

**Synthese und Untersuchung
von
Nucleosiddiphosphat Prodrugs**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Tilmann Schulz

aus Hamburg

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

Hamburg, im Dezember 2011

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit von Juni 2007 bis März 2011 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Chris Meier im Institut für Organische Chemie des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian B. W. Stark

Die Disputation fand am 17. Februar 2012 im Department Chemie der Universität Hamburg statt. Prüfungskommission: Frau Dr. Brita Werner, Prof. Dr. Marcus Fischer, Prof. Dr. Chris Meier.

Meinen Eltern und Nathalie

Herrn Prof. Dr. Chris Meier danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, den gewährten wissenschaftlichen Freiraum zur Bearbeitung dieser ausgesprochen interessanten Themenstellung sowie die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Meinen ehemaligen und aktuellen Arbeitskollegen danke ich für eine sehr gute Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft im 5.Stock, wie auch anderen Institutsmitgliedern die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Vielen Dank an die Labormannschaft von U-515 für die hervorragende Zeit und die ausgesprochen gute Zusammenarbeit: Jens O.Thomann, Henning J.Jessen, Ulf Görbig, Svenja Warnecke, Viktoria C.Tonn und Saskia Wolf.

Für das Abenteuer Canada und die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanke ich mich ganz herzlich bei Bastian Reichardt und Sönke Jessel. Mein Dankeschön für lustige Stunden geht an Basti, Sönke, Svenja, Jens und Maike.

Ohne meine Mentoren Olaf R.Ludek und Henning J.Jessen hätte ich wohl nicht zur Organischen Chemie und in den Arbeitskreis für Spitzenforschung gefunden, vielen Dank. Henning, vielen Dank für zahlreiche Tipps und Tricks zur Synthesechemie und deine Hilfsbereitschaft, die auch nach deinem Abschied von Hamburg nicht abnahm.

Für die tatkräftige Unterstützung möchte ich mich bei allen Studentinnen und Studenten bedanken, die im Rahmen ihres Studiums experimentelle Arbeiten für mich durchgeführt haben. Dies gilt insbesondere für Thiago Dinis de Oliveira.

Mein ganz herzliches Dankeschön für die kritische Durchsicht dieser Arbeit gilt Florian Pertenbreiter und Nathalie Lunau. Florian, vielen Dank für deine Hilfe und Freude an der fachlichen Diskussion.

Herrn Prof. J.Balzarini und seinen Mitarbeiterinnen danke ich für die Durchführung der *in vitro* Zelltests und die Bereitstellung von Zellextrakten.

Den Herren Dr. V.Sinwell, Dr. T.Hackl, Dr. E.T.K.Haupt und ihren Mitarbeiterinnen E.Juhas, V.Priegnitz, S.Weidner, G.Eggers, U.Gralla und C.Wontorra danke ich für die Messung zahlreicher NMR-Spektren.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Freunden Sebastian Binger, Sebastian Troch und Christian Warner. Jörn Fürstenau danke ich für Exkursionen in der Mittagspause und die vielen aufmunternde Worte.

Ein riesiges Dankeschön gilt meinen Eltern Hannelore und Frank für ihr uneingeschränktes Interesse an meiner Arbeit und ihre verständnisvolle sowie finanzielle Unterstützung während meiner gesamten universitären Ausbildung. Vielen Dank!

Meiner Freundin Nathalie Lunau danke ich von ganzem Herzen für die unglaubliche Kraft und Motivation die sie mir gibt. Ihre liebevolle und selbstlose Unterstützung hat maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen. Vielen, vielen Dank!

Abkürzungen und Symbole

3TC	2'-Desoxy-3'-thia-L-cytidin
9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonan
δ	chemische Verschiebung (NMR)
Δ	Energie
λ	Wellenlänge
ν	Wellenzahl
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ABC	Abacavir
abs.	absolut
Ac	Acetyl
Äq.	Äquivalent, Äquivalente
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
arom.	aromatisch
AZT	3'-Azidothymidin
BAB	Bis-(4-acyloxybenzyl)
BBB	Bis-(4-benzyloxybenzyl)
ber.	berechnet
BIB	Bis-(4- <i>iso</i> -butyryloxybenzyl)
Bn	Benzyl
BPB	Bis-(4-pivaloyloxybenzyl)
bs	breites Singulett (NMR)
BVdU	(<i>E</i>)-5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxyuridin
C	Cytidin

CC	Cytotoxische Konzentration
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CEM/0	humane Wildtyp T-Lymphozyten Zelllinie
COSY	correlation spectroscopy
<i>cycloSal</i>	<i>cycloSaligenyl</i>
d	Dublett (NMR)
d	2'-Desoxy (Nucleoside/Nucleotide)
d4	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydro (Nucleoside/Nucleotide)
d4T	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin
dA	2'-Desoxyadenosin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
DCM	Dichlormethan
dd	Doppeldublett (NMR)
dd	2',3'-Didesoxy (Nucleoside/Nucleotide)
ddA	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydroadenosin
ddC	2',3'-Didesoxycytidin
ddd	Dreifachdublett (NMR)
dddd	Vierfachdublett (NMR)
ddl	2',3'-Didesoxyinosin
ddT	2',3'-Didesoxythymidin
dest.	destilliert
DIPA	<i>N,N</i> -Diisopropylamin
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DIPPRO	Diphosphat Prodrug
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dt	Doppeltriplett
dT	2'-Desoxythymidin
dU	2'-Desoxyuridin
EBV	Epstein-Barr Virus
EC	effektive Konzentration
EE	Ethylacetat
EI	Electron Impact
em	Emission
ESI	Electrospray Ionization
FAB	Fast Atom Bombardement
FCS	Fötale Kälberserum
G	Guanosin
FDA	Food and Drug Administration of the United States of America
gef.	gefunden
h	Stunde
HAART	Highly Active Anti Retroviral Therapy
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
hept	Heptett (NMR)
HMBC	hetero nuclear multiple bond correlation
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	high resolution
HS	Humanes Serum
HSV	Herpes Simplex Virus
HWZ	Hydrolysehalbwertszeit
<i>i</i>	<i>ipso</i>

IR	Infrarot
<i>iso</i> -A	<i>iso</i> -Adenosin
<i>iso</i> -ddA	<i>iso</i> -2',3'-dideoxy-Adenosin
<i>J</i>	Skalare Kern-Kern Kopplungskonstante (NMR)
konz.	konzentriert
m	Multiplett (NMR)
<i>m</i>	<i>meta</i>
M	mol/L
max.	Maximum
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Ms	Methansulfonyl
min	Minute
Min.	Minimum
MP	Monophosphat
MS	Massenspektrometrie
n	Nano
n.d.	nicht detektierbar
NDP	Nucleosiddiphosphat
NDPK	Nucleosiddiphosphat Kinase
NMP	Nucleosidmonophosphat
NMPK	Nucleosidmonophosphat Kinase
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
n.r.	nicht rein >95%
NNRTI	nicht nucleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
NRTI	nucleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
NTP	Nucleosidtriphosphat

<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Petrolether
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLE	Pig Liver Esterase
ppm	parts per million
R_f	Ratio of fronts
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RP	Reversed Phase
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkriptase
R_t	Raumtemperatur
R_t	Retentionszeit
s	Singulett (NMR), Sekunde
Sdp.	Siedepunkt
sept	Septett (NMR)
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett (NMR)
$t_{1/2}$	Hydrolysehalbwertszeit
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBAH	Tetrabutylammoniumhydroxid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TK	Thymidin Kinase
TK ⁻	Thymidin Kinase Defizienz

TMPK	Thyminmonophosphat Kinase
TMS	Trimethylsilyl
U	Uridin
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen / Volumen
vs	versus

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Kenntnisstand.....	3
2.1	Der HIV-Replikationszyklus und die Antiretrovirale Therapie.....	3
2.2	Nucleosidanaloga als Reverse Transkriptase Inhibitoren in der HIV Therapie.....	4
2.2.1	Phosphorylierung der Nucleosidanaloga	6
2.3	Prodrug Konzepte	9
2.3.1	Prodrug Konzepte für Nucleosidmonophosphate	9
2.3.1.1	Das <i>cycloSal</i> -Konzept	10
2.3.1.2	Das Bis-(AB)-Nucleotid Konzept	13
2.3.2	Prodrug Konzepte für Nucleosiddi- und -triphosphate	15
2.3.2.1	Phospholipidanaloga antiviral aktiver Nucleoside	17
2.3.2.2	Acylester antiviral aktiver Nucleosiddi- und -triphosphate.....	17
2.3.2.3	<i>cycloSal</i> -AZT-Diphosphate als mögliche NDP Prodrugs	18
2.3.2.4	Das Bis-(4-acyloxybenzyl)-nucleosiddiphosphat bzw. <i>DiPPro</i> Konzept	20
3	Aufgabenstellung	23
4	Resultate und Diskussion.....	25
4.1	Synthese der Bis-(4-acyloxybenzyl)-Nucleosiddiphosphate	25
4.1.1	Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)-d4TDPs mit lipophilen (4-Acyloxybenzyl)-Einheiten.....	26
4.1.1.1	Zielverbindungen und Synthesestrategie	28
4.1.1.2	Zusammenfassung der Synthesergebnisse der BAB-d4TDP Prodrugs	60
4.1.2	Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)-AZTDP Prodrugs mit lipophilen (4-Acyloxybenzyl)-Einheiten.....	61
4.1.2.1	Abschlussbetrachtung zur Synthese der BAB-AZTDP Verbindungen.....	64

4.1.3	Synthese von Bis-(4- <i>iso</i> -butyryloxybenzyl)-3'- <i>O</i> - <i>iso</i> -butyryl-BVdUDP	65
4.1.4	Synthese von Bis-(4- <i>iso</i> -butyryloxybenzyl)-3'- <i>O</i> - <i>iso</i> -butyryl- <i>D</i> - <i>carba</i> -dTDP.....	67
4.1.5	Synthese von Bis-(4- <i>iso</i> -butyryloxybenzyl)-3'- <i>O</i> - <i>iso</i> -butyryl-2'-fluor-2'-methyluridindiphosphat und Bis-(4- <i>iso</i> -butyryloxybenzyl)-2'-methyluridindiphosphat	74
4.1.5.1	Synthese von Bis-(4- <i>iso</i> -butyryloxybenzyl)-3'- <i>O</i> - <i>iso</i> -butyryl-2'-fluor-2'-methyluridindiphosphat	75
4.1.5.2	Synthese von Bis-(4- <i>iso</i> -butyryloxybenzyl)-2'-methyluridindiphosphat	79
4.2	Darstellung von Boran-modifizierten Bis-(4-acyloxybenzyl)-Nucleosiddiphosphaten	83
4.2.1	Syntheseversuch zur Darstellung von α -P-BH ₃ -modifizierten BAB-d4TDP Verbindungen.....	84
4.2.2	Synthese einer β -P-BH ₃ -modifizierten BAB-d4TDP Verbindung.....	88
4.3	Synthese der d4T- und AZT-Diphosphate und von d4T-Triphosphat aus <i>cyclo</i> Sal-Nucleosidmonophosphaten.....	90
4.4	Synthese eines bioreversibel geschützten Bis-(4-acyloxybenzyl)-Nucleosidtriphosphats.....	95
4.5	Charakterisierung und Untersuchung von BAB-d4TDP und -AZTDP Prodrugs	103
4.5.1	³¹ P-NMR-spektroskopische Untersuchung einer lipophilen BAB-d4TDP Verbindung.....	103
4.5.2	Hydrolysestudien der BAB-d4TDP und -AZTDP Verbindungen.....	106
4.5.2.1	Untersuchungen zur chemischen Hydrolyse von BAB-d4TDP Prodrugs	106
4.5.2.2	Untersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse von BAB-d4TDP Prodrugs...	126
4.5.2.3	Untersuchungen zur Hydrolyse von BAB-AZTDP Prodrugs	141
4.5.3	Antivirale Eigenschaften und Cytotoxizitäten von BAB-d4TDP und BAB-AZTDP Prodrugs.....	143
4.6	Charakterisierung und Untersuchung von Bis-(4- <i>iso</i> -butyryloxybenzyl)-d4TTP als potentielles Triphosphat Prodrug.....	148
4.6.1	³¹ P-NMR-spektroskopische Untersuchung der Hydrolyse von BIB-d4TTP	148
4.6.2	Hydrolysestudien von Bis(4- <i>iso</i> -butyryloxybenzyl)-d4TTP	152
4.6.2.1	Untersuchungen zur chemischen Hydrolyse von BIB-d4TTP	152
4.6.2.2	Untersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse von BIB-d4TTP125.....	157

4.6.3	Antivirale Eigenschaften und Cytotoxizität von BIB-d4TTP.....	162
4.7	Charakterisierung von Bis-(4- <i>iso</i> -butyryloxybenzyl)-Nucleosiddiphosphaten .	163
4.7.1	Hydrolysestudien.....	163
4.7.2	Antivirale Eigenschaften von Bis-(4- <i>iso</i> -butyryloxybenzyl)-3'- <i>O</i> - <i>iso</i> -butyryl-BVdUDP	173
4.8	Zusammenfassung der Hydrolyseuntersuchungen.....	175
5	Zusammenfassung.....	177
6	Summary.....	181
7	Experimenteller Teil.....	185
7.1	Allgemeines	185
7.1.1	Lösungsmittel.....	185
7.1.2	Absolute Lösungsmittel	185
7.1.3	Edukte und Reagenzien	186
7.1.4	Chromatographie	187
7.1.5	Spektroskopie	192
7.1.6	Massenspektromie	193
7.1.7	Weitere verwendete Geräte	194
7.2	Synthesen.....	195
7.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV).....	195
7.2.2	Synthese einiger Reagenzien.....	200
7.2.3	Synthese und Modifikation von Nucleosiden	203
7.2.3.1	Darstellung von 3'-Azidothymidin.....	203
7.2.3.2	Darstellung von 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T).....	207
7.2.3.3	Darstellung von 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydroadenosin (d4A)	209
7.2.3.4	Synthese von D- <i>carba</i> -dT	212
7.2.3.5	Modifikationen weiterer Nucleosidanaloga	220
7.2.4	Synthesen von 4-Acyloxybenzylalkoholen.....	225

7.2.5	Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)- <i>N,N</i> -diisopropylphosphoramiditen	235
7.2.6	Synthese von Nucleosidmonophosphaten (NMP)	243
7.2.7	Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)-Nucleosiddiphosphaten	253
7.2.8	Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)-d4TDPs	261
7.2.9	Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)-AZTDPs	283
7.2.10	Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)-Nucleosidtriphosphaten	286
7.2.11	Synthese von Salicylalkoholen	289
7.2.12	Synthese von <i>cycloSal</i> -Chlorphosphiten	290
7.2.13	Synthese von <i>cycloSal</i> -NMPs	290
7.2.14	Synthese von Nucleosiddi- und -triphosphaten aus <i>cycloSal</i> -NMPs	292
7.3	Hydrolysestudien	299
8	Literaturverzeichnis	302

Anhang I

Gefahrstoffliste	I
Verbindungsliste I	X
Verbindungsliste II	XI
Lebenslauf	XII
Publikationen	XIV
Eidesstattliche Erklärung	XV

1 Einleitung

Nach Erkenntnissen des UNAIDS waren im Jahr 2009 weltweit mehr als 33 Millionen Menschen mit dem HIV (**H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus) infiziert und es kamen ca. 2.6 Mio. Neuinfektionen hinzu.¹ Das HI-Virus ist Auslöser der Immunschwächekrankheit AIDS (**A**cquired **I**mmunodeficiency **S**yndroms), eine der bedrohlichsten Infektionskrankheiten der Welt, die nach Schätzungen bis zu 1.8 Millionen Todesopfer pro Jahr fordert.¹ Besonders in den südlichen Ländern Afrikas haben die sehr hohen Infektions- und Mortalitätsraten starke sozio-ökonomische Folgen. Darüber hinaus sind die Länder Süd- und Zentralasiens und Südamerikas stark von der HIV-Epidemie betroffen.

HIV des Typs 1 (HIV-1) wurde von *Barre-Sinoussi et al.*² und von *Gallo et al.*³ isoliert und ein Jahr später konnte das Retrovirus als Auslöser der Krankheit AIDS identifiziert werden.⁴ Im Verlauf einer HIV-Infektion befällt das Virus überwiegend Zellen des Immunsystems die den CD4-Rezeptor tragen, also CD4-positive Zellen sind.⁵⁻⁷ Durch die Virusreplikation kommt es zu einem massiven Absterben der T-Helferzellen und folglich zu einer Schwächung des Immunsystems, so dass selbst harmlose Infektionen lebensbedrohlich werden.⁷

Aus dem Verständnis des HIV-Aufbaus und seines Replikationszyklus konnten während der vergangenen 26 Jahre unterschiedliche Therapieansätze abgeleitet werden, mit deren Hilfe die Proliferation von HIV im Organismus weitestgehend unterdrückt werden kann. Allerdings gibt es noch keine Therapeutika, die zu einer Heilung führen.⁸ Verantwortlich hierfür sind u.a. Virenreservoirs, die von bestimmten Zelltypen⁹⁻¹¹ und dem zentralen Nervensystem^{12,13} gebildet werden. Ebenso führt die hohe Mutationsrate der Retroviren zur Bildung von vielfältigen Resistenzen^{8,14}, was die Entwicklung von Wirk- und Impfstoffen erschwert.

Eine entscheidende Rolle in der HIV-Therapie spielen Nucleosidanaloga, wie 3'-Azidothymidin (AZT), welches als erster Wirkstoff gegen HIV zugelassen wurde.¹⁵ Zwölf von insgesamt einunddreißig zugelassenen anti-HIV Medikamenten sind Nucleosidanaloga, die als Inhibitoren der Reversen Transkriptase wirken.¹⁶ Damit sich das HI-Virus replizieren kann, muss sein Genom in die DNA der Wirtszelle integriert werden. Bevor dies geschehen kann, wird die einsträngige virale RNA durch die virale Reverse Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA (dsDNA) umgeschrieben. Die strukturellen Modifikationen der

Nucleosidanaloga führen bei diesem Prozess zu einem Abbruch der Transkription.^{17,18} Allerdings treten auch gegenüber diesen Chemotherapeutika Resistenzen auf, die u.a. auf die Fehlerhaftigkeit der RT zurückzuführen sind.¹⁹ Außerdem leiden einige Patienten aufgrund der benötigten hohen Dosierungen unter Unverträglichkeiten und starken Nebenwirkungen, wie z.B. Anämie.^{14,20} Aufgrund dieser Schwierigkeiten mit anti-HIV Medikamenten sollten neue antivirale Wirkstoffe entwickelt werden und die bereits bekannten hinsichtlich ihrer Wirkung und Verträglichkeit verbessert werden. Ein großer Vorteil bei der Optimierung von bestehenden Therapeutika ist, dass deren Wirkung bereits ausführlich erforscht wurde. Möglicherweise wird die Ausbildung von Resistenzen gegenüber optimierten Wirkstoffen verlangsamt. Eine Verbesserung wäre erreicht, wenn die Dosierung und damit auch die Nebenwirkungen verringert werden könnten.

Diese Arbeit befasst sich mit der Weiterentwicklung eines Prodrug Konzeptes zur bioreversiblen Maskierung von antiviral aktiven Nucleosiddi- und Nucleosidtriphosphaten. Chemische Modifikationen sollen die Zellaufnahme von phosphorylierten Nucleosidanaloga ermöglichen und haben die Verbesserung der antiviralen Eigenschaften von zugelassenen Wirkstoffen zum Ziel.

2 Kenntnisstand

2.1 Der HIV-Replikationszyklus und die Antiretrovirale Therapie

Das HI-Virus besteht aus einem zweischichtigen Capsid und einer Doppellipidmembran, die das virale Genom umhüllen. Im Inneren dieses Capsids befinden sich einige viruseigene Enzyme, die für die Virusreplikation essentiell sind. Auf der Oberfläche präsentiert das Virus u.a. die Glycoproteine gp41 und gp120, die zur Erkennung und zur Bindung an die Wirtszelle dienen.^{21,22} Dabei werden hauptsächlich CD4-positive Zellen von HI-Viren befallen. CD4 ist ein Glycoprotein, welches bereits 1984 als primärer und für den Viruseintritt entscheidender Rezeptor identifiziert wurde.¹⁴ Zu der Gruppe der CD4-positiven Zellen gehören z.B. die T-Helferzellen, Makrophagen und dendritische Zellen, die deshalb als Wirtszellen für HIV dienen.^{14,23} Bei der Infektion der Zellen durch HIV kommt es zur Interaktion der viralen Glycoproteine gp41 und gp120 mit den CD4-Rezeptoren und deren Corezeptoren (CCR5, CXCR4). Auf die Fusion des Viruscapsids mit der Zellmembran folgt die Freisetzung des viralen RNA-Genoms, der Reversen Transkriptase, der Integrase und anderer viraler Proteine im Cytosol.^{7,14} Die Reverse Transkriptase beginnt, die einzelsträngige RNA in eine doppelsträngige DNA (dsDNA) umzuschreiben. Diese gelangt in den Zellkern und wird nachfolgend von der Integrase in die DNA des Wirtsgenoms integriert (frühe Phase der Replikation).²² Die spätere Phase der Replikation beginnt mit der Synthese von gespleißter und nicht-gespleißter mRNA, die den Zellkern verlassen und translatiert werden. Hieraus entsteht eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine, unter ihnen regulatorische Proteine, deren Import in den Zellkern eine Amplifikation der Transkription und die Bildung weiterer ungespleißter RNA und einfach gespleißter mRNA bewirkt. mRNA und RNA werden ins Cytosol exportiert. Die folgende Translation der mRNA-Stränge führt zur Bildung der viralen Strukturproteine, die sich an der Cytoplasmamembran mit der als Virusgenom dienenden einzelsträngigen RNA zusammenlagern. Auf diese Weise kommt es zur Knospung und Freisetzung noch unreifer Viruspartikel von der Zelloberfläche.^{7,24-26} Aus dem Verständnis dieses Replikationszyklus konnten insgesamt sechs Therapieansätze abgeleitet werden, für die Medikamente von der US Food and Drug Administration (FDA) zugelassen wurden (s. Abb. 1). Hierzu gehören die Störung der Virus-Wirt Interaktion („Entry“-Inhibition (1), Corezeptoragonisten (2), die Fusions Inhibition (3)), die Inhibition der Reversen Transkriptase (4), der Integrase (5) sowie der Protease (6).¹⁴

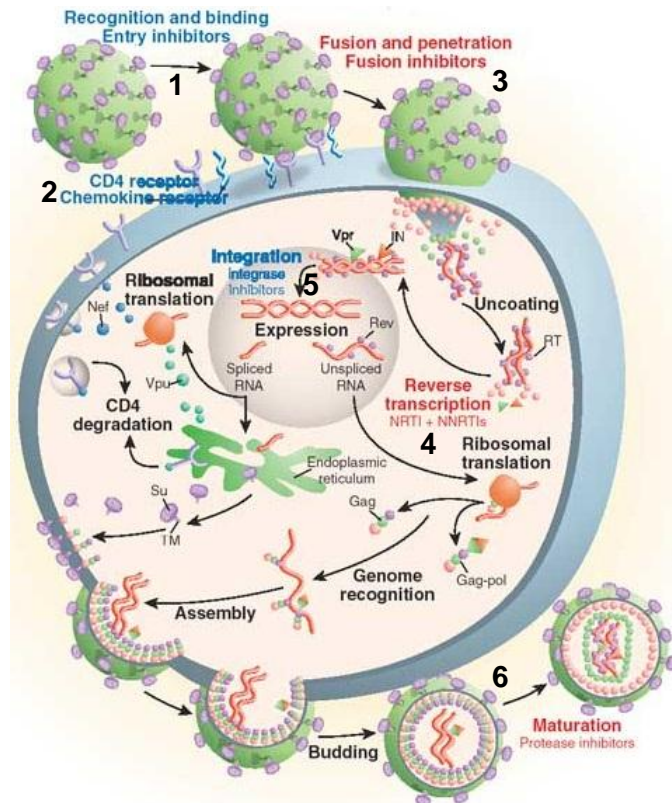


Abb. 1: Replikationszyklus von HIV-1 und Angriffspunkte für die antiretrovirale Therapie (1-6)⁸

In der Mitte der 1990er Jahre wurde erfolgreich die Kombination von Wirkstoffen, die die Virusreplikation auf unterschiedliche Weise inhibieren, eingeführt und als „Hoch Aktive Antiretrovirale Therapie (HAART)“ bezeichnet. Die HAART führte zu einem deutlichen Rückgang der Mortalitätsrate und einer weitreichenden Reduktion der Virenlast unter den behandelten Patienten.⁸ Diese Kombinationstherapien vereinen in der Regel zwei nucleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI) und einen dritten Wirkstoff aus der Gruppe der Protease Inhibitor (PI) oder der nicht-nucleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI), wobei auch die Kombination aus drei NRTI möglich ist.²⁷ In dieser Arbeit soll auf die Inhibition der Reversen Transkriptase unter der Verwendung von NRTI eingegangen werden.

2.2 Nucleosidanaloga als Reverse Transkriptase Inhibitoren in der HIV Therapie

Im Jahre 1985 gelang es *Mitsuya et al.* aus der Gruppe von *S. Broder* gemeinsam mit der Firma Burroughs-Wellcome das Nucleosidanalogen 3'-Azidothymidin (AZT, Zidovudin) **1** als

nucleosidischen Inhibitor mit einer *in vitro* anti-HIV Aktivität zu identifizieren.²⁸ Diese Entdeckung zeigte, dass sich die Replikation von HIV über einen chemotherapeutischen Ansatz inhibieren lässt.¹⁶ Im folgenden Jahr konnten *Furman et al.* zeigen, dass AZT-Triphosphat (AZTTP) die Reverse Transkriptase inhibiert.²⁹ Auf die Zulassung von AZT durch die FDA im Jahre 1987 als NRTI folgten weitere acht Nucleosidanaloga zur Chemotherapie gegen HIV: 2',3'-Dideoxyinosin (ddI, Didanosin), 2',3'-Dideoxycytidin (ddC, Zalcitabin), 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T, Stavudin) **2**, L-2',3'-Dideoxy-3'-thiacytidin (3TC, Lamivudin), *carba*-2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydro-6-cyclopropylaminoguanosin (ABC, Abacavir) und L-2',3'-Dideoxy-5-fluor-3'-thiacytidin (FTC, Emtricitabin).¹⁶

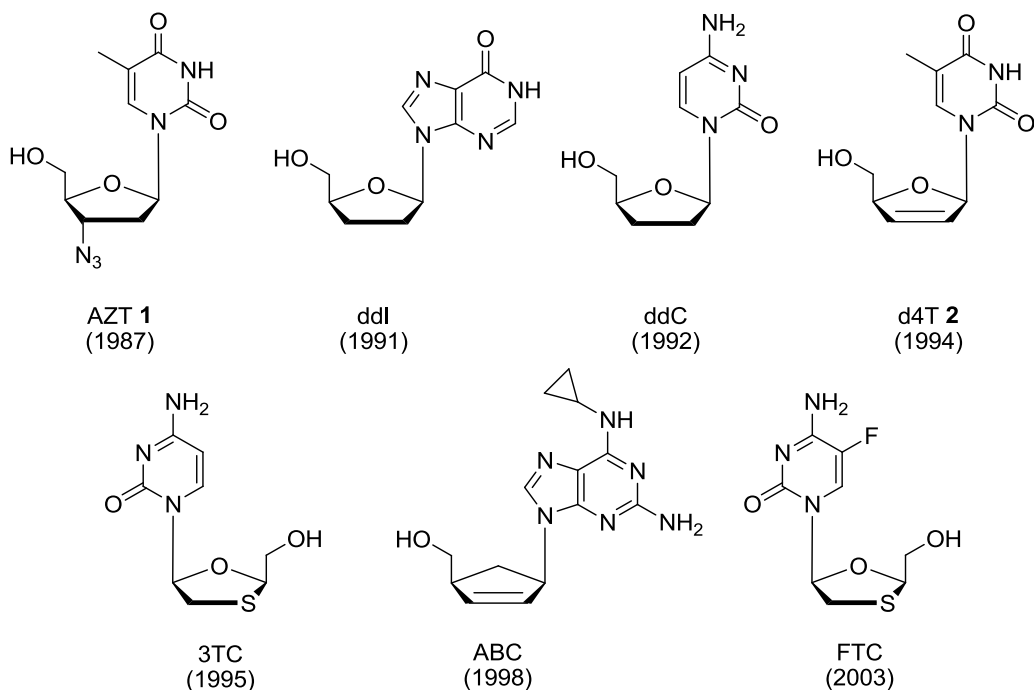


Abb. 2: Von der FDA zugelassene Nucleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren¹⁶

Bevor die Nucleosidanaloga als RT-Inhibitoren wirken können, müssen sie intrazellulär zu den entsprechenden Nucleosidtriphosphaten (NTP) metabolisiert werden. Die antiviral aktiven NTP konkurrieren als Substrate für die Reverse Transkriptase mit den Triphosphaten der natürlichen Nucleoside. Allen NRTI ist das Fehlen der 3'-OH-Gruppe gemein. Nach ihrem Einbau in den wachsenden proviralen DNA-Strang kommt es zu einem Abbruch der Transkription, da keine weitere Phosphordiesterbindung mehr gebildet werden kann.^{30,31} Im Gegensatz zu den humanen DNA-Polymerasen besitzt die RT keine *proofreading* Funktion, so dass der entsprechende NRTI nicht entfernt werden kann. Die

humanen DNA-Polymerasen erkennen die Triphosphate der Nucleosidanaloga und können sie nach dem Einbau in die zelleigene DNA wieder entfernen.²¹

2.2.1 Phosphorylierung der Nucleosidanaloga

Nucleosidanaloga wie AZT oder d4T müssen intrazellulär phosphoryliert werden, damit sie als Inhibitoren der RT wirken können. Die eigentlich aktiven Wirkstoffe sind letztendlich die Triphosphate. Die Phosphorylierung des Nucleosids zum Nucleosid-5'-monophosphat wird von spezifischen Enzymen des *salvage pathway* katalysiert. Dieser erste Phosphorylierungsschritt wird in der Regel durch eines dieser vier Enzyme katalysiert: Thymidinkinase 1 (TK1), Thymidinkinase 2 (TK2), Desoxycytidinkinase (dCK) oder Desoxyguanosinkinase. Die Nucleosidanaloga AZT und d4T werden durch die Thymidinkinase 1 phosphoryliert.^{32,33} Bei vielen NRTI ist diese erste Metabolisierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, da die Thymidinkinasen substratspezifische Enzyme sind.¹⁹ Die Phosphorylierung des unnatürlichen d4T zum d4T-Monophosphat (d4TMP) **3** läuft kinetisch gehemmt ab, so dass die Bildung des d4T-Triphosphats (d4TTP) **5** insgesamt verlangsamt abläuft, obwohl die weiteren Phosphorylierungen zum Di- und auch zum Triphosphat weniger gehemmt sind.^{30,31,34}

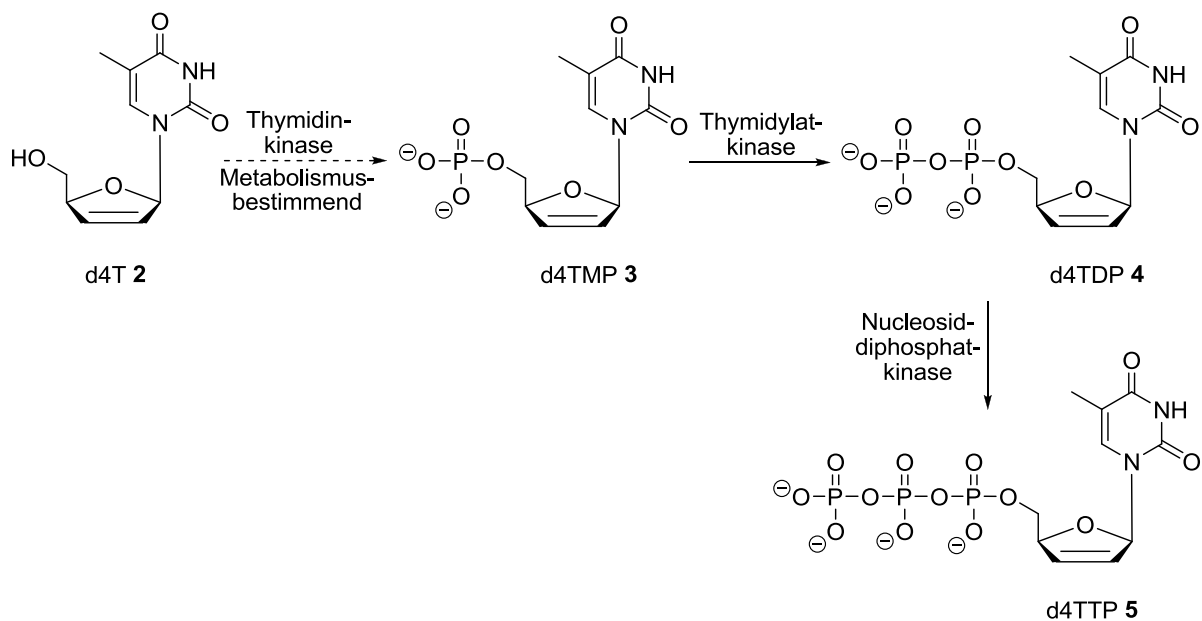


Abb. 3: Intrazelluläre enzymatische Phosphorylierung von d4T **2** zum d4TTP **5**

Die Phosphorylierung von d4TMP **3** zum d4TDP **4** wird durch die weniger spezifische Thymidylatkinase katalysiert, während der dritte Schritt dieser Kaskade durch die relativ unspezifische Nucleosiddiphosphatkinase katalysiert wird.³⁴ Um die antivirale Aktivität von d4T gegenüber der RT zu steigern, wäre es von Vorteil, direkt d4TMP **3** als Wirkstoff zu verwenden, um die Phosphorylierung durch die TK1 zu umgehen (TK-Bypass).^{33,34} Die Phosphate der Nucleoside liegen allerdings bei einem physiologischen pH-Wert von 7.3 bis 7.4 als polare Dianionen vor, so dass sie eine lipophile Zellmembran nicht passieren können. Zudem existieren im Blut und an den Zelloberflächen unspezifische Phosphatasen (saure und alkalische Phosphatase, 5'-Nucleotidase), die solche Nucleotide dephosphorylieren würden.³⁵ Aus diesen Gründen scheint die Verwendung und Entwicklung von Prodrugsystemen, die intrazellulär das NMP freisetzen, sehr sinnvoll. Eine Nebenwirkung bei der Langzeiteinnahme von d4T ist die Lipoatrophie (Veränderungen des Fettgewebes). Sie wird durch die Inhibition der mitochondrialen DNA-Polymerase γ durch d4TTP ausgelöst.¹⁹ Die mtDNA pol γ kann nicht zwischen den natürlichen NTP und den Triphosphaten der NRTI diskriminieren, so dass es zu einer Beeinträchtigung der Mitochondrienbildung kommt. Bei der Primärtherapie von HIV wird in westlichen Industrieländern auf die Verwendung von d4T weitestgehend verzichtet, während es in Ländern mit mittleren und niedrigen Einkommen aufgrund der günstigen Verfügbarkeit weiterhin eingesetzt wird.^{14,36} Neuere Studien haben gezeigt, dass bei einer niedrigeren Dosierung von d4T seine Wirkung gegen HIV erhalten bleibt³⁷, aber das Risiko der Lipoatrophie gesenkt wird.³⁶ Auch die Verwendung von Prodrugs sollte die benötigte Dosis verringern und könnte so zu einer Reduktion von Nebenwirkungen führen.

Die sukzessive Phosphorylierung von AZT **1** ist ebenfalls eingeschränkt. Bei diesem Nucleosidanalogen ist der zweite Schritt der Phosphorylierung durch die Thymidylatkinase gehemmt und wird so zum Flaschenhals bei der Bildung von AZTTP **8**.²⁹ *Balzarini et al.* hatten in Studien festgestellt, dass die gebildete Menge an AZTDP **7** und AZTTP **8** in MT-4 Zellen 200- bis 600-mal niedriger war als die entstandene Menge an AZTMP **6**. Mit erhöhter Menge an AZT nahm nur die Menge an AZTMP **6**, nicht jedoch die an AZTDP **7** bzw. AZTTP **8** zu.³¹

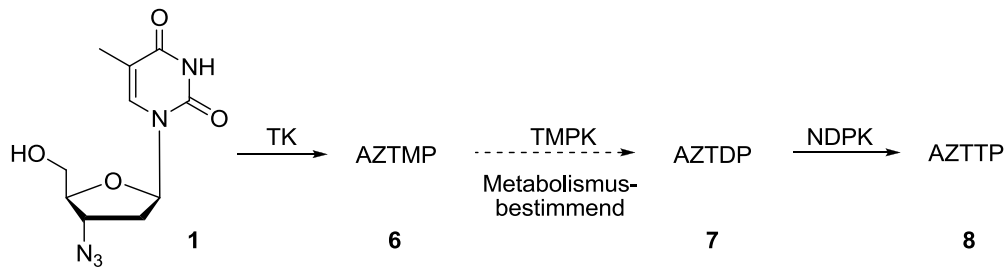


Abb. 4: Sukzessive Phosphorylierung von AZT **1** zum AZTTP **8**

Der Rückgang der katalytischen Aktivität der Thymidylatkinase bei der Phosphorylierung von AZTMP konnte durch verschiedene Untersuchungen, insbesondere durch die Kristallisation von AZTMP und ATP gemeinsam mit dem Enzym belegt werden. Es wurde eindeutig gezeigt, dass die Inhibition auf die 3'-Azidgruppe zurückzuführen ist.³⁸⁻⁴⁰ Diese Inhibition der Phosphorylierung zum Nucleosiddiphosphat führt zu einer intrazellulären Akkumulation von AZTMP **6**, welches für Nebeneffekte wie die Inhibition von zellulären 3'-Exonucleasen verantwortlich zu sein scheint.³⁰ Eine solche Inhibition verhindert die Reparatur von AZT-terminierten DNA-Strängen.⁴¹ *Sommadossi et al.* konnten zeigen, dass AZTMP **6** in die DNA von Knochenmarkszellen eingebaut wird, was zu einer Schädigung von pluripotenten Stammzellen führt.^{42,43} Zudem kann es durch hohe Konzentrationen an AZTMP **6** zu einer Inhibition zellulärer Fettglykosylierungen kommen.⁴⁴ Weitere Nebenwirkungen von AZT wie z.B. die Myopathie, die Kardiomyopathie und die Anämie (Verringerung der Erythrozyten) wurden mit der mitochondrialen Toxizität von AZT in Verbindung gebracht. Allerdings zeigten *Johnson et al.* das AZTTP **8** nur ein relativ schlechtes Substrat für die mtDNA pol γ ist. Vermutlich führt AZT zur Inhibition der Thymidin-phosphorylierenden Enzyme, so dass es zu einer Reduktion an Thymidintriphosphat in den Mitochondrien kommt. Als Resultat ergäbe sich eine indirekte Inhibition der mtDNA pol γ .¹⁹ Die Phosphorylierung von AZT sollte aus den genannten Gründen umgangen werden. Dies könnte durch die Anwendung von Nucleosiddi- bzw. -triphosphat Prodrugs erreicht werden. Sie sollten so konzipiert werden, dass sie intrazellulär AZTDP **7** oder entsprechend AZTTP **8** freisetzen. Der Nutzen solcher Prodrugkonzepte sollte sich nicht auf die Verwendung von AZT beschränken. Durch sie könnten andere Nucleosidanaloga, die aufgrund ihrer ineffizienten Phosphorylierung nur eine geringe antivirale Aktivität besitzen, zu potentiellen Wirkstoffen werden.

2.3 Prodrug Konzepte

Substanzen, die Wirkstoffe maskieren, wurden erstmals 1958 von *A. Albert* mit dem Begriff Prodrug versehen.⁴⁵ Durch eine chemische oder enzymatische Reaktion werden pharmakologisch unwirksame Stoffe in aktive Wirkstoffe metabolisiert. Die Aktivierung kann vor, während und nach der Aufnahme oder idealerweise erst am spezifischen Wirkort im Körper erfolgen. Im Fall antiviral aktiver Nucleosidanaloga wären dies Pronucleotide, die am Wirkort die phosphorylierten Nucleotide freisetzen können. Die dreistufige enzymatische Aktivierung von beispielsweise d4T sollte durch ein d4TMP-Pronucleotid um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt verkürzt werden. Ebenso könnten durch den Einsatz eines Nucleosiddiphosphat-Prodrugs zwei der benötigten Phosphorylierungen umgangen werden. Voraussetzungen für ein solches Pronucleotid wären eine ausreichende Stabilität im Blut, eine erhöhte Lipophilie um Zellmembranen und die Blut-Hirn-Schranke passieren zu können sowie die Freisetzung des Wirkstoffes unter Abspaltung nicht-toxischer Nebenprodukte. Die maskierenden Einheiten sollten durch eine chemische oder enzymatische Reaktion erst am Wirkort abgespalten werden.

2.3.1 Prodrug Konzepte für Nucleosidmonophosphate

Um Nucleosidmonophosphate lipophil maskieren zu können, müssen die negativen Ladungen der 5'-Phosphatgruppe maskiert werden, da Nucleosidmonophosphate bei physiologischem pH-Wert als Dianionen vorliegen. Es zeigte sich, dass die Maskierung einer der Ladungen durch einfache Alkyl- oder Arylester zur Bildung eines funktionierenden Pronucleotides nicht ausreicht, da solche Verbindungen zu polar bleiben und durch Phosphordiesterasen abgebaut werden.⁴⁶

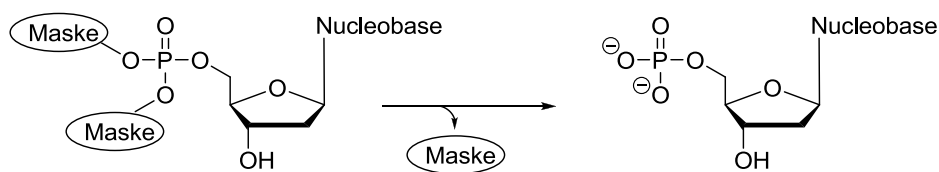


Abb. 5: Das Pronucleotid-Konzept

Bei der Maskierung beider Ladungen als Dialkylphosphatester traten andere Unwägbarkeiten auf. Aus diesen Verbindungen konnte das NMP nicht freigesetzt werden,

da die gebildeten Phosphatdiester aufgrund der negativen Ladung am Phosphat hydrolytisch stabil waren.³⁵ In Folge dessen wurden neuere Pronucleotidansätze entwickelt, bei denen die NMP nach einer mehrstufigen Hydrolysekaskade freigesetzt werden. Solch dreiteilige Prodrug Systeme werden in der Regel enzymatisch aktiviert.⁴⁶ Einige Beispiele sind:

- Bis-(POM)-Nucleotide [Bis-(pivaloyloxymethyl)-]⁴⁷,
- Bis-(POC)-Nucleotide [Bis-(isopropylloxycarbonyloxymethyl)-]^{48,49},
- Bis-(SATE)-Nucleotide [Bis-(S-acyl-2-thioethyl)-]⁵⁰⁻⁵²
- Bis-(AB)-Nucleotide [Bis-(4-acetoxybenzyl)-]⁵³,
- Phosphoramidat-Nucleoside⁵⁴⁻⁵⁶,
- HepDirect-Pronucleotide^{57,58}.

Die selektive Freisetzung der Nucleotide aus diesen Prodrugs basiert auf der höheren intrazellulären Konzentration von Esterasen in den Zellen als im Blutplasma.^{59,60} Die Freisetzung der NMP aus den HepDirect-Pronucleotiden erfolgt gewebespezifisch. Sie werden aufgrund eines speziellen Hydrolysemechanismus durch das Enzym Cytochrom P450, welches bevorzugt in der Leber exprimiert wird, aktiviert. Ein genereller Nachteil von enzymatisch aktivierten Pronucleotiden ist deren Abhängigkeit von den spaltenden Enzymen. Reicht z.B. am Wirkort die Enzymkonzentration nicht aus, um das Pronucleotid zu aktivieren, kann das NMP nicht freigesetzt werden. Umgekehrt kann es frühzeitig zur Aktivierung kommen, wenn andernorts die Enzymkonzentration zu hoch ist. Aus diesen Gründen wurde 1996 von C. Meier das *cycloSal*-Konzept vorgestellt, welches durch eine chemisch aktivierte Hydrolyse das entsprechende NMP selektiv freisetzen kann.⁶¹

2.3.1.1 Das *cycloSal*-Konzept

Die *cycloSal*-Pronucleotide sind aus einem Nucleotid und einem Salicylalkohol, der die bidente Maske bildet, aufgebaut. Die Nummerierung der *cycloSal*igenyl-Nucleosidmonophosphate (*cycloSal*-NMP) erfolgt in Anlehnung an die IUPAC Nomenklatur (Abb. 6).

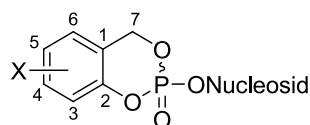


Abb. 6: Ein *cycloSal*igenyl-Nucleosidmonophosphat (*cycloSal*-NMP)

Eine Besonderheit der *cycloSal*-NMP ist die selektiv verlaufende Hydrolyse des Phosphorsäuretriesters, welche durch die verschiedenen Stabilitäten der Phenyl-, Benzyl- und Alkylphosphatesterbindung bedingt wird. In einem ersten Hydrolyseschritt wird die Phenylesterbindung des *cycloSal*-NMP durch den nucleophilen Angriff eines Hydroxidions auf das Phosphoratom gespalten. Dies führt zur Bildung des (2-Hydroxybenzyl)-phosphatdiesters. Der O-P-Bindungsbruch der phenolischen Esterbindung wird bevorzugt, da die auftretende negative Ladung im (2-Hydroxybenzyl)-phosphatdiester mesomeriestabilisiert ist (Schritt A, Abb. 7).

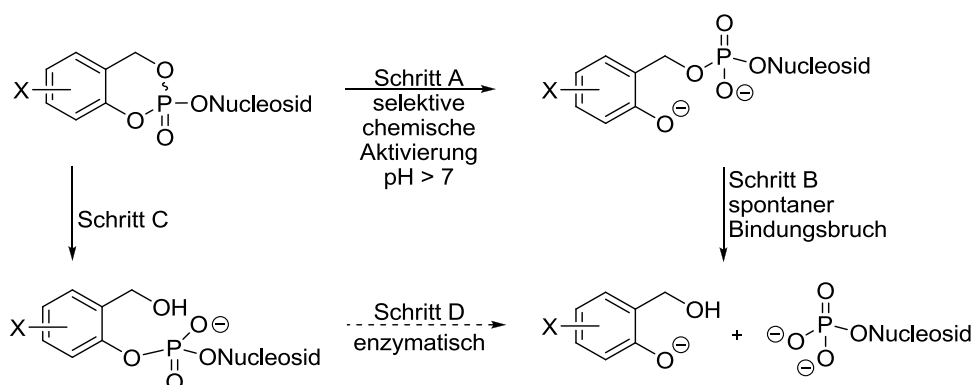


Abb. 7: Chemische Hydrolyse von *cycloSal*-Nucleosidmonophosphaten

Der *ortho*-Substituent des Benzylesters wird dadurch von einem schwachen Elektronendonator (Phosphatgruppe) zu einem starken Elektronendonator (Hydroxygruppe). Die resultierende Umpolung führt zur Freisetzung des Nucleotids und der Maske (Salicylalkoholderivat) (Schritt B). Die andere denkbare Hydrolyse zum (2-Hydroxymethylphenyl)-NMP-phosphatdiester, tritt in untergeordnetem Maß auf (Schritt C). Die Freisetzung des NMP über den Schritt D findet bei physiologischem pH-Wert nicht oder stark verlangsamt statt, da das Anion am Phosphoratom einen weiteren nucleophilen Angriff verhindert. Der *cycloSal*-Pronucleotid-Ansatz ist erfolgreich und mehrere Studien belegen die intrazelluläre Freisetzung der entsprechenden NMP.⁶² Aufgrund der Erfolge der *cycloSal*-d4TMP Verbindungen wurde das Konzept auf andere Nucleosidanaloga übertragen wie z.B. AZT,⁶³ ddA und d4A (ddA-Bypass),⁶⁴ ara- und ribo-F-ddA⁶⁵ und BVdU⁶⁶. Das *cycloSal*-Konzept unterlag lange Zeit einer stetigen Weiterentwicklung. Um die Einstellung eines Diffusionsgleichgewichts über die Zellmembran zu vermeiden wurde die *cycloSal*-Einheit auf unterschiedliche Weise funktionalisiert. Diese Modifikationen sollten intrazellulär deutlich schneller gespalten werden als extrazellulär und eine polare Gruppe am Aromaten des *cycloSal*-NMPs zurücklassen. Durch diese Gruppe sollte die „Rück“-

Diffusion in den extrazellulären Raum unterbunden werden und das NMP intrazellulär freigesetzt werden.

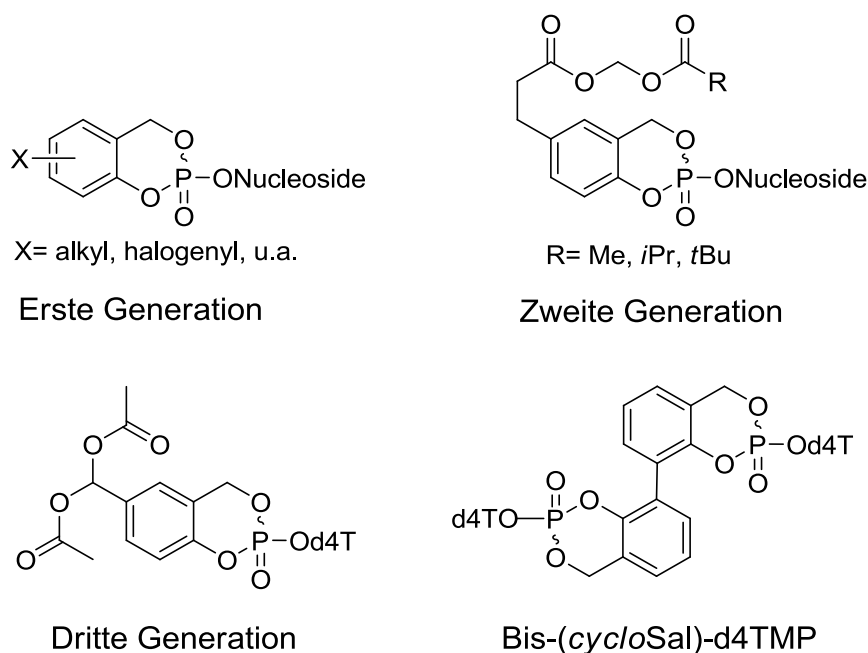


Abb. 8: Verschiedene Entwicklungsstufen der *cycloSal*-Pronucleotide

Intensiven Arbeiten führten zu den *cycloSal*-Pronucleotiden der zweiten und dritten Generation.⁶⁷⁻⁷² Die *cycloSal*-Pronucleotide wurden ebenfalls durch Aminosäuren⁷³ und Kohlenhydrate⁷⁴ modifiziert, um ggf. zelluläre Transporter anzusteuern. Durch die Synthese von Bis-*cycloSal*-Nucleotiden konnten *C. Ducho* und *N. Gisch* ein Wirkstoff-Maske-Verhältnis von 2:1 einstellen, was bisher einmalig unter Pronucleotidkonzepten ist.^{68,71} Durch intensive Arbeiten in den letzten Jahren gelang es, die *cycloSal*-Pronucleotide der ersten Generation diastereoselektiv darzustellen. Nach den ursprünglichen Synthesemethoden konnten die *cycloSal*-Pronucleotide nur als Gemisch ihrer Diastereomere erhalten werden, welches sich nur in wenigen Fällen trennen ließ.^{75,76} Die verwendete Auxiliarmethodik zur diastereoselektiven Synthese der *cycloSal*-NMP Verbindungen konnte kürzlich innerhalb der Arbeitsgruppe auf die diastereoselektive Synthese von Phosphoramidat-Pronucleotiden übertragen werden.^{77,78} Das *cycloSal*-Konzept kann außerdem zur Synthese verschiedenster Nucleosiddi- und -triphosphate; 5',5'-Dinucleosiddi-, -tri- und -tetraphosphaten und weiteren Nucleosidbiokonjugaten verwendet werden.⁷⁹ Bei der Synthese dieser Verbindungen fungieren akzeptor-substituierte *cycloSal*-NMP als aktivierte Phosphatdonatoren. Besonders erfolgreich lässt sich dieses Synthesekonzept zur Darstellung von 5'-Nucleosiddiphosphatpyranosen

(XDP-Zucker) verwenden. Unter Einsatz der 5-Nitro-*cycloSal*-NMP lassen sich XDP-Zucker von natürlichen und nicht-natürlichen Nucleosiden bzw. Pyranosen mit definierter Konfiguration am anomeren Zentrum in sehr guten Ausbeuten synthetisieren.⁸⁰⁻⁸³ Die Synthese von Nucleosidmonophosphatpyranosen, insbesondere die von CMP-*N*-Acetylneuraminsäureanaloga ist ebenfalls möglich.

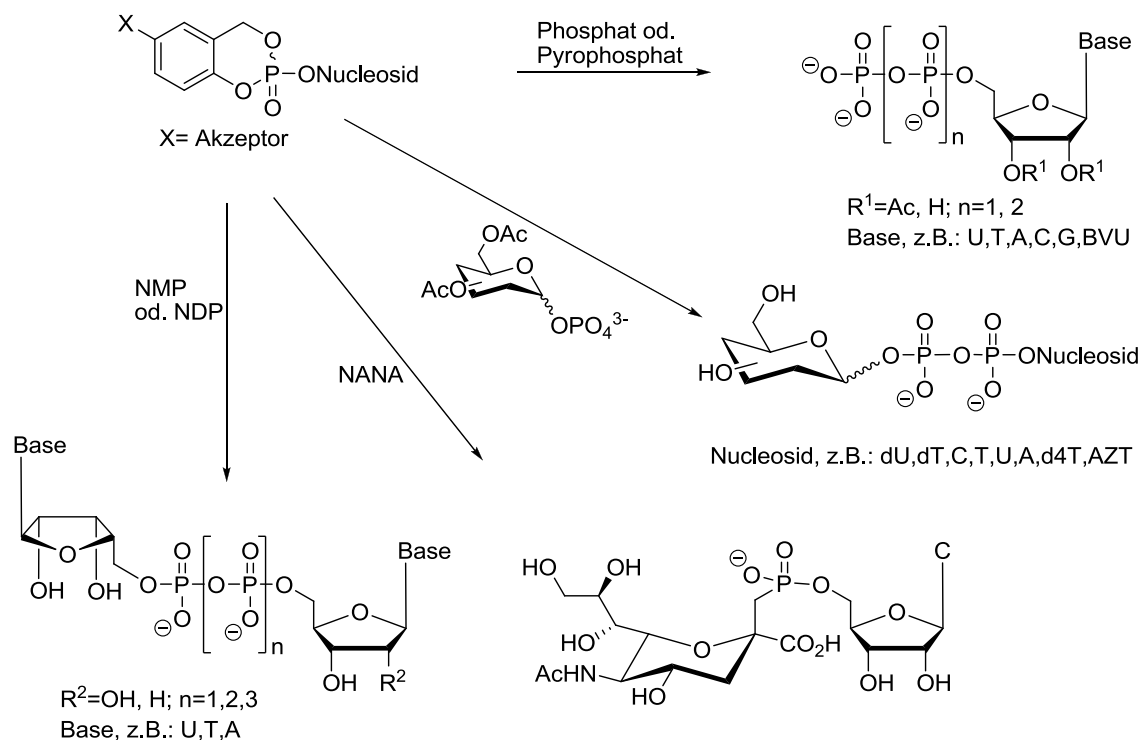


Abb. 9: Das vielseitige synthetische Potential von *cycloSal*-NMPs als Phosphataktivester

Außerdem wurden auch Desoxyribose, 2-*N*-Acetylpyranosen, Disaccharide und weitere Pyranosederivate zur Darstellung der XDP-Zucker eingesetzt. Von *V. Tonn* wurde gezeigt, dass die festphasengestützte Synthese von Nucleosiddi- und -triphosphaten sowie XDP-Zuckern grundsätzlich möglich ist. Durch die Immobilisierung der *cycloSal*-Ribo- und *cycloSal*-Desoxyribonucleosidmonophosphate konnte die Reinigung dieser polaren und oft auch instabilen Verbindungen erheblich vereinfacht werden.⁸⁴

2.3.1.2 Das Bis-(AB)-Nucleotid Konzept

Freeman et al. und *Glazier et al.* entwickelten unabhängig voneinander das Bis-(4-acyloxybenzyl)-Konzept für Nucleosidmonophosphate.⁸⁵⁻⁸⁸ Das Konzept nach *S. Freeman* bildet die Grundlage für die in dieser Arbeit entwickelten Bis-(4-acyloxybenzyl)-Nucleosiddiphosphate (BAB-NDP). Bei der enzymatisch aktivierten Freisetzung eines Nucleotids aus einem Phosphorsäuretriester wird intermediär ein negativ geladener Phosphorsäurediester **12**

gebildet. Um die Substrataffinität dieses Intermediats gegenüber Carboxyesterasen zu sichern, trennte *S. Freeman* den Angriffspunkt der Esterase räumlich vom Phosphatteil über einen Benzyl-Spacer, um eine Inhibition der Esterase durch die negative Ladung zu vermeiden.⁵³

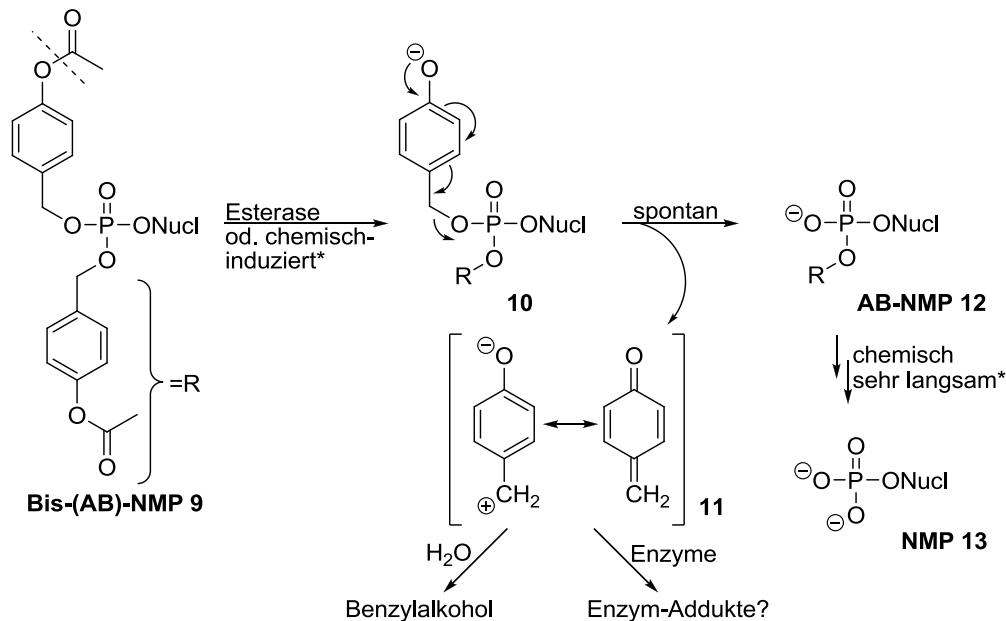


Abb. 10: Hydrolysemechanismus von Bis-(AB)-Nucleotiden (*Meier *et al.*⁸⁹)

Das NMP 13 wird aus diesem Pronucleotid 9 über den folgenden Mechanismus freigesetzt: Im ersten Schritt der Hydrolysekaskade wird der Acetylester enzymatisch gespalten, so dass sich der (4-Hydroxybenzyl)-phosphatdiester 10 bildet. Durch die Spaltung des Esters

kommt es zu einer Umpolung des zur Benzylgruppe *para*-ständigen Restes: Der Elektronenakzeptor (Acylester) wird zu einem Elektronendonator (Phenol). Infolgedessen kommt es zu einem spontanen Bruch der Benzylbindung und zur Bildung des Intermediates 12 sowie des mesomeriestabilisierten Chinonmethids 11. Eine Wiederholung dieser Hydrolysekaskade setzt das Nucleotid 13 frei.⁵³ Meier *et al.* konnten zeigen, dass das NMP 13 aus den Bis-(AB)-Nucleotiden ebenfalls über eine rein chemische Hydrolyse freigesetzt werden kann.⁸⁹ Als ein Nachteil dieses Prodrug Konzeptes wurde die Bildung des Chinonmethids 11 diskutiert, welches möglicherweise Proteine alkylieren könnte und so die zur Freisetzung benötigten Esterasen inhibieren würde.^{46,90} Hydrolysestudien eines Bis-(4-acetoxybenzyl)-Nucleotids wurden in deuteriertem Methylphosphonatpuffer bei einem pD-Wert von 8 durchgeführt und mittels Ionenpaarchromatographie und NMR-Studien verfolgt. Als Spaltprodukte wurden der Benzylalkohol, Acetat und das NMP gefunden. Es

wurde auch Benzylphosphat gefunden, welches aus einer möglichen Reaktion des Chinonmethids mit dem Puffer hervorging. Da *Freeman et al.* bei enzymatischen Hydrolysen keinen Rückgang der Enzymaktivität beobachten konnten, scheint die Reaktion des Chinonmethids mit Proteinen unwahrscheinlich.⁵³ *Glazier et al.* modifizierten die Bis-(AB)-Nucleotide dahingehend, dass sie bei der Hydrolyse kein Chinonmethid bzw. keinen Benzylalkohol mehr freisetzen konnten und sich stattdessen 4-Hydroxymethylsäure bildet.⁹¹ *Meier et al.* synthetisierten Bis-(4-acetoxy- α -methylmethoxycarbonylbenzyl)-d4TMP (setzt kein Chinonmethid frei), um dessen Hydrolyseverhalten mit dem von *cycloSal*-Nucleotiden und dem von Bis-(4-acyloxybenzyl)-d4TMP vergleichen zu können. Bis-(4-acetoxy- α -methylmethoxycarbonylbenzyl)-d4TMP zeigte einen CC_{50} -Wert von 19 μ M, während sich für die unmodifizierte Verbindung Bis-(4-acyloxybenzyl)-d4TMP ein CC_{50} -Wert von 58 μ M ergab, also in der CEM/0 Zelllinie weniger toxisch war.⁸⁹ Eine Korrelation zwischen Chinonmethid und Toxizität konnte nicht abgeleitet werden.

2.3.2 Prodrug Konzepte für Nucleosiddi- und -triphosphate

Die intrazelluläre Phosphorylierung von Nucleosidanaloga ist essentiell für ihre biologische Aktivität. Aufgrund der Spezifität der phosphatübertragenden Enzyme (TK, TMPK) können einzelne Schritte auf dem Weg zum 5'-Nucleosidtriphosphat metabolismusbestimmend sein. Beispielsweise ist die Phosphorylierung von AZTMP zu AZTDP durch die TMPK kinetisch gehemmt, was Folgen für die Wirkung und die Verträglichkeit von AZT hat (vergl. 2.2.1). Aus diesem Grunde ist es ausgesprochen erstrebenswert, den zweiten oder sogar den dritten Phosphorylierungsschritt zu umgehen. Ein direkter Einsatz der entsprechend phosphorylierten Nucleosidanaloga ist jedoch nicht möglich, da sie bei physiologischem pH-Wert als hochpolare Anionen vorliegen, was ihre Membrangängigkeit praktisch unmöglich macht. Zudem existieren im Blut unspezifische Phosphatasen, welche die Dephosphorylierung der ND(T)P katalysieren (s. 2.3). Um also die Di- oder Triphosphate antiviral aktiver Nucleosidanaloga direkt anwenden zu können, ist man gezwungen, lipophile, membrangängige Prodrugs einzusetzen, welche intrazellulär durch einen spezifischen und möglichst hoch selektiv verlaufenden Mechanismus z.B. AZTDP freisetzen und somit die gehemmte Kinase-Reaktion umgangen wird. Entsprechend könnte ein System, das Nucleosidtriphosphate freisetzt, den Nucleosiddiphosphat-Kinase Bypass (NDPK-Bypass) ermöglichen, womit dann die gesamte Phosphorylierungsfolge zum Triphosphat umgangen würde.

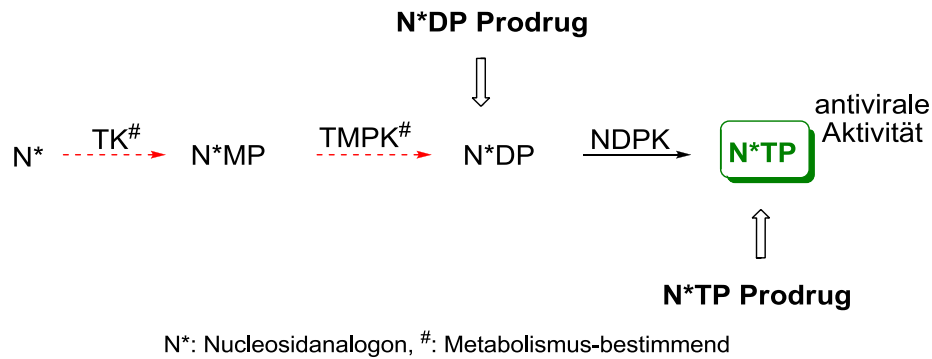


Abb. 11: Einsatz von NDP bzw. NTP Prodrugs zum Bypass der Phosphorylierung

Solche Systeme zur bioreversiblen Maskierung von NDP bzw. NTP könnten inaktive oder schwach aktive Nucleosidanaloga in wirksame Verbindungen umwandeln. Dieser Ansatz käme für solche Analoga in Frage, die nicht oder sehr unvollständig zum Di- oder Triphosphat metabolisiert werden, deren phosphorylierte Metabolite aber antivirale Aktivität besitzen. Es ist außerdem denkbar, dass so auch selektive Nucleosidanaloga wie z.B. *E*-5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxyuridin (BVdU) gegenüber anderen Viren wirken könnten. BVdU wird erfolgreich zur Therapie von Herpes-Erkrankungen eingesetzt und entfaltet seine antivirale Wirkung als BVdU-Triphosphat (BVdUTP). Im Gegensatz zu den anti-HIV-NRTI wird BVdU nicht durch humane Kinasen phosphoryliert, sondern durch virale Enzyme (Herpes Simplex Virus TK und Varizella Zoster Virus TK).⁹² BVdU kann deshalb nur gegenüber Viren aktiv sein, die diese viralen Enzyme codieren und ist somit selektiv. Ein BVdUDP-Prodrug sollte die notwendigen Phosphorylierungen umgehen und BVdU könnte ggf. eine antivirale Wirkung gegenüber HIV entfalten. Ein großer pharmakologischer Vorteil einiger anti-HIV NRTI ist die hohe intrazelluläre Halbwertszeit ihrer Triphosphate. So ermöglicht die intrazelluläre Stabilität von ddI-Triphosphat ($t_{1/2} = 24$ h in mononuklearen Zellen des peripheren Blutes, PBMC) gegenüber einer Halbwertszeit von 1.5 h im Blut eine einmalige Dosierung von ddI pro Tag.¹⁹ Die Verwendung von NDP bzw. NTP Prodrugs könnte also eine seltenere Dosierung ermöglichen. Generell ist wenig über die Metabolismen der Nucleosidanaloga im Zellinneren bekannt. Die Anwendung von Systemen zur effektiven intrazellulären Freisetzung ihrer Di- oder Triphosphate könnte zu einem besseren Verständnis biochemischer Zusammenhänge beitragen und ist deshalb auch aus analytischer Sicht von besonderem Interesse. Überraschenderweise sind in der Literatur nur äußerst wenige Prodrugsysteme für Nucleosiddi- bzw. -triphosphate beschrieben worden. Dies ist einerseits dem schwierigen chemisch-synthetischen Zugang zu solchen Verbindungen geschuldet und andererseits der Instabilität der Phosphorsäureanhydridbindung in Nucleosiddi- bzw. -triphosphaten.

2.3.2.1 Phospholipidanaloga antiviral aktiver Nucleoside

In erster Linie synthetisierten *Hostetler et al.* Phosphatester von Nucleosidmono- und diphosphaten auf Diglycerid-Basis, um eine verbesserte Aufnahme der Nucleosidanaloga AZT, ddC und 3dT von Makrophagen zu erreichen.⁹³ Die verbesserten antiviralen Aktivitäten der Dimyristoylglyceroldiphosphate von ddT und ddC (3dTDP-DMG und ddCDP-DMG) gegenüber den Nucleosiden 3dT und ddC konnten auf die Freisetzung der Nucleosidmonophosphate zurückgeführt werden. Die intrazelluläre Freisetzung der entsprechenden NDP konnte nicht nachgewiesen werden.⁹⁴⁻⁹⁶ Acyclovidiphosphat-DMG (ACVDP-DMG) zeigte antivirale Aktivitäten in einer Acyclovir resistenten Zelllinie. Untersuchungen zum Metabolismus von ACVDP-DMG konnten nicht die direkte Freisetzung von ACVDP zeigen. Die Autoren führten die biologische Aktivität auf die intrazelluläre Freisetzung von ACVMP zurück.⁹⁷

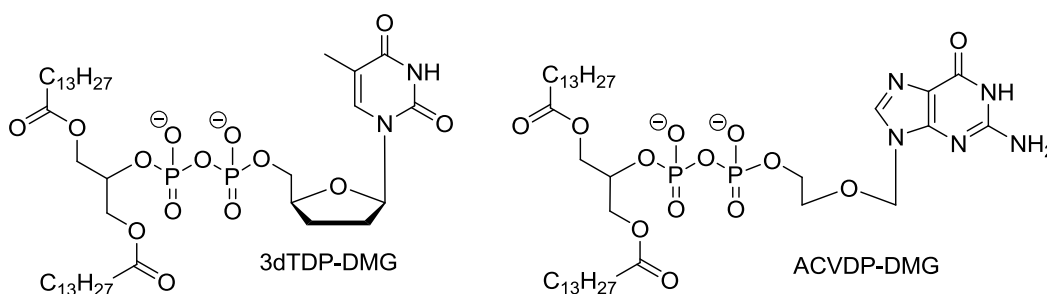


Abb. 12: Phospholipidanaloga nach *Hostetler et al.*⁹⁴⁻⁹⁷

2.3.2.2 Acylester antiviral aktiver Nucleosiddi- und -triphosphate

Die Arbeitsgruppe um *T. Huynh Dinh* synthetisierte unterschiedliche Acylphosphatester von Nucleosidmono-, -di- und -triphosphaten, in denen je eine negative Ladung der endständigen Phosphatgruppe lipophil maskiert war.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Prinzipiell sollten diese Verbindungen selektiv das jeweilige NDP oder NTP freisetzen, da für die gemischte Carbonsäure-Phosphorsäure-Anhydridbindung eine geringere Stabilität als für die symmetrischen Phosphorsäureanhydridbindungen angenommen wurde.¹⁰¹ Für die meisten Verbindungen wurden jedoch die Acylphosphatester der Myristinsäure und der 13-Oxamyristinsäure gebildet. Die 13-Oxamyristinsäure zeigte eine biologische Aktivität gegenüber HIV.¹⁰² Die potentiellen d4TD(T)P und AZTD(T)P Prodrugs setzten während Hydrolysestudien in wässrigen Puffern und in RPMI-Kulturmedium tatsächlich die entsprechenden Nucleosiddi- bzw. -triphosphate selektiv frei.⁹⁸ Allerdings wurde im RPMI-Kulturmedium ein deutlicher Rückgang der Hydrolysehalbwertszeit von 1.4 h gegenüber 156 h im Puffer registriert (Myr-AZTTP). Die untersuchten Verbindungen zeigten im

Vergleich zu den Nucleosiden d4T und AZT keine verbesserte antivirale Aktivität gegenüber HIV-1 in CEM Zellen. Dieser Befund wurde mit den geringen Stabilitäten der getesteten Verbindungen im RPMI-Kulturmedium begründet.¹⁰¹

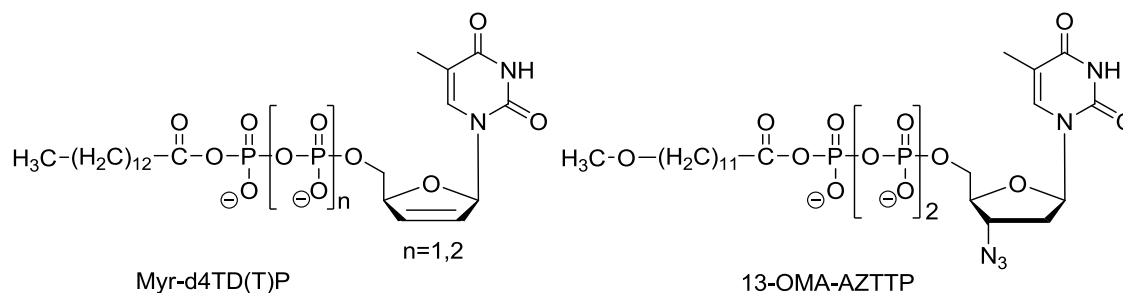


Abb. 13: Acylester von Nucleosiddi- und -triphosphaten nach *T. Huynh Dinh*¹⁰¹

2.3.2.3 *cycloSal*-AZT-Diphosphate als mögliche NDP Prodrugs

Aufgrund der in der Gruppe *C. Meier* vorhandenen Expertise im Umgang mit der *cycloSal*-Technologie versuchte *H. Jessen* in seiner Promotion dieses erfolgreiche Konzept auf Nucleosiddiphosphate zu übertragen.⁷⁰ Die *cycloSal*-Einheit bildet einen cyclischen Diester mit den negativen Ladungen des Nucleosidmonophosphats (vergl. Abb. 6). Daher musste sie zur Maskierung eines NDP am β -Phosphat eingeführt werden und es wurde untersucht, ob die Maskierungseinheit durch chemisch-induzierte Hydrolyse abgespalten werden kann, um das Nucleosiddiphosphat freizusetzen. In diesen ersten Versuchen wurde eine strukturelle Vorgabe für das Design von NDP-Prodrugs berücksichtigt, die später weiter verfolgt wurde (s. 2.3.2.4). Aufgrund der erwarteten hohen hydrolytischen Labilität der vollständig ungeladenen Pyrophosphatgruppe, darf die α -Phosphatgruppe nicht maskiert werden. Daraus resultiert eine verbleibende Stabilisierung der Diphosphatgruppe, da zum einen die elektrostatische Repulsion einen nucleophilen Angriff an den Phosphatgruppen behindert und zum anderen das α -Phosphat zu einer sehr schlechten Austrittsgruppe wird, da es als zweifach negativ geladener Phosphorsäurediester (NMP) substituiert werden müsste. Diese Vorteile werden allerdings mit einer höheren Polarität „bezahlt“. Wie unter Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben wurde, lassen sich die Hydrolyseeigenschaften der *cycloSal*-NMP durch das Substitutionsmuster am Aromaten beeinflussen.^{61,103} Es wurde je ein *cycloSal*-AZTDP mit einer Donor-substituierten **14** (3-Methyl) *cycloSal*- bzw. einer Akzeptor-substituierten **15** (5-Chlor) Einheit synthetisiert.

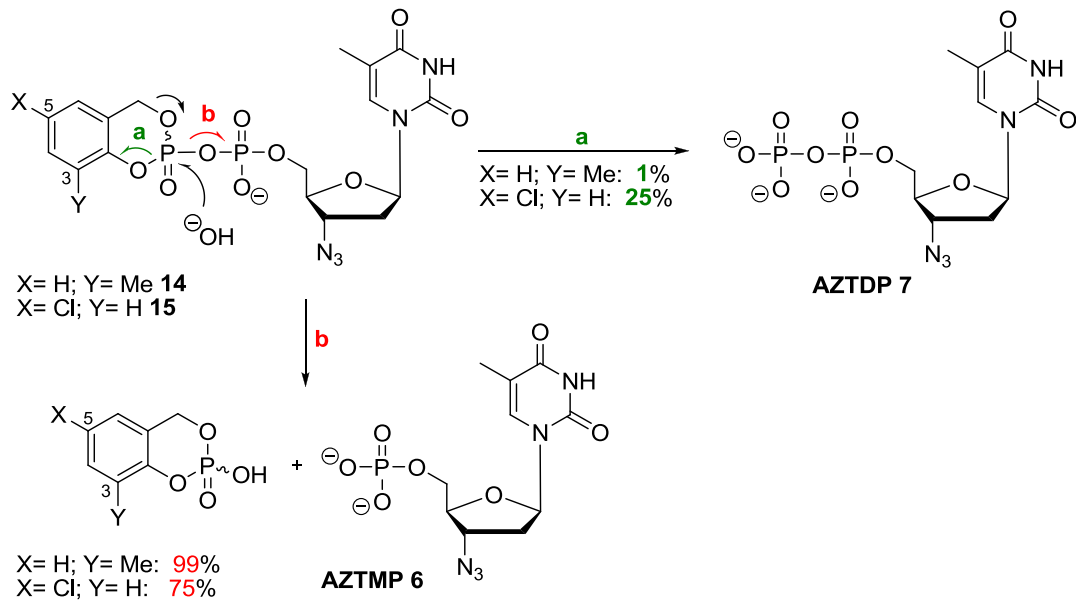


Abb. 14: Chemische Hydrolyse von *cycloSal*-AZTDP Prodrugs

Für die Derivate **14** und **15** wurden prinzipiell zwei mögliche Hydrolysewege angenommen. *H. Jessen* musste feststellen, dass beide Derivate nicht zur selektiven Freisetzung des Nucleosiddiphosphates geeignet waren. Die Spaltung der Phosphorsäureanhydridbindung dominierte in beiden Fällen (Weg b). Aus 3-Methyl-*cycloSal*-AZTDP **14** wurde lediglich 1% AZTDP **7** während der Hydrolyse in wässrigem Phosphatpuffer (pH 7.3) freigesetzt und als klar dominante Hydrolyseprodukte konnten AZTMP **6** sowie 3-Methyl-*cycloSal*-Phosphat **14** durch ^{31}P -NMR Experimente identifiziert werden. Aus diesem Resultat wurde abgeleitet, dass sogar die zweifach negativ geladene Phosphatgruppe (AZTMP) eine bessere Austrittsgruppe als das Phenolat ist (Weg b, $Y = \text{Me}$). Der 5-Chlor-Substituent an der *cycloSal*-Einheit sollte die Phenylphosphatbindung stärker destabilisieren und eine Hydrolyse über den Weg a zum gewünschten AZTDP **7** begünstigen. Tatsächlich konnte die freigesetzte Menge an AZTDP auf 25% gesteigert werden. Obwohl durch die Verbindung **15** der erhoffte Trend bewiesen werden konnte, war die gefundene Selektivität bei weitem nicht ausreichend, zumal der 5-Chlor-Substituent zu einer signifikanten Verringerung der Hydrolysehalbwertszeit von **15** führte. Eine Hydrolysekaskade, die über eine Aktivierung am α -Phosphat eingeleitet wird, schien daher ungeeignet für die Entwicklung eines NDP-Prodrug-Konzeptes zu sein. Aus diesen Gründen wurde die Idee verworfen, die *cycloSal*-Technologie zum Design von bioreversibel geschützten Nucleosiddiphosphaten einzusetzen.

2.3.2.4 Das Bis-(4-acyloxybenzyl)-nucleosiddiphosphat bzw. DiPPro

Konzept

Basierend auf den Ergebnissen der *cycloSal-AZTDP* Verbindungen konzipierte *H. Jessen* ein Prodrugsystem für Nucleosiddiphosphate, dessen Aktivierungsreaktion entfernt von der labilen Phosphorsäureanhydridbindung durch eine enzymatische oder chemische Reaktion eingeleitet werden kann. Hierzu adaptierte er das Bis-(AB)-Konzept und führte am β -Phosphat des Nucleosiddiphosphats zwei Bis-(4-Acetoxybenzyl)-Estergruppen ein. Um das BAB-NDP Konzept namentlich von BAB-NMP Konzepten abzugrenzen, wird es alternativ als DiPPro Konzept bezeichnet (DiPhosphateProdrug). Die Leitstruktur von Bis-(4-acyloxybenzyl)-nucleosiddiphosphate (BAB-NDP) **16** nach dem DiPPro Konzept und der enzymatisch bzw. chemisch induzierte Hydrolysemechanismus sind in Abb. 15 dargestellt. Die Freisetzung des Nucleosiddiphosphats aus der entsprechenden BAB-NDP Verbindung läuft über eine Hydrolysekaskade, wie sie für die Bis-(AB)-Nucleotide beschrieben wurde (Abb. 10).

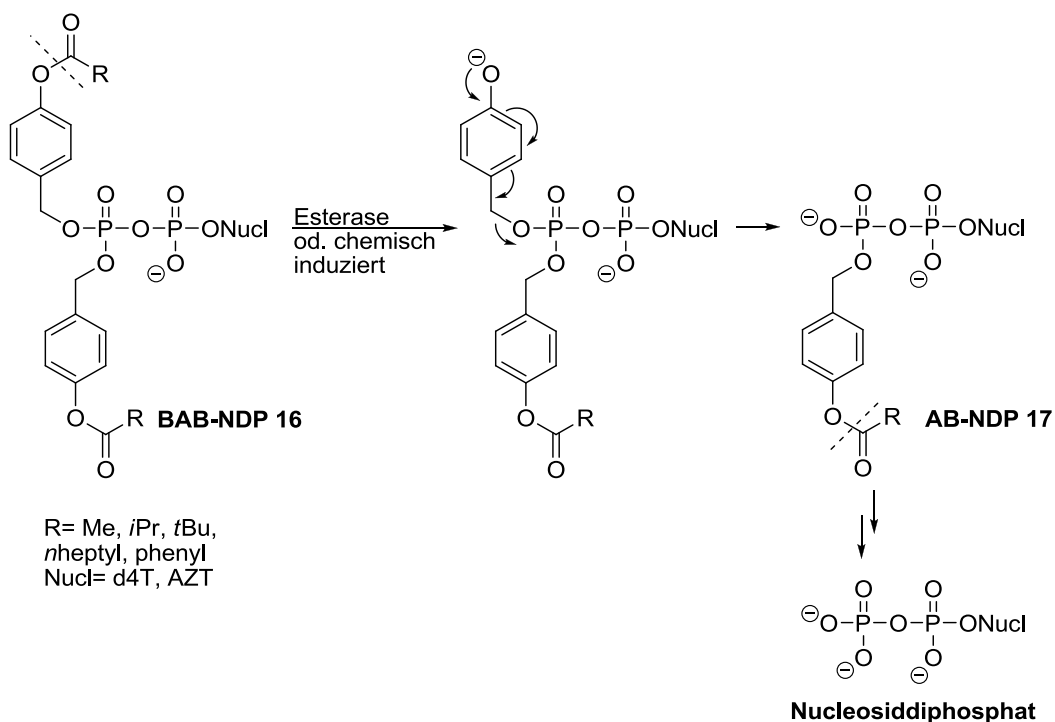


Abb. 15: Struktur der Bis-(4-acyloxybenzyl)-Nucleosiddiphosphate **17** und deren Hydrolyse zum NDP

Im ersten Schritt wird der Phenylcarbonsäureester chemisch oder enzymatisch gespalten und es kommt zu einer Umpolung der *para*-ständigen Gruppe, gefolgt von einer 1,6-Eliminierung, die zum Bruch der Benzylbindung führt.¹⁰⁴ Als relativ stabiles Intermediat

bildet sich das einfach geschützte (4-Acyloxybenzyl)-Nucleosiddiphosphat (AB-NDP) **17**, welches nach Wiederholung dieser Sequenz das Nucleosiddiphosphat freigibt. Um die chemischen Eigenschaften wie Lipophilie und Stabilität der potentiellen NDP-Prodrugs näher zu untersuchen, wurden BAB-NDP Verbindungen verschiedener Nucleosidanaloga mit unterschiedlichen Acylresten (R) synthetisiert.^{70,105} Es wurden hauptsächlich die (4-Hydroxymethyl)phenylester der Essigsäure, der *iso*-Buttersäure, der Pivalinsäure und der Benzoesäure zur Maskierung der β -Phosphateinheit von d4TDP bzw. AZTDP eingesetzt. Die Syntheseroute zur Darstellung dieser BAB-NDP Verbindungen wird u.a. im Kapitel 4.1 gemeinsam mit den Ergebnissen dieser Arbeit ausführlich diskutiert werden. Durch die Verfolgung der Hydrolyse dieser Verbindungen in wässrigem Phosphatpuffer, mit Hilfe der ³¹P-NMR Spektroskopie und HPLC-Analytik konnte die beschriebene Hydrolysekaskade nachvollzogen werden. So hydrolysierten Bis-(4-Acetoxybenzyl)-AZTDP und Bis-(4-Acetoxybenzyl)-d4TDP bei physiologischem pH-Wert vollständig über das 4-Acetoxybenzyl-Intermediat (AB-NDP) zu AZTDP bzw. d4TDP (Phosphatpuffer, pH 7.3). Die Reaktion lief also unabhängig von einer enzymatischen Aktivierung ab. Außerdem zeigten die Verbindungen erhebliche Stabilitäten in biologischen Medien (20-50% humanes Serum, RPMI-Kulturmedium, 10% fötales Kälberserum). Es konnte gezeigt werden, dass sich die Hydrolysestabilität der BAB-AZTDP Verbindungen in Abhängigkeit des Acylrestes (R= Me, *i*Pr, *t*Bu) erhöhte. Gleiches galt auch für die Hydrolyseintermediate (AB-AZTDP). Inkubationsstudien von Bis-(4-Acetoxybenzyl)-AZTDP in T-Lymphozyten-(CEM/0)-Zellextrakten zeigten eine drastische Beschleunigung der Spaltungsreaktion, da der Acetylcyster im Extrakt enzymatisch gespalten wurde. Im Vergleich zu den Halbwertszeiten bei der chemischen Hydrolyse in Phosphatpuffer, verlief die Bildung des AB-AZTDP in den Extrakten 500-fach schneller ($t_{1/2}$ = 2 min) und die zweite Hydrolyse zum AZTDP war 2500-fach schneller ($t_{1/2}$ = 3 min).¹⁰⁵ Nach diesen vielversprechenden Ergebnissen wurden die synthetisierten BAB-NDP Derivate in Kooperation mit Jan Balzarini von der Katholieke Universiteit Leuven in Belgien auf ihre antivirale Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 untersucht. Alle getesteten BAB-d4TDP und BAB-AZTDP Verbindungen zeigten im Vergleich zu d4T bzw. AZT bessere oder vergleichbare Aktivitäten.⁷⁰ Wichtig für die Bestätigung des Konzeptes waren die Ergebnisse, die Tests in einer HIV-2-infizierten mutierten T-Lymphozyten-Zelllinie lieferten. Diese Zellen exprimieren das Enzym Thymidinkinase aufgrund einer Mutation nicht (TK-defizient, CEM/TK⁻). Zumindest ein Derivat zeigte einen EC₅₀-Wert von 0.85 μ M ohne cytotoxisch zu sein, während d4T in dieser Mutante nur einen EC₅₀-Wert von 70 μ M zeigte. Dies belegte eindeutig, dass die Verbindung über die Zellmembran diffundieren konnte und intrazellulär aktive Metabolite

freisetzte. Allerdings zeigten nicht alle getesteten Derivate solch gute Ergebnisse, was auf eine fehlende Lipophilie der Verbindungen zurückgeführt wurde.⁷⁰

Die ersten Anwendungen des BAB-Konzeptes zur bioreversiblen Maskierung von Nucleosiddiphosphaten hatten vielversprechende Ergebnisse liefern können. Zur Verbesserung der biologischen Aktivitäten von BAB-Nucleosiddiphosphaten sollten weitere Schritte unternommen werden, wie z.B. die Erhöhung der Lipophilie, um eine bessere Membrangängigkeit dieser Verbindungen zu erreichen. Durch die gezielte Synthese und Untersuchung von weiteren BAB-NDP Verbindungen eines Nucleosids könnten wichtige Struktur-Wirkbeziehungen für zukünftige BAB-Nucleosiddiphosphate abgeleitet werden. Außerdem wäre es interessant, wenn auch die Triphosphate von antiviral aktiven Nucleosidanaloga so bioreversibel geschützt werden könnten, dass sie intrazellulär das entsprechende NTP freisetzen. In diesem Fall würden alle notwendigen Phosphorylierungsschritte umgangen werden (vergl. Abb. 11).

3 Aufgabenstellung

Nachdem in Vorarbeiten erstmalig gezeigt wurde, dass sich Nucleosiddiphosphate unter Verwendung von Bis-(4-acyloxybenzyl)-Einheiten reversibel maskieren lassen, sollten die Eigenschaften dieser neuen NDP-Prodrug Klasse hinsichtlich Lipophilie, Hydrolyseverhalten und biologischer Aktivität optimiert werden.

Um diese Aufgabe realisieren zu können, sollte eine Reihe von BAB-NDP Verbindungen mit unterschiedlichen Acylresten (R) synthetisiert werden und d4T als Modellnucleosid eingesetzt werden. Die Variation des Acylrestes unter Verwendung langkettiger Carbonsäuren sollte die Lipophilie der BAB-d4TDP Derivate erhöhen und so ihre Membrangängigkeit verbessert werden können. Eine mögliche Struktur-Wirkung-Beziehung sollte aus den Stabilitäten und Hydrolyseeigenschaften in unterschiedlichen biologischen Medien und Puffersystemen abgeleitet werden und der Hydrolysemechanismus detailliert untersucht werden. Hierzu sollte ein Zugang zu dem einfach maskierten Hydrolyseintermediat (AB-d4TDP) gefunden werden. Nach erfolgreicher Einstellung der Synthese- und Chromatographiemethodik auf die veränderten Eigenschaften der alkylfunktionalisierten BAB-d4TDP Verbindungen sollte eine entsprechende BAB-AZTDP Verbindung synthetisiert und ihre Eigenschaften untersucht werden. Rückschlüsse über die effektive Diffusion der Verbindungen durch die Zellmembran und die Freisetzung der phosphorylierten Wirkstoffe sollten aus den antiviralen Tests gezogen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-NDP Prodrugs verschiedener Ribo- und 2'-Desoxyribonucleosidanaloga wie *D-carba*-dT, BVdU, 2'-Fluor-2'-methyluridin und 2'-Methyluridin, dargestellt werden. Anschließend sollten die Stabilitäten dieser Verbindungen in unterschiedlichen Medien ermittelt werden und untersucht werden, ob die funktionellen Gruppen der Ribose- bzw. Desoxyriboseeinheit einen Einfluss auf den Hydrolysemechanismus haben.

Erstmalig sollte ein Nucleosidtriphosphat reversibel maskiert werden, um einen Zugang zu potentiellen NTP Prodrugs antiviraler Wirkstoffe zu erhalten. Zur mechanistischen Interpretation der chemisch bzw. enzymatisch induzierten Hydrolysekaskade vom BIB-d4TTP zum IB-d4TTP und schließlich zum d4TTP sollten die postulierten Metabolite synthetisiert werden. Die Eignung eines BAB-NTP als Nucleosidtriphosphat-Prodrug sollte

durch Abbaustudien in unterschiedlichen Medien und antivirale Untersuchungen ermittelt werden.

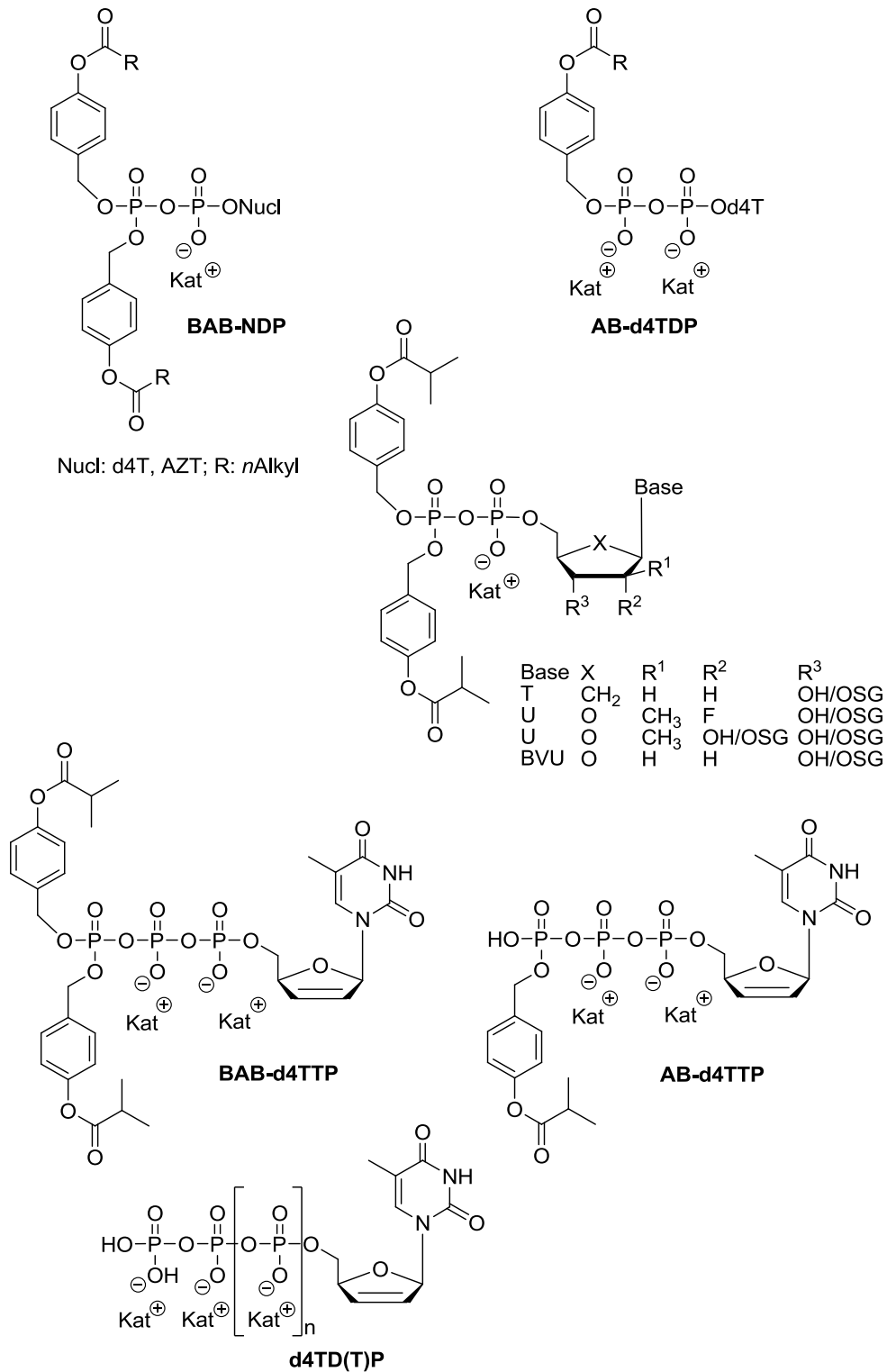


Abb. 16: Zielstrukturen: Bis-(4-acyloxybenzyl)-Nucleosiddi- und -triphosphate, AB-d4TDP, AB-d4TTP, d4TDP und d4TTP

4 Resultate und Diskussion

4.1 Synthese der Bis-(4-acyloxybenzyl)-Nucleosiddiphosphate

In diesem Kapitel wird die Synthese einer Vielzahl von BAB-Nucleosiddiphosphaten vorgestellt. Die Arbeit auf diesem Gebiet lässt sich prinzipiell in zwei Teile gliedern. Auf der einen Seite sollte eine Reihe von lipophil funktionalisierten BAB-d4TDP Prodrugs dargestellt werden, um die Eigenschaften der bioreversibel geschützten NDPs näher untersuchen zu können. Auf der anderen Seite sollte das BAB-Konzept auf verschiedene antiviral aktive Nucleosidanaloga übertragen werden, um die generelle Anwendbarkeit der Syntheseroute und des Prodrug-Konzeptes unter Beweis zu stellen. Auch die Möglichkeit zur Modifikation der allgemeinen BAB-NDP Struktur **16** durch Veränderung der Pyrophosphateinheit soll diskutiert werden. Im Prinzip sollten all diese Verbindungen über die Kupplung eines entsprechenden Nucleosidmonophosphats **13** mit einem geeigneten Bis-(4-acyloxybenzyl)-*N,N*-Diisopropylphosphoramidit **18** synthetisch zugänglich sein (Abb. 17).⁷⁰

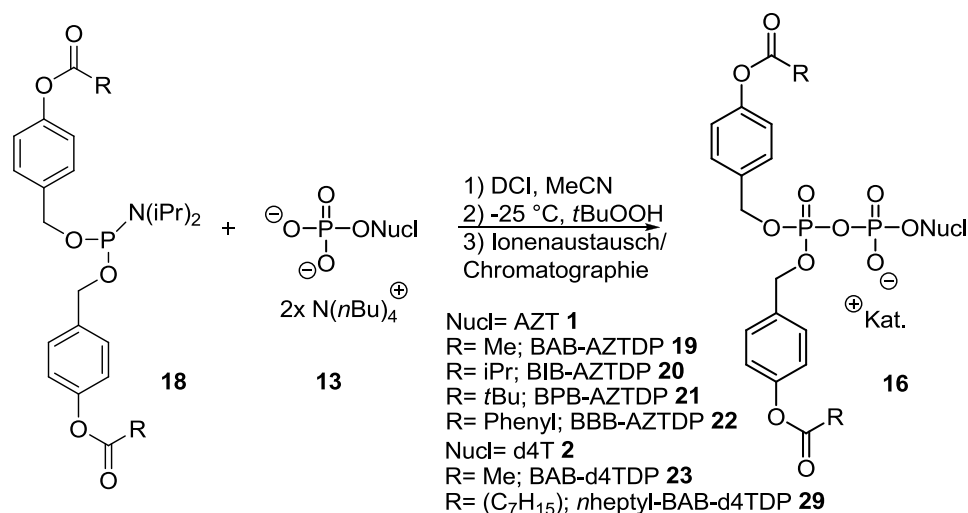


Abb. 17: Allgemeines Syntheschema zur Darstellung von BAB-NDP Prodrugs und in Vorarbeiten dargestellte BAB-d4TDP und BAB-AZTDP Prodrugs⁷⁰

4.1.1 Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)-d4TDPs mit lipophilen (4-Acyloxybenzyl)-Einheiten

H. Jessen gelang über die in Abb. 17 gezeigte Synthesemethode die Darstellung verschiedener NDP Prodrugs, hauptsächlich solcher des AZT **1** und des d4T **2**. Um die Lipophilie, Stabilität und die antiviralen Eigenschaften der potentiellen NDP-Prodrugs näher zu untersuchen, wurden von ihm Derivate mit unterschiedlichen Acylresten (R) dargestellt. Es handelte sich um den Methyl-, Isopropyl-, *tert*-Butyl-, *n*-Heptyl- und Phenylrest (s. Abb. 17). Zur Synthese wurde das entsprechende NMP **13** als Bis-(tetra-*n*-butyl)-ammoniumsalz in Acetonitril aufgenommen und über Molsieb getrocknet, bevor es mit 1.6 bis 1.8 Äquivalenten des jeweiligen *N,N*-Diisopropylphosphoramidits **18** unter Zusatz von 4,5-Dicyanoimidazol umgesetzt wurde. Nach beendetem Umsatz des NMPs wurde mit *tert*-Butylhydroperoxid oxidiert, die Lösungsmittel entfernt und die erhaltenen Rohgemische gereinigt. *H. Jessen* konnte die von ihm synthetisierten Verbindungen in der Regel an RP-18 Kieselgel mit Methanol-Wasser-Gradienten oder mit Acetonitril-Wasser-Gradienten von Nebenprodukten und nicht umgesetzten Edukten trennen. Die Verbindungen mussten in den meisten Fällen zweimal chromatographiert werden, da während der ersten Chromatographie nur DCI und das nicht umgesetzte NMP abgetrennt werden konnte. Die in Abb. 17 gezeigten Verbindungen konnten als Ammoniumsalze besser gereinigt werden und lagen nach abschließender Gefriertrocknung als farblose Watten vor, während die entsprechenden Tetra-*n*-butylammoniumsalze als hygroskopische Harze erhalten wurden. Deshalb wurden nach der ersten Chromatographie die vorliegenden Kationen gegen Ammoniumionen ausgetauscht. Allerdings kam es beim Austausch der Kationen zu einer teilweisen Spaltung der Phosphorsäureanhydridbindung. Am Ende seiner Arbeiten konnte *H. Jessen* diesen Prozess verbessern, indem er die zweite Chromatographie mit einem Ammoniumformiatpuffer anstelle von Wasser durchführte. Wie unter Kapitel 2.3.2.4 beschrieben wurde, setzten diese Verbindungen Nucleosiddiphosphate frei. Allerdings schien die fehlende Lipophilie die antiviralen Aktivitäten einiger Verbindungen zu beeinträchtigen.¹⁰⁵ Aus diesem Grund sollte die negative Ladung des α -Phosphats stärker kompensiert werden, um den passiven Membrantransport zu verbessern. Theoretisch wäre dies über eine zusätzliche Maskierung am α -Phosphat denkbar (Abb. 18).

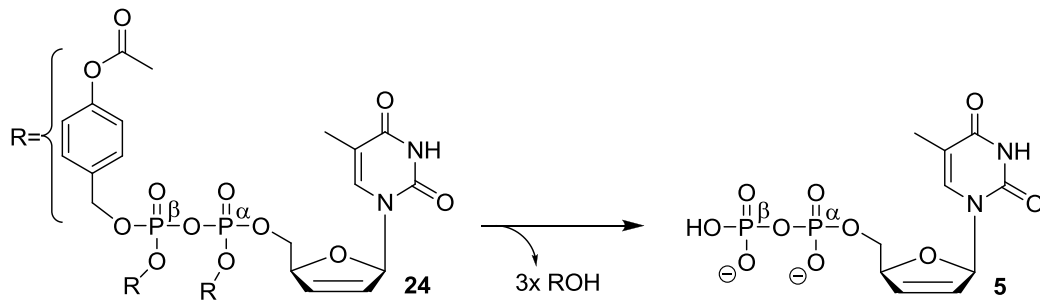


Abb. 18: Dreifach maskiertes d4TDP (Tris-(4-acyloxybenzyl)-d4TDP **24** (Dissertation *H. Jessen*⁷⁰)

Die Synthese einer solchen Verbindung **24** gelang jedoch nicht. Bei der Synthese dieser Verbindung durch *H. Jessen* zeigte sich nochmals, dass sich die Geschwindigkeit einer hydrolytischen Spaltung durch die vollständige Maskierung der drei negativen Ladungen stark erhöht. Die Phosphorsäureanhydridbindung eines Nucleosiddiphosphats ist inhärent labil und nur aufgrund ihrer bei physiologischem pH-Wert vorliegenden negativen Ladungen kinetisch stabilisiert. Ein nucleophiler Angriff auf die Diphosphateinheit wird so geschwächt. Ein Fehlen aller drei Ladungen führte zum sofortigen Bindungsbruch. Aus diesem Grund waren die strukturellen Eigenschaften für ein lipophiles BAB-NDP Prodrug vorgegeben und das Grundgerüst **16** der BAB-NDPs sollte nicht verändert werden. Um die Lipophilie der Verbindung **16** gezielt zu modulieren, sollten Acylester mit langkettigen Alkylresten (R) Verwendung finden. Durch diese Arbeiten sollte geprüft werden, ob es einen Schwellenwert für die Lipophilie gibt, ab dem die BAB-NDP-Derivate ausreichend lipophil sind, um durch die Membran zu diffundieren. Um die veränderten Eigenschaften der BAB-NDP Prodrugs, die sich durch die Derivatisierung der maskierenden Acyloxybenzyleinheiten ergeben sollten, analysieren zu können, sollte eine Reihe an BAB-NDP Verbindungen mit d4T als Modellnucleosid synthetisiert werden. Zum einen ist d4T synthetisch sehr leicht zugänglich und kostengünstig darstellbar (Abb. 25, Synthese von d4T) und zum anderen ist seine enzymatische Phosphorylierung kinetisch gehemmt (s. 2.2.1). Zudem lässt die antivirale Aktivität von BAB-d4TDP Derivaten in HIV infizierten CEM/TK Rückschlüsse auf den passiven Membrantransport der Zielverbindungen zu (vergl. 2.3.2.4). Die in der Arbeitsgruppe vorhandene Expertise in Bezug auf *cycloSal*-d4TMPs sollte ebenfalls bei der vergleichenden Interpretation von antiviralen Daten, der Synthese von Referenzverbindungen und der Durchführung von Hydrolysestudien helfen.^{72,103} Außerdem war nach der Synthese von Bis-(4-octanoyloxybenzyl)-d4TDP **29** bekannt, dass sich fettsäuremodifizierte BAB-d4TDP Verbindungen darstellen lassen und sie zur bioreversiblen Maskierung von d4TDP durchaus geeignet sind.^{70,105}

4.1.1.1 Zielverbindungen und Synthesestrategie

Eine Reihe an funktionalisierten Bis-(4-acyloxybenzyl)-d4TDPs **26-34** sollte dargestellt werden, um anschließend den Einfluss der unterschiedlichen Acylmodifikationen studieren zu können. Die Verbindungen **36** und **37** sollten zum besseren Verständnis des Hydrolysemechanismus dargestellt werden (Abb. 19). Die Verbindung **36** sollte über die Hydrolyse von **30** oder aus der Verbindung **37** zugänglich sein.

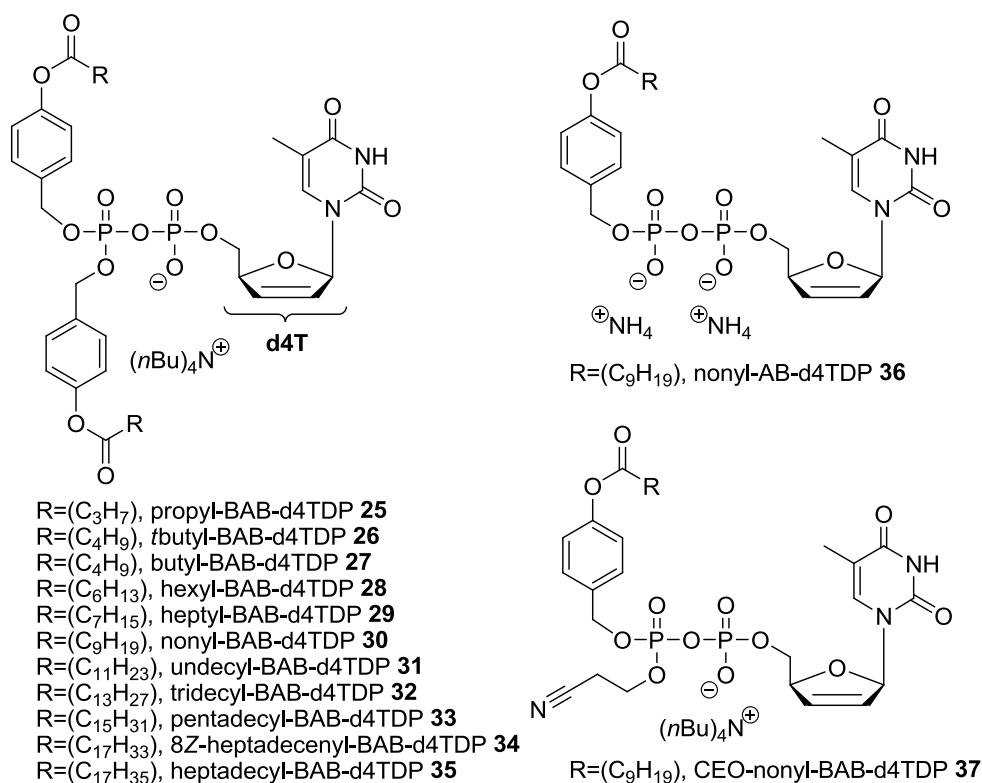


Abb. 19: BAB-d4TDP Zielverbindungen **26-34**, C9-AB-d4TDP **36** und CEO-C9-AB-d4TDP **37**

Um die Reihe an funktionalisierten Bis-(4-acyloxybenzyl)-d4TDPs **25-34** zu synthetisieren, sollte eine konvergente Syntheseroute verwendet werden. Nach retrosynthetischer Analyse sieht sie den Aufbau der Pyrophosphateinheit am Ende vor. Diese Reaktionsfolge hat den großen Vorteil, dass die unterschiedlich in der Position R modifizierten Bis-(4-acyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite **18** mit verschiedenen Nucleotiden gekuppelt werden könnten. Die entsprechenden Nucleotide, hier d4TMP **3**, müssten linear aufgebaut werden und ebenso die Bis-(4-acyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite **18**. Als letzten Reaktionsschritt sieht diese Route eine Dicyanoimidazol vermittelte Kupplung des entsprechenden Phosphoramidits **18** mit dem zu wählenden Di-(tetra-*n*-butylammonium)-Salz des Nucleotids und abschließender Oxidation durch *tert*-

Butylhydroperoxid vor. Für eine derartige Kupplung wird Di-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP **3b** benötigt, welches aus dem Nucleosid nach einem Protokoll von *T. Sowa* und *F. Ouchi* zugänglich ist.¹⁰⁶ Die jeweiligen Phosphoramidite **18** sollten aus dem P(III)-Reagenz **41** und aus den entsprechenden Phenylestern **40** darstellbar sein. Die in der Position R modifizierten Phenylester sollten durch eine Acylierung von kommerziell erhältlichem 4-Hydroxybenzylalkohol **39** mit den Alkylcarbonsäurechloriden **38** dargestellt werden. Die Synthese des P(III)-Reagenzes **41** sollte durch Umsetzen von *N,N*-Diisopropylamin mit Phosphorylchlorid gelingen.

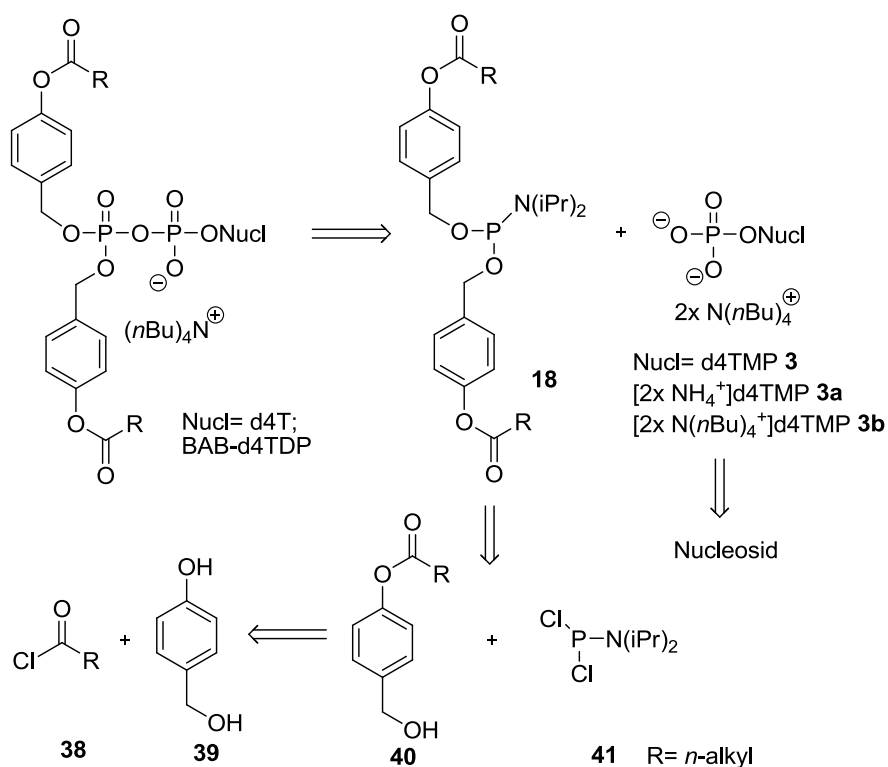


Abb. 20: Retrosyntheseschema zur Darstellung von BAB-NDP bzw. BAB-d4TDP Prodrugs

Die von *H. Jessen* für die BAB-NDP Prodrugs eingeführte Nomenklatur soll an die neuen Verbindungen angepasst werden. Die generelle Schreibweise für die Verbindungen soll erhalten bleiben: **Bis-(4-AcyloxyBenzyl)-NucleosidDiPhosphat**, also **BAB-NDP**. Um die langkettigen Acylreste im Namen berücksichtigen zu können, soll die Benennung in Anlehnung an die von Fettsäurederivaten¹⁰⁷ erfolgen, während die für verzweigte Alkylreste (R) weiter bestehen bleiben soll:

Bis-(4-AcetoxyBenzyl)-NDP: BAB-NDP

Bis-(4-Iso-butyroxyBenzyl)-NDP: BIB-NDP

Bis-(4-PivaloyloxyBenzyl)-NDP:
BPB-NDP

Bei der Nomenklatur für die BAB-NDPs wird die Verknüpfung der beiden 4-Acyloxybenzyleinheiten an das β -Phosphoratom der Pyrophosphateinheit nicht gesondert kenntlich gemacht. Abweichungen von diesem Substitutionsmuster an der Diphosphatgruppe werden durch die Präfixe α - bzw. β - kenntlich gemacht.

	Alkylrest R=(C ₁₁ H ₂₃)	Bis-(4-AcyloxyBenzyl)-	NucleosidDiPhosphat
Name	undecyl-	BAB-	NDP
alternativ	C11-	BAB-	NDP

Für monomaskierte Nucleosiddiphosphate soll gelten: (4-AcyloxyBenzyl)-NDP, also **AB-NDP**. Für monomaskierte Nucleosiddiphosphate mit einem verzweigten Alkylrest kann in Analogie auch **IB-NDP** anstelle von (4-*Iso*-butyryloxyBenzyl)-NDP geschrieben werden.

Aus der retrosynthetischen Analyse der Synthese der BAB-d4TDPs ging hervor, dass für den finalen Kupplungsschritt zum Aufbau der Pyrophosphateinheit einige Vorstufen notwendig sind. Wie bereits erwähnt wurde, sollte die lipophile Funktionalisierung durch den Alkylrest R eingeführt werden. Dies sollte durch die direkte Veresterung von 4-Hydroxybenzylalkohol **39** mit unterschiedlichen Carbonsäurechloriden geschehen und auf eine hohe Selektivität verzichtet werden. Zum einen, da die Edukte für die Reaktion sehr kostengünstig zu erwerben waren und zum anderen, da die Nebenprodukte chromatographisch leicht abzutrennen sein sollten.^{70,108-110}

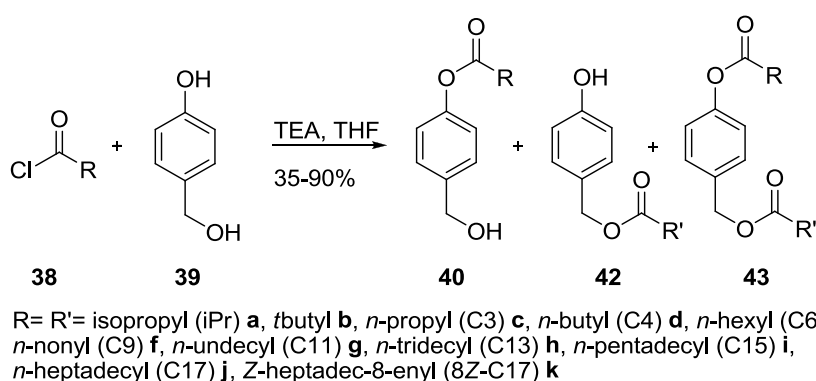


Abb. 21: Synthese der 4-Hydroxymethylphenylester **40a-k**

Ob Letzteres auf die Verwendung von langkettigen Alkylcarbonsäurechloriden zutreffen würde, sollte untersucht werden. Um die Bildung der Nebenprodukte nach Möglichkeit

gering zu halten, wurden nur 1.0-1.3 Äquivalente des Säurechlorids verwendet. Zur Deprotonierung der phenolischen Hydroxygruppe wurde genau ein Äquivalent Triethylamin zugesetzt, welches gleichzeitig das entstehende Hydrochlorid als Triethylammoniumchlorid abfing. Die Reaktionen wurden bei tiefer Temperatur gestartet (0 °C) und nach einigen Stunden auf Raumtemperatur erwärmt. Die Bildung der 4-Hydroxybenzylester **42** und der Diester **43** konnte minimiert werden und die Produkte **40a-k** in guten bis sehr guten Ausbeuten erhalten werden. Die 4-Hydroxybenzylester **42** wurden durch wässrige Aufarbeitung abgetrennt, während die Diester **43** durch Kristallisation bzw. Chromatographie entfernt werden mussten. Die Kristallisation der Phenylester mit Alkylresten (C3-C7) war nicht möglich.

Verbindung	Alkylrest R	Säurechlorid	Reinigungsmethode	Ausbeute [%]
40a	iPr	<i>iso</i> -Butyrylchlorid	A	39
40b	<i>t</i> Bu	Pivalinsäurechlorid	B	44
40c	C3	Buttersäurechlorid	A	53
40d	C4	Valeriansäurechlorid	A	46
40e	C6	Heptansäurechlorid	A	56
40f	C9	Decansäure	C	57
40g	C11	Laurinsäurechlorid	C	40
40h	C13	Myristoylchlorid	D	70
40i	C15	Palmitinsäurechlorid	C	36
40j	C17	Stearinsäurechlorid	C	57
40k	8Z-C17	Ölsäurechlorid	C	27

A: Chromatographie; B: nicht quantitative (n. q.) Kristallisation; C: n. q. Kristallisation gefolgt von Chromatographie; D: mehrfache Kristallisation

Tabelle 1: Synthese der (4-Hydroxymethyl)phenylester **40a-k**

Die Phenylester mit Alkylresten (C \geq 9) ließen sich prinzipiell kristallisieren. Die Kristallisation blieb jedoch in den meisten Fällen unvollständig, so dass sie mehrfach wiederholt wurde. Nachdem dieses Verhalten bekannt war, wurde der ersten Kristallisation eine

Chromatographie angeschlossen. Dieses Vorgehen führte zu Ausbeuteverlusten. Es sei angemerkt, dass erhaltene Produktmischfraktionen nach der ersten Chromatographie nicht ein weiteres Mal gereinigt worden sind. Die Verbindungen konnten dennoch in guten bis sehr guten Ausbeuten im Multigramm-Maßstab (bis ca. 9 g) erzeugt werden.

Bei der Synthese von (4-Hydroxymethyl)phenylundecanoat **40g** wurde bei der Säulenchromatographie 4-(Undecyloxymethyl)phenylundecanoat **43g** als Nebenprodukt in einer Ausbeute von 24% isoliert und charakterisiert (Abb. 22).

Aufgrund der verschiedenen Reinigungsmethoden war eine vernünftige Quantifizierung der Nebenprodukte nicht möglich. Deshalb wurde bei anderen Chromatographien auf die Isolierung des Diesters **43** verzichtet. Außerdem hätte der ebenfalls entstehende Benzylester **42** nicht quantifiziert werden können, da er hauptsächlich bei der wässrigen Aufarbeitung der Rohgemische abgetrennt wurde. Als ein Ergebnis der zunehmenden Lipophilie reicherte sich dieses Nebenprodukt **42** in immer größeren Mengen auch in der organischen Phase an und konnte erst bei der Chromatographie entfernt werden.

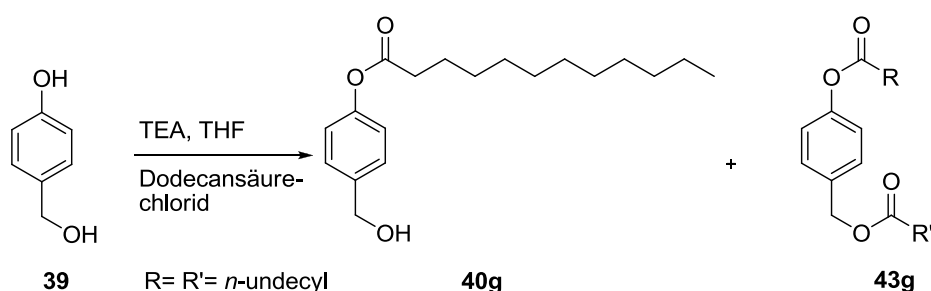


Abb. 22: Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylundecanoat **40g** und 4-(Undecyloxymethyl)phenylundecanoat **43g**

Nach dem gleichen Syntheseverfahren wurden drei aromatisch funktionalisierte 4-(Hydroxymethyl)phenylester des Hydroxybenzylalkohols **39** dargestellt. Hierfür wurden Benzoylchlorid, *p*-Fluorbenzoylchlorid und *p*-Chlorbenzoylchlorid verwendet. Die Ester 4-(Hydroxymethyl)phenylbenzoat, 4-(Hydroxymethyl)phenyl-*p*-fluorbenzoat und 4-(Hydroxymethyl)phenyl-*p*-chlorbenzoat wurden in Ausbeuten bis zu 70% erhalten. Die lipophile Modifikation von BAB-NDP Verbindungen wurde in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt, weil der Schwerpunkt auf Modifikationen mit Fettsäuren gelegt war. Die erhaltenen 4-(Hydroxymethyl)phenylbenzoate konnten von *L. Richter* zur Derivatisierung von BAB-NDPs eingesetzt werden.¹¹¹ Nachdem nun eine ganze Reihe von 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoaten **40a-k** synthetisiert worden war, sollten aus diesen Verbindungen die Acyloxybenzylphosphoramidite **18** dargestellt werden.

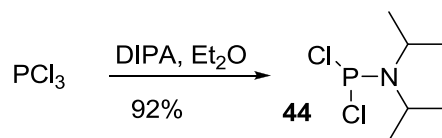


Abb. 23: Synthese von Dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **44**

Zur Synthese dieser Phosphoramidite **18** wurde als Edukt Dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **44** dargestellt. Dies gelang durch Umsetzen von destilliertem *N,N*-Diisopropylamin (DIPA) mit dest. Phosphortrichlorid in trockenem Diethylether. Nach kurzen Reaktionszeiten (bis max. 2 h) und Schlenkfiltration wurde das Produkt erhalten. Seine Reinheit wurde mittels ^1H - und ^{31}P -NMR Spektroskopie überprüft. In einigen Fällen musste die Schlenkfiltration wiederholt werden. Das Produkt konnte bei $-26\text{ }^\circ\text{C}$ über mehrere Monate gelagert werden.

Aus den 4-(Hydroxymethyl)phenylalkanoaten **40a-k** und **44** konnten nun die Acyloxybenzylphosphormidite **45-53** in Tetrahydrofuran (THF) unter Zusatz von zwei Äquivalenten Triethylamin nach einem abgeänderten Protokoll von *E. Uhlman* und *J. Engels* synthetisiert werden.¹¹² Nach Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur wurden die Rohprodukte durch Filtration im Stickstoffgegenstrom vom Hydrochlorid befreit. *H. Jessen* hatte die von ihm benötigten Phosphoramidite mit Hilfe der zirkulären präparativen Chromatographie (Chromatotron) reinigen können. Vermutlich aufgrund der erhöhten Lipophilie ließen sich die Phosphoramidite **48-53** so nicht chromatographieren. Um das jeweilige Produkt von den nicht identifizierten Nebenprodukten sauber trennen zu können, wurden längere Verweilzeiten auf dem Chromatotron und somit andere Laufmittelgradienten benötigt. Dieses Zusammenspiel führte bei den ersten Versuchen immer zur Zersetzung der Produkte. Insbesondere die Synthesen von Bis-(4-decanoyloxybenzyl)- und Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **50** bzw. **51** wurden in diesem Zusammenhang mehrmals als Testreaktionen wiederholt. Da letztlich nicht mehr sicher war, ob die Reaktion funktioniert hatte, wurde die Synthese zu **44** wiederholt. Die NMR-Spektren waren jedoch identisch mit denen des zuvor dargestellten Dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidits **44** und denen aus der Literatur.¹¹² Eine MS-Analyse konnte aufgrund der hohen Reaktivität dieser Verbindung nicht durchgeführt werden. Die Reaktion zum Amidit **50** wurde ein weiteres Mal wiederholt und in diesem Fall das Rohgemisch unter Schlenkbedingungen filtriert und eine ^{31}P -NMR-Analyse durchgeführt. Aus dem erhaltenen Spektrum konnte auf die Bildung des Produktes geschlossen werden. Damit war sicher, dass die vorige Fehlerquelle entweder die Filtration

oder die Chromatographie-Bedingungen waren. In Vorarbeiten waren die Produkte problemlos für kurze Zeit an der Luft gehandhabt worden, so dass die Filtration im Stickstoffgegenstrom (semi-Schlenk-Bedingung) als Fehlerquelle ausgeschlossen wurde und die Bedingungen der Chromatographie näher untersucht wurden. Phosphoramidite sind in der Regel etwas säurelabil. Um die sauren Eigenschaften des gipshaltigen Kieselgels zu kompensieren, wurde dem Laufmittelgemisch 5-10% Triethylamin zugesetzt. Die Produkte konnten nach dieser Änderung in guten bis sehr guten Ausbeuten sauber isoliert werden. Die Reinigung der BAB-d4TDP Verbindungen **26-37** wurde zur hauptsächlichen Schwierigkeit bei deren Darstellung. Deshalb war es sehr wichtig, dass die eingesetzten Phosphoramidite **48-53** von hoher Reinheit waren. Eine mehrfache Chromatographie war deshalb in vielen Fällen unvermeidlich, was zu Ausbeuteverlusten führte und die schlechteren Ausbeuten in den Fällen **45**, **48** und **52** begründen dürfte. Die unterdurchschnittliche Ausbeute von **53** hing damit zusammen, dass dies eines der ersten langkettigen Amidite war, welches synthetisiert wurde. Seine Synthese wurde nicht wiederholt.

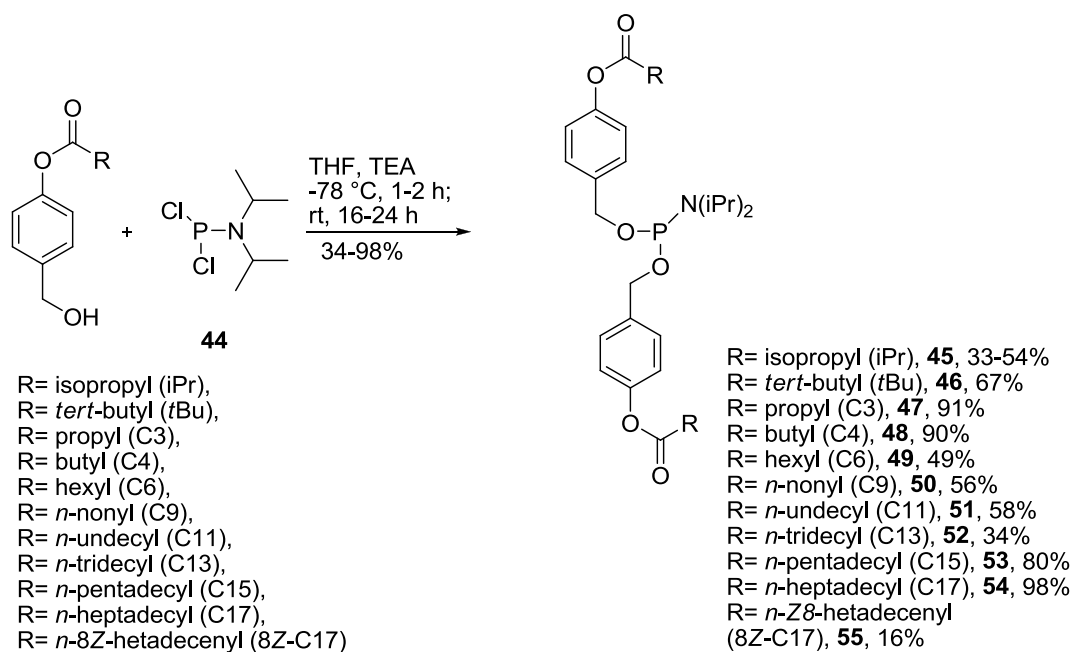


Abb. 24: Synthese der Phosphoramidite **45-53**

Nachdem die verzweigtmodifizierte Phosphoramidite **45,46** und die fettsäuremodifizierte Phosphoramidite **48-53** synthetisiert worden waren, fehlte zur Synthese der Zielverbindungen noch das Nucleosidmonophosphat d4TMP **3b**.

Zur Darstellung von d4TMP **3** musste das Nucleosid d4T **2** ausgehend von 2'-Desoxythymidin (dT) synthetisiert werden. Bei dieser Synthese konnte auf eine bereits etablierte Methode zurückgegriffen werden.^{68,113,114} Da d4T **2** ein sehr wichtiger Baustein der hier vorgestellten Arbeiten war, soll die Syntheseroute die in Details verändert wurde, kurz wiedergegeben werden. Im ersten Schritt wurden die freien Hydroxygruppen des Thymidins durch Zugabe von Methansulfonylchlorid in Pyridin mesyliert. 3',5'-O-Dimesylthymidin konnte nach Kristallisation in einer sehr guten Ausbeute von max. 92% erhalten werden und wurde durch Zugabe von Natronlauge in die 3',5'-Anhydro-Verbindung überführt. Nach wässriger Aufarbeitung und Kristallisation konnte das Produkt in einer Ausbeute von 65% isoliert werden. Durch eine E2-Eliminierung mit der nicht nucleophilen Base Kalium-*tert*-butanolat erhielt man d4T **2**. Zur Reinigung der hydrophilen Verbindung wurde in früheren Vorschriften stets neutralisiert und mit Ethylacetat extrahiert.^{114,115}

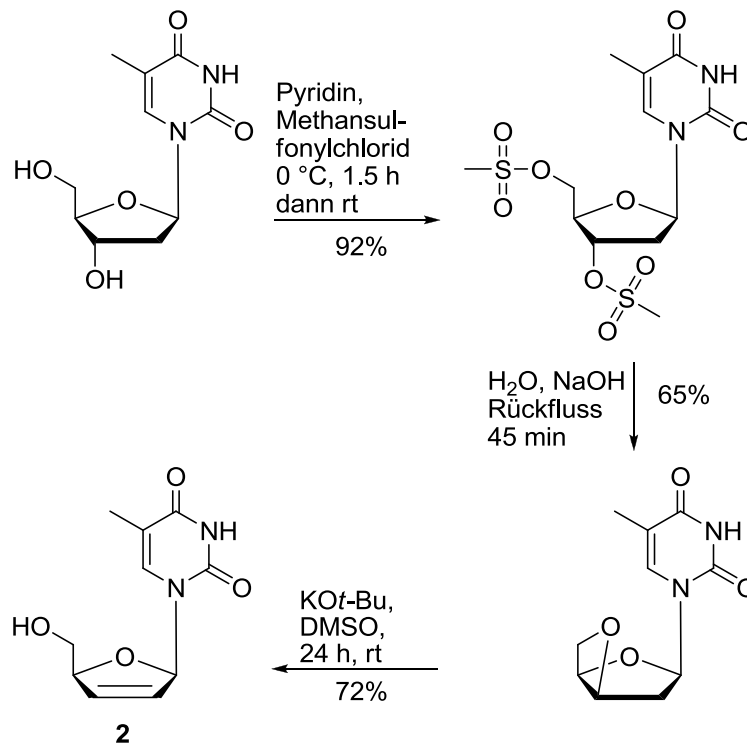


Abb. 25: Synthese von d4T **2** über drei Stufen

Aufgrund der Polarität von d4T führte diese Vorgehensweise jedoch zu Ausbeuteverlusten. C. Ducho wandelte diese Vorschrift ab. Er erhielt das Produkt nach Gefriertrocknung der wässrigen Phase und einer anschließenden Chromatographie in einer Ausbeute von 40%.⁶⁸ Um die Chromatographie zu vermeiden wurde ebenfalls gefriergetrocknet, der erhaltene

Schaum in sehr wenig Wasser aufgenommen und mehrmals mit einem deutlichen Überschuss an Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde eingeeengt und das Produkt bei 4 °C kristallisiert. Die Ausbeute konnte auf 72% gesteigert werden.

Um die 5'-O-Position von Nucleosiden selektiv zu phosphorylieren, entwickelten *T. Sowa und F. Ouchi*¹⁰⁶ eine Methode von *Yoshikawa et al.*¹¹⁶ weiter. Es hatte sich gezeigt, dass diese Methode auch für die Phosphorylierung von d4T sehr gut geeignet ist, obwohl d4T keine weiteren Hydroxygruppen neben der in 5'-O-Position besitzt.¹⁰⁵ Zur Synthese von d4TMP **3a** wurden zunächst Wasser, Pyridin und Phosphorylchlorid in einem bestimmten molaren Verhältnis zueinander in Acetonitril vorgelegt. Nach *T. Sowa und F. Ouchi*¹⁰⁶ bildet sich so das Tetrachlorpyrophosphat **56**, wobei unterstellt wird, dass die Chloridionen und Pyridin bei einem Mischungsverhältnis von 2:1:2 (Phosphorylchlorid/Wasser/Pyridin (mol/mol/mol)) einem dynamischen Austausch unterliegen. In Verbindung mit dem Nucleosid bildet sich das Nucleosid-Pyrophosphat-Addukt **57**, welches durch die Zugabe von Ammoniumhydrogencarbonat in das entsprechende 5'-O-Nucleosidmonophosphat und Pyrophosphat zerfällt. Die Reaktion wurde mehrfach wiederholt und dabei zeigte sich, dass die angegebenen Mischungsverhältnisse sehr genau einzuhalten waren, obwohl d4T nur eine freie Hydroxygruppe besitzt. Die verwendeten Lösungsmittel und Reagenzien sollten also unbedingt trocken sein und bei Zugabe des Wassers zu der Lösung aus Phosphorylchlorid und Pyridin in Acetonitril musste mit äußerster Vorsicht vorgegangen werden, damit es nicht zur Bildung von Nebenprodukten bzw. Ausbeuteverlusten kam.

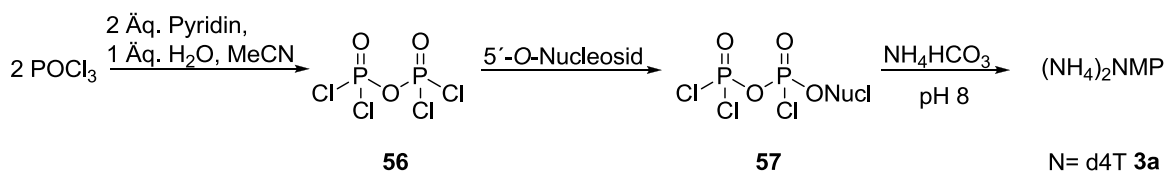


Abb. 26: Synthese von Nucleosidmonophosphaten nach *T. Sowa und F. Ouchi*¹⁰⁶

Um die Dosierung der Äquivalente Wasser zu erleichtern, bot es sich an, die Reaktionsansätze in größeren Maßstäben durchzuführen. Das NMP liegt nach dieser Reaktion immer als Ammoniumsalz vor. In Abb. 26 wurde das NMP zur Vereinfachung als Bis-Ammoniumsalz gezeichnet. Das stimmt wahrscheinlich mit der Realität nicht ganz überein, da das Rohgemisch nach Gefriertrocknung erhalten wurde und man von einem Ausgasen des Ammoniaks unter teilweiser Protonierung der Phosphatgruppe ausgehen sollte.⁷⁰ Bei der Berechnung der prozentualen Ausbeute in Bezug auf die eingesetzte Menge an Nucleosid wurde immer von zwei Ammoniumionen ausgegangen, da sich der

anteilige Austausch etwa durch Protonen oder Natriumionen kaum bemerkbar macht. d4TMP **3a** musste nach Reaktion und Gefriertrocknung von den entstandenen Phosphatsalzen gereinigt werden, welche sich aus dem überschüssigen Phosphorylchlorid durch die Hydrolyse bildeten. Für die Chromatographie des Rohproduktes bot sich die Verwendung von RP-18 Kieselgel an. Um d4TMP vom Phosphat zu trennen, wurde Wasser als Laufmittel verwendet. Eine Trennung von d4TMP und Phosphatsalz war auf diese Weise möglich, musste allerdings in den meisten Fällen zwei bis dreimal wiederholt werden, da keine quantitative Trennung in einem Schritt möglich war. Es wurden Ausbeuten von bis zu 94% mit dieser Methode erhalten und es konnte bis zu 1.5 g d4T pro Reaktion umgesetzt werden. Größere Reaktionsansätze ließen sich nur schlecht reinigen.

Als Alternative wurde die Trennung von NMP und Phosphatsalz durch fraktionierte Kristallisation mit einer 1 M Bariumacetatlösung untersucht. Bei diesem Ansatz sollte das Phosphatsalz als in Wasser unlösliches Bariumsalz gefällt werden, während die Nucleotide in Lösung verbleiben sollten. Der Niederschlag des Bariumphosphats war jedoch zu feinkristallin, als dass er durch Filtration hätte abgetrennt werden können. Auch der Versuch, ihn durch Zentrifugieren aus dem Überstand zu entfernen schlug fehl.

Zur Kupplung des d4TMPs mit den unterschiedlichen lipophilen Phosphoramiditen **46-53** musste es in eine, in organischen Lösungsmitteln lösliche Form überführt werden. Bis-(tetra-*n*-butyl)-ammonium-d4TMP **3b** sollte neben einer verbesserten Lipophilie auch eine höhere Nucleophilie als das Bisammoniumsalz **3a** besitzen.

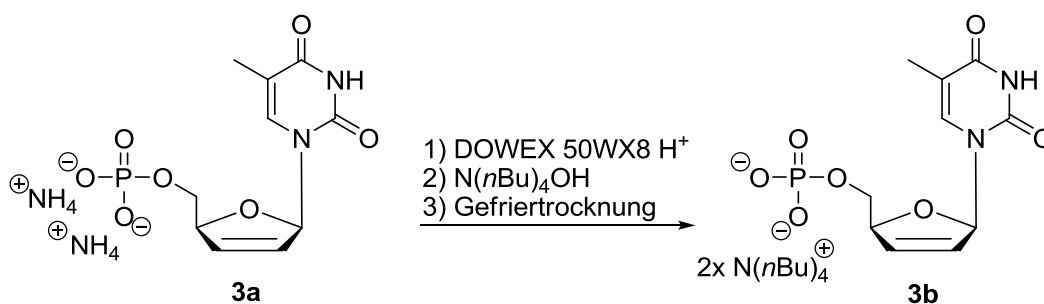


Abb. 27: Ionentausch von d4TMP über DOWEX 50WX8

Der Austausch der Kationen wurde indirekt mittels Titration durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde Bis-ammonium d4TMP über eine protonierte DOWEX 50WX8 Ionenaustauschersäule gegeben und so in die H⁺-Form überführt. Zur Titration wurden zwei Äquivalente Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid eingewogen und zu dem sauren Eluat

gegeben. In der Regel konnte so sehr genau bis zum Neutralpunkt titriert werden und das Bis-(tetra-*n*-butyl)-ammonium-d4TMP **3b** nach Gefriertrocknung erhalten werden.

Synthese und Reinigung der d4TDP Zielverbindungen 26-34

Bevor die Synthesen der Zielverbindungen **26-34** diskutiert werden, wird die Gliederung des Abschnittes erläutert:

Die Zielverbindungen **26-34** sollten prinzipiell nach der Methode, die auf Seite 26f beschrieben wurde, synthetisiert werden. Aufgrund der veränderten Eigenschaften der eingesetzten Phosphoramidite kam es bei den ersten Synthesen der Zielverbindungen zu Schwierigkeiten hinsichtlich Umsatz und Chromatographie. Die Methodik zur Synthese der Verbindungen wurde im zeitlichen Verlauf der durchgeführten Experimente angepasst und an einigen Stellen optimiert. Allerdings traten die Schwierigkeiten bei der Chromatographie der Verbindungen von Derivat zu Derivat in unterschiedlichem Maß und Form auf, so dass die verwendeten Methoden individuell gewählt und angepasst wurden. Während der anspruchsvollen Chromatographien der Zielverbindungen **26-34** sammelte sich des Öfteren Produkt in Mischfraktionen an, welches nicht weiter isoliert werden konnte. Aus diesem Grund sollte die Ausbeute nicht als generelles Maß zur Beurteilung der durchgeführten Anpassungen gelten. In der Regel führten solche Optimierungen erst zur Darstellung der entsprechenden Verbindung in vernünftigen Mengen und ausreichender Reinheit. Um die vorgenommenen Änderungen hinsichtlich Reaktionsführung und Chromatographie-Methodik besser begründen zu können, soll weitestgehend die chronologische Reihenfolge der Laborarbeiten eingehalten werden.

Viele der Zielverbindungen wurden in den jeweils ersten Syntheseansätzen nach der Methode A unter einer N₂-Schutzgasatmosphäre mit trockenen Lösungsmitteln synthetisiert: Ca. 90 mg (114 µmol) Bis-(tetra-*n*-butyl)-ammonium-d4TMP **3** wurden in Acetonitril gelöst, für ein bis zwei Stunden in einem Tropftrichter über Molekularsieb (0.3 nm) getrocknet und anschließend in den Reaktionskolben gegeben. Das Molsieb wurde mit einigen Millilitern Acetonitril gewaschen und die Waschlösungen ebenfalls in den Reaktionskolben überführt. Der Rückstand wurde mehrmals mit einigen mL Acetonitril coevaporiert, in 2 bis 4 mL Acetonitril aufgenommen und bei 0 °C wurden 1.4 bis 1.6 Äquivalente des jeweiligen Phosphoramidits **18** zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1.4 bis 1.6 Äquivalenten 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) gestartet. In der Regel wurden während des Reaktionsverlaufs 0.2 bis 0.8 Äquivalente des jeweiligen Phosphoramidits **18** und ähnliche Mengen an DCI portionsweise zugegeben, um den

Umsatz zu erhöhen. Der Reaktionsverlauf konnte dünnschichtchromatographisch verfolgt werden. Die Reaktionszeiten betragen dabei einige Stunden bis zu maximal zwei Tagen. Das β -Phosphoratom, der neu gebildeten Phosphorsäureanhydridbindung, wurde im Anschluss bei niedrigen Temperaturen mit *tert*-Butylhydroperoxid *in situ* zum Phosphor(V) oxidiert. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck entfernt. In einer ersten Chromatographie an RP-18 Kieselgel wurde das Produkt von überschüssigem d4TMP und DCI befreit. Es wurde in der Regel ein Methanol-Wasser-Gradient beginnend mit einem Verhältnis von 1:1 v/v verwendet. Es schlossen sich dann ein bis zwei weitere Chromatographien an, um gebildete Nebenprodukte und Reste des d4TMPs abzutrennen. Bei diesen Chromatographien wurden zur Verbesserung der Trennergebnisse teilweise andere Lösungsmittelgemische eingesetzt.

Zu Beginn der synthetischen Arbeiten wurde die Serie der verzweigtmodifizierten BAB-d4TDPs durch die Darstellung von BPB-d4TDP **26** ergänzt. Nach der Methode A und der ersten Chromatographie mit Methanol-Wasser wurde BPB-d4TDP **26** mit genau einem Tetra-*n*-butylammoniumion mit einer Ausbeute von 36% erhalten. Eine Mischfraktion sollte ein weiteres Mal gereinigt werden. Aus den auf Seite 26 angeführten Gründen, wurde an dieser Stelle die Chromatographie mit Methanol und einem 0.25 M Ammoniumformiatpuffer erprobt. Durch die Ionenaenchromatographie sollte die Trennwirkung an RP-18 Kieselgel erhöht werden und die Kationen gleichzeitig ausgetauscht werden. Der Vorteil dieses Puffers gegenüber anderen Puffern besteht darin, dass keine überschüssigen Puffersalze zurückbleiben, weil sie bei der abschließenden Gefriertrocknung als Ammoniak und Kohlenstoffdioxid ausgasen. Auf diese Weise konnten 18.5 mg des Produktes gereinigt werden und die Kationen erfolgreich ausgetauscht werden.

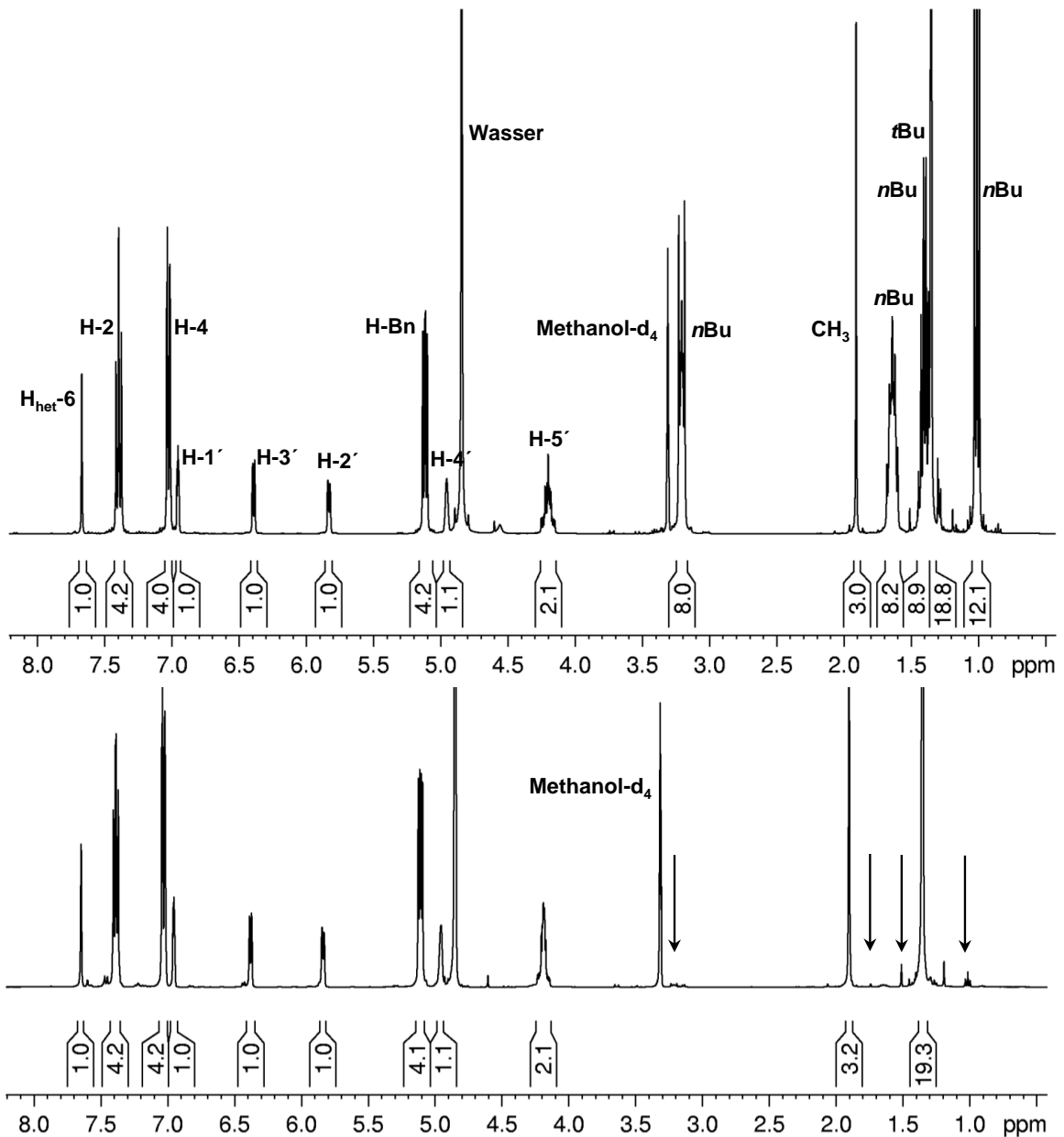


Abb. 28: Quantitativer Austausch der Kationen von Tetra-*n*-butylammonium BPB-d₄TDP **26** (oben) zu Ammonium BPB-d₄TDP (unten, durch Pfeile markiert)

Synthese von C₁₁-BAB-d₄TDP **31** und Chromatographie an RP-18 Kieselgel

Als eine der ersten fettsäuremodifizierten BAB-d₄TDP Verbindungen wurde **31** aus dem Phosphoramidit **51** und d₄TMP nach der Methode A dargestellt. Bei diesem Ansatz zeigten sich jedoch erste Probleme aufgrund des langkettigen Acylrestes (R= C₁₁) des Phosphoramidits. Zum Reaktionsbeginn sollten 78 µmol Nucleosidmonophosphat mit 108 µmol **51** gekuppelt werden. Allerdings löste sich das Amidit nur sehr schlecht in Acetonitril, so dass die Reaktionslösung um den Faktor vier verdünnt und mit Ultraschall behandelt werden musste. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur löste sich schließlich das Amidit. Um

den Umsatz zu erhöhen, wurde das Amidit und DCI zweimal nachgegeben. Ein vollständiger Verbrauch des NMPs konnte nicht beobachtet werden, so dass die Reaktion nach ca. 16 h durch die Zugabe des Oxidationsmittels beendet wurde. Das erhaltene Rohgemisch wurde mit Methanol-Wasser wie beschrieben chromatographiert. Es zeigte sich, dass die Zielverbindung **31** nur schlecht in dem Laufmittel (Methanol/Wasser 1:1 v/v) löslich war, weshalb mehr Methanol zugesetzt werden musste, was wiederum die Trennung verschlechterte. Bei der zweiten Chromatographie wurde anstatt Methanol Isopropanol eingesetzt und auch hier Wasser durch den Formiatpuffer ersetzt. Tatsächlich löste sich das Rohgemisch von **31** nun besser, so dass die Chromatographie mit dem Laufmittel (Isopropanol/Formiatpuffer 1:1, v/v) begonnen werden konnte. Allerdings führte die Erhöhung des Isopropanolanteils im Gradienten zu einer drastischen Verringerung der Tropfgeschwindigkeit während der Säulenchromatographie unter leichtem Überdruck. Es konnte kein reines Produkt isoliert werden, so dass ein weiteres Mal chromatographiert werden musste. Nach dieser Chromatographie konnte das Produkt bereits mit Verunreinigungen von knapp 5% isoliert werden. Bei dem Nebenprodukt handelte es sich vermutlich um den Phosphorsäurediester **59g**, welcher höchstwahrscheinlich aus dem Bruch der Pyrophosphatbrücke entstanden ist. Dies würde auch erklären, warum bei den folgenden Reinigungen erneut d4TMP abgetrennt wurde, was bei der ersten Trennung quantitativ erfolgt war. Der Phosphorsäurediester **59g** könnte sich ebenfalls durch wässrige Hydrolyse des entsprechenden Phosphor-4,5-dicyanoimidazolidats **60g** gebildet haben. Solch ein 4,5-Dicyanoimidazolidat **60** könnte aus überschüssigem 4,5-Dicyanoimidazol und dem Phosphoramidit **51** gefolgt von der Oxidation entstanden sein. Die Verwendung von 5'-O-Nucleosidphosphorimidazolidaten zur Synthese von Nucleosidtriphosphaten ist bekannt.^{117,118} Die Phosphoramidate **58a-k** können bei dieser Reaktionsführung während der Oxidation des Reaktionsgemisches aus überschüssigem Phosphoramidit **18** gebildet werden. An dieser Stelle konnten die Nebenprodukte Phosphoramidat **58g** bzw. Phosphorsäurediester **59g** nicht sauber isoliert werden. Aus dem Protonenspektrum der Verbindung **31** musste auf eine solche Verunreinigung geschlossen werden, da die Integrale der aromatischen Protonen, der Benzylprotonen und der Acylreste nicht im gleichen Verhältnis zu den Integralen des d4Ts standen. Die chemischen Verschiebungen der Signale des Nebenproduktes waren fast identisch mit denen der beiden Acyloxybenzyleinheiten von **31**. Bei späteren Synthesen dieses Typs konnte das Phosphoramidat **58a** isoliert werden (Abb. 52 auf S. 73).

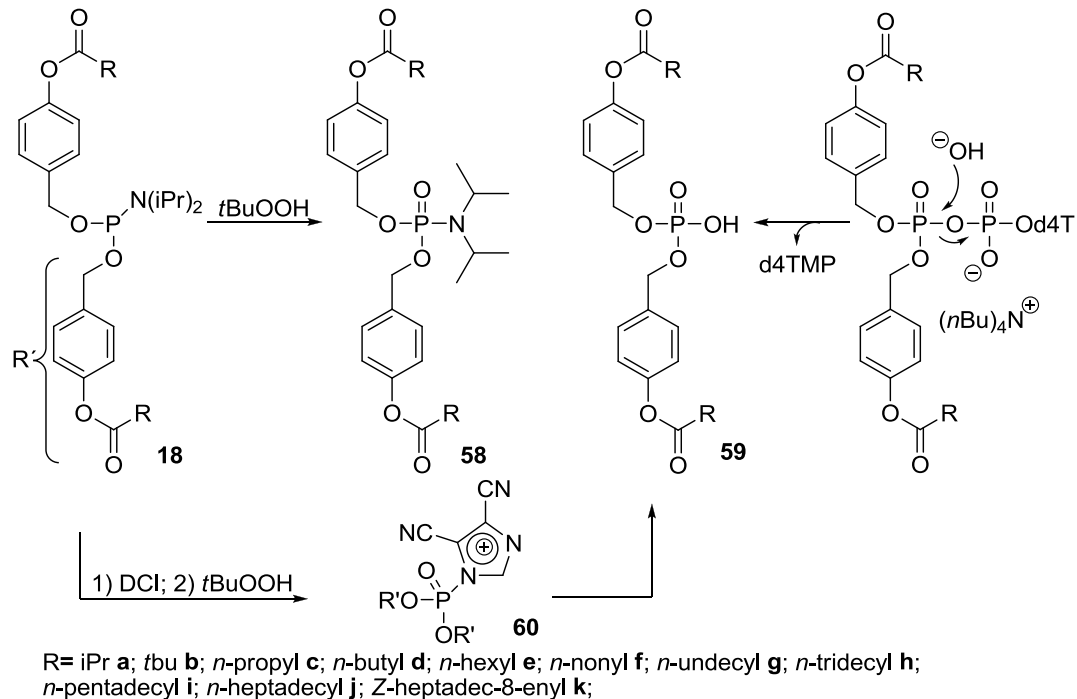


Abb. 29: Bildung möglicher Nebenprodukte: Phosphoramidate **58a-k** und Phosphorsäurediester **59a-k**

Synthese von (8*Z*)-C17-BAB-d4TDP **34** und Chromatographie an RP-18 Kieselgel

Als zweite Zielverbindung aus der Gruppe der lipophil-maskierten BAB-d4TDP Prodrugs sollte Bis-(4-(*Z*-octadec-9-enoyloxybenzyl)-d4TDP **34** synthetisiert werden. Diese Verbindung sollte bei seiner Hydrolyse Ölsäure freisetzen. Ölsäure kommt in Form der entsprechenden Triglyceride in vielen pflanzlichen und tierischen Fetten vor und ist eine Omega-9-Fettsäure. Die Verwendung von Ölsäure im Acylrest sollte eine hohe Lipophilie des BAB-d4TDP Prodrugs gewährleisten. Dieser Acylrest könnte möglicherweise schnell durch Lipasen gespalten werden, was eine schnelle und selektive intrazelluläre Freisetzung des d4TDPs fördern würde. Außerdem sollte der Einfluss, der beiden Doppelbindungen, auf die Hydrolyseeigenschaften untersucht werden. Da es bei der Chromatographie der Zielverbindung **31** aufgrund der erschwerten Löslichkeit zu Schwierigkeiten gekommen war, wurde die Ansatzgröße nahezu halbiert. Um den Umsatz zu verbessern, wurden 47 μmol d4TMP gelöst in Acetonitril für eine Nacht über Molsieb getrocknet. Auch bei dieser Reaktion konnte trotz eines Überschusses an Phosphoramidit **53** kein vollständiger Verbrauch des Monophosphats beobachtet werden (DC-Kontrolle). Der Umsatz konnte durch die Zugabe weiterer Äquivalente an Amidit und DCI nicht erhöht werden. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Oxidationsmittels beendet und das Rohgemisch in einer ersten Chromatographie von DCI und d4TMP weitestgehend befreit (Isopropanol-Wasser Gradient). Als hauptsächliche Verunreinigung wurde der Phosphorsäurediester **59k**

identifiziert. Das Phosphoratom des Phosphorsäurediesters hatte eine chemische Verschiebung von $\delta = 0.5$ ppm und das Phosphoratom von d4TMP hatte eine sehr ähnliche chemische Verschiebung von $\delta = 0.5$ bis $\delta = -0.5$ ppm. Die Anwesenheit von d4TMP neben dem Phosphorsäurediester ging aus dem $^1\text{H-NMR}$ Spektrum hervor. Im $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum waren neben den beiden Dubletts der Zielverbindung zwei weitere Singulets im Bereich um 0 ppm zu erkennen, was als weiteres Indiz für die Bildung der Verbindung **59k** galt. Um den verbliebenen Anteil des Nebenproduktes abzutrennen, wurde eine der erhaltenen Mischfraktionen ein zweites und ein drittes Mal über RP-18 Kieselgel gereinigt. Diesmal wurden Laufmittelgradienten aus Isopropanol und Ammoniumformiatpuffer verwendet, was zu keiner Verbesserung führte. Äußerst schwierig gestaltete sich die Detektion des vermuteten Nebenproduktes **59k** nach der Chromatographie mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Die Verbindungen **59a-k** waren trotz der chromophoren Benzylester nicht detektierbar (UV). Die Verwendung eines Schwefelsäure-Anisaldehyd-Reagenzes eignete sich nicht zur Visualisierung der Phosphorsäurediester **59a-k**, wie auch andere Anfärbereagenzien (Iod, Kaliumpermanganat, Ammoniummolybdat). Die BAB-d4TDP Verbindungen konnte hingegen durch das Schwefelsäure-Anisaldehyd-Reagenz und Erhitzen der DC-Folie sichtbar gemacht werden. Die lange Retentionszeit der Zielverbindung **34** auf der RP-18 Phase führte zu einer Verteilung über viele Fraktionen, was automatisch zu einer Verdünnung und damit zur Erschwerung der Detektion beitrug. Diese Schwierigkeiten traten bei den RP-Chromatographien aller Zielverbindungen **26-34** auf. Die Reinheit von **34** konnte nach dieser ersten Synthese nicht auf über 92% gesteigert werden.

*Versuche zur verbesserten Reinigung von (8Z)-C17-BAB-d4TDP **34** durch Extraktion und Fällung bzw. Kristallisation*

Das Fettsäuremodifizierte (8Z)-C17-BAB-d4TDP Prodrug **34** war aufgrund der beiden langen, ungesättigten Acylreste besonders lipophil, was gepaart mit den hydrophilen Eigenschaften der Phosphateinheit zur Amphiphilie der Verbindung beitrug. Die Verbindung durch einfache Extraktion mit Chloroform und Wasser zu reinigen, misslang. Im Scheidetrichter bildete sich eine Emulsion und es konnte keine Phasentrennung beobachtet werden. Da sich **34** weder in Acetonitril, noch in Wasser und schlecht in Methanol löste, sollte es durch Fällung gereinigt werden. Zu dem, in Wasser-Isopropanol gelöst, fast sauberen Produkt, wurde langsam Acetonitril getropft. Die Suspension wurde zentrifugiert, aber die Bildung eines Niederschlags blieb aus. Ähnliches wurde mit einer NMR-Probe der gleichen Fraktion versucht. Hier wurde zu der in deuteriertem Chloroform gelösten Probe Acetonitril gegeben. Nach einer anfänglichen Trübung blieb die Bildung eines

Niederschlags aus, so dass die Verbindung weder gefällt noch kristallisiert werden konnte. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften der BAB-d4TDPs ist eine einfache Kristallisation nicht möglich.

*Versuch der Chromatographie von (8Z)-C17-BAB-d4TDP **34** mit Hilfe der zirkularen präparativen Chromatographie (Chromatotron)*

Während der vorangegangenen Versuche hatte sich gezeigt, dass sich (8Z)-C17-BAB-d4TDP **34** in unpolaren Lösungsmitteln wie Dichlormethan, Chloroform aber auch in Petrolether und Ethylacetat löste. Es war bekannt, dass sich die BAB-d4TDPs nicht an Kieselgel während einer Säulenchromatographie trennen ließen, sich aber sehr kleine Mengen auf DC-Folie mit einem Lösungsmittelgemisch (Ethylacetat/Methanol 7:3 v/v) separieren ließen. Aus der Reihe der Alkyl-modifizierten BAB-d4TDP Prodrugs, sollte BAB-d4TDP **34** die höchste Lipophilie besitzen (Abb. 19). Durch zirkulare präparative Chromatographie (Chromatotron) sollte **34** über gipshaltiges Kieselgel gereinigt werden. Vorteile dieser Form der Normalphasenchromatographie gegenüber der Säulenchromatographie sind: Der Fortschritt der Trennung kann mittels UV-Detektion verfolgt werden und der Laufmittelgradient kurzfristig an das Trennproblem angepasst werden. Des weiteren verlaufen Trennungen am Chromatotron in der Regel schneller als Säulenchromatographien, so dass die empfindlichen Verbindungen für kürzere Zeit mit dem leicht sauren Kieselgel in Wechselwirkung treten und ungewollte Zersetzungsreaktionen minimiert werden können. Es wurden ca. 50 mg von einer der sauberen Mischfraktionen der ersten RP-Chromatographie von **34** in wenig Dichlormethan aufgenommen, um am Chromatotron gereinigt zu werden (Petrolether-Ethylacetat Gradient). Zu Beginn der Trennung war noch eine Bande (vermutlich des Produktes) zu erkennen, die sich dann leider über die gesamte Breite der Trennscheibe verteilte und nicht mehr zu erkennen war. Die Polarität des Laufmittels wurde stark erhöht, aber es konnte weder das Produkt noch Nebenprodukte eluiert werden.

*Versuche zur Reinigung von C11-BAB-d4TDP **31** und von (8Z)-C17-BAB-d4TDP **34** an der präparativen HPLC*

Es wurden Stammlösungen der Verbindungen **31** und **34** angesetzt und präparative HPLC Chromatographien mit unterschiedlichen Eluentengemischen (isokratisch) durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von Acetonitril zu Wasser und später von Acetonitril zu Ammoniumformiatpuffer (0.25 M) untersucht. Es konnten keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. Aufgrund der hohen Lipophilie der Verbindungen kam es zu hohen Verweilzeiten der Verbindungen auf der RP-18 Säule (bis 40 min). Die

Produkte konnten nicht reiner als bei der RP-Chromatographie unter Normaldruck isoliert werden. Bei der Verwendung des Ammoniumformiatpuffers wurde auch hier die Spaltung der Anhydridbindung beobachtet, welche durch den Ammoniumformiatpuffer beschleunigt wurde. Da sich bereits bei den Testläufen (Einsatz von ca. 5 mg pro Trennversuch) keine vernünftige Trennung erzielt wurde, wurden keine weiteren Versuche unternommen diese Verbindungen über eine präparative Säule an der HPLC zu trennen. Problematisch bei der Methodenentwicklung war der relativ hohe Verbrauch von bereits gesäuberten Produkten. Für eine vernünftige Analyse der einzelnen erhaltenen Fraktionen per Protonen-NMR mussten mindestens 5 mg der jeweiligen Verbindung für einen Testlauf eingesetzt werden. Die Methoden, die zur Analyse an der analytischen HPLC verwendet wurden, konnten aus zweierlei Gründen nicht auf die Anwendung an der präparativen HPLC übertragen werden. Bei der analytischen HPLC wurde mit Laufmittelgradienten gearbeitet und ein anderer Ionenpuffer, Tetra-*n*-butylammonium-Phosphatpuffer, verwendet. Dieser Puffer eignet sich nicht zum Einsatz bei der präparativen HPLC, da die Ionen nicht durch einfache Gefriertrocknung (s. Ammonium-Formiat-Puffer) abgetrennt werden können. Die erhaltenen Produkte wären durch einen großen Überschuss an Salzen kontaminiert. Grundsätzlich sollte die Möglichkeit der chromatographischen Trennung von BAB-NDP Prodrugs an der präparativen HPLC nicht ausgeschlossen werden. Erst zum Ende dieser Arbeiten wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass evtl. die Pumpleistung in Kombination mit der benutzten Säule nicht ausreichend war, so dass das Optimum der van-Deemter-Beziehung unterschritten wurde.¹¹⁹

*Synthese und Chromatographie von C9-BAB-d4TDP **30** und von C13-BAB-d4TDP **32***

Die Verbindungen **30** und **32** wurden als Nächste dargestellt. Mit ihren Alkylketten der Summenformeln R= C₉H₁₉ (C9) bzw. R= C₁₃H₂₇ (C13) grenzten sie den mittleren Bereich der angestrebten Reihe an lipophil-derivatisierten BAB-d4TDPs ein. Aus den Syntheseansätzen zu C11-BAB-d4TDP **31** und (8Z)-C17-BAB-d4TDP **34** war bekannt, dass sich ein zu großer Überschuss an Phosphoramidit nicht unbedingt in einem besseren Umsatz oder gar der Ausbeute widerspiegelte. Deshalb wurden bei der Synthese von **30** und **32** nur einmal nach Kupplungsbeginn 0.4 Äquivalente des Phosphoramidits zur Reaktionslösung gegeben und auch die Reaktionszeit auf 2 h bzw. 3 h verkürzt. Nach dieser Zeit war bereits die gesamte Menge des Nucleosidmonophosphats verbraucht. Der sehr gute und schnelle Umsatz war vermutlich ein Resultat der intensiven Vortrocknung des NMPs gewesen (im Vakuum gefolgt von mehrstündiger Trocknung über Molsieb vor Reaktionsbeginn). Da nur einmal DCI und Phosphoramidit nachgegeben wurde, wurde auch an dieser Stelle die Möglichkeit zur Kontamination der Reaktionslösung mit

Feuchtigkeit minimiert. Das 4,5-Dicyanoimidazol wurde zu diesem Zeitpunkt noch nicht getrocknet. Bei der Reaktion zu **32** gab es Schwierigkeiten mit der Löslichkeit von Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit in Acetonitril. Die Reaktionslösung wurde nicht weiter verdünnt, da dies bei der ersten Darstellung von C11-BAB-d4TDP **31** zu keiner offensichtlichen Verbesserung geführt hatte (*Anmerkung*: Alternativ wurde der Ansatz zur Darstellung von C13-BAB-d4TDP **32** in Dimethylformamid durchgeführt. In diesem Lösungsmittel lösten sich alle Reagenzien, allerdings kam es zu keinem Umsatz des d4TMPs (DC-Kontrolle)). Nach Oxidation und Entfernen der Lösungsmittel wurden beide Rohprodukte C9-BAB-d4TDP und C13-BAB-d4TDP gereinigt. Im Fazit hatte sich aus der Reinigung von C11-BAB-d4TDP **31** und (8*Z*)-C17-BAB-d4TDP **34** ergeben, dass die RP-18 Säulenchromatographie zu den besten Resultaten führte (s.o.). Deshalb wurden die Reaktionsansätze zu **30** und **32** mit einem Methanol-Wasser Gradienten über RP-18 Kieselgel chromatographiert und bereits nach der ersten Trennung sehr sauber in Ausbeuten von 62% (**30**) und 58% (**32**) isoliert. Das ¹H-NMR-Spektrum von C13-BAB-d4TDP **32** wies ebenfalls auf eine sehr gute Reinheit der Verbindung hin. Im ³¹P-NMR der Verbindung **30** waren noch minimale Verunreinigungen zu erkennen. Außerdem enthielt das Spektrum messbedingte Störsignale, die zu einer falschen Einschätzung des Grades an Verunreinigung führte (Abb. 31, linkes Spektrum). Die Abbildung zeigt das ³¹P-NMR-NMR Spektrum von **30** nach der ersten und zweiten Chromatographie sowie eine Vergrößerung des für die BAB-d4TDP Prodrugs charakteristischen Dubletts der beiden Phosphoratome. Von C9-BAB-d4TDP **30** wurde eine zweite Chromatographie mit Methanol und Ammoniumformiatpuffer (0.25 M) durchgeführt, um letzte Spuren von Salzen bzw. Nebenprodukten zu entfernen und die Kationen durch Ammoniumionen zu ersetzen. Parallel dazu wurde auch C13-BAB-d4TDP **32** ein weiteres Mal chromatographiert. Im Anschluss musste festgestellt werden, dass sich beide Produkte während der Chromatographie mit dem Formiatpuffer anteilig zersetzt hatten. Aus den NMR-Spektren der Verbindung **30** wurde deutlich, dass die Pyrophosphatbrücke teilweise gespalten wurde. Dies ist in der Abb. 32 an dem doppelten Signalsatz für die nucleosidischen Protonen zu erkennen. Auch im aromatischen Bereich sind zusätzliche Signale, die dem Phosphorsäurediester **59f** zuzuordnen sind, klar zu erkennen. Übrige Ameisensäure des Formiatpuffers konnte nicht vollständig durch die Gefriertrocknung entfernt werden, was eindeutig am Singulett bei fast 9 ppm zu erkennen ist. Das verunreinigte Produkt, was nach der zweiten Chromatographie erhalten wurde, wurde ein drittes Mal chromatographiert. Es wurde versucht, dass Produkt nun wieder mit einem Methanol-Wasser-Gradienten zu reinigen.

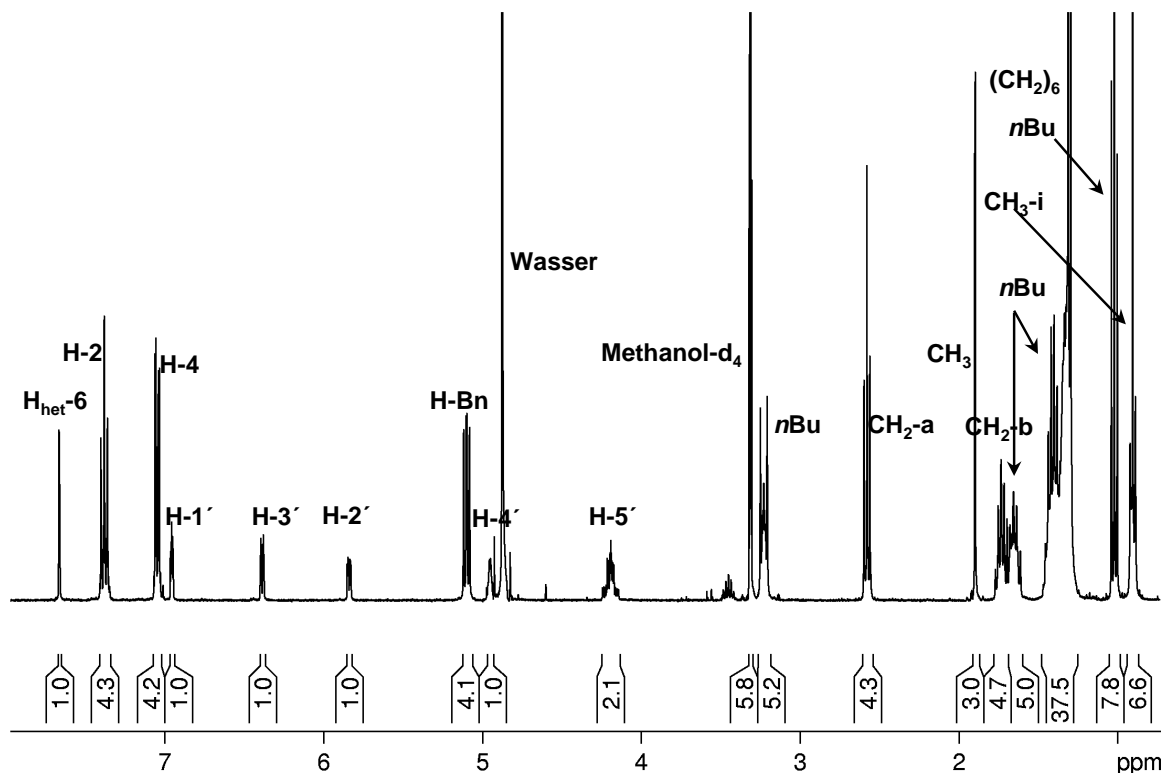


Abb. 30: ^1H -NMR-Spektrum von C9-BAB-d4TDP **30** nach der ersten Chromatographie

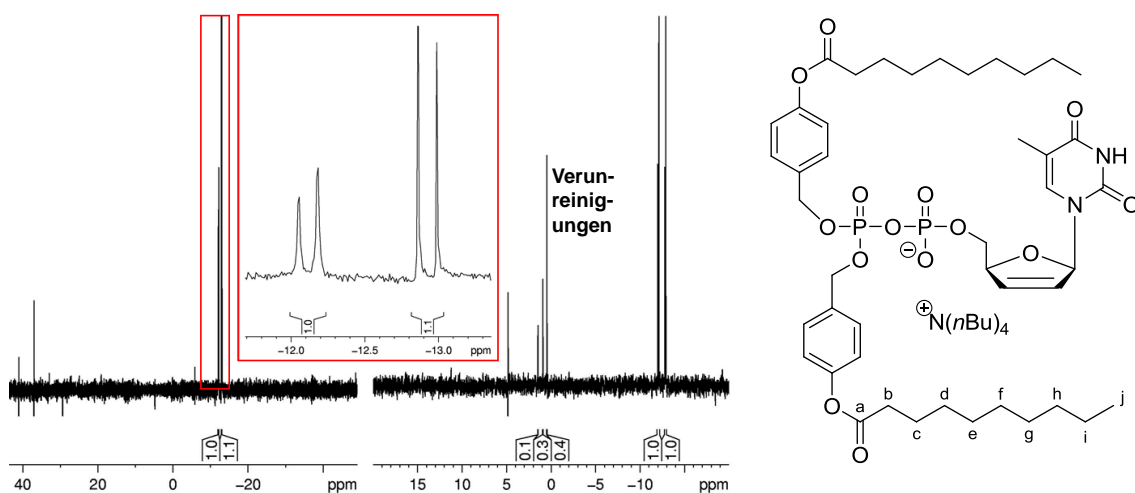


Abb. 31: ^{31}P -NMR-Spektrum von **30** nach der ersten Chromatographie (links) und rechts nach der zweiten Chromatographie (mit Formiatpuffer); Vergrößerung der Dubletts (Rahmen)

Der Reinheitsgrad verschlechterte sich ein weiteres Mal. Der Ansatz musste verworfen werden. Wahrscheinlich trug das überschüssige Ammoniumformiat (Abb. 32) zur Spaltung des Produktes während dieser dritten Chromatographie bei. Für die Zersetzung der beiden Verbindungen **30** und **32** durch die Chromatographie mit dem Ammoniumformiatpuffer

konnte keine Erklärung gefunden werden. Der pH-Wert des Puffers wurde überprüft und auf ca. 5.5-6.0 mit Merck-Neutralit pH-Papier bestimmt. Das beim Ansetzen des Puffers hinsichtlich der Konzentration ein Fehler gemacht wurde, ist sehr unwahrscheinlich und sollte eigentlich nicht zur Zersetzung der Produkte führen. Es war vermutlich wegen der längeren Chromatographiedauer zum Bruch der Pyrophosphateinheit gekommen.

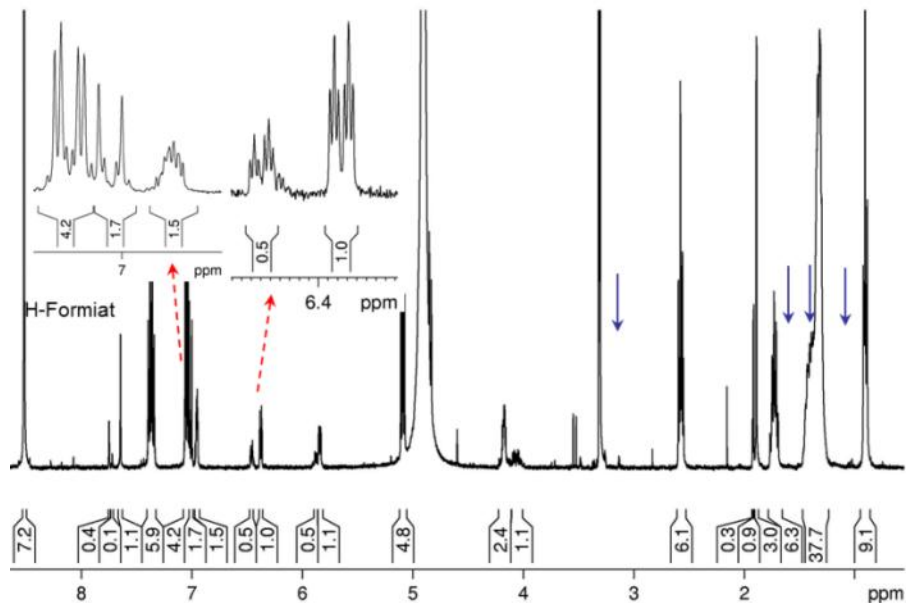


Abb. 32: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von C9-BAB-d4TDP **30** nach Chromatographie mit Ammoniumformiatpuffer, anteilige Zersetzung und fehlende Tetra-*n*-butylammoniumionen (Pfeile)

Im Gegensatz zu der Chromatographie von BPB-d4TDP **21** verliefen die Chromatographien von **30** und **32** langsamer, da die Verbindungen eine höhere Retentionszeit besitzen. Die breite Verteilung des Produktes über viele Fraktionen (ca. 30-40 Reagenzgläser à 6 mL) führte zu einer erheblichen Verdünnung, so dass die sofortige Detektion per DC erschwert wurde und viele Fraktionen mehrfach getüpfelt werden mussten. Nach den negativen Resultaten bei Trennungen mit Ammoniumformiatpuffer (Normaldruck und HPLC) wurden keine weiteren Chromatographieversuche mit diesem Puffer mehr durchgeführt.

Die Verbindungen C9-BAB-d4TDP **30** und C13-BAB-d4TDP **32** waren zu Beginn sehr gut mit Methanol-Wasser-Gradienten an RP-18 Kieselgel von überschüssigen Edukten (Amidit, DCI) und Nebenprodukten getrennt worden. Aus diesem Grund wurden zur Reinigung weiterer Reaktionsansätze der BAB-d4TDP Prodrugs diese Lösungsmittel eingesetzt.

*Zweiter Reaktionsansatz zur Synthese von C9-BAB-d4TDP **30** und C13-BAB-d4TDP **32***

Nach dem skizzierten Protokoll (Methode A, S. 38) und Chromatographie mit Methanol-Wassergradienten wurden die Verbindungen **30** und **32** ein weiteres Mal dargestellt. Die Verbindung **30** wurde ein zweites Mal chromatographiert, so dass die erhaltene Ausbeute von 44% niedriger war als zuvor (62%). Wie Eingangs schon gesagt wurde, sollten die Ausbeuten keinem direkten Vergleich unterzogen werden, da in den meisten Fällen Mischfraktionen anfielen. Es zeigte sich, dass aus den Mischfraktionen auch durch wiederholte Chromatographie kaum reines Produkt isoliert werden konnte. Dies ist auf das sehr ähnliche Elutionsverhalten der Phosphorsäurediester **59** und den Zielverbindungen zurückzuführen. Beim Wiederholen der Reaktion zu C13-BAB-d4TDP **32** wurde von der Methode A (vergl. S. 38). In diesem Fall wurde d4TMP direkt mit je 1.5 Äquivalenten an DCI und Phosphoramidit **52** zur Reaktion gebracht und keine weiteren Äquivalente an DCI bzw. Phosphoramidit hinzugegeben (Methode B). Zum einen, um den Eintrag von Feuchtigkeit in die Reaktionslösung zu vermeiden (die Phosphoramidite wurden nicht unter Schlenkbedingungen abgewogen) und zum anderen, weil sich das Amidit in Acetonitril nur schlecht löste. Die Zielverbindung **32** wurde in einer sehr guten Ausbeute von 67% bereits nach der ersten Chromatographie isoliert.

*Synthese von C11-BAB-d4TDP **31** und C15-BAB-d4TDP **33***

Im nächsten Schritt wurden die Verbindungen C11-BAB-d4TDP **31** und C15-BAB-d4TDP **33** synthetisiert und erfolgreich chromatographiert. Bei der Synthese von C15-BAB-d4TDP **33** konnte das Phosphoramidit **54** durch Zusatz von 2 mL Dichlormethan und eine kurze Behandlung im Ultraschallbad gelöst werden. Obwohl sich die Reaktionslösung nach ca. 24 h erneut getrübt hatte, wurde die Reaktion weitergeführt. Die Verbindung **33** konnte in einer Ausbeute von 49% sauber isoliert werden. Während eine große Produktfraktion von C15-BAB-d4TDP **33** bereits nach der ersten Trennung sehr sauber erhalten werden konnte, musste eine Hauptfraktion von C11-BAB-d4TDP **31** ein weiteres Mal chromatographiert werden. Die Zielverbindung wurde in einer Ausbeute von 31% erhalten. An dieser Stelle wurde ebenfalls geprüft, ob die Chromatographie der Zielverbindungen besser gelänge, wenn die Gegenionen polarer wären. So wurde ein Teil des verunreinigten Produktes einem Ionenaustausch unterzogen und die Tetra-*n*-butylammoniumionen durch Ammoniumionen ersetzt. Während des Ionenaustausches an DOWEX 50WX8 (Ammoniumform) kam es zum Bruch der Pyrophosphateinheit bei einem Teil des Produktes, was die nachfolgende Chromatographie erschwerte, so dass das Ammoniumsalz von C11-BAB-d4TDP nicht sauber isoliert werden konnte.

Synthese von C3-BAB-d4TDP 25 und C4-BAB-d4TDP 27

Nachdem ein Großteil der in Abb. 19 gezeigten fettsäuremodifizierten BAB-d4TDP Prodrugs dargestellt worden war, wurden noch zwei kurzkettigmodifizierte BAB-d4TDPs synthetisiert. Diese Verbindungen sollten die Reihe der *n*-Alkyl-BAB-d4TDP Verbindungen sinnvoll ergänzen, um die Struktur-Aktivitätsbeziehung über eine größere Bandbreite hinweg betrachten zu können. Bei der Synthese der Verbindung C3-BAB-d4TDP **25** traten bei mehreren Reaktionsansätzen Schwierigkeiten hinsichtlich Umsatz und Reinigung auf. Dies überraschte, da bei den Reaktionen zu den fettsäuremodifizierten BAB-d4TDPs **30-33** viele der Unwägbarkeiten überwunden wurden. Die Notwendigkeit für eine absolut trockene Reaktionsumgebung wurde nochmals offensichtlich. Es konnte zu Beginn der Reaktion zu C3-BAB-d4TDP **25** und nach Zugabe weiterer Äquivalente an Phosphoramidit **47** kein Umsatz des Nucleosidmonophosphats beobachtet werden, was sich nach Zugabe von Molsieb sofort änderte (DC-Kontrolle). Das Molsieb wurde während der Reaktionszeit durch den Rührfisch zermahlen und musste vor der Chromatographie durch mehrfaches Zentrifugieren des Rohgemisches abgetrennt werden. Der Niederschlag musste deshalb mehrfach mit Methanol gewaschen werden, welches destillativ am Rotationsverdampfer entfernt werden mussten. Aufgrund der Empfindlichkeit der Zielverbindungen sollte dieser Schritt vermieden werden. Bei der Chromatographie des Rohgemisches von C3-BAB-d4TDP **25** an RP-18 Kieselgel konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Der Phosphorsäurediester **59c** konnte auch nach mehrmaliger Chromatographie nicht vom Produkt getrennt werden. Ein Teil der erhaltenen Mischfraktionen wurde über einen Ionentauscher gegeben und so die Tetra-*n*-butylammoniumionen durch Ammoniumionen ersetzt. Die Chromatographie verlief mit diesem Salz von C3-BAB-d4TDP besser, so dass wenige Milligramm der Verbindung erhalten werden konnten. Aus dem Rohgemisch eines weiteren Reaktionsansatzes konnte die Verbindung **25** auch als Tetra-*n*-butylammoniumsalz mit leichten Verunreinigungen isoliert werden. Die Verbindung C4-BAB-d4TDP **27** wurde in einer Ausbeute von 32% erhalten. Die Ionen weiterer Mischfraktionen wurden ausgetauscht und 13 mg des Produkts erhalten. Warum es bei der Chromatographie von **25** und **27** zu Problemen bei der Reinigung an RP-18 Kieselgel kam, kann nicht erklärt werden. Die Wechselwirkungen der Produkte und der Nebenprodukte (Phosphorsäurediester) mit der RP-18 Phase scheinen nicht unterschiedlich genug zu sein. Interessanterweise wurde ein ähnliches Problem bei den Chromatographien der von C17-BAB-d4TDP **35** und (8Z)-C17-BAB-d4TDP **34** beobachtet.

Synthese und Chromatographie von C17-BAB-d4TDP **35**

Nachdem relativ zu Beginn die Verbindung (8Z)-C17-BAB-d4TDP **34** synthetisiert wurde, sollte das entsprechend gesättigte Analogon dargestellt werden. Bei der Synthese von C17-BAB-d4TDP **35** wurde nur zu Reaktionsbeginn das entsprechende Phosphoramidit **55** und DCI zugegeben und die Löslichkeit des Phosphoramidits durch Zugabe von wenigen Millilitern Dichlormethan und kurze Behandlung des Reaktionsansatzes im Ultraschallbad erreicht (vergl. S. 49). Nach einigen Stunden bildete sich eine Suspension. Die Reaktion wurde nicht ausschließlich in Dichlormethan durchgeführt, da in diesem Lösungsmittel d4TMP nicht löslich ist. In DMF liefen die Kupplungsreaktionen nicht ab. Während des Reaktionsverlaufs wurde ein unvollständiger Umsatz des d4TMPs beobachtet. Als äußerst schwierig gestaltete sich die Chromatographie von C17-BAB-d4TDP **35**. Die Reinigung der BAB-d4TDPs mit einem Methanol-Wasser Gradienten an RP-18 Kieselgel hatte sich so weit als zuverlässigste Methode erwiesen. Unter anderem auch deshalb, weil nicht reagiertes d4TMP und der Aktivator DCI bei einem Laufmittelverhältnis von Methanol/Wasser 1:1 sehr gut vom Hauptprodukt getrennt werden konnten. Durch Erhöhung des Methanolanteils im Laufmittel konnte nach und nach das entsprechende BAB-d4TDP Prodrug eluiert werden. C17-BAB-d4TDP **35** löste sich nicht in Methanol/Wasser 1:1, so dass das Rohgemisch in reinem Methanol aufgenommen werden musste, während das RP-18 Kieselgel mit Methanol/Wasser 1:1 äquilibriert worden war. Anfänglich bildete sich daher eine „Kruste“ des Produktgemisches auf dem Kieselgel, was die Tropfgeschwindigkeit stark verlangsamte.

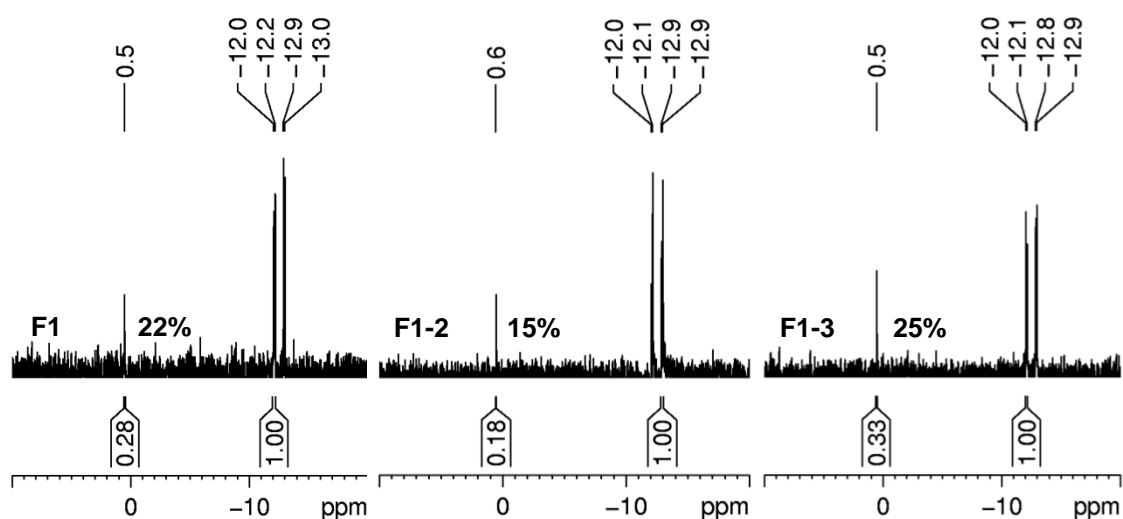


Abb. 33: ^{31}P -NMR Spektren von C17-BAB-d4TDP **35** mit F1 nach erster Chromatographie, F1-2 und F1-3 sind Fraktionen der Chromatographie von F1

Aufgrund seiner Lipophilie wurde **35** erst mit Methanol/Wasser 20:1 eluiert. Das Produkt war noch durch den vermuteten Phosphorsäurediester **59j** verunreinigt. In Abb. 33 sind ³¹P-NMR-Spektren der Chromatographien abgebildet. Dort ist zu erkennen, dass sich der Anteil des Nebenproduktes **59j** durch wiederholte Chromatographie kaum reduzieren ließ. Die erste Produktfraktion der zweiten Chromatographie enthielt den Phosphorsäurediester **59j** und d4TMP (Spektrum nicht gezeigt). Ein Nachweis dafür, dass sich ein Teil der Verbindung **35** durch einen Bruch der Pyrophosphateinheit zersetzte, was der höhere Anteil des Phosphorsäurediester **59j** im ³¹P-NMR Spektrum von F1-3 bestätigte. Dieser Bruch der Phosphorsäureanhydridbindung im Verlauf der Chromatographien wurde schon früher erkannt, konnte aber nicht eindeutig belegt werden. Es kam aufgrund der längeren Chromatographie zur Verstärkung dieses Problems.

*Versuch der Chromatographie von C17-BAB-d4TDP **35** an Sephadex LH20*

Um die Trennung an einem nicht kieselgelbasierten Material zu erproben, wurde Sephadex LH20 gewählt. Die Chromatographie an Sephadex beruht auf dem Prinzip des Größenausschlusses. (Reinigungen an verschiedenen Sephadex Matrices dienen in der Biochemie z.B. zur Trennung von Proteingemischen oder aber auch zum Austausch von Pufferionen). Die meisten Sephadexgele sind nur für die Chromatographie in wässrigen Medien ausgelegt. Sephadex LH20 dagegen toleriert eine Bandbreite an organischen Solventien, was für die Chromatographie von **35** entscheidend war. Sephadex LH20 besteht aus quervernetztem Dextran, welches hydroxypropyliert wurde. Aufgrund seiner Struktur besitzt es hydrophile und lipophile Charakteristika. In Abhängigkeit vom Lösungsmittel kann die Trennung auch aufgrund von Verteilungseffekten erfolgen.¹²⁰ Da es keinerlei Expertise in der Arbeitsgruppe im Umgang mit Gelfiltrationen gab, wurden Menge und Säulenhöhe abgeschätzt (vergl. Experimenteller Teil, 7.2.8). Das Sephadexgel wurde in Methanol aufgequollen und die Chromatographie mit Methanol durchgeführt. Das Produkt **35** konnte in Mischfraktionen lediglich angereichert und nach einer dritten Chromatographie aufgrund der großen Verdünnung nicht mehr detektiert werden. Nach den vielen Versuchen zur Reinigung von **35** konnte diese Art der Chromatographie nicht ein weiteres Mal untersucht werden. Bei zukünftigen Synthesen solch extrem langkettigmodifizierter BAB-NDP Prodrugs sollte dies nachgeholt werden.

Anpassung des Syntheseprotokolls zur Darstellung von BAB-d4TDP Verbindungen

Nachdem eine Vielzahl von Synthesen zu den BAB-d4TDP Zielverbindungen durchgeführt worden waren, sollte das verwendete Syntheseprotokoll nochmals angepasst werden. Zum einen war festgestellt worden, dass sich der Umsatz des d4TMPs durch Zugabe von

weiteren Äquivalenten des Phosphoramidits und des Aktivators nicht unbedingt verbessern ließ. Zum anderen war ein Überschuss an Phosphoramidit gleichbedeutend mit einer größeren Menge an Phosphorsäurediester **59**, der nur schwer abgetrennt werden konnte (vergl. Abb. 29). Hinzu kam, dass die lipophileren Amidite **52-55** kaum in Acetonitril löslich waren. Deshalb sollten bei folgenden Synthesen nur 1.1 Äquivalente des jeweiligen Amidits und 1.1-1.3 Äquivalente an DCI zur Kupplung verwendet werden. Es sollten 100 bis 180 mg (126-227 μmol) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP eingesetzt werden. Ebenfalls war festgestellt worden, dass die Trockenheit der Reaktionslösung einen sehr großen Einfluss auf ihren Erfolg hatte. Bei allen bisherigen Ansätzen wurde d4TMP unmittelbar vor der Reaktion in Acetonitril aufgenommen, über Molsieb in einem Tropftrichter getrocknet und in den Reaktionskolben getropft. Das Molsieb musste mehrmals mit Acetonitril gewaschen werden, um alles d4TMP in den Reaktionskolben überführen zu können. Dies hat den Nachteil, dass direkt vor Reaktionsbeginn die Trocknung des NMPs abgewartet werden und das Molsieb gewaschen werden muss. Um diesen Arbeitsschritt zu verbessern, wurde eine Stammlösung von d4TMP in trockenem Acetonitril angesetzt und über aktiviertem Molsieb unter Inertgas bei -26 °C gelagert. Zur Reaktion wurde die benötigte Menge d4TMP in den Reaktionskolben gegeben, das Lösungsmittel entfernt, die tatsächliche Menge an d4TMP durch Wiegen bestimmt und wieder in Acetonitril aufgenommen, um die Reaktion direkt zu starten.

*Synthese und Chromatographie von (8Z)-C17-BAB-d4TDP **34***

Die Verbindung (8Z)-C17-BAB-d4TDP **23** war bereits zu Beginn der Arbeiten synthetisiert worden, konnte nicht vollständig gereinigt werden (vergl. S. 42). Die Synthese wurde nach dem angepassten Protokoll wiederholt und das erhaltene Rohgemisch chromatographiert (Methanol-Wasser Gradient, RP-18 Kieselgel). Das Produkt wurde nach zwei Chromatographien leicht verunreinigt in einer Ausbeute von 39% erhalten. Um die richtigen Fraktionen nach der Chromatographie zu vereinigen, wurde jede Dritte bis Fünfte an der HPLC analysiert, da die Detektion per DC nicht ausreichte.

*Synthese von C6-BAB-d4TDP **28** und verbesserte Synthese von C11-BAB-d4TDP **31***

Die Verbindung C6-BAB-d4TDP **28** wurde nach dem angepassten Syntheseprotokoll (Methode C, Tabelle 2) synthetisiert. Während der ersten Chromatographie konnte reines Produkt erhalten werden. Nach einer weiteren Chromatographie konnte das Produkt in sehr hoher Reinheit und mit einer Ausbeute von 40% isoliert werden. Die Verbindung C11-BAB-d4TDP **31** war bereits zweimal synthetisiert worden (S. 40 und 49). Um eine ausreichende Menge für Hydrolysestudien, Charakterisierung und antivirale Tests zur Verfügung zu

haben musste sie ein drittes Mal synthetisiert werden. Mit dem gesamten erarbeiteten Know-How (optimiertes Reaktionsprotokoll, Methode C und Chromatographie) konnte die Verbindung in einer sehr guten Ausbeute von 63% erhalten werden. In beiden Fällen konnte aus Mischfraktionen kein reines Produkt isoliert werden.

Zusammenfassung der Synthesergebnisse für die BAB-d4TDP Zielverbindungen 25-34

Verbindung	R	Ansatz	Methode*	Ausbeute	Chromatographie
26	tBu		A	36%	vergl. S. 39
25	C3	1.	A	-	vergl. S. 50
		2.	A	-	
27	C4		A	32%	^b
28	C6		C	40%	^b
30	C9	1.	A	62% ^c	^b
		2.	A	44%	^b
31	C11	1.	A	n.r. ^d	vergl. S. 40
		2.	A	31%	^b
		3.	C	63%	^b
32	C13	1.	A	58% ^c	vergl. S. 45
		2.	A	67%	^b
33	C15		B	49%	^b
35	C17	1.	B	n.r. ^d	vergl. S. 51ff
		2.	B	n.r. ^d	vergl. S. 261ff
34	(8Z)-17	1.	A	n.r. ^d	vergl. S. 42
		2.	B	39%	^b

^a: als Bis-Ammoniumsalz; ^b: RP-18, Methanol-Wasser Gradient, vergl. Experimenteller Teil, 7.2.8; ^c: Verlust bei 2. Chromatographie mit Ammoniumformiatpuffer; ^d: nicht rein >95%; *: Methode A: Trocknung d4TMP unmittelbar vor der Reaktion über Molsieb, mehrfache Zugabe von Phosphoramidit und DCI; B: vergl. A, einmalige Zugabe von Phosphoramidit und DCI (1.4-1.7 Äq); C d4TMP Stammlösung über Molsieb, einmalige Zugabe Phosphoramidit und DCI (max. 1.1-1.2 Äq.), s. 7.2.8

Tabelle 2: Übersicht zur Synthese der BAB-d4TDP Prodrugs **25-34**

Die Synthese der Zielverbindungen **25-34** aus den entsprechenden Phosphoramiditen **46-53** und d4TMP **3** wurde in Ausbeuten von 32-67% erreicht. In allen Fällen wurden die Bedingungen für die Chromatographien individuell erarbeitet. Viele Verbindungen mussten mehrmals synthetisiert werden. Die besten Ergebnisse wurden letztendlich durch mehrfache Säulenchromatographie an RP-18 Kieselgel mit Methanol-Wasser-Gradienten erzielt. Über die durchgeführten Synthesen hinweg wurde das Syntheseprotokoll weiterentwickelt und an die veränderten Gegebenheiten (sehr lipophile Phosphoramidite) angepasst. Die Ergebnisse der beschriebenen Experimente sind in Tabelle 2 zusammengefasst:

*Synthese von (4-Decanoyloxybenzyl)-d4TDP (C9-AB-d4TDP) **36** und von (Cyanethoxy-4-decanoyloxybenzyl)-d4TDP (CEO-C9-AB-d4TDP) **37***

Um den Hydrolysemechanismus und das Verhalten der lipophilen BAB-d4TDP Prodrugs besser studieren und verstehen zu können sollte ein Hydrolyseintermediat z.B. C9-AB-d4TDP **36** synthetisiert werden, welches während der Hydrolyse von C9-BAB-d4TDP **30** entsteht.

H. Jessen hatte die monosubstituierten Intermediate (Acyloxybenzyl)-AZTDP und (Phenyloxybenzyl)-d4TDP aus den ³¹P-NMR-Hydrolyselösungen isolieren können.⁷⁰ Im Prinzip sollten sich auch die AB-Intermediate der BAB-d4TDP Verbindungen **26-34** auf diese Art isolieren lassen. Jedoch, war die Synthese und insbesondere die Reinigung dieser Verbindungen kompliziert und nicht alle Verbindungen wurden in größeren Mengen (> 40 mg) erhalten. Um die Hydrolyse vernünftig mittels ³¹P-NMR Spektroskopie verfolgen zu können und eine ausreichende Menge des monomaskierten Intermediats nach Chromatographie der Hydrolyselösung zu erhalten, müssten ca. 25 mg der BAB-d4TDP Verbindung eingesetzt werden (Molgewicht ca. 1000g/mol). Bei den chemischen Hydrolysen der Verbindungen wurde festgestellt, dass gerade die langkettigmodifizierte Verbindungen (R>C₆H₁₃) hohe Halbwertszeiten besitzen (S. 109). Auch dieser Umstand würde die Isolation der monosubstituierten Intermediate erschweren. Aus diesen Gründen wurde nach einer alternativen Syntheseroute gesucht, die die direkte Darstellung von Decanoyloxybenzyl-d4TDP **36** ermöglicht. Auf dem Synthesekonzept zur Darstellung der BAB-NDPs sollte die Synthese der monosubstituierten AB-d4TDP Verbindungen aufbauen.

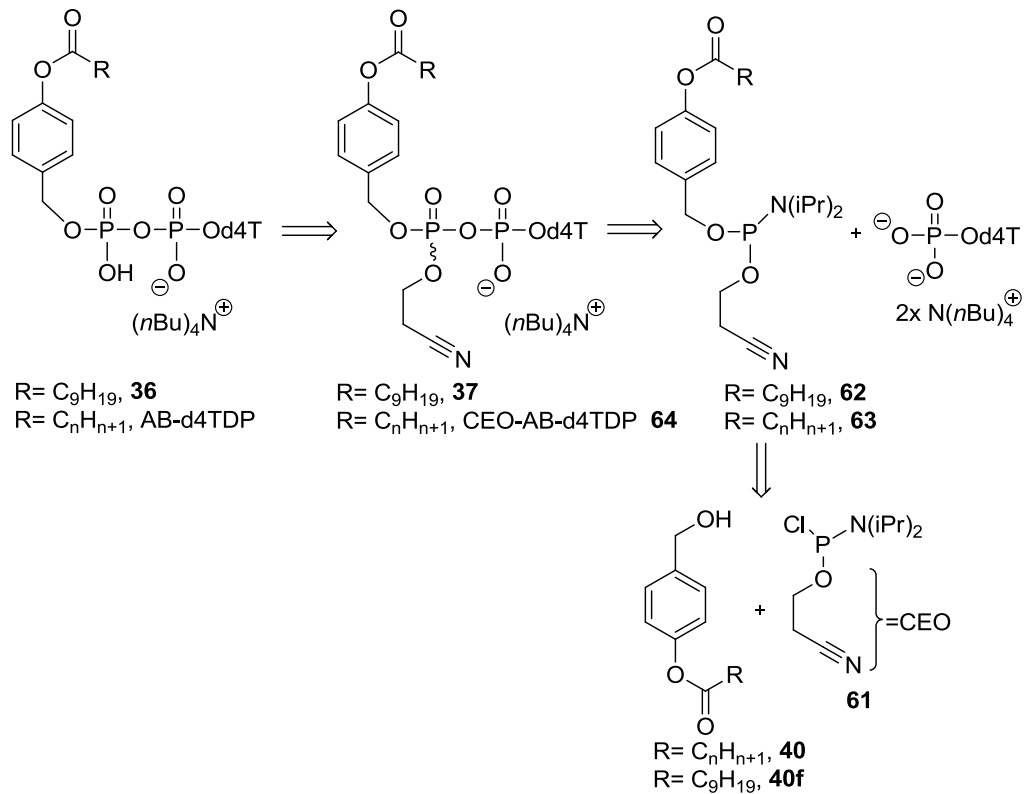


Abb. 34: Retrosyntheseschema zur Darstellung von C9-AB-d4TDP **36** und CEO-C9-AB-d4TDP **37**

Wie das Retrosyntheseschema zu Decanoyloxybenzyl-d4TDP **36** in Abb. 34 zeigt, sollte **36** aus dem asymmetrischen CEO-AB-d4TDP **37** durch Eliminierung der β -Cyanoethylgruppe (CEO) von **37** dargestellt werden. *P,P*-Cyanoethoxy-(4-decanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **62** wurde aus Cyanoethoxychloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **61** und 4-(Hydroxymethyl)phenyldecanoat **40f** erhalten (Abb. 35). Das eingesetzte Cyanoethoxychloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **61** war in der Arbeitsgruppe vorhanden. Alternativ kann es nach einer Vorschrift von *Amigues et al.* dargestellt werden.¹²¹

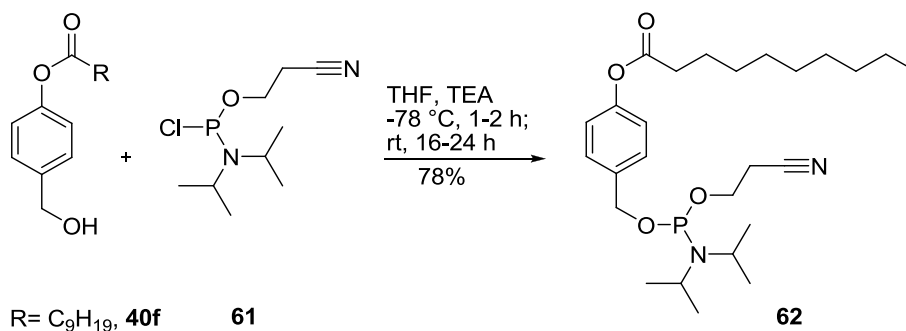


Abb. 35: Synthese des Phosphoramidits **62**

Die Reaktion zu **62** wurde unter einer Inertgasatmosphäre durchgeführt und das Produkt in einer Ausbeute von 78% nach Schlenkfiltration erhalten. Zur Synthese von CEO-C9-AB-d4TDP **37** wurde d4TMP mit dem Amidit **62** gekuppelt. Die Reaktion wurde nach Methode C durchgeführt (vergl. C6-BAB-d4TDP **28**, S.52). Nach einmaliger Chromatographie an RP-18 Kieselgel mit einem Methanol-Wasser Gradienten wurde **37** in einer Ausbeute von 40% erhalten. Eine Besonderheit von **37** ist, dass aufgrund der vier verschiedenen Substituenten am β -Phosphoratom ein stereogenes Zentrum generiert wurde. Es wurde zum ersten Mal ein asymmetrisches BAB-d4TDP Prodrug synthetisiert.

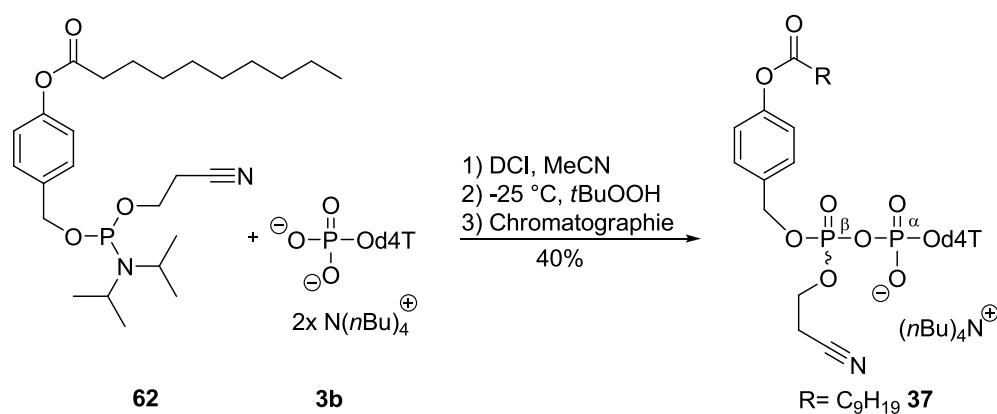


Abb. 36: Synthese von CEO-C9-AB-d4TDP **37**

Aufgrund der definierten Stereokonfiguration des Nucleosides und des stereogenen Zentrums am β -Phosphoratom wurde **37** als Gemisch zweier Diastereomere isoliert. Aufgrund des asymmetrischen β -Phosphoratoms von **37** wurden im ^{31}P -NMR Spektrum mehrere Signalsätze erwartet. Für die symmetrischen BAB-d4TDPs ergeben sich im ^1H -entkoppeltem ^{31}P -NMR Spektrum zwei Dubletts, die mit Hilfe eines ^{31}P - ^1H -COSY-NMR Experiments jeweils einem der beiden Phosphoratome zugeordnet werden konnten. Das zu tieferem Feld verschobene Signal wurde dem α -Phosphoratom zugewiesen (S. 104). Diese Zuweisung der Signale wurde auf **37** übertragen. Dem α -Phosphoratom ($\delta = 12.0$ ppm) konnte nur ein Dublett mit der Kopplungskonstante ($^2J_{\text{PP}} = 20.2$ Hz) zugeordnet werden. Da es sich um ein Diastereomerengemisch von **37** handelte, wurde ein zweites erwartet (Abb. 37). Für das β -Phosphoratom wurden zwei Dubletts gefunden, die zu einem doppelten Dublett überlagerten ($\delta = -13.4$ ppm, dd, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.3$ Hz, $J_{\text{PP}} = 8.6$ Hz, P- β). Anhand der Integration der drei Dubletts zeigte sich eindeutig, dass sich die beiden zu erwartenden Dubletts des α -Phosphoratoms überlagerten (Integrale: 2:1:1). Um die Aufspaltung dieser beiden Signale durch eine Veränderung der chemischen Verschiebung zu erzwingen,

wurden NMR Messungen in unterschiedlichen deuterierten Lösungsmitteln (CDCl_3 , CD_3OD , C_6D_6) durchgeführt (Abb. 37).

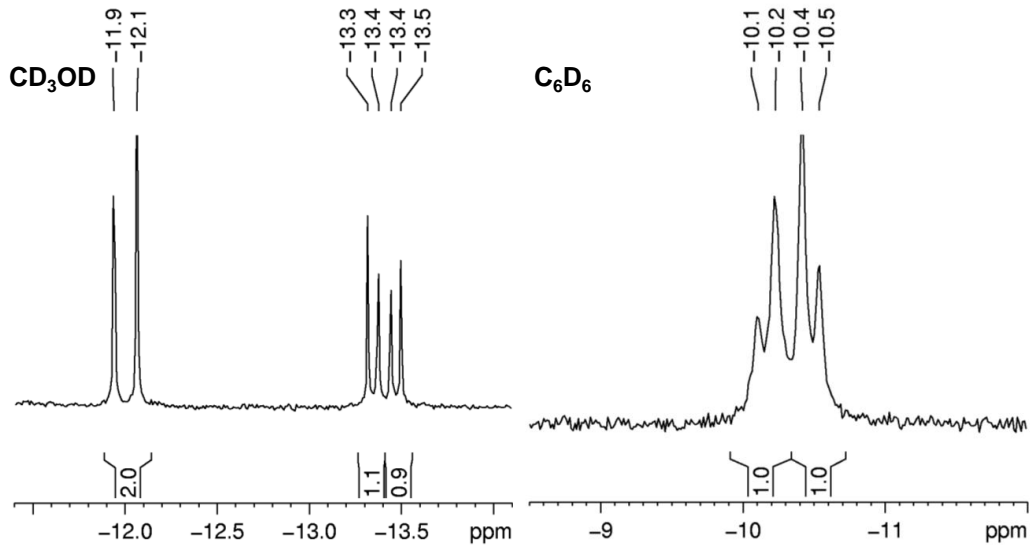


Abb. 37: ^{31}P -NMR Spektren von CEO-C9-AB-d4TDP **37** in Methanol- d_4 und in Benzol- d_6 (rechts)

Die abnehmende Polarität der Lösungsmittel bewirkte allerdings genau das Gegenteil: In den untersuchten Lösungsmitteln kam es zu einer Angleichung der chemischen Verschiebungen der Diastereomere.

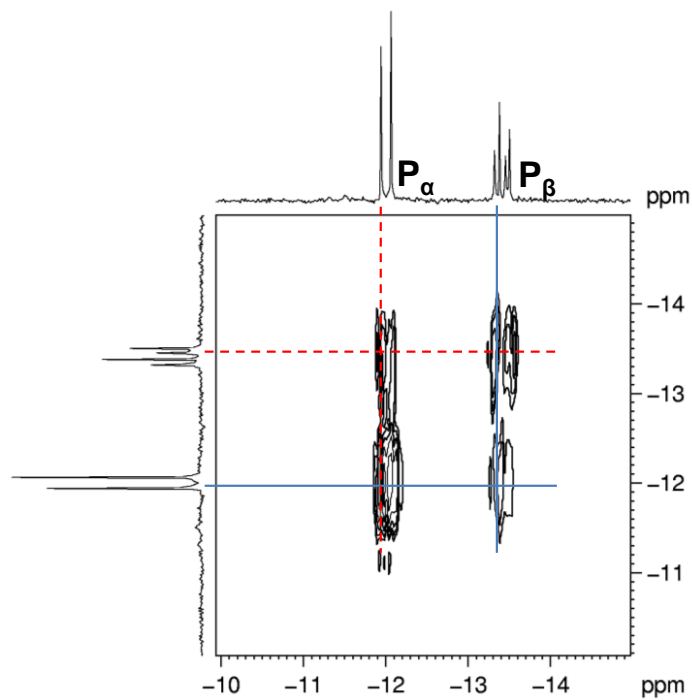


Abb. 38: ^{31}P , ^{31}P -COSY-NMR Spektrum von CEO-C9-AB-d4TDP **37** in Methanol- d_4

Vermutlich war der Einfluss der chiralen Umgebung des β -Phosphoratoms auf die chemische Verschiebung des α -Phosphoratoms nicht groß genug. Aus der Kopplungskonstanten von ${}^2J_{PP} = 20.2$ Hz für das Dublett des α -Phosphoratoms und der gemittelten großen Kopplung von ${}^2J_{PP} = 20.3$ Hz der beiden β -Phosphoratomen konnte auf die erfolgreiche Bildung der Pyrophosphatbrücke geschlossen werden. Den endgültigen Beweis erbrachte ein ${}^{31}\text{P}$, ${}^{31}\text{P}$ -COSY-NMR Experiment, in dem eindeutig die Kopplung der beiden Phosphoratomen miteinander zu erkennen ist (Abb. 38). Nachdem die Verbindung CEO-C9-AB-d4TDP **37** erfolgreich synthetisiert worden war, sollte diese in Decanoyloxybenzyl-AB-d4TDP **36** durch Eliminierung der Cyanoethylgruppe überführt werden. Zur Eliminierung der in der Synthese von Oligonucleotiden vielfach verwendeten β -Cyanethoxygruppe können prinzipiell viele verschiedene Basen eingesetzt werden, da sie über einen $\text{E}_{1\text{cb}}$ Mechanismus abgespalten wird. Bei der Reaktion zu **36** sollte eine nicht nucleophile Base unter trockenen Reaktionsbedingungen eingesetzt werden, um eine Verseifung der Acylgruppen zu vermeiden. In einem ersten Versuch wurde Diazabicycloundecen (DBU) verwendet. Hierzu wurde **37** in Acetonitril aufgenommen, zweimal koevaporiert, in Acetonitril gelöst und bei Raumtemperatur mit einem Äquivalent DBU versetzt. Nach 15 min konnte keine Veränderung beobachtet werden (DC), so dass die Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurden. Der Reaktionsansatz war zu klein, um das Rohgemisch zu chromatographieren und deshalb wurde aus den Spektren folgendes ermittelt:

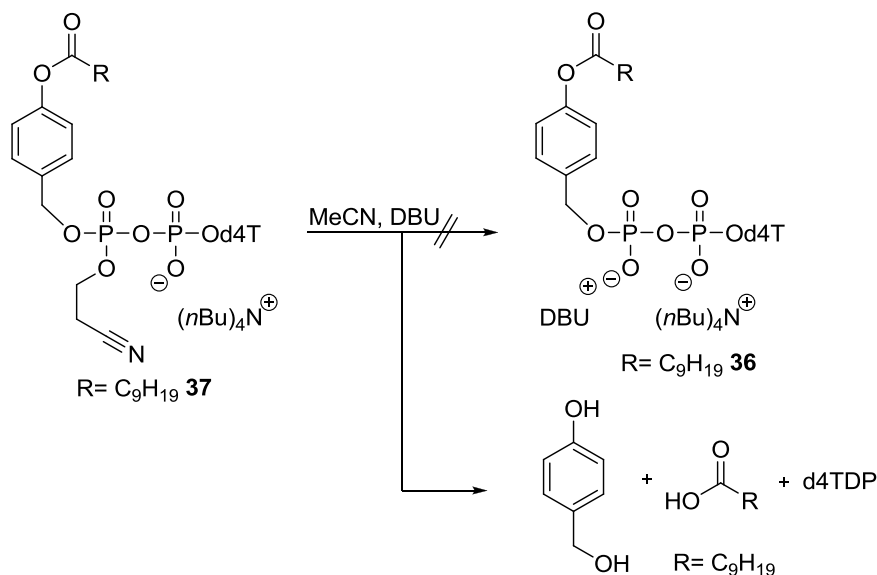


Abb. 39: Versuch der Darstellung von (4-Decanoyloxybenzyl)-d4TDP **36**

Die Cyanethoxygruppe und die Decanoyloxybenzylgruppe waren gespalten worden. Dies wurde aus der chemischen Verschiebung der α -Methylengruppe des Acylrestes geschlossen. Auch die chemische Verschiebung der Phosphoratome wies auf die Bildung von d4TDP hin. Eine mögliche Fehlerquelle ist die Trockenheit des DBUs, was das Ergebnis erklären dürfte. Um die Verbindung **36** in einem nächsten Versuch zu erhalten, sollte DBU mehrere Tage über Calciumhydrid destilliert werden und bei der abschließenden Chromatographie des Rohgemisches sollte ein Puffer verwendet werden, um die Basizität des DBUs zu kompensieren. Die Verbindung (4-Decanoyloxybenzyl)-d4TDP **36** konnte durch chemische Hydrolyse von Bis-(4-decanoyloxybenzyl)-d4TDP **30** in Phosphatpuffer und anschließender Chromatographie erhalten werden. Die Hydrolyse wurde mittels ^{31}P -NMR Spektroskopie verfolgt (vergl. Hydrolyse von C6-BAB-d4TDP, S. 105).

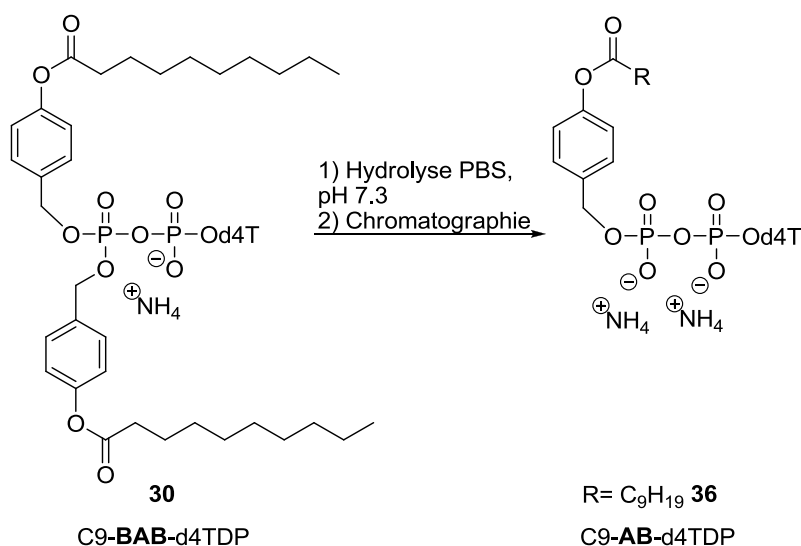


Abb. 40: Hydrolyse von C9-BAB-d4TDP **30** zu C9-AB-d4TDP **23**

4.1.1.2 Zusammenfassung der Syntheseresultate der BAB-d4TDP

Prodrugs

Die Zielverbindungen **26-37** wurden über eine konvergente Syntheseroute dargestellt. Die benötigten Phenolester **40a-k** konnten im Grammaßstab dargestellt werden. Die Bedingungen für die Chromatographie der *N,N*-Diisopropylphosphoramidite **48-53** mussten an deren Lipophilie angepasst werden (S. 33f). Das Nucleosidmonophosphat d4TMP **3** wurde in einer vierstufigen Synthese ausgehend von Thymidin synthetisiert und in das benötigte Bis-tetra-*n*-butylammoniumsalz **3a** in einer Ausbeute von 98% überführt (S. 35ff). Die Zielverbindungen **26-34** wurden aus d4TMP und den Phosphoramiditen **48-53** durch eine DCI vermittelte Kupplung in Ausbeuten von 32 bis 67% dargestellt. Die

Chromatographie erwies sich als eine komplexe Herausforderung, die unabhängig von der Kettenlänge des Acylrestes war. Sowohl die Reinigung von C3-BAB-d4TDP **25** als auch die von (8Z)-C17-BAB-d4TDP **34** und C17-BAB-d4TDP **35** waren sehr schwierig wobei viele Möglichkeiten zur Reinigung dieser amphiphilen Verbindungen untersucht wurden: Chromatographie an Kieselgel (Chromatotron), Größenausschlusschromatographie, Ionenpaarchromatographie mittels HPLC, Ionenpaarchromatographie an RP-18 Kieselgel unter Atmosphärendruck. Als zuverlässigste Methode erwies sich die mehrfache Trennung der Verbindungen an RP-18 Kieselgel mit Wasser-Methanol-Gradienten. Als Nebenprodukte bildeten sich die Phosphorsäurediester **59a-k** die ein sehr ähnliches Elutionsverhalten wie die Zielverbindungen zeigten und die Reinigung erschwerten. Um den Reaktionsumsatz zu steigern und die Bildung der Phosphorsäurediester zu minimieren, wurde die Reaktionsführung nach und nach optimiert und an die jeweilige Verbindung angepasst, so dass die Mehrheit der Zielverbindungen in Ausbeuten von über 60% erhalten wurde (Tabelle 2). Mit der Synthese von CEO-C9-AB-d4TDP **37** wurde erstmalig ein asymmetrisches d4TDP Prodrug dargestellt und ein Syntheseweg zu den monomaskierten AB-d4TDP Verbindungen eröffnet. Die abschließende Eliminierung der Cyanoethoxyeinheit von CEO-C9-AB-d4TDP **37** zu C9-AB-d4TDP **36** gelang in einem ersten Versuch nicht. Allerdings sollte dies unter den richtigen Reaktionsbedingungen (absolute Trockenheit) gelingen. Aus der chemische Hydrolyse von C9-BAB-d4TDP **30** konnte C9-AB-d4TDP **36** gewonnen werden und stand als wichtige Referenzverbindung für HPLC Untersuchungen zur Verfügung.

4.1.2 Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)-AZTDP Prodrugs mit lipophilen (4-Acyloxybenzyl)-Einheiten

Die Synthese von lipophilen Bis-(4-acyloxybenzyl)-d4TDPs **26-34** verlief nach anfänglichen Schwierigkeiten in Bezug auf Reaktionsführung und Chromatographie dennoch sehr erfolgreich. Wie bereits beschrieben wurde, wird AZTMP **6** während der intrazellulären Phosphorylierung nur schlecht in das Nucleosiddiphosphat **7** überführt (Kapitel 2.2.1). Aus diesem Grund wären die Untersuchungen der biologischen Eigenschaften von lipophilfunktionalisierten BAB-AZTDP Prodrugs sehr interessant. Spannend wäre auch der Vergleich zwischen den Hydrolyseeigenschaften der BAB-AZTDP mit denen der BAB-d4TDP Prodrugs, der sicherlich weitere Erkenntnisse über das Verhalten dieser Verbindungen liefern könnte. Das Nucleosid d4T wurde als Modellverbindung zur vertiefenden Analyse der Synthese und des Verhaltens von fettsäuremodifizierten BAB-

NDP Verbindungen gewählt. Es sollte versucht werden, die Syntheseroute auf einige entsprechende AZT Verbindungen zu übertragen:

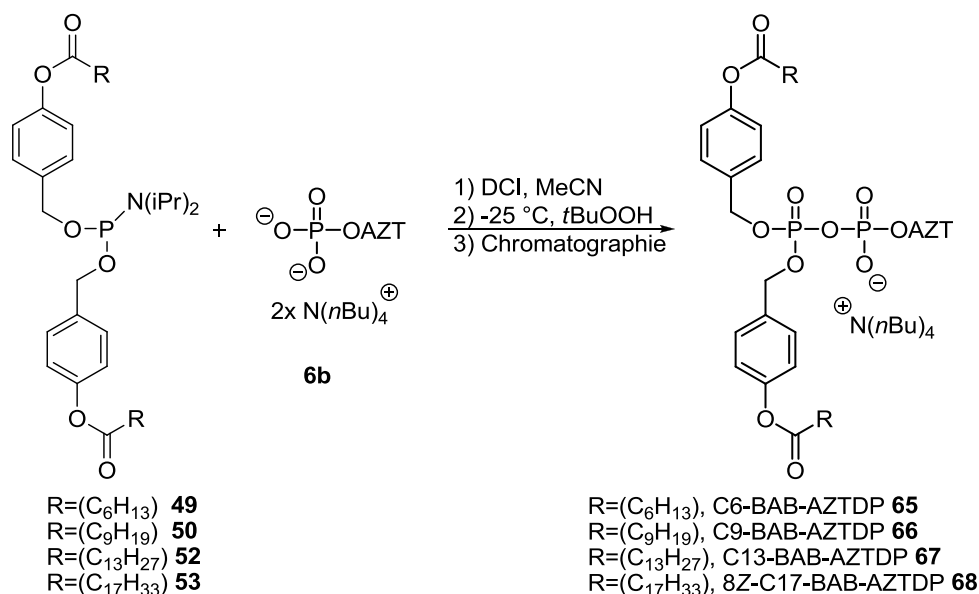
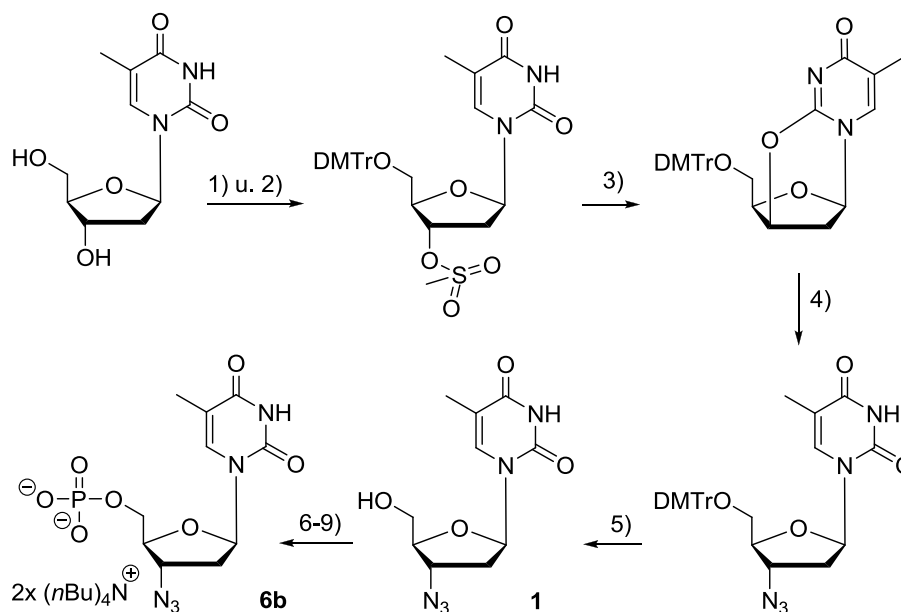


Abb. 41: Synthese von fettsäuremodifizierten BAB-AZTDPs

Die für die Synthese der BAB-AZTDPs **65-68** benötigten Phosphoramidite **49,50,52** und **53** waren bereits synthetisiert worden (Abb. 24), so dass nur noch das Nucleosidmonophosphat AZTMP **6** benötigt wurde. AZT **1** wurde nach einer Vorschrift von *Horwitz et al.*¹²² und nach einem angepassten Protokoll von *T. Knispel*¹¹⁵ in einer Gesamtausbeute von 16% über vier Stufen ausgehend von Thymidin hergestellt. Später wurde AZT kommerziell erworben, da sich sein Marktpreis deutlich verringert hatte. Aus AZT wurde nach dem Protokoll von *T. Sowa und F. Ouchi*¹⁰⁶ AZTMP als Ammoniumsalz **6a** gewonnen. Nach zweimaliger Chromatographie wurde es in einer Ausbeute von 89% isoliert und die Ammoniumionen durch Tetra-*n*-butylammoniumionen ersetzt. Dies gelang durch Ionentausch an DOWEX 50WX8 und Gefriertrocknung in einer Ausbeute von 98%. Tetra-*n*-butylammonium-AZTMP **6b** ist in Acetonitril löslich und kann in Kupplungsreaktionen mit den Phosphoramiditen umgesetzt werden.



- 1) DMTr-Cl, TEA, Dimethylaminopyridin, Pyridin, 98%; 2) Mesylchlorid, Pyridin, 88%;
 3) Phthalimid-Kaliumsalz, DMF, H₂O, 42%; 4) Lithiumazid, DMF, 65%; 5) Trifluoressigsäure,
 DCM, 67%; 6) Phosphorylchlorid, Pyridin, Acetonitril 7) *in situ* Eiswasser, (NH₄)HCO₃; 8)
 Gefriertrocknung, Chromatographie, 98%; 9) DOWEX 50WX8 H⁺, N(*n*Bu)₄OH,
 Gefriertrocknung, 89%

Abb. 42: Synthese von AZT **1** und AZTMP **6b**

*Erste Versuche der Synthese von C9-BAB-AZTDP **66**, von C13-BAB-AZTDP **67** und von (8Z)-C17-BAB-AZTDP **68***

Lipophile, durch langkettige Fettsäuren funktionalisierte BAB-AZTDP Prodrugs waren noch nicht synthetisiert worden. In einer ersten Synthese wurde AZTMP **70** mit Bis-(4-decanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit in einer DCI vermittelten Kupplungsreaktion umgesetzt (Methode A, s. 38). Erstaunlicherweise konnte bei dieser Reaktion bereits nach ca. 4 h Reaktionszeit ein fast vollständiger Umsatz des Monophosphates **70** und die Bildung eines neuen Produktes beobachtet werden (DC). Nach Oxidation und Entfernen der Lösungsmittel wurde das Rohgemisch über RP-18 Kieselgel mit einem Methanol-Wasser-Gradienten gereinigt. Das Produkt konnte angereichert werden, wurde aber nicht sauber erhalten. Ein dominantes Nebenprodukt blieb der Phosphorsäurediester **59f**. Durch ein Massenspektrum wurden dies bestätigt (MS-ESI (neg.): **59f** [M]⁻: ber. 617.32, gef. 617.09 und **66** [M]⁻: ber. 946.38, gef. 946.06). Nach einer zweiten Chromatographie der angereicherten Mischfraktion wurde nur stärker verunreinigtes Produkt isoliert. Die Verbindung C9-BAB-AZTDP **66** konnte in diesem ersten Versuch synthetisiert aber nicht sauber isoliert werden. Ihre Synthese wurde daher zu einem späteren Zeitpunkt nach Methode C wiederholt, deren Vorteile in der besseren

Trocknung des Nucleosidmonophosphats und der Zugabe von nur 1.2 Äquivalenten des Phosphoramidits gesehen wurden (vergl. S.52 für Methode C). Die Bildung von Nebenprodukten sollte als Folge minimiert werden. Bei dieser zweiten Reaktion konnte kein vollständiger Verbrauch von AZTMP beobachtet werden. Dennoch wurde die Reaktion nach etwa 24 h durch Oxidation und anschließendem Entfernen der Lösungsmittel abgebrochen und das Rohprodukt über RP-18 Kieselgel getrennt. Abermals gestaltete sich die Chromatographie als problematisch: Da einerseits die Detektion der Nebenprodukte per DC nicht eindeutig war und andererseits diese Nebenprodukten aufgrund ihre ähnlichen Elutionsverhaltens kaum abgetrennt werden konnten. Dennoch wurde Produkt nach einer zweiten Chromatographie in guter Reinheit erhalten, so dass sein Hydrolyseverhalten untersucht werden konnte (S. 141ff). Während der Synthesen von C13-BAB-AZTDP **67** und von (8Z)-C17-BAB-AZTDP **68** nach der Methode A konnte die Bildung eines Produktes per DC beobachtet werden. Beide Reaktionsansätze waren aufgrund der unlöslichen Phosphoramidite Suspensionen gewesen, so dass es nur zu einem schlechten Umsatz des AZTMPs kam. Die Produkte konnten nicht isoliert werden.

*Synthese von C6-BAB-AZTDP **65** und Versuche zur Reinigung per HPLC im präparativen Maßstab*

C6-BAB-AZTDP **65** wurde nach der Methode A synthetisiert. Nach 20 h wurde ein sehr guter Umsatz des AZTMPs beobachtet (DC). Es wurde wie beschrieben weiterverfahren. Nach der ersten Chromatographie an RP-18 Kieselgel konnte wie in den Fällen zuvor kein sauberes Produkt isoliert werden. In den ³¹P-NMR Spektren der erhaltenen Mischfraktionen wurden viele Signale im Bereich um 11 ppm registriert, die normalerweise nur in sehr geringer Intensität oder garnicht beobachtet wurden. Keines dieser phosphorhaltigen Nebenprodukte konnte isoliert werden. Zu den isolierten Nebenprodukten (nach Proton-NMR Analyse) gehörten: der Phenylester **40e** und Heptansäure. Durch die erneute Reinigung von Mischfraktionen konnte das Produkt **65** nicht sauber erhalten werden. Aus diesem Grund wurde versucht eine bessere Reinigung durch präparative HPLC Chromatographie zu erreichen. Viele Versuche mit unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen (Methanol-Wasser, Acetonitril-Wasser, Methanol-Ammoniumformiatpuffer) wurden durchgeführt. In einem Fall wurde ein kleiner Teil des Produktes mit Verunreinigungen erhalten.

4.1.2.1 Abschlussbetrachtung zur Synthese der BAB-AZTDP Verbindungen

Zwar stand die Darstellung von BAB-AZTDP Prodrugs nicht im Mittelpunkt dieser Arbeit, dennoch sollte die Reihe von lipophilen BAB-d4TDPs sinnvoll durch analoge BAB-AZTDP

Verbindungen ergänzt werden, um ihre Eigenschaften (Hydrolyseverhalten, antivirale Aktivität) vergleichen zu können. Bei der Synthese der funktionalisierten BAB-d4TDPs **26-34** war es bereits zu Schwierigkeiten bei deren Reinigung gekommen. Die Chromatographie der synthetisierten BAB-AZTDPs **65-68** war noch anspruchsvoller. Auffallend war, dass sich bei den Reaktionen zu C6-BAB-AZTDP **65** und C9-BAB-AZTDP **66** ein fast vollständiger Umsatz des AZTMPs gezeigt hatte. Gleichzeitig wurde jedoch die Chromatographie schwieriger und die Anzahl an Nebenprodukten (nach Signalen im ^{31}P -NMR zu urteilen) war höher als bei den Synthesen der vergleichbaren BAB-d4TDPs. Möglicherweise konkurrierte mit der gewollten Kupplungsreaktion eine Staudinger-Reaktion, die die Reduktion von Aziden zu Aminen unter milden Bedingungen ermöglicht.^{123,124} Unter den gewählten Kupplungsbedingungen könnte es in der Tat zu einer Reaktion zwischen dem aktivierten Phosphoramidit und der Azidgruppe des AZTMPs gekommen sein. *Wada et al.* beobachteten eine Reaktion zwischen 2-Azidoadenosin und Diethyloxy-*N,N*-diisopropylphosphoramidit unter Bildung eines entsprechenden Phosphinimins mit einer chemischen Verschiebung von 13 ppm im ^{31}P -NMR Spektrum.¹²⁵ Bei der Reaktion zu C6-BAB-AZTDP **65** war eine Häufung von Signalen im ^{31}P -NMR Spektrum um 11 ppm beobachtet worden (S. 64). Aufgrund der Beobachtungen von *Wada et al.* wählten *Kiviniemi et al.* die H-Phosphonatmethode zur Inkorporation von 4'-C-Azidomethylthymidin in Oligonucleotide.¹²⁶ Eingehender haben sich *Coppola et al.* mit diesen Konkurrenzreaktionen während der Oligonucleotidsynthese und -funktionalisierung beschäftigt.¹²⁷ Ggf. kam es aufgrund dieser Reaktion auch zu dem sehr guten Umsatz des AZTMPs bei der Darstellung von **65** und **66** und eben auch zur Bildung von mehreren nicht identifizierten Nebenprodukten. Bei zukünftigen Synthesen von BAB-AZTDPs sollte diese Möglichkeit zur Konkurrenzreaktion berücksichtigt werden. Festzuhalten bleibt, dass bei allen hier gezeigten Syntheseansätzen die gewünschten Produkte entstanden waren, sie aber nur in zwei Fällen isoliert werden konnten.

4.1.3 Synthese von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-*O*-*iso*-butyryl-BVdUDP

Wie unter Abschnitt 2.3.2 erwähnt wurde, wird das Nucleosidanalogon BVdU zur Therapie von Herpes-Infektionen eingesetzt und entfaltet dabei seine antivirale Aktivität als BVdU-Triphosphat.⁹² Die Phosphorylierung des Nucleosids zum Mono- und zum Diphosphat (BVdUMP bzw. BVdUDP) erfolgt durch virale Kinasen. In Zellen, die nicht mit dem Herpes Virus infiziert sind, ist BVdU daher nicht antiviral aktiv, da es nicht zum BVdU-Triphosphat (BVdUTP) phosphoryliert werden kann (S.15f). Gelänge es mit Unterstützung eines Prodrugs BVdUDP intrazellulär freizusetzen, könnte es durch zelleigene NDP-Kinasen zum

Triphosphat phosphoryliert werden und antivirale Aktivität gegenüber anderen Viren, wie z.B. HIV, zeigen. *H. Jessen* hatte in seiner Doktorarbeit Bis-(4-phenoxybenzyl)-3'-*O*-*iso*-butyryl-BVdUDP synthetisiert und antivirale Eigenschaften gegenüber HIV-1 und HIV-2 nachgewiesen. Ob diese Aktivitäten in einem direkten Zusammenhang mit der Verwendung des BAB-BVdUDP Prodrugs standen, konnte nach einem Befund nicht mit Sicherheit geklärt werden.⁷⁰ In einer der ersten Synthesen dieser Dissertation wurde Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-*O*-*iso*-butyryl-BVdUDP **71** synthetisiert. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass die Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-Einheiten wichtige Eigenschaften für die bioreversible Maskierung von Nucleosiddiphosphaten vereinen: Zum einen besitzen die Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-maskierten NDPs eine ausreichende Hydrolysestabilität und zum anderen wird das entsprechende NDP noch schnell und selektiv freigesetzt.⁷⁰ Zu diesem Zeitpunkt war noch nicht klar gewesen, dass die Lipophilie der Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-Einheit ggf. nicht ausreichte, um die negative Ladung des α -Phosphats zu kompensieren. Die Zielverbindung **71** sollte wie auch die BAB-d4TDP und die BAB-AZTDP Verbindungen über eine DCI vermittelte Kupplung des Phosphoramidits mit dem BVdUMP **70** erhalten werden.

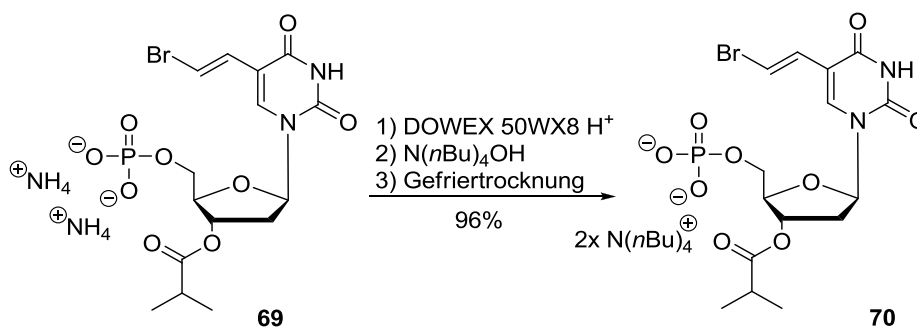


Abb. 43: Ionenaustausch an 3'-*O*-*iso*-butyryl-BVdUMP **69** zu **70**

Um Nebenreaktionen während dieser Kupplung und der vorangegangenen Phosphorylierung des BVdUs zu verhindern, wurde BVdU selektiv an der 3'-OH-Position mit einer biodegradierbaren Schutzgruppe versehen. Das Bisammoniumsalz von BVdUMP **69** war vorhanden und musste für die folgende Reaktion durch Ionenaustausch in das Bis-tetra-*n*-butylammoniumsalz überführt werden, was in einer Ausbeute von 96% gelang. Nach der Methode A wurde BVdUMP **70** mit Bis-(4-pivaloyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **46** unter Zusatz von DCI umgesetzt, mit *tert*-Butylhydroperoxid oxidiert und anschließend einer ersten Säulenchromatographie unterzogen (Methode A, S.38). Nach dieser Chromatographie wurde das Produkt **71** bereits in einer sehr guten Reinheit mit einer hohen Ausbeute von 64% isoliert. Erhaltene Mischfraktionen wurden ein

weiteres Mal mit einem Laufmittelgradienten aus Methanol und Ammoniumformiatpuffer (0.25 M) an RP-18 Kieselgel chromatographiert, so dass ein weiterer Teil an sauberem Produkt als Ammoniumsalz erhalten werden konnte.

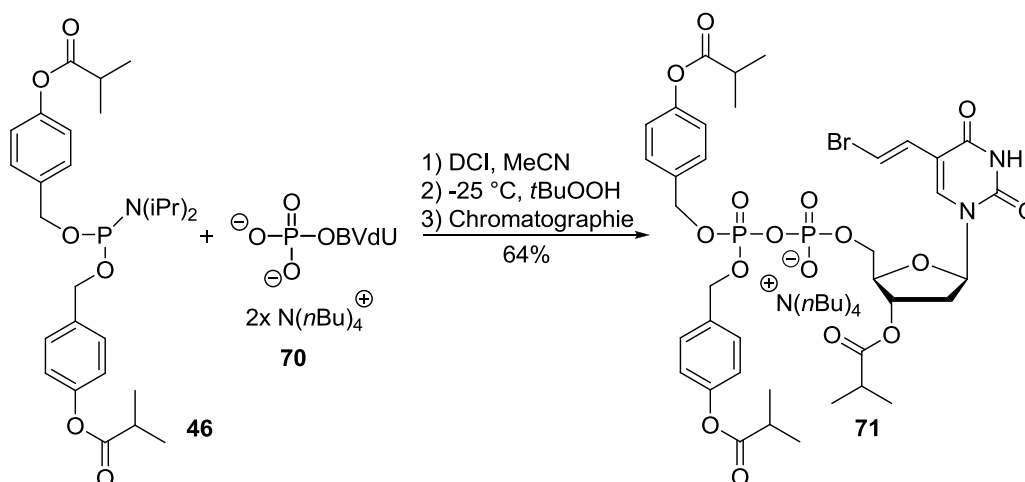


Abb. 44: Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-*O*-*iso*-butyryl-BVdUDP, BIB-BVdUDP **71**

Die Chromatographie von **71** verlief verglichen mit den Reinigungen der BAB-d4TDPs und der BAB-AZTDPs sehr gut. Dies war mit Sicherheit der geringen Polarität der Verbindung geschuldet, so dass die Nebenprodukte wie z.B. der Phosphorsäurediester **59** leicht abgetrennt werden konnten. Mit Verbindung **71** war ein weiteres sehr interessantes BAB-Prodrug synthetisiert worden. Die in Abb. 17 gezeigte Syntheseroute konnte demnach ebenfalls für die Darstellung von 3'-*O*-geschützten BAB-NDPs verwendet werden.

4.1.4 Synthese von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-*O*-*iso*-butyryl-D-*carba*-dTDP

Das Nucleosidanalogen D-*carba*-dT zeigte vielversprechende antivirale Aktivitäten gegenüber HIV-1 in unterschiedlichen Zellsystemen und gegenüber NRTI-resistenten HIV-RT Mutanten bei *in vitro* Assays.¹²⁸ Anders als die in Abb. 2 auf Seite 5 gezeigten NRTIs besitzt D-*carba*-dT eine 3'-OH-Gruppe. Allerdings wurde in diesem Nucleosidanalogen der Ringsauerstoff durch eine Methylengruppe substituiert. Aufgrund der vorhandenen 3'-OH-Gruppe und seiner, aus dem Cyclopentanring resultierenden, speziellen Konformation, sollte D-*carba*-dT von Kinasen und auch Polymerasen als Substrat akzeptiert werden.¹²⁹ Zum Abbruch der Reversen Transkription kommt es nicht direkt nach dem Einbau von D-*carba*-dT in den wachsenden DNA-Strang. Durch die HIV-1 RT wird nur ein weiteres Nucleotid nach D-*carba*-dT in den Strang eingefügt. Es kommt zu einem

sogenannten kinetischen Kettenabbruch.¹³⁰ Untersuchungen von *D-carba-dT* und 3-MethylcycloSal-*D-carba-dT* weisen allerdings daraufhin, dass die Phosphorylierungen von *D-carba-dT* zum *carba-dTMP* und möglicherweise weiter zum *carba-dTDP* unzureichend durch die entsprechenden Enzyme katalysiert werden.^{128,131} Die selektive intrazelluläre Freisetzung von *D-carba-dTDP* könnte dieses Problem umgehen. Nach der gezielten Freisetzung sollte *carba-dTDP* zum Triphosphat phosphoryliert werden können. Für die weiteren Untersuchungen der Eigenschaften von *carba-dT* und seiner intrazellulären Phosphorylierung wurde ein Diphosphat Prodrug von *D-carba-dT* im Rahmen eines Schwerpunktpraktikums in Zusammenarbeit mit S. Jessel synthetisiert.

Grundsätzlich sollte die Zielverbindung Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-*O-iso*-butyryl-*carba-dTDP* **88** nach der gezeigten konvergenten Synthesestrategie erzeugt werden (Abb. 51, S. 72). Zum Aufbau der Pyrophosphateinheit sollte auch hier im Kupplungsschritt ein 3'-*O*-geschütztes *carba-dTMP* mit Bis-(*iso*-butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropyl-phosphoramidit **46** unter Zusatz von DCI umgesetzt werden.

Synthese von *D-carba-dT* **72**

D-carba-dT **72** musste synthetisiert werden. Zur Synthese von carbocyclischen Nucleosiden wurden innerhalb der Arbeitsgruppe viele Arbeiten angefertigt, auf die nicht im Detail eingegangen werden kann. O. Ludek¹³¹⁻¹³³ konnte eine Syntheseroute zur Darstellung von carbocyclischen D-Nucleosidanaloga ausgehend von Cyclopentadien unter Berücksichtigung der Vorarbeiten von Biggadike et al.¹³⁴ etablieren. Im Zuge der Synthese von carbocyclischen L-Nucleosidanaloga gelang es S. Jessel die Syntheseroute von O. Ludek nochmals zu optimieren und sie auf die Darstellung von *D-carba-dT* **72** zu übertragen.^{135,136}

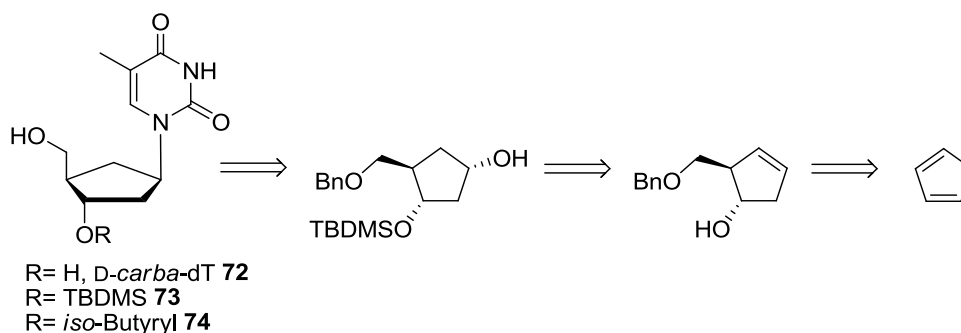


Abb. 45: Retrosynthetische Darstellung von *D-carba-dT* **72**

Die 3'-Hydroxygruppe von *carba*-dT sollte während der Synthese von *carba*-dT-monophosphat (*carba*-dTMP) mit einer Schutzgruppe versehen sein, die auch auf der Stufe des Diphosphat Prodrugs **88** erhalten bleiben sollte. Wie bei der Synthese der BVdUDP-Verbindung **71** sollte als bioreversible Schutzgruppe ein *iso*-Butyrylester verwendet werden. Ein solcher Ester sollte vom Prodrug durch Esterasen abgespalten werden können. Diese Schutzgruppe wurde bei der Syntheseführung zur Darstellung von *carba*-dT **72** frühzeitig berücksichtigt, um sich zusätzliche Stufen durch Funktionalisierung/Defunktionalisierung sparen zu können. Beim Aufbau des enantiomerenreinen carbocyclischen Grundgerüsts sollten daher die Schutzgruppen so früh wie möglich definiert werden. Die basenlabile *iso*-Butyrylgruppe hätte bei einigen Synthesen während des Aufbaus von *carba*-dT **72** unkontrolliert abgespalten werden können, so dass sie zunächst durch eine Silylschutzgruppe substituiert wurde. Aus Cyclopentadien **75** konnte unter Verwendung von (-)-*Diisopinocampheylboran* ((-)-*ipc*)₂-Boran) enantiomerenrein das Cyclopentenol (1*S*,2*R*)-2-(Benzyloxymethyl)cyclopent-3-enol **76** in einer Ausbeute von 64% über zwei Stufen synthetisiert werden (Abb. 46).

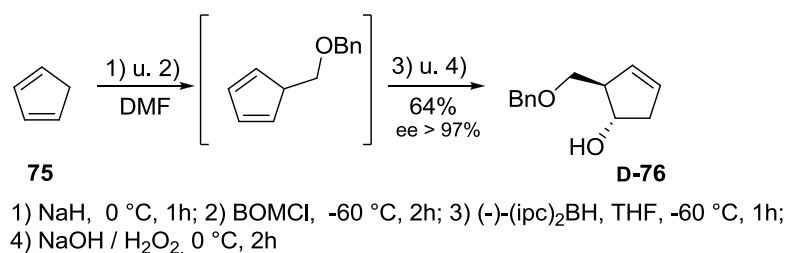


Abb. 46: Enantiomerenreine Darstellung des Cyclopentenols **D-76**

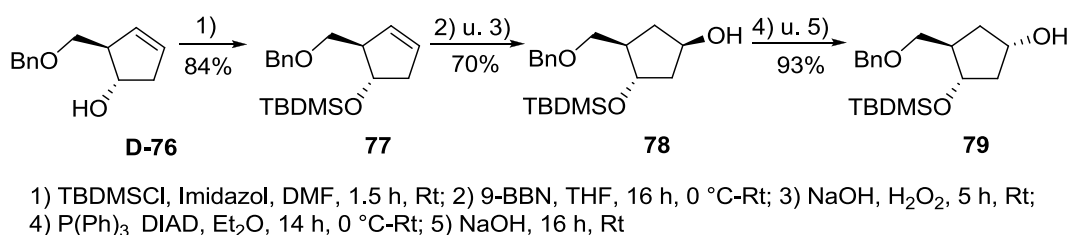
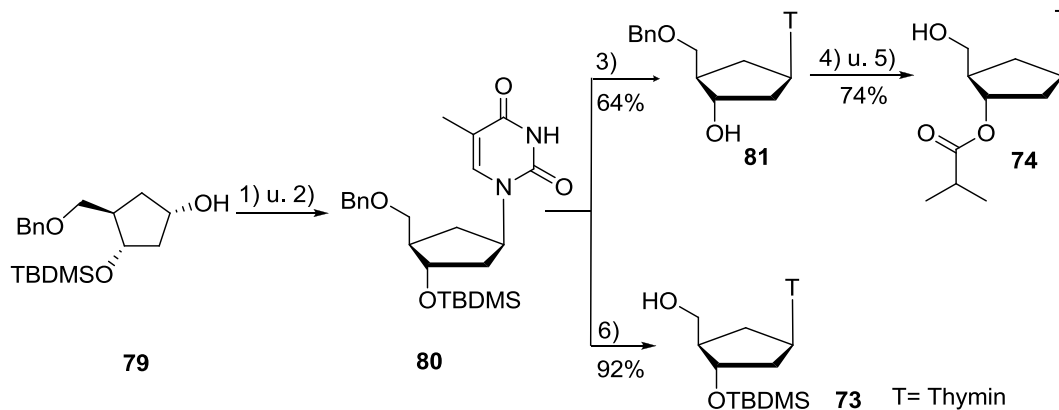


Abb. 47: Darstellung der Cyclopentanole **78** und **79**

Das Cyclopentenol **D-76** besitzt auf dieser Stufe bereits die carbocyclische Grundstruktur des Desoxyriboseteils eines Nucleosids. Über die Synthesesequenz von Silylierung, Hydroborierung und Mitsunobu-Reaktion wurde der Vorläufer für die Kupplung mit Benzoylthymidin zum *carba*-dT erhalten (Abb. 47). Durch eine weitere Mitsunobu-Reaktion gefolgt von einer *in situ* Debenzoylierung der Nucleobase wurde das doppelt geschützte

carba-dT **80** erhalten (Abb. 48).¹³⁵ Vor der Synthese der Monophosphate musste nun noch die 5'-O-Position deblockiert werden. Durch Hydrogenolyse wurde die Benzylgruppe entfernt und die 3'-silylierte Verbindung **73** erhalten. Um zu 3'-*O*-*iso*-butyryl-*carba*-dT **74** zu gelangen, wurde mit TBAF desilyliert, mit *iso*-Buttersäureanhydrid verestert und abschließend unter einer Wasserstoffatmosphäre an Palladium auf Aktivkohle debenzyliert. Alle Reaktionen lieferten die gewünschten Produkte in guten bis sehr guten Ausbeuten.



1) *N*1-Benzoylthymin, P(Ph)₃, DIAD, Et₂O, 14 h, 0 °C-Rt; 2) NaOH, 16 h, Rt; 3) TBAF, THF, 3 h Rt; 4) *iso*-Buttersäureanhydrid, Pyridin, 3 h, Rt; 5) H₂, Pd/C, EtOH, 24 h; 6) H₂, Pd/C, EtOH, 24 h

Abb. 48: Synthese von 3'-*O*-TBDMS-*carba*-dT **73** und 3'-*O*-*iso*-butyryl-*carba*-dT **74**

Synthese der *D*-*carba*-dT Monophosphate **84** und **86**

Die entsprechenden *D*-*carba*-dT Monophosphate **84** und **86** sollten über die bewährte Phosphorylierung nach *T. Sowa* und *F. Ouchi* generiert werden (vergl. Abb. 26, S.36). Die Umsetzung von 3'-*O*-*iso*-butyryl-*carba*-dT **74** zu Diammonium-3'-*O*-*iso*-butyryl-*carba*-dTMP **84** gelang in einer Ausbeute von 50%. Die geringere Ausbeute, verglichen mit denen der Synthesen von d4TMP (94%) und AZTMP (89%) kann auf die Spaltung des *iso*-Butyrylesters bei einem Teil des NMPs **84** während der Reaktion zurückgeführt werden, so dass zwei Produkte sehr ähnlicher Polarität an RP-18 Kieselgel getrennt werden mussten.

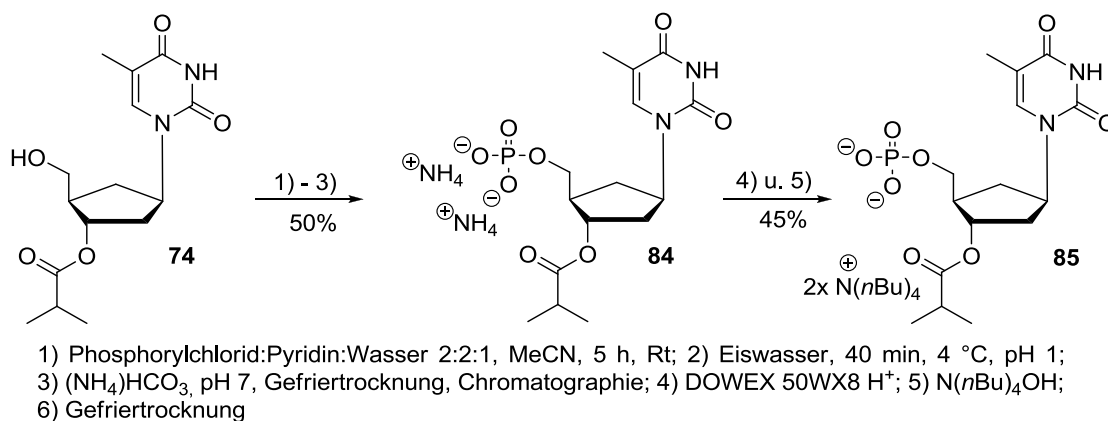


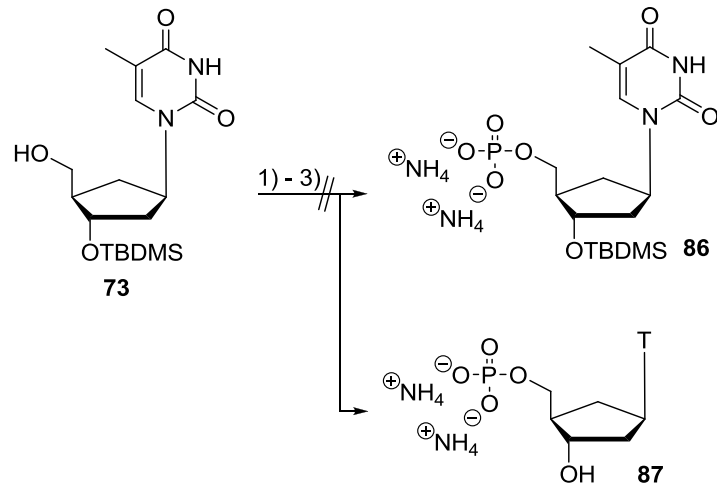
Abb. 49: Synthese von 3'-*O*-iso-buteryl-*carba*-dTMP als Diammonium- und als Bis-tetra-*n*-butylammoniumsalz

Dennoch konnte die Verbindung sauber erhalten werden und in das Bis-tetra-*n*-butylammoniumsalz **85** in einer Ausbeute von 45% überführt werden. Des Weiteren wurde erstmalig der Versuch unternommen, ein in 3'-Position silyliertes Nucleosidanalogon nach der genannten Methode zu phosphorylieren. Dieses Experiment wurde unternommen, um das entsprechende Monophosphat **86** zu erhalten. Es sollte anschließend entweder mit einem Phosphoramidit zum Prodrug umgesetzt werden und dann desilyliert werden oder als Monophosphat desilyliert und dann mit dem Amidit gekuppelt werden. Beide Zielverbindungen (Prodrug mit und ohne TBDMS-Gruppe) wären aus synthetischer und analytischer Sicht interessant gewesen. Allerdings konnte 3'-*O*-TBDMS-*carba*-dT **83** nach der Methode von *T. Sowa und F. Ouchi* nicht phosphoryliert und 3'-*O*-TBDMS-*carba*-dTMP **86** nicht erhalten werden. Bei der wässrigen Hydrolyse des überschüssigen Phosphorylchlorids bei 4 °C für 40 bis 60 min stellt sich ein pH-Wert von 1 ein und erst danach wird mit Ammoniumhydrogencarbonat neutralisiert. Unter diesen stark sauren Bedingungen war die Silylschutzgruppe nicht stabil, so dass zwar das desilylierte *carba*-dTMP **87** im ¹H-NMR identifiziert, aber die noch vorhandenen Verunreinigungen nicht entfernt werden konnten.

Synthese von Bis-(4-iso-butyryloxybenzyl)-3'-*O*-iso-butyryl-D-*carba*-dTDP **88**

Nachdem nun Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-3'-*O*-iso-butyryl-D-*carba*-dTMP **85** über 11 Stufen ausgehend von Cyclopentadien in einer konvergenten Synthese dargestellt worden war, konnten 83.1 mg (43.4 μmol) 3'-*O*-iso-butyryl-D-*carba*-dTMP **85** für die Kupplung mit dem Bis-(4-iso-butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **45** eingesetzt werden. Die Reaktion wurde nach Methode A durchgeführt und es wurden zweimal je 0.3 Äquivalente des Phosphoramidits und zweimal je 0.4 Äquivalente des 4,5-

Dicyanoimidazols zugegeben. Nach dreistündiger Reaktion bei Raumtemperatur wurde durch Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid abgebrochen.



1) Phosphorylchlorid:Pyridin:Wasser 2:2:1, MeCN, 5 h, Rt;
 2) Eiswasser, 40 min, 4 °C, pH 1; 3) (NH₄)HCO₃, pH 7, Gefriertrocknung, Chromatographie

Abb. 50: Versuch der Synthese von 3'-O-TBDMS-*carba*-dTMP **86**

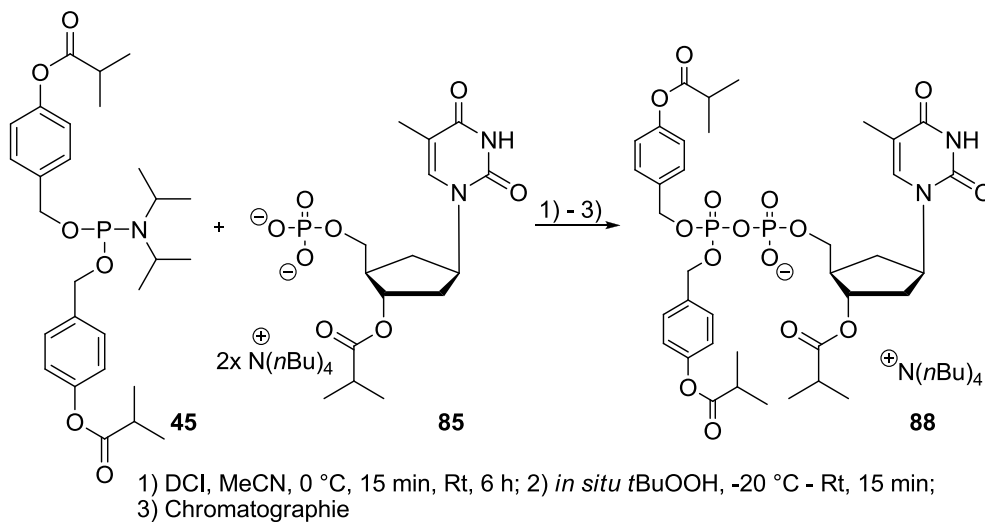


Abb. 51: Synthese von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-O-*iso*-butyryl-D-*carba*-dTDP **88**

Aufgrund des kleinen Reaktionsansatzes konnte die Trennung an RP-18 Kieselgel nicht wiederholt und das Produkt nur verunreinigt isoliert werden. Im Vergleich zu den alkyl-modifizierten BAB-d4TDPs eluierte das Produkt **88** sehr viel früher. Als Verunreinigung, die nur teilweise abgetrennt werden konnte, trat auch hier der Phosphorsäurediester auf. Interessanterweise wurde auch das Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidat **58a** als sauberes Nebenprodukt abgetrennt. Es eluierte nach dem Produkt und

konnte sehr deutlich auf der DC-Folie mit Schwefelsäure-Anisaldehyd-Färbereagenz und Erhitzen als roter Spot detektiert werden.

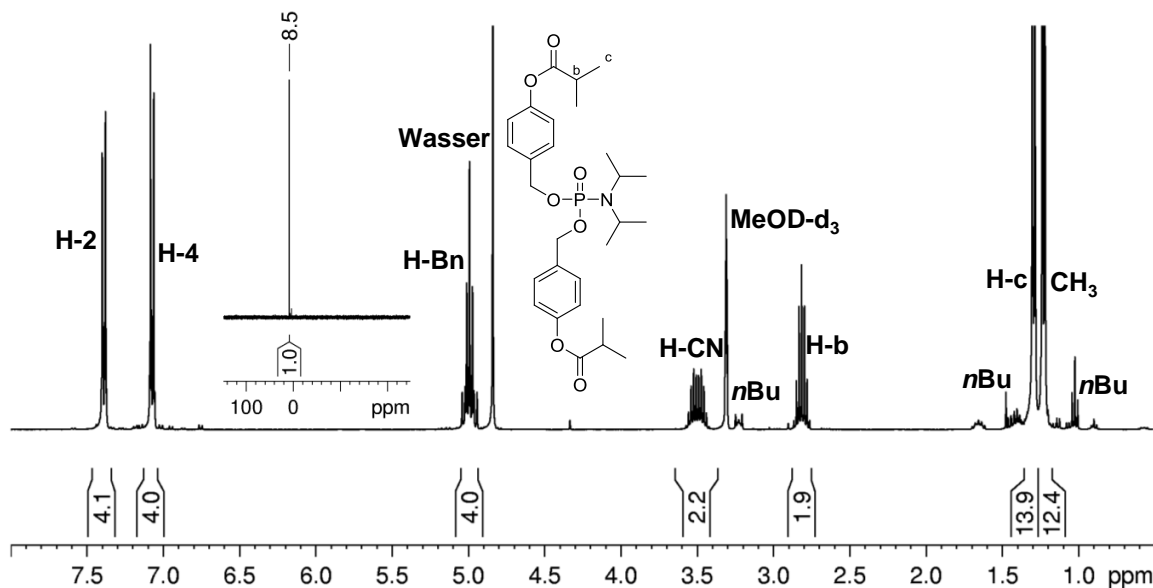


Abb. 52: ^1H - und ^{31}P -NMR Spektrum des isolierten Nebenproduktes Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidat **58a**

Im Gegensatz dazu war in den meisten Fällen der Phosphorsäurediester kaum detektiert worden. Auch er färbte sich beim Erhitzen in Kombination mit dem Anfärbereagenz rot, jedoch verschwand diese Färbung noch während des Erhitzens wieder.

Das Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidat **58a** isoliert werden konnte, war verwunderlich, denn es wurde davon ausgegangen, dass überschüssiges Phosphoramidit **45** zumindest mit dem DCI reagieren sollte und sich spätestens bei der wässrigen Chromatographie der Phosphorsäurediester **59a** bilden würde (vergl. Abb. 29, S 42). Unter Umständen war das bei dieser Reaktion eingesetzte DCI weniger reaktiv, was den schlechten Umsatz zwischen dem Monophosphat und dem Phosphoramidit erklären könnte, der sich in der niedrigen Ausbeute von 16% widerspiegelte.

Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Synthese eines weiteren BAB-NDP Prodrugs vorgestellt. Die bekannte Synthesemethode konnte zur Darstellung von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-*O*-*iso*-butyryl-D-*carba*-dTDP **88** erfolgreich angepasst werden. Um **88** zu generieren wurde zuerst das antiviral aktive D-*carba*-dT **72** in einer mehrstufigen Synthese in Kooperation mit S. Jessel dargestellt und mit den notwendigen Schutzgruppen versehen.¹³⁵ Die erhaltenen

Nucleoside 3'-O-TBDMS-D-*carba*-dT **73** und 3'-O-*iso*-butyryl-D-*carba*-dT **74** sollten anschließend phosphoryliert werden, was im Fall von **74** in einer Ausbeute von 50% gelang. Die Phosphorylierung von **73** misslang, da die gewählte Silylschutzgruppe unter den Reaktionsbedingungen nicht stabil war. Allerdings gelangen der Ionentausch an **74** und die anschließende Kupplung mit dem Phosphoramidit. Bei der Chromatographie der Zielverbindung **88** konnte das Nebenprodukt **58a** isoliert und charakterisiert werden. Mit der Zielverbindung **88** wurde ein BAB Diphosphat Prodrug eines sehr interessanten antiviral aktiven Nucleosidanalogs hergestellt. Neben den Hydrolyseeigenschaften dieses carbocyclischen Prodrugs wird seine antivirale Aktivität gegenüber HIV in weiteren Studien in Kooperation mit *S. Hughes* vom National Cancer Institute, Frederick, USA untersucht. Die Ergebnisse lagen zum Zeitpunkt der Abgabe nicht vor.

4.1.5 Synthese von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-O-*iso*-butyryl-2'-fluor-2'-methyluridindiphosphat und Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-2'-methyluridindiphosphat

Etwa 180 Millionen Menschen sind weltweit mit dem Hepatitis C Virus (HCV) infiziert. Bei ca. 80% der Betroffenen kommt es zur Ausbildung einer chronischen HCV Infektion, die in ca. 30% der Fälle zu einer Leberzirrhose führt. Bei etwa 10% der Patienten kommt es zur Ausbildung von Krebserkrankungen der Leber.¹³⁷ Bestimmte Therapieansätze zur Behandlung von HCV setzen auf Nucleosidanaloga, deren Triphosphate die virale Polymerase NS5B inhibieren und so die Proliferation des Virus einschränken können. Als antiviral aktive Wirkstoffe wurden Prodrugs von 2'-methylcytidin (2'-Me-Cytidin) und von 2'-Fluor-2'-methylcytidin (2'-F-2'-Me-Cytidin) in klinischen Studien untersucht.¹³⁸ Allerdings kommt es zur Desaminierung dieser Nucleosidanaloga bzw. ihrer phosphorylierten Metabolite zu den entsprechenden Uridinanaloga 2'-Fluor-2'-methyluridin¹³⁹⁻¹⁴¹ (2'-F-2'-Me-Uridin) **89** und 2'-C-methyluridin¹⁴² (2'-Me-Uridin) **90**. 2'-F-2'-Me-Uridin wird nicht zum Monophosphat metabolisiert weshalb *Sofia et al.* Phosphoramidat-Pronucleotide dieses Nucleosids untersucht haben.¹³⁸ Nach Arbeiten von *Murakami et al.* wird 2'-F-2'-Me-Uridin-Monophosphat (2'-F-2'-Me-UMP) von der Uridin-Cytidin-Monophosphatkinase 200 mal schlechter in das Diphosphat überführt als das natürliche Substrat Uridin.¹⁴¹ In einer Kooperation mit der Firma Alios Bio Pharma, Kalifornien, USA sollten Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-NDP Prodrugs von 2'-F-2'-Me-Uridin **89** und 2'-Me-Uridin **90** synthetisiert und untersucht werden.

Wie bei der Synthese von BIB-3'-*O*-*ibu*-BVdUDP **71** und BIB-3'-*O*-*ibu*-D-*carba*-dTDP **88** war der Einfluss der aliphatischen Acylreste auf die Eigenschaften der BAB-NDP Prodrugs aus den Untersuchungen der fettsäuremodifizierten BAB-d4TDPs **26-34** noch nicht vollständig bekannt. Als Maskierung für das β -Phosphat des Nucleosiddiphosphates wurde die (4-*iso*-butyryloxybenzyl)-Einheit gewählt, da diese in vorangegangenen Arbeiten die besten Resultate für ein optimales Zusammenspiel aus Hydrolysestabilität und antiviraler Wirkung gezeigt hatte. Deshalb sollten die Verbindungen Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-*O*-*iso*-butyryl-2'-fluor-2'-methyluridindiphosphat (BIB-3'-*O*-*ibu*-2'-F-2'-Me-UDP) **91** und Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-2'-methyluridindiphosphat (BIB-2'-Me-UDP) **92** synthetisiert werden.

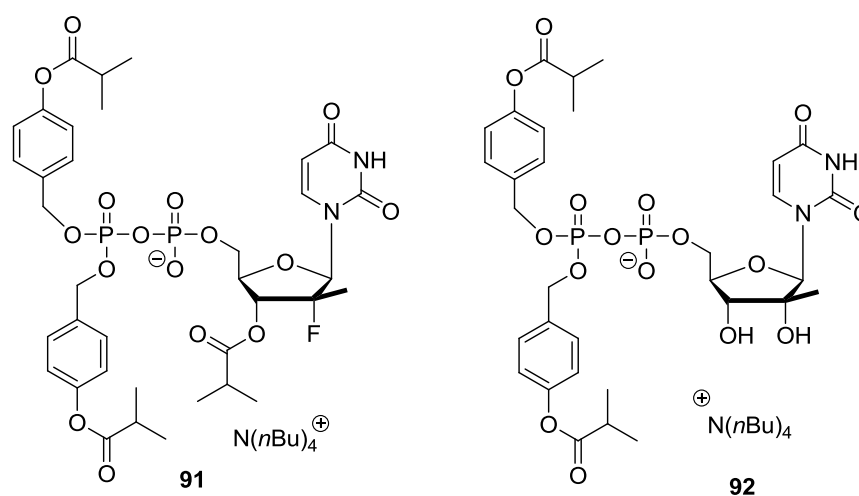


Abb. 53: Zielverbindungen BIB-3'-*O*-*ibu*-2'-F-2'-Me-UDP **91** und BIB-2'-Me-UDP **92**

4.1.5.1 Synthese von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-*O*-*iso*-butyryl-2'-fluor-2'-methyluridindiphosphat

Das Nucleosidanalogon 2'-Fluor-2'-methyluridin **89** besitzt eine freie 3'-Hydroxyfunktion. Wie bei den Synthesen des BVdUDP Prodrugs **71** und des *carba*-dTDP Prodrugs **88** sollte diese mit einer Schutzgruppe versehen sein, um Nebenreaktionen bei der Phosphorylierung und bei der Kupplung mit dem Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **45** zu vermeiden. Für die einfache Acylierung mit *iso*-Buttersäureanhydrid musste zunächst die 5'-OH-Position defunktionalisiert werden. Hierfür sollte sich die Einführung einer Silylgruppe eignen, die nach erfolgter Acylierung der 3'-Position durch die Verwendung von Fluoridreagenzien wieder entfernt werden sollte.

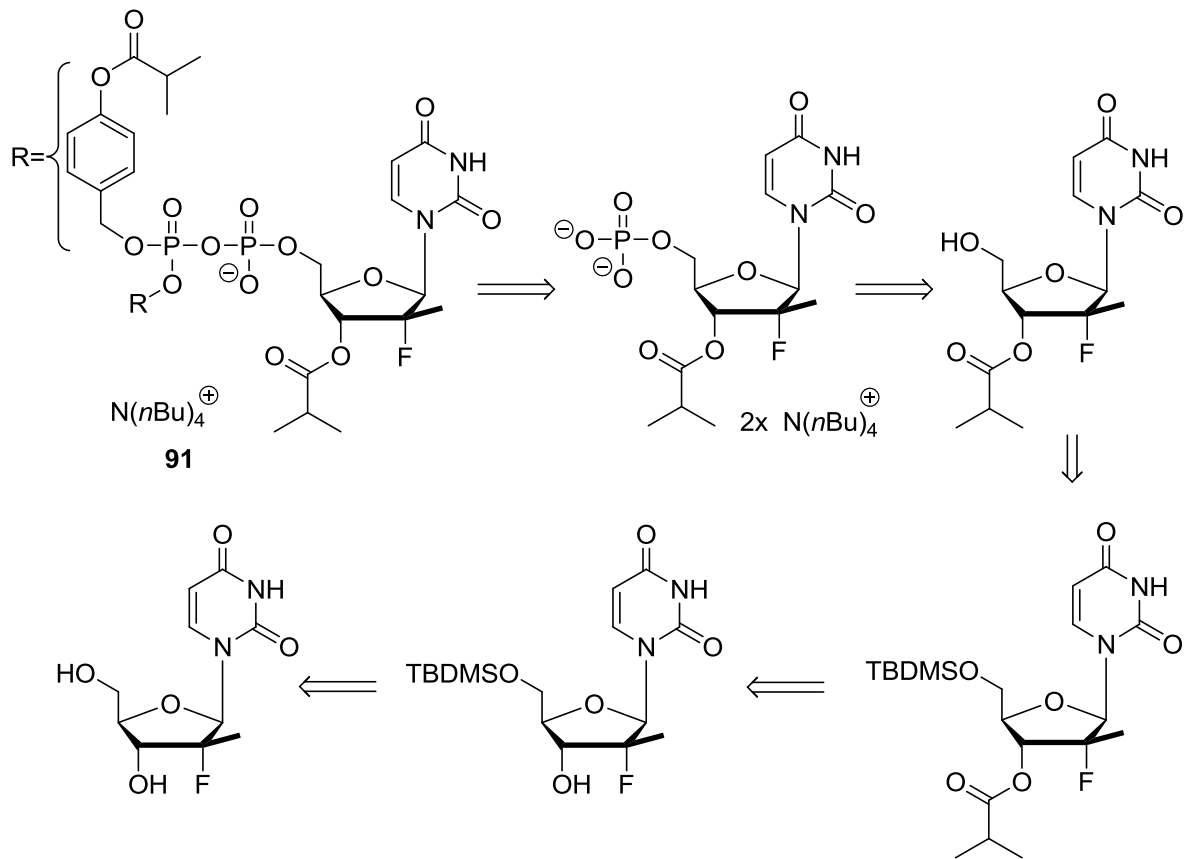


Abb. 54: Retrosyntheseschema zur Darstellung von BIB-3'-O-*tert*-bu-2'-F-2'-Me-UDP **91**

Von dem Nucleosidanalogen 2'-Fluor-2'-methyluridin **89** wurden vom Kooperationspartner 213 mg (818 μmol) zur Verfügung gestellt werden. Dieses Nucleosidanalogen kann über eine achtstufige Synthese ausgehend von Cytidin nach *Clark et al.*¹⁴³ synthetisiert werden.

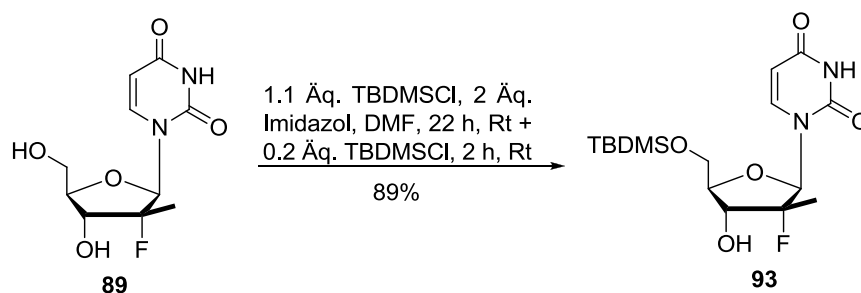


Abb. 55: Silylierung von 2'-Fluor-2'-methyluridin **93**

Im ersten Syntheseschritt konnte die reaktivere 5'-OH-Position unter Verwendung von *tert*-Butyldimethylsilylchlorid und Imidazol sehr selektiv und in einer guten Ausbeute silyliert werden.^{144,145} Nach einem fast quantitativen Umsatz wurde die Reaktion durch Zugabe von Methanol abgebrochen und das Produkt chromatographiert. Nach der Silylierung konnte die

freie 3'-Hydroxyfunktion mit *iso*-Buttersäureanhydrid in trockenem Pyridin verestert werden (Abb. 56). Das Produkt **94** wurde in einer Ausbeute von 79% isoliert. Im nächsten Syntheseschritt sollte die 5'-Position mit Tetra-*n*-butylammoniumhydrofluorid (TBAF) deblockiert werden. Nach einer Testreaktion konnte das gewünschte Produkt nicht erhalten werden, da es zur Zersetzung von **94** unter Abspaltung der *iso*-Butyrylgruppe und anderer Nebenreaktionen kam. In einer zweiten Reaktion konnte die TBDMS-Gruppe mit Triethylamintrihydrofluorid nach einer Vorschrift von *Pirrung et al.*¹⁴⁶ selektiv entfernt und 3'-*O*-*iso*-Butyryl-2'-fluor-2'-methyluridin **95** in einer Ausbeute von 95% erhalten werden.

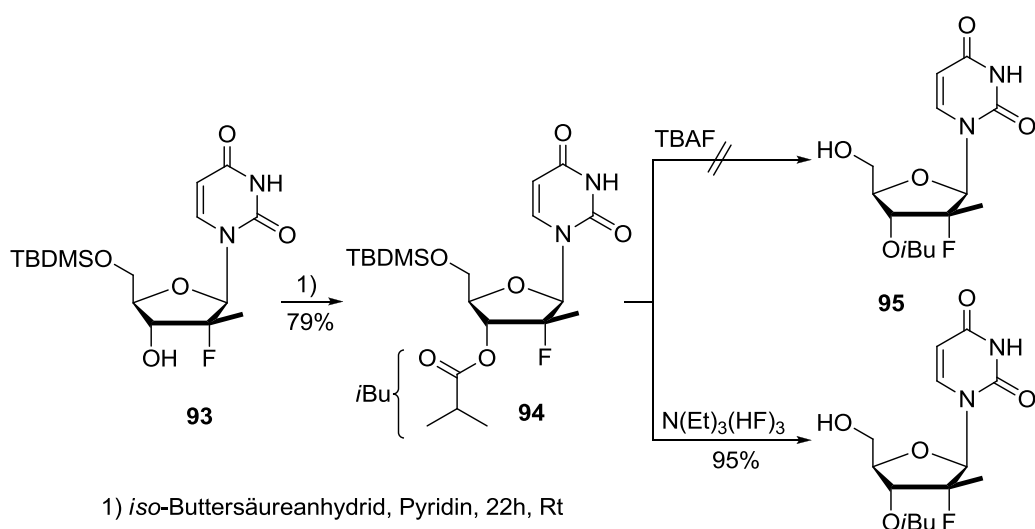


Abb. 56: Synthese von 5'-*O*-TBDMS-3'-*O*-*iso*-butyryl-2'-fluor-2'-methyluridin **94** und von 3'-*O*-*iso*-butyryl-2'-fluor-2'-methyluridin **95**

Nachdem die 3'-OH-Position erfolgreich mit der *iso*-Butyrylgruppe verestert worden war, sollte die 5'-OH-Position phosphoryliert werden. Die Synthese von Diammonium-3'-*O*-*iso*-butyryl-2'-Fluor-2'-methyluridinmonophosphat **96** gelang in einer Ausbeute von 48%. Allerdings konnten 45% des eingesetzten Nucleosids **95** reisoliert werden. Das so erhaltene Diammoniumsalz **96** konnte in einer guten Ausbeute von 80% in das für die folgende Synthese benötigte Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-3'-*O*-*iso*-butyryl-2'-F-2'-Me-UMP **97** überführt werden.

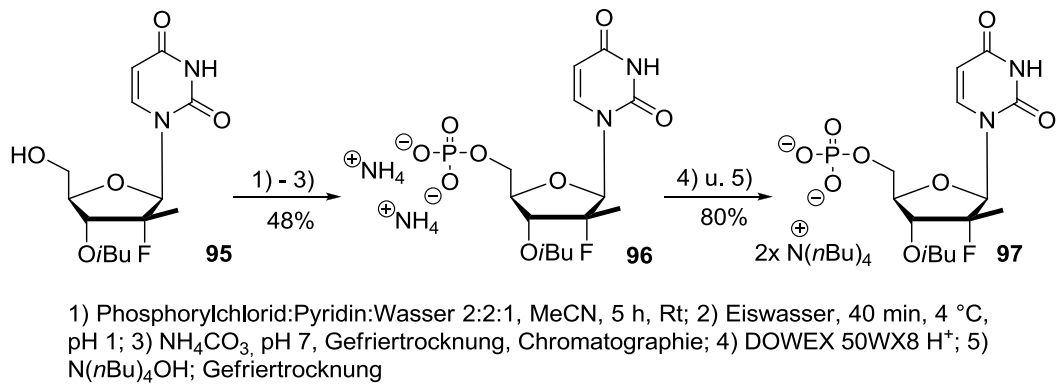


Abb. 57: Synthese der 3'-O-*iso*-Butyryl-2'-fluor-2'-methyluridinmonophosphate **96** und **97**

Die DCI vermittelte Kupplung zur Zielverbindung BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **94** wurde nach Methode A durchgeführt (vergl. S. 38). Allerdings wurde das NMP **97** nicht über Molsieb getrocknet, sondern mehrmals mit Acetonitril coevaporiert. Nach vierstündiger Reaktionszeit war ein Großteil des NMPs **97** verbraucht, so dass mit *tert*-Butylhydroperoxid oxidiert und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurden. Das Produkt wurde zweimal chromatographiert und konnte in einer hervorragenden Ausbeute von 73% isoliert werden.

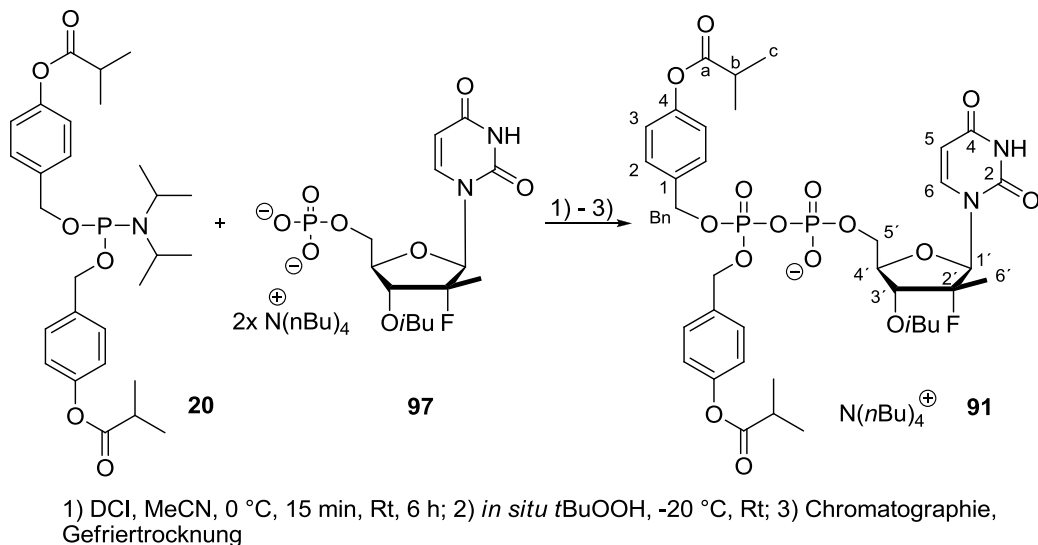


Abb. 58: Synthese von BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91**

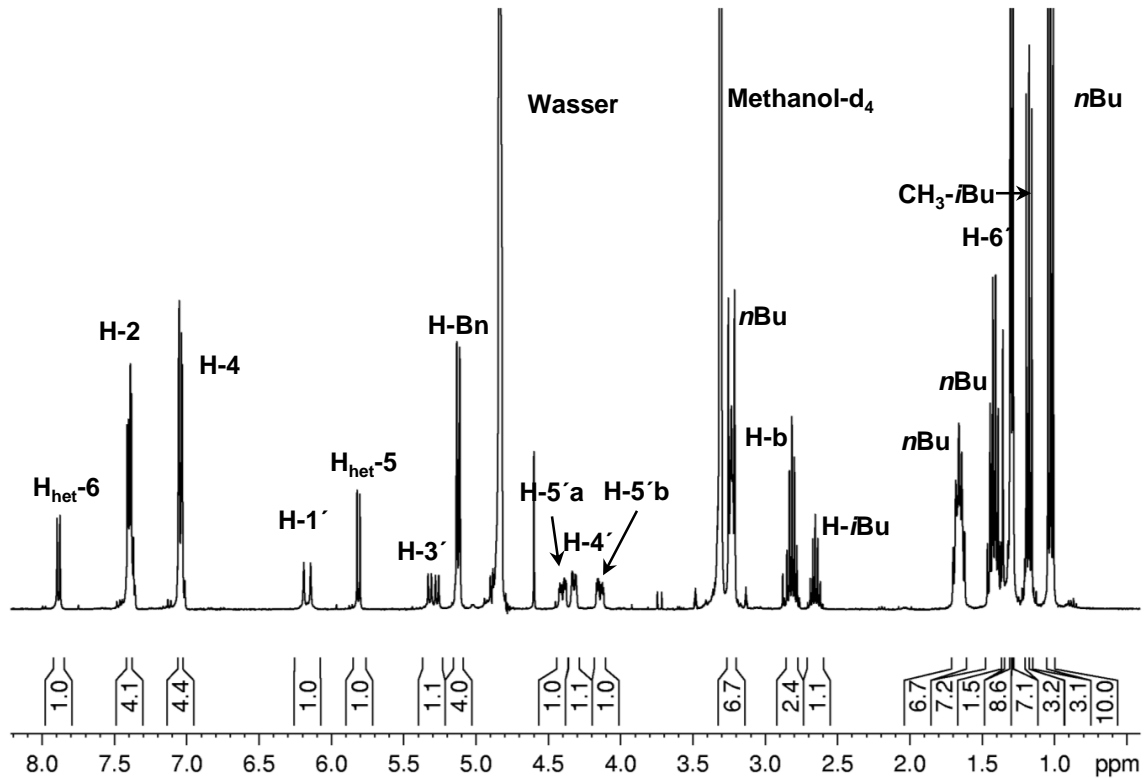


Abb. 59: ¹H-NMR-Spektrum von BIB-3'-O-ibu-2'-F-2'-Me-UDP **91**

4.1.5.2 Synthese von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-2'-methyluridindiphosphat

Das BAB-Konzept konnte erfolgreich zur bioreversiblen Maskierung der Diphosphate unterschiedlicher Nucleosidanaloga eingesetzt werden. Es wurden BAB-NDP Verbindungen von d4T, AZT, 3'-O-*i*Bu-BVdU, 3'-O-*i*Bu-D-*carba*-dT, 3'-O-*i*Bu-2'-fluor-2'-methyluridin und *carba-iso*-ddA⁷⁰ synthetisiert. Die Synthese einer ribonucleosidischen BAB-NDP Verbindung war noch nicht durchgeführt worden. Dies sollte mit der Synthese von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-2'-methyluridindiphosphat (BIB-2'-Me-UDP) **92** erstmals erfolgen. Abgesehen davon wurde noch kein 2'-Desoxy- oder ein Ribonucleosid analogon mit freien Hydroxyfunktionen zur Synthese der entsprechenden BAB-NDP Verbindung eingesetzt. Es war nicht bekannt, ob die DCI vermittelte Kupplung zum Aufbau der Pyrophosphateinheit durch die 2'- bzw. 3'-Hydroxyfunktionen beeinträchtigt wird. Es wurde daher ein Syntheseplan zur Darstellung des UMPs entworfen, der zunächst nur mit Uridin erprobt werden sollte, da 2'-Methyluridin **90** nur in begrenzter Menge zur Verfügung stand. Die 5'-Hydroxyfunktion sollte selektiv mit TBDMS-Chlorid verethert werden, um im Folgeschritt die 2'- und die 3'-Position als Carbonat zu blockieren. Im Anschluss würde die 5'-O-Position deblockiert werden und das 2',3'-O,O-geschützte Nucleosid könnte phosphoryliert werden.

Die Kupplung mit dem entsprechenden Phosphoramidit sollte die Zielverbindung BIB-2',3'-O,O-carbonyl-2'-methyluridindiphosphat liefern. Bei dem Carbonat handelt es sich um eine biodegradierbare Schutzgruppe, die zunächst im Zielmolekül verbleiben sollte. Sie hätte allerdings auch unter milden basischen Bedingungen abgespalten werden können (Abb. 60).

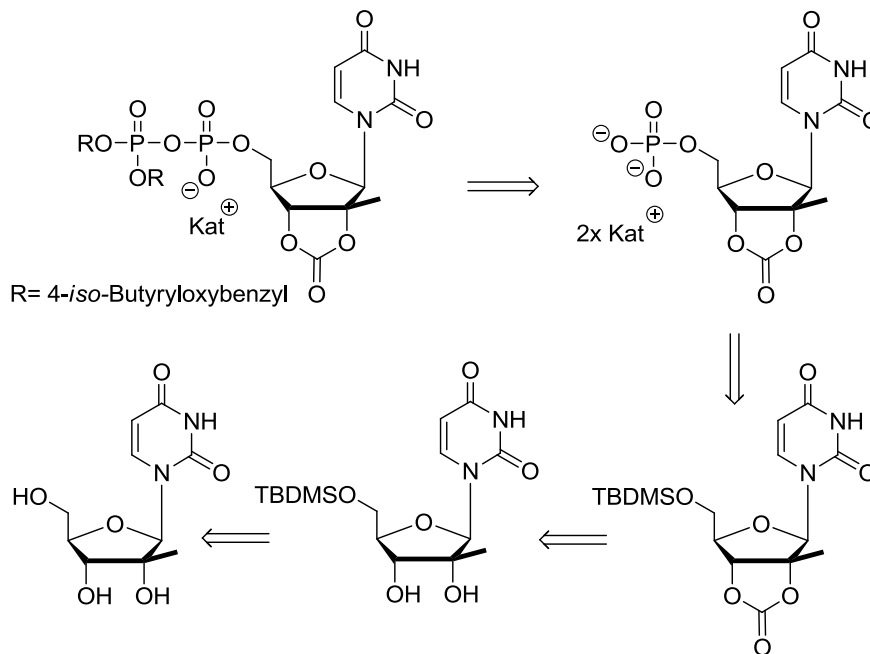


Abb. 60: Syntheseplan zur Darstellung von BIB-2',3'-O,O-carbonyl-2'-methyluridindiphosphat

Die Silylierung von Uridin erfolgte durch *tert*-Butyldimethylsilylchlorid in Gegenwart von Imidazol. Nach zwei Stunden war die Reaktion beendet und 5'-O-*tert*-Butyldimethylsilyluridin **98** wurde in einer Ausbeute von 85% erhalten. Zur Darstellung von 5'-O-TBDMS-2',3'-O,O-carbonyluridin **99** wurde 5'-O-*tert*-Butyldimethylsilyluridin **98** in Acetonitril gelöst, zweimal coevaporiert und in trockenem Dichlormethan aufgenommen. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur mit 0.8 Äquivalenten 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) versetzt. Nach 19 h wurden weitere 1.7 Äq. CDI zugesetzt und die Reaktion nach dreieinhalb Stunden beendet.¹⁴⁷ Das Produkt konnte in einer guten Ausbeute von 77% erhalten werden. Die folgende Desilylierung mit TBAF misslang. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie konnte nur die vollständige Zersetzung des Eduktes beobachtet werden. Mit Triethylamintrihydrofluorid wurde in einer „spot to spot“-Reaktion der Silylether gespalten und das Produkt durch Extraktion isoliert. Beim Lösen eines Teils der Substanz in Chloroform-d₁ wurde die sofortige Abspaltung des Carbonats beobachtet (Uridin ist unlöslich in Chloroform und fiel aus). Aufgrund der säurelabilen

Carbonatschutzgruppe konnte die in Abb. 60 gezeigte Syntheseroute nicht weiter verfolgt werden. Bei der Phosphorylierung muss teilweise bei einem pH-Wert von 1 gearbeitet werden (vergl. Abb. 49). Parallel zu den hier beschriebenen Synthesen wurde in Betracht gezogen, ob nicht doch das ungeschützte 2'-Methyluridinmonophosphat **102** mit Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-*N,N*-isopropylphosphoramidit **45** gekuppelt werden könnte.

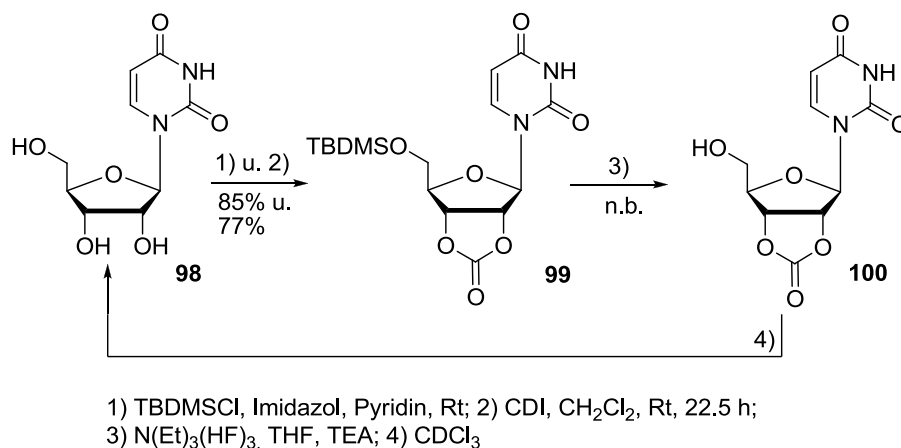
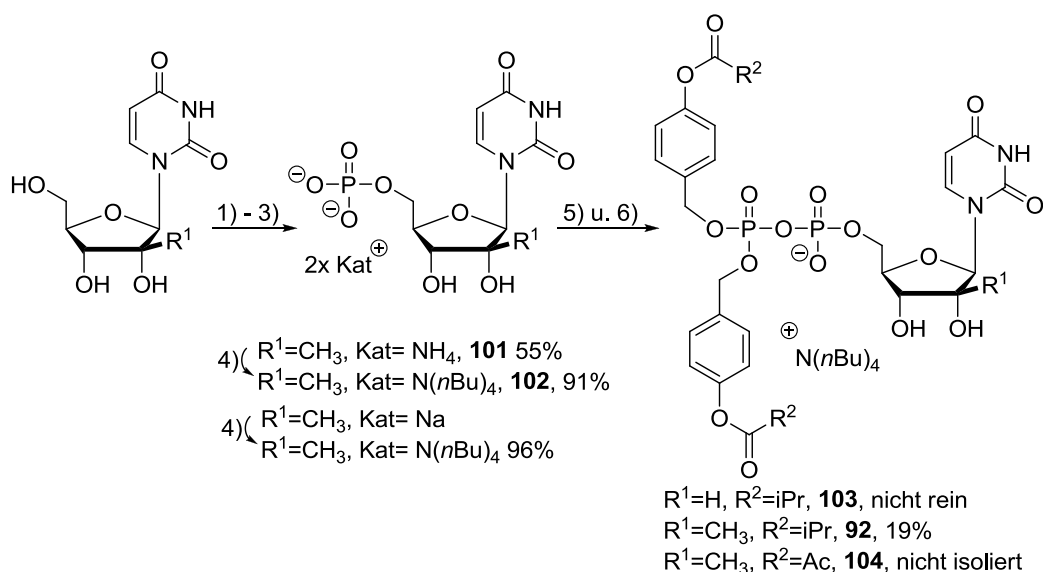


Abb. 61: Synthese der Uridinderivate **98-100**

Um dies zuvor in Erfahrung zu bringen wurde kommerziell erhältliches Dinatrium-UMP über einen Ionentauscher protoniert und mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxidlösung behandelt. Das erhaltene Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-UMP wurde mit dem Phosphoramidit **45** durch Zugabe von DCI in Acetonitril zur Reaktion gebracht (Methode A, S.38, 54). Das Kupplungsprodukt **103** konnte nach der ersten Chromatographie bereits relativ rein erhalten werden und durch die Chromatographie einer Mischfraktion wurde **103** weiter angereichert. Diese Reaktion hatte gezeigt, dass die Kupplung zwischen dem Phosphoramidit und einem Ribonucleosidmonophosphat mit freien Hydroxygruppen abläuft. Inwieweit die Hydroxygruppen den Umsatz beeinflussen, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden. Nach diesem Ergebnis wurde ein Teil des erhaltenen 2'-Methyluridins phosphoryliert. Nach *T. Sowa und F. Ouchi* ist Uridinmonophosphat in einer Ausbeute von 86% mit einer 5'-Selektivität von 98%¹⁰⁶ darstellbar und in der Tat wurde Bis-ammonium-2'-Me-UMP **101** immerhin in einer Ausbeute von 55% erhalten. Der nachfolgende Ionenaustausch lieferte das Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-Salz **102** von 2'-Me-UMP in einer Ausbeute von 91%. Die Kupplung zu Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-2'-methyluridindiphosphat **92** zwischen dem Phosphoramidit **45** und **102** wurde nach Methode A durchgeführt (S.38,54). Die Reaktionsverfolgung per DC wurde aufgrund der Polaritäten des 2'-Me-UMPs **102** und des Kupplungsproduktes erschwert. Es konnte keine vernünftige Trennung der Spots (DCI,

2'-Me-UMP, Phosphoramidit, Kupplungsprodukt) erreicht werden. Erschwerend kam die schlechtere Farbreaktion des 2'-Me-Uridins mit dem Schwefelsäure-Anisaldehyd-Färbereagenz hinzu (verglichen mit Thymidin). Aus diesen Gründen konnte ein vollständiger Umsatz vor der Oxidation nicht sicher festgestellt werden. Die folgende Chromatographie an RP-18 Kieselgel gestaltete sich ebenso schwer, wie die von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-UDP (Modellreaktion). Das Produkt **92** konnte dennoch durch wiederholte Chromatographie von Mischfraktionen angereichert werden, so dass letztendlich 18 µmol (18.3 mg) der reinen Substanz isoliert wurden, was einer Ausbeute von 19% entspricht. Zur Verbesserung der Synthese anderer ribonucleosidischer BAB-NDP Verbindungen sollte die 2'- und die 3'-Position ggf. durch Acylierung modifiziert werden, um deren Lipophilie zu erhöhen und somit die Chromatographie zu vereinfachen. Die Verbindung Bis-(4-acetyloxybenzyl)-2'-methyl-uridindiphosphat **104** (BAB-2'-Me-UDP) konnte ebenfalls synthetisiert werden. Nachdem sich die Schwierigkeiten bei der Reinigung von **92** gezeigt hatten, wurde aufgrund der eingesetzten Menge von 2'-Me-UMP **102** (23 mg, 0.028 mmol) das Rohprodukt von BAB-2'-Me-UDP **104** nicht gereinigt.



1) Phosphorylchlorid:Pyridin:Wasser 2:2:1, MeCN, 5 h, Rt; 2) Eiswasser, 40 min, 4 °C, pH 1; 3) NH_4CO_3 , pH 7, Gefriertrocknung, Chromatographie; 4) DOWEX 50WX8 H^+ , $N(nBu)_4OH$, Gefriertrocknung; 5) Bis-(4-Acyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit, DCI, MeCN, 0 °C - Rt; 6) *in situ* $tBuOOH$, -20 °C - Rt

Abb. 62: Synthese von 2'-Me-UMP **101**, **102** und der Zielverbindungen BIB-2'-Me-UDP **92**, BIB-UDP **103** und BAB-2'-Me-UDP **104**

In diesem Kapitel wurde die erste erfolgreiche Synthese von zwei ribonucleosidischen BAB-UDP Verbindungen vorgestellt. Nachdem die Defunktionalisierung der 2'- und 3'-Position als *O,O*-Carbonat für die verwendete Syntheseroute nicht praktikabel war, wurde mit freien

Hydroxylgruppen selektiv phosphoryliert und 2'-Me-UMP **101** in einer guten Ausbeute von 55% synthetisiert. Mit der Synthese von BIB-2'-Me-UDP **92** und von BIB-UDP **103** konnte gezeigt werden, dass sich die allgemeine Synthesestrategie zur Darstellung von BAB-NDP Verbindungen auf Ribonucleoside übertragen lässt.

4.2 Darstellung von Boran-modifizierten Bis-(4-acyloxybenzyl)-Nucleosiddiphosphaten

Nucleosidboranophosphate, eine neue Klasse von Boran-modifizierten Nucleotidanaloga, wurden erstmalig in den 1990er Jahren von *B. Shaw* beschrieben.^{148,149} Diese Verbindungen besitzen eine Borangruppe (BH₃-Gruppe) am α -Phosphat, anstelle eines nichtverbrückenden Sauerstoffatoms (Abb. 63) Diese Modifizierung führt zu einer hydrolysestabileren Phosphodiesterbindung. Die Borangruppe besitzt genau wie die nichtverbrückenden Sauerstoffatome bzw. Schwefelatome in Thioaten eine negative Ladung und ist isoelektrisch mit Sauerstoff (in Phosphaten) und pseudoisoelektrisch mit Schwefel, wie er in Thioaten vorkommt. Boranophosphate besitzen eine hohe Wasserlöslichkeit, sind aber dennoch lipophiler als vergleichbare Phosphate.¹⁵⁰ Die Einführung der Borangruppe generiert an dem α -Phosphoratom ein Stereozentrum, so dass generell zwischen (*R*_P)- α -P-BH₃-Nucleosiddi- bzw. -triphosphat und (*S*_P)- α -P-BH₃-Nucleosiddi- bzw. -triphosphat unterschieden werden muss. Aufgrund der genannten Eigenschaften gelten α -P-Borano-Nucleosiddi- und -triphosphate als Mimetika der Nucleotide. α -P-Borano-Nucleosiddi- bzw. -triphosphate antiviral aktiver Nucleoside wurden eingehend auf ihre potentielle Wirkung gegenüber viralen Infektionen untersucht. Die Gruppe um *B. Canard* konnte in ihren Arbeiten belegen, dass α -P-BH₃-d4TDP und α -P-BH₃-AZTDP bessere Substrate für die Nucleosiddiphosphatkinase sind als d4TDP bzw. AZTDP.^{151,152} Des Weiteren zeigten α -P-BH₃-d4TTP und α -P-BH₃-AZTTP als Inhibitoren der HIV-1 RT eine höhere Wirksamkeit als die entsprechenden Nucleotidanaloga (d4TTP und AZTTP) und sie inhibierten klinisch relevante Mutationen der HIV-1 RT in biologischen Assays.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Ähnliche Ergebnisse wurden für weitere boran-modifizierte antiviral aktive Nucleosidpolyphosphate gefunden.^{155,156} Solche Verbindungen könnten Wirkstoffresistenzen, die auf Mutationen der HIV-1 RT zurückzuführen sind, überwinden, wenn sich ähnliche Ergebnisse *in vivo* bestätigen sollten. Es wurden mit den Verbindungen α -BH₃-d4TTP und α -BH₃-AZTTP bisher keine antiviralen Tests an infizierten Zelllinien (z.B. CEM/O-Zellen) durchgeführt. Zwar besitzen diese Verbindungen eine höhere Lipophilie und eine erhöhte Hydrolysestabilität als die Nucleotidanaloga d4TTP und AZTTP, jedoch sollten

auch diese Polyanionen nicht über die Zellmembran diffundieren können.¹⁵⁰ Eine anti-HIV Aktivität in Zellkulturen bzw. *in vivo* sollte durch dieses Verhalten stark eingeschränkt werden. Eine bioreversible Schützung der negativen Ladungen in α -BH₃-Nucleosiddiphosphaten könnte zu einer erhöhten Aktivität gegenüber der HIV-RT und bestimmten Mutationen der HIV-RT führen. Über derartige Bemühungen ist in der Literatur bislang nichts bekannt.

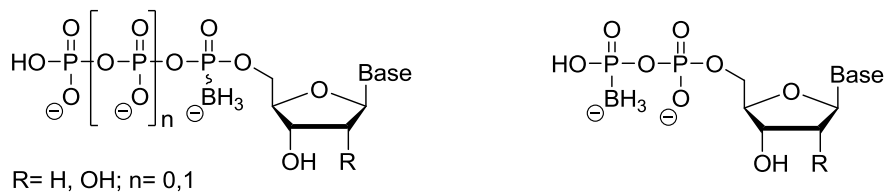


Abb. 63: α -P-BH₃-Nucleosiddi bzw. -triphosphat und ein β -P-BH₃-Nucleosiddiphosphat

Neben den α -P-BH₃-Nucleosiddi und -triphosphaten sind auch β -P-boran-modifizierte Nucleosiddiphosphate bekannt. β -P-thio-modifizierte Moleküle werden zu Studien von biochemischen Prozessen verwendet. Zum Beispiel fand 5'-(β -P-thio)-adenosindiphosphat Anwendung in Untersuchungen zur Phosphotransferase und einer ATP-abhängigen Synthethase.^{157,158} Außerdem wurden Studien zur Signaltransmission durch den p2Y Rezeptor mit dieser Verbindung durchgeführt.¹⁵⁹ Aus diesen Gründen könnten auch β -P-Boran-modifizierte Nucleosiddiphosphate und besonders deren bioreversible maskierte Derivate für biochemische Studien von Interesse sein.

4.2.1 Syntheseversuch zur Darstellung von α -P-BH₃-modifizierten BAB-d4TDP Verbindungen

Aufgrund ihrer veränderten chemischen Eigenschaften und der vielversprechenden biologischen Aktivitäten von α -P-BH₃-d4TDP und α -P-BH₃-AZTDP bzw. von α -P-BH₃-d4TTP und α -P-BH₃-AZTTP sollte die Möglichkeit untersucht werden, sie bioreversibel zu maskieren. Durch die Maskierung der negativen Ladungen des β -Phosphates, sollte die Stabilität von z.B. α -BH₃-d4TDP gegenüber Phosphatasen erhöht werden und die Diffusion über eine lipophile Zellmembran ermöglicht werden. Aus diesen Gründen wurde ein Versuch unternommen α -P-BH₃-BAB-d4TDP **105** zu synthetisieren (Abb. 64).

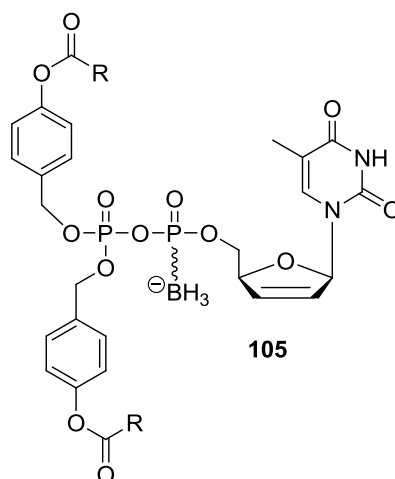
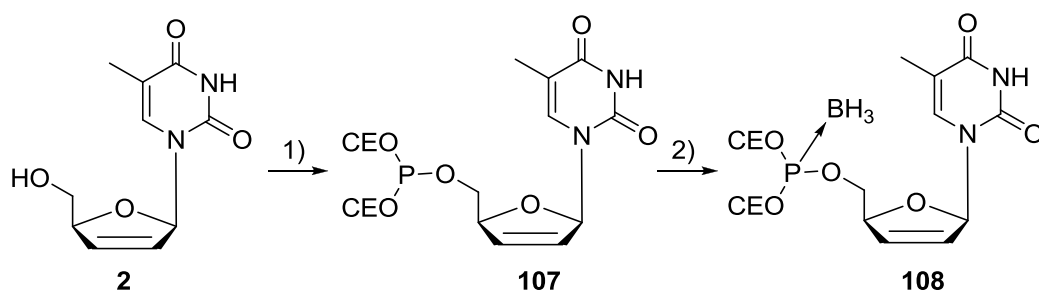


Abb. 64: Bioreversibel funktionalisiertes α -P-BH₃-d4TDP, α -P-BH₃-BAB-d4TDP **105**

Wie auch bei der Darstellung der BAB-d4TDP Verbindungen sollte die labile Pyrophosphateinheit erst im letzten Syntheseschritt aufgebaut werden. Da eine Oxidation aufgrund der Boran-Modifikation im letzten Syntheseschritt nicht möglich ist, sollte die Kupplung von Boran-d4TMP **109** mit einem Phosphorchloridat durchgeführt werden. Die Oxophilie des Phosphors hätte bei einer Oxidation sehr wahrscheinlich zur Substitution der Borangruppe geführt.

Darstellung von Borano-d4TMP **109**

Borano-d4TMP **109** sollte ausgehend von d4T und Bis-(2-cyanethoxy)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **106** in einer dreistufigen Synthese nach einer Vorschrift von *Khan et al.* dargestellt werden.¹⁶⁰ Zuvor wurde das Phosphitylierungsreagenz **106** nach einer Vorschrift von *E. Uhlmann* und *J. Engels* durch Umsetzen von 3-Hydroxypropionitril mit Dichlor-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **41** in Anwesenheit der Hünig-Base *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) hergestellt.¹¹²



1) (CEO)₂P(N(iPr)₂) **106**, DCl, MeCN, 24 h, Rt; 2) *in situ* Me₂S:BH₃, 4 d
CEO= Cyanethoxy

Abb. 65: Synthese von α -P-Borano-bis-(2-cyanethoxy)-d4TMP **108**

Um Bis-(2-cyanoethoxy)-d4TMP **107** zu erhalten, wurde d4T mit Bis-(2-cyanoethoxy)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **106** und DCI als Aktivator umgesetzt. *Khan et al.* hatten für diese Kupplung 1H-Tetrazol verwendet, was aber keinen Unterschied machen sollte. Durch die *in situ* Zugabe von Boran-Dimethylsulfid-Addukt wurde der Borankomplex **108** erhalten und nach wässriger Aufarbeitung und Chromatographie in einer Ausbeute von 60% isoliert (Abb. 65).

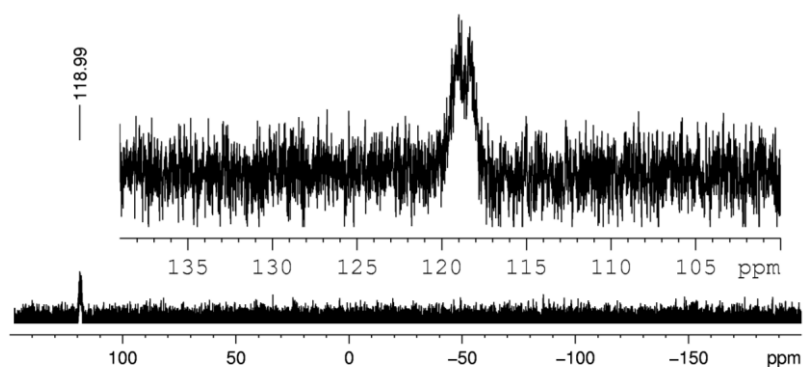


Abb. 66: ^{31}P -NMR Spektrum des Boran-Komplexes **108**

In Abb. 66 ist das ^{31}P -NMR Spektrum von α -P-Borano-bis-(2-cyanoethoxy)-d4TMP **108** über den gesamten Messbereich und in einem vergrößerten Ausschnitt wiedergegeben. Selbst in diesem Proton-entkoppelten Spektrum ist die Breite des Signals sehr deutlich zu erkennen. Dieses breite Multiplett im ^{31}P -NMR wurde durch die Kopplung des Phosphoratoms mit dem Boratom hervorgerufen. Natürlich vorkommendes Bor besteht aus den beiden NMR-aktiven Isotopen ^{10}B (19.6%, $I = 3$) und ^{11}B (80.4%, $I = 3/2$) die beide mit dem ^{31}P -Kern ($I = 1/2$) koppeln und zur komplexen Aufspaltung des Signals führen. Für die Kopplung eines ^{31}P -Kerns mit einem ^{11}B -Kern ergeben sich vier Signale mit einem Verhältnis von 1:1:1:1, für die Kopplung mit einem ^{10}B -Kern ergeben sich sieben Signale gleicher Intensität. Hinzu kommt, dass die Kopplungskonstante für eine ^{31}P - ^{10}B -Kopplung nur etwa ein Drittel der einer ^{31}P - ^{11}B -Kopplung beträgt.¹⁵⁰

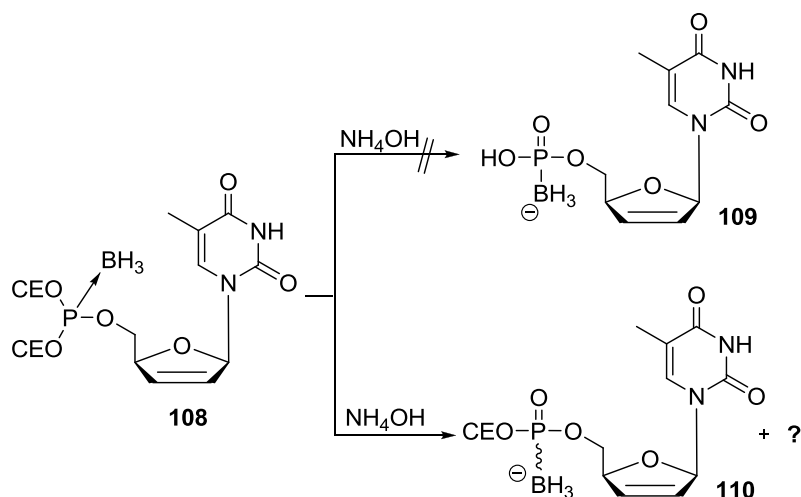


Abb. 67: Syntheseversuch zur Darstellung von α-P-Borano-d4TMP **109** und isoliertes Produkt **110**

Im nächsten Reaktionsschritt sollten durch Rühren in wässrigem Ammoniak die beiden 2-Cyanethylgruppen eliminiert werden und α-P-Borano-d4TMP **109** synthetisiert werden. Der Reaktionsfortschritt ließ sich per DC gut verfolgen, allerdings konnte das Produkt **109** nach Chromatographie an RP-18 Kieselgel nicht isoliert werden. Stattdessen wurde α-P-Borano-(2-cyanoethoxy)-d4TMP **110** als Gemisch von zwei Diastereomeren gemeinsam mit einer nicht identifizierten Verbindung isoliert und charakterisiert. Dass diese Verbindung entstanden war, konnte anhand der Signalverhältnisse (Integrale) im Proton-NMR und durch die Zuordnung der Signale mit Hilfe von 2D-NMR Experimenten bestätigt werden. Zudem wurde die Veränderung der chemischen Verschiebung des Phosphorsignals von $\delta = 119$ ppm von **108** zu $\delta = 93.5$ ppm von **110** beobachtet.

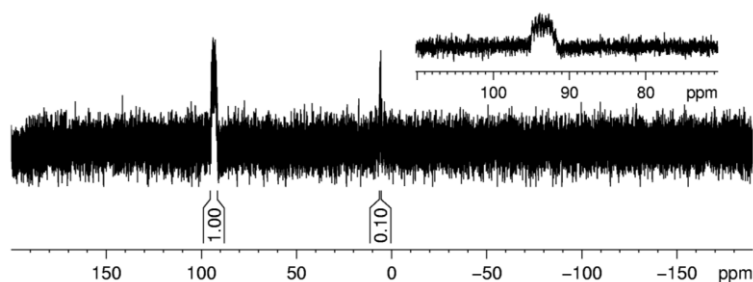


Abb. 68: ³¹P-NMR Spektrum von α-P-Boran-(2-cyanoethoxy)-d4TMP **110**

Nach *Khan et al.* verlief diese Reaktion zur Darstellung von α-P-Boran-5-ethinyl-uridinmonophosphat in guten Ausbeuten.¹⁶⁰ Nach *Evans et al.* verläuft die Abspaltung der beiden Cyanethylgruppen mit DBU nur unter Zusatz von Trimethylsilylchlorid vollständig.¹⁶¹ Die Kupplungsreaktion zwischen α-P-Borano-d4TMP **109** und einem entsprechenden Bis-

(4-acyloxybenzyl)-phosphorchloridat wäre ein völlig neuer Reaktionstyp gewesen, um die Zielverbindung **105** darzustellen. Außerdem hätte ein entsprechendes Phosphorchloridat synthetisiert werden müssen. Die Versuche zur Synthese von α -BH₃-modifizierten BAB-d4TDPs wurden aus diesen Gründen nicht weiter intensiviert.

4.2.2 Synthese einer β -P-BH₃-modifizierten BAB-d4TDP Verbindung

Aus synthetischem Interesse sollte untersucht werden, ob mit der Syntheseroute zur Darstellung von BAB-NDP Verbindungen auch β -P-BH₃-modifizierte Verbindungen zugänglich sind. Ein solches β -P-BH₃-BAB-d4TDP könnte evtl. biologisch aktiv sein und die Untersuchungen der Hydrolyse von BAB-d4TDPs **29,26-34** vergleichend ergänzen. Aus der Synthese von α -P-modifizierten Nucleosiddi- und triphosphaten ist bekannt, dass die Phosphor(III)-spezies mit entsprechenden Reagenzien in die Boran-, Schwefel oder auch Selen-haltigen Phosphatanaloga überführt werden können.^{150,162,163} Diese Möglichkeit sollte zur Synthese von β -P-BH₃-Bis-(4-tetradecanoyloxybenzyl)-d4TDP **112** aufgegriffen werden. Noch eine kleine Ergänzung zur Nomenklatur: Bei der Bezeichnung der symmetrischen BAB-NDP Verbindungen wurde auf das vorangestellte „ β “ verzichtet, da die Bis-(4-acyloxybenzyl)-Einheiten immer über das β -Phosphoratom an das Nucleosiddiphosphat gebunden sind. Zur Bezeichnung von **112** wurde das „ β “ vorangestellt, um die Position des Boransubstituenten zu definieren.

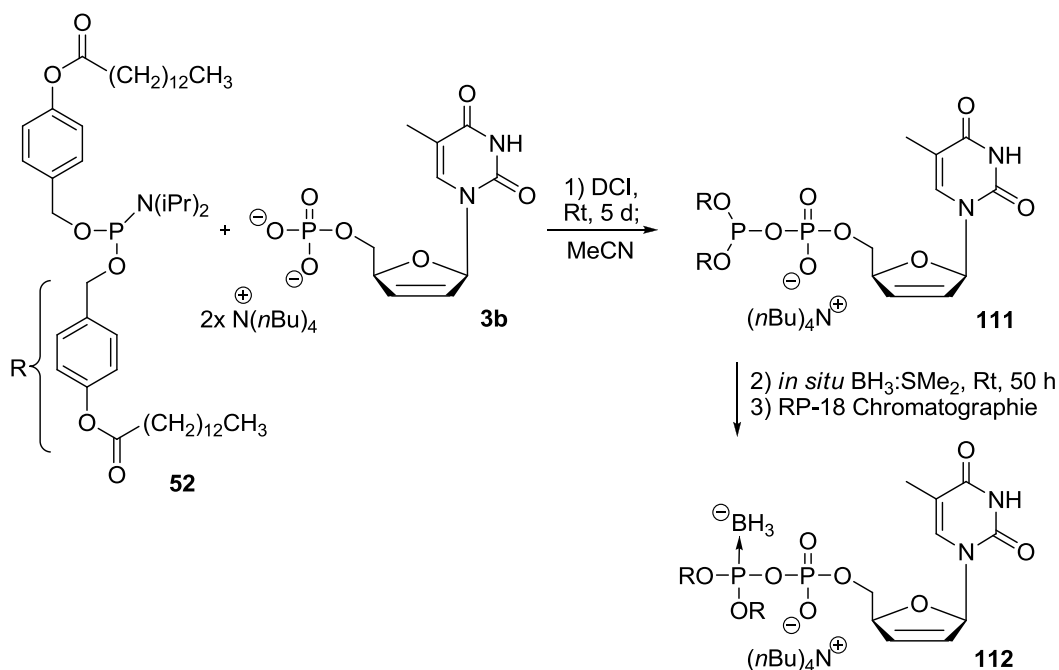


Abb. 69: Synthese von β -P-Borano-bis-(4-tetradecanoyloxybenzyl)-d4TDP **112**

Die Synthese zu β -BH₃-Bis-(4-tetradecanoyloxybenzyl)-d4TDP **112** wurde nach der Methode A durchgeführt (vergl. Tabelle 2, S.54). Nachdem kein weiterer Umsatz des d4TMPs mehr festgestellt werden konnte, wurde das Syntheseintermediat **111** nicht oxidiert, sondern *in situ* mit dem Boran-Dimethylsulfid-Addukt zur Reaktion gebracht. Der Reaktionsverlauf konnte nicht per DC verfolgt werden, deshalb wurde mehrmalig ein Teil der Reaktionslösung entnommen, mit wenig CDCl₃ versetzt und ein ³¹P-NMR Spektrum gemessen. Nach beendeter Addition des Borans wurden die Lösungsmittel destillativ entfernt und das Reaktionsgemisch an RP-18 Kieselgel getrennt. Nach einmaliger Chromatographie wurde die Zielverbindung mit leichten Verunreinigungen in einer Ausbeute von 46% isoliert. In Abb. 70 wird das ¹H-breitband-entkoppelte ³¹P-NMR Spektrum von **112** gezeigt. Wie bei den BAB-d4TDP Verbindungen spaltete das Signal des P- α zu einem Dublett auf. Im Gegensatz dazu spaltete das Signal von P- β zu einem Multiplett auf und war zu viel tieferem Feld verschoben (δ = 102.6 ppm). Die abweichende Tieffeldverschiebung und Aufspaltung resultierten aus der Koordination des Borans und der Kopplung zwischen den Kernen ¹⁰Bor bzw. ¹¹Bor und ³¹Phosphor (vergl. Abb. 66, S. 86).

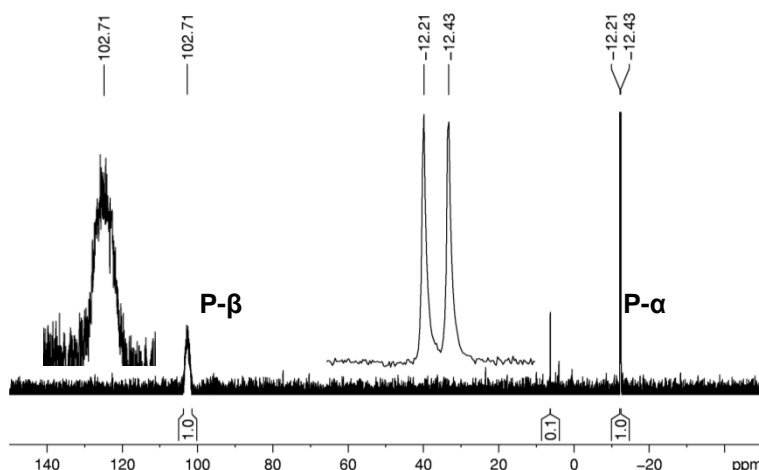


Abb. 70: ³¹P-NMR Spektrum von β -P-Borano-bis-(4-tetradecanoyloxybenzyl)-d4TDP **112**

Mit der Synthese von β -P-Borano-bis-(4-tetradecanoyloxybenzyl)-d4TDP **112** konnte gezeigt werden, dass sich der letzte Syntheseschritt der allgemein verwendeten Route so gestalten lässt, dass weitere interessante Analoga von BAB-NDP Verbindungen zugänglich werden. Möglich wäre hier der Umsatz mit entsprechenden schwefel- oder selenhaltigen Reagenzien, um die β -P-Thio bzw. β -P-Selen-Verbindungen zu erhalten.¹⁶²

4.3 Synthese der d4T- und AZT-Diphosphate und von d4T-Triphosphat aus *cycloSal*-Nucleosidmonophosphaten

Bei der Hydrolyse von BAB-NDP Verbindungen werden die entsprechenden Nucleosiddiphosphate (NDPs) freigesetzt. Der Hydrolysemechanismus von BAB-NDP Prodrugs wurde unter 2.3.2.4 vorgestellt und wird im Kapitel 4.5 ausführlich diskutiert. Als Referenzverbindungen für detaillierte Untersuchungen dieses Mechanismus mittels HPLC wurden die Nucleosiddiphosphate von d4T und AZT benötigt. Des Weiteren sollte d4T-Triphosphat (d4TTP) als Referenzverbindung synthetisiert werden. Die Nucleosiddi- und triphosphate sollten nach einer von S. Warnecke etablierten Synthesemethode aus 5-akzeptorsubstituierten *cycloSal*-NMPs dargestellt werden.⁷⁹ Auf die Verwendung von *cycloSal*-NMPs als Phosphataktivester zur Synthese von phosphorylierten Biokonjugaten wurde auf S.13ff hingewiesen. Grundsätzlich reagiert das *cycloSal*-NMP als Phosphataktivester mit einem entsprechenden Nucleophil. Die zur Synthese von Nucleosiddi- bzw. triphosphaten benötigten Nucleophile sind in organischen Lösungsmitteln lösliche Phosphat- bzw. Pyrophosphatsalze.

Zur Synthese der Nucleosiddi- bzw. -triphosphate können die 5-Chlor- und 5-Nitro-*cycloSal*-NMPs eingesetzt werden, wobei sich die 5-Nitro-*cycloSal*-NMPs durch eine höhere Reaktivität auszeichnen. Mit dieser Reaktivität geht jedoch eine hohe Labilität der Phosphortriesterbindung einher, so dass die 5-Nitro-*cycloSal*-NMPs nur unter Ausbeuteverlusten chromatographisch gereinigt werden können. Sie werden daher als Rohprodukte in der folgenden Synthese eingesetzt. Die 5-Chlor-*cycloSal*-NMPs können gereinigt werden. Bei den Synthesen der benötigten Di- und triphosphate wurden beide Aktivester verwendet.

Synthese von cycloSal-d4TMP 118, 119 und cycloSal-AZTMP 120

Als erstes wurde der benötigte 5-Chlor-Salicylalkohol **114** durch Reduktion der 5-Chlor-Salicylsäure mit Lithiumaluminiumhydrid in einer Ausbeute von 80% synthetisiert, während der 5-Nitro-Salicylalkohol **115** vorhanden war. Die Salicylalkohole konnten unter trockenen Bedingungen unter Zugabe von Phosphortrichlorid in Anwesenheit von Pyridin in die entsprechenden 5-Chlor- bzw. 5-Nitro-*cycloSal*igenylchlorphosphite **116** und **117** überführt werden.

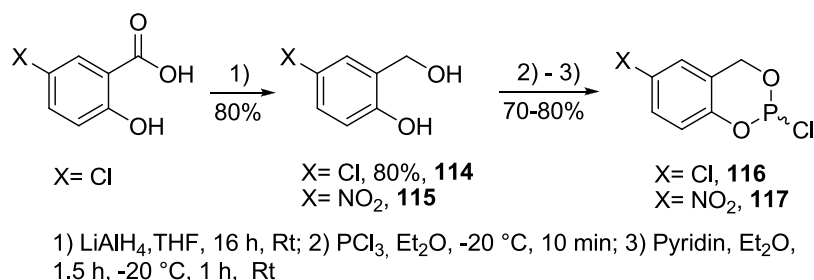


Abb. 71: Synthese von 5-Chlor- und 5-Nitro-*cycloSaligenylchlorophosphiten* **116** und **117**

Die *cycloSaligenylchlorophosphite* **116** und **117** wurden vom Pyridinhydrochlorid durch Schlenkfiltration getrennt und unter Stickstoffatmosphäre bei -18°C gelagert. Die benötigten *cycloSal-NMPs* **118,119** und **120** wurden durch Kupplung des entsprechenden Chlorphosphits **116** bzw. **117** mit d4T oder AZT in wasserfreiem Acetonitril in Anwesenheit von DIPEA und abschließender Oxidation mit Oxone dargestellt.¹⁶⁴ 5-Chlor-*cycloSal*-d4TMP **118** und 5-Chlor-*cycloSal*-AZTMP **120** wurden nach der Reinigung am Chromatotron in guten Ausbeuten erhalten. 5-Nitro-*cycloSal*-d4TMP **119** wurde aufgrund seiner Hydrolyselabilität nicht gereinigt und als Rohprodukt für weitere Synthesen eingesetzt.

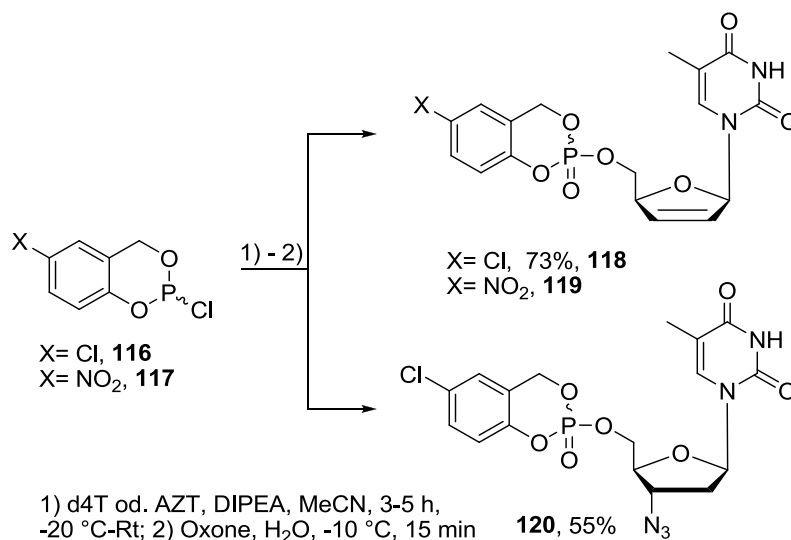


Abb. 72: Synthese der *cycloSal-NMPs* **118,119** und **120**

Synthese von d4TDP **4** und AZTDP **7**

Für eine effiziente Umsetzung der *cycloSal*-Nucleotide **118** und **120** zu den Nucleosiddiphosphaten d4TDP bzw. AZTDP sollte Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-Phosphat **121b** als Nucleophil eingesetzt werden. Um das kommerziell erhältliche Natriumdihydrogenphosphat in die lipophilere und damit nucleophilere Form zu überführen,

wurde es an DOWEX 50WX8 protoniert und anschließend mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid versetzt. Nach Gefriertrocknung konnte es als farbloses, hygroskopisches Pulver erhalten werden. Vor den Reaktionen zu den Diphosphaten wurde es mehrere Tage lang im Vakuum der Ölpumpe getrocknet.

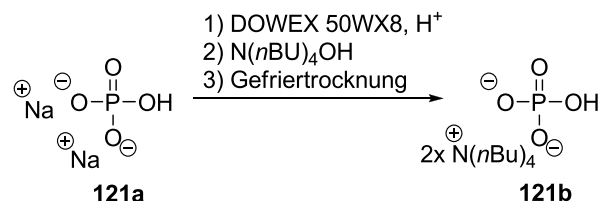
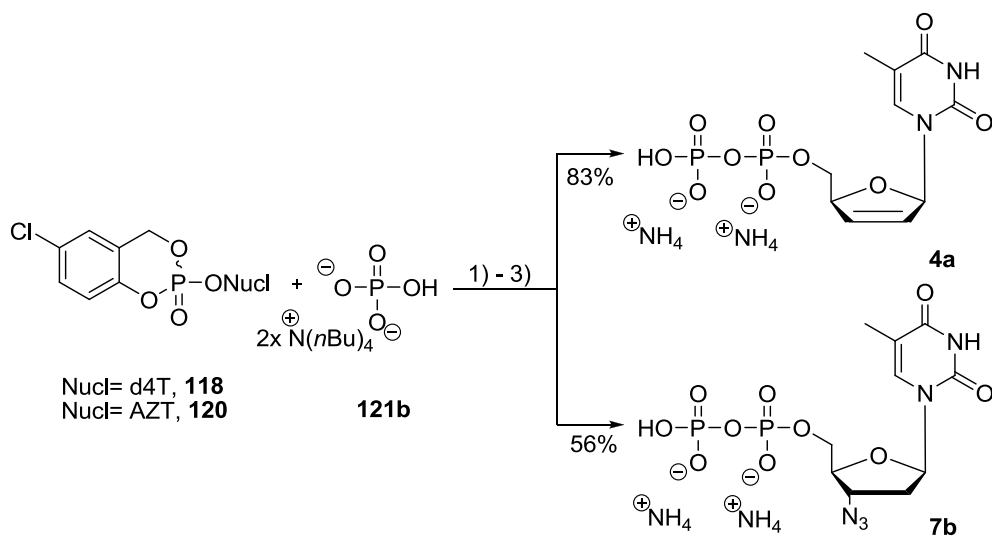


Abb. 73: Ionenaustausch an Dinatriumphosphat **121a**

Zur Synthese von d4TDP **4a** bzw. AZTDP **7a** wurden drei Äquivalente des Phosphatsalzes **121b** in DMF aufgenommen. Das jeweilige *cycloSal*-Nucleotid wurde ebenfalls für mehrere Stunden im Vakuum der Ölpumpe getrocknet, in DMF gelöst, über Molsieb getrocknet und schließlich langsam zum gelösten Phosphat getropft (ca. 1 h). Das Ende der Reaktion konnte anhand des Verbrauchs des *cycloSal*-NMPs per DC bestimmt werden.



1) Trocknung im Vakuum und über Molsieb in DMF; 2) DMF, 4- 20 h, Rt; 3) Ionenaustausch DOWEX 50WX8, NH_4^+ -Form; 3) RP-18 Chromatographie

Abb. 74: Synthese von d4TDP und AZTDP als Ammoniumsalze

In der Regel waren die Reaktionen nach vier Stunden beendet. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt (ca. 20 mL DMF bei 400 mg *cycloSal*-NMP) und die Tetra-*n*-butylammoniumionen durch Ammoniumionen ersetzt, um die NDPs an RP-18 Kieselgel reinigen zu können. Dieses Vorgehen hatte sich bei anderen NDPs bewährt.¹⁶⁴

Die beiden Nucleosiddiphosphate konnten in Ausbeuten von 56% für AZTDP **7a** und 82% für d4TDP **4a** sowie in vernünftigen Mengen (ca. 100 bis 150 mg) hergestellt werden. Bei einer der Synthesen zu d4TDP wurde in einer Mischfraktion neben dem Produkt noch ein Nebenprodukt identifiziert, dessen Entstehung jedoch rätselhaft blieb.

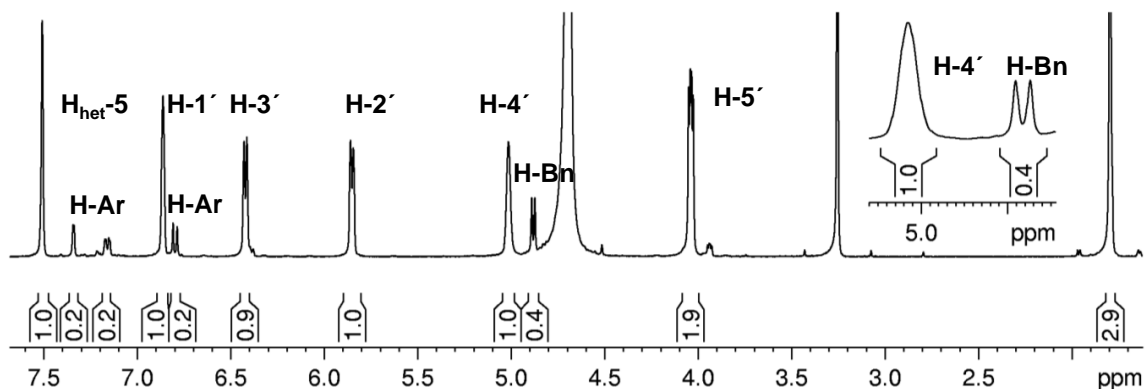


Abb. 75: ^1H -NMR von d4TDP und dem Nebenprodukt **128**

Mit großer Wahrscheinlichkeit handelte es sich um das benzylierte Pyrophosphat **122**, was aus den durchgeführten NMR-Experimenten (^1H , ^{31}P , ^{13}C und HSQC) geschlussfolgert wurde. **122** konnte durch RP-18 Chromatographie nicht vom d4TDP getrennt werden. Wie im Proton-NMR (Abb. 75) zu sehen ist, lagen Nebenprodukt **128** und d4TDP **4** in einem Verhältnis von 0.2:1 vor. Für das Integral der beiden benzyliischen Protonen ergab sich ein Integral von 0.4 (d, $^2J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, die Kopplung zum Phosphor war nicht erkennbar). Das gleiche Verhältnis von Nebenprodukt zu Produkt wurde auch im ^{31}P -NMR-Spektrum gefunden (Abb. 76). Aus diesem Spektrum wurde auf das benzylierte Pyrophosphat **128** geschlossen, da hier neben den beiden Dubletts für das Produkt zwei weitere Dubletts zu erkennen waren, hinter denen sich zwei koppelnde Phosphoratome verbargen ($^2J_{\text{PP}} = 21.3$ Hz, blauer Rahmen, Abb. 76). Um zu prüfen, ob es sich tatsächlich um das benzylierte Pyrophosphat **128** handelte, wurde ein Teil der Mischfraktion in D_2O aufgenommen und bei 37°C inkubiert. Nach drei Tagen wurde die vollständige Hydrolyse von **128** festgestellt. Die beiden Dubletts (blauer Rahmen) waren verschwunden und es hatte sich ein neues Signal gebildet (roter Rahmen). Die Verschiebung von -10 ppm entspricht genau der des Pyrophosphats **123** (vergl. 7.2.2).

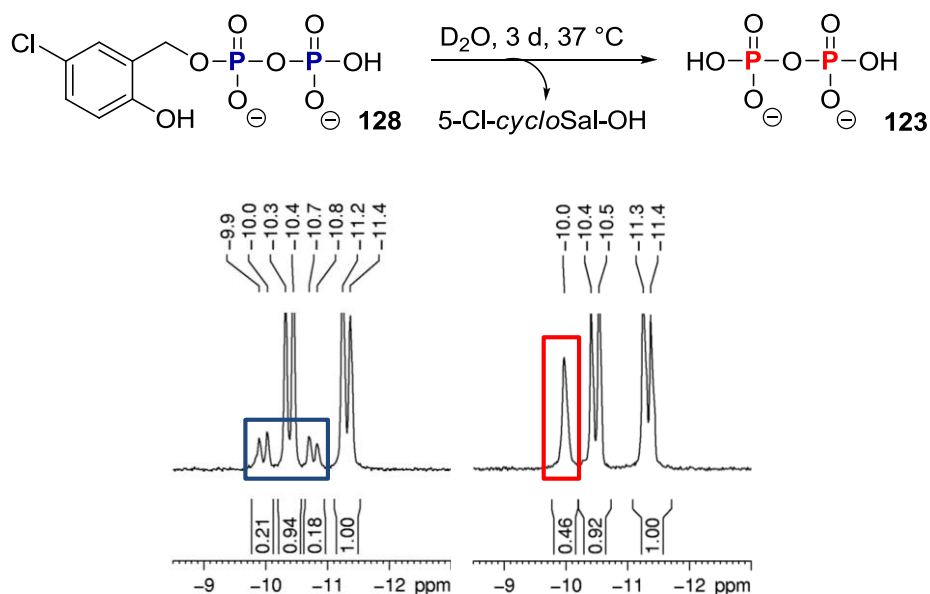


Abb. 76: ^{31}P -NMR von **122** vor und nach der Hydrolyse zum Pyrophosphat **123**

Synthese von d4T-Triphosphat **5**

Zur Synthese von d4TTP **5** wurde wie bei der Darstellung von d4TDP vorgegangen. Als Nucleophil wurde Bis-(Tetra-*n*-butylammonium)-Pyrophosphat **124b** mit dem 5-Nitro-*cycloSal*-d4TMP **119** zur Reaktion gebracht. Aus dem kommerziell erhältlichen Dinatriumdihydrogenpyrophosphat **124a** konnte zuvor Bis-(Tetra-*n*-butylammonium)-Pyrophosphat **124b** über einen Ionenaustausch in einer Ausbeute von 98% hergestellt werden. Wie schon das Phosphatsalz wurde auch dieses vor Reaktionsbeginn mehrere Tage im Vakuum getrocknet. Der Einsatz von 5-Nitro-*cycloSal*-NMPs als Phosphataktivester hat folgenden Vorteil: Durch das stärkere Akzeptorvermögen der 5-Nitrogruppe erniedrigt sich die Elektronendichte des Phosphatriesters, was zu einer deutlich schnelleren Reaktion mit dem gewählten Nucleophilen führen sollte.⁷⁹ Dieses Reaktionsverhalten wurde bei der Synthese von **5** bestätigt: Bereits nach einer guten Stunde war 5-Nitro-*cycloSal*-d4TMP verbraucht, so dass die Reaktion beendet wurde. Wie bei der Chromatographie der Nucleosiddiphosphate, war es ratsam, die Kationen auszutauschen, um das Produkt in sauberer Form isolieren zu können. Aus diesem Grund wurde das Rohgemisch über ein Ionenaustauscherharz (DOWEX 50WX8, NH_4^+ -Form) gegeben und gefriergetrocknet. An dieser Stelle offenbarte sich ein Nachteil des Einsatzes von 5-Nitro-*cycloSal*-d4TMP als Phosphataktivester: Der freigewordene 5-Nitrosalicylalkohol **115** sollte sich schwieriger vom Produkt entfernen lassen als der 5-Chlorsalicylalkohol **114**. Die Verbindung **5** wurde als Referenzsubstanz für HPLC Experimente benötigt und durfte deshalb nicht die geringste Spur des stark UV-

absorbierenden 5-Nitrosalicylalkohols enthalten. Nach mehrmaliger Chromatographie konnte das Produkt schließlich in einer guten Ausbeute von 42% erhalten werden, während weiteres Produkt aus Mischfraktionen nicht isoliert werden konnte. Warum sich der verbleibende Teil an Salicylalkohol nicht abtrennen ließ, kann nicht erklärt werden.

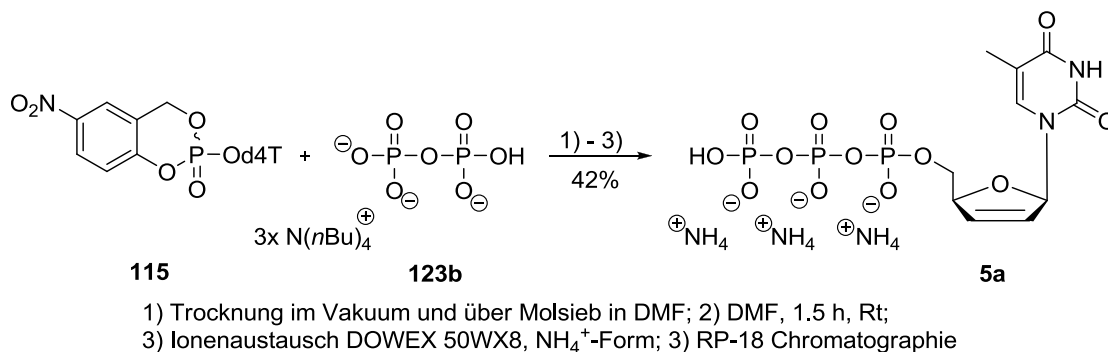


Abb. 77: Synthese von d4TTP **5a**

4.4 Synthese eines bioreversibel geschützten Bis-(4-acyloxybenzyl)-Nucleosidtriphosphats

Bis-(4-acyloxybenzyl)-maskierte Nucleosiddiphosphate mit vielen verschiedenen Acylresten von unterschiedlichen Nucleosiden konnten erfolgreich synthetisiert werden. Zum Abschluss des Syntheseteils soll die Darstellung eines potentiellen Nucleosidtriphosphat Prodrugs vorgestellt werden.

BAB-Nucleosiddiphosphat Prodrugs wurden synthetisiert, um die entsprechenden Nucleosiddiphosphate intrazellulär freizusetzen und deren antivirale Wirkung durch Umgehen der notwendigen Phosphorylierungsschritte zu verbessern. In den Kapiteln 4.5-4.7 wird detailliert gezeigt werden, dass die BAB-NDP Verbindungen die Nucleosiddiphosphate tatsächlich freisetzen. Könnte das Nucleosidtriphosphat direkt intrazellulär angeboten werden, so würde die gesamte Phosphorylierungskaskade umgangen werden (vergl. 2.3.2). Allgemein gilt der letzte durch die Nucleosiddiphosphat Kinase katalysierte Phosphorylierungsschritt als wenig problematisch, da das Enzym alle *natürlichen* Nucleosiddiphosphate mit einer sehr hohen katalytischen Aktivität phosphoryliert. Bei dieser Phosphorylierung dienen ATP oder GTP als Phosphatdonoren und die Reaktion ist vollständig reversibel.³² Ob dies so generell für alle Nucleosidanaloga gilt, ist nicht sehr intensiv untersucht worden. Allerdings ist die NDPK *in vitro* bei der Phosphorylierung von d4TDP und AZTDP 10^3 bis 10^4 mal weniger effizient als bei der

Phosphorylierung von Thymidindiphosphat.^{34,152} In der Literatur wurde nur ein mögliches Prodrugsystem für Nucleosidtriphosphate von der Gruppe um *T.Huynh Dinh* beschrieben. Die potentiellen Prodrugs setzten bei Hydrolysestudien in wässrigen Pufferlösungen tatsächlich die entsprechenden Nucleosidtriphosphate frei. Allerdings war die Hydrolysestabilität der untersuchten Verbindungen im RPMI-Kulturmedium sehr gering, womit eine fehlende antivirale Aktivität begründet wurde (vergl. 2.3.2.2).¹⁰¹ Wie dieser eine bekannte Versuch belegt, gestaltet es sich kompliziert, Nucleosidtriphosphate lipophil und reversibel zu maskieren. Dies ist einerseits dem sehr schwierigen chemisch-synthetischen Zugang zu solchen Verbindungen geschuldet, andererseits liegt es wie bei den Nucleosiddiphosphaten an der inhärenten Labilität der Phosphorsäureanhydridbindung, die nur aufgrund der Delokalisierung der negativen Ladungen stabil ist. Die Maskierung dieser Ladungen führt folglich zu einer Destabilisierung der Bindungen.

Das zur bioreversiblen lipophilen Maskierung von Nucleosiddiphosphaten erfolgreich verwendete BAB-Konzept sollte prinzipiell auch zur Maskierung eines Nucleosidtriphosphats verwendet werden können und ein solches BAB-NTP könnte über einen vergleichbaren Syntheseansatz zugänglich sein. Zur Synthese der BAB-Nucleosiddiphosphate wurde das entsprechende Nucleosidmonophosphat mit einem Phosphoramidit gekuppelt und *in situ* die Phosphor(III)-spezies oxidiert. Auf diese Weise wurde im letzten Syntheseschritt die labile Pyrophosphateinheit aufgebaut. Nach dem gleichen Prinzip sollte zur Synthese eines BAB-Nucleosidtriphosphats ein Nucleosiddiphosphat mit einem reaktiven Phosphoramidit gekuppelt und abschließend oxidiert werden, um die Triphosphateinheit aufzubauen. Es war zunächst nicht bekannt, ob eine solche Verbindung stabil genug wäre, um sie zu synthetisieren und als potentielles Prodrug einzusetzen. Ein Vorteil dieser Syntheseroute war mit Sicherheit, dass die präparative Vorgehensweise der DCI vermittelten Kupplung und Oxidation aus der Synthese der BAB-NDPs bekannt war. Außerdem waren die benötigten Bis-(4-acyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite **45-53** bereits synthetisiert worden.

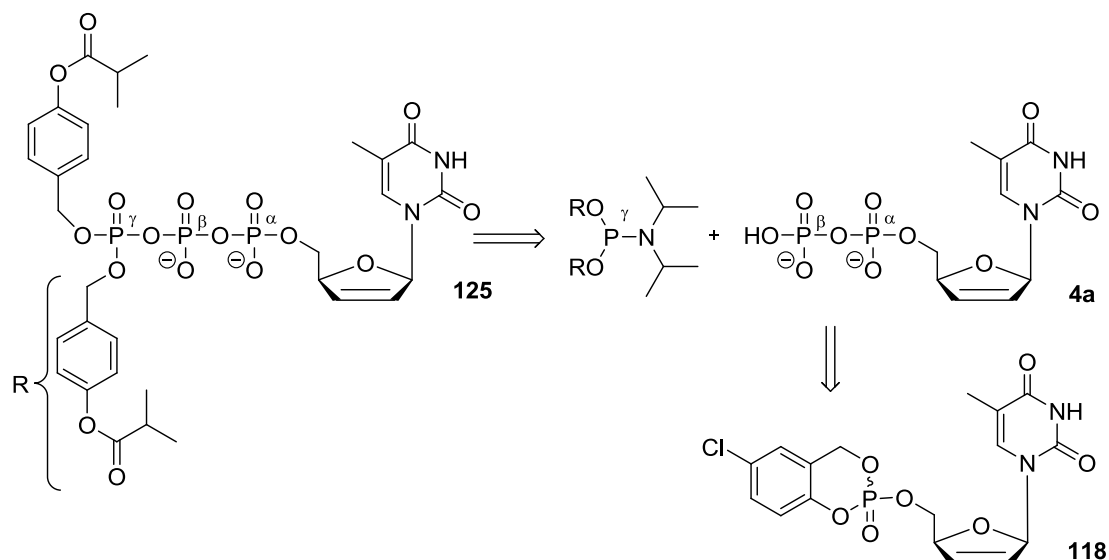


Abb. 78: Retrosynthese zur Darstellung von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-d4TTP **125** als ein potentielles Nucleosidtriphosphat Prodrug

Um die Zielverbindung Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-d4TTP (BIB-d4TTP) **125** darstellen zu können, wurde lediglich ein in Acetonitril lösliches Salz des d4T-Diphosphats benötigt. Bei der Synthese von d4TDP **5** entsteht eigentlich das benötigte Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **5b**, welches aber in dieser Form nicht sauber zu isolieren war (Abb. 74). Aus diesem Grund musste das Ammoniumsalz **5a** protoniert werden (DOWEX 50WX8, H⁺-Form), um anschließend mit N(*n*Bu)₄OH in das Bis-tetra-*n*-butylammonium-d4TDP **5b** „zurück“ geführt zu werden. Dieser doppelte Schritt des Umsalzens ließ sich nicht umgehen (nach der Reaktion für die Chromatographie, vor der Reaktion zum BIB-d4TTP **125**). Jedoch konnte **5b** in einer Ausbeute von bis zu 94% erhalten werden. Dies ergab eine Gesamtausbeute von 77% bezogen auf das *cycloSal*-d4TMP **118** inkl. zweimaligen Ionenaustausches und RP-18 Chromatographie.

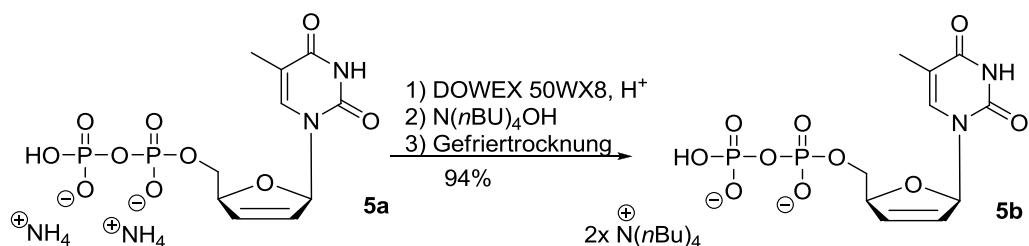
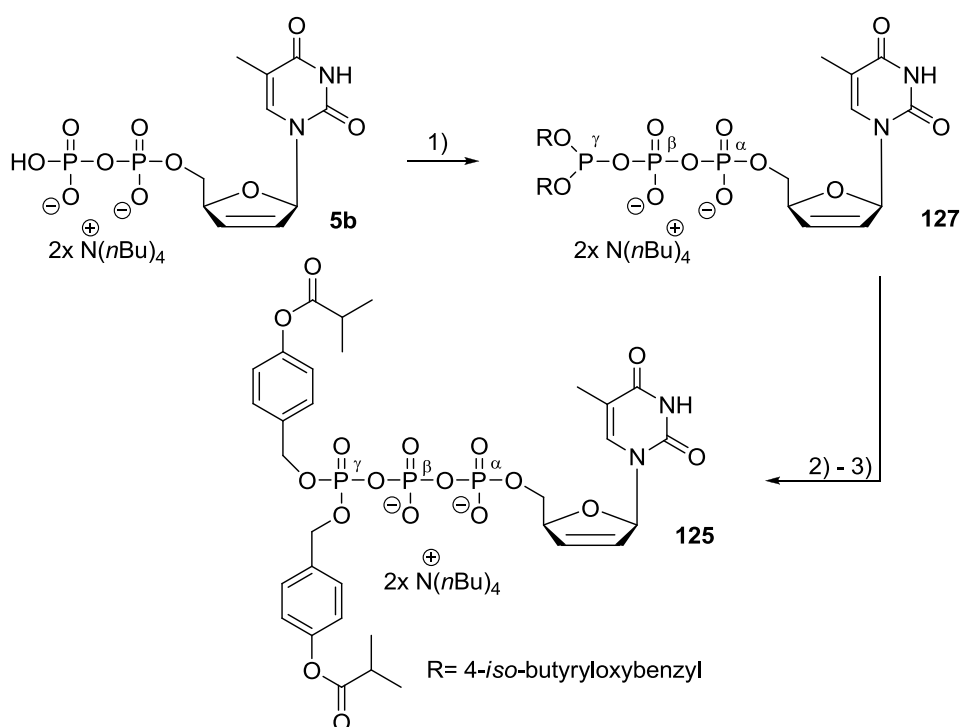


Abb. 79: Darstellung von Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **5b** aus Bisammonium-d4TDP **5a** durch Ionenaustausch

Die Gefriertrocknungen konnten zwar in den meisten Fällen über Nacht durchgeführt werden, jedoch verzögerten sie den Arbeitsfortgang und führten ggf. zu Ausbeuteverlusten,

da die relativ kleinen Mengen des reinen Diphosphats (ca. 100 mg) nach dem Ionentausch in ca. einem Liter Wasser gelöst waren und nach Gefriertrocknung in kleinere Kolben überführt werden mussten. Es standen nun die beiden Edukte für die erste Synthese von BIB-d4TTP **125** bereit, so dass die Reaktion nach der Methode A durchgeführt werden konnte (vergl. Synthese von BAB-d4TDP Derivaten S. 38). Das vorgetrocknete d4TDP **5b** wurde mit Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **45** unter Anwesenheit von DCI in Acetonitril gekuppelt. Da nicht bekannt war, ob die Reaktion ablaufen würde und die Reaktionsverfolgung per DC nicht eindeutig war, wurden während der Reaktion ^{31}P -NMR Spektren aufgenommen. Hierfür wurde jeweils ein Teil der Reaktionslösung entnommen und mit CDCl_3 für das „Lock-Signal“ versetzt.



1) DCI, Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **45**, MeCN, 0 °C - Rt; 2) *in situ* *tert*-BuOOH; 3) RP-18 Chromatographie, Gefriertrocknung

Abb. 80: Synthese von Bis(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-d4TTP **125**

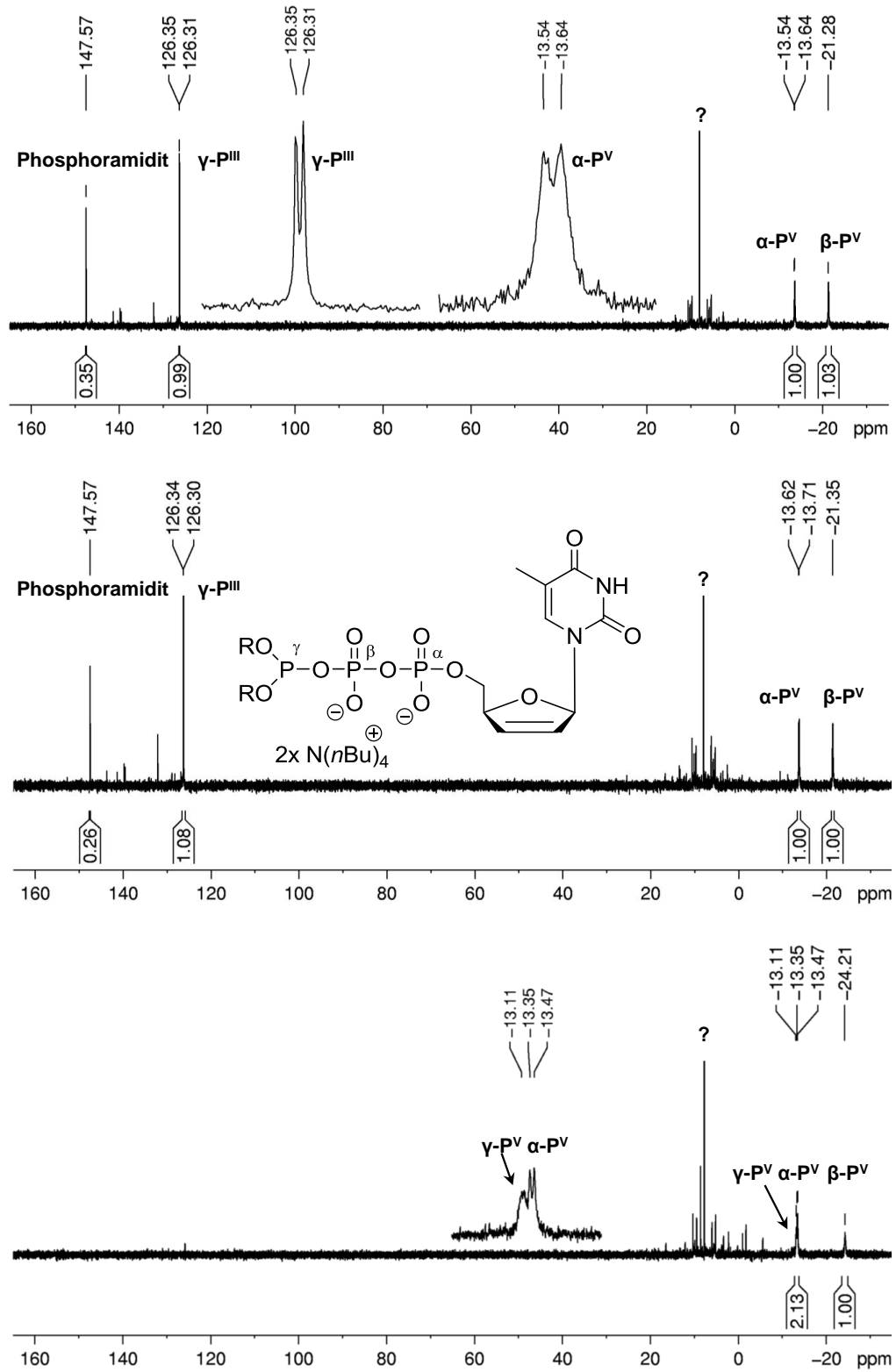


Abb. 81: ^{31}P -NMR Spektren der Reaktion zu **125** (von oben nach unten: nach 20 min, 45 min und nach der Oxidation)

In Abb. 81 sind die NMR-Spektren, die während der Reaktionsverfolgung gemessen wurden, gezeigt. Das erste NMR-Spektrum wurde etwa nach einer Reaktionszeit von 20 min aufgenommen. In diesem Spektrum wurden die Signale wie folgt zugeordnet: Das Signal bei $\delta = 147.6$ ppm wurde sehr wahrscheinlich vom Phosphoramidit **45** hervorgerufen, während die drei Signale mit einer Peakfläche von ca. 1.0, dem Zwischenprodukt **127** zugewiesen werden konnten. Für das γ -Phosphoratom konnte aufgrund der Kopplung mit dem β -Phosphat eine Aufspaltung zum Dublett beobachtet werden ($\delta = 126.3$ ppm). Ebenso spaltete das Signal des α -Phosphoratoms aufgrund der Kopplung zum β -Phosphoratom zum Dublett ($\delta = -13.6$ ppm). In den Spektren der Reaktionsverfolgung konnte für das β -Phosphoratom nur ein Multiplett beobachtet werden ($\delta = -21.4$ ppm). Das sehr intensive Signal bei ca. 8 ppm (mit einem „?“ markiert) stammte sehr wahrscheinlich vom Phosphoramidat **58a**, welches sich als Verunreinigung im Edukt (Phosphoramidit) befand (Abb. 81). Die Abnahme des Eduktes **45** konnte bereits nach weiteren 45 min beobachtet werden. Nachdem das Edukt fast vollständig verbraucht worden war (nach weiteren 2 h, Spektrum nicht gezeigt), wurde mit *tert*-Butylhydroperoxid oxidiert. Durch den Wechsel der Oxidationsstufe von +III auf +V verschob sich das Signal des γ -Phosphoratoms deutlich (von $\delta = 126.3$ ppm zu $\delta = -13.1$ ppm, unteres Spektrum Abb. 81).

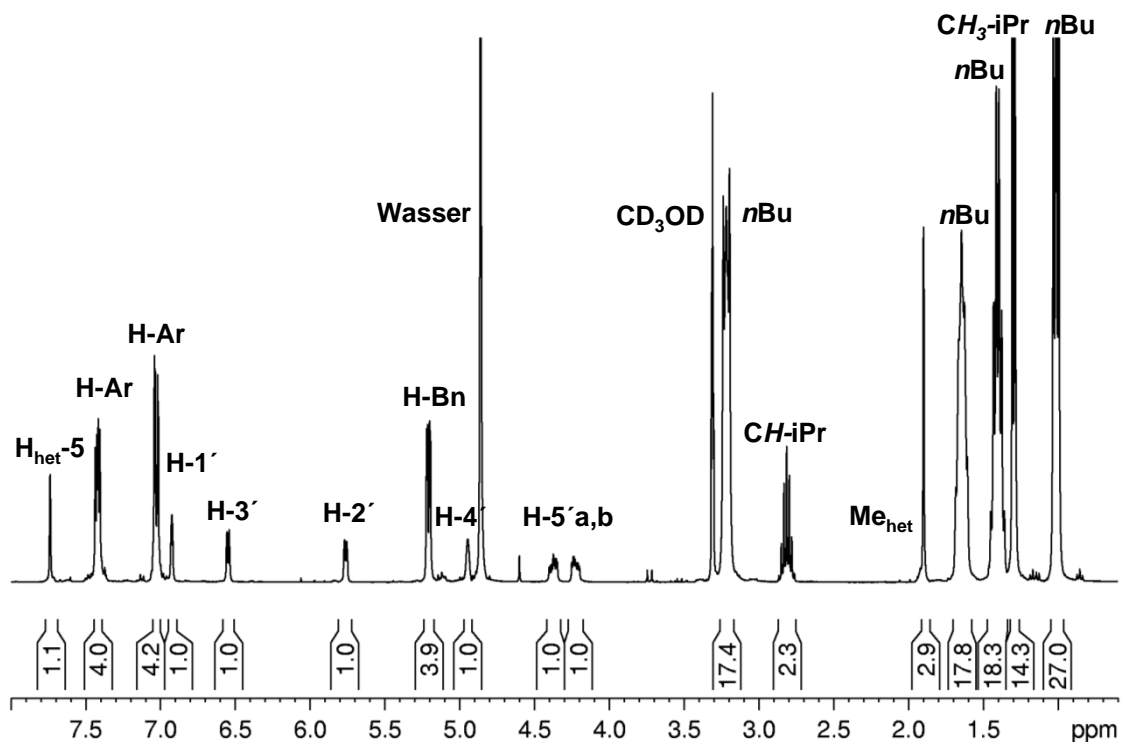


Abb. 82: ^1H -NMR Spektrum von BIB-d4TTP **125**

Das Produkt konnte durch Chromatographie an RP-18 Kieselgel mit einem Gradienten von Methanol und Wasser gereinigt werden. Das bei dieser Reaktion erhaltene saubere Produkt wurde vollständig für eine ^{31}P -NMR Hydrolyse eingesetzt (S.151). Die Reaktion wurde wiederholt, um das Produkt in einer Ausbeute von 54% und einer sehr guten Reinheit zu erhalten. Neben dem reinen Produkt konnte d4TDP reisoliert werden. Im ^1H -NMR Spektrum von BIB-d4TTP **125** ist die hohe Reinheit des Produktes an den einzelnen Integralen zu erkennen. Im Unterschied zu den BAB-d4TDP Verbindungen spalteten bei diesem d4TTP Prodrug die Protonen der 5'-Methylengruppe stärker auf, was mit der Kopplung zu den Phosphoratomen zusammenhängen muss (vergl. ^1H -NMR von C9-BAB-d4TDP **30**, S.47). Im ^1H -Breitband-entkoppelten ^{31}P -NMR Spektrum wurden die erwarteten Aufspaltungen gefunden: Aufgrund der Kopplung zu zwei benachbarten Phosphaten spaltete das Signal von P- β zu einem doppelten Dublett auf und besaß die größte Hochfeldverschiebung ($\delta = -24.2$ ppm). Die beiden anderen Phosphoratome spalteten jeweils zu einem Dublett (Abb. 83). Im gekoppelten Modus spalteten die Signale dieser beiden Atome zu Multipletts.

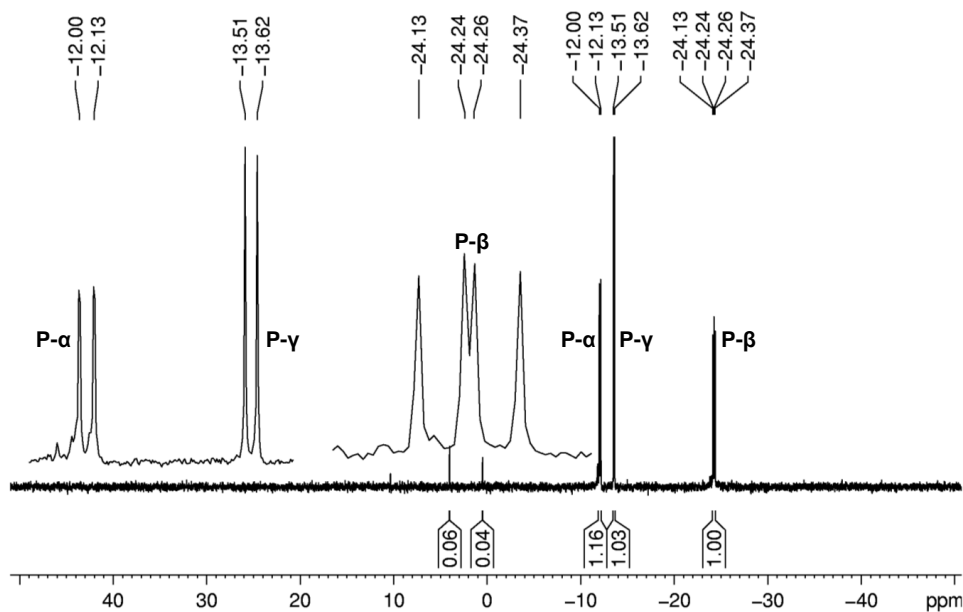


Abb. 83: ^{31}P -NMR Spektrum von BIB-d4TTP **125**

Das Signal von P- β zeigte auch im gekoppelten Spektrum eine Aufspaltung zum doppelten Dublett. Die Zuordnung des Signals für P- β war aus diesen NMR Experimenten möglich gewesen, während für die Zuordnung von P- α und von P- γ ein $^1\text{H},^{31}\text{P}$ -COSY-NMR Spektrum gemessen werden musste. Mit Hilfe dieses 2D-NMR Experiments war es möglich, die beiden Signale ihren Phosphoratomen zuzuordnen. Die Kopplung von P- α mit den beiden Methylenprotonen der 5'-Position wurde ebenso deutlich wie die Kopplung von

P- γ mit den insgesamt vier benzylichen Protonen bei etwa 5.2 ppm. Etwas tieffeldverschoben von P- α ist ein Signal sehr kleiner Intensität zu erkennen, dass von einer nicht identifizierten Verunreinigung stammt (Crosspeak X).

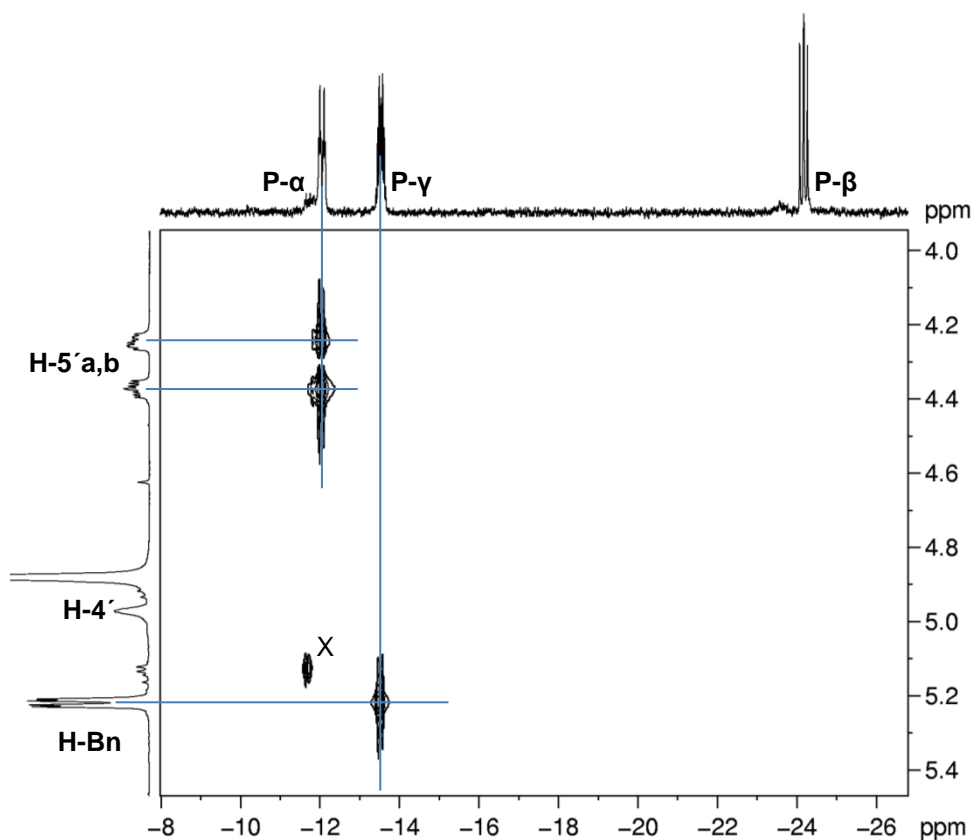


Abb. 84: $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ -COSY Spektrum von BIB-d4TTP **125**, mit Zuweisung der Crosspeaks

Mit der Reaktion zu BIB-d4TTP **125** und der NMR-Charakterisierung konnte erstmalig bewiesen werden, dass sich tatsächlich mit der Synthesemethode neben BAB-NDP Verbindungen auch BAB-Nucleosidtriphosphate darstellen lassen. Das im Fall des BIB-d4TTPs **125** ebenfalls von einer bioreversiblen Maskierung der Triphosphateinheit gesprochen werden kann und das solche Verbindungen deshalb als potentielle Prodrugs für Nucleosidtriphosphate bezeichnet werden dürfen, wird in Kapiteln 4.6 gezeigt.

4.5 Charakterisierung und Untersuchung von BAB-d4TDP und -AZTDP Prodrugs

Nach der Synthese zahlreicher Prodrugs wird deren Charakterisierung detailliert erläutert und diskutiert. Im Vordergrund stehen dabei das Hydrolyseverhalten der synthetisierten Verbindungen und die Untersuchung möglicher Struktur-Aktivitätsbeziehungen. Die Reihe der BAB-d4TDP Prodrugs **27-34** mit langkettigen Acylresten wurde aus den folgenden Überlegungen heraus dargestellt:

- Hat die Kettenlänge einen Einfluss auf die Stabilität?
- Welchen Einfluss hat sie auf den Hydrolysemechanismus?
- Welchen Einfluss hat sie auf die Hydrolysehalbwertszeiten?
- Bei einer chemischen Hydrolyse?
- Bei einer enzymatischen Hydrolyse?
- Haben die Modifikationen des Acylrestes einen Einfluss auf die antivirale Aktivität der Verbindungen?

Um ein geordnetes Bild des Hydrolyseverhaltens zu bekommen und Antworten auf die Fragen zu erhalten, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Untersuchung der Hydrolyse mit Hilfe von ^{31}P -NMR-Spektroskopie und Zuordnung von Hydrolyseprodukten.
- Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeit der BAB-d4TDP/ -AZTDP Prodrugs bei unterschiedlichen pH-Werten (6.8 und 7.3) mit Hilfe der HPLC.
- Zuordnung von Hydrolyseintermediaten und -produkten durch Interpretation der HPLC Chromatogramme unter Verwendung der synthetisierten Referenzsubstanzen.
- Untersuchung des Hydrolyseverhaltens in biologisch relevanten Medien (CEM/0 Zellextrakte, RPMI-Nährmedium mit und ohne Zusatz von FCS, humanes Serum).

4.5.1 ^{31}P -NMR-spektroskopische Untersuchung einer lipophilen BAB-d4TDP Verbindung

Die BAB-NDP Verbindungen zeigen ein charakteristisches Signalmuster im protonen-entkoppelten ^{31}P -NMR Spektrum, bestehend aus zwei Signalen. Durch die 2J -Kopplung der beiden Phosphoratome der Pyrophosphateinheit ergibt sich jeweils ein Dublett für das

α -Phosphoratom und eins für das β -Phosphoratom bei ca. -12.2 ppm bzw. bei ca. -12.8 ppm. Die Kopplungskonstante beträgt durchschnittlich etwa $^2J_{PP} = 20.5$ Hz. Um die beiden Signale dem α - oder dem β -Phosphoratom zuzuordnen, wurde ein $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ -COSY-NMR Experiment mit der Verbindung C6-BAB-d4TDP **28** durchgeführt. Die Zuordnung der Phosphorsignale aus einem gekoppelten ^{31}P -NMR Spektrum über die Kopplungskonstanten, war nicht möglich.

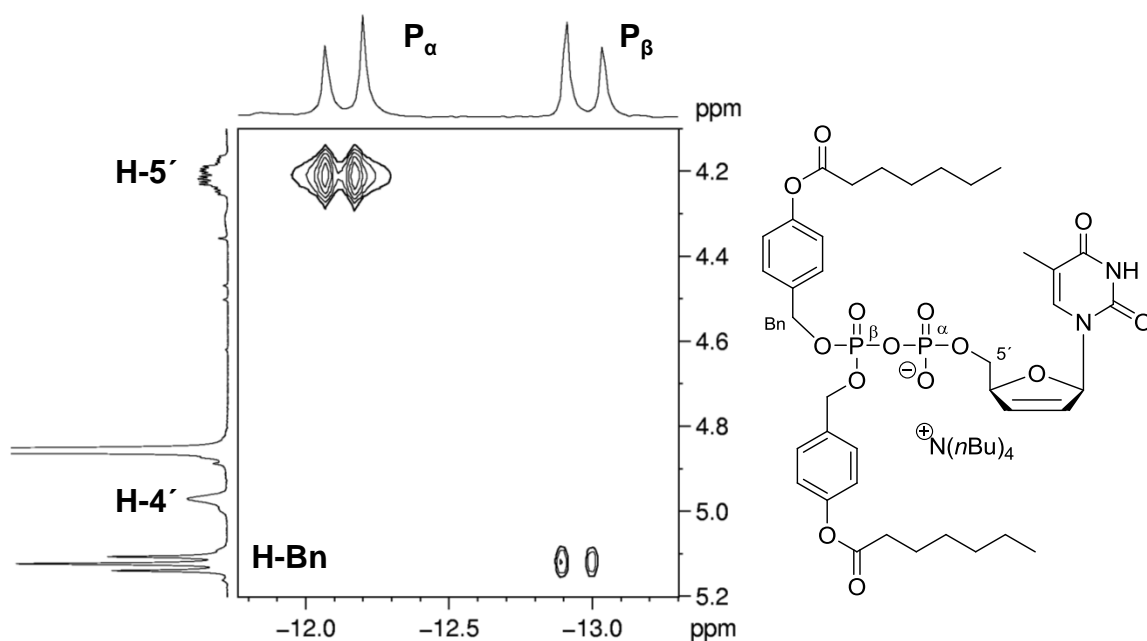


Abb. 85: $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ -COSY-NMR Spektrum zur Zuweisung des α - bzw. β -Phosphoratoms in BAB-NDP am Beispiel von **28**

Durch das Korrelationsspektrum konnten die beiden Dubletts dem jeweiligen Phosphoratom zugeordnet werden. Die Kopplung von $\text{P-}\alpha$ mit den Protonen der 5'-Position des Nucleosids sowie die Kopplung von $\text{P-}\beta$ mit den benzylichen Protonen war eindeutig. Die so festgelegte Zuordnung wurde für alle anderen BAB-NDP Verbindungen übernommen.

Der prinzipielle Hydrolysemechanismus für die BAB-NDP Verbindungen wurde im Kenntnisstand erklärt und ist in Abb. 90 wiedergegeben (S. 109). Die chemische Hydrolyse von C6-BAB-d4TDP **28** wurde per ^{31}P -NMR-Spektroskopie untersucht. Es wird gezeigt, dass ein fettsäuremodifiziertes BAB-d4TDP Prodrug ebenso wie die von *Jessen et al.* beschriebenen Verbindungen, hydrolysiert.¹⁰⁵ Für die ^{31}P -NMR-spektroskopische Untersuchung der Hydrolyse von C6-BAB-d4TDP **28** wurden etwa 38 μmol der Verbindung in gleichen Teilen von DMSO-d_6 und Phosphatpuffer pH 7.3 gelöst und die ersten NMR-Spektren aufgenommen.

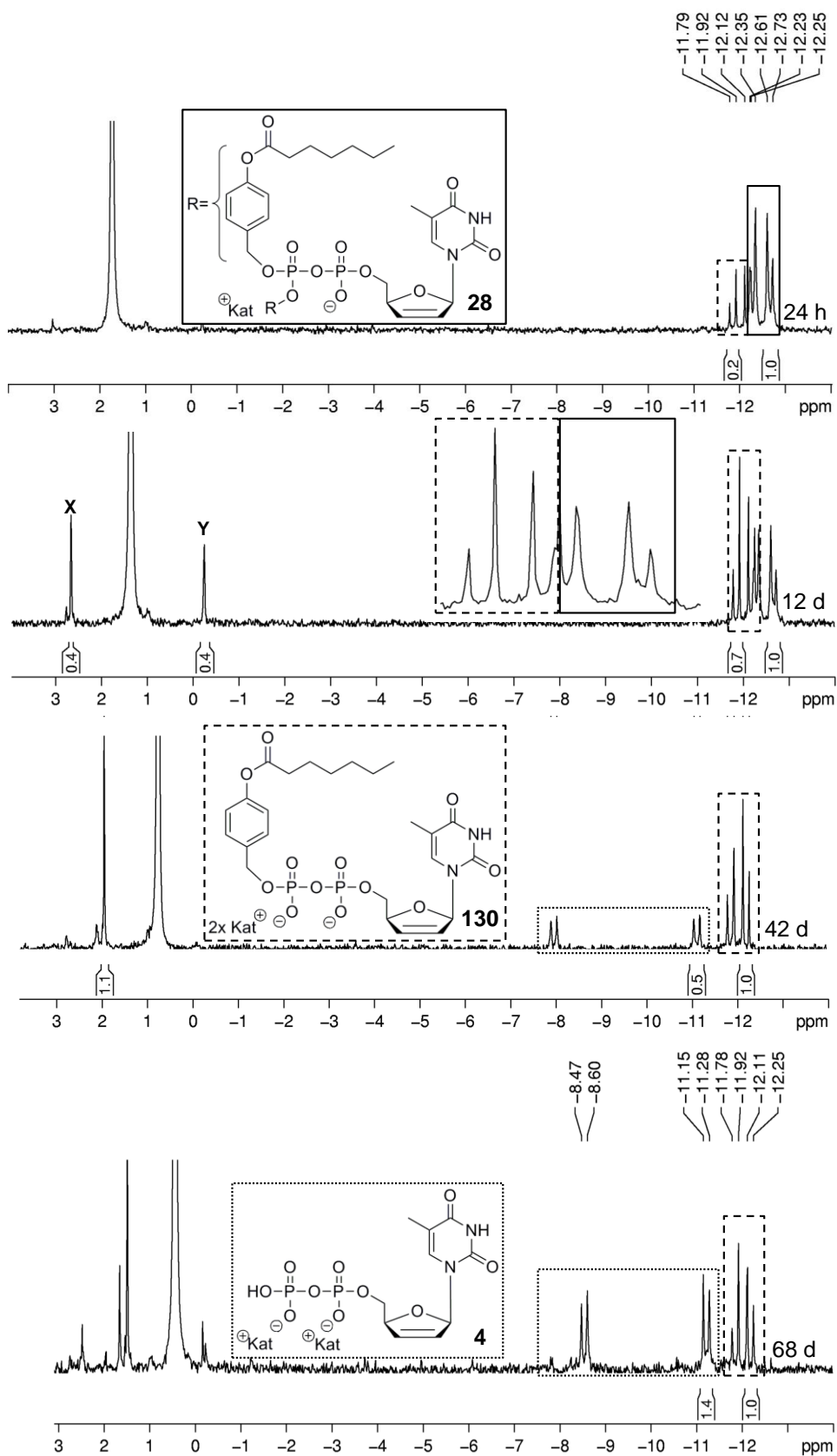


Abb. 86: ^{31}P -NMR Hydrolyse von C6-BAB-d4TDP **28** bei 37 °C und pH 7.3

Die verwendete Lösung war zu konzentriert, so dass die Hydrolyse zur Verdünnung unterbrochen werden musste. Im ersten Spektrum ist daher bereits eine anteilige Abspaltung einer der maskierenden Einheiten zu erkennen. Das Prodrug **28** hydrolysierte innerhalb von ca. 42 Tagen vollständig zu dem Hydrolyseintermediat C6-AB-d4TDP **130**. Außerdem kam es zur Spaltung der Phosphorsäureanhydridbindung eines Teils der Verbindung **28**, was die Bildung von zwei neuen Produkten erklärt (**X** und **Y** nach 12 d). Das Signal **X** stammte mit ziemlicher Sicherheit vom Phosphorsäurediester **59e** und **Y** vom gebildeten d4TMP. Die Spektren belegen, dass aus dem AB-Intermediat **130** d4TDP **4** freigesetzt wird. Die Bildung von d4TDP **4** war nach 42 d Hydrolyse zu erkennen und dessen Menge nahm in den weiteren 24 d zu. Die Freisetzung von d4TDP erfolgt unter chemischer Hydrolyse ausschließlich aus dem Hydrolyseintermediat C6-AB-d4TDP **28**. Es handelt sich um einen konsekutiven Prozess (vergl. Abb. 10 und Abb. 90).

4.5.2 Hydrolysestudien der BAB-d4TDP und -AZTDP Verbindungen

4.5.2.1 Untersuchungen zur chemischen Hydrolyse von BAB-d4TDP

Prodrugs

Die chemische Hydrolyse der BAB-d4TDP Verbindungen **26,27-37** und von β -BH₃-BAB-d4TDP **112** wurde genauer untersucht. Hierfür wurden die Verbindungen bei 37 °C in Phosphatpuffer (pH 6.8, 7.3) inkubiert und zu bestimmten Zeiten der Hydrolysefortschritt mittels HPLC analysiert (S. 299f). Die verwendeten HPLC-Methoden wurden so entwickelt, dass die Zu- und Abnahme aller Hydrolyseprodukte parallel verfolgt werden konnte. Um eine Signalüberlagerung zu vermeiden wurde auf den Zusatz eines internen Standards verzichtet. Aufgrund der hohen Stabilitäten der BAB-d4TDPs **26,27-37** und der gebildeten Hydrolyseintermediate **128-135** mussten die Hydrolysen über mehrere Wochen bis zu zweieinhalb Monate verfolgt werden. In der Regel wurden die Hydrolysen bis zum Verbrauch des BAB-d4TDPs und des Intermediats (AB-d4TDP) verfolgt. In Abb. 87 ist der Hydrolyseverlauf von C9-BAB-d4TDP **30** gezeigt (Zur besseren Darstellung werden nur einige Chromatogramme stellvertretend für die gesamte Hydrolyse abgebildet, alle Chromatogramme wurden bei 264-265 nm extrahiert). Aus den Chromatogrammen war bereits nach 10 Tagen die Bildung des AB-Intermediats **36** und von d4TMP aus C9-BAB-d4TDP **30** zu beobachten.

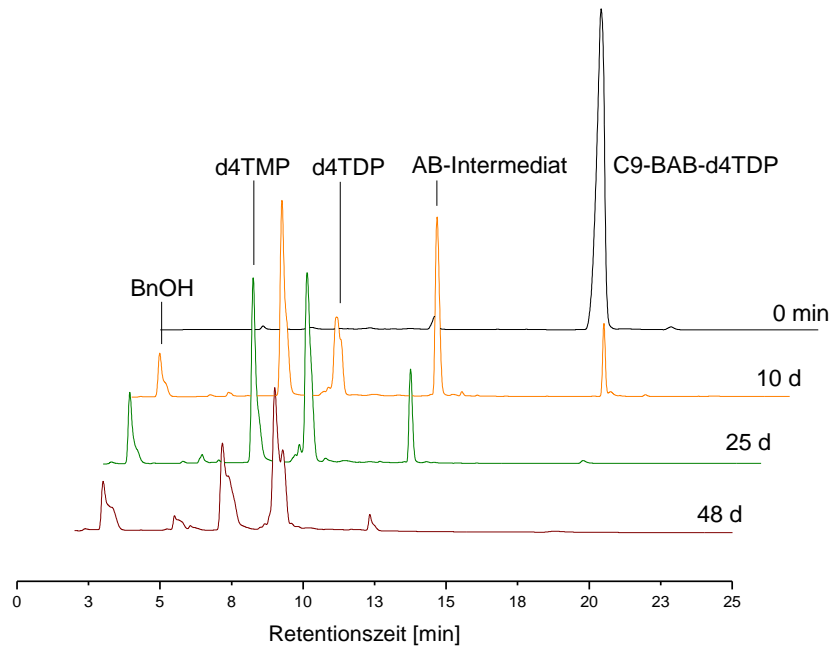


Abb. 87: HPLC Chromatogramme der Hydrolyse von **30** bei pH 7.3 (265 nm)

Im weiteren Verlauf wurde die Freisetzung von d4TMP, dem zweiten Hauptprodukt, immer deutlicher. In den Chromatogrammen nach 10 bis zu 48 Tagen ist außerdem ein weiteres Spaltprodukt gut zu erkennen gewesen, bei dem es sich um 4-Hydroxybenzylalkohol handelte. Dieser wird bei der Zersetzung der beiden Bis-(4-acyloxybenzyl)-Einheiten frei bzw. sofort aus dem Chinonmethid gebildet (vergl. S. 13 und Abb. 90). Über die Verwendung von Benzylalkohol als Referenzsubstanz und dessen UV-Maximum bei 272 nm konnte dieses Signal zugeordnet werden (nicht gezeigt).

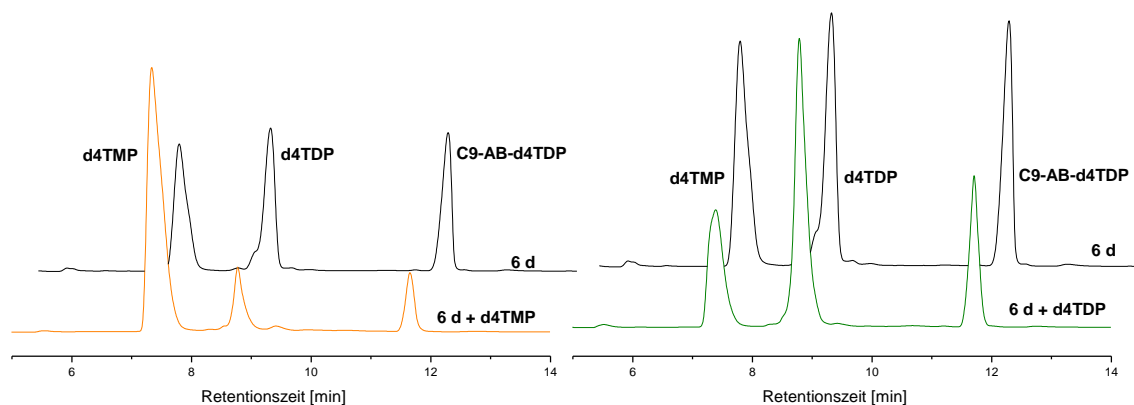


Abb. 88: Coinjektion mit d4TMP (links) und mit d4TDP (rechts)

Die Zuordnung der verbleibenden Peaks erfolgte durch Coinjektion von d4TMP und von d4TDP jeweils mit einem Teil des Hydrolysats nach sechs Tagen. Es ist klar zu erkennen, dass die Intensität von d4TMP bzw. d4TDP relativ zu den anderen Signalen zunimmt (Abb. 88). Die Zuordnung des AB-Intermediats **36** erfolgte auf gleiche Weise. Die Zunahme des Signals relativ zu den anderen Peaks, insbesondere beim Vergleich der Signalintensität mit dem von d4TMP, wurde deutlich (Abb. 89).

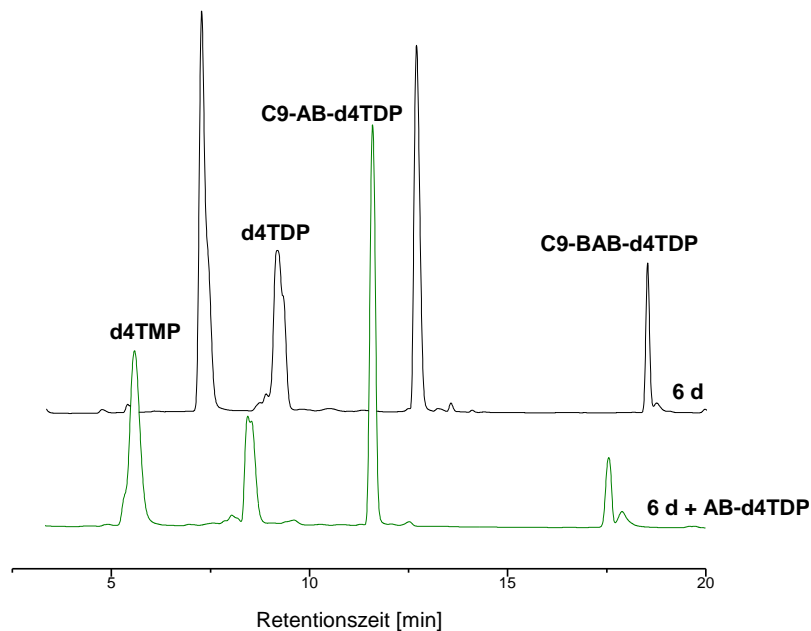


Abb. 89: Hydrolysechromatogramm von **30** nach 6 Tagen ohne und mit Zusatz des Hydrolyseintermediats C9-AB-d4TDP **36** (vorne)

Aus den HPLC Chromatogrammen der Hydrolysen wurde die 1. Halbwertszeit (1. HWZ) für die BAB-d4TDP Prodrugs wie folgt bestimmt: Die Abnahme der Peakfläche des Eduktes (BAB-d4TDP) wurde gegen die Hydrolysezeit graphisch aufgetragen und mit einem Tabellenkalkulationsprogramm eine exponentielle Ausgleichskurve berechnet, so dass die Geschwindigkeitskonstanten k ermittelt werden konnten. Aufgrund des großen Wasserüberschusses konnten Kinetiken *pseudo-erster Ordnung* angenommen werden und die Halbwertszeiten nach der Formel $t_{1/2} = \ln 2 / k$ berechnet werden. Für die Hydrolysen der BAB-d4TDP Prodrugs **27-34** zu den entsprechenden Hydrolyseintermediaten AB-d4TDP **36,128-135** wurden die Halbwertszeiten bestimmt (Diagramm 1). Es wurde offensichtlich, dass mit wachsender Kettenlänge des Acylrestes die Stabilität der jeweiligen BAB-d4TDP Verbindung zunahm. Für die betrachteten aliphatischen Reste ergab sich eine ungefähre Versiebenfachung der 1. Hydrolysehalbwertszeit (C6-BAB- zu C15-BAB-d4TDP). Für die Alkylketten mit R=C4,

C6, C7 befanden sich die Halbwertszeiten im gleichen Bereich. Ab einer Kettenlänge von $R \geq C9$ stiegen die Halbwertszeiten stark an. Aus dem Anstieg der Stabilität mit steigender Kettenlänge fällt 8Z-C17-BAB-d4TDP **34** heraus. Dieses Phänomen wird zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert (S.114).

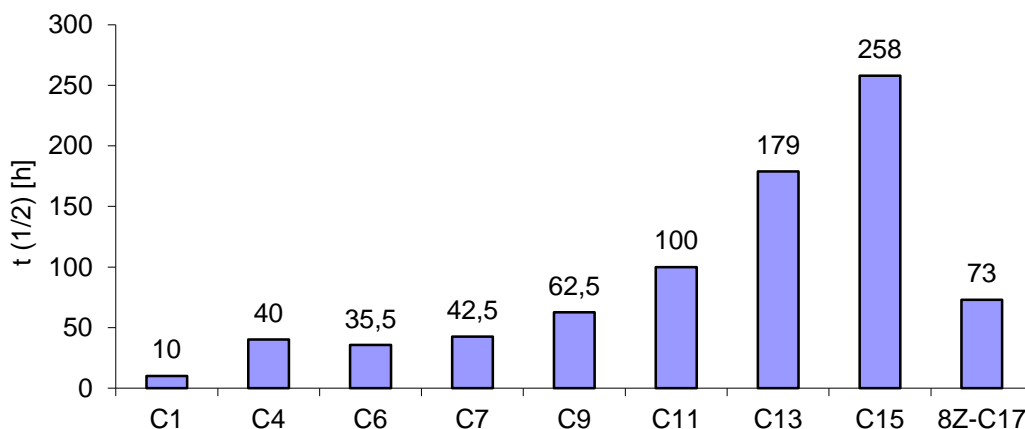


Diagramm 1: Erste Hydrolysehalbwertszeit der Verbindungen **27-34** in PBS bei pH 7.3

Wie an der Hydrolyse von C9-BAB-d4TDP **30** in Abb. 87 zu erkennen ist, entsteht neben d4TDP auch d4TMP, welches aus der Spaltung der Phosphorsäureanhydridbindung hervorgeht. Dieser Bindungsbruch tritt als Konkurrenzreaktion zur Esterspaltung auf.

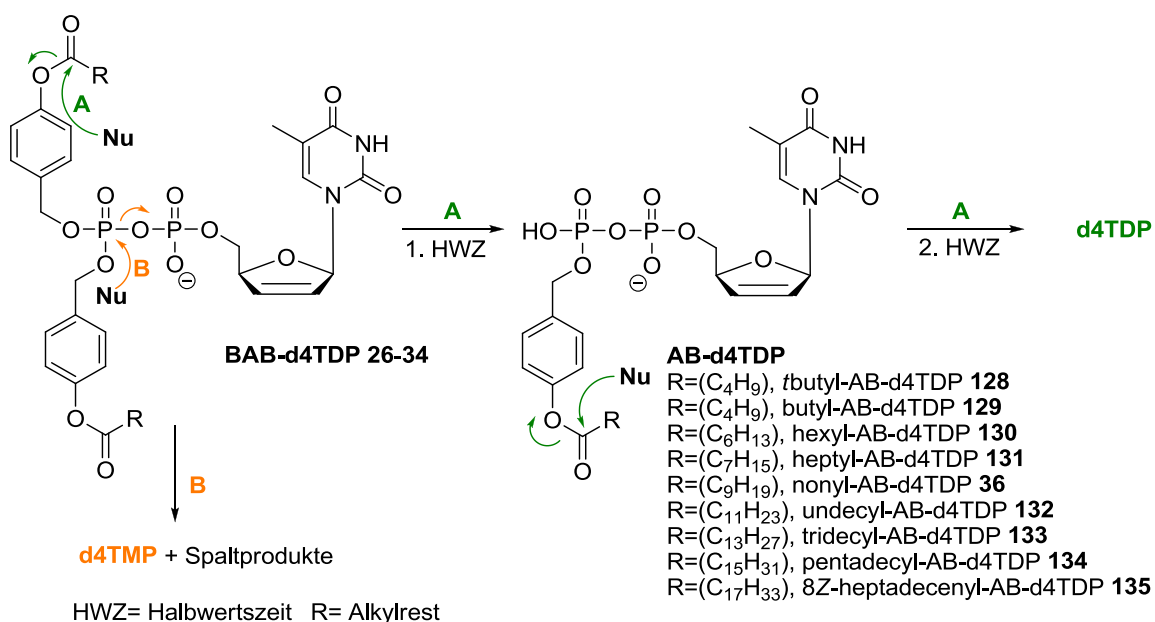


Abb. 90: Hydrolysemechanismus von BAB-d4TDPs; Weg A: Bildung von d4TDP via AB-d4TDP; Weg B: Anhydridspaltung unter Bildung von d4TMP

Um die Verhältnismäßigkeiten zwischen dem Hydrolyseweg A, die Freisetzung von d4TDP via Intermediat AB-d4TDP, und dem Hydrolyseweg B, der Bildung von d4TMP durch die Spaltung der Anhydridbindung, besser interpretieren zu können, wurden die Hydrolyseverläufe von C4-BAB-d4TDP **27** und C9-BAB-d4TDP **30** graphisch dargestellt.

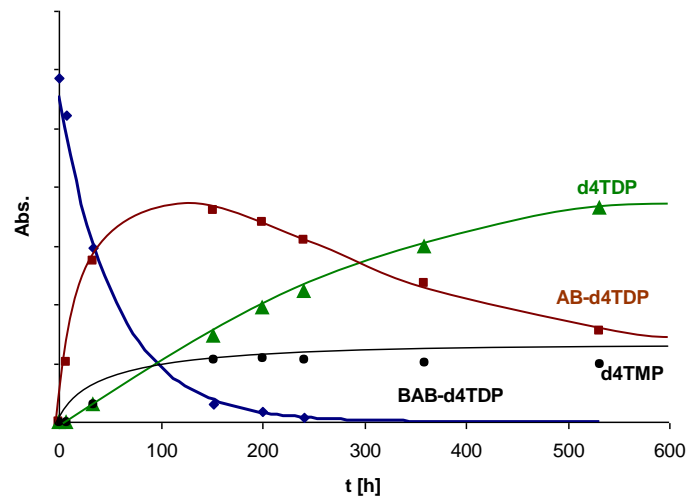


Diagramm 2: Hydrolyseverlauf von **27** in PBS bei pH 7.3

Die Hydrolyse von **27** wurde über einen Zeitraum von etwa 600 h (25 d) verfolgt. Wie in Diagramm 2 zu sehen ist, war **27** nach etwa 250 h bereits vollständig verbraucht. Die berechnete Halbwertszeit betrug 40 h. Nach 151 h war das AB-Intermediat **129** das hauptsächliche Hydrolyseprodukt und nicht d4TMP. Die Spaltung der Anhydridbindung verlief demnach deutlich langsamer als die Bildung des Intermediats und die maximale Menge an d4TMP war zu diesem Zeitpunkt bereits entstanden. Dies bestätigte, dass d4TMP nur aus der Anhydridspaltung hervorgehen kann (Weg B, Abb. 90). Außerdem nahm die Bildungsgeschwindigkeit von d4TDP unter Abnahme des Intermediats zu. Diese Tatsache belegt den postulierten Hydrolyseweg A.

In Abb. 87 sind die Chromatogramme des Hydrolyseverlaufs von C9-BAB-d4TDP **30** gezeigt. Der aliphatische Decanylester ist vier Methyleneinheiten länger als die Acylester der Verbindung **27** ($R=C_4H_9$). Diese Verlängerung hatte einen merklichen Einfluss auf die Stabilität des Acyltriggers und führte zu einer 1. Halbwertszeit von 80 h und wie erwartet zu einer erhöhten Freisetzung an d4TMP. Nach etwa 200 h hatten die gebildete Menge AB-d4TDP und d4TMP ihr Maximum erreicht und die Menge an d4TDP war ca. halb so groß (Diagramm 3). Die Menge an d4TDP nahm jedoch weiter zu, da es aus dem Intermediat freigesetzt wurde, während nicht mehr d4TMP entstehen konnte, da keine nennbare Menge an C9-BAB-d4TDP **30** mehr vorhanden war. Fazit: Aus dem BAB-d4TDP wurden sowohl

d4TMP als auch d4TDP freigesetzt. Die Bildung von d4TDP erfolgt für Acylreste bis $R=C_9H_{19}$ über das Intermediat AB-d4TDP (Weg A) und die freigesetzte Menge an d4TMP nahm mit längerer 1. Halbwertszeit zu, da es aus der Spaltung der Phosphorsäureanhydridbindung hervorgeht.

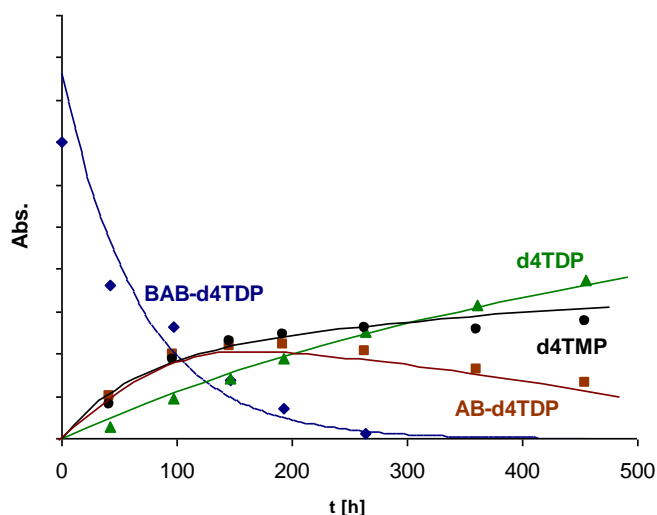


Diagramm 3: Hydrolyseverlauf von **30** in PBS bei pH 7.3

Die Geschwindigkeiten, mit denen der erste Acyltrigger abgespalten wird und die konkurrierende Spaltungsgeschwindigkeit der Pyrophosphateinheit entscheiden über die Menge an d4TDP bzw. d4TMP, die aus einem Äquivalent BAB-d4TDP freigesetzt werden kann.

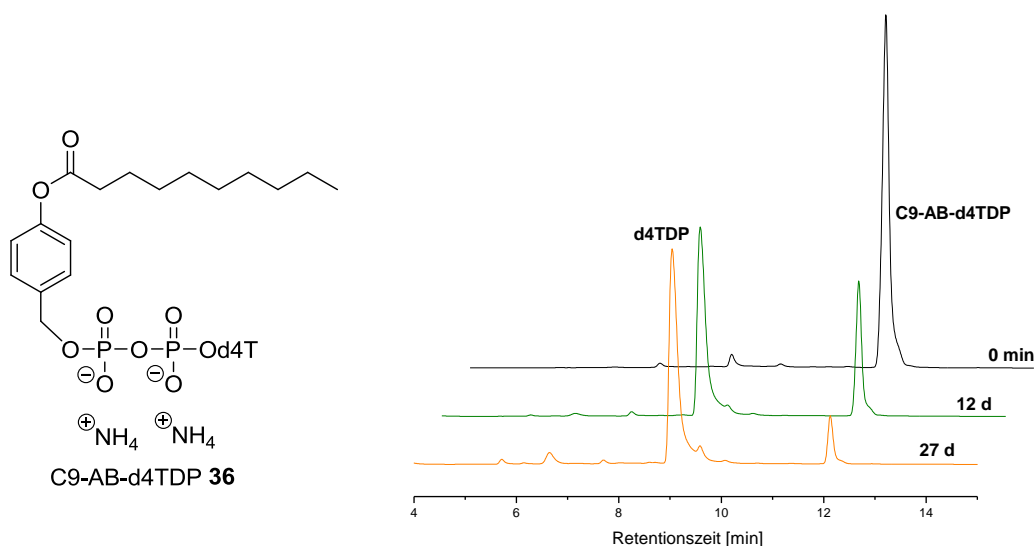


Abb. 91: Hydrolysechromatogramme von C9-AB-d4TDP **36** bei pH 7.3

Die Hydrolyse von d4TDP zu d4TMP und weiteren Produkten wurde beobachtet, was zu einer Abnahme der gebildeten Mengen an d4TDP und d4TMP führte (S.116). Mit der Bezeichnung „Menge“ ist nur die jeweilige Peakfläche gemeint. Um eindeutig beweisen zu können, dass aus dem AB-Intermediat wirklich nur d4TDP freigesetzt wird und kein d4TMP, durch eine denkbare Spaltung der Anhydridbindung, wurde das isolierte C9-AB-Intermediat **36** hydrolysiert. Dabei wurde nur die Bildung von d4TDP beobachtet (Abb. 91). Aus der Hydrolyse wurde für das C9-AB-Intermediat die Halbwertszeit berechnet, die im Prinzip die zweite Halbwertszeit von C9-BAB-d4TDP wiedergibt. Die Hydrolyse der zweiten Acyloxybenzyleinheit ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt während der Freisetzung des Nucleosiddiphosphats aus dem BAB-d4TDP. In einem ersten Versuch gelang es nicht, die AB-Intermediate zu synthetisieren (Abb. 39, S. 59). Die Verbindung **36** wurde aus einer NMR-Hydrolyselösung isoliert (s. S. 60). Dieses Verfahren ist jedoch nicht für die Darstellung aller AB-Intermediate praktikabel gewesen, da die synthetisch schwer zugänglichen BAB-d4TDP Derivate nicht in ausreichenden Mengen dargestellt werden konnten und deren Hydrolysen mehrere Wochen dauerten. Deshalb wurde nach einem anderen Weg gesucht, die 2. Hydrolysehalbwertszeit der Verbindungen **27-34** bestimmen zu können. Aus den Hydrolyseverläufen bei pH 7.3 ging hervor, dass ab einem gewissen Zeitpunkt das jeweilige BAB-d4TDP zu dem entsprechenden AB-Intermediat hydrolysiert war. Dies gilt insbesondere für die C4-, C6-, C7- und C9-BAB-d4TDPs. Nach dem Verbrauch des BAB-d4TDPs wurde die Abnahme der Peakfläche des AB-Intermediats aufgezeichnet und daraus die 2. Hydrolysehalbwertszeit errechnet.

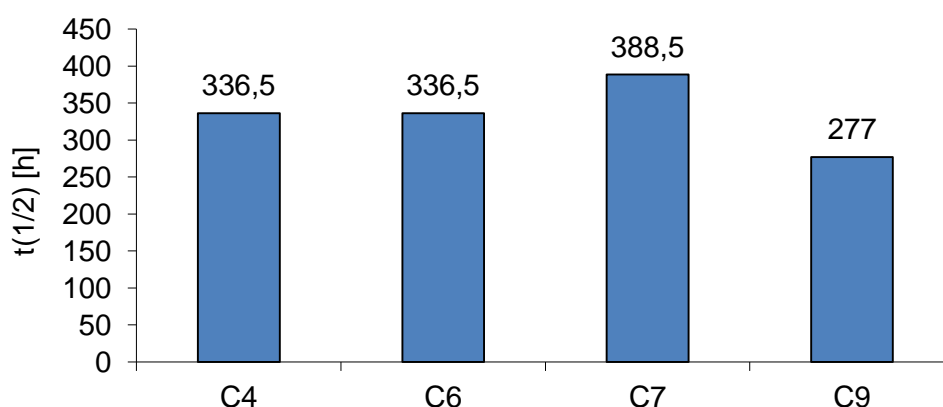


Diagramm 4: Die zweite Hydrolysehalbwertszeit der Verbindungen **27-30** in PBS bei pH 7.3

Zur Ermittlung der zweiten Halbwertszeit wurden zwei Messungen durchgeführt und im Diagramm 4 sind die jeweiligen Mittelwerte angegeben. Die Hydrolysehalbwertszeiten der AB-Intermediate **36,129-135** folgten nicht dem Trend der ersten Hydrolysehalbwertszeiten

der entsprechenden BAB-d4TDPs **27-30** (Anstieg der HWZ mit Länge des Alkylrestes R). Eher entgegen diesem Trend entwickelte sich die 2. Halbwertszeit von **30**. Hier wurde eine Abnahme der 2. Halbwertszeit mit der Länge des Alkylrestes beobachtet. Für die langkettig-modifizierte Verbindungen **31-35** konnte keine 2. Halbwertszeit bestimmt werden, da die Peakflächen der Intermediate sehr klein waren (s. Abb. 92). Die Hydrolysehalbwertszeit von AB-d4TDP **36** wurde auf $t_{1/2} = 182$ h berechnet. Die Bestimmung der HWZ von **36** aus der Hydrolyse von C9-BAB-d4TDP **30** ergab dagegen eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 277$ h. Allerdings konnte bei diesem Experiment die Halbwertszeit von AB-d4TDP **36** erst nach der vollständigen Hydrolyse von **30** berechnet werden. Zu diesem Zeitpunkt war aber schon ein erheblicher Teil an **36** zu d4TDP weiterhydrolysiert. Berechnet man die Halbwertszeit von AB-d4TDP **36** ab einer Hydrolysedauer ≥ 340 min so ergibt sich eine Halbwertszeit von 247 h (s. Diagramm 5).

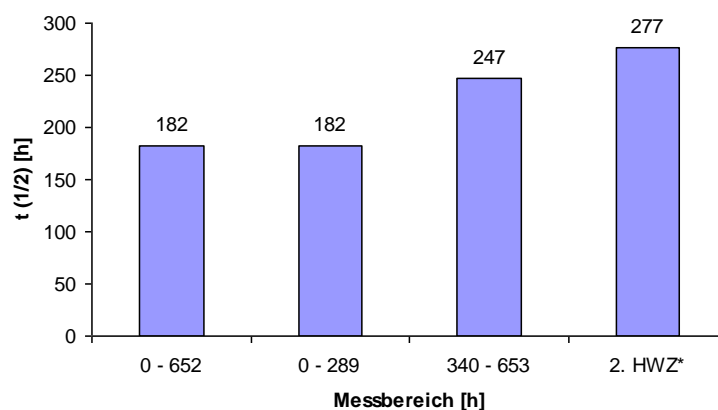


Diagramm 5: Halbwertszeiten des Intermediats C9-AB-d4TDP **36** berechnet nach unterschiedlichen Hydrolysedauern und 2. Halbwertszeit von C9-BAB-d4TDP **30***

Eine Erklärung für die Unterschiede der berechneten Halbwertszeiten könnte eine Veränderung des pH-Wertes sein. Wird die zweite Hydrolysehalbwertszeit aus der Hydrolyse von C9-BAB-d4TDP bestimmt, so hat sich der pH der Hydrolyselösung ggf. verändert (Freisetzung des Chinonmethids, dann des Benzylalkohols und der Carbonsäure). Bei vergleichbaren Hydrolyseexperimenten hatten *Freeman et al.* eine Reaktion des Chinonmethids mit Phosphat des Puffers beobachtet, was ebenfalls den pH-Wert beeinflussen würde.⁵³ Die zweiten Halbwertszeiten konnten aus der gesamten Hydrolyse ebenso bestimmt werden wie für ein isoliertes AB-Intermediat. Aus beiden Möglichkeiten wurde ersichtlich, dass die Hydrolyseintermediate um das acht- bis neunfache stabiler sind als die entsprechenden BAB-d4TDPs, sofern die Kettenlänge $R \leq C_9H_{19}$ ist. Für die

Freisetzung von d4TDP ist die zweite Hydrolyse geschwindigkeitsbestimmend. Bei den Untersuchungen der Verbindungen **31-34** ($R \geq C_{11}H_{23}$) wurde festgestellt, dass die Halbwertszeiten der Zwischenprodukte AB-d4TDP **132-135** sehr viel kleiner sind als die jeweilige 1. Halbwertszeit. Dieses Verhalten würde erklären, warum bei diesen Prodrugs fast keine Bildung des Intermediats beobachtet wurde (Abb. 92). Wahrscheinlich ist der nucleophile Angriff am Acyltrigger von C13-BAB-d4TDP **32** sterisch oder elektronisch gehindert. Aufgrund der beiden Fettsäureester sind diese Prodrugs sehr amphiphil. Die Fettsäurereste sorgen für eine erhöhte Lipophilie, während die Pyrophosphateinheit für sich genommen lipophob ist. Es könnte gut sein, dass sie in dem PBS-DMSO-Gemisch eine solche räumliche Anordnung einnehmen, dass der nucleophile Angriff nur sehr schwer erfolgen kann, was durch die höheren Halbwertszeiten bestätigt wurde.

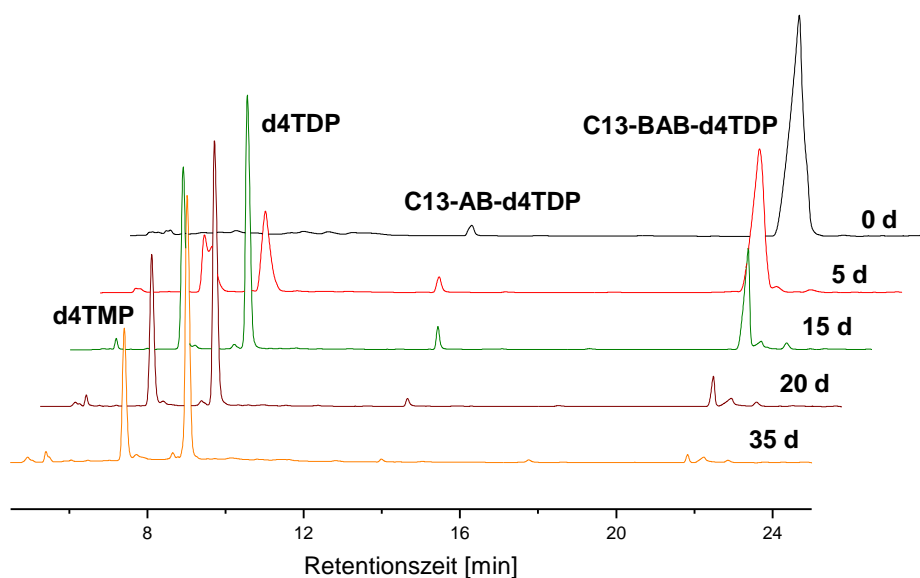


Abb. 92: HPLC Chromatogramme der chemischen Hydrolyse von C13-BAB-d4TDP **32** bei pH 7.3

Nach der Esterspaltung wird sofort die Benzyleinheit vom Phosphat abgespalten. Die verbleibende Acyleinheit, des zweifach negativ geladenen Intermediats, ist aufgrund der Struktur und der erhöhten Polarität ggf. besser für ein Nucleophil zu erreichen. Ein nucleophiler Angriff an diesem Zwischenprodukt könnte dann viel schneller erfolgen, so dass nur die Bildung einer geringen Menge an AB-d4TDP beobachtet wird. Dieses Verhalten wurde für die Verbindungen C11-, C13- und C15-BAB-d4TDP **31-33** beobachtet. Das Prodrug 8Z-C17-BAB-d4TDP **34** wurde mit zwei Ölsäureresten funktionalisiert. Trotz der längsten verwendeten Alkylreste wurde eine relativ kurze 1. HWZ von ca. 70 h gefunden und die Bildung des Zwischenproduktes beobachtet. Wahrscheinlich führen in

diesem Molekül die beiden Doppelbindungen der Ölsäureester zu einer anderen räumlichen Anordnung, so dass der nucleophile Angriff an einer der Acyleinheiten ähnlich gut erfolgen kann, wie bei den Derivaten mit kürzeren Acylresten.

Nachdem die Halbwertszeiten und der Hydrolysemechanismus vollständig untersucht und belegt wurden, soll nun geklärt werden wie viel d4TDP bzw. d4TMP aus den jeweiligen Verbindungen freigesetzt wurde. Hierzu wurden die Hydrolysen bis zum Ende verfolgt, so dass nur noch d4TDP und d4TMP vorhanden waren. Prodrug und Intermediat sollten zur Bestimmung verbraucht sein. Dies erforderte sehr lange Inkubationszeiten (s. Abb. 92, Chromatogramm nach 35 Tagen). Da nur eine bestimmte Menge an Aliquoten zur Messung aus einer Hydrolyselösung zur Verfügung stand, konnte nicht immer der optimale Zeitpunkt für die letzte Bestimmung gefunden werden (BAB-d4TDP und Intermediat gerade verbraucht). Aus den Chromatogrammen wurden die prozentualen Verhältnisse wie folgt bestimmt:

$$\text{d4TDP}\% = (A_{\text{Ende}}(\text{d4TDP}) / (A_{\text{Ende}}(\text{d4TDP}) + A_{\text{Ende}}(\text{d4TMP}))) * 100$$

$$\text{d4TMP}\% = (A_{\text{Ende}}(\text{d4TMP}) / (A_{\text{Ende}}(\text{d4TDP}) + A_{\text{Ende}}(\text{d4TMP}))) * 100$$

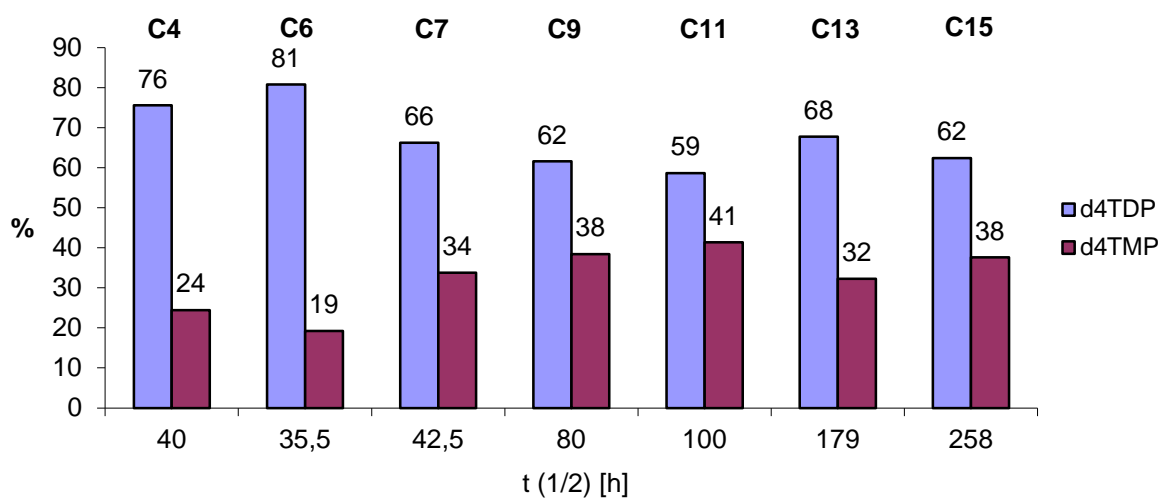


Diagramm 6: Prozentuale Verhältnisse von d4TDP zu d4TMP am Ende der Hydrolyse

Wie aus dem hier gezeigtem Diagramm ersichtlich wird, setzten alle untersuchten BAB-d4TDPs mehr Diphosphat als Monophosphat frei. Allerdings nahm die Menge an Diphosphat mit steigender Stabilität des Prodrugs ab während die Menge an Monophosphat zunahm. Dies ist auf die Spaltung der Anhydridbindung zurückzuführen. . Es wurde auch untersucht, wie stabil d4TMP bzw. d4TDP über den gemessenen Zeitraum

ist. Die Menge an d4TMP nahm während des untersuchten Zeitraums wegen einer Spaltung der glycosidischen Bindung ab, so dass nach sechswöchiger Hydrolyse bereits ein Drittel d4TMP zerfallen war und die Nucleobase Thymin sehr gut detektiert werden konnte. Eine Halbwertszeit konnte nicht berechnet werden, da es sich nicht um eine exponentielle Abnahme handelte. Das Verhalten von d4TMP bei einem pH-Wert von 6.8 war nahezu identisch. Die Hydrolyse von d4TDP dagegen ergab eine Halbwertszeit von ca. 90 Tagen aus seiner exponentiellen Abnahme. Als Hydrolyseprodukte konnten d4TMP und Thymin identifiziert werden (Abb. 93). Unter leicht sauren Bedingungen erwies sich die Pyrophosphatbindung als etwas stabiler. Die Halbwertszeit bei pH 6.8 wurde auf 113 Tage bestimmt. Um die Abnahme an d4TMP und d4TDP über den Messzeitraum zu berücksichtigen, wurden die prozentualen Verhältnisse von d4TMP zu d4TDP über einen zweiten Ansatz berechnet. Es wurden die maximal gebildeten Mengen an d4TDP und d4TMP zu einander in Beziehung gesetzt. Dabei wurde nicht der Zeitpunkt der Hydrolyse berücksichtigt:

$$\text{d4TMP\%} = (A_{\text{max}}(\text{d4TMP}) / ((A_{\text{max}}(\text{d4TDP}) + A_{\text{max}}(\text{d4TMP}))) * 100$$

$$\text{d4TDP\%} = (A_{\text{max}}(\text{d4TDP}) / ((A_{\text{max}}(\text{d4TDP}) + A_{\text{max}}(\text{d4TMP}))) * 100$$

Auch bei dieser Auswertung überzeugt das Ergebnis: Alle untersuchten Verbindungen setzten mehr Diphosphat als Monophosphat frei. Es wird jedoch deutlich, dass bei hoher Stabilität (1. HWZ > 100 h) Diphosphat und Monophosphat etwa in einem Verhältnis von 1:1 freigesetzt werden. Während man bei kürzeren Halbwertszeiten ein Verhältnis von 3:1 findet.

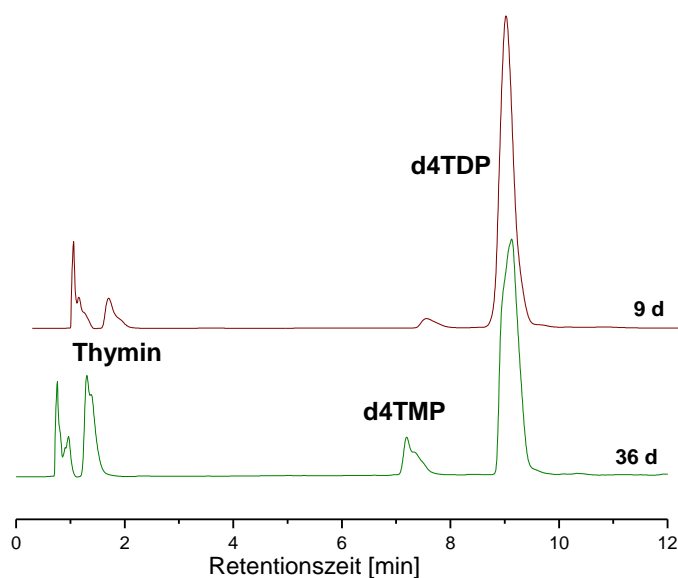


Abb. 93: Hydrolyse von d4TDP bei pH 7.3

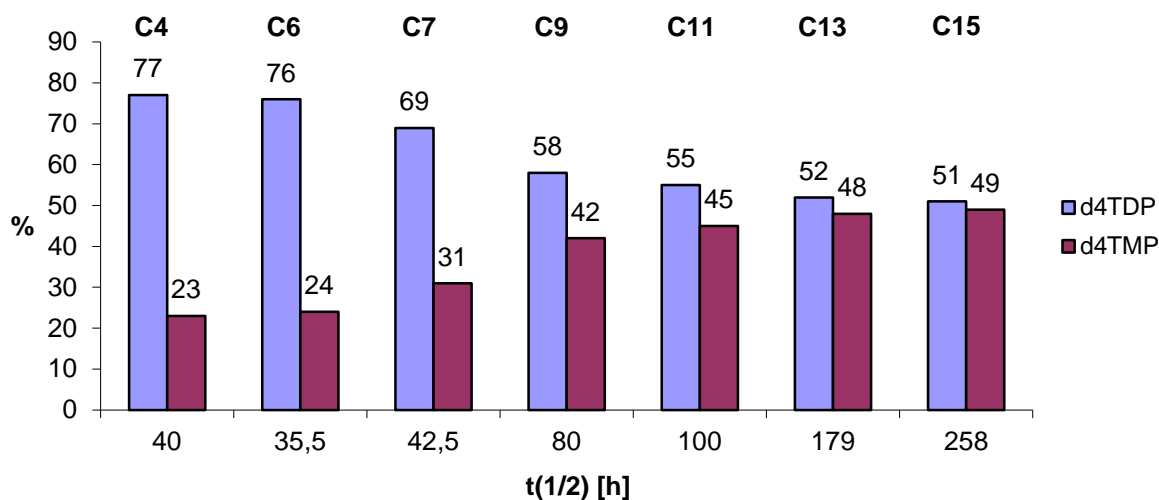


Diagramm 7: Prozentuales Verhältnis für die maximal gebildeten Mengen von d4TDP und d4TMP

Unter Kapitel 4.2.2 wurde die Synthese von β -BH₃-Bis-(4-tetradecanolyoxybenzyl)-d4TDP **112** als Analogon von Bis-(4-tetradecanolyoxybenzyl)-d4TDP **32** vorgestellt. Die Hydrolyse von **112** wurde über einen Zeitraum von 699 h und parallel dazu die von **32** über 295 h verfolgt. Für einen direkten Vergleich wurden die Halbwertszeiten der beiden Verbindungen nach 295 h bestimmt.

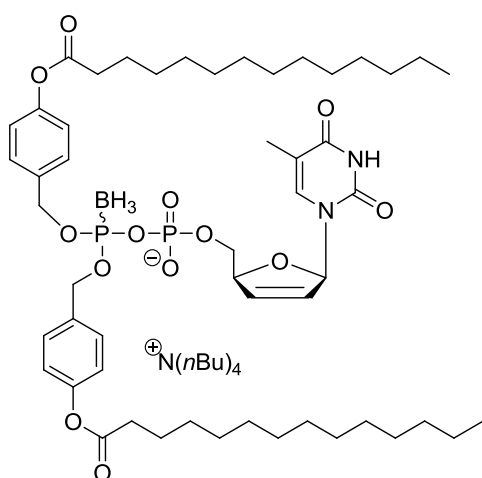


Abb. 94: β -BH₃-Bis-(4-tetradecanolyoxybenzyl)-d4TDP **112**

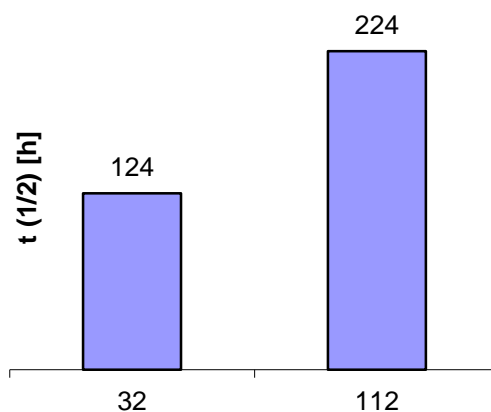


Diagramm 8: Halbwertszeiten nach 295 h bei pH 7.3

Dabei konnte festgestellt werden, dass die Boran-modifizierte Verbindung eine um 110 h höhere Stabilität als ihr BAB-d4TDP Analogon **32** besaß. Sie lag damit zwischen der von **32** und der von Bis-(4-hexadecanolyoxybenzyl)-d4TDP **33** (s. Diagramm 1). Aus den bisher gewonnenen Erkenntnissen über das Hydrolyseverhalten der BAB-d4TDPs **27-34** sollte

man aus der Halbwertszeit auf eine prozentuale Freisetzung des Nucleosiddiphosphates zwischen 50-60% schließen.

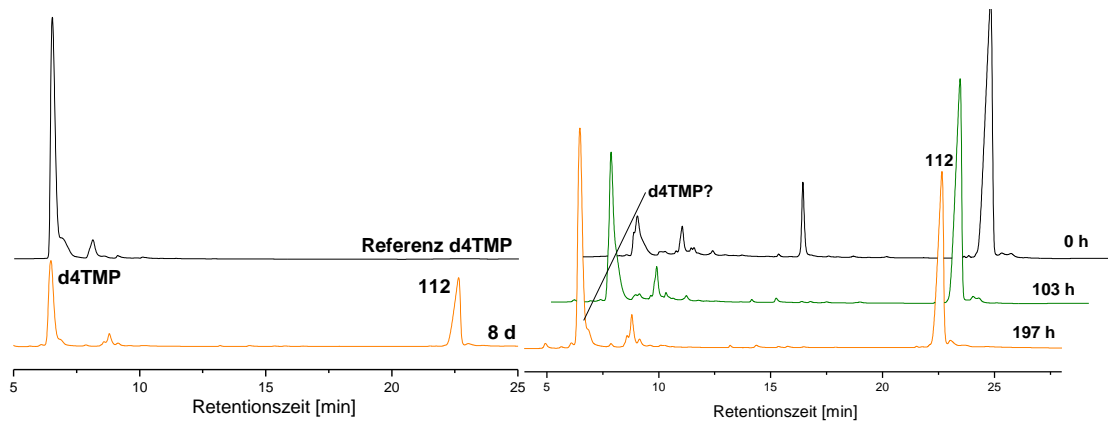


Abb. 95: HPLC Chromatogramm von **112** nach 8 Tagen und d4TMP Referenz (links), HPLC-Verfolgung der Hydrolyse von **112** (rechts, X= Verunreinigung)

In diesem Fall ist natürlich die Freisetzung von β -BH₃-d4TDP gemeint. Unglücklicherweise wurde jedoch ein fast vollständiger Bruch der Boran-modifizierte Pyrophosphateinheit beobachtet. Es wurde fast ausschließlich die Zunahme eines Peaks bei einer Retentionszeit von ca. 7.5 min (markiert mit „d4TMP?“) registriert. Bei ihm handelte es sich sehr wahrscheinlich um d4TMP, was aus dem Referenzchromatogramm abgeleitet wurde (Abb. 95). Mit einer geringen Wahrscheinlichkeit könnte es sich bei dem „d4TMP?“-Peak auch um das Signal des freiwerdenden β -BH₃-d4TDP gehandelt haben, da die beiden Verbindungen ggf. eine ähnliche Lipophilie besitzen. Die Boran-Analoga der entsprechenden Nucleotide sollen weniger polar sein.¹⁵⁰ β -BH₃-d4TDP wurde während dieser Arbeiten nicht synthetisiert, so dass es nicht als Referenzsubstanz zur Verfügung stand. Die Bildung von d4TMP durch den Bruch der Anhydridbindung ist sehr wahrscheinlich. Vermutlich kommt es zu einem nucleophilen Angriff am α -Phosphoratom und folglich zum Bindungsbruch der Pyrophosphateinheit. Dieser nucleophile Angriff könnte durch die Bindung des Borans über das freie Elektronenpaar des β -Phosphoratoms sogar noch begünstigt werden, da die Elektronendichte der Phosphorsäureanhydridbindung aufgrund der koordinativen Bindung zum Boran reduziert ist.¹⁶⁵

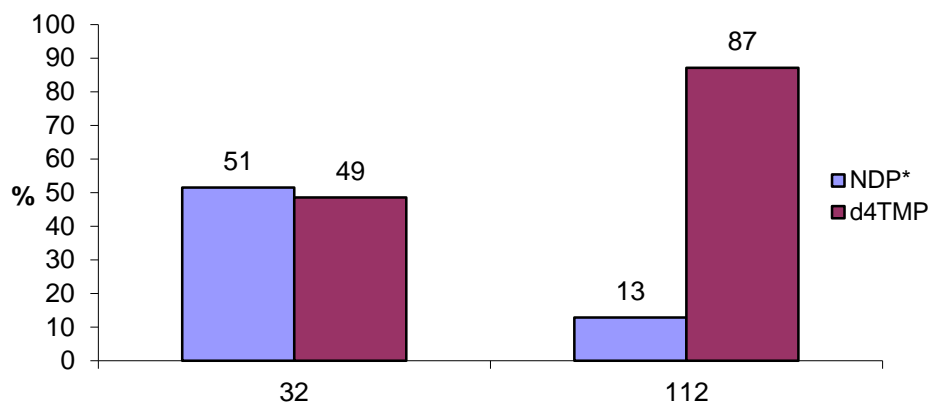


Diagramm 9: Prozentuale Verhältnisse für die max. gebildete Menge von NDP* und d4TMP, *NDP = d4TDP für **32**, *NDP = β -BH₃-d4TDP für **112**

Um das Hydrolyseverhalten der BAB-d4TDPs **27-34** bei einem pH-Wert von 6.8 abschätzen zu können wurden C6-BAB-d4TDP **28** (R=C₆H₁₃) und C15-BAB-d4TDP **33** (R=C₁₅H₃₁) hydrolysiert. **28** und **33** wurden für diese Untersuchung gewählt, um die Bandbreite der Verbindungen **27-34** abzudecken. Es wurde genauso vorgegangen wie bei den Hydrolysen bei pH 7.3. Die Stabilitäten der beiden Verbindungen erhöhen sich bei pH 6.8. Für **28** erhöht sich die 1. Halbwertszeit um das 1.7-fache, für **33** erhöht sie sich um das 1.6-fache. Die 1. Halbwertszeit von BAB-d4TDPs mit kürzeren bzw. längeren Alkylketten erhöht sich im gleichen Maße. Die 2. Halbwertszeit steigert sich für **28** bei pH 6.8 sogar um das 2.6 fache auf 866 h.

BAB-d4TDP	pH 6.8				pH 7.3			
	t _{1/2} [h]		A _{max} [%] ^a		t _{1/2} [h]		A _{max} [%] ^a	
	1.	2.	d4TDP	d4TMP	1.	2.	d4TDP	d4TMP
28	59	866	58	42	35.5	336.5	69	31
33	407	-	43	57	258	-	51	49

^a A_{max}: Maximal freigesetzte Menge

Tabelle 3: Ergebnisse für die Hydrolyse von **28** und **33** in PBS bei pH 6.8 und 7.3

In beiden Fällen verringerte sich die prozentual freigesetzte Menge an d4TDP bei pH 6.8, was durch das acidere Milieu erklärt werden kann. Durch anteilige Protonierung des α -Phosphats wurde die Pyrophosphateinheit stärker destabilisiert und es konnte sich im Verlauf der Hydrolyse mehr Monophosphat bilden. Die Halbwertszeit von **33** liegt bei einem

pH-Wert von 6.8 zudem 149 h höher, so dass mehr Zeit für die Spaltung der Anhydridbindung vorhanden ist.

Chemische Hydrolyse von CEO-C9-AB-d4TDP

Bei CEO-C9-AB-d4TDP **37** handelt es sich um die einzige Verbindung, bei der die negativen Ladungen des β -Phosphats mit zwei unterschiedlichen Resten maskiert wurden. Bei einem der Reste handelt es sich um eine Decanoyloxybenzyleinheit, wie sie auch bei C9-BAB-d4TDP **30** verwendet wurde. Bei dem zweiten Rest handelt es sich um die Cyanoethoxygruppe, die unter anderem in der automatisierten Festphasensynthese von Oligonucleotiden als basenlabile Schutzgruppe der 3'-O-Nucleosidphosphoramidite eingesetzt wird. Aufgrund der Unterschiede zwischen den beiden maskierenden Gruppen stellten sich folgende Fragen:

- Wird aus dieser Verbindung d4TDP freigesetzt?
 - Wenn ja, nach welchem Hydrolysemechanismus?
 - Wie stabil ist die Phosphorsäureanhydridbindung?
- In welchem prozentualen Verhältnis entstehen d4TDP und ggf. d4TMP?

Für den Hydrolysemechanismus kommen neben der ungewollten Spaltung der Phosphorsäureanhydridbindung prinzipiell zwei Wege in Betracht: Über den Hydrolyseweg A würde zuerst das bereits bekannte AB-Intermediat **36** gebildet werden. Aus diesem würde dann d4TDP freigesetzt werden. Denkbar ist jedoch auch der Hydrolyseweg B, bei dem erst die AB-Maske abgespalten wird und anschließend die β -Cyanoethylgruppe (Abb. 96). Aus den Stabilitäten der BAB-d4TDPs scheint der Hydrolyseweg A bevorzugt zu sein, denn die Decanoyloxybenzyleinheit hydrolysiert mit einer Halbwertszeit von 80 h bei **30**. Die β -Cyanoethylgruppe hingegen sollte schneller abgespalten werden. Um dieses zu untersuchen, wurde die Verbindung CEO-C9-AB-d4TDP **37** bei drei verschiedenen pH-Werten (6.8, 7.3, 8.7) hydrolysiert.

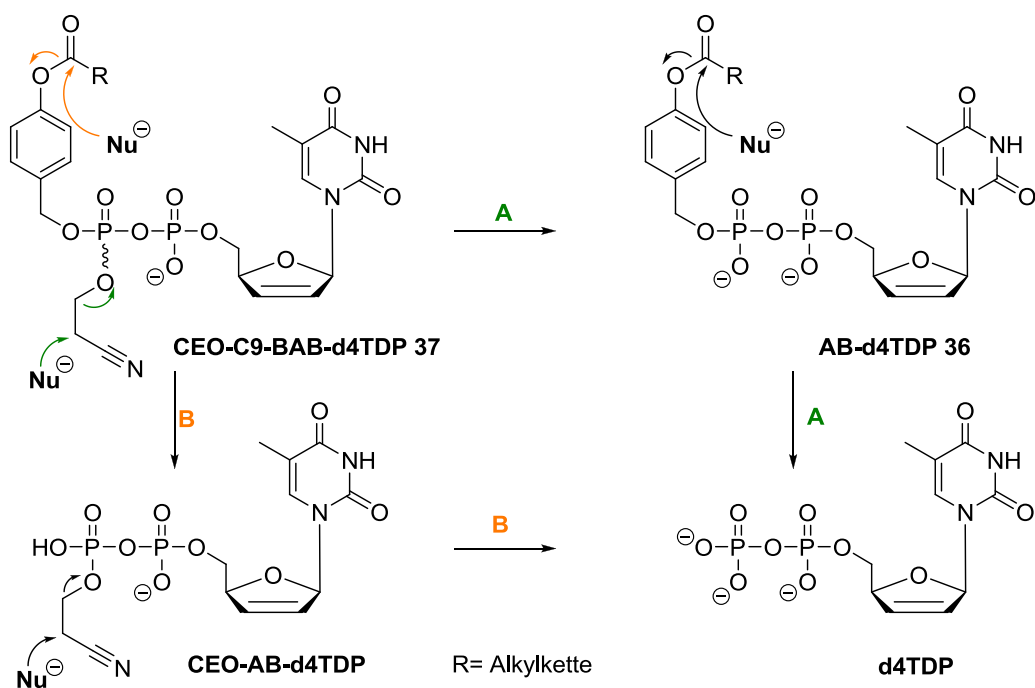


Abb. 96: Mögliche Hydrolysewege von CEO-C9-AB-d4TDP 37

Für alle drei pH-Werte wurde eine Hydrolyse über den Weg A beobachtet und in allen drei Fällen das Hydrolyseintermediat **36** durch Coinjektion nachgewiesen. Die Zuordnung von d4TMP und d4TDP erfolgte bei diesen Experimenten über die Retentionszeiten der Referenzsubstanzen. Wie aus den Chromatogrammen der HPLC-Verfolgung deutlich wird, konnte bei der Hydrolyse von **37** eine schnelle und fast quantitative Freisetzung von d4TDP beobachtet werden (Abb. 97, Diagramm 11). Dieses Ergebnis galt in den drei untersuchten Medien. Für die Hydrolyse der β -Cyanoethylgruppe wurden Halbwertszeiten von 5.5 bis zu 11 h gefunden (Weg A). Sie läuft bei pH 7.3 dreimal so schnell ab wie die der Heptanoyloxybenzyleinheit (C6-BAB-d4TDP **28**) und etwa siebenmal so schnell wie die der Decanoyloxybenzyleinheit (C9-BAB-d4TDP **30**) (vergl. Diagramm 1). Sie wird ungefähr genauso schnell gespalten, wie die erste Acetyloxybenzyleinheit aus Bis(4-Acetoxybenzyl)-d4TDP.¹⁰⁵ Auch die 2. Hydrolysehalbwertszeit dieser Verbindung konnte aus den Hydrolysen berechnet werden. Hier handelt es sich logischerweise um die Abspaltung der Decanoyloxybenzyleinheit aus dem AB-Intermediat **36**.

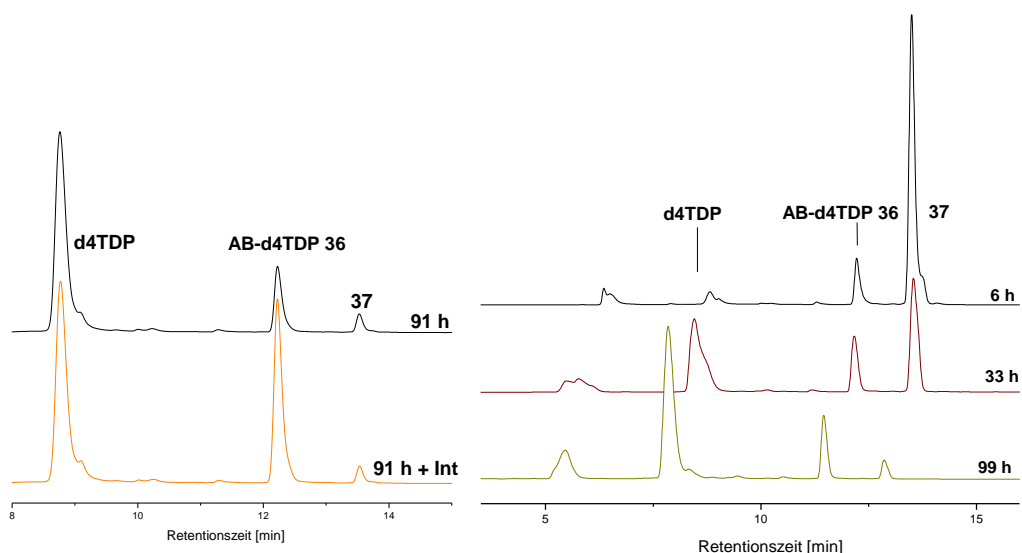


Abb. 97: HPLC-Verfolgung der Hydrolyse von **37** bei pH 6.8 (rechts) und Coinjektion von AB-d4TDP **36** (links)

Die hier ermittelte Halbwertszeit befindet sich mit 277 h in der gleichen Größenordnung (vergl. Diagramm 4 und Diagramm 5). Um die 1. und 2. HWZ von **37** in einem Diagramm darstellen zu können, wurde eine logarithmische Skalierung für die y-Achse gewählt. Interessanterweise wurde die β -Cyanethylgruppe bei pH 6.8 etwas schneller abgespalten als bei pH 8.7. Dies ist insofern ungewöhnlich, da es sich bei der CEO-Gruppe um eine basenlabile Schutzgruppe handelt. Die Halbwertszeiten wurden in diesem Fall nur einmalig bestimmt und ein Fehler kann nicht ausgeschlossen werden.

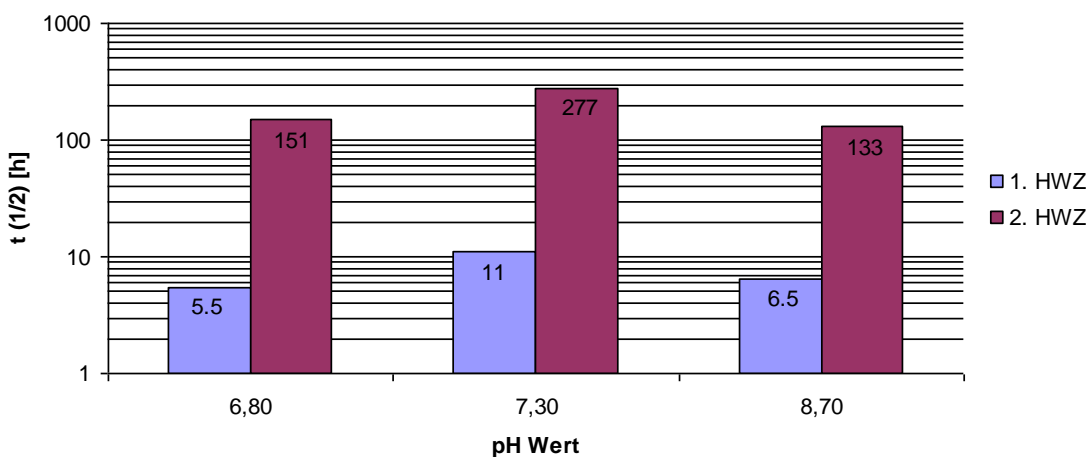


Diagramm 10: Erste und zweite Halbwertszeit der Verbindung **37**, logarithmische Skalierung

Viel wichtiger ist jedoch die Erkenntnis, dass sich die zweite Halbwertszeit bei leicht saurem und auch im basischen pH-Bereich verringert. Bei pH 8.7 nimmt die 2. HWZ um 140 h ab, was mit der höheren Konzentration an Hydroxidionen leicht erklärt werden kann: Die Esterspaltung erfolgt schneller, somit die Umpolung von Akzeptor zu Donor was im Bruch der Benzylbindung und der Freisetzung von d4TDP resultiert (s. Kenntnisstand). Der leicht acide PBS-Puffer beschleunigte ebenfalls die Hydrolyse, so dass sich die Halbwertszeit um ca. 120 h erniedrigte. Vermutlich förderte die höhere Protonenkonzentration die Abspaltung des Esters auf direktem Weg durch eine protonenkatalysierte Esterspaltung. Allerdings könnte die Pyrophosphateinheit höher protoniert vorgelegen haben, so dass der Angriff eines Nucleophils am Molekül insgesamt begünstigt wurde. Vielleicht kam es bei diesem pH-Wert auch zum Bruch der Anhydridbindung. Ein solcher Bindungsbruch konnte bei pH 7.3 ausgeschlossen werden (S.111, Abb. 91). Auch die Analyse der HPLC Chromatogramme deutete nicht auf eine Spaltung der Anhydridbindung des AB-Intermediats hin. Wäre dies der Fall, sollte sich der Anteil an d4TMP nach einer vollständigen Hydrolyse von **37** ins AB-Intermediat **36** noch weiter erhöhen. Wie bei den übrigen BAB-d4TDP Prodrugs wurden die prozentualen Verhältnisse für die Bildung von d4TDP und d4TMP aus den Verhältnissen der Peakflächen bestimmt (S.115ff).

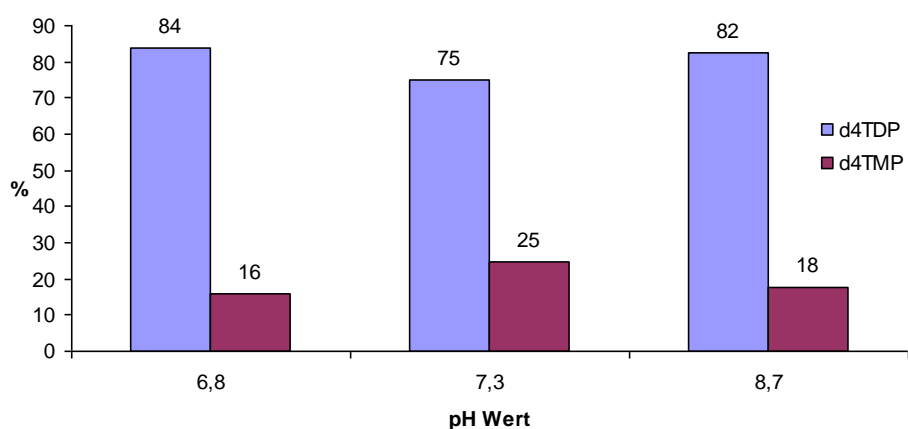


Diagramm 11: Verhältnis für die maximal gebildete Menge von d4TDP und d4TMP in % bei der Hydrolyse von **37**

Aus Diagramm 11 wird folgendes offensichtlich: **37** setzte d4TDP und d4TMP in einem sehr guten Verhältnis von 80% zu 20% frei und das über einen pH-Bereich von 6.8 bis 8.7. Verantwortlich hierfür war die schnelle Abspaltung der CEO-Gruppe vom β -Phosphat. Es bildete sich innerhalb von 55 h die maximale Menge des stabileren AB-Intermediats aus dem d4TDP freigesetzt werden konnte. Bei **30** wurde dieses Maximum erst nach ca. 180 h erreicht, was sich in einem prozentualen Verhältnis von 58% zu 42% verdeutlichte. Dieses

Ergebnis ist ein weiterer Beweis dafür, dass d4TDP aus dem stabileren AB-Intermediat freigesetzt wird und dass umso mehr d4TDP erhalten wird, je kürzer die erste Halbwertszeit ist.

Die BAB-d4TDP Prodrugs mit einer längeren Fettsäuremodifikation **30-34** zeigten eine höhere antivirale Aktivität in CEM/0 und in CEM/TK⁻ Zellen (S.144) als jene mit kürzeren Alkylresten. Aufgrund der längeren Alkylketten kann die negative Ladung des α -Phosphats stärker als bei Verbindungen mit kürzeren Alkylketten kompensiert werden. Dies führt insgesamt zu einer höheren Lipophilie (S. 28) und erleichtert die passive Diffusion über die Zellmembran. Bei einer rein chemisch induzierten Hydrolyse führen allerdings die längeren Fettsäuremodifikationen zu erhöhten Stabilitäten. Als Konsequenz erhöht sich die anteilige Spaltung der Anhydridbindung auf ca. 48%. Ginge man davon aus, dass die intrazelluläre Hydrolyse nur rein chemisch erfolgte, wäre die Kombination aus CEO- und Z-Octadec-9-enoyloxybenzylgruppe theoretisch die Beste.

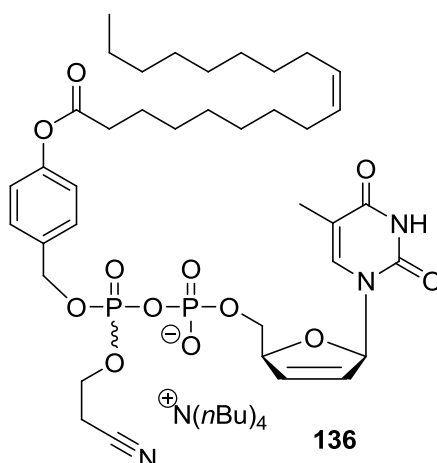


Abb. 98: Optimiertes BAB-Prodrug **136** zur effizienten Freisetzung von d4TDP unter chemischer Hydrolyse

Für die Z-Octadec-9-enoyloxybenzylgruppe wurde eine vergleichsweise kurze 1. Hydrolysehalbwertszeit ermittelt. Diese Gruppe vereint eine relativ hohe Lipophilie mit einer relativ kurzen Halbwertszeit. Auf die sehr schnelle Abspaltung der CEO-Gruppe sollte daher eine relativ schnelle Freisetzung von d4TDP aus dem AB-Intermediat folgen. Die Verbindung **136** konnte während dieser Arbeit nicht mehr synthetisiert werden.

Chemische Hydrolyse von Bis-(4-pivaloyloxybenzyl)-d4TDP (BPB-d4TDP)

Die Betrachtungen zur chemischen Hydrolyse der BAB-d4TDP Prodrugs soll mit BPB-d4TDP **26** abgeschlossen werden.¹⁰⁵ Aus der Hydrolyse bei pH 7.3 wurden die

Halbwertszeit und die Verhältnisse der freigesetzten Menge von d4TDP und d4TMP bestimmt. Mit 55 h liegt die erste Halbwertszeit dieser Verbindung 15 h über der von C4-BAB-d4TDP **27**. Der verzweigte Alkylrest bewirkt eine höhere Stabilität als der lineare mit gleicher Summenformel (C₄H₉). Das Intermediat PB-d4TDP **128** besitzt mit einer Halbwertszeit von 1386 h eine sehr hohe Stabilität. Aufgrund dessen musste die Hydrolyse über einen Zeitraum von 2066 h (ca. 86 d) verfolgt werden. Diese 2. Halbwertszeit ist damit mehr als viermal so hoch wie die von **27**. Das gefundene Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen von *H. Jessen*, der die Entstehung von AZTDP aus dem Intermediat Pivaloyloxybenzyl-AZTDP während der von ihm gewählten Hydrolysedauer überhaupt nicht beobachten konnte.⁷⁰

	pH 7.3			
	t _{1/2} [h]		A _{max} [%] ^a	
	1.	2.	d4TDP ^b	d4TMP ^b
BPB-d4TDP	55	1386	53	47

Tabelle 4: Hydrolyseergebnisse für **26**; ^a: A_{max}: freigesetzte Menge, ^b: Hydrolyse war nicht beendet

In diesem Abschnitt konnte eindeutig gezeigt werden, dass die hier vorgestellten BAB-d4TDP Prodrugs über ein Hydrolyseintermediat zum d4TDP hydrolysieren. Aus der konkurrierenden Spaltung der Phosphorsäureanhydridbindung resultiert die Bildung von d4TMP, welches nur aus dem BAB-d4TDP Prodrug entstehen kann. Das gebildete Intermediat besitzt in allen Fällen eine höhere Hydrolysestabilität als das entsprechende BAB-d4TDP. Dieses Intermediat setzt nur d4TDP frei, eine Hydrolyse zum Monophosphat konnte nicht festgestellt werden.

Für die Bildungsgeschwindigkeit von d4TDP aus den Verbindungen C4-, C6-, C7- und C9-BAB-d4TDP **27-30**, sind die erste und die zweite Hydrolysehalbwertszeit entscheidend. Die jeweiligen AB-Intermediate besitzen eine höhere Hydrolysestabilität als die BAB-d4TDPs. Die beiden Halbwertszeiten konnten für **27-30** bestimmt werden. Im Falle der asymmetrischen Verbindung CEO-C9-AB-d4TDP **37** ist die Hydrolyse des C9-AB-Intermediats **36** der geschwindigkeitsbestimmende Schritt während der Freisetzung von d4TDP. Bei der Hydrolyse der längerkettigen Derivate C11-, C13-, C15- und 8Z-C17-BAB-d4TDP **31-34** konnte die Bildung des Hydrolyseintermediats nur in einem sehr untergeordneten Maß beobachtet werden, so dass eine Bestimmung der zweiten Halbwertszeit für diese Moleküle nicht möglich war. Dieses veränderte Hydrolyseverhalten

wurde hypothetisch erklärt. Es wurden die prozentualen Verhältnisse der freigesetzten Mengen d4TDP und d4TMP berechnet. Werden diese Messungen nach beendeter Hydrolyse durchgeführt, dann ergibt sich für die Bildung von d4TDP ein besseres prozentuales Verhältnis. Dies konnte auf die anteilige Zersetzung des früher gebildeten Monophosphats zurückgeführt werden. Berechnet man die prozentualen Verhältnisse für die maximal gebildeten Mengen an d4TDP bzw. d4TMP, überwog in allen untersuchten Fällen nach wie vor die Menge an d4TDP.

4.5.2.2 Untersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse von BAB-d4TDP

Prodrugs

Um die biologischen Eigenschaften und die Ergebnisse der antiviralen Tests besser verstehen zu können, wurden die fettsäuremodifizierte BAB-d4TDP Prodrugs **27-34** in biologischen Medien (CEM/0 Zellextrakt, RPMI-Kulturmedium, RPMI/FCS10%, FCS10%, humanes Serum (HS20%)) untersucht. Durch diese Studien sollte geklärt werden, welchen Einfluss Enzyme auf das Hydrolyseverhalten dieser Prodrugs haben. Interessant könnte bei diesen Betrachtungen auch die Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von der Kettenlänge des Acylrestes sein. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die Hydrolyse von Methyl-, Isopropyl-, *tert*-Butyl-, Heptyl- und Benzyl-funktionalisierten BAB-NDP Prodrugs enzymatisch aktivierbar ist (s. 20).⁷⁰

Ergebnisse der Hydrolyseuntersuchungen von BAB-d4TDPs 27-34 in CEM/0 Zellextrakten

Die Stabilität und der Hydrolysemechanismus der BAB-NDP Prodrugs wurde aus folgenden Gründen in CEM/0 Zellextrakten untersucht werden: Die antivirale Aktivität der Prodrugs gegenüber HIV-1 und HIV-2 wird in CEM/0 und CEM/TK⁻ Zellen ermittelt. In diesen Zellextrakten sind Esterasen enthalten, die eine enzymatische Spaltung der Prodrugs bewirken können. Möglicherweise werden die längerkettigen Acyltrigger schneller durch bestimmte Enzyme gespalten, als die kurzkettigen bzw. die verzweigten Acyltrigger. So könnte z.B. bei den fettsäuremodifizierten Prodrugs eine schnellere Abspaltung der Acyleinheiten durch Lipasen möglich sein und zu einer Verbesserung der antiviralen Aktivitäten führen. Solche Lipasen könnten ebenfalls in den CEM/0 Zellextrakten vorhanden sein.⁵⁹

Die ersten Hydrolyseuntersuchungen in CEM/0 Zellextrakten wurden nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll^{68,70,71} durchgeführt: Eine definierte Menge Prodrug wurde mit CEM Zellextrakt unter Zusatz von Magnesiumchloridlösung bei 37 °C inkubiert. Die Hydrolyse wird durch Zugabe des Prodrugs zum Zellextrakt gestartet. Für die

unterschiedlichen Messwerte wurde je eine Hydrolyselösung angesetzt. Nach bestimmten Zeitintervallen wurde die Hydrolyse durch Zugabe von 300 µL Methanol gestoppt und die Proteine wurden gefällt (Lagerung auf Eis für etwa 10 min). Es wurde zentrifugiert, der Überstand über einen Spritzenfilter filtriert und das Hydrolysat bis zur Analyse an der HPLC bei -196 °C gelagert. Außerdem wurde je eine Blindprobe (Wasser anstatt Zellextrakt) und eine Nullprobe (nach Zugabe des Prodrugs sofortiger Abbruch der Hydrolyse durch Zugabe von Methanol und Lagerung auf Eis) angefertigt. Es stellte sich bei den ersten Untersuchungen von C9-, C11-, C13- und von C15-BAB-d4TDP **30-33** schnell heraus, dass dieses Protokoll nicht für die HPLC-Analyse dieser Verbindungen geeignet war. Bei der Auswertung der Chromatogramme von **30** und **31** wurde nach einigen Versuchen klar, dass die einzelnen HPLC Läufe nicht reproduzierbar waren. Es konnte keine einheitliche Abnahme der entsprechenden Verbindung festgestellt werden. Bei der Analyse von C13- und von C15-BAB-d4TDP **32,33** wurde das eigentliche Problem offensichtlich: Während die Blindprobe ein sauberes HPLC-Signal ergab, konnte bei der Analyse der Nullprobe keinerlei BAB-d4TDP detektiert werden. Eine sofortige und vollständige Zersetzung des BAB-d4TDPs innerhalb von Sekunden (Start der Hydrolyse bis zur Zugabe des Methanols) wurde zum einen aufgrund der Geschwindigkeit und zum anderen, weil keine Signale auf nucleosidhaltige Verbindungen hindeuteten (Multiwellendetektion) als Möglichkeit ausgeschlossen. Es wurde zunächst vermutet, dass die Verbindungen aufgrund der langen Fettsäuremodifikation vom Spritzenfilter zurückgehalten wurden. Deshalb wurde auch der Blindwert über einen Spritzenfilter gegeben. Bei Analyse mittels HPLC konnte die entsprechende Verbindung in vernünftiger Intensität detektiert werden, so dass die Filtration als Fehlerquelle ausgeschlossen werden konnte. Das „Verschwinden“ trat vorwiegend bei längeren Fettsäuremodifikationen ($R \geq C_9H_{19}$) und im Zusammenhang mit dem Zellextrakt bzw. mit der Proteinfällung auf. Deshalb wurde angenommen, dass die Verbindungen mit dem Protein in Wechselwirkung treten und bei der Fällung „mitfallen“ und nach der Filtration nicht mehr im Überstand detektiert werden können. Um dies zu umgehen, wurden verschiedene Lösungsmittel, die zur Proteinfällung geeignet sind, ausprobiert. Dazu wurde je eine Blind- und eine Nullprobe vorbereitet. Als Lösungsmittel wurden gekühltes Ethanol, Isopropanol, Aceton und Acetonitril verwendet. Bei der Verwendung von Isopropanol konnte sehr wenig C15-BAB-d4TDP **32** detektiert werden. Im Vergleich zum Blindwert wurde weiterhin ein deutlicher Verlust an Prodrug bemerkt, bei den anderen Lösungsmitteln konnte allerdings nach wie vor kein Prodrug detektiert werden. Das Problem der konjugierten Fällung von Proteinen und Prodrug konnte durch die Verwendung von Isopropanol nicht zufriedenstellend gelöst werden. Deshalb wurde wie folgt vorgegangen:

Nach Fällung mit Methanol und Lagerung auf Eis wurde die Suspension für 5 min im Ultraschallbad behandelt, zentrifugiert und abschließend filtriert. Die Analyse des Überstandes offenbarte folgendes Ergebnis: Die Verbindung **32** konnte reproduzierbar detektiert werden. Weitere Optimierung lieferte das für die folgenden Messungen abgewandelte Protokoll: Fällung mit kaltem Isopropanol, Lagern für 10 bis 15 min auf Eis (quantitative Fällung), 15 min Ultraschall, 10 min zentrifugieren, Überstand filtrieren, lagern bei -196 °C bis zur HPLC-Analyse.

Nachdem die oben angegebenen Probleme bei der Analyse der enzymatischen Hydrolyse in CEM/0 Zellextrakten identifiziert und gelöst worden waren, konnten die BAB-d4TDPs **27-34** untersucht werden. Die Hydrolyse von C9-BAB-d4TDP **30** ergab: Die Verbindung wurde durch Enzyme über den in Abb. 90 gezeigten Hydrolysemechanismus (Weg A) über das AB-Intermediat zum d4TDP hydrolysiert. Die Bildung von d4TMP konnte ebenfalls angenommen werden, denn im Bereich der Retentionszeit von d4TMP kam es zur Akkumulation mehrerer Spaltprodukte. Ob es sich hierbei um d4TMP handelte, konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Entweder ging die mögliche Bildung von d4TMP bei dieser Hydrolyse aus einem Bruch der Anhydridbindung hervor oder entstand beim enzymatischen Abbau des gebildeten d4TDPs (S130). Dass die Hydrolyse von **30** durch die anwesenden Esterasen beschleunigt wurde, zeigte die verkürzte Hydrolysehalbwertszeit von 7.6 h gegenüber der bei pH 7.3 von 80 h.

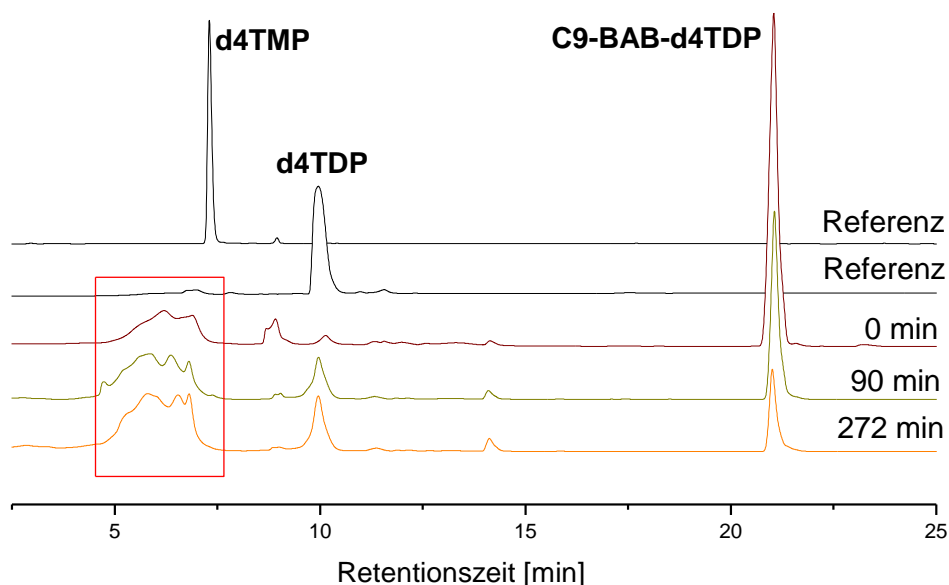


Abb. 99: Erste Zellextrakthydrolyse von C9-BAB-d4TDP **30**

Als die Hydrolysen von C4-, C7-, C9-, C13- und C15-BAB-d4TDP erstmalig durchgeführt wurden, war die Gruppe der fettsäuremodifizierten BAB-d4TDPs noch nicht vollständig synthetisiert worden. Um die Vergleichbarkeit der zu ermittelnden Hydrolysehalbwertszeiten gewährleisten zu können, sollten sie von *t*Bu-BAB-d4TDP **26**, von C4-BAB-d4TDP **27**, C6-BAB-d4TDP **28**, C7-BAB-d4TDP **29**, C9-BAB-d4TDP **30**, C11-BAB-d4TDP **31**, C13-BAB-d4TDP **32**, C15-BAB-d4TDP **33**, C17-(8Z)-BAB-d4TDP **34**, CEO-C9-AB-d4TDP **37** und β -BH₃-C13-BAB-d4TDP **112** in einer Charge des Zellextraktes ermittelt werden. Da sich gezeigt hatte, dass die Enzymaktivität unterschiedlicher Zellysate voneinander abwich. Daher wurden sie alle nach Beendigung sämtlicher synthetischer Arbeiten und dem Erhalt einer größeren Charge an CEM/0 Zellextrakt begonnen. Bei der Analyse der ersten Experimente mit dem neuen Zellextrakt, traten erneut Schwierigkeiten auf: Die Akkumulation von d4TDP konnte in dem zuvor gemessenem Umfang nicht detektiert werden. Daraufhin wurde d4TDP im Zellextrakt hydrolysiert und ein sehr schneller Abbau zu nicht definierten Spaltprodukten festgestellt. Eine Verdünnungsreihe des Zellextraktes wurde angefertigt und die Hydrolyse von d4TDP untersucht. Bei allen untersuchten Verdünnungen konnte ein Abbau des Nucleosiddiphosphates beobachtet werden, wobei auch bei einer Verdünnung von 1:10 v/v (CEM/0:PBS pH 6.8) die Abbauprodukte nicht klar definiert werden konnten. Dies war nicht möglich, da UV-Aktive Substanzen des Extraktes gemeinsam mit d4TMP eluierten. Durch Anpassungen der HPLC-Methode konnte keine Verbesserung erreicht werden, da die Retentionszeiten der Rückstände und von d4T bzw. d4TMP weiter im gleichen Bereich lagen. Da hier nicht die Hydrolyse von d4TDP, sondern die der BAB-d4TDP Prodrugs untersucht werden sollte, wurden diese Versuche eingestellt. Um die Akkumulation von d4TDP während einer zehnstündigen Hydrolyse gewährleisten zu können, wurde der Zellextrakt auf 33% mit PBS Puffer verdünnt. Aus den Chromatogrammen der Abb. 100 geht hervor, dass d4TDP bei der gewählten Verdünnung akkumulieren kann.

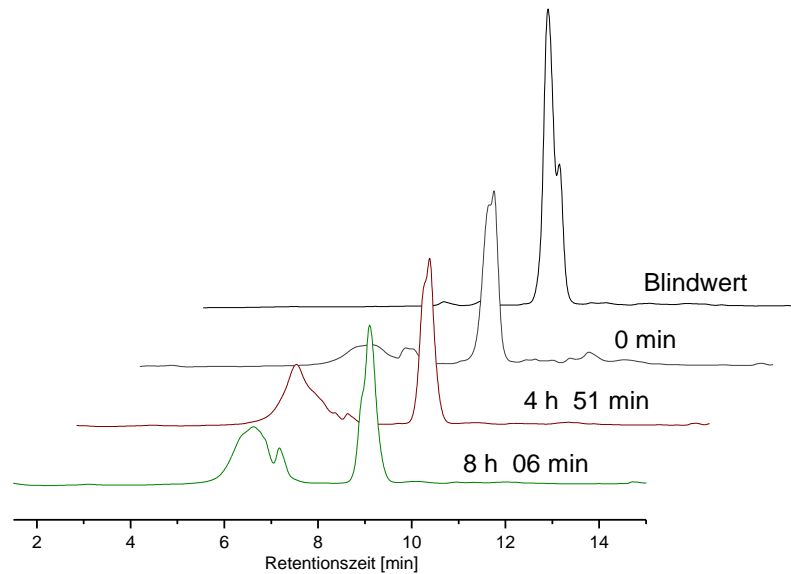


Abb. 100: Hydrolyse von d4TDP in CEM/0 Zellextrakt (33% in PBS Puffer, pH 6.8)

Die Hydrolysen der BAB-d4TDP Prodrugs sollten im Zellextrakt nicht länger als 24 h verfolgt werden, da sich bereits nach etwa 8 h eine merkliche Trübung der Hydrolyselösungen bemerkbar machte, welche auf eine Denaturierung der enthaltenen Proteine zurückzuführen war. Aus diesem Grund wurden die Halbwertszeiten aus Messwerten der ersten 10 h bestimmt. Natürlich führte die Verdünnung des Zellextraktes zu einer Erniedrigung der Enzymkonzentration bei den Hydrolyseuntersuchungen und so zu einer langsameren enzymatischen Hydrolyse der untersuchten Verbindungen. Dieser Nachteil wurde in Kauf genommen, um den Hydrolysemechanismus besser verfolgen zu können. Nachdem nun bessere Bedingungen zur Aufklärung der enzymatische Hydrolyse gefunden worden waren, konnte die Reihe der BAB-d4TDP Prodrugs untersucht werden. Die Interpretation der HPLC-Chromatogramme bestätigte, dass die Hydrolyse von C4-, C6-, C7- und C9-BAB-d4TDP **27-30** bei enzymatischer Spaltung über das Hydrolyseintermediat abläuft (Abb. 101, Diagramm 12).

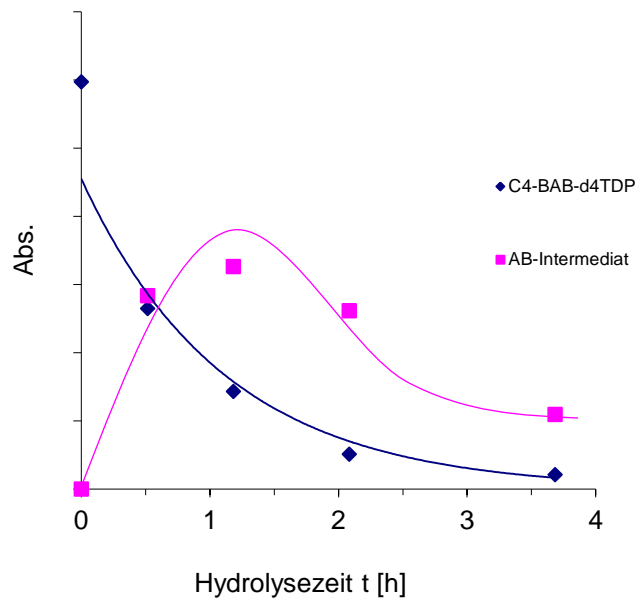


Diagramm 12: Hydrolyseverlauf von C4-BAB-d4TDP **27** in CEM/0 Zellextrakt (33% in PBS 6.8 v/v)

In Diagramm 12 wird die exponentielle Abnahme des Prodrugs C4-BAB-d4TDP **27** und die zeitgleiche Zu- und Abnahme des Intermediats sehr deutlich. Die Geschwindigkeit der gesamten Hydrolyse nahm durch die enzymatische Aktivierung stark zu, so dass sie spätestens nach 6 h beendet war. Die gesamte chemische Hydrolyse bei pH 7.3 dauerte dagegen ca. 1460 h. Die Hydrolyse im Zellextrakt lief 243-mal so schnell ab wie die chemische Hydrolyse. Mit Abb. 101 wird gezeigt, dass die enzymatische Hydrolyse von C9-BAB-d4TDP **30** über das Intermediat zur Freisetzung von d4TDP führte. Auch bei der Hydrolyse dieser Verbindung wurde eine Abnahme der Stabilität, sowohl des Intermediats als auch des Prodrugs offensichtlich. Die Bildung von d4TDP wurde über die Referenzverbindung nachgewiesen. Nach ca. 9 h war die Hydrolyse noch nicht abgeschlossen, so dass hier nicht wie bei den chemischen Hydrolysen eine quantitative Aussage über die freigesetzte Menge an Diphosphat gemacht werden konnte. Außerdem sollte nicht vergessen werden, dass das Diphosphat in diesem Medium sehr viel schneller abgebaut wird als im Phosphatpuffer. Der Abbau von Nucleosidmono- und diphosphaten wird in Zellextrakten unter anderem durch unspezifische Phosphatasen katalysiert.³⁵

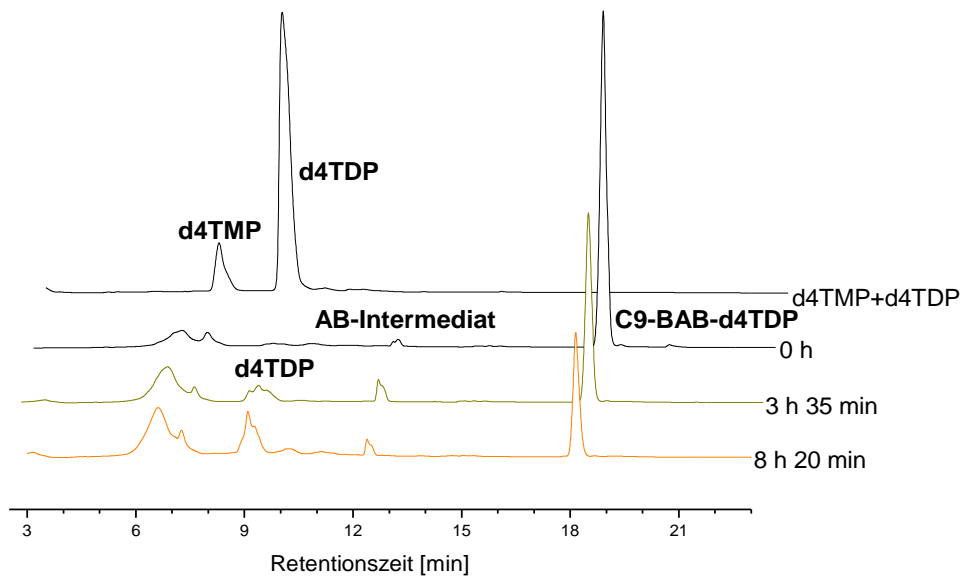


Abb. 101: HPLC Chromatogramme der Zellextrakthydrolyse von C9-BAB-d4TDP **30** (CEM/0 Zellextrakt, 33%)

Durch die graphische Darstellung des Hydrolyseverlaufs von **27** in Diagramm 12 wird folgendes verdeutlicht: Die Bestimmung der 2. Halbwertszeit ist aus dem Hydrolyseverlauf im CEM/0 Extrakt nicht möglich gewesen, da Prodrug und Intermediat fast zeitgleich verbraucht waren.

Die Stabilitäten der Verbindungen folgten im Zellextrakt einem ähnlichen Trend wie bei pH 7.3. Die Hydrolysehalbwertszeiten nehmen mit steigender Kettenlänge des Acylrestes zu. Eine Ausnahme bildete auch hier die Verbindung 8Z-C17-BAB-d4TDP **34**. Die Halbwertszeiten für C4-BAB-d4TDP **27**, C7-BAB-d4TDP **29** und C11-BAB-d4TDP **31** konnten durch eine Dreipunktbestimmung ermittelt werden, so dass sie ggf. mit einem größeren Fehler behaftet sind. Nimmt man diese drei aus der Betrachtung heraus, stellt man fest, dass sich die Halbwertszeit im Mittel um den Faktor 11 verringert (Diagramm 13). Eine höhere Beschleunigung der Hydrolyse durch den möglichen Einfluss von Lipasen konnte nicht beobachtet werden.

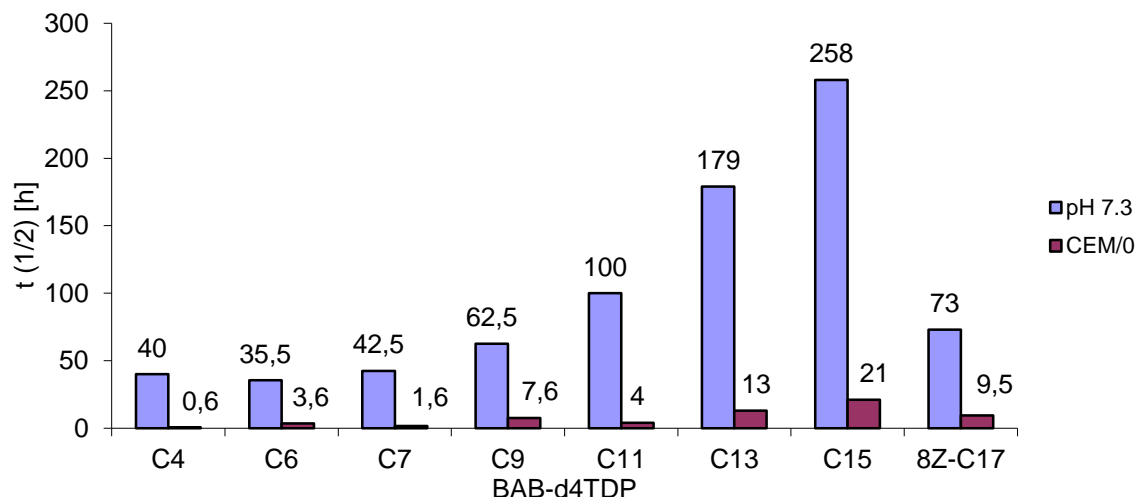


Diagramm 13: Vergleich der Hydrolysehalbwertszeiten bei pH 7.3 und in CEM/0 Zellextrakt

Es kann davon ausgegangen werden, dass die hydrolysierten Verbindungen allesamt Substrate für Carboxyesterasen sind. Die Zunahme der Stabilität mit längererkettigen Acylresten wurde auch von *Liang et al.* bei Untersuchungen von lipophilen 5'-O-Dioxolanthymidinstern festgestellt.¹⁶⁶ Ob **30-34** gute Substrate für andere Carboxyesterasen oder eben Lipasen sind, könnte selbstverständlich durch Hydrolysestudien mit den entsprechenden Enzymen geprüft werden. Von solchen Untersuchungen wurde abgesehen, weil die vorgestellten Verbindungen primär für die Freisetzung von d4TDP innerhalb der CEM/0 Zellen vorgesehen sind. Die Optimierung des Hydrolyseverhaltens auf spezielle Enzyme oder Enzymgemische wäre daher nicht zielführend gewesen.

*Ergebnisse der Hydrolyseuntersuchungen von C6- und C15-BAB-d4TDP **28,33** in RPMI/FCS Kulturmedium, in humanem Serum und in Leberextrakten*

Um das Hydrolyseverhalten der BAB-d4TDPs eingehender zu untersuchen, wurden **28** und **33** in weiteren biologischen Medien untersucht. **28** und **33** wurden als Vertreter der aliphatischen Reihe der BAB-d4TDPs mit einem kürzeren Acylrest (C_6H_{13}) und einem sehr langen Acylrest ($C_{15}H_{31}$) in der Bis-(4-acyloxybenzyl)-Einheit ausgewählt. Bei RPMI handelt es sich um das Kulturmedium für die CEM/0 Zellen, das bei den antiviralen Tests mit einem Anteil von 10% an fötalem Kälberserum (FCS) versetzt wird. In diesem Medium werden die mit HIV-1 und mit HIV-2 infizierten Zellen reproduziert und die antiviralen Tests durchgeführt. Die Ergebnisse der Hydrolysen in RPMI unter Zusatz von 10% FCS sollen die Interpretation der antiviralen Daten fundieren. Untersucht wurde des Weiteren die Stabilität der Verbindungen in PBS Puffer mit einem Zusatz von 10% FCS, um die enzymatische Aktivität dieses Mediums zu betrachten und einen weiteren Nachweis für die enzymatische

Aktivierung der Prodrugs zu erbringen. Ob die BAB-d4TDP Prodrugs stabil genug sind, um sich über die Blutbahn im Körper zu verteilen wurde im Modell durch Hydrolyseuntersuchungen in humanem Serum (HS) ermittelt. Das humane Serum wurde in 20%iger Verdünnung eingesetzt (PBS Puffer pH 6.8). Die angegebenen Hydrolysehalbwertszeiten wurden nach dem Protokoll ermittelt, welches für die Hydrolysen in CEM/0 Zellextrakten verwendet wurde (S. 128 u. 299f). Die Halbwertszeiten wurden aus der exponentiellen Abnahme des jeweiligen Prodrugs aus Sechs- bis Achtpunktbestimmungen während einer gesamten Hydrolysedauer von max. neun Stunden ermittelt. Nach ca. 24 h wurde ein letzter Wert ermittelt, der in der Regel nicht in die Berechnung einbezogen wurde.

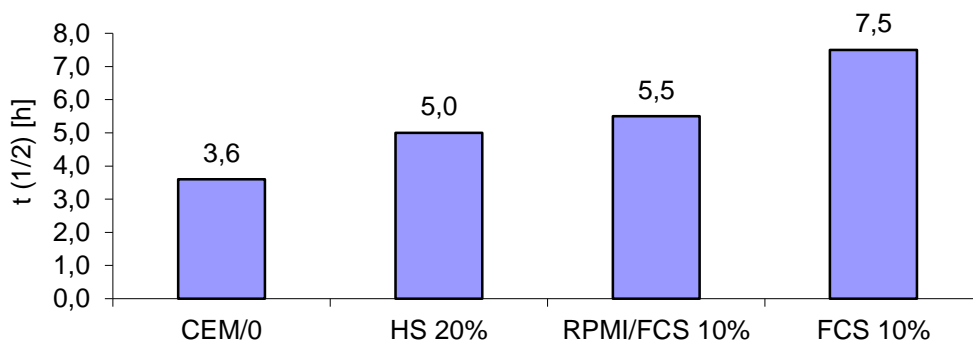


Diagramm 14: Hydrolyseprofil von C6-BAB-d4TDP **28**

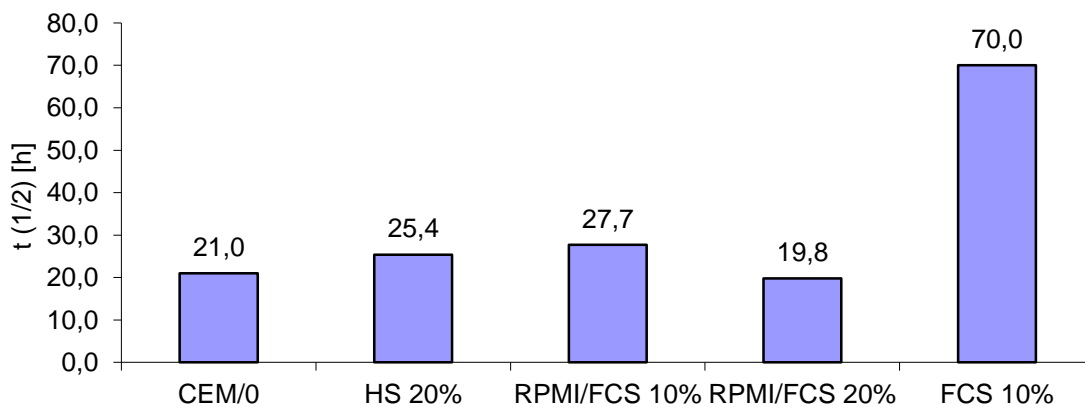


Diagramm 15: Hydrolyseprofil von C15-BAB-d4TDP **33**

Aus den HPLC Chromatogrammen wurde deutlich, dass im HS, im RPMI/FCS Kulturmedium und in FCS **28** über das Hydrolyseintermediat abgebaut wurde. Die

ermittelten Halbwertszeiten bestätigen allesamt eine enzymatisch aktivierte Freisetzung von d4TDP aus **28**, da sie kürzer sind als die bei pH 6.8 (Tabelle 3). Die Abspaltung der ersten 4-Heptanoyloxybenzyleinheit vollzog sich im Humanen Serum etwas langsamer als in den Zellextrakten. Die Esteraseaktivität war vermutlich etwas niedriger als im Zellextrakt. Interessant ist der Vergleich zwischen den Stabilitäten für 10% FCS in Phosphatpuffer und 10% FCS im RPMI-Kulturmedium. Hier zeigte sich ein Unterschied von 2 h in der Halbwertszeit. Da der Anteil von FCS in beiden Hydrolyselösungen gleich ist, sollte auch der Level an Enzymen gleich sein.

Ein Grund für die niedrigeren Stabilitäten im RPMI/FCS Medium könnten dessen Inhaltsstoffe sein (u.a. Glucose, verschiedene Aminosäuren, Inositol, Phenolrot, Folsäure, Nicotinamid, Riboflavin, Thiamin, Biotin, Glutathion, Vitamin B-12, L-Glutamin, Calciumnitrat, Cholinchlorid, Natrium- und Kaliumphosphate, Natriumbicarbonat, HEPES-Puffer, Magnesiumsulfat). Der pH-Wert beträgt ungefähr 7.5. Die erhöhte Anzahl an anwesenden Nucleophilen könnte zu einer schnelleren Spaltung der Anhydridbindung beigetragen haben, was die erniedrigte Stabilität erklären dürfte. Es war nicht möglich, die Bildung von d4TMP während der Hydrolyse, sowohl in RPMI/FCS als auch in FCS zu quantifizieren, da Rückstände des Mediums die gleiche Retentionszeit hatten. Eine exakte Quantifizierung hätte diese Vermutung widerlegt oder bewiesen. Die Bildung von d4TDP aus dem Hydrolyseintermediat (4-Heptanoyloxybenzyl)-d4TDP **130** während der Hydrolyse von **28** im HS, in RPMI/FCS und im FCS konnte nicht detektiert werden. Die Bildung des Intermediats **131** war eindeutig. Wahrscheinlich konnte die relativ kleine Menge an freigesetztem d4TDP im zeitlichen Mittel der Hydrolyse nicht akkumulieren. Es wurde angenommen, dass das d4TDP von unspezifischen Phosphatasen zu schnell abgebaut wurde. Die Metaboliten des d4TDPs eluierten gemeinsam mit den Proteinrückständen der entsprechenden Medien (s.o.). Die Inkubation von d4TDP in FCS20% ergab durch eine Dreipunktbestimmung eine ungefähre Halbwertszeit von 23 h, so dass d4TDP über die Messzeit akkumulieren konnte. Diese Bestimmung und der Versuch einer Bestimmung der Halbwertszeit von d4TDP in CEM/0 waren mit einem relativ großen Fehler behaftet. Deshalb wurde angenommen, dass d4TDP durch das verwendete Versuchsprotokoll und seiner schlechten Löslichkeit in Isopropanol nicht quantitativ bestimmbar war (S.128). Durch die schlechte Löslichkeit kam es ggf. zu einer teilweisen Fällung von d4TDP mit den Proteinen. Eine kleine freigesetzte Menge d4TDP könnte komplett ausgefällt worden sein oder die Menge so gering gewesen sein, dass sie nicht detektierbar war. Die Fällung eines kleinen Anteils an d4TDP bei der isolierten Hydrolyse von d4TDP dagegen wäre nur als

Fehler bei den einzelnen Messwerten aufgefallen. Solche Abweichungen wurden beobachtet.

Die Halbwertszeiten von C15-BAB-d4TDP **33** in den Medien Zellextrakt, HS und RPMI/FCS10% sind ca. fünf bis siebenmal höher als die von C6-BAB-d4TDP **28**. Der Trend nach dem sich die Stabilität mit wachsender Alkylkette erhöht wurde bei diesen Hydrolysen bestätigt. Auch in den proteinhaltigen Medien HS und FCS waren keine Enzyme vorhanden, die bevorzugt langkettige Carbonsäureester spalten. In 10%iger FCS-Lösung war **33** 2.8-mal so stabil wie im humanen Serum (20%). Die Verringerung der Halbwertszeit von fast 28 h in RPMI/FCS10% auf 20 h in RPMI/FCS20% bestätigte einmal mehr, dass die Hydrolyse der lipophilen BAB-d4TDPs durch Enzyme aktiviert wird. Aus den Messungen ging ebenfalls hervor, dass die Konkurrenzreaktion (Bruch der Anhydridbindung) durch die Anwesenheit verschiedenster Nucleophile im RPMI Medium begünstigt wird. Wie aus den Hydrolysebetrachtungen bei pH 6.8 und 7.3 bekannt war, nimmt die anteilige Spaltung dieser Bindung mit steigender Stabilität zu. Die Halbwertszeit von **33** in RPMI/FCS liegt ca. 32 h unterhalb der in FCS. Die Konzentration an Proteinen sollte in beiden Fällen gleich gewesen sein (10% FCS), so dass nur die Spaltung der Anhydridbindung für die geringere Halbwertszeit der Verbindung verantwortlich sein kann.

Die gezeigten Ergebnisse belegen, dass die Aktivierung der BAB-d4TDP Prodrugs enzymatisch aktiviert wird und dass sie außerdem abhängig von der Konzentration und Art der Proteine ist. Die im RPMI-Kulturmedium vorhandenen Nucleophile erhöhen die Wahrscheinlichkeit eines Anhydridbindungsbruchs als Konkurrenz zur Acylspaltung. Die für die Prodrugs ermittelte Stabilität in HS20% von 5 bis 25 h liegt für Prodrugs in einem akzeptablen Rahmen. Die Untersuchungen in diesen Medien zeigten, dass die Stabilität mit steigender Kettenlänge des Carbonsäureesters ansteigt, wobei keine Ausnahme, durch z.B. eine verbesserte Enzym-Substrataffinität, gefunden werden konnte. Die ermittelten Halbwertszeiten für **28** und **33** liegen etwa 20 h auseinander. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Halbwertszeiten für die übrigen BAB-d4TDPs **29-33** dazwischen liegen. Diese Ergebnisse geben somit einen Gesamteindruck für die BAB-d4TDPs **27-34** und werden bei der Interpretation der antiviralen Daten und beim Design zukünftiger lipophiler BAB-NDPs helfen.

*Ergebnisse der Hydrolyseuntersuchungen von β -Cyanethoxy- β -(4-decanoyloxybenzyl)-d4TDP **37** in CEM/0 Zellextrakten, in RPMI/FCS Kulturmedium und in humanem Serum*
 Aufgrund seiner zwei unterschiedlichen Substituenten am β -Phosphat sollen die Hydrolyseergebnisse von CEO-C9-AB-d4TDP **37** in biologischen Medien separat diskutiert werden.

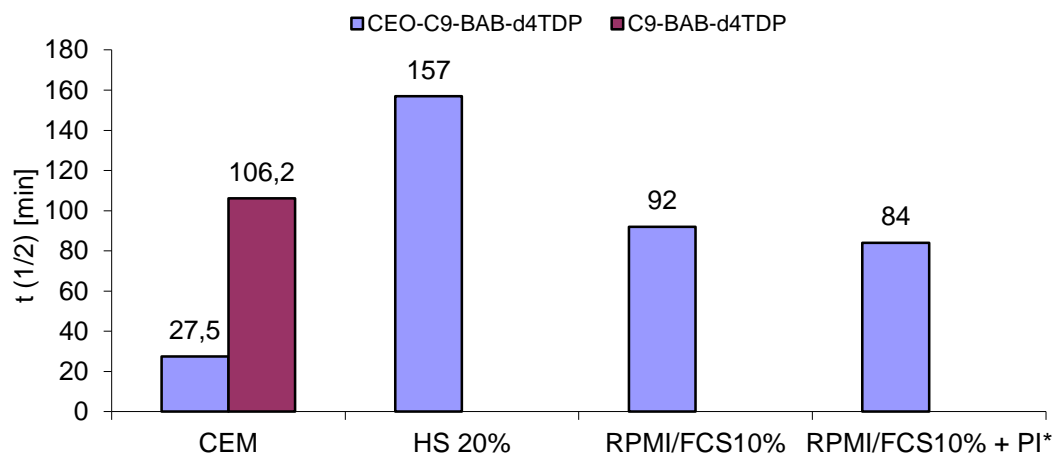


Diagramm 16: Hydrolyseprofil von **37** und C9-BAB-d4TDP **30** im gleichen Zellextrakt;
 *PI: Phosphatase Inhibitor

Insbesondere wurde untersucht, ob die Halbwertszeiten von **37** im Vergleich niedriger sind, als die der symmetrischen BAB-d4TDPs, wie es bei den chemischen Hydrolysen festgestellt wurde. Aus den Hydrolyseprofilen von **37** in Diagramm 16 und den dazugehörigen Chromatogrammen konnten interessante Informationen gewonnen werden. Im Zellextrakt wurde für **37** eine Halbwertszeit von ca. 30 min bestimmt. Um sie direkt mit der Halbwertszeit von C9-BAB-d4TDP **30** vergleichen zu können, wurde **30** in dem gleichen Zellextrakt hydrolysiert und die Halbwertszeit auf 106 min bestimmt. **37** wurde wie auch die anderen BAB-d4TDPs enzymatisch aktiviert hydrolysiert und zwar etwa viermal schneller als C13-BAB-d4TDP **30** aus der Reihe der aliphatischen BAB-d4TDP Prodrugs. Bei den Messungen der Halbwertszeiten im Humanen Serum und im RPMI/FCS Kulturmedium wurden ebenfalls kürzere Halbwertszeiten aus den Verläufen der Hydrolysen ermittelt. Es stehen hier nur die Halbwertszeiten von C9-BAB-d4TDP **28** zum Vergleich zur Verfügung, welche im Bereich von fünf bis fünfeinhalb Stunden und damit deutlich über denen von **37** in den betrachteten Medien lagen (vergl. Diagramm 16). **37** wurde in allen untersuchten enzym- bzw. esterasehaltigen Medien schneller hydrolysiert. Die enzymatische und die chemische Aktivierung dieses Prodrugs war schneller als die der symmetrischen BAB-d4TDP Verbindungen. Die Hydrolyse von **37** in humanem Serum

verlief über ein Intermediat, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um C9-AB-d4TDP **36** handelte (Vergleich der Retentionszeiten). Die Bildung eines Hydrolyseintermediats wurde ebenfalls bei den Hydrolysen in RPMI/FCS Kulturmedium mit und ohne Zusatz eines Phosphataseinhibitors beobachtet (Diagramm 17 und 18).

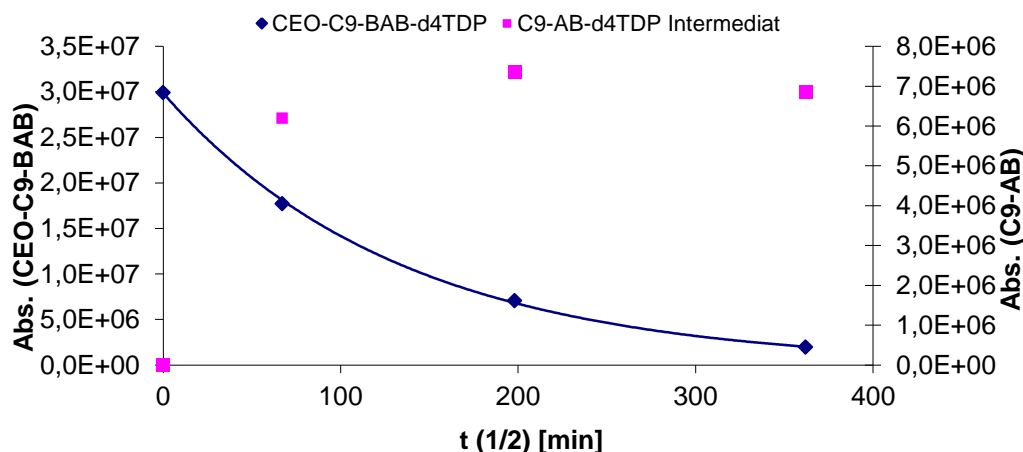


Diagramm 17: Hydrolyseverlauf von **37** und Intermediat **36** (RPMI/FCS10%)

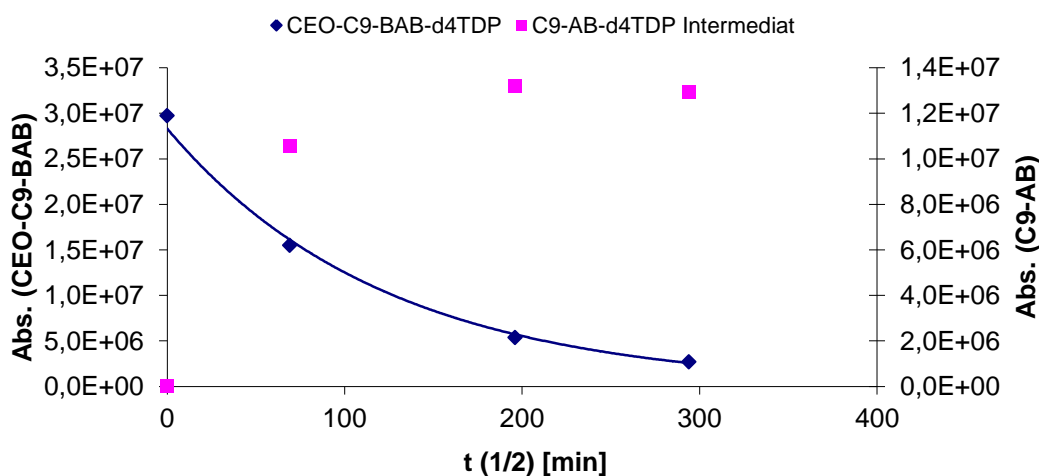


Diagramm 18: Hydrolyseverlauf von **37** und Intermediat **36** (RPMI/FCS10% mit PI)

Aus zum Zeitpunkt der Messungen ungeklärtem Grund konnte die Bildung von d4TDP bzw. d4TMP während der HPLC-Läufe nicht detektiert werden. Auch ähnlich polare Abbauprodukte wurden während dieser Hydrolysen nicht registriert. Auf Seite 136 wurde ein ganz ähnliches Phänomen für die Hydrolyse von d4TDP in FCS beschrieben. Es wurde zudem vermutet, dass die anwesenden Phosphatasen das Nucleosiddiphosphat zu schnell

spalten, so dass seine geringen Mengen nicht mehr detektiert werden konnten. Um diese These zu untersuchen, wurde **37** im RPMI/FCS Kulturmedium unter Zusatz eines Phosphataseinhibitorcocktails (PI) hydrolysiert. Der verwendete PI bestand aus unterschiedlichen Salzen wie Natriumfluorid, Natriummolybdat, Natriumorthovanadat, Natriumtetratridihydrat und Imidazol. Nach den Angaben des Herstellers soll er sowohl alkalische als auch acide Phosphatasen inhibieren. Wie dem Diagramm 16 entnommen werden kann, inhibierte die Zugabe an PI die Aktivität der Enzyme nicht oder nur in einem untergeordneten Maß. Die Halbwertszeit wurde sogar etwas erniedrigt und es konnte kein d4TDP detektiert werden. Zur näheren Untersuchung wurde daraufhin d4TDP in 10%igem FCS unter Zusatz von PI inkubiert. Es wurde eine ähnlich schnelle Zersetzung zu nicht identifizierten Metaboliten beobachtet wie ohne den Zusatz des Phosphataseinhibitors. Die Versuche zur Hydrolyse in Anwesenheit von PI wurden nicht weitergeführt. Die verringerte Stabilität bei der Hydrolyse in RPMI/FCS unter Zusatz von PI hat folgenden Grund: Die Hydrolyselösung mit PI hatte einen pH-Wert von 9-10. Ohne den Zusatz von PI hat die Hydrolyselösung (RPMI mit 10% FCS) einen neutralen bis leicht sauren pH-Wert. Bei einem basischen pH-Wert wird die Cyanoethylgruppe natürlich schneller abgespalten.

Die Bildung des AB-Intermediates **36** wurde enzymatisch eingeleitet, was aus den niedrigen Halbwertszeiten in den biologischen Medien geschlossen wurde. d4TDP konnte im Gegensatz zum Intermediat nicht detektiert werden, auch nicht unter Verwendung von Phosphataseinhibitoren. Das Nucleosiddiphosphat war aus den bereits erwähnten Gründen nicht detektierbar (freigesetzte Menge zu gering bzw. bei Fällung mit Isopropanol abgetrennt, S.136). Es kann dennoch davon ausgegangen werden, dass die Verbindung unter enzymatischem Einfluss d4TDP freisetzt und dies deutlich schneller als bei einer rein chemischen Hydrolyse.

*Vergleichende Hydrolyseuntersuchungen von C13-BAB-d4TDP **32** und β -BH₃-C13-BAB-d4TDP **112** in CEM/0 Zellextrakten und in RPMI/FCS Kulturmedium*

Die enzymatisch aktivierte Hydrolyse des β -Boran Derivates **112** wurde ebenfalls durch Inkubation sowohl im CEM/0 Zellextrakt als auch im Kulturmedium untersucht. Bei beiden Hydrolyseexperimenten verlief der Abbau von **112** nicht exponentiell, so dass eine Halbwertszeit nicht aus dem Geschwindigkeitsgesetz einer Reaktion *pseudo-erster* Ordnung berechnet werden konnte. Im Zellextrakt verringerte sich die Menge an **116** innerhalb der ersten sieben Stunden um ca. ein Drittel und um ein Fünftel im Kulturmedium. Auch **112** schien somit ein Substrat für Esterasen zu sein. Bei diesen Hydrolysen konnten keine klaren Abbauprodukte identifiziert werden. Durch die Inkubation von C13-BAB-d4TDP

32 in RPMI/FCS konnte eine Halbwertszeit von 11 h bestimmt werden. Im Gegensatz zu **112** zeigte sich wie bei allen BAB-d4TDP Prodrugs eine exponentielle Abnahme der Verbindung über die Hydrolysedauer von 24 Stunden.

Die Hydrolyse von C13-BAB-d4TDP **32** bestätigte, dass die Stabilität der Prodrugs mit zunehmender Länge des Acylrestes zunimmt (S.136).

*Hydrolyseuntersuchungen von BPB-d4TDP **26** in CEM/0 Zellextrakt und in FCS 10%*

Die Hydrolyse von BPB-d4TDP **26** wurde im Zellextrakt untersucht und seine Halbwertszeit bestimmt. Die Halbwertszeit im Zellextrakt betrug 6.1 h und ist ungefähr so hoch wie die von C9- bzw. C11-BAB-d4TDP **30,31** (Diagramm 13). Die vergleichsweise höhere Halbwertszeit in Bezug auf **27** (R=C₄H₉) bestätigte die hohe Stabilität, die durch den *tert*-Butylrest (R=C₄H₉) hervorgerufen wird. Ein ähnliches Verhältnis wurde beim Vergleich der Stabilitäten während der chemischen Hydrolyse bei pH 7.3 beobachtet. Es wurden außerdem Hydrolyseuntersuchungen in PBS/FCS 10% mit und ohne Zusatz von PI gemacht. An diesem Beispiel sollte geklärt werden, ob der PI ggf. einen anderen Einfluss hat, wenn die Inhaltsstoffe des RPMI Kulturmediums nicht anwesend sind. Allerdings wurde keine Phosphataseinhibition beobachtet bzw. es wurde kein d4TDP detektiert. Das bei der enzymatischen Hydrolyse von **26** das Nucleosiddiphosphat freigesetzt wird, ging aus Hydrolyseexperimenten hervor, die in einer anderen Charge Zellextrakt durchgeführt wurden (Abb. 102). Diese Studie wurde zu Beginn der Dissertation durchgeführt, so dass sie in der Form nicht wiederholt werden konnte.

	t _{1/2} [h]		
	CEM/0	FCS 10%	FCS 10% + PI
BPB-d4TDP 26	6.1	12.8	11.6

Tabelle 5: Hydrolysehalbwertszeiten von BPB-d4TDP **26**

Dieses Ergebnis ist in zweierlei Hinsicht sehr interessant gewesen. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Verbindung **26** tatsächlich d4TMP und d4TDP freisetzt und zum anderen wurde ein Unterschied zu der analogen Verbindung Bis-(4-pivaloyloxybenzyl)-AZTDP festgestellt. Für diese Verbindung hatte *H. Jessen* keine Freisetzung des Diphosphats bei Zellextrakthydrolysen beobachten können, während dies für Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-AZTDP **19** und Bis-(4-acetoxybenzyl)-AZTDP **20** der Fall war. Er führte dies auf die hohe Stabilität des AB-Intermediats unter chemischer Hydrolyse zurück und

ging davon aus, dass sich das AB-Intermediat bei der Hydrolyse im Zellextrakt zersetzte, so dass kein AZTDP gebildet werden konnte.

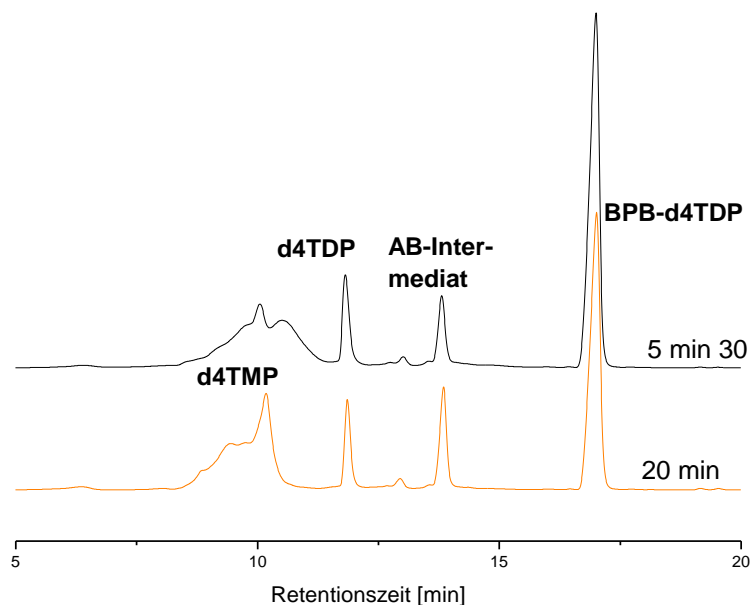


Abb. 102: HPLC Chromatogramme der Hydrolyse von BPB-d4TDP **26** in CEM/0 Zellextrakt

Wie in Abb. 102 gezeigt wurde, setzte Bis-(4-pivaloyloxybenzyl)-d4TDP **26** d4TDP frei. Die These von *H. Jessen*, dass ein zu stabiles Intermediat (chemische Hydrolyse) auf andere Weise zerfällt und dann kein NDP freisetzen kann, konnte nicht bestätigt werden.⁷⁰ Dieses Erkenntnis ist insbesondere für die Betrachtungen der fettsäuremodifizierten BAB-d4TDPs wichtig, da etliche von ihnen eine erhebliche Stabilität zeigten.

An vielen Stellen ist eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung zu erkennen, die auf die Variation des Acylrestes zurückzuführen ist. Die gewonnenen Erkenntnisse aus den Abbaustudien im RPMI/FCS Kulturmedium und in den Zellextrakten werden die Interpretation der antiviralen Daten sinnvoll ergänzen.

4.5.2.3 Untersuchungen zur Hydrolyse von BAB-AZTDP Prodrugs

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Synthese von BAB-AZTDP Prodrugs konnten nach der Darstellung der Reihe an fettsäuremodifizierten BAB-d4TDP Prodrugs nur zwei BAB-AZTDP Prodrugs dargestellt werden, von denen nur C9-BAB-AZTDP **66** in ausreichender Reinheit erhalten wurde, um Hydrolyseexperimente durchführen zu können. Bei der chemischen Hydrolyse von **66** in PBS-Puffer bei pH 7.3 wurde das gleiche Hydrolyseverhalten wie für die BAB-d4TDPs beobachtet. Aus den HPLC

Chromatogrammen konnte die 1. Hydrolysehalbwertszeit bestimmt werden. Sie beträgt 133 h und liegt 53 h über der 1. HWZ von C9-BAB-d4TDP **30**. Das AZTDP Prodrug war gegenüber dem d4TDP Prodrug wesentlich hydrolysestabiler. Um dieses Ergebnis verifizieren zu können, wurden die Ergebnisse mit denen von *H. Jessen* verglichen.⁷⁰ Aus den in Diagramm 19 zusammengestellten Halbwertszeiten geht hervor, dass die AZTDP Prodrugs tatsächlich eine höhere Stabilität als die d4TDP Prodrugs besitzen. Wahrscheinlich nehmen die BAB-AZTDPs im PBS-Puffer eine andere räumliche Anordnung an als die analogen BAB-d4TDP Prodrugs, so dass ein nucleophiler Angriff an den Acylresten langsamer abläuft.

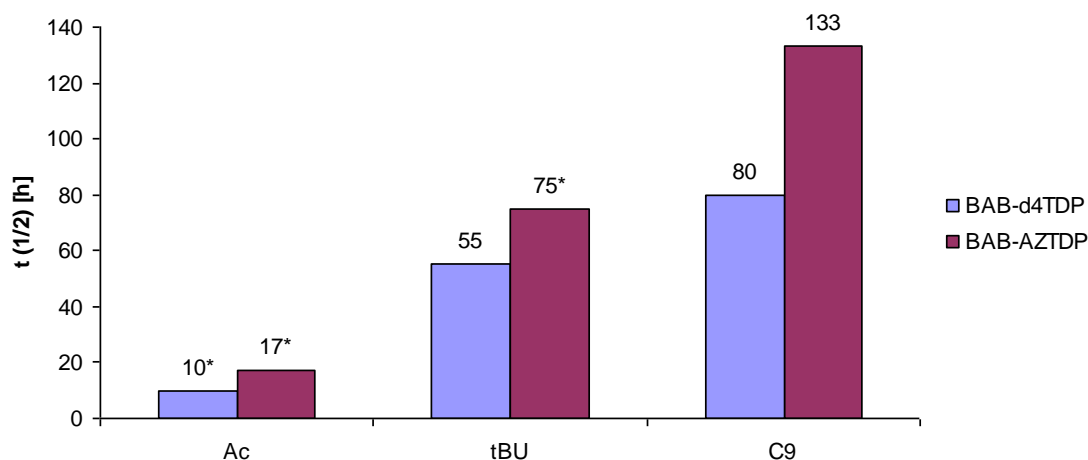


Diagramm 19: Vergleich der 1. Halbwertszeit von d4TDP und AZTDP Prodrugs; ^{*}Dissertation *H. Jessen*⁷⁰

Ein Grund dafür könnten die unterschiedlichen Riboseeinheiten der Nucleosidanaloga sein. Bei der chemischen Hydrolyse von **66** wurde das prozentuale Verhältnis für die freigesetzten Mengen an AZTDP und AZTMP auf 53% zu 47% bestimmt. Auch die BAB-AZTDP Prodrugs hydrolysieren über das stabile AB-Intermediat, was anhand der HPLC Chromatogramme bestätigt wurde.

	t _{1/2} [h]		A _{max} [%]	
	pH 7.3	CEM/0	AZTDP	AZTMP
C9-BAB-AZTDP 66	133	7.6	53	47

Tabelle 6: Hydrolyseergebnisse für **66**; A_{max}: freigesetzte Menge in PBS 7.3

Die enzymatische Hydrolyse wurde in CEM/0 Zellextrakt untersucht. Hierbei wurde wie bei der Untersuchung der d4TDP Prodrugs vorgegangen und der Zellextrakt in der gleichen Verdünnung eingesetzt (vergl. S.129). So konnte die Halbwertszeit unter enzymatischer Aktivierung auf 350 min bestimmt werden. C9-BAB-d4TDP **30** wurde im Zellextrakt in genau der gleichen Zeit abgebaut. Was darauf hinweist, dass die Struktur des Nucleosidanalogs keinen Einfluss auf die enzymatische Spaltung der Acylgruppen hat, da die beteiligten Enzyme unspezifisch genug sind. Das Hydrolyseverhalten der fettsäuremodifizierten AZTDP Prodrugs und das der d4TDP Prodrugs hat hinsichtlich der chemischen Hydrolyse und beim Katabolismus im Zellextrakt große Ähnlichkeiten. Das BAB-NDP Konzept lässt sich auf die Diphosphate anderer Nucleosidanaloga übertragen.

4.5.3 Antivirale Eigenschaften und Cytotoxizitäten von BAB-d4TDP und BAB-AZTDP Prodrugs

In einer Kooperation mit *Prof. Dr. Jan Balzarini* wurde die antivirale Aktivität der BAB-d4TDPs **26-34** und der BAB-AZTDP Verbindungen **65,66** sowie von β -BH₃-BAB-d4T **112** gegenüber HIV-1 und HIV-2 in infizierten Wildtypzellen (CEM/0) ermittelt. Außerdem konnte die antivirale Aktivität in HIV-1 infizierten TK-defizienten Zellen ermittelt werden (CEM/TK⁻). In CEM/TK⁻ Zellen wird die Thymidinkinase nicht exprimiert, d.h. die Nucleosidanaloga d4T und AZT werden in diesen Zellen nicht zum Monophosphat anabolisiert und verlieren daher ihre antivirale Wirkung.

Bei der Interpretation der Ergebnisse gilt folgende These: Eine antivirale Aktivität in diesen Zellen (TK⁻-Aktivität bzw. TK-Bypass) zeigt die Diffusion des BAB-NDP Prodrugs über die Zellmembran unter nachfolgender Abspaltung der maskierenden Einheiten und der Freisetzung von phosphorylierten Metaboliten (NMP od. NDP) im intrazellulären Raum an. Aus der Aktivität in den TK⁻-Zellen kann nicht direkt auf eine Freisetzung des entsprechenden NDPs geschlossen werden, da ein intrazellulär freigesetztes NMP durch die Thymidylat-Kinase zum Di- und dann weiter zum Triphosphat phosphoryliert wird (vergl. 2.2.1). Eine Zelllinie, in der die Thymidylatkinase nicht exprimiert wird, stand nicht zur Verfügung. Wie aber unter Kapitel 4.5.2 gezeigt werden konnte, wurden von allen Verbindungen sowohl unter chemischer als auch unter enzymatischer Hydrolyse in CEM/0-Zellextrakten die Nucleosiddiphosphate freigesetzt.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]			CC ₅₀ ^b [μM]
	CEM/0		CEM/TK ⁻	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
BAB-d4TDP ^{c,d} 23	1.05 ± 0.92	1.5 ± 0.7	21.0 ± 5.7	>125
BPB-d4TDP ^{c,d} 26	0.78 ± 0.80	0.90 ± 0.16	14 ± 5	66 ± 1.4
C4-BAB-d4TDP 27	2.0 ± 1.8	2.9 ± 2.8	15 ± 7.1	80 ± 0.71
C6-BAB-d4TDP 28	0.47 ± 0.28	1.1 ± 0.14	1.2 ± 0.28	85 ± 2.1
C7-BAB-d4TDP ^c 29	0.90 ± 0.44	1.3 ± 0.39	2.6 ± 1.9	81.1 ± 1.4
C9-BAB-d4TDP ^d 30	0.13 ± 0.087	0.20 ± 0.006	0.15 ± 0.042	61 ± 11
C9-BAB-d4TDP 30	0.080 ± 0.042	0.32 ± 0.12	0.11 ± 0.042	62 ± 6.4
C11-BAB-d4TDP 31	0.16 ± 0.042	0.35 ± 0.078	0.23 ± 0.064	39 ± 0.71
C13-BAB-d4TDP 32	1.8 ± 1.6	2.0 ± 1.2	1.2 ± 0.030	134 ± 21
C15-BAB-d4TDP 33	2.0 ± 1.8	1.7 ± 0.42	0.99 ± 0.014	72 ± 9.9
(8Z)-C17-d4TDP 34	1.1 ± 0.29	1.8 ± 1.5	0.65 ± 0.35	100 ± 3.1
C17-BAB-d4TDP 35	0.25 ± 0.042	0.58 ± 0.25	0.24 ± 0.014	94 ± 16
CEO-C9-AB-d4TDP 37	0.99 ± 0.16	5.0 ± 2.5	2.8 ± 2.1	86 ± 4.9
β-BH ₃ -C9-BAB-d4TDP 112	1.6 ± 0.64	1.8 ± 0.35	2.5 ± 2.3	24 ± 1.4
d4T	0.86 ± 0.45	2.3 ± 2.4	173 ± 70	>250
BAB-AZTDP ^{c,d} 19	0.065 ± 0.074	0.037 ± 0.037	25.0 ± 0.0	73 ± 14
BIB-AZTDP ^{c,d} 20	0.062 ± 0.077	0.039 ± 0.036	35.0 ± 21.2	77 ± 12
BPB-AZTDP ^{c,d} 21	0.028 ± 0.019	-	36 ± 0	71 ± 8.5
C6-BAB-AZTDP 65	0.038 ± 0.018	0.053 ± 0.039	3.1 ± 1.5	99 ± 36
C9-BAB-AZTDP 66	0.051 ± 0.001	0.11 ± 0.035	0.79 ± 0.28	87 ± 8.5
AZT	0.024 ± 0.0	0.024 ± 0.013	>250	>250

a: effektive Konzentration od. benötigte Konzentration, um 50% der CEM Zellen vor der Cytopathogonie des HIV zu schützen; b: cytotoxische Konzentration od. benötigte Konzentration zur Reduktion der Lebensfähigkeit von 50% der CEM Zellen; c: *H. Jessen*⁷⁰; d: Ammoniumsalz.

Tabelle 7: Antivirale Aktivitäten gegenüber HIV-1 und HIV-2 in CEM/0 Wildtyp und CEM/TK-defizienten Zellen

Aus den in Tabelle 7 zusammengefassten Daten kann folgendes abgeleitet werden: Alle BAB-d4TDP Verbindungen **26-34** CEO-C9-AB-d4TDP **37** und β -BH₃-C9-BAB-d4TDP **112** besitzen antivirale Aktivität gegenüber HIV-1 und HIV-2 in CEM/0 Wildtypzellen. In der Mehrheit der Fälle ist sie genauso gut oder besser als die antivirale Wirkung der Referenzverbindung d4T in dieser Zelllinie. In Abhängigkeit der lipophilen Acylreste wurde für die BAB-d4TDP Verbindungen **27-34** ($R \geq C_6H_{13}$) ein vollständiger TK⁻-Bypass gemessen, während die TK⁻-Aktivität von BAB-d4TDP **23**, *t*Butyl-BAB-d4TDP **26** und von C4-BAB-d4TDP **27** lediglich als unvollständig gelten kann. Die TK⁻-Aktivität ist demnach von der Lipophilie und somit von der Kettenlänge abhängig. Vielmehr wurden die besten TK⁻-Aktivität für C9-BAB-d4TDP **30** und für C11-BAB-d4TDP **31** gemessen. Das Bis-tetra-*n*-butylammoniumsalz von C9-BAB-d4TDP **30** zeigt eine 11-fach höhere Aktivität gegenüber HIV-1 als d4T. In CEM/TK⁻ Zellen wurde sogar eine 1575-fache Zunahme der antiviralen Aktivität gemessen. Die Aktivitäten des korrespondierenden Bis-Ammoniumsalzes sind innerhalb der Fehlertoleranz nahezu gleich, während sie sich auch in ihren Cytotoxizitäten nicht unterscheiden. Die Verbindung C11-BAB-d4TDP **31** zeigte ebenfalls sehr gute antivirale Aktivitäten: Gegenüber HIV-1 und HIV-2 wurde eine 5-fach bessere Aktivität als für d4T gemessen und die TK⁻-Aktivität steigerte sich um das 750-fache. Die höher alkylierten Verbindungen BAB-d4TDP **32-34** zeigten allesamt eine ähnliche Steigerung der TK⁻-Aktivität gegenüber d4T. Es konnte gezeigt werden, dass mit einer Erhöhung der Lipophilie die Erhöhung der TK⁻-Aktivität einhergeht.

Die Strukturvariation in 8Z-C17-d4TDP **34** hat keinen messbaren Einfluss auf Aktivität und Cytotoxizität des Prodrugs. Die Cytotoxizität der BAB-d4TDPs **26-35** lag in einem für Prodrugs moderatem Bereich. Gleichzeitig sind sie ein weiterer Hinweis darauf, dass die BAB-d4TDP Verbindungen die Zellmembran passieren. Die derivatisierten BAB-Verbindungen CEO-C9-AB-d4TDP **37** und β -BH₃-C9-BAB-d4TDP **112** zeigen ähnliche antivirale Aktivitäten wie d4T in den Zellen des Wildtyps. Ihre TK⁻-Aktivitäten blieben hinter denen der lipophilen BAB-d4TDP Verbindungen zurück, aber auch diese Verbindungen scheinen die lipophile Zellmembran zu überwinden und phosphorylierte Metabolite von d4T freizusetzen. Die gemessene TK⁻-Aktivität von β -BH₃-C9-BAB-d4TDP **112** liegt bei EC₅₀ = 2.5 ± 2.3 μ M. Die Verbindung **112** zeigte die höchste Cytotoxizität der hier untersuchten Derivate. Die hohe Cytotoxizität deutet daraufhin, dass die Verbindung in die Zellen gelangte. Ob von ihr dort das Di- oder nur das Monophosphat freigesetzt wurde, kann nicht belegt werden. Nach den Ergebnissen der Hydrolysestudien zu urteilen, setzt dieses Prodrug eher das Monophosphat frei. Nach meiner Erkenntnis gab es bislang keine Aktivitätsstudien von Boran-modifizierten Nucleosiddi- oder Nucleosidtriphosphaten in

Zellsystemen, so dass nicht geklärt werden konnte, ob die höhere Cytotoxizität auf die BH_3 -Gruppe zurückgeführt werden kann. CEO-C9-AB-d4TDP **37** zeigte eine ähnliche TK^- -Aktivität, bei deutlich geringerer Cytotoxizität. Die antivirale Aktivität gegenüber HIV-1 in Wildtypzellen entspricht in etwa der von d4T selbst. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Verbindung intrazellulär d4TDP freisetzt. Zumindest hat CEO-C9-AB-d4TDP **37** bei den chemischen Hydrolysen sehr selektiv d4TDP freigesetzt und unter enzymatischer Hydrolyse wurde eindeutig die Bildung des AB-Intermediats **36** beobachtet. Aus dem Intermediat sollte, wie es am Beispiel von C9-BAB-d4TDP **30** im CEM/0 Zellextrakt gezeigt werden konnte, d4TDP freigesetzt werden. Vermutlich war die Verbindung CEO-C9-AB-d4TDP **37** nicht lipophil genug, um eine ähnlich gute Aktivität in TK^- -Zellen wie C9-BAB-d4TDP **30** selbst hervorzurufen.

Um eine Aussage über die Lipophilie der untersuchten Prodrugs machen zu können, wurden ihre Retentionszeiten an einer RP-18 Säule mittels HPLC bestimmt.¹⁶⁷ Ein Anstieg der Retentionszeiten mit zunehmender Kettlänge des Acylrestes wurde festgestellt und kann mit der Lipophilie korreliert werden. Die Chromatogramme der Abb. 103 zeigen eindeutig, dass die BAB-d4TDPs unter Zunahme der Kettenlänge ihrer Acylreste lipophiler werden. Zum Beispiel verdoppelte sich bei dem gewählten Gradienten die Retentionszeit von C4-BAB-d4TDP **26** zu C15-BAB-d4TDP fast, während das Hydrolyseintermediat C9-AB-d4TDP **36** wesentlich polarer war als das doppelt geschützte C9-BAB-d4TDP **30**. Bei der Interpretation der antiviralen Daten war festgestellt worden, dass die BAB-d4TDPs mit einem Acylrest $\text{R} \geq \text{C}_6\text{H}_{13}$ die Zellmembran passieren können und mit Acylresten $\text{R} \geq \text{C}_9\text{H}_{19}$ sehr gute Aktivitäten in TK^- -Zellen besaßen. Nur ein Teil von C4-BAB-d4TDP **27** hatte aufgrund seiner Polarität die Zellmembran passieren können. Das Hydrolyseintermediat C9-AB-d4TDP **36** ist polarer als C4-BAB-d4TDP **27** und sollte die Zellmembran nicht passieren können. Entsteht es bei einer intrazellulären Hydrolyse, so kann es die Zelle nicht wieder verlassen. Es käme somit zu einem „lock-in“ des Intermediats und d4TDP sollte freigesetzt werden.

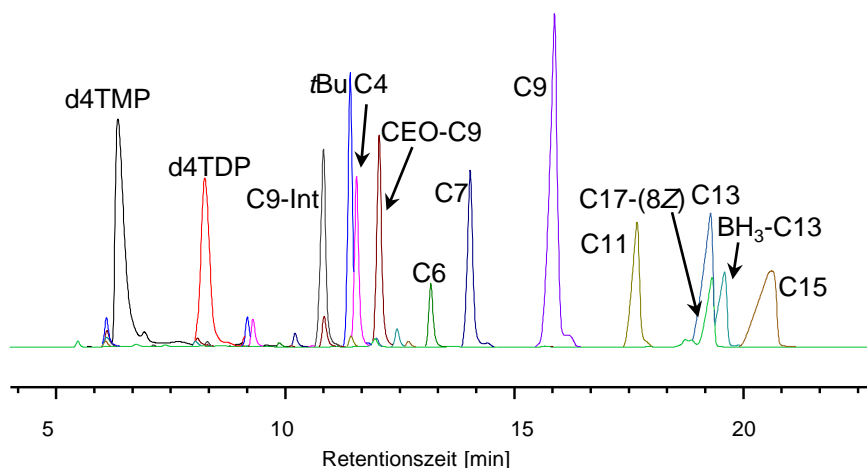


Abb. 103: Chromatogramme von d4TMP, d4TDP, aller BAB-d4TDPs, C9-AB-d4TDP und von CEO-C9-AB-d4TDP

Bei dem Design zukünftiger BAB-Nucleosiddiphosphate als Prodrugs sollte darauf geachtet werden, dass sie eine ähnliche Lipophilie wie C9-BAB-d4TDP besitzen und eine der beiden maskierenden Einheiten sehr schnell abgespalten wird, um über einen solchen „lock-in“ eine effiziente intrazelluläre Freisetzung des Nucleosiddiphosphats sicherzustellen. Einen ersten Ansatz zu solchen asymmetrischen Verbindungen bot CEO-C9-AB-d4TDP **37**, dessen Cyanoethylgruppe sowohl unter chemischer Hydrolyse als auch im CEM/0 Zellextrakt schneller abgespalten wird als die (4-Acyloxybenzyl)-Einheit (vergl. z.B. Diagramm 16). Jedoch besaß **37** nicht die ausreichende Lipophilie, um die Zellmembran zu passieren, so dass die antivirale Aktivität in TK-defizienten Zellen schlechter war als die von C9-BAB-d4TDP **30**. Die niedrigere Lipophilie von **37** ist in den Chromatogrammen zu erkennen (Abb. 103). Des Weiteren konnte bei den durchgeführten enzymatischen Hydrolysen nicht vollständig geklärt werden, zu welchen Produkten die relativ stabilen Intermediate gespalten werden. Um die schnelle Abspaltung beider maskierender Einheiten zu erreichen, sollten auch andere funktionelle Gruppen als „Trigger“ an der (4-Acyloxybenzyl)-Einheit in Betracht gezogen werden. Mögliche Strukturen solcher maskierender Einheiten für NDP Prodrugs sollen im Ausblick vorgestellt werden.

Die antiviralen Eigenschaften der verzweigtmodifizierten AZTDP Prodrugs, nämlich BAB-AZTDP **19**, BIB-AZTDP **20** und BPB-AZTDP **21**, wurden bereits untersucht.⁷⁰ Die Verbindungen besitzen in den Wildtypzellen ähnlich gute Aktivitäten wie das Nucleosid selbst, zeigten jedoch nur einen unvollständigen TK-Bypass. Dies sollte durch die Verwendung von lipophileren Acylresten in der Bis-(4-acyloxybenzyl)-Einheit verbessert werden, was für die Verbindung C9-BAB-AZTDP **66** gelang. Dieses Resultat zeigte, dass

der konzeptionelle Ansatz auf BAB-Prodrugs anderer Nucleoside übertragbar ist. Der EC_{50} -Wert von C9-BAB-AZTDP **66** beträgt $0.79 \pm 0.28 \mu\text{M}$ in infizierten TK-defizienten CEM-Zellen, während AZT aufgrund der fehlenden Phosphorylierung seine Wirkung vollständig einbüßt ($EC_{50} \geq 250 \mu\text{M}$). Aufgrund dieser Ergebnisse sollten in zukünftigen Arbeiten weitere fettsäuremodifizierte BAB-AZTDPs synthetisiert werden.

4.6 Charakterisierung und Untersuchung von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-d4TTP als potentiell Triphosphat Prodrug

Wie unter Kapitel 4.4 beschrieben wurde, konnte erstmalig ein bioreversibel geschütztes Nucleosidtriphosphat, Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-d4TTP (BIB-d4TTP) **125**, synthetisiert werden. Außerdem gelang die Synthese der Edukte bzw. Referenzverbindungen d4TDP und d4TTP aus den *cycloSal*-Phosphataktivestern (vergl. Abschnitt 4.3). Nach dem auf Seite 103 skizzierten Kriterien sollte nach der Charakterisierung der BAB-d4TDP und BAB-AZTDP Prodrugs die Hydrolyse des potentiellen d4TTP Prodrugs **125** untersucht werden. Bei den Untersuchungen zum Hydrolyseverhalten wird geklärt werden, ob die Verbindung **125** das Nucleosidtriphosphat freisetzen kann und ob die Hydrolyse auch in diesem Fall sowohl enzymatisch als auch chemisch eingeleitet wird. Außerdem wird die Frage, ob die Hydrolyse von BIB-d4TTP **125** einem zu den BAB-d4TDP Prodrugs analogen Mechanismus folgt, hier beantwortet werden.

4.6.1 ^{31}P -NMR-spektroskopische Untersuchung der Hydrolyse von BIB-d4TTP

Es wurde davon ausgegangen, dass die Verbindung BIB-d4TTP **125** wie die BAB-d4TDPs **26-35** über ein monomaskiertes Intermediat hydrolysiert. Allerdings war zu beachten, dass es zwischen dem β - und dem γ -Phosphat eine weitere labile Phosphorsäureanhydridbindung gibt, wie sie zwischen dem α - und dem β -Phosphat bei den BAB-d4TDP Prodrugs vorkommt. Aus den Untersuchungen der Diphosphat Prodrugs ging hervor, dass die Pyrophosphatbrücke der gebildeten AB-Intermediate **36,128-131** gegenüber einem Bruch stabilisiert ist. Für die Hydrolyse von BIB-d4TTP **125** zu d4TTP wurde folgender Hydrolysemechanismus angenommen:

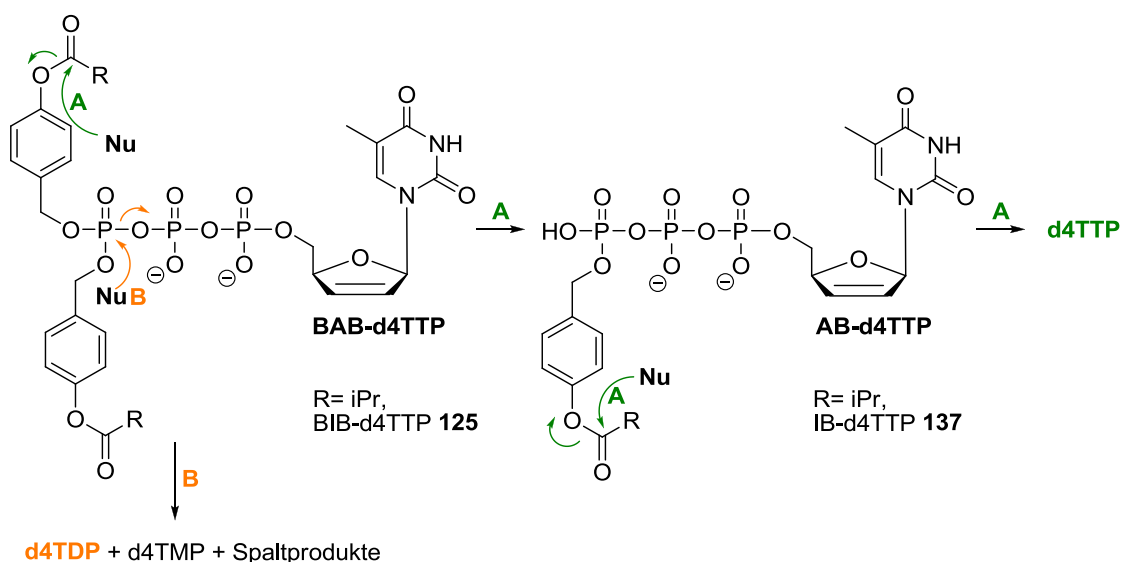


Abb. 104: Postulierter Hydrolysemechanismus für BAB-d4TTP Prodrugs

Wie im Fall der Diphosphat Prodrugs sollte BIB-d4TTP **125** auf dem Hydrolyseweg A über das Intermediat (IB-d4TTP **137**) zum d4TTP hydrolysieren. Eine konkurrierende Spaltung der β - γ -Phosphorsäureanhydridbindung, z.B. durch einen nucleophilen Angriff am γ -Phosphoratom, würde über den Weg B das Nucleosiddiphosphat freisetzen. Von einem Bindungsbruch zwischen dem α - und dem β -Phosphat wurde nicht ausgegangen, da sie durch die beiden negativen Ladungen stabilisiert sein sollte. In einem ersten Schritt wurde der Hydrolysemechanismus von BIB-d4TTP **125** mit Hilfe der ^{31}P -NMR Spektroskopie untersucht. Zur Aufnahme der Spektren wurden ca. 15 mg **125** in 0.35 mL DMSO- d_6 gelöst. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 0.35 mL 50 mM PBS-Puffer pH= 7.3 gestartet und das erste NMR Spektrum gemessen. Die Hydrolyselösung wurde im NMR-Röhrchen belassen und zu bestimmten Zeitpunkten wurde ein weiteres NMR Spektrum aufgenommen. Die NMR-Probe wurde bei Raumtemperatur gelagert und zur Messung der Spektren kurzzeitig durchmischt. Zu Beginn der Hydrolyse waren fast ausschließlich die drei Signale des Eduktes zu erkennen (Abb. 105). Wie auf Seite 101, Abb. 83 und Abb. 84 näher erläutert wurde, handelt es sich jeweils um die Dubletts des α - und des γ -Phosphoratoms und um das Pseudotriplett des β -Phosphoratoms bei ca. -24 ppm. Während der Hydrolyse über 88 Tage wurde die Bildung des Hydrolyseintermediats **137** beobachtet. Das IB-d4TTP **137** wurde nachgewiesen. Die Hydrolyselösung wurde nach vollständigem Verbrauch von **125** gefriergetrocknet und das Intermediat anschließend durch Chromatographie über RP-18 Kieselgel von Salzen und Nebenprodukten gereinigt, isoliert und NMR-spektroskopisch charakterisiert. In Abb. 105 sind die beiden Pseudotriplets des Intermediats klar zu erkennen. Die beiden Dubletts des α - und des γ -

Phosphoratoms fielen zusammen und ergaben so das Pseudotriplett bei ca. -11.5 ppm. Für das β -Phosphoratom wurde ähnlich wie im Edukt ein Pseudotriplett bei ca. -22.5 ppm gefunden. Die α - und γ -Phosphoratome des Hydrolyseintermediats **137** besaßen nahezu die gleiche chemische Verschiebung. Das α -Phosphoratom ist mit der 5'-Methylengruppe verestert, während das γ -Phosphoratom mit der benzylichen Methylengruppe verestert ist (sehr ähnliche chemische Umgebung für P- α und P- γ). Alle übrigen Substituenten sind die Gleichen (2x Sauerstoff, 1x β -Phosphat). In der Vergrößerung sind die beiden Dubletts, die das Pseudotriplett ergeben, zu erkennen. Dieses doppelte Dublett (dd) konnte nur im Spektrum nach 88 Tagen und in dem der isolierten Verbindung erkannt werden. Das Verhältnis der Integrale der beiden Pseudotriplets von 2:1 bestätigte ebenfalls, dass es sich bei dem Pseudotriplett (bzw. dd, ca. -11.5 ppm) um die Signale von α - und γ -Phosphoratom handelte (Abb. 106). BIB-d4TTP **125** hydrolysierte über den Weg A zu dem Intermediat IB-d4TTP **137** (vergl. Abb. 104). Während der NMR-Hydrolyse konnte nicht die Freisetzung von d4TTP aus IB-d4TTP beobachtet werden. Unter Umständen konnte ein Nucleophil die verbleibende Acyleinheit des dreifach negativ geladenen Hydrolyseintermediats **137** aufgrund von repulsiven Wechselwirkungen nicht mehr angreifen. IB-d4TTP blieb deshalb stabil und d4TTP wurde nicht freigesetzt. Ausgesprochen positiv zu erwähnen ist die Tatsache, dass die Bildung des Nucleosiddiphosphats d4TDP über den Weg B oder anderer Nebenprodukte kaum auftrat. Die Bildung von d4TMP wurde nicht registriert. In Abb. 106 sind die beiden Dubletts des sehr wahrscheinlich entstandenen d4TDPs markiert. Im Verhältnis zum Hydrolyseintermediat haben sich ca. 11% d4TDP gebildet.

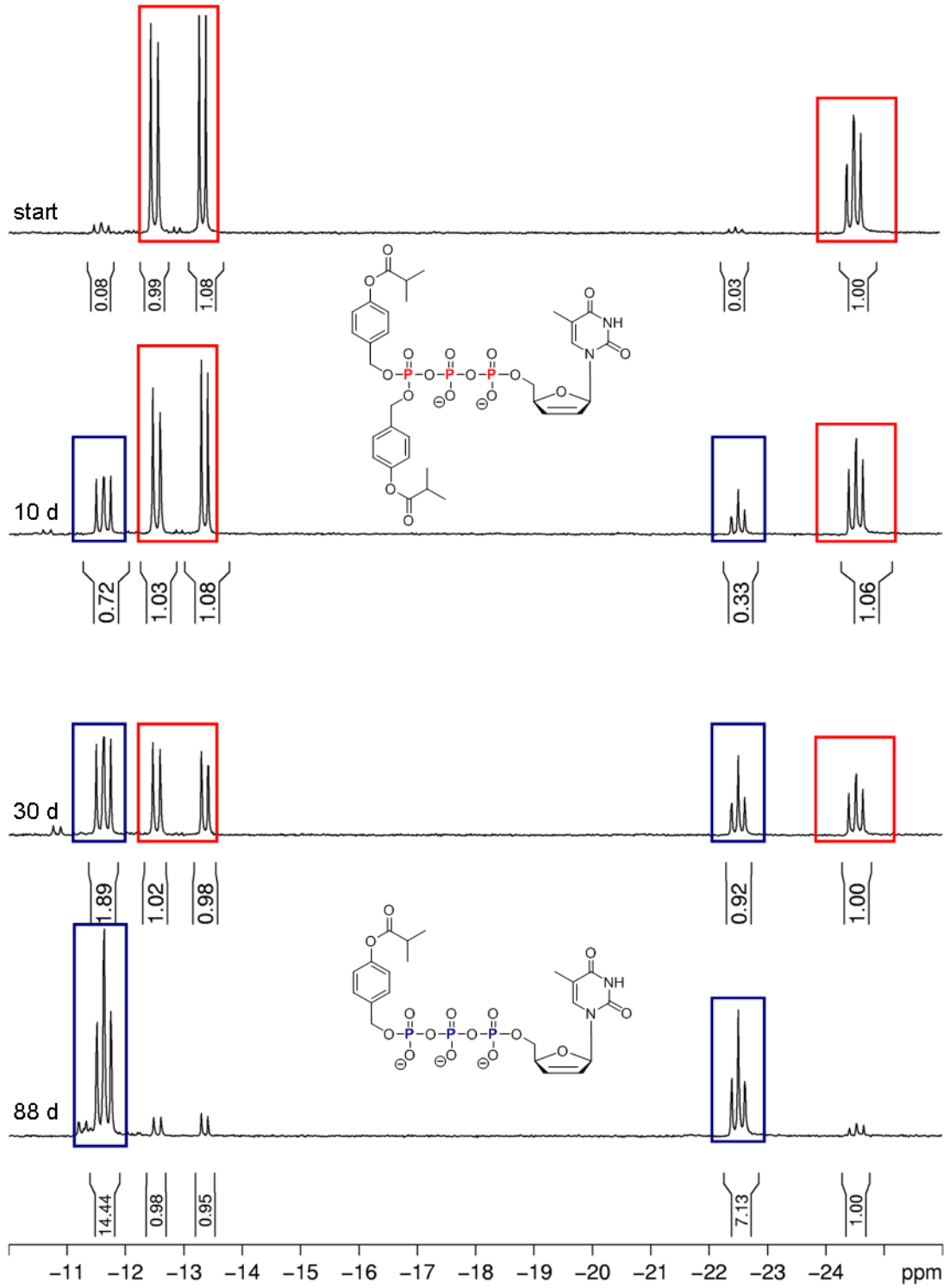


Abb. 105: ^{31}P -NMR-Hydrolyse von BIB-d4TTP 125 in PBS Puffer bei pH 7.3

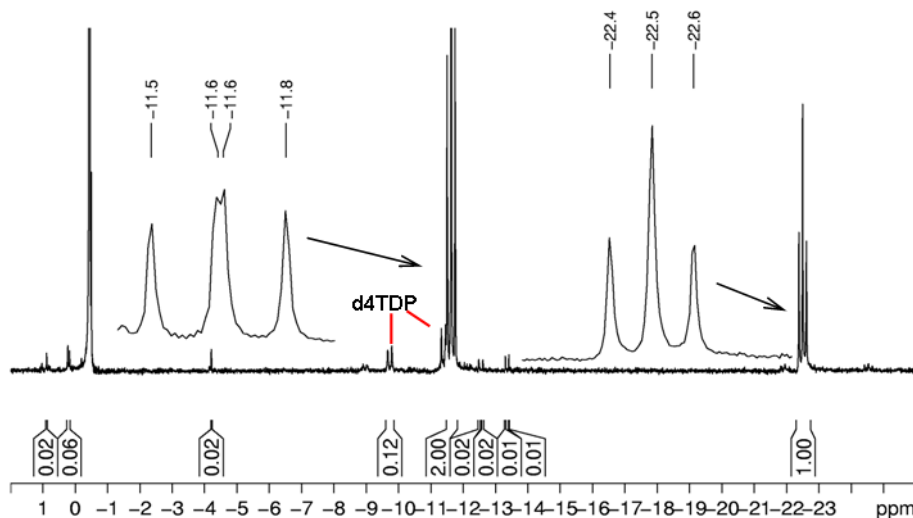


Abb. 106: ^{31}P -NMR-Spektrum der Hydrolyse von BIB-d4TTP **125** nach 88 Tagen mit beiden Signalen des Intermediats **137** in der Vergrößerung

4.6.2 Hydrolysestudien von Bis(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-d4TTP

4.6.2.1 Untersuchungen zur chemischen Hydrolyse von BIB-d4TTP

Die Reaktionsverfolgung der chemischen Hydrolyse von BIB-d4TTP **125** hatte gezeigt, dass die Verbindung **125** selektiv über den Weg A zum Intermediat IB-d4TTP **137** hydrolysierte (s. Abb. 105). Allerdings konnte die Freisetzung des d4T-Triphosphats nicht beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde die chemische Hydrolyse von BIB-d4TTP **125** genauer untersucht. Es wurde wie bei den Hydrolysen der BAB-d4TDPs vorgegangen (vergl. 4.5.2.1). Aus den Chromatogrammen von d4TTP, IB-d4TTP **137** und d4TDP war deutlich geworden, dass sie eine sehr ähnliche Retentionszeit besitzen. Die Anpassung des Laufmittelgradienten und der Flussrate führte nicht zur Basislinientrennung von d4TTP und dem Hydrolyseintermediat **137**. Zu den möglichen Hydrolyseprodukten wurden d4TDP, d4TTP, IB-d4TTP und der Benzylalkohol gezählt. Diese Produkte sind bei einer Wellenlänge von 263-265 nm sehr gut zu detektieren, während das UV-Maximum des Benzylalkohols bei 272 nm liegt. Wie Abb. 107 zeigt, eluierten d4TDP, d4TTP und BIB-d4TTP **125** getrennt voneinander. Da d4TTP und IB-d4TTP **137** fast gleichzeitig eluierten ist das Chromatogramm von IB-d4TTP nicht gezeigt.

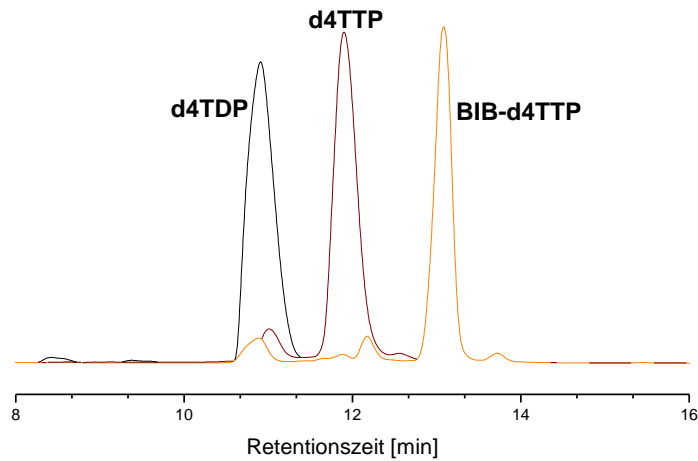


Abb. 107: Retentionszeiten von d4TDP, d4TT und von BIB-d4TTP **125**

Über die ^{31}P -NMR Hydrolyse wurde bereits bewiesen, dass sich aus BIB-d4TTP **125** das Intermediat **137** bildete, jedoch konnte die Freisetzung von d4TTP dort nicht beobachtet werden. Während des Hydrolyseverlaufs von BIB-d4TTP **125** in PBS-Puffer 7.3 konnten Bildung und Abnahme des Zwischenproduktes **137** eindeutig festgestellt werden (Abb. 108, Hydrolyse nach 28 h bis 891 h).

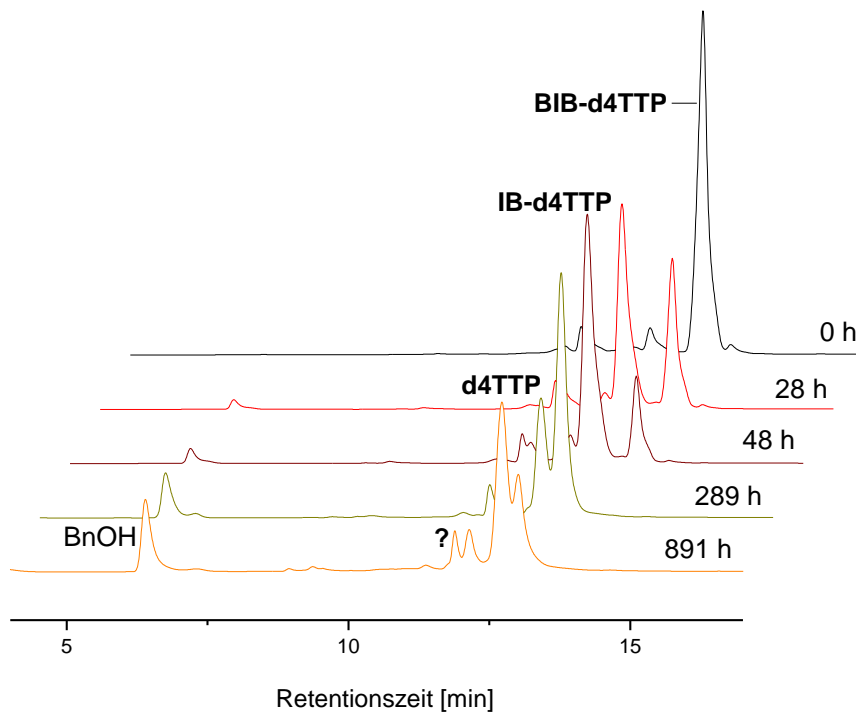


Abb. 108: Hydrolyseverlauf von BIB-d4TTP **125** bei pH 7.3

In Abb. 109 sind der Hydrolyseverlauf nach 55 h und das Chromatogramm von IB-d4TTP **137** abgebildet. IB-d4TTP **137** war durch Chromatographie aus der ^{31}P -NMR Hydrolyselösung isoliert und charakterisiert worden. Das Intermediat konnte über eine Coinjektion (nicht gezeigt) und über die identischen Retentionszeiten im Hydrolyseverlauf zugeordnet werden (Abb. 109). Aus dem gebildeten AB-Intermediat wurde d4TTP freigesetzt (s. 289 h und 891 h in Abb. 108). Bei einer Retentionszeit von ca. 4 min war die Zunahme des Benzylalkohols erkennbar. Diese Chromatogramme zeigten eindeutig, dass die chemische Hydrolyse von BIB-d4TTP sehr selektiv über den Weg A (Abb. 104) zum d4TTP verläuft. Das tatsächlich d4TTP aus dem Intermediat freigesetzt wurde, konnte durch Coinjektion mit der Referenzverbindung belegt werden (Abb. 110).

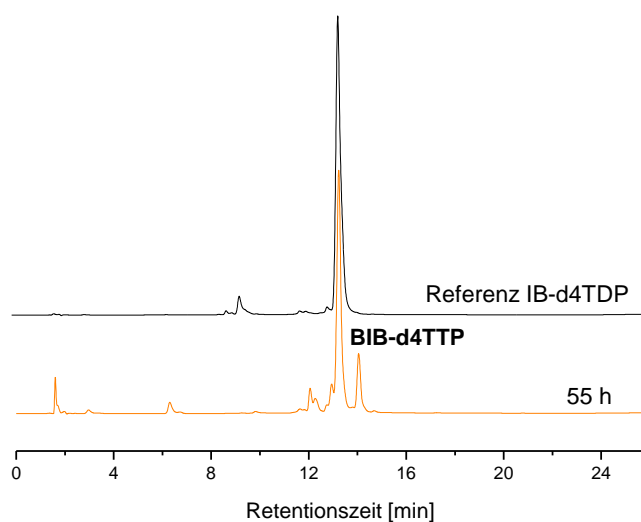


Abb. 109: Zuordnung des IB-Intermediates **137** über die Retentionszeiten

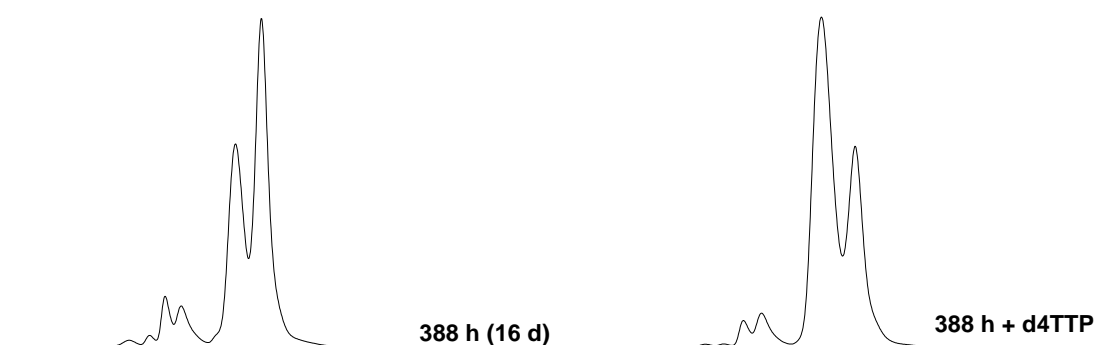


Abb. 110: Hydrolyseverlauf nach 388 h mit Zusatz von d4TTP und ohne (links)

Die in Abb. 108 mit „?“ gekennzeichneten Peaks konnten nicht exakt zugeordnet werden. Aus Abb. 107 wissen wir, dass sich d4TDP und d4TTP in ihren Retentionszeiten um ca.

1 min unterschieden. Zwischen den Signalen mit Fragezeichen und dem gebildeten d4TTP lag ca. 1 min. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Signalen um d4TDP, das durch Bruch der Triphosphateinheit über den Weg B entstand, handelte. Bereits zum Beginn der Hydrolyse war in diesem Bereich ein sehr kleiner Peak zu erkennen. Die Signalintensität nahm jedoch während der gesamten Hydrolyse leicht zu. Wie aus den Untersuchungen der BAB-d4TDP Prodrugs bekannt ist, endete die Zunahme an d4TMP nach vollständigem Verbrauch des Eduktes, da das AB-Intermediat gegenüber einem Bruch der Pyrophosphateinheit stabilisiert ist. Gleiches sollte für das IB-d4TTP **137** gelten. Auch d4TTP wurde in PBS Puffer bei einem pH-Wert von 7.3 über 41 Tage hydrolysiert und es wurde nach ca. 11 d die Bildung von d4TDP beobachtet. Ein Teil der geringen Menge d4TDP dürfte aus dem gebildeten d4TTP hervorgegangen sein. Bei den „?“-Peaks könnte es sich ebenso um d4TTP gehandelt haben, dass aufgrund anderer Gegenionen früher eluierte. BIB-d4TTP **125** wurde mit *tetra-n*-Butylammoniumionen für die Hydrolyse eingewogen. Im Phosphatpuffer befinden sich jedoch Kaliumionen und Natriumionen. Obwohl das Laufmittel *tetra-n*-Butylammoniumionen enthält, könnte es sein, dass die Gegenionen austauschen und die Retentionszeiten abweichen. Bei einigen Hydrolysestudien reiner Verbindungen wurden aus diesem Grund Doppelpeaks erhalten.

Warum BIB-d4TTP **125** bei der NMR-Hydrolyse nicht bis zum Triphosphat hydrolysieren konnte, blieb unklar. Vermutlich war die Hydrolyse durch die fehlende Temperatur und Durchmischung stark verlangsamt. Das AB-Intermediat **137** ist gegenüber einem nucleophilen Angriff aufgrund der drei negativen Ladungen der Triphosphateinheit stabilisiert. Es könnte sein, dass ein Nucleophil nicht mehr in der Lage war an der zweiten Acyloxybenzyleinheit anzugreifen. IB-d4TTP **137** ist in der Tat viel stabiler als BIB-d4TTP **125**, was eindeutig aus den ermittelten Halbwertszeiten hervorging.

	t _{1/2} [h]			
	pH 7.3		pH 6.8	
	1.	2.		
BIB-d4TTP 125	30	462		
d4TTP 5			1155	990

Tabelle 8: Halbwertszeiten für **125** und d4TTP bei chemischer Hydrolyse

Die Halbwertszeit für das AB-Intermediat (2. Halbwertszeit für BIB-d4TTP) wurde, wie auch bei den BAB-d4TDPs, aus der laufenden Hydrolyse nach vollständigem Verbrauch des

Eduktes bestimmt. Bedauerlicherweise konnte die Hydrolyse nicht bis zum Ende verfolgt werden, so dass eine Quantifizierung des gebildeten d4TTPs nicht erfolgen konnte. Da in dieser Arbeit die Verbindung Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-d4TDP **138** nicht dargestellt wurde, konnte kein Vergleich zwischen den Stabilitäten des Triphosphat Prodrugs und dem analogen Diphosphat Prodrug hergestellt werden. In Tabelle 8 sind die Halbwertszeiten für **125** zusammengefasst. Besonders auffällig ist die sehr hohe Halbwertszeit von 462 h für das gebildete Intermediat IB-d4TTP **137**. Es ist 15-mal stabiler als das BIB-d4TTP Prodrug **125**. Aus Diagramm 4 geht hervor, dass die 2.Halbwertszeit von C4-BAB-d4TDP **27** 8.4-mal höher ist als die Erste (S. 112). Die Stabilität des C4-AB-Intermediats **129** lag also in etwa um die Hälfte unterhalb der von BIB-d4TTP **125** während die von PB-d4TDP **128** etwa doppelt so hoch ist (S. 140). PB-d4TDP **128** war ca. 25-mal stabiler als BPB-d4TDP **26** selbst. Die Diskussion der Halbwertszeiten für BPB-d4TDP **26** und C4-BAB-d4TDP **27** ergab, dass der verzweigte Acylrest zu einer deutlich höheren Stabilität sowohl des Prodrugs als auch des Intermediats führt (vergl. S. 125, Tabelle 4). Es kann angenommen werden, dass die Verzweigung im Acylrest zur stärkeren Erhöhung der Stabilität führt als die Länge der Alkylkette. Ob die höhere Stabilität von BIB-d4TTP **125** gegenüber C4-BAB-d4TDP **27** auf die Verzweigung im Acylrest oder die zusätzliche negative Ladung zurückzuführen ist, kann nicht eindeutig gesagt werden. Wahrscheinlich spielen beide Faktoren eine Rolle. Für den direkten Vergleich ist die Synthese von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-d4TDP nötig.

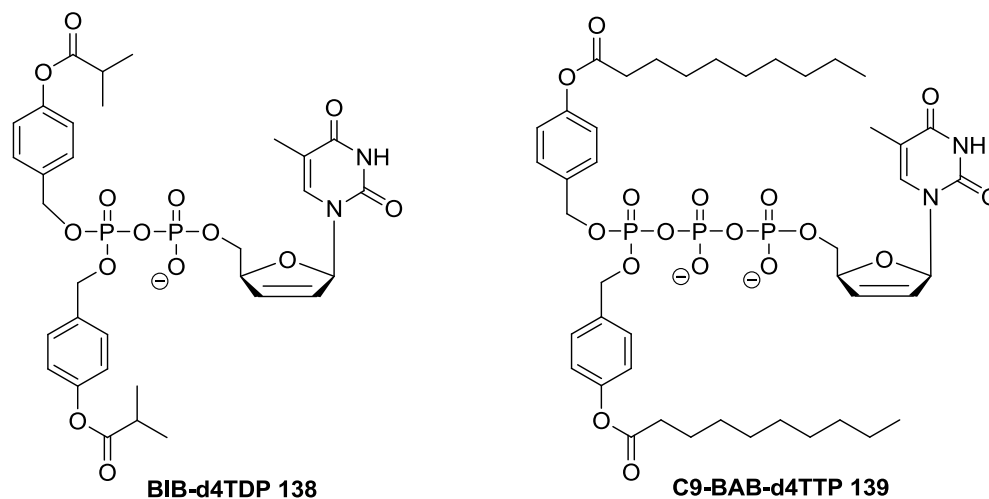


Abb. 111: BIB-d4TDP **138** und ein lipophiles Triphosphat Prodrug **139**

Da die fettsäuremodifizierten lipophileren BAB-d4TDPs **28-34** eine verbesserte antivirale Aktivität besitzen, sollte Bis-(4-decanoyloxybenzyl)-d4TTP **139** synthetisiert und dessen

Halbwertszeiten mit denen von Bis-(4-decanoyloxybenzyl)-d4TDP **30** verglichen werden (Abb. 111). Außerdem sollte man bei den Hydrolysen von C9-BAB-d4TTP **139** feststellen können, ob mit steigender Stabilität ein Bruch der Triphosphateinheit über den Weg B als Konkurrenzreaktion zunimmt. Dieses Verhalten wurde bei den BAB-d4TDP Verbindungen beobachtet.

Es wurde gezeigt, dass BIB-d4TTP **125** unter chemischer Hydrolyse d4TTP freisetzt. Wie bei den BAB-d4TDP Verbindungen erfolgt diese Hydrolyse über ein monomaskiertes Zwischenprodukt (IB-d4TTP **137**).

4.6.2.2 Untersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse von BIB-d4TTP125

Die Hydrolyse von BIB-d4TTP **125** wurde unter enzymatischen Bedingungen in CEM/0 Zellextrakt, humanem Serum, HepG2 Zellextrakt und dem RPMI Kulturmedium mit Zusatz von 10% FCS untersucht. HepG2 Zellkulturen werden standardmäßig bei *in vitro* Tests von möglichen anti-Hepatitis Wirkstoffen verwendet.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ Wie unter 4.1.5 besprochen wurde, kann das BAB-Nucleosiddiphosphat Prodrugsystem möglicherweise die Wirksamkeit von anti-HCV Nucleosidanaloga erhöhen. In dieser Arbeit wurde die Synthese von anti-HCV BAB-Prodrugs beschrieben und diskutiert (S. 74). BIB-d4TTP **125** sollte als Modell für zukünftige anti-HCV BAB-Triphosphat Prodrugs in HepG2 Zelllinien hydrolysiert werden. Im Diagramm 20 sind die Halbwertszeiten von BIB-d4TTP **125**, die in biologischen Medien ermittelt wurden, wiedergegeben.

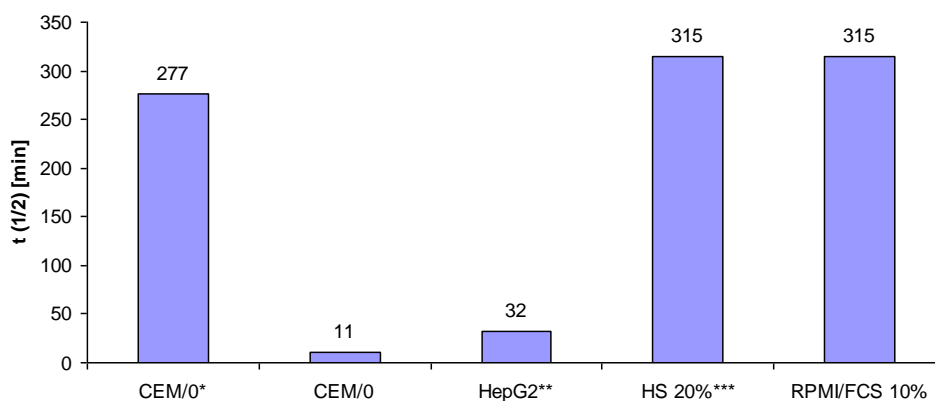


Diagramm 20: Hydrolyseprofil von BIB-d4TTP **125**; *33% in PBS 6.8, **50% in PBS 6.8, ***20% in PBS 6.8

Sie zeigen, dass die Hydrolyse des d4TTP Prodrugs auch enzymatisch aktiviert wird, was aus den verkürzten Halbwertszeiten abgeleitet wird. Im Vergleich zur rein chemischen Hydrolyse bei pH 7.3 wurde die Halbwertszeit von BIB-d4TTP **125** im CEM/0 Zellextrakt um

das 160-fache reduziert. Die Hydrolysen im Leberzellextrakt HepG2 und im CEM/0 Zellextrakt liefen so schnell ab, dass die Extrakte für eine bessere Bestimmung der Halbwertszeit und der Hydrolyseprodukte verdünnt wurden. Mit Halbwertszeiten von 277 bis 315 min lag die Stabilität von **125** im Bereich der Stabilität von C6-BAB-d4TDP **28**. Die zusätzliche Ladung am BIB-d4TTP **125** verminderte die Aktivität der esterspaltenden Enzyme nicht. Der direkte Vergleich mit Bis-(4-*isobutyryloxybenzyl*)-d4TDP könnte dies genauer belegen (Abb. 111). Einen durchaus ähnlichen Effekt hatte *H. Jessen* im Vergleich von Bis-(4-*acetyloxybenzyl*)-d4TDP **23** mit Bis-(4-*acyloxybenzyl*)-d4T-Monophosphat **9** machen können. Er stellte bei der enzymatischen Hydrolyse des AB-d4TDPs (zwei negative Ladungen) eine schnellere Hydrolyse als für AB-d4TMP (eine negative Ladung) fest.⁷⁰ Deshalb schränkte er die These ein, dass sich die enzymatische Hydrolyse durch steigende repulsive Wechselwirkungen mit dem Enzym verlangsamen.^{89,171} Die Chromatogramme aller Hydrolysen (CEM/0, HS20%, HepG2, RPMI/FCS10%) zeigten die Bildung hauptsächlich einer Verbindung.

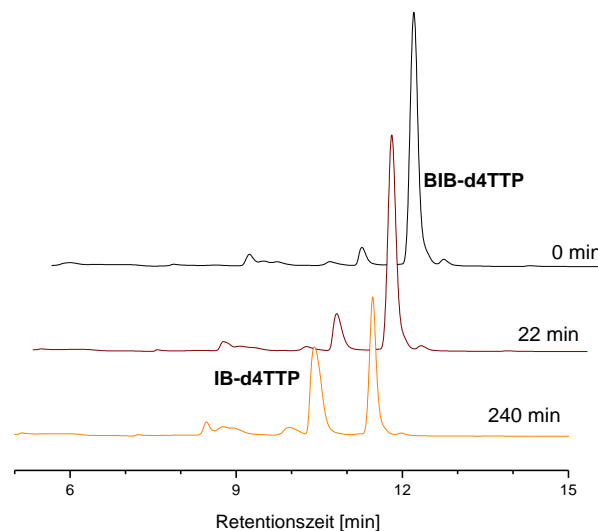


Abb. 112: HPLC Chromatogramme der CEM/0 Zellextrakthydrolyse von BIB-d4TTP **125**

In den HPLC Chromatogrammen (Abb. 112) ist die Abnahme von BIB-d4TTP **125** und die Bildung eines Produktes über die Dauer der Hydrolyse sehr gut zu erkennen. Die Zuordnung der freigesetzten Produkte d4TTP bzw. IB-d4TTP **137** erfolgte per Coinjektion (Abb. 113). Im linken Chromatogramm nahm das Signal ($R_t=10.5$ min, vorne) durch die Zugabe des Hydrolyseintermediats zu, während bei Zugabe von d4TTP ein drittes Signal hinzukam (Abb. 113, rechts). Dieses Ergebnis ließ sich auf die enzymatischen Hydrolysen in den anderen Medien übertragen. Das Triphosphat Prodrug **125** hydrolysierte unter enzymatischer Aktivierung über den Weg A hauptsächlich zum Hydrolyseintermediat **137**.

Offen blieben die Fragen: Setzt das Intermediat **137** unter enzymatischer Hydrolyse das d4T Triphosphat frei und wenn ja, warum ist es nicht im Chromatogramm sichtbar? Die Analyse der Peakflächen von **125** und des Intermediats **137** ergab für alle Hydrolysen eine Zunahme des Intermediats **137** bis zum Ende der Hydrolyse (Abbruch nach ca. 8 h od. nach ca. 24 h). Eine mögliche Antwort wäre, dass die Hydrolyse des Intermediats durch die Enzyme zu langsam verläuft und kein d4TTP freigesetzt werden konnte. Allerdings konnte bei vorangegangenen Experimenten kein Rückgang der Enzymaktivität durch Zunahme an Ladung im Molekül beobachtet werden. Außerdem hätte sich bei einer Hydrolysedauer von 8 bis 24 h über die chemische Hydrolyse d4TTP bilden müssen. Bei den Untersuchungen der BAB-d4TDP Prodrugs in Zellextrakten waren ebenfalls Probleme bei der Detektion des freiwerdenden d4TDPs aufgetreten. Sie wurden auf die Löslichkeit und auf die freigesetzte Menge an Nucleosiddiphosphat zurückgeführt (vergl. S.136).

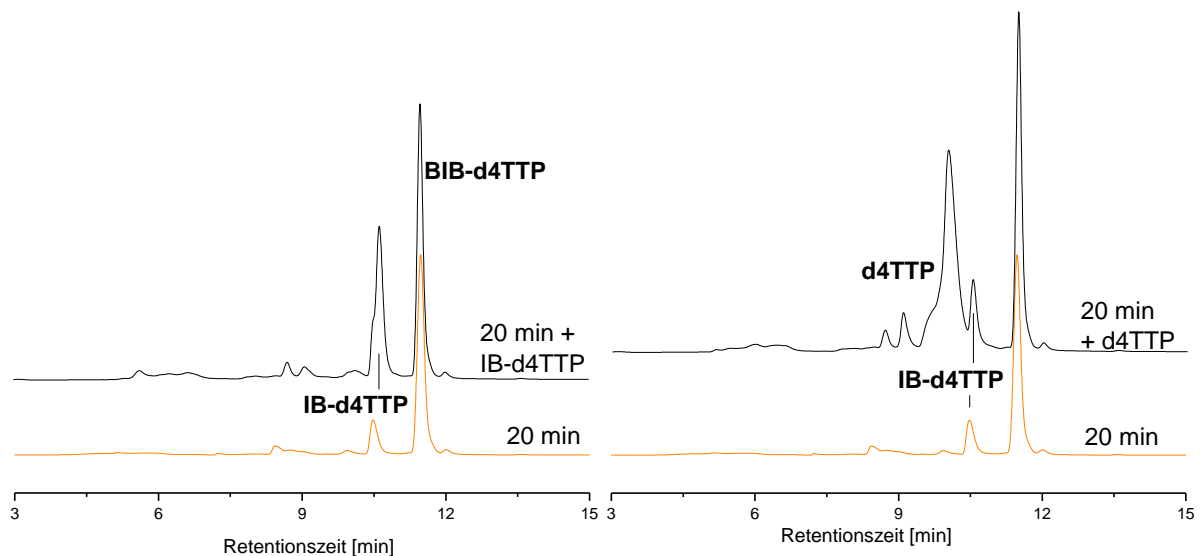


Abb. 113: Coinjektion mit IB-d4TTP **137** (links) und mit d4TTP (rechts) nach 20 min Hydrolyse im CEM/0 Zellextrakt

Um einen möglichen Fehler während der Probenbereitung auszuschließen, wurde d4TTP in CEM/0 Zellextrakt hydrolysiert und dazu das alte Protokoll verwendet (S.127). Zur Prüfung wurden zwei Proben angesetzt: Eine mit CEM/0 Zellextrakt (Blindwert) und die Zweite mit bidest. Wasser anstatt des Zellextraktes (Nullwert). Die Hydrolyse wurde in beiden Fällen durch Zugabe der d4TTP-Lösung gestartet, durchmischt, sofort durch Zugabe von Methanol abgebrochen, für 10 min auf Eis gelagert, zentrifugiert, der Überstand filtriert und mit folgendem Ergebnis an der HPLC untersucht:

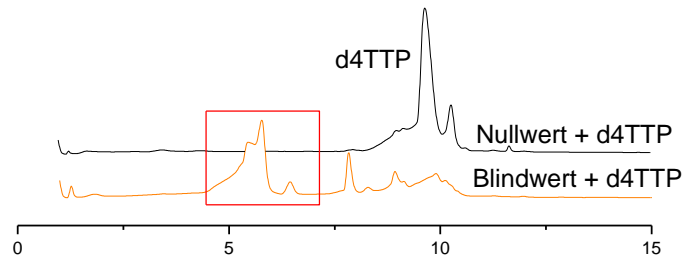


Abb. 114: HPLC Chromatogramme des Nullwertes und des Blindwertes der Zellextrakthydrolysate von d4TTP

Durch den Vergleich der Chromatogramme des Nullwertes (hinten) und des Blindwertes (vorne) wurde offensichtlich, dass d4TTP über diese Methode nicht detektiert werden konnte. Ob es sich bei denen, mit einem Rahmen markierten Signalen, um mögliche Metabolite des d4TTPs handelte, konnte nicht ausgeschlossen werden, da es sich auch um Rückstände aus dem Zellextrakt handeln konnte. Eine vollständige Hydrolyse des d4TTPs innerhalb von wenigen Sekunden erschien unwahrscheinlich. Deshalb wurden andere Wege gesucht, um neben BIB-d4TTP **125** und IB-d4TTP **137** auch d4TTP nachweisen zu können. Zur Proteinfällung bzw. -trennung wurden neben den gängigen organischen Lösungsmitteln auch andere Fällungreagenzien eingesetzt.

Fällungsmittel	Ultraschall	Ergebnis	Literatur
Methanol	-	keine Detektion	-
Methanol	15 min	keine Detektion	-
Acetonitril	-	keine Detektion	-
Acetonitril	15 min	keine Detektion	-
Trichloressigsäure	-	sehr gute Fällung, Zersetzung des d4TTPs	¹⁷²
Ammoniumsulfat	-	unzureichende Fällung, d4TTP und d4TMP	¹⁷³
Chloroform/Methanol	-	n. reproduzierbar	<i>Jiang et al.</i> ¹⁷⁴
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	-	s. Text	<i>Noack et al.</i> , ¹⁷⁵ <i>Gellerich et al.</i> , ¹⁷⁶ <i>P.Chomczynski und N.Sacchi</i> , ¹⁷⁷ verwendetes Protokoll ¹⁷⁸

Tabelle 9: Untersuchte Methoden zur Proteinfällung, um neben BIB-d4TTP, AB-d4TDP auch d4TTP detektieren zu können

Die durchgeführten Experimente sind mit ihren Ergebnissen in Tabelle 9 zusammengefasst. Methodisch wurde so vorgegangen, wie es auf Seite 127, im Experimentalteil und in der angegebenen Literatur beschrieben war. Da d4TTP in Acetonitril und Methanol nicht löslich ist, konnte es im Überstand nicht detektiert werden. Deshalb wurde die Suspension aus gefällten Proteinen und den Hydrolyseprodukten vor dem Zentrifugieren und Filtrieren mit Ultraschall behandelt, was jedoch nicht zu einer verbesserten Löslichkeit des Triphosphats im Überstand führte. Zur Detektion von d4TTP musste nach weiteren Alternativen gesucht werden. Da man davon ausgehen konnte, dass das d4TTP aufgrund seiner schlechten Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln nicht detektiert wurde, wurden wässrige Reagenzien zur Proteinfällung untersucht. Die Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA) bzw. mit einer Ammoniumsulfatlösung kamen somit als Alternative in Frage. Leider wurde nach Fällung mit TCA die Zersetzung von d4TTP registriert, was auf den stark sauren pH-Wert zurückzuführen ist. Die Fällung der Proteine durch Zugabe einer Ammoniumsulfatlösung verlief nicht quantitativ und führte zur Zersetzung des Nucleosidtriphosphats. Von *P. Chomczynski* und *N. Sacchi* wurde 1987 eine Methode zur gezielten Trennung von DNA, RNA und Proteinen vorgestellt, die seitdem vielfach eingesetzt wurde. Sie verwendeten eine Mischung aus Chloroform, Isoamylalkohol, Guanidiniumthiocyanat und eine gepufferte Phenollösung. Aufgrund unterschiedlicher Löslichkeiten befinden sich die Proteine in der organischen Phase und die getrennten Nucleinsäuren (DNA und RNA) in der wässrigen Phase bzw. in der Interphase.^{177,179} Das Verfahren von *P. Chomczynski* und *N. Sacchi* ist auf eine sehr frühe Methode von *K. Kirby* zurückzuführen, der mittels einer zwei-Phasen-Phenol/Wasser-Mischung RNA aus Proteinen isolieren konnte.¹⁸⁰ *Noack et al.* gelang es nach einem Protokoll von *Gellerich et al.* Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺), Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP⁺), deren protonierte Formen (NADH, NADPH) und Adenosintriphosphat erfolgreich aus „rat liver mitochondria“ zu extrahieren und sie an einer analytischen HPLC nachzuweisen.^{175,176} *Noack et al.* verwendeten eine Mischung aus Chloroform, Isoamylalkohol und einer gepufferten Phenollösung. Nach der Extraktion war es ihnen durch einen weiteren Extraktionsschritt mit Diethylether gelungen, das Phenol aus dem Analyten (wässrige Phase) zu entfernen. Nach dieser Methode wurden einige erfolglose Versuche unternommen. Es gelang nicht, das Phenol in ausreichender Menge aus dem wässrigen Überstand zu entfernen. Das anwesende Phenol absorbierte während der HPLC Analyse zu stark, so dass übrige Signale nicht aufgelöst werden konnten. Aufgrund der unterschiedlichen Extraktionsschritte wurde zudem die verlässliche Umsetzbarkeit dieser Methode in Bezug auf die hier verfolgten Anforderungen angezweifelt und nicht weiter

verfolgt. Allerdings kann weiteres Optimieren der unterschiedlichen Versuchsprotokolle und Anpassen der HPLC-Methoden zum Erfolg führen.

Es wurde gezeigt, dass aus BIB-d4TTP **125** sowohl durch chemische als auch durch enzymatische Hydrolyse das Hydrolyseintermediat freigesetzt **137** wird. Die enzymatische Aktivierung des BIB-d4TTP Prodrugs lief viel schneller ab als die entsprechende chemische Hydrolyse. Dieses Ergebnis zeigte sich bei allen Hydrolysen in den untersuchten biologischen Medien. Sicher ist außerdem, dass aus dem Hydrolyseintermediat über eine chemische Hydrolyse d4TTP freigesetzt wird. Ein Nucleosidtriphosphat konnte nach dem BAB-Konzept erfolgreich bioreversibel maskiert werden. Die ermittelten Halbwertszeiten im RPMI/FCS Kulturmedium und aus der CEM/0 Zellextrakthydrolyse werden bei der Interpretation der antiviralen Daten von Nutzen sein. Schwierigkeiten gab es bei der Detektion des freiwerdenden d4TTPs nach Hydrolyse in biologischen Medien. Diese konnten auf die unzureichende Löslichkeit von d4TTP in organischen Lösungsmitteln zurückgeführt werden. Alternative Methoden zur Probenbereitung, bei denen die störenden Proteine in die organische Phase gedrängt werden und der wässrige Überstand analysiert werden kann, wurden deshalb untersucht. Sie führten jedoch nicht zum Erfolg, so dass an dieser Stelle Bedarf für weitere Optimierungen bestehen blieb.

4.6.3 Antivirale Eigenschaften und Cytotoxizität von BIB-d4TTP

Wie auch die BAB-d4T-Diphosphate wurde BAB-d4T-Triphosphat **125** auf seine antivirale Aktivität gegenüber HIV-1 und HIV-2 untersucht. Es wurde erwartet, dass diese Verbindung aufgrund der freien Ladungen an der Phosphatbrücke zu polar sei, um die Zellmembran zu passieren. Ein ähnliches Ergebnis war bereits bei *t*Bu-BAB-d4TDP **26** und den verzweigt-modifizierten BAB-AZTDPs **20,21** diskutiert worden (S.20 und S.143). Die Verbindung **125** zeigte in der TK-defizienten Zelllinie eine deutliche Aktivität gegenüber HIV-2, die im Vergleich mit den Diphosphat Prodrugs **23,26** sogar um das 1.5 bis 2.3-fache besser war. Gegenüber der Referenzverbindung wurde die Aktivität um das 19-fache gesteigert. Diese gute TK⁻-Aktivität deutete stark daraufhin, dass **125** die Zellmembran passieren konnte und d4TTP intrazellulär freisetzte. Wenn nicht d4TTP direkt freigesetzt wurde, dann zumindest d4TMP oder d4TDP. Außerdem besaß BIB-d4TTP **125** nur eine geringe Cytotoxizität, die ebenfalls auf das Eindringen der Verbindung in die Zelle hindeutete. Diese Daten belegen, dass das BAB-Prodrug Konzept erfolgreich zum Design eines potentiellen Nucleosidtriphosphat Prodrugs verwendet werden kann.

Verbindung	EC ₅₀ ^a [μM]			CC ₅₀ ^b [μM]
	CEM/0		CEM/TK	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
BAB-d4TDP ^c 23	1.05 ± 0.92	1.5 ± 0.7	21.0 ± 5.7	>125
BPB-d4TDP ^c 26	0.78 ± 0.80	0.90 ± 0.16	14 ± 5	66 ± 1.4
BIB-d4TTP 125	0.37 ± 0.23	1.1 ± 0.071	9.2 ± 3.3	100 ± 7.1
d4T	0.21 ± 0.057	0.56 ± 0.16	172 ± 67	>250

^a: effektive Konzentration od. benötigte Konzentration, um 50% der CEM Zellen vor der Cytopathogonie des HIV zu schützen; ^b: cytotoxische Konzentration od. benötigte Konzentration zur Reduktion der Lebensfähigkeit von 50% der CEM Zellen; ^c: Ammoniumsalz.

Tabelle 10: Antivirale Wirksamkeit von BIB-d4TTP **125** und von BAB-d4TDP **23**, BPB-d4TDP **26** zum Vergleich⁷⁰

4.7 Charakterisierung von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-Nucleosiddiphosphaten

4.7.1 Hydrolysestudien

In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse der Hydrolysestudien weiterer Nucleosiddiphosphat Prodrugs gemeinsam diskutiert werden, da sie alle als Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-NDP Prodrugs synthetisiert wurden. Die Nucleosidanaloga 2'-Fluor-2'-methyluridins, D-*carba*-dT und BVdU wurden an der 3'-O-Position mit der *iso*-Butyrylgruppe während der Synthese zu den BIB-NDPs funktionalisiert. Da diese Gruppe sowohl einer chemischen als auch einer enzymatischen Hydrolyse unterliegen sollte, wurde sie nach der Synthese des entsprechenden Prodrugs nicht entfernt. Die Abspaltung dieser Gruppe während der Hydrolysen führte natürlich zu einer erhöhten Anzahl an möglichen Zwischen- bzw. Endprodukten. Diese Verbindungen und mögliche Hydrolysewege zu ihnen sind in Abb. 115 beispielhaft für BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** skizziert. Zur genauen Zuordnung der Abbauprodukte des jeweiligen Prodrugs wurden in diesen Fällen nicht die Referenzverbindungen synthetisiert. Zum einen waren die Hydrolysewege aus den Untersuchungen zu den BAB-d4TDPs bekannt und zum anderen wurde davon ausgegangen, dass die Prodrugs ein entsprechendes Nucleosiddiphosphat (mit 3'-OH oder 3'-O-*i*Bu) freisetzen würden. Die Synthese sämtlicher Referenzverbindungen hätte zudem einen erheblichen synthetischen Aufwand bedeutet, der nicht im Verhältnis zu seinem

Nutzen gestanden hätte. Sollte eine der hier untersuchten Verbindungen zu einer deutlichen Verbesserung der antiviralen Aktivität gegenüber dem Elternnucleosid führen, müsste dies nachgeholt werden, bzw. die Abbauprodukte der Hydrolyse gezielt per HPLC/MS untersucht werden.

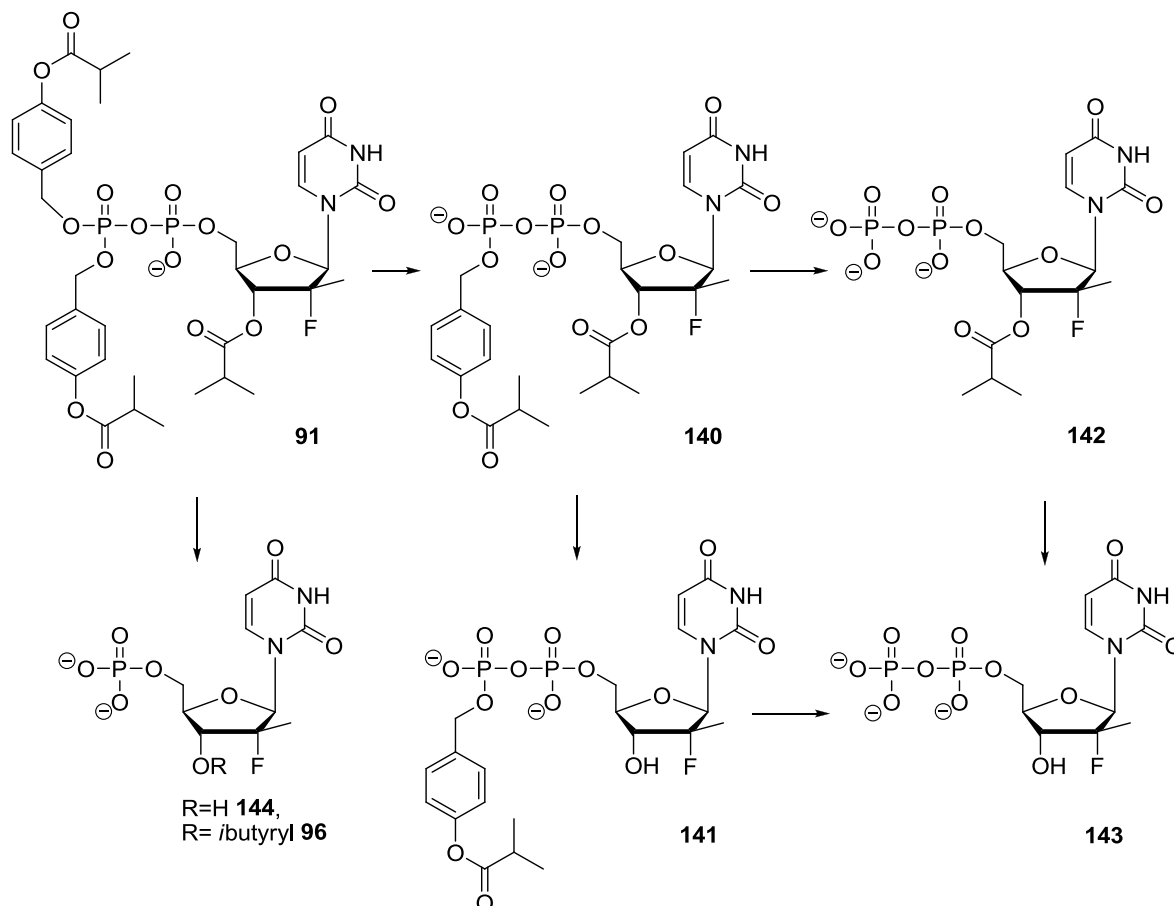


Abb. 115: Mögliche Hydrolysewege von BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** und Hydrolyseprodukte

Die Möglichkeit des LC/MS Monitorings der Hydrolysen stand zum Zeitpunkt ihrer Durchführung am Institut nicht zur Verfügung.

Hydrolyseuntersuchungen von BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91**

Die Verbindung BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** wurde chemisch in Phosphatpuffer bei pH-Werten von 6.8 und 7.3 hydrolysiert. In beiden Fällen war die Bildung eines Hydrolyseintermediats dominant, welches im weiteren Verlauf wahrscheinlich 2'-Fluor-2'-methyluridindiphosphat mit und ohne 3'-O-Schutzgruppe **142,143** freisetzte. In Abb. 116 sind die Hydrolysechromatogramme von **91** gezeigt. Im hinteren Chromatogramm war neben **91** auch das 3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-Ump **97** zu erkennen, was sich rasch durch den Bruch der Pyrophosphateinheit gebildet hatte. Es hydrolysierte sehr wahrscheinlich zum

ungeschützten Monophosphat **144**. Der Peak bei $R_t = 9.6$ min wurde dem geschützten 2'-Fluor-2'-methyl-UDP **142** zugeordnet (Abb. 117). Bei den Hydrolyseuntersuchungen von 3'-O-*i*-Bu-2'-F-2'-Me-UMP **97** war eine sehr hohe Stabilität der 3'-O-*iso*-Butyrylgruppe festgestellt worden. Es konnte keine genaue Halbwertszeit bestimmt werden, aber die Menge an **97** blieb über den untersuchten Zeitraum (37 Tage) nahezu konstant. Deswegen wird davon ausgegangen, dass dies auch für die Stabilität der Schutzgruppe in den Molekülen 3'-O-*i*-Bu-2'-F-2'-Me-UDP **142** und 3'-O-*i*-Bu-AB-Intermediat **140** zutreffend ist. Dem Signal bei $R_t = 9$ min wurde das 3'-O-geschützte Monophosphat **97** eindeutig über die Retentionszeit der Referenzverbindung **97** zugeordnet.

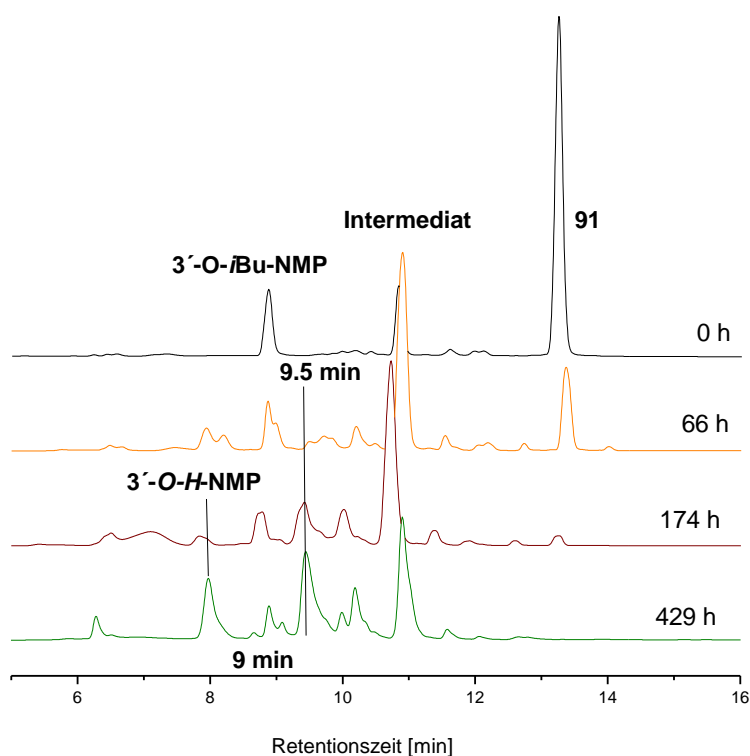


Abb. 116: Hydrolyseverlauf von BIB-3'-O-*i*-Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** bei pH 7.3

Aus den Chromatogrammen der Hydrolysen konnten die erste und zweite Halbwertszeit für BIB-3'-O-*i*-Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** bei pH 6.8 und 7.3 berechnet werden. Die fehlerfreien Verlaufskurven der Zu- und Abnahme des Intermediats **140** (nicht gezeigt), waren ein weiterer Hinweis auf die Stabilität des 3'-O-*iso*-Butyrylesters an **140**.

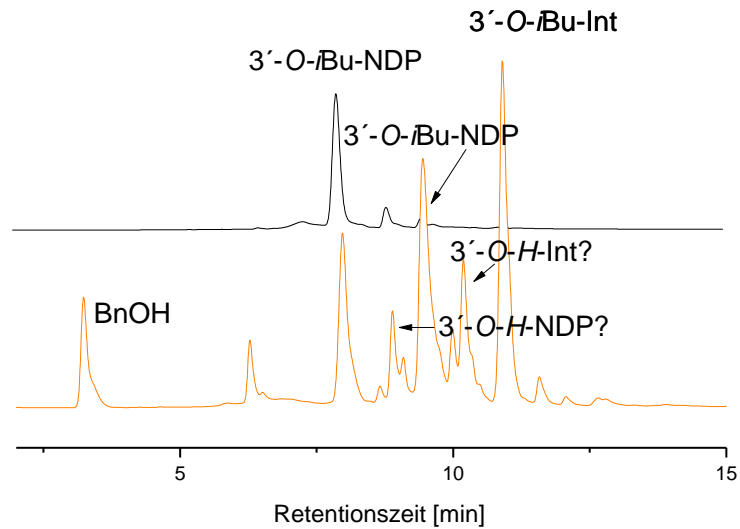


Abb. 117: Chromatogramm nach 429 h und Referenzlauf von 3'-O-iBu-2'-F-2'-Me-UMP **97** (hinten)

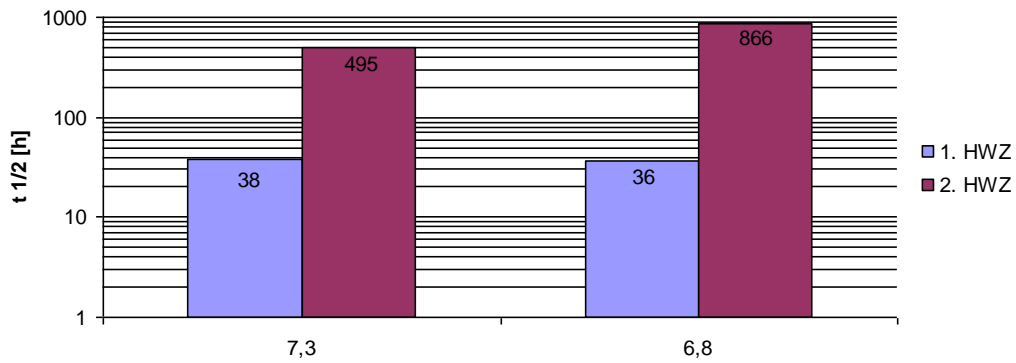


Diagramm 21: Erste und zweite Halbwertszeit von BIB-3'-O-iBu-2'-F-2'-Me-UDP **91** (chemische Hydrolyse, logarithmische Skalierung)

Wie bei den BAB-d4TDP Prodrugs lag die zweite Halbwertszeit um ein vielfaches höher als die erste, was ein Hinweis darauf ist, dass die 3'-O-Schutzgruppe am Intermediat **140** stabil war. Eine schnelle Verseifung der *iso*-Butyrylgruppe des Intermediats **140** hätte zu einer Erniedrigung der zweiten Halbwertszeit führen müssen. Mit Halbwertszeiten von 36-38 h lag die Stabilität von **91** in dem erwarteten Bereich. Wie die Hydrolyseintermediate IB-AZTDP und PB-d4TDP **128** (S.140f) besaß das Intermediat von BIB-3'-O-iBu-2'-F-2'-Me-UDP **91** ebenfalls eine sehr hohe Stabilitäten bei pH 7.3 und bei 6.8. Sie nimmt mit der Verzweigung des Acylrestes stärker zu als mit Homologisierung der Alkylkette. Die zweite Halbwertszeit bei pH 6.8 war fast doppelt so hoch wie jene bei pH 7.3.

Die Beschleunigung der Hydrolyse durch die Anwesenheit von esterspaltenden Enzymen wurde bei Studien in Zellextrakten (HepG2, CEM/0) und in Phosphatpuffer mit Zusätzen von 20% humanem Serum bzw. 10% fötalem Kälberserum beobachtet (Diagramm 22).

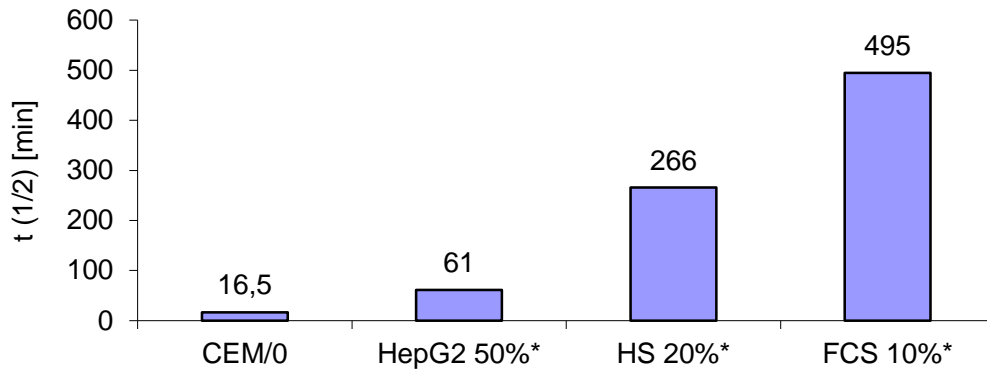


Diagramm 22: Hydrolysehalbwertszeiten von BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** in unterschiedlichen Medien; *% in PBS Puffer mit pH 6.8

Die Hydrolyse in CEM/0 Zellextrakten lief schneller ab als die im Leberzellextrakt. Die rasche Hydrolyse von **91** im HepG2 Extrakt ist äußerst positiv zu bewerten, da dies zu einer schnellen Freisetzung des Nucleosiddiphosphats am Wirkort führen würde. **91** wurde als potentielles anti-HCV Prodrug konzipiert und sollte somit in der Leber NDP freisetzen (vergl. 4.1.5). Die Stabilität der Verbindung in 20%igem Blutplasma lag mit achteinhalb Stunden in einem für Prodrugs akzeptablen Rahmen. Die enzymatische Hydrolyse von **91** lief vorwiegend über ein Zwischenprodukt ab, was aus den HPLC Chromatogrammen ersichtlich war und in Diagramm 23 graphisch dargestellt ist.

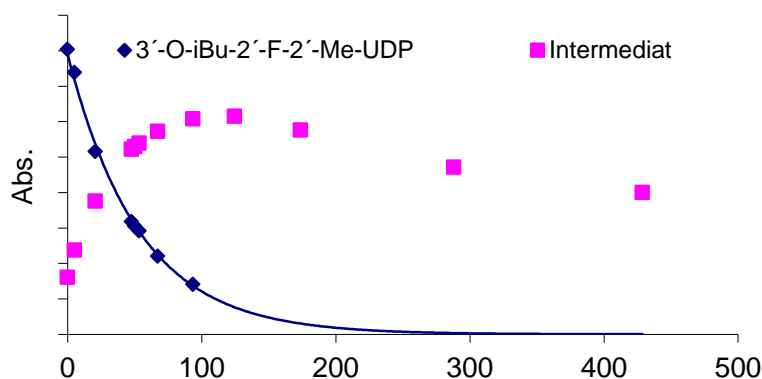


Diagramm 23: Hydrolyseverlauf von BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** und Intermediat **140** in HepG2 Zellextrakt

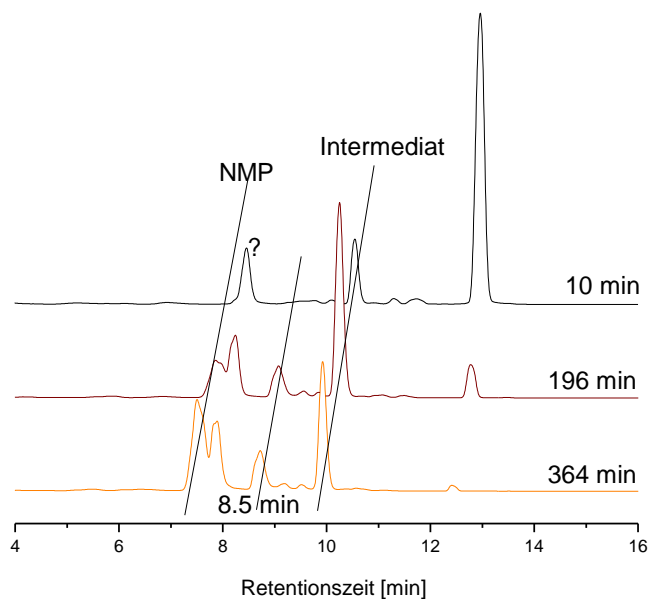


Abb. 118: Enzymatische Hydrolyse von BIB-3'-O-*iso*-Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** in HepG2

Hierbei handelte es sich sehr wahrscheinlich um das 3'-O-*iso*-Bu-funktionalisierte Intermediat **140**. Die Halbwertszeit des Zwischenproduktes **140** konnte aufgrund der kurzen Hydrolysezeit und der parallelen Anwesenheit von **91** nicht ermittelt werden (Diagramm 23). Bei diesen Hydrolyseexperimenten blieben die HPLC Chromatogramme übersichtlicher als bei der chemischen Hydrolyse. Dies wurde auf die kürzere Hydrolysedauer und die relative Stabilität der 3'-O-*iso*-Butyrylgruppe zurückgeführt. Aufgrund der fehlenden Referenzverbindung konnte die Bildung von 2'-Fluor-2'-methyl-3'-O-*iso*-butyryl-UDP **142** bzw. 2'-Fluor-2'-methyl-3'-OH-UDP **143** nicht direkt bewiesen werden. Urteilt man nach Erfahrung und den Chromatogrammen in Abb. 118, so ist die Freisetzung des Diphosphats **142** sehr wahrscheinlich. Nach 196 min hatte sich die Menge an BIB-3'-O-*iso*-Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** merklich reduziert und sich das Intermediat **140** gebildet. Die Bildung eines weiteren Produktes mit einer Retentionszeit von ca. 8.5 min, sehr wahrscheinlich 2'-Fluor-2'-methyl-3'-O-*iso*-bu-UDP **142**, war außerdem gut zu erkennen. Das Integral dieses Signals blieb während der Hydrolyse annähernd konstant, was auf eine stetige Bildung gefolgt von einem Abbau z.B. zum Monophosphat oder zum 2'-Fluor-2'-methyl-3'-OH-UDP **143** zurückgeführt wurde. Es hatte sich noch eine weitere Verbindung gebildet die bei ca. 7.3 min eluierte, vermutlich 2'-Fluor-2'-methyl-3'-O-*iso*-butyryl-UMP **97** oder 2'-Fluor-2'-methyl-3'-hydroxy-UMP **144**. Wie zu erkennen ist, nahm die Intensität dieses Signals während der Hydrolyse zu. Gegebenenfalls bildete sich das NMP aus dem entstandenen Diphosphat (s.o.). Das mit einem Fragezeichen markierte Signal konnte keiner Verbindung zugeordnet werden. Seine Intensität blieb während der Hydrolyse nahezu konstant.

Vermutlich handelte es sich um 2'-Fluor-2'-methyl-3'-O-iso-butyryl-UMP **97**, was ein Vergleich der Retentionszeiten ergab.

BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** hydrolysierte sowohl unter chemischer als auch unter enzymatischer Aktivierung über ein Intermediat (sehr wahrscheinlich mit 3'-O-Schutzgruppe **140**) und setzte phosphorylierte Verbindungen frei. Aus den Hydrolysen der BAB-d4TDPs ist bekannt, dass aus dem Intermediat unter chemischer Hydrolyse ausschließlich das Diphosphat freigesetzt wird, was auch für **91** angenommen werden kann. Die Chromatogramme der enzymatischen Spaltung im HepG2 Zellextrakt ließen Rückschlüsse auf die Freisetzung der 3'-O-funktionalisierten oder -unfunktionalisierten 2'-Fluor-2'-methyl-Uridindi- bzw. -monophosphate zu.

*Hydrolyseuntersuchungen von Bis-(4-iso-butyryloxybenzyl)-3'-O-iso-butyryl-D-carba-dTDP **88** und von 3'-O-iso-butyryl-D-carba-dTMP **85***

Wie in Kapitel 4.1.4 gezeigt wurde, war die Synthese von Bis-(4-iso-butyryloxybenzyl)-3'-O-iso-butyryl-D-carba-dTDP **88** (BIB-3'-O-*i*Bu-*carba*-dTDP) gelungen. Um die Stabilität der 3'-O-iso-butyryl-Gruppe abschätzen zu können wurde 3'-O-iso-butyryl-*carba*-dTMP **85** hydrolysiert. Beide Verbindungen wurden sowohl chemisch als auch enzymatisch hydrolysiert. Die Halbwertszeit von BIB-3'-O-*i*Bu-*carba*-dTDP **88** bei pH 7.3 lag in etwa doppelt so hoch wie die von BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91**, während sich die beiden Halbwertszeiten bei einem pH-Wert von 6.8 sehr ähnelten. Eine plausible Erklärung konnte hierfür nicht gefunden werden. Aus den Halbwertszeiten der chemischen Hydrolysen von 3'-O-iso-butyryl-*carba*-dTMP **85** wurde die hohe Stabilität der 3'-O-Schutzgruppe offensichtlich, die auch im CEM/0 Zellextrakt mit fast neun Stunden eine hohe Halbwertszeit besaß. Unter enzymatischem Einfluss kam es zu einer deutlichen Verringerung der Halbwertszeit von BIB-3'-O-*i*Bu-*carba*-dTDP **88** auf ca. 10 min. Die intrazelluläre Freisetzung von *carba*-dT Diphosphat aus diesem Prodrug ist möglich.

Aufgrund vieler unterschiedlicher Produkte konnte weder die Bildung des Diphosphats noch die des Monophosphats während der chemischen bzw. enzymatischen Hydrolyse nachweislich beobachtet werden. Da die Hydrolyse von BIB-3'-O-*i*Bu-*carba*-dTDP **88** mechanistisch wie die von BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** ablaufen sollte, kann davon ausgegangen werden, dass das NDP freigesetzt wurde. Zumindest sollte das Monophosphat durch konkurrierende Anhydridspaltung freigesetzt worden sein.

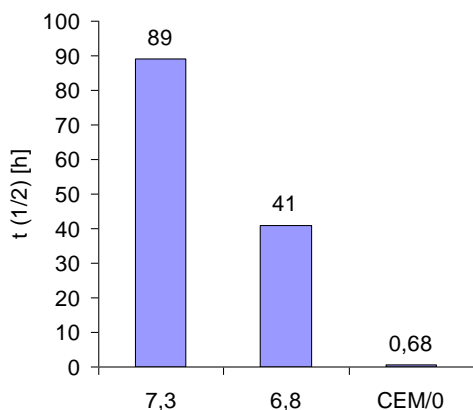


Diagramm 24: Hydrolyseprofil des *carba*-dTDP Prodrugs **88**

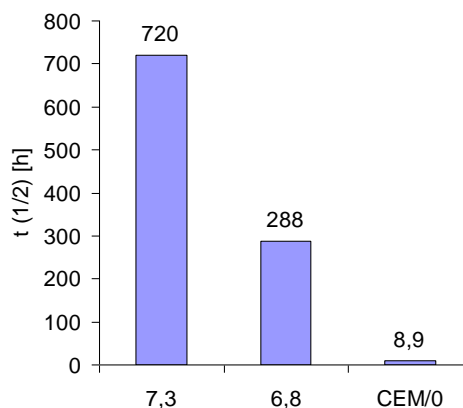


Diagramm 25: Hydrolyseprofil des Monophosphats **85**

Hydrolyseuntersuchungen von Bis-(4-iso-butyryloxybenzyl)-3'-O-iso-butyryl-BVdUDP 71

Die enzymatischen Hydrolysen von **71** wurden in RPMI Kulturmedium mit Zusatz von 10% FCS, in 50%igem humanem Serum und in P3HR1 Zellextrakt durchgeführt. P3HR1 Zelllinien werden zur Vermehrung des Epstein-Barr Virus verwendet und finden Anwendung bei antiviralen Studien über Herpes Simplex Viren.^{181,182} Für das BIB-BVdUDP Prodrug **71** wurde eine Halbwertszeit von ca. 60 h errechnet. Sie liegt damit zwischen denen von BIB-3'-O-*i*Bu-*carba*-dTDP **88** (89 h) und BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** (38 h).

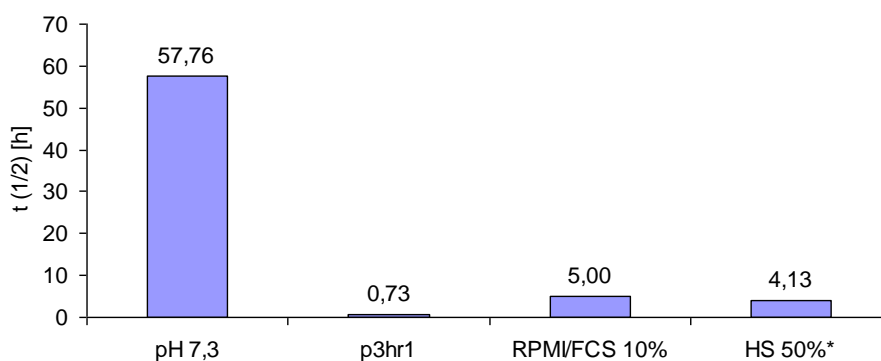


Diagramm 26: Hydrolyseprofil von BIB-3'-O-*i*Bu-BVdUDP **71**

Mit Halbwertszeiten von fünf Stunden im RPMI/FCS-Medium und ca. vier Stunden im verdünnten Plasma entsprachen sie etwa denen von **88** und **91**. Es kam zu einer raschen Hydrolyse von BIB-3'-O-*i*Bu-BVdUDP **71** im Zellextrakt (Diagramm 26)

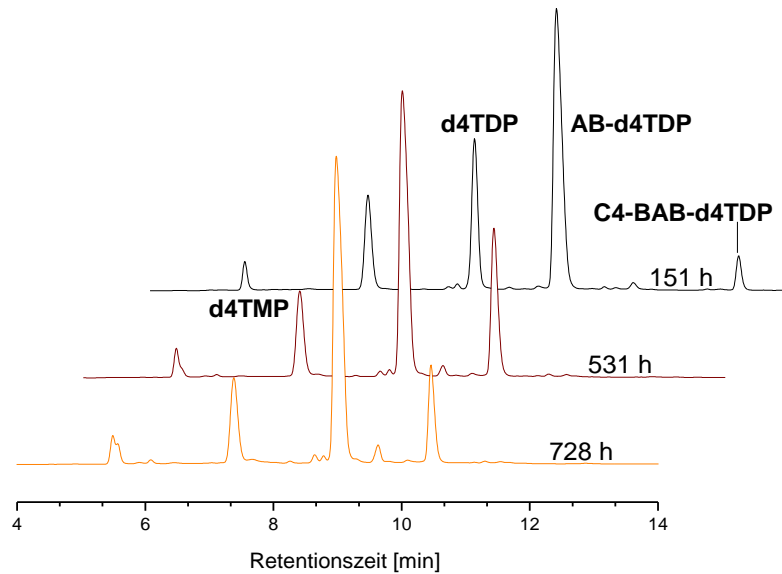


Abb. 119: Hydrolyseverlauf von C4-BAB-d4TDP **27** bei pH 7.3 zum Vergleich mit der P3HR1-Hydrolyse von BIB-3'-O-*t*-Bu-BVdUDP **71**

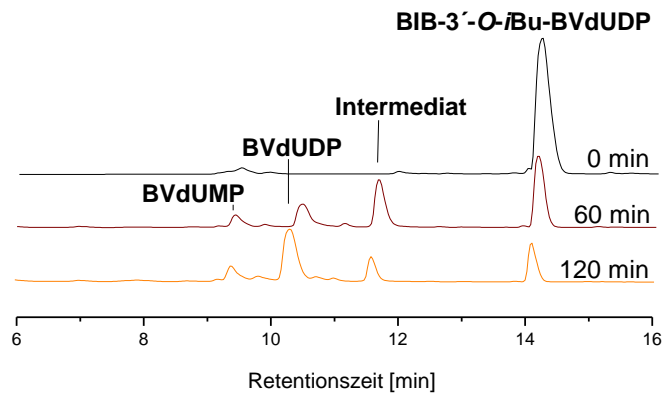


Abb. 120: Chromatogramme der Hydrolyse von BIB-3'-O-*t*-Bu-BVdUDP **71** in P3HR1 Zellextrakt

Bei der Interpretation der Hydrolyse im P3HR1 Zellextrakt fiel die Ähnlichkeit zum Hydrolyseverlauf von C4-BAB-d4TDP **27** in Phosphatpuffer auf (Abb. 119). Bei dieser Hydrolyse konnten alle auftretenden Signale den entsprechenden Verbindungen zugeordnet werden. Die Signale der Hydrolyse von **71** in Abb. 120 konnten so zugeordnet werden (Annahme: gleicher Hydrolysemechanismus). Aus dem BVdUDP-Prodrug **71** hatten sich, vermutlich mit 3'-O-Ester, nach 60 min das IB-Intermediat **145**, BVdUDP **147** (R_t ca. 10 min) und das BVdUMP **70** (R_t ca. 9 min) gebildet. Unter Abnahme des Prodrugs **71** und des Intermediats **145** nahm die Signalintensität des BVdUDPs **147** zu (Abb. 120, Abb. 121). Möglicherweise konnte BVdUMP aufgrund der enzymatischen Aktivität nicht gut akkumulieren. Dessen Menge blieb nahezu konstant. Wie gezeigt wurde, bildet sich bei einer rein chemischen Hydrolyse das entsprechende NMP durch Spaltung der

Anhydridbindung (vergl. Diagramm 2). Es kann so lange NMP freigesetzt werden, wie Prodrug vorhanden ist (vergl. Abb. 119). Demnach hätte die Menge an BVdUMP **70** bis zur Hydrolyse von 120 min zunehmen können. Allerdings kann die Menge an BVdUMP **70** zeitgleich durch eine Defunktionalisierung der 3'-O-Position reduziert worden sein.

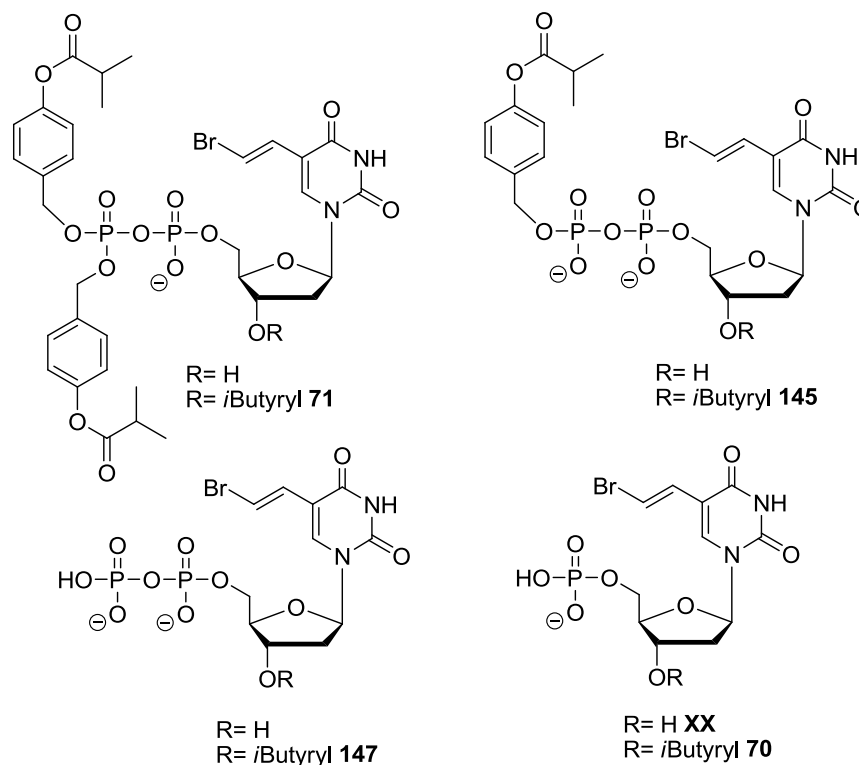


Abb. 121: Mögliche Hydrolyseprodukte von BIB-3'-O-*i*Bu-BVdUDP **71**

Diese Analyse hat gezeigt, dass BIB-3'-O-*i*Bu-BVdUDP **71** über eine enzymatische Aktivierung sehr wahrscheinlich BVdUDP **147** und BVdUMP **70** freisetzt. Auch diese Verbindung wird als Prodrug aktiv sein.

*Hydrolyseuntersuchungen von Bis-(4-iso-butyryloxybenzyl)-2'-methyl-UDP **92***

Bei der Synthese von BIB-2'-Me-UDP **92** wurden die 2',3'-Hydroxygruppen der Riboseeinheit nicht funktionalisiert. Die Gründe dafür wurden unter Kapitel 4.1.5.2 erläutert. Bei ersten HPLC Experimenten zeigte sich, dass die Reinheit von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-UDP **103** für genaue Studien nicht ausreichend war, da ein Nebenprodukt mit fast gleicher Retentionszeit eluierte. Die Hydrolyse von **103** hätte einige Vorteile mit sich gebracht: Erstens ist **103** ein fast identisches Analogon von **92** und zweitens sind die Hydrolyseprodukte 5'-O-Uridinmonophosphat (UMP) und 5'-O-Uridindiphosphat (UDP) kommerziell erhältlich bzw. über verwendete Synthesemethoden gut zugänglich (Abb. 62,

Abb. 9, Abb. 74). Eine Zuordnung der Hydrolyseprodukte von BIB-2'-Me-UDP **92** wäre dadurch sehr vereinfacht worden. Die chemische Hydrolyse von **92** ergab eine Halbwertszeit von ca. 24 h. Aus der Reihe der Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-maskierten NDPs besaß BIB-2'-Me-UDP **92** somit die geringste Stabilität. Es bildete sich während der Hydrolyse eine erhebliche Anzahl an Nebenprodukten, so dass die Abnahme des Intermediats und die Bildung von 2'-Methyl-Uridindiphosphat nicht verfolgt werden konnte. Es konnte nicht geklärt werden, ob die Vielzahl an gebildeten Hydrolyseprodukten von BIB-2'-Me-UDP oder von einer Verunreinigung, die gemeinsam mit **92** eluierte, stammten. Während der enzymatischen Hydrolyse (50% HepG2 Zellextrakt in PBS Puffer, pH-Wert 6.8) wurde eine saubere Abnahme von BIB-2'-Me-UDP **92** beobachtet und die Halbwertszeit zu 9 min berechnet. Bei dieser Hydrolyse wurden nur wenige Hydrolyseprodukte gebildet, die nicht zugeordnet werden konnten. Aufgrund der fehlenden Referenzverbindungen, konnte der Hydrolysemechanismus dieses 2'-Me-Uridindiphosphat Prodrugs nicht aufgeklärt werden.

Die Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-maskierten NDPs **71,88,91** und **92** wurden in unterschiedlichen Medien hydrolysiert und ihr chemischer und enzymatischer Abbau untersucht. Während der unterschiedlichen Hydrolysen von BIB-3'-*O*-*i*Bu-BVdUDP **71**, BIB-3'-*O*-*i*Bu-D-*carba*-dTDP **88** und BIB-3'-*O*-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** wurde die Bildung verschiedener Hydrolyseprodukte beobachtet, die auf die Spaltung des 3'-*O*-*iso*-Butyrylesters zurückgeführt wurde. Theoretisch können BAB-NDP, AB-NDP, NDP und NMP mit und ohne Schutzgruppe im Hydrolysat vorliegen. Durch die genaue Auswertung der HPLC Chromatogramme, Bestimmung der Stabilitäten der NMP 3'-*O*-*i*Bu-*carba*-dTMP **85** und 3'-*O*-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UMP und Vergleiche mit den zuvor erarbeiteten Daten wurde dennoch gezeigt, dass die Verbindungen **71,88** und **91** über den bekannten Mechanismus hydrolysieren und für die Freisetzung der Nucleosiddiphosphate geeignet sind.

4.7.2 Antivirale Eigenschaften von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-*O*-*iso*-butyryl-BVdUDP

Die Verbindung Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-*O*-*iso*-butyryl-BVdUDP **71** wurde auf seine antiviralen Eigenschaften gegenüber HIV-1 und HIV-2 untersucht. Die Daten zu Messungen gegenüber HSV-1 und EBV lagen bei Abgabe dieser Dissertation nicht vor. Wie unter 4.1.3 bereits ausführlicher erläutert wurde, gehört BVdU zu den selektiven antiviralen Verbindungen, da BVdU durch virale Kinasen zum Diphosphat anabolisiert wird und abschließend durch die zelleigene NDP-Kinase in das wirksame Triphosphat überführt wird.

Was wiederum im Umkehrschluss bedeutet, dass in Zellen, die nicht von HSV infiziert sind, BVdUDP und somit BVdU-Triphosphat (BVdUTP) nicht entstehen können. Für BIB-BVdUDP **71** wurde eine antivirale Aktivität gegenüber HIV-1 und HIV-2 sowohl im CEM-Wildtyp als auch in der TK-defizienten Zelllinie ermittelt. Bei BIB-AZTDP **20** konnte kein vollständiger TK-Bypass festgestellt werden, was auf eine fehlende Lipophilie zurückgeführt wurde. Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-*O*-*iso*-butyryl-BVdUDP **71** wurde synthetisiert, bevor die antiviralen Daten zu BIB-AZTDP **20** vorlagen.

	EC ₅₀ ^a [μM]		CC ₅₀ ^b [μM]	
	CEM/0	CEM/TK	CEM/0	
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
BIB-AZTDP ^{c,d} 20	0.062 ± 0.077	0.039 ± 0.036	35.0 ± 21.2	77 ± 12
BIB-BVdUDP 71	50 ± 0.0	38 ± 11	39 ± 11	102 ± 0.0
AZT	0.024 ± 0.0	0.024 ± 0.013	>250	>250
BVdU ^c	>250	>250	>250	>250

^a: effektive Konzentration od. benötigte Konzentration, um 50% der CEM Zellen vor der Cytopathogonie des HIV zu schützen; ^b: cytotoxische Konzentration od. benötigte Konzentration zur Reduktion der Lebensfähigkeit von 50% der CEM Zellen; ^c: aus Dissertation *H. Jessen*⁷⁰; ^d: Ammoniumsalz.

Tabelle 11: Antivirale Aktivität von BIB-3'-*O*-*iso*-butyryl-BVdUDP **71**

Nachdem die Hydrolyseeigenschaften der BAB-d4TDP Prodrugs **26-34** ausführlich untersucht wurden, sollte in zukünftigen Arbeiten C9-BAB-BVdUDP oder auch C11-BAB-BVdUDP synthetisiert werden. Diese BAB-BVdUDP Prodrugs sollten hinreichend lipophil sein, um die Zellmembran zu passieren. Eine antivirale Aktivität dieser Verbindungen würde beweisen, dass BVdU-Diphosphat intrazellulär freigesetzt wird. BVdU würde in einem solchen Fall indirekt als Sonde dienen. Dies wäre ein bedeutendes Beispiel für die Erweiterung des antiviralen Aktivitätsspektrums einer Verbindung durch die Verwendung eines Prodrug-Systems. Eine gegenüber HIV inaktive Verbindung würde zu einem anti-HIV Wirkstoff werden.

4.8 Zusammenfassung der Hydrolyseuntersuchungen

Das Hydrolyseverhalten der lipophilen BAB-d4TDP Prodrugs **26-34** wurde mittels ^{31}P -NMR Studien und HPLC Untersuchungen in wässrigen Phosphatpuffern detailliert aufgeklärt. Es wurde gezeigt, dass *t*Bu-, C4-, C6-, C7- und C9-BAB-d4TDP **26-30** über die monomaskierten AB-Intermediate **36,128-131** zum d4TDP hydrolysieren. Für die Bildungsgeschwindigkeit von d4TDP sind die Stabilitäten des Prodrugs sowie des Intermediats entscheidend (erste und zweite Hydrolysehalbwertszeit). Durch die Bestimmung dieser Halbwertszeiten wurde festgestellt, dass die AB-Intermediate eine größere Stabilität besitzen (S. 122,125). Bei der Hydrolyse der längerkettigen Derivate C11-, C13-, C15- und 8Z-C17-BAB-d4TDP **31-34** wurde die Bildung des Hydrolyseintermediats nur in einem sehr untergeordneten Maß beobachtet. Grundsätzlich nahm die Stabilität der BAB-d4TDP Prodrugs **26-34** mit wachsender Kettenlänge des Acylrestes zu, was sowohl für die Prodrugs **26-34** als auch für die AB-Intermediate **128-131** gilt. Mit zunehmender Stabilität nimmt die freigesetzte Menge von d4TDP, aufgrund einer konkurrierenden Spaltung der Phosphorsäureanhydridbindung, ab. Allerdings setzten alle untersuchten Prodrugs mehr d4TDP als d4TMP frei (S. 115ff). Bei der Hydrolyse von CEO-C9-AB-d4TDP **37** konnte eine rasche Eliminierung der Cyanethoxygruppe beobachtet werden ($t_{1/2} = 11$ h), während die Halbwertszeit für das Intermediat 277 h beträgt (S. 122). Durch Inkubation der einzelnen Prodrugs in biologischen Medien wurde nachgewiesen, dass die Hydrolyse unter enzymatischer Aktivierung um ein Vielfaches beschleunigt wird. Beispielsweise wurde die Hydrolysehalbwertszeit von C6-BAB-d4TDP im CEM/0 Zellextrakt um das zehnfache und die von C11-BAB-d4TDP um das 25-fache reduziert (S. 133). Während dieser Hydrolysen wurde ebenfalls die Freisetzung von d4TDP nachgewiesen. Die freigesetzten Mengen an d4TDP konnten bei diesen Experimenten aufgrund der Enzymaktivität und methodischer Schwierigkeiten nicht quantifiziert werden. Weitere Stabilitätsuntersuchungen wurden in humanem Serum und in RPMI/FCS-Kulturmedium durchgeführt (S. 134f). Hinsichtlich einer Struktur-Aktivitäts-Beziehung wurde festgestellt, dass die Stabilitäten der fettsäuremodifizierten BAB-d4TDPs **26-34** in allen Medien mit länger werdendem Alkylrest zunehmen. Die Cyanethoxygruppe von CEO-C9-AB-d4TDP **37** wurde enzymatisch katalysiert besonders schnell abgespalten, was sie hinsichtlich eines intrazellulären „lock-in“ Effektes sehr interessant macht (S. 137). Die Ergebnisse der antiviralen Tests bestätigten das entwickelte Konzept. Die Erhöhung der Lipophilie der BAB-d4TDP Prodrugs führt zu einer Verbesserung der antiviralen Aktivität von d4T gegenüber HIV-1 in CEM/0 Zellen und HIV-2 in TK-defizienten CEM Zellen. Ab einer Länge

des Acylrestes $R \geq C_6H_{13}$ wird die negative Ladung des α -Phosphats so weit kompensiert, dass die Verbindungen die Zellmembran passieren können und phosphorylierte Metabolite freigesetzt werden. Mit einem EC_{50} von $0.79 \mu M$ zeigte C9-BAB-AZTDP **66** ebenfalls eine sehr gute Aktivität in der TK-defizienten Zelllinie (S. 144ff).

Die Hydrolyse der 3'-O-*iso*-butyryl-funktionalisierten Verbindungen BIB-3'-O-*i*Bu-BVdUDP **71**, BIB-3'-O-*i*Bu-D-*carba*-dTDP **88** und BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** wurde in verschiedenen Medien untersucht und die Bildung einer Vielzahl von Hydrolyseprodukten beobachtet, was die Analyse der HPLC Chromatogramme erschwerte (S. 165,171). Es konnte dennoch gezeigt werden, dass diese Verbindungen über ein AB-Intermediat hydrolysieren und mit hoher Wahrscheinlichkeit die entsprechenden Nucleosiddiphosphate freisetzen.

Erstmals wurde ein Nucleosidtriphosphat nach dem BAB-Konzept reversibel maskiert. Der Hydrolysemechanismus von BIB-d4TTP **125** konnte mittels ^{31}P -NMR Spektroskopie und HPLC Studien aufgeklärt werden. Es wurde eindeutig nachgewiesen, dass die Hydrolyse dieser Verbindung über ein stabiles AB-Intermediat **137** verläuft und daraus d4TTP freigesetzt wird (S. 152,153ff). Die Halbwertszeiten von BIB-d4TTP **125** und IB-d4TTP **137** wurden bestimmt (S. 155). Die Beschleunigung der Hydrolyse durch eine enzymatische Aktivierung konnte in CEM/0 und HepG2 Zellextrakten sowie in humanem Serum und im RPMI/FCS-Kulturmedium beobachtet werden (S. 157). Im Vergleich zur rein chemischen Hydrolyse bei pH 7.3 wurde die Halbwertszeit von BIB-d4TTP im CEM/0 Zellextrakt um das 160-fache reduziert. Während der Hydrolysen in den biologischen Medien konnte die Bildung des AB-Intermediats, nicht jedoch die Bildung von d4TTP beobachtet werden, was auf eine gemeinsame Fällung von d4TTP mit den Proteinen zurückgeführt wurde (S. 160). Es wird dennoch angenommen, dass auch in den biologischen Medien d4TTP aus IB-d4TTP, zumindest über die chemische Hydrolyse, freigesetzt wird. BIB-d4TTP **125** kann daher als Nucleosidtriphosphat Prodrug bezeichnet werden. Bei den antiviralen Tests wurde eine Aktivität von $9.2 \mu M$ gegen HIV-2 in der TK-defizienten Zelllinie gemessen und die Aktivität von d4T somit um das 19-fache gesteigert. Dieses Ergebnis weist stark darauf hin, dass BIB-d4TTP die Zellmembran passieren konnte und ggf. d4TTP freigesetzt wurde.

5 Zusammenfassung

Nucleosidanaloga spielen eine entscheidende Rolle bei der Behandlung von HIV Infektionen. Um effektiv als nucleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren wirken zu können, müssen sie intrazellulär mehrfach phosphoryliert werden. Die daran beteiligten Enzyme sind substratspezifisch, was bei bestimmten Nucleosidanaloga zu einer verlangsamten Bildung des aktiven Nucleosidtriphosphats führt. Um diese Limitierungen umgehen zu können, wurden in Vorarbeiten Nucleosiddiphosphat Prodrugs synthetisiert.

In dieser Arbeit wurde das Bis-(4-acyloxybenzyl)-NDP Konzept weiterentwickelt, auf verschiedene Nucleosidanaloga übertragen und erstmalig ein Nucleosidtriphosphat reversibel maskiert. Um ein tiefergehendes Verständnis über die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen dieser NDP Prodrugs zu erlangen, wurde eine Reihe von lipophilen BAB-d4TDP Verbindungen **26-35** synthetisiert und untersucht.

Zur Variation der Acylreste (R) in den BAB-d4TDP Prodrugs wurde eine konvergente Syntheseroute gewählt. Durch Umsatz der Carbonsäurechloride mit 4-Hydroxybenzylalkohol wurden die 4-Hydroxybenzylester **40a-k** erhalten, die anschließend mit Dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **44** zu den benötigten Bis-(4-acyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramiditen **46-53** in sehr guten Ausbeuten bis zu 98% umgesetzt wurden (S. 31-34). Die Phosphorylierung von d4T zu d4TMP **3a** gelang in einer sehr guten Ausbeuten von 94% (S. 36-37). Über eine 4,5-Dicyanoimidazol vermittelte Kupplung zwischen den Phosphoramiditen und d4TMP **3b**, gefolgt von einer Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid wurden die Zielverbindungen **26-35** generiert (S. 37-54). Die Verwendung von Boran-Dimethylsulfid ermöglichte die Synthese von β -Boran-C13-BAB-d4TDP **112** und eröffnete einen synthetischen Zugang zu modifizierten BAB-NDPs (S. 88). Insbesondere die Chromatographie dieser amphiphilen Verbindungen wurde im Zusammenhang mit unterschiedlichen Synthesemethoden intensiv untersucht und an die Eigenschaften des jeweiligen Produktes angepasst. Mit Hilfe der verbesserten Synthese- und Reinigungsabläufe konnten die komplexen BAB-d4TDPs **26-35** mit sehr guter Reinheit und in Ausbeuten von 32-67% erhalten werden (S. 54). Durch umfangreiche Hydrolysestudien konnte herausgearbeitet werden, welchen Einfluss die Veränderung des Acylrestes auf den Hydrolysemechanismus, die Stabilität und die Lipophilie der BAB-d4TDPs hat. Mit der Kettenlänge des Acylrestes nahmen die Stabilitäten der BAB-d4TDPs **27-35** in allen Medien zu (S. 133ff). Die unter chemischer Hydrolyse prozentual

freigesetzten Mengen an d4TDP und d4TMP wurden quantifiziert und es wurde gezeigt, dass sie von den Hydrolysehalbwertszeiten der Bis-(4-acyloxybenzyl)-Einheiten abhängig sind. Alle Verbindungen **26-35** setzten mehr d4TDP als d4TMP frei (S. 115ff). Die konkurrierende Bildung von d4TMP resultiert aus einem Bruch der Phosphorsäureanhydridbindung. Untersuchungen ergaben, dass *t*Bu-, C4-, C6-, C7- und C9-BAB-d4TDP **26-30** über die monomaskierten AB-Intermediate **36,128-131** zum d4TDP hydrolysieren. Die Halbwertszeiten dieser Intermediate konnten berechnet werden (S. 112). Die Bildung des Hydrolyseintermediats aus C11-, C13-, C15- und 8Z-C17-BAB-d4TDP **31-34** wurde nur in einem sehr untergeordneten Maß beobachtet, was hypothetisch erklärt werden konnte. Anhand der Hydrolyse des AB-Intermediats **36** (C9) wurde nachgewiesen, dass die zweifach negativ geladene Phosphorsäureanhydridbindung der Hydrolyseintermediate nicht gespalten wird. Aufgrund dieser Tatsache sind die Hydrolyseergebnisse von CEO-C9-AB-d4TDP **37** für die Entwicklung weiterer BAB-NDP Prodrugs besonders interessant, da die Cyanethoxygruppe ($t_{1/2}$ = 27 min) sehr viel schneller hydrolysierte als die (4-Decanoyloxybenzyl)-Einheit ($t_{1/2}$ = 106 min, CEM/0, S. 137). In CEM/0 Zellextrakten nahmen die Halbwertszeiten je nach Acylrest auf 1 bis 20 h gegenüber den hohen extrazellulären Stabilitäten (40 bis 260 h) stark ab (S. 133). Die Hydrolyse zu d4TDP konnte nachgewiesen werden, allerdings kam es nicht zu einer beschleunigten Freisetzung durch eine mögliche Lipaseaktivität. Die in Kooperation durchgeführten antiviralen Tests bestätigten den konzeptionellen Ansatz. Durch die Erhöhung der Lipophilie bei lägerkettigen Acylresten kann die verbleibende Ladung des α -Phosphats kompensiert werden, so dass die BAB-d4TDPs die Zellmembran passieren und d4TDP bzw. d4TMP freisetzen können. Besonders C9-BAB-d4TDP **30** konnte die Wirkung von d4T gegenüber HIV-1 und 2 in CEM/0 Zellen bei moderaten Cytotoxizitäten steigern. In TK-defizienten CEM Zellen kam es zu einer 1570-fachen Verbesserung der antiviralen Aktivität (S. 143-148). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde C9-BAB-AZTDP **66** synthetisiert. **66** zeigte ebenfalls eine verbesserte antivirale Aktivität in der TK-defizienten Zelllinie, was auf die intrazelluläre Freisetzung von AZTDP hindeutet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte die Anwendungsbreite der gewählten Syntheseroute durch die Darstellung von BIB-3'-O-*t*Bu-BVdUDP **71**, BIB-3'-O-*t*Bu-D-*carba*-dTDP **88**, BIB-3'-O-*t*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** und BIB-2'-Me-UDP **104** demonstriert werden. BIB-3'-O-*t*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** und BIB-2'-Me-UDP **104** wurden als potentielle anti-HCV Wirkstoffe, für eine Kooperation mit der Firma Alios Biopharma Inc., ausgehend von den Nucleosidanaloga synthetisiert. In einer dreistufigen Synthesesequenz wurde die 3'-O-Position von 2'-F-2'-Me-Uridin **89** als *iso*-Butyrylester blockiert und 3'-O-*iso*-Butyryl-2'-fluor-

2'-methyluridin in einer Gesamtausbeute von 67% erhalten (S. 76-78). Im Anschluss wurde die 5'-O-Position phosphoryliert und das nach Ionenaustausch erhaltene Tetra-*n*-butylammonium-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UMP **97** mit dem Phosphoramidit **45** umgesetzt. Nach Oxidation konnte BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** in einer hervorragenden Ausbeute von 73% isoliert werden (S. 78-78). 2'-Me-UMP **102** wurde ohne Blockierung der 2'-und 3'-Hydroxyfunktionen synthetisiert und zur Zielverbindung BIB-2'-Me-UDP **104** in einer moderaten Ausbeute umgesetzt (S. 82). Mit dieser Synthese gelang erstmals die Darstellung eines BAB-Ribonucleosiddiphosphats. *D-carba*-dT zeigt vielversprechende antivirale Aktivitäten, insbesondere bei der Inhibition der HIV-1 RT. Für weitere biologische Studien wurde BIB-3'-O-*i*Bu-*D-carba*-dTDP **88** aus 3'-O-*i*Bu-*D-carba*-dTMP **85** und dem Phosphoramidit **45** synthetisiert. 3'-O-*i*Bu-*D-carba*-dTMP **85** wurde ausgehend von Cyclopentadien in Kooperation mit *S. Jessel* hergestellt. Während der Umkehrphasenchromatographie von BIB-3'-O-*i*Bu-*D-carba*-dTDP **88** konnte Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidat **58a** als Nebenprodukt isoliert werden (S. 67-74). BVdU wird als selektiver Inhibitor in der Therapie von Herpesinfektionen eingesetzt. Mit Hilfe von BIB-3'-O-*i*Bu-BVdUDP **71** sollte u.a. untersucht werden, ob das BAB-NDP Prodrug Konzept es ermöglicht, das antivirale Spektrum eines Nucleosidanalogons zu erweitern, indem notwendige enzymatische Metabolismen umgangen werden (S. 65-67). Die Hydrolyse von BIB-3'-O-*i*Bu-BVdUDP **71**, BIB-3'-O-*i*Bu-*D-carba*-dTDP **88** und BIB-3'-O-*i*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** wurde unter chemischen und enzymatischen Bedingungen in unterschiedlichen Medien untersucht (S. 163-175). Durch die Inkubation von 3'-O-*i*Bu-*D-carba*-dTMP **85** konnte die hohe Stabilität der 3'-O-*iso*-butyryl-Gruppe belegt werden (720 h bei pH 7.3, 9 h in CEM/0 Extrakt, S. 170). Die relativ hohen Halbwertszeiten der BAB-NDP Verbindungen **71,88** und **91** bei pH 7.3 von 40 bis 90 h nehmen in verschiedenen Zellextrakten auf ca. 1 h ab, während sie im humanen Serum Stabilitäten von ca. 4 h besitzen. Ein besonderer Einfluss durch die 3'-O-*iso*-butyryl-Gruppe auf den Hydrolysemechanismus wurde nicht festgestellt und es konnte gezeigt werden, dass die BAB-NDP Prodrugs **71,88** und **91** über die entsprechenden AB-Intermediate zu den NDPs hydrolysieren.

Die reversible Maskierung eines Nucleosidtriphosphats nach dem BAB-Konzept wurde in dieser Arbeit erstmalig realisiert. In Anlehnung an die sehr erfolgreiche Synthesemethode zur Darstellung der BAB-NDPs konnte d4TDP in einer 4,5-Dicyanoimidazol vermittelten Kupplung mit dem Phosphoramidit **45** zur Reaktion gebracht werden. BIB-d4TTP **125** wurde in einer sehr guten Reinheit und einer Ausbeute von 54% isoliert (S. 98). Aus den 5-Chlor- bzw. 5-Nitro-*cyclo*Sal-Aktivestern **118-120** wurden d4TDP, AZTDP und d4TTP in

Ausbeuten von bis zu 83% synthetisiert und standen als Referenzverbindungen für Hydrolysestudien zur Verfügung (S. 92-95). Es wurde eindeutig nachgewiesen, dass die Hydrolyse von BIB-d4TTP **125** über das stabile AB-Intermediat **137** abläuft und d4TTP fast quantitativ freigesetzt wird (S. 152ff). Die Halbwertszeiten von BIB-d4TTP **125** und IB-d4TTP **137** konnten bestimmt werden (S. 155). Tatsächlich ließ sich die chemische Stabilität von ca. 40 h durch eine enzymatische Aktivierung der Hydrolysekaskade auf 10 bis 30 min in unterschiedlichen Zellextrakten reduzieren (S. 157-162). Die antivirale Aktivität von **125** gegenüber HIV-1 und 2, besonders in der TK-defizienten Zelllinie, weist stark auf das Eindringen des intakten Prodrugs in die Zelle hin (S. 162-163). Ein besonders gutes Ergebnis, das aufgrund der relativ hohen Polarität von BIB-d4TTP, in dieser Ausprägung nicht erwartet wurde.

Durch die umfangreichen Untersuchungen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von BAB-d4TDP Verbindungen konnten richtungsweisende Kriterien herausgearbeitet werden, die für das Design zukünftiger BAB-NDP Prodrugs entscheidend sind.

Das große Potential des BAB-NDP Konzeptes zur bioreversiblen Maskierung einer Vielzahl von Nucleosiddiphosphaten wurde durch die Synthese von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-NDP Prodrugs mehrerer 3'-O-veresterter Desoxynucleoside und eines Ribonucleosids belegt. Außerdem wurde gezeigt, dass die Funktionalisierung der Phosphorsäureanhydridbindung über die gewählte Synthesemethode möglich ist.

Mit der Synthese von BIB-d4TTP konnte das BAB-Konzept erfolgreich auf die Maskierung eines Nucleosidtriphosphats übertragen werden. In Kombination mit den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über das Verhalten von BAB-NDP Prodrugs können BAB-NTPs möglicherweise so gestaltet werden, dass sie Zellmembranen passieren und intrazellulär selektiv die Nucleosidtriphosphate freisetzen.

6 Summary

Nucleoside analogs play an important role in the therapy of HIV infections. The antiviral effect of nucleoside analogs depends on their conversion into the ultimately bioactive nucleoside triphosphate (NTP) which acts as a nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI). Generally, the formation of these 5'-O-triphosphates proceeds via three phosphorylation steps. The inefficiency of this metabolism represents a major hurdle for a range of nucleosides. Bis-(4-acyloxybenzyl)-NDP prodrugs (BAB-NDP prodrugs) were designed to circumvent these limitations bypassing the first and second phosphorylation step.

This thesis deals with three main topics: the improvement of the BAB-NDP concept, transfer of the concept to other nucleosides and the synthesis and evaluation of a novel BAB-nucleoside triphosphate.

To gain deeper understanding of the structure-activity relationship of such BAB-NDPs, a series of more lipophilic bis-(4-acyloxybenzyl)-d4T diphosphates (BAB-d4TDPs) was synthesized and investigated. A linear-convergent strategy was chosen to vary the acyl moiety (R) of the BAB-d4TDPs. Reaction of acylchlorides with 4-hydroxybenzylalcohol led to the (4-acyloxy)-benzylalcohols **40a-k** and after reaction with dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidite **44** the bis-(4-acyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidites **46-53** were obtained in moderate to excellent yields of 34 to 96% (p. 31-34). The nucleoside monophosphate d4TMP was prepared by the method of *T. Sowa* and *S. Ouchi* and obtained in a yield of 94% (p. 36-37). Finally, the BAB-d4TDPs **26-35** were generated using a 4,5-dicyanoimidazole mediated coupling reaction of d4TMP with a phosphoramidite and a subsequent oxidation with *tert*-butyl hydroperoxide (p. 37-54). Using borane-dimethylsulfide complex instead of *tert*-butyl hydroperoxide led to the formation of β -borano-C13-BAB-d4TDP **112** and consequently opens the possibility for further modifications including the pyrophosphate bond. Methods of chromatography in combination with different synthetic approaches have been studied and were adjusted for the purification of these amphiphilic compounds. Finally, the target compounds were obtained in high purity and satisfying yields of 32% to 67% (p. 54). Various hydrolysis studies in different media were performed to investigate the influence of the acetyl moiety on the mechanism of hydrolysis, stability and lipophilicity of the BAB-d4TDPs **27-35**. In all media, prodrugs with longer alkyl chain moieties were hydrolysed slower than those with shorter (p. 133). The

percentage distribution of d4TDP and d4TMP was determined and its dependence on the rates of hydrolysis was found (p. 115). All compounds **27-35** released more d4TDP during incubation in phosphate buffer at pH 7.3. In some cases a cleavage of the anhydride bond was observed resulting in the formation of d4TMP. It could be shown, that *t*Bu-, C4-, C6-, C7- and C9-BAB-d4TDP **26-30** were hydrolysed via the stable AB-intermediates **36,128-131**. Half-lives of these intermediates were calculated (p. 112). In contrary, only very small amounts of C11-, C13-, C15- and 8Z-C17-AB-intermediates were detected. The intermediates **36,128-131** do not release d4TMP but exclusively d4TDP. The two negative charges seem to inhibit a cleavage of the intermediate's anhydride bond which was shown by hydrolysis of the isolated C9-AB-intermediate **36**. The hydrolysis behaviour of CEO-C9-AB-d4TDP **37** was also studied and revealed interesting results with regard to the design of future BAB-NDP prodrugs. The cyanoethoxy-group ($t_{1/2}$ = 27 min) was cleaved 4-fold than the (4-decanoyloxybenzyl)-unit of the β -phosphate ($t_{1/2}$ = 106 min, CEM/0, p. 137) making an intracellular "lock-in" of the intermediate possible. As a result of enzymatic hydrolysis, the half-lives decreased in CEM/0 cellular extracts ($t_{1/2}$ = 1-20 h) compared to those measured under chemical conditions ($t_{1/2}$ = 40-260 h, p. 133). The formation of d4TDP during enzymatic hydrolysis was detected but no reduction of half-lives due to the activity of e.g. lipases was observed. Very supportive results for the concept were obtained from the antiviral evaluations of the BAB-d4TDP compounds. All compounds proved to be at least equipotent against HIV-1 and 2 in wild-type CEM/0 cells as d4T. Strikingly, compounds with acyl residues $R \geq C_6H_{13}$ have shown very good anti-HIV activities in the thymidine kinase deficient cell line (CEM/TK⁻) indicating their ability to penetrate cellular membranes and release d4TDP or at least d4TMP. Especially, C9-BAB-d4TDP **30** could show the potential of the BAB-NDP concept with a 1570-fold higher antiviral activity than its parent nucleoside in TK-deficient CEM cells. These results demonstrate that the BAB-NDP concept was successfully optimized by increasing the lipophilicity of the prodrugs (p. 143-148). In addition, C9-BAB-AZTDP **66** was prepared and its properties were investigated. An EC₅₀ of 0.79 μ M in TK-deficient cells points at a possible intracellular release of AZTDP.

In the second part, BAB-NDPs of different deoxy- and ribonucleoside analogs were synthesized and their hydrolysis was studied. BIB-3'-O-*t*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** and BIB-2'-Me-UDP **104** were synthesized as potential anti-HCV agents in cooperation with Alios Biopharma, Inc. The 3'-OH group of 2'-F-2'-Me-Uridin **89** was selectively blocked as *iso*-butyrate and obtained after three steps in an overall yield of 67% (p. 76-78). Diammonium-3'-O-*t*Bu-2'-F-2'-Me-UMP **96** was obtained after phosphorylation and converted into Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-3'-O-*t*Bu-2'-F-2'-Me-UMP **97** by ion exchange. The more lipophilic

bis-(tetra-*n*-butylammonium)-salt **97** was coupled with phosphoramidite **45** and oxidized. BIB-3'-*O*-*t*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** was obtained in a very good yield of 73% after purification (p. 78-78). 2'-Me-Uridine **102** was phosphorylated at the 5'-position without any protection of the 2'- and 3'-OH groups and isolated in a moderate yield after multiple purifications on an RP-18 column. The first BAB-ribonucleosiddiphosphate (BIB-2'-Me-UDP **104**) was generated in a moderate yield using the described synthetic approach (p. 82). *D*-*carba*-dT has shown promising antiviral activities. For further investigations of its potential to act as an inhibitor of HIV-1 RT, the corresponding BIB-3'-*O*-*t*Bu-*D*-*carba*-dTDP prodrug **88** was synthesized from 3'-*O*-*t*Bu-*D*-*carba*-dTMP **85** and phosphoramidite **45**. NMP **85** was generated starting from cyclopentadiene in a cooperative work with *S. Jessel*. Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidate **58a** was isolated as a byproduct after the final coupling reaction to BIB-3'-*O*-*t*Bu-*D*-*carba*-dTDP **88** (p. 67-74). BVdU is used in the therapy of Herpes infections. After phosphorylation to BVdUDP by viral enzymes it acts as a selective polymerase inhibitor. It would be of great interest, if BVdU can be converted into an anti-HIV agent. This might be achieved by the BIB-3'-*O*-*t*Bu-BVdUDP prodrug **71** which possibly bypasses the needed intracellular phosphorylation in HIV infected cells. Chemical and enzymatic hydrolysis of BIB-3'-*O*-*t*Bu-BVdUDP **71**, BIB-3'-*O*-*t*Bu-*D*-*carba*-dTDP **88** and BIB-3'-*O*-*t*Bu-2'-F-2'-Me-UDP **91** were studied in different media (p. 163-175). The 3'-*O*-*iso*-butyryl group exhibited high chemical and enzymatic stabilities (e.g. 3'-*O*-*t*Bu-*D*-*carba*-dTMP **85**, 720 h at pH 7.3, 9 h in CEM/0 extract, p. 170). The higher stabilities of **71**, **88** and **91** with half-lives from 40 h to 90 h were markedly reduced in different cell extracts to approx. 1 h and 4 h in human serum (p. 163-175). Compounds **71**, **88** and **91** released the diphosphates via the AB-intermediates and the 3'-*O*-*iso*-butyryl group had no observable effect on the mechanism of hydrolysis.

Moreover, a bioreversible protection of a nucleoside triphosphate (NTP) with the bis-(acyloxybenzyl) concept was achieved. Following the successful synthetic protocol for the synthesis of BAB-NDPs, d4TDP was coupled with the phosphoramidite **45** to yield BIB-d4TTP **125** after oxidation. The BAB-NTP prodrug was obtained in a very satisfying purity and a yield of 54% (p. 98). The *cycloSal*-approach was successfully used for the synthesis of d4TDP, AZTDP and d4TTP which were obtained in yields of up to 83% (p. 92-95). The polyphosphates were useful as reference compounds for HPLC analysis. It has been demonstrated, that hydrolysis of BIB-d4TTP **125** proceeded via AB-intermediate **137** to release d4TTP in nearly quantitative amounts (p. 152). Fortunately, the extracellular stability of 40 h was strongly reduced to several minutes by enzymatic activation in different cell extracts (p. 157-162). BIB-d4TTP **125** has shown very promising antiviral activities against

HIV-1 and 2, especially in TK-deficient cells pointing at its ability to penetrate cell membranes and to release d4TTP intracellularly (p. 162-163).

In conclusion, the structure-activity-relationship of a series of BAB-d4TDP was investigated; the potential of the approach to mask diphosphates of different nucleosides e. g d4T, AZT, D-*carba*-dT, BVdU, 2'-fluor-2'-methyluridine and 2'-methyluridine has been demonstrated and BIB-d4TTP was synthesized to be the first NTP prodrug. All obtained results are very useful for the design of more potent BAB-ND(T)P prodrugs in the future.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeines

7.1.1 Lösungsmittel

Die folgenden Lösungsmittel wurden in technischer Qualität bezogen und daher vor ihrer Verwendung wie folgt behandelt. Alle weiteren Lösungsmittel wurden vor ihrer Verwendung nicht weiter gereinigt.

Chloroform-d₁ (CDCl₃): für die NMR-Spektroskopie, Deutero GmbH.

Dichlormethan: zur präparativen Chromatographie und zur Synthese über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck destilliert.

Diethylether: über Kaliumhydroxid gelagert, getrocknet und vor Gebrauch am Rotationsverdampfer destilliert.

Dimethylsulfoxid-d₆: für die NMR-Spektroskopie über Molsieb (0.4 nm) gelagert, Deutero GmbH.

Ethylacetat: zur Chromatographie über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck destilliert.

Ethanol: 98.8%, zur Synthese verwendet.

Methanol: zur präparativen Chromatographie und Synthese bei Normaldruck destilliert.

Methanol-d₄: für die NMR-Spektroskopie, Deutero GmbH.

Petrolether (50-70): zur präparativen Chromatographie bei Normaldruck destilliert.

7.1.2 Absolute Lösungsmittel

Für Reaktionen, die unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit und Sauerstoff erfolgen sollten, wurden die Lösungsmittel wie folgt getrocknet.

Acetonitril:	über Calciumhydrid vorgetrocknet, mehrere Tage unter Rückfluss und Stickstoffatmosphäre getrocknet, bei Normaldruck destilliert, über Molsieb (0.3 nm) gelagert.
Dichlormethan:	über Calciumhydrid mehrere Tage unter Rückfluss getrocknet, unter Stickstoffatmosphäre bei Normaldruck destilliert und über Molsieb (0.4 nm) gelagert.
Diethylether:	über Natrium mehrere Tage unter Rückfluss getrocknet, bei Normaldruck unter Stickstoffatmosphäre destilliert und über Molsieb (0.4 nm) gelagert.
<i>N,N</i> -Dimethylformamid:	Fluka Nr. 40248, absolut über Molekularsieb (0.4 nm).
Dimethylsulfoxid:	Fluka Nr. 41648, absolut über Molekularsieb (0.4 nm).
Pyridin:	über Calciumhydrid mehrere Tage unter Rückfluss getrocknet, bei Normaldruck unter Stickstoffatmosphäre destilliert und über Molsieb (0.4 nm) gelagert. Dichte [g/cm ³]: 0.97.
Tetrahydrofuran:	über Kalium mehrere Tage unter Rückfluss getrocknet, bei Normaldruck unter Stickstoffatmosphäre destilliert und über Molsieb (0.4 nm) gelagert.
Toluol:	über Natrium mehrere Tage unter Rückfluss getrocknet, bei Normaldruck unter Stickstoffatmosphäre destilliert und über Molsieb (0.4 nm) gelagert.

7.1.3 Edukte und Reagenzien

Acetanhydrid:	unter Inertgas destilliert.
Acetylchlorid:	unter Inertgas destilliert.
Di- <i>iso</i> -propylamin:	mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und unter Inertgas destilliert. Dichte [g/cm ³]:

	0.722.
Di- <i>iso</i> -propylethylamin:	mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und unter Inertgas destilliert. Dichte [g/cm ³]: 0.74.
<i>iso</i> -Butyrylchlorid:	unter Inertgas destilliert.
Phosphor(III)-chlorid:	unter Inertgas destilliert. Dichte [g/cm ³]: 1.57.
Phosphor(V)-chlorid:	unter Inertgas destilliert.
Pivaloylchlorid:	unter Inertgas destilliert.
Triethylamin:	mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und unter Inertgas destilliert. Dichte [g/cm ³]: 0.726.

7.1.4 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (Merck Nr. 5554; Schichtdicke 0.2 mm; Macherey & Nagel Xtra Sil UV254, Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Die Platten wurden auf eine Größe von 2-5 x 7 cm zugeschnitten; die Laufstrecke betrug 5-6 cm. Alle R_f -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm und 366 nm und durch Besprühen mit einem Färbereagenz (Gemisch aus *p*-Methoxybenzaldehyd (0.5 mL), Ethanol (20 mL), konz. H₂SO₄ (0.5 mL), Essigsäure (0.1 mL), Wasser (20 mL) alias „Schwefelsäure-Anisaldehyd-Färbereagenz“) und anschließender Wärmebehandlung. Zur Detektion von ungesättigten Verbindungen wurde eine Iodkammer verwendet. Zur Detektion von oxidierbaren Substanzen wurde ggf. eine Kaliumpermanganatlösung verwendet.

Präparative (zentrifugale) Dünnschichtchromatographie (Chromatotron)

Mittels eines Chromatotrons der Firma Harrison Research, Modell 7924 T, wurden Substanzgemische mit Rohausbeuten von maximal 4 g getrennt. Als Trennmateriale 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

Die säulenchromatographischen Trennungen wurden an Kieselgel 60 (230-400 mesh, Korngröße 0.040-0.063 nm, der Hersteller Merck, MN, Sigma-Aldrich) durchgeführt. Unter Umständen wurde nach dem Flash-Verfahren mit einem leichten Überdruck gearbeitet. Es wurden stets destillierte Lösungsmittel verwendet.

Umkehrphasenchromatographie

Für Dünnschichtchromatogramme wurde RP-18 F_{254 S} DC-Folie der Firma Merck verwendet (RP-18). Für die Säulenchromatographie kam LiChroprep RP-18 (40-63 µm) zum Einsatz.

Größenausschlußchromatographie

Für die Größenausschlußchromatographie wurde Sephadex LH20 mit Methanol als Quell- und Eluent verwendet. Außerdem wurde Sephadex G15 mit Wasser als Quell- und Eluent verwendet.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Analytische HPLC

Es wurden folgende HPLC-Anlagen der Firmen Merck-Hitachi bzw. VWR-Hitachi verwendet:

Merck-Hitachi-Anlage, Modell D-7000

Software	Chromatography Data Station Software, HPLC System Manager Version 3.1.1
Interface	Model L-7000
Pumpe	Model L-7100
Autosampler	Model L-7200
Detektor	Diode Array Detector (DAD) L-7455

VWR-Hitachi-Anlage, LaChromElite

Software	EzChrom Elite, Version 3.2.1
Interface	Organizer
Pumpe	Model L-2130
Autosampler	Model L-2200
Detektor	Diode Array Detector (DAD) L-2455
Analytische Säule	EcoCart 125-3 mit LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) Füllmaterial (Merck)
Analytische Vorsäule	LiChroCart 4-4 LiChrospher 100 RP-18e (5 µm) Füllmaterial (Merck)
Säulenhalter	Halterung für EcoCart 125-3 Glaskartusche (Merck)

HPLC-Methode 1:

Von 0 bis 20 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten (5% bis 90%), dann 4 min isokratisch 10% Puffer mit 90 % Acetonitril, dann 5 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten (90% auf 5%), dann 7 min isokratisch 5% Acetonitril mit 95% Puffer; Flussrate 1 mL/min. Die UV-Detektion wurde auf die entsprechenden Verbindungen abgestimmt.

HPLC-Methode 2:

Von 0 bis 24 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten (5% bis 90%), dann 4 min isokratisch 10% Puffer mit 90 % Acetonitril. Dann 2 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten (90% auf 5%), dann 5 min isokratisch 5% Acetonitril mit 95% Puffer; Flussrate 1 mL/min. Die UV-Detektion wurde auf die entsprechenden Verbindungen abgestimmt.

HPLC-Methode 3:

Von 0 bis 28 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten (5% bis 90%), dann 5 min isokratisch 10% Puffer mit 90 % Acetonitril. Dann 2 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten (90% auf 5%), dann 5 min isokratisch 5% Acetonitril mit 95% Puffer; Flussrate 1 mL/min. Die UV-Detektion wurde auf die entsprechenden Verbindungen abgestimmt.

HPLC-Methode 4:

Von 0 bis 36 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten (5% bis 90%), dann 7 min isokratisch 10% Puffer mit 90 % Acetonitril. Dann 3 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten (90% auf 5%), dann 4 min isokratisch 5% Acetonitril mit 95% Puffer; Flussrate 1 mL/min. Die UV-Detektion wurde auf die entsprechenden Verbindungen abgestimmt.

HPLC-Methode 5:

Von 0 bis 15 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten (5% bis 70%), dann 3 min isokratisch 30% Puffer mit 70% Acetonitril, dann 3 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten (70% auf 5%), dann isokratisch 5% Acetonitril mit 95% Puffer; Flussrate 1 mL/min. Die UV-Detektion wurde auf die entsprechenden Verbindungen abgestimmt.

HPLC-Methode 6:

Von 0 bis 18 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten (5% bis 95%), dann 12 min isokratisch 5% Puffer mit 95% Acetonitril, dann 5 min 100% Acetonitril, dann 10 min isokratisch 95% Puffer mit 5% Acetonitril. Flussrate 1 mL/min. Die UV-Detektion wurde auf die entsprechenden Verbindungen abgestimmt.

HPLC-Methode 7:

Von 0 bis 22 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten (5% bis 100%), dann 8 min isokratisch 95% Puffer mit 5% Acetonitril. Flussrate 1 mL/min. Die UV-Detektion wurde auf die entsprechenden Verbindungen abgestimmt.

HPLC-Methode 8:

Von 0 bis 27 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten (5% bis 100%), dann 3 min isokratisch 95% Puffer mit 5% Acetonitril. Flussrate 1 mL/min. Die UV-Detektion wurde auf die entsprechenden Verbindungen abgestimmt.

HPLC-Methode 9:

Von 0 bis 18 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten (5% bis 95%), dann 8 min isokratisch 5% Puffer mit 95% Acetonitril, dann 4 min Acetonitril-Gradienten (95% auf 5%), dann 5 min isokratisch 95% Puffer mit 5% Acetonitril. Flussrate 1 mL/min. Die UV-Detektion wurde auf die entsprechenden Verbindungen abgestimmt.

Die Säule wurde nach Benutzung mit Puffersalzen, mit einer Sequenz der folgenden Methoden gespült, um dann beliebig lange gelagert werden zu können.

1. 5% Acetonitril, 95% Puffer mit einem Wassergradienten (0 bis 95 %) über 5 min mit einer Flußrate 0.5 mL/min, dann 5% Acetonitril mit 95% Wasser über 5 min mit einer Flußrate 1 mL/min.
2. 5% Acetonitril mit 95% Wasser isokratisch über 120 min bei einer Flußrate von 0.5 mL/min.
3. 5% Acetonitril mit 95% Wasser isokratisch über 50 min, dann 10 min ein Acetonitrilgradient (5% bis 90%), dann 10 min ein Acetonitrilgradient (90% bis 5%), dann 20 min 5% Acetonitril mit 95% Wasser isokratisch bei einer Flußrate von 0.5 mL/min.
4. Wasser mit einem Acetonitrilgradienten (5% bis 70%) über 10 min, dann 70% Acetonitril mit 30% Wasser isokratisch über 10 min bei einer Flußrate von 0.5 mL/min.
5. 70% Acetonitril mit 30% Wasser isokratisch über 80 min bei einer Flußrate von 0.5 mL/min.

Lösungsmittel:

Für die aufgeführten Methoden und Spülläufe wurden Acetonitril und Methanol des Reinheitsgrades „HPLC grade“ von der Firma VWR International und von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Es wurde ausschließlich Reinstwasser (Milli-Q) verwendet.

Ionenpuffer:

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

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

Extraktion der gezeigten Chromatogramme:

Die abgebildeten Chromatogramme aller d4T-, AZT-, 2'-Me-U- und BVdU-Verbindungen wurden bei einer Wellenlänge von 264-265 nm extrahiert. Alle gezeigten Chromatogramme

der 2'-F-2'-Me-Uridin-Verbindungen wurden bei 260 nm und die der D-carba-dT Derivate bei 272 nm extrahiert.

Präparative HPLC

Versuche zur Trennung und Reinigung von Nucleosiddiphosphat Prodrugs wurden an einer Merck-Hitachi-Anlage durchgeführt. Angaben über Eluent, Detektion und Flussraten finden sich bei den entsprechenden Experimenten.

Schreiber	Chromato-Integrator D-2500A
Pumpe	Intelligent Pump L-6250
Probenschleife	5 µL
Detektor	LaChrom UV-Detektor L-7400
Säule	Merck Hibar Fertigsäule 250-25, LiChrospher 100 RP-18e (5 µm)

7.1.5 Spektroskopie

Kernresonanzspektroskopie

NMR-Spektren wurden im Institut für Organische Chemie in der spektroskopischen Abteilung unter der Leitung von Dr. Sinnwell und Dr. Hackl auf Bruker-Geräten aufgenommen. Auf dem Modell AMX 400 wurden 400 MHz-¹H-NMR- und 101 MHz-¹³C-NMR-Spektren gemessen. Auf den Geräten AV I 400 und AV II 400 wurden 400 MHz-¹H-NMR-, 101 MHz-¹³C-NMR- und 162 MHz-³¹P-NMR-Spektren gemessen. Zusätzlich wurden auf diesen Modellen HH-COSY, HMQC, HSQC, HMBC und HP-COSY Korrelationsspektren aufgenommen. Auf dem Modell DRX 500 konnten 500 MHz-¹H-NMR-, 125 MHz-¹³C-NMR-, 202 MHz-³¹P-NMR und 471 MHz-¹⁹F-NMR Spektren gemessen werden. Zusätzlich wurden auf diesem Modell HH-COSY, HMQC und HMBC Korrelationsspektren aufgenommen. Die Messungen von ³¹P-NMR-Spektren konnte sowohl ¹H-gekoppelt als auch ¹H-entkoppelt durchgeführt werden. Alle Spektrometer laufen im Automationsbetrieb und sind mit Probensamplern (B-ACS 120) ausgestattet.

Im Institut für Anorganische Chemie wurden in der spektroskopischen Abteilung unter der Leitung von Dr. Haupt NMR-Spektren aufgenommen. Die Nutzung dieses Services wurde hauptsächlich für luftempfindliche Proben in Anspruch genommen. Auf dem Gerät Bruker

AVANCE 400 wurden 400 MHz- ^1H -NMR-, 101 MHz- ^{13}C -NMR- und 162 MHz- ^{31}P -NMR-Spektren gemessen. Zusätzlich wurden auf diesem Modell HH-COSY, HMQC, HSQC, HMBC und PP-COSY Korrelationsspektren aufgenommen. Auch dieses Spektrometer läuft im Automationsbetrieb. Auf dem Gerät Varian Gemini-2000BB wurden 200 MHz- ^1H -NMR-, 81 MHz- ^{31}P -NMR- und 188 MHz- ^{19}F -NMR-Spektren gemessen.

Chemische Verschiebungen δ [ppm] wurde auf die Lösungsmittelsignale bezogen, wobei Chloroform- d_1 auf 7.26 (^1H) bzw. 77.16 (^{13}C) ppm, Dimethylsulfoxid- d_6 auf 2.50 (^1H) bzw. 39.52 (^{13}C) ppm, Methanol- d_4 auf 3.31 (^1H) bzw. 49.00 (^{13}C) ppm, Deuteriumoxid auf 4.79 (^1H) ppm, Acetonitril- d_1 auf 1.94 (^1H) bzw. 1.32 (^{13}C) ppm und Benzol- d_6 auf 7.16 (^1H) bzw. 128.1 (^{13}C) ppm kalibriert wurde. Die chemischen Verschiebungen δ [ppm] wurden der Literatur entnommen.¹⁸⁴ Die Verschiebungen der ^{31}P -NMR-Signale wurden gegen einen externen Standard (Computeradresse) von 85%-iger Phosphorsäure angegeben. Die Verschiebungen der ^{19}F -NMR-Signale wurden gegen CFCl_3 als externen Standard (Computeradresse) angegeben.

Infrarotspektroskopie

Die Infrarot-Spektren wurden entweder an einem Alpha P FT-IR Spektrometer der Firma Bruker bei Raumtemperatur in einem Messbereich von 400-4000 cm^{-1} oder an einem AVATAR 370 FT-IR von Thermo Nicolet (gekennzeichnet durch: KBr für Feststoffe, film für Öle) aufgenommen.

Ultraviolett-Spektroskopie

Die UV-Spektren wurden mit dem Diode Array Detector L-2455 der VWR-LaChromElite HPLC (s.o.) ermittelt.

7.1.6 Massenspektrometrie

Alle massenspektrometrischen Untersuchungen wurden im Institut für Organische Chemie an der Universität Hamburg unter Leitung von Dr. Francke und von Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Francke durchgeführt. Die FAB (fast atom bombardment) und HR-FAB (high resolution fast atom bombardment) Messungen wurden an einem VG/70-250F Spektrometer (Xenon (Stoßgas), *m*-Nitrobenzylalkohol (Matrix)) der Firma VG Analytical gemessen. Die EI (electron ionisation) Massenspektren wurden an einem VG Analytical VG/70-250S-Spektrometer (doppelt fokussierend) aufgenommen. Die HR-ESI (high resolution electron spray ionization) Massenspektren wurden an einem ThermoQuest MAT 95XL

Massenspektrometer der Firma Finnigan oder an einem Agilent 6224 LC-MS-TOF Gerät aufgenommen. An beiden Geräten wurde im positiv oder negativ Modus gemessen.

7.1.7 Weitere verwendete Geräte

Gefriertrocknungsanlage

Zur Gefriertrocknung wurden zwei Geräte der Firma Christ verwendet: Alpha 2-4, Alpha 2-4 LD plus in Kombination mit Drehschieberpumpen der Firma Vacuubrand.

Zentrifugen

Für größere Volumina von Suspensionen (Abtrennung von Molsieb-Pulver, Kieselgel, Hydrierkatalysator) wurde eine Heraeus Biofuge Pimo R bei 6000 u/min verwendet. Zum Zentrifugieren kleinerer Volumina bis 2 mL (Eppendorfcap) wurde eine Heraeus Biofuge Pico bei bis zu 13000 u/min verwendet.

Ultraschallbäder

Zum Entgasen und Durchmischen der HPLC-Lösungsmittel wurde ein Ultraschallbad der Firma Bandelin, Sonorex RK512H verwendet. Für das Lösen von Suspensionen oder Feststoffen in Reaktionsgemischen wurde ein Gerät Sonorex RK102 Transistor der Firma Bandelin benutzt.

Polarimeter

Die Drehwerte optisch aktiver, reiner Substanzen, separierter Stereoisomere wurden an einem P8000 Polarimeter der Firma A. Krüss Optonic GmbH mit einer Na-Lampe ($\lambda = 589 \text{ nm}$) aufgenommen.

Schmelzpunktbestimmung

Die Bestimmungen wurden mit einem Schmelzpunktbestimmungsapotec der Firma Otto Stein durchgeführt. Schmelzpunkte wurden von reinen Feststoffen gemessen und sind ohne Fehler angegeben. Feststoffe, die nach Gefriertrocknung erhalten wurden, wurden nicht bestimmt.

Thermostat

Zur Durchführung von Hydrolysen in NMR-Röhrchen bei konstanter Temperatur (37 °C) wurde ein Wasserbad-Thermostat der Firma GFL verwendet.

Thermomixer

Zur Durchführung von Hydrolysen in Eppendorfcaps wurden die Geräte Eppendorf Thermomixer5436 und Eppendorf ThermomixerCompact verwendet. Sie wurden bei 900 u/min und 37 °C benutzt.

7.2 Synthesen

7.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: Synthese von Salicylalkoholen durch Reduktion von Carbonylverbindungen

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 2.0 Äq. trockenes (gräulich bis farbloses Pulver) Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH_4) in abs. Tetrahydrofuran (THF) suspendiert. Zu dieser Suspension wurde bei Raumtemperatur (Rt) eine Lösung von 1.0 Äq. der jeweiligen Salicylsäure in abs. THF über 30 min getropft und anschließend über Nacht bei Rt gerührt. Abschließend wurde noch einige Stunden unter Rückfluss erhitzt (DC Kontrolle). Überschüssiges LiAlH_4 wurde bei 0 °C durch vorsichtige Zugabe zunächst von konz. Salzsäure und später von 2 M Salzsäure zerstört, bis ein pH-Wert zwischen 4 und 5 erreicht war. Nach Zugabe von Wasser wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mindestens dreimal mit Ethylacetat extrahiert. In der Regel war es notwendig, eine erste Phasentrennung über Nacht abzuwarten. So konnten die Rückstände der Lithiumaluminiumsalze besser entfernt werden. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Produkte wurden im Ölpumpenvakuum getrocknet. Abschließende Reinigung erfolgte durch Kristallisation (lösen in Ethylacetat und Eintropfen in kalten Petrolether). Erfolgte die Kristallisation nicht quantitativ wurde über Kieselgel filtriert (Dichlormethan).

AAV 2: Synthese von Saligenylchlorphosphiten

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äq. des jeweiligen Salicylalkohols in abs. Diethylether gelöst und auf -30 bis -20 °C gekühlt. Anschließend wurden bei -30 bis -20 °C 1.2 Äq. dest. (PCl_3) zugegeben und nach ca. 5 min 2.3 Äq. abs. Pyridin, gelöst in abs. Diethylether über einen Zeitraum von 30 min bis 1h zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde noch 2 h bei Rt rühren gelassen. Der Kolben wurde über Nacht bei -26 °C aufbewahrt, dann wurde Pyridiniumchlorid unter Inertgas durch Schlenkfiltration entfernt, der Rückstand mehrmals mit Diethylether gewaschen und

das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Die erhaltenen Öle oder Feststoffe wurden ohne weitere Reinigung für die nachfolgenden Synthesen eingesetzt. Ihr Reinheitsgehalt wurde aus ^1H - und ^{31}P -NMR Spektren ermittelt.

AAV 3: Synthese von *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphaten

Die Reaktion wurde in einer N_2 -Schutzgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurde ein Äquivalent des entsprechenden Nucleosidanalogons zweimal mit ca. 3-5 mL abs. Acetonitril koevaporiert und anschließend in abs. Acetonitril aufgenommen. Bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ wurde es mit je zwei Äquivalenten abs. DIPEA und zwei Äquivalenten des entsprechenden Chlorphosphits, gelöst in abs. Acetonitril, tropfenweise versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung des Nucleosids gerührt. In der Regel dauerte dies etwa zwei bis fünf Stunden (DC-Kontrolle: Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v). Abschließend wurde bei etwa $-10\text{ }^\circ\text{C}$ mit vier Äquivalenten Oxone (zwei Äquivalente pro Phosphoratom), gelöst in kaltem Wasser, oxidiert. Die erhaltene Suspension wurde etwa 10-15 min bei Rt gerührt und direkt mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde zweimal mit kaltem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Entfernen der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer wurden die Rohprodukte als gelblich-farblose Schäume erhalten. Die 5-Chlor-*cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate wurden am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient bis 20%, 0.1% Essigsäure). Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck entfernt und die erhaltenen Schäume in Wasser/Acetonitril, 7:3 v/v aufgenommen und gefriergetrocknet. 5-Nitro-*cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate wurden nicht gereinigt.

AAV 4: Selektive Acylierung von 4-Hydroxybenzylalkohol

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äq. 4-Hydroxybenzylalkohol und 1.1 Äq. abs. Triethylamin (TEA) in abs. THF oder Diethylether gelöst und auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ (Eisbad) gekühlt. Zu dieser Lösung wurden über 20 bis 60 min die jeweiligen Säurechloride (1.1 Äq., nicht destilliert), gelöst in abs. THF oder Diethylether, getropft. Nach 2 h Reaktionsdauer bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ wurde Triethylammoniumchlorid durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel im Vakuum abkondensiert. Es kann aber auch bei Rt über Nacht gerührt werden (*Variante B*). Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen, mehrmals mit gesättigter Natriumcarbonatlösung und zweimal mit dest. Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum

entfernt. Die Produkte wurden entweder durch Kristallisation oder Chromatographie abschließend gereinigt.

AAV 5: Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramiditen

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurde 1.0 Äq. Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit in abs. THF gelöst. Die Lösung wurde durch ein Stickstoff-Aceton-Kältebad auf ca. -78 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 2.2 Äq. des jeweiligen Esters sowie 2.3 Äq. abs. TEA, beides gelöst in abs. THF, über ein bis zwei Stunden zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde noch weitere 16 bis 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Triethylammoniumchlorid wurde abfiltriert und mit abs. THF gewaschen. Das gelöste Produkt wurde unter Stickstoffgegenstrom aufgenommen und im Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. In einzelnen Fällen musste die Filtration wiederholt werden oder weiteres Triethylammoniumchlorid bei der folgenden Chromatographie abgetrennt werden. Die erhaltenen Rohprodukte (farblose Öle) wurden am Chromatotron mit Petrolether und einem Ethylacetatgradienten bis 80% gereinigt. Es ist sehr darauf zu achten, dass dem Lösungsmittel von Beginn an 5 bis 10% Triethylamin zugesetzt werden und die Chromatographie rasch durchgeführt wird (max. 45 min). Auch dem Lösungsmittel für die DC sollte stets Triethylamin zugesetzt werden und die DC-Karte sollte vor Auftragen der Probe mit dem Eluent äquilibriert werden.

AAV 6: Synthese von Nucleosidmonophosphaten (NMP)

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 4.4 Äq. Phosphorylchlorid (POCl_3) in abs. Acetonitril gelöst und auf 0 °C (Eisbad) gekühlt. Dieser Lösung wurden exakt 4.4 Äq. abs. Pyridin zugefügt. Das Hinzufügen von 2.2 Äq. destilliertem Wasser wurde sehr vorsichtig vorgenommen (langsames eintropfen). Sollte es an dieser Stelle zu einer erkennbaren Reaktion (Zischen, Dampfentwicklung) kommen, muss der Ansatz verworfen werden und von Neuem begonnen werden. Nach 5-10 min wurde 1.0 Äq. des betreffenden Nucleosides als Feststoff oder gelöst in sehr wenig abs. Acetonitril zugegeben. Das entsprechende Nucleosid wurde durch mehrfaches Koevaprieren mit abs. Acetonitril unmittelbar vor der Reaktion getrocknet. Nach 4 bis 5 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von Eiswasser abgebrochen, in einen 250 oder 500 mL Rundkolben überführt und für eine Stunde bei 4 °C im Kühlschrank gerührt. Durch vorsichtige Zugabe von festem Ammoniumhydrogencarbonat wurde ein pH-Wert von 8 eingestellt. Die Lösungsmittel wurden durch Gefriertrocknung über Nacht entfernt. Der erhaltene farblose bis gelbliche Feststoff wurde in wenig Wasser aufgenommen. Ggf. musste etwas Acetonitril oder

Methanol hinzugegeben werden. Es folgte eine Reinigung über RP-18 Kieselgel mit Wasser (ggf. Acetonitril- od. Methanolgradient). Der Nachweis des überschüssigen Phosphatsalzes erfolgte per DC mit einem Schwefelsäure-Anisaldehyd-Reagenz. In der Regel hinterlassen die Phosphatsalze einen farblosen Fleck auf der DC-Karte.

AAV 7: Synthese der Bis-(4-acyloxybenzyl)-Nucleosiddiphosphate (BAB-NDP)

Die Reaktion wurde in einer N₂-Schutzgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 1 Äq. des Nucleosid-Monophosphatsalzes, 1.1-1.2 Äq. Bis-(4-acyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite sowie 1.2 Äq. DCI in 3 bis 6 mL abs. Acetonitril gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde bis mehrere Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v). Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch auf -35 bis -25 °C gekühlt und mit der entsprechenden Anzahl an Äquivalenten *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Es wurde für 10-20 min bei Rt gerührt und anschließend die Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt musste in den meisten Fällen mehrfach säulenchromatographisch an RP-18 Kieselgel mit Wasser und Methanol gereinigt werden (i. d. Regel: Isokratisch Methanol/Wasser, 1:1, 3:1, 5:1 bis 10:1 v/v). Bei den Verhältnissen 1:1 bis 3:1 konnte in den meisten Fällen der Aktivator DCI und nicht umgesetztes NMP abgetrennt werden. Nach der Trennung und vereinen der Fraktionen wurde der Methanol bei niedriger Temperatur am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und das Produkt nach Gefriertrocknung erhalten.

Variante A: Das entsprechende Bis-(tetra-*n*-butylammonium)nucleosidmonophosphat wurde gelöst in abs. Acetonitril als Stammlösung über Molsieb (0.3 nm) unter N₂-Schutzgasatmosphäre und Feuchtigkeitsausschluss bei -18 °C gelagert. Eine definierte Menge wurde direkt vor Reaktionsbeginn in den Reaktionskolben überführt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Variante B: Das entsprechende Bis-(tetra-*n*-butylammonium)nucleosidmonophosphat wurde als Feststoff unter N₂-Schutzgasatmosphäre und Feuchtigkeitsausschluss bei -18 °C gelagert, vor der Reaktion gelöst und die entsprechende Menge in den Reaktionskolben überführt.

AAV 8: Einstellen von Ionentauscherharz

Für den Ionenaustausch wurde DOWEX 50WX8 (Merck, Sigma-Aldrich) eingesetzt und folgendermaßen verwendet: Das Harz wurde in dest. Wasser aufgeschlämmt und in eine

Chromatographiesäule geeigneter Größe gegeben. Bei erstmaliger Verwendung wurde solange mit dest. Wasser gewaschen, bis das Eluat farblos und klar erschien. *Beladung mit Protonen*: Um das Harz mit Protonen zu beladen, wurden 2 bis 5 mL konz. Salzsäure in 100 mL dest. Wasser gelöst und über die Säule gegeben, bis sich ein saurer pH-Wert eingestellt hatte. Die Säule wurde anschließend mit Wasser gewaschen, bis das erhaltene Eluat wieder neutral war. *Beladung mit Ammoniumionen*: Um das Harz mit Ammoniumionen zu beladen, wurde die Säule mit wenig konz. Ammoniak behandelt, bis sich ein basischer pH-Wert eingestellt hatte. Die Säule wurde anschließend mit Wasser gewaschen, bis das erhaltene Eluat wieder neutral war. *Beladung mit Natriumionen*: Es wurde wie oben beschrieben verfahren. Allerdings wurde verdünnte Natronlauge anstatt Ammoniak verwendet.

AAV 9: Ionenaustausch an Phosphatsalzen

Variante A: Die entsprechenden Phosphatsalze wurden als Pulver auf eine Ionentauschersäule (DOWEX 50WX8, H⁺-beladen, pH neutral) gegeben und mit dest. Wasser eluiert. Das Eluat wurde sofort mit einer tetra-*n*-Butylammoniumhydroxidlösung (40% in Wasser, m/v) bis zu einem pH-Wert von 6 titriert und gefriergetrocknet. Die erhaltenen tetra-*n*-Butylammonium-Phosphatsalze wurden vor Gebrauch im Ölpumpenvakuum mehrere Stunden getrocknet. *Variante B*: Die entsprechenden Phosphatsalze wurden als Pulver auf eine Ionentauschersäule (DOWEX 50WX8, H⁺-beladen, pH neutral) gegeben und mit dest. Wasser eluiert. Das Eluat wurde mit wenig THF versetzt und mit Triethylamin bis zu einem pH-Wert von 6 titriert. Die Lösemittel wurden durch Gefrier Trocknung entfernt und die erhaltenen Triethylammonium-Phosphatsalze wurden vor Gebrauch im Ölpumpenvakuum mehrere Stunden getrocknet.

AAV 10: Ionenaustausch an Nucleosidmonophosphaten (NMP)

Die Ammoniumsalze der entsprechenden Nucleosidmonophosphate wurden in wenig Wasser gelöst (ggf. Zugabe von Acetonitril), auf eine Ionentauschersäule (DOWEX 50WX8, H⁺-beladen, pH neutral) gegeben und mit Wasser eluiert. Die Vollständigkeit der Elution wurde mittels DC (UV-Detektion) geprüft. Die vereinigten Phasen wurden sofort mit einer tetra-*n*-Butylammoniumhydroxidlösung (40% in Wasser, m/v) bis zu einem pH-Wert von 6 titriert und gefriergetrocknet. Die tetra-*n*-Butylammoniumsalze der NMPs wurden als gelbliche, hygroskopische Harze erhalten. Diese wurden zur weiteren Verwendung in wenig abs. Acetonitril aufgenommen, vom Lösungsmittel befreit und unter Inertgas bei -26 °C gelagert.

AAV 11: Ionenaustausch an Nucleosiddi- und triphosphaten (NDP und NTP)

Variante A: Der Austausch von Ammoniumkationen auf tetra-*n*-Butylammonium-kationen erfolgte wie in **AAV 10**.

Variante B: Die tetra-*n*-Butylammoniumsalze der entsprechenden Nucleosiddi- bzw. triphosphate wurden in Acetonitril gelöst, auf eine Ionentauschersäule (DOWEX 50WX8, NH₄⁺-beladen, pH neutral) gegeben und mit Wasser eluiert. Die Vollständigkeit der Elution wurde mittels DC (UV-Detektion) überprüft. Die Lösungsmittel wurden durch Gefriertrocknung entfernt und die Produkte als farblose Watten erhalten.

AAV 12: Ionenaustausch an BAB-Nucleosiddiphosphaten (BAB-NDP)

*Variante A, Austausch von tetra-*n*-Butylammoniumkationen gegen Ammoniumkationen:* Die tetra-*n*-Butylammoniumsalze der entsprechenden Nucleosiddiphosphat Prodrugs wurden in wenig Methanol aufgenommen, auf eine ammoniakalische Ionentauschersäule (DOWEX 50WX8, NH₄⁺-beladen, pH neutral) gegeben und mit Wasser (ggf. Zusatz von Methanol) eluiert. Die Vollständigkeit der Elution wurde mittels DC (UV-Detektion) überprüft. Die organischen Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt, anschließend wurde Wasser durch Gefriertrocknung entfernt und die Produkte als farblose Watten erhalten.

*Variante B, Austausch von Tetra-*n*-butylammoniumionen gegen Natriumionen:* Die Tetra-*n*-butylammoniumsalze der entsprechenden Nucleosiddiphosphat Prodrugs wurden in wenig Methanol aufgenommen, auf eine Ionentauschersäule (DOWEX 50WX8, Na⁺-beladen, pH neutral) gegeben und mit Wasser (ggf. Zusatz von Methanol) eluiert. Die Vollständigkeit der Elution wurde mittels DC (UV-Detektion) geprüft. Die organischen Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt, anschließend wurde Wasser durch Gefriertrocknung entfernt und die Produkte als farblose Watten erhalten.

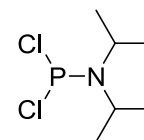
7.2.2 Synthese einiger Reagenzien**Synthese von Dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit 41**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 4.4 mL (6.9 g, 50.3 mmol, 1 Äq.) Phosphortrichlorid in 20 mL abs. Diethylether vorgelegt und auf -20 °C gekühlt. Es erfolgte das langsame Zutropfen von 14.2 mL (10.2 g, 101.0 mmol, 2 Äq.) *N,N*-Diisopropylamin in 20 mL abs. Diethylether. Es bildete sich sofort ein farbloser Niederschlag. Der Reaktionsansatz wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Hilfe einer Umkehrfritte unter Inertgas filtriert. Der Rückstand wurde zweimal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde im

Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Eine weitere Reinigung wurde nicht durchgeführt. Bei Lagerung unter Schutzgas und $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ist das Produkt fest und bleibt über Monate hinweg stabil.

Ausbeute: 9.35 g (46.3 mmol, 92%) eines farblos-gelblichen Öls

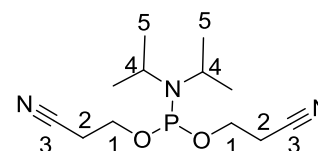
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 3.92 (sept., 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.5\text{ Hz}$, H-iPr), 1.27 (d, 12 H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7\text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{-iPr}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 48.4 (CH-iPr), 48.2 (CH-iPr), 23.6 ($\text{CH}_3\text{-iPr}$), 23.5 ($\text{CH}_3\text{-iPr}$); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CDCl_3) δ [ppm]=



169.5; Dichte [g/mol]: 1.098; Molgewicht [g/mol]: 202.06; Summenformel: $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{NP}$

Synthese von Bis-(2-cyanoethoxy)-N,N-diisopropylphosphoramidit 106

Zu einer Lösung aus 0.66 mL (0.68 g, 9.65 mmol, 2.1 Äq.) frisch destilliertem 3-Hydroxypropionitril und 2.56 mL (1.94 g, 15.1 mmol, 3.3 Äq.) abs. DIPEA in 4 mL abs. THF wurden unter Rühren bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ innerhalb von 15 Minuten 0.912 mL (0.926 g, 4.56 mmol, 1 Äq.) Dichloro-N,N-diisopropylphosphoramidit getropft. Nach Erwärmen auf Rt wurde die Reaktionslösung weitere 30 Minuten gerührt. Der farblose Niederschlag wurde filtriert und dreimal mit 5 mL Diethylether gewaschen. Das Filtrat wurde mit 100 mL Ethylacetat verdünnt und dreimal mit je 15 mL Phosphatpuffer (pH 7.3) gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum der Ölpumpe von den Lösungsmitteln befreit.



Nach Erwärmen auf Rt wurde die Reaktionslösung weitere 30 Minuten gerührt. Der farblose Niederschlag wurde filtriert und dreimal mit 5 mL Diethylether gewaschen. Das Filtrat wurde mit 100 mL Ethylacetat verdünnt und dreimal mit je 15 mL Phosphatpuffer (pH 7.3) gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum der Ölpumpe von den Lösungsmitteln befreit.

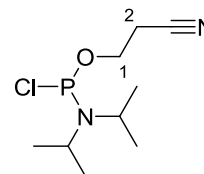
Ausbeute: 725 mg (2.66 mmol, 54%) eines farblosen Öls

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 3.94-3.85 (m, 2H, H-1), 3.85-3.76 (m, 2H, H-1), 3.67-3.56 (m, 2H, H-4), 2.65 (dd, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 6.2\text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 6.2\text{ Hz}$, H-2), 1.20 (s, 6H, H-5), 1.17 (s, 6H, H-5); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 117.7 (2x C-3), 58.6 (C-1), 58.5 (C-1), 43.4 (C-4), 43.3 (C-4), 24.7 (C-5), 24.6 (C-5), 20.5 (C-2), 20.4 (C-2); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CDCl_3) δ [ppm]= 149.06; **R_f-Wert:** 0.56 (Petrolether/Ethylacetat, 1:1 v/v); Molgewicht [g/mol]: 271.29; Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2\text{P}$

Chloro-(2-Cyanoethoxy)-N,N-diisopropylphosphoramidit 61

Diese Verbindung war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden. Eine Lagerung bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ scheint über einen sehr langen Zeitraum möglich zu sein. Sie kann nach *E. Amigues* dargestellt werden.¹²¹

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 4.05 (quint., 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, H-1), 3.86-3.74 (m, 2H, NC-H), 2.74 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, H-2), 1.28 (dd, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 1.4$ Hz, Me), 1.28 (d, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, Me); **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CDCl_3) δ [ppm]= 179.95; Molgewicht [g/mol]: 271.29; Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2\text{P}$; gelbliches Öl;

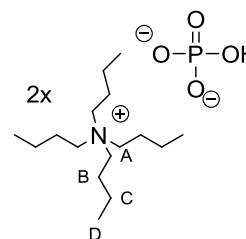


Darstellung von Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-hydrogenphosphat 121b

Die Durchführung erfolgte gemäß **AAV 9**, Variante A. Es wurden 900 mg Natriumdihydrogenphosphat (7.56 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt und mit einer Lösung von Bis-(tetra-*n*-butylammonium)hydroxid (25% in Wasser) auf pH = 6 titriert. *Anmerkung:* Es wird zur Vereinfachung der Nomenklatur und der stöchiometrischen Berechnungen von zwei Gegenionen ausgegangen. Tatsächlich werden bei einem pH-Wert von 6 pro Phosphat lediglich etwa 1.5 Gegenionen ausgetauscht.

Ausbeute: 3.42 g (7.38 mmol, 98%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]= 3.25-3.10 (m, 16H, H-A), 1.71-1.56 (m, 16H, H-B), 1.34 (sext., 16H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-C), 0.93 (t, 24H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-D); **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, ^1H -entkoppelt, D_2O) δ [ppm]= -0.03; Molgewicht [g/mol]: 459.5 (1.5 Gegenionen), 596.95 (2 Gegenionen); Summenformel: $\text{C}_{33}\text{H}_{77}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$

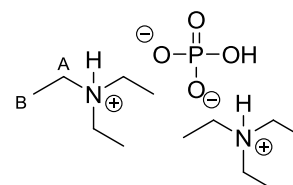


Bis-(triethylammonium)-hydrogenphosphat 121c

Es wurden 0.5 mL (0.77 g, 7.94 mmol) α -Phosphorsäure (85% in Wasser) mit 20 mL dest. Wasser verdünnt. Diese Lösung wurde unter Rühren mit Triethylamin auf pH 6 titriert und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 2.34 g (1.45 mmol, 98%) farbloser, hygroskopischer Feststoff

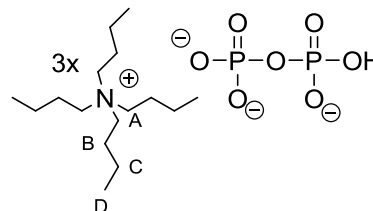
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]= 2.98-2.88 (m, 12H, H-A), 1.04 (t, 9H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, H-B), 1.03 (t, 9H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, H-B); **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, ^1H -entkoppelt, D_2O) δ [ppm]= 0.09; Molgewicht [g/mol]: 300.37 (2 Gegenionen); Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$



Tris-(tetra-*n*-butylammonium)-hydrogenpyrophosphat 123b

Die Durchführung erfolgte gemäß **AAV 9, Variante A**. Es wurden 1.150 g (5.29 mmol, 1.0 Äq.) Dinatriumdihydrogenpyrophosphat eingesetzt und mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (25% in Wasser) auf pH 6 titriert.

Anmerkung: Es wird zur Vereinfachung der Nomenklatur und der stöchiometrischen Berechnungen von drei Gegenionen ausgegangen. Nach Literaturangaben liegen am Neutralpunkt (pH=7) drei Tetra-*n*-butylammoniumionen pro Pyrophosphat vor.^{164,185} Das Molgewicht wurde im Folgenden auf 3 Gegenionen berechnet.



Ausbeute: 4.62 g (5.13 mmol, 98%) eines farblosen, hygroscopischen Feststoffs

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]= 3.27-3.14 (m, 24H, H-A), 1.71-1.58 (m, 24H, H-B), 1.35 (sext., 24H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-C), 0.95 (t, 36H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-D); ³¹P-NMR (162 MHz, ¹H-entkoppelt, D₂O) δ [ppm]= -10.12; Molgewicht [g/mol]: 918.38 (3 Gegenionen);
Summenformel: C₄₉H₁₁₃N₃O₇P₂

7.2.3 Synthese und Modifikation von Nucleosiden

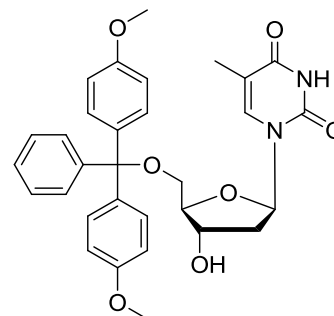
7.2.3.1 Darstellung von 3'-Azidothymidin

Synthese von 5'-O-Dimethoxytritylthymidin

Die Reaktion wurde unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Zunächst wurden 8.02 g (33.1 mmol, 1 Äq.) Thymidin mit 6 mL abs. Pyridin coevaporiert. Nach dem Lösen in 200 mL abs. Pyridin wurden 203 mg (1.66 mmol, 1.6 Äq.) *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP), 6.4 mL (4.7 g, 46 mmol) abs. Triethylamin und portionsweise 13.44 g (39.67 mmol) Dimethoxytritylchlorid (DMTr-Cl) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, durch Zugabe von 100 mL Methanol abgebrochen und im Anschluss vom Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum befreit. Nach der Aufnahme des Rückstandes in 300 mL Chloroform (+ 1% TEA) wurde die organische Phase zweimal mit dest. Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Anschließend wurde das Rohprodukt zweimal mit 100 mL Toluol coevaporiert und aus 100 mL Toluol umkristallisiert. Der Feststoff wurde filtriert, mit kaltem Toluol gewaschen und am Ölpumpenvakuum getrocknet.

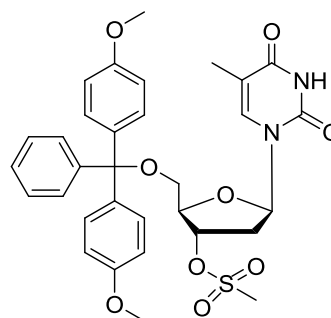
Ausbeute: 17.6 g (32.3 mmol, 98%) eines farblosen Feststoffes

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 11.33 (s, 1H, NH), 7.39 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H-6), 7.34-7.20 (m, 9H, H_{aryl}), 6.93-6.85 (m, 4H, H_{aryl}), 6.21 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H-1'), 5.36 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz, OH-3'), 4.37-4.28 (m, 1H, H-3'), 3.92-3.86 (m, 1H, H-4'), 3.73 (s, 6H, Me), 3.21 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.5 Hz, ³J_{HH} = 4.5 Hz, H-5'a), 3.16 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.5 Hz, ³J_{HH} = 3.6 Hz, H-5'b), 2.24 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.5 Hz, ³J_{HH} = 6.8 Hz, H-2'), 2.19-2.12 (m, 1H, H-2'), 1.44 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, Me_{het}); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 164.1 (C-4), 150.7 (C-2), 135.8 (C-6), 130.1, 129.3, 128.6, 128.3, 128.0, 127.2, 125.7 (C_{aryl}), 113.6 (C-5), 85.8 (C-1'), 84.1 (C-4'), 70.9 (C-5'), 64.1 (C-3'), 55.4 (2x Me), 21.4 (C-2'), 12.1 (Me_{het}). **IR** (KBr): ν [cm⁻¹]= 3449, 3171, 3033, 2925, 1699, 1606, 1509, 1296, 1177, 1055, 962; **Smp.:** 105 °C; **R_f-Wert:** 0.78 (Dichlormethan/Methanol, 19:1 v/v); **Drehwert:** [α]_D²⁵ = +3.1 ° (c = 0.23, Methanol); **MS** (FAB): ber. 544.2 [M⁺], 543.2 [M-H⁺], 545.2 [M+H⁺], gef. 543.2, 545.2; Molgewicht [g/mol]: C₃₁H₃₂N₂O₇; Summenformel: 544.59



5'-O-Dimethoxytrityl-3'-O-mesylylthymidin

Die Reaktion wurde unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Es wurden 16.1 g (29.6 mmol, 1 Äq.) 5'-O-Dimethoxytrityl-2'-desoxythymidin in 60 mL abs. Pyridin gelöst und unter Eiskühlung wurden 8.50 mL (12.6 g, 110 mmol, 3.7 Äq.) Methansulfonylchlorid zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und nach dem Zutropfen von 4 mL dest. Wasser wurde eine weitere Stunde gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in 900 mL Eiswasser gegeben und das entstandene Rohprodukt filtriert. Der zähflüssige Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und die organische Phase dreimal mit dest. Wasser gewaschen. Nachdem die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert wurde, folgte das Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat und das Einengen im Vakuum. Der Feststoff wurde in ca. 40 mL Aceton gelöst und durch die Zugabe von ca. 300 mL Eiswasser gefällt. Das Produkt konnte kalt filtriert werden und wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.



Ausbeute: 16.27 g (26.13 mmol, 88%) eines orangefarbenen Feststoffs

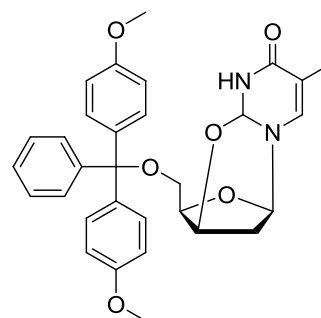
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 8.64 (s, 1H, NH), 7.48 (s, 1H, H-6), 7.22-7.10 (m, 9H, H_{aryl}), 6.79-6.75 (m, 4H, H_{aryl}), 6.37 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.8 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H-1'), 5.31 (m, 1H, H-3'), 4.25 (m, 1H, H-4'), 3.73 (s, 6H, Me), 3.48 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.8 Hz, ³J_{HH} = 3.0 Hz, H-5'a), 3.38 (dd, 1H, ²J_{HH} = 10.8 Hz, ³J_{HH} = 2.3 Hz, H-5'), 2.96 (s, 3H, -SCH₃), 2.61-2.58 (m, 1H, H-2'), 2.44-2.37 (m, 1H, H-2'), 1.39 (s, 3H, Me_{het}); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 159.0 (C-4), 148.6 (C-2), 139.9 (C-6), 130.5, 130.4, 129.5, 128.5, 128.5, 128.3, 128.2, 127.5, 124.8 (C_{aryl}), 113.6 (C-5), 87.1 (C-1'), 85.3 (C-4'), 80.2 (CH₃-S), 77.7 (C-5'), 62.4 (C-3'), 55.7 (2x Me), 39.0 (C-2'), 13.0 (Me_{het}); **IR** (KBr): ν [cm⁻¹]= 3446, 3185, 3056, 2932, 1607, 1582, 1512, 1250, 1070, 829, 634; **Smp.:** 89-90 °C; **R_f-Wert:** 0.49 (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v); **Molgewicht** [g/mol]: 622.69; **Summenformel:** C₃₂H₃₄N₂O₉S

2,3'-Anhydrido-5'-O-dimethoxytrityl-3'-desoxythymidin

Zunächst wurden 24.21 g (130.6 mmol, 5 Äq.) Kaliumphthalimid in 65 mL dest. Wasser gelöst und eine Lösung aus 16.26 g (26.11 mmol, 1 Äq.) 3'-O-Mesyl-5'-O-dimethoxytrityl-2'-desoxythymidin in 200 mL DMF hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 15 Minuten auf 130 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Rt wurde es in 900 mL Eiswasser getropft und das entstandene Rohprodukt filtriert. Dieses wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan mit einem Methanolgradienten 0-20%, 2% Triethylamin) gereinigt.

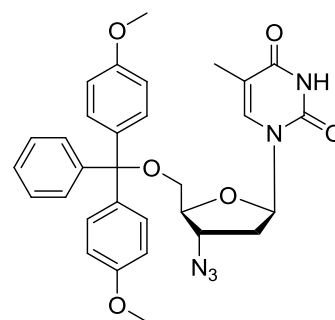
Ausbeute: Es wurden 5.829 g (11.07 mmol, 42%) eines gelblichen Feststoffes erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 7.67 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H-6), 7.44-7.22 (m, 9H, H_{aryl}), 6.92-6.85 (m, 4H, H_{aryl}), 5.93 (d, 1H, ³J_{HH} = 3.8 Hz, H-1'), 5.35 (m, 1H, H-3'), 4.48-4.42 (m, 1H, H-4'), 3.76 (s, 6H, Me), 3.20-3.08 (m, 2H, H-5'), 2.64-2.57 (m, 2H, H-2'), 1.82 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, Me_{het}); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 159.0 (C-4), 152.5 (C-2), 134.9 (C-6), 130.1 (C_{aryl}), 130.0 (C_{aryl}), 129.2 (C_{aryl}), 128.0 (C_{aryl}), 127.9 (C_{aryl}), 127.9 (C_{aryl}), 127.8 (C_{aryl}), 127.1 (C_{aryl}), 126.9 (C_{aryl}), 113.2 (C-5), 87.4 (C-1'), 84.6 (C-4'), 76.7 (C-5'), 62.5 (C-3'), 55.3 (2x Me), 34.5 (C-2'), 13.5 (Me_{het});⁷⁰ **IR** : ν [cm⁻¹]= 3059, 3033, 3002, 2953, 2836, 1770, 1727, 1661, 1608, 1412, 1382, 1177, 1136, 934; **Smp.:** 68 °C; **R_f-Wert:** 0.48 (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v); **Drehwert:** [α]_D²⁵ = -78.8 ° (c = 0.17, Methanol); **Molgewicht** [g/mol]: 528.59; **Summenformel:** C₃₁H₃₂N₂O₆



3'-Azido-3'-desoxy-5'-O-dimethoxytritylthymidin

Es wurden 5.40 g (10.3 mmol, 1 Äq.) 2',3'-Anhydrido-5'-O-dimethoxytrityl-2'-desoxythymidin in 100 mL Dimethylformamid gelöst und 13.2 mL (2.66 g, 54.4 mmol, 5.1 Äq.) Lithiumazid (20%-ige Lösung in Wasser) langsam zugetropft. Nachdem das Reaktionsgemisch für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, folgte das Erhitzen unter Rückfluss für 26 h mit anschließendem Rühren bei Raumtemperatur für weitere 64 h. Das Reaktionsgemisch wurde in 500 mL Ethylacetat gegeben und je zweimal mit 2%-iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, dest. Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die vereinigten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das so gewonnene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Dichlormethan mit einem Methanolgradienten 0-20%, 2% Triethylamin) gereinigt.



Ausbeute: 3.789 g (6.652 mmol, 65%) eines orangenen Feststoffes

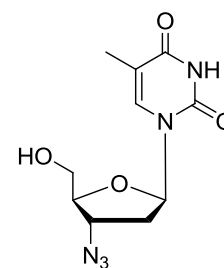
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 9.37 (s, 1H, NH), 7.50 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H-6), 7.40-7.09 (m, 13H, H_{aryl}), 6.20 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.3 Hz, ³J_{HH} = 6.3 Hz, H-1'), 4.30-4.26 (m, 1H, H-3'), 3.91-3.89 (m, 1H, H-4'), 3.71 (s, 6H, Me), 3.27-3.23 (m, 2H, H-5'), 2.43-2.31 (m, 2H, H-2'), 1.42 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, Me_{het}); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 162.6 (C-4), 150.6 (C-2), 135.2 (C-6), 130.1 (C_{aryl}), 130.0 (C_{aryl}), 129.2 (C_{aryl}), 128.0 (C_{aryl}), 127.9 (C_{aryl}), 127.9 (C_{aryl}), 127.8 (C_{aryl}), 127.1 (C_{aryl}), 126.9 (C_{aryl}), 113.1 (C-5), 84.5 (C-1'), 83.5 (C-4'), 61.7 (C-5'), 60.6 (C-3'), 55.2 (2x Me), 36.5 (C-2'), 12.9 (Me_{het}); **IR** : ν [cm⁻¹]= 3128, 3019, 2110, 1724, 1670;¹⁸⁶ **R_f-Wert**: 0.81 (Dichlormethan/Methanol, 10:1 v/v); **Molgewicht** [g/mol]: 569.61; **Summenformel**: C₃₁H₃₁N₅O₆

Darstellung von 3'-Azidothymidin (AZT) 1

Es wurden 2.0 g (3.5 mmol, 1 Äq.) 3'-Azido-2',3'-didesoxy-5'-O-dimethoxytritylthymidin in 40 mL Dichlormethan gelöst. Es wurden 0.80 mL (1.2 g, 10 mmol, 2. Äq.) Trifluoressigsäure zugetropft und die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf konnte dünnschichtchromatographisch (Dichlormethan/Methanol, 20:1 v/v) verfolgt werden. Nach 15 Minuten wurden Lösungsmittel und Trifluoressigsäure am Rotationsverdampfer und im Anschluß im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient 0-5%).

Ausbeute: 0.630 g (2.36 mmol, 67%) eines farblosen Feststoffs

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 11.32 (s, 1H, NH), 7.67 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H-6), 6.08 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.6 Hz, ³J_{HH} = 6.6 Hz, H-1'), 5.21 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.3 Hz, ³J_{HH} = 5.3 Hz, OH-5'), 4.44-4.34 (m, 1H, H-3'), 3.81 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ³J_{HH} = 4.0 Hz, H-4'), 3.67-3.55 (m, 2H, H-5'), 2.42-2.33 (m, 1H, H-2'), 2.31-2.22 (m, 1H, H-2'), 1.77 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, Me_{het}); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 163.7 (C-4), 150.5 (C-2), 136.1 (C-6), 109.6 (C-5), 84.0 (C-1'), 83.4 (C-4'), 60.8 (C-5'), 60.2 (C-3'), 36.2 (C-2'), 12.3 (Me_{het}); **IR** (KBr): ν [cm⁻¹]= 3474, 3403, 3176, 3060, 2925, 2497, 1709, 1659, 1388, 1248, 1050, 959, 757;⁷⁰ **Smp.:** 103-105 °C; **R_f-Wert:** 0.45 (Dichlormethan/Methanol, 20:1 v/v); **Molgewicht** [g/mol]: 267.24; **Summenformel:** C₁₀H₁₃N₅O₄



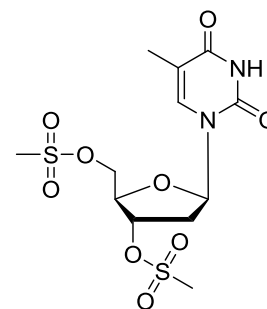
7.2.3.2 Darstellung von 2',3'-Dideoxy-2',3'-dideoxythymidin (d4T)

Darstellung von 3',5'-Di-O-mesylythymidin

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 10.0 g (41.3 mmol) 2'-Desoxythymidin in 40 mL abs. Pyridin suspendiert. Die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und eine Lösung von 7.99 mL (11.7 g, 103 mmol) Methansulfonylchlorid in 10 mL abs. Pyridin langsam dazugetropft. Die Reaktionslösung färbte sich über gelb nach braun. Es wurde 1.5 Stunden bei 0 °C gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 5:1, v/v) verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde die Suspension auf Eiswasser gegeben. Die Lösung wurde zur vollständigen Fällung 24 Stunden bei 4 °C belassen, filtriert und das Rohprodukt aus Aceton umkristallisiert.

Ausbeute: 15.1 g (37.8 mmol; 92%) farblose Kristalle erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 11.43 (s, 1H, NH), 7.51 (s, 1H, H-6), 6.22 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H-1'), 5.30 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H-3'), 4.50-4.41 (m, 2H, H-5), 4.40-4.34 (m, 1H, H-4'), 3.33 (s, 3H, Me), 3.25 (s, 3H, Me), 1.79 (s, 3H, Me_{het}); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 136.6 (C-6), 84.8 (C-1'), 81.3 (C-4'), 80.2 (C-3'), 69.2 (C-5'), 37.6 (Me), 37.2 (Me), 12.8 (Me_{het}); **IR** : ν [cm⁻¹]= 3028, 1719, 1689, 1473, 1355, 1343),



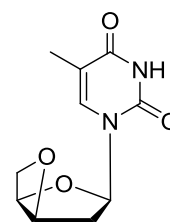
1280, 985, 958, 936, 912, 876, 876, 839, 722; **Smp.:** 132°C, **R_f-Wert:** 0.56 (Dichlormethan/Methanol 5:1, v/v); **MS** (FAB): ber. 399.05 [M+H⁺], gef. 399.1; Molgewicht [g/mol]: 398.41; Summenformel: C₁₂H₁₈N₂O₉S₂

Darstellung von 3',5'-Anhydrothymidin

4.56 g (114 mmol, 3 Äq.) NaOH wurden in 100 mL destilliertem Wasser gelöst. Es wurden portionsweise 15.1 g (37.9 mmol, 1 Äq.) 3',5'-Di-O-mesylylthymidin dazugegeben und 45 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit konzentrierter Salzsäure neutralisiert. Es wurden circa 2/3 des Wassers am Rotationsverdampfer entfernt, bis sich ein farbloser Niederschlag bildete. Zur Kristallisation wurde die Lösung über Nacht bei 4 °C gelagert, dann filtriert und die Kristalle mit kaltem Wasser gewaschen. Die braune Mutterlauge wurde zusätzlich dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt.

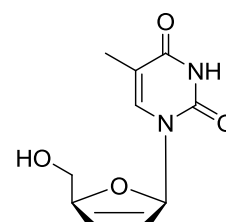
Ausbeute: 5.56 g (24.8 mmol, 65%) hellbraune Kristalle

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 11.35 (s, 1H, NH), 8.02 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H-6), 6.50 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.6 Hz, ³J_{HH} = 6.1 Hz, H-1'), 5.50-5.45 (m, 1H, H-3'), 4.91-4.87 (m, 1H, H-4'), 4.71-4.67 (m, 1H, H-5'a), 4.05-4.01 (m, 1H, H-5'b), 1.78 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, Me_{het}); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 137.4 (C-6), 89.1 (C-1'), 87.7 (C-3'), 80.7 (C-4'), 76.0 (C-5'), 13.2 (Me_{het}); **IR** : ν [cm⁻¹]= 3179, 3070, 1681, 1462, 1268, 989, 955, 938, 903, 859, 814, 787, 753; **IR** (KBr): ν [cm⁻¹]= 3169, 3044, 2876, 2818, 1682, 1466, 1420, 1271, 1090, 970, 951, 859, 759, 425;¹⁸⁷ **UV** (Methanol): λ_{max} [nm]= 264;¹⁸⁷ **Smp.:** 197 °C; **R_f-Wert:** 0.55 (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 224.07 [M+H⁺] gef. 225.1; Molgewicht [g/mol]: 224.2; Summenformel: C₁₀H₁₂N₂O₄



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

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Luftsauerstoff und Feuchtigkeit von der Reaktion auszuschließen. Es wurden 5.56 g (24.8 mmol, 1 Äq.) 3',5'-Anhydrothymidin in 22 mL abs. Dimethylsulfoxid gelöst und die Lösung 15 °C gekühlt. Es wurden portionsweise 4.46 g (39.7 mmol, 1.6 Äq.) Kalium-*tert*-butylat dazugegeben. Bei Raumtemperatur wurde die Lösung 20



Stunden gerührt. Während dieser Zeit fiel ein dunkelbrauner Feststoff aus. Der Verlauf der

Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 9:1, v/v) verfolgt. Zum Abbruch der Reaktion wurde die Lösung auf 200 mL Toluol gegeben, wobei sich ein hellbrauner Niederschlag bildete. Es wurde 20 Minuten gerührt und der Niederschlag filtriert. Der Niederschlag wurde in destilliertem Wasser gelöst Toluol durch Phasentrennung abgetrennt. Die wässrige Phase wurde bei 4 °C mit verdünnter Salzsäure neutralisiert. Es wurde mit viel Essigsäureethylester mehrfach extrahiert. Die organische Phase wurde eingeeengt und zur Kristallisation drei Tage bei 4 °C belassen. Der erhaltene farblose Feststoff wurde filtriert und im Vakuum getrocknet. Die erhaltene wässrige Phase wurde gefriergetrocknet. Das erhaltene Lyophilisat wurde in wenig Wasser aufgenommen und mit viel Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigte organische Phase wurde eingeeengt und ebenfalls zur Kristallisation für drei Tage bei 4 °C belassen, filtriert und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 3.99 g (17.8 mmol, 72%) eines farblosen Feststoffes

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 11.28 (s, 1H, NH), 7.63 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H-6), 6.81 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, H-1'), 6.38 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ³J_{HH} = 5.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, H-3'), 5.90 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ³J_{HH} = 5.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, H-2'), 5.00 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.2 Hz, OH), 4.76-4.73 (m, 1H, H-4'), 3.64-3.60 (m, 2H, H-5), 1.71 (d, 3H, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, Me_{het}); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 164.1 (C-4), 151.0 (C-2), 137.0 (C-6), 135.2 (C-3'), 126.2 (C-2'), 109.2 (C-5), 89.1 (C-1'), 87.5 (C-4'), 62.5 (C-5'), 12.4 (Me_{het}); **IR** : ν [cm⁻¹]= 3465, 3152, 3029, 2930, 2823, 1674, 1455, 1250, 1113, 876, 850, 816, 759; **IR** (KBr): ν [cm⁻¹]=3465, 3155, 3032, 2823, 1682, 1467, 1422, 1343, 1269, 1252, 1226, 1115, 1091, 1072, 975, 881, 851, 819, 780, 760, 742, 582, 429;¹⁸⁷**UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_R [min]= 2.99, Methode 5; **Smp.:** 146 °C; **R_F-Wert:** 0.39 (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v), 0.16 (Dichlormethan/Methanol, 20:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 225.1 [M+H⁺], 246.1 [M+Na⁺-H⁺], 247.1 [M+Na⁺], gef. 225.2, 246.2, 247.2; Molgewicht [g/mol]: 224.21; Summenformel: C₁₀H₁₂N₂O₄

7.2.3.3 Darstellung von 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydroadenosin (d4A)

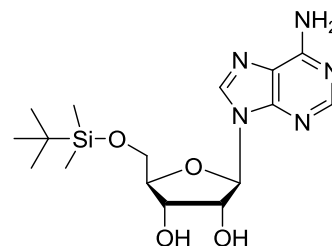
Darstellung von 5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-Adenosin

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 5.00 g (18.6 mmol) Adenosin wurden in 20 mL abs. Dimethylformamid (DMF) suspendiert. Portionsweise wurden 3.11 g (20.6 mmol) *tert*-Butylsilylchlorid (TBDMSCl) gelöst in 1.63 mL (20.6 mmol) abs. Pyridin hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 2:1,

v/v) verfolgt. Zum Abbruch der Reaktion wurden 50 mL Methanol hinzugegeben und die Lösung langsam in 400 mL kaltes Toluol getropft. Nach vollständiger Kristallisation über Nacht bei 4 °C wurde filtriert. Der farblose Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Eluentengemisch (Dichlormethan/Ethylacetat 2:1, v/v; Triethylamin 1%) gereinigt.

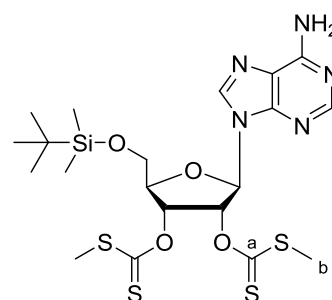
Ausbeute: 6.32 g (16.6 mmol, 89%) eines farblosen Feststoffs

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]= 8.28 (s, 1H, H-2), 8.14 (s, 1H, H-8), 7.29 (s, 2H, NH₂), 5.90 (d, ³J_{HH} = 4.9 Hz, 1H, H-1'), 5.54 (d, ³J_{HH} = 5.8 Hz, 1H, OH-2'), 5.20 (d, ³J_{HH} = 5.5 Hz, 1H, OH-3'), 4.53 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 5.1 Hz, ³J_{HH} = 10.5 Hz, ³J_{HH} = 10.5 Hz, H-2'), 4.17 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 4.9 Hz, ³J_{HH} = 9.8 Hz, ³J_{HH} = 9.8 Hz, H-3'), 3.95 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 4.0 Hz, ³J_{HH} = 8.9 Hz, ³J_{HH} = 8.9 Hz, H-4'), 3.87 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.5 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, H-5'a), 3.74 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.4 Hz, ³J_{HH} = 4.2 Hz, H-5'b), 0.87 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 0.04 (s, 6H, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]= 156.0 (C-6), 152.6 (C-8), 149.4 (C-4), 138.9 (C-2), 119.0 (C-5), 87.4 (C-1'), 84.4 (C-4'), 73.6 (C-2'), 69.8 (C-3'), 62.8 (C-5'), 25.8 (3x CH₃-*t*Bu), 18.1 (CH-*t*Bu), -5.4 (2x Me); **Smp.:** 125-126 °C;¹⁸⁸ **R_f-Wert:** 0.51 (Dichlormethan/Methanol 9:1, v/v); **MS** (FAB): ber. 382.2 [M+H⁺], gef. 382.2; Molgewicht [g/mol]: 381.50; Summenformel: C₁₆H₂₇N₅O₄Si



Darstellung von 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2',3'-*O*-bis(dithiocarbonyl)adenosin

500 mg (1.31 mmol, 1 Äq.) 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-Adenosin wurden in 5 mL Dimethylsulfoxid gelöst, 0.27 mL (0.34 g, 4.4 mmol, 3.4 Äq.) Kohlenstoffdisulfid zugegeben und anschließend die Lösung tropfenweise mit 0.58 mL 5 N NaOH versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Minuten gerührt und es wurden 0.18 mL (0.41 g, 2.9 mmol, 2.2 Äq.) Methylidiod tropfenweise zugegeben. Nach einer Stunde wurde unter Rühren bei Raumtemperatur zum Abbruch der Reaktion Acetatpuffer (pH=4-5) hinzugegeben. Es wurde mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase mit destilliertem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel destillativ am Rotationsverdampfer entfernt. Das gelb schaumige Rohprodukt wurde am Chromatotron (Dichlormethan mit einem Methanolgradienten 0-20%, 1% Triethylamin) gereinigt.



Ausbeute: 456 mg (0.812 mmol; 62%) eines farblosen Harzes

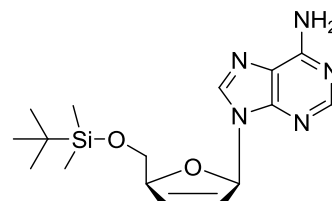
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 8.29 (s, 1H, H-2), 8.14 (s, 1H, H-8), 7.41 (br s, 2H, NH₂), 6.78 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H-2'), 6.50 (dd, 1H, ³J_{HH} = 3.9 Hz, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H-3'), 6.45 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.5 Hz, H-1'), 4.53 (dd, 1H, ³J_{HH} = 3.6 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H-4'), 3.97 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.5 Hz, ³J_{HH} = 3.6 Hz, H-5'a), 3.93 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.5 Hz, ³J_{HH} = 3.6 Hz, H-5'b), 2.63 (s, 3H, H-b), 2.54 (s, 3H, H-b), 0.86 (s, 9H, CH₃-tBu), 0.06 (s, 6H, Me), 0.06 (s, 6H, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 156.2 (C-6), 152.9 (C-8), 149.1 (C-4), 139.3 (C-2), 118.9 (C-5), 85.1 (C-1'), 82.4 (C-4'), 79.6 (C-2'), 78.0 (C-3'), 62.4 (C-5'), 25.8 (3x CH₃-tBu), 18.8 (CH-tBu); **Drehwert:** [α]_{599nm}²⁵ = -55.6 ° (c = 1.0; CHCl₃); **R_f-Wert:** 0.69 (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 561.1 [M⁺], 562.1 [M+H⁺], gef. 562.1; **Molgewicht** [g/mol]: 561.83; **Summenformel:** C₂₀H₃₁N₅O₄S₄Si

Darstellung von 5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydroadenosin

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 257 mg (0.457 mmol, 1 Äq.) 5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-2',3'-O-bis(dithiocarbonyl)adenosin in 5 mL abs. Toluol gelöst und über eine Stunde ein Ansatz aus 30 mg (0.17 mmol, 0.4 Äq.) 2,2'-Azobisisobutyronitril und 425 mg (0.561 mL, 1.82 mmol, 3.9 Äq.) Tris(trimethylsilyl)silan in 2 mL Toluol in der Siedehitze zugetropft. Es wurde weitere 20 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 20:1, v/v) verfolgt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das gelb ölige Rohprodukt am Chromatotron (Dichlormethan mit einem Methanolgradienten 0-15%, 1%Triethylamin) gereinigt. Es war nötig erhaltene Mischfraktionen ein zweites Mal unter den gleichen Bedingungen zu chromatographieren.

Ausbeute: 132 mg (0.379 mmol, 83%) hellgelbe Kristalle

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 8.15 (s, 1H, H-2), 8.09 (s, 1H, H-8), 7.26 (br s, 2H, NH₂), 6.94 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.0 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.6 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.6 Hz, H-1'), 6.45 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ³J_{HH} = 6.1 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.6 Hz, H-3'), 6.17 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 5.9 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.3 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.2 Hz, H-2'), 4.95-4.86 (m, 1H, H-4'), 3.77 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 15.3 Hz, ³J_{HH} = 11.4 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 3.4 Hz, H-5'), 0.82 (s, 9H, CH₃-tBu), -0.03 (s, 6H, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 156.1 (C-6), 152.7 (C-8), 149.3 (C-4), 138.8 (C-2), 133.8 (C-3'), 125.8 (C-2'), 118.7 (C-5), 87.6, 87.5 (C-1', C-4'), 64.7 (C-5'), 25.8 (3x CH₃-tBu), 18.2 (CH-tBu), -5.3 (2x



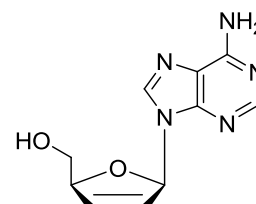
Me); **Drehwert:** $[\alpha]_D^{25} = +75.7^\circ$ ($c = 1.0$; Trichlormethan); **Smp.:** 69°C ; **R_f-Wert:** 0.45 (Dichlormethan/Methanol 20:1, v/v); **MS (FAB):** ber. 347.2 $[M^+]$, 348.2 $[M+H^+]$, gef. 348.2; Molgewicht $[\text{g/mol}]$: 347.48; Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_2\text{Si}$

Darstellung von 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydroadenosin

124 mg (0.357 mmol, 1. Äq.) 5'-O-*tert*-Butyldimethylsilyl-2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydroadenosin wurden in 4 mL THF gelöst und 0.55 mL einer 1 molaren Lösung von Tetrabutylammoniumfluorid in THF dazugetropft. Die Lösung färbte sich gelb. Es wurde 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanol-Gradient, 1% Triethylamin) gereinigt.

Ausbeute: 81 mg (0.35 mmol, 98%) farblose Kristalle

¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]= 8.16 (s, 1H, H-2), 8.15 (s, 1H, H-8), 7.26 (br s, 2H, NH₂), 6.94 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.1$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, H-1'), 6.46 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, H-3'), 6.14 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 2.2$ Hz, H-2'), 5.04



(dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, OH-5'), 4.93-4.81 (m, 1H, H-4'), 3.57 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 4.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.1$ Hz, H-5'); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm]= 156.1 (C-6), 152.6 (C-8), 149.2 (C-4), 139.2 (C-2), 134.4 (C-3'), 125.5 (C-2'), 118.7 (C-5), 88.1 (C-1'), 87.8 (C-4'), 62.8 (C-5'); **IR** (KBr): ν [cm^{-1}]= 3329, 3186, 2915, 1656, 1600, 1476, 1167, 1124, 1040, 984, 966, 850; **Smp.:** 55°C ; **R_f-Wert:** 0.17 (Dichlormethan/Methanol, 17:1 v/v); Molgewicht $[\text{g/mol}]$: 233.23; Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_2$

7.2.3.4 Synthese von D-*carba*-dT

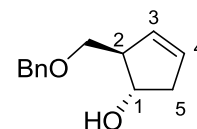
Die Synthese von D-*carba*-dT erfolgte in Zusammenarbeit mit S.Jessel.¹³⁵

Darstellung von (1*R*,2*S*)-2-Benzylloxymethylcyclopent-3-enol D-76

Die Reaktion wurde in einer N₂-Schutzgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Zur Darstellung von (+)-Diisopinocampheylboran wurde (-)- α -Pinen (12.01 g, 88.2 mmol) langsam bei 0°C mit einer 1 molaren Boran-THF-Lösung (40 mL, 40 mmol) versetzt. Dann wurde das Reaktionsgemisch 5 Stunden bei 0°C gerührt. Zu einer Suspension aus 1.20 g (50.0 mmol) Natriumhydrid in 50 mL abs. THF wurden bei 0°C langsam 5.0 mL (60 mmol) frisch destilliertes Cyclopentadien zugetropft und eine Stunde auf dem Eisbad gerührt. Die blassrosa Lösung wurde langsam bei -40°C zu einer stark

rührenden Lösung aus 8.4 mL (60 mmol) Benzylchlormethylether in 20 mL abs. DMF getropft. Nach 30 min starken Rühren wurde die Reaktionslösung in 300 mL eiskaltem Petrolether und Wasser im Verhältnis 2:1 aufgenommen und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde noch zweimal mit je 100 mL Eiswasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel bei -10 °C im Vakuum entfernt. Das gelbliche Öl wurde in 50 mL abs. THF aufgenommen und bei -78 °C tropfenweise mit einer zuvor frisch dargestellten Suspension von 50 mL (50 mmol) (+)-Diisopinocampheylboran in abs. THF zugetropft. Nach einer Stunde Rühren bei -60 °C wurde langsam auf 0 °C erwärmt und noch für weitere 16 h bei dieser Temperatur gerührt. Die Hälfte des Lösungsmittels wurde dann durch abs. Diethylether ersetzt. Im Anschluss wurden bei 0° erst 18 mL 3 N NaOH-Lösung und dann 18 mL 30% H₂O₂ zugetropft. Es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Petrolether/Essigester 3:1 v/v). Als Nebenprodukt fällt in geringen Mengen Cyclopentenol an.

Ausbeute: 6.74 g (33.0 mmol, 66%) farbloses Öl



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.30-7.20 (m, 5H, H_{aryl}), 5.69 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 4.2 Hz, ³J_{HH} = 6.2 Hz, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, H-3), 5.59 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 4.1 Hz, ³J_{HH} = 6.2 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, H-4), 4.47 (s, 2H, H-Bn), 4.25 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 4.3 Hz, ³J_{HH} = 4.3 Hz, ³J_{HH} = 7.0 Hz, H-1), 3.38 (dd, 1H, ²J_{HH} = 9.3 Hz, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H-6a), 3.26 (dd, 1H, ²J_{HH} = 9.3 Hz, ³J_{HH} = 9.3 Hz, H-6b), 3.04-2.97 (m, 1H, H-2), 2.64 (dddd, 1H, ²J_{HH} = 16.9 Hz, ³J_{HH} = 4.1 Hz, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, H-5a), 2.23 (dddd, 1H, ³J_{HH} = 4.3 Hz, ³J_{HH} = 4.3 Hz, ³J_{HH} = 16.9 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, H-5b), 1.66 (bs, 1H, OH); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 138.7 (C_{aryl}), 130.5 (C-3), 129.7 (C-4), 128.9, 128.1, 128.0 (C_{aryl}), 76.8 (C-1), 73.7 (C-Bn), 72.6 (C-6), 55.6 (C-2), 41.4 (C-5); **IR** : ν [cm⁻¹]= 3373, 3087, 3060, 3031, 2858, 1701, 1495, 1453, 1361, 1312, 1274, 1205, 1099, 1028, 951, 736, 613; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = -87.4 ° (c = 0.91, Chloroform), Lit.: [α]_D²⁰ = +88 ° (c = 1.0, CHCl₃);¹³⁴ **R_f-Wert**: 0.48 (Petrolether/Ethylacetat, 1:1 v/v); **MS** (HR-FAB): ber. 205.1229 [M+H⁺], gef. 205.1225; Molgewicht [g/mol]: 204.26; Summenformel: C₁₃H₁₆O₂

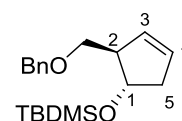
(1S,2R)-2-(Benzyloxymethyl)-1-(tert-butyl dimethylsilyloxy)cyclopent-3-en 77

Die Reaktion wurde in einer N₂-Schutzgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 1.95 g (9.54 mmol, 1 Äq.) (1R,2S)-2-(Benzyloxymethyl)-cyclopent-

3-enol in 20 mL absolutem DMF gelöst. Nach Zugabe von 1.69 g (24.8 mmol, 2.6 Äq.) Imidazol und 1.87 g (12.4 mmol, 1.3 Äq.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid wurde für 1.5 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Es wurde viermal mit dest. Wasser gewaschen, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Petrolether/Ethylacetat 2:1 v/v.)

Ausbeute: 2.55 g (8.01 mmol, 84%) eines gelblichen Öls.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.27-7.19 (m, 5H, H_{aryl}), 5.64 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 4.2 Hz, ³J_{HH} = 6.2 Hz, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, H-4), 5.59 (dd, 1H, ³J_{HH} = 2.1 Hz, ³J_{HH} = 6.0 Hz, H-3), 4.46 (s, 2H, H-Bn), 4.22 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 4.3 Hz, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H-1), 3.37-3.30 (m, 2H, H-6), 2.77 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 1.9 Hz, ³J_{HH} = 1.9 Hz, ³J_{HH} = 7.9 Hz, H-2), 2.56 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 9.0 Hz, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, H-5a), 2.19 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 16.9 Hz, ³J_{HH} = 4.1 Hz, ³J_{HH} = 7.0 Hz, H-5b), 0.81 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 0.05-0.02 (m, 6H, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 130.4, 129.4, 128.3 (C_{aryl}), 127.6 (C-3), 127.5 (C-4), 75.1 (C-1), 73.1 (C-7), 72.2 (C-6), 42.1 (C-5), 25.9 (C-*t*Bu), -4.7 (Me); **IR** (film): ν [cm⁻¹]= 2953, 2928, 2886, 2856, 1723, 1252, 1097, 1068, 834, 775; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = +143 ° (c = 2.5; Chloroform); **R_f-Wert**: 0.66 (Petrolether/Ethylacetat, 1:1 v/v); **MS** (EI⁺): ber. 317.2 [M-H⁺], 318.2 [M⁺], gef. 317.2; Molgewicht [g/mol]: 318.52; Summenformel: C₁₉H₃₀O₂Si

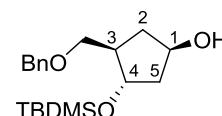


(1R,3R,4S)-3-(Benzyloxymethyl)-4-(tert-butyldimethylsilyloxy)-cyclopentanol 78

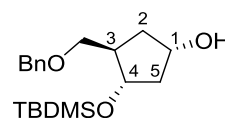
Die Reaktion wurde in einer N₂-Schutzgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 1.82 g (5.69 mmol) (1S,2R)-2-(Benzyloxymethyl)-1-(tert-butyldimethylsilyloxy)cyclopent-3-en wurden in 50 mL absolutem THF gelöst und auf 0°C abgekühlt. Dann wurden langsam 22.8 mL 9-BBN-Lösung (0.5 M in THF, 11.4 mmol) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde langsam auf Raumtemperatur gebracht und 16 Stunden gerührt. Dann wurden 5 mL einer 3 molaren NaOH-Lösung und anschließend 5 mL 30%ige Wasserstoffperoxidlösung zugefügt und weitere 5 Stunden gerührt. Nach Filtration wurde das Filtrat dreimal mit Ethylacetat gewaschen und von den vereinigten organischen Phasen das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/Ethylacetat, 3:1 v/v).

Ausbeute: 1.33 g (3.95 mmol, 70%) eines gelblichen Öls.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.37-7.27 (m, 5H, H_{aryl}), 4.56 (d, 2H, ³J_{HH} = 1.6 Hz, H-Bn), 4.26-4.25 (dd, 2H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, ³J_{HH} = 12.1 Hz, H-1, H-4), 3.53-3.46 (m, 2H, H-6), 2.36-2.27 (m, 1H, H-2a), 2.08 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 4.7 Hz, ³J_{HH} = 9.6 Hz, H-5a), 1.99-1.94 (m, 1H, H-3), 1.77-1.70 (m, 1H, H-5b), 1.48-1.44 (m, 1H, H-2b), 0.86 (s, 9H, CH₃-tBu), 0.01 (s, 6H, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 128.5, 127.8, 127.7 (C_{aryl}), 74.8 (C-4), 73.3 (C-7), 71.9 (C-1), 71.5 (C-6), 47.1 (C-3), 45.8 (C-5), 37.4 (C-2), 25.8 (C-tBu), -4.6 (Me), -4.8 (Me); **IR** : ν [cm⁻¹]= 3345, 2928, 2860, 1715, 1452, 1272, 1096, 1069, 1025, 712; **R_f-Wert**: 0.16 (Petrolether/Ethylacetat, 2:1 v/v); **Drehwert**: [α]_D²⁰ = +27.0 ° (c = 1.5, Chloroform); **MS** (EI⁺): ber. 336.2 [M⁺], 338.3 [M+2H⁺], gef. 338.3; Molgewicht [g/mol]: 336.54; Summenformel: C₁₉H₃₂O₃Si

**(1S,3R,4S)-3-(Benzyloxymethyl)-4-(tert-butyldimethylsilyloxy)cyclopentanol 79**

Die Reaktion wurde in einer N₂-Schutzgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 2.07 g (7.72 mmol) Triphenylphosphin in 20 mL absolutem Diethylether suspendiert, auf 0 °C gekühlt und 1.52 mL (7.72 mmol) DIAD zugetropft. Zu der Suspension wurde eine Lösung aus 1.3 g (3.9 mmol) (1R,3R,4S)-3-(Benzyloxymethyl)-4-(tert-butyldimethylsilyloxy)-cyclopentanol und 945 mg (7.72 mmol) Benzoesäure in 30 mL absolutem Diethylether getropft, wobei sich die Suspension aufhellte. Nach 14 h Rühren bei Rt wurde das Reaktionsgemisch filtriert und mit Ethylacetat gewaschen.



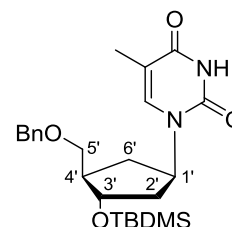
Anschließend wurden das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und 20 mL einer 1%igen methanolischen NaOH-Lösung zugegeben. Nach weiteren 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur, wurde die Lösung mittels 1 molarer Salzsäure neutralisiert, die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Petrolether/Ethylacetat, 3:1 v/v).

Ausbeute: 1.21 g (3.59 mmol, 93%) gelbliches Öl

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.36-7.28 (m, 5H, H_{aryl}), 4.53-4.45 (m, 2H, H-Bn), 4.26-4.21 (m, 2H, H-1, H-4), 3.36 (dd, 1H, ³J_{HH} = 9.3 Hz, ⁴J_{HH} = 5.6 Hz, H-6a), 3.23 (dd, 1H, ³J_{HH} = 9.3 Hz, ⁴J_{HH} = 7.4 Hz, H-6b), 2.51-2.44 (m, 1H, H-2), 2.10-2.04 (m, 1H, H-5b), 1.83-1.76 (m, 1H, H-3), 1.54 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 14.2 Hz, ³J_{HH} = 6.9 Hz, ⁴J_{HH} = 5.6 Hz, H-5a), 1.29-1.22 (m, 1H, H-2a), 0.88 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 0.09 (s, 6H, Me), 0.07 (s, 6H, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 128.3, 127.5, 127.4 (C_{aryl}), 74.1 (C-4), 73.0 (C-7), 72.1 (C-1), 71.5 (C-6), 47.4 (C-3), 42.9 (C-5), 38.0 (C-2), 25.8 (C-*t*Bu), -4.8 (Me), -4.9 (Me); **IR** : ν [cm⁻¹]= 3344, 3063, 3030, 2928, 2857, 1715, 1453, 1273, 1068, 698; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = -10.5 ° (c= 2.3, Chloroform); **R_f-Wert**: 0.26 (Petrolether/Ethylacetat, 2:1 v/v); **MS** (EI⁺): ber. 336.2 [M⁺] gef. 336.2; Molgewicht [g/mol]: 336.54; Summenformel: C₁₉H₃₂O₃Si

5'-O-Benzyl-3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-D-carba-dT 80

Die Reaktion wurde in einer N₂-Schutzgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 2.72 g (10.4 mmol) Triphenylphosphin in 20 mL abs. Diethylether suspendiert, auf 0 °C gekühlt und 1.88 mL (9.68 mmol) DIAD zugetropft. Zu der Suspension wurde eine Lösung aus 1.16 g (3.46 mmol) (1*S*,3*R*,4*S*)-3-(Benzyloxymethyl)-4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-



cyclopentanol und 1.50 g (6.91 mmol) *N*3-Benzoylthymin in 30 mL abs. Diethylether getropft, wobei sich die Suspension aufhellte. Nach 14 h Rühren bei Rt wurde das Reaktionsgemisch filtriert und mit Ethylacetat gewaschen. Anschließend wurden das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und 20 mL einer 1%igen methanolischen NaOH-Lösung zugegeben. Nach weiteren 16 h Rühren bei Raumtemperatur, wurde die Lösung mittels 1 molarer Salzsäure neutralisiert, die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Petrolether/Ethylacetat, 3:1 v/v).

Ausbeute: Das so erhaltene Produkt zeigte noch Spuren von Triphenylphosphinoxid und wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

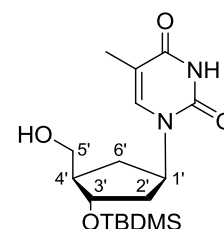
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 9.10 (s, 1H, NH), 7.36-7.28 (m, 5H, H_{aryl}), 7.09 (s, 1H, H-6), 5.13 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.8 Hz, ³J_{HH} = 8.8 Hz, H-1'), 4.55-4.48 (m, 2H, H-Bn), 4.23 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.9 Hz, ³J_{HH} = 4.9 Hz, H-3'), 3.73-3.71 (m, 2H, H-5'), 2.21-2.10 (m, 1H, H-4'), 1.95 (dd, 2H, ³J_{HH} = 5.2 Hz, ³J_{HH} = 8.7 Hz, H-6'), 1.73 (s, 3H, Me_{het}), 1.40-1.31 (m, 2H, H-2'), 0.86 (s, 9H, CH₃-tBu), 0.03 (s, 6H, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 163.8 (C-4), 151.0 (C-2), 137.2 (C-6), 128.4, 127.7, 127.6 (C_{aryl}), 110.9 (C-5), 73.9 (C-1'), 61.8 (C-5'), 54.4 (C-3'), 47.6 (C-4'), 40.3 (C-2'), 31.9 (C-6'), 25.7 (C-tBu), 12.3 (Me_{het}), -4.7 (Me), -4.9 (Me); **IR:** ν [cm⁻¹]= 3164, 3028, 2952, 2928, 2854, 1681, 1648, 1078, 835, 776; **R_f-Wert:** 0.72 (Petrolether/Ethylacetat, 2:1 v/v); **MS** (EI⁺): ber. 444.2 [M⁺], 445.2 [M+H⁺], gef. 445.2; Molgewicht [g/mol]: 444.63; Summenformel: C₂₄H₃₆N₂O₄Si

3'-O-tert-Butyldimethylsilyl-D-carba-dT 73

220 mg (550 μmol) 5'-O-Benzyl-3'-O-tert-butyldimethylsilyl-D-carba-dT wurden in 2 mL 99.9%igem Ethanol gelöst und in Anwesenheit des Hydrierkatalysators Palladium auf Aktivkohle (10% Palladium, Wassergehalt 60%) unter Wasserstoffatmosphäre 16 h bei Raumtemperatur gerührt, bis das Edukt vollständig umgesetzt war. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und mit Ethanol gespült. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck, wurde der Rückstand am Chromatotron (Dichlormethan) gereinigt.

Ausbeute: 157 mg (503 μmol, 92%) farbloses Öl

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 9.38 (s, 1H, NH), 7.11 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 0.9 Hz, H-6), 5.01-4.92 (m, 1H, H-1'), 4.24 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.7 Hz, ³J_{HH} = 11.3 Hz, ³J_{HH} = 11.3 Hz, H-3'), 3.72 (dd, 2H, ²J_{HH} = 2.3 Hz, ³J_{HH} = 5.1 Hz, H-5'), 2.29-2.21 (m, 1H, H-4'), 2.13-1.96 (m, 3H, H-6a, H-2'), 1.91 (d, ⁴J_{HH} = 0.9 Hz, 3H, Me); 0.87 (s, 9H, CH₃-tBu); 0.06 (s, 3H, Me_{het}), 0.04 (s, 3H, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 164.0 (C-4), 151.0 (C-2), 138.1 (C-6), 110.9 (C-5), 73.9 (C-1'), 63.5 (C-5'), 55.9 (C-3'), 40.3 (C-4'), 39.8 (C-2'), 31.3 (C-6'), 25.8 (C-tBu), 12.5 (Me_{het}), -4.6 (Me), 4.9 (Me); **IR:** ν [cm⁻¹]= 3374, 3184, 3036, 2953, 2927, 2855, 1676, 1257, 1047, 833; **R_f-Wert:** 0.25 (Petrolether/Ethylacetat, 2:1 v/v); **Drehwert:** [α]_D²⁰ = 19.3 ° (c = 1.6; Chloroform); **MS** (EI⁺): ber. 354.2 [M⁺], 355.2 [M+H⁺], gef. 355.2; Molgewicht [g/mol]: 354.51; Summenformel: C₁₇H₃₀N₂O₄Si



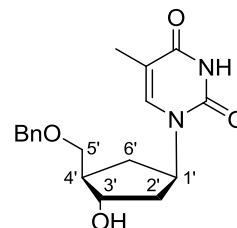
5'-O-Benzyl-D-carba-dT 81

Es wurden 790 mg (1.40 mmol) 5'-O-Benzyl-3'-O-tert-butyldimethylsilyl-D-carba-dT in 24 mL THF gelöst und 2.1 mL einer 1 molaren Lösung von TBAF in THF zugetropft. Nach Rühren

für 3 h wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient 0-10% v/v).

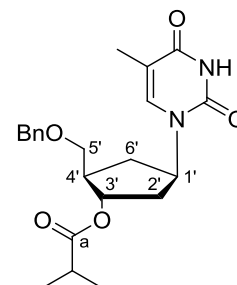
Ausbeute: 295 mg (893 μmol , 64%) hellgelbliches Öl

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 9.45 (s, 1H, NH), 7.37-7.28 (m, 5H, H_{aryl}), 7.06 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 0.8$ Hz, H-6), 5.14 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ Hz, H-1'), 4.57-4.50 (m, 2H, H-Bn), 4.28 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 11.2$ Hz, H-3'), 3.66 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 9.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.3$ Hz, H-5'a), 3.52 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 9.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, H-5'b), 2.32-2.17 (m, 2H, H-4', H-6'a), 2.07 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 8.6$ Hz, H-2'), 1.80 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 0.8$ Hz, Me_{het}), 1.53 (ddd, $^2J_{\text{HH}} = 12.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 9.3$ Hz, $^3J = 9.3$ Hz, H-6'b); **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 163.9 (C-4), 151.1 (C-2), 137.2 (C-6), 128.5, 127.8, 127.6 (C_{aryl}), 111.1 (C-5), 75.0 (C-1'), 73.4 (Me_{het}), 72.3 (C-5'), 54.2 (C-3'), 46.7 (C-4'), 39.3 (C-2'), 32.4 (C-6), 12.4 (Me_{het}); **IR**: ν [cm^{-1}]= 3391, 3181, 3031, 2926, 2855, 1655, 1453, 1271, 1070, 743; **Drehwert**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -10.8^\circ$ ($c = 1.6$; Chloroform); **R_f-Wert**: 0.30 (Dichlormethan/Methanol, 19:1 v/v); **MS** (EI^+): ber. 330.1 [M^+], 331.2 [$\text{M}+\text{H}^+$], gef. 331.1; Molgewicht [g/mol]: 330.37; Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$



5'-O-Benzyl-3'-O-iso-butyryl-D-carba-dT

Die Reaktion wurde in einer N_2 -Schutzgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 263 mg (797 μmol) 5'-O-Benzyl-D-carba-dT mit abs. Pyridin coevaporiert und anschließend in 5 mL abs. Pyridin gelöst. Nach Zutropfen von 0.53 mL (3.2 mmol) frisch destilliertem *iso*-Buttersäureanhydrid wurde das Reaktionsgemisch für 3 h gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Es wurden erneut 0.27 mL (1.59 mmol) *iso*-Buttersäureanhydrid zugegeben und für weitere 2 h gerührt. Durch Zugabe von 1.5 mL Methanol wurde die Reaktion beendet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand zweimal mit Toluol coevaporiert. Nachdem der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen wurde, wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient 0-3% v/v).



Ausbeute: 295 mg (893 μmol , 64%) hellgelbliches Öl

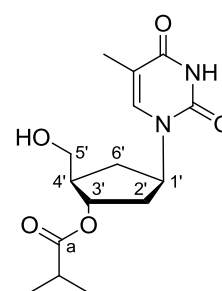
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 9.22 (s, 1H, NH), 7.37-7.28 (m, 5H, H_{aryl}), 7.12 (s, 1H, H-6), 5.26-5.17 (m, 1H, H-1'), 5.15 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 2.7 Hz, ³J_{HH} = 5.6 Hz, ³J_{HH} = 5.6 Hz, H-3'), 4.58-4.48 (m, 2H, H-Bn), 3.70 (dd, 1H, ²J_{HH} = 9.1 Hz, ³J_{HH} = 3.9 Hz, H-5'a), 3.56 (dd, 1H, ²J_{HH} = 9.1 Hz, ³J_{HH} = 3.6 Hz, H-5'b), 2.79 (sept., 1H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, CH-*t*Bu), 2.56-2.47 (m, 1H, H-4'), 2.41-2.25 (m, 2H, H-6'), 2.15-2.02 (m, 2H, H-2'), 1.74 (s, 3H, Me_{het}), 1.16 (d, 3H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, CH₃-*t*Bu), 1.14 (d, 3H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, CH₃-*t*Bu); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 176.8 (C-8), 163.7 (C-4), 151.1 (C-2), 136.4 (C-6), 128.5, 127.8, 127.6 (C_{aryl}), 111.3 (C-5), 76.5 (C-1'), 73.5 (C-Bn), 71.3 (C-5'), 53.8 (C-3'), 44.3 (C-4'), 37.5 (C-2'), 33.9 (CH-*t*Bu), 32.1 (C-6'), 18.8 (2x Me), 12.4 (Me_{het}); **IR**: ν [cm⁻¹]= 3184, 3033, 2971, 2926, 2854, 1677, 1269, 1154, 713; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = -4.9 ° (c = 1.7; Chloroform); **R_F-Wert**: 0.60 (Petrolether/Ethylacetat, 9:1 v/v); **MS** (EI⁺): ber. 400.2 [M⁺], 401.2 [M+H⁺], gef. 401.2; Molgewicht [g/mol]: 400.46; Summenformel: C₂₂H₂₈N₂O₅

3'-O-iso-Butyryl-D-*carba*-dT 74

Es wurden 808 mg (1.82 mmol) 5'-O-Benzyl-3'-O-iso-butyryl-D-*carba*-dT in 2 mL 99.9%igem Ethanol gelöst und in Anwesenheit des Hydrierkatalysators Palladium auf Aktivkohle (10% Palladium, Wassergehalt 60%) unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt, bis das Edukt vollständig umgesetzt war. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und mit Dichlormethan gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck, wurde der Rückstand am Chromatotron (Dichlormethan) gereinigt.

Ausbeute: 257 mg (724 μmol, 40%) farbloses Öl

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 9.03 (s, 1H, NH), 7.13 (s, 1H, H-6), 5.13-5.09 (m, 2H, H-1', H-3'), 3.73 (dd, 2H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, H-5'), 2.55 (sept., 1H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, CH-*t*Bu), 2.21-2.14 (m, 4H, H-4', H-2'b, H-6'), 1.94 (s, 3H, Me_{het}), 1.69-1.67 (m, 1H, H-2'a), 1.16 (d, 6H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, CH₃-*t*Bu); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 177.5 (C-a), 163.6 (C-4), 151.0 (C-2), 136.7 (C-6), 111.4 (C-5), 75.2 (C-1'), 63.2 (C-5'), 54.3 (C-3'), 46.7 (C-4'), 36.8 (C-2'), 34.0 (CH-*t*Bu), 32.0 (C-6'), 18.9 (Me), 18.8 (Me), 12.6 (Me_{het}); **IR**: ν [cm⁻¹]= 3429, 3182, 3054, 2973, 2928, 2876, 1672, 1469, 1156, 734; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = 230 ° (c = 0.7; Chloroform); **R_F-Wert**: 0.35 (Dichlormethan/Methanol, 19:1 v/v); **MS** (EI⁺): ber. 310.1 [M⁺], 311.2 [M+H⁺], gef. 311.1; Molgewicht [g/mol]: 310.34; Summenformel: C₁₅H₂₂N₂O₅



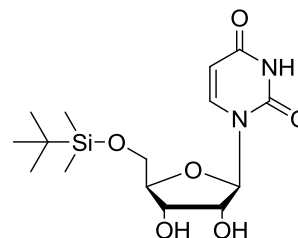
7.2.3.5 Modifikationen weiterer Nucleosidanaloga

Synthese von 5'-O-tert-Butyldimethylsilyluridin 98

Die Reaktion wurde in einer N₂-Schutzgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 50.0 mg (0.205 mmol, 1 Äq.) Uridin wurden in 4 mL abs. DMF gelöst. Diese Lösung wurde mit 33.9 mg (0.225 mmol, 1.1 Äq.) tert-Butyldimethylsilylchlorid und 27.9 mg (0.014 mmol, 2 Äq.) Imidazol versetzt. Es wurde zweieinhalb Stunden bei Rt gerührt, die Reaktion mit Methanol versetzt und die Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanolgradient 0-20%) gereinigt.

Ausbeute: 62.9 mg (0.175 mmol, 85%) eines farblosen Feststoffs

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 11.32 (s, 1H, NH), 7.76 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-6), 5.76 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.5 Hz, H-1'), 5.56 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-5), 5.44 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.9 Hz, OH-2'), 5.10 (d, 1H, ³J_{HH} = 4.1 Hz, OH-3'), 3.99 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.7 Hz, ³J_{HH} = 9.6 Hz, H-2'), 3.93 (dd, 1H, ³J_{HH} = 4.2 Hz, ³J_{HH} = 8.6 Hz, H-3'), 3.91-3.86 (m, 1H, H-4'), 3.83 (dd, 1H, ³J_{HH} = 2.7 Hz, ³J_{HH} = 11.5 Hz, H-5'), 3.73 (dd, 1H, ³J_{HH} = 2.9 Hz, ³J_{HH} = 11.5 Hz, H-5'), 0.88 (s, 9H, tBu-CH₃), 0.07 (s, 6H, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 162.9 (C-4), 150.5 (C-2), 140.1 (C-6), 101.5 (C-5), 87.9 (C-1'), 84.0 (C-4'), 73.6 (C-3'), 69.5 (C-2'), 62.5 (C-5'), 25.5 (CH₃-tBu), 17.9 (C-tBu), -5.55 (Me), -5.61 (Me); **IR** (KBr): ν [cm⁻¹]= 3368, 2927, 2855, 1670, 1462, 1389, 1106, 1053, 992, 827, 808, 775; **Smp.:** 96-97 °C;¹⁸⁸ **R_f-Wert:** 0.47 (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 359.16 [M+H⁺], 381.14 [M+Na⁺], gef. 359.2, 381.2; Molgewicht [g/mol]: 358.45; Summenformel: C₁₅H₂₆N₂O₆Si

*Synthese von 5'-O-tert-Butyldimethylsilyluridin in einem größeren Maßstab*

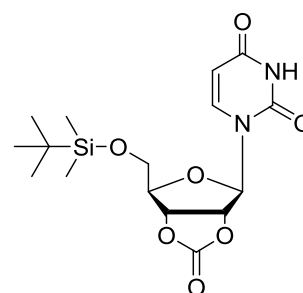
Die Reaktion wurde wie oben beschrieben mit den folgenden Mengen durchgeführt: 500 mg (2.05 mmol) Uridin (zweimal mit 2 mL abs. Acetonitril koevaporiert), 339.5 mg (2.26 mmol, 1.1 Äq.) tert-Butyldimethylsilylchlorid, 283 mg (4.20 mmol) Imidazol. Nach zwei Stunden bei Rt wurde die Reaktion abgebrochen, da sich ein erheblicher Teil des disilylierten Produktes bildete. Nach einmaliger Chromatographie (s.o.) wurde das Produkt nicht vollständig rein erhalten. Mischfraktionen wurden in 3 mL Acetonitril gelöst und das Produkt mit kaltem Wasser gefällt. Ausbeute: 456.3 mg (1.272 mmol, 62%) farblose Kristalle

Synthese von 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2',3'-*O*,*O*-carbonyluridin 99

Die Reaktion wurde unter Schutzgas durchgeführt. Es wurden 200 mg (0.550 mmol, 1 Äq.) 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyluridin mit 3 mL abs. Acetonitril koevaporiert, in 10 mL abs. Dichlormethan aufgenommen und mit 74.88 mg (0.4617 mmol, 0.8 Äq.) 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) versetzt. Nach 19 h Rühren bei Rt wurden weitere 150 mg (0.925 mmol, 1.7 Äq.) CDI zugegeben. Nach weiteren dreieinhalb Stunden bei Rt wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.5 M Acetatpuffer abgebrochen. Es wurde mit Dichlormethan extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt konnte am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient 0-5%) werden.

Ausbeute: 156 mg (0.405 mmol, 77%) eines farblosen Feststoffs

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]= 11.50 (s, 1H, NH), 7.72 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, H-6), 5.95 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 1.8 Hz, H-1'), 5.64 (d, 1H, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, H-5), 5.55 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 1.8 Hz, ³*J*_{HH} = 7.6 Hz, H-2'), 5.19 (dd, 1H, ³*J*_{HH} = 3.5 Hz, ³*J*_{HH} = 7.6 Hz, H-3'), 4.42-4.23 (m, 1H, H-4'), 3.80 (d, 2H, ³*J*_{HH} = 5.9 Hz, H-5'), 0.85 (s, 9H, *t*Bu-CH₃), 0.03 (s, 6H, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]= 163.2 (C-4), 153.5 (C-6'), 150.3 (C-2), 142.8 (C-6), 101.6 (C-5), 92.5 (C-1'), 86.2 (C-4'), 82.9 (C-2'), 80.5 (C-3'), 62.5 (C-5'), 25.6 (CH₃-*t*Bu), 17.8 (C-*t*Bu), -5.47 (Me), -5.54 (Me); **IR** (KBr): ν [cm⁻¹]= 3017, 2952, 2929, 2856, 1816, 1687, 1376, 1251, 1075, 992, 865, 813, 761, 557; **Smp.:** 134.5°C; **R_f-Wert:** 0.66 (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 327.06 [C₁₂H₁₅N₂O₇Si⁺], 385.14 [M+H⁺], 407.12 [M+Na⁺], gef. 327.1, 385.2, 407.2; Molgewicht [g/mol]: 384.45; Summenformel: C₁₆H₂₄N₂O₇Si

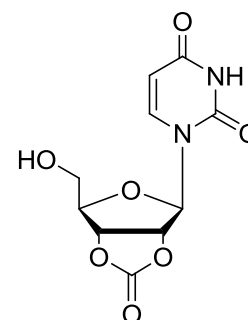


Versuch der Synthese von 2',3'-*O*,*O*-Carbonyluridin 100 durch Desilylieren mit *tert*-Butylammoniumhydrofluorid

Es wurde unter Schutzgasatmosphäre gearbeitet. 43 mg (0.12 mmol, 1 Äq.) 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2',3'-*O*,*O*-carbonyluridin wurden in 1 mL abs. THF aufgenommen und mit 0.152 mL (0.152 mmol, 1.3 Äq.) *tert*-Butylammoniumhydrofluorid (1M Lösung) versetzt. Nach einer Stunde Reaktionszeit wurde die vollständige Zersetzung des Eduktes festgestellt (Dünnschichtchromatographie).

Versuch der Synthese von 2',3'-O,O-Carbonyluridin 100 durch Desilylieren mit Triethylammoniumtrihydrofluorid

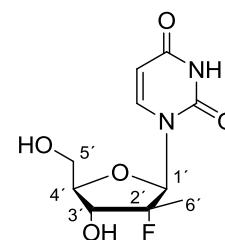
Es wurde unter Schutzgasatmosphäre gearbeitet. 29.1 mg (0.075 mmol, 1 Äq.) 5'-O-*tert*-Butyldimethylsilyl-2',3'-O,O-carbonyluridin wurden in 2 mL abs. THF aufgenommen, mit 63 μ L (45.5 mg, 0.449 mmol, 6 Äq.) Triethylamin und mit 61.5 μ L (60.8 mg, 0.377 mmol, 5 Äq.) Triethylammoniumtrihydrofluorid versetzt. Nach 16 h Rühren bei Rt wurde mit 2 mL Methanol versetzt, um die Reaktion abubrechen. Es konnte eine spot to spot Umsetzung beobachtet werden (DC-Kontrolle). Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Das Produkt verteilte sich in beiden Phasen. Die wässrige Phase wurde gefriergetrocknet, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und destillativ vom Lösungsmittel befreit. Beim Versetzen mit CDCl_3 wurde die Zersetzung des Produktes beobachtet. Die Carbonylbrücke ist also sehr labil in saurer Umgebung. Diese Schutzgruppe kam daher für die weiteren Synthesestufen nicht mehr in Betracht. Molgewicht [g/mol]: 270.05; Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_7$



Charakterisierung von 2'-Fluor-2'-methyluridin (2'-F-2'-Me-U) 89

Die Verbindung 2'-Fluor-2'-methyluridin wurde von der Firma Alios BioPharma, Kalifornien, USA für ein Kooperationsprojekt zur Verfügung gestellt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]= 11.44 (br s, 1H, NH), 7.95 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, H-6), 5.98 (d, 1H, $^3J_{\text{HF}} = 18.8$ Hz, H-1'), 5.65 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, H-5), 5.27 (br s, 1H, OH-3'), 3.90-3.77 (m, 3H, H-3', H-4', H-5'a), 3.67-3.58 (m, 1H, H-5'b), 1.25 (d, 3H, $^3J_{\text{HF}} = 22.5$ Hz, H-6'); **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]= 162.8 (C-4), 150.5 (C-2), 139.5 (C-6), 102.1 (C-5), 100.8 (d, $^1J_{\text{CF}} = 180.5$ Hz, C-2'), 88.3 (m, C-1'), 81.6 (C-4'), 70.4 (d, $^2J_{\text{CF}} = 17.8$ Hz, C-3'), 58.4 (C-5'), 16.4 (d, $^2J_{\text{CF}} = 25.4$ Hz, C-6'); **$^{19}\text{F-NMR}$** (188 MHz, ^1H -entkoppelt, DMSO-d_6) δ [ppm]= -159.89; **Smp.:** 238 °C; **Drehwert:** $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 83.2^\circ$ (c = 1; Methanol); **R_f -Wert:** 0.1 (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v); **MS¹³⁸**; Molgewicht [g/mol]: 260.22; **Summenformel:** $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{O}_5$

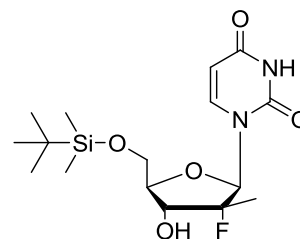


Synthese von 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2'-fluor-2'-methyluridin 93

Es wurde unter Schutzgas gearbeitet. 213 mg (0.818, 1 Äq.) 2'-Fluor-2'-methyluridin wurden 6.5 mL abs. DMF aufgenommen und mit 112 mg (1.636 mmol, 2 Äq.) Imidazol und 135.5 mg (0.899 mmol, 1.1 Äq.) TBDMSCI versetzt. Nach 22 h Rühren bei Rt konnte kein vollständiger Umsatz festgestellt werden. Es wurden weitere 24.6 mg (0.163 mmol, 0.2 Äq.) TBDMSCI zugesetzt. Es zeigte sich kein weiterer Umsatz nach weiteren 2 h, daher wurde durch Zugabe von 2 mL Methanol abgebrochen und die Lösungsmittel destillativ im Ölpumpenvakuum entfernt (Rotationsverdampfer). Das Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient 0-10%).

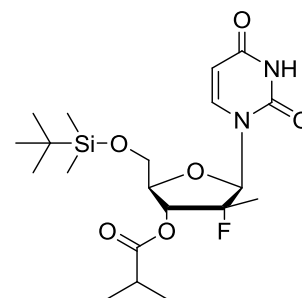
Ausbeute: 272 mg (0.726 mmol, 89%) eines farblosen Harzes

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 11.51 (br s, 1H, NH), 7.82 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-6), 5.99 (d, 1H, ³J_{HF} = 18.8 Hz, H-1'), 5.73 (d, 1H, ³J_{HH} = 6.8 Hz OH-3'), 5.53 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-5), 4.02 (d, 1H, ³J_{HH} = 1.3 Hz, ³J_{HF} = 11.8 Hz, H-3'), 3.93-3.72 (m, 3H, H-4', H-5'), 1.27 (d, 3H, ³J_{HF} = 22.5 Hz, H-6'), 0.90 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 0.10 (s, 3H, Me), 0.09 (s, 3H, Me); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.86 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-6), 6.11 (d, 1H, ³J_{HF} = 18.8 Hz, H-1'), 5.56 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-5), 4.00 (dd, 1H, ²J_{HH} = 11.8 Hz, ³J_{HH} = 1.3 Hz, H-5'a), 3.90-3.74 (m, 3H, H-3', H-4', H-5'b), 1.28 (d, 3H, ³J_{HF} = 22.3 Hz, H-6'), 0.81 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 0.01 (s, 3H, Me), 0.00 (s, 3H, Me); ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 162.8 (C-4), 150.4 (C-2), 139.9 (C-6), 102.7 (C-5), 101.4 (d, ¹J_{CF} = 177.8 Hz, C-2'), 88.6 (d, ²J_{CF} = 39.3 Hz, C-1'), 82.5 (C-4'), 71.5 (d, ²J_{CF} = 17.8 Hz, C-3'), 60.3 (C-5'), 26.0 (CH₃-*t*Bu), 18.5 (C-*t*Bu), 16.5 (d, ²J_{CF} = 25.4 Hz, C-6'), -5.3 (Me), -5.5 (Me); ¹⁹F-NMR (188 MHz, ¹H-entkoppelt, CDCl₃) δ [ppm]= -163.5; **R_F-Wert:** 0.28 (Dichlormethan/Methanol, 20:1 v/v); Molgewicht [g/mol]: 374.47; Summenformel: C₁₆H₂₇FN₂O₅Si



Synthese von 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-*O*-*iso*-Butyryl-2'-fluor-2'-methyluridin 94

Es wurde unter Schutzgasatmosphäre gearbeitet. 260 mg (0.694 mmol, 1 Äq.) 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2'-fluor-2'-methyluridin wurden mit abs. Acetonitril in den Reaktionskolben überführt und koevaporiert. Es wurde ein weiteres Mal mit 1 mL abs. Pyridin koevaporiert und in 4 mL abs. Pyridin gelöst. Die Lösung wurde mit 0.46 mL (439 mg, 2.77 mmol, 3.9 Äq.) dest. *iso*-Butyrylsäureanhydrid versetzt.



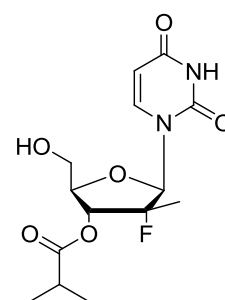
Nach 22 h bei Rt wurde durch Zugabe von 1 mL Methanol abgebrochen. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und anschließend dreimal mit Toluol koevaporiert. Der Rückstand wurde in 10 mL Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit je 15 mL dest. Wasser gewaschen. Die vereinigte organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und die Lösungsmittel destillativ entfernt. Das Produkt konnte ohne jegliche Reinigung für die nächste Synthesestufe eingesetzt werden.

Ausbeute: 244 mg (0.548 mmol, 79%) eines farblosen Feststoffs

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 8.86 (br s, 1H, NH), 8.07 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, H-6), 6.25 (d, 1H, ³J_{HF} = 17.5 Hz, H-1'), 5.73 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, H-5), 5.32 (dd, 1H, ³J_{HH} = 9.5 Hz, J = 23.8 Hz, H-3'), 4.24 (dd, 1H, ³J_{HH} = 9.3 Hz, ⁴J_{HH} = 0.95 Hz, H-4'), 4.15-4.07 (m, 1H, H-5'a), 3.66 (d, 1H, ²J_{HH} = 12.1 Hz, ³J_{HH} = 1.5 Hz, H-5'b), 2.65 (sept., 1H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, CH-*t*Bu), 1.35 (d, 3H, ³J_{HF} = 22.3 Hz, H-6'), 1.21 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, CH₃-*t*Bu), 0.93 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 0.09 (s, 6H, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 176.0 (C-*t*Bu), 162.7 (C-4), 150.4 (C-2), 139.6 (C-6), 102.7 (C-5), 100.2 (d, ¹J_{CF} = 183.6 Hz, C-2'), 89.2 (d, ²J_{CF} = 40.3 Hz, C-1'), 80.0 (C-4'), 69.8 (d, ²J_{CF} = 18.8 Hz, C-3'), 60.2 (C-5'), 33.9 (CH-*t*Bu), 25.9 (CH₃-*t*Bu), 19.1 (CH₃-*t*Bu), 19.0 (CH₃-*t*Bu), 18.9 (C-*t*Bu), 17.3 (d, ²J_{CF} = 25.2 Hz, C-6'), -5.55 (Me), -5.59 (Me); **¹⁹F-NMR** (188 MHz, ¹H-entkoppelt, CDCl₃) δ [ppm]= -159.58; **R_f-Wert:** 0.88 (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v); Molgewicht [g/mol]: 444.56; Summenformel: C₂₀H₃₃FN₂O₆Si

Synthese von 3'-O-*iso*-Butyryl-2'-fluor-2'-methyluridin 95

Variante A: Es wurde unter Stickstoffatmosphäre gearbeitet. Es wurden 19 mg (0.042 mmol, 1 Äq.) 5'-O-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-O-*iso*-butyryl-2'-fluor-2'-methyluridin in 1 mL abs. THF gelöst und mit 55 µL (0.055 mmol, 1.3 Äq.) tetra-*n*-Butylammonium-fluorid (1M Lösung) versetzt. Nach 70 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.5 mL Methanol abgebrochen und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das gewünschte Produkt konnte im ¹H-NMR-Spektrum des Rohgemisches nicht identifiziert werden.



Variante B: 201 mg (0.452 mmol, 1 Äq.) 5'-O-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-O-*iso*-butyryl-2'-fluor-2'-methyluridin wurden in 10 mL abs. THF gelöst und mit 377 µL (274.4 mg, 2.71 mmol, 6 Äq.) abs. Triethylamin versetzt. Es wurden 367 µL (364 mg, 2.26 mmol, 5 Äq.) Triethylamintrihydrofluorid zugegeben. Nach 20 h bei Rt wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 mL Methanol abgebrochen. Die Lösungsmittel wurden sehr schnell am

Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient bis 5%).

Ausbeute: 142 mg (0.429 mmol, 95%) farbloser Schaum

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 8.52 (br s, 1H, NH), 8.02 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, H-6), 6.22 (d, 1H, ³J_{HF} = 17.8 Hz, H-1'), 5.77 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-5), 5.03 (dd, 1H, ³J_{HH} = 9.4 Hz, J = 23.4 Hz, H-3'), 4.15 (dd, 1H, ³J_{HH} = 9.3 Hz, ⁴J_{HH} = 0.6 Hz, H-4'), 4.07 (d, 1H, ²J_{HH} = 13.3 Hz, H-5'a), 3.71 (d, 1H, ²J_{HH} = 13.3 Hz, ³J_{HH} = 1.5 Hz, H-5'b), 2.71 (sept., 1H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, CH-*t*Bu), 1.40 (d, 3H, ³J_{HF} = 21.9 Hz, H-6'), 1.23 (t, 6H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, CH₃-*t*Bu); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 177.5 (C-*t*Bu), 162.4 (C-4), 150.3 (C-2), 139.5 (C-6), 103.2 (C-5), 100.3 (d, ¹J_{CF} = 185.7 Hz, C-2'), 89.2 (C-1', hsqc signal), 80.2 (C-4'), 71.0 (d, ²J_{CF} = 16.5 Hz, C-3'), 59.9 (C-5'), 34.03 (CH-*t*Bu), 19.1 (CH₃-*t*Bu), 18.9 (CH₃-*t*Bu), 17.0 (d, ²J_{CF} = 25.3 Hz, C-6'); **¹⁹F-NMR** (188 MHz, ¹H-entkoppelt, CDCl₃) δ [ppm]= -160.00; **R_F-Wert:** 0.28 (Di-chlormethan/Methanol, 20:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 111.02 [M⁺-Uracil], 259.07 [C₁₀H₁₂FN₂O₅⁺], 313.12 [M-OH⁺]; gef. 219.1, 259.2, 313.3; Molgewicht [g/mol]: 330.31; Summenformel: C₁₄H₁₉FN₂O₆

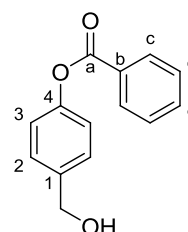
7.2.4 Synthesen von 4-Acyloxybenzylalkoholen

4-(Hydroxymethyl)phenylbenzoat

Die Synthese wurde gemäß **AAV 4** durchgeführt. Es wurden 4.0 g 4-Hydroxybenzylalkohol (32 mmol, 1 Äq.) sowie 4.46 mL abs. Triethylamin (3.26 g, 32.2 mmol, 1.0 Äq.) in 20 mL abs. THF gelöst. Die Veresterung erfolgte durch Zugabe von 3.74 mL dest. Benzoylchlorid (4.53 g, 32.2 mmol, 1.0 Äq.), das in 20 mL abs. THF gelöst war, bei 0 °C. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren aus Petrolether in der Siedehitze und wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die Reinigung erfolgte nicht quantitativ.

Ausbeute: 1.33 g (58.2 mmol, 22%) eines farblosen Feststoffes

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 8.18-8.08 (m, 2H, H-d), 7.78-7.71 (m, 1H, H-e), 7.64-7.58 (m, 2H, H-c), 7.45-7.36 (m, 2H, H-2), 7.25-7.18 (m, 2H, H-3), 5.26 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, OH), 4.52 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H-Bn); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 164.6 (C-a), 149.3 (C-4), 140.3 (C-1), 133.9 (C-e), 129.6 (C-b, 2x C-c), 128.9 (2x C-d), 127.5 (2x C-3), 121.4 (2x C-2), 62.4 (C-Bn); **IR** (KBr): ν [cm⁻¹]= 3326, 1731, 1509, 1291, 1217, 1066, 700; **Smp.:** 71 °C; **R_F-Wert:**



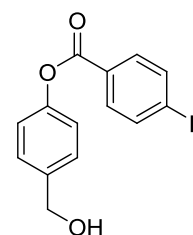
0.1 (Petrolether/Ethylacetat, 3:1 v/v), 0.57 (Dichlormethan/Methanol 20:1 v/v); **MS** (HR-FAB): ber. 228.0786 [M], 229.0865 [M+H⁺], gef. 228.0790, 229.0856; Molgewicht [g/mol]: 228.24; Summenformel: C₁₄H₁₂O₃;

4-(Hydroxymethyl)phenyl-*p*-fluorbenzoat

Die Synthese wurde gemäß **AAV 4** durchgeführt. Es wurden 4.0 g 4-Hydroxybenzylalkohol (32 mmol, 1 Äq.) sowie 4.46 mL abs. Triethylamin (3.26 g, 32.2 mmol, 1.0 Äq.) in 20 mL abs. THF gelöst. Die Veresterung erfolgte durch Zugabe von 3.74 mL *p*-Fluorbenzoylchlorid (4.53 g, 32.2 mmol, 1.0 Äq.), das in 20 mL abs. THF gelöst war, bei 0 °C. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren aus Petrolether unter Zugabe von wenig Ethylacetat. Es wurde über Nacht bei 4 °C kristallisiert und dann filtriert. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Die Reinigung erfolgte nicht quantitativ.

Ausbeute: 5.55 g (22.5 mmol, 70%) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 8.23-8.16 (m, 2H, H-d), 7.46-7.37 (m, 4H, H-c, H-2), 7.25-7.20 (m, 2H, H-3), 5.25 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.8 Hz, OH), 4.53 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.6 Hz, H-Bn); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 166.6, 164.2, 163.6 (C-a, C-e, C-b), 149.2 (C-4), 140.3 (C-1), 132.6 (d, ³J_{CF} = 9.6 Hz, 2x C-c), 127.5 (2x C-2), 121.4 (2x C-3), 116.1 (d, ²J_{CF} = 22.3 Hz, 2x C-d), 62.3 (C-Bn); **¹⁹F-NMR** (470 MHz, ¹H-entkoppelt, DMSO-d₆) δ [ppm]= -104.78; **¹⁹F-NMR** (470 MHz, ¹H-gekoppelt, DMSO-d₆) δ [ppm]= -104.78 (m, 1F); **Smp.:** 82 °C; **IR** (KBr): ν [cm⁻¹]= 3310, 1731, 1603, 1507, 1412, 1211, 939, 852, 574; **MS** (FAB): ber. 246.1 [M], 247.1 [M+H⁺], gef. 246.1, 247.1; Molgewicht [g/mol]: 246.23; Summenformel: C₁₄H₁₁FO₃

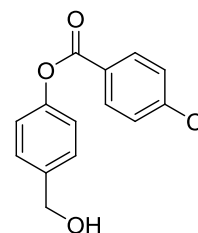


4-(Hydroxymethyl)phenyl-*p*-chlorbenzoat

Die Synthese wurde gemäß **AAV 4** durchgeführt. Es wurden 8.0 g 4-Hydroxybenzylalkohol (64 mmol, 1 Äq.) sowie 8.92 mL abs. Triethylamin (6.52 g, 64.4 mmol, 1.0 Äq.) in 20 mL abs. THF gelöst. Die Veresterung erfolgte durch Zugabe von 3.74 mL *p*-Chlorbenzoylchlorid (9.06 g, 64.4 mmol, 1.0 Äq.), das in 20 mL abs. THF gelöst war, bei 0 °C. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren aus Petrolether in der Siedehitze unter Zugabe von wenig Ethylacetat, bis sich der Feststoff gerade löste. Es wurde über Nacht bei 4 °C kristallisiert und dann filtriert. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Die Reinigung erfolgte nicht quantitativ.

Ausbeute: 9.62 g (36.7 mmol, 60%) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 8.18-8.06 (m, 2H, H-d), 7.73-7.63 (m, 2H, H-c), 7.45-7.36 (m, 2H, H-2), 7.26-7.16 (m, 2H, H-3), 5.25 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.8 Hz, OH), 4.50 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.8 Hz, H-Bn); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 163.9 (C-a), 149.2 (C-4), 140.5 (C-1), 139.0 (C-e), 131.6 (2x C-d), 129.2 (2x C-b, 2x C-c), 127.5 (2x C-2), 121.5 (2x C-3), 62.4 (C-Bn);



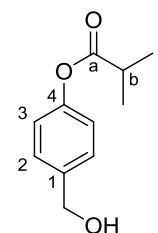
IR (KBr): ν [cm⁻¹]= 3217, 2925, 2870, 1729, 1589, 1485, 1036, 849, 769, 749, 502; **Smp.:** 89 °C; **R_f-Wert:** 0.12 (Petrolether/Ethylacetat, 3:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 262.0 [M], 263.0 [M+H⁺], gef. 263.0; Molgewicht [g/mol]: 262.68, Summenformel: C₁₄H₁₁ClO₃

4-(Hydroxymethyl)phenyl-*iso*-butyrat 40a

Die Synthese wurde gemäß **AAV 4 Variante B** durchgeführt. Es wurden 8.0 g 4-Hydroxybenzylalkohol (64 mmol, 1 Äq.) sowie 10.7 mL abs. Triethylamin (7.82 g, 77.3 mmol, 1.2 Äq.) in 80 mL abs. THF gelöst. Die Acylierung erfolgte durch tropfenweise Zugabe von 8.18 mL *iso*-Butyrylchlorid (8.18 g, 76.8 mmol, 1.2 Äq.) bei 0 °C. Nach 16 h Rühren bei Rt wurde filtriert, mit Dichlormethan gewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Es wurde in Dichlormethan aufgenommen und wie in **AAV 4** beschrieben weitergemacht. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/Ethylacetat 3:1 v/v bis das zweifachacylierte Produkt abgetrennt war, dann Petrolether/Ethylacetat 3:2 v/v).

Ausbeute: 4.86 g (25.0 mmol, 39%) eines farblosen Feststoffes

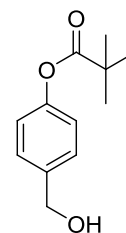
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 7.35-7.30 (m, 2H, H-3), 7.07-7.02 (m, 2H, H-2), 5.22 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.8 Hz, OH), 4.49 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H-Bn), 2.80 (sept., 1H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, CH-*i*Bu), 1.23 (d, 6H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, CH₃-*i*Bu); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 175.1 (C-a), 149.2 (C-1), 139.9 (C-4), 127.4 (C-3), 121.2 (C-2), 62.3 (C-Bn), 33.2 (C-b), 18.6 (2x C-c); **Smp.:** 35 °C; **R_f-Wert:** 0.46 (Dichlormethan/Methanol 20:1 v/v); Molgewicht [g/mol]: 194.23; Summenformel: C₁₁H₁₄O₃



4-(Hydroxymethyl)phenylpivalat 40b

Die Synthese wurde gemäß **AAV 4 Variante B** durchgeführt. Es wurden 4.0 g 4-Hydroxybenzylalkohol (32 mmol, 1 Äq.) sowie 4.46 mL abs. Triethylamin (3.26 g, 32 mmol, 1 Äq.) in 20 mL abs. THF gelöst. Die Acylierung erfolgte durch tropfenweise Zugabe von 4.16 mL Pivalinsäurechlorid (4.07 g, 32 mmol, 1 Äq.) bei 0 °C. Nach 1.5 h

Rühren bei Rt wurde filtriert, mit Dichlormethan gewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Die Reinigung des so erhaltenen Öls erfolgte durch Umkristallisieren aus Petrolether in der Siedehitze unter Zugabe von wenig Ethylacetat, bis sich der Feststoff gerade löste. Es wurde über Nacht bei 4 °C kristallisiert und dann filtriert. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Die Reinigung erfolgte nicht quantitativ.



Ausbeute: 2.90 g (13.9 mmol, 44%) eines farblosen Feststoffes.

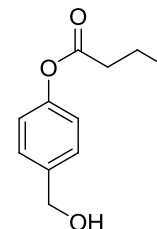
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]= 7.35-7.32 (m, 2H, H-3), 7.04-7.00 (m, 2H, H-2), 5.22 (t, 1H, ³*J*_{HH} = 5.6 Hz, OH), 4.48 (d, 2H, ³*J*_{HH} = 5.6 Hz, H-Bn), 1.28 (s, 9H, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]= 176.4 (C-a), 149.4 (C-1), 139.9 (C-4), 127.4 (C-3), 121.2 (C-2), 62.3 (C-Bn), 38.5 (C-*t*Bu), 26.7 (Me); **IR** (KBr): ν [cm⁻¹]= 3299, 2984, 1751, 1508, 1279, 1196, 1164, 1125, 897;⁷⁰ **Smp.:** 39 °C;⁷⁰ **R_f-Wert:** 0.69 (Petrolether/Ethylacetat, 3:2 v/v); **MS** (FAB): ber. 208.1 [M⁺], 209.1 [M+H⁺], 191.1 [M⁺-HO]; gef. 208.1, 209.1, 191.1; Molgewicht [g/mol]: 208.25; Summenformel: C₁₂H₁₆O₃;

4-(Hydroxymethyl)phenylpropanoat 40c

Die Synthese wurde gemäß **AAV 4 Variante B** im Integrierten Synthesepaktikum mit 4.0 g 4-Hydroxybenzylalkohol (32 mmol, 1 Äq.), 4.46 mL abs. Triethylamin (3.26 g, 32 mmol, 1 Äq.) in 20 mL abs. THF durchgeführt. Die Acylierung erfolgte durch tropfenweise Zugabe von 3.14 mL Propionylchlorid (2.96 g, 32 mmol, 1 Äq.) bei 0 °C. Nach 1.5 h Rühren bei Rt wurde filtriert, mit Dichlormethan gewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Die Reinigung des so erhaltenen Öls erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel.

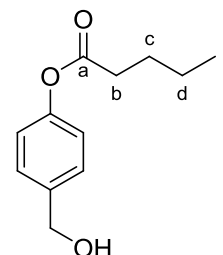
Ausbeute: 3.29 g (13.9 mmol, 53%) eines gelben Öls.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]= 7.36 (d, 2H, ³*J*_{HH} = 8.5 Hz, H-3), 7.06 (d, 2H, ³*J*_{HH} = 8.4 Hz, H-2), 5.33 (br s, 1H, OH), 4.52 (s, 2H, H-Bn), 2.54 (dd, 2H, ³*J*_{HH} = 7.3 Hz, H-b), 1.66 (sext., 2H, ³*J*_{HH} = 7.3, H-c), 0.97 (t, 3H, ³*J*_{HH} = 7.3 Hz, H-d); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]= 171.7 (C-a), 149.2 (C-1), 140.1 (C-4), 127.5 (C-3), 121.4 (C-), 62.4 (C-Bn), 35.3 (C-b), 17.8 (C-c), 13.4 (C-d); **IR:** ν [cm⁻¹]= 3405, 2965, 2875, 1753, 1604, 1507, 1244, 1198, 1142, 1013, 829, 560; **MS** (FAB): ber. 177.09 [M⁺-HO], 194.09 [M], gef. 177.1 194.1; Molgewicht [g/mol]: 194.23, Summenformel: C₁₁H₁₄O₃



Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylpentanoat 40d

Die Synthese wurde gemäß **AAV 4** mit 6.0 g 4-Hydroxybenzylalkohol (48 mmol, 1 Äq.), 8.08 mL abs. Triethylamin (5.86 g, 58 mmol, 1 Äq.) in 30 mL abs. THF durchgeführt. Die Acylierung erfolgte durch tropfenweise Zugabe einer Lösung aus 20 mL abs. THF und von 6.99 mL *n*-Butansäurechlorid (2.96 g, 32 mmol, 1 Äq.) bei 0 °C. Nach 23 h Rühren bei Rt wurde filtriert, mit Dichlormethan gewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der farblose Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/Ethylacetat 3:1, v/v) gereinigt.



Ausbeute: 4.98 g (23.0 mmol, 46%) eines farblosen Öls.

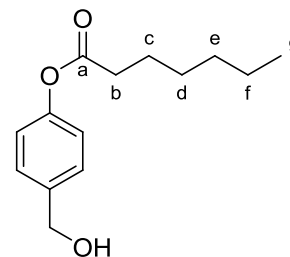
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.41-7.35 (m, 2H, H-3), 7.08-7.03 (m, 2H, H-2), 4.67 (s, 2H, H-Bn), 2.56 (dd, 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 1.78-1.69 (m, 2H, H-c), 1.49-1.38 (m, 2H, H-d), 0.96 (m, 3H, H-e); **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 7.44-7.25 (m, 2H, H-3), 7.12-6.96 (m, 2H, H-2), 5.21 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.6 Hz, OH), 4.49 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-Bn), 2.56 (dd, 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 1.62 (quint., 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-c), 1.39 (sext., 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-d), 0.92 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-e); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 171.8 (C-a), 149.2 (C-4), 140.0 (C-1), 127.4 (2x C-3), 121.3 (2x C-2), 62.4 (C-Bn), 33.2 (C-b), 26.5 (C-c), 21.6 (C-d), 13.5 (C-e); **IR** : ν [cm⁻¹]= 3361, 2959, 2933, 2873, 1754, 1507, 1465, 1417 1366, 1198, 1045, 1014, 811; **R_f-Wert**: 0.22 (Petrolether/Ethylacetat, 3:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 191.12 [M⁺-HO], 208.10 [M], 209.12 [M+H⁺], 231.09 [M+Na⁺]; gef. 191.1, 208.1, 231.1; Molgewicht [g/mol]: 208.25; Summenformel: C₁₂H₁₆O₃

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylheptanoat 40e

Die Synthese wurde gemäß **AAV 4 Variante B** durchgeführt. Es wurden 8.0 g 4-Hydroxybenzylalkohol (64 mmol, 1 Äq.) sowie 10.7 mL abs. Triethylamin (7.82 g, 77.3 mmol, 1.2 Äq.) in 50 mL abs. THF gelöst. Die Acylierung erfolgte durch tropfenweise Zugabe einer Lösung aus 12.0 mL Heptanoylchlorid (11.5 g, 77.3 mmol, 1.2 Äq.) in 20 mL abs. THF bei 0 °C. Nach 20 h Rühren bei Rt wurde filtriert, mit Dichlormethan gewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/Ethylacetat 8:1 v/v als Gradient auf Petrolether/Ethylacetat 4:1 v/v).

Ausbeute: 5.50 g (23.3 mmol, 56%) eines gelben Öls.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 7.36-7.31 (m, 2H, H-3), 7.06-7.02 (m, 2H, H-2), 5.22 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, OH), 4.48 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H-Bn), 2.56 (dd, 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 1.63 (tt, 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-c), 1.40-1.24 (m, 6H, H-d, H-e, H-f), 0.87 (t, 1H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H-g); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 171.7 (C-a), 149.1 (C-1), 140.0 (C-4), 127.4 (2x C-3), 121.2 (2x C-2), 62.3 (C-Bn), 33.4 (C-b), 24.2 (C-c), 30.7, 27.9, 21.7 (C-d, C-e, C-f), 13.7 (C-g); **IR:** ν [cm⁻¹]= 3353, 2955, 2929, 2859, 1755, 1507, 1195, 1163, 1140, 1101, 1014, 503; **R_f-Wert:** 0.28 (Petrolether/Ethylacetat 3:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 219.14 [M⁺-HO], 236.14 [M], 237.14 [M+H⁺]; gef. 219.2, 237.2; Molgewicht [g/mol]: 236.30; Summenformel: C₁₄H₂₀O₃

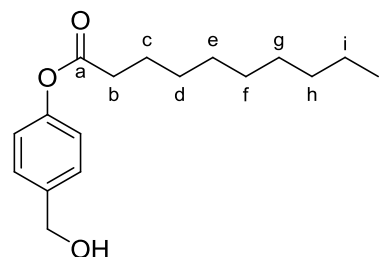


Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyldecanoat 40f

Die Synthese wurde gemäß **AAV 4 Variante B** durchgeführt. Es wurden 8.0 g 4-Hydroxybenzylalkohol (64 mmol, 1 Äq.) sowie 8.92 mL abs. Triethylamin (6.52 g, 64.4 mmol, 1.0 Äq.) in 100 mL abs. THF gelöst. Die Veresterung erfolgte durch Zugabe von 13.4 mL Decanoylchlorid (12.3 g, 64.4 mmol, 1 Äq.), das in 80 mL abs. THF gelöst war, bei 0 °C. Die Reinigung durch Umkristallisieren war erfolglos. Es folgte eine Säulenchromatographie zunächst mit Petrolether/Ethylacetat 5:1 v/v, gefolgt von Petrolether/Ethylacetat 5:2 v/v.

Ausbeute: 10.19 g (36.6 mmol, 57%) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 7.35-7.31 (m, 2H, H-3), 7.06-7.01 (m, 2H, H-2), 5.21 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, OH), 4.47 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H-Bn), 2.55 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-b), 1.64 (tt, 2H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-c), 1.40-1.18 (m, 12H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i), 0.85 (t, 3H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H-j); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 171.8 (C-a), 149.1 (C-1), 139.9 (C-4), 127.4 (C-3), 121.3 (C-2), 62.3 (C-Bn), 33.4 (C-b), 24.3 (C-c), 31.2, 28.8, 28.6, 28.5, 28.3, 22.0 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i), 13.8 (C-j); **IR:** ν [cm⁻¹]= 3326, 2954, 2916, 2848, 1748, 1604, 1211, 1143, 846, 719, 579, 513; **Smp.:** 45-48 °C, **R_f-Wert:** 0.34 (Petrolether/Ethylacetat, 3:1 v/v); **MS** (FAB): 278.19 [M], 279.19 [M+H⁺]; gef. 279.2 [M+H⁺]; Molgewicht [g/mol]: 278.38; Summenformel: C₁₇H₂₆O₃



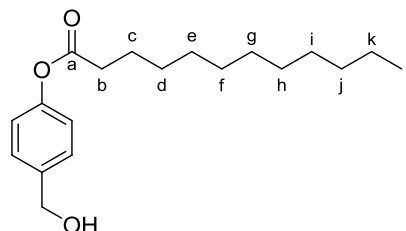
Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyldodecanoat 40g und 4-(Dodecyloxymethyl)phenyldodecanoat 43g

Die Synthese wurde gemäß **AAV 4 Variante B** durchgeführt. Es wurden 6.01 g (48.5 mmol, 1 Äq.) 4-Hydroxybenzylalkohol sowie 8.08 mL abs. Triethylamin (5.87 g, 58.0 mmol, 1.2 Äq.) in 30 mL abs. THF gelöst. Die Veresterung erfolgte durch Zugabe von 13.4 mL Dodecanoylchlorid (12.7 g, 58.0 mmol, 1.2 Äq.), das in 20 mL abs. THF gelöst war, bei 0 °C. Eine vollständige Reinigung durch Umkristallisieren aus Petrolether/Ethylacetat war nicht möglich. Es folgte eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel zunächst mit Petrolether/Ethylacetat 10:1 v/v, gefolgt von Petrolether/Ethylacetat 3:1 v/v.

Ausbeute: 5.81 g (18.9 mmol, 40%) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 7.37-7.28

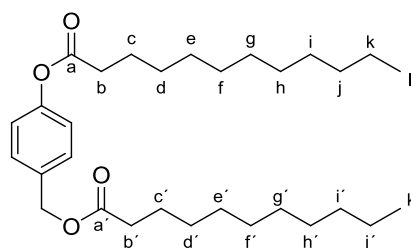
(m, 2H, H-3), 7.07-6.98 (m, 2H, H-2), 5.20 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.6 Hz, OH), 4.48 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.6 Hz, H-Bn), 2.55 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 1.63 (tt, 2H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H-c), 1.40-1.16 (m, 18H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k), 0.85 (t,



3H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, H-l); **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 171.8 (C-a), 149.2 (C-1), 140.04 (C-4), 127.4 (2x C-3), 121.3 (2x C-2), 62.4 (C-Bn), 33.4 (C-b), 24.3 (C-c), 31.3, 28.9, 28.9, 28.6, 28.4, 28.3, 22.2 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 13.9 (C-l); **IR:** ν [cm⁻¹]= 3332, 2995, 2915, 2848, 1748, 1605, 1509, 1464, 1411, 1384, 1328, 1297, 1267, 1235, 1035, 1013, 719; **Smp.:** 58 °C; **R_f-Wert:** 0.28 (Petrolether/Ethylacetat, 3:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 183.17 [C₁₂H₂₃O⁺], 289.22 [M⁺-HO], 306.22 [M⁺], 307.23 [M+H⁺]; gef. 183.2 [C₁₂H₂₃O⁺], 289.3 [M⁺-HO], 307.3 [M+H⁺], 329.3 [M+Na⁺]; Molgewicht [g/mol]: 306.44; Summenformel: C₁₉H₃₀O₃;

Als Nebenprodukt wurde 4-(Dodecyloxymethyl)phenyl-dodecanoat isoliert. Ausbeute: 3.35 g (6.85 mmol, 24%) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.36-7.27 (m, 2H, H-3), 7.05-6.96 (m, 2H, H-2), 5.04 (s, 2H, H-Bn), 2.50 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b'), 2.28 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H-b), 1.70 (tt, 2H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H-c'), 1.58 (tt, 2H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H-c), 1.41-1.13 (m, 30H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j,



H-k, H-d', H-e', H-f', H-g', H-h', H-i', H-j', H-k'), 0.83 (dt, 6H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, ³J_{HH} = 8.0 Hz,

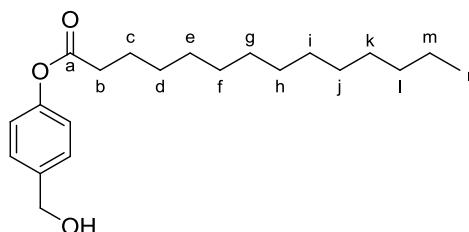
H-I, H-I'); $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 173.5 (C-a), 172.2 (C-a'), 150.5 (C-1), 133.6 (C-4), 129.4 (C-3), 121.6 (C-2), 65.4 (C-Bn), 34.40 (C-b'), 34.3 (C-b), 31.8, 29.5, 29.4, 29.3, 29.1 (C-d, C-e, C-e', C-f, C-f', C-g, C-g', C-h, C-h', C-i, C-i', C-j, C-j', C-k, C-k'), 24.9 (C-c, C-c'), 22.6 (C-d'), 14.1 (C-m, C-m');); **IR**: ν [cm^{-1}]= 2955, 2915, 2848, 1753, 1732, 1508, 1464), 1413), 1388, 1350, 1327, 1297, 1268, 1236, 1083, 1016, 727; **Smp.**: 52 °C; **R_f-Wert**: 0.78 (Petrolether/Ethylacetat, 3:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 183.17 [$\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}^+$], 289.22 [$\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}_2^+$], 488.39 [M^+], 489.39 [$\text{M}+\text{H}^+$], 511.37 [$\text{M}+\text{Na}^+$]; gef. 183.2, 289.3, 488.5, 511.5; Molgewicht [g/mol]: 488.74; Summenformel: $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_4$;

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyltetradecanoat (4-(Hydroxymethyl)phenylmyristoylat) 40h

Die Synthese wurde gemäß **AAV 4** durchgeführt. Es wurden 8.0 g (64 mmol, 1 Äq.) 4-Hydroxybenzylalkohol sowie 8.92 mL (6.52 g, 64.4 mmol, 1.0 Äq.) abs. Triethylamin in 100 mL abs. THF gelöst. Die Veresterung erfolgte durch Zugabe von 17.5 mL (15.9 g, 64.4 mmol, 1 Äq.) Tetradecanoylchlorid (Myristoylchlorid), das in 80 mL abs. THF gelöst war, bei 0 °C. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren aus Petrolether und Ethylacetat. Sie musste mehrfach wiederholt werden.

Ausbeute: 21.5 g (64.3 mmol, 70%) eines farblosen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]= 7.36-7.30 (m, 2H, H-3), 7.06-7.01 (m, 2H, H-2), 5.22 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.4$ Hz, OH), 4.47 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 5.0$ Hz, H-Bn), 2.54 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-b), 1.61 (tt, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, H-c), 1.38-1.17



(m, 20H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m), 0.85 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, H-n); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]= 171.8 (C-a), 149.1 (C-1), 139.9 (2x C-4), 127.4 (2x C-3), 121.3 (C-2), 62.3 (C-Bn), 33.4 (C-b), 24.3 (C-c), 31.3, 29.0, 28.9, 28.8, 28.7, 28.6, 28.5, 28.3, 22.0 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m), 13.8 (C-n); **IR**: ν [cm^{-1}]= 2955, 2914, 2847, 1750, 1508, 1252, 1214, 1165, 1014, 924, 719, 496; **Smp.**: 61 °C; **R_f-Wert**: 0.33 (Petrolether/Ethylacetat, 5:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 334.25 [M], 335.26 [$\text{M}+\text{H}$], gef. 335.3; Molgewicht [g/mol]: 334.49; Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$;

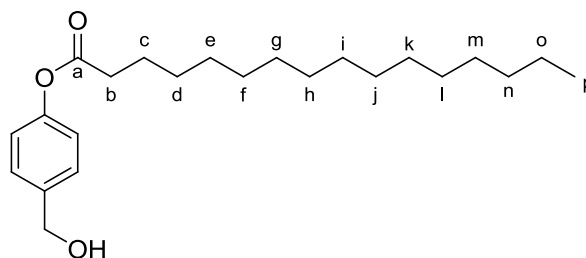
Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylhexadecanoat (4-(Hydroxymethyl)phenylpalmitinsäureester) 40i

Die Synthese wurde gemäß **AAV 4** Variante *B* durchgeführt. Es wurden 8.0 g (64 mmol, 1 Äq.) 4-Hydroxybenzylalkohol sowie 9.0 mL (6.5 g, 65.0 mmol, 1.0 Äq.) abs. Triethylamin in 50 mL abs. THF gelöst. Die Veresterung erfolgte durch Zugabe von 19.6 mL (17.7 g, 64.4 mmol, 1.0 Äq.) Hexadecanoylchlorid (Palmitinsäurechlorid), das in 20 mL abs. THF gelöst war, bei 0 °C. Die wässrige Aufarbeitung erfolgte gemäß **AAV 4**. Das Rohprodukt wurde aus Petrolether und Ethylacetat umkristallisiert und anschließend säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat, 3:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 8.44 g (23.3 mmol, 36%) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆)

δ [ppm]= 7.36-7.30 (m, 2H, H-3), 7.06-7.00 (m, 2H, H-2), 5.20 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, OH), 4.47 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, H-Bn), 2.55 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 1.62 (tt, 2H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H-c), 1.38-1.17 (m, 24H,



H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m, H-n, H-o), 0.85 (t, 3H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, H-p);

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 171.5 (C-a), 149.4 (C-1), 137.4 (2x C-4), 128.5 (2x C-3), 120.7 (C-2), 63.9 (C-Bn), 33.5 (C-b), 24.1 (C-c), 31.1, 28.7, 28.6, 28.5, 28.4, 28.4, 28.3, 21.7 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n, C-o), 13.2 (C-p);

IR: ν [cm⁻¹]= 3396, 3073, 2916, 1758, 1509, 1471, 1220, 1152, 1220, 1388, 1471; **Smp.:** 75 °C; **R_f-Wert:** 0.53 (Petrolether/Ethylacetat, 1:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 239.23 [C₁₆H₃₁O⁺], 345.27 [C₂₃H₃₇O₂⁺] [M⁺-HO], 363.28 [M+H⁺]; gef. 239.3, 345.3, 363.3; Molgewicht [g/mol]: 362.27; Summenformel: C₂₃H₃₈O₃

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylheptadecanoat (4-(Hydroxymethyl)phenylstearinsäureester) 40j

Die Synthese wurde gemäß **AAV 4** Variante *B* durchgeführt. Es wurden 8.0 g (64 mmol, 1 Äq.) 4-Hydroxybenzylalkohol sowie 9.0 mL (6.5 g, 65.0 mmol, 1.0 Äq.) abs. Triethylamin in 50 mL abs. THF gelöst. Die Veresterung erfolgte durch Zugabe von 21.7 mL (19.5 g, 64.5 mmol) Heptadecanoylchlorid (Stearinsäurechlorid), das in 20 mL abs. THF gelöst war, bei 0 °C. Die wässrige Aufarbeitung erfolgte gemäß **AAV 4**. Das Rohprodukt wurde aus

Petrolether und Ethylacetat umkristallisiert und abschließend säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/Ethylacetat, 3:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 6.72 g (17.2 mmol, 27%) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)

δ [ppm]= 7.35-7.30 (m, 2H, H-3),

7.05-7.01 (m, 2H, H-2), 5.19 (t, 1H,

³J_{HH} = 5.6 Hz, OH), 4.47 (d, 2H,

³J_{HH} = 5.6 Hz, H-Bn), 2.55 (t, 2H,

³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 1.62 (tt, 2H,

³J_{HH} = 7.3 Hz, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H-c),

1.38-1.17 (m, 28H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q), 0.85

(t, 3H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, H-r); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 172.5 (C-a), 150.3 (C-1),

138.5 (2x C-4), 128.2 (2x C-3), 121.7 (C-2), 64.9 (C-Bn), 34.5 (C-b), 25.1 (C-c), 32.1, 29.7,

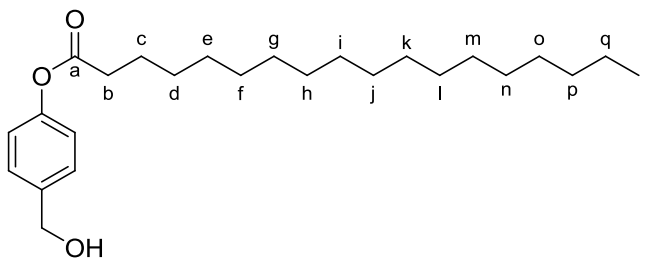
29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 22.7 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n, C-o, C-p,

C-q), 14.2 (C-r); IR: ν [cm⁻¹]= 3345, 3074, 2918, 1751, 1510, 1464, 1220, 1152; Smp.: 74

°C; R_f-Wert: 0.67 (Petrolether/Ethylacetat, 1:1 v/v); MS (FAB): ber. 267.26 [C₁₈H₃₅O⁺],

373.31 [C₂₅H₄₁O₂⁺] [M⁺-HO], 391.32 [M+H⁺]; gef. 267.3, 373.3, 391.3; Molgewicht [g/mol]:

390.59; Summenformel: C₂₅H₄₂O₃



Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyl-Z-octadec-9-enoat (4-(Hydroxymethyl)-phenylölsäureester) 40k

Die Synthese wurde gemäß **AAV 4 Variante B** durchgeführt. Es wurden 8.0 g (64 mmol, 1 Äq.) 4-Hydroxybenzylalkohol sowie 10.8 mL (7.82 g, 77.3 mmol, 1.2 Äq.) abs. Triethylamin in 50 mL abs. THF gelöst.

Die Veresterung erfolgte bei 0 °C durch Zugabe von 25.5 mL (23.3 g, 77.3 mmol, 1.2 Äq.)

Z-9-Octadecenoylchlorid

(Ölsäurechlorid), das in 20 mL abs.

THF gelöst war. Die wässrige

Aufarbeitung erfolgte gemäß **AAV 4**. Das Rohprodukt wurde aus Petrolether und Ethylacetat umkristallisiert und abschließend säulenchromatographisch (Petrolether/Ethylacetat, 5:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 13.6 g (36.5 mmol, 57%) eines farblosen Öls.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.41-7.33 (m, 2H, H-2), 7.10-7.01 (m, 2H, H-3), 5.43-5.31 (m, 2H, H-i, H-j), 4.68 (s, 2H, H-Bn), 2.55 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H-b), 2.12-1.93 (m, 4H, H-h, H-k), 1.75 (tt, 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-c), 1.46-1.21 (m, 20H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-l, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q), 0.87 (t, 3H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, H-r); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 172.1 (C-a), 150.1 (C-4), 138.1 (C-1), 129.5 (C-i, C-j), 127.8 (C-2), 121.5 (C-3), 64.6 (C-Bn), 34.1 (C-b), 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.1, 29.1, 24.8, 22.6 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-l, C-m, C-n, C-o, C-p, C-q), 27.2 (C-h, C-k), 13.7 (C-r); **IR**: ν [cm⁻¹]= 2922, 2853, 1739, 1609, 1509, 1463, 1199, 1162, 851, 723; **R_f-Wert**: 0.38 (Petrolether/Ethylacetat, 3:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 343.26 [M-CH₃OH], 374.28 [M], gef. 343.3, 371.3; Molgewicht [g/mol]: 374.55; Summenformel: C₂₄H₃₈O₃

7.2.5 Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramiditen

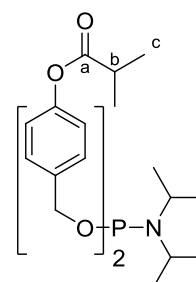
Synthese von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit 45

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 2.5 g (12 mmol, 2.2 Äq.) 4-(Hydroxymethyl)phenyl-isopropanoat und 1.79 mL (1.3 g, 4.81 mmol, 1.9 Äq.) abs. Triethylamin, gelöst in 10 mL abs. THF, mit 1.07 mL (1.17 g, 5.84 mmol, 1 Äq.) Dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit, gelöst in 15 mL abs. THF, umgesetzt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Petrolether mit Ethylacetatgradient bis 50% v/v, 4% TEA).

Ausbeute: 2.77 g (5.35 mmol, 33 %) farbloses Öl

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.37-7.31 (m, 4H, H-2), 7.05-7.00 (m, 4H, H-3), 4.75 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.7 Hz, ³J_{HP} = 8.2 Hz, H-Bn), 4.67 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.7 Hz, ³J_{HP} = 8.2 Hz, H-Bn), 3.74-3.63

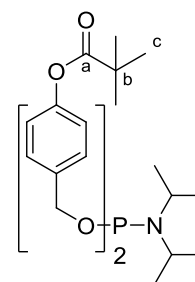
(m, 2H, NC-H), 2.79 (sept., 2H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H-b), 1.31 (d, 12H, ³J_{HH} = 7.00 Hz, H-c), 1.20 (d, 12H, ³J_{HH} = 7.00 Hz, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 175.7 (2x C-a), 150.0 (2x C-4), 136.9 (d, ²J_{CP} = 7.3 Hz, 2x C-1), 128.0 (4x C-2), 121.3 (4x C-3), 64.8 (d, ²J_{CP} = 18.3 Hz, 2x C-Bn), 43.1 (d, ²J_{CP} = 12.6 Hz, 2x C-N), 34.2 (2x C-b), 24.6 (d, ³J_{CP} = 7.2 Hz, 4x Me), 18.9 (4x C-c); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CDCl₃) δ [ppm]= 147.86; **IR**: ν [cm⁻¹]= 2968, 1754, 1607, 1507, 1468, 1364, 1199, 1180, 1003, 972, 915, 797, 736, 639, 504; **R_f-Wert**: 0.35 (Petrolether/Ethylacetat, 5:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 517.25 [M], 518.26 [M+H⁺] gef. 518.3; Molgewicht [g/mol]: 517.59; Summenformel: C₂₈H₄₀NO₆P



Synthese von Bis-(4-*tert*-Butanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit 46

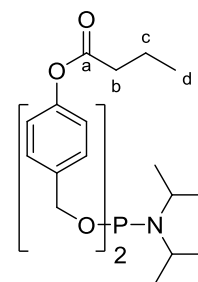
Diese Verbindung wurde von *H. Jessen* übernommen.⁷⁰

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.37-7.32 (m, 4H, H-2), 7.04-6.98 (m, 4H, H-3), 4.75 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.6 Hz, ³J_{HP} = 8.0 Hz, H-Bn), 4.67 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.6 Hz, ³J_{HP} = 8.0 Hz, H-Bn), 3.75-3.65 (m, 2H, NC-H), 1.35 (s, 18H, H-b), 1.20 (d, 12H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 177.2 (2x C-a), 150.4 (2x C-4), 136.9 (d, ²J_{CP} = 7.5 Hz, 2x C-1), 128.1 (4x C-2), 121.3 (4x C-3), 65.0 (d, ²J_{CP} = 18.3 Hz, 2x C-Bn), 43.2 (d, ²J_{CP} = 12.6 Hz, 2x C-N), 27.3 (6x C-b), 24.6 (d, ³J_{CP} = 7.5 Hz, 4x Me), **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CDCl₃) δ [ppm]= 147.95; **IR:** ν [cm⁻¹]= 2967, 2933, 2871, 1750, 1507, 1479, 1460, 1197, 1163, 1006 940, 894, 876, 749, 701, 562, 506; **Smp.:** 25-27 °C; **R_f-Wert:** 0.63 (Petrolether/Ethylacetat, 5:1 v/v) **MS** (FAB): ber. 545.28 [M], 546.29 [M+H⁺] gef. 546.3; Molgewicht [g/mol]: 545.65; Summenformel: C₃₀H₄₄NO₆P



Synthese von Bis-(4-butanoyloxybenzyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit 47

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 2.50 g (12.9 mmol, 2 Äq.) 4-(Hydroxymethyl)phenylbutyrat und 1.79 mL (12.9 mmol, 2 Äq.) Triethylamin, gelöst in 10 mL abs. THF, mit 1.19 mL (1.31 g, 6.45 mmol, 1 Äq.) Dichloro-N,N-diisopropylphosphoramidit, gelöst in 20 mL abs. THF, umgesetzt. Das Rohprodukt wurde in 2 mL Dichlormethan aufgenommen und am Chromatotron gereinigt (Petrolether mit Ethylacetatgradient von 0-20%, 5% TEA).



Ausbeute: 3.04 g (5.87 mmol, 91%) eines farblosen Öls.

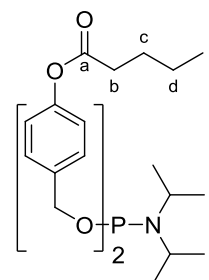
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.37-7.32 (m, 4H, H-2), 7.06-7.01 (m, 4H, H-3), 4.74 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.8 Hz, ³J_{HP} = 8.2 Hz, H-Bn), 4.67 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.8 Hz, ³J_{HP} = 8.2 Hz, H-Bn), 3.76-3.62 (m, 2H, NC-H), 2.54 (t, 4H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-b), 1.78 (sext., 4H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-c), 1.20 (d, 12H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, Me), 0.96 (t, 6H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-d); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 172.3 (2x C-a), 150.1 (2x C-4), 137.1 (d, ²J_{CP} = 7.6 Hz, 2x C-1), 128.1 (4x C-2), 121.5 (4x C-3), 64.9 (d, ²J_{CP} = 18.4 Hz, 2x C-Bn), 43.2 (d, ²J_{CP} = 13.0 Hz, 2x C-N), 36.4 (2x C-b), 24.7 (Me), 24.4 (Me), 18.5 (2x C-c), 13.7 (2x C-d); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CDCl₃) δ [ppm]= 147.94; **IR:** ν [cm⁻¹]= 2965, 2932, 2874, 1756, 1507, 1163, 1098, 1026, 1004, 750, 547; **R_f-Wert:** 0.72 (Petrolether/Ethylacetat, 5:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 518.3 [M+H⁺], gef. 518.1; Molgewicht [g/mol]: 517.59; Summenformel: C₂₈H₄₀NO₆P

Synthese von Bis-(4-pentanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit 48

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 1.997 g (9.60 mmol, 1.9 Äq.) 4-(Hydroxymethyl)phenylpentanoat und 1.4 mL (1.0 g, 10 mmol, 2.3 Äq.) abs. Triethylamin, gelöst in 25 mL abs. THF, mit 0.882 g (4.36 mmol, 1 Äq.) Dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit, gelöst in 25 mL abs. THF, umgesetzt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Petrolether, 5% TEA).

Ausbeute: 2.13 g (3.91 mmol, 90%) eines farblosen Öls.

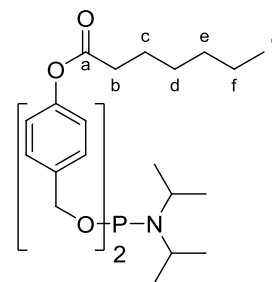
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.36-7.32 (m, 4H, H-2), 7.06-7.00 (m, 4H, H-3), 4.74 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.6 Hz, ³J_{HP} = 8.1 Hz, H-Bn), 4.66 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.6 Hz, ³J_{HP} = 8.1 Hz, H-Bn), 3.75-3.61 (m, 2H, NC-H), 2.54 (t, 4H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H-b), 1.74 (tt, 4H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H-c), 1.44 (sext., 4H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H-d), 1.19 (d, 12H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, Me), 0.96 (t, 6H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-e); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 172.4 (2x



C-a), 150.0 (2x C-4), 137.2 (2x C-1), 128.1 (4x C-2), 121.5 (4x C-3), 64.9 (d, ²J_{CP} = 18.5 Hz, 2x C-Bn), 43.2 (d, ²J_{CP} = 12.9 Hz, 2x C-N), 34.3, 27.2, 24.7, 24.7, 22.4 (C-b, C-c, C-d, 2x Me), 13.8 (C-e); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CDCl₃) δ [ppm]= 147.86, **IR**: ν [cm⁻¹]= 2963, 2931, 2871, 1757, 1507, 1460, 1417, 1364, 1198, 1100, 1026, 851; **R_f-Wert**: 0.69 (Petrolether/Ethylacetat, 5:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 545.3 [M⁺], 546.3 [M+H⁺]; gef. 544.3 [M-H⁺], 546.4 [M+H⁺]; Molgewicht [g/mol]: 545.64; Summenformel: C₃₀H₄₄NO₆P

Synthese von Bis-(4-heptanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit 49

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 1.8 g (7.6 mmol, 2.2 Äq.) 4-(Hydroxymethyl)phenylheptanoat und 1.11 mL (0.78 g, 7.96 mmol, 2.3 Äq.) abs. Triethylamin, gelöst in 10 mL abs. THF, mit 0.69 g (0.64 mL, 3.46 mmol, 1 Äq.) Dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit, gelöst in 10 mL abs. THF, umgesetzt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Petrolether mit Ethylacetatgradient 0-50%, 10% TEA).



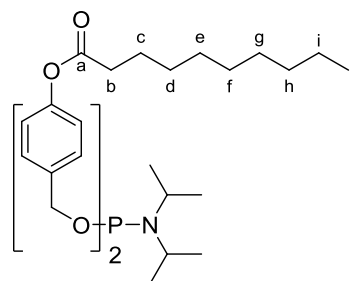
Ausbeute: 984 mg (1.66 mmol, 49%) farbloses Öl

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.37-7.32 (m, 4H, H-2), 7.05-7.00 (m, 4H, H-3), 4.74 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.6 Hz, ³J_{HP} = 8.0 Hz, H-Bn), 4.66 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.6 Hz, ³J_{HP} = 8.0 Hz, H-Bn), 3.74-3.63 (m, 2H, NC-H), 2.54 (t, 4H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 1.75 (tt, 4H, ³J_{HH} = 7.4 Hz,

$^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-c), 1.45-1.22 (m, 12H, H-d, H-e, H-f), 1.19 (d, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, Me), 0.90 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, H-g); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 173.7 (2x C-a), 154.4 (C-4), 154.3 (C-4), 130.3 (2x C-1), 129.8 (4x C-2), 120.0 (4 C-3), 119.9 (2x C-3), 65.7 (2x C-Bn), 44.1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 13.7$ Hz, 2x -N), 34.2, 27.1, 24.5, 24.5, 22.3 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, Me), 13.7 (C-g); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CDCl_3) δ [ppm]= 147.92; **IR** (film): ν [cm^{-1}]= 2962, 2930, 2860, 1759, 1608, 1459, 1417, 1199, 1142, 1027, 975, 853, 754; **R_f-Wert**: 0.55 (Petrolether/Ethylacetat/Triethylamin, 4:1:0.1 v/v/v); **MS** (FAB): ber. 601.35 [M], 602.36 [M+H⁺] gef. 602.4; Molgewicht [g/mol]: 601.75; Summenformel: $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{NO}_6\text{P}$

Synthese von Bis-(4-decanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit 50

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 3.99 g (14.4 mmol, 2.2 Äq.) 4-(Hydroxymethyl)phenyldecanoat und 2.1 mL (1.5 g, 14.6 mmol, 2.2 Äq.) abs. Triethylamin, gelöst in 10 mL abs. THF, mit 1.31 g (6.47 mmol, 1 Äq.) Dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit, gelöst in 30 mL abs. THF, umgesetzt. Das Rohprodukt wurde zweimal am Chromatotron gereinigt (Petrolether/Ethylacetat 9:1 v/v, 5% TEA).

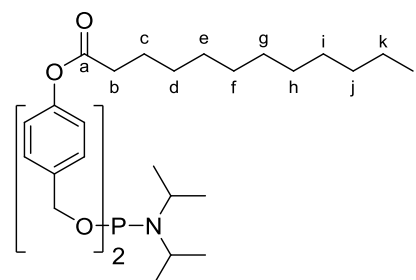


Ausbeute: 2.48 g (3.62 mmol, 56%) farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 7.37-7.32 (m, 4H, H-2), 7.05-7.00 (m, 4H, H-3), 4.74 (dd, 2H, $^2J_{\text{HH}} = 12.6$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 8.0$ Hz, H-Bn), 4.66 (dd, 2H, $^2J_{\text{HH}} = 12.6$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 8.0$ Hz, H-Bn), 3.75-3.64 (m, 2H, NC-H), 2.54 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, H-b), 1.75 (tt, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-c), 1.45-1.23 (m, 24H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i), 1.21 (d, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, Me), 0.88 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, H-j); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 172.4 (2x C-a), 150.0 (2x C-4), 137.1 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz, 2x C-1), 128.1 (4x C-2), 121.5 (4x C-3), 64.9 (d, $^2J_{\text{CP}} = 18.6$ Hz, 2x C-Bn), 43.2 (d, $^2J_{\text{CP}} = 13.0$ Hz, 2x C-N), 34.5, 31.9, 29.5, 29.4, 29.2, 26.3, 25.1, 22.7 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i), 24.8 (Me), 24.6 (Me), 14.2 (C-j); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CDCl_3) δ [ppm]= 147.94; **IR**: ν [cm^{-1}]= 2955, 2916, 2848, 1749, 1508, 1210, 1143, 1120, 719, 579, 514; **R_f-Wert**: 0.53 (Petrolether/Ethylacetat, 5:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 685.44 [M], 686.45 [M+H⁺], gef. 686.5; Molgewicht [g/mol]: 685.91; Summenformel: $\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{NO}_6\text{P}$

Synthese von Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit 51

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 3.01 g (9.82 mmol, 2.2 Äq.) 4-(Hydroxymethyl)phenyldodecanoat und 1.43 mL (1.01 g, 10.3 mmol, 2.3 Äq.) abs. Triethylamin, gelöst in 25 mL abs. THF, mit 0.902 g (0.821 mL, 4.45 mmol, 1 Äq.) Dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit, gelöst in 25 mL abs. THF, umgesetzt. Es wurde wie unter



AAV 5 aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Petrolether mit Ethylacetatgradient bis 50% v/v, 5% TEA).

Ausbeute: 1.92 g (2.59 mmol, 58%) farbloser Feststoff

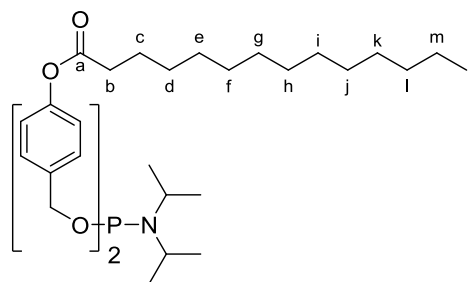
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.36-7.31 (m, 4H, H-2), 7.05-7.00 (m, 4H, H-3), 4.74 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.8 Hz, ³J_{HP} = 8.0 Hz, H-Bn), 4.66 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.8 Hz, ³J_{HP} = 8.0 Hz, H-Bn), 3.74-3.63 (m, 2H, NC-H), 2.54 (t, 4H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 1.75 (tt, 4H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H-c), 1.45-1.22 (m, 32H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k), 1.19 (d, 12H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, Me), 0.87 (t, 6H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, H-l); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 172.4 (2x C-a), 150.0 (2x C-4), 137.1 (d, ³J_{CP} = 7.5 Hz, 2x C-1), 128.1 (4x C-2), 121.5 (4x C-3), 64.9 (d, ²J_{CP} = 18.5 Hz, 2x C-Bn), 43.2 (d, ²J_{CP} = 13.0 Hz, 2xC-N), 34.5, 32.0, 29.5, 29.5, 29.5, 29.4, 29.2, 25.1, 22.7 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j), 24.7, 24.6 (Me), 14.2 (C-k); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CDCl₃) δ [ppm]= 147.88; **IR:** ν [cm⁻¹]= 2958, 2915, 2849, 1753, 1508, 1463, 1412, 1387, 1362, 1328, 1298, 1267, 1236, 1083, 1017, 728; **Smp.:** 47 °C; **R_f-Wert:** 0.87 (Petrolether/Ethylacetat, 5:1 v/v); **MS (FAB):** ber. 741.50 [M], 780.47 [M+K⁺]; gef. 780.6 [M+K⁺]; Molgewicht [g/mol]: 742.02; Summenformel: C₄₄H₇₂NO₆P

Synthese von Bis-(4-tetradecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit 52

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 2.00 g (5.98 mmol, 2 Äq.) 4-(Hydroxymethyl)phenyltetradecanoat und 0.84 mL (0.59 g, 5.98 mmol, 2 Äq.) abs. Triethylamin, gelöst in 15 mL abs. Diethylether, mit 603 mg (0.549 mL, 2.99 mmol, 1 Äq.) Dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit, gelöst in 30 mL abs. Diethylether, umgesetzt. Es wurde wie unter **AAV 5** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Petrolether mit Ethylacetatgradient bis 50% v/v, 5% TEA).

Ausbeute: 811 mg (1.01 mmol, 34%) farbloser Feststoff

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.38-7.32 (m, 4H, H-2), 7.05-7.00 (m, 4H, H-3), 4.74 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.5 Hz, ³J_{HP} = 8.0 Hz, H-Bn), 4.66 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.5 Hz, ³J_{HP} = 8.0 Hz, H-Bn), 3.74-3.63 (m, 2H, NC-H), 2.54 (t, 4H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 1.74 (tt, 4H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} =



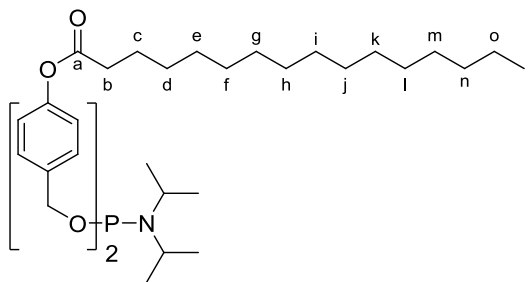
7.5 Hz, H-c), 1.45-1.22 (m, 40H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m), 1.19 (d, 12H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, Me), 0.88 (t, 6H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, H-o); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 172.5 (2x C-a), 150.1 (2x C-4), 137.1 (d, ³J_{CP} = 7.6 Hz, 2x C-1), 128.1 (4x C-2), 121.5 (4x C-3), 64.5 (d, ²J_{CP} = 18.1 Hz, 2x C-Bn), 43.3 (d, ²J_{CP} = 13.0 Hz, 2x C-N), 34.5, 34.4, 32.1, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 22.7 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m), 25.1 (2x Me), 14.3 (C-n); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CDCl₃) δ [ppm]= 147.84; **IR:** ν [cm⁻¹]= 2956, 2914, 2847, 1752, 1508, 1463, 1361, 1218, 1197, 1091, 968, 851, 819, 512; **Smp.:** 47 °C; **R_f-Wert:** 0.82 (Petrolether/Ethylacetat, 5:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 797.57 [M], 798.57 [M+H⁺], gef. 798.5; Molgewicht [g/mol]: 798.12; Summenformel: C₄₈H₈₀NO₆P;

Synthese von Bis-(4-hexadecanoyloxybenzyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit 54

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 4.018 g (11.07 mmol, 2.2 Äq.) 4-(Hydroxymethyl)phenylhexadecanoat und 1.61 mL (1.17 g, 11.5 mmol, 2.3 Äq.) abs. Triethylamin, gelöst in 10 mL abs. THF, mit 0.92 mL (1.01 g, 4.99 mmol, 1 Äq.) Dichloro-N,N-diisopropylphosphoramidit, gelöst in 10 mL abs. THF, umgesetzt. Es wurde wie unter **AAV 5** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Petrolether mit Ethylacetatgradient bis 50% v/v, 5% TEA).

Ausbeute: 3.43 g (4.15 mmol, 80%) farbloser Feststoff

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.37-7.32 (m, 4H, H-2), 7.05-7.00 (m, 4H, H-3), 4.74 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.8 Hz, ³J_{HP} = 8.1 Hz, H-Bn), 4.66 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.8 Hz, ³J_{HP} = 8.1 Hz, H-Bn), 3.75-3.62 (m, 2H, NC-H), 2.54 (t, 4H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 1.74 (tt, 4H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H-c),



1.45-1.22 (m, 48H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m, H-n, H-o), 1.19 (d, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, Me), 0.88 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, H-p); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 172.5 (2x C-a), 150.1 (2x C-4), 137.1 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.4$ Hz, 2x C-1), 128.1 (4x C-2), 121.5 (4x C-3), 64.9 (d, $^2J_{\text{CP}} = 18.3$ Hz, 2x C-Bn), 43.3 (d, $^2J_{\text{CP}} = 13.0$ Hz, 2xC-N), 34.5, 32.4, 32.1, 29.8, 29.7, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 25.1, 22.4 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n, C-o), 24.7 (Me), 24.6 (Me), 14.3 (C-p); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CDCl_3) δ [ppm]= 147.94; **IR**: ν [cm^{-1}]= 2916, 2848, 1754, 1223, 1153, 971, 849, 819, 763; **Smp.**: 53 °C; **R_f-Wert**: 0.70 (Petrolether/Ethylacetat, 5:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 853.63 [M], 854.64 [M+H⁺], gef. 854.9; Molgewicht [g/mol]: 854.24; Summenformel: $\text{C}_{52}\text{H}_{88}\text{O}_6\text{NP}$

Synthese von Bis-(4-octadecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit 55

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 4.027 g (10.30 mmol, 2.2 Äq.) 4-(Hydroxymethyl)phenyloctadecanoat und 1.49 mL (1.08 g, 10.7 mmol, 2.3 Äq.) abs. Triethylamin, gelöst in 30 mL abs. THF, mit 0.86 mL (0.94 g, 4.66 mmol, 1 Äq.) Dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit, gelöst in 10 mL abs. THF, umgesetzt. Es wurde wie unter **AAV 5** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Petrolether mit Ethylacetatgradient bis 50% v/v, 5% TEA).

Ausbeute: 4.18 g (4.59 mmol, 98 %) farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm]= 7.36-7.32 (m, 4H, H-2),

7.05-7.00 (m, 4H, H-3), 4.74 (dd,

2H, $^2J_{\text{HH}} = 13.0$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 8.0$ Hz,

H-Bn), 4.66 (dd, 2H, $^2J_{\text{HH}} =$

13.0 Hz, $^3J_{\text{HP}} = 8.0$ Hz, H-Bn), 3.74-

3.62 (m, 2H, NC-H), 2.54 (t, 4H,

$^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-b), 1.75 (tt, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, H-c), 1.45-1.22 (m, 56H, H-d,

H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q), 1.19 (d, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz,

Me), 0.87 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, H-r); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 172.5 (2x C-a),

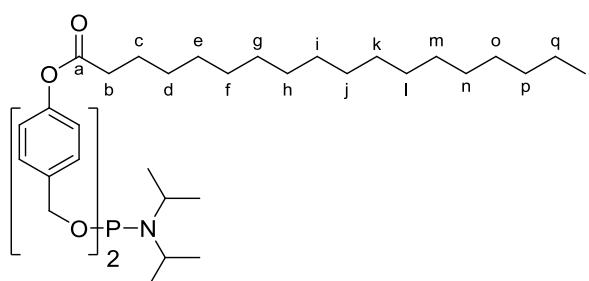
150.0 (2x C-4), 137.1 (2x C-1), 129.8 (4x C-2), 121.4 (4x C-3), 64.9 (d, $^2J_{\text{CP}} = 18.6$ Hz, 2x

C-Bn), 43.2 (d, $^2J_{\text{CP}} = 12.6$ Hz, 2x C-N), 34.5, 32.1, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.4,

29.3, 25.1, 25.1, 22.7 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n, C-o,

C-p, C-q), 24.7 (2x Me), 14.3 (C-r); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CDCl_3) δ [ppm]=

147.83; **IR** (KBr): ν [cm^{-1}]= 2916, 2848, 1754, 1223, 1153, 971; **Smp.**: 59 °C; **R_f-Wert**: 0.80



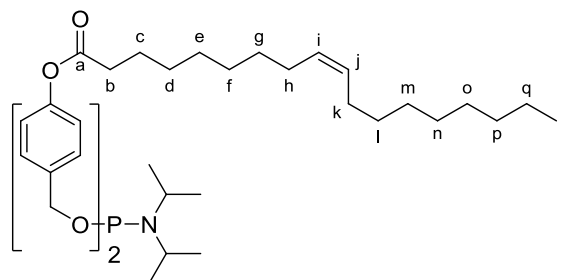
(Petrolether/Ethylacetat, 5:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 909.69 [M], 910.70 [M+H⁺], gef. 910.4; Molgewicht [g/mol]: 910.32; Summenformel: C₄₈H₈₀O₆NP

Synthese von Bis-(4-*E*-octadec-9-enoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit 53

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 5**

durchgeführt. Es wurden 2.00 g
(5.33 mmol, 2.1 Äq.) 4-

(Hydroxymethyl)phenyl-*E*-octadec-9-
enoat und 0.69 mL (0.48 g, 4.81 mmol,
1.9 Äq.) abs. Triethylamin, gelöst in 25
mL abs. Diethylether, mit 0.455 mL



(0.499 g, 2.47 mmol, 1 Äq.) Dichloro-*N,N*-diisopropylphosphoramidit, gelöst in 15 mL abs. Diethylether, umgesetzt. Es wurde wie unter **AAV 5** aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron gereinigt (Petrolether mit Ethylacetatgradient bis 50% v/v, 5% TEA).

Ausbeute: 795 mg (0.877 mmol, 16 %) farbloses Öl

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 7.36-7.32 (m, 4H, H-2), 7.05-7.01 (m, 4H, H-3), 5.43-5.28 (m, 4H, H-i, H-j), 4.75 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.8 Hz, ³J_{HP} = 8.2 Hz, H-Bn), 4.67 (dd, 2H, ²J_{HH} = 12.8 Hz, ³J_{HP} = 8.2 Hz, H-Bn), 3.74-3.63 (m, 2H, NC-H), 2.54 (t, 4H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 2.09-1.93 (m, 8H, H-h, H-k), 1.75 (tt, 4H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H-c), 1.46-1.23 (m, 40H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-l, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q), 1.19 (d, 12H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, Me), 0.87 (m, 6H, H-r); **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 172.5 (2x C-a), 150.1 (2x C-4), 137.1 (d, ³J_{CP} = 8.0 Hz, 2x C-1), 130.2, 129.8 (2x C-i, 2x C-j), 128.1 (4x C-2), 121.4 (4x C-3), 64.9 (d, ²J_{CP} = 18.5 Hz, 2x C-Bn), 43.3 (d, ²J_{CP} = 12.6 Hz, 2x C-N), 34.5 (C-b), 32.1, 29.8, 29.8, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 29.1, 27.4, 27.3, 22.7 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-l, C-m, C-n, C-o, C-p, C-q), 25.1 (C-h, C-k), 24.7 (d, ³J_{CP} = 7.5 Hz, 4x Me), 14.8 (C-r); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CDCl₃) δ [ppm]= 147.91; **IR**: ν [cm⁻¹]= 2923, 2853, 1761, 1198, 1164, 1129, 1051, 1026, 1008, 974, 915, 754, 553; **R_f-Wert**: 0.94 (Petrolether/Ethylacetat, 5:1 v/v), 0.74 (Petrolether/Ethylacetat/Triethylamin, 5:1:0.1 v/v/v); **MS** (FAB): ber. 905.66 [M], 906.67 [M+H⁺] gef. 906.4; Molgewicht [g/mol]: 906.31; Summenformel: C₅₆H₉₂NO₆P

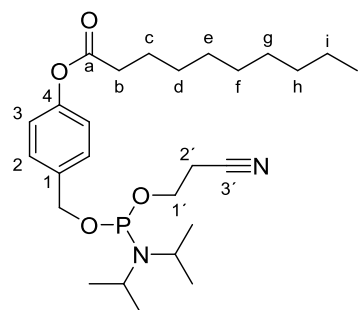
Synthese von 2-Cyanethoxy-(4-decanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit 62

Die Reaktion wurde unter einer N₂-Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluß durchgeführt. Zu einer Lösung aus 113 mg (0.405 mmol, 0.9 Äq.)

4-(Hydroxymethyl)phenyldecanoat und 70.7 μL (52.3 mg, 0.405 mmol, 0.9 Äq.) abs. DIPEA in 10 mL abs. THF wurden unter Rühren bei 0 °C innerhalb von 20 min 100 mg (0.449 mmol, 1.1 Äq.) Chloro-(2-Cyanoethoxy)*N,N*-diisopropylphosphoramidit, gelöst in 10 mL abs. THF, getropft. Nach Erwärmen auf Rt wurde die Reaktionslösung weitere 90 Minuten gerührt. Es bildete sich kein Niederschlag. Die Reaktionslösung wurde mit Phosphatpuffer pH=7.3 versetzt, einmal mit 30 mL Ethylacetat extrahiert und die organische Phase einmal mit 30 mL Phosphatpuffer gewaschen. Die vereinte organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum der Ölpumpe von den Lösungsmitteln befreit. Das Produkt wurde aufgrund seiner Luftempfindlichkeit nicht gereinigt.

Ausbeute: 150 mg (0.313 mmol, 78%) farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 7.39-7.31 (m, 2H, $\text{H}_{\text{aryl-3}}$), 7.08-7.02 (m, 2H, $\text{H}_{\text{aryl-2}}$), 4.74 (dd, 2H, $^2J_{\text{HH}} = 12.6$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 8.0$ Hz, H-Bn), 4.66 (dd, 2H, $^2J_{\text{HH}} = 12.6$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 8.0$ Hz, H-Bn), 3.89-3.78 (m, 2H, H-1'), 3.70-3.59 (m, 2H, NC-H), 2.62 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Hz, H-2'), 2.54 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, H-b), 1.75 (tt, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-c), 1.45-1.23 (m, 12H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i), 1.19 (d, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 5.2$ Hz, Me), 0.87 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, H-j); **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CDCl_3) δ [ppm]= 148.54; **R_f -Wert:** 0.93, (Ethylacetat/Methanol, 1:1 v/v); Molgewicht [g/mol]: 478.60; Summenformel: $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$



7.2.6 Synthese von Nucleosidmonophosphaten (NMP)

Anmerkung: Für die Nucleosidmonophosphate ist es nicht genau bekannt, wie viele Gegenionen vorhanden sind. Im Falle von Tetra-*n*-butylammonium als Kation lässt sich die Menge an Gegenionen im Protonenspektrum quantifizieren. Das Vorkommen von genau zwei tetra-*n*-Butylammoniumgegenionen wurde beobachtet. Es gab jedoch Fälle in denen weniger (1.6-1.8 tetra-*n*-Butylammoniumionen) Gegenionen beobachtet wurden. Es wird im Folgenden bei der Auswertung der NMR-Spektren und der Berechnung der Molmassen immer die Anzahl von zwei Gegenionen angenommen. Ist Ammonium als Kation verwendet worden, kann die Menge an vorliegenden Ionen nicht bestimmt werden, zumindest nicht per NMR-Spektroskopie. Eine Elementaranalyse kommt wegen des Restwassergehaltes der Verbindungen nicht in Betracht. Auch hier wird bei Berechnung von Molmassen von genau zwei Ammoniumionen ausgegangen.

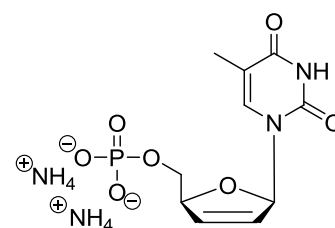
Synthese von Diammonium-2',3'-didesoxy-2',3'-didehydrothymidinmonophosphat (d4TMP) 3a

Die Phosphorylierung von 2',3'-didesoxy-2',3'-didehydrothymidin wurde nach **AAV 6** durchgeführt. Es wurden 1.55 g (6.94 mmol, 1.0 Äq.) trockenes d4T in 14 mL abs. Acetonitril 2.85 mL (30.5 mmol, 4.4 Äq.) dest. POCl₃, 2.4 mL (2.41 g, 30.5 mmol, 4.4 Äq.) abs. Pyridin und 0.27 mL (0.27 g, 15.3 mmol, 2.2 Äq.) dest. Wasser umgesetzt. Das nach Gefriertrocknung erhaltene Rohprodukt wurde über RP-18-Kieselgel zweimal chromatographiert.

Ausbeute: 2.21 g (6.53 mmol, 94%)

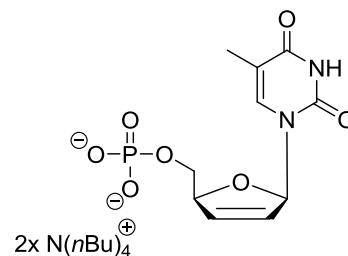
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]= 7.58 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H-6), 6.93 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, H-1'), 6.45 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.1 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H-3'), 5.88 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.1 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.3 Hz, ⁴J_{HH} = 1.4 Hz, H-2'), 5.07-5.02 (m, 1H, H-4'), 4.00-3.91 (m, H-5'), 1.85 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, Me);

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) δ [ppm]= 166.7 (C-4), 152.3 (C-2), 138.2 (C-6), 134.2 (C-3'), 125.2 (C-2'), 111.4 (C-5), 89.9 (C-1'), 85.9 (d, ³J_{CP} = 8.6 Hz, C-4'), 65.5 (d, ²J_{CP} = 4.8 Hz, C-5'), 11.41 (Me); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, D₂O) δ [ppm]= 0.42; **IR:** ν [cm⁻¹]= 2819, 1661, 1468, 1223, 1164, 1038, 908, 642, 489; **UV (HPLC):** λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_R [min]= 6.31, Methode 9; **Drehwert:** [α]_D²⁵ = -10.2° (c = 1, Methanol/Wasser, 1:1 v/v) **R_f-Wert:** (Isopropanol/Wasser/Ammoniak (25% in H₂O) 14:7:1 v/v)= 0.38; **MS** (ESI pos.): ber. 302.03 [M⁺], gef. 302.99; Molgewicht [g/mol]: 338.25; Summenformel: C₁₀H₁₉N₄O₇P



Synthese von Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidinmonophosphat (d4TMP) 3b

Es wurden die Ammoniumionen von 133 mg (0.39 mmol) Diammonium-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidinmonophosphat nach **AAV 10** ausgetauscht. Es wurde mit 511 mg tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid (40%ige Lösung in Wasser) titriert und das Produkt nach Gefriertrocknung erhalten.

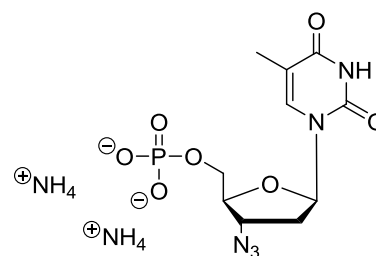


Ausbeute: 260 mg (0.33 mmol, 85%) eines hygroskopischen Harzes.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.77 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H-6), 6.95 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H-1'), 6.56 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.8 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.8 Hz, H-3'), 5.80 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.3 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H-2'), 4.13-4.05 (m, 1H, H-4'), 4.01-3.94 (m, 1H, H-5'), 3.28-3.17 (m, 16H, H-A), 1.93 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, Me), 1.72-1.60 (m, 16 H, H-B), 1.42 (sext., ³J_{HH} = 7.4 Hz, 16 H, H-C), 1.02 (t, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 24 H, H-D); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 167.4 (C-4), 153.0 (C-2), 135.1-134.9 (m, C-3'), 134.2 (C-6), 126.3 (C-2'), 109.5 (C-5), 88.7 (C-1'), 85.4 (d, J = 7.6 Hz, C-4'), 64.9 (d, J = 5.0 Hz, C-5'), 57.4 (C-a), 23.0 (C-b), 19.1 (C-c), 13.4 (C-d), 13.0 (Me); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= 3.57; **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_R [min]= 6.31, Methode 9; Molgewicht [g/mol]: 787.10; Summenformel: C₄₂H₈₃N₄O₇P

Synthese von Diammonium-3'-Azido-2',3'-didesoxythymidinmonophosphat 6a

Die Synthese von Diammonium-3'-Azido-2',3'-didesoxythymidinmonophosphat wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 0.55 g (2.09 mmol, 1.0 Äq.) AZT in 6 mL abs. Acetonitril, mit 0.82 mL (1.4 g, 9.2 mmol, 4.4 Äq.) dest. POCl₃, 0.76 mL (0.75 g, 9.2 mmol, 4.4 Äq.) abs. Pyridin und 0.075 mL (0.075 g, 4.18 mmol, 2.2 Äq.) dest. Wasser umgesetzt. Das nach Gefriertrocknung erhaltene Rohprodukt wurde an RP-18-Kieselgel zweimal chromatographisch gereinigt.



Ausbeute: 710 mg (1.85 mmol, 89%) eines gelben Schaumes.

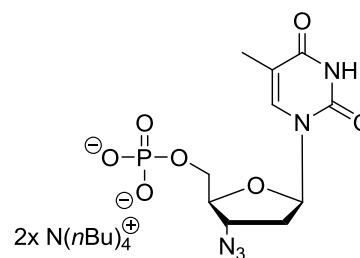
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]= 7.77 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H-6), 6.28 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.7, ³J_{HH} = 6.7, H-1'), 4.49 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 4.1 Hz, ³J_{HH} = 4.1 Hz, ³J_{HH} = 6.5 Hz, H-3'), 4.17 (dddd, 1H, ³J_{HH} = 3.8 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.4 Hz, H-4'), 4.06-3.96 (m, 2H, H-5'), 2.56-2.43 (m, 2H, H-2'), 1.92 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O) δ [ppm]= 166.9 (C-4), 152.1 (C-2), 137.8 (C-6), 112.1 (C-5), 85.2 (C-1'), 83.6 (d, ³J_{CP} = 8.7 Hz, C-4'), 64.8 (d, ²J_{CP} = 4.7 Hz, C-5'), 61.1 (C-3'), 36.7 (C-2'), 12.0 (Me); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, D₂O) δ [ppm]= 0.25; **IR** (KBr): ν [cm⁻¹]=3186, 3074, 2111, 1713, 1660, 1273, 1112, 1061; **R_f-Wert**: 0.87 (Wasser, RP-18); **HR-MS** (ESI neg.): ber. 346.0551 [M-H]⁻ gef. 346.0551 ; Molgewicht [g/mol]: 381.28; Summenformel: C₁₀H₂₀N₇O₇P

Synthese von Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin (AZTMP) 6b

Der Ionentausch wurde wie in **AAV 10** beschrieben durchgeführt. Es wurden 94.5 mg (0.25 mmol) Diammonium-3'-Azido-2',3'-dideoxythymidinmonophosphat eingesetzt. Es wurde mit 293.81 mg tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid (40%ige Lösung in Wasser) titriert und das Produkt nach Gefriertrocknung erhalten.

Ausbeute: 203.4 mg (0.245 mmol, 98%) eines hygroskopischen Harzes.

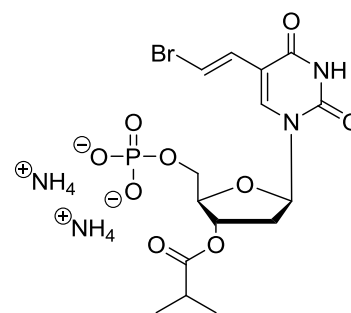
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 8.04 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H-6), 6.26 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.5, ³J_{HH} = 5.5, H-1'), 4.71-4.66 (m, 1H, H-3'), 4.11-4.06 (m, 1H, H-4'), 4.59-3.96 (m, 2H, H-5'), 3.28-3.18 (m, 16H, H-A), 1.96 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, Me), 1.73-1.66 (m, 16H, H-B), 1.42 (sext., 16H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-C), 1.02 (t, 24H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-D); **¹³C-NMR** (101 MHz, CD₃OD)



δ [ppm]= 138.7 (C-6), 112.3 (C-5), 85.8 (d, ³J_{CP} = 9.2 Hz, C-4'), 85.7 (C-1'), 65.5 (d, ²J_{CP} = 4.7 Hz, C-5'), 64.2 (C-3'), 59.5 (pt, C-A), 37.8 (C-2'), 24.7 (C-B), 20.6 (C-C), 13.8 (C-D), 12.8 (Me); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= 4.28; **UV** (HPLC): λ_{max} = 265 nm; Molgewicht [g/mol]: 830.13; Summenformel: C₄₂H₈₄N₇O₇P

Diammonium-3'-O-*iso*-butyryl-Bromovinyldeoxyuridin (3'-O-*ibu*-BVdUMP) 69

Es wurden 455 mg 3'-O-*iso*-butyryl-BVdU (1.13 mmol, 1.0 Äq.) in 2.0 mL abs. Acetonitril mit 0.45 mL dest. POCl₃ (5.0 mmol, 4.4 Äq.), 0.41 mL abs. Pyridin (d= 0.982 g/mL, 5.0 mmol, 4.4 Äq.) und 45 µL dest. Wasser (d= 1.00 g/mL, 2.5 mmol, 2.2 Äq.) umgesetzt. Zur Neutralisation wurden in diesem Fall genau 2.73 g Ammoniumhydrogencarbonat (ca. 35 mmol) zugegeben und nicht durch einen Überschuss neutralisiert. Durch RP-18 Chromatographie



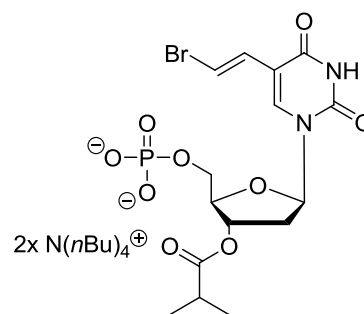
mit Wasser wurden zunächst die Phosphatsalze abgetrennt. Dann wurde das Produkt mit Wasser/Acetonitril 9:1 v/v eluiert. Da beim Auftragen auf die Säule relativ viel Acetonitril zum Lösen zugegeben werden musste, eluierte ein Teil des Produktes mit den Phosphatsalzen. Diese Fraktion wurde lyophilisiert und auf die gleiche Weise erneut chromatographiert. Das Produkt wurde vereint und lyophilisiert. Es wurden zudem einige Mischfraktionen erhalten, die das vermutlich anteilig deacylierte Produkt enthielten.⁷⁰

Ausbeute: 0.25 g (0.49 mmol, 43%) eines Feststoffes

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 8.36 (s, 1H, H_{het}-6), 7.41 (d, 1H, *J*= 13.6 Hz, H_{het}-8), 7.13 (d, 1H, ³*J*_{HH}= 13.6 Hz, H_{het}-7), 6.24 (dd, 1H, ³*J*_{HH}= 5.6 Hz, ³*J*_{HH}= 9.1 Hz, H-1'), 5.31-5.25 (m, 1H, H-3'), 4.10-4.05 (m, 1H, H-4'), 3.93-3.84 (m, 2H, H-5'), 2.57 (sept., 1H, ³*J*_{HH}= 7.0 Hz, H-b), 2.42-2.15 (m, 2H, H-2'), 1.10 (d, 6H, ³*J*_{HH}= 7.0 Hz, H-c); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 175.6 (C-a), 161.7 (C_{het}-4), 149.4 (C_{het}-2), 139.3 (C_{het}-6), 129.9 (C_{het}-7), 110.6 (C_{het}-5), 107.2 (C_{het}-8), 84.1 (C-1'), 83.7 (d, ³*J*_{CP}= 7.5 Hz, C-4'), 75.4 (C-3'), 64.1 (d, ²*J*_{CP}= 4.5 Hz, C-5'), 36.8 (C-2'), 33.0 (CH-*i*-Bu), 18.6 (2x CH₃-*i*Bu); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, DMSO-d₆) δ [ppm]= -0.64; **IR** (KBr): ν [cm⁻¹]=3421, 3205, 3069, 2976, 2360, 1720, 1469, 1191, 1115, 953; **R_f-Wert**: 0.50 (Wasser/Acetonitril, 9:1 v/v, RP-18); **MS** (HR-FAB): ber. 483.017 [M⁺], 485.015 [M+3H⁺]; gef. 483.018, 485.017; Molgewicht [g/mol]: 517.27; Summenformel: C₁₅H₂₆BrN₄O₉P

Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-3'-*O*-iso-butyryl-BVdUMP (3'-*O*-*i*bu-BVdUMP) 70

Der Ionentausch wurde wie in **AAV 10** beschrieben durchgeführt. Es wurden 50 mg (0.096 mmol) Diammonium-3'-*O*-iso-butyryl-BVdUMP eingesetzt. Es wurde mit 125 mg (0.192 mmol, 2 Äq.) tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid (40%ige Lösung in Wasser) titriert und das Produkt nach Gefriertrocknung erhalten. Ausbeute: 89 mg (0.092 mmol, 96%) hygroskopisches Harz, Molgewicht [g/mol]: 966.12; Summenformel: C₄₇H₉₀BrN₄O₉P;

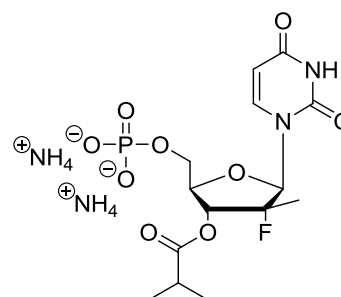


Synthese von Diammonium-3'-*O*-iso-butyryl-2'-fluor-2'-methyluridinmonophosphat (3'-*O*-*i*bu-2'-F-2'-Me-UMP) 96

Nach **AVV 6** wurden 120 mg (0.363 mmol, 1 Äq.) 3'-*O*-iso-Butyryl-2'-fluor-2'-methyluridin mit 149 µL (244 mg, 1.59 mmol, 4.4 Äq.) Phosphorylchlorid, 128 µL (126 mg, 1.59 mmol, 4.4 Äq.) abs. Pyridin und 14.4 µL (14.4 mg, 0.79 mmol, 2.2 Äq.) Wasser in 0.5 mL abs. Acetonitril umgesetzt. Wobei das Nucleosid nach 15 min gelöst in 0.5 mL abs. Acetonitril zur Reaktionslösung gegeben wurde. Die Reaktion wurde nach 4 h 45 min wie in **AVV 6** beschrieben abgebrochen und aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde an RP-18 Kieselgel zweimalig gereinigt. Die erste Chromatographie wurde isokratisch mit Wasser begonnen und das Produkt wurde schließlich mit Methanol eluiert. Bei der zweiten Chromatographie wurde das Trennmateriale auf Wasser äquilibriert (Eluent: Wasser/Methanol 200:5 v/v). Die

Produktfraktionen wurden am Rotationsverdampfer vom Methanol befreit und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 78 mg (0.173 mmol, 48%) einer farblosen Warte. Es wurden außerdem 77 mg des Nucleosids reisoliert und weitere mg des Produktes aus Mischfraktionen nicht isoliert.



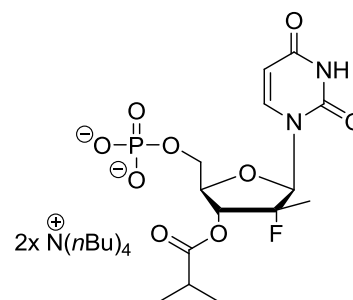
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.98 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, H-6), 6.18 (d, 1H, ³J_{HF} = 18.6 Hz, H-1'), 5.84 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, H-5), 5.32 (dd, 1H, ³J_{HH} = 9.1 Hz, ³J_{HF} = 20.5 Hz, H-3'), 4.36-4.29 (m, 2H, H-4', H-5'a), 4.08-4.01 (m, 1H, H-5'b), 2.67 (sept., 1H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, CH-*t*Bu), 1.35 (d, 3H, ³J_{HF} = 22.6 Hz, H-6'), 1.21 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, CH₃-*t*Bu), 1.19 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, CH₃-*t*Bu); **¹³C-NMR** (101 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 177.4 (C-*t*Bu), 165.3 (C-4), 142.6 (C-6), 103.8 (C-5), 101.2 (d, ¹J_{CF} = 186.8 Hz, C-2'), 81.1 (d, ³J_{CP} = 9.7 Hz, C-4'), 73.1 (d, ²J_{CF} = 15.5 Hz, C-3'), 62.4 (d, ²J_{CP} = 3.7 Hz, C-5'), 34.89 (CH-*t*Bu), 19.8 (CH₃-*t*Bu), 19.0 (CH₃-*t*Bu), 18.5 (d, ²J_{CF} = 25.3 Hz, C-6'); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= 0.32; **¹⁹F-NMR** (188 MHz, ¹H-entkoppelt, CDCl₃) δ [ppm]= -154.65; **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265; HPLC: t_R [min]= 6.65, Methode 9; **R_f-Wert**: 0.89 (Methanol, 100%, RP-18); Molgewicht [g/mol]: 444.35, Summenformel: C₁₄H₂₆FN₄O₉P

Synthese von Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-3'-*O*-iso-butyryl-2'-fluor-2'-methyluridinmonophosphat 97

60 mg (0.135 mmol) Diammonium-3'-*O*-iso-Butyryl-2'-fluor-2'-methyluridin-mono-phosphat wurden nach **AAV 10** in die protonierte Form überführt und mit 170.8 mg (0.657 mmol) tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid (40%ige Lösung in Wasser) titriert, bis ein pH-Wert von 6.5-7.0 eingestellt war. Das Produkt wurde gefriergetrocknet.

Ausbeute: 95.2 mg (0.106 mmol, 80%) farbloses hygroskopisches Harz

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 8.22 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, H-6), 6.20 (d, 1H, ³J_{HF} = 18.2 Hz, H-1'), 5.94 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, H-5), 5.35 (dd, 1H, ³J_{HH} = 9.2 Hz, ³J_{HF} = 19.0 Hz, H-3'), 4.33-4.27 (m, 2H, H-4', H-5'a), 4.01-3.91 (m, 1H, H-5'b), 3.26-3.20 (m, 16H, H-A), 2.66 (sept., 1H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, CH-*t*Bu), 1.71-1.60 (m, 16H, H-B), 1.41 (sext., 16H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-C), 1.35 (d, 3H, ³J_{HF} = 23.2



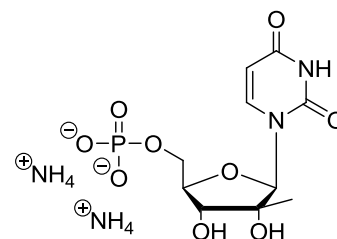
Hz, H-6'), 1.20 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, CH₃-iBu), 1.17 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, CH₃-iBu), 1.02 (t, 24H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, H-D) (3 Kationen); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 177.2 (C-iBu), 166.3 (C-4, hmbc signal), 152.5 (C-2, hmbc signal), 142.4 (C-6), 103.8 (C-5), 101.2 (d, $^1J_{\text{CF}} = 186.8$ Hz, C-2'), 81.1 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.7$ Hz, C-4'), 73.1 (d, $^2J_{\text{CF}} = 15.6$ Hz, C-3'), 62.4 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3.6$ Hz, C-5'), 59.4 (pt, C-A), 34.89 (CH-iBu), 24.7 (C-B), 20.6 (pt, C-C), 19.5 (CH₃-iBu), 19.0 (CH₃-iBu), 18.5 (d, $^2J_{\text{CF}} = 25.3$ Hz, C-6'), 13.9 (C-D); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= 3.53; $^{19}\text{F-NMR}$ (188 MHz, ^1H -entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -159.65; **IR**: ν [cm⁻¹]= 2975, 1654, 1421, 1267, 1030, 971, 813, 789, 503; **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_{R} [min]= 6.65, Methode 9; Molgewicht [g/mol]: 893.20; Summenformel: C₄₆H₉₀FN₄O₉P

Synthese von Diammonium-2'-Methyluridinmonophosphat (2'-Me-UMP) 101

Nach **AAV 6** wurden 140 mg (0.542 mmol, 1 Äq.) 2'-Methyluridin mit 223 μL (365 mg, 2.38 mmol, 4.4 Äq.) Phosphorylchlorid, 192 μL (188 mg, 2.38 mmol, 4.4 Äq.) abs. Pyridin und 21.5 μL (21.5 mg, 1.19 mmol, 2.2 Äq.) Wasser in 1.5 mL abs. Acetonitril umgesetzt. Zuvor wurde das Nucleosid mit 3 mL abs. Acetonitril coevaporiert. Nach einer Reaktionszeit von 6 h und 10 min wurde wie in **AAV 6** beschrieben hydrolysiert und anschließend gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde an RP-18 Kieselgel gereinigt (Wasser, 1% Methanol). Zwei Mischfraktionen wurden separat voneinander auf die gleiche Weise erneut chromatographiert. Nach der Chromatographie wurde gefriergetrocknet.

Ausbeute: 101 mg (0.173 mmol, 55%) einer farblosen Watte.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D₂O) δ [ppm]= 8.03 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, H-6), 5.97 (s, 1H, H-1'), 5.92 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, H-5), 4.21 (ddd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.3$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 2.1$ Hz, H-5'a), 4.12-4.06 (m, 1H, H-4'), 4.07-4.01 (m, 1H, H-5'b), 3.99 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 9.4$ Hz, H-3'), 1.16 (s, 3H, H-6'); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D₂O) δ [ppm]= 166.1 (C-4), 151.5 (C-2), 141.5 (C-6), 102.3 (C-5), 91.3 (C-1'), 80.7 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.7$ Hz, C-4'), 79.1 (C-2'), 71.5 (C-3'), 61.7 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.7$ Hz, C-5'), 18.6 (C-6'); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, D₂O) δ [ppm]= 1.64; **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_{R} [min]= 5.51, Methode 9; Molgewicht [g/mol]: 372.26; Summenformel: C₁₀H₂₁N₄O₉P



Synthese von Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-2'-methyluridinmonophosphat

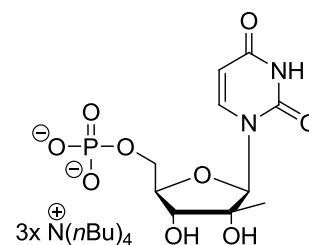
90 mg (0.267 mmol) Diammonium-2'-methyluridinmonophosphat wurden nach **AAV 10** in die protonierte Form überführt und mit 312 mg (0.481 mmol) tetra-*n*-

Butylammoniumhydroxid (40%ige Lösung in Wasser) titriert bis ein pH-Wert von 7.0-7.5 eingestellt war. Es wurde gefriergetrocknet.

Ausbeute: 198.6 mg (0.2420 mmol, 91%) farbloses hygroskopisches Harz

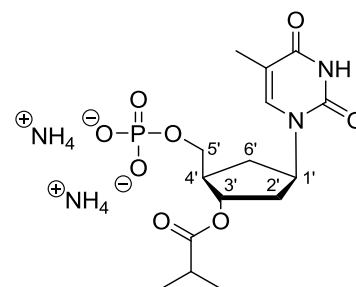
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 8.28 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-6), 5.95 (s, 1H, H-1'), 5.93 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-5), 4.21 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 12.3 Hz, ³J_{HH} = 3.3 Hz, ³J_{HP} = 2.4 Hz, H-5'a), 4.16-4.12 (m, 1H, H-5'b), 4.10 (d, 1H, ³J_{HH} = 9.0 Hz, H-3'), 3.96 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 1.8 Hz, ³J_{HH} = 3.7 Hz, ³J_{HH} = 9.0 Hz, H-4'), 3.26-3.19 (m, 24H, H-A), 1.74-1.56 (m, 24H, H-B), 1.42 (sext., 24H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-C), 1.15 (s, 3H, H-6'), 1.02

(t, 36H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-D) *Anmerkung:* Es wurden 3 Kationen gefunden; **¹³C-NMR** (101 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 167.5 (C-4), 153.5 (C-2), 143.2 (C-6), 103.2 (C-5), 92.6 (C-1'), 83.8 (d, ³J_{CP} = 8.3 Hz, C-4'), 80.5 (C-2'), 72.6 (C-3'), 62.2 (d, ²J_{CP} = 4.2 Hz, C-5'), 59.5 (pt, C-A), 24.7 (C-B), 20.6 (C-C), 20.4 (C-6'), 13.8 (C-D); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= 4.83; **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_R [min]= 5.51, Methode 9; **HR-MS** (ESI neg.): ber. 338.0515 [M], 337.0442 [M-H] gef. 337.0443; Molgewicht [g/mol]: 821.11; Summenformel: C₄₂H₈₅N₄O₉P



Diammonium-3'-O-iso-butyryl-D-carba-dTMP (3'-ibu-D-carba-dTMP) 84

Unter Stickstoffatmosphäre wurden nach **AAV 6** 138 mg (441 μmol, 1 Äq.) 3'-O-iso-Butyryl-D-carba-dT, 181 μL (1.94 mmol, 4.4 Äq.) Phosphorylchlorid, 156 μL (1.94 mmol, 4.4 Äq.) Pyridin und 17.5 μL (970 μmol, 2.2 Äq.) dest. Wasser in 1.5 mL absolutem Acetonitril umgesetzt. Die Reinigung erfolgte mehrmals mittels an RP-18 Kieselgel (Wasser, isokratisch Wasser/Methanol, 1:1 v/v). Das Eluat wurde anschließend an der Lyophilie gefriergetrocknet.



Ausbeute: 94.1 mg (222 μmol, 50%) farblose Watte

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) [ppm]= 7.62 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H-6), 5.14 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.2 Hz, ³J_{HH} = 4.0 Hz, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H-1'), 5.05 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ³J_{HH} = 7.8 Hz, ³J_{HH} = 10.6 Hz, H-3'), 3.98 (ddd, 2H, ²J_{HH} = 15.5 Hz, ³J = 5.1 Hz, ³J_{HH} = 10.3 Hz, H-5'), 2.64 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 14.0 Hz, ³J_{HH} = 7.0 Hz, H-6'a), 2.38-2.31 (m, 1H, H-4'), 2.29-2.20 (m, 2H, H-2'), 2.16-2.10 (m, 1H, H-6'b), 1.91 (d, ⁴J_{HH} = 0.9 Hz, 3H, Me_{net}), 1.77 (dq, 1H, ³J_{HH} = 12.7 Hz,

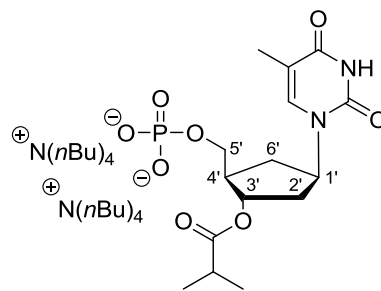
$^3J_{\text{HH}} = 10.5$ Hz, CH-*i*Bu), 1.17 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, CH₃-*i*Bu), 1.15 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, CH₃-*i*Bu); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D₂O) δ [ppm]= 180.2 (C-a), 166.6 (C-4), 152.5 (C-2), 139.5 (C-6), 111.2 (C-5), 76.0 (C-1'), 65.8 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, C-5'), 54.6 (C-3'), 44.0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.8$ Hz, C-4'), 36.3 (C-2'), 33.9 (CH-*i*Bu), 31.2 (C-6'), 18.1 (2x Me), 11.4 (Me_{het}); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, D₂O) δ [ppm]= 0.52; **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_{R} [min]= 7.51, Methode 9; **R_f-Wert**: 0.32 (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v); **HR-MS** (ESI neg): ber. 390.1192 [M], 389.1133 [M-H], gef. 389.1132; Molgewicht [g/mol]: 424.38; Summenformel: C₁₅H₂₉N₄O₈P

Bis-(tetra-*n*-butylammonium-3'-*O*-iso-butyryl-D-*carba*-dTMP 85

Es wurden 78.9 mg (186 μmol) Diammonium-3'-*O*-iso-butyryl-D-*carba*-dTMP in wenig dest. Wasser gelöst und nach **AAV 10** in die protonierte Form überführt. Es wurde mit 0.22 mL (0.34 mmol) Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (40%ige Lösung in Wasser), gelöst in 5 mL dest. Wasser, titriert und ein pH-Wert 6.5-7.0 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 160 mg (83.7 μmol , 45%) farblose Watte

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D₂O) δ [ppm]= 7.53 (s, 1H, H-6), 5.44 (s, 1H, H-1'), 5.05 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 9.7$ Hz, H-3'), 4.31 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.6$ Hz, $^3J = 5.1$ Hz, H-5'a), 3.19-3.16 (m, 16H, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, H-A), 2.42-2.33 (m, 1H, H-4'), 2.28-2.02 (m, 4H, H-6', H-2'), 1.86 (s, 3H, Me_{het}), 1.69-1.59 (m, 16H, H-B), 1.35 (sext., 16H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 14.7$ Hz, H-C), 1.14 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, CH-*i*Bu), 1.04 (d, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, CH₃-*i*Bu), 0.93 (t, 24H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-D); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, D₂O) δ [ppm]= 3.96; **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_{R} [min]= 7.51, Methode 9; Molgewicht [g/mol]: 873.24, Summenformel: C₄₇H₉₃N₄O₈P



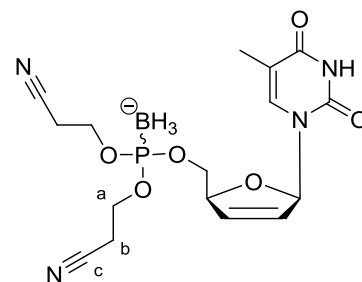
Synthese von *P*-Borano-*P*-bis-(2-cyanoethoxy)-d4TMP 110

Zu einer Lösung aus 150 mg (0.669 mmol, 1 Äq.) d4T in 10 mL abs. Acetonitril wurden unter Rühren bei 0 °C erst 238 mg (0.869 mmol, 1.3 Äq.) Bis-(2-cyanoethoxy)*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 108 mg (0.869 mmol, 1.3 Äq.) DCI gegeben. Die Reaktionslösung wurde nach 20 Minuten auf Rt erwärmt und weitere 24 Stunden gerührt. Es wurde *in situ* mit 0.127 mL (1.204 mmol) Boran-Dimethylsulfid (90% in Dimethylsulfid) versetzt und 4 Tage bei Rt gerührt. Anschließend wurden die Lösungsmittel bei

vermindertem Druck entfernt. Das gelbliche Öl wurde in 20 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 15 mL Phosphatpuffer gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt. Das Rohprodukt (339.4 mg) wurde anschließend säulenchromatographisch am Chromatotron gereinigt (Dichlormethan mit Methanolgradient 0-10%).

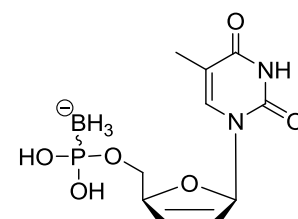
Ausbeute: 164 mg (0.402 mmol, 60%) farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 8.62 (br s, 1H, NH), 7.15 (s, 1H, H-6), 7.02 (br s, 1H, H-1'), 6.39-6.30 (m, 1H, H-3'), 5.97-5.91 (m, 1H, H-2'), 5.06-4.98 (m, 1H, H-4'), 4.35-4.16 (m, 6H, H-a, H-5'), 2.76 (dd, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 5.4$ Hz, $J_{\text{HH}} = 11.2$ Hz, H-b), 1.94 (s, 3H, Me_{het}), 0.99-0.13 (br m, 3H, BH_3); **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm]= 163.5 (C-4), 150.7 (C-2), 135.6 (C-6), 132.9 (C-3'), 127.9 (C-2'), 116.5 (2x C-c), 111.7 (C-5), 89.9 (C-1'), 84.4 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6.4$ Hz, C-4'), 67.2 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.3$ Hz, C-5'), 62.0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 12.0$ Hz, C-a), 20.0 (m, C-b), 12.7 (Me_{het}); **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CDCl_3) δ [ppm]= 118.7 (br s); **R_f -Wert:** 0.38 (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v); Molgewicht [g/mol]: 408.15; Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{BN}_4\text{O}_6\text{P}$



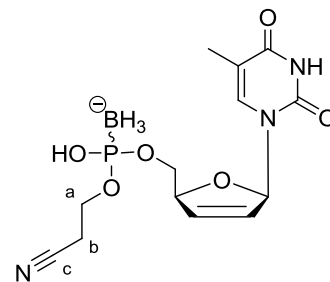
Versuch der Synthese von *P*-Borano-d4TMP 109

Es wurden 96.4 mg (0.235 mmol, 1 Äq.) α -P-borano-bis-(2-cyanoethoxy)d4TMP in Acetonitril aufgenommen und bei Rt mit ca. 3 mL Ammoniak (wässrige Lösung, 25%) versetzt. Nach 30 min zeigte sich keine Reaktion (DC, Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v) deshalb wurde ein mL Ammoniak zugegeben. Da sich auch nach zweimaliger Wiederholung dieses Vorganges keine Veränderung zeigte, wurde mit konz. Ammoniak versetzt. Es zeigte sich innerhalb von 20 min ein vollständiger Verbrauch des Eduktes und die Bildung zweier Produkte. Die Reaktionslösung wurde gefriergetrocknet. Das erhaltene Rohgemisch wurde an RP-18 Kieselgel gereinigt: Isokratisch mit Wasser/Methanol 5:1 v/v, dann 1:1 v/v und dann 1:2 v/v. Die Hauptfraktion wurde unter vermindertem Druck vom Methanol befreit und dann gefriergetrocknet. Das Produkt konnte nicht rein isoliert werden. Molgewicht [g/mol]: 302.03; Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{BN}_2\text{O}_6\text{P}$



Es wurde ein Gemisch der beiden Diastereomere von *P*-borano-(cyanethoxy)-d4TMP **110** und einer nicht identifizierten Verbindung erhalten.

Als Gemisch zweier Diastereomere: ¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]= 7.65 (s, 1H, H-6), 7.54 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H-6), 6.92 (m, 2H, 2x H-1'), 6.49-6.44 (m, 2H, H-3'), 5.97-5.93 (m, 2H, 2x H-2'), 5.11-5.05 (m, 2H, 2x H-4'), 4.11-3.92 (m, 6H, 2x H-a, 2x H-5'), 2.81-2.73 (m, 4H, 2x H-b), 1.91 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, Me_{het}), 1.90 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, Me_{het}), 0.73 - -0.33 (br m, 3H, 2x BH₃); ³¹P-NMR (162 MHz, ¹H-entkoppelt, D₂O) δ [ppm]= 96.35-90.34 (br m, 1P); **R_f-Wert:** 0.87 (Methanol/Wasser, 1:1 v/v, RP-18); Molgewicht [g/mol]: 355.09; Summenformel: C₁₃H₁₉BN₃O₆P



7.2.7 Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)-Nucleosiddiphosphaten

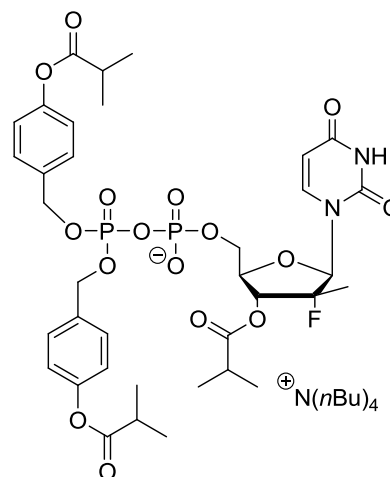
Synthese von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-*O*-*iso*-butyryl-2'-fluor-2'-methyluridindiphosphat (BIB-3'-*O*-*i*Bu-2'F-2'-Me-UDP) **91**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 90 mg (0.101 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-3'-*O*-*iso*-butyryl-2'-fluor-2'-methyluridinmonophosphat zweimal mit 2 mL abs. Acetonitril koevaporiert. Anschließend wurde in 8 bis 10 mL abs. Acetonitril aufgenommen und die gelbliche Lösung mit 83.44 mg (0.161 mmol, 1.6 Äq.) Bis-(4-*isobutyryloxybenzyl*)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 20.3 mg (0.172 mmol, 1.6 Äq.) 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) versetzt. Nach 1h20 Rühren bei Rt wurden weitere 40 mg (0.08 mmol, 0.76 Äq.) Amidit und 6.2 mg (0.052 mmol, 0.5 Äq.) DCI zugegeben. 2 h später wurden erneut 15 mg (0.028 mmol, 0.28 Äq.) Amidit und 6 mg (0.05 mmol, 0.5 Äq.) DCI zugegeben. Nach einer weiteren Stunde wurde die Lösung auf -25 °C gekühlt und mit 48 µL (0.26 mmol, 2.64 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Es wurde für 15 bis 20 min bei -25 °C gerührt und dann die Lösungsmittel bei Rt im Ölpumpenvakuum entfernt. Über Nacht wurde das Rohprodukt unter Stickstoffatmosphäre bei -18 °C gelagert. Das Rohprodukt wurde an RP-18 Kieselgel gereinigt werden. Für die erste Chromatographie wurde erst Methanol/Wasser 1:1 v/v, dann Methanol/Wasser 3:1 v/v, dann Methanol/Wasser 5:1 v/v verwendet und abschließend mit Methanol gespült. Das Produkt konnte auf diese Weise bereits von Nebenprodukten und DCI befreit werden. Um jedoch eine höhere Reinheit zu erzielen wurde eine der Mischfraktionen nochmals chromatographiert. Die RP-18 Säule wurde mit Methanol/Wasser 3:1 v/v äquilibriert. Es

wurde sauber erhalten. Die organischen Lösungsmittel wurden destillativ entfernt, dann wurde gefriergetrocknet.

Ausbeute: 79.6 mg (0.0734 mmol, 73%) eines gelblichen hygroscopischen Harzes

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.88 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, H-6), 7.42-7.37 (m, 4H, H-2), 7.05-7.02 (m, 4H, H-3), 6.16 (d, 1H, ³J_{HF} = 18.8 Hz, H-1'), 5.81 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-5), 5.28 (dd, 1H, ³J_{HH} = 9.2 Hz, ³J_{HF} = 20.2 Hz, H-3'), 5.12 (d, 4H, ²J_{HH} = 8.0 Hz, H-Bn), 4.44-4.34 (m, 1H, H-5'a), 4.35-4.28 (m, 1H, H-4'), 4.14 (ddd, 1H, J = 2.6 Hz, J = 4.7 Hz, J = 12.1 Hz, H-5'b), 3.26-3.20 (m, 8H, H-A), 2.81 (sept., 2H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H-b), 2.65 (sept., 1H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, CH-*t*Bu), 1.71-1.60 (m, 8H, H-B), 1.41 (sext., 8H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-C), 1.35 (d, 3H, ³J_{HF} = 20.4 Hz, H-6'), 1.30

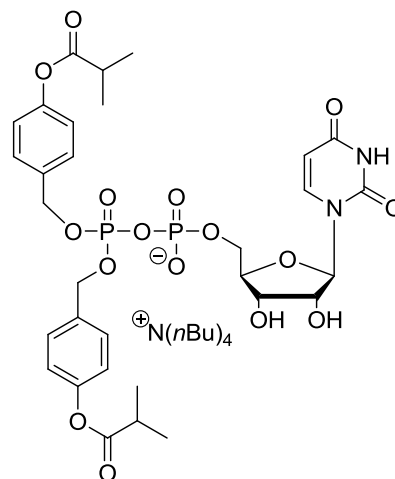


(s, 6H, H-c), 1.28 (s, 6H, H-c), 1.18 (d, 3H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, CH₃-*t*Bu), 1.16 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, CH₃-*t*Bu), 1.03 (t, 12H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-D); **¹³C-NMR** (101 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 177.2 (2x C-a), 177.0 (C-*t*Bu), 165.5 (C_{het}-4), 152.5 (2x C-4), 152.2 (C_{het}-2), 141.5 (C_{het}-6), 134.9 (d, ³J_{CP} = 7.0 Hz, 2x C-1), 130.4 (d, ⁴J_{CP} = 4.6 Hz, 4x C-2), 122.7 (4x C-3), 103.7 (C_{het}-5), 100.9 (d, ¹J_{CF} = 183.6 Hz, C-2'), 91.2 (C-1', hsqc signal), 79.8 (d, ³J_{CP} = 9.5 Hz, C-4'), 72.7 (d, ²J_{CF} = 16.7 Hz, C-3'), 70.3 (d, ²J_{CP} = 5.5 Hz, 2x C-Bn), 64.5 (C-5'), 59.5 (pt, 4x C-A), 35.3 (2x C-b), 34.8 (CH-*t*Bu), 24.7 (C-B), 20.6 (pt, 4x C-C), 19.4 (2x CH₃-*t*Bu), 19.2 (4x C-c), 18.0 (d, ²J_{CF} = 25.2 Hz, C-6'), 13.8 (4x C-D); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -12.23 (d, 1P, ²J_{PP} = 19.5 Hz, P-α), -12.74 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.6 Hz, P-β); **¹⁹F-NMR** (188 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -159.5; **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_R [min]= 11.83, Methode 9; **R_f-Wert**: 0.43 (Methanol/Wasser, 3:1 v/v, RP-18), 0.73 (Methanol/Wasser, 5:1 v/v, RP-18); **HR-MS** (ESI neg.): ber. 842.223 [M⁻], 841.2156 [M-H⁻], gef. 841.2164; Molgewicht [g/mol]: 1084.15; Summenformel: C₅₂H₈₀FN₃O₁₆P₂

Synthese von Bis-(4-iso-butyryloxybenzyl)-uridindiphosphat (BIB-UDP) 103

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 74 mg (0.146 mmol, 1 Äq.) tetra-*n*-butylammonium-uridinmonophosphat (0.75 Tetra-*n*-butylammoniumionen, 1.25 Protonen Molgewicht [g/mol]: 503.3) in 2 mL abs. Acetonitril aufgenommen und in einem Tropftrichter über ausgeheiztem Molsieb (0.3 nm) gelagert.

Nach 60 min wurde diese Lösung langsam in den Reaktionskolben getropft. Das Molsieb wurde zweimal mit 3 mL abs. Acetonitril gewaschen und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Edukt wurde in 5 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 121 mg (0.233 mmol, 1.6 Äq.) Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropyl-phosphoramidit und 29.3 mg (0.247 mmol, 1.7 Äq.) DCI bei Rt versetzt. Nach 3 h Rühren bei Rt wurden weitere 64 mg (0.12 mmol, 0.8 Äq.) Amidit und 15 mg (0.13 mmol, 0.85 Äq.) DCI zugegeben. Nach 2 h und 45 min wurden nochmals 30 mg (0.06 mmol, 0.4 Äq.) Amidit und 8 mg (0.07 mmol, 0.4 Äq.) DCI zugegeben. Nach 17 Stunden konnte mittels Dünnschichtchromatographie (Ethylacetat/Methanol 7:3, v/v) kein weiterer Fortschritt der Reaktion beobachtet werden. Die Lösung wurde auf -25 °C gekühlt und mit 74 µL (0.408 mmol, 2.8 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Es wurde 15 min bei -25 °C gerührt und anschließend die Lösungsmittel bei Rt im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an RP-18 Kieselgel gereinigt. Es wurde Methanol/Wasser 1:1 v/v verwendet. Eine der erhaltenen Mischfraktionen wurde ein weiteres Mal mit Methanol/Wasser 3:1 v/v chromatographiert. Die organischen Lösungsmittel wurden destillativ entfernt, dann wurde gefriergetrocknet. *Anmerkung:* Das Produkt konnte nach dieser Modellreaktion nicht rein (>90%) erhalten werden.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.92 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-6), 7.43-7.35 (m, 4H, H-2), 7.06-7.02 (m, 4H, H-3), 5.96 (d, 1H, ³J_{HH} = 5.1 Hz H-1'), 5.75 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-5), 5.13 (4H, H-Bn unter HDO), 4.26-4.05 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5'), 3.26-3.15 (m, 8H, H-A), 2.82 (sept., 2H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H-b), 1.72-1.60 (m, 8H, H-B), 1.42 (sext., 8H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-C), 1.30 (s, 6H, H-c), 1.28 (s, 6H, H-c), 1.02 (t, 36H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-D); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -13.35 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.1 Hz, P-α), -14.25 (d, 1P, ²J_{PP} = 19.9 Hz, P-β); R_f-Wert: 0.64 (Methanol/Wasser, 5:1 v/v, RP-18); Molgewicht [g/mol]: 998.04; Summenformel: C₄₇H₇₃N₃O₁₆P₂

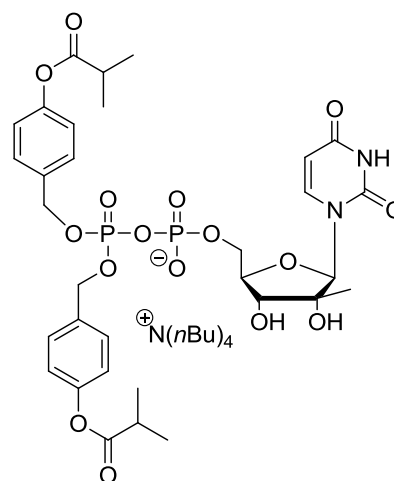
Synthese von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-2'-methyluridindiphosphat (BIB-2'-Me-UDP) 92

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 80 mg (0.097 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-2'-methyluridinmonophosphat in 2 mL abs. Acetonitril aufgenommen und in einem Tropftrichter über aktiviertem Molsieb (0.3 nm)

gelagert. Nach 30 min wurde diese Lösung langsam in den Reaktionskolben getropft. Das Molsieb wurde zweimal mit 2 mL abs. Acetonitril gewaschen. Anschließend wurden 80.7 mg (0.155 mmol, 1.6 Äq.) Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 9.5 mg (0.165 mmol, 1.7 Äq.) Dicyanoimidazol (DCI) bei 0 °C zugegeben. Nach Rühren 2 h und 15 min bei Rt wurden weitere 40 mg (0.08 mmol, 0.8 Äq.) Amidit und 5 mg (0.04 mmol, 0.85 Äq.) DCI zugegeben. Nach weiteren 5 h wurden 40 mg (0.08 mmol, 0.8 Äq.) Amidit und 5 mg (0.04 mmol, 0.85 Äq.) DCI zugegeben. Nach 17 Stunden konnte mittels Dünnschichtchromatographie (Ethylacetat/Methanol 7:3, v/v) kein weiterer Fortschritt der Reaktion beobachtet werden. Nach weiteren 90 min wurde die Lösung auf -35 °C gekühlt und mit 56.4 µL (0.31 mmol, 3.2 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Es wurde 25 min bei -35 °C gerührt und anschließend die Lösungsmittel bei Rt im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Stickstoffatmosphäre bei -18 °C gelagert. Das Rohprodukt musste mehrfach an RP-18 Kieselgel gereinigt werden. Für die erste Chromatographie wurde Methanol/Wasser 1:1 v/v verwendet, bis dass DCI und nicht reagiertes Nucleosidmonophosphat eluiert worden waren. Dann wurde Methanol/Wasser 3:1 v/v eingesetzt, um das Produkt zu eluieren (Spülen mit Methanol/Wasser 10:1 v/v isokratisch und Methanol). Die Mischfraktionen wurden ein weiteres Mal mit Methanol/Wasser 3:1 v/v chromatographiert.

Ausbeute: 18.3 mg (0.018 mmol, 19%) eines farblosen Harzes

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.95 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-6), 7.42-7.36 (m, 4H, H-2), 7.06-7.02 (m, 4H, H-3), 5.95 (s, 1H, H-1'), 5.79 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.1 Hz, H-5), 5.13 (dd, 4H, ²J_{HH} = 8.3 Hz, ³J_{HP} = 3.7 Hz, H-Bn), 4.42 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 12.1 Hz, ³J_{HH} = 4.5 Hz, ³J_{HP} = 2.0 Hz, H-5'a), 4.25 (ddd, 1H, ²J_{HH} = 11.9 Hz, ³J_{HH} = 5.5 Hz, ³J_{HP} = 2.1 Hz, H-5'b), 4.02 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 2.1 Hz, ³J_{HH} = 4.5 Hz, ³J_{HH} = 9.0 Hz, H-4'), 3.88 (d, 1H, ³J_{HH} = 9.0 Hz, H-3'), 3.26-3.19 (m, 8H, H-A), 2.81 (sept., 2H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H-b), 1.72-1.60 (m, 8H, H-B), 1.42 (sext., 8H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-C), 1.30 (s, 6H, H-c), 1.28 (s, 6H, H-c), 1.13 (s, 3H, H-6'), 1.02 (t, 36H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-D); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -11.85 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.0 Hz, P-α), -12.85 (d, 1P, ²J_{PP} = 19.6 Hz, P-β); **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_R [min]= 10.39, Methode 9; **R_f**

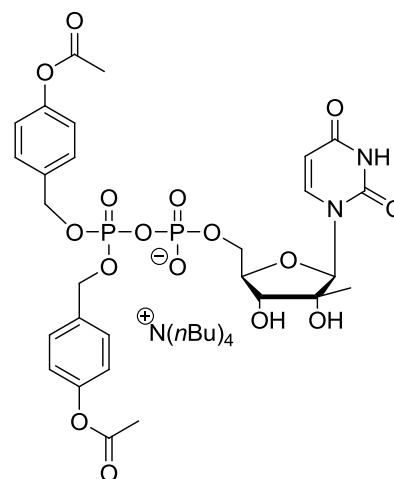


Wert: 0.3 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); **HR-MS** (ESI neg.): ber. 770.1853 [M⁻], 769.178 [M-H] gef. 769.1779; Molgewicht [g/mol]: 1012.06; Summenformel: C₄₈H₇₅N₃O₁₆P₂

Versuch der Synthese von Bis-(4-acetoxybenzyl)-2'-methyluridindiphosphat

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 23 mg (0.028 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-2'-methyluridinmonophosphat in 1 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 21 mg (0.048 mmol, 1.6 Äq.) Bis-(4-acetoxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit, 5.6 mg (0.047 mmol, 1.7 Äq.) DCI und einigen Körnern Molsieb (0.3 nm) versetzt.

Nach 15 h Rühren bei Rt wurden weitere 10 mg (0.02 mmol, 0.8 Äq.) Amidit und 2.5 mg (0.022 mmol) DCI zugegeben. Nach weiteren 24 h wurden der vollständige Verbrauch des Nucleosidmonophosphates mittels Dünnschichtchromatographie (Ethylacetat/Methanol, 7:3, v/v) erkannt. Daraufhin wurde die Lösung auf -35 °C gekühlt und mit 12.2 µL (0.0672 mmol, 2.4 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert.



Es wurde für 15 min bei -35 °C gerührt und folgend die Lösungsmittel bei Rt im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Produkt konnte aufgrund der zu kleinen Ansatzgröße nicht isoliert werden. Molgewicht [g/mol]: 955.96; Summenformel: C₄₄H₆₇N₃O₁₆P₂

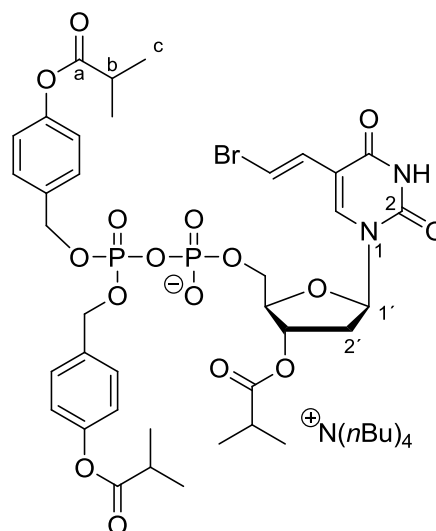
Synthese von Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-*O*-*iso*-butyryl-BVdUDP als Tetra-*n*-butylammonium- und Ammoniumsalz (BIB-3'-*O*-*i*Bu-BVdUDP) 71

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 54 mg (0.056 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-BVdUMP in 5 mL abs. Acetonitril aufgenommen und in einem Tropftrichter über ausgeheiztem Molsieb (0.3 nm) 60 min lang vorgetrocknet. Vor Reaktionsbeginn wurde diese Lösung langsam in den Reaktionskolben getropft. Das Molsieb wurde dreimal mit 2 mL abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in den Reaktionskolben überführt. Die Lösungsmittel wurden entfernt, dann das NMP in 2 mL abs. Acetonitril aufgenommen und bei 0 °C mit 40.5 mg (0.078 mmol, 1.4 Äq.) Bis-(4-*iso*butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 11.2 mg (0.095 mmol, 1.7 Äq.) DCI versetzt. Nach ca. 2 h wurden weitere 8.7 mg (0.016 mmol,

0.3 Äq.) Amidit und 2.6 mg (0.022 mmol, 0.3 Äq.) DCI zugegeben und nach 90 min durch Zugabe von 19.0 μL (0.104 mmol, 2 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) bei 0 °C oxidiert. Nach 15 min bei Rt wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde wie folgt an RP-18 Kieselgel gereinigt: Isokratisch mit Methanol/Wasser 1:1 v/v, dann 3:1 v/v. Die Produktfraktionen wurden vereint und Methanol am Rotationsverdampfer bei niedriger Temperatur bis auf einige mL entfernt. Es wurde mit Wasser aufgefüllt und die Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 40.9 mg (0.035 mmol, 64%) farbloses Harz

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ [ppm]= 7.98 (s, 1H, $\text{H}_{\text{het-6}}$), 7.46-7.37 (m, 5H, H-2, $\text{H}_{\text{het-8}}$), 7.06-7.00 (m, 5H, H-3, $\text{H}_{\text{het-7}}$), 6.31 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 9.0$ Hz, H-1'), 5.36-5.32 (m, 1H, H-3'), 5.17-5.11 (m, 4H, H-Bn), 4.28-4.18 (m, 2H, H-5'), 4.18-4.15 (m, 1H, H-4'), 3.25-3.16 (m, 8H, H-A), 2.83 (sept., 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, H-b), 2.83 (sept., 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, H-b), 2.59 (sept., 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, CH-*t*Bu), 2.35-2.22 (m, 2H, H-2'), 1.68-1.57 (m, 8H, H-B), 1.40 (sext., 8H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-C), 1.29 (d, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, H-c), 1.29 (d, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, H-c), 1.17 (d, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, CH_3 -*t*Bu), 1.02 (t, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-D); **$^{13}\text{C-NMR}$** : s. Ammonium- β -bis-(4-isobutyryloxybenzyl)BVdUDP; **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CD_3OD) δ [ppm]= -11.88 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.6$ Hz, P- α), -12.55 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.6$ Hz, P- β); **R_f-Wert**: 0.83 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); **Molgewicht** [g/mol]: 1157.06; **Summenformel**: $\text{C}_{53}\text{H}_{80}\text{BrN}_3\text{O}_{16}\text{P}_2$

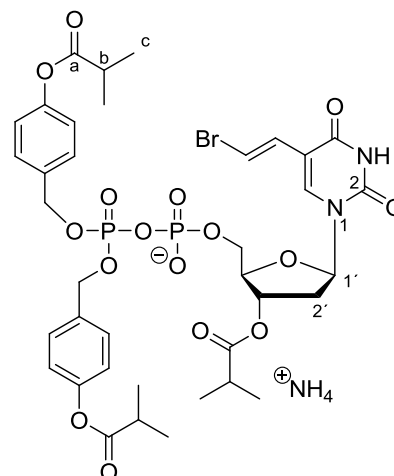


Ammonium-bis-(4-iso-butyryloxybenzyl)-3'-O-iso-butyryl-BVdUDP

Es wurde ein weiteres Mal unter Verwendung eines Ammoniumformiatpuffers (0.25 M) an RP-18 Kieselgel chromatographiert: Isokratisch mit Methanol/Puffer, 3:1 v/v. Die Produktfraktionen wurden vereint, bei niedriger Temperatur vom Methanol befreit, in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 16.5 mg (0.017 mmol, 32% über zwei Stufen) farbloses Harz

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.96 (s, 1H, H_{het}-6), 7.45-7.37 (m, 5H, H-2, H_{het}-8), 7.06-6.98 (m, 5H, H-3, H_{het}-7), 6.30 (dd, 1H, ³J_{HH} = 5.6 Hz, ³J_{HH} = 8.7 Hz, H-1'), 5.36-5.32 (m, 1H, H-3'), 5.17-5.11 (m, 4H, H-Bn), 4.27-4.19 (m, 2H, H-5'), 4.19-4.15 (m, 1H, H-4'), 2.81 (sept., 1H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, H-b), 2.81 (sept., 1H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, H-b), 2.59 (sept., 1H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, CH-*t*Bu), 2.35-2.22 (m, 2H, H-2'), 1.28 (d, 6H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, H-c), 1.28 (d, 6H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, H-c), 1.16 (d, 6H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, CH₃-*t*Bu); **¹³C-NMR** (101 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 177.3 (C-a', hmbc signal), 176.6 (C-a, hmbc signal), 163.3 (C_{het}-4), 152.4 (2x C-4), 152.0 (C_{het}-2, hmbc signal), 139.8 (C_{het}-6), 134.6 (2x C-1, hmbc signal), 130.6 (C_{het}-7), 130.4 (d, ⁴J_{CP} = 2.6 Hz, 4x C-2), 122.7 (4x C-3), 112.7 (C_{het}-5), 109.4 (C_{het}-8), 86.3 (C-1'), 85.2 (d, ³J_{CP} = 8.8 Hz, C-4'), 76.7 (C-3'), 70.3 (d, ³J_{CP} = 5.8 Hz, C-Bn), 70.3 (d, ³J_{CP} = 5.8 Hz, C-Bn), 67.5 (d, ²J_{CP} = 5.5 Hz, C-5'), 38.4 (C-2'), 35.3, 34.9 (2x C-b, CH-*t*Bu), 19.2 (4x C-c), 19.2 (2x CH₃-*t*Bu); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -11.98 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.0 Hz, P-α), -12.68 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.3 Hz, P-β); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-gekoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -11.99 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.0 Hz, P-α), -12.68 (m, 1P, P-β); **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_R [min]= 12.15, Methode 9; **HR-MS** (ESI neg.): ber. 913.1355 [M-H], 915.1343 [M-H] gef. 915.1347; Molgewicht [g/mol]: 932.64; Summenformel: C₃₇H₄₈BrN₃O₁₆P₂



Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-3'-*O*-*iso*-butyryl-D-*carba*-dTDP als Tetra-*n*-Butylammoniumsalz (BIB-3'-*O*-*t*Bu-*carba*-dTDP) 88

Die Reaktion wurde unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Es wurden 83.1 mg (43.4 μmol) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-3'-*O*-*iso*-butyryl-D-*carba*-dTMP in einem Tropftrichter in 3 mL abs. Acetonitril gelöst und eine Stunde über 3 Å Molsieb getrocknet. Nach Ablassen der Lösung wurde das Molsieb zweimal mit je 2 mL abs. Acetonitril gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 2.5 mL abs. Acetonitril gelöst. Zur Lösung wurden 78.8 mg (152 μmol) Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 19.1 mg (0.162 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) zugegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v). Nach 1.75 Stunden wurden weitere 14.8 mg (28.6 μmol) BAP und 4.5 mg (38 μmol) DCI zugegeben, nach weiteren 1.5 Stunden nochmals dieselben Mengen. Die Oxidation erfolgte nach weiteren drei Stunden durch Zugabe von 38.1 μL (209 μmol) einer 5.5 molaren Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in

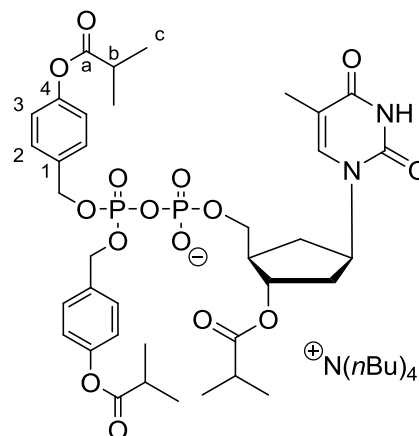
n-Decan bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Lösungsmittel wurden nach 15 minütigem Rühren unter vermindertem Druck entfernt. Es erfolgte die Reinigung des Rückstandes mittels Umkehrphasenchromatographie (Methanol/Wasser, zunächst 1:1, dann 3:1, dann 5:1 v/v). Nach Entfernen des Methanols unter vermindertem Druck wurde gefriergetrocknet.

Ausbeute: 15.1 mg (712 nmol, 16%) farblose Watte.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ [ppm]= 7.45 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.1\text{ Hz}$, H-6), 7.35-7.32 (m, 4H, H-2), 6.99-6.96 (m, 4H, H-3), 5.06 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8.5\text{ Hz}$, H-Bn), 4.53 (s, 1H, H-1'), 4.17 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.7\text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.1\text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.1\text{ Hz}$, H-3'), 3.99 (ddd, 2H, $^2J_{\text{HH}} = 10.2\text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 5.0\text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 5.0\text{ Hz}$, H-5'), 3.26-3.19 (m, 8H, $^3J_{\text{HH}} = 8.6\text{ Hz}$, H-A), 2.81 (sept., 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9\text{ Hz}$, H-b), 2.81 (sept., 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9\text{ Hz}$, CH-*t*Bu), 2.15-2.05 (m, 2H, H-4', H-6'a), 2.00-1.93 (m, 1H, H-2'a), 1.88-1.84 (m, 2H, H-6'b, H-2'b); 1.81 (d, 3H,

$^4J_{\text{HH}} = 1.0\text{ Hz}$, Me_{het}), 1.63-1.55 (m, 8H, H-B), 1.34 (sext., 8H, $^3J_{\text{HH}} = 14.9\text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.4\text{ Hz}$, H-C), 1.29 (d, 18H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0\text{ Hz}$, H-c, CH_3 -*t*Bu), 0.95 (t, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4\text{ Hz}$, H-D); **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, CD_3OD) δ [ppm]= 177.0 (2x, C-a, C-*t*Bu), 164.6 (C_{het} -4, hmbc signal), 152.5 (2x C-4), 139.6 (C_{het} -6), 135.0 (2x C-1), 129.6 (4x C-2), 122.5 (4x C-3), 111.7 (C_{het} -5, hmbc signal), 73.5 (C-3'), 70.3 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.6\text{ Hz}$, C-5'), 68.5 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.2\text{ Hz}$, C-Bn), 67.7 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1\text{ Hz}$, C-Bn), 59.6 (C-A), 40.0 (C-2'), 35.3 (CH-*t*Bu), 33.1 (C-4'), 24.8 (C-B), 20.7 (C-C), 19.2 (CH_3 -*t*Bu), 13.9 (C-D), 12.4 (Me_{het}); **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CD_3OD) δ [ppm]= -11.26 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.4\text{ Hz}$, P- α), -12.95 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 21.5\text{ Hz}$, P- β);

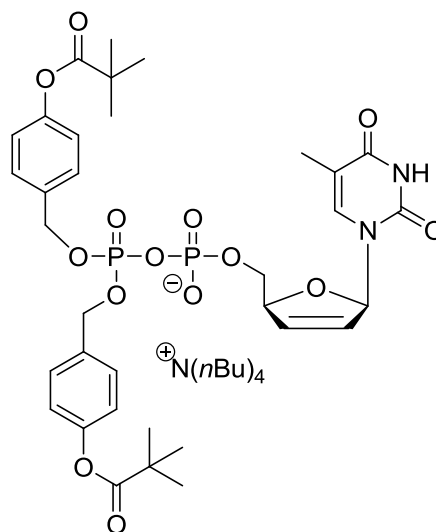
UV (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_{R} [min]= 10.52, Methode 9; **R_{f} -Wert**: 0.69 (Wasser/Methanol, 3:1 v/v, RP); **HR-MS** (ESI neg.): ber. 821.2452, 751.2033 [$\text{M-C}_4\text{H}_7\text{O}^-$], 449.1365 [$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{P}^-$], gef. 821.2456, 751.20385, 449.1368; Molgewicht [g/mol]: 1064.17; Summenformel: $\text{C}_{53}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{P}_2$, Exact Mass: 1063.5299



7.2.8 Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)-d4TDPs

Synthese von Bis-(4-pivaloyloxybenzyl)-d4TDP als Tetra-*n*-butylammonium- und Ammoniumsalz (BPB-d4TDP) 26

Nach AAV 7 Variante A wurden 138 mg (0.175 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP mit 157 mg (0.287 mmol, 1.6 Äq.) Bis-(4-pivaloyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 38.3 mg (0.324 mmol, 1.8 Äq.) DCI in 1.5 mL abs. Acetonitril umgesetzt. Nach ca. 3 h Stunden wurde mit 51 μ L (0.31 mmol, 1.7 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (6.0 M in *n*-Decan) oxidiert. Das Rohprodukt wurde wie folgt an RP-18 Kieselgel gereinigt: Methanol/Wasser 1:1 v/v, dann Methanol/Wasser 3:1 v/v. Nach dieser ersten Chromatographie wurden 65 mg (0.064 mmol, 36%) sauberes Produkt erhalten und eine weitere fast saubere Fraktion von 18.5 mg (0.018 mmol, 10%).



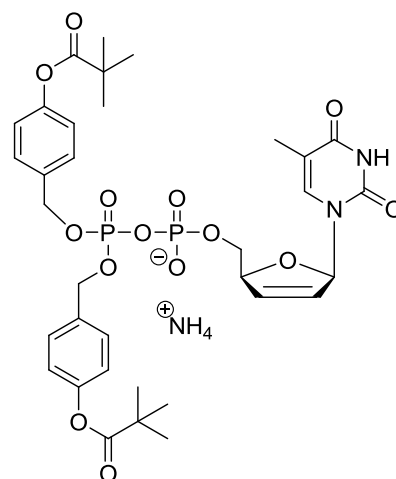
Ausbeute: 65 mg (0.064 mmol, 36%) farbloses Harz

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.66 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.43-7.35 (m, 4H, H-2), 7.05-7.00 (m, 4H, H-3), 6.95 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.7 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.7 Hz, H-1'), 6.38 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H-3'), 5.83 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.1 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.3 Hz, H-2'), 5.12 (dd, 4H, ²J_{HH} = 8.3 Hz, ³J_{HP} = 5.6 Hz, H-Bn), 4.97-4.93 (m, 1H, H-4'), 4.26-4.14 (m, 2H, H-5'), 3.25-3.15 (m, 8H, H-A), 1.90 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, Me_{het}), 1.68-1.57 (m, 8H, H-B), 1.39 (sext., 8H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H-C), 1.35 (s, 18H, H-b), 1.04 (t, 12H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-D); **¹³C-NMR**: s. Ammonium- β -Bis-(4-pivaloyloxybenzyl)-d4TDP; **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -12.12 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.8 Hz, P- α), -12.95 (d, 1P, ²J_{PP} = 21.7 Hz, P- β); **UV** (HPLC): λ_{\max} [nm]= 265, HPLC: t_R [min]= 11.44, Methode 9; **R_f-Wert**: 0.3 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); **MS** (HR-ESI⁺): ber. 764.2111 [M], 763.2039 [M-H⁻]; gef. 763.2037 [M-H⁻]; Molgewicht [g/mol]: 1006.10; Summenformel: C₅₀H₇₇N₃O₁₄P₂

Synthese von Ammonium-Bis-(4-pivaloyloxybenzyl)-d4TDP

18.5 mg (0.018 mmol) Tetra-*n*-butylammonium-bis-(4-pivaloyloxybenzyl)-d4TDP wurden nach **AAV 12** in das Ammoniumsalz überführt und mit Methanol/Wasser an RP-18 Kieselgel gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.65 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.42-7.34 (m, 4H, H-2), 7.05-6.99 (m, 4H, H-3), 6.95 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.6 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.6 Hz, H-1'), 6.37 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H-3'), 5.83 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.1 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.3 Hz, H-2'), 5.10 (dd, 4H, ²J_{HH} = 8.4 Hz, ³J_{HP} = 4.8 Hz, H-Bn), 4.97-4.93 (m, 1H, H-4'), 4.24-4.13 (m, 2H, H-5'), 1.89 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, Me_{het}), (s, 18H, H-c); **¹³C-NMR** (101 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 178.5 (2x C-a), 166.5 (C_{het}-4), 152.7 (C_{het}-2), 152.6 (C-4), 152.6 (C-4), 138.6 (C_{het}-6), 135.2



(C-3'), 134.8 (d, ³J_{CP} = 7.5 Hz, 2x C-1), 130.4 (d, ⁴J_{CP} = 2.9 Hz, 4x C-2), 127.5 (C-2'), 122.7 (4x C-3), 112.0 (C_{het}-5), 90.8 (C-1'), 86.8 (d, ³J_{CP} = 9.0 Hz, C-4'), 70.2 (d, ²J_{CP} = 5.9 Hz, C-Bn), 70.2 (d, ²J_{CP} = 5.9 Hz, C-Bn), 68.1 (d, ²J_{CP} = 6.3 Hz, C-5'), 40.1 (C-b), 27.5 (C-c), 12.5 (Me_{het}); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -12.06 (d, 1P, ²J_{PP} = 19.9 Hz, P-α), -12.84 (d, 1P, ²J_{PP} = 19.6 Hz, P-β); **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_R [min]= 11.44, Methode 9; **R_f-Wert**: 0.3 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v), 0.8 (Methanol/Wasser 3:1 v/v, RP18); **MS** (HR-ESI): ber. 764.2111 [M], 763.2039 [M-H⁻]; gef. 763.2039 [M-H⁻]; Molgewicht [g/mol]: 781.68; Summenformel: C₃₄H₄₅N₃O₁₄P₂

Synthese von Bis-(4-butanoyloxybenzyl)-d4TDP als Tetra-*n*-butylammonium- bzw. als Ammoniumsalz (C3-BAB-d4TDP) 25

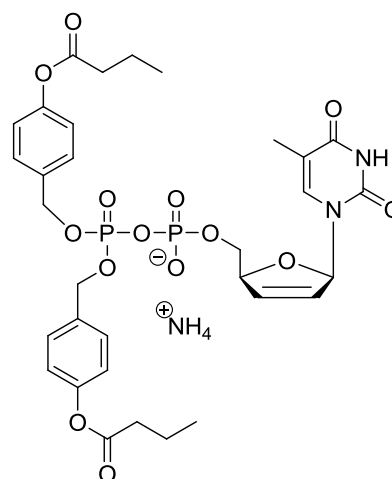
Durchführung A: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 140 mg (0.178 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP in 3 mL abs. Acetonitril aufgenommen und in einem Tropftrichter über aktiviertem Molsieb (0.3 nm) 60 min lang vorgetrocknet. Vor Reaktionsbeginn wurde diese Lösung langsam in den Reaktionskolben getropft. Das Molsieb wurde zweimal mit 3 mL abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in den Reaktionskolben überführt. Die Lösungsmittel wurden entfernt, dann das NMP in 3 mL abs. Acetonitril aufgenommen und bei 0 °C mit 148 mg (0.285 mmol, 1.6 Äq.) Bis-(4-butanoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropyl-phosphoramidit, und 34 mg (0.285 mmol, 1.6 Äq.) DCI versetzt. Nach 60 min Rühren bei Rt wurden weitere 55.3 mg

(0.107 mmol, 0.6 Äq.) Amidit und 12.6 mg (0.107 mmol, 0.6 Äq.) DCI zugegeben. Nach weiteren 20 h Reaktionszeit wurde die Lösung auf -30 °C gekühlt und mit 71 µL (0.38 mmol, 2.1 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Es wurde 15 min gerührt und anschließend die Lösungsmittel bei Rt im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal an RP-18 Kieselgel gereinigt. *Chromatographie 1*: Methanol/Wasser, 1:1 v/v, dann 3:1 v/v, dann 8:1 v/v und schließlich Methanol. Das Produkt konnte nur gemeinsam mit einem Nebenprodukt (20% im ³¹P-NMR, 28% im ¹H-NMR) eluiert werden. *Chromatographie 2*: Die Mischfraktionen wurden nach **AAV 12** in die entsprechenden Ammoniumsalze überführt. Es wurde über RP-18 Kieselgel gereinigt (Methanol/Wasser, 5:1 v/v).

Ausbeute: 14.3 mg (0.189 mmol, 11%, über 2 Stufen) farblose Watte

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.65 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.42-7.35 (m, 4H, H-2), 7.09-7.03 (m, 4H, H-3), 6.95 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.7 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.7 Hz, H-1'), 6.37 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H-3'), 5.83 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 5.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.0 Hz, H-2'), 5.10 (dd, 4H, ²J_{HH} = 8.3 Hz, ³J_{HP} = 6.3 Hz, H-Bn), 4.82-4.79 (m, H-4', H₂O), 4.25-4.12 (m, 2H, H-5'), 2.55 (dd, 4H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, ³J_{HH} = 7.1 Hz, H-b), 1.88 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, Me_{het}), 1.75 (tt, 4H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-c), 1.38-1.28 (m, 4H, H-d), 1.04 (t, 6H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-e);

¹³C-NMR: aufgrund der geringen Menge wurde auf die Messung verzichtet; **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -13.48 - -13.76 (m, 1P, P-α), -14.41 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.1 Hz, P-β); **R_f-Wert**: 0.31 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); Molgewicht [g/mol]: 753.63; Summenformel: C₃₂H₄₁N₃O₁₄P₂

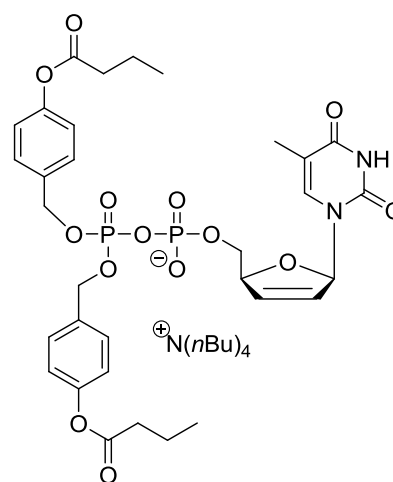


Durchführung B: Die Reaktion wurde in weiten Teilen so durchgeführt wie es oben beschrieben ist. Es wurden 170 mg (0.216 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP in 5 mL abs. Acetonitril mit 179 mg (0.346 mmol, 1.6 Äq.) Bis-(4-butanoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 43 mg (0.37 mmol, 1.7 Äq.) DCI bei 0 °C umgesetzt. Zugabe weiterer Äquivalente des Amidits und von DCI folgten: nach 60 min: 82.7 mg (0.171 mmol, 0.8 Äq.) Amidit, 15.1 mg (0.129 mmol, 0.6 Äq.) DCI; nach 90 min: 82.7 mg (0.171 mmol, 0.8 Äq.) Amidit, 15.1 mg (0.129 mmol, 0.6 Äq.) DCI; nach 120 min:

82.7 mg (0.171 mmol, 0.8 Äq.) Amidit, 15.1 mg (0.129 mmol, 0.6 Äq.) DCI. Nach weiteren 16 h Reaktionszeit wurde die Lösung auf -20 °C gekühlt und mit 157 µL (0.863 mmol, 3.9 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Es wurde 15 min gerührt und anschließend die Lösungsmittel bei Rt im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal an RP-18 Kieselgel gereinigt, wobei immer die „sauberste“ Mischfraktion erneut eingesetzt wurde. *Chromatographie 1*: Methanol/Wasser, 1:1 v/v, dann 5:1 v/v und Methanol. *Chromatographie 2*: Methanol/Wasser, 3:1 v/v dann 6:1 v/v und Methanol.

Ausbeute: 11.1 mg (0.011 mmol) farblose Watte

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.69 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H_{het-6}), 7.40-7.33 (m, 4H, H-2), 7.07-7.02 (m, 4H, H-3), 6.94 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.5 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.6 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.6 Hz, H-1'), 6.37 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, H-3'), 5.83 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.4 Hz, H-2'), 5.12-5.05 (m, 4H, H-Bn), 4.97-4.93 (m, 1H, H-4'), 4.22-4.14 (m, 2H, H-5'), 3.25-3.17 (m, 8H, H-A), 2.55 (t, 4H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H-b), 1.89 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, Me_{het}), 1.75 (sext., 4H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H-c), 1.68-1.59 (m, 8H, H-B), 1.40 (sext., 8H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H-C), 1.04 (t, 12H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H-D), 1.01 (t, 6H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H-d), Verunreinigung: 7.40-7.33 (m, 2H, H-2), 6.98-6.94 (m, 2H, H-3), 5.05-5.02 (m, 4H, H-Bn), 2.53 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 1.75 (sext., 2H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H-c), 1.01 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H-d); **¹³C-NMR** (126 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 173.5 (2x C-a), 165.4 (C_{het-4}), 152.9 (C_{het-2}), 152.4 (2x C-4), 137.3 (C_{het-6}), 135.3 (C-3'), 134.8 (d, ³J_{CP} = 7.3 Hz, ³J_{CP} = 7.3 Hz, C-1), 134.8 (d, ³J_{CP} = 7.3 Hz, ³J_{CP} = 7.3 Hz, C-1), 130.4 (d, ⁴J_{CP} = 5.4 Hz, 4x C-2), 127.5 (C-2'), 122.8 (4x C-3), 111.3 (C_{het-5}), 91.7 (C-1'), 87.0 (d, ³J_{CP} = 9.5 Hz, C-4'), 70.2 (d, ²J_{CP} = 5.6 Hz, C-Bn), 70.2 (d, ²J_{CP} = 5.6 Hz, C-Bn), 68.0 (d, ²J_{CP} = 6.0 Hz, C-5'), 59.5 (pt, 4x C-A), 38.8 (2x C-b), 24.7 (4x C-B), 20.6 (4x C-C), 19.4 (2x C-c), 13.8 (2x C-d), 13.2 (Me_{het}), Verunreinigung: Es konnten hier nicht alle Signale ermittelt werden, da es zu Überlagerungen kommt; 173.6 (C-a), 151.5 (2x C-4), 130.5 (2x C-2), 122.6 (2x C-3), 13.8 (C-d); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -12.14 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.57 Hz, P-α), -12.96 (d, 1P, ²J_{PP} = 21.15 Hz, P-β); **R_f-Wert**: 0.24 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); Molgewicht [g/mol]: 978.05; Summenformel: C₄₈H₇₃N₃O₁₄P₂



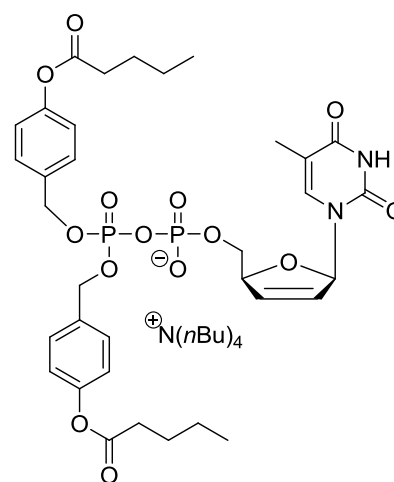
Synthese von Bis-(4-pentanoyloxybenzyl)-d4TDP als Tetra-*n*-butylammonium- und als Ammoniumsalz (C4-BAB-d4TDP) 27

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 115 mg (0.146 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP in 2 mL abs. Acetonitril aufgenommen und in einem Tropftrichter über aktiviertem Molsieb (0.3 nm) 45 min lang vorgetrocknet. Vor Reaktionsbeginn wurde diese Lösung langsam in den Reaktionskolben getropft. Das Molsieb wurde zweimal mit 3 mL abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung in den Reaktionskolben gegeben. Die Lösungsmittel wurden entfernt, das NMP in 4 mL abs. Acetonitril aufgenommen und bei 0 °C mit 129 mg (0.235 mmol, 1.6 Äq.) Bis-(4-pentanoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 27.7 mg (0.235 mmol, 1.6 Äq.) DCI versetzt. Nach 2 h Rühren bei Rt wurden weitere 32 mg (0.058 mmol, 0.4 Äq.) Amidit und 6.9 mg (0.058 mmol, 0.4 Äq.) DCI zugegeben. Nach weiteren 23 h Rühren bei Rt wurde die Lösung auf -28 °C gekühlt und mit 53 µL (0.28 mmol, 1.8 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Es wurde für 20 min bei -15 °C gerührt und anschließend die Lösungsmittel bei Rt im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an RP-18 Kieselgel gereinigt: Isokratisch mit Methanol/Wasser, 1:1 v/v, dann 5:1 v/v, dann Methanol.

Ausbeute: 47 mg (0.0467 mmol, 32%) farbloses Harz

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.65 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H_{het}-6), 7.43-7.35 (m, 4H, H-2), 7.09-7.02 (m, 4H, H-3), 6.94 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.5 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.7 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.7 Hz, H-1'), 6.37 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.1 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H-3'), 5.83 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.2 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, H-2'), 5.01 (dd, 4H, ²J_{HH} = 8.2 Hz, ³J_{HP} = 6.3 Hz, H-Bn), 4.97-4.92 (m, 1H, H-4'), 4.25-4.12 (m, 2H, H-5'), 3.26-3.19 (m, 8H, H-A), 2.53 (t, 4H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, H-b), 1.89 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, Me_{het}), 1.76-1.60 (m, 12H, H-B, H-c), 1.51-1.36 (m, 12H, H-C, H-d),

1.05-0.94 (m, 16H, H-D, H-e); **¹³C-NMR** (126 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 173.6 (2x C-a), 166.5 (C_{het}-4), 152.7 (C_{het}-2), 152.4 (2x C-4), 138.6 (C_{het}-6), 135.3 (C-3'), 134.8 (d, ³J_{CP} = 7.0 Hz, C-1), 134.8 (d, ³J_{CP} = 7.0 Hz, C-1), 130.4 (d, ⁴J_{CP} = 3.5 Hz, 4x C-2), 127.5 (C-2'), 122.8 (4x C-3), 112.1 (C_{het}-5), 90.7 (C-1'), 86.9 (d, ³J_{CP} = 8.1 Hz, C-4'), 70.2 (d, ²J_{CP} = 5.5 Hz, C-Bn), 70.2 (d, ²J_{CP} = 5.5 Hz, C-Bn), 68.0 (d, ²J_{CP} = 6.0 Hz, C-5'), 59.5 (pt, 4x C-A), 34.6 (2x C-b), 28.1 (2x C-c), 24.7 (4x C-B), 23.2 (2x C-d), 20.6 (4x C-C), 14.1 (2x C-e), 13.8 (4x C-D), 12.5



(Me_{het}); ³¹P-NMR (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -12.08 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.6 Hz, P-α), -12.96 (d, 1P, ²J_{PP} = 21.3 Hz, P-β); **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_R [min]= 11.57, Methode 9; **R_f-Wert**: 0.35 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); **HR-MS** (ESI neg.): ber. 820.2737 [M⁻], 819.2665 [M-H], gef. 819.2665; Molgewicht [g/mol]: 1006.11; Summenformel: C₅₀H₇₇N₃O₁₄P₂

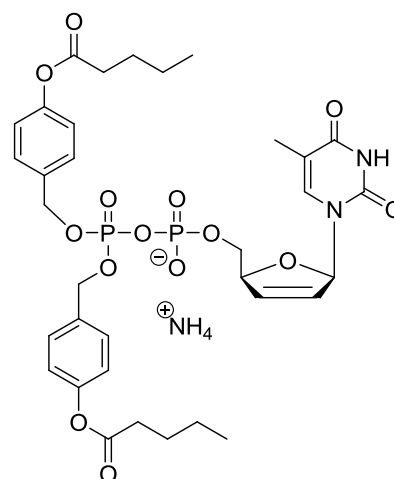
Synthese Ammonium-bis-(4-pentanoyloxybenzyl)-d4TDP

36.4 mg des Tetra-*n*-butylammoniumsalzes einer leicht verunreinigten Mischfraktion wurden nach **AAV 12** in das Ammoniumsalz überführt. Nach Gefriertrocknung wurde erneut an RP-18 Kieselgel gereinigt.

Ausbeute: 13 mg (16.8 μmol) farbloser Feststoff

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.65 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.42-7.33 (m, 4H, H-2), 7.08-6.98 (m, 4H, H-3), 6.95 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.7 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.7 Hz, H-1'), 6.37 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H-3'), 5.83 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.2 Hz, H-2'), 5.09 (dd, 4H, ²J_{HH} = 8.3 Hz, ³J_{HP} = 5.6 Hz, H-Bn), 4.96-4.92 (m, 1H, H-4'), 4.23-4.12 (m, 2H, H-5'), 2.61-2.54 (m, 4H, H-b), 1.88 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, Me_{het}), 1.74 (tt, 4H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-c), 1.45 (sext., 4H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H-d), 0.98 (t, 6H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-e);

¹³C-NMR (126 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 171.2 (2x C-a, hmbc signal), 163.5 (C_{het}-4, hmbc signal), 151.6 (2x C-4), 135.6 (C_{het}-6, hmbc signal), 135.3 (C-3'), 134.3 (2x C-1, hmbc signal), 130.4 (d, ⁴J_{CP} = 3.9 Hz, 4x C-2), 127.5 (C-2'), 122.8 (4x C-3), 112.1 (C_{het}-5, hmbc signal), 90.7 (C-1'), 86.9 (d, ³J_{CP} = 8.8 Hz, C-4'), 70.2 (d, J_{CP} = 3.4 Hz, 2x C-Bn), 67.7 (d, ²J_{CP} = 5.4 Hz, C-5'), 34.6, 34.6 (2x C-b), 28.1, 28.1 (2x C-c), 23.2 (2x C-d), 14.1 (2x C-e), 12.5 (Me_{het}); ³¹P-NMR (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -11.94 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.3 Hz, P-α), -12.77 (d, 1P, ²J_{PP} = 18.6 Hz, P-β); **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265; **R_f-Wert**: 0.36 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); Molgewicht [g/mol]: 781.68; Summenformel: C₃₄H₄₅N₃O₁₄P₂



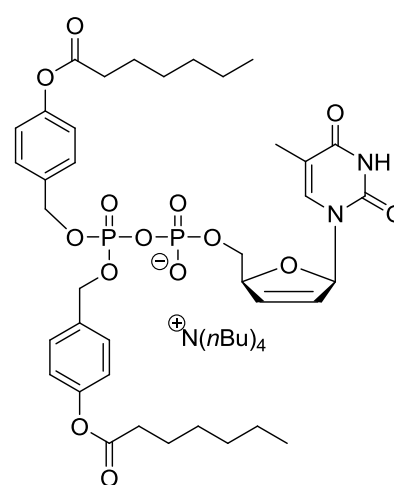
Synthese von Bis-(4-heptanoyloxybenzyl)-d4TDP als Tetra-*n*-butylammoniumsalz (C6-BAB-d4TDP) 28

Nach **AAV 7** Variante A wurden 190 mg (0.348 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP mit 251 mg (0.417 mmol, 1.1 Äq.) Bis-(4-heptanoyloxy-benzyl)*N,N*-

diisopropylphosphoramidit und 49.0 mg (0.418 mmol, 1.2 Äq.) DCI in 3 mL abs. Acetonitril umgesetzt. Nach einer Stunde wurde mit 76 μ L (mmol, Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Das Rohprodukt wurde wie folgt an RP-18 Kieselgel gereinigt: Isokratisch mit Methanol/Wasser 1:1 v/v, dann Methanol/Wasser 5:1 v/v. Nach dieser ersten Chromatographie wurden 53 mg (0.049 mmol) sauberes Produkt erhalten. Eine der Mischfraktionen wurde mit Methanol/Wasser 5:1 v/v noch mal gereinigt. Es konnten 96 mg (0.090 mmol) sauber isoliert werden. Mischfraktionen, die weiteres Produkt enthielten (ca. 20%), wurden nicht chromatographiert.

Ausbeute: 149 mg (0.140 mmol, 40%) farbloses Harz

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ [ppm]= 7.65 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, $\text{H}_{\text{het-6}}$), 7.42-7.35 (m, 4H, H-2), 7.07-7.02 (m, 4H, H-3), 6.95 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, H-1'), 6.37 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.9$ Hz, H-3'), 5.83 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 2.3$ Hz, H-2'), 5.01 (dd, 4H, $^2J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 6.2$ Hz, H-Bn), 4.97-4.92 (m, 1H, H-4'), 4.25-4.13 (m, 2H, H-5'), 3.25-3.17 (m, 8H, H-A), 2.57 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-b), 1.88 (d, 3H, $^4J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, Me_{het}), 1.76-1.59 (m, 12H, H-B, H-c), 1.48-1.32 (m, 20H, H-C, H-d, H-e, H-f), 1.02 (t, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, H-D), 0.92 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, H-g); **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, CD_3OD) δ [ppm]= 173.6 (2x C-a), 166.5 ($\text{C}_{\text{het-4}}$), 152.7 ($\text{C}_{\text{het-2}}$), 152.4 (C-4), 152.4 (C-4), 138.6 ($\text{C}_{\text{het-6}}$), 135.3 (C-3'), 134.8 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz, C-1), 134.8 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz, C-1), 130.4 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.7$ Hz, 4x C-2), 127.5 (C-2'), 122.8 (4x C-3), 112.1 ($\text{C}_{\text{het-5}}$), 90.7 (C-1'), 86.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.1$ Hz, C-4'), 70.2 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.8$ Hz, C-Bn), 70.2 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.8$ Hz, C-Bn), 68.0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.2$ Hz, C-5'), 59.5 (pt, 4x C-A), 35.0 (2x C-b), 32.5, 29.7, 25.8, 24.7, 23.5, 20.6, 19.3 (2x C-c, 2x C-d, 2x C-e, 2x C-f, 4x C-B), 14.4 (2x C-g), 13.8 (4x C-D), 12.5 (Me_{het}); **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CD_3OD) δ [ppm]= -12.11 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.3$ Hz, P- α), -12.92 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 21.4$ Hz, P- β); **IR** : ν [cm^{-1}]= 2959, 2931, 2873, 1755, 1688, 1508, 1465, 1262, 1007, 910, 836, 804, 502; **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_{R} [min]= 13.2, Methode 9; **R_{f} -Wert**: 0.80 (Ethylacetat/Petrolether, 7:3 v/v); **HR-MS** (ESI neg.): ber. 820.2737 [M], 819.2665 [M-H], gef. 819.2665; Molgewicht [g/mol]: 1062.21; Summenformel: $\text{C}_{54}\text{H}_{85}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{P}_2$

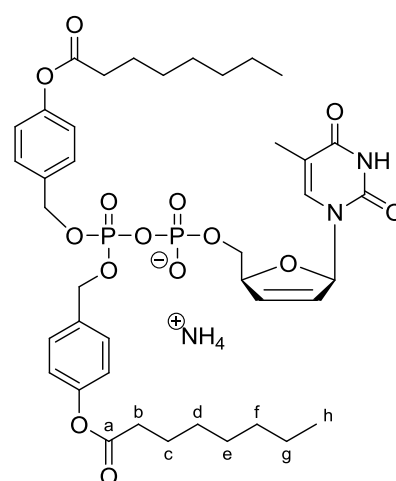


Synthese von Ammonium-bis-(4-octanoyloxybenzyl)-d4TDP (C7-BAB-d4TDP) 29

Diese Verbindung wurde von *H. Jessen* dargestellt: „Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 160 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)d4TMP (203 μmol , 1.0 Äq.) wurden zunächst 2 h über Molekularsieb 0.3 nm in 3 mL abs. Acetonitril getrocknet. Die getrocknete Lösung wurde in einen Reaktionskolben überführt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Molsieb wurde noch zweimal mit abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in den Reaktionskolben überführt. Das Edukt wurde noch dreimal mit wenigen mL abs. Acetonitril coevaporiert, so dass ein farbloser Schaum entstand. Dieser wurde in 2 mL abs. Acetonitril aufgenommen. Zu der Lösung wurden 0.22 g Bis-(4-octanoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (0.35 mmol, 1.7 Äq.) gegeben und die Reaktion durch Zufügen von 43 mg DCI (0.37 mmol, 1.8 Äq.) gestartet. Nach 3 h bei RT wurde durch Zugabe von 63 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.35 mmol, 1.7 Äq.) bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ oxidiert. Nach 15 min wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser/Acetonitril aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde in wenig Methanol gelöst und über eine RP-18 Phase chromatographiert, jeweils isokratisch mit Methanol/Wasser 1:1, 2:1, 5:1 und schließlich 6:1. Bei dem 1:1 Gemisch konnten verbliebenes Edukt und DCI abgetrennt werden. Die Produktfraktionen wurden vereint und der Methanol am Rotationsverdampfer bei niedriger Temperatur bis auf einige mL entfernt. Es wurde mit Wasser aufgefüllt und die Lösung lyophilisiert. Die erhaltenen 150 mg wurden über einen Ionentauscher (Dowex 50WX8, NH_4^+ , 30% Acetonitril in Wasser) gegeben und das Eluat lyophilisiert. Eine weitere RP-18 Chromatographie mit Methanol/Wasser 5:1 lieferte das reine Produkt. Dieses wurde erneut gefriergetrocknet.

Ausbeute: 114 mg (132 μmol , 65%) eines farblosen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]= 11.21 (s, 1H, NH), 7.65 (q, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.2\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{het-6}}$), 7.44-7.35 (m, 4H, H-2), 7.10-7.03 (m, 4H, H-3), 6.82 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.5\text{ Hz}$, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.7\text{ Hz}$, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.7\text{ Hz}$, H-1'), 6.34 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0\text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.6\text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.6\text{ Hz}$, H-3'), 5.86 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0\text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.6\text{ Hz}$, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 2.0\text{ Hz}$, H-2'), 5.02 (dd, 4H, $^2J_{\text{HH}} = 8.5\text{ Hz}$, $^3J_{\text{HP}} = 6.2\text{ Hz}$, H-Bn), 4.88-4.84 (m, 1H, H-4'), 4.10-3.88 (m, 2H, H-5'), 2.56 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4\text{ Hz}$, H-b), 1.78 (d, 3H, $^4J_{\text{HH}} = 1.0\text{ Hz}$, Me_{het}), 1.65 (tt, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3\text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.3\text{ Hz}$, H-c), 1.40-1.20 (m, 16H, H-d, H-e, H-f, H-g), 0.87 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.8\text{ Hz}$, H-h); **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, CD_3OD) δ [ppm]=



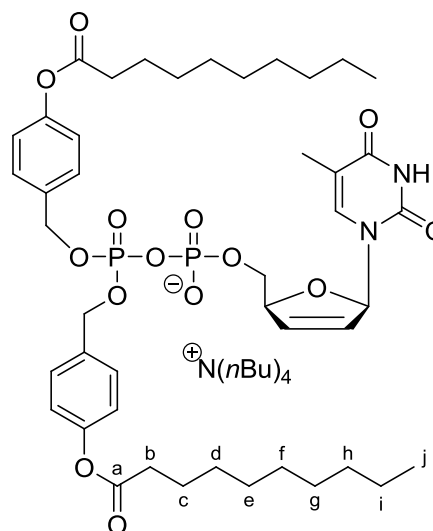
173.8 (2x C-a), 166.6 (C_{het}-4), 152.9 (C_{het}-2), 152.4 (2x C-4), 138.7 (C_{het}-6), 135.3 (C-3'), 134.9 (d, ³J_{CP} = 7.0 Hz, C-1), 130.4 (d, ⁴J_{CP} = 2.7 Hz, 4x C-2), 127.6 (C-2'), 122.9 (4x C-3), 112.1 (C_{het}-5), 90.9 (C-1'), 87.0 (d, ³J_{CP} = 9.3 Hz, C-4'), 70.3 (d, ²J_{CP} = 5.6 Hz, C-Bn), 70.3 (d, ²J_{CP} = 5.6 Hz, C-Bn), 68.2 (d, ²J_{CP} = 6.2 Hz, C-5'), 68.2 (d, ²J_{CP} = 6.2 Hz, C-5'), 35.1 (2x C-b), 32.9, 30.2, 30.1, 23.7 (2x C-d, 2x C-e, 2x C-f, 2x C-g), 26.0 (2x C-c), 14.4 (2x C-h), 12.5 (Me_{het}); ³¹P-NMR (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm] = -12.11 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.3 Hz, P-α), -12.92 (d, 1P, ²J_{PP} = 21.4 Hz, P-β); IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3188, 3071, 2956, 2927, 2856, 1756, 1701, 1467, 1263, 1112, 1010; UV (HPLC): λ_{max} [nm] = 265, HPLC: t_R [min] = 14.05, Methode 9; R_f-Wert: 0.40 (Ethylacetat/Petrolether, 7:3 v/v), 0.40 (Wasser/Methanol 1:5 v/v, RP-18); HR-MS (ESI neg.): ber. 847.297 [M-H], gef. 847.296 [M-H];⁷⁰ Molgewicht [g/mol]: 865.84; Summenformel: C₄₀H₅₇N₃O₁₄P₂

Synthese von Bis-(4-decanoyloxybenzyl)-d4TDP als Tetra-*n*-butylammonium- und als Ammoniumsalz (C9-BAB-d4TDP) 30

Nach **AAV 7** Variante A wurden 148 mg (0.271 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP mit 208 mg (0.303 mmol, 1.1 Äq.) Bis-(4-decanoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 37.0 mg (0.313 mmol, 1.2 Äq.) DCI in 4 mL abs. Acetonitril umgesetzt. Nach drei Stunden wurde mit 53 µL (0.28 mmol, 1.0 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Das Rohprodukt wurde wie folgt an RP-18 Kieselgel gereinigt: Methanol/Wasser 1:1 v/v, dann Methanol/Wasser 5:1 v/v.

Ausbeute: 121 mg (0.105 mmol, 39%)
 farbloses Harz

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm] = 7.65 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.42-7.34 (m, 4H, H-2), 7.07-7.02 (m, 4H, H-3), 6.95 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.5 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.7 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.7 Hz, H-1'), 6.38 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, H-3'), 5.84 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.0 Hz, H-2'), 5.10 (dd, 4H, ²J_{HH} = 8.5 Hz, ³J_{HP} = 6.2 Hz, H-Bn), 4.97-4.92 (m, 1H, H-4'), 4.25-4.15 (m, 2H, H-5'), 3.25-3.17 (m, 8H, H-A), 2.57 (t, 4H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 1.89 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, Me_{het}), 1.77 (tt, 4H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H-c), 1.68-1.58 (m, 8H, H-B), 1.46-1.25 (m,



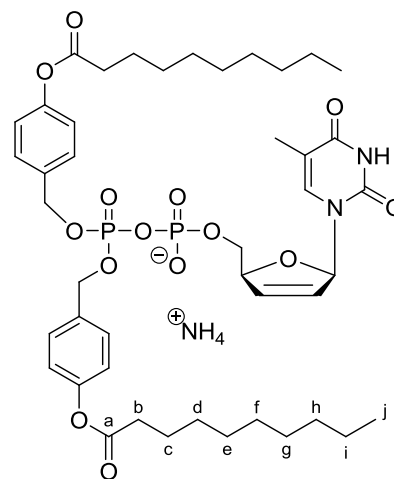
32H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-C), 1.01 (t, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, H-D), 0.90 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, H-j); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ [ppm]= 173.6 (2x C-a), 166.5 ($\text{C}_{\text{het-4}}$), 152.7 ($\text{C}_{\text{het-2}}$), 152.4 (C-4), 152.4 (C-4), 138.5 ($\text{C}_{\text{het-6}}$), 135.3 (C-3'), 134.8 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.4$ Hz, C-1), 134.8 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.4$ Hz, C-1), 130.4 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.7$ Hz, 4x C-2), 127.5 (C-2'), 122.5 (4x C-3), 112.1 ($\text{C}_{\text{het-5}}$), 90.7 (C-1'), 86.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.0$ Hz, C-4'), 70.2 (d, $J_{\text{CP}} = 5.8$ Hz, C-Bn), 70.2 (d, $J_{\text{CP}} = 5.8$ Hz, C-Bn), 68.0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.3$ Hz, C-5'), 59.5 (pt, 4x C-A), 35.0 (2x C-b), 33.0, 30.5, 30.4, 30.3, 30.1, 25.9, 24.7, 23.6, 20.6, 19.3 (2x C-c, 2x C-d, 2x C-e, 2x C-f, 2x C-g, 2x C-h, 2x C-i, 4x C-B, 4x C-C), 14.4 (2x C-j), 13.8 (4x C-D), 12.5 (Me_{het}); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CD_3OD) δ [ppm]= -12.15 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.6$ Hz, P- α), -12.93 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.5$ Hz, P- β); **IR** : ν [cm^{-1}]= 2926, 2855, 1758, 1691, 1509, 1465, 1379, 1200, 1167, 1140, 1008, 981, 838, 505; **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_{R} [min]= 15.88, Methode 9; **R_F-Wert**: 0.44 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); **HR-MS** (ESI neg.): ber. 903.3604 [M-H], gef. 903.36035; Molgewicht [g/mol]: 1146.37; Summenformel: $\text{C}_{60}\text{H}_{97}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{P}_2$

Synthese von Ammonium-bis-(4-decanoyloxybenzyl)-d4TDP

22.9 mg (0.0199 mmol) Tetra-*n*-butylammonium- β -bis-(4-decanoyloxybenzyl)-d4TDP wurden nach **AAV 12** in das Ammoniumsalz überführt.

Ausbeute: 16.3 mg (17.6 μmol , 89%) farblose Watte

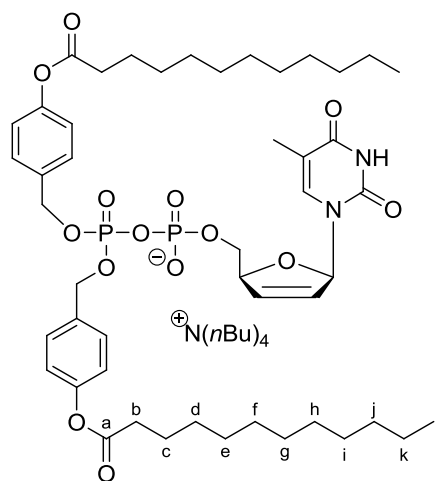
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ [ppm]= 7.65 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, $\text{H}_{\text{het-6}}$), 7.41-7.35 (m, 4H, H-2), 7.06-7.02 (m, 4H, H-3), 6.95 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, H-1'), 6.38 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, H-3'), 5.85-5.80 (m, 1H, H-2'), 5.09 (dd, 4H, $^2J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 7.8$ Hz, H-Bn), 4.97-4.93 (m, 1H, H-4'), 4.23-4.13 (m, 2H, H-5'), 2.56 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-b), 1.88 (d, 3H, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, Me_{het}), 1.77 (quint., 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-c), 1.46-1.25 (m, 24H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i), 0.90 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, H-j); $^{13}\text{C-NMR}$: s. Tetra-*n*-



butylammonium- β -bis-(4-decanoyloxybenzyl)-d4TDP; $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CD_3OD) δ [ppm]= -12.06 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.3$ Hz, P- α), -12.90 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.1$ Hz, P- β); **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_{R} [min]= 15.88, Methode 9; Molgewicht [g/mol]: 921.94; Summenformel: $\text{C}_{44}\text{H}_{65}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{P}_2$

Synthese von Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-d4TDP als Tetra-*n*-butylammoniumsalz (C11-BAB-d4TDP) 31

Durchführung A: Nach **AAV 7** Variante A wurden 153 mg (0.280 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP mit 228 mg (0.319 mmol, 1.1 Äq.) Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 40.6 mg (0.344 mmol, 1.2 Äq.) DCI in 3 mL abs. Acetonitril umgesetzt. Nach zwei Stunden wurde mit 58 μ L (0.32 mmol, 1.0 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Das Rohprodukt wurde wie folgt an RP-18 Kieselgel gereinigt: Methanol/Wasser 1:1 v/v, dann Methanol/Wasser 5:1 v/v.



Ausbeute: 211 mg (0.175 mmol, 63%) farbloses Öl

Durchführung B: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.126 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP in 2 mL abs. Acetonitril aufgenommen und in einem Tropftrichter über ausgeheiztem Molsieb (0.3 nm) 45 min lang vorgetrocknet. Vor Reaktionsbeginn wurde diese Lösung langsam in den Reaktionskolben getropft. Das Molsieb wurde zweimal mit 3 mL abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in den Reaktionskolben überführt. Die Lösungsmittel wurden entfernt, dann das NMP in 4 mL abs. Acetonitril aufgenommen und bei 0 °C mit 154 mg (0.207 mmol, 1.5 Äq.) Bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 24.1 mg (0.204 mmol, 1.5 Äq.) DCI versetzt. Nach 2 h Rühren bei Rt wurden weitere 38 mg (0.051 mmol, 0.4 Äq.) Amidit und 6.0 mg (0.051 mmol, 0.4 Äq.) DCI zugegeben. 23 h später wurde die Lösung auf -36 °C gekühlt und mit 46 μ L (0.25 mmol, 2 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Es wurde für 15 min bei -20 °C gerührt und anschließend die Lösungsmittel bei Rt im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an RP-18 Kieselgel gereinigt: Isokratisch mit Methanol/Wasser, 1:1 v/v, dann 3:1 v/v dann 15:1 v/v.

Ausbeute: 47.8 mg (39.7 μ mol, 31%) farblose Watte

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.65 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.39-7.35 (m, 4H, H-2), 7.06-7.02 (m, 4H, H-3), 6.95 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.7 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.7 Hz,

H-1'), 6.38 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, H-3'), 5.84 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 2.3$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.4$ Hz, H-2'), 5.09 (dd, 4H, $^2J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 6.4$ Hz, H-Bn), 4.97-4.93 (m, 1H, H-4'), 4.25-4.15 (m, 2H, H-5'), 3.25-3.19 (m, 8H, H-A), 2.57 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-b), 1.89 (d, 3H, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, Me_{het}), 1.77-1.61 (m, 12H, H-c, H-B), 1.46-1.26 (m, 40H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-C), 1.01 (t, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-D), 0.89 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, H-l); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 173.6 (2x C-a), 166.5 (C_{het}-4), 152.7 (C_{het}-2), 152.4 (2x C-4), 138.5 (C_{het}-6), 135.3 (C-3'), 134.8 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.4$ Hz, 2x C-1), 130.4 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.7$ Hz, 4x C-2), 127.5 (C-2'), 122.8 (4x C-3), 112.1 (C_{het}-5), 90.7 (C-1'), 86.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.3$ Hz, C-4'), 70.2 (d, $J_{\text{CP}} = 5.2$ Hz, C-Bn), 70.2 (d, $J_{\text{CP}} = 5.2$ Hz, C-Bn), 68.1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.3$ Hz, C-5'), 59.5 (pt, 4x C-A), 35.0 (2x C-b), 33.1, 30.6, 30.5, 30.4, 30.4, 30.2, 25.9, 24.7, 23.4, 20.6 (2x C-c, 2x C-d, 2x C-e, 2x C-f, 2x C-g, 2x C-h, 2x C-i, 2x C-j, 2x C-k, 4x C-B, 4x C-C), 14.4 (2x C-l), 13.8 (4x C-D), 12.5 (Me_{het}); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -12.10 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.4$ Hz, P- α), -12.94 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.9$ Hz, P- β); **IR** : ν [cm⁻¹]= 2926, 2855, 1758, 1691, 1509, 1379, 1200, 1140, 1008, 981, 914, 838, 505; **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_{R} [min]= 17.76, Methode 9; **R_f-Wert**: 0.46 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); **HR-MS** (ESI neg.): ber. 959.4224 [M-H], gef. 959.42295; Molgewicht [g/mol]: 1202.48; Summenformel: C₆₄H₁₀₅N₃O₁₄P₂

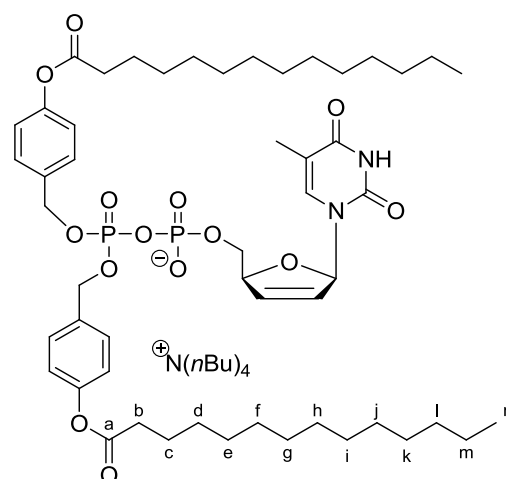
Versuch der Darstellung von Ammonium-bis-(4-dodecanoyloxybenzyl)-d4TDP

Eine Mischfraktion von 31 mg Produkt (42% Verunreinigungen im $^1\text{H-NMR}$) wurden nach **AAV 12** umgesalzen und erneut chromatographiert (Methanol/Wasser, 5:1 v/v). Es kam zur Zersetzung des Produktes, so dass es nicht erhalten wurde.

Synthese von Bis-(4-tetradecanoyloxybenzyl)-d4TDP als Tetra-*n*-butyl-ammoniumsalz (C13-BAB-d4TDP) 32

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 149 mg (0.189 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP in 5 mL abs. Acetonitril aufgenommen und in einem Tropftrichter über ausgeheiztem Molsieb (0.3 nm) 90 min lang vorgetrocknet. Vor Reaktionsbeginn wurde diese Lösung langsam in den Reaktionskolben getropft. Das Molsieb wurde zweimal mit 3 mL abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung wurde ebenfalls in den Reaktionskolben gegeben. Die Lösungsmittel wurden entfernt, das NMP in 3 mL abs. Acetonitril aufgenommen und bei 0 °C mit 242 mg (0.304 mmol, 1.5 Äq.) Bis-(4-tetradecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 35.8 mg (0.303 mmol, 1.5 Äq.) DCI versetzt. Es ergab sich eine farblose Suspension, da sich das

Amidit nur schlecht in abs. Acetonitril löste. Nach 91.5 h Reaktionszeit wurde bei $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit $56\text{ }\mu\text{L}$ (0.31 mmol , $1.5\text{ }\ddot{\text{A}}\text{q.}$) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Es wurde 15 min gerührt und anschließend die Lösungsmittel bei Rt im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an RP-18 Kieselgel gereinigt: Isokratisch mit Methanol/Wasser, $1:1\text{ v/v}$, dann $3:1\text{ v/v}$, dann $6:1$, dann $8:1\text{ v/v}$ und schließlich Methanol 100% . Die vereinten Fraktionen wurden unter vermindertem Druck vom Methanol befreit und das Produkt nach Gefriertrocknung erhalten.

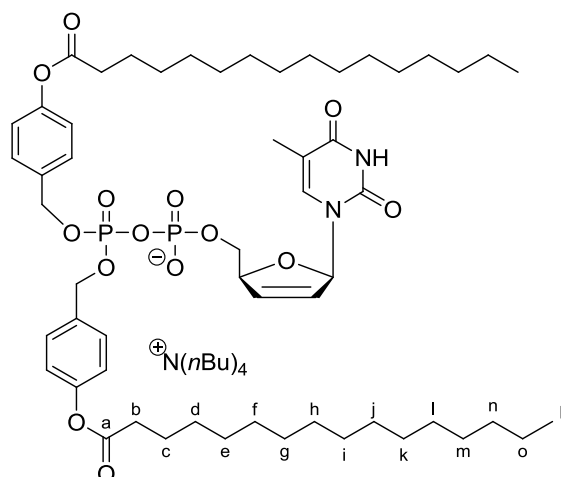


Ausbeute: 159.9 mg ($154.6\text{ }\mu\text{mol}$, 67%) farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz , CD_3OD) δ [ppm]= 7.66 (d, 1H , $^4J_{\text{HH}} = 1.2\text{ Hz}$, $\text{H}_{\text{het-6}}$), $7.40\text{-}7.33$ (m, 4H , H-2), $7.06\text{-}7.02$ (m, 4H , H-3), 6.95 (ddd, 1H , $^3J_{\text{HH}} = 3.5\text{ Hz}$, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.8\text{ Hz}$, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.8\text{ Hz}$, $\text{H-1}'$), 6.38 (ddd, 1H , $^3J_{\text{HH}} = 6.0\text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.6\text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.6\text{ Hz}$, $\text{H-3}'$), 5.84 (ddd, 1H , $^3J_{\text{HH}} = 5.9\text{ Hz}$, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 2.2\text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.3\text{ Hz}$, $\text{H-2}'$), 5.08 (dd, 4H , $^2J_{\text{HH}} = 8.5\text{ Hz}$, $^3J_{\text{HP}} = 6.5\text{ Hz}$, H-Bn), $4.97\text{-}4.93$ (m, 1H , $\text{H-4}'$), $4.25\text{-}4.13$ (m, 2H , $\text{H-5}'$), $3.26\text{-}3.19$ (m, 8H , H-A), 2.57 (t, 4H , $^3J_{\text{HH}} = 7.4\text{ Hz}$, H-b), 1.89 (d, 3H , $^4J_{\text{HH}} = 1.2\text{ Hz}$, Me_{het}), $1.77\text{-}1.61$ (m, 12H , H-c , H-B), $1.46\text{-}1.25$ (m, 48H , H-d , H-e , H-f , H-g , H-h , H-i , H-j , H-k , H-l , H-m , H-C), 1.02 (t, 12H , $^3J_{\text{HH}} = 7.3\text{ Hz}$, H-D), 0.89 (t, 6H , $^3J_{\text{HH}} = 6.7\text{ Hz}$, H-n); **$^{13}\text{C-NMR}$** (126 MHz , CD_3OD , CH_2Cl_2) δ [ppm]= 173.7 ($2\times\text{C-a}$), 166.5 ($\text{C}_{\text{het-4}}$), 152.7 ($\text{C}_{\text{het-2}}$), 152.4 ($2\times\text{C-4}$), 138.5 ($\text{C}_{\text{het-6}}$), 135.3 ($\text{C-3}'$), 134.8 ($2\times\text{C-1}$), 130.4 (d, $^4J_{\text{CP}} = 4.3\text{ Hz}$, $4\times\text{C-2}$), 127.5 ($\text{C-2}'$), 122.8 ($4\times\text{C-3}$), 112.1 ($\text{C}_{\text{het-5}}$), 90.7 ($\text{C-1}'$), 86.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.3\text{ Hz}$, $\text{C-4}'$), 70.2 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.2\text{ Hz}$, C-Bn), 70.2 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.2\text{ Hz}$, C-Bn), 68.1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.3\text{ Hz}$, $\text{C-5}'$), 59.5 (pt, $4\times\text{C-A}$), 54.7 (CH_2Cl_2), 35.0 ($2\times\text{C-b}$), 25.9 ($2\times\text{C-c}$), 24.7 ($4\times\text{C-B}$), 33.1 , 30.7 , 30.7 , 30.6 , 30.5 , 30.5 , 30.4 , 30.2 , 23.6 , 20.6 , 19.3 ($2\times\text{C-d}$, $2\times\text{C-e}$, $2\times\text{C-f}$, $2\times\text{C-g}$, $2\times\text{C-h}$, $2\times\text{C-i}$, $2\times\text{C-j}$, $2\times\text{C-k}$, $2\times\text{C-l}$, $2\times\text{C-m}$, $4\times\text{C-C}$), 14.4 ($2\times\text{C-n}$), 13.8 ($4\times\text{C-D}$), 12.5 (Me_{het}); **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz , ^1H -entkoppelt, CD_3OD) δ [ppm]= -12.09 (d, 1P , $^2J_{\text{PP}} = 20.9\text{ Hz}$, $\text{P-}\alpha$), -12.91 (d, 1P , $^2J_{\text{PP}} = 19.9\text{ Hz}$, $\text{P-}\beta$); **IR**: ν [cm^{-1}]= 2916 , 2849 , 1756 , 1687 , 1508 , 1466 , 1252 , 1142 , 1111 , 1003 , 974 , 914 , 836 , 503 ; **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265 , HPLC: t_{R} [min]= 19.23 , Methode 9; **R_{f} -Wert**: 0.73 (Ethylacetat/Methanol, $7:3\text{ v/v}$); **MS** (FAB): ber. 1016.48 [M], 1039.47 [M+Na $^+$], 1061.45 [M-H $^+$ +2Na $^+$] gef. 1039.5 , 1061.5 ; Molgewicht [g/mol]: 1258.58 ; Summenformel: $\text{C}_{68}\text{H}_{113}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{P}_2$

Synthese von Bis-(4-hexadecanoyloxybenzyl)-d4TDP als Tetra-*n*-butylammoniumsalz (C15-BAB-d4TDP) 33

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 160 mg (0.203 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP in 3 mL abs. Acetonitril aufgenommen und in einem Tropftrichter über ausgeheiztem Molsieb (0.3 nm) 60 min lang vorgetrocknet. Vor Reaktionsbeginn wurde diese Lösung langsam in den Reaktionskolben getropft. Das Molsieb wurde zweimal mit



3 mL abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösungen ebenfalls in den Reaktionskolben gegeben. Die Lösungsmittel wurden entfernt, das NMP in 3 mL abs. Acetonitril aufgenommen und bei 0 °C mit 280 mg (0.328 mmol, 1.6 Äq.) Bis-(4-hexadecanoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 50.4 mg (0.427 mmol, 2.1 Äq.) DCI versetzt. Da sich das Amidit in abs. Acetonitril kaum löste, wurden 2 mL abs. Dichlormethan hinzugefügt und der Reaktionsansatz 15 min mit Ultraschall behandelt. Nach 116 h Reaktionszeit bei Rt lag wieder eine Suspension, in der viel farbloser Feststoff ausgefallen war, vor. Bei -30 °C wurde mit 60 µL (0.33 mmol, 1.6 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Es wurde 15 min gerührt und anschließend die Lösungsmittel bei Rt im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an RP-18 Kieselgel gereinigt: Isokratisch mit Methanol/Wasser, 1:1 v/v, dann 3:1 v/v, dann 6:1, dann 15:1 v/v und schließlich Methanol 100%. Die vereinten Fraktionen wurden unter vermindertem Druck vom Methanol befreit und das Produkt nach Gefriertrocknung erhalten.

Ausbeute: 132 mg (0.100 mmol, 49%) farblose Watte

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.66 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.39-7.34 (m, 4H, H-2), 7.06-7.02 (m, 4H, H-3), 6.95 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.7 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.7 Hz, H-1'), 6.38 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H-3'), 5.84 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 5.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.2 Hz, H-2'), 5.08 (dd, 4H, ²J_{HH} = 8.5 Hz, ³J_{HP} = 6.4 Hz, H-Bn), 4.98-4.92 (m, 1H, H-4'), 4.27-4.12 (m, 2H, H-5'), 3.27-3.18 (m, 8H, H-A), 2.56 (t, 4H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 1.89 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, Me_{het}), 1.77-1.61 (m, 12H, H-c, H-B), 1.46-1.25 (m, 56H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m, H-n, H-o, H-C), 1.02 (t, 12H, ³J_{HH} = 7.5 Hz, H-D), 0.89 (t, 6H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, H-p); **¹³C-NMR** (101 MHz, CD₃OD)

δ [ppm]= 173.6 (2x C-a), 166.5 ($C_{\text{het-4}}$), 152.7 ($C_{\text{het-2}}$), 152.4 (2x C-4), 138.6 ($C_{\text{het-6}}$), 135.3 (C-3'), 134.8 (2x C-1), 130.4 (d, $^4J_{\text{CP}} = 3.3$ Hz, 4x C-2), 127.5 (C-2'), 122.8 (4x C-3), 112.1 ($C_{\text{het-5}}$), 90.7 (C-1'), 86.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.4$ Hz, C-4'), 70.2 (d, $J_{\text{CP}} = 5.6$ Hz, C-Bn), 70.2 (d, $J_{\text{CP}} = 5.6$ Hz, C-Bn), 68.0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, C-5'), 59.5 (pt, 4x C-A), 35.0 (2x C-b), 25.9 (2x C-c), 24.7 (4x C-B), 33.0, 30.7, 30.6, 30.6, 30.5, 30.4, 30.4, 30.2, 23.6, 20.6, 19.3 (2x C-d, 2x C-e, 2x C-f, 2x C-g, 2x C-h, 2x C-i, 2x C-j, 2x C-k, 2x C-l, 2x C-m, 2x C-n, 2x C-o, 4x C-C), 14.4 (2x C-p), 13.8 (4x C-D), 12.4 (Me_{het}); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CD_3OD) δ [ppm]= -12.08 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.07$ Hz, P- α), -12.92 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.21$ Hz, P- β); **IR** : ν [cm^{-1}]= 2915, 2848, 1757, 1687, 1466, 1143, 979, 915, 878, 780, 764, 721, 574, 503; **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_{R} [min]= 20.54, Methode 9; **R_f-Wert**: 0.61 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); **HR-MS** (ESI neg.): ber. 1072.555 [M⁻], 1071.5478 [M-H⁻], gef. 1071.5470 [M-H⁻]; Molgewicht [g/mol]: 1314.69; Summenformel: $\text{C}_{72}\text{H}_{121}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{P}_2$

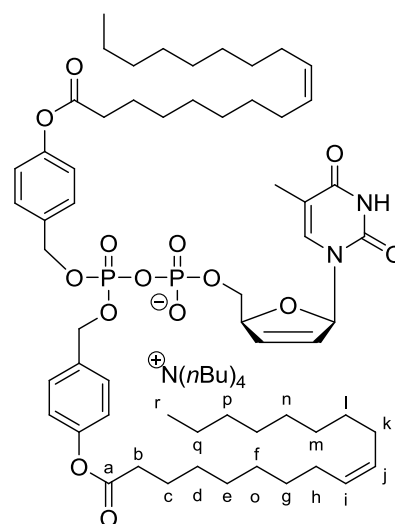
Synthese von Bis-(4-(Z)-octadec-9-enoyloxybenzyl)-d4TDP als Tetra-*n*-butylammonium- und als Ammoniumsalz (8Z-C17-BAB-d4TDP) 34

Durchführung A: Nach **AAV 7** Variante A wurden 144 mg (0.264 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP mit 263 mg (0.290 mmol, 1.1 Äq.) Bis-(4-(Z)-octadec-9-enoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 37.1 mg (0.314 mmol, 1.2 Äq.) DCI in 2 mL abs. Acetonitril umgesetzt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und mit 58 μL (0.26 mmol, 1.0 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert, da kein weiterer Reaktionsfortschritt festgestellt wurde (DC, Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v).

Das Rohprodukt wurde wie folgt an RP-18 Kieselgel gereinigt: Isokratisch mit Methanol/Wasser 1:1 v/v, dann Methanol/Wasser 10:1 v/v. Das Produkt konnte mit leichten Verunreinigungen isoliert werden.

Ausbeute: 105 mg (76.0 μmol , 29%) farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ [ppm]= 7.65 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.1$ Hz, $\text{H}_{\text{het-6}}$), 7.40-7.33 (m, 4H, H-2), 7.06-7.00 (m, 4H, H-3), 6.95 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, H-1'), 6.38 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, H-3'), 5.84 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 2.2$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.4$ Hz, H-2'), 5.39-5.34 (m, 4H, H-i, H-j), 5.08 (dd, 4H, $^2J_{\text{HH}} =$



8.5 Hz, $^3J_{HP} = 6.1$ Hz, H-Bn), 4.97-4.93 (m, 1H, H-4'), 4.25-4.13 (m, 2H, H-5'), 3.25-3.18 (m, 8H, H-A), 2.56 (t, 4H, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, H-b), 2.13-1.98 (m, 8H, H-h, H-k), 1.89 (s, 3H, Me_{het}), 1.77-1.61 (m, 12H, H-c, H-B), 1.47-1.25 (m, 48H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-l, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q, H-C), 1.02 (t, 12H, $^3J_{HH} = 7.3$ Hz, H-D), 0.88 (t, 6H, $^3J_{HH} = 6.5$ Hz, H-r); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD₃OD) [ppm]= 173.6 (2x C-a), 166.5 (C_{het}-4), 152.4 (C_{het}-2), 150.5 (2x C-4), 138.6 (C_{het}-6), 135.3 (C-3'), 130.9, 130.7 (2x C-i, 2x C-j), 130.4 (d, $^4J_{CP} = 3.1$ Hz, 4x C-2), 129.6, 127.5 (C-2'), 122.8 (4x C-3), 112.0 (C_{het}-5, hmbc), 90.7 (C-1'), 86.9 (d, $^3J_{CP} = 9.4$ Hz, C-4'), 70.2 (m, 2x C-Bn), 68.7 (d, $^2J_{CP} = 5.5$ Hz, C-5'), 59.5 (pt, 4x C-A), 35.0 34.9 (2x C-b), 33.0, 30.7, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.4, 30.3, 30.3, 30.2, 28.1, 28.1, 25.9, 24.7, 23.4, 20.6 (2x C-c, 2x C-d, 2x C-e, 2x C-f, 2x C-g, 2x C-h, 2x C-k, 2x C-l, 2x C-m, 2x C-n, 2x C-o, 2x C-p, 2x C-q, 4x C-C, 4x C-B), 14.4 (2x C-r), 13.8 (4x C-D), 12.4 (Me_{het}); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -12.06 (d, 1P, $^2J_{PP} = 20.98$ Hz, P- α), -12.91 (d, 1P, $^2J_{PP} = 20.24$ Hz, P- β); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CDCl₃) δ [ppm]= -11.73 (s, 2P, P- α , P- β); **IR** : ν [cm⁻¹]= 2959, 2925, 2874, 2854, 1755, 1687, 1464, 1244, 1044, 503; **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265; HPLC: t_R [min]= 19.86, Methode 9; **R_f-Wert**: 0.68 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); Molgewicht [g/mol]: 1366.76; Summenformel: C₇₆H₁₂₅N₃O₁₄P₂

Versuch der Chromatographie von Bis-(4-(Z)-octadec-9-enoyloxybenzyl)-d4TDP als Ammoniumsalz

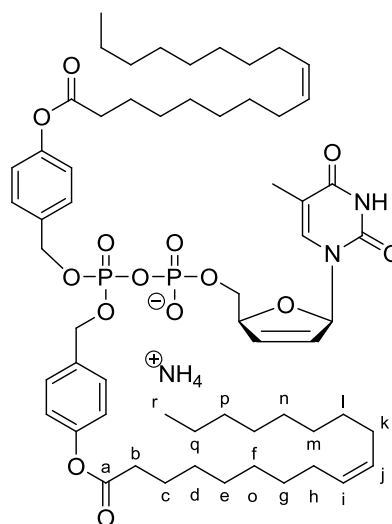
Es wurden 50 mg (0.036 mmol) Bis-(4-(Z)-octadec-9-enoyloxybenzyl)-2',3'-didehydro-2',3'-didesoxythymidindiphosphat als Tetra-*n*-butylammoniumsalz nach **AAV 12** in das entsprechende Ammoniumsalz überführt. Nach dem Umsalzen konnte bereits eine anteilige Zersetzung des Eduktes bemerkt werden. Dies wurde durch ^1H - und ^{31}P -NMR Messungen bestätigt. Das verunreinigte Produkt wurde wie folgt an RP-18 Kieselgel gereinigt: Isokratisch mit Methanol/Wasser 6:1 v/v. Aufgrund der hohen Verdünnung mussten alle Fraktionen per HPLC (Methode 1) auf ihre Reinheit geprüft werden. Die organischen Lösungsmittel wurden destillativ entfernt und das Rohprodukt gefriergetrocknet. Ausbeute: ca. 2 mg (1.7 μmol) farblose Watte

Durchführung B: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 37.6 mg (0.047 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP in 2 mL abs. Acetonitril aufgenommen und in einem Tropftrichter über ausgeheiztem Molsieb (0.3 nm) über Nacht vorgetrocknet. Vor Reaktionsbeginn wurde diese Lösung langsam in den Reaktionskolben getropft. Das Molsieb wurde zweimal mit 3 mL abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung in das Reaktionsgefäß überführt. Die Lösungsmittel wurden entfernt, das

NMP in 4 mL abs. Acetonitril aufgenommen und bei 0 °C mit 66 mg (0.072 mmol, 1.5 Äq.) Bis-(4-(*Z*)-octadec-9-enoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropyl-phosphoramidit, gelöst in 1.5 mL abs. Acetonitril, und 10 mg (0.084 mmol, 1.8 Äq.) DCI, gelöst in 0.6 mL abs. Acetonitril, umgesetzt. Nach 2 h Rühren bei Rt wurden weitere 66 mg (0.072 mmol, 1.5 Äq.) Amidit und 9.4 mg (0.078 mmol, 1.6 Äq.) DCI zugegeben. Nach weiterem 90 minütigem Rühren bei Rt konnte mittels Dünnschichtchromatographie (Ethylacetat/Methanol 7:3, v/v) kein weiterer Fortschritt der Reaktion beobachtet werden. Daher wurden 44 mg (0.048 mmol, 1 Äq.) Amidit und 5 mg (0.042 mmol, 0.9 Äq.) DCI zugegeben. Nach weiteren 100 min wurde die Lösung auf -20 °C gekühlt und mit 16 µL (0.088 mmol, 1.8 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Es wurde für 20 min bei -15 °C gerührt und anschließend die Lösungsmittel bei Rt im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Stickstoffatmosphäre bei -18 °C gelagert. Das Rohprodukt wurde mehrmals an RP-18 Kieselgel gereinigt.: *Chromatographie 1*: Wasser mit Methanolgradient, es konnten 66 mg (0.057 mmol) der Verbindung mit einer Verunreinigung bis 15% im ¹H-NMR-Spektrum bzw. 10% im ³¹P-NMR-Spektrum. *Chromatographie 2*: Die 66 mg (0.057 mmol) wurden mit Isopropanol/Formiatpuffer (0.25 M, pH= 5.5-6.0) chromatographiert: 2:1 v/v, 4:1 v/v, 6:1 v/v. Es konnten ca. 19 mg stärker verunreinigtes Produkt als Ammoniumsalz isoliert werden. Es kam zur anteiligen Zersetzung der Zielverbindung. *Chromatographie 3*: Die erhaltene Mischfraktion wurde mit Isopropanol/Wasser chromatographiert: 2:1 v/v, 4:1 v/v, 6:1 v/v.

Ausbeute: wenige mg einer farblosen Watte

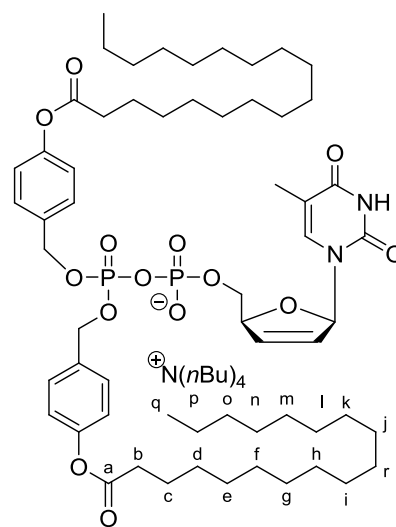
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.66 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H_{het-6}), 7.39-7.34 (m, 4H, H-2), 7.06-7.02 (m, 4H, H-3), 6.95 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.5 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.8 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.8 Hz, H-1'), 6.38 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.1 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H-3'), 5.86-5.81 (m, 1H, H-2'), 5.37-5.33 (m, 4H, H-i, H-j), 5.08 (dd, 4H, ²J_{HH} = 8.5 Hz, ³J_{HP} = 6.4 Hz, H-Bn), 4.97-4.93 (m, 1H, H-4'), 4.25-4.14 (m, 2H, H-5'), 3.25-3.18 (m, 2H, H-A), 2.56 (t, 4H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 2.08-2.00 (m, 8H, H-h, H-k), 1.89 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, Me_{het}), 1.77-1.68 (m, 6H, H-c, H-B), 1.46-1.25 (m, 42H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-l, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q, H-C), 1.02 (t, 3H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-D), 0.88 (t, 6H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, H-r), Es sind noch 0.25 Tetra-*N*-butylammoniumionen enthalten;



¹³C-NMR: vergl. Tetra-*n*-butylammonium-bis-(4-(*Z*)-octadec-9-enoyloxybenzyl)-d4TDP; ³¹P-NMR (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -12.06 (d, 1P, ²J_{PP} = 21.68 Hz, P-α), -12.91 (d, 1P, ²J_{PP} = 19.87 Hz, P-β); **R_f-Wert:** 0.36 (*iso*-Propanol/Formiatpuffer (0.25 M), 4:1 v/v); Molgewicht [g/mol]: 1142.34; Summenformel: C₆₀H₉₃N₃O₁₄P₂

Synthese von Bis-(4-octadecanoyloxybenzyl)-d4TDP als Tetra-*n*-butylammoniumsalz (C17-BAB-d4TDP) 35

Nach **AAV 7** Variante A wurden 166 mg (0.306 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP mit 445 mg (0.489 mmol, 1.6 Äq.) Bis-(4-octadecanoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 65 mg (0.551 mmol, 1.7 Äq.) DCI in 9 mL abs. Acetonitril umgesetzt. Es ergab sich eine farblose Suspension die bei Rt gerührt wurde. Nach ca. 3 h konnte ein deutlicher Verbrauch an d4TMP und die Bildung des Produktes beobachtet werden (DC, Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v). Nach weiteren ? 2.5 h wurde mit 88 µL (0.48 mmol, Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Das



Rohprodukt wurde mehrmals gereinigt: *Chromatographie 1*: Methanol/Wasser, 1:1 v/v; dann Methanol/Wasser, 10:1 v/v; dann Methanol/Wasser, 20:1 v/v an RP-18 Kieselgel. Das Produkt konnte von d4TMP und dem DCI getrennt werden, wurde jedoch nur verunreinigt isoliert. *Chromatographie 2*: Es wurden ca. 102 mg einer Mischfraktion über Sephadex LH20 (30 g in Methanol gequollen) mit Methanol als Eluent getrennt. Der Methanol wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Produkt konnte etwas angereichert werden, war aber nicht sauber (Produktfraktion ca. 75 mg). *Chromatographie 3*: 75 mg Der Mischfraktion wurden erneut an Sephadex (100 g in Methanol gequollen) gereinigt. Eine leichte Anreicherung des Produktes wurde beobachtet (Proton-NMR), bei gleichzeitiger Abnahme der Quantität. *Chromatographie 4*: analog zu Chromatographie 3, es konnte kein sauberes Produkt erhalten werden.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.66 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, H_{het-6}), 7.38-7.32 (m, 4H, H-2), 7.06-7.02 (m, 4H, H-3), 6.95 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.5 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.8 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.8 Hz, H-1'), 6.38 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, H-3'), 5.86-5.80 (m, 1H, H-2'), 5.08 (dd, 4H, ²J_{HH} = 8.5 Hz, ³J_{HP} = 5.9 Hz, H-Bn), 4.97-4.92 (m, 1H, H-4'), 4.25-4.13 (m, 2H, H-5'), 3.26-3.19 (m, 8H, H-A), 2.56 (t, 4H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-b), 1.89 (d, 3H, ⁴J_{HH} =

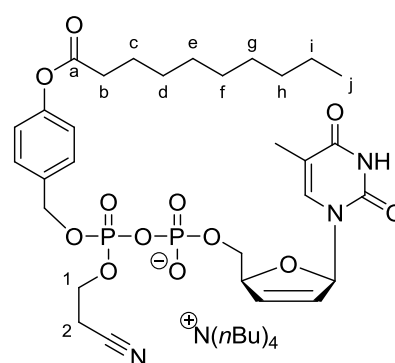
1.0 Hz, Me_{het}), 1.77-1.61 (m, 12H, H-c, H-B), 1.47-1.24 (m, 44H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q, H-C), 1.02 (t, 12H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, H-D), 0.89 (t, 6H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, H-r); **¹³C-NMR** (101 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 173.5 (2x C-a), 166.2 (C_{het}-4), 152.6 (C_{het}-2), 152.1 (2x C-4), 138.3 (C_{het}-6), 135.2 (C-3'), 134.6 (d, ³J_{CP} = 5.1 Hz, 2x C-1), 130.4 (d, ⁴J_{CP} = 3.1 Hz, 4x C-2), 127.3 (C-2'), 122.6 (4x C-3), 112.0 (C_{het}-5), 90.5 (C-1'), 86.6 (d, ³J_{CP} = 8.9 Hz, C-4'), 70.0 (d, ²J_{CP} = 5.8 Hz, C-Bn), 70.0 (d, ²J_{CP} = 5.8 Hz, C-Bn), 67.8 (d, ²J_{CP} = 6.5 Hz, C-5'), 59.4 (pt, 4x C-A), 34.9 (2x C-b), 25.7 (2x C-c), 24.5 (4x C-B), 32.8, 30.5, 30.5, 30.5, 30.4, 30.3, 30.2, 30.0, 23.5, 20.5, 19.3 (2x C-d, 2x C-e, 2x C-f, 2x C-g, 2x C-h, 2x C-i, 2x C-j, 2x C-k, 2x C-l, 2x C-m, 2x C-n, 2x C-o, 2x C-p, 2x C-q, 4x C-C), 14.4 (2x C-r), 13.8 (4x C-D), 12.4 (Me_{het}); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -12.11 (d, 1P, ²J_{PP} = 21.24 Hz, P-α), -12.92 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.15 Hz, P-β); **R_f-Wert:** 0.64 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); Molgewicht [g/mol]: 1370.79; Summenformel: C₇₆H₁₂₉N₃O₁₄P₂

Synthese von β-P-Cyanoethoxy-β-P-(4-decanoyloxybenzyl)-d4TDP als Tetra-*n*-butylammoniumsalz (CEO-C9-BAB-d4TDP) 37

Nach **AAV 7** Variante A wurden 83 mg (0.15 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butyl-ammonium)-d4TDP mit 92 mg (0.20 mmol, 1.1 Äq.) Cyanoethoxy-(4-decanoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 21.4 mg (0.18 mmol, 1.2 Äq.) DCI in 3 mL abs. Acetonitril umgesetzt. Bei Rt wurde über Nacht gerührt und anschließend mit 36 µL (0.19 mmol, 1.3 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Das Rohprodukt wurde wie folgt an RP-18 Kieselgel gereinigt: Isokratisch mit Methanol/Wasser 1:1 v/v, dann Methanol/Wasser 8:1 v/v.

Ausbeute: 142 mg (0.152 mmol, 40%) farbloses Öl

Als Gemisch zweier Diastereomere: **¹H-NMR** (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.65 (q, 1H, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H_{het}-6), 7.52-7.46 (m, 2H, H_{aryl}-2), 7.12-7.06 (m, 2H, H_{aryl}-3), 6.97-6.93 (m, 1H, H-1'), 6.42 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 5.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H-3'), 5.88-5.84 (m, 1H, H-2'), 5.18 (dd, 2H, ²J_{HH} = 8.4 Hz, ³J_{HP} = 2.4 Hz, H-Bn), 4.98-4.95 (m, 1H, H-4'), 4.31-4.13 (m, 4H, H-1, H-5'), 3.26-3.17 (m, 8H, H-A), 2.84 (dd, 2H, ³J_{HH} = 5.9 Hz, H-2), 2.62-2.54 (m, 2H, H-b), 1.92-1.88 (m, 3H, Me_{het}), 1.76-1.60 (m, 10H, H-c, H-B), 1.47-1.25 (m, 20H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h,



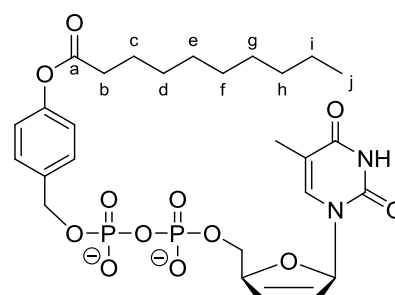
H-i, H-C), 1.02 (t, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, H-D), 0.90 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, H-j); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) δ [ppm]= 173.8 (C-a), 173.8 (C-a), 166.5 ($\text{C}_{\text{het-4}}$), 152.7 ($\text{C}_{\text{het-2}}$), 152.5 ($\text{C}_{\text{aryl-4}}$), 138.6 ($\text{C}_{\text{het-6}}$), 135.3 (C-3'), 134.8 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6.9$ Hz, $\text{C}_{\text{aryl-1}}$), 130.5 (2x $\text{C}_{\text{aryl-2}}$), 127.5 (C-2'), 122.9 (2x $\text{C}_{\text{aryl-3}}$), 118.5 (C-N), 112.1 ($\text{C}_{\text{het-5}}$), 90.8 (C-1'), 86.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.0$ Hz, C-4'), 70.2 (d, $J_{\text{CP}} = 5.0$ Hz, C-Bn), 68.1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.0$ Hz, C-5'), 64.1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4.0$ Hz, C-1), 59.5 (pt, 4x C-A), 35.0 (2x C-b), 32.9, 30.5, 30.4, 30.1, 25.8, 24.7, 23.6, 20.6, 19.9, 19.8 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, 4x C-B, 4x C-C, C-2), 14.4 (2x C-j), 13.8 (4x C-D), 12.4 (Me_{het}); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CD_3OD) δ [ppm]= -12.02 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.2$ Hz, P- α), -13.42 (dd, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.3$ Hz, $J_{\text{PP}} = 8.6$ Hz, P- β); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CD_3CN) δ [ppm]= -11.50 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 22.1$ Hz, P- α), -12.38 (dd, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 21.4$ Hz, $J_{\text{PP}} = 7.2$ Hz, P- β); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, C_6D_6) δ [ppm]= -10.15 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 19.5$ Hz, P- α), -10.46 (dd, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 18.9$ Hz, P- β); **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_{R} [min]= 12.09, Methode 9; **R_f-Wert**: 0.61 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); **HR-MS** (ESI neg.): ber. 696.2093 [M-H] gef. 696.2082; Molgewicht [g/mol]: 939.05; Summenformel: $\text{C}_{46}\text{H}_{76}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{P}_2$

Versuch der Synthese von β -P-(4-Decanoyloxybenzyl)-d4TDP (C9-AB-d4TDP) 36

Um Feuchtigkeit und Luftsauerstoff auszuschließen, wurde die Reaktion unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 11 mg (16 μmol) von Tetra-*n*-butylammonium-cyanoethoxy-(4-decanoyloxybenzyl)-d4TDP in 2 mL abs. Acetonitril vorgelegt und mit 1.87 μL (0.123 μmol) Diazabicycloundecen (DBU) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohgemisch wurde per NMR-Spektroskopie untersucht. Es konnte kein Produkt erhalten werden. Es wurde vermutlich ein Gemisch aus d4TDP, Benzylalkohol und Decansäure erhalten. Molgewicht [g/mol]: 642.53 (ohne Gegenionen); Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{P}_2$ (ohne Gegenionen);

Synthese von β -P-(4-Decanoyloxybenzyl)-d4TDP (C9-AB-d4TDP) 36

Es wurden 10.4 mg (11.2 μmol) Ammonium- β -bis-(4-Decanoyloxybenzyl)d4TDP in 0.3 mL DMSO-d_6 gelöst und mit 0.3 mL 50 mM PBS-Puffer pH= 7.3 versetzt. Leider konnte bei diesem Mischungsverhältnis kein Signal mehr im $^{31}\text{P-NMR}$ beobachtet werden. Die Hydrolyselösung wurde daher mit sehr viel Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde



in 0.4 mL D_2O und 0.2 mL Acetonitril aufgenommen und die Hydrolyse $^{31}\text{P-NMR}$ -

spektroskopisch verfolgt. Nach ca. zwei Monaten bei 37 °C wurde die Hydrolyselösung verdünnt und gefriergetrocknet. Das Gemisch wurde an RP-18 Kieselgel isokratisch mit Methanol/Wasser 5:1 v/v gereinigt. Zur besseren Identifikation der gewünschten Fraktionen wurde die HPLC eingesetzt (Methode 9). Es wurde ein zweites Mal gereinigt (Methanol/Wasser 5:1 v/v). *Anmerkung:* Der Puffer enthält neben Natrium- auch Kaliumionen als Kationen.

Ausbeute: 3.5 mg (5.44 μ mol, 48%, ohne Gegenionen berechnet)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ [ppm]= 7.65 (s, 1H, $\text{H}_{\text{het-6}}$), 7.47-7.43 (m, 2H, H-2), 7.12-7.07 (m, 2H, H-3), 6.95 (br s, 1H, H-1'), 6.45 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, H-3'), 5.86 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz, H-2'), 5.12-5.07 (m, 1H, H-4'), 4.95 (dd, 2H, $^2J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 3.7$ Hz, H-Bn), 4.24-4.15 (m, 2H, H-5'), 2.68 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, H-b), 1.81 (br s, 3H, Me_{het}), 1.76 (quint., 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, H-c), 1.48-1.25 (m, 12H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i), 0.88 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, H-j); **$^{13}\text{C-NMR}$** : Aufgrund der geringen erhaltenen Menge wurde von der Messung eines $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrums abgesehen. **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, ^1H -entkoppelt, D_2O) δ [ppm]= -11.33 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 22.5$ Hz, P- α), -11.78 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 21.8$ Hz, P- β); UV (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_{R} [min]= 12.09, Methode 9; Molgewicht [g/mol]: 642.53; Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{P}_2$

Synthese von β -P-Borano-(bis-(4-tetradecanoyloxybenzyl))-d4TDP als Tetra-*n*-butylammoniumsalz (β -P-BH₃-C13-BAB-d4TDP) 112

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 154 mg (0.195 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP in 5 mL abs. Acetonitril aufgenommen und in einem Tropftrichter über ausgeheiztem Molsieb (0.3 nm) vorgetrocknet. Vor Reaktionsbeginn wurde diese Lösung langsam in den Reaktionskolben getropft. Das Molsieb wurde zweimal mit 3 mL abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in den Reaktionskolben überführt. Die Lösungsmittel wurden entfernt, dann das NMP in 4 mL abs. Acetonitril aufgenommen und bei 0 °C mit 249 mg (0.317 mmol, 1.6 Äq.) Bis-(4-tetradecanoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 36.9 mg (0.312 mmol, 1.6 Äq.) DCI versetzt. Es ergab sich eine farblose Suspension, da sich das Amidit nur schlecht in abs. Acetonitril löste. Es wurden 30.0 mg (37.6 μ mol, 0.2 Äq.) Amidit, 4.3 mg (36 μ mol, 0.2 Äq.) DCI und 2 mL abs. Acetonitril nach 19 h zur Reaktionslösung gegeben. Da sich keine weitere Veränderung mehr zeigte wurde der Reaktionsansatz nach 5 d mit 41 μ L (0.40 mmol) Boran-Dimethylsulfid-Komplex (>90% in Dimethylsulfid) versetzt. Die Reaktion wurde mittels $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektroskopie verfolgt und

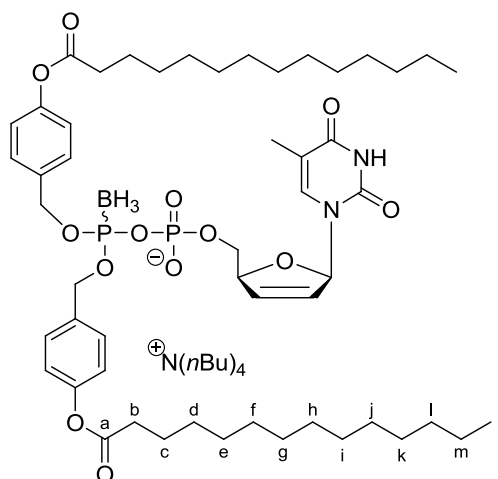
nach 50 h durch Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum der Ölpumpe beendet. Das Rohprodukt wurde an RP-18 Kieselgel gereinigt: Isokratisch mit Methanol/Wasser, 1:1 v/v, dann 8:1 v/v und dann 15:1 v/v. Die vereinten Fraktionen wurden unter vermindertem Druck vom Methanol befreit und das Produkt nach Gefriertrocknung erhalten. Weitere Mischfraktionen, die Produkt enthielten, wurden nicht erneut chromatographiert.

Ausbeute: 113 mg (899 μ mol, 46%)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ [ppm]= 7.65

(d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, $\text{H}_{\text{het-6}}$), 7.39-7.33 (m, 4H, H-2), 7.05-7.00 (m, 4H, H-3), 6.95 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, H-1'), 6.38 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, H-3'), 5.84 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 2.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, H-2'), 5.16-5.04 (m, 4H, H-Bn), 4.97-4.93 (m, 1H, H-4'), 4.23-4.08 (m, 2H, H-5'), 3.25-3.18 (m, 8H, H-A), 2.57 (m, 4H, H-b), 1.89 (d, 3H, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, Me_{het}),

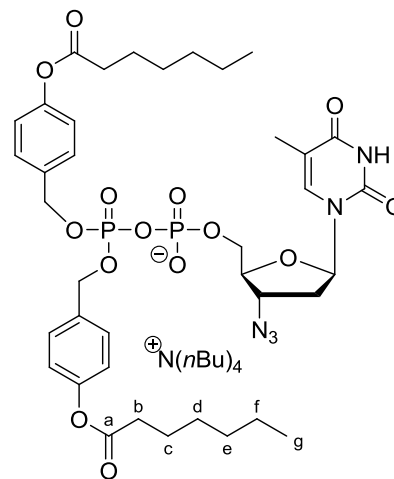
1.76-1.59 (m, 12H, H-c, H-B), 1.47-1.24 (m, 48H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m, H-C), 1.02 (t, 12H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, H-D), 0.89 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, H-n); **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, CD_3OD) δ [ppm]= 173.8 (2x C-a), 166.5 ($\text{C}_{\text{het-4}}$, hmbc signal), 152.4 (2x C-4), 138.5 ($\text{C}_{\text{het-6}}$), 135.4 (C-3'), 135.4 (2x C-1), 130.4 (4x C-2), 127.5 (C-2'), 122.8 (4x C-3), 112.1 ($\text{C}_{\text{het-5}}$), 90.7 (C-1'), 86.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 10.4$ Hz, C-4'), 68.8 (m, 2x C-Bn), 68.0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.3$ Hz, C-5'), 59.5 (pt, 4x C-A), 35.1 (2x C-b), 25.9 (2x C-c), 24.7 (4x C-B), 35.1, 33.0, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.4, 30.1, 23.6, 20.6 (2x C-d, 2x C-e, 2x C-f, 2x C-g, 2x C-h, 2x C-i, 2x C-j, 2x C-k, 2x C-l, 2x C-m, 4x C-C), 14.4 (2x C-n), 13.8 (4x C-D), 12.5 (Me_{het}); **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CD_3OD) δ [ppm]= -12.32 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 35.05$ Hz, P- α), -102.71 (m, 1P, P- β - BH_3); UV (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_{R} [min]= 19.47, Methode 9; **R_{f} -Wert:** 0.64 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); Molgewicht [g/mol]: 1256,42; Summenformel: $\text{C}_{68}\text{H}_{116}\text{BN}_3\text{O}_{13}\text{P}_2$



7.2.9 Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)-AZTDPs

Synthese von Bis-(4-heptanoyloxybenzyl)-AZTDP als Tetra-*n*-butylammonium- bzw. als Ammoniumsalz (C6-BAB-AZTDP) 65

Durchführung A: Nach **AAV 7** Variante A wurden 205 mg (0.247 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-AZTMP mit 164 mg (0.273 mmol, 1.1 Äq.) Bis-(4-heptanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 35.3 mg (0.299 mmol, 1.2 Äq.) DCI in 3.5 mL abs. Acetonitril umgesetzt. Nach einer Stunde Rühren bei Rt wurde mit 49 μ L (0.26 mmol, 1.1 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Das Rohprodukt wurde wie folgt an RP-18 Kieselgel gereinigt: Isokratisch mit Methanol/Wasser 1:1 v/v, dann Methanol/Wasser 8:1 v/v. Das Produkt konnte nicht erhalten werden. Die NMR-Spektren der einzelnen Fraktionen wiesen nicht auf eine Produktbildung hin (Dublett im ^{31}P -NMR).
Molgewicht [g/mol]: 1062.21; Summenformel: $\text{C}_{54}\text{H}_{85}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{P}_2$

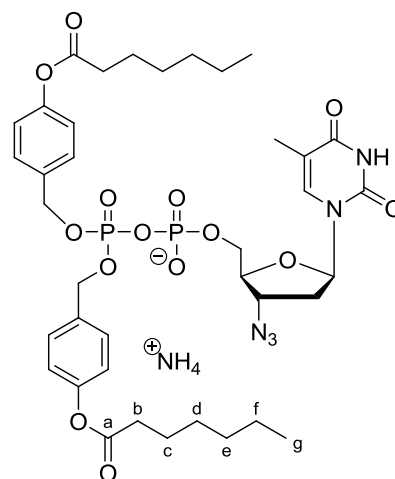


Durchführung B: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.65 mL einer Stammlösung in abs. Acetonitril (152.1 mg, 0.183 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-AZTMP über ausgeheiztem Molsieb (0.3 nm) in einem Tropftrichter 2 h lang vorgetrocknet. Das Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-AZTMP wurde in den Reaktionskolben überführt und mit weiteren 3.5 mL abs. Acetonitril versetzt. Die Reaktion wurde bei 0 °C durch Zugabe von 176 mg (0.293 mmol, 1.6 Äq.) Bis-(4-heptanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 38 mg (0.32 mmol, 1.6 Äq.) DCI gestartet. Nach Rühren für 1 h bei Rt wurden weitere 44 mg (0.073 mmol, 0.6 Äq.) Amidit und 9.2 mg (0.077 mmol, 0.6 Äq.) DCI zugegeben. Nach 3 h konnte mittels Dünnschichtchromatographie (Ethylacetat/Methanol 7:3, v/v) kein vollständiger Umsatz beobachtet werden, so dass weitere 22 mg (0.036 mmol, 0.3 Äq.) Amidit und 4.6 mg (0.038 mmol, 0.3 Äq.) DCI zugegeben wurden. Nach Rühren über Nacht wurde ein fast vollständiger Verbrauch an AZTMP festgestellt. Die Lösung wurde auf -23 °C gekühlt und mit 73 μ L (0.403 mmol, 2.2 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Es wurde für 20 min bei -15 °C gerührt und anschließend die Lösungsmittel bei Rt im Ölpumpenvakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt musste mehrfach an RP-18 Kieselgel chromatographiert werden. *Chromatographie 1:* Methanol/Wasser 1:1 v/v, dann

5:1 v/v, dann 10:1 v/v. Das Produkt konnte so von DCI und AZTMP befreit werden. *Chromatographie 2*: Eine Mischfraktion wurde mit Methanol/Wasser 6:1 v/v, dann 3:1 v/v gereinigt. Es konnte kein sauberes Produkt erhalten werden. *Chromatographie an der präparativen HPLC*: Es wurden insgesamt 11 verschiedene Versuche mit unterschiedlichen Kombinationen an Eluenten (Acetonitril/Wasser, Acetonitril/Formiatpuffer (0.25 M)) durchgeführt. Das Produkt wurde nicht rein (>95%) erhalten.

Ausbeute: 4.1 mg (4.65 μmol) farblose Watte

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ [ppm]= 7.71 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, $\text{H}_{\text{het-6}}$), 7.44-7.37 (m, 4H, H-2), 7.08-7.03 (m, 4H, H-3), 6.21 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ H-1'), 5.12 (m, 4H, H-Bn), 4.39 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 3.7$ Hz, H-3'), 4.23-4.15 (m, 1H, H-5'), 4.15-4.08 (m, 1H, H-5'), 4.03 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 2.9$ Hz, $^{3/4}J_{\text{HH}} = 2.9$ Hz, H-4'), 2.57 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, H-b), 2.37-2.23 (m, 2H, H-2'), 1.89 (d, 3H, $^4J_{\text{HH}} = 1.0$ Hz, Me_{het}), 1.73 (quint., 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 14.4$ Hz, H-c), 1.48-1.33 (m, 12H, H-d, H-e, H-f), 0.93 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} =$



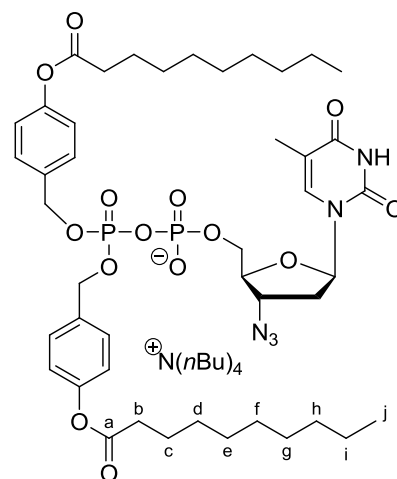
6.8 Hz, H-g); **$^{13}\text{C-NMR}$** : aufgrund der geringen Menge nicht gemessen; **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CD_3OD) δ [ppm]= -12.18 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.7$ Hz, P- α), -12.75 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 20.3$ Hz, P- β); Molgewicht [g/mol]: 880.81; Summenformel: $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{P}_2$

Synthese von Bis-(4-decanoyloxybenzyl)-AZTDP als Tetra-*n*-butylammoniumsalz (C9-BAB-AZTDP) 66

Nach **AAV 7** Variante A wurden 161 mg (0.194 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butyl-ammonium)-AZTMP mit 162 mg (0.236 mmol, 1.2 Äq.) Bis-(4-decanoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 27.1 mg (0.229 mmol, 1.2 Äq.) DCI in 3 mL abs. Acetonitril umgesetzt. Nach Rühren über Nacht bei Rt wurde mit 43 μL (0.24 mmol, 1.1 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Das Rohprodukt wurde wie folgt an RP-18 Kieselgel gereinigt: *Chromatographie 1*: Methanol/Wasser 1:1 v/v, dann Methanol/Wasser 5:1 v/v. *Chromatographie 2*: Eine Mischfraktion der ersten Trennung wurde nach AAVXX behandelt. Es wurde dann an RP-18 Kieselgel gereinigt (Methanol/Wasser, 5:1 v/v). Es wurde kein Produkt isoliert.

Ausbeute: 16 mg (13.5 μmol , 7%) farbloses Öl

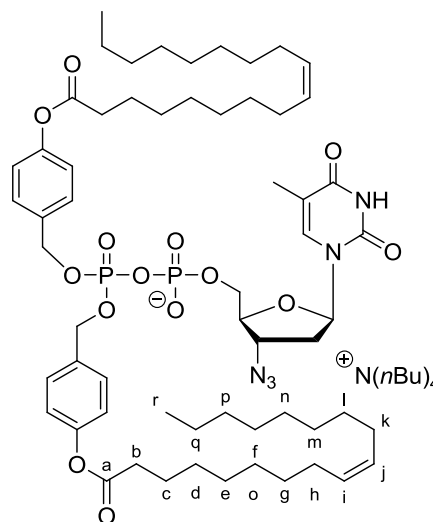
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, CH₂Cl₂) δ [ppm]= 7.72 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H-6), 7.43-7.37 (m, 4H, H-2), 7.07-7.03 (m, 4H, H-3), 6.21 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, ³J_{HH} = 6.7 Hz, H-1'), 5.12 (m, 4H, H-Bn), 4.40 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 3.3 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 3.5 Hz, H-3'), 4.23-4.15 (m, 1H, H-5'), 4.15-4.08 (m, 1H, H-5'), 4.03 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 5.4 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.5 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 3.0 Hz, H-4'), 3.27-3.18 (m, 8H, H-A), 2.56 (t, 4H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H-b), 2.38-2.34 (m, 2H, H-2'), 1.90 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, Me_{het}), 1.77-1.61 (m, 12H, H-c, H-B), 1.47-1.27 (m, 32H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-C), 1.02 (t, 12H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-D), 0.90 (t, 6H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H-j); **¹³C-NMR** (101 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 173.5 (2x C-a), 166.2 (C_{het}-4), 152.2 (2x C-4), 152.1 (C_{het}-2), 137.5 (C_{het}-6), 134.6 (d, ³J_{CP} = 7.2 Hz, C-1), 134.6 (d, ³J_{CP} = 7.2 Hz, C-1), 130.3 (4x C-2), 122.7 (4x C-3), 112.2 (C_{het}-5), 85.5 (C-1'), 84.2 (d, ³J_{CP} = 9.3 Hz, C-4'), 70.2 (d, ²J_{CP} = 4.9 Hz, C-Bn), 70.2 (d, ²J_{CP} = 4.9 Hz, C-Bn), 67.1 (d, ²J_{CP} = 6.3 Hz, C-5'), 62.4 (C-3'), 59.4 (pt, 4x C-A), 37.8 (C-2'), 34.9 (2x C-b), 32.8, 30.4, 30.2, 30.0, 29.9, 25.7, 24.6, 23.5, 20.5 (2x C-c, 2x C-d, 2x C-e, 2x C-f, 2x C-g, 2x C-h, C-i, 4x C-B, 4x C-C), 14.4 (2x C-j), 13.8 (4x C-D), 12.5 (Me_{het}); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -12.14 (d, 1P, ²J_{PP} = 19.6 Hz, P-α), -12.71 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.0 Hz, P-β); UV (HPLC): λ_{max} [nm]= 265; HPLC: t_R [min]= 16.15, Methode 9; **R_f-Wert**: 0.78 (Ethylacetat/Methanol, 7:3 v/v); **HR-MS** (ESI neg.): ber. 947.3847 [M], 946.3775 [M-H]⁻ gef. 946.3765; Molgewicht [g/mol]: 1189.40; Summenformel: C₆₀H₉₈N₆O₁₄P₂



Versuch der Synthese von Bis-(4-(Z)-octadec-9-enoyloxybenzyl)-AZTDP (8Z-C17-BAB-AZTDP) 68

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 116.3 mg (0.14 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-AZTMP in 2 mL abs. Acetonitril aufgenommen und in einem Tropftrichter über aktiviertem Molsieb (0.3 nm) über Nacht vorgetrocknet. Vor Reaktionsbeginn wurde diese Lösung langsam in den Reaktionskolben getropft. Das Molsieb wurde dreimal mit 2 mL abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung in das Reaktionsgefäß überführt. Die Lösungsmittel wurden entfernt, das NMP in ca. 4 mL abs. Acetonitril aufgenommen und bei 0 °C mit 172 mg (0.19 mmol, 1.4 Äq.) Bis-(4-(Z)-octadec-9-enoyloxy-benzyl)*N,N*-diisopropylphosphoramidit, gelöst in 0.2 mL abs. Acetonitril, und 28 mg (0.24 mmol, 1.7 Äq.) DCI umgesetzt. Das Amidit löste sich erst bei Rt. Nach 2 h Rühren wurden weitere 86 mg (0.094 mmol, 0.7 Äq.) Amidit und 14 mg (0.11 mmol, 0.9 Äq.)

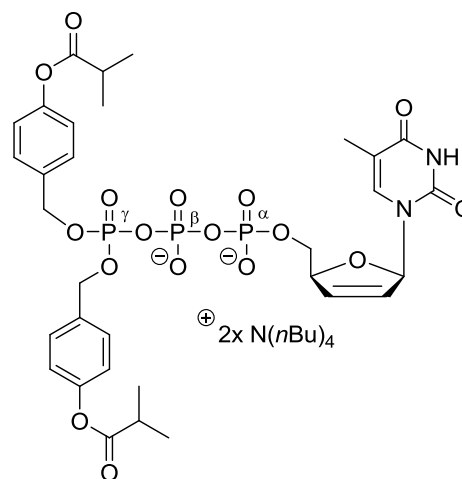
DCI zugegeben. Die Suspension wurde über Nacht gerührt und mit 0.5 mL abs. DMF und 5 mL abs. Acetonitril versetzt, um eine das Amidit wieder zu lösen. Es misslang. Die Lösung wurde auf -25 °C gekühlt und mit 48 µL (0.266 mmol, 1.9 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Es wurde für 2 min bei -25 °C gerührt und anschließend die Lösungsmittel bei Rt im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde an RP-18 Kieselgel gereinigt: Isokratisch mit Methanol/Wasser 1:1 v/v, 6:1 v/v, 20:1 v/v, schließlich Methanol. Das Produkt konnte nicht isoliert werden. **R_f-Wert:** 0.36 (Isopropanol/Wasser, 4:1 v/v, RP-18) Rohprodukt; Molgewicht [g/mol]: 1409.79; Summenformel: C₇₆H₁₂₆N₆O₁₄P₂



7.2.10 Synthese von Bis-(4-acyloxybenzyl)-Nucleosidtriphosphaten

Synthese von γ -Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-d4TTP als Tetra-*n*-butyl-ammoniumsalz (BIB-d4TTP) 125

In Analogie zu **AAV 7** Variante A wurden 125.3 mg (0.1444 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP mit 119.9 mg (0.2317 mmol, 1.6 Äq.) Bis-(4-*isobutyryloxybenzyl*)*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 31 mg (0.26 mmol, 1.8 Äq.) DCI in 3 mL abs. Acetonitril umgesetzt. Es kam zu einem fast vollständigen Verbrauch an d4TDP, so dass nach drei Stunden mit 42 µL (0.23 mmol, 1.6 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) bei -30 °C 15 min lang oxidiert wurde. Die Lösungsmittel wurden bei etwa 35 °C im Vakuum der Ölpumpe entfernt. Das Rohprodukt wurde mehrfach an RP-18 Kieselgel gereinigt (1. *Chromatographie*: Methanol/Wasser 3:1 v/v isokratisch, 2. *Chromatographie*: Methanol/Wasser 2:1 v/v isokratisch). Es konnten erhebliche Teile des eingesetzten d4TDPs reisoliert werden



Ausbeute: 101 mg (77.8 µmol, 54%) farbloses Harz

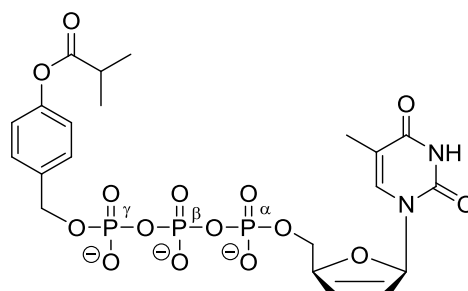
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.73 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.44-7.38 (m, 4H, H-2), 7.05-7.00 (m, 4H, H-3), 6.92 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.6 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.6 Hz, H-1'), 6.55 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H-3'), 5.76 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 5.9 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H-2'), 5.21 (dd, 4H, ²J_{HH} = 7.8 Hz, ³J_{HP} = 2.6 Hz, H-Bn), 4.96-4.92 (m, 1H, H-4'), 4.42-4.32 (m, 1H, H-5'), 4.27-4.17 (m, 1H, H-5'), 3.25-3.16 (m, 16H, 4x H-A), 2.81 (sept., 2H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, H-b), 1.89 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, Me_{het}), 1.70-1.57 (m, 16H, H-B), 1.40 (sext., 16H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-C), 1.29 (d, 12H, ³J_{HH} = 7.00 Hz, H-c), 1.01 (t, 12H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-D); **¹³C-NMR** (101 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 177.0 (2x C-a), 166.5 (C_{het}-4), 152.7 (C_{het}-2), 152.3 (2x C-4), 138.7 (C_{het}-6), 136.3 (C-3'), 135.4 (d, ³J_{CP} = 7.8 Hz, 2x C-1), 130.4 (d, ⁴J_{CP} = 3.4 Hz, 4x C-2), 126.6 (C-2'), 122.5 (4x C-3), 112.2 (C_{het}-5), 90.7 (C-1'), 87.5 (d, ³J_{CP} = 8.3 Hz, C-4'), 70.3-70.1 (m, 2x C-Bn), 67.7 (d, ²J_{CP} = 5.3 Hz, C-5'), 59.5 (br s, 4x C-A), 35.3 (2x C-b), 24.7 (4x C-B), 20.6 (4x C-C), 19.2 (4x C-c), 13.8 (4x C-D), 12.5 (Me_{het}); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -12.14 (d, 1P, ²J_{PP} = 21.5 Hz, P-α), -13.63 (d, 1P, ²J_{PP} = 21.3 Hz, P-γ), -24.33 (t, 1P, ²J_{PP} = 18.1 Hz, P-β); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-gekoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -12.04 (ddd, 1P, ²J_{PP} = 21.4 Hz, ³J_{PH} = 5.9 Hz, P-α), -13.53 (m, 1P, P-β), -24.16 (dd, 1P, ²J_{PP} = 21.4 Hz, ²J_{PP} = 17.8 Hz, P-γ); **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_R [min]= 10.29, Methode 9; **R_f-Wert**: 0.51 (schmiert) (Ethylacetat/Methanol, 1:1 v/v), 0.5 (Methanol/Wasser, 3:1 v/v, RP-18); **HR-MS** (ESI neg.): ber. 815.1383 [M-H], 837.1203 [M-2H⁻+Na⁺], gef. 815.1378, 837.1198; Molgewicht [g/mol]: 1297.51; Summenformel: C₆₅H₁₁₁N₄O₁₆P₃

Synthese von γ-(4-iso-butyryloxybenzyl)-d4TTP (IB-d4TTP) 137

Es wurden ca. 15 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-γ-bis-(4-isobutyryloxybenzyl)-d4TTDP in 0.35 mL DMSO-d₆ gelöst und mit 0.35 mL 50 mM PBS-Puffer pH= 7.3 versetzt und die Hydrolyse ³¹P-NMR-spektroskopisch verfolgt. Nach ca. sechs Monaten bei Rt wurde die Hydrolyselösung verdünnt und gefriergetrocknet.

Das Gemisch wurde an RP-18 Kieselgel gereinigt: Isokratisch mit Wasser, dann Acetonitril/Wasser 10:1 v/v, dann Methanol/Wasser 2:1 v/v. Das Produkt wurde nach Gefrier Trocknung erhalten.

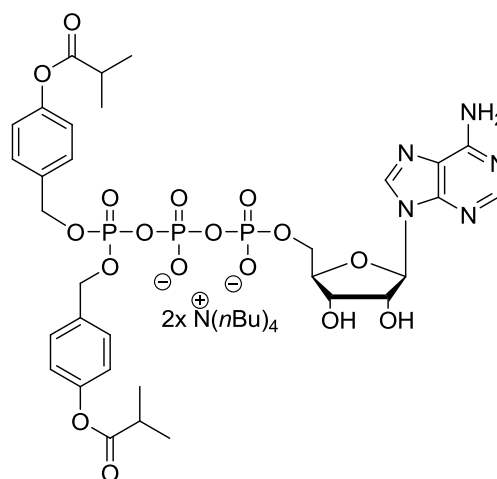
Ausbeute: ca. 3.5 mg farblose Watte



¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]= 7.75 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.50-7.44 (m, 2H, H-2), 7.11-7.06 (m, 2H, H-3), 6.91 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.9 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.9 Hz, H-1'), 6.45 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.2 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H-3'), 5.79 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.9 Hz, H-2'), 5.08-5.03 (m, 1H, H-4'), 4.96 (dd, 2H, ²J_{HH} = 6.4 Hz, ³J_{HP} = 2.5 Hz, H-Bn), 4.25-4.18 (m, 2H, H-5'), 3.25-3.15 (m, 2.5H, 4x H-A), 1.70 (s, 3H, Me_{het}), 1.71-1.60 (m, 2.5H, H-B), 1.40-1.33 (m, 2.5H, H-C, 6H, H-c), 0.95 (t, 3.8H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, H-D); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]= 164.7 (C_{het}-4), 149.3 (C_{het}-2), 149.0 (C-4), 138.3 (C_{het}-6), 135.1 (C-1), 133.8 (C-3'), 128.3 (d, ⁴J_{CP} = 5.2 Hz, 2x C-2), 127.5 (C-2'), 120.7 (2x C-3), 110.0 (C_{het}-5), 88.4 (C-1'), 85.3 (C-4'), 65.7 (d, ²J_{CP} = 5.3 Hz, C-5'), 65.4-65.2 (m, 2x C-Bn), 57.0 (br s, 4x C-A), 26.9 (C-b), 25.8 (2x C-c), 22.2 (4x C-B), 18.3 (4x C-C), 12.5 (C-D, Me_{het}); *Anmerkung:* Das ¹³C-NMR-Spektrum wurde von der Hydrolyselösung gemessen. Von der sauber isolierten Verbindung konnte aufgrund der geringen Menge kein ¹³C-NMR-Spektrum gemessen werden. **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, D₂O) δ [ppm]= -11.45 (d, 1P, ²J_{PP} = 19.6 Hz, P), -11.62 (d, 1P, ²J_{PP} = 18.5 Hz, P), -23.16 (t, 1P, ²J_{PP} = 19.4 Hz, P-β); **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_R [min]= 9.46, Methode 9; Molgewicht [g/mol]: 635.36; Summenformel: C₂₂H₂₆N₂O₁₄P₃ (ohne Gegenionen berechnet)

Versuch der Synthese von γ-Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)-adenosintri-phosphat (BIB-ATP)

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 150 mg (0.11 mmol, 1 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-adenosindiphosphat in 1.79 mL abs. Acetonitril aufgenommen und für eine Stunde über Molsieb (0.3 nm) in einem Tropftrichter gelagert. Die Lösung wurde in den Reaktionskolben überführt und das Molsieb dreimal mit je 2 mL abs. Acetonitril gewaschen. Die Lösung wurde auf etwa 4 °C abgekühlt, mit 95.0 mg (0.183 mmol, 1.6 Äq.) Bis-(4-*iso*-butyryloxybenzyl)*N,N*-diisopropylphosphoramidit und mit 20.5 mg (0.174 mmol, 1.6 Äq.) DCI versetzt. Nach 48 h Rühren bei Rt wurden weitere 44 mg (0.085 mmol, 0.7 Äq.) Amidit und 11.4 mg (0.095 mmol, 0.8 Äq.) DCI zugegeben, da kein Reaktionsfortschritt beobachtet werden konnte (DC, Ethylacetat/Methanol, 7:3, v/v). Nach vier Tagen wurde ein Phosphor-NMR der Reaktionslösung gemessen. Das Ergebnis



war nicht eindeutig. Die Lösung wurde auf $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und mit $40\text{ }\mu\text{L}$ (0.22 mmol , 2 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) versetzt. Es wurde für 15 min bei $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und die Lösungsmittel bei *Rt* im Ölpumpenvakuum entfernt. Es hatte sich kein Produkt gebildet ($^{31}\text{P-NMR}$). Molgewicht [g/mol]: 1342.52 ; Summenformel: $\text{C}_{64}\text{H}_{110}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3$

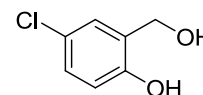
7.2.11 Synthese von Salicylalkoholen

Synthese von 5-Chlorsalicylalkohol 114

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 5.0 g (29.1 mmol , 1.0 Äq.) 5-Chlor-2-hydroxy-benzoesäure mit 2.19 g (57.8 mmol , 2 Äq.) LiAlH_4 in 40 mL abs. THF umgesetzt.

Ausbeute: 3.6 g (22.7 mmol , 80%) farbloser Feststoff

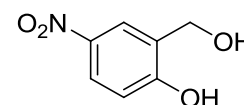
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz , DMSO-d_6) δ [ppm]= 9.66 (s, 1H , Ph-OH), 7.27 (d, 1H , $J=2.7\text{ Hz}$, H-6), 7.06 (dd, 1H , $J=2.7\text{ Hz}$, $J=8.5\text{ Hz}$, H-4), 6.76 (d, 1H , $J=8.5\text{ Hz}$, H-3), 5.12 (t, 1H , $J=5.7\text{ Hz}$, Bn-OH), 4.45 (d, 2H , $J=5.7\text{ Hz}$, H-Bn); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz , DMSO-d_6) δ [ppm]= 152.8 (C-2), 131.0 (C-1), 126.6 , 126.4 (C-6, C-4), 122.3 (C-5), 115.9 (C-3), 57.6 (C-Bn); **IR** (KBr): ν [cm^{-1}]= 3436 , 3153 , 1609 , 1448 , 1435 , 1408 , 1304 , 1182 , 1124 , 1002 , 822 , 745 , 659 , 564 , 485 ; **Smp.**: $98\text{ }^{\circ}\text{C}$; **R_f-Wert**: 0.51 (Dichlormethan/Methanol, $9:1\text{ v/v}$); **MS** (EI^+): ber. 140.01 [$\text{M-H}_2\text{O}^+$], 142.0 [M-O^+], 158.01 [M^+], 160.01 [$\text{M}+2\text{H}^+$], gef. 140 , 142 , 158 , 160 ; Molgewicht [g/mol]: 158.58 ; Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClO}_2$



5-Nitro-Salicylalkohol 115

Die Verbindung wurde von *S. Warnecke* synthetisiert.¹⁶⁴

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz , DMSO-d_6) δ [ppm]= 11.09 (s, 1H , OH-Phenol), 8.21 (d, $^4J_{\text{HH}}=3.0\text{ Hz}$, 1H , H6), 8.02 (dd, $^3J_{\text{HH}}=8.9\text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}}=3.0\text{ Hz}$, 1H , H4), 6.93 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.9\text{ Hz}$, 1H , H3), 5.35 (s, 1H , OH-Benzyl), 4.51 (s, 2H , H7); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz , DMSO-d_6) δ [ppm]= 160.5 (C2), 139.6 (C5), 130.3 (C1), 124.0 (C4), 122.7 (C6), 114.7 (C3), 57.4 (C7); **IR** (KBr) ν [cm^{-1}]= 3457 , 3080 , 1592 , 1490 , 1329 , 821 , 756 , 702 ; **R_f-Wert**: 0.55 (Di-chlormethan, $9:1\text{ v/v}$); **MS** (EI^+): ber. 169 (M) gef. 169 (M, 72%), 151 (100), 93 (11), 79 (28), 65 (26), 51 (20), 39 (12); Molgewicht [g/mol]: 169.1 ; Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_4$



7.2.12 Synthese von *cycloSal*-Chlorphosphiten

Synthese von 5-Chlor-*cycloSal*-chlorphosphit 116

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 1.50 g 5-Chlorsalicylalkohol (9.5 mmol, 1.0 Äq.) und 1.00 mL (1.57g, 11.3 mmol, 1.2 Äq.) Phosphorylchlorid, gelöst in 35 mL abs. Diethylether, mit 1.54 mL Pyridin (1.49 g, 19.2 mmol, 2 Äq.), gelöst in 5 mL abs. Diethylether, umgesetzt.

Ausbeute: 1.89 (8.48 mmol) verunreinigtes farbloses Öl

Als Gemisch zweier Enantiomere: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

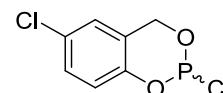
δ [ppm]= 7.22 (dd, ³J_{HH} = 8.6 Hz, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, H-4), 6.98 (d,

⁴J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, H-6), 6.92 (d, ³J_{HH} = 8.6 Hz, 1H, H-3), 5.41 (dd,

²J_{HH} = 14.4 Hz, ³J_{HP} = 2.4 Hz, 1H, H-7), 4.98 (dd, ²J_{HH} = 14.4 Hz, ³J_{HP} = 9.6 Hz, 1H, H-7);

³¹P-NMR (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CDCl₃) δ [ppm]= 140.13; Molgewicht [g/mol]: 222.99;

Summenformel: C₇H₅Cl₂O₂P



Synthese von 5-Nitro-*cycloSal*-chlorphosphit 117

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 600 mg 5-Nitrosalicylalkohol (3.55 mmol, 1.0 Äq.) und 0.37 mL (0.58 g, 4.26 mmol, 1.2 Äq.) Phosphorylchlorid, gelöst in 100 mL abs. Diethylether, mit 0.66 mL Pyridin (0.64 g, 8.16 mmol, 2.3 Äq.), gelöst in 13 mL abs. Diethylether, umgesetzt.

Ausbeute: 793 mg, gelbliches Öl

Als Gemisch von zwei Enantiomeren: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

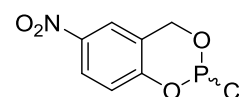
δ [ppm]= 8.22 (dd, ³J_{HH} = 8.6 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, 1H, H4), 8.10 (d,

⁴J_{HH} = 2.0 Hz, 1H, H6), 5.98 (d, ³J_{HH} = 8.6 Hz, 1H, H3), 4.81 (dd,

²J_{HH} = 14.2 Hz, ³J_{HP} = 2.6 Hz, 1H, H7), 4.78 (dd, ²J_{HH} = 14.2 Hz, ³J_{HP} = 9.6 Hz, 1H, H7); ³¹P-

NMR (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CDCl₃) δ [ppm]= 139.13; Molgewicht [g/mol]: 233.54;

Summenformel: C₇H₅ClNO₄P



7.2.13 Synthese von *cycloSal*-NMPs

Synthese von 5-Chlor-*cycloSal*-d4TMP (5-Chlor-*cycloSal*-d4TMP) 118

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 200 mg (0.89 mmol, 1.0 Äq.) d4T, 258 mg (1.16 mmol, 1.3 Äq.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit, 0.32 mL (0.24 g, 1.78

mmol, 2.0 Äq.) DIPEA und 1.42 g Oxone (2.32 mmol, 2.6 Äq.) verwendet. Die Reaktion wurde mit 15 mL abs. Acetonitril und 1 mL abs. DMF durchgeführt.

Ausbeute: 276 mg (0.646 mmol, 73%) farblose Watte

Als Gemisch von zwei Diastereomeren: **¹H-NMR** (400

MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm]= 11.34 (bs, 2x 1H, 2x N-H),

7.46-7.39 (m, 2x 2H, 2x H-4, 2x H-6), 7.20-7.17 (m, 2x

1H, H-3), 7.17-7.13 (m, 2x 1H, 2x H_{het}-6), 6.82-6.76

(m, 2x 1H, 2x H-1'), 6.42 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 5.9 Hz,

⁴J_{HH} = 1.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, H-3'), 6.36 (ddd, 1H,

³J_{HH} = 5.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, H-3'), 6.05-5.98 (m, 2x 1H, 2x H-2'), 5.55-5.33

(m, 2x 2H, H-bn), 4.99-4.91 (m, 2x 1H, 2x H-4'), 4.38-4.32 (m, 2x 2H, 2x H-5', 2x H-5'),

1.68 (d, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, Me_{het}), 1.64 (d, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, Me_{het}); **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆)

δ [ppm]= 163.6 (2x C_{het}-4), 150.6 (2x C_{het}-2), 135.6 (2x C_{het}-6), 132.6, 132.5 (2x C-3'), 129.6

(C-4), 129.5 (C-4), 128.2 (2x C-5), 127.3 (2x C-2'), 126.0 (2x C-6), 120.0, 119.8 (2x C-3),

109.6 (2x C_{het}-5), 89.2 (2x C-1'), 84.0, 83.9 (2x C-4'), 68.6-68.4 (m, 2x C-5'), 67.6 (d, ²J_{CP} =

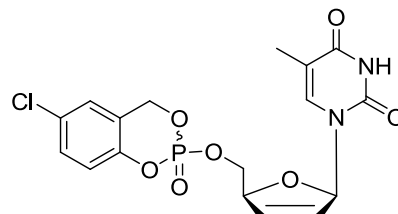
7.3 Hz, C-bn), 67.3 (d, ²J_{CP} = 7.3 Hz, C-bn), 11.8, 11.7 (2x Me_{het}); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-

entkoppelt, DMSO-*d*₆) δ [ppm]= -9.81, -9.88; **IR** : ν [cm⁻¹]= 3181, 3062, 1685, 1480, 1245,

1187, 1027, 993, 940, 868, 782, 425; **R_f-Wert**: 0.57 (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v); **MS**

(FAB): ber. 426.4 [M⁺], 427.1 [M+H⁺]; gef. 427.2, 853.4 [2xM⁺]; Molgewicht: 426.74 g/mol;

Summenformel: C₁₇H₁₆ClN₂O₇P



Synthese von 5-Nitro-cycloSal-d4TMP 119

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 245 mg (1.09 mmol, 1.0 Äq.)

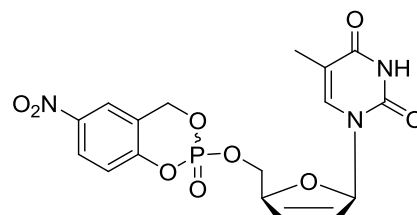
d4T, 510 mg (2.18 mmol, 1.3 Äq.) 5-

Nitrosaligenylchlorphosphit, 0.35 mL (0.26 g, 2.18

mmol, 2.0 Äq.) DIPEA und 2.68 g Oxone (14.6 mmol,

2 Äq.) verwendet. Die Reaktion wurde mit 17 mL abs.

Acetonitril und 1.3 mL abs. DMF durchgeführt.



Ausbeute: 363 mg, gelblich farblose Watte

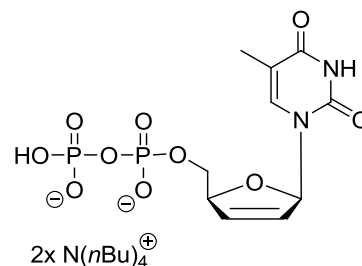
als Rohprodukt

Als Gemisch zweier Diastereomere: **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]= 8.22-8.14 (m, 2x

1H, H-4), 8.03-7.98 (m, 2x 1H, 2x H_{het}-6), 7.14-7.01 (m, 2x 2H, 2x H-4, 2x H-3), 6.95-6.91

(m, 2x 1H, 2x H-1'), 6.32 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 5.9 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, H-3'), 6.28

(ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, H-3'), 5.94-5.88 (m, 2x 1H, 2x H-2'), 5.46-5.25 (m, 2x 2H, H-Bn), 5.01-4.95 (m, 2x 1H, 2x H-4'), 4.42-4.27 (m, 2x 2H, 2x H-5'), 1.77 (d, $^4J_{\text{HH}} = 0.9$ Hz, Me_{het}), 1.72 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, Me_{het}); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, CDCl_3) δ [ppm]= -9.78, -9.91; **R_f-Wert**: 0.48 (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v); Molgewicht [g/mol]: 437.29; Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_9$

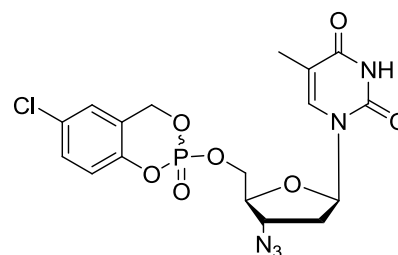


Synthese von 5-Chlor-cycloSal-AZTMP 120

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 1.00 g (3.74 mmol, 1.0 Äq.) AZT, 1.082 g (4.864 mmol, 1.3 Äq.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit, 1.35 mL (1.07 g, 7.47 mmol, 2.0 Äq.) DIPEA und 4.66 g Oxone (7.58 mmol, 2.6 Äq.) verwendet. Die Reaktion wurde mit 15 mL abs. Acetonitril und 2 mL abs. DMF durchgeführt.

Ausbeute: 965 mg (2.05 mmol, 55%) farblose Watte

Als Gemisch von zwei Diastereomeren: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]= 11.34 (br s, 2x 1H, 2x N-H), 7.46-7.37 (m, 2x 3H, 2x H_{het}-6, 2x H-4, 2x H-6), 7.20-7.13 (m, 2x 1H, 2x H-3), 6.10, 6.09 (2x t, 2x 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, 2x H-1'), 5.56-5.39 (m, 2x 2H, 2x H-Bn), 4.49-4.27 (m, 2x 3H, 2x H-3', 2x H-5', 2x H-5''), 4.02-3.94 (m, 2x 1H, 2x H-4'), 2.45-2.36 (m, 2x 1H, 2x H-2'), 2.35-2.26 (m, 2x 1H, 2x H-2'), 1.74 (2x d, $^4J_{\text{HH}} = 0.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 0.93$ Hz, 2x Me_{het}); $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]= 163.6 (2x C_{het}-4), 150.3 (2x C_{het}-2), 148.2 (2x C-2), 135.9 (2x C_{het}-6), 129.5 (2x C-6), 128.3 (2x C-5), 125.9 (2x C-4), 122.9, 122.7 (2x C-1), 120.1, 120.0 (2x C-3), 110.3, 110.3 (2x C_{het}-5), 83.8, 83.3 (2x C-1'), 81.02, 80.92 (2x C-4'), 68.1, 68.00 (2x C-Bn), 67.03 (m, 2x C-5'), 59.6, 59.4 (2x C-3'), 35.5, 35.5 (2x C-2'), 12.1, 12.0 (2x Me_{het}); $^{189}\text{ }^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, DMSO-d_6) δ [ppm]= -10.05 (s, 0.5P), -10.16 (s, 0.5); **IR** (KBr): ν [cm^{-1}]= 3480, 3210, 3020, 2130, 1686, 1489, 1458, 1379, 1294, 1189, 1104, 1020, 998, 946; $^{189}\text{ UV}$: $\lambda_{\text{max}} = 266$ nm, HPLC: $t_{\text{R}} = 21.31$ min; $^{189}\text{ R}_f$ -Wert: 0.59 (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v); **MS** (FAB): ber. 469.0 [M^+], 470.1 [$\text{M}+\text{H}^+$], 492.04 [$\text{M}+\text{Na}^+$]; gef. 470.1, 492.1; Molgewicht: 469.77 g/mol; Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClN}_5\text{O}_7\text{P}$



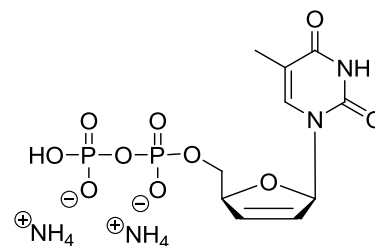
7.2.14 Synthese von Nucleosiddi- und -triphosphaten aus cycloSal-NMPs

Synthese von 2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidindiphosphat als Ammoniumsalz (d4TDP) 4a

Die Reaktion wurde unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt, um Luftfeuchtigkeit und Sauerstoff auszuschließen. Es wurden 185 mg (0.434 mmol) 5-Chlor-cycloSal-d4TMP mit 6 mL abs. Acetonitril koevaporiert. Daraufhin wurde 5-Chlor-cycloSal-d4TMP in 20 mL abs. DMF aufgenommen und mit 441 mg (1.3 mmol, 3 Äq.) Bis-(*tetra-n-butylammonium*)-hydrogen-phosphat versetzt. Das Hydrogenphosphat wurde vorher drei Stunden im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die Lösung rührte für 26 Stunden bei 48 °C bevor ein vollständiger Verbrauch des 5-Chlor-cycloSal-d4TMP dünnschichtchromatographisch festgestellt wurde (Dichlormethan/Methanol 9:1, v/v). Daraufhin wurde das DMF im Vakuum entfernt. Das Rohgemisch wurde in Wasser aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigte wässrige Phase wurde über Nacht gefriergetrocknet. Der so erhaltene hygroskopische Feststoff wurde nach **AAV 11** Variante B umgesalzen und erneut gefriergetrocknet. Das so erhaltene Rohgemisch an Ammoniumsalzen wurde in wenig Wasser aufgenommen und zweimal über RP-18 Kieselgel chromatographiert (Wasser).

Ausbeute: 149.3 mg (0.356 mmol) einer farblosen Watte

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]= 7.62 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H-6), 6.95 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.3 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H-1'), 6.52 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, H-3'), 5.94 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.2 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.5 Hz, H-2'), 5.13-5.07 (m, 1H, H-4'), 4.13 (dd, 2H, ³J_{HH} = 6.5 Hz, ³J_{HH} = 3.5 Hz, H-5'), 1.88 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O) δ [ppm]= 167.2 (C-4), 152.6 (C-2), 145.8 (C-3), 138.5 (C-6), 134.6 (C-3'), 125.5 (C-2'), 111.8 (C-5), 90.4 (C-1'), 86.4 (d, ³J_{CP} = 8.6 Hz, C-4'), 66.7 (d, ²J_{CP} = 6.0 Hz, C-5'), 11.7 (Me); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, D₂O) δ [ppm]= -10.61 (d, 1P, ²J_{PP} = 21 Hz, P-α), -11.87 (d, 1P, ²J_{PP} = 21 Hz, P-β); **UV** (HPLC): λ_{max} [nm]= 265, HPLC: t_R= 8.29 min, Methode 9; **R_f-Wert**: 0.75 (0.1 M Ammoniumacetat in Wasser/Isopropanol, 2:1 v/v), 0.16 (0.1 M Ammoniumacetat in Wasser/Isopropanol, 1:2 v/v); Molgewicht: 418.23; Summenformel: C₁₀H₂₀N₄O₁₀P₂



Synthese von d4TDP als tetra-*n*-Butylammoniumsalz 4b durch Ionenaustausch

Nach **AAV 11** Variante A wurden 50 mg (0.114 mmol) Bis-ammonium-2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidindiphosphat in die protonierte Form überführt und mit 199.65 mg tetra-*n*-

Butylammoniumhydroxid (40%ige Lösung in Wasser) titriert. Das Produkt wurde nach Gefriertrocknung erhalten.

Ausbeute: 219.6 mg (0.302 mmol) eines hygroskopischen Harzes

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 7.65 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, H-6), 6.98 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 3.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.4 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 1.9 Hz, H-1'), 6.58 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, H-3'), 5.82 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 6.2 Hz, ^{3/4}J_{HH} = 2.3 Hz, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, H-2'), 5.01-4.96 (m, 1H, H-4'), 4.35-4.27 (m, 1H, H-5'), 4.20-4.13 (m, 1H, H-5'), 3.28-3.18 (m, 24H, H-A), 1.91 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, Me), 1.71-1.60 (m, 24H, H-B), 1.42 (tq, 24H, H-C), 1.02 (t, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 36H, H-D); **¹³C-NMR** (101 MHz, CD₃OD) δ [ppm]= 155.7 (C-2), 138.2 (C-6), 136.0 (C-3'), 127.1 (C-2'), 112.3 (C-5), 91.1 (C-1'), 87.3 (d, ³J_{CP} = 8.4 Hz, C-4'), 67.7 (d, ²J_{CP} = 6.0 Hz, C-5'), 59.5 (pt, C-A), 24.7 (C-B), 20.6 (C-C), 13.8 (C-D), 13.0 (Me); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, CD₃OD) δ [ppm]= -9.24 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.2 Hz, P-α), -10.65 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.2 Hz, P-β); **UV** (HPLC): λ_{max} = 265 nm, HPLC: t_R = 8.29 min, Methode 9; Die Messung eines HR-MS gelang trotz mehrfacher Versuche nicht; Molgewicht: 867.08; Summenformel: C₄₂H₈₄N₄O₁₀P₂

Versuch der direkten Synthese von Tetra-*n*-butylammonium-d4TDP 4b

Die Reaktion wurde unter einer Schutzgasatmosphäre durchgeführt, um Luftfeuchtigkeit und Sauerstoff auszuschließen. Es wurden 1.19 g (2.06 mmol, 2 Äq.) Bis-(*tetra-n-butylammonium*)-hydrogenphosphat 1.5 d im Ölpumpenvakuum getrocknet und in 22 mL abs. DMF aufgenommen und mit Molsieb 0.4 nm versetzt. Diese Suspension wurde auf 40 °C erwärmt, um das Hydrogenphosphat vollständig zu lösen. Diese Lösung wurde tropfenweise mit einer Lösung aus 440 mg (1.03 mmol, 1 Äq.) 5-Chlor-*cycloSal*-d4TMP, in 2.5 mL abs. DMF, über eine Stunde hinweg versetzt und anschließend bei Rt gerührt. Die Reaktion war bereits nach 90 min beendet. DMF wurde im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohgemisch sollte über Sephadex G15 (0.45 L) gereinigt werden. Das Sephadex G15 war zuvor mit Wasser äquilibriert worden. Es konnten auf diese Weise keine reinen Produktfraktionen erhalten werden. Von einem weiteren Versuch wurde abgesehen. Es wurde wie oben beschrieben ein Ionentausch auf Ammonium vorgenommen und an RP-18 Kieselgel gereinigt.

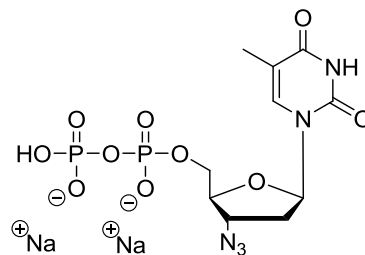
Synthese von 3'-Azido-3'-desoxythymidindiphosphat als Natriumsalz (AZTDP) 7

Die Reaktion wurde unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt, um Luftfeuchtigkeit und Sauerstoff auszuschließen. Es wurden 400 mg (0.853 mmol, 1 Äq.) 5-Chlor-*cycloSal*-AZTMP über Nacht an der Lyophille getrocknet, in 6 mL abs. DMF aufgenommen und in

einem Tropftrichter über Molsieb (0.4 nm) für eine Stunde gelagert. Unterdessen wurden 884 mg (2.71 mmol, 3.2 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)hydrogenphosphat (mehrere Tage im Ölpumpenvakuum getrocknet) in 20 mL abs. DMF aufgenommen und für zwei Stunden über Molsieb (0.4 nm) gelagert. Nun wurde das 5-Chlor-*cyclo*Sal-AZTMP zu dem gelösten Hydrogenphosphat getropft. Das Molsieb wurde mit 4 mL abs. DMF gespült. Nach vier Stunden Rühren bei Rt konnte bereits ein vollständiger Verbrauch des 5-Chlor-*cyclo*Sal-AZTMP dünnschichtchromatographisch festgestellt werden (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v). Daraufhin wurde die Reaktionslösung in einen Einhalskolben überführt, mit Ethylacetat nachgespült und die Lösungsmittel nacheinander am Rotationsverdampfer und im Vakuum (Ölpumpe) entfernt. Das so erhaltene Rohgemisch wurde in Wasser aufgenommen und über Nacht gefriergetrocknet. Der so erhaltene hygroscopische Feststoff wurde nach **AAV 12** Variante B umgesalzen und erneut gefriergetrocknet. In diesem Falle wurde das Ionentauscherharz nach **AAV 8** mit Natriumionen beladen. Das so erhaltene Rohgemisch wurde in wenig Wasser aufgenommen und über RP-18 Kieselgel chromatographiert (Wasser).

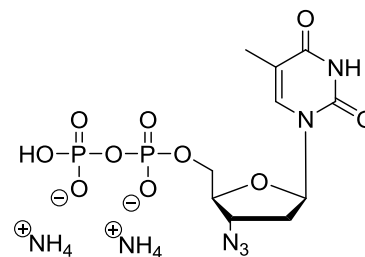
Ausbeute: 126 mg (0.265 mmol, 32%) farblose Watte über zwei Stufen

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]= 7.75 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, H-6), 6.26 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.8, ³J_{HH} = 6.8, H-1'), 4.59 (ddd, 1H, ³J_{HH} = 4.0 Hz, ³J_{HH} = 4.0 Hz, ³J_{HH} = 6.3 Hz, H-3'), 4.27-4.17 (m, 3H, H-4', H-5'), 2.57-2.44 (m, 2H, H-2'), 1.92 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, Me); **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O) δ [ppm]= 166.6 (C-4), 151.7 (C-2), 137.3 (C-6), 111.8 (C-5), 84.9 (C-1'), 83.1 (d, ³J_{CP} = 9.1 Hz, C-4'), 65.5 (d, ²J_{CP} = 5.6 Hz, C-5'), 60.9 (C-3'), 36.3 (C-2'), 11.6 (Me); **³¹P-NMR** (162 MHz, ¹H-entkoppelt, D₂O) δ [ppm]= -10.39 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.5 Hz, P-α), -11.48 (d, 1P, ²J_{PP} = 20.5 Hz, P-β); **UV** (HPLC): λ_{max} = 265 nm, HPLC: t_R = 8.15 min, Methode 9; **R_F-Wert**: 0.6 (0.1 M Ammoniumacetat in Wasser/Isopropanol, 2:1 v/v); **HR-MS** (ESI neg.): ber. 427.0294 [M], 426.0221 [M-H⁻], gef. 426.0224 [M-H⁻], Molgewicht: 471.16 (ber. für 2 Natriumionen, 1 Proton); Summenformel: C₁₀H₁₃N₅Na₂O₁₀P₂



Synthese von 3'-Azido-3'-desoxythymidindiphosphat als Ammoniumsalz (AZTDP) 7a

Die Reaktion wurde unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt, um Luftfeuchtigkeit und Sauerstoff auszuschließen. Es wurden 145 mg (0.31 mmol, 1 Äq.) 5-Chlor-*cycloSal*-AZTMP zweimal mit je 5 mL abs. Acetonitril koevaporiert. Daraufhin wurde in ca. 8 mL abs. DMF aufgenommen. 209 mg (0.62 mmol, 2 Äq.) Bis-(tetra-*n*-butylammonium)hydrogenphosphat

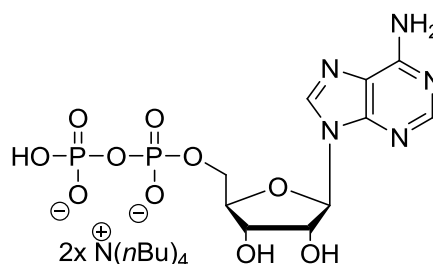


(mehrere Tage im Ölpumpenvakuum getrocknet) wurden in 11 mL abs. DMF aufgenommen und zwei Stunden über Molsieb (0.4 nm) gelagert. Das fast gelöste Hydrogenphosphat wurde nun langsam (ca. 1 h lang) zu dem gelösten 5-Chlor-*cycloSal*-AZTMP getropft. Das Molsieb wurde mit 2 mL abs. DMF gespült. Die Lösung rührte 19 Stunden bei Rt bevor ein vollständiger Verbrauch des 5-Chlor-*cycloSal*-AZTMP dünnschichtchromatographisch festgestellt wurde (Dichlormethan/Methanol, 9:1 v/v). Daraufhin wurde die Reaktionslösung in einen Einhalskolben überführt und das DMF am Rotationsverdampfer (Ölpumpe) entfernt und weitere 2 h im Vakuum getrocknet. Das so erhaltene Rohgemisch wurde in Wasser aufgenommen und mehrmals mit Dichlormethan gewaschen. Die wässrige Phase wurde über Nacht gefriergetrocknet. Der so erhaltene hygroskopische Feststoff (250 mg) wurde nach **AAV 11** Variante B umgesalzen und erneut gefriergetrocknet. Das so erhaltene Rohgemisch (155 mg) wurde in wenig Wasser aufgenommen und zweimal über RP-18 Kieselgel chromatographiert (Wasser).

Ausbeute: 81 mg (0.17 mmol, 56%) farblose Watte über zwei Stufen

Synthese von Bis(tetra-*n*-butylammonium)-adenosindiphosphat

Nach **AAV 11** Variante A wurden 160 mg (0.344 mmol, 1 Äq.) Monokaliumadenosindiphosphatdihydrat in die protonierte Form gebracht und mit 729 mg (1.125 mmol, 3 Äq.) Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid bis zu einem pH-Wert von 5 titriert. Aus dem Protonenspektrum ergeben sich 2.5 Tetra-*n*-butylammoniumionen.



Ausbeute: 283 mg (0.311 mmol, 98%) gelbliches hygroskopisches Harz

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm]= 8.57 (s, 1H, H-8), 8.24 (s, 1H, H-2), 6.12 (d, ³J_{HH} = 5.2 Hz, 1H, H-1'), 4.75 (dd, ³J_{HH} = 4.5 Hz, ³J_{HH} = 5.2 Hz, 1H, H-2'), 4.64 (dd, ³J_{HH} = 4.2 Hz,

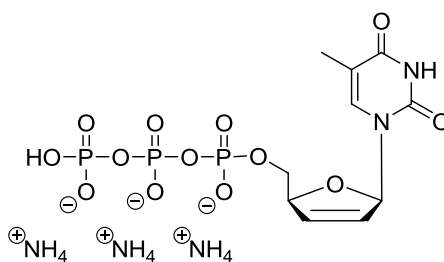
$^3J_{\text{HH}} = 4.8$ Hz, 1H, H-3'), 4.40-4.33 (m, 1H, H-4'), 4.32-4.24 (m, 1H, H-5'a), 4.22-4.14 (m, 1H, H-5'b), 3.25-3.08 (m, 16H, H-A), 1.69-1.59 (m, 16H, H-B), 1.35 (sext., 16H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-C), 0.94 (t, 24H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, H-D); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, D_2O) δ [ppm]= -6.29 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 23.0$ Hz, P- α), -10.92 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 22.7$ Hz, P- β); Molgewicht [g/mol]: 910.11; Summenformel: $\text{C}_{42}\text{H}_{85}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{P}_2$

Synthese von 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidintriphosphat als Ammoniumsalz (d4TTP) 5a

Die Reaktion wurde unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt, um Luftfeuchtigkeit und Sauerstoff auszuschließen. Es wurden 106 mg (0.243 mmol) 5-Nitro-cycloSal-d4TMP mehrere Tage im Vakuum der Ölpumpe getrocknet. Unmittelbar vor der Reaktion wurde weitere 45 min getrocknet und der Triester dann in 2 mL abs. DMF aufgenommen. Es wurden einige Körner Molsieb (0.4 nm) zugesetzt. Diese Lösung wurde zu einer Lösung aus 320 mg (0.485 mmol, 2 Äq.) Bis-(*tetra-n-butylammonium*)-hydrogen-phosphat in 6 mL abs. DMF über 15 min tropfenweise zugegeben. Es wurde zweimal mit je 2 mL abs. DMF nachgespült. Die Reaktion war bereits nach einer Stunde beendet (DC-Kontrolle, Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v). Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum (Rotationsverdampfer) entfernt. Das erhaltene Öl wurde in Wasser aufgenommen und zweimal mit Ethylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde gefriergetrocknet. *Ionentausch*: Der erhaltene hygroskopische Feststoff wurde in Wasser aufgenommen und nach **AAV 11** Variante B umgesetzt. Die mehrmalige Chromatographie wurde an einer RP-18 Phase durchgeführt.

Ausbeute: 18 mg (0.035 mmol, 14%) eines gelblichen Harzes

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ [ppm]= 7.63 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, H-6), 6.96 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, H-1'), 6.55 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, H-3'), 5.96-5.93 (m, H-2'), 5.15-5.10 (m, 1H, H-4'), 4.25-4.12 (m, 1H, H-5'), 1.90 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C-NMR}$



(126 MHz, D_2O) δ [ppm]= 166.7 (C-4), 152.3 (C-2), 138.2 (C-6), 134.4, 134.6 (C-3'), 125.1 (C-2'), 111.5 (C-5), 89.9 (C-1'), 85.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.6$ Hz, C-4'), 66.5, 66.7 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.6$ Hz, C-5'), 11.5 (Me); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, D_2O) δ [ppm]= -10.27 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 19.9$ Hz, P- α), -11.47 (d, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 19.9$ Hz, P- γ), -23.08 (t, 1P, $^2J_{\text{PP}} = 19.9$ Hz, $^2J_{\text{PP}} = 19.9$ Hz, P- β); **UV** (HPLC): $\lambda_{\text{max}} = 265$ nm, HPLC: $t_{\text{R}} = 9.01$ min, Methode 9; Die Messung eines

HR-MS gelang trotz mehrfacher Versuche nicht; **R_f-Wert:** 0.79 (0.1 M Ammoniumacetat in Wasser/Isopropanol, 2:1 v/v); Molgewicht: 515.24; Summenformel: C₁₀H₂₄N₅O₁₃P₃

7.3 Hydrolysestudien

Verwendete Puffer und Lösungen

50 mM Phosphatpuffer nach Sørensen (pH= 6.8, pH= 7.3, pH= 7.5, pH= 8.7)

Es wurden 155 mg Kaliumdihydrogenphosphat und 547 mg Dinatriumhydrogenphosphat eingewogen und mit deionisiertem Wasser auf 100 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde kontrolliert und entsprechend mit Phosphorsäure bzw. Natronlauge (2M) eingestellt.

50 mM Citrat-HCl-Puffer (pH= 2.0)

Es wurden 1.22 g Ammoniumcitrat in 100 mL deionisiertem Wasser gelöst und mit konz. Salzsäure auf pH= 2.0 eingestellt.

pH abhängige Hydrolysekinetiken

Es wurden 50 mM Stammlösungen der zu untersuchenden Verbindungen in DMSO-d₆ angesetzt. Für die Prodrugs wurden von diesen Stammlösungen je 11 µL mit 100 µL bidest. Wasser und weiteren 189 µL DMSO verdünnt, so dass 300 µL einer 1.9 mM Hydrolyse-Stammlösungen erhalten wurden. Alternativ wurden je 6 µL mit 50 µL bidest. Wasser und weiteren 94 µL DMSO verdünnt, so dass 150 µL einer 1.9 mM Hydrolyse-Stammlösungen erhalten wurden. Für Nucleoside, Nucleosidmono-, di- und triphosphate wurden von der 50 mM Stammlösung je 11 µL mit 189 µL bidest. Wasser und weiteren 100 µL DMSO-d₆ verdünnt, so dass 300 µL einer 1.9 mM Hydrolyse-Stammlösungen erhalten wurden.

Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 150 µL bzw. 300 µL Phosphatpufferlösung (PBS, 50 mM, pH=7.3) gestartet (Hydrolyselösung 0.94 mM). Auf die Zugabe eines internen Standards musste verzichtet werden. Nach kurzem Durchmischen (Vortex) wurden die Proben in einem Thermomixer bei 37 °C inkubiert. Es wurden nun nach verschiedenen Zeiträumen Aliquote der Kinetiklösung entnommen (je 30 µL) und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden einzeln aufgetaut und sofort analysiert. Hierzu wurden 20 µL in die analytische HPLC injiziert. Je nach Lipophilie der zu untersuchenden Verbindung wurde eine bestimmte Methode verwendet. Zur Auswertung der Kinetiken wurden die Chromatogramme bei verschiedenen UV-Wellenlängen ausgewertet. Die Peakflächen wurden gegen die Hydrolysedauer graphisch aufgetragen. Zur Auswertung wurden mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms exponentielle Ausgleichskurven durch die einzelnen Messpunkte gelegt, so dass die Geschwindigkeitskonstanten k der Hydrolysen ermittelt werden konnten. Die Hydrolysehalbwertszeiten konnten nun mit der

Formel $t_{1/2} = \ln 2 / k$ ermittelt werden. Es wird vorausgesetzt, dass es sich bei großem Wasserüberschuss um Kinetiken Pseudo-erster-Ordnung handelte. Dies wurde für alle Kinetiken angenommen; sowohl für die Hydrolyse der ersten, als auch für die zweite Bis-(acyloxy)benzyleinheit der Di- bzw. triphosphat-Prodrugs. Die Hydrolysehalbwertszeit für die zweite Bis-(acyloxy)benzyleinheit wurde nach kompletter Umwandlung des Eduktes in das Hydrolyseintermediat wie beschrieben ermittelt. Diese Versuche wurden analog für die Ermittlung der Hydrolysehalbwertszeiten bei anderen pH-Werten durchgeführt (2.0, 6.8, 7.3, 8.7).

Hydrolysekinetiken in Zellextrakten

Es wurden 30 μL der 50 mM DMSO-Stammlösung der Verbindungen mit 220 μL DMSO auf eine Konzentration von 6.0 mM verdünnt. Im Folgenden wurden 100 μL Zellextrakt (CEM/0 für d4T, P3HR1 für BVdU, HepG2 für 2'-F-2'-Methyluridinderivate und 2'-Methyluridinderivate, Mausleberextrakt für verschiedene Verbindungen) mit 20 μL 70 mM Magnesiumchloridlösung versetzt und 20 μL der 6.0 mM Stammlösung hinzu pipettiert. Durch kurzes Durchmischen (Vortex) wurde die Hydrolyse gestartet. Es wurde für jeden Messwert eine solche Hydrolyselösung angesetzt und bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Nach den entsprechenden für eine Messung gewählten Zeiträumen wurden die Hydrolysen durch Zugabe von 300 μL Methanol abgebrochen, für 5 min bei 0 °C gelagert und anschließend für 10-15 min im Ultraschallbad behandelt. Danach erfolgte Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde in Spritzen aufgenommen und filtriert (Schleicher & Schuell Spartan 13/30, 0.2 μm) und in flüssigem Stickstoff eingefroren (-196 °C). Die Proben wurden separat aufgetaut und sofort vermessen. Hierfür wurden 90 μL in die analytische HPLC injiziert. Die Auswertung erfolgte wie bei der pH-abhängigen Hydrolyse (s. pH-abhängige Hydrolyse). *Anmerkung:* Die hier beschriebene Prozedur weicht von der bisher in der Arbeitsgruppe verwendeten Vorschrift ab (Ultraschallbad). Dieser zusätzliche Schritt ist notwendig, um dass entsprechende Prodrug vom gefällten Protein zu separieren. Um den Schritt des Ultraschallbades zu umgehen wurden andere Lösungsmittel (Acetonitril, Ethanol, Isopropanol) verwendet. Das Prodrug konnte nur nach Behandlung mit Ultraschall nach Zentrifugation und Filtration quantitativ im Überstand detektiert werden.

Hydrolysekinetiken in humanem Blutplasma

Die Hydrolysekinetiken in humanem Blutplasma erfolgten analog den Kinetiken in Zellextrakten. Anstelle des Zellextraktes wurde verdünntes Blutserum (20% in 50 mM PBS pH 6.8) zu den Proben gegeben.

Hydrolysekinetiken in Kulturmedium

Die Hydrolysekinetiken in Kulturmedium erfolgten analog den Kinetiken in Zellextrakten. Anstelle des Zellextraktes wurde (RPMI oder RPMI+10% hitzedeaktiviertes fötales Kälberserum (FCS)) zugegeben. Es wurden auch Versuche mit 10% FCS in Phosphatpuffer (6.8, 50 mM) bei einigen Verbindungen durchgeführt.

³¹P-NMR Hydrolyseuntersuchungen

Es wurden ca. 10-15 mg der zu untersuchenden Verbindung in 350 µL DMSO-d₆ gelöst und mit 350 µL 50 mM PBS-Puffer des gewünschten pH Wertes versetzt. Die Proben wurden bei Rt oder 37 °C (s. Experiment) aufbewahrt und regelmäßig NMR-spektroskopisch untersucht. Soll aus der Hydrolyselösung eines Di- oder Triphosphat-Prodrugs ein Hydrolyseintermediat durch Chromatographie isoliert werden, sollte die Verbindung als Ammoniumsalz eingesetzt werden. Dies erleichtert die Chromatographie um ein Vielfaches.

8 Literaturverzeichnis

- [1] http://www.unaids.org/globalreport/Epi_slides.htm (letzter Zugriff 14.10.2011).
Joint United Nations Program on HIV/AIDS (UNAIDS)
- [2] F. Barre-Sinoussi, J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, L. Montagnier, Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, 220, 868-871.
- [3] R.C. Gallo, P.S. Sarin, E.P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V.S. Kalyanaraman, D. Mann, G.D. Sidhu, R.E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, M. Popovic, Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, 220, 865-867.
- [4] R.C. Gallo, S.Z. Salahuddin, M. Popovic, G.M. Shearer, M. Kaplan, B.F. Haynes, T.J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, et al., Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **1984**, 224, 500-503.
- [5] J. Sodroski, W.C. Goh, C. Rosen, K. Campbell, W.A. Haseltine, Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* **1986**, 322, 470-474.
- [6] R.E. Hussey, N.E. Richardson, M. Kowalski, N.R. Brown, H.-C. Chang, R.F. Siliciano, T. Dorfman, B. Walker, J. Sodroski, E.L. Reinherz, A soluble CD4 protein selectively inhibits HIV replication and syncytium formation. *Nature* **1988**, 331, 78-81.
- [7] <http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/pages/hivreplicationcycle.aspx> (letzter Zugriff 14.10.2011).
- [8] R.J. Pomerantz, D.L. Horn, Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat. Med.* **2003**, 9, 867-73.
- [9] D. Finzi, M. Hermankova, T. Pierson, L.M. Carruth, C. Buck, R.E. Chaisson, T.C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D.D. Ho, D.D. Richman, R.F. Siliciano, Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* **1997**, 278, 1295-1300.
- [10] T.F. Zhu, N. Wang, A. Carr, D.S. Nam, R. Moor Jankowski, D.A. Cooper, D.D. Ho, Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and

- genital secretions: Evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J. Virol.* **1996**, *70*, 3098-3107.
- [11] J.K. Wong, M. Hezareh, H.F. Gunthard, D.V. Havlir, C.C. Ignacio, C.A. Spina, D.D. Richman, Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* **1997**, *278*, 1291-1295.
- [12] S. Haggerty, M. Stevenson, Predominance of distinct viral genotypes in brain and lymph node compartments of HIV-1-infected individuals. *Viral Immunol.* **1991**, *4*, 123-31.
- [13] G. Pialoux, S. Fournier, A. Moulignier, J.D. Poveda, F. Clavel, B. Dupont, Central nervous system as a sanctuary for HIV-1 infection despite treatment with zidovudine, lamivudine and indinavir. *AIDS* **1997**, *11*, 1302-3.
- [14] C. Hoffmann, J.K. Rockstroh, *HIV 2010*, Medizin Fokus Verlag, Hamburg, **2010**.
- [15] C. Ezzell, AIDS drug gets green light. *Nature* **1987**, *329*, 751-751.
- [16] S. Broder, The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 1-18.
- [17] P.A. Furman, D.W. Barry, Spectrum of antiviral activity and mechanism of action of Zidovudine - An Overview. *Am. J. Med.* **1988**, *85*, 176-181.
- [18] D.D. Richman, HIV chemotherapy. *Nature* **2001**, *410*, 995-1001.
- [19] T. Cihlar, A.S. Ray, Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 39-58.
- [20] D.D. Richman, M.A. Fischl, M.H. Grieco, M.S. Gottlieb, P.A. Volberding, O.L. Laskin, J.M. Leedom, J.E. Groopman, D. Mildvan, M.S. Hirsch, The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N. Engl. J. Med.* **1987**, *317*, 192-197.
- [21] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 5 Aufl., W. H. Freeman & Company, New York, **2002**.
- [22] B.G. Turner, M.F. Summers, Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1-32.
- [23] P. Sinelton, D. Sainsbury, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, John Wiley & Sons LTD, Chichester, **2001**.
- [24] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2004**.
- [25] S. Modrow, D. Falke, *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1998**.

- [26] G. Löffler, P.E. Petrides, P.C. Heinrich, *Biochemie und Pathobiochemie*; 8 Aufl., Springer Medizinverlag, Heidelberg, **2006**.
- [27] J.A. Esté, T. Cihlar, Current status and challenges of antiretroviral research and therapy. *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 25-33.
- [28] H. Mitsuya, K.J. Weinhold, P.A. Furman, M.H. St Clair, S.N. Lehrman, R.C. Gallo, D. 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. U. S. A.* **1985**, *82*, 7096-7100.
- [29] P.A. Furman, J.A. Fyfe, M.H. St Clair, K. Weinhold, J.L. Rideout, G.A. Freeman, S.N. Lehrman, D.P. Bolognesi, S. Broder, H. Mitsuya, Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 8333-8337.
- [30] J. Balzarini, Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine derivatives. *Pharm. World Sci.* **1994**, *16*, 113-26.
- [31] J. Balzarini, P. Herdewijn, E. de Clercq, Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6127-33.
- [32] D. Deville-Bonne, C. el Amri, P. Meyer, Y. Chen, L.A. Agrofoglio, J. Janin, Human and viral nucleoside/nucleotide kinases involved in antiviral drug activation: Structural and catalytic properties. *Antiviral Res.* **2010**, *86*, 101-120.
- [33] E. de Clercq, Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 13-25.
- [34] B. Schneider, R. Biondi, R. Sarfati, F. Agou, C. Guerreiro, D. Deville-Bonne, M. Veron, The Mechanism of phosphorylation of anti-HIV d4T by Nucleoside Diphosphate Kinase. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 948-953.
- [35] C.R. Wagner, V.V. Iyer, E.J. McIntee, Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417-51.
- [36] A. Cournil, M. Coudray, C. Kouanfack, C.N. Essomba, C.A.D. Tonfack, M. Biwolé-Sida, E. Delaporte, K. Bork, C. Laurent, Reduced dose of stavudine and lipoatrophy in HIV-infected patients in Cameroon. *AntiViral Ther.* **2010**, *15*, 1039-1043.
- [37] H. Ait-Mohand, M. Bonmarchand, M. Guiguet, L. Slama, F. Marguet, A. Behin, B. Amellal, Y. Bennai, G. Peytavin, V. Calvez, G. Pialoux, R. Murphy, C. Katlama, Viral

- efficacy maintained and safety parameters improved with a reduced dose of stavudine: a pilot study. *HIV Medicine* **2008**, *9*, 738-746.
- [38] A. Lavie, I. Schlichting, I.R. Vetter, M. Konrad, J. Reinstein, R.S. Goody, The bottleneck in AZT activation. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 922-924.
- [39] A. Lavie, I.R. Vetter, M. Konrad, R.S. Goody, J. Reinstein, I. Schlichting, Structure of thymidylate kinase reveals the cause behind the limiting step in AZT activation. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 601-604.
- [40] N. Ostermann, D. Segura-Peña, C. Meier, T. Veit, C. Monnerjahn, M. Konrad, A. Lavie, Structures of Human Thymidylate Kinase in complex with Prodrugs: Implications for the structure-based design of novel compounds. *Biochemistry* **2003**, *42*, 2568-2577.
- [41] J.A. Harrington, J.E. Reardon, T. Spector, 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) monophosphate: an inhibitor of exonucleolytic repair of AZT-terminated DNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 918-20.
- [42] J.P. Sommadossi, R. Carlisle, Z. Zhou, Cellular pharmacology of 3'-azido-3'-deoxythymidine with evidence of incorporation into DNA of human bone marrow cells. *Mol. Pharmacol.* **1989**, *36*, 9-14.
- [43] J.P. Sommadossi, R. Carlisle, Toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine for normal human hematopoietic progenitor cells in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, *31*, 452-4.
- [44] J.-P. Yan, D.D. Ilesley, C. Frohlick, R. Steet, E.T. Hall, R.D. Kuchta, P. Melancon, 3'-Azidothymidine (zidovudine) inhibits glycosylation and dramatically alters glycosphingolipid synthesis in whole cells at clinically relevant concentrations. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22836-41.
- [45] A. Albert, Chemical aspects of selective toxicity. *Nature* **1958**, *182*, 421-423.
- [46] C. Meier, Pro-Nucleotides - Recent advances in the design of efficient tools for the delivery of biologically active nucleoside monophosphates. *Synlett* **1998**, 233-242.
- [47] A. Pompon, I. Lefebvre, J.L. Imbach, S. Kahn, D. Farquhar, Decomposition pathways of the mono- 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*, 91-8.
- [48] 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*, 441-5.

- [49] D. Farquhar, S. Khan, D.N. Srivastva, P.P. Saunders, Synthesis and antitumor evaluation of Bis[(pivaloyloxy)methyl] 2'-Deoxy-5-fluorouridine 5'-Monophosphate (FdUMP): A strategy to introduce nucleotides into cells. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3902-3909.
- [50] C. Périgaud, G. Gosselin, I. Lefebvre, J.-L. Girardet, S. Benzaria, I. Barber, J.-L. Imbach, Rational design for cytosolic delivery of nucleoside monophosphates: "SATE" and "DTE" as enzyme-labile transient phosphate protecting groups. *Bioorg. Med. Chem.* **1993**, *3*, 2521-2526.
- [51] S. Peyrottes, D. Egron, I. Lefebvre, G. Gosselin, J.L. Imbach, C. Perigaud, SATE pronucleotide approaches: an overview. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 395-408.
- [52] I. Lefebvre, C. Perigaud, A. Pompon, A.-M. Aubertin, J.-L. Girardet, A. Kirn, G. Gosselin, J.-L. Imbach, Mononucleoside 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.
- [53] W. Thomson, D. Nicholls, W.J. Irwin, J.S. Al-Mushadani, S. Freeman, A. Karpas, J. Petrik, N. Mahmood, A.J. Hay, Synthesis, bioactivation and anti-HIV activity of the bis(4-acyloxybenzyl) and mono(4-acyloxybenzyl) esters of the 5'-monophosphate of AZT. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 1239-45.
- [54] C. McGuigan, R.N. Pathirana, N. Mahmood, K.G. Devine, A.J. Hay, Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV-1 in cell lines which are resistant to the action of AZT. *Antiviral Res.* **1992**, *17*, 311-321.
- [55] C. McGuigan, R.N. Pathirana, J. Balzarini, E. de Clercq, Intracellular delivery of bioactive AZT nucleotides by aryl phosphate derivatives of AZT. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1048-1052.
- [56] Y. Mehellou, J. Balzarini, C. McGuigan, An investigation into the anti-HIV activity of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyuridine (d4U) and 2',3'-dideoxyuridine (ddU) phosphoramidate 'ProTide' derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2548-2553.
- [57] M.D. Erion, K.R. Reddy, S.H. Boyer, M.C. Matelich, J. Gomez-Galeno, R.H. Lemus, B.G. Ugarkar, T.J. Colby, J. Schanzer, P.D. van Poelje, Design, synthesis, and characterization of a series of cytochrome P450 3A-activated Prodrugs (HepDirect Prodrugs) Useful for targeting phosph(on)ate-based drugs to the liver. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5154-5163.

- [58] M.D. Erion, D.A. Bullough, C.-C. Lin, Z. Hong, HepDirect prodrugs for targeting nucleotide-based antiviral drugs to the liver. *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2006**, *7*, 109-117.
- [59] B.M. Liederer, R.T. Borchardt, Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 1177-1195.
- [60] C. Perigaud, G. Gosselin, J.-L. Imbach, Minireview: from the pronucleotide concept to the SATE phosphate protecting groups. *Curr. Top. Med. Chem.* **1997**, *2*, 15-29.
- [61] C. Meier, 2-Nucleos-5'-O-yl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphinin-2-oxides A new concept for lipophilic, potential Prodrugs of biologically active nucleoside monophosphates. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1996**, *35*, 70-72. C. Meier, 2-Nucleos-5'-O-yl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphinin-2-oxide ein neues Konzept für lipophile, potentielle Prodrugs biologisch' aktiver Nucleosidmonophosphate, *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 77-79.
- [62] 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.
- [63] C. Meier, E. de Clercq, J. Balzarini, Nucleotide delivery from *cycloSaligenyl-3'-azido-3'-deoxythymidine monophosphates (cycloSal-AZTMP).* *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *1998*, 837-846.
- [64] 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.
- [65] C. Meier, T. Knispel, V.E. Marquez, M.A. Siddiqui, E. De Clercq, J. Balzarini, *cycloSal-Pronucleotides of 2'-Fluoro-ara- and 2'-Fluoro-ribo-2',3'- dideoxyadenosine as a strategy to bypass a metabolic blockade.* *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1615-1624.
- [66] C. Meier, A. Lomp, A. Meerbach, P. Wutzler, *cycloSal-BVDUMP Pronucleotides: How to convert an antiviral-inactive nucleoside analogue into a bioactive compound against EBV.* *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5157-5172.
- [67] M. Ruppel. *Dissertation 2003*, Universität Hamburg.
- [68] C. Ducho. *Dissertation 2005*, Universität Hamburg.
- [69] D. V.-Tenter. *Dissertation 2008*, Universität Hamburg.
- [70] H.J. Jessen. *Dissertation 2008*, Universität Hamburg.
- [71] N. Gisch. *Dissertation 2008*, Universität Hamburg.

- [72] N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, Studies on enzyme-cleavable dialkoxymethyl-*cycloSaligenyl-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine* monophosphates. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6752-6760.
- [73] H.J. Jessen, J. Balzarini, C. Meier, Intracellular Trapping of *cycloSal*-Pronucleotides: Modification of prodrugs with amino acid esters. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6592-6598.
- [74] T. Schulz. *Diplomarbeit* **2007**, Universität Hamburg.
- [75] E.H. Rios Morales, C. Arbelo Roman, J.O. Thomann, C. Meier, Linear synthesis of chiral *cycloSal*-Pronucleotides. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4397-4408.
- [76] E.H. Rios Morales, J. Balzarini, C. Meier, Diastereoselective synthesis of *cycloSaligenyl-Nucleosyl-Phosphotriesters*. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1649-1659.
- [77] C. Arbelo Roman, J. Balzarini, C. Meier, Diastereoselective Synthesis of Aryloxy Phosphoramidate Prodrugs of 3'-Deoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphate. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7675-7681.
- [78] C. Arbelo Roman, P. Wasserthal, J. Balzarini, C. Meier, Diastereoselective Synthesis of (Aryloxy)phosphoramidate Prodrugs. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4899-4909.
- [79] S. Warnecke, C. Meier, Synthesis of nucleoside di- and triphosphates and dinucleoside polyphosphates with *cycloSal*-Nucleotides. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3024-3030.
- [80] S. Wendicke, S. Warnecke, C. Meier, Efficient synthesis of nucleoside diphosphate glycopyranoses. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 1500-1502.
- [81] S. Wolf, T. Zismann, N. Lunau, C. Meier, Reliable synthesis of various nucleoside diphosphate glycopyranoses. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7656-7664.
- [82] S. Wolf, T. Zismann, N. Lunau, S. Warnecke, S. Wendicke, C. Meier, A convenient synthesis of nucleoside diphosphate glycopyranoses and other polyphosphorylated bioconjugates. *Eur. J. Cell Biol.* **2010**, *89*, 63-75.
- [83] S. Wolf, R.M. Berrio, C. Meier, Synthesis of nonnatural nucleoside diphosphate sugars. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6304-6313.
- [84] V.C. Tonn, C. Meier, Solid-Phase synthesis of (poly)phosphorylated nucleosides and conjugates. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9832-9842.
- [85] S. Freeman, W.J. Irwin, A.G. Mitchell, D. Nicholls, W. Thomson, Bioreversible protection for the phospho group: chemical stability and bioactivation of di(4-acetoxybenzyl) methylphosphonate with carboxyesterase. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 875-877.

- [86] A. Glazier, Preparation of P-acyloxybenzyl derivatives of phosphate and phosphonate drugs as prodrugs. *WO9119721A1*, **1991**.
- [87] A.G. Mitchell, D. Nicholls, W.J. Irwin, S. Freeman, Prodrugs of phosphonoformate: the effect of para-substituents on the products, kinetics and mechanism of hydrolysis of dibenzyl methoxycarbonylphosphonate. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1992**, 1145-50.
- [88] W. Thomson, D. Nicholls, A.G. Mitchell, J.A. Corner, W.J. Irwin, S. Freeman, Synthesis and bioactivation of bis(aryloxymethyl) and mono(aryloxymethyl) esters of benzylphosphonate and phosphonoacetate. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 2303-8.
- [89] C. Meier, U. Muus, J. Renze, L. Naesens, E. De Clercq, J. Balzarini, Comparative study of bis(benzyl)phosphate triesters of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine (d4T) and *cycloSal*-d4TMP - hydrolysis, mechanistic insights and anti-HIV activity. *Antiviral Chem. Chemother.* **2002**, *13*, 101-114.
- [90] L.J. Filar, S. Winstein, Preparation and behavior of simple quinone methides. *Tetrahedron Lett.* **1960**, 9-16.
- [91] A. Glazier, M. Yanachkova, I. Yanachkova, G.E. Wright, E.R. Kern, R. Sidwell, D. Smee, M. McKeough, S.L. Spruance, *International Conference on Antiviral Research* Urabandai, Fukushima, Japan, 1996.
- [92] E. de Clercq, Hamao Umezawa Memorial Award Lecture: 'An Odyssey in the Viral Chemotherapy Field'. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2001**, *18*, 309-328.
- [93] K.Y. Hostetler, L.M. Stuhmiller, H.B.M. Lenting, H. van den Bosch, D.D. Richman, Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6112-17.
- [94] G.M.T. van Wijk, K.Y. Hostetler, H. van den Bosch, Lipid conjugates of antiretroviral agents: release of antiretroviral nucleoside monophosphates by a nucleoside diphosphate diglyceride hydrolase activity from rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* **1991**, *1084*, 307-10.
- [95] G.M.T. van Wijk, K.Y. Hostetler, M. Schlame, H. van den Bosch, Cytidine diphosphate diglyceride analogs of antiretroviral dideoxynucleosides: evidence for release of dideoxynucleoside-monophosphates by phospholipid biosynthetic enzymes in rat liver subcellular fractions. **1991**, *1086*, 99-105.
- [96] K.Y. Hostetler, D.D. Richman, D.A. Carson, L.M. Stuhmiller, G.M.T. van Wijk, H. van den Bosch, Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxythymidine diphosphate

- dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 3'-deoxythymidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 2025-9.
- [97] K.Y. Hostetler, S. Parker, C.N. Sridhar, M.J. Martin, J.L. Li, L.M. Stuhmiller, G.M.T. van Wijk, H. van den Bosch, M.F. Gardner, et al., Acyclovir diphosphate dimyristoylglycerol: a phospholipid prodrug with activity against acyclovir-resistant herpes simplex virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 11835-9.
- [98] D. Bonnaffé, B. Dupraz, J. Ughetto-Monfrin, A. Namane, T. Huynh Dinh, Synthesis of nucleotide lipophilic prodrugs containing two inhibitors targeted against different phases of the HIV replication cycle. *Nucleosides Nucleotides* **1995**, *14*, 783-787.
- [99] D. Bonnaffé, B. Dupraz, J. Ughetto-Monfrin, A. Namane, T. Huynh Dinh, Synthesis of acyl pyrophosphates. Application to the synthesis of nucleotide lipophilic prodrugs. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 531-534.
- [100] A. Kreimeyer, J. Ughetto-Monfrin, A. Namane, T. Huynh-Dinh, Synthesis of acylphosphates of purine ribonucleosides. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8739-8742.
- [101] D. Bonnaffé, B. Dupraz, J. Ughetto-Monfrin, A. Namane, Y. Henin, T. Huynh Dinh, Potential lipophilic nucleotide prodrugs: synthesis, hydrolysis, and antiretroviral activity of AZT and d4T acyl nucleotides. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 895-902.
- [102] M.L. Bryant, R.O. Heuckeroth, T.K. Jason, L. Ratner, J.I. Gordon, Replication of Human Immunodeficiency Virus 1 and Moloney Murine Leukemia Virus is inhibited by different heteroatom-containing analogs of myristic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 8655-8659.
- [103] C. Meier, *cycloSal* phosphates as chemical Trojan horses for intracellular nucleotide and glycosyl-monophosphate delivery - chemistry meets biology. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1081-1102.
- [104] R.B. Greenwald, A. Pendri, C.D. Conover, H. Zhao, Y.H. Choe, A. Martinez, K. Shum, S. Guan, Drug Delivery Systems employing 1,4- or 1,6-elimination: poly(ethylene glycol) prodrugs of amine-containing compounds. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3657-3667.
- [105] H.J. Jessen, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Bioreversible protection of nucleoside diphosphates. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8719-8722. H.J. Jessen, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Bioreversible Maskierung von Nucleosiddiphosphaten. *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8847-8850.
- [106] T. Sowa, S. Ouchi, Facile synthesis of 5'-nucleotides by the selective phosphorylation of a primary hydroxyl group of nucleosides with phosphoryl chloride. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, *48*, 2084-90.

- [107] E. Fahy, S. Subramaniam, R.C. Murphy, M. Nishijima, C.R.H. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.J.O. Wakelam, E.A. Dennis, Update of the Lipid Maps comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S9-S14.
- [108] T. Mukaiyama, F.-C. Pai, M. Onaka, K. Narasaka, A useful method for selective acylation of alcohols using 2,2'-bipyridyl-6-yl carboxylate and cesium fluoride. *Chem. Lett.* **1980**, 563-6.
- [109] P.M. Paglialunga, Z.G. Pagani, I. Torrini, Selective acylations of aminophenols and (hydroxyalkyl)phenols with 1-acetyl-*v*-triazolo[4,5-*b*]pyridine. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5029-32.
- [110] A. Saito, B. Shimizu, Synthesis of Mesoionic Triazolopyridine. III. Applications of *N*-acyl mesoionic triazolopyridines as acylating reagents. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 2974-2980.
- [111] L. Richter. *Diplomarbeit* **2010**, Universität Hamburg.
- [112] E. Uhlmann, J. Engels, Chemical 5'-phosphorylation of oligonucleotides valuable in automated DNA synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1023-6.
- [113] M.M. Mansuri, J.E. Starrett, Jr., I. Ghazzouli, M.J.M. Hitchcock, R.Z. Sterzycki, V. Brankovan, T.S. Lin, E.M. August, W.H. Prusoff, et al., 1-(2,3-Dideoxy-beta -D-glycero-pent-2-enofuranosyl)thymine. A highly potent and selective anti-HIV agent. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 461-6.
- [114] M. Lorey. *Dissertation* **2000**, Universität Hamburg.
- [115] T. Knispel. *Dissertation* **2001**, Universität Hamburg.
- [116] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, Nucleoside 5'-phosphites. *JP45011694B4*, **1970**.
- [117] S. Mohamady, D.L. Jakeman, An improved method for the synthesis of nucleoside triphosphate analogues. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10588-10591.
- [118] D.E. Hoard, D.G. Ott, Conversion of mono- and oligodeoxyribonucleotides to 5'-triphosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1785-1788.
- [119] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chem. Eng. Sci.* **1956**, *5*, 271-289.
- [120] Sephadex LH-20. *GE Healthcare*, Data File 18-1107-22 AB.
- [121] E.J. Amigues, C. Hardacre, G. Keane, M.E. Migaud, S.E. Norman, W.R. Pitner, Selective synthesis of chlorophosphoramidites using ionic liquids. *Green Chem.* **2009**, *11*, 1391-1396.

- [122] J.P. Horwitz, J. Chua, M. Noel, Nucleosides. V. The Monomesylates of 1-(2'-Deoxy- β -D-lyxofuranosyl)thymine. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 2076-2078.
- [123] H. Staudinger, J. Meyer, Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* **1919**, 2, 635-646.
- [124] F.L. Lin, H.M. Hoyt, H. van Halbeek, R.G. Bergman, C.R. Bertozzi, Mechanistic investigation of the Staudinger ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2686-2695.
- [125] T. Wada, A. Mochizuki, S. Higashiya, H. Tsuruoka, S.-i. Kawahara, M. Ishikawa, M. Sekine, Synthesis and properties of 2-azidodeoxyadenosine and its incorporation into oligodeoxynucleotides. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 9215-9219.
- [126] A. Kiviniemi, P. Virta, H. Lönnberg, Utilization of intrachain 4'-c-azidomethylthymidine for preparation of oligodeoxyribonucleotide conjugates by Click Chemistry in solution and on a solid support. *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 1726-1734.
- [127] C. Coppola, L. Simeone, L. De Napoli, D. Montesarchio, On the compatibility of azides in phosphoramidite-based couplings: Synthesis of a novel, convertible azido-functionalized CyPLOS Analogue. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011, 1155-1165.
- [128] P.L. Boyer, B.C. Vu, Z. Ambrose, J.G. Julias, S. Warnecke, C. Liao, C. Meier, V.E. Marquez, S.H. Hughes, The nucleoside analogue D-*carba* T blocks HIV-1 reverse transcription. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 5356-5364.
- [129] A. Kálmán, T. Yoritsánszky, J. Béres, G. Sági, Crystal and molecular structure of (+)-*carba*-Thymidine, C₁₁ H₁₀ N₂ O₆. *Nucleosides Nucleotides* **1990**, 9, 235-243.
- [130] P.L. Boyer, J.G. Julias, Z. Ambrose, M.A. Siddiqui, V.E. Marquez, S.H. Hughes, The nucleoside analogs 4'-C-Methyl Thymidine and 4'-C-Ethyl Thymidine block DNA synthesis by Wild-type HIV-1 RT and excision proficient NRTI resistant RT variants. *J. Mol. Biol.* **2007**, 371, 873-882.
- [131] O.R. Ludek, T. Krämer, J. Balzarini, C. Meier, Divergent synthesis and biological evaluation of carbocyclic α -, *iso*- and 3'-*epi*-nucleosides and their lipophilic nucleotide prodrugs. *Synthesis* **2006**, 1313-1324.
- [132] O.R. Ludek. *Dissertation* **2005**, Universität Hamburg.
- [133] O.R. Ludek, C. Meier, New convergent synthesis of carbocyclic nucleoside analogues. *Synthesis* **2003**, 2101-2109.
- [134] K. Biggadike, A.D. Borthwick, D. Evans, A.M. Exall, B.E. Kirk, S.M. Roberts, L. Stephenson, P. Youds, Use of diethylaminosulfur trifluoride (DAST) in the preparation of synthons of carbocyclic nucleosides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, 549-54.

- [135] S. Jessel. *Dissertation* **2010**, Universität Hamburg.
- [136] S. Jessel, C. Meier, Synthesis of 2',3'-Modified carbocyclic L-nucleoside analogues. **2011**, *2011*, 1702-1713.
- [137] D. Lavanchy, The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* **2009**, *29*, 74-81.
- [138] M.J. Sofia, D. Bao, W. Chang, J. Du, D. Nagarathnam, S. Rachakonda, P.G. Reddy, B.S. Ross, P. Wang, H.-R. Zhang, S. Bansal, C. Espiritu, M. Keilman, A.M. Lam, H.M.M. Steuer, C. Niu, M.J. Otto, P.A. Furman, Discovery of a β -D-2'-Deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of Hepatitis C Virus. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7202-7218.
- [139] H. Ma, W.-R. Jiang, N. Robledo, V. Leveque, S. Ali, T. Lara-Jaime, M. Masjedizadeh, D.B. Smith, N. Cammack, K. Klumpp, J. Symons, Characterization of the metabolic activation of Hepatitis C Virus nucleoside inhibitor β -D-2'-Deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine (PSI-6130) and identification of a novel active 5'-triphosphate species. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 29812-29820.
- [140] E. Murakami, H. Bao, M. Ramesh, T.R. McBrayer, T. Whitaker, H.M. Micolochick Steuer, R.F. Schinazi, L.J. Stuyver, A. Obikhod, M.J. Otto, P.A. Furman, Mechanism of activation of β -D-2'-Deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine and Inhibition of Hepatitis C Virus NS5B RNA polymerase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 503-509.
- [141] E. Murakami, C. Niu, H. Bao, H.M. Micolochick Steuer, T. Whitaker, T. Nachman, M.A. Sofia, P. Wang, M.J. Otto, P.A. Furman, The mechanism of action of β -D-2'-Deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine involves a second metabolic pathway leading to β -D-2'-Deoxy-2'-fluoro-2'-C-methyluridine 5'-Triphosphate, a potent inhibitor of the Hepatitis C Virus RNA-dependent RNA polymerase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 458-464.
- [142] C. Pierra, A. Amador, S. Benzaria, E. Cretton-Scott, M. D'Amours, J. Mao, S. Mathieu, A. Moussa, E.G. Bridges, D.N. Standring, J.-P. Sommadossi, R. Storer, G. Gosselin, Synthesis and pharmacokinetics of Valopicitabine (NM283), an efficient prodrug of the potent anti-HCV agent 2'-C-Methylcytidine. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6614-6620.
- [143] J.L. Clark, L. Hollecker, J.C. Mason, L.J. Stuyver, P.M. Tharnish, S. Lostia, T.R. McBrayer, R.F. Schinazi, K.A. Watanabe, M.J. Otto, P.A. Furman, W.J. Stec, S.E. Patterson, K.W. Pankiewicz, Design, synthesis, and antiviral activity of 2'-Deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine, a potent inhibitor of Hepatitis C Virus replication. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5504-5508.

- [144] K.K. Ogilvie, The *tert*-butyldimethylsilyl group as a protecting group in deoxynucleosides. *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 3799-3807.
- [145] E.J. Corey, A. Venkateswarlu, Protection of hydroxyl groups as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190-6191.
- [146] M.C. Pirrung, S.W. Shuey, D.C. Lever, L. Fallon, A convenient procedure for the deprotection of silylated nucleosides and nucleotides using triethylamine trihydrofluoride. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1345-1346.
- [147] V.A. Korshun, D.A. Stetsenko, M.J. Gait, Novel uridin-2'-yl carbamates: synthesis, incorporation into oligodeoxyribonucleotides, and remarkable fluorescence properties of 2'-pyren-1-ylmethylcarbamate. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1092-1104.
- [148] T. Jenö, S.B. Ramsay, P. Ken, F.S. Bernard, S. Anup, 5'-P-Borane-Substituted thymidine monophosphate and triphosphate. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1992**, *31*, 1373-1375.
- [149] A. Sood, B.R. Shaw, B.F. Spielvogel, Boron-containing nucleic acids. 2. Synthesis of oligodeoxynucleoside boranophosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9000-9001.
- [150] P. Li, Z.A. Sergueeva, M. Dobrikov, B.R. Shaw, Nucleoside and oligonucleoside boranophosphates: Chemistry and properties. *Chem. Rev. (Washington, DC)* **2007**, *107*, 4746-4796.
- [151] B. Schneider, P. Meyer, S. Sarfati, L. Mulard, C. Guerreiro, J. Boretto, J. Janin, M. Véron, D. Deville-Bonne, B. Canard, Activation of anti-Reverse Transcriptase nucleotide analogs by Nucleoside Diphosphate Kinase: Improvement by boranophosphate substitution. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 297-306.
- [152] P. Meyer, B. Schneider, S. Sarfati, D. Deville-Bonne, C. Guerreiro, J. Boretto, J. Janin, M. Véron, B. Canard, Structural basis for activation of α -boranophosphate nucleotide analogues targeting drug-resistant reverse transcriptase. *EMBO J.* **2000**, *19*, 3520-3529.
- [153] B. Selmi, J.I. Boretto, S.R. Sarfati, C. Guerreiro, B. Canard, Mechanism-based Suppression of Dideoxynucleotide Resistance by K65R Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase using an α -boranophosphate nucleoside analogue. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48466-48472.
- [154] K. Alvarez, J.r.m. Deval, B. Selmi, K. Barral, J. Boretto, C. Guerreiro, L. Mulard, R. Sarfati, B. Canard, Borano-Nucleotides: New analogues to circumvent HIV-1 RT-

- mediated nucleoside drug-resistance. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2005**, *24*, 419 - 422.
- [155] J. Deval, K. Alvarez, B. Selmi, M. Bermond, J. Boretto, C. Guerreiro, L. Mulard, B. Canard, Mechanistic insights into the suppression of drug resistance by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase using α -boranophosphate nucleoside analogs. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3838-3846.
- [156] A. Frangeul, K. Barral, K. Alvarez, B. Canard, In vitro suppression of K65R Reverse Transcriptase-mediated Tenofovir- and Adefovir-5'-Diphosphate resistance conferred by the boranophosphonate derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3162-3167.
- [157] R.C. Bethell, G. Lowe, A new synthesis of adenosine 5'-(γ -(R)-17O,18O)- γ -thiotriphosphate) and its use to determine the stereochemical course of the activation of glutamate by glutamine synthetase. *Biochemistry* **1988**, *27*, 1125-1131.
- [158] J.F. Marlier, S.J. Benkovic, On the mechanism of de novo polymerization by form I polynucleotide phosphorylase of *M. luteus*. *Biochemistry* **2002**, *21*, 2349-2356.
- [159] F. Marteau, D. Communi, J.-M. Boeynaems, N. Suarez Gonzalez, Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukocyte Biol.* **2004**, *76*, 796-803.
- [160] S.I. Khan, M.I. Dobrikov, B.R. Shaw, Synthesis of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine-5'-boranomonophosphate as a potential thymidylate synthase inhibitor. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, *24*, 1047.
- [161] D.A. Evans, J.R. Gage, J.L. Leighton, Asymmetric synthesis of calyculin A. 3. Assemblage of the calyculin skeleton and the introduction of a new phosphate monoester synthesis. **1992**, *57*, 1964-1966.
- [162] N. Boyle, P. Fagan, J. Brooks, M. Prhavic, J. Lambert, P.D. Cook, 2',3'-dideoxynucleoside 5'- α,β -(difluoromethylene) triphosphates with α -p-thio or α -p-seleno modifications: Synthesis and their inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, *24*, 1651-1664.
- [163] G. Wang, N. Boyle, F. Chen, V. Rajappan, P. Fagan, J.L. Brooks, T. Hurd, J.M. Leeds, V.K. Rajwanshi, Y. Jin, M. Prhavic, T.W. Bruice, P.D. Cook, Synthesis of AZT 5'-triphosphate mimics and their inhibitory effects on HIV-1 Reverse Transcriptase. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6902-6913.
- [164] S. Warnecke. *Dissertation* **2010**, Universität Hamburg.

- [165] P. Li, Z.H. Xu, H.Y. Liu, C.K. Wennefors, M.I. Dobrikov, J. Ludwig, B.R. Shaw, Synthesis of alpha-p-modified nucleoside diphosphates with ethylenediamine. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16782.
- [166] Y. Liang, A. Sharon, J.P. Grier, K.L. Rapp, R.F. Schinazi, C.K. Chu, 5'-O-Aliphatic and amino acid ester prodrugs of (-)-β-d-(2R,4R)-dioxolane-thymine (DOT): Synthesis, anti-HIV activity, cytotoxicity and stability studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1404-1409.
- [167] J. Balzarini, M. Cools, E. de Clercq, Estimation of the lipophilicity of anti-HIV nucleoside analogues by determination of the partition coefficient and retention time on a lichrospher 60 RP-8 HPLC column. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *158*, 413-422.
- [168] W.E.I.V. Delaney, H. Yang, M.D. Miller, C.S. Gibbs, S. Xiong, Combinations of Adefovir with nucleoside analogs produce additive antiviral effects against Hepatitis B Virus in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3702-3710.
- [169] T. Javed, U. Ashfaq, S. Riaz, S. Rehman, S. Riazuddin, In-vitro antiviral activity of Solanum nigrum against Hepatitis C Virus. **2011**, *8*, 26.
- [170] B.S. Sun, J. Pan, M.M. Clayton, J. Liu, X. Yan, A.A. Matskevich, D.S. Strayer, M. Gerber, M.A. Feitelson, Hepatitis C virus replication in stably transfected HepG2 cells promotes hepatocellular growth and tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.* **2004**, *201*, 447-458.
- [171] U. Muus. *Dissertation* **2003**, Universität Hamburg.
- [172] http://www.chromatinchronicles.com/wiki/index.php?title=TCA_Precipitation (letzter Zugriff 18.11.2011).
- [173] J.M. Walker, *The Protein Protocols Handbook*, 2nd Ed., Humana Press Inc., Totowa, N.J., **2002**.
- [174] L. Jiang, L. He, M. Fountoulakis, Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1023*, 317-320.
- [175] H. Noack, W.S. Kunz, W. Augustin, Evaluation of a procedure for the simultaneous determination of oxidized and reduced pyridine nucleotides and adenylates in organic phenol extracts from mitochondria. *Anal. Biochem.* **1992**, *202*, 162-5.
- [176] F.N. Gellerich, M. Schlame, R. Bohnensack, W. Kunz, Dynamic compartmentation of adenine nucleotides in the mitochondrial intermembrane space of rat-heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *890*, 117-126.

- [177] P. Chomczynski, N. Sacchi, The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protocols* **2006**, *1*, 581-585.
- [178] www.worldlingo.com/ma/enwiki/en/Phenol-chloroform_extraction (letzter Zugriff 18.02.2011).
- [179] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 156-159.
- [180] K.S. Kirby, A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem. J.* **1956**, *64*, 405-408.
- [181] J.B. Wilson, G.H.W. May, *Eppstein-Barr Virus Protocols*, Humana Press Inc., Totowa, N.J., **2002**, Vol. 174.
- [182] D. Brigden, P. Fiddian, A.E. Rosling, T. Ravenscroft, Acyclovir — A review of the preclinical and early clinical data of a new antiherpes drug. *Antiviral Res.* **1981**, *1*, 203-212.
- [183] T. Gollnest. *Diplomarbeit* **2011**, Universität Hamburg.
- [184] H.E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [185] J.G. Moffatt, General synthesis of nucleoside 5'-triphosphates. *Can. J. Chem.* **1964**, *42*, 599-604.
- [186] K. Gogoi, A.D. Gunjal, U.D. Phalgune, V.A. Kumar, Synthesis and RNA binding selectivity of oligonucleotides modified with five-atom thioacetamido nucleic acid backbone structures. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2697-2700.
- [187] C. Ducho. *Dissertation* **2005**, Universität Hamburg.
- [188] S. Debarge, J. Balzarini, A.R. Maguire, Design and synthesis of alpha-carboxy phosphono-nucleosides. *J. Org. Chem.* **2010**, *76*, 105-126.
- [189] C. Meier, E. de Clercq, J. Balzarini, Nucleotide delivery from *cycloSaligenyl*-3'-azido-3'-deoxythymidine monophosphates (*cycloSal-AZTMP*). *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 837-846.

Anhang

Gefahrstoffliste

Die folgende Liste umfasst Verbindungen und Lösungsmittel, mit denen während dieser Arbeit umgegangen wurde. Die Stoffe, für die keine bekannte Einstufung existiert, sind als gefährlich einzustufen. Es ist unbedingt zu vermeiden, dass man sich mit diesen Stoffen in irgendeiner Weise kontaminiert und dass diese Stoffe in die Umwelt eingebracht werden.

Stoffname	GHS Pictogramme	H-Sätze	P-Sätze
2-Propanol	GHS02, GHS07	H225, H319, H336	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P264, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P337+P313, P370+P378, P403+P235, P501
4-Chlorobenzoylchlorid	GHS05, GHS07	H314, H335	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P403+P233, P405, P501
4-Nitrobenzoylchlorid	GHS05	H314	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501
5-Chlorsalicylsäure	GHS07	H302, H315, H319	P264, P280, P301+P312, P302+P352, P305+P351+P338, P321, P330, P332+P313, P337+P313, P362, P501
5-Nitrosalicylaldehyd	GHS07	H315, H319	P264, P280, P302+P352, P305+P351+P338, P321, P332+P313, P337+P313, P362
Aceton	GHS02, GHS07	EUH066, H225, H319, H336	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P264, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P337+P313, P370+P378, P403+P235, P501
Acetonitril	GHS02, GHS07	H225, H302, H312, H319, H332	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P261, P264, P280, P301+P312, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P322, P330, P337+P313, P370+P378, P403+P235, P501

Stoffname	GHS Pictogramme	H-Sätze	P-Sätze
Ammoniak >= 25%	GHS05, GHS09	H314, H400	P260, P264, P273, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P391, P405, P501
Ammoniumchlorid	GHS07	H302, H319	P264, P280, P301+P312, P305+P351+P338, P330, P337+P313, P501
Bariumacetat	GHS07	H302, H332	P261, P264, P301+P312, P304+P340, P330, P501
Benzoessäure	GHS07	H302, H319	P264, P280, P301+P312, P305+P351+P338, P330, P337+P313, P501
Benzol-d6	GHS02, GHS07, GHS08	H225, H304, H315, H319, H340, H350, H372 **	P201, P202, P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P281, P301+P310, P302+P352, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P308+P313, P321, P331, P332+P313, P337+P313, P370+P378, P403+P235, P405, P501
Benzoylchlorid	GHS05, GHS07	H302, H312, H314, H317, H332	P260, P264, P280, P301+P312, P301+P330+P331, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P333+P313, P405, P501
Boran-Tetrahydrofuran- Komplex	GHS07	EUH014, EUH019, H302, H315, H319, H335	P261, P264, P280, P301+P312, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P321, P330, P332+P313, P337+P313, P362, P403+P233, P405, P501
Calciumchlorid	GHS07	H319	P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313
Calciumhydrid	GHS02	H260	P223, P231+P232, P280, P335+P334, P370+P378, P402+P404, P501
Chloroform-d1	GHS07, GHS08	H302, H315, H350, H373 **	P201, P202, P260, P264, P280, P281, P301+P312, P302+P352, P308+P313, P321, P330, P332+P313, P362, P405, P501
DBU	GHS05, GHS07	H302, H314, H412	P260, P264, P273, P280, P301+P312, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501

Stoffname	GHS Pictogramme	H-Sätze	P-Sätze
Decanoylchlorid	GHS05, GHS07	H314, H335	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P403+P233, P405, P501
Dichlormethan	GHS08	H351	P201, P202, P281, P308+P313, P405, P501
Dicyclopentadien	GHS02, GHS07, GHS09	H225, H302, H315, H319, H332, H335, H411	P210, P240, P241, P242, P243, P261, P264, P273, P280, P301+P312, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P321, P330, P332+P313, P337+P313, P370+P378, P391, P403+P233, P403+P235, P405, P501
Diethylether	GHS02, GHS07	EUH019, EUH066, H224, H302, H336	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P264, P280, P301+P312, P303+P361+P353, P330, P370+P378, P403+P235, P501
Dodecanoylchlorid	GHS05, GHS07	H314, H335	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P403+P233, P405, P501
Essigsäure ≥ 90%	GHS02, GHS05	H226, H314	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P370+P378, P403+P235, P405, P501
Essigsäureanhydrid	GHS02, GHS05, GHS07	H226, H302, H314, H332	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P301+P312, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P370+P378, P403+P235, P405, P501
Ethanol	GHS02	H225	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P280, P303+P361+P353, P370+P378, P403+P235, P501
Heptanoyl chloride	GHS05, GHS06	H314, H330, H335	P260, P264, P280, P284, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P320, P403+P233, P405, P501
Isobutyrylchlorid	GHS02, GHS05	H225, H314	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340,

Stoffname	GHS Pictogramme	H-Sätze	P-Sätze
			P305+P351+P338, P310, P321, P370+P378, P403+P235, P405, P501
Isovaleriansäure	GHS05	H314	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501
Jod	GHS07, GHS09	H312, H332, H400	P261, P273, P280, P302+P352, P304+P340, P312, P322, P363, P391, P501
Kalium	GHS02, GHS05	EUH014, H260, H314	P223, P231+P232, P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P335+P334, P370+P378, P402+P404, P405, P501
Kaliumhydroxid (fest)	GHS05, GHS07	H302, H314	P260, P264, P280, P301+P312, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501
Kaliumpermanganat	GHS03, GHS07, GHS09	H272, H302, H410	P210, P220, P221, P264, P273, P280, P301+P312, P330, P370+P378, P391, P501
Kohlenstoffdisulfid	GHS02, GHS07, GHS08	H225, H315, H319, H361fd, H372 **	P201, P202, P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P281, P302+P352, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P308+P313, P321, P332+P313, P337+P313, P370+P378, P403+P235, P405, P501
LiChrosorb RP 18	GHS07	H319, H332, H335	P261, P264, P280, P304+P340, P305+P351+P338, P312, P337+P313, P403+P233, P405, P501
Lithiumaluminiumhydrid	GHS02, GHS05	H260, H314	P223, P231+P232, P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P335+P334, P370+P378, P402+P404, P405, P501
Methanol	GHS02, GHS06, GHS08	H225, H301, H311, H331, H370 **	P210, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P301+P310, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P307+P311, P321, P330, P370+P378, P403+P233, P403+P235, P405, P501

Stoffname	GHS Pictogramme	H-Sätze	P-Sätze
Methanol-d ₄	GHS02, GHS06, GHS08	H225, H301, H311, H331, H370 **	P210, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P301+P310, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P307+P311, P321, P330, P370+P378, P403+P233, P403+P235, P405, P501
Methansulfonylchlorid	GHS05, GHS06	H301, H311, H314, H330, H335	P260, P264, P280, P284, P301+P310, P301+P330+P331, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P320, P403+P233, P405, P501
Methyljodid	GHS06, GHS08	H301, H312, H315, H331, H335, H351	P201, P202, P261, P264, P280, P281, P301+P310, P302+P352, P304+P340, P308+P313, P321, P330, P332+P313, P362, P403+P233, P405, P501
Molekularsieb 4A	GHS07	H315, H319, H335	P261, P264, P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P312, P321, P332+P313, P337+P313, P362, P403+P233, P405, P501
Molekularsieb 5A	GHS07	H315, H319, H335	P261, P264, P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P312, P321, P332+P313, P337+P313, P362, P403+P233, P405, P501
N,N-Diethylformamid	GHS07	H315, H319, H335	P261, P264, P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P312, P321, P332+P313, P337+P313, P362, P403+P233, P405, P501
N,N-Dimethylformamid	GHS07, GHS08	H312, H319, H332, H360D ***	P201, P202, P261, P264, P280, P281, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P308+P313, P312, P322, P337+P313, P363, P405, P501
Natrium	GHS02, GHS05	EUH014, H260, H314	P223, P231+P232, P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P335+P334, P370+P378, P402+P404, P405, P501
Natriumazid	GHS06, GHS09	EUH032, H300, H410	P264, P273, P301+P310, P321, P330, P391, P405, P501

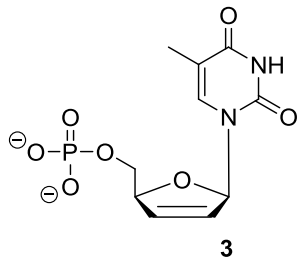
Stoffname	GHS Pictogramme	H-Sätze	P-Sätze
Natriumcarbonat	GHS07	H319	P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313
Natriumhydroxid (fest)	GHS05	H314	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501
Natriumnitrit	GHS03, GHS06, GHS09	H272, H301, H400	P210, P220, P221, P264, P273, P280, P301+P310, P321, P330, P370+P378, P391, P405, P501
n-Hexan	GHS02, GHS07, GHS08, GHS09	H225, H304, H315, H336, H361f ***, H373 **, H411	P201, P202, P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P273, P280, P281, P301+P310, P302+P352, P303+P361+P353, P308+P313, P321, P331, P332+P313, P370+P378, P391, P403+P235, P405, P501
Petrolether 50-70	GHS02, GHS07, GHS08, GHS09	H225, H304, H315, H336, H411	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P264, P273, P280, P301+P310, P302+P352, P303+P361+P353, P321, P331, P332+P313, P370+P378, P391, P403+P235, P405, P501
Phenylboronic acid	GHS07	H302	P264, P301+P312, P330, P501
Phosphorpentachlorid	GHS05, GHS06, GHS08	EUH014, EUH029, H302, H314, H330, H373 **	P260, P264, P280, P284, P301+P312, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P314, P320, P403+P233, P405, P501
Phosphorpentoxid	GHS05	H314	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501
Phosphorsäure > 25%	GHS05	H314	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501

Stoffname	GHS Pictogramme	H-Sätze	P-Sätze
Phosphortrichlorid	GHS05, GHS06, GHS08	EUH014, EUH029, H300, H314, H330, H373 **	P260, P264, P280, P284, P301+P310, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P314, P320, P403+P233, P405, P501
4-Hydroxybenzoesäure	GHS07	H315, H319, H335	P261, P264, P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P312, P321, P332+P313, P337+P313, P362, P403+P233, P405, P501
Pivaloylchlorid	GHS02, GHS05, GHS06	EUH014, H225, H302, H314, H330	P210, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P284, P301+P312, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P320, P370+P378, P403+P233, P403+P235, P405, P501
Propionsäureanhydrid	GHS05	H314	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501
Propionylchlorid	GHS02, GHS05	EUH014, H225, H314	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P370+P378, P403+P235, P405, P501
p-Toluenesulfonylchlorid	GHS05	H314	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501
p-Toluolsulfonsäure Monohydrat	GHS07	H315, H319, H335	P261, P264, P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P312, P321, P332+P313, P337+P313, P362, P403+P233, P405, P501
Pyridin	GHS02, GHS07	H225, H302, H312, H332	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P261, P264, P280, P301+P312, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P322, P330, P370+P378, P403+P235, P501
Salpetersäure ≥ 70%	GHS03, GHS05	H272, H314	P210, P220, P221, P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P370+P378, P405, P501

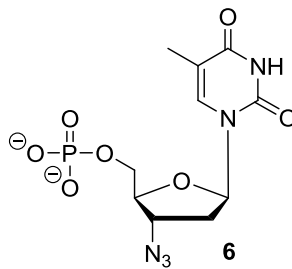
Stoffname	GHS Pictogramme	H-Sätze	P-Sätze
Salzsäure ≥ 25%	GHS05, GHS07	H314, H335	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P403+P233, P405, P501
Schwefelsäure ≥ 15%	GHS05	H314	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501
Silica gel	GHS08	H350i	P201, P202, P281, P308+P313, P405, P501
<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl chlorid	GHS02, GHS05	H314	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	GHS02, GHS05, GHS07, GHS08	H226, H242, H302, H304, H312, H314, H332	P210, P220, P233, P234, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P301+P310, P301+P330+P331, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P321, P370+P378, P403+P235, P405, P410, P411+P235, P420, P501
Tetrahydrofuran	GHS02, GHS07	EUH019, H225, H319, H335	P210, P240, P241, P242, P243, P261, P264, P280, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P312, P337+P313, P370+P378, P403+P233, P403+P235, P405, P501
Tetra-n- butylammoniumfluorid	GHS02, GHS05	EUH019, H314	P260, P264, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501
Toluol	GHS02, GHS07, GHS08	H225, H304, H315, H336, H361d ***, H373 **	P201, P202, P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P281, P301+P310, P302+P352, P303+P361+P353, P308+P313, P321, P331, P332+P313, P370+P378, P403+P235, P405, P501

Stoffname	GHS Pictogramme	H-Sätze	P-Sätze
Trichlormethan	GHS07, GHS08	H302, H315, H350, H373 **	P201, P202, P260, P264, P280, P281, P301+P312, P302+P352, P308+P313, P321, P330, P332+P313, P362, P405, P501
Triethylamin	GHS02, GHS05, GHS07	H225, H302, H312, H314, H332	P210, P233, P240, P241, P242, P243, P260, P264, P280, P301+P312, P301+P330+P331, P302+P352, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P370+P378, P403+P235, P405, P501
Triethylamin Trihydrofluorid	GHS05, GHS06	H300, H310, H314, H330	P260, P262, P264, P280, P284, P301+P310, P301+P330+P331, P302+P350, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P320, P403+P233, P405, P501
Trifluoressigsäure	GHS05, GHS07	H314, H332, H412	P260, P264, P273, P280, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310, P321, P405, P501
Wasserstoffperoxid 8-35%	GHS05, GHS07	H302, H318	P264, P280, P301+P312, P305+P351+P338, P310, P330, P501
Zidovudin	GHS08	H351	P201, P202, P281, P308+P313, P405, P501

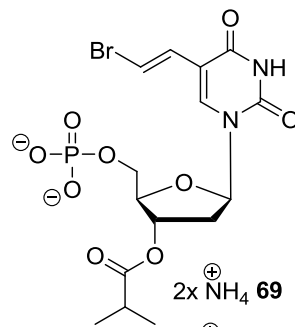
Verbindungsliste I



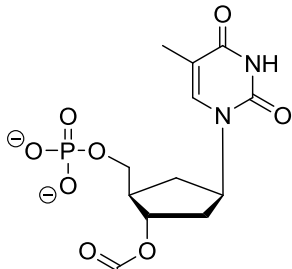
2x NH₄⁺ **3a** 2x N⁺(nBu)₄ **3b**



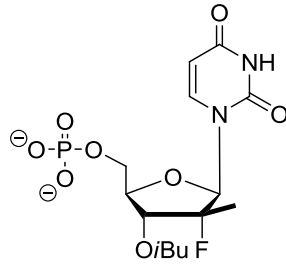
2x NH₄⁺ **6a** 2x N⁺(nBu)₄ **6b**



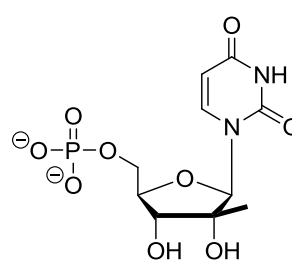
2x NH₄⁺ **69**
2x N⁺(nBu)₄ **70**



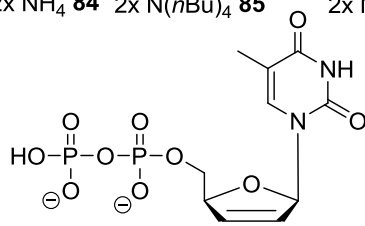
2x NH₄⁺ **84** 2x N⁺(nBu)₄ **85**



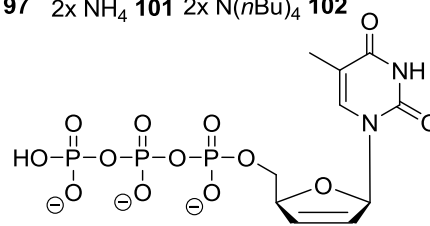
2x NH₄⁺ **96** 2x N⁺(nBu)₄ **97**



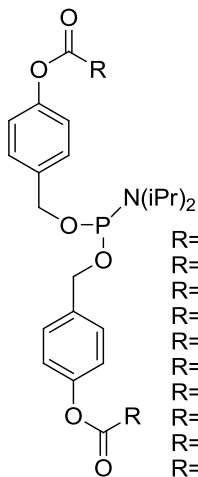
2x NH₄⁺ **101** 2x N⁺(nBu)₄ **102**



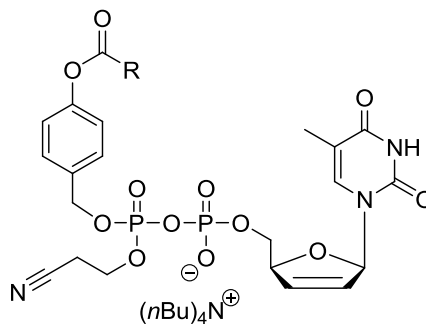
2x NH₄⁺ **4a** 2x N⁺(nBu)₄ **4b**



3x NH₄⁺ **5a** 2x N⁺(nBu)₄ **5b**

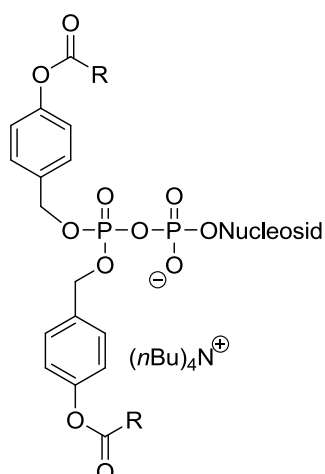
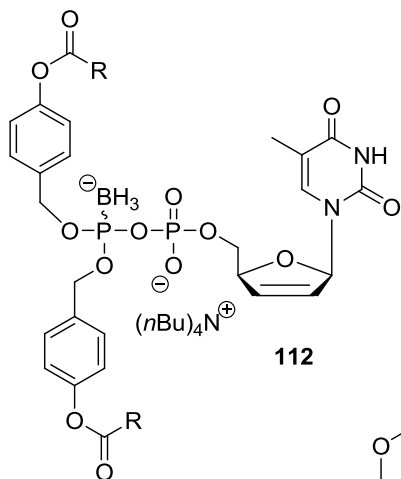
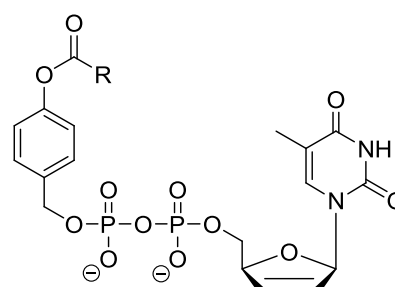
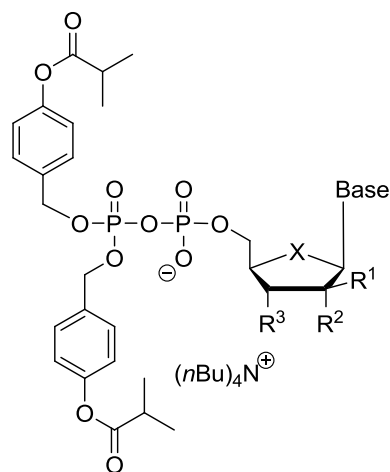


R= isopropyl (iPr), **45**
R= *tert*-butyl (tBu), **46**
R= propyl (C3), **47**
R= butyl (C4), **48**
R= hexyl (C6), **49**
R= *n*-nonyl (C9), **50**
R= *n*-undecyl (C11), **51**
R= *n*-tridecyl (C13), **52**
R= *n*-pentadecyl (C15), **53**
R= *n*-heptadecyl (C17), **54**
R= *n*-Z8-hetadecenyl (8Z-C17), **55**

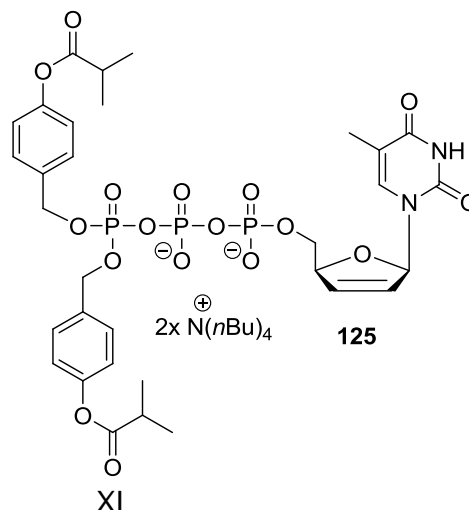


R=(C₉H₁₉), CEO-nonyl-BAB-d4TDP

Verbindungsliste II

Nucleosid= **d4T 2**R=(C₃H₇), propyl-BAB-d4TDP **25**R=(C₄H₉), *t*butyl-BAB-d4TDP **26**R=(C₄H₉), butyl-BAB-d4TDP **27**R=(C₆H₁₃), hexyl-BAB-d4TDP **28**R=(C₇H₁₅), heptyl-BAB-d4TDP **29**R=(C₉H₁₉), nonyl-BAB-d4TDP **30**R=(C₁₁H₂₃), undecyl-BAB-d4TDP **31**R=(C₁₃H₂₇), tridecyl-BAB-d4TDP **32**R=(C₁₅H₃₁), pentadecyl-BAB-d4TDP **33**R=(C₁₇H₃₃), 8*Z*-heptadecenyl-BAB-d4TDP **34**R=(C₁₇H₃₅), heptadecyl-BAB-d4TDP **35**Nucleosid= **AZT 1**R=(C₉H₁₉), nonyl-BAB-AZTDP **66****112****AB-d4TDP**R=(C₄H₉), *t*butyl-AB-d4TDP **128**R=(C₄H₉), butyl-AB-d4TDP **129**R=(C₆H₁₃), hexyl-AB-d4TDP **130**R=(C₇H₁₅), heptyl-AB-d4TDP **131**R=(C₉H₁₉), nonyl-AB-d4TDP **36**R=(C₁₁H₂₃), undecyl-AB-d4TDP **132**R=(C₁₃H₂₇), tridecyl-AB-d4TDP **133**R=(C₁₅H₃₁), pentadecyl-AB-d4TDP **134**R=(C₁₇H₃₃), 8*Z*-heptadecenyl-AB-d4TDP **135**

Base	X	R ¹	R ²	R ³	
T	CH ₂	H	H	O <i>i</i> Bu,	88
U	O	CH ₃	F	O <i>i</i> Bu,	91
U	O	CH ₃	OH	OH,	92
BVU	O	H	H	O <i>i</i> Bu,	71

**125**

XI

Lebenslauf

Dipl.-Chem. Tilmann Schulz

Geboren am 10.11.1979 in Hamburg, Deutschland

Ausbildung

- seit 06/2007 **Promotion**
Universität Hamburg
- 10/2000-05/2007 **Studium der Chemie**
Universität Hamburg
Abschluss als Dipl.-Chemiker (Gesamtnote: sehr gut)
- 08/2006-04/2007 Diplomarbeit: „Glycosyl-funktionalisierte *cycloSal*-Pronucleotide“,
Betreuer: Prof. Dr. Chris Meier
- 03/2005-06/2005 **Forschungsaufenthalt**
Universität Oviedo, Spanien
Organometallchemie; Synthese von Fischer Carbenen, Heterocyclen
- 07/2004-08/2004 **Forschungsaufenthalt**
Institut f. Chemische Technologie Prag, Tschechische Republik
UV-Spektroskopie, kinetische Untersuchungen von Nanoaggregaten
- 11/2002 **Vordiplom in Chemie**
Gesamtnote: gut
- 06/1999 **Abitur**
Gymnasium der Wichern-Schule, Hamburg
Durchschnittsnote: 2.2
- 1990-1999 *Gymnasium der Wichern-Schule*
- 1986-1990 *Grundschule der Wichern-Schule*

Berufliche Qualifikationen

- 06/2007-03/2011 **wissenschaftlicher Mitarbeiter**
Institut f. Organische Chemie, Universität Hamburg
Assistent in Laborpraktika des Studiengangs Chemie: Anorg. Chemie I, Org. Chemie im Nebenfach, Integrierte Anorg. und Org. Synthese
Anleitung von Bachelor-/ Diplomstudenten bei Abschluss- und Projektarbeiten in Organischer Chemie
Betreuung einer italienischen Gastwissenschaftlerin (5 Monate)
- 2004-2007 **studentische Hilfskraft**
Unterstützung bei Laborkursen für Org. Chemie, Chemie f. Mediziner
- 08/1999-06/2000 **Zivildienst, Hamburg**, ambulante Kranken- und Altenpflege

Stipendien und Auszeichnungen

- 04/2010 **Stipendium**, GSK Stiftung, Teilnahme an der "23rd International Conference on Antiviral Research", *San Francisco, USA*
- 07/2009 **Einladung** zum "**59th Meeting of Nobel Laureates**", *Lindau am Bodensee, Deutschland*
- 05/2009 **1st prize – Graduate Student**, "22nd International Conference on Antiviral Research", *Miami Beach, USA*
Poster: "Bioreversible Protection of Nucleosidediphosphates - Synthesis and Properties"
- 04/2009 **Stipendium**, Stiftung Universität Hamburg, Besuch der "22nd International Conference on Antiviral Research", *Miami Beach, USA*
- 03/2005-6/2005 **Stipendium**, Erasmus/Sokrates Programm der EU
- 07/2004-8/2004 **Stipendium**, DAAD/IAESTE, "Summer School for Technical Experiences" in *Prag, Tschechische Republik*

Publikationen

- L. Richter, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Bis(4-Acyloxybenzyl)-nucleoside Diphosphate Prodrugs, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2010**.
- H. J. Jessen, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Bioreversible Protection of Nucleoside Diphosphates, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8847-8850; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8719-8722.

Poster

- T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Lipophilic Nucleoside Diphosphate Prodrugs - Synthesis and Properties, *Antiviral Res.* **2010**, *86*, A67.
- T. Schulz, H. J. Jessen, J. Balzarini, C. Meier, Bioreversible Protection of Nucleosidediphosphates - Synthesis and Properties, *Antiviral Res.* **2009**, *82*, A63.
- T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Synthesis and Properties of Glycosyl-functionalised *cycloSal*-Pronucleotides, *Antiviral Res.* **2008**, *78*, A63.
- H. Jessen, W. Fendrich, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Synthesis and Properties of Intrinsically Fluorescent *cycloSal*-Pronucleotides, *Antiviral Res.* **2006**, *70*, A60.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Synthese und Untersuchung von Nucleosiddiphosphat Prodrugs“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer mit dem Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Dipl.-Chem. Tilmann Schulz

Hamburg,