



# Fluoreszenzmarkierte *cycloSal*- und *DiPPro*-Nucleotide

## Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

**Florian Pertenbreiter**

aus Hamburg

vorgelegt dem Fachbereich Chemie

der Universität Hamburg

Hamburg 2013

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier in der Zeit von Januar 2009 bis März 2013 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke

Datum der Disputation: 24.05.2013

*„Wozu ist das?“  
„Das ist blaues Licht“  
„Und was macht es?“  
„Es leuchtet blau“  
„Verstehe!“*

*-Rambo III*

*„La lutte elle-même vers les sommets suffit  
à remplir un cœur d’homme.  
Il faut imaginer Sisyphe heureux.“*

*-Albert Camus, „Le Mythe de Sisyphe“*

*[Der Kampf gegen Gipfel vermag ein Menschenherz auszufüllen.  
Wir müssen uns Sisyphos als einen glücklichen Menschen vorstellen.]*

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Chris Meier danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und den wissenschaftlichen Freiraum bei dessen Bearbeitung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke danke ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens zu dieser Arbeit.

Ein sehr herzlicher Dank geht an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der „Familie Ackermeier“ für das hervorragende Arbeitsklima, für die Hilfsbereitschaft, viele fachliche und fachfremde Diskussionen und eine Menge Unsinn! Ganz besonders danke ich Dr. Marcus Schröder, dass ich mir mit ihm nicht nur ein Labor, sondern auch Humor und Musikgeschmack sowie eine Reihe von Hotelzimmern teilen durfte. Arigato gozaimasu! Lina Weinschenk, Tristan Gollnest und Inga Reimer danke ich für Prodrug-Fachsimpelei auf höchstem Niveau und Dr. Tilmann Schulz für chemische Stützräder bei den ersten DiPPro-Synthesen und die HPLC-Schulung. Johanna Huchting sei herzlich gedankt für die vertrauensvolle Beratung in Sachen Zucker und verwandte Substanzklassen. Dr. Minetta Wunderskirchner danke ich für eine kurzweilige Schreibphase, gemeinsames „Topf“ essen und für ihre Unterstützung bei den kleinen und großen Hürden des Promotions- und Bewerbungsalltags.

Für die tatkräftige Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten bedanke ich mich bei allen OC-F-, Naturstoff- und ISP-Praktikanten. Besonders hervorzuheben sind dabei Inga Reimer und Sven Bettermann, die beide eine ganze Bachelorarbeit beigesteuert haben.

Prof. Dr. Jan Balzarini danke ich für die Durchführung der antiviralen Tests und die Bereitstellung des Zellextrakts, Dr. Arwyn T. Jones und Helen Wiggins für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und Dr. Ilona Hauber für das Züchten und Inkubieren der Zellen für die HPLC-MS-Studien. Dr. Maria Trusch danke ich sehr herzlich für die hervorragende fachliche und persönliche Zusammenarbeit bei der Entwicklung der HPLC-MS-Methode.

Den Teams aus den NMR-Abteilungen von Dr. Thomas Hackl und Dr. Erhard Haupt und der massenspektrometrischen Abteilung von Dr. Maria Trusch danke ich für die Messung unzähliger Spektren.

Inga Reimer und Lina Weinschenk danke ich sehr herzlich für die kritische und detaillierte Durchsicht dieser Arbeit und für viele Anregungen und Ideen.

Meinen Eltern und meiner Großmutter Helmi Ziriacks danke ich für die finanzielle Unterstützung über viele Jahre, ohne die weder mein Studium noch die Anfertigung dieser Arbeit möglich gewesen wäre. Meiner ganzen Familie und meinen Freunden innerhalb und außerhalb der Uni danke ich für den unverzichtbaren Rückhalt und die moralische Unterstützung (nicht nur) in den letzten Jahren.

## ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

6-H-2'-dBCNA	3-(2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,3-dihydrofuro[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-2-on
6-H-BCNA	3-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl)-2,3-dihydrofuro[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-2-on
6-H-ddBCNA	3-(2',3'-Didesoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,3-dihydrofuro- [2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-2-on
6-H-di-OAc-BCNA	3-(2',3'-Di-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,3-dihydrofuro[2,3- <i>d</i> ]- pyrimidin-2-on
6-Prop-2'-dBCNA	3-(2',3'-Didesoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro- [2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-2-on
6-Prop-d4BCNA	3-(2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydro- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3- dihydrofuro[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-2-on
6-Prop-ddBCNA	3-(2',3'-Didesoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro- [2,3- <i>d</i> ]pyrimidin-2-on
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ABC	Abacavir
abs.	absolut
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
ACV	Aciclovir
AIBN	Azoisobutyronitril
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Äquiv.	Äquivalent
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	abgeschwächte Totalreflexion
AZT	3'-Azidothymidin
BCNA	bicyclisches Nucleosidanalogen
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
CC <sub>50</sub>	50% cytotoxische Konzentration
CDCl <sub>3</sub>	Trichlormethan (einfach deuteriert)

CEM/0	humane T-Lymphozyten-Zelllinie (Wildtyp)
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitril
d4T	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin
d4A	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydroadenosin
d4U	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrouridin
δ	chemische Verschiebung (NMR)
d	Dublett (NMR)
dA	2'-Desoxyadenosin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
dd	Dublett eines Dubletts (NMR)
ddA	2',3'-Didesoxyadenosin
ddd	Dublett eines Dubletts eines Dubletts (NMR)
ddU	2',3'-Didesoxyuridin
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimethylsulfoxid (sechsfach deuteriert)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC <sub>50</sub>	50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation
EE	Essigsäureethylester (Ethylacetat)
EI	Elektronenstoßionisation
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
EtOH	Ethanol
ETV	Entecavir

FAB	<i>Fast-Atom Bombardement</i>
FACS	<i>Fluorescence Assisted Cell Sorting</i>
FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
FTC	L-2',3'-Dideoxy-5-fluor-3'-thiacytidin
gef.	gefunden
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GT	Glycosyltransferase
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCMV	humanes Cytomegalie-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<i>iPr</i>	<i>Isopropyl</i>
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
M	mol/L
m	Multipllett (NMR)
<i>m</i>	<i>meta</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
<i>mCPBA</i>	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
min	Minute

MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
NDP	Nucleosiddiphosphat
NDPK	Nucleosiddiphosphatkinase
NMP	Nucleosidmonophosphat
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NNRTI	nicht-nucleosidischer RT-Inhibitor
NP	<i>normal phase</i>
NRTI	nucleosidischer RT-Inhibitor
NtRTI	nucleotidischer RT-Inhibitor
Nu	Nucleophil
Nucl.	Nucleosid
<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
PE	Petrolether (50-70)
ppm	<i>parts per million</i>
PTC-Cl	Phenoxythiocarbonylchlorid
<i>p</i> -TsCl	<i>p</i> -Toluolsulfonylchlorid
RH	relative Luftfeuchtigkeit ( <i>relative humidity</i> )
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonucleinsäure)
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	reverse Transkriptase
Rt	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
sept	Septett (NMR)
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett (NMR)
$t_{1/2}$	Halbwertszeit



TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumfluorid
TBAH	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumhydroxid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDMSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>t</i> -BuOOH	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TDF	Tenofovir
THF	Tetrahydrofuran
TK	Thymidinkinase
TK <sup>-</sup>	Thymidinkinase defizient
TMP	Thymidinmonophosphat
TMPK	Thymidylatkinase
TMS	Trimethylsilyl
TTMSS	Tris(trimethylsilyl)silan
TOF	<i>time of flight</i>
tq	Triplett eines Quartetts (NMR)
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
tt	Triplett eines Triplets (NMR)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
VZV	Varicella-Zoster-Virus

INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Kenntnisstand</b> .....	<b>7</b>
2.1. Prodrugs und Pronucleotidkonzepte .....	7
2.1.1. Unterschiedliche Pronucleotidkonzepte .....	8
2.1.2. Pronucleotide nach dem <i>cycloSal</i> -Konzept.....	10
2.1.3. Präparative Nutzung des <i>cycloSal</i> -Konzepts.....	15
2.1.4. Nucleosiddiphosphatprodrugs nach dem <i>DiPPro</i> -Konzept .....	16
2.2. Verfahren zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration von Wirkstoffen .....	19
2.2.1. Radioaktiv markierte Pronucleotide .....	19
2.2.2. Fluoreszenzmarkierte Pronucleotide.....	20
2.2.3. Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie .....	23
<b>3. Aufgabenstellung</b> .....	<b>24</b>
<b>4. Resultate und Diskussion</b> .....	<b>26</b>
4.1. Nucleosidmono- und -diphosphatprodrugs von 2',3'-Didesoxy-2',3'- didehydrouridin (d4U) <b>42</b> und 2',3'-Didesoxyuridin (ddU) <b>43</b> .....	26
4.1.1. Synthese von <i>DiPPro</i> -Nucleotiden .....	26
4.1.2. Hydrolysemechanismus und antivirale Aktivität der <i>DiPPro</i> -Nucleotide von AZT <b>1</b> und d4T <b>2</b> .....	27
4.1.3. 2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrouridin <b>42</b> und 2',3'-Didesoxyuridin <b>43</b> .....	29
4.1.4. Synthese von d4U <b>42</b> und ddU <b>43</b> .....	31
4.1.5. Synthese der 5'-Monophosphate von d4U <b>42</b> und ddU <b>43</b> .....	34
4.1.6. Synthese der Bis(4-acyloxybenzyl)-diisopropylaminophosphoramidite .....	36
4.1.7. Synthese der Diphosphatprodrugs von d4U <b>42</b> und ddU <b>43</b> .....	38
4.1.8. Synthese der 3-Methyl- <i>cycloSal</i> -Triester <b>85</b> und <b>86</b> von d4U <b>42</b> und ddU <b>43</b> ....	46
4.1.9. Synthese der Nucleosiddiphosphate <b>59</b> und <b>89</b> von d4U <b>42</b> und ddU <b>43</b> .....	48
4.1.10. Hydrolyseverhalten der Prodrugs von d4U <b>42</b> und ddU <b>43</b> in Phosphatpuffer (pH 7.3) .....	50

4.1.11. Hydrolyseverhalten der Prodrugs von d4U <b>42</b> und ddU <b>43</b> in CEM/0-Zellextrakten .....	59
4.1.12. Aktivität der Prodrugs von d4U <b>42</b> und ddU <b>43</b> gegen HIV-1 und HIV-2.....	62
4.2. Bicyclische Nucleosidanaloga als analytische Sonden für Fluoreszenzstudien .....	68
4.2.1. Entstehung von Fluoreszenz .....	68
4.2.2. Bioanalytische Nutzung von Fluoreszenzphänomenen .....	69
4.2.3. Bicyclische Nucleosidanaloga (BCNA) .....	71
4.2.4. Synthese der Bicyclischen Nucleosidanaloga (BCNA).....	74
4.2.5. Synthese der <i>cycloSal</i> -Pronucleotide der bicyclischen Nucleosidanaloga .....	85
4.2.6. Synthese der <i>DiPPro</i> -Nucleotide der bicyclischen Nucleosidanaloga .....	86
4.2.7. Hydrolyseverhalten der BCNA-Prodrugs in Phosphatpuffer (pH 7.3).....	93
4.2.8. Hydrolyseverhalten der BCNA-Prodrugs in CEM/0-Zellextrakten .....	100
4.2.9. Vergleich der Lipophilie der BCNA-Prodrugs .....	105
4.2.10. Untersuchung der BCNA-Prodrugs mittels Fluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie .....	107
4.3. Synthese fluoreszenzmarkierter Nucleosiddiphosphatzucker .....	116
4.3.1. Synthese von Nucleosiddiphosphatzuckern (NDP-Zucker).....	116
4.3.2. Fluoreszenzmarkierte Nucleosiddiphosphatzucker in GT-Inhibitionsassays....	118
4.3.3. Synthesestrategie.....	120
4.3.4. Synthese der Pyranosylphosphate <b>178</b> und <b>179</b> .....	122
4.3.5. Synthese des acetylgeschützten bicyclischen Ribonucleosids <b>177</b> .....	123
4.3.6. Synthese der <i>cycloSal</i> -Triester und der NDP-Zucker .....	125
4.4. Entwicklung einer HPLC-MS basierten Methode zur Untersuchung der Zellaufnahme von Nucleosidmono- und -diphosphatprodrugs.....	134
4.4.1. HPLC-MS basierte Methoden zur Analytik von Nucleotiden .....	134
4.4.2. Massenspektrometer und Ionisationsmethode .....	136
4.4.3. Entwicklung der HPLC-Methoden .....	136
4.4.4. Hydrolyseverfolgung mittels HPLC-MS .....	141
4.4.5. Untersuchung der Zellaufnahme von d4U-Prodrugs mittels HPLC-MS.....	143
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>146</b>
<b>6. Summary.....</b>	<b>150</b>

<b>7. Experimenteller Teil .....</b>	<b>154</b>
7.1. Allgemeines .....	154
7.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) .....	163
7.3. Synthese der Saligenylchlorphosphite .....	171
7.4. Synthese der Bis(acyloxybenzyl)-phosphoramidite .....	175
7.5. Synthese der Glycopyranosylphosphate .....	182
7.6. Synthese der Nucleosidanaloga .....	189
7.7. Synthese der <i>cyclo</i> Sal-Nucleosidmonophosphate .....	219
7.8. Synthese der Nucleosidmonophosphate .....	231
7.9. Synthese der Nucleosiddiphosphate .....	238
7.10 Synthese der Bis(acyloxybenzyl)-nucleosiddiphosphatprodrugs .....	240
7.11 Synthese der Nucleosiddiphosphatpyranosen .....	260
7.12. Hydrolysestudien .....	262
7.13. Aufnahme der UV/Vis- und Fluoreszenzspektren .....	264
7.14. Zellaufnahmestudien für die Analyse mittels HPLC-MS .....	264
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>265</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>I</b>
Gefahrstoffverzeichnis .....	I
Verbindungsliste I .....	VIII
Verbindungsliste II .....	IX
Verbindungsliste III .....	X
Lebenslauf .....	XI
Publikationen .....	XII
Posterbeiträge .....	XII
Eidesstattliche Erklärung .....	XIII

## 1. EINLEITUNG

Als Grundbausteine der DNA und RNA gehören die Nucleoside zu den wichtigsten Naturstoffen. Sie sind zusammengesetzt aus einem Glycon (schwarz), das aus Ribose (RNA) oder Desoxyribose (DNA) besteht und einer Nucleobase (Aglycon, blau) dessen Grundgerüst auf Purin bzw. Pyrimidin basiert (Abb. 1). Die Verknüpfung dieser beiden Einheiten erfolgt über eine *N*-glycosidische Bindung zwischen dem C-1' des Glycons und dem *N*-1 (Pyrimidinnucleoside) bzw. dem *N*-9 (Purinnucleoside) des Aglycons. Zur Bildung eines DNA- bzw. RNA-Stranges sind jeweils die 3'- und die 5'-Hydroxyfunktionen eines Nucleosids über Phosphatbrücken (grün) mit den benachbarten Nucleosiden verbunden. Während die RNA in der Regel als Einzelstrang vorliegt, lagern sich zwei DNA-Einzelstränge zu einer Doppelhelix zusammen, in der die beiden gegenüberliegenden Stränge über Wasserstoffbrückenbindungen (rot) zwischen den Nucleobasen miteinander verbunden sind. Gemäß Watson-Crick-Basenpaarung bilden Guanin (G) und Cytosin (C) das eine, Adenin (A) und Thymin (T) das zweite Basenpaar. In RNA ist das Thymin durch Uracil (U) ersetzt, das keine Methylgruppe am C-5 trägt.<sup>[1]</sup>

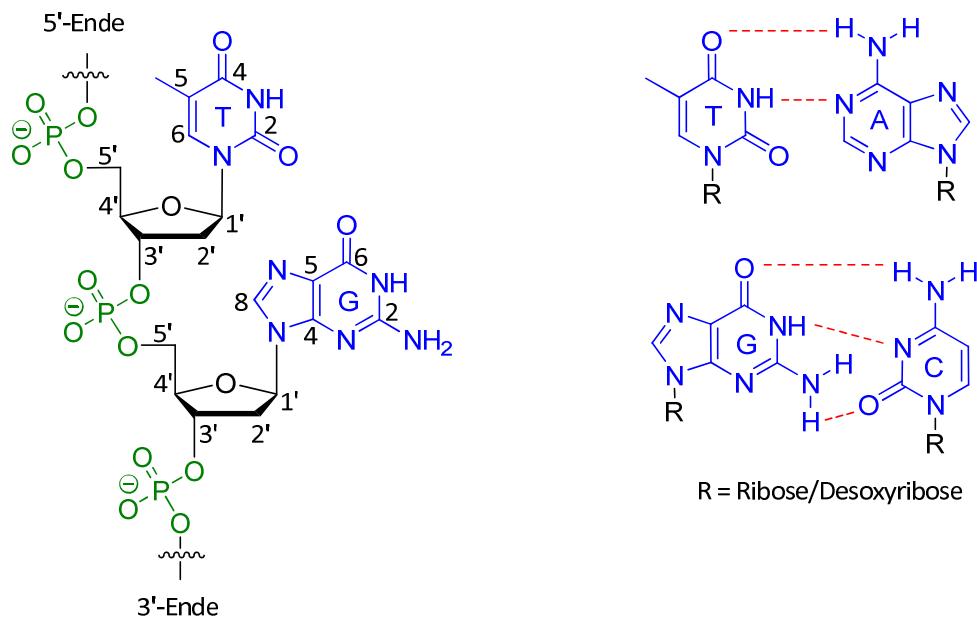


Abb. 1: Aufbau eines DNA-Einzelstrangs und H-Brücken zwischen den Nucleobasen im Doppelstrang.

Die wesentliche biologische Funktion der DNA besteht in der Speicherung der Erbinformation. Bei der Genexpression ist sie Vorlage für die Synthese von mRNA durch eine RNA-Polymerase (Transkription), die dann ihrerseits die Aminosäuresequenz für den Aufbau der Proteine codiert (Translation). Zur Biosynthese von DNA und RNA werden Nucleosid-5'-triphosphate benötigt, die durch eine Polymerase unter Pyrophosphatabspaltung mit dem 3'-Ende des vorigen Nucleotids verknüpft werden, sodass die 3'-Hydroxyfunktion für die Bindung zum folgenden Nucleotid zur Verfügung steht.<sup>[1]</sup>

Analoga der natürlichen Nucleoside, die Modifikationen im Glycon, im Aglycon oder in beiden Teilen tragen können, haben breite Anwendung in der Behandlung unterschiedlicher viraler Erkrankungen und in der Krebstherapie. Dazu gehört die Bekämpfung des Humanen Immundefizienzvirus (HIV), das zu den Retroviren gehört und die Ursache für die Krankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) ist. Der Replikationscyclus des Virus beginnt mit der Bindung des Viruspartikels an die Wirtszelle (in der Regel T-Lymphozyten, die den CD-4-Rezeptor tragen). Danach folgen die Fusion des Viruspartikels mit der Zellmembran sowie die Aufnahme viraler RNA und viraler Proteine in die Wirtszelle. Anschließend wird diese RNA durch das viruseigene Enzym Reverse Transkriptase (RT) in DNA transkribiert, die dann schließlich durch ein weiteres virales Enzym, die Integrase, in das Wirtsgenom integriert wird. Durch die Expression der entsprechenden Gene werden neue Viruspartikel gebildet, die die Wirtszelle verlassen können.<sup>[2]</sup>

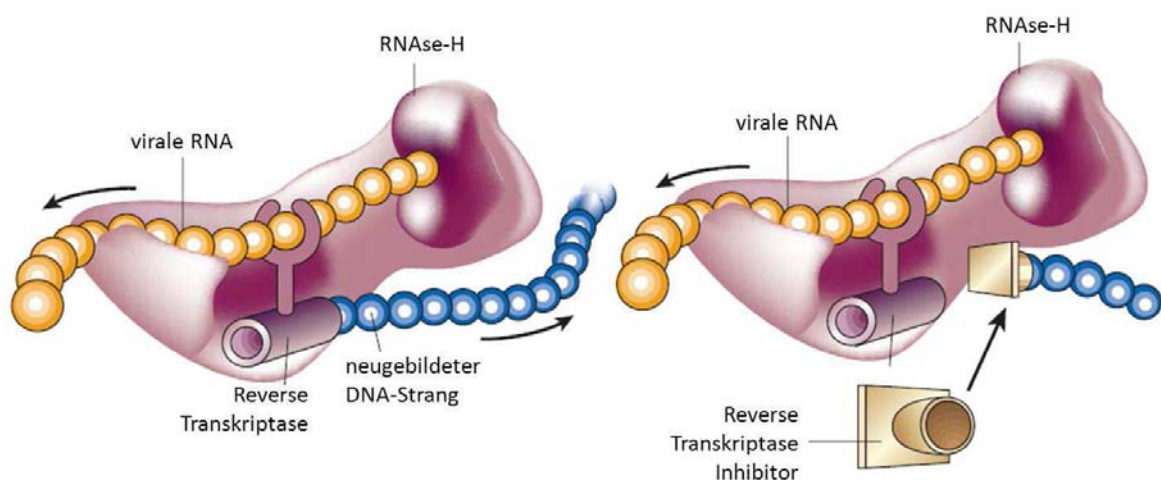


Abb. 2: Wirkmechanismus nucleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI) nach [4].

Der erste nucleosidische antiretrovirale Wirkstoff ist 3'-Azidothymidin (AZT **1**), das seit seiner Zulassung 1987 gegen das HI-Virus eingesetzt wird.<sup>[3]</sup> Der Wirkmechanismus beruht auf der Inhibition der RT. Durch das Fehlen der 3'-Hydroxyfunktion ist nach Einbau des Wirkstoffs anstelle eines natürlichen Nucleosids keine weitere Elongation des neu gebildeten DNA-Strangs möglich. Dadurch wird die Virusreplikation gestoppt, da die RT im Unterschied zu humanen DNA-Polymerasen keine Exonucleasefunktion besitzt, um falsch eingebaute Nucleotide wieder zu entfernen (Abb. 2, S. 2).<sup>[4]</sup>

Auf einem identischen Wirkmechanismus beruht auch die anti-HIV Aktivität von 3'-Desoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T **2**), das 1994 als Medikament zugelassen wurde.<sup>[5]</sup> Insgesamt gibt es sieben NRTI, die in der HIV-Therapie eingesetzt werden. Dazu gehören u. a. das L-Nucleosid Emtricitabin (FTC **3**), das sich von L-Cytidin ableitet und Modifikationen sowohl im Glycon, als auch im Aglycon trägt<sup>[6]</sup> sowie das carbocyclische Nucleosidanalogen Abacavir (ABC **4**), bei dem neben anderen Modifikationen der Ringsauerstoff des Glycons durch eine Methylengruppe ersetzt ist<sup>[7]</sup>. Bei dem acyclischen Phosphonat Tenofovir (TDF **5**) handelt es sich um einen nucleotidischen RT-Inhibitor (NtRTI), dessen Zulassung in Form des Disoproxilfumarats 2001 erfolgte.<sup>[8]</sup>

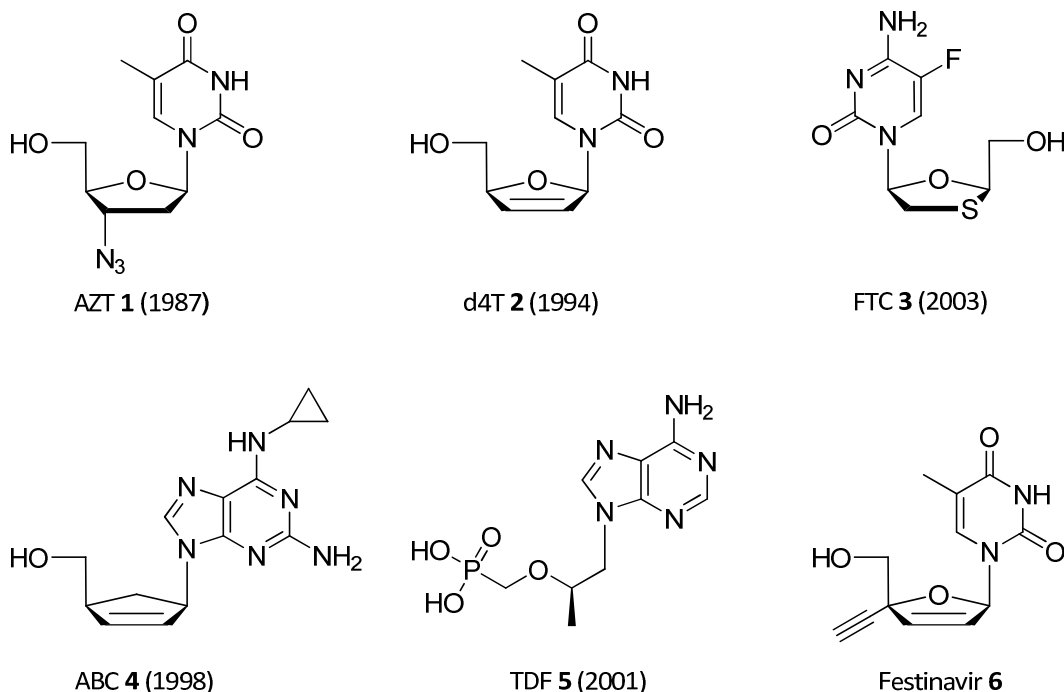


Abb. 3: Ausgewählte gegen das HI-Virus wirksame N(t)RTI (Jahr der Zulassung in den USA).

Ein aussichtsreicher Kandidat als anti-HIV Wirkstoff ist das 4'-Ethinyl-substituierte d4T-Analogon Festinavir **6**, das bei geringerer Toxizität eine 5-10-fach höhere Aktivität gegen das HI-Virus besitzt als d4T **2** und derzeit klinisch getestet wird.<sup>[9,10]</sup>

Da die RT im Vergleich zu humanen DNA-Polymerasen eine hohe Fehlerrate beim Einbau von Nucleotiden aufweist (ein falsches pro 1700 Nucleotide), kann es bei der Monotherapie mit N(t)RTI schnell zur Resistenzbildung kommen.<sup>[11]</sup> Dies führte zur Entwicklung der hochaktiven, antiretroviralen Therapie (HAART), bei der in der Regel zwei N(t)RTI (sog. *Backbone*) mit einem nicht-nucleosidischen RT-Inhibitor (NNRTI) oder einem Proteaseinhibitor (PI) kombiniert werden.<sup>[12]</sup> Die Wirkung der NNRTI beruht auf allosterischen Effekten, die aus der Bindung des Wirkstoffs in der Nähe des aktiven Zentrums der RT resultieren.<sup>[13]</sup> Weitere Ansatzpunkte für die HIV-Therapie sind die Unterbindung der Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom (Integraseinhibitoren)<sup>[14]</sup> sowie das Verhindern des Eindringens des Viruspartikels in die Zelle (*Entry*-Inhibitoren)<sup>[15]</sup>. Trotz aller Fortschritte in der Therapie von HIV und AIDS in den letzten Jahrzehnten stellt eine Infektion nach wie vor eine große medizinische Herausforderung dar, da die bekannten Therapieverfahren die Viruslast im Körper zwar drastisch senken, das Virus aber nicht vollständig entfernen können. So lebten im Jahr 2010 ca. 34 Millionen Menschen mit einer HIV-Infektion.<sup>[12]</sup> Zusätzlich macht die hohe Mutationsrate des Virus die Verbesserung der bekannten Behandlungen, die weitere Suche nach neuen Wirkstoffen und neuartigen Therapieansätzen nötig.

Ein weiteres Anwendungsgebiet für Nucleosidanaloga ist die Behandlung einer Hepatitis-B-Infektion, von der weltweit ca. 350 Mio. Menschen betroffen sind.<sup>[16]</sup> Das Hepatitis-B-Virus (HBV) ist ein Hepadnavirus, das seine Erbinformation im Gegensatz zu HIV in Form von DNA in die Wirtszelle einbringt. Allerdings besitzt auch das HBV eine RT, die nach Transkription und Translation der Strukturproteine die virale RNA in DNA umschreibt, die als Teil eines neuen Viruspartikels die Wirtszelle verlässt. Daher ist auch im Fall des HBV die RT ein effektiver Angriffspunkt für Therapeutika.<sup>[16]</sup> Derzeit sind sieben NRTI zur Behandlung von HBV-Infektionen zugelassen. Dazu gehört neben den auch als anti-HIV-Wirkstoffe eingesetzten Emtricitabin **3** und Tenofovir **5** u. a. das carbocyclische Desoxyguanosin-



analogon Entecavir (ETV **7**), das trotz des Vorhandenseins einer 3'-Hydroxyfunktion hohe Aktivität als RT-Inhibitor zeigt. In diesem Fall wird nach dem Einbau des Wirkstoffs der DNA-Strang noch um einige Nucleotide verlängert, bevor die Replikation abbricht. Dieser Mechanismus ist vermutlich auf die Konformationsänderung im Glycon zurückzuführen, die aus dem Austausch des Ringsauerstoffs durch eine Methylengruppe resultiert und eine Veränderung der Ausrichtung der 3'-Hydroxyfunktion im aktiven Zentrum der RT zur Folge hat.<sup>[17]</sup>

Bei dem Hepatitis-C-Virus (HCV) handelt es sich um ein RNA-Virus aus der Familie der Flaviviren. Ein *Target* für Wirkstoffe zur Behandlung einer HCV-Infektion ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B, die eine entscheidende Rolle im Replikationscyclus des HCV spielt. Zu den gängigen Therapeutika gehört das Ribonucleosid Ribavirin **8**, das als NS5B-Inhibitor in Kombination mit Interferon- $\alpha$  eingesetzt wird.<sup>[18]</sup> Ein vielversprechender Wirkstoff ist auch das in 2'-Position methyl- und fluorsubstituierte Uridinanalogen **9**, das in Form eines Phosphoramidatpronucleotids (Sofosbuvir) klinisch getestet wird.<sup>[19]</sup> Weiterhin ist eine große Zahl nucleosidanaloger anti-HCV-Wirkstoffe in der Entwicklung.<sup>[20]</sup>

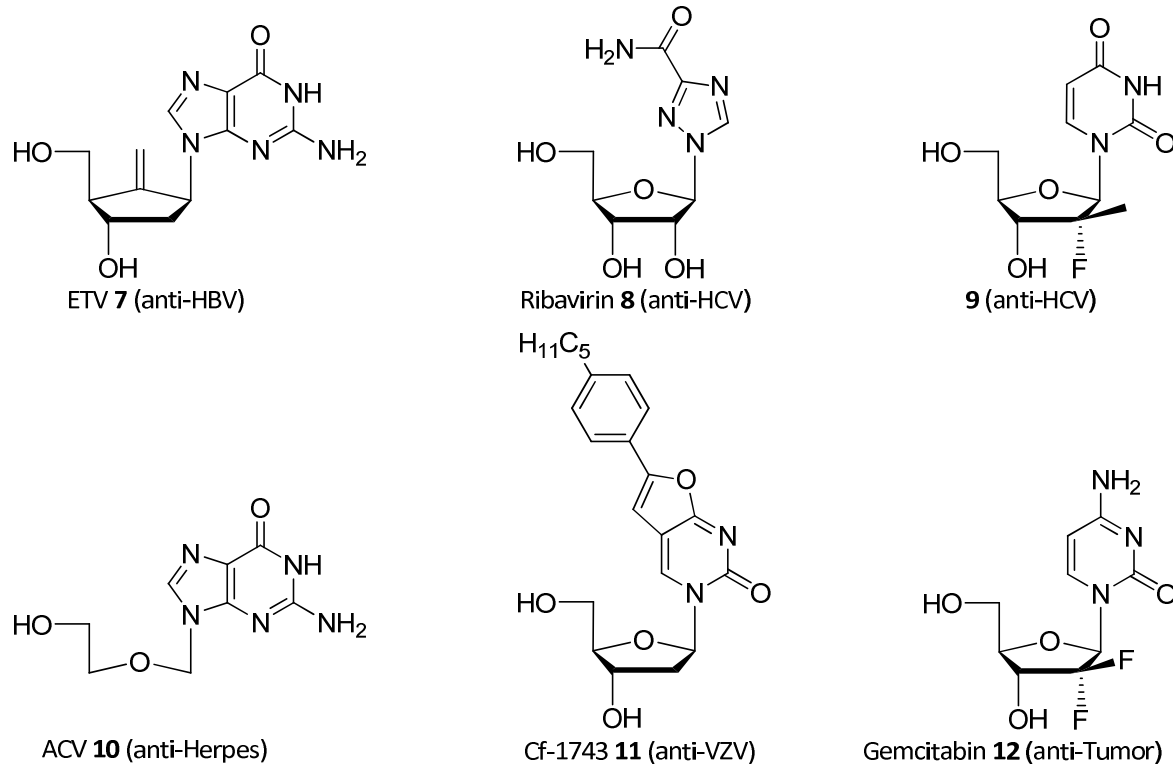


Abb. 4: Nucleosidanaloga mit unterschiedlicher pharmakologischer Wirkung.

Das acyclische Guanosinanalogen Aciclovir (ACV **10**) zeigt Aktivität gegen eine Reihe von Herpesviren, wie das Herpes-Simplex-Virus (HSV), das Varicella-Zoster-Virus (VZV), das Epstein-Barr-Virus (EBV) sowie das humane Cytomegalie-Virus (HCMV) und ist der Wirkstoff des bekannten anti-Herpes Medikamentes Zovirax® (GlaxoSmithKline).<sup>[21]</sup> Ein Wirkstoff, der selektiv und potent gegen das VZV wirkt, das Windpocken und Gürtelrose hervorruft, ist das bicyclische Nucleosidanalogen (BCNA) Cf-1743 **11**, das sich in klinischen Studien befindet.<sup>[22]</sup>

Ein Beispiel für den Einsatz von Nucleosidanaloga in der Krebstherapie ist das Cytostatikum 2',2'-Difluoro-2'-desoxycytidin (Gemcitabin **12**).<sup>[23]</sup> Nach Einbau des Wirkstoffs anstelle von Desoxycytidin während der DNA-Replikation wird der DNA-Strang noch um ein weiteres Nucleotid verlängert, was das Herausschneiden des Wirkstoffs durch Exonucleasen verhindert. Anschließend bricht die DNA-Replikation ab.<sup>[24]</sup> Zusätzlich können phosphorylierte Metabolite von Gemcitabin **12** auch weitere Enzyme inhibieren, die bei der DNA-Replikation wichtige Funktionen übernehmen. Neben **12** werden noch weitere Nucleosidanaloga als Cytostatika in der Chemotherapie gegen Krebs eingesetzt.<sup>[25]</sup>

Wie die natürlich vorkommenden Nucleoside müssen auch die Nucleosidanaloga als 5'-Triphosphate vorliegen, um in DNA oder RNA eingebaut werden zu können und antivirale bzw. cytostatische Wirkung zu zeigen. Diese Triphosphate werden in drei voneinander unabhängigen Phosphorylierungsreaktionen durch humane Kinasen des *salvage-pathway* oder viruseigene Kinasen aufgebaut. Da diese Enzyme hohe Substratspezifität aufweisen, ist häufig einer der Phosphorylierungsschritte geschwindigkeitsbestimmend für die Bioaktivierung der Nucleosidanaloga. Ist einer der Schritte stark gehemmt, kann dies die Aktivität des Wirkstoffs signifikant verringern oder gänzlich unterbinden.<sup>[26]</sup> Die Untersuchung unterschiedlicher Strategien, dieses Problem zu umgehen, stellt den Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

## 2. KENNTNISSTAND

### 2.1. Prodrugs und Pronucleotidkonzepte

Als Prodrugs werden im Allgemeinen biologisch inaktive Verbindungen bezeichnet, die an ihrem Wirkort chemisch oder enzymatisch in eine biologisch aktive Verbindung umgewandelt werden. Mit Hilfe solcher Vorläuferverbindungen lassen sich beispielsweise Probleme wie schlechte Wasserlöslichkeit, chemische Instabilität, schlechte Aufnahme in den Körper und in die Zellen sowie *first-pass* Effekte und Toxizität umgehen.<sup>[27]</sup> Dazu müssen die Prodrugs während des Transports zu ihrem Wirkort in unterschiedlichen Medien stabil sein (je nach Applikationsform z. B. im Magensaft, Blutplasma etc.), eine gute Membrangängigkeit aufweisen um in Zellen eindringen oder die Blut-Hirn-Schranke überwinden zu können und an ihrem Wirkort schnell den entsprechenden Wirkstoff freisetzen.<sup>[27]</sup>

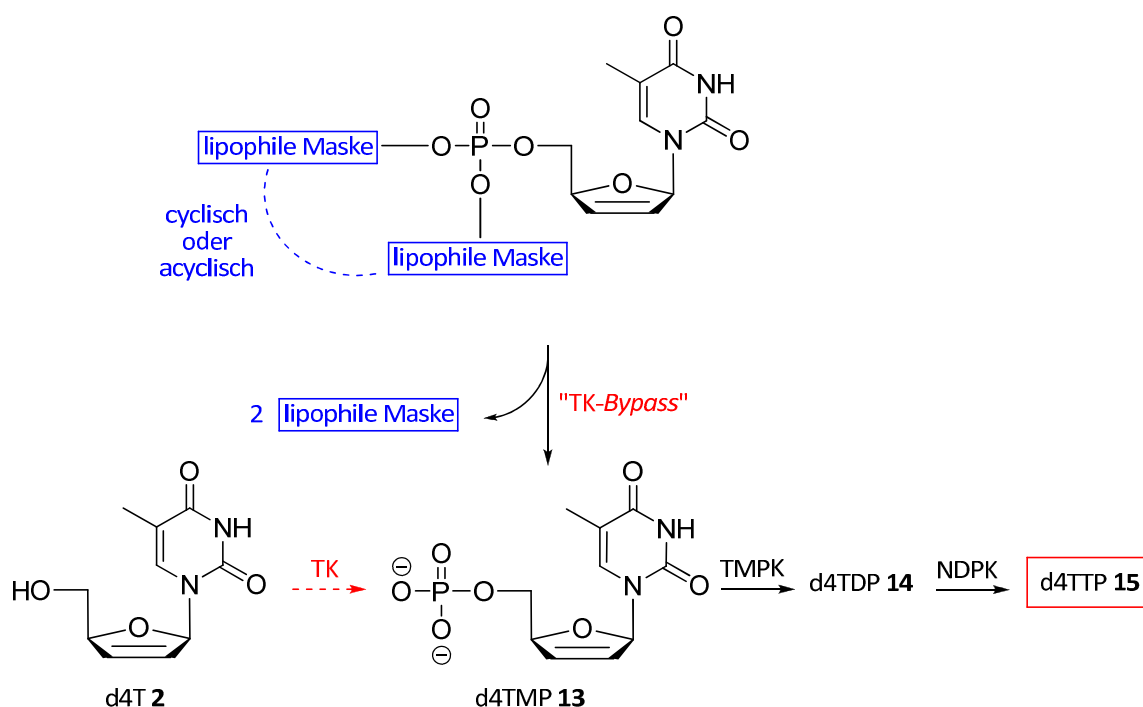


Abb. 5: Prinzip des Pronucleotidkonzepts am Beispiel von d4T 2.

Die als pharmazeutische Wirkstoffe eingesetzten Nucleosidanaloga sind in der Regel Prodrugs ihrer bioaktiven Nucleosid-5'-triphosphate. Die intrazelluläre Phosphorylierung wird schrittweise durch virale Kinasen oder humane Kinasen des *salvage-pathway*

bewerkstelligt. Aufgrund der hohen Substratspezifität dieser Enzyme kann einer oder mehrere dieser Phosphorylierungsschritte für die Nucleosidanaloga stark verlangsamt sein.<sup>[26]</sup> So ist zum Beispiel für den anti-HIV Wirkstoff d4T **2** der erste Phosphorylierungsschritt, der durch die Thymidinkinase (TK) katalysiert wird, gehemmt.<sup>[28]</sup> Im Fall von AZT **1** stellt hingegen die zweite Phosphorylierung durch die Thymidylatkinase (TMPK) den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar.<sup>[29]</sup>

Eine Strategie, dieses Problem zu umgehen, ist die direkte Verabreichung der bereits phosphorylierten Nucleoside (sog. *TK-Bypass*). Aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatgruppe(n) ist es diesen hydrophilen Molekülen allerdings nicht möglich, die lipophile Zellmembran zu überwinden. Dies führte zur Entwicklung unterschiedlicher Konzepte, durch lipophile Substituenten die Ladungen des Phosphats zu maskieren und so membrangängige Prodrugs zu generieren, die intrazellulär die entsprechenden Nucleosid-5'-phosphate freisetzen. Dieses Konzept ist am Beispiel von d4T **2** (Abb. 5, S. 7) gezeigt. Der überwiegende Teil dieser Konzepte befasst sich mit Nucleosidmonophosphatprodrugs, die auch als Pronucleotide bezeichnet werden.<sup>[30,31]</sup>

### 2.1.1. Unterschiedliche Pronucleotidkonzepte

Einige der wichtigsten Pronucleotidkonzepte sind in Abb. 6 (S. 9) gezeigt. Bei dem überwiegenden Teil findet intrazellulär eine enzymatische Abspaltung der lipophilen Substituenten statt, was zur Freisetzung des entsprechenden Monophosphats führt. Alle hier vorgestellten Konzepte wurden auf eine Vielzahl unterschiedlicher Nucleosidphosphate und -phosphonate angewendet und mit diversen unterschiedlich substituierten Masken evaluiert. Die ersten Nucleosidmonophosphatprodrugs wurden 1984 von FARQUHAR ET AL. veröffentlicht.<sup>[32]</sup> Dabei wurden zwei Acyloxyalkylestergruppen verwendet, die intrazellulär zunächst durch Carboxyesterasen an der Esterfunktion gespalten werden, um dann aus dem daraus gebildeten Hydroxymethyl-Intermediat durch Abspaltung von Formaldehyd das Nucleosidmonophosphat freizusetzen. In Abb. 6 (S. 9) ist exemplarisch das Bis[pivaloyloxymethyl] (Bis[POM])-Prodrug des Antitumorwirkstoffs 5-Fluor-2'-desoxyuridin **16** gezeigt.<sup>[33]</sup>

Auch bei dem Bis[S-acylthioethyl] (Bis[SATE])-Prodrug **17** nach IMBACH ET AL. erfolgt die Initiierung der Spaltung der Maske durch eine Carboxyesterase. Nach anschließender Abspaltung von Thiiran wird das Nucleosidmonophosphat erhalten.<sup>[34,35]</sup>

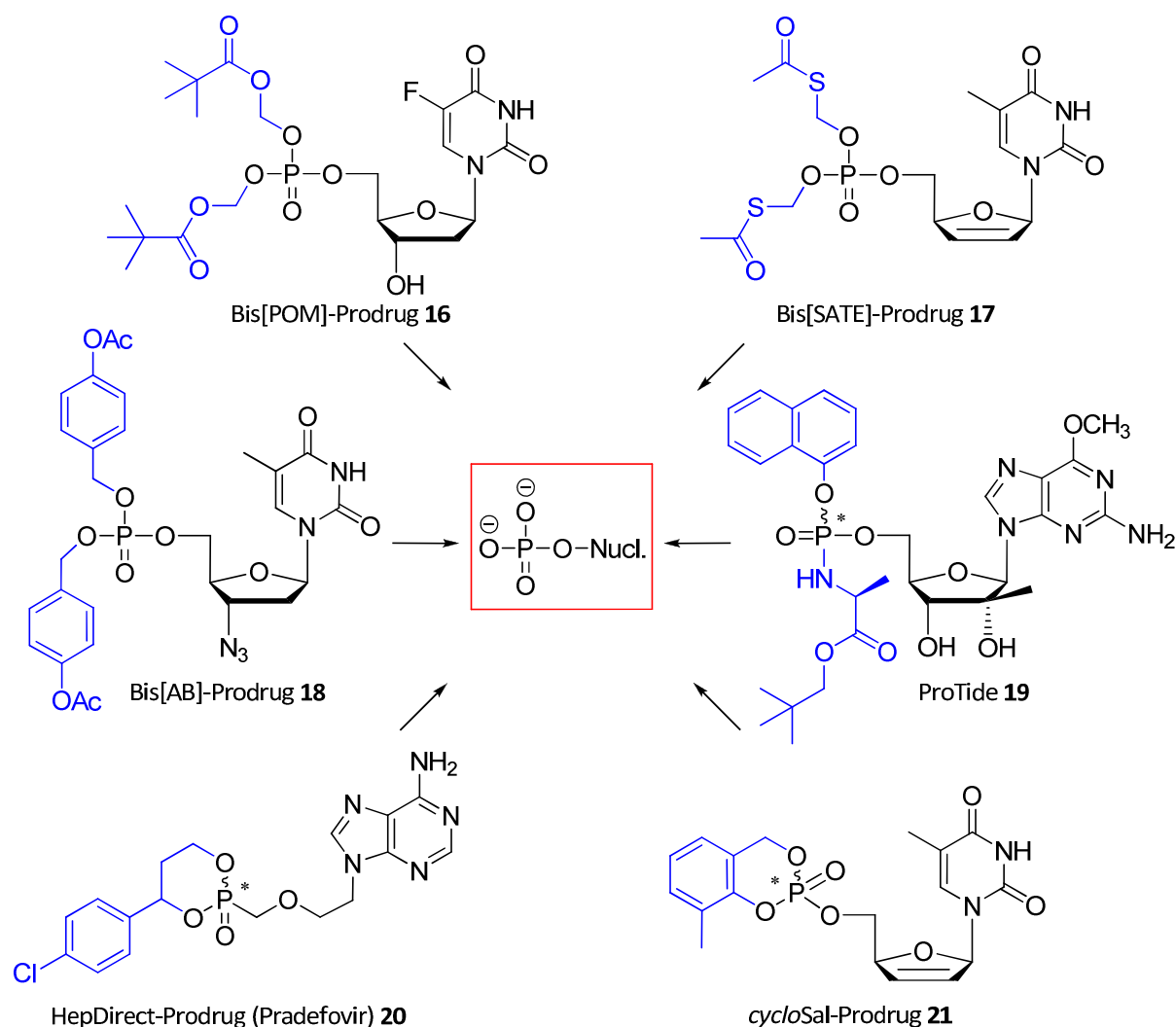


Abb. 6: Pronucleotide als Beispiele für unterschiedliche Pronucleotidkonzepte.

Die Freisetzung von AZT-Monophosphat aus dem Bis[acyloxybenzyl] (Bis[AB])-Prodrug **18** beginnt mit der Spaltung des Acylesters in *para*-Position des Phenylrings. Aus dem so gebildeten 4-Hydroxybenzylester spaltet sich ein Chinonmethid ab, das mit Wasser zu 4-Hydroxybenzylalkohol reagiert. Nach der Abspaltung der zweiten Maske auf analogem Weg wird AZT-Monophosphat gebildet.<sup>[36]</sup>

Eines der am meisten angewendeten und am besten untersuchten Konzepte stellen die Phosphoramidatprodrugs (ProTides) nach MCGUIGAN ET AL. dar.<sup>[37]</sup> In diesem Fall befinden sich

zwei unterschiedliche Substituenten an der Phosphateinheit: Ein Alkylester einer L-Aminosäure sowie eine Aryloxy- oder Alkyloxyeinheit. An der Abspaltung der Masken sind vermutlich zwei Enzyme beteiligt. Eine Esterase spaltet den Aminosäureester, was zu einer spontanen Cyclisierung unter Verlust des Alkyl- oder Aryloxysubstituenten führt. Nach der folgenden Ringöffnung wird die Aminosäure unter Bildung des Nucleosidmonophosphats durch eine Phosphoramidase abgespalten.<sup>[38]</sup> Das in Abb. 6 (S. 9) gezeigte Pronucleotid **19** ist ein hochpotenter anti-HCV-Wirkstoff, der sich derzeit in klinischen Studien befindet.<sup>[39]</sup>

Zur selektiv in der Leber stattfindenden Wirkstofffreisetzung wurden die HepDirect-Prodrugs entwickelt. Der Freisetzungsmechanismus beruht auf Cytochrom P<sub>450</sub>-vermittelter Oxidation des direkt der Phosphateinheit benachbarten Kohlenstoffatoms. Das so gebildete Hemiketal reagiert nach spontaner Ringöffnung und  $\beta$ -Eliminierung unter Abspaltung eines Arylvinylnketons zum freien Phosphat.<sup>[40]</sup> Aufgrund dieses Mechanismus wurde das HepDirect-Konzept auf eine Vielzahl von Wirkstoffen gegen Lebererkrankungen angewendet, wie das als Beispiel gezeigte Phosphonatprodrug Pradefovir **20**.<sup>[41]</sup>

Bei dem von MEIER ET AL. entwickelten *cycloSal*-Konzept erfolgt die Abspaltung der Maske durch hydrolytische Spaltung der Phenylesterbindung und anschließenden Bruch der Benzylesterbindung.<sup>[42]</sup> Bei der in Abb. 6 (S. 9) gezeigten Verbindung handelt es sich um das 3-Methyl-*cycloSal*-d4T-monophosphat **21**.<sup>[43,44]</sup> Da die Untersuchung und Anwendung des *cycloSal*-Konzepts einen Schwerpunkt dieser Arbeit darstellt, wird dies im folgenden Abschnitt ausführlich beschrieben.

### 2.1.2. Pronucleotide nach dem *cycloSal*-Konzept

Bei Pronucleotiden nach dem *cycloSal*-Konzept werden zur Maskierung Salicylalkohole unterschiedlicher Substitutionsmuster verwendet. Einfache *cycloSal*-Prodrugs kommen ohne enzymatische Spaltung aus. Im Vergleich zu den meisten gängigen Pronucleotidkonzepten zeichnet sich die *cycloSal*-Technik dadurch aus, dass mit nur einer cyclischen Maske beide Ladungen des Phosphats geschützt werden, sodass pro Mol freigesetzten Wirkstoffs nur ein Mol der Maske als Nebenprodukt entsteht. Der in Abb. 7 (S. 11) am Beispiel des d4T-Prodrugs **21** gezeigte Mechanismus der intrazellulären Phosphatfreisetzung beruht auf einer

rein chemischen hydrolytischen Spaltung der Phenylesterbindung in einer  $S_N1$ -Reaktion aus der der Benzylphosphatdiester **22** resultiert. Durch die erste Bindungsspaltung wird der zur Benzylesterbindung *ortho*-ständige Substituent von einem schwachen Donor (Phosphat) zu einem starken Donor (Hydroxy). Durch diese Umpolung wird ein spontaner Bruch der Benzylesterbindung induziert, aus dem das entsprechende Nucleosidmonophosphat (d4TMP **13**) und der Salicylalkohol **23** resultieren. Letzterer wird vermutlich zunächst als Chinonmethid **24** abgespalten und nach Addition von Wasser erhalten. Findet zunächst in einer  $S_N1$ -artigen Reaktion die Spaltung der Benzylesterbindung statt, wird der hydrolysestabile Phenylphosphatdiester **25** gebildet, aus dem eine Freisetzung des Nucleosidphosphats **13** nicht zu erwarten ist.<sup>[42]</sup>

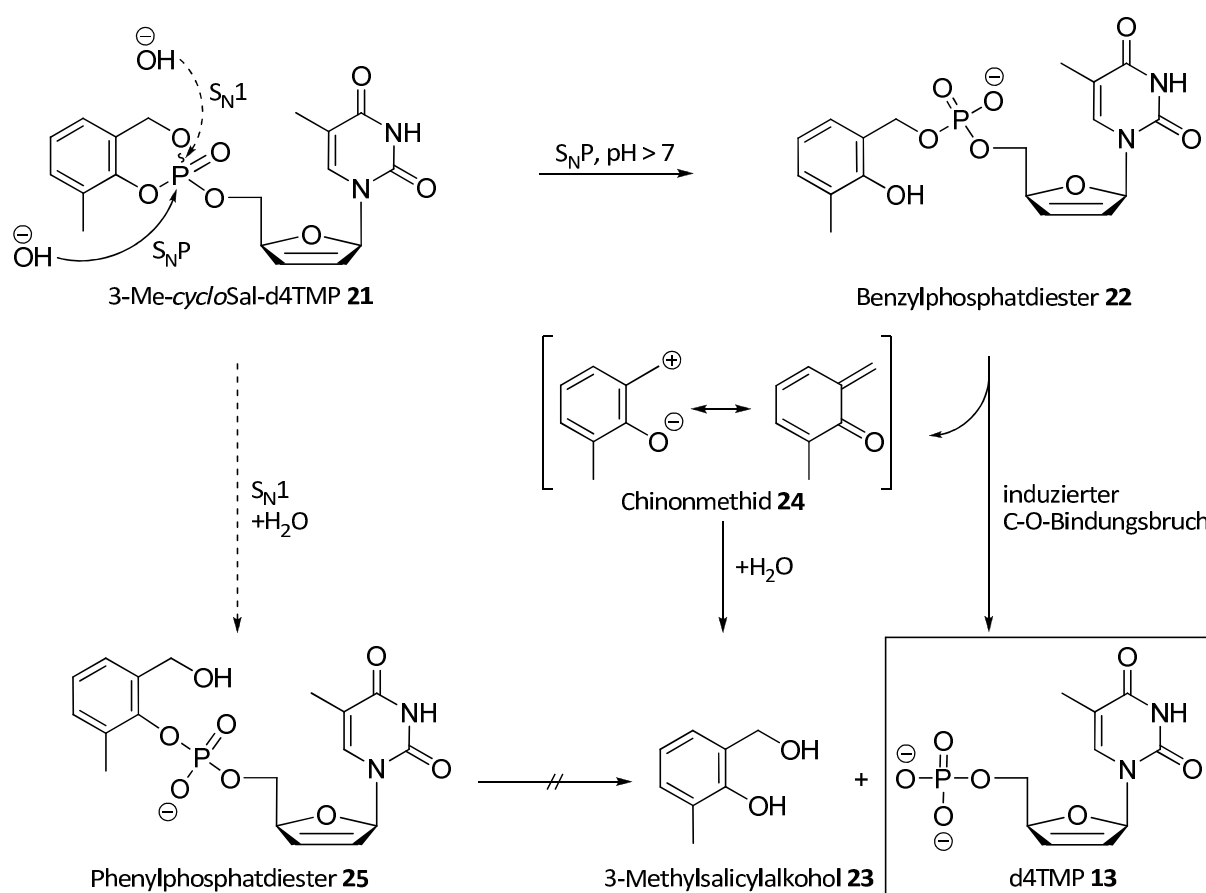


Abb. 7: Hydrolysemechanismus des *cycloSal*-Pronucleotids **3-Me-cycloSal-d4TMP 21**.

Die Hydrolysegeschwindigkeit und der Hydrolyseweg können durch die Wahl der Substituenten am Salicylalkohol gesteuert werden. Donorsubstituenten in 3-Position führen zu einer Erhöhung der Hydrolysehalbwertszeit, während Akzeptorsubstituenten in der

5-Position diese verringern, da sie die Elektrophilie des Phosphorzentrums erhöhen und somit den Angriff eines Nucleophils erleichtern. Donorsubstituenten in Benzylposition führen zu einer Bevorzugung der  $S_N1$ -Reaktion durch Stabilisation des intermediär gebildeten Carbokations. Eine Auswahl an Substitutionsmustern für *cycloSal*-Pronucleotide der 1. Generation sind am Beispiel eines d4T-Prodrugs in Abb. 8 gezeigt. Neben d4TMP **13** wurde das *cycloSal*-Konzept auf eine Vielzahl weiterer Nucleosidphosphate und -phosphonate angewendet.<sup>[42]</sup>

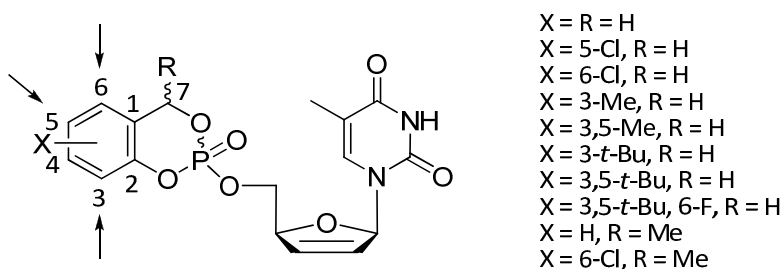


Abb. 8: Ausgewählte Substitutionsmuster von *cycloSal*-Pronucleotiden der 1. Generation.

Eine Weiterentwicklung des Konzepts stellen die *cycloSal*-Pronucleotide der 2. Generation mit „*lock-in*“-Modifikationen dar. Diese tragen Substituenten am Salicylalkohol, die nach dem Eindringen in die Zelle schnell enzymatisch gespalten werden, wodurch ein polares Intermediat erzeugt wird, dem ein erneutes Passieren der Zellmembran nicht möglich ist. Intrazellulär werden diese Intermediate anschließend nach dem in Abb. 7 (S. 11) gezeigten Mechanismus hydrolysiert. Ein Beispiel ist die in Abb. 9 (S. 13) gezeigte 5-Acylfunktionalisierte Verbindung **26**, die durch Esterasespaltung und Verlust von Formaldehyd zu dem polaren Intermediat **27** reagiert.<sup>[45]</sup> Eine weitere Möglichkeit der „*lock-in*“-Modifikation ist die Verwendung von Aminosäureestern als enzymspaltbarer Gruppe.<sup>[46]</sup> In beiden Fällen verhindert ein Ethylenspacer zwischen enzymatisch spaltbarer Gruppe und Phenylring einen direkten Einfluss der Enzymreaktion auf die Hydrolysegeschwindigkeit. Im Unterschied dazu führt bei den enzymatisch aktivierbaren *cycloSal*-Prodrugs der 3. Generation die enzymatische Esterspaltung zu einer Umpolung des Substituenten von einem schwachen zu einem starken Akzeptor, was eine schnelle chemische Hydrolyse zur Folge hat.<sup>[47]</sup> Anhand des in Abb. 9 (S. 13) gezeigten 5-(1-Acetoxyvinyl)-substituierten Pronucleotids **28** ist die Bildung der 5-acetylsubstituierten Verbindung **29** nach enzymatischer Spaltung der Esterfunktion mit anschließender schneller Hydrolyse zum d4TMP **13** gezeigt. Der „*lock-in*“



findet bei diesen Verbindungen auf der Stufe des Nucleotids statt.<sup>[48]</sup> Trotz erfolgreicher intrazellulärer Freisetzung des Wirkstoffs konnte bei den *cycloSal*-Pronucleotiden der 2. und 3. Generation keine Verbesserung der antiviralen Aktivität erreicht werden. Dies ist vermutlich auf eine anteilige extrazelluläre Spaltung der Verbindungen zurückzuführen.

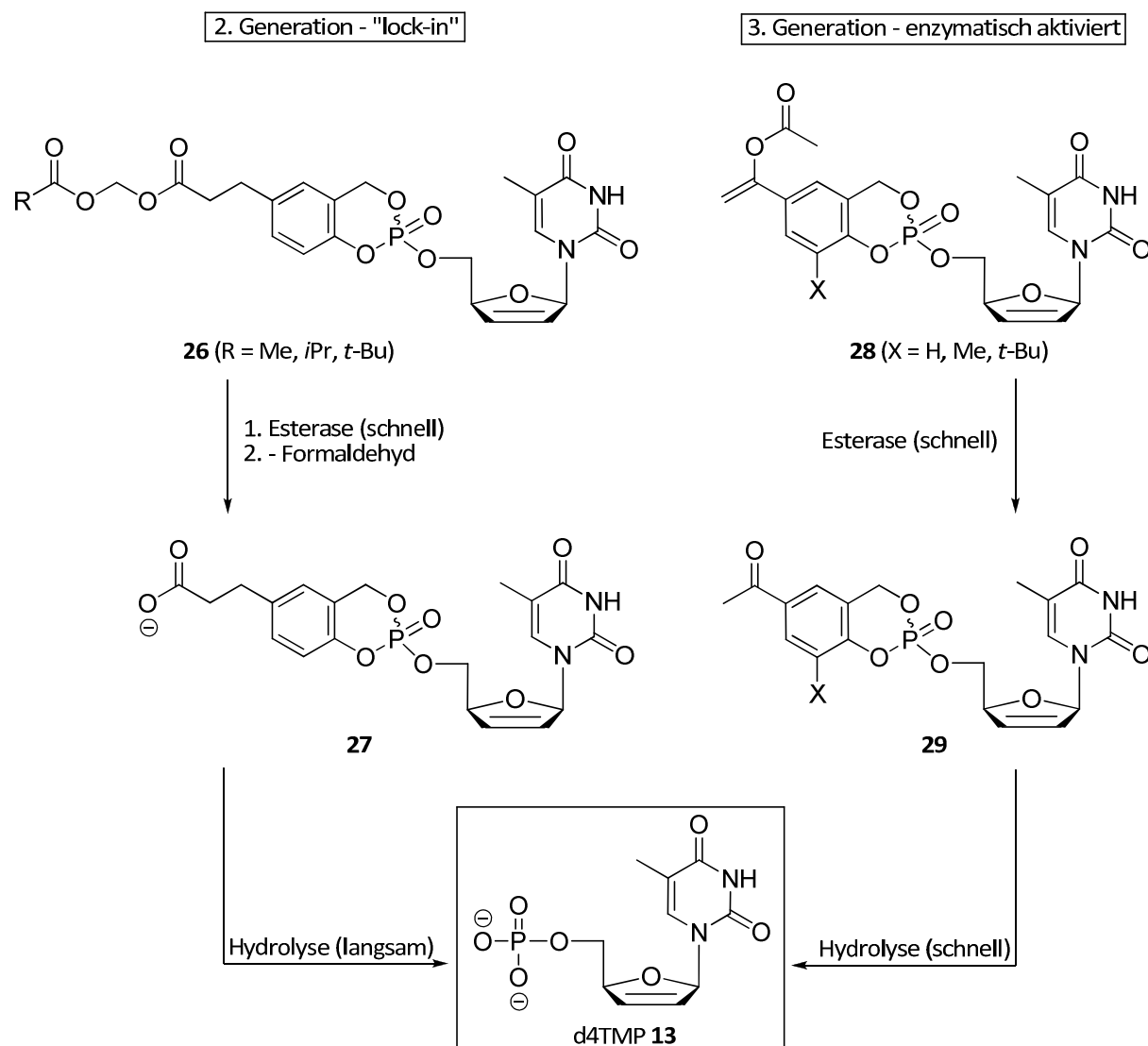


Abb. 9: *cycloSal*-Pronucleotide der 2. und 3. Generation mit jeweiligem Spaltungsmechanismus.

Ein besonders effizientes Verhältnis von Maske zu Wirkstoff von 1:2 wurde durch die in Abb. 10 (S. 14) gezeigten Verbindungen realisiert. Neben d4T-Prodrugs wie Verbindung **30**<sup>[49]</sup> wurde das Konzept von PARANG und AHMADIBENI aufgegriffen, die die Freisetzung zweier unterschiedlicher Wirkstoffe aus dem asymmetrischen Prodrug **31** zeigen konnten<sup>[50]</sup>.

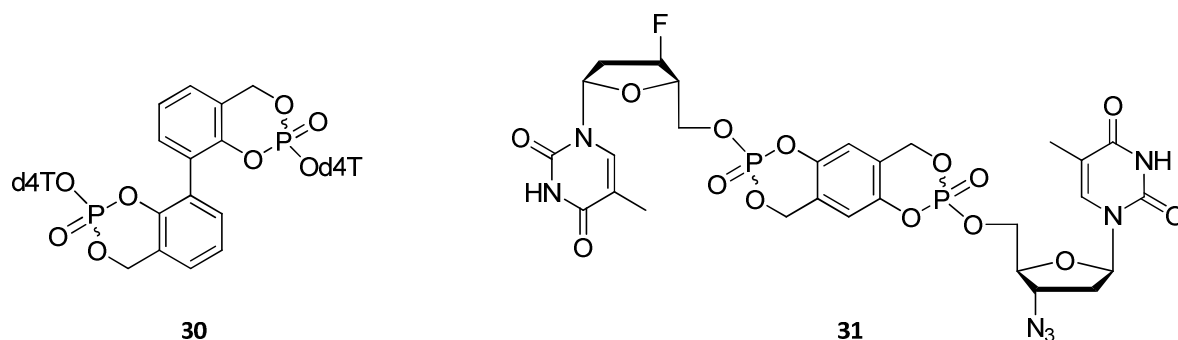


Abb. 10: Symmetrisches (**30**) und asymmetrisches (**31**) Bis-*cycloSal*-Pronucleotid.

Werden in Pronucleotidsystemen zwei unterschiedliche oder cyclische Masken verwendet, wie es bei dem *cycloSal*-Konzept aber auch bei den in Abb. 6 (S. 9) gezeigten HepDirect- und ProTide-Verbindungen der Fall ist, befindet sich ein stereogenes Zentrum am Phosphoratom. Diese Verbindungen liegen daher als Gemische zweier Diastereomere vor, deren Trennung sich als sehr aufwändig erweist und nur in einigen Fällen erfolgreich ist. Da sich die Hydrolysegeschwindigkeit und die antivirale Aktivität der Diastereomere signifikant voneinander unterscheiden können, wurde eine stereoselektive Synthese entwickelt, die unter Verwendung chiraler Auxiliare den Zugang zu *cycloSal*-Pronucleotiden mit hohen Diastereoselektivitäten ermöglicht. In Abb. 11 ist die Synthese von (*R<sub>p</sub>*)-**21** durch Kupplung von d4T **2** mit dem chiralen Phosphorchloridat (*S<sub>p</sub>*)-**32** gezeigt.<sup>[51]</sup>

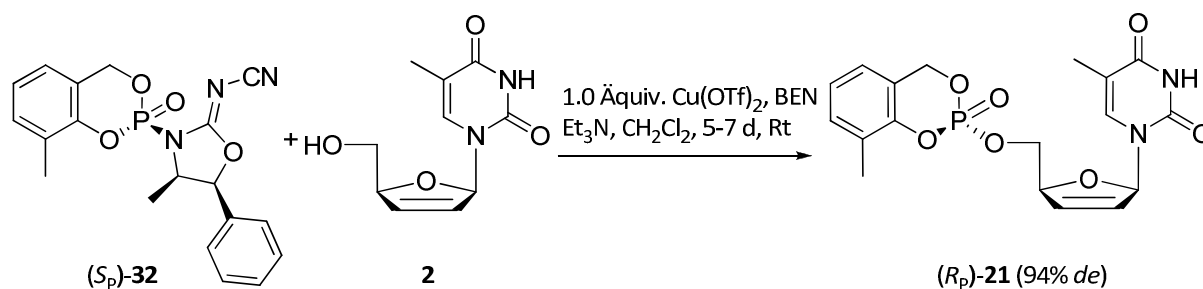


Abb. 11: Diastereoselektive Synthese von *cycloSal*-Pronucleotiden am Beispiel von (*R<sub>p</sub>*)-**21**.

### 2.1.3. Präparative Nutzung des *cycloSal*-Konzepts

Durch Angriff geeigneter Nucleophile am elektrophilen Phosphorzentrum eines *cycloSal*-Phosphatriesters lässt sich eine Vielzahl unterschiedlicher phosphorylierter Biomoleküle synthetisieren. So wurde dieses Konzept zur Synthese von Nucleosiddi- und -triphosphaten sowie zur Darstellung von Dinucleosidpolyphosphaten genutzt.<sup>[52,53]</sup> Unter Verwendung von deprotonierten Zuckern und Zuckerphosphaten als Nucleophile lassen sich Nucleosidmono- und -diphosphatzucker synthetisieren.<sup>[54-57]</sup> Diese Synthesestrategie eignet sich nicht nur zur Darstellung anomenreiner Nucleosidmono- und diphosphatglycopyranosen mit kurzen Reaktionszeiten und hohen Ausbeuten, sondern ermöglicht auch die Synthese dieser Verbindungen mit unterschiedlichen Modifikationen im Nucleosid- sowie im Glycopyranoseteil.<sup>[58-60]</sup> Zur Synthese werden *cycloSal*-Phosphatriester mit starken Akzeptorsubstituenten (NO<sub>2</sub>, Cl) in 5-Position des Salicylalkohols verwendet. Eine Übersicht über die synthetischen Möglichkeiten gibt Abb. 12.

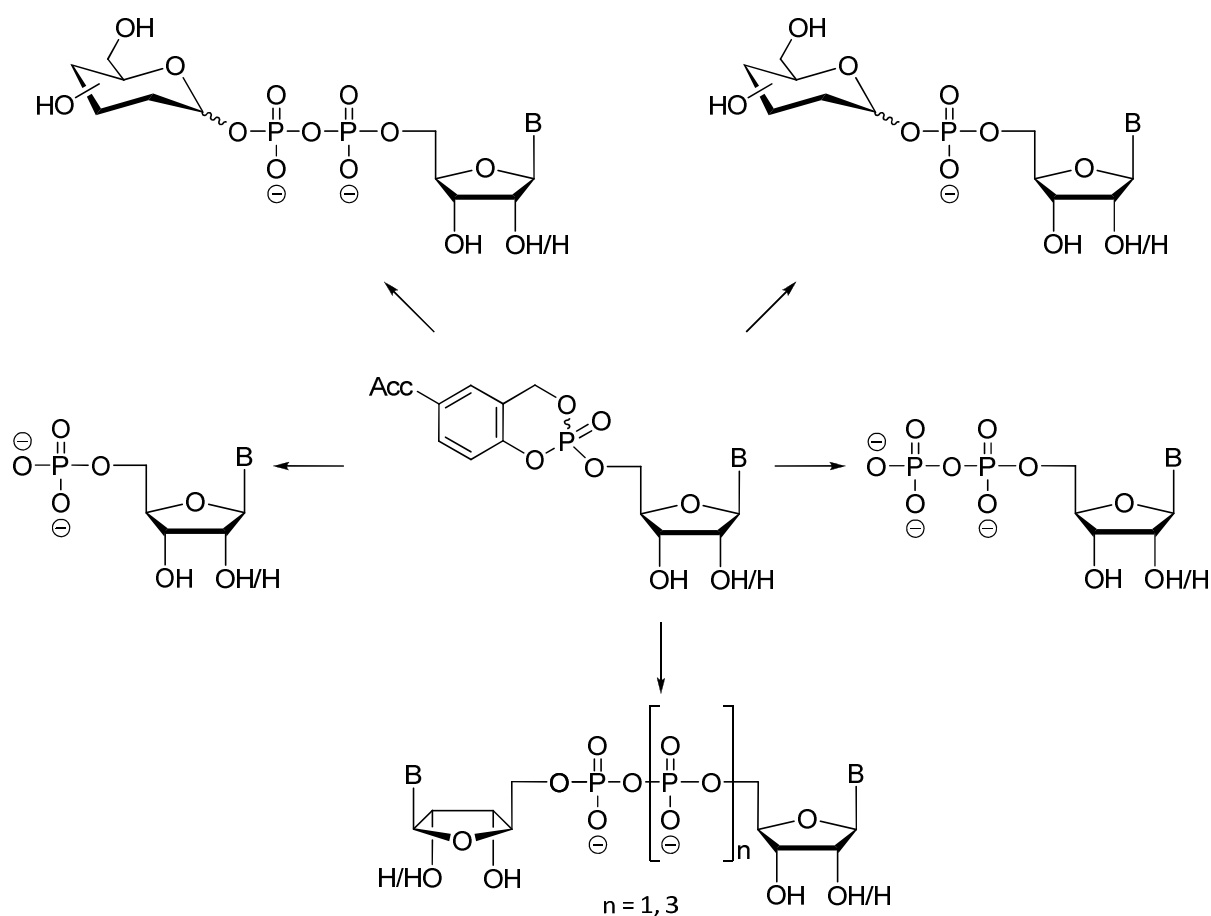


Abb. 12: Übersicht des Synthesepotentials des *cycloSal*-Konzepts (Acc = Akzeptorsubstituent).

#### 2.1.4. Nucleosiddiphosphatprodrugs nach dem DiPPro-Konzept

Während der Bioaktivierung von AZT **1** stellt die zweite Phosphorylierungsreaktion von AZTMP **33** zu AZTDP **34** den gehemmten Schritt dar (Abb. 13). Bei der HIV-Therapie mit AZT **1** kommt es daher zur intrazellulären Akkumulation von AZTMP **33**, was zu Nebenwirkungen und ineffizientem Aufbau von AZTTP **35** führt.<sup>[29]</sup>

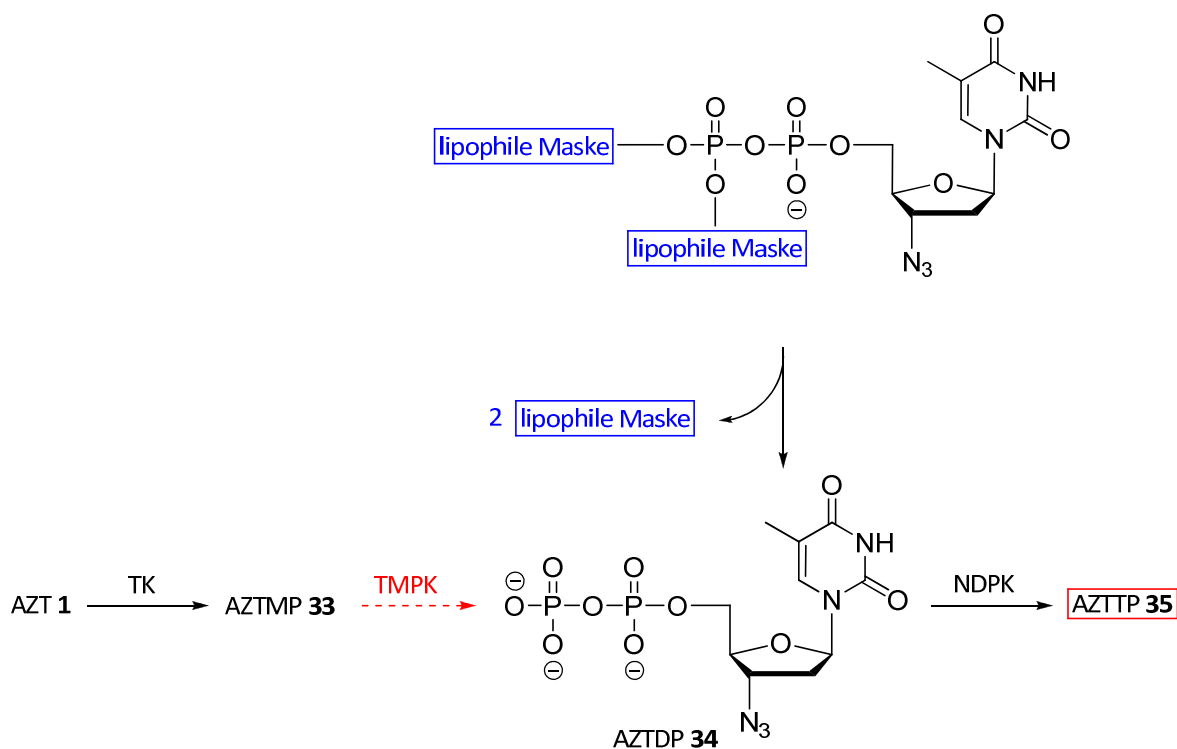


Abb. 13: Prinzip des DiPPro-Konzepts am Beispiel von AZT **1**.

Im Gegensatz zu der Vielfalt unterschiedlicher Strategien zur intrazellulären Freisetzung von Nucleosidmonophosphaten gibt es für die Entwicklung von Nucleosiddiphosphatprodrugs nur wenige Ansätze. HOSTETLER ET AL. nutzten Dimyristoylglycerol, um das  $\beta$ -Phosphat des Diphosphats von Aciclovir **10** zu maskieren, während zwei negative Ladungen an der Diphosphateinheit verblieben. Es wurde allerdings festgestellt, dass diese Verbindungen intrazellulär nicht wie gewünscht das Diphosphat, sondern durch Bruch der Phosphoanhydridbindung lediglich das Monophosphat freisetzen.<sup>[61]</sup> Ein weiteres System untersuchten BONNAFFÉ ET AL., die Nucleosidmono-, -di- und -triphosphate an der endständigen Phosphateinheit mit einer Acylfunktion schützten. Allerdings waren diese Verbindungen im RPMI-Zellkulturmedium bei der Durchführung antiviraler Tests nicht stabil.<sup>[62]</sup> Erste Versuche von JESSEN ET AL., das *cycloSal*-Konzept auf Nucleosiddiphosphate

anzuwenden, führten ebenfalls nicht zum Erfolg, da auch hier der Bruch der Anhydridbindung gegenüber der Abspaltung der Maske überwog.<sup>[63,64]</sup> Die Anwendung des bereits in Abb. 6 (S. 9) für Nucleosidmonophosphate gezeigten Bis(acyloxybenzyl)-Systems nach THOMSON ET AL.<sup>[36]</sup> war dagegen erfolgreich. Für die Modellverbindungen mit d4T **2** und AZT **1** als Nucleoside und Acylresten unterschiedlicher Kettenlänge wurde die Freisetzung des entsprechenden Nucleosiddiphosphats bei Hydrolysen in Phosphatpuffer (pH 7.3) und in CEM/O-Zellextrakten nachgewiesen, während die aus der Spaltung der Anhydridbindung resultierende Bildung des Monophosphats nur in untergeordnetem Maße beobachtet wurde.

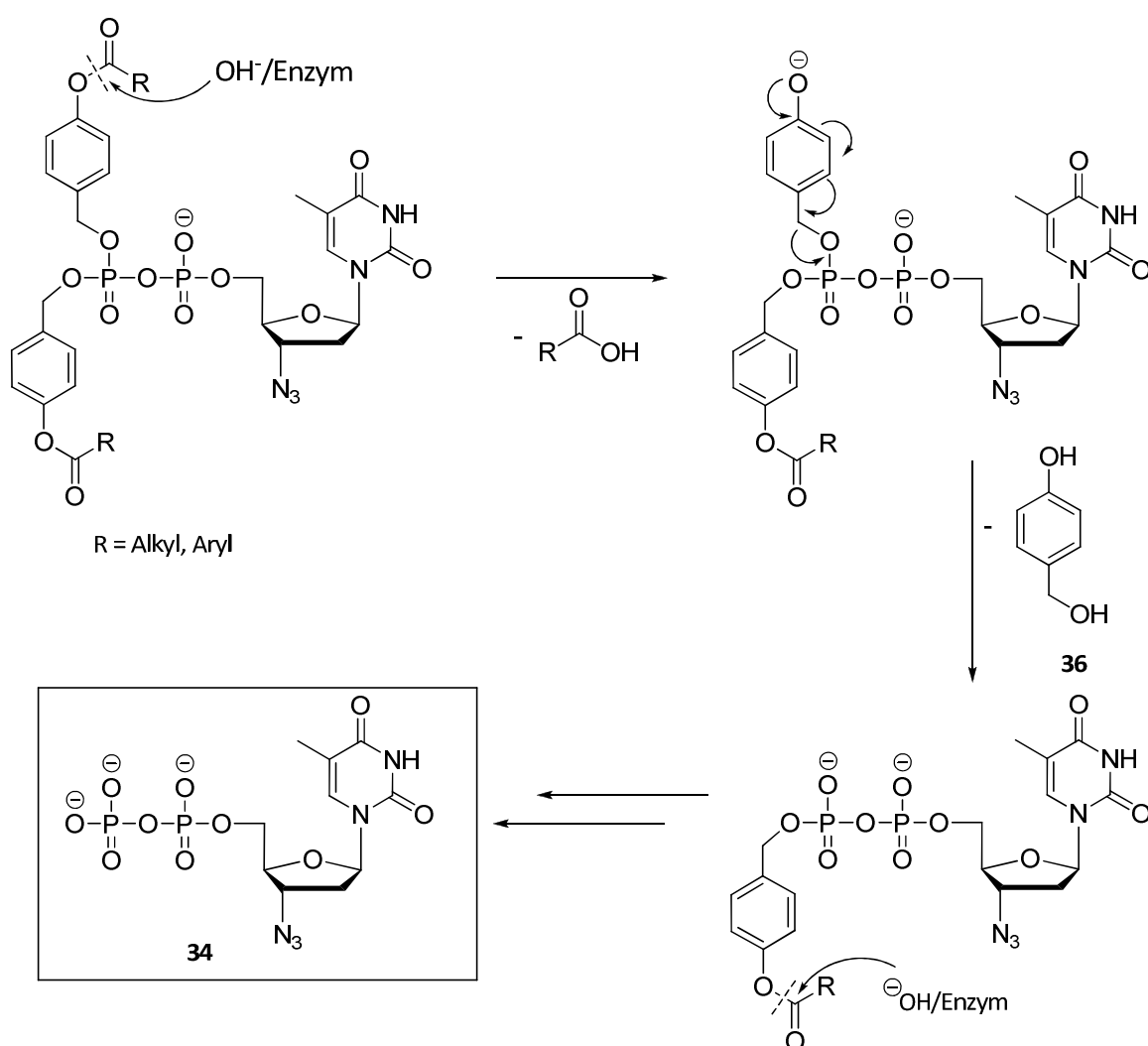


Abb. 14: Spaltung eines DiPPro-Nucleotids am Beispiel eines AZT-Prodrugs.

Der postulierte Spaltungsmechanismus ist in Abb. 14 gezeigt.<sup>[63,64]</sup> Zunächst wird die Acylesterfunktion einer der Masken enzymatisch oder hydrolytisch gespalten, gefolgt von

einer 1,6-Eliminierung, die zur Abspaltung eines Chinonmethids führt, das nach Addition von Wasser zu 4-Hydroxybenzylalkohol **36** reagiert.<sup>[65]</sup> Das so gebildete einfach maskierte Intermediat besitzt eine deutlich höhere Stabilität als das zweifach maskierte Prodrug, zeigt aber einen identischen Spaltungsmechanismus für die zweite Maske, nach dem schließlich AZTDP **34** freigesetzt wird. Durch den Vergleich der Hydrolysehalbwertszeiten in Phosphatpuffer (pH 7.3) und CEM/0-Zellextrakt konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Hydrolyse der Acylfunktion signifikant schneller abläuft. Für das AZT-Prodrug mit einem Methylsubstituenten konnte eine 500-fach schnellere Spaltung für die erste Hydrolyse und eine um das 2500-fache beschleunigte Hydrolyse für den zweiten Schritt im Zellextrakt gefunden werden.<sup>[63,64]</sup> Dies ist eine wichtige Eigenschaft dieser Prodrugs, da eine stark beschleunigte enzymatische Hydrolyse zu einer selektiven intrazellulären Freisetzung des Diphosphats führen sollte.

In ersten Versuchen zur Synthese von Nucleosiddiphosphatprodrugs war die Synthese von Tris(acyloxybenzyl)-Prodrugs, bei denen zusätzlich zu den Ladungen am  $\beta$ -Phosphat auch die am  $\alpha$ -Phosphat maskiert ist, nicht erfolgreich. Zur Stabilität der Prodrugs ist offenbar die negative Ladung am  $\alpha$ -Phosphat notwendig, da diese einen nucleophilen Angriff, der zur Spaltung der Anhydridbindung führen würde, erschwert.<sup>[66]</sup> Die daraus resultierende Polarität kann durch die Wahl der Substituenten an der Acylfunktion kompensiert werden. Allerdings nimmt mit zunehmender Kettenlänge nicht nur die Lipophilie, sondern auch die Halbwertszeit des Prodrugs zu, was wiederum zu einem verstärkten Auftreten der konkurrierenden Anhydridspaltung führt. Dieses Phänomen wurde unter Verwendung unterschiedlicher Kettenlängen eingehend untersucht.<sup>[67]</sup> Durch Verwendung von Aryl- statt Alkylgruppen an der Acylfunktion kann die Hydrolysestabilität der Prodrugs in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster am Aromaten gesteuert werden. Die Auswirkungen von aktivierenden und deaktivierenden Substituenten auf das Hydrolyseverhalten der Prodrugs konnten anhand unterschiedlicher Beispiele evaluiert werden.<sup>[68]</sup> In Abgrenzung zu anderen Prodrugkonzepten wird das hier vorgestellte System als DiPPro-Konzept bezeichnet, was sich von Diphosphatprodrug ableitet.

## 2.2. Verfahren zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration von Wirkstoffen

Um die Effektivität pharmazeutischer Wirkstoffe zu evaluieren ist es notwendig, deren Konzentration an ihrem Wirkort sowie die Konzentration potentiell toxischer Metabolite bestimmen zu können. Dazu genutzte analytische Verfahren müssen hochspezifisch für die untersuchten Verbindungen sein und eine hohe Sensitivität aufweisen. Je nach analysiertem Medium ist häufig eine aufwändige Probenvorbereitung nötig, während der der Analyt stabil sein muss. Drei Verfahren und deren Anwendung auf Nucleosidanaloga und Nucleotidprodrugs werden im Folgenden vorgestellt: radioaktive Markierung, Fluoreszenzmarkierung und LC-MS Methoden.

### 2.2.1. Radioaktiv markierte Pronucleotide

Radioaktiv markierte Verbindungen lassen sich mit sehr niedrigen Nachweisgrenzen in biologischen Medien nachweisen. Dazu ist die Synthese entsprechender Verbindungen, die ein radioaktives Isotop in einem geeigneten Molekülteil tragen, nötig. Ein Vorteil dieser Methoden ist, dass die Isotopenmarkierung nahezu keinen Einfluss auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften und auf die enzymatische Umsetzung des Analyten hat. Ein allgemeiner Nachteil ist der hohe experimentelle Aufwand, die Notwendigkeit strikter Sicherheitsauflagen sowie hohe Kosten für die markierten Moleküle. Eine klassische Anwendung der Isotopenmarkierung zur Aufklärung biochemischer Prozesse stellt die DNA-Sequenzierung dar, bei der in der Regel  $^{32}\text{P}$ - oder  $^{35}\text{S}$ -markierte Nucleosidtriphosphate als Sonden verwendet werden.<sup>[69]</sup>

Erste Untersuchungen zu Zellaufnahme und intrazellulärem Metabolismus von 3-Methyl-*cycloSal*-d4TMP **21** und 3-Methyl-*cycloSal*-AZTMP wurden mit Verbindungen durchgeführt, die an der Methylgruppe der Nucleobase eine Tritiummarkierung tragen. Zellen verschiedener Zelllinien wurden für unterschiedliche Zeiträume und mit verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach anschließender Zelllyse und Extraktion der Analyten wurden diese *via* HPLC getrennt und die einzelnen Fraktionen mit einem Szintillationsdetektor analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass in

beiden Fällen das Nucleosidmonophosphat effizient freigesetzt wird, dieses im Fall von AZT **1** aber wie erwartet akkumuliert und nur wenig zum AZTDP **34** umgesetzt wird.<sup>[70,71]</sup>

KORTYLEWICZ ET AL. synthetisierten unterschiedliche *cycloSal*-Pronucleotide von 5-[<sup>125</sup>I]-2'-desoxyuridin, das aufgrund seiner Radiotoxizität einen potentiellen anti-Tumor Wirkstoff darstellt. Da diese Wirkung räumlich begrenzt ist, tritt ein Effekt nur auf, wenn das Nucleosidanalogon in einen DNA-Strang eingebaut wird und somit irreparable Brüche in diesem Strang hervorrufen kann. Daher ist eine effektive Zellaufnahme und Umsetzung zum Nucleosidtriphosphat notwendig. Anhand der radioaktiv markierten Nucleobase ließ sich die Zellaufnahme dieser Verbindungen detailliert beobachten. Die Untersuchung der getrennten Diastereomere zeigte eine Abhängigkeit der Zellaufnahme von der absoluten Konfiguration am Phosphorzentrum.<sup>[72]</sup>

### 2.2.2. Fluoreszenzmarkierte Pronucleotide

Die Verwendung fluoreszenzmarkierter Biomoleküle stellt eine weit verbreitete Methode in der Bioanalytik dar. Ein besonders prominentes Beispiel ist die Verwendung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) für dessen Entwicklung CHALFIE, SHIMOMURA und TSIEN im Jahr 2008 den Chemienobelpreis erhielten. Daneben gibt es eine große Zahl unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe, die als Fluorophore eingesetzt werden können, um biochemische Prozesse *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Diese Farbstoffe müssen sich in ihrer Anregungswellenlänge ausreichend von denen anderer in der Zelle vorhandener Fluorophore (z. B. aromatische Aminosäuren) unterscheiden, um eine selektive Anregung zu gewährleisten und dürfen Struktur und Eigenschaften des Analyten möglichst wenig verändern. Zusätzlich müssen sie über ausreichende chemische Stabilität im untersuchten Medium, Stabilität gegenüber Photobleaching sowie hohe Quantenausbeuten verfügen.<sup>[73]</sup>

Die Fluoreszenzmarkierung bietet gegenüber anderen Methoden den Vorteil, den Analyten durch wellenlängenselektive Anregung mittels Fluoreszenzmikroskopie direkt in der Zelle oder anderen komplexen Medien untersuchen zu können.



Nucleoside und Nucleotide können sowohl Markierungen am Glycon oder am Aglycon tragen. Zwei Beispiele sind das in Abb. 15 gezeigte, mit Fluorescein markierte Adenosin-analogon **37** und das mit Dansyl markierte Uridinderivat **38**.<sup>[74]</sup>

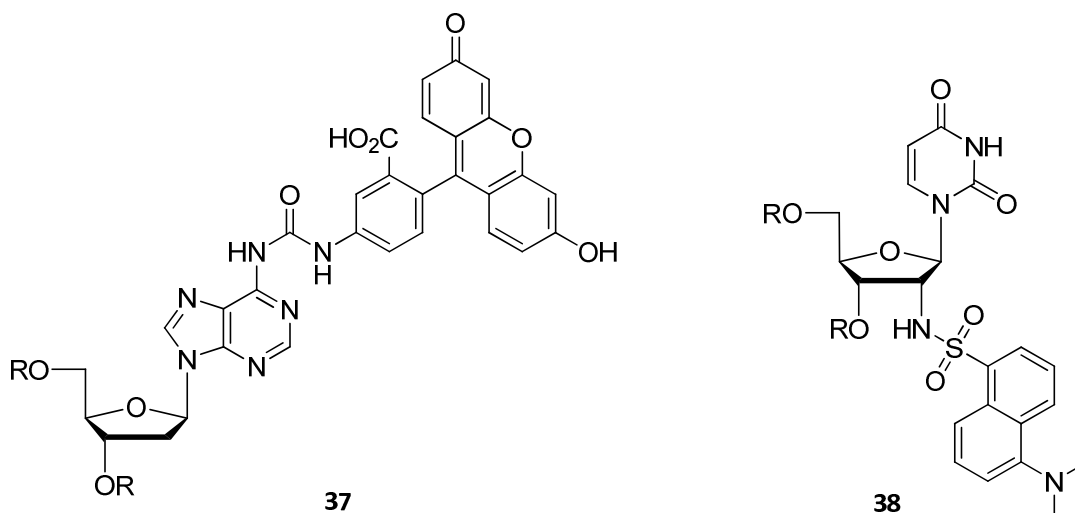


Abb. 15: Mit Fluorescein und Dansyl markierte Nucleosidanaloga.

Aufgrund ihrer Größe können die in Abb. 15 gezeigten Farbstoffe für die Markierung großer Moleküle wie DNA- oder RNA-Stränge verwendet werden, sind für die Untersuchung der Zellaufnahme von vergleichsweise kleinen Molekülen wie Pronucleotiden nicht geeignet, da sie deren Diffusionseigenschaften zu sehr verändern. Eine Möglichkeit, diese Verbindungen zu untersuchen, bietet die Verwendung intrinsisch fluoreszierender Nucleosidanaloga, bei denen eine in ihrer Struktur nur leicht modifizierte Nucleobase als Fluorophor dient. Einige Beispiele solcher modifizierter Nucleobasen sind in Abb. 16 gezeigt.<sup>[75]</sup>

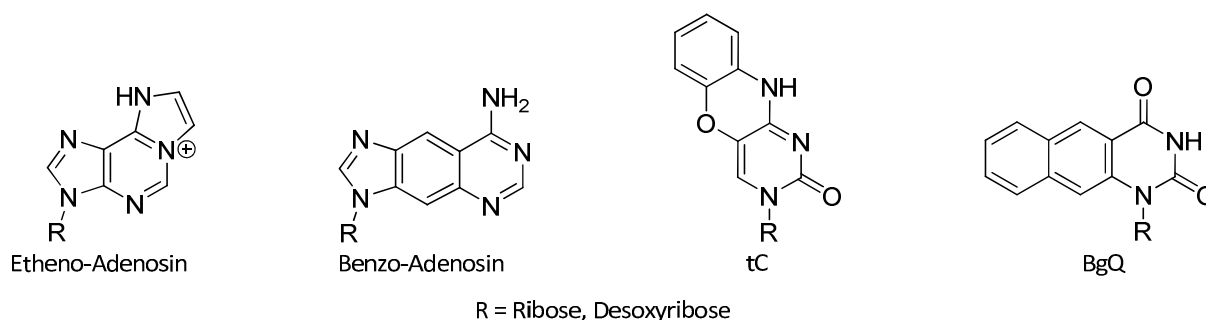


Abb. 16: Beispiele modifizierter Nucleobasen als Fluorophore.

Erste Untersuchungen zur Zellaufnahme von *cycloSal*-Pronucleotiden unter Verwendung intrinsisch fluoreszierender Nucleosidanaloga wurden von JESSEN durchgeführt. Dazu wurden

die 3-Methyl-*cycloSal*-Triester sowie Prodrugs mit „lock-in“-Modifikationen der in Abb. 17 gezeigten Nucleoside  $dm^5K$  **39a**,  $ddm^5K$  **39b**, *iso*-dA **40a**, *iso*-ddA **40b** und *iso*-d4A **40c** sowie *carba-iso*-ddA **40d** und *carba-iso*-d4A **40e** und das DiPPro-Nucleotid **41** synthetisiert.<sup>[66,76]</sup>

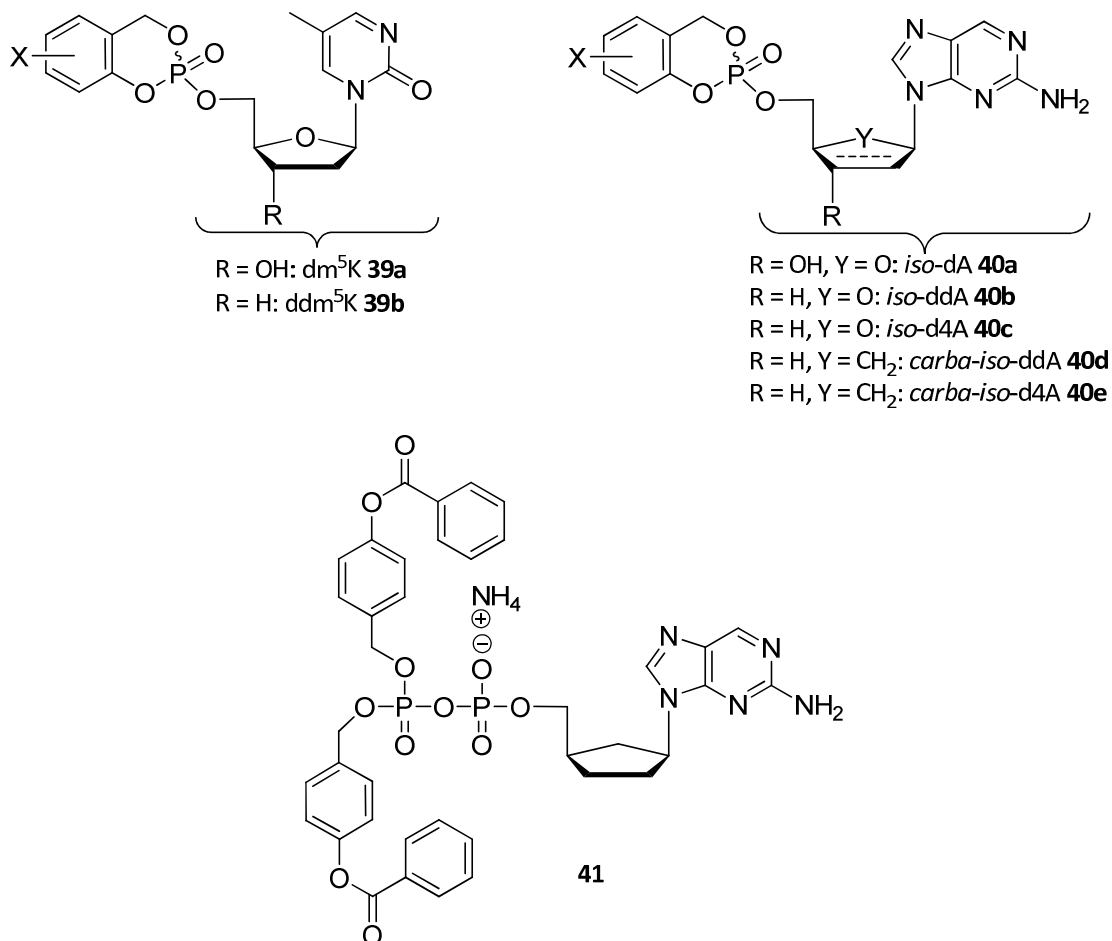


Abb. 17: Prodrugs von Nucleosiden der  $m^5K$ - und der *iso*-A-Reihe.

Die in Abb. 17 gezeigten Verbindungen wurden auf ihre Fluoreszenz- und Hydrolyse-eigenschaften hin eingehend untersucht. Allerdings war die Anwendung für Zellaufnahmestudien unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie nicht erfolgreich. Die Anregungswellenlängen ( $\lambda_{ex}$  = 314 nm für  $m^5K$ -Derivate,  $\lambda_{ex}$  = 305 nm für *iso*-A-Derivate) sind zu kurzweilig, um mit den für die Messungen zur Verfügung stehenden Lichtquellen ausreichend angeregt zu werden, da die minimale Anregungswellenlänge hier 350 nm betrug.<sup>[66]</sup>

### 2.2.3. Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie

Eine weitere häufig verwendete Methode, um die intrazelluläre Konzentration pharmazeutischer Wirkstoffe und deren Metabolite zu analysieren, ist die Kopplung flüssigkeitschromatographischer Trennmethoden mit massenspektrometrischer Analyse. Hierzu ist eine Isolierung der Analyten aus dem biologischen Medium nötig, der sich eine chromatographische Trennung anschließt. Hierzu wird in der Regel die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) verwendet.<sup>[77]</sup> Die folgende massenspektrometrische Detektion erlaubt sowohl die qualitative als auch die quantitative Analyse der zu untersuchenden Verbindungen. Für die Anwendung dieser Methode auf die Untersuchung von Nucleosiden und Nucleotiden in unterschiedlichen Medien stellt die chromatographische Trennung der polaren Nucleotide unter für die Massenspektrometrie geeigneten Bedingungen die größte Herausforderung dar. Indirekte Methoden beruhen auf der Dephosphorylierung der Nucleotide und Trennung der resultierenden Nucleoside unter RP-HPLC-Bedingungen.<sup>[78,79]</sup> Aufgrund der aufwändigen Probenvorbereitung sind indirekte Methoden mit einem vergleichsweise großen systematischen Fehler behaftet. Bei der Verwendung direkter Methoden werden für die Trennung der Nucleotide in der Regel Ionenpaarungsreagenzien bei der RP-HPLC verwendet, die zu Ionensuppression und Kontamination der Ionenquelle bei der Massenspektrometrie führen können. Neuere direkte Methoden beruhen auf einer Trennung der Nucleotide an alternativen Säulenmaterialien wie z. B. HILIC- oder Graphitsäulen.<sup>[78,79]</sup>

### 3. AUFGABENSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Methoden zur Untersuchung der intrazellulären Freisetzung von Nucleosidmono- und -diphosphaten aus Prodrugs. Dazu sollten drei Ansätze verfolgt werden. Zum einen sollten *cycloSal*- und *DiPPro*-Nucleotide von 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrouridin (d4U) **42** und 2',3'-Dideoxyuridin (ddU) **43** synthetisiert werden, um deren Hydrolyseverhalten bei pH-abhängiger und enzymatischer Hydrolyse sowie deren Aktivität gegen das HI-Virus zu untersuchen. Zum anderen sollten *cycloSal*- und *DiPPro*-Nucleotide bicyclischer Nucleosidanaloga (BCNA) dargestellt und ebenfalls auf ihr Hydrolyseverhalten hin untersucht werden. Da die BCNA starke Autofluoreszenz zeigen, sollten die synthetisierten Verbindungen als Sonden für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden, um auf diese Weise Rückschlüsse auf deren intrazelluläre Konzentration ziehen zu können.

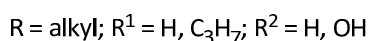
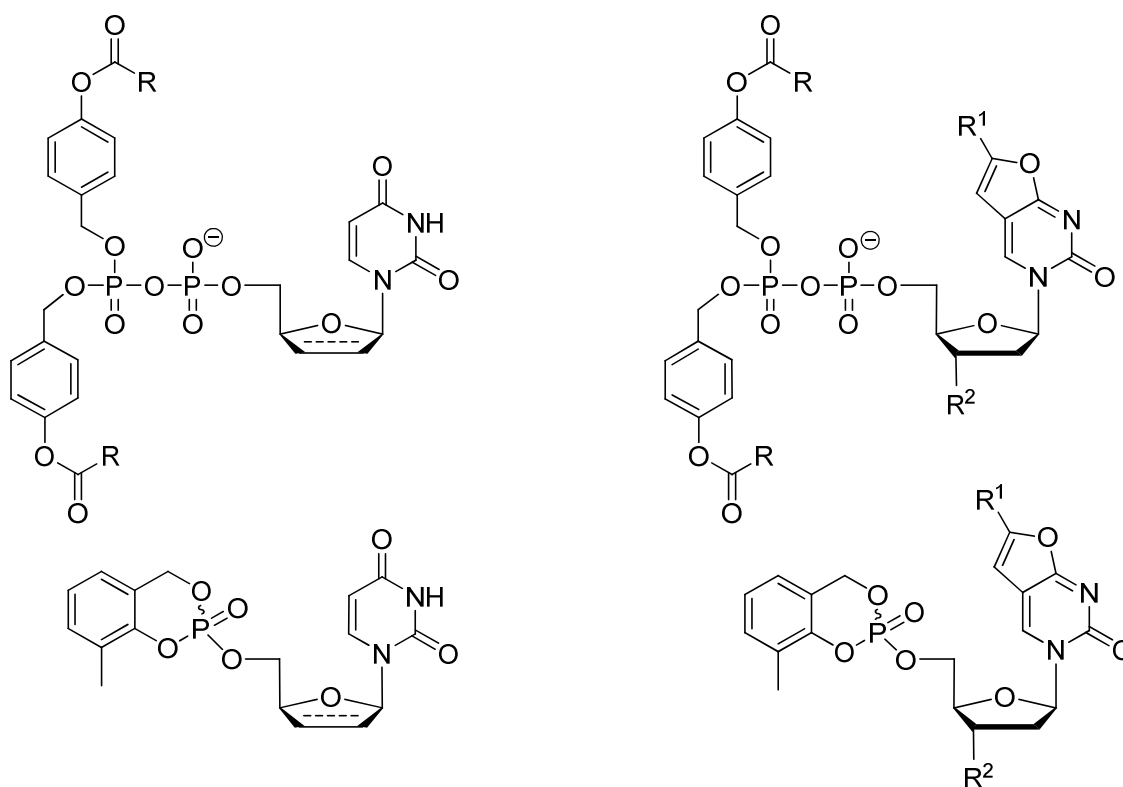


Abb. 18: Übersicht der zu synthetisierenden *cycloSal*- und *DiPPro*-Nucleotide.

In einem dritten Ansatz sollte eine Methode zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration von Nucleosidanaloga entwickelt werden, die auf der Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie beruht. Dazu sollten zunächst geeignete Bedingungen gefunden werden, die eine Trennung der Nucleosidphosphate und deren Prodrugs unter für die Massenspektrometrie geeigneten Bedingungen erlaubt. Anschließend sollte die neue Methode auf die Isolierung der Analyten aus zellulärem Medium und schließlich zur Durchführung von Zellaufnahmestudien angewendet werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Synthese einer fluoreszenzmarkierten Nucleosiddiphosphatpyranose unter Verwendung eines BCNA (Abb. 19). Verbindungen dieser Art stellen potentielle Fluoreszenzsonden für die Durchführung biochemischer Untersuchungen wie beispielsweise Ligandenaustauschassays zur Identifikation von Glycosyltransferaseinhibitoren dar. Für die Synthese sollte das *cycloSal*-Konzept genutzt werde.

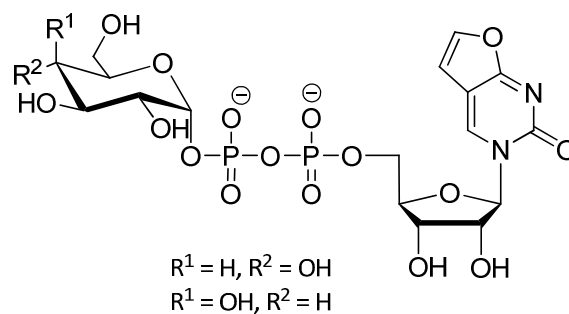


Abb. 19: Fluoreszenzmarkierter Nucleosiddiphosphatzucker.

#### 4. RESULTATE UND DISKUSSION

##### 4.1. Nucleosidmono- und -diphosphatprodrugs von 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrouridin (d4U) **42** und 2',3'-Dideoxyuridin (ddU) **43**

###### 4.1.1. Synthese von DiPPro-Nucleotiden

Die Synthese von DiPPro-Nucleotiden ist anhand eines Retrosyntheschemas in Abb. 20 gezeigt. Dabei stellt die Kupplung eines Nucleosidmonophosphats mit einem geeigneten Diisopropylaminophosphoramidit, das die zur Maskierung verwendeten Acyloxybenzylgruppen trägt, gefolgt von der Oxidation des  $\beta$ -Phosphoratoms den Schlüsselschritt der konvergenten Syntheseroute dar.

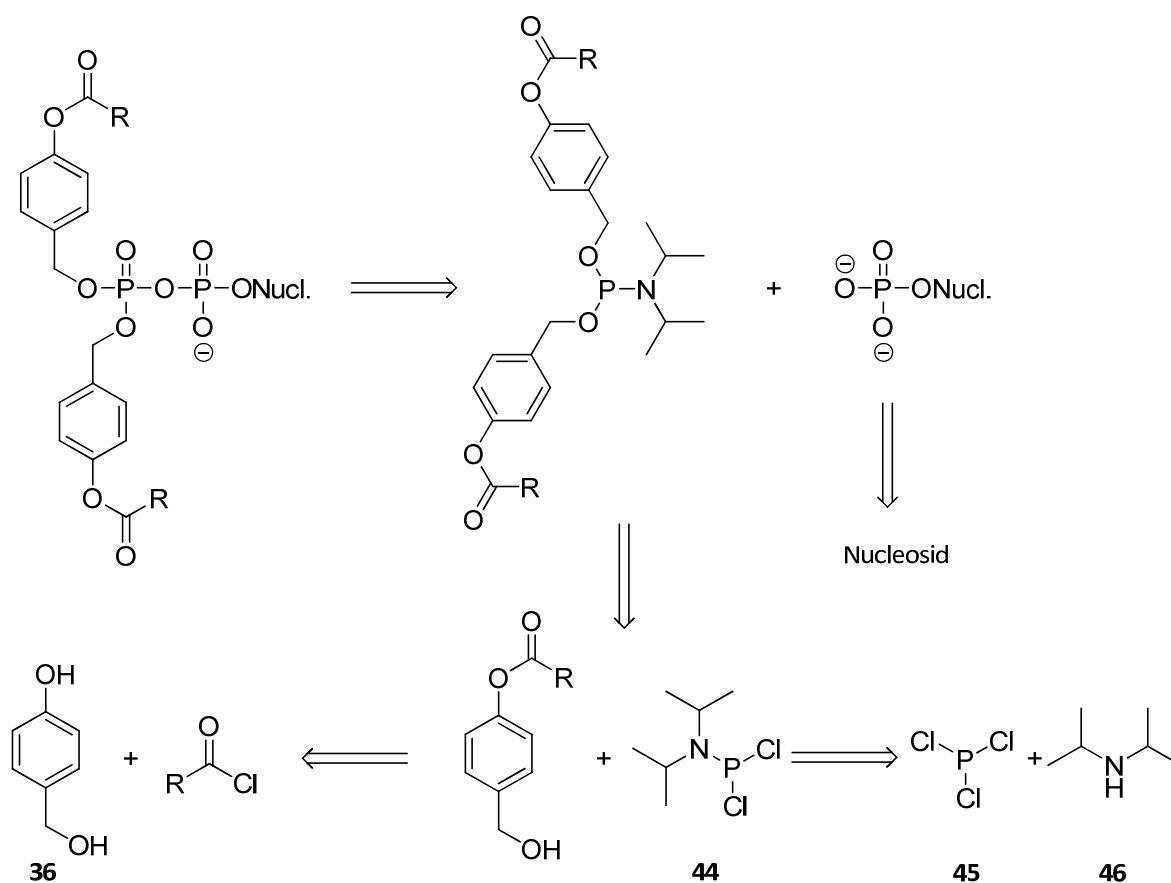


Abb. 20: Retrosyntheschema der Darstellung von DiPPro-Nucleotiden.

Die Phosphoramidite werden ausgehend von 4-Hydroxybenzylalkohol **36** durch Veresterung der phenolischen Hydroxyfunktion mit einem Carbonsäurechlorid, das einen

entsprechenden Alkylrest trägt und anschließende Reaktion mit Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **44** erhalten. Das Reagenz **44** wird durch Umsetzung von Phosphor(III)-chlorid **45** mit Diisopropylamin **46** hergestellt, während die Nucleosidmonophosphate in der Regel über wenige Stufen aus den entsprechenden Nucleosiden herstellbar sind.<sup>[66,67]</sup>

#### 4.1.2. Hydrolysemechanismus und antivirale Aktivität der DiPPro-Nucleotide von AZT **1** und d4T **2**

Nucleosiddiphosphatprodrugs nach dem DiPPro-Konzept wurden gezielt entwickelt, um intrazellulär die 5'-Diphosphate von Nucleosidanaloga freizusetzen und so die ersten zwei Phosphorylierungsschritte des Aufbaus der 5'-Triphosphate zu umgehen. Die Hydrolyse dieser Verbindungen in unterschiedlichen Medien wurde von JESSEN und SCHULZ eingehend untersucht.<sup>[63,64,66,67]</sup> Alternativ zur hydrolytischen oder enzymatischen Spaltung der Maske (Weg A), kann es zum Bruch der Phosphorsäureanhydridbindung zwischen dem  $\alpha$ - und dem  $\beta$ -Phosphat durch nucleophilen Angriff eines Hydroxidansions (Weg B) kommen, der trotz der negativen Ladung am  $\alpha$ -Phosphat nicht vollständig unterbunden werden kann (Abb. 21).

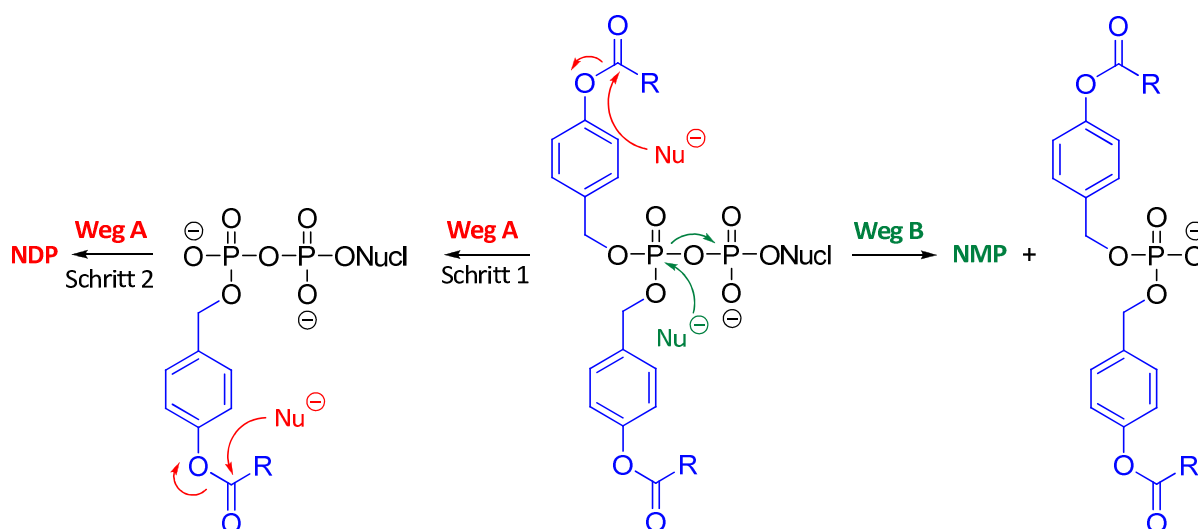


Abb. 21: Hydrolysemechanismus und alternative Spaltung der Anhydridbindung eines DiPPro-Nucleotids.

Durch diese Spaltung kommt es zur Freisetzung des Nucleosidmonophosphats sowie eines Phosphatdiesters, der zwei intakte Masken trägt. Aus dem einfach maskierten Intermediat konnte die Freisetzung des Monophosphats nicht beobachtet werden, da vermutlich die

zusätzliche negative Ladung am  $\beta$ -Phosphat einen nucleophilen Angriff ausschließt. Aufgrund dieser Tatsache ist die Menge des bei der Hydrolyse entstehenden Monophosphats abhängig von der Stabilität des intakten Prodrugs bzw. von der Geschwindigkeit der Bildung des einfach geschützten Intermediats. Da diese Geschwindigkeit wiederum von der Länge der Alkylkette der Acylfunktion abhängt, lässt sich der Schluss ziehen, dass mit zunehmender Länge der Alkylkette die Menge des gebildeten Monophosphats zunimmt.<sup>[66,67]</sup> Die ersten DiPPro-Nucleotide wurden mit unterschiedlichen Substituenten an der Acylfunktion mit AZT **1** und d4T **2** als Nucleoside synthetisiert und untersucht. Dabei zeigten einige dieser Verbindungen gute antivirale Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 und behielten diese Aktivität auch in Thymidinkinase defizienten Zellen (TK<sup>-</sup>). Diese Ergebnisse lassen auf eine erfolgreiche Diffusion der Verbindungen durch die Zellmembran sowie auf die intrazelluläre Bildung des bioaktiven 5'-Triphosphats schließen. Einige Beispiele sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Antivirale Daten unterschiedlicher DiPPro-Nucleotide.

Verbindung	EC <sub>50</sub> <sup>a</sup> [μM]			CC <sub>50</sub> <sup>b</sup> [μM]
	CEM/O		CEM/TK <sup>-</sup>	CEM/O
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
Nucl. = d4T <b>2</b> , R = C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> <sup>[67]</sup>	0.47 ± 0.28	1.1 ± 0.14	1.2 ± 0.28	85 ± 2.1
Nucl. = d4T <b>2</b> , R = C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> <sup>[67]</sup>	0.080 ± 0.042	0.32 ± 0.12	0.11 ± 0.042	62 ± 6.4
Nucl. = d4T <b>2</b> , R = C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> <sup>[67]</sup>	0.16 ± 0.042	0.35 ± 0.078	0.23 ± 0.064	39 ± 0.71
Nucl. = d4T <b>2</b> , R = Phenyl <sup>[66]</sup>	0.20 ± 0.0	0.30 ± 0.14	0.85 ± 0.07	36 ± 5
Nucl. = AZT <b>1</b> , R = CH <sub>3</sub> <sup>[66]</sup>	0.065 ± 0.074	0.037 ± 0.037	25.0 ± 0.0	73 ± 14
Nucl. = AZT <b>1</b> , R = Phenyl <sup>[66]</sup>	0.17 ± 0.14	0.05 ± 0.025	>10	23
d4T <b>2</b> <sup>[67]</sup>	0.86 ± 0.45	2.3 ± 2.4	173 ± 70	>250
AZT <b>1</b> <sup>[67]</sup>	0.024 ± 0.0	0.024 ± 0.013	>250	>250

<sup>a</sup>50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; <sup>b</sup>50% cytotoxische Konzentration

Da aber im Fall von AZT **1** und d4T **2** sowohl aus dem Nucleosid, als auch aus dem Nucleosidmonophosphat ausreichende Mengen des entsprechenden 5'-Triphosphats



gebildet werden können um antivirale Aktivität hervorzurufen, kann aus diesen Daten nicht auf eine erfolgreiche intrazelluläre Freisetzung der 5'-Diphosphate geschlossen werden.

#### 4.1.3. 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrouridin **42** und 2',3'-Dideoxyuridin **43**

Trotz ihrer engen strukturellen Verwandtschaft zu d4T **2** zeigen die Uridinanaloga 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrouridin (d4U) **42** und 2',3'-Dideoxyuridin (ddU) **43** in ihrer nucleosidischen Form keinerlei antivirale Aktivität gegen das HI-Virus. Ihre 5'-Triphosphate hingegen sind effektive Inhibitoren der HIV-RT, was durch Tests mit dem isolierten Enzym belegt wurde (Abb. 22).<sup>[80,81]</sup>

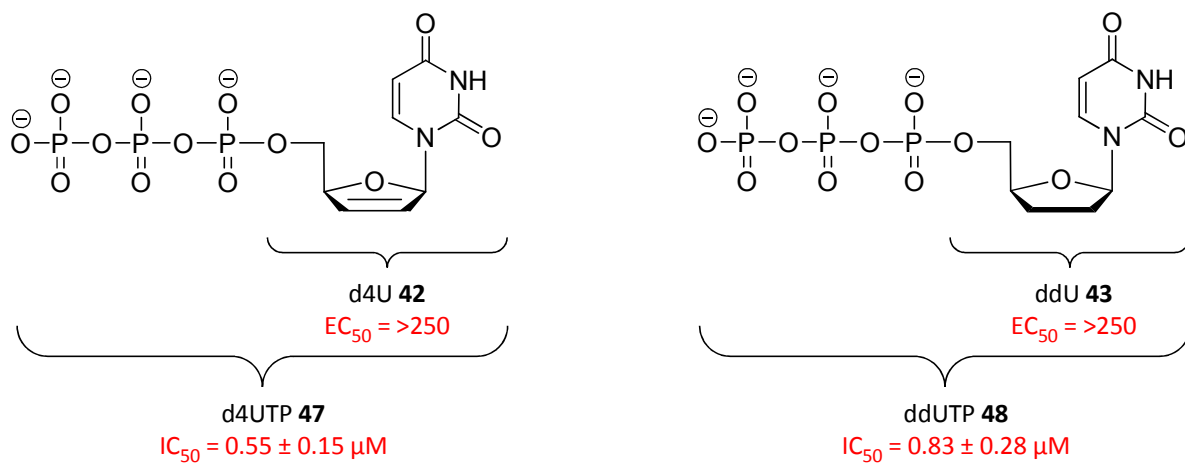


Abb. 22: Strukturen von d4UTP **47** und ddUTP **48** und deren IC<sub>50</sub>-Werte (50% inhibitorische Konzentration).<sup>[81]</sup>

Die Hypothese, dass die Inaktivität der Nucleoside auf unzureichende intrazelluläre Phosphorylierung zurückzuführen ist, führte zur Synthese und Evaluierung unterschiedlicher Nucleosidmonophosphatprodrugs beider Verbindungen, wobei für ddU-Prodrugs lediglich moderate, für d4U-Prodrug keine anti-HIV-Aktivität beobachtet werden konnte.<sup>[82-86]</sup>

McGUIGAN ET AL. untersuchten neben Phosphoramidatprodrugs dieser Nucleosidanaloga mit Hilfe von *in silico* Dockingstudien deren Phosphorylierung durch humane Thymidinkinase 1 (hTK-1). Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zum natürlichen Substrat Thymidin die zu phosphorylierende 5'-Hydroxyfunktion von der idealen Position um 0.1 nm (ddU **43**) bzw. 0.2 nm (d4U **42**) abweicht. Dies ist auf konformative Unterschiede im Glycon zurückzuführen und eine mögliche Erklärung für eine ineffektive erste Phosphorylierung.<sup>[87]</sup> Für den zweiten Phosphorylierungsschritt wurde ebenfalls durch *molecular modeling* die Lage der Nucleosid-

5'-monophosphate mit der von Thymidin-5'-monophosphat (TMP) im aktiven Zentrum der Thymidylatkinase verglichen. Die Phosphatgruppe von d4UMP **49** zeigt einen großen Abstand zu der Position des Phosphats von TMP, was eine ineffiziente zweite Phosphorylierung nahelegt, aus der eine niedrige Konzentration von d4UTP **47** und eine entsprechend geringe antivirale Aktivität trotz der Umgehung der ersten Phosphorylierung resultieren.<sup>[88]</sup> Im Gegensatz dazu liegt die 5'-Phosphateinheit von ddUMP **50** an nahezu der gleichen Stelle wie die von TMP, sodass eine zweite Phosphorylierung möglich wird und die untersuchten Pronucleotide von ddU **43** moderate anti-HIV-Aktivität zeigen ( $EC_{50} = 15\text{-}43 \mu\text{M}$ ).<sup>[88]</sup>

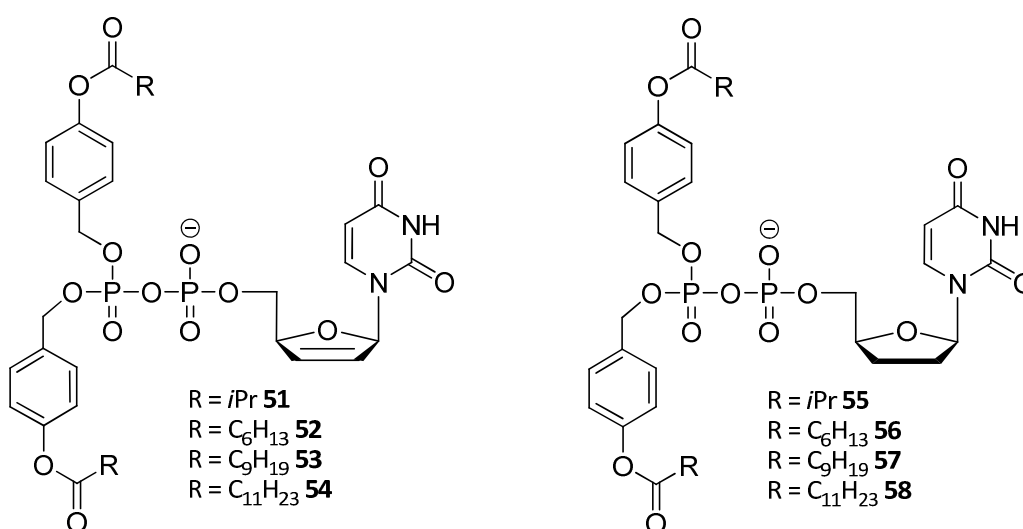


Abb. 23: Zielverbindungen **51-58**.

Aufgrund dieser Eigenschaften stellen Nucleosiddiphosphatprodrugs von d4U **42** und ddU **43** nach dem DiPPro-Konzept interessante Verbindungen dar um zu untersuchen, ob sich durch Umgehung des zweiten Phosphorylierungsschritts die anti-HIV-Aktivität von ddU **43** steigern lässt und ob die intrazelluläre Freisetzung von d4UDP **59** zu anti-HIV-Aktivität führt. Als maskierende Gruppen wurden solche ausgewählt, die bei der Verwendung zur Maskierung von d4TDP **14** zu guter antiviraler Aktivität geführt haben und bei denen die Freisetzung des Nucleosiddiphosphats in Hydrolysestudien nachgewiesen wurde. Des Weiteren sollte durch Wahl der Maske ein breiter Bereich unterschiedlicher Lipophilie der Prodrugs abgedeckt werden. Die Zielverbindungen sind in Abb. 23 gezeigt.

#### 4.1.4. Synthese von d4U **42** und ddU **43**

Für die Darstellung von d4U **42** wurde zunächst auf die von MCGUIGAN ET AL. beschriebene Synthese zurückgegriffen, die in Abb. 24 gezeigt ist.<sup>[89]</sup>

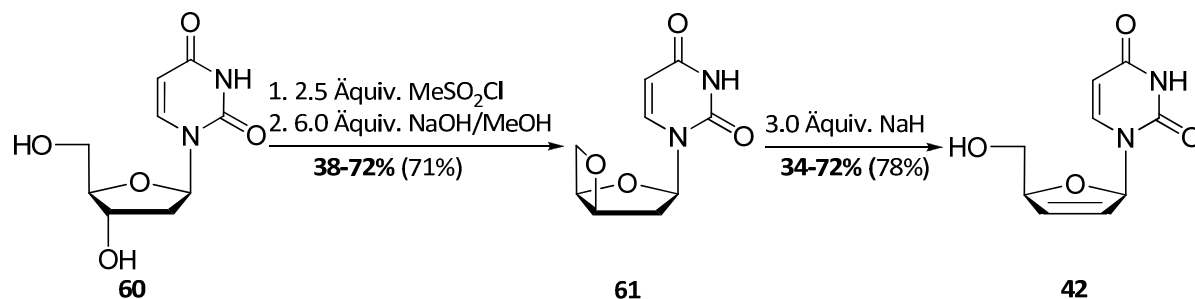


Abb. 24: Synthese von d4U **42** nach [89] (Literaturausbeute in Klammern).

Die Umsetzung von 2'-Desoxyuridin **60** zu 3',5'-Anhydro-2'-desoxyuridin **61** wurde in einer *one-pot* Reaktion durchgeführt, bei der zunächst durch Reaktion mit Methansulfonylchlorid in Pyridin 3',5'-Di-*O*-mesyl-2'-desoxyuridin **62** gebildet wird, das anschließend durch intramolekulare nucleophile Substitution zu Verbindung **61** umgesetzt wird. Die schwankenden Ausbeuten von 38-72% sind im Wesentlichen durch Schwierigkeiten bei der Reinigung zu erklären. Die in der Literatur beschriebene Extraktion mit siedendem Aceton wurde auf unterschiedliche Weise versucht, so wurde zunächst das Rohgemisch in Aceton suspendiert, diese Suspension zum Sieden erhitzt und heiß filtriert. Trotz mehrmaliger Wiederholung dieses Verfahrens war es nicht möglich, das vergleichsweise polare Produkt von den während der Reaktionen entstandenen Salzen vollständig zu trennen. Auch die Durchführung einer Soxhlet-Extraktion mit Aceton über Nacht führte nicht zu einer Optimierung der Reinigung. Eine Extraktion des Produktes mit Ethylacetat aus einer wässrigen Lösung des Rohproduktes erbrachte ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg. Die beste Ausbeute von 72% wurde durch eine Säulenfiltration des Rohproduktes an Kieselgel mit Aceton als Eluent erzielt. Allerdings war dieses Verfahren sehr zeitaufwendig und es wurde eine große Menge Aceton verbraucht.

Auch für die folgende Reaktion der 3',5'-Anhydro-Verbindung **61** zu d4U **42** mit Natriumhydrid als Base und *N,N*-Dimethylformamid als Lösungsmittel bei 100 °C konnten keine reproduzierbar hohen Ausbeuten erreicht werden. Ein Grund dafür ist eine Nebenreaktion, die zur Abspaltung der Nucleobase führt und in Abb. 25 (S. 32) gezeigt ist.

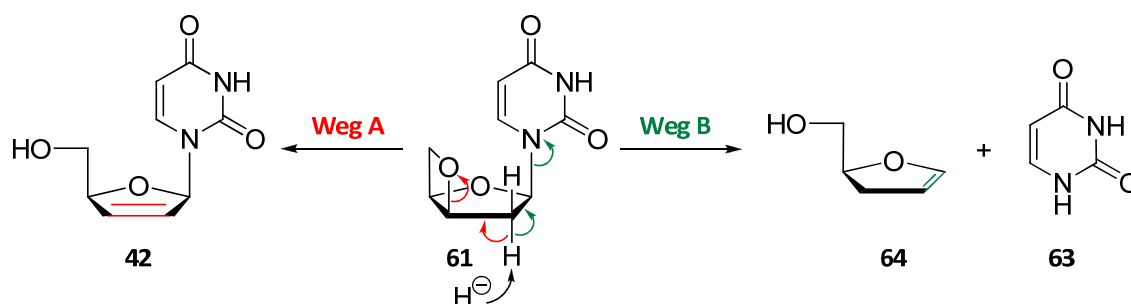


Abb. 25: Nebenreaktion bei der Bildung von d4U **42** durch  $\beta$ -Eliminierung.

Die Doppelbindung von d4U **42** zwischen der 2'- und der 3'-Position wird durch  $\beta$ -Eliminierung des zum 4'-Sauerstoffatom *anti*-ständigen Protons in 2'-Position nach einem E2-Mechanismus gebildet (Weg A). Die über Weg B verlaufende Konkurrenzreaktion führt nach dem gleichen Mechanismus zur Eliminierung von Uracil **63** und zur Bildung des Glycals **64**. Reaktionen dieser Art sind literaturbekannt und können bei Erhöhung der Austrittstendenz der Nucleobase zur selektiven Synthese von Glycalen genutzt werden.<sup>[90,91]</sup>

Ein weiteres Problem stellt das sehr ähnliche Elutionsverhalten von Uracil **63** und d4U **42** bei der chromatographischen Reinigung dar, sodass die vollständige Abtrennung der Nucleobase selten möglich war. Dies führte ebenfalls dazu, dass die Nucleobase in der Regel nicht vollständig rein isoliert werden und deren Menge daher nicht zuverlässig quantifiziert werden konnte.

Aufgrund der genannten Probleme der in Abb. 24 (S. 31) gezeigten Reaktionssequenz wurde die Synthese von d4U **42** analog zu der von HORWITZ ET AL. beschriebenen Syntheseroute durchgeführt, die als Standardsynthese für d4T **2** genutzt wird.<sup>[92]</sup> Diese begann erneut mit der Umsetzung von 2'-Desoxyuridin **60** zu 3',5'-Di-O-mesyl-2'-desoxyuridin **62**, das in diesem Fall vor der weiteren Umsetzung isoliert wurde. Die Reinigung erfolgte durch Ausfällen des Produkts aus wässriger Lösung und Extraktion des restlichen in der wässrigen Phase verbliebenen Produkts mit Ethylacetat. Auf diesem Weg konnte Verbindung **62** reproduzierbar mit hohen Ausbeuten von bis zu 85% erhalten werden. Die Umsetzung zu 3',5'-Anhydro-2'-desoxyuridin **61** erfolgte wie bei der zuvor beschriebenen Route durch Umsetzung mit Natriumhydroxid. Die Reinigung erfolgte wie im ersten Schritt durch Kristallisation aus Wasser und anschließende Extraktion des restlichen Produkts mit Ethylacetat. So konnte Verbindung **61** mit Ausbeuten von bis zu 80% erhalten werden.

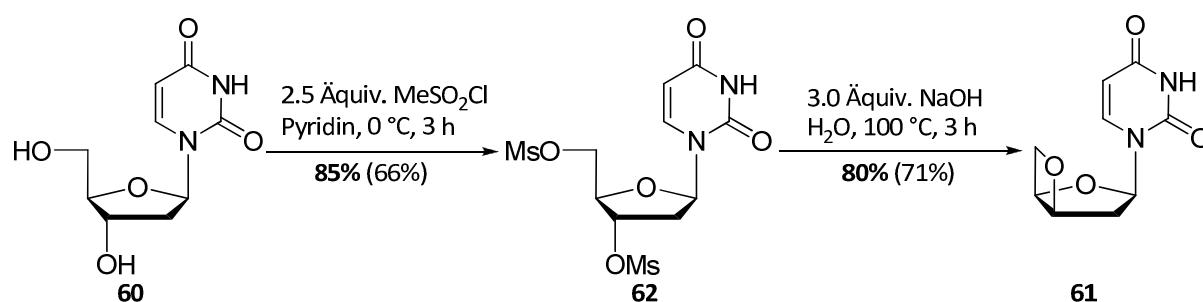


Abb. 26: Synthese von 3',5'-Anhydro-2'-desoxyuridin **61** nach HORWITZ ET AL.<sup>[92]</sup> (Literaturausbeute in Klammern)

Für die weitere Umsetzung der 3',5'-Anhydro-Verbindung **61** wurde Kalium-*tert*-butanolat in Dimethylsulfoxid verwendet. Zur vollständigen Umsetzung des Edukts war zwar eine lange Reaktionszeit von ca. 70 h notwendig, nichtsdestoweniger lief diese Reaktion bei Raumtemperatur ab, was zu einer Verringerung der Abspaltung der Nucleobase führte. Das Produkt konnte nach säulenchromatographischer Reinigung mit Ausbeuten von bis zu 70% erhalten werden (Abb. 27).

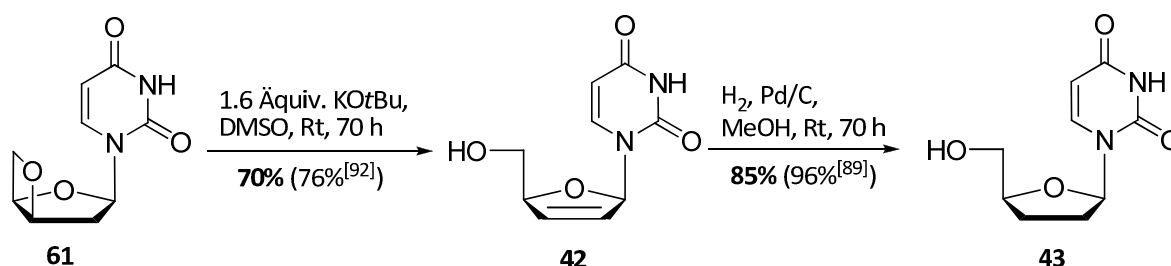


Abb. 27: Synthese von d4U **42** und ddU **43** (Literaturausbeuten in Klammern).

Die Darstellung von ddU **43** erfolgte durch Hydrierung der Doppelbindung im Glycon von d4U **42** unter Wasserstoffatmosphäre an Palladium auf Aktivkohle (10% Pd) und Methanol als Lösungsmittel.<sup>[89]</sup> Das Produkt konnte auf diesem Weg mit Ausbeuten von bis zu 85% erhalten werden.

#### 4.1.5. Synthese der 5'-Monophosphate von d4U **42** und ddU **43**

Bei der Synthese der DiPPro-Nucleotide stellt die Kupplung des Nucleosid-5'-monophosphats mit dem Diisopropylaminophosphoramidit der maskierenden Gruppe den Schlüsselschritt dar (Abb. 20, S. 26). Hierfür war es zunächst notwendig, d4UMP **49** und ddUMP **50** zu synthetisieren. Es wurde wie in Vorarbeiten bereits für AZT **1** und d4T **2**<sup>[66,67]</sup> die Methode nach SOWA und OUCHI verwendet<sup>[93]</sup>, die eine Variante der von YOSHIKAWA entwickelten selektiven 5'-Phosphorylierung nicht geschützter Nucleoside darstellt<sup>[94]</sup>. Dabei wird zur Phosphorylierung ein Gemisch aus Phosphorylchlorid, Wasser und Pyridin im Verhältnis 2:1:2 (mol/mol/mol) verwendet. Die genaue Einhaltung dieses Verhältnisses ist entscheidend für den Erfolg der Reaktion, da so aus den Komponenten das eigentliche Phosphorylierungsreagenz Tetrachloropyrophosphat **65** gebildet werden kann. Durch Reaktion mit der 5'-Hydroxyfunktion des Nucleosids wird zunächst das entsprechende Dichlorophosphat gebildet, das durch Hydrolyse in das 5'-Phosphat überführt wird.<sup>[93]</sup>

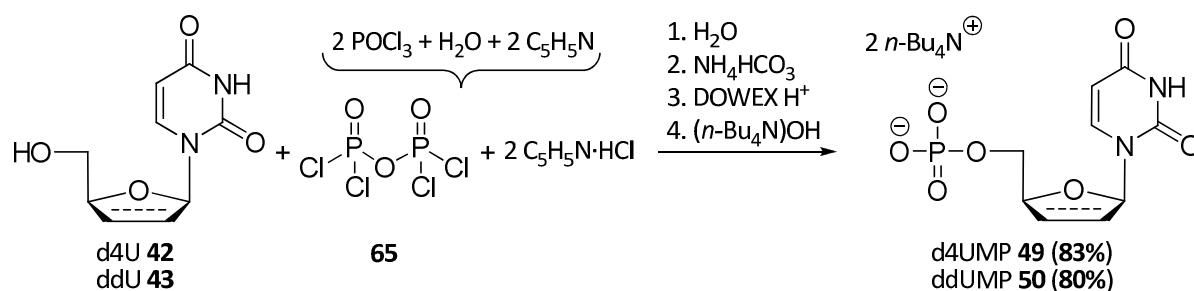


Abb. 28: Synthese von d4UMP **49** und ddUMP **50** nach SOWA und OUCHI.<sup>[93]</sup>

Durch Neutralisation der Reaktionslösung mit Ammoniumhydrogencarbonat wird das Ammoniumsalz des Nucleosidphosphats erhalten, das säulenchromatographisch an RP-Kieselgel gereinigt werden kann. Um für die anschließende Kupplungsreaktion sowohl die Aktivität des Nucleotids, als auch dessen Löslichkeit in Acetonitril zu erhöhen, wurden die Ammoniumgegenionen gegen sterisch anspruchsvolle, lipophile Tetra-*n*-butylammoniumkationen getauscht. Dies erfolgte zunächst durch Austausch der Ammoniumionen gegen Protonen an DOWEX 50WX8 Ionentauscherharz (H<sup>+</sup>-Form) und anschließende Titration der wässrigen Lösung mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxidlösung (40% in Wasser w/w) auf pH 6-7. Über diesen Syntheseweg konnten ddUMP **50** und d4UMP **49** mit guten Ausbeuten von 80% bzw. 83% erhalten werden (Abb. 28).

Als Alternative zu der in Abb. 28 (S. 34) gezeigten Reaktion wurde die Synthese von ddUMP **50** in Anlehnung an einen von EISENHUTH und RICHERT beschriebenen Weg durchgeführt, der in Abb. 29 gezeigt ist.<sup>[95]</sup> Dabei wurde d4U **42** zunächst in einer DCI-vermittelten Kupplungsreaktion mit Dibenzyl-diisopropylaminophosphoramidit und Oxidation mit *meta*-Chlorperbenzoesäure zu dem Dibenzylphosphat **66** umgesetzt. Anschließend wurden die Benzylgruppen hydrogenolytisch abgespalten, während gleichzeitig die Doppelbindung im Glycon zur Einfachbindung hydriert wurde. DdUMP **50** wurde auf diesem Weg als Triethylammoniumsalz erhalten. Mit 91% und 63% verliefen beide Reaktionen mit guten Ausbeuten, dennoch ist die Gesamtausbeute ausgehend von d4U **42** niedriger als bei der zuvor gezeigten Syntheseroute (85% und 80%). Des Weiteren bietet die erste Route den Vorteil, dass sich neben dem ddUMP **50** auch ddU **43** isolieren lässt und für andere Verwendungen zur Verfügung steht.

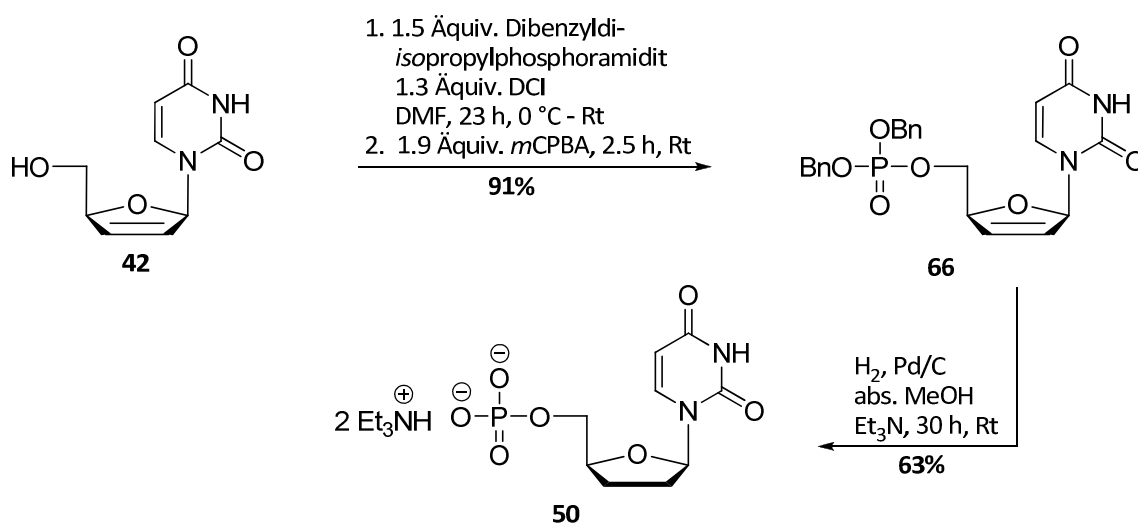


Abb. 29: Alternative Synthese von ddUMP **50**.

#### 4.1.6. Synthese der Bis(4-acyloxybenzyl)-diisopropylaminophosphoramidite

Den zweiten Baustein für die Kupplung zum DiPPro-Nucleotid stellen die Diisopropylaminophosphoramidite **67-70** dar, die die zur Maskierung verwendeten Acyloxybenzylgruppen tragen. Deren Darstellung erfolgte analog zu den von JESSEN und SCHULZ beschriebenen Synthesen.<sup>[66,67]</sup> Ausgehend von 4-Hydroxybenzylalkohol **36** wurden zunächst durch Veresterung der phenolischen Hydroxyfunktion mit einem geeigneten Carbonsäurechlorid (**71-74**) in Anwesenheit von Triethylamin die 4-(Hydroxymethyl)-benzylalkanoate **75-78** erhalten. Im Fall der Synthese des Heptanoats **76** wurde das doppelt acylierte Produkt **79** bei der Säulenchromatographie mit einer Ausbeute von 27% isoliert. Bei den weiteren Synthesen wurde auf eine genaue Untersuchung der Nebenprodukte verzichtet, obwohl deren Bildung auch hier dünnschichtchromatographisch beobachtet wurde. Durch Verwendung von jeweils nur einem Äquivalent Triethylamin und Säurechlorid wurden die phenylsubstituierten Verbindungen **75-78** dennoch mit ausreichender Selektivität erhalten, um größere Mengen davon herzustellen.

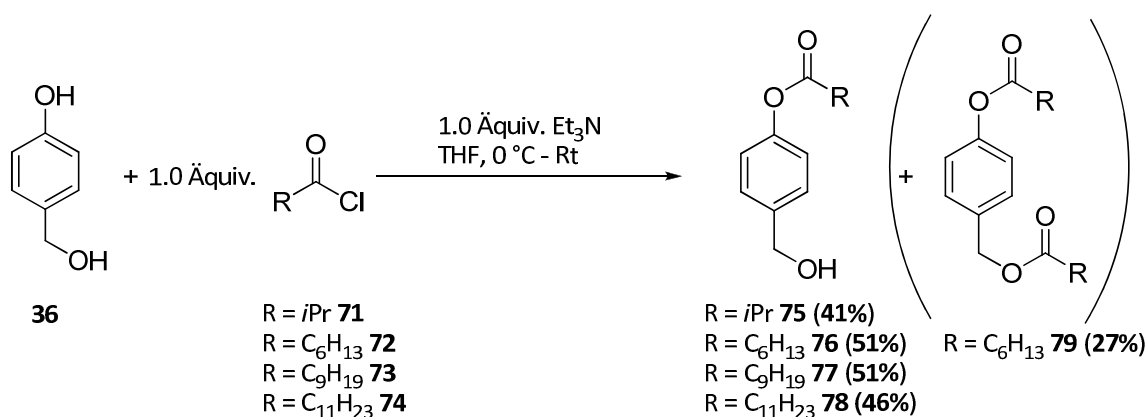


Abb. 30: Synthese der 4-(Hydroxymethyl)-benzylalkanoate **75-78**.

Die Synthese von Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **44** erfolgte durch Umsetzung von frisch destilliertem Phosphor(III)-chlorid **45** mit *N,N*-Diisopropylamin **46** bei -10 °C. Dabei wurden 2.0 Äquiv. der Base verwendet, die gelöst in Diethylether langsam zu einer Lösung des Phosphor(III)-chlorids **45** getropft wurden. Das zusätzliche Äquivalent der Base diente zur Bindung des entstehenden Chlorwasserstoffs als Diisopropylammoniumchlorid, das nach vollständiger Reaktion durch Filtration unter Schutzgas abgetrennt wurde. Verbindung **44** konnte auf diesem Weg mit einer Ausbeute von 45% erhalten werden



(Abb. 31). Ausbeuteverluste können im Wesentlichen auf nicht ausreichendes Waschen des Feststoffs nach der Filtration zurückgeführt werden.

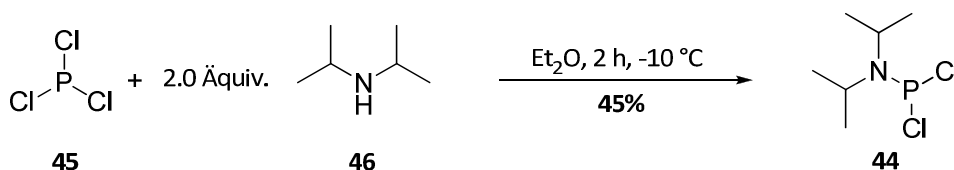


Abb. 31: Synthese von Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **44**.

Zur Darstellung der Diisopropylaminophosphoramidite **67-70** wurde eine Lösung von 2.2 Äquiv. des entsprechenden 4-(Hydroxymethyl)-benzylalkanoats **75-78** und 2.4 Äquiv. Triethylamin in Tetrahydrofuran bei  $-78^\circ\text{C}$  über eine Stunde zu einer Lösung des Phosphorreagenzes **44** getropft. Die Reaktionslösungen wurden jeweils bis zur vollständigen Umsetzung der Edukte bei Raumtemperatur gerührt.

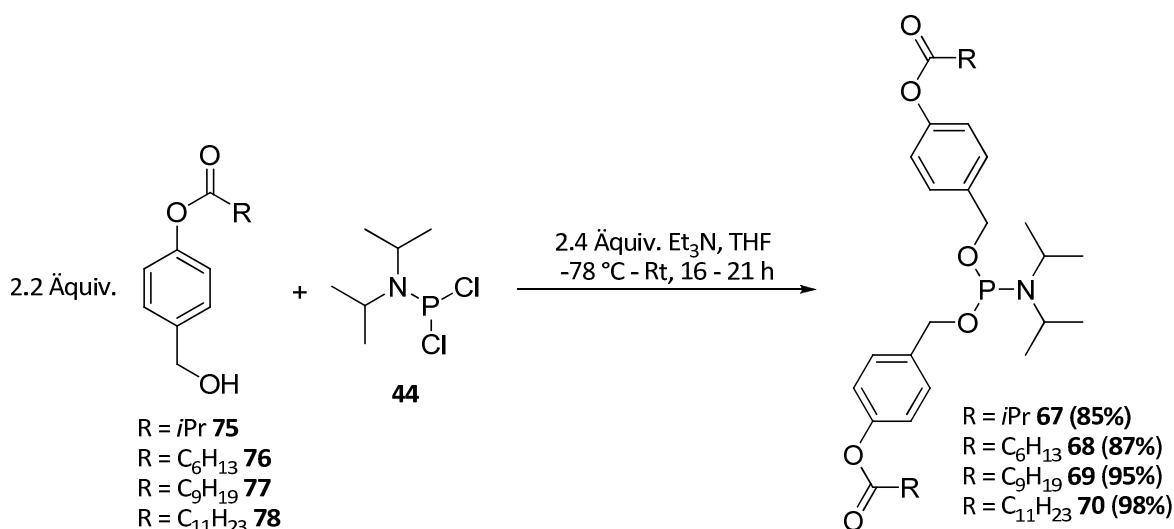


Abb. 32: Synthese der Phosphoramidite **67-70**.

Anschließend wurde das gebildete Triethylammoniumchlorid durch Filtration abgetrennt und das Rohprodukt durch circulare präparative Dünnschichtchromatographie am Chromatotron™ gereinigt. Dabei war es unverzichtbar, zu dem Eluenten Petrolether (50-70) 10% Triethylamin hinzuzufügen, um den sauren Charakter des gipshaltigen Kieselgels zu kompensieren. Versuche der Reinigung ohne Zusatz von Base führten zur vollständigen Zersetzung der Produkte. Auf dem beschriebenen Weg konnten die Phosphoramidite **67-70** mit sehr guten Ausbeuten von 85-98% erhalten werden (Abb. 32).

#### 4.1.7. Synthese der Diphosphatprodrugs von d4U **42** und ddU **43**

Gemäß der in Abb. 20 (S. 26) gezeigten Syntheseroute erfolgte die Darstellung der Zielverbindungen **51-58** durch eine 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) vermittelte Kupplungsreaktion der unter 4.1.5 (S. 34) beschriebenen Nucleosidmonophosphate **49** und **50** und der im vorigen Kapitel behandelten Phosphoramidite **67-70** (4.1.6, S. 36) gefolgt von der Oxidation des  $\beta$ -Phosphoratoms mit *tert*-Butylhydroperoxid. Die Reaktionsbedingungen sind in Abb. 33 für die d4U-Prodrugs **51-54** gezeigt.

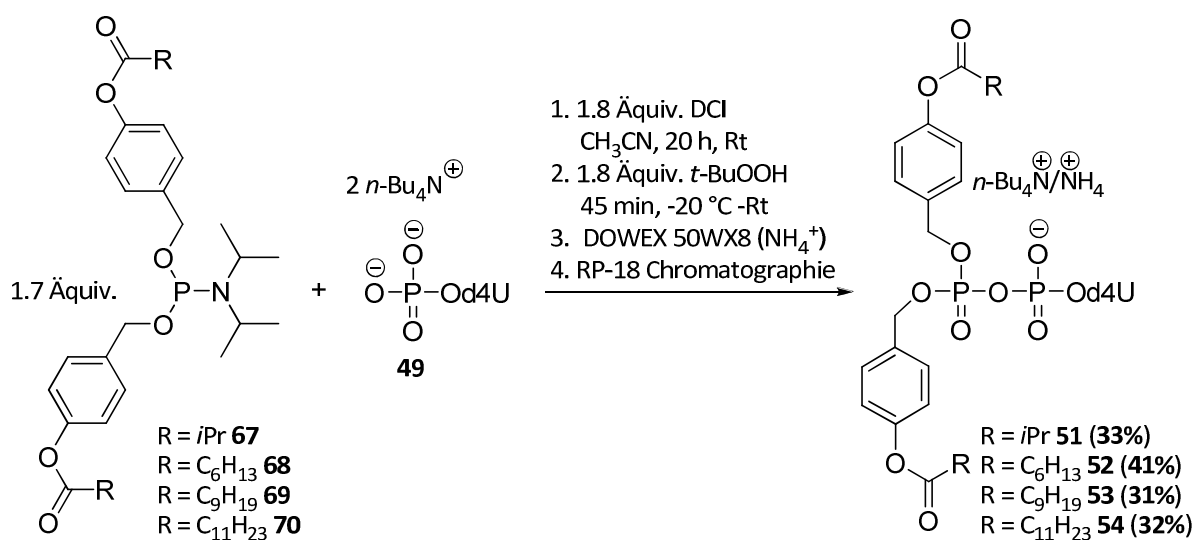


Abb. 33: Synthese der d4U-Diphosphatprodrugs **51-54**.

D4UMP **49** wurde über Nacht gefriergetrocknet und mit einer kleinen Menge Acetonitril in den Reaktionskolben überführt. Anschließend wurde zwei bis drei Mal mit Acetonitril coevaporiert, bis das Monophosphat als farbloser Schaum vorlag. Die Phosphoramidite wurden vor ihrer Verwendung mehrere Stunden im Ölpumpenvakuum getrocknet und direkt zu der Lösung des Monophosphats in Acetonitril gegeben, wobei die Verbindungen **67-69** sich problemlos in dem Lösungsmittel lösten. Lediglich das undecansubstituierte Phosphoramidit **70** löste sich erst nach Zugabe des DCI vollständig. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktionen stellte eine Schwierigkeit dar, da das Produkt zwar detektiert werden konnte, aber nicht eindeutig festgestellt werden konnte, ob das ebenfalls detektierte Monophosphat nicht vollständig reagiert hatte oder aus einer anteiligen Zersetzung des Produkts während der Dünnschichtchromatographie stammte. Um also eine möglichst quantitative Umsetzung des Monophosphats zu

gewährleisten, wurden die Reaktionslösungen für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden sie auf -20 °C abgekühlt und mit 1.8 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 45 min wurde das Lösungsmittel entfernt. Die Reinigung dieser Substanzen stellte die größte Herausforderung während der Synthese dar. In Vorarbeiten wurden bereits verschiedene Reinigungsmethoden erprobt, wie z. B. Normalphasen-, Umkehrphasen- und Größenausschlusschromatographie sowie Kristallisation. Die besten Trennergebnisse konnten allerdings durch mehrfache chromatographische Trennung mit unterschiedlichen Methanol/Wasser Gemischen an RP-18 Kieselgel erreicht werden, so dass auch in dieser Arbeit auf diese Methode zurückgegriffen wurde.<sup>[66,67]</sup> Dabei wurde in allen Fällen zunächst ein Laufmittelgemisch von Methanol/Wasser (1:1 v/v) gewählt, um polare Verunreinigungen wie überschüssiges Monophosphat und DCI abzutrennen und anschließend ein Laufmittel mit höherem Methanolanteil verwendet, um das Produkt zu eluieren. Danach schloss sich mindestens eine weitere Umkehrphasenchromatographie an. Um das Trennergebnis zu verbessern, wurde vor den weiteren Reinigungsschritten ein Kationenaustausch vorgenommen, bei dem die lipophilen Tetra-*n*-butylammoniumionen gegen Ammoniumionen ersetzt wurden. Dazu wurde das Produkt in einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril (3:1 v/v) gelöst und über einen DOWEX 50WX8 Ionentauscher (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Form) eluiert. Die folgenden Chromatographien wurden dann ebenfalls mit Methanol/Wasser als Laufmittel durchgeführt, wobei die Zusammensetzung sich nach der Polarität der Verbindungen richtete. Das entscheidende Problem bei der Reinigung stellte die Abtrennung der Phosphatdiester **80-83** (Abb. 34, S. 40) dar, deren Bildung sowohl aus überschüssigem Phosphoramidit bzw. daraus entstandenem Phosphoramidat durch Hydrolyse oder aus dem Bruch der Anhydridbindung (vgl. Abb. 21, S. 27) möglich ist. Wahrscheinlich tragen beide Reaktionen zur Bildung des Nebenproduktes bei, da JESSEN eine Zunahme der Bildung der Phosphatdiester bei Erhöhung des Überschusses an Phosphoramidit beobachten konnte<sup>[66]</sup> und trotz quantitativer Abtrennung des Nucleosidmonophosphats bei der ersten Chromatographie bei den folgenden Reinigungsschritten geringe Mengen Monophosphat isoliert werden konnten, was auf eine anteilige Zersetzung des Produktes bei der Reinigung hindeutet.

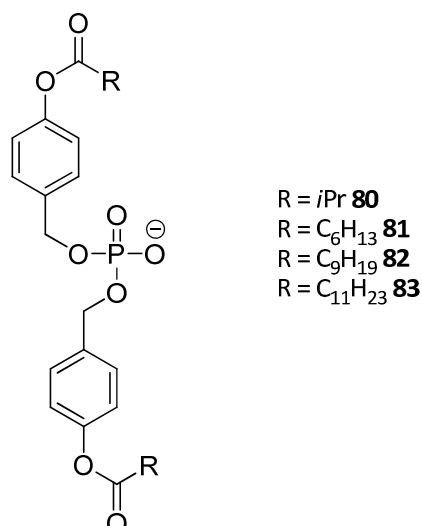
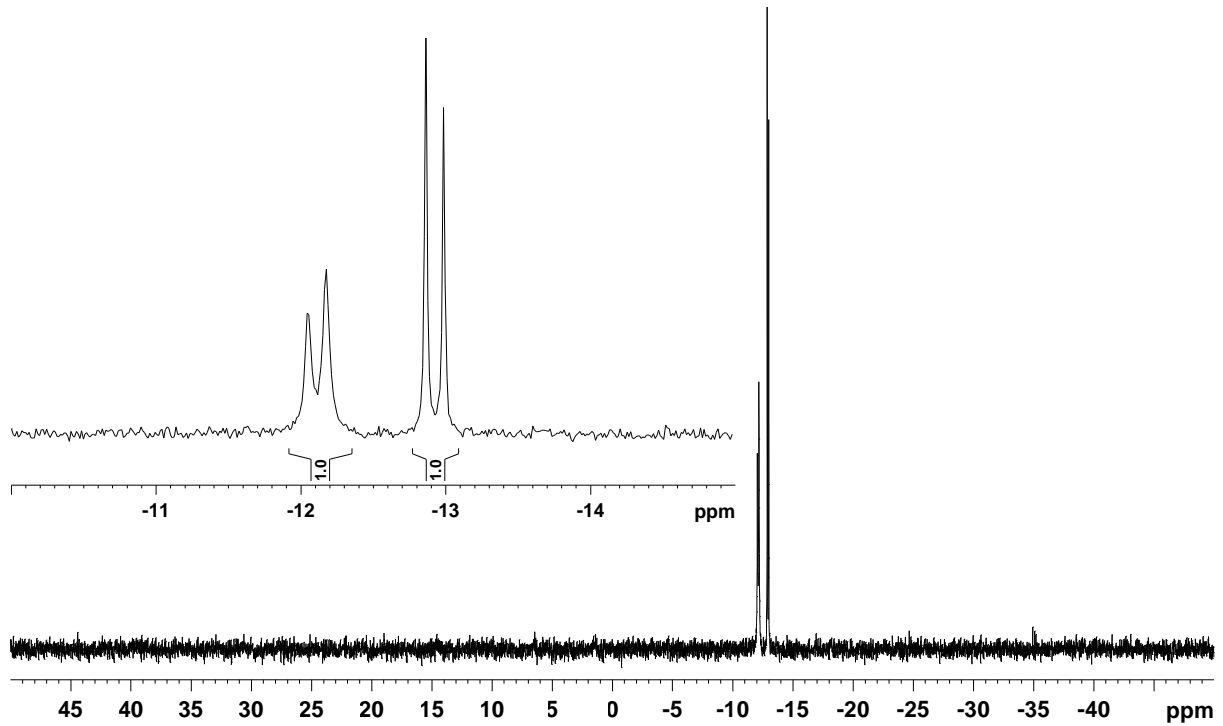
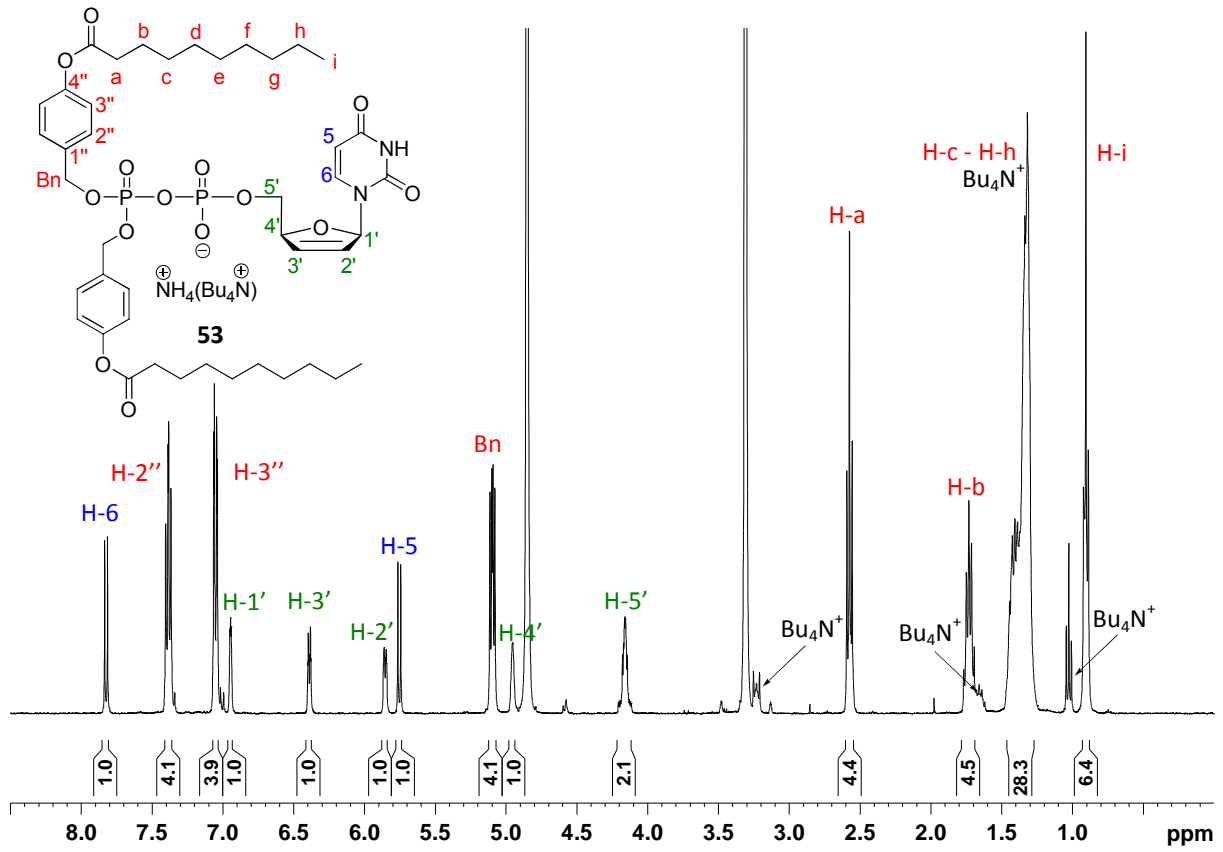


Abb. 34: Phosphatdiester **80-83** als Nebenprodukte bei der Synthese der Diphosphatprodrugs.

Aufgrund des nahezu identischen Elutionsverhaltens dieser Phosphatdiester und der Produkte konnte in keinem Fall eine vollständige Abtrennung des Nebenprodukts erreicht werden, sodass sich die in Abb. 33 (S. 38) angegebenen Ausbeuten von 32-41% auf die isolierte Menge reiner Verbindung beziehen, während stets weiteres Produkt in Mischfraktionen vorhanden war. Nicht alle der Zielverbindungen wurden nach mehrmaliger Chromatographie als reine Ammoniumsalze erhalten. Obwohl der vor der Chromatographie durchgeführte Kationenaustausch in der Regel vollständig stattfand (dies wurde per NMR-Spektroskopie überprüft), lagen die Verbindungen nach der Chromatographie teilweise als Tetra-*n*-butylammoniumsalze vor. Vermutlich wurde ein Teil der Kationen während der Chromatographie ausgetauscht, da sich die Tetra-*n*-butylammoniumionen durch Spülen nicht vollständig von der Säule entfernen lassen. In Fällen, in denen sich der anteilige Kationenaustausch auf die Ausbeute auswirkte, wurde dies bei der Berechnung berücksichtigt. In Abb. 35 (S. 41) ist exemplarisch das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des  $\text{C}_9$ -d4UDP-Prodrugs **53** gezeigt. Die Signale der Tetra-*n*-butylammoniumionen sind gekennzeichnet, in diesem Fall war deren Menge allerdings nicht relevant für die Bestimmung der Ausbeute. Das in Abb. 36 (S. 41) dargestellte  $^{31}\text{P}$ -NMR der Verbindung **53** zeigt die typische Aufspaltung in je ein Dublett für das  $\alpha$ - und das  $\beta$ -Phosphat durch  $^2J_{\text{P-P}}$ -Kopplung.



Für die Synthese der ddU-Prodrugs **55-58** wurden die gleichen Reaktionsbedingungen verwendet wie für die d4U-Prodrugs **51-54**. Da ddUMP **50** über die in Abb. 29 (S. 35) dargestellte Syntheseroute als Triethylammoniumsalz erhalten wurde, wurde anhand der Kupplung mit dem *isopropyl*- und dem hexylsubstituierten Phosphoramidit **55** und **56** untersucht, ob sich auch mit diesem Gegenion die Kupplungsreaktion erfolgreich durchführen lässt. Dabei wurden im Wesentlichen zwei Beobachtungen gemacht: Zum einen nimmt die Löslichkeit des Monophosphats in Acetonitril signifikant ab, sodass zu der Reaktionslösung gerade so viel *N,N*-Dimethylformamid gegeben wurde, um das Monophosphat vollständig zu lösen. Zum anderen war der Umsatz des Monophosphats sehr viel geringer, sodass bei der ersten chromatographischen Reinigung im Vergleich zu den vorigen Reaktionen viel unumgesetztes Monophosphat isoliert wurde. Da dieses aber stets im Gemisch mit dem DCI-Salz isoliert wurde, konnte keine zuverlässige Quantifizierung vorgenommen werden. Aus diesen Gründen lagen die Ausbeuten bei Verwendung der Triethylammoniumsalze mit 15% bzw. 9% deutlich unter denen, die bei Verwendung der Tetra-*n*-butylammoniumsalze erreicht wurden (29% bzw. 35%, Abb. 37), sodass bei den weiteren Synthesen wieder auf letztere zurückgegriffen wurde.

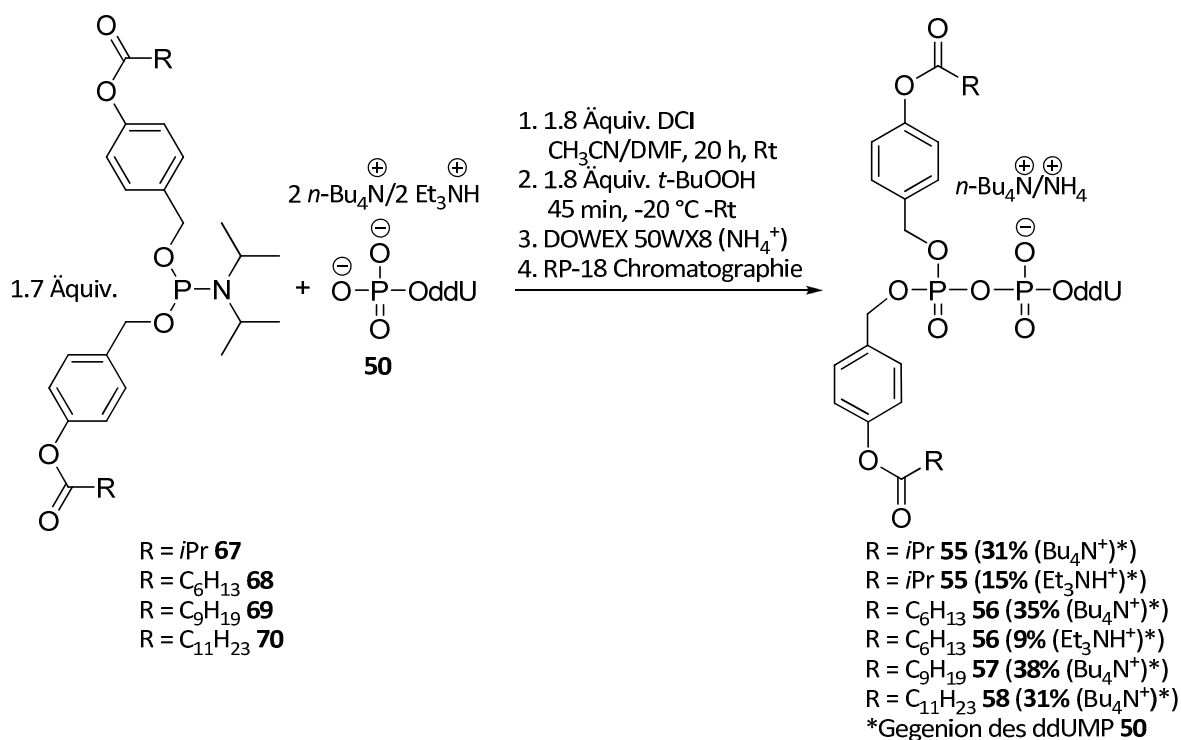


Abb. 37: Synthese der ddU-Diphosphatprodrugs **55-58**.

Die Reinigung erfolgte wie zuvor für die d4U-Prodrugs **51-54** beschrieben durch mehrfache Umkehrphasenchromatographie, wobei auch hier eine vollständige Abtrennung der Phosphatdiester **80-83** nicht möglich war und sich die Ausbeuten von 29% - 38% auf die rein isolierten Verbindungen beziehen, während weiteres Produkt in Mischfraktionen vorhanden war. Um die Reaktionen trotz der bereits erwähnten Probleme bei der DC-Verfolgung genauer untersuchen und feststellen zu können, ob das Kupplungsprodukt unter den Reaktionsbedingungen stabil ist oder ein anteiliger Bruch der Anhydridbindung bereits bei langen Reaktionszeiten auftritt, wurden zur Reaktionskontrolle HPLC-Läufe durchgeführt. Dazu wurden zu geeigneten Zeitpunkten während der Reaktion Proben von 5  $\mu\text{L}$  entnommen und mit 150  $\mu\text{L}$  Acetonitril verdünnt. Diese Proben wurden nun mittels HPLC vermessen.

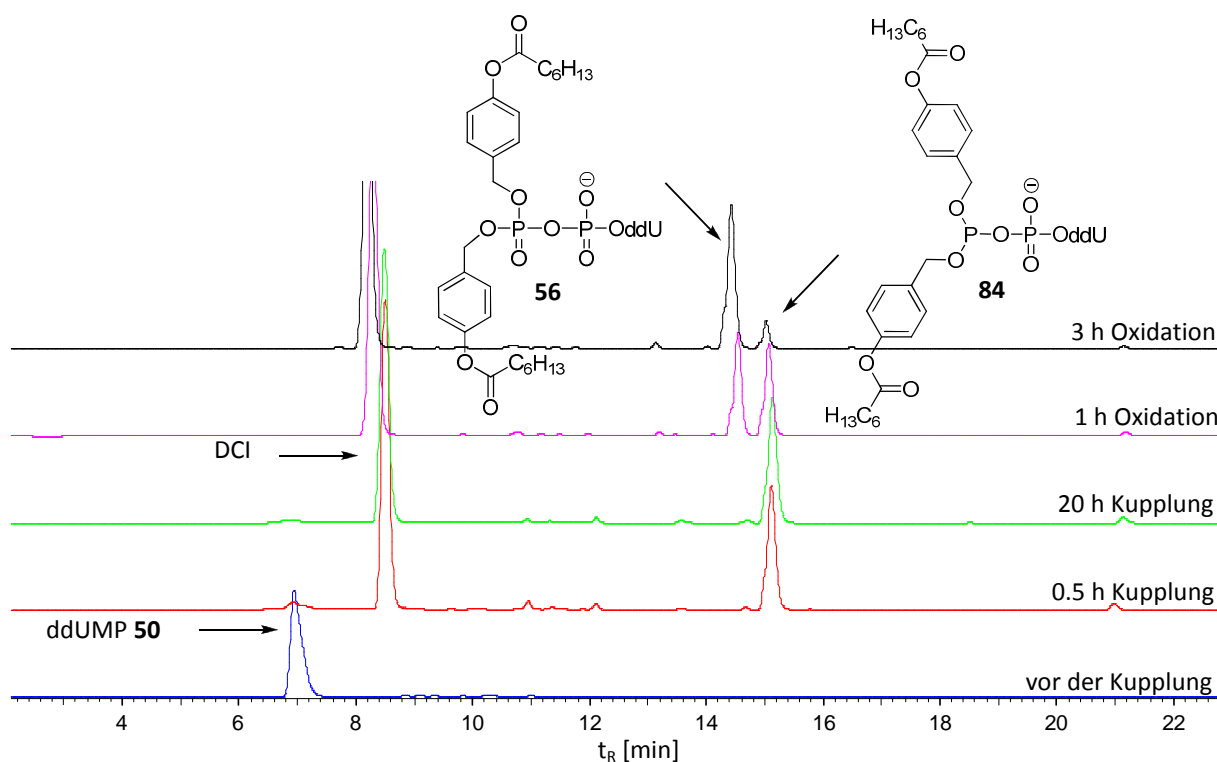


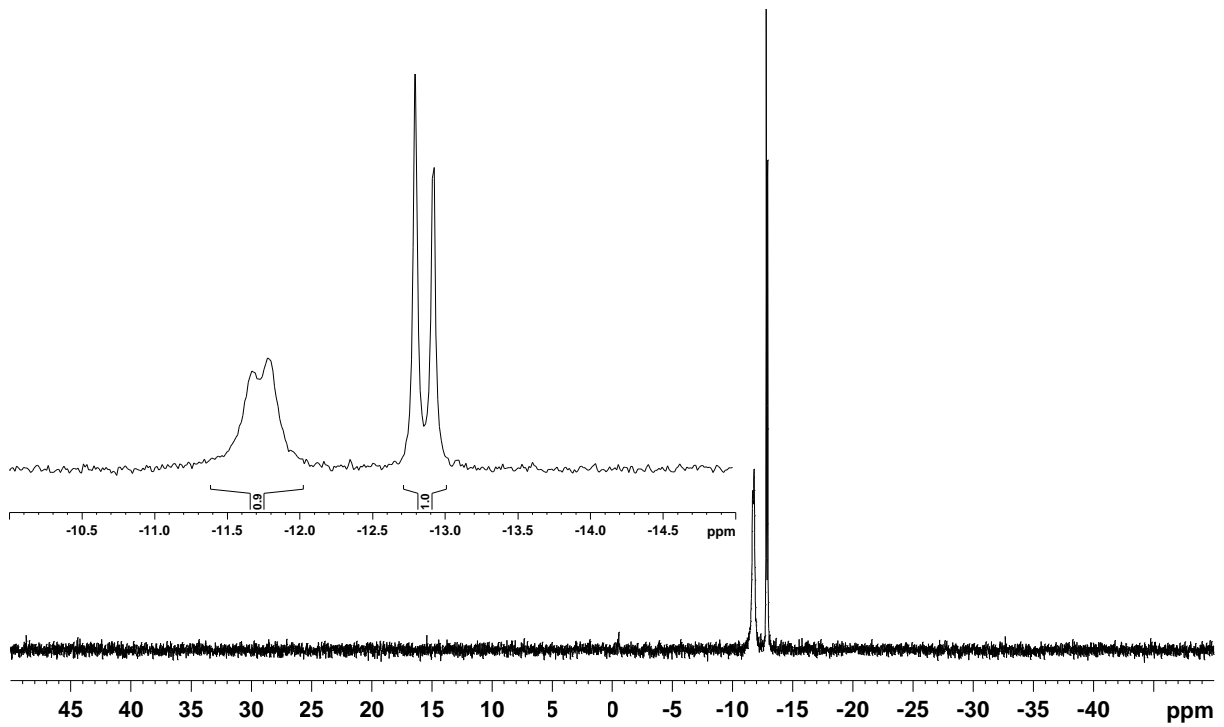
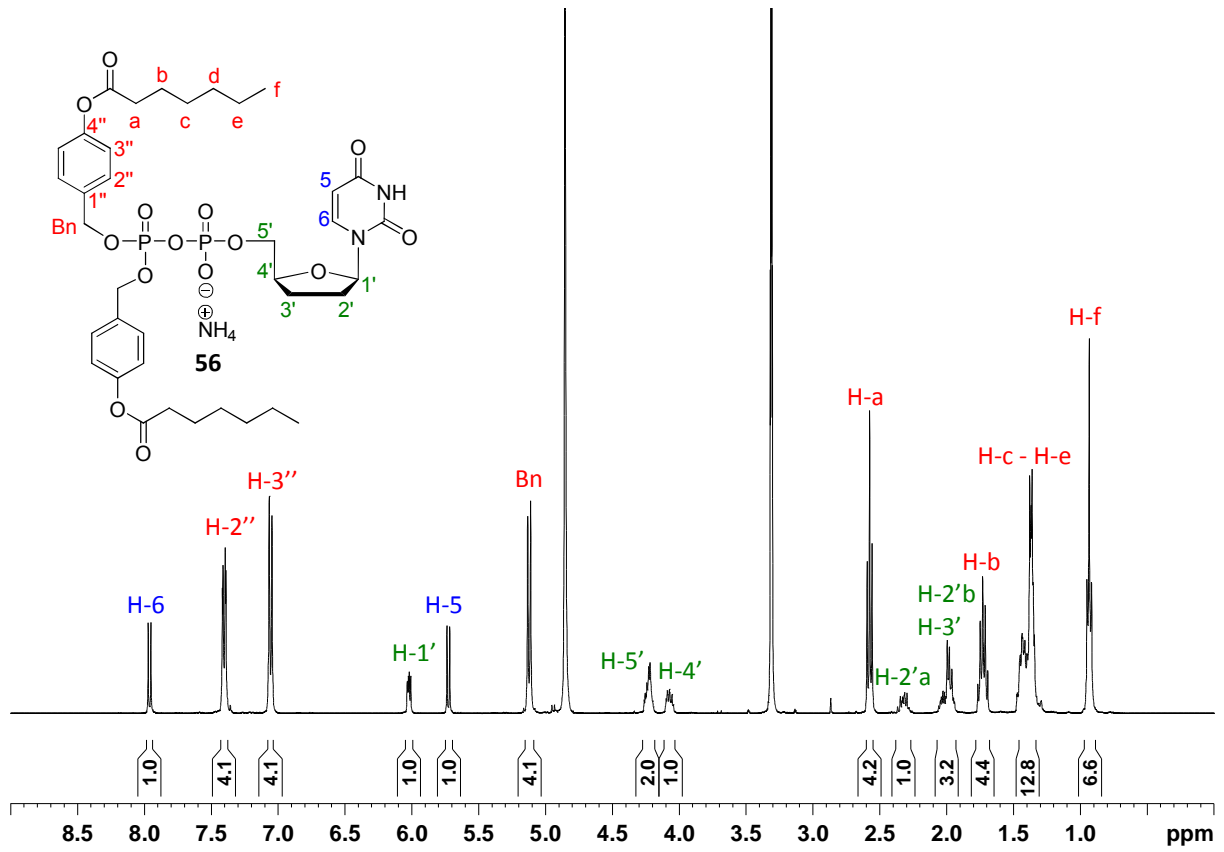
Abb. 38: Reaktionsverfolgung der Synthese des  $\text{C}_6$ -ddUDP-Prodrugs **56** (Methode II, 260 nm).

In Abb. 38 ist die Reaktionsverfolgung der Synthese des  $\text{C}_6$ -ddUDP-Prodrugs **56** gezeigt. Dabei ist deutlich ersichtlich, dass bereits nach einer Reaktionszeit von 30 min das Monophosphat **50** nahezu vollständig reagiert hat und sich das Kupplungsprodukt **84** gebildet hat. Des Weiteren ist zu erkennen, dass Verbindung **84** unter den Reaktionsbedingungen auch bei langen Reaktionszeiten stabil ist und es auch nach 20 h Rühren bei Raumtemperatur nicht zur Zersetzung kommt. Ebenfalls deutlich zu sehen ist die

Oxidation von Verbindung **84** zum Produkt **56**. Offensichtlich sind beide Verbindungen auch unter den Bedingungen der Oxidation stabil, da keine Zersetzungsprodukte detektiert werden konnten. Dabei ist anzumerken, dass die Oxidation nur zur Durchführung der Reaktionsverfolgung für einen so langen Zeitraum durchgeführt wurde. In der Regel wurde diese nach 45 min durch Entfernung des Lösungsmittels beendet. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass durch das Konzentrieren des Oxidationsmittels die Oxidation vollständig abläuft. Wie zu erwarten war, ist das Phosphoramidit **68** bei einer Wellenlänge von 260 nm nahezu nicht detektierbar. Für die Synthese des *i*Pr-ddUDP-Prodrug **55** konnte nach 1 h keine vollständige Umsetzung festgestellt werden, so dass weitere 1.8 Äquiv. des Phosphoramidits und 1.3 Äquiv. DCI zugegeben wurden, was zur schnellen Vervollständigung der Reaktion führte. Bei den C<sub>9</sub>- und C<sub>11</sub>-ddUDP-Prodrugs **57** und **58** zeigte die Reaktionsverfolgung ein sehr ähnliches Ergebnis, wie das in Abb. 38 (S. 43) gezeigte: die Kupplungsreaktion verlief sehr schnell, während keine Zersetzung der Kupplungsprodukte detektiert werden konnte. Generell hat sich die Verfolgung dieser Reaktionen per HPLC als sehr nützlich erwiesen, da diese auch für eine Vielzahl weiterer Reaktionen mit unterschiedlichen Nucleosidphosphaten eingesetzt werden konnte und dabei wertvolle Informationen lieferte.

Beispielhaft für die ddUDP-Prodrugs **55-58** ist in Abb. 39 (S. 45) das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des C<sub>6</sub>-ddUDP-Prodrug **56** gezeigt, das als reines Ammoniumsalz vorlag. Wie zu erwarten war, zeigt das in Abb. 40 (S. 45) abgebildete <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum der Verbindung **56** eine identische Aufspaltung in zwei Dubletts durch <sup>2</sup>J<sub>p-p</sub>-Kopplung, wie es bereits für die d4U-Prodrugs **51-54** beobachtet wurde.





4.1.8. Synthese der 3-Methyl-cycloSal-Triester **85** und **86** von d4U **42** und ddU **43**.

Als Referenzverbindungen für die Untersuchung der antiviralen Aktivität der in Kapitel 4.1.7. (S. 38) vorgestellten Nucleosiddiphosphatprodrugs **51-58**, wurden die 3-Methyl-cycloSal-Triester **85** und **86** synthetisiert, die durch intrazelluläre Hydrolyse die entsprechenden Nucleosidmonophosphate d4UMP **49** bzw. ddUMP **50** freisetzen sollen. Der Hydrolysemechanismus von Pronucleotiden nach dem cycloSal-Konzept wurde bereits in Abb. 7 (S. 11) detailliert dargestellt. Unterschiedliche Möglichkeiten zur Synthese dieser Art von Verbindungen wurden in einer Vielzahl früherer Arbeiten ausführlich beschrieben.<sup>[42-44]</sup> Die am häufigsten verwendete Variante stellt die Kupplung des Nucleosids mit einem entsprechend substituierten Saligenylchlorphosphit mit anschließender Oxidation des Phosphits zum Phosphat dar. Auf diese Methode wurde auch für die Synthese der Verbindungen **85** und **86** zurückgegriffen. Das 3-Methylsaligenylchlorphosphit **87** wurde dabei durch Umsetzung von 3-Methylsalicylalkohol **23** mit Phosphor(III)-chlorid **45** erhalten, während der Salicylalkohol **23** durch Reduktion von 3-Methylsalicylsäure **88** mit Lithiumaluminiumhydrid zugänglich war.<sup>[96]</sup> Unter den in Abb. 41 angegebenen Reaktionsbedingungen wurde 3-Methylsalicylalkohol **23** mit einer Ausbeute von 75% erhalten.

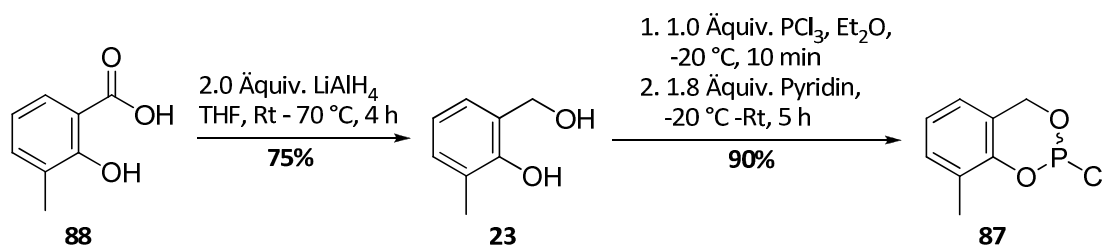


Abb. 41: Synthese von 3-Methylsaligenylchlorphosphit **87** ausgehend von 3-Methylsalicylsäure **88**.

In zwei aufeinanderfolgenden  $\text{S}_\text{N}\text{P}$ -Reaktionen wurde der Salicylalkohol **23** mit Phosphor(III)-chlorid **45** zu dem Saligenylchlorphosphit **87** umgesetzt. Durch langsame Zugabe des Pyridins bei  $-20^\circ\text{C}$  wurde eine möglichst quantitative Präzipitation des während der Reaktion gebildeten Pyridiniumchlorids gewährleistet. Dieses wurde durch Filtration unter Schlenk-Bedingungen abgetrennt und nach Entfernung des Lösungsmittels Verbindung **87** als racemisches Gemisch zweier Enantiomere mit einer Ausbeute von 90% erhalten.

Zur Darstellung der 3-Methyl-cycloSal-Phosphatriester **85** und **86** wurden d4U **42** und ddU **43** mit jeweils 2.0 Äquiv. des Chlorphosphits **87** in Anwesenheit von 2.0 Äquiv.

Diisopropylethylamin (DIPEA) zur Reaktion gebracht. Nach vollständiger Umsetzung des Nucleosids wurde durch Zugabe von 3.0 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) der Phosphitriester zum Phosphattriester oxidiert. Nach vollständiger Oxidation wurde das Rohprodukt durch wässrige Extraktion zur Entfernung von Salzen und präparative circulare Dünnschichtchromatographie am Chromatotron™ gereinigt. Die Zielverbindungen **85** und **86** konnten so mit Ausbeuten von 18% und 19% als Diastereomeregemische (Verhältnis ca. 1:1) erhalten werden (Abb. 42).

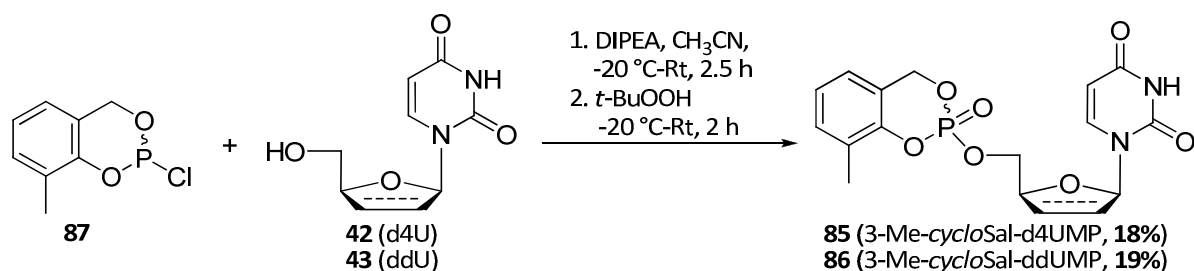


Abb. 42: Synthese der *cycloSal*-Pronucleotide **85** und **86**.

Ausbeuteverluste sind im Wesentlichen auf die Tatsache zurückzuführen, dass die Verbindungen mehrfach gereinigt werden mussten und während der Reinigung eine anteilige Zersetzung der Produkte auftrat. Durch Zusatz von Essigsäure zum Laufmittel während der Chromatographie sollte sich die Zersetzung des Produkts bei diesem Schritt minimieren lassen.<sup>[97]</sup> In Abb. 43 ist das <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum von Verbindung **85** gezeigt. Deutlich zu erkennen ist je ein Singulett für beide Diastereomere.

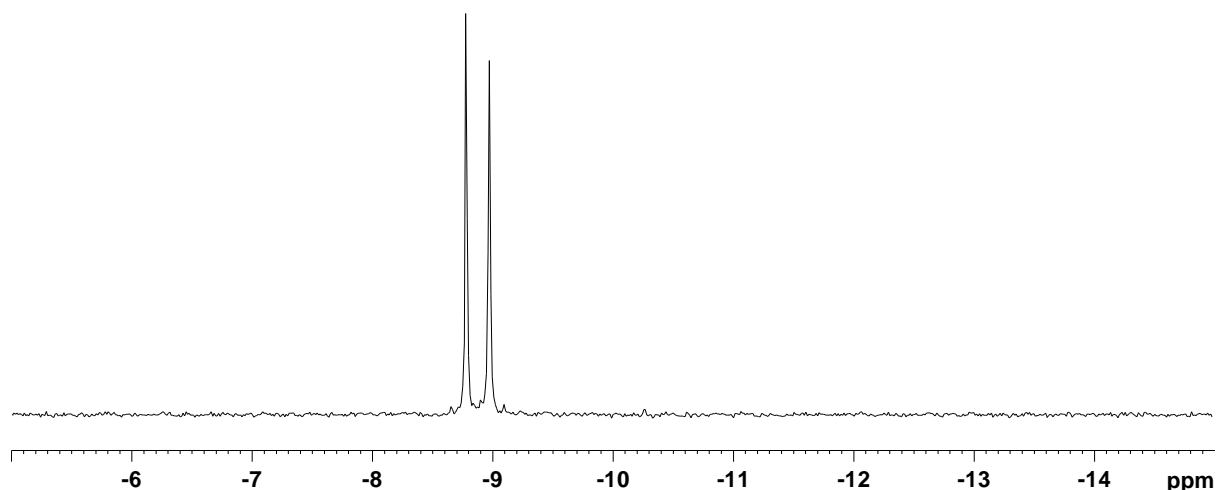


Abb. 43: <sup>31</sup>P-NMR des 3-Me-*cycloSal*-d4UMP **85** (<sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-entkoppelt, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 162 MHz).

#### 4.1.9. Synthese der Nucleosiddiphosphate **59** und **89** von d4U **42** und ddU **43**

Die Nucleosiddiphosphate **59** und **89** wurden als Vergleichssubstanzen für die Untersuchung des Hydrolyseverhaltens und der Zellaufnahme der Nucleosiddiphosphatprodrugs **51-58** benötigt. Die Synthese dieser beiden Verbindungen erfolgte durch präparative Nutzung des *cycloSal*-Konzepts, auf die bereits in Abb. 12 (S. 15) eingegangen wurde. Dabei wird von *cycloSal*-Triestern ausgegangen, die einen starken Akzeptorsubstituenten (z. B. Cl oder NO<sub>2</sub>) in Position 5 der Maske tragen. Durch Umsetzung einer solchen *cycloSal*-Verbindung mit Tetra-*n*-butylammoniumphosphat werden die entsprechenden Nucleosiddiphosphate erhalten.<sup>[52,53]</sup> Daher wurden zunächst die 5-Chlor-substituierten *cycloSal*-Triester **90** und **91** von d4U **42** und ddU **43** synthetisiert. Diese Synthesen erfolgten wie bereits in Abb. 42 (S. 47) für die 3-Methyl-substituierten Verbindungen **85** und **86** gezeigt durch Kupplung des Nucleosids mit dem entsprechenden Saligenylchlorphosphit und anschließende Oxidation. Das 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **92** wurde durch Reduktion von 5-Chlorsalicylsäure **93** mit Lithiumaluminiumhydrid zum 5-Chlorsalicylalkohol **94** und anschließende Umsetzung mit Phosphor(III)-chlorid **45** erhalten.<sup>[98]</sup>

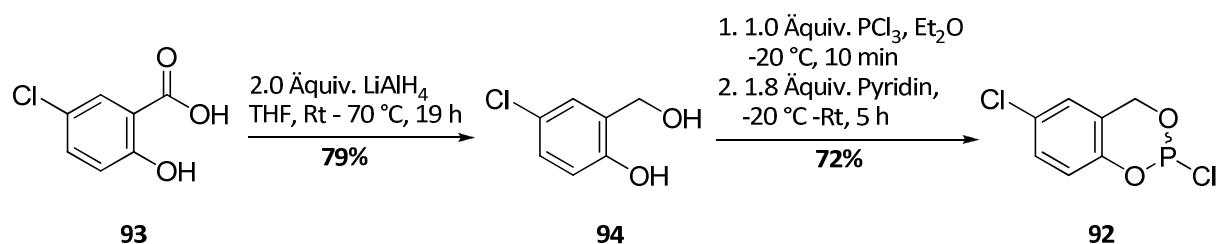


Abb. 44: Synthese des 5-Chlorsaligenylchlorphosphits **92**.

Im Unterschied zu den vorangegangenen Synthesen wurden für die 5-Chlor-substituierten Verbindungen **90** und **91** Oxone® als Oxidationsmittel verwendet. Dabei handelt es sich um ein Tripelsalz der Zusammensetzung 2KHSO<sub>5</sub>·KHSO<sub>4</sub>·K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, wobei das Kaliumperoxomonophosphat das eigentliche oxidierende Reagenz darstellt. Dieses Oxidationsmittel hat sich insbesondere für hydrolyseempfindliche *cycloSal*-Verbindungen bewährt, da nicht nur die Oxidation in sehr kurzer Zeit erfolgt, sondern der saure Charakter des Salzgemisches in wässriger Lösung zusätzlich der basischen Hydrolyse des Produkts während der Aufarbeitung entgegenwirkt.<sup>[99]</sup> Auf diesem Weg konnten die beiden 5-Chlor-substituierten *cycloSal*-Triester **90** und **91** mit Ausbeuten von 63% und 64% erhalten werden.

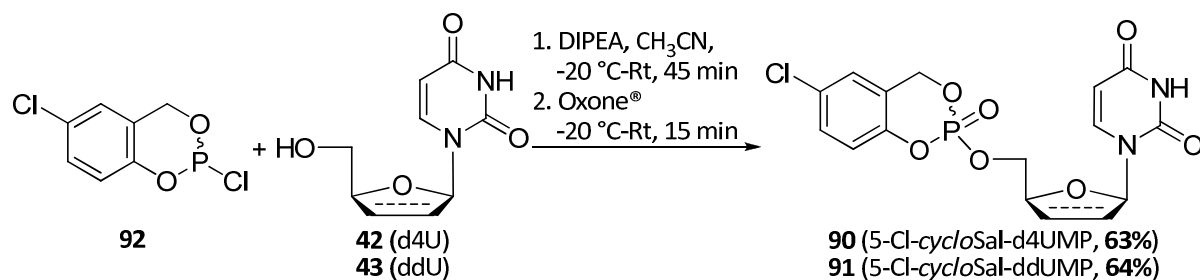


Abb. 45: Synthese der 5-Cl-substituierten *cycloSal*-Triester **90** und **91**.

Die Nucleosiddiphosphate **59** und **89** wurden durch Umsetzung der 5-Chlor-*cycloSal*-Triester **90** und **91** mit Tetra-*n*-butylammoniumphosphat erhalten. Dafür wurde ein von WARNECKE ausgearbeitetes Syntheseprotokoll angewendet.<sup>[98]</sup> Für den Erfolg dieser Reaktionen ist es entscheidend, sie unter vollständigem Ausschluss von Feuchtigkeit durchzuführen. Dazu wurde das hygroskopische Phosphatsalz zunächst in *N,N*-Dimethylformamid gelöst und für eine Stunde über aktiviertem Molsieb gerührt. Anschließend wurde der jeweilige 5-Chlor-*cycloSal*-Triester ebenfalls gelöst in *N,N*-Dimethylformamid über eine Stunde zugetropft, sodass stets ein großer Überschuss des Phosphatsalzes vorhanden war. Nach vollständiger Umsetzung der *cycloSal*-Triester wurden die Rohprodukte durch Extraktion und mehrfache Umkehrphasenchromatographie gereinigt. Dabei stellte die Abtrennung der Nucleosidmonophosphate **49** und **50**, die trotz der intensiven Trocknung vermutlich durch Hydrolyse des Edukts durch Restfeuchtigkeit in der Reaktionslösung als Nebenprodukte entstanden, die größte Hürde dar. Zusätzlich wirkte sich die Bildung der Monophosphate negativ auf die Ausbeuten aus, sodass diese mit 32% (d4UDP **59**) und 28% (ddUDP **89**) niedrig ausfielen.

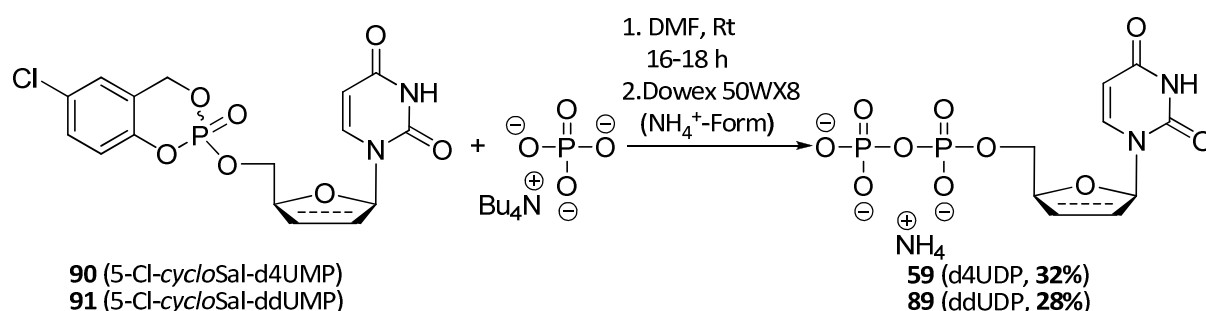


Abb. 46: Synthese der Nucleosiddiphosphate d4UDP **59** und ddUDP **89**.

4.1.10. Hydrolyseverhalten der Prodrugs von d4U **42** und ddU **43** in Phosphatpuffer (pH 7.3)

Zur Untersuchung der chemischen Hydrolyse der Prodrugs von d4U **42** und ddU **43** wurden Hydrolysestudien in einem Phosphatpuffer bei pH 7.3 durchgeführt.

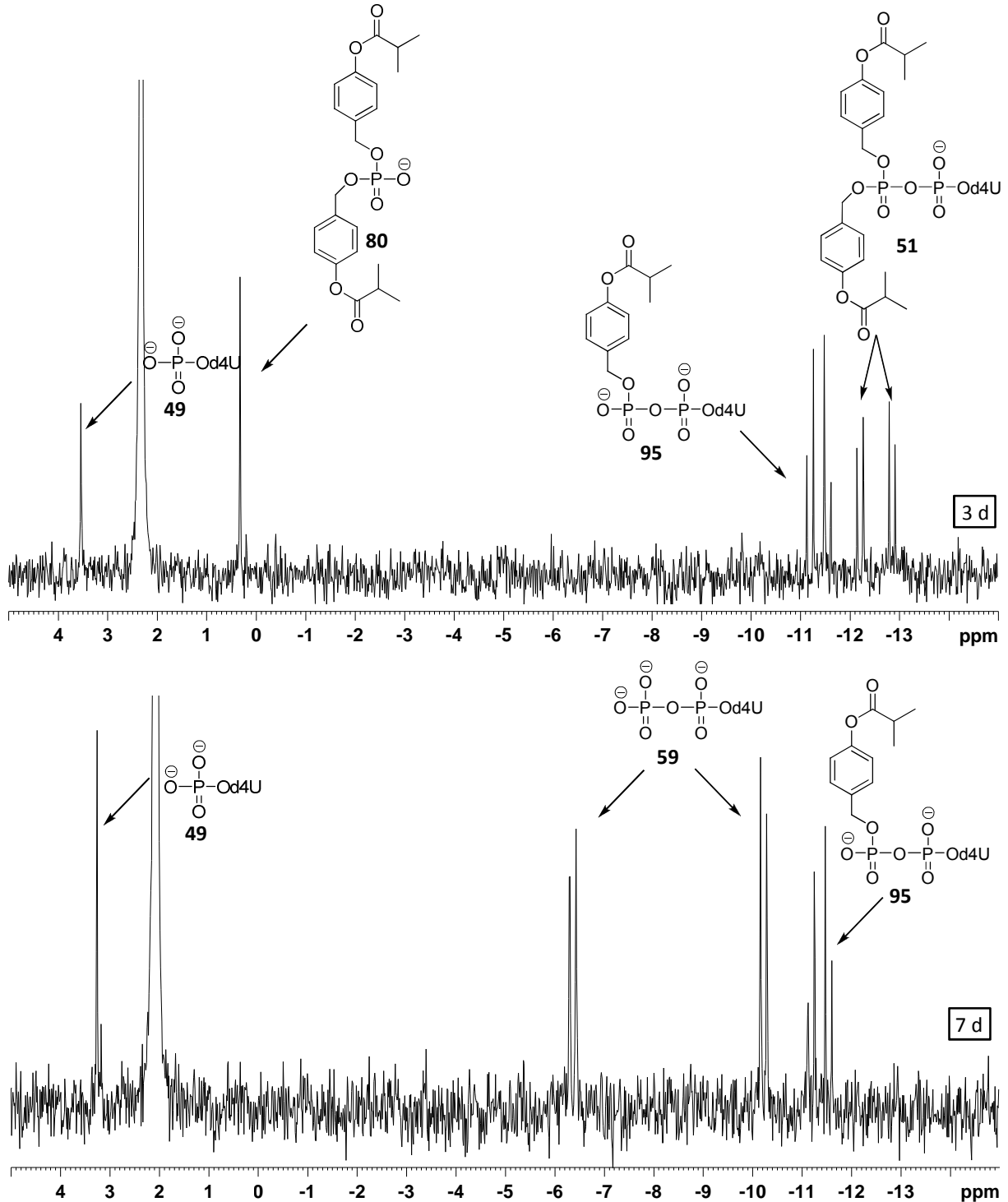


Abb. 47: Verfolgung der Hydrolyse von **51** mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie (Methanol- $d_4$ , 162 MHz).

Zunächst wurde die Hydrolyse des *i*Pr-d4UDP-Prodrugs **51** mit Hilfe der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie verfolgt. Dazu wurde eine Lösung der Verbindung in Methanol- $d_4$  im Verhältnis 1:1 (v/v) mit dem Phosphatpuffer versetzt und bei 37 °C inkubiert. Die in Abb. 47 (S. 50) dargestellten Spektren zeigen die Hydrolyse nach drei und sieben Tagen. Dabei ist deutlich die Bildung des einfach maskierten Intermediats **95** zu erkennen, aus dem das d4UDP **59** freigesetzt wird. Ebenfalls ist die Bildung von d4UMP **49** und dem Phosphatdiester **80** zu sehen, der bei längerer Inkubation ebenfalls hydrolysiert wird.

Um die Hydrolysen quantitativ besser untersuchen und die Kinetik der Abbau- bzw. Bildungsreaktionen bestimmen zu können, wurden diese per HPLC verfolgt. Dazu wurden Lösungen der zu untersuchenden Verbindungen in Phosphatpuffer (pH 7.3) hergestellt und in der Regel über mehrere Wochen bei 37 °C inkubiert. Zu geeigneten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels HPLC vermessen, um die Hydrolyseprodukte zu identifizieren und die Kinetiken zu bestimmen.

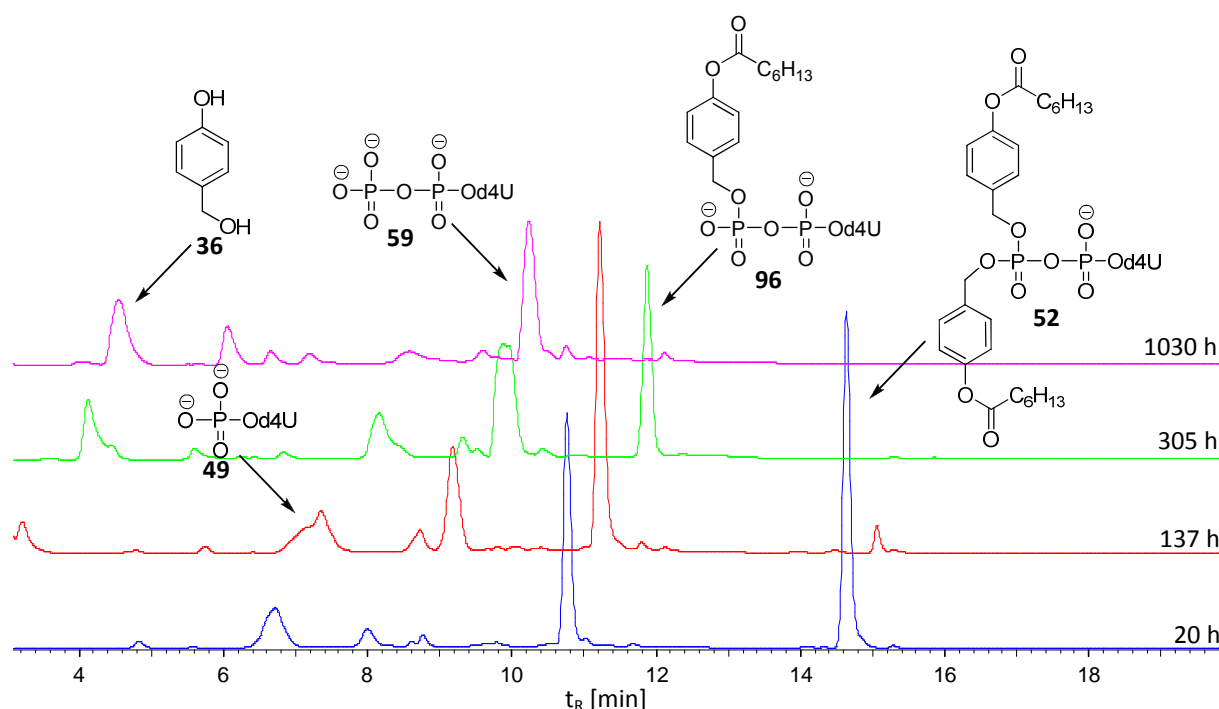


Abb. 48: Verlauf der Hydrolyse des  $\text{C}_6$ -d4UDP-Prodrugs **52** bei pH 7.3 (Methode II, 260 nm).

Die Untersuchung der Kinetik der Zersetzung bzw. Bildung der Verbindungen erfolgte durch Integration der Peakflächen und Auftragung dieser Flächen gegen die Hydrolysedauer. Dabei wurde festgestellt, dass die Prodrugs von d4U **42** und ddU **43** mit gleichen Masken ein

identisches Hydrolyseverhalten zeigen, sodass bei der folgenden Diskussion der Ergebnisse exemplarisch nur auf je eine Verbindung eingegangen wird.

Die in Abb. 48 (S. 51) gezeigte Verfolgung der Hydrolyse des C<sub>6</sub>-d4UDP-Prodrugs **52** zeigt deutlich die Abnahme des Prodrugs unter Bildung des Intermediats **96** und d4UDP **59** sowie d4UMP **49** gemäß des in Abb. 21 (S. 27) gezeigten Hydrolysemechanismus. Die Zuordnung der Peaks für **49** und **59** erfolgte durch Coinjektion der Referenzsubstanzen (Abb. 49). Es ist zu erkennen, dass zu Beginn der Hydrolyse zunächst das d4UMP **49** durch Bruch der Anhydridbindung und das Hydrolyseintermediat **96** durch Abspaltung der ersten Maske entstehen. Solange noch das Prodrug **52** in der Hydrolyselösung vorhanden ist, finden Bildung und Abbau des Intermediats **96**, aus dem durch Abspaltung der zweiten Maske d4UDP **59** gebildet wird, gleichzeitig statt. d4UMP **49** wird vermutlich nur gebildet, solange das Prodrug noch nicht vollständig abgebaut ist.

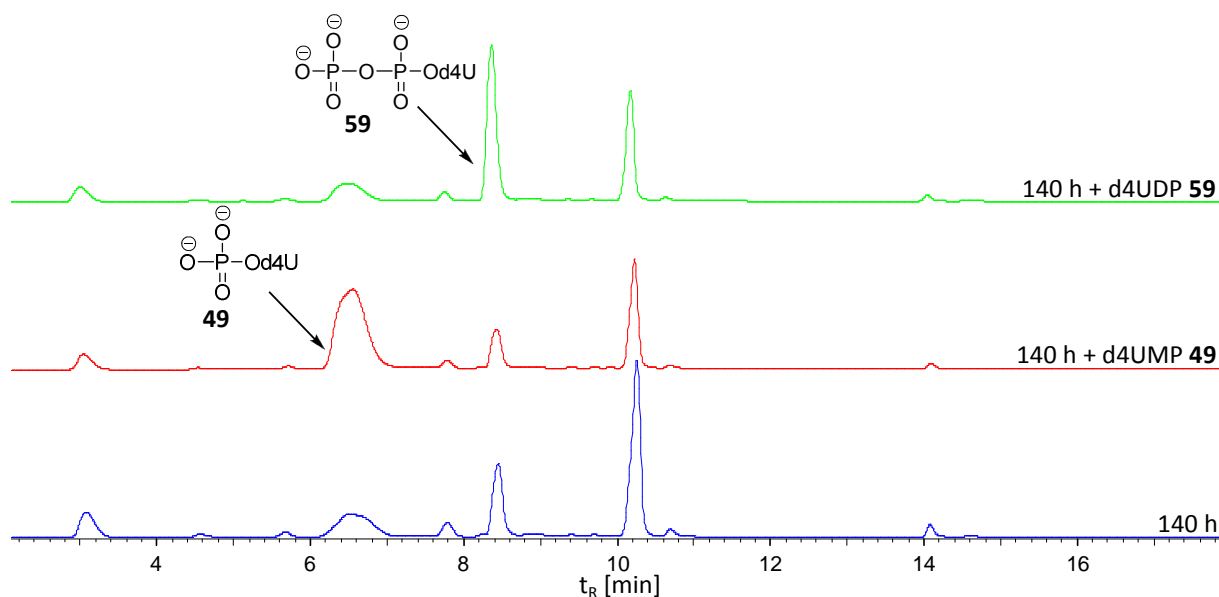


Abb. 49: Coinjektion von **49** und **59** nach 140 h Hydrolyse des C<sub>6</sub>-d4UDP-Prodrugs **52** (Methode II, 260 nm).

Die Auftragung der Peakflächen gegen die Hydrolysedauer zeigt anschaulich den Verlauf der in Abb. 48 (S. 51) abgebildeten Hydrolyse (Abb. 50, S. 53). Für lange Hydrolysedauern zeigte sich eine anteilige Zersetzung von d4UMP **49** und d4UDP **59**. Beide Verbindungen wurden isoliert mit dem Hydrolysepuffer inkubiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass nach zwölf Tagen sowohl das Mono- als auch das Diphosphat vollständig zersetzt waren. Dies war in vorangegangenen Arbeiten bereits für d4TMP **13** und d4TDP **14** beobachtet worden, wobei die Zersetzung deutlich langsamer verlief.<sup>[67]</sup> Zusätzlich kam es zu einer Veränderung



der Peakform des d4UMP **49**, die eine genaue Integration dieses Peaks erschwerte. Dabei kann nicht genau geklärt werden, ob es sich dabei lediglich um eine Peakverbreiterung bzw. um die Bildung von Doppelpeaks für das Monophosphat oder um eine Überlagerung mit benachbarten Peaks unbekannter Nebenprodukte handelte. Dieses Problem wurde bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten DiPPro-Nucleotide beobachtet, sodass keine verlässliche Aussage über das Verhältnis der bei den Hydrolysen entstandenen Mengen an Nucleosidmono- und -diphosphat gemacht werden kann. Solche Phänomene treten bei der HPL-Chromatographie von geladenen Verbindungen häufig auf, wenn diese bei dem vorliegenden pH-Wert in unterschiedlichen Protonierungszuständen vorliegen. Bei den durchgeführten Hydrolysen ist es möglich, dass sich der pH-Wert über die Zeit durch Freisetzung der Spaltprodukte (4-Hydroxybenzylalkohol **36**, Carbonsäure) ändert, was zusätzlich einen Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit des Prodrugs und des Intermediats sowie auf die Stabilität der Hydrolyseprodukte haben kann.

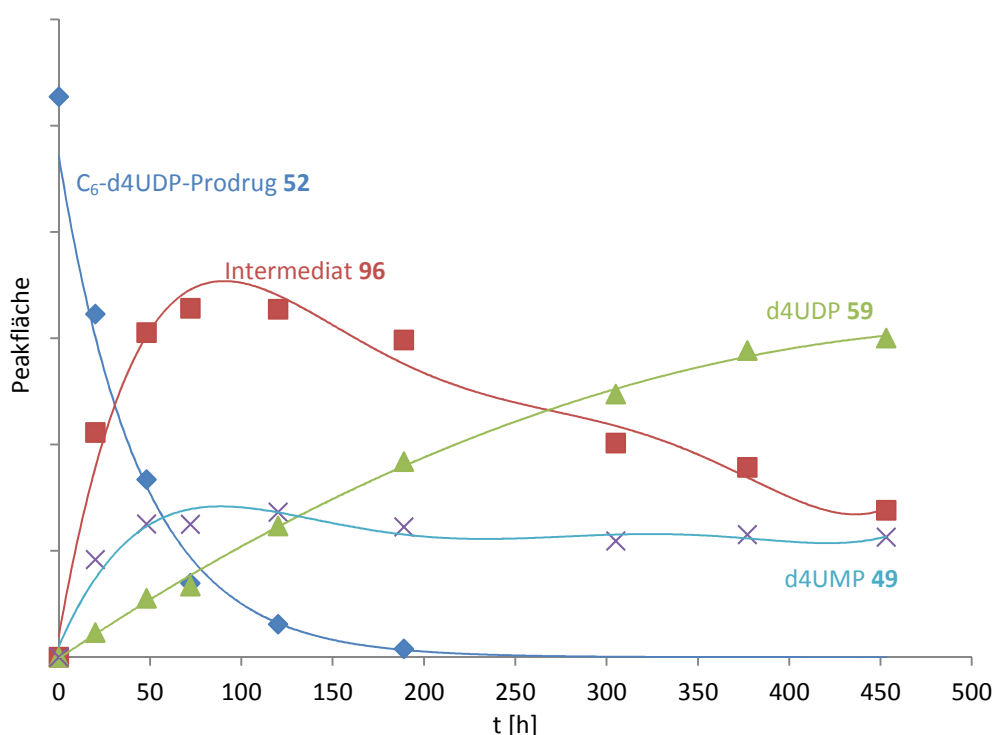


Abb. 50: Verlauf der Hydrolyse des C<sub>6</sub>-d4UDP-Prodrugs **52** bei pH 7.3.

Während die beiden *iPr*-substituierten Prodrugs **51** und **55** ein sehr ähnliches Hydrolyseverhalten zeigten wie die C<sub>6</sub>-substituierten Verbindungen **52** und **56**, verlief die Hydrolyse der C<sub>9</sub>-substituierten Verbindungen **53** und **57** deutlich langsamer. Dies führte zum einen zur Bildung deutlich geringerer Mengen der einfach geschützten Intermediate **97** und **98**, zum anderen zur Freisetzung von mehr d4UMP **49** als bei den vorigen Verbindungen, da über einen deutlich längeren Zeitpunkt das jeweilige Prodrug in der Lösung vorhanden war. Der Verlauf der Hydrolyse des C<sub>9</sub>-d4UDP-Prodrugs **53** ist in Abb. 51 gezeigt. Dieser Effekt war noch ausgeprägter für die C<sub>11</sub>-substituierten Verbindungen **54** und **58** bei denen kaum noch einfach maskiertes Intermediat (**99**, **100**) gebildet wird (Abb. 52, S. 55).

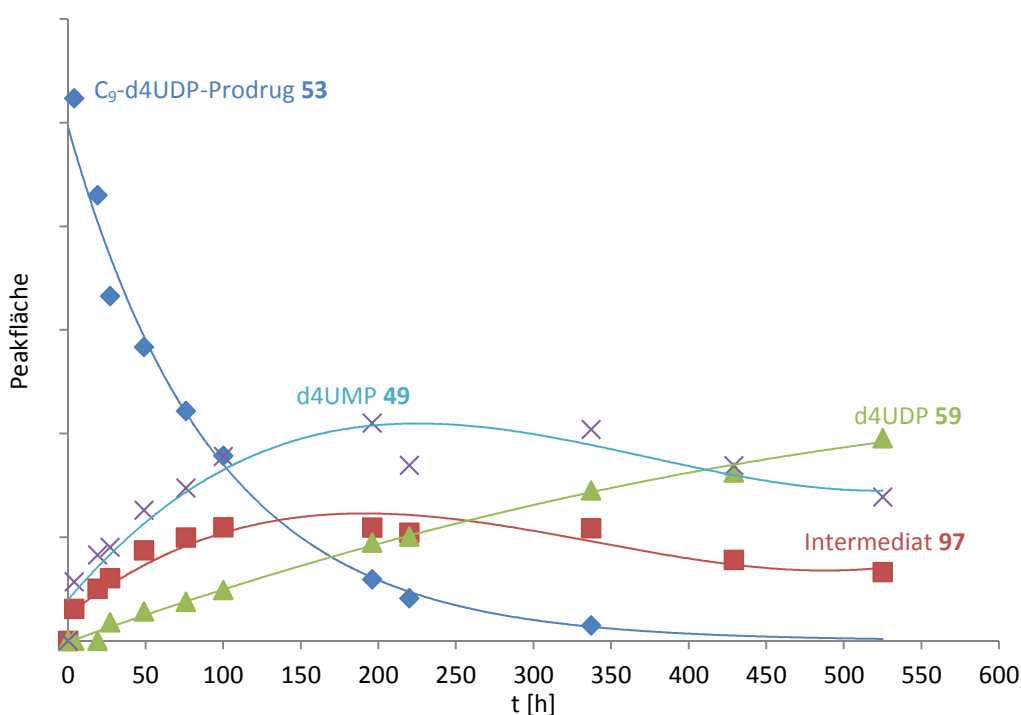


Abb. 51: Verlauf der Hydrolyse des C<sub>9</sub>-d4UDP-Prodrugs **53** bei pH 7.3.

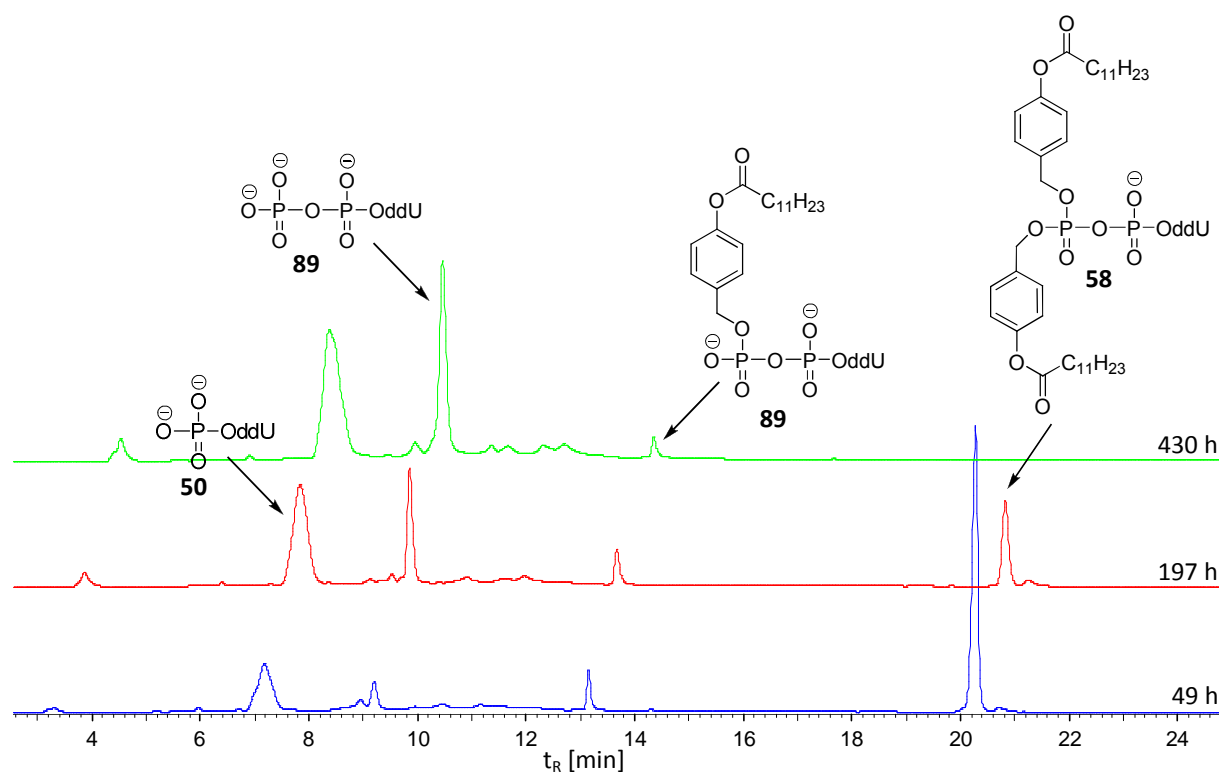


Abb. 52: Verlauf der Hydrolyse des C<sub>11</sub>-ddUDP-Prodrugs **58** bei pH 7.3 (Methode II, 260 nm).

Zur Bestimmung der Halbwertszeiten der zweifach maskierten Prodrugs und der einfach geschützten Intermediate wurden die durch Integration der Peaks der HPL-Chromatogramme erhaltenen Peakflächen gegen die Hydrolysedauer aufgetragen. Mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms wurde eine Ausgleichsfunktion für die exponentielle Abnahme der Peakflächen bestimmt und daraus die Geschwindigkeitskonstante  $k$  der jeweiligen Hydrolyse erhalten. Unter der Annahme, dass es sich bei den Hydrolysen aufgrund des hohen Wasserüberschusses um Kinetiken *pseudo*-erster-Ordnung handelt, wurden die Halbwertszeiten nach der Formel  $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$  bestimmt. Für die Bestimmung der Halbwertszeiten der Intermediate wurden die Peakflächen zu Zeitpunkten bestimmt, zu denen das jeweilige Prodrug bereits vollständig umgesetzt war. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in Abb. 53 (S. 56) und Abb. 54 (S. 57) gezeigt.

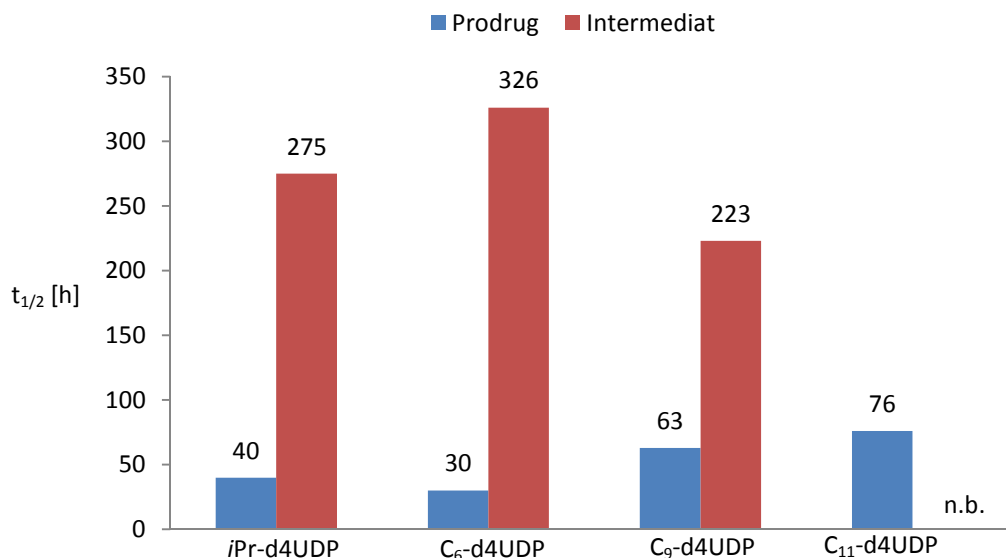


Abb. 53: Hydrolysehalbwertszeiten der d4U-Prodrugs **51-54** und Intermediate **95-97, 99**.

Wie zu erwarten war, erhöhte sich die Halbwertszeit der Prodrugs, die unverzweigte Alkylketten tragen, mit zunehmender Kettenlänge. Die *iPr*-substituierten Prodrugs **51** und **55** zeigen Halbwertszeiten, die in der gleichen Größenordnung wie die der C<sub>6</sub>-substituierten Verbindungen **52** und **56** liegen. Dieser Trend ist zu erklären, geht man davon aus, dass die Veränderung der Hydrolysegeschwindigkeit im Wesentlichen auf sterischen Effekten beruht. Eine unterschiedlich gute Zugänglichkeit der Carbonylfunktion für das angreifende Nucleophil führt zu einer Verlangsamung der Hydrolyse. Zusätzlich kann es zu intra- und intermolekularen hydrophoben Wechselwirkungen kommen, die Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit haben. Im Fall der *iPr*-substituierten Verbindungen **51** und **55** führt die Verzweigung in der Alkylkette zu einem entsprechend größeren Raumanpruch.

Die Halbwertszeiten für die Hydrolyse der zweiten Maske aus den Intermediaten liegen für kurze Alkylketten um ein vielfaches höher, als die der ersten Hydrolyse. Eine mögliche Ursache dafür ist die zusätzliche negative Ladung an der Phosphateinheit, die zu repulsiven elektronischen Wechselwirkungen mit dem angreifenden Nucleophil führt. Für die Halbwertszeiten der Intermediate ist ein umgekehrter Trend zu beobachten als für die Prodrugs: Mit zunehmender Kettenlänge nimmt die Halbwertszeit ab. Für die C<sub>11</sub>-substituierten Verbindungen **54** und **58** wurden nur sehr kleine Mengen der

Intermediate detektiert, so dass auf eine Bestimmung der Halbwertszeit ihrer Hydrolyse verzichtet werden musste (s. Abb. 52, S. 55).

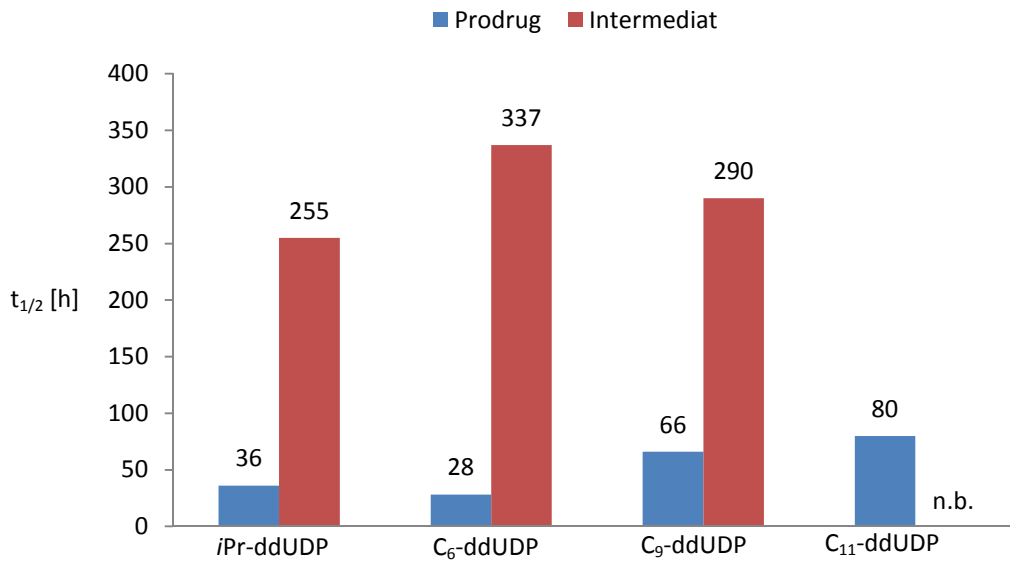


Abb. 54: Hydrolysehalbwertszeiten der ddU-Prodrugs **55-58** und Intermediate **98, 100-102**.

Das für die Prodrugs **51-58** beobachtete Hydrolyseverhalten ist sowohl bezüglich des Hydrolysemechanismus, als auch in Bezug auf die Hydrolysehalbwertszeiten in guter Übereinstimmung mit den für d4TDP-Prodrugs mit gleichen Masken ermittelten Daten.<sup>[66,67]</sup>

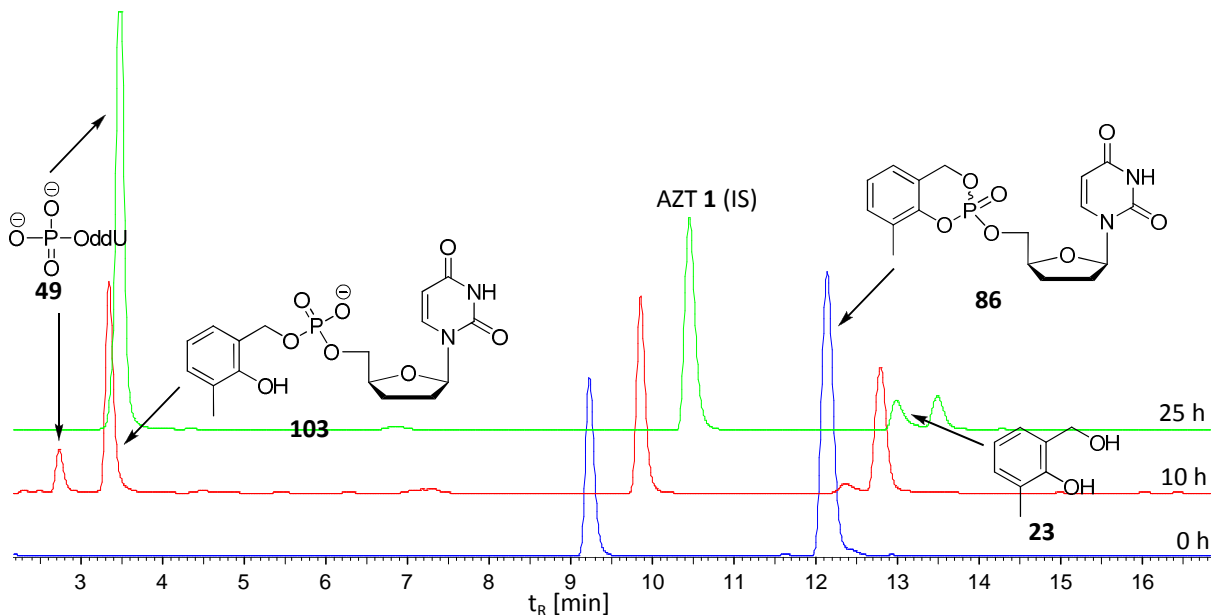


Abb. 55: Hydrolyse von 3-Me-cycloSal-ddUMP **86** in Phosphatpuffer (pH 7.3) (Methode I, 264 nm).

Zusätzlich zur Untersuchung der DiPPro-Nucleotide von d4U **42** und ddU **43** wurde auch das Hydrolyseverhalten der beiden 3-Me-cycloSal-Triester **85** und **86** in Phosphatpuffer (pH 7.3) untersucht. Dabei wurde genauso vorgegangen wie zuvor für die DiPPro-Nucleotide beschrieben. Die Verfolgung der Hydrolyse von 3-Me-cycloSal-ddUMP **86** ist in Abb. 55 (S. 57) gezeigt. Unter der Voraussetzung, dass es sich bei den in der Abbildung markierten Verbindungen um ddUMP **50** und den Benzylphosphatdiester **103** handelt, ist davon auszugehen, dass die Hydrolyse nach dem in Abb. 7 (S. 11) gezeigten Mechanismus abläuft.

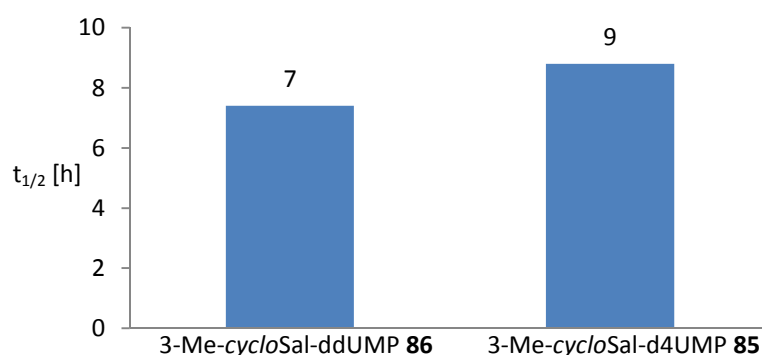


Abb. 56: Hydrolysehalbwertszeiten von **86** und **85**.

Der Verlauf der Hydrolysen war für beide untersuchten Verbindungen identisch, so sind auch die Halbwertszeiten nahezu gleich. Im Fall des 3-Me-cycloSal-ddUMP **86** war in der HPL-Chromatographie keine Trennung der Diastereomere zu beobachten, hingegen konnten für 3-Me-cycloSal-d4UMP **85** zwei Peaks detektiert werden, die allerdings nicht basisliniengetrennt vorlagen, sodass eine getrennte Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeiten der Diastereomere nicht vorgenommen werden konnte.

#### 4.1.11. Hydrolyseverhalten der Prodrugs von d4U **42** und ddU **43** in CEM/O-Zellextrakten

Die Hydrolysen in Phosphatpuffer stellen ein sehr artifizielles System dar, mit dem sich nur die rein chemische Hydrolyse untersuchen lässt. Um die intrazelluläre Metabolisierung der Mono- und Diphosphatprodrugs möglichst realitätsnah simulieren zu können, wurden Hydrolysestudien in CEM/O-Zellextrakten durchgeführt, die von PROF. JAN BALZARINI von der Universität Leuven, Belgien zur Verfügung gestellt wurden. Diese Extrakte wurden ausgewählt, da die Evaluierung der antiviralen Aktivität der untersuchten Verbindungen in CEM/O- bzw. CEM/TK-Zellen durchgeführt wird. Dabei galt es zu untersuchen, welche Auswirkungen die enzymatische Spaltung der Prodrugs auf die Hydrolysegeschwindigkeit sowie auf die Bildung der Hydrolyseprodukte hat. Für die Untersuchungen wurde ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Verfahren verwendet.<sup>[67]</sup> Es wurden Lösungen der Prodrugs in DMSO und Wasser hergestellt, die mit den Zellextrakten versetzt und für unterschiedliche Zeiträume bei 37 °C inkubiert wurden. Nach Präzipitation der Proteine durch Zugabe von Methanol und Zentrifugation wurden die Proben, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, mittels HPLC vermessen und die Hydrolysekinetiken ermittelt. Für alle untersuchten DiPPro-Nucleotide wurde eine drastische Beschleunigung der Hydrolyse festgestellt, wie dies auch für die in vorigen Arbeiten untersuchten Verbindungen der Fall war.<sup>[66,67]</sup> Dieser Effekt ist auf eine enzymatische Spaltung der Esterfunktionen der Prodrugs durch im Zellextrakt vorhandene Esterasen zurückzuführen. Dabei ist davon auszugehen, dass die chemische Hydrolyse aufgrund der kurzen Hydrolysedauern und wegen des vergleichsweise geringen pH-Werts (pH 6.8<sup>[100]</sup>) des Zellextrakts keine Rolle spielt. Im Zellextrakt findet die Bildung des einfach maskierten Intermediats nur in untergeordnetem Maße statt, so dass eine Kinetik der Bildung bzw. Hydrolyse dieser Verbindungen nicht ermittelt wurde. Dies gilt auch für die freigesetzten Nucleosidmono- und -diphosphate, die einer schnellen enzymatischen Zersetzung unterliegen und sich die Monophosphatpeaks zusätzlich mit denen der Zersetzungsprodukte und bei gleicher Wellenlänge absorbierender Zellextraktbestandteile überlagern. Die Untersuchung der Stabilität der Nucleosid-diphosphate im Zellextrakt ergab sowohl für d4UDP **59**, als auch für ddUDP **89** eine Halbwertszeit von 2 h.

Die Hydrolyse des C<sub>6</sub>-d4UDP-Prodrugs **52** ist anhand der HPL-Chromatogramme in Abb. 57 dargestellt.

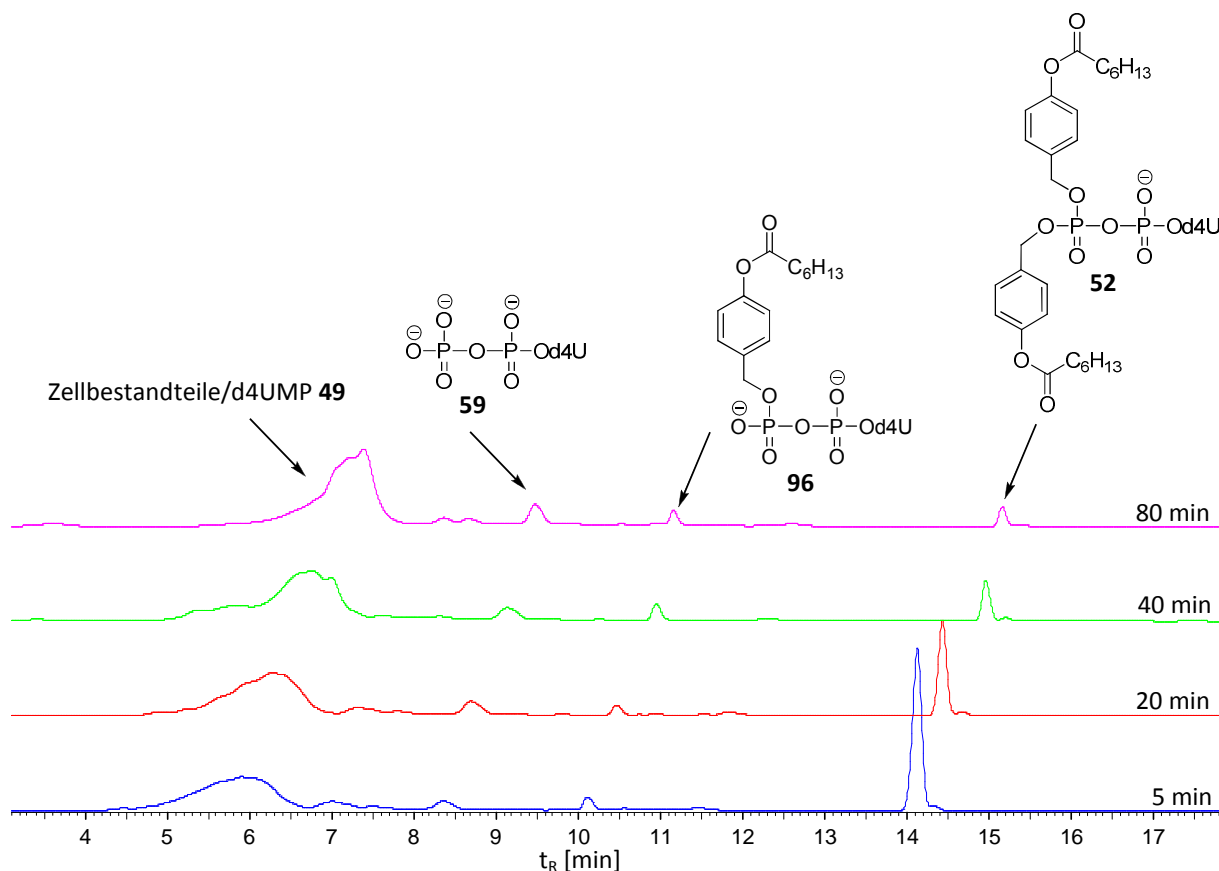


Abb. 57: Verlauf der Hydrolyse des C<sub>6</sub>-d4UDP-Prodrugs **52** in CEM/O-Zellextrakt (Methode II, 260 nm).

Die Hydrolysehalbwertszeiten der Zellextrakthydrolysen der DiPPro-Nucleotide sind in Abb. 58 und Abb. 59 (S. 61) im Vergleich zu denen der chemischen Hydrolysen gezeigt. Wie bereits bei den chemischen Hydrolysen in Phosphatpuffer ist hier eine Zunahme der Halbwertszeit bei Verlängerung der Alkylkette zu beobachten, während die Werte der *i*Pr- und C<sub>6</sub>-substituierten Verbindungen **51**, **52**, **55**, und **56** in der gleichen Größenordnung liegen. Dabei ist anzumerken, dass diese Werte aufgrund der experimentellen Durchführung mit einem größeren Fehler behaftet sind als die der chemischen Hydrolyse, da für jeden Messwert eine separate Hydrolyselösung angesetzt wurde.



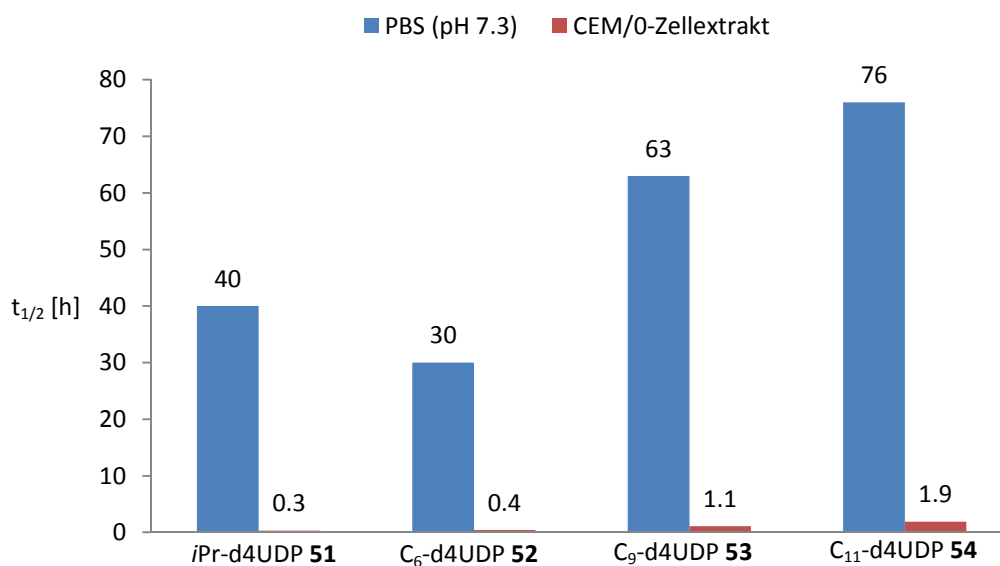


Abb. 58: Hydrolysehalbwertszeiten der d4U-Prodrugs **51-54** bei pH 7.3 und in CEM/0-Zellextrakt.

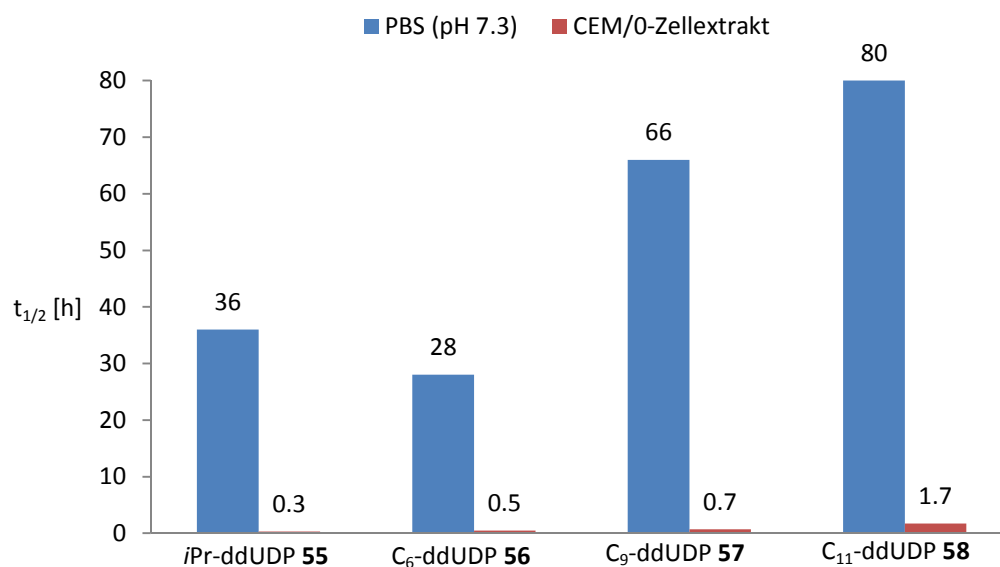


Abb. 59: Hydrolysehalbwertszeiten der ddU-Prodrugs **55-58** bei pH 7.3 und in CEM/0-Zellextrakt.

Die im Vergleich zu den chemischen Hydrolysen sehr schnellen Hydrolysen im Zellextrakt deuten auf eine schnelle intrazelluläre Degradation hin. Unter der Voraussetzung, dass die Konzentration der dafür verantwortlichen Esterasen intrazellulär höher ist als extrazellulär, sollte die Freisetzung der Hydrolyseprodukte mit hinreichender Selektivität intrazellulär ablaufen. Des Weiteren hat eine schnelle Spaltung der maskierenden Gruppen den Vorteil, dass für die daraus gebildeten Verbindungen aufgrund ihrer Polarität ein „lock-in“-Effekt resultieren sollte.

Wie die DiPPro-Nucleotide wurden auch die 3-Me-cycloSal-Prodrugs **85** und **86** in CEM/0-Zellextrakt hydrolysiert und deren Halbwertszeiten in diesem Medium bestimmt. Aufgrund des rein pH-abhängigen Hydrolysemechanismus dieser Verbindungen wurde kein Einfluss durch die Anwesenheit von Esterasen erwartet. Der niedrigere pH-Wert (pH 6.8<sup>[100]</sup>) ließ aber eine im Vergleich zur Hydrolyse im Phosphatpuffer höhere Halbwertszeit annehmen. Diese Vermutung wurde durch das Experiment bestätigt. Die entsprechenden Halbwertszeiten sind in Abb. 60 wiedergegeben.

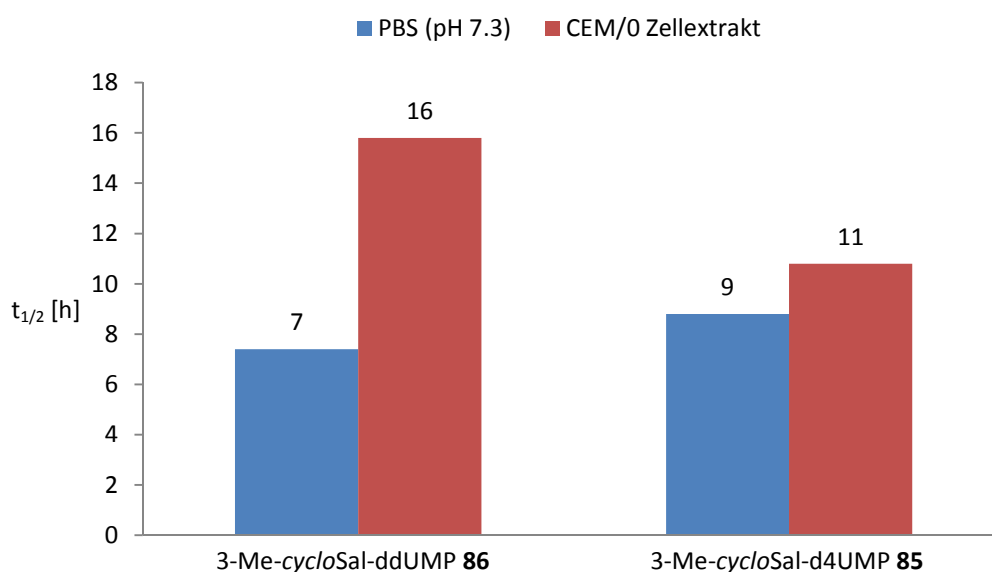


Abb. 60: Hydrolysehalbwertszeiten von **86** und **85** bei pH 7.3 und in CEM/0-Zellextrakt.

#### 4.1.12. Aktivität der Prodrugs von d4U **42** und ddU **43** gegen HIV-1 und HIV-2

Die Testung der antiviralen Aktivität der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Prodrugs wurde von PROF. JAN BALZARINI an der Universität Leuven, Belgien, durchgeführt. Dazu wurden mit HIV-1 und HIV-2 infizierte T-Lymphozytzen des Wildtyps (CEM/0) sowie einer Zelllinie, in der die Thymidinkinase (TK) nicht produziert wird (CEM/TK<sup>-</sup>), verwendet.

Zur Interpretation der antiviralen Daten ist zunächst ein Blick auf die Lipophilie der untersuchten Verbindungen nützlich. Eine Möglichkeit, die Lipophilie von Verbindungen relativ zueinander abzuschätzen ist der Vergleich der Retentionszeiten bei der RP-HPLC.<sup>[101]</sup> Abb. 61 (S. 63) zeigt die HPL-Chromatogramme der Coinjektion der DiPPro-Nucleotide der d4U- und der ddU-Reihe. Dies zeigt zum einen, dass die Modifikation im Glycon

erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Lipophilie des Prodrugs hat und zum anderen, dass die Verbindungen mit zunehmender Länge der Alkylkette lipophiler werden.

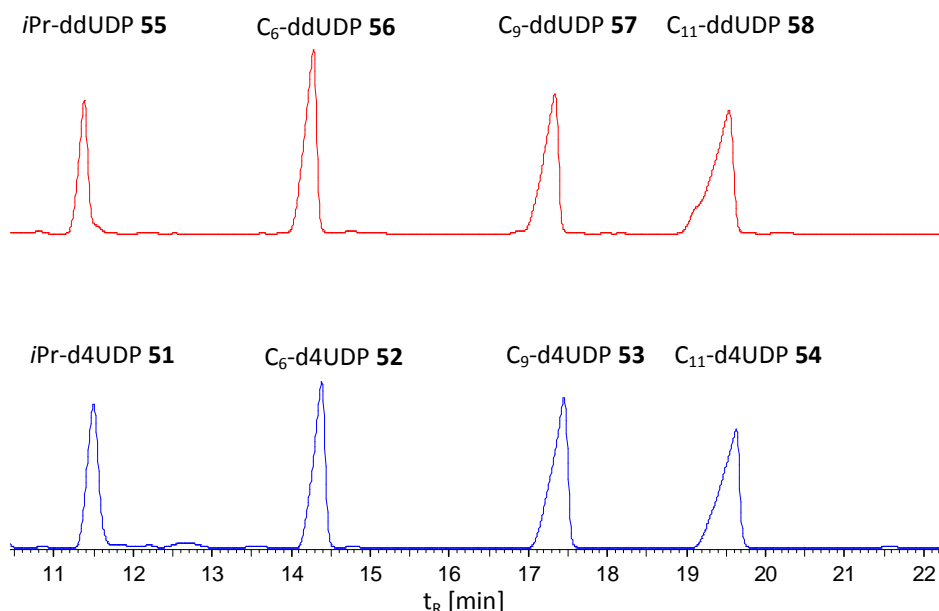


Abb. 61: Coinjektion der DiPPro-Nucleotide der d4U- und ddU-Reihe (Methode II, 260 nm).

Es ist davon auszugehen, dass die Verbindungen mit zunehmender Lipophilie besser in der Lage sind, die unpolare Zellmembran zu überwinden. Andererseits wurde gezeigt, dass gerade die Verbindungen mit langen Alkylketten an der Maske höhere Hydrolysehalbwertszeiten aufweisen. Dies kann zum einen zu einer vermehrten Freisetzung des entsprechenden Nucleosidmonophosphats führen und zum anderen begünstigt die langsame Abspaltung der ersten Maske den Efflux des Prodrugs.

Die in Tabelle 2 (S. 64) wiedergegebenen EC<sub>50</sub>-Werte zeigen zunächst einmal, dass d4U **42** und ddU **43** in ihrer nucleosidischen Form erwartungsgemäß keine Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 zeigen. Das gleiche gilt für die 3-Me-*cycloSal*-Pronucleotide **85** und **86**, sodass davon ausgegangen werden kann, dass auch die Freisetzung der entsprechenden Nucleosidmonophosphate in diesen Fällen keine antivirale Aktivität hervorzurufen vermag oder aus den *cycloSal*-Verbindungen keine ausreichenden Mengen an Monophosphat gebildet werden. Allerdings ist dieses Ergebnis teilweise im Widerspruch zu den Ergebnissen von MCGUIGAN ET AL., die unter gleichen Bedingungen für ddU-Monophosphatprodrugs EC<sub>50</sub>-Werte von 15 µM - 43 µM ermittelten.<sup>[87]</sup>

Tabelle 2: Antivirale Daten der Prodrugs von d4U **42** und ddU **43**.

Verbindung	EC <sub>50</sub> <sup>a</sup> [μM]			CC <sub>50</sub> <sup>b</sup> [μM]
	CEM/0		CEM/TK <sup>-</sup>	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
d4U <b>42</b>	>250	>250	>250	>250
3-Me-cycloSal-d4UMP <b>85</b>	>50	>50	>10	93 ± 7.1
<i>i</i> Pr-d4UDP <b>51</b>	<b>32 ± 16</b>	<b>23 ± 1.4</b>	≥50	110 ± 1.4
C <sub>6</sub> -d4UDP <b>52</b>	<b>35 ± 2.1</b>	<b>30 ± 4.2</b>	<b>24 ± 2.8</b>	109 ± 2.1
C <sub>9</sub> -d4UDP <b>53</b>	<b>36 ± 20</b>	<b>20 ± 3.5</b>	>10	95 ± 3.5
C <sub>11</sub> -d4UDP <b>54</b>	>50	>50	>50	116 ± 2.8
ddU <b>43</b>	>250	>250	>250	>250
3-Me-cycloSal-ddUMP <b>86</b>	>50	>50	>50	104 ± 3.5
<i>i</i> Pr-ddUDP <b>55</b>	>50	>50	>50	>250
C <sub>6</sub> -ddUDP <b>56</b>	<b>26 ± 9.9</b>	<b>30 ± 4.9</b>	>50	124 ± 11
C <sub>9</sub> -ddUDP <b>57</b>	≥50	<b>42 ± 12</b>	>50	99 ± 3.5
C <sub>11</sub> -ddUDP <b>58</b>	>50	>50	>50	144 ± 7.1

<sup>a</sup>50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; <sup>b</sup>50% cytotoxische Konzentration

Die Ergebnisse für die DiPPro-Nucleotide waren zunächst überraschend. Eine Freisetzung des Nucleosiddiphosphats vorausgesetzt, war davon ausgegangen worden, dass daraus schnell das entsprechende Triphosphat gebildet wird, da die Nucleosiddiphosphatkinase (NDPK) aufgrund ihrer Struktur eine wesentlich geringere Substratspezifität aufweist als die Kinasen, die die ersten beiden Phosphorylierungsschritte katalysieren.<sup>[26]</sup> Tatsächlich konnte bei den ddU-Prodrugs lediglich für das C<sub>6</sub>-ddUDP **56** eine moderate antivirale Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 gefunden werden, eine geringe Aktivität ist auch für das C<sub>9</sub>-ddUDP **57** gegen HIV-2 möglich. Die Interpretation dieser Daten und der direkte Vergleich sind jedoch durch die teilweise sehr großen Standardabweichungen erschwert. Für die DiPPro-Nucleotide der d4U-Reihe konnte für die *i*Pr-, C<sub>6</sub>- und C<sub>9</sub>-substituierten Verbindungen eine geringe Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 gefunden werden. Da bisher keine Aktivität durch die Freisetzung von d4UMP **49** bekannt ist, ist davon auszugehen dass die hier gemessene Aktivität nur durch die

intrazelluläre Bildung des d4UDP **59** aus dem entsprechenden Prodrug hervorgerufen werden kann. Erstaunlich ist jedoch, dass bis auf das C<sub>6</sub>-d4UDP **52** alle Verbindungen ihre Aktivität in den Thymidinkinase defizienten Zellen (TK<sup>-</sup>) verlieren, da das Fehlen dieses Enzyms bei Freisetzung des Nucleosiddiphosphates keinen Einfluss haben sollte. Allerdings lässt der Wert für C<sub>9</sub>-d4UDP **53** keine schlüssige Interpretation zu. In Bezug auf die Struktur-Aktivitäts-Beziehung der untersuchten Verbindungen ist festzuhalten, dass offenbar trotz seiner vergleichsweise geringen Lipophilie das *iPr*-d4UDP **51** in der Lage ist, die Zellmembran zu überwinden und d4UDP **59** freizusetzen. Dies gilt ebenso für die C<sub>6</sub>- und C<sub>9</sub>-substituierten Verbindungen. Die Inaktivität der beiden C<sub>11</sub>-substituierten Verbindungen deutet darauf hin, dass aufgrund der höheren Hydrolysehalbwertszeit die Bildung des jeweiligen Monophosphats zur Freisetzung geringerer Mengen des entsprechenden Diphosphats führt. Zusätzlich wäre es möglich, dass ein Efflux der Verbindungen vermehrt auftritt. Die gemessenen Cytotoxizitäten waren für alle untersuchten Verbindungen gering.

Für die insgesamt niedrige Aktivität der untersuchten Verbindungen sind verschiedene Gründe denkbar. Zum einen ist es möglich, dass die Verbindungen nicht in ausreichenden Mengen in die Zelle gelangen. Zum anderen könnte durch Konkurrenzreaktionen im komplexen zellulären Medium die freigesetzte Menge an Nucleosiddiphosphat zu gering sein oder das Diphosphat enzymatisch zersetzt werden, bevor es zur Triphosphatbildung kommt. Ebenfalls möglich ist, dass der durch die NDPK katalysierte Aufbau des Triphosphats nicht mit der angenommenen Effizienz stattfindet. Im Unterschied zu anderen humanen Kinasen wird bei der NDPK die zu übertragende Phosphatgruppe von einem Donor (ATP oder GTP) auf das aktive Zentrum übertragen und dort kovalent gebunden. Das Akzeptorsubstrat ragt mit der Diphosphateinheit und dem Glycon in das aktive Zentrum und wird dort über ein Mg<sup>2+</sup>-Kation koordiniert. Diese Koordination erfolgt zwischen beiden Phosphateinheiten und der 3'-Hydroxyfunktion des Glycons. Dies hat zur Folge, dass Modifikationen im Glycon einen sehr viel größeren Einfluss auf die Effizienz dieser Phosphorylierung haben, als Modifikationen im Aglycon. Insbesondere das Fehlen der 3'-Hydroxyfunktion führt zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität.<sup>[26]</sup> Eine schwache Koordination ist allerdings auch mit einer Doppelbindung zwischen der 2'- und der 3'-Position des Glycons möglich, so berichten

SCHNEIDER ET AL. dass aufgrund dieser Wechselwirkung d4TDP **14** um den Faktor 10 effizienter umgesetzt wird als AZTDP **34**, wo diese Koordination nicht möglich ist.<sup>[102]</sup>

Um die Effektivität der Umsetzung der Nucleosiddiphosphate zu den entsprechenden Triphosphaten durch die NDPK zu untersuchen, wurden in der Arbeitsgruppe von PROF. JAN BALZARINI Tests mit dem isolierten Enzym durchgeführt. Das überraschende Ergebnis dieser Studien war, dass sowohl für d4UDP **59**, als auch für ddUDP **89** keine Umsetzung zum Triphosphat beobachtet werden konnte. Nach diesem Ergebnis kann davon ausgegangen werden, dass diese Tatsache der Hauptgrund für die geringe antivirale Aktivität der untersuchten Verbindungen ist. Neben der NDPK sind weitere Enzyme in der Lage, die Phosphorylierung von Nucleosiddiphosphaten zu katalysieren. Ein Beispiel ist die Phosphoglyceratkinase, die u.a. in der Lage ist, d4TTP **15** und AZTTP **35** zu synthetisieren.<sup>[103]</sup> Möglicherweise können also auch d4UDP **59** und ddUDP **89** durch andere Enzyme als die NDPK phosphoryliert werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass von den Nucleosiden 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrouridin (d4U) **42** und 2',3'-Dideoxyuridin (ddU) **43** jeweils vier DiPPro-Nucleotide mit unterschiedlichen Masken (*iPr*-, C<sub>6</sub>-, C<sub>9</sub>-, C<sub>11</sub>- substituiert) synthetisiert werden konnten. Zusätzlich wurden die 3-Me-*cycloSal*-Triester **85** und **86** sowie die Nucleosiddiphosphate **59** und **89** beider Nucleoside als Vergleichssubstanzen dargestellt. Das Hydrolyseverhalten der DiPPro-Nucleotide wurde in unterschiedlichen Medien untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass in Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten die rein chemische Hydrolyse in Phosphatpuffer (pH 7.3) nach dem in Abb. 21 (S. 27) gezeigten Mechanismus abläuft, bei dem durch konkurrierende Spaltung der Anhydridbindung das Nucleosidmonophosphat und ein Phosphatdiester als Nebenprodukte entstehen. Die Hydrolysehalbwertszeit steigt mit zunehmender Länge der Alkylkette an, während die Halbwertszeit des einfach maskierten Intermediats abnimmt. Aufgrund einer schnellen enzymatischen Spaltung sind die Halbwertszeiten in CEM/O-Zellextrakten deutlich geringer. Allerdings kommt es dabei auch zu einem schnellen Abbau der Nucleosiddiphosphate, so dass über die freigesetzten Mengen keine zuverlässige Aussage gemacht werden kann. Die Untersuchung der antiviralen Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 zeigte keine Aktivität für die Nucleoside **42** und **43** sowie für die

*cycloSal*-Verbindungen **85** und **86**. Für die DiPPro-Nucleotide wurde in den Fällen des *iPr*-d4UDP **51**, C<sub>6</sub>-d4UDP **52**, C<sub>9</sub>-d4UDP **53** und C<sub>6</sub>-ddUDP **56** lediglich moderate Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 (EC<sub>50</sub> = 23 µM – 42 µM) gefunden, während die weiteren Verbindungen inaktiv waren. Dies kann möglicherweise auf eine unzureichende Membrangängigkeit, eine ineffiziente Freisetzung der Nucleosiddiphosphate oder eine nicht ausreichende Phosphorylierung zum Nucleosidtriphosphat zurückzuführen sein. Untersuchungen zur Phosphorylierung der Nucleosiddiphosphate durch isolierte NDPK zeigten keine Umsetzung zu den Triphosphaten. Dieser unerwartete Befund ist vermutlich der Hauptgrund für die niedrige antivirale Aktivität der getesteten Verbindungen

#### 4.2. Bicyclische Nucleosidanaloga als analytische Sonden für Fluoreszenzstudien

Die Nutzung von Fluoreszenzphänomenen zur Aufklärung biochemischer Prozesse gehört zu den Standardverfahren in der Bioanalytik, die breite Anwendung finden. Ein großer Vorteil fluoreszenzbasierter Methoden ist die Möglichkeit, durch wellenlängenselektive Anregung der Fluorophore qualitative und quantitative Informationen aus komplexen biochemischen Systemen (z. B. intakten Zellen) *in vitro* und *in vivo* erhalten zu können. Zusätzlich lassen sich beispielsweise durch Ausnutzung der Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität, *Quenching*- oder *Bleaching*-Effekte dynamische Prozesse verfolgen.

##### 4.2.1. Entstehung von Fluoreszenz

Bei der Fluoreszenz handelt es sich um ein Lumineszenzphänomen, das wie die Phosphoreszenz auf der Anregung von Elektronen durch Absorption von Strahlung und anschließender Relaxation beruht (Abb. 62). Da es sich dabei in der Regel um  $n \rightarrow \pi^*$  oder  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergänge handelt, sind für die Anregung ausgedehnte  $\pi$ -Systeme notwendig.

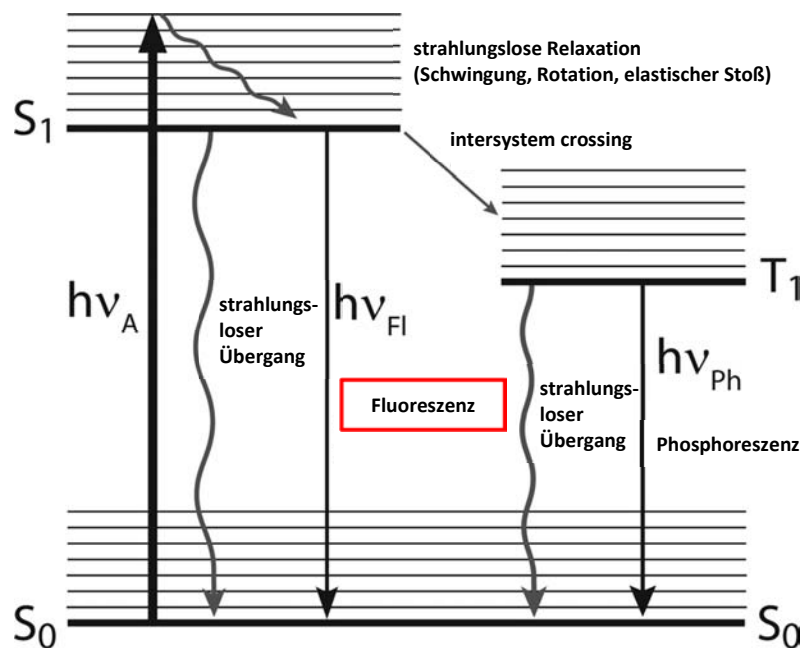


Abb. 62: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm (verändert nach [75]).  $S_0$ : Singulettgrundzustand,  $S_1$ : erster angeregter Singulettzustand,  $T_1$ : erster angeregter Triplettzustand,  $h$ : Planck'sches Wirkungsquantum,  $\nu_A$ : Absorptionswellenlänge,  $\nu_{Fl}$ : Fluoreszenzwellenlänge,  $\nu_{Ph}$ : Phosphoreszenzwellenlänge.



Durch Absorption der Anregungsenergie ( $E_A = h \cdot \nu_A$ ) in Form von Strahlung der Anregungswellenlänge ( $\nu_A$ ) wird ein Elektron vom Singulettgrundzustand ( $S_0$ ) in einen angeregten Schwingungszustand des ersten angeregten Singulettzustands ( $S_1$ ) angehoben. Es erfolgt zunächst strahlungslose Relaxation beispielsweise durch Schwingung, Rotation oder elastischen Stoß bis zum Grundzustand von  $S_1$ . Ist der Energieunterschied zwischen dem Grundzustand von  $S_1$  und den angeregten Zuständen von  $S_0$  groß, kann die zur Relaxation abzugebende Energiemenge nicht strahlungsfrei an die Umgebung abgegeben werden. Die Relaxation erfolgt durch Emission von Strahlung der Fluoreszenzwellenlänge ( $\nu_{FI}$ ). Im Vergleich zur Anregungswellenlänge ist die Fluoreszenzwellenlänge rotverschoben (sog. „Stokes Shift“). Dies ist zum einen durch den Energieverlust durch die strahlungslose Relaxation vor Aussendung der Fluoreszenzstrahlung begründet, zum anderen ist eine Relaxation in einen angeregten Zustand von  $S_0$  möglich, der eine weitere strahlungsfreie Desaktivierung folgt.<sup>[75]</sup>

Ist Spinumkehr möglich, kann ein Übergang von  $S_1$  in den ersten angeregten Triplettzustand ( $T_1$ ) stattfinden (*intersystem crossing*). Da dieser Übergang spinverboten ist, ist die Wahrscheinlichkeit dafür gering und die Relaxationszeit deutlich länger als bei der Fluoreszenz. Die bei der Relaxation von  $T_1$  nach  $S_0$  abgegebene Strahlung wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit und der langen Relaxationszeiten spielt die Phosphoreszenz in der Bioanalytik praktisch keine Rolle.<sup>[69]</sup>

Da die Lebensdauer der angeregten Zustände bei der Fluoreszenz ( $10^{-9}$ - $10^{-7}$  s) in der Größenordnung liegen wie die Zeiten, die für Diffusion, Rotation oder Konformationsänderungen von Biomolekülen benötigt werden, ist eine Untersuchung solcher Prozesse durch Fluoreszenzmessungen möglich.<sup>[69]</sup>

#### 4.2.2. Bioanalytische Nutzung von Fluoreszenzphänomenen

Neben der einfachen Fluoreszenzspektroskopie wurde eine Vielzahl bioanalytischer Verfahren entwickelt, die auf Fluoreszenzphänomenen beruhen. Durch Fluoreszenzmikroskopie lassen sich Fluoreszenzphänomene in biologischen Medien (z. B. Zellen und Geweben) verfolgen. Dabei wird in der Regel die Epifluoreszenzmikroskopie verwendet, bei

der die Probe nicht durchstrahlt, sondern durch ein Objektiv beleuchtet wird. Als Anregungsquellen dienen heutzutage in der Regel Laser.

Zu den modernen Verfahren gehört z. B. FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*). Mit dieser Methode lassen sich Diffusionseigenschaften von Molekülen durch eine Membran untersuchen. Dazu werden die Moleküle mittels kurzer intensiver Bestrahlung durch irreversible Zerstörung des Fluorophors gebleicht (*Photobleaching*). Anschließend kommt es durch Diffusion fluoreszenzmarkierter Moleküle aus der Umgebung durch die Membran zu einer Rückkehr des Fluoreszenzsignals.<sup>[104]</sup>

Durch FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) lässt sich die räumliche Nähe zweier Fluorophore untersuchen. Durch strahlungsfreien intra- oder intermolekularen Energietransfer, der auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen beruht, wird Energie von einem angeregten Donor auf einen Akzeptor übertragen. Dieser Transfer tritt auf, wenn Donor und Akzeptor nicht weiter als ca. 10 nm voneinander entfernt sind. Wird der Donor angeregt, ohne dass sich der Akzeptor in der Nähe befindet, ist nur Donorfluoreszenz zu detektieren. Wird der FRET-Abstand nicht überschritten, wird zusätzlich Akzeptorfluoreszenz beobachtet.<sup>[104]</sup> Aufgrund dieser Eigenschaften lassen sich mittels FRET unter anderem enzymatische Bindungsknüpfungs- und -spaltungsreaktionen untersuchen.

Eine Möglichkeit, Zellen nach bestimmten Kriterien zu trennen stellt FACS (*Fluorescence Assisted Cell Sorting*) dar. Dabei können beispielsweise infizierte Zellen durch einen fluoreszierenden Antikörper markiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie von nicht infizierten Zellen getrennt werden.<sup>[69]</sup>

*Multicolor Imaging* erlaubt das gleichzeitige Markieren unterschiedlicher Zell- oder Gewebebestandteile mit verschiedenen Farben. Diese Methode wird häufig für medizinische Studien *in vivo* eingesetzt.<sup>[105]</sup>

Weitere Methoden beruhen darauf, dass das Fluoreszenzverhalten eines Fluorophors durch Parameter wie Lösungsmittel, pH-Wert und Packungseffekte in Kristallen beeinflusst wird. Beim *Quenching* der Fluoreszenz kommt es zur reversiblen Auslöschung der Fluoreszenz bei intaktem Fluorophor z. B. durch Energieübertragung auf ein anderes Molekül.

#### 4.2.3. Bicyclische Nucleosidanaloga (BCNA)

Die hohe und selektive Aktivität bicyclischer Nucleosidanaloga (BCNA) gegen das Varicella-Zoster-Virus (VZV) wurde 1999 erstmals durch MCGUIGAN ET AL. beschrieben.<sup>[106]</sup> Das bereits in Abb. 4 (S. 5) gezeigte Cf-1743 **11** ist der potenteste bekannte anti-VZV-Wirkstoff und übersteigt die Wirkung des aktuell zur Behandlung der Infektion verwendeten ACV **10** um das 1000-fache.<sup>[107]</sup> Die allgemeine Struktur dieser Verbindungen ist in Abb. 63 gezeigt. Ausgehend davon wurde eine Reihe von Analoga synthetisiert und untersucht, die Modifikationen im Glycon und im Aglycon tragen. Dabei führten diese Modifikationen bestenfalls zu einer Retention der antiviralen Aktivität im Vergleich zu **11**, in den meisten Fällen war sie geringer oder ging vollständig verloren.<sup>[107-109]</sup> Ein interessantes Ergebnis wurde bei der Untersuchung der 2',3'-Didesoxyanaloga gefunden: Während sie ihre anti-VZV-Aktivität vollständig verloren, zeigten die D-Nucleoside selektive Aktivität gegen HCMV.<sup>[89]</sup> Die 2',3'-Didesoxyanaloga der L-Reihe zeigen dagegen Aktivität gegen das Vaccinia- und das Masern-Virus.<sup>[110]</sup>

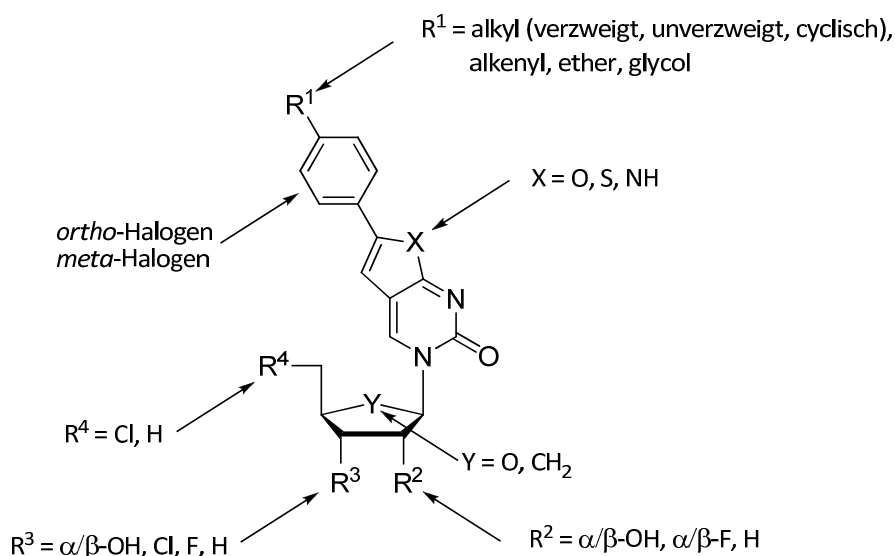


Abb. 63: Allgemeine Struktur und Beispiele für Modifikationen eines BCNA (verändert nach [107]).

Es wurde nachgewiesen, dass die BCNA nur durch VZV-eigene Kinasen in ihre Mono- und Diphosphate überführt werden. Allerdings sind BCNA-Diphosphate keine Substrate der humanen NDPK, sodass unklar ist, ob und auf welchem Weg BCNA-Triphosphate gebildet werden. In Zellen, in denen viruseigene Thymidinkinase nicht produziert wird, verlieren die Verbindungen ihre Aktivität, sodass davon auszugehen ist, dass phosphorylierte Metabolite

der BCNA für die Aktivität verantwortlich sind.<sup>[108]</sup> Ein möglicher Wirkmechanismus ist die Inhibition der VZV-Polymerase durch diese Metaboliten.<sup>[107]</sup>

Neben der Anwendung der BCNA als antivirale Wirkstoffe zeichnen sie sich durch starke Autofluoreszenz aus. Zusätzlich unterscheiden sich einfache BCNA in ihrer Struktur nur gering von den natürlichen Pyrimidinnucleosiden. Sie wurden daher schon häufig erfolgreich als Fluoreszenzsonden für unterschiedliche Untersuchungen eingesetzt. MCGUIGAN ET AL. untersuchten die Zellaufnahme von FV-100 **104**, dem 5'-O-L-Valinylester von Cf-1743 **11**, der als Prodrug zur Steigerung der Bioverfügbarkeit durch Verbesserung der Wasserlöslichkeit eingesetzt wird. Die Aufnahme in HeLa-Zellen wurde dabei mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm beobachtet.<sup>[111]</sup>

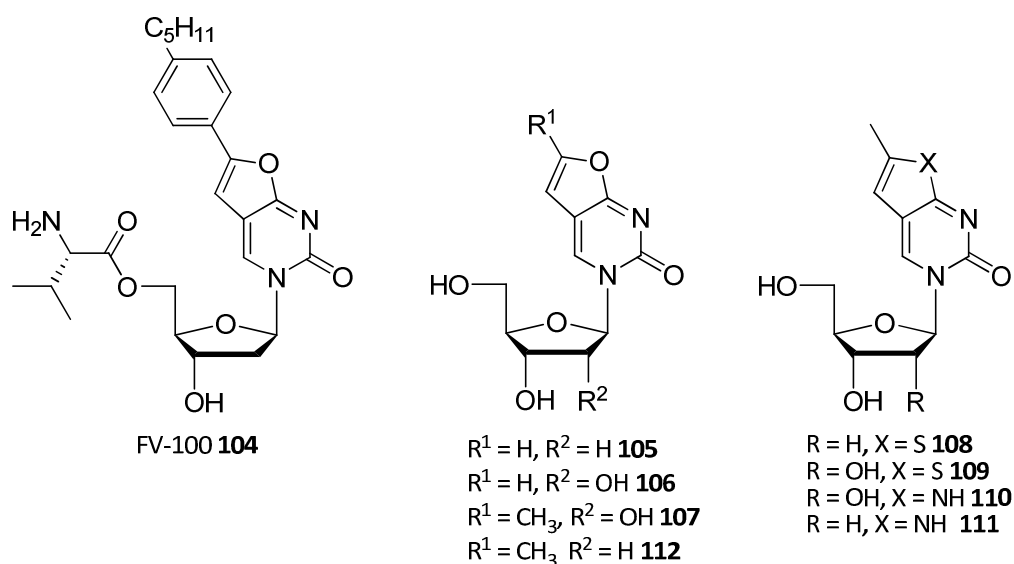


Abb. 64: Beispiele für BCNA als Fluoreszenzsonden.

Zur Untersuchung der Transportprozesse von Nucleosiden durch die Zellmembran mit Hilfe von Nucleosidtransportproteinen verwendeten ZHANG ET AL. die Verbindungen **105** und **106**, mit denen unter anderem FRAP-Experimente durchgeführt wurden (Abb. 64).<sup>[112]</sup> Ähnliche Studien wurden auch von DAMARAJU ET AL. durchgeführt. Dazu wurden u. a. die Verbindungen **106-110** verwendet.<sup>[113]</sup> BERRY ET AL. gelang der Einbau der Pyrroloderivate **110** und **111** in Oligonucleotide durch automatisierte Festphasensynthese unter Verwendung der entsprechenden Phosphoramidite. Anhand des *Quenching* der Fluoreszenz unter bestimmten Bedingungen lässt sich das Hybridisierungsverhalten dieser Oligonucleotide

untersuchen.<sup>[114]</sup> Auf Basis der Verbindungen **107** und **112** führten LUTZ ET AL. eine Vielzahl von Modifikationen im Glycon ein (z. B. 2',3'-Didesoxy, 2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydro, 3'-Azido). Diese Nucleosidanaloga wurden verwendet, um deren intrazelluläre Phosphorylierung durch unterschiedliche Kinasen mit Hilfe von FACS-Experimenten zu untersuchen.<sup>[115,116]</sup>

Über die ersten fluoreszenzmarkierten Prodrugs nach dem *cycloSal*- und dem *DiPPro*-Konzept wurde bereits im Kenntnisstand berichtet (S. 25f). Diese konnten aufgrund ihrer niedrigen Anregungswellenlänge mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht erfolgreich als Fluoreszenzsonden eingesetzt werden.<sup>[66]</sup> In eigenen Arbeiten wurden daher die beiden in Abb. 65 gezeigten *cycloSal*-Triester **113** und **114** zweier BCNA synthetisiert, um deren Eignung als Fluoreszenzsonden für Zellaufnahmestudien zu untersuchen.<sup>[117]</sup>

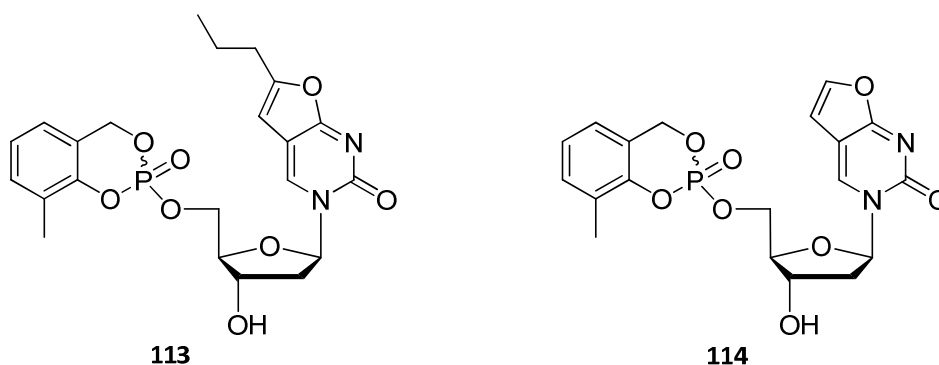
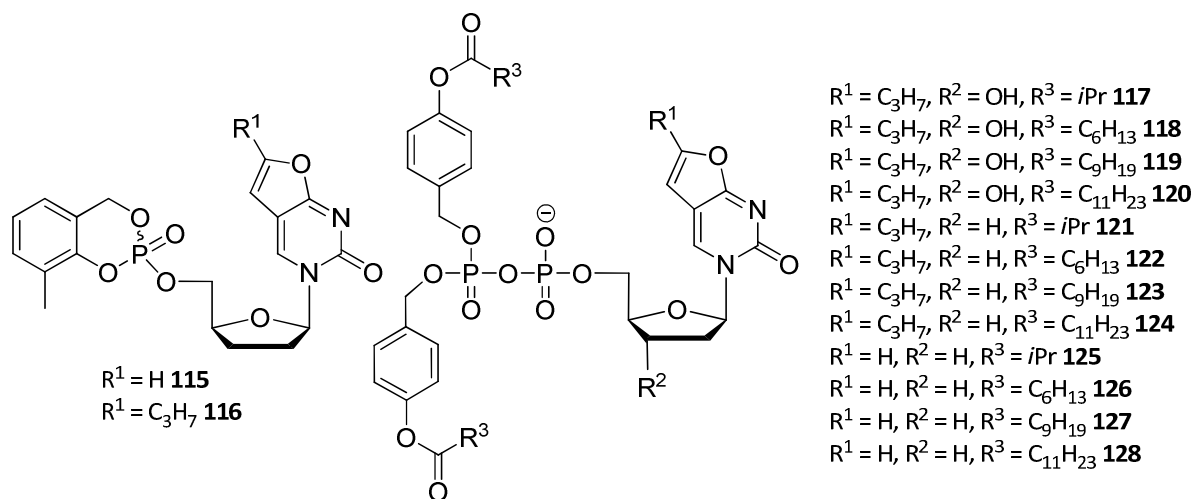


Abb. 65: Erste *cycloSal*-Triester zweier BCNA.<sup>[117]</sup>

Ziel dieser Arbeit war es, weitere BCNA-Prodrugs nach dem *cycloSal*- und dem *DiPPro*-Konzept zu synthetisieren und deren Eigenschaften, insbesondere bezüglich ihrer Eignung als Fluoreszenzsonden, zu untersuchen. Dabei sollte der Schwerpunkt auf der Synthese der 2',3'-Didesoxyanaloga liegen, da diese am besten geeignet sein sollten, das Diffusionsverhalten antiviral aktiver 2',3'-Didesoxynucleoside zu simulieren. Anhand der *DiPPro*-Nucleotide **117-128** sollte der Einfluss der 3'-Hydroxyfunktion und der Propylgruppe an der Nucleobase auf die Lipophilie und das Hydrolyseverhalten evaluiert werden. Die Zielverbindungen **115-128** sind in Abb. 66 (S. 74) gezeigt.


 Abb. 66: Zielverbindungen **115-128**.

#### 4.2.4. Synthese der Bicyclischen Nucleosidanaloga (BCNA)

Den Schlüsselschritt der Synthese bicyclischer Nucleosidanaloga stellt die Sonogashira-Kupplung eines geeigneten Alkins mit einem 5-Iod-Uridinderivat mit anschließender kupferkatalysierter 5-*endo-dig*-Cyclisierung dar. Erste Reaktionen dieser Art wurden von ROBINS ET AL. beschrieben<sup>[118,119]</sup> und von MCGUIGAN ET AL. optimiert, sodass Kupplung und Cyclisierung in einer *one-pot*-Reaktion durchgeführt werden können.<sup>[111]</sup> In Analogie zu dieser Syntheseroute wurde in eigenen Arbeiten 6-Prop-2'-dBCNA **129** dargestellt.<sup>[117]</sup> Ausgehend von kommerziell erhältlichem 5-Iod-2'-desoxyuridin **130** wurde die Sonogashira-Kupplung mit Pent-1-in und Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) als Katalysator sowie Kupfer(I)-iodid und Diisopropylethylamin (DIPEA) als Cokatalysatoren bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Cyclisierung erfolgte unter Rückfluss nach Zugabe zusätzlichen Kupfer(I)-iodids und Triethylamin. Verbindung **129** konnte auf diesem Weg mit Ausbeuten bis zu 58% über zwei Stufen erhalten werden (Abb. 67, S. 75). Für die Synthese von 6-H-2'-dBCNA **105** wurde ebenfalls von 5-Iod-2'-desoxyuridin **130** ausgegangen. Als Kupplungspartner wurde Trimethylsilylacetylen verwendet. Dies hatte zwei Gründe: Zum einen handelt es sich im Gegensatz zu Ethin um eine Flüssigkeit, was die präparative Arbeit wesentlich erleichtert. Zum anderen sollte durch die Silylschutzgruppe die Dimerisierung durch eine Glaser-Kupplung zwischen den Nucleosiden verhindert werden. Der Ringschluss konnte nicht wie bei **129** in einer *one-pot*-Reaktion durchgeführt werden. Daher erfolgte zunächst die

Abspaltung der Silylgruppe von **131** mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) um **132** zu erhalten. Der Ringschluss zu **105** wurde anschließend unter den gleichen Bedingungen wie für **129** durchgeführt. Allerdings waren hierzu 1.2 Äquiv. Kupfer(I)-iodid notwendig.<sup>[117,120]</sup> Unter diesen Reaktionsbedingungen besteht wieder die Möglichkeit der Glaser-Kupplung als Nebenreaktion. Das entsprechende Dimer konnte bei keiner der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Synthesen isoliert werden, wurde aber von JANEBA ET AL. für sehr ähnliche Cyclisierungsreaktionen beschrieben.<sup>[121]</sup>

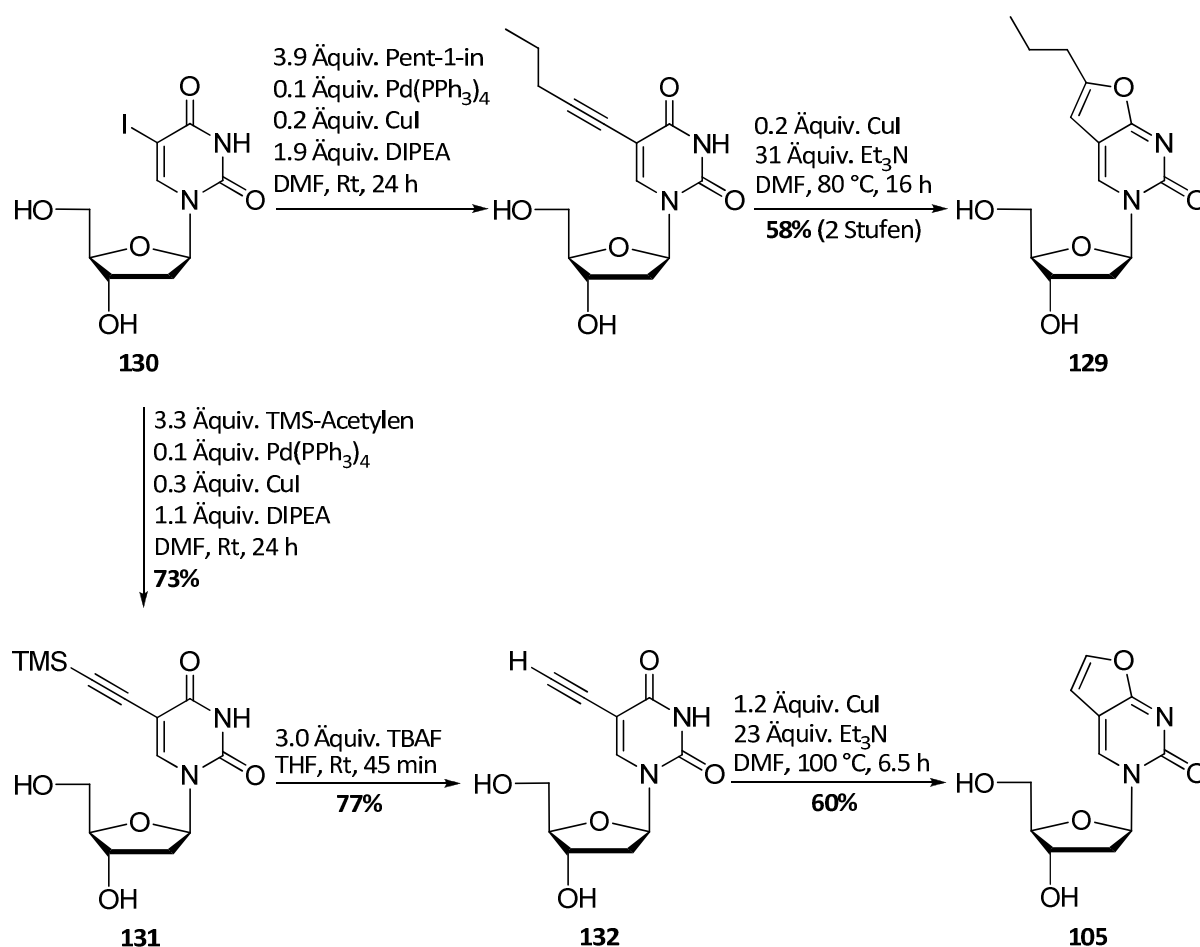


Abb. 67: Synthese von 6-Prop-2'-dBCNA **129** und 6-H-2'-dBCNA **105**.<sup>[117]</sup>

Zur Darstellung des 2',3'-Didesoxyanalogon von **129** (6-Prop-ddBCNA **133**) wurde in einem ersten Ansatz nach dem in Abb. 68 (S. 76) gezeigten Retrosyntheschema vorgegangen. Den Schlüsselschritt dieser Route sollte die der Barton-McCombie-Reaktion analoge radikalische Desoxygenierung des Phenylthiokohlensäureesters **134** zu **135** darstellen, der aus dem 5'-O-TBDMS-geschützten 6-Prop-2'-dBCNA **136** hergestellt werden sollte.

Verbindung **136** sollte nach Silylschätzung der 5'-Hydroxyfunktion von 5-Iod-2'-desoxyuridin **130** durch die in Abb. 67 (S. 75) gezeigte Sequenz aus Sonogashira-Kupplung und Cyclisierung erhalten werden.

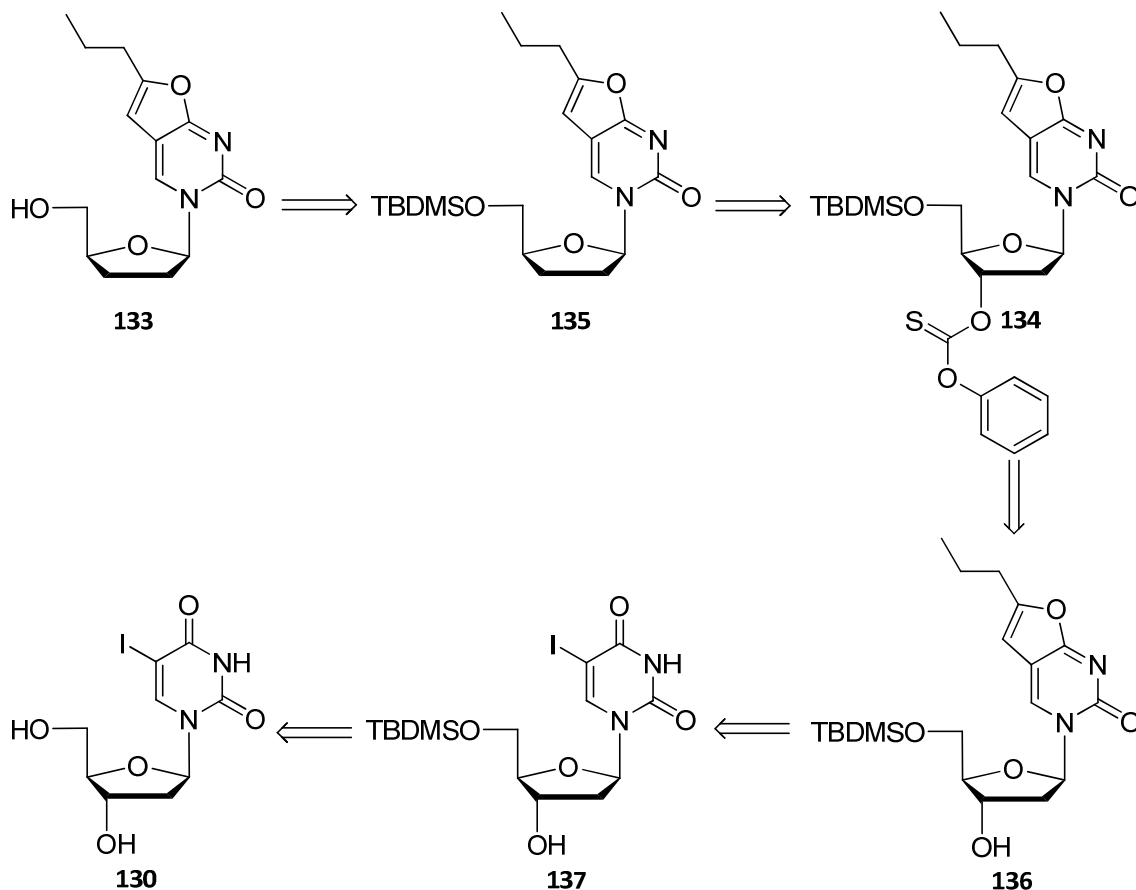


Abb. 68: Retrosyntheschema zur Darstellung von 6-Prop-ddBCNA **133**.

Die Silylschätzung der 5'-Hydroxyfunktion von 5-Iod-2'-desoxyuridin **130** erfolgte durch Umsetzung mit 1.1 Äquiv. *tert*-Butyldimethylsilylchlorid in Pyridin unter den in Abb. 69 angegebenen Reaktionsbedingungen.<sup>[122]</sup> Dabei konnte Verbindung **137** mit einer Ausbeute von 76% erhalten werden.

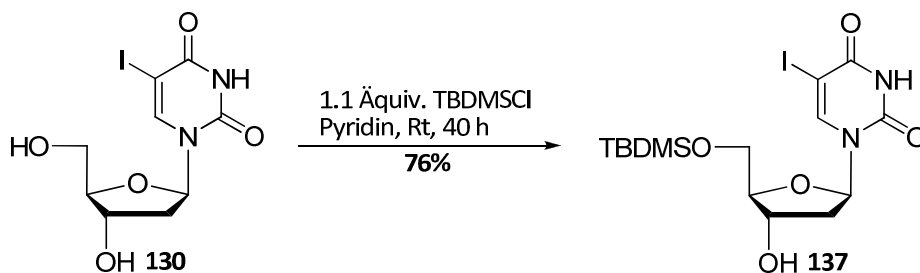


Abb. 69: Selektive Silylierung der 5'-Hydroxyfunktion von **130**.



Die Bildung einer geringen Menge der vermutlich zweifach silylierten Verbindung konnte mittels Dünnschichtchromatographie beobachtet werden, deren Abtrennung war bei der chromatographischen Reinigung allerdings problemlos möglich. Die anschließende Sonogashira-Kupplung gefolgt von der Cyclisierung in einer *one-pot*-Reaktion lieferte **136** mit einer Ausbeute von 75% (Abb. 70).

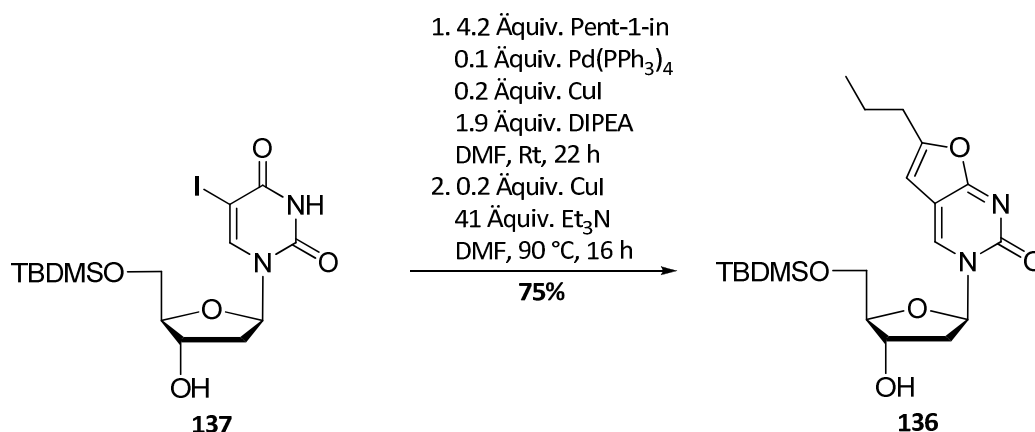


Abb. 70: Synthese von 5'-O-TBDMS-2'-dBCNA **136**.

Zur Synthese des Phenylthiokohlensäureesters **134** wurde 5'-O-TBDMS-2'-dBCNA **136** mit Phenoxythiocarbonylchlorid (PTC-Cl) umgesetzt.<sup>[123]</sup> Unter den in Abb. 71 angegebenen Reaktionsbedingungen wurde Verbindung **134** mit einer Ausbeute von 72% erhalten.

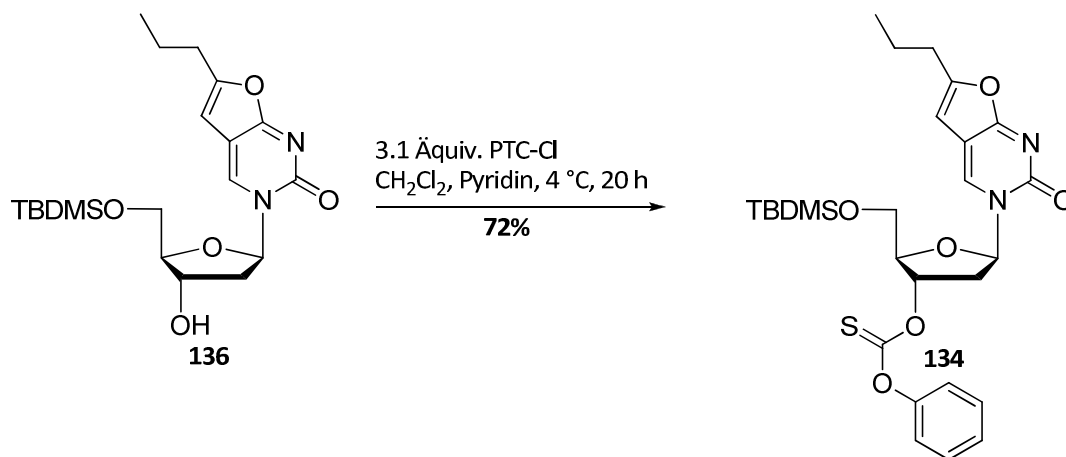


Abb. 71: Darstellung des Phenylthiokohlensäureesters **134**.

Die Desoxygenierung wurde analog der Barton-McCombie-Reaktion durchgeführt.<sup>[124]</sup> Im Hinblick auf die spätere Anwendung in biologischen Tests wurde im Gegensatz zur ursprünglichen Durchführung dieser Reaktion auf die Verwendung des giftigen

Tributylstannans verzichtet. Als Wasserstoffatomdonor fungierte stattdessen Tris(trimethylsilyl)silan (TTMSS). Als Radikalstarter wurde Azoisobutyronitril (AIBN) eingesetzt.<sup>[125,126]</sup> Nach vollständiger Umsetzung des Edukts konnte allerdings als einziges Produkt, das die für die BCNA typische blaue Fluoreszenz aufwies, die abgespaltene bicyclische Nucleobase **138** mit einer Ausbeute von 66% isoliert werden (Abb. 72). Die weiteren Produkte konnten anhand der spektroskopischen Daten nicht identifiziert werden.

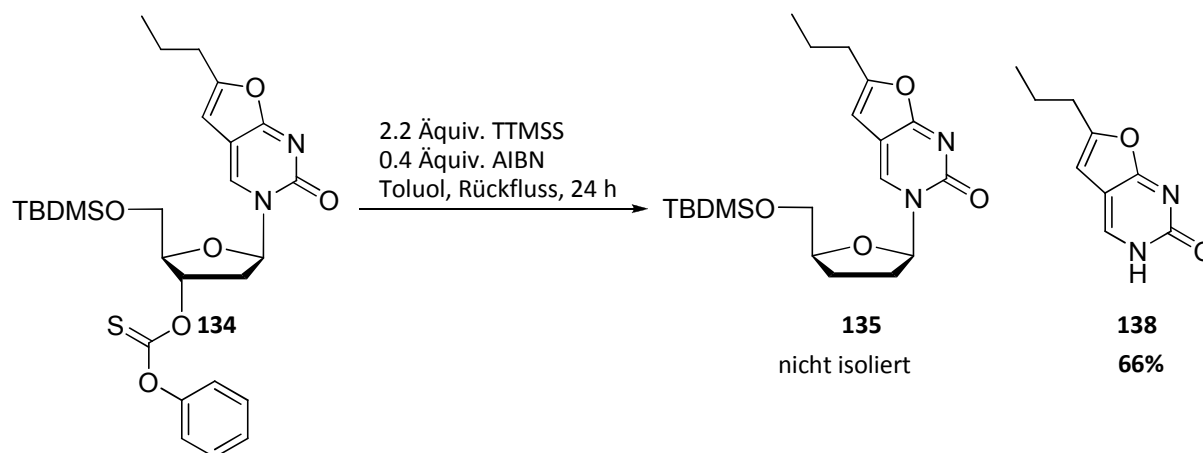


Abb. 72: Versuch der Synthese von **135** durch Barton-McCombie-Desoxygenierung.

Auch durch Veränderung der Reaktionsbedingungen konnte die Reaktion nicht zum Erfolg geführt werden: Bei Raumtemperatur fand keinerlei Umsetzung statt und auch bei einer Reaktionszeit von nur 4 h unter Rückfluss wurde bereits eine signifikante Menge der Nucleobase gebildet, während der größte Teil des Edukts noch nicht umgesetzt war.

Da die in Abb. 68 (S. 76) gezeigte Syntheseroute nicht erfolgreich zu Ende geführt werden konnte, wurde auf einen von MCGUIGAN ET AL. entwickelten Weg zur Darstellung der 2',3'-Dideoxynucleoside der BCNA zurückgegriffen, bei der zuerst die Desoxygenierung des Glycons und anschließend der Aufbau der bicyclischen Nucleobase erfolgt.<sup>[89]</sup> In Anlehnung daran sollte zur Synthese von **133** und **139** von 2'-Desoxyuridin **60** ausgegangen werden. Die ersten vier Schritte bis zum 2',3'-Dideoxyuridin (ddU) **43** sollten dabei wie bereits in Kapitel 4.1.4. (S. 31) beschrieben durchgeführt werden. Anschließend sollte die Iodierung in der 5-Position der Nucleobase zu **140** erfolgen, gefolgt von der Sonogashira-Kupplung mit Pent-1-in und der Cyclisierung, um 6-Prop-ddBCNA **133** zu erhalten (Weg 1). Für 6-H-ddBCNA **139** sollte als Kupplungspartner Trimethylsilylacetylen verwendet werden, um **141** zu erhalten

und die Ringschlussreaktion ausgehend von **142** nach Abspaltung der Silylschutzgruppe erfolgen (Weg 2, Abb. 73).

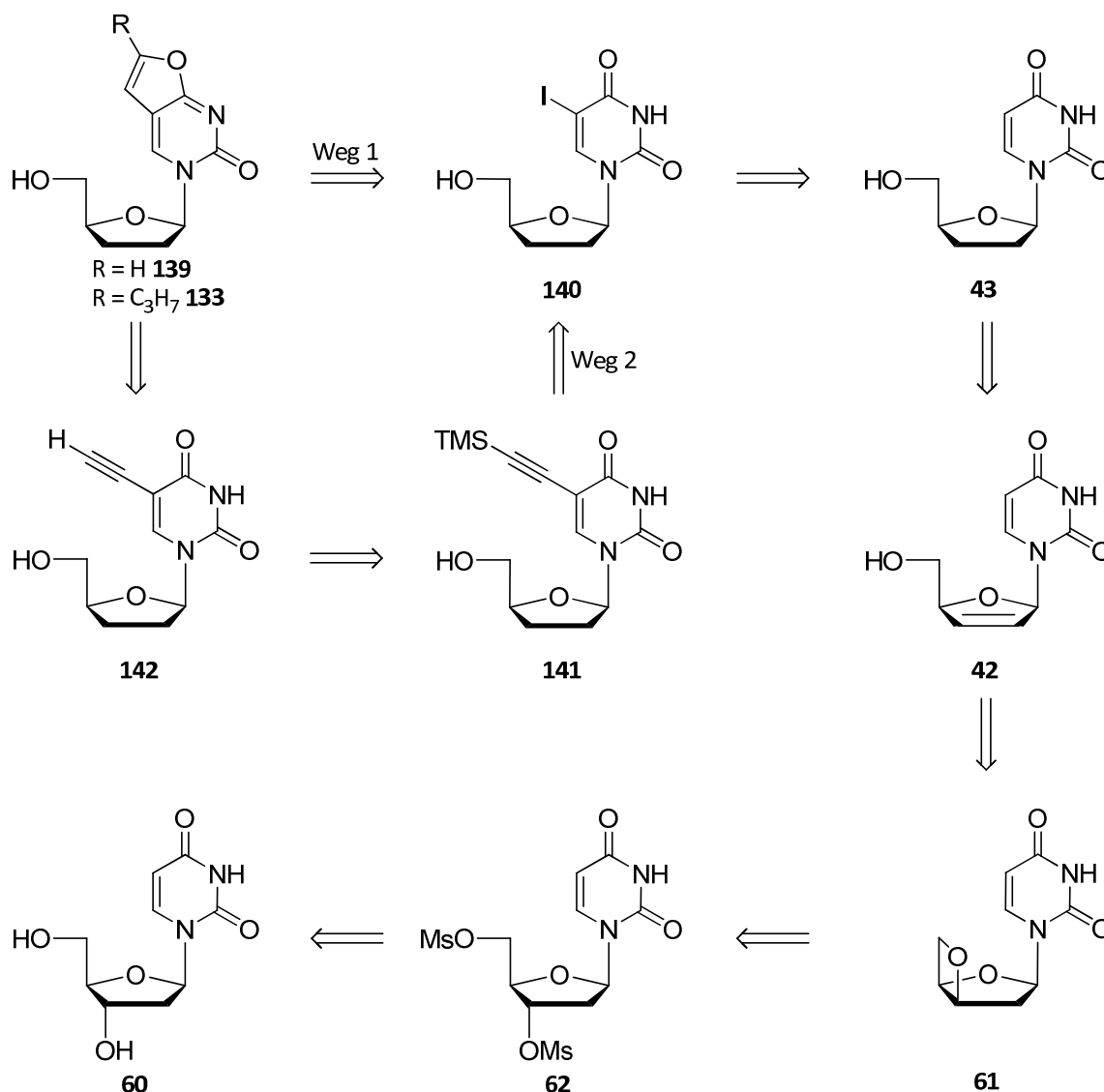


Abb. 73: Retrosyntheschema zur Darstellung von 6-Prop-ddBCNA **133** und 6-H-ddBCNA **139**.

Da die Synthese von ddU **43** bereits ausführlich behandelt wurde (S. 31), wird die Syntheseroute ausgehend von **43** diskutiert. Die Iodierung in 5-Position erfolgte durch Umsetzung mit Iodmonochlorid (ICl) in einer elektrophilen aromatischen Substitutionsreaktion. Während die Reaktion laut dünnschichtchromatographischer Verfolgung mit vollständigem Umsatz des Edukts ablief und selektiv das Produkt lieferte, stellte die Aufarbeitung ein Problem dar. Bei den ersten Synthesen wurde exakt nach Literaturvorschrift gearbeitet. Diese sah das Waschen des in Ethylacetat gelösten

Rohprodukts mit Natriumthiosulfatlösung vor.<sup>[89]</sup> Dabei wurde festgestellt, dass sich nach der Extraktion eine erhebliche Menge des Produkts in der wässrigen Phase befand, das auch durch Extraktion dieser Phase mit weiterem Ethylacetat nicht vollständig isoliert werden konnte. So wurde die wässrige Phase gefriergetrocknet und separat chromatographisch gereinigt. Dennoch konnte das Produkt auf diesem Weg nur mit einer Gesamtausbeute von 18-45% erhalten werden. Eine Alternative stellte die direkte chromatographische Reinigung des Rohprodukts dar, bei der zunächst die iodhaltigen Verunreinigungen mit reinem Dichlormethan und anschließend das Produkt unter Verwendung eines geeigneten Methanolgradienten eluiert wurden. Allerdings war auf diesem Weg besonders für größere Ansätze eine mehrfache Reinigung notwendig und eine Verbesserung der Ausbeute war nicht möglich. Das beste Ergebnis lieferte die folgende Durchführung: Das Rohprodukt wurde in Wasser aufgenommen und so lange mit Dichlormethan extrahiert, bis sich die organische Phase nicht mehr violett verfärbte. Nach Gefriertrocknung der wässrigen Phase und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt mit einer Ausbeute von 73% erhalten werden (Abb. 74).

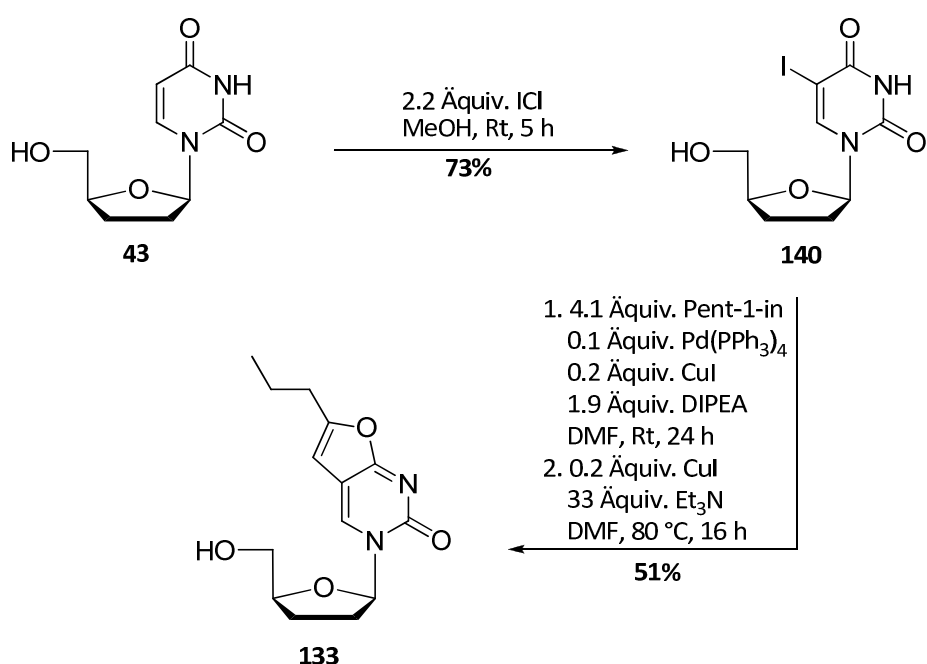


Abb. 74: Synthese von 5-Iod-2',3'-dideoxyuridin **140** und 6-Prop-ddBCNA **133**.

Das so erhaltene 5-Iod-2',3'-didesoxyuridin **140** wurde durch Sonogashira-Kupplung und Cyclisierung in einer *one-pot*-Reaktion zu 6-Prop-ddBCNA **133** umgesetzt, das auf diesem Weg mit einer Ausbeute von 51% erhalten werden konnte.

Zur Synthese von 6-H-ddBCNA **139** wurde ebenfalls von **140** ausgegangen und analog zu der in Abb. 67 (S. 75) gezeigten Syntheseroute eine Sonogashira-Kupplung mit Trimethylsilylacetylen durchgeführt. Da das Kupplungsprodukt trotz Säulenchromatographie nicht vollständig gereinigt werden konnte, wurde es leicht verunreinigt in der Folgestufe eingesetzt. Die Abspaltung der Silylschutzgruppe erfolgte durch Umsetzung mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF). Die Ausbeute für **142** über zwei Stufen betrug 68% (Abb. 75).

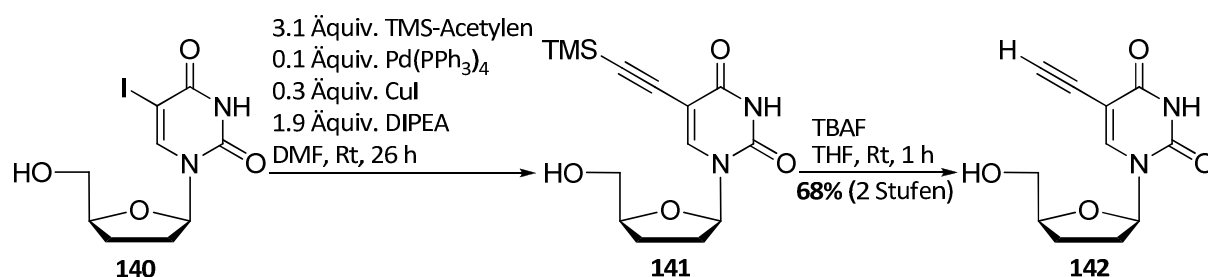


Abb. 75: Synthese von **142** durch Sonogashira-Kupplung und Desilylierung.

Die 5-*endo-dig*-Cyclisierung wurde durch Kupfer(I)-iodid und Triethylamin katalysiert. Wie bereits für **105** beschrieben wurde in diesem Fall eine äquimolare Menge des Kupfersalzes benötigt. 6-H-ddBCNA **139** wurde unter den in Abb. 76 angegebenen Reaktionsbedingungen mit einer Ausbeute von 66% erhalten.

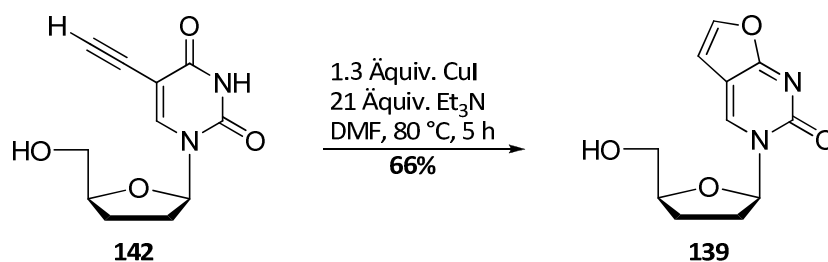


Abb. 76: Synthese von 6-H-ddBCNA **139**.

Ein Syntheseweg zur Darstellung von 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydroanaloga der BCNA (d4BCNA) ist in der Literatur beschrieben. Dabei wird die Sonogashira-Kupplung mit anschließendem Ringschluss an 5-Iod-2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrouridin durchgeführt.<sup>[116]</sup>

Experimentelle Details zu den entsprechenden Reaktionen wurden allerdings nicht veröffentlicht. Da eine solche Kupplungsreaktion mit Pent-1-in in eigenen Arbeiten nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte<sup>[117]</sup>, wurden zwei alternative Strategien in Testansätzen erprobt.

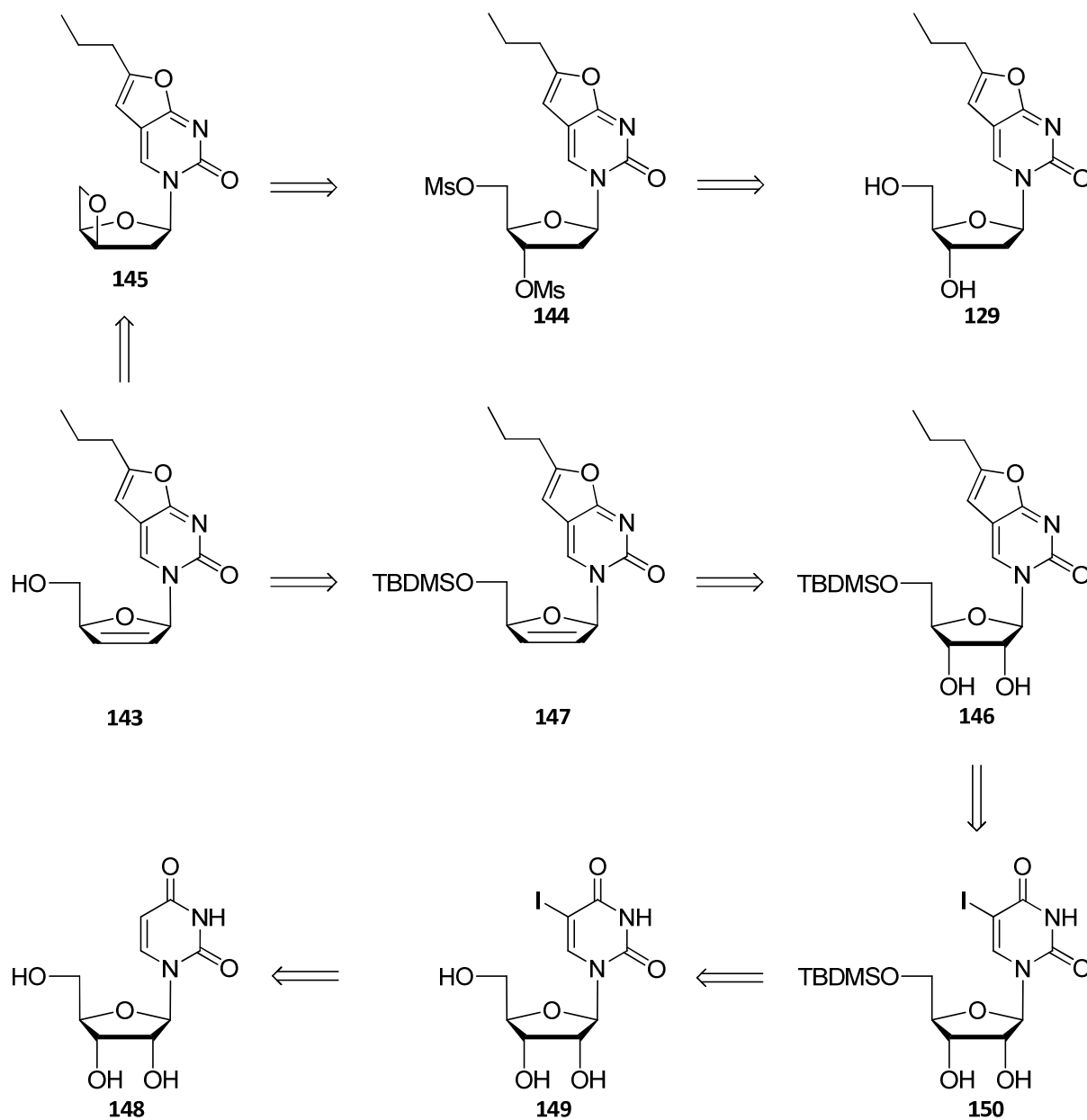


Abb. 77: Retrosyntheschema zweier möglicher Syntheserouten zur Darstellung von 6-Prop-d4BCNA **143**.

Zum einen sollte ausgehend von 6-Prop-2'-dBCNA **129** über den für die Synthese von d4U **42** genutzten Weg zunächst die 3'- und die 5'-Position mesyliert werden (**144**), um anschließend die 3',5'-Anhydroverbindung **145** zu erhalten und diese in 6-Prop-d4BCNA **143** zu

überführen. Zum anderen sollte die Desoxygenierung des bicyclischen Ribonucleosids **146** durch eine von GAREGG und SAMUELSSON beschriebene Reaktion zu **147** erfolgen.<sup>[127]</sup> Dafür sollte ausgehend von Uridin **148** zunächst 5-Ioduridin **149** dargestellt und an der 5'-Hydroxyfunktion mit der TDBMS-Schutzgruppe versehen werden (**150**). Durch die bekannte Sequenz aus Sonogashira-Kupplung und 5-*endo-dig*-Cyclisierung sollte **146** erhalten werden. In Abb. 77 (S. 82) ist das Retrosyntheschema der genannten Synthesen gezeigt.

Die Umsetzung von 6-Prop-2'-dBCNA **129** mit 2.9 Äquiv. Methansulfonylchlorid in Pyridin lieferte Verbindung **144** mit einer Ausbeute von 71%.

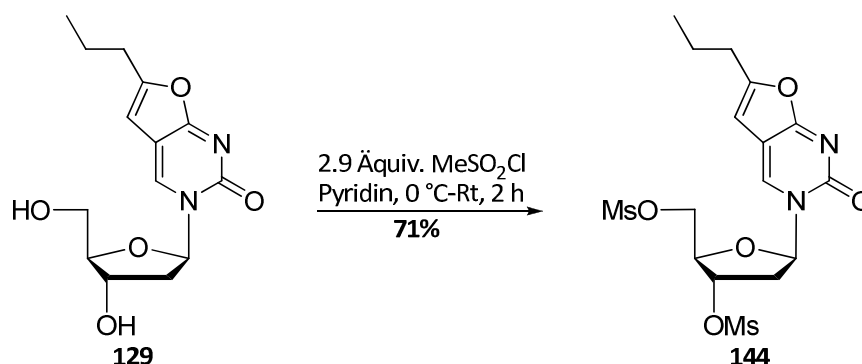


Abb. 78: Synthese von 3',5'-Di-O-mesyl-6-Prop-2'-dBCNA **144**.

Bei der folgenden Umsetzung in wässriger Natriumhydroxidlösung konnte die 3',5'-Anhydroverbindung **145** allerdings nicht isoliert werden (Abb. 79, S. 84). Während bei Raumtemperatur zunächst keinerlei Umsetzung zu beobachten war, kam es beim Erwärmen der Reaktionslösung zu einer schnellen Umsetzung des Edukts. Als einzige fluoreszierende Verbindung konnte die abgespaltene Nucleobase **138** erhalten werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass nach der Bildung von **145** unter den basischen Bedingungen aufgrund der hohen Austrittstendenz der Nucleobase bereits eine  $\beta$ -Eliminierung abläuft, die zur Spaltung der glycosidischen Bindung führt (vgl. Abb. 25, S. 32, Weg B).

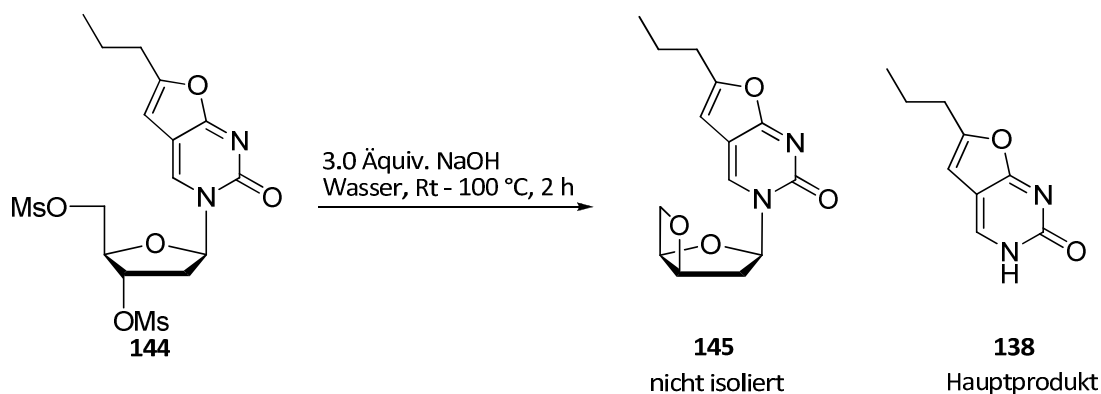


Abb. 79: Versuch der Synthese der 3',5'-Anhydroverbindung **145**.

Die Darstellung von 5-Ioduridin **149** erfolgte, wie in Abb. 74 (S. 80) für **140** beschrieben, durch Umsetzung mit Iodmonochlorid. Unter den in Abb. 80 angegebenen Reaktionsbedingungen wurde das Produkt mit einer Ausbeute von 70% erhalten. Die anschließende Silylierung der 5'-Hydroxyfunktion durch Reaktion mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid lieferte Verbindung **150** mit einer Ausbeute von 72%. Durch Sonogashira-Kupplung mit Pent-1-in und Cyclisierung als *one-pot*-Reaktion wurde Verbindung **146** mit einer Ausbeute von 48% erhalten.

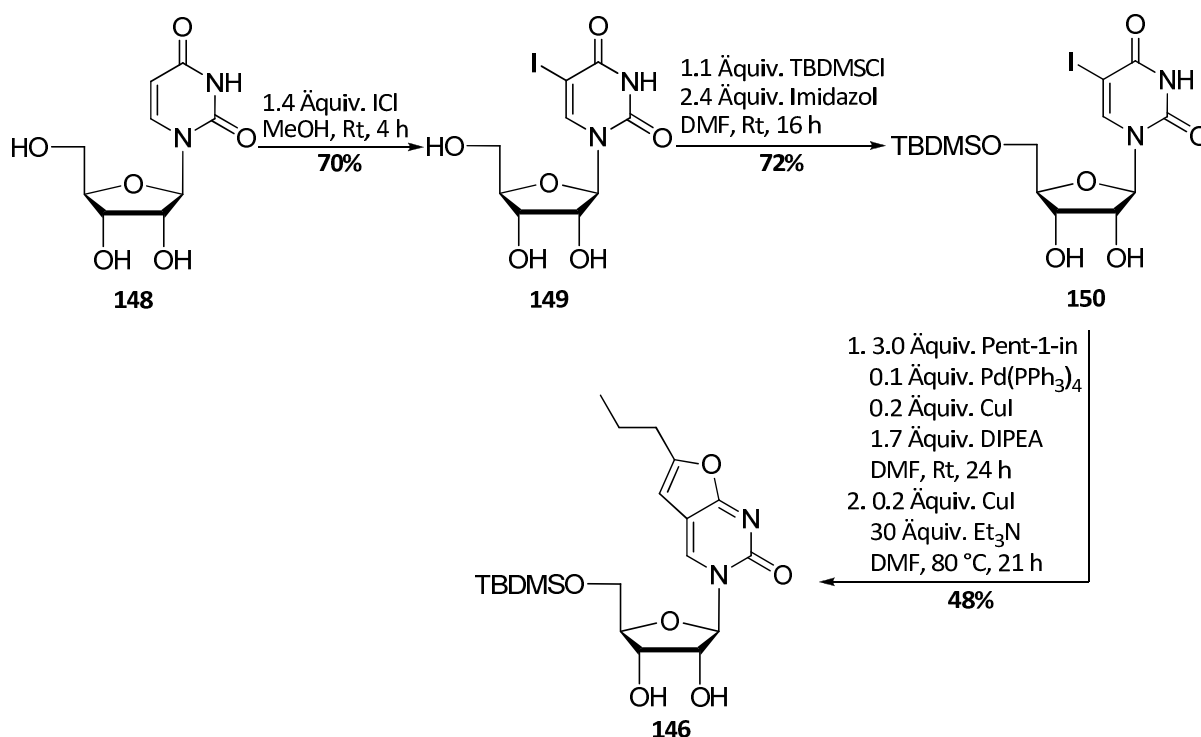


Abb. 80: Synthese von **146** ausgehend von Uridin **148**.



Die von GAREGG und SAMUELSSON beschriebene Desoxygenierung von vicinalen Diolen unter Bildung von Olefinen<sup>[127]</sup> wurde bereits von LUZZIO und MENES zur Synthese von d4T **2** eingesetzt.<sup>[128]</sup> Diese Reaktion unter Verwendung von Triphenylphosphin, Imidazol und Iod wurde zur Synthese von 6-Prop-d4BCNA **143** erprobt. Nach 20 h Reaktionszeit bei 90 °C konnte allerdings nur die vollständige Zersetzung des Edukts zu einer Vielzahl nicht identifizierbarer Reaktionsprodukte festgestellt werden.

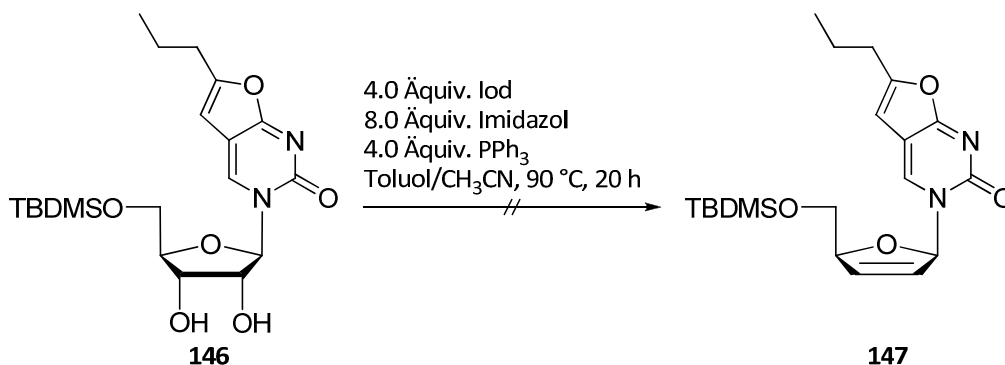


Abb. 81: Versuch der Synthese von **147** durch Desoxygenierung nach GAREGG und SAMUELSSON.<sup>[127]</sup>

Nach der Erfolglosigkeit der in Abb. 79 (S. 84) und Abb. 81 gezeigten Testansätze zur Synthese eines d4BCNAs wurden keine weiteren Syntheseversuche unternommen, sondern das Hauptaugenmerk auf die Synthese von Nucleosidmono- und -diphosphatprodrug der 2'-Desoxy- und 2',3'-Didesoxyanaloga gerichtet.

#### 4.2.5. Synthese der *cycloSal*-Pronucleotide der bicyclischen Nucleosidanaloga

Die Synthese der *cycloSal*-Phosphatriester **113** und **114** wurde bereits in eigenen Vorarbeiten erfolgreich durchgeführt (Abb. 65, S. 73).<sup>[117]</sup> Diese Synthesen erfolgten durch Kupplung des entsprechenden Nucleosids mit 3-Methylsaligenylchlorphosphit **87** und anschließende Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid. Zur Durchführung von Fluoreszenz- und Hydrolysestudien wurde die Synthese von 3-Me-*cycloSal*-6-Prop-2'-dBCNAMP **113** erneut durchgeführt und ist daher in Abb. 82 (S. 86) gezeigt. Auf dem gleichen Weg konnten auch die *cycloSal*-Verbindungen **115** und **116** der Didesoxyanaloga **133** und **139** erhalten werden. Bei der Darstellung von **113** wurde dünnschichtchromatographisch die Bildung geringer Mengen eines Nebenprodukts beobachtet, bei dem es sich vermutlich um eine Verbindung

mit *cycloSal*-Masken an der 3'- und der 5'-Position handelt. Bei den Synthesen von **115** und **116** wurden keine dünnschichtchromatographisch detektierbaren Nebenprodukte erhalten, allerdings mussten Ausbeuteverluste durch die Notwendigkeit mehrfacher Reinigung und der dabei auftretenden teilweisen Zersetzung der Produkte in Kauf genommen werden.

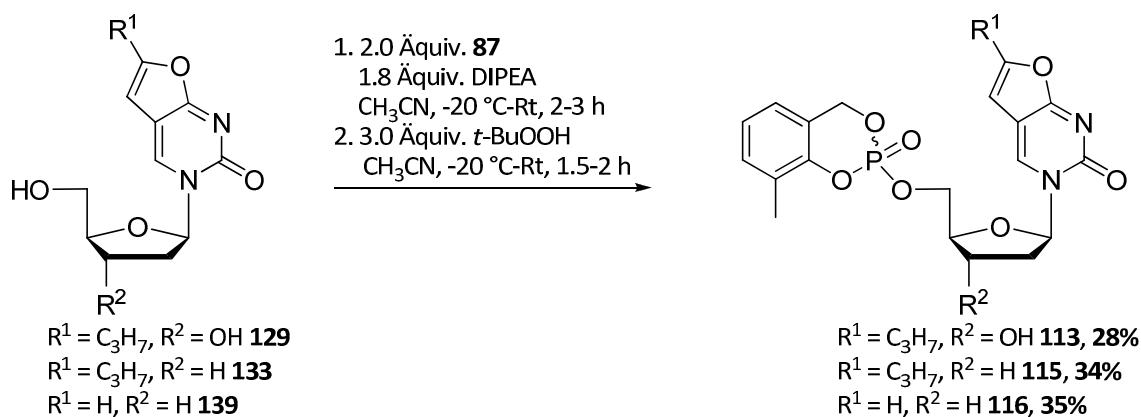


Abb. 82: Synthese der *cycloSal*-Phosphotriester **113-116**.

#### 4.2.6. Synthese der DiPPro-Nucleotide der bicyclischen Nucleosidanaloga

Die Synthese der DiPPro-Nucleotide der BCNA **117-128** sollten nach der in Abb. 20 (S. 26) gezeigten Syntheseroute durch Kupplung des entsprechenden Nucleosidmonophosphats mit einem der Bis(4-acyloxybenzyl)-diisopropylaminophosphoramidite **67-70** und anschließende Oxidation des  $\beta$ -Phosphoratoms erhalten werden. Dazu war zunächst die Synthese der Nucleosidmonophosphate **151-153** notwendig. Die einzige literaturbekannte Synthese für ein BCNA-Monophosphat ist die Umsetzung mit Phosphorylchlorid in Triethylphosphat nach YOSHIKAWA.<sup>[94,111]</sup> Da das Arbeiten in Triethylphosphat aufgrund des hohen Siedepunkts präparativ aufwendig ist, wurde nach Alternativen für diese Reaktion gesucht. Da mit der Variante der Yoshikawa-Reaktion nach SOWA und OUCHI bereits gute Erfahrungen gemacht wurden (Abb. 28, S. 34), wurde in einem Testansatz zunächst versucht, 6-Prop-2'-dBCNA **129** unter diesen Bedingungen zu 6-Prop-2'-dBCNAMP **151** umzusetzen (Abb. 83, S. 87).<sup>[93]</sup>

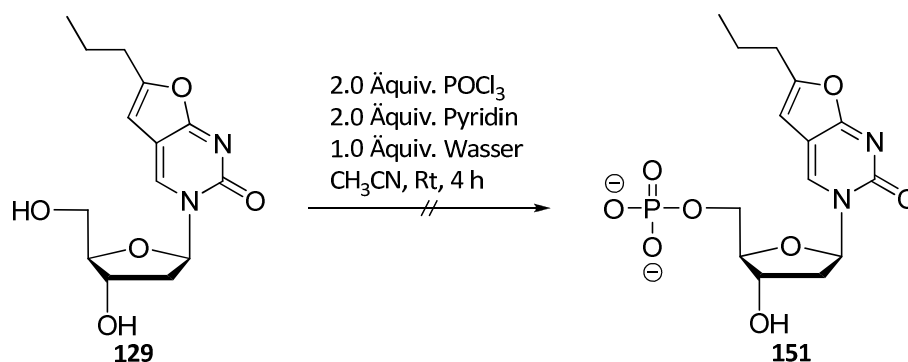


Abb. 83: Versuch der Synthese von **151** nach SOWA und OUCHI.<sup>[93]</sup>

Nach vier Stunden Reaktionszeit konnten bei der dünnschichtchromatographischen Verfolgung zwei Spots detektiert werden. Einer zeigte blaue Fluoreszenz aber keine Reaktion mit dem schwefelsäurehaltigen Zuckerfärbereagenz. Der zweite Spot war bei UV-Detektion nicht sichtbar, ließ sich aber mit dem Färbereagenz anfärben. Aufgrund dieses Befundes wurde davon ausgegangen, dass es unter den leicht sauren Reaktionsbedingungen zur Spaltung der glycosidischen Bindung kam und es sich bei den Reaktionsprodukten um die abgespaltene Nucleobase und das phosphorylierte Glycon handelte. Der Ansatz wurde daher nicht weiter aufgearbeitet.

Eine mögliche Alternative stellt die bereits für die Synthese von ddUMP **50** verwendete Strategie dar, die das Nucleosidmonophosphat durch hydrogenolytische Debenzylierung des entsprechenden Dibenzylphosphats liefert (Abb. 29, S. 35).<sup>[95]</sup> Um vor der Synthese des Dibenzylphosphats zu testen, ob Verbindung **129** unter den Bedingungen der Entschützung stabil ist, wurde das Nucleosid in Anwesenheit von Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach 20 h konnte dünnschichtchromatographisch die vollständige Zersetzung von **129** festgestellt werden, dabei war kein Spot zu detektieren der blaue Fluoreszenz zeigte. Für die Messung aussagekräftiger Spektren der Reaktionsprodukte war die für den Testansatz verwendete Menge zu gering.

DAVISSON ET AL. berichteten über die Darstellung von Nucleosiddiphosphaten ausgehend von den 5'-*O*-tosylierten Nucleosiden durch nucleophile Substitution mit Pyrophosphat.<sup>[129]</sup> Diese Methode wurde von LIANG ET AL. aufgegriffen, um methylenverbrückte Nucleosiddiphosphate zu synthetisieren<sup>[130]</sup> und sollte zur Synthese der BCNA-Monophosphate unter Verwendung von Tetra-*n*-butylammoniumphosphat **154** als Nucleophil erprobt werden. Die Reaktion zu

den 5'-*O*-Tosyl-Verbindungen **155-157** erfolgte durch Umsetzung mit *p*-Toluolsulfonylchlorid (*p*-TsCl) in Pyridin (Abb. 84). Die Zugabe des *p*-Toluolsulfonylchlorids gelöst in Pyridin erfolgte für **129** über drei Stunden bei 4 °C, für **133** und **139** über 30 min ebenfalls bei 4 °C. Zur vollständigen Umsetzung der Edukte waren lange Reaktionszeiten und im Fall von **133** und **139** die Zugabe weiteren Reagenzes nötig. Bei der Umsetzung des 6-Prop-2'-dBCNA **129** konnte zusätzlich die zweifach tosylierte Verbindung **158** mit einer Ausbeute von 30% isoliert werden. Diese ließ sich allerdings säulenchromatographisch problemlos abtrennen.

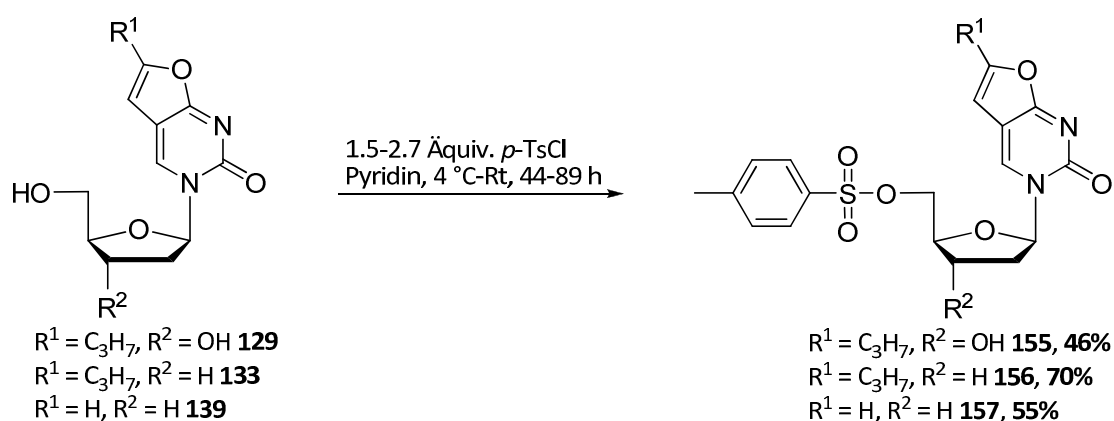


Abb. 84: Synthese der 5'-*O*-tosylierten BCNA **155-157**.

Die Umsetzung der tosylierten Nucleoside **155-157** zu den entsprechenden Nucleosidmonophosphaten erfolgte durch Reaktion mit Tetra-*n*-butylammoniumphosphat **154**, das durch Titration von Phosphorsäure mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxidlösung bis pH 6 erhalten wurde. Bei diesem pH-Wert ist davon auszugehen, dass das Salz mit etwa 1.5 Tetra-*n*-butylammoniumkationen vorliegt.<sup>[98]</sup> In einem ersten Testansatz wurde Verbindung **155** mit 2.0 Äquiv. des Phosphatsalzes **154** in Acetonitril gelöst und für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Da nach dieser Zeit kein Umsatz des Edukts zu beobachten war, wurde der Reaktionsansatz für insgesamt 2 h in der Mikrowelle auf 70 °C erhitzt. Nach dieser Zeit hatte sich das Edukt vollständig umgesetzt. Um die Reaktionen bei höherer Temperatur durchführen zu können und damit die Reaktionszeit zu verkürzen, wurde für die folgenden Reaktionen DMF als Lösungsmittel verwendet. Bei einer Temperatur von 100 °C erfolgte die vollständige Umsetzung des Edukts in der Regel nach 10-30 min. Bei der Reaktion kam es stets zur Bildung eines Nebenprodukts, das ebenfalls blaue Fluoreszenz aufwies und sich bei der RP-Chromatographie nur schlecht entfernen ließ. Durch Extraktion einer Lösung des

Rohprodukts in Wasser mit Dichlormethan war es allerdings problemlos möglich, dieses Nebenprodukt abzutrennen. Die NMR-spektroskopische Untersuchung des Rückstands der organischen Phase zeigte jedoch lediglich Signale, die einer *p*-Toluolsulfonylgruppe sowie Tetra-*n*-butylammoniumkationen zugeordnet werden konnten. Die blaue Fluoreszenz legte dennoch die Vermutung nahe, dass es während der Reaktion zur Abspaltung der Nucleobase kam und diese Abspaltung verantwortlich für die niedrigen Ausbeuten sein könnte. Daher wurde untersucht, ob sich durch Zusatz von Triethylamin diese Nebenreaktion verhindern lässt. Bei der Umsetzung von **155** in Anwesenheit von 1.0 Äquiv. Triethylamin zeigte sich allerdings, dass die Bildung des Nebenprodukts auch unter diesen Bedingungen auftritt und sich durch Zusatz der Base die Ausbeute nicht steigern ließ.

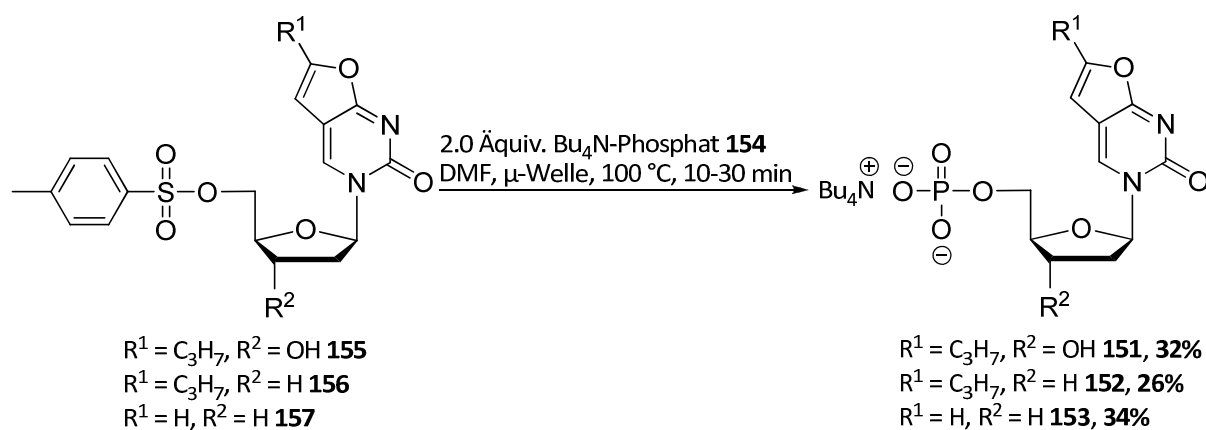


Abb. 85: Synthese der 5'-Monophosphate der BCNA **151-153**.

Die Abb. 86, Abb. 87 und Abb. 88 (S. 91) zeigen die  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Verbindung **153**. Die Bildung des 5'-Phosphats lässt sich anhand der  $^2J_{\text{C-P}}$ - bzw.  $^3J_{\text{C-P}}$ -Kopplungen des C-4' und C-5' nachweisen, die zur Aufspaltung zu je einem Dublett führt (Abb. 88, S 91).

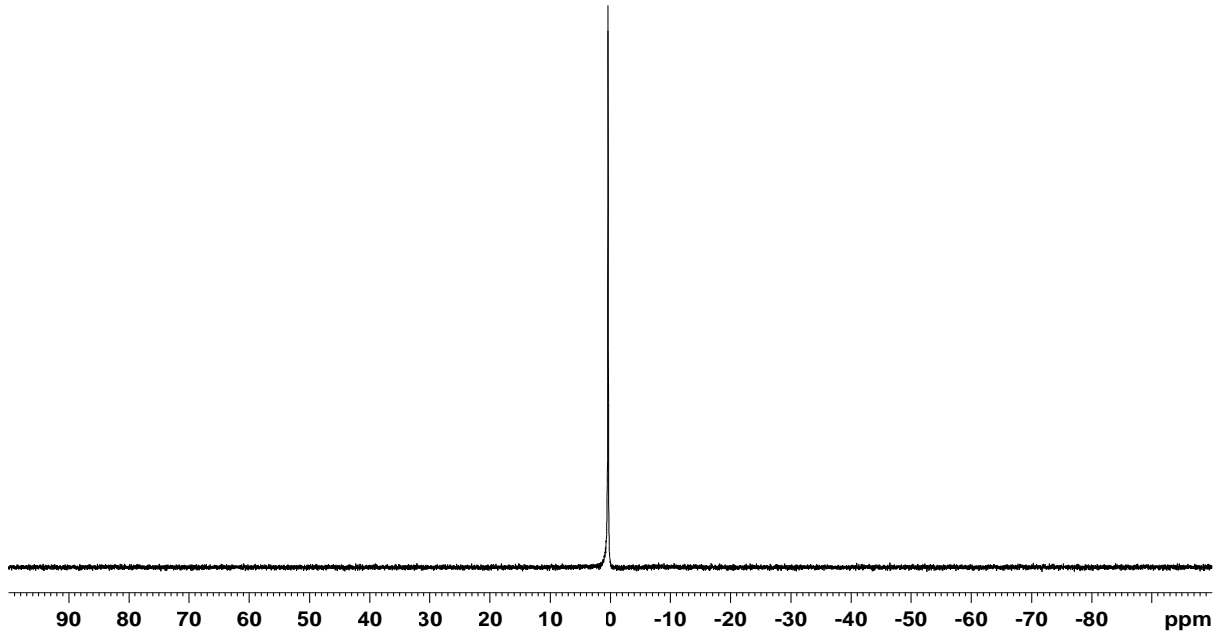


Abb. 86:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von **153** ( $\text{D}_2\text{O}$ , 162 MHz,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -entkoppelt).

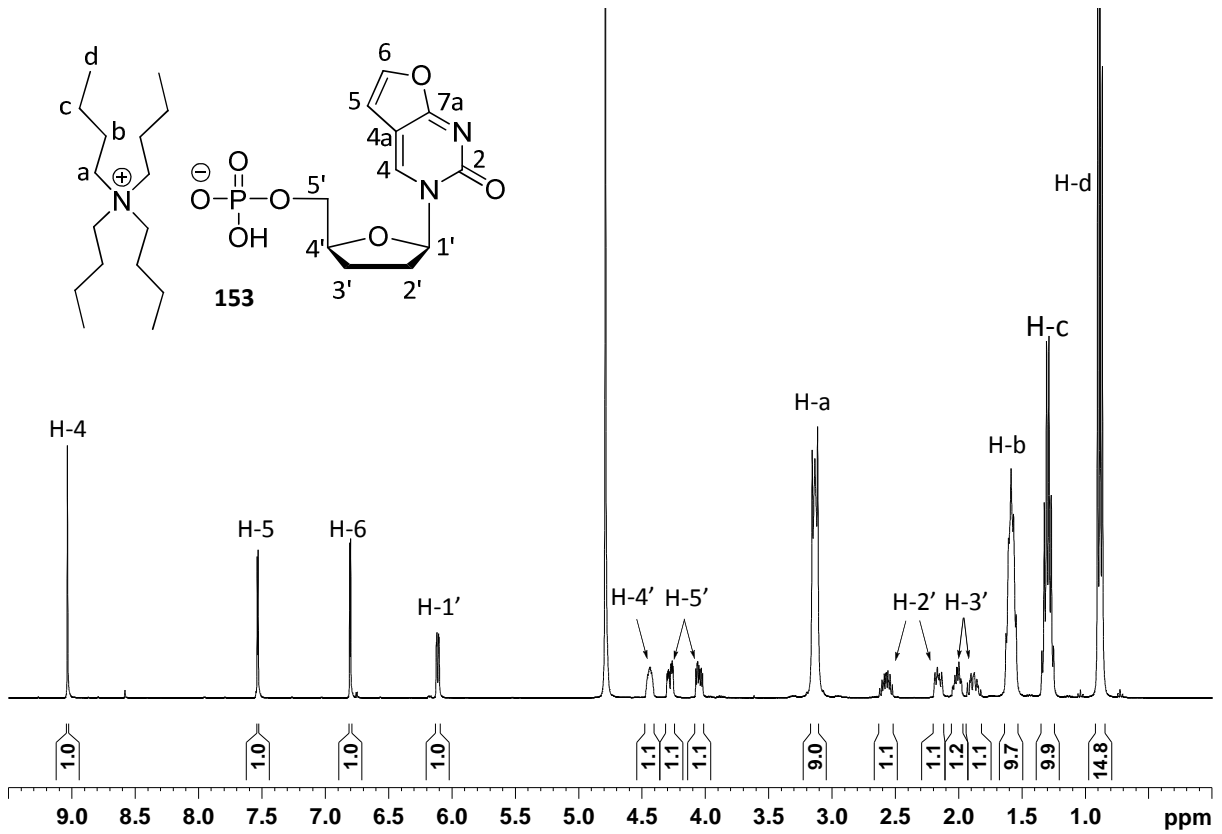


Abb. 87:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **153** ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz).

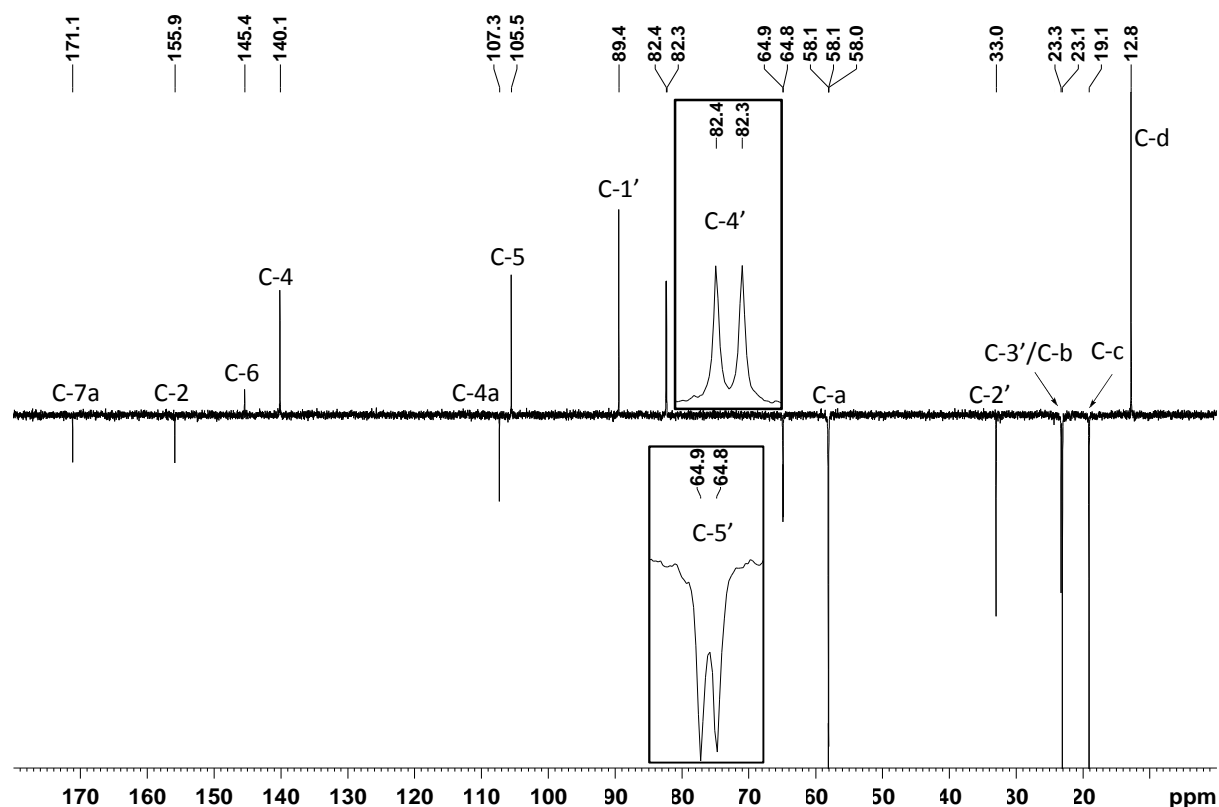


Abb. 88:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **153** ( $\text{D}_2\text{O}$ , 101 MHz).

Die Synthese der DiPPro-Nucleotide erfolgte, wie bereits in Kapitel 4.1.7 (S. 38) für die d4U und ddU-Prodrugs diskutiert, durch DCI-vermittelte Kupplung des Nucleosidmonophosphats mit einem geeigneten Phosphoramidit und anschließende Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid. Die Reaktionen wurden mittels HPLC verfolgt und dabei in allen Fällen eine vollständige Umsetzung des Monophosphats beobachtet. Auch bei der Umsetzung von **151** zu **118-120** wurde dabei die Bildung nur eines Kupplungsprodukts beobachtet, sodass davon auszugehen ist, dass eine Reaktion des Phosphoramidits mit der freien 3'-OH-Funktion nicht stattfindet. Die Reinigung der Rohprodukte erfolgte ebenfalls wie zuvor beschrieben durch mehrfache Umkehrphasenchromatographie mit Methanol/Wasser-Gemischen (Abb. 89, S. 92).

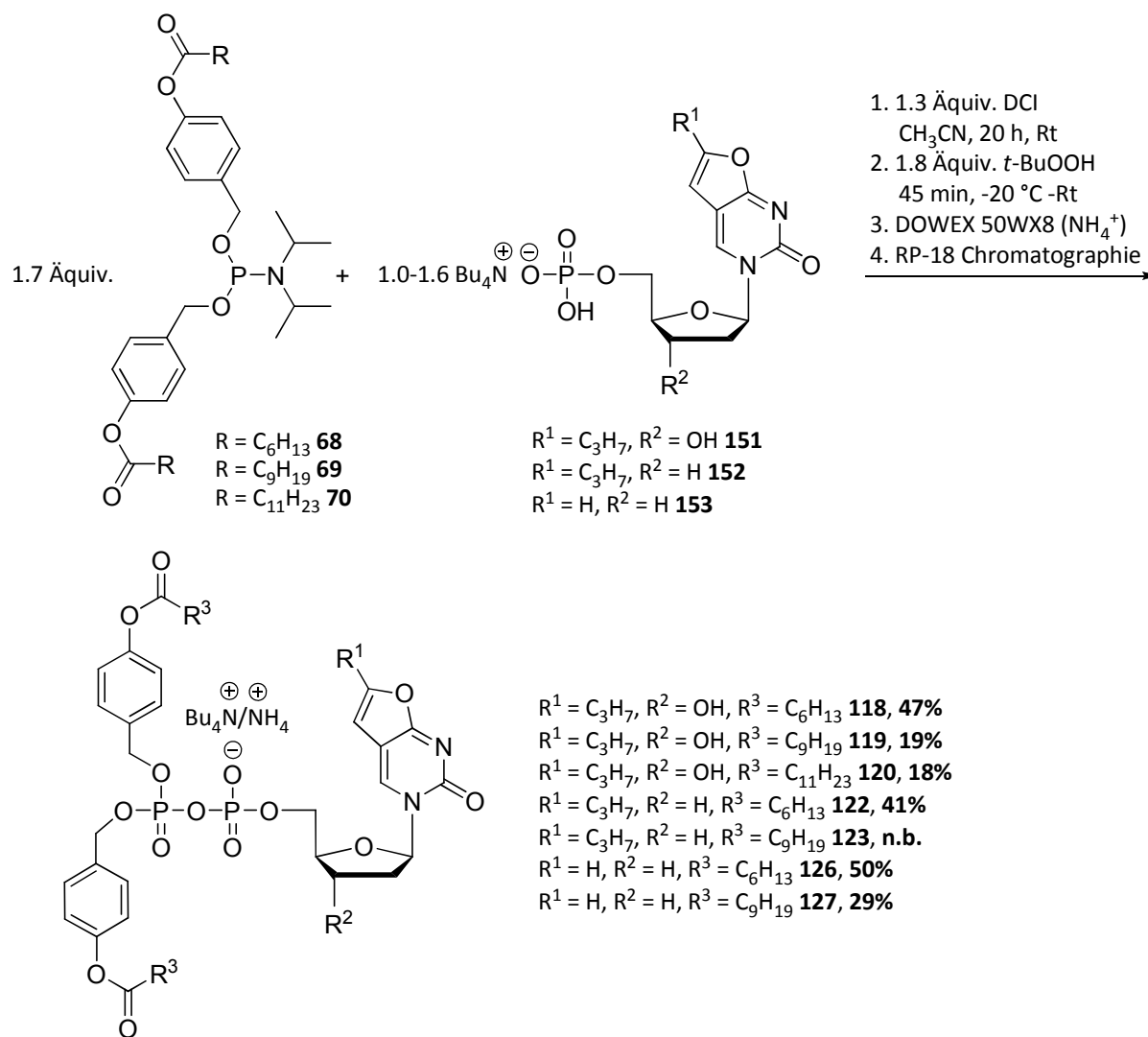


Abb. 89: Synthese der Zielverbindungen **118-127** (n.b. = nicht bestimmt).

Die in Abb. 89 angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die rein isolierten Produkte. Weiteres Produkt war in allen Fällen in Fraktionen vorhanden, die mit den entsprechenden Phosphatdiestern **81-83** verunreinigt waren. Von Verbindung **123** konnten auch nach viermaliger Chromatographie keine reinen Fraktionen erhalten werden, sodass hier keine Ausbeute angegeben werden kann. Die besten Ausbeuten wurden jeweils für die C<sub>6</sub>-substituierten Verbindungen **118**, **122** und **126** erhalten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass hier die Abtrennung des Phosphatdiesters **81** am besten gelang. Da von den drei BCNA die DiPPro-Nucleotide mit unterschiedlichen Masken synthetisiert wurden und anhand dieser Verbindungen der Einfluss des Propylsubstituenten an der Nucleobase und der 3'-Hydroxyfunktion auf die Lipophilie und das Hydrolyseverhalten untersucht werden



konnte, wurde auf die Synthese der *i*Pr- und C<sub>11</sub>-substituierten Verbindungen **117**, **121**, **124**, **125** und **128** verzichtet.

#### 4.2.7. Hydrolyseverhalten der BCNA-Prodrugs in Phosphatpuffer (pH 7.3)

Um deren Eignung als Fluoreszenzsonden für Zellaufnahmestudien zu evaluieren, wurde das Hydrolyseverhalten der BCNA-Prodrugs in Phosphatpuffer (pH 7.3) untersucht. Diese Studien wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie für die d4U- und ddU-Prodrugs (s. Kapitel 4.1.10., S. 50). In Abb. 90 ist die Hydrolyse des C<sub>6</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP **118** gezeigt. In guter Übereinstimmung mit dem in Abb. 48 (S. 51) gezeigten Verlauf der Hydrolyse von C<sub>6</sub>-d4UDP **52** ist deutlich die Abnahme der Prodrugkonzentration unter Bildung der Hydrolyseprodukte zu erkennen. Dabei ist davon auszugehen, dass es sich um das einfach geschützte Intermediat **159** sowie das Nucleosiddiphosphat **160** handelt. Als Referenzverbindung stand lediglich 6-Prop-2'-dBCNAMP **151** zur Verfügung, dessen Retentionszeit durch Coinjektion bestätigt werden konnte. Die Halbwertszeit von 29 h stimmt mit den für die entsprechenden d4U- und ddU-Prodrugs **52** (30 h) und **56** (28 h) überein. In Abb. 91 (S. 94) ist der Verlauf der Hydrolyse anhand der Auftragung der Peakflächen der Chromatogramme gegen die Hydrolysedauer gezeigt.

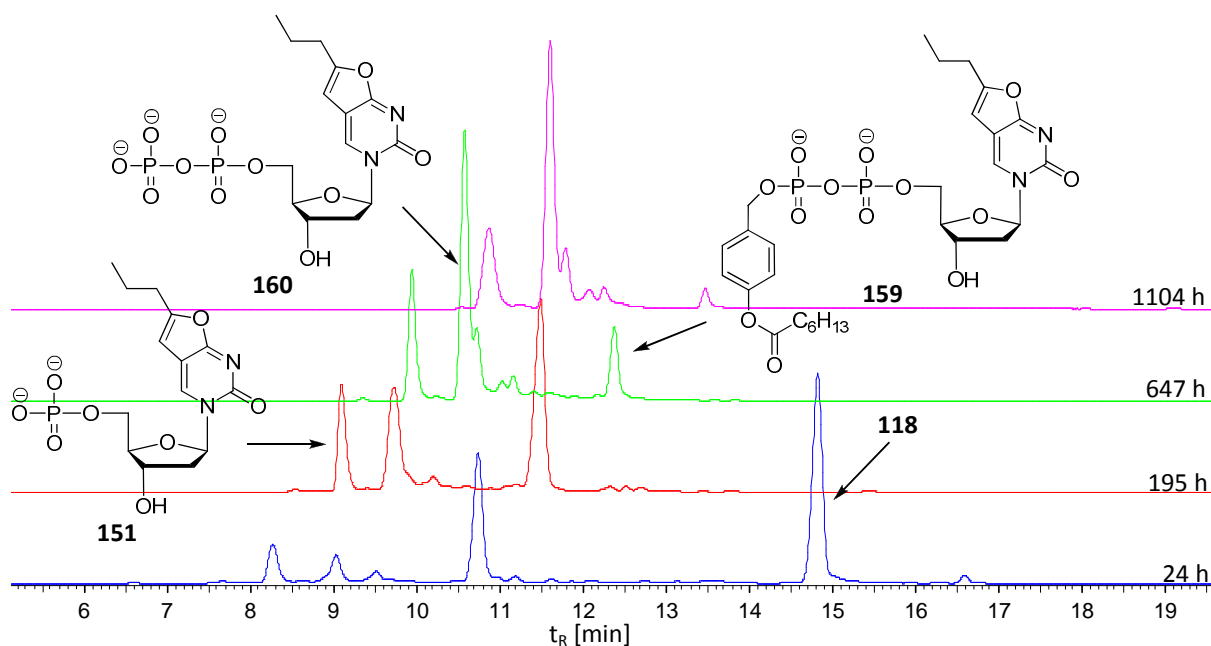


Abb. 90: Hydrolyse von C<sub>6</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP **118** bei pH 7.3 (Methode II, 330 nm).

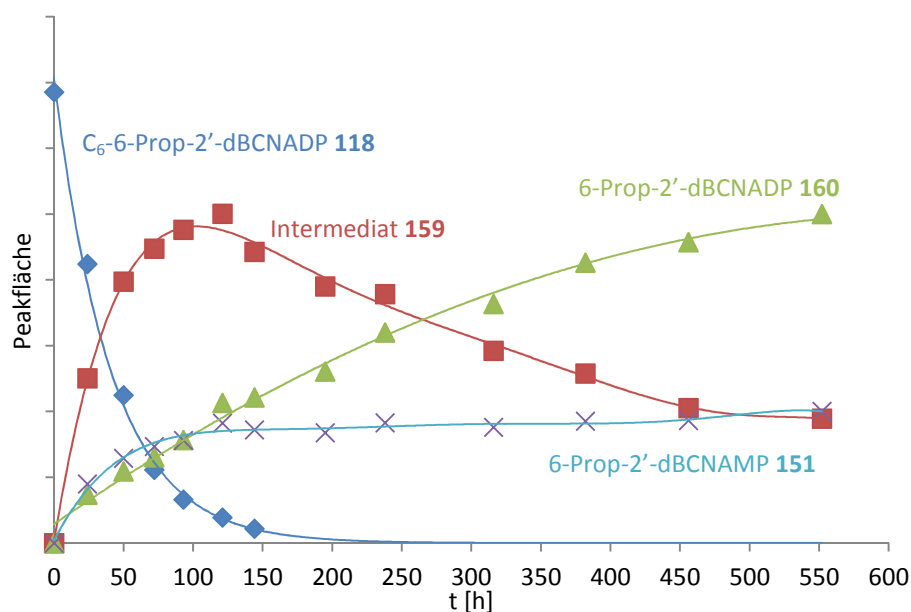


Abb. 91: Verlauf der Hydrolyse von C<sub>6</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP **118** bei pH 7.3.

Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Hydrolyse des C<sub>9</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP **119** erhalten. Sowohl das Hydrolyseverhalten, als auch die ermittelte Halbwertszeit von 58 h stimmen gut mit den Werten der d4U- und ddU-Prodrugs **53** (63 h) und **57** (66 h) überein. Der Verlauf der Hydrolyse ist in Abb. 92 gezeigt.

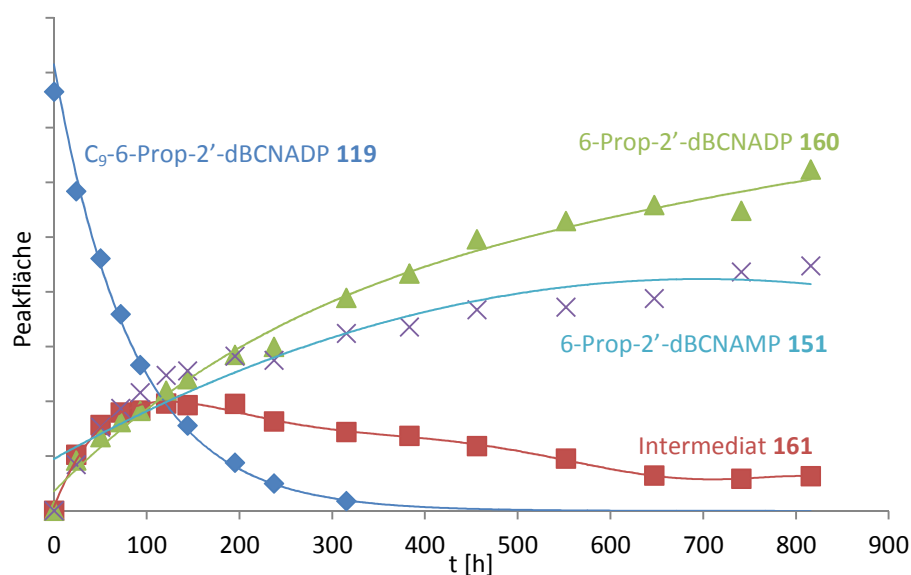


Abb. 92: Verlauf der Hydrolyse von C<sub>9</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP **119** bei pH 7.3.

Der Verlauf der Hydrolyse von C<sub>11</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP **120** ist in Abb. 93 (S. 95) dargestellt. Wie bei den zuvor untersuchten Verbindungen mit gleicher Maske wird auch hier nur eine

geringe Menge des einfach maskierten Intermediats **162** detektiert. Allerdings liegt die Halbwertszeit mit 50 h deutlich unter den Werten vergleichbarer Verbindungen (76 h ( $C_{11}$ -d4UDP **54**), 80 h ( $C_{11}$ -ddUDP **58**)). Möglicherweise ist dies auf konformative Effekte zurückzuführen, die durch Wechselwirkung der Alkylgruppen der Masken mit der Nucleobase hervorgerufen werden.

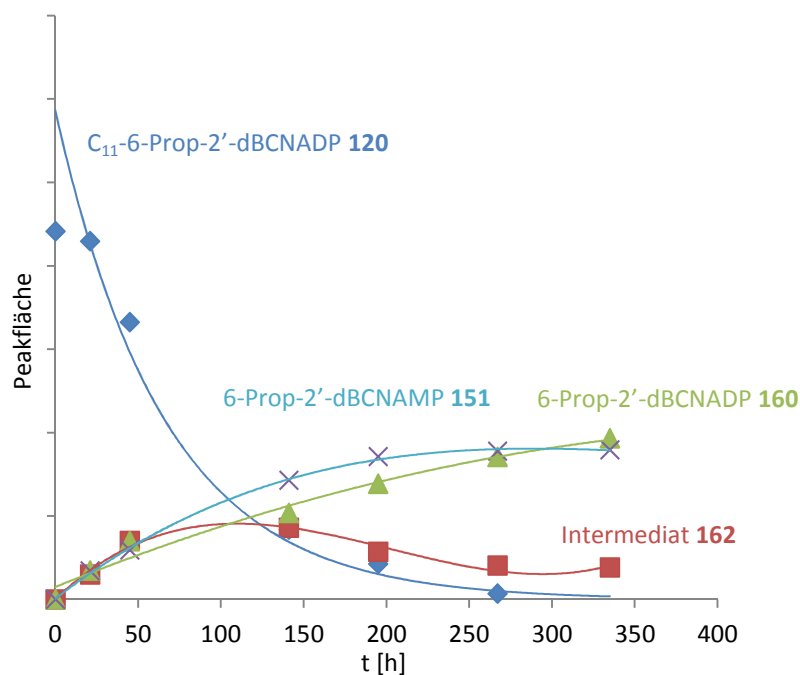


Abb. 93: Verlauf der Hydrolyse von  $C_{11}$ -6-Prop-2'-dBCNADP **120** bei pH 7.3.

Die Hydrolysen der  $C_6$ - und  $C_9$ -substituierten DiPPro-Nucleotide von 6-Prop-ddBCNA **122** und **123** zeigten Verläufe, die im Wesentlichen mit denen von **118** und **119** übereinstimmen. Verbindung **123** wurde trotz der Verunreinigung mit dem Phosphatdiester **82** für die Hydrolysestudien eingesetzt, da davon auszugehen ist, dass diese Verunreinigung keinen Einfluss auf das Ergebnis dieser Studien haben sollte. Bei der Hydrolyse von **122** kam es zur Bildung eines unbekanntes Nebenprodukts, das eine sehr ähnliche Retentionszeit aufwies, wie das 6-Prop-ddBCNADP **163**. Möglicherweise handelt es sich dabei lediglich um die Bildung eines Doppelpeaks für **163**, das in unterschiedlichen Protonierungsgraden vorliegt. Die Zuordnung der Signale des Mono- und Diphosphats **152** und **163** wurden in diesem Fall durch Coinjektion der Referenzsubstanzen bestätigt (Abb. 94, S. 96). Das dazu verwendete Diphosphat **163** wurde freundlicherweise von TRISTAN GOLLNEST zur Verfügung gestellt.

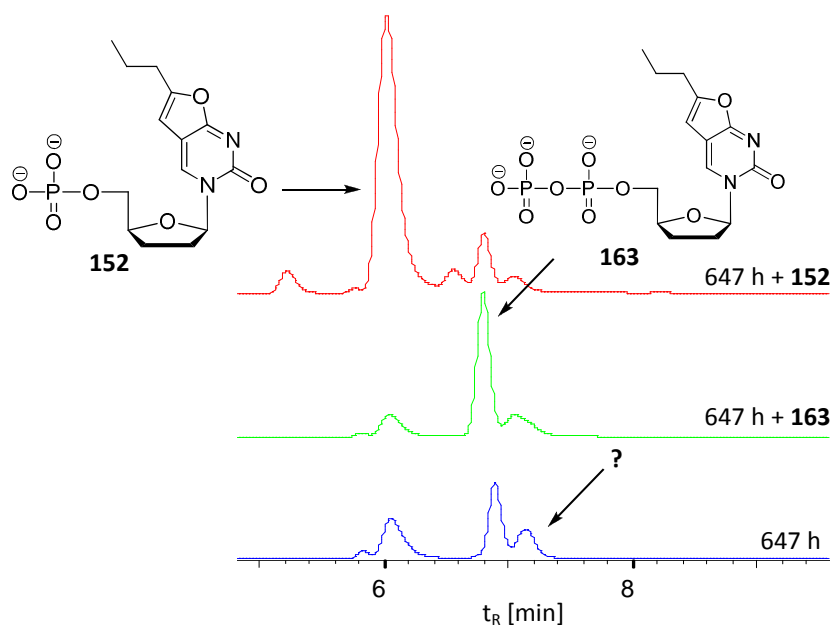


Abb. 94: Coinjektion von **152** und **163** bei der Hydrolyse von **122** bei pH 7.3 (Methode II, 330 nm).

Die Halbwertszeit des C<sub>6</sub>-6-Prop-ddBCNADP **122** stimmt mit 28 h mit denen der zuvor diskutierten DiPPro-Nucleotide mit gleicher Maske überein. Mit 78 h liegt die Halbwertszeit des C<sub>9</sub>-6-Prop-ddBCNADP **123** etwas höher, als die der vergleichbaren Verbindungen aber in der gleichen Größenordnung.

Ein überraschendes Ergebnis lieferte die Hydrolyse von C<sub>6</sub>-6-H-ddBCNADP **126**. Wie bei den zuvor betrachteten Hydrolysen verläuft auch diese vermutlich über das einfach maskierte Intermediat **164**, aus dem das entsprechende Diphosphat **165** gebildet wird. Ebenfalls entsteht das Monophosphat **153** durch Spaltung der Anhydridbindung. Zusätzlich zu den erwarteten Hydrolyseprodukten konnte die Bildung einer unbekanntem Verbindung bereits nach 24 h Reaktionszeit beobachtet werden (Abb. 95, S. 97).

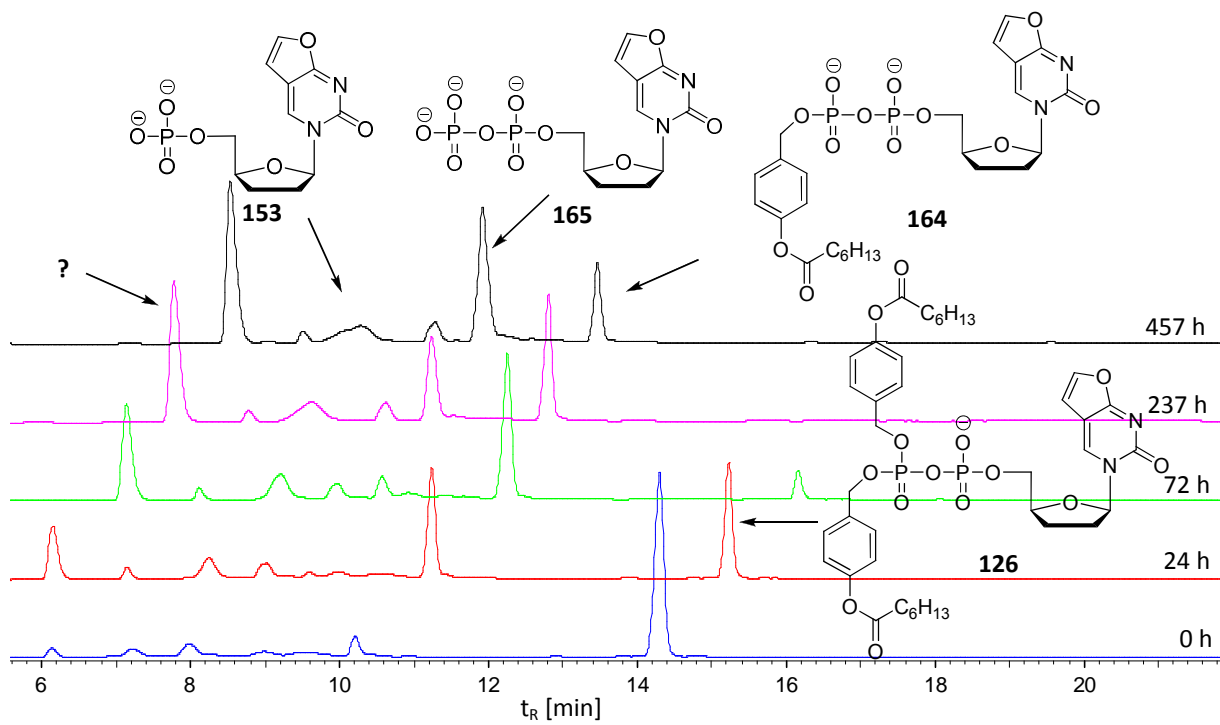


Abb. 95: Hydrolyse von C<sub>6</sub>-6-H-ddBCNADP **126** bei pH 7.3 (Methode II, 330 nm).

Die Auftragung der Peakflächen gegen die Hydrolysedauer zeigt deutlich, dass die unbekannte Verbindung zum Anfang der Hydrolyse sehr schnell gebildet wird und sich die gebildete Menge dann einem Maximalwert annähert (Abb. 96).

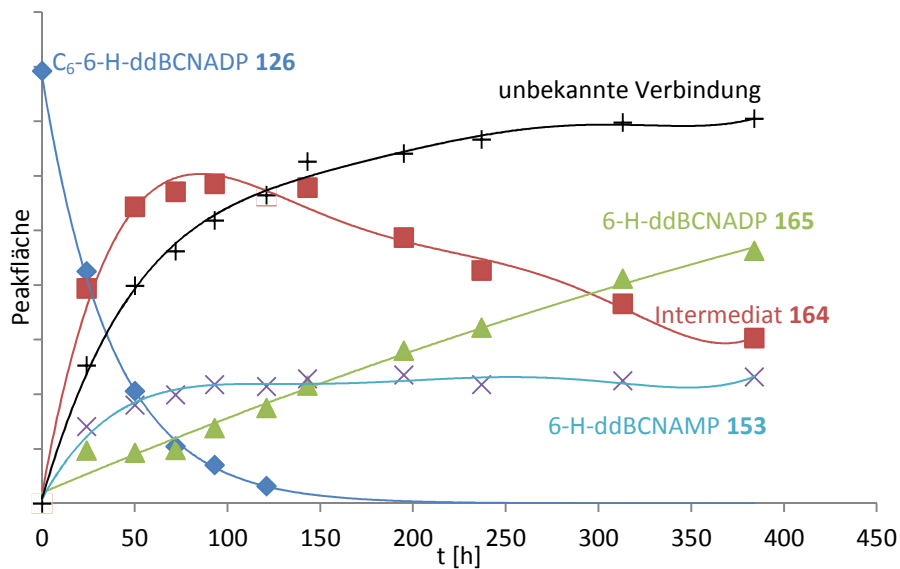


Abb. 96: Verlauf der Hydrolyse von C<sub>6</sub>-6-H-ddBCNADP **126** bei pH 7.3.

Vergleicht man das Hydrolyseverhalten der in Abb. 95 abgebildeten Verbindungen mit dem in Abb. 91 (S. 94) gezeigten Verlauf der Hydrolyse von C<sub>6</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP **118**, so ist dies nahezu identisch, sodass die Bildung der unbekanntes Verbindung offenbar keine

Auswirkungen auf die Bildung bzw. den Abbau der weiteren Verbindungen hat. Mit 26 h stimmt die Halbwertszeit von **126** mit den zuvor für DiPPro-Nucleotide mit gleicher Maske bestimmten Werten überein, was darauf hindeutet, dass die nicht identifizierte Verbindung nicht durch Zersetzung des Prodrugs **126** während der Hydrolyse entsteht. Betrachtet man zusätzlich die in Abb. 97 dargestellte Hydrolyse von C<sub>9</sub>-6-H-ddBCNADP **127**, so ist die Bildung des unbekannten Produkts nicht zu beobachten. Die Halbwertszeit von 63 h stimmt gut mit den zuvor bestimmten Werten für Verbindungen mit der gleichen Maske überein. Eine mögliche Erklärung für die Bildung des unbekannten Produkts bei der Hydrolyse von **126** ist das Vorhandensein einer Verunreinigung in der Hydrolysestammllösung beispielsweise durch teilweise Zersetzung des Prodrugs vor der Hydrolyse. Weist diese Verunreinigung zunächst keine Retention unter den verwendeten HPLC-Bedingungen auf, könnte sie unter den Hydrolysebedingungen zu der unbekannten Verbindung reagieren.

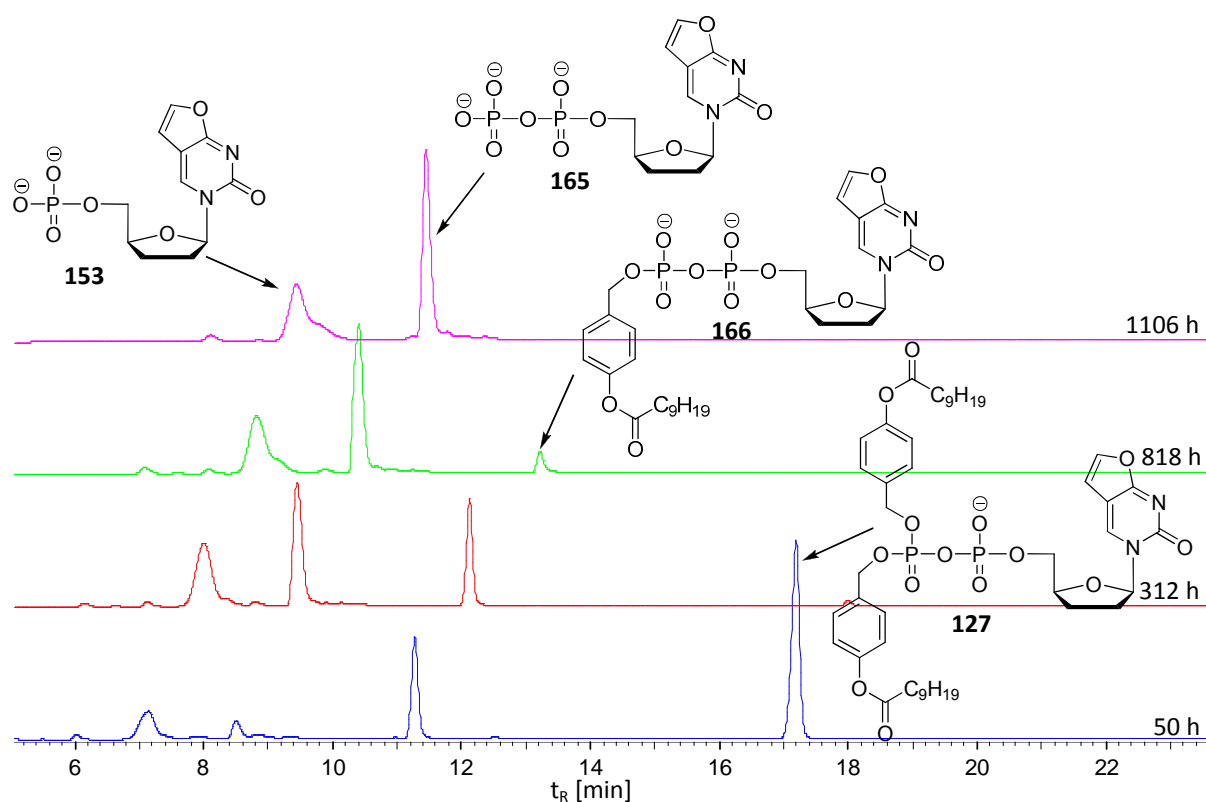


Abb. 97: Hydrolyse von C<sub>9</sub>-6-H-ddBCNADP **127** bei pH 7.3 (Methode II, 330 nm).

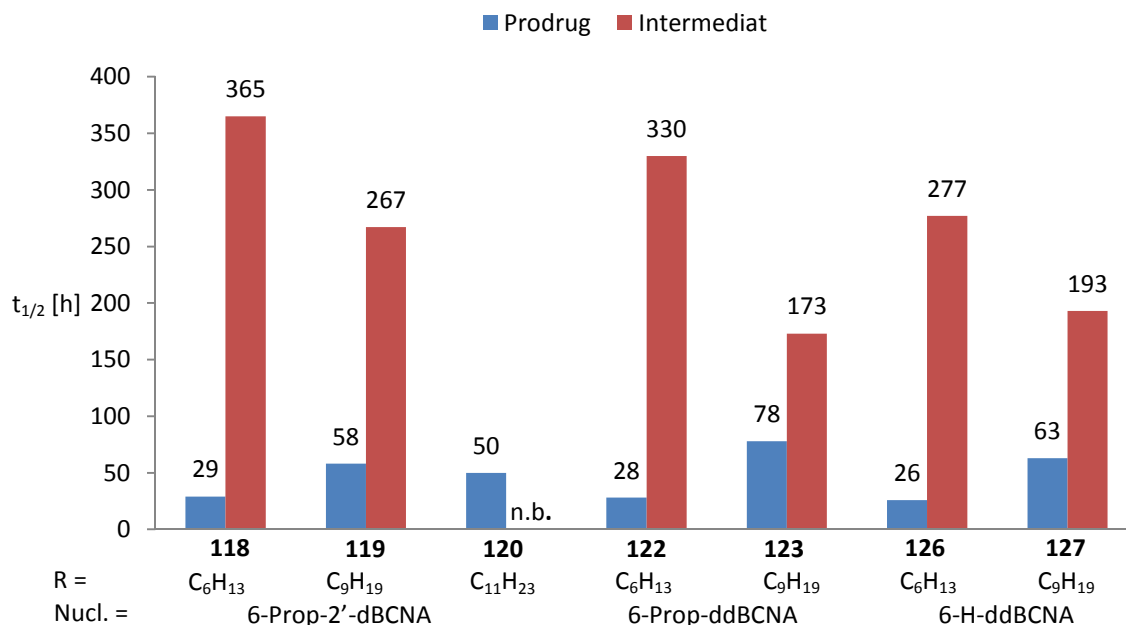


Abb. 98: Übersicht der Hydrolysehalbwertszeiten der DiPPro-Nucleotide der BCNA bei pH 7.3.

Die Hydrolysehalbwertszeiten der BCNA-DiPPro-Nucleotide sind in Abb. 98 zusammengefasst. Analog zu den zuvor untersuchten DiPPro-Nucleotiden ist eine Zunahme der Hydrolysehalbwertszeit mit zunehmender Länge der Alkylkette an der Maske zu beobachten (mit Ausnahme von **120**). Die Halbwertszeiten der einfach maskierten Intermediate liegen deutlich höher als die der zweifach maskierten Prodrugs. Dabei nehmen die Halbwertszeiten der Intermediate mit zunehmender Kettenlänge ab. Die Bestimmung einer Halbwertszeit für das Intermediat von **120** war nicht möglich, da Prodrug und Intermediat über die beobachtete Hydrolysedauer gleichzeitig vorlagen (Abb. 93, S. 95).

Die Hydrolysehalbwertszeit im Phosphatpuffer (pH 7.3) der 3-Me-cycloSal-Triester der BCNA **115** und **116** wurden unter den gleichen Bedingungen ermittelt, wie die der DiPPro-Nucleotide. Die Ergebnisse sind in Abb. 99 (S. 100) zusammengefasst. Für die Untersuchungen wurden die Diastereomere verwendet. Da die Signale der Diastereomere bei der HPLC ausreichend getrennt waren, wurden die Halbwertszeiten dennoch für die einzelnen Diastereomere bestimmt.

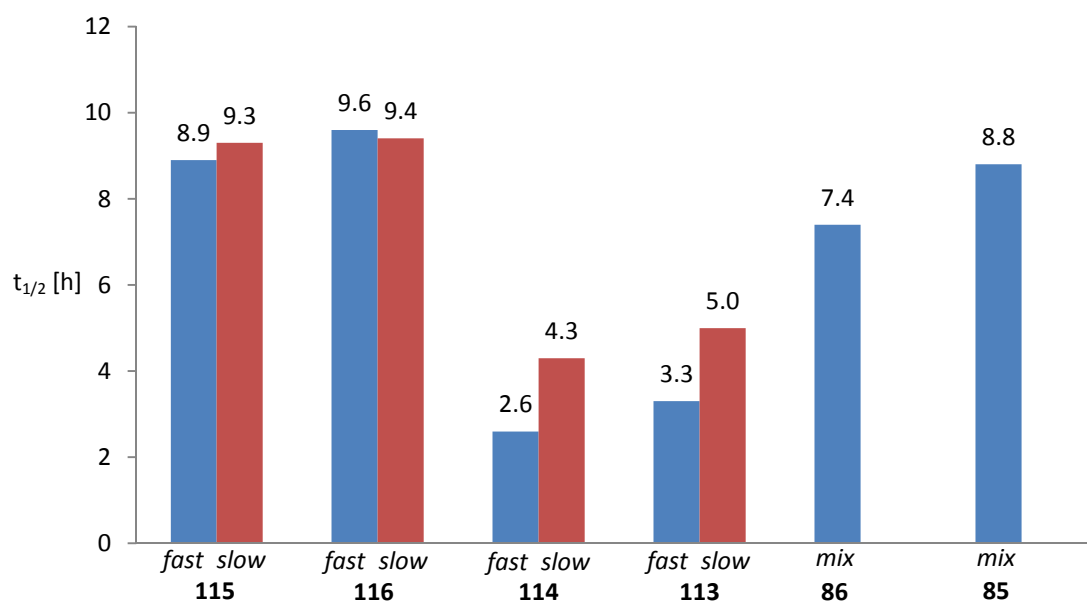


Abb. 99: Hydrolysehalbwertszeiten der 3-Me-cycloSal-Triester in Phosphatpuffer (pH 7.3).

Wie zu erwarten war, liegen die Halbwertszeiten der *cycloSal*-Triester der Didesoxynucleoside **115** und **116** deutlich über denen der 2'-Desoxynucleoside **113** und **114**<sup>[117]</sup>. Dieser Unterschied wurde schon für eine Reihe anderer Verbindungen festgestellt und ist vermutlich auf einen „assistierenden Effekt“ zurückzuführen, bei dem durch Wasserstoffbrückenbindung der 3'-Hydroxyfunktion zu dem angreifenden Hydroxid anion das Nucleophil in die Nähe der zu spaltenden Phosphatesterbindung dirigiert wird.<sup>[97]</sup> Eine gute Übereinstimmung der Halbwertszeiten von **115** und **116** konnte mit den 3-Me-cycloSal-Triestern von d4U und ddU **85** und **86** gefunden werden.

#### 4.2.8. Hydrolyseverhalten der BCNA-Prodrugs in CEM/O-Zellextrakten

Wie bereits in Kapitel 4.1.11. (S. 59) für die d4U- und ddU-Prodrugs beschrieben, wurde das Hydrolyseverhalten auch für die BCNA-Prodrugs **118-127** in CEM/O-Zellextrakten untersucht. Dabei sollte die im Vergleich zu den zuvor betrachteten Verbindungen größere Anregungswellenlänge von 330 nm bei der UV-Absorption während der HPLC den Vorteil bieten, die Metaboliten unabhängig von Zellbestandteilen detektieren zu können. In Abhängigkeit vom jeweiligen Nucleosid wurden unterschiedliche Ergebnisse erhalten, die im Folgenden diskutiert werden.



Bei den Hydrolysen der 6-Prop-2'-dBCNADP-Prodrugs **118-120** konnte deutlich die Bildung der Abbauprodukte beobachtet werden. Allerdings kam es dabei auch zu der Bildung von Nebenprodukten, die eine genaue Zuordnung der Signale erschweren. Dies gilt besonders für das Signal des Diphosphats **160**. Über die gesamte Hydrolysedauer wurde nur eine geringe Menge der einfach maskierten Intermediate **159-162** detektiert, was auf einen schnellen enzymatischen Abbau dieser Verbindung hindeutet. In Abb. 100 ist exemplarisch die Hydrolyse von C<sub>9</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP **119** gezeigt.

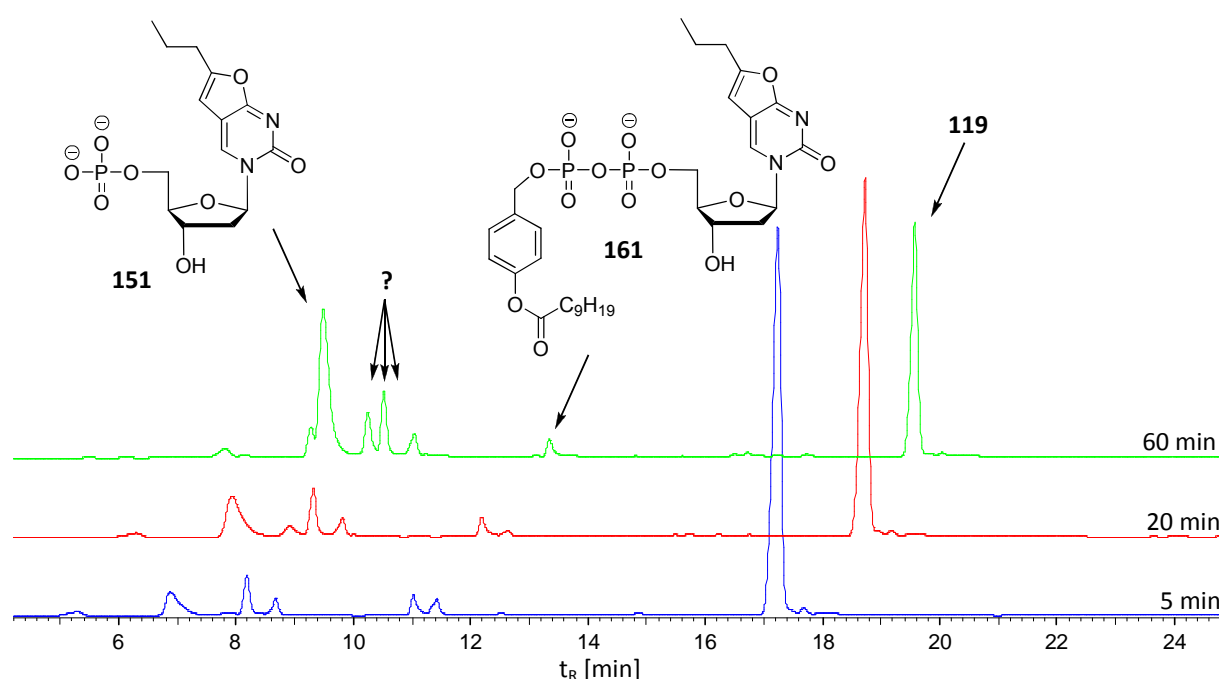


Abb. 100: Verlauf der Hydrolyse des C<sub>9</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP **119** in CEM/0-Zelleextrakt (Methode II, 330 nm).

Die Hydrolyse der 6-Prop-ddBCNADP-Prodrugs **122** und **123** verlief weitgehend ohne die Bildung der in Abb. 100 gezeigten Nebenprodukte. Bei den gekennzeichneten Verbindungen handelt es sich vermutlich um das freigesetzte Monophosphat **152** und das Diphosphat **163**. Auch hier wird nur eine sehr kleine Menge der Intermediate **167** und **168** detektiert. Abb. 101 (S. 102) zeigt die Hydrolyse von C<sub>6</sub>-6-Prop-ddBCNADP **122**.

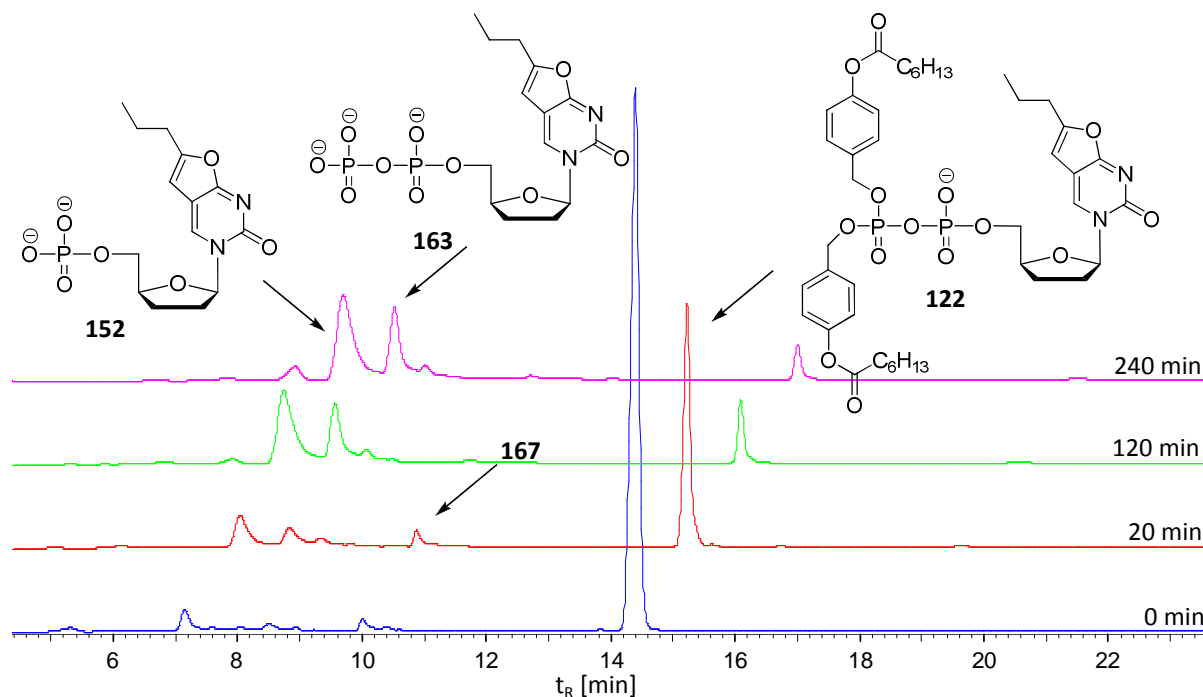


Abb. 101: Verlauf der Hydrolyse des C<sub>6</sub>-6-Prop-ddBCNADP **122** in CEM/0-Zellextrakt (Methode II, 330 nm).

Exemplarisch wurde für 6-Prop-ddBCNAMP **152** und 6-Prop-ddBCNADP **163** die Stabilität im Zellextrakt untersucht. Dabei wurde für das Monophosphat **152** eine Halbwertszeit von 13 h und für das Diphosphat **163** eine Halbwertszeit von 5 h bestimmt. Daher sind beide Verbindungen ausreichend stabil, um während der untersuchten Hydrolysedauer nachgewiesen werden zu können.

Im Gegensatz zu den zuvor gezeigten Hydrolyseverläufen, konnte bei den 6-H-ddBCNADP- Prodrugs **126** und **127** im Wesentlichen die Bildung nicht identifizierbarer Zersetzungsprodukte beobachtet werden (Abb. 102, S. 103). Vermutlich ist dies auf eine schnelle enzymatische Zersetzung der Hydrolyseprodukte zurückzuführen. Da zum Zeitpunkt der Durchführung der Hydrolysen keine Vergleichsproben des Mono- und Diphosphats **153** und **165** zur Verfügung standen, konnte die Kinetik dieser Verbindungen im Zellextrakt nicht gesondert untersucht werden.

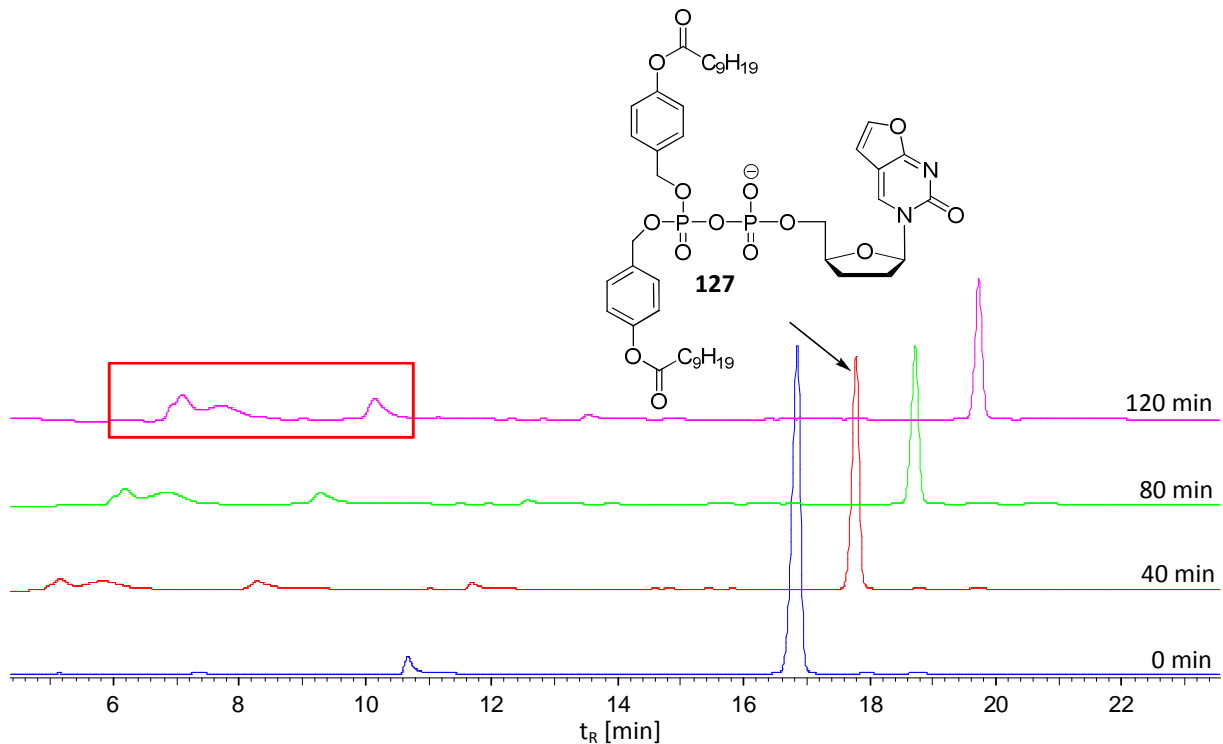


Abb. 102: Verlauf der Hydrolyse des C<sub>9</sub>-6-H-ddBCNADP **127** in CEM/0-Zellextrakt (Methode II, 330 nm).

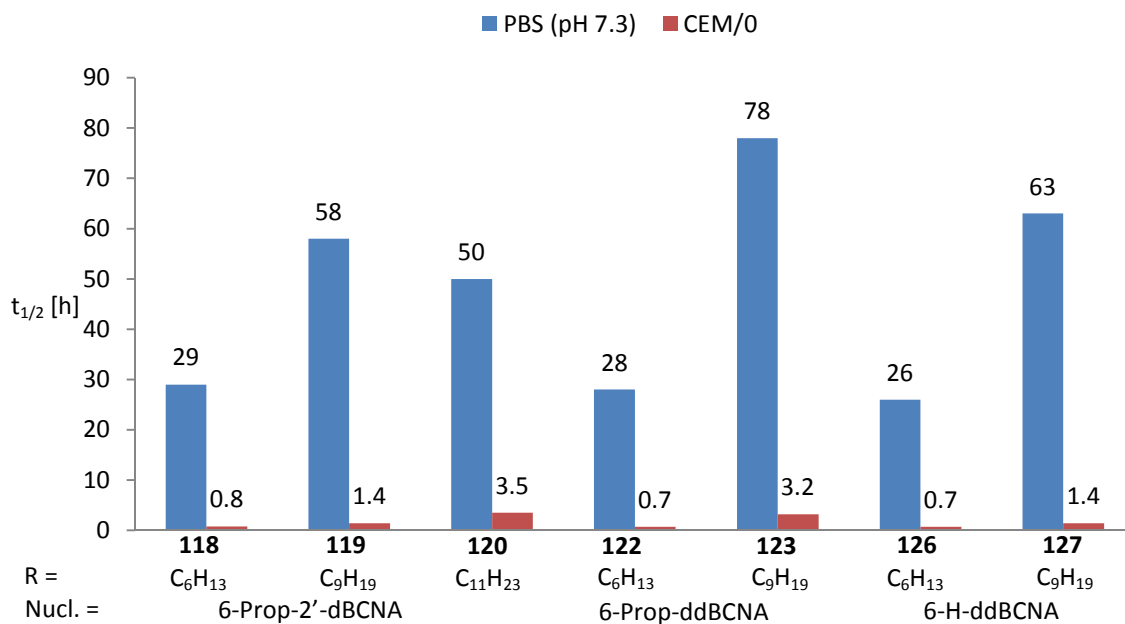


Abb. 103: Hydrolysehalbwertszeiten der BCNA-DiPPro-Nucleotide in CEM/0-Zellextrakt und bei pH 7.3.

In Abb. 103 sind die Hydrolysehalbwertszeiten der BCNA-DiPPro-Nucleotide im Vergleich zu denen der chemischen Hydrolyse zusammengefasst. Dabei ist eine deutliche Verringerung der Halbwertszeiten durch die überwiegend enzymatische Spaltung der Masken zu

erkennen. Wie schon bei der chemischen Hydrolyse beobachtet, nimmt auch hier die Hydrolysegeschwindigkeit mit zunehmender Länge der Alkylkette an der Maske zu.

Die Zellextrakthydrolysen der 3-Me-cycloSal-Triester **113-116** führten zu einem ähnlichen Ergebnis, wie die der entsprechenden d4U- und ddU-Prodrugs **85** und **86** und zeigten ebenfalls die Freisetzung der Nucleosidmonophosphate. Die Halbwertszeiten liegen für alle Verbindungen deutlich höher, als im Phosphatpuffer bei pH 7.3. Offenbar hat erwartungsgemäß auch hier lediglich der niedrigere pH-Wert (6.8<sup>[100]</sup>) einen Einfluss auf das Hydrolyseverhalten. Die erhaltenen Werte sind im Vergleich zu den im Phosphatpuffer ermittelten in Abb. 104 zusammengefasst. Auch für diese Untersuchungen wurden die Diastereomergemische eingesetzt. Diese wurden allerdings bei der HPLC nicht ausreichend getrennt, sodass die Halbwertszeiten jeweils nur für das Gemisch bestimmt wurden.

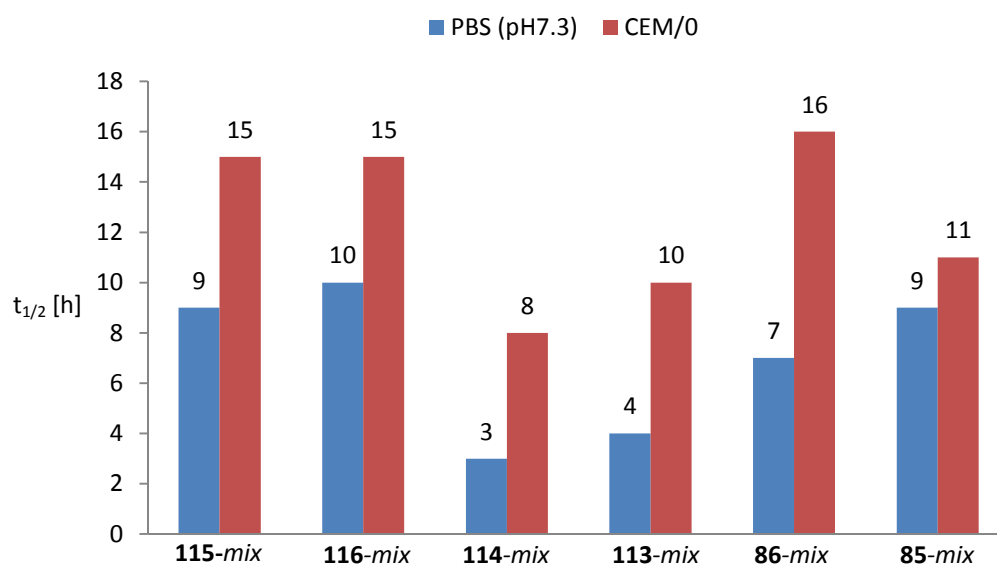


Abb. 104: Hydrolysehalbwertszeiten von **85**, **86** und **113-116** bei pH 7.3 und in CEM/0-Zellextrakt.

#### 4.2.9. Vergleich der Lipophilie der BCNA-Prodrugs

Der Vergleich der BCNA-Prodrugs mit den d4U- und ddU-Prodrugs bezüglich ihrer Lipophilie erfolgte anhand der Retentionszeiten bei der RP-HPLC.<sup>[101]</sup> In Abb. 105 ist die Coinjektion der vier 3-Me-cycloSal-Triester **113-116** der BCNA im Vergleich zu **85** und **86** gezeigt.

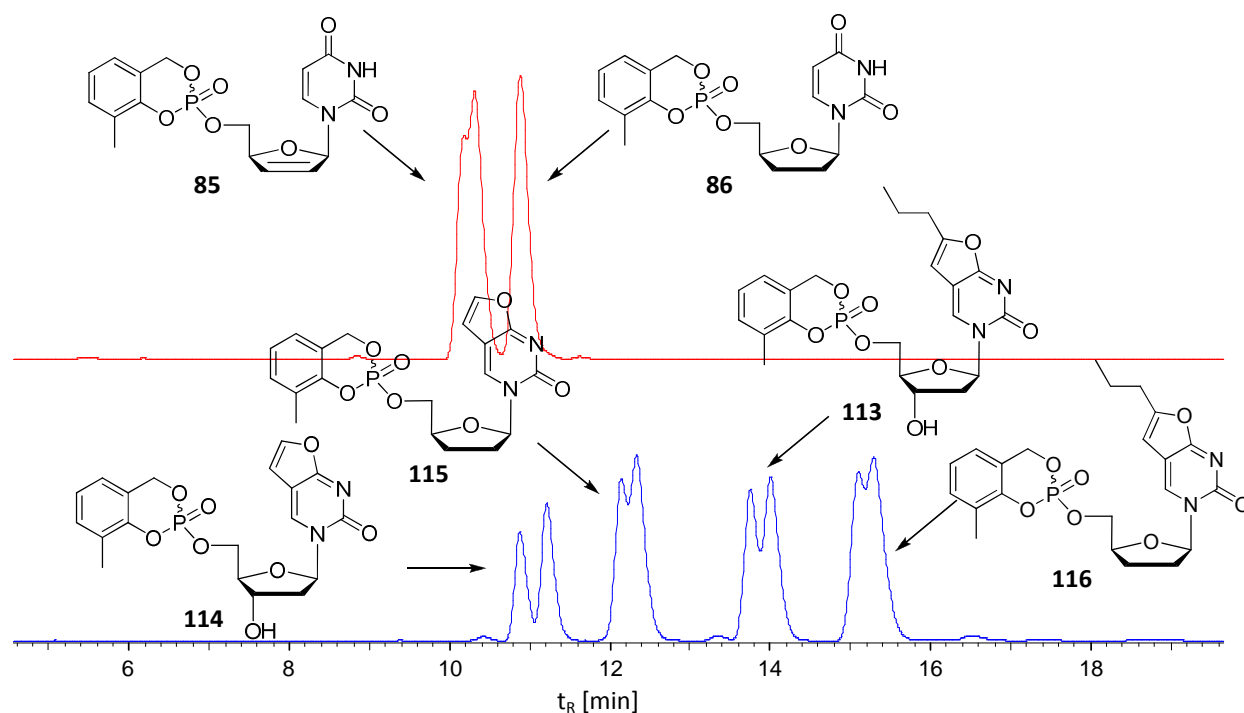


Abb. 105: Coinjektion von **113-116** im Vergleich zu **85** und **86** (Methode I, unten: 330 nm, oben: 260 nm).

Beim Vergleich der Retentionszeiten der vier BCNA-cycloSal-Triester **113-116** wird deutlich, dass der Propylsubstituent an der Nucleobase einen größeren Einfluss auf die Lipophilie des Prodrugs hat, als die 3'-Hydroxyfunktion. Durch direkten Vergleich der Retentionszeiten von 3-Me-cycloSal-ddUMP **86** und 3-Me-cycloSal-6-H-ddBCNAMP **115** ist zu erkennen, dass die unsubstituierte Furanoeinheit nur zu einer geringen Veränderung der Lipophilie führt. Durch geeignete Wahl der Modifikationen im Glycon und im Aglycon lässt sich so die Lipophilie der Fluoreszenzsonde der Lipophilie der zu simulierenden Verbindung anpassen.

Betrachtet man die DiPPro-Nucleotide der BCNA auf gleiche Weise im Vergleich mit den entsprechenden d4U-Prodrugs, so zeigt sich, dass die Modifikationen am Nucleosid einen wesentlich kleineren Einfluss auf die Lipophilie des Gesamtmoleküls haben, als es bei den cycloSal-Verbindungen in Abb. 105 der Fall ist. Auch hier ist der Einfluss des Propylsubstituenten größer, als der der 3'-Hydroxyfunktion (Abb. 106, S. 106).

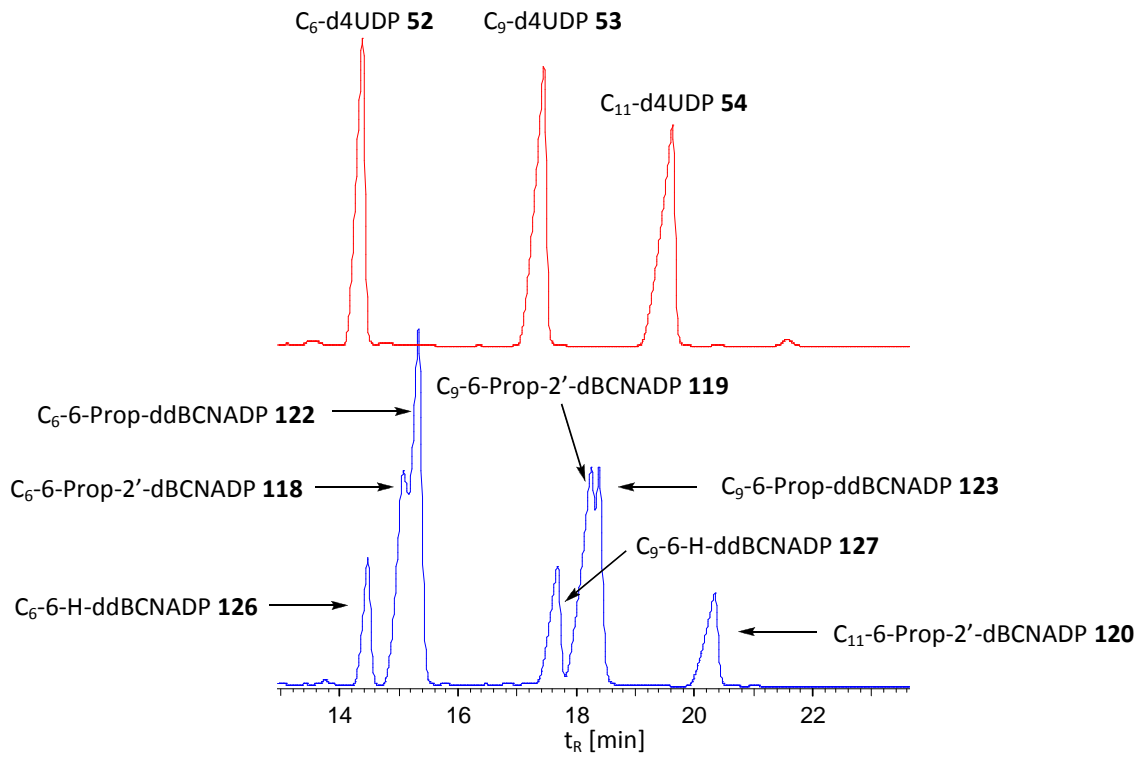


Abb. 106: Coinjektion von **118-127** im Vergleich zu **52-54** (Methode II, unten: 330 nm, oben: 260 nm).

4.2.10. Untersuchung der BCNA-Prodrugs mittels Fluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie

Um die Eignung der synthetisierten BCNA-Prodrugs als Fluoreszenzsonden zu evaluieren, wurde zunächst deren Absorptions- und Emissionsverhalten mittels UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Um den Einfluss unterschiedlicher Modifikationen im Glycon und im Aglycon untersuchen zu können, wurden die in Abb. 107 abgebildeten Nucleoside und *cycloSal*-Triester sowie das DiPPro-Nucleotid C<sub>11</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP **120** verwendet.

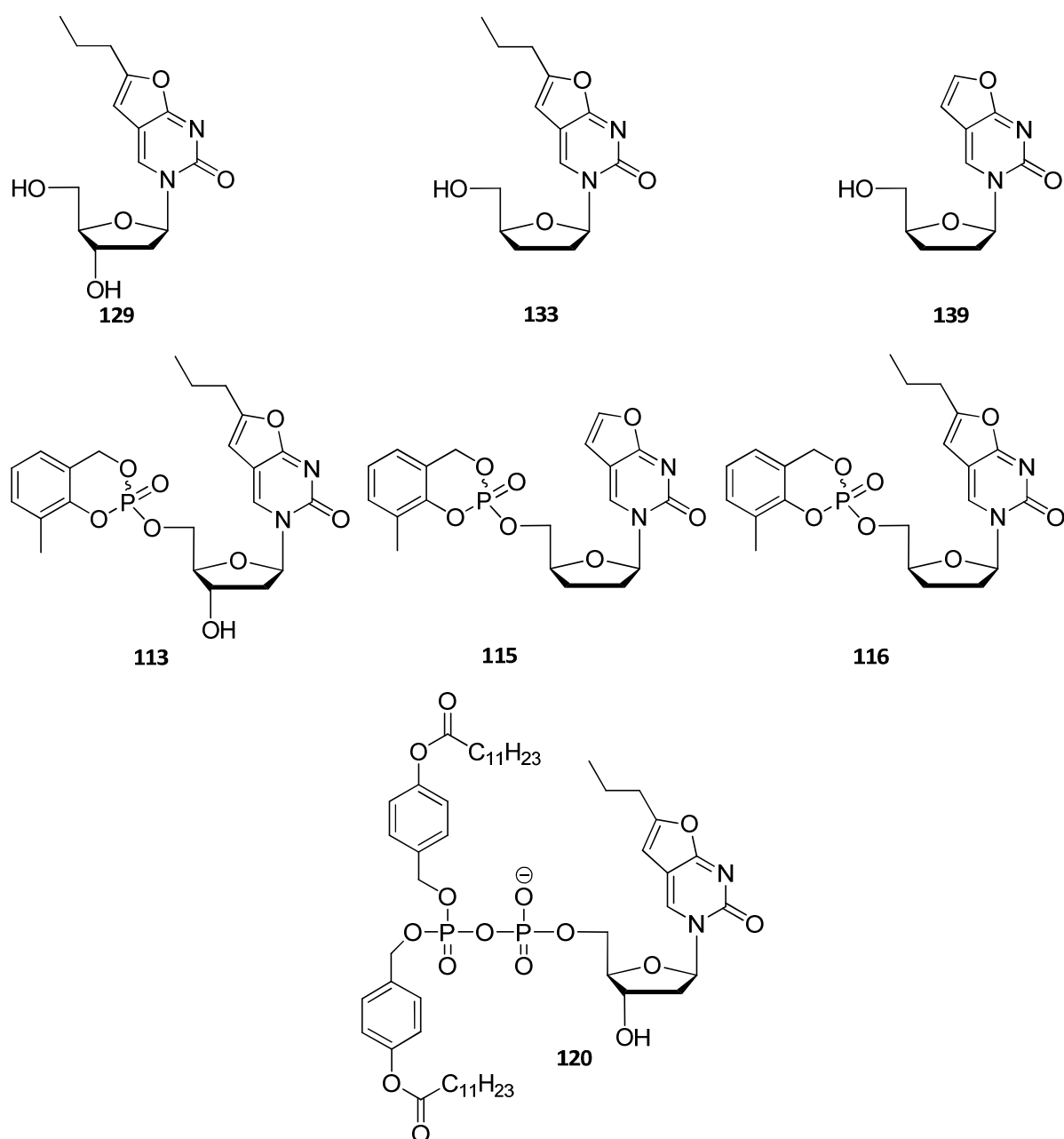


Abb. 107: Zur Untersuchung des Absorptions- und Emissionsverhaltens eingesetzte Verbindungen.

Es wurden 0.11 mM Lösungen der Verbindungen in demineralisiertem Wasser angesetzt und deren Absorptionsspektren mittels UV/Vis-Spektroskopie ermittelt.

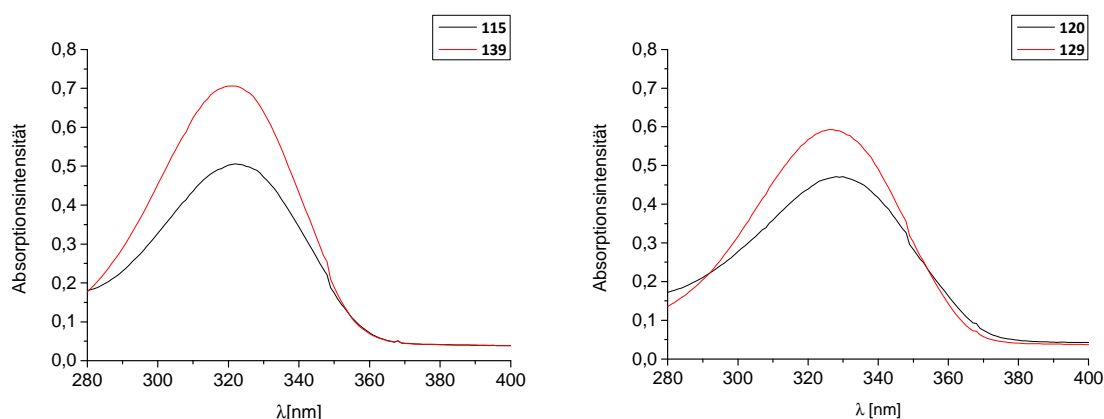


Abb. 108: Absorptionsspektren von **129** und **139** und der Prodrugs **115** und **120**.

In Abb. 108 sind die Absorptionsspektren der Nucleoside **129** und **139** sowie der entsprechenden Prodrugs **115** und **120** abgebildet. Diese zeigen zum einen, dass die Absorption der Prodrugs bei gleicher Konzentration geringer ist als für die freien Nucleoside. Dies galt ebenso für die anderen untersuchten *cycloSal*-Triester **113** und **116**. Zum anderen zeigen die Absorptionsspektren einen Unterschied in der Lage des Absorptionsmaximums in Abhängigkeit von der Substitution an der Nucleobase. Während die unsubstituierten Verbindungen ein Absorptionsmaximum von 322 nm aufweisen, liegt das der propylsubstituierten Verbindungen bei 327 nm. Eine mögliche Ursache für diesen bathochromen Effekt ist ein sterischer oder induktiver Einfluss der Propylgruppe. Der hypochrome Effekt, der bei den Prodrugs auftritt, könnte durch Solvatationseffekte sowie intra- oder intermolekulare Wechselwirkungen des Chromophors mit den aromatischen Systemen der maskierenden Gruppen hervorgerufen werden.

Um die optimalen Anregungswellenlängen für die höchste Fluoreszenzintensität zu ermitteln, wurden Fluoreszenzspektren in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge aufgenommen. Dazu wurde die Anregungswellenlänge im Abstand von 5 nm über einen Bereich von 250 nm bis 450 nm variiert. Das Ergebnis einer dieser Messungen ist exemplarisch für 3-Me-*cycloSal*-6H-ddBCNAMP **115** in Abb. 109 (S. 109) gezeigt.



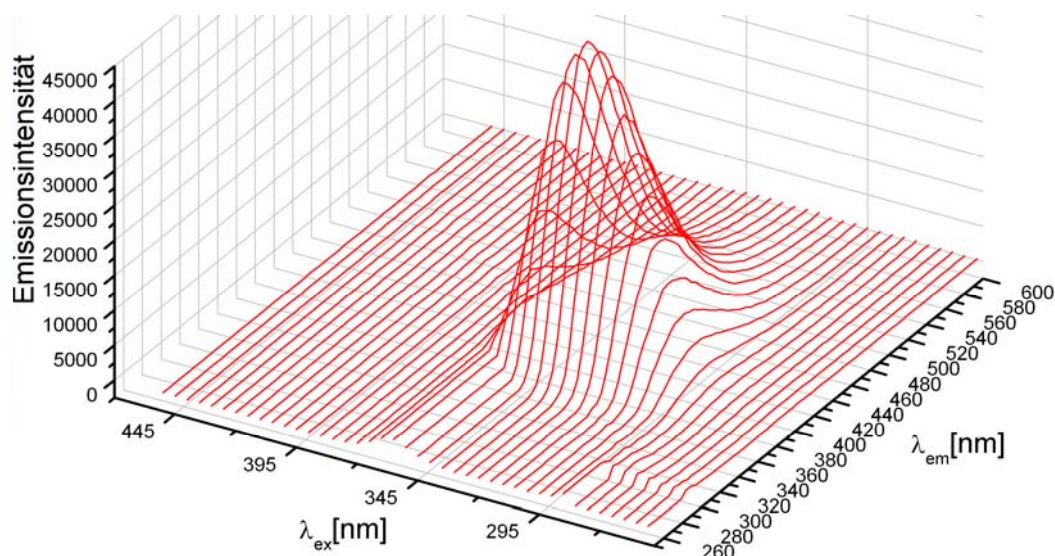


Abb. 109: Emissionsspektren von **115** bei variabler Anregungswellenlänge.

Die auf diese Weise ermittelten Anregungswellenlängen, die zur maximalen Emissionsintensität führten, lagen bei 335 nm für die an der Nucleobase unsubstituierten Verbindungen **115** und **139** und bei 340 nm für die propylsubstituierten Verbindungen. Die Maxima der Emissionsspektren zeigen ebenfalls eine Abhängigkeit von der Substitution am Bicyclus. Für die unsubstituierten Verbindungen ergaben sich Maxima bei 400-405 nm, während die Werte für Verbindungen mit Propylsubstituenten bei 410-415 nm lagen. Dabei lagen die Intensitäten der Emissionsspektren bei der maximalen Anregungswellenlänge für die *cycloSal*-Verbindungen in allen Fällen höher, als die der entsprechenden Nucleoside. Für das DiPPro-Nucleotid **120** lag die Intensität dagegen unter der des Nucleosids **129** (Abb. 110).

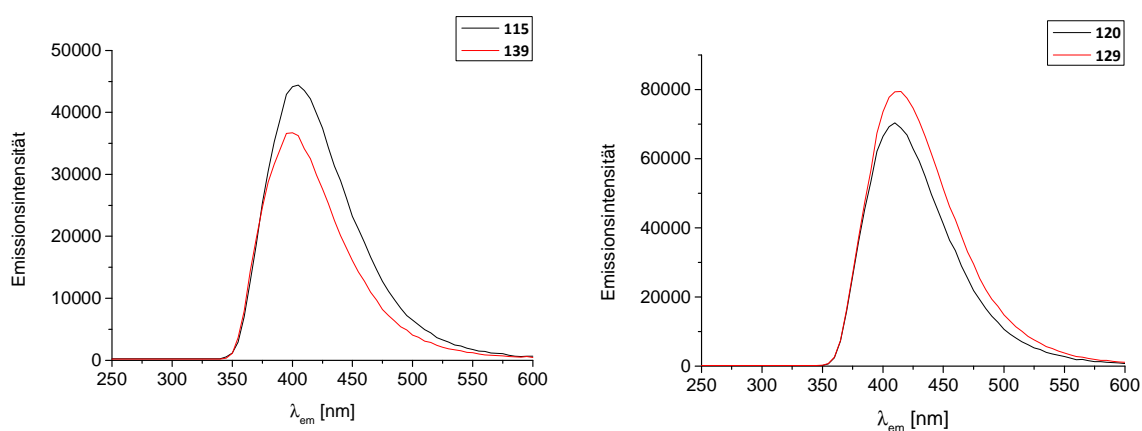


Abb. 110: Emissionsspektren von **115**, **120**, **129** und **139** (links:  $\lambda_{ex} = 335$  nm, rechts:  $\lambda_{ex} = 340$  nm).

Neben dem bathochromen Effekt des Propylsubstituenten tritt offensichtlich auch ein deutlicher hyperchromer Effekt auf, der bei Betrachtung der Emissionsintensität von **116** und **133** (Abb. 111) im Vergleich zu **115** und **139** (Abb. 110, S. 109) besonders evident wird. Zusätzlich ist eine Verschiebung des Emissionsmaximums um ca. 5 nm für die *cycloSal*-Triester im Vergleich zum jeweiligen Nucleosid zu beobachten.

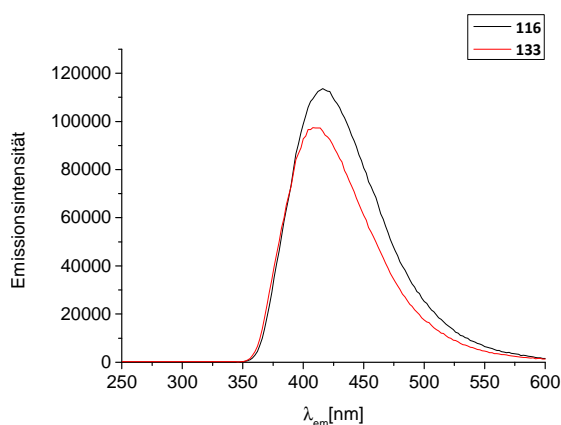


Abb. 111: Emissionsspektren von **116** und **133** ( $\lambda_{ex} = 340$  nm).

Insbesondere der hyperchrome Effekt, der bei den *cycloSal*-Triestern der BCNA im Vergleich zu den Nucleosiden auftritt ist unerwartet, da von JESSEN für die von ihm untersuchten *cycloSal*-Triester der m<sup>5</sup>K-Reihe (Abb. 17, S. 22) ein Quenching der Fluoreszenz im Vergleich zu den Nucleosiden beschrieben wurde.<sup>[66]</sup> Ob für dieses Phänomen sterische, elektronische oder Solvatationseffekte ursächlich sind, kann anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden.

Für die Untersuchung der Zellaufnahme der markierten Prodrugs wurden die Verbindungen **113**, **115** und **120** verwendet. Da bekannt war, dass für die Fluoreszenzmikroskopie ein Laser zur Verfügung steht, dessen minimale Anregungswellenlänge 350 nm beträgt, wurde zunächst anhand der Fluoreszenzspektren überprüft, wie sich die Emissionsintensität bei dieser Wellenlänge im Vergleich zur jeweils optimalen Anregungswellenlänge verändert. Den in Abb. 112 (S. 111) gezeigten Emissionsspektren ist zu entnehmen, dass durch die etwas geringere optimale Anregungswellenlänge des unsubstituierten Fluorophors von **115** der Verlust an Intensität bei einer Anregungswellen von 350 nm deutlich größer ist, als bei der propylsubstituierten Verbindung **113**. Das gleiche Ergebnis wie für **113** wurde auch für **120** erhalten.

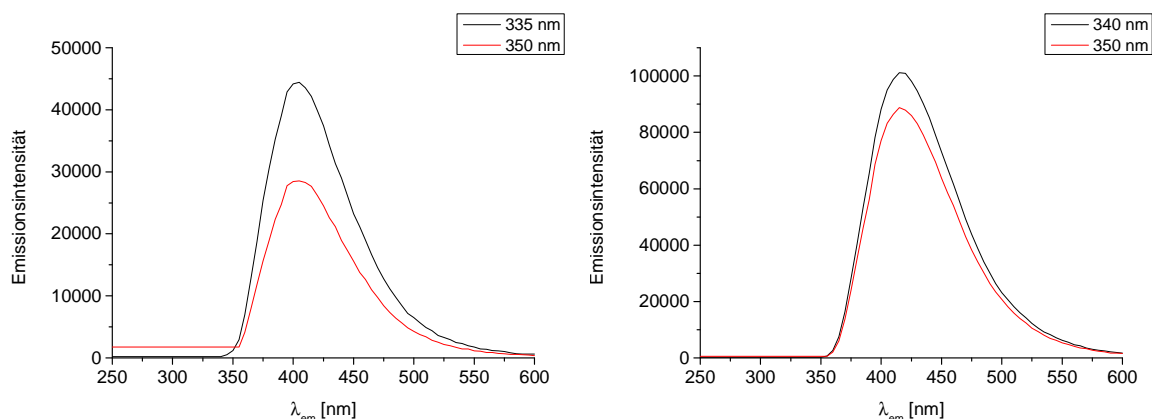


Abb. 112: Emissionsspektren von **115** (links) und **113** (rechts) bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen.

Die Zellaufnahmestudien wurden von HELEN WIGGINS in der Arbeitsgruppe von DR. ARWYN T. JONES an der Cardiff School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences in Cardiff, Wales durchgeführt. Dazu wurden HeLa-Zellen für 1 h bzw. 24 h mit Zellkulturmedium inkubiert, das die entsprechende Verbindung mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  enthielt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Als Referenzsubstanz wurde FV100 **104** verwendet (Abb. 107, S. 107), dessen optimale Anregungswellenlänge bei 346 nm liegt.<sup>[131]</sup> Die genaue experimentelle Durchführung entsprach dem von MCGUIGAN ET AL. beschriebenen Verfahren.<sup>[111]</sup> In Abb. 113 ist die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach der Inkubation mit der Positivkontrolle FV100 **104** für 1 h mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  gezeigt. Dabei ist deutlich die Lage der einzelnen Zellen zu erkennen, bei denen sich das Nucleosid im Cytosol befindet. Die Zellkerne sind als dunkle Punkte in der Zelle zu sehen.

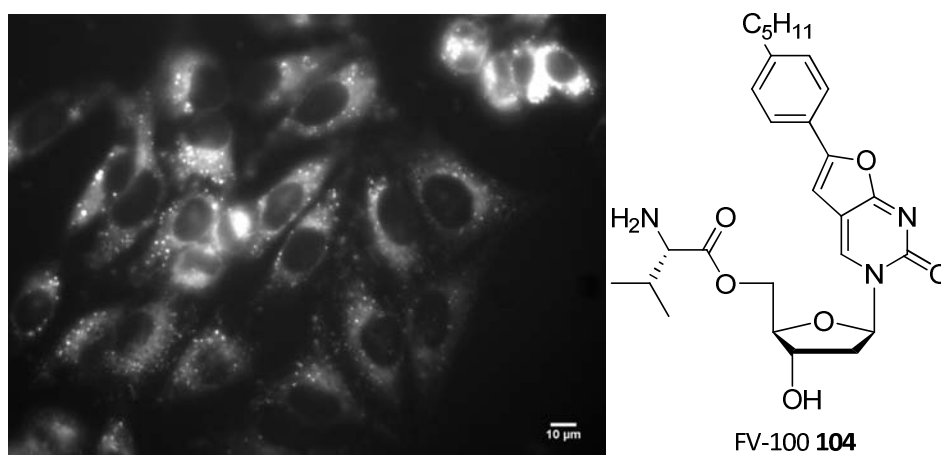


Abb. 113: Inkubation mit FV100 **104** (10  $\mu\text{M}$ , 1 h,  $\lambda_{\text{ex}}$  = 350 nm).

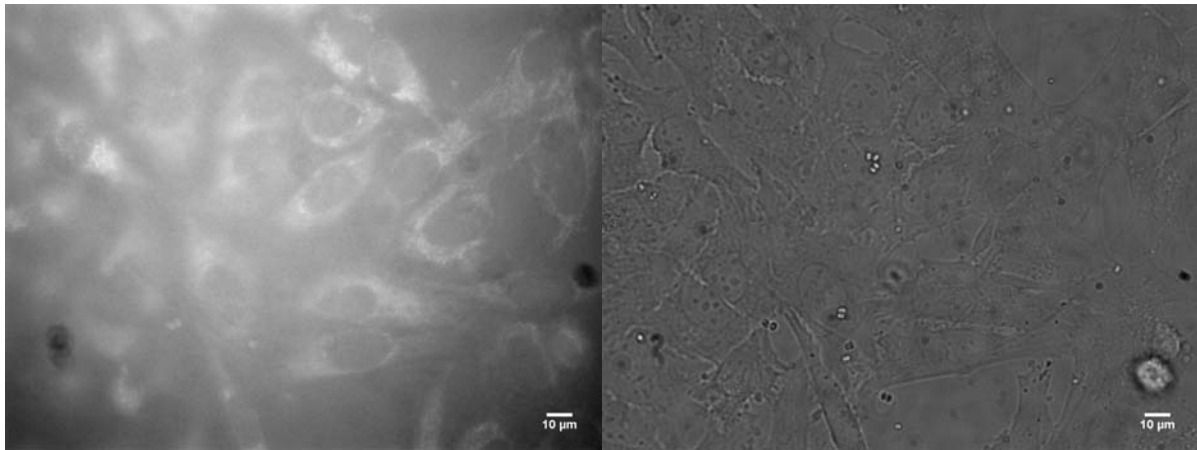


Abb. 114: Inkubation mit **115** (10  $\mu$ M, 1 h,  $\lambda_{\text{ex}}$  = 350 nm, links) und Lichtfeldaufnahme (rechts).

In Abb. 114 ist die Aufnahme nach der Inkubation mit 3-Me-*cyclo*Sal-6-H-ddBCNAMP **115** gezeigt (10  $\mu$ M, 1 h). Zusätzlich ist die Lichtfeldaufnahme abgebildet, in der die Zellen vor der Inkubation zu erkennen sind. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zeigt ein deutlich schwächeres Fluoreszenzsignal, als dies für die Inkubation mit der Positivkontrolle der Fall ist (Abb. 113, S. 111).

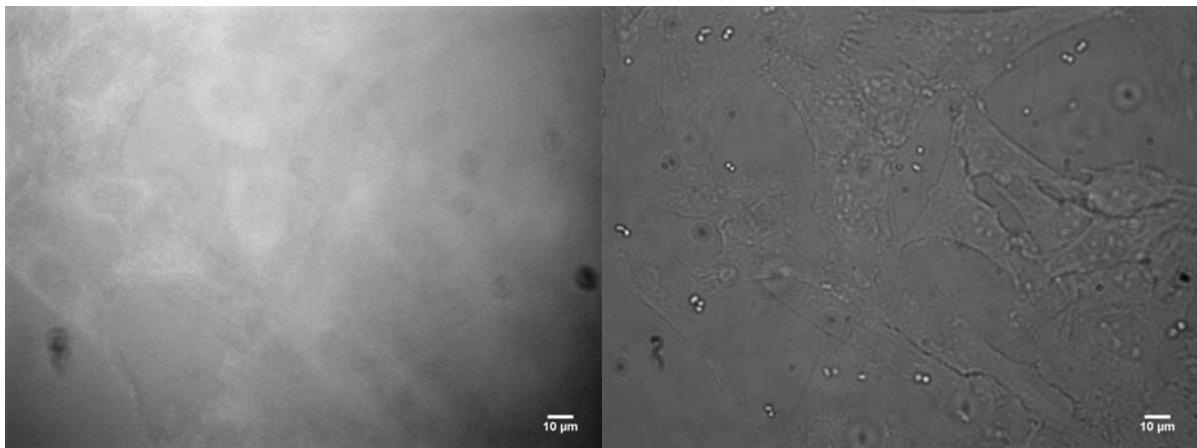


Abb. 115: Inkubation mit **113** (10  $\mu$ M, 1 h,  $\lambda_{\text{ex}}$  = 350 nm, links) und Lichtfeldaufnahme (rechts).

Die in Abb. 115 abgebildete Inkubation mit 3-Me-*cyclo*Sal-6-Prop-2'-dBCNAMP **113** zeigt wiederum ein schwächeres Fluoreszenzsignal als das im Fall von **115** (Abb. 114) detektierte.

Die Inkubation von C<sub>11</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP **120** führte zu einem deutlicheren Fluoreszenzsignal, als das für **113** gemessene (Abb. 116, S. 113). Hier sind erneut deutlich die Zellen zu erkennen, deren Cytosol durch den Fluoreszenzfarbstoff angefärbt sind.

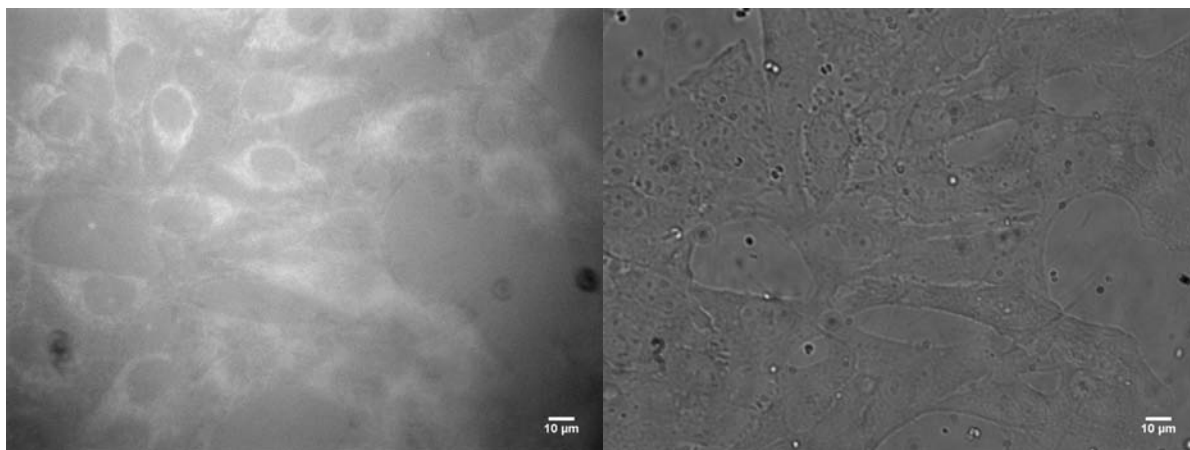


Abb. 116: Inkubation mit **120** (10 µM, 1 h,  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  nm, links) und Lichtfeldaufnahme (rechts).

Da die Fluoreszenzintensität für alle drei untersuchten Verbindungen schwach war im Vergleich zur Positivkontrolle, wurden die Inkubationen zum einen mit höherer Konzentration (100 µM) und zum anderen mit längerer Inkubationsdauer (24 h) wiederholt.

Die Erhöhung der Konzentration bei gleicher Inkubationsdauer bewirkte für **115** keine Verbesserung der Fluoreszenzintensität (Abb. 117), für **113** und **120** konnten aufgrund der Cytotoxizität der Verbindungen keine verwertbaren Aufnahmen erhalten werden.

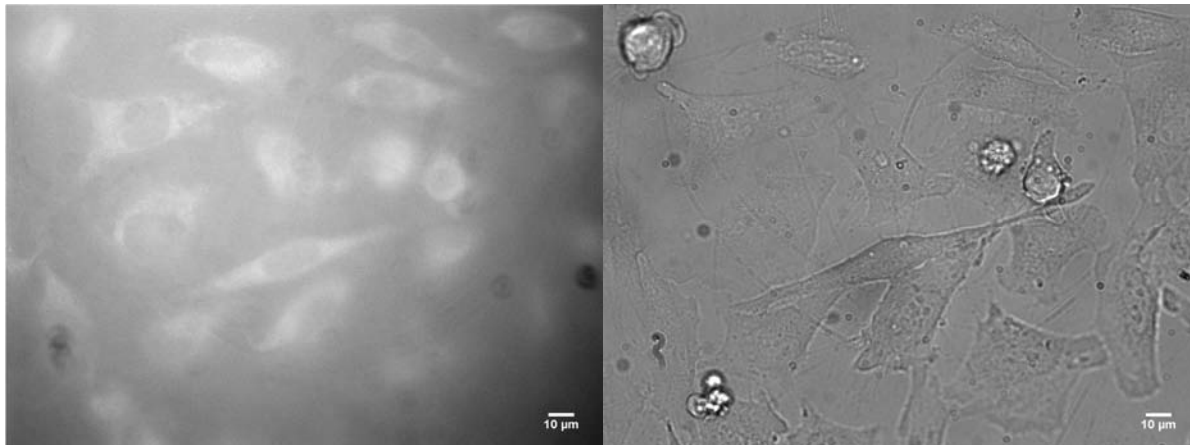


Abb. 117: Inkubation mit **115** (100 µM, 1 h,  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  nm, links) und Lichtfeldaufnahme (rechts).

Eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität durch eine Verlängerung der Inkubationsdauer konnte für **113** erreicht werden (Abb. 118, S. 114). Für die anderen beiden Verbindungen wurde ein etwas schwächeres Signal detektiert (nicht gezeigt).

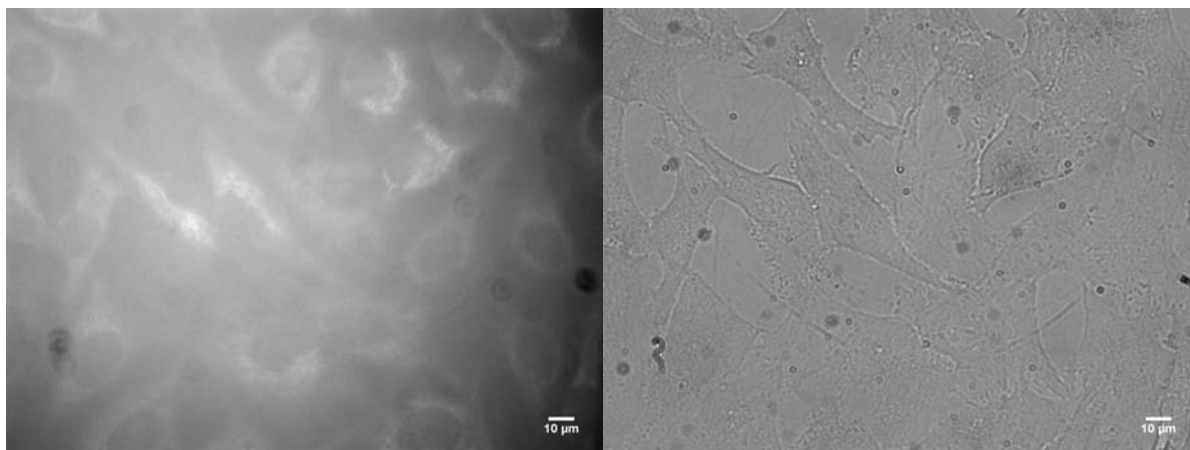


Abb. 118: Inkubation mit **113** (10  $\mu$ M, 24 h,  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  nm, links) und Lichtfeldaufnahme (rechts).

Betrachtet man die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Inkubationen der Prodrugs, so lässt sich positiv festhalten, dass alle untersuchten Verbindungen in den Zellen in ausreichendem Maße akkumulieren, um unter den Versuchsbedingungen nachgewiesen werden zu können. Allerdings zeigten die Untersuchungen auch, dass die Anregung bei 350 nm zu schnellem Photobleaching führte, was die Messungen erheblich erschwerte. Daher ist nicht klar, ob sich anhand der beobachteten Fluoreszenzintensitäten tatsächlich Rückschlüsse auf die intrazellulären Konzentrationen der Verbindungen ziehen lassen. Des Weiteren ist anzumerken, dass das Problem des Photobleachings auch für die Positivkontrolle FV100 **104** auftritt. Die niedrigeren Fluoreszenzintensitäten der untersuchten Prodrugs im Vergleich zur Referenz **104** können also neben der nicht optimalen Anregungswellenlänge noch eine Reihe weiterer Gründe haben. Beispielsweise könnte die Membranpermeabilität deutlich geringer sein als für **104**. Zusätzlich könnten Quenchingeffekte durch Interaktion der Fluorophore mit Zellbestandteilen auftreten.

Dieses Kapitel zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Prodrugs bicyclischer Nucleosidanaloga (BCNA) nach dem *cycloSal*- und dem *DiPPro*-Konzept zur Verwendung als Fluoreszenzsonden für Zellaufnahmestudien synthetisiert wurden. Dazu wurden 2'-Desoxy- und 2',3'-Didesoxyanaloga der BCNA verwendet, bei denen sich entweder ein Propylsubstituent oder kein Substituent an der Nucleobase befand. Die Untersuchung des Hydrolyseverhaltens der Prodrugs zeigte, dass die Hydrolyse der *DiPPro*-Nucleotide der BCNA in Phosphatpuffer (pH 7.3) nach dem in Abb. 21 (S. 27) gezeigten Mechanismus über die einfach maskierte Verbindung als Intermediat verläuft. Aus diesem Intermediat wird das

entsprechende Nucleosiddiphosphat freigesetzt. Durch alternative Spaltung der Phosphorsäureanhydridbindung kam es zusätzlich zur Freisetzung des Nucleosidmonophosphats. Die für die Abnahme der Prodrugkonzentration ermittelten Hydrolysehalbwertszeiten lagen in der gleichen Größenordnung wie für die in Kapitel 4.1. (S. 26) untersuchten DiPPro-Nucleotide von d4U **42** und ddU **43**. In CEM/O-Zellextrakt zeigten die Diphosphatprodrugs in Abhängigkeit von der Modifikation des Nucleosids unterschiedliches Hydrolyseverhalten. Während bei der Hydrolyse der Prodrugs von 6-Prop-ddBCNA **122**, **123** deutlich die Freisetzung des Nucleosidmono- und -diphosphats zu erkennen war, zeigte sich bei der Hydrolyse der 6-Prop-2'-dBCNADP-Prodrugs **118-120** die Bildung unbekannter Nebenprodukte. Im Fall der Prodrugs von 6-H-ddBCNADP **126**, **127** waren nur geringe Mengen des Nucleosiddi- und -monophosphats sowie Zersetzungsprodukte zu beobachten. Die Halbwertszeiten der Verbindungen in CEM/O-Zellextrakt lagen in der gleichen Größenordnung, wie die der zuvor untersuchten DiPPro-Nucleotide von d4U **42** und ddU **43**. Die *cycloSal*-Triester der BCNA wurden ebenfalls auf ihr Hydrolyseverhalten hin untersucht. Auch für diese Verbindungen zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Hydrolysehalbwertszeiten mit denen der *cycloSal*-Verbindungen von d4U **42** und ddU **43** und auch hier wurde die Bildung der Nucleosidmonophosphate beobachtet.

Für einige der synthetisierten Prodrugs und Nucleosidanaloga wurden u. a. die optimalen Anregungswellenlängen bestimmt. Diese lagen für die propylsubstituierten Verbindungen bei 340 nm und für die unsubstituierten Verbindungen bei 335 nm. Die Verbindungen 3-Me-*cycloSal*-6-H-ddBCNAMP **115**, 3-Me-*cycloSal*-6-Prop-2'-dBCNAMP **113** und C<sub>11</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP **120** wurden für Zellaufnahmestudien mittels Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Die Anregung erfolgte gerätebedingt bei 350 nm. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Verbindungen in den Zellen in ausreichendem Maße akkumulieren, um unter den Versuchsbedingungen nachgewiesen werden zu können. Allerdings wurde für alle Verbindungen lediglich ein schwaches Fluoreszenzsignal detektiert. Ein Hauptproblem bei diesen Messungen war ein schnelles Photobleaching der Fluorophore, sodass sich durch die gemessenen Fluoreszenzintensitäten keine verlässliche Rückschlüsse auf die intrazellulären Konzentrationen der Fluorophore ziehen lassen.

### 4.3. Synthese fluoreszenzmarkierter Nucleosiddiphosphatzucker

Als aktivierte Form der Kohlenhydrate stellen Zuckernucleotide wichtige Bausteine in der Biosynthese von Glykokonjugaten dar. So dienen sie als Ausgangsmaterialien zum Aufbau von Desoxy- und Aminozuckern sowie von verzweigt-kettigen Oligo- und Polysacchariden und Harnsäuren. Die allgemeine Struktur der Zuckernucleotide ist in Abb. 119 dargestellt. Sie bestehen aus einer Glycosyleinheit (rot), die über eine oder zwei Phosphatbrücken (grün) am anomeren Zentrum mit einem Nucleosid (blau) verbunden ist. Durch die Phosphat-esterbindung wird der Glycosylrest für enzymatische Übertragungsreaktionen aktiviert, während das Nucleosid als Erkennungsmerkmal für das Enzym dient. Diese Übertragungsreaktionen werden in der Regel durch Glycosyltransferasen (GT) katalysiert. Als Substrate von Glycosyltransferasen, die in Säugetieren vorkommen, fungieren acht Zuckernucleotide: UDP- $\alpha$ -D-Glc, UDP- $\alpha$ -D-Gal, UDP- $\alpha$ -D-GlcNAc, UDP- $\alpha$ -D-GalNAc, UDP- $\alpha$ -D-GlcUA, GDP- $\alpha$ -D-Man, GDP- $\beta$ -L-Fuc und CMP- $\beta$ -D-Neu5Ac.<sup>[132-134]</sup>

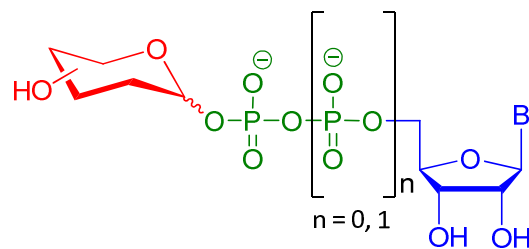


Abb. 119: Allgemeine Struktur eines Zuckernucleotids.

#### 4.3.1. Synthese von Nucleosiddiphosphatzuckern (NDP-Zucker)

Da es sich bei dem Großteil der natürlich vorkommenden Zuckernucleotide um Nucleosiddiphosphatpyranosen ( $n = 1$ , Abb. 119) handelt, wurden eine Reihe von Synthesewegen entwickelt, um Verbindungen dieser Substanzklasse darzustellen. Dazu werden im Wesentlichen zwei unterschiedliche Strategien verwendet: Die Knüpfung der Pyrophosphatbindung durch Reaktion eines Pyranosylphosphats mit einem aktivierten Nucleosid-5'-Phosphat (Strategie A, Abb. 120, S. 117) und die Umsetzung eines Nucleosiddiphosphats mit einer aktivierten Pyranose (Strategie B, Abb. 120, S. 117)<sup>[135]</sup> Des Weiteren besteht die Möglichkeit der enzymatischen Knüpfung der Pyrophosphatbindung, die beispielsweise von THIEM ET AL. für die Synthese von GDP- $\beta$ -L-Fuc beschrieben wurde.<sup>[136]</sup>



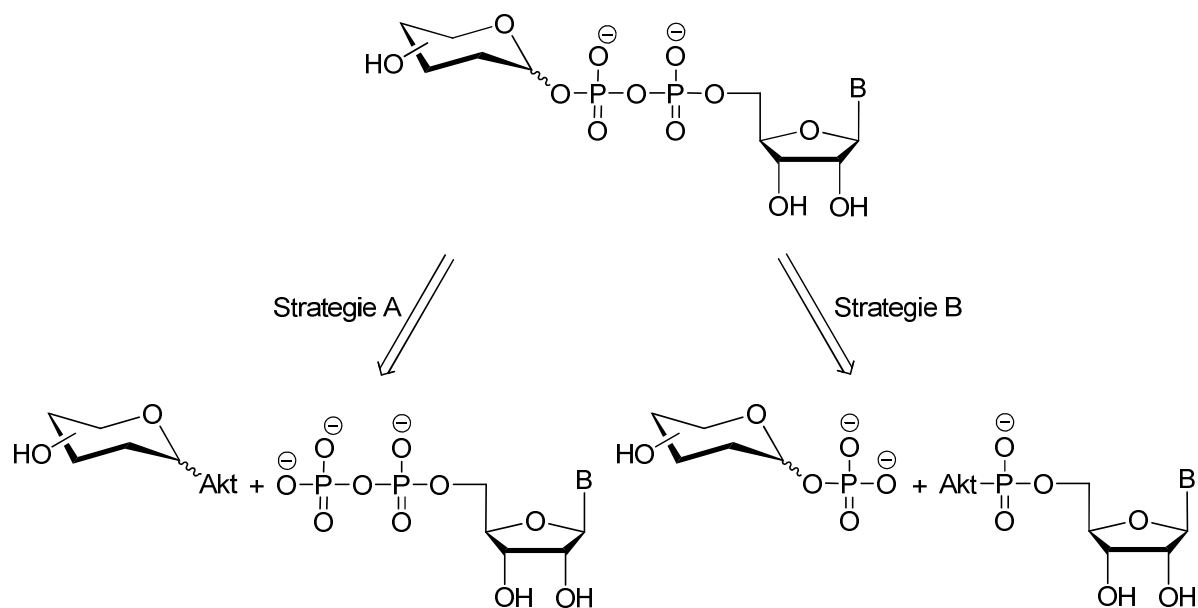


Abb. 120: Strategien zur Darstellung von Nucleosiddiphosphatzuckern (Akt = Aktivator), verändert nach [135].

Der Strategie A folgt beispielsweise die Halogenose-Methode nach HINDSGAUL ET AL., bei der die Aktivierung der benzylgeschützten Pyranose durch Halogenierung am anomeren Zentrum erfolgt. Nach Kupplung mit einem Nucleosiddiphosphat wird der NDP-Zucker als Anomerengemisch erhalten.<sup>[137]</sup> Durch Verwendung von Acetyl- und Benzoyl- anstatt der Benzylschutzgruppen gelang JAKEMAN ET AL. unter Ausnutzung des anchimeren Effekts die Synthese anomerenreiner NDP-Mannose und -Fucose mit der Halogenose-Methode.<sup>[138]</sup> Ein weiteres Beispiel für aktivierte Pyranosen sind die von KLAFFKE ET AL. beschriebenen 1,2-Anhydrozucker.<sup>[139]</sup> FERRIÈRES ET AL. verwendeten zur Aktivierung des Zuckerbausteins Mercaptobenzimidazol.<sup>[140]</sup>

Die am häufigsten zur Synthese von NDP-Zuckern verwendete Methode ist die von MOFFAT und KHORANA entwickelte Phosphormorpholidat-Methode. Nach Strategie B wird dabei ein Nucleosid-5'-Phosphormorpholidat mit einem ungeschützten Pyranosylphosphat zum NDP-Zucker umgesetzt.<sup>[141]</sup> Die Aktivierung des Nucleosidphosphats als Phosphoramidit beschrieben VAN DER MAREL ET AL.<sup>[142]</sup> Kürzlich berichteten HINDSGAUL ET AL. von einer Methode, bei der die Umsetzung des Nucleosids in Form eines reaktiven Phosphorimidazolid mit einem Pyranosylphosphat die Synthese von NDP-Zuckern in Wasser als Lösungsmittel ohne die Notwendigkeit einer anschließenden Reinigung ermöglicht.<sup>[143,144]</sup> NDP-Zucker lassen sich auch mit Hilfe der *cycloSal*-Methode synthetisieren. Der präparative Nutzen des *cycloSal*-

Konzepts wurde bereits im Kenntnisstand (Abb. 12, S. 15) beschrieben. Dazu werden *cycloSal*-Phosphatriester verwendet, bei denen sich in 5-Position der Maske ein starker Akzeptorsubstituent (z. B. Cl oder NO<sub>2</sub>) befindet. Durch Umsetzung mit einem Pyranosylphosphat als Nucleophil lassen sich so anomenrein Nucleosiddiphosphatpyranosen mit kurzen Reaktionszeiten und guten Ausbeuten synthetisieren (Abb. 121). Diese Methode ist vielseitig anwendbar und wurde bereits zur Synthese einer Vielzahl von NDP-Zuckern mit natürlichen und modifizierten Nucleosid- und Glycosylbausteinen verwendet.<sup>[54-58,60]</sup>

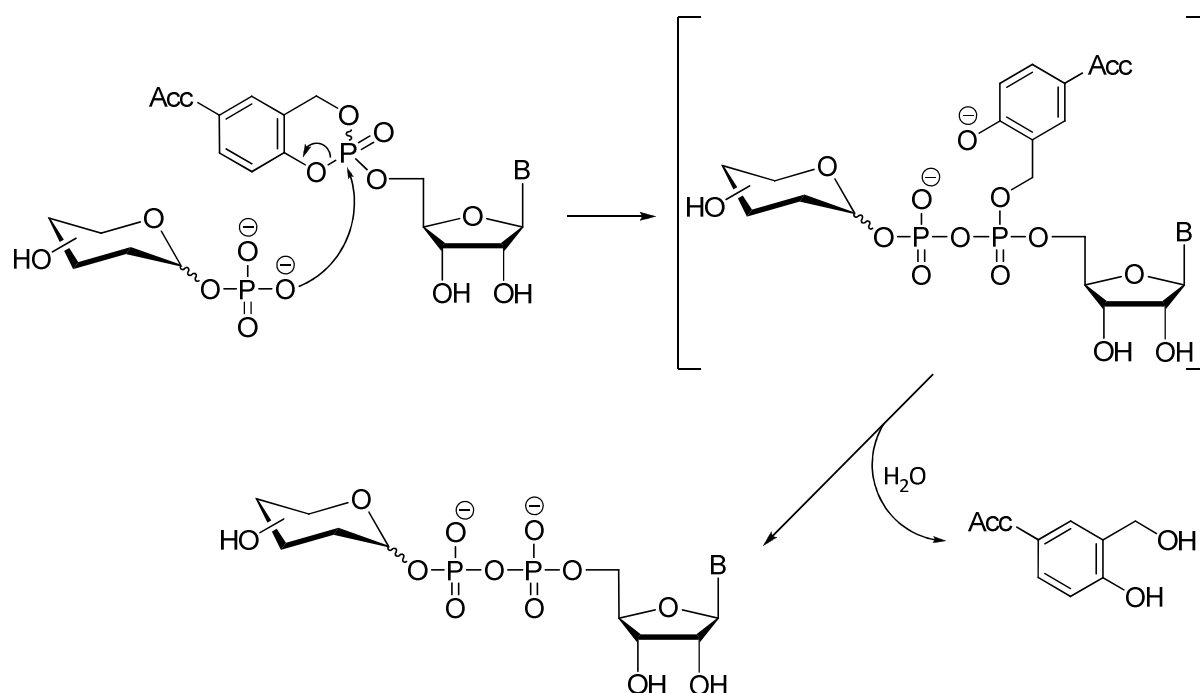


Abb. 121: Synthese eines NDP-Zuckers nach dem *cycloSal*-Konzept (Acc = Akzeptorsubstituent).

#### 4.3.2. Fluoreszenzmarkierte Nucleosiddiphosphatzucker in GT-Inhibitionsassays

Aufgrund der großen Bedeutung von Glycosyltransferasen (GT) für eine Reihe biologischer Prozesse stellen sie interessante *Targets* für die Wirkstoffentwicklung dar. Mögliche Anwendungen für GT-Inhibitoren sind die Therapie von Stoffwechselkrankheiten, Infektionen, Entzündungen, Krebs sowie neurologische Erkrankungen. Allerdings befinden sich nur zwei GT-Inhibitoren in klinischer Anwendung: der Glucosylceramidsynthaseinhibitor Miglustat gegen Morbus Gaucher und der Arabinosyltransferaseinhibitor Ethambutol gegen Tuberkulose.<sup>[145]</sup> Eine Reihe potentieller GT-Inhibitoren wurde bereits synthetisiert.<sup>[146]</sup> Um

diese auf ihre Wirksamkeit testen zu können, sind verlässliche Assays für die GT-Inhibition notwendig.

Auf der Grundlage fluoreszenzmarkierter NDP-Pyranosen wurden eine Reihe biochemischer Assays entwickelt, die zur Identifikation von Glycosyltransferasen dienen.<sup>[145]</sup> Beispielsweise beschrieben WALKER ET AL. die Verwendung des an der Pyranoseeinheit durch Fluorescein markierten UDP- $\alpha$ -D-GlcNAc **170** als analytische Sonde zur Durchführung eines *High-Throughput-Screenings* zur Identifikation von Inhibitoren des Enzyms MurG, einem potentiellen Target in der antibiotischen Chemotherapie.<sup>[147]</sup> WAGNER ET AL. verwendeten Derivate von UDP- $\alpha$ -D-Gal, die in 5-Position der Nucleobase eine Fluoreszenzmarkierung tragen, für die Entwicklung eines Assays zur Identifikation von Galactosyltransferase-inhibitoren.<sup>[148]</sup> Das in Abb. 122 gezeigte 5-Formylthienyl-substituierte UDP- $\alpha$ -D-Gal-Analogon **171** zeigt neben der Fluoreszenz auch selbst inhibitorische Eigenschaften gegenüber Galactosyltransferasen.<sup>[149]</sup>

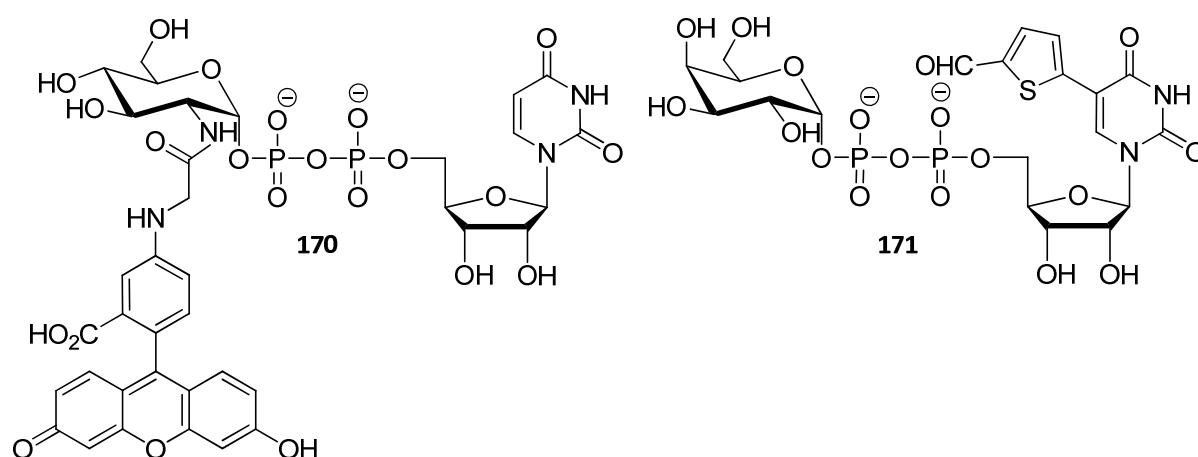


Abb. 122: Fluoreszenzmarkierte NDP-Zucker nach WALKER<sup>[147]</sup> und WAGNER<sup>[149]</sup>.

Die mit den in Abb. 122 gezeigten Verbindungen durchgeführten Ligandenaustauschassays beruhen auf Fluoreszenzquenching durch Wechselwirkungen des Fluorophors mit dem Enzym bei Bindung der markierten Verbindung im aktiven Zentrum. Wird die Fluoreszenzsonde von einer Verbindung mit höherer Bindungsaffinität verdrängt, ist dies durch einen Anstieg der Fluoreszenzintensität detektierbar (Abb. 123, S. 120). Weitere fluoreszenzbasierte Assays nutzen beispielsweise FRET-Effekte oder fluoreszenzmarkierte Antikörper.<sup>[145]</sup>

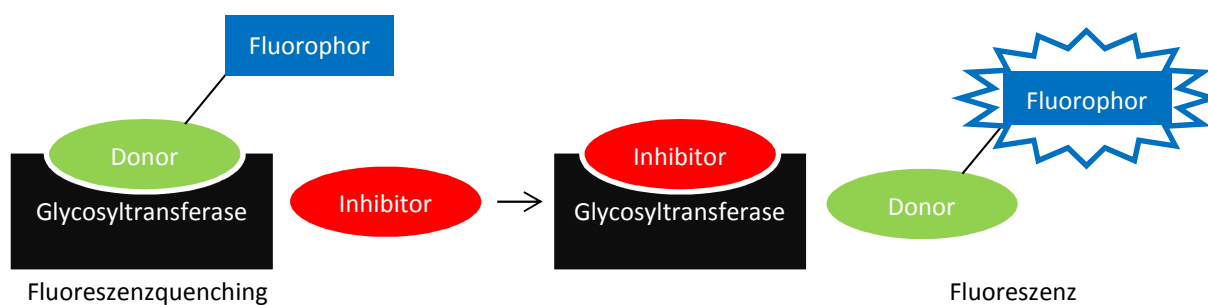


Abb. 123: Fluoreszenzbasierter Ligandenaustauschassay (verändert nach [145]).

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Synthese von Nucleosiddiphosphatzuckern mit einem bicyclischen Nucleosidanalogen als Fluorophor unter Verwendung des *cycloSal*-Konzepts, um dessen Eignung als Sonde für fluoreszenzbasierte Assays zu untersuchen.

#### 4.3.3. Synthesestrategie

In Abb. 124 (S. 121) ist die Strategie zur Synthese der NDP-Zucker **172** und **173** dargestellt. Als Schlüsselschritt sollte die Kupplung eines akzeptorsubstituierten *cycloSal*-Triesters mit einem Pyranosylphosphat nach dem in Abb. 121 (S. 118) gezeigten Mechanismus genutzt werden. Dabei sollten die *cycloSal*-Verbindungen **174** und **175** durch Kupplung eines geeigneten Phosphorchloridits (**92**, **176**) mit dem acetylgeschützten bicyclischen Ribonucleosid **177** erhalten werden. Die Synthese des 6-H-BCNA **106** sollte ausgehend von 5-Ioduridin **149** analog zu der in Abb. 67 (S. 75) gezeigten Route erfolgen. Zur Darstellung der acetylierten Pyranosylphosphate **178** und **179** sollte von D-Glucose **180** und D-Galactose **181** ausgegangen werden, die nach Peracetylierung (**182**, **183**) und selektiver Deacetylierung des anomeren Zentrums (**184**, **185**) in die Dibenzylphosphate **186** und **187** überführt werden sollten. Daran anschließend sollte die hydrogenolytische Debenzylierung zu **178** und **179** durchgeführt werden.

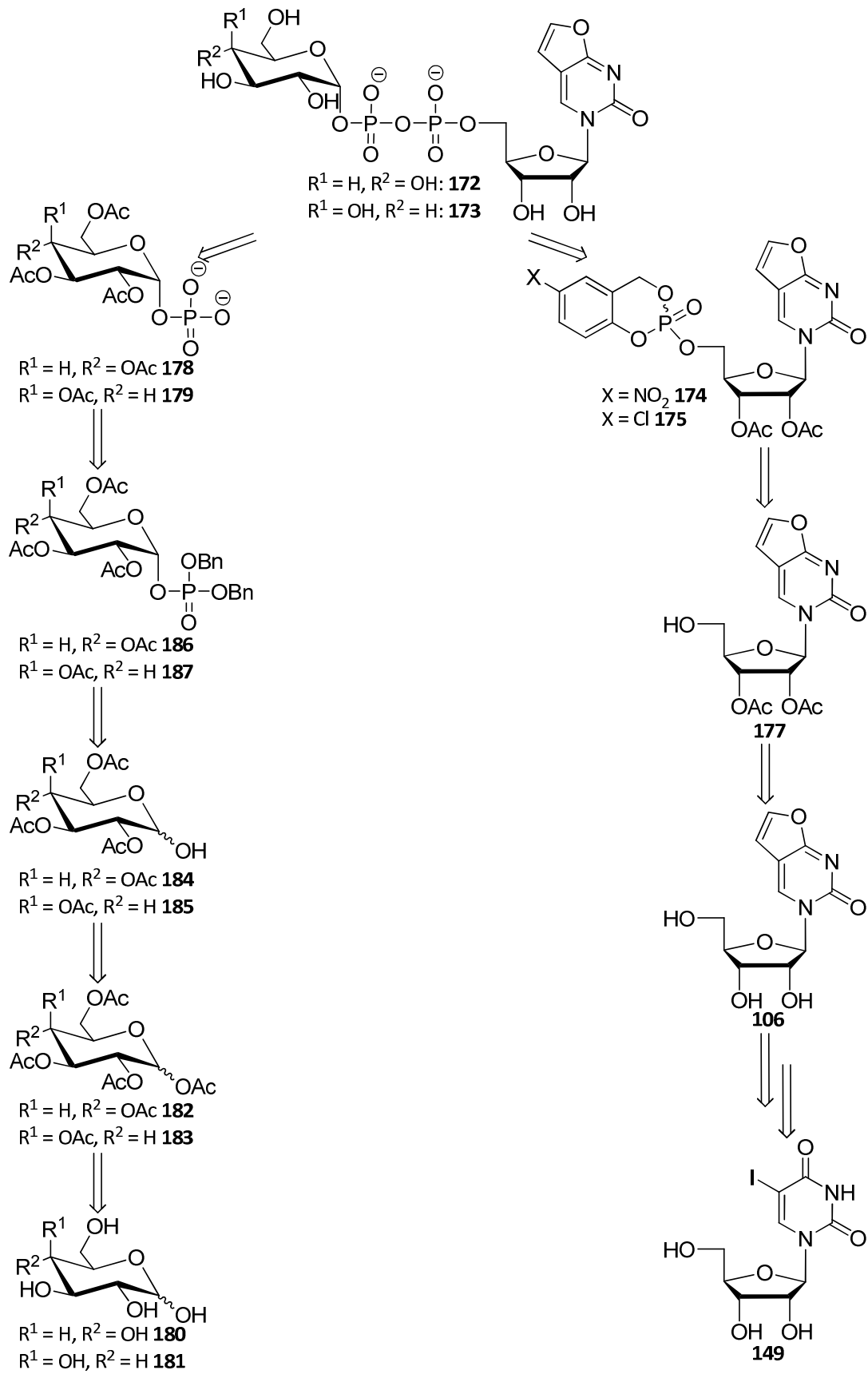


Abb. 124: Retrosyntheseschema zur Darstellung der fluoreszenzmarkierten NDP-Zucker **172** und **173**.

#### 4.3.4. Synthese der Pyranosylphosphate **178** und **179**

Zur Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-phosphat **178** und 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-1-phosphat **179** über die in Abb. 124 (S. 121) gezeigte Syntheseroute war zunächst die Synthese der acetylgeschützten Zucker mit freier Hydroxyfunktion am anomeren Zentrum nötig. Dazu wurde D-Galactose **181** durch Umsetzung mit Acetanhydrid peracetyliert<sup>[150]</sup>, während im Fall von D-Glucose **180** die peracetylierte Verbindung bereits vorhanden war.

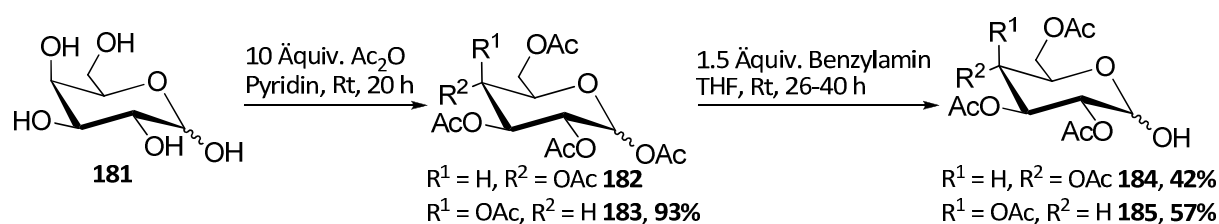


Abb. 125: Darstellung der acetylgeschützten Pyranosen **184** und **185**.

Die selektive Deblockierung der anomeren Hydroxyfunktion von **182** und **183** erfolgte durch Umsetzung mit 1.5 Äquiv. Benzylamin.<sup>[151]</sup> Dabei wurde die Reaktion nicht bis zur vollständigen Umsetzung des Edukts durchgeführt, sondern so rechtzeitig abgebrochen, dass Nebenreaktionen an den weiteren Acetylgruppen minimiert wurden.<sup>[152]</sup> Die Tetraacetylpyranosen **184** und **185** konnten auf diesem Weg mit Ausbeuten von 42% und 57% erhalten werden. Das Verhältnis von  $\alpha$ - zu  $\beta$ -Anomer wurde aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestimmt und betrug in beiden Fällen 1:0.3.

Die Phosphoramiditmethode zur Synthese von Pyranosyl-1-phosphaten wurde von WONG ET AL. beschrieben und beruht auf der Kupplung eines Dibenzylphosphoramidits mit der anomeren Hydroxyfunktion einer geschützten Pyranose<sup>[153]</sup> und anschließender Oxidation zum Phosphat. Durch hydrogenolytische Debenzylierung werden die freien Phosphate erhalten.<sup>[154]</sup> Die Verbindungen **184** und **185** wurden mit Dibenzyl-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit in einer DCI-vermittelten Kupplungsreaktion umgesetzt. Die Oxidation erfolgte mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA).<sup>[99]</sup> Die aus den  $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektren der Rohprodukte bestimmten Verhältnisse von  $\alpha$ - zu  $\beta$ -Anomer betragen 1:0.2 (für **186**) und 1:0.4 (für **187**). Auf der Stufe der Dibenzylphosphate konnten die Anomere säulenchromatographisch teilweise getrennt werden, sodass die reinen  $\alpha$ -Anomere mit Ausbeuten von 39%

und 49% erhalten wurden (Abb. 126). Weiteres Produkt lag als Anomerengemisch vor und wurde nicht weiter verwendet.

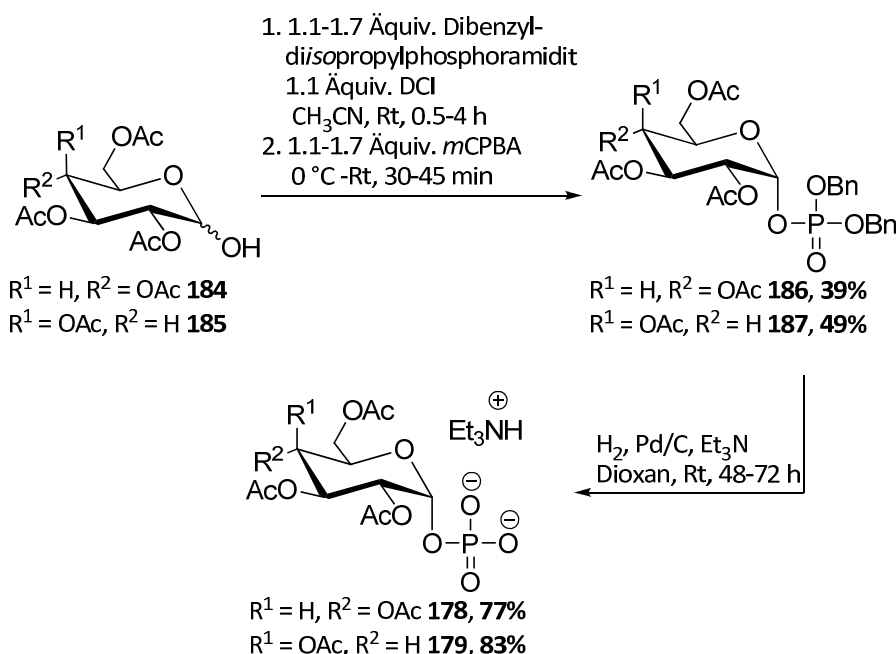


Abb. 126: Synthese der Pyranosyl-1-phosphate **178** und **179** nach der Phosphoramiditmethode.

Die hydrogenolytische Debenzylierung unter Wasserstoffatmosphäre in Anwesenheit von Palladium auf Aktivkohle (5%, 55% Wasser) und Triethylamin lieferte die Pyranosyl-1-phosphate **178** und **179** mit Ausbeuten von 77% und 83% als Triethylammoniumsalze.

#### 4.3.5 Synthese des acetylgeschützten bicyclischen Ribonucleosids **177**

Die Synthese von 5-Ioduridin **149** wurde bereits auf S. 84 beschrieben. Davon ausgehend wurde die Sonogashira-Kupplung mit Trimethylsilylacetylen unter den in Abb. 127 (S. 124) beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Das Kupplungsprodukt **188** wurde nach Säulenchromatographie leicht verunreinigt erhalten und so für die Abspaltung der Silylschutzgruppe eingesetzt. Über zwei Stufen konnte Verbindung **189** mit einer Ausbeute von 64% erhalten werden.

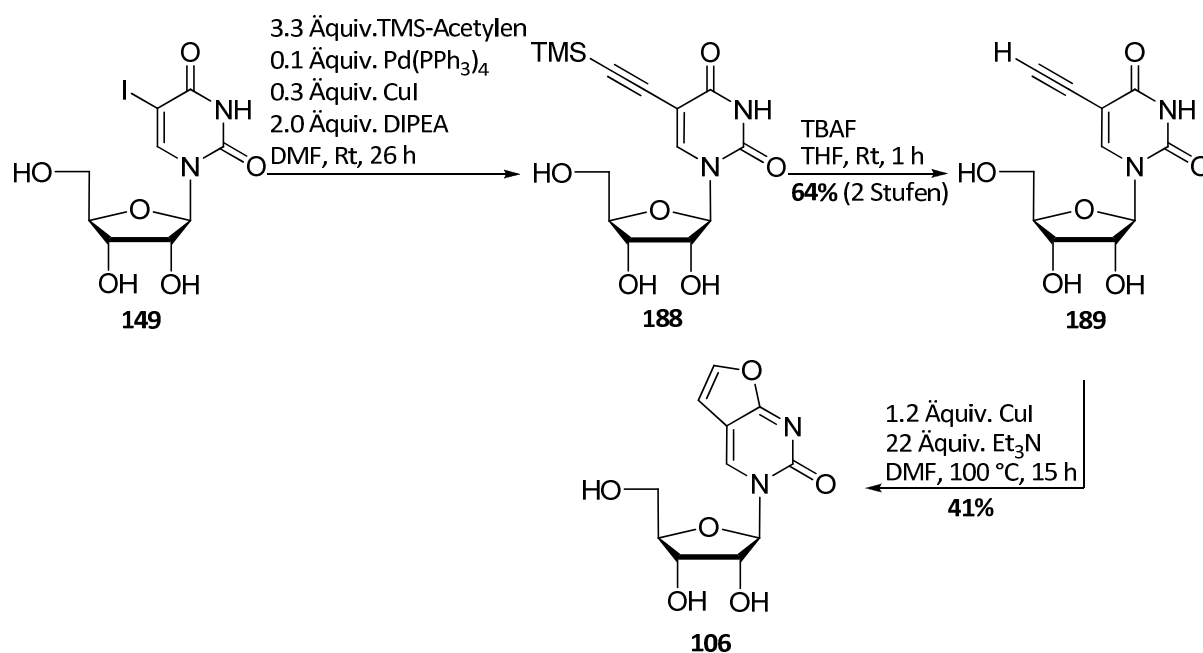


Abb. 127: Synthese des bicyclischen Ribonucleosids **106** ausgehend von 5-Ioduridin **149**.

Obwohl die dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung die Bildung von **106** als Hauptprodukt zeigte, lag die Ausbeute der isolierten Verbindung nach der Ringschlussreaktion bei 41%. Dies ist im Wesentlichen auf Probleme bei der chromatographischen Reinigung zurückzuführen, da sich das Produkt aufgrund der hohen Polarität durch die drei freien Hydroxyfunktionen über viele Fraktionen verteilte, was die Identifikation produkthaltiger Fraktionen erschwerte.

Zur Darstellung des in 2'- und 3'-Position acetylgeschützten Nucleosids **177** wurde zunächst die 5'-Hydroxyfunktion als Silylether geschützt. Dabei konnte dünnschichtchromatographisch stets die Bildung der vermutlich zweifach silylierten Verbindung beobachtet werden, was sich negativ auf die Ausbeute auswirkte. Anschließend wurden in einer *one-pot*-Reaktion die 2'- und 3'-Hydroxyfunktion durch Umsetzung mit Acetanhydrid verestert, um Verbindung **190** zu erhalten. Die Spaltung des Silylethers erfolgte unter Verwendung von Triethylamintrihydrofluorid (Abb. 128, S. 125).<sup>[98]</sup> Um einen ersten Testansatz zur Synthese eines 5-Nitro-substituierten *cycloSal*-Triesters des BCNA durchführen zu können, bevor die Synthese von **177** abgeschlossen war, wurde 6-H-2'-dBCNA **105**, das aus eigenen Vorarbeiten bereits vorhanden war, unter den in Abb. 128 (S. 125) angegebenen Bedingungen an der 3'-Hydroxyfunktion mit einer Acetylschutzgruppe versehen. Die dünnschichtchromato-



graphische Verfolgung der Desilylierung von **191** zeigte die selektive Bildung des Produkts **192**. Aufgrund eines Fehlers bei der chromatographischen Reinigung konnten allerdings nur 16% des Produkts isoliert werden. Die tatsächliche Ausbeute lag deutlich höher. Dennoch stand Verbindung **192** in ausreichender Menge zur Verfügung, um den Testansatz durchführen zu können.

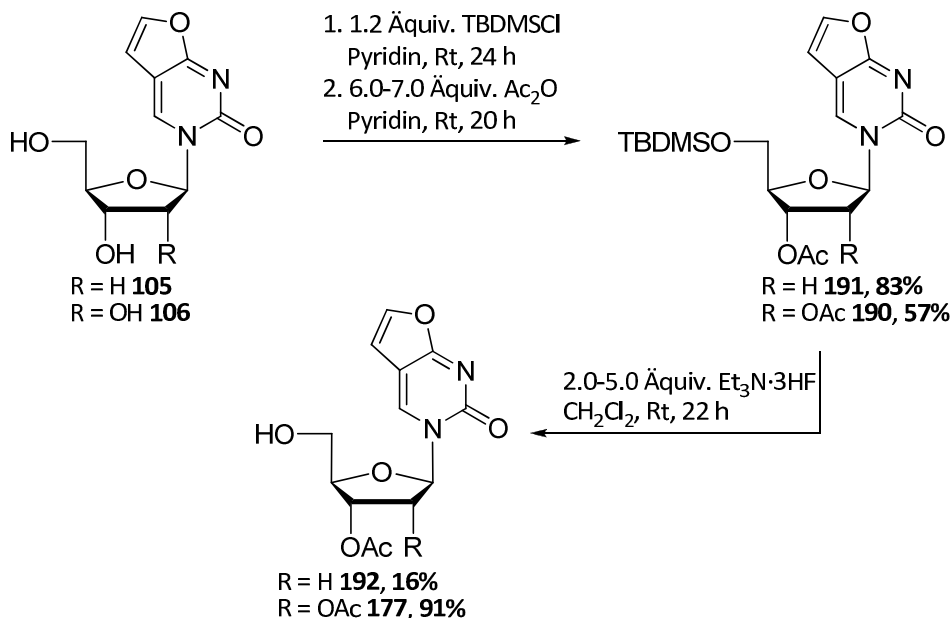


Abb. 128: Synthese der acetylgeschützten bicyclischen Nucleoside **177** und **192**.

#### 4.3.6. Synthese der *cycloSal*-Triester und der NDP-Zucker

Um zu überprüfen, ob die glycosidische Bindung eines BCNA unter den sauren Bedingungen der Oxidation mit Oxone® bei der Synthese eines 5-Nitro-*cycloSal*-Triesters stabil ist, wurde parallel zur Synthese des Ribonucleosids **177** ein Testansatz mit dem in 3'-Position acetylgeschützten 6-H-2'-dBCNA **192** durchgeführt. Dazu war zunächst die Darstellung des 5-Nitrosaligenylchlorphosphits **176** notwendig. Dieses wurde durch Umsetzung von 5-Nitrosalicylalkohol **193** mit Phosphor(III)-chlorid **45** als leicht verunreinigtes Rohprodukt erhalten. Die Synthese des Salicylalkohols **193** erfolgte durch Reduktion von 5-Nitrosalicylaldehyd **194** mit Natriumborhydrid (Abb. 129, S. 126).

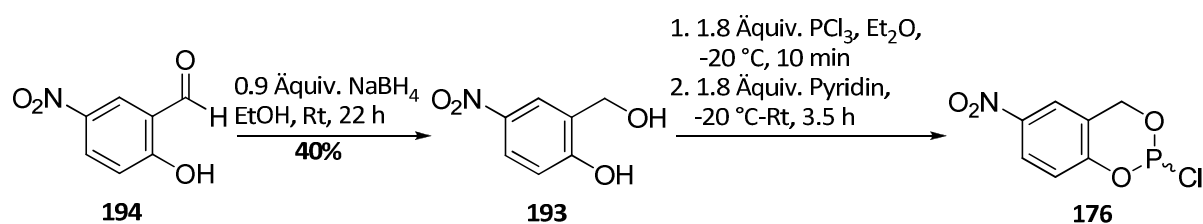


Abb. 129: Synthese von 5-Nitrosaligenylchlorophosphit **176**.

Das so erhaltene Chlorphosphit **176** wurde mit **192** unter den in Abb. 130 angegebenen Bedingungen umgesetzt. Nach vollständiger Reaktion des Edukts wurde die Oxidation mit Oxone<sup>®</sup> durchgeführt.

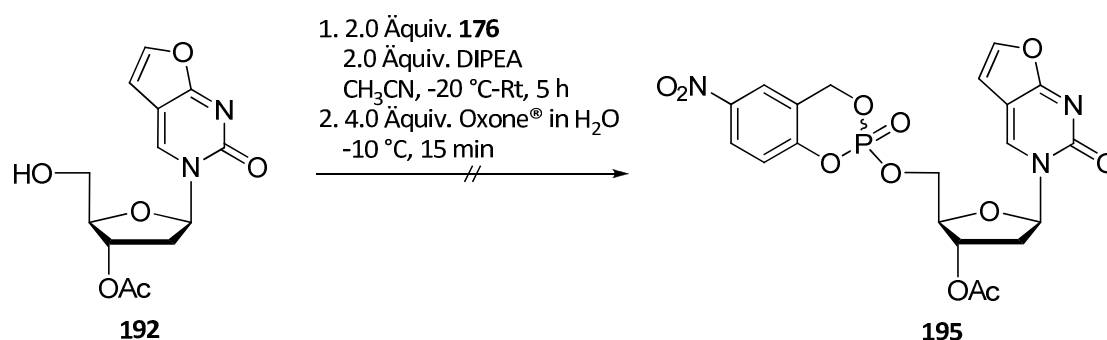


Abb. 130: Versuch der Synthese des 5-Nitro-*cycloSal*-Triesters **195**.

Nach Aufarbeitung der Reaktion konnte allerdings lediglich die Bildung eines Gemisches verschiedener unbekannter Verbindungen festgestellt werden, aus dem das Produkt **195** nicht isoliert werden konnte. Möglicherweise ist diese Zersetzung auf eine Spaltung der glycosidischen Bindung unter den sauren Bedingungen der Oxidation zurückzuführen. Die Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid ist für die Synthese von 5-Nitro-*cycloSal*-Triestern nicht geeignet, da dies zu Produktgemischen und dementsprechend niedrigen Ausbeuten führt.<sup>[98]</sup> Als Alternative zu 5-Nitro-substituierten *cycloSal*-Triestern können auch die entsprechenden 5-Chlor-substituierten Verbindungen zur Synthese von NDP-Zuckern genutzt werden. Zwar sind dafür längere Reaktionszeiten nötig und die Ausbeuten sind geringer, allerdings können die benötigten *cycloSal*-Verbindungen durch Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid erhalten werden. Um diese Alternative zu erproben, wurde das acetylgeschützte Ribonucleosid **177** mit 5-Chlorsaligenylchlorophosphit **92** umgesetzt, dessen Synthese bereits auf S. 48 beschrieben wurde.

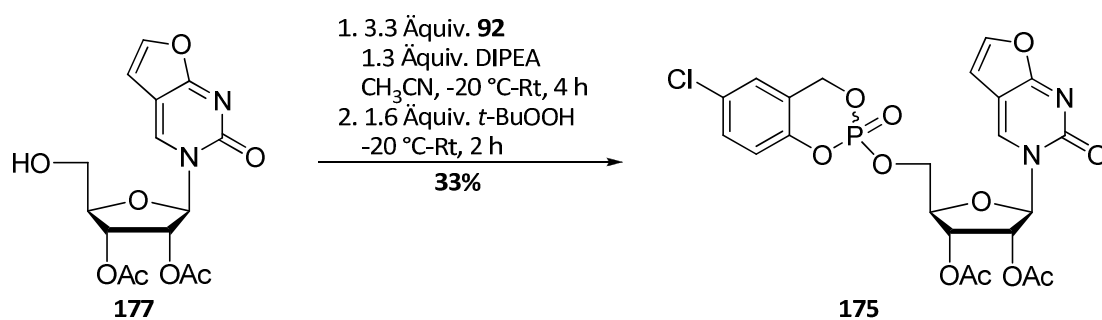


Abb. 131: Synthese des 5-Chlor-*cycloSal*-Triesters **175**.

Nach der erfolgreichen Synthese des 5-Chlor-*cycloSal*-Triesters **175** wurde nun die Synthese eines NDP-Zuckers versucht. Dazu wurde ein von WOLF beschriebenes Syntheseprotokoll verwendet, bei dem die Reaktionspartner vor der Reaktion akribisch getrocknet werden und die *cycloSal*-Verbindung gelöst in DMF zu einer Lösung des Pyranosylphosphats als Triethylammoniumsalz getropft wird. Die Abspaltung der Acetylschutzgruppen erfolgt dabei unter Verwendung eines Gemischs aus Methanol, Wasser und Triethylamin (7:3:1).<sup>[56]</sup>

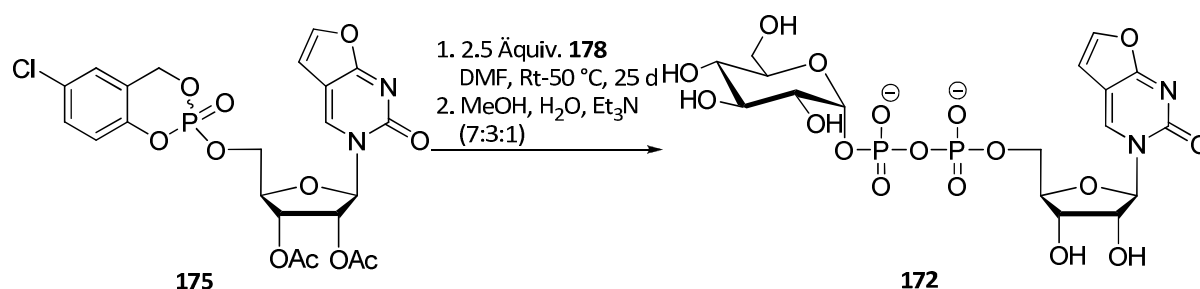


Abb. 132: Synthese des NDP-Zuckers **172**.

Die Reaktionslösung wurde zunächst bei Raumtemperatur gerührt und der Verlauf der Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Da sich nach 21 Tagen noch immer eine signifikante Menge des Edukts in der Lösung befand, wurde die Reaktion für weitere 4 Tage bei 50 °C durchgeführt, bis das Edukt vollständig umgesetzt war. Die Reaktion wurde aufgearbeitet und die Abspaltung der Acetylschutzgruppen durchgeführt. Das nach der Abspaltung aufgenommene <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum zeigt die Bildung einer geringen Menge des Produkts **172** (-11.29 ppm, -12.86 ppm) sowie das deacetylierte nicht umgesetzte α-D-Glucose-1-phosphat **196** (1.22 ppm). Das Signal bei 10.72 ppm stammt vermutlich von dem 1,2-Cyclophosphat **197**, das unter den basischen Abspaltbedingungen durch nucleophilen Angriff der Hydroxyfunktion des Zuckers am β-Phosphat entstehen kann (Abb. 133, S. 128).<sup>[60,155]</sup> Das Signal des dabei ebenfalls entstehenden Nucleosidmono-

phosphats fällt wahrscheinlich mit dem Signal des Zuckerphosphats **196** zu dem breiten Singulett bei 1.22 ppm zusammen.

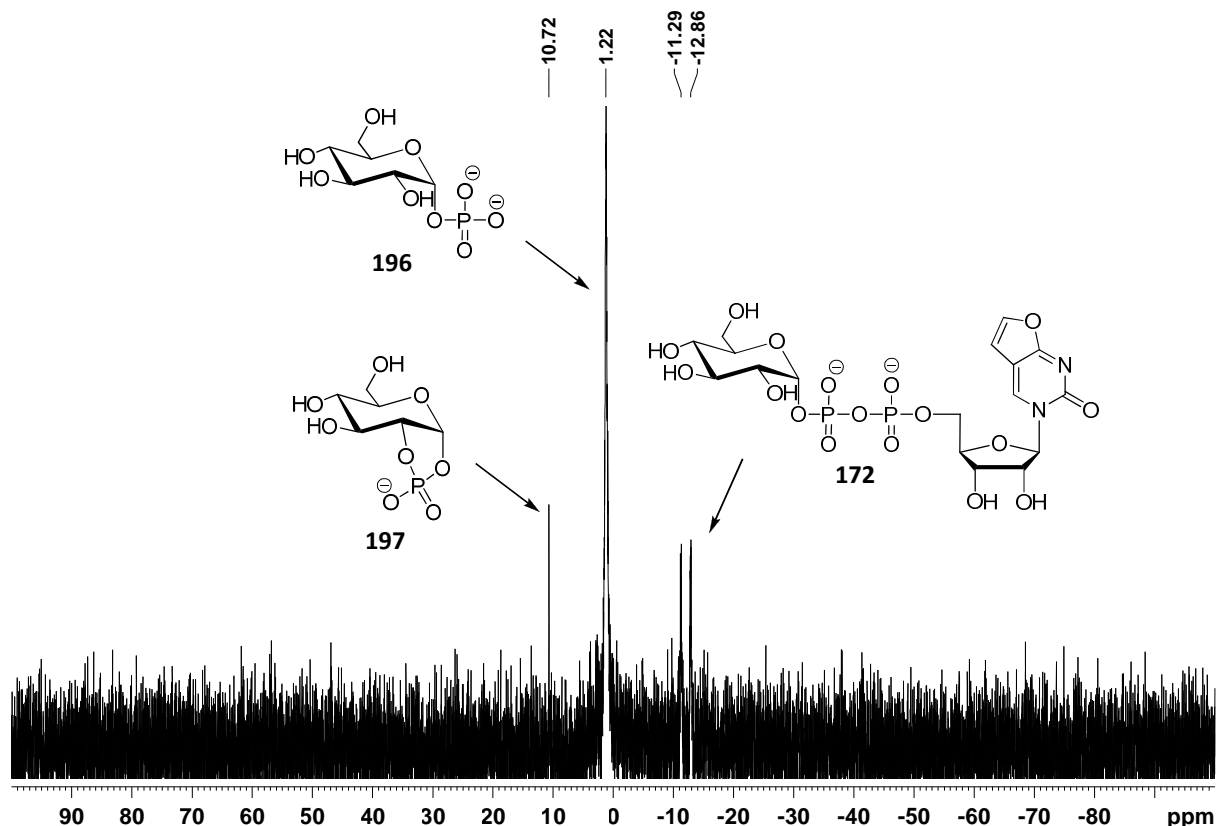


Abb. 133:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Rohprodukts **172** nach Entschützung ( $\text{D}_2\text{O}$ , 162 MHz,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -entkoppelt).

Nach der säulenchromatographischen Reinigung an RP-18 Kieselgel konnte allerdings keine produktthaltige Fraktion identifiziert werden. Dabei ist anzumerken, dass die Reaktion als Testansatz mit nur 11 mg des Triesters **175** durchgeführt wurde. Daher war vermutlich die Konzentration des Produkts im Eluenten so gering, dass eine dünnschichtchromatographische Detektion nicht möglich war. Dennoch konnte anhand dieser Reaktion gezeigt werden, dass durch Verwendung des 5-Chlor-*cycloSal*-Triesters **175** der NDP-Zucker **172** erhalten werden kann. Allerdings scheint die Methode aufgrund der langen Reaktionszeit und der Bildung des Nebenprodukts **197** für eine breitere Anwendung nicht geeignet, sodass weiter nach Alternativen gesucht wurde.

Ein mildes Oxidationsmittel, das bereits erfolgreich zur Oxidation von *cycloSal*-Phosphittriestern verwendet wurde, ist ein Gemisch aus Iod, Tetrahydrofuran und Pyridin, das Spuren von Wasser enthält und bei der automatisierten Festphasensynthese von

Oligonucleotiden eingesetzt wird.<sup>[98]</sup> Da keine experimentellen Details für diese Reaktion beschrieben sind, wurde zunächst ein Testansatz durchgeführt, bei dem 2',3'-Di-O-acetyluridin **198** mit 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **176** umgesetzt wurde. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe einer Iodlösung (0.1 M in THF/Wasser/Pyridin 77:2:21 v/v/v), sodass 2.5 Äquiv. Iod vorlagen.

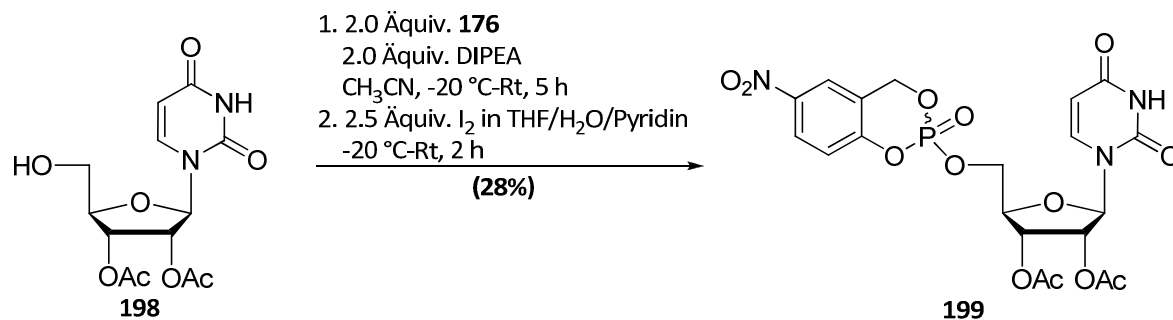


Abb. 134: Synthese des 5-Nitro-*cycloSal*-Triesters **199** durch Oxidation mit Iodlösung.

Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionslösung in Wasser gegeben, um überschüssiges Chlorphosphit zu hydrolysieren. Die wässrige Phase wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Zur Entfernung iodhaltiger Rückstände wurde die organische Phase zusätzlich mit Natriumdisulfitlösung gewaschen. Auf diese Weise wurde die *cycloSal*-Verbindung **199** mit einer Ausbeute von ca. 28% erhalten. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum wies noch leichte nicht identifizierbare Verunreinigungen auf, während das in Abb. 135 gezeigte <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum das Vorliegen von **199** als einzige phosphorhaltige Verbindung zeigte. Die geringe Ausbeute ist vermutlich auf eine teilweise Zersetzung des sehr hydrolyseempfindlichen *cycloSal*-Triesters **199** bei der wässrigen Aufarbeitung zurückzuführen.

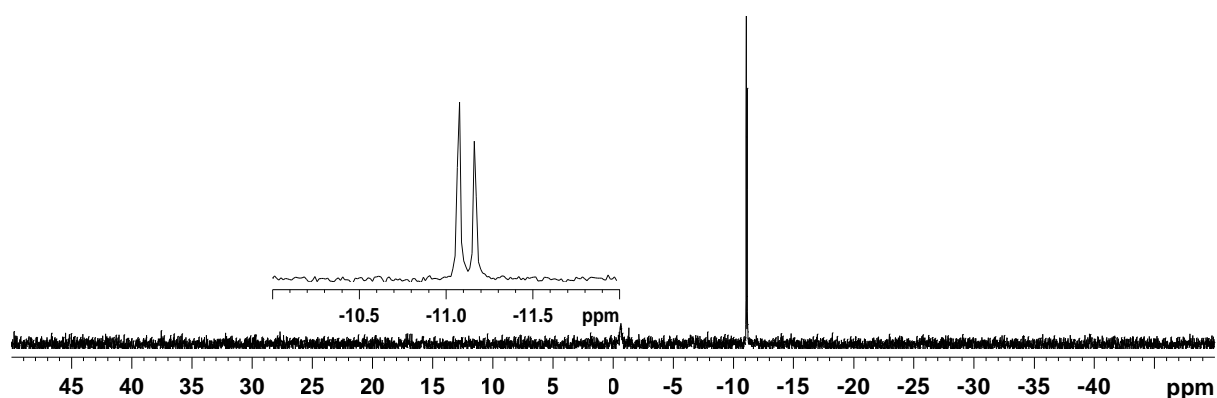


Abb. 135: <sup>31</sup>P-NMR des *cycloSal*-Triesters **199** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 162 MHz, <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-entkoppelt).

Nach diesem Ergebnis wurde unter den gleichen Bedingungen die Synthese des 5-Nitro-*cycloSal*-Triesters des acetylgeschützten BCNA **177** erprobt. Dafür wurde **177** unter den zuvor getesteten Bedingungen mit 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **176** umgesetzt (Abb. 136).

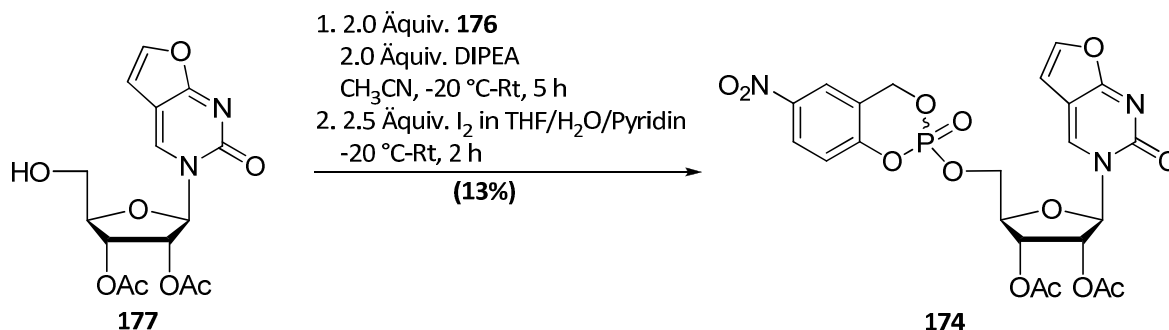


Abb. 136: Synthese des 5-Nitro-*cycloSal*-Triesters **174**.

Probleme bei der Reaktion traten im Wesentlichen bei der Reinigung auf. Bei den Extraktionsschritten trennten sich die Phasen nur langsam, sodass sich das hydrolyseempfindliche Produkt anteilig zersetzte. Nach der ersten Reinigung lag das Produkt allerdings noch stark verunreinigt vor, sodass es erneut in Ethylacetat aufgenommen und die organische Phase mit Wasser gewaschen wurde. Eine vollständige Reinigung des Produkts gelang auf diesem Weg dennoch nicht. Das in Abb. 137 (S. 131) gezeigte  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum zeigt neben den Produktsignalen bei  $-11.11\text{ ppm}$  und  $-11.27\text{ ppm}$  Signale unbekannter Verunreinigungen bei  $17.02\text{ ppm}$  und  $16.36\text{ ppm}$ . Die chemischen Verschiebungen der Verunreinigungen liegen in einem Bereich, der typisch ist für H-Phosphonate. Ein solches H-Phosphonat könnte durch Hydrolyse des vor der Oxidation gebildeten Phosphittriesters entstanden sein.<sup>[156]</sup> Dies ist ein Hinweis darauf, dass möglicherweise die Oxidation bei der Aufarbeitung des Ansatzes noch nicht vollständig abgelaufen war. Zusätzlich konnte das Produkt aufgrund der Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung lediglich mit einer Ausbeute von ca. 13% erhalten werden.

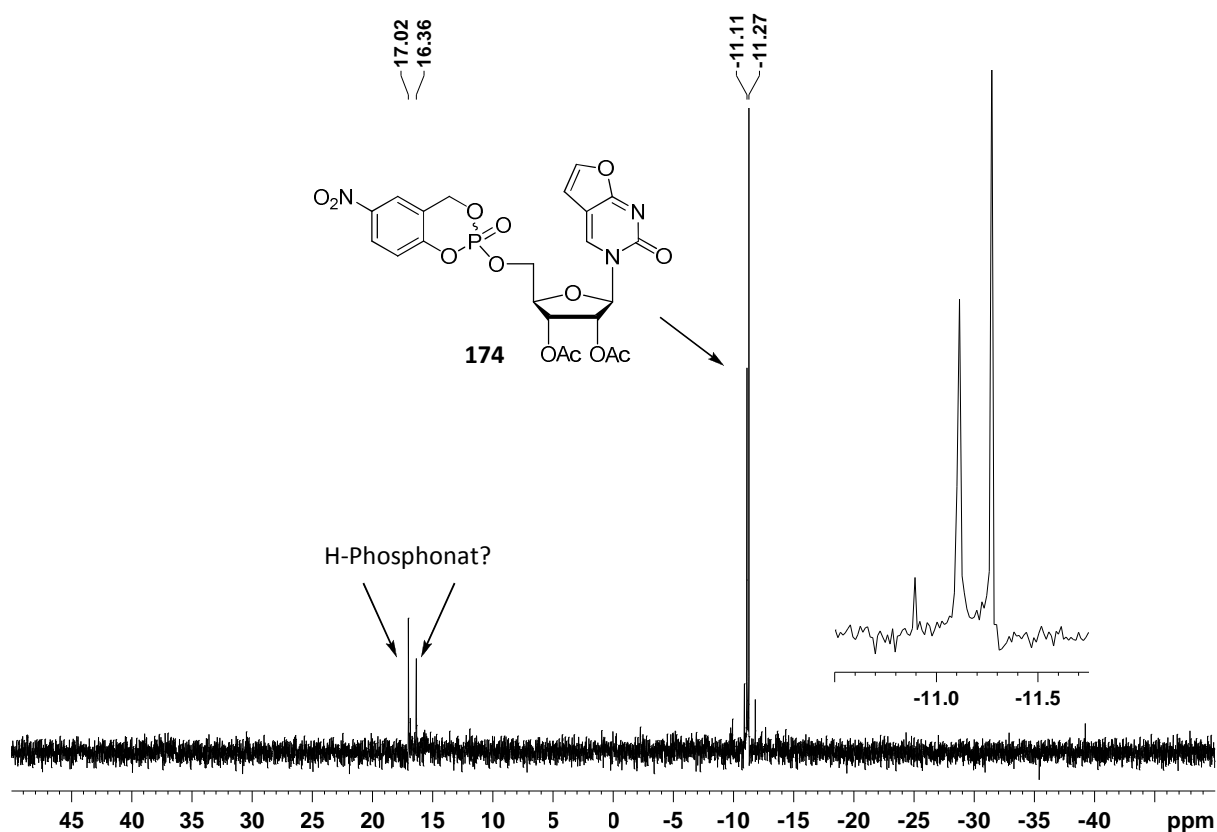


Abb. 137:  $^{31}\text{P}$ -NMR des *cycloSal*-Triesters **174** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 162 MHz,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -entkoppelt).

Trotz der geringen Ausbeute und der Verunreinigung wurde Verbindung **174** für eine Testreaktion zur Synthese eines NDP-Zuckers eingesetzt. Dazu wurde **174** nach dem etablierten Syntheseprotokoll mit dem acetylgeschützten  $\alpha$ -D-Galactose-1-phosphat **179** umgesetzt (Abb. 138).<sup>[56]</sup>

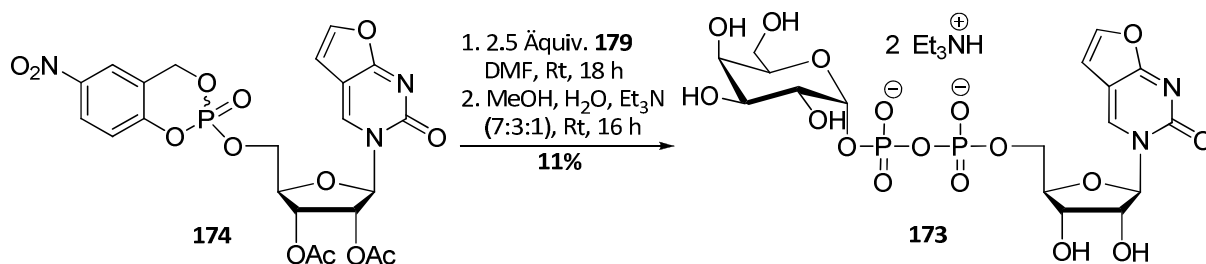


Abb. 138: Synthese der NDP-Pyranose **173**.

Nach der säulenchromatographischen Reinigung an RP-18-Kieselgel wurde das Produkt **173** mit einer Ausbeute von 11% erhalten. Dabei ist darauf hinzuweisen, dass sich diese Ausbeute auf den verunreinigten *cycloSal*Triester **174** bezieht. Des Weiteren erschwerte die geringe Ansatzgröße (24 mg Edukt **174**) die Detektion produktthaltiger Fraktionen bei der

Chromatographie, sodass möglicherweise weiteres Produkt vorhanden war. Zusätzlich wurden weitere Fraktionen isoliert, die mittels UV-Licht detektierbar waren. Aufgrund der geringen Substanzmengen konnten allerdings keine aussagekräftigen NMR-Daten dieser Verbindungen erhalten werden. Wie die in Abb. 139 und Abb. 140 (S. 133) gezeigten  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren zeigen, konnte der NDP-Zucker **173** mit hoher Reinheit erhalten werden.

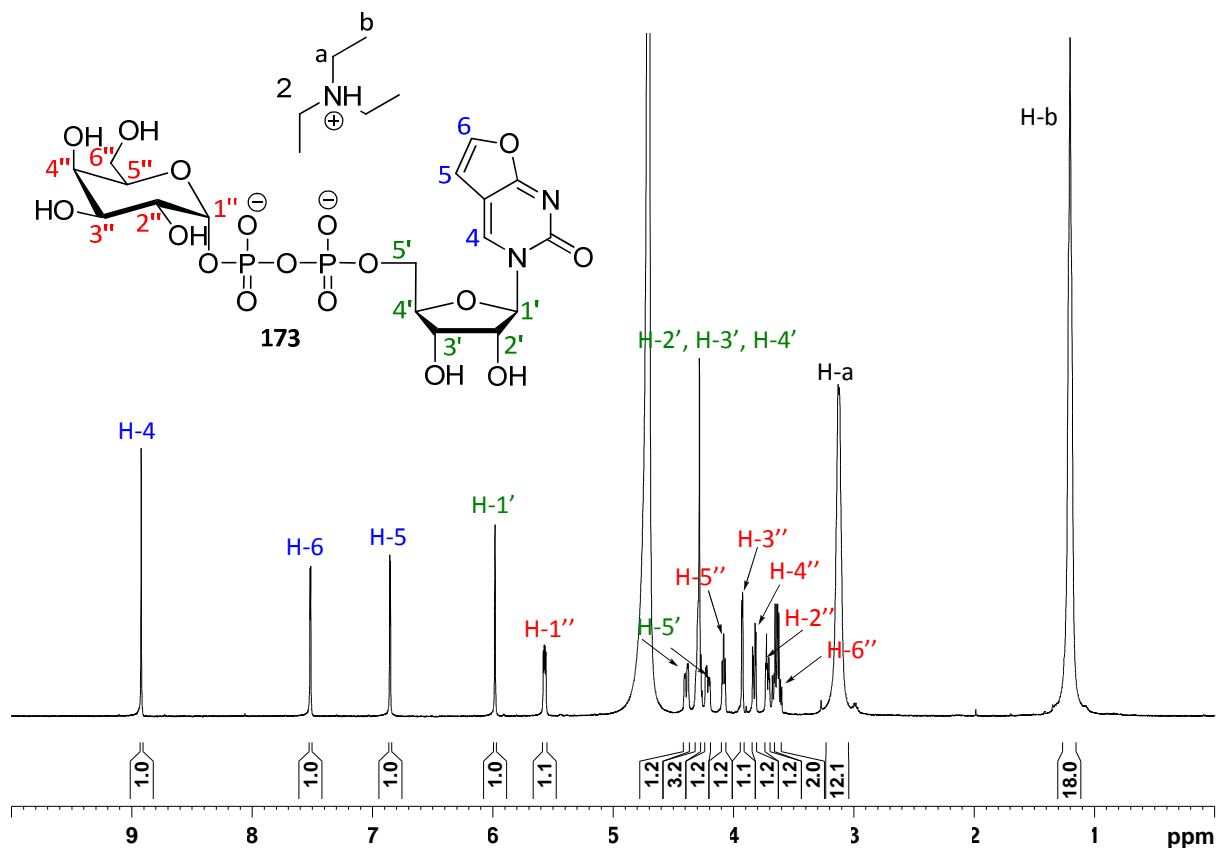


Abb. 139:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des NDP-Zuckers **173** ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz).

Eine Wiederholung der Syntheseroute und eine Optimierung der einzelnen Reaktionsschritte war im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Aufgrund der niedrigen Ausbeuten in den letzten beiden Syntheseschritten konnten von der Zielverbindung **173** nur 3.8 mg erhalten werden. Daher konnten Untersuchungen zur Eignung der Verbindung als Fluoreszenzsonde für bioanalytische Untersuchungen, wie z. B. Ligandenaustauschassays zur Identifikation potentieller Glycosyltransferaseinhibitoren, nicht durchgeführt werden.



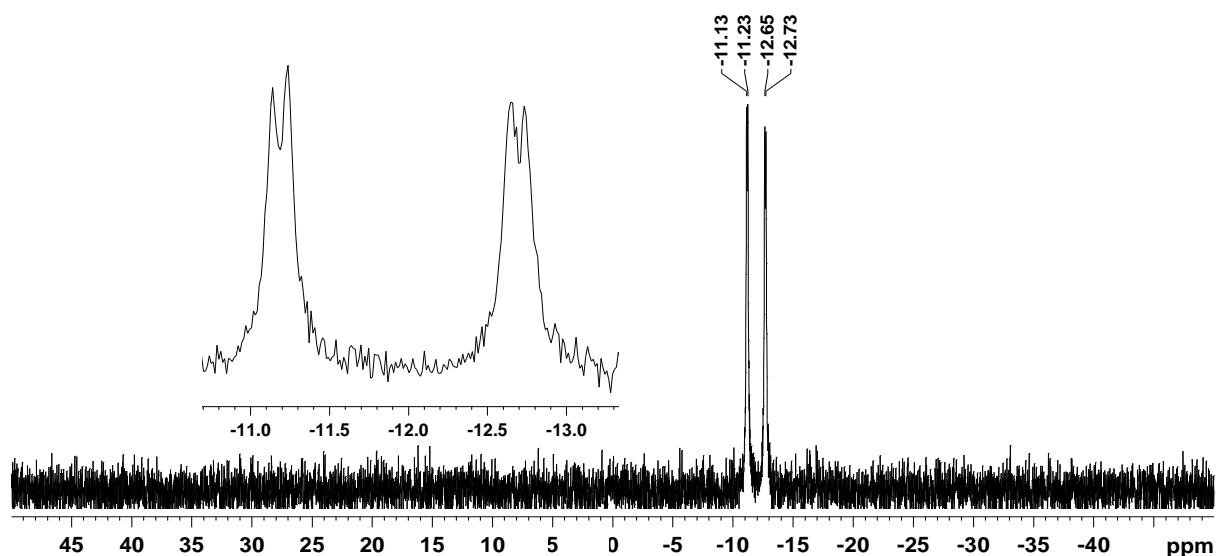


Abb. 140:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des NDP-Zuckers **173** ( $\text{D}_2\text{O}$ , 202 MHz,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -entkoppelt).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es nicht möglich war, einen 5-Nitro-*cycloSal*-Triester eines BCNA über das Standardprotokoll durch Oxidation mit Oxone<sup>®</sup> zu synthetisieren. Durch Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid konnte der 5-Chlor-substituierte *cycloSal*-Triester **175** erhalten werden. Für dessen vollständige Umsetzung mit acetylgeschütztem  $\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat **178** war allerdings eine lange Reaktionszeit und ein Erwärmen der Reaktionslösung erforderlich. Die Bildung des Produkts **172** konnte zwar aufgrund der entsprechenden Signale im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum angenommen werden, eine Isolierung durch chromatographische Reinigung des Rohgemisches gelang allerdings nicht. Durch Verwendung von Iod (0.1 M in Pyridin/THF) als Oxidationsmittel, konnte der 5-Nitro-*cycloSal*-Triester **174** erhalten werden. Dieser konnte mit acetylgeschütztem  $\alpha$ -D-Galactose-1-phosphat **179** erfolgreich zur Zielverbindung **173** umgesetzt werden. Insbesondere für die letzten beiden Syntheseschritte besteht erheblicher Optimierungsbedarf. Die Oxidation des Phosphittriesters mit Iod sollte mit unterschiedlichen Mengen des Oxidationsmittels evaluiert und die Aufarbeitung nach der Reaktion so modifiziert werden, dass eine Zersetzung des Produkts weitgehend vermieden werden kann. Bei Durchführung der Synthese der Zielverbindung im größeren Maßstab sollte es möglich sein, die chromatographische Reinigung zu verbessern und mögliche Nebenprodukte, die die Ausbeute mindern, zu identifizieren.

#### 4.4 Entwicklung einer HPLC-MS basierten Methode zur Untersuchung der Zellaufnahme von Nucleosidmono- und -diphosphatprodrugs

Analytische Methoden, die auf der Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Detektion mittels Massenspektrometrie (MS) beruhen, haben in den letzten Jahrzehnten stetig an Bedeutung gewonnen und gehören heute zu den Standardverfahren in der Analytik von Wirkstoffmetaboliten. Im Gegensatz zu Methoden, bei denen UV- oder Fluoreszenzdetektion verwendet werden, kann auf ein chemisches *Labeling* der Verbindungen verzichtet werden. Zusätzlich ist eine qualitative Analyse häufig ohne die aufwändige Synthese von Referenzverbindungen möglich.<sup>[77]</sup>

##### 4.4.1. HPLC-MS basierte Methoden zur Analytik von Nucleotiden

Für die Untersuchung der intrazellulären Konzentration therapeutisch relevanter Nucleotidanaloga wurde eine Reihe unterschiedlicher Verfahren entwickelt. Diese lassen sich in direkte und indirekte Methoden unterteilen (Abb. 141).<sup>[79]</sup>

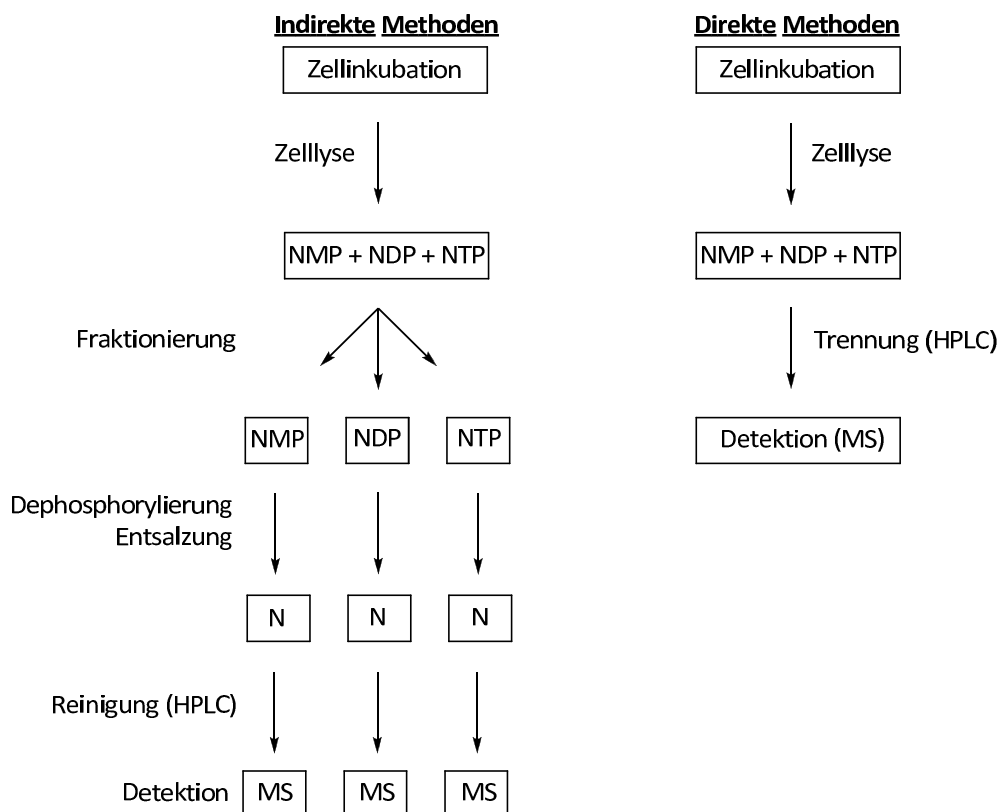


Abb. 141: Vergleich direkter und indirekter Methoden zur Analyse von Nucleotidanaloga (verändert nach [79]).

Indirekte Methoden basieren auf der Fraktionierung der polaren Analyte beispielsweise durch Festphasenextraktion und anschließende enzymatische Dephosphorylierung. Nach einem Entsalzungsschritt können die einzelnen nucleosidhaltigen Fraktionen HPL-chromatographisch gereinigt und massenspektrometrisch quantifiziert werden. Aufgrund der intensiven Probenvorbereitung sind indirekte Methoden nicht nur zeitaufwändig sondern auch anfällig für systematische Fehler. Zusätzlich ist durch die separate Quantifizierung der einzelnen Analyten viel Messzeit nötig.

Bei direkten Methoden erfolgt die Trennung und Reinigung der Analyten durch Chromatographie des Zellysats in der Regel ohne zusätzliche Aufarbeitung der Proben. Durch dieses Vorgehen werden sowohl Fehlerquellen, als auch Messzeit minimiert. Dabei stellt die chromatographische Trennung der polaren Verbindungen unter für die Massenspektrometrie geeigneten Bedingungen die größte Herausforderung dar. Bei dem überwiegenden Teil der in der Literatur beschriebenen direkten Methoden wird die Trennung mittels RP-HPLC durchgeführt. Allerdings sind hierzu starke Ionenpaarreagenzien wie Tetrabutylammoniumsalze oder Dimethylhexylamin notwendig, die häufig zu Ionensuppression und Kontamination der Ionenquelle bei der Massenspektrometrie führen.<sup>[79]</sup> Weitere Methoden basieren auf einer Trennung durch Anionenaustauschchromatographie<sup>[157]</sup> und der Verwendung von Graphitsäulen<sup>[158]</sup>. Für die Anwendung der *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) zur Bestimmung intrazellulärer Konzentrationen von Nucleotidanaloga ist bislang nur ein Beispiel in der Literatur beschrieben.<sup>[159]</sup>

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Entwicklung einer direkten HPLC-MS basierten Methode zur Bestimmung der intrazellulären Freisetzung von Nucleosidphosphaten aus Nucleosidmono- und -diphosphatprodrugs. Die Entwicklung der Methoden und die massenspektrometrischen Messungen wurden in Kooperation mit DR. MARIA TRUSCH aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

#### 4.4.2. Massenspektrometer und Ionisationsmethode

Für die massenspektrometrische Analyse von Biomolekülen wird bevorzugt die Elektrospray-Ionisation (ESI) verwendet. Da es sich dabei um ein mildes Ionisationsverfahren handelt, findet Fragmentierung nur in untergeordnetem Maße statt, sodass hauptsächlich Quasimolekülionen ( $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$ ) oder Addukte mit Bestandteilen des Eluenten ( $[M+Na]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ) gebildet werden. Aus diesem Grund eignet sich die ESI-MS beispielsweise zur Bestimmung von Molekülmassen und zur Sequenzierung von Proteinen und Oligonucleotiden. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Kompatibilität von ESI-MS mit flüssigkeitschromatographischen Trennmethode wie der HPLC.<sup>[160,161]</sup> Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde ein ESI-Q-TOF Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonik verwendet, das aus der ESI-Ionenquelle, einem Quadrupol- und einem *time-of-flight*- (TOF-) Massenanalysator aufgebaut ist. Durch Kopplung mit einem HPLC-System bestand die Möglichkeit, HPLC-MS und HPLC-MS/MS Messungen durchzuführen.

#### 4.4.3. Entwicklung der HPLC-Methoden

Als Testverbindungen wurden 3-Me-*cycloSal*-d4UMP **85** und C<sub>6</sub>-d4UDP **52** verwendet, um die beiden in dieser Arbeit verwendeten Prodrugsysteme untersuchen zu können. Als Referenzverbindungen fungierten d4UMP **49** und d4UDP **59**. Die Synthesen der Test- und Referenzsubstanzen wurde in Kapitel 4.1. (S. 26) ausführlich beschrieben.

Aufgrund der bereits erwähnten Nachteile von Ionenpaarreagenzien war eine direkte Übertragung der HPLC-Methoden, die für die in den vorigen Kapiteln dargestellten Untersuchungen verwendet wurden, nicht möglich. Da eine gewisse Erfahrung mit der Verwendung von HILIC-Säulen für die HPLC bestand und eine solche Säule für erste Tests zur Verfügung stand, wurde auf diese Trennmethode für die polaren Analyte zurückgegriffen. Die HILIC vereint die Vorteile von *reversed phase*- (RP-) und Normalphasen- (NP-) HPLC. Bei der RP-HPLC werden eine unpolare stationäre Phase und vergleichsweise polare Eluenten verwendet. Daher eignet sich diese Methode hervorragend zu Trennung unpolarer Analyte, während polare Verbindungen in der Regel keine Retention zeigen. Die NP-HPLC basiert auf der Verwendung einer polaren stationären Phase und eines unpolaren Eluenten. Auf diese

Weise lassen sich polare Substanzen trennen, allerdings treten hier Probleme mit der Löslichkeit des Analyten im Eluenten und ein Verlust der Empfindlichkeit bei der massenspektrometrischen Detektion durch schlechte Ionisierbarkeit aufgrund des Eluenten auf. Die HILIC erlaubt die Trennung polarer Substanzen unter Verwendung polarer Eluenten. Dazu wird eine polar modifizierte unpolare stationäre Phase verwendet. Die Trennung erfolgt unter für die Massenspektrometrie geeigneten Bedingungen ohne oder mit schwachen Ionenpaarreagenzien (z. B. Ammoniumformiat) in niedriger Konzentration.<sup>[162]</sup> Für die HILIC werden neutrale, geladene oder zwitterionische stationäre Phasen genutzt. Bei der in dieser Arbeit verwendeten NUCLEOSHELL® HILIC-Säule der Firma Macherey-Nagel besteht die zwitterionische stationäre Phase aus Ammonium-Sulfonsäure modifiziertem Kieselgel.

Für erste Tests des Elutionsverhaltens bei der RP-HPLC und der HILIC wurden C<sub>6</sub>-d4UDP **52**, d4UMP **49** und d4UDP **59** verwendet. Als Eluenten wurden Gemische aus Acetonitril und Wasser sowie aus Acetonitril und Ammoniumformiatpuffer (10 mM) verwendet. Da es sich bei dem Ammoniumformiatpuffer um einen flüchtigen Laufpuffer handelt, ist er in niedrigen Konzentrationen für MS-Messungen geeignet. Die negativen Ladungen der Nucleosidphosphate legen eine Ionisierung im negativen ESI-Modus (ESI<sup>-</sup>) nahe. Daher wurde für den Puffer ein pH-Wert von 8.3 gewählt. Bei den ersten Messungen wurde ein generelles Problem des zu untersuchenden Systems von Prodrugs und Nucleosidphosphaten deutlich: Während die Prodrugs aufgrund ihrer Lipophilie bei der HILIC keine Retention zeigten, war andererseits für die Nucleosidphosphate keine Retention bei der RP-HPLC zu beobachten. Eine Erhöhung der Pufferkonzentration (50 mM, 100 mM) brachte in beiden Fällen keine Verbesserung. Aus diesen ersten Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass für die Untersuchung der Prodrugs und der Nucleosidphosphate unterschiedliche Methoden entwickelt werden müssen. Die Verwendung eines Acetonitril/Wasser-Gemisches ohne Zugabe von Puffer zur Trennung von d4UMP **49** und d4UDP **59** führte zu einem deutlich schlechteren Trennergebnis und einer schlechteren Ionisation der Analyten. Die extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) der Trennung von d4UMP **49** und d4UDP **59** mittels HILIC (Acetonitril/10 mM Ammoniumformiat, pH 8.3) sind in Abb. 142 (S. 138) gezeigt.

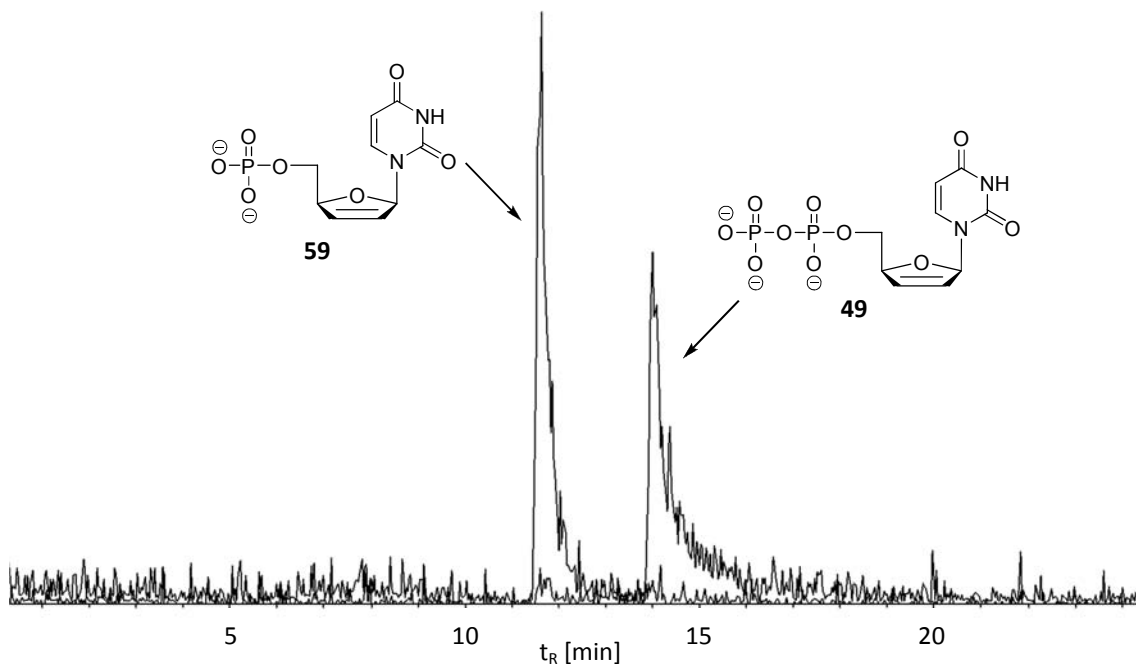


Abb. 142: EIC von d4UMP **49** und d4UDP **59** (je 1 µg, HILIC, 10 mM Ammoniumformiat, pH 8.3, Methode IV).

Das Massenspektrum von d4UMP **49** ist in Abb. 143 gezeigt. Dabei ist deutlich die Bildung des Quasimoleküliions  $[M-H]^-$  zu erkennen. Zusätzlich ist ein Signal für  $[2M-H]^-$  zu erkennen, das vermutlich durch Dimerisierung während der Ionisierung entsteht.

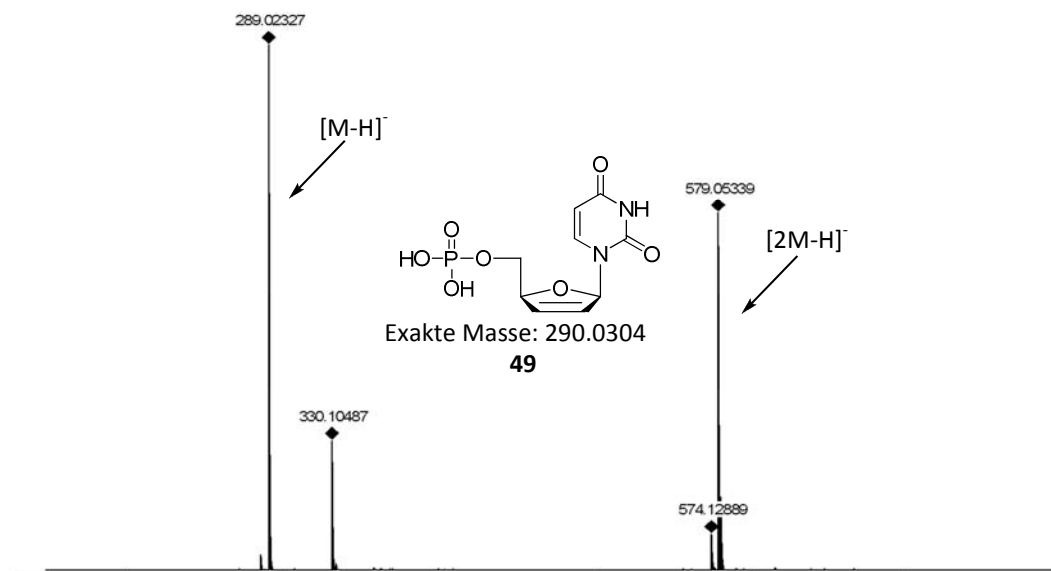


Abb. 143: ESI<sup>-</sup>-Massenspektrum von d4UMP **49**.

Das in Abb. 144 (S. 139) dargestellte Massenspektrum von d4UDP **59** zeigt ebenfalls die Bildung des Quasimoleküliions  $[M-H]^-$ . Ein Signal für  $[2M-H]^-$  wurde in diesem Fall nicht beobachtet. Analoge Ergebnisse wurden auch für ddUMP **50** und ddUDP **89** erhalten.

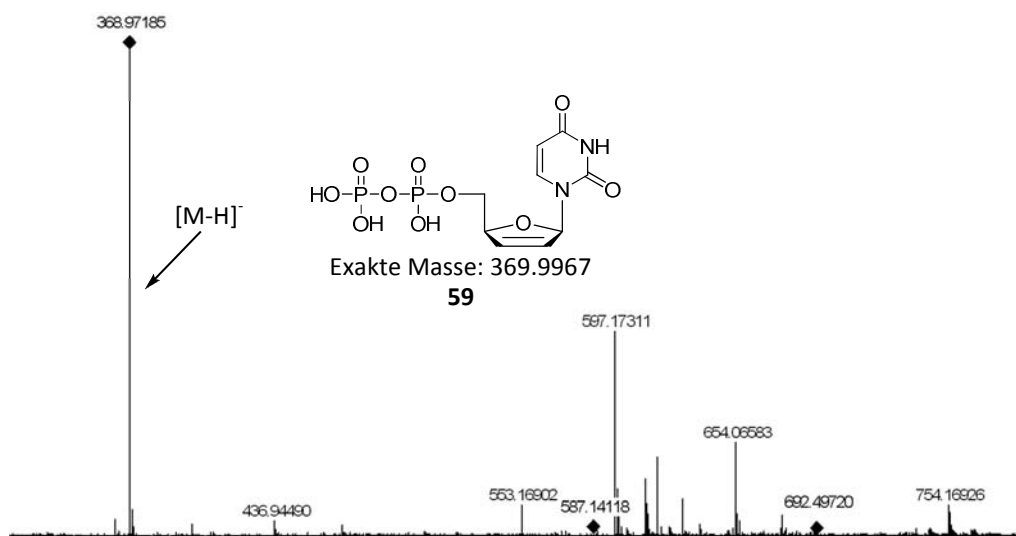


Abb. 144: ESI<sup>-</sup>-Massenspektrum von d4UDP **59**.

Die Aufnahme der Massenspektren von Nucleotiden im positiven ESI-Modus (ESI<sup>+</sup>) ist durch Protonierung der Phosphatgruppen oder der Nucleobase grundsätzlich möglich und führt bei einigen Beispielen zu einer höheren Empfindlichkeit.<sup>[79]</sup> Die Ionisation von d4UMP **49** und d4UDP **59** im positiven ESI-Modus führte allerdings nicht zu interpretierbaren Spektren. Dies gilt ebenso für ddUMP **50** und ddUDP **89**.

Wie bereits erwähnt, erfolgte die Analyse der Prodrugs mittels RP-HPLC mit anschließender massenspektrometrischer Detektion. Um eine hohe Vergleichbarkeit der Ionisationsbedingungen für die Nucleotide und die Prodrugs sicherzustellen, wurde auch hier ein Gemisch aus Acetonitril und Ammoniumformiat (10 mM, pH 8.3) als Eluent verwendet. In Abb. 145 (S. 140) sind die EIC von C<sub>6</sub>-d4UDP **52** und dem Phosphatdiester **81** sowie das ESI<sup>-</sup> Massenspektrum von **52** dargestellt. Der Phosphatdiester **81** wird vermutlich durch Bruch der Anhydridbindung während der Ionisation gebildet.

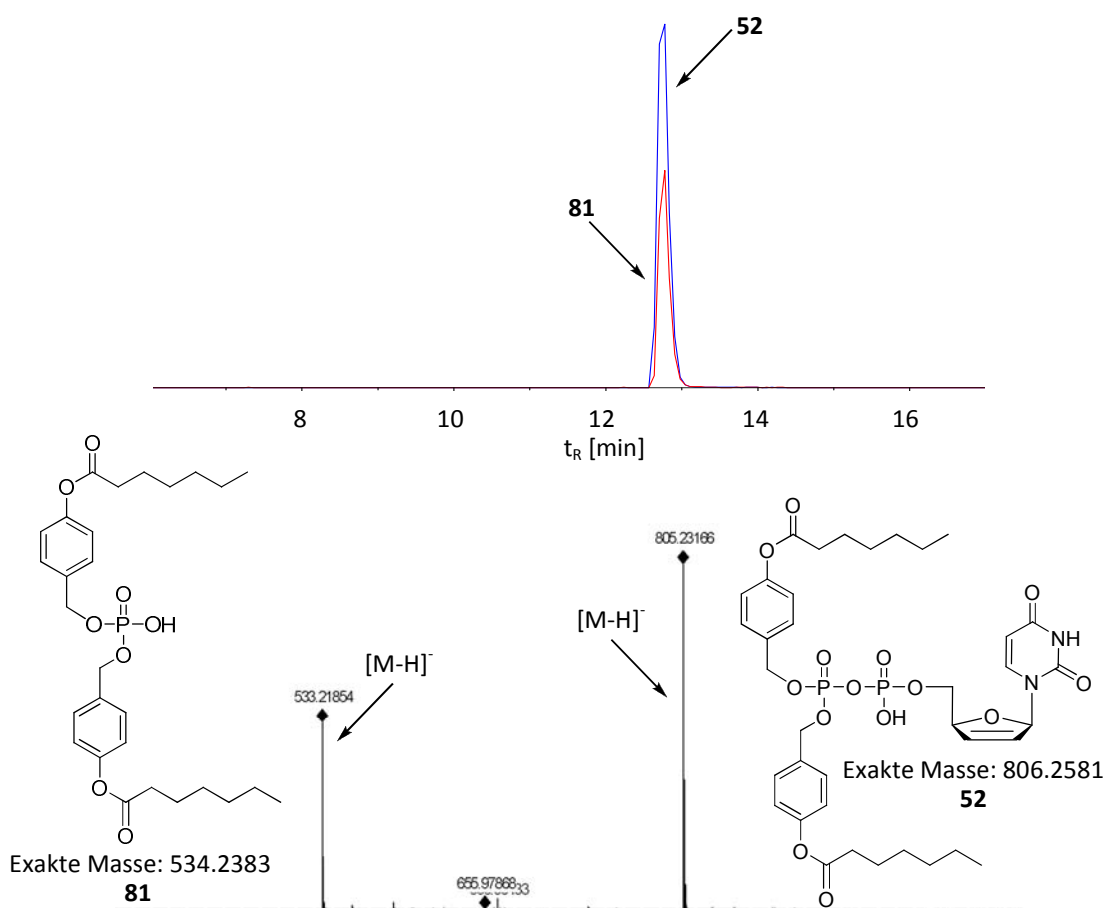


Abb. 145: EIC von **52** und **81** und ESI-Massenspektrum von C<sub>6</sub>-d<sub>4</sub>UDP **52** (RP-HPLC, Methode III).

Unter Verwendung der gleichen HPLC-Bedingungen wurde die Analyse von 3-Me-cycloSal-d<sub>4</sub>UMP **49** durchgeführt. Das EIC ist in Abb. 146 gezeigt.

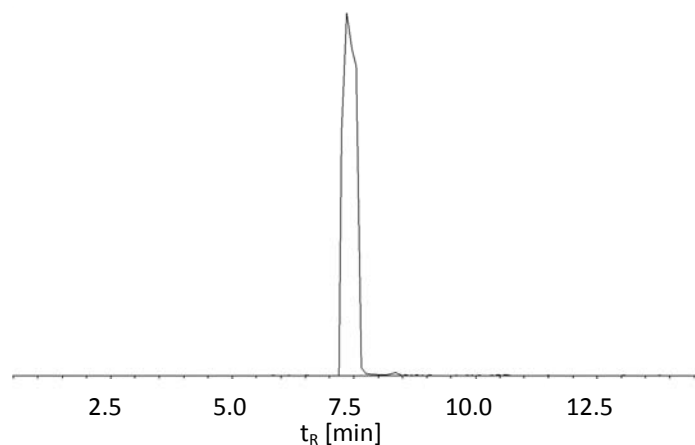


Abb. 146: EIC von 3-Me-cycloSal-d<sub>4</sub>UMP **85** (RP-HPLC, Methode III).

Da sich die cycloSal-Verbindung **85** leicht durch Bildung des Natriumaddukts ionisieren lässt, wurde die Ionisation im positiven ESI-Modus durchgeführt. Das entsprechende



Massenspektrum ist in Abb. 147 gezeigt. Darin ist deutlich das Signal des Natriumaddukts ( $[M+Na]^+$ ), sowie das Natriumaddukt des Dimers ( $[2M+Na]^+$ ) zu erkennen.

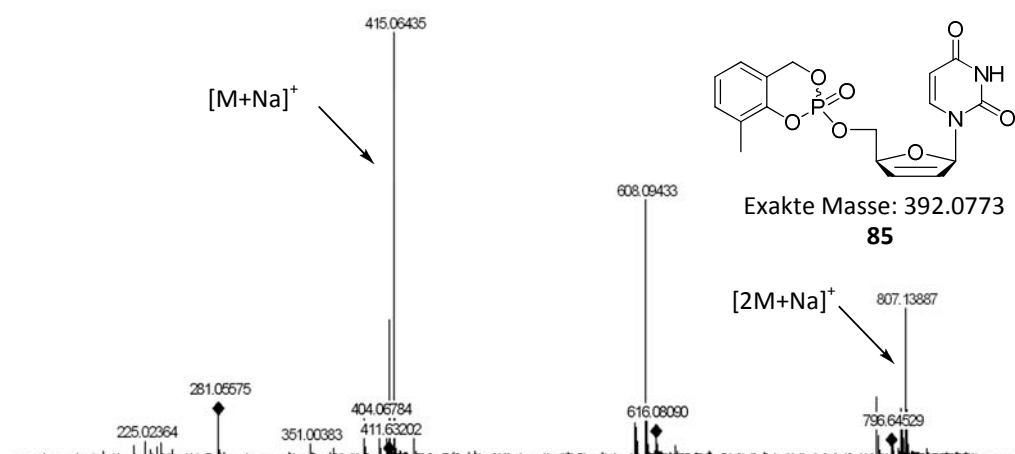


Abb. 147: ESI<sup>+</sup>-Massenspektrum von 3-Me-cycloSal-d4UMP **85**.

#### 4.4.4. Hydrolyseverfolgung mittels HPLC-MS

Nach der Entwicklung der HPLC-MS-Methoden, die für die Analyse der Nucleosidphosphate und der Prodrugs geeignet sind, wurde untersucht, wie sich diese Methoden auf die Untersuchung der Verbindungen in zellulärem Medium anwenden lassen. Dazu wurde die Hydrolyse von C<sub>6</sub>-d4UDP **52** in CEM/O-Zellextrakt auf gleiche Weise durchgeführt, wie bereits in Kapitel 4.1.11. (S. 59) ausführlich beschrieben wurde. Zur Analyse von d4UMP **49** und d4UDP **59** wurde die HILIC-Methode verwendet, die Untersuchung des Prodrugs **52**, des Hydrolyseintermediats **96** und des Phosphatdiesters **81** erfolgte mit der RP-HPLC-Methode. Zur Auswertung der Messungen wurden die Peaks in den jeweiligen EIC für die Verbindungen integriert und deren Fläche gegen die Hydrolysedauer aufgetragen. Der in Abb. 148 (S. 142) gezeigte Verlauf der Hydrolyse zeigt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der HPLC-Studien mit UV-Detektion eine schnelle exponentielle Abnahme der Prodrugkonzentration. Das einfach maskierte Hydrolyseintermediat **96** wird nur zu einem geringen Anteil gebildet oder schnell enzymatisch abgebaut. Ebenfalls zu erkennen ist die Bildung des Phosphatdiesters **81**, dessen Konzentration über die Zeit abnimmt. Ob dieser durch Bruch der Anhydridbindung während der Hydrolyse oder bei der Ionisierung entsteht kann aufgrund des mit dem Prodrug identischen Elutionsverhaltens nicht festgestellt

werden. Wahrscheinlich ist beides der Fall. Die Abnahme der Konzentration lässt sich also zum einen durch die abnehmende Prodrugkonzentration und zum anderen durch eine schnelle enzymatische Degradation des bei der Hydrolyse entstehenden Anteils von **81** erklären.

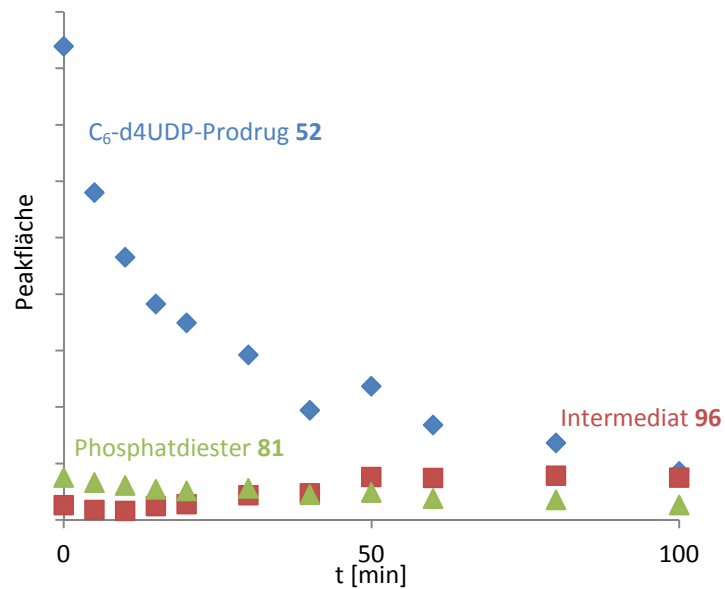


Abb. 148: Verlauf der Zellextrakthydrolyse von C<sub>6</sub>-d4UDP **52** (RP-HPLC, Methode III).

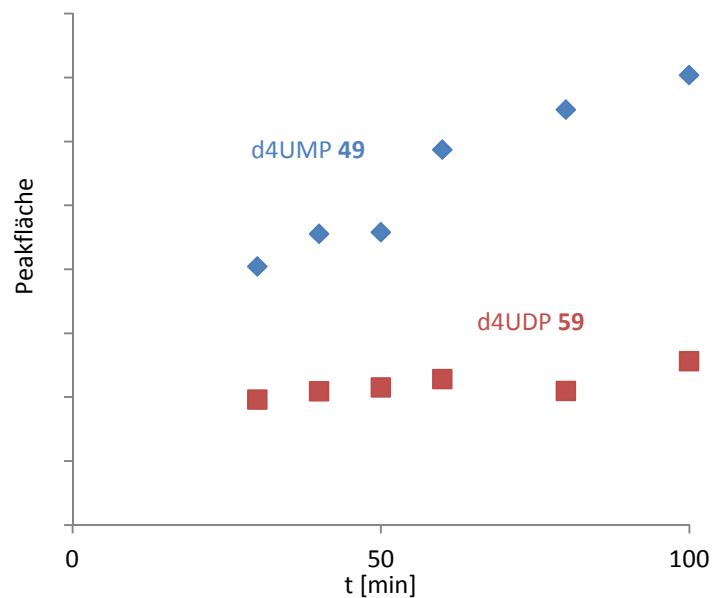


Abb. 149: Verlauf der Zellextrakthydrolyse von C<sub>6</sub>-d4UDP **52** (HILIC, Methode IV).

Der Verlauf der Hydrolyse für d4UMP **49** und d4UDP **59** ist in Abb. 149 gezeigt. Aufgrund eines Gerätefehlers bei den ersten Messungen sind die Werte erst ab einer Hydrolysedauer

von 30 min gezeigt. Die Konzentration beider Verbindungen nimmt über die Zeit zu, wobei die Konzentration des d4UMP **49** deutlich größer ist als die des d4UDP **59**. Unter Berücksichtigung der geringen Halbwertszeit von d4UDP **59** im Zellextrakt (2.3 h) lässt sich diese Beobachtung durch eine enzymatische Zersetzung von **59** erklären, bei der vermutlich auch d4UMP **49** gebildet wird.

#### 4.4.5. Untersuchung der Zellaufnahme von d4U-Prodrugs mittels HPLC-MS

Um die neu entwickelten HPLC-MS-Methoden für die Untersuchung der Aufnahme der d4U-Prodrugs **52** und **85** in Zellen zu erproben, wurden CEM-Zellen mit Zellkulturmedium inkubiert, das die Verbindungen enthielt. Die Zellinkubationen wurden von DR. ILONA HAUBER am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie in Hamburg durchgeführt. Bei dem ersten Test wurden die Zellen für 2 h mit einer Konzentration von 100 µM der jeweiligen Verbindung in RPMI-1640 Zellkulturmedium inkubiert und anschließend mehrfach gewaschen und zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde in 300 µL eines Gemisches aus Methanol und Wasser (2:1 v/v) aufgenommen und anschließend 10 min im Ultraschallbad behandelt, 10 min auf Eis gelagert und 10 min unter Kühlung zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch einen Spritzenfilter filtriert. Das Filtrat wurde per HPLC-MS analysiert. Da bei der Untersuchung der ersten Proben keine der gesuchten Verbindungen detektiert werden konnte, wurde die Inkubationszeit verlängert (6 h) und die Konzentration erhöht (200 µM). Die Probenvorbereitung wurde wie für die ersten Proben beschrieben durchgeführt. Die EIC von d4UMP **49**, d4UDP **59** und d4UTP **47** sind in Abb. 150 (S. 144) dargestellt. Darin ist deutlich das Signal für d4UMP **49** zu erkennen, während weder das Di- noch das Triphosphat detektiert werden konnten. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass zum einen 3-Me-cycloSal-d4UMP **85** in der Lage ist, durch die Zellmembran in die Zelle zu gelangen und dort das Monophosphat freigesetzt wird. Eine weitere Umsetzung zu d4UDP **59** und d4UTP **47** findet dagegen entweder nicht statt oder die Verbindungen werden schnell enzymatisch abgebaut.

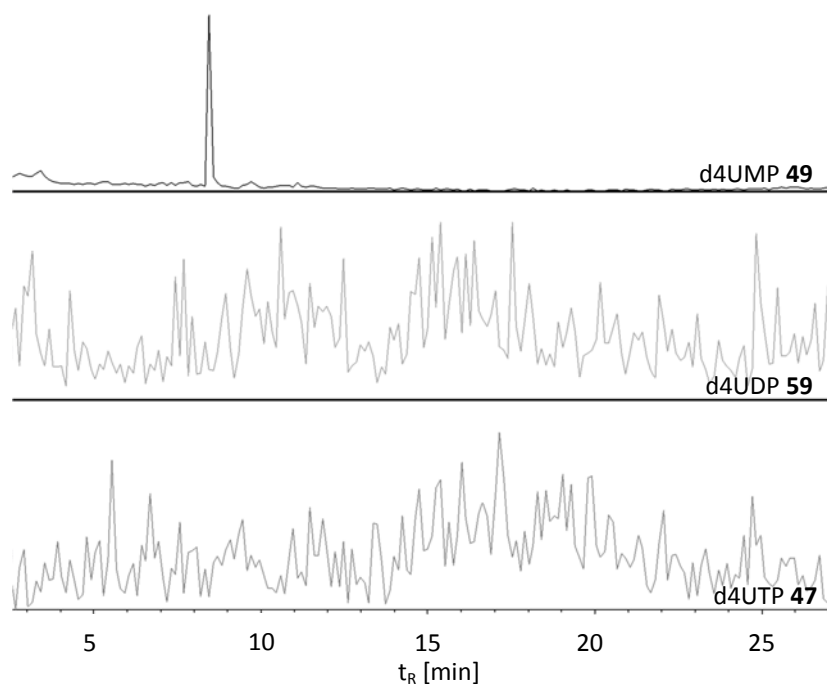


Abb. 150: EIC von d4UMP **49**, d4UDP **59** und d4UTP **47**; Inkubation mit 3-Me-cycloSal-d4UMP **85** (6 h, 200  $\mu$ M).

Die Analyse des Zelllysats nach der Inkubation mit C<sub>6</sub>-d4UDP **52** zeigte ebenfalls nur ein Signal im EIC von d4UMP **49**, während die Bildung des Di- und Triphosphats nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 151).

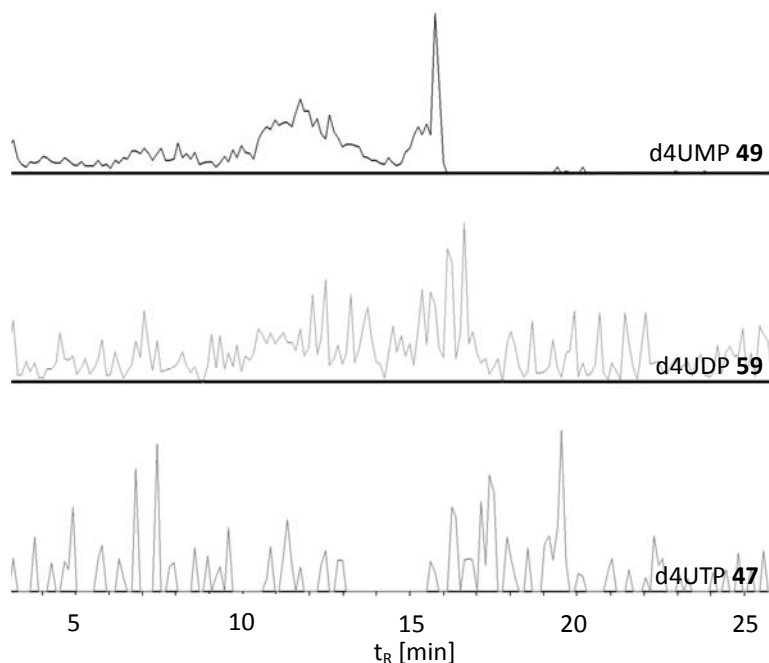


Abb. 151: EIC von d4UMP **49**, d4UDP **59** und d4UTP **47**; Inkubation mit C<sub>6</sub>-d4UDP **52** (6 h, 200  $\mu$ M).

Allerdings liegt das Signal für d4UMP **49** bei einer deutlich größeren Retentionszeit als dies in Abb. 150 der Fall ist. Da für die HPLC-Messungen identische Bedingungen verwendet

wurden, kann dieser Umstand nicht erklärt werden. Unklar ist ebenfalls, ob das d4UMP **49** durch Spaltung der Anhydridbindung bei der Hydrolyse des Prodrugs **52** oder als Abbauprodukt von intrazellulär freigesetztem d4UDP **59** gebildet wird. Die Beobachtung, dass sich d4UMP **49** in der Zelle befindet, kann dennoch als indirekter Nachweis für die Aufnahme des Prodrugs **52** in die Zelle betrachtet werden.

Dieses Kapitel zusammenfassend lässt sich festhalten, dass grundlegende Arbeiten zur Entwicklung einer direkten, HPLC-MS basierten Methode zur Untersuchung der Zellaufnahme von Nucleotidprodrugs durchgeführt wurden. Dabei war es nicht möglich, die lipophilen Prodrugs und die polaren Nucleosidphosphate mit einer Methode zu untersuchen. Für die Analyse der Prodrugs wurde eine RP-HPLC-Methode verwendet, während die Trennung der Nucleosidphosphate mittels HILIC gelang. Als Eluent wurde für beide Methoden ein Gemisch aus Acetonitril und Ammoniumformiatpuffer (10 mM, pH 8.3) verwendet. Unter diesen Bedingungen wurden reproduzierbar gute Trennergebnisse und eine gute Ionisierbarkeit der Analyte bei der ESI-Massenspektrometrie erreicht. Die Anwendung der neu entwickelten Methoden auf die Verfolgung der Zellextrakthydrolyse von C<sub>6</sub>-d4UDP **52** zeigte, dass sich Bildung und Abbau aller Hydrolyseprodukte mit diesen Methoden verfolgen lassen. Mit den Prodrugs 3-Me-cycloSal-d4UMP **85** und C<sub>6</sub>-d4UDP **52** wurden Zellaufnahmestudien unter Verwendung von CEM-Zellen durchgeführt. Die Untersuchung des Zelllysats nach der Inkubation mit der entsprechenden Verbindung zeigte im Fall von 3-Me-cycloSal-d4UMP **85** deutlich das Vorhandensein von d4UMP **49**, während kein Di- und Triphosphat detektiert werden konnte. Bei der Analyse des Zelllysats nach Inkubation mit C<sub>6</sub>-d4UDP **52** konnte ebenfalls nur ein Signal im EIC des d4UMP **49** beobachtet werden. Das Di- und Triphosphat konnten nicht detektiert werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Analoga natürlicher Nucleoside haben breite Anwendung als Wirkstoffe in der antiviralen Chemotherapie sowie in der Krebsbehandlung. Um biologische Aktivität zu zeigen, müssen sie in der Regel intrazellulär in die 5'-Triphosphate überführt werden. Diese Phosphorylierungen erfolgen in drei einzelnen Schritten, die von unterschiedlichen Kinasen katalysiert werden. Aufgrund der hohen Substratspezifität dieser Enzyme finden die Phosphorylierungsreaktionen der Nucleosidanaloga häufig nur ineffizient statt, was eine niedrige intrazelluläre Triphosphatkonzentration und entsprechend niedrige antivirale Aktivität zur Folge hat. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist die Verwendung lipophil maskierter, phosphorylierter Nucleosidanaloga (Pronucleotide), die in der Zelle durch Abspaltung der maskierenden Gruppe das jeweilige Nucleosidphosphat freisetzen können. Ziel dieser Arbeit war es, Methoden zu entwickeln, um die intrazelluläre Freisetzung von Nucleosidmono- und -diphosphaten aus *cycloSal*- und *DiPPro*-Nucleotiden untersuchen zu können.

Anhand der antiviralen Aktivität der *DiPPro*-Nucleotide von 2',3'-Didesoxyuridin (ddU) **43** und 2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrouridin (d4U) **42** sollte die Freisetzung der Nucleosiddiphosphate in der Zelle untersucht werden. Dazu wurden von beiden Nucleosiden jeweils vier *DiPPro*-Nucleotide mit unterschiedlichen Masken (*iPr*-, C<sub>6</sub>-, C<sub>9</sub>-, C<sub>11</sub>- substituiert) synthetisiert. (Kapitel 4.1.7., S. 38). Als Vergleichssubstanzen wurden zusätzlich die 3-Me-*cycloSal*-Triester **85** und **86** sowie die Nucleosiddiphosphate **59** und **89** beider Nucleoside dargestellt. Die Untersuchung des Hydrolyseverhaltens der *DiPPro*-Nucleotide in unterschiedlichen Medien zeigte, dass die chemische Hydrolyse in Phosphatpuffer (pH 7.3) nach dem in Abb. 21 (S. 27) gezeigten Mechanismus über das einfach maskierte Intermediat abläuft, aus dem das Nucleosiddiphosphat freigesetzt wird. Durch konkurrierende Spaltung der Anhydridbindung entstehen zusätzlich das Nucleosidmonophosphat sowie der entsprechende Phosphatdiester (Kapitel 4.1.10., S. 50). Die Hydrolysehalbwertszeit der Prodrugs nimmt mit zunehmender Länge der Alkylkette zu. Aufgrund einer schnellen enzymatischen Spaltung der Esterfunktion sind die Halbwertszeiten in CEM/O-Zellextrakten

deutlich geringer. Allerdings kommt es dabei auch zu einem schnellen Abbau der Nucleosiddiphosphate, sodass über die freigesetzte Menge keine zuverlässige Aussage gemacht werden kann (Kapitel 4.1.11., S. 59). Die Untersuchung der antiviralen Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 zeigte erwartungsgemäß keine Aktivität der Nucleoside **42** und **43** sowie für die *cycloSal*-Verbindungen **85** und **86**. Doch auch für die DiPPro-Nucleotide wurde keine oder nur moderate Aktivität gefunden ( $EC_{50} = 23 \mu\text{M} - 42 \mu\text{M}$ ). Motiviert durch diese niedrige Aktivität wurden Untersuchungen zum Aufbau der Nucleosidtriphosphate aus den Nucleosiddiphosphaten durch isolierte humane Nucleosiddiphosphatkinase durchgeführt. Dabei zeigte sich keine Umsetzung der Diphosphate. Dieser unerwartete Befund ist vermutlich der Grund für die niedrige antivirale Aktivität der getesteten Verbindungen (Kapitel 4.1.12., S. 62).

Mit dem Ziel, die Aufnahme der Prodrugs in Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgen zu können, wurden *cycloSal*- und DiPPro-Nucleotide bicyclischer Nucleosidanaloga (BCNA) synthetisiert (Kapitel 4.2.5., S. 85 und 4.2.6., S. 86). Neben ihrer antiviralen Aktivität beispielsweise gegen das Varicella-Zoster-Virus zeichnen sich die BCNA durch starke Autofluoreszenz aus. Es wurden 2'-Desoxy- und 2',3'-Didesoxyanaloga der BCNA verwendet, bei denen sich entweder ein Propylsubstituent oder kein Substituent an der Nucleobase befand. Die Untersuchung der chemischen Hydrolyse in Phosphatpuffer (pH 7.3) zeigte, dass die DiPPro-Nucleotide der BCNA ebenfalls nach dem in Abb. 21 (S. 27) gezeigten Mechanismus unter Bildung der Nucleosidmono- und -diphosphate hydrolysiert werden (Kapitel 4.2.7., S. 93). Dabei lagen die Halbwertszeiten in der gleichen Größenordnung wie die zuvor für die d4U- und ddU-Prodrugs ermittelten. In CEM/O-Zellextrakt zeigten die Diphosphatprodrugs in Abhängigkeit von der Modifikation des Nucleosids unterschiedliches Hydrolyseverhalten. Während bei der Hydrolyse der Prodrugs von 6-Prop-ddBCNADP **163** deutlich die Freisetzung des Nucleosidmono- und -diphosphats zu erkennen war, zeigte sich bei der Hydrolyse der 6-Prop-2'-dBCNADP-Prodrugs die Bildung unbekannter Nebenprodukte. Im Fall der Prodrugs von 6-H-ddBCNADP **165** war nur eine geringe Mengen des Nucleosiddi- und -monophosphats sowie Zersetzungsprodukte zu beobachten. Dies ist

vermutlich auf eine schnelle enzymatische Degradation dieser Verbindungen zurückzuführen. Die Halbwertszeiten der Verbindungen in CEM/O-Zellextrakt lagen in der gleichen Größenordnung, wie die der zuvor untersuchten DiPPro-Nucleotide von d4U **42** und ddU **43**. Die *cycloSal*-Triester der BCNA wurden ebenfalls auf ihr Hydrolyseverhalten hin untersucht. Auch für diese Verbindungen ergab sich eine gute Übereinstimmung der Hydrolysehalbwertszeiten mit denen der *cycloSal*-Verbindungen von d4U **42** und ddU **43** und die selektive Freisetzung der Nucleosidmonophosphate. Für alle BCNA-Prodrugs konnten bei den Untersuchungen im Zellextrakt durch UV-Detektion bei 330 nm die Hydrolyseprodukte ohne Überlagerung mit Signalen des Zellextrakts nachgewiesen werden (Kapitel 4.2.8., S. 100). Die BCNA zeigten Anregungsmaxima von 335 nm (unsubstituiert) und 340 nm (propylsubstituiert). Drei Verbindungen (3-Me-*cycloSal*-6-H-ddBCNAMP **115**, 3-Me-*cycloSal*-6-Prop-2'-dBCNAMP **113** und C<sub>11</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP **120**) wurden für Zellaufnahmestudien verwendet. Dazu wurden HeLa-Zellen mit Zellkulturmedium, das die jeweilige Verbindung enthielt, inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Kapitel 4.2.10., S. 107). Die Anregung erfolgte gerätebedingt bei 350 nm. Für alle drei Verbindungen konnte gezeigt werden, dass sie in der Zelle in ausreichendem Maße akkumulieren, um unter den Versuchsbedingungen nachgewiesen werden zu können. Allerdings zeigten sie lediglich ein schwaches Fluoreszenzsignal. Neben der nicht optimalen Anregungswellenlänge ist dies im Wesentlichen auf ein schnelles Photobleaching der Fluorophore zurückzuführen, sodass sich keine verlässlichen Rückschlüsse auf die intrazellulären Konzentrationen ziehen lassen.

In einem dritten Ansatz sollte ein Verfahren zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration der Hydrolyseprodukte von *cycloSal*- und DiPPro-Nucleotiden entwickelt werden, die auf der Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie (MS) basiert. Es wurden Methoden entwickelt, die die Analyse der lipophilen Prodrugs mittels RP-HPLC und die Untersuchung der Nucleosidmono- und -diphosphate durch HILIC mit anschließender massenspektrometrischer Detektion ermöglichen. Als Eluent wurde für beide Methoden ein Gemisch aus Acetonitril und Ammoniumformiatpuffer (10 mM, pH 8.3) verwendet



(Kapitel 4.4.3., S. 136). Die Anwendung dieser Methoden auf die Verfolgung der Hydrolyse von C<sub>6</sub>-d4UDP **52** in CEM/O-Zellextrakt zeigte, dass sich alle Hydrolyseprodukte nachweisen lassen (Kapitel 4.4.4., S. 141). Mit den Prodrugs 3-Me-*cycloSal*-d4UMP **85** und C<sub>6</sub>-d4UDP **52** wurden Zellaufnahmestudien unter Verwendung von CEM-Zellen durchgeführt. Die Untersuchung des Zelllysats nach der Inkubation mit der entsprechenden Verbindung zeigte im Fall von 3-Me-*cycloSal*-d4UMP **85** deutlich das Vorhandensein von d4UMP **49**, während kein Di- und Triphosphat detektiert werden konnte. Bei der Analyse des Zelllysats nach Inkubation mit C<sub>6</sub>-d4UDP **52** konnte ebenfalls nur das Signal von d4UMP **49** beobachtet werden. Das Di- und Triphosphat konnte nicht detektiert werden (Kapitel 4.4.5., S. 143).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Synthese einer fluoreszenzmarkierten Nucleosiddiphosphatpyranose zur Verwendung als analytische Sonde für biochemische Assays wie beispielsweise Ligandenaustauschassays zur Identifizierung von Glycosyltransferaseinhibitoren (Kapitel 4.3., S. 116). Dazu sollte zunächst der 5-Nitro-substituierte *cycloSal*-Triester des bicyclischen Ribonucleosids 6-H-BCNA **106** synthetisiert werden, der anschließend mit einem Pyranosylphosphat als Nucleophil zur Nucleosiddiphosphatpyranose umgesetzt werden sollte. Da die Synthese der 5-Nitro-*cycloSal*-Verbindung **174** nach dem Standardprotokoll (Oxidation mit Oxone<sup>®</sup>) nicht gelang, wurde der 5-Chlor-*cycloSal*-Triester **175** synthetisiert (Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid) und mit 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-phosphat **178** umgesetzt. Für die vollständige Umsetzung der *cycloSal*-Verbindung **175** war allerdings eine lange Reaktionszeit und ein Erwärmen der Reaktionslösung erforderlich. Die Bildung des Produkts **172** konnte zwar aufgrund der entsprechenden Signale im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum angenommen werden, eine Isolierung durch chromatographische Reinigung des Rohgemisches gelang allerdings nicht. Durch Verwendung von Iod (0.1 M in Pyridin/THF) als Oxidationsmittel, konnte der 5-Nitro-*cycloSal*-Triester **174** schließlich erhalten werden. Dieser konnte mit 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-Galactose-1-phosphat **179** erfolgreich zur Zielverbindung **173** umgesetzt werden. (s. S. 132)

## 6. SUMMARY

Analogs of natural nucleosides are widely used in antiviral and anticancer therapy. In order to possess antiviral activity, these compounds need to be phosphorylated to their biologically active triphosphates. These phosphorylations are accomplished in three steps that are catalyzed by different kinases. Due to high substrate specificity of these enzymes the phosphorylation reactions are often inefficient resulting in low intracellular concentration of the triphosphate and low antiviral activity. One option to overcome this obstacle is the use of lipophilically masked phosphorylated nucleoside analogs (pronucleotides) that release the corresponding nucleoside phosphates by cleavage of the masking units inside the cell. The aim of this thesis was to develop new methods to investigate the intracellular release of nucleoside mono- and diphosphates from *cycloSal*- and *DiPPro*-nucleotides.

Using *DiPPro*-nucleotides of 2',3'-dideoxyuridine (ddU) **43** and 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrouridine (d4U) **42**, the intracellular release of the corresponding nucleoside diphosphates should be examined by means of their antiviral activity against HIV-1 and HIV-2. For this purpose, four *DiPPro*-nucleotides of both nucleosides with different masking units (*iPr*-,  $C_6$ -,  $C_9$ -,  $C_{11}$ - substituted) were synthesized (chapter 4.1.7., p. 38). Additionally, the 3-Me-*cycloSal* triesters **85** and **86** of both nucleosides were prepared. Analysis of the hydrolysis behavior of the *DiPPro*-nucleotides in different media revealed that hydrolysis in phosphate buffer (pH 7.3) proceeded in accordance with the mechanism described in fig. 21 (p. 27) via the mono substituted intermediate that releases the nucleoside diphosphate. By competing cleavage of the anhydride bond the nucleoside monophosphate and respective phosphate diester are formed as well (chapter 4.1.10., p. 50). Hydrolysis half-lives of the prodrugs rose with increasing length of the alkyl chain in the masking unit. In consequence of fast enzymatic cleavage of the ester function, half-lives were distinctly lower in CEM/0 cell extracts. However, due to rapid enzymatic degradation of the nucleoside diphosphates the released amounts could not be determined reliably (chapter 4.1.11., p. 59). Examination of the antiviral activity against HIV-1 and HIV-2 showed no activity of the nucleosides **42** and **43**

and *cycloSal* compounds **85** and **86**. For the DiPPro-nucleotides no or only moderate activity ( $EC_{50} = 23 \mu\text{M} - 42 \mu\text{M}$ ) was observed as well. Motivated by the low antiviral activity, synthesis of nucleoside triphosphates from nucleoside diphosphates by isolated nucleoside diphosphate kinase was investigated. These studies revealed no conversion for both compounds. This unexpected result can be assumed to be the main reason for the low antiviral activity of the tested compounds.

With the goal to study the cellular uptake of prodrugs using fluorescence microscopy, *cycloSal*- and DiPPro-nucleotides of bicyclic nucleoside analogs were synthesized (chapter 4.2.5., p. 85 and chapter 4.2.6., p. 86). Besides their antiviral activity e. g. against varicella-zoster virus, they also exhibit strong autofluorescence. 2'-Deoxy- and 2',3'-dideoxy analogs of BCNAs either bearing a propyl group or no substituent at the nucleobase were used. Investigation of the hydrolytic behavior in phosphate buffer (pH 7.3) indicated, that DiPPro-nucleotides of BCNAs are also hydrolyzed in compliance with the aforementioned mechanism (fig. 21, p. 27) releasing the nucleoside diphosphates as well as nucleoside monophosphates (chapter 4.2.7., p. 93). Hydrolysis half-lives of the BCNA prodrugs were in the range as those determined for the d4U and ddU prodrugs. In CEM/0 cell extracts the DiPPro nucleotides showed different hydrolytic behavior depending on the modification of the nucleoside. In case of prodrugs of 6-Prop-ddBCNADP formation of nucleoside mono- and diphosphate was clearly observable, whereas hydrolysis of prodrugs 6-Prop-2'-dBCNADP led to the formation of unknown byproducts. In contrast, hydrolysis of 6-H-ddBCNADP prodrugs predominantly showed products of decomposition. Again, half-lives of the BCNA prodrugs were in the range as those determined for the d4U and ddU Prodrugs. This was also the case for the *cycloSal* triesters that showed selective release of the nucleoside monophosphates. For all BCNA prodrugs UV detection at 330 nm allowed observation of the signals of hydrolysis products without interference with the signals of cellular components. The BCNAs show excitation maxima at 335 nm (unsubstituted) and 340 nm (propyl substituted). Three compounds (3-Me-*cycloSal*-6-H-ddBCNAMP **115**, 3-Me-*cycloSal*-6-Prop-2'-dBCNAMP **113** and C<sub>11</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP **120**) were used to investigate their cellular uptake. For this purpose,

HeLa cells were incubated with cell culture medium that contained the respective compound and subsequently examined using fluorescence microscopy with an excitation wavelength of 350 nm (chapter 4.2.10., p. 107). All compounds accumulated inside the cell sufficiently to be detected under used conditions. However, they only showed weak fluorescence. The primary reasons for this result are the non-optimal excitation wavelength and rapid photobleaching of the fluorophores.

In a third approach, a procedure to determine intracellular concentrations of hydrolysis products of *cycloSal*- and *DiPPro*-nucleotides based on HPLC coupled with mass spectrometry was developed. Initially, methods were developed that allow for the analysis of lipophilic prodrugs using RP-HPLC and polar nucleoside phosphates applying HILIC with mass spectrometric detection. For both methods a mixture of acetonitrile and ammonium formate buffer (10 mM, pH 8.3) was used as eluent (chapter 4.4.3., p. 136). Utilization of these methods to study the hydrolysis of C<sub>6</sub>-d4UDP **52** in CEM/0 cell extract revealed that all hydrolysis product could be detected in cellular medium (chapter 4.4.4., p. 141). Prodrugs 3-Me-*cycloSal*-d4UMP **85** and C<sub>6</sub>-d4UDP **52** were used to study their cellular uptake in CEM-SS cells. Examination of cell lysate after incubation with the respective compound showed in case of 3-Me-*cycloSal*-d4UMP **85** the presence of d4UMP **49** but no di- or triphosphate. Analysis of the cell lysate after incubation with C<sub>6</sub>-d4UDP **52** the presence of d4UMP **49** was observed as well, whereas no di- or -triphosphate was detectable.

An additional aim of this thesis was the synthesis of a fluorescently labeled nucleoside diphosphate pyranose as potential probe for biochemical assays (e. g. fluorescent-based ligand displacement assays) (chapter 4.3., p. 116). Therefore, the synthesis of the 5-nitro-*cycloSal* triester of the bicyclic ribonucleoside analog 6-H-BCNA **106** was attempted. However, using the standard protocol (oxidation with oxone®) the synthesis was not successful. As an alternative, 5-chloro-substituted *cycloSal* triester **175** was prepared successfully (oxidation with *tert*-butylhydroperoxide) and reacted with 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-phosphate **178**. For complete conversion of the *cycloSal*

compound, a long reaction time and warming of the solution was necessary. Although the product was formed according to  $^{31}\text{P}$ -NMR, it could not be isolated from the reaction mixture. However, the 5-nitro-*cycloSal* triester **174** of 6-H-BCNA **106** was obtained using iodine (0.1 M in pyridin/THF) as oxidizing agent. The triester **174** was reacted with 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-Galactose-1-phosphate **179** to the desired nucleoside diphosphate pyranose **173** (p. 132).

## 7. EXPERIMENTELLER TEIL

### 7.1. Allgemeines

#### 7.1.1. Edukte und Reagenzien

Sämtliche Edukte und Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen VWR, Fluka, Acros, TCI, Alfa Aesar, Grüssing GmbH und Sigma-Aldrich in Synthesequalität bezogen und ohne weitere Reinigung für die Synthesen verwendet. Deuterierte Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie wurden von der Deutero GmbH erworben.

*4,5-Dicyanoimidazol (DCI)*: [C<sub>5</sub>H<sub>2</sub>N<sub>4</sub>, MG = 118.10]. Im Ölpumpenvakuum getrocknet und unter Inertgas gelagert.

*Diisopropylamin (DIPA)*: [C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N, MG = 101.19, Sdp.: 84 °C, ρ = 0.722 g/cm<sup>3</sup>]. Mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet, unter Inertgas destilliert und unter Lichtausschluss und Inertgas gelagert.

*N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA)*: [C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N, MG = 129.24, Sdp.: 127 °C, ρ = 0.742 g/cm<sup>3</sup>]. Mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet, unter Inertgas destilliert und unter Lichtausschluss und Inertgas gelagert.

*Phosphor(III)-chlorid (PCl<sub>3</sub>)*: [MG = 137.33, Sdp.: 74-78 °C, ρ = 1.574 g/cm<sup>3</sup>]. Unter Inertgas destilliert und gelagert.

*Phosphorylchlorid (POCl<sub>3</sub>)*: [MG = 153.33, Sdp.: 106 °C, ρ = 1.645 g/cm<sup>3</sup>]. Unter Inertgas destilliert und gelagert.

*Triethylamin (Et<sub>3</sub>N)*: [C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N, MG = 101.19, Sdp.: 89 °C, ρ = 0.726 g/cm<sup>3</sup>]. Mehrere Tage über unter Rückfluss Calciumhydrid getrocknet, unter Inertgas destilliert und unter Lichtausschluss und Inertgas gelagert.

### 7.1.2. Lösungsmittel

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

*Dichlormethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):* [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MG = 84.93, Sdp.: 39-40 °C, ρ = 1.325 g/cm<sup>3</sup>]. Unter Normaldruck destilliert.

*Ethylacetat (EE):* [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, MG = 88.11, Sdp.: 77 °C, ρ = 0.902 g/cm<sup>3</sup>]. Unter Normaldruck destilliert.

*Methanol (MeOH):* [CH<sub>4</sub>O, MG = 32.04, Sdp.: 65 °C, ρ = 0.791 g/cm<sup>3</sup>]. Unter Normaldruck destilliert.

*Petrolether (50-70) (PE):* [Sdp.: 50-70 °C]. Unter Normaldruck destilliert.

### 7.1.3. absolute Lösungsmittel

Für Reaktionen unter Luft- und/oder Feuchtigkeitsausschluss wurden die folgenden absoluten Lösungsmittel verwendet:

*Acetonitril (CH<sub>3</sub>CN):* [C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N, MG = 41.05, Sdp.: 81-82 °C, ρ = 0.786 g/cm<sup>3</sup>]. Mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet, unter Inertgas destilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) gelagert.

*Diethylether (Et<sub>2</sub>O):* [C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O, MG = 74.12, Sdp.: 35 °C, ρ = 0.706 g/cm<sup>3</sup>]. Mehrere Tage unter Rückfluss über Natrium/Benzophenon getrocknet, unter Inertgas destilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) gelagert.

*N,N-Dimethylformamid (DMF):* [C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO, MG = 73.09, Sdp.: 153 °C, ρ = 0.944 g/cm<sup>3</sup>]. Sigma-Aldrich: 40228.

*Dimethylsulfoxid (DMSO):* [C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, MG = 78.13, Sdp.: 189 °C, ρ = 1.10 g/cm<sup>3</sup>]. Sigma-Aldrich: 41647.

*Methanol (MeOH)*: [CH<sub>4</sub>O, MG = 32.04, Sdp.: 65 °C, ρ = 0.791 g/cm<sup>3</sup>]. Sigma-Aldrich: 32213.

*Pyridin*: [C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, MG = 79.10, Sdp.: 115 °C, ρ = 0.978 g/cm<sup>3</sup>]. Sigma-Aldrich: 82704.

*Tetrahydrofuran (THF)*: [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O, MG = 72.11, Sdp.: 65-67 °C, ρ = 0.889 g/cm<sup>3</sup>]. Mehrere Tage über Kaliumhydroxid gelagert, unter Rückfluss über Kalium/Benzophenon getrocknet, unter Inertgas destilliert und über Molekularsieb (0.4 nm) gelagert.

#### 7.1.4. Chromatographie

##### *Dünnschichtchromatographie (DC)*

Es wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (VWR Nr. 5554; Schichtdicke 0.2 mm, Macherey-Nagel Alugram® Xtra Sil G/UV<sub>254</sub>, Nr. 818333, Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Die Laufstrecke betrug 7-8 cm. Alle R<sub>F</sub>-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm oder durch Eintauchen in ein Schwefelsäure-Anisaldehyd-Färbereagenz (135 mL Ethanol, 5 mL konz. Schwefelsäure, 1.5 mL Eisessig, 3.7 mL *p*-Anisaldehyd) und anschließende Wärmebehandlung.

##### *Präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™)*

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



### *Säulenchromatographie*

Für säulenchromatographische Trennungen wurde VWR Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm, 230-400 mesh ASTM) oder Macherey-Nagel Kieselgel 60 M (0.040-0.063 mm, 230-400 mesh) verwendet.

### *Umkehrphasenchromatographie (RP-Chromatographie)*

Für die Umkehrphasenchromatographie wurde LiChroprep® RP-18 (40-63 µm) der Firma Merck verwendet.

### *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-Detektion*

Die analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde an einer VWR-Hitachi-Anlage, Modell Elite LaChrom durchgeführt.

Software:	EZChrom Elite
Pumpe:	L-2130
Automatischer Probenwechsler:	L-2200
Detektion:	Diode Array Detector L-2455
Analytische Säule:	EcoCART® 125-3 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) der Firma Merck

Für alle HPLC-Anwendungen wurde Acetonitril des Reinheitsgrads „gradient grade“ (HiPerSolv CHROMANORM®, Nr.: 83639.320 der Firma VWR oder CHROMASOLV® der Firma Sigma-Aldrich, Nr.: 34851) sowie Reinstwasser verwendet. Die Lösungsmittel wurden vor der Verwendung durch Behandlung im Ultraschallbad entgast.

*HPLC-Methoden:*

Methode I: Von 0 min bis 25 min: Wasser mit einem Acetonitrilgradienten (5%-100%), von 25 min bis 35 min: isokratisch (5% Acetonitril, 95% Wasser). Flussrate: 0.5 mL/min, UV-Detektion bei 264 nm bzw. 330 nm.

Methode II: Von 0 min bis 20 min: TBAH-Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (5%-90%), von 20 min bis 24 min: isokratisch (90% Acetonitril, 10% TBAH-Laufpuffer), von 24 min bis 29 min: TBAH-Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (90%-5%), von 29 min bis 36 min: isokratisch (5% Acetonitril, 95% TBAH-Laufpuffer). Flussrate: 1.0 mL/min, UV-Detektion bei 264 nm bzw. 330 nm.

*TBAH-Laufpuffer:*

Stammlösung (9.8 mM TBAH): Es wurden 1000 mL Reinstwasser mit 6.6 mL einer Lösung von Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (TBAH) (40% w/w aq.) versetzt und mit konz. 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.

*7.1.5. Spektroskopie*

*Kernresonanzspektroskopie (NMR)*

Die NMR-Spektren wurden in der spektroskopischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie auf Geräten der Firma Bruker aufgenommen. Auf den Modellen AVANCE I, AVANCE II und DRX 500 wurden 400 MHz- bzw. 500 MHz-<sup>1</sup>H-NMR- und 101 MHz- bzw. 126 MHz-<sup>13</sup>C-NMR-Spektren sowie <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H- (H,H-COSY) sowie <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-Korrelationsspektren (HSQC, HMBC) gemessen. Darüber hinaus wurden <sup>31</sup>P-NMR-Spektren (162 MHz bzw. 202 MHz) sowohl in der spektroskopischen Abteilung des Instituts für Anorganische und Angewandte Chemie (Bruker Avance 400) als auch des Instituts für Organische Chemie

aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  [ppm] wurde auf die Lösungsmittelsignale bezogen, wobei DMSO- $d_6$  auf 2.50 ppm ( $^1\text{H}$ ) bzw. 39.52 ppm ( $^{13}\text{C}$ ),  $\text{CDCl}_3$  auf 7.26 ppm ( $^1\text{H}$ ) bzw. 77.16 ppm ( $^{13}\text{C}$ ),  $\text{D}_2\text{O}$  auf 4.79 ppm ( $^1\text{H}$ ) und MeOD auf 3.31 ppm ( $^1\text{H}$ ) und 49.00 ppm ( $^{13}\text{C}$ ) kalibriert wurde. Die Verschiebungen der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Signale wurden gegen einen externen Standard von 85%-iger Phosphorsäure angegeben. Luft- und hydrolyseempfindliche Substanzen wurden in zuvor über Molekularsieb 0.4 nm getrocknetem  $\text{CDCl}_3$  vermessen.

#### *Infrarotspektroskopie (IR)*

Die IR-Spektren wurden an einem Alpha FT-IR-Spektrometer der Firma Bruker bei Raumtemperatur in einem Messbereich von  $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen. Die Verbindungen wurden als Reinsubstanz durch abgeschwächte Totalreflexion (ATR) vermessen.

#### *UV/Vis-Spektroskopie*

Die UV/Vis-Spektren wurden an einem Cary<sup>®</sup> 300 Bio Spektrophotometer der Firma Varian aufgenommen.

#### *Fluoreszenzspektroskopie*

Die korrigierten Fluoreszenzspektren wurden an einem FluoroLog<sup>®</sup>-3-22 Spektrofluorometer der Firma Horiba Jobin Yvon gemessen. Schlitzweite: 1.5 nm

#### *7.1.6. Massenspektrometrie (MS)*

Alle Massenspektren wurden in der massenspektrometrischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie der Universität Hamburg aufgenommen.

Die *EI-Massenspektren* wurden an einem VG 70S EI doppelfokussierenden Sektorfeld-massenspektrometer der Firma VG Analytical gemessen.

Die *FAB-Massenspektren* wurden an einem doppelfokussierenden Spektrometer VG 70S Xenon FAB der Firma VG Analytical gemessen. Als Stoßgas wurde Xenon, als Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol verwendet.

Die *MALDI-Massenspektren* wurden an einem ultrafleXtreme™ MALDI-TOF-TOF-Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonik in unterschiedlichen Matrices gemessen.

Die *ESI-Massenspektren* wurden an einem Agilent 6224 ESI-TOF-Massenspektrometer der Firma Agilent Technologies im positiven oder negativen Ionenmodus gemessen.

#### *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS)*

Die HPLC-MS-Messungen wurden an einem maXis™ ESI-Q-TOF-Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonik, gekoppelt mit einem Dionex UltiMate® 3000 UHPLC-System der Firma Thermo Scientific, durchgeführt. Für die RP-HPLC wurde eine EC 50/2 NUCLEODUR® C<sub>18</sub> Gravity, 1.8 µm der Firma Macherey-Nagel und für die HILIC eine EC 150/2 NUCLEOSHELL® HILIC, 2.7 µm Trennsäule der Firma Macherey-Nagel verwendet.

#### *Ionisierungsparameter*

Für die HILIC-Methode: Capillary-Voltage: +2900 V, Nebulizer Gas: 3 bar, Dry Gas: 8 L/min, Dry Temperature: 180 °C. Transfer: Funnel RF: 150 Vpp, ISCID Energy: 0 eV, Multiple RF: 150 Vpp, Collision-Cell Energy: 8 eV, Collision-RF: 2500 Vpp, Transfer time: 40 µs. m/z range: 150-1400, Spektrenrate: 0.8 Hz.

Für die RP-HPLC-Methode: Capillary-Voltage: -4500 V, Nebulizer Gas: 4 bar, Dry Gas: 10 L/min, Dry Temperature: 200 °C. Transfer: ISCID Energy: 0 eV, Collision-Cell Energy: 10 eV, Collision-RF: 1200 Vpp, Transfer time: 60 µs. m/z range: 100-1400, Spektrenrate: 1.0 Hz.

### *HPLC-Methoden*

Methode III (RP-HPLC): Von 0 min bis 2 min: isokratisch 5% Acetonitril, 95% Wasser, von 2 min bis 22 min: Wasser mit einem Acetonitrilgradienten (5%-80%), von 22 min bis 23 min: isokratisch 80% Acetonitril, 20% Wasser, von 23 min bis 24 min: Wasser mit einem Acetonitrilgradienten (80%-5%), von 24 min bis 27 min: isokratisch 5% Acetonitril, 95% Wasser. Flussrate: 0.5 mL/min.

Methode IV (HILIC): Von 0 min bis 25 min: Acetonitril mit einem Formiatpuffergradienten (5%-50%), von 25 min bis 27 min: isokratisch 50% Acetonitril, 50% Formiatpuffer, von 27 min bis 30 min: Acetonitril mit einem Formiatpuffergradienten (50%-5%), von 30 min bis 35 min: isokratisch 95% Acetonitril, 5% Formiatpuffer. Flussrate: 0.15 mL/min.

### *10 mM Ammoniumformiatpuffer (pH 8.3)*

Es wurden 630 mg Ammoniumformiat in 1000 mL Reinstwasser gelöst und der pH-Wert durch Zugabe von verd. Ammoniaklösung eingestellt.

### *7.1.7. Weitere Geräte und Materialien*

#### *Polarimeter*

Die Drehwerte optisch aktiver Verbindungen wurden an einem P8000 Polarimeter der A. Krüss Optonic GmbH mit einer Natriumlampe ( $\lambda = 598 \text{ nm}$ ) bei 20 °C gemessen.

#### *Mikrowelle*

Für mikrowellenunterstützte Reaktionen wurde eine Discover® BenchMate Mikrowelle der Firma CEM verwendet.

*Schmelzpunktbestimmungsgerät*

Zur Bestimmung der Schmelzpunkte wurde das Schmelzpunktbestimmungsgerät IA 9200 der Firma Electrothermal verwendet.

*Zentrifuge*

Es wurde eine Zentrifuge 5418 R der Firma Eppendorf verwendet.

*Thermomixer*

Es wurde ein Thermomixer® compact der Firma Eppendorf verwendet.

*Reinstwasseranlage*

Zur Herstellung von Reinstwasser wurde ein arium® pro UV Reinstwassersystem der Firma Sartorius verwendet.

*Spritzenfilter*

Es wurden CHROMAFIL® RC-20/15 MS Spritzenfilter der Firma Macherey-Nagel verwendet.

*Gefriertrocknung*

Zur Gefriertrocknung wässriger Lösungen wurde eine ALPHA 2-4 LD plus Gefriertrocknungsanlage der Firma Christ verwendet.

## 7.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

### 7.2.1. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Reduktion 3- und 5-substituierter Salicylsäuren mit Lithiumaluminiumhydrid (AAV 1)

Es wurden 2.0 Äquiv. Lithiumaluminiumhydrid in abs. THF suspendiert und bei Rt 1.0 Äquiv. der Salicylsäure, gelöst in abs. THF, langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde bei Rt gerührt und anschließend zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde durch vorsichtige Zugabe von Eis das überschüssige Lithiumaluminiumhydrid hydrolysiert und anschließend durch Zugabe von 10%iger Schwefelsäure auf pH 1 titriert. Nach Zugabe von Ethylacetat wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase fünf Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde in wenig Dichlormethan gelöst und in kalten Petrolether (50-70) getropft, wobei sich ein farbloser Niederschlag bildete. Dieser wurde durch Saugfiltration abgetrennt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

### 7.2.2. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Saligenylchlorphosphiten (AAV 2)

Der entsprechende Salicylalkohol wurde in abs. Diethylether gelöst, auf -20 °C abgekühlt und 1.0 Äquiv. Phosphor(III)-chlorid **45** tropfenweise hinzugegeben. Nach 10 min Rühren wurden 1.8 Äquiv. abs. Pyridin gelöst in abs. Diethylether über einen Zeitraum von 2.5 h bei -20 °C hinzugegetropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Rt erwärmt und weitere 2.5 h gerührt. Über Nacht wurde die Reaktionslösung bei -20 °C gelagert. Das ausgefallene Pyridiniumchlorid wurde durch Filtration unter Schlenkbedingungen abgetrennt und das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt.

*7.2.3. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur selektiven Veresterung von 4-Hydroxybenzylalkohol mit Säurechloriden (AAV 3)*

Eine Lösung von 4-Hydroxybenzylalkohol **36** und 1.0 Äquiv. Triethylamin in abs. THF wurde auf 0 °C gekühlt und eine Lösung von 1.0 Äquiv. des Säurechlorids in abs. THF über 30 min zugetropft. Die Reaktionslösung wurde bei 0 °C und ggf. bei Rt gerührt und anschließend das während der Reaktion entstandene Triethylammoniumchlorid durch Filtration abgetrennt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde zwei Mal mit Natriumcarbonatlösung und zwei Mal mit Wasser gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch an Kieselgel gereinigt.

*7.2.4. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Bis(4-acyloxybenzyl)-diisopropylaminophosphoramiditen (AAV 4)*

Eine Lösung von Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit in abs. THF wurde auf -78 °C abgekühlt. Über 60 min wurde eine Lösung von 2.2 Äquiv. des jeweiligen Esters und 2.4 Äquiv. Triethylamin in abs. THF zugetropft. Die Reaktionslösung wurde auf Rt erwärmt und 16-21 h gerührt. Durch Filtration unter Schlenkbedingungen wurde bei der Reaktion entstandenes Triethylammoniumchlorid entfernt und der Feststoff zwei Mal mit abs. THF gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde unter vermindertem Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt durch circulare präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™) (PE/Et<sub>3</sub>N 9:1 v/v) gereinigt.



7.2.5. *Allgemeine Arbeitsvorschrift zur selektiven Deacetylierung der anomeren Hydroxyfunktion peracetylierter Glycopyranosen (AAV 5)*

Die peracetylierte Glycopyranose wurde in THF gelöst und mit 1.5 Äquiv. Benzylamin versetzt. Die Reaktionslösung wurde bis zur nahezu vollständigen Umsetzung des Edukts bei Rt gerührt und anschließend auf die Hälfte eingeeengt. Nach Zugabe von Ethylacetat wurde zwei Mal mit 1 M Salzsäure, zwei Mal mit Wasser, zwei Mal mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und weitere zwei Mal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

7.2.6. *Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Phosphorylierung der anomeren Hydroxyfunktion von Glycopyranosen mit Dibenzyl-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (AAV 6)*

Die am anomeren Zentrum entschützte Glycopyranose wurde in abs. Acetonitril gelöst und 1.1 Äquiv. DCI sowie 1.1 Äquiv. Dibenzyl-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bis zur vollständigen Umsetzung des Edukts bei Rt gerührt. Dazu war es ggf. nötig, weiteres Phosphoramidit hinzuzufügen. Anschließend wurde bei 0 °C mit 1.2 Äquiv. *meta*-Chlorperbenzoesäure versetzt und bis zur vollständigen Oxidation bei Rt gerührt. Wurde Phosphoramidit nachgegeben, wurde die entsprechende Menge an Äquiv. Oxidationsmittel ergänzt. Der Reaktionsansatz wurde mit Ethylacetat versetzt und mit ges. Natriumsulfatlösung, ges. Natriumcarbonatlösung und zwei Mal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

7.2.7. *Allgemeine Arbeitsvorschrift zur hydrogenolytischen Spaltung der Benzylgruppen von Dibenzyl(glycopyranosyl)-1-phosphaten (AAV 7)*

Das Dibenzyl(glycopyranosyl)-1-phosphat wurde in Dioxan gelöst und mit 1.3-1.9 Äquiv. Triethylamin versetzt. Nach Zugabe von Pd/C (5% Pd, 55% Wasser) wurde bis zur vollständigen Umsetzung des Edukts unter Wasserstoffatmosphäre bei Rt gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite® filtriert, in Dichlormethan aufgenommen und mehrmals mit Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden gefriergetrocknet.

7.2.8. *Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese 5'-O-tosylierter Nucleoside (AAV 8)*

Das Nucleosid wurde in abs. Pyridin gelöst und bei 0 °C 1.5-3.0 Äquiv. *p*-TsCl gelöst in abs. Pyridin langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde bis zur vollständigen Umsetzung des Edukts bei 0 °C-Rt gerührt und anschließend in Eiswasser gegeben. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand drei Mal mit Toluol coevaporiert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

7.2.9. *Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von cycloSal-Nucleosidmonophosphaten (AAV 9)*

*Variante A: Oxidation mit tert-Butylhydroperoxid*

Das jeweilige Nucleosid wurde mit abs. Acetonitril coevaporiert und in abs. Acetonitril gelöst. Bei -20 °C wurden zu der Lösung 1.6 Äquiv. DIPEA und 2.0 Äquiv. des entsprechenden Saligenylchlorphosphits gelöst in abs. Acetonitril gegeben und die Reaktionslösung bis zur vollständigen Umsetzung des Nucleosids bei Rt gerührt. Anschließend wurde die Lösung wieder auf -20 °C gekühlt, 3.0 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) zugegeben und bis zur vollständigen Oxidation des Phosphitriesters bei Rt gerührt. Die Reaktionslösung wurde in Eiswasser gegeben und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten org. Phasen

wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des so erhaltenen Rohprodukts erfolgte mit Hilfe circularer präparativer Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™). Anschließend wurde das Produkt in einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser (1:1 v/v) aufgenommen und gefriergetrocknet.

*Variante B: Oxidation mit Oxone®*

Das jeweilige Nucleosid wurde mit Acetonitril coevaporiert und in abs. Acetonitril gelöst. Bei -20 °C wurden zu der Lösung 1.6 Äquiv. DIPEA und 2.0 Äquiv. des entsprechenden Saligenylchlorphosphits gelöst in abs. Acetonitril gegeben und die Reaktionslösung 45 min bei Rt gerührt. Anschließend wurde die Lösung wieder auf -20 °C gekühlt, 1.0 Äquiv. bzw. 4.0 Äquiv. Oxone®, gelöst in kaltem Wasser, zugegeben und 15 min bei Rt gerührt. Die so erhaltene Suspension wurde drei Mal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des so erhaltenen Rohprodukts erfolgte mit Hilfe circularer präparativer Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™) (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v + 0.1% Vol. Eisessig). Anschließend wurde das Produkt in einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser (1:1 v/v) aufgenommen und gefriergetrocknet.

*Variante C: Oxidation mit Iod*

Das jeweilige Nucleosid wurde mit abs. Acetonitril coevaporiert und in abs. Acetonitril gelöst. Bei -20 °C wurden zu der Lösung 2.0 Äquiv. DIPEA und 2.0 Äquiv. des entsprechenden Saligenylchlorphosphits gelöst in abs. Acetonitril gegeben und die Reaktionslösung bis zur vollständigen Umsetzung des Nucleosids bei Rt gerührt. Anschließend wurde die Lösung wieder auf -20 °C gekühlt und 2.5 Äquiv. Iod (0.1 M in THF/Wasser/Pyridin 77:2:21 v/v/v) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde bis zur vollständigen Oxidation bei Rt gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und drei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen

wurden mit ges. Natriumsulfitlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser (1:1 v/v) aufgenommen und gefriergetrocknet.

#### *7.2.10. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Nucleosid-5'-monophosphaten (AAV 10)*

*Variante A: Nach SOWA und OUCHI<sup>[93]</sup>*

Es wurden 4.4 Äquiv. Phosphorylchlorid in abs. Acetonitril gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nun wurden 4.4 Äquiv. Abs. Pyridin und 2.2 Äquiv. Wasser vorsichtig unter Rühren zugegeben. Nach 10 min wurde das jeweilige Nucleosid portionsweise zugefügt und die Reaktionslösung 4 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von Eiswasser und Rühren für 1 h bei 4 °C überschüssiges Phosphorylchlorid hydrolysiert. Nach Neutralisation durch Zugabe festen Ammoniumhydrogencarbonats wurde die Lösung gefriergetrocknet und das so erhaltene Rohprodukt durch Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel mit Wasser als Eluent gereinigt. Die Nucleosid-5'-monophosphate wurden auf diesem Weg als Ammoniumsalze erhalten. Der Austausch der Kationen gegen Tetrabutylammonium gelang durch Elution einer wässrigen Lösung des Ammoniumsalzes über die protonierte Form einer Kationenaustauschersäule Dowex 50WX8 und anschließende Neutralisation (pH 6-7) durch Zugabe von Tetra-*n*-butylammoniumhydroxidlösung (40% w/w aq.). Das Lösungsmittel wurde durch Gefrier Trocknung entfernt.

*Variante B: Durch Umsetzung 5'-O-tosylierter Nucleoside mit Tetra-*n*-butylammoniumphosphat **154***

Das jeweilige 5'-O-tosylierte Nucleosid wurde in abs. DMF gelöst und bei Rt 1.4-2.0 Äquiv. Tetrabutylammoniumphosphat **154** zugegeben. Der Ansatz wurde bis zur vollständigen Umsetzung des Edukts bei 100 °C (150 Watt) in der Mikrowelle gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser

aufgenommen und drei Mal mit Dichlormethan gewaschen. Die wässrige Phase wurde gefriergetrocknet und das so erhaltene Rohprodukt durch Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:2 v/v) gereinigt.

#### 7.2.11. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Nucleosid-5'-diphosphaten (AAV 11)

Es wurden 2.0-2.9 Äquiv. Tetra-*n*-butylammoniumphosphat **154** im Ölpumpenvakuum getrocknet, in abs. DMF gelöst und eine Stunde über aktiviertem Molsieb gerührt. Das entsprechende 5-Chlor-*cycloSal*-Nucleosidmonophosphat wurde in abs. DMF gelöst und über 1 h zugetropft. Die Reaktionslösung wurde bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Wasser und Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde drei Mal mit Wasser extrahiert und die vereinigten wässrigen Phasen gefriergetrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wurde durch Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel gereinigt und anschließend die Kationen an einem DOWEX 50WX8 Kationenaustauscher gegen Ammoniumionen ausgetauscht.

#### 7.2.12. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Bis(acyloxybenzyl)-nucleosid-diphosphatprodrugs (AAV 12)

Das entsprechende Nucleosidmonophosphat wurde gefriergetrocknet, mit abs. Acetonitril coevaporiert und in abs. Acetonitril gelöst. Dazu wurden 1.7 Äquiv. des jeweiligen Bis(acyloxybenzyl)-phosphoramidits und 1.3-1.8 Äquiv. DCI gegeben und die Reaktionslösung bis zu 20 h bei Rt gerührt. Nach vollständiger Kupplung (HPLC-Verfolgung) wurde die Reaktionslösung auf -20 °C gekühlt und 1.8 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) zugegeben und weitere 45 min-3 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt zunächst durch Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel gereinigt. Anschließend erfolgte der Austausch der Kationen durch Elution über eine mit NH<sub>4</sub><sup>+</sup> beladene Dowex 50WX8

Kationenaustauschersäule. Anschließend wurde mehrfach an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O) chromatographiert.

*7.2.13. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Nucleosiddiphosphatpyranosen (AAV 13)*

Es wurden 2.0 Äquiv. des acetylgeschützten Pyranosylphosphats mehrere Stunden im Vakuum getrocknet, in abs. DMF gelöst und für eine weitere Stunde über aktiviertem Molsieb (4 Å) gelagert. Anschließend wurden 1.0 Äquiv. des *cycloSal*-Nucleosidphosphats, das ebenfalls über mehrere Stunden im Vakuum getrocknet wurde, gelöst in abs. DMF langsam zu der Lösung des Pyranosylphosphats getropft. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur vollständigen Umsetzung der *cycloSal*-Verbindung bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wurde gefriergetrocknet und der Rückstand in einem Gemisch von Methanol, Wasser und Triethylamin (7:3:1 v/v/v) aufgenommen. Nach Rühren bei Rt für 20 h wurde erneut gefriergetrocknet und das so erhaltene Rohprodukt durch Umkehrphasenchromatographie mit Wasser als Eluent gereinigt.

### 7.3. Synthese der Saligenylchlorphosphite

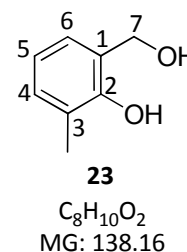
#### 7.3.1. Synthese von 3-Methylsalicylalkohol **23**

Die Synthese wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 2.50 g (65.9 mmol, 2.0 Äquiv.) Lithiumaluminiumhydrid in 40 mL abs. THF und 5.00 g (32.9 mmol) 3-Methylsalicylsäure **88** in 15 mL abs. THF verwendet. Die Reaktionszeiten betragen 2 h bei Rt und 2 h unter Rückfluss.

Die Ausbeute betrug 3.40 g (24.6 mmol, 75%) eines farblosen Feststoffs.

Smp. = 35 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.39 (s, 1H, 2-OH), 7.06 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.4 Hz, 1H, H-6), 6.96 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-4), 6.71 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-5), 5.28 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.4 Hz, 1H, 7-OH), 4.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.4 Hz, 2H, H-7), 2.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).



<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 152.6 (C-2), 129.0 (C-4), 128.0 (C-1), 125.0 (C-6), 124.1 (C-3), 119.0 (C-5), 59.8 (C-7), 16.2 (Me).

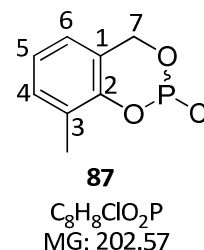
IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3318, 1595, 1468, 1437, 1338, 1269, 1206, 989, 836, 770, 737, 674, 525. MS (EI): *m/z* = ber.: 138 [M]<sup>+</sup>, gef.: 138 (56%), 120 (97%), 91 (100%).

#### 7.3.2 Synthese von 3-Methylsaligenylchlorphosphit **87**

Die Synthese wurde nach AAV 2 durchgeführt. Es wurden 360 mg (2.61 mmol) 3-Methylsalicylalkohol **23** gelöst in 26 mL abs. Diethylether, 0.24 mL (0.36 g, 2.6 mmol, 1.0 Äquiv.) Phosphor(III)-chlorid und 0.36 mL (0.36 g, 4.6 mmol, 1.8 Äquiv.) abs. Pyridin in 3 mL abs. Diethylether verwendet.

Die Ausbeute betrug 474 mg (2.34 mmol, 90%) eines farblosen Öls als racemisches Gemisch.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.13 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 0.7 Hz, 1H, H-6), 6.99 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, 1H, H-5), 6.81 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 0.7 Hz, 1H, H-4), 5.43 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 14.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-P</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-7a), 5.01 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 14.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-P</sub> = 9.4 Hz, 1H, H-7b), 2.24 (s, 3H, Me).



**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 140.81.

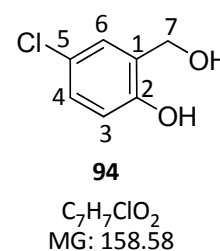
### 7.3.3. Synthese von 5-Chlorsalicylalkohol **94**

Die Synthese wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 2.19 g (57.7 mmol, 2.0 Äquiv.) Lithiumaluminiumhydrid in 35 mL abs. THF und 4.99 g (28.9 mmol) 5-Chlorsalicylsäure **93** in 30 mL abs. THF verwendet. Die Reaktionszeiten betragen 18 h bei Rt und 1 h unter Rückfluss.

Die Ausbeute betrug 3.61 g (22.5 mmol, 79%) eines beigen Feststoffs.

**Smp.** = 96 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 9.63 (s, 1H, 2-OH), 7.27 (d, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-6), 7.06 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-4), 6.76 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-3), 5.09 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.8 Hz, 1H, 7-OH), 4.44 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.4 Hz, 2H, H-7).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 152.8 (C-2), 131.0 (C-1), 126.7 (C-4), 126.5 (C-6), 122.4 (C-5), 115.9 (C-3), 57.7 (C-7).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3406, 3143, 2972, 2903, 1607, 1481, 1407, 1262, 1178, 1077, 885, 819, 656, 484, 453. **MS** (EI): *m/z* = ber.: 158 [M]<sup>+</sup>, gef.: 158 (45%), 140 (100%), 112 (72%), 77 (54%).

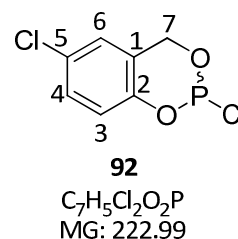


#### 7.3.4. Synthese von 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **92**

Die Synthese wurde nach AAV 2 durchgeführt. Es wurden 803 mg (5.06 mmol) 5-Chlorsalicylalkohol **94** gelöst in 40 mL abs. Diethylether, 0.55 mL (0.86 g, 6.3 mmol, 1.2 Äquiv.) Phosphor(III)-chlorid und 0.74 mL (0.73 g, 9.2 mmol, 1.8 Äquiv.) abs. Pyridin in 3 mL abs. Diethylether verwendet.

Die Ausbeute betrug 808 mg (3.62 mmol, 72%) eines gelben Öls als racemisches Gemisch.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.23 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.6 Hz, 1H, H-4), 6.98 (d, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-6), 6.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-3), 5.41 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 14.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-P</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-7a), 5.00 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 14.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-P</sub> = 9.6 Hz, 1H, H-7b).



<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 139.00.

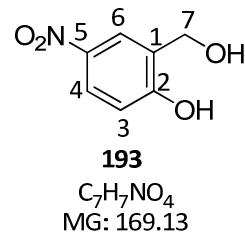
#### 7.3.5. Synthese von 5-Nitrosalicylalkohol **193**

Es wurden 4.19 g (25.1 mmol) 5-Nitrosalicylaldehyd **194** in 125 mL Ethanol gelöst und portionsweise mit 0.86 g (23 mmol, 0.9 Äquiv.) Natriumborhydrid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 22 h bei Rt gerührt und anschließend 10 mL Wasser zugegeben. Durch Titration mit konz. Salzsäure wurde ein pH-Wert von 2 eingestellt, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel, der anschließend durch Filtration entfernt wurde. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt drei Mal mit Methanol coevaporiert. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisation aus Wasser.

Die Ausbeute betrug 1.71 g (10.1 mmol, 40%) eines gelben Feststoffs.

DC: R<sub>f</sub>-Wert = 0.41 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v). Smp. = 124 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.08 (s, 1H, 2-OH), 8.21, (d, <sup>4</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-6), 8.02 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.8 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-4), 6.93 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.8 Hz, 1H, H-3), 5.34 (s, 1H, 7-OH), 4.51 (s, 2H, H-7).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 160.5 (C-2), 139.7 (C-5), 130.3 (C-1), 124.0 (C-4), 122.7 (C-6), 114.7 (C-3), 57.4 (C-7).

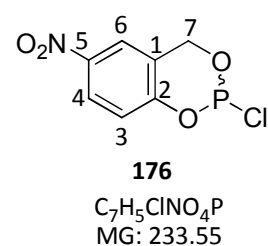
**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3458, 3077, 1617, 1591, 1521, 1484, 1331, 1290, 1085, 987, 905, 843, 752, 734, 641, 617, 491. **MS** (FAB): *m/z* = ber.: 170.0 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 170.0.

### 7.3.6. Synthese von 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **176**

Die Synthese wurde nach AAV 2 durchgeführt. Es wurden 288 mg (1.70 mmol) 5-Nitrosalicylalkohol **193** gelöst in 12 mL abs. Diethylether, 0.27 mL (0.41 g, 3.1 mmol, 1.8 Äquiv.) Phosphor(III)-chlorid und 0.45 mL (0.45 g, 5.6 mmol, 3.3 Äquiv.) abs. Pyridin in 3.0 mL abs. Diethylether verwendet.

Die Ausbeute betrug 221 mg eines leicht verunreinigten farblosen Öls als racemisches Gemisch.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.18 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 9.1 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-4), 7.98 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.6 Hz, 1H, H-6), 7.13 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.6 Hz, 1H, H-3), 5.52 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 14.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H-P</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-7a), 5.14 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 14.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H-P</sub> = 9.6 Hz, 1H, H-7b).



**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 139.23.

## 7.4. Synthese der Bis(acyloxybenzyl)-phosphoramidite

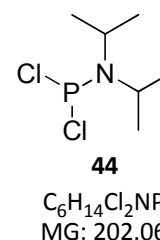
### 7.4.1. Synthese von Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **44**

Es wurden 4.40 mL (6.91 g, 50.3 mmol) frisch destilliertes Phosphor(III)-chlorid in 20 mL abs. Diethylether gelöst und auf -10 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurden über 45 min 14.2 mL (10.2 g, 101 mmol, 2.0 Äquiv.) *N,N*-Diisopropylamin gelöst in 20 mL abs. Diethylether (ebenfalls auf -10 °C abgekühlt) hinzugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 75 min bei -10 °C gerührt und kalt unter Stickstoff als Schutzgas filtriert.

Die Ausbeute betrug 4.59 g (22.7 mmol, 45%) eines gelben Öls.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 4.04-3.80 (m, 2H, CH-*i*Pr), 1.28 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>-*i*Pr).

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 169.58.



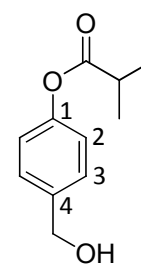
### 7.4.2. Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylisobutyrat **75**

Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 2.50 g (20.1 mmol) 4-Hydroxybenzylalkohol **36** und 2.80 mL (2.04 g, 20.2 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 30 mL abs. THF und 2.10 mL (2.14 g, 20.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Isobutyrylchlorid **71** in 20 mL abs. THF verwendet. Reaktionszeit: 2 h bei 0 °C. Die Reinigung erfolgte durch circulare präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™)(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

Die Ausbeute betrug 1.60 g (8.24 mmol, 41%) als farbloses Öl.

DC: R<sub>f</sub>-Wert = 0.26 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.34 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.5 Hz, 2H, H-3), 7.05 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.5 Hz, 2H, H-2), 5.19 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.8 Hz, 1H, OH), 4.49 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.8 Hz, 2H, Bn), 2.80 (sept, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 1H, CH-*i*Pr), 1.23 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>-*i*Pr).



**75**  
C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>  
MG: 194.23

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 175.1 (C=O), 149.2 (C-1), 140.0 (C-4), 127.4 (C-3), 121.3 (C-2), 62.3 (Bn), 33.3 (CH-*i*Pr), 18.7 (CH<sub>3</sub>-*i*Pr).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3362, 2976, 2936, 2877, 1752, 1507, 1469, 1200, 1181, 1163, 1129, 1095, 917, 868, 760, 503. **MS** (FAB): *m/z* = ber.: 194.1 [M]<sup>+</sup>, gef.: 194.1.

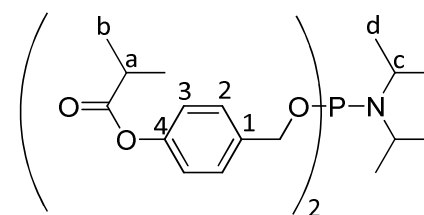
#### 7.4.3. Synthese von Bis(4-isobutyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **67**

Die Synthese wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 0.70 mL (0.77 g, 3.8 mmol) Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **44** gelöst in 16 mL abs. THF sowie 1.60 g (8.24 mmol, 2.2 Äquiv.), 4-(Hydroxymethyl)phenylisobutyrat **75** und 1.2 mL (0.88 g, 8.7 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin in 16 mL abs. THF verwendet.

Die Ausbeute betrug 1.68 g (3.25 mmol, 85%) eines farblosen Öls.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.87 (PE/Et<sub>3</sub>N 9:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.35 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.4 Hz, 4H, H-2), 7.04 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.4 Hz, 4H, H-3), 4.80-4.63 (m, 4H, Bn), 3.76-3.62 (m, 2H, H-c), 2.80 (sept, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, H-a), 1.32 (d, 12H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, H-b), 1.21 (d, 12H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, H-d).



**67**  
C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>6</sub>P  
MG: 517.59

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 175.7 (C=O), 150.2 (C-4), 137.0 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 7.8 Hz, C-1), 128.1 (C-2), 121.4 (C-3), 65.0 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 18.3 Hz, Bn), 43.3 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 12.5 Hz, C-c), 34.3 (C-a), 24.8 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 7.4 Hz, C-d), 19.1 (C-b).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 148.00.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2968, 2932, 2874, 1755, 1508, 1468, 1364, 1234, 1199, 1181, 1126, 1004, 972, 868, 702, 521, 504. **MS** (MALDI, 9-AA)  $m/z$  = ber.: 540.249  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 556.223  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , gef.: 540.279, 556.291.

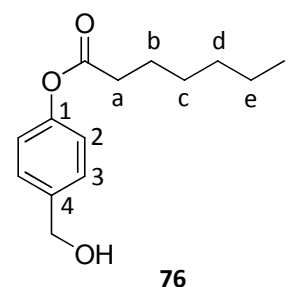
#### 7.4.4. Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-phenylheptanoat **76**

Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 3.31 g (26.7 mmol) 4-Hydroxybenzylalkohol **36** und 3.70 mL (2.70 g, 26.7 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 30 mL abs. THF und 3.81 mL (3.66 g, 24.6 mmol, 0.9 Äquiv.) Heptanoylchlorid **72** in 20 mL abs. THF verwendet. Reaktionszeit: 2 h bei 0 °C. Die Reinigung erfolgte säulen-chromatographisch an Kieselgel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

Die Ausbeute betrug 3.22 g (13.6 mmol, 51%) eines farblosen Feststoffs.

**DC:**  $R_f$ -Wert = 0.30 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). **Smp.** = 30 °C.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.34 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$  Hz, 2H, H-3), 7.04 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$  Hz, 2H, H-2), 5.21 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$  Hz, 1H, OH), 4.48 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$  Hz, 2H, Bn), 2.56 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 2H, H-a), 1.63 (tt,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 2H, H-b), 1.41-1.21 (m, 6H, H-c, H-d, H-e), 0.88 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$  Hz, 3H, H-f).



**76**

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_3$   
MG: 236.31

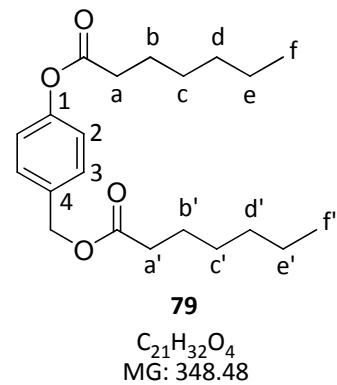
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 171.8 (C=O), 149.1 (C-1), 140.0 (C-4), 127.4 (C-3), 121.3 (C-2), 62.3 (Bn), 33.4, 30.8, 28.0, 24.3, 21.9 (C-a, C-b, C-c, C-d, C-e), 13.8 (C-f).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3383, 2955, 2929, 2859, 1754, 1507, 1196, 1163, 1141, 1101, 1014, 848, 502.

**MS** (FAB):  $m/z$  = ber.: 236.1  $[\text{M}]^+$ , gef.: 236.1.

Als Nebenprodukt wurden 2.52 g (7.23 mmol, 27%) des zweifach veresterten 4-Hydroxybenzylalkohols **79** als farbloser Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.40 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.4 Hz, 2H, H-3), 7.11 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.4 Hz, 2H, H-2), 5.08 (s, 2H, Bn), 2.57 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-a), 2.35 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-a'), 1.64 (tt, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 2H, H-b), 1.54 (tt, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, 2H, H-b'), 1.40-1.20 (m, 12H, H-c, H-c', H-d, H-d', H-e, H-e'), 0.88 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 3H, H-f), 0.85 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 3H, H-f').



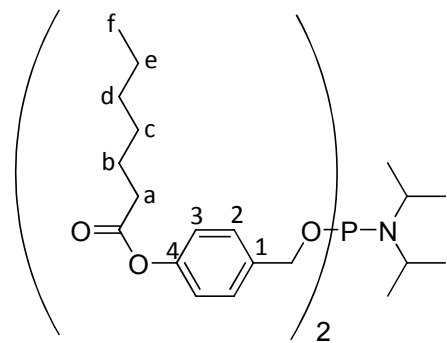
#### 7.4.5. Synthese von Bis(4-heptanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **68**

Die Synthese wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 0.42 mL (0.46 g, 2.3 mmol) Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **44** gelöst in 6 mL abs. THF sowie 1.16 g (4.91 mmol, 2.1 Äquiv.), 4-(Hydroxymethyl)-phenylheptanoat **76** und 0.73 mL (0.54 g, 5.2 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin in 6 mL abs. THF verwendet.

Die Ausbeute betrug 1.21 g (2.01 mmol, 87%) eines farblosen Öls.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.71 (PE/Et<sub>3</sub>N 9:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.35 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.4 Hz, 4H, H-2), 7.03 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.4 Hz, 4H, H-3), 4.79-4.63 (m, 4H, Bn), 3.76-3.62 (m, 2H, CH-*i*Pr), 2.55 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 4H, H-a), 1.75 (tt, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, 4H, H-b), 1.46-1.30 (m, 12H, H-c, H-d, H-e), 1.20 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>-*i*Pr), 0.91 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 6H, H-f).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 172.5 (C=O), 150.0 (C-4), 137.1 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 7.5 Hz, C-1), 128.1 (C-2), 121.5 (C-3), 65.0 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 18.3 Hz, Bn), 43.2 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 12.1 Hz, CH-*i*Pr), 34.5, 31.6, 28.9, 25.0 (C-a, C-b, C-c, C-d), 24.8 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C-P</sub> = 7.4 Hz, CH<sub>3</sub>-*i*Pr), 22.6 (C-e), 14.1 (C-f).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 147.95.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2961, 2929, 2860, 1758, 1507, 1460, 1364, 1197, 1139, 1004, 973, 753, 504. **MS** (MALDI, DHB):  $m/z$  = ber.: 640.316  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , gef.: 640.190.

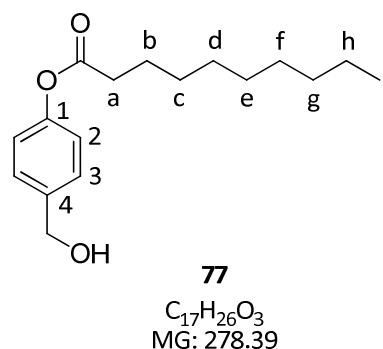
#### 7.4.6. Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-phenyldecanoat **77**

Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 3.31 g (26.7 mmol) 4-Hydroxybenzylalkohol **36** und 3.70 mL (2.70 g, 26.7 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 30 mL abs. THF und 5.54 mL (5.09 g, 26.7 mmol, 1.0 Äquiv.) Decanoylchlorid **73** in 20 mL abs. THF verwendet. Reaktionszeit: 2 h bei 0 °C und 3 h bei Rt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 3:2 v/v).

Die Ausbeute betrug 3.80 g (13.7 mmol, 51%) eines farblosen Feststoffs.

**DC:**  $R_f$ -Wert = 0.32 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). **Smp.** = 39 °C.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.34 (d,  $^3J_{\text{H,H}}=8.5$  Hz, 2H, H-3), 7.04 (d,  $^3J_{\text{H,H}}=8.4$  Hz, 2H, H-2), 5.21 (t,  $^3J_{\text{H,H}}=5.7$  Hz, 1H, OH), 4.49 (d,  $^3J_{\text{H,H}}=5.4$  Hz, 2H, Bn), 2.55 (t,  $^3J_{\text{H,H}}=7.4$  Hz, 2H, H-a), 1.63 (tt,  $^3J_{\text{H,H}}=7.5$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}}=7.2$  Hz, 2H, H-b), 1.40-1.20 (m, 12H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.86 (t,  $^3J_{\text{H,H}}=6.8$  Hz, H-i).



**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 171.8 (C=O), 149.2 (C-1), 140.0 (C-4), 127.4 (C-3), 121.3 (C-2), 62.3 (Bn), 33.5, 31.2, 28.8, 28.7, 28.6, 28.4, 24.3, 22.1 (H-a, H-b, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h), 13.9 (C-i).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2955, 2916, 2848, 1748, 1508, 1466, 1412, 1383, 1325, 1288, 1214, 1148, 1013, 924, 847, 720, 514. **HRMS** ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z$  = ber.: 301.1774  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , gef.: 301.1710.

7.4.7. Synthese von Bis(4-decanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **69**

Die Synthese wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 0.37 mL (0.41 g, 2.0 mmol) Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **44** gelöst in 6 mL abs. THF sowie 1.25 g (4.49 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenyldecanoat **77** und 0.65 mL (0.48 g, 4.7 mmol, 2.4 Äquiv.) Triethylamin in 6 mL abs. THF verwendet.

Die Ausbeute betrug 1.30 g (1.89 mmol, 95%) eines farblosen Öls.

**DC:**  $R_f$ -Wert = 0.81 (PE/Et<sub>3</sub>N 9:1 v/v).

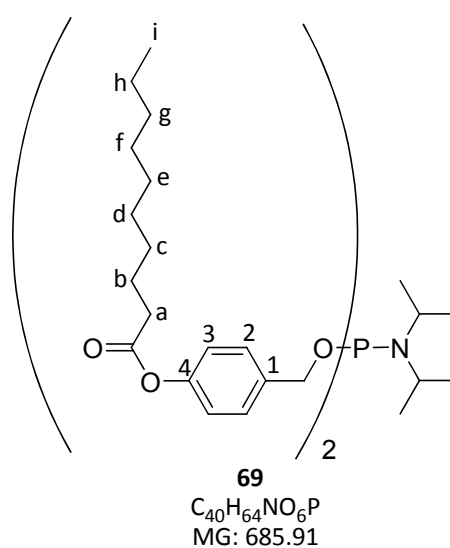
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.35 (d, <sup>3</sup> $J_{H,H}$  = 8.5 Hz, 4H, H-2), 7.03 (d, <sup>3</sup> $J_{H,H}$  = 8.5 Hz, H-3), 4.79-4.63 (m, 4H, Bn), 3.75-3.63 (m, 2H, CH-*i*Pr), 2.54 (t, <sup>3</sup> $J_{H,H}$  = 7.5 Hz, 4H, H-a), 1.75 (tt, <sup>3</sup> $J_{H,H}$  = 7.6 Hz, <sup>3</sup> $J_{H,H}$  = 7.4 Hz, 4H, H-b), 1.47-1.24 (m, 24H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.89 (t, <sup>3</sup> $J_{H,H}$  = 6.7 Hz, 6H, H-i).

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 172.5 (C=O), 150.1 (C-4), 137.1 (d, <sup>3</sup> $J_{C-P}$  = 7.3 Hz, C-1), 128.1 (C-2), 121.5 (C-3), 65.0 (d, <sup>2</sup> $J_{C-P}$  = 18.5 Hz, Bn), 43.3 (d, <sup>3</sup> $J_{C-P}$  = 12.3 Hz,

CH-*i*Pr), 34.6, 32.0, 29.6, 29.4, 29.4, 29.3, 25.1 (C-a, C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g), 24.8 (d, <sup>3</sup> $J_{C-P}$  = 7.3 Hz, CH<sub>3</sub>-*i*Pr), 22.8 (C-i).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 147.96.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2961, 2924, 2854, 1759, 1507, 1460, 1364, 1197, 1164, 1137, 1106, 1006, 753, 504. **MS** (MALDI, 9-AA):  $m/z$  = ber.: 724.410 [M+K]<sup>+</sup>, gef.: 724.521.





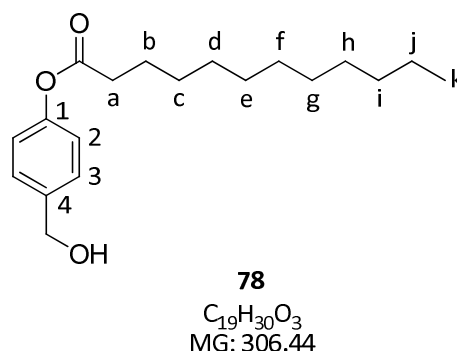
#### 7.4.8. Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-phenyldodecanoat **78**

Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 3.31 g (26.7 mmol) 4-Hydroxybenzylalkohol **36** und 3.70 mL (2.70 g, 26.7 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 30 mL abs. THF und 6.20 mL (5.72 g, 26.2 mmol, 1.0 Äquiv.) Dodecanoylchlorid **74** in 20 mL abs. THF verwendet. Reaktionszeit: 21 h bei 0 °C und 3 h bei Rt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 3:2 v/v).

Die Ausbeute betrug 3.76 g (12.3 mmol, 46%) eines farblosen Feststoffs.

**DC:**  $R_f$ -Wert = 0.24 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). **Smp.** = 58 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.34 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.5 Hz, 2H, H-3), 7.04 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.5 Hz, 2H, H-2), 5.20 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.7 Hz, 1H, OH), 4.49 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.4 Hz, 2H, Bn), 2.54 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, H-a), 1.63 (tt, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 2H, H-b), 1.40-1.19 (m, 16H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j), 0.86 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, H-k).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 171.8 (C=O), 149.2 (C-1), 140.0 (C-4), 127.4 (C-3), 121.3 (C-2), 62.4 (Bn), 33.5, 31.3, 29.0, 29.0, 28.9, 28.7, 28.7, 28.4, 24.4 (C-a, C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j), 13.9 (C-k).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2915, 2848, 1748, 1509, 1464, 1411, 1384, 1215, 1148, 1013, 924, 847, 719, 513. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 329.2087 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 329.2048.

#### 7.4.9. Synthese von Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **70**

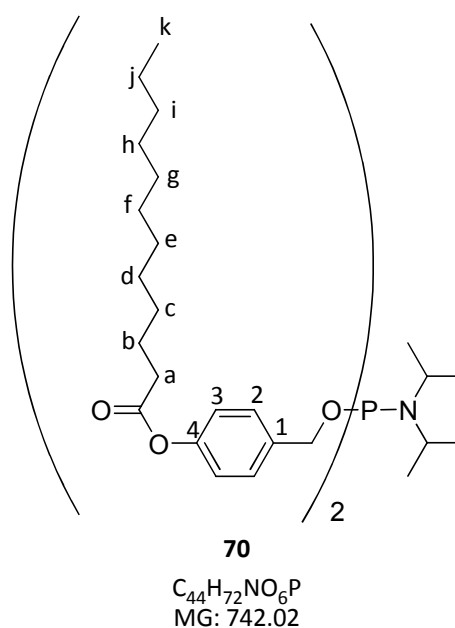
Die Synthese wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 0.37 mL (0.41 g, 2.0 mmol) Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **44** gelöst in 6 mL abs. THF sowie 1.39 g (4.54 mmol, 2.3 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenyldodecanoat **78** und 0.65 mL (0.48 g, 4.7 mmol, 2.4 Äquiv.) Triethylamin in 6 mL abs. THF verwendet.

Die Ausbeute betrug 1.45 g (1.95 mmol, 98%) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert = 0.76 (PE/Et<sub>3</sub>N 9:1 v/v). Smp. = 37 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.35 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.5 Hz, 4H, H-2), 7.04 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.5 Hz, 4H, H-3), 4.79-4.64 (m, 4H, Bn), 3.76-3.62 (m, 2H, CH-*i*Pr), 2.54 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, H-a), 1.75 (tt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 4H, H-b), 1.46-1.24 (m, 32H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j), 1.20 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>-*i*Pr).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 172.5 (C=O), 150.1 (C-4), 137.1 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.8 Hz, C-1), 128.1 (C-2), 121.5 (C-3), 65.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 18.3 Hz, Bn), 43.3 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 12.5 Hz, CH-*i*Pr), 34.6, 32.0, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 25.1 (C-a, C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i), 24.8 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.3 Hz, CH<sub>3</sub>-*i*Pr), 22.8 (C-j), 14.2 (C-k).



<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 147.91.

IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2958, 2915, 2848, 1751, 1508, 1464, 1361, 1199, 1152, 1032, 968, 760, 693, 509. MS (MALDI, 9-AA):  $m/z$  = ber.: 780.473 [M+K]<sup>+</sup>, gef.: 780.484.

## 7.5. Synthese der Glycopyranosylphosphate

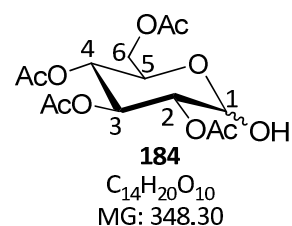
### 7.5.1. Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-glycopyranose **184**

Die Synthese wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 2.96 g (7.58 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-glycopyranose **182** gelöst in 100 mL THF und 1.3 mL (1.2 g, 12 mmol, 1.6 Äquiv.) Benzylamin verwendet. Die Reaktionszeit betrug 26 h, die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:2-1:3 v/v).

Die Ausbeute betrug 1.11 g (3.19 mmol, 42%) eines farblosen Öls. Das Anomerenverhältnis wurde aus dem <sup>1</sup>H-NMR bestimmt und betrug  $\alpha/\beta$  = 1:0.3.

DC:  $R_f$ -Wert = 0.32 (PE/EE 1:1 v/v).

$\alpha$ - $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 5.53 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.8$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.9$  Hz, 1H, H-3), 5.46 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.5$  Hz, 1H, H-1), 5.08 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.8$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.6$  Hz, H-4), 4.90 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 10.2$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.5$  Hz, 1H, H-2), 4.30-4.20 (m, 2H, H-5, H-6a), 4.18-4.10 (m, 1H, H-6b), 2.09, 2.08, 2.03, 2.01 (4 x s, 4 x 3H, 4 x OAc).



$\alpha$ - $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 170.9, 170.3, 170.3, 169.8 (4 x COCH<sub>3</sub>), 90.3 (C-1), 71.2 (C-2), 70.0 (C-3), 68.6 (C-4), 67.4 (C-5), 62.1 (C-6), 20.9, 20.9, 20.8, 20.8 (4 x COCH<sub>3</sub>).

IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3467, 2969, 1740, 1433, 1367, 1211, 1153, 1030, 772, 600, 551, 487, 457.

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = ber.: 371.0949 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 371.0965.

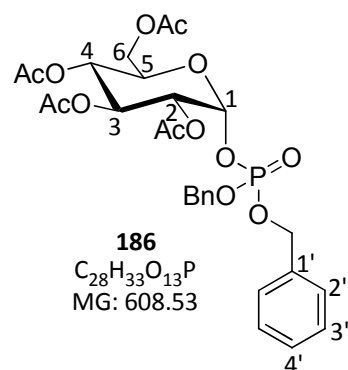
### 7.5.2. Synthese von Dibenzyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-1-phosphat **186**

Die Synthese wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 1.10 g (3.16 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-glucopyranose **184**, 10 mL abs. Acetonitril, 410 mg (3.47 mmol, 1.1 Äquiv.) DCI und 1.2 mL (1.2 g, 3.5 mmol, 1.1 Äquiv.) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit verwendet. Nach 30 min Reaktionszeit wurden bei 0 °C 0.65 g (3.8 mmol, 1.2 Äquiv.) *meta*-Chlorperbenzoesäure zugefügt und 45 min bei Rt gerührt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 3:1-1:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 740 mg (1.22 mmol, 39%) des reinen  $\alpha$ -Anomers als farbloses Öl.

DC:  $R_f$ -Wert = 0.38 (PE/EE 1:1 v/v).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.40-7.33 (m, 10H, H-arom.), 5.90 (dd,  $^3J_{\text{H-P}} = 6.8$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.4$  Hz, 1H, H-1), 5.48 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.8$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.8$  Hz, 1H, H-3), 5.14-5.05 (m, 5H, H-4, Bn), 4.98 (ddd,  $^3J_{\text{H,H}} = 10.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.4$  Hz,  $^4J_{\text{H-P}} = 2.7$  Hz, 1H, H-2), 4.17 (dd,  $^2J_{\text{H,H}} = 12.4$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.1$  Hz, 1H, H-6a), 4.05 (ddd,  $^3J_{\text{H,H}} = 10.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.1$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.2$  Hz, 1H, H-5), 3.93 (dd,  $^2J_{\text{H,H}} = 12.5$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.1$  Hz, 1H, H-6b), 2.03, 2.02, 2.01, 1.90 (4 x s, 4 x 3H, 4 x OAc).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ [ppm] = 170.5, 170.0, 169.8, 169.4 (4 x COCH<sub>3</sub>), 135.4 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.1 Hz, 1 x C-1'), 135.3 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, 1 x C-1'), 128.9, 128.8 (2 x C-arom.), 128.8 (d, <sup>4</sup>J<sub>C-P</sub> = 1.4 Hz, C-2'), 128.2, 128.0 (2 x C-arom.), 94.0 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.1 Hz, C-1), 69.9 (C-2), 69.8 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.5 Hz, Bn), 69.4 (C-3), 69.4 (C-5), 67.7 (C-4), 61.3 (C-6), 20.7, 20.6, 20.6, 20.4 (4 x COCH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ [ppm] = -2.73.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 1745, 1456, 1367, 1211, 1150, 1034, 1010, 948, 739, 697, 599, 551, 480. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = ber.: 631.1546 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 631.1561. [ $\alpha$ ]<sub>598</sub><sup>20</sup> = +85° (c = 0.80, CHCl<sub>3</sub>).

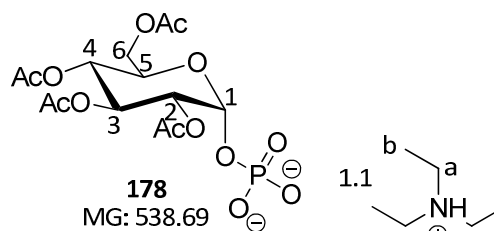
### 7.5.3. Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-phosphat **178** als Triethylammoniumsalz

Die Synthese wurde nach AAV 7 durchgeführt. Es wurden 370 mg (0.608 mmol) Dibenzyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-1-phosphat **186** gelöst in 10 mL Dioxan und 0.11 mL (80 mg, 0.79 mmol, 1.3 Äquiv.) Triethylamin sowie eine Spatelspitze Pd/C (5% Pd, 55% Wasser) verwendet. Die Reaktionszeit betrug 72 h.

Die Ausbeute betrug 254 mg (0.472 mmol, 77%) eines farblosen Feststoffs als reines  $\alpha$ -Anomer. Die Anzahl der Triethylammoniumionen wurde anhand des <sup>1</sup>H-NMR bestimmt.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.63 (Aceton/Wasser 3:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$ [ppm] = 5.73 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-P</sub> = 7.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.6 Hz, 1H, H-1), 5.52 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.8 Hz, 1H, H-3), 5.19 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.8 Hz, 1H, H-4), 5.08 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 10.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.3 Hz, 1H, H-2), 4.48-4.39 (m, 2H, H-5, H-6a), 4.26-4.20 (m, 1H, H-6b), 3.24 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 7H, H-a), 2.16, 2.15, 2.14, 2.11 (4 x s, 4 x 3H, 4 x OAc), 1.31 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 10H, H-b).



$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 173.8, 173.3, 172.8 (4 x  $\text{COCH}_3$ ), 91.4 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5.2$  Hz, C-1), 70.5 (C-3), 70.5 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 8.5$  Hz, C-2), 68.1 (C-4), 67.9 (C-5), 61.8 (C-6), 46.7 (C-a), 20.1, 20.1, 20.1 (4 x  $\text{COCH}_3$ ), 8.2 (C-b).

$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -1.77.

IR:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2981, 2351, 1740, 1450, 1366, 1216, 1033, 915, 836, 644, 600, 552, 481, 394.

HRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  = ber.: 451.0612 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ , gef.: 451.0594.  $[\alpha]_{598}^{20} = +110^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

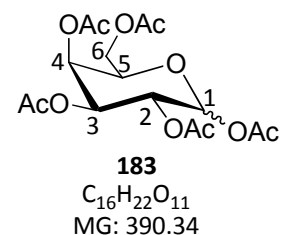
#### 7.5.4. Synthese von 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-galactopyranose **183**

Es wurden 5.15 g (28.6 mmol) D-Galactose **181** in 90 mL Pyridin suspendiert, 27.0 mL (29.2 g, 290 mmol, 10.1 Äquiv.) Essigsäureanhydrid hinzugegeben und die Reaktionslösung für 20 h bei Rt gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mehrmals mit Toluol und Dichlormethan coevaporiert. Anschließend wurde der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und drei Mal mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Die Ausbeute betrug 10.4 g (26.6 mmol, 93%) eines farblosen Feststoffs. Das Anomerenverhältnis wurde aus dem  $^1\text{H-NMR}$  bestimmt und betrug  $\alpha/\beta = 1:0.3$ .

DC:  $R_f$ -Wert = 0.52 (PE/EE 3:2 v/v). Smp. = 71 °C.

$\alpha$ - $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 6.37 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 1.7$  Hz, 1H, H-1), 5.51-5.47 (m, 1H, H-4), 5.34-5.31 (m, 2H, H-2, H-3), 4.37-4.29 (m, 1H, H-5), 4.12-4.05 (m, 2H, H-6), 4.11-4.07 (m, 2H, H-6), 2.15 (s, 6H, 2 x OAc), 2.03, 2.01, 1.99 (3 x s, 3 x 3H, 3 x OAc).



$\alpha$ - $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 170.5, 170.2, 170.0, 169.5, 169.0 (5 x  $\text{COCH}_3$ ), 89.8 (C-1), 68.9 (C-5), 67.6 (C-4), 67.5, 66.6 (C-2, C-3), 61.4 (C-6), 21.0, 20.8, 20.7, 20.7, 20.6 (5 x  $\text{COCH}_3$ ).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 1742, 1431, 1207, 1040, 962, 651, 601, 470, 417. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = ber.: 413.1054 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 413.1058.

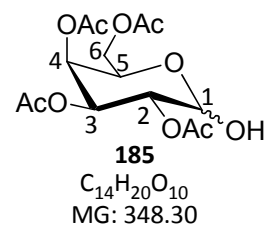
#### 7.5.5. Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-galactopyranose **185**

Die Synthese wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 10.4 g (26.6 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-galactopyranose **183** gelöst in 250 mL THF und 4.4 mL (4.3 g, 40 mmol, 1.5 Äquiv.) Benzylamin verwendet. Die Reaktionszeit betrug 40 h, die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 5.26 g (15.1 mmol, 57%) eines farblosen Öls. Das Anomerenverhältnis wurde aus dem <sup>1</sup>H-NMR bestimmt und betrug  $\alpha/\beta$  = 1:0.3.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.39 (PE/EE 1:1 v/v).

**$\alpha$ -<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 5.51 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.7 Hz, 1H, H-1), 5.47 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.1 Hz, 1H, H-4), 5.39 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 10.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.4 Hz, 1H, H-3), 5.15 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.4 Hz, H-2), 4.46 (dt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 0.9 Hz, 1H, H-5), 4.11-4.07 (m, 2H, H-6), 2.14, 2.09, 2.05, 1.99 (4 x s, 4 x 3H, 4 x OAc).



**$\alpha$ -<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 170.7, 170.6, 170.4, 170.2 (4 x COCH<sub>3</sub>), 90.8 (C-1), 68.5 (C-2), 68.3 (C-4), 67.3 (C-3), 66.3 (C-5), 61.9 (C-6), 20.9, 20.8, 20.8, 20.8 (4 x COCH<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 1738, 1369, 1212, 1039, 600, 461, 432. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = ber.: 371.0949 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 371.0953.

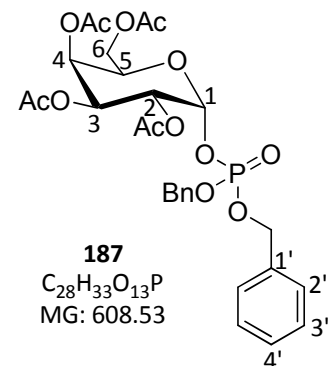
7.5.6. Synthese von Dibenzyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-1-phosphat **187**

Die Synthese wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 5.12 g (14.7 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-galactopyranose **185**, 40 mL abs. Acetonitril, 1.91 g (16.1 mmol, 1.1 Äquiv.) DCI und 5.3 mL (5.4 g, 16 mmol, 1.1 Äquiv.) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit verwendet. Nach 3.5 h Reaktionszeit wurden weitere 2.4 mL (2.5 g, 7.3 mmol, 0.5 Äquiv.) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit zugegeben. Nach weiteren 30 min Reaktionszeit wurden bei 0 °C 3.17 g (18.3 mmol, 1.2 Äquiv.) *meta*-Chlorperbenzoesäure zugefügt. Nach 20 min Rühren bei Rt wurden mit weiteren 1.32 g (7.65 mmol, 0.5 Äquiv.) *meta*-Chlorperbenzoesäure versetzt und 10 min bei Rt gerührt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 2:1-1:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 4.35 g (7.15 mmol, 49%) des reinen  $\alpha$ -Anomers als farbloses Öl. Zusätzlich wurden 1.43 g (2.35 mmol, 16%)  $\alpha/\beta$ -Gemisch sowie 856 mg (1.41 mmol, 10%) des  $\beta$ -Anomers erhalten.

DC:  $R_f$ -Wert = 0.36 (PE/EE 1:1 v/v).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.40-7.30 (m, 10H, H-arom.), 5.95 (dd,  $^2J_{\text{H-P}} = 6.7$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.4$  Hz, 1H, H-1), 5.45 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 1.2$  Hz, 1H, H-4), 5.33 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 10.8$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.3$  Hz, 1H, H-3), 5.21 (ddd,  $^3J_{\text{H,H}} = 10.8$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.0$  Hz,  $^4J_{\text{H-P}} = 2.8$  Hz, 1H, H-2), 5.08 (dd,  $^2J_{\text{H,H}} = 8.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$  Hz, 4H, Bn), 4.30 (dt,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 0.9$  Hz, 1H, H-5), 4.07 (dd,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$  Hz, 1H, H-6a), 3.96 (dd,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$  Hz, 1H, H-6b), 2.13, 1.99, 1.92, 1.90 (4 x s, 4 x 3H, 4 x OAc).



$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 170.3, 170.2, 170.0 (4 x  $\text{COCH}_3$ ), 135.5 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 3.7$  Hz, 1 x C-1'), 135.4 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 3.7$  Hz, 1 x C-1'), 128.9, 128.9 (2 x C-arom.), 128.8 (d,  $^4J_{\text{C-P}} = 1.8$  Hz, C-2'), 128.2, 128.1 (2 x C-arom.), 94.6 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5.4$  Hz, C-1), 69.8 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5.5$  Hz, 1 x Bn), 69.7 (d,  $^2J_{\text{C-P}} = 5.5$  Hz, 1 x Bn), 68.5 (C-5), 67.5 (C-4), 67.1 (d,  $^3J_{\text{C-P}} = 6.9$  Hz, C-2), 67.0 (C-3), 61.3 (C-6), 20.7, 20.7, 20.6, 20.6 (4 x  $\text{COCH}_3$ ).

$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -2.60.

IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3034, 1744, 1370, 1212, 1151, 1151, 1072, 1010, 944, 736, 670, 598, 466.

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = ber.: 631.1551 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 631.1556.  $[\alpha]_{598}^{20} = +15^\circ$  (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>).

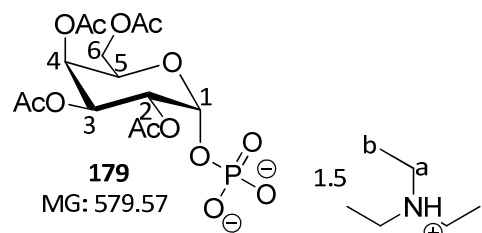
7.5.7. Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-1-phosphat **179** als Triethylammoniumsalz

Die Synthese wurde nach AAV 7 durchgeführt. Es wurden 1.84 g (3.02 mmol) Dibenzyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-1-phosphat **187** gelöst in 75 mL Dioxan und 0.81 mL (0.59 g, 5.8 mmol, 1.9 Äquiv.) Triethylamin sowie vier Spatelspitzen Pd/C (5% Pd, 55% Wasser) verwendet. Die Reaktionszeit betrug 48 h.

Die Ausbeute betrug 1.46 g (2.52 mmol, 83%) eines farblosen Öls als reines  $\alpha$ -Anomer. Die Anzahl der Triethylammoniumionen wurde anhand des <sup>1</sup>H-NMR bestimmt.

DC: R<sub>f</sub>-Wert = 0.61 (Aceton/Wasser 3:1 v/v).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 5.76 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-P</sub> = 7.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1), 5.60 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.0 Hz, 1H, H-4), 5.45 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.3 Hz, 1H, H-3), 5.26 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.5 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H-P</sub> = 2.0 Hz, 1H, H-2), 4.65 (dt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz,



<sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 0.9 Hz, 1H, H-5), 4.30 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.0 Hz, 1H, H-6a), 4.23 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.5 Hz, H-6b), 3.24 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 9H, H-a), 2.25, 2.17, 2.12, 2.07 (4 x s, 4 x 3H, 4 x OAc), 1.31 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 14H, H-b).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 173.6, 173.4, 173.1, 172.9 (4 x COCH<sub>3</sub>), 91.9 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub> = 5.2 Hz, C-1), 68.8 (C-4), 68.2 (C-3), 68.0 (d, <sup>3</sup>J<sub>C-P</sub> = 7.3 Hz, C-2), 66.9 (C-5), 62.0 (C-6), 46.7 (C-a), 20.3, 20.2, 20.1, 20.0 (4 x COCH<sub>3</sub>), 8.2 (C-b).

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = -0.80.



IR:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2981, 2346, 1739, 1449, 1370, 1218, 1046, 918, 529, 465. HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = ber.: 451.0612 [M+Na]<sup>+</sup>, 467.0351 [M+K]<sup>+</sup>, gef.: 451.0574, 467.0269.  $[\alpha]_{598}^{20}$  = +72° (c = 1.00, H<sub>2</sub>O).

## 7.6. Synthese der Nucleosidanaloga

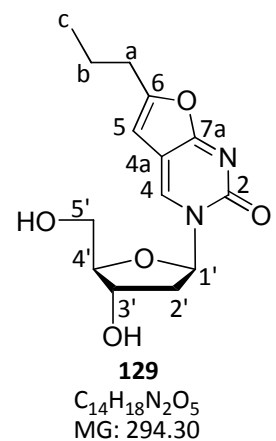
### 7.6.1. Synthese von 3-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]-pyrimidin-2-on (6-Prop-2'-dBCNA) **129**

Unter Stickstoff als Schutzgas wurden 2.00 g (5.60 mmol) 5-Iod-2'-desoxyuridin **130** in 30 mL abs. DMF gelöst. Anschließend wurden 600 mg (0.519 mmol, 0.1 Äquiv.) Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) sowie 1.4 mL (1.5 g, 22 mmol, 3.9 Äquiv.) Pent-1-in hinzugegeben und bei Rt gerührt, bis die Lösung klar wurde. Nach Zugabe von 200 mg (1.05 mmol, 0.2 Äquiv.) Kupfer(I)-iodid und 1.80 mL (1.34 g, 10.4 mmol, 1.9 Äquiv.) DIPEA wurde 24 h bei Rt gerührt. Nun wurden weitere 200 mg (1.05 mmol, 0.2 Äquiv.) Kupfer(I)-iodid und 24.0 mL (17.5 g, 173 mmol, 31 Äquiv.) Triethylamin zugegeben und 16 h bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1-9:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 952 mg (3.23 mmol, 58%) eines farblosen Feststoffs.

DC: R<sub>f</sub>-Wert = 0.19 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v). Smp. = 157-158 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.67 (s, 1H, H-4), 6.43 (s, 1H, H-5), 6.16 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, 1H, H-1'), 5.28 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.3 Hz, 1H, 3'-OH), 5.12 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, 1H, 5'-OH), 4.27-4.18 (m, 1H, H-3'), 3.92-3.88 (m, 1H, H-4'), 3.70-3.57 (m, 2H, H-5'), 2.62 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-a), 2.41-2.33 (m, 1H, H-2'a), 2.09-2.00 (m, 1H, H-2'b), 1.64 (tq, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-b), 0.93 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 3H, H-c).



<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 171.2 (C-7a), 158.1 (C-6), 153.8 (C-2), 136.7 (C-4), 106.3 (C-4a), 99.8 (C-5), 88.1 (C-4'), 87.4 (C-1'), 69.7 (C-3'), 60.8 (C-5'), 41.2 (C-2'), 29.3 (C-a), 19.8 (C-b), 13.3 (C-c).

IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3257, 3101, 1669, 1620, 1575, 1383, 1159, 782, 653, 570. HRMS (FAB): *m/z* = ber.: 295.1288 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 295.1290. UV/Vis (MeOH): λ<sub>max</sub> [nm] = 330, 210. [α]<sub>598</sub><sup>20</sup> = +114° (c = 0.55, MeOH).

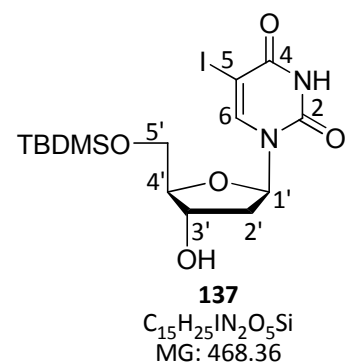
### 7.6.2. Synthese von 5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-5-iod-2'-desoxyuridin **137**

Unter Stickstoff als Schutzgas wurden 1.04 g (2.82 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Iod-2'-desoxyuridin **130** in 20 mL abs. Pyridin gelöst und 511 mg (3.11 mmol, 1.1 Äquiv.) TBDMSCl hinzugegeben. Nach 40 h rühren bei Rt wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und drei Mal mit Toluol sowie ein Mal mit Dichlormethan coevaporiert. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und die org. Phase drei Mal mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten org. Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde am Chromatotron™ gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 0-10% Vol.).

Die Ausbeute betrug 1.00 g (2.14 mmol, 76%) eines farblosen Feststoffs.

DC: R<sub>f</sub>-Wert = 0.58 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v). Smp. = 219-220 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 11.69 (s, 1H, NH), 7.99 (s, 1H, H-6), 6.10 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.0 Hz, 1H, H-1'), 5.27 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 1H, 3'-OH), 4.18 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-3'), 3.89-3.85 (m, 1H, H-4'), 3.80 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.6 Hz, 1H, H-5'a), 3.72 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-5'b), 2.18-2.11 (m, 1H, H-2'a), 2.09-2.01 (m, 1H, H-2'b), 0.90 (s, 9H, *t*-Bu), 0.12, 0.11 (2 x s, 2 x 3H, 2 x SiCH<sub>3</sub>).



$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 160.4 (C-4), 150.0 (C-2), 144.0 (C-6), 87.2 (C-4'), 84.9 (C-1'), 70.6 (C-3'), 69.6 (C-5), 63.2 (C-5'), 40.2 (C-2'), 26.0 (*t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 18.1 (*t*-Bu), -5.3 (SiCH<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2851, 1676, 1257, 1117, 830, 781, 605, 546, 448. **MS** (FAB):  $m/z$  = ber.: 469.1 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 469.1. **UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  [nm] = 285, 215.  $[\alpha]_{598}^{20} = -15^\circ$  ( $c = 0.94$ , MeOH).

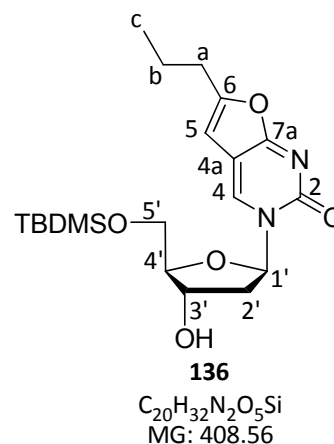
### 7.6.3. Synthese von 3-(5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2'-desoxy- $\beta$ -*D*-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on **136**

Unter Stickstoff als Schutzgas wurden 300 mg (0.641 mmol) 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-5-iod-2'-desoxyuridin **137** in 3.0 mL abs. DMF gelöst. Anschließend wurden 75 mg (0.063 mmol, 0.1 Äquiv.) Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) sowie 0.18 mL (0.18 g, 2.7 mmol, 4.2 Äquiv.) Pent-1-in hinzugegeben und bei Rt gerührt, bis die Lösung klar wurde. Nach Zugabe von 25 mg (0.13 mmol, 0.2 Äquiv.) Kupfer(I)-iodid und 90  $\mu\text{L}$  (0.16 g, 1.2 mmol, 1.9 Äquiv.) DIPEA wurde für 22 h bei Rt gerührt. Nun wurden weitere 25 mg (0.13 mmol, 0.2 Äquiv.) Kupfer(I)-iodid und 1.5 mL (2.6 g, 26 mmol, 41 Äquiv.) Triethylamin zugegeben und 16 h bei 90 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (EE).

Die Ausbeute betrug 195 mg (0.478 mmol, 75%) eines farblosen Öls.

**DC:  $R_f$ -Wert** = 0.35 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.52 (s, 1H, H-4), 6.35 (s, 1H, H-5), 6.15 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$  Hz, 1H, H-1'), 5.31 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.1$  Hz, 1H, 3'-OH), 4.23-4.17 (m, 1H, H-3'), 4.00-3.97 (m, 1H, H-4'), 3.89 (dd,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.6$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$  Hz, 1H, H-5'a), 3.78 (dd,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.5$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$  Hz, 1H, H-5'b), 2.63 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 2H, H-a), 2.48-2.40 (m, 1H, H-2'a), 2.08-2.00 (m, 1H, H-2'b), 1.63 (tq,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 2H, H-b), 0.92 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 3H, H-c), 0.84 (s, 9H, *t*-Bu), 0.08, 0.07 (2 x s, 2 x 3H, 2 x SiCH<sub>3</sub>).



$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 171.2 (C-7a), 158.3 (C-6), 153.6 (C-2), 136.2 (C-4), 106.2 (C-4a), 99.6 (C-5), 87.8 (C-4'), 87.7 (C-1'), 69.9 (C-3'), 62.7 (C-5'), 41.5 (C-2'), 29.2 (C-a), 25.7 (*t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 19.8 (C-b), 17.9 (*t*-Bu), 13.2 (C-c), -5.5 (SiCH<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2928, 1734, 1668, 1572, 1231, 1067, 831, 776, 399. **MS** (FAB):  $m/z$  = ber.: 409.2 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 409.2.

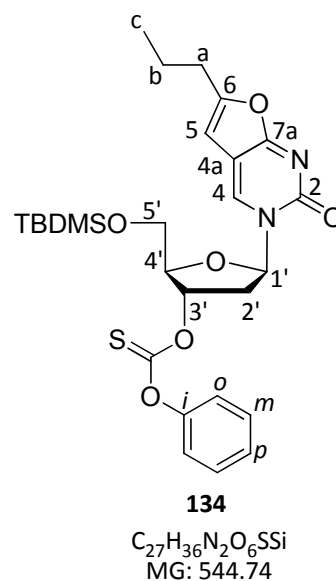
#### 7.6.4. Synthese von 3-(5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-*O*-phenoxythiocarbonyl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]pyrimidin-2-on **134**

Unter Stickstoff als Schutzgas wurden 90 mg (0.22 mmol) **136** in 1 mL abs. Dichlormethan und 0.15 mL abs Pyridin gelöst. Bei 4 °C wurden 75  $\mu\text{L}$  (0.12 g, 0.69 mmol, 3.1 Äquiv.) Phenoxythiocarbonylchlorid (PTC-Cl) tropfenweise zugegeben und anschließend 20 h bei 4 °C gerührt. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und drei Mal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden drei Mal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  0-5% Vol.).

Die Ausbeute betrug 86 mg (0.16 mmol, 72%) eines gelben Öls.

**DC:  $R_f$ -Wert** = 0.61 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.54 (s, 1H, H-4), 7.51-7.45 (m, 2H, H-*m*), 7.37-7.32 (m, 1H, H-*p*), 7.27-7.22 (m, 2H, H-*o*), 6.40 (s, 1H, H-5), 6.22 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$  Hz, 1H, H-1'), 5.69 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$  Hz, 1H, H-3'), 4.63-4.59 (m, 1H, H-4'), 4.03 (dd,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.5$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.1$  Hz, 1H, H-5'a), 3.93 (dd,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.5$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.1$  Hz, 1H, H-5'b), 2.96 (dd,  $^2J_{\text{H,H}} = 14.8$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$  Hz, 1H, H-2'a), 2.65 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 2H, H-*a*), 2.41-2.31 (m, 1H, H-2'b), 1.64 (tq,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$  Hz, 2H, H-*b*), 0.92 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 3H, H-*c*), 0.79 (s, 9H, *t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 0.06, 0.05 (2 x s, 2 x 3H, 2 x SiCH<sub>3</sub>).

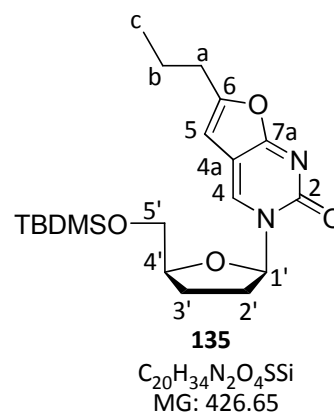


**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 172.0 (C-7a), 158.4 (C-6), 153.5 (C-2), 153.1 (C-*i*), 136.2 (C-4), 129.8 (C-*m*), 126.8 (C-*p*), 121.8 (C-*o*), 99.7 (C-5), 88.4 (C-1'), 85.4 (C-4'), 85.0 (C-3'), 63.2 (C-5'), 29.2 (C-*a*), 25.6 (*t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 19.8 (C-*b*), 17.7 (*t*-Bu), 13.2 (C-*c*), -5.7 (SiCH<sub>3</sub>).

**MS (FAB):** *m/z* = ber.: 545.2 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 545.3.

#### 7.6.5. Versuch der Synthese von 3-(5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-didesoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]pyrimidin-2-on **135**

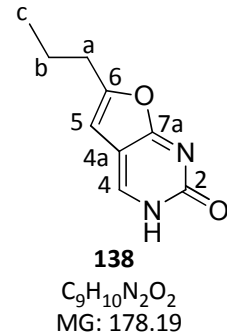
Es wurden 200 mg (0.367 mmol) **134** in 6 mL abs. Toluol gelöst, 25 mg (0.15 mmol, 0.4 Äquiv.) Azoisobutyronitril (AIBN) sowie 0.26 mL (0.21 g, 0.83 mmol, 2.2 Äquiv.) Tris(trimethylsilyl)silan (TTMSS) hinzugegeben. Die Lösung wurde entgast und anschließend für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und zwei Mal mit Dichlormethan coevaporiert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde am Chromatotron™ gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 0-5% Vol.). Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.



Es wurden 43 mg (0.24 mmol, 66%) 6-Propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]pyrimidin-2-on **138** als farbloser Feststoff erhalten.

DC:  $R_f$ -Wert = 0.40 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 11.94 (s, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, H-4), 6.37 (s, 1H, H-5), 2.61 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, H-a), 1.63 (tq, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, H-b), 0.93 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 3H, H-c).



<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 172.6 (C-7a), 157.5 (C-6), 151.1 (C-2), 138.8 (C-4), 105.6 (C-4a), 99.6 (C-5), 29.2 (C-a), 19.8 (C-b), 13.3 (C-c).

MS (FAB): *m/z* = ber.: 179.1 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 179.1.

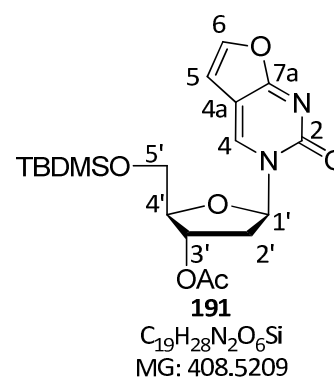
#### 7.6.6. Synthese von 3-(5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-3'-O-acetyl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on **191**

Es wurden 648 mg (2.57 mmol) 6-H-2'-dBCNA **105** in 20 mL abs. Pyridin gelöst und 465 mg (3.08 mmol, 1.2 Äquiv.) TBDMSCl hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 24 h bei Rt gerührt und anschließend 1.50 mL (1.62 g, 15.4 mmol, 6.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid zugefügt und weitere 24 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und anschließend drei Mal mit Toluol und vier Mal mit Dichlormethan coevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 872 mg (2.14 mmol, 83%) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert = 0.85 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v). Smp. = 120 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.69 (s, 1H, H-4), 7.76 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-6), 6.75 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-5), 6.15 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 5.23-5.16 (m, 1H, H-3'), 4.33-4.27 (m, 1H, H-4'), 3.95 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 11.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.1 Hz, 1H, H-5'a), 3.83 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 11.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.1 Hz, 1H, H-5'b), 2.68-2.64 (m, 1H, H-2'a), 2.22-2.17 (m, 1H, H-2'b), 2.08 (s, 3H, OAc), 0.80 (s, 9H, *t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 0.05 (s, 6H, SiCH<sub>3</sub>).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 172.0 (C-7a), 167.9 (COCH<sub>3</sub>), 153.8 (C-2), 144.2 (C-6), 138.4 (C-4), 105.0 (C-5), 104.7 (C-4a), 88.4 (C-1'), 85.7 (C-4'), 74.5 (C-3'), 62.9 (C-5'), 38.8 (C-2'), 25.5 (*t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 20.7 (COCH<sub>3</sub>), 15.2 (*t*-Bu), -5.6 (SiCH<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2929, 2856, 1682, 1463, 1365, 1233, 1196, 1020, 833, 777. **HRMS** (FAB): *m/z* = ber.: 431.1609 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 431.1615.

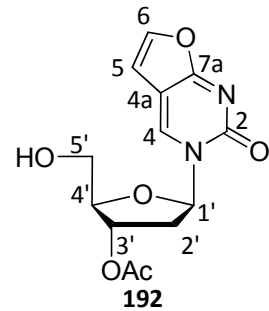
#### 7.6.7. Synthese von 3-(3'-O-Acetyl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on **192**

Es wurden 872 mg (2.14 mmol) **191** in 25 mL Dichlormethan gelöst und 1.40 mL (1.37 g, 8.54 mmol, 4.0 Äquiv.) Triethylamintrihydrofluorid hinzugegeben. Die Reaktion wurde 20 h bei Rt gerührt. Da nach dieser Zeit das Edukt noch nicht vollständig umgesetzt war, wurden weitere 0.70 mL (0.69 g, 4.3 mmol, 2.0 Äquiv.) Triethylamintrihydrofluorid zugefügt und erneut 4 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 165 mg (0.345 mmol, 16%) eines farblosen Feststoffs.

**DC: R<sub>F</sub>-Wert** = 0.35 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.63 (s, 1H, H-4), 7.76 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-6), 6.84 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-5), 6.20 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 5.26-5.16 (m, 1H, H-3'), 4.42-4.35 (m, 1H, H-4'), 4.34-4.26 (m, 2H, H-5'), 2.67-2.58 (m, 1H, H-2'a), 2.41-2.33 (m, 1H, H-2'b), 2.08 (s, 3H, OAc).



C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>  
MG: 294.2601

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 170.0 (C-7a), 164.1 (COCH<sub>3</sub>), 151.6 (C-2), 145.1 (C-6), 138.9 (C-4), 105.3 (C-5), 105.1 (C-4a), 88.0 (C-1'), 82.4 (C-4'), 74.0 (C-3'), 63.5 (C-5'), 37.8 (C-2'), 20.7 (COCH<sub>3</sub>).

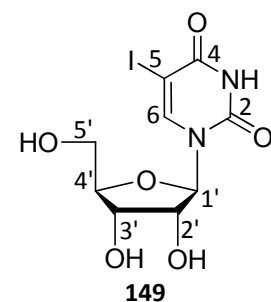
#### 7.6.8. Synthese von 5-Ioduridin **149**

Es wurden 4.00 g (16.4 mmol) Uridin **148** suspendiert in 220 mL Methanol mit 1.2 mL (3.7 g, 23 mmol, 1.4 Äquiv.) Iodmonochlorid versetzt und 4 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von 10%iger Ammoniaklösung neutralisiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 7:1 v/v) und mit Dichlormethan gewaschen.

Die Ausbeute betrug 4.21 g (11.4 mmol, 70%) eines hellgelben Feststoffs.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.38 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1 v/v). **Smp.** = 208-209 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.66 (s, 1H, NH), 8.47 (s, 1H, H-6), 5.72 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.7 Hz, 1H, H-1'), 5.39 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.2 Hz, 1H, 2'-OH), 5.24 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.5 Hz, 1H, 5'-OH), 5.05 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.2 Hz, 1H, 3'-OH), 4.07-4.00 (m, 1H, H-2'), 4.00-3.94 (m, 1H, H-3'), 3.89-3.83 (m, 1H, H-4'), 3.68 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 12.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.1 Hz, 1H, H-5'a), 3.56 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 12.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-5'b).



C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>  
MG: 370.10

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 160.5 (C-4), 150.4 (C-2), 145.2 (C-6), 88.3 (C-1'), 84.8 (C-4'), 74.0 (C-2'), 69.4 (C-3'), 69.3 (C-5), 60.2 (C-5').



**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3331, 2364, 2344, 1685, 1256, 1016, 635, 449. **MS** (FAB):  $m/z$  = ber.: 371.0 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 371.1.

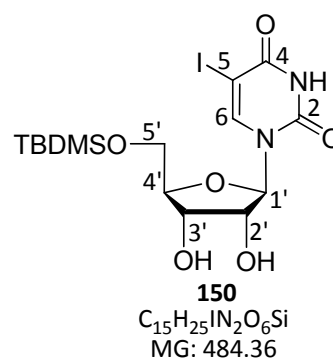
### 7.6.9. Synthese von 5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-5-ioduridin **150**

Unter Stickstoff als Schutzgas wurden 500 mg (1.35 mmol) 5-Ioduridin **149** mit abs. Acetonitril coevaporiert und anschließend in 5 mL abs. DMF gelöst. Nach Zugabe von 218 mg (3.20 mmol, 2.4 Äquiv.) Imidazol und 230 mg (1.53 mmol, 1.1 Äquiv.) TBDMSCl wurde die Reaktionslösung 16 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und zwei Mal mit Methanol coevaporiert. Bei Zugabe von Wasser bildete sich ein farbloser Niederschlag. Dieser wurde durch Filtration isoliert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Die Ausbeute betrug 473 mg (0.977 mmol, 72%) eines farblosen Feststoffs.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.57 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v). **Smp.** = 226-227 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.74 (s, 1H, NH), 7.95 (s, 1H, H-6), 5.77 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.0 Hz, 1H, H-1'), 5.44 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.7 Hz, 1H, 2'-OH), 5.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.4 Hz, 1H, 3'-OH), 4.03-3.90 (m, 1H, H-2'), 3.93-3.88 (m, 2H, H-3', H-4'), 3.81 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.2 Hz, 1H, H-5'a), 3.73 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-5'b), 0.92 (s, 9H, *t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 0.14 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>), 0.13 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>).



**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 160.4 (C-4), 150.4 (C-2), 144.0 (C-6), 87.5 (C-1'), 84.7 (C-4'), 73.6 (C-2'), 70.2 (C-5), 70.0 (C-3'), 63.1 (C-5'), 26.1 (*t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 18.2 (*t*-Bu), -5.1 (SiCH<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2926, 1704, 1676, 1124, 1095, 831, 782, 613, 539, 445. **MS** (FAB):  $m/z$  = ber.: 485.1 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 485.1. **UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  [nm] = 285, 214. [ $\alpha$ ]<sub>598</sub><sup>20</sup> = -40° (c = 0.95, MeOH).

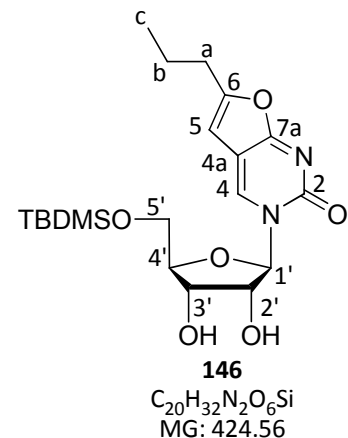
7.6.10. Synthese von 3-(5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl- $\beta$ -*D*-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]pyrimidin-2-on **146**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 151 mg (0.310 mmol) 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-5-ioduridin **150**, 36 mg (30  $\mu$ mol, 0.1 Äquiv.) Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) und 64 mg (0.94 mmol, 3.0 Äquiv.) Pent-1-in in 3 mL abs. DMF gelöst und bei Rt so lange gerührt, bis die Lösung klar wurde. Es wurden 12 mg (62  $\mu$ mol, 0.2 Äquiv.) Kupfer(I)-iodid und 90  $\mu$ L (68 mg, 0.53 mmol, 1.7 Äquiv.) DIPEA hinzugegeben und 24 h bei Rt gerührt. Anschließend wurden weitere 12 mg (62  $\mu$ mol, 0.2 Äquiv.) Kupfer(I)-iodid sowie 2.5 mL (1.8 g, 17.8 mmol, 57 Äquiv.) Triethylamin zugegeben und 21 h bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt am Chromatotron™ gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 39:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 64 mg (0.15 mmol, 48%) eines braunen Feststoffs.

**DC:** *R<sub>f</sub>*-Wert = 0.37 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v). **Smp.** = 157-158 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.57 (s, 1H, H-4), 6.31 (s, 1H, H-5), 5.84 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 1.7 Hz, 1H, H-1'), 5.64 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.4 Hz, 1H, 2'-OH), 5.03 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.0 Hz, 1H, 3'-OH), 4.03-3.94 (m, 4H, H-2', H-3', H-4', H-5'a), 3.82-3.80 (m, 1H, H-5'b), 2.64 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, H-a), 1.63 (tq, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, H-b), 0.93 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 3H, H-c), 0.91 (s, 9H, *t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 0.13, 0.11 (2 x s, 2 x 3H, 2 x SiCH<sub>3</sub>).

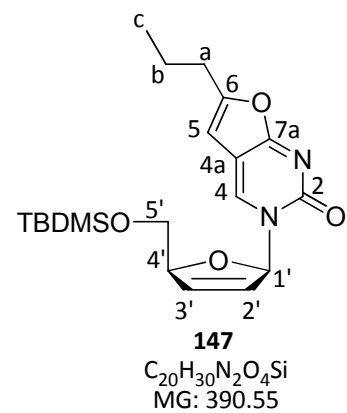


**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 171.3 (C-7a), 185.5 (C-6), 153.9 (C-2), 136.2 (C-4), 106.3 (C-4a), 99.5 (C-5), 91.5 (C-1'), 83.5 (C-4'), 74.8 (C-2'), 67.9 (C-3'), 61.6 (C-5'), 29.2 (C-a), 25.9 (*t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 19.9 (C-b), 18.2 (*t*-Bu), 13.3 (C-c), -5.4 (SiCH<sub>3</sub>), -5.4 (SiCH<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3351, 2956, 2856, 1669, 1573, 1113, 1050, 831, 778. **MS** (FAB): *m/z* = ber.: 425.2 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 425.2. [ $\alpha$ ]<sub>598</sub><sup>20</sup> = +36° (c = 0.57, MeOH).

7.6.11. Versuch der Synthese von 3-(5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-β-D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on **147**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 110 mg (0.433 mmol, 4.0 Äquiv.) Iod und 59 mg (0.87 mmol, 8.0 Äquiv.) Imidazol in 2 mL Toluol/Acetonitril (2:1 v/v) gelöst. Unter Rühren bei Rt wurden zu der resultierenden dunkelroten Lösung 114 mg (0.433 mmol, 4.0 Äquiv.) Triphenylphosphin zugegeben, wobei die Lösung sich gelb färbte. Nun wurden 46 mg (0.11 mmol) **146** zugegeben und bei 90 °C für 20 h gerührt. Die Lösung wurde filtriert und das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem



Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $CH_2Cl_2/MeOH$  19:1 v/v, 1% Vol.  $Et_3N$ )

Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

7.6.12. Synthese von 3-(3',5'-Di-O-methansulfonyl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on **144**

Es wurden 32 mg (0.11 mmol) 6-Prop-2'-dBCNA **129** in 1 mL abs. Pyridin gelöst und bei 0 °C 25 µL (37 mg, 0.32 mmol, 2.9 Äquiv.) Methansulfonylchlorid zugetropft und 20 min gerührt. Nach weiteren 2 h bei Rt wurde die Reaktionslösung in Eiswasser gegeben und drei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden drei Mal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

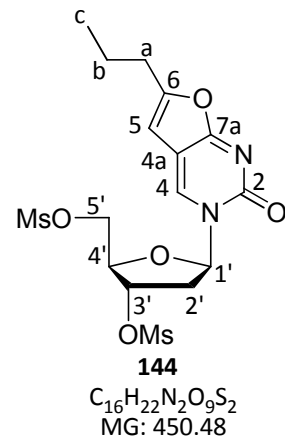
Die Ausbeute betrug 42 mg (93 µmol, 71%) eines gelben Öls.

DC:  $R_f$ -Wert = 0.70 ( $CH_2Cl_2/MeOH$  4:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.43 (s, 1H, H-4), 6.43 (s, 1H, H-5), 6.22 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 1H, H-1'), 5.34-5.29 (m, 1H, H-3'), 4.58-4.47 (m, 3H, H-4', H-5'), 3.33, 3.27 (2 x s, 2 x 3H, 2 x CH<sub>3</sub>), 2.79 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 14.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.4 Hz, 1H, H-2'a), 2.63 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 2H, H-a), 2.56-2.52 (m, 1H, H-2'b), 1.64 (tq, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, H-b), 0.94 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 3H, H-c).

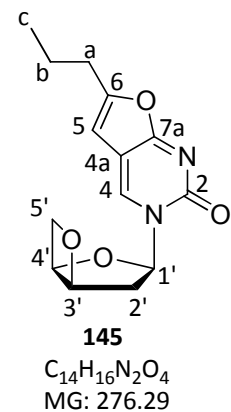
**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 171.5 (C-7a), 158.6 (C-6), 153.6 (C-2), 136.8 (C-4), 106.8 (C-4a), 99.8 (C-5), 87.9 (C-1'), 81.7 (C-4'), 79.2 (C-3'), 68.1 (C-5'), 37.9 (C-2'), 37.6 (CH<sub>3</sub>), 36.9 (CH<sub>3</sub>), 29.2 (C-a), 19.8 (C-b), 13.3 (C-c).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2933, 1673, 1576, 1347, 1172, 968, 925, 527. **MS** (FAB): *m/z* = ber.: 451.1 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 451.1. [ $\alpha$ ]<sub>598</sub><sup>20</sup> = +51° (c = 0.01, CHCl<sub>3</sub>).



### 7.6.13. Versuch der Synthese von 3-(3',5'-Anhydro-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]pyrimidin-2-on **145**

Es wurden 23 mg (0.051 mmol) **144** in 1.5 mL Wasser suspendiert und 6.0 mg (0.15 mmol, 3.0 Äquiv.) Natriumhydroxid gelöst in 0.5 mL Wasser zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 40 min bei Rt gerührt und 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde durch Zugabe von 1 M Salzsäure neutralisiert und die wässrige Phase neun Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:2 v/v).



Das gewünschte Produkt konnte nicht erhalten werden. Als Hauptprodukt wurde die leicht verunreinigte Nucleobase erhalten (s. 7.6.5., S. 194).

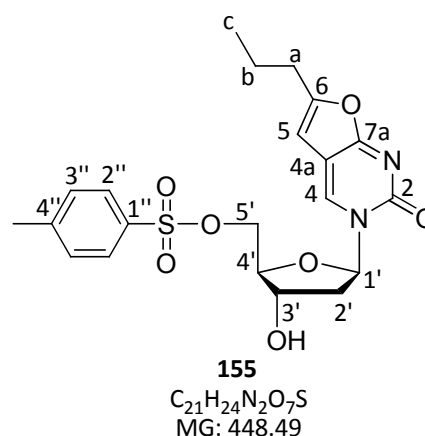
7.6.14. Synthese von 3-(5'-O-p-Toluolsulfonyl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on **155**

Die Reaktion wurde nach AAV 8 durchgeführt. Zu 500 mg (1.70 mmol) 6-Prop-2'-dBCNA **129** gelöst in 3 mL abs. Pyridin wurden 490 mg (2.57 mmol, 1.5 Äquiv.) *p*-TsCl gelöst in 3 mL abs. Pyridin über 3 h langsam bei 4 °C zugetropft und weitere 46 h bei 4 °C gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 348 mg (0.776 mmol, 46%) eines farblosen Feststoffs.

**DC:** R<sub>f</sub>-Wert = 0.54 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v). **Smp.** = 120 °C (zers.).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.27 (s, 1H, H-4), 7.81 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.3 Hz, 2H, H-2''), 7.47 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.3 Hz, 2H, H-3''), 6.38 (s, 1H, H-5), 6.16 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, 1H, H-1'), 5.48 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.3 Hz, 1H, OH), 4.36-4.26 (m, 2H, H-5'), 4.17-4.11 (m, 1H, H-3'), 4.03-3.98 (m, 1H, H-4'), 2.65 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, H-a), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.38-2.31 (m, 1H, H-2'a), 2.15-2.06 (m, 1H, H-2'b), 1.65 (tq, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, H-b), 0.95 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 3H, H-c).



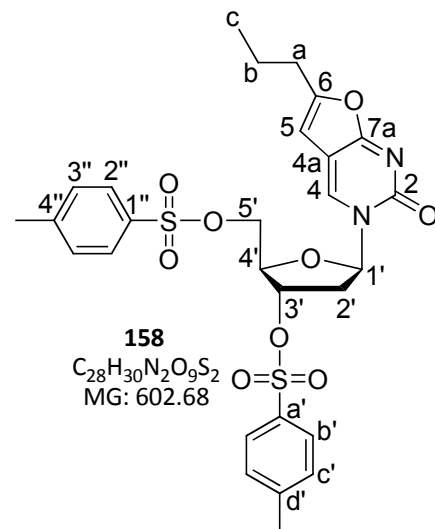
**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 171.3 (C-7a), 158.4 (C-6), 153.6 (C-2), 145.1 (C-4''), 136.5 (C-4), 132.2 (C-1''), 130.2 (C-3''), 127.6 (C-2''), 106.6 (C-4a), 99.7 (C-5), 87.5 (C-1'), 84.0 (C-4'), 69.8 (C-5'), 69.5 (C-3'), 40.1 (C-2'), 29.3 (C-a), 21.1 (CH<sub>3</sub>), 19.8 (C-b), 13.3 (C-c).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3101, 2957, 1667, 1630, 1582, 1477, 1403, 1347, 1173, 1123, 1009, 964, 858, 780, 664, 572. **MS** (FAB): *m/z* = ber.: 449.1 [M+H<sup>+</sup>], gef.: 449.1.

Als Nebenprodukt wurden 307 mg (0.509 mmol, 30%) der zweifach tosylierten Verbindung **158** erhalten.

**DC:** R<sub>f</sub>-Wert = 0.84 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = 8.23 (s, 1H, H-4), 7.81 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$  Hz, 2H, H-2''), 7.74 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$  Hz, 2H, H-b'), 7.49 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$  Hz, 2H, H-3''), 7.44 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$  Hz, 2H, H-c'), 6.40 (s, 1H, H-5), 6.10 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$  Hz, 1H, H-1'), 5.06-5.00 (m, 1H, H-3'), 4.35-4.29 (m, 1H, H-4'), 4.23-4.12 (m, 2H, H-5'), 2.64 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 2H, H-a), 2.59-2.53 (m, 1H, H-2'a), 2.43, 2.38 (2 x s, 2 x 3H, 2 x  $\text{CH}_3$ ), 2.36-2.77 (m, 1H, H-2'b), 1.64 (tq,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 2H, H-b), 0.94 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 3H, H-c).



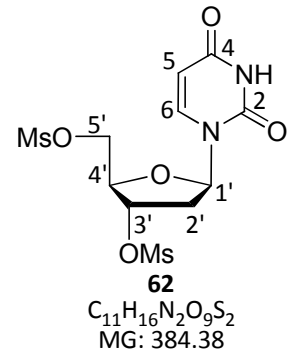
#### 7.6.15. Synthese von 3',5'-Di-O-methansulfonyl-2'-desoxyuridin **62**

Es wurden 1.00 g (4.40 mmol) 2'-Desoxyuridin **60** in 18 mL abs. Pyridin suspendiert und bei 0 °C 0.85 mL (1.3 g, 11 mmol, 2.5 Äquiv.) Methansulfonylchlorid langsam zugetropft. Nach ca. 3 h Rühren bei 0 °C wurde das Reaktionsgemisch in Eiswasser gegeben und eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde der Niederschlag durch Filtration isoliert, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert, bis in dieser dünnschichtchromatographisch kein Produkt mehr detektierbar war. Die vereinigten org. Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der so erhaltene farblose Feststoff wurde mit dem filtrierte Niederschlag vereinigt.

Die Ausbeute betrug 1.44 g (3.74 mmol, 85%) eines farblosen Feststoffs.

**DC:**  $R_f$ -Wert = 0.59 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v). **Smp.** = 142 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.41 (s, 1H, NH), 7.66 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 1H, H-6), 6.19 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 1H, H-1'), 5.68 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.3 Hz, 1H, H-5), 5.31-5.25 (m, 1H, H-3), 4.50-4.34 (m, 3H, H-4', H-5'), 3.31, 3.24 (2 x s, 2 x 3H, 2 x CH<sub>3</sub>), 3.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.55 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, 2H, H-2').



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 162.9 (C-4), 150.3 (C-2), 140.6 (C-6), 102.2 (C-5), 84.6 (C-1'), 80.6 (C-4'), 79.2 (C-3'), 68.2 (C-5'), 37.7, 36.8 (2 x CH<sub>3</sub>), 36.0 (C-2').

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3034, 1685, 1328, 1169, 919, 805, 524. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 407.0189 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 407.0175.  $[\alpha]_{598}^{20}$  = -14° (c = 0.57, MeOH).

#### 7.6.16. Synthese von 3',5'-Anhydro-2'-desoxyuridin **61**

##### Variante A

Es wurden 1.44 g (3.74 mmol) 3',5'-Di-*O*-methansulfonyl-2'-desoxyuridin **62** portionsweise zu einer Lösung von 447 mg (11.2 mmol, 3.0 Äquiv.) Natriumhydroxid in 80 mL Wasser gegeben und das Reaktionsgemisch 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit 1 M Salzsäure neutralisiert und die Lösung auf die Hälfte eingengt. Die Kristallisation des Produktes erfolgte bei 4 °C über Nacht. Das kristallisierte Produkt wurde durch Filtration isoliert, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Das Filtrat wurde mit Ethylacetat extrahiert, bis sich dünnschichtchromatographisch kein Produkt mehr in der wässrigen Phase detektieren ließ. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der so erhaltene farblose Feststoff wurde mit dem filtrierten Niederschlag vereinigt.

Die Ausbeute betrug 630 mg (3.00 mmol, 80%) eines farblosen Feststoffs.

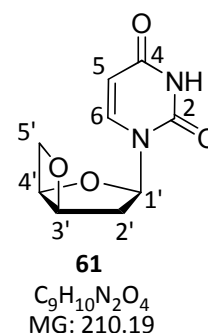
Variante B

Zu einer Lösung von 3.02 g (13.3 mmol) 2'-Desoxyuridin **60** in 25 mL abs. Pyridin wurden bei 0 °C langsam 2.55 mL (3.77 g, 32.9 mmol, 2.5 Äquiv.) Methansulfonylchlorid getropft und die Reaktionslösung 5 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und zu dem öligen, dunkelbraunen Rückstand 30 mL Wasser gegeben. Dieses wurde ebenfalls unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit einer Lösung von 3.15 g (78.8 mmol, 5.9 Äquiv.) Natriumhydroxid in 75 mL Methanol versetzt und 23 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Neutralisation mit 1 M Salzsäure wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand durch Kieselgelfiltration (Aceton) gereinigt.

Die Ausbeute betrug 2.01 g (9.56 mmol, 72%) eines hellbeigen Feststoffs.

**DC:**  $R_f$ -Wert = 0.57 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v). **Smp.** = 183 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.36 (s, 1H, NH), 8.16 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-6), 6.51 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.2 Hz, 1H, H-1'), 5.71 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-5), 5.50-5.46 (m, 1H, H-3'), 4.91 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.2 Hz, 1H, H-4'), 4.68 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.0 Hz, 1H, H-5'a), 4.01 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.0 Hz, 1H, H-5'b), 2.49-2.45 (m, 2H, H-2').



**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 163.2 (C-4), 151.2 (C-2), 141.2 (C-6), 102.2 (C-5), 88.5 (C-1'), 86.9 (C-3'), 80.1 (C-4'), 75.2 (C-5'), 37.2 (C-2').

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3039, 1714, 1682, 1461, 1269, 1087, 802, 549, 525. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 233.0533 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 233.0549. [ $\alpha$ ]<sub>598</sub><sup>20</sup> = -87° (c = 0.26, MeOH).



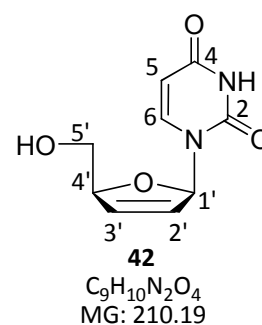
7.6.17. Synthese von 2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrouridin (d4U) **42**

Es wurden 630 mg (3.00 mmol) 3',5'-Anhydro-2'-desoxyuridin **61** in 6 mL abs. DMSO gelöst und portionsweise 537 mg (4.80 mmol, 1.6 Äquiv.) Kalium-*tert*-butylat hinzugegeben. Nach einer Reaktionsdauer von 70 h bei Rt wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde mit 1 M Salzsäure neutralisiert und gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 441 mg (2.10 mmol, 70%) eines farblosen Feststoffs.

**DC:** R<sub>f</sub>-Wert = 0.33 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v). **Smp.** = 124 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 11.30 (s, 1H, NH), 7.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-6), 6.83-6.78 (m, 1H, H-1'), 6.40 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.9 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.6 Hz, 1H, H-3'), 5.92 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.2 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.4 Hz, 1H, H-2'), 5.59 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-5), 4.97 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.5 Hz, 1H, OH), 4.81-4.74 (m, 1H, H-4'), 3.62-3.54 (m, 2H, H-5').



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 163.2 (C-4), 150.8 (C-2), 141.1 (C-6), 135.1 (C-3'), 125.7 (C-2'), 101.5 (C-5), 89.1 (C-1'), 87.4 (C-4'), 62.2 (C-5').

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3454, 3167, 3039, 1673, 1453, 1392, 1228, 1083, 851, 812, 562, 425. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 233.0533 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 233.0541. [α]<sub>598</sub><sup>20</sup> = -19.7° (c = 0.20, MeOH).

7.6.18. Synthese von 2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrouridin-5'-*O*-dibenzylphosphat **66**

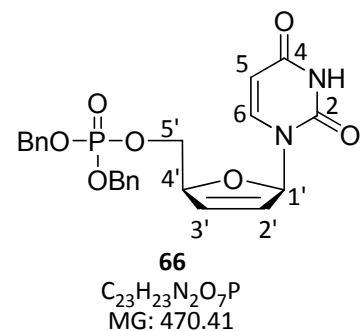
Zu einer Lösung von 300 mg (1.43 mmol) 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrouridin **42** in 15 mL abs. DMF wurden bei 0 °C 7.0 mL (1.8 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) sowie 0.7 mL (0.7 g, 2 mmol, 1.5 Äquiv.) Dibenzyl-diisopropylaminophosphoramidit gegeben. Nach 23 h Rühren bei Rt wurden bei 0 °C 480 mg (2.78 mmol, 1.9 Äquiv.) *meta*-Chlorperbenzoesäure hinzugegeben und weitere 2.5 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel

wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und erst zwei Mal mit Natriumthiosulfatlösung, dann zwei Mal mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden zwei Mal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 610 mg (1.30 mmol, 91%) eines farblosen Öls.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.54 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 11.34 (s, 1H, NH), 7.43-7.32 (m, 11H, H-arom., H-6), 6.83-6.79 (m, 1H, H-1'), 6.39 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.8 Hz, 1H, H-3'), 5.99 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.5 Hz, 1H, H-2'), 5.37 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 1H, H-5), 5.01 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 4H, Bn), 4.96-4.91 (m, 1H, H-4'), 4.13 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.6 Hz, 2H, H-5').



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 162.9 (C-4), 150.6 (C-2), 140.4 (C-6), 135.9, 135.8 (2 x C-arom.), 133.3 (C-3'), 128.4, 128.4, 128.3, 127.8, 127.1 (8 x C-arom.), 126.7 (C-2'), 101.7 (C-5), 89.3 (C-1'), 84.1 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 8.3 Hz, C-4'), 68.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.5 Hz, Bn), 68.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.5 Hz, Bn), 67.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.5 Hz, C-5').

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): -0.96.

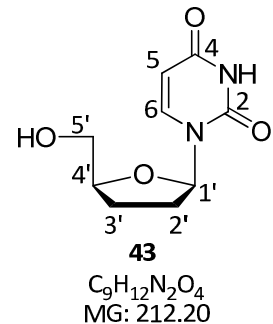
#### 7.6.19. Synthese von 2',3'-Dideoxyuridin (ddU) **43**

Es wurden 1.97 g (9.37 mmol) 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrouridin **42** in 80 mL abs. Methanol gelöst, 100 mg Palladium auf Aktivkohle (10% Pd) hinzugegeben und 70 h unter Wasserstoffatmosphäre bei Rt gerührt. Die Reaktionslösung wurde filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Die Ausbeute betrug 1.70 g (8.01 mmol, 85%) eines farblosen Feststoffs.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.33 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v). **Smp.** = 115 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 11.24 (s, 1H, NH), 7.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-6), 5.94 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.6 Hz, 1H, H-1'), 5.58 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-5), 5.02 (s, 1H, OH), 4.05-3.97 (m, 1H, H-4'), 3.67 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-5'a), 3.52 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.3 Hz, 1H, H-5'b), 2.34-2.20 (m, 1H, H-2'a), 2.00-1.75 (m, 3H, H-2'b, H-3').



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 163.1 (C-4), 150.3 (C-2), 140.5 (C-6), 101.0 (C-5), 85.1 (C-1'), 81.4 (C-4'), 62.1 (C-5'), 31.7 (C-2'), 24.8 (C-3').

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3369, 3169, 3051, 2911, 1655, 1468, 1294, 1179, 1100, 1043, 816, 558, 519, 415. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 235.0689 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 235.0692. [α]<sub>598</sub><sup>20</sup> = -30.9° (c = 0.27, MeOH).

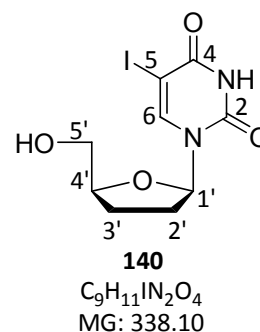
#### 7.6.20. Synthese von 5-Iod-2',3'-dideoxyuridin **140**

Zu einer Lösung von 677 mg (3.19 mmol) 2',3'-Dideoxyuridin **43** in 24 mL Methanol wurden 0.36 mL (1.1 g, 6.9 mmol, 2.2 Äquiv.) Iodmonochlorid gegeben und 5 h bei Rt gerührt. Nach Neutralisation mit Ammoniaklösung (10%) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mit Dichlormethan gewaschen, bis die organische Phase sich nicht mehr violett färbte. Die wässrige Phase wurde gefriergetrocknet und das so erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 793 mg (2.34 mmol, 73%) eines farblosen Feststoffs.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.76 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1 v/v). **Smp.** = 160 °C (zers.).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.60 (s, 1H, NH), 8.56 (s, 1H, H-6), 5.89 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 1H, H-1'), 5.19 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.9 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.9 Hz, 1H, OH), 4.11-4.02 (m, 1H, H-4'), 3.75 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 12.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.2 Hz, 1H, H-5'a), 3.53 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 12.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.2 Hz, 1H, H-5'b), 2.34-2.21 (m, 1H, H-2'a), 2.06-1.97 (m, 1H, H-2'b), 1.90-1.80 (m, 2H, H-3').



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 160.6 (C-4), 150.1 (C-2), 145.2 (C-6), 85.8 (C-1'), 82.1 (C-4'), 68.1 (C-5), 61.2 (C-5'), 32.5 (C-2'), 23.9 (C-3').

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2925, 2852, 1733, 1454, 1372, 1240, 1189, 1072, 1027, 843, 736, 697, 605.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 360.9656 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 360.9653. [ $\alpha$ ]<sub>598</sub><sup>20</sup> = +42° (c = 0.1, MeOH).

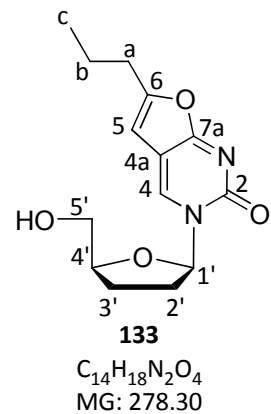
#### 7.6.21. Synthese von 3-(2',3'-Dideoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on (6-Prop-ddBCNA) **133**

Unter Stickstoff als Schutzgas wurden 793 mg (2.36 mmol) 5-Iod-2',3'-dideoxyuridin **140** in 17 mL abs. DMF gelöst. Anschließend wurden 272 mg (0.235 mmol, 0.1 Äquiv.), Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0), sowie 0.60 mL (0.66 g, 9.6 mmol, 4.1 Äquiv.) Pent-1-in hinzugegeben und bei Rt gerührt, bis die Lösung klar wurde. Nach Zugabe von 83 mg (0.44 mmol, 0.2 Äquiv.) Kupfer(I)-iodid und 0.75 mL (0.56 g, 4.4 mmol, 1.9 Äquiv.) DIPEA wurde 24 h bei Rt gerührt. Nun wurden weitere 83 mg (0.44 mmol, 0.2 Äquiv.) Kupfer(I)-iodid und 10.8 mL (7.9 g, 78 mmol, 33 Äquiv.) Triethylamin zugegeben und 25 h bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und filtriert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 338 mg (1.21 mmol, 51%) eines farblosen Feststoffs.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.48 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v). **Smp.** = 116 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.84 (s, 1H, H-4), 6.43 (s, 1H, H-5), 5.99 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.4 Hz, 1H, H-1'), 5.19 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.3 Hz, 1H, OH), 4.19-4.11 (m, 1H, H-4'), 3.82 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 12.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.2 Hz, 1H, H-5'a), 3.63 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 12.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.9 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.7 Hz, 1H, H-5'b), 2.62 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, H-a), 2.47-2.38 (m, 1H, H-2'a), 2.04-1.96 (m, 1H, H-2'b), 1.89-1.74 (m, 2H, H-3'), 1.64 (tq, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 1H, H-b), 0.93 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 1H, H-c).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 171.1 (C-7a), 157.8 (C-6), 153.8 (C-2), 137.0 (C-4), 105.8 (C-4a), 99.8 (C-5), 88.0 (C-1'), 83.0 (C-4'), 61.4 (C-5'), 33.1 (C-2'), 29.3 (C-a), 23.7 (C-3'), 19.8 (C-b), 13.3 (C-c).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3408, 3109, 2962, 1661, 1623, 1568, 1383, 1325, 1174, 1093, 1074, 1038, 920, 787, 647, 553. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 301.1159 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 301.1173. [ $\alpha$ ]<sub>598</sub><sup>20</sup> = +101° (c = 0.1, MeOH).

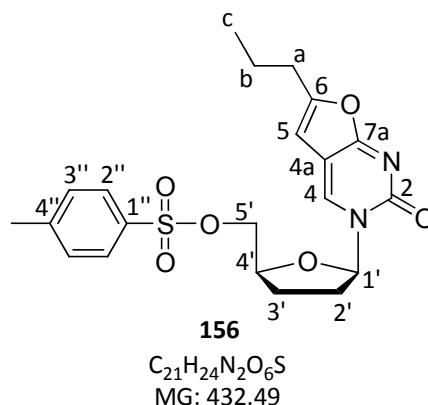
#### 7.6.22. Synthese von 3-(5'-*O*-*p*-Toluolsulfonyl-2',3'-didesoxy- $\beta$ -*D*-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]pyrimidin-2-on **156**

Die Reaktion wurde nach AAV 8 durchgeführt. Zu 341 mg (1.23 mmol) 6-Prop-ddBCNA **133** in 2.5 mL abs Pyridin wurden 325 mg (1.71 mmol, 1.4 Äquiv.) *p*-TsCl gelöst in 1.4 mL abs. Pyridin über 30 min zugetropft und 75 h bei 0 °C gerührt. Da nach dieser Zeit dünnschichtchromatographisch noch Edukt detektiert werden konnte, wurden weitere 310 mg (1.63 mmol, 1.3 Äquiv.) gelöst in 1.5 mL abs. Pyridin über 15 min zugegeben und weitere 24 h bei Rt gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 372 mg (0.860 mmol, 70%) eines farblosen Öls.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.65 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.39 (s, 1H, H-4), 7.77 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.2 Hz, 2H, H-2''), 7.34 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.2 Hz, 2H, H-3''), 6.13 (s, 1H, H-5), 6.11 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 1H, H-1'), 4.46 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.4 Hz, 1H, H-5'a), 4.37-4.29 (m, 1H, H-4'), 4.15 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.2 Hz, 1H, H-5'b), 2.59 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2H, H-a), 2.57-2.50 (m, 1H, H-2'a), 2.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.17-2.09 (m, 1H, H-2'b), 2.00-1.90 (m, 1H, H-3'a), 1.87-1.75 (m, 1H, H-3'b), 1.69 (tq, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 1H, H-b), 0.96 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 1H, H-c).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 171.9 (C-7a), 159.5 (C-6), 154.8 (C-2), 145.5 (C-4''), 134.9 (C-4), 132.5 (C-1''), 130.2 (C-3''), 127.9 (C-2''), 107.5 (C-4a), 99.3 (C-5), 88.6 (C-1'), 79.2 (C-4'), 69.4 (C-5'), 33.4 (C-2'), 30.2 (C-a), 24.4 (C-3'), 21.7 (CH<sub>3</sub>), 20.3 (C-b), 13.6 (C-c).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2961, 2874, 1668, 1571, 1378, 1360, 1330, 1173, 1088, 952, 812, 780, 664, 551.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = ber.: 433.1428 [M+H]<sup>+</sup>, 455.1247 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 433.1432, 455.1253.

$[\alpha]_{598}^{20}$  = +63° (c = 0.50, MeOH).

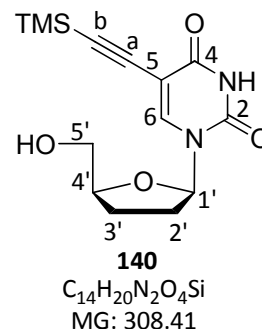
### 7.6.23. Synthese von 5-[(Trimethylsilyl)ethynyl]-2',3'-dideoxyuridin **141**

Unter Stickstoff als Schutzgas wurden 1.53 g (4.53 mmol) 5-Iod-2',3'-Dideoxyuridin **140** in 40 mL abs. DMF gelöst und 1.9 mL (1.4 g, 14 mmol, 3.1 Äquiv.) Trimethylsilylacetylen sowie 596 mg (0.516 mmol, 0.1 Äquiv.) Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) hinzugegeben und bei Rt gerührt, bis die Lösung klar wurde. Nun wurden 250 mg (1.31 mmol, 0.3 Äquiv.) Kupfer(I)-iodid und 1.5 mL (1.1 g, 8.8 mmol, 1.9 Äquiv.) DIPEA ergänzt und die Reaktionslösung für 26 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 1.19 g eines leicht verunreinigten braunen Öls.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.31 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.57 (s, 1H, NH), 8.44 (s, 1H, H-6), 5.88 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.6 Hz, 1H, H-1'), 5.16 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.9 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.9 Hz, 1H, OH), 4.08-4.01 (m, 1H, H-4'), 3.75 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 12.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 1H, H-5'a), 3.53 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 12.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.2 Hz, 1H, H-5'b), 2.35-2.21 (m, 1H, H-2'a), 2.08-1.98 (m, 1H, H-2'b), 1.93-1.79 (m, 2H, H-3'), 0.18 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 161.5 (C-4), 149.3 (C-2), 144.9 (C-6), 98.2 (C-5), 97.4 (C-a), 96.6 (C-b), 86.0 (C-1'), 82.1 (C-4'), 61.2 (C-5'), 32.3 (C-2'), 23.9 (C-3'), -0.1 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3401, 3189, 3058, 2956, 2821, 2159, 1657, 1455, 1273, 1248, 1096, 1068, 839, 758, 539. **MS** (FAB): *m/z* = ber.: 309.1 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 309.2.

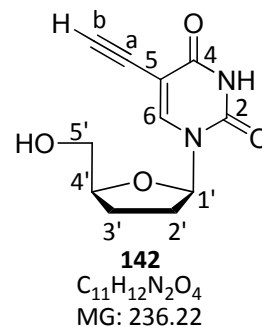
#### 7.6.24. Synthese von 5-Ethynyl-2',3'-dideoxyuridin **142**

Zu 1.19 g leicht verunreinigtem **141** gelöst in 85 mL THF wurden 11 mL (2.9 g, 11 mmol) TBAF (1 M in THF) gegeben und 1 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 727 mg (3.08 mmol, 68% über 2 Stufen) eines hellgelben Feststoffs.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.18 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v). **Smp.** = 165 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.57 (s, 1H, NH), 8.46 (s, 1H, H-6), 5.89 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 1H, H-1'), 5.18 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, 1H, OH), 4.09-4.02 (m, 1H, H-4'), 4.05 (s, 1H, H-b), 3.75 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 12.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.9 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 1H, H-5'a), 3.53 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 12.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.8 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.8 Hz, 1H, H-5'b), 2.34-2.22 (m, 1H, H-2'a), 2.07-1.99 (m, 1H, H-2'b), 1.90-1.80 (m, 2H, H-3').



$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 161.8 (C-4), 149.4 (C-2), 144.7 (C-6), 96.7 (C-5), 85.9 (C-b), 83.1 (C-a), 82.1 (C-4'), 76.6 (C-b), 61.3 (C-5'), 32.3 (C-2'), 23.9 (C-3').

IR:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3263, 3176, 3056, 1682, 1450, 1280, 1090, 1056, 814, 665, 539, 465, 443.

HRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  = ber.: 259.0689 [M+Na] $^+$ , gef.: 259.0694.  $[\alpha]_{598}^{20} = +82^\circ$  (c = 0.2, MeOH).

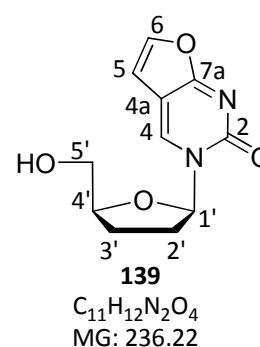
### 7.6.25. Synthese von 3-(2',3'-Didesoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on (6-H-ddBCNA) **139**

Zu einer Lösung von 610 mg (2.58 mmol) **142** in 24 mL abs. DMF wurden 8.6 mL (5.4 g, 54 mmol, 21 Äquiv.) abs. Triethylamin und 650 mg (3.41 mmol 1.3 Äquiv.) Kupfer(I)-iodid gegeben und 5 h bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH $_2$ Cl $_2$ /MeOH 9:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 404 mg (1.71 mmol, 66%) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert = 0.34 (CH $_2$ Cl $_2$ /MeOH 9:1 v/v). Smp. = 230 °C (zers.).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.03 (s, 1H, H-4), 7.73 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.8$  Hz, 1H, H-6), 6.80 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.8$  Hz, 1H, H-5), 6.00 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.2$  Hz, 1H, H-1'), 5.22 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$  Hz, 1H, OH), 4.20-4.13 (m, 1H, H-4'), 3.83 (ddd,  $^2J_{\text{H,H}} = 12.2$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.1$  Hz, 1H, H-5'a), 3.64 (ddd,  $^2J_{\text{H,H}} = 12.2$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.0$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.6$  Hz, 1H, H-5'b), 2.48-2.39 (m, 1H, H-2'a), 2.07-1.98 (m, 1H, H-2'b), 1.89-1.72 (m, 2H, H-3').



$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 171.2 (C-7a), 153.84 (C-2), 144.6 (C-6), 139.2 (C-4), 105.3 (C-5), 104.2 (C-4a), 88.3 (C-1'), 83.2 (C-4'), 61.3 (C-5'), 33.1 (C-2'), 23.6 (C-3').

IR:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3112, 2875, 1664, 1572, 1441, 1388, 1332, 1173, 1078, 1033, 769, 739, 512.

HRMS (ESI $^+$ ):  $m/z$  = ber.: 259.0689 [M+Na] $^+$ , gef.: 259.0699.  $[\alpha]_{598}^{20} = +110^\circ$  (c = 0.2, MeOH).



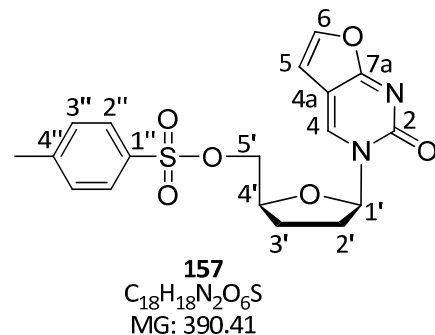
7.6.26. Synthese von 3-(5'-O-p-Toluolsulfonyl-2',3'-didesoxy-β-D-ribofuranosyl)-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on **157**

Die Reaktion wurde nach AAV 8 durchgeführt. Zu 320 mg (1.35 mmol) 6-H-ddBCNA **139** in 10 mL abs. Pyridin wurden 420 mg (2.20 mmol, 1.6 Äquiv.) *p*-TsCl gelöst in 4 mL abs. Pyridin über 30 min zugetropft und 20 h bei 0 °C gerührt. Da nach dieser Zeit dünnschichtchromatographisch noch Edukt detektiert werden konnte, wurden weitere 100 mg (0.525 mmol, 0.4 Äquiv.) *p*-TsCl als Feststoff zugegeben und weitere 24 h bei Rt gerührt. Das Rohprodukt wurde zwei Mal säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v und EE).

Die Ausbeute betrug 290 mg (0.743 mmol, 55%) eines farblosen Feststoffs.

**DC:** R<sub>f</sub>-Wert = 0.22 (EE). **Smp.** = 150 °C (zers.).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.65 (s, 1H, H-4), 7.80 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.3 Hz, 2H, H-2''), 7.37 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.3 Hz, 2H, H-3''), 7.34 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-6), 6.58 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-5), 6.15 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-1'), 4.52 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.4 Hz, 1H, H-5'a), 4.40-4.34 (m, 1H, H-4'), 4.17 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-5'b), 2.68-2.57 (m, 1H, H-2'a), 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.25-2.17 (m, 1H, H-2'b), 2.02-1.93 (m, 1H, H-3'a), 1.90-1.79 (m, 1H, H-3'b).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 172.0 (C-7a), 154.8 (C-2), 145.6 (C-4''), 144.3 (C-6), 137.4 (C-4), 132.6 (C-1''), 130.2 (C-3''), 127.9 (C-2''), 105.6 (C-4a), 104.9 (C-5), 89.1 (C-1'), 79.4 (C-4'), 69.1 (C-5'), 33.4 (C-2'), 24.3 (C-3'), 21.7 (CH<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 1662, 1569, 1384, 1360, 1174, 1090, 954, 773, 734, 677, 546. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 413.0778 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 413.0789.

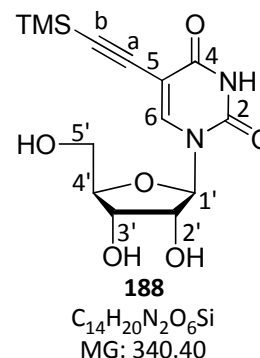
7.6.27. Synthese von 5-[(Trimethylsilyl)ethynyl]uridin **188**

Zu 2.79 g (7.53 mmol) 5-Ioduridin **149** in 90 mL abs. DMF wurden 3.4 mL (25 mmol, 3.3 Äquiv.) Trimethylsilylacetylen und 870 mg (0.753 mmol, 0.1 Äquiv.) Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde bei Rt gerührt, bis eine klare gelbe Lösung entstanden war. Anschließend wurden 434 mg (2.28 mmol, 0.3 Äquiv.) Kupfer(I)-iodid und 2.6 mL (15 mmol, 2.0 Äquiv.) DIPEA zu der Lösung gegeben. Diese wurde 16 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt in Dichlormethan aufgenommen und drei Mal mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde weitere zwei Mal mit Wasser extrahiert und die vereinigten wässrigen Phasen gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 2.82 g eines leicht verunreinigten farblosen Feststoffes.

**DC:** R<sub>f</sub>-Wert = 0.31 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 11.63 (s, 1H, NH), 8.34 (s, 1H, H-6), 5.73 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.7 Hz, 1H, H-1'), 5.39 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.4 Hz, 1H, 2'-OH), 5.18 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.8 Hz, 1H, 5'-OH), 5.05 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.5 Hz, 1H, 3'-OH), 4.07-4.01 (m, 1H, H-2'), 4.01-3.94 (m, 1H, H-3'), 3.87-3.82 (m, 1H, H-4'), 3.71-3.53 (m, 2H, H-5'), 0.18 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 161.4 (C-4), 149.7 (C-2), 144.9 (C-6), 98.3 (C-5), 97.9 (C-a), 97.1 (C-b), 88.4 (C-1'), 84.8 (C-4'), 73.9 (C-2'), 69.3 (C-3'), 60.2 (C-5'), 0.0 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] 3403, 3061, 2898, 2627, 2163, 1681, 1463, 1247, 1056, 838, 701, 585. **HRMS** (ESI<sup>-</sup>): *m/z* = ber.: 339.1012 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 339.1027.

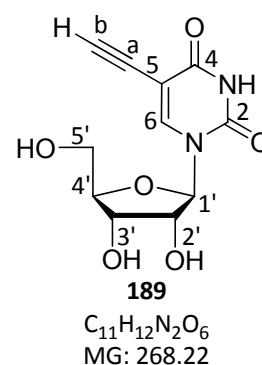
7.6.28. Synthese von 5-Ethynyluridin **189**

Es wurden 2.82 g leicht verunreinigtes 5-[(Trimethylsilyl)ethynyl]uridin **188** in 250 mL THF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 25 mL (25 mmol) TBAF (1 M in THF) gegeben und 45 min bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 1.29 g (4.81 mmol, 64% über zwei Stufen) eines farblosen Feststoffs.

**DC:** R<sub>f</sub>-Wert = 0.22 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v). **Smp.** = 170 °C (zers.).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 11.64 (s, 1H, NH), 8.38 (s, 1H, H-6), 5.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.8 Hz, 1H, H-1'), 5.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.4 Hz, 1H, 2'-OH), 5.24 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.7 Hz, 1H, 5'-OH), 5.07 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.4 Hz, 1H, 3'-OH), 4.10 (s, 1H, H-b), 4.06-4.02 (m, 1H, H-2'), 4.00-3.96 (m, 1H, H-3'), 3.88-3.85 (m, 1H, H-4'), 3.68 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 12.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-5'a), 3.57 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 12.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-5'b).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 161.6 (C-4), 149.7 (C-2), 144.7 (C-6), 97.4 (C-5), 88.4 (C-1'), 84.8 (C-4'), 83.6 (C-b), 76.3 (C-a), 74.0 (C-2'), 69.3 (C-3'), 60.2 (C-5').

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3284, 2933, 1715, 1661, 1459, 1112, 1044, 1018, 696, 645, 629, 581. **HRMS** (ESI<sup>-</sup>): *m/z* = ber.: 267.0617 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 267.0627.

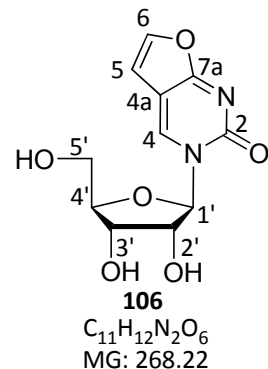
7.6.29. Synthese von 3-(β-D-Ribofuranosyl)-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]pyrimidin-2-on (6-*H*-BCNA) **106**

Es wurden 434 mg (1.62 mmol) 5-Ethynyluridin **189** in 15 mL abs. DMF gelöst und 367 mg (1.94 mmol, 1.2 Äquiv.), Kupfer(I)-iodid und 5.2 mL (3.8 g, 38 mmol, 23 Äquiv.) Triethylamin hinzugegeben. Nach 2.5 h Rühren bei 100 °C wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 179 mg (0.667 mmol, 41%) eines farblosen Feststoffs.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.14 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v). **Smp.** = 145 °C (zers.).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.99 (s, 1H, H-4), 7.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-6), 6.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-5), 5.86 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.0 Hz, 1H, H-1'), 5.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.7 Hz, 1H, 2'-OH), 5.27 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, 5'-OH), 5.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.6 Hz, 3'-OH), 4.03-3.94 (m, 3H, H-2', H-3', H-4'), 3.82 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 12.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-5'a), 3.66 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 12.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-5'b).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 171.3 (C-7a), 154.0 (C-2), 144.9 (C-6), 139.4 (C-4), 105.1 (C-5), 104.8 (C-4a), 91.6 (C-1'), 84.1 (C-4'), 74.8 (C-2'), 68.0 (C-3'), 59.5 (C-5').

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3307, 1663, 1625, 1571, 1381, 1335, 1181, 1097, 1042, 997, 938, 767, 732, 570, 510. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 291.0588 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 291.0592.

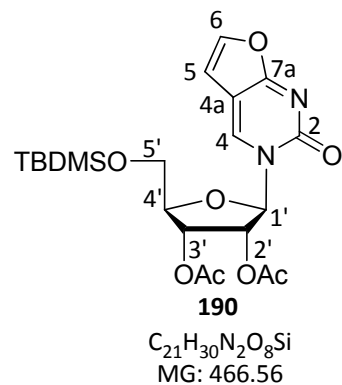
#### 7.6.30. Synthese von 3-(5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-2',3'-di-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on **190**

Es wurden 373 mg (1.39 mmol) **106** zwei Mal mit abs. Pyridin coevaporiert und in 25 mL abs. Pyridin gelöst. Zu der Lösung wurden 258 mg (1.71 mmol, 1.2 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid gegeben und 24 h bei Rt gerührt. Anschließend wurden 0.90 mL (1.0 g, 9.8 mmol, 7.1 Äquiv.) Essigsäureanhydrid zugegeben und weitere 20 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand drei Mal mit Toluol coevaporiert und in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde zwei Mal mit Wasser und zwei Mal mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das so erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 366 mg (0.784 mmol, 57%) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert = 0.41 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v). Smp. = 152 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.67 (s, 1H, H-4), 7.80 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.6 Hz, 1H, H-6), 6.75 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-5), 6.14 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.1 Hz, 1H, H-1'), 5.44 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.4 Hz, 1H, H-2'), 5.32 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.4 Hz, 1H, H-3'), 4.36-4.31 (m, 1H, H-4'), 4.01 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 11.7 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-5'a), 3.84 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 11.9 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 1H, H-5'b), 2.07, 2.06 (2 x s, 2 x 3H, 2 x OAc), 0.87 (s, 9H, *t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 0.10, 0.08 (2 x s, 2 x 3H, 2 x Si-CH<sub>3</sub>).



<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 171.7 (C-7a), 169.3 (COCH<sub>3</sub>), 169.2 (COCH<sub>3</sub>), 153.8 (C-2), 145.7 (C-6)\*, 138.6 (C-4), 105.5 (C-4a), 104.8 (C-5), 89.3 (C-1'), 82.7 (C-4'), 74.1 (C-2'), 69.8 (C-3'), 62.0 (C-5'), 25.7 (*t*-Bu-CH<sub>3</sub>), 20.3 (COCH<sub>3</sub>), 20.2 (COCH<sub>3</sub>), 17.9 (*t*-Bu), -5.6 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.7 (Si-CH<sub>3</sub>). \* aus dem HMBC bestimmt.

IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2930, 2859, 1754, 1740, 1680, 1648, 1569, 1239, 1220, 1093, 837, 773, 729, 546, 517. HRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 489.1664 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 489.1670.

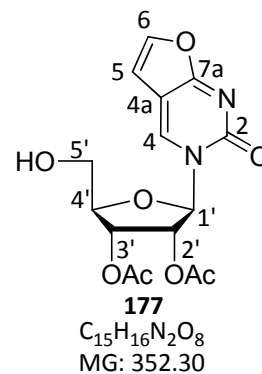
#### 7.6.31. Synthese von 3-(2',3'-Di-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on (6-H-di-OAc-BCNA) **177**

Zu einer Lösung von 322 mg (0.692 mmol) **190** in 15 mL Dichlormethan wurden 0.52 mL (3.4 mmol, 4.9 Äquiv.) Triethylamintrihydrofluorid gegeben und 22 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 223 mg (0.633 mmol, 91%) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert = 0.35 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v). Smp. = 145 °C.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.87 (s, 1H, H-4), 7.78 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.6 Hz, 1H, H-6), 6.84 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.6 Hz, 1H, H-5), 6.17 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.7 Hz, 1H, H-1'), 5.47 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, 1H, OH), 5.43 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, 1H, H-2'), 5.35 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.3 Hz, 1H, H-3'), 4.28-4.23 (m, 1H, H-4'), 3.80 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 12.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.9 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-5'a), 3.67 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 12.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-5'b), 2.08, 2.05 (2 x s, 2 x 3H, 2 x OAc).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 171.7 (C-7a), 169.4 (COCH<sub>3</sub>), 169.2 (COCH<sub>3</sub>), 153.9 (C-2), 145.5 (C-6), 139.2 (C-4), 105.7 (C-4a), 105.1 (C-5), 88.8 (C-1'), 83.1 (C-4'), 74.0 (C-2'), 69.9 (C-3'), 60.0 (C-5'), 20.4 (COCH<sub>3</sub>), 20.2 (COCH<sub>3</sub>).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3337, 1744, 1468, 1572, 1429, 1371, 1336, 1212, 1097, 1044, 997, 869, 768, 733, 595, 570. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 375.0799 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 375.0810.

## 7.7. Synthese der *cycloSal*-Nucleosidmonophosphate

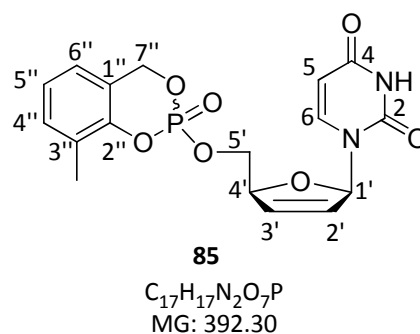
### 7.7.1. Synthese von 3-Methyl-*cycloSal*-2',3'-didesoxy-2',3'-didehydrouridinmonophosphat (3-Me-*cycloSal*-d4UMP) **85**

Die Reaktion wurde nach AAV 7, Variante A, durchgeführt. Es wurden 200 mg (0.952 mmol) 2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrouridin **42** gelöst in 25 mL abs. Acetonitril, 0.30 mL (0.22 g, 2.2 mmol, 2.3 Äquiv.) DIPEA und 474 mg (2.34 mmol, 2.5 Äquiv.) 3-Methylsaligenylchlorphosphit **87** in 8 mL abs. Acetonitril sowie 500 µL (2.73 mmol, 2.9 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeiten betragen für die Kupplung 2.5 h und für die Oxidation 2 h. Das Rohprodukt wurde drei Mal chromatographisch gereinigt (1. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 0-5% Vol., 2. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v, 3. EE).

Die Ausbeute betrug 65 mg (0.17 mmol, 18%) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:1.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.50 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 11.33 (s, 2H, 2 x NH), 7.30-7.20 (m, 4H, 2 x H-6'', 2 x H-6), 7.13-7.06 (m, 4H, 2 x H-4'', 2 x H-5''), 6.80-6.76 (m, 2H, 2 x H-1'), 6.43 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.6 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.6 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.39 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.6 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.04-5.97 (m, 2H, 2 x H-2'), 5.51-5.32 (m, 4H, 4 x H-7''), 5.29 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.3 Hz, 1H, 1 x H-5), 5.15 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.1 Hz, 1H, 1 x H-5), 5.00-4.92 (m, 2H, 2 x H-4'), 4.36-4.23 (m, 4H, 4 x H-5'), 2.21 (s, 3H, 1 x CH<sub>3</sub>), 2.20 (s, 3H, 1 x CH<sub>3</sub>).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 163.0 (1 x C-4), 162.9 (1 x C-4), 150.7 (1 x C-2), 150.6 (1 x C-2), 140.1 (1 x C-6), 140.0 (1 x C-6), 133.1 (1 x C-3'), 133.1 (1 x C-3'), 131.0 (2 x C-6''), 127.0 (2 x C-2'), 126.9 (2 x C-2'')\*, 124.0 (2 x C-5''), 123.6 (2 x C-4''), 121.0 (2 x C-1'')\*, 101.7 (1 x C-5), 101.6 (1 x C-5), 89.4 (1 x C-1'), 89.3 (1 x C-1'), 84.3 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.5 Hz, 1 x C-4'), 84.2 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.8 Hz, 1 x C-4'), 68.4-68.1 (m, 2 x C-5', 2 x C-7''), 14.9 (1 x CH<sub>3</sub>), 14.8 (1 x CH<sub>3</sub>).

\* aus dem HMBC bestimmt.

$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = -8.78, -8.97.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 1685, 1459, 1376, 1287, 1243, 1188, 1086, 994, 940, 844, 720, 654, 433. **HRMS** (ESI $^+$ ):  $m/z$  = ber.: 415.0666 [M+Na] $^+$ , gef.: 415.0630.

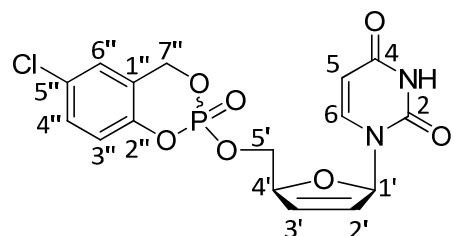
### 7.7.2. Synthese von 5-Chlor-cycloSal-2',3'-didesoxy-2',3'-didehydrouridinmonophosphat (5-Cl-cycloSal-d4UMP) **90**

Die Reaktion wurde nach AAV 7, Variante B, durchgeführt. Es wurden 192 mg (0.913 mmol) 2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrouridin **42** gelöst in 12 mL abs. Acetonitril, 0.25 mL (0.19 g, 1.5 mmol, 1.6 Äquiv.) DIPEA und 400 mg (1.79 mmol, 2.0 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **92** in 5 mL abs. Acetonitril sowie 562 mg (0.914 mmol, 1.0 Äquiv.) Oxone $^{\text{®}}$  verwendet. Die Reaktionszeiten betragen für die Kupplung 45 min und für die Oxidation 15 min.

Die Ausbeute betrug 237 mg (0.574 mmol, 63%) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:0.9.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.38 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = 11.35 (s, 2H, 2 x NH), 7.47-7.40 (m, 4H, 2 x H-6'', 2 x H-4''), 7.28 (d,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 8.1 Hz, 1H, 1 x H-6), 7.23-7.16 (m, 3H, 1 x H-6, 2 x H-3''), 6.81-6.75 (m, 2H, H-1'), 6.43 (ddd,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 6.1 Hz,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 1.6 Hz,  $^4J_{\text{H,H}}$  = 1.6 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.39 (ddd,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 6.1 Hz,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 1.6 Hz,  $^4J_{\text{H,H}}$  = 1.6 Hz, 1H, 1 x H-3'), 6.05-5.97 (m, 2H, 2 x H-2'), 5.55-5.31 (m, 5H, 4 x H-7'', 1 x H-5), 5.26 (dd,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 8.1 Hz,  $^4J_{\text{H,H}}$  = 2.0 Hz, 1H, 1 x H-5), 5.00-4.94 (m, 2 H, 2 x H-4'), 4.38-4.25 (m, 4H, 4 x H-5').



**90**  
C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>7</sub>P  
MG: 412.72

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = 163.0 (1 x C-4), 163.0 (1 x C-4), 150.7 (1 x C-2), 150.7 (1 x C-2), 148.5 (2 x C-1'')\*, 140.2 (1 x C-6), 140.1 (1 x C-6), 133.1 (2 x C-3'), 129.7 (1 x C-4''), 129.6 (1 x C-4''), 128.4 (1 x C-5''), 128.3 (1 x C-5''), 127.1 (2 x C-2'), 126.1 (1 x C-6''), 126.0 (1 x C-6''), 123.0 (1 x C-2'')\*, 122.9 (1 x C-2'')\*, 120.2 (d,  $^3J_{\text{C,P}}$  = 2.2 Hz, 1 x C-3'), 120.1



(d,  $^3J_{C,P} = 2.2$  Hz, 1 x C-3''), 101.8 (1 x C-5), 101.7 (1 x C-5), 89.4 (2 x C-1'), 84.3 (d,  $^3J_{C,P} = 7.7$  Hz, 1 x C-4'), 84.2 (d,  $^3J_{C,P} = 7.7$  Hz, 1 x C-4'), 68.4-68.2 (m, 2 x C-5'), 68.0-67.8 (m, 2 x C-7''). \* aus dem HMBC bestimmt.

$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = -10.05, -10.08.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 1685, 1481, 1244, 1187, 1086, 1027, 995, 941, 816, 440. **HRMS** (ESI $^+$ ):  $m/z$  = ber.: 435.0119 [M+Na] $^+$ , gef.: 435.0124.

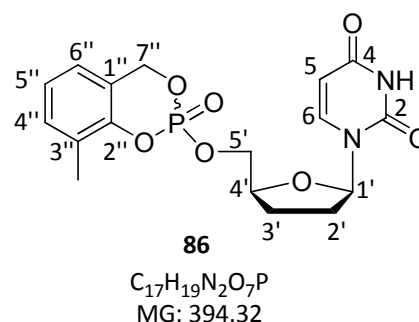
### 7.7.3. Synthese von 3-Methyl-cycloSal-2',3'-didesoxyuridinmonophosphat (3-Me-cycloSal-ddUMP) **86**

Die Reaktion wurde nach AAV 7, Variante A, durchgeführt. Es wurden 74 mg (0.35 mmol) 2',3'-Didesoxyuridin **43** gelöst in 10 mL abs. Acetonitril, 0.10 mL (72 mg, 0.71 mmol, 2.0 Äquiv.) DIPEA und 140 mg (0.691 mmol, 2.0 Äquiv.) 3-Methylsaligenylchlorphosphit **87** in 2.2 mL abs. Acetonitril sowie 190  $\mu\text{L}$  (1.00 mmol, 2.9 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeiten betragen für die Kupplung 3 h und für die Oxidation 2.5 h. Das Rohprodukt wurde zwei Mal chromatographisch gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 27 mg (68  $\mu\text{mol}$ , 19%) einer farblosen Wasse als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:0.9.

**DC:**  $R_f$ -Wert = 0.52 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.28 (s, 2H, 2 x NH), 7.55 (d,  $^3J_{H,H} = 8.1$  Hz, 1H, 1 x H-6), 7.52 (d,  $^3J_{H,H} = 8.1$  Hz, 1H, 1 x H-6), 7.29-7.22 (m, 2H, 2 x H-6''), 7.13-7.06 (m, 4H, 2 x H-4'', 2 x H-5''), 6.00-5.92 (m, 2H, 2 x H-1'), 5.54-5.35 (m, 6H, 4 x H-7'', 2 x H-5), 4.44-4.14 (m, 6H, 2 x H-4', 4 x H-5'), 2.35-2.24 (m, 2H, 2 x H-2'a), 2.22 (s, 3H, 1 x  $\text{CH}_3$ ), 2.20 (s, 3H, 1 x  $\text{CH}_3$ ), 2.07-1.86 (m, 4 H, 2 x H-2'b, 2 x H-3'a), 1.84-1.71 (m, 2H, 2 x H-3'b).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 163.0 (2 x C-4), 150.3 (2 x C-2), 140.1 (1 x C-6), 140.1 (1 x C-6), 130.8 (1 x C-6''), 130.8 (1 x C-6''), 126.9 (1 x C-2'')\*, 126.8 (1 x C-2'')\*, 123.9 (2 x C-5''), 123.5 (1 x C-4''), 123.5 (1 x C-4''), 120.9 (2 x C-1'')\*, 101.4 (1 x C-5), 101.4 (1 x C-5), 85.2 (1 x C-1'), 85.1 (1 x C-1'), 78.1 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 3.8 Hz, 1 x C-4'), 78.0 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 3.8 Hz, 1 x C-4'), 68.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.2 Hz, 1 x C-5'), 68.7 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.2 Hz, 1 x C-5'), 68.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 7.4 Hz, 1 x C-7''), 68.3 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 7.4 Hz, 1 x C-7''), 30.6 (1 x C-2'), 30.5 (1 x C-2'), 25.1 (1 x C-3'), 25.0 (1 x C-3'), 14.8 (1 x CH<sub>3</sub>), 14.8 (1 x CH<sub>3</sub>). \* aus dem HMBC bestimmt.

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = -9.05, -9.21.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 1680, 1464, 1377, 1265, 1188, 1090, 993, 937, 771, 720, 522, 422. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 417.0822 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 417.0718.

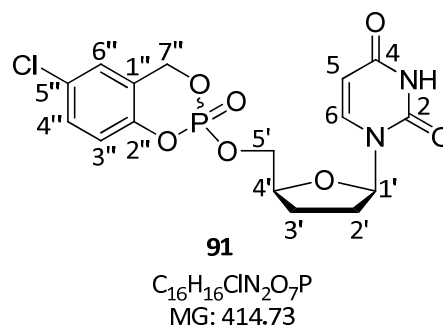
#### 7.7.4. Synthese von 5-Chlor-cycloSal-2',3'-didesoxyuridinmonophosphat (5-Cl-cycloSal-ddUMP) **91**

Die Reaktion wurde nach AAV 7, Variante B, durchgeführt. Es wurden 195 mg (0.918 mmol) 2',3'-Didesoxyuridin **43** gelöst in 12 mL abs. Acetonitril, 0.25 mL (0.19 g, 1.5 mmol, 1.6 Äquiv.) DIPEA und 400 mg (1.79 mmol, 2.0 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **92** in 5 mL abs. Acetonitril sowie 560 mg (0.911 mmol, 1.0 Äquiv.) Oxone® verwendet. Die Reaktionszeiten betragen für die Kupplung 45 min und für die Oxidation 15 min.

Die Ausbeute betrug 245 mg (0.591 mmol, 64%) einer farblosen Wasse als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:0.9.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.38 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.28 (s, 2H, 2 x NH), 7.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 1H, 1 x H-6), 7.52 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 1H, 1 x H-6), 7.47-7.39 (m, 4H, 2 x H-6'', 2 x H-4''), 7.23-7.16 (m, 2H, 2 x H-3''), 6.00-5.93 (m, 2H, 2 x H-1'), 5.56-5.34 (m, 6H, 4 x H-7'', 2 x H-5), 4.42-4.24



(m, 4H, 4 x H-5'), 4.22-4.15 (m, 2H, 2 x H-4'), 2.34-2.22 (m, 2H, 2 x H-2'a), 2.05-1.88 (m, 4H, 2 x H-2'b, 2 x H-3'a), 1.84-1.71 (2 x H-3'b).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 163.1 (1 x C-4), 163.0 (1 x C-4), 150.3 (2 x C-2), 148.2 (2 x C-1'')\*, 140.2 (1 x C-6), 140.2 (1 x C-6), 129.6 (2 x C-4''), 128.3 (2 x C-5''), 126.0 (2 x C-6''), 122.9 (1 x C-2''), 122.8 (1 x C-2''), 120.2 (2 x C-3''), 101.5 (1 x C-5), 101.5 (1 x C-5), 85.2 (1 x C-1'), 85.2 (1 x C-1'), 78.1 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 6.7 Hz, 1 x C-4'), 78.0 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 6.7 Hz, 1 x C-4'), 69.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.9 Hz, 1 x C-5'), 68.9 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.9 Hz, 1 x C-5'), 68.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 7.5 Hz, 1 x C-7''), 67.9 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 7.5 Hz, 1 x C-7''), 30.6 (1 x C-2'), 30.5 (1 x C-2'), 25.1 (1 x C-3'), 25.1 (1 x C-3').  
\* aus dem HMBC bestimmt.

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = -10.20, -10.31.

IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 1680, 1481, 1460, 1263, 1186, 1028, 994, 939, 865, 810, 718, 435. HRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 437.0270 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 437.0274.

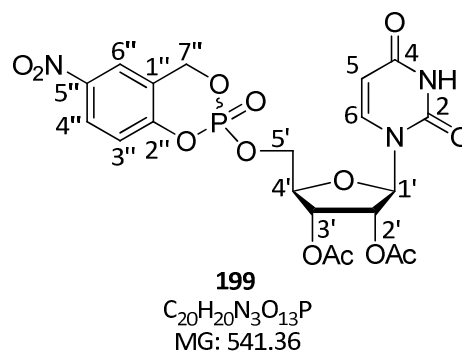
#### 7.7.5. Synthese von 5-Nitro-cycloSal-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **199**

Die Reaktion wurde nach AAV 7, Variante C, durchgeführt. Es wurden 63 mg (0.19 mmol) 2',3'-Di-O-acetyluridin **198** gelöst in 4 mL abs. Acetonitril, 65  $\mu$ L (49 mg, 0.38 mmol, 2.0 Äquiv.) DIPEA und 88 mg (0.38 mmol, 2.0 Äquiv.) 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **176** in 4 mL abs. Acetonitril sowie 4.8 mL (0.48 mmol, 2.5 Äquiv.) Iod (0.1 M in THF/Wasser/Pyridin 77:2:21 v/v/v) verwendet. Die Reaktionszeiten betragen für die Kupplung 5 h und für die Oxidation 2 h.

Die Ausbeute betrug 28 mg einer hellgelben Masse als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:0.9. Das Produkt lag leicht verunreinigt vor.

DC: *R<sub>f</sub>*-Wert = 0.26 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.43-11.38 (m, 2H, 2 x NH), 8.26-8.24 (m, 1H, 1 x H-4''), 8.24-8.21 (m, 1H, 1 x H-4''), 8.15-8.07 (m, 2H, 1 x H-6''), 7.64 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 1H, 1 x H-6), 7.63 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 1H, 1 x H-6), 7.39 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.9 Hz, 1H, 1 x H-3''), 7.37 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.9 Hz, 1H, 1 x H-3''), 5.83 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.0 Hz, 2H, H-1'), 5.68-5.52 (m, 6H, 4 x H-7'', 2 x H-5), 5.38-5.25 (m, 4H, 2 x H-2', 2 x H-3'), 4.55-4.36 (m, 4H, 4 x H-5'), 4.31-4.23 (m, 2H, 2 x H-4'), 2.08 (s, 3H, 1 x OAc), 2.06 (s, 3H, 1 x OAc), 2.04 (s, 6H, 2 x OAc).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 169.6 (4 x COCH<sub>3</sub>)<sup>\*</sup>, 160.4 (2 x C-4), 154.2 (2 x C-5'')<sup>\*</sup>, 150.3 (2 x C-2), 145.1 (2 x C-6), 143.6 (2 x C-2'')<sup>\*</sup>, 125.4 (2 x C-4''), 122.5 (2 x C-6''), 102.7 (2 x C-5)<sup>\*</sup>, 88.3 (2 x C-1'), 84.7 (2 x C-4'), 73.9 (2 x C-2'), 69.3 (2 x C-4'), 69.2 (2 x C-7''), 60.2 (2 x C-5'), 20.2 (4 x COCH<sub>3</sub>). <sup>\*</sup> aus dem HMBC bestimmt.

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = -11.07, -11.16.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3307, 2928, 1668, 1574, 1379, 1340, 1237, 1091, 1042, 938, 548, 436. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 542.0807 [M+H]<sup>+</sup>, 564.0626 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 542.0808, 564.0630.

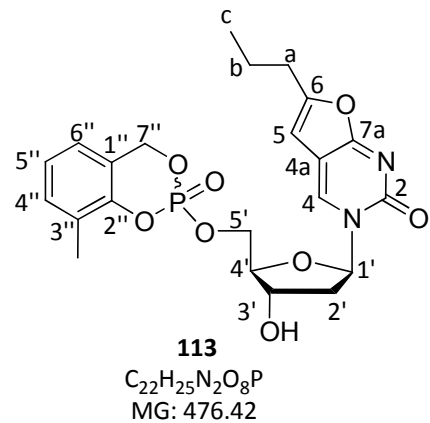
#### 7.7.6. Synthese von 3-Methyl-cycloSal-3-(2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (3-Me-cycloSal-6-Prop-2'-dBCNAMP) **113**

Die Reaktion wurde nach AAV 7, Variante A, durchgeführt. Es wurden 86 mg (0.29 mmol) 6-Prop-2'-dBCNA **129** gelöst in 13 mL abs. Acetonitril und 3 mL abs. DMF, 80  $\mu$ L (61 mg, 0.47 mmol, 1.6 Äquiv.) DIPEA und 117 mg (0.578 mmol, 2.0 Äquiv.) 3-Methylsaligenylchlorphosphit **87** in 2 mL abs. Acetonitril sowie 160  $\mu$ L (0.880 mmol, 3.0 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeiten betragen für die Kupplung 3 h und für die Oxidation 1.5 h. Das Rohprodukt wurde chromatographisch gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 38 mg (80  $\mu$ mol, 28%) einer farblosen Warte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:0.8.

**DC:  $R_f$ -Wert** = 0.38 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.39 (s, 1H, 1 x H-4), 8.38 (s, 1H, 1 x H-4), 7.26-7.19 (m, 2H, 2 x H-6''), 7.10-7.03 (m, 4H, 2 x H-4'', 2 x H-5''), 6.27 (t,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.1$  Hz, 1 x H-5), 6.23 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 1.1$  Hz, 1 x H-5), 6.21-6.14 (m, 2 H, 2 x H-1'), 5.53-5.36 (m, 6H, 4 x H-7'', 2 x 3'-OH), 4.47-4.33 (m, 4H, 2 x H-5'), 4.24-4.17 (m, 2H, 2 x H-3'), 4.12-4.04 (m, 2H, 2 x H-4'), 2.65-2.58 (m, 4H, 4 x H-a), 2.44-2.35 (m, 2H, 2 x H-2'a), 2.18 (s, 3H, 1 x  $\text{CH}_3$ ), 2.16 (s, 3H, 1 x  $\text{CH}_3$ ), 2.11-2.00 (m, 2H, 2 x H-2'b), 1.63 (tq,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 4H, 4 x H-b), 0.94 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 6H 6 x H-c).



**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 171.4 (2 x C-7a)\*, 158.3 (1 x C-6), 158.2 (1 x C-6), 153.2 (2 x C-2)\*, 147.9 (2 x C-2'')\*, 136.5 (1 x C-4), 136.3 (1 x C-4), 130.9 (1 x C-6''), 130.8 (1 x C-6''), 126.3 (C-3'')\*, 123.9 (1 x C-5''), 123.9 (1 x C-5''), 123.6 (1 x C-4''), 123.5 (1 x C-4''), 120.7 (2 x C-1'')\*, 106.5 (1 x C-4a)\*, 106.4 (1 x C-4a)\*, 99.7 (1 x C-5), 99.6 (1 x C-5), 87.6 (1 x C-1'), 87.6 (1 x C-1'), 85.3 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 6.6$  Hz, 1 x C-4'), 85.1 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 6.6$  Hz, 1 x C-4'), 69.7 (1 x C-3'), 69.6 (1 x C-3'), 68.4 (d,  $^2J_{\text{C,P}} = 6.6$  Hz, 1 x C-7''), 68.4 (d,  $^2J_{\text{C,P}} = 6.6$  Hz, 1 x C-7''), 67.6 (d,  $^2J_{\text{C,P}} = 5.9$  Hz, 1 x C-5'), 67.5 (d,  $^2J_{\text{C,P}} = 5.9$  Hz, 1 x C-5'), 40.5 (1 x C-2'), 40.3 (1 x C-2'), 29.2 (2 x C-a), 19.8 (2 x C-b), 14.8 (2 x  $\text{CH}_3$ ), 13.3 (1 x H-d), 13.3 (1 x H-d). \* aus dem HMBC bestimmt.

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -8.87, -9.05.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3386, 2961, 1667, 1572, 1292, 1188, 1013, 938, 776, 650. **HRMS** ( $\text{ESI}^+$ ):  $m/z$  = ber.: 477.1421 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , 499.1241 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ , gef.: 477.1383, 499.1204.

7.7.7. Synthese von 3-Methyl-cycloSal-3-(2',3'-Dideoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on-5'-monophosphat

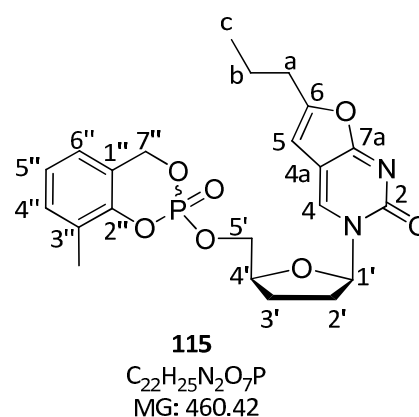
(3-Me-cycloSal-6-Prop-ddBCNAMP) **115**

Die Reaktion wurde nach AAV 7, Variante A, durchgeführt. Es wurden 90 mg (0.32 mmol) 6-Prop-ddBCNA **133** gelöst in 15 mL abs. Acetonitril und 0.10 mL (76 mg, 0.59 mmol, 1.8 Äquiv.) DIPEA und 150 mg (0.740 mmol, 2.3 Äquiv.) 3-Methylsaligenylchlorphosphit **87** in 2.5 mL abs. Acetonitril sowie 200  $\mu$ L (1.10 mmol, 3.4 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeiten betragen für die Kupplung 2 h und für die Oxidation 1.5 h. Das Rohprodukt wurde chromatographisch gereinigt (EE).

Die Ausbeute betrug 50 mg (0.11 mmol, 34%) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:1.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.55 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.41 (s, 1H, 1 x H-4), 8.40 (s, 1H, 1 x H-4), 7.27-7.20 (m, 2H, 2 x H-6''), 7.12-7.05 (m, 4H, 2 x H-4'', 2 x H-5''), 6.21 (t, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.0 Hz, 1 H, 1 x H-5), 6.16 (t, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.0 Hz, 1H, 1 x H-5), 6.02 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 1 x H-1'), 6.02 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 1 x H-1'), 5.53-5.37 (m, 4H, 4 x H-7''), 4.54-4.30 (m, 6H, 2 x H-4', 4 x H-5'), 2.65-2.58 (m, 4H, 4 x H-a), 2.48-2.41 (m, 2H, 2 x H-2'a), 2.20 (s, 3H, 1 x CH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3H, 1 x CH<sub>3</sub>), 2.05-1.94 (m, 4H, 2 x H-2'b, 2 x H-3'a), 1.77-1.68 (m, 2 x H-3'b), 1.63 (tq, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 4H, 4 x H-b), 0.94 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 6H, 6 x H-c).



**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 171.2 (1 x C-7a), 171.2 (1 x C-7a), 158.1 (1 x C-6), 158.1 (1 x C-6), 153.8 (1 x C-2), 153.8 (1 x C-2), 147.9 (2 x C-2''), 136.4 (1 x C-4), 136.3 (1 x C-4), 131.0 (1 x C-6''), 130.9 (1 x C-6''), 126.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 6.1 Hz, 1 x C-3''), 126.8 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 6.1 Hz, 1 x C-3''), 124.0 (1 x C-5''), 124.0 (1 x C-5''), 123.7 (1 x C-4''), 123.6 (1 x C-4''), 121.1 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 9.8 Hz, 1 x C-1''), 120.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 9.3 Hz, 1 x C-1''), 106.3 (1 x C-4a), 106.2 (1 x C-4a), 99.8 (1 x C-5), 99.7 (1 x C-5), 88.4 (2 x C-1'), 79.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 6.9 Hz, 1 x C-4'), 79.8 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> =

6.9 Hz, 1 x C-4'), 68.8 (d,  $^2J_{C,P} = 5.9$  Hz, 1 x C-5'), 68.7 (d,  $^2J_{C,P} = 5.9$  Hz, 1 x C-5'), 68.5 (d,  $^2J_{C,P} = 6.9$  Hz, 1 x C-7''), 68.4 (d,  $^2J_{C,P} = 7.4$  Hz, 1 x C-7''), 32.4 (1 x C-2'), 32.3 (1 x C-2'), 29.3 (2 x C-a), 24.5 (1 x C-3'), 24.3 (1 x C-3'), 19.8 (2 x C-b), 14.9 (1 x CH<sub>3</sub>), 14.9 (1 x CH<sub>3</sub>), 13.4 (2 x C-c).

$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ [ppm] = -8.69, -8.87.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2960, 2875, 1667, 1570, 1295, 1187, 1168, 1090, 989, 933, 773, 649, 466, 436.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 461.1472 [M+H]<sup>+</sup>, 483.1292 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 461.1443, 483.1268.

### 7.7.8. Synthese von 3-Methyl-cycloSal-3-(2',3'-didesoxy-β-D-ribofuranosyl)-2,3-dihydrofuro-[2,3-d]pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (3-Me-cycloSal-6-H-ddBCNAMP) **116**

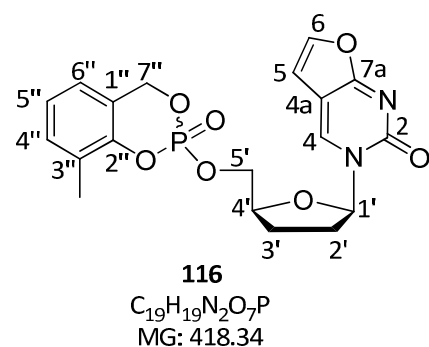
Die Reaktion wurde nach AAV 7, Variante A, durchgeführt. Es wurden 160 mg (0.677 mmol) 6-H-ddBCNA **139** gelöst in 30 mL abs. Acetonitril und 0.20 mL (0.15 g, 1.2 mmol, 1.8 Äquiv.) DIPEA und 280 mg (1.38 mmol, 2.0 Äquiv.) 3-Methylsaligenylchlorphosphit **87** in 4.5 mL abs. Acetonitril sowie 370 μL (2.04 mmol, 3.0 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeiten betragen für die Kupplung 2.5 h und für die Oxidation 2 h. Das Rohprodukt wurde chromatographisch gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 0-5% Vol.).

Die Ausbeute betrug 100 mg (0.239 mmol, 35%) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:1.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.64 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.59 (s, 2H, 2 x H-4), 7.72 (d,  $^3J_{H,H} = 2.6$  Hz, 1H, 1 x H-6), 7.70 (d,  $^3J_{H,H} = 2.6$  Hz, 1H, 1 x H-6), 7.27-7.19 (m, 2H, 2 x H-6''), 7.13-7.04 (m, 4H, 2 x H-4'', 2 x H-5''), 6.63 (d,  $^3J_{H,H} = 2.6$  Hz, 1H, 1 x H-5), 6.59 (d,  $^3J_{H,H} = 2.6$  Hz, 1H, 1 x H-5), 6.06-5.99 (m, 2H, 2 x H-1'), 5.55-5.37 (m, 4H, 4 x H-7''), 4.55-4.31 (m, 6H, 4 x H-5', 2 x H-4'), 2.49-2.43 (m, 2H, 2 x H-2'a), 2.20

(s, 3H, 1 x CH<sub>3</sub>), 2.18 (s, 3H, 1 x CH<sub>3</sub>), 2.06-1.95 (m, 4H, 2 x H-2'b, 2 x H-3'a), 1.78-1.64 (m, 2H, 2 x H-3'b).



<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 171.8 (2 x C-7a)\*, 154.8 (2 x C-2), 149.2 (2 x C-2'')\*, 144.4 (2 x C-6), 137.5 (2 x C-4), 131.6 (2 x C-6''), 128.0 (1 x C-3''), 127.9 (1 x C-3''), 124.3 (1 x C-5''), 124.3 (1 x C-5''), 123.1 (1 x C-4''), 123.1 (1 x C-4''), 120.8 (1 x C-1''), 120.8 (1 x C-1''), 105.6 (2 x C-4a)\*, 104.8 (1 x C-5), 104.8 (1 x C-5), 89.6 (1 x C-1'), 89.5 (1 x C-1'), 80.4 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 6.9 Hz, 1 x C-4'), 80.3 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 6.5 Hz, 1 x C-4'), 69.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.5 Hz, 1 x C-5'), 68.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 7.3 Hz, 1 x C-7''), 68.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 7.0 Hz, 1 x C-7''), 68.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 6.0 Hz, 1 x C-5'), 33.5 (1 x C-2'), 33.4 (1 x C-2'), 24.7 (1 x C-3'), 24.4 (1 x C-3'), 15.4 (1 x CH<sub>3</sub>), 15.4 (1 x CH<sub>3</sub>). \* aus dem HMBC bestimmt.

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = -8.76, -8.94.

IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3117, 2953, 1665, 1570, 1470, 1380, 1293, 1187, 1090, 989, 932, 767, 728, 648, 481. HRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = ber.: 441.0822 [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 441.0806.

#### 7.7.9. Synthese von 5-Chlor-cycloSal-3-(2',3'-di-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,3-dihydrofuro-[2,3-d]pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (5-Cl-cycloSal-6-H-di-OAc-BCNAMP) **175**

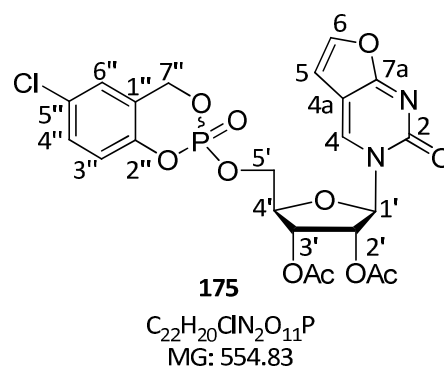
Die Reaktion wurde nach AAV 7, Variante A durchgeführt. Es wurden 33 mg (94  $\mu$ mol) 6-H-di-OAc-BCNA **177** gelöst in 2.7 mL abs. Acetonitril und 20  $\mu$ L (15 mg, 0.12 mmol, 1.3 Äquiv.) DIPEA und 69 mg (0.31 mmol, 3.3 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **92** in 1.2 mL abs. Acetonitril sowie 30  $\mu$ L (0.15 mmol, 1.6 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeiten betragen für die Kupplung 4 h und für die Oxidation 2 h. Das Rohprodukt wurde chromatographisch gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 0-3% Vol.).

Die Ausbeute betrug 17 mg (31  $\mu$ mol, 33%) einer farblosen Warte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:1.

DC: *R<sub>f</sub>*-Wert = 0.44 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).



**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.58 (s, 2H, 2 x H-4), 7.82-7.78 (m, 2H, 2 x H-6), 7.41-7.33 (m, 4H, 2 x H-6'', 2 x H-4''), 7.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.8 Hz, 1H, 1 x H-3''), 7.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.8 Hz, 1H, 1 x H-3''), 6.77 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 2H, 2 x H-5), 6.03 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.5 Hz, 1H, 1 x H-1'), 6.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.5 Hz, 1H, 1 x H-1'), 5.55-5.44 (m, 6H, 2 x H-2', 4 x H-7''), 5.40 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 1H, 1 x H-3'), 5.34 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 1H, 1 x H-3'), 4.56-4.33 (m, 6H, 2 x H-4', 4 x H-5'), 2.07 (s, 6H, 2 x OAc), 2.05 (s, 3H, 1 x OAc), 2.03 (s, 3H, 1 x OAc).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 171.9 (1 x C-7a), 171.8 (1 x C-7a), 169.2 (2 x COCH<sub>3</sub>), 169.2 (1 x COCH<sub>3</sub>), 169.1 (1 x COCH<sub>3</sub>), 153.6 (2 x C-2), 148.1 (2 x C-1''), 145.7 (2 x C-6), 140.6 (1 x C-4), 140.4 (1 x C-4), 129.4 (1 x C-4''), 129.4 (1 x C-4''), 128.2 (1 x C-5''), 128.2 (1 x C-5''), 125.9 (2 x C-6''), 122.9 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 4.3 Hz, 1 x C-2''), 122.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 4.3 Hz, 1 x C-2''), 120.1 (1 x C-3''), 120.0 (1 x C-3''), 105.7 (1 x C-4a), 105.7 (1 x C-4a), 105.0 (2 x C-5), 91.9 (1 x C-1'), 91.6 (1 x C-1'), 79.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 7.3 Hz, 1 x C-4'), 79.6 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 7.3 Hz, 1H, 1 x C-4'), 73.0 (1 x C-2'), 72.9 (1 x C-2'), 69.0 (1 x C-3'), 68.8 (1 x C-3'), 68.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 7.7 Hz, 1 x C-5'), 68.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 7.7 Hz, 1 x C-5'), 66.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.3 Hz, 1 x C-7''), 66.5 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.3 Hz, 1 x C-7''), 20.2 (3 x COCH<sub>3</sub>), 20.2 (1 x COCH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR** (202 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = -10.49, -10.58.

#### 7.7.10. Synthese von 5-Nitro-cycloSal-3-(2',3'-di-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)- 2,3-dihydrofuro-[2,3-*d*]pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (5-Nitro-cycloSal-6-H-di-OAc-BCNAMP) **174**

Die Reaktion wurde nach AAV 7, Variante C, durchgeführt. Es wurden 160 mg (0.454 mmol) 6-H-di-OAc-BCNA **177** gelöst in 10 mL abs. Acetonitril, 0.16 mL (0.12 g, 0.94 mmol, 2.0 Äquiv.) DIPEA und 215 mg (0.921 mmol, 2.0 Äquiv.) 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **176** in 10 mL abs. Acetonitril sowie 11.4 mL (1.14 mmol, 2.5 Äquiv.) Iod (0.1 M in THF/Wasser/Pyridin 77:2:21 v/v/v) verwendet. Die Reaktionszeiten betragen für die Kupplung 5 h und für die Oxidation 2 h.



Das gewünschte Produkt konnte aus einer Vielzahl phosphorhaltiger Verbindungen nicht isoliert werden.

## 7.8. Synthese der Nucleosidmonophosphate

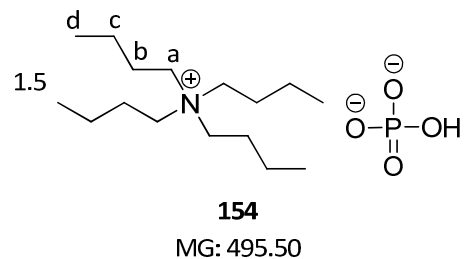
### 7.8.1. Synthese von Tetra-*n*-butylammoniumphosphat **154**

Es wurde 1 mL 85%ige Phosphorsäure in 20 mL Wasser gegeben und durch Zugabe von Tetra-*n*-butylammoniumhydroxidlösung (40% in Wasser w/w) auf pH 6 eingestellt. Anschließend wurde das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt.

Die Ausbeute betrug 5.6 g eines farblosen, hygroskopischen Feststoffs.

*Anmerkung:* Es wird davon ausgegangen, dass das Salz bei einem pH-Wert von 6 mit 1.5 Tetra-*n*-butylammoniumionen vorliegt.<sup>[98]</sup> Dies wurde bei der Berechnung der Molmasse sowie bei der Verwendung als Reagenz in den Folgestufen berücksichtigt.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 3.24-3.14 (m, 12H, H-a), 1.71-1.58 (m, 12H, H-b), 1.42-1.30 (m, 12H, H-c), 0.95 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 18H, H-d).



<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.11.

### 7.8.2. Synthese von 2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrouridin-5'-monophosphat (*d4UMP*) **49** als Tetra-*n*-butylammoniumsalz

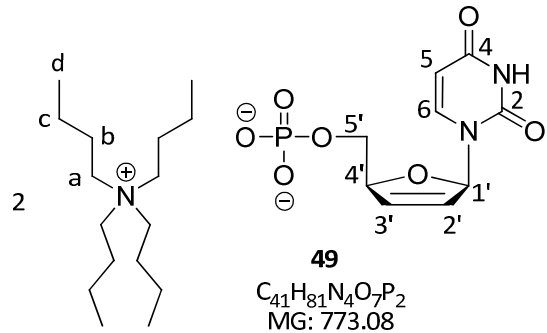
Die Reaktion wurde nach AAV 10 Variante A durchgeführt. Es wurden 245 mg (1.17 mmol) 2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrouridin **42**, 0.48 mL (0.81 g, 5.3 mmol, 4.4 Äquiv.) Phosphorylchlorid, 0.42 mL (0.41 g, 5.2 mmol, 4.4 Äquiv.) abs. Pyridin und 47.5  $\mu$ L (47.5  $\mu$ g, 2.64 mmol, 2.2 Äquiv.) Wasser in 11.5 mL abs. Acetonitril verwendet.

Die Ausbeute betrug 754 mg (0.975 mmol, 83%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffs.

Die Anzahl der Tetra-*n*-butylammoniumionen wurde anhand des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums bestimmt und bei der Berechnung der Molmasse berücksichtigt.

**DC:  $R_f$ -Wert** = 0.57 (*i*PrOH/ $\text{NH}_4\text{OAc}$  (1 M) 2:1 v/v).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ [ppm] = 7.88 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$  Hz, 1H, H-6), 6.99-6.96 (m, 1H, H-1'), 6.51 (ddd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 1.9$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.6$  Hz, 1H, H-3'), 5.95 (ddd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.2$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 1.5$  Hz, 1H, H-2'), 5.89 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$  Hz, 1H, H-5), 5.13-5.08 (m, 1H, H-4'), 4.01 (dd,  $^2J_{\text{H,H}} = 5.5$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.3$  Hz, 2H, H-5'), 3.26-3.17 (m, 16H, H-a), 1.74-1.61 (m, 16H, H-b), 1.38 (tq,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 16H, H-c), 0.96 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 24H, H-d).



$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ [ppm] = 166.4 (C-4), 152.1 (C-2), 143.0 (C-6), 134.6 (C-3'), 125.0 (C-2'), 102.1 (C-5), 90.1 (C-1'), 86.1 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 8.5$  Hz, C-4'), 65.3 (d,  $^2J_{\text{C,P}} = 5.5$  Hz, C-5'), 58.1 (C-a), 23.1 (C-b), 19.1 (C-c), 12.8 (C-d).

$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ [ppm] = 0.29.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2959, 2873, 1684, 1458, 1380, 1246, 1175, 1102, 1045, 886, 740, 527, 424.

**HRMS** (ESI $^-$ ):  $m/z$  = ber.: 289.0231 [M-H] $^-$ , gef.: 289.0233.

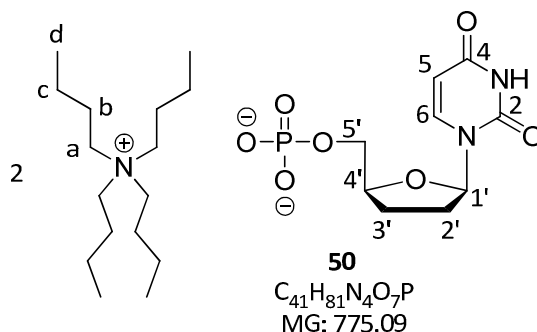
### 7.8.3. Synthese von 2',3'-Dideoxyuridin-5'-monophosphat (ddUMP) **50** als Tetra-*n*-butylammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach AAV 10 Variante A durchgeführt. Es wurden 130 mg (0.613 mmol) 2',3'-Dideoxyuridin **43**, 0.25 mL (0.42 g, 2.8 mmol, 4.4 Äquiv.) Phosphorylchlorid, 0.22 mL (0.21 g, 2.7 mmol, 4.4 Äquiv.) abs. Pyridin und 25  $\mu\text{L}$  (25  $\mu\text{g}$ , 1.4 mmol, 2.2 Äquiv.) Wasser in 6 mL abs. Acetonitril verwendet.

Die Ausbeute betrug 380 mg (0.490 mmol, 80%) eines hellgelben, hygroskopischen Feststoffs. Die Anzahl der Tetra-*n*-butylammoniumkationen wurde anhand des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums bestimmt und bei der Berechnung der Molmasse berücksichtigt.

**DC:  $R_f$ -Wert** = 0.52 (*i*PrOH/ $\text{NH}_4\text{OAc}$  (1 M) 2:1 v/v).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.09 (d,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 8.1 Hz, 1H, H-6), 6.12 (dd,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 6.7 Hz,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 3.5 Hz, 1H, H-1'), 5.92 (d,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 8.1 Hz, 1H, H-5), 4.41-4.33 (m, 1H, H-4'), 4.10 (ddd,  $^2J_{\text{H,H}}$  = 11.6 Hz,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 4.9 Hz,  $^3J_{\text{H,P}}$  = 2.9 Hz, 1H, H-5'), 3.97-3.90 (m, 1H, H-5'), 3.26-3.16 (m, 16H, H-a), 2.51-2.40 (m, 1H, H-2'a), 2.22-2.07 (m, 2H, H-2'b, H-3'a),



2.05-1.91 (m, 1H, H-3'b), 1.73-1.60 (m, 16H, H-b), 1.37 (tq,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 7.5 Hz,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 7.5 Hz, 16H, H-c), 0.96 (t,  $^3J_{\text{H,H}}$  = 7.3 Hz, 24H, H-d).

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 166.4 (C-4), 151.6 (C-2), 142.4 (C-6), 101.74 (C-5), 86.5 (C-1'), 81.0 (d,  $^3J_{\text{C,P}}$  = 8.5 Hz, C-4'), 65.4 (d,  $^2J_{\text{C,P}}$  = 5.1 Hz, C-5'), 58.1 (C-a), 31.6 (C-2'), 24.8 (C-3'), 23.1 (C-b), 19.1 (C-c), 12.8 (C-d).

$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.33.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2959, 2873, 1683, 1521, 1459, 1381, 1268, 1185, 1101, 1056, 886, 790, 521.

**HRMS** (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  = ber.: 291.0388 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 291.0451.

#### 7.8.4. Synthese von 2',3'-Dideoxyuridin-5'-monophosphat (ddUMP) **50** als Triethylammoniumsalz

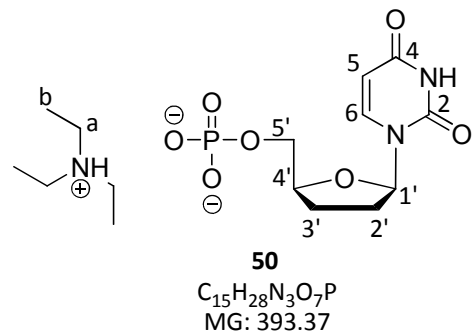
Es wurden 610 mg (1.30 mmol) 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrouridin-5'-*O*-dibenzylphosphat **66** in 70 mL abs. Methanol gelöst und 360  $\mu\text{L}$  (263 mg, 2.60 mmol, 2.0 Äquiv.) abs. Triethylamin sowie vier Spatelspitzen Pd/C hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde unter Wasserstoffatmosphäre 30 h bei Rt gerührt, filtriert und das Lösungsmittel unter

vermindertem Druck entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde durch Umkehrphasen-chromatographie an RP-18 Kieselgel gereinigt (H<sub>2</sub>O).

Die Ausbeute betrug 323 mg (0.821 mmol, 63%) eines farblosen hygroskopischen Feststoffs. Die Anzahl der Triethylammoniumionen wurde anhand des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums bestimmt und bei der Berechnung der Molmasse berücksichtigt.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.52 (*i*PrOH/NH<sub>4</sub>OAc (1 M) 2:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 8.04 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 1H, H-6), 6.14 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1'), 5.93 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.2 Hz, 1H, H-5), 4.44-4.37 (m, 1H, H-4'), 4.19 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-5'a), 4.06-3.99 (m, 1H, H-5'b), 3.23 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 6H, H-a), 2.55-2.43 (m, 1H, H-2'a) 2.24-2.10 (m, 2H, H-2'b/H-3'a), 2.07-1.96 (m, 1H, H-3'b), 1.31 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 9H, H-b).



**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 0.34.

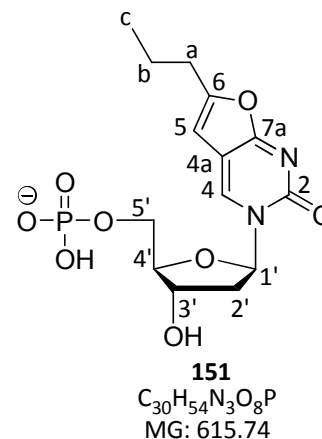
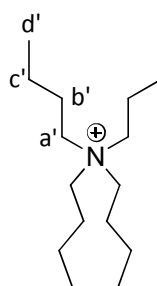
#### 7.8.5. Synthese von 3-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (6-Prop-2'-dBCNAMP) **151**

Die Reaktion wurde nach AAV 10 Variante B durchgeführt. Es wurden 280 mg (0.624 mmol) 5'-O-Tosyl-6-Prop-2'dBCNA **155** und 580 mg (1.26 mmol, 2.0 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat **154** (1.5 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 11 mL abs. DMF verwendet und in der Mikrowelle 10 min auf 100 °C (150 W) erhitzt.

Die Ausbeute betrug 123 mg (0.200 mmol, 32%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffs. Die Anzahl der Tetra-*n*-butylammoniumionen wurde anhand des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums bestimmt und bei der Berechnung der Molmasse berücksichtigt.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.71 (*i*PrOH/NH<sub>4</sub>OAc (1 M) 2:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 8.76 (s, 1H, H-4), 6.52 (s, 1H, H-5), 6.39 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, 1H, H-1'), 4.62-4.55 (m, 1H, H-3'), 4.37-4.31 (m, 1H, H-4'), 4.24 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-5'a), 4.13 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 3.9 Hz, 1H, H-5'b), 3.26-3.18 (m, 8H, H-a'), 2.72 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 2H, H-a), 2.70-2.65 (m, 1H, H-2'a), 2.42-2.33 (m, 1H, H-2'b), 1.79-1.62 (m, 10H, H-b, H-b'), 1.39 (tq, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 8H, H-c'), 0.99 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 3H, H-c), 0.97 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 12H, H-d').



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 171.5 (C-7a)\*, 161.0 (C-6), 156.0 (C-2), 137.1 (C-4), 109.8 (C-4a), 99.9 (C-5), 88.4 (C-1'), 86.3 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 8.7 Hz, C-4'), 70.1 (C-3'), 64.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 4.8 Hz, C-5'), 58.1 (C-a'), 40.5 (C-2'), 29.4 (C-a), 23.1 (C-b'), 19.7 (C-b), 19.1 (C-c), 12.8 (C-d'), 12.9 (C-c). \* aus dem HMBC bestimmt.

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 0.22.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2960, 2935, 2874, 1667, 1573, 1462, 1383, 1334, 1252, 1167, 1100, 906, 754, 508. **HRMS** (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  = ber.: 373.0806 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 373.0801.

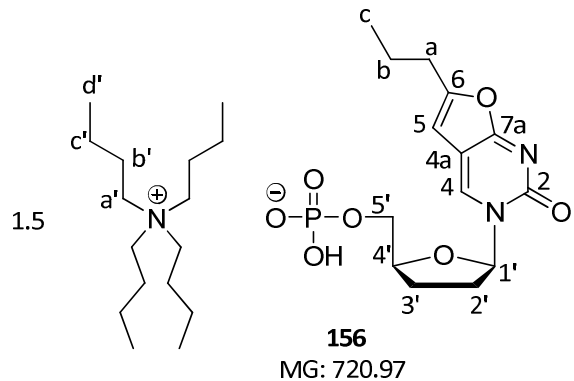
#### 7.8.6. Synthese von 3-(2',3'-Dideoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (6-Prop-ddBCNAMP) **152**

Die Reaktion wurde nach AAV 10 Variante B durchgeführt. Es wurden 90 mg (0.21 mmol) 5'-O-Tosyl-6-Prop-ddBCNA **156** und 210 mg (0.444 mmol, 2.1 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat **154** (1.5 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 5 mL abs. DMF verwendet und in der Mikrowelle 30 min auf 100 °C (150 W) erhitzt.

Die Ausbeute betrug 40 mg (0.055 mmol, 26%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffs. Die Anzahl der Tetra-*n*-butylammoniumkationen wurde anhand des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums bestimmt und bei der Berechnung der Molmasse berücksichtigt.

**DC:  $R_f$ -Wert** = 0.48 (*i*PrOH/ $\text{NH}_4\text{OAc}$  (1 M) 2:1 v/v).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ [ppm] = 8.84 (s, 1H, H-4), 6.47 (s, 1H, H-5), 6.14 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 1.8$  Hz, 1H, H-1'), 4.49-4.43 (m, 1H, H-4'), 4.29 (ddd,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.6$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$  Hz,  $^3J_{\text{H,P}} = 2.6$  Hz, 1H, H-5'a), 4.08 (ddd,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.6$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$  Hz,  $^3J_{\text{H,P}} = 4.2$  Hz, 1H, H-5'a), 3.24-3.12 (m, 13H, H-a'), 2.65 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} =$



7.4 Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 2H, H-a), 2.63-2.55 (m, 1H, H-2'a), 2.21-2.13 (m, 1H, H-2'b), 2.10-2.02 (m, 1H, H-3'a), 1.96-1.87 (m, 1H, H-3'b), 1.72-1.57 (m, 15H, H-b, H-b'), 1.34 (tq,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 13H, H-c'), 0.94 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 3H, H-c), 0.92 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 18H, H-d').

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = 171.1 (C-7a), 156.8 (C-6), 153.9 (C-2), 138.6 (C-4), 106.1 (C-4a), 101.0 (C-5), 88.0 (C-1'), 82.1 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 8.3$  Hz, C-4'), 63.2 (d,  $^2J_{\text{C,P}} = 5.1$  Hz, C-5'), 57.5 (C-a'), 33.3 (C-2'), 29.3 (C-a), 23.3 (C-3'), 23.1 (C-b'), 19.9 (C-b), 19.1 (C-c'), 13.4 (C-d'), 13.3 (C-c).

$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ [ppm] = 0.49.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2960, 2934, 2874, 1666, 1571, 1382, 1168, 1098, 1073, 898, 786, 518. **HRMS** (ESI $^-$ ):  $m/z$  = ber.: 357.0857 [M-H] $^-$ , gef.: 357.0874.



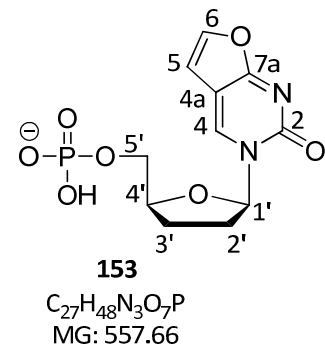
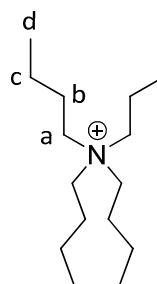
7.8.7. Synthese von 3-(2',3'-Didesoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2,3-dihydrofuro[2,3-d]pyrimidin-2-on-5'-monophosphat (6-H-ddBCNAMP) **153**

Die Reaktion wurde nach AAV 10 Variante B durchgeführt. Es wurden 170 mg (0.435 mmol) 5'-O-Tosyl-6-H-ddBCNA **157** und 285 mg (0.620 mmol, 1.4 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat **154** ( $1.5 \times n\text{-Bu}_4\text{N}^+$ ) in 4 mL abs. DMF verwendet und in der Mikrowelle 20 min auf 100 °C (150 W) erhitzt.

Die Ausbeute betrug 86 mg (0.15 mmol, 34%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffs. Die Anzahl der Tetra-*n*-butylammoniumkationen wurde anhand des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums bestimmt und bei der Berechnung der Molmasse berücksichtigt.

**DC:  $R_f$ -Wert** = 0.71 (*i*PrOH/ $\text{NH}_4\text{OAc}$  (1 M) 2:1 v/v).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.03 (s, 1H, H-4), 7.53 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.7$  Hz, 1H, H-5), 6.80 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.7$  Hz, 1H, H-6), 6.11 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 1.8$  Hz, 1H, H-1'), 4.48-4.40 (m, 1H, H-4'), 4.28 (ddd,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.8$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$  Hz,  $^3J_{\text{H,P}} = 2.6$  Hz, 1H, H-5'a), 4.05 (ddd,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.8$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$  Hz,  $^3J_{\text{H,P}} = 3.7$  Hz, 1H, H-5'b), 3.18-3.08 (m, 8H, H-a), 2.63-



2.51 (m, 1H, H-2'a), 2.28-2.21 (m, 1H, H-2'b), 2.14-2.05 (m, 1H, H-3'a), 2.02-1.90 (m, 1H, H-3'b), 1.73-1.60 (m, 8H, H-b), 1.38 (tq,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 8H, H-c), 0.97 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 12H, H-d).

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 171.1 (C-7a), 155.9 (C-2), 145.4 (C-6), 140.1 (C-4), 107.3 (C-4a), 105.5 (C-5), 89.4 (C-1'), 82.3 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 8.8$  Hz, C-4'), 64.9 (d,  $^2J_{\text{C,P}} = 5.3$  Hz, C-5'), 58.1 (C-a), 33.0 (C-2'), 23.3 (C-3'), 23.1 (C-b), 19.1 (C-c), 12.80 (C-d).

$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.37.

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2960, 2874, 1667, 1573, 1462, 1383, 1334, 1167, 1100, 907, 781, 508. **HRMS** (ESI $^-$ ):  $m/z$  = ber.: 315.0388 [M-H] $^-$ , gef.: 315.0416.

## 7.9. Synthese der Nucleosiddiphosphate

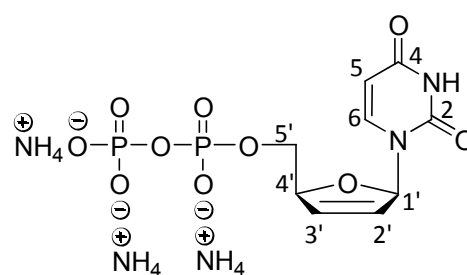
### 7.9.1. Synthese von 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrouridin-5'-diphosphat (d4UDP) **59** als Ammoniumsalz

Die Synthese wurde nach AAV 11 durchgeführt. Es wurden 619 mg (1.35 mmol, 2.9 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ( $1.5 \times n\text{-Bu}_4\text{N}^+$ ) in 10 mL abs. DMF und 194 mg (0.470 mmol) 5-Cl-*cycloSal*-d4UMP **90** in 8 mL abs. DMF verwendet. Die Reaktionszeit betrug 18 h. Die Reinigung erfolgte durch zweifache Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (1. H<sub>2</sub>O, 2. H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1 v/v) anschließend wurden die Kationen durch Elution über eine Dowex 50WX8 Kationenaustauschersäule (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Form) ausgetauscht.

Die Ausbeute betrug 62 mg (0.15 mmol, 32%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffs.

**DC:** R<sub>f</sub>-Wert = 0.17 (*i*PrOH/NH<sub>4</sub>OAc (1 M) 2:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 7.84 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$  Hz, 1H, H-6), 6.99-6.95 (m, 1H, H-1'), 6.53 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$  Hz, 1H, H-3'), 5.95 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$  Hz, 1H, H-2'), 5.89 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 5.15-5.10 (m, 1H, H-4'), 4.18-4.08 (m, 2H, H-5').



**59**

C<sub>9</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub>  
MG: 421.24

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 166.3 (C-4)\*, 151.8 (C-2)\*, 143.0 (C-6), 134.6 (C-3'), 124.9 (C-2'), 102.3

(C-5), 90.1 (C-1'), 86.1 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 8.8$  Hz, C-4'), 66.0 (d,  $^2J_{\text{C,P}} = 6.0$  Hz, C-5'). \* aus dem HMBC bestimmt.

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = -9.74 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 19.7$  Hz), -11.29 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 21.5$  Hz).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2953, 2927, 1699, 1541, 1250, 1178, 1066, 1037, 963, 902, 833, 776, 702, 668, 515, 419. **HRMS** (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  = ber.: 368.9894 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 368.9719.

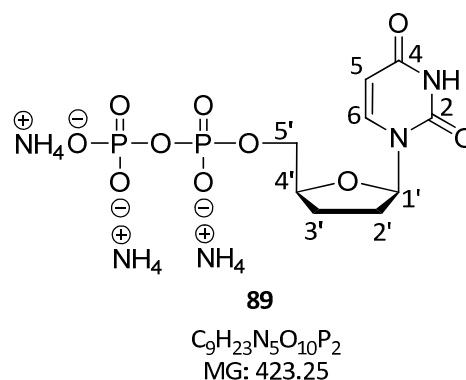
7.9.2. Synthese von 2',3'-Dideoxyuridin-5'-diphosphat (ddUDP) **89** als Ammoniumsalz

Die Synthese wurde nach AAV 11 durchgeführt. Es wurden 300 mg (0.653 mmol, 2.0 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ( $1.5 \times n\text{-Bu}_4\text{N}^+$ ) in 5 mL abs. DMF und 137 mg (0.330 mmol) 5-Cl-*cycloSal*-ddUMP **91** in 5 mL abs. DMF verwendet. Die Reaktionszeit betrug 16 h. Die Reinigung erfolgte durch zweifache Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (H<sub>2</sub>O) anschließend wurden die Kationen durch Elution über eine Dowex 50WX8 Kationenaustauschersäule (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Form) ausgetauscht.

Die Ausbeute betrug 39 mg (92 μmol, 28%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffs.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.17 (*i*PrOH/NH<sub>4</sub>OAc (1 M) 2:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 8.00 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-6), 6.11 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1'), 5.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.2 Hz, 1H, H-5), 4.43-4.35 (m, 1H, H-4'), 4.28-4.21 (m, 1H, H-5'a), 4.11-4.05 (m, 1H, H-5'b), 2.50-2.40 (m, 1H, H-2'a), 2.21-2.08 (m, 2H, H-2'b, H-3'a), 2.05-1.94 (m, 1H, H-3'b).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 166.5 (C-4), 151.7

(C-2), 142.2 (C-6), 101.8 (C-5), 86.5 (C-1'), 80.6 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 8.8 Hz, C-4'), 66.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.1 Hz, C-5'), 31.3 (C-2'), 24.7 (C-3').

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = -9.54 (bs), -10.94 (bs).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2987, 2901, 1666, 1409, 1221, 1055, 900, 809, 715, 523. **HRMS** (ESI<sup>-</sup>): *m/z* = ber.: 371.0051 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 371.0091.

## 7.10 Synthese der Bis(acyloxybenzyl)-nucleosiddiphosphatprodrugs

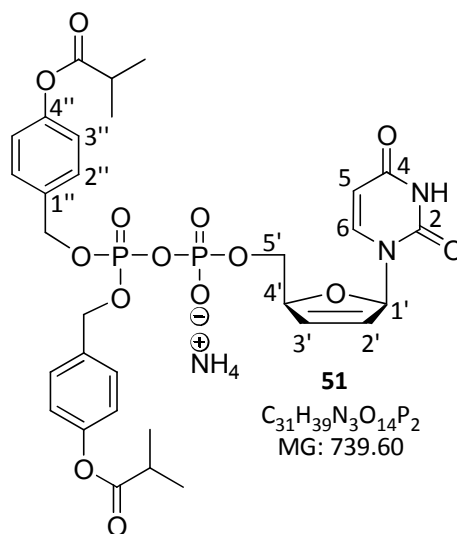
### 7.10.1. Synthese von Bis(4-isobutyryloxybenzyl)-d4UDP (iPr-d4UDP) 51

Die Synthese wurde nach AAV 12 durchgeführt. Es wurden 107 mg (0.138 mmol) d4UMP **49** (2 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 5 mL abs. Acetonitril, 129 mg (0.249 mmol, 1.8 Äquiv.) Bis(4-isobutyryloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **67**, 30 mg (0.25 mmol, 1.8 Äquiv.) DCI und 45 µL (0.25 mmol, 1.8 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeit für die Kupplung betrug 2 h und für die Oxidation 30 min. Die Reinigung erfolgte durch eine erste Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 v/v) und nach Kationenaustausch durch zweifache Chromatographie an RP-18 Kieselgel (1. MeOH/H<sub>2</sub>O 3:1 v/v, 2. MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 33 mg (45 µmol, 33% (1 x NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)) eines farblosen hygroskopischen Feststoffs. Weiteres Produkt war in Mischfraktionen enthalten.

DC: R<sub>f</sub>-Wert = 0.65 (EE/MeOH 7:3 v/v).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 7.82 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 1H, H-6), 7.43-7.37 (m, 4H, H-2''), 7.08-7.03 (m, 4H, H-3''), 6.94-6.92 (m, 1H, H-1'), 6.39 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.7 Hz, 1H, H-3'), 5.85 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.4 Hz, 1H, H-2'), 5.75 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 1H, H-5), 5.11 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 5.1 Hz, 1H, Bn), 4.98-4.93 (m, 1H, H-4'), 4.22-4.10 (m, 2H, H-5'), 2.82 (sept, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 2H, CH-*i*Pr), 1.30 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>-*i*Pr).



<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 177.1 (2 x C=O), 166.2 (C-4), 152.7 (2 x C-4''), 152.5 (C-2), 143.3 (C-6), 135.5 (C-3'), 134.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 7.7 Hz, 2 x C-1''), 130.4 (d, <sup>4</sup>J<sub>C,P</sub> = 2.9 Hz, 4 x C-2''), 127.3 (C-2'), 122.8 (4 x C-3''), 103.2 (C-5), 91.0 (C-1'), 87.0 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 9.6 Hz, C-4'), 70.3 (dd, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.9 Hz, <sup>4</sup>J<sub>C,P</sub> = 2.2 Hz, 2 x Bn), 68.0 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.8 Hz, C-5'), 35.2 (2 x CH-*i*Pr), 19.2 (4 x CH<sub>3</sub>-*i*Pr).

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, MeOD): δ [ppm] = -12.10 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,P</sub> = 20.1 Hz), -12.88 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,P</sub> = 20.1 Hz).

IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2972, 2877, 1753, 1684, 1509, 1460, 1386, 1244, 1106, 1004, 964, 837, 764, 694, 501. HRMS (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  = ber.: 721.1569 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 721.1798.

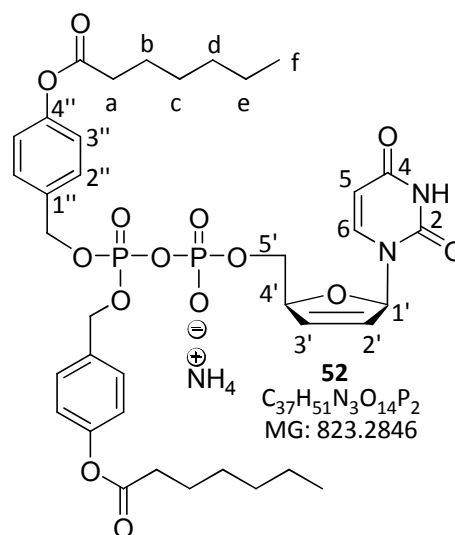
### 7.10.2. Synthese von Bis(4-heptanoyloxybenzyl)-d4UDP (C<sub>6</sub>-d4UDP) **52**

Die Synthese wurde nach AAV 12 durchgeführt. Es wurden 107 mg (0.138 mmol) d4UMP **49** (2 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 5 mL abs. Acetonitril, 152 mg (0.253 mmol, 1.8 Äquiv.) Bis(4-heptanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **68**, 30 mg (0.25 mmol, 1.8 Äquiv.) DCI und 45  $\mu$ L (0.25 mmol, 1.8 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeit für die Kupplung betrug 20 h und für die Oxidation 30 min. Die Reinigung erfolgte durch eine erste Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1-5:1 v/v) und nach Kationenaustausch durch zweifache Chromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 3:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 47 mg (57  $\mu$ mol, 41% (1 x NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)) eines farblosen hygroskopischen Feststoffs. Weiteres Produkt war in Mischfraktionen enthalten.

DC: R<sub>f</sub>-Wert = 0.29 (EE/MeOH 7:3 v/v).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 7.82 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 1H, H-6), 7.42-7.37 (m, 4H, H-2''), 7.08-7.03 (m, 4H, H-3''), 6.96-6.93 (m, 1H, H-1'), 6.39 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.7 Hz, 1H, H-3'), 5.87-5.83 (m, 1H, H-2'), 5.75 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 1H, H-5), 5.10 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 6.9 Hz, 4H, Bn), 4.97-4.93 (m, 1H, H-4'), 4.21-4.11 (m, 2H, H-5'), 2.57 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 4H, H-a), 1.73 (tt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 4H, H-b), 1.47-1.33 (m, 12H, H-c, H-d, H-e), 0.93 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 6H, H-f).



<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 173.8 (2 x C=O), 166.2 (C-4), 152.7 (2 x C-4''), 152.4 (C-2), 143.3 (C-6), 135.5 (C-3'), 134.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 6.9 Hz, 2 x C-1''), 130.5 (d, <sup>4</sup>J<sub>C,P</sub> = 3.7 Hz, 4 x

C-2''), 127.3 (C-2'), 122.9 (4 x C-3''), 103.3 (C-5), 91.0 (C-1'), 87.0 (d,  $^3J_{C,P} = 8.7$  Hz, C-4'), 70.3 (dd,  $^2J_{C,P} = 5.7$  Hz,  $^4J_{C,P} = 2.8$  Hz, 2 x Bn), 68.0 (d,  $^2J_{C,P} = 5.6$  Hz, C-5'), 35.0, 32.6, 29.8, 25.9, 23.6 (C-a, C-b, C-c, C-d, C-e), 14.4 (C-f).

$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz, MeOD):  $\delta$ [ppm] = -12.11 (d,  $^2J_{P,P} = 19.8$  Hz), -12.92 (d,  $^2J_{P,P} = 21.8$  Hz).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2958, 2873, 1754, 1687, 1508, 1461, 1378, 1198, 1103, 1005, 977, 763, 498.

**HRMS** (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  = ber.: 805.2508 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 805.2505.

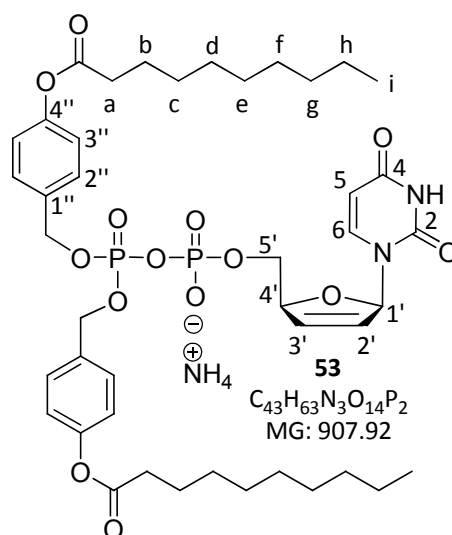
### 7.10.3. Synthese von Bis(4-decanoyloxybenzyl)-d4UDP (C<sub>9</sub>-d4UDP) **53**

Die Synthese wurde nach AAV 12 durchgeführt. Es wurden 106 mg (0.137 mmol) d4UMP **49** (2 x  $n\text{-Bu}_4\text{N}^+$ ) in 5 mL abs. Acetonitril, 171 mg (0.249 mmol, 1.8 Äquiv.) Bis(4-decanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **69**, 30 mg (0.25 mmol, 1.8 Äquiv.) DCI und 45  $\mu\text{L}$  (0.25 mmol, 1.8 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeit für die Kupplung betrug 18 h und für die Oxidation 1 h. Die Reinigung erfolgte durch eine erste Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1-9:1 v/v) und nach Kationenaustausch durch eine weitere Chromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 5:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 39 mg (43  $\mu\text{mol}$ , 31% (1 x  $\text{NH}_4^+$ )) eines farblosen hygroskopischen Feststoffs. Weiteres Produkt war in Mischfraktionen enthalten.

**DC:**  $R_f$ -Wert = 0.38 (EE/MeOH 7:3 v/v).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 7.82 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$  Hz, 1H, H-6), 7.42-7.35 (m, 4H, H-2''), 7.08-7.03 (m, 4H, H-3''), 6.96-6.93 (m, 1H, H-1'), 6.39 (ddd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 1.7$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$  Hz, 1H, H-3'), 5.88-5.83 (m, 1H, H-2'), 5.75 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$  Hz, 1H, H-5), 5.10 (dd,  $^2J_{\text{H,H}} = 8.6$  Hz,  $^3J_{\text{H,P}} = 5.4$  Hz, 4H, Bn), 4.98-4.93 (m, 1H, H-4'), 4.22-4.11 (m, 2H, H-5'), 2.58 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 4H, H-a), 1.73 (tt,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$  Hz, 4H, H-b), 1.47-1.25 (m, 24H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.91 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$  Hz, 6H, H-i).



**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 173.8 (2 x C=O), 166.3 (C-4), 152.7 (2 x C-4''), 152.4 (C-2), 143.3 (C-6), 135.6 (C-3'), 149.9 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 5.9$  Hz, 2 x C-1''), 130.5 (d,  $^4J_{\text{C,P}} = 2.9$  Hz, 4x C-2''), 127.3 (C-2'), 122.9 (4 x C-3''), 103.3 (C-5), 91.0 (C-1'), 87.0 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 9.5$  Hz, C-4'), 70.3 (dd,  $^2J_{\text{C,P}} = 5.9$  Hz,  $^4J_{\text{C,P}} = 2.9$  Hz, 2 x Bn), 68.0 (d,  $^2J_{\text{C,P}} = 5.9$  Hz, C-5'), 35.0, 33.1, 30.6, 30.4, 30.4, 30.2, 26.0, 23.7 (C-a, C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 14.4 (C-i).

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -12.12 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 21.1$  Hz), -12.93 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 19.6$  Hz).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2921, 2851, 1754, 1687, 1509, 1464, 1379, 1248, 1105, 1005, 968, 914, 837, 764, 695, 504. **HRMS** (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  = ber.: 889.3520 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 889.3448.

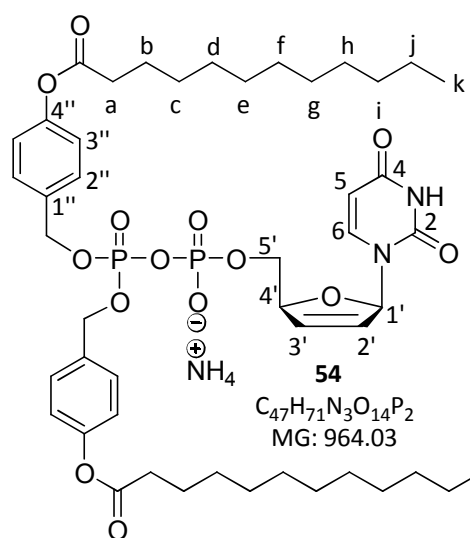
#### 7.10.4. Synthese von Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-d4UDP (C<sub>11</sub>-d4UDP) **54**

Die Synthese wurde nach AAV 12 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.129 mmol) d4UMP **49** (2 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 5 mL abs. Acetonitril, 190 mg (0.256 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **70**, 30 mg (0.25 mmol, 1.8 Äquiv.) DCI und 45  $\mu\text{L}$  (0.25 mmol, 1.8 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeit für die Kupplung betrug 24 h und für die Oxidation 1 h. Die Reinigung erfolgte durch eine erste Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1-9:1 v/v) und nach Kationenaustausch durch eine weitere Chromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 40 mg (41  $\mu\text{mol}$ , 32% ( $1 \times \text{NH}_4^+$ )) eines farblosen hygroskopischen Feststoffs. Weiteres Produkt war in Mischfraktionen enthalten.

**DC:  $R_f$ -Wert** = 0.34 (EE/MeOH 7:3 v/v).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 7.82 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$  Hz, 1H, H-6), 7.41-7.35 (m, 4H, H-2''), 7.07-7.03 (m, 4H, H-3''), 6.96-6.93 (m, 1H, H-1'), 6.39 (ddd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 1.7$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$  Hz, 1H, H-3'), 5.87-5.84 (m, 1H, H-2'), 5.75 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$  Hz, 1H, H-5), 5.10 (dd,  $^2J_{\text{H,H}} = 8.5$  Hz,  $^3J_{\text{H,P}} = 5.2$  Hz, 4H, Bn), 4.98-4.93 (m, 1H, H-4'), 4.21-4.11 (m, 2H, H-5'), 2.57 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 4H, H-a), 1.73 (tt,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 4H, H-b), 1.48-1.24 (m, 32H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j), 0.90 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$  Hz, 6H, H-k).



**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 173.7 (2 x C=O), 166.2 (C-4), 152.7 (2 x C-4''), 152.4 (C-2), 143.3 (C-6), 135.5 (C-3'), 134.9 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 6.5$  Hz, 2 x C-1''), 130.4 (d,  $^4J_{\text{C,P}} = 2.9$  Hz, 4 x C-2''), 127.3 (C-2'), 122.9 (2 x C-3''), 103.3 (C-5), 91.0 (C-1'), 87.0 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 8.8$  Hz, C-4'), 70.3 (dd,  $^2J_{\text{C,P}} = 5.9$  Hz,  $^4J_{\text{C,P}} = 3.0$  Hz, 2 x Bn), 67.9 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 6.5$  Hz, C-5'), 35.0, 33.1, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 26.0, 23.7 (C-a, C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j), 14.4 (C-k).

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -12.10 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 20.8$  Hz), -12.91 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 19.7$  Hz).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2917, 2849, 1753, 1686, 1509, 1465, 1380, 1221, 1169, 1107, 977, 917, 837, 764, 720, 506. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = ber.: 947.4219 [M+H]<sup>+</sup>, 969.4038, [M+Na]<sup>+</sup>, gef.: 947.4212, 969.4010.





IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2974, 2878, 1753, 1674, 1509, 1461, 1261, 1202, 1166, 1005, 956, 803, 498.

HRMS (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  = ber.: 723.1726 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 723.1736.

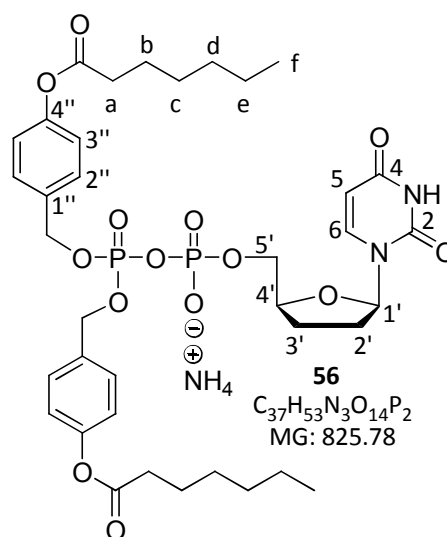
#### 7.10.6. Synthese von Bis(4-heptanoyloxybenzyl)-ddUDP (C<sub>6</sub>-ddUDP) **56**

Die Synthese wurde nach AAV 12 durchgeführt. Es wurden 130 mg (0.168 mmol) ddUMP **50** (2 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 5 mL abs. Acetonitril, 170 mg (0.283 mmol, 1.7 Äquiv.) Bis(4-heptanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **68**, 36 mg (0.30 mmol, 1.8 Äquiv.) DCI und 55  $\mu$ L (0.31 mmol, 1.8 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeit für die Kupplung betrug 24 h und für die Oxidation 3.5 h. Die Reinigung erfolgte durch eine erste Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1-5:1 v/v) und nach Kationenaustausch durch zweifache Chromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 5:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 48 mg (58  $\mu$ mol, 41% (1 x NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)) eines farblosen hygroskopischen Feststoffs. Weiteres Produkt war in Mischfraktionen enthalten.

DC: R<sub>f</sub>-Wert = 0.75 (EE/MeOH 7:3 v/v).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 7.96 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.2 Hz, 1H, H-6), 7.43-7.37 (m, 4H, H-2''), 7.08-7.01 (m, 4H, H-3''), 6.02 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.6 Hz, 1H, H-1'), 5.73 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 1H, H-5), 5.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.4 Hz, 4H, Bn), 4.27-4.18 (m, 2H, H-5'), 4.11-4.03 (m, 1H, H-4'), 2.58 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 4H, H-a), 2.38-2.27 (m, 1H, H-2'a), 2.06-1.93 (m, 3H, H-2'b, H-3'), 1.73 (tt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 4H, H-b), 1.48-1.28 (m, 12H, H-c, H-d, H-e), 0.93 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 6H, H-f).



<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 173.7 (2 x C=O), 166.3 (C-4), 152.4 (2 x C-4''), 152.3 (C-2), 142.6 (C-6), 134.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 7.4 Hz, C-1''), 130.5 (4 x C-2''), 122.9 (4 x C-3''), 102.5 (C-5),

87.5 (C-1'), 81.2 (d,  $^3J_{C,P} = 9.2$  Hz, C-4'), 70.3 (d,  $^3J_{C,P} = 5.5$  Hz, 2 x Bn), 68.3 (d,  $^2J_{C,P} = 6.5$  Hz, C-5'), 35.0 (C-a), 33.3 (C-2'), 32.6, 29.8 (C-b, C-c), 26.1 (C-3'), 25.9, 23.6 (C-d, C-e), 14.4 (C-f).

$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -11.73 (d,  $^2J_{P,P} = 17.7$  Hz), -12.86 (d,  $^2J_{P,P} = 20.1$  Hz).

IR:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2955, 2929, 2858, 1755, 1678, 1509, 1462, 1263, 1198, 1102, 1025, 960, 810, 557. HRMS (ESI):  $m/z$  = ber.: 807.2737 [M-H] $^-$ , gef.: 807.2652.

#### 7.10.7. Synthese von Bis(4-decanoyloxybenzyl)-ddUDP (C<sub>9</sub>-ddUDP) **57**

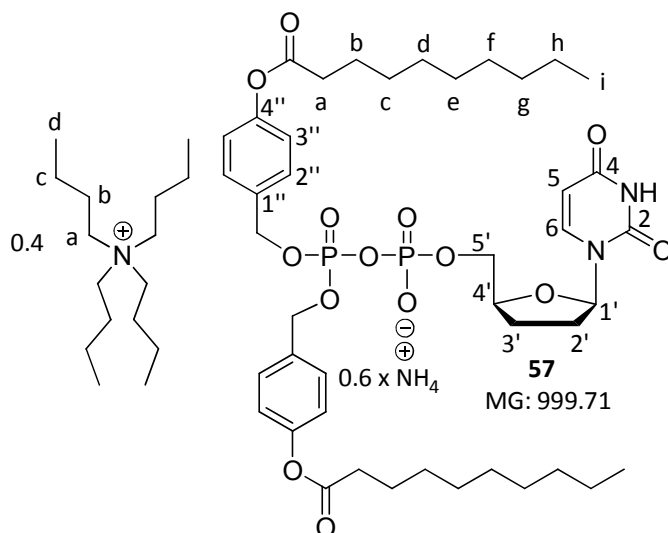
Die Synthese wurde nach AAV 12 durchgeführt. Es wurden 86 mg (0.11 mmol) ddUMP **50** (2 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 5 mL abs. Acetonitril, 135 mg (0.197 mmol, 1.8 Äquiv.) Bis(4-decanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **69**, 25 mg (0.21 mmol, 1.9 Äquiv.) DCI und 36  $\mu\text{L}$  (0.20 mmol, 1.8 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeit für die Kupplung betrug 20 h und für die Oxidation 30 min. Die Reinigung erfolgte durch eine erste Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1-9:1 v/v) und nach Ionenaustausch durch eine weitere Chromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 5:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 42 mg (42  $\mu\text{mol}$ , 38% (0.4 x Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>, 0.6 x NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)) eines farblosen Öls. Die Anzahl der Tetra-*n*-butylammoniumkationen wurde aus dem  $^1\text{H-NMR}$  bestimmt. Weiteres Produkt war in Mischfraktionen enthalten.

DC:  $R_f$ -Wert = 0.29 (EE/MeOH 7:3 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] =

7.97 (d,  $^3J_{H,H} = 8.1$  Hz, 1H, H-6), 7.43-7.37 (m, 4H, H-2''), 7.07-7.03 (m, 4H, H-3''), 6.02 (dd,  $^3J_{H,H} = 6.4$  Hz,  $^3J_{H,H} = 3.6$  Hz, 1H, H-1'), 5.73 (d,  $^3J_{H,H} = 8.1$  Hz, 1H, H-5), 5.12 (d,  $^2J_{H,H} = 8.2$  Hz, 4H, Bn), 4.27-4.19 (m, 2H, H-5'), 4.11-4.04 (m, 1H, H-4'), 3.26-3.19 (m, 3H, H-a Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 2.57 (t,  $^3J_{H,H} = 7.4$  Hz, 4H, H-a), 2.37-2.25 (m, 1H, H-2'a), 2.07-1.93 (m,



3H, H-2'b, H-3'), 1.78-1.61 (m, 7H, H-b, H-b Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 1.47-1.24 (m, 27H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-c Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 1.03 (t,  $^3J_{H,H} = 7.4$  Hz, 5H, H-d Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 0.91 (t,  $^3J_{H,H} = 6.9$  Hz, 6H, H-i).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 173.8 (2 x C=O), 152.4 (2 x C-4''), 142.6 (C-6), 134.8 (d,  $^3J_{C,P} = 7.4$  Hz, 2 x C-1''), 130.5 (2 x C-2''), 122.9 (2 x C-3''), 102.5 (C-5), 87.5 (C-1'), 81.2 (d,  $^3J_{C,P} = 9.2$  Hz, C-4'), 70.35 (d,  $^2J_{C,P} = 9.2$  Hz, 2 x Bn), 68.3 (d,  $^3J_{C,P} = 6.0$  Hz, C-5'), 59.5 (C-a Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 35.0 (C-a), 33.3 (C-2'), 33.0, 30.6, 30.4, 30.4, 30.2 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f), 26.1 (C-3'), 26.0, 24.7 (C-g, C-h), 23.7 (C-b Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 20.7 (C-c Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 14.4 (C-i), 13.9 (C-d Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -11.67 (d,  $^2J_{P,P} = 20.3$  Hz), -12.86 (d,  $^2J_{P,P} = 20.9$  Hz).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2921, 2851, 1755, 1686, 1509, 1464, 1380, 1264, 1200, 1106, 964, 813, 510.

**HRMS** (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  = ber.: 891.3676 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 891.3592.

#### 7.10.8. Synthese von Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-ddUDP (C<sub>11</sub>-ddUDP) **58**

Die Synthese wurde nach AAV 12 durchgeführt. Es wurden 91 mg (0.11 mmol) ddUMP **50** (2 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 5 mL abs. Acetonitril, 160 mg (0.216 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **70**, 25 mg (0.21 mmol, 1.9 Äquiv.) DCI und 40  $\mu$ L (0.22 mmol, 2.0 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeit für die Kupplung betrug 22 h und für die Oxidation 30 min. Die Reinigung erfolgte durch eine erste Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O

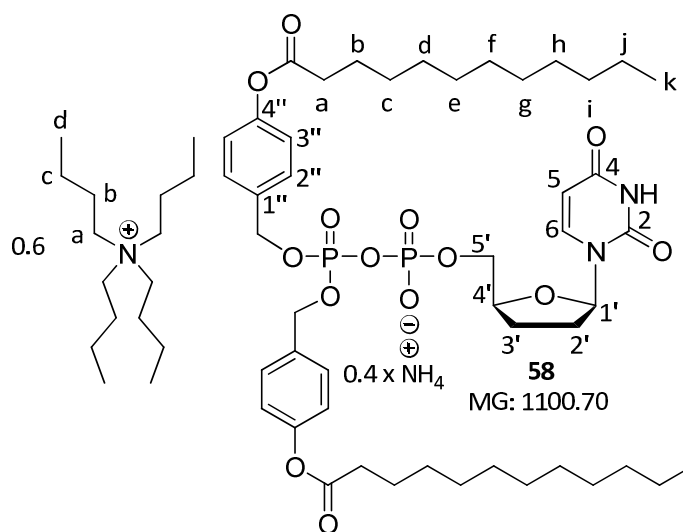
1:1-10:1 v/v) und nach Kationenaustausch durch eine weitere Chromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 37 mg (0.034 mmol, 31% (0.6 x Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>, 0.4 x NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)) eines farblosen Öls. Die Anzahl der Tetra-*n*-butylammoniumkationen wurde aus dem <sup>1</sup>H-NMR bestimmt. Weiteres Produkt war in Mischfraktionen enthalten.

**DC: R<sub>f</sub>-Wert** = 0.19 (EE/MeOH 7:3 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, MeOD): δ [ppm] =

7.97 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 1H, H-6), 7.42-7.37 (m, 4H, H-2''), 7.07-7.02 (m, 4H, H-3''), 6.04-6.00 (m, 1H, H-1'), 5.73 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 1H, H-5), 5.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.6 Hz, 4H, Bn), 4.27-4.19 (m, 2H, H-5'), 4.11-4.04 (m, 1H, H-4'), 3.26-3.20 (m, 5H, H-a Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 2.57 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 4H, H-a), 2.37-2.27 (m, 1H, H-2'a), 2.07-1.94 (m, 3H, H-2'b, H-3'), 1.73 (tt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 4H, H-b), 1.70-1.61 (m, 5H, H-b Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 1.47-1.24 (m, 37H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-c Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 1.03 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 7H, H-d Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 0.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 6H, H-k).



**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, MeOD): δ [ppm] = 173.7 (2 x C=O), 167.8 (C-4), 152.4 (2 x C-4''), 152.3 (C-2), 142.6 (C-6), 134.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 6.5 Hz, 2 x C-1''), 130.5 (4 x C-2''), 122.9 (4 x C-3''), 102.5 (C-5), 87.5 (C-1'), 81.2 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 9.1 Hz, C-4'), 70.3 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 6.4 Hz, 2 x Bn), 68.3 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.6 Hz, C-5'), 59.5 (C-a Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 35.0 (C-a), 33.3 (C-2'), 33.1, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 26.1 (C-3'), 26.0, 24.8 (C-i, C-j), 23.7 (C-b Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 20.7 (C-c Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 14.4 (C-k), 13.9 (C-d Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>).

**<sup>31</sup>P-NMR** (202 MHz, MeOD): δ [ppm] = -13.18 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,P</sub> = 19.8 Hz), -14.35 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,P</sub> = 22.2 Hz).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2956, 2916, 2849, 1752, 1685, 1510, 1465, 1382, 1222, 1004, 968, 816, 720, 513. **HRMS** (ESI<sup>-</sup>): *m/z* = ber.: 947.4230 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 947.4225.

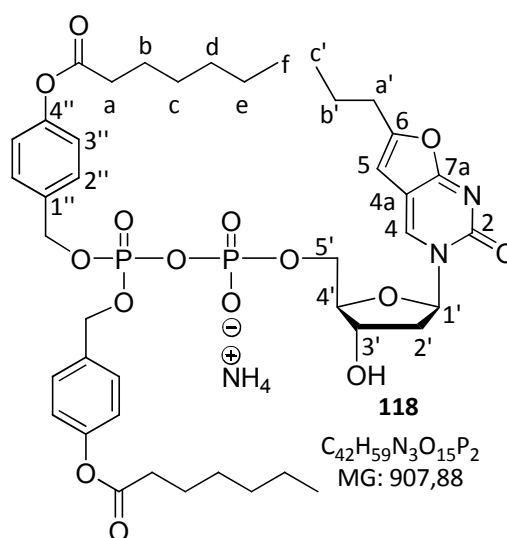
7.10.9. Synthese von Bis(4-heptanoyloxybenzyl)-6-Prop-2'-dBCNADP (C<sub>6</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP) **118**

Die Synthese wurde nach AAV 12 durchgeführt. Es wurden 105 mg (0.171 mmol) 6-Prop-2'-dBCNAMP **151** (1 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 5 mL abs. Acetonitril, 170 mg (0.283 mmol, 1.7 Äquiv.) Bis(4-heptanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **68**, 25 mg (0.21 mmol, 1.2 Äquiv.) DCI und 50 µL (0.28 mmol, 1.7 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeit für die Kupplung betrug 20 h und für die Oxidation 45 min. Die Reinigung erfolgte durch eine erste Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1-4:1 v/v) und nach Kationenaustausch durch dreifache Chromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 3:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 73 mg (0.080 mmol, 47% (1 x NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)) eines farblosen hygroskopischen Feststoffs. Weiteres Produkt war in Mischfraktionen enthalten.

DC: R<sub>f</sub>-Wert = 0.73 (EE/MeOH 7:3 v/v).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.77 (s, 1H, H-4), 7.38 (m, 4H, H-2''), 7.03 (m, 4H, H-3''), 6.42 (s, 1H, H-5), 6.32 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.0 Hz, 1H, H-1'), 5.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.5 Hz, 4H, Bn), 4.46-4.40 (m, 1H, H-3'), 4.31 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-5'a), 4.21 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-5'b), 4.15-4.11 (m, 1H, H-4'), 2.63-2.49 (m, 7H, H-a, H-a', H-2'a), 2.23-2.14 (m, 1H, H-2'b), 1.77-1.62 (m, 6H, H-b, H-b'), 1.48-1.29 (m, 12H, H-c, H-d, H-e), 0.98 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 3H, H-c'), 0.93 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, 6H, H-f).



<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 173.7 (2 x C=O)\*, 173.0 (C-7a)\*, 159.1 (C-6)\*, 155.3 (C-2)\*, 152.4 (2 x C-4''), 138.5 (C-4), 134.8 (2 x C-1''), 130.4 (d, <sup>4</sup>J<sub>C,P</sub> = 2.9 Hz, 4 x C-2''), 122.9 (4 x C-3''), 109.8 (C-4a), 101.5 (C-5), 89.5 (C-1'), 87.8 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 9.3 Hz, C-4'), 71.2 (C-3'), 70.4 (dd, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.9 Hz, <sup>4</sup>J<sub>C,P</sub> = 2.2 Hz, 2 x Bn), 66.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 6.3 Hz, C-5'), 42.6 (C-2'), 35.0, 32.6

(C-a, C-b), 30.9 (C-a'), 29.8, 25.9, 23.6 (C-c, C-d, C-e), 21.3 (C-b'), 14.4 (C-f), 13.9 (C-c'). \* aus dem HMBC bestimmt.

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -11.89 (d,  $^2J_{P,P} = 19.9$  Hz), -12.74 (d,  $^2J_{P,P} = 21.2$  Hz).

IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2956, 2930, 2858, 1756, 1668, 1617, 1575, 1508, 1459, 1422, 1381, 1255, 1199, 1166, 1142, 1103, 1006, 962, 812, 780, 505. HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = ber.: 891.3229 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 891.3244.

#### 7.10.10. Synthese von Bis(4-decanoyloxybenzyl)-6-Prop-2'-dBCNADP (C<sub>9</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP) **119**

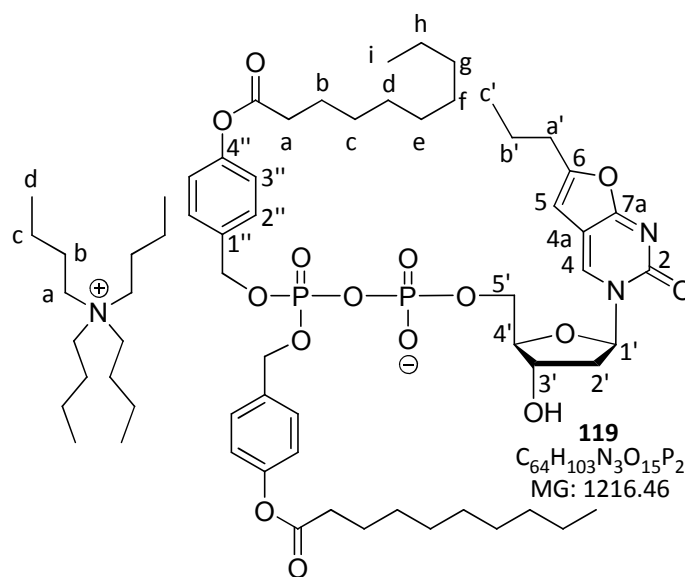
Die Synthese wurde nach AAV 12 durchgeführt. Es wurden 55 mg (89  $\mu$ mol) 6-Prop-2'-dBCNAMP **151** (1 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 2.5 mL abs. Acetonitril, 103 mg (0.150 mmol, 1.7 Äquiv.) Bis(4-decanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **69**, 14 mg (0.12 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI und 25  $\mu$ L (0.14 mmol, 1.6 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeit für die Kupplung betrug 1 h und für die Oxidation 1 h. Die Reinigung erfolgte durch eine erste Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1-5:1 v/v) und nach Kationenaustausch durch dreifache Chromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 5:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 21 mg (17  $\mu$ mol, 19% (1 x Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)) eines farblosen Öls. Weiteres Produkt war in Mischfraktionen enthalten.

DC: R<sub>f</sub>-Wert = 0.77 (EE/MeOH 7:3 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm]

= 8.78 (s, 1H, H-4), 7.40-7.35 (m, 4H, H-2''), 7.05-7.00 (m, 4H, H-3''), 6.42 (s, 1H, H-5), 6.32 (dd,  $^3J_{H,H} = 6.0$  Hz,  $^3J_{H,H} = 6.0$  Hz, 1H, H-1'), 5.12 (d,  $^3J_{H,H} = 8.5$  Hz, 4H, Bn), 4.47-4.41 (m, 1H, H-3'), 4.32 (ddd,  $^2J_{H,H} = 11.6$  Hz,  $^3J_{H,H} = 4.8$  Hz,  $^3J_{H,P} = 2.8$  Hz, 1H, H-5'a), 4.21 (ddd,  $^2J_{H,H} = 11.6$  Hz,  $^3J_{H,H} = 5.3$  Hz,  $^3J_{H,P} = 2.8$  Hz, 1H, H-5'b), 4.16-4.10



(m, 1H, H-4'), 3.27-3.19 (m, 8H, H-a Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 2.63-2.49 (m, 7H, H-a, H-a', H-2'a), 2.23-2.15 (m, 1H, H-2'b), 1.78-1.60 (m, 14H, H-b, H-b', H-b Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 1.48-1.25 (m, 32H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-c Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 1.02 (t,  $^3J_{H,H} = 7.4$  Hz, 12H, H-d Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 0.98 (t,  $^3J_{H,H} = 7.4$  Hz, 3H, H-c'), 0.90 (t,  $^3J_{H,H} = 6.8$  Hz, 6H, H-i).

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 172.1 (2 x C=O)\*, 171.3 (C-7a)\*, 159.2 (C-6)\*, 155.3 (C-2)\*, 150.8 (2 x C-4'')\*, 136.6 (C-4)\*, 134.8 (2 x C-1''), 130.4 (d,  $^4J_{C,P} = 2.5$  Hz, 4 x C-2''), 122.9 (4 x C-3''), 108.3 (C-4a)\*, 101.5 (C-5), 89.5 (C-1'), 87.8 (d,  $^3J_{C,P} = 9.0$  Hz, C-4'), 71.2 (C-3'), 70.3 (dd,  $^2J_{C,P} = 5.7$  Hz,  $^4J_{C,P} = 2.9$  Hz, 2 x Bn), 66.6 (C-5'), 59.5 (C-a Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 42.6 (C-2'), 35.0 (C-a), 33.0, 30.9, 30.6, 30.4, 30.4, 30.2, 26.0, 24.7, 23.7, 21.3, 20.7 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-a', C-b', C-b Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>, C-c Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 14.4 (C-i), 13.9 (C-c', C-d Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>). \* aus dem HMBC bestimmt.

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -11.90 (d,  $^2J_{P,P} = 18.7$  Hz), -12.77 (d,  $^2J_{P,P} = 19.9$  Hz).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2958, 2926, 2855, 1757, 1670, 1574, 1509, 1463, 1380, 1278, 1199, 1166, 1140, 1106, 1006, 969, 781, 499. **HRMS** (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  = ber.: 973.4022 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 973.4013.



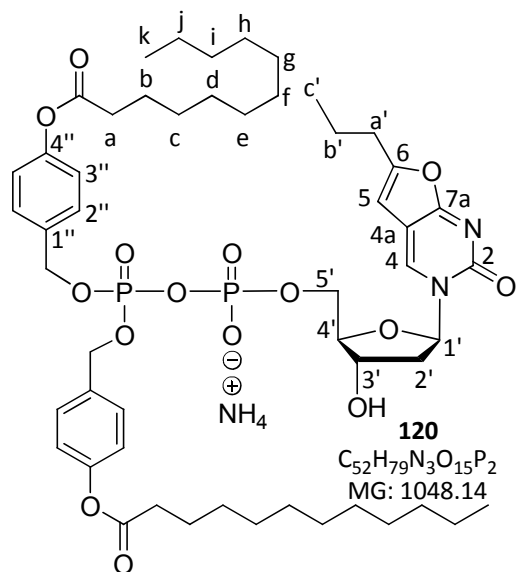
7.10.11. Synthese von Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-6-Prop-2'-dBCNADP (C<sub>11</sub>-6-Prop-2'-dBCNADP) **120**

Die Synthese wurde nach AAV 12 durchgeführt. Es wurden 97 mg (0.16 mmol) 6-Prop-2'-dBCNAMP **151** (1 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 5 mL abs. Acetonitril, 200 mg (0.270 mmol, 1.7 Äquiv.) Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **70**, 27 mg (0.23 mmol, 1.4 Äquiv.) DCI und 45 µL (0.25 mmol, 1.6 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeit für die Kupplung betrug 23 h und für die Oxidation 3 h. Die Reinigung erfolgte durch eine erste Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1-9:1 v/v) und nach Kationenaustausch durch zweifache Chromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 30 mg (29 µmol, 18% (1 x NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)) eines farblosen hygroskopischen Feststoffs. Weiteres Produkt war in Mischfraktionen enthalten.

DC: R<sub>f</sub>-Wert = 0.82 (EE/MeOH 7:3 v/v).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.78 (s, 1H, H-4), 7.41-7.34 (m, 4H, H-2''), 7.05-7.00 (m, 4H, H-3''), 6.42 (s, 1H, H-5), 6.32 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, 1H, H-1'), 5.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.5 Hz, 4H, Bn), 4.46-4.41 (m, 1H, H-3'), 4.32 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-5'a), 4.21 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-5'b), 4.15-4.11 (m, 1H, H-4'), 2.63-2.49 (m, 7H, H-a, H-a', H-2'a), 2.23-2.15 (m, 1H, H-2'b), 1.78-1.61 (m, 6H, H-b, H-b'), 1.48-1.23 (m, 32H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j), 0.98 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 3H, H-c'), 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 6H, H-k).



<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 172.3 (2 x C=O)\*, 171.4 (C-7a)\*, 159.2 (C-6)\*, 150.4 (2 x C-4'')\*, 135.8 (C-4)\*, 130.5 (4 x C-2''), 122.9 (4 x C-3''), 108.4 (C-4a)\*, 101.5 (C-5), 89.5 (C-1'), 87.8 (C-4'), 71.2 (C-3'), 70.3 (2 x Bn), 65.1 (C-5'), 42.6 (C-2'), 35.0 (2 x C-a), 33.1, 30.7, 30.6,

30.5, 30.4, 30.2, 26.0, 25.7, 23.7, 21.3 (C-b, C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-a', C-b'), 14.4 (C-k), 13.9 (C-c'). \* aus dem HMBC bestimmt.

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -11.85 (bs), -12.73 (d,  $^2J_{P,P} = 19.8$  Hz).

IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2958, 2924, 2855, 1756, 1670, 1574, 1509, 1464, 1380, 1244, 1198, 1166, 1140, 1007, 970, 739, 502. HRMS (ESI):  $m/z$  = ber.: 1031.4794 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 1031.4778.

#### 7.10.12. Synthese von Bis(4-heptanoyloxybenzyl)-6-Prop-ddBCNADP (C<sub>6</sub>-6-Prop-ddBCNADP) **122**

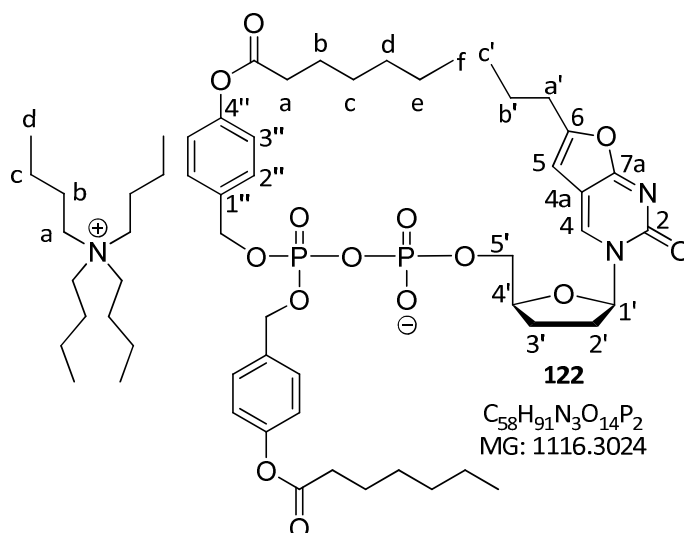
Die Synthese wurde nach AAV 12 durchgeführt. Es wurden 40 mg (0.054 mmol) 6-Prop-ddBCNAMP **152** (1.6 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 2.5 mL abs. Acetonitril, 60 mg (0.10 mmol, 1.9 Äquiv.) Bis-(4-heptanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **68**, 10 mg (0.085 mmol, 1.6 Äquiv.) DCI und 20  $\mu$ L (0.11 mmol, 2.0 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeit für die Kupplung betrug 20 h und für die Oxidation 45 min. Die Reinigung erfolgte durch eine erste Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1-5:1 v/v) und nach Kationenaustausch durch eine weitere Chromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 4:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 25 mg (22  $\mu$ mol, 41% (1 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)) eines farblosen Öls. Weiteres Produkt war in Mischfraktionen enthalten.

DC:  $R_f$ -Wert = 0.76 (EE/MeOH 7:3 v/v).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$ [ppm] =

8.94 (s, 1H, H-4), 7.42-7.37 (m, 4H, H-2''), 7.05-7.00 (m, 4H, H-3''), 6.50 (s, 1H, H-5), 6.12 (dd,  $^3J_{H,H} = 6.8$  Hz,  $^3J_{H,H} = 2.2$  Hz, 1H, H-1'), 5.14 (d,  $^3J_{H,H} = 8.4$  Hz, 4H, Bn), 4.43 (ddd,  $^2J_{H,H} = 11.8$  Hz,  $^3J_{H,H} = 4.8$  Hz,  $^3J_{H,P} = 2.4$  Hz, 1H, H-5'a), 4.39-4.32 (m, 1H, H-4'), 4.17 (ddd,  $^2J_{H,H} = 11.5$  Hz,  $^3J_{H,H} = 5.5$  Hz,  $^3J_{H,P} = 2.9$  Hz, 1H, H-5'b), 3.29-



3.21 (m, 8H, H-a Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 2.66-2.49 (m, 7H, H-a, H-a', H-2'a), 2.16-2.07 (m, 1H, H-2'b), 1.98-1.89 (m, 2H, H-3'), 1.80-1.62 (m, 14H, H-b, H-b', H-b Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 1.50-1.35 (m, 20H, H-c, H-d, H-e, H-c Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 1.05 (t,  $^3J_{H,H} = 7.3$  Hz, 12H, H-d Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 1.00 (t,  $^3J_{H,H} = 7.4$  Hz, 3H, H-c'), 0.95 (t,  $^3J_{H,H} = 6.9$  Hz, H-f).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, MeOD):  $\delta$ [ppm] = 173.6 (2 x C=O), 172.9 (C-7a), 160.4 (C-6), 156.9 (C-2), 152.4 (2 x C-4''), 139.0 (C-4), 134.8 (d,  $^3J_{C,P} = 6.6$  Hz, 2 x C-1''), 130.4 (4 x C-2''), 122.9 (4 x C-3''), 109.3 (C-4a), 101.7 (C-5), 90.5 (C-1'), 83.0 (d,  $^3J_{C,P} = 9.2$  Hz, C-4'), 70.3 (dd,  $^2J_{C,P} = 5.5$  Hz,  $^4J_{C,P} = 3.0$  Hz, 2 x Bn), 67.3 (d,  $^2J_{C,P} = 5.6$  Hz, C-5'), 59.5 (C-a Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 35.0 (C-a), 34.7 (C-2'), 32.7 (C-b), 30.9 (C-a'), 29.9 (C-c), 25.9 (C-b Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 24.8 (C-d), 24.7 (C-3'), 23.6 (C-c Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 21.4 (C-b'), 20.7 (C-e), 14.4 (C-d Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 13.9 (C-f), 13.9 (C-c').

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, MeOD):  $\delta$ [ppm] = -11.89 (d,  $^2J_{P,P} = 21.0$  Hz), -12.76 (d,  $^2J_{P,P} = 20.6$  Hz).

IR:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2959, 2932, 2873, 1756, 1669, 1573, 1509, 1462, 1381, 1284, 1199, 1166, 1143, 1104, 1009, 967, 499. HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = ber.: 875.3280 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 875.3291.

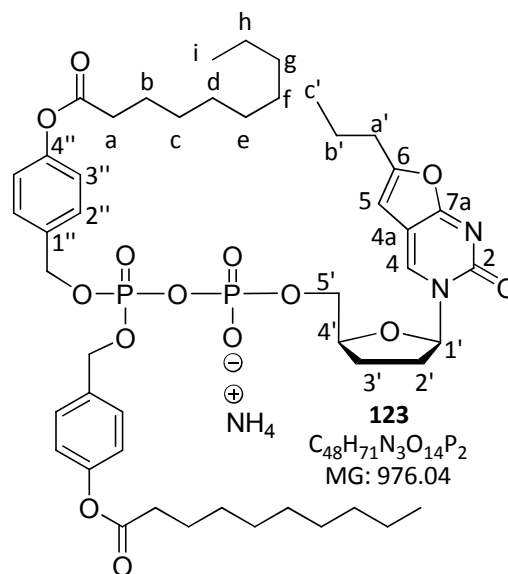
7.10.13. Synthese von Bis(4-decanoyloxybenzyl)-6-Prop-ddBCNADP (C<sub>9</sub>-6-Prop-ddBCNADP) **123**

Die Synthese wurde nach AAV 12 durchgeführt. Es wurden 30 mg (0.040 mmol) 6-Prop-ddBCNAMP **152** (1.6 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 2.5 mL abs. Acetonitril, 53 mg (77 μmol, 1.9 Äquiv.) Bis(4-decanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **69**, 7.5 mg (64 μmol, 1.6 Äquiv.) DCI und 15 μL (83 μmol, 2.0 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeit für die Kupplung betrug 1 h und für die Oxidation 1 h. Die Reinigung erfolgte durch eine erste Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1-5:1 v/v) und nach Kationenaustausch durch zwei weitere Chromatographien an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 4:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 10 mg eines farblosen Öls. Eine vollständige Abtrennung des Phosphatdiesters **82** war nicht möglich.

DC: R<sub>f</sub>-Wert = 0.83 (EE/MeOH 7:3 v/v).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 8.91 (s, 1H, H-4), 7.40-7.33 (m, 4H, H-2''), 7.07-6.99 (m, 4H, H-3''), 6.47 (s, 1H, H-5), 6.10 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.2 Hz, 1H, H-1'), 5.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.2 Hz, 4H, Bn), 4.42 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 2.3 Hz, 1H, H-5'a), 4.37-4.30 (m, 1H, H-4'), 4.15 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-5'b), 2.63-2.53 (m, 7H, H-a, H-a', H-2'a), 2.14-2.06 (m, 1H, H-2'b), 1.95-1.87 (m, 2H, H-3'), 1.78-1.63 (m, 6H, H-b, H-b'), 1.48-1.25 (m, 24H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.98 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 3H, H-c'), 0.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 6H, H-i).



<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, MeOD): δ [ppm] = 173.6 (2 x C=O), 171.3 (C-7a)\*, 158.9 (C-6)\*, 155.4 (C-2)\*, 152.4 (2 x C-4''), 137.3 (C-4)\*, 133.4 (2 x C-1''), 130.4 (4 x C-2''), 122.8 (4 x C-3''), 107.8 (C-4a)\*, 101.7 (C-5), 90.5 (C-1'), 83.0 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 9.5 Hz, C-4'), 70.3 (m, 2 x Bn), 68.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.5 Hz, C-5'), 35.0 (C-a), 34.7 (C-2'), 33.1 (C-b), 30.9 (C-a'), 30.6, 30.4, 30.4, 30.2, 26.0

(C-c, C-d, C-e, C-f, C-g), 24.7 (C-3'), 23.7 (C-h), 21.4 (C-b'), 14.4 (C-i), 13.9 (C-c'). \* aus dem HMBC bestimmt.

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -11.87 (d,  $^2J_{P,P} = 19.5$  Hz), -12.76 (d,  $^2J_{P,P} = 20.7$  Hz).

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = ber.: 959.4219 [M+H]<sup>+</sup>, gef.: 959.4215.

#### 7.10.14. Synthese von Bis(4-heptanoyloxybenzyl)-6-H-ddBCNADP (C<sub>6</sub>-6-H-ddBCNADP) **126**

Die Synthese wurde nach AAV 12 durchgeführt. Es wurden 40 mg (72  $\mu$ mol) 6-H-ddBCNAMP **153** (1 x  $n$ -Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 2.5 mL abs. Acetonitril, 87 mg (0.14 mmol, 1.9 Äquiv.) Bis(4-heptanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **68**, 15 mg (0.13 mmol, 1.8 Äquiv.) DCI und 25  $\mu$ L (0.14 mmol, 1.9 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeit für die Kupplung betrug 20 h und für die Oxidation 45 min. Die Reinigung erfolgte durch eine erste Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1-5:1 v/v) und nach Kationenaustausch durch zweifache Chromatographie an RP-18 Kieselgel (1. MeOH/H<sub>2</sub>O 5:1 v/v, 2. MeOH/H<sub>2</sub>O 4:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 33 mg (0.036 mmol, 50% (0.3 x  $n$ -Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>, 0.7 x NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)) eines farblosen hygroskopischen Feststoffes. Die Anzahl der Tetra-*n*-butylammoniumkationen wurde aus dem <sup>1</sup>H-NMR bestimmt.

DC:  $R_f$ -Wert = 0.74 (EE/MeOH 7:3 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] =

9.10 (s, 1H, H-4), 7.49 (d,  $^3J_{H,H}$  =

2.7 Hz, 1H, H-6), 7.41-7.36 (m, 4H,

H-2''), 7.04-7.00 (m, 4H, H-3''), 6.84

(d,  $^3J_{H,H}$  = 2.7 Hz, 1H, H-5), 6.10 (dd,

$^3J_{H,H}$  = 6.7 Hz,  $^3J_{H,H}$  = 2.1 Hz, 1H, H-1'),

5.12 (d,  $^3J_{H,H}$  = 8.5 Hz, 4H, Bn), 4.42

(ddd,  $^2J_{H,H}$  = 11.7 Hz,  $^3J_{H,H}$  = 4.7 Hz,

$^3J_{H,P}$  = 2.3 Hz, 1 H, H-5'a), 4.39-4.32

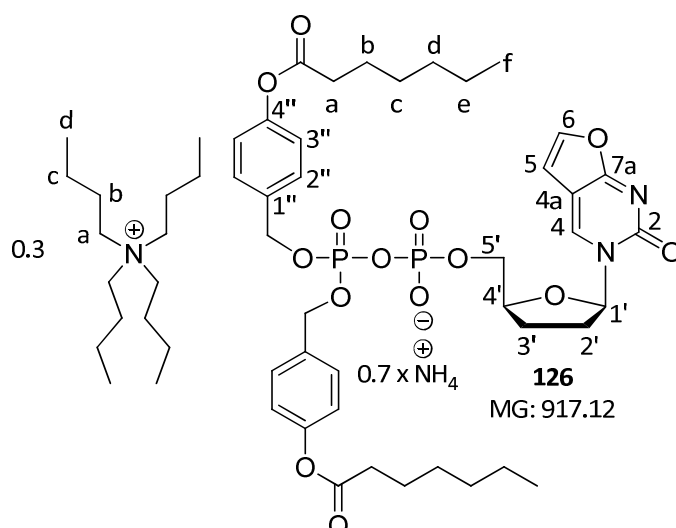
(m, 1H, H-4'), 4.15 (ddd,  $^2J_{H,H}$  =

11.7 Hz,  $^3J_{H,H}$  = 5.4 Hz,  $^3J_{H,P}$  = 2.9 Hz, 1H, H-5'b), 3.27-3.19 (m, 3H, H-a Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 2.61-2.48 (m,

5H, H-a, H-2'a), 2.17-2.08 (m, 1H, H-2'b), 1.95-1.86 (m, 2H, H-3'), 1.78-1.60 (m, 7H, H-b, H-b

Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 1.48-1.31 (m, 15H, H-c, H-d, H-e, H-c Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 1.02 (t,  $^3J_{H,H}$  = 7.4 Hz, 4H, H-d Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>),

0.93 (t,  $^3J_{H,H}$  = 6.8 Hz, 6H, H-f).



**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = 173.7 (2 x C=O), 171.7 (C-7a), 155.3 (C-2)\*, 152.4 (2 x

C-4''), 144.3 (C-6)\*, 139.8 (C-4)\*, 133.4 (2 x C-1'')\*, 130.5 (4 x C-2''), 122.9 (4 x C-3''), 107.1

(C-5), 90.7 (C-1'), 83.1 (d,  $^3J_{C,P}$  = 9.3 Hz, C-4'), 70.3 (m, 2 x Bn), 67.2 (d,  $^3J_{C,P}$  = 6.3 Hz, C-5'),

59.5 (C-a Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 35.0 (C-a), 34.7 (C-2'), 32.7, 29.9, 25.9, 24.8, 24.6, 23.6, 20.7 (C-b, C-c, C-d,

C-e, C-b Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>, C-c Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>, C-3'), 14.4 (C-f), 13.9 (C-d Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>). \* aus dem HMBC bestimmt.

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, MeOD):  $\delta$  [ppm] = -11.91 (d,  $^2J_{P,P}$  = 20.0 Hz), -12.72 (d,  $^2J_{P,P}$  = 21.8 Hz).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2956, 2930, 2872, 1755, 1668, 1639, 1572, 1509, 1263, 1199, 1166, 1141, 1102,

1003, 960, 501. **HRMS** (ESI):  $m/z$  = ber.: 831.2665 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 831.2655.

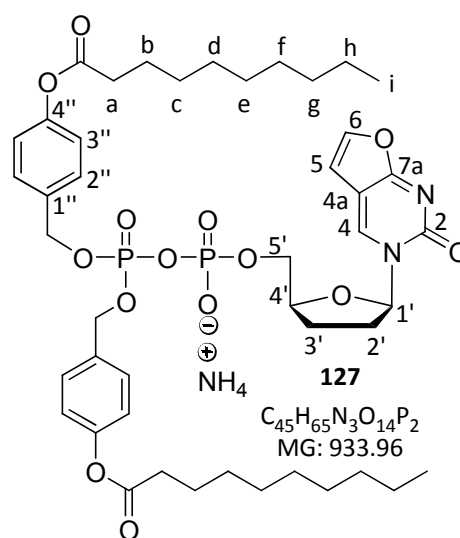
7.10.15. Synthese von Bis(4-decanoyloxybenzyl)-6-H-ddBCNADP (C<sub>9</sub>-6-H-ddBCNADP) **127**

Die Synthese wurde nach AAV 12 durchgeführt. Es wurden 24 mg (0.048 mmol) 6-H-ddBCNAMP **153** (1 x *n*-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) in 2.5 mL abs. Acetonitril, 56 mg (0.82 mmol, 1.7 Äquiv.) Bis(4-decanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **69**, 10 mg (0.85 mmol, 1.8 Äquiv.) DCI und 18 µL (99 µmol, 2.0 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) verwendet. Die Reaktionszeit für die Kupplung betrug 20 h und für die Oxidation 1 h. Die Reinigung erfolgte durch eine erste Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1-5:1 v/v) und nach Kationenaustausch durch eine zweite Chromatographie an RP-18 Kieselgel (MeOH/H<sub>2</sub>O 5:1 v/v).

Die Ausbeute betrug 13 mg (14 µmol, 29% (1 x NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)) eines farblosen hygroskopischen Feststoffs.

DC: R<sub>f</sub>-Wert = 0.76 (EE/MeOH 7:3 v/v).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 9.10 (s, 1H, H-4), 7.49 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-6), 7.39-7.36 (m, 4H, H-2''), 7.03-7.00 (m, 4H, H-3''), 6.84 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1H, H-5), 6.10 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.1 Hz, 1H, H-1'), 5.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.6 Hz, 4H, Bn), 4.42 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 2.4 Hz, 1H, H-5'a), 4.39-4.32 (m, 1H, H-4'), 4.15 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 2.8 Hz, 1H, H-5'b), 2.61-2.49 (m, 5H, H-a, H-2'a), 2.17-2.09 (m, 1H, H-2'b), 1.95-1.86 (m, 2H, H-3'), 1.73 (tt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 4H, H-b), 1.47-1.26 (m, 24H, H-c, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.91 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 6H, H-i).



<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, MeOD): δ [ppm] = 172.1 (2 x C=O)\*, 171.3 (C-7a)\*, 155.3 (C-2)\*, 150.9 (2 x C-4'')\*, 139.8 (C-4), 133.1 (2 x C-1'')\*, 130.5 (4 x C-2''), 122.9 (4 x C-3''), 107.6 (C-4a), 107.1 (C-5), 90.7 (C-1'), 70.3 (dd, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.9 Hz, <sup>4</sup>J<sub>C,P</sub> = 2.9 Hz, 2 x Bn), 67.3 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.3 Hz, C-5'), 35.0 (C-a), 34.7 (C-a, C-b), 33.0 (C-2'), 30.6, 30.4, 30.2, 26.0, 24.6 (C-c, C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 23.7 (C-3'), 14.4 (C-i). \* aus dem HMBC bestimmt.

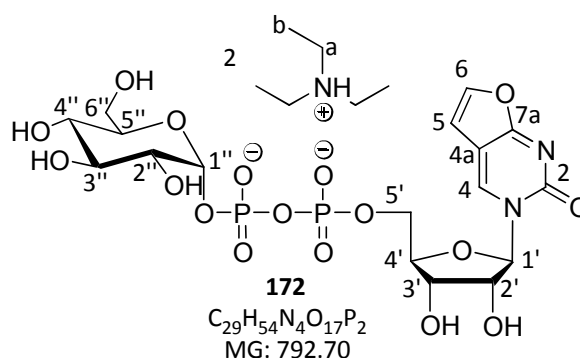
$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz, MeOD):  $\delta$ [ppm] = -11.89 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 21.7$  Hz), -12.74 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 19.4$  Hz).

IR:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2924, 2854, 1757, 1668, 1574, 1233, 1149, 1106, 981, 509. HRMS (ESI $^-$ ):  $m/z$  = ber.: 915.3604 [M-H] $^-$ , gef.: 915.3598.

## 7.11 Synthese der Nucleosiddiphosphatpyranosen

### 7.11.1. Versuch der Synthese von 6-H-BCNADP- $\alpha$ -D-glucose **172**

Die Reaktion wurde nach AAV 13 durchgeführt. Es wurden 11 mg (20  $\mu\text{mol}$ ) 5-Cl-*cycloSal*-6-H-BCNAMP **175** und 28 mg (52  $\mu\text{mol}$ , 2.6 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1-phosphat **178** als Triethylammoniumsalz in je 1 mL abs. DMF verwendet. Die Reaktionslösung wurde 21 d



bei Rt und weitere 4 d bei 50 °C gerührt. Die Abspaltung der Acetylschutzgruppen erfolgte in 10 mL eines Gemisches aus Methanol, Wasser und Triethylamin (7:3:1 v/v/v) über 20 h bei Rt. Das Rohprodukt wurde durch Umkehrphasenchromatographie (H<sub>2</sub>O) gereinigt.

Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

### 7.11.2. Synthese von 6-H-BCNADP- $\alpha$ -D-galactose **173**

Die Reaktion wurde nach AAV 13 durchgeführt. Es wurden 24 mg (42  $\mu\text{mol}$ ) 5-Nitro-*cycloSal*-6-H-di-*OAc*-BCNAMP **174** und 48 mg (83  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-1-phosphat **179** als Triethylammoniumsalz in je 2 mL abs. DMF verwendet. Die Reaktionslösung wurde 18 h bei Rt gerührt. Die Abspaltung der Acetylschutzgruppen erfolgte in 10 mL eines Gemisches aus Methanol, Wasser und Triethylamin (7:3:1 v/v/v) über 24 h bei Rt. Das Rohprodukt wurde durch Umkehrphasenchromatographie (H<sub>2</sub>O) gereinigt.



Die Ausbeute betrug 3.8 mg (4.8  $\mu\text{mol}$ , 11%) eines farblosen Feststoffs als Triethylammoniumsalz.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.01 (s, 1H,

H-4), 7.60 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.7$  Hz, 1H, H-6), 6.94 (d,

$^3J_{\text{H,H}} = 2.7$  Hz, 1H, H-5), 6.08-6.05 (m, 1H, H-1'),

5.65 (dd,  $^3J_{\text{H,P}} = 7.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.6$  Hz, 1H, H-1''),

4.48 (ddd,  $^2J_{\text{H,H}} = 12.1$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.2$  Hz,  $^3J_{\text{H,P}} =$

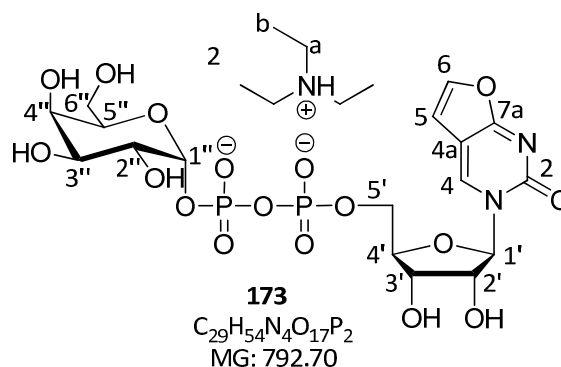
1.6 Hz, 1H, H-5'a), 4.42-4.34 (m, 3H, H-2', H-3',

H-4'), 4.30 (ddd,  $^2J_{\text{H,H}} = 12.0$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.3$  Hz,

$^3J_{\text{H,P}} = 2.0$  Hz, 1H, H-5'b), 4.17 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$  Hz, 1H, H-5''), 4.01 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.1$  Hz, 1H, H-3''),

3.91 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 10.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$  Hz, 1H, H-4''), 3.80 (ddd,  $^3J_{\text{H,H}} = 10.3$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.1$  Hz,  $^4J_{\text{H,P}} =$

3.1 Hz, 1H, H-2''), 3.77-3.68 (m, 2H, H-6''), 3.31-3.14 (m, 12H, H-a), 1.41-1.20 (m, 18H, H-b).



**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 171.3 (C-7a)\*, 155.9 (C-2)\*, 145.2 (C-6)\*, 139.6 (C-4)\*,

108.0 (C-4a)\*, 105.7 (C-5), 95.8 (d,  $^2J_{\text{C,P}} = 7.0$  Hz, C-1''), 92.1 (C-1'), 82.4 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 9.1$  Hz, C-4'),

75.1 (C-2'), 71.9 (C-5''), 69.3 (C-4''), 69.1 (C-3''), 68.4 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 8.1$  Hz, C-2''), 67.8 (C-3'), 63.8

(d,  $^2J_{\text{C,P}} = 5.5$  Hz, C-5'), 61.0 (C-6''), 46.7 (C-a), 8.2 (C-b). \* aus dem HMBC bestimmt.

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (202 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -11.19 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 19.7$  Hz), -12.70 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 19.7$  Hz).

**HRMS** (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  = ber.: 589.0477 [M-H]<sup>-</sup>, gef.: 589.0489.

## 7.12. Hydrolysestudien

### 7.12.1. Verwendete Puffer und Lösungen

#### 50 mM Phosphatpuffer nach Sørensen:

Es wurden 547 mg Dinatriumhydrogenphosphat und 155 mg Kaliumdihydrogenphosphat in 100 mL Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert wurde gegebenenfalls mit verd. Phosphorsäure oder 1 M Natronlauge auf den benötigten Wert (pH = 7.3) eingestellt.

#### Interner Standard (AZT-Lösung):

Es wurden 5 mg AZT **1** in 500  $\mu$ L Reinstwasser gelöst.

### 7.12.2 pH-Wert abhängige chemische Hydrolyse

Von allen untersuchten Prodrugs wurden 50 mM Stammlösungen in DMSO angesetzt. Anschließend wurden in einem Eppendorf-Cap 11  $\mu$ L der 50 mM DMSO-Stammlösung mit 189  $\mu$ L DMSO und 100  $\mu$ L Reinstwasser versetzt. Zu dieser Lösung wurden 300  $\mu$ L des 50 mM Phosphatpuffers (pH 7.3) und bei Untersuchung der *cycloSal*-Verbindungen zusätzlich 5  $\mu$ L der AZT-Lösung (interner Standard) gegeben (dadurch wurde die Pufferkonzentration auf 24.8 mM und die des *cycloSal*-Nucleotides auf 0.94 mM verdünnt). Durch kurzes Durchmischen (Vortex) wurde die Hydrolyse gestartet und die Probe für die Dauer der Hydrolyse im Thermomixer bei 37 °C inkubiert. Das erste Aliquot ( $t_0$ ) wurde sofort und weitere Aliquote (30  $\mu$ L) in zunehmend größer werdenden Zeitabständen entnommen und die Proben zur Lagerung in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren oder sofort HPLC-analytisch untersucht (20  $\mu$ L Injektionsvolumen, Methode I für *cycloSal*-Verbindungen und Methode II für DiPPro-Nucleotide). Eingefrorene Proben wurden einzeln aufgetaut und anschließend HPLC-analytisch vermessen. Zur Auswertung der Kinetiken wurden für jede Probe die Fläche der Peaks der Prodrugs und der Hydrolyseprodukte bestimmt und gegen die Hydrolysedauer (in Stunden; h) graphisch aufgetragen. Bei *cycloSal*-Verbindungen wurde der Quotient aus den Peakflächen des Prodrugs und des internen Standards gebildet und ebenfalls gegen die Hydrolysedauer aufgetragen. Zur Bestimmung der Halbwertszeiten

wurden durch die experimentell bestimmten Messpunkte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms EXCEL exponentielle Ausgleichskurven gelegt, sodass sich aus den entsprechenden Funktionen Werte für die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der Hydrolyse ergaben. Aus den so erhaltenen Werten für  $k$  konnten gemäß der Formel  $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$  die Hydrolysehalbwertszeiten  $t_{1/2}$  errechnet werden, da es sich auf Grund des großen Wasserüberschusses um Kinetiken *pseudo*-erster Ordnung handelt.

### 7.12.3 Hydrolysen in CEM/O-Zelleextrakt

Es wurden 20  $\mu\text{L}$  der 50 mM Stammlösungen mit 230  $\mu\text{L}$  DMSO verdünnt, um die Hydrolysestammlösungen zu erhalten. Für die Hydrolyselösungen wurden 50  $\mu\text{L}$  des CEM/O-Zelleextrakts und 10  $\mu\text{L}$  einer 70 mM Magnesiumchloridlösung (in Reinstwasser) in ein Eppendorf-Cap gegeben und die Hydrolyse durch Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  der Hydrolysestammlösung und kurzes Vermischen (Vortex) gestartet. Für jeden Messwert wurde eine separate Hydrolyselösung angesetzt, die für die Dauer der Hydrolyse im Thermomixer bei 37 °C inkubiert wurde. Zur Beendigung der Hydrolyse wurden 200  $\mu\text{L}$  Methanol hinzugegeben, die Probe für 10 min auf Eis gelagert und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde 10 min bei 0 °C zentrifugiert (14.000 rpm) und der Überstand durch einen Spritzenfilter filtriert. Die Proben wurden bis zur HPL-chromatographischen Analyse in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert, einzeln aufgetaut und vermessen (90  $\mu\text{L}$  Injektionsvolumen, Methode I für *cycloSal*-Verbindungen und Methode II für *DiPPro*-Nucleotide). Die Bestimmung der Halbwertszeiten erfolgte wie unter 7.12.2. beschrieben.

Für die Analyse der Hydrolyseproben mittels HPLC-MS wurden die Proben wie oben beschrieben hergestellt. Die Analyse der Prodrugs erfolgte durch RP-HPLC (Methode III, Injektionsvolumen: 100  $\mu\text{L}$ ), die Untersuchung der Hydrolyseprodukte (Mono- und Diphosphat) wurde mittels HILIC (Methode IV, Injektionsvolumen: 50  $\mu\text{L}$ ) durchgeführt.

#### 7.12.4. <sup>31</sup>P-NMR Hydrolysestudien

Es wurden 10 mg der zu untersuchenden Verbindung in 350 µL DMSO-*d*<sub>6</sub> gelöst und 350 µL des 50 mM Phosphatpuffers hinzugegeben. Die Probe wurde bei Rt gelagert und regelmäßig <sup>31</sup>P-NMR-spektroskopisch vermessen.

#### 7.13. Aufnahme der UV/Vis- und Fluoreszenzspektren

Es wurden 3.6 mM Stammlösungen der zu untersuchenden Verbindungen in Methanol angesetzt. Diese Stammlösungen wurden mit Reinstwasser auf eine Konzentration von 0.11 mM verdünnt und in einer Quartzküvette anschließend die UV/Vis- und die korrigierten Fluoreszenzspektren gemessen. Zur Bestimmung der optimalen Wellenlänge wurden die Emissionsspektren bei Anregungswellenlängen von 250 nm bis 600 nm im Abstand von 5 nm gemessen (Schlitzweite: 1.5 nm). Die Auswertung und Bearbeitung der erhaltenen Spektren erfolgte mit Origin® 9.0.

#### 7.14. Zellaufnahmestudien für die Analyse mittels HPLC-MS

Die Zellinkubationen wurden von DR. ILONA HAUBER am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie in Hamburg durchgeführt. Es wurden CEM-SS Zellen in Zellkulturmedium (RPMI-1640 Medium, pH 7.5, 10% fötales Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamin) in T175-Zellkulturflaschen expandiert, bis ca. 10<sup>9</sup>-Zellen vorhanden waren. Die Zellen wurden in 20 mL des Zellkulturmediums aufgenommen und 2 h bzw. 6 h mit einer Konzentration von 100 µM bzw. 200 µM des entsprechenden Prodrugs im Zellkulturmedium inkubiert (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% RH). Anschließend wurden die Zellen zwei Mal intensiv mit PBS gewaschen, zentrifugiert und bei -78 °C gelagert. Das Zellpellet wurde in 300 µL eines Gemisches aus Methanol und Wasser (2:1 v/v, auf Eis gekühlt) suspendiert, 10 min auf Eis gelagert und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde für 10 min bei 0 °C zentrifugiert (14.000 rpm) und der Überstand durch einen Spritzenfilter filtriert. Die Probe wurde anschließend mittels HPLC-MS analysiert (HILIC, Methode IV aufgetragene Menge: 50 µL).

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **2003**, 5-7.
- [2] R. J. Pomerantz, D. L. Horn, Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 867-873.
- [3] 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.
- [4] D. D. Richman, HIV chemotherapy. *Nature* **2001**, *410*, 995-1001.
- [5] T. S. Lin, R. F. Schinazi, W. H. Prusoff, Potent and selective in vitro activity of 3'-deoxythymidin-2'-ene (3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine) against human immunodeficiency virus. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 2713-2718.
- [6] M. Nelson, M. Schiavone, Emtricitabine (FTC) for the treatment of HIV infection. *Int. J. Clin. Pract.* **2004**, *58*, 504-510.
- [7] S. M. Daluge, S. S. Good, M. B. Faletto, W. H. Miller, M. H. St. Clair, L. R. Boone, M. Tisdale, N. R. Parry, J. E. Reardon, R. E. Dornsife, D. R. Averett, T. A. Krenitsky, 1592U89, a novel carbocyclic nucleoside analog with potent, selective anti-human immunodeficiency virus activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1082-1093.
- [8] Z. Suo, K. A. Johnson, Selective inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by an antiviral inhibitor, (R)-9-(2-Phosphonylmethoxypropyl)adenine. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27250-27258.
- [9] T. Nitanda, X. Wang, H. Kumamoto, K. Haraguchi, H. Tanaka, Y. C. Cheng, M. Baba, Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and resistance profile of 2',3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 3355-3360.
- [10] T. Cihlar, A. S. Ray, Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 39-58.
- [11] J. D. Roberts, K. Bebenek, T. A. Kunkel, The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **1988**, *242*, 1171-1173.
- [12] C. Reynolds, C. B. de Koning, S. C. Pelly, W. A. van Otterlo, M. L. Bode, In search of a treatment for HIV-current therapies and the role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs). *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4657-4670.
- [13] M. P. de Béthune, Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009). *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 75-90.
- [14] K. B. Ingale, M. S. Bhatia, HIV-1 integrase inhibitors: a review of their chemical development. *Antiviral Chem. Chemother.* **2011**, *22*, 95-105.
- [15] M. Hertje, M. Zhou, U. Dietrich, Inhibition of HIV-1 entry: multiple keys to close the door. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1825-1835.
- [16] E. Michailidis, K. A. Kirby, A. Hachiya, W. Yoo, S. P. Hong, S. O. Kim, W. R. Folk, S. G. Sarafianos, Antiviral therapies: focus on hepatitis B reverse transcriptase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 1060-1071.
- [17] D. R. Langley, A. W. Walsh, C. J. Baldick, B. J. Eggers, R. E. Rose, S. M. Levine, A. J. Kapur, R. J. Colonno, D. J. Tenney, Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *J. Virol.* **2007**, *81*, 3992-4001.
- [18] J. Neyts, Selective inhibitors of hepatitis C virus replication. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 363-371.

- [19] 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. Steuer, C. Niu, M. J. Otto, P. A. Furman, Discovery of a  $\beta$ -D-2'-deoxy-2'- $\alpha$ -fluoro-2'- $\beta$ -C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7202-7218.
- [20] M. J. Sofia, W. Chang, P. A. Furman, R. T. Mosley, B. S. Ross, Nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside inhibitors of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA-polymerase. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2481-2531.
- [21] J. Piret, G. Boivin, Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 459-472.
- [22] M. Migliore, FV-100: the most potent and selective anti-varicella zoster virus agent reported to date. *Antiviral Chem. Chemother.* **2010**, *20*, 107-115.
- [23] L. W. Hertel, G. B. Boder, J. S. Kroin, S. M. Rinzel, G. A. Poore, G. C. Todd, G. B. Grindey, Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Res.* **1990**, *50*, 4417-4422.
- [24] P. Huang, S. Chubb, L. W. Hertel, G. B. Grindey, W. Plunkett, Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 6110-6117.
- [25] L. P. Jordheim, C. Dumontet, Review of recent studies on resistance to cytotoxic deoxynucleoside analogues. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1776*, 138-159.
- [26] 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.
- [27] J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Jarvinen, J. Savolainen, Prodrugs: design and clinical applications. *Nature Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 255-270.
- [28] J. Balzarini, P. Herdewijn, E. De Clercq, Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6127-6133.
- [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, D. W. Barry, 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] S. J. Hecker, M. D. Erion, Prodrugs of phosphates and phosphonates. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2328-2345.
- [31] A. S. Ray, K. Y. Hostetler, Application of kinase bypass strategies to nucleoside antivirals. *Antiviral Res.* **2011**, *92*, 277-291.
- [32] D. N. Srivastva, D. Farquhar, Bioreversible Phosphate Protective Groups: Synthesis and Stability of Model Acyloxymethyl Phosphates. *Bioorg. Chem.* **1984**, *12*, 118-129.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] J.-L. Girardet, C. Périgaud, A.-M. Aubertin, G. Gosselin, A. Kirn, J.-L. Imbach, Increase of the Anti-HIV Activity of d4T in Human T-Cell Culture by the Use of the SATE Pronucleotide Approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2981-2984.
- [36] W. Thomson, D. Nicholls, W. J. Irwin, J. 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**, 1239-1245.

- [37] C. McGuigan, R. N. Pathirana, N. Mahmood, K. G. Devine, A. J. Hay, Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV1 in cell lines which are resistant to the action of AZT. *Antiviral Res.* **1992**, *17*, 311-321.
- [38] Y. Mehellou, J. Balzarini, C. McGuigan, Aryloxy phosphoramidate triesters: a technology for delivering monophosphorylated nucleosides and sugars into cells. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1779-1791.
- [39] J. H. Vernachio, B. Bleiman, K. D. Bryant, S. Chamberlain, D. Hunley, J. Hutchins, B. Ames, E. Gorovits, B. Ganguly, A. Hall, A. Kolykhalov, Y. Liu, J. Muhammad, N. Raja, C. R. Walters, J. Wang, K. Williams, J. M. Patti, G. Henson, K. Madela, M. Aljarah, A. Gilles, C. McGuigan, INX-08189, A Phosphoramidate Prodrug of 6-O-Methyl-2'-C-Methyl Guanosine, is a Potent Inhibitor of Hepatitis C Virus Replication with Excellent Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1843-1851.
- [40] M. D. Erion, K. R. Reddy, S. H. Boyer, M. C. Matelich, J. Gomez-Galeno, R. H. Lemus, B. G. Ugarkar, T. J. Colby, J. Schanzer, P. D. Van Poelje, Design, synthesis, and characterization of a series of cytochrome P(450) 3A-activated prodrugs (HepDirect prodrugs) useful for targeting phosph(on)ate-based drugs to the liver. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5154-5163.
- [41] K. R. Reddy, M. C. Matelich, B. G. Ugarkar, J. E. Gomez-Galeno, J. DaRe, K. Ollis, Z. Sun, W. Craig, T. J. Colby, J. M. Fujitaki, S. H. Boyer, P. D. van Poelje, M. D. Erion, Pradefovir: a prodrug that targets adefovir to the liver for the treatment of hepatitis B. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 666-676.
- [42] C. Meier, *cycloSal* phosphates as chemical Trojan horses for intracellular nucleotide and glycosylmonophosphate delivery - Chemistry meets biology. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1081-1102.
- [43] 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.
- [44] 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. Engl.* **1996**, *1*, 70-72.
- [45] C. Meier, C. Ducho, H. Jessen, D. Vukadinovic-Tenter, J. Balzarini, Second-generation *cycloSal*-d4TMP pronucleotides bearing esterase-cleavable sites - the "trapping" concept. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 197-206.
- [46] 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.
- [47] N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, Enzymatically activated *cycloSal*-d4T-monophosphates: The third generation of *cycloSal*-pronucleotides. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1658-1667.
- [48] N. Gisch, F. Pertenbreiter, J. Balzarini, C. Meier, 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*igenyl-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphates, a Second Type of New, Enzymatically Activated *cycloSal*igenyl Pronucleotides. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 8115-8123.
- [49] C. Ducho, U. Görbig, S. Jessel, N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, Bis-*cycloSal*-d4T-monophosphates: Drugs that deliver two molecules of bioactive nucleotides. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1335-1346.
- [50] Y. Ahmadibeni, R. Tiwari, C. Swepson, J. Pandhare, C. Dash, G. F. Doncel, K. Parang, Synthesis and anti-HIV activities of bis-(*cycloSal*igenyl) pronucleotides derivatives of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 802-805.
- [51] E. H. Rios Morales, J. Balzarini, C. Meier, Diastereoselective Synthesis of *cycloSal*igenyl-Nucleosyl-Phosphotriesters. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1649-1659.
- [52] S. Warnecke, C. Meier, Synthesis of Nucleoside Di- and Triphosphates and Dinucleoside Polyphosphates with *cycloSal*-Nucleotides. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3024-3030.

- [53] V. C. Tonn, C. Meier, Solid-Phase Synthesis of (Poly)phosphorylated Nucleosides and Conjugates. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9832-9842.
- [54] S. Wendicke, S. Warnecke, C. Meier, Effiziente Synthese von Nucleosiddiphosphat-Glycopyranosen. *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1523-1525.
- [55] S. Wendicke, S. Warnecke, C. Meier, Efficient synthesis of nucleoside diphosphate glycopyranoses. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1500-1502.
- [56] S. Wolf, T. Zismann, N. Lunau, C. Meier, Reliable Synthesis of Various Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7656-7664.
- [57] 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.
- [58] S. Wolf, R. Molina Berrio, C. Meier, Synthesis of Nonnatural Nucleoside Diphosphate Sugars. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6304-6313.
- [59] S. Wolf, S. Warnecke, J. Ehrlich, F. Freiburger, R. Gerardy-Schahn, C. Meier, Chemical Synthesis and Enzymatic Testing of CMP-Sialic Acid Derivatives. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2605-2615.
- [60] N. Lunau, C. Meier, Synthesis of L-Altrose and Some Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 6260-6270.
- [61] K. Y. Hostetler, S. Parker, C. N. Sridhar, M. J. Martin, J. L. Li, L. M. Stuhmiller, G. M. van Wijk, H. van den Bosch, M. F. Gardner, K. A. Aldern, D. D. Richman, Acyclovir diphosphate dimyristoylglycerol: a phospholipid prodrug with activity against acyclovir-resistant herpes simplex virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 11835-11839.
- [62] 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.
- [63] H. J. Jessen, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Bioreversible Maskierung von Nucleosiddiphosphaten. *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8847-8850.
- [64] H. J. Jessen, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Bioreversible protection of nucleoside diphosphates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8719-8722.
- [65] R. B. Greenwald, A. Pendri, C. D. Conover, H. Zhao, Y. H. Choe, A. Martinez, K. Shum, S. Y. 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.
- [66] H. J. Jessen, *Untersuchungen zur intrazellulären Freisetzung von Nucleosidphosphaten*, Dissertation, Universität Hamburg, **2008**.
- [67] T. Schulz, *Synthese und Untersuchung von Nucleosiddiphosphat Prodrugs*, Dissertation, Universität Hamburg, **2011**.
- [68] L. Richter, *Darstellung und Charakterisierung biologisch aktiver Nucleosiddiphosphat-Prodrugs*, Diplomarbeit, Universität Hamburg, **2010**.
- [69] F. Lottspeich, J. W. Engels, *Bioanalytik*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2012**
- [70] J. Balzarini, L. Naesens, S. Aquaro, T. Knispel, C.-F. Perno, E. De Clercq, C. Meier, Intracellular Metabolism of cycloSaligenyl 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine Monophosphate, a Prodrug of 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine (Zidovudine). *Mol. Pharmacol.* **1999**, 1354-1361.
- [71] 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**, 928-935.
- [72] Z. P. Kortylewicz, Y. Kimura, K. Inoue, E. Mack, J. Baranowska-Kortylewicz, Radiolabeled CycloSaligenyl Monophosphates of 5-Iodo-2'-deoxyuridine, 5-Iodo-3'-fluoro-2',3'-dideoxyuridine, and 3'-Fluorothymidine for Molecular Radiotherapy of Cancer: Synthesis and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2649-2671.
- [73] M. S. T. Goncalves, Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190-212.



- [74] C. Wojczewski, K. Stolze, J. W. Engels, Fluorescent oligonucleotides - Versatile tools as probes and primers for DNA and RNA analysis. *Synlett* **1999**, 1667-1678.
- [75] R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, Fluorescent Analogs of Biomolecular Building Blocks: Design, Properties, and Applications. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579-2619.
- [76] H. J. Jessen, W. Fendrich, C. Meier, Synthesis and properties of fluorescent *cycloSal* nucleotides based on the pyrimidine nucleoside m<sup>5</sup>K and its 2',3'-dideoxy analog dM<sup>5</sup>K. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 924-931.
- [77] A. Tolonen, M. Turpeinen, O. Pelkonen, Liquid chromatography-mass spectrometry in *in vitro* drug metabolite screening. *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 120-133.
- [78] J. P. Lai, J. Wang, Z. W. Cai, Nucleoside reverse transcriptase inhibitors and their phosphorylated metabolites in human immunodeficiency virus-infected human matrices. *J. Chromatogr. B* **2008**, *868*, 1-12.
- [79] R. S. Jansen, H. Rosing, J. H. Schellens, J. H. Beijnen, Mass spectrometry in the quantitative analysis of therapeutic intracellular nucleotide analogs. *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, *30*, 321-343.
- [80] Z. Hao, D. A. Cooney, D. Farquhar, C. F. Perno, K. Zhang, R. Masood, Y. Wilson, N. R. Hartman, J. Balzarini, D. G. Johns, Potent DNA Chain Termination Activity and Selective-Inhibition of Human-Immunodeficiency-Virus Reverse-Transcriptase by 2',3'-Dideoxyuridine-5'-Triphosphate. *Mol. Pharmacol.* **1990**, *37*, 157-163.
- [81] R. L. Mackman, L. Zhang, V. Prasad, C. G. Booramra, J. Chen, J. Douglas, D. Grant, G. Laflamme, H. Hui, C. U. Kim, J. Parrish, A. D. Stoycheva, S. Swarninathan, K. Wang, T. Cihlar, Synthesis and anti-HIV activity of cyclic pyrimidine phosphonmethoxy nucleosides and their prodrugs: A comparison of phosphonates and corresponding nucleosides. *Nucleosides Nucleotides, Nucleic Acids* **2007**, *26*, 573-577.
- [82] S. R. Khan, S. K. Kumar, D. Farquhar, Bis(carbamoyloxymethyl) esters of 2',3'-dideoxyuridine 5'-monophosphate (ddUMP) as potential ddUMP prodrugs. *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 390-396.
- [83] C. McGuigan, P. Bellevergue, H. Sheeka, N. Mahmood, A. J. Hay, Certain Phosphoramidate Derivatives of Dideoxy Uridine (ddU) Are Active against HIV and Successfully By-pass Thymidine Kinase. *FEBS Lett.* **1994**, *351*, 11-14.
- [84] J. K. Sastry, P. N. Nehete, S. Khan, B. J. Nowak, W. Plunkett, R. B. Arlinghaus, D. Farquhar, Membrane-Permeable Dideoxyuridine 5'-Monophosphate Analog Inhibits Human-Immunodeficiency-Virus Infection. *Mol. Pharmacol.* **1992**, *41*, 441-445.
- [85] J. Romanowska, A. Szymanska-Michalak, J. Boryski, J. Stawinski, A. Kraszewski, R. Loddo, G. Sanna, G. Collu, B. Secci, P. La Colla, Aryl nucleoside H-phosphonates. Part 16: Synthesis and anti-HIV-1 activity of di-aryl nucleoside phosphotriesters. *Biorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3489-3498.
- [86] T. Rodriguez-Perez, S. Fernandez, Y. S. Sanghvi, M. Detorio, R. F. Schinazi, V. Gotor, M. Ferrero, Chemoenzymatic Syntheses and Anti-HIV-1 Activity of Glucose-Nucleoside Conjugates as Prodrugs. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2239-2249.
- [87] 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.
- [88] Y. Mehellou, C. McGuigan, A. Brancale, J. Balzarini, Design, synthesis, and anti-HIV activity of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyuridine (d4U), 2',3'-dideoxyuridine (ddU) phosphoramidate 'ProTide' derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3666-3669.
- [89] C. McGuigan, R. N. Pathirana, R. Snoeck, G. Andrei, E. De Clercq, J. Balzarini, Discovery of a new family of inhibitors of human cytomegalovirus (HCMV) based upon lipophilic alkyl furano pyrimidine dideoxy nucleosides: Action via a novel non-nucleosidic mechanism. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1847-1851.

- [90] E. Larsen, P. T. Jorgensen, M. A. Sofan, E. B. Pedersen, A New and Easy Synthesis of Silylated Furanoid Glycols in One-Step from Nucleosides. *Synthesis* **1994**, 1037-1038.
- [91] K. Temburnikar, Z. B. Zhang, K. Seley-Radtke, Modified Synthesis of 3'-OTBDPS-Protected Furanoid Glycol. *Nucleosides Nucleotides, Nucleic Acids* **2012**, *31*, 319-327.
- [92] J. P. Horwitz, J. Chua, M. A. Darooge, M. Noel, I. L. Klundt, Nucleosides. IX. Formation of 2',3'-Unsaturated Pyrimidine Nucleosides Via a Novel  $\beta$ -Elimination Reaction. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 205-211.
- [93] T. Sowa, S. Ouchi, Facile Synthesis of 5'-Nucleotides by Selective Phosphorylation of a Primary Hydroxyl Group of Nucleosides with Phosphoryl Chloride. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, *48*, 2084-2090.
- [94] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, Studies of Phosphorylation. III. Selective Phosphorylation of Unprotected Nucleosides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, *42*, 3505-3508.
- [95] R. Eisenhuth, C. Richert, Convenient Syntheses of 3'-Amino-2',3'-dideoxynucleosides, Their 5'-Monophosphates, and 3'-Aminoterminal Oligodeoxynucleotide Primers. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 26-37.
- [96] E. H. Rios Morales, *Stereoselektive Darstellung von cycloSal-Pronucleotiden mittels chiraler Austrittsgruppen*, Dissertation, Universität Hamburg, **2010**.
- [97] C. Ducho, *cycloSal-Nucleotide - Ansätze zur Optimierung eines Wirkstoffsystems*, Dissertation, Universität Hamburg, **2005**.
- [98] S. Warnecke, *Neue Synthese phosphorylierter Biokonjugate aus cycloSal-aktivierten Nucleotiden* Dissertation, Universität Hamburg, **2010**.
- [99] S. Wendicke, *Neue Synthese von Nucleosiddiphosphatpyranosen mit Hilfe von cycloSal-aktivierten Phosphatdonatoren*, Dissertation, Universität Hamburg, **2007**.
- [100] N. Gisch, *Synthese und Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung enzymatisch aktivierbarer cycloSal-Pronucleotide*, Dissertation, Universität Hamburg, **2008**.
- [101] 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.
- [102] 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.
- [103] S. Gallois-Montbrun, A. Faraj, E. Seclaman, J. P. Sommadossi, D. Deville-Bonne, M. Veron, Broad specificity of human phosphoglycerate kinase for antiviral nucleoside analogs. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 1749-1756.
- [104] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, G. P. C. Drummen, Advanced Fluorescence Microscopy Techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* **2012**, *17*, 4047-4132.
- [105] H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620-2640.
- [106] C. McGuigan, C. J. Yarnold, G. Jones, S. Velazquez, H. Barucki, A. Brancale, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, Potent and selective inhibition of varicella-zoster virus (VZV) by nucleoside analogues with an unusual bicyclic base. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4479-4484.
- [107] M. Derudas, C. McGuigan, Serendipity and VZV drug discovery. *Drug Discovery Today: Technologies* **2012**, *9*, e177-e181.
- [108] J. Balzarini, C. McGuigan, Chemotherapy of varicella-zoster virus by a novel class of highly specific anti-VZV bicyclic pyrimidine nucleosides. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1587*, 287-295.
- [109] C. McGuigan, A. Brancale, H. Barucki, S. Srinivasan, G. Jones, R. Pathirana, S. Blewett, R. Alvarez, C. J. Yarnold, A. Carangio, S. Velazquez, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, Fluorescent bicyclic furo pyrimidine deoxynucleoside analogs as potent and

- selective inhibitors of VZV and potential future drugs for the treatment of chickenpox and shingles. *Drug Future* **2000**, *25*, 1151-1161.
- [110] C. McGuigan, K. Hinsinger, L. Farleigh, R. N. Pathirana, J. J. Bugert, Novel Antiviral Activity of L-Dideoxy Bicyclic Nucleoside Analogues versus Vaccinia and Measles Viruses in Vitro. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1311-1322.
- [111] C. McGuigan, R. N. Pathirana, M. Migliore, R. Adak, G. Luoni, A. T. Jones, A. Diez-Torrubia, M. J. Camarasa, S. Velazquez, G. Henson, E. Verbeken, R. Sienaert, L. Naesens, R. Snoeck, G. Andrei, J. Balzarini, Preclinical development of bicyclic nucleoside analogues as potent and selective inhibitors of varicella zoster virus. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 1316-1330.
- [112] J. Zhang, X. J. Sun, K. M. Smith, F. Visser, P. Carpenter, G. Barron, Y. S. Peng, M. J. Robins, S. A. Baldwin, J. D. Young, C. E. Cass, Studies of nucleoside transporters using novel autofluorescent nucleoside probes. *Biochemistry* **2006**, *45*, 1087-1098.
- [113] V. L. Damaraju, K. M. Smith, D. Mowles, I. Nowak, E. Karpinski, J. D. Young, M. J. Robins, C. E. Cass, Interaction of fused-pyrimidine nucleoside analogs with human concentrative nucleoside transporters: High-affinity inhibitors of human concentrative nucleoside transporter 1. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 82-90.
- [114] D. A. Berry, K. Y. Jung, D. S. Wise, A. D. Sercel, W. H. Pearson, H. Mackie, J. B. Randolph, R. L. Somers, Pyrrolo-dC and pyrrolo-C: fluorescent analogs of cytidine and 2'-deoxycytidine for the study of oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2457-2461.
- [115] L. F. Liu, Y. F. Li, D. Liotta, S. Lutz, Directed evolution of an orthogonal nucleoside analog kinase via fluorescence-activated cell sorting. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 4472-4481.
- [116] Y. F. Li, P. B. Soni, L. F. Liu, X. Zhang, D. C. Liotta, S. Lutz, Synthesis of fluorescent nucleoside analogs as probes for 2'-deoxyribonucleoside kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 841-843.
- [117] F. Pertenbreiter, *Synthese und Charakterisierung fluoreszierender cycloSal-Nucleotid-Analoga*, Diplomarbeit, Universität Hamburg, **2008**.
- [118] M. J. Robins, P. J. Barr, Nucleic-Acid Related-Compounds. 31. Smooth and Efficient Palladium-Copper Catalyzed Coupling of Terminal Alkynes with 5-Iodouracil Nucleosides. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 421-424.
- [119] M. J. Robins, P. J. Barr, Nucleic-Acid Related-Compounds. 39. Efficient Conversion of 5-Iodo to 5-Alkynyl and Derived 5-Substituted Uracil Bases and Nucleosides. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1854-1862.
- [120] M. J. Robins, K. Miranda, V. K. Rajwansi, M. A. Peterson, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, Synthesis and biological evaluation of 6-(alkyn-1-yl)furo[2,3-d]pyrimidin-2(3H)-one base and nucleoside derivatives. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 391-398.
- [121] Z. Janeba, A. Holy, R. Pohl, R. Snoeck, G. Andrei, E. De Clercq, J. Balzarini, Synthesis and biological evaluation of acyclic nucleotide analogues with a furo[2,3-d]pyrimidin-2(3H)-one base. *Can. J. Chem.* **2010**, *88*, 628-638.
- [122] K. K. Ogilvie, S. L. Beaucage, A. L. Schifman, N. Y. Theriault, K. L. Sadana, Synthesis of Oligoribonucleotides. II. Use of Silyl Protecting Groups in Nucleoside and Nucleotide Chemistry.VII. *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 2768-2780.
- [123] C. K. Chu, B. Doboszewski, W. Schmidt, G. V. Ullas, Synthesis of Pyrimidine 3'-Allyl-2',3'-Dideoxyribonucleosides by Free-Radical Coupling. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2767-2769.
- [124] D. H. R. Barton, S. W. McCombie, New Method for Deoxygenation of Secondary Alcohols. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1975**, 1574-1585.
- [125] P. Arya, M. Lesage, D. D. M. Wayner, Tris(Trimethylsilyl)Silane (TTMSS) - Formation of Carbon-Centered Radicals from Oxathiolane and Thiazolidine Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2853-2856.
- [126] H. J. Jessen, *Synthese und Charakterisierung fluoreszierender cycloSal-Nucleotid-Analoga*, Diplomarbeit, Universität Hamburg, **2005**.










- [127] P. J. Garegg, B. Samuelsson, One-Step Conversion of Vicinal Diols into Olefins, Using a Novel Reagent System. *Synthesis* **1979**, 469-470.
- [128] F. A. Luzzio, M. E. Menes, A Facile Route to Pyrimidine-Based Nucleoside Olefins - Application to the Synthesis of d4T (Stavudine). *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7267-7272.
- [129] V. J. Davisson, D. R. Davis, V. M. Dixit, C. D. Poulter, Synthesis of Nucleotide 5'-Diphosphates from 5'-O-Tosyl Nucleosides. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1794-1801.
- [130] F. T. Liang, N. Jain, T. Hutchens, D. D. Shock, W. A. Beard, S. H. Wilson, M. P. Chiarelli, B. P. Cho,  $\alpha,\beta$ -Methylene-2'-deoxynucleoside 5'-Triphosphates as Noncleavable Substrates for DNA Polymerases: Isolation, Characterization, and Stability Studies of Novel 2'-Deoxycyclonucleosides, 3,5'-Cyclo-dG, and 2,5'-Cyclo-dT. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6460-6470.
- [131] M. Derudas, *Persönliche Mitteilung*, **2012**.
- [132] E. F. Neufeld, W. Z. Hassid, Biosynthesis of Saccharides from Glycopyranosyl Esters of Nucleotides ("Sugar Nucleotides"). *Adv. Carbohydr. Chem.* **1963**, *18*, 309-356.
- [133] C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, Enzyme in der organischen Synthese: das Problem der molekularen Erkennung von Kohlenhydraten (Teil 2). *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 569-593.
- [134] C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, Enzymes in Organic Synthesis: Application to the Problems of Carbohydrate-Recognition (Part 2). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 521-546.
- [135] G. K. Wagner, T. Pesnot, R. A. Field, A survey of chemical methods for sugar-nucleotide synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1172-1194.
- [136] R. Stiller, J. Thiem, Enzymatic-Synthesis of  $\beta$ -L-Fucose-1-Phosphate and GDP-Fucose. *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, 467-471.
- [137] M. Arlt, O. Hindsgaul, Rapid Chemical Synthesis of Sugar Nucleotides in a Form Suitable for Enzymatic Oligosaccharide Synthesis. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 14-15.
- [138] S. C. Timmons, D. L. Jakeman, Stereoselective chemical synthesis of sugar nucleotides via direct displacement of acylated glycosyl bromides. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1227-1230.
- [139] C. Ernst, W. Klaffke, A short route to nucleoside diphosphate activated D- and L-hexoses. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2973-2975.
- [140] P. Peltier, R. Daniellou, C. Nugier-Chauvin, V. Ferrieres, Versatile synthesis of rare nucleotide furanoses. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5227-5230.
- [141] S. Roseman, J. J. Distler, J. G. Moffatt, H. G. Khorana, Nucleoside Polyphosphates. XI. An Improved General Method for Synthesis of Nucleotide Coenzymes. Syntheses of Uridine-5', Cytidine-5' and Guanosine-5' Diphosphate Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 659-663.
- [142] H. Gold, P. van Delft, N. Meeuwenoord, J. D. C. Codée, D. V. Filippov, G. Eggink, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel, Synthesis of Sugar Nucleotides by Application of Phosphoramidites. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 9458-9460.
- [143] H. Tanaka, Y. Yoshimura, M. R. Jørgensen, J. A. Cuesta-Seijo, O. Hindsgaul, A simple synthesis of sugar nucleoside diphosphates by chemical coupling in water. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11531-11534.
- [144] H. Tanaka, Y. Yoshimura, M. R. Jørgensen, J. A. Cuesta-Seijo, O. Hindsgaul, A simple synthesis of sugar nucleoside diphosphates by chemical coupling in water. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11699-11702.
- [145] G. K. Wagner, T. Pesnot, Glycosyltransferases and their Assays. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1939-1949.
- [146] T. Kajimoto, M. Node, Synthesis of Glycosyltransferase Inhibitors. *Synthesis* **2009**, 3179-3210.
- [147] J. S. Helm, Y. N. Hu, L. Chen, B. Gross, S. Walker, Identification of active-site inhibitors of MurG using a generalizable, high-throughput glycosyltransferase screen. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11168-11169.

- [148] T. Pesnot, M. M. Palcic, G. K. Wagner, A Novel Fluorescent Probe for Retaining Galactosyltransferases. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1392-1398.
- [149] K. Descroix, T. Pesnot, Y. Yoshimura, S. S. Gehrke, W. Wakarchuk, M. M. Palcic, G. K. Wagner, Inhibition of Galactosyltransferases by a Novel Class of Donor Analogues. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2015-2024.
- [150] J. Conchie, G. A. Levvy, Aryl Glycopyranosides by the Helferich Method. *Methods Carbohydr. Chem.* **1963**, *2*, 345-347.
- [151] B. Helferich, W. Portz, Über *N*-Glykoside. II. *Chem. Ber.* **1953**, *86*, 604-612.
- [152] J. Huchting, *cycloSal-Nucleotide zur Synthese von Nucleosiddiphosphat-Disacchariden*, Diplomarbeit, Universität Hamburg, **2010**.
- [153] J. W. Perich, R. B. Johns, A New, Convenient and Efficient General Procedure for the Conversion of Alcohols into Their Dibenzyl Phosphorotriesters Using *N,N*-Diethyl Dibenzyl Phosphoramidite. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 101-102.
- [154] M. M. Sim, H. Kondo, C.-H. Wong, Synthesis and Use of Glycosyl Phosphites: An Effective Route to Glycosyl Phosphates, Sugar Nucleotides, and Glycosides. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2260-2267.
- [155] V. C. Tonn, *Festphasen-gebundene cycloSal-Nucleotide zur Synthese phosphorylierter Biomoleküle*, Dissertation, Universität Hamburg, **2011**.
- [156] J. E. Marugg, M. Tromp, E. Kuyl-Yeheskiely, G. A. Van der Marel, J. H. Van Boom, A Convenient and General-Approach to the Synthesis of Properly Protected D-Nucleoside-3'-Hydrogenphosphonates Via Phosphite Intermediates. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2661-2664.
- [157] G. Shi, J. T. Wu, Y. Li, R. Geleziunas, K. Gallagher, T. Emm, T. Olah, S. Unger, Novel direct detection method for quantitative determination of intracellular nucleoside triphosphates using weak anion exchange liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1092-1099.
- [158] J. Xing, A. Apedo, A. Tymiak, N. Zhao, Liquid chromatographic analysis of nucleosides and their mono-, di- and triphosphates using porous graphitic carbon stationary phase coupled with electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 1599-1606.
- [159] V. Pucci, C. Giuliano, R. Zhang, K. A. Koeplinger, J. F. Leone, E. Monteagudo, F. Bonelli, HILIC LC-MS for the determination of 2'-C-methyl-cytidine-triphosphate in rat liver. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 1275-1283.
- [160] N. B. Cech, C. G. Enke, Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, *20*, 362-387.
- [161] C. G. Huber, H. Oberacher, Analysis of nucleic acids by on-line liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, *20*, 310-343.
- [162] P. G. Wang, W. He, (Ed.), *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Advanced Applications*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, **2011**, 445-467.














## ANHANG

**Gefahrstoffverzeichnis**














Im folgenden Verzeichnis sind Verbindungen und Lösungsmittel aufgelistet, mit denen während dieser Promotion gearbeitet wurde. Für diese Gefahrstoffe sind die gültigen Gefahrensymbole sowie die H- und P-Sätze angegeben. Die Stoffe, für die keine bekannte Einstufung existiert, sind als gefährlich einzustufen. Es ist unbedingt zu vermeiden, sich oder andere Personen mit diesen Substanzen zu kontaminieren und diese Stoffe in die Umwelt einzubringen.

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Aceton		225-319-336- EUH066	210-233-305+351+338
Acetonitril		225-302+312+332- 319	210-305+351+338- 403+235
Ammoniak		314-335-400	280-273-304+340- 305+351+338-310
Ammoniumformiat		315-319-335	261-305+351+338
Ammonium- hydrogencarbonat		302	-
<i>p</i> -Anisaldehyd		302	280
Azoisobutyronitril		242-332-302-412	210-273-280
Benzylamin		314-302-312	280-305+351+338-310
<i>tert</i> - Butyldimethylsilyl- chlorid		228-314	210-280-301+330+331- 305+351+338

Anhang













Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid (5.5 M in <i>n</i> -Decan)		226-302-304-311+331-314-317-341-411	261-273-280-301+310-305+351+338-310
Calciumhydrid		260	402/404
5-Chlorsalicylalkohol		315-319-335	280-305+351+338
5-Chlorsalicylsäure		301	260-262-309+310
<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure		242-302-314	301+330+331-280-305+351+338-301+312
Decanoylchlorid		290-314	280-301+330+331-305+351+338-309+310
Dibenzyl- <i>N,N</i> -diisopropylamino-phosphoramidit		315-319-335	261-305+351+338
Dichlormethan		351	281-308+313
4,5-Dicyanoimidazol		315-318-335	261-280-350+351+338
Diethylether		224-302-336-EUH019-EUH066	210-240-403+235
Diisopropylamin		225-302+332-314-412	210-233-240-273-280-301+330+331-305+351+338-309+310-403+235
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin		225-301-314-412	210-233-240-273-280-301+330+331-305+351+338-309+310-403+235
<i>N,N</i> -Dimethylformamid		360D-226-312+332-319	201-302+352-305+351+338-308+313

Anhang

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Dimethylsulfoxid	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
1,4-Dioxan		225+EUH019 319+EUH066- 351-335	281-303+361+353-305+351+338-308+313-337+313-403+235
Dodecanoylchlorid		314	280-305+351+338-310
DOWEX 50WX8		319	280-264-305+351+338
Essigsäure 100%		226-314	280-305+351+338-310
Essigsäureanhydrid		226-332-302-314-335	280-301+330-331-305+351+338-309+310
Essigsäureethylester		225-319-336- EUH066	210-240-305+351+338
Ethanol		225	210-233-240-403+235
Heptanoylchlorid		330-314	260-280-284-305+351+338-310
4-Hydroxybenzyl- alkohol		319	305+351+338
Imidazol		302-314-361d	280-301+330+331-305+351+338
5-Iod-2'-desoxyuridin		315-319-335-341-361	261-281-305+351+338
Iodmonochlorid		314-335	280-301+330+331-304+340-305+351+338-309+310
Isobutyrylchlorid		225-314	210-280-301+330+331-305+351+338-309+310














Anhang

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Kalium		260-314-EUH014	280-301+330+331-305+351+338-402+404
Kaliumhydroxid		314-302-290	280-301/330/331-305/351/338
Kalium- <i>tert</i> -butanolat		261-302-314-EUH014	280-301+330+331-305+351+338-402+404
Kieselgel	-	-	260
Kupfer(I)-iodid		302-315-319-335-400	261-273-305+351+338
Lithium-aluminiumhydrid		260-314	223-231+232-280-305+351+338-370+378-422
Methanol		225-301+311+331-370	210-280-302+352-403+235
Methansulfonylchlorid		300-311-330-314	301+310-303+361+353-305+351+338-320-361-405-501
3-Methylsalicylsäure		302-315-318-335	280-302+352-305+351+338-313
Natriumcarbonat		319	260-305+351+338
Natrium		260-314-EUH014	280-301+330+331-305+351+338-402+404
Natriumborhydrid		260-301+311-314	280-301+330+331-302+352-305+351+338-309+310-402+404
Natriumhydrid		260	223-231+232-370+378-422




Anhang

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Natriumhydroxid		314-290	280-301+330+331-305+351+338
Natriumsulfit	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Natriumthiosulfat	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
5-Nitrosalicylaldehyd		302-315-319	302+352-305+351+338
Oxone®		272-314-317-334-335	220-261-280-305+351+338-310
Palladium/Kohle		315-319	305+351+338
Pent-1-in		225-315-319-335-304	210-261-301+310-305+351+338-331
Petrolether (50-70 °C)		225-304-336-411-EUH066	210-273-243-301+310-331
Phenoxythio-carbonylchlorid		314	280-301+330+331-305+351-338-309+310
Phosphor(III)-chlorid		300+330-373-314 EUH014-EUH029	280-301+330+331-304+340-305+351+228-309-310
Phosphorylchlorid		330-302-314-372-EUH014-EUH029	233-271-280-301+330+331-305+351+338-309+310
Phosphorsäure (85%)		324-290	280-301+330+331-305+351+338-309+310
Pyridin		225-302+312+332	210-233-302+352

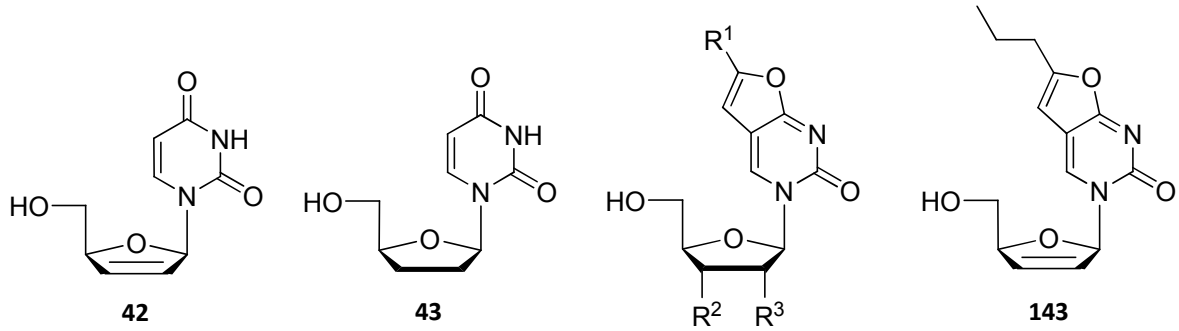
Anhang

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Salzsäure (25%)		314-335	261-280-305+351+338-310
Schwefelsäure (95-97%)		290-314	280-301+330+331-305+351+338
Tetra- <i>n</i> -butylammonium-fluorid (1 M in THF)		225-314-335	210-261-280-305+351+338-310
Tetra- <i>n</i> -butylammonium-hydroxidlösung (40% aq.)		314	280-301+330+331, 305+351+331-309+310
Tetrahydrofuran		225-319-335-EUH019	210-233-243-305+351+338
Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0)		302-315-317-319	280-302+352-305+351+338
Toluol		225-304-315-336-361d-373	210-240-301+310-331-302+352-403+235
<i>p</i> -Toluolsulfonylchlorid		315-318	302+352-305+351+338-313
Trichlormethan (deuteriert)		351-302-373-373-315	201-202-260-264-270-280-281-301+312-302+352-308+313-314-321-330-332+313-362-405-501
Triethylamin		225-332-312-302-314-335	210-280-301+330+331-302+352-305+351+338
Triethylamin-Trihydrofluorid		300-310-314-330	260-262-264-280-284-301+310-301+330+331-302+350-303+361+353-304+340-305+351+338-320

Anhang

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Trimethylsilyl-acetylen		225-315-319-335	210-261-305+351+338
Triphenylphosphin		302-317-413	262-273-280-302+352
Tris(trimethylsilyl)-silan		226	210
Wasserstoff		220	210-377-381-403

Verbindungsliste I



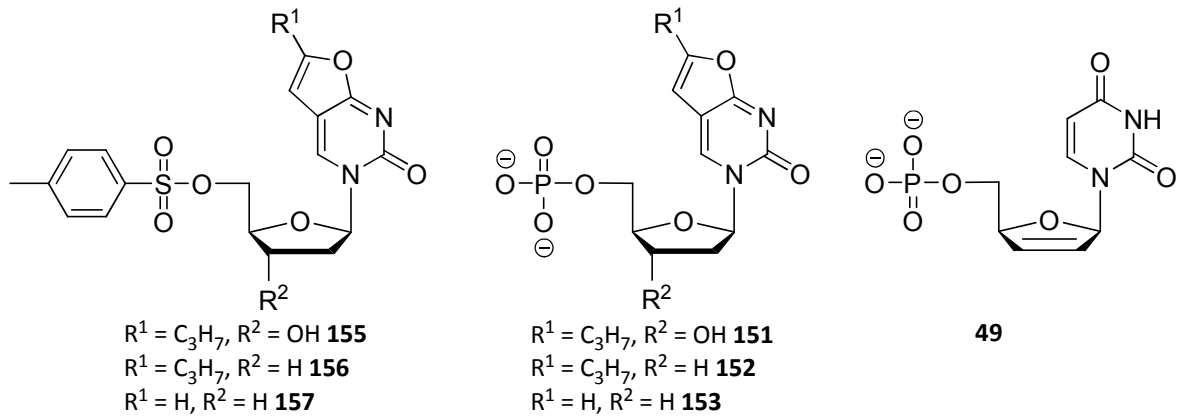
$R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = H$  **105**

$R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = OH$  **106**

$R^1 = C_3H_7, R^2 = OH, R^3 = H$  **129**

$R^1 = C_3H_7, R^2 = H, R^3 = H$  **133**

$R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H$  **139**



$R^1 = C_3H_7, R^2 = OH$  **155**

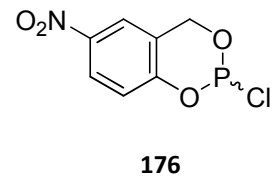
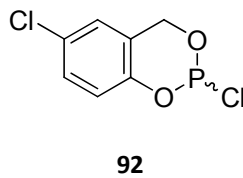
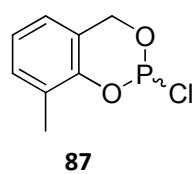
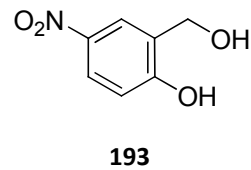
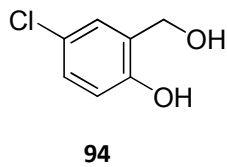
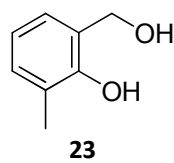
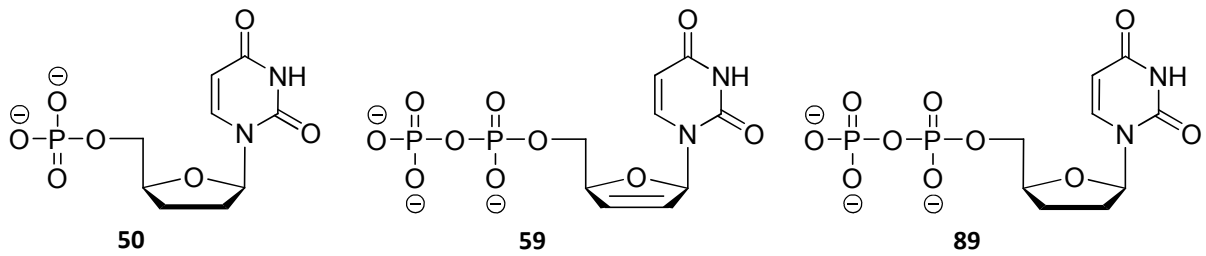
$R^1 = C_3H_7, R^2 = H$  **156**

$R^1 = H, R^2 = H$  **157**

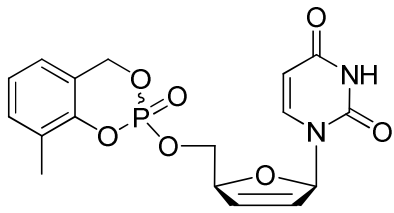
$R^1 = C_3H_7, R^2 = OH$  **151**

$R^1 = C_3H_7, R^2 = H$  **152**

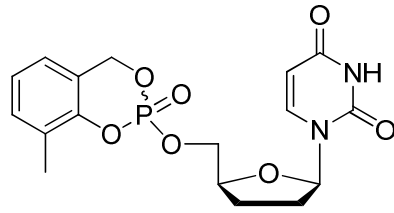
$R^1 = H, R^2 = H$  **153**



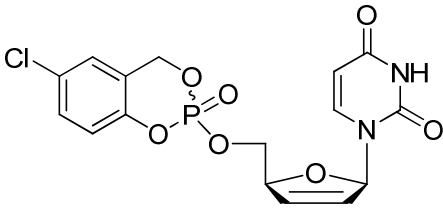
Verbindungsliste II



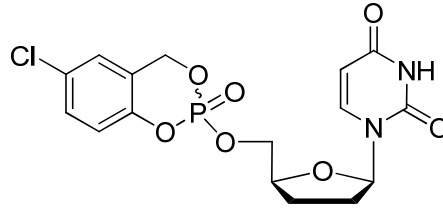
85



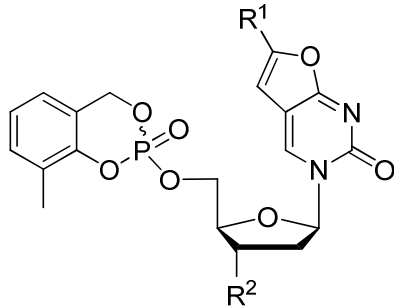
86



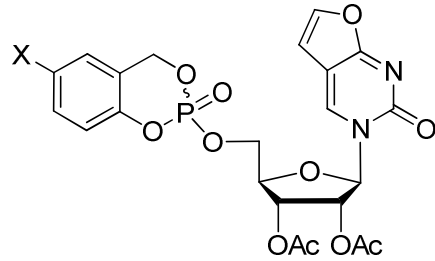
90



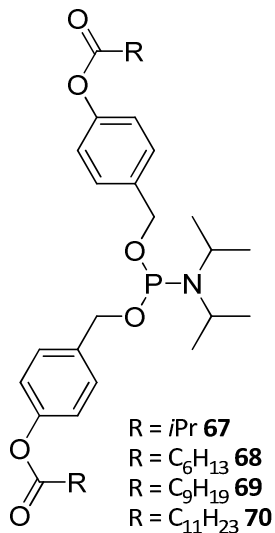
91



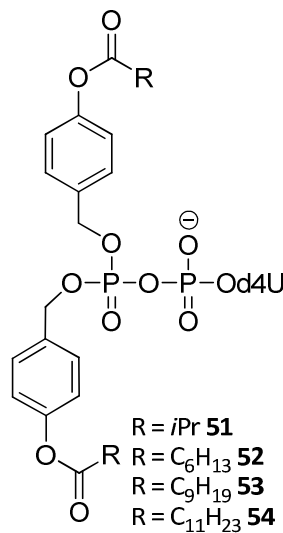
$R^1 = C_3H_7, R^2 = OH$  **113**  
 $R^1 = H, R^2 = OH$  **114**  
 $R^1 = C_3H_7, R^2 = H$  **115**  
 $R^1 = H, R^2 = H$  **116**



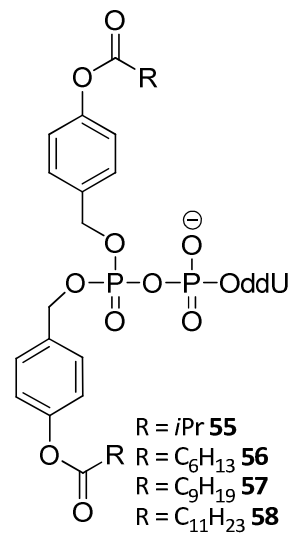
$X = NO_2$  **174**  
 $X = Cl$  **175**



$R = iPr$  **67**  
 $R = C_6H_{13}$  **68**  
 $R = C_9H_{19}$  **69**  
 $R = C_{11}H_{23}$  **70**

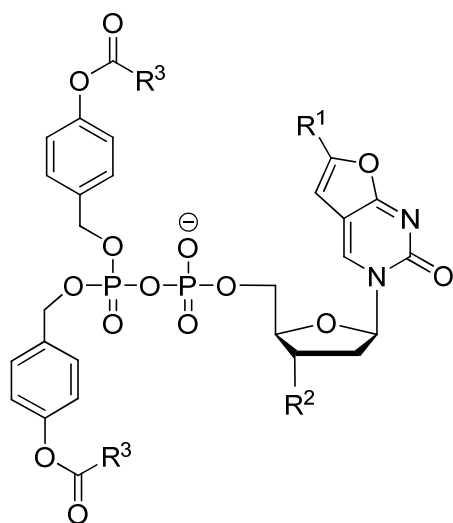


$R = iPr$  **51**  
 $R = C_6H_{13}$  **52**  
 $R = C_9H_{19}$  **53**  
 $R = C_{11}H_{23}$  **54**

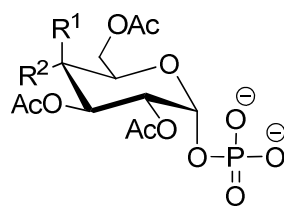


$R = iPr$  **55**  
 $R = C_6H_{13}$  **56**  
 $R = C_9H_{19}$  **57**  
 $R = C_{11}H_{23}$  **58**

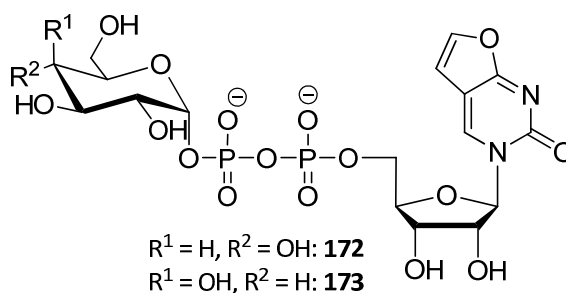
## Verbindungsliste III



- $R^1 = C_3H_7, R^2 = OH, R^3 = C_6H_{13}$  **118**  
 $R^1 = C_3H_7, R^2 = OH, R^3 = C_9H_{19}$  **119**  
 $R^1 = C_3H_7, R^2 = OH, R^3 = C_{11}H_{23}$  **120**  
 $R^1 = C_3H_7, R^2 = H, R^3 = C_6H_{13}$  **122**  
 $R^1 = C_3H_7, R^2 = H, R^3 = C_9H_{19}$  **123**  
 $R^1 = H, R^2 = H, R^3 = C_6H_{13}$  **126**  
 $R^1 = H, R^2 = H, R^3 = C_9H_{19}$  **127**



- $R^1 = H, R^2 = OAc$  **178**  
 $R^1 = OAc, R^2 = H$  **179**



- $R^1 = H, R^2 = OH$ : **172**  
 $R^1 = OH, R^2 = H$ : **173**

## Lebenslauf

Dipl.-Chem. Florian Pertenbreiter

geboren am 22. Januar 1981 in Hamburg

### *Schulische Ausbildung*

06/2000	Abitur (Durchschnittsnote: 1.8)
1991-2000	Gymnasium Meiendorf, Hamburg

### *Akademische Ausbildung*

Seit 01/2009	Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier am Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg
12/2008	Diplom in Chemie (Gesamtnote: „sehr gut“)
04/2008-12/2008	Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier am Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg  Titel: „Synthese und Charakterisierung fluoreszierender <i>cycloSal</i> -Nucleotid-Analoga“ (Note: „sehr gut“)
10/2001-12/2008	Diplomstudiengang Chemie an der Universität Hamburg

### *Lehrtätigkeit*

01/2009-10/2012	Assistent im Integrierten Synthesepraktikum in Anorganischer und Organischer Chemie (ISP), im Forschungspraktikum Organische Chemie und im Modul Naturstoffchemie
-----------------	---



### Publikationen

- N. Gisch, F. Pertenbreiter, J. Balzarini, C. Meier, 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSal*-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphates – A Second Type of New, Enzymatically Activated *cycloSal*-Pronucleotides, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 8115–8123.

### Posterbeiträge

- F. Pertenbreiter, J. Balzarini, C. Meier, DiPPro-Nucleotides of 2',3'-Dideoxyuridine (ddU) and 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrouridine (d4U), Poster und Vortrag bei der 25<sup>th</sup> *International Conference on Antiviral Research (ICAR)*, 16. - 19. April 2012, Sapporo, Japan.
- F. Pertenbreiter, C. Meier, Nucleoside Diphosphate Prodrugs of Antivirally Active Nucleosides, Poster at the 23<sup>rd</sup> *International Conference on Antiviral Research (ICAR)*, 25. - 28. April 2010, San Francisco, CA, USA.  
Abstract: *Antiviral Res.* **2010**, *86*, A64.
- F. Pertenbreiter, C. Meier, Synthesis and Properties of *cycloSal*-phosphatetriesters of Fluorescent Bicyclic Nucleoside Analogues (BCNAs), Poster bei der 22<sup>nd</sup> *International Conference on Antiviral Research (ICAR)*, 03. - 07. Mai 2009, Miami Beach, FL, USA.  
Abstract: *Antiviral Res.* **2009**, *82*, A62.

Folgende Bachelorarbeiten wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation unter meiner Betreuung angefertigt und bereits veröffentlicht:

- Sven Bettermann, *Synthese eines fluoreszenzmarkierten Nucleosiddiphosphatzuckers*, Bachelorarbeit, Universität Hamburg, **2011**.
- Inga Reimer, *Synthese fluoreszierender Nucleosidanaloga zur Verwendung als analytische Sonden von Prodrugsystemen*, Bachelorarbeit, Universität Hamburg, **2010**.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Fluoreszenzmarkierte *cycloSal*- und *DiPPro*-Nucleotide“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Hamburg, den 03. April 2013

Dipl.-Chem. Florian Pertenbreiter