

## 5. Zusammenfassung

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese von neuartigen Nucleotidanaloga und die Untersuchung ihrer Substrateigenschaften gegenüber Thymidylatkinase (TdpK). Die dargestellten Nucleosidmonophosphate stellen dabei Analoga des ersten Metaboliten des antiviral aktiven Nucleosidanalogs AZT **1**, AZTMP **26**, dar. In Abbildung 119 sind die dargestellten Nucleotidanaloga zusammengefaßt.

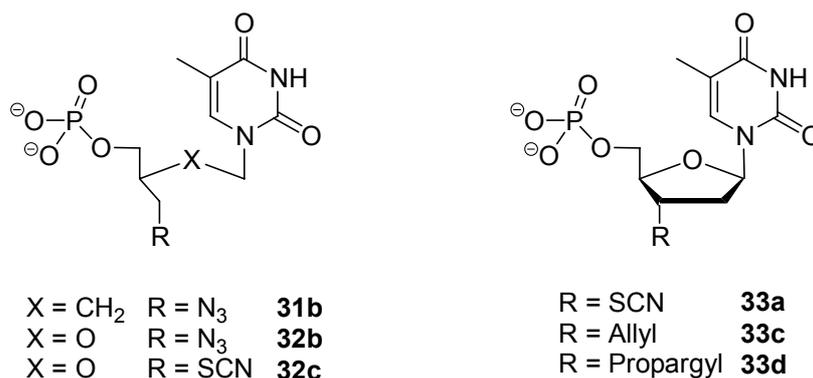


Abb. 119 Dargestellte Nucleotidanaloga **31**, **32** und **33**

Zur Darstellung der Nucleotidanaloga **31-33** sollten zunächst die korrespondierenden Nucleosidanaloga **30**, **40**, **41a,b** sowie **42a-d** dargestellt werden (Kap. 4.1, S. 22).

Die bereits in der Diplomarbeit<sup>[93]</sup> beschriebene Synthese des acyclischen Nucleosidanalogs T-Penciclovir **40** konnte dabei entscheidend verbessert werden (Kap. 4.1.1.2, S. 24). Einerseits gelang es, die Gesamtausbeute über drei isolierte Stufen auf 24% verglichen mit 13% über fünf Stufen<sup>[93]</sup> zu verbessern.

Die entscheidende Verbesserung der Synthese lag jedoch in der Verwendung des Kaliumsalzes von Thymin **49** in Dimethylsulfoxid in der Substitutionsreaktion mit dem Bromid **48**. Dadurch konnte die zuvor beobachtete Verunreinigung des Nucleosidanalogs **40** mit dem unerwünschten *N*-3-alkylierten Produkt (Abb. 25, S. 26) vermieden werden.

Die Synthese des Nucleosidanalogs T-Ganciclovir **30** gelang in einer Ausbeute von 23% über fünf Stufen (Kap. 4.1.2, S. 26). Zwar gelang die Synthese des Nucleosids **30** in früheren Arbeiten<sup>[93]</sup> in einer Gesamtausbeute von 43% über vier Stufen, jedoch konnte in der neu entwickelten Syntheseroute die Darstellung des potentiell cancerogenen Chlormethylethers **51** und damit die Verwendung des krebserregenden Lösungsmittels 1,2-Dichlorethan sowie der Einsatz von korrosivem Chlorwasserstoffgas vermieden werden.

Bei der Synthese des Intermediates 1-Chlor-2-acetoxymethoxy-3-acetoxypropan **56a** konnte lediglich ein 3:1 Gemisch des gewünschten Isomers **56a** und 1-Chlor-2-acetoxy-3-acetoxymethoxypropan **56b** isoliert werden. Zwar konnte in der letzten Synthesestufe das Nucleosidanalogen **30** durch Umkristallisation aus Ethanol isomerenrein erhalten werden, die Gesamtausbeute der Syntheseroute wurde jedoch durch das Auftreten des durch herkömmliche chromatographische Methoden nicht trennbaren Isomerengemisches deutlich erniedrigt. Da das zweifach Acetyl-geschützte Nucleosidanalogen **58a** ebenfalls nicht in isomerenreiner Form erhalten werden konnte, konnte der Versuch einer stereoselektiven Abspaltung einer der beiden Acetylgruppen nicht unternommen werden.

Die bei der Einführung einer säurelabilen Tritylschutzgruppe an eine der beiden primären Hydroxylgruppen der acyclischen Nucleosidanaloga **30** und **40** beobachtete Reaktion beider Hydroxylgruppen konnte durch selektive Einführung einer Acetyl-Schutzgruppe und anschließende Schutzgruppenmanipulation vermieden werden (Abb. 35, S. 34). Die Ausbeute an 4'-*O*-Trityl-T-Ganciclovir **66** ließ sich damit von 40% auf 66% steigern.

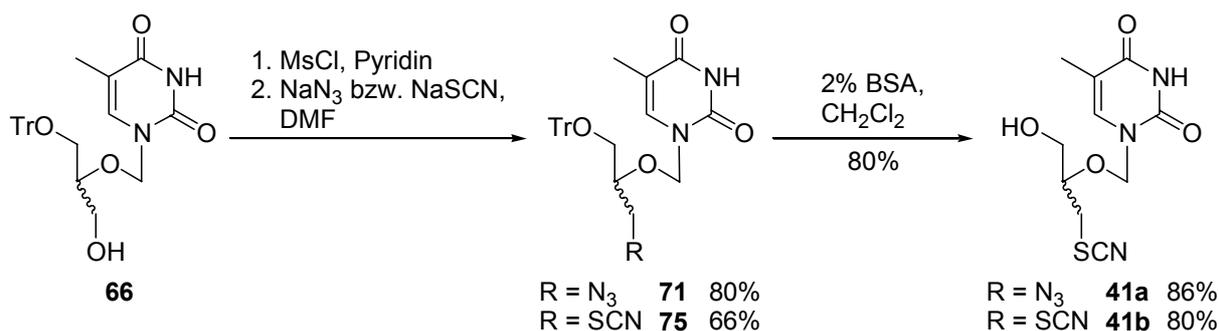


Abb. 120 Darstellung der acyclischen AZT-Analoga **41a,b**

Aus Verbindung **66** ließen sich in drei Stufen Azido-T-Ganciclovir **41a** sowie erstmals Thiocyanato-T-Ganciclovir **41b** darstellen (Abb. 120, S. 115). Verbindung **41a** ließ sich ebenfalls mit einer Acetyl-Schutzgruppe darstellen (Abb. 38, S. 37).

Der Versuch einer Racematspaltung von Azido-T-Ganciclovir **41a** durch Veresterung mit (1*S*)-(-)-Camphansäure bzw. (+)-Campher-10-sulfochlorid und anschließende Trennung der Diastereomere mißlang jedoch, da weder säulenchromatographisch noch mittels HPLC eine Trennung der beiden Diastereomere beobachtet werden konnte (Kap. 4.1.3.3, S. 38). Auch der Versuch der Trennung durch fraktionierte Kristallisation scheiterte.

Die Nucleosidanaloga **42a-d** ließen sich in Analogie zu literaturbekannten Synthesewegen aus 2'-Desoxythymidin darstellen (Kap. 4.1.4, S. 41 sowie Kap. 4.1.5, S. 49). Da die Gesamtausbeute von 2'-Desoxy-3'-isothiocyantothymidin **42b** lediglich 4% betrug, wurde

die Verbindung auf einer anderen Syntheseroute in einer Gesamtausbeute von 62% aus AZT **1** dargestellt (Abb. 48, S. 46).

Es gelang, das Nucleosidanaloga **42b** aus Dichlormethan/Methanol zu kristallisieren und röntgenographisch zu untersuchen (Abb. 50, S. 47). Dabei konnte eine sehr gute strukturelle Übereinstimmung in bezug auf die 2'-Deoxyriboseeinheit sowie die Nucleobase mit einem der beiden im Kristall gefundenen Konformere von AZT **1** beobachtet werden. Unterschiede zeigen sich jedoch am Substituenten in der 3'-Position. Während die Azidgruppe in AZT **1** am ersten Stickstoffatom gewinkelt ist, ist die Isothiocyanatgruppe in Verbindung **42b** von C3' bis zum Schwefel nahezu gestreckt.

Nach Synthese der Nucleosidanaloga **30**, **40**, **41a,b** sowie **42a-d** wurden diese durch Reaktion mit den Phosphitylierungsreagenzien **96** bzw. **97** (Kap. 4.1.6.1, S. 55) unter Basen- bzw. Säurekatalyse und Oxidation der intermediären Phosphor(III)-Addukte mit *tert*-Butylhydroperoxid in die korrespondierenden *cycloSal*-Nucleosidmonophosphate **37**, **38b-d** und **39a-d** überführt (Kap. 4.1.6.2, S. 56).

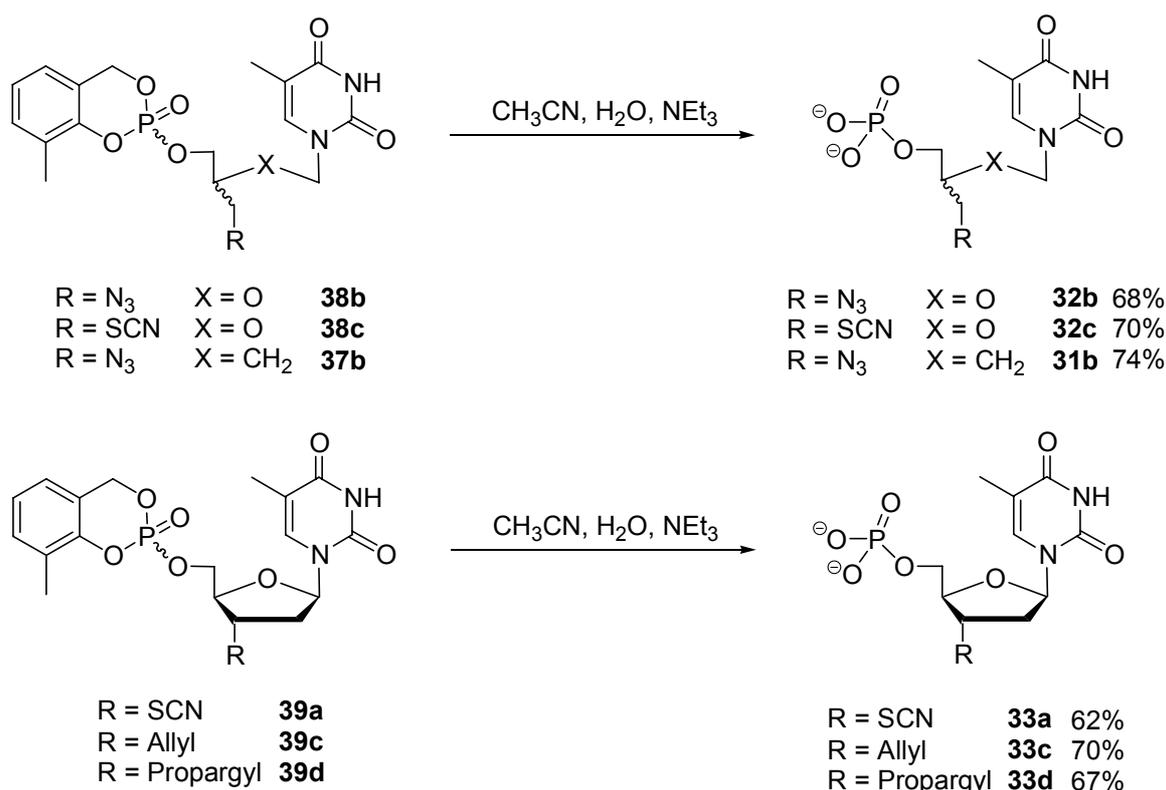


Abb. 121    *Synthese der modifizierten Nucleotidanaloga durch Hydrolyse der korrespondierenden cycloSal-Phosphattriester*

Zur Synthese der Nucleotidanaloga **31**, **32** und **33** wurden die korrespondierenden *cycloSal*-Phosphattriester mit wässrigem Triethylamin in Acetonitril hydrolysiert (Kap. 4.1.7, S. 59). Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie über eine Reversed-Phase C<sub>18</sub>-

Kieselgelsäule mit Wasser/Acetonitril als Eluent. Nach Gefriertrocknung wurden die Nucleotide mit einer Ionentauschersäule in das Dinatrium- bzw. Dikaliumsalz überführt.

Die Nucleotidanaloga konnten dabei in guten bis sehr guten Ausbeuten isoliert werden (Abb. 121, S. 116). Der Vorteil dieser Synthesemethode von Nucleosidmonophosphaten besteht in der einfachen Aufreinigung der Produkte, da im Gegensatz zu anderen Ansätzen (vgl. Kap. 4.1.7, S. 59) keine Salze als Nebenprodukte entstehen, die nur mühsam von den geladenen Nucleotiden abgetrennt werden können.

Bei der Hydrolyse von 3-Methyl-*cycloSal*-2'-desoxy-3'-isothiocyanatothymidinmonophosphat **39b** konnte neben der Hydrolyse der *cycloSal*-Maske auch die Hydrolyse der Isothiocyanatgruppe beobachtet werden. Es konnte lediglich 3'-Amino-2'-desoxythymidinmonophosphat **106** isoliert werden (Abb. 70, S. 62).

Bei der Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeiten der Phosphattriester **39a,c,d** sowie von Referenzverbindungen in Phosphatpuffer bei pH 7.3 konnte eine starke Abhängigkeit der Hydrolysehalbwertszeit vom Substituenten in der 3'-Position des 2'-Desoxyriboseringes beobachtet werden (Kap. 4.2.1, S. 63). Die beobachtete Stabilisierung von Verbindungen mit unpolaren Substituenten relativ zu Verbindungen ohne Substituent konnte dabei auf eine sterische Abschirmung des Phosphoratoms sowie lipophile Wechselwirkungen zurückgeführt werden (Abb. 76, S. 69). Die Destabilisierung von Verbindungen mit polarem Substituenten wurden mit einem assistierenden Effekt des Substituenten erklärt. In <sup>31</sup>P-NMR-Hydrolysestudien konnte gezeigt werden, daß keine Bildung des cyclischen Phosphatdiesters **112** auftrat (Abb. 75, S. 68).

Die niedrigen Hydrolysehalbwertszeiten der acyclischen *cycloSal*-Phosphattriester **37a** und **38a** konnten dagegen mit Hilfe von <sup>31</sup>P-NMR-Hydrolysestudien auf die überwiegende Bildung der korrespondierenden cyclischen Phosphatdiester zurückgeführt werden (Abb. 78, S. 70).

Bei Untersuchungen der inhibitorischen Eigenschaften der *cycloSal*-Phosphattriester **37a** und **38a** gegenüber Serumcholinesterase wurde beobachtet, daß diese Verbindungen stärker inhibieren als vergleichbare *cycloSal*-Phosphattriester cyclischer Nucleoside (Kap. 4.2.2, S. 72). Die korrespondierenden Phosphattriester von PCV **8** sowie GCV **9** zeigten jedoch eine deutlich geringere inhibitorische Aktivität. Der Grad der Inhibition der Serumcholinesterase ist demnach sowohl vom Nucleosidrückgrat als auch von der Nucleobase abhängig.

Die synthetisierten Nucleosidanaloga sowie deren *cycloSal*-Phosphatriester wurden auf ihre Aktivität gegen das HI-Virus untersucht (Kap. 4.2.3, S. 75). Dabei zeigte keine der untersuchten Verbindungen eine Aktivität gegen das Virus.

Bei der Untersuchung der Substrateigenschaften der dargestellten Nucleotidanaloga gegenüber Thymidylatkinase konnte überraschenderweise nahezu keine Phosphorylierung der Nucleotide **33a,c,d** beobachtet werden (Kap. 4.3, S. 76). Die schlechten Substrateigenschaften von Verbindungen, die AZTMP **26** strukturell eng verwandt oder sogar isoelektronisch zu AZTMP **26** sind, läßt sich möglicherweise mit der zwitterionischen Struktur der Azidgruppe erklären, die die auftretenden sterischen Repulsionen möglicherweise zum Teil kompensiert.

Aus den enzymkinetischen Daten der acyclischen Nucleotidanaloga **31a,b** und **32a** lassen sich wertvolle Hinweise auf den Mechanismus der Phosphorylierung ableiten (Tabelle 3, S. 79). Mit abnehmender struktureller Ähnlichkeit der Nucleotidanaloga zum natürlichen Substrat fällt auch die Phosphorylierungsrate dieser Verbindungen. Jedoch werden alle untersuchten acyclischen Nucleotidanaloga nur sehr unzureichend phosphoryliert. Die Tatsache daß die acyclischen Nucleotidanaloga schlecht phosphoryliert werden, liefert einen guten Hinweis darauf, daß nicht der chemische Schritt der Thymidylatkinasereaktion, der Phosphoryltransfer, sondern tatsächlich die als *induced fit* bezeichnete Konformationsänderung von der offenen in die geschlossene Form, die durch die Substratbindung induziert wird, den ratenlimitierenden Schritt der Thymidylatkinasereaktion darstellt.

Zweites Ziel der vorliegenden Arbeit war die Übertragung des *cycloSal*-Konzeptes auf die Substanzklasse der acyclischen Nucleosidphosphonate. Aufgrund der Kohlenstoff-Phosphorbindung dieser Verbindungen konnte nicht die etablierte Synthesemethode über die Phosphitylierungsreagenzien **96** und **97** angewandt werden, sondern es mußte eine neuartige Syntheseroute entwickelt werden.

Als Stammverbindung sollte zunächst 9-[2-*cycloSal*-Phosphonylmethoxyethyl]adenin **34a** dargestellt werden. Nach Synthese des Diethylesters von PMEAs **11** (Kap. 4.4.1, S. 81) in einer fünfstufigen Synthese wurde zunächst erfolglos versucht, die exocyclische Aminogruppe mit einer BOC-Schutzgruppe zu schützen (Kap. 4.4.3, S. 84). Nach dem Scheitern dieser Versuche gelang es, die Aminogruppe mit der Fmoc-Schutzgruppe zu versehen. Ausgehend von dem Fmoc-geschützten Diethylphosphonat **131** gelang die Einführung der *cycloSal*-Maske durch Überführen des Diethylphosphonates **131** in das korrespondierende Phosphonsäuredichlorid und anschließende Reaktion mit Salicylalkohol in Ausbeuten von 5-35% (Kap. 4.4.4, S. 85). Bei der nachfolgenden Abspaltung der

Schutzgruppe traten jedoch massive Probleme auf. Nachdem eine Reihe von Standardmethoden zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe gescheitert waren (Abb. 90, S. 87), gelang schließlich die Abspaltung der Schutzgruppe mit Triethylamin in Pyridin in einer unbefriedigenden Ausbeute von 20%. Die unbefriedigenden Ausbeuten sowohl bei der Einführung der *cycloSal*-Maske als auch bei der Abspaltung der Schutzgruppe sind auf die hohe Labilität der Zielverbindung unter basischen Bedingungen zurückzuführen (vgl. Kap. 4.5.1, S. 101). Aufgrund der unzureichenden Ausbeuten wurde eine Synthesestrategie mit einer säurelabilen MMTr-Schutzgruppe unternommen (Kap. 4.4.5, S. 88). Bei der Überführung des Diethylphosphonates **133** in das korrespondierende Säurechlorid **138** mit Oxalylchlorid in Gegenwart katalytischer Mengen an *N,N*-Dimethylformamid kam es zur Reaktion des *in situ* erzeugten *Vilsmeier-Reagenz* mit der Schutzgruppe (Abb. 92, S. 88). Erst die Verwendung von Phosphorpentachlorid als Chlorierungsmittel erlaubte die Darstellung des Säurechlorids **138** und dessen Reaktion mit Salicylalkoholen (Abb. 122).

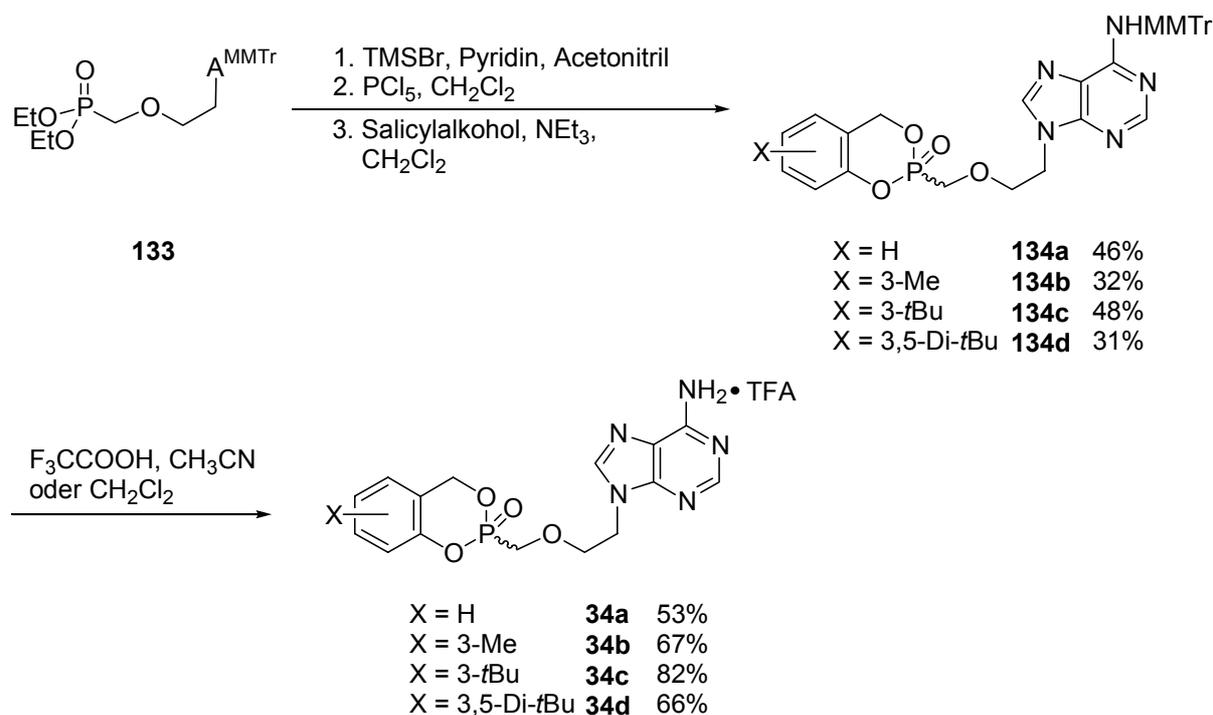


Abb. 122 Synthese der *cycloSal*-Phosphonatdiester **34a-d**

Die abschließende Abspaltung der MMTr-Schutzgruppe gelang mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan bzw. Acetonitril in Ausbeuten zwischen 53 und 82%.

Es gelang außerdem, Verbindung **134a** durch Kondensation des freien Phosphonates **129** mit Salicylalkohol in Gegenwart des Aktivators Mesitylsulfonyl-3-nitrotriazol (MSNT) darzustellen (Abb. 98, S. 93). Diese Synthesestrategie konnte auch erfolgreich auf die Synthese der *cycloSal*-Phosphonatdiester von PMPA **12** angewandt werden (Kap. 4.4.6,

S. 94). Dabei konnten die Zielverbindungen **35a,b** durch direkte Kondensation von PMPA **12** mit Salicylalkoholen in Ausbeuten von 41 bzw. 35% dargestellt werden.

Ausgehend von diesen positiven Ergebnissen wurde versucht, auch den *cycloSal*-Phosphonatdiester von HPMPC **13** durch direkte Kondensation des ungeschützten Phosphonats **13** mit 3,5-Di-*tert*-Butylsalicylalkohol darzustellen. Es ließen sich jedoch weder bei der Reaktion von HPMPC **13** noch bei der Reaktion von *O*-DMTr-HPMPC **135** mit 3-*tert*-Butylsalicylalkohol in Gegenwart von MSNT die gewünschten Produkte **36** bzw. **136** isolieren. Da es aufgrund der Acidität der Phosphonsäure nicht möglich war, die zweifach DMTr-geschützte Verbindung **137** zu isolieren und mit einem Salicylalkohol zu kondensieren, wurde die Zielverbindung **36** auf einem alternativen Syntheseweg über den zweifach geschützten Phosphonatdiester **141** dargestellt. Dieser wurde durch Schutzgruppenmanipulation in zwei Stufen aus *N*-Benzoyl-*O*-trityl-HPMPC **139** mit einer Ausbeute von 58% synthetisiert (Abb. 106, S. 99).

Die Einführung der *cycloSal*-Maske gelang durch Überführung des Diethylphosphonates **141** in das Phosphonsäuredichlorid und anschließende Reaktion mit 3,5-Di-*tert*-Butylsalicylalkohol (Abb. 106, S. 99). Die abschließende Abspaltung beider Schutzgruppen gelang mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan. Die Zielverbindung **36** konnte in einer Ausbeute von 78% als Trifluoracetat isoliert werden (Abb. 107, S. 100).

Bei der Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeiten der *cycloSal*-PMEA-Verbindungen **34a-d** konnte eine 24- bis 50-fache Beschleunigung der Hydrolyse dieser Verbindungen im Vergleich zu Phosphatrestern von d4T **2** festgestellt werden (Kap. 4.5.1, S. 101). Diese Beschleunigung der Hydrolyse kann durch eine fehlende  $d\pi$ - $p\pi$ -Wechselwirkung der freien  $d$ -Orbitale des Phosphoratoms und den freien Elektronenpaaren eines Sauerstoffatoms im Phosphonat verglichen mit einem Phosphat erklärt werden. Durch diese fehlende Wechselwirkung nimmt die Elektronendichte am Phosphoratom ab und dessen Elektrophilie damit zu.

Bei der Hydrolyse der Verbindungen **34a,b** konnte HPLC-chromatographisch und  $^{31}\text{P}$ -NMR-spektroskopisch ein Intermediat der Hydrolyse detektiert werden (Abb. 112, S. 105). Das Produkt beider Hydrolysen war PMEa **11**. Da der Phenylphosphonatmonoester **147** unter den Bedingungen der alkalischen Hydrolyse nicht weiter gespalten werden konnte, handelt es sich bei dem Intermediat vermutlich um den Benzylphosphonatmonoester **146**, der weiter in das Phosphonat und, nach Reaktion mit Wasser, den entsprechenden Salicylalkohol zerfallen kann. Die *cycloSal*-Nucleosidphosphonate hydrolysieren daher nach einem analogen Mechanismus wie die *cycloSal*-Nucleosidmonophosphate (Abb. 110, S. 103).

Es wurde ein paralleler Einfluß der Substituenten am aromatischen Ring der *cycloSal*-Maske der PMEAs-Verbindungen **34a-d** auf die Hydrolysehalbwertszeit verglichen mit den analogen d4T-Verbindungen gefunden. Es konnte mit einer  $^{31}\text{P}$ -NMR-Studie gezeigt werden, daß bei der Hydrolyse von 3,5-Di-*tert*-Butyl-*cycloSal*-PMEA **34d** im Gegensatz zu 3,5-Di-*tert*-Butyl-*cycloSal*-d4TMP **145** keine Konkurrenzreaktion zum Phenylphosphonatmonoester **147** auftritt. Die Gründe der schnelleren Hydrolyse von Verbindung **34d** verglichen mit Verbindung **34c** bleiben unklar, zumal die korrespondierende PMPA-Verbindung **35b** eine höhere Halbwertszeit relativ zur monosubstituierten Verbindung **35a** aufweist (Abb. 114, S. 106).

Für die Verbindungen **34c** und **35a** konnten in CEM/0-Zellextrakt (Abb. 115, S. 107) sowie in 20%igem humanem Serum (Abb. 116, S. 108) Halbwertszeiten beobachtet werden, die sich nicht wesentlich von denen in wäßrigem Phosphatpuffer bei pH 7.3 unterschieden. Diese Ergebnisse erlauben den Schluß, daß auch in den untersuchten biologischen Medien ein enzymatischer Abbau der *cycloSal*-Phosphonatediester **34c** und **35a** keine Rolle spielt und die Verbindungen durch eine chemische Hydrolyse abgebaut werden.

3,5-Di-*tert*-butyl-*cycloSal*-HPMPC **36** erwies sich bereits in organischen Lösungsmitteln als so labil, daß in Dimethylsulfoxid  $^{31}\text{P}$ -NMR-spektroskopisch ein Zerfall der Verbindung beobachtet werden konnte (Abb. 117, S. 108). Vermutlich kommt es auch in diesem Fall zu einem nucleophilen Angriff der freien Hydroxylgruppe auf das Phosphoratom. Bei dem Produkt des Zerfalls handelt es sich aller Voraussicht nach um cHPMPC **149** (Abb. 118, S. 109).

Die stabilsten *cycloSal*-Nucleosidphosphonate wurden wiederum auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber Butyrylcholinesterase hin untersucht (Kap. 4.5.2, S. 110).

Diese Untersuchungen ergaben, daß die *cycloSal*-Nucleosidphosphonate **34c,d** sowie **35a,b** das Enzym bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  nicht inhibieren (Tabelle 4, S. 111). Die fehlende Inhibition läßt sich für den Fall der disubstituierten Verbindungen **34d** und **35b** mit dem Substitutionsmuster am aromatischen Ring der *cycloSal*-Maske erklären. Die mangelnde Inhibition der monosubstituierten Verbindungen **34c** und **35a** läßt sich nicht mit dem Substitutionsmuster erklären, da die korrespondierende d4T-Verbindung **144** das Enzym signifikant inhibiert. Die genauen Einflüsse des Rückgrates, der Nucleobase sowie der Einfluß der Phosphonateinheit müssen in weiterführenden Arbeiten genauer untersucht werden.

Die *cycloSal*-Nucleosidphosphonate **34c,d** sowie **35a,b** wurden *in-vitro*-anti-HIV-Tests in Zellkulturen unterzogen (Kap. 4.5.3, S. 112). Die untersuchten Verbindungen zeigten dabei

sowohl in den Wildtypzelllinien als auch in den Thymidinkinase-defizienten Zellen eine zwei- bis vierfach höhere antivirale Aktivität als die Stammverbindungen PMEA **11** bzw. PMPA **12**.

Es konnte dabei eine gute Korrelation der antiviralen Aktivität einer Verbindung und ihrer Hydrolysehalbwertszeit hergestellt werden. So zeigen die labileren Verbindungen **34d** und **35a** eine geringere antivirale Aktivität als die stabileren Derivate.

Die untersuchten *cycloSal*-Nucleosidphosphonate zeigen eine 15- bis 40-fach geringere antivirale Aktivität als die beiden auf dem Markt befindlichen Prodrugs Bis-(POM)-PMEA **14** und Bis-(POC)-PMPA **15**. Insbesondere die beiden PMEA-Verbindungen **34c,d** sind jedoch deutlich weniger cytotoxisch als Bis-(POM)-PMEA **14**. Ihre cytotoxische Konzentration ( $CC_{50}$ ) liegt weit über der effektiven Konzentration ( $EC_{50}$ ).

Das *cycloSal*-Konzept konnte demnach erfolgreich auf die Substanzklasse der Nucleosidphosphonate angewandt werden und die antivirale Aktivität gesteigert werden.

## 6. Summary

The limiting step in the bioactivation of the antivirally active nucleoside analogue AZT **1** is, in contrast to other nucleoside analogues like d4T **2**, the second phosphorylation from AZTMP **26** to AZTDP **27** catalysed by the enzyme thymidylate kinase (TpmK). Therefore, the first aim of this work was the synthesis of AZTMP analogues and the evaluation of their substrate properties towards TpmK.

After synthesis of the corresponding nucleoside analogues **30**, **40**, **41a,b** and **42a-d** (see chapters 4.1.1 - 4.1.5), these compounds were converted into their *cycloSal*-phosphotriesters (chapter 4.1.6) by subsequent treatment with a cyclic chlorophosphite and oxidation with *tert*-butylhydroperoxide. Since the *cycloSal*-prodrug approach is based on the degradation of these compounds by means of chemical hydrolysis instead of enzymatic reactions (see chapter 2.5), it is possible to use these compounds as synthons in the preparation of nucleosidemonophosphates. The nucleotide analogues **31b**, **32b,c** and **33,a,c,d** could be obtained in very good yields (chapter 4.1.7). Main advantage of this procedure compared to others is the very simple work-up of the nucleotides since no other negatively charged by-products, which have to be separated from the nucleotides, are formed.

Hydrolysis studies of the synthesised *cycloSal*-phosphotriesters revealed a strong dependence of the half-lives on the nature of the 3'-substituent on the 2'-deoxyribose moiety (chapter 4.2.1). Additionally, it could be shown that phosphotriesters of acyclic nucleoside analogues bearing a free hydroxyl group do not hydrolyse to the nucleoside monophosphates. Instead, a predominant formation of the corresponding cyclic phosphodiester could be observed in <sup>31</sup>P-nmr hydrolysis studies.

The investigation of the inhibitory properties of *cycloSal*-phosphotriesters towards butyrylcholinesterase revealed that the prepared acyclic compounds showed a stronger inhibition of the enzyme as compared to corresponding cyclic compounds. It could also be observed that not only the nucleoside backbone but also the nature of the nucleobase influence the inhibitory properties towards this enzyme (chapter 4.2.2).

The investigation of the prepared nucleotide analogues **33,a,c,d** towards TpmK revealed a total loss of phosphorylation of these compounds as compared to AZTMP **26** although they are structurally close related to the latter (chapter 4.3). This might be due to the zwitterionic structure of the azido group in AZTMP **26**.

It could be deduced from the enzyme-kinetical data obtained for the acyclic compounds **31a,b** and **32a** that most likely the limitation of the thymidylate kinase reaction is not the chemical

step, i.e. the phosphoryl transfer, but the conformational change of the enzyme-substrate complex, also called the *induced-fit*.

Second aim of this work was the application of the *cycloSal*-prodrug approach to antivirally active nucleosidephosphonates. Since the *cycloSal* moiety could not be introduced by phosphitylating reagents, a new synthetic approach had to be developed. It was possible to prepare *cycloSal*-phosphonate diesters of the antivirally active nucleosidephosphonates PMEAs **11**, PMPAs **12** and HPMPCs **13** either via the corresponding phosphonic acid dichlorides or by direct condensation of the free phosphonate with a suitable salicylic alcohol (chapter 4.4).

Hydrolysis studies of the prepared *cycloSal*-phosphonate diesters showed a 24- to 50-fold increase in the rate of hydrolysis of these compounds as compared to corresponding *cycloSal*-phosphotriesters (chapter 4.5.1). This is most probably due to the fact that in phosphonate diesters one of the three  $d\pi$ - $p\pi$ -interactions between the phosphorous atom and an oxygen atom in phosphotriesters is missing, resulting in a decrease of electron density on the phosphorous atom and leading to an increase of the electrophilicity of the atom. The degradation pathway of the *cycloSal*-phosphonate diesters was studied by means of HPLC and  $^{31}\text{P}$ -nmr-hydrolysis studies. All PMEAs- and PMPAs compounds **34a-d** and **35a,b** were hydrolysed to the corresponding nucleosidephosphonate, while the HPMPC-compound **36** was degraded most likely to cHPMPC **149** even in organic solvents. In this case a nucleophilic attack of the free hydroxyl group on the electrophilic phosphorous atom took place.

In case of the most labile compounds **34a,b** an intermediate of the hydrolysis reaction could be observed. The appearance of this intermediate, the benzylphosphonate monoester **146**, points to the conclusion that the hydrolysis of *cycloSal*-phosphonate diesters follows a similar pathway as observed for *cycloSal*-phosphotriesters.

The compounds **34c,d** and **35a,b** exhibited no inhibition of butyrylcholinesterase, which can partly be explained by the substitution pattern of the aromatic ring. But effects of the nucleobase as well as the backbone are also involved (chapter 4.5.2).

The evaluation of the anti-HIV activity of the compounds **34c,d** and **35a,b** showed a 2- to 4-fold increase in the antiviral activity as compared to the free phosphonates **11** and **12** (chapter 4.5.3). The cytotoxic concentrations ( $\text{CC}_{50}$ ) of the investigated compounds were well above the effective concentrations ( $\text{EC}_{50}$ ). Hence, the *cycloSal*-prodrug approach could be successfully applied to antivirally active nucleosidephosphonates.