

**Synthese, Untersuchung und mechanistische Interpretation von
Prodrug-Konzepten an Nucleotidanaloga und
Glycosylmonophosphaten**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ulrike Muus

aus Hamburg

Hamburg 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wittko Francke

Disputation

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Meier im Institut für Organische Chemie in der Zeit von April 1999 bis März 2003 an der Universität Hamburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Chris Meier gilt mein Dank für die interessante Themenstellung und den gewährten wissenschaftlichen Freiraum, das stete Interesse und zahlreiche konstruktive Diskussionen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	<i>Prolog</i>	2
1.2	<i>Phosphorylierte Wirkstoffe</i>	6
1.3	<i>Das Prodrug-Konzept</i>	6
1.3.1	Pro-Nucleotid-Konzepte	8
1.3.1.1	Das bis-[AB]-Konzept	9
1.3.1.2	Das <i>cycloSal</i> -Konzept	14
2	Aufgabenstellung	18
3	Synthese, Untersuchungen und mechanistische Interpretation zum Hydrolyseverhalten von bis-[AB]-Nucleotiden	21
3.1	<i>Kenntnisstand</i>	21
3.1.1	Das HI-Virus	21
3.1.2	Der Replikationszyklus des HI-Virus	22
3.1.3	Ansätze der HIV-Therapie	23
3.2	<i>Synthesen</i>	26
3.2.1	Synthese der Alkohole	28
3.2.1.1	Darstellung des <i>para</i> -Acetoxybenzylalkohols 50	28
3.2.1.2	Darstellung des <i>ortho</i> -Acetoxybenzylalkohols 52	30
3.2.1.3	Darstellung des α -Methoxycarbonylmethylbenzylalkohols 57	31
3.2.1.4	Darstellung des <i>para</i> -Acetoxy-(α -MCM)-benzylalkohols 60	32
3.2.2	Synthese der Phosphat-Triester	38
3.2.2.1	Die Phosphorchloridat- und die Phosphordichloridat-Methode (Variante C und D)	39
3.2.2.2	Die Phosphoramidit- und die Di-(benzyloxy)-chlorphosphan-Methode (Variante A und B)	41

3.3	<i>Resultate und Diskussion</i>	44
3.3.1	Hydrolysestudien	44
3.3.1.1	Hydrolysen im wässrigen Phosphatpuffer bei pH 7.3 und ^{31}P -NMR-Studien	44
3.3.1.2	Hydrolysen in humanen CEM/0-Zellen	53
3.3.2	Massenspektrometrische Untersuchung	57
3.3.3	Antivirale <i>in vitro</i> -Aktivität	62
4	Synthese, Untersuchung und mechanistische Interpretation zum Hydrolyseverhalten maskierter Glycosylmonophosphate	65
4.1	<i>Kenntnisstand</i>	65
4.1.1	Glykokonjugate -Vorkommen, Bedeutung, Struktur und Biosynthese	65
4.1.2	Congenital Disorder of Glycosylation – CDG	70
4.1.3	CDG-Ia	72
4.2	<i>Synthese</i>	75
4.2.1	Syntheseplanung	75
4.2.2	Synthese der Verbindungen	77
4.2.2.1	Synthese von geschützten Hexopyranosen	77
4.2.2.2	Synthese von 1,2,3,4-Tetra- <i>O</i> -acetyl-D-mannopyranosid 96	81
4.2.2.3	Synthese der <i>cyclo</i> Saligenylchlorphosphite	82
4.2.2.4	Synthese der <i>cyclo</i> Saligenyl-Hexosemonophosphate	82
4.3	<i>Resultate und Diskussion</i>	87
4.3.1	Hydrolysestudien	87
4.3.1.1	Hydrolysen im wässrigen Phosphatpuffer bei pH 7.3	87
4.3.1.2	Identifizierung der Hydrolyseprodukte durch Massenspektrometrie	88
4.3.1.3	Quantitative Bestimmung und Identifizierung der Hydrolyseprodukte durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie	91
4.3.1.4	Hydrolysemechanismus von <i>cyclo</i> SalHMP	95
4.3.1.5	Produktverhältnisse der ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien	99
4.3.1.6	Hydrolyseverhalten der <i>cyclo</i> Sal-Mannose-6-phosphate	102

4.3.2	<i>in vitro</i> -Experimente an Fibroblasten	104
5	Zusammenfassung	110
6	Summary	117
7	Ausblick	120
8	Experimentaltteil	125
8.1	<i>Allgemeines</i>	125
8.1.1	Lösungsmittel	125
8.1.2	Verwendete Puffer und Reagenzien	126
8.2	<i>Chromatographie</i>	127
8.2.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	127
8.2.2	Zirkulare, zentrifugale Dünnschichtchromatographie (CCTLC)	127
8.2.3	Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie)	127
8.2.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	127
8.2.4.1	HPLC-Methoden	128
8.2.5	Gaschromatographie	129
8.3	<i>Kernresonanzspektroskopie (NMR)</i>	129
8.4	<i>Massenspektrometrie (MS)</i>	129
8.5	<i>Polarimeter</i>	130
8.6	<i>Geräte</i>	130
8.6.1	Gefriertrocknung	130
8.6.2	Thermomixer	130
8.7	<i>Enzymatische und biologische Arbeitsvorschriften</i>	131
8.7.1	Enzymatische Experimente	131
8.7.2	LLO (Lipid Linked Oligosaccharides)-Analyse	131
8.8	<i>Hydrolysekinetiken</i>	132
8.8.1	Hydrolysekinetiken in Phosphatpuffer	132

8.8.2	Hydrolysekinetiken in humanem Serum	133
8.8.3	³¹ P-NMR-Hydrolysestudien	133
8.9	<i>Synthese der Nucleosidmonophosphat-Triester</i>	134
8.9.1	Synthese der Alkohole	134
8.9.1.1	Darstellung von 1-Acetyl-1,2,3-triazolo[4,5-b]-pyridin 42	134
8.9.1.2	Darstellung von 4-Acetoxybenzylalkohol 50	134
8.9.1.3	Darstellung von Acetoxysalicylaldehyd 54	135
8.9.1.4	Darstellung von 2-Acetoxybenzylalkohol 52	136
8.9.1.5	Darstellung von 3-Phenyl-3-oxo-methylpropionat 56	136
8.9.1.6	Darstellung von 3-Phenyl-3-hydroxy-methylpropionat (α -Methoxycarbonylmethylbenzylalkohol) 57	137
8.9.1.7	Darstellung von 4-Acetoxybenzaldehyd 59	138
8.9.1.8	Darstellung von 4-Hydroxyzimtsäuremethylester 17	139
8.9.1.9	Darstellung von 4-Acetoxyzimtsäuremethylester 63	139
8.9.1.10	Darstellung von 3-(4-Acetoxyphenyl)-oxiran-2-methylcarboxylat 64	140
8.9.1.11	Versuche zur Darstellung von 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-hydroxy- methylpropionat (<i>para</i> -Acetoxy(α -methoxycarbonylmethyl)- benzylalkohol) 60 ausgehend vom 3-(4-Acetoxyphenyl)oxiran-2- methylcarboxylat 64	141
8.9.1.12	Darstellung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-3-oxo-methylpropionat 66	142
8.9.1.13	Darstellung von 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-oxo-methylpropionat 67	142
8.9.1.14	Darstellung von 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-hydroxy-methylpropionat (<i>para</i> -Acetoxy(α -methoxycarbonylmethyl)benzylalkohol) 60	143
8.9.1.15	Versuche zur Darstellung von 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-hydroxy- methylpropionat (<i>para</i> -Acetoxy(α -methoxycarbonylmethyl)- benzylalkohol) 60 ausgehend vom 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-oxo- methylpropionat 67	144
8.9.2	Synthese der Phosphoramidite	146
8.9.2.1	Darstellung von Dichlor- <i>N,N</i> -diisopropylphosphoramidit 68	146
8.9.2.2	Darstellung von Dichlor- <i>N,N</i> -diethylphosphoramidit 69	147

8.9.2.3	AAV 1 zur Darstellung der bis-(Benzyl)- <i>N,N</i> -diisopropylphosphoramidite 50a , 57a sowie 70a – 72a	147
8.9.2.3.1	Darstellung von bis-(Benzyl)- <i>N,N</i> -diisopropylphosphoramidit 70a	148
8.9.2.3.2	Darstellung von (<i>R,R</i>)-bis-(α -Methylbenzyl)- <i>N,N</i> -diisopropylphosphoramidit 71a	148
8.9.2.3.3	Darstellung von (<i>S,S</i>)-bis-(α -Methylbenzyl)- <i>N,N</i> -diisopropylphosphoramidit 72a	149
8.9.2.3.4	Darstellung von bis-(4-Acetoxybenzyl)- <i>N,N</i> -diisopropylphosphoramidit 50a	150
8.9.2.3.5	Darstellung von bis-(α -Methoxycarbonylmethylbenzyl)- <i>N,N</i> -diisopropylphosphoramidit 57a	151
8.9.2.4	Synthese der substituierten bis-(Benzyl)- <i>N,N</i> -diethylphosphoramidite 52b und 60b	151
8.9.2.4.1	Darstellung von bis-(2-Acetoxybenzyl)- <i>N,N</i> -diethylphosphoramidit 52b	151
8.9.2.4.2	Darstellung von bis-(α -Methoxycarbonylmethyl-4-acetoxybenzyl)- <i>N,N</i> -diethylphosphoramidit 60b	152
8.9.2.5	AAV 2 zur Kupplung der Phosphoramidite 50a , 57a sowie 70a – 72a mit d4T 39	153
8.9.2.5.1	Darstellung von bis-(Benzyl)-d4TMP 27	153
8.9.2.5.2	Darstellung von bis-(2-Acetoxybenzyl)-d4TMP 31	154
8.9.2.5.3	Darstellung von bis-(4-Acetoxybenzyl)-d4TMP 30	155
8.9.2.5.4	Darstellung von (<i>R,R</i>)-bis-(α -Methylbenzyl)-d4TMP 25	156
8.9.2.5.5	Darstellung von (<i>S,S</i>)-bis-(α -Methylbenzyl)-d4TMP 26	157
8.9.2.5.6	Darstellung von bis-(α -Methoxycarbonylmethylbenzyl)-d4TMP 28	158
8.9.2.5.7	Darstellung von bis-[4-Acetoxybenzyl-(α -methoxycarbonylmethyl)]-d4TMP 29	160
8.10	<i>Synthese der Monosaccharidmonophosphat-Triester</i>	163
8.10.1	Synthese der Glycosylpyranosen	163

8.10.1.1	Darstellung von 1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -acetyl-D-mannopyranosid 76	163
8.10.1.2	Darstellung von 1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -acetyl-D-glucopyranosid 77	164
8.10.1.3	Darstellung von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-mannopyranose 78	164
8.10.1.4	Darstellung von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-D-glucopyranose 79	165
8.10.1.5	Darstellung von Levulinsäureanhydrid 80	166
8.10.1.6	Darstellung von 1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -levulinyl-D-mannopyranosid 82	167
8.10.1.7	Darstellung von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -levulinyl-D-mannopyranose 83	167
8.10.1.8	Darstellung von 1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -benzoyl- α -D-mannopyranosid 85	168
8.10.1.9	Darstellung von 1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -benzoyl-D-glucopyranosid 86	169
8.10.1.10	Darstellung von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -benzoyl- α -D-mannopyranose 87	170
8.10.1.11	Darstellung von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -benzoyl-D-glucopyranose 88	171
8.10.1.12	Darstellung von 1- <i>O</i> -Allyl- α -D-mannopyranosid 89	172
8.10.1.13	Darstellung von 1- <i>O</i> -Allyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> - <i>para</i> -methoxybenzyl- α -D-mannopyranosid 90	172
8.10.1.14	Darstellung von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> - <i>para</i> -methoxybenzyl-D-mannopyranose 91	174
8.10.1.15	Darstellung von 1- <i>O</i> -Allyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -tetrahydropyranyl-D-mannopyranosid 92	175
8.10.1.16	Darstellung von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -tetrahydropyranyl-D-mannopyranose 93	175
8.10.1.17	Darstellung von 6- <i>O</i> -Dimethoxytrityl-D-mannopyranose 94	176
8.10.1.18	Darstellung von 6- <i>O</i> -Dimethoxytrityl-1,2,3,4-tetra- <i>O</i> -acetyl-D-mannopyranosid 95	177
8.10.1.19	Darstellung von 1,2,3,4-Tetra- <i>O</i> -acetyl-D-mannopyranosid 96	178
8.10.2	AAV 3 zur Darstellung der cyclischen Saligenylchlorphosphate	178
8.10.2.1	Darstellung von Saligenylchlorphosphan 97a	179
8.10.2.2	Darstellung von 3-Methylsaligenylchlorphosphan 97b	180
8.10.2.3	Darstellung von 5- <i>t</i> -Butylsaligenylchlorphosphan 97d	180
8.10.3	AAV 4 zur Darstellung der <i>cyclo</i> Saligenyl-Monosaccharidmonophosphate	181
8.10.3.1	Darstellung von <i>cyclo</i> Saligenyl-tetra- <i>O</i> -acetyl-	

	α -D-mannopyranosyl-1-phosphat 32aI	181
8.10.3.2	Darstellung von 3-Methyl- <i>cyclo</i> Saligenyl-tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-mannopyranosyl-1-phosphat 32bI	183
8.10.3.3	Darstellung von 5-Chlor- <i>cyclo</i> Saligenyl-tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-mannopyranosyl-1-phosphat 32cI	184
8.10.3.4	Darstellung von 3,5-Di- <i>t</i> butyl- <i>cyclo</i> Saligenyl-tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-manno-pyranosyl-1-phosphat 32eI	185
8.10.3.5	Darstellung von 5- <i>t</i> Butyl- <i>cyclo</i> Saligenyl-tetra- <i>O</i> -levulinyl- α -D-manno-pyranosyl-1-phosphat 32dIII	186
8.10.3.6	Darstellung von <i>cyclo</i> Saligenyl-tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-glucopyranosyl-1-phosphat 33aI	187
8.10.3.7	Darstellung von 3-Methyl- <i>cyclo</i> Saligenyl-tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-glucopyranosyl-1-phosphat 33bI	188
8.10.3.8	Darstellung von 5- <i>t</i> Butyl- <i>cyclo</i> Saligenyl-tetra- <i>O</i> -benzoyl- α -D-manno-pyranosyl-1-phosphat 32dII	189
8.10.3.9	Darstellung von 5- <i>t</i> Butyl- <i>cyclo</i> Saligenyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzoyl- α -D-glucopyranosyl-1-phosphat 33dII	190
8.10.3.10	Darstellung von <i>cyclo</i> Saligenyl-tetra- <i>O</i> -acetyl-D-mannopyranosyl-6-phosphat 36a	191
8.10.3.11	Darstellung von 3-Methyl- <i>cyclo</i> Saligenyl-tetra- <i>O</i> -acetyl-D-mannopyranosyl-6-phosphat 36b	192
8.10.3.12	Darstellung von 5-Chlor- <i>cyclo</i> Saligenyl-tetra- <i>O</i> -acetyl-D-mannopyranosyl-6-phosphat 36c	193
8.10.3.13	Darstellung von bis-(<i>para</i> -Acetoxybenzyl)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-D-mannopyranosyl-1-phosphat 34	194
8.10.3.14	Darstellung von bis-(<i>ortho</i> -Acetoxybenzyl)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-mannopyranosyl-1-phosphat 35	195
8.10.4	Darstellung der Referenzsubstanz 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-D-mannopyranosyl-1-phosphat 99 in Form des Triethylammoniumsalzes	196

8.10.4.1	Darstellung von bis-(Benzyl)- <i>N,N</i> -diethylphosphoramidit 70b	196
8.10.4.2	Darstellung von bis-(Benzyl)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-D-mannopyranosyl-1-phosphat 105	197
8.10.4.3	Darstellung von 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-D-mannopyranosyl-1-phosphat 99 in Form des Triethylammoniumsalzes	198
9	Literaturverzeichnis	199
10	Gefahrstoffverzeichnis	215

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	4-Acyloxybenzyl
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
arom.	aromatisch
AZT	3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin
Äquiv.	Moläquivalente
Bu	Butyl
Bz	Benzoyl
CC ₅₀	cytotoxische Konzentration
CDCl ₃	Deuteriochloroform
CEM/0	Lymphozytenzellstamm (Wildtyp)
CEM/TK ⁻	Lymphozytenzellstamm (Thymidin-Kinase defizient)
<i>cyclo</i> Sal	<i>cyclo</i> -Saligenyl
δ	chemische Verschiebung (NMR)
D ₂ O	Deuteriumoxid
d	Dublett
dd	Doppeldublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin („Hünigs-Base“)
DMAP	4,4'-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimethylsulfoxid (sechsfach deuteriert)
DMTr	4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EC	Enzyme Commission
EC ₅₀	effektive Konzentration
EE	Essigsäureethylester

ESI	Elektronenspraymassenspektrometrie
Gluc	Glucose
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
Hz	Hertz
<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
k	Geschwindigkeitskonstante
konz.	konzentriert
μL	Mikroliter
Lev	Levulinyll
m	Multipllett
M	Molekülmasse
Man	Mannose
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass (Matrix-unterstützte Laser-Desorptions Ionisations Massenspektrometrie)
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mmol	Millimol
mM	millimolar
mRNA	Botenribonucleinsäure (messenger RNA)
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
NMP	Nucleosidmonophosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NRTI	Nucleosidischer RT-Inhibitor
pH	negativer dekadische Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
pMb	para-Methoxybenzyl
Ph	Phenyl
ppm	parts per million

q	quartär
R	Rest (chemische Gruppe)
<i>ribo</i>	ribosyl
RNA	Ribonucleinsäure
RP-HPLC	Reversed Phase-HPLC (Umkehrphasen-HPLC)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
s	Singulett
SATE	S-Acyl-2-thioethyl
<i>sek</i>	sekundär
SG	Schutzgruppe
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
<i>tert</i>	tertiär
t_R	Retentionszeit
T	Thymin
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyranyl
TrCl	Triphenylmethylchlorid
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenanteile
wäss.	wässrig

1 EINLEITUNG

Die Chemie der Naturstoffe war schon immer ein wichtiger Zweig bei der Synthese von Wirkstoffen.

Zu den vier großen Naturstoffklassen zählen neben den Proteinen und Lipiden die Nucleinsäuren und Kohlenhydrate. Den beiden letztgenannten Klassen kommen dabei unterschiedlichste Aufgaben zu.

Kohlenhydrate erfüllen einfache, aber ebenso essentielle Funktionen beispielsweise als Stütz- und Gerüstsubstanzen in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren (Cellulose, Proteoglycane, Chitin) als schnell mobilisierbare Energiequelle (Stärke, Glycogen) oder als Gerüstsubstanz der RNA und DNA (D-Ribose bzw. 2-Desoxy-D-ribose). Wesentlich diffizilere Funktionen erfüllen Saccharidstrukturen in Form komplexer Glycokonjugate als Bestandteil nahezu aller Zellen,¹ an deren Oberfläche sie vielfältige Prozesse vermitteln wie beispielsweise die interzelluläre Kommunikation,^{2,3,4} die Ankopplung von Viren und Bakterien,^{5,6} die Einschleusung von Toxinen⁷ sowie das Auslösen zellinterner Vorgänge durch Enzyme oder Hormone. Zu den Glycokonjugaten⁸ zählen neben den Glycolipiden die Glycoproteine (Abb. 1) deren fehlerhafte Biosynthese beispielsweise zu einer schwerwiegenden Stoffwechselerkrankung namens CDG-Syndrom (Congenital Disorders of Glycosylation) führen kann.⁹

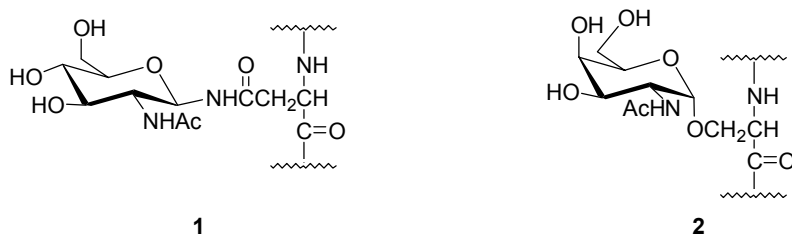


Abb. 1: Glycoproteine, 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose *N*-glykosidisch verknüpft mit L-Asparagin-säure **1**; 2-Acetamido-2-deoxy-D-galactose *O*-glykosidisch verknüpft mit L-Serin oder L-Threonin **2**

Nucleinsäuren sind lineare Polymere von Nucleotiden, deren Phosphat-Reste die 3'- und 5'-Positionen aufeinanderfolgender Zuckerreste verbinden.¹⁰ Nucleinsäuren unterteilen sich in zwei Klassen, wobei die DNA als Träger der Erbinformation fast aller zellulärer Lebensformen deren Transkription und Replikation während der Zellteilung, die RNA in Form der m-RNA und der rRNA an der Translation beteiligt ist.¹¹ Bei Viren der Klasse 4 ist die RNA und nicht die DNA der Träger der Erbinformation, es handelt sich um Retroviren.¹²

Das bekannteste Retrovirus ist das HI-Virus (human immunodeficiency virus), das die Immunschwächekrankheit AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrom) auslöst.¹³ Zur HIV-Therapie werden einige Analoga der Nucleoside eingesetzt, so das AZT **3**, ein naher Verwandter des Thymidins.¹⁴

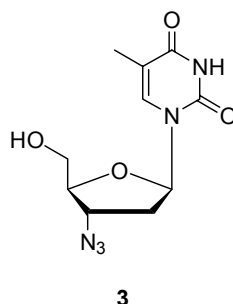


Abb. 2: 3'-Azidothymidin (AZT) **3**

Mit wachsenden molekularbiologischen und genetischen Kenntnissen ist es möglich geworden, neue Strategien zur Bekämpfung von genetischen Defekten oder Krankheiten zu entwickeln. Zuerst wird der Wirkstoff selbst gezielt entwickelt, dieses wird unter dem Begriff Wirkstoffdesign zusammengefaßt. Manchmal ist es möglich, die Wirksamkeit durch verhältnismäßig einfache, chemische Modifizierung noch zu erhöhen.

Der Trend in der Entwicklung neuer chemischer Substanzen zielt darauf ab, eine verbesserte Wirkung durch eine erhöhte Selektivität für den jeweiligen Wirkort zu erreichen.

1.1 Prolog

Unerläßlich ist das Verständnis der vielfältigen biologischen Prozesse zum Design und einer selektiveren Freisetzung eines Wirkstoffes. Bemerkenswert bei Stoffwechselprozessen und Biosynthesen ist die phosphorylierte Form der meisten Metaboliten, die somit für Wirkstoffe, die direkt am Metabolismus teilhaben, ebenfalls notwendig wird. Nur wenige Ausnahmen sind bekannt, in denen Substrat-geeignete Kinasen vorliegen.

Die immense Relevanz der Phosphatgruppen zeigt sich einerseits an ihrer maßgeblichen Beteiligung an der Energetik des Stoffwechsels und zum anderen am Verbleib der Metaboliten in den Zellen bzw. ihrer Kompartimente. Um ein besseres Verständnis der genannten Aspekte zu erreichen, wird nun auf die Komplexität des Metabolismus detaillierter eingegangen.

Definitionsgemäß ist der Stoffwechsel ein Gesamtprozeß, durch den lebende Systeme die zur Ausübung ihrer verschiedenen Funktionen benötigte Freie Enthalpie G erhalten.

Chemotrophe Organismen erlangen ihre Freie Enthalpie durch die Oxidation organischer Verbindungen (Kohlenhydrate, Lipide, Proteine), wobei diese meistens über zwischengeschaltete exergonische Reaktionen von energiereichen Phosphatverbindungen wie Adenosintriphosphat (ATP) **4** mit endergonischen Reaktionen gekoppelt ist. Folglich sind Stoffwechselwege stark exergonisch, d.h. sie gehen mit negativen Änderungen der Freien Enthalpie ΔG einher. Diese Triebkraft gewährleistet vollständig ablaufende Reaktionen und somit deren Irreversibilität.

LIPMANN und KALCKAR erkannten bereits 1941 die zentrale Bedeutung von ATP **4** (Abb. 3) im Energiestoffwechsel, das aus einer Adenosin-Einheit besteht, an die über eine Phosphatesterbindung eine Kette aus drei Phosphorylgruppen gebunden ist. Letztere sind untereinander durch zwei Phosphoanhydridbindungen verknüpft.

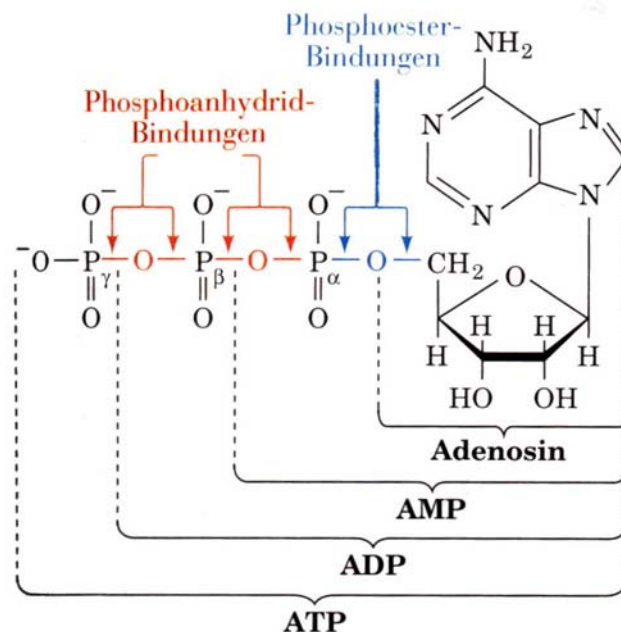


Abb. 3: Struktur von ATP **4**

Im Gegensatz zu anderen Säureanhydriden haben Phosphoanhydridbindungen ungewöhnlich große Freie Aktivierungsenthalpien, weshalb ATP **4** unter physiologischen Bedingungen relativ stabil ist, allerdings in enzym-katalysierten Reaktionen leicht hydrolysiert. Beispielhaft ist die durch Hexokinase katalysierte Bildung von Mannose-6-phosphat angeführt, dem ersten Schritt des Mannose-Stoffwechsels. (Abb. 4)

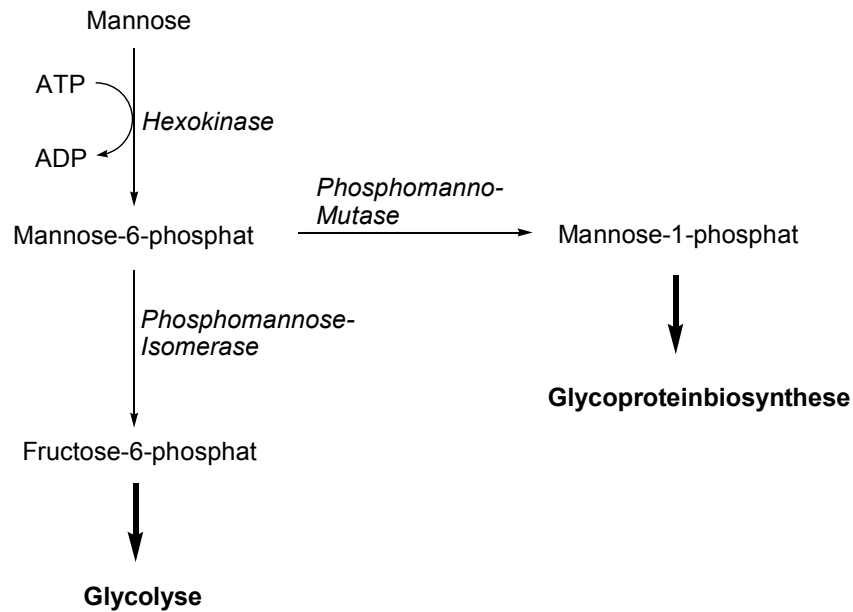


Abb. 4: Bedeutung von ATP im Mannose-Stoffwechsel

Mannose-6-phosphat wird anschließend entweder zu Fructose-6-phosphat mittels einer Phosphomannose-Isomerase isomerisiert und somit in die Glycolyse eingeschleust oder es wird Mannose-1-phosphat mit Hilfe einer Phosphomannose-Mutase gebildet, das bei der Biosynthese von Glycoproteinen eine Rolle spielt.

Der energiereiche Charakter der Phosphoanhydridbindungen begründet sich erstens auf ihre niedrigere Resonanzstabilisierung, zweitens auf die destabilisierende Abstoßung zwischen den geladenen Gruppen und drittens auf die geringere Solvatationsenergie, jeweils im Vergleich zu den Hydrolyseprodukten zu sehen. Die Tragweite des hohen Phosphorylgruppenübertragungspotentials von ATP 4 läßt sich beispielhaft an der Biosynthese der RNA demonstrieren (Abb. 5). Benötigte Nucleosidtriphosphate werden durch Phosphorylierung der entsprechenden Monophosphate erhalten, folglich werden energiereiche Phosphorylgruppen übertragen. Bedeutung gewinnt dieser Umstand bei der Biosynthese, in dessen Verlauf die Monophosphate unter Freisetzung von Pyrophosphat in den RNA-Strang eingebaut werden. Somit erhält der Entropieterm der Gibbs-Helmholtz-Gleichung

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

ein positives Vorzeichen.

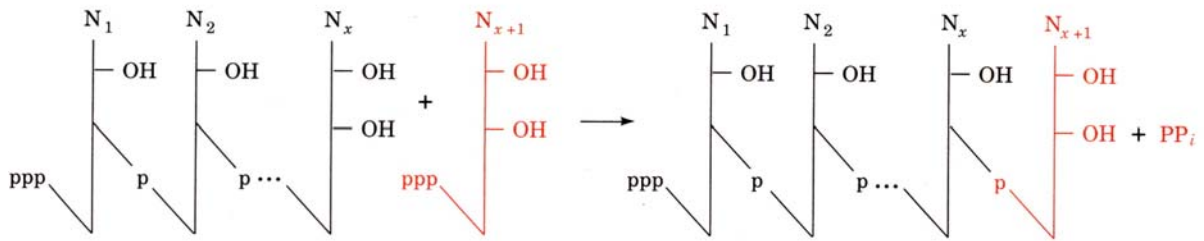


Abb. 5: Bedeutung der Phosphorylgruppen am Beispiel der Nucleosidtriphosphate

Kompensierend wirkt sich die Hydrolyse des energiereichen Pyrophosphats aus, so dass die Änderung der Enthalpie ΔH einen negativen Term darstellt und derart gekoppelte Reaktionen insgesamt exergonisch verlaufen.

Des Weiteren werden in Eukaryontenzellen die Metaboliten in spezifischen membranbegrenzten subzellulären Kompartimenten synthetisiert. Die sie umgebende Plasmamembran (Abb. 6) ist hochselektiv und reguliert auf diese Weise das Zellvolumen, den intrazellulären pH-Wert und die intrazelluläre Ionenzusammensetzung, um ein günstiges Milieu für enzymatische Aktivitäten zu schaffen. Biologische Membranen bestehen neben Glycolipiden, Cholesterin (nur in Eukaryonten), integralen und peripheren Membranproteinen, hauptsächlich aus Phospholipiden.

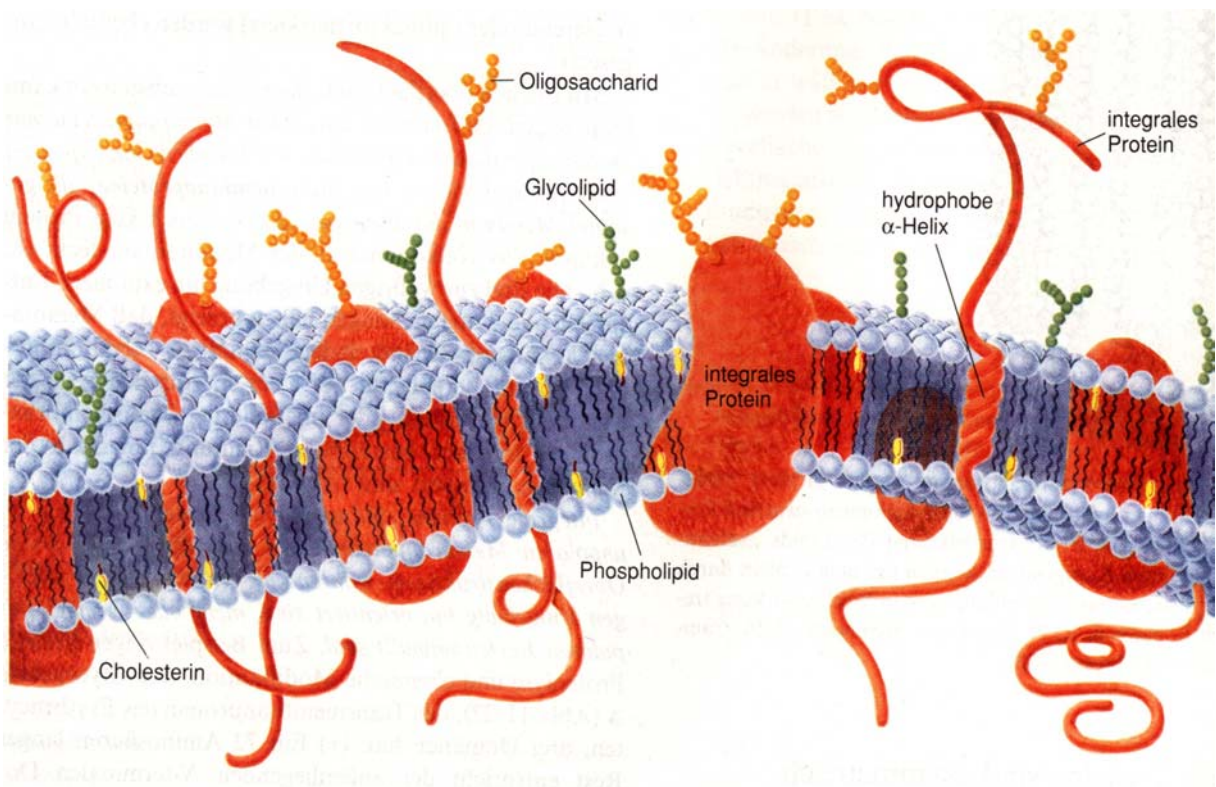


Abb. 6: Schematischer Aufbau einer Zellmembran

Der amphipathische Charakter dieser Bestandteile führt im *self-assembly* zur Ausbildung einer geschlossenen bimolekularen Schicht, der Lipiddoppelschicht. Diese stabilisiert sich sowohl durch hydrophobe Kräfte und van-der-Waals-Anziehungskräfte als auch durch elektrostatische Bindungen und Wasserstoffbrücken zwischen den polaren Köpfen und den Wassermolekülen der Umgebung. Lipiddoppelschichten sind daher für Ionen und damit für die meisten phosphorylierten Metaboliten nicht permeabel.

1.2 Phosphorylierte Wirkstoffe

Therapeutische Ansätze greifen z.T. direkt in Stoffwechselprozesse ein, indem beispielsweise Analoga körpereigener Substanzen oder Stoffe, die der Körper aufgrund genetischer Defekte nicht selbst synthetisieren kann, verabreicht werden sollen. Oft müssen derartige Wirkstoffe als Monophosphate appliziert werden, damit diese überhaupt im Metabolismus akzeptiert werden. Phosphorylierte Wirkstoffe besitzen zum einen als ionische Moleküle eine zu geringe Lipophilie, um in Ermangelung geeigneter Transportproteine Membranen passiv zu passieren, und zum anderen dephosphorylieren Phosphatasen und unspezifische Nucleotidasen die Verbindungen im Blutkreislauf, wodurch sie im Organismus nur geringfügig verfügbar sind. Wünschenswert ist daher ein Carrier-System, das die Phosphatgruppe des Wirkstoffs maskiert, demzufolge enzymatischen Angriffen auf dem Weg zur Membran standhält, diese ungehindert passiert und abschließend selektiv gespalten wird.

1.3 Das Prodrug-Konzept

Substanzen, die Wirkstoffe maskieren, wurden 1958 erstmals von ALBERT als Prodrugs bezeichnet.¹⁵ Pharmakologisch inaktive Verbindungen werden durch eine Reaktion in aktive Wirkstoffe metabolisiert. Die Aktivierung kann vor, während und nach der Aufnahme oder idealerweise erst am spezifischen Wirkort im Körper erfolgen.

An Prodrugs werden verschiedene Bedingungen gestellt, deren Zusammenspiel über eine erfolgreiche Freisetzung entscheidet:

- Ausreichende Hydrophilie, um im Blutserum gelöst zu werden,
- ausreichende Stabilität, um den Wirkort zu erreichen,
- ausreichende Lipophilie, um die Zellmembran passieren zu können

und abschließend darf die abgespaltene Maske nicht toxisch sein, wobei die Abspaltung selbst entweder enzymatisch oder hydrolytisch induziert wird.¹⁶

Im Wesentlichen wird zwischen zwei- und dreiteiligen Prodrug-Systemen unterschieden. Das Zwei-Komponenten-Prodrug (Abb. 7) maskiert den Wirkstoff durch nur einen lipophilen Carrier, somit liegt dieser zunächst in seiner geschützten, biologisch inaktiven Form vor und wird erst durch spontane oder enzymatische Abspaltung der Maske in seiner aktiven Form freigesetzt.¹⁷

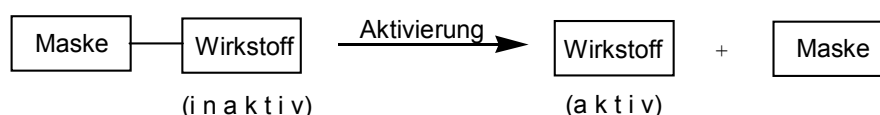


Abb. 7: Zwei-Komponenten-Prodrug-Systeme

Hingegen enthält ein dreiteiliges Prodrug-System (Abb. 8) ein zusätzliches Brückenglied, das die Maske mit dem Wirkstoff verbindet,¹⁸ auch in diesem Fall liegt der Wirkstoff in seiner inaktiven Form vor. Die Maske wird in zwei voneinander abhängigen Schritten abgespalten, die erste Maske wird durch eine chemisch oder enzymatisch induzierte Reaktion abgespalten, wodurch wiederum die Abspaltung der zweiten Maske aktiviert wird und der biologisch aktive Wirkstoff freigesetzt wird.

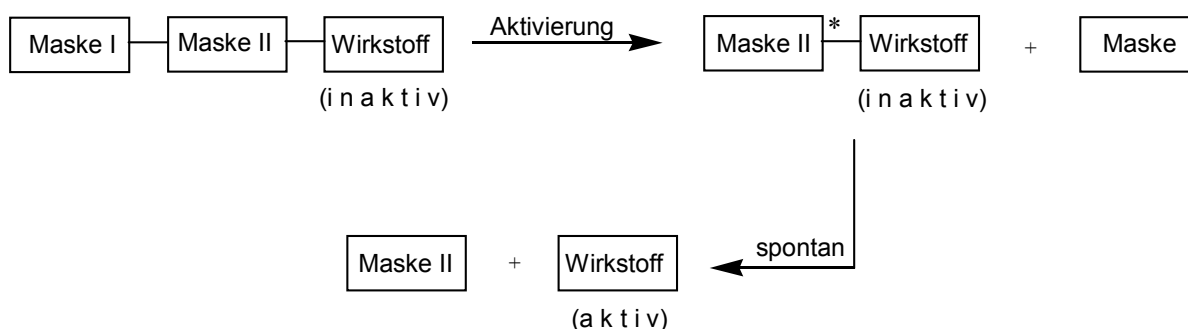


Abb. 8: Drei-Komponenten-Prodrug-Systeme

Formal stellen phosphorylierte Wirkstoffe Phosphorsäuremonoester dar (Abb. 9), wobei unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen dem Monoanion und dem Dianion vorliegt ($pK_A1 \sim 1.6$ und $pK_A2 \sim 6.6$).¹²⁹

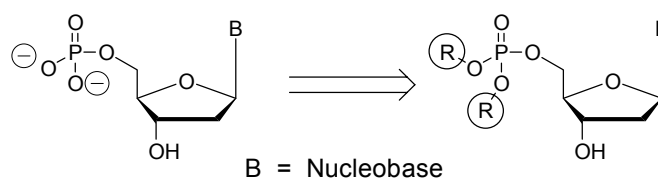


Abb. 9: Vom Nucleotid zum Pro-Nucleotid

Diese gilt es mit Alkoholen zu maskieren und in neutrale, membrangängige Phosphat-Triester zu überführen. Für die selektive Freisetzung des Wirkstoffes ist es unerlässlich, zwischen den drei Esterbindungen zu unterscheiden. Dabei muß die Nucleosylesterbindung selektiv diskriminiert und die Esterbindungen der Maske bevorzugt gespalten werden. Instrumentarium zur Diskriminierung stellen die unterschiedlichen elektronischen und sterischen Eigenschaften der eingesetzten Alkohole dar.

Aus der Literatur sind Prodrug-Konzepte für Carbonsäuren,^{19,20} Phosphonate,²¹ Inositole^{22,23} und Nucleotide²⁴ bekannt, letztere, die sog. Pro-Nucleotid-Konzepte werden im Folgenden vorgestellt.

1.3.1 Pro-Nucleotid-Konzepte

Chronologisch betrachtet sind die Dialkylphosphat-Triester zuerst zu nennen, bei diesem Zwei-Komponenten-Prodrug bleibt die Hydrolyse auf der Stufe des stabilen Phosphor-Diesters aufgrund der negativen Ladung, die eine weitere chemische oder enzymatische Reaktion verhindert, stehen. Daher wird der biologisch aktive Wirkstoff nicht freigesetzt.²⁵ Erfolgreicher sind dagegen die neueren Drei-Komponenten-Prodrugs, wobei als enzymatisch gesteuerte Vertreter folgende genannt seien:

- bis-(POM)-Nucleotide [bis-(Pivaloyloxymethyl)-]^{26,27}
- bis-(POC)-Nucleotide [bis-(*iso*-Propyloxycarbonyloxymethyl)-]²⁸
- bis-(DTE)-Nucleotide [bis-(Dithioethyl)-]²⁹
- bis-(SATE)-Nucleotide [bis-(S-Acyl-2-thioethyl)-]³⁰
- Aryl-(SATE)-Nucleotide [Aryl-(S-Acyl-2-thioethyl)-]³¹
- bis-(SGTE)-Nucleotide [bis-(S-(β -Glucopyranosidyl)-2-thioethyl)-]³²
- bis-(AB)-Nucleotide [bis-(4-Acyloxybenzyl)-]^{37,39,82}
- APA-Nucleotide [Arylphosphoramidat-]³³
- Phosphoramidatnucleosid-Monoester³⁴
- Phosphoramidatnucleosid-Diester³⁵

All diese enzymatisch gesteuerten Systeme setzen intrazellulär die Monophosphate der in diesem Fall verwendeten Nucleoside bzw. deren Analoga frei. Gemeinsam haben diese Konzepte, dass im ersten Schritt eine Carboxyesterase an der Maske eine Esterbindung spaltet. Die gebildete Hydroxygruppe ihrerseits aktiviert die Maske, wodurch deren spontane Abspaltung eingeleitet wird. Der intermediär auftretende Phosphor-Diester kann die Spaltung der zweiten Phosphatesterbindung insofern behindern, dass dessen negative Ladung die Substrataffinität des Enzyms beeinträchtigt.

1.3.1.1 Das bis-[AB]-Konzept

Das bis-[AB]-Konzept von S. FREEMAN et al. und dessen Weiterentwicklung von A. GLAZIER et al. behandeln diese Problematik ausführlich. Der konzeptionelle Ansatz liegt in einem genügenden Abstand der anionischen Phosphatgruppe des Diesters zum aktiven Zentrum der Carboxyesterase. Diesbezüglich wurde ein rigider Spacer in Form einer Benzylgruppe zwischen den Phosphatester und der primären Spaltstelle eingebracht. Der Hydrolysemechanismus beginnt mit einer enzymatischen Spaltung der Carbonsäureestergruppe der bis-(Acyloxybenzyl)-einheit **5** (Abb. 10). Aufgrund der elektronenschiebenden Wirkung der entstandenen Hydroxylgruppe wird die C_{Benzyl}-O-Bindung in **6** gespalten und ein 4-Hydroxybenzyl-Kation **10** freigesetzt, das entweder direkt mit Wasser zum Hydroxybenzylalkohol **11** reagiert oder zuerst ein Chinonmethid bildet, welches abschließend mit Wasser reagiert.

Bei der Bildung von Chinonmethiden spielt die allgemeine Säure-Base-Katalyse eine bedeutende Rolle. Bei Phenolen wird die Abspaltung von Protonen durch eine diffusionskontrollierte Reaktion gefördert. So ist die Deprotonierung von Phenol um den Faktor $3 \cdot 10^5$ bei physiologischem pH schneller als die Acetylaceton von, trotz der vergleichbaren pK_a-Werte der Verbindungen (pK_A ~ 8.6).⁸²

Neben der Bildung der Chinonmethide ist vor allem deren Verweildauer interessant. Im Phosphatdiester **7** ist die negative Ladung des Phosphats ca. 4 Å, das der Länge eines aromatischen Ringes und einer C-C-Bindung entspricht, von der Spaltstelle der Esterase entfernt. Somit sollte durch nochmaliges Durchlaufen der Esterase-Reaktion sowie spontaner Abspaltung der 4-Hydroxybenzylgruppe das Monophosphat **9** freigesetzt werden.

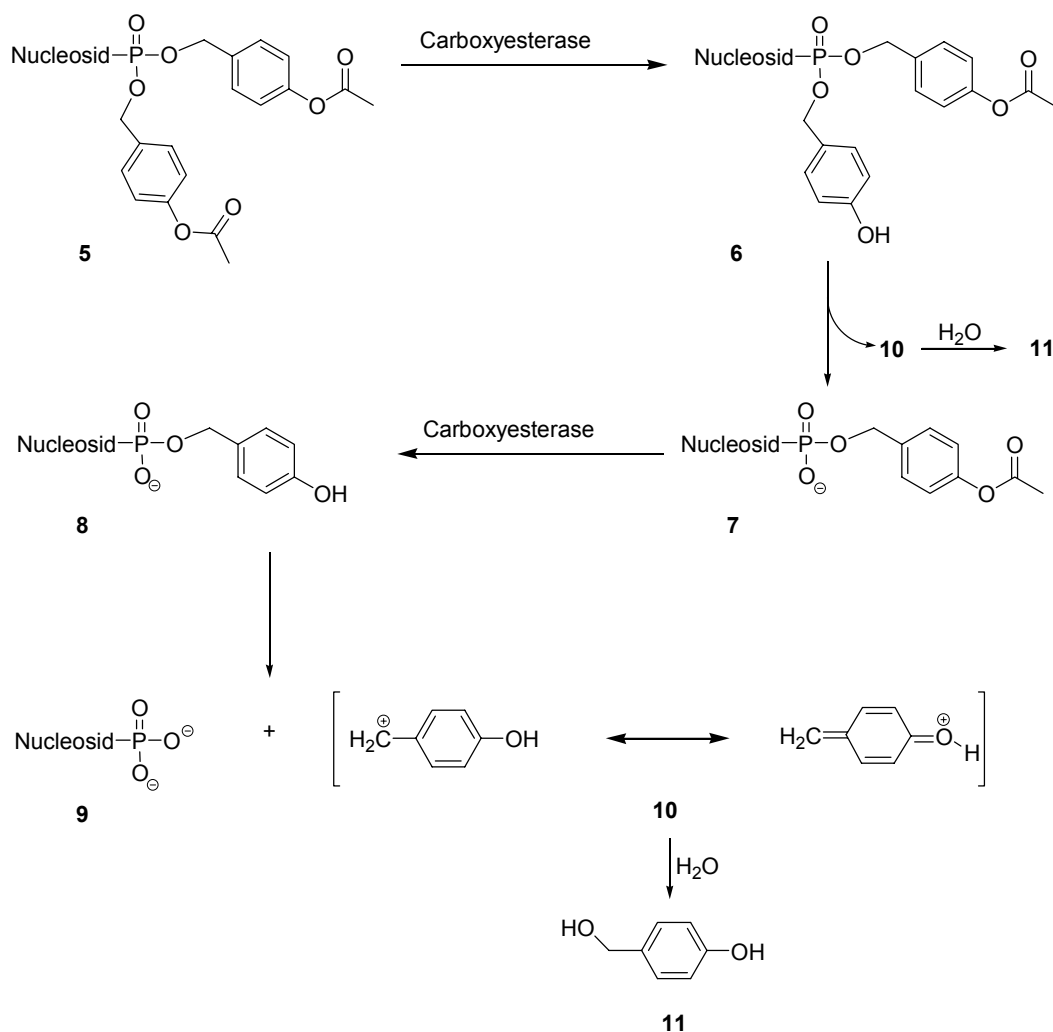


Abb. 10: Hydrolysemechanismus eines bis-[AB]-Nucleosids nach FREEMAN

Problematisch bei diesem Ansatz ist die Bildung des reaktiven Benzyl-Kations **10**, bzw. seiner mesomeren Form, dem Chinonmethid, in unmittelbarer Nachbarschaft zum aktiven Zentrum des Enzyms (Abb. 11). Solche als alkylierende Agentien bekannten Kationen können mit den Seitenarmen der Aminosäuren reagieren. Des Weiteren sind Reaktionen mit zellulären Nucleophilen respektive DNA oder Gluthathion möglich. Die Lebensdauer eines *para*-Chinonmethids hängt entscheidend von den Substituenten in 2- und 6-Position ab. So beträgt die Halbwertszeit $t_{1/2}$ in Phosphatpuffer bei pH 7.3 und 25 °C von 2-Methoxy-*para*-Chinonmethid 1.3 s und die Halbwertszeit von 2,6-Di-*t*butyl-*para*-Chinonmethid 3600 s.³⁶

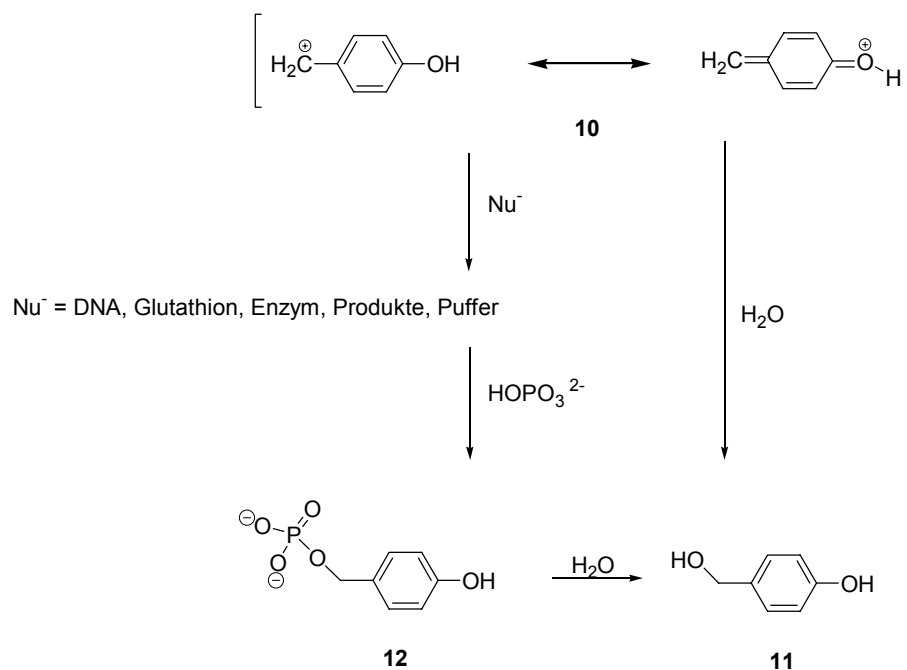


Abb. 11: Postulierter Metabolismus des Chinonmethids

Derartige Nebenreaktionen sind mit von entscheidender Bedeutung für die Toxizität; aus diesem Grunde haben FREEMAN et al. große Anstrengungen unternommen, um den Verbleib des Chinonmethids **10** detailliert zu ergründen. Vorab ist anzumerken, dass das bis-[AB]-Konzept bei der Hydrolyse, die ^1H - und ^{31}P -NMR-spektroskopisch bei pD 8.0 untersucht wurde, Hydroxybenzylalkohol **11**, Acetat und das Monophosphat **9** ($t_{1/2} = 55.4$ h Diester, $t_{1/2} = 153$ h Monoester) freisetzt. Bei derselben Untersuchung verkürzen sich nach Zugabe von Carboxyesterase, die Halbwertszeiten auf 3 min für den ersten und 2 h für den zweiten Schritt.³⁷

Erste Untersuchungen zum Metabolismus des Chinonmethids **10** zeigten, dass dieses zu Beginn der Hydrolyse nur zu 30 % mit Wasser reagiert. Als weitere nucleophile Reaktionspartner kommen das Enzym, weitere Produkte und der Puffer in Betracht. Ein nucleophiler Angriff des Enzyms konnte ausgeschlossen werden, da eine gleichbleibende katalytische Effizienz beobachtet werden konnte. Denkbare elektrophile aromatische Substitutionen³⁸, die zu 3-(*p*-Hydroxybenzyl)-4-hydroxybenzylalkohol führen, wurden NMR-spektroskopisch nicht nachgewiesen.³⁹ Der größte Teil des Chinonmethids **10** reagiert mit dem anorganischen Phosphat zu 4-Hydroxybenzylphosphat **12**, das abschließend zum 4-Hydroxybenzylalkohol **11** ($t_{1/2} = 1$ h) hydrolysiert wird. *In vitro*-Experimente mit bis-(4-Acyloxybenzyl)-AZTMP zeigen antivirale Aktivität gegenüber HIV-1 in verschiedenen Zelllinien, die vergleichbar mit der von AZT **3** ist.^{40,41} Allerdings zeigen die CC_{50} -Daten, dass die Verbindungen um den Faktor 20 toxischer sind als AZT **3**.⁴⁰ Letztendlich bleibt zu

erwähnen, dass FREEMAN et al. in neueren Arbeiten Prodrugs favorisieren, in denen eine 4-Acetoxybenzyl-Maske durch ein weiteres Nucleosidanalogen ersetzt wird, „um in der Hydrolyse nur ein potentiell toxisches Chinonmethid zu generieren“.⁴²

An diesen Daten wird die Toxizität des Chinonmethids deutlich und wie erstrebenswert eine möglichst kurze Verweildauer desselben ist.

Zu diesem Zweck haben GLAZIER et al. einen Methoxycarbonylmethyl-Rest in die Benzylposition der bis-[AB]-Maske eingeführt (Abb. 12).

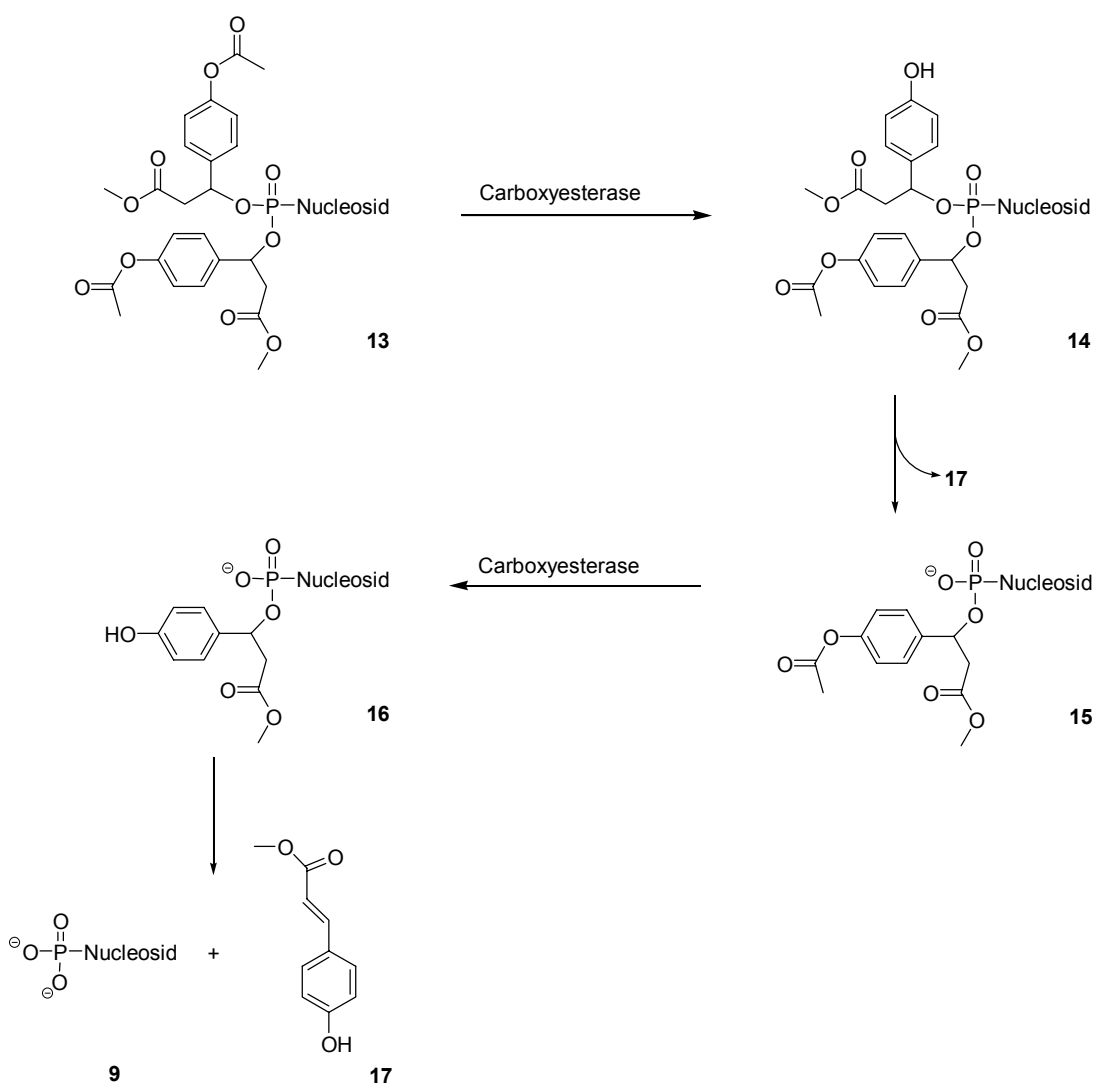


Abb. 12: Hydrolysemechanismus eines bis-[AB]-Nucleosids nach GLAZIER

Die Freisetzung des Monophosphats **9** verläuft über die gleiche Carboxyesterase vermittelte Aktivierung wie oben dargestellt, nur werden die abgespaltenen Benzylderivate nicht mehr über eine nucleophile Abfangreaktion nach einem S_N1-Mechanismus, sondern durch eine Eliminierungsreaktion 1. Ordnung abgebaut.

Die Methoxycarbonylmethylgruppe als Akzeptor in Benzyl-Stellung ermöglicht die Protonabspaltung in α -Stellung zur Carbonylgruppe zum Einen durch das Absenken der Gesamtelektronendichte, zusätzlich wird die Abspaltung durch die Resonanzstabilisierung des Intermediats gefördert. Als dritten Effekt vereinfacht der Akzeptor durch eine allgemeine basenkatalysierte Tautomerisierung die Bildung des Eliminierungsproduktes *p*-Hydroxyzimtsäuremethylester **17** (Abb. 13). Insgesamt ist somit ein nucleophiler Angriff des Solvents oder anderer Nucleophile langsamer als die Eliminierung eines Protons in Nachbarschaft zur Benzylgruppe, so dass auch von einem "fleeting Chinonmethid" gesprochen wird.

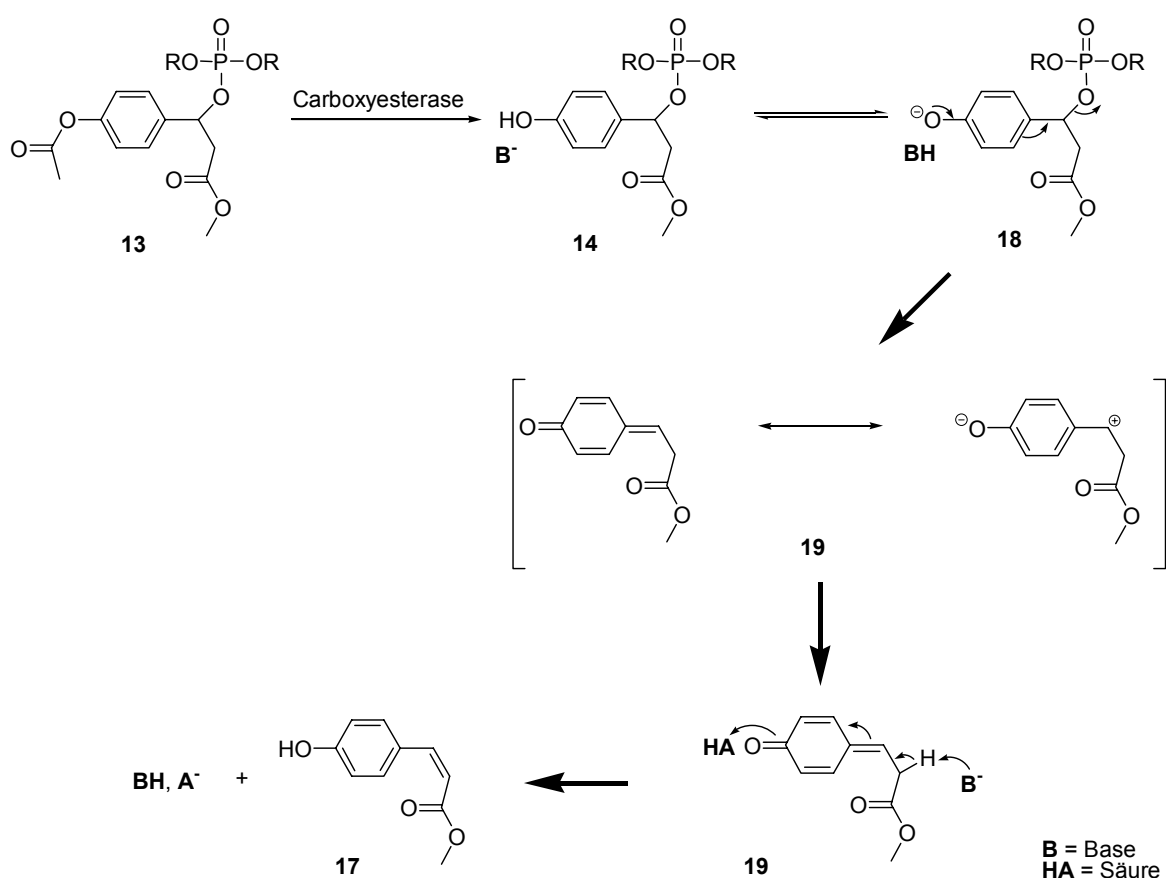


Abb. 13: Postulierter Mechanismus der Eliminierung

GLAZIER et al. konnten mit bis-(*p*-Acetoxy- α -methoxycarbonylmethylbenzyl)acyclovir monophosphat als Modellkomponente in ^1H - und ^{31}P -NMR-Experimenten nachweisen, dass neben Methanol, Essigsäure und Acyclovirmonophosphat die *p*-Hydroxyzimtsäure (aus *p*-Hydroxyzimtsäuremethylester **17**) gebildet wurde, nachdem die Verbindung 2 h mit Schweineleberesterase inkubiert worden war. In weiteren Experimenten wurde nachgewiesen, dass auch dieses erweiterte bis-[AB]-Konzept nur in Anwesenheit von Carboxyesterasen zur

Freisetzung der gewünschten Monophosphate **9** befähigt ist. Nachdem der gedanklich konzipierte Freisetzungsmechanismus faktisch bewiesen wurde, gilt ein besonderes Interesse der Toxizität derartiger Prodrugs. Untersuchungen mit der oben genannten Modellkomponente zeigten bei *in vitro*-Tests eine begrenzt verbesserte antivirale Aktivität in einer Vielzahl von Zelllinien gegenüber Acyclovir, dafür aber ebenso keine toxischen Wirkungen ($CC_{50} > 100 \mu\text{M}$). Bei *in vivo*-Tests von Mäusen gegen Herpes Simplex Virus I (HSV I) liegt die maximal tolerierte Dosis über 100 mg/kg Körpergewicht und somit ungefähr 1000-fach höher als die örtlich aufgenommene Wirkstoffdosis in therapeutischen Untersuchungen.⁸² Bei Neurotoxizitätstests mit AZT **3** als Wirkstoff konnten in Mäusen bei einer Prodruggabe von 300 mg/kg Körpergewicht keinerlei Nebenwirkungen festgestellt werden. Nachteilig könnten sich die sehr kurzen Halbwertszeiten der Verbindungen ($t_{1/2} = 16$ min; gemessen in Phosphatpuffer pH 7.3 nach Zugabe von Schweineleberesterase) bei der Applikation auswirken.⁴⁰

Unbestreitbarer Nachteil bei enzymatisch angesteuerten Prodrug-Konzepten ist eben diese Abhängigkeit vom aktivierenden Enzym, da die Freisetzung des Wirkstoffes lediglich in Zellen gelingt, die über dieses Enzym verfügen.

1.3.1.2 Das *cycloSal*-Konzept

Einen Ausweg stellt das 1996 von C. MEIER entwickelte dreiteilige *cycloSal*-Konzept dar (Abb. 14). Durch die Einführung der unterschiedlich stabilen Phenyl-^{43,44} Benzyl-⁴⁵ und Alkylphosphatester in die *cycloSal*-Grundstruktur gelingt es chemisch zwischen den einzelnen Phosphatesterbindungen zu diskriminieren und somit in einer gekoppelten Hydrolyse die Schwierigkeiten der chemischen bzw. oft auch der enzymatischen Hydrolyse der intermediär gebildeten Phosphat-Diester zu umgehen.⁴⁶ Das *cycloSal*-Konzept basiert auf einem einzigen Aktivierungsschritt, um das Monophosphat **9** freizusetzen.

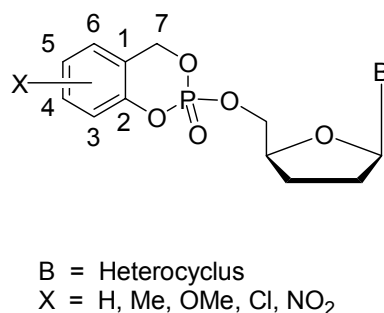


Abb. 14: Grundstruktur eines *cycloSal*-Nucleotids mit der Numerierung der Kohlenstoffatome

Grundlegend für das Design einer bidenten Maske, die zur Phosphatgruppe eines Wirkstoffs sowohl eine Phenyl- als auch eine Benzylester-Bindung ausbildet, waren Untersuchungen von bis-(Phenyl)- bzw. bis-(Benzyl)-phosphat-Triestern. Beide Systeme hydrolysieren lediglich bis zum Phosphat-Diester aber auf unterschiedlichen Hydrolysewegen. So wird die Spaltung der bis-(Phenyl)-phosphat-Triester durch einen nucleophilen Angriff eines Hydroxidions auf das Phosphoratom eingeleitet. Nach dem Bruch der Phenylphosphatesterbindungen trägt die Phosphatgruppe des Diesters eine negative Ladung, die einen weiteren nucleophilen Angriff verhindert. Die Hydrolyse des Diesters wird gestoppt.⁴⁷

Im Fall der bis-(Benzyl)-phosphat-Triester wird die Hydrolyse durch einen spontanen Benzyl-C-O-Bindungsbruch eingeleitet (Abb. 15). Das entstandene Benzyl-Kation reagiert mit Wasser zu Benzylalkohol ab. Die Spaltung der zweiten Benzylphosphatesterbindung findet nicht statt. Die negative Ladung der Phosphatgruppe des Diesters blockiert das Monophosphat als Austrittsgruppe zu fungieren.⁴⁵

Die gewünschten benzyllischen und phenylischen Eigenschaften der Maske zeichnen den Salicylalkohol **24** als Prototyp aus. Die Maske wird allein durch eine pH-abhängige chemische Reaktion gespalten, die auf einem selektiven Kaskadenmechanismus basiert. Als labilster Ester in **20** wird zuerst der Phenylester zum 2-Hydroxybenzylphosphat-Diester **21** gespalten, bedingt durch die Möglichkeit der negativen Ladung am Sauerstoff durch den aromatischen Ring Mesomerie-stabilisiert zu werden. Die alternativ denkbare Spaltung zum 2-Hydroxymethylphenylphosphat-Diester **23** ist wegen des Phosphatrestes (Akzeptor-Substituent) in *ortho*-Position zum Benzylester unwahrscheinlich, da Akzeptor-Substituenten am Aromaten die Hydrolyse extrem verlangsamen.⁴⁵ Im ersten Schritt wird folglich der Phenylester selektiv gespalten, wodurch der zur Benzylgruppe *ortho*-stehende Akzeptor (Phosphat) in einen Donor-Substituenten umgewandelt wird. Das Ergebnis dieser Umpolung ist die Aktivierung zur spontanen Spaltung des Diesters **21**.⁴⁵ Das Monophosphat **9** wird freigesetzt und ebenso der Salicylalkohol **24** (Tandem-Reaktion).

Die Hydrolysegeschwindigkeit der *cycloSal*-phosphat-Triester läßt sich durch verschiedene Substituenten am aromatischen System steuern, so bewirken Akzeptor-Substituenten in *para*- und *ortho*-Stellung eine Stabilisierung des Phenolatanions. Folglich erhöht sich die Reaktionsgeschwindigkeit. Darüber hinaus kann durch Substituenten in Benzylposition nicht nur die Hydrolysegeschwindigkeit sondern auch das Produktverhältnis beeinflußt werden. Es kommt zur Bildung von Phenylphosphatdiestern, wobei Benzyl-Substituenten, die eine positive Ladung am Benzyl-Kohlenstoffatom stabilisieren können die heterolytische Benzyl-C-O-Fragmentierung begünstigen. Hingegen ist die Bildung von Phenylphosphatdiestern bei

Benzyl-Substituenten, die die positive Ladung nicht stabilisieren können, wie bei Chlormethylgruppen, auf vergrößerte Ringspannungseffekte zurückzuführen. Derartige Effekte werden auch durch den elektronischen Beitrag des Arylsystems, welcher entsprechend seines Substituenten variiert, überlagert.⁵⁷

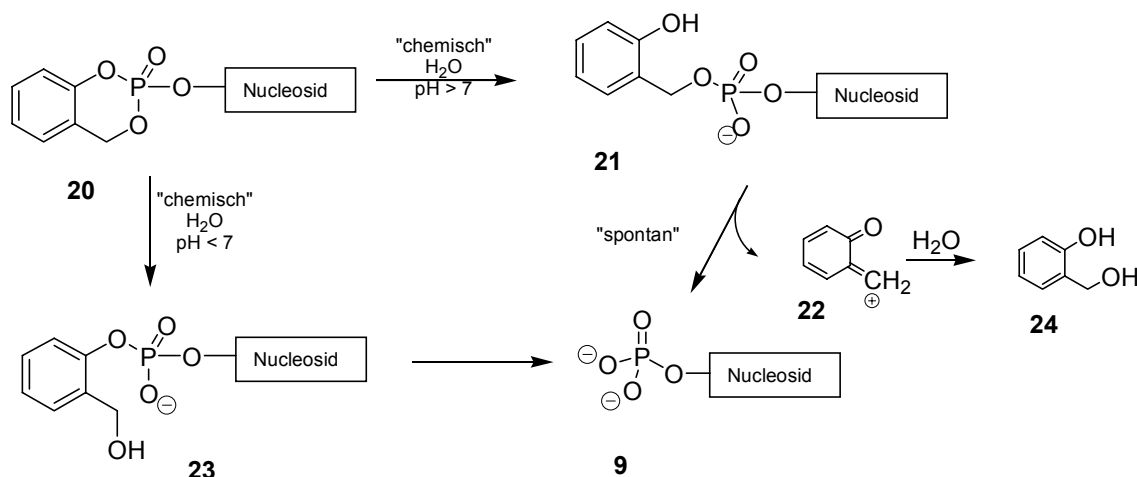


Abb. 15: Postulierter Hydrolysemechanismus von *cycloSal*-NMP **20**

Der Hydrolysemechanismus wurde sowohl NMR- als auch massenspektrometrisch detailliert aufgeklärt. Die chemische Hydrolyse von *cycloSal*-d4TMP- (TK-Bypass)⁴⁸ oder *cycloSal*-ddAMP-Derivaten⁴⁹ zeigte den ausschließlichen Abbau zum Nucleotid und die Bildung des entsprechenden Salicylalkohols. Darüber hinaus wurden Metabolismus-Studien mit Tritium-markierten *cycloSal*-Nucleotiden durchgeführt.^{50,51} Das *cycloSal*-Prodrug-Konzept wurde erfolgreich bei antiviralen *in vitro*-Tests angewandt. Bei Hydrolysestudien wurde für die *cycloSal*-d4TMPs **20** eine Korrelation zwischen ihrer Struktur und der biologischen Aktivität gefunden: Je stärker die Elektronendonorfähigkeit des Substituenten am Aromaten ist, desto besser ist die antivirale Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 in CEM/0 Zellen. Die 3- und 5-Methyl- genauso wie 3,5-Dimethyl-*cycloSal*-d4TMP weisen in Wildtyp-Zelllinien sogar eine höhere Aktivität (0.09 μ M) als das Nucleosid d4T **39** (0.18 μ M).⁵² Das *cycloSal*-Konzept konnte ebenso auf einige anti-Herpesvirus aktive Nucleosidanaloga wie ACV übertragen werden.⁵³ Durch den Einsatz von *cycloSal*-BVDUMPs wurden die Einsatzgebiete des Nucleosidanalogs drastisch erweitert. Während BVDU selbst gegen den Epstein-Barr-Virus (EBV) inaktiv ist, zeigen die entsprechenden *cycloSal*-Phosphattriester eine sehr gute Aktivität gegen EBV.⁵⁴ Die Cytotoxizität von *cycloSal*-d4TMP-Verbindungen liegt in der gleichen Größenordnung wie die von d4T **39** (56 μ M). Zusätzlich wurde das Endprodukt der Hydrolyse, der Salicylalkohol **24** getestet; es wurde kein cytotoxischer Effekt festgestellt.

(> 250 μM).⁵⁵ Die Unbedenklichkeit der intrazellulären Freisetzung von Salicylalkohol zeigt ebenso das Präparat Assalix[®]. Der Wirkstoff, dieses als Antirheumatikum und Analgetikum verabreichten Medikaments ist Salicin (2-(Hydroxymethyl)phenyl- β -D-glucopyranosid), welches im Körper durch eine β -Glucosidase zum Salicylalkohol metabolisiert wird.⁵⁶ Quelle der toxischen Effekte könnte das im zweiten Schritt intermediär gebildete Chinonmethid **22** sein. Mit Wasser reagiert das Intermediat zum Salicylalkohol **24**; doch sind entsprechend dem oben Dargestellten auch nucleophile Angriffe auf das sich in diesem Fall ausbildende "*ortho*-Chinonmethid" **22** vorstellbar. Herausragend ist im Gegensatz zu fast allen anderen Prodrug-Systemen die Freisetzung nur einer Maskeneinheit (Chinonmethid), wodurch das Verhältnis zwischen Wirkstoff und Maske auf 1:1 reduziert wird.

Abschließend bleibt festzustellen, dass die Ursachen der Cytotoxizität noch nicht vollständig geklärt sind. Von großer Bedeutung ist es somit, die Prodrug-Systeme durch Substituenten geschickt zu variieren, um durch Hydrolysestudien vertiefende Kenntnis der Mechanismen zu erlangen.

Ein weiteres Arbeitsfeld zeigt die Effektivität der Prodrug-Konzepte auf; sie gestattet einen breitgefächerten therapeutischen Einsatz phosphorylierter Wirkstoffe.

2 AUFGABENSTELLUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollen auf der einen Seite vertiefende Untersuchungen zum Hydrolyseverhalten von modifizierten bis-(Benzyl)- und bis-[AB]-nucleotidmonophosphaten durchgeführt werden, um weitere Hinweise zur mechanistischen Interpretation des Hydrolyseweges zu erlangen. Auf der anderen Seite sollen Pro-Nucleotid-Konzepte erstmals zur Freisetzung von Glycosyl-1-phosphaten herangezogen werden.

Untersuchungen an benzyl-funktionalisierten *cycloSal*-Verbindungen zeigten ein abweichendes Hydrolyseverhalten, indem verstärkt der unerwünschte Phenylphosphat-Diester **23** gebildet wurde.⁵⁷ Im ersten Teil der Arbeit soll daher untersucht werden, inwieweit Substituenten in der Benzylposition von acyclischen Pro-Nucleotid-Verbindungen deren Hydrolyse beeinflussen. Zu diesem Zweck sollen die bis-(Benzyl)-Verbindungen durch Donor- und Akzeptor-Substituenten in der Benzylposition modifiziert werden (Abb. 16).

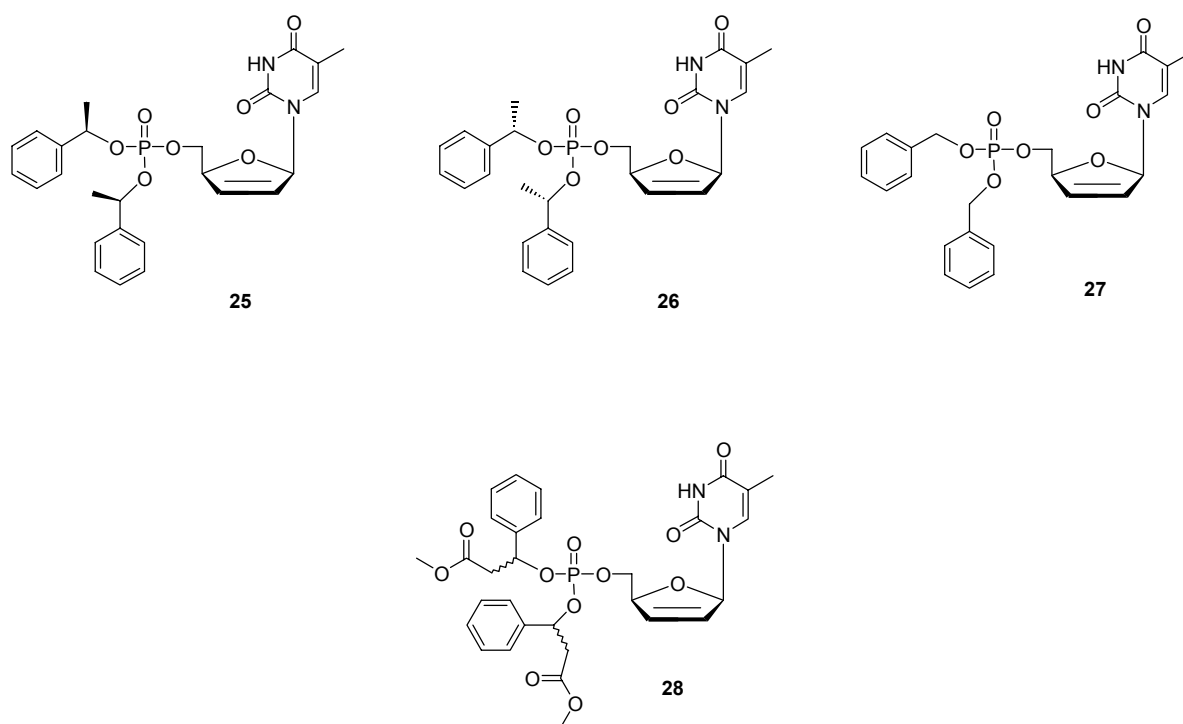


Abb. 16: Modifizierte bis-(Benzyl)-Verbindungen

In diesem Rahmen soll auch ein bis-[*o*-AB]-Triester **31** synthetisiert werden, der das Verbindungsglied zwischen dem *cycloSal*- und dem acyclischen bis-[AB]-Konzept darstellt (Abb. 17).

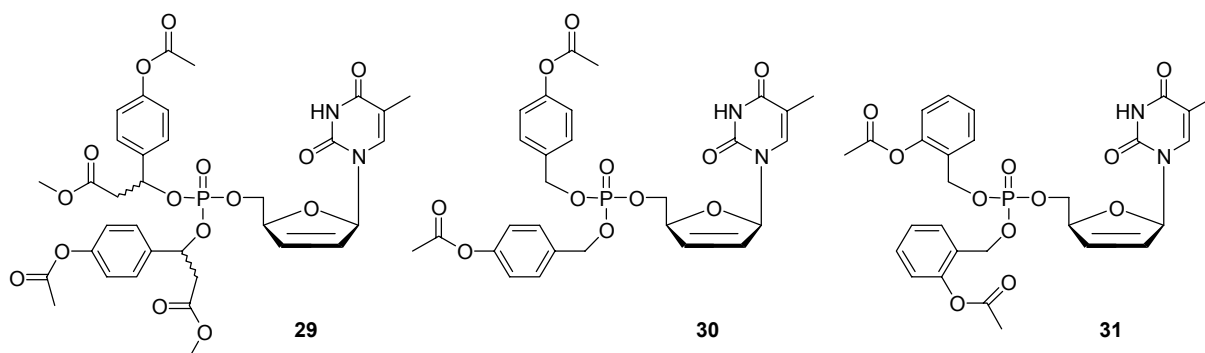
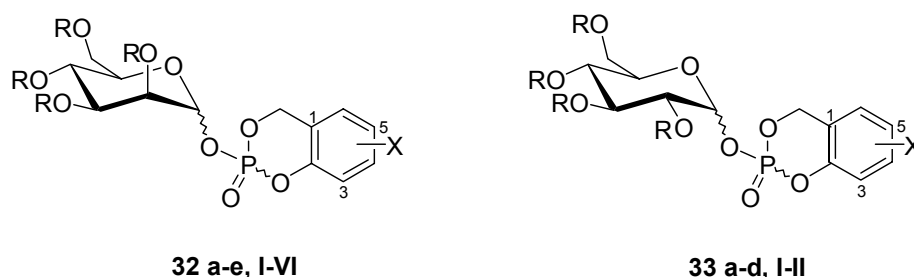


Abb. 17: bis-[AB]-Verbindungen nach GLAZIER **29** bzw. FREEMAN **30** und die bis-[o-AB]-Verbindung **31**

Anschließend sollen die Hydrolysehalbwertszeiten in Phosphatpuffer und in Zellextrakten bei pH 7.3 getestet werden. Die Hydrolyseprodukte sollen durch ^{31}P -Spektroskopie identifiziert werden. Abschließend sollen in Zelltests die anti-HIV-Aktivität und der Einfluß der Hydrolyseneigenschaften auf die Wirksamkeit der Prodrugs getestet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen die Prodrug-Konzepte von S. FREEMAN und C. MEIER erstmalig auf Glycosylmonophosphate angewendet werden. Der therapeutische Ansatz ist die Stoffwechselkrankheit CDG (Congenital Disorder of Glycosylation); bedingt durch einen genetischen Defekt steht Phosphomannomutase 2 (PMM 2) nicht zur Verfügung, wodurch die Umwandlung von Mannose-6-phosphat in Mannose-1-phosphat beeinträchtigt ist. Dieses wird als CDG-Ia-Syndrom bezeichnet.

Es sollen sowohl *cycloSal*-Triester von Mannose-1-phosphat **32a-e, I-VI** dargestellt werden, die verschiedene Substituenten im aromatischen Ring tragen, als auch deren epimeren *gluco*-Analoga **33a-d, I-II**, um einen möglichen Einfluss des Nachbargruppeneffektes auf den Freisetzungsmechanismus zu untersuchen (Abb. 18).



R = Ac (I); Bz (II); Lev (III); THP (IV); *p*Mb (V); H (VI)

X = H (a); 3-Me (b); 5-Cl (c); 5-*tert*Butyl (d); 3,5-Di-*tert*butyl (e)

Abb. 18: *cycloSal*-Mannose-1-phosphate **32a-e, I-VI** und *cycloSal*-Glucose-1-phosphate **33a-d, I-II**

Des Weiteren sollen bis-[AB]-Triester von Mannose-1-phosphat synthetisiert werden (Abb. 19).

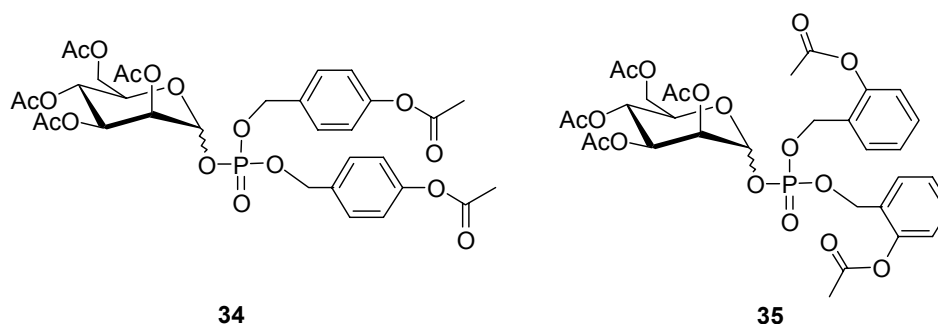
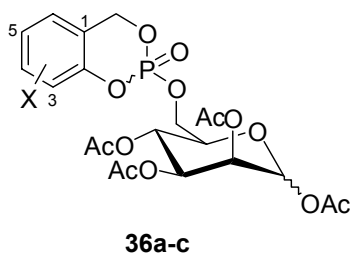


Abb. 19: bis-[AB]-Mannose-1-phosphate **34**, **35**

Aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu den *cycloSal*-5'-Nucleosidmonophosphaten sollen für vergleichende Untersuchungen *cycloSal*-Mannose-6-phosphate **36a-c** dargestellt werden (Abb. 20).



X = H (**a**); 3-Me (**b**), 5-Cl (**c**)

Abb. 20: *cycloSal*-Mannose-6-phosphate **36a-c**

Von Interesse sind vor allem die Übertragbarkeit des Hydrolyseverhaltens der Systeme, worüber im Rückschluss hilfreiche Hinweise für den Freisetzungsmechanismus der Mannose-1-phosphate denkbar wären.

In allen Fällen soll das Schutzgruppenmuster des Glycons derart gewählt werden, dass eine Entschützung vor *in vitro*-Tests klassisch oder enzymatisch erfolgt bzw. intrazellulär enzymatisch.

Die Hydrolysehalbwertszeiten der Verbindungen sollen in isotonischen Phosphatpuffer bei pH 7.3 gemessen und die Hydrolyseprodukte identifiziert werden. Dies soll durch Massenspektrometrie und die ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse geschehen. Darüber hinaus soll die biologische Aktivität an PMM-defizienten Zellen *in vitro* getestet werden.

Erster Teil

3 SYNTHESE, UNTERSUCHUNGEN UND MECHANISTISCHE INTERPRETATION ZUM HYDROLYSEVERHALTEN VON BIS-[AB]-NUCLEOTIDEN

3.1 Kenntnisstand

3.1.1 Das HI-Virus

Das HI-Virus, das die Immunschwächekrankheit AIDS auslöst, wurde vor zwanzig Jahren von MONTAGNIER et al. isoliert und charakterisiert.^{58,59,60} Es unterteilt sich in zwei Familien, HIV-1 (Vorkommen in Nordamerika, Europa und Nordafrika) und HIV-2 (Vorkommen vor allem in Asien), die ihrerseits in Subtypen gegliedert werden.

Weltweit sind schätzungsweise 42 Millionen Menschen infiziert und bereits 20 Millionen Menschen gestorben,⁶¹ vor allem in Ländern der Dritten Welt hat die Ausbreitung von HIV bedrohliche Ausmaße angenommen, die die Volkswirtschaft dieser Länder in den nächsten Jahren nachhaltig in Mitleidenschaft ziehen wird. In den westlichen Industrienationen kommt es trotz vielfältiger Aufklärungskampagnen weiterhin zu Neuinfektionen, deren Bekämpfung mit antiviralen Medikamenten durchgeführt wird. Die folgende Tabelle 1 gibt eine Übersicht der in der HIV-Therapie verwendeten Präparate.⁶²

Tabelle 1: Übersicht der handelsüblichen antiviralen Medikamente

Name	Wirkstoff	Hersteller
Retrovir [®]	2',3'-Didesoxy-3'-azidothymidin (AZT) 3	GlaxoSmithKline
Videx [®]	2',3'-Didesoxyinosin (ddI) 37	Bristol-Meyers Squibb
Hivid [®]	2',3'-Didesoxycytidin (ddC) 38	Hoffmann-La Roche
Zerit [®]	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T) 39	Bristol-Meyers Squibb
Ziagen [®]	Abacavir (ABC) 40	GlaxoSmithKline
Epivir [®]	L-2',3'-Didesoxy-3'-thiacytidin (3TC) 41	GlaxoSmithKline

3.1.2 Der Replikationszyklus des HI-Virus

Beim retroviralen HI-Virus transkribiert die reverse Transkriptase (RT) die genetische Information des Virus, die in Form von RNA vorliegt in komplementäre DNA.

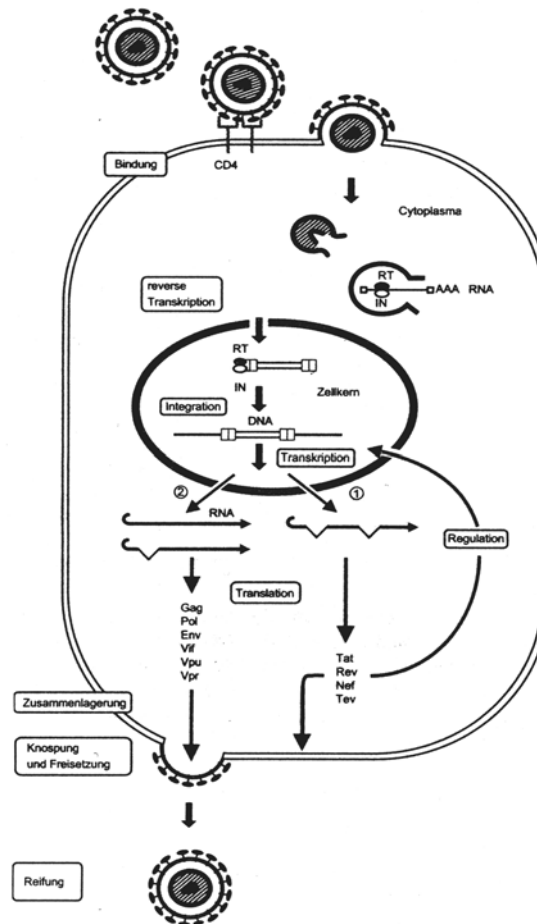


Abb. 21: Retroviraler Replikationszyklus⁶³

HIV befällt in der Regel CD4-positive Zellen, hierbei handelt es sich um Zellen, die den Oberflächenrezeptor CD4 tragen, z.B. T-Helferzellen des Immunsystems. Im ersten Schritt bindet das Virus über den äußeren Teil seines Glycoproteinkomplexes an CD4, woraufhin die Virushülle mit der Zellmembran verschmilzt. Das nun in der Zelle vorliegende RNA-Genom des Virus (in Abb. 21 mit dem typischen Poly-A-Tail dargestellt) wird durch die RT in doppelsträngige komplementäre DNA transkribiert. Nach Eindringen des Transkripts in den Zellkern wird dieses mit Hilfe der viralen Integrase (IN) in das Genom der Wirtszelle integriert. Es folgt die Transkription der proviralen DNA durch die RNA-Polymerase II der Wirtszelle, die zunächst zur Bildung mehrfach gespleißter mRNAs führt (Schritt 1 in Abb. 21). Die Translation dieser mRNAs liefert die regulatorischen Proteine Tat, Rev, Nef und Tev, deren Import in den Zellkern eine Amplifikation der Transkription und die Bildung

ungespleißter und einfach gespleißter mRNAs bewirkt (Schritt 2 in Abb. 21). Die Translation dieser mRNA-Stränge im Cytosol führt nunmehr zur Bildung der viralen Strukturproteine, die sich an der Cytoplasmamembran mit den als Virusgenom dienenden mRNAs zusammenlagern. Auf diese Weise kommt es zur Knospung und Freisetzung noch unreifer Viruspartikel von der Zelloberfläche. Die Reifung zu infektiösen Partikeln erfolgt anschließend durch die Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine durch die virale Protease.⁶³ Da die RT des HI-Virus verhältnismäßig fehlerhaft arbeitet (ca. 1 Fehler auf 2000 Nucleotide), zeigt HIV eine stark erhöhte Mutationsrate. Bei dem HI-Virus handelt es sich daher um ein hochvariables Virus, so dass die Entwicklung eines Impfstoffes bisher nicht gelungen ist und sich auch zukünftig als sehr schwierig gestalten wird.

3.1.3 Ansätze der HIV-Therapie

Therapeutische Ansätze sind dahingehend entwickelt worden, die Vermehrung des Virus selektiv zu blockieren. Einerseits wird versucht die viruseigene Protease zu hemmen und somit die Bildung neuer virulenter Viruspartikel zu verhindern. Andererseits wird das virale Enzym Reverse Transkriptase inhibiert. Daraus ergeben sich sechs therapeutische Ansatzpunkte:

- ◆ Die Blockade des Glycoproteins gp 120 der Virushülle soll die Bindung von HIV an den CD4-Rezeptor unterbinden.
- ◆ Die Inhibierung der RT soll die Bindung von DNA aus der viralen RNA verhindern.
- ◆ Eine Hybridisierung der mRNA mit Antisense-Oligonucleotiden soll die Translation unterbinden.
- ◆ Die Bildung von Triple-Helices kann eine Transkription der DNA in virale mRNA verhindern.
- ◆ Protease-Inhibitoren sollen die Proteinsynthese hemmen.
- ◆ Eine weitere Möglichkeit stellt die Kombinationstherapie mit gleichzeitiger Applikation von RT- und Protease-Inhibitoren dar.

Interessant ist die bereits angewendete RT-Inhibition, da hierdurch gezielt ein virusspezifischer Vorgang gestört wird, der aber gleichzeitig für die Wirtszelle bedeutungslos ist. Im folgenden sind die in der HIV-Therapie eingesetzten RT-Inhibitoren vorgestellt:

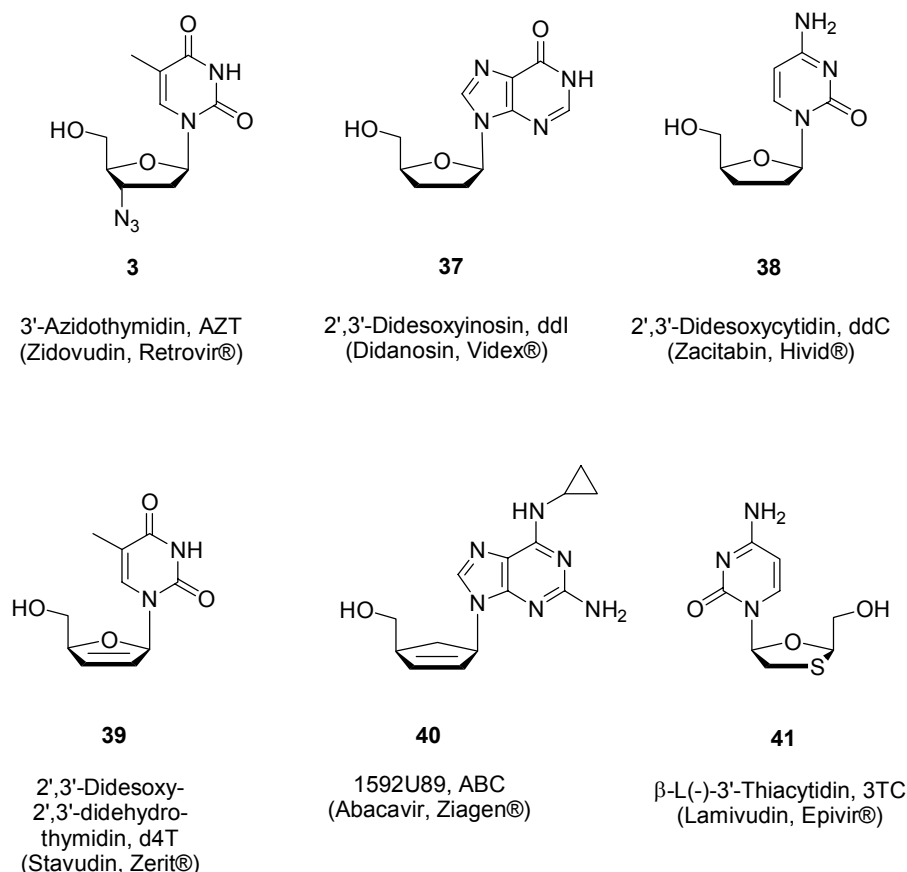
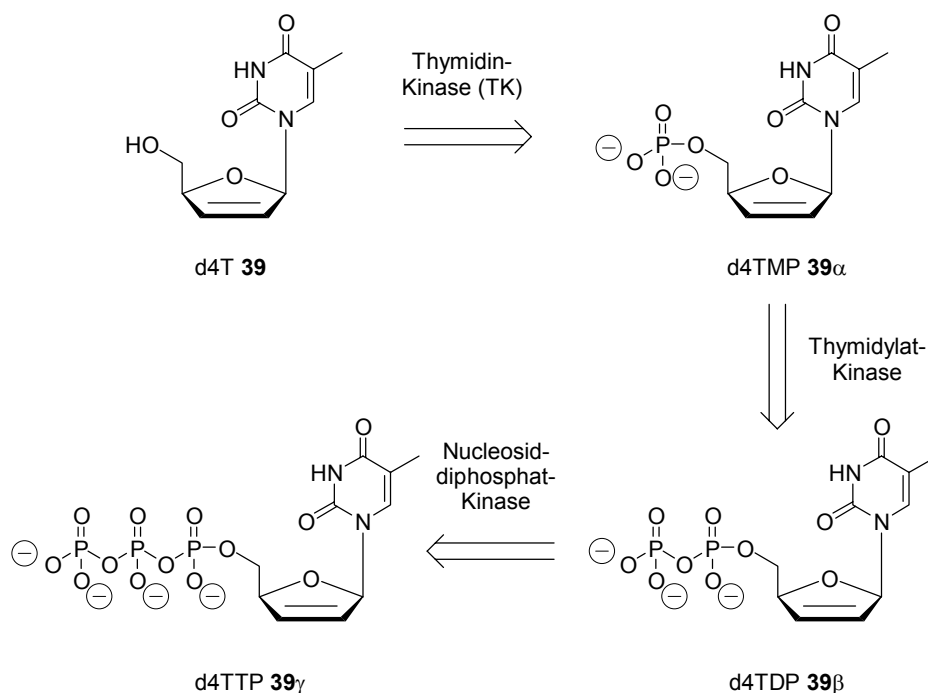


Abb. 22: Nucleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI)

Bei den nucleosidischen RT-Inhibitoren handelt es sich im allgemeinen um Nucleosidanaloga. So leiten sich beispielsweise AZT **3** und d4T **39** vom natürlichen 2'-Desoxythymidin (dT) ab, ddI **37** ist ein Analogon des 2'-Desoxyinosins (dI), ddC **38** hingegen ist ein Analogon des 2'-Desoxycytidins (dC). Das ABC **40** stellt ein Basen-modifiziertes carbocyclisches Purin-Nucleosid dar, das 3TC **41** ein Glycon-modifiziertes L-Cytidin.

Allen RT-inhibierenden Nucleosidanaloga ist gemein, dass sie keine 3'-Hydroxygruppe besitzen. Werden sie also in einen entstehenden DNA-Strang eingebaut, kann keine weitere Elongation in 3'-Richtung erfolgen. Die Transkription wird an dieser Stelle abgebrochen. Im Gegensatz zur RT besitzen die körpereigenen DNA-Polymerasen ein „Proof-reading“-System, verwirklicht unter anderem durch die 3'→5'-Exonucleaseaktivität der δ- und ε-DNA-Polymerasen. Dieses System erkennt und eliminiert fälschlich eingebaute Nucleosid-Analoga aus den DNA-Strängen.

Zum Einbau in den DNA-Strang müssen Nucleosid-Analoga entsprechend den natürlichen Nucleotiden zu aktiven Triphosphaten metabolisiert werden (Abb. 23). Dies geschieht durch zelleigene Kinasen, die auch die natürlichen Nucleoside phosphorylieren.

Abb. 23: Metabolisierung von d4T **39**

Insgesamt müssen drei Phosphorylierungsreaktionen katalysiert werden (Abb. 24): d4T **39** wird von der zellulären Thymidin-Kinase (TK), einem Enzym des „salvage pathways“ für Thymidin, zunächst zum 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidinmonophosphat (d4TMP) **39**_α phosphoryliert. Dieses wird durch die Thymidylat-Kinase zum 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidindiphosphat (d4TDP) **39**_β umgesetzt. Eine unspezifische Nucleosiddiphosphat-Kinase katalysiert schließlich die Reaktion vom d4TDP **39**_β zum biologisch aktiven 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidylattriphosphat (d4TTP) **39**_γ.

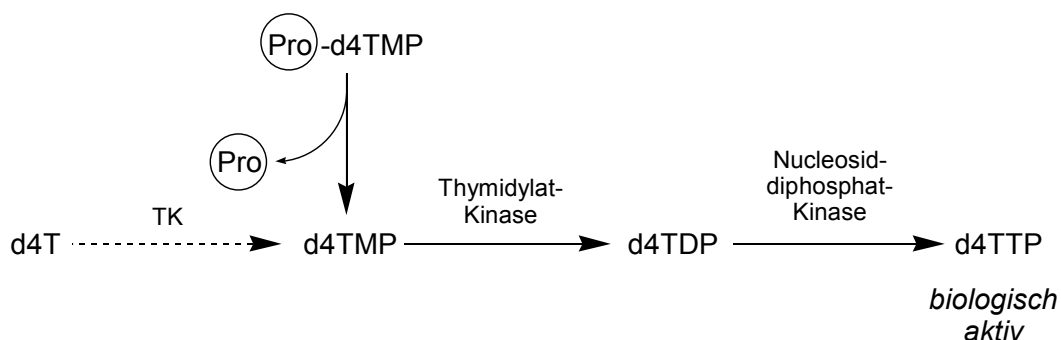


Abb. 24: Schema des TK-Bypass-Konzeptes

Aufgrund der Substratspezifität der beteiligten Kinasen können die Phosphorylierungsschritte für die Nucleosid-Analoga gehemmt sein.⁶⁴ Für d4T **39** läßt sich feststellen, dass insbesondere die erste Phosphorylierung durch die Thymidin-Kinase nur sehr langsam abläuft, wohingegen

die nachfolgenden Reaktionen praktisch keine Beeinträchtigung der enzymkinetischen Parameter aufweisen. Somit stellt d4T **39** ein Nucleosid-Analogon dar, das erstens in seiner monophosphorylierten Form eine therapeutische Wirksamkeit aufweist (TK-Bypass Abb. 24). Zweitens ist es im Gegensatz zu anderen Nucleosid-Analoga, wie z.B. das säurelabile ddI **37**,⁶⁵ unproblematischer bei der Applikation. Für die Untersuchungen hinsichtlich des Hydrolyseverhaltens modifizierter bis-(Benzyl)-Verbindungen wurde daher d4T **39** als freizusetzendes Nucleosidanalogon ausgewählt.

3.2 Synthesen

Initiiert wurden die folgenden Arbeiten durch die Beobachtung, dass Substituenten in der Benzylposition von *cycloSal*-d4TMP einen immensen Einfluss auf das Hydrolyseverhalten besitzen. So kam es sowohl zu einer deutlich verkürzten Hydrolysehalbwertszeit als auch zur Bildung von Konkurrenzprodukten (Abb. 25). An die Seite der primären Spaltung der Phenylphosphatesterbindung durch einen nucleophilen Angriff auf das Phosphoratom war die Spaltung der Benzylphosphatesterbindung getreten, die der Freisetzung von d4TMP **39α** entgegensteht (Kap. 1.3.1.2, S.14).

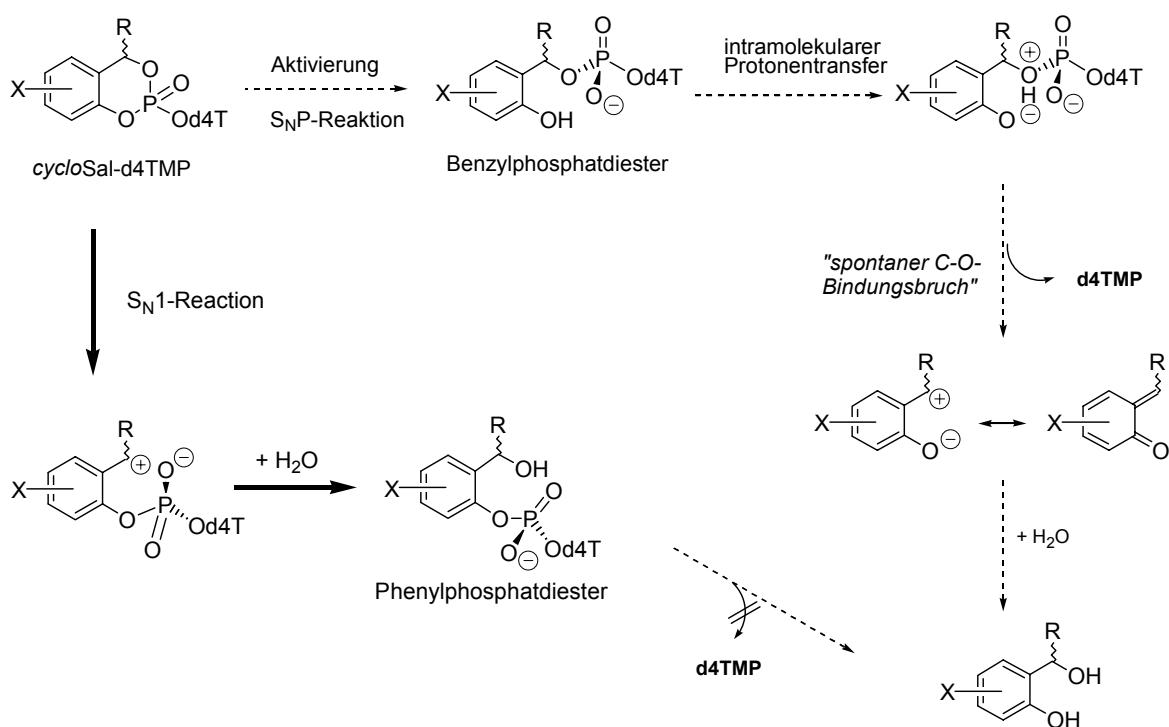


Abb. 25: Hydrolysemechanismus benzyloxy-substituierter *cycloSal*-d4TMP

Um das Phänomen des erweiterten Hydrolysemechanismus detaillierter untersuchen zu können, sollten in dieser Arbeit sieben acyclische bis-(Benzyl)-phosphat-Triester **25-31** synthetisiert und auf ihre Hydrolyseprodukte hin untersucht werden (Abb. 26).

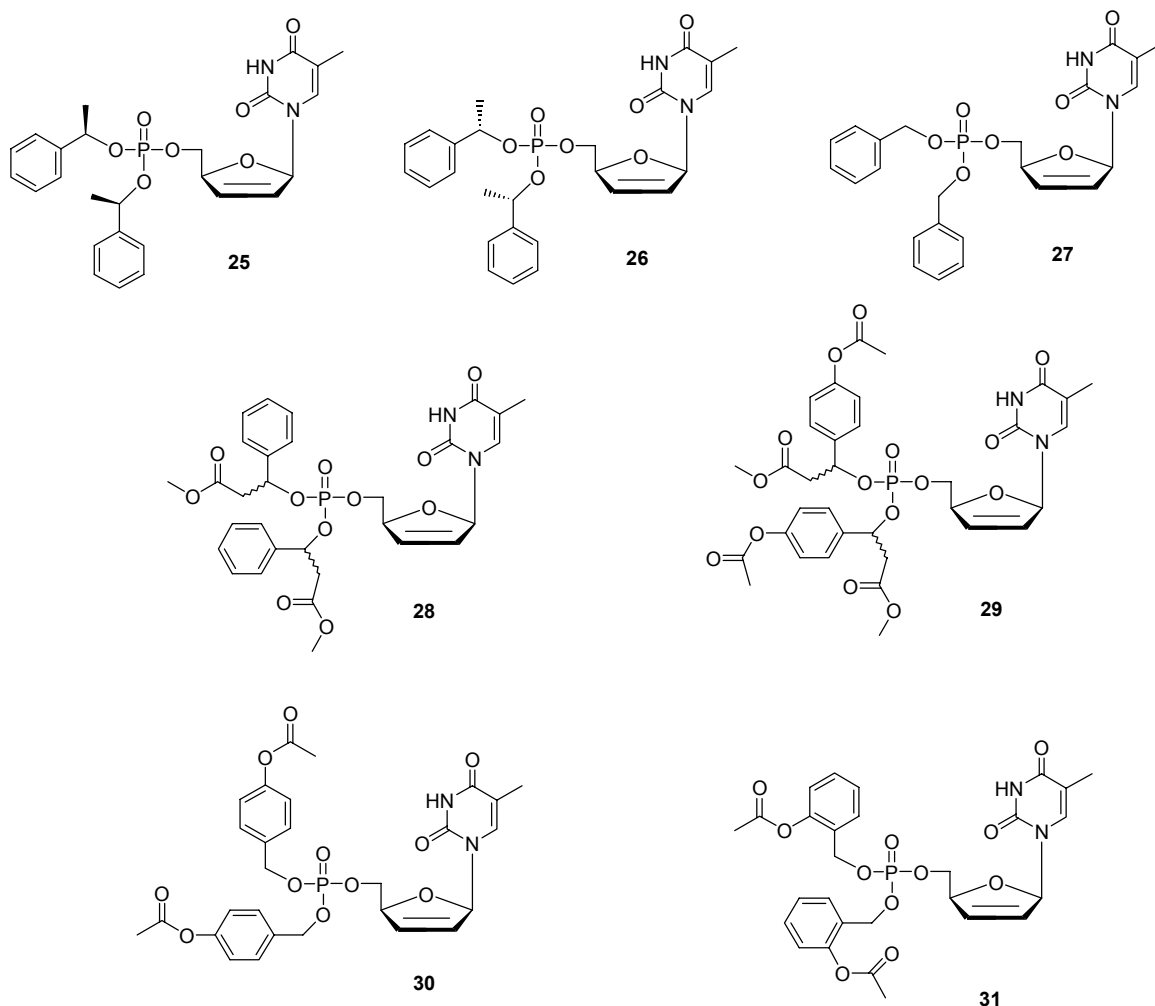


Abb. 26: Acyclische bis-(Benzyl)-phosphat-Triester **25-31**

bis-(Benzyl)-d4TMP **27** stellt den unfunktionalisierten Prototyp dar, welcher auf der einen Seite durch die elektronenziehende Estergruppe (**28**), auf der anderen Seite durch einen Substituenten mit positivem induktiven Effekt in der Benzylposition (Methylgruppe; **25,26**) ergänzt werden sollte. Inwieweit die Stereochemie an der Benzylposition auf das Hydrolyseverhalten des Triesters Einfluß nimmt, sollte durch die Darstellung diastereomerenreiner α -Methylbenzylester **25, 26** untersucht werden.

Als Erweiterung wurden die enzymatisch spaltbaren Verbindungen **29** und **30** ausgewählt, die auf den von GLAZIER und FREEMAN basierenden Konzepten beruhen.

Letztgenannte gab den Anstoß zur Synthese des *ortho*-Acetoxybenzylphosphat-Triesters **31**; interessant dürfte der Vergleich dieser Regioisomere sein, da **31** ein strukturelles

Verbindungsglied zwischen dieser acyclischen Reihe von Benzylphosphat-Triestern und den *cycloSal*-Verbindungen darstellt.

3.2.1 Synthese der Alkohole

Im folgenden Kapitel werden die Synthesen des *para*-Acetoxybenzylalkohols **50**, des *ortho*-Acetoxybenzylalkohols **52**, des α -Methoxycarbonylmethylbenzylalkohols **57** und des *para*-Acetoxy(α -methoxycarbonylmethyl)-benzylalkohols **60** dargestellt.

3.2.1.1 Darstellung des *para*-Acetoxybenzylalkohols **50**

Ausgehend vom *para*-Hydroxybenzylalkohol **49** sollte die *para*-Position acetyliert werden. Acetylierungen von Alkoholen sind eine der fundamentalen Reaktionen der organischen Chemie und eine große Bandbreite an Methoden wurde dafür entwickelt.⁶⁶ Im Allgemeinen werden hochreaktive Acetylierungsreagenzien wie Acetylchlorid oder Essigsäureanhydrid eingesetzt. Derartige Reagenzien führen bei der chemoselektiven Acetylierung von bifunktionalen Substanzen wie dem *para*-Hydroxybenzylalkohol **49** jedoch nicht zum Erfolg. Die Acetylierung einer phenolischen Hydroxygruppe ist gegenüber der primären aliphatischen nur geringfügig bevorzugt.⁶⁶ Milde Acetylierungsreagenzien sind in der Lage diesen geringen elektronischen Reaktivitätsunterschied der Hydroxylgruppen untereinander selektiv zu nutzen (Reaktivitäts-/Selektivitäts-Prinzip). Die zugesetzte Hilfsbase Natriumhydroxid führt zur Bildung eines Phenolats, jedoch nicht nur zur Bildung des primären Alkoholats. Aufgrund der größeren Nucleophilie des Phenolats, im Vergleich zu einem primären Alkohol, wird ausschließlich an der phenolischen Position acyliert.⁶⁶ Literaturbekannte selektive Acetylierungsreagenzien zur Darstellung des *para*-Acetoxybenzylalkohols **50** sind das 2,2'-Bipyridyl-6-yl-carboxylat **43** mit 71 % Ausbeute und das 1-Acetyl-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin **42** mit 80 % (Abb. 27).⁶⁷

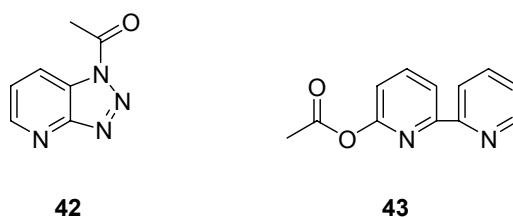


Abb. 27: Acetylierungsreagenzien: 1-Acetyl-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin **42** und 2,2'-Bipyridyl-6-yl-carboxylat **43**

Allerdings führt das erstgenannte Reagenz nur in Gegenwart des toxischen Cäsiumfluorids als Hilfsbase zur Zielverbindung, bei Reaktionen mit 1-Acetyl-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin **42** hingegen kann Natriumhydroxid als Base verwendet werden.

Bei den vorgestellten Verbindungen handelt es sich um Weiterentwicklungen der Imidazole (*N*-Acyllderivate des Imidazols). Diese milden und zugleich selektiven Acetylierer sind hochreaktiv, ausschlaggebend ist hierfür die relativ schwache „Amid“-Bindung. Wegen des aromatischen Charakters der Imidazole ist das Elektronenpaar am Amid-Stickstoff nur wenig in die Carbonylgruppe delokalisiert, was normalerweise für Amide charakteristisch ist. Zum anderen wird die Reaktivität durch die Protonierung des zweiten Stickstoffatoms erhöht, wodurch ein Imidazolring zu einer besseren Abgangsgruppe wird. Nachteilig ist die Instabilität der Imidazole gegenüber hydrolytischer Zersetzung und die somit erforderliche vorsichtige Handhabung bestimmt die Einsatzgebiete.⁶⁸

Die Entwicklung eines stabileren Acetylierungsreagenzes, wie es das 1-Acetyl-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin **42** darstellt, gehen auf die grundlegenden Arbeiten von H. A. STAAB zurück. Vergleichende Untersuchungen zwischen *N*-Acetylimidazol **44** und *N*-Acetyl-1.2.3-Triazol **45** zeigen eine Zunahme der Reaktionsfähigkeit mit steigender Anzahl der Stickstoffatome, da die Delokalisation der Elektronen des Amid-Stickstoffs - und damit auch der Elektronensog des Ringes - um so größer wird, je mehr CH-Gruppen des Ringes durch die elektronegativeren Stickstoffatome ersetzt werden.

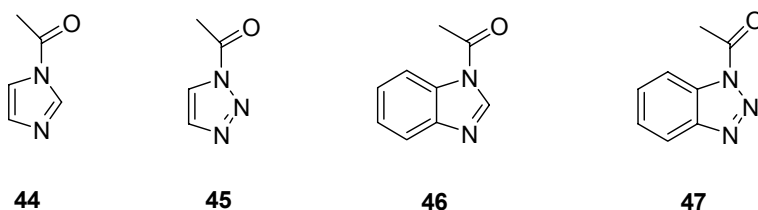


Abb. 28: *N*-Acetylimidazol **44**, *N*-Acetyl-1.2.3-Triazol **45**, *N*-Acetyl-Benzimidazol **46** und *N*-Acetyl-Benztriazol **47**

Entsprechend verhalten sich auch *N*-Acetyl-Benzimidazol **46** und *N*-Acetyl-Benztriazol **47**, allerdings ist die Reaktionsfähigkeit um den Faktor 4.5 kleiner als bei den monocyclischen Azoliden **44** und **45** (Abb. 28).⁶⁹ Der Austausch des Benzols durch das isoelektronische Pyridin führt zum 1*H*-1,2,3-Triazolo[4,5-*b*]pyridin **48**. Dieses ist als kristalline Substanz käuflich zu erwerben und kann in einer einfachen Reaktion mit Essigsäureanhydrid in Pyridin zum stabilen Acetylierungsreagenz 1-Acetyl-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridin **42** in 83 % Ausbeute umgesetzt werden (Abb. 29).

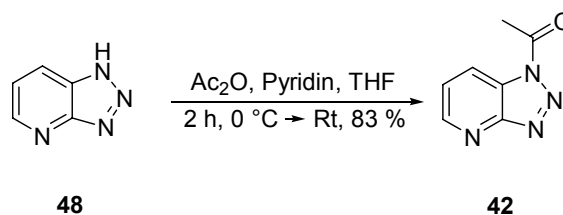


Abb. 29: Darstellung des Acetylierungsreagenzes 1-Acetyl-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin **42**

Die anschließende chemoselektive Acetylierung des *para*-Hydroxybenzylalkohols **49** in THF unter Verwendung einer ein molaren wässrigen Natriumhydroxid-Lösung führte zum *para*-Acetoxybenzylalkohol **50** in 46 % Ausbeute (Abb. 30). Das Edukt wurde reisoliert.

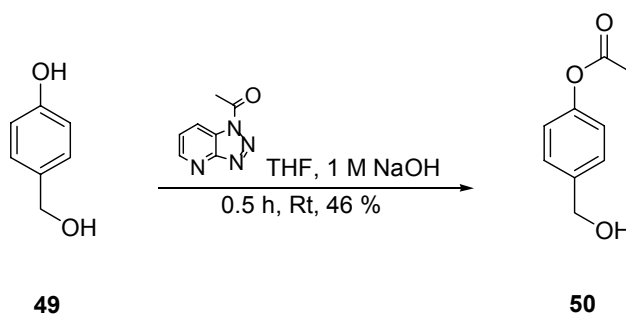


Abb. 30: Darstellung des *para*-Acetoxybenzylalkohols **50**

3.2.1.2 Darstellung des *ortho*-Acetoxybenzylalkohols **52**

Die erfolgreiche Anwendung des 1-Acetyl-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin **42** als selektives und zugleich mildes Acetylierungsreagenzes zur Darstellung des *para*-Acetoxybenzylalkohols **50** versagte beim entsprechenden *ortho*-Derivat **51** vollständig (Abb. 31). Der Reaktionsansatz wurde nach wenigen Minuten schwarz und die dünnschichtchromatographische Verfolgung zeigte kein Produkt.

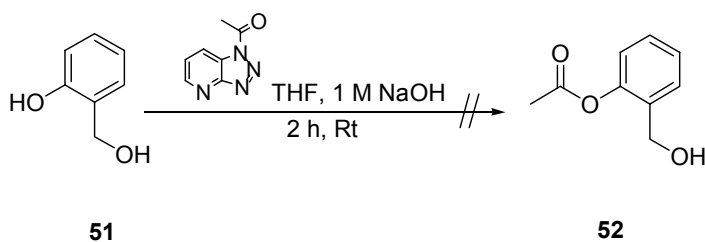


Abb. 31: Versuch der Darstellung des *ortho*-Acetoxybenzylalkohols **52**

Sterische Faktoren scheinen hier eine tragende Rolle zu übernehmen und erforderten einen neuen Syntheseweg. Um aufwendige Schutzgruppentechniken der primären und phenolischen Hydroxylgruppe zu umgehen, wurde ein zweistufiger Syntheseweg (Abb. 32), ausgehend von Salicylaldehyd **53**, gewählt.

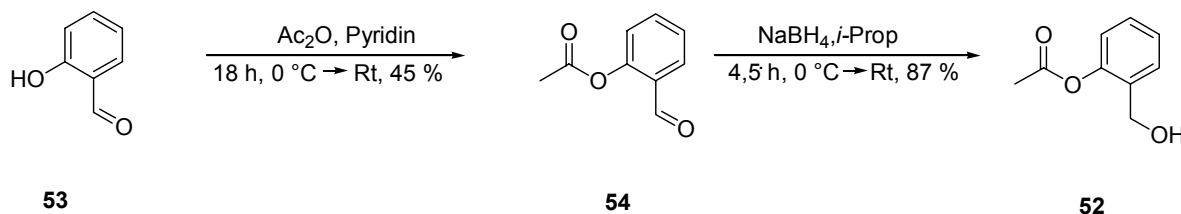


Abb. 32: Darstellung des *ortho*-Acetoxybenzylalkohols **52**

Der Salicylaldehyd **53** wurde dabei mit Essigsäureanhydrid in Pyridin in einer Ausbeute von 45 % acetyliert. Die anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid in *i*-Propanol zum *ortho*-Acetoxybenzylalkohol **52** gelang mit einer guten Ausbeute von 87 %.

3.2.1.3 Darstellung des α -Methoxycarbonylmethylbenzylalkohols **57**

Zur Einführung der Methoxycarbonylmethylengruppe (MCM) in die α -Position wurde zuerst Acetophenon **55** mit Dimethylcarbonat carboxymethyliert (Abb. 33).⁷⁰ Dimethylcarbonat verfügt über kein α -ständiges Proton und kann somit nicht enolisieren, es erfolgt daher ein elektrophiler Angriff vom Carbanion des Acetophenons **55** unter Bildung des β -Ketoesters **56**. Das 3-Phenyl-3-oxomethylpropionat **56** wurde als leicht gelbliches Öl in 93 % Ausbeute erhalten.

Abschließend wurde die Ketogruppe in **56** mit Natriumborhydrid in *i*-Propanol mit 33 % Ausbeute zum gewünschten α -(MCM)-benzylalkohol **57** reduziert (Abb. 33). Außerdem konnte noch das Edukt reisoliert werden und erneut umgesetzt werden.

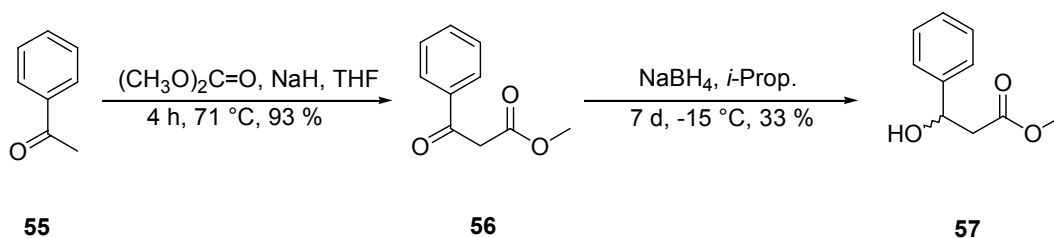


Abb. 33: Darstellung des α -Methoxycarbonylmethylbenzylalkohols **57**

Der Versuch den α -Methoxycarbonylmethylbenzylalkohol **57** in einem Schritt aus Benzaldehyd mittels einer Reformatsky-Reaktion⁷¹ zu synthetisieren, gelang in einer Ausbeute von 12 %. Der Literaturwert von 85 % konnte jedoch nicht reproduziert werden.

3.2.1.4 Darstellung des *para*-Acetoxy-(α -MCM)-benzylalkohols **60**

Für die Darstellung des *para*-Acetoxy-(α -MCM)-benzylalkohols **60** wurde zuerst eine Reformatsky-Reaktion in Betracht gezogen. Die Reformatsky-Reaktion wird häufig angewendet, um β -Hydroxyester darzustellen. Dabei reagieren Zink, ein α -Halogensäureester und eine Carbonylverbindung miteinander.⁷² Das Zink und α -Halogensäureester generieren ein Zinkenolat (Abb. 34), in welchem das Metall sowohl an das carbanionische Zentrum als auch an das Sauerstoffatom gebunden ist. Dieses kann dann die Aldehyd-Carbonylgruppe nucleophil unter Ausbildung eines β -Hydroxyesters angreifen.⁷³

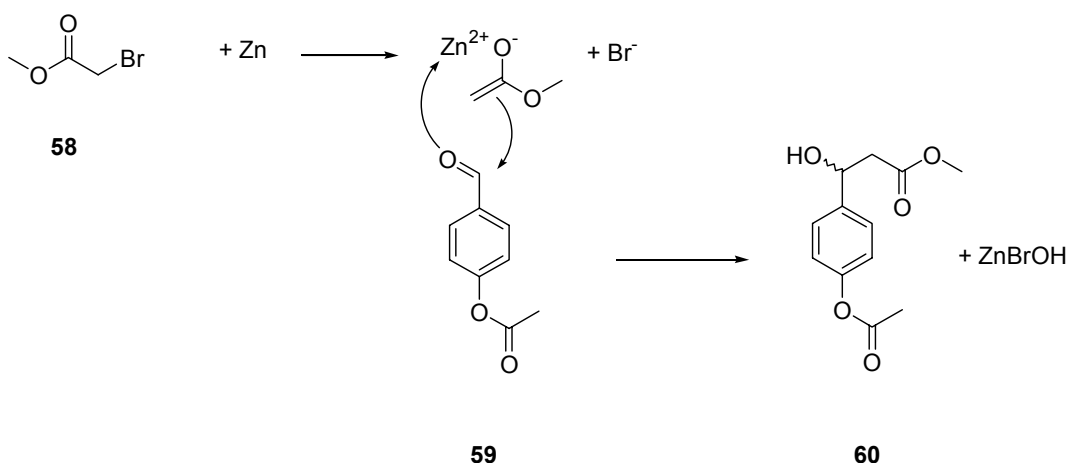


Abb. 34: Nucleophiler Angriff eines Zinkenolats auf die Aldehydgruppe

Ausgehend von *para*-Hydroxybenzaldehyd **61** und Methylbromacetat **58** wurde nach einer Reaktionsdauer von vier Tagen jedoch keine Produktbildung festgestellt. Die entsprechende Umsetzung mit *para*-Acetoxybenzaldehyd **59**, welcher zuvor durch Acetylierung von *para*-Hydroxybenzaldehyd **61** in 61 % Ausbeute dargestellt wurde, lieferte den *para*-Acetoxy-(α -MCM)-benzylalkohol **60** in 4 % Ausbeute (Abb. 35).⁷¹ Das Produkt **60** wurde durch mehrfache Aufreinigung aus dem Produktgemisch isoliert.

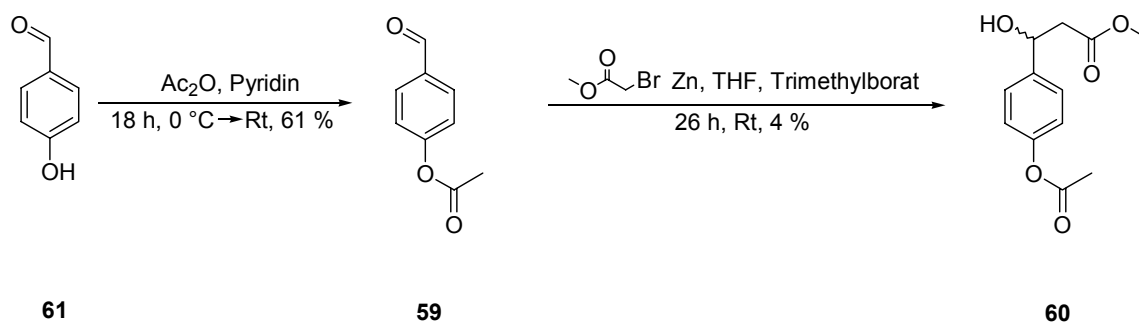


Abb. 35: Darstellung des *para*-Acetoxy-(α -MCM)-benzylalkohols **60** ausgehend von *para*-Hydroxybenzaldehyd **61**

Verantwortlich für die sehr geringe Ausbeute ist vermutlich, dass das Zink vorab nicht "aktiviert" wurde, z.B. durch eine Kupferacetatlösung, wodurch ein reaktiveres Zink-Kupfer-Paar gebildet wird.⁷⁴

Eine weitere interessante Synthese des *para*-Acetoxy-(α -MCM)-benzylalkohols **60** stellt die Route ausgehend von *para*-Hydroxyzimtsäure **62** dar (Abb. 36). Diese sollte zuerst an der Säurefunktion sauer verestert und dann an der phenolischen OH-Gruppe acetyliert werden. Anschließend sollte die Doppelbindung epoxidiert werden. Durch regioselektive Öffnung des Epoxids mit Hydrid sollte abschließend der gewünschte Alkohol **60** dargestellt werden (Abb. 37, S. 34).

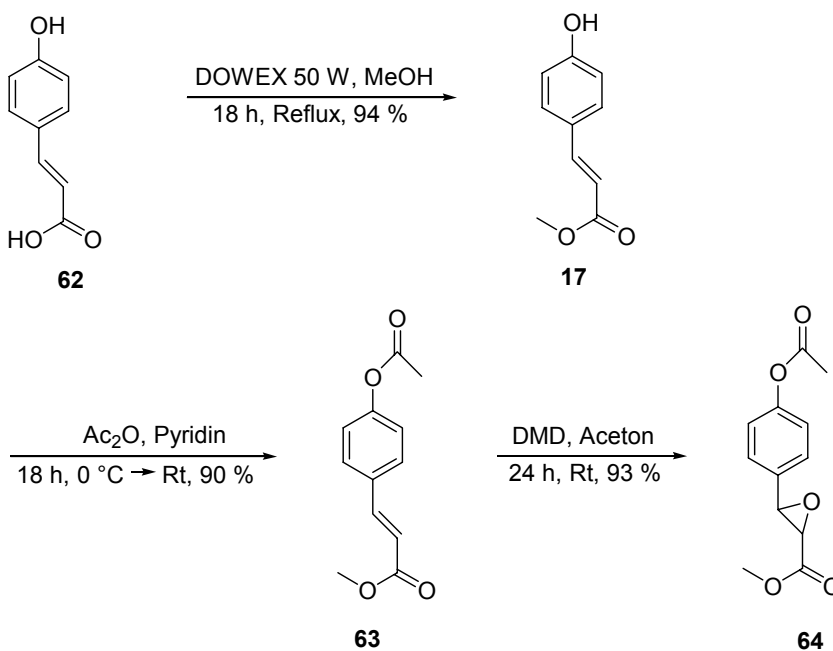


Abb. 36: Vorstufen zur Darstellung des *para*-Acetoxy-(α -MCM)-benzylalkohols **60** ausgehend von *para*-Hydroxyzimtsäure **62**

Die Veresterung der Säurefunktion wurde in Methanol mit dem Anionentauscher Dowex 50 W in 94 % Ausbeute durchgeführt⁷⁵; die Acetylierung der phenolischen OH-Gruppe von **17** gelang in Pyridin mit Essigsäureanhydrid in 90 % Ausbeute und die Epoxidierung⁷⁶ wurde mit Dimethyldioxiran (DMD) in Aceton in 93 % Ausbeute durchgeführt.

Die Synthese wurde bis zum 3-(*para*-Acetoxyphenyl)oxiran-2-methylcarboxylat **64** in sehr guten Ausbeuten durchgeführt. Der „Knackpunkt“ dieser Strategie ist jedoch die auf der letzten Stufe erforderliche regioselektive Epoxidöffnung, die in diesem Fall durch den nucleophilen Angriff eines Hydrids erfolgen sollte, ohne dabei die Ester zu reduzieren. Aus der Literatur^{77,78,79} ist hierfür die Öffnung eines Epoxids mit Samariumiodid (Abb. 37), wobei der Chelatkomplex-Bildner *N,N*-Dimethylaminoethanol (DMAE) als Hydridspender fungiert, bekannt. Der Mechanismus dieser Reaktion ist noch nicht geklärt.⁷⁸

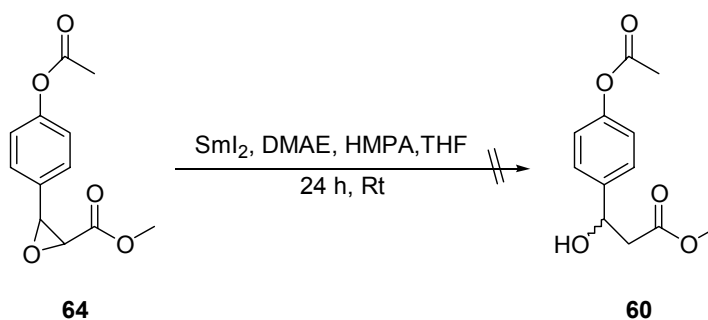


Abb. 37: Regioselektive Öffnung des Epoxids **64** mit Samariumiodid

Außerdem lassen sich Epoxide nach KAWAKAMI et al. regioselektiv mit einem "katalytisch" arbeitenden $\text{Bu}_3\text{SnH}/\text{Bu}_3\text{SnI}$ -Phosphinoxid-System öffnen.⁸⁰ Der Grund für die Bildung eines β -Hydroxyesters liegt in dem Übergangszustand der Reaktion (Abb. 38).

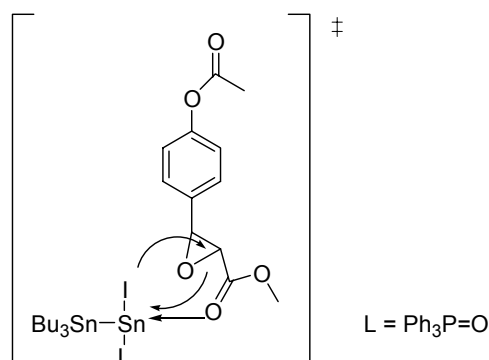


Abb. 38: Übergangszustand der katalytischen Reduktion eines Epoxids mit Hilfe des $\text{Bu}_3\text{SnH}/\text{Bu}_3\text{SnI}$ -Phosphinoxid-Systems nach KAWAKAMI et al.

Hierbei wird das Iodid selektiv auf die α -Position des Esters übertragen und kann anschließend durch Hydrid nucleophil substituiert werden.

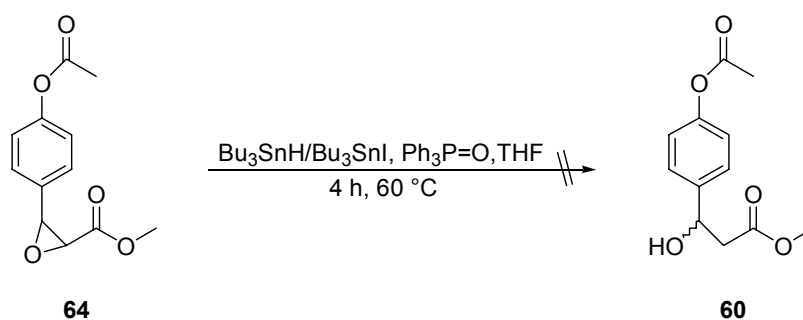


Abb. 39: Regioselektive Öffnung des Epoxids **64** mit einem katalytischen $\text{Bu}_3\text{SnH/Bu}_3\text{SnI}$ -Phosphinoxid-System

Auf beiden Wegen wurden mannigfaltige Produktgemische erhalten, aus denen das gewünschte Produkt nicht isoliert werden konnte.

Um diese synthetische Sackgasse zu umgehen, wurde letztendlich auf die bereits bewährte Synthesestrategie zur Darstellung des α -Methoxycarbonylmethylbenzylalkohols **57** zurückgegriffen (Kap.: 3.2.1.3, S. 31).

Hierzu wurde *para*-Hydroxyacetophenon **65** mit Natriumhydrid und Dimethylcarbonat carboxymethyliert (Abb. 40).⁷⁰ Das 3-(*para*-Hydroxyphenyl)-3-oxomethylpropionat **66** wurde als leicht bräunliches Öl in 80 % Ausbeute erhalten.

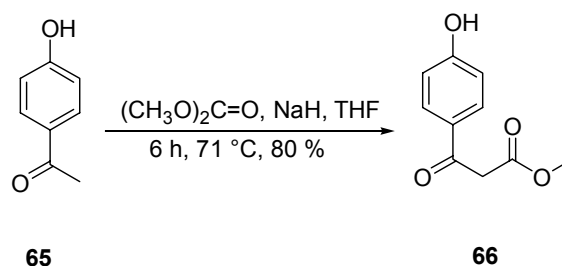


Abb. 40: Darstellung von 3-(*para*-Hydroxyphenyl)-3-oxo-methylpropionat **66**

Die anschließende Acetylierung der phenolischen OH-Gruppe, wobei Acetylchlorid und Triethylamin bei 0 °C hinzuge tropft und danach 1 h bei RT gerührt wurden,⁸² führte nicht zum gewünschten *para*-Acetoxyester **67**. Die NMR-Spektren zeigen deutlich, dass sowohl die phenolische Hydroxyfunktion als auch die CH-acide Methylengruppe deprotoniert und acetyliert wurden. Das erhaltene Gemisch besteht aus mono- und diacetylierten Produkten und ließ sich nur sehr schwer trennen. Ein Absenken der Temperatur auf 0 °C führte in schlechten Ausbeuten (40 %) zum monoacetylierten Produkt. Eine Reaktivitätsabschwächung

durch den Einsatz von Essigsäureanhydrid in Pyridin führte ebenfalls zu mono- und diacetylierten Produkten. Eine saure Acetylierungsmethode stellt die Aktivestermethode mit Essigsäure, 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) dar. Sie führte nach 0.45 h bei Raumtemperatur zum gewünschten 3-(4-Acetoxyphenyl)3-oxo-methylpropionat **67** in 60 % Ausbeute (Abb. 41).⁸¹

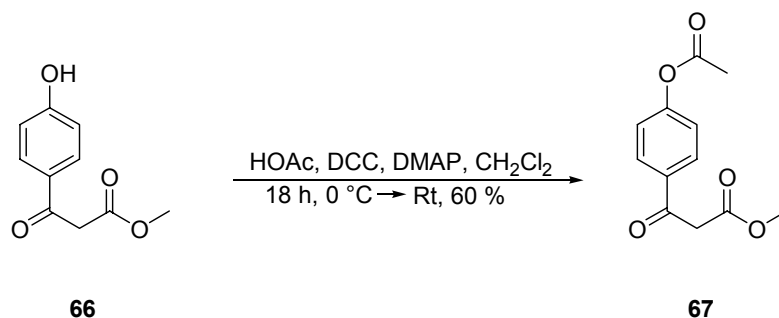


Abb. 41: Acetylierung zum 3-(4-Acetoxyphenyl)3-oxo-methylpropionat **67**

Die abschließende Reduktion des β -Ketoesters **67** zum Alkohol **60** stellte einen herausfordernden Schritt dar, wobei die Stereochemie des erhaltenen optisch aktiven β -Hydroxyesters ohne Belang für die weitere Synthese ist.

Die von GLAZIER et al. vorgeschlagene Reduktion der Ketogruppe mit Pd/C und Wasserstoff⁸² erwies sich als undurchführbar (Abb. 42). Sowohl die Verkürzung der Reduktionsdauer auf 10 min als auch die Variation des Lösungsmittels (Ethanol, Essigester, Dichlormethan) führten zur Bildung von *para*-Acetoxyphenylpropionat **63a**. Das ¹H-Spektrum zeigt deutlich die zwei Triplets der homotopen Protonen der beiden Methylengruppen mit vicinalen Kopplungskonstanten von 7.6 Hz. Im Einklang damit weist das ¹³C-Pendant-Spektrum zwei Signale im für CH₂-Gruppen typischen Bereich auf.

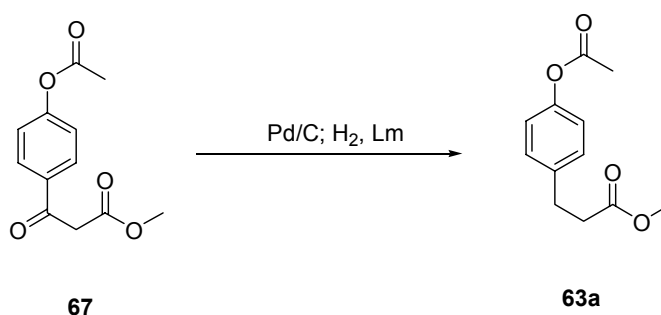


Abb. 42: Darstellung von *para*-Acetoxyphenylpropionat **63a** mittels Wasserstoff und Pd/C

Eine bekannte Methode zur Reduktion von β -Ketoestern stellt die Umsetzung mit aktiv fermentierender Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) dar (Abb. 43).^{83,84} Die Arbeiten zeigen,

dass 3-Oxo-3-phenylpropionsäureethylester mit 60 % Ausbeute zum entsprechenden 3-Hydroxy-3-phenylpropionsäureethylester umgesetzt wird. Eben dieser strukturelle Unterschied, die Acetoxygruppe in *para*-Position, verhindert jedoch im vorliegenden Fall die Reduktion der Ketogruppe in 3-Position. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen in verschiedenen Laufmittelgemischen mit 3-(4-Hydroxyphenyl)-3-oxomethylpropionat **66** als Referenz belegten, dass selektiv der Phenylester gespalten wurde.

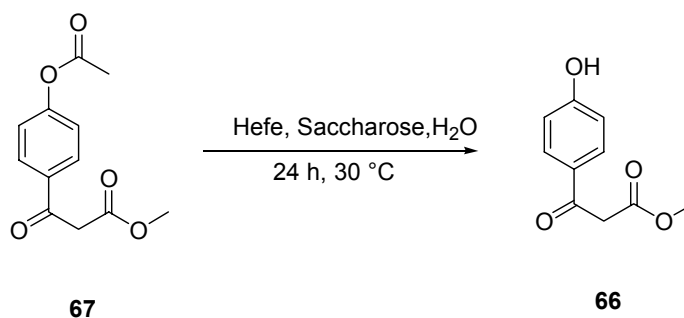


Abb. 43: Deacetylierung von **67** mittels *Saccharomyces cerevisiae*

Eine weitere Möglichkeit eine Ketogruppe selektiv neben einem Ester zu reduzieren, ist die Meerwein-Ponndorf-Verley-Reduktion.⁸⁵ Allerdings führte auch hier die Umsetzung mit Aluminium-*triisopropylat* in *i*-Propanol unter Rückfluß erneut zum 3-(*para*-Hydroxyphenyl)-3-oxomethylpropionat **66** (Abb. 44). Grund hierfür ist der hohe Enolcharakter des Moleküls. Hervorgerufen wird dieser zum einen durch das in Konjugation zur Doppelbindung des Enols stehende π -Orbitalsystem des Phenylrestes, zum anderen durch die Ausbildung einer starken intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung. Sowohl erhöhte Temperatur, als auch die Wahl eines polaren Lösungsmittels - Faktoren, die die Ketoform begünstigen - vermögen es nicht, das Gleichgewicht auf diese Seite zu verschieben.⁸⁶

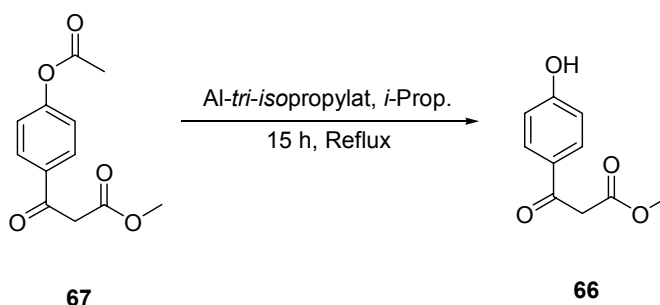


Abb. 44: Versuch der Darstellung von *para*-Acetoxy-(α -MCM)-benzylalkohols **60** mittels der Meerwein-Ponndorf-Verley-Reduktion

Moderne Entwicklungen auf dem Gebiet der stereoselektiven Reduktion von β -Ketoestern zeigen sich in der homogenen katalytischen Hydrierung mit Rutheniumkatalysatoren wie z.B. [BINAP-Ru(OAc)₂]^{87,88,89}, dem Einsatz neutraler Boran-THF-Addukte^{90,91,92} oder anionischer Borhydride mit chiralen Reagentien.^{93,94} Die letztgenannte Methode wurde ohne den Zusatz des Auxiliars ausgewählt (Abb. 45), um den angestrebten *para*-Acetoxy-(α -MCM)-benzylalkohol **60** darzustellen. Diese Methode bewährte sich bereits bei der Darstellung des α -Methoxycarbonylmethylbenzylalkohols **57**.

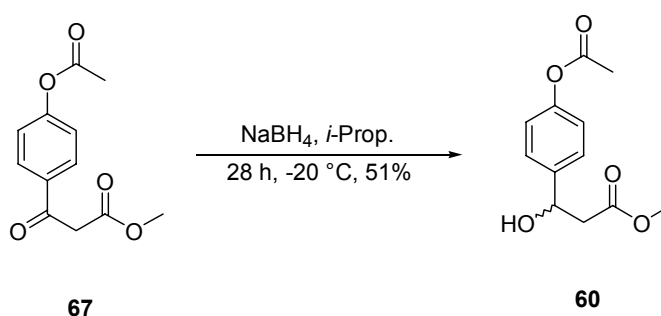
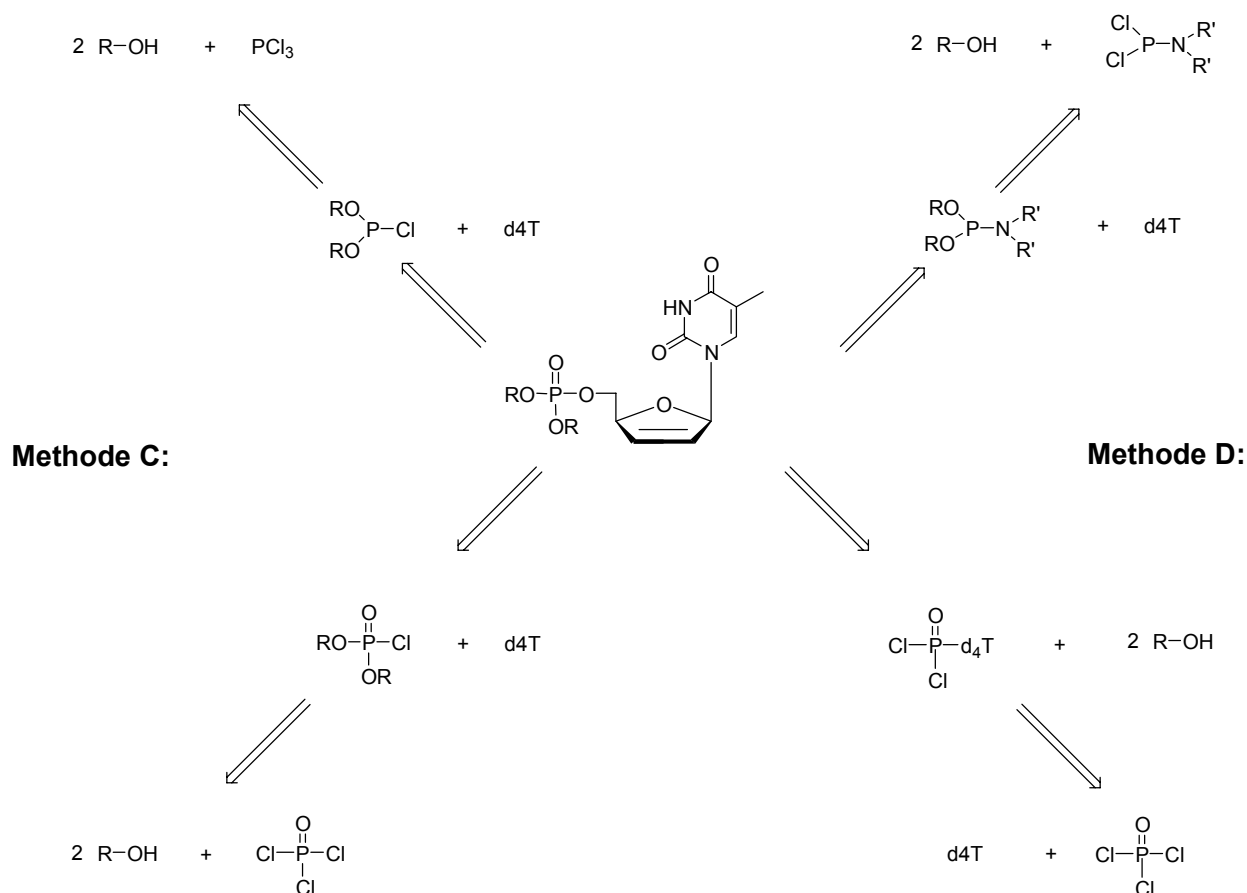


Abb. 45: Reduktion zum *para*-Acetoxy-(α -MCM)-benzylalkohols **60** mittels Natriumborhydrid

Als Gegenion des Tetrahydridoborats wurde Na⁺ der Vorzug vor Li⁺ gegeben, da Na⁺ die schwächere Lewis-Säure von beiden und somit weniger reaktiv ist.⁹⁵ Natriumborhydrid stellt daher ein mildes Reduktionsmittel dar, das mit Ketogruppen reagiert, aber mit Estern nur sehr langsam. Die Reaktion wurde bei Temperaturen von -40 bis -10 °C und in verschiedenen absolutierten Lösemitteln (THF, MeOH, EtOH, *i*-Prop) durchgeführt, als ideale Reaktionsbedingungen stellten sich eine Reaktionsdauer von 28 h in *iso*-Propanol bei -20 °C heraus. Der *para*-Acetoxy-(α -MCM)-benzylalkohol **60** konnte so in guter Ausbeute (51 %) synthetisiert werden. Das in DMSO-d₆ aufgenommene ¹H-Spektrum zeigte für die entstandene Hydroxyfunktion ein Dublett bei 5.55 ppm.

3.2.2 Synthese der Phosphat-Triester

Bevor ein bis-(Benzyl)-phosphat-Triester bezüglich seiner hydrolytischen Eigenschaften untersucht werden kann, steht zunächst seine Synthese im Vordergrund. Die Synthese der Alkohole **50**, **52**, **57** und **60** ist im Kapitel 3.2.1, S. 28 dargestellt; Benzylalkohol **70**, (*R*)- α -Methylbenzylalkohol **71** sowie (*S*)- α -Methylbenzylalkohol **72** sind käuflich zu erwerben. Bemerkenswert ist die Einführung der Phosphatgruppe in das Molekül, für die in diesem Fall vier synthetische Ansätze denkbar sind (Abb. 46):

Methode A:**Methode B:**Abb. 46: Retrosyntheseschema zur Darstellung der Phosphat-Triester **25-31**

Die Varianten A und B gehen von der reaktiveren Phosphitchemie aus, verglichen mit der Phosphatchemie der Varianten C und D.

3.2.2.1 Die Phosphorchloridat- und die Phosphordichloridat-Methode (Variante C und D)

Auf den ersten Blick stellt die Phosphatchemie eine einfache und schnelle Synthese von Phosphat-Triestern in Aussicht, da die bei der Phosphitchemie notwendige Oxidation überflüssig ist. Variante C bzw. die "Phosphorchloridat-Methode" beschreibt die Umsetzung von Phosphorylchlorid mit zwei Äquivalenten eines entsprechenden Alkohols zum Di-(alkyl/benzyl)-phosphorchloridat, das abschließend mit einer dritten Hydroxyfunktion in Pyridin unter den Bedingungen von FÖLSCH (-40 °C für 15 min, dann über Nacht bei 0 °C) zum Phosphat-Triester reagiert. Untersuchungen zeigten allerdings, dass die Ausbeute an

Phosphat-Triester von den verwendeten Alkoholen abhängt. So ist die Ausbeute für Alkanole stets höher als für Benzylalkohole. Begründet wird dieses durch den Mechanismus; so steht das Di-(alkyl/benzyl)-phosphorchloridat mit einem Di-(alkyl/benzyl)-phosphor-*N*-pyridinium-Intermediat im Gleichgewicht, wobei die letztgenannte Verbindung das eigentlich aktive Phosphorylierungssagens darstellt (Abb. 47). Diese Spezies kann jedoch dealkylieren, wobei der Austritt einer Benzylgruppe gegenüber einer Alkylgruppe erleichtert ist.¹⁰⁰

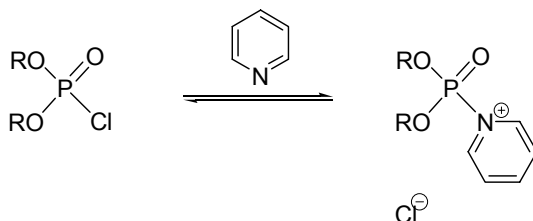


Abb. 47: Gleichgewicht zwischen der Chloridatform und dem Pyridiniumsalz

Des Weiteren wurde beobachtet, dass sperrige Reste, wie z.B. *t*Butylalkohol die Bildung des aktiven Phosphorylierungsspezies nachhaltig behindern.¹⁰⁰ Ein solcher Effekt ist für die modifizierten Benzylalkohole **50**, **52**, **57** und **60** ebenfalls in Betracht zu ziehen.

Somit eignet sich die Phosphorchloridat-Methode nicht zur Darstellung der Zielverbindungen aufgrund der angesprochenen Probleme bei den bis-(Benzyl)-phosphorchloridaten.

Als Variante D ist die "Phosphordichloridat-Methode" zu nennen. Hierbei erfolgt die Umsetzung von Phosphorylchlorid mit dem Nucleosid zum Phosphorsäuredichlorid, dessen weitere Reaktion mit zwei Äquivalenten Benzylalkohol zum korrespondierenden bis-(Benzyl)-phosphat-Triester führt. In der Literatur existieren nur die von MEIER et al. durchgeführten Arbeiten auf diesem Gebiet.^{96,55} Die Phosphordichloridat-Methode liefert lediglich Ausbeuten zwischen 27-39 % an Triester, die auf die inaktivere Phosphorylierungsspezies zurückzuführen sind. Daneben gestaltet sich die Synthese sehr zeitaufwendig und gelingt in einigen Fällen nur durch die Zugabe von Aktivatoren.⁹⁷

Die Varianten C und D sind somit zu ineffizient zur Darstellung von bis-(Benzyl)-phosphat-Triestern.

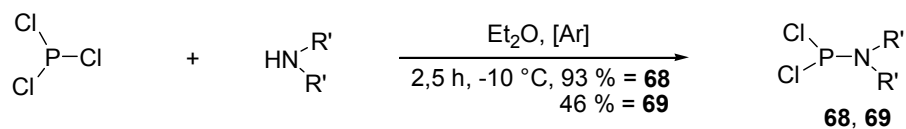
3.2.2.2 Die Phosphoramidit- und die Di-(benzyloxy)-chlorphosphan-Methode (Variante A und B)

Variante A, als ein Vertreter der reaktiveren Phosphitchemie, beschreibt die Reaktion von Phosphor(III)-chlorid mit zwei Äquivalenten des Benzylalkohols zum gewünschten Di-(benzyloxy)-chlorphosphan. Dieses wird in einer zweiten Reaktion mit dem Nucleosid zum Phosphit-Triester umgesetzt und abschließend oxidiert. Problematisch ist bei der Synthese die Instabilität des Di-(benzyloxy)-chlorphosphans, das auch bei tiefen Temperaturen nur kurze Zeit gelagert werden kann.⁹⁸

Die Phosphoramidit-Methode bietet bei der Synthese der säurelabilen bis-(Benzyl)-phosphat-Triester den Vorzug unter sehr milden Reaktionsbedingungen sich trotzdem der reaktiveren Phosphitchemie zu bedienen.

Bei der Phosphoramidit-Methode, hier als Variante B beschrieben, wird zunächst Phosphor(III)-chlorid mit einem Dialkylamin zum Dichlordialkylaminophosphan umgesetzt. Eine weitere Reaktion mit den entsprechenden Alkoholen liefert Dialkoxydialkylaminophosphate (Phosphoramidite), die synthetisch wertvolle Kupplungsreagenzien in der Nucleotidchemie darstellen. Sie können in sehr guten Ausbeuten (80 % für bis-(Benzyl)-phosphoramidit)⁹⁹ in einer einfachen Reaktionsfolge dargestellt werden und zeichnen sich vor allem durch ihre hohe Stabilität aus, die z.T. ihre säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel gestattet. Bemerkenswert ist die damit verbundene lange Lagerungszeit ohne Zerfall.⁹⁸

Als Dialkylamine wurden *Diisopropylamin* und *Diethylamin* ausgewählt und zu ihren korrespondierenden Dichlordialkylaminophosphanen umgesetzt. Dichlordiethylaminophosphate **69** besitzen eine geringere sterische Hinderung als die entsprechenden *iso*-Propylverbindungen **68** und dadurch eine gesteigerte Reaktivität, jedoch auch eine größere Labilität.¹⁰⁰ Dagegen können die Dichlordiisopropylaminophosphate **68** mehrere Monate bei -20 °C ohne Zersetzung gelagert werden. Zur Synthese der Dichlordialkylaminophosphate **68** und **69** wurde zu einer heftig gerührten Lösung destilliertem Phosphortrichlorids in abs. Diethylether, tropfenweise destilliertes *N,N*-Diisopropylamin, bzw. *N,N*-Diethylamin, hinzugefügt und 2.5 h bei -10 °C gerührt (Abb. 48).¹⁰¹ Nach Filtration des entstandenen Hydrochlorids und Kugelrohrdestillation der Rohprodukte konnten **68** in 93 % und **69** in 46 % Ausbeute isoliert werden.



$\text{R}' = (\text{CH}_3)_2\text{CH}$ für **68**, $\text{R}' = \text{CH}_2\text{CH}_3$ für **69**

Abb. 48: Darstellung der Dichlordialkylaminophosphate **68** und **69**

Zur Darstellung der korrespondierenden Phosphoramidite wurde der entsprechende Benzylalkohol (**50**, **52**, **57**, **60** sowie **70-72**) in abs. Diethylether gelöst und destilliertes Triethylamin hinzugegeben (Abb. 49).⁴⁰ Diese Lösung wurde binnen 10 Minuten zu einer Lösung des Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphans in abs. Diethylether bei -78°C gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration des ausgefallenen Hydrochlorids und Chromatographie der Rohprodukte konnten die Amidite in Ausbeuten um 40 % isoliert werden.

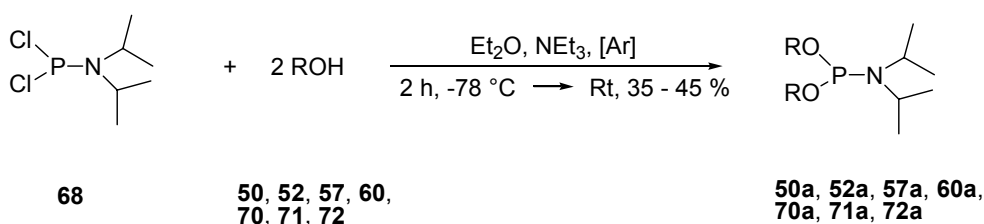


Abb. 49: Darstellung der Phosphoramidite **50a**, **52a**, **57a**, **60a**, **70a**, **71a** und **72a** mit Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphan **68**

Die Darstellung des bis-(*ortho*-Acetoxybenzyl)-*N,N*-phosphoramidites **52a** und des bis-(*para*-Acetoxy-(α -MCM-benzyl)-*N,N*-phosphoramidites **60a** verlief mit Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphan **68** unvollständig und es wurde kein Produkt isoliert. So wurde das sterisch ungehindertere Dichlor-*N,N*-diethylaminophosphan **69** verwendet (Abb. 50). Im Falle des bis-(*ortho*-Acetoxybenzyl)-*N,N*-phosphoramidites **52b** wurden 45 % Ausbeute erzielt. Hingegen zeigte sich bei der Synthese des bis-(*para*-Acetoxy-(α -MCM-benzyl)-*N,N*-phosphoramidites **60b** erneut eine nur unvollständige Umsetzung, so dass auf die Reinigung des Rohproduktes verzichtet wurde.

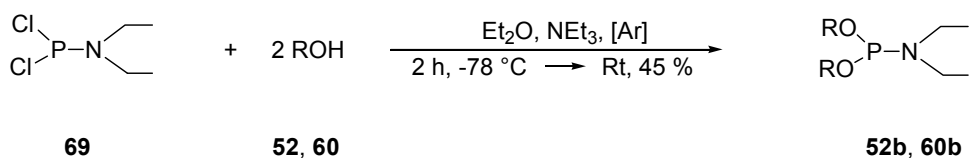


Abb. 50: Darstellung der Phosphoramidite **52b** und **60b** mit Dichlor-*N,N*-diethylaminophosphan **69**

Phosphoramidite reagieren am Stickstoffatom als Lewis-Basen und können daher mit Brönsted-Säuren, wie z.B. 1*H*-Tetrazol, protoniert (aktiviert) werden¹⁰². Nach Austritt von Diisopropylamin bildet sich intermediär ein reaktives Tetrazolid, das mit einem weiteren Alkohol leicht einen Phosphit-Triester bildet¹⁰³. Dieser kann durch anschließende direkte Oxidation in ein Phosphat-Triester überführt werden (Abb. 51).

Weitreichende Untersuchungen von F. MUGNIER aus der Arbeitsgruppe behandeln den Einfluss von verschiedenen Aktivatoren, deren Menge, sowie die Temperatur- und Lösungsmittelabhängigkeit auf die Reaktion von cyclischen Phosphoramiditen mit Nucleosiden.¹⁰⁴ Basierend auf ihren Ergebnissen wurde 1*H*-Tetrazol als Aktivator und Acetonitril als Lösungsmittel ausgewählt.

Die abschließende Oxidation des Phosphit-Triesters nach LETSINGER und LUNSFORD¹⁰⁵, und deren vereinfachte Variante mit einem Iod/Wasser-Gemisch, führte zu vielen Nebenprodukten, vor allem bei Di-(benzyl)- und Di-(*t*butyl)-phosphit-Triestern. Während der Oxidation kommt es zur Abspaltung von Benzyl- bzw. *t*Butylphosphatgruppen.¹⁰⁰ Als alternative Oxidationsmittel sind Iodobenzol-diacetat¹⁰⁶, Tetrabutylammoniumperiodat¹⁰⁷, *m*-Chlorperbenzoesäure¹⁰⁸ und *t*Butylhydroperoxid¹⁰⁹ anzuführen, die alle gute Ausbeuten ergeben. Die Wahl fiel auf *t*Butylhydroperoxid, das bereits bei der Oxidation cyclischer Nucleosidphosphit-Triester in der Arbeitsgruppe mit Erfolg eingesetzt wurde und die Reaktionsführung dahingehend vereinfacht werden kann, indem sich die Phophitylierung und Oxidation in einer Eintopf-Reaktion durchführen lassen.

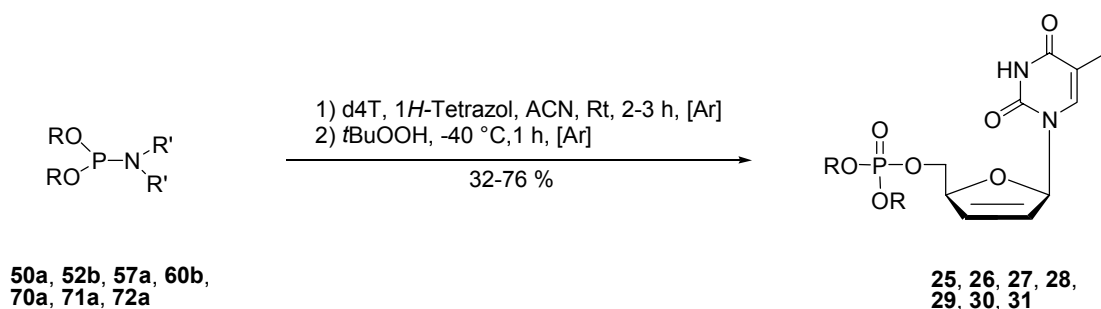


Abb. 51: Darstellung der Phosphat-Triester **25-31**

Zur Kupplung der Phosphoramidite **50a**, **52b**, **57a**, **60b**, **70a**, **71a** und **72a** mit dem Nucleosid d4T **39** wurde dieses in abs. Acetonitril bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer Argonatmosphäre vorgelegt und mit 2.5 Äquivalenten 1*H*-Tetrazol versetzt. Anschließend wurde das in abs. Acetonitril gelöste entsprechende bis-(Benzyl)-*N,N*-phosphoramidit hinzugegeben und zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Abschließend wurde der Ansatz auf $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und der Phosphit-Triester zum Phosphat-Triester mit *t*Butylhydroperoxid in Ausbeuten zwischen 32-76 % oxidiert. Die große Varianz der Ausbeuten ist auf die Stabilität der einzelnen Verbindungen zurückzuführen und bestätigt sich in den folgenden Hydrolyseexperimenten.

3.3 Resultate und Diskussion

3.3.1 Hydrolysestudien

Im folgenden Abschnitt soll untersucht werden, inwieweit Substituenten in der Benzylposition von acyclischen Pro-Nucleotid-Verbindungen deren Hydrolyse beeinflussen. Die Bestimmung der Halbwertszeiten und die Identifikation der Hydrolyseprodukte gestattet Einblicke in den Mechanismus der Hydrolyse.

Zu diesem Zweck wurde das Verhalten der durch Donor- und Akzeptor-Substituenten modifizierten bis-(Benzyl)-Verbindungen **25-31** in einem basischen Phosphatpuffer bei pH 7.3 und in Extrakten humaner CEM/0-Zellen untersucht; des Weiteren wurden ^{31}P -NMR-Studien durchgeführt.

3.3.1.1 Hydrolysen im wässrigen Phosphatpuffer bei pH 7.3 und ^{31}P -NMR-Studien

Die chemischen Hydrolysekinetiken wurden in basischem Medium bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit isotonischen Phosphatpufferlösungen (25 mM, PBS, pH = 7.3) durchgeführt und simulieren somit physiologische Bedingungen. Aufgrund des großen Überschusses an Wasser konnte die Hydrolyse als Reaktion *pseudo*-erster Ordnung aufgefasst werden, so dass sich Hydrolyse-Halbwertszeiten $t_{1/2}$ ermitteln ließen.

Es wurde eine 1.9 mM Hydrolyse-Stammlösung des jeweiligen Phosphat-Triesters durch Verdünnen einer 50 mM Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) mit DMSO/Wasser-Gemischen angesetzt. Diese 1.9 mM Hydrolyse-Stammlösung wurde mit einem internen Standard (AZT) versetzt und die Hydrolyse anschließend durch Zugabe des auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

temperierten PBS und Durchmischen gestartet. Die Konzentration des Pro-Nucleotids in der so hergestellten Kinetik-Lösung betrug 0.94 mM, die der Puffersalze 24.8 mM. Sofort nach Zugabe des PBS wurde jeweils ein erstes Aliquot entnommen (t_0). Während der Hydrolyse wurden weitere Proben entnommen und zum Stoppen auf einen Tropfen konzentrierte Essigsäure pipettiert sowie auf $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (flüssiger Stickstoff) abgekühlt. Die so erhaltenen Proben wurden RP-HPLC-analytisch bei UV-Detektion untersucht.

Sämtliche Hydrolysekinetiken wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Auswertung der Kinetiken wurde für jede Probe der Quotient aus den Peakflächen des Prodrugs und des internen Standards gebildet (= normierte Integrationseinheit; normierte **IE**) und gegen die Hydrolysedauer (in Stunden; h) graphisch aufgetragen. Durch die experimentell bestimmten Messpunkte wurden mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogrammes exponentielle Ausgleichskurven gelegt, so dass sich Werte für die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten k der Hydrolyse ergaben. Aus den so erhaltenen Werten für k konnten gemäß der Formel

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

die Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ errechnet werden.

Zur Identifikation der Hydrolyseprodukte, die nicht immer eindeutig durch Koinjektion mittels der HPLC bestimmt werden konnten, und zur mechanistischen Verfolgung der Hydrolyse, wurden ^{31}P -NMR-Studien herangezogen.

Zu deren Durchführung wurden ungefähr 7 μmol des jeweiligen bis-(Benzyl)-phosphat-Triesters in Gemischen aus deuteriertem DMSO und einem 50 mM Imidazol-Salzsäure-Puffer ($\text{pH} = 7.3$) gelöst. Die Hydrolysen fanden bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ im NMR-Röhrchen statt und wurden durch Messung ^1H -entkoppelter ^{31}P -NMR-Spektren verfolgt. Unter den genannten Bedingungen lagen die Hydrolyse-Halbwertszeiten im Bereich mehrerer Tage, so dass eine spektroskopische Verfolgung der Reaktion problemlos möglich war.

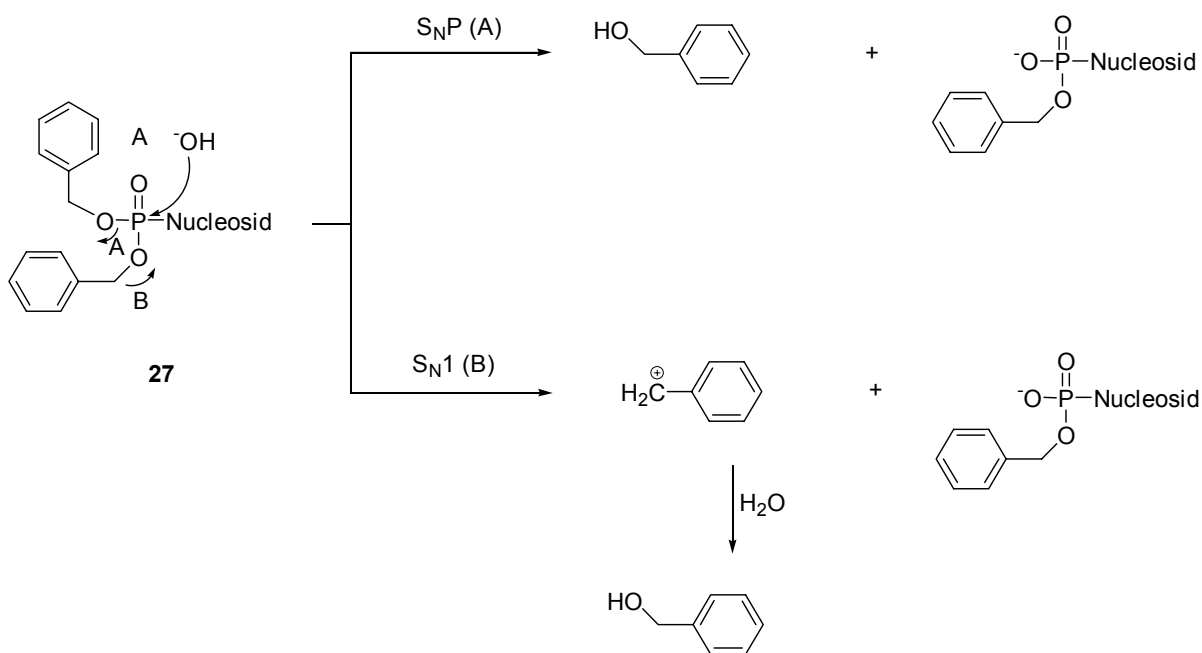
In Tabelle 2 sind die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ und Hydrolyseprodukte der Verbindungen **25-31** einer Hydrolyse bei $\text{pH} 7.3$ in PBS aufgeführt.

Tabelle 2: Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ bei pH 7.3

Verbindung	Halbwertszeit $t_{1/2}$ [h]	Hydrolyseprodukte
	PBS; 25 mM; pH 7.3; 37 °C 1. Schritt / 2. Schritt	[%] ²
bis-(Benzyl)-d4TMP 27	16.8 / --- ¹	Diester (100)
bis-((<i>R</i>)- α -Methylbenzyl)-d4TMP 25	0.05 / --- ¹	Diester (100)
bis-((<i>S</i>)- α -Methylbenzyl)-d4TMP 26	0.05 / --- ¹	Diester (100)
bis-(α -MCM-Benzyl)-d4TMP 28	4.1 / --- ¹	Diester (100)
bis-[<i>p</i> -AB]-d4TMP 30	7.2 / 17.2	d4TMP (100)
bis-[<i>o</i> -AB]-d4TMP 31	> 100	d4TMP (100)
bis-[α -MCM-AB]-d4TMP 29	1.8/27.6	d4TMP (100)

¹: keine weitere Hydrolyse; ²: bestimmt durch HPLC und/oder durch ³¹P-NMR

Bevor die Daten an sich und im Hinblick auf mechanistische Interpretationen diskutiert werden, wird im Vorfeld der Reaktionsmechanismus einer Abbaureaktion von Benzylphosphateestern besprochen. Denkbar ist hierbei ein Additions-/Eliminierungsmechanismus am Phosphoratom (S_NP -Reaktion), sowie eine S_N1 -Reaktion in der Benzylposition (Abb. 52).

Abb. 52: S_NP -Angriff versus S_N1 -Angriff

Bei der S_N1 -Reaktion kommt es zu einem spontanen Bruch der Benzyl-C-O-Bindung, unter Ausbildung eines Phosphat-Diesters und eines Benzyl-Kations, das mit Wasser als Nucleophil zu Benzylalkohol reagieren kann.

Bei der S_NP -Reaktion hingegen erfolgt ein nucleophiler Angriff des Wassers (Hydroxids) direkt am Phosphoratom. Der sich bildende trigonal-bipyramidale Übergangszustand kann sich durch Abspaltung des Benzylalkohols stabilisieren und geht dabei in den Phosphat-Diester über. Die Fähigkeit eines Alkohols als Austrittsgruppe zu fungieren, hängt wesentlich von seiner Basizität (pKs-Wert) ab; je basischer der Alkohol, desto niedriger ist seine Austrittswahrscheinlichkeit.

Betrachtet man die Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ der dargestellten Phosphat-Triester, so wird eine deutliche Beschleunigung der Hydrolyse für Triester mit Substituenten in der Benzylposition festgestellt. Formal handelt es sich bei den resultierenden Alkoholen um sekundäre Alkohole, deren korrespondierende Anionen basischer sind als die von primären. Folglich sollte, bei Annahme eines S_NP -Mechanismus, die Hydrolysehalbwertszeit für α -substituierte Benzylalkohole, im Vergleich zum unsubstituierten Prototyp **27**, deutlich ansteigen. Da jedoch genau das Gegenteil beobachtet wird, wird für die folgende Diskussion der S_N1 -Mechanismus zugrunde gelegt.

Als erstes wird der Einfluss der Substituenten in Benzylposition auf die Halbwertszeit diskutiert. Bei den vier Verbindungen **25-28** wurde allein die erste Benzylester-Bindung unter Bildung des Phosphat-Diesters gespalten. Die Spaltung der zweiten Benzylphosphat-esterbindung findet nicht statt. Hier verhindert die durch die erste Esterspaltung entstandene negative Ladung am Phosphoratom die Fähigkeit des 5'-Nucleosidphosphat-Fragments, als Austrittsgruppe zu fungieren.⁴⁵

Interessant sind die sehr unterschiedlichen Halbwertszeiten $t_{1/2}$ dieser Verbindungen; so hydrolysiert die in Benzylposition unsubstituierte Verbindung **27** mit einer Halbwertszeit von 16.8 h. Eine elektronenziehende Methoxycarbonylmethyl-Gruppe in α -Stellung (**28**) verkürzt die Halbwertszeit $t_{1/2}$ auf 4 h. Ebenso bewirkt die elektronenschiebende Methylgruppe in Benzyl-Position eine Verringerung, allerdings in so drastischem Ausmaß, dass die Halbwertszeit $t_{1/2}$ nur noch drei Minuten für **25** und für **26** beträgt.

Fraglich ist, ob der elektronenziehende Effekt der Estergruppe über die Methylengruppe hinaus einen Einfluß hat. Um diese Frage zu beantworten, wurde die ^1H -Verschiebung der zur Methoxycarbonylmethyl-Gruppe von Triester **28** benachbarten CH-Gruppe verglichen mit den der Triester **25** und **26**. Das gegenüber den Triestern **25** und **26** (5.2 ppm)

tieffeldverschobene Signal der CH-Gruppe von Triester **28** bei 5.6 ppm resultiert aus der elektronenziehenden Wirkung der Estergruppe.

Das Phänomen der unterschiedlichen Halbwertszeiten wird durch einen spontanen Benzyl-C-O-Bindungsbruch erklärt. Eben diese Spontanität und die sie implizierenden Halbwertszeiten hängen von der Stabilität des in einer S_N1 -Reaktion entstehenden Benzyl-Kations ab (Abb. 53), das abschließend mit Wasser zu Benzylalkohol reagiert. Folglich werden für Benzyl-Kationen, die sich stabilisieren können, kleinere Halbwertszeiten $t_{1/2}$ erwartet.

Nach der ausführlichen Diskussion dieses Phänomens wird an dieser Stelle auf die Fragestellung eingegangen, inwieweit die Stereochemie der Benzylposition auf das Hydrolyseverhalten Einfluß nimmt. Die diastereomeren Verbindungen bis-((*R*)- α -Methylbenzyl)-d4TMP **25** und bis-((*S*)- α -Methylbenzyl)-d4TMP **26** weisen gleiche Halbwertszeiten $t_{1/2}$ auf, so dass von einer stereochemischen Beeinflussung der Hydrolyse nicht gesprochen werden kann.

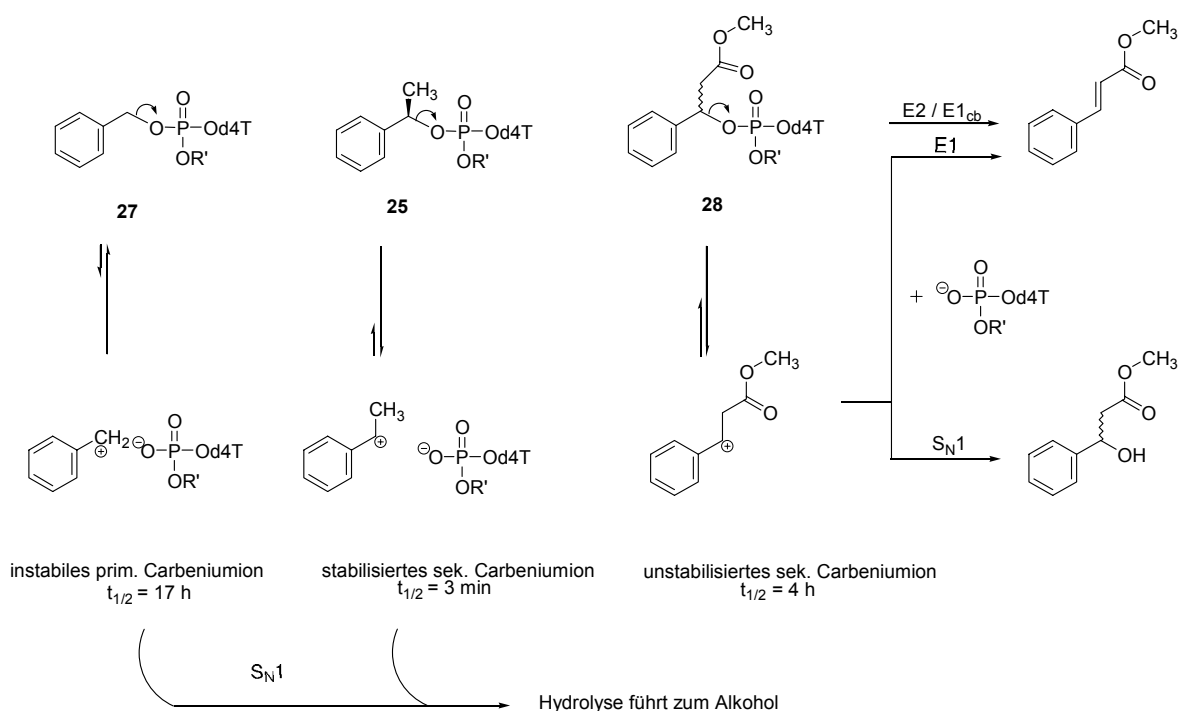


Abb. 53: Carbeniumionen und die resultierenden Halbwertszeiten der Verbindungen **25-28**

Im Fall der Verbindung **27** müsste sich ein primäres Carbeniumion ausbilden, dessen Instabilität und die damit verbundene geringe Tendenz der Bildung erklären die lange Halbwertszeit von 17 h. Die Verbindungen **25** und **28** tragen beide einen Substituenten in der Benzylposition, so dass bei beiden sekundäre Carbeniumionen ausgebildet werden. Also müssen die Substituenten für die verschiedenen Halbwertszeiten verantwortlich sein. Die Methylgruppe von **25** stabilisiert durch ihren +I-Effekt das sekundäre Benzylkation und beschleunigt somit seine Bildung, was in der kleinen Halbwertszeit von drei Minuten Ausdruck findet. Hingegen destabilisiert der –I-Effekt der Methoxycarbonylmethyl-Gruppe von **28** dieses sekundäre Carbeniumion, wodurch sich die Halbwertszeit auf 4 h verlängert.

Als zweites soll das Augenmerk auf die Verbindungen **29** und **30** gerichtet werden. Beide Verbindungen basieren auf dem bis-[AB]-Konzept, folglich handelt es sich um enzymatisch gesteuerte Systeme. Gemeinsam haben diese Konzepte, dass im ersten Schritt eine Carboxyesterase an der Maske eine Esterbindung spaltet, die eine Aktivierung nach sich zieht, gefolgt von einer spontanen Abspaltung des restlichen Maskenteils. Daher ist es bemerkenswert, dass beide Verbindungen bereits unter chemischen Bedingungen hydrolysieren. Um das Hydrolyseverhalten aufzuklären, wurden Koinjektionsversuche und ^{31}P -NMR-Studien durchgeführt.

Bei den Koinjektionsversuchen wurden sowohl die Hydrolysate der Verbindungen **29** und **30** als auch d4TMP **39α** zuerst separat HPLC-analytisch untersucht (Abb. 54). In beiden Fällen stimmte die Retentionszeit des jeweiligen Hydrolysats mit der Retentionszeit von d4TMP **39α** überein. Dieser Hinweis, dass bereits unter chemischen Hydrolysebedingungen das Nucleosidmonophosphat freigesetzt wurde, fand seine Bestätigung durch die Koinjektion. Das Chromatogramm wies keinen neuen Peak auf, allerdings vergrößerte sich wie erwartet die Peakfläche des d4TMPs **39α**.

Die Untersuchungen wurden an einer RP-18-Phase mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten durchgeführt (Acetonitril-Gradient in Wasser von 0–80 % in 20 Minuten, dann Acetonitril-Gradient in Wasser von 80% bis 100% in 5 Minuten, dann 10 Minuten 100% Acetonitril, abschließend 5 Minuten 100% Wasser mit einer Flussrate von 0.5 mL/min).

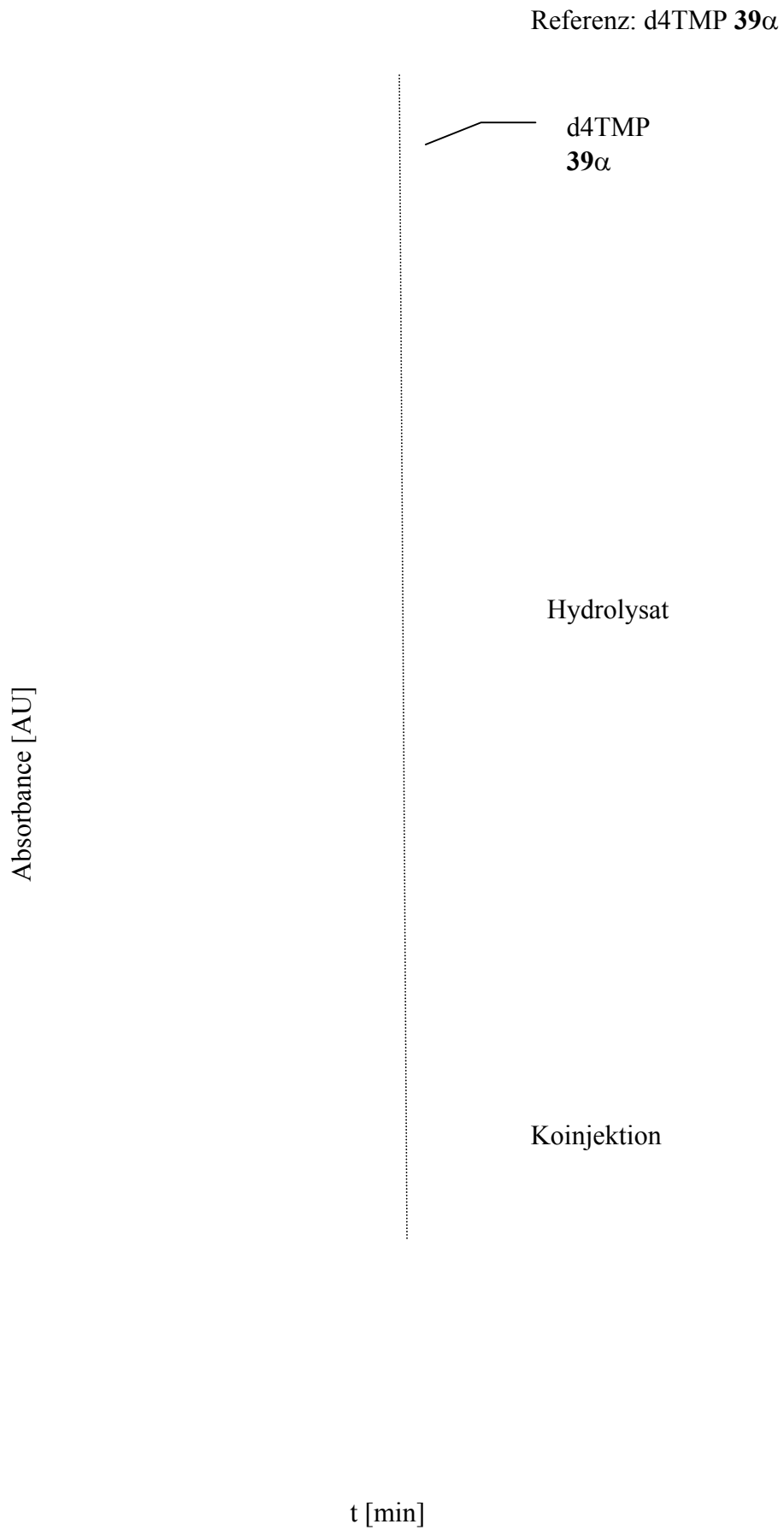


Abb. 54: Koinjektion zum Nachweis von d4TMP **39** α (RP-18, Gradient B)

Ebenfalls belegen die ^{31}P -NMR-Studien (Abb. 55), beispielhaft an Verbindung **30** erläutert, dass bereits bei einem pH von 7.3 ohne Carboxyesterase binnen 23 Tagen das Monophosphat freigesetzt wurde. Die ^{31}P -Spektren zeigen eindrucksvoll in einem Bereich von 0.5 ppm, wie das Signal des Phosphat-Triesters **30** bei 0.35 ppm abnimmt unter Bildung eines zum Phosphat-Diester gehörenden Signals bei 0.5 ppm. Dieses Signal wiederum verkleinert sich bei gleichzeitiger Bildung des d4TMP-Signals **39 α** bei 0.7 ppm.

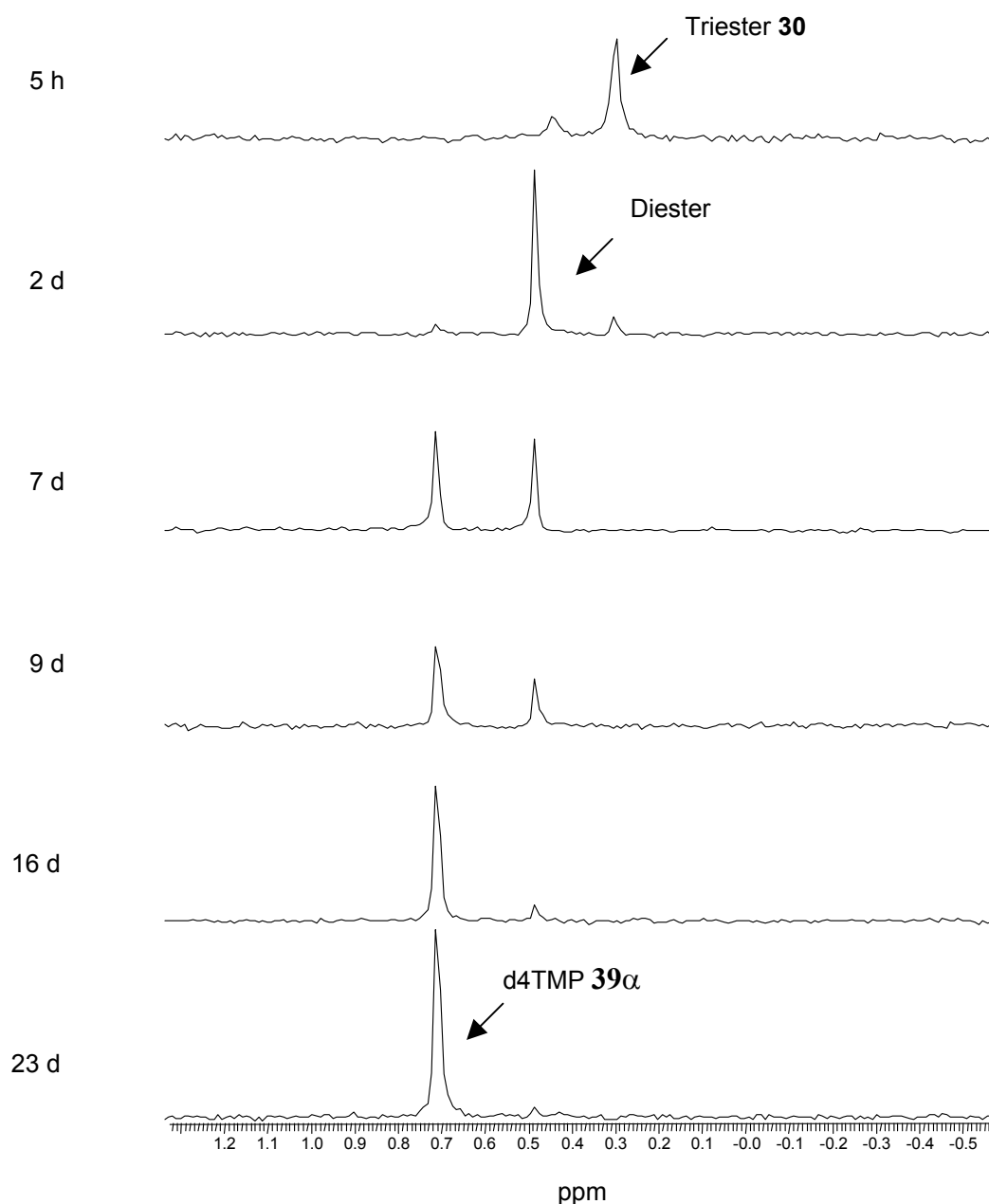


Abb. 55: ^{31}P -NMR-Hydrolysestudie von bis-[pAB]-d4TMP **30**

Kinetische Untersuchungen zur Bildung des d4T-Monophosphates **39 α** zeigen, dass die Phosphat-Diester der Verbindungen **29** und **30** nur langsam zum d4TMP **39 α** hydrolysieren. Die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ dieses zweiten Schrittes liegen bei 27.6 h für **29** und 17.2 h für **30**. Zur Erklärung der Bildung von d4TMP **39 α** der Verbindungen **29** und **30** unter chemischen Hydrolysebedingungen ist ein Vergleich mit ihren in *para*-Position unsubstituierten Analoga **27** und **28** notwendig, die nur bis zum Phosphat-Diester hydrolysieren. Dieser Umstand weist der 4-Acetoxygruppe eine Rolle zu, die sich normalerweise in einer Deaktivierung der Hydrolysegeschwindigkeit und somit in größeren Halbwertszeiten $t_{1/2}$ widerspiegelt.⁴⁵ Die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der Verbindungen **30** und **29** mit 7.2 h und 1.8 h sind aber kleiner als die der Verbindungen **27** und **28** mit 16.8 h und 4.1 h. Das Ergebnis könnte auf eine Esterspaltung in *para*-Position hindeuten, wodurch auf der einen Seite Essigsäure gebildet wird und auf der anderen Seite eine *para*-Hydroxygruppe (Esterspaltung in Abb. 56). Diese Umpolung aktiviert ihrerseits die Benzyl-C-O-Bindung, welche unter 1,6-Eliminierung einen Phosphatester und ein *para*-Chinonmethid bildet. Die Annahme einer parallel ablaufenden Esterspaltung erklärt nicht nur die Halbwertszeiten, sondern vor allem die Freisetzung von d4TMP **39 α** unter chemischen Bedingungen.

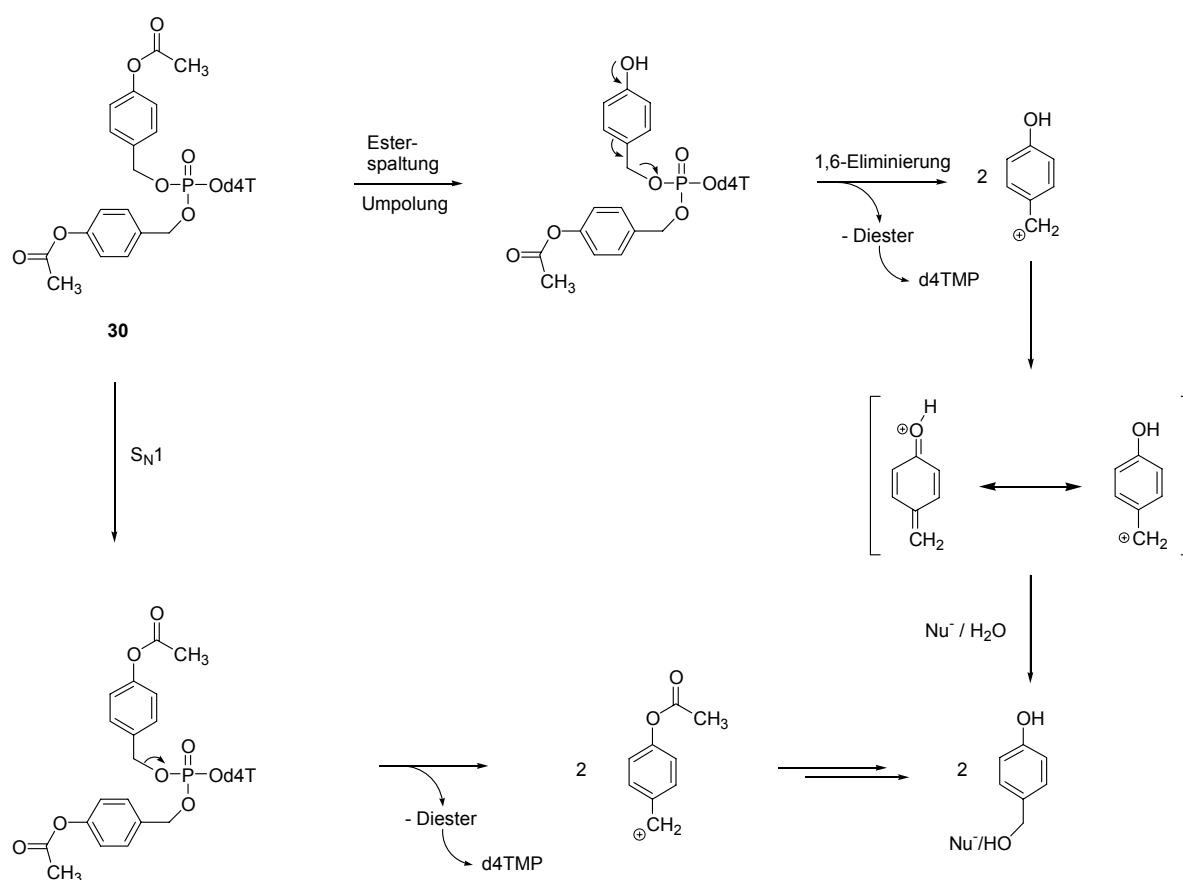


Abb. 56: Parallel ablaufende Reaktionen von **30**

Somit bleibt als Ergebnis festzuhalten, dass parallel zu einer S_N1 -Reaktion der 4-Acetoxyester gespalten wird und das bis-[α -MCM-AB]-d4TMP **29** zwar seinem „intramolekular abfangenden Konzept“ entsprechende Hydrolyseprodukte liefert, allerdings verringert sich dadurch die chemische Stabilität von **29**.

Als drittes wurden die Halbwertszeiten der Verbindungen **29** und **30** zueinander untersucht. Mit einer Halbwertszeit von 1.8 h für den ersten Schritt hydrolysiert Verbindung **29** wesentlich schneller als Verbindung **30** in 7.2 h. Das Ergebnis beruht auf den die Verbindungen unterscheidenden Substituenten in Benzylposition. Verbindung **29** bildet ein, wenn auch unstabilisiertes, sekundäres Benzylkation aus und hydrolysiert deshalb schneller im Gegensatz zu Verbindung **30**, die ein primäres Benzylkation durchläuft. Daraus ergibt sich für die Bildung des Phosphat-Diesters, dass die parallel zu einer Esterspaltung in *para*-Position ablaufende S_N1 -Reaktion für **29** vermehrt stattfindet. Hingegen erfolgt der zweite Schritt, also die Bildung des Nucleosidmonophosphates allein durch die, die Umpolung einleitende Spaltung des 4-Acetoxyesters.

Als vierter Punkt wird das bis-[*o*-AB]-d4TMP **31** diskutiert, das Verbindungsglied zwischen dem *cycloSal*- und dem acyclischen bis-[AB]-Konzept. Verglichen mit dem bis-[*p*-AB]-d4TMP **30** ist die Halbwertszeit $t_{1/2}$ von bis-[*o*-AB]-d4TMP **31** um den Faktor 14 größer und weist **31** mit $t_{1/2} > 100$ h als eine sehr stabile Verbindung gegenüber chemischer Hydrolyse aus. Ein Ansatz zur Erklärung dieses Verhaltens liegt in der sterischen und/oder elektronischen Behinderung des Benzylkations, welches durch eine S_N1 -Reaktion abgefangen wird.

Insgesamt betrachtet, gestatten die chemischen Hydrolysen bei pH 7.3 detaillierte mechanistische Interpretationen.

3.3.1.2 Hydrolysen in humanen CEM/0-Zellen

Das intrazelluläre Verhalten der Verbindungen **25** - **31** wurde durch Hydrolysekinetiken in Extrakten humaner CEM/0-Zellen durchgeführt. Diese Zellextrakte wurden freundlicherweise von Dr. Lieve Naesens, Rega Institut Leuven, Belgien, zur Verfügung gestellt. Ziel der Untersuchung war neben der Bestimmung von Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ auch eine Identifikation der gebildeten Produkte.

Zur Durchführung wurde der jeweilige Zellextrakt mit Magnesiumchlorid-Lösung versetzt und die Hydrolyse durch Zugabe einer 1.5 mM Lösung des jeweiligen Phosphat-Triesters

gestartet. Im Gegensatz zu den chemischen Hydrolysen wurden aus diesen Hydrolyselösungen keine Aliquote entnommen. Vielmehr wurde für jeden gewünschten Messwert eine eigene Hydrolyselösung angesetzt, um eine Kontamination des biologischen Mediums durch Probennahme zu vermeiden. Somit war auch die Verwendung eines internen Standards nicht notwendig. Die Hydrolyse wurde schließlich durch die Zugabe von essigsaurem Methanol gestoppt und die Lösung anschließend bei 0 °C aufbewahrt, um ein möglichst vollständiges Ausfallen der denaturierten Protein-Bestandteile zu gewährleisten. Nach Zentrifugation wurde der zusätzlich filtrierte Überstand RP-HPLC-analytisch bei UV-Detektion untersucht. Auch für die Zellextrakt-Kinetiken wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

Zur Auswertung wurden die Absolutflächen des jeweiligen Phosphat-Triesters gegen die Hydrolysedauer (in Stunden; h) graphisch aufgetragen. Die Ermittlung der Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ erfolgte analog zu dem im Kapitel 3.3.1.1, S. 44 für die chemischen Hydrolysekinetiken beschriebenen Verfahren.

In Tabelle 3 sind die Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ der Verbindungen **25** - **31** unter enzymatischen Hydrolysebedingungen wiedergegeben.

Tabelle 3: Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ in CEM/0-Zellen

Verbindung	$t_{1/2}$ [h] CEM/0	$t_{1/2}$ [h] PBS
	1. Schritt / 2. Schritt	1. Schritt / 2. Schritt
bis-(Benzyl)-d4TMP 27	8.5 / --- ¹	16.8 / --- ¹
bis-((<i>R</i>)- α -Methylbenzyl)-d4TMP 25	< 0.15 / --- ¹	0.05 / --- ¹
bis-((<i>S</i>)- α -Methylbenzyl)-d4TMP 26	< 0.15 / --- ¹	0.05 / --- ¹
bis-(α -MCM-Benzyl)-d4TMP 28	5.0 / --- ¹	4.1 / --- ¹
bis-[<i>p</i> -AB]-d4TMP 30	< 0.15 / 4	7.2 / 17.2
bis-[<i>o</i> -AB]-d4TMP 31	1.4 / 5	> 100
bis-[α -MCM-AB]-d4TMP 29	< 0.15 / 25	1.8 / 27.6

¹: keine weitere Hydrolyse

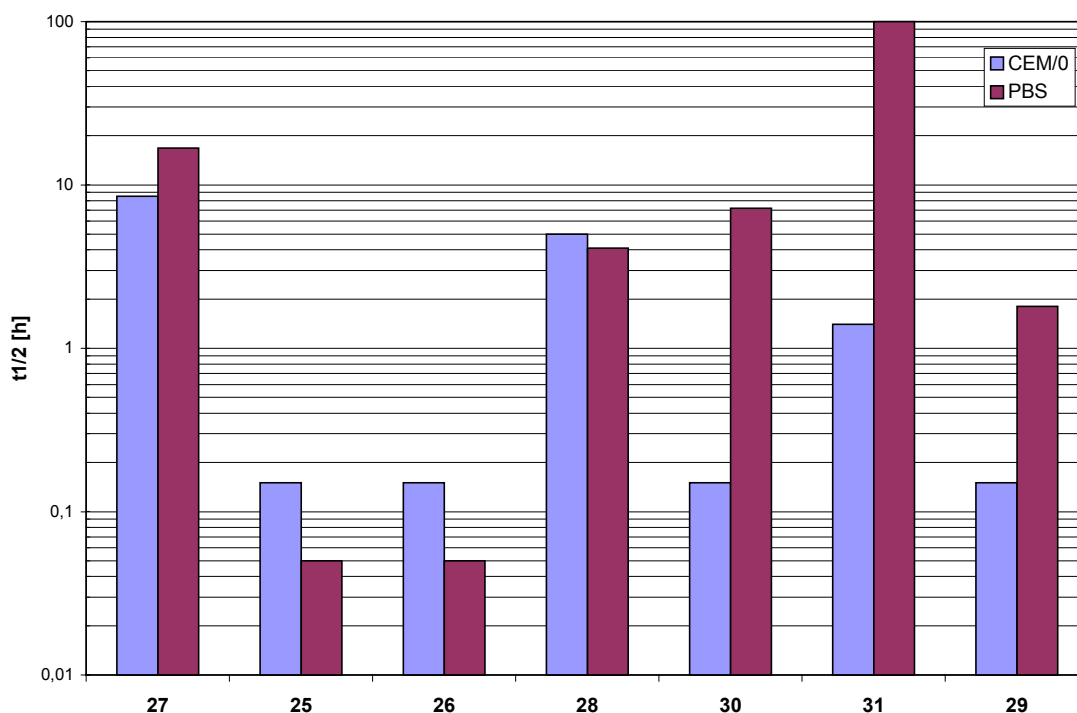


Diagramm 1: Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ in CEM/0-Zellen sowie im PBS-Puffer bei pH = 7.3 (logarithmische Auftragung)

Die in humanen Zellextrakten bestimmten Halbwertszeiten $t_{1/2}$ korrelieren mit denen in Phosphatpuffer bei pH 7.3 gemessenen Daten. Jedoch weisen die drei Verbindungen **29**, **30** und **31** kürzere Halbwertszeiten $t_{1/2}$ auf.

Bei der Hydrolyse der Verbindungen **25** - **28** wurde erneut lediglich die Bildung des Phosphat-Diesters beobachtet, eine anschließende Freisetzung des d4T-Monophosphates **39 α** wurde nicht detektiert. Die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ sowohl der chemischen als auch der enzymatischen Hydrolyse stimmen sehr gut überein. Damit belegen die Ergebnisse, dass eine enzymatische Spaltung auszuschließen ist.

Indessen verringern sich die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der Verbindungen **29** - **31** erheblich. Der konzeptionelle Ansatz des bis-[AB]-Konzept von FREEMAN und dessen Weiterentwicklung von GLAZIER beruht auf einem genügenden Abstand der anionischen Phosphatgruppe des Diesters vom aktiven Zentrum der Carboxyesterase. Der Hydrolysemechanismus beginnt mit einer enzymatischen Spaltung der Carbonsäureestergruppe der bis-(*para*-Acyloxybenzyl)-einheit. Aufgrund der elektronenschiebenden Wirkung der entstandenen Hydroxylgruppe wird die C_{Benzyl}-O-Bindung gespalten und ein 4-Hydroxybenzyl-Kation und der Mono-(*para*-Acyloxybenzyl)phosphat-Diester freigesetzt. Die letztgenannte Verbindung durchläuft aufgrund des ausreichenden Abstandes von 4 Å den Hydrolysemechanismus unter Freisetzung von d4TMP **39 α** und eines Hydroxybenzyl- bzw. Benzylalkohols erneut. Die

deutlich verkürzten Halbwertszeiten $t_{1/2}$ zeigen, dass das Enzym seine Aufgabe effektiv erfüllt. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass in Langzeittests von vier Wochen die Dephosphorylierung des freigesetzten d4TMPs **39** α nicht beobachtet wurde.

Indes differiert die Halbwertszeit der *ortho*-Verbindung **31** mit 1.4 h für den ersten Schritt sehr stark von der Halbwertszeit der *para*-Verbindung **30** mit <0.15 h. Eine Begründung für die verlängerte Halbwertszeit des bis-[*o*-AB]-d4TMP **31** ist vermutlich in einer sterischen Hinderung des Enzyms durch die *ortho*-Stellung der Substituenten zu suchen.

Erstaunlich ist ein Vergleich der Halbwertszeiten des zweiten Hydrolyseschrittes. Bereits erläutert wurde, dass intermediär auftretende Phosphat-Diester durch ihre negative Ladung die Substrataffinität des Enzyms beeinträchtigen und daher die Spaltung der zweiten Phosphatesterbindung behindern. Diesbezüglich wurde von FREEMAN ein rigider Spacer in Form einer Benzylgruppe (4 Å) zwischen den Phosphatester und die in *para*-Position befindliche primäre Spaltstelle eingebracht. Folglich müsste die enzymatische Spaltung des Phosphat-Diesters der *ortho*-Verbindung gehemmt sein und sich diese Gegebenheit in einer längeren Halbwertszeit ausdrücken. Mit 4 h für Triester **30** und 5 h für Triester **31** haben beide Verbindungen jedoch den gleichen Wert im Rahmen der Fehlergenauigkeit. Daher ist anzunehmen, dass ein ausreichender Abstand zwischen dem aktiven Zentrum der Carboxyesterase und der negativen Ladung nicht erst durch neun, sondern bereits durch sieben Bindungen gegeben ist. Da die Anzahl der Bindungen in einer räumlichen Darstellung an Aussagekraft verliert, wurden die Verbindungen **30** und **31** einer energieminimierenden Kraftfeldrechnung (Chem 3D Pro Version 4.0) unterzogen. Wobei der Abstand zwischen dem Carboxylkohlenstoff und dem Phosphoratom des Phosphatdiesters bei der *para*-Verbindung **30** 8.8 Å beträgt, bei der *ortho*-Verbindung lediglich 5.0 Å. Somit zeigt auch dieses grobe Modelling, dass ein kleinerer Abstand ausreichen dürfte.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die in humanem Zellextrakt bestimmte Halbwertszeit von $t_{1/2} = 25$ h für den zweiten Hydrolyseschritt von bis-[α -MCM-AB]-d4TMP **29** mit den 27.6 h der chemischen Hydrolyse übereinstimmt. Das Resultat deutet einen ohne enzymatische Beteiligung ablaufenden zweiten Hydrolyseschritt an.

Im Ganzen betrachtet liefern die drei Verbindungen **29** - **31** einen überzeugenden Beweis für einen enzymatisch gesteuerten Mechanismus.

3.3.2 Massenspektrometrische Untersuchung

Des Weiteren wurden die Produkte der in CEM/0-Zellextrakten durchgeführten Hydrolyse von bis-[α -MCM-AB]-d4TMP **29** mittels Gaschromatographischer/Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS) untersucht. Zur Identifikation wurden die Retentionszeiten und die Massenspektren von Referenzsubstanzen herangezogen. Die verwendete Probe wurde 45 min hydrolysiert, so dass bei einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 9$ min der Phosphat-Triester vollständig hydrolysiert worden war. Damit wurde gewährleistet, dass das Hydrolysat die Endprodukte in detektierbaren Mengen enthält.

Neben der bereits bewiesenen Freisetzung von d4TMP **39 α** sind *para*-Acetoxy-(α -MCM)-benzylalkohol **60** und verschiedene seiner Derivate als Hydrolyseprodukte denkbar (Abb. 57).

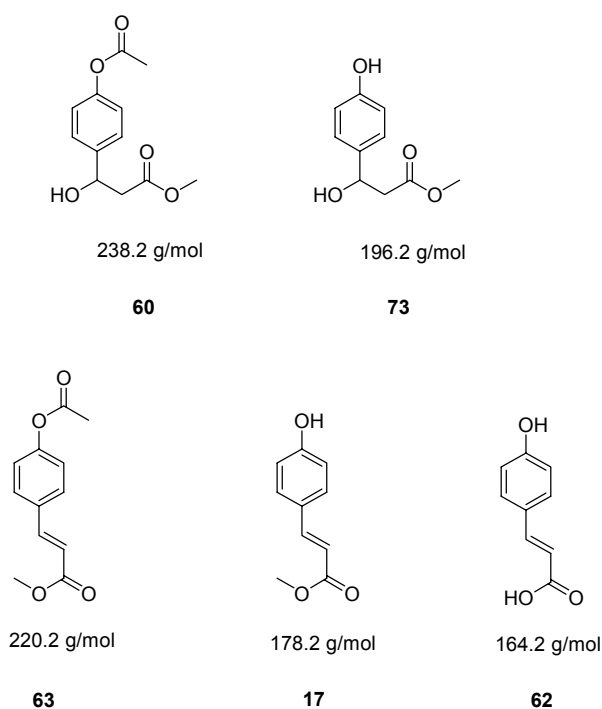


Abb. 57: Mögliche Hydrolyseprodukte von bis-[α -MCM-AB]-d4TMP **29**

Vorstellbar ist eine S_NP -Reaktion, wodurch *para*-Acetoxy-(α -MCM)-benzylalkohol **60** freigesetzt wird, der im basischen Milieu zum *para*-Acetoxyzimtsäuremethylester **63** eliminiert. Aus dem Massenspektrum (Abb. 58) des Hydrolysats geht die Molmasse von **60** mit 238 g/mol bzw. von **63** mit 220 g/mol nicht hervor, da alle Signale unter m/z 200 auftreten.

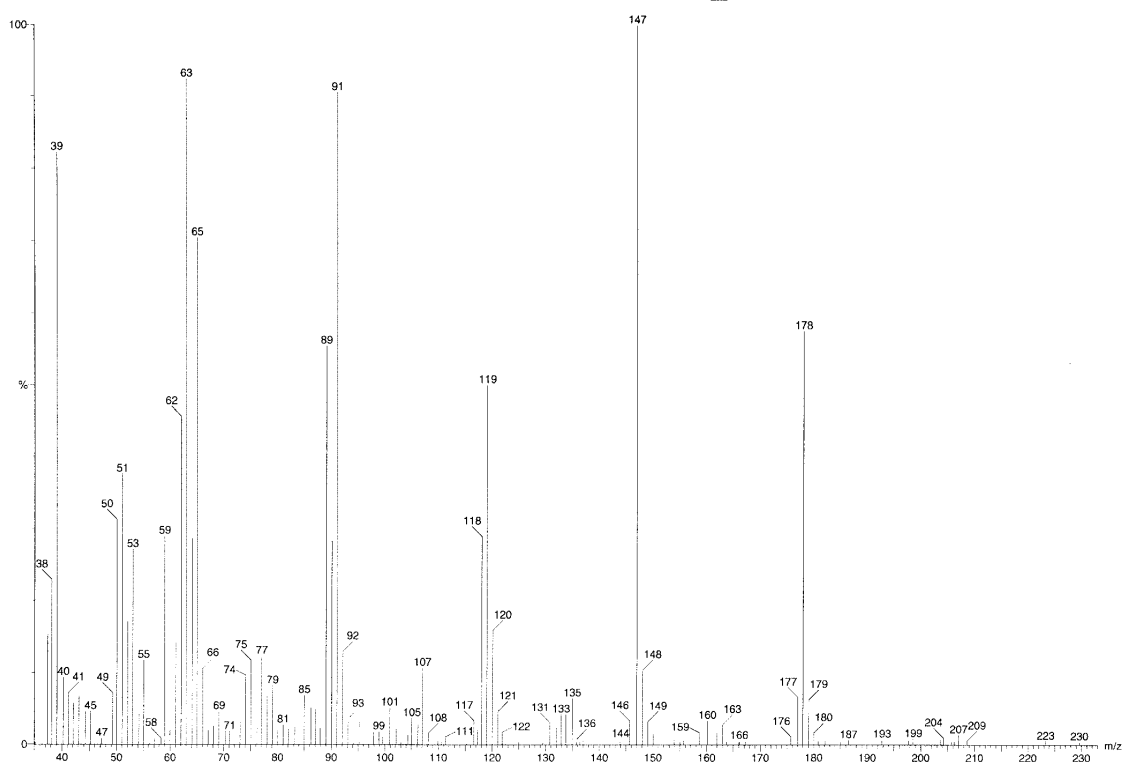


Abb. 58: Massenspektrum des Hydrolysats von bis-[α -MCM-AB]-d4TMP **29**

Des Weiteren tritt m/z 43, ein für Acetylgruppen typisches Signal, im Massenspektrum nicht auf. Somit sind *para*-Acetoxy-(α -MCM)-benzylalkohol **60** und *para*-Acetoxyzimtsäuremethylester **63** als Hydrolyseprodukte unwahrscheinlich.

Weitere mögliche Hydrolyseprodukte sind entweder der aus dem *para*-Chinonmethid durch eine intramolekulare Eliminierungsreaktion gebildete *para*-Hydroxymethylester **17** oder der durch eine nucleophile Abfangreaktion (S_N1) gebildete *para*-Hydroxy-(α -MCM)-benzylalkohol **73**, welcher unter basischen Bedingungen zu **17** eliminiert. Das höchste auftretende Signal im Massenspektrum des Hydrolysats ist dasjenige mit m/z 178, also wurde der Moleküllen-Peak von *para*-Hydroxy-(α -MCM)-benzylalkohol **73** mit einer Molmasse 196 g/mol nicht detektiert. Eventuell hat der *para*-Hydroxy-(α -MCM)-benzylalkohol **73** Wasser eliminiert.

Allerdings weist dessen Referenzspektrum (Abb. 59) einen Basis-Peak mit m/z 123 auf, den das Massenspektrum des Hydrolysats vermissen lässt.

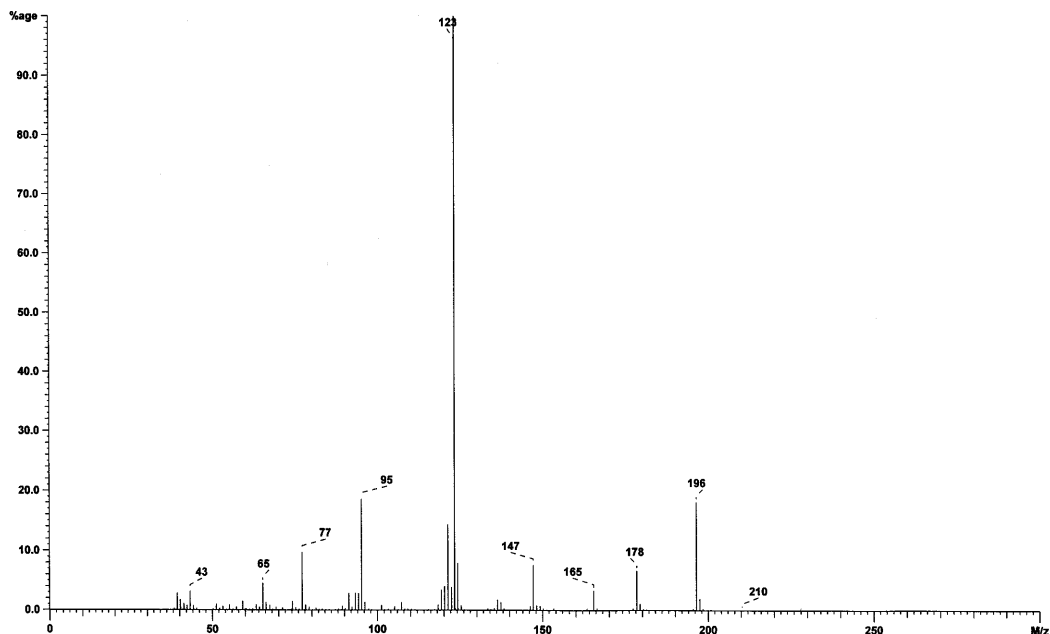


Abb. 59: Massenspektrum der Referenzverbindung *para*-Hydroxy-(α -MCM)-benzylalcohol **73**

Es handelt sich bei m/z 123 um ein stabiles Fragment von $[\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CO}]^+$. Die Differenz von m/z 73 entspricht dem abgespaltenen $[\text{CH}_2\text{COOCH}_3]^+$ -Fragment des Methylesters. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass das Hydrolysat keinen *para*-Hydroxy-(α -MCM)-benzylalcohol **73** enthält.

Allerdings beträgt die Molmasse von *para*-Hydroxyzimtsäuremethylester **17** 178 g/mol, daher ist denkbar, dass das höchste Signal dessen Molekülionen-Peak darstellt. Dieser erste Hinweis wird unterstützt durch gleiche Retentionszeiten und vor allem durch identische Massenspektren des Hydrolysats und der Referenzsubstanz.

Bemerkenswert ist, dass das Gaschromatogramm sowohl vom Hydrolysat als auch von der Referenzsubstanz zwei Peaks aufweist, deren Massenspektren zueinander identisch sind. Das ^1H -NMR-Spektrum der Referenzsubstanz zeigt nur einen Signalsatz mit der für das thermodynamisch-stabilere *trans*-Produkt typischen Kopplung von 15.8 Hz. Grund für die zwei Peaks ist wahrscheinlich eine geringe Anregungsenergie, da das Molekül von der Carbonylgruppe des Methylesters bis zum Aromaten konjugiert ist. Daher kommt es während der Messung zur Isomerisierung und der *para*-Hydroxyzimtsäuremethylester **17** liegt gleichzeitig als *cis*- und *trans*-Produkt vor (Abb. 60).

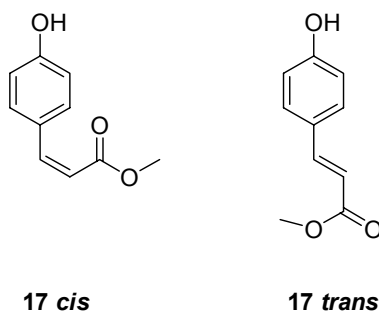


Abb. 60: Konfigurationsisomere des *para*-Hydroxyzimtsäuremethylesters **17**

Die Retentionszeiten liegen bei 16.85 min und 18.07 min für das Hydrolysat **29** und bei 16.98 min und 18.20 min für die Referenzsubstanz **17**(Abb. 61).

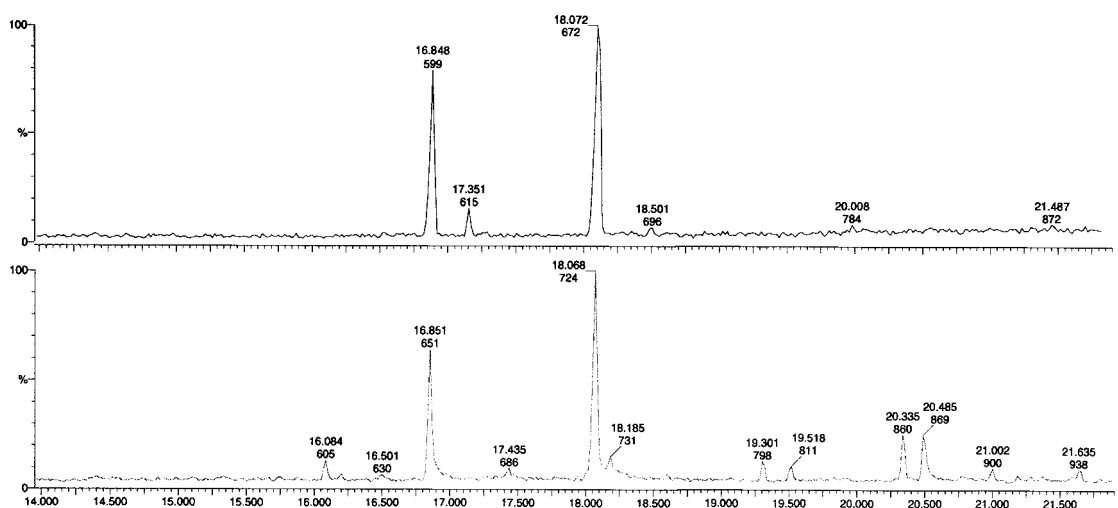


Abb. 61: Gaschromatogramme der Referenzverbindung *para*-Hydroxyzimtsäuremethylester **17** (oben) und des Hydrolysats **29** (unten); (DB 5 fused silica, 60 °C / 0 min / 10 °C/min / 300 °C / 5 min)

Die identischen Massenspektren weisen auch dieselben Intensitäten auf. Der Basispeak liegt mit m/z 147 vor (Abb. 62), gebildet wird $M - 32$ durch die Abspaltung von Methanol aus dem Methylester. Charakteristisch für Methylester sind die Signale bei m/z 74, das aus einer McLafferty-Umlagerung (in diesem Fall nicht möglich) hervorgeht und m/z 59 durch eine α -Spaltung; das Signal m/z 59 findet sich im Spektrum. Das Fragmentation m/z 119 entsteht durch die Abspaltung von m/z 59 $[\text{COOCH}_3]^+$. Diese Fragmente belegen, dass es sich bei dem Hydrolyseprodukt sehr wahrscheinlich um den Methylester der *para*-Hydroxyzimtsäure (**17**) handelt.

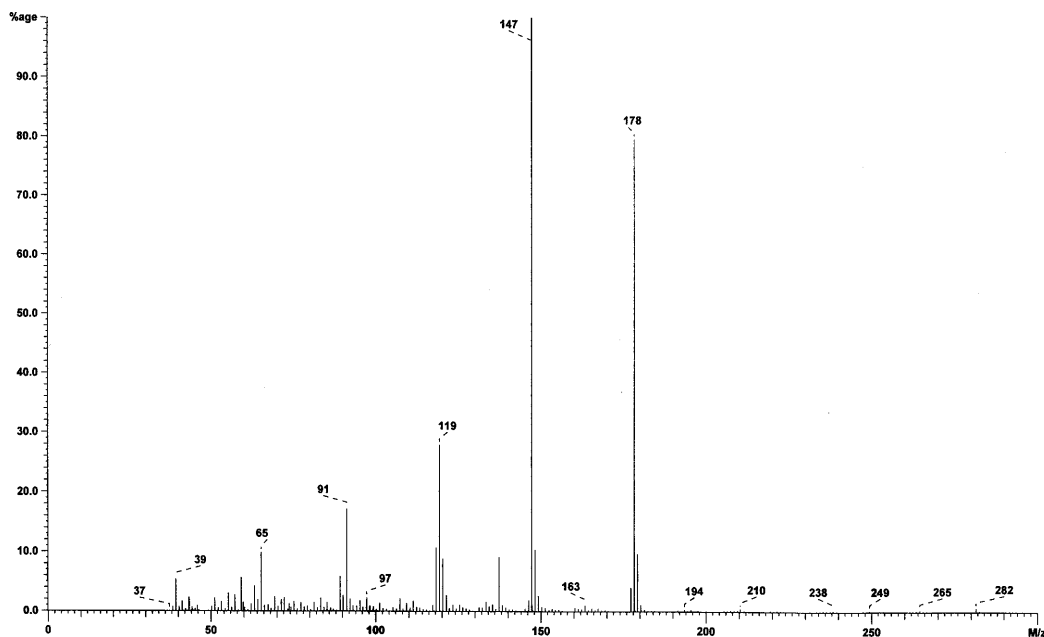


Abb. 62: Massenspektrum der Referenzverbindung *para*-Hydroxycinnensäuremethylester **17**

GLAZIER hat in NMR-Untersuchungen neben dem Ester **17** auch noch die *para*-Hydroxycinnensäure **62** nachgewiesen.⁸² Ein Vergleich der Massenspektren der beiden Referenzsubstanzen zeigt eine weitgehende Übereinstimmung, abgesehen von den Signalen bei m/z 59. Somit ist die Bildung der *para*-Hydroxycinnensäure **62** in Betracht zu ziehen. Die Retentionszeit von 13.5 min und die stark „tailende“ Peakform der *para*-Hydroxycinnensäure **62** lässt sie als Hydrolyseprodukt jedoch ausscheiden.

Ansonsten weist das Massenspektrum die für eine Benzyl-Spaltung typischen Signale auf. Das Ion mit m/z 91 entspricht der Bildung des stabilen Tropyliumions, welches wiederum Ethen abspaltet und zu einem Signal bei m/z 65 führt.

Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit der *para*-Hydroxycinnensäuremethylester **17** als Produkt der in humanen Zellextrakten durchgeführten Hydrolyse identifiziert wurde.

Abschließend ist zu den Untersuchungen in CEM/0-Extrakten zusammenzufassen, dass die Verbindungen **25-28** genauso wie unter chemischen Bedingungen lediglich bis zum Phosphat-Diester hydrolysieren und das alleinig bis-*[o*-AB]-d4TMP **31**, bis-*[p*-AB]-d4TMP **30** und bis-*[α*-MCM-AB]-d4TMP **29** d4TMP **39α** mit zunehmender Reaktionsgeschwindigkeit freisetzen.

3.3.3 Antivirale *in vitro*-Aktivität

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jan Balzarini, Universität Leuven, Belgien, wurden die synthetisierten Phosphat-Triester **25-31** *in vitro*-anti-HIV-Tests in Zellkulturen unterzogen. Als Testsysteme kamen HIV-1- bzw. HIV-2-infizierte humane T-Lymphozyten (CEM/0) ebenso zum Einsatz wie HIV-2-infizierte Thymidin-Kinase-defiziente Zellen (CEM/TK⁻). Außerdem wurde d4T **39** als Referenzsubstanz getestet.

Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Antivirale Daten

Verbindung	EC ₅₀ [μM] ¹		CC ₅₀ [μM] ²	
	CEM/0		CEM/TK ⁻	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
bis-(Benzyl)-d4TMP 27	1.57 ± 0.75	18.3 ± 5.8	> 10	129
bis-((<i>R</i>)-α-Methylbenzyl)-d4TMP 25	113 ± 18	100 ± 0.0	> 250	> 250
bis-((<i>S</i>)-α-Methylbenzyl)-d4TMP 26	51.7 ± 41.9	18.3 ± 5.8	> 250	> 250
bis-(α-MCM-benzyl)-d4TMP 28	5.0 ± 0.7	8.0 ± 28	> 10	≥ 250
bis-[<i>p</i> -AB]-d4TMP 30	0.17 ± 0.12	0.33 ± 0.11	0.13 ± 0.04	58
bis-[<i>o</i> -AB]-d4TMP 31	0.12 ± 0.07	0.22 ± 0.18	0.48 ± 0.46	21
bis-[α-MCM-AB]-d4TMP 29 (Diastereomengemisch)	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.28 ± 0.18	19
bis-[α-MCM-AB]-d4TMP 29' (ein Diastereomer)	0.25 ± 0.0	0.34 ± 0.08	0.20 ± 0.07	19
d4T 39	0.3 ± 0.11	0.25 ± 0.0	> 10	80

¹: 50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation

²: 50% cytotoxische Konzentration

Die Phosphat-Triester **25 - 28** und d4T **39** zeigen in CEM/0-Zellen antivirale Aktivität, die sie jedoch in TK-defizienten Zellen verlieren. Die antivirale Aktivität in TK-kompetenten Zellen ist auf die Freisetzung von d4T **39** aus dem Phosphat-Triester bzw. Diester durch

intrazelluläre Enzyme zurückzuführen. Die intakte Thymidin-Kinase phosphoryliert das d4T **39** zum antiviral aktiven d4TMP **39 α** . Folglich verlieren die Verbindungen in TK-defizienten Zellen ihr antivirales Potential; damit korrelieren auch die Daten der enzymatischen Hydrolysen. Bereits in humanen Zellextrakten wurde nur die Bildung des Phosphat-Diesters nachgewiesen, d4TMP **39 α** wurde nicht identifiziert und daher ist die antivirale Inaktivität zu verstehen. Ebenso wurde im humanen Zellextrakt auch nicht die Dephosphorylierung von freigesetzten d4TMP **39 α** beobachtet (Kap. 3.3.1.2, S. 53). Vermutlich sind die Enzymaktivitäten im Zellextrakt im Vergleich zum *in vitro*-Test eingeschränkt.

Ein Vergleich der EC₅₀-Werte in CEM-kompetenten Zellen zeigt eine um den Faktor 5 für bis-(Benzyl)-d4TMP **27** und sogar um den Faktor 350 für bis-((*R*)- α -Methylbenzyl)-d4TMP **25** schlechtere Aktivität im Vergleich zur Referenzverbindung d4T **39**. An dieser Stelle sei eingeschoben, dass die beiden Diastereoisomere des bis-(α -Methylbenzyl)-d4TMP **25** und **26** keinen Unterschied in ihrem antiviralen Verhalten zeigen. Das Resultat stützt das ebenfalls gleiche Verhalten der Diastereomere in der chemischen und enzymatischen Hydrolyse.

Auffällig ist, dass sich die antivirale Aktivität in dem Maße verringert, wie sich die Hydrolysehalbwertszeiten verkürzen. Die unterschiedlichen Halbwertszeiten wurden über die Stabilität bzw. Labilität des Benzylkations erklärt. Zur Erklärung sind zwei Ansätze vorstellbar. Zum einen könnten die Verbindungen so labil sein, dass sie bereits extrazellulär hydrolysieren. Folglich ist für nicht enzymatisch-gesteuerte Systeme ein Schwellenwert notwendig. Zum anderen ist denkbar, dass die intrazelluläre Freisetzung von d4TMP **39 α** durch den Substituenten in Benzylposition gehindert ist.

Alle drei auf dem bis-[AB]-Konzept beruhenden Verbindungen weisen eine geradezu identische antivirale Aktivität in beiden Zelllinien auf. Interessant ist die antivirale Aktivität des chemisch stabilen bis-[*o*-AB]-d4TMP **31**; die Daten zeigen keinen Unterschied zum *para*-substituierten Analogon (**30**). Ebenfalls zeigt das bis-[α -MCM-AB]-d4TMP **29**, welches den labilsten Phosphat-Triester mit einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 1.8 h darstellt, eine im Vergleich zu den stabilen Verbindungen **30** mit $t_{1/2}$ von 7.2 h und **31** mit $t_{1/2}$ von >100 h identische antivirale Aktivität in TK-kompetenten und TK-defizienten CEM-Zellen. Deshalb ist für bis-[α -MCM-AB]-d4TMP **29** eine schnelle und effiziente Aufnahme in die Zellen anzunehmen, in deren Anschluss es zur enzymatischen Spaltung kommt, so dass von einem intrazellulären *lock-in*-Mechanismus gesprochen werden kann.

Das bis-[α -MCM-AB]-d4TMP **29** stellt ein Gemisch aus vier Diastereomeren dar. Bei der chromatographischen Aufreinigung an einer semipräparativen RP-Säule mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch gelang die Abtrennung eines Diastereomers, dessen

Konfiguration nicht zugeordnet werden konnte. Triester **29'** verhält sich in CEM/0- und CEM/TK⁻- Zellen genauso wie das Diastereomerengemisch; darüber hinaus weist es die gleiche Cytotoxizität auf. Die Beobachtung lässt eine konfigurationsunabhängige Spaltung der Diastereomere vermuten.

Abschließend ist als bewiesen festzuhalten, dass eine enzymatische Aktivierung der drei Verbindungen durch zelluläre Esterasen vorliegt.

Als nächster Punkt wird die Cytotoxizität diskutiert. Außerordentliche Tragweite hat dabei die Frage nach der potentiellen Toxizität des intermediär auftretenden Chinonmethids. Neue Hinweise hierzu wurden aus den gemessenen Cytotoxizitätsdaten gewonnen.

Zuerst soll geklärt werden, ob die von GLAZIER entwickelte intramolekulare Eliminierungsreaktion vorteilhafter ist als die nucleophile Abfangreaktion von FREEMAN.

Die Methoxycarbonylgruppe als Akzeptor in α -Stellung ermöglicht drei Effekte: Das Absenken der Elektronendichte, die Resonanzstabilisierung des Intermediats und eine allgemeine basenkatalysierte Tautomerisierung. Insgesamt ist somit ein nucleophiler Angriff des Solvents oder anderer Nucleophile langsamer als die Eliminierung eines Protons in Nachbarschaft zur Benzylgruppe. Die alkylierende Wirkung des sog. "fleeting Chinonmethid" auf andere Bionucleophile ist deshalb als gering einzustufen. Um so erstaunlicher ist ein Vergleich der Cytotoxizitätsdaten von bis- $[\alpha$ -MCM-AB]-d4TMP **29** und bis- $[p$ -AB]-d4TMP **30**. Die das "fleeting Chinonmethid" ausbildende Verbindung **29** ist wesentlich toxischer mit 19 μ M als die das *para*-Chinonmethid bildende bis- $[p$ -AB]-d4TMP **30** mit 58 μ M. Der miserable Toxizitätswert des bis- $[\alpha$ -MCM-AB]-d4TMP **29** rechtfertigt den synthetischen Aufwand in keinsten Weise. Abschließend betrachtet sind die im Verlauf der Hydrolyse auftretenden Chinonmethid-Derivate als Ursache der gemessenen Cytotoxizitäten in Frage zu stellen.

Zweitens wurden die Toxizitätsdaten von bis- $[p$ -AB]-d4TMP **30** und bis- $[o$ -AB]-d4TMP **31** verglichen. Die unterschiedlichen Toxizitätsdaten von **30** und **31** führen zu der Frage, ob *ortho*- und *para*-Chinonmethide in biologischen Systemen ein abweichendes Verhalten zeigen. In der Literatur gibt es zu diesem Thema keinerlei Untersuchungen. Die *ortho*-Verbindung besitzt mit 21 μ M eine dem bis- $[\alpha$ -MCM-AB]-d4TMP **29** entsprechende cytotoxische Wirkung.

Das Resultat unterstreicht die Fragwürdigkeit, die intermediären Chinonmethid-Derivate als potentielle Quelle der Cytotoxizität anzunehmen.

Zweiter Teil

4 SYNTHESE, UNTERSUCHUNG UND MECHANISTISCHE INTERPRETATION ZUM HYDROLYSEVERHALTEN MASKIERTER GLYCOSYLMONOPHOSPHATE

4.1 Kenntnisstand

Im vorstehenden Abschnitt wurde die Anwendung von Prodrug-Systemen auf Nucleoside diskutiert. Ebenso wie die Nucleosidmonophosphate besitzen auch Glycosylmonophosphate fundamentale Aufgaben im Stoffwechsel, so bei der Biosynthese von Glycokonjugaten. Im zweiten Teil war das Ziel die Maskierung von Glycosylmonophosphaten sowohl mit dem enzymatisch-gesteuerten bis-[AB]-Konzept nach FREEMAN als auch mit dem chemisch-gesteuerten *cycloSal*-Konzept nach MEIER.

Zielsetzung war sowohl die biologische Untersuchung der Verbindungen, aber vor allem waren mechanistische Einblicke in diese neue Klasse von "Kohlenhydrat-Prodrugs" zu gewinnen.

4.1.1 Glycokonjugate -Vorkommen, Bedeutung, Struktur und Biosynthese

Die Familie der Glycokonjugate umfasst neben den Glycolipiden die Glycoproteine. Der Glycoanteil besteht meistens aus Oligo- und Polysacchariden, die sowohl in linearen als auch verzweigten Ketten vorliegen. Die zum Aufbau verwendeten Monosaccharide sind D-Glucose, D-Mannose, D-Galactose und L-Fucose, die oft in Begleitung von 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose/D-galactose und N-Acetylneuraminsäure auftreten.¹¹⁰ Der Kohlenhydratanteil von Glycoproteinen variiert von 0.5 bis 85 %, so weisen eukaryontische Zellmembranen, in denen Glycoproteine als integrale Membranproteine vorliegen, einen Kohlenhydratanteil zwischen 2 bis 10 % auf. Auf der extrazellulären Seite der Zellmembran befinden sich die kommunikationsvermittelnden Saccharid-Antennen (Abb. 63).

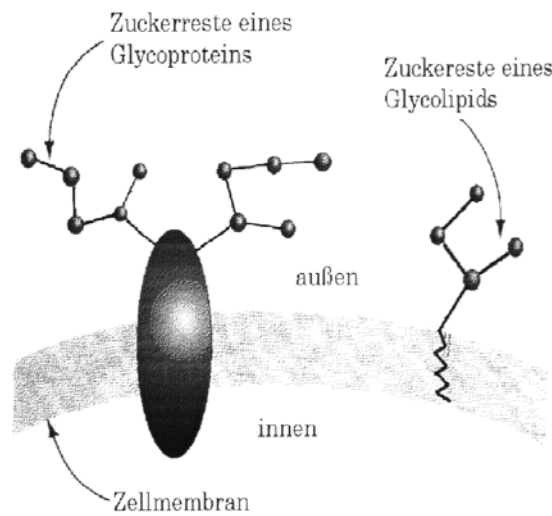


Abb. 63: Glykokonjugate in einer biologischen Membran

Die Bedeutung der komplexen Oligosaccharidstrukturen liegt in der für die Zell-Zell-Kommunikation wichtigen Codierung biologischer Informationen begründet. Der Kommunikationsprozess basiert auf Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen. Der Rezeptor ist aus komplizierten Oligosaccharidstrukturen (antennären Saccharidstrukturen) aufgebaut, die den extrazellulären Kohlenhydratteil der Glycoproteine darstellen. Den komplementären Liganden bilden Kohlenhydrat-spezifische Proteine, sogenannte Lektine und Selektine.

Lektine sind Glycoproteine, die mit bestimmten Kohlenhydratstrukturen schnell und selektiv reagieren (sich binden und quervernetzen) und dadurch z.B. verschiedene Zellen (Erythrocyten, Tumorzellen, bestimmte Bakterien und Hefen) agglutinieren und präzipitieren. Alle Lektine enthalten eine oder mehr Bindungsstellen für Kohlenhydrateinheiten, die für die Agglutination von Erythrocyten und anderen Zellen verantwortlich sind. Lektine wurden zuerst aus Pflanzen isoliert; seit Mitte der 1950er Jahre sind auch tierische Lektine bekannt.¹¹¹

Ein Beispiel für Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen ist die Blutgruppenbestimmung. Lektine binden die als antigen-determinante Gruppen wirkenden Oligosaccharidengruppen, mit unterschiedlicher Spezifität und werden daher zum Nachweis bestimmter membranständiger Zuckerreste (Rezeptoren) auf Erythrocyten verwendet. In der Erythrocytenmembran liegen die Oligosaccharidengruppen als Glycosphingolipide vor.

Strukturell charakteristisch für Glycoproteine ist ihre kovalente Bindung zwischen Kohlenhydrat und Protein. In Glycoproteinen ist das anomere Zentrum des Kohlenhydratrestes entweder α -O-glycosidisch an eine Serin- oder Threoninseitenkette oder β -N-glycosidisch an eine Asparaginseitenkette gebunden (Abb. 64).

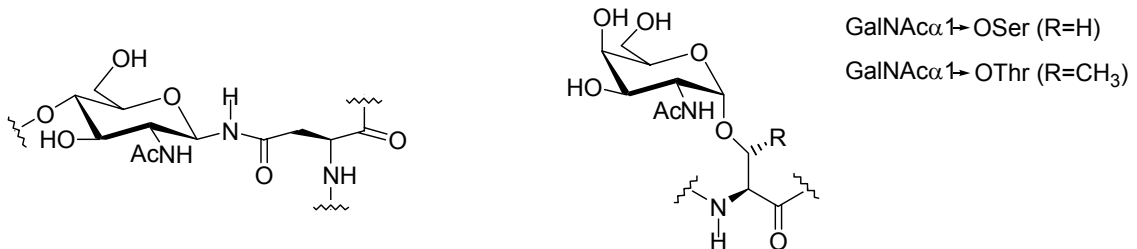


Abb. 64: Schema einer N-glycosidischen Bindung (links) bzw. einer O-glycosidischen Bindung vom Mucin-Typ (rechts)

Den dritten Typ einer Kohlenhydrat-Protein-Bindung stellen die GPI-Anker (Glycosylphosphatidylinositol) dar (Abb. 65); eine Ethanolamin-Phosphat-Brücke verbindet den C-Terminus der Aminosäure des Proteins mit dem terminalen Bestandteil einer unterschiedlich aufgebauten Kohlenhydratkette, die an Phosphatidylinositol gebunden ist.¹¹²

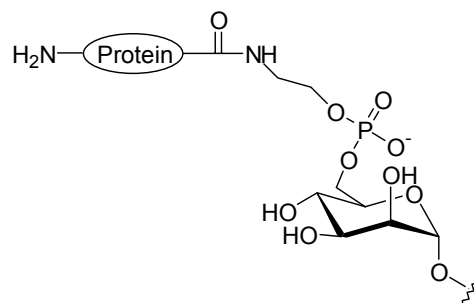


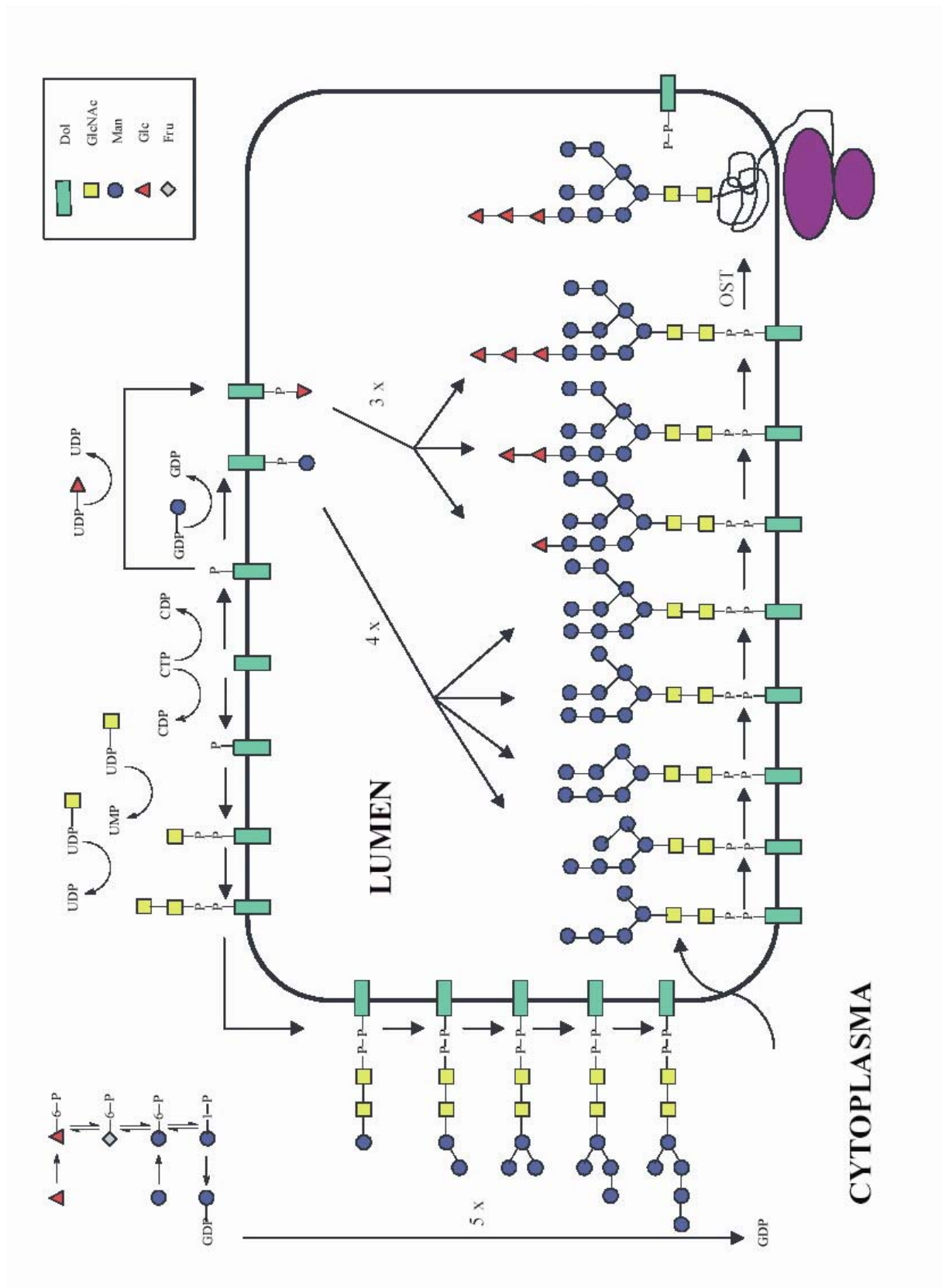
Abb. 65: Schema einer Ethanolamin-Phosphat-Brücke

1972 wurde von A. PARODI und L. LELOIR die Glycoprotein-Biosynthese aufgeklärt. Der Prozess beginnt im endoplasmatischen Retikulum (ER) und wird im Golgi-Apparat fortgeführt; er verläuft co-translational. Zunächst werden N-gekoppelte Oligosaccharide als lipidgebundene Vorstufen synthetisiert, deshalb wird von der LLO-Synthese (lipid-linked oligosaccharide) gesprochen (Abb. 66, S. 69). Als Lipidkomponente fungiert Dolicholphosphat; das langkettige Phosphopolyisoprenol verankert das wachsende Oligosaccharid in der Membran des endoplasmatischen Retikulums.

Im ersten Schritt agiert Dolicholphosphat als Akzeptor für *N*-Acetylglucosaminphosphate aus UDP-*N*-acetylglucosamin. An das Produkt wird in einer GlcNAc-Transferase-katalysierten Reaktion eine weitere Einheit *N*-Acetylglucosamin gebunden. Mittels spezifischer Mannosyltransferasen wird in fünf Schritten eine biantennäre $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ -Struktur aufgebaut, wobei GDP-Mannose als Donorsubstrat dient.

Von nun ab findet die Kettenverlängerung auf der lumenalen Seite des ER statt. Diesem Wechsel liegt ein Flipase vermittelter Flip-Flop-Mechanismus zu Grunde.¹¹³ In den nächsten Schritten synthetisieren ER-eigene Glycosyl-Transferasen das fertige Oligosaccharid. Dieses Molekül mit der Struktur $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ wird von einem membrangebundenen Oligosaccharid-Transferasekomplexes (OST) *N*-glycosyliert, welches die Aminosäuresequenz Asn-X-Ser/Thr erkennt und somit auf die naszierende Polypeptidkette überträgt. X kann jede Aminosäure außer Prolin sein, da dieses die erforderliche Wasserstoffbrücken-Ausrichtung für β -Schleifen oder H-Loops zwischen Asparagin und Serin/Threonin verhindert.

Die Prozessierung bzw. das "Trimming" beginnt im ER mit der enzymatischen Abspaltung der drei Glucose-Reste und einem Mannose-Rest. Nach dieser vorläufigen Prozessierung werden die Proteine in Vesikeln eingekapselt, die aus Membranen des ER bestehen und anschließend mit den cis-Zisternen des Golgi-Apparates verschmelzen. Während ein Glycoprotein den Golgi-Apparat von der cis- über die medial- zur trans-Zisterne durchwandert, werden Mannosereste abgespalten und *N*-Acetylglucosamin-, Galactose-, Fucose- und Sialinsäure-Reste angefügt und damit die Prozessierung abgeschlossen.^{114,115}

Abb. 66: Darstellung der ER-Pathway¹¹⁶

N-glycosidisch gebundene Oligosaccharide besitzen eine gemeinsame Pentasaccharidgrundstruktur, die auch Core genannt wird (Abb. 67). Sie ist aus drei Mannose- und zwei *N*-Acetylglucosaminresten aufgebaut. Diese Grundstruktur kann durch Anfügen zusätzlicher Zucker variiert werden, die zu einer erneuten Klassifizierung führen: mannosereiche, komplexe und hybride Oligosaccharide.¹¹⁷

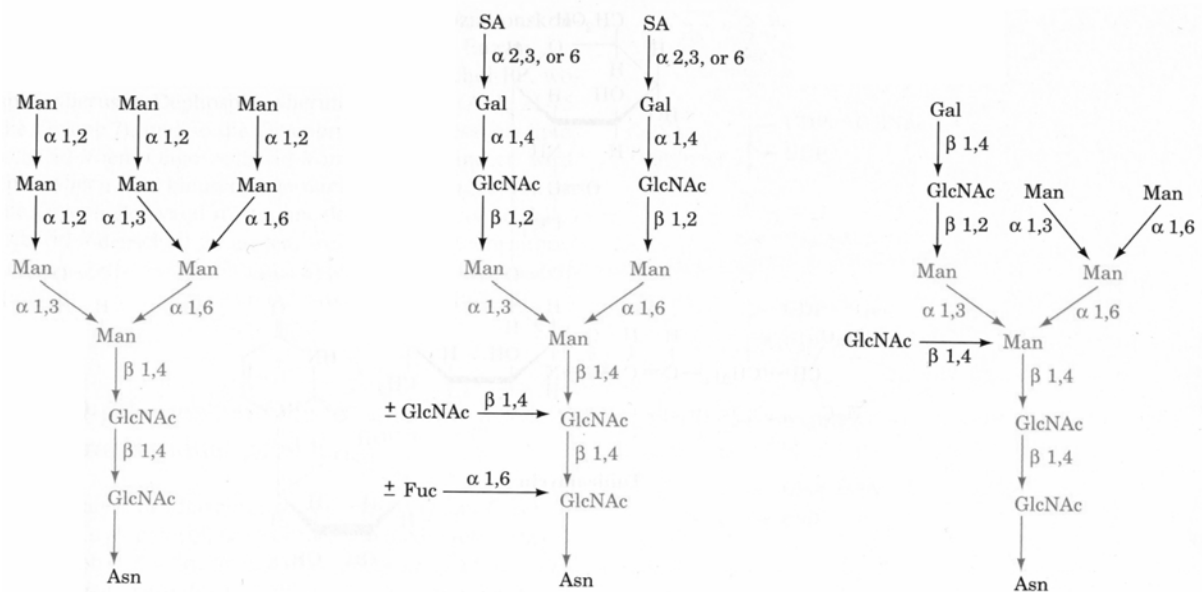


Abb. 67: Typische Primärstruktur von a) mannosereichen, b) komplexen und c) hybriden *N*-gekoppelten Oligosacchariden

Herauszustellen ist die Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten zu variablen Strukturen, wobei jede einzelne eine spezifische biologische Nachricht verschlüsseln kann. Die Mannigfaltigkeit von Oberflächenstrukturen birgt ein immenses Informationspotential. Dieses befähigt Oligosaccharidstrukturen eine bedeutende Rolle bei der Immunantwort und der Steuerung von Körperfunktionen zu übernehmen. Die spezifischen Oligosaccharidstrukturen reagieren besonders empfindlich auf mutagene Einflüsse. Die geänderten Zelloberflächenstrukturen verursachen Autoimmunkrankheiten¹¹⁴, Krebs und Stoffwechselkrankheiten.¹¹⁸

4.1.2 Congenital Disorder of Glycosylation – CDG

J. JAEKEN entdeckte erstmals 1980 ein Krankheitsbild dem er den Namen “Carbohydrate Deficient Glycoconjugate Syndrome” (CDG-Syndrom) gab.¹¹⁹

Die Forschungen der letzten 20 Jahre auf diesem Gebiet führten zur Entdeckung immer neuer CDG-Typen, so dass die auf den Ergebnissen der isoelektrischen Fokussierung (IEF) von Serumtransferrin beruhende Nomenklatur 1999 durch eine übersichtliche Nomenklatur ersetzt wurde. Die verschiedenen CDG-Typen werden nun entsprechend ihrer intrazellulären Lokalisierung eingeteilt. CDG-I bezeichnet Defekte, die im Cytosol oder ER auftreten, CDG-II dagegen Defekte, die bei der Prozessierung auftreten. Die jeweiligen Subtypen werden durch kleine Buchstaben gekennzeichnet, ungeklärte Enzymdefekte erhalten ein x. (Tabelle 5)

Tabelle 5: CDG-Typen

Typ	Defekt	Lokalisierung
CDG-Ia	Phosphomanno-Mutase	Cytosol
CDG-Ib	Phosphomannose-Isomerase	Cytosol
CDG-Ic	$\alpha 1 \rightarrow 3$ -Glucosyltransferase	ER
CDG-Id	$\alpha 1 \rightarrow 3$ -Mannosyltransferase	ER
CDG-Ie	Dol-P-Mannose-Synthase-1	ER
CDG-If	Mannose-Dol-P Utilization Defect (MPDU1-Gen)	ER
CDG-IIa	GlcNAc-Transferase II	Golgi
CDG-IIb	Glucosidase I	ER
CDG-IIc	GDP-Fucose-Transporter	Golgi

In diesem Zusammenhang wurde auch ein neuer Terminus für CDG eingeführt. Die jetzt lautende Bezeichnung "Congenital Disorder of Glycosylation" umfasst erbliche Stoffwechselkrankheiten, in denen genetisch bedingte Enzymdefekte in der Biosynthese von N- und O-Glycoproteinen und von Glycolipiden Hypoglycosylierung verursachen.

Dabei führen unterschiedliche Enzymdefekte in frühen Stadien der Biosynthese zu verschieden verkürzten Oligosaccharidketten, die aber eine einheitliche Hypoglycosylierung des Glycoproteins aufweisen. Grund ist die Substratspezifität des OST-Komplexes, der außer der vollständig aufgebauten Oligosaccharidstruktur ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) oder einer verkürzten $\text{Man}_{4-6}\text{GlcNAc}_2$ -Struktur kaum andere Intermediate effizient transferiert. Daher ist

eine einheitliche Hypoglycosylierung unterschiedlicher Glycoproteine ein Charakteristikum von CDG.^{114,120}

Die Hypoglycosylierung hat Multisystemstörungen zur Folge, die z.B. bei CDG-Ia eine Sterberate von 20 % bereits in den ersten Lebensjahren herbeiführt.

4.1.3 CDG-Ia

Der am häufigsten vorkommende CDG-I-Typ ist das als "klassisches Jaeken Syndrom"¹²¹ bekannte CDG-Ia.¹²² Rund 70 % der CDG-I-Patienten, diese Zahl entspricht ca. 300 Patienten weltweit¹²³, leiden unter CDG-Ia typischen Symptomen wie schweren psychomotorischen Behinderungen und lebensbedrohlichen Leberstörungen, die von eingezogenen Brustwarzen, Schielen und Wachstumsstörungen begleitet sind. Die Kinder haben ein deformiertes Skelett und eine charakteristische Verteilung ihres Fettgewebes.¹²⁴

Ursache ist ein mutiertes Gen¹²¹ des cytosolischen Enzyms Phosphomannomutase 2 (PMM 2), das Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1-phosphat umwandelt (Abb. 68).¹²⁵

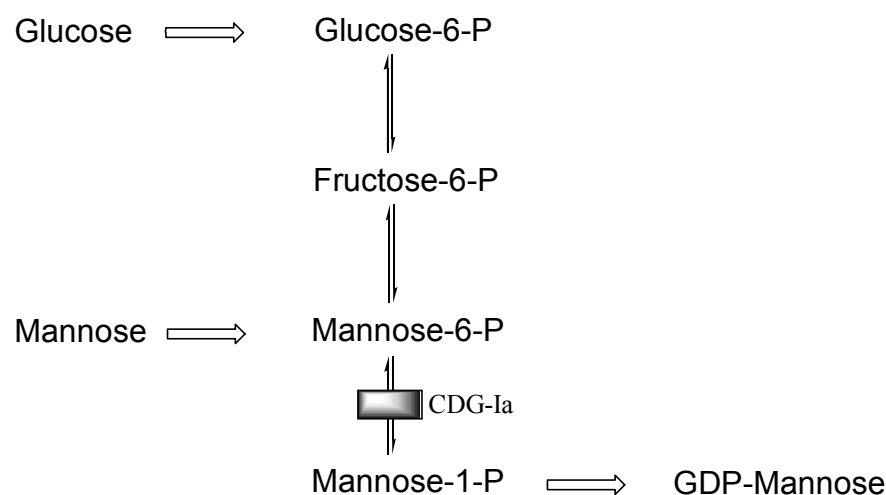


Abb. 68: Biosynthese der LLO und Lokalisierung des früh auftretenden Glycolysierungsdefektes CDG-Ia

Allgemein haben Untersuchungen an CDG-I gezeigt, dass ein Verlust der Enzymaktivität um 90 % eine zwei- bis vierfache Verringerung der Glycosylierung in CDG-Fibroblasten und eine um 30 % verminderte Glycosylierung aller im Serum auftretenden Glycoproteine aufwies.¹²⁶ In CDG-Ia-Fibroblasten ist die GDP-Man-Konzentration auf ca. 10 % reduziert.¹²⁷

Patienten mit einer verringerten Enzymaktivität werden als „leaky“ bezeichnet. Ein vollständiges Fehlen von Phosphomannomutase 2 hätte den Tod zur Folge.

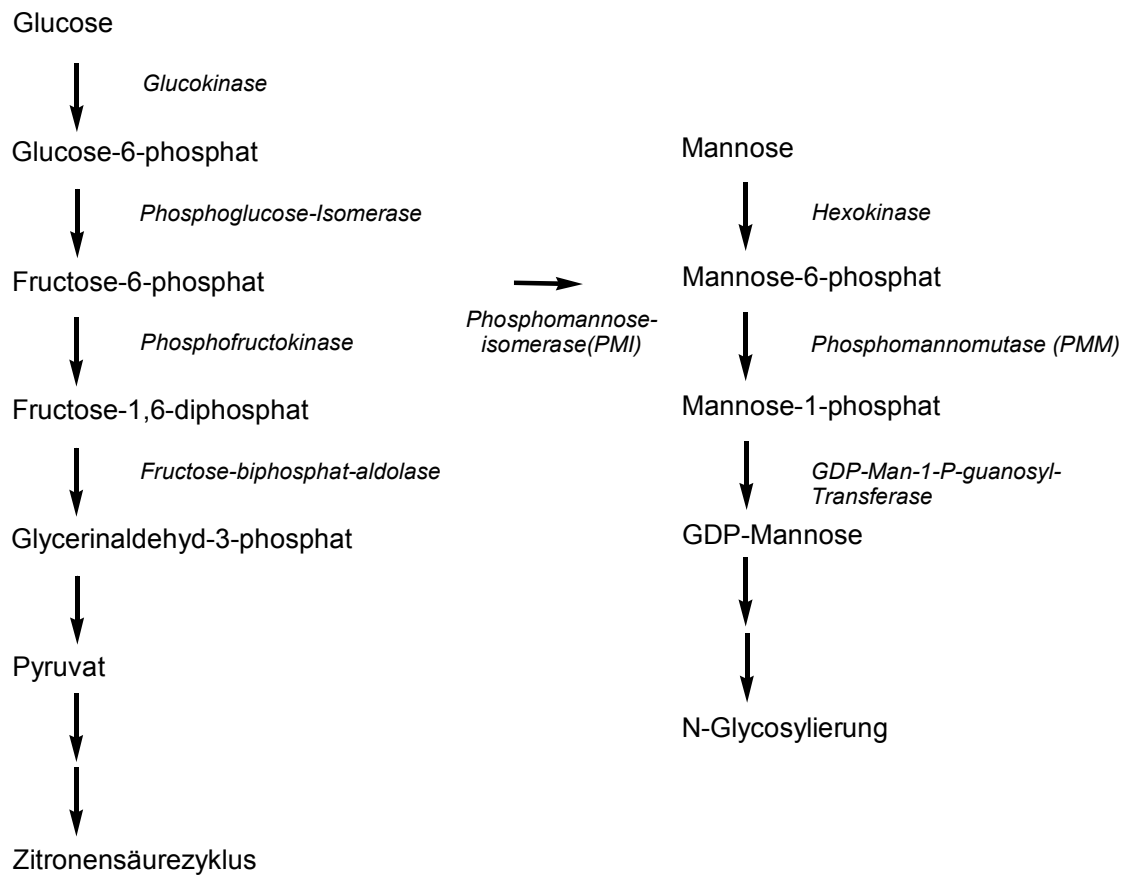


Abb. 69: Bedeutung der GDP-Man bei der N-Glycoproteinbiosynthese

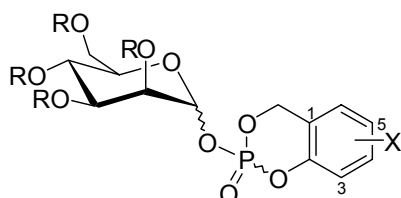
Bemerkenswert ist die essentielle Rolle von GDP-Man bei der N-Glycoproteinbiosynthese (Abb. 69). Drei enzymatische Reaktionen sind notwendig, um aus Fructose-6-Phosphat GDP-Mannose darzustellen: Phosphomannoisomerase katalysiert die Isomerisierung von Fructose-6-phosphat zu Mannose-6-phosphat, Phosphomannomutase konvertiert Mannose-6-phosphat zu Mannose-1-phosphat und abschließend wird durch GDP-Man-Pyrophosphorylase GDP-Mannose aus Mannose-1-phosphat gebildet.¹²⁸ GDP-Mannose wird nicht nur in den frühen Stadien der N-Glycoproteinbiosynthese zum Aufbau der $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Struktur auf der cytoplasmatischen Seite des ER benötigt, sondern auch auf dessen lumenaler Seite zur Bildung der $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Struktur. Die hier eingebaute Mannose wird von Dol-P-Man zur Verfügung gestellt, die ebenso aus GDP-Man durch eine GDP-Man-Synthase aufgebaut wird.

Vor diesem Hintergrund wird die Bedeutung von Mannose-1-phosphaten deutlich, die im Gegensatz zu den Nucleosidmonophosphaten nicht als Inhibitoren eingesetzt werden, sondern als Substitute. Substitute (engl.: dietary substitute) sind Wirkstoffe, die der Organismus

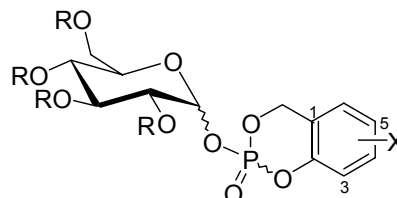
aufgrund eines Defektes nicht in der Lage ist selbstständig zu produzieren. Patienten müssen ausreichende Dosen derartige Wirkstoffe in regelmäßigen Abständen zu sich nehmen. Somit ist aufgrund der viel höheren Konzentrationen die Toxizität von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit sollten mittels der Prodrug-Konzepte von FREEMAN und MEIER Mannose-1-phosphate intrazellulär freigesetzt werden, um die Konzentration von GDP-Man anzuheben und somit vollständige Oligosaccharidstrukturen aufzubauen.

Dafür sollten sowohl *cycloSal*-Triester von Mannose-1-phosphat dargestellt werden (Abb. 70), die verschiedene Substituenten (X = H (**a**); 3-Me (**b**); 5-Cl (**c**); 5-*t*butyl (**d**); 3,5-Di-*t*butyl (**e**)) am Aryl-System tragen, als auch deren epimeren *gluco*-Analoga, um einen möglichen Einfluss des Nachbargruppeneffektes zu untersuchen.



32 a-e, I-VI



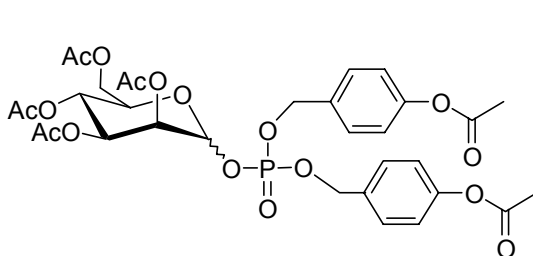
33 a-d, I-II

R = Ac (**I**); Bz (**II**); Lev (**III**); THP (**IV**); *p*Mb (**V**); H (**VI**)

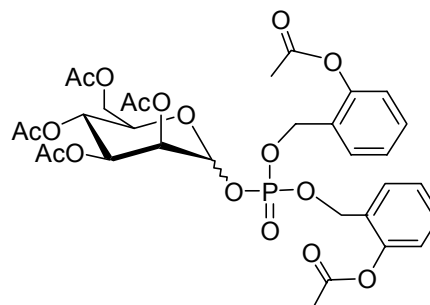
X = H (**a**); 3-Me (**b**); 5-Cl (**c**); 5-*t*Butyl (**d**); 3,5-Di-*t*butyl (**e**)

Abb. 70: *cycloSal*-Triester von Mannose-1-phosphat **32a-e, I-VI** bzw. Glucose-1-phosphat **33 a-d, I-II**

Darüber hinaus sollten die bis-[AB]-Triester **34** und **35** von Mannose-1-phosphat synthetisiert werden (Abb. 71).



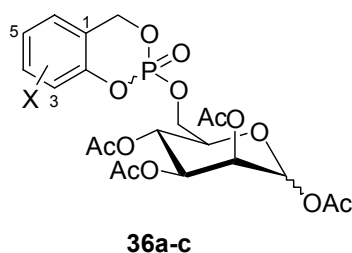
34



35

Abb. 71: bis-[AB]-triester von Mannose-1-phosphat **34** und **35**

Aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu den *cycloSal*-5'-Nucleosidmonophosphaten sollten *cycloSal*-Mannose-6-phosphate dargestellt werden (Abb. 72).



X = H (**a**); 3-Me (**b**); 5-Cl (**c**)

Abb. 72: *cycloSal*-Triester von Mannose-6-phosphat **36a-c**

Von Interesse waren vor allem die Übertragbarkeit des Hydrolyseverhaltens der Systeme, worüber im Rückschluss aufschlussreiche Einblicke in den Mechanismus neuartiger „Monosaccharid-Prodrug-Systeme“ denkbar sind.

4.2 Synthese

4.2.1 Syntheseplanung

Die intrazelluläre Freisetzung von Glycosyl-1(6)-phosphaten erforderte eine Maskierung der Hydroxyfunktionen der Phosphatgruppe, welche die passive Diffusion der geschützten Substitute durch die Zellmembran gestattet. Daher ist die Lipophilie der Verbindungen ein entscheidendes, aber im voraus nicht abzuschätzendes Kriterium. Aus diesem Grunde sollten neben der Veresterung der Phosphat-Funktion, die Hydroxylfunktionen des Zuckers unterschiedlich geschützt werden, um die Lipophilie zu variieren. Diese Abspaltung sollte entweder erst intrazellulär durch zelleigene Esterasen erfolgen oder vor einem *in vitro*-Test extern in einer chemischen Reaktion. Vorversuche hatten gezeigt, dass bei der direkten Umsetzung von D-Mannose **74** mit cyclischem Chlorophosphan das angestrebte Produkt nicht isoliert werden konnte. Ein weiteres Kriterium ist die Stabilität. So können freie Hydroxyfunktionen, die sich in vicinaler Stellung zum Phosphat-Triester befinden, cyclische Phosphat-Intermediate bilden (Abb. 73). Solche intramolekularen nucleophilen Angriffe wurden bei cyclischen Nucleosiden, bei denen sich die Phosphat-Funktion in der 5'-Position des 2'-Desoxyriboseringes befindet, nicht beobachtet.

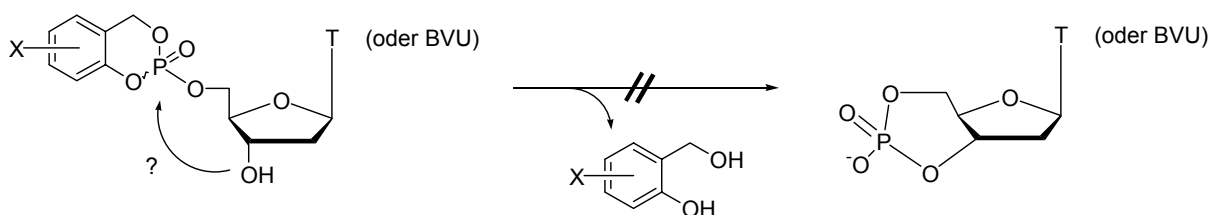


Abb. 73: Cyclische Phosphat-Intermediate

Die Hydroxyfunktionen des Zuckers wurden als Ester und Ether geschützt. Die Acetyl-Schutzgruppe (**I**) kann mittels Carboxyesterasen enzymatisch abgespalten werden, womit sie sich ideal für das ebenfalls auf Carboxyesterase-basierende bis-[AB]-Konzept anbietet. Eine sehr starke Varianz bezüglich der Lipophilie sollte durch die Benzoylgruppe (**II**) eingebracht werden. Vorteilhaft erschien ebenfalls die in der Nucleotidchemie oft verwendete Levulinylnyl-Schutzgruppe (**III**), da sie unter sehr milden chemischen Bedingungen abgespalten werden kann. Gerade im Hinblick auf das chemisch-gesteuerte *cycloSal*-Konzept sind die Bedingungen der Entschützung, die nach der Einbringung der maskierten Phosphat-Einheit stattfindet, ein zu berücksichtigender Aspekt. So wurden als mild abzusplattende Ether-Schutzgruppen die *para*-Methoxybenzyl- (pMb-**V**) und die acetalische Tetrahydropyranoyl-Gruppe (THP-**IV**) ausgewählt. Letztgenannte generiert ein neues Stereozentrum pro Schutzgruppe, so dass die NMR-spektroskopische Auswertung stark erschwert wird und auf MALDI-TOF-Spektren ausgewichen werden sollte.

Zur Darstellung der bis-(Acetoxybenzyloxy)-hexosemonophosphate bis-[AB]-HMP **34** und **35** sollte erneut die Phosphoramidit-Methode (Kap. 3.2.2.2, S. 41) angewendet werden.

Die *cycloSal*igenyl-Hexosemonophosphate (*cycloSal*-HMP) sollten durch die Umsetzung des geschützten Monosaccharids mit dem cyclischen Saligenylchlorophosphan zu dem entsprechenden cyclischen Phosphit dargestellt werden, welches im Anschluß zu dem gewünschten Phosphat-Triester oxidiert wird (Abb. 74). Die cyclischen Saligenylchlorophosphite sollten aus den entsprechenden Salicylalkoholen durch Umsetzung mit Phosphor(III)-chlorid synthetisiert werden.

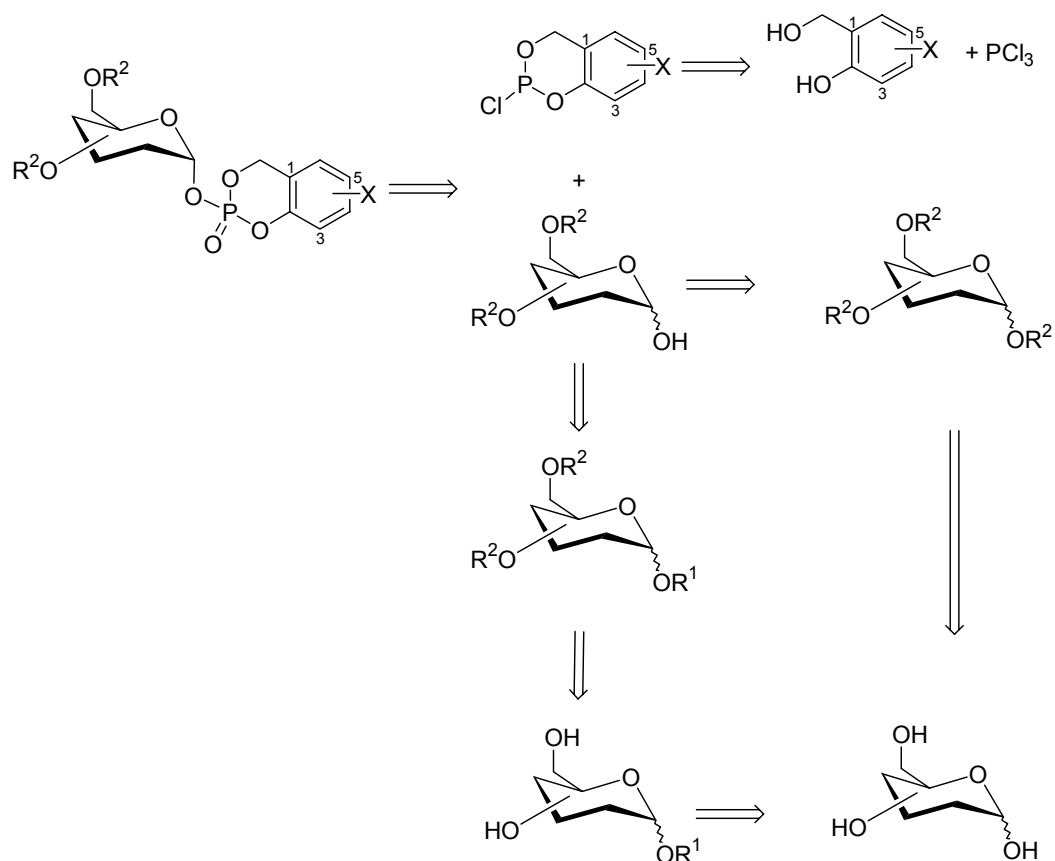


Abb. 74: Retrosyntheseschema zur Darstellung der *cycloSal*-HMP

Die aufgezeigte Route ist zur Synthese von *cycloSal*igenyl-Nucleotiden erfolgreich etabliert¹²⁹, so dass der eigentliche synthetische Reiz in der Übertragung auf Monosaccharide lag. Besonders Synthesen am reaktiven anomeren Zentrum stellten eine Herausforderung dar.

4.2.2 Synthese der Verbindungen

Ausgangssubstanzen waren D-Mannose **74** und D-Glucose **75**, deren Hydroxyfunktionen zuerst geschützt wurden, um anschließend in 1-Position bzw. 6-Position die entsprechend maskierte Phosphat-Einheit einzuführen.

4.2.2.1 Synthese von geschützten Hexopyranosen

Zur Darstellung der 1-OH-freien Manno- bzw. Glucopyranosen wurde ein zweistufiger Weg gewählt. Die entsprechende Pyranose wurde vollständig verestert und anschließend aufgrund der erhöhten Reaktivität der Hemiacetalstruktur selektiv entschützt.

D-Mannose **74** wurde mit Essigsäureanhydrid in Pyridin zum 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-mannopyranosid **76** verestert¹³⁰. Die nachfolgende Alkoholyse mit einem Äquivalent Natriummethanolat in THF abs. ergab das 1-*O*-deacetylierte Produkt **78** in 58 % Ausbeute.¹³¹ D-Glucose **75** wurde, wie oben beschrieben, umgesetzt und 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranose **79** in 72 % Ausbeute erhalten (Abb. 75).

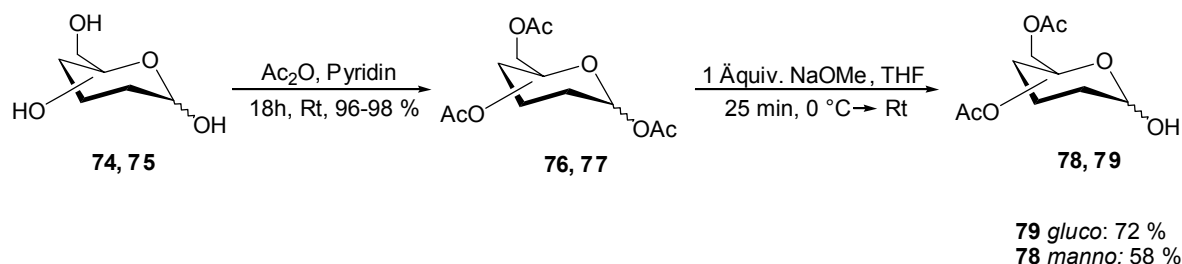


Abb. 75: Darstellung der 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-glycopyranosen **78** und **79**

Die Veresterung mit Levulinsäureanhydrid **80** setzte vorab dessen Synthese aus Levulinsäure **81** voraus. *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) reagiert mit der Levulinsäure **81** zum *O*-Acylisoharnstoff. Dieser Aktivester reagierte in einer S_N -Reaktion mit einem zweiten Äquivalent der Carbonsäure zum Levulinsäureanhydrid **80**.^{132,133} Nach Filtration des *N,N*-Dicyclohexylharnstoffes wurde das Rohprodukt ohne weitere Reinigung (Ausbeuteverluste) eingesetzt. Die Veresterung wurde in 65 % Ausbeute durchgeführt.¹³⁰ Die im basischen durchgeführte selektive Entschützung ergab 2,3,4,6-Tetra-*O*-levulinyl-D-mannopyranose **83** in 54 % Ausbeute (Abb. 76).

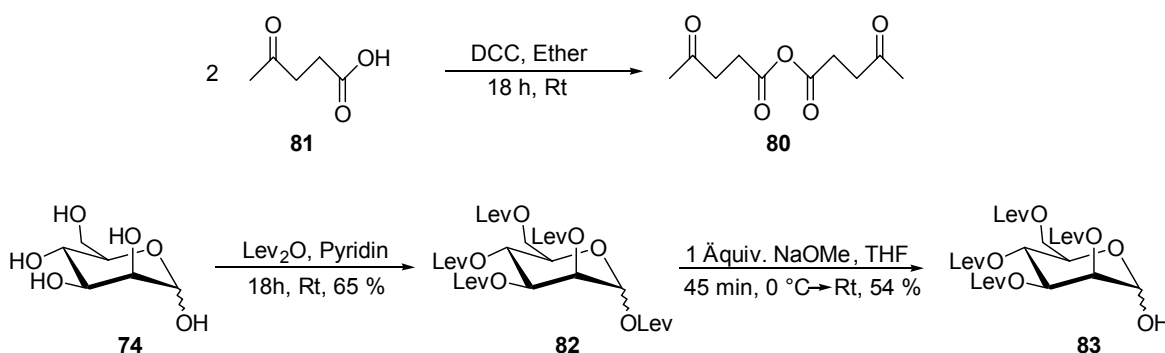


Abb. 76: Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-levulinyl-D-mannopyranose **83**

Die Ausbeute der Levulinylierung sollte durch den Einsatz des reaktiveren Acylierungsreagenz Levulinsäurechlorid **84** erhöht werden. HELBERGER¹³⁴ und KANDA¹³⁵ setzten Levulinsäure **81** mit Thionylchlorid um (Abb. 77). Die entsprechend durchgeführte

Synthese führte nicht zur Bildung des Levulinsäurechlorids **84**, sondern zum isomeren Lacton **84a**.^{136,137}

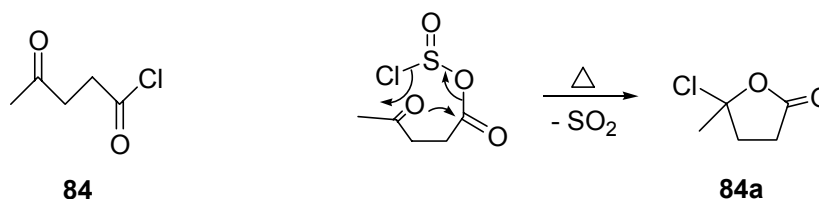


Abb. 77: Darstellung des cyclischen Isomers **84a** vom Levulinsäurechlorid **84**

Das vollständig benzoylierte Mannosepyranosid **85** bzw. Glucosepyranosid **86** wurde ebenfalls durch die Veresterung mit destilliertem Benzoylchlorid in Pyridin abs. in 88 % Ausbeute α -anomenenrein für **85** und 95 % Ausbeute für **86** dargestellt.¹³⁸ Der Literaturwert beträgt 96 %. Die selektive 1-*O*-Debenzoylierung wurde zuerst mit ges. ammoniakalischer Methanol-Lösung versucht. Nach drei Wochen wurde dünnschichtchromatographisch immer noch das Edukt detektiert.¹³⁹ Ebenso erfolglos verlief die Reaktion mit Natriummethanolat in THF.¹³¹ Sinnvoll schien es daher, die Nucleophilie der Base weiter zu erhöhen. Schließlich gelang mit Dimethylamin in Acetonitril abs. die Abspaltung der anomeren Benzoylgruppe (Abb. 78). Ein Äquivalent des gasförmigen Dimethylamins wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in das Reaktionsgemisch kondensiert und der Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt.^{140,141} 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranose **87** wurde in 57 % Ausbeute erhalten, das entsprechende *gluco*-Derivat **88** in 55 % Ausbeute (Literaturwert: 60 %).

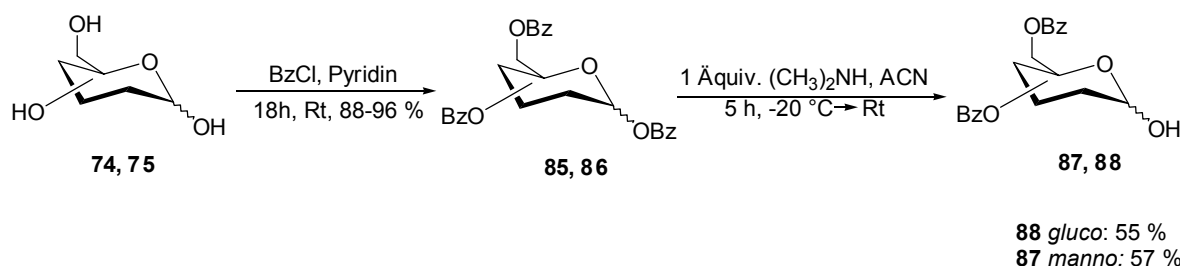
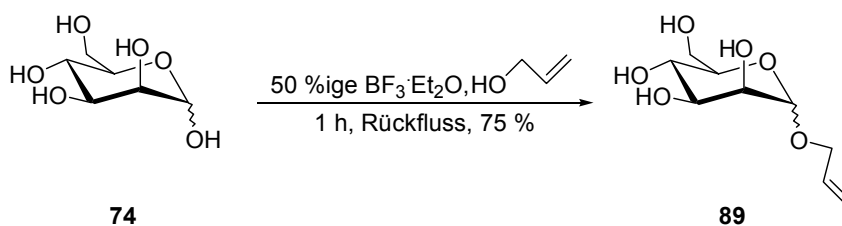
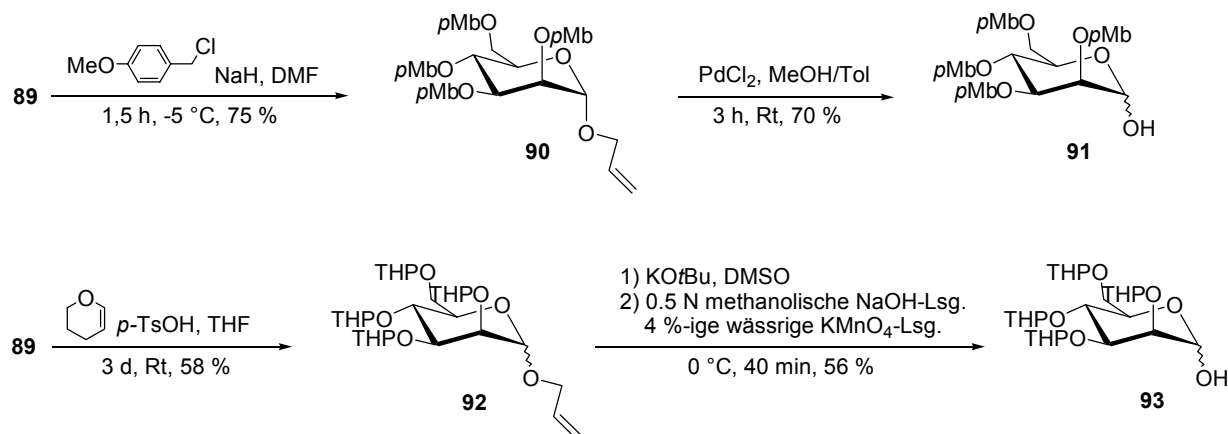


Abb. 78: Darstellung der 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl-D-glycopyranosen **87** und **88**

Zur Darstellung der *para*-Methoxybenzyl- (pMb) und der Tetrahydropyranyl- (THP) geschützten Verbindung wurde zuerst D-Mannose **74** mit Allylkohol in 50 %iger etherischer Bortrifluorid-Lösung am anomeren Zentrum in 75 % Ausbeute verethert (Abb. 79).¹⁴²

Abb. 79: Darstellung von 1-Allylmannopyranosid **89**

Zum einen wurde aus dem 1-Allylmannopyranosid **89** in Gegenwart von NaH als Base das Alkoholat gebildet und dann mit *p*-Methoxybenzylchlorid in 75 % Ausbeute zu **90** alkyliert (Abb. 80).¹⁴³ Zum anderen greift **89** sauer katalysiert Dihydropyran elektrophil an (Enolether-Methode).¹⁴⁴ 1-*O*-Allyl-2,3,4,6-tetra-*O*-tetrahydropyranyl- α -D-mannopyranosid **92** wurde in 58 % Ausbeute erhalten.

Abb. 80: Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-*para*-methoxybenzyl-D-mannopyranose **91** (oben) und von 2,3,4,6-Tetra-*O*-tetrahydropyranyl-D-mannopyranose **93** (unten)

Der Allylether in 1-Position des *p*-Methoxybenzyl-Derivates **90** wurde selektiv durch die Zugabe katalytischer Mengen Palladium-II-chlorid in einem Methanol/Toluol-Gemisch in 70 % Ausbeute entschützt.^{145,146} Die 2,3,4,6-Tetra-*O*-*para*-methoxybenzyl-D-mannopyranose **91** wurde als α/β -Anomerengemisch im Verhältnis 3:1 erhalten. Das Reaktionsgemisch wurde zunehmend saurer während der Entschützung. Dieses Milieu führt jedoch nicht zur Abspaltung der leicht säurelabilen *p*-Methoxybenzylgruppen, solange vor der Aufarbeitung neutralisiert wird.

Die orthogonale Schutzgruppenstrategie gestattete aufgrund der Säurelabilität der THP-Gruppe in **92** unter basischen Bedingungen die 1-Position zu entschützen.¹⁴⁷ Zuerst erfolgte durch Zugabe von KOtBu die Isomerisierung des Prop-2-enyls zum *cis*-Prop-1-enyl,

anschließend wurde durch Zugabe 4 %iger wässriger Kaliumpermanganat-Lösung zur *cis*-dihydroxyliert; das gebildete Halbacetal zerfiel sofort unter Freisetzung der 1-OH-Funktion zu **93**.¹⁴⁸ Die geringe Ausbeute von 56 % ist vermutlich auf die Okklusion des Produktes **93** beim massiven Ausfall von Braunstein zurückzuführen.

4.2.2.2 Synthese von 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid **96**

Der Darstellung von 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid **96** liegt eine dreistufige Synthese zugrunde (Abb. 81).¹⁴⁹ Im ersten Schritt wurde die 6-Hydroxyfunktion der D-Mannose **74** in einen 4,4'-Dimethoxytritylether **94** überführt. Die Reaktion ist unter kontrollierten Bedingungen durchzuführen, da sonst polytritylierte Produkte entstehen. Bei der säulenchromatographischen Aufreinigung mit Dichlormethan-Methanol-Gemischen empfiehlt sich der Zusatz von Triethylamin.

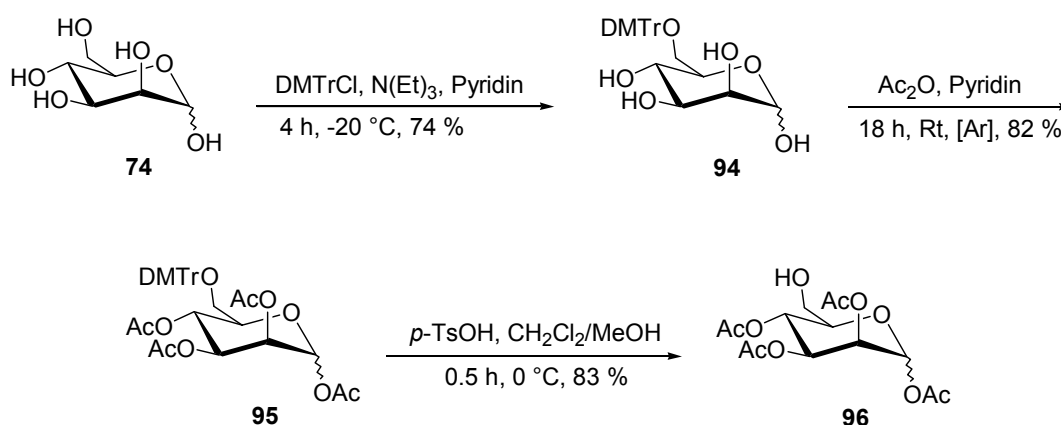


Abb. 81: Darstellung von 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid **96**

Die 6-*O*-Dimethoxytrityl-D-mannopyranose **94** wurde als Anomerengemisch in 82 % Ausbeute erhalten (Literaturwert: 90 %). Nachfolgend wurde mit einem Überschuss Essigsäureanhydrid in Pyridin abs. acetyliert. Das Anomerengemisch 6-*O*-Dimethoxytrityl-1,2,3,4-D-mannopyranosid **95** wurde in 74 % Ausbeute erhalten. Im letzten Schritt führte die saure Spaltung des 4,4'-Dimethoxytritylethers mit *para*-Toluolsulfonsäure zum Anomerengemisch 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid **96** in 83 % Ausbeute.

4.2.2.3 Synthese der *cyclo*Saligenylchlorphosphite

Die Umsetzung der Salicylalkohol-Derivate **24a-e** zu den cyclischen Saligenylchlorphosphiten **97a-e** (Abb. 82) erfolgte mit 1.2 Äquivalenten Phosphor(III)-Chlorid unter Zugabe von 2.3 Äquivalenten Pyridin als Base in Diethylether bei einer Temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.¹⁵⁰

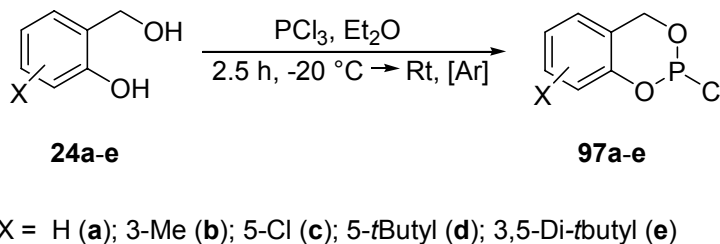


Abb. 82: Darstellung der *cyclo*Saligenylchlorphosphite

Das bei der Reaktion ausfallende Pyridinhydrochlorid ließ sich durch Filtration abtrennen. Anschließendes Abkondensieren des Lösungsmittels lieferte Öle, in seltenen Fällen Feststoffe, als Rohprodukte. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Saligenylchlorphosphite, vor allem gegenüber Feuchtigkeit, kam eine Aufreinigung dieser Rohprodukte nicht in Frage. Sie wurden deshalb direkt als phosphitylierende Agentien in den nachfolgenden Synthesen der *cyclo*Sal-HMP eingesetzt und waren bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über mehrere Monate haltbar.

4.2.2.4 Synthese der *cyclo*Saligenyl-Hexosemonophosphate

Zur Synthese der *cyclo*Sal-HMP wurde das entsprechend geschützte Monosaccharid und die HÜNIG-Base Diisopropylamin (DIPEA) in Acetonitril bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Inertgasatmosphäre vorgelegt. Zu diesen Lösungen wurden die jeweiligen Saligenylchlorphosphite **97a-e** getropft, wobei nach Variation zwei Äquivalente als ideal gefunden wurden. Nach Erwärmen der Reaktionslösung auf Raumtemperatur wurde der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt. Erschien der Umsatz nach ca. 1,5 h Reaktionszeit noch unvollständig, wurden weitere Mengen des jeweiligen Chlorphosphits bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zugegeben und das Reaktionsgemisch erneut auf Raumtemperatur gebracht. Nach vollständiger Umsetzung wurde das entstandene Phosphit in einer Eintopf-Reaktion mittels *t*Butylhydroperoxid zu dem entsprechenden Phosphat oxidiert. Nach Abkondensieren des

Lösungsmittels und chromatographischer Aufreinigung konnten die gewünschten *cycloSal*-HMPs als farblose Feststoffe erhalten werden (Abb. 83).

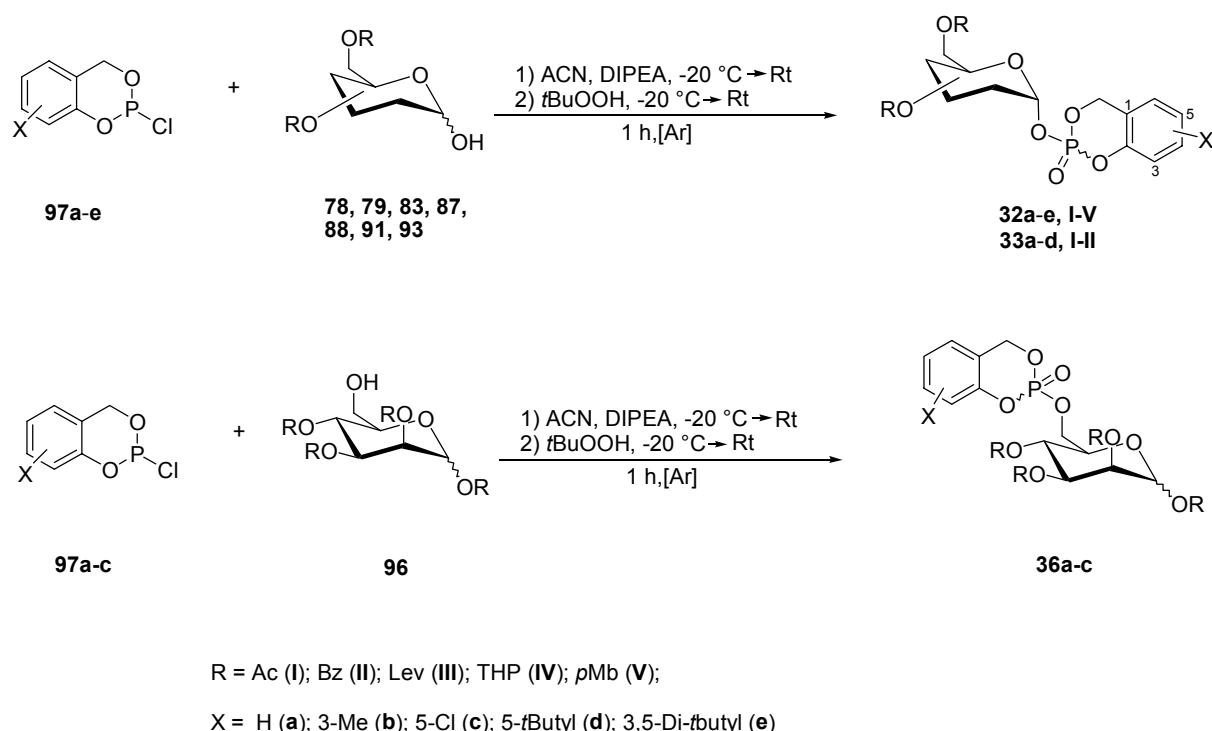


Abb. 83: Darstellung der *cycloSaligenyl*-Hexosemonophosphate

Die Darstellung von bis-*[p*-AB]-ManMP **34** und bis-*[o*-AB]-ManMP **35** wurde entsprechend der Phosphoramidit-Methode (Kap. 3.2.2.2, S. 41) durchgeführt (Abb. 84).

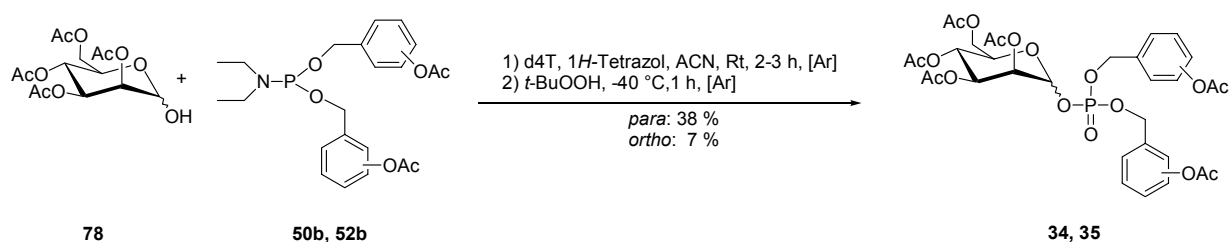


Abb. 84: Darstellung von bis-*[p*-AB]-ManMP **34** und bis-*[o*-AB]-ManMP **35**

Die in Tabelle 6 aufgelisteten Ausbeuten der *cycloSaligenyl*-hexosemonophosphate sind vergleichbar mit denen der *cycloSaligenyl*-Nucleotide, wobei die Ausbeuten weitestgehend die Hydrolysestabilität der Verbindungen widerspiegeln (Kap. 4.3.1.1, S. 87).

Tabelle 6: Synthetisierte *cyclo*Saligenyl-Hexosemonophosphate

	Bezeichnung	Ausbeute
32aI:	Hexose = Man-1-P; X = H; R = Ac	59 %
32bI:	Hexose = Man-1-P; X = 3-Me; R = Ac	62 %
32cI:	Hexose = Man-1-P; X = 5-Cl; R = Ac	6 %
32eI:	Hexose = Man-1-P; X = 3,5-Di- <i>t</i> Bu; R = Ac	61 %
32dII:	Hexose = Man-1-P; X = 5- <i>t</i> Bu; R = Bz	70 %
32dIII:	Hexose = Man-1-P; X = 5- <i>t</i> Bu; R = Lev	27 %
33aI:	Hexose = Gluc-1-P; X = H; R = Ac	23 %
33bI:	Hexose = Gluc-1-P; X = 3-Me; R = Ac	38 %
33dII:	Hexose = Gluc-1-P; X = 5- <i>t</i> Bu; R = Bz	68 %
34:	bis-[<i>p</i> -AB]-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-D-mannopyranosyl)-1-phosphat	38 %
35:	bis-[<i>o</i> -AB]-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-mannopyranosyl)-1-phosphat	7 %
36a:	Hexose = Man-6-P; X = H; R = Ac	64 %
36b:	Hexose = Man-6-P; X = 3-Me; R = Ac	67 %
36c:	Hexose = Man-6-P; X = 5-Cl; R = Ac	7 %

Im Gegensatz zu den *cyclo*Saligenyl-Nucleotid erhebt sich bei den *cyclo*Saligenyl-Hexose-1-monophosphaten die Frage nach der Konfiguration des anomeren Zentrums. Im allgemeinen läßt sich mittels eines ^1H -Spektrums die Konfiguration des anomeren Zentrums der glycosidischen Bindung klären. Gemäß der Karplus-Beziehung zeigen α -Glycoside mit einem Diederwinkel von 60° , also einer *cis-trans*-Stellung von H-1 und H-2, Kopplungskonstanten von $J_{1,2} \approx 3.5$ Hz. β -Glycoside mit einem Diederwinkel von 180° , welches einer *trans-trans*-Stellung von H-1 und H-2 entspricht, weisen eine Kopplungskonstante von $J_{1,2} \approx 8.0$ Hz auf. Die drei *gluco*-Verbindungen **33aI**, **33bI** und **33dII** zeigen Kopplungskonstanten von $J_{1,2} \approx 3.3$ - 3.5 Hz und liegen folglich ausschließlich als α -Anomere vor.

Weit komplizierter sind die Verhältnisse bei den *manno*-Verbindungen, da beide Anomere ungefähr einen Diederwinkel von 60° aufweisen und somit sich auch die Kopplungskonstanten stark ähneln. Die Zuordnung von α - bzw. β -Mannopyranosiden erfolgt

durch ein ^{13}C -gated-NMR-Spektrum. In diesem nicht entkoppelten Spektrum kann die Kopplungskonstante zwischen C-1 und H-1 bestimmt werden, deren Größe für beide Anomere signifikante Unterschiede aufweisen. α -Mannopyranoside besitzen Werte von $^1J_{\text{C-1,H-1}} \approx 170\text{-}180\text{ Hz}$, β -Mannopyranoside von $^1J_{\text{C-1,H-1}} \approx 150\text{-}160\text{ Hz}$.^{151,152} Die untersuchten *manno*-Verbindungen des *cycloSal*-Phosphattriester sind α -anomerenrein.

Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass die etablierte Methode zur Darstellung von *cycloSal*igenyl-Nucleotiden¹²⁹ sich ebenfalls hervorragend zur Synthese von *cycloSal*igenyl-Hexosemonophosphaten eignet.

Bemerkenswert ist, dass die durch Etherschutzgruppen blockierten Mannopyranosen nicht phosphoryliert werden konnten. Ähnliches berichten auch PANNECOUCKE et al.¹⁴⁹ Um zu überprüfen, ob ein weiterer synthetischer Aufwand gerechtfertigt ist, sollten die *p*Mb- und THP-geschützten 1-Allylmannopyranoside **90** und **92** entschützt werden. Neben der Milde der Reaktionsbedingungen ist vor allem die Dauer der Entschätzung ausschlaggebend. Die Halbwertszeit der chemisch-gesteuerten *cycloSal*-Verbindungen liegt meistens im Bereich weniger Stunden, so dass eine längere Entschätzungsdauer unweigerlich neben der Freisetzung der Hydroxyfunktionen am Monosaccharid zur Demaskierung der Phosphat-Einheit führt. Die Entschätzung von 1-*O*-Allyl-2,3,4,6-tetra-*O*-*p*-methoxybenzyl-D-mannopyranosid **90** mit Cer(IV)ammoniumnitrat (CAN) in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (Abb. 85)¹⁵³ führte nach über 50 h nicht zur Deblockierung, so dass die Synthese des Phosphat-Triesters nicht weiter verfolgt wurde.

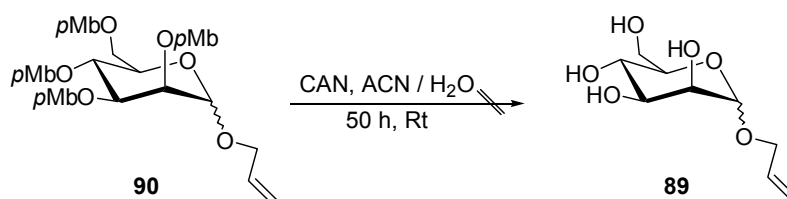


Abb. 85: Entschätzung von 1-*O*-Allyl-2,3,4,6-tetra-*O*-*p*-Methoxybenzyl- α -D-mannopyranosid **90** mit CAN

Die Entschätzung von 1-*O*-Allyl-2,3,4,6-tetra-*O*-tetrahydropyranyl-D-mannopyranosid **92** mit saurem Ionenaustauscher DOWEX 50W8 in Methanol¹⁵⁴ führte nach einer Stunde zu keinem Ergebnis. Durch die Zugabe von *p*-Toluolsulfonsäure¹⁵⁵ wurde dünnschicht-chromatographisch ein geringfügig tieferlaufender Spot beobachtet; vermutlich wurde die 6-Position entschützt. Erst die Zugabe von 5 %-iger Trifluoressigsäure in Dichlormethan-

Methanol führte nach 2.5 h zur Entschützung. Aufgrund der schwierigen Analytik und der Dauer der Entschützung wurden keine weiteren Arbeiten auf diesem Gebiet angestrengt.

Die Auswahl dieser sehr mild abspaltbaren Gruppen hatte zur Zielsetzung, nach Einbringung der maskierten Phosphat-Einheit zu entschützen, um so *cycloSaligenyl*-D-mannopyranosyl-1-phosphat **32aVI** mit freien Hydroxyfunktionen an C-2, -3, -4 und C-6 zu erhalten. Um dieses Ziel dennoch zu erreichen, sollte *cycloSaligenyl*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-1-phosphat **32aI** enzymatisch deacetyliert werden.

Die Kohlenhydratchemie hat wahrscheinlich die längste Geschichte in der Anwendung von Enzymen.^{156,157,158} Vor allem auf dem Gebiet der selektiven Acetylierung bzw. Deacetylierung sind beachtliche Fortschritte erzielt worden.^{159,160} Die Deacetylierung wurde mit Lipase aus *Weizenkeimen* (E.C. 3.1.1.3) unter sehr milden Bedingungen durchgeführt.^{161,162,163} Daneben wurden Cellulasen (E.C.3.2.1.4) aus *Aspergillus niger* und aus *Trichoderma resei* ausgewählt (Abb. 86), wobei in Vorversuchen (pH 7.0, 38 °C) mit Mannosepentaacetat lediglich die Cellulase aus *Aspergillus niger* zur vollständigen Deacetylierung führte.

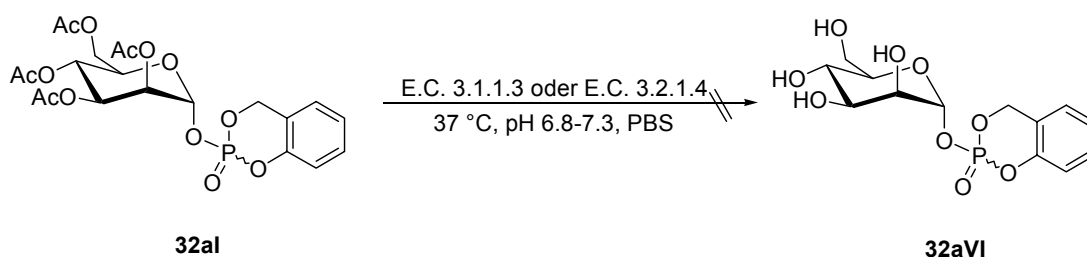


Abb. 86: Deacetylierung von **32aI** mit Lipase aus *Weizenkeimen* (E.C. 3.1.1.3) und Cellulasen (E.C.3.2.1.4) aus *Aspergillus niger* und aus *Trichoderma resei*

Die enzymatische Deacetylierung von *cycloSal*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-1-phosphat **32aI** wurde in einem Phosphatpuffersystem bei pH 6.5, 7.0, 7.3 und in dest. Wasser mit Aceton als Lösungsvermittler bei 37 °C im Thermoschüttler durchgeführt (Kap. 8.7.1, S. 131).¹⁶⁴ Die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion zeigte unabhängig von der Dauer immer dasselbe Ergebnis. Der Eduktspot verschwand zu Gunsten eines sich auf der Startlinie befindlichen Spots und eines zweiten Spots der anhand der Referenzsubstanz 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranose **78** zugeordnet wurde.

Die erfolglose enzymatische Deacetylierung ist unerheblich, da zeitgleich durchgeführte Forschungen davon ausgehen, dass die Acetylgruppen der Zuckereinheit für den passiven Membrantransport relevant sind.^{165,166}

Indessen wurden erste Kenntnisse über das hydrolytische Verhalten der neuartigen *cycloSal*-HMPs gesammelt, welches im folgenden Kapitel eingehend untersucht werden soll.

4.3 Resultate und Diskussion

4.3.1 Hydrolysestudien

Nach der erfolgreichen Synthese stand nun die hydrolytische Untersuchung im Vordergrund, um mechanistische Einblicke zu gewinnen. Zudem sollte biologische Aktivität der Substitute untersucht werden.

4.3.1.1 Hydrolysen im wässrigen Phosphatpuffer bei pH 7.3

Die chemischen Hydrolysekinetiken wurden im basischen Medium bei 37 °C mit isotonischen Phosphatpufferlösungen (PBS, pH = 7.3) entsprechend Kap. 3.3.1.1, S. 44 durchgeführt. In Tabelle 7 sind die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der dargestellten Verbindungen aufgeführt.

Tabelle 7: Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ im wässrigen Phosphatpuffer bei pH 7.3

Bezeichnung	$t_{1/2}$ [h] (PBS; 25 mM; pH 7.3; 37 °C)
5-Cl- <i>cycloSal</i> -(ManAc ₄)-1-phosphat 32cI	0.07
<i>cycloSal</i> -(ManAc ₄)-1-phosphat 32aI	0.12
3-Me- <i>cycloSal</i> -(ManAc ₄)-1-phosphat 32bI	0.18
3,5-Di- <i>t</i> but- <i>cycloSal</i> -(ManAc ₄)-1-phosphat 32eI	--- ¹
5- <i>t</i> But- <i>cycloSal</i> -(ManLev ₄)-1-phosphat 32dIII	0.68
<i>cycloSal</i> -(GlucAc ₄)-1-phosphat 33aI	1.19
3-Me- <i>cycloSal</i> -(GlucAc ₄)-1-phosphat 33bI	1.42
5- <i>t</i> Butyl- <i>cycloSal</i> -(ManBz ₄)-1-phosphat 32dII	--- ¹
5- <i>t</i> Butyl- <i>cycloSal</i> -(GlucBz ₄)-1-phosphat 33dII	--- ¹
bis-[<i>p</i> -AB]-ManAc ₄ -1-phosphat 34	2.13
bis-[<i>o</i> -AB]-ManAc ₄ -1-phosphat 35	0.63
5-Cl- <i>cycloSal</i> -(ManAc ₄)-6-phosphat 36c	4.6
<i>cycloSal</i> -(ManAc ₄)-6-phosphat 36a	6.6
3-Me- <i>cycloSal</i> -(ManAc ₄)-6-phosphat 36b	11.7

¹: Verbindung unter den Versuchsbedingungen unlöslich

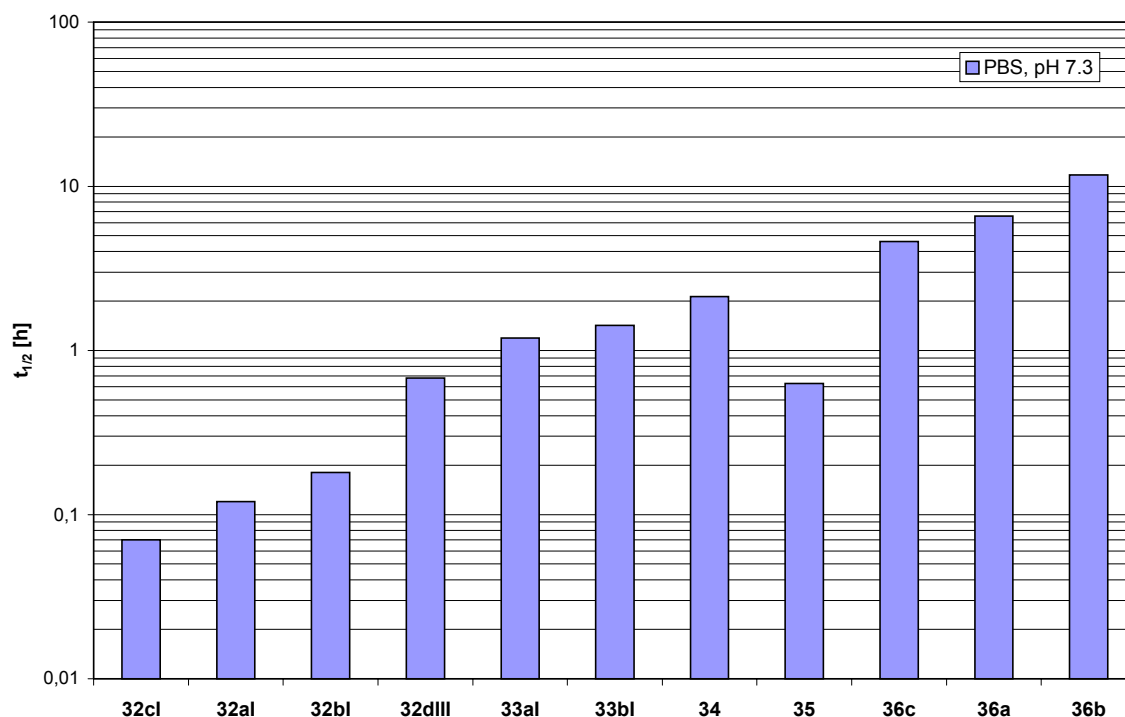


Diagramm 2: Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ der dargestellten Phosphatriester im wässrigen Phosphatpuffer bei pH 7.3 (logarithmische Darstellung)

Beachtenswert ist, dass sowohl bei den *cycloSal*-Man-1-MP als auch bei den *cycloSal*-Gluc-1-MP sowie bei den *cycloSal*-Man-6-MP die Halbwertszeit $t_{1/2}$ mit zunehmender Elektronendonorstärke in *ortho*- bzw. *para*-Position zum phenylischen Phosphatester zunimmt. Somit weisen die *cycloSal*-HMP ein von den *cycloSal*-NMP her bekanntes Verhalten auf. Interessanterweise differieren die Halbwertszeiten der drei *cycloSal*-HMP-Gruppen untereinander sehr stark, so dass bereits allein diese Daten den Einfluß der 1- bzw. der 6-Position und der *manno*- bzw. *gluco*-Form des Monosaccharids verdeutlichen. Ebenso drastisch zeigt sich der Austausch des Nucleosids gegen Monosaccharid bei den bis-[AB]-maskierten Verbindungen **34** und **35**. Zuvor betrug die Halbwertszeit der *para*-Verbindung 7.2 h und die der *ortho*-Verbindung sogar über 100 h. Detailliert werden die Halbwertszeiten im Zusammenhang mit den Hydrolyseprodukten und deren Verhältnissen in Kap. 4.3.1.5, S. 99 diskutiert.

4.3.1.2 Identifizierung der Hydrolyseprodukte durch Massenspektrometrie

Bereits bei den enzymatischen Deacetylierungsversuchen wurde dünnschichtchromatographisch ein auf der Startlinie befindlicher Spot, der auf den polaren bzw. ionischen Charakter der Substanz hinweist, detektiert. Zudem ein Spot, der anhand der

Referenzsubstanz 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose **78** α/β -Mannosetetraacetat zugeordnet wurde. Diese Beobachtung wird ebenfalls durch die HPLC-Analytik bestätigt (Abb. 87), auch hier konnte α/β -Mannosetetraacetat **78** anhand der Referenzsubstanz zugeordnet werden. Der bereits bei 4.39 min auftretende Peak lässt erneut den Rückschluss auf eine ionisch vorliegende Verbindung zu.

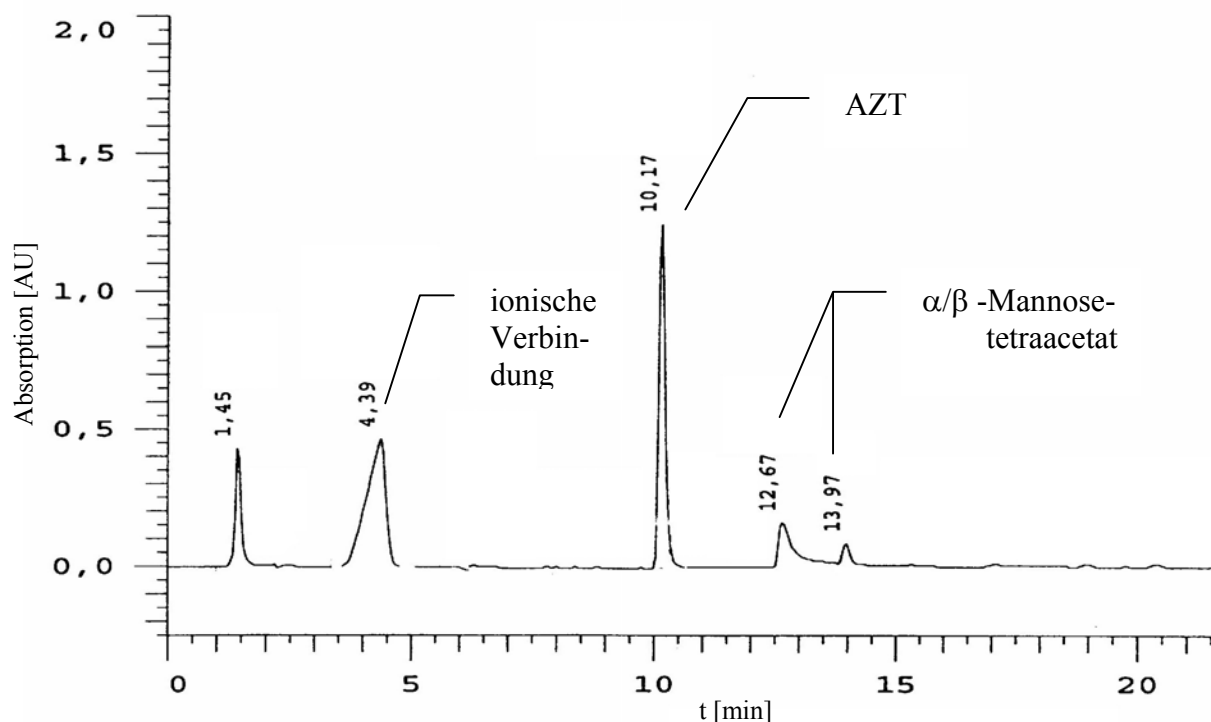


Abb. 87: HPLC-Chromatogramm von *cycloSal*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-1-phosphat **32aI** nach vollständiger Hydrolyse (RP-18, Gradient B)

Um eine Aussage über die Hydrolyseprodukte zu treffen, wurden die Lösungen der *cycloSal*-HMPs nach vollständiger Hydrolyse massenspektrometrisch mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) untersucht. Bei diesem Ionisationsverfahren wird eine Substanzlösung durch eine Kapillare in eine Kammer gesprüht. Diesem Sprühnebelstrahl entgegengerichtet strömt ein Trockengas. Zwischen der Kapillare und dem Kammermantel ist ein Potential von einigen Kilovolt angelegt. Somit entstehen geladene Tröpfchen, die unter Verdampfung des Lösemittels (Acetonitril/Wasser) kleiner werden. Getrieben durch das elektrische Feld, bewegen sich die geladenen Tröpfchen durch eine Glaskapillare in den Analysatorvorraum und werden, durch elektrostatische Liniensysteme fokussiert, in den Analysator des Massenspektrometers (Sektorfeld-MS) gelenkt und analysiert. Das ESI-MS ist mit einem zweiten Massenspektrometer (Ionenfalle) gekoppelt, wodurch von einer Substanz mehrere Generationen von Fragment-Ionen erzeugt werden können. Diese Kombination gestattet es, auch die Trapping-Methodik (MS/MS) heranzuziehen. Im ersten Massenspektrometer wird

ein Massenspektrum aufgenommen (MS^1). Die interessierenden Ionen können in der Ionenfalle gesammelt und anschließend „ausgegossen“ werden, so dass ein Massenspektrum (MS^2) dieser Ionen erzeugt wird. Die gezielte Fragmentierung der einzelnen Produkte kann zu ESI- MS^n -Spektren führen, die wertvolle Hinweise bei der Strukturaufklärung darstellen.

Das folgende Massenspektrum (MS^1) stellt die Hydrolyseprodukte von *cycloSal*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-1-phosphat **32aI** dar (Abb. 88).

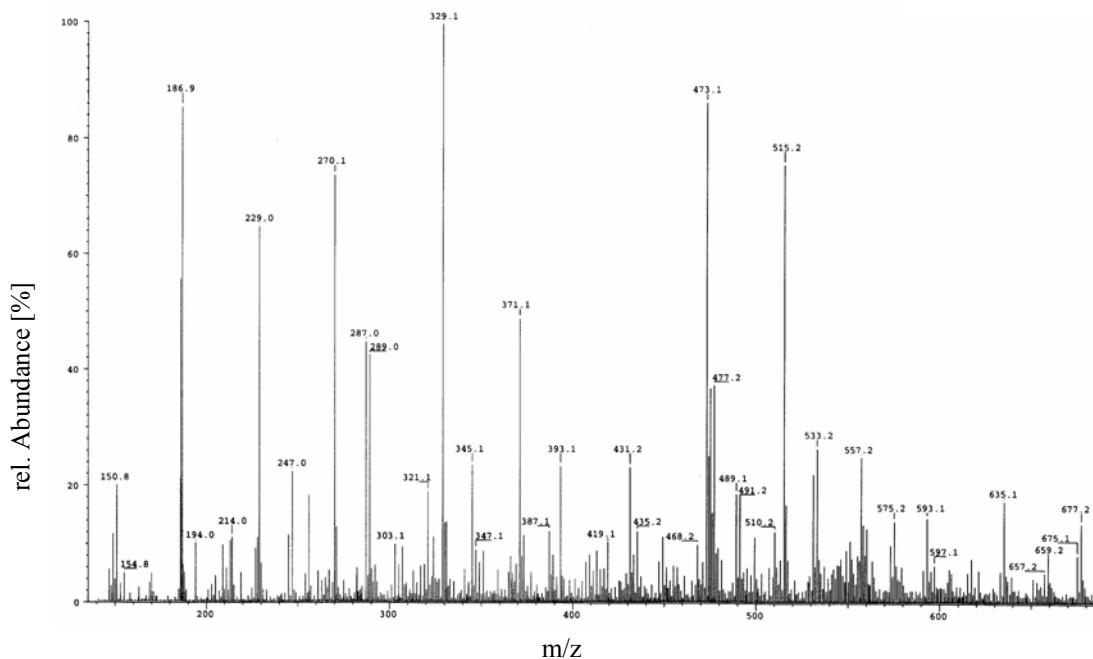


Abb. 88: ESI-Massenspektrum (MS^1) des Hydrolysats von *cycloSal*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-1-phosphat **32aI**

Wesentlich intensiver als der $[M+1]$ -Peak bei m/z 187 im MS^1 fällt im MS^2 das Signal bei m/z 107 aus. Die Bildung des $(C_7H_7O^+)$ -Fragmentions ist typisch für hydroxylierte Benzylalkohole, so dass m/z 187 im MS^1 dem *cycloSal*igenylphosphat **98** zugeordnet werden kann.

Dieser Befund beansprucht geradezu als Gegenstück zu **98** die 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose **78**. Die Molekülionen bei m/z 371, m/z 329 und m/z 287 im MS^1 könnten den tetra-, tri- und di-acetylierten Mannose-Derivaten jeweils als $[M+Na]^+$ entsprechen. Das Molekülion bei m/z 515 im MS^1 entspräche $[426+\text{Imidazol}+H_2O+3H]^+$ und das Molekülion mit m/z 473 $[426+2Na+H]^+$, wobei die Molmasse von 426 g/mol dem 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** zuzuordnen sei.

Die Molekülionen der zuckerhaltigen Verbindungen wurden gleichermaßen mit der Trapping-Methodik untersucht, wobei im MS^2 - MS^4 die für derartige Verbindungen charakteristische Abspaltung des Acetylions m/z 42 ebenso beobachtet wurde wie M-60 [HOAc].

Die massenspektrometrische Analytik liefert somit starke Hinweise auf die Hydrolyseprodukte 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose **78** und 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99**. Jedoch können die entstandenen Produkte nicht quantifiziert werden, da die Fähigkeit Molekütionen auszubilden von Produkt zu Produkt variiert und somit die Intensität des Massensignals nicht allein von der Konzentration der Substanz abhängig ist. Zur Quantifizierung der Hydrolyseprodukte wird im folgenden Kap. 4.3.1.3, S. 99 die ^{31}P -NMR-Spektroskopie herangezogen.

4.3.1.3 Quantitative Bestimmung und Identifizierung der Hydrolyseprodukte durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie

Eine weitere Möglichkeit die Hydrolyseprodukte zu identifizieren bietet die ^{31}P -NMR-Spektroskopie und stellt somit ein wertvolles Instrumentarium zur Aufklärung der Produktverhältnisse dar. Die Quantifizierung beruht auf der natürlichen Isotopenhäufigkeit von fast 100 % des ^{31}P -Kerns.

Die Signale der *cycloSal*-HMPs liegen in einem Bereich zwischen -8 ppm bis -12 ppm. Ein zu erwartendes Hydrolyseprodukt ist 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99**; denkbar ist ebenfalls das aus dem Bruch der glykosidischen Bindung hervorgehende *cycloSal*igenylphosphat **98**.

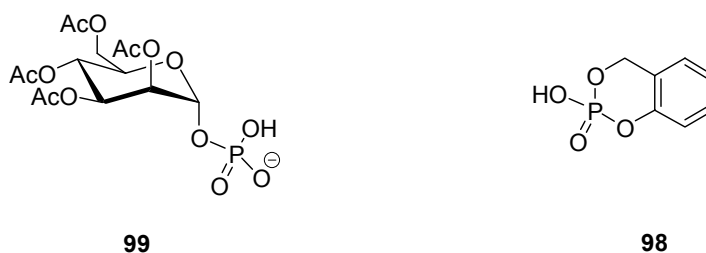


Abb. 89: Hydrolyseprodukte: 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** und *cycloSal*igenylphosphat **98**

Zunächst war von beiden Substanzen die ^{31}P -NMR-spektroskopische Verschiebung ihrer Signale zu klären. Zu diesem Zweck wurde 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** als Referenzsubstanz dargestellt.

Zur Synthese von Verbindung **99** wurde das bis-(Benzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosyl-1-phosphat **105**, welches mittels der Phosphoramidit-Methode (Kap. 3.2.2.2, S. 41) aus 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranose **78** und bis-(Benzyl)-*N,N*-diethylphosphoramidit **70b** in 25 % Ausbeute dargestellt wurde, verwendet. Die anschließende reduktive

Debenzylierung¹⁶⁷ mit Palladium auf Aktivkohle unter Zusatz von Triethylamin lieferte das 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** in 44 % Ausbeute in Form seines Monotriethylammoniumsalzes (Abb. 90).

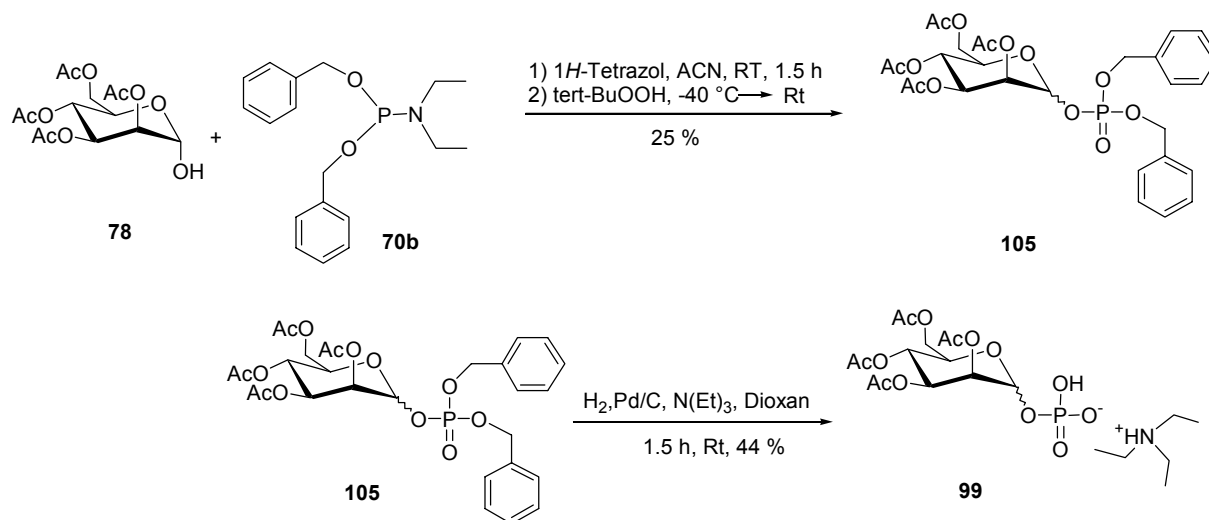


Abb. 90: Synthese von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99**

Da die Hydrolyseprodukte mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie identifiziert werden sollten, wurde als nächstes die chemische Verschiebung und das Kopplungsmuster derartiger Verbindungen untersucht. Als Modellkomponente wurde handelsübliches Glucose-1-phosphat gewählt. Dabei wurde die Lage des H-1 im Bereich von 5.4 ppm im ¹H-Spektrum und des C-1 im Bereich von 95 ppm im ¹³C-Spektrum von Glucose-1-phosphat genutzt. Diese exponierte Lage ist auf das anomere Zentrum zurückzuführen und ermöglicht eine eindeutige Identifikation des C-1 bzw. H-1, die direkt benachbart zum Phosphor liegen und letzteres dessen Kopplungsmuster bestimmt. Um nun eine eindeutige Zuordnung zu treffen wurde ein ¹H-³¹P-gekoppeltes Spektrum (Abb. 91) von Glucose-1-phosphat in deuteriertem TRIS-Puffer bei pD 8.0 aufgenommen. Dieses Milieu entspricht dem HCl/Imidazol-Puffers, in dem die Hydrolysen der *cycloSal*-HMP durchgeführt werden sollen. Das ¹H-³¹P-gekoppelte Spektrum zeigt deutlich einen Crosspeak vom H-1 bei 5.45 ppm und dem Phosphor bei 3.8 ppm. Da es sich bei dem Signal bei 5.45 ppm tatsächlich um das H-1 handelt, wurde vorab durch ein HMQC-Spektrum verifiziert.

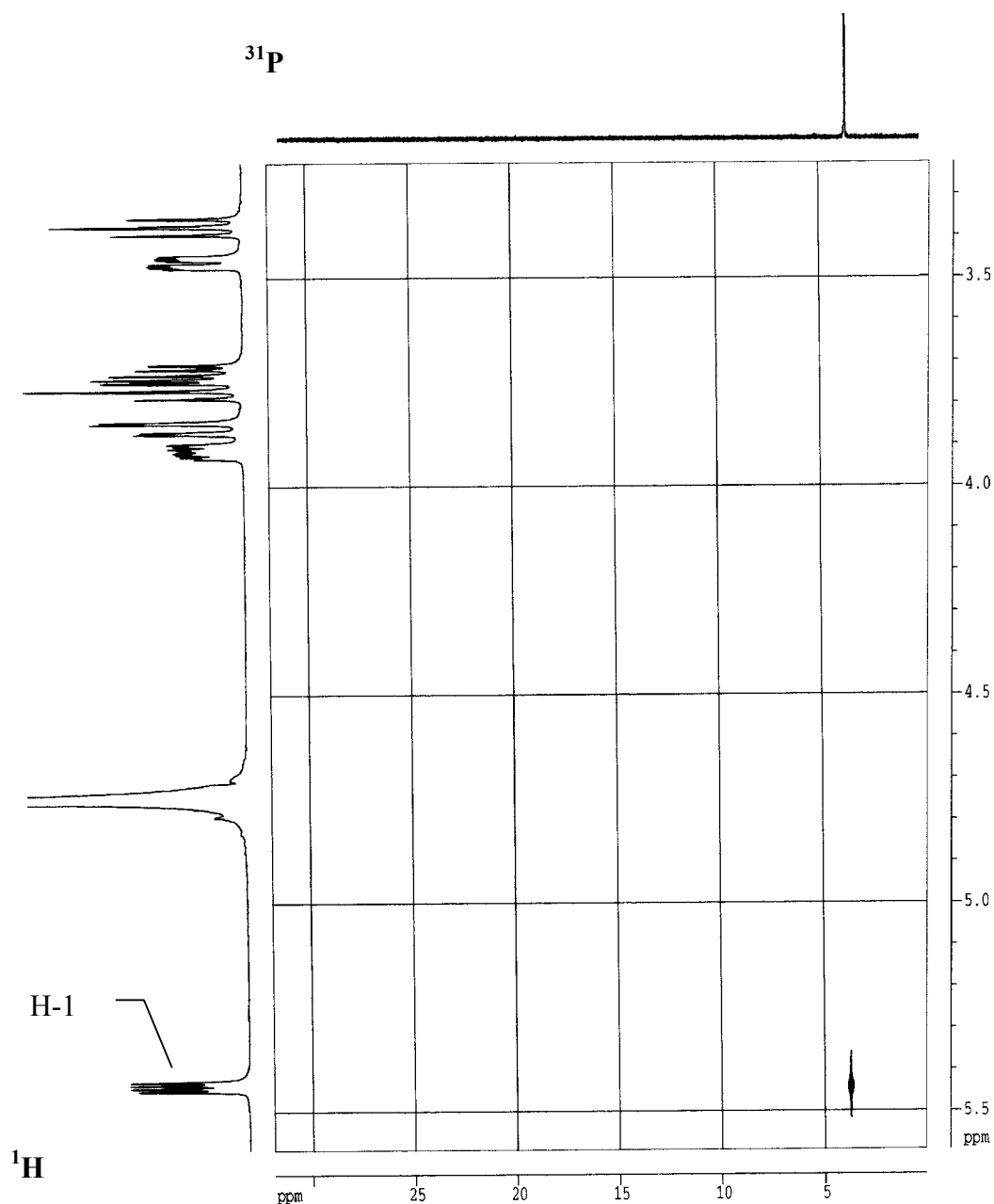


Abb. 91: ^1H - ^{31}P -COSY-NMR-Spektrum von Glucose-1-phosphat

Auf diese Weise wurde ebenfalls die Referenzsubstanz 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosyl-1-phosphat **99** untersucht. Erneut weist das ^1H - ^{31}P -NMR-Spektrum (Abb. 92) einen Crosspeak zwischen dem dd-System des H-1 bei 5.25 ppm und dem Phosphor bei 0.5 ppm auf. Das dd-System wird hervorgerufen sowohl durch die Kopplung zum benachbarten H-2, mit einer Kopplungskonstanten von $^3J_{1,2} = 1.2$ Hz als auch durch die Kopplung zum Phosphor mit einer Kopplungskonstanten von $^2J_{1,\text{P}} = 7.6$ Hz. Zur Überprüfung wurde ein gekoppeltes ^{31}P -NMR-Spektrum aufgenommen, das für das Signal bei 0.5 ppm ein Dublett mit einer Kopplungskonstanten von ebenfalls $^2J_{1,\text{P}} = 7.6$ Hz aufwies (Abb. 92).

Vermutlich resultiert der zweite Crosspeak vom in sehr geringen Mengen entstehenden β -Anomer des 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosyl-1-phosphat **99** her.

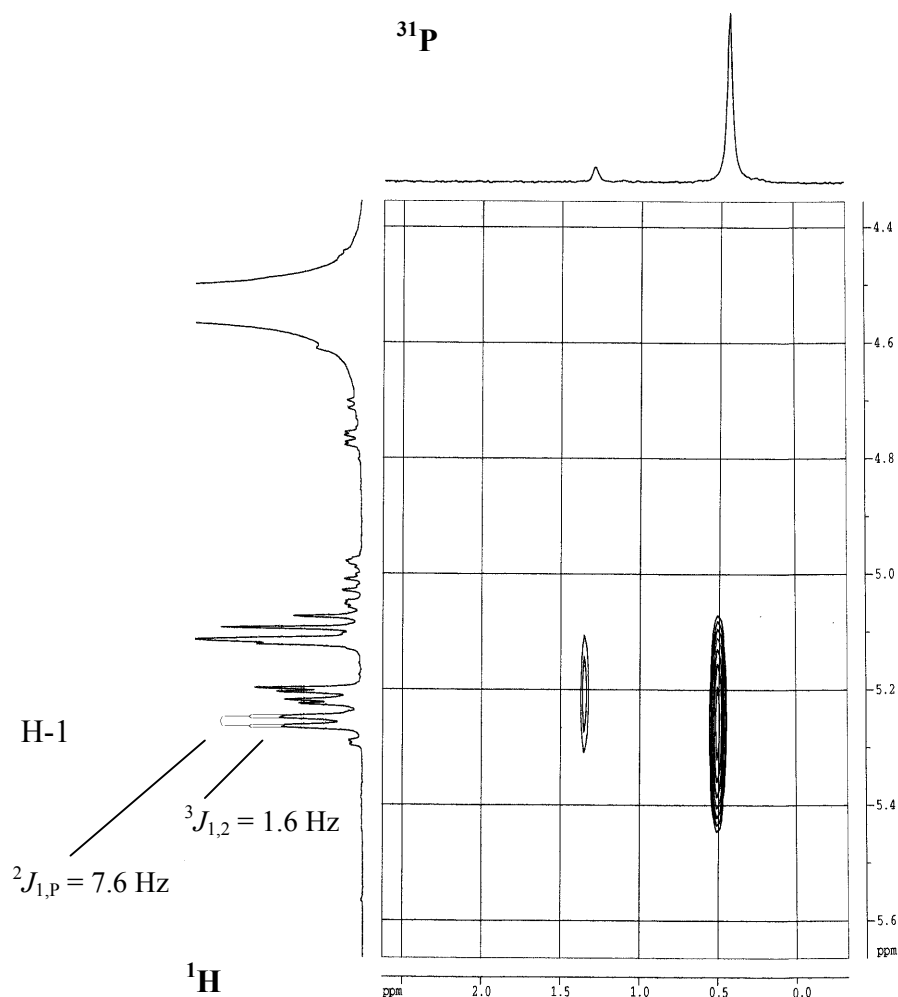


Abb. 92: ^1H - ^{31}P -COSY-NMR-Spektrum von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** in deuteriertem TRIS-Puffer

Zur Darstellung des durch den Bruch der glykosidischen Bindung entstehenden *cyclo*Saligenylphosphat **98** wurde *cyclo*Saligenylchlorphosphan **97a** mit einer Lösung von *t*Butylhydroperoxid in Wasser oxidiert und ohne weitere Aufreinigung im HCl/Imidazol-Puffer ^{31}P -NMR-spektroskopisch vermessen (Abb. 93). Das Signal bei -7.6 ppm weist ein Triplet auf, das durch die benzylicischen Protonen in unmittelbarer Nachbarschaft des Phosphors verursacht wird. Somit stammt dieses Signal vom *cyclo*Saligenylphosphat **98**.

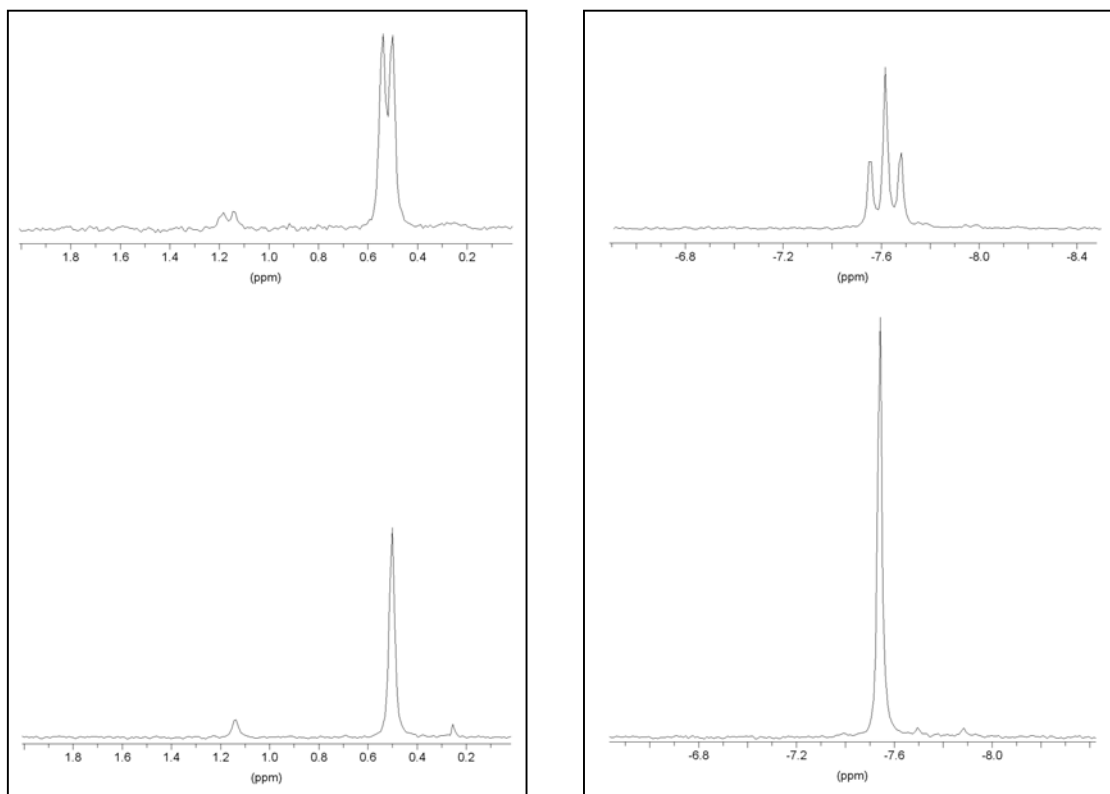


Abb. 93: ^{31}P -NMR-Spektren von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** (links), *cyclo*Saligenylphosphat **98** (rechts); entkoppelt (unten), gekoppelt (oben)

Die zu erwartenden Hydrolyseprodukte können nun anhand ihrer chemischen Verschiebung und ihrer Kopplungsmuster identifiziert werden.

4.3.1.4 Hydrolysemechanismus von *cyclo*SalHMP

Um erste Indizien über den Mechanismus zu gewinnen, wurden 2.9 mg *cyclo*Sal-(ManAc₄)-1-phosphat **32aI** in 5 μL Aceton gelöst und danach mit 100 μL O^{18} -markiertem Wasser (10 atom % O^{18}) versetzt. Nach vollständiger Hydrolyse wurde das Gemisch massenspektrometrisch untersucht (Abb. 94).

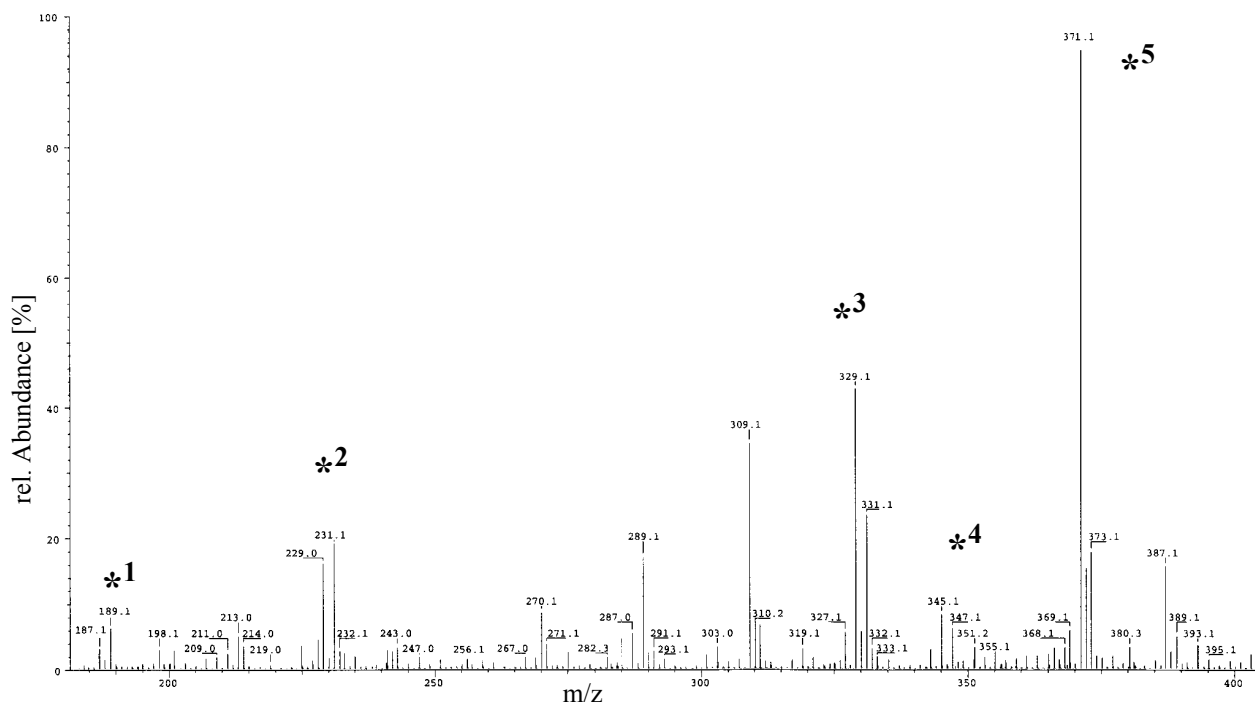


Abb. 94: ESI-Massenspektrum des O¹⁸-markierten Hydrolysats von *cycloSal*-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-1-phosphat **32al**

Diese Vorgehensweise gestattete eine präzise Untersuchung des Bindungsbruches, da die Hydrolyseprodukte O¹⁸-markiert waren (Abb. 95). Die Auswertung der O¹⁶/O¹⁸-markierten Peakpaare ergab, dass wie zu erwarten, die Phenylesterbindung brach aber auch die glykosidische Bindung.

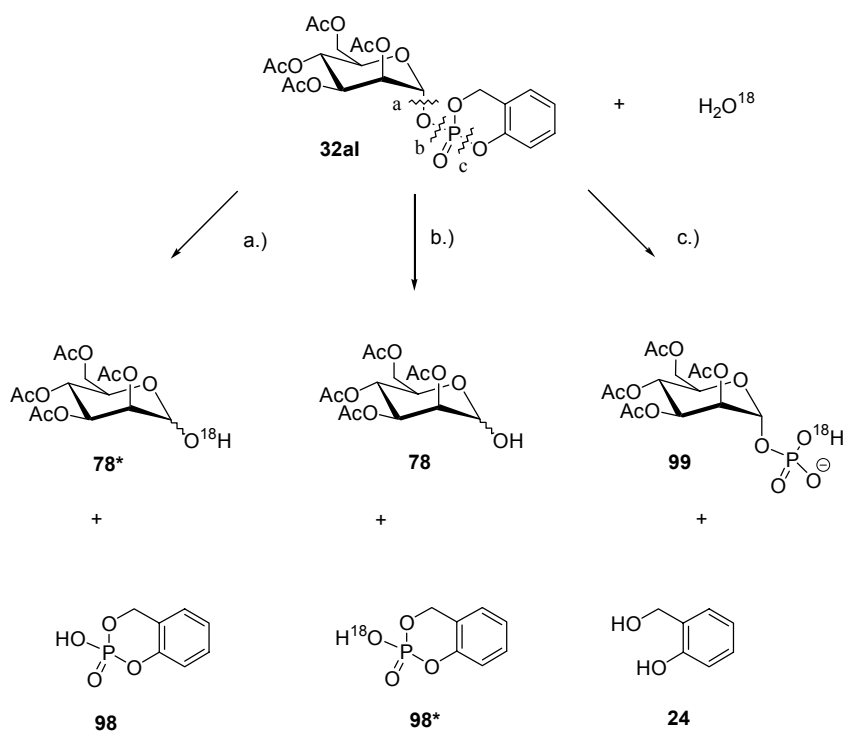


Abb. 95: Durch O¹⁸-Markierung nachzuweisende Bindungsbrüche in **32al**

Der Bindungsbruch des Phenylesters (Weg c) führte zu O^{18} -markierten Mannose-1-phosphat-derivaten (*4: $m/z = 345/347 \rightarrow$ Diacetylmannose-1-phosphat + H), dagegen entstanden beim Bruch der glykosidischen Bindung (Weg a) folgende O^{18} -markierte Mannosederivat-Addukte (*2: $m/z = 289/291 \rightarrow$ Diacetylmannose + Na; *3: $m/z = 329/331 \rightarrow$ Triacetylmannose + Na; *5: $m/z = 371/373 \rightarrow$ Tetraacetylmannose + Na). Bemerkenswert ist das mit schwacher Intensität auftretende Peakpaar m/z 187/189 (*1), da es die Bildung O^{18} -markierten *cyclo*Saligenylphosphats **98*** belegt. Folglich ist die Spaltung der Mannopyranosylesterbindung (Weg b) nicht völlig auszuschließen.

Die Untersuchung mit O^{18} -markiertem Wasser deutet sehr stark darauf hin, dass sowohl der Phenylester als auch die glykosidische Bindung bricht. Außerdem scheint ebenfalls die Mannopyranosylesterbindung zu brechen.

Als nächstes soll der Hydrolyseverlauf von *cyclo*Sal-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-1-phosphat **32aI** in einem HCl/Imidazol-Puffer ^{31}P -NMR-spektroskopisch untersucht werden, um eventuelle Intermediate ausfindig zu machen (Abb. 96).

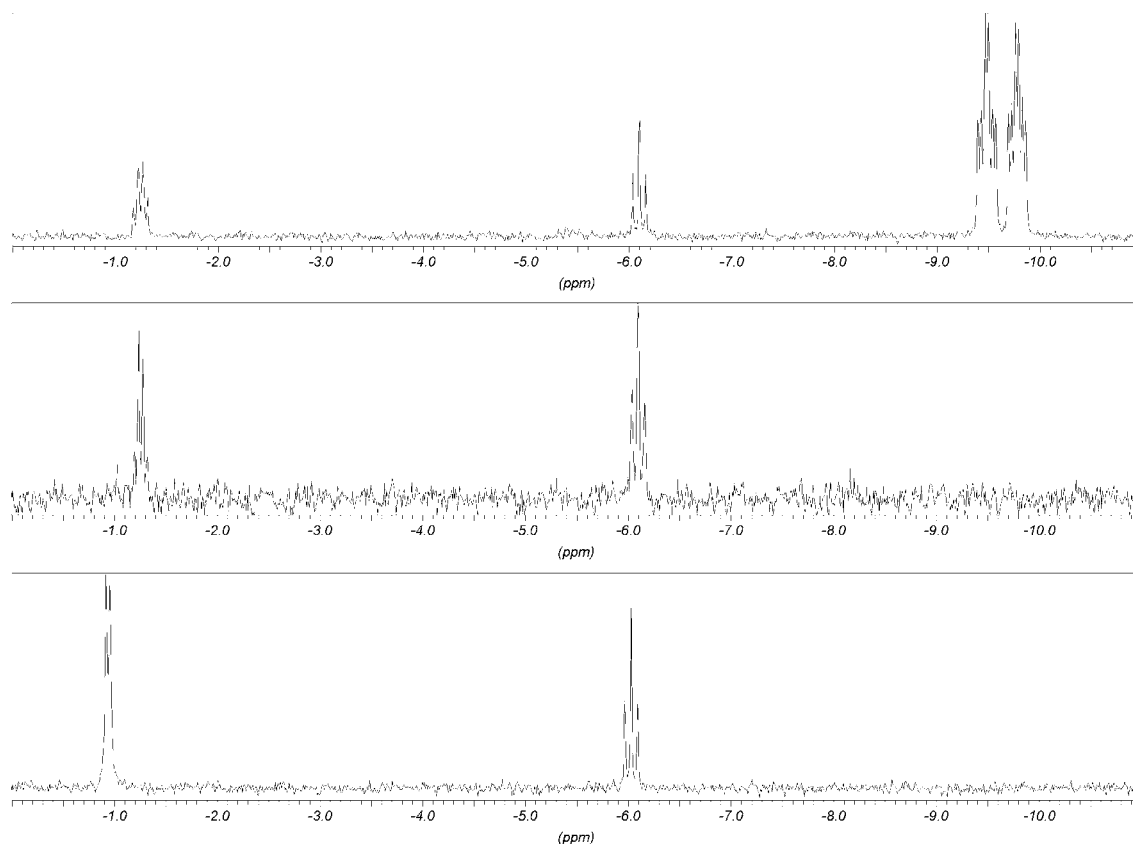


Abb. 96: ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse von *cyclo*Sal-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-1-phosphat **32aI** (gekoppelte ^{31}P -NMR-Spektren)

Der Verlauf zeigt deutlich, dass neben den beiden Diastereomerenpeaks des Edukts mit R_P und S_P Konfiguration bei -9.8 ppm und bei -9.4 ppm sich ein Triplett bei -6.0 ppm des *cycloSaligenylphosphat* **98** zeigt sowie ein bis hierher unbekanntes ddd-System (virtuelles Quartett) bei -1.6 ppm, welches während der Hydrolyse zugunsten eines Dubletts bei -0.9 ppm abnimmt. Dieser Zusammenhang zwischen den Signalen deutet darauf hin, dass sich 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** aus der Substanz bei -1.6 ppm formiert. Denkbar ist die Bildung des Diesters; der Bruch der Phenylesterbindung bedingt das tieffeldverschobene ^{31}P -Signal bei -1.6 ppm. Die diastereotopen Protonen der benzylichen Methylengruppe und das anomere H-1 führen zum ddd-System. Somit bestätigen Tieffeldverschiebung und Kopplungsmuster den Diester als Intermediat.

Mit den gesammelten Informationen lässt sich folgender erster Hydrolysemechanismus postulieren (Abb. 97):

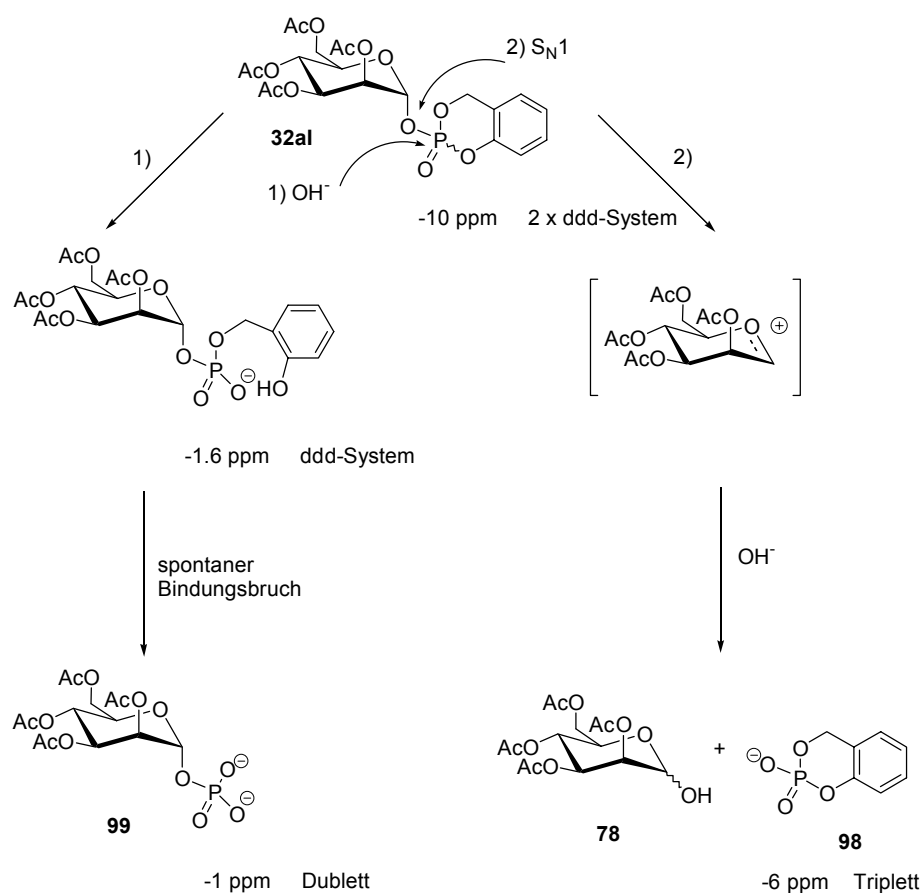


Abb. 97: Postulierter Hydrolysemechanismus von *cycloSal*-hexosemonophosphaten

Die *cycloSal*-HMPs werden im neutralen Medium (pH 6.8-7.3) auf zwei parallel ablaufenden Wegen hydrolysiert. Zum einem findet der nucleophile Angriff eines Hydroxidions am Phosphor statt, wodurch der Phenylester selektiv gespalten wird. Der zur Benzylgruppe *ortho*-stehende Akzeptor (Phosphat) wird in einen Donor-Substituenten (Phenolatanion)

umgewandelt. Das Ergebnis dieser Umpolung ist die Aktivierung zur spontanen Spaltung des Diesters. Das 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** wird freigesetzt und ebenso das Diol **24** (Reaktionsweg 1). Zum anderen wird entweder durch Protonierung oder in einer S_N1-artigen Reaktion der Monosaccharidrest als stabilisiertes Oxocarbenium abgespalten, welches durch den nucleophilen Angriff eines Hydroxidions die 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranose **78** ausbildet. Als zweites Produkt wird das sehr stabile cyclische *cyclo*Saligenylphosphat **98** gebildet (Reaktionsweg 2).

Die Konkurrenz dieser beiden Reaktionswege ist pH-abhängig; so ist bei pH 6.8, der im extrazellulären Medium vorherrscht, die Bildung des Oxocarbeniumions bevorzugt. Im Cytoplasma jedoch ist bei pH 7.3 die Spaltung des Phenylesters dominierend.¹⁶⁸

4.3.1.5 Produktverhältnisse der ³¹P-NMR-Hydrolysestudien

Es wurden ³¹P-NMR-Hydrolysen entsprechend Kap. 3.3.1.1, S. 44 durchgeführt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Produktverhältnisse von *cyclo*Sal-HMP und bis-[AB]-HMP aus ³¹P-NMR-Hydrolysen

Bezeichnung	Produktverhältnisse [%]	
	geschütztes Glycosyl-1-MP	1-OH-freies Monosaccharid
5-Cl- <i>cyclo</i> Sal-(ManAc ₄)-1-phosphat 32cI	60	26 ¹
<i>cyclo</i> Sal-(ManAc ₄)-1-phosphat 32aI	57	32 ¹
3-Me- <i>cyclo</i> Sal-(ManAc ₄)-1-phosphat 32bI	51	47 ¹
3,5-Di- <i>t</i> butyl- <i>cyclo</i> Sal-(ManAc ₄)-1-phosphat 32eI	37	62 ¹
5- <i>t</i> Butyl- <i>cyclo</i> Sal-(ManLev ₄)-1-phosphat 32dIII	61	35 ¹
<i>cyclo</i> Sal-(GlucAc ₄)-1-phosphat 33aI	82	9 ²
3-Me- <i>cyclo</i> Sal-(GlucAc ₄)-1-phosphat 33bI	80	8 ²
bis-[<i>p</i> -AB]-ManAc ₄ -1-phosphat 34	86	--- ²
bis-[<i>o</i> -AB]-ManAc ₄ -1-phosphat 35	--- ³	--- ³

¹: Der zu 100 % ergänzende Peak bei 0.7 ppm wurde nicht identifiziert.

²: In diesen Fällen wurde kein Mannosetetraacetat identifiziert; die zu 100 % ergänzenden Peaks wurden nicht identifiziert.

³: Die Peaks konnten nicht identifiziert werden.

Dieses Experiment gestattete erstmals die Produktverhältnisse von *cycloSal*-HMPs und bis-[AB]-HMPs zu quantifizieren.

Die Produktverhältnisse der Verbindungen in Tabelle 8 sind abhängig von dem Substituenten der *cycloSal*-Einheit. Je destabilisierender der Einfluss des Substituenten, desto kleiner ist erstens die Halbwertszeit (Kap. 3.3.1.1, S. 44) und desto größer ist zweitens der Anteil an gebildetem Mannose-1-phosphat **99**. Die Ursache für diese Beobachtung liegt in den konkurrierenden Reaktionen. Bei konstantem pH 7.3 erfolgt die Bildung des Mannosetetraacetats **78** mit gleichbleibender Geschwindigkeit. Hingegen erhöht sich durch den zunehmenden destabilisierenden Einfluss des Substituenten die Geschwindigkeit des Phenylesterbruches, welches sich in einer Verkürzung der Halbwertszeit und in einem erhöhten Anteil des 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** äußert.

Sehr interessant ist der Vergleich der *gluco*-Derivate **33aI** und **33bI** mit den *manno*-Derivaten **32a-cI**. Die *gluco*-Verbindungen hydrolysieren mit annähernd der gleichen Halbwertszeit von 1.2 h für **33aI** und 1.4 h für **33bI**. Ebenso sind auch die Produktverhältnisse gleich, wobei sich zu 80 % 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-glucose-1-phosphat **100** bildet. Folglich hat der Substituent am *cycloSal*-Rest einen zu vernachlässigenden Einfluss. Das Phänomen basiert vielmehr auf der axialen bzw. äquatorialen Stellung des Acetoxyrestes in C-2 Position des Kohlenhydrateils. Die Untersuchung der Epimere zeigte, dass nicht allein die S_N1-artige Bildung des *manno*- bzw. *gluco*-Oxocarbeniumions stabilisierend wirkt (Reaktionsweg 2a), sondern vielmehr die Stabilisierung durch den Nachbargruppeneffekt eine bedeutende Rolle übernimmt (Abb. 98). Folglich findet ein S_N2-artiger intramolekularer Angriff des nucleophilen Carbonylsauerstoffs der Acetoxygruppe an C-2 unter Bildung eines Acetoxoniums statt (Reaktionsweg 2b). Erst danach kommt es zum nucleophilen Angriff durch das Hydroxidion. Die *manno*-Verbindung bildet aufgrund der *trans*-diaxialen Stellung der Substituenten an C-1 und C-2 bevorzugt das *manno*-Acetoxonium, der *gluco*-Verbindung ist aus den erläuterten sterischen Gründen ein derartiger intramolekularer Angriff unmöglich.^{169,170} Der Nachbargruppeneffekt hat nicht nur einen stabilisierenden Einfluss, sondern vielmehr einen beschleunigenden. Der *trans*-ständige Acetoxysubstituent erleichtert durch den nucleophilen Angriff seines Carbonylsauerstoffs den Austritt der Phosphatgruppe. Dadurch wird die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht, so dass es sich um eine anchimere Beschleunigung handelt.

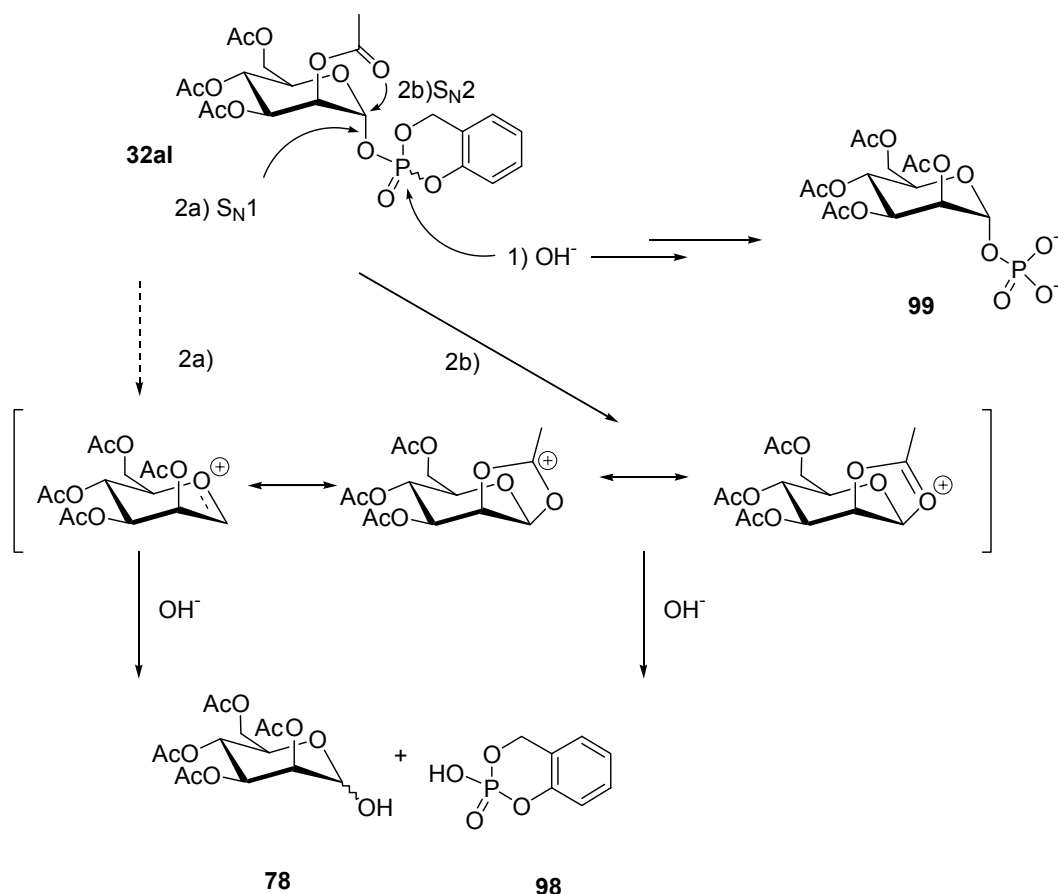


Abb. 98: Postulierter erweiterter Hydrolysemechanismus von *cycloSal*-HMP

Interessant ist in diesem Zusammenhang, inwieweit sich die anchimere Beschleunigung bei Verbindung **32dIII** beobachten lässt, bei der die Acetyl-Schutzgruppen gegen Levulinyllgruppen ausgetauscht sind. Das 5-*t*Butyl-*cycloSal*-(ManLev₄)-1-phosphat **32dIII** zeigt mit 41 min eine deutlich größere Halbwertszeit als die anderen *manno*-Derivate **32a-cI**, deren Halbwertszeiten zwischen vier bis zehn Minuten betragen. Wäre die Verlängerung der Halbwertszeit allein vom *t*Butylsubstituenten der *cycloSal*-Einheit abhängig, so wäre ein Produktverhältnis zugunsten des Mannosetetraacetats **78** zu erwarten; entsprechend der Beobachtung: Je stabilisierender der Einfluss eines Substituenten am Arylsystem, desto mehr Mannosetetraacetat **78** wird gebildet. Allerdings ist bei der levulinierten Verbindung das Produktverhältnis mit 61 % zu Gunsten des 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphats **99** verschoben. Also ist der Nachbargruppeneffekt der Levulinyllgruppe, die formal betrachtet eine Acetylgruppe beinhaltet, geringer. Denkbar ist erstens eine Konkurrenz der beiden Carbonylsauerstoffe, wobei sowohl die Ausbildung eines Fünfringes als auch die höhere Nucleophilie der Carboxylgruppe vorteilig ist.

Insgesamt verlangsamen diese Faktoren den Reaktionsweg 2, so dass mehr gewünschtes 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphats **99** über Reaktionsweg 1 gebildet wird.

Das bis-[*p*-AB]-ManAc₄-1-phosphat **34** liefert mit einer Halbwertszeit von 2.13 h wie erwartet die gewünschte 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** zu 86 %.

Hingegen setzt die entsprechende *ortho*-Verbindung **35** kein 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** frei. Der Triester bei –12 ppm verschwindet und als neuer Produktpeak (82 %) entsteht ein Singulett bei –10 ppm, dessen Struktur nicht geklärt werden konnte.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen bleibt festzuhalten, dass der Reaktionsweg 2 des Hydrolysemechanismus um ein Acetoxonium zu erweitern ist. Die Experimente der epimeren Verbindungen zeigen deutlich, dass die Stellung des Substituenten an C-2 eine Weiche für den bevorzugt zu durchlaufenden Hydrolysemechanismus darstellt. Aufschlussreich ist, dass allein die Art des Substituenten, z.B. eine Acetyl- oder Levulinygruppe an C-2 entscheidend das Produktverhältnis beeinflusst.

4.3.1.6 Hydrolyseverhalten der *cycloSal*-Mannose-6-phosphate

Die strukturelle Verwandtschaft der Verbindungen in Tabelle 9 liegt in der Verknüpfung der primären Hydroxyfunktion einer Ribofuranose bzw. einer Mannopyranose mit der Phosphateinheit der *cycloSal*-Maske. Interessant ist vor allem, inwiefern sich das Hydrolyseverhalten der *cycloSal*-NMPs auf die *cycloSal*-H-6-MPs übertragen lässt.

Tabelle 9: Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ der *cycloSal*-Mannose-6-Phosphate im Vergleich zu den entsprechenden d4T-Derivaten

Entsprechend d4-TMP-Derivaten			
Bezeichnung	t _{1/2} [h]		Bezeichnung ⁵⁵
	(PBS; 37 °C; pH 7.3)		
5-Cl- <i>cycloSal</i> -(ManAc ₄)-6-phosphat 36c	4.6	0.7	5-Cl- <i>cycloSal</i> -d4TMP 39c
<i>cycloSal</i> -(ManAc ₄)-6-phosphat 36a	6.6	4.5	<i>cycloSal</i> -d4TMP 39a
3-Me- <i>cycloSal</i> -(ManAc ₄)-6-phosphat 36b	11.7	14.0	3-Me- <i>cycloSal</i> -d4TMP 39b

Die in Tabelle 9 aufgeführten Halbwertszeiten der *cycloSal*-H-1-MP und *cycloSal*-NMP besitzen die gleiche Größenordnung im Vergleich zu den entsprechenden *cycloSal*-H-1-MP, deren Halbwertszeiten im Minutenbereich liegen. Außerdem ist ebenfalls bei den *cycloSal*-H-6-MPs die Halbwertszeit umso größer, je stabilisierender der Einfluss im Arylsystem ist. Sowohl die 3-Me-Verbindungen **36b** und **39b** als auch die unsubstituierten Verbindungen **36a**

und **39a** hydrolysieren im selben Verhältnis zueinander. Auffällig ist die große Differenz der Halbwertszeiten der 5-Cl-Verbindungen mit 0.7 h für **39c** und 4.6 h für **36c**, d.h. dem destabilisierenden Chlorsubstituenten wirkt ein stabilisierender Effekt entgegen.

Die bisherigen Befunde werden nun im Zusammenhang mit den Produktverhältnissen der Tabelle 10 diskutiert.

Tabelle 10: Produktverhältnisse der *cycloSal*-HMP im Vergleich zu den *cycloSal*-NMP

Bezeichnung	Monophosphat		Bezeichnung ⁵⁷
	[%]		
5-Cl- <i>cycloSal</i> -(ManAc ₄)-6-phosphat 36c	55 ¹	99	5-Cl- <i>cycloSal</i> -d4TMP 39c
<i>cycloSal</i> -(ManAc ₄)-6-phosphat 36a	82 ¹	99	<i>cycloSal</i> -d4TMP 39a
3-Me- <i>cycloSal</i> -(ManAc ₄)-6-phosphat 36b	65 ¹	94	3-Me- <i>cycloSal</i> -d4TMP 39b

¹: Die zu 100 % ergänzenden Peaks wurden nicht identifiziert.

Erneut verhält sich das 5-Cl-*cycloSal*-(ManAc₄)-6-phosphat **36c** auffällig, da lediglich 55 % des entsprechenden Monophosphats freigesetzt wird. Folglich begünstigt der stabilisierende Effekt einen Hydrolyseweg dessen Produkte anhand der gekoppelten ³¹P-NMR-Spektren nicht identifiziert werden konnten.

Ebenso liefern die Verbindungen **36a** und **36b** nur zu 82 % bzw. zu 65 % 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-6-phosphat **101**, wohingegen die *cycloSal*-NMPs zwischen 94-99 % d4TMP **39a** liefern. Als Konkurrenzprodukt entsteht der Phenylphosphatdiester **23** entsprechend in 6-1% (Kap. 1.3.1.2, S. 14). Die 3-Me-Verbindung **36b** setzt weniger Monophosphat frei als die Verbindung **36a** entsprechend der Reihenfolge der *cycloSal*-H-1-MP, allerdings ist der prozentuale Anteil bei den *cycloSal*-H-6-MP höher verglichen mit den *cycloSal*-H-1-MP.

Das aus dem *cycloSal*-1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-6-phosphat **36a** gebildete Monophosphat **101** (82 %) besitzt aufgrund der beiden diastereotopen Protonen H-6a und H-6b ein dd~t Kopplungsmuster bei 1 ppm, welches zweimal durch die α/β-Konfiguration des anomeren Zentrums auftritt (Abb. 99). Alle ³¹P-NMR-Spektren wiesen Hydrolyseprodukte bei 18 ppm und bei 0.75 ppm auf, deren Identifizierung anhand der gekoppelten ³¹P-NMR-Spektren allein fehlschlug. (Kap.7, S. 120)

Abb. 99: ^{31}P -NMR-spektroskopische Darstellung der Hydrolyseprodukte von *cycloSal*-(ManAc₄)-6-phosphat **36a**; oben: entkoppelt, unten: gekoppelt

Offensichtlich sind die *cycloSal*-H-6-MP bezüglich ihres Hydrolyseverhaltens zwischen den *cycloSal*-H-1-MP und den *cycloSal*-NMP einzuordnen, wobei die Halbwertszeiten stärker denen der *cycloSal*-NMPs gleichen, die Produktverteilung wiederum mehr denen der *cycloSal*-H-1-MP.

Diese Ergebnisse legen insgesamt die Vermutung nahe, dass den *cycloSal*-H-6-MPs noch weitere Hydrolysewege zur Verfügung stehen. Die strukturellen und die daraus resultierenden konformativen Unterschiede zwischen der Ribofuranose und der Mannopyranose sind anscheinend richtungsweisend für das Hydrolyseverhalten der *cycloSal*-maskierten Substanzen.

4.3.2 *in vitro*-Experimente an Fibroblasten

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Thorsten Marquardt, Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde, Universität Münster wurden die Verbindungen **32a-eI**, **32dIII**, **34** sowie **35** biologischen Untersuchungen unterzogen. Die *in vitro*-Experimente (Kap. 8.7.2, S. 131) wurden an Fibroblasten der Haut durchgeführt, die in Earle's MEM (spezielles Nährmedium) kultiviert wurden.¹²⁰ Die Zellkulturen wurden radioaktiv mit [2- ^3H]-Mannose markiert. Dem

Markierungsmedium sind zuvor die entsprechenden Versuchssubstanzen (1 M Stammlösung in DMSO) zugesetzt worden, so dass eine Konzentration von 1 mM Substanz erreicht wurde. Eine jeweilige Kontrollzellkultur (Patient und zur Kontrolle Gesunder) wurde ohne Zugabe von Substanz markiert. Die so behandelten Zellkulturen wurden bei 37 °C 0.5 h oder 2 h inkubiert. Währenddessen kommt es zum Aufbau der zu untersuchenden Oligosaccharidstrukturen. Anschließend wurden die Zellen verschiedenen Reinigungs- und Extraktionsschritten unterzogen. Es wurden hierbei unterschiedliche Pellets gewonnen. Die einen enthalten die Protein- gebundenen Oligosaccharide (PDO-Analyse) und die anderen Dolicholpyrophosphat-gebundene Oligosaccharide (LLO-Analyse). Bei der LLO-Analyse wurden die Kohlenhydrate durch saure Hydrolyse freigesetzt und anschließend durch HPLC untersucht. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Verbindungen **32a-eI**, **32dIII**, **34** sowie **35** wurden an Kontroll- und Patientenfibroblasten getestet. In den gesunden Fibroblasten werden vollständige Oligosaccharidketten aufgebaut, also $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Struktur, die mit G3 abgekürzt wird. Hingegen bauen PMM 2-defiziente Patientenfibroblasten lediglich verkürzte Oligosaccharidketten mit einer $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ - oder $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ -Struktur auf; M4 bzw. M3 abgekürzt (Abb. 100).

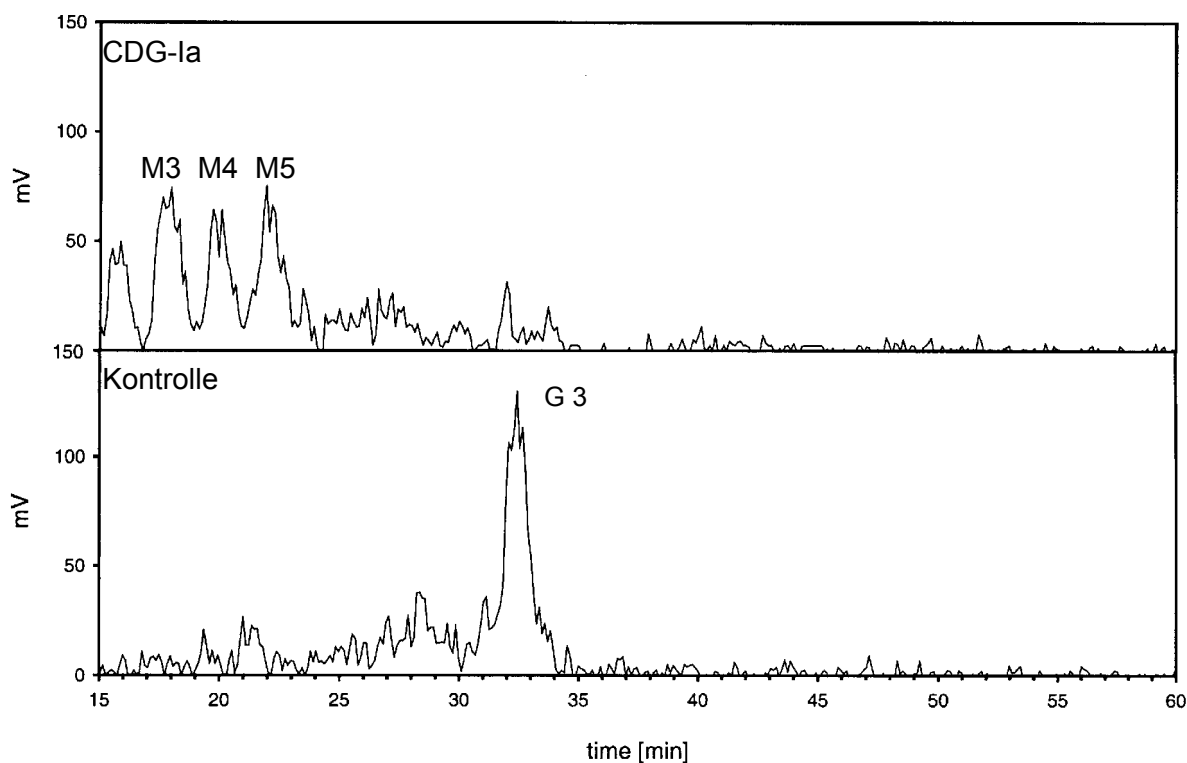


Abb. 100: HPLC-Chromatogramme der LLO-Analyse eines Patienten mit verkürzten Oligosaccharidstrukturen vom M3- und M4-Typ und eines Gesunden mit vollständig aufgebauten Oligosaccharidstrukturen vom G3-Typ

Die Totalkorrektur dieses Phänotyps setzt voraus, dass Mannose-1-phosphat intrazellulär freigesetzt wird und somit die $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Struktur biosynthetisiert wird. Folglich muss intrazellulär sowohl die Phosphatschutzgruppe chemisch beim *cycloSal*-Konzept bzw. enzymatisch beim bis-[AB]-Konzept als auch die Kohlenhydratschutzgruppen enzymatisch abgespalten werden.

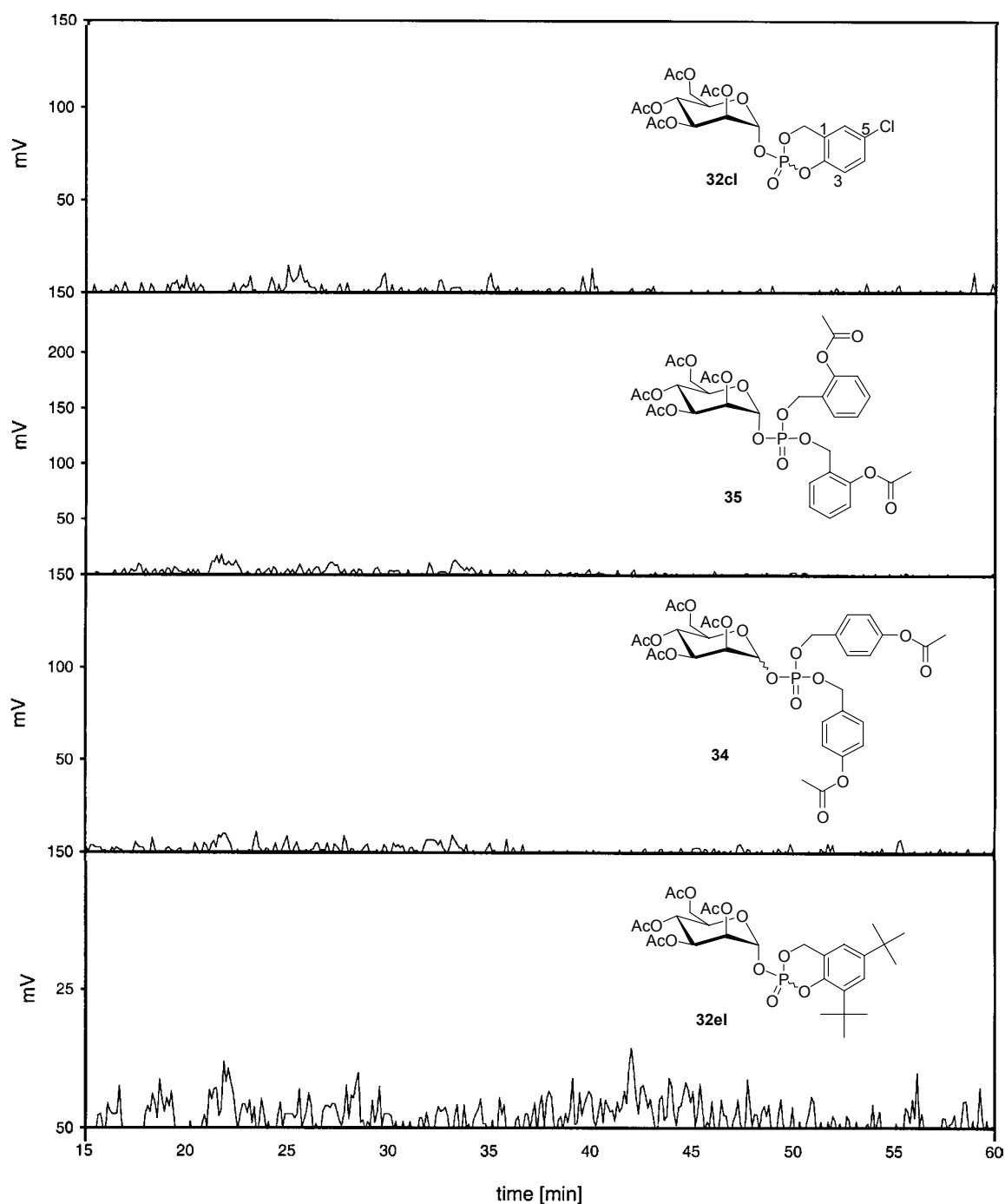


Abb. 101: HPLC-Chromatogramme der LLO-Analyse der Substanzen **32cl**, **34**, **35** und **32el**

Die Verbindung **32cI** zeigt keinerlei Effekt. Ebenso verhalten sich die acyclischen bis-[AB]-Verbindungen **34** und **35** nach FREEMAN; das HPLC-Chromatogramm weist keine Peaks von M3 und M4 auf. Als stark lipophile Substanz dieser Reihe ist Verbindung **32eI** zu betrachten. Ebenso wie die acyclischen bis-[AB]-hexosemonophosphate verhält sich Verbindung **32eI**. Vielmehr scheinen diese Substanzen cytotoxisch zu sein, da nicht einmal mehr der Aufbau der verkürzten Oligosaccharidketten M3 und M4 stattfindet (Abb. 101).

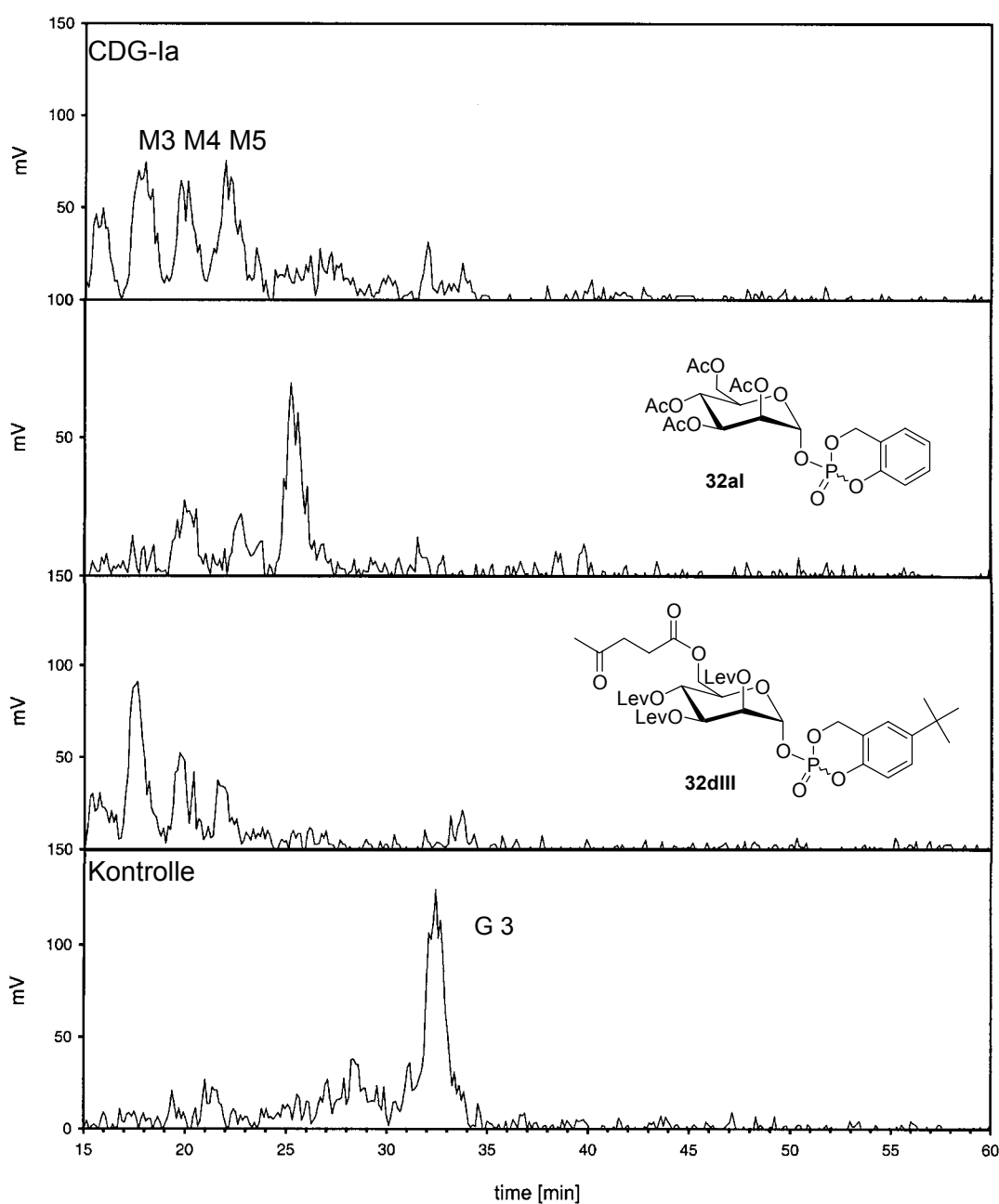


Abb. 102: HPLC-Chromatogramme der LLO-Analyse der Substanzen **32aI** und **32dIII**

Von all den untersuchten Substanzen ist Verbindung **32dIII** aufgrund der Levulinyln-Schutzgruppen und der *t*Butylgruppe am Arylsystem die lipophilste Verbindung. Im Test werden lediglich die verkürzten Oligosaccharidstrukturen M3 und M4 aufgebaut. Möglicherweise verhindert die Lipophilie von **32dIII** die Diffusion durch die Zellmembran. Das *cyclo*Sal-HMP **32aI** zeigt im *in vitro*-Experiment ein interessantes Verhalten, so weist diese eine Teilkorrektur auf. Der Peak bei M3 ist fast verschwunden und der Peak bei M4 stark verkleinert; dafür werden Peaks im Bereich höherglycosylierter Oligosaccharide erkannt (Abb. 102).

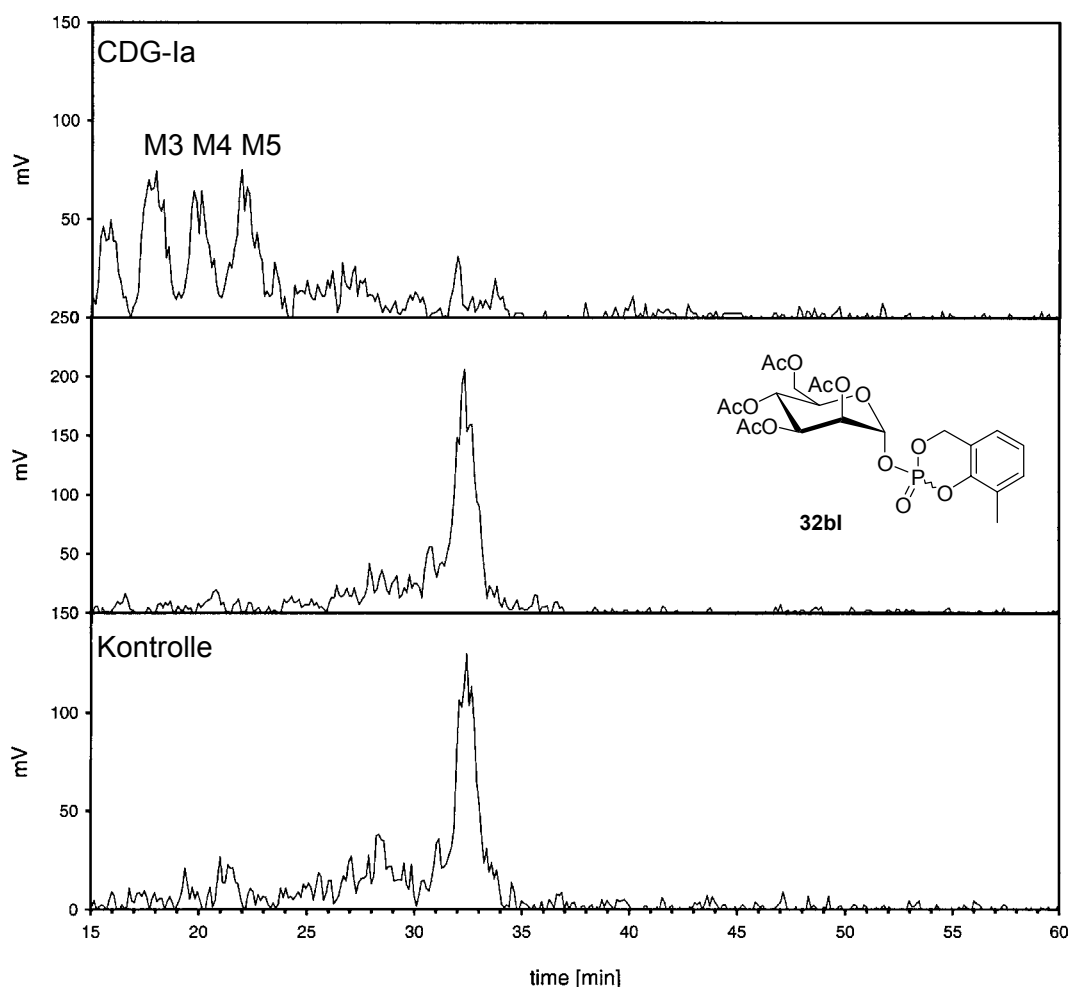


Abb. 103: HPLC-Chromatogramm der LLO-Analyse der Substanz **32bI**

Herausragend ist die Totalkorrektur des Phänotyps durch 3-Methyl-*cyclo*Saligenyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-1-phosphat **32bI** (Abb. 103). Das Chromatogramm zeigt deutlich den Aufbau der G3-Struktur ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$).

Diese biologischen Daten, betrachtet im Zusammenhang mit ihren Halbwertszeiten, zeigen, dass für eine Totalkorrektur ein Schwellenwert von $t_{1/2} > 4$ min vorliegen muss.

Des Weiteren sind die biologischen Daten unter dem Aspekt zu diskutieren, dass bei *in vitro*-Tests die Zugabe von Mannose ebenfalls zum vollständigen Aufbau der Oligosaccharidketten führt.¹⁷¹ Für dieses Phänomen gibt es verschiedene Erklärungsansätze.^{172,173} So könnte die Zugabe von Mannose die zelluläre Konzentration von Man-6-phosphat erhöhen, das wiederum könnte die Phosphomannomutase stimulieren.¹⁷⁴

Die durchgeführten Hydrolyseexperimente bei pH 7.3 haben gezeigt, dass Verbindung **32bI** im Verhältnis 1:1 zu Tetraacetylmannose-1-phosphat **99** und Mannosetetraacetat **78** zerfällt. Trotzdem ist anzunehmen, dass einzig Mannose-1-phosphat für den vollständigen Aufbau der Oligosaccharidketten wesentlich ist. Die Untersuchungen von H.H. FREEZE et al. wurden bei Zugabe von 1 mM Mannoselösung eine vollständige Korrektur beobachtet und bei Zugabe von 0.25 mM Mannoselösung eine 75 %ige Korrektur.^{120,171} Die Zugabe einer 1 mM Markierungslösung bedeutet, dass maximal 0.5 mmol des Mannosetetraacetats bzw. der Mannose gebildet werden können. Die intrazelluläre Konzentration ist jedoch als erheblich geringer anzunehmen, da es sich bei dem Membrantransport um einen langsamen passiven Prozess (Diffusion) handelt, so dass aufgrund der geringen Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 11 min nur ein geringer Prozentsatz der Verbindung **32bI** das Zellinnere erreicht. Zudem stellt sich an der Membran ein Gleichgewicht ein, folglich diffundieren Moleküle zurück in das extrazelluläre Medium. Außerdem ist im Cytoplasma bei pH 7.3 die Spaltung des Phenylesters und somit die Bildung von Mannose-1-phosphat bevorzugt.

Daher ist die effektive Konzentration an Mannose, welche im Zellinneren vorliegt, als minimal einzuschätzen. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass extrazellulär zugesetztes Mannosetetraacetat im Zelltest keinen Effekt zeigt.

Somit kann für die Totalkorrektur durch Verbindung **32bI** allein das gebildete Mannose-1-phosphat und die dadurch bewirkte erhöhte GDP-Man-Konzentration zu Grunde gelegt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Therapeutische Ansätze basieren teilweise auf direkten Eingriffen in den Metabolismus, daher müssen derartige Wirkstoffe oft als Monophosphate appliziert werden. Um den polaren phosphorylierten Wirkstoffe einen passiven Membrantransport in die Zelle zu ermöglichen, wird die Phosphateinheit mit lipophilen Alkoholen maskiert. Diese Phosphatester müssen intrazellulär wieder spaltbar sein. Derartig maskierte Wirkstoffe werden als Prodrugs bezeichnet.

Beim bis-[AB]-konzept von S. FREEMAN und A. GLAZIER wird als Maske eine bis-(Acyloxybenzyl)-einheit verwendet, deren Hydrolyse enzymatisch induziert wird. Das acyclische bis-(*p*-Acyloxybenzyl)-Konzept basiert auf einem rigiden Spacer der zwischen die Phosphat-Einheit und der enzymatisch-spaltbaren Acylgruppe eingebracht ist. Der Spacer erzeugt einen ausreichenden Abstand zwischen dem aktiven Zentrum der Carboxyesterase und der negativen Ladung des Phosphat-Diesters. Nachteilig ist bei der Freisetzung des Monophosphats die Bildung eines alkylierend-wirkenden Chinonmethids. Aus diesem Grund hat A. GLAZIER eine Methylmethoxycarbonylgruppe in Benzylposition eingebracht, so dass nun eine Eliminierung über das sog. "fleeting Chinonmethid" stattfindet; also insgesamt die Verweildauer des Chinonmethids verkürzt wird. (Kap. 1.3.1.1, S. 9)

Das *cycloSal*-Konzept nach C. MEIER basiert auf unterschiedlich stabilen Phenyl-, Benzyl- und Alkylphosphateestern. Somit gelingt es chemisch zwischen den einzelnen Phosphatesterbindungen zu diskriminieren und das Monophosphat in einer gekoppelten Hydrolyse freizusetzen (Tandem-Reaktion). (Kap. 1.3.1.2, S. 14)

Als Wirkstoffe wurden sowohl Analoga körpereigener Substanzen, wie sie die in der HIV-Therapie angewendeten d4T-monophosphate darstellen als auch geschützte Mannopyranosylmonophosphate, die zur Behandlung von CDG (Congenital Disorder of Glycosylation) erstrebenswert sind, untersucht.

Das Bis[AB]-Konzept und dessen Erweiterung wurden zur Maskierung nucleosidanaloger Monophosphate eingesetzt, die therapeutisch als Inhibitoren der Reversen Transkriptase des HI-Virus verabreicht werden. (Kap. 3.1, S. 21) Das *cycloSal*-Konzept wurde erstmals als membrangängiges Carrier-System für Glycosyl-monophosphate genutzt, die als Substitute zur Therapie der Stoffwechselkrankheit CDG-Ia intrazellulär Mannose-1-phosphat freisetzen sollen. (Kap. 4.1, S. 65)

Zielsetzung der Untersuchungen der synthetisierten Verbindungen war in beiden Teilen neue Erkenntnisse über die jeweiligen Hydrolysemechanismen zu gewinnen und die biologische Aktivität zu testen.

Erster Teil:

Initiiert wurde der erste Teil dieser Arbeit durch die Beobachtung, dass Substituenten in der Benzylposition von *cycloSal*-d4TMP deren Hydrolyseverhalten immens beeinflussen, so kam es sowohl zu einer deutlich verkürzten Hydrolysehalbwertszeit als auch zur Bildung von Konkurrenzprodukten. (Kap. 1.3.1.2, S. 15) Um das Phänomen detaillierter zu untersuchen, wurden die acyclischen bis-(Benzyl)-phosphat-Triester **25-31** synthetisiert, deren Benzylposition durch Donor- und Akzeptor-Substituenten modifiziert wurde.

Das bis-(Benzyl)-d4TMP **27** stellt den unfunktionalisierten Prototyp dar, welcher auf der einen Seite durch die elektronenziehende Estergruppe (**28**), auf der anderen Seite durch die elektronenschiebende Methylgruppe (**25, 26**) in Benzylposition ergänzt wurde. Inwieweit die Stereochemie der Benzylposition auf das Hydrolyseverhalten Einfluss nimmt, wurde durch Verwendung enantiomerenreiner α -Methylbenzylalkohole **71** und **72** untersucht.

Des Weiteren wurden die enzymatisch-spaltbaren Verbindungen **29** und **30** ausgewählt, die auf den von GLAZIER und FREEMAN entwickelten Konzepten basieren.

Außerdem wurde der *ortho*-Acetoxybenzylphosphat-Triester **31**, ein strukturelles Verbindungsglied zwischen dieser acyclischen Reihe von Benzylphosphat-Triestern und den *cycloSal*-Verbindungen, synthetisiert.

Zuerst wurden die Alkohole synthetisiert, wobei der *para*-Acetoxybenzylalkohol **50** durch Acetylierung von *para*-Hydroxybenzylalkohol **49** mittels 1-Acetyl-1,2,3-triazolo[4,5b]pyridin dargestellt wurde. Der *ortho*-Acetoxybenzylalkohol **52** wurde durch Acetylierung und anschließende Reduktion des Salicylaldehyds **53** erhalten. Ausgehend vom Acetophenon wurde durch eine Carboxymethylierung und abschließender Reduktion der α -Methoxycarbonylmethylbenzylalkohol **57** dargestellt. Zur Synthese des *para*-Acetoxy-(α -MCM)benzylalkohols **60** wurde *para*-Hydroxyacetophenon in einer Kondensationsreaktion carboxymethyliert, danach acetyliert und die Ketogruppe abschließend reduziert. Die Darstellung der Phosphat-Triester erfolgte nach der Phosphoramidit-Methode in 32-76 % Ausbeute. (Kap.3.2, S. 26)

Die Hydrolysehalbwertszeiten wurden im Phosphatpuffer und in Zellextrakten bei pH 7.3 getestet. Die Hydrolyseprodukte wurden durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie und GC-MS-

Analytik untersucht. Abschließend wurden in Zelltests die anti-HIV-Aktivität und der Einfluß der Hydrolyseneigenschaften auf die Wirksamkeit der Prodrugs untersucht.

Die Daten der chemischen Hydrolyse zeigten, dass eine S_NP -Reaktion wegen der sehr unterschiedlichen Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der Verbindungen **25-31** auszuschließen und eine S_N1 -Reaktion zu Grunde zu legen ist. Die unterschiedlichen Halbwertszeiten konnten durch die Stabilität der bei der Hydrolyse zu durchlaufenden primären bzw. sekundären Carbeniumionen erklärt werden. (Kap. 3.3.1.1, S. 47)

Bei den vier Verbindungen **25-28** wurde allein die Bildung des Phosphat-Diesters beobachtet, da die negative Ladung der Phosphatgruppe des Diesters das Monophosphat daran hindert, als Austrittsgruppe zu fungieren. (Kap. 3.3.1.1, S. 47)

Ebenso wurde durch die gleichen Halbwertszeiten $t_{1/2}$ von bis-((*R*)- α -Methylbenzyl)-d4TMP **25** und bis-((*S*)- α -Methylbenzyl)-d4TMP **26** nachgewiesen, dass die Stereochemie der Benzylposition auf das Hydrolyseverhalten keinen Einfluss nimmt. (Kap. 3.3.1.1, S. 48)

Interessant ist die Beobachtung, dass die beiden auf dem enzymatisch-gesteuerten bis-[AB]-Konzept basierenden Verbindungen **29** und **30** bereits unter chemischen Bedingungen hydrolysieren. Bewiesen wurde dieses Phänomen HPLC-analytisch durch Koinjektion und ^{31}P -NMR-Studien. Zur Erklärung wird eine parallel ablaufende Esterspaltung angenommen, denn eine S_N1 -Reaktion der Phosphat-Triester von **27** und **28** führt lediglich zur Bildung der Phosphat-Diester. (Kap. 3.3.1.1, S. 49)

Bemerkenswert ist das Hydrolyseverhalten von bis-[*o*-AB]-d4TMP **31**, welches das Verbindungsglied zwischen dem *cycloSal*- und dem acyclischen bis-[AB]-Konzept darstellt. Verglichen mit dem bis-[*p*-AB]-d4TMP **30** ist die Halbwertszeit $t_{1/2}$ von bis-[*o*-AB]-d4TMP **31** um den Faktor 14 größer. Ein Ansatz zur Erklärung dieses Verhaltens liegt in der sterischen und/oder elektronischen Behinderung des Benzylkations, welches durch eine S_N1 -Reaktion abgefangen wird. (Kap. 3.3.1.1, S. 53)

Die in humanen Zellextrakten bestimmten Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der Verbindungen **25-28** stimmen mit denen der chemischen Hydrolyse sehr gut überein. Damit belegt der Befund, dass eine enzymatische Spaltung auszuschließen ist. Indessen haben sich die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der enzymatisch-gesteuerten bis-[AB]-Verbindungen **29-31** wie erwartet drastisch verringert. (Kap. 3.3.1.2, S. 53)

Aufschlussreich ist die Beobachtung, dass die *ortho*- und die *para*-Verbindung **30** und **31** die gleiche Halbwertszeit in CEM/0-Zellextrakten aufweisen. Daher ist anzunehmen, dass ein ausreichender Abstand zwischen dem aktiven Zentrum der Carboxyesterase und der negativen

Ladung nicht erst durch neun Bindungen ($\sim 8.8 \text{ \AA}$), sondern bereits durch sieben Bindungen ($\sim 5.0 \text{ \AA}$) gegeben ist. (Kap. 3.3.1.2, S. 56)

Zusätzlich wurden die Produkte der durchgeführten Hydrolyse von bis- $[\alpha\text{-MCM-AB}]$ -d4TMP **29** massenspektrometrisch nach vorheriger gaschromatischer Trennung (GC-MS-Kopplung) untersucht. Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass der *para*-Hydroxymethylsäuremethylester **17** als Produkt der in humanen Zellextrakten durchgeführten Hydrolyse identifiziert wurde. (Kap. 3.3.2, S. 57)

Abschließend wurden die synthetisierten Phosphat-Triester **25-31** *in vitro*-anti-HIV-Tests in Zellkulturen unterzogen. Als Testsysteme kamen HIV-1- bzw. HIV-2-infizierte humane T-Lymphozyten (CEM/0) ebenso zum Einsatz wie HIV-2-infizierte Thymidin-Kinase-defiziente Zellen (CEM/TK⁻). (Kap. 3.3.3, S. 62)

Die Phosphat-Triester **25-31** und d4T **39** zeigen in CEM/0-Zellen antivirale Aktivität, die sie jedoch in TK-defizienten Zellen verlieren. Damit korrelieren auch die Daten der enzymatischen Hydrolysen. (Kap. 3.3.3, S. 62)

Alle drei auf dem bis- $[\text{AB}]$ -Konzept beruhenden Verbindungen (**29,30,31**) weisen eine identische antivirale Aktivität in beiden Zelllinien auf. Interessant ist die antivirale Aktivität des chemisch stabilen bis- $[\text{o-AB}]$ -d4TMP **31**; die Daten zeigen keinen Unterschied zum *para*-substituierten Analogon **30**. Für das bis- $[\alpha\text{-MCM-AB}]$ -d4TMP **29** ist trotz seiner geringen Halbwertszeit eine schnelle und effiziente Aufnahme in die Zellen anzunehmen, in deren Anschluß es zur enzymatischen Spaltung kommt, so dass von einem intrazellulären *lock-in*-Mechanismus gesprochen werden kann. (Kap. 3.3.3, S. 63)

Als nächster Punkt wird die Cytotoxizität diskutiert. Außerordentliche Tragweite hat dabei die Frage nach der potentiellen Toxizität des intermediär auftretenden Chinonmethids. Neue Hinweise hierzu wurden aus den gemessenen Cytotoxizitätsdaten gewonnen.

Das von A. GLAZIER entwickelte "fleeting Chinonmethid" (**29**) ist wesentlich toxischer mit $19 \mu\text{M}$ als die das *para*-Chinonmethid bildende Verbindung bis- $[\text{p-AB}]$ -d4TMP **30** mit $58 \mu\text{M}$. Der miserable Toxizitätswert des bis- $[\alpha\text{-MCM-AB}]$ -d4TMP **29** rechtfertigt den synthetischen Aufwand in keinsten Weise. Somit sind die im Verlauf der Hydrolyse auftretenden Chinonmethid-Derivate als Ursache der gemessenen Cytotoxizitäten in Frage zu stellen. (Kap. 3.3.3, S. 64)

Ein Vergleich der Toxizitätsdaten von bis- $[\text{p-AB}]$ -d4TMP **30** und bis- $[\text{o-AB}]$ -d4TMP **31** ergab, dass die unterschiedlichen Toxizitätsdaten von **30** und **31** zu der Frage führen, ob *ortho*- und *para*-Chinonmethide in biologischen Systemen ein abweichendes Verhalten zeigen. In der Literatur gibt es zu diesem Thema keinerlei Untersuchungen. Die *ortho*-

Verbindung besitzt mit 21 μ M eine dem bis- $[\alpha$ -MCM-AB]-d4TMP **29** entsprechende cytotoxische Wirkung. Das Resultat unterstreicht nochmals die Fragwürdigkeit, die intermediären Chinonmethid-Derivate als potentielle Quelle der Cytotoxizität anzunehmen. (Kap. 3.3.3, S. 64)

Zweiter Teil:

Congenital disorders of glycosylation (CDG) umfasst erbliche Stoffwechselkrankheiten, in denen genetisch bedingte Enzymdefekte in der Biosynthese von Glycoproteinen Hypoglycosylierung verursachen. Die Folge davon sind Multisystemstörungen und eine entsprechend geringe Lebenserwartung. Der am meistverbreitete Typ ist CDG-Ia. In diesem Fall ist die Phosphomannomutase 2 (PMM 2) defizient, wodurch die Umwandlung von Mannose-6-phosphat in Mannose-1-phosphat beeinträchtigt ist. (Kap. 4.1.2, S. 70)

Als therapeutischer Ansatz ist die intrazelluläre Freisetzung von Mannose-1-phosphat denkbar. Daher wurden im zweiten Teil der Arbeit erstmalig die in der Nucleotidchemie etablierten Prodrug-Konzepte von S. FREEMAN und C. MEIER erfolgreich zur Maskierung von Mannose-1-phosphaten angewendet. Aus der therapeutischen Anwendung ergibt sich die Wahl dieser beiden Prodrug-Systeme aufgrund ihrer geringen Cytotoxizität, da die Wirkstoffe als Substitute eingesetzt werden sollen.

Um Einblicke in den Hydrolysemechanismus dieser neuen Klasse von „Kohlenhydrat-Prodrugs“ zu gewinnen, wurden sowohl die epimeren *gluco*-Analoga der Mannose-1-phosphate dargestellt, als auch aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu den *cycloSal*-5'-Nucleosidmonophosphaten die *cycloSal*-mannose-6-phosphate **36a-c**.

Zur Synthese der Triester wurden die lipophilen Acetyl- bzw. Levuliny- geschützten Monosaccharide **78,79** und **83** verwendet, um den passiven Transport der Triester durch die Zellmembran zu gewährleisten. Die im aromatischen Ring unterschiedlich substituierten *cycloSal*-Triester von Mannose-1-phosphat **32a-e** sowie deren epimeren *gluco*-Analoga **33a-d** und die *cycloSal*-Mannose-6-phosphate **36a-c** konnten hervorragend durch die etablierte Methode zur Darstellung von *cycloSal*igenyl-Nucleosidmonophosphaten mittels *cycloSal*igenyl-chlorphosphit **97a-e** und anschließender Oxidation erhalten werden. Die bis-[AB]-Mannose-1-phosphate **34** und **35** wurden nach der Phosphoramidit-Methode dargestellt. (Kap. 4.2, S. 75)

In den Untersuchungen war vor allem der Hydrolysemechanismus von Interesse. Daher wurden die Hydrolysehalbwertszeiten der Verbindungen in isotonischem Phosphatpuffer bei

pH 7.3 HPLC-analytisch bestimmt. Des Weiteren gelang die Identifikation der Hydrolyseprodukte durch Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) und ^{31}P -NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse. Das neuartige ^1H - ^{31}P -NMR-Korrelationsexperiment trug maßgeblich zur Identifikation und Quantifizierung der Hydrolyseprodukte bei.

Die gewonnenen Daten aus den Hydrolyseexperimenten zeigen, dass sowohl bei den *cycloSal*-Man-1-MP als auch bei den *cycloSal*-Gluc-1-MP sowie bei den *cycloSal*-Man-6-MP die Halbwertszeit $t_{1/2}$ mit zunehmender Elektronendonorstärke in *ortho*- bzw. *para*-Position zum phenylischen Phosphatester zunimmt. Somit weisen die *cycloSal*-HMP ein von den *cycloSal*-NMP her bekanntes Verhalten auf. (Kap. 4.3.1.1, S. 88)

Außerdem identifizierte die massenspektrometrische Untersuchung der Hydrolyseprodukte der *cycloSal*-HMPs mittels Elektrospray-Ionisation (ESI), wobei auch die Trapping-Methodik (MS/MS) herangezogen wurde, 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose **78** und 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** eindeutig als Hydrolyseprodukte. (Kap. 4.3.1.2, S. 90)

Ebenso beweist das Massenspektrum der zuvor mit O^{18} -markiertem Wasser behandelten *cycloSal*-HMP, dass sowohl der Phenylester als auch die glykosidische Bindung bei der Hydrolyse bricht. (Kap. 4.3.1.4, S. 95)

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde folgender Hydrolysemechanismus postuliert. Die *cycloSal*-HMPs hydrolysieren im neutralen Medium auf zwei parallel ablaufenden Wegen. Zum einem findet der nucleophile Angriff eines Hydroxidions am Phosphor statt, wodurch 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** freigesetzt wird und ebenso das Diol **24a-e**. Zum anderen wird entweder durch Protonierung oder in einer $\text{S}_{\text{N}}1$ -artigen Reaktion der Monosaccharidrest als Oxocarbenium abgespalten, welches durch den nucleophilen Angriff eines Hydroxidions die 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranose **78** ausbildet. Als zweites Produkt wird das sehr stabile *cycloSal*igenylphosphat **98** gebildet. (Kap. 4.3.1.4, S. 95)

Interessanterweise zeigt die Untersuchung der Epimere, dass nicht allein die $\text{S}_{\text{N}}1$ -artige Bildung des *manno*- bzw. *gluco*-Oxocarbeniumions stabilisierend wirkt, sondern vielmehr die Stabilisierung durch den Nachbargruppeneffekt eine bedeutende Rolle übernimmt. Die *manno*-Verbindung bildet aufgrund der *trans*-diaxialen Stellung der Substituenten C-1 und C-2 bevorzugt das *manno*-Acetoxonium, was der *gluco*-Verbindung aus sterischen Gründen unmöglich ist. Der Nachbargruppeneffekt hat nicht nur einen stabilisierenden Einfluss, sondern vielmehr einen beschleunigenden, so dass es sich um eine anchimere Beschleunigung handelt. Aufschlussreich ist des Weiteren, dass allein die Art des Substituenten an C-2 entscheidend das Produktverhältnis beeinflusst. (Kap. 4.3.1.4, S. 100)

Der postulierte Hydrolysemechanismus erklärt die Beobachtung, dass je destabilisierender der Einfluß des Substituenten ist, desto kleiner erstens die Halbwertszeit und desto größer zweitens der Anteil an Mannosetetraacetat-1-phosphat **99** ist. Ursache für diese Beobachtung liegt in den konkurrierenden Reaktionen. Bei konstantem pH 7.3 erfolgt die Bildung des Mannosetetraacetats **78** mit gleichbleibender Geschwindigkeit. Hingegen erhöht sich durch den zunehmenden destabilisierenden Einfluss des Substituenten die Geschwindigkeit des Phenylesterbruches, welches sich in einer Verkürzung der Halbwertszeit und in einem erhöhten Anteil des 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** äußert. (Kap. 4.3.1.4, S. 100)

Interessant war außerdem die Übertragbarkeit des Hydrolyseverhaltens der *cycloSal*NMP auf die *cycloSal*HMP. Offensichtlich sind die *cycloSal*-H-6-MP bezüglich ihres Hydrolyseverhaltens zwischen den *cycloSal*-H-1-MP und den *cycloSal*-NMP einzuordnen, wobei die Halbwertszeiten stärker denen der *cycloSal*-NMPs gleichen, die Produktverteilung wiederum mehr denen der *cycloSal*-H-1-MP. (Kap. 4.3.1.6, S. 104)

Die biologische Aktivität wurde an PMM-defizienten Fibroblasten *in vitro* getestet. Die Totalkorrektur des Phänotyps setzt voraus, dass Mannose-1-phosphat intrazellulär freigesetzt wird und somit vollständige Oligosaccharidstrukturen der Glycoproteine biosynthetisiert werden. Von allen getesteten Verbindungen zeigte 3-Methyl-*cycloSal*igenyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-1-phosphat **32bI** eine ausgezeichnete biologische Aktivität. (Kap. 4.3.2, S. 104)

6 SUMMARY

Therapeutic approaches are partially based on direct intervention in the metabolism, which often necessitates the application of the active agents as monophosphates. In order to smuggle the polar phosphorylated agents into the cells, the phosphate unit is masked with lipophilic alcohols. These phosphate esters must be able to be cleaved intracellularly. Such masked active agents are termed “prodrugs”.

The bis[AB]-concept of S. FREEMAN and A. GLAZIER involves the application of a bis(acyloxybenzyl) unit as the mask, with subsequent enzymatic hydrolysis.

The *cycloSal*-concept of C. MEIER is based on the differential stabilities of phenyl, benzyl and alkyl phosphate esters. These allow chemical discrimination between the various phosphate ester bonds and the release of the monophosphate in a coupled hydrolysis.

Analogues of the body's own substances, such as the d4T monophosphates applied in HIV therapies, as well as protected mannopyranosyl monophosphates, which are desirable for the treatment of CDG (Congenital Disorder of Glycosylation), were investigated as active agents.

The observation that substituents in the benzyl position of *cycloSal*-d4TMP exercise an enormous influence on their hydrolysis behaviour triggered the synthesis of acyclic bis(benzyl) phosphate triesters **25–28** with benzyl groups modified by donor and acceptor substitution. In addition, the bis[AB] phosphate triester **29, 30** was synthesised according to FREEMAN and GLAZIER, as well as the *ortho*-acetoxybenzyl phosphate triester **31**, which represents a structural link between the acyclic benzyl phosphate triesters and the *cycloSal* phosphate trisesters. The synthesis of the phosphate triesters was conducted via the phosphoramidite method.

The hydrolysis stability of the compounds was tested in phosphate buffer and in cell extracts at pH 7.3, and the hydrolysis products were identified using ^{31}P -NMR spectroscopy. The bis(benzyl) phosphate triesters **25–28** hydrolysed under chemical conditions only as far as the phosphate diester. The enzymatically-controlled bis[AB] compounds **29** and **30** hydrolysed even under chemical conditions to d4TMP. The half-lives $t_{1/2}$ of the bis(benzyl) phosphate trisesters **25–28** determined in human cell extracts corresponded very well with those of the chemical hydrolyses, while the half-lives $t_{1/2}$ of the bis[AB] compounds **29** and **30** were dramatically shortened. All in all, the hydrolysis data lead to the conclusion that an $\text{S}_{\text{N}}\text{P}$ reaction can be excluded, and that the hydrolysis is subject to an $\text{S}_{\text{N}}1$ mechanism.

The data from the chemical hydrolysis studies, as is also the case for the data from the cell extract studies, are in excellent agreement with the data obtained for the antiviral tests. Solely the bis[AB] phosphate triesters **29** and **30** demonstrate antiviral activity in TK-deficient CEM cells.

The toxicity data emphasise the dubiety of the hypothesis that the cytotoxicity observed may arise from quinone methides appearing in the prodrug systems investigated.

The prodrug concepts of S. FREEMAN and C. MEIER were applied for the first time to glycosyl monophosphates. One potential therapeutical application is the hereditary metabolic disease CDG, in which a genetic defect leads to the inavailability of phosphomannomutase 2 (PMM 2), which hinders the conversion of mannose-6-phosphate to mannose-1-phosphate.

In order to gain insights into the hydrolysis mechanism of this new class of “carbohydrate prodrugs”, the epimeric glucose analogues **33aI**, **33bI** and **33dII** of mannose-1-phosphate **32aI-eI**, **32dII**, **32dIII** were made, as were the *cycloSal*-mannose-6-phosphates **36a-c**, because of their structural relationship to the *cycloSal*-5'-nucleoside monophosphates. The *cycloSal*-hexose-phosphates (*cycloSal*-H-phosphates) **33aI**, **33bI**, **33dII**, **32aI-eI**, **32dII**, **32dIII** and **36a-c** were achieved using the established method for synthesis of *cycloSal*igenyl-nucleoside monophosphates via *cycloSal*igenyl chlorphosphite and subsequent oxidation. The bis[AB]-mannose-1-phosphates **34** and **35** were obtained using the phosphoramidite method.

Conclusions regarding the hydrolysis mechanism can be drawn based on the half-life values, measured by HPLC, and the distribution of the hydrolysis products, measured using ³¹P-NMR spectroscopy. With respect to their hydrolysis behaviour, the *cycloSal*-H-6-MPs **36a-c** can be placed between the *cycloSal*-H-1-MPs **32aI-eI**, **32dII**, **32dIII** and the *cycloSal*-NMPs, whereby the *cycloSal*-H-6-MP **36a-c** half-lives are more comparable with those of the *cycloSal*-NMPs, while their product distribution is more similar to that of the *cycloSal*-H-1-MPs **33aI**, **33bI**, **33dII**, **32aI-eI**, **32dII**, **32dIII**.

The investigation of the hydrolysis mechanism of the epimers demonstrates anchimeric acceleration in the case of the *manno* compounds **32aI-eI**, **32dII** and **32dIII**, because of the neighbouring group effect.

On the basis of an ESI-MS/MS investigation, 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannose **78** and 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphate **99** could be identified as hydrolysis products. Supporting these observations, the mass spectrum of a *cycloSal*-H-1-MP **32aI** hydrolysed with ¹⁸O-labelled water illustrated that both the phenyl ester linkage and the glycosidic linkage break.

In addition, the biological activity was tested *in vitro* on PMM-deficient fibroblasts.

Of all compounds tested, 3-methyl-*cyclo*Sal-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose-1-phosphate **32bI** was the most biologically active and showed a total correction of the phenotype.

7 AUSBLICK

Die aus den Hydrolysestudien der modifizierten bis-(Benzyl)-nucleotide **25-31** gewonnenen Daten untermauern, dass der Hydrolyse ein S_N1 -Mechanismus zu Grunde liegt. Eine abschließende Klärung des Mechanismus kann durch Hydrolyse in ^{18}O -markiertem Wasser und anschließender massenspektrometrischer Untersuchung der Hydrolyseprodukte erreicht werden. Ein S_NP -Angriff würde zu einer ^{18}O -Markierung des Monophosphats **39 α *** führen, hingegen würde bei einem S_N1 -Angriff lediglich ^{18}O -markierter Benzylalkohol auftreten (Abb. 104).

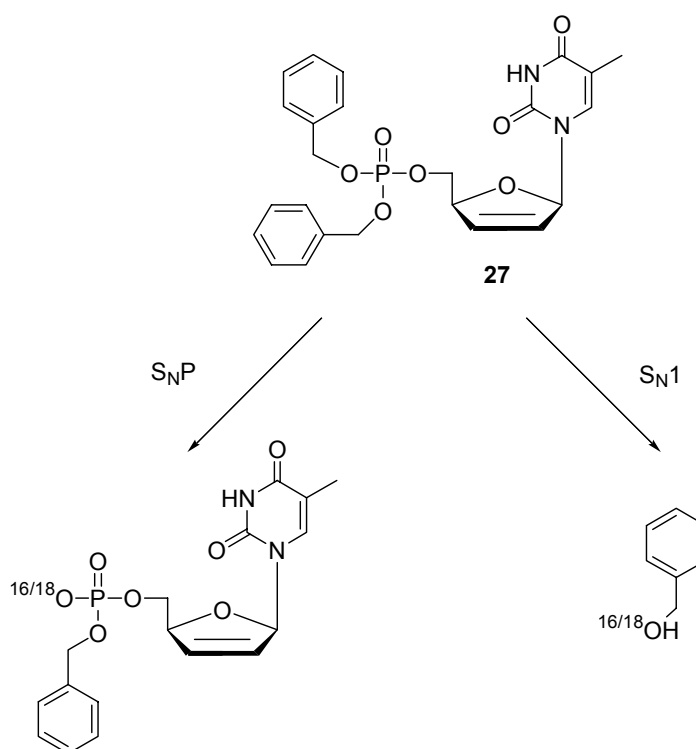
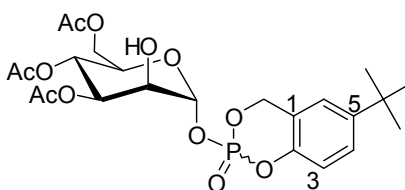


Abb. 104: Mögliche Produkte bei der Hydrolyse in ^{18}O -markiertem Wasser

Die Untersuchung der *cycloSal*-Hexosemonophosphate (*cycloSal*-HMP) bezüglich ihres Hydrolyseverhaltens hat gezeigt, daß die Acetyl-Schutzgruppe in 2-Position bei Mannose zu einer anchimeren Beschleunigung führt. Des Weiteren ist dieser Nachbargruppeneffekt bei der Lävulinylgruppe, die formal betrachtet eine Acetylgruppe beinhaltet, in geringeren Ausmaß beobachtet worden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, inwieweit das Produktverhältnis zwischen 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphats **99** und *cycloSal*-phosphat **98** von dem Substituenten in 2-Position der Mannose abhängt. Folgende Verbindungen könnten zur Klärung dieses Phänomens beitragen: 5-*t*Butyl-*cycloSal*-2-hydroxy-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **32dl²** (Abb. 105) sowie Verbindungen gleichen Typs, deren 2-Position

durch sterisch anspruchsvollere Ester, die zugleich noch enzymatisch spaltbar sind (z.B. Pivaloyl), geschützt sind.

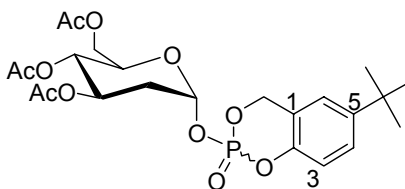


32dl²

Abb. 105: 5-*t*Butyl-*cycloSal*-2-hydroxy-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **32dl²**

Derartige Substanzen sollten zum einen die gezielte Freisetzung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** intrazellulär ermöglichen und zum anderen sollte der stabilisierende Einfluss des Substituenten am Arylsystem das Produktverhältnis zu Gunsten des gewünschten Mannosetetraacetats **78** beeinflussen.

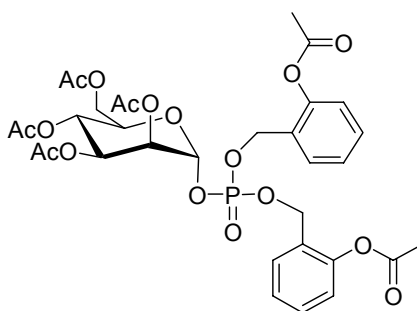
Dagegen schließt die Verbindung 5-*t*Butyl-*cycloSal*-2-desoxy-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **102dl** (Abb. 106) jeglichen Nachbargruppeneffekt aus und wäre unter diesem Blickwinkel sehr interessant.



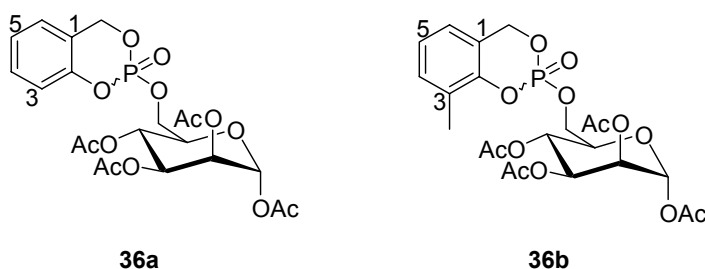
102dl

Abb. 106: 5-*t*But-*cycloSal*-2-desoxy-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **102dl**

Bei der Hydrolyse von bis-*[o-AB]*-ManAc₄-1-phosphat **35** wurde kein 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat **99** freigesetzt (Abb. 107). Die ³¹P-NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse zeigt, daß das Signal des Triesters bei –12 ppm verschwindet und als neuer Produktpeak (82 %) ein Singulett bei –10 ppm entsteht. Zur Strukturaufklärung sollte eine größere Menge hydrolysiert werden und anschließend aufgereinigt werden. Die reine isolierte Substanz kann dann NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch analysiert werden.

**35**Abb. 107: bis-[o-AB]-ManAc₄-1-phosphat **35**

Ebenso liefern die Verbindungen **36a** und **36b** (Abb. 108) nur zu 82 % bzw. zu 65 % 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-6-phosphat **101**. Alle ³¹P-NMR-Spektren wiesen Hydrolyseprodukte bei 18 ppm und bei 0.75 ppm auf, deren Identifizierung analog des oben beschriebenen Weges erfolgen kann.

**36a****36b**Abb. 108: *cycloSal*-(ManAc₄)-6-phosphat **36a** und 3-Me-*cycloSal*-(ManAc₄)-6-phosphat **36b**

Die detaillierte Aufklärung der Hydrolyseprodukte von *cycloSal*-(ManAc₄)-6-phosphaten ist bezüglich der Therapie des CDG-Typs Ib von großer Bedeutung¹⁷⁵. Bei diesem Subtyp ist die Phosphomannose-Isomerase defizient, so daß vom Körper Fructose-6-phosphat nur unzureichend in Mannose-6-phosphat umgewandelt wird (Abb. 109). Im Gegensatz zum CDG-Ia ist das Krankheitsbild zwar durch Gabe von Mannose therapierbar, allerdings müssen die Patienten ungefähr 300 mg/kg Körpergewicht/Tag Mannose zu sich nehmen. Derartig große Mengen könnten durch die Applikation eines Prodrugs, das direkt intrazellulär Mannose-6-phosphat freisetzt, umgangen werden.

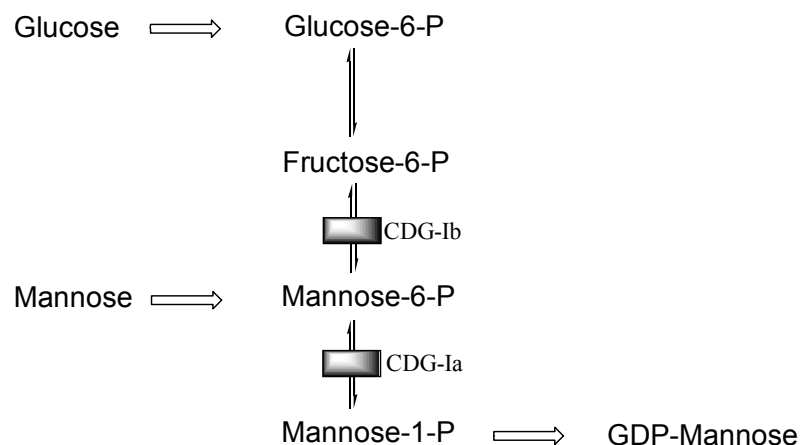


Abb. 109: Lokalisierung der früh auftretenden Glycolysierungsdefekte CDG-Ia und CDG-Ib

Ein weiteres Einsatzgebiet von *cycloSal*-Hexose-1-phosphaten stellt die Synthese von Nucleosiddiphosphatpyranosen dar (Abb. 110).

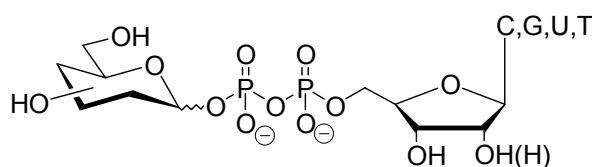


Abb. 110: (d)NDP- α/β -D-Hexosen

Diese sind wichtige Bausteine bei der Biosynthese von Oligosacchariden. Aus diesem Grund ist der synthetische Zugang zu diesen Bausteinen von essentieller Bedeutung z.B. für Studien zur Biosynthese von Lipopolysacchariden (LPS).

Hierzu sollen die *cycloSal*-Hexose-1-phosphate als aktivierte Elektrophile in einer S_NP -Reaktion mit Nucleotiden als *O*-Nucleophile, unter Ausbildung einer Pyrophosphatbrücke, zur Reaktion gebracht werden (Abb. 111).

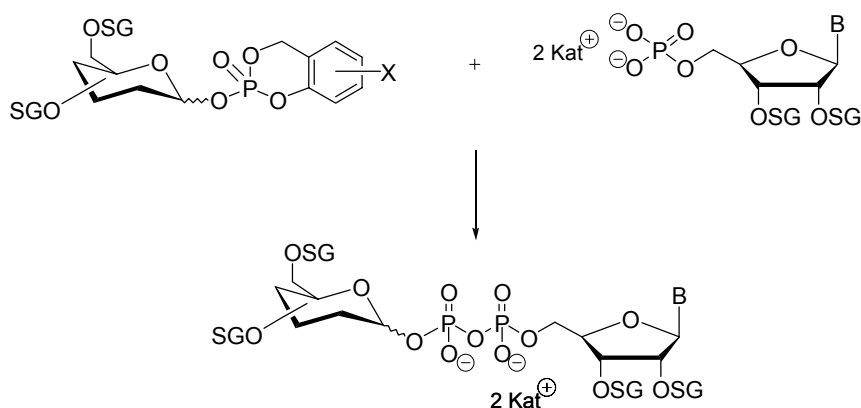


Abb. 111: Darstellung von Nucleosiddiphosphatzuckern mit einer durch *cycloSal* aktivierten Phosphateinheit

Diese konvergente Synthesestrategie erlaubt auch die Darstellung von Nucleosiddiphosphatzuckern, die auf enzymatischem Wege auf Grund fehlender Enzyme bzw. Substrataffinität nicht darstellbar sind.

Von Interesse ist die Rolle von dTDP- α -6d-L-Alt_p **103** α bzw. dTDP- β -6d-L-Alt_p **103** β und CDP- α -6d-D-Gul_p **104** α bzw. CDP- β -6d-D-Gul_p **104** β bei der Biosynthese von LPS gram-negativer Bakterien spielen (Abb. 112).

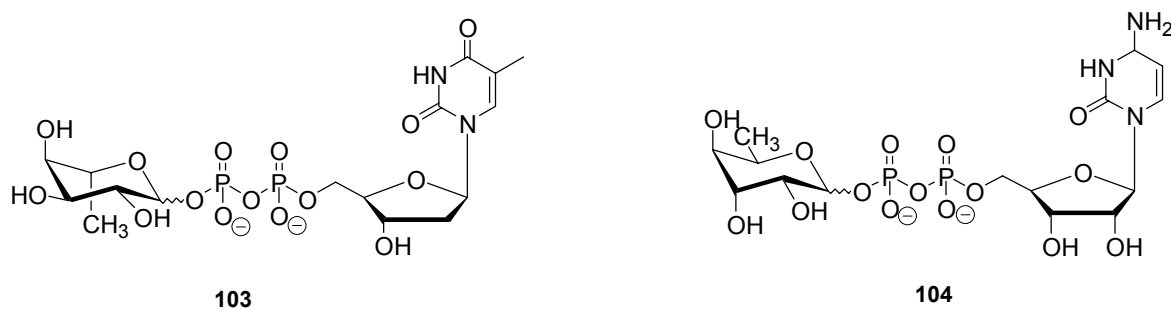


Abb. 112: dTDP- α/β -6d-L-Altrose **103** und CDP- α/β -6d-D-Gulose **104**

8 EXPERIMENTALTEIL

8.1 Allgemeines

8.1.1 Lösungsmittel

Acetonitril; $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ [41.05]; Sdp.: 81-82 °C; $d = 0.78$

- a) puriss. absolut, über Molsieb, $\text{H}_2\text{O} \leq 0.001 \%$; Fluka Nr. 0069.
- b) zur Synthese; Merck Nr. 800015.
- c) technische Qualität; über di-Phosphorpentoxid getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert

Benzol; C_6H_6 [78.11]; Sdp.: 79-81 °C; $d = 0.879$; min. 99.7 %; Riedel-de-Haën Nr. 32212.

Dichlormethan; CH_2Cl_2 [84.93]; Sdp.: 39-40 °C; $d = 1.325$

- a) technische Qualität; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert.
- b) puriss. absolut, über Molsieb, $\text{H}_2\text{O} \leq 50 \text{ ppm}$; Fluka Nr. 66749.

Diethylether; $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ [74.12]; technische Qualität; Sdp.: 35 °C;

- a) bei Normaldruck destilliert und über Kaliumhydroxid aufbewahrt.
- b) über Natrium getrocknet und bei Normaldruck destilliert.

N,N-Dimethylformamid (DMF); $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ [73.10]; Sdp.: 190-191°C; puriss. absolut, über Molsieb, Fluka Nr. 40248

Dimethylsulfoxid, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ [78.13]; Sdp.: 190-191°C, $d = 1.100$; puriss. absolut, über Molsieb, Fluka Nr. 41648

Essigsäureethylester; $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ [88.11]; technische Qualität; Sdp.: 77 °C; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert.

Ethanol; $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ [46.07]; Sdp.: 78 °C; über Natrium und Phthalsäurediethylester getrocknet und bei unter Inertgas destilliert.

Methanol; CH_4O [32.04]; Sdp.: 64 °C; $d = 0.791$

- a) technische Qualität; bei Normaldruck destilliert.
- b) puriss. absolut, über Molsieb, Fluka Nr. 65542.

Petrolether (45-60); technische Qualität; Sdp.: 45-60 °C; bei Normaldruck destilliert.

Tetrachlormethan; CCl_4 [153.82]; puriss., Fluka Nr. 87037.

Tetrahydrofuran; $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ [72.11];

- a) puriss. absolut über Molsieb, $\text{H}_2\text{O} \leq 50 \text{ ppm}$; Fluka Nr. 87371.
- b) technische Qualität; über Kalium getrocknet und bei Normaldruck destilliert.

Pyridin; C_5H_5N [79.10];

- a) puriss. absolut über Molsieb, $H_2O \leq 50$ ppm; Fluka Nr. 82704.
- b) technische Qualität; über Natriumhydriddispersion getrocknet und bei Normaldruck destilliert.

Toluol; C_7H_8 [92.14]; technische Qualität; Sdp.: $110^\circ C$; bei Normaldruck destilliert.

8.1.2 Verwendete Puffer und Reagenzien

Ammoniak-gesättigte Methanollösung

In einem 1000 mL Rundkolben wurde Ammoniakgas in ca. 800 mL wasserfreies Methanol bei $-15^\circ C$ für etwa 0.5 h eingeleitet. Das Ammoniakgas wurde dabei durch zwei mit Kaliumhydroxid-Plätzchen gefüllte Gaswaschflaschen vorgetrocknet, die Kühlung der Methanollösung erfolgte durch eine Eis-Kochsalz-Kältemischung. Die fertige Ammoniak-gesättigte Methanollösung wurde anschließend bei $-20^\circ C$ gelagert.

Ionenpuffer für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Es wurden 1000 mL Wasser und 6.6 mL Tetrabutylammoniumhydroxid gemischt und mit konzentrierter Phosphorsäure der pH-Wert auf 3.8 eingestellt (Puffer I). Zu 60 mL der Puffer I-Lösung wurden wiederum 1000 mL Wasser gegeben, um den eigentlichen Ionenpuffer zu erhalten (Puffer II).

50 mM Phosphatpuffer (PBS, pH 6.8) für die Hydrolysekinetiken

In 1000 mL Wasser wurden 8.00 g (137 mmol) Natriumchlorid, 0.20 g (2.68 mmol) Kaliumchlorid, 7.20 g (41.5 mmol) Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) und 1.40 g (8.8 mmol) Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) gelöst und falls nötig, der pH-Wert mittels verdünnter Salzsäure oder verdünnter Natronlauge auf 6.8 eingestellt.

50 mM Phosphatpuffer (pH 7.3) für die Hydrolysekinetiken

In 1000 mL Wasser wurden 6.85 g (38.5 mmol) Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) und 1.55 g (11.4 mmol) Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) gelöst und falls nötig, der pH-Wert mittels verdünnter Phosphorsäure oder verdünnter Natronlauge auf 7.3 eingestellt.

8.2 Chromatographie

8.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (Merck Nr. 5554; Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Die Platten wurden auf eine Größe von 2 - 4 x 10 cm zugeschnitten; die Laufstrecke betrug 8 - 9 cm. Alle R_f -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm und durch Besprühen mit 10 %iger ethanolischer Schwefelsäure und anschließende Wärmebehandlung. Zur Detektion von ungesättigten Verbindungen wurde eine Iodkammer verwendet.

8.2.2 Zirkulare, zentrifugale Dünnschichtchromatographie (CCTLC)

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

8.2.3 Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie)

Die säulenchromatographischen Trennungen wurden an Kieselgel 60 (230 – 400 mesh, Korngröße 0.040 – 0.063 mm, Merck) nach dem Flash-Verfahren bei einem Überdruck von 0.2 – 0.4 bar durchgeführt. Es wurden stets destillierte Lösungsmittel verwendet.

8.2.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde an zwei Merck-Hitachi-Anlagen durchgeführt.

Software:	Chromatography Data Station Software HPLC-Manager Version 2
Interface:	Model D 6000
Pumpe:	Model L 6200 A Intelligent Pump
Automatischer Probenwechsler:	Model AS 2000 A
Detektion	UV, 260 nm
Analytische Säule:	LiChroCART 250-3 mit Lichrospher 100-3 RP 18 (5 µm) Füllmaterial
Software:	Chromatography Data Station Software HPLC System Manager Version 3.1.1.

Interface:	Model L-7000
Pumpe:	Model L-7100
Automatischer Probenwechsler:	Model L-7200
Dioden Array Detektor	Model L-7455
Analytische Säule:	LiChroCART 250-3 mit Lichrospher 100-3 RP 18 (5 µm) Füllmaterial

8.2.4.1 HPLC-Methoden:

a) Analytische Reinheitskontrollen

Gradient A:

Acetonitril-Gradient in Wasser von 5-100 % in 20 Minuten, dann 10 Minuten isokratisch 5 % Acetonitril mit einer Flussrate von 0.5 mL/min.

Gradient B:

Acetonitril-Gradient in Wasser von 0–80 % in 20 Minuten, dann Acetonitril-Gradient in Wasser von 80% bis 100% in 5 Minuten, dann 10 Minuten 100% Acetonitril, abschließend 5 Minuten 100% Wasser mit einer Flussrate von 0.5 mL/min.

Gradient C:

Acetonitril-Gradient in Wasser von 0 bis 60 % Acetonitril in 20 Minuten, Acetonitril-Gradient in Wasser von 60% bis 100% in 3 Minuten, dann 10 Minuten 100% Acetonitril, abschließend 5 Minuten 100% Wasser mit einer Flussrate von 0.5 mL/min.

Gradient D:

Acetonitril-Gradient in Wasser von 8-100 % Acetonitril in 22 min, 5 min 100 % Acetonitril, dann 6 min isokratisch 8 % Acetonitril mit einer Flussrate von 0.6 mL/min.

Gradient E:

Acetonitril-Gradient in Ionenpaarungspuffer von 8-100 % Acetonitril in 22 min, 5 min 100 % Acetonitril, dann 6 min isokratisch 8 % Acetonitril mit einer Flussrate von 0.6 mL/min.

b. Semipräparative Trennungen

Isokratisch mit 35 % Acetonitril und 65 % Wasser bei einer Flussrate von 4 mL/min und UV-Detektion bei 260 nm. Die verwendete Säule ist eine Merck LiChroCart 250-10, reversed phase mit Silicagel Lichrospher 100 RP 18 (10 µm); Merck, Darmstadt.

8.2.5 Gaschromatographie

Die gaschromatographischen Untersuchungen wurden mit dem Gerät Hewlett Packard 5890 Series II durchgeführt. Hierbei diente Wasserstoff als Trägergas und die Detektion erfolgte durch einen Flammenionisationsdetektor (FID). Für die Trennung wurde eine Kapillare mit folgender Belegung verwendet:

DB-5MS fused silica, 30 m, 0.25 mm I.D., 0.25 μ m Filmdicke.

Generelles Temperaturprogramm: 60 °C (0 min)-10 °C/min-300 °C-5 min; 30 sec splitless

8.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden in der spektroskopischen Abteilung der Universität Hamburg aufgenommen. Es standen folgende Geräte zur Verfügung:

Bruker AC 250 P (^1H mit 250 MHz; ^{13}C mit 62.9 MHz), Bruker AMX 400 (^1H mit 400 MHz; ^{13}C mit 101 MHz), Bruker DMX 500 (^1H mit 500 MHz; ^{13}C mit 126 MHz).

^1H -NMR:

Die Standardisierung erfolgte gegen CDCl_3 ($\delta = 7.27$ ppm), $\text{DMSO}-d_6$ ($\delta = 2.49$ ppm) und D_2O ($\delta = 4.65$ ppm).

^{13}C -NMR:

Die Standardisierung erfolgte gegen CDCl_3 ($\delta = 77.0$ ppm) und $\text{DMSO}-d_6$ ($\delta = 39.7$ ppm).

^{31}P -NMR:

Bruker AC 250 (81 MHz), Bruker AMX 400 (162 MHz), Bruker DMX 500 (202 MHz).

Die Standardisierung erfolgte gegen einen externen Standard (85% Phosphorsäure).

Zur Wiedergabe der Multiplizitäten in den ^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR-Spektren finden folgende Abkürzungen Verwendung:

br. = breit, s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quadruplett, quin = Quintett, sept = Septett, m = Multipllett, ar. = aromatisch.

8.4 Massenspektrometrie (MS)

Die ESI-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg mit einem Elektrospray-Gerät (Hewlett Packard HP 5989 B MS mit einem ESI Interface HP 599 87 A API oder Finnegan MAT 95 Trap XL) gemessen und mit der Software ISIS 8.1 nachbearbeitet. Als Fließmittel wurde Acetonitril mit 0.1 % Essigsäure (ESI^+) oder Acetonitril/Wasser 50:50 v/v benutzt.

Die FAB-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg mit einem doppel-fokussierenden Spektrometer VG/70-250 F der Firma VG Analytical gemessen. Als Matrix wurde *m*-Nitrobenzylalkohol verwendet.

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem Bruker Biflex-III-Gerät im Positiv-Modus unter Verwendung eines Stickstoff-Lasers ($\lambda = 337$ nm) gemessen (Matrix *nor*-Haman).

Massenspektren wurden an der Geräte-Kombination GC 8000 Series/MD800 (Fisons Instruments) mit Elektronenstoßionisation (EI) von 70 eV und einer Quelltemperatur von 200 °C im Massenbereich von 35 bis 600 amu erhalten. Als Trägergas diente Helium. Angegeben werden Massenzahlen (m/z) und relative Intensitäten (in %) bezogen auf das intensivste Signal.

8.5 Polarimeter

Drehwerte optisch aktiver Substanzen wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 oder 243 in 10 cm Küvetten mit einer Natriumlampe bei einer Wellenlänge von 589 nm gemessen. Die Drehwerte der Monosaccharidphosphat-Triester wurden mit einer Quecksilberlampe bei 546 nm gemessen.

8.6 Geräte

8.6.1 Gefriertrocknung

Wässrige Lösungen wurden an einer Amsco/Finn-Aqua Lyovac GT2 Gefriertrocknungsanlage bzw. an einer Christ/Alpha 2-4 Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

8.6.2 Thermomixer

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

8.7 Enzymatische und biologische Arbeitsvorschriften

8.7.1 Enzymatische Experimente

Zur Durchführung der enzymatischen Untersuchungen wurden jeweils eine frische Lösung mit $c = 0.01$ mmol angesetzt.¹³⁹ Dazu wurde *cycloSal*-(ManAc₄)-1-phosphat **32aI** in Aceton bzw. Dioxan gelöst und dann dest. Wasser bzw. der entsprechende Phosphatpuffer (pH 6.8, pH 7.0, pH 7.3) hinzugegeben. Die Proben wurden durchmischt (Vortex) und dann mit dem jeweiligen Enzym (Lipase E.C. 3.1.1.3, Cellulase E.C.3.2.1.4) versetzt. Die zugesetzten Units wurden der Vorschrift entsprechend berechnet.¹³⁹ Die Proben wurden in einem Thermomixer bei 37 °C aufbewahrt und dünnschichtschromatographisch mit Methanol/Dichlormethan 9:1 und Dichlormethan/Methanol 30:1 verfolgt und mittels Zuckersprühareagenz detektiert. Als Referenzsubstanz wurde 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranose **78** verwendet.

Alle Dünnschichtchromatogramme wiesen unabhängig von der Zeit (20 min-3 d) das selbe Ergebnis auf. Das *cycloSal*-(ManAc₄)-1-phosphat **32aI** zersetzt sich unter Bildung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranose **78** und eines Spots, der auf der Startlinie liegen bleibt.

8.7.2 LLO (Lipid Linked Oligosaccharides)-Analyse

Die Zellkulturen (Gesunde als Kontrolle, Patient) wurden je einmal mit 2-3 mL (37 °C) gewaschen und anschließend radioaktiv markiert. Dazu wurden pro Platte 5 mL Markierungsmedium (mit und ohne Versuchssubstanz) zugesetzt und für 0.5 h bzw. 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde mit 3 mL MEM (37 °C) gewaschen und nach Zugabe von 10 mL MEM für weitere 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS (37 °C) gewaschen. Die Platten wurden auf Eis gegeben und die Zellen mit 3 mL Methanol (4 °C) abgekratzt und in ein Glasröhrchen überführt. Nach Zugabe von jeweils 6 mL Chloroform und kräftigem Vortexen wurden die Proben 10 min bei 4 °C und 3500 Upm zentrifugiert. Die Pellets wurden jeweils zweimal mit Chloroform/Methanol (2:1; 4 °C) gewaschen, anschließend in N₂-Strom getrocknet und in jeweils 1 mL Wasser aufgenommen. Die Proben wurden im Ultraschall zerkleinert und erneut bei 4 °C und 3500 Upm zentrifugiert. Die Pellets wurden im N₂-Strom getrocknet und mehrmals mit jeweils 4 mL Chloroform/Methanol/Wasser (10:10:3) extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und im N₂-Strom eingengt. Die gewonnenen Pellets enthalten hauptsächlich die proteingebundenen Oligosaccharide (PDO-Analyse). Die anderen Pellets enthalten die Dolicholpyrophosphat-gebundenen Oligosaccharide. Sie werden durch milde saure Hydrolyse in *n*-Propanol/0.1 M

HCl (1:2) freigesetzt. Anschließend wurde im Vakuum zentrifugiert, der Rückstand in 21 μL Wasser aufgenommen und HPLC-analytisch untersucht [Eluent A (Acetonitril) / Eluent B (Wasser), 65 : 35 $\rightarrow$ 35 : 65 (60 Minuten) $\rightarrow$ 0 : 100 (61 Minuten) $\rightarrow$ 0 : 100 (70 Minuten) $\rightarrow$ 65 : 35 (71 Minuten)].

8.8 Hydrolysekinetiken

8.8.1 Hydrolysekinetiken in Phosphatpuffer

Es wurde eine 50 mM Stammlösung der jeweiligen Verbindung in DMSO angesetzt. Von dieser Stammlösung wurden 11.4 μL mit 288 μL eines Wasser verdünnt, um so die 1.9 mM Hydrolyse-Stammlösung zu bilden. Diese wurde mit 5 μL des internen Standards (AZT-Lösung: 5 mg AZT **3** gelöst in 500 μL Wasser) versetzt und die Hydrolyse anschließend durch Zugabe von 300 μL des zuvor auf 37 °C temperierten 50 mM Phosphatpuffers sowie Durchmischen (Vortex) gestartet. Die Konzentrationen betrugen somit 0.94 mM (Verbindung) und 24.8 mM (Puffersalze). Sofort nach Zugabe der Pufferlösung wurde ein erstes Aliquot (60 μL) entnommen, auf 2-3 Tropfen konzentrierte Essigsäure pipetiert und bei -196 °C eingefroren. Die Zuckerverbindungen wurden direkt eingefroren und erst direkt vor der HPLC-analytischen Untersuchung aufgetaut. Anschließend wurde die Kinetiklösung bei 37 °C in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert. Mit den entnommenen Proben (jeweils 60 μL) wurde analog zu der Nullprobe verfahren. Die einzelnen Proben wurden HPLC-analytisch untersucht (Gradient B für Zucker; Gradient C für Nucleoside), wobei jeweils 40 μL (90 μL bei den Zuckerverbindungen; Auswertung der Chromatogramme bei 215 nm) injiziert wurden. Von jeder Verbindung wurden zwei Bestimmungen durchgeführt.

Zur Auswertung der Kinetiken wurde für jede Probe der Quotient aus den Peakflächen des Prodrugs und des internen Standards gebildet (= normierte Integrationeinheit; normierte IE) und gegen die Hydrolysedauer (in Stunden; h) aufgetragen.

Durch die experimentell bestimmten Messpunkte wurden mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogrammes exponentielle Ausgleichskurven gelegt, so dass sich Werte für die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten k der Hydrolyse ergaben. Aus den so erhaltenen Werten für k konnten gemäß der Formel

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

die Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ errechnet werden, die dann gemittelt wurden.

8.8.2 Hydrolysekinetiken in humanem Serum

Durch Verdünnen von 12 μL der 50 mM DMSO-Stammlösung mit 388 μL DMSO wurde eine 1.5 mM DMSO-Lösung des jeweiligen Nucleotids angesetzt. Für die Hydrolyselösungen wurden 100 μL Zellextrakt (CEM/0; reines Wasser für Nullproben) mit 20 μL einer 70 mM Magnesiumchlorid-Lösung versetzt. Die Hydrolyse wurde durch anschließende Zugabe von 20 μL der 1.5 mM DMSO-Lösung und Durchmischen (Vortex) gestartet. Es wurden separate Kinetiklösungen für Proben mit 0, 2, 4, 6, 8 h Reaktionszeit angesetzt, die jeweils bei 37 °C in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert wurden. Zum Stoppen der Hydrolyse wurde die jeweilige Kinetik-Lösung mit 300 μL essigsauerm Methanol (20 mL Methanol plus 1 mL konzentrierte Essigsäure) versetzt, 5 min bei 0 °C aufbewahrt und anschließend 10 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Einmal-Filter (Schleicher & Schuell; Spartan 13/30, 0.2 μm) filtriert und HPLC-analytisch untersucht (Gradient E, 90 μL Injektion).

Zur Auswertung der Kinetien wurden die Absolutflächen des jeweiligen Phosphattriesters gegen die Hydrolysedauer (in Stunden; h) aufgetragen. Die Ermittlung der mittleren Hydrolyse-Halbwertszeiten $t_{1/2}$ erfolgte analog zu dem in Kapitel 8.8.1, S. 132 für die chemischen Hydrolysekinetiken beschriebenen Verfahren.

8.8.3 ^{31}P -NMR-Hydrolysestudien

Es wurden ungefähr 7 mmol des jeweiligen Phosphattriesters auf einer Analysenwaage in ein Eppendorf-Cap eingewogen und mit 500 μL DMSO- d_6 sowie 500 μL eines 50 mM Imidazol-Salzsäure-Puffers (pH = 7.5) versetzt. Im Falle der Verbindungen **32eI** und **32dIII** wurden weitere 300 μL DMSO- d_6 zugegeben, um klare Lösungen zu erhalten. Die Kinetik-Lösungen wurden in NMR-Röhrchen überführt und sofort ^{31}P -NMR-spektroskopisch (^1H -entkoppelt und ^1H -gekoppelt, 202 MHz, 1024 Scans) vermessen. Die NMR-Proben wurden bei 25 °C aufbewahrt und in Abständen von Stunden, dann Tagen und schließlich Wochen erneut ^{31}P -NMR-spektroskopisch untersucht.

*Erster Teil**8.9 Synthese der Nucleosidmonophosphat-Triester***8.9.1 Synthese der Alkohole****8.9.1.1 Darstellung von 1-Acetyl-1,2,3-triazolo[4,5-b]-pyridin **42****

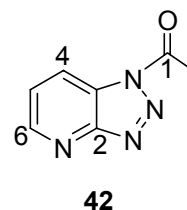
1.00 g (8.32 mmol) 1*H*-1,2,3-Triazolo[4,5-*b*]-pyridin **48** wurden in 30 mL THF suspendiert und mit 3.20 mL Pyridin versetzt. Zu der auf 0 °C abgekühlten Suspension wurden 1.20 mL (12.30 mmol, 1.50 Äquiv.) Essigsäureanhydrid getropft und nach 0.5 h Rühren bei 0 °C wurden weitere 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit 40 mL Essigester versetzt und die organische Phase dreimal mit je 20 mL Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand ca. dreimal mit Toluol codestiliert. Das Produkt **42** wurde aus Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 0.90 g (5.55 mmol, 66 %)

farblose Nadeln

$C_6H_6ON_4 = 162.15$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 30:1 v/v): R_f -Wert = 0.32



1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.88-8.85, 8.65-8.60, 7.65-7.59 (je m, je 1 H, -*CH* Aryl); 3.01 (s, 3 H, - CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 169.89 (C=O); 158.24 (C-2); 150.19 (C-2); 124.17 (C-5); 124.32 (C-4); 123.64 (C-3); 23.09 (- CH_3).

8.9.1.2 Darstellung von 4-Acetoxybenzylalkohol **50**

0.50 g 4-Hydroxybenzylalkohol **70** (4.00 mmol, 1.00 Äquiv.) wurden in 5 mL 1 N NaOH gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0.80 g (5.00 mmol, 1.25 Äquiv.) 1-Acetyl-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]-pyridin **42**, gelöst in 20 mL THF, gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 2 N HCl neutralisiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in ca. 20 mL

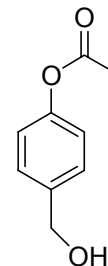
Diethylether aufgenommen und dreimal mit je 10 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Petrolether (9:1) als Laufmittel aufgereinigt.

Ausbeute: 0.30 g (1.84 mmol, 46 %)

gelblicher Feststoff

$C_9H_{10}O_3 = 166.14 \text{ g/mol}$

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v): R_F -Wert = 0.60



50

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.40-7.35, 7.10-7.05 (je m, je 2 H, -CH Aryl); 4.65 (s, 2 H, - CH_2); 2.30 (s, 3 H, - CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 170.03 (C=O); 150.48 (Cq Aryl *para*); 138.91 (Cq Aryl); 128.50 (-CH *ortho*); 122.09 (-CH *meta*); 65.14 (- CH_2); 21.53 (- CH_3).

8.9.1.3 Darstellung von Acetoxysalicylaldehyd **54**

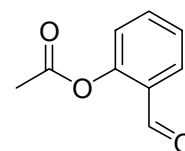
3.00 g (24.6 mmol, 1.00 Äquiv.) Salicylaldehyd **53** wurden bei 0 °C in 20 mL abs. Pyridin gelöst und 3.00 mL (3.25 g, 1.30 Äquiv.) Essigsäureanhydrid zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde anschließend 18 h bei Raumtemperatur gerührt und danach mehrfach mit Toluol codestilliert. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen und gründlich dreimal mit je 10 mL Wasser und einmal mit 10 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Hexan/Dichlormethan (10:1) als Laufmittel aufgereinigt.

Ausbeute: 1.80 g (11.0 mmol, 45 %),

farbloser Feststoff

$C_9H_8O_3 = 164.12 \text{ g/mol}$

DC (CH_2Cl_2/n -Hex 1:2 v/v): R_F -Wert = 0.14



54

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 10.12 (s, 1 H, -CHO); 7.89-7.87, 7.66-7.61, 7.42-7.38, 7.19-7.17 (je m, je 1 H, -CH Aryl); 2.39 (s, 3 H, - CH_3).

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 198.16 (C=O Aldehyd); 169.53 (C=O Acetyl); 154.91 (Cq Aryl *ortho*); 135.71, 135.14, 132.87, 131.73 (-CH Aryl); 130.75 (Cq Aryl); 126.85, 126.55, 124.39, 123.91 (-CH Aryl); 21.27 (-CH₃).

8.9.1.4 Darstellung von 2-Acetoxybenzylalkohol **52**

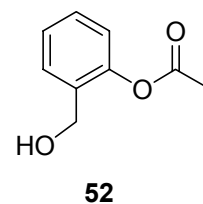
Zu einer Lösung aus 1.00 g Acetoxysalicylaldehyd **54** (6.00 mmol, 1.00 Äquiv.), gelöst in 50 mL abs. *iso*-Propanol wurden bei $-38\text{ }^\circ\text{C}$ 113 mg NaBH_4 (3.00 mmol, 0.50 Äquiv.) hinzugegeben. Nachdem der Reaktionsansatz 4.5 h bei $-38\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt worden war, wurde die Reaktionslösung mit 2 N HCl neutralisiert und die organische Phase zweimal mit je 10 mL ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase dreimal mit je 10 mL Dichlormethan gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockne am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-2%) aufgereinigt.

Ausbeute: 866 mg (5.20 mmol, 87 %)

farbloser Feststoff

$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3 = 166.17\text{ g/mol}$

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30:1 v/v): R_f -Wert = 0.66



^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.33-7.20 (m, 2 H, -CH Aryl), 6.97-6.84 (m, 2 H, -CH Aryl); 5.13 (s, 3 H, -CH₂); 2.13 (s, 3 H, -CH₃).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 17.15 (C=O Acetyl); 155.99 (Cq Aryl *ortho*); 132.63, 131.61 (-CH Aryl); 122.06 (Cq Aryl); 120.98, 118.27 (-CH Aryl); 63.74 (-CH₂); 21.32 (-CH₃ Acetyl).

8.9.1.5 Darstellung von 3-Phenyl-3-oxo-methylpropionat **56**

798 mg (33.2 mmol, 2.00 Äquiv.) Natriumhydrid wurden in 15 mL abs. THF suspendiert und tropfenweise mit Acetophenon **55** (1.90 mL, 16.6 mmol, 1.00 Äquiv.) versetzt. Die Lösung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 7.60 mL (89.8 mmol, 5.40 Äquiv.) Dimethylcarbonat tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 4 h

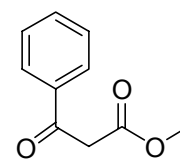
refluxiert und nach Abkühlung auf Raumtemperatur mit 3 M Essigsäure auf pH 4 eingestellt. Zu dieser Lösung wurden 15 mL Diethylether gegeben und die organische Phase separiert. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit je 10 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 10 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und danach über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene Produkt konnte ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden.

Ausbeute: 2.75 g (15.4 mmol, 93 %)

farbloser Feststoff

$C_{10}H_{10}O_3 = 178.18 \text{ g/mol}$

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 30:1 v/v): R_F -Wert = 0.64



56

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = δ = 7.41-7.29 (m, 5 H, -CH Aryl); 4.00 (s, 2 H, - CH_2); 3.78 (s, 3 H, O- CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 197.05 (C-3); 173.28 (C-1); 136.79, 129.59, 128.65, 128.24 (-CH Aryl); 52.47 (O- CH_3); 44.01 (- CH_2).

8.9.1.6 **Darstellung von 3-Phenyl-3-hydroxy-methylpropionat** **(α -Methoxycarbonyl-methylbenzylalkohol) 57**

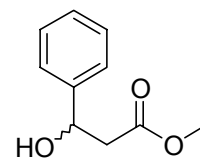
Zu einer Lösung aus 2.00 g 3-Phenyl-3-oxo-methylpropionat **56** (11.2 mmol) in 30 mL abs. *iso*-Propanol wurden bei $-38^\circ C$ 220.0 mg $NaBH_4$ (11.2 mmol, 1.00 Äquiv.) hinzugegeben. Nachdem die Reaktionslösung 10 h bei $-38^\circ C$ gerührt worden war, wurden weitere 5 mg $NaBH_4$ hinzugegeben und der Ansatz 18 h bei $-25^\circ C$ gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 2 N HCl neutralisiert und die organische Phase zweimal mit je 10 mL ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase dreimal mit je 10 mL Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockne am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt mit CH_2Cl_2 /Methanol (30:1) als Laufmittel.

Ausbeute: 330 mg (1.83 mmol, 33 %)

farbloser Feststoff

$C_{10}H_{12}O_3 = 180.20$ g/mol

DC (CH_2Cl_2 /MeOH 30:1 v/v): R_F -Wert = 0.52



57

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.41-7.29 (m, 5-H, -CH Aryl); 5.17 (dd, 1 H, $^3J = 8.6$ Hz, $^3J = 3.8$ Hz, H-3); 3.74 (s, 3 H, - CH_3); 2.79 (dd, 1 H, $^2J = 16.6$ Hz, $^3J = 8.6$ Hz, H-2a); 2.73 (dd, 1 H, $^2J = 16.6$ Hz, $^3J = 3.8$ Hz, H-2b).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 129.02, 128.29, 128.14, 126.10, 126.06 (-CH Aryl); 70.76 (C-3); 52.38 (O- CH_3); 43.58 (- CH_2).

8.9.1.7 Darstellung von 4-Acetoxybenzaldehyd **59**

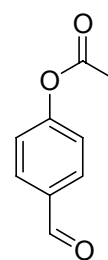
2.00 g (16.4 mmol, 1.00 Äquiv.) 4-Hydroxybenzaldehyd **61** wurden in 12 mL abs. Pyridin gelöst und 1.90 mL (2.00 g, 1.20 Äquiv.) Essigsäureanhydrid zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt und danach mehrfach mit Toluol codestilliert. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen und gründlich dreimal mit je 10 mL Wasser und einmal mit 10 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-3%) aufgereinigt.

Ausbeute: 1.60 g (9.90 mmol, 61 %)

farbloser Feststoff

$C_9H_8O_3 = 164.12$ g/mol

DC (CH_2Cl_2 /MeOH 9:1 v/v): R_F -Wert = 0.85



59

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.99 (s, 1 H, -CHO); 7.94-7.90 (m, 2 H, -CH Aryl), 7.30-7.26 (m, 2 H, -CH Aryl); 2.34 (s, 3 H, - CH_3).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 191.27 (C=O Aldehyd); 169.06 (C=O Acetyl); 155.74 (Cq Aryl *para*); 133.46 (Cq Aryl); 131.58, 131.35 (-CH Aryl *ortho*); 122.78, 122.63 (-CH Aryl *meta*); 21.52 (- CH_3).

8.9.1.8 Darstellung von 4-Hydroxyzimtsäuremethylester 17

2.00 g (12.20 mmol) 4-Hydroxyzimtsäure **62** wurden in 15 mL Methanol gelöst und nach Zugabe von 0.2 g DOWEX 50X8 wurde der Reaktionsansatz 24 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde das DOWEX 50X8 abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-3%) aufgereinigt.

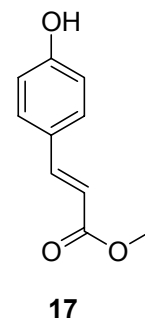
Ausbeute: 2.00 g (11.2 mmol, 94 %)

farblose Nadeln

cis/trans-Isomere: 0.1:1

$C_{10}H_{10}O_3 = 178.16$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v): R_F -Wert = 0.61



trans- 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ [ppm] = 10.0 (br. s, 1 H, -OH); 7.60-7.50 (m, 3 H, -CH, 2x -CH Aryl), 6.80-6.75 (m, 2 H, -CH Aryl); 6.40 (d, 1 H, $^3J_{Ha,Hb} = 16.0$ Hz, -CH); 3.70 (s, 3 H, -CH₃).

trans- ^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$): δ [ppm] = 167.40 (C=O); 160.21 (Cq Aryl, *para*); 145.11 (C-3); 132.85, 130.67 (-CH, Aryl, *ortho*); 125.41 (Cq, Aryl); 116.11 (C-2); 115.45, 115.27 (-CH, Aryl, *meta*); 51.58 (-CH₃).

8.9.1.9 Darstellung von 4-Acetoxyzimtsäuremethylester 63

2.00 g (11.5 mmol) 4-Hydroxyzimtsäuremethylester **17** wurden in 12 mL abs. Pyridin gelöst und 1.30 mL (1.40 g, 1.20 Äquiv.) Essigsäureanhydrid zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mehrfach mit Toluol codestilliert. Danach wurde der Rückstand in 30 mL Essigester aufgenommen und dreimal mit je 15 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Abschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Methanol 30:1 als Laufmittel aufgereinigt.

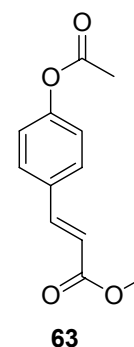
Ausbeute: 2.20 g (9.96 mmol, 87 %)

farblose Nadeln

cis/trans-Isomere: 0.1:1

$C_{12}H_{12}O_3 = 220.16 \text{ g/mol}$

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 30:1 v/v): R_F -Wert = 0.40



trans: 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.72-7.65 (m, 1 H, $^3J_{Ha,Hb} = 16.0 \text{ Hz}$, -CHb); 7.60-7.50 (m, 2 H, -CH Aryl); 7.16-7.10 (m, 2 H, -CH Aryl); 6.40 (d, 1 H, $^3J_{Ha,Hb} = 16.0 \text{ Hz}$, -CHa); 3.82 (s, 3 H, -OCH₃); 2.32 (s, 3 H, -CH₃).

trans: ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 169.54 (C=O, Acetoxy); 167.70 (C=O); 152.49 (Cq Aryl, *para*); 144.13 (C-3); 132.51, 132.49 (-CH, Aryl, *ortho*); 129.60 (Cq, Aryl); 122.54 (C-2); 118.38, 118.32 (-CH, Aryl, *meta*); 52.14 (-OCH₃); 21.53 (-CH₃).

8.9.1.10 Darstellung von 3-(4-Acetoxyphenyl)-oxiran-2-methylcarboxylat **64**

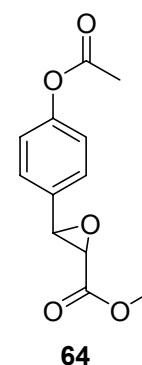
100 mg (0.45 mmol) 4-Acetoxyzimtsäuremethylester **63** wurden in 2 mL Aceton gelöst und mit 13.0 mL Dimethyldioxiran ($c = 35 \text{ mmol/l}$ Aceton) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle wurden weitere 16.0 mL Dimethyldioxiran hinzugegeben und weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt am Chromatotron mit einem *n*-Hexan/Essigester-Gradienten (0-3%) gereinigt.

Ausbeute: 50.0 mg (0.21 mmol, 46 %)

farblose Nadeln

$C_{12}H_{12}O_5 = 236.22 \text{ g/mol}$

DC (*n*-Hexan/EE 7:3 v/v): R_F -Wert = 0.32



1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.35-7.30 (m, 2 H, -CH Aryl); 7.14-7.09 (m, 2 H, -CH Aryl); 4.10 (d, 1 H, $^3J_{Ha,Hb} = 2.0 \text{ Hz}$, -CHa); 3.85 (s, 3 H, -OCH₃); 3.50 (d, 1 H, $^3J_{Hb,Ha} = 2.0 \text{ Hz}$, -CHb); 2.32 (s, 3 H, -CH₃).

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 169.68 (C=O, Acetoxy); 168.85 (C=O); 151.56 (Cq Aryl, *para*); 132.88 (-CH, Aryl, *ortho*); 127.32 (Cq, Aryl); 122.38 (-CH, Aryl, *meta*); 57.87 (C-2); 57.03 (C-3); 53.04 (-OCH₃); 21.49 (-CH₃).

8.9.1.11 Versuche zur Darstellung von 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-hydroxy-methylpropionat (*para*-Acetoxy(α -methoxycarbonylmethyl)benzylalkohol) **60 ausgehend vom 3-(4-Acetoxyphenyl)oxiran-2-methylcarboxylat **64****

Reduktive Epoxidöffnung mit Samariumdiodid:

50.0 mg (0.21 mmol, 1.00 Äquiv.) 3-(4-Acetoxyphenyl)oxiran-2-methylcarboxylat **64** wurden in 4.5 mL 0.1 molarer SmI_2/THF -Lösung zur Komplexbildung zusammengegeben. Nach 0.5 h wurden 174 μL Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPTA) und dann 42.0 μL Dimethylaminoethanol (DMAE) zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und durch Zugabe von 5 mL Phosphatpuffer (pH 8; 25 mM) gequencht. Die organische Phase wurde dreimal mit je 10 mL Wasser und einmal mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und dann das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-2%) aufgereinigt. In keiner der isolierten Fraktionen konnte das Produkt NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.

Reduktive Epoxidöffnung mit $\text{Bu}_3\text{SnH}/\text{Bu}_3\text{SnI}$ -Phosphinoxid:

56.8 μL (87.0 mg, 0.21 mmol) Tributylzinniodid wurden in 1.0 mL abs. THF gelöst und zu dieser Lösung wurden 58.0 mg (0.21 mmol, 1.00 Äquiv.) Triphenylphosphinoxid gegeben. Zur Komplexbildung wurde der Reaktionsansatz 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde tropfenweise eine Lösung aus 166 μL (183 mg, 0.63 mmol, 3.00 Äquiv.) Tributylzinnhydrid und 50.0 mg (0.21 mmol, 1.00 Äquiv.) 3-(4-Acetoxyphenyl)-oxiran-2-methylcarboxylat **64** zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 60 °C gerührt und anschließend mit 1.0 mL Methanol gequencht. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-3%) aufgereinigt.

In keiner der isolierten Fraktionen konnte das Produkt NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.

8.9.1.12 Darstellung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-3-oxo-methylpropionat **66**

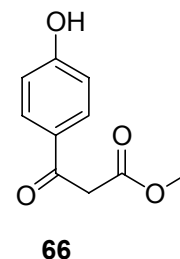
1.58 g (65.7 mmol, 3.00 Äquiv.) Natriumhydrid wurden in 30 mL abs. THF suspendiert und tropfenweise mit *para*-Hydroxyacetophenon **65** (3.00 g, 21.9 mmol, 1.00 Äquiv.), gelöst in 5 mL abs. THF versetzt. Die Lösung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 10.0 mL (119 mmol, 5.40 Äquiv.) Dimethylcarbonat tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 4 h refluxiert und nach Abkühlung auf Raumtemperatur mit 3 M Essigsäure auf pH 4 eingestellt. Zu dieser Lösung wurden 15 mL Diethylether gegeben und die organische Phase separiert. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit je 10 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 10 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und danach über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene Produkt konnte ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden.

Ausbeute: 2.24 g (11.5 mmol, 82 %)

farbloser Feststoff

$C_{10}H_{10}O_4 = 194.06 \text{ g/mol}$

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v): R_F -Wert = 0.31



1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.90-7.86 (m, 2 H, -CH Aryl); 6.94-6.90 (m, 2 H, -CH Aryl); 4.02 (s, 2 H, -CH₂); 3.75 (s, 3 H, -CH₃).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 192.45 (C-3); 169.38 (C-1); 131.79, 129.59, 116.24, 116.00 (-CH Aryl); 53.18 (-CH₃); 45.75 (-CH₂).

8.9.1.13 Darstellung von 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-oxo-methylpropionat **67**

Eine Lösung aus 3-(4-Hydroxyphenyl)-3-oxo-methylpropionat **66** (1.40 g, 7.30 mmol), Eisessig (0.60 mL, 11.0 mmol) und 4-Dimethylaminopyridin in 20 mL abs. Dichlormethan wurde bei 0 °C gerührt. Zu dieser Lösung wurden in 15 min 2.20 g Dicyclohexylcarbodiimid (11.0 mmol), gelöst in 5 mL Dichlormethan hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Methanol abgebrochen und die organische Phase dreimal mit je 15 mL Wasser und einmal mit 10 mL ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat

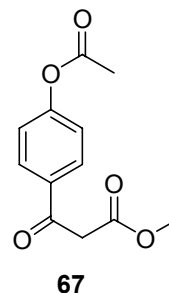
getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit CH₂Cl₂/Methanol (95:5) aufgereinigt.

Ausbeute: 1.00 g (4.40 mmol, 60%)

farbloser Feststoff

C₁₂H₁₂O₅ = 236.22 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v): R_F-Wert = 0.63



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ [ppm] = 8.05-8.00 (m, 2-H, -CH Aryl); 7.22-7.17 (m, 2 H, -CH Aryl); 4.00 (s, 2 H, -CH₂); 3.85 (s, 3 H, -CH₃); 2.33 (s, 3 H, O-CO-CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 191.47 (C-3); 169.28 (C-1); 168.15 (O-CO-CH₃); 155.79, 133.59, 130.24, 122.00 (C-arom.); 51.88 (O-CH₃); 46.10 (-CH₂); 21.55 (O-CO-CH₃).

8.9.1.14 Darstellung von 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-hydroxy-methylpropionat (*para*-Acetoxy(α-methoxycarbonylmethyl)benzylalkohol) **60**

mittels der Reformatsky-Reaktion:

1.10 g (6.70 mmol) *para*-Acetoxybenzaldehyd **59** und 0.44 g (6.70 mmol, 1.00 Äquiv.) Zinkpulver wurden in 8 mL eines Lösungsmittelgemisches aus THF/Trimethylborat 1:1 vorgelegt und 0.52 mL (6.70 mmol, 1.02 g, 1.00 Äquiv.) Methylbromacetat hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 26 h bei Raumtemperatur gerührt und dann durch Zugabe von 4 mL 25%iger Ammoniak-Lösung und 3 mL Glycerin abgebrochen. Der Reaktionsansatz wurde mit Diethylether ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit CH₂Cl₂/Methanol (30:1) als Laufmittel aufgereinigt.

Ausbeute: 64.0 mg (0.27 mmol, 4 %)

farbloser Feststoff

DC (CH₂Cl₂/MeOH 30:1 v/v): R_F-Wert = 0.71

mit Natriumborhydrid:

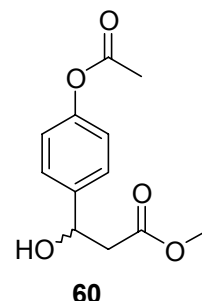
Zu einer Lösung aus 1.00 g 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-oxo-methylpropionat **67** (4.23 mmol) in 50 mL abs. *iso*-Propanol wurden bei $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 86.0 mg NaBH_4 (2.10 mmol, 1.00 Äquiv.) hinzugegeben. Nachdem die Reaktionslösung 10 h bei $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt worden war, wurden weitere 5.00 mg NaBH_4 hinzugegeben und der Ansatz 18 h bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 2 N HCl neutralisiert und die organische Phase zweimal mit je 10 mL ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase dreimal mit je 10 mL Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockne am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2 /Methanol (30:1) als Laufmittel aufgereinigt.

Ausbeute: 517 mg (2.20 mmol, 51 %)

farbloser Feststoff

$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5 = 238.24\text{ g/mol}$

DC (CH_2Cl_2 /MeOH 9:1 v/v): R_f -Wert = 0.29



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.40-7.35 (m, 2 H, -CH Aryl); 7.10-7.05 (m, 2 H, -CH Aryl); 5.12 (dd, 1 H, $^3J = 8.5\text{ Hz}$, $^3J = 4.5\text{ Hz}$, H-3); 3.72 (s, 3 H, - CH_3); 2.78-2.68 (m, 2 H, $^2J = 16.8\text{ Hz}$, - CH_2); 2.28 (s, 3 H, O-CO- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 173.15 (C-1); 169.89 (O-CO- CH_3); 150.57 (Cq, Aryl, para); 140.44 (Cq, Aryl); 127.22, 126.94, 122.10, 121.99 (-CH Aryl); 70.24 (C-3); 52.36 (O- CH_3); 43.49 (C-2); 21.53 (O-CO- CH_3).

8.9.1.15 Versuche zur Darstellung von 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-hydroxy-methylpropionat (*para*-Acetoxy(α -methoxycarbonylmethyl)benzylalkohol) **60 ausgehend vom 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-oxo-methylpropionat **67****

mittels der Meerwein-Ponndorf-Verley-Reduktion:

Eine Reaktionsmischung aus 1.00 g (4.23 mmol) 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-oxo-methylpropionat **67** und 1.25 g (6.35 mmol, 1.50 Äquiv.) Aluminiumtriisopropylat in 20 mL trockenem *iso*-Propanol wurden 15 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand im Eisbad mit verd.

Salzsäure (0.1 M) hydrolysiert. Die Phasen wurden getrennt und die wäßrige mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-3%) aufgereinigt.

Als Produkt wurde 3-(4-Hydroxyphenyl)-3-oxo-methylpropionat **66** NMR-spektroskopisch nachgewiesen (8.9.1.12).

mittels *Saccharomyces cerevisiae*:

100 g Hefe (DHW) wurden in 600 mL dest. Wasser suspendiert und bei einer Wasserbadtemperatur von 30 °C mit 100 g (0.29 mmol) Saccharose versetzt. Anschließend wurde 1.00 g (4.23 mmol) 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-oxo-methylpropionat **67**, das sich nicht in Wasser löst hinzugegeben. Nach 24 h Rühren bei 30 °C wurden weitere 50.0 g Saccharose hinzugegeben und erneut 24 h gerührt. Die Hefe wurde über Celite abfiltriert und die wäßrige Phase mit Ethylacetat ausgeschüttelt und mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-4%) aufgereinigt.

Als Produkt wurde 3-(4-Hydroxyphenyl)-3-oxo-methylpropionat **66** NMR-spektroskopisch nachgewiesen (8.9.1.12).

mittels Wasserstoff und Palladium/Kohle:

Jeweils 120 mg (0.50 mmol) 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-oxo-methylpropionat **67** wurden in ca. 2 mL des entsprechenden Lösungsmittels (Ethanol, Ethylacetat, Dichlormethan) gelöst und 5.00 mg Palladium/Kohle (10%ig) mit leichtem H₂-Überdruck reduziert. Die Reaktionsdauer wurde variiert von 25 min bis zu 3 d. Der Reaktionsansatz wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0.5 %) aufgereinigt.

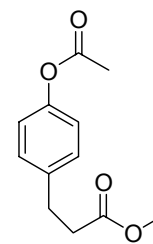
Als Produkt wurde 3-(4-Acetoxyphenyl)-methylpropionat **63a** NMR-spektroskopisch nachgewiesen.

Ausbeute: 52.0 mg (0.23 mmol, 47 %)

farbloser Feststoff

$C_{12}H_{14}O_4 = 222.24 \text{ g/mol}$

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v): R_F -Wert = 0.69



63a

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.25-7.20, 7.05-7.00 (je m, je 2 H, -CH Aryl); 3.68 (s, 3 H, -OCH₃); 2.95 (t, 2 H, $^3J = 7.8$, -CH₂a); 2.63 (t, 2 H, $^3J = 7.8$, -CH₂b); 2.29 (s, 3 H, -CH₃).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 173.61 (C=O); 170.03 (C=O, Acetoxy); 149.50 (Cq, Aryl, *para*); 138.49 (Cq, Aryl); 130.21, 129.69 (-CH, Aryl, *ortho*); 122.09, 121.96 (-CH, Aryl, *meta*); 52.06 (-OCH₃); 36.02 (C-2); 30.70 (C-3); 21.54 (-CH₃).

8.9.2 Synthese der Phosphoramidite

8.9.2.1 Darstellung von Dichlor-*N,N*-diisopropylphosphoramidit 68

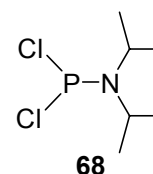
4.40 mL frisch destilliertes Phosphortrichlorid (50.0 mmol) wurden in 20 mL abs. Diethylether unter sehr starkem Rühren gelöst und auf $-10^\circ C$ abgekühlt. Der Reaktionsansatz wurde tropfenweise mit einer ebenfalls auf $-10^\circ C$ vorgekühlten Lösung aus *N,N*-Diisopropylamin (100 mmol, 14.2 mL) gelöst in 20 mL abs. Diethylether, versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 2.5 h bei $-10^\circ C$ gerührt.

Das ausgefallene *N,N*-Diisopropylammoniumchlorid wurde mittels einer Umkehrfritte abfiltriert und der Niederschlag dreimal mit je 10 mL abs. Diethylether gewaschen. Das Filtrat wurde im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingeeengt und das gelbliche Rohprodukt mittels Kugelrohrdestillation ($63^\circ C/9 \text{ torr}$) aufgereinigt.

Ausbeute: 9.40 g (46.5 mmol, 93%)

leicht gelbliche Flüssigkeit

$C_6H_{14}Cl_2NP = 201.02 \text{ g/mol}$



68

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = $\delta = 3.91$ -3.84 (m, 2 H, 2 x (CH₃)₂CH); 1.21 (d, 12 H, $^3J = 6.7 \text{ Hz}$, (CH₃)₂CH).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 38.21 ((CH₃)₂CH); 21.97 ((CH₃)₂CH).

^{31}P -NMR (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.83

8.9.2.2 Darstellung von Dichlor-*N,N*-diethylphosphoramidit 69

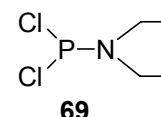
4.40 mL frisch destilliertes Phosphortrichlorid (6.90 g, 50.0 mmol) wurden in 20 mL abs. Diethylether unter sehr starkem Rühren gelöst und auf $-10\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Der Reaktionsansatz wurde tropfenweise mit einer ebenfalls auf $-10\text{ }^\circ\text{C}$ vorgekühlten Lösung aus *N,N*-Diethylamin (100 mmol, 12.5 mL, 7.30 g, 1.20 Äquiv.) gelöst in 20 mL abs. Diethylether, versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 2.5 h bei $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt.

Das ausgefallene *N,N*-Diethylammoniumchlorid wurde mittels einer Umkehrfritte abfiltriert und der Niederschlag dreimal mit je 10 mL abs. Diethylether gewaschen. Das Filtrat wurde im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Ausbeute: 4.02 g (23.1 mmol, 46%)

farblose Flüssigkeit

$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NP}$ = 172.99 g/mol



^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3.25 (q, 4 H, $^3J = 7.2$, 2 x $-\text{CH}_2$); 1.13 (t, 6H, $^3J = 7.2$, 2 x $-\text{CH}_3$).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 38.92 ($-\text{CH}_2$); 16.52 ($-\text{CH}_3$).

^{31}P -NMR (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 163.68

8.9.2.3 AAV 1 zur Darstellung der bis-(Benzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidite 50a, 57a, sowie 70a – 72a

Das entsprechende Benzylderivat **50**, **57**, **70** – **72** (2.00 mmol) und Triethylamin (2.00 mmol, 1.00 Äquiv.) wurden in 5 mL abs. Diethylether gelöst. Diese Lösung wurde tropfenweise innerhalb von 10 min zu einer auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlten Lösung aus Dichlorid-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **68** in 10 mL abs. Diethylether gegeben. Die Reaktionslösung wurde langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt und anschließend weitere 2 h gerührt. Das ausgefallene Triethylammoniumchlorid wurde abfiltriert und der Niederschlag zweimal mit je

5 mL abs. Diethylether gewaschen. Das Filtrat wurde im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit (*n*-Hexan/Ethylacetat/NEt₃, 7:3:1) aufgereinigt. Einige Phosphoramidite wurden auf Grund ihrer Instabilität ohne Aufreinigung eingesetzt.

8.9.2.3.1 Darstellung von bis-(Benzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **70a**

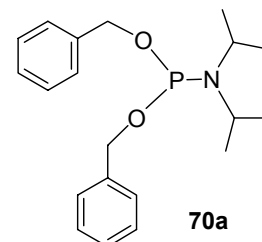
Die Darstellung erfolgte nach AAV 1. Der Benzylalkohol (220 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äquiv.) und das Triethylamin (310 µL, 2.00 mmol, 1.00 Äquiv.) wurden in 5 mL abs. Diethylether gelöst. Das Dichlor-*N,N*-diisopropylphosphoramidit (203 mg, 1.00 mmol, 0.50 Äquiv.) wurde in 10 mL abs. Diethylether gelöst. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit (*n*-Hexan/Ethylacetat/NEt₃, 7:3:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 138 mg (0.40 mmol, 40 %)

farbloses Öl

C₂₀H₂₈NO₂P = 345.42 g/mol

DC (*n*-Hexan/Ethylacetat/NEt₃, 7:3:1): R_F-Wert = 0.88



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.35-7.15 (m, 10 H, -CH Aryl); 4.70 (dd, 2 H, ²J = 12.6 Hz, ³J = 8.2 Hz, 2 x CHH-Ph); 4.62 (dd, 2 H, ²J = 12.6 Hz, ³J = 8.2 Hz, 2 x CHH-Ph); 3.70-3.60 (m, 2 H, 2 x (CH₃)₂CH); 1.12 (d, 12 H, ³J = 6.9 Hz, 2 x (CH₃)₂CH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 138.54, 138.46 (C_q Aryl); 127.67, 127.39, 127.19, 126.99, 126.71, 126.52, 126.40, 126.18, 125.95 (-CH Aryl); 64.44, 64.25 (²J_{CH₂,P} = 18.0 Hz, 2x CH₂-Ph); 42.13, 42.00 (²J_{CH,P} = 12.3 Hz, (CH₃)₂CH); 23.65, 23.58 (³J_{CH₃,P} = 7.2 Hz, (CH₃)₂CH).

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 148.91

8.9.2.3.2 Darstellung von (*R,R*)-bis-(α-Methylbenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **71a**

Die Darstellung erfolgte nach AAV 1. Der (*R*)-α-Methylbenzylalkohol **71** (483 µL, 4.00 mmol, 1.00 Äquiv.) und das Triethylamin (557 µL, 4.00 mmol, 1.00 Äquiv.) wurden in 9 mL abs. Diethylether gelöst. Das Dichlor-*N,N*-diisopropylphosphoramidit (405 mg, 2.00 mmol,

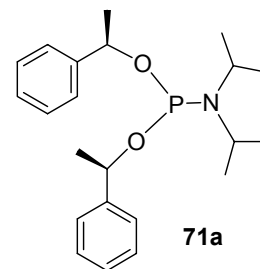
0.50 Äquiv.) wurde in 10 mL abs. Diethylether gelöst. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit (*n*-Hexan/Ethylacetat/NEt₃, 7:3:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 326 mg (0.87 mmol, 44 %)

leicht beiges Öl

C₂₂H₃₂NO₂P = 373.47 g/mol

DC (*n*-Hexan/Ethylacetat/NEt₃, 7:3:1): R_F-Wert = 0.73



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.35-7.20 (m, 10 H, -CH Aryl); 4.94-4.87 (m, 1 H, CH₃-CH-Ph(a)); 4.80-4.74 (m, 1 H, CH₃-CH-Ph(b)); 3.65-3.57 (m, 2 H, 2 x (CH₃)₂CH); 1.52 (d, 3 H, ³J = 6.6 Hz, CH₃-CH-Ph(a)); 1.39 (d, 3 H, ³J = 6.6 Hz, CH₃-CH-Ph(b)); 1.18 (d, 6 H, ³J = 6.7 Hz, (CH₃)₂CH(a)); 1.07 (d, 6 H; ³J = 6.9 Hz, (CH₃)₂CH(b)) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 139.23, 139.17 (C_q Aryl); 129.03, 128.59, 128.45, 127.61, 127.30, 126.35, 126.27, 126.23 (-CH Aryl); 73.59, 73.42 (²J_{CH,P} = 18.0 Hz, 2 x CH₃-CH-Ph); 43.51, 43.42 (²J_{CH,P} = 12.3 Hz, 2 x (CH₃)₂CH); 25.08, 25.00 (³J_{CH₃,P} = 7.0 Hz, 2 x CH₃-CH-Ph); 24.82, 24.71 (³J_{CH₃,P} = 7.2 Hz, 2 x (CH₃)₂-CH).

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 146.32

8.9.2.3.3 Darstellung von (*S,S*)-bis-(α-Methylbenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **72a**

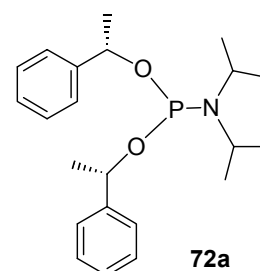
Die Darstellung erfolgte nach AAV 1. Der (*S,S*)-α-Methylbenzylalkohol **72** (483 μL, 4.00 mmol, 1.00 Äquiv.) und das Triethylamin (557 μL, 4.00 mmol, 1.00 Äquiv.) wurden in 10 mL abs. Diethylether gelöst. Das Dichlor-*N,N*-diisopropylphosphoramidit (405 mg, 2.00 mmol, 0.50 Äquiv.) wurde in 10 mL abs. Diethylether gelöst. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit (*n*-Hexan/Ethylacetat/NEt₃, 7:3:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 311 mg (0.83 mmol, 42 %)

leicht gelbliches Öl

C₂₂H₃₂NO₂P = 373.47 g/mol

DC (*n*-Hexan/Ethylacetat/NEt₃, 7:3:1): R_F-Wert = 0.71



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.40-7.16 (m, 10 H, -CH Aryl); 4.94-4.88 (m, 1 H, $\text{CH}_3\text{-CH-Ph(a)}$); 4.81-4.75 (m, 1 H, $\text{CH}_3\text{-CH-Ph(b)}$); 3.65-3.58 (m, 2 H, 2 x $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 1.52 (d, 3 H, $^3J = 6.6$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH-Ph(a)}$); 1.39 (d, 3 H, $^3J = 6.6$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH-Ph(b)}$); 1.18 (d, 6 H, $^3J = 6.7$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CH(a)}$); 1.08 (d, 6 H, $^3J = 6.9$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CH(b)}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 139.25, 139.19 (Cq Aryl); 128.99, 128.57, 128.39, 128.21, 127.58, 126.31, 126.29, 126.22, 126.19 (-CH Aryl); 73.49, 73.38 ($^2J_{\text{CH,P}} = 18.0$ Hz, 2 x $\text{CH}_3\text{-CH-Ph}$); 43.48, 43.42 ($^2J_{\text{CH,P}} = 12.3$ Hz, 2 x $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 25.05, 24.99 ($^3J_{\text{CH}_3,\text{P}} = 7.0$ Hz, 2 x $\text{CH}_3\text{-CH-Ph}$); 24.79, 24.68 ($^3J_{\text{CH}_3,\text{P}} = 7.2$ Hz, 2 x $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 146.32

8.9.2.3.4 Darstellung von bis-(4-Acetoxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **50a**

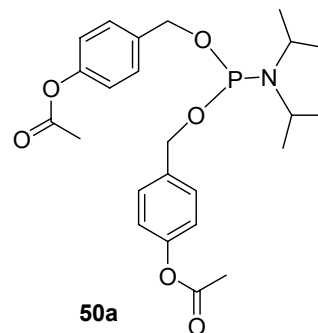
Die Darstellung erfolgte nach AAV 1. Der *para*-Acetoxybenzylalkohol **50** (200 mg, 1.20 mmol, 1.00 Äquiv.) und das Triethylamin (186 μL , 1.20 mmol, 1.00 Äquiv.) wurden in 2.00 mL abs. Diethylether gelöst. Das Dichlor-*N,N*-diisopropylphosphoramidit (121 mg, 0.60 mmol, 0.50 Äquiv.) wurde in 1.00 mL abs. Diethylether gelöst. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit (*n*-Hexan/Ethylacetat/ NEt_3 , 7:3:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 136 mg (0.45 mmol, 38 %)

farbloser Feststoff

$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{NO}_6\text{P} = 461.49$ g/mol

DC (*n*-Hexan/Ethylacetat/ NEt_3 , 7:3:1): R_f -Wert = 0.52



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.36-7.32 (m, 4 H, -CH Aryl *meta*); 7.05-7.01 (m, 4 H, -CH Aryl *ortho*); 4.76 (dd, 2 H, $^2J = 12.7$ Hz, $^3J = 8.2$ Hz, CHH-Ph); 4.68 (dd, 2H, $^2J = 12.7$ Hz, $^3J = 8.2$ Hz, CHH-Ph); 3.75-3.65 (m, 2 H, 2 x $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 2.30 (s, 6 H, 2 x O-CO- CH_3); 1.2 (d, 12 H, $^3J = 6.9$ Hz, 2 x $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 168.18 (O-CO- CH_3); 154.39 (Cq Aryl *para*); 131.81 (Cq Aryl); 128.41, 128.35, 128.09 (-CH Aryl *ortho*); 121.73, 121.52, 121.39, 121.32 (-CH Aryl *meta*); 64.79 ($^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 18.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$); 39.45 ($^3J_{\text{CH},\text{P}} = 12.3$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 25.54, 25.32 ($^3J_{\text{CH}_3,\text{P}} = 7.0$ Hz, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$); 21.63, 21.59 (O-CO- CH_3).

^{31}P -NMR (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 149.24

8.9.2.3.5 Darstellung von bis-(α -Methoxycarbonylmethylbenzyl)- N,N -diisopropylphosphoramidit **57a**

Der α -Methoxycarbonylmethylbenzylalkohol **57** (330 mg, 1.83 mmol, 1.00 Äquiv.) und das Triethylamin (280 μL , 2.00 mmol, 1.00 Äquiv.) wurden in 2.00 mL abs. Diethylether gelöst. Das Dichlorid- N,N -diisopropylphosphoramidit (158 mg, 0.91 mmol, 0.50 Äquiv.) wurde in 4.00 mL abs. Diethylether gelöst. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

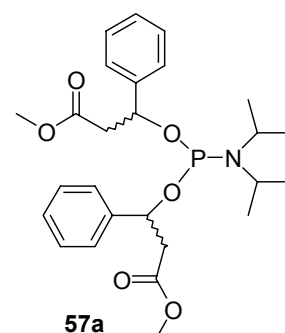
Ausbeute: 47.0 mg Rohprodukt

Diastereomerenverhältnis 1.0:1.0

$\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{NO}_6\text{P}$ = 489.54 g/mol

DC (n -Hexan/Ethylacetat/ NEt_3 , 7:3:1): R_F -Wert = 0.74

^{31}P -NMR (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 149.51, 149.31



8.9.2.4 Synthese der substituierten bis-(Benzyl)- N,N -diethylphosphoramidite **52b** und **60b**

8.9.2.4.1 Darstellung von bis-(2-Acetoxybenzyl)- N,N -diethylphosphoramidit **52b**

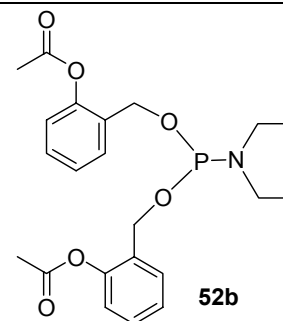
Eine Lösung von Dichlor- N,N -diethylphosphoramidit (121 mg, 0.60 mmol, 0.50 Äquiv) in 8 mL abs. THF wurde auf -30°C gekühlt und dann wurden 400 μL Triethylamin (2.60 mmol, 1.00 Äquiv.) hinzugegeben. Anschließend wurden 433 mg *ortho*-Acetoxybenzylalkohol **52** (2.60 mmol, 1.00 Äquiv.) gelöst in 16 mL abs. THF zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 3.5 h bei -30°C gerührt und nach dünnschicht-chromatographischer Kontrolle weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde durch Filtration des Triethylammoniumchlorids isoliert und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit (n -Hexan/Ethylacetat/ NEt_3 , 7:3:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 253 mg (0.58 mmol, 45 %)

farbloser Feststoff

$C_{22}H_{28}NO_6P = 433.43 \text{ g/mol}$

DC (*n*-Hexan/Ethylacetat/ NEt_3 , 7:3:1): R_f -Wert = 0.59



1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.36-7.32, 7.25-7.20, 7.10-7.01 (m, 8 H, -CH Aryl); 5.12 (q, 4 H, $^2J = 12.3 \text{ Hz}$, - CH_2 Benzyl); 3.34-3.26 (m, 4 H, N- CH_2); 2.04 (s, 6 H, - CH_3 Acetyl); 1.14 (t, 6 H, $^3J = 7.3 \text{ Hz}$, - CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167.93 (Cq Acetyl); 153.43 (Cq Aryl *ortho*); 130.62, 129.84 (-CH Aryl); 127.56 (Cq Aryl); 123.24, 119.47, 119.32 (-CH Aryl); 62.29 ($^2J_{CH_2,P} = 18.1 \text{ Hz}$, - CH_2); 38.72, 38.50 ($^2J_{CH_2,P} = 21.7 \text{ Hz}$, N- CH_2); 15.19, 15.15 (- CH_3 Acetyl); 11.56 ($^3J_{CH_3,P} = 7.3 \text{ Hz}$, - CH_3).

^{31}P -NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 142.11

8.9.2.4.2 Darstellung von bis-(α -Methoxycarbonylmethyl-4-acetoxybenzyl)-*N,N*-diethylphosphoramidit **60b**

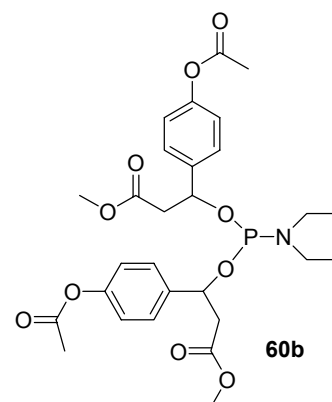
Eine Lösung von Dichlor-*N,N*-diethylphosphoramidit (82.0 μ L, 0.56 mmol) in 3 mL abs. Diethylether wurde auf $-30^\circ C$ gekühlt und dann wurden 170 μ L Triethylamin (1.23 mmol) hinzugegeben. Anschließend wurden 267 mg 3-(4-Acetoxyphenyl)-3-hydroxymethylpropionat **60** (1.12 mmol) gelöst in 10 mL abs. Diethylether zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 3.5 h bei $-30^\circ C$ gerührt und nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde durch Filtration des Triethylammoniumchlorids isoliert und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

Ausbeute: 305 mg Rohprodukt

Diastereomerenverhältnis 1.2:1.0:0.2

$C_{28}H_{36}NO_{10}P = 577.56 \text{ g/mol}$

DC (*n*-Hexan/Ethylacetat/ NEt_3 , 7:3:1): R_f -Wert = 0.52



^{31}P -NMR (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 151.02, 149.29, 149.05

8.9.2.5 AAV 2 zur Kupplung der Phosphoramidite 50a, 57a sowie 70a – 72a mit d4T 39

Eine Lösung aus d4T **39** (0.80 Äquiv.) und 1*H*-Tetrazol (2.50 Äquiv.) wurden in 10 mL abs. Acetonitril gelöst. Danach wurde das entsprechende Phosphoramidit (1.00 Äquiv.) hinzugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur 45 min gerührt. Nach dünnschichtschromatographischer Kontrolle ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) wurde das Reaktionsgemisch auf $-40\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt und mit *t*-Butylhydroperoxid (5-6 M Lösung in *n*-Decan, 2.00 Äquiv.) oxidiert. Nachdem der Ansatz langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 30 min gerührt worden war, wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Die meist leicht gelblichen Sirupe wurden säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2 :Methanol 30:1 aufgereinigt oder am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten.

8.9.2.5.1 Darstellung von bis-(Benzyl)-d4TMP 27

Nach AAV 2 wurden d4T **39** (41.3 mg, 0.18 mmol, 0.80 Äquiv.) und 1*H*-Tetrazol (38.5 mg, 0.55 mmol, 2.50 Äquiv.) in 1.50 mL abs. Acetonitril gelöst. Das *N,N*-Diisopropylphosphoramidit **70a** (77.0 mg, 0.21 mmol, 1.00 Äquiv.) gelöst in 5.50 mL Acetonitril, wurde anschließend langsam hinzugegeben. Nach dünnschichtschromatographischer Kontrolle ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) wurde das Reaktionsgemisch auf $-40\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt und mit *t*-Butylhydroperoxid (88.0 μL , 0.44 mmol, 2.00 Äquiv.) oxidiert. Die Aufreinigung erfolgte am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-1 %).

Ausbeute: 83.0 mg (0.14 mmol, 76 %), farblose Watte

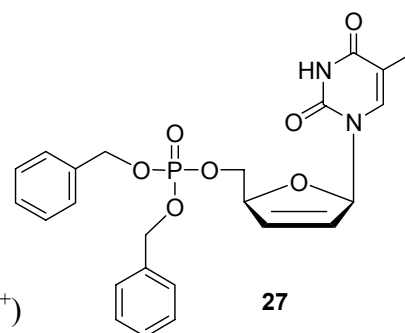
$\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}$ = 484.44 g/mol

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v): R_f -Wert = 0.59

HPLC: t_R = 20.04 min Gradient C

t_R = 13.31 min Gradient E

MS (ESI^+): m/z 485.2 ($\text{M}+\text{H}^+$), 507.2 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 523.1 ($\text{M}+\text{K}^+$)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ [ppm] = 8.11 (bs, 1 H, *NH* Thymin); 7.41-7.32 (m, 10 H, -*CH* Aryl); 7.29 (d, 1 H, $^4J = 1.1$ Hz, H-6 Thymin); 7.01 (ddd, 1 H, $^3J = 3.7$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, $^5J = 1.6$ Hz, H-1'); 6.19 (ddd, 1 H, $^3J = 6.0$ Hz, 1.6 Hz, $^4J = 1.8$ Hz, H-3'); 5.84 (ddd, 1 H, $^3J = 6.0$ Hz, 3.7 Hz, $^4J = 1.8$ Hz, H-2'); 5.11-5.01 (m, 4 H, 2 x CH_2 -Ph); 4.94-4.88 (m, 1 H, H-4'); 4.19 (ddd, 1 H, $^2J = 11.6$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, 2.6 Hz, H-5a'); 4.16 (ddd, 1 H, $^2J = 11.6$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, 2.8 Hz, H-5'b); 1.82 (d, 3 H, $^4J = 1.1$ Hz, H-7 Thymin).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 163.25 (C-4 Thymin); 152.91 (C-2 Thymin); 143.22 (Cq Aryl); 136.40 (C-3'); 133.37 (C-6 Thymin); 129.14, 128.55, 128.52 (-CH Aryl); 127.87 (C-2'); 111.39 (C-5 Thymin); 89.87 (C-4'); 84.53 (C-1'); 70.06 ($^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 4.6$ Hz, CH_2 -Ph); 67.42 ($^2J_{\text{C-5'},\text{P}} = 5.5$ Hz, C-5'); 12.56 (C-7 Thymin).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.79

8.9.2.5.2 Darstellung von bis-(2-Acetoxybenzyl)-d4TMP **31**

Nach AAV 2 wurden d4T **39** (152 mg, 0.68 mmol, 0.80 Äquiv.) und 1*H*-Tetrazol (148 mg, 2.11 mmol, 2.50 Äquiv.) in 2.50 mL abs. Acetonitril gelöst. Das *N,N*-Diethylphosphoramidit **52b** (368 mg, 0.84 mmol, 1.00 Äquiv.) gelöst in 5.50 mL Acetonitril, wurde anschließend langsam hinzuge tropft. Nach dünnschichtschromatographischer Kontrolle ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) wurde das Reaktionsgemisch auf -40 °C abgekühlt und mit *t*Butylhydroperoxid (1.00 mL, 5.80 mmol, 3.50 Äquiv.) oxidiert. Die Aufreinigung erfolgte am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-5%).

Ausbeute: 88.0 mg (0.15 mmol, 22 %), farblose Watte

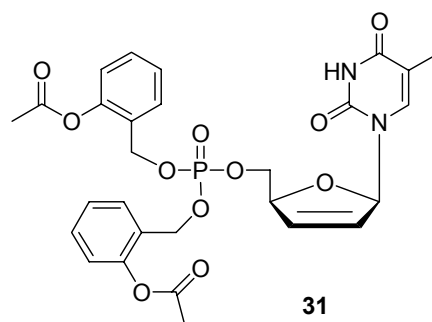
$\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{P} = 600.51$ g/mol

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v): R_f -Wert = 0.59

HPLC: $t_R = 19.24$ min Gradient C

$t_R = 12.96$ min Gradient E

MS (ESI^+): m/z 623.5 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 639.4 ($\text{M}+\text{K}^+$)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ [ppm] = 8.20 (bs, 1 H, *NH* Thymin); 7.41-7.19 (m, 9 H, H-6, -*CH* Aryl); 7.04 (ddd, 1 H, $^3J = 3.8$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, $^5J = 1.6$ Hz, H-1'); 6.36 (ddd, 1 H, $^3J = 6.1$ Hz, 1.8 Hz, $^4J = 1.6$ Hz, H-3'); 5.95 (ddd, 1 H, $^3J = 6.1$ Hz, 3.8 Hz, $^4J = 1.7$ Hz, H-2');

5.16-5.11 (m, 4 H, 2 x -CH₂ Benzyl); 5.09-5.05 (m, 1 H, H-4'); 4.57-4.48 (m, 2 H, H-5'a, H-5'b); 2.06, 2.04 (je s, je 3 H, 2 x -CH₃ Acetyl); 1.76 (d, 3H, ⁴J = 1.0 Hz, H-7 Thymin).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.11 (Cq Acetyl); 164.25 (C-4 Thymin); 152.34 (C-2 Thymin); 149.21 (Cq Aryl *ortho*); 136.09 (C-3'); 133.19 (C-6 Thymin); 134.21 (Cq Aryl); 131.09, 130.87, 130.40, 130.16, 128.31, 126.44, 126.39 (-CH Aryl); 120.33, 120.56 (C-2'); 112.32 (C-5 Thymin); 90.15 (C-1'); 84.67 (³J_{C4',P} = 8.7 Hz, C-4'); 69.53, 69.46 (²J_{CH2,P} = 7.0 Hz, 2 x -CH₂ Benzyl); 61.30 (²J_{C-5,P} = 5.5 Hz, C-5'); 21.25, 21.22 (2 x -CH₃ Acetyl); 12.49 (C-7 Thymin).

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -11.18

8.9.2.5.3 Darstellung von bis-(4-Acetoxybenzyl)-d4TMP **30**

Nach AAV 2 wurden d4T **39** (86.0 mg, 0.38 mmol, 0.80 Äquiv.) und 1*H*-Tetrazol (80.0 mg, 1.14 mmol, 2.50 Äquiv.) in 1.50 mL abs. Acetonitril gelöst. Das *N,N*-Diisopropylphosphoramidit **50a** (368 mg, 0.84 mmol, 1.00 Äquiv.) gelöst in 1.00 mL Acetonitril, wurde anschließend langsam hinzuge tropft. Nach dünnschichtschromatographischer Kontrolle (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) wurde das Reaktionsgemisch auf -40 °C abgekühlt und mit *t*Butylhydroperoxid (183 µL, 0.92 mmol, 2.00 Äquiv.) oxidiert. Die Aufreinigung erfolgte zuerst am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-1%) und anschließend wurde semipräparativ an der HPLC mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (32:68 v/v) aufgereinigt.

Ausbeute: 80.0 mg (0.19 mmol, 42 %), farblose Watte

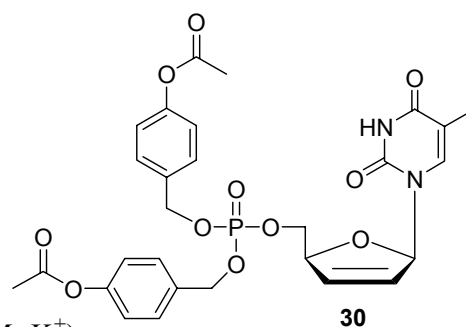
C₂₈H₂₉N₂O₁₁P = 600.51 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v): R_F-Wert = 0.55

HPLC: t_R = 19.31 min Gradient C

t_R = 12.69 min Gradient E

MS (ESI⁺): m/z 601.3 (M+H⁺), 623.1 (M+Na⁺), 639.2 (M+K⁺)



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.06 (bs, 1 H, NH Thymin); 7.39-7.37 (m, 4 H, -CH Aryl *ortho*); 7.21 (d, 1 H, ⁴J = 1.0 Hz, H-6 Thymin); 7.10-7.03 (m, 4 H, -CH Aryl *meta*); 6.97 (ddd, 1 H, ³J = 3.8 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, ⁵J = 1.6 Hz, H-1'); 6.18 (ddd, 1 H, ³J = 6.1 Hz, 1.8 Hz, ⁴J

= 1.6 Hz, H-3'); 5.81 (ddd, 1 H, $^3J = 6.1$ Hz, 3.8 Hz, $^4J = 1.7$ Hz, H-2'); 5.09-4.95 (m, 4H, 2 x CH₂-Ph); 4.93-4.86 (m, 1 H, H-4'); 4.15 (ddd, 1 H, $^2J = 11.6$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, 2.9 Hz, H-5'a); 4.13 (ddd, 1 H, $^2J = 11.6$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, 3.1 Hz, H-5'b); 2.30 (s, 6 H, 2 x O-CO-CH₃); 1.82 (d, 3 H, $^4J = 1.0$ Hz, H-7 Thymin).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.82, 169.79 (2 x O-CO-CH₃); 163.91 (C-4 Thymin); 151.41 (C-2 Thymin); 151.13, 151.09 (2 x Cq Aryl *para*); 136.36 (C-6 Thymin); 135.92 (C-3'); 133.45, 133.34 (Cq Aryl); 129.91, 129.85, 129.80, 129.73 (-CH Aryl); 127.90 (C-2'); 122.89, 122.63, 122.44, 122.41 (-CH Aryl); 111.54 (C-5 Thymin); 89.89 (C-4'); 84.77 (C-1'); 69.42, 69.34 ($^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 5.9$ Hz, 2 x CH₂-Ph); 67.89 ($^2J_{\text{C-5},\text{P}} = 5.7$ Hz, C-5'); 21.59, 21.52 (2 x O-CO-CH₃); 12.66 (C-7 Thymin).

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.69

8.9.2.5.4 Darstellung von (*R,R*)-bis-(α-Methylbenzyl)-d4TMP **25**

Nach AAV 2 wurden d4T **39** (135 mg, 0.33 mmol, 0.80 Äquiv.) und 1*H*-Tetrazol (131 mg, 1.87 mmol, 2.50 Äquiv.) in 1.50 mL abs. Acetonitril gelöst. Das *N,N*-Diisopropylphosphoramidit **71a** (360 mg, 0.75 mmol, 1.00 Äquiv.) gelöst in 2.50 mL Acetonitril, wurde anschließend langsam hinzuge tropft. Nach dünnschichtschromatographischer Kontrolle (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) wurde das Reaktionsgemisch auf -40 °C abgekühlt und mit *t*Butylhydroperoxid (300 µL, 1.50 mmol, 2.00 Äquiv.) oxidiert. Die Aufreinigung erfolgte am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-1%).

Ausbeute: 117 mg (0.23 mmol, 69 %), farblose Watte

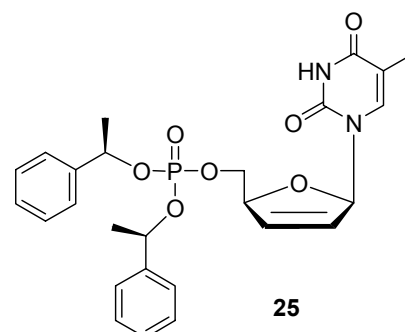
C₂₆H₂₉N₂O₇P = 512.49 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v): R_F-Wert = 0.77

HPLC: t_R = 20.23 min Gradient C

t_R = 14.29 min Gradient E

MS (ESI⁺): m/z 713.5 (M+H⁺), 735.5 (M+Na⁺), 751.4 (M+K⁺)



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.46 (s, 1 H, NH Thymin); 7.28-7.09 (m, 10 H, -CH Aryl); 7.07 (d, 1 H, $^4J = 1.2$ Hz, H-6 Thymin); 6.82 (ddd, 1 H, $^3J = 3.7$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, $^5J =$

1.6 Hz, H-1'); 6.02 (ddd, 1 H, $^3J = 6.0$ Hz, 1.6 Hz, $^4J = 1.8$ Hz, H-3'); 5.57 (ddd, 1 H, $^3J = 6.0$ Hz, 3.7 Hz, $^4J = 1.8$ Hz, H-2'); 5.39 (dq, 1 H, $^3J = 6.9$ Hz, 6.6 Hz, CH₃-CH-Ph(a)); 5.27 (dq, 1 H, $^3J = 6.9$ Hz, 6.6 Hz, CH₃-CH-Ph(b)); 4.70 (m, 1 H, H-4'); 3.99 (ddd, 1 H, $^2J = 11.3$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz, 3.1 Hz, H-5'a); 3.84 (ddd, 1 H, $^2J = 11.3$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz, 2.5 Hz, H-5'b); 1.71 (d, 3 H, $^4J = 1.2$ Hz, H-7 Thymin); 1.55 (d, 3 H, $^3J = 6.9$ Hz, CH₃-CH-Ph(a)); 1.31 (d, 3 H, $^3J = 6.9$ Hz, CH₃-CH-Ph(b)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 164.18 (C-4 Thymin); 151.15 (C-2 Thymin); 141.52, 141.49 (Cq Aryl); 136.48 (C-3'); 133.24 (C-6 Thymin); 128.98, 128.92, 127.83, 127.43, 126.39, 126.30 (C-2', -CH Aryl); 111.59 (C-5 Thymin); 89.76 (C-4'); 84.85 (C-1'); 77.09, 77.07 (2 x CH₃-CH-Ph); 67.50 ($^2J_{C-5',P} = 5.8$ Hz, C-5'); 24.55, 24.07 ($^3J_{CH_3,P} = 5.6$ Hz, 2 x CH₃-CH-Ph); 12.61 (C-7 Thymin).

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = - 1.17

8.9.2.5.5 Darstellung von (*S,S*)-bis-(α -Methylbenzyl)-d4TMP **26**

Nach AAV 2 wurden d4T **39** (135 mg, 0.33 mmol, 0.80 Äquiv.) und 1*H*-Tetrazol (131 mg, 1.87 mmol, 2.50 Äquiv.) in 1.50 mL abs. Acetonitril gelöst. Das *N,N*-Diisopropylphosphoramidit **72a** (360 mg, 0.75 mmol, 1.00 Äquiv.) gelöst in 2.50 mL Acetonitril, wurde anschließend langsam hinzuge tropft. Nach dünnschichtschromatographischer Kontrolle (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) wurde das Reaktionsgemisch auf -40 °C abgekühlt und mit *t*Butylhydroperoxid (300 μ L, 1.50 mmol, 2.00 Äquiv.) oxidiert. Die Aufreinigung erfolgte am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-1%).

Ausbeute: 51.0 mg (0.10 mmol, 30 %), farblose Watte

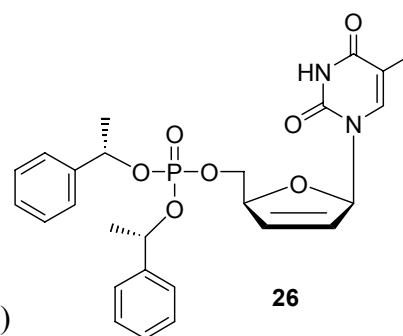
C₂₆H₂₉N₂O₇P = 512.49 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v): R_F-Wert = 0.78

HPLC: t_R = 21.44 min Gradient C

t_R = 14.35 min Gradient E

MS (ESI⁺): m/z 713.5 (M+H⁺), 735.5 (M+Na⁺), 751.4 (M+K⁺)



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.03 (s, 1H, NH Thymin); 7.32-7.13 (m, 10 H, -CH Aryl); 7.10 (d, 1 H, $^4J = 1.2$ Hz, H-6 Thymin); 6.91 (ddd, 1 H, $^3J = 3.7$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, $^5J =$

1.6 Hz, H-1'); 5.93 (ddd, 1 H, $^3J = 6.0$ Hz, 1.6 Hz, $^4J = 1.8$ Hz, H-3'); 5.78 (ddd, 1 H, $^3J = 6.0$ Hz, 3.7 Hz, $^4J = 1.8$ Hz, H-2'); 5.43 (dq, 1 H, $^3J = 6.9$ Hz, 6.6 Hz, CH₃-CH-Ph(a)); 5.31 (dq, 1 H, $^3J = 6.9$ Hz, 6.6 Hz, CH₃-CH-Ph(b)); 4.70 (m, 1 H, H-4'); 3.89 (m, 2 H, H-5'a, H-5'b); 1.84 (d, 3 H, $^4J = 1.2$ Hz, H-7 Thymin); 1.61 (d, 3 H, $^3J = 6.9$ Hz, CH₃-CH-Ph(a)); 1.38 (d, 3 H, $^3J = 6.9$ Hz, CH₃-CH-Ph(b)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 165.20 (C-4 Thymin); 151.34 (C-2 Thymin); 141.73, 141.68 (Cq Aryl); 136.69 (C-3'); 133.47 (C-6 Thymin); 129.13, 129.05, 128.03, 127.65, 126.61, 126.50 (C-2', -CH Aryl); 111.81 (C-5 Thymin); 89.99 (C-4'); 85.05 (C-1'); 77.28, 77.23 (2 x CH₃-CH-Ph); 67.71 ($^2J_{C-5',P} = 5.8$ Hz, C-5'); 24.76, 24.28 ($^3J_{CH_3,P} = 5.6$ Hz, 2 x CH₃-CH-Ph); 12.82 (C-7 Thymin).

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = - 1.36

8.9.2.5.6 Darstellung von bis-(α-Methoxycarbonylmethylbenzyl)-d4TMP **28**

Nach AAV 2 wurden d4T **39** (17.8 mg, 0.08 mmol, 0.80 Äquiv.) und 1*H*-Tetrazol (16.3 mg, 0.23 mmol, 2.50 Äquiv.) in 0.50 mL abs. Acetonitril gelöst. Das *N,N*-Diisopropylphosphoramidit **57a** (47.0 mg, 0.10 mmol, 1.00 Äquiv.) gelöst in 2.50 mL Acetonitril, wurde anschließend langsam hinzuge tropft. Nach dünnschichtschromatographischer Kontrolle (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) wurde das Reaktionsgemisch auf -40 °C abgekühlt und mit *t*Butylhydroperoxid (38.0 µL, 1.90 mmol, 2.00 Äquiv.) oxidiert. Die Aufreinigung erfolgte am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-1%) und anschließend wurde semipräparativ an der HPLC mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (37:63 v/v) aufgereinigt.

Ausbeute: 27.0 mg (0.04 mmol, 55 %), farblose Watte
im Diastereomerenverhältnis 1:0.6:1:0.3

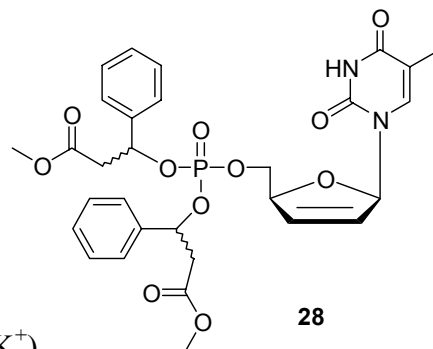
C₃₀H₃₃N₂O₁₁P = 628.56 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v): R_F-Wert = 0.55

HPLC: t_R = 20.24 min Gradient C

t_R = 13.79 min Gradient E

MS (ESI⁺): m/z 629.2 (M+H⁺), 651.2 (M+Na⁺), 676.2 (M+K⁺)



Slow:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.00 (s, 1 H, -NH Thymin); 7.85 (s, 1 H, -NH Thymin); 7.36-7.23 (m, 20 H, -CH Aryl); 7.21 (d, 1 H, $^4J=1.3$ Hz, H-6 Thymin); 7.15 (d, 1 H, $^4J=1.3$ Hz, H-6 Thymin); 6.99 (ddd, 1 H; $^4J=1.9$ Hz, $^5J=1.7$ Hz, $^3J=3.8$ Hz, H-1'); 6.95 (ddd, 1 H; $^4J=1.9$ Hz, $^5J=1.7$ Hz, $^3J=3.8$ Hz, H-1'); 6.25 (ddd, 1 H; $^3J=4.1$ Hz, $^4J=1.7$ Hz, $^3J=1.7$ Hz, H-3'); 5.92 (ddd, 1 H; $^3J=4.1$ Hz, $^4J=1.7$ Hz, $^3J=1.7$ Hz, H-3'); 5.84 (ddd, 1 H; $^3J=6.09$ Hz, $^4J=1.6$ Hz, $^3J=1.9$ Hz, H-2'); 5.76 (m, 1 H, H-2'); 5.64-5.55 (m, 4 H, 2x -CHa, 2x -CHb); 4.88 (m, 1 H, H-4'); 4.71 (m, 1 H, H-4'); 4.16 (ddd, 1 H; $^2J=11.4$ Hz, $^3J=6.0$ Hz, H-5'a); 4.08 (ddd, 1 H; $^2J=11.4$ Hz, $^3J=5.0$ Hz, H-5'b); 3.85 (ddd, 2 H; $^2J=11.3$ Hz, $^3J=5.4$ Hz, H-5'a', H-5'b'); 3.64 (s, 3 H, -OCH₃a'); 3.62 (s, 3 H, -OCH₃a); 3.60 (s, 3 H, -OCH₃b); 3.59 (s, 3 H, -OCH₃b'); 3.06 (dd, 2 H; $^2J=15.8$ Hz, $^3J=7.9$ Hz, -CH₂); 2.90 (dd, 2 H; $^2J=15.8$ Hz, $^3J=7.9$ Hz, -CH₂); 2.83-2.76 (m, 2 H, -CH₂); 2.67 (ddd, 2 H; $^2J=15.8$ Hz, $^3J=6.3$ Hz, -CH₂); 1.88 (d, 3 H, $^3J=1.3$ Hz, H-7a Thymin); 1.84 (d, 3 H, $^3J=1.3$ Hz, H-7b Thymin).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 171.59 (4x C=O); 164.51 (2x C-4 Thymin); 151.81 (2x C-2 Thymin); 151.73, 151.37 (4x Cq Aryl); 135.99, 133.65 (2x C-6 Thymin); 129.23, 129.13, 129.07, 129.03, 127.03, 126.77 (2x C-2', 2x C-3', 10x -CH Aryl); 111.99 (2x C-5 Thymin); 89.95 (2x C-4'); 84.75 (2x C-1'); 76.85, 76.80 (4x CH₂-CH-Ph); 68.01 (2x C-5'); 52.33, 52.27 (4x CO-O-CH₃); 42.96, 42.89 (4x CH₂-CH-Ph); 12.71 (2x C-7 Thymin).

Fast:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.00 (br. s, 2 H, -NH Thymin); 7.39-7.20 (m, 20 H, -CH Aryl); 7.08 (d, 1 H, $^4J=1.3$ Hz, H-6 Thymin); 7.11 (d, 1 H, $^4J=1.3$ Hz, H-6 Thymin); 6.91 (ddd, 1 H; $^4J=1.7$ Hz, $^3J=3.8$ Hz, H-1'); 6.87 (ddd, 1 H; $^4J=1.9$ Hz, $^3J=3.8$ Hz, H-1'); 6.01 (ddd, 1 H; $^3J=6.0$ Hz, $^3J=1.7$ Hz, H-3'); 5.81-5.73 (m, 5 H, H-3', 4x -CH); 5.66 (ddd, 1 H; $^3J=6.0$ Hz, $^4J=1.6$ Hz, $^3J=1.9$ Hz, H-2'); 5.61 (ddd, 1 H; $^3J=5.4$ Hz, $^4J=1.7$ Hz, H-2'); 4.77 (m, 1 H, H-4'); 4.66 (m, 1 H, H-4'); 4.06 (ddd, 1 H; $^2J=11.0$ Hz, $^3J=5.4$ Hz, H-5'a); 3.92 (ddd, 1 H; $^2J=11.4$ Hz, $^3J=5.4$ Hz, H-5'b); 3.82 (ddd, 1 H; $^2J=14.0$ Hz, $^3J=6.0$ Hz, H-5'a'); 3.76 (ddd, 1 H; $^2J=14.0$ Hz, $^3J=6.0$ Hz, H-5'b'); 3.68 (s, 3 H, -OCH₃a); 3.67 (s, 3 H, -OCH₃a'); 3.66 (s, 3 H, -OCH₃b); 3.63 (s, 3 H, -OCH₃b'); 3.06-2.98 (m, 4 H; $^2J=15.8$ Hz, 2x -CH₂); 2.84-2.72 (m, 4 H, 2x -CH₂); 1.81 (d, 3 H, $^3J=0.9$ Hz, H-7a Thymin); 1.79 (d, 3 H, $^3J=1.3$ Hz, H-7b Thymin).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.99 (4x C=O); 164.12 (2x C-4 Thymin); 151.39 (2x C-2 Thymin); 151.32 (4x Cq Aryl); 136.41 (2x C-6 Thymin); 129.42, 129.20, 129.12, 129.06, 127.54, 127.02, 126.91, 126.84 (2x C-2', 2x C-3', 10x -CH Aryl); 111.45 (2x C-5 Thymin); 89.46 (2x C-4'); 84.23 (2x C-1'); 76.45, 76.39 (4x $\text{CH}_2\text{-CH-Ph}$); 67.73 (2x C-5'); 52.32, 52.27 (4x CO-O-CH_3); 42.56, 42.49 (4x $\text{CH}_2\text{-CH-Ph}$); 12.56 (2x C-7 Thymin).

Slow / Fast

^{31}P -NMR (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -2.21, -2.19, -1.87, -1.86

8.9.2.5.7 Darstellung von bis-[4-Acetoxybenzyl-(α -methoxycarbonylmethyl)]-d4TMP **29**

Das Rohprodukt von *N,N*-Diethylphosphoramidit **60b** (0.56 mmol) wurde in 3 mL abs. Acetonitril gelöst und hinzu wurde eine Lösung von 52.0 mg d4T **39** (0.24 mmol) gelöst in 1.5 mL abs. Acetonitril, gegeben. Anschließend wurde 1*H*-Tetrazol (49.0 mg, 700 mmol), gelöst in 1 mL abs. Acetonitril, zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde auf ca. 4 mL im Ölpumpenvakuum eingengt und für 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtschromatographisch verfolgt. Dann wurde das Reaktionsgemisch auf $-30\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt und mit *t*-Butylhydroperoxid (111 μL , 0.28 mmol) oxidiert. Anschließend wurde der Ansatz 1 h bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Abschließend wurde das Rohprodukt bis zur Trockne im Ölpumpenvakuum eingengt. Die Aufreinigung erfolgte am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-1%) und anschließend wurde semipräparativ an der HPLC mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (34,66 v/v) aufgereinigt.

Bei der Zugabe der Reagenzien ist die Reihenfolge einzuhalten.

Ausbeute: 53.0 mg (0.12 mmol, 32 %), farblose Watte

im Diastereomerenverhältnis 1:0.6:0.6:0.5

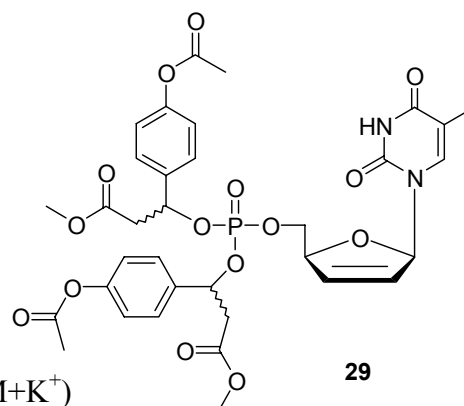
$\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_{15}\text{P} = 744.64\text{ g/mol}$

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v): R_f -Wert = 0.79

HPLC: $t_R = 19.97\text{ min}$ Gradient C

$t_R = 13.25\text{ min}$ Gradient E

MS (ESI^+): m/z 745.6 ($\text{M}+\text{H}^+$), 767.3 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 783.2 ($\text{M}+\text{K}^+$)



Slow:

$^1\text{H-NMR}$ [ein Diastereomer] (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.45 (s, 1 H, NH Thymin); 7.32-7.35 (m, 2 H, $-\text{CH}$ Aryl); 7.28-7.25 (m, 2 H, $-\text{CH}$ Aryl); 7.19 (d, 1 H, $^4J = 1.0$ Hz, H-6 Thymin); 7.08-7.02 (m, 4 H, $-\text{CH}$ Aryl); 6.92 (ddd, 1 H, $^3J = 3.8$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, $^5J = 1.6$ Hz, H-1'); 5.97 (ddd, 1 H, $^3J = 6.1$ Hz, 1.8 Hz, $^4J = 1.6$ Hz, H-3'); 5.77 (ddd, 1 H, $^3J = 6.1$ Hz, 3.8 Hz, $^4J = 1.7$ Hz, H-2'); 5.72 (ddd, 1 H, $^3J = 7.4$ Hz, 7.0 Hz, 6.8 Hz, CH-Ph(a)); 5.61 (ddd, 1 H, $^3J = 7.4$ Hz, 7.0 Hz, 6.8 Hz, CH-Ph(b)); 4.73-4.68 (m, 1 H, H-4'); 3.83 (ddd, 1 H, $^2J = 11.6$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, 3.3 Hz, H-5'a); 3.79 (ddd, 1 H, $^2J = 11.6$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, 3.3 Hz, H-5'b); 3.61 (s, 3 H, $\text{O-CH}_3\text{(a)}$); 3.60 (s, 3 H, $\text{O-CH}_3\text{(b)}$); 3.03 (dd, 1 H, $^2J = 16.0$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, CHH(a)); 2.84 (dd, 1 H, $^2J = 16.0$ Hz, $^3J = 6.8$ Hz, CHH(a)); 2.76 (ddd, 1 H, $^2J = 16.0$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, CHH(b)); 2.64 (ddd, 1 H, $^2J = 16.0$ Hz, $^3J = 6.8$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, CHH(b)); 2.29 (s, 3 H, $\text{O-CO-CH}_3\text{(a)}$); 2.28 (s, 3 H, $\text{O-CO-CH}_3\text{(b)}$); 1.87 (d, 3 H, $^4J = 1.0$ Hz, H-7 Thymin).

$^{13}\text{C-NMR}$ [ein Diastereomer] (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 169.90, 169.86 (2 x CO-O-CH_3); 169.71, 169.65 (2 x O-CO-CH_3); 163.99 (C-4 Thymin); 151.49 (C-2 Thymin); 151.41, 151.06 (Cq Aryl *para*); 136.52, 136.38 (Cq Aryl); 136.34 (C-3'); 133.48 (C-6 Thymin); 128.33, 128.18, 128.06, 127.98 ($-\text{CH}$ Aryl *ortho*); 127.59 (C-2'); 127.34, 127.25 ($-\text{CH}$ Aryl *ortho*); 122.47, 122.33 ($-\text{CH}$ Aryl *meta*); 111.77 (C-5 Thymin); 89.95 (C-4'); 84.75 (C-1'); 76.85, 76.80 ($^2J_{\text{CH,P}} = 4.6$ Hz, 2 x $\text{CH}_2\text{-CH-Ph}$); 68.01 ($^2J_{\text{C-5',P}} = 6.0$ Hz, C-5'); 52.38, 52.31 (2 x CO-O-CH_3); 42.96, 42.89 ($^3J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 8.3$ Hz, 2 x $\text{CH}_2\text{-CH-Ph}$); 21.54, 21.51 (2 x O-CO-CH_3); 12.66 (C-7 Thymin).

Fast:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.02 (s, 2 H, NH Thymin); 7.43-7.33 (m, 4 H, $-\text{CH}$ Aryl); 7.28-7.25 (m, 4 H, $-\text{CH}$ Aryl); 7.17 (d, 1 H, $^4J = 1.8$ Hz, H-6 Thymin); 7.12-7.08 (m, 4 H, $-\text{CH}$ Aryl); 7.07 (d, 3 H, $^4J = 1.8$ Hz, H-6 Thymin'); 7.05-7.00 (m, 4 H, $-\text{CH}$ Aryl); 6.91 (ddd, 1 H, $^3J = 3.8$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, $^5J = 1.6$ Hz, H-1'); 6.87 (ddd, 1 H, $^3J = 3.8$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, $^5J = 1.6$ Hz, H-1'); 6.03 (m, 1 H, H-3'); 5.85 (m, 1 H, H-3'); 5.80-5.70 (m, 2 H, 2x H-2'); 5.67-5.50 (m, 4 H, CH-Ph(a) , CH-Ph(b) , CH-Ph(a') , CH-Ph(b')); 4.73-4.68 (m, 1 H, H-4'); 3.75 (m, 4 H, H-5'a, H-5'b, H-5'a', H-5'b'); 3.68 (s, 3 H, $\text{O-CH}_3\text{(a)}$); 3.67 (s, 3 H, $\text{O-CH}_3\text{(b)}$); 3.66 (s, 3 H, $\text{O-CH}_3\text{(a')}$); 3.63 (s, 3 H, $\text{O-CH}_3\text{(b')}$); 3.05 (dd, 1 H, $^2J = 16.4$ Hz, $^3J = 8.2$ Hz, CHH(a) , CHH(a)); 3.02 (dd, 1 H, $^2J = 16.4$ Hz, $^3J = 8.2$ Hz, CHH(a')); 2.64 (dd, 1 H, $^2J = 16.4$ Hz, $^3J = 8.2$ Hz, CHH(b) , CHH(b) , CHH(b') , CHH(b')); 2.90-2.60 (m, 4 H, CHH(b) , CHH(b) , CHH(b') , CHH(b'));

2.31 (s, 3 H, O-CO-CH₃(a)); 2.30 (s, 3 H, O-CO-CH₃(b); 2.29 (s, 3 H, O-CO-CH₃(a')); 2.28 (s, 3 H, O-CO-CH₃(b')); 1.84 (d, 3 H, ⁴J = 1.3 Hz, H-7' Thymin); 1.83 (d, 3 H, ⁴J = 1.3 Hz, H-7 Thymin).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.21, 169.98, 169.96 (4x CO-O-CH₃); 169.80, 169.74 (4x O-CO-CH₃); 164.08 (2x C-4 Thymin); 151.57 (2x C-2 Thymin); 151.50, 151.16 (4x Cq Aryl *para*); 136.64, 136.47 (4x Cq Aryl); 136.45 (2x C-3'); 133.48 (2x C-6 Thymin); 128.82, 128.78, 128.76, 128.28, 127.91 (-CH Aryl *ortho*); 127.65, 127.58 (2x C-2'); 127.89, 127.82, 127.66 (-CH Aryl *ortho*); 122.67, 122.63, 122.61 (-CH Aryl *meta*); 110.63 (2x C-5 Thymin); 89.92, 89.89 (2x C-4'); 85.06, 85.04 (2x C-1'); 76.93, 76.90, 76.88 (²J_{CH,P} = 4.6 Hz, 4x CH₂-CH-Ph); 68.52 (²J_{C-5',P} = 6.0 Hz, C-5'); 52.46, 52.40 (4x CO-O-CH₃); 42.99, 42.91 (³J_{CH₂,P} = 8.3 Hz, 4x CH₂-CH-Ph); 21.59, 21.58 (4x O-CO-CH₃); 12.75 (2x C-7 Thymin).

Slow / Fast

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -1.77, -1.81, -2.06, -2.36

*Zweiter Teil**8.10 Synthese der Monosaccharidmonophosphat-Triester***8.10.1 Synthese der Glycosylpyranosen****8.10.1.1 Darstellung von 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-mannopyranosid **76****

1.00 g D-Mannose **74** (5.55 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde langsam in kleinen Portionen zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus 12 mL abs. Pyridin und 8.30 mL Essigsäureanhydrid (9.04 g, 88.0 mmol, 3.00 Äquiv. pro OH-Gruppe) gegeben. Die Lösung wurde 2 h bei 0 °C gerührt und anschließend weitere 18 h bei Raumtemperatur. Danach wurde mehrmals mit Toluol codestilliert, bis kein Pyridingeruch mehr vorhanden war. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und gründlich mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Petrolether/Ethylacetat (10:1) als Laufmittel aufgereingt.

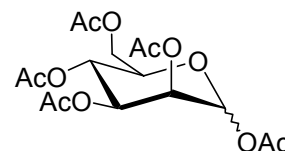
Ausbeute: 2.10 g (5.30 mmol, 98 %); farbloser Sirup

Anomerenverhältnis ($\alpha/\beta \approx 7:1$)

$C_{16}H_{22}O_{11}$: 390.34 g/mol

DC (Pentan/EE 2:1 v/v): R_f -Wert = 0.77

$[\alpha]_D^{20} = +0.47^\circ$ (c = 1.0, $CHCl_3$)

**76**

α - 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.09 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 2.0$ Hz, H-1); 5.37-5.33 (m, 2 H, $^3J_{4,5} = 9.9$ Hz, H-3, H-4); 5.27 (vt, 1H, $^3J_{2,3} = 2.5$ Hz, H-2); 4.28 (dd, 1 H, $^3J_{5,6a} = 2.1$ Hz, H-6a); 4.11 (dd, 1 H, $^3J_{5,6b} = 4.3$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, H-6b); 4.05 (ddd, 1 H, H-5); 2.19, 2.17, 2.10, 2.06, 2.01 (je s, je 3 H, $-CH_3$ Acetyl).

α - ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 171.01, 170.57, 170.36, 169.36, 168.75 (C=O Acetyl); 90.99 (C-1); 73.67 (C-5); 69.13 (C-3); 68.73 (C-2); 65.94 (C-4); 62.46 (C-6); 21.82, 21.13, 21.07, 21.00, 20.90 ($-CH_3$ Acetyl).

8.10.1.2 Darstellung von 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-glucopyranosid **77**

1.00 g D-Glucose **75** (5.55 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde langsam in kleinen Portionen zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus 12 mL abs. Pyridin und 8.30 mL Essigsäureanhydrid (9.04 g, 88.0 mmol, 3.00 Äquiv. pro OH-Gruppe) gegeben. Die Lösung wurde 2 h bei 0 °C gerührt und anschließend weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde mehrmals mit Toluol codestilliert, bis kein Pyridingeruch mehr vorhanden war. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und gründlich mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch mit Petrolether/Ethylacetat (10:1) als Laufmittel aufgereinigt.

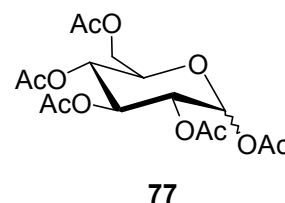
Ausbeute: 2.08 g (5.30 mmol, 96 %); farbloser Sirup

Anomerenverhältnis ($\alpha/\beta \approx 7:1$)

$C_{16}H_{22}O_{11}$: 390.34 g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v): R_F -Wert = 0.75

$[\alpha]_D^{20} = +8.3^\circ$ ($c = 0.5$, $CHCl_3$)



α - 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.73 (m, 1 H, H-1); 5.27 (vt, 1H, $^3J_{2,3} = 2.5$ Hz, H-2); 4.30 (dd, 1 H, $^3J_{5,6a} = 2.1$ Hz, H-6a); 4.12 (dd, 1 H, $^3J_{5,6b} = 4.3$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, H-6b); 3.85 (ddd, 1 H, H-5); 2.19, 2.17, 2.10, 2.06, 2.01 (je s, je 3 H, $-CH_3$ Acetyl).

α - ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 170.98, 170.59, 170.47, 170.04, 169.77 (C=O, Acetyl); 92.11 (C-1); 73.19 (C-5); 70.65 (C-3); 69.60 (C-2); 68.18 (C-4); 61.86 (C-6); 21.82, 21.13, 21.07, 21.00, 20.90 ($-CH_3$ Acetyl).

8.10.1.3 Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose **78**

Zu einer auf 0 °C gekühlten Suspension aus 0.30 g (5.55 mmol, 1.00 Äquiv.) Natriummethanolat in 25 mL abs. THF wurde 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-mannosid **76** (2.17 g, 5.55 mmol, 1.00 Äquiv.) gegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und nach ca. 30 min Rühren bei 0 °C durch Zugabe von 0.50 mL Eisessig abgebrochen. Die Lösung wurde weitere 10 min gerührt und dann eingeeengt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 20 mL Wasser gewaschen,

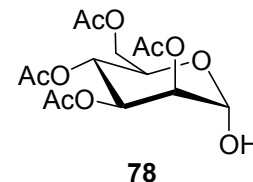
anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/EE (1:10) als Laufmittel aufgereinigt.

Ausbeute: 1.12 g (3.18 mmol, 58 %); farbloser Sirup

$C_{14}H_{20}O_{10} = 348.30 \text{ g/mol}$

DC (Pentan/EE 2:2 v/v): R_F -Wert = 0.27

$[\alpha]_D^{20} = +21.6^\circ$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$)



1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.44 (dd, 1 H, $^3J_{3,4} = 10.1 \text{ Hz}$, H-3); 5.31 (vt, 1 H, $^3J_{4,5} = 9.5 \text{ Hz}$, H-4); 5.28 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.6 \text{ Hz}$, H-2); 5.25 (d, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.8 \text{ Hz}$, H-1); 4.30-4.20 (m, 2 H, H-6a, H-6b); 4.15 (ddd, 1 H, $^3J_{5,6a} = 4.8 \text{ Hz}$, $^3J_{5,6b} = 2.5 \text{ Hz}$, H-5); 2.16, 2.12, 2.06, 2.00 (je s, je 3 H, $-CH_3$ Acetyl).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 171.24, 170.61, 170.45, 170.23 (C=O Acetyl); 92.64 (C-1); 70.37 (C-5); 69.16 (C-3); 68.97 (C-2); 66.58 (C-4); 62.99 (C-6); 21.33, 21.20, 21.14, 21.12 ($-CH_3$ Acetyl).

8.10.1.4 Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranose 79

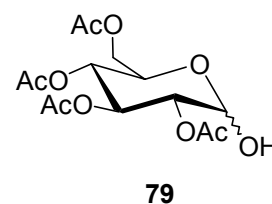
Zu einer auf 0 °C gekühlten Suspension aus 0.30 g (5.55 mmol, 1.00 Äquiv.) Natriummethanolat in 25 mL abs. THF wurde 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-glucosid **77** (2.17 g, 5.55 mmol, 1.00 Äquiv.) gegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und nach ca. 30 min Rühren bei 0 °C durch Zugabe von 0.5 ml Eisessig abgebrochen. Die Lösung wurde weitere 10 min gerührt und dann eingengt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 20 mL Wasser gewaschen, anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/EE (1:10) als Laufmittel.

Ausbeute: 1.12 g (3.18 mmol, 58 %); farbloser Sirup

Anomerenverhältnis ($\alpha/\beta \approx 4:1$)

$C_{14}H_{20}O_{10} = 348.30 \text{ g/mol}$

DC (CH_2Cl_2 /MeOH 9:1 v/v): R_F -Wert = 0.53



$$[\alpha]_D^{20} = +78.2^\circ (c = 1.0, \text{CHCl}_3)$$

α - ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.25 (dd, 1 H, $^3J_{3,4} = 9.6$ Hz, H-3); 5.10 (vt, 1 H, $^3J_{4,5} = 9.9$ Hz, H-4); 4.90 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.6$ Hz, H-2); 4.89 (d, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.8$ Hz, H-1); 4.26 (dd, 1 H, H-6a); 4.15 (dd, 1 H, $^2J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, H-6b); 3.77 (ddd, 1 H, $^3J_{5,6a} = 4.8$ Hz, $^3J_{5,6b} = 2.3$ Hz, H-5); 2.11, 2.10, 2.03, 2.01 (je s, je 3 H, $-\text{CH}_3$ Acetyl).

α - ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 171.27, 171.17, 170.59, 170.05 (C=O Acetyl); 95.97 (C-1); 72.62 (C-5); 71.50 (C-3); 68.91 (C-2); 67.66 (C-4); 62.38 (C-6); 21.13, 21.11, 21.01, 20.98 ($-\text{CH}_3$ Acetyl).

8.10.1.5 Darstellung von Levulinsäureanhydrid 80

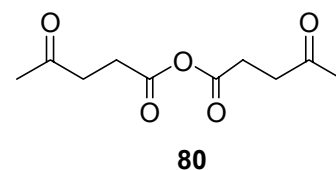
Die Reaktion wurde unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. Zu einer Lösung von 13.9 g (0.12 mol, 1.00 Äquiv.) Levulinsäure **81**, gelöst in 200 mL abs. Diethylether, wurden portionsweise 12.4 g (0.06 mol, 0.50 Äquiv.) *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) bei 0 °C hinzugegeben. Die Lösung wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt und danach wurde Dicyclohexylharnstoff (DCU) mittels einer Umkehrfritte abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abkondensiert und das Rohprodukt, das eine bräunlich zähe Flüssigkeit war, wurde ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

Ausbeute: 8.36 g (0.04 mmol, 65 % bezogen auf Levulinsäure)

bräunl. zähe Flüssigkeit

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5 = 214.22$ g/mol

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30:1 v/v): R_f -Wert = 0.46



^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.83-2.78, 2.74-2.69 (je m, je 4 H, $-\text{CH}_2$); 2.20 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 207.23 ($-\text{CH}_3\text{-C=O}$); 154.98 ($-\text{CH}_2\text{-C=O}$); 39.23, 38.36 ($\text{CH}_3\text{C(O)CH}_2$); 29.18, 28.15 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C=O}$); 25.31, 25.22 ($-\text{CH}_3$).

8.10.1.6 Darstellung von 1,2,3,4,6-Penta-*O*-levulinyl-D-mannopyranosid **82**

Zu einer Lösung von 468 mg (2.60 mmol, 1.00 Äquiv.) D-Mannopyranose **74**, gelöst in 10 mL abs. Pyridin wurden bei 0 °C 8.36 g (39.0 mmol, 3.00 Äquiv. pro OH-Funktion) Lävulinsäureanhydrid **80**, ebenfalls gelöst in 15 mL abs. Pyridin, getropft. Die Reaktionslösung wurde anschließend 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde mit Toluol codestilliert, bis kein Pyridingeruch mehr vorhanden war. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und gründlich mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-2%) aufgereinigt.

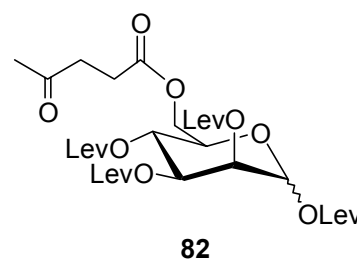
Ausbeute: 1.13 g (1.69 mmol, 65 %); leicht gelblicher Sirup

Anomerenverhältnis ($\alpha/\beta \approx 4:1$)

$C_{31}H_{42}O_{16} = 670.66$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 30:1 v/v): R_F -Wert = 0.58

$[\alpha]_D^{20} = +3.4^\circ$ ($c = 0.5$, $CHCl_3$)



α - 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.02 (d, 1 H, $^3J_{1,2} = 2.0$ Hz, H-1); 5.33-5.28 (m, 1 H, $^3J_{3,4} = 9.0$ Hz, H-3, H-4); 5.23 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, H-2); 4.25-4.18 (m, 2 H, $^2J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, H-6a, H-6b); 4.09 (ddd, 1 H, $^3J_{4,5} = 9.4$ Hz, $^3J_{5,6a} = 5.5$ Hz, $^3J_{5,6b} = 2.5$ Hz, H-5); 2.84-2.43 (m, 20 H, $-CH_2$ Lev); 2.18, 2.17, 2.16, 2.15, 2.14 (je s, je 3 H, $-CH_3$ Lev).

α - ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 207.96, 207.78, 207.44, 206.81, 206.39 (Cq Keton Lev); 171.96, 171.85, 171.55, 171.43, 171.22 (Cq Ester Lev); 91.05 (C-1); 71.03 (C-5); 69.14 (C-2); 68.62 (C-4); 65.76 (C-3); 62.70 (C-6); 38.35, 38.23, 38.17, 38.11, 38.06 ($-CH_2$ Keton Lev); 30.20, 30.12, 30.08, 30.02 ($-CH_3$); 28.45, 28.32, 28.27, 28.24 ($-CH_2$ Ester Lev).

8.10.1.7 Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-levulinyl-D-mannopyranose **83**

Bei einer Temperatur von 0 °C wurden zu einer Lösung von 580 mg (0.90 mmol, 1.00 Äquiv.) 1,2,3,4,6-Penta-*O*-levulinyl-D-mannopyranosid **82**, gelöst in 20 mL abs. THF, portionsweise 47.0 mg (0.90 mmol, 1.00 Äquiv.) Natriummethanolat hinzugegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch bei 0 °C verfolgt und nach 1 h durch Zugabe von 0.10 mL Eisessig abgebrochen. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen

und dreimal mit je 20 mL Wasser und einmal mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/ Methanol-Gradienten (0-6%) aufgereinigt.

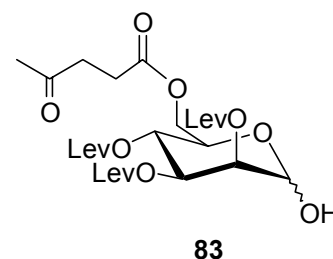
Ausbeute: 267 mg (0.48 mmol, 54 %); gelblicher Sirup

Anomerenverhältnis ($\alpha/\beta \approx 4:1$)

$C_{26}H_{36}O_{14} = 572.56$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v): R_F -Wert = 0.65

$[\alpha]_D^{20} = +17.8^\circ$ (c = 1.0, $CHCl_3$)



α - 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.40 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.5$ Hz, $^3J_{3,4} = 10.1$ Hz, H-3); 5.24 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.5$ Hz, H-2); 5.22-5.14 (m, 2 H, $^3J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-1, H-4); 4.26-4.18 (m, 2 H, $^3J_{5,6a} = 6.6$ Hz, H-5, H-6a); 4.14 (dd, 1 H, $^3J_{5,6b} = 3.1$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, H-6b); 2.83-2.51 (m, 16 H, $-CH_2$ Lev); 2.18, 2.15 (je s, je 6 H, $-CH_3$ Lev).

α - ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 208.17, 207.07, 206.87, 206.72 (Cq Keton Lev); 172.66, 172.28, 172.16, 172.11 (Cq Ester Lev); 92.72 (C-1); 70.53 (C-3); 69.22 (C-2); 68.51 (C-5); 66.84 (C-4); 63.29 (C-6); 38.64, 38.24, 38.13, 38.04 ($-CH_2$ Keton Lev); 30.29, 30.23, 30.15, 30.10 ($-CH_3$); 28.49, 28.36, 28.31, 28.27 ($-CH_2$ Ester Lev).

8.10.1.8 Darstellung von 1,2,3,4,6-Penta-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranosid 85

1.00 g (5.55 mmol, 1.00 Äquiv.) D-Mannopyranose **74** wurden in 12 mL abs. Pyridin gelöst und auf $-5^\circ C$ gekühlt. Zu dieser Lösung wurden langsam 4.00 mL (4.84 g, 34.4 mmol, 6.20 Äquiv. pro OH-Gruppe) frisch destilliertes Benzoylchlorid getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei $-5^\circ C$ gerührt und anschließend weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mehrmals mit Toluol codestilliert, bis kein Pyridingeruch mehr vorhanden war. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und gründlich mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch mit PE/EE (8:1) als Laufmittel aufgereinigt.

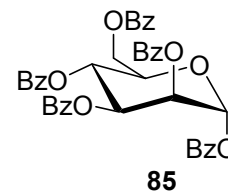
Ausbeute: 3.40 g (4.90 mmol, 88 %); farbloser kristalliner Feststoff

$C_{41}H_{32}O_{11} = 700.69 \text{ g/mol}$

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v): R_f -Wert = 0.83

$[\alpha]_D^{20} = -30.7^\circ$ ($c = 1.0$, CH_3Cl_3)

Smp: 157-159.5 °C



α - 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.25-7.87 (m, 10 H, -CH Benzoyl *ortho*); 7.73-7.21 (m, 15 H, -CH Benzoyl), 6.64 (d, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.8 \text{ Hz}$, H-1); 6.28 (vt, 1 H, $^3J_{4,5} = 10.1 \text{ Hz}$, H-4); 6.07 (dd, 1 H, $^3J_{3,4} = 10.2 \text{ Hz}$, H-3); 5.92 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.3 \text{ Hz}$, H-2); 4.72 (dd, 1 H, $^3J_{5,6a} = 2.5 \text{ Hz}$, H-6a); 4.62 (ddd, 1 H, $^3J_{5,6b} = 3.8 \text{ Hz}$, H-5); 4.50 (dd, 1 H, $^2J_{6a,6b} = 12.2 \text{ Hz}$, H-6b).

α - ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167.58, 167.39, 167.17, 166.82 (C=O Benzoyl); 133.93, 133.74, 133.10, 133.00, 132.95 (-CH Benzoyl *para*); 130.91, 130.87, 130.83 (-CH Benzoyl); 130.24, 130.21, 130.18, 130.09 (Cq Benzoyl); 129.85, 129.49, 129.28, 129.11, 128.97, 128.21, 128.07, 127.97, 127.91, 127.88 (-CH Benzoyl); 91.85 (C-1); 71.85 (C-3); 70.80 (C-5); 70.45 (C-2); 69.16 (C-4); 61.79 (C-6).

8.10.1.9 Darstellung von 1,2,3,4,6-Penta-*O*-benzoyl-D-glucopyranosid 86

1.00 g (5.55 mmol, 1.00 Äquiv.) D-Glucopyranose **75** wurden in 12 mL abs. Pyridin gelöst und auf $-5^\circ C$ gekühlt. Zu dieser Lösung wurden langsam 4.00 mL (4.84 g, 34.4 mmol, 6.20 Äquiv. pro OH-Gruppe) frisch destilliertes Benzoylchlorid getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei $-5^\circ C$ gerührt und anschließend weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mehrmals mit Toluol codestilliert, bis kein Pyridingeruch mehr vorhanden war. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und gründlich mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Trocknung über Magnesiumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferten das Rohprodukt, welches durch Umkristallisation in Wasser/Aceton 54:37 (v/v) erhalten wurde.

Ausbeute: 3.70 g (5.30 mmol, 95 %), farbloser kristalliner Feststoff

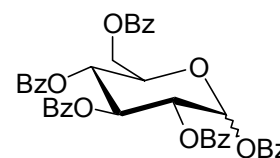
Anomerenverhältnis ($\alpha/\beta \approx 4:1$)

$C_{41}H_{32}O_{11} = 700.69 \text{ g/mol}$

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v): R_F -Wert = 0.85

$[\alpha]_D^{20} = +114.5^\circ$ ($c = 1.0$, CH_3Cl_3)

Smp.: 187-188.5 °C



86

α - 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.17-7.85 (m, 10 H, -CH Benzoyl *ortho*); 7.55-7.27 (m, 15 H, -CH Benzoyl), 6.85 (d, 1 H, $^3J_{1,2} = 3.7 \text{ Hz}$, H-1); 6.32 (vt, 1 H, $^3J_{4,5} = 10.0 \text{ Hz}$, H-4); 5.86 (vt, 1 H, $^3J_{3,4} = 9.8 \text{ Hz}$, H-3); 5.68 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 10.4 \text{ Hz}$, H-2); 4.62 (m, 2 H, $^3J_{5,6a} = 4.9 \text{ Hz}$, H-5, H-6a); 4.48 (dd, 1 H, $^3J_{5,6b} = 2.8 \text{ Hz}$, $^2J_{6a,6b} = 12.8 \text{ Hz}$, H-6b).

α - ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 166.50, 166.33, 165.77, 164.82 (C=O Benzoyl); 134.33, 133.94, 133.90, 133.76, 133.55 (-CH Benzoyl *para*); 130.99, 130.85, 130.45, 130.39, 130.31 (-CH Benzoyl); 130.27, 130.25, 130.21, 130.17, 130.08 (Cq Benzoyl); 129.83, 129.42, 129.22, 129.12, 128.91, 128.86, 128.83, 128.79, 128.51, 128.36 (-CH Benzoyl); 90.47 (C-1); 70.92 (C-3); 70.90 (C-5); 70.86 (C-2); 69.28 (C-4); 62.89 (C-6).

8.10.1.10 Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranose **87**

Die Reaktion wurde in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. Bei -20°C wurden 0.67 mL (10.1 mmol, 1.00 Äquiv.) Dimethylamin in das Reaktionsgefäß einkondensiert. Anschließend wurde eine auf -20°C gekühlte Lösung, aus 1.00 g (1.42 mmol, 0.10 Äquiv.) 1,2,3,4,6-Penta-*O*-benzoyl-D-mannopyranosid **85** und 8 mL abs. Acetonitril, zugegeben. Nach fünfstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit PE/EE (5:1) als Laufmittel aufgereinigt.

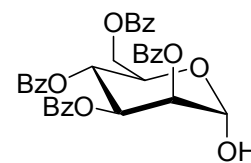
Ausbeute: 482 mg (0.81 mmol, 57 %); farblose Nadeln

$C_{34}H_{28}O_{10} = 596.58 \text{ g/mol}$

DC (Benzol/Aceton 95:5 v/v): R_F -Wert = 0.17

$[\alpha]_D^{20} = -79.4^\circ$ ($c = 1.0$, CH_3Cl_3)

Smp.: 178-180 °C



87

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.01-7.73 (m, 8 H, -CH Benzoyl *ortho*); 7.48-7.23 (m, 12 H, -CH Benzoyl); 6.06 (vt, 1 H, $^3J_{4,5} = 10.1$ Hz, H-4); 5.89 (dd, 1 H, $^3J_{3,4} = 10.1$ Hz, H-3); 5.68 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.3$ Hz, H-2); 5.42 (bs, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.9$ Hz, H-1); 4.65 (dd, 1 H, $^3J_{5,6a} = 3.8$ Hz, H-6a); 4.56 (ddd, 1 H, $^3J_{5,6b} = 2.7$ Hz, H-5); 4.34 (dd, 1 H, $^2J_{6a,6b} = 12.3$ Hz, H-6b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 166.76, 166.43, 165.99, 165.91 (C=O Benzoyl); 133.86, 133.84, 133.59, 133.49 (-CH Benzoyl *para*); 130.44, 130.31, 130.26, 130.24 (-CH Benzoyl); 130.23, 130.18, 130.09 (Cq Benzoyl); 129.73, 129.65, 129.52, 129.46, 129.32, 129.08, 128.98, 128.87, 128.72, 128.58, 128.39 (-CH Benzoyl); 92.80 (C-1); 71.28 (C-5); 70.19 (C-2); 69.35 (C-3); 67.33 (C-4); 63.18 (C-6).

8.10.1.11 Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl-D-glucopyranose **88**

Die Reaktion wurde in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. Bei -20°C wurden 0.67 mL (10.1 mmol, 1.00 Äquiv.) Dimethylamin in das Reaktionsgefäß einkondensiert. Anschließend wurde eine auf -20°C gekühlte Lösung, aus 1.00 g (1.42 mmol, 0.10 Äquiv.) 1,2,3,4,6-Penta-*O*-benzoyl-D-glucopyranosid **86** und 8 mL abs. Acetonitril, zugegeben. Nach fünfstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit PE/EE (5:1) als Laufmittel aufgereinigt.

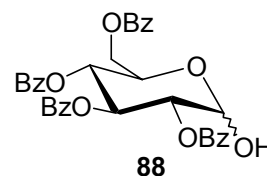
Ausbeute: 466 mg (0.78 mmol, 55 %); farbloser Sirup

Anomerenverhältnis ($\alpha/\beta \approx 3:1$)

$\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{O}_{10} = 596.58$ g/mol

DC (Benzol/Aceton 95:5 v/v): R_f -Wert = 0.19

$[\alpha]_D^{20} = +158.5^\circ$ ($c = 1.0$, CH_3Cl_3)



α - $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.13-7.81 (m, 8 H, -CH Benzoyl *ortho*); 7.72-7.23 (m, 12 H, -CH Benzoyl); 6.25 (vt, 1 H, $^3J_{3,4} = 9.6$ Hz, H-3); 5.78-5.68 (m, 2 H, $^3J_{1,2} = 3.4$ Hz, $^3J_{4,5} = 10.1$ Hz, H-1, H-4); 5.32 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 10.3$ Hz, H-2); 4.72-4.62 (m, 2 H, $^3J_{5,6a} = 4.4$ Hz, H-5, H-6a); 4.47 (dd, 1 H, $^3J_{5,6b} = 2.9$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 12.3$ Hz, H-6b).

α - $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 166.57, 166.43, 166.27, 165.70 (C=O Benzoyl); 133.87, 133.81, 133.76, 133.53 (-CH Benzoyl *para*); 130.41, 130.35, 130.28, 130.23 (-CH Benzoyl); 130.15, 130.11, 130.08 (Cq Benzoyl); 128.87, 128.83, 128.80, 128.77, 128.71,

128.39, 127.53, 127.46 (-CH Benzoyl); 90.92 (C-1); 74.80 (C-3); 72.72 (C-5); 72.64 (C-2); 69.88 (C-4); 63.74 (C-6).

8.10.1.12 Darstellung von 1-*O*-Allyl- α -D-mannopyranosid **89**

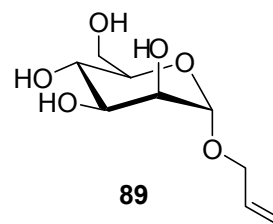
Die Reaktion wurde unter Argon als Inertgas durchgeführt. 10.5 g (60.0 mmol) wasserfreie D-Mannopyranose **74** wurden in 150 mL (2.20 mol) Allylalkohol dispergiert und 1.75 mL einer 50%igen Lösung von Bortrifluorid in Diethylether (2.00 g, entspricht 15.0 mmol Bortrifluorid) hinzugegeben. Die Suspension wurde 1 h unter Rückfluss erhitzt, so dass sich eine klare Lösung ergab. Das überschüssige Bortrifluorid wurde durch Zugabe von 25 mL Wasser zerstört und die Lösung mit 25 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel mit EE/MeOH (9:1) als Laufmittel aufgereinigt.

Ausbeute: 9.97 g (45.1 mmol, 75 %); farbloser Sirup

$C_9H_{16}O_6 = 220.22$ g/mol

DC (EE/MeOH 9:1 v/v): R_F -Wert = 0.35

$[\alpha]_D^{20} = +51.6^\circ$ (c = 0.2, H₂O)



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 5.84 (dddd, 1H, -CH Allyl); 5.20 (dd, 1 H, $^3J_{\text{Allyl,trans}} = 17.29$ Hz, =CH₂ Allyl trans); 5.08 (dd, 1 H, $^3J_{\text{Allyl,cis}} = 10.43$ Hz, =CH₂ Allyl cis); 4.70 (d, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.52$ Hz, H-1); 4.12 (dd, 1 H, $^2J_{\text{O-CH}_2} = 12.9$ Hz, $^3J_{\text{O-CH}_2\text{-CH}} = 5.8$ Hz, O-CH₂); 3.92 (dd, 1 H, O-CH₂); 3.91 (dd, 1 H, H-2); 3.80 (dd, 1 H, $^2J_{\text{H-6a,H-6b}} = 12.7$ Hz, H-6a); 3.78-3.72 (m, 2 H, H-3, H-6b); 3.67 (vt, 1 H, $^3J_{3,4} = 9.6$ Hz, $^3J_{4,5} = 9.4$ Hz, H-4); 2.01-1.96 (m, 1 H, $^3J_{5,6} = 2.3$ Hz, 5-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 134.41 (-CH Allyl); 116.18 (=CH₂ Allyl); 99.65 (C-1); 73.65 (C-5); 71.56 (C-3); 71.10 (C-2); 67.58 (C-4); 67.51 (O-CH₂ Allyl); 61.85 (C-6).

8.10.1.13 Darstellung von 1-*O*-Allyl-2,3,4,6-tetra-*O*-*para*-methoxybenzyl- α -D-mannopyranosid **90**

837 mg (3.80 mmol) 1-*O*-Allyl-D-mannopyranosid **89** wurden in 80 mL DMF gelöst und nach Kühlung auf -5°C wurden 474 mg (19.8 mmol, 1.30 Äquiv. pro OH-Funktion)

zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, bevor 2.50 mL (2.85 g, 18.20 mmol, 1.20 Äquiv. pro OH-Funktion) *para*-Methoxybenzylchlorid, gelöst in 10 mL DMF, zugegeben wurden. Die Reaktionsösung wurde 72 h bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und anschließend mit 10 mL Wasser gequencht. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abkondensiert und der Rückstand in 25 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 20 mL Wasser und einmal mit 25 mL ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und bis zur Trockne im Vakuum eingengt. Die abschließende säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte an Kieselgel mit EE/*n*-Hexan (1:11) als Laufmittel.

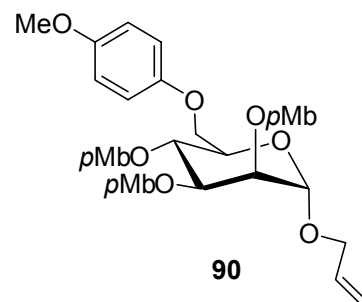
Ausbeute: 2.00 g (2.85 mmol, 75 %)

gelblicher Sirup

$\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{O}_{10} = 644.71\text{ g/mol}$

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30:1 v/v): R_f -Wert = 0.81

$[\alpha]_D^{20} = +0.2^{\circ}$ ($c = 1.0$, CHCl_3)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.18-7.12 (m, 8 H, -CH pMb *ortho*); 6.78-6.64 (m, 8 H, -CH, pMb *meta*); 5.1 (dddd, 1H, -CH Allyl); 5.08 (dd, 1 H, $^3J_{\text{Allyl,trans}} = 17.3\text{ Hz}$, =CH₂ Allyl trans); 5.00 (dd, 1 H, $^3J_{\text{Allyl,cis}} = 10.4\text{ Hz}$, =CH₂ Allyl cis); 4.75 (d, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.6\text{ Hz}$, H-1); 4.63 (dd, 1 H, $^3J_{\text{O-CH}_2\text{-CH}} = 5.8\text{ Hz}$, $^2J_{\text{O-CH}_2} = 12.9\text{ Hz}$, O-CH₂ Allyl); 4.53-4.28 (m, 8 H, -CH₂ pMb); 4.37 (dd, 1 H, O-CH₂ Allyl); 4.00 (dd, 1 H, $^2J_{\text{H-6a,H-6b}} = 12.1\text{ Hz}$, H-6a); 3.83-3.74 (m, 3 H, H-2, H-3, H-4); 3.68, 3.66, 3.65, 3.64 (je s, je 3 H, O-CH₃ pMb); 3.61-3.52 (m, 3 H, $^3J_{5,6} = 2.3\text{ Hz}$, H-5, H-6a, H-6b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 159.60, 159.54, 159.52, 159.50 (Cq pMb *para*); 134.30 (-CH Allyl); 131.24, 131.19, 130.95, 130.89 (Cq pMb); 130.47, 130.03, 129.90, 129.83, 129.82, 129.76, 129.63, 129.61 (-CH pMb *ortho*); 117.47 (=CH₂ Allyl); 114.56, 114.22, 114.16, 114.14, 114.12 (-CH pMb *meta*); 97.56 (C-1); 80.37 (C-5); 75.10 (C-3); 74.70 (C-2); 72.03 (C-4); 72.00, 71.98, 71.93 (-CH₂ pMb); 71.89 (O-CH₂ Allyl); 69.27 (C-6); 55.68, 55.64, 55.57, 55.49 (O-CH₃ pMb).

8.10.1.14 Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-*para*-methoxybenzyl-D-mannopyranose **91**

1.00 g (1.40 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-*O*-Allyl-2,3,4,6-tetra-*O*-*para*-methoxybenzyl- α -D-mannopyranosid **90** wurden in einem Methanol/Toluol-Gemisch (9:3 v/v) gelöst und in einer Argonatmosphäre mit 32.0 mg (0.18 mmol) Palladium-II-chlorid versetzt. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur änderte sich die Farbe von dunkelrot nach schwarz. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-1%) aufgereinigt.

Ausbeute: 652 mg (0.98 mmol, 70 %)

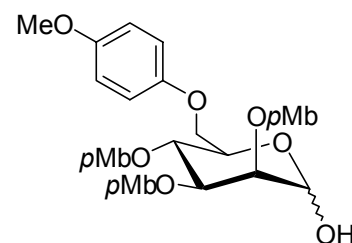
leicht gelblicher Sirup

Anomerenverhältnis ($\alpha/\beta \approx 3:1$)

$C_{34}H_{36}O_{10} = 604.64$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 30:1 v/v): R_f -Wert = 0.31

$[\alpha]_D^{20} = +2.1^\circ$ (c = 0.5, $CHCl_3$)



91

α - 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.28-7.19 (m, 8 H, -CH pMb *ortho*); 6.86-6.78 (m, 8 H, -CH, pMb *meta*); 5.19 (d, 1H, $^3J_{1,2} = 1.5$ Hz, H-1); 4.75-4.34 (m, 8 H, -CH₂ pMb); 3.98 (ddd, 1 H, $^3J_{4,5} = 10.4$ Hz, H-5); 3.90 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, $^3J_{3,4} = 9.4$ Hz, H-3); 3.79-3.75 (m, 14 H, H-2, H-4, O-CH₃ pMb); 3.64 (dd, 1 H, $^3J_{5,6a} = 6.6$ Hz, H-6a); 3.59 (dd, 1 H, $^3J_{5,6b} = 3.3$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 10.4$ Hz, H-6b).

α - ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 159.83, 159.67, 159.60, 159.52 (Cq pMb *para*); 131.20, 130.77, 130.71, 130.61 (Cq pMb); 130.31, 130.12, 130.08, 130.04; 129.92, 129.70, 129.65, 129.62 (-CH pMb *ortho*); 114.57, 114.34, 114.15, 114.12, 113.78 (-CH pMb *meta*); 94.20 (C-1); 79.93 (C-3); 76.06 (C-2); 72.03 (C-4); 75.63, 75.40, 74.89, 74.71 (-CH₂ pMb); 71.83 (C-5); 69.11 (C-6); 55.68, 55.64, 55.62, 55.59 (O-CH₃ pMb).

8.10.1.15 Darstellung von 1-*O*-Allyl-2,3,4,6-tetra-*O*-tetrahydropyranyl-D-mannopyranosid **92**

250 mg (1.10 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-*O*-Allyl-D-mannopyranosid **89** wurden in 10 mL abs. THF gelöst und mit 41.8 mg (0.22 mmol) *para*-Toluolsulfonsäure versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Zu dieser Lösung wurden 0.82 mL (760 mg, 9.10 mmol, 2.20 Äquiv. pro OH-Funktion) Tetrahydropyran, gelöst in 5 mL abs. THF, gegeben. Das trübe Reaktionsgemisch wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt und dann die Reaktion mit 4 mL ges. ammoniakalischer Methanol-Lösung abgebrochen. Die, durch Zugabe der ges. ammoniakalischen Methanol-Lösung, klargewordene Lösung wurde im Vakuum bis zur Trockne eingengt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen, wobei ein weißlicher Niederschlag von *p*-Toluolsulfonsäure ausfiel. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-2%) aufgereinigt.

Ausbeute: 355 mg (0.63 mmol, 58 %)

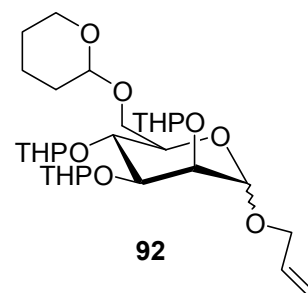
farbloser Sirup

$C_{29}H_{48}O_{10}$ = 556.69 g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 30:1 v/v): R_F -Wert = 0.70

$[\alpha]_D^{20} = +52.5^\circ$ (c = 1.0, $CHCl_3$)

MS (MALDI): m/z 579.4 (M+Na⁺); 595.3 (M+K⁺)



8.10.1.16 Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-tetrahydropyranyl-D-mannopyranose **93**

Eine Lösung von 1.00 g (1.80 mmol, 1.00 Äquiv.) 1-*O*-Allyl-2,3,4,6-tetra-*O*-tetrahydropyranyl-D-mannopyranosid **92** und 0.56 g Kalium-*t*butylat (5.00 mmol, 2.70 Äquiv.) in 12 mL DMSO wurde 3 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlung auf 0 °C wurden 30 mL einer 0.5 molaren methanolischen Natriumhydroxid-Lösung und 20 mL einer 4%igen wässrigen Kaliumpermanganat-Lösung hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Der massiv ausfallende Braunstein wurde mehrfach über Celite abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 25 mL Dichlormethan aufgenommen und gründlich mit Wasser (dreimal je 25 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und säulenchromatographisch an Kieselgel mit $CH_2Cl_2/MeOH$ (60:1) als Laufmittel aufgereinigt.

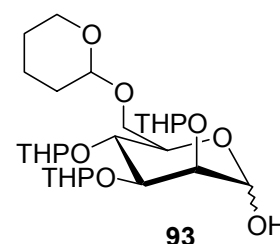
Ausbeute: 516 mg (1.00 mmol, 56 %); farbloser Sirup

$C_{26}H_{44}O_{10} = 516.62 \text{ g/mol}$

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 30:1 v/v): R_f -Wert = 0.68

$[\alpha]_D^{20} = +34.4^\circ$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$)

MS (MALDI): m/z 539.2 ($M+Na^+$); 555.1 ($M+K^+$)



8.10.1.17 Darstellung von 6-*O*-Dimethoxytrityl-D-mannopyranose 94

Die Reaktion wurde in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt. Zu einer auf $-20^\circ C$ gekühlten Lösung aus 4.50 g (25.0 mmol, 1.00 Äquiv.) D-Mannopyranose **74** und 50 mL abs. Pyridin wurden 17.4 mL (125 mmol, 5.00 Äquiv.) abs. Triethylamin und 10.0 g (29.5 mmol, 1.20 Äquiv.) Dimethoxytritylchlorid gegeben. Die Reaktionslösung wurde 4 h bei $-20^\circ C$ gerührt und weitere 18 h bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 2 mL Wasser wurde die Reaktion abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde mehrfach mit Toluol codestilliert, bis kein Pyridingeruch mehr vorhanden war. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und gründlich mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum bis Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit $CH_2Cl_2/MeOH$ (93:7 v/v) + 1% Triethylamin als Laufmittel aufgereinigt.

Ausbeute: 9.25 g (19.2mmol, 77 %)

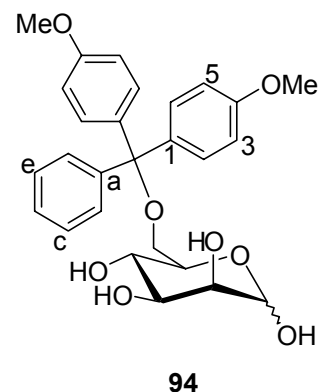
farbloser Sirup

Anomerenverhältnis ($\alpha/\beta \approx 5:1$)

$C_{27}H_{30}O_8 = 482.52 \text{ g/mol}$

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v): R_f -Wert = 0.40

$[\alpha]_D^{20} = 12.3^\circ$ ($c = 1.0$, $MeOH$)



α - 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ [ppm] = 7.23-7.11, 7.09-6.92, 6.80-6.73 (je m, 13 H, -CH DMTr); 4.86 (d, 1 H, $^3J_{1,2} = 3.6 \text{ Hz}$, H-1); 4.52-4.21 (m, 3 H, H-2, H-3, H-4); 3.52 (s, 6 H, -OCH₃); 3.27-3.08 (m, 3 H, H-5, H-6a, H-6b).

α - ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ [ppm] = 158.31, 158.22 (C4 DMTr); 145.59 (Ca DMTr); 137.71, 136.45 (C1 DMTr); 129.25, 128.61, 128.56, 128.38, 128.26, 128.00 (C2, C6, Cb, Cc, Ce, Cf, -CH DMTr); 125.67 (Cd, -CH, DMTr); 113.38, 113.27 (C3, C5, -CH, DMTr);

94.59 (C-1); 85.47 (Cq DMTr); 76.05 (C-3); 74.32 (C-2); 71.79 (C-5); 67.81 (C-4); 64.39 (C-6); 55.36, 55.09 (O-CH₃ DMTr).

8.10.1.18 Darstellung von 6-*O*-Dimethoxytrityl-1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid **95**

Die Reaktion wurde in Inertgasatmosphäre durchgeführt. 1.78 g (3.70 mmol, 1.00 Äquiv.) 6-*O*-Dimethoxytrityl-D-mannopyranose **94** wurden in 40 mL abs. Pyridin gelöst und langsam mit 5.60 mL (6.09 g, 59.2 mmol, 4.00 Äquiv. pro OH-Gruppe) Essigsäureanhydrid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h gerührt und anschließend mehrfach mit Toluol codestiliert, bis kein Pyridingeruch mehr vorhanden war. Der Rückstand wurde in 50 ml Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit je 50 ml Wasser gewaschen. Nach dem Gegenschütteln wurden die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/EE (8:2 → 2:8) als Laufmittel aufgereinigt.

Ausbeute: 1.95 g (2.97 mmol, 82 %)

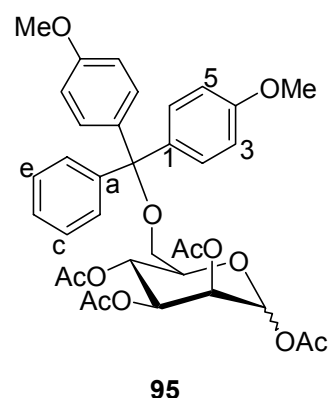
farbloser Sirup

Anomerenverhältnis ($\alpha/\beta \approx 5:1$)

C₃₅H₃₈O₁₂ = 650.67 g/mol

DC (Hexan/EE 1:1 v/v): R_F-Wert = 0.40

$[\alpha]_D^{20} = 16.4^\circ$ (c = 1.0, CHCl₃)



α -¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.46-7.43, 7.35-7.31, 7.29-7.24, 7.21-7.15, 6.85-6.79 (je m, 13 H, -CH DMTr); 6.16 (d, 1 H, ³J_{1,2} = 1.9 Hz, H-1); 5.51 (vt, 1 H, ³J_{4,5} = 10.1 Hz, H-4); 5.30 (dd, 1 H, ³J_{3,4} = 9.8 Hz, H-3); 5.25 (dd, 1 H, ³J_{2,3} = 2.6 Hz, H-2); 3.92 (ddd, 1 H, ³J_{5,6a} = 4.1 Hz, H-5); 3.78 (s, 6 H, -OCH₃); 3.29 (dd, 1 H, ²J_{6a,6b} = 10.7 Hz, H-6a); 3.08 (dd, 1 H, ³J_{5,6b} = 2.5 Hz, H-6b); 2.22, 2.15, 2.00, 1.76 (je s, je 3 H, -CH₃ Acetyl).

α -¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.61, 170.27, 169.47, 168.66 (C=O Acetyl); 158.86, 158.43 (C4 DMTr); 145.07 (Ca DMTr); 136.33, 136.18 (C1 DMTr); 130.52, 129.55, 128.63, 128.38, 128.24, 128.15 (C2, C6,Cb, Cf Cc, Ce, -CH DMTr); 127.13 (Cd DMTr); 113.58, 113.46 (C3, C5 DMTr); 91.18 (C-1); 86.34 (Cq DMTr); 72.62 (C-3); 71.39 (C-2);

69.66 (C-4); 68.84 (C-5); 62.58 (C-6); 55.62, 55.59 (O-CH₃ DMTr); 21.44, 21.31, 21.23, 21.11 (-CH₃ Acetyl) .

8.10.1.19 Darstellung von 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid **96**

Bei 0 °C wurden 1.10 g (1.68 mmol, 1.00 Äquiv.) 6-*O*-Dimethoxytrityl-1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid **95** in 110 mL einer 0.5%igen Lösung von *para*-Toluolsulfonsäure (0.55 g, 2.90 mmol, 1.70 Äquiv.) in Dichlormethan/Methanol (95:5 v/v) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde 0.5 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 70 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung abgebrochen und dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH (93:7) als Laufmittel aufgereinigt.

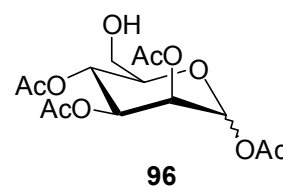
Ausbeute: 0.48 g (1.39 mmol, 83 %); leicht gelblicher Sirup

Anomerenverhältnis ($\alpha/\beta \approx 2:1$)

C₁₄H₂₀O₁₀ = 348.30 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v): R_F-Wert = 0.76

$[\alpha]_D^{20} = +28.7^\circ$ (c = 0.5, CHCl₃)



α -¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.08 (d, 1 H, ³J_{1,2} = 1.8 Hz, H-1); 5.50 (dd, 1 H, ³J_{2,3} = 3.3 Hz, H-2); 5.32 (vt, 1 H, ³J_{4,5} = 10.1 Hz, H-4); 5.28 (dd, 1 H, ³J_{3,4} = 9.9 Hz, H-3); 3.85 (ddd, 1 H, ³J_{5,6a} = 3.9 Hz, ³J_{5,6b} = 2.8 Hz, H-5); 4.81-3.55 (m, 1 H, ²J_{6a,6b} = 11.8 Hz, H-6a, H-6b); 2.16, 2.08 (je s, je 6 H, -CH₃ Acetyl).

α -¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.99, 169.71, 169.53 (C=O Acetyl); 91.11 (C-1); 73.28 (C-3); 68.99 (C-2); 68.81 (C-4); 66.22 (C-5); 61.62 (C-6); 21.28, 21.16, 21.10, 21.08 (-CH₃ Acetyl).

8.10.2 AAV 3 zur Darstellung der cyclischen Saligenylchlorphosphate

Die Reaktion wurde in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Zu einer Lösung von 1.00 Äquiv. des jeweiligen Salicylalkohols **24a-e** in wasserfreiem

Diethylether wurden vorsichtig 1.10 Äquiv. Phosphortrichlorid hinzugegeben. Nach Abkühlung auf - 10 °C tropfte man über einen Zeitraum von 2 h eine Lösung von 2.20 Äquiv. Pyridin in trockenem Diethylether hinzu. Dabei fiel ein farbloser voluminöser Niederschlag, Pyridinhydrochlorid, aus. Nach Beendigung der Zugabe wurde die Reaktionsmischung zur vollständigen Umsetzung auf Raumtemperatur erwärmt und 1 h gerührt, bevor man sie für 18 h bei - 20 °C lagerte. Dies diente zur vollständigen Ausfällung des entstandenen Pyridinhydrochlorids. Im Anschluss wurde der Niederschlag unter Inertgas abfiltriert und das Lösungsmittel sowie überschüssiges Phosphortrichlorid und Pyridin im Ölpumpenvakuum abdestilliert. Man erhielt gelbe Öle, die zum Teil durch Kugelrohrdestillation im Vakuum aufgereinigt wurden oder aber als Rohprodukte zur weiteren Umsetzung eingesetzt wurden.

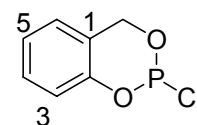
8.10.2.1 Darstellung von Saligenylchlorphosphan **97a**

Die Darstellung von Saligenylchlorphosphan **97a** wurde nach AAV 3 durchgeführt. Eine Lösung von 6.00 g (48.0 mmol, 1.00 Äquiv.) Salicylalkohol **24a** wurde in 120 ml absolutem Diethylether, 7.77 g (4.90 ml, 56.0 mmol, 1.20 Äquiv.) Phosphortrichlorid sowie 9.00 g (9.20 ml, 112 mmol, 2.30 Äquiv.) Pyridin in 10 ml absolutem Diethylether gelöst. Nach oben beschriebener Aufarbeitung wurde das erhaltene Rohprodukt **97a** mittels Kugelrohrdestillation aufgereinigt.

Ausbeute: 4.88 g (25.9 mmol, 57 %)

farbloses Öl

$C_7H_6ClO_2P = 188.55$ g/mol



97a

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.19 (dd, 1 H, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, H4); 7.12 (dd, 1 H, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, H6); 6.85 (d, 1 H, $^3J = 8.3$ Hz, H3); 5.34 (dd, 1 H, $^2J = 14.4$ Hz, $^3J_{HP} = 2.3$ Hz, $-CH_a$ Benzyl); 4.72 (dd, 1 H, $^2J = 14.4$ Hz, $^3J_{HP} = 9.6$ Hz, $-CH_b$ Benzyl).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 144.35 (C2); 131.34 (C1); 129.21 (C5); 125.46 (C6); 122.58 (C4); 121.38 (C3); 66.04 ($-CH_2$).

^{31}P -NMR (162 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 140.39

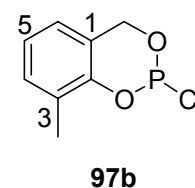
8.10.2.2 Darstellung von 3-Methylsaligenylchlorphosphan **97b**

Die Darstellung von 3-Methylsaligenylchlorphosphan **97b** wurde nach AAV 3 durchgeführt. Eine Lösung von 3.10 g (22.4 mmol, 1.00 Äquiv.) 3-Methylsalicylalkohol **24b** wurde in 60 ml absolutem Diethylether, 3.41 g (2.10 ml, 21.4 mmol, 1.10 Äquiv.) Phosphortrichlorid sowie 3.87 g (3.90 mL, 49.3 mmol, 2.20 Äquiv.) Pyridin in 5 mL abs. Diethylether gelöst. Nach oben beschriebener Aufarbeitung wurde das erhaltene Rohprodukt mittels Kugelrohrdestillation aufgereinigt.

Ausbeute: 2.06 g (10.1 mmol, 33 %)

farbloses Öl

$C_8H_8ClO_2P = 202.57 \text{ g/mol}$



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.18 (d, 1 H, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, H-4); 7.11 (t, 1 H, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, H-5); 6.62 (d, 1 H, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, H-6); 5.37 (dd, 1 H, $^2J_{a,b} = 14.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HP}} = 2.6 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_a$ Benzyl); 5.19 (dd, 1 H, $^2J_{b,a} = 14.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HP}} = 9.4 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_b$ Benzyl); 2.18 (s, 3 H, $-\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 131.67 (C2); 123.65 (C5); 122.79 (C1); 122.27 (C4); 121.49 (C6); 118.94 (C3); 61.98 ($-\text{CH}_2$); 15.55 ($-\text{CH}_3$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 140.8

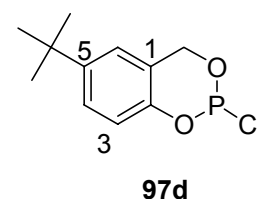
8.10.2.3 Darstellung von 5-*t*-Butylsaligenylchlorphosphan **97d**

Die Darstellung von 5-*t*-Butylsaligenylchlorphosphan **97d** wurde nach AAV 3 durchgeführt. Eine Lösung von 3.02 g (20.0 mmol, 1.00 Äquiv.) 5-*t*-Butylsalicylalkohol **24d** wurde in 70 ml absolutem Diethylether, 3.35 g (1.92 ml, 22.0 mmol, 1.10 Äquiv.) Phosphortrichlorid sowie 3.50 g (3.50 mL, 44.1 mmol, 2.20 Äquiv.) Pyridin in 5 mL abs. Diethylether gelöst. Das erhaltene Rohprodukt wurde nicht weiter aufgereinigt.

Ausbeute: 3.87 g (15.8 mmol, 79 %)

gelbliches Öl

$C_{11}H_{14}ClO_2P = 244.65 \text{ g/mol}$



^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.24 (s, 1 H, H6); 6.88 (d, 1 H, $^3J = 8.1$ Hz, H4); 6.81 (d, 1 H, $^3J = 8.6$ Hz, H3); 5.37-5.30 (m, 1 H, $-\text{CH}_2$ Benzyl); 4.98-4.93 (m, 1 H, $-\text{CH}_2$ Benzyl); 1.24 (s, 9 H, *tert*-Bu).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 145.87 (C2), 143.67 (C1); 126.18 (C4); 122.38 (C6); 120.56 (C5); 118.82 (C3); 61.29 (d, $^2J_{\text{CP}} = 1.9$ Hz, $-\text{CH}_2$); 35.43 (Cq *tert*-Bu) 31.23 ($-\text{CH}_3$ *tert*-Bu).

^{31}P -NMR (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 141.44

8.10.3 AAV 4 zur Darstellung der *cyclo*Saligenyl-Monosaccharidmonophosphate

Das entsprechend geschützte Monosaccharid (1.00 Äquiv.) und die Hünig-Base Diisopropylamin (2.00-2.50 Äquiv.) wurden in Acetonitril (≈ 0.025 molar) bei -20°C unter Inertgasatmosphäre vorgelegt. Zu diesen Lösungen wurden die jeweiligen Saligenylchlorphosphite (2.00-2.50 Äquiv.) getropft. Nach Erwärmen der Reaktionslösung auf Raumtemperatur wurde der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 9:1 v/v) verfolgt. Erschien der Umsatz nach ca. 1,5 h Reaktionszeit noch unvollständig, so wurden weitere Mengen des jeweiligen Chlorphosphits bei -20°C zugegeben und das Reaktionsgemisch erneut auf Raumtemperatur gebracht. Nach vollständiger Umsetzung wurde die entstandene Phosphor-III-Verbindung erneut auf -20°C abgekühlt und in einer Eintopf-Reaktion mittels 3.00 – 4.00 Äquivalenten *t*Butylhydroperoxid (5-6 M Lösung in *n*-Decan) zu der entsprechenden Phosphor-V-Verbindung oxidiert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und 1 h nachgerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abdestilliert. Aus den so erhaltenen gelblichen Rohprodukten wurden in einer ersten Trennung (Essigester/Methanol 9:1 v/v) die Salze entfernt. Durch weitere Aufreinigung am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanol-Gradienten) wurden die gewünschten *cyclo*Sal-MSMPs, als farblose Feststoffe erhalten.

8.10.3.1 Darstellung von *cyclo*Saligenyl-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl-1-phosphat 32aI

Gemäß AAV 4 wurden 150 mg (0.43 mmol, 1.00 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose **78** und 183 μL (1.07 mmol, 2.50 Äquiv.) DIPEA in 5 mL abs. ACN gelöst

und 203 mg (1.07 mmol, 2.50 Äquiv.) *cyclo*Saligenylchlorphosphan **97a** zugetropft. Die Reaktionslösung wurde mit 140 μ L *t*BuOOH oxidiert.

Ausbeute: 131 mg (0.25 mmol, 59 %), farbloser Schaum

im Diastereomerenverhältnis 1:1

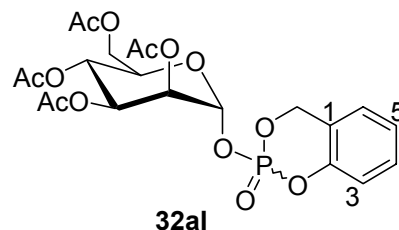
$C_{21}H_{25}O_{13}P = 516.39$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 30:1 v/v): R_F -Wert = 0.71

$[\alpha]_D^{20} = +0.06^\circ$ (c = 0.17, $CHCl_3$)

HPLC: $t_R = 17.16$ min Gradient B

MS (ESI⁺): m/z 539.3 (M+Na⁺), 555.3 (M+K⁺)



1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.35-7.30 (m, 2 H, -CH Aryl); 7.18-7.04 (m, 6 H, -CH Aryl); 5.80 (dd, 1 H, $^3J_{1',2'} = 1.9$ Hz, $^3J_{1',P'} = 6.2$ Hz, H-1'); 5.73 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.9$ Hz, $^3J_{1,P} = 6.7$ Hz, H-1); 5.43-5.25 (m, 9 H, $^3J_{3,4} = 10.0$ Hz, -CH₂, -CH₂', H-2', H-3, H-3', H-4, H-4'); 5.22 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.1$ Hz, H-2); 4.24 (dd, 2 H, $^2J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, H-6a, H-6a'); 4.15 (ddd, 1 H, $^3J_{4',5'} = 9.7$ Hz, $^3J_{5',6a'} = 5.0$ Hz, $^3J_{5',6b'} = 2.5$ Hz, H-5'); 4.09 (dd, 1 H, H-6b); 4.03 (dd, 1 H, $^2J_{6a',6b'} = 12.2$ Hz, H-6b'); 3.96 (ddd, 1 H, $^3J_{4,5} = 9.7$ Hz, $^3J_{5,6a} = 5.2$ Hz, $^3J_{5,6b} = 2.9$ Hz, H-5); 2.13, 2.12, 2.08, 2.07, 2.00, 1.97, 1.95, 1.94 (je s, je 3 H, -CH₃ Acetyl).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 171.00, 170.96, 170.53, 170.10, 169.93, 169.89, 169.83 (Cq Acetyl); 150.26, 150.19 (d, $^3J_{C2,P} = 7.0$ Hz, C2 Aryl); 131.01, 130.56 (C6 Aryl); 126.06, 125.85 (C4 Aryl); 121.09, 120.91 (C5 Aryl); 119.28, 119.08 (d, $^3J_{C1,P} = 9.3$ Hz, C1 Aryl); 115.88, 115.83 (C3 Aryl); 96.44, 96.30 (d, $^2J_{C-1,P} = 5.4$ Hz, C-1); 71.02, 70.95 (C-5); 69.08, 68.98 (d, $^2J_{C7,P} = 4.4$ Hz, -CH₂ Benzyl); 68.95, 68.60 (C-2); 68.49, 68.31 (C-4); 65.77, 65.55 (C-3); 62.29, 62.17 (C-6); 21.11, 21.08, 20.99, 20.97, 20.95, 20.93 (-CH₃ Acetyl).

^{13}C -gated (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 96.5 (d, $^1J_{C-1,H-1} = 179.5$ Hz, C-1)

^{31}P -NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = -10.8, -10.7

8.10.3.2 Darstellung von 3-Methyl-*cyclo*Saligenyl-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl-1-phosphat **32bI**

Gemäß AAV 4 wurden 99.0 mg (0.28 mmol, 1.00 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose **78** und 121 μ L (0.71 mmol, 2.50 Äquiv.) DIPEA in 4 mL abs. ACN gelöst und 144 mg (0.71 mmol, 2.50 Äquiv.) 3-Methyl-*cyclo*Saligenylchlorphosphan **97b** zugetropft. Die Reaktionslösung wurde mit 140 μ L *t*BuOOH oxidiert.

Ausbeute: 62.0 mg (0.12 mmol, 62 %), farbloser Schaum
im Diastereomerenverhältnis 1:1

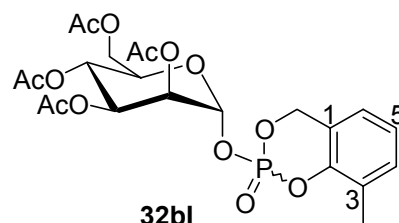
$C_{22}H_{27}O_{13}P = 530.12$ g/mol

DC (CH_2Cl_2 /MeOH 30:1 v/v): R_f -Wert = 0.89

$[\alpha]_D^{20} = +0.03^\circ$ (c = 0.35, $CHCl_3$)

HPLC: $t_R = 17.96$ min Gradient B

MS (ESI⁺): m/z 553.4 (M+Na⁺), 569.3 (M+K⁺)



1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.22-7.19, 7.09-7.04, 6.98-6.93 (je m, je 2 H, -CH Aryl); 6.04 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.9$ Hz, $^3J_{1,P} = 6.3$ Hz, H-1); 5.96 (dd, H, $^3J_{1',2'} = 1.2$ Hz, $^3J_{1',P} = 6.9$ Hz, H-1'); 5.42-5.29 (m, 10 H, H-2, H-2', -CH₂, -CH₂', H-3, H-3', H-4, H-4'); 4.30 (dd, 2 H, $^2J_{6a',6b'} = 11.9$ Hz, H-6a', H-6b'); 4.19 (ddd, 1 H, $^3J_{4',5'} = 9.5$ Hz, $^3J_{5',6a'} = 5.0$ Hz, $^3J_{5',6b'} = 1.9$ Hz, H-5'); 4.14 (dd, 1 H, $^3J_{5,6a} = 5.7$ Hz, H-6a); 4.02 (dd, 1 H, $^3J_{5,6b} = 2.5$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 12.6$ Hz, H-6b); 3.96 (ddd, 1 H, $^3J_{4,5} = 10.1$ Hz, H-5), 2.31, 2.30, 2.11, 2.09, 2.07, 2.03, 2.02, 2.01, 1.99, 1.96 (je s, je 3 H, 8x O-CH₃ Acetyl, 2x -CH₃ Aryl).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 169.60, 169.53, 169.35 (Cq Acetyl); 155.73, 155.45 (d, $^3J_{C2,P} = 7.3$ Hz, C2 Aryl); 131.88, 131.86 (C4 Aryl); 126.75, 126.68 (d, $^3J_{C1,P} = 9.3$ Hz, C1 Aryl); 124.75, 124.72 (C6 Aryl); 123.42, 123.38 (C3 Aryl); 115.05, 115.03 (C5 Aryl); 96.35, 96.22 (d, $^2J_{C-1,P} = 5.5$ Hz, C-1); 71.08, 70.02 (C-5); 69.45, 67.36 (d, $^2J_{C7,P} = 4.6$ Hz, -CH₂ Benzyl); 68.62, 68.58 (C-2); 68.58, 68.53 (C-4); 65.83, 65.53 (C-3); 62.35, 62.04 (C-6); 21.30, 21.28, 21.22, 21.17, 21.11, 21.09, 20.95, 20.05 (-CH₃ Acetyl); 15.75 (-CH₃ Aryl).

^{13}C -gated (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 96.1 (d, $^1J_{C-1,H-1} = 180.2$ Hz, C-1)

^{31}P -NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = -10.2, -9.9

8.10.3.3 Darstellung von 5-Chlor-*cyclo*Saligenyl-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl-1-phosphat **32cl**

Gemäß AAV 4 wurden 200 mg (0.57 mmol, 1.00 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose **78** und 153 μ L (1.15 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA in 5 mL abs. ACN gelöst und 256 mg (1.15 mmol, 2.00 Äquiv.) 5-Chlor-*cyclo*Saligenylchlorphosphan **97c** zugetropft. Die Reaktionslösung wurde mit 690 μ L *t*BuOOH oxidiert. Bei der Darstellung dieser Verbindung ist schnelles Arbeiten erforderlich.

Ausbeute: 19.5 mg (0.03 mmol, 6 %), leicht gelblicher Schaum

im Diastereomerenverhältnis 1:1

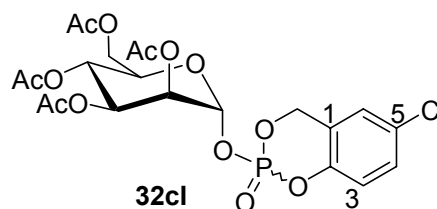
$C_{21}H_{24}ClO_{13}P = 550.06 \text{ g/mol}$

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 30:1 v/v): R_F -Wert = 0.75

$[\alpha]_D^{20} = +0.28^\circ$ ($c = 0.7$, $CHCl_3$)

HPLC: $t_R = 18.64$ min Gradient B

MS (ESI^+): m/z 573.3 ($M+Na^+$), 589.3 ($M+K^+$)



1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.33-7.29, 7.16-7.09, 7.06-6.99 (je m, je 2 H, -CH, -CH^c Aryl); 5.74 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.9$ Hz, $^3J_{1,P} = 6.3$ Hz, H-1); 5.63 (dd, 1 H, $^3J_{1',2'} = 1.9$ Hz, $^3J_{1',P'} = 6.2$ Hz, H-1'); 5.42-5.16 (m, 10 H, -CH₂, -CH₂', H-2, H-2', H-3, H-3', H-4, H-4'); 4.24 (dd, 2 H, $^2J_{6a,6b} = 12.6$ Hz, H-6a, H-6b); 4.16-4.06 (m, 3 H, $^2J_{6a',6b'} = 11.9$ Hz, H-5, H-6a', H-6b'); 3.97 (ddd, 1 H, $^3J_{4',5'} = 9.5$ Hz, $^3J_{5',6a'} = 4.4$ Hz, $^3J_{5',6b'} = 1.9$ Hz, H-5'); 3.96 (ddd, 1 H, $^3J_{5,6a} = 5.7$ Hz, $^3J_{5,6b} = 2.5$ Hz, H-5), 2.15, 2.13, 2.08, 2.07, 2.02, 1.99, 1.97, 1.96 (je s, je 3 H, -CH₃ Acetyl).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 172.12, 171.89, 171.53 (Cq Acetyl); 148.73, 148.45 (d, $^3J_{C2,P} = 7.3$ Hz, C2 Aryl); 131.88, 131.86 (C5 Aryl); 126.75, 126.68 (d, $^3J_{C1,P} = 9.3$ Hz, C1); 124.75, 124.72 (C4 Aryl); 123.42, 123.38 (C6 Aryl); 115.05 (C3 Aryl); 96.40, 96.34 (d, $^2J_{C1,P} = 5.3$ Hz, C-1); 71.07, 70.83 (C-5); 69.74, 69.22 (d, $^2J_{C7,P} = 4.6$ Hz, -CH₂ Benzyl); 69.11, 68.98 (C-2); 68.70, 68.56 (C-4); 65.94, 65.58 (C-3); 62.36, 62.07 (C-6); 21.30, 21.28, 21.22, 21.17, 21.11, 21.09, 20.95 (-CH₃ Acetyl).

^{31}P -NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = -11.2, -11.0

8.10.3.4 Darstellung von 3,5-Di-*t*butyl-*cyclo*Saligenyl-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl-1-phosphat **32el**

Gemäß AAV 4 wurden 150 mg (0.43 mmol, 1.00 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose **78** und 151 μ L (0.86 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA in 6 mL abs. ACN gelöst und 259 mg (0.86 mmol, 2.00 Äquiv.) 3,5-Di-*t*Butyl-*cyclo*Saligenylchlorphosphan zugetropft. Die Reaktionslösung wurde mit 192 μ L *t*BuOOH oxidiert.

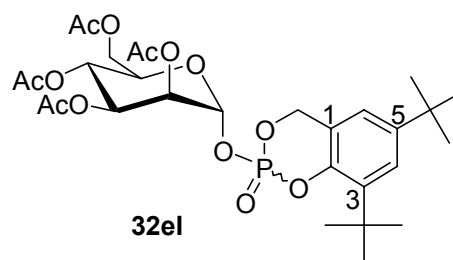
Ausbeute: 160 mg (0.26 mmol, 61 %), farbloser Schaum
im Diastereomerenverhältnis 1:0.7

$C_{29}H_{41}O_{13}P = 628.60$ g/mol

DC (CH_2Cl_2 /MeOH 30:1 v/v): R_F -Wert = 0.57

$[\alpha]_D^{20} = +0.25^\circ$ (c = 0.55, $CHCl_3$)

MS (ESI⁺): m/z 651.4 (M+Na⁺), 667.4 (M+K⁺)



¹H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.37-7.35, 7.00-6.95 (je m, je 2 H, -CH Aryl); 5.85 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.8$ Hz, $^3J_{1,P} = 6.9$ Hz, H-1); 5.82 (dd, 1 H, $^3J_{1',2'} = 1.8$ Hz, $^3J_{1',P} = 6.4$ Hz, H-1'); 5.40-5.24 (m, 10 H, H-2, H-2', -CH₂, -CH₂', H-3, H-3', H-4, H-4'); 4.32-4.24 (m, 2 H, H-6a', H-6b'); 4.17-4.08 (m, 4 H, $^3J_{5,6a} = 5.7$ Hz, $^3J_{5,6a} = 4.3$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, H-5, H-5', H-6a, H-6b); 2.17, 2.16, 2.09, 2.08, 2.03, 2.02, 1.99, 1.97 (je s, je 3 H, 8x -CH₃ Acetyl); 1.42, 1.31, 1.30 (je br.s, 36 H; -CH₃ *tert*-Bu).

¹³C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 170.52, 170.49, 170.34, 170.28 (Cq Acetyl); 149.79, 149.68 (d, $^3J_{C2,P} = 7.1$ Hz, C2 Aryl); 140.49 (C5 Aryl); 133.72, 134.69 (C3 Aryl); 126.98, 126.95 (C1 Aryl); 125.35, 125.22 (C6 Aryl); 121.00, 120.90 (C4 Aryl); 96.40, 96.34 (d, $^2J_{C-1,P} = 5.2$ Hz, C-1); 71.08, 70.02 (C-5); 69.45, 69.36 (d, $^2J_{C7,P} = 4.6$ Hz, -CH₂ Benzyl); 68.62, 68.58 (C-2); 68.58, 68.53 (C-4); 65.83, 65.53 (C-3); 62.35, 62.04 (C-6); 35.67 (Cq *tert*-Bu C3); 31.79, 30.28 (-CH₃ *tert*-Bu C5); 25.37 (Cq *tert*-Bu); 21.10, 21.07, 21.01, 20.95, 20.21 (-CH₃ Acetyl).

¹³C-gated (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 96.4 (d, $^1J_{C-1,H-1} = 178.0$ Hz, C-1)

³¹P-NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = -9.7, -9.2

8.10.3.5 Darstellung von 5-*t*Butyl-*cyclo*Saligenyl-tetra-*O*-levulinyl- α -D-mannopyranosyl-1-phosphat **32dIII**

Gemäß AAV 4 wurden 340 mg (0.59 mmol, 1.00 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-levulinyl-D-mannopyranose **83** und 251 μ L (1.47 mmol, 2.50 Äquiv.) DIPEA in 5 mL abs. ACN gelöst und 360 mg (1.47 mmol, 2.50 Äquiv.) 5-*t*Butyl-*cyclo*Saligenylchlorphosphan **97d** zugetropft. Die Reaktionslösung wurde mit 150 μ L *t*BuOOH oxidiert.

Ausbeute: 128 mg (0.16 mmol, 27 %), farbloser Schaum

im Diastereomerenverhältnis 1:0.9

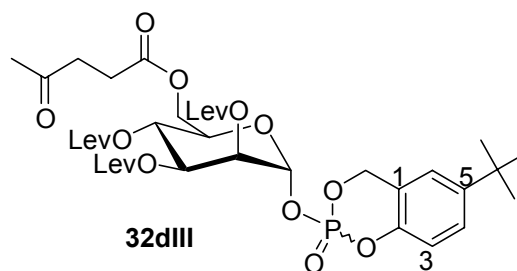
$C_{37}H_{49}O_{17}P = 796.75$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v): R_F -Wert = 0.83

$[\alpha]_D^{20} = +0.18^\circ$ (c = 0.7, $CHCl_3$)

HPLC: $t_R = 19.92$ min Gradient B

MS (ESI^+): m/z 819.4 ($M+Na^+$), 835.3 ($M+K^+$)



1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.36-7.32, 7.12-7.06, 7.02-6.89 (je m, 6 H, -CH Aryl); 5.80 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.9$ Hz, $^3J_{1,P} = 6.7$ Hz, H-1); 5.79 (dd, 1 H, $^3J_{1',2'} = 1.2$ Hz, $^3J_{1',P} = 6.2$ Hz, H-1'); 5.36-5.24 (m, 10 H, H-2, H-2', -CH₂, -CH₂', H-3, H-3', H-4, H-4'); 4.26-4.18 (m, 3 H, H-5, H-6a, H-6a'); 4.16-4.08 (m, 3 H, H-5', H-6b, H-6b'); 2.85-2.40 (m, 32 H, -CH₂ Lev); 2.19-2.17, 2.14-2.12 (je m, je 12 H, -CH₃ Lev); 1.40 (s, 18 H, *tert*-Bu).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 207.48, 207.29, 206.97, 206.70, 206.38 (Cq Keton Lev); 172.68, 172.15, 171.98, 171.93, 171.86, 171.68 (Cq Ester Lev); 150.13, 150.09 (d, $^2J_{C2,P} = 7.0$ Hz, C2 Aryl); 140.32, 140.07 (C3 Aryl); 128.34, 128.25 (C6 Aryl); 124.87, 124.23 (C4 Aryl); 123.91, 123.89 (C5 Aryl); 122.95, 122.86 (d, $^3J_{C1,P} = 9.3$ Hz, C1 Aryl); 96.35, 96.29 (d, $^2J_{C-1,P} = 5.5$ Hz, C-1); 71.08, 70.98 (C-3); 69.44, 69.40, 69.33, 69.31 (d, $^2J_{C7,P} = 4.4$ Hz, -CH₂ Benzyl); 69.20, 69.16 (C-2); 69.04, 68.57 (C-5); 65.62, 65.28 (C-4); 62.51, 62.17 (C-6); 38.11, 38.05 (-CH₂ Keton Lev); 35.22 (Cq *tert*-Bu); 31.28, 30.21, 30.14, 30.03 (-CH₃ *tert*-Bu); 28.52, 28.37 (-CH₂ Ester Lev); 21.05, 20.98, 20.87 (-CH₃ Lev).

^{31}P -NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = -10.1, -9.8

8.10.3.6 Darstellung von *cyclo*Saligenyl-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl-1-phosphat **33al**

Gemäß AAV 4 wurden 150 mg (0.43 mmol, 1.00 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranose **79** und 151 μ L (0.86 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA in 6 mL abs. ACN gelöst und 162 mg (0.86 mmol, 2.00 Äquiv.) *cyclo*Saligenylchlorphosphan **97a** zugetropft. Die Reaktionslösung wurde mit 270 μ L *tert*-BuOOH oxidiert.

Ausbeute: 51.3 mg (0.10 mmol, 23 %), farbloser Schaum
im Diastereomerenverhältnis 1:0.7

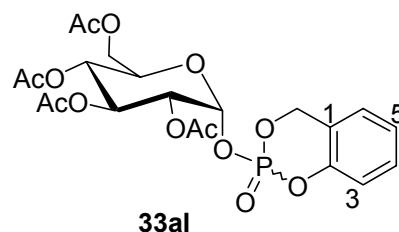
$C_{21}H_{25}O_{13}P = 516.10$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 30:1 v/v): R_F -Wert = 0.68

$[\alpha]_D^{20} = +0.03$ (c = 0.25, $CHCl_3$)

HPLC: $t_R = 17.17$ min Gradient B

MS (ESI^+): m/z 539.3 ($M+Na^+$), 555.3 ($M+K^+$)



1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.40-7.34 (m, 2 H, -CH Aryl); 7.22-7.06 (m, 6 H, -CH Aryl); 6.04 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 3.5$ Hz, $^3J_{1,P} = 6.9$ Hz, H-1); 5.97 (dd, 1 H, $^3J_{1',2'} = 3.3$ Hz, $^3J_{1',P'} = 6.6$ Hz, H-1'); 5.49-5.36 (m, 6 H, -CH₂, -CH₂', H-3, H-3'); 5.12 (dd, 2 H, $^3J_{3,4} = 9.6$ Hz, $^3J_{4,5} = 9.7$ Hz, $^3J_{3',4'} = 9.6$ Hz, $^3J_{4',5'} = 9.7$ Hz, H-4, H-4'); 5.04 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 2.7$ Hz, H-2); 4.99 (dd, 1 H, $^3J_{2',3'} = 2.7$ Hz, H-2'); 4.30-4.20 (m, 2 H, $^3J_{5,6a} = 4.6$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 12.0$ Hz, H-6a, H-5'); 4.14-4.09 (m, 2 H, H-6a', H-6b); 4.01-3.98 (m, 2 H, H-5', H-6b'); 2.11, 2.09, 2.08, 2.03, 2.02, 2.01, 1.99, 1.97 (je s, je 3 H, -CH₃ Acetyl).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 170.94, 170.52, 170.13, 169.82, 169.66 (Cq Acetyl); 151.57, 151.79 (d, $^3J_{C2,P} = 7.0$ Hz, C2 Aryl); 131.11, 131.04 (C4 Aryl); 126.08, 126.01 (d, $^3J_{C1,P} = 9.0$ Hz, C1 Aryl); 121.12, 120.97 (C6 Aryl); 119.31, 119.24 (C3); 115.88, 115.83 (C5 Aryl); 96.89, 96.81 (d, $^2J_{C-1,P} = 5.0$ Hz, C-1); 71.32, 71.26 (C-5); 70.28, 70.13 (C-3); 69.02, 68.97 (C-2); 68.62, 68.53 (d, $^2J_{C7,P} = 6.1$ Hz, -CH₂ Benzyl); 67.25, 67.21 (C-4); 62.47, 62.38 (C-6); 21.05, 21.02, 20.90, 20.75 (-CH₃ Acetyl).

^{31}P -NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = -10.6, -10.3

8.10.3.7 Darstellung von 3-Methyl-*cyclo*Saligenyl-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl-1-phosphat **33bl**

Gemäß AAV 4 wurden 150 mg (0.43 mmol, 1.00 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranose **79** und 150 μ L (0.88 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA in 6 mL abs. ACN gelöst und 185 mg (0.91 mmol, 2.10 Äquiv.) 3-Methyl-*cyclo*Saligenylchlorphosphan **97b** zugetropft. Die Reaktionslösung wurde mit 270 μ L *t*BuOOH oxidiert.

Ausbeute: 87.0 mg (0.16 mmol, 38 %), farbloser Schaum

im Diastereomerenverhältnis 1:1

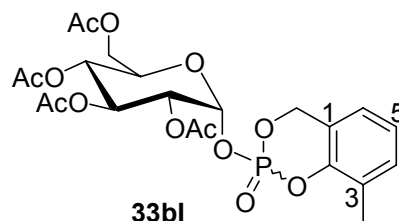
$C_{22}H_{27}O_{13}P = 530.12$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 30:1 v/v): R_F -Wert = 0.66

$[\alpha]_D^{20} = +0.45^\circ$ (c = 0.37, $CHCl_3$)

HPLC: $t_R = 18.01$ min Gradient B

MS (ESI^+): m/z 553.4 ($M+Na^+$), 569.4 ($M+K^+$)



1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.23-7.19, 7.10-7.04, 6.98-6.94 (je m, je 2 H, -CH Aryl); 6.05 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 3.3$ Hz, $^3J_{1,P} = 7.1$ Hz, H-1) 5.97 (dd, 1 H, $^3J_{1',2'} = 3.3$ Hz, $^3J_{1',P} = 6.6$ Hz, H-1'); 5.48-5.32 (m, 6 H, -CH₂, -CH₂', H-3, H-3'); 5.12 (dd, 2 H, $^3J_{3,4} = 9.9$ Hz, $^3J_{3',4'} = 9.9$ Hz, H-4, H-4'); 5.03 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 10.2$ Hz, H-2); 4.98 (dd, 1 H, $^3J_{2',3'} = 10.2$ Hz, H-2'); 4.27 (dd, 1 H, $^3J_{5,6a} = 4.4$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 12.0$ Hz, H-6a); 4.25 (dd, 1 H, $^3J_{5',6b'} = 2.3$ Hz, $^2J_{6a',6b'} = 11.9$ Hz, H-6b'); 4.19 (ddd, 1 H, $^3J_{5,6a} = 2.5$ Hz, $^3J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-5); 4.14 (dd, 1 H, $^3J_{5',6a'} = 5.0$ Hz, H-6a'); 4.04-3.96 (m, 2 H, $^3J_{4',5'} = 9.5$ Hz, H-5', H-6b'); 2.31, 2.30 (je s, je 3 H, -CH₃ Aryl); 2.11, 2.09, 2.07, 2.03, 2.02, 2.01, 1.99, 1.96 (je s, je 3 H, 8x -CH₃ Acetyl).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 171.23, 169.77, 169.67 (Cq Acetyl); 148.69, 148.53 (d, $^3J_{C2,P} = 7.3$ Hz, C2 Aryl); 132.21, 132.28 (C4 Aryl); 126.75, 126.68 (d, $^3J_{C1,P} = 9.3$ Hz, C1); 124.73, 124.68 (C6 Aryl); 123.63, 123.59 (C5 Aryl); 117.64, 117.60 (C3 Aryl); 95.06, 95.01 (d, $^2J_{C-1,P} = 6.1$ Hz, C-1); 70.21, 70.06 (d, $^3J_{C-2,P} = 7.0$ Hz, C-2); 69.63, 69.39 (C-5); 68.89, 68.82 (C-3); 67.43, 67.36 (d, $^2J_{C7,P} = 4.6$ Hz, -CH₂ Benzyl); 67.85, 67.83 (C-4); 61.69, 61.35 (C-6); 21.07, 21.03, 20.92, 20.81, 20.70 (-CH₃ Acetyl); 15.76, 15.70 (-CH₃ Aryl).

^{31}P -NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = -9.7, -9.5

8.10.3.8 Darstellung von 5-*t*Butyl-*cyclo*Saligenyl-tetra-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-1-phosphat **32dII**

Gemäß AAV 4 wurden 129 mg (0.30 mmol, 1.00 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranose **78** und 125 μ L (0.75 mmol, 2.50 Äquiv.) DIPEA in 4 mL abs. ACN gelöst und 180 mg (0.75 mmol, 2.50 Äquiv.) 5-*t*Butyl-*cyclo*Saligenylchlorphosphan **97d** zugetropft. Die Reaktionslösung wurde mit 150 μ L *t*BuOOH oxidiert.

Ausbeute: 173 mg (0.21 mmol, 70 %), farbloser Schaum

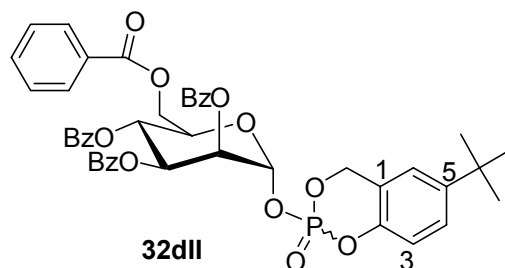
im Diastereomerenverhältnis 1:1

$C_{45}H_{41}O_{13}P = 820.77$ g/mol

DC (CH_2Cl_2 /MeOH 9:1 v/v): R_F -Wert = 0.81

$[\alpha]_D^{20} = +0.18^\circ$ (c = 0.33, $CHCl_3$)

MS (ESI⁺): m/z 843.3 (M+Na⁺), 859.3 (M+K⁺)



¹H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.08-8.06, 7.98-7.95, 7.89-7.86, 7.77-7.73 (je m, je 4 H, -CH Bz *ortho*); 7.62-7.34 (m, 24 H, -CH Bz); 7.32-6.92 (m, 6 H, Aryl); 6.20 (vt, 1 H, $^3J_{3,4} = 10.1$ Hz, $^3J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4); 6.14-6.08 (m, 3 H, H-2, H-2', H-4'); 5.89 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.5$ Hz, H-3); 5.87 (dd, H, $^3J_{2',3'} = 3.3$ Hz, $^3J_{3',4'} = 10.0$ Hz, H-3'); 5.84-5.80 (m, 2 H, $^3J_{1,2} = 2.3$ Hz, $^3J_{1,p} = 5.6$ Hz, H-1, H-1'); 5.48-5.32 (m, 4 H, -CH₂ Benzyl); 4.71 (dd, 1 H, $^3J_{5,6a} = 4.5$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, H-6a); 4.67 (dd, 1 H, $^3J_{5,6b} = 2.5$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, H-6b); 4.62-4.58 (m, 2 H, $^3J_{4',5'} = 9.9$ Hz, H-5, H-5'); 4.48-4.42 (m, 2 H, $^3J_{5',6a'} = 5.0$ Hz, $^3J_{5',6b'} = 2.8$ Hz, $^2J_{6a',6b'} = 12.2$ Hz, H-6a', H-6b'); 1.45 (s, 18 H, *tert*-Bu).

¹³C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 166.54, 166.04, 165.80, 165.56 (C=O Bz); 150.13, 150.09 (d, $^2J_{C2,p} = 7.0$ Hz, C2 Aryl); 140.16, 140.09 (C5 Aryl); 133.97, 133.96, 133.94, 133.83, 133.71, 133.61 (-CH Bz *para*); 130.33, 130.30, 130.28, (Cq Bz) 130.22, 130.14, 130.09, 130.06, 130.03 (-CH Bz); 129.24, 129.00 (d, $^3J_{C1,p} = 9.3$ Hz, C1 Aryl); 128.85, 128.80, 128.75, 128.16 (-CH Bz); 124.69 (C4 Aryl); 124.05, 123.96 (C6 Aryl); 116.97 (C3 Aryl); 95.48, 95.42 (d, $^2J_{C-1,p} = 5.4$ Hz, C-1); 71.18, (C-3); 71.09 (C-2); 70.63, (C-5); 70.09 (C-4); 69.18, 69.12 (d, $^2J_{C7,p} = 4.3$ Hz, -CH₂ Benzyl); 62.95 (C-6); 35.22 (Cq *tert*-Bu); 30.22 (-CH₃ *tert*-Bu).

³¹P-NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = -10.3, -9.6

8.10.3.9 Darstellung von 5-*t*Butyl-*cyclo*Saligenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranosyl-1-phosphat **33dll**

Gemäß AAV 4 wurden 179 mg (0.30 mmol, 1.00 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl-D-glucopyranose **79** und 125 μ L (0.74 mmol, 2.50 Äquiv.) DIPEA in 4 mL abs. ACN gelöst und 180 mg (0.74 mmol, 2.50 Äquiv.) 5-*t*Butyl-*cyclo*Saligenylchlorphosphan **97d** zugetropft. Die Reaktionslösung wurde mit 150 μ L *t*BuOOH oxidiert.

Ausbeute: 171 mg (0.20 mmol, 68 %), farbloser Schaum

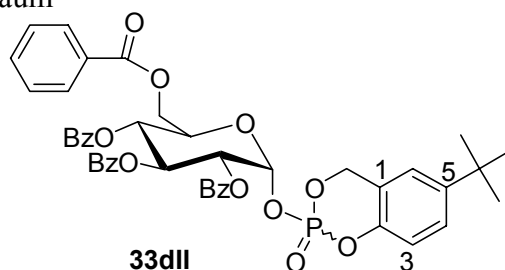
im Diastereomerenverhältnis 1:0.7

$C_{45}H_{41}O_{13}P = 820.77$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 30:1 v/v): R_F -Wert = 0.78

$[\alpha]_D^{20} = +0.10^\circ$ (c = 0.22, $CHCl_3$)

MS (ESI⁺): m/z 843.3 (M+Na⁺), 859.3 (M+K⁺)



¹H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.91-7.38 (m, 46 H, -CH, Benzoyl, Aryl); 6.34 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 3.5$ Hz, $^3J_{1,P} = 6.7$ Hz, H-1); 6.30 (dd, 1 H, $^3J_{1',2'} = 3.3$ Hz, $^3J_{1',P'} = 6.1$ Hz, H-1'); 6.12 (vt, 2 H, $^3J_{3,4} = 10.0$ Hz, $^3J_{4,5} = 9.9$ Hz, $^3J_{3',4'} = 10.0$ Hz, $^3J_{4',5'} = 9.9$ Hz, H-4, H-4'); 5.82-5.68 (m, 2 H, $^3J_{2,3} = 3.3$ Hz, $^3J_{2',3'} = 3.3$ Hz, H-3, H-3'); 5.50-5.44 (m, 2 H, H-2, H-2'); 5.42-5.16 (m, 4 H, -CH₂, -CH₂'); 4.68-4.56 (m, 4 H, $^3J_{5,6a} = 5.0$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 12.7$ Hz, H-5, H-5', H-6a, H-6a'); 4.48-4.41 (m, 2 H, $^3J_{5',6b'} = 2.2$ Hz, H-6b, H-6b'); 1.47 (s, 18 H, *tert*-Bu).

¹³C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 169.21, 169.19, 169.05, 168.94 (C=O Bz); 151.09, 151.00 (d, $^2J_{C2,P} = 7.0$ Hz, C2 Aryl); 139.82, 139.76 (C5 Aryl); 133.98, 133.71, 133.60 (-CH Bz *para*); 130.47, 130.41, 130.32, 130.25, 130.19 (-CH Bz); 129.82, 129.78, 129.72 (Cq Bz); 129.56, 129.53 (d, $^3J_{C1,P} = 9.3$ Hz, C1 Aryl); 128.84, 128.77, 128.15 (-CH Bz); 124.70, 124.42 (C4 Aryl); 123.97, 123.86 (C6 Aryl); 119.97, 119.92 (C3 Aryl); 95.74, 95.43 (d, $^2J_{C-1,P} = 5.2$ Hz, C-1); 74.41, 74.36 (C-2); 70.93, 70.90 (C-5); 70.64, 70.08 (C-3); 69.24, 69.21 (d, $^2J_{C7,P} = 4.4$ Hz, -CH₂ Benzyl); 68.86, 68.79 (C-4); 62.61, 62.04 (C-6); 35.03 (Cq *tert*-Bu); 30.22, 30.17, 30.06 (-CH₃ *tert*-Bu).

³¹P-NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = -10.3, -10.1

8.10.3.10 Darstellung von *cyclo*Saligenyl-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosyl-6-phosphat **36a**

Gemäß AAV 4 wurden 150 mg (0.42 mmol, 1.00 Äquiv.) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid **96** und 145 μ L (0.84 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA in 6 mL abs. ACN gelöst und 169 mg (0.84 mmol, 2.00 Äquiv.) *cyclo*Saligenylchlorphosphan **97a** zugetropft. Die Reaktionslösung wurde mit 250 μ L *t*BuOOH oxidiert.

Ausbeute: 139 mg (0.26 mmol, 64 %), farbloser Schaum
im Diastereomerenverhältnis 1:0.8:0.6:0.6

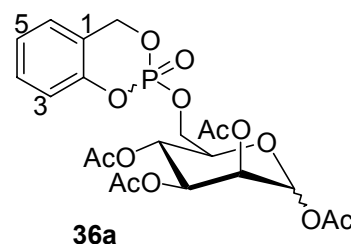
$C_{21}H_{25}O_{13}P = 516.10$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v): R_F -Wert = 0.89

$[\alpha]_D^{20} = +0.11^\circ$ (c = 0.35, $CHCl_3$)

HPLC: $t_R = 16.75$ min, 17.09 min Gradient B

MS (ESI⁺): m/z 539.3 (Na⁺), 555.3 (M+K⁺)



¹H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.34-7.29, 7.19-7.03 (je m, 16 H, -CH Aryl); 6.06 (d, 1 H, $^3J_{1\alpha,2\alpha} = 1.6$ Hz, H-1 α); 6.01 (d, 1 H, $^3J_{1'\alpha,2'\alpha} = 1.6$ Hz, H-1' α); 5.87 (d, 1 H, $^3J_{1\beta,2\beta} = 0.9$ Hz, H-1 β); 5.83 (d, 1 H, $^3J_{1\beta',2\beta'} = 0.9$ Hz, H-1' β); 5.48-5.20 (m, 18 H, H-2 α , H-2' α , H-2 β , H-2' β , H-3 α , H-3' α , H-3 β , H-3' β , H-4 α , H-4' α , -CH₂ α , -CH₂' α , -CH₂ β , -CH₂' β); 5.14 (t, 1 H, H-4 β); 5.12 (t, 1 H, H-4' β); 4.40-4.20 (m, 8 H, H-6 $\alpha\alpha$, H-6 $\alpha'\alpha$, H-6 $\beta\alpha$, H-6 $\beta'\alpha$, H-6 $\alpha\beta$, H-6 $\alpha'\beta$, H-6 $\beta\beta$, H-6 $\beta'\beta$); 4.15 (ddd, 1 H, $^3J_{4\alpha,5\alpha} = 8.5$ Hz, $^3J_{5\alpha,6\alpha\alpha} = 6.0$ Hz, $^3J_{5\alpha,6\beta\alpha} = 2.3$ Hz, H-5 α); 4.08 (ddd, 1 H, $^3J_{4\beta,5\beta} = 8.5$ Hz, $^3J_{5\beta,6\alpha\beta} = 6.0$ Hz, $^3J_{5\beta,6\beta\beta} = 2.3$ Hz, H-5 β); 3.90-3.81 (m, 1 H, H-5' α , H-5' β); 2.17, 2.16, 2.15, 2.11, 2.10, 2.09, 2.08, 2.07, 2.06, 2.01, 2.00 (je s, je 3 H, -CH₃ Acetyl).

¹³C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 170.45, 170.31, 170.29, 168.61, 168.44, 168.33 (Cq Acetyl); 150.56, 150.49 (d, $^3J_{C2,P} = 7.0$ Hz, C2 Aryl); 130.32, 130.13 (C6 Aryl); 125.67, 125.59 (C4 Aryl); 124.67, 124.58 (C5 Aryl); 119.51, 119.44 (d, $^3J_{C1,P} = 9.3$ Hz, C1); 119.18, 119.09 (C3 Aryl); 90.77, 90.70, 90.60 (C-1); 71.60, 71.53, 71.46, 71.39 (d, $^2J_{C-5,P} = 6.1$ Hz, C-5); 70.85, 70.79 (C-2); 69.21, 69.15, 69.08, 69.04 (d, $^2J_{C7,P} = 5.0$ Hz, -CH₂ Benzyl); 68.72, 68.42 (C-3); 66.91, 66.83, 68.76 (d, $^3J_{C-6,P} = 5.9$ Hz C-6); 66.03, 65.88, 65.84 (C-4); 21.25, 21.18, 21.10, 21.06, 21.04, 21.01, 20.96, 20.92 (-CH₃ Acetyl).

^{31}P -NMR (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -8.2, -8.3, -8.5, -8.7

8.10.3.11 Darstellung von 3-Methyl-*cyclo*Saligenyl-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosyl-6-phosphat **36b**

Gemäß AAV 4 wurden 150 mg (0.42 mmol, 1.00 Äquiv.) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid **96** und 145 μL (0.84 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA in 6 mL abs. ACN gelöst und 170 mg (0.84 mmol, 2.00 Äquiv.) 3-Methyl-*cyclo*Saligenylchlorphosphan **97b** zugetropft. Die Reaktionslösung wurde mit 250 μL *t*BuOOH oxidiert.

Ausbeute: 148 mg (0.28 mmol, 67 %), farbloser Schaum

im Diastereomerenverhältnis 1:0.8:0.4:0.3

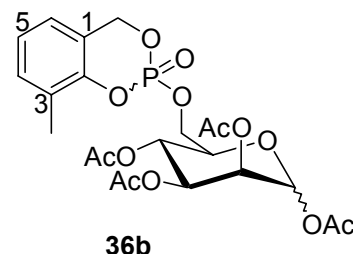
$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{O}_{13}\text{P}$ = 530.12 g/mol

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30:1 v/v): R_f -Wert = 0.71

$[\alpha]_D^{20} = +0.14^\circ$ (c = 0.5, CHCl_3)

HPLC: t_R = 17.64 min, 18.00 min Gradient B

MS (ESI^+): m/z 553.3 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 569.3 ($\text{M}+\text{K}^+$)



^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.20-7.13, 7.05-6.97, 6.93-6.88 (je m, 12 H, -CH Aryl); 6.05 (d, 1 H, $^3J_{1\alpha,2\alpha} = 1.5$ Hz, H-1 α); 5.99 (d, 1 H, $^3J_{1'\alpha,2'\alpha} = 1.6$ Hz, H-1' α); 5.87 (d, 1 H, $^3J_{1\beta,2\beta} = 0.9$ Hz, H-1 β); 5.82 (d, 1 H, $^3J_{1'\beta,2'\beta} = 0.9$ Hz, H-1' β); 5.48-5.20 (m, 18 H, H-2 α , H-2' α , H-2 β , H-2' β , H-3 α , H-3' α , H-3 β , H-3' β , H-4 α , H-4' α , -CH $_2\alpha$, -CH $_2'\alpha$, -CH $_2\beta$, -CH $_2'\beta$); 5.16-5.10 (m, 2 H, H-4 β , H-4' β); 4.40-4.20 (m, 8 H, H-6 $\alpha\alpha$, H-6 $\alpha'\alpha$, H-6 $\beta\alpha$, H-6 $\beta'\alpha$, H-6 $\alpha\beta$, H-6 $\alpha'\beta$, H-6 $\beta\beta$, H-6 $\beta'\beta$); 4.15 (ddd, 1 H, $^3J_{4\alpha,5\alpha} = 8.8$ Hz, $^3J_{5\alpha,6\alpha\alpha} = 5.8$ Hz, $^3J_{5\alpha,6\alpha\beta} = 2.7$ Hz, H-5 α); 4.06 (ddd, 1 H, $^3J_{4\beta,5\beta} = 8.8$ Hz, $^3J_{5\beta,6\alpha\beta} = 5.8$ Hz, $^3J_{5\beta,6\beta\beta} = 2.7$ Hz, H-5 β); 3.87 (ddd, 1 H, $^3J_{5'\alpha,6\alpha'\alpha} = 5.8$ Hz, $^3J_{5'\alpha,6\beta'\alpha} = 2.7$ Hz, $^3J_{4'\alpha,5'\alpha} = 8.8$ Hz, H-5' α); 3.81 (ddd, 1 H, $^3J_{4'\beta,5'\beta} = 8.8$ Hz, $^3J_{5'\beta,6\alpha'\beta} = 5.8$ Hz, $^3J_{5'\beta,6\beta'\beta} = 2.7$ Hz, H-5' β); 2.40, 2.36, 2.29, 2.28, 2.24, 2.17, 2.15, 2.14, 2.11, 2.10, 2.09, 2.08, 2.07, 2.06, 2.01, 2.00 (je s, je 3 H, -CH $_3$ Acetyl); 1.99 (br.s, 12 H, -CH $_3$ Aryl).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.46, 170.33, 170.30, 170.14, 168.63, 168.46, 168.35, 168.21, 168.14 (Cq Acetyl); 149.08, 149.01 (d, $^3J_{\text{C}2,\text{P}} = 6.7$ Hz, C2 Aryl); 131.46, 131.40, 131.33 (C4 Aryl); 128.74, 128.52 (d, $^3J_{\text{C}1,\text{P}} = 9.2$ Hz C1 Aryl); 126.20, 124.56, 124.23, 124.21, 123.71, 123.28, 123.15, 123.02 (C6 Aryl); 120.87, 120.34, 120.28 (C3 Aryl); 119.76,

119.74 (C5 Aryl); 90.78, 90.70, 90.59 (C-1); 71.59, 71.52, 71.46, 71.40 (d, $^2J_{C-5,P} = 6.2$ Hz, C-5); 70.89, 70.83 (C-2); 69.08, 69.02 (d, $^2J_{C7,P} = 5.0$ Hz, -CH₂ Benzyl); 68.85, 68.82 (C-3); 68.72, 68.69, 68.49, 68.44 (d, $^3J_{C-6,P} = 5.9$ Hz, C-6); 66.03, 65.87, 65.81 (C-4); 21.21, 21.16, 21.07, 21.03, 20.99, 20.92, 20.90 (-CH₃ Acetyl); 15.73 (-CH₃ Aryl).

^{31}P -NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -9.5, -9.7, -9.9

8.10.3.12 Darstellung von 5-Chlor-*cyclo*Saligenyl-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosyl-6-phosphat **36c**

Gemäß AAV 4 wurden 150 mg (0.42 mmol, 1.00 Äquiv.) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosid **96** und 145 μL (0.84 mmol, 2.00 Äquiv.) DIPEA in 6 mL abs. ACN gelöst und 187 mg (0.84 mmol, 2.00 Äquiv.) 5-Chlor-*cyclo*Saligenylchlorphosphan **97c** zugetropft. Die Reaktionslösung wurde mit 250 μL *t*BuOOH oxidiert und verfärbte sich rötlich während der Zugabe. Schnelles Arbeiten ist bei der chromatographischen Aufreinigung erforderlich.

Ausbeute: 17.3 mg (0.03 mmol, 7.4 %), leicht gelblicher Schaum

im Diastereomerenverhältnis 1:0.6:0.6:0.5

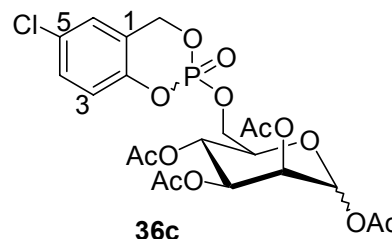
$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClO}_{13}\text{P} = 550.06$ g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v): R_f -Wert = 0.86

$[\alpha]_D^{20} = -0.01^\circ$ (c = 0.1, CHCl₃)

HPLC: $t_R = 18.32$ min, 18.67 min Gradient B

MS (ESI⁺): m/z 573.3 (M+Na⁺), 589.2 (M+K⁺)



^1H -NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.47-6.92 (m, 12 H, -CH Aryl); 6.08 (d, 1 H, $^3J_{1\alpha,2\alpha} = 1.6$ Hz, H-1 α); 6.06 (d, 1 H, $^3J_{1'\alpha,2'\alpha} = 1.6$ Hz, H-1' α); 5.84 (d, 1 H, $^3J_{1\beta,2\beta} = 0.9$ Hz, H-1 β); 5.82 (d, 1 H, $^3J_{1'\beta,2'\beta} = 0.9$ Hz, H-1' β); 5.47-5.06 (m, 20 H, H-2 α , H-2' α , H-2 β , H-2' β , H-3 α , H-3' α , H-3 β , H-3' β , H-4 α , H-4' α , H-4 β , H-4' β -CH₂ α , -CH₂' α , -CH₂ β , -CH₂' β); 4.37-3.85 (m, 12 H, H-5 α , H-5 β , H-5' α , H-5' β , H-6 α , H-6' α , H-6 β , H-6' β , H-6 α , H-6' α , H-6 β , H-6' β); 2.17, 2.16, 2.15, 2.11, 2.10, 2.09, 2.08, 2.07, 2.06, 2.01, 2.00 (je s, je 3 H, -CH₃ Acetyl).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.47, 170.33, 170.31, 168.63, 168.47, 168.35 (Cq Acetyl); 148.73, 148.45 (C2 Aryl); 131.88, 131.86 (C5 Aryl); 126.74, 126.67 (d, $^3J_{C1,P} = 9.3$

Hz, C1); 125.63, 125.58 (C4 Aryl); 123.40, 123.36 (C6 Aryl); 115.12, 115.09 (C3 Aryl); 90.77, 90.71, 90.62, 90.54 (C-1); 71.58, 71.52, 71.44 (d, $^2J_{C-5,P} = 6.1$ Hz, C-5); 70.87, 70.83, 70.78 (C-2); 69.38, 69.31, 69.28 (d, $^2J_{C7,P} = 5.0$ Hz, -CH₂ Benzyl); 69.13, 69.08 (C-3); 68.73, 68.40 (d, $^3J_{C-6,P} = 5.9$ Hz C-6); 66.05, 65.89, 65.85 (C-4); 21.21, 21.18, 21.07, 21.04, 20.99, 20.91 (-CH₃ Acetyl).

^{31}P -NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -8.8, -8.9, -9.1, -9.2

8.10.3.13 Darstellung von bis-(*para*-Acetoxybenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosyl-1-phosphat **34**

Eine Lösung aus 150 mg (0.42 mmol, 0.80 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose **78** und 77.0 mg 1*H*-Tetrazol (1.10 mmol, 2.50 Äquiv.) wurden in 6 mL abs. Acetonitril gelöst. Danach wurden 234 mg (0.54 mmol, 1.00 Äquiv.) bis-(*para*-Acetoxybenzyl)-*N,N*-diethylphosphoramidit **50b**, gelöst in 2 mL abs. Acetonitril, zugetropft und die Lösung bei Raumtemperatur 45 min gerührt. Nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) wurde das Reaktionsgemisch auf -40 °C abgekühlt und mit 196 μL *t*Butylhydroperoxid (5-6 M Lösung in *n*-Decan, 2.00 Äquiv.) oxidiert. Nachdem der Ansatz langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 30 min gerührt worden war, wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der leicht gelbliche Sirup wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-5%) aufgereinigt.

Ausbeute: 116 mg (0.16 mmol, 38 %), farbloser Schaum

im Anomerenverhältnis $\alpha/\beta \approx 1:0.3$

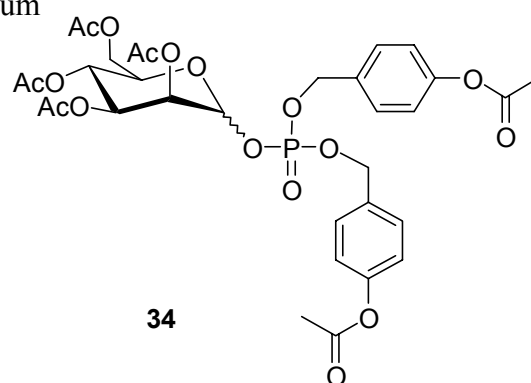
$\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{O}_{17}\text{P} = 724.60$ g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 30:1 v/v): R_F -Wert = 0.58

$[\alpha]_D^{20} = +0.11^\circ$ (c = 0.7, CHCl₃)

HPLC: $t_R = 19.52$ min mit Gradient B

MS (ESI⁺): m/z 747.3 (M+Na⁺), 763.2 (M+K⁺)



^1H -NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.39-7.32 (m, 8 H, -CH Aryl *ortho*); 7.11-7.04 (m, 8 H, -CH Aryl *meta*); 5.60 (dd, 1 H, $^3J_{1\alpha,2\alpha} = 1.9$ Hz, $^3J_{1\alpha,P\alpha} = 4.4$ Hz, H-1 α); 5.41 (dd, 1 H, $^3J_{1\beta,2\beta} = 1.4$ Hz, $^3J_{1\beta,P\beta} = 7.5$ Hz, H-1 β); 5.30-5.26 (m, 4 H, H-2 α , H-2 β , H-3 α , H-3 β); 5.23 (br.s, 2 H, H-4 α , H-4 β); 5.09-5.02 (m, 8 H, -CH₂ α , -CH₂ β); 4.21-4.16 (m, 3 H, H-6 α , H-

6a β ; H-6b β); 4.06 (ddd, 2 H, $^3J_{4\alpha,5\alpha} = 9.5$ Hz, $^3J_{5\alpha,6a\alpha} = 4.4$ Hz, $^3J_{5\alpha,6b\alpha} = 1.9$ Hz, $^3J_{4\beta,5\beta} = 9.5$ Hz, $^3J_{5\beta,6a\beta} = 4.4$ Hz, $^3J_{5\beta,6b\beta} = 1.9$ Hz, H-5 α , H-5 β); 3.98 (dd, 1 H, $^2J_{6a\alpha,6b\alpha} = 12.6$ Hz, H-6b α); 2.26 (s, 12 H, -CH₃ Aryl); 2.14, 2.03, 2.00, 1.98 (je s, je 6 H, -CH₃ Acetyl).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.96, 170.91, 170.87, 170.83, 170.78, 170.56, 169.54, 169.50 (Cq Acetyl); 150.82, 150.79 (Cq Aryl *para*); 136.67, 136.60 (Cq Aryl); 129.87, 129.68 (-CH Aryl *ortho*); 122.37, 122.28, 122.22 (-CH Aryl *para*); 95.62, 95.57 (d, $^2J_{C-1,P} = 5.2$ Hz, C-1); 70.80 (C-5); 69.80, 69.75, 69.65, 69.60 (d, $^2J_{CH_2,P} = 5.6$ Hz, -CH₂ Benzyl); 69.24, 69.13 (d, $^2J_{C-2,P} = 11.1$ Hz, C-2); 68.60, 68.54 (C-4); 65.70, 65.67 (C-3); 62.50, 62.25 (C-6); 21.51, 21.12, 21.03, 20.99, 20.91 (-CH₃ Acetyl, -CH₃ Aryl).

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -1.7, -2.1

8.10.3.14 Darstellung von bis-(*ortho*-Acetoxybenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl-1-phosphat **35**

Eine Lösung aus 100 mg (0.28 mmol, 0.80 Äquiv.) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose **78** und 50.0 mg 1*H*-Tetrazol (0.72 mmol, 2.00 Äquiv.) wurden in 6 mL abs. Acetonitril gelöst. Danach wurden 155 mg (0.36 mmol, 1.00 Äquiv.) bis-(*ortho*-Acetoxybenzyl)-*N,N*-diethylphosphoramidit **52b**, gelöst in 2 mL abs. Acetonitril, zugetropft und die Lösung bei Raumtemperatur 45 min gerührt. Nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) wurde das Reaktionsgemisch auf -40 °C gekühlt und mit 131 μ L *t*Butylhydroperoxid (5-6 M Lösung in *n*-Decan, 2.00 Äquiv.) oxidiert. Nachdem der Ansatz langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 30 min gerührt worden war, wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der leicht gelbliche Sirup wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-5%) aufgereinigt.

Ausbeute: 14.4 mg (0.02 mmol, 7 %), leicht bräunlicher Schaum

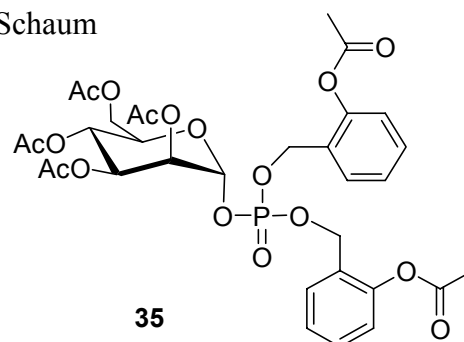
C₃₂H₃₇O₁₇P = 724.60 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 30:1 v/v): R_F-Wert = 0.68

$[\alpha]_D^{20} = +0.04^\circ$ (c = 0.1, CHCl₃)

HPLC: t_R = 20.07 min mit Gradient B

MS (ESI⁺): m/z 747.3 (M+Na⁺), 763.2 (M+K⁺)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.45-7.30 (m, 4 H, -CH Aryl *ortho*); 7.23-7.20 (m, 4 H, -CH Aryl *meta*); 5.60 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.3$ Hz, $^3J_{1,P} = 6.9$ Hz, H-1); 5.28 (dd, 1 H, $^3J_{2,3} = 3.1$ Hz, H-2); 5.25 (vt, 1 H, $^3J_{3,4} = 10.0$ Hz, $^3J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-4); 5.12-5.04 (m, 5 H, -CH₂, -CH₂; H-3); 4.20-4.15 (dd, 1 H, $^3J_{5,6a} = 5.0$ Hz, H-6a); 3.96 (dd, 1 H, $^3J_{5,6b} = 2.5$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 12.0$ Hz, H-6b); 3.76 (ddd, 1 H, H-5); 2.17, 2.08, 2.06, 2.04, 2.03, 1.98 (je s, 18 H, -CH₃ Aryl, -CH₃ Acetyl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 171.15, 171.10, 171.07, 170.93, 170.89, 170.73, 170.68 (Cq Acetyl); 151.35, 151.27 (Cq Aryl *ortho*); 134.51, 134.47 (Cq Aryl); 129.93, 129.89, 129.70, 127.83, 127.79 (-CH Aryl); 122.39, 122.30, 122.24 (-CH Aryl *meta*); 95.61, 95.58 (d, $^2J_{C-1,P} = 5.7$ Hz, C-1); 74.63 (C-5); 72.19 (C-3); 67.33 (C-2); 70.06 (C-4); 62.38 (C-6); 60.84, 60.80 (-CH₂ Benzyl); 21.49, 21.10, 21.01, 20.98, 20.90 (-CH₃ Acetyl, -CH₃ Aryl).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -12.5, -12.4

8.10.4 Darstellung der Referenzsubstanz 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-mannopyranosyl-1-phosphat **99** in Form des Triethylammoniumsalzes

8.10.4.1 Darstellung von bis-(Benzyl)-*N,N*-diethylphosphoramidit **70b**

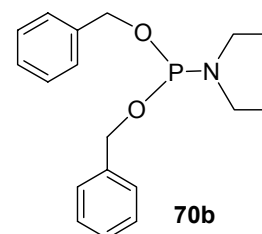
Die Darstellung erfolgte nach AAV 1 (Kap.8.9.2.3, S.147). 880 mg Benzylalkohol **70** (8.00 mmol, 1.00 Äquiv.) und 1.24 mL abs.Triethylamin (8.00 mmol, 1.00 Äquiv.) wurden in 20 mL abs. THF gelöst. Das Dichlor-*N,N*-diethylphosphoramidit (690 mg, 4.00 mmol, 0.50 Äquiv.) wurde in 30 mL abs. THF gelöst. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit *n*-Hexan/Ethylacetat/ NEt_3 (7:3:1) als Laufmittel aufgereinigt.

Ausbeute: 844 mg (2.65 mmol, 66 %)

farbloses Öl

$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{NO}_2\text{P} = 317.36$ g/mol

DC (*n*-Hexan/Ethylacetat/ NEt_3 , 7:3:1): R_f -Wert = 0.91



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.38-7.29 (m, 10 H, -CH Aryl); 4.77 (dd, 2 H, $^3J = 8.2$ Hz, $^2J = 12.6$ Hz, -CHH-Ph); 4.70 (dd, 2 H, $^3J = 8.2$ Hz, $^2J = 12.6$ Hz, -CHH-Ph); 3.15-3.05 (m, 4 H, 2x -CH₂); 1.05 (t, 6 H, $^3J = 6.9$ Hz, 2x -CH₃).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 141.98, 141.91 (Cq Aryl); 129.12, 128.97, 128.83, 128.68, 128.44, 128.15, 128.06, 127.96, 127.76, 127.60 (-CH Aryl); 65.78, 64.95 ($^2J_{\text{CH}_2,\text{P}}$ = 18.9 Hz, -CH₂ Benzyl); 38.31, 37.92 ($^2J_{\text{CH}_2,\text{P}}$ = 21.0 Hz, -CH₂); 15.48, 14.89 (-CH₃).

^{31}P -NMR (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 149.02

8.10.4.2 Darstellung von bis-(Benzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosyl-1-phosphat **105**

Eine Lösung aus 334 mg (0.96 mmol, 0.80 Äquiv.) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranose **78** und 210 mg 1*H*-Tetrazol (3.00 mmol, 2.50 Äquiv.) wurden in 15 mL abs. Acetonitril gelöst. Danach wurden 380 mg (1.20 mmol, 1.00 Äquiv.) bis-(Benzyl)-*N,N*-diethylphosphoramidit **70b**, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, hinzuge tropft und die Lösung bei Raumtemperatur 45 min gerührt. Nach dünnschichtschromatographischer Kontrolle ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30:1) wurde das Reaktionsgemisch auf $-40\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt und mit 536 μL *t*Butylhydroperoxid (5-6 M Lösung in *n*-Decan, 2.00 Äquiv.) oxidiert. Nachdem der Ansatz langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 30 min gerührt worden war, wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der leicht gelbliche Sirup wurde am Chromatotron mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-5%) aufgereinigt.

Ausbeute: 120 mg (0.20 mmol, 25 %), farbloser Sirup

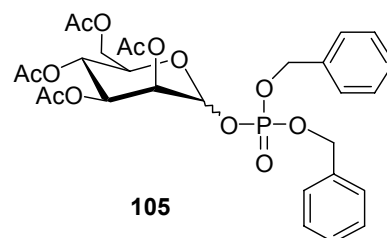
im Anomerenverhältnis $\alpha/\beta \approx 1:0.4$

$\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{O}_{13}\text{P}$ = 608.54

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30:1 v/v): R_f -Wert = 0.66

$[\alpha]_D^{20} = +29.7^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3)

MS (ESI^+): m/z 631.6 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 647.6 ($\text{M}+\text{K}^+$)



α - ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.38-7.30 (m, 10 H, Aryl); 5.61 (dd, 1 H, $^3J_{1,2} = 1.8$ Hz, $^3J_{1,\text{P}} = 6.3$ Hz, H-1); 5.30-5.20 (m, 2 H, H-2, H-4); 5.12-4.95 (m, 5 H, H-3, 2x -CH₂ Benzyl); 4.30-4.12 (m, 2 H, H-6a); 4.04 (ddd, 1 H, $^3J_{5,6b} = 2.3$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, H-5); 3.93 (dd, 1 H, H-6b); 2.15, 2.03, 2.01, 2.00 (je s, 12 H, -CH₃ Acetyl).

α - ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.92, 170.12, 169.94 (Cq Acetyl); 129.23, 129.20, 129.04, 128.98, 128.86, 128.61, 128.40, 128.01 (-CH Aryl); 95.59 (d, $^2J_{\text{C-1},\text{P}} = 5.5$ Hz,

C-1); 73.53 (C-5); 70.83, 70.39 (d, $^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 5.5$ Hz, $-\text{CH}_2$ Benzyl); 70.05 (C-4); 68.89 (d, $^2J_{\text{C}-2,\text{P}} = 8.3$ Hz, C-2); 65.81 (C-3); 62.56 (C-6); 21.13, 21.07, 21.04, 21.01 ($-\text{CH}_3$ Acetyl).

^{31}P -NMR (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -1.60, -1.98

8.10.4.3 Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosyl-1-phosphat **99** in Form des Triethylammoniumsalzes

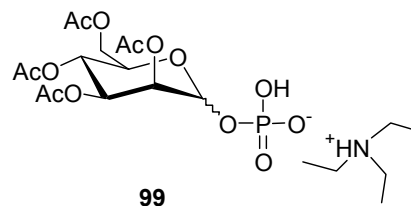
140 mg (0.23 mmol, 1.00 Äquiv.) bis-(Benzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosyl-1-phosphat **105** wurden in ca. 8 mL abs. Dioxan gelöst und anschließend wurden 63.1 μL Triethylamin (46.0 mg, 0.46 mmol, 2.00 Äquiv.) zugetropft. Abschließend wurden 23.0 mg Palladium/Kohle (10%ig) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit leichten H_2 -Überdruck bei Raumtemperatur reduziert. Die Reaktionsdauer betrug 1.5 h. Der Reaktionsansatz wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Ausbeute: 54.0 mg (0.10 mmol, 44 %)

farbloser Sirup

$\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{NO}_{13}\text{P} = 529.47$ g/mol

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30:1 v/v): R_f -Wert = 0.71



α - ^1H -NMR (500 MHz, Methanol- d_4): δ [ppm] = 5.50 (dd, 1 H, $^2J_{1,\text{P}} = 7.6$ Hz, $^3J_{1,2} = 1.6$ Hz, H-1); 5.39 (dd, 1 H, $^3J_{3,2} = 3.1$ Hz, $^3J_{3,4} = 10.1$ Hz, H-3); 5.34-5.31 (m, 2 H, H-2, H-4); 4.32-4.26 (m, 2 H, H-5, H-6a); 4.18-4.12 (m, 1 H, H-6b); 3.2 (q, 6 H, $-\text{CH}_2$ N(Et) $_3$); 2.17, 2.08, 2.06, 1.97 (je s, je 3 H, $-\text{CH}_3$ Acetyl); 1.35 (t, 9 H, $-\text{CH}_3$ N(Et) $_3$).

α - ^{13}C -NMR (100 MHz, Methanol- d_4): δ [ppm] = 171.89, 171.80, 171.71, 171.69 (C=O Acetyl); 95.14 (d, $^2J_{\text{C}-1,\text{P}} = 5.5$ Hz, C-1); 71.66 (C-2); 70.97 (C-3); 70.60 (C-4); 67.41 (C-5); 63.55 (C-6); 47.58, 47.52 ($-\text{CH}_2$ N(Et) $_3$); 20.91, 20.87, 20.82, 20.80 ($-\text{CH}_3$ Acetyl); 9.05 ($-\text{CH}_3$ N(Et) $_3$).

^{31}P -NMR (202 MHz, Methanol- d_4): δ [ppm] = -0.27, -0.91

9 LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ N. Sharon, H. Lis, Kohlenhydrate und Zellerkennung, *Spektrum der Wissenschaft*; **1993**, 3, 66-74.
- ² G. M. Edelmann, Zelladhäsionsmoleküle und embryonale Musterbildung, *Spektrum der Wissenschaft*; **1984**, 6, 62-74.
- ³ G. M. Edelmann, Topobiologie, *Spektrum der Wissenschaft*; **1989**, 7, 52-60.
- ⁴ A. Varki, Biological Roles of Oligosaccharides: All of the Theories are Correct, *Glycobiology*; **1993**, 3, 97-130.
- ⁵ J. C. Paulson, The Receptors, Academic Press, New York; **1985**, 5, 131-145.
- ⁶ N. Sharon, The Proteins, Academic Press; **1982**, 5, 1-24.
- ⁷ T. Feizi, Demonstration by Monoclonal Antibodies, that Carbohydrate Structures of Glycoproteins and Glycolipids are Onco-Developmental Antigens; *Nature*, **1985**, 314, 53-57.
- ⁸ Y. C. Lee, T. Lee, Glycoconjugates, Marcel Dekker, New York; **1992**, 140-151.
- ⁹ Participants of the First International Workshop on CDGS; *Glycoconjugate J.*, **1999**, 16, 669-671.
- ¹⁰ T. L. Gilchrist, Heterocyclenchemie, VCH Verlag, Weinheim, **1995**, 259-277.
- ¹¹ D. Voet, J. G. Voet, Biochemie, VCH Verlag, Weinheim, **1994**, 794-796.
- ¹² L. Stryer, Biochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, **1987**, 887-921.
- ¹³ H. Brandis, H. J. Eggers, W. Koehler, G. Pulverer, Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **1994**.
- ¹⁴ J.J. Fox, N. C. Miller, Nucleosides. XVI. Further Studies of Anhydronucleosides; *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 104-129.
- ¹⁵ A. Albert, Chemical Aspects of Selective Toxicity; *Nature*, **1958**, 182, 421-423.
- ¹⁶ H. Bundgaard, P. Krosgaard-Larsen, Textbook of Drug Design and Development, Harwood Academic Publishers; **1991**, 113-191.

-
- ¹⁷ H. Bundgaard, Novel Chemical Approaches in Prodrug Design, Drugs of the future, **1991**, *16*, 443-458
- ¹⁸ P.L. Carl, P.K. Chakravarty, J. L. Katzenellenbogen, A Novel Connector Linkage Applicable in Prodrug Design; *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 479-480.
- ¹⁹ A.B.A. Jansen, T.J. Russell, Some Novel Penicillin Derivatives; *J. Chem. Soc.* **1965**, 2127-2132.
- ²⁰ R. Y. Tsien, A Non-Disruptive Technique for Loading Calcium Buffers and Indicators into Cells; *Nature*, **1981**, *290*, 527-528.
- ²¹ R. P. Iyer, L.R. Philips, J. A. Biddle, D.R. Thakker, W. Egan, S. Aoki, H. Mitsuya, Synthesis of Acyloxyalkyl Acylphosphonates as Potential Prodrugs of the Antiviral, Trisodium Phosphonoformate (Foscarnet Sodium); *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 7141-7144.
- ²² T. Jiang, G. Sweeny, M.T. Rudolf, A. Klip, A. Traynor-Kaplan, R. Y. Tsien, Membrane-permeant Esters of Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate; *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 11017-11024.
- ²³ W. Li, C. Schultz, J. Llopis, R.Y. Tsien, Membrane-permeant Esters of Inositol Polyphosphates, Chemical Synthesis and Biological Applications; *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 12017-12040.
- ²⁴ S. Freeman, K. C. Ross, Prodrug Design for Phosphates and Phosphonates; *Prog. Med. Chem.*, **1997** (*34*), 112-147.
- ²⁵ C. A. Bunton, M.M. Mhala, K.G. Oldham, C. A. Vernon, The Reaction of Organic Phosphates Part III: The Hydrolysis of Dimethyl Phosphate; *J. Chem. Soc.*, **1960**, 3293-3301.
- ²⁶ D. Farquhar, D.N. Srivastava, N.J. Kattesch, P. P. Saunders, Biologically Reversible Phosphate-Protective Groups; *J. Pharm. Sci.*, 1983, *72*, 324-325.
- ²⁷ J.K. Sastry, P.N. Nehete, S. Khan, B.J. Nowak, W. Plunkett, R.B. Arlington, D. Farquhar, Membrane-Permeable Dideoxyuridine 5'-Monophosphate Analogue inhibits Human Immunodeficiency Virus Infection; *Mol Pharmacol.*, 1992, *41*, 441-445.

- ²⁸ M.N. Arimilli, C.U. Kim, J. Dougherty, A. Mulato, R. Oliyai, J.P. Shaw, K.C. Kundy, N. Bischofsberger, Synthesis, in vitro biological evaluation and oral bioavailability of 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) prodrugs, *Antiviral Chem. Chemother.*, **1997**, 8(6), 557-564.
- ²⁹ C. Périgaud, G. Gosselin, J.-L. Imbach, Minireview: From the Pronucleotide Concept to the SATE Phosphate Protecting Groups; *Curr. Topics in Med. Chem.*, **1997**, 2, 15-29.
- ³⁰ I. Lefebvre, C. Périgaud, A. Pompom, A.-M. Aubertin, J.-L. Giradet, A. Kim, G. Gosselin, J.-L. Imbach, Mononucleoside Phosphotriester Derivatives with S-Acyl-2-thioethyl Bioreversible Phosphate-Protecting Groups: Intracellular Delivery of 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine-5'-monophosphate; *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 3941-3950.
- ³¹ S. Peyrottes, G. Coussot, I. Lefebvre, J.-L. Imbach, G. Gosselin, A.-M. Aubertin, C. Périgaud, S-Acyl-2-Thioethyl Aryl Phosphotriester Derivatives of AZT: Synthesis, Antiviral Activity and Stability Study; *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 782-793.
- ³² N. Schlienger, C. Perigaud, G. Gosselin, J.-L. Imbach, Synthesis and Studies of Mononucleoside Glucosyl Phosphotriester Derivatives, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 7216-7221.
- ³³ A. Q. Siddiqui, C. Ballatore, C. Mc Guigan, E. De Clercq, J. Balzarini, The Presence of substituents on the Aryl Moiety of the Aryl Phosphoramidate Derivative of d4T Enhances Anti-HIV Efficacy in Cell Culture: A Structure- Activity Relationship, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 393-399.
- ³⁴ S.-L. Chang, G.W. Griesgraber, P.J. Southern, C.R. Wagner, Amino Acid Phosphoramidate Monoesters of 3'-Azido-3'-Deoxythymidine: Relationship between Antiviral Potency and Intracellular Metabolism, *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 223-231.
- ³⁵ S.C. Tobias, R.F. Borch, Synthesis and Biological Studies of Novel Nucleoside Phosphoramidate Prodrugs; *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 4475-4480.
- ³⁶ Q. Zhou, K.D. Turnbull, Quinone Methide Phosphodiester under Aqueous Conditions; *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 1072-1077.

- ³⁷ S. Freeman, W. J. Irwin, A. G. Mitchell, D. Nicholls, W. Thomson, Bioreversible Protection for the Phospho Group: Chemical Stability and Bioactivation of Di(4-acetoxybenzyl) Methylphosphonate with Carboxyesterase, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 875-877.
- ³⁸ G.W. Kenner, J. Mather, Studies on Phosphorylation Part XIV. The Solvolysis by Phenols of Benzyl Phosphates; *J. Chem. Soc.*, **1956**, 3524.
- ³⁹ A. G. Mitchell, W. Thomson, D. Nicholls, W. J. Irwin, S. Freeman, Bioreversible Protection for the Phospho Group: Bioactivation of the Di(4-acyloxybenzyl) and Mono(4-acyloxybenzyl) Phosphoesters of Methylphosphonate and Phosphonoacetate; *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1992**, *1*, 2345-2353.
- ⁴⁰ W. Thomson, D. Nicholls, W. J. Irwin, J. S. Al-Mushadani, S. Freeman, A. Karpas, J. Petrik, N. Mahmood, A. J. Hay, Synthesis, Bioactivation and Anti-HIV Activity of the Bis(4-acyloxybenzyl) and Mono(4-acyloxybenzyl) Esters of the 5'-Monophosphate of AZT, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1993**, *1*, 1239-1245.
- ⁴¹ A. D. Briggs, M. Camplo, S. Freeman, J. Lundström, B. G. Pring, Acyloxymethyl and 4-Acyloxybenzyl Diester Prodrugs of Phosphonoformate, *Tetrahedron*, **1996**, *47*(52), 14937-14950.
- ⁴² A. Routledge, I. Walker, S. Freeman, A. Hay, N. Mahmood, Synthesis, Bioactivation and Anti-HIV Activity of 4-Acyloxybenzyl Bis(Nucleosid-5-yl) Phosphates; *Nucl. Nucl.*, **1995**, *14*(7), 1545-1558.
- ⁴³ S.N. Farrow, A.S. Jones, A. Kumar, R.T. Walker, J. Balzarini, E. De Clercq, Synthesis and Biological Properties of Novel Phosphotriesters: A New Approach to the Introduction of Biologically Active Nucleotides into Cells; *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 1400-1406.
- ⁴⁴ S.I. Schimizu, J. Balzarini, E. De Clercq, R.T. Walker, The Synthesis and Biological Properties of Some Aryl bis(nucleosid-5'-yl) Phosphates Using Nucleosides with Proven anti-HIV Activity; *Nucl. Nucl.*, **1992**, *11*, 583-594.
- ⁴⁵ C. Meier, L.W. Habel, J. Balzarini, E. De Clercq, 5',5'-Di-*O*-nucleosyl-*O*-benzylphosphotriesters as Potential Prodrugs of 3'-Azido-2',3'-dideoxy-thymidine-5'-monophosphate; *Liebigs Ann.*, **1995**, 2203-2208

- ⁴⁶ J.-L. Giradet, G. Gosselin, C. Perigaud, J. Balzarini, E. De Clercq, J.-L. Imbach, New Prodrugs of 9-(2-Phosphonomethoxyethyl) Adenine [PMEA]: Synthesis and Stability Studies; *Nucl. Nucl.*, **1995**, *14*, 563-565.
- ⁴⁷ A.J. Kirby, M. Younas, The Reactivity of Phosphate Esters; *J. Chem. Soc. B*, **1970**, 510-513.
- ⁴⁸ C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini, Cyclic Saligenyl Phosphotriesters of 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidine (d4T)- A New Pro-nucleotide Approach; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, 99-104.
- ⁴⁹ C. Meier, T. Knispel, E. De Clercq, J. Balzarini, ADA-Bypass by lipophilic cycloSal-ddAMP Pro-Nucleotides- A second Example of the Efficiency of the cycloSal-Concept; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, 1577-1582.
- ⁵⁰ 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**, *56*, 1354-1361.
- ⁵¹ J. Balzarini, S. Aquaro, T. Knispel, C. Rampazzo, V. Bianchi, C.-F. Perno, E. De Clercq, C. Meier, CycloSaligenyl-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine Monophosphate: Efficient Intracellular Delivery of d4TMP, *Mol. Pharmacol.*, **2000**, *58*, 928-935.
- ⁵² C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini, cyclo Sal-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphate (cycloSal-d4TMP): Synthesis and Antiviral Evaluation of a New d4TMP Delivery System, *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 1417-1427.
- ⁵³ A. Meerbach, R. Klöcking, C. Meier, A. Lomp, B. Helbig, P. Wutzler, Inhibitory Effect of cycloSaligenyl-nucleoside Monophosphates (cycloSal-NMP) of acyclic nucleoside Analogues on HSV-1 and EBV, *Antiviral Res.*, **2000**, *45*, 69-77.
- ⁵⁴ C. Meier, A. Lomp, A. Meerbach, P. Wutzler, cycloSal-BVDUMP Pronucleotides: How to Convert an Antiviral-Inactive Nucleoside Analogue into a Bioactive Compound against EBV, *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 5157-5172.
- ⁵⁵ Dissertation Martina Lorey, cycloSaligenyl-Nucleosidmonophosphat, ein neues Pro-Nucleotid-Konzept für antiviral und antitumor aktive Nucleosidanaloge, Universität Würzburg, **1999**.

- ⁵⁶ R. Glaser, Aspirin. An ab Initio Quantum-Mechanical Study of Conformational Preferences and of Neighboring Group Interactions; *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 771-779.
- ⁵⁷ Dissertation Jürgen T. Renze, Untersuchungen und mechanistische Interpretationen zum Hydrolyseverhalten Benzyl-funktionalisierter *cyclo*Sal-Nucleotide, Universität Hamburg, **2002**.
- ⁵⁸ F. Barre-Sinoussi, J. C. Cheman, F. Rey, M.T. Nugeyere, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Bhin, F. Yenizet-Brun, C. Rozioux, L. Montagnier, Isolation of a T-lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for AIDS; *Science*, **1983**, *220*, 868-871.
- ⁵⁹ M. Popovic, M.G. Sarngadharan, E. Reed, R. C. Gallo, Detection, Isolation and Continuous Production of Cytopathic Retrovirus (HTLV-III) from Patients with AIDS and pre-AIDS; *Science*, **1984**, *224*, 497-499.
- ⁶⁰ R.C. Gallo, F. Wong-Staal, A Human T-lymphotropic Retrovirus (HTLV-III) as the Cause of the Acquired Immunodeficiency Syndrome; *Ann. Intern Med.*, **1985**, *103*, 679-689.
- ⁶¹ Die AIDS-Epidemie - Ein Statusbericht: Dezember 2002; <http://www.unaids.org>; **2003**
- ⁶² <http://www.hiv.net/2010/pdf/kapitel2.pdf>, **2001**.
- ⁶³ S. Modrow, D. Falke; Molekulare Virologie; Spektrum Verlag; Heidelberg; **1998**.
- ⁶⁴ J. Balzarini, P. Herdewijn, E. De Clercq, Differential Patterns of Intracellular Metabolism of 2',3'-Didehydro-dideoxythymidine and 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine, Two Potent Anti-Human Immunodeficiency Virus Compounds; *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 6127-6133.
- ⁶⁵ J.L. York, Effect of the structure of the Glycon on the Acid-Catalyzed of Adenine Nucleosides, *J. Org. Chem.*, **1981**, *46*, 2171-2173.
- ⁶⁶ T. Mukaiyama, F.-C. Pai, M. Onaka, K. Narasaka, A Useful Method For Selective Acylation of Alcohols Using 2,3'-Bipyridyl-6-yl Carboxylate and Cesium Fluoride; *Chem. Lett.*, **1980**, 563-566.
- ⁶⁷ M. P. Paradisi, G. P. Zecchini, I. Torrini, Selective Acylations of Aminophenols and Hydroxyalkylphenols with 1-Acetyl-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]-pyridin; *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27(41)*, 5029-5032.

- ⁶⁸ A. Saito, B. Shimizu, Synthesis of Mesoionic Triazolopyridine. III Applications of *N*-Acyl Mesoionic Triazolopyridines as Acylating Reagents; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, *56*, 2974-2980.
- ⁶⁹ H.A. Staab, Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie IV: Synthesen mit heterocyclischen Amiden (Azoliden); *Angew. Chem.*, **1962**, *12*, 407-423.
- ⁷⁰ D. G. Drueckhammer, W. J. Hennen, R. L. Pederson, C. F. Barbas, C.M. Gautheron, T. Krach, C.-H. Wong, Enzyme Catalysis in Synthetic Carbohydrate Chemistry; *Synthesis*, **1991**, 499-525.
- 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**, *58*, 928-935.
- ⁷² M.W. Rathke, The Reformatsky Reaction; *Org.React.*, **1975**, *22*, 423-460.
- ⁷³ S.E. Denmark, J.P. Edwards, S.R. Wilson, Solution and Solid State Structural Studies of (Halomethyl)Zinc Reagents, *J. Am. Chem. Soc.*; **1992**, *114*, 2592-2602.
- ⁷⁴ L.R. Krepski, L.E. Lynch, S.M. Heilmann, J. K. Rasmussen, Reaction of *O*-Trimethylsilylated Cyanohydrins with α -Bromoesters: A New Synthesis of Tetronic Acids; *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, 981-984.
- ⁷⁵ E. Balzacchini, C. Carnevali, F. Morazzoni, M. Orlandi, B. Rindone, R. Scotti, Spectromagnetic Investigation of the Active Species in the Oxidation of Propenoidic Phenols Catalysed by [*N,N*-bis(salicylidene)-ethane-1,2-diaminato]-cobalt (II); *J. Chem. Soc.Dalton Trans.*, **1997**, *24*, 4695-4700.
- ⁷⁶ R. W. Murray, D. L. Shiang, Dioxirane Chemistry. Part 15. Rate studies on Epoxidation by Dimethyloxirane; *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1990**, *2*, 349-352.
- ⁷⁷ G.A. Molander, B. E. La Belle, G. Hahn, Reduction of Vinyloxiranes with Samarium Diiodide. An Efficient Route to Functionalized Chiral, Nonracemic (E)-Allylic Alcohols; *J.Org.Chem.*, **1986**, *51*, 5259-5264.

- ⁷⁸ K. Otsubo, J. Inanaga, M. Yamaguchi, SmI₂-Induced Highly Regioselective Reduction of α,β Epoxy Esters and γ,δ Epoxy- α,β -unsaturated Esters. An Efficient Route to Optically Active β -Hydroxy and δ -Hydroxy Esters; *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 4437-4440.
- ⁷⁹ M. Miyashita, M. Hoshino, T. Suzuki, A. Yoshikoshi, Organoselenium-mediated Reduction of α,β Epoxy Esters to β -Hydroxy Esters; *Chem. Lett.*, **1988**, 507-508.
- ⁸⁰ T. Kawakami, D. Zanizawa, I. Shibata, A. Baba, Chemo- and Regioselective Reductions of Functionalized Epoxids by Bu₃SnH/Bu₃SnI-Phosphine Oxide, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 9357-9360.
- ⁸¹ W. S. Saari, J. E. Schwering, P. A. Lyle, S. J. Smith, E. L. Engelhardt, Cyclization-Activated Prodrugs. Basic Esters of 5-Bromo-2'-deoxyuridine; *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 2590-2595.
- ⁸² A. Glazier et al., Poster at the 9th International Conference on Antiviral Research, May 19-24, *Fukushima, Japan*, **1995**.
- ⁸³ B. S. Deol, D. D. Ridley, G. W. Simpson, Asymmetric Reduction of Carbonyl Compounds by Yeast. Preparation of Optically Active α - and β -Hydroxy Carboxylic Acid Derivatives; *Aust. J. Chem.*, **1976**, 29, 2459-2467.
- ⁸⁴ D. Seebach, M. A. Sutter, R. H. Weber, M. F. Züger, Yeast Reduction of Ethyl Acetoacetate: (*S*)-(+)-Ethyl 3-Hydroxybutanoate; *Org. Synthesis*, **1985**, 63, 1-9.
- ⁸⁵ C.F. de Graauw, J.A. Peters, H. van Bekkum, J. Huskens, Meerwein-Ponndorf-Verley-Reductions and Oppenauer Oxidations: An Integrated Approach; *Synthesis*, **1994**, 1007-1017.
- ⁸⁶ Z. Rappoport, S.E. Biali, Sterically Crowded Stable Simple Enols; *Acc. Chem. Res.* **1988**, 21, 442-449.
- ⁸⁷ M. Kitamura, M. Tokunaga, R. Noyori, Practical Synthesis of BINAP-Ruthenium (II) Dicarboxylate Complexes; *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 4053-4054.
- ⁸⁸ R. Noyori, T. Ohkuma, M. Kitamura, Asymmetric Hydrogenation of β -Keto Carboxylic Esters. A Practical, Purely Chemical Access to β -Hydroxy Esters in High Enantiomeric Purity; *J. Am. Soc.*, **1987**, 109, 5856-5858.

- ⁸⁹ Z. Zhang, H. Quian, J. Longmire, X. Zhang, Synthesis of Chiral Biphosphines with Tunable Bite Angles and Their Application in Asymmetric Hydrogenation of β -Ketoesters; *J. Org. Chem. Notes*, **2000**, A-D.
- ⁹⁰ H. C. Brown, V. Varma, Selective Reductions. XX. Stereochemistry of the Reduction of Cyclic, Bicyclic and Polycyclic Ketones by Dialkylboranes. A Simple, Convenient Procedure for the Reduction of Ketones to the Corresponding Alcohols with Exceptionally High Steric Control; *J. Org. Chem.*, **1974**, 39(12), 1631-1636.
- ⁹¹ H. C. Brown, D. B. Bigley, S. K. Arora, N. M. Yoon, Selective Reductions. XVI. Reaction of Disiamylborane in Tetrahydrofuran with Selected Organic Compounds Containing Representative Functional Groups; *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92(24), 7161-7167.
- ⁹² H. C. Brown, J. V. B. Kanth, P. V. Dalvi, M. Zaidlewicz, Molecular Addition Compounds. 15. Synthesis, Hydroboration and Reduction Studies of New, Highly Reactive *tert*-Butyldialkylamine-Borane Adducts; *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 6263-6274.
- ⁹³ R.P. Mauritz, F. S. Schmelz, C. Meier, Elucidation of the Hydrolytical Properties of α -Hydroxybenzylphosphonates as a New Potential ProOligonucleotide Concept; *Nucl. Nucl.*, **1999**, 18(6&7), 1417-1418.
- ⁹⁴ F. Mugnier, C. Meier, Phosphoramidite Chemistry for the Synthesis of *cycloSal*-Pro-Nucleotides; *Nucl. Nucl.*, **1999**, 18(4&5), 941-942.
- ⁹⁵ H.C. Brown, S. Narashimhan, Y.M. Choi, Selective Reductions 30. Effect of Cation and Solvent on the Reactivity of Saline Borohydrides for Reduction of Carboxylic Esters. Improved Procedures for the Conversion of Esters to Alcohols by Metal Borohydrides; *J. Org. Chem.*, **1982**, 47, 4702-4708.
- ⁹⁶ M. Lorey, C. Meier, E. De Clercq, J. Balzarini, New Synthesis and Antitumor Activity of *cycloSal*-Derivatives of 5-Fluoro-2'-Deoxyuridinemonophosphate; *Nucl. Nucl.*, **1997**, 16, 789-792.
- ⁹⁷ Persönliche Mitteilung von C. Meier.
- ⁹⁸ J. Imai, P. F. Torrence, Bis(2,2,2-trichloroethyl) Phosphorochloridite as a Reagent for the Phosphorylation of Oligonucleotides: Preparation of 5'-Phosphorylated 2',5'-Oligoadenylates; *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 4015-4021.

- ⁹⁹ W. Bannwarth, A. Trzeciak, 21. A Simple and Effective Chemical Phosphorylation Procedure for Biomolecules; *Helv. Chim. Acta*, **1987**, 70, 175-186.
- ¹⁰⁰ J.W. Perich, P.F. Alewood, R.B. Johns, Synthesis of Casein-related Peptides of Phosphopeptides. VII: The Efficient Synthesis of Ser(*P*)-Containing Peptides by the Use of Boc-Ser(PO₃R₂)-OH Derivatives; *Aust. J. Chem.*, **1991**, 44, 233-252.
- ¹⁰¹ J. W. Perich, R. B. Johns, Di-*tert*-butyl *N,N*-Diethylphosphoramidite. A New Phosphitylating Agent for the Efficient Phosphorylation of Alcohols; *Synth. Commun.*, **1988**, 2, 142-144.
- ¹⁰² H. Boudjebel, H. Concalves, F. Mathis, N° 117 Etude de liaison P-N dans le motif S₂P-NMe₂ en résonance magnétique nucléaire et par réaction d'échange avec trifluoroacetate de méthyle; *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1975**, 628.
- ¹⁰³ M.M. Sim, H. Kondo, C.-H. Wong, 2-Cyanoethyl Phosphate and its Use in the Synthesis of Phosphate Esters; *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, 83, 159-168.
- ¹⁰⁴ Florence Mugnier, P.F.E. Report, A New Preparative Method towards *cycloSal*-Nucleoside Monophosphates: Cyclic Phosphoramidites as Phosphitylating Agents, **1998**.
- ¹⁰⁵ R.L. Letsinger, W.B. Lunsford, Synthesis of Thymidine Oligonucleotides by Phosphite Triester Intermediates; *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 3655-3661.
- ¹⁰⁶ J.G. Sharefkin, H. Saitzman, Iodobenzene Diacetate; *Org. Synth.*, **1963**, 43, 62-65.
- ¹⁰⁷ J.L. Fourrey, J. Varenne, Introduction of Non-aqueous Oxidation Procedure in the Phosphite Triester Route for Oligonucleotides Synthesis; *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 1217-1220.
- ¹⁰⁸ K.K. Ogilvie, M.J. Nemer, Non-aqueous Oxidation of Phosphites to Phosphates in Nucleotide Synthesis; *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 2531-2532.
- ¹⁰⁹ K.K. Akashi, R.E. Palermo, K.B. Sharpless, A Major Improvement in the Osmium Catalysed Vicinal Hydroxylation of Olefins by *tert*-Butyl Hydroperoxide; *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 2063-2066.
- ¹¹⁰ P. Collins, R. Ferrier, Monosaccharides: Their Chemistry and Their Roles in Natural Products, Wiley & Sons, Chichester, **1995**, 498.

- ¹¹¹ T.K. Lindhorst, Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- ¹¹² B. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem (Eds.), Glycoscience, Chemistry and Chemical Biology, Springer Verlag, Berlin, **2001**.
- ¹¹³ J.S. Schutzbach, J.W. Zimmerman, Yeast Dolichyl-phosphomannose Synthase: Reconstitution of Enzyme Activity with Phospholipids; *Biochem. Cell Biol.*, **1992**, *70*, 460-465.
- ¹¹⁴ T. Marquardt, H. H. Freeze, Congenital Disorder of Glycosylation. Glycosylation Defects in Man and Biological Models for their Study; *Biol. Chem.*, **2001**, *382*, 161-177.
- ¹¹⁵ W. Gerrard, W. J. Green, R. J. Phillips, Some Phosphorous Containing Derivatives of 2:2:2 Trichlorethanol; *J. Chem. Soc.*, **1954**, 1148-1150.
- ¹¹⁶ Dissertation Synke Rutschow, Synthese und Untersuchung membrangängiger Derivate von Mannose-1-Phosphat, Universität Hamburg, **2002**.
- ¹¹⁷ R. Kornfeld, S. Kornfeld, Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides; *Annu. Rev. Biochem.*, **1985**, *54*, 631-661.
- ¹¹⁸ H. Carchon, E. van Schaftingen, G. Matthijs, J. Jaeken, Carbohydrate-deficient Glycoprotein Syndrome Type Ia (Phosphomannomutase-Deficiency), *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1455*, 155-165.
- ¹¹⁹ J. Jaeken, M. Vanderschueren-Lodeweyckx, P. Casaer, Familial Psychomotor Retardation with Markedly Low Fluctuating Serum Proteins, FSH and GH Levels, Partial TBG Deficiency, Increased Serum Arylphosphatase A and Increased CSF Protein: a New Syndrome?; *Pediatr. Res.*, **1980**, *14*, 179-187.
- ¹²⁰ K. Panneerselvam, H.H. Freeze, Mannose Corrects Altered N-Glycosylation in Carbohydrate-deficient Glycoprotein Syndrome Fibroblasts; *J. Clin. Invest.*, **1996**, *97*, 1478-1487.
- ¹²¹ G. Matthijs, E. Schollen, L. Heykanta, S. Grünwald, Phosphomannomutase Deficiency: The Molecular Basis of the Classical Jaeken Syndrome (CDGS Type Ia); *Molecular Genetics Metabolism*, **1999**, *68*, 220-226.

- ¹²² St. Grünewald, E. Schollen, E. van Schaftingen, J. Jaeken, G. Matthijs, High Residual Activity of PMM2 in Patients' Fibroblasts: Possible Pitfall in the Diagnosis of CDG-Ia (Phosphomannomutase Deficiency); *Am. J. Hum. Genet.*, **2001**, 68, 347-354.
- ¹²³ T. Dupre, M. Cuer, S. Barrot, A. Barnier, V. Cornier-Daire, A. Munnich, G. Durand, N. Seta, Congenital Disorder of Glycosylation Ia with Deficient Phosphomannomutase Activity but Normal Plasma Glycoprotein Pattern; *Clin. Chem.*, **2001**, 47(1), 132-134.
- ¹²⁴ S. Kjaergaard, B. Kristiansson, H. Stibler, M. Schwarz, T. Martinsson, F. Skovby, Failure of Short-Term Mannose Therapy of Patients with Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndrome Type Ia; *Acta Paediatr.*, **1998**, 87, 884-888.
- ¹²⁵ J. Jaeken, E. van Schaftingen, Phosphomannomutase Deficiency is a Cause of Carbohydrate-deficient Glycoprotein Syndrome Type I; *FEBS Lett.*, **1995**, 377, 318-320.
- ¹²⁶ G. Matthijs, E. Schollen, E. van Schaftingen, J.-J. Cassiman, J. Jaeken, Lack of Homozygotes for the most Frequent Disease in Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndrome Type Ia; *Am. J. Hum. Genet.*, **1998**, 62, 542-550.
- ¹²⁷ K. Panneerselvam, J. R. Etchison, F. Skovby, H. H. Freeze, Abnormal Metabolism of Mannose in Families with Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndrome Type 1; *Biochem. Molec. Med.*, **1997**, 61, 161-167.
- ¹²⁸ P. Burda, M. Aepli, The Dolichol Pathway of N-linked Glycosylation; *Biochem. Biophys. Acta*, **1999**, 1426, 239-257.
- ¹²⁹ C. Meier, cycloSal-Pronucleotides-Design of Chemical Trojan Horses; *Mini Rev. Med. Chem.*, **2002**, 2, 219-234.
- ¹³⁰ J. Coniche, G. A. Levvy, Aryl Glycopyranosides by the Helferich Method; *Methods Carbohydr. Res.*, **1963**, 2, 345-347.
- ¹³¹ T. Itoh, H. Takamura, K. Watanabe, Y. Akari, Y. Ishido, A Facile Procedure for Regioselective 1-O-Deacylation of Fully Acylated Sugars with Sodium Methoxide; *Carbohydr. Res.*, **1986**, 156, 241-246.
- ¹³² A. Hassner, G. Strand, M. Rubinstein, A. Patchornik, Levulinic Esters. An Alcohol Protecting Group Applicable to Some Nucleosides; *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 1614-1615.

- 133 J.H. v. Boom, P.M.J. Burgers, Use of Levulinic Acid in the Protection of Oligonucleotides via the Modified Phosphotriester Method: Synthesis of Decaribonucleotide U-A-U-A-U-A-U-A-U-A; *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 52, 4875-4878.
- 134 A. Hellberger, *Annalen der Chemie*, Über das Verhalten des Lävulinsäurechlorids und der Acetylävulinsäure bei der Friedel-Crafts'schen Reaktion; **1936**, 522, 269-277.
- 135 K. Kanda, H. Arai, T. Ashizawa, M. Morimoto, M. Kasaj, New Potent Mitomycin Derivatives: Synthesis and Antitumor Activity of 7,7-(Ethylenedioxy)mitomycins; *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 2781-2786.
- 136 M. S. Newman, N. Gill, B. Darre, The [3.2.1] Bicyclic Mechanism in the Acyclic Field; *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 31, 2713-2714.
- 137 T. H. Fife, Acylal Hydrolysis. The Hydrolysis of γ -Ethoxy- γ -butyrolactone; *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87(2), 271-275.
- 138 R. K. Ness, H. G. Fletcher, jr., C. S. Hudson, The Reaction of 2,3,4,6-Tetrabenzoyl- α -D-glucopyranosyl Bromide and 2,3,4,6-Tetrabenzoyl- α -D-mannopyranosyl Bromide with Methanol. Certain Benzoylated Derivates of D-Glucose and D-Mannose; *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72, 2200-2205.
- 139 Diplomarbeit Andreas Hohlfeld, Synthese, Charakterisierung und Eigenschaften von Bausteinen zur Synthese α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierter Oligonucleotide, Universität Würzburg, **2000**.
- 140 A. V. Nikolaev, I. A. Ivanova, V. N. Shibaev, N. K. Kochetkov, Application of the Hydrogenphosphate Approach in the Synthesis of Glycosyl Phosphosugars Linked through Secondary Hydroxyl Groups; *Carbohydr. Res.*, **1990**, 204, 65-78.
- 141 P. Westerduin, G.H. Veeneman, G.A. van der Marel, J. van Boom, Synthesis of the Fragment GlcNAc- α (1 $\rightarrow$ P $\rightarrow$ 6)-GlcNAc of the Cell Wall Polymer of *Staphylococcus Lactis* Having Repeating N-Acetyl-D-Glucosamine Phosphate Units; *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 6271-6274.
- 142 J. M. J. Tronchet, M. Zsely, M. Geoffroy, Spin-labelled Glycolipid Analogues: D-Glucose Series, *Carbohydr. Res.*, **1995**, 275, 2, 245-258.

- ¹⁴³ V. Nair, J. Prabhakaran, T. G. George, A Facile Synthesis of Optically Active Lactones Using Benzyl-3,6-Anhydro Glucofuranoside as Chiral Auxiliary; *Tetrahedron*, **1997**, *44*(53), 15061-15068.
- ¹⁴⁴ J. Toullec, M. El-Alaoui, R. Bertrand, Kinetics and Mechanism of Acid-Catalysed Addition of Methanol to α -Methoxystyrenes; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1987**, 1517-1522.
- ¹⁴⁵ H. G. Bazin, Y. Du, T. Polat, R. J. Linhardt, Synthesis of a Versatile Neuraminic Acid "C"-Disaccharide Precursor for the Synthesis of C-Glycoside Analogues of Gangliosides; *J. Org. Chem.*, **1999** (64), 7254-7259.
- ¹⁴⁶ R. D. Marwood, A. M. Riley, D. J. Jenkins, B. V. L. Potter, Synthesis of Adenophostin A and Congeners Modified at Glucose, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2000**, *1*, 1935-1947.
- ¹⁴⁷ A. Vasella, Ch. Witzig, Ch. Waldrapp, P. Uhlmann, K. Briner, B. Bernet, 205. Glycosylidene Carbenes (Part 13): Synthesis and Thermolysis of Representative 1-Azglycoses; *Helv. Chim. Act.*, **1993** (76), 2847-2875.
- ¹⁴⁸ J. Cunningham, R. Gigg, C. D. Warren, The Allyl Ether as a Protecting Group in Carbohydrate Chemistry; *Tetrahedron Lett.*, **1964**, *19*, 1191-1196.
- ¹⁴⁹ X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, Synthesis of Phosphoric Acid Diesters of 7 β -Hydroxycholesterol and of Carbohydrates; *Tetrahedron*, **1994**, *50*(22), 6569-6578.
- ¹⁵⁰ C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini, *cycloSal*-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphate (*cycloSal*-d4TMP): Synthesis and Antiviral Evaluation of a New d4TMP Delivery System; *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 1417-1427.
- ¹⁵¹ K. Bock, I. Lundt, C. Pedersen, Assignment of Anomeric Structure to Carbohydrates through Geminal ¹³C-H Coupling Constants; *Tetrahedron Lett.*, **1973**, *13*, 1037-1040.
- ¹⁵² K. Bock, C. Pedersen, A Study of ¹³CH Coupling Constants in Hexopyranoses; *J. Chem. Soc., Perkin Trans II*, **1974**, 293-296.
- ¹⁵³ R. Johansson, B. Samuelson, Regioselective Reductive Ring-opening of 4-Methoxybenzylidene Acetals of Hexapyranosides. Access to a Novel Protecting-group Strategy. Part 1.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1984**, *I*, 2371-2374.
- ¹⁵⁴ R. Beier, B. P. Muhdy, A Facile Removal of the Tetrahydropyranyl Protecting Group from Alcohol Derivatives; *Synthetic Communications*, **1979**, *9*(4), 271-273.

- ¹⁵⁵ E.J. Corey, K. Achiwa, J.A. Katzenellenbogen, Total Synthesis of dl-Sirenin; *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91*, 4318-4320.
- ¹⁵⁶ C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, Enzyme in der organischen Synthese: Das Problem der molekularen Erkennung von Kohlenhydraten (Teil 1); *Angew. Chem.*, **1995**, *107*, 453-474.
- ¹⁵⁷ 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.
- ¹⁵⁸ H. Waldmann, D. Sebastian, Enzymatic Protecting Group Techniques; *Chem. Rev.*, **1994**, *94*, 911-937.
- ¹⁵⁹ G.-T. Ong, K.-Y. Chang, S.-H. Wu, K.-T. Wang, Selective Deacylation on the Glycosyl Moiety of octa-*O*-Acetylsucrose by Enzymic Hydrolysis: Formation of 2,1',3',4'.6'-penta-*O*-Acetylsucrose; *Carbohydr. Res.*, **1993**, 327-333.
- ¹⁶⁰ D. G. Drueckhammer, W. J. Hennen, R. L. Pederson, C. F. Barbas, C.M. Gautheron, T. Krach, C.-H. Wong, Enzyme Catalysis in Synthetic Carbohydrate Chemistry; *Synthesis*, **1991**, 499-525.
- ¹⁶¹ S. K. Pancholy, J. Q. Lynd, Characterization of Wheat Germ Lipase; *Phytochemistry*, **1972**, *11*, 643-645.
- ¹⁶² P. Braun, H. Waldmann, H. Kunz, Chemoenzymatic Synthesis of *O*-Glycopeptides Carrying the Tumor Associated Tn-Antigen Structure; *BioMed. Chem Lett.*, **1993**, 197-207.
- ¹⁶³ H. Waldmann, P. Braun, H. Kunz, New Enzymatic Protecting Group Techniques for the Construction of Peptides and Glycopeptides; *Biomed. Biochem. Acta*, **1991**, *50(10/11)*, 243-248.
- ¹⁶⁴ J. Eberling, P. Braun, D. Kowalczyk, M. Schultz, H. Kunz, Chemoselective Removal of Protecting Groups from *O*-Glycosyl Amino Acid and Peptide (Methoxyethoxy)ethyl Esters Using Lipases and Papain; *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 2638-2646.
- ¹⁶⁵ Persönliche Mitteilung Dr. T. Marquardt, Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde, Münster, **2002**.

- ¹⁶⁶ N. Schlienger, C. Perigaud, G. Gosselin, J.-L. Imbach, Synthesis and Studies of Mononucleoside Glucosyl Phosphotriester Derivatives; *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 7216-7221.
- ¹⁶⁷ G. Baisch, R. Öhrlein, Convenient Chemoenzymatic Synthesis of β -Purine-diphosphate Sugars (GDP-fucose-analogues); *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, *5*, 383-391.
- ¹⁶⁸ Dissertation Andreas Lomp, Design, Synthese und Eigenschaften neuer antiviral aktiver Prodrugs, Universität Hamburg, **2002**.
- ¹⁶⁹ S. Weinstein, E. Grunwald, R.E. Buckles, C. Hanson, The Role of Neighbouring Groups in Replacement Reactions XI. Some Reactivities Involving Neighbouring Groups; *J. Am. Chem. Soc.*, **1948**, *70*, 816-821.
- ¹⁷⁰ S. Weinstein, C. Hanson, E. Grunwald, The Role of Neighbouring Groups in Replacement Reactions X. Kinetics of Solvolysis of *trans*-2-Acetoxycyclohexyl *p*-Toluenesulfonate; *J. Am. Chem. Soc.*, **1948**, *70*, 812-816.
- ¹⁷¹ J. S. Rush, K. Panneerselvam, C. J. Waechter, H. H. Freeze, Mannose Supplementation Corrects GDP-Mannose Deficiency in Cultured Fibroblasts from some Patients with Congenital Disorders of Glycosylation (CDG); *Glycobiology*, **2000**, *10*(8), 829-835.
- ¹⁷² M. Prard, Y. Achouri, J.F. Collet, E. Schollen, G. Matthijs, E. van Schaftingen, Kinetic Properties and Tissue Distribution of Mammalian Phosphomannomutase Isoenzymes; *Biochem. J.*, **1999**, *452*, 319-322.
- ¹⁷³ J.L. O'Rear, J.R. Scocca, B.K. Walker, A. Kaiden, S.S. Kragg, Chinese Hamster Ovary Cells with Reduced Hexokinase Activity Maintain Normal GDP-Mannose Levels; *J. Cell. Biochem.*, **1999**, *72*, 56-66.
- ¹⁷⁴ M. Pirard, G. Matthijs, L. Heykens, E. Schollen, S. Grünwald, J. Laeken, E. van Schaftingen, Effect of Mutations Found in Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndrome Type IA on the Activity of Phosphomannomutase 2; *FEBS*, **1999**, *452*, 319-322.
- ¹⁷⁵ V. Westphal, S. Kjaergaard, J. A. Davis, S. M. Peterson, F. Skovby, H. H. Freeze, Genetic and Metabolic Analysis of the First Adult with Congenital Disorder of Glycosylation Type Ib: Long-Term Outcome and Effects of Mannose Supplementation, *Molecular Genetics and Metabolism*, **2001**, *73*, 77-85.

10 GEFAHRSTOFFE

Chemikalien	R-Sätze	S-Sätze	Gefahren-symbole
Acetonitril	11-23/24/25	16-17-45	F, T
Acetylchlorid	11-14-34	9-16-26-45	F, C
Benzol	45-11-48/23/24/25	53-45	F, T
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	7-10-21/22-23-34	3/7-14-26-36/37/39-45	O, C
Chloroform	22-38-40-48/20/22	36/37	Xn
Dichlormethan	40	23-24/25-36/37	Xn
Dicyclohexylcarbodiimid	22-24-41-43	24-26-37/39-45	T
<i>N,N</i> -Diethylamin	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45	F, C
<i>N,N</i> -Diisopropylamin	11-36/37/38	9-16	F, Xi
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin	11-20/21/22-34	16-26-36/37/39-45	F, C
4,4'-Dimethylaminopyridin	24/25-36/37/38	26-36/37/39-45	T
Dimethylcarbonat	11	9-16	F
Dimethylformamid	61-20/21-36	53-45	T
Dimethylsulfoxid		24/25	
Essigsäure	10-35	23-26-45	C
Essigsäureanhydrid	10-20/22-34	26-36/37/39-45	C
Essigsäureethylester	11	16-23-29-33	F
Ethanol	11	7-16	F
Hexan	11-38-48/20-51/53-62-65-67	9-16-29-33-36/37-61-62	F, Xn, N
4-Hydroxybenzaldehyd			
4-Hydroxybenzylalkohol			
4-Hydroxymethylsäure	36/37/38		Xi
Imidazol	22-34	26-36/37/39-45	C
Kalium- <i>tert</i> -butylat	11-14-22-34	7/8-16-26-36/37/39-43-43-45	F, C
Kaliumpermanganat	8-22-50/53	60-61	O, Xn, N
Magnesiumsulfat		22-24/25	
Methanol	11-23/25	7-16-24-45	F, T
Natriumborhydrid	15-25-34	26-36/37/39-43-43-45	F, T
Natriumhydrid	15-34	7/8-26-36/37/39-43.6-45	

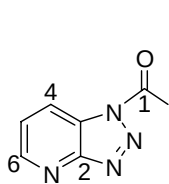
Natriumdihydrogenphosphat			
Natriumhydrogencarbonat		22-24/25	
Natriumhydroxid	35	26-37/39-45	C
Natriummethanolat	11-14-34	8-16-26-43.6-45	
Natriumsulfat		22-24/25	
Petrolether	12	9-16-29-33	F
<i>ortho</i> -Phosphorsäure	34	26-45	C
Phosphortrichlorid	34-37	7/8-26-45	C
2-Propanol	11	7-16	F
Pyridin	11-20/21/22	26-28	F, Xn
Salzsäure	34-37	26-45	C
Schwefelsäure	35	26-30-45	C
Tetrabutylammoniumfluorid	23/24/25-34	26-36/37/39-45	T, C
Tetrahydrofuran (THF)	11-19-36/37	16-29-33	F, Xi
1 <i>H</i> -Tetrazol	5-11	16-22-24/25	
Toluol	11-20	16-25-29-33	F, Xn
Toluol-4-sulfonsäure-monohydrat	36/37/38	26-37	Xi
Tributylzinnhydrid	14-21-25-36/38-48/23/25	35-36/37/39-45	T+
Triethylamin (TEA)	11-36/37	16-26-29	F, Xi
Trifluoressigsäure (TFA)	20-35	9-26-27-28-45	C
Zink	15-17	7-8-43-43	F
Zinntetrachlorid	34-37	7/8-26-45	C

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation „Synthese, Untersuchung und mechanistische Interpretation von Prodrug-Konzepten an Nucleotidanaloga und Glycosylmonophosphaten“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwandt habe.

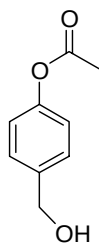
Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

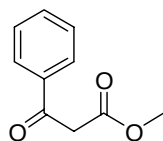
Hamburg, im Mai 2003



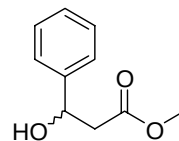
42



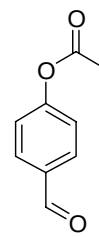
50



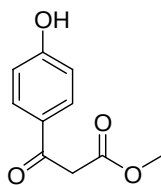
56



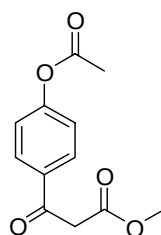
57



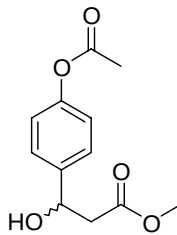
59



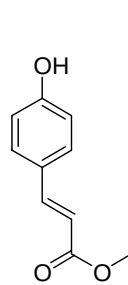
66



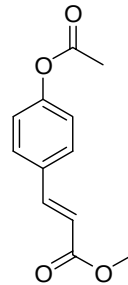
67



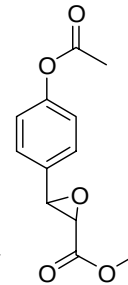
60



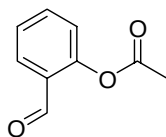
17



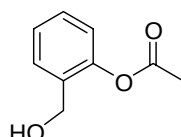
63



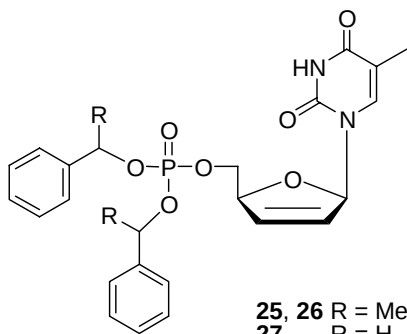
64



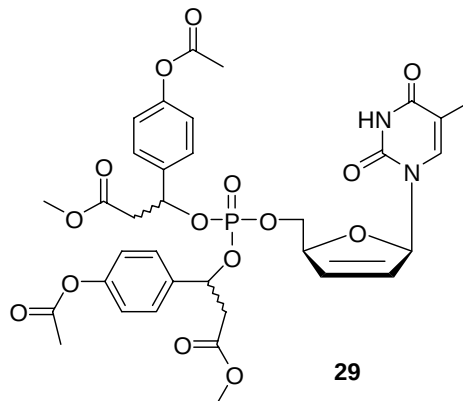
54



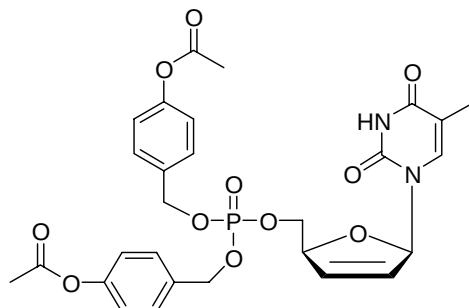
52



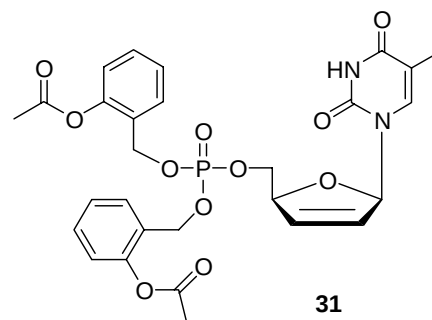
25, 26 R = Me
27 R = H
28 R = MCM



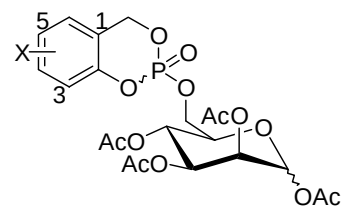
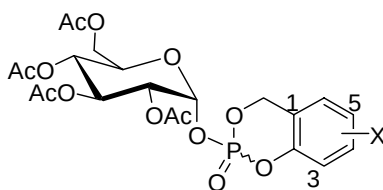
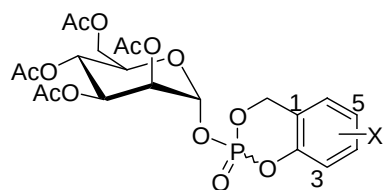
29



30



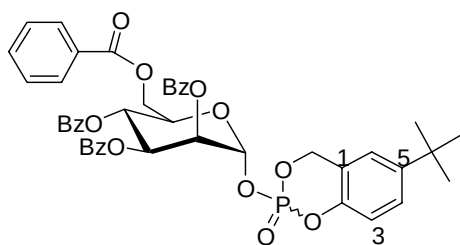
31



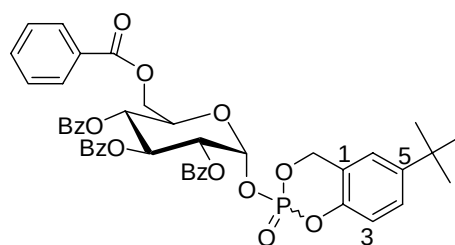
32al X = H
32bl X = 3-Me
32cl X = 5-Cl
32el X = 3,5-Di-*t*Bu

33al X = H
33bl X = 3-Me

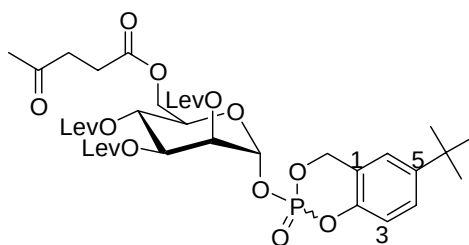
36a X = H
36b X = 3-Me
36c X = 5-Cl



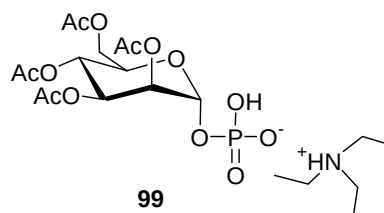
32dII



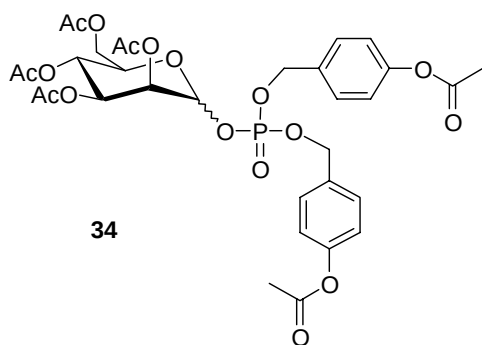
33dII



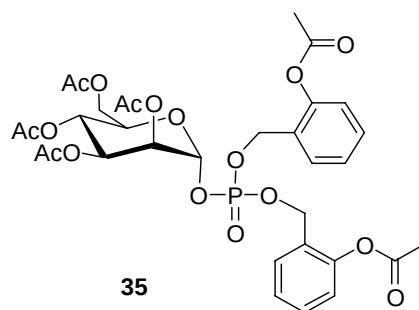
32dIII



99



34



35