

**Das Tri*PP*ro-Konzept:
Entwicklung und Charakterisierung von
antiviralen Nukleosidtriphosphat-Prodrugs**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

von

Tristan Gollnest

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

Hamburg 2015

Die Druckfreigabe für diese Arbeit wurde am 04.04.2016 durch das Studienbüro des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg erteilt.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier in der Zeit von Oktober 2011 bis November 2015 angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Chris Meier

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke

Datum der Disputation: 01.04.2016

*"Be not afraid of going slowly;
be afraid only of standing still."*

(Chinesisches Sprichwort)

Publikationsliste

T. Gollnest, T. Dinis de Oliveira, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier; The TriPPPro-approach: Lipophilic prodrugs of nucleoside triphosphates as biochemical probes and potential antivirals; *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8716.

T. Gollnest, T. Dinis de Oliveira, A. Rath, I. Hauber, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 5341-5344.

L. Weinschenk, **T. Gollnest**, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier; Bis(benzoyloxybenzyl)-DiPPPro nucleoside diphosphates of anti-HIV active nucleoside analogues; *ChemMedChem* **2015**, *10*, 891-900.

C. Meier, **T. Gollnest**, T. Nack, L. Weinschenk; Di- und Triphosphat-Propharmaka; Patent: WO 2016026493 (A1) 2016-02-25; DE 102014112055 (A1) 2014-08-22.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Symbole	i
Zusammenfassung	v
Abstract	vii
1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand	4
2.1 Das HI-Virus.....	4
2.2 Antiretrovirale Therapie.....	6
2.3 Grundlage von Pronukleotidkonzepten.....	8
2.3.1 Nukleosidmonophosphat-Prodrugs.....	10
2.3.2 Nukleosiddiphosphat-Prodrugs.....	14
2.3.3 Nukleosidtriphosphat-Prodrugs.....	18
2.4 Anwendungsspektrum von Nukleosidtriphosphat-Prodrugs.....	20
3 Aufgabenstellung	24
4 Resultate und Diskussion	27
4.1 Synthese von d4T-Triphosphat-Prodrugs.....	29
4.1.1 Synthese der Bausteine zur Darstellung der Bis(alkanoyloxybenzyl)- d4TTP-Prodrugs.....	30
4.1.1.1 Synthese der Bis(alkanoyloxybenzyl)-diisopropylphosphoramidite.....	30
4.1.1.2 Synthese von d4TMP, d4TDP und d4TTP.....	32
4.1.1.2.1 Synthese von 3'-Desoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T).....	33
4.1.1.2.2 Synthese von d4TMP.....	34
4.1.1.2.3 Synthese von d4TDP.....	35
4.1.1.2.4 Synthese von d4TTP.....	43
4.1.2 Synthese der Mono(alkanoyloxybenzyl)-d4TTP-Prodrugs.....	43
4.1.3 Synthese neuartiger Maskierungseinheiten.....	46
4.1.3.1 Synthese der 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkylcarbonate.....	47
4.1.3.2 Synthese der 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkylcarbamate.....	47
4.1.3.3 Synthese carbonat- und carbamatfunktionalisierter Phosphoramidite.....	51
4.1.4 Synthese der Bis(alkanoyloxybenzyl)-d4TTP-Prodrugs.....	51
4.1.5 Synthese eines Bis(nonanoyloxybenzyl)-d4TDP-Prodrugs.....	59
4.2 Hydrolyseverhalten der d4TTP-Prodrugs.....	60
4.2.1 Hydrolyseverhalten der d4TTP-Prodrugs in Phosphatpuffer (PBS, pH 7.3).....	61

4.2.2	Hydrolyseverhalten der d4TTP-Prodrugs in CEM/0-Zellextrakten.....	78
4.2.3	Hydrolyseverhalten der d4TTP-Prodrugs im PLE-Medium.....	86
4.3	Antivirale Aktivität der d4TTP-Prodrugs	90
4.4	Fazit der Synthese und Charakterisierung der d4TTP-Prodrugs.....	97
4.5	Erweiterung des TriPPPro-Konzepts auf verschiedene Nukleosidanaloga.....	97
4.5.1	Metabolisierung der Nukleoside.....	98
4.5.1.1	Metabolisierung von verschiedenen Thymidin- und Uridinanaloga.....	99
4.5.1.2	Metabolisierung von BVdU.....	100
4.5.1.3	Metabolisierung von ddC.....	101
4.5.1.4	Metabolisierung von ABC.....	101
4.5.1.5	Metabolisierung von ddl und ddA.....	102
4.5.1.6	Metabolisierung von ddG.....	103
4.5.2	Synthese der verschiedenen Nukleosidanaloga.....	103
4.5.2.1	Synthese von 3'-Azido-3'-desoxythymidin (AZT).....	104
4.5.2.2	Synthese von 3'-Desoxythymidin (ddT).....	104
4.5.2.3	Synthese von 3'-O-Acetylthymidin und 3'-O-Acetyl- <i>carba</i> -dT.....	105
4.5.2.4	Synthese von 3'-Azido-2',3'-didesoxyuridin (AZU).....	105
4.5.2.5	Synthese von 2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydroxyuridin (d4U) und 2',3'-Didesoxyuridin (ddU).....	106
4.5.2.6	Synthese von 3'-O-Acetyl-BVdU.....	109
4.5.2.7	Synthese von <i>N</i> ¹ -Acetyl-2',3'-didesoxycytidin.....	110
4.5.2.8	Synthese von Abacavir (ABC).....	111
4.5.2.9	Synthese von 2',3'-Didesoxyadenosin (ddA).....	112
4.5.2.10	Synthese von <i>N</i> ² -Acetyl-2',3'-didesoxyguanosin.....	112
4.5.3	Entwicklung einer neuartigen Syntheseroute zur Darstellung von TriPPPro-NTP-Prodrugs.....	114
4.5.3.1	Synthese von Nukleosiddiphosphaten.....	114
4.5.3.2	Synthese von Bis(nonanoyloxybenzyl)-NTP-Prodrugs über die Phosphoramiditroute.....	116
4.5.3.3	Synthese eines DiPPPro-d4UDP-Prodrug über die Phosphoramiditmethode.....	117
4.5.3.4	Diskussion unterschiedlicher Ansätze zur Darstellung von NTP-Prodrugs.....	118
4.5.3.5	Synthese von Nukleosid-5'-monophosphaten.....	140
4.5.3.6	Synthese von Bis(nonanoyloxybenzyl)-NTP-Prodrugs über die H-Phosphonatroute.....	144
4.5.3.7	Synthese eines DiPPPro-d4TDP-Prodrugs über H-Phosphonatchemie.....	148
4.6	Hydrolyseverhalten von Bis(nonanoyloxybenzyl)-NTP-Prodrugs.....	148
4.6.1	Hydrolyse von Bis(nonanoyloxybenzyl)-NTP-Prodrugs in PBS.....	149

4.6.1.1	Chemische Hydrolyse von Uridin- und Thymidinanaloga.....	151
4.6.1.2	Chemische Hydrolyse der NTP-Prodrugs von ABC, dId und ddG.....	152
4.6.1.3	Chemische Hydrolyse des TriPPPro-ddCTP-Prodrugs.....	158
4.6.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der ersten Hydrolysehalbwertszeit von NTP-Prodrugs in PBS.....	158
4.6.1.5	Zweite Hydrolysehalbwertszeit von NTP-Prodrugs in PBS.....	160
4.6.2	Hydrolyseverhalten von NTP-Prodrugs in CEM/0-Zellextrakten.....	161
4.6.3	Hydrolyseverhalten von NTP-Prodrugs im PLE-Medium.....	167
4.6.3.1	Nachweis von NTP durch Primer-Extension-Assay.....	170
4.6.3.2	Nachweis von NTP durch Polymerasekettenreaktion.....	171
4.7	Antivirale Aktivität von Bis(nonanoyloxybenzyl)-NTP-Prodrugs.....	173
4.8	Fazit der Synthese und Charakterisierung von verschiedenen TriPPPro-NTP-Prodrugs.....	180
4.9	Synthese eines asymmetrischen d4T-Triphosphat-Prodrugs.....	181
4.10	Hydrolyseverhalten des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs.....	183
4.10.1	Hydrolyseverhalten des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs in PBS.....	184
4.10.2	Hydrolyseverhalten des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs in CEM/0-Zellextrakten.....	186
4.10.3	Hydrolyseverhalten des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs im PLE-Medium.....	187
4.11	Antivirale Aktivität des asymmetrischen Prodrugs.....	188
4.12	Fazit der Synthese und Charakterisierung des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs.....	190
4.13	Fluoreszierendes Nukleosidanalogen als analytische Sonde für TriPPPro-NTP-Prodrugs.....	190
4.14	Synthese eines BCNA-Triphosphat-Prodrugs.....	195
4.15	Synthese von BCNAMP und BCNATP.....	200
4.16	Hydrolyseverhalten des TriPPPro-BCNATP-Prodrugs.....	200
4.17	Zellaufnahmestudien mit dem TriPPPro-BCNATP-Prodrug.....	203
4.18	Antivirale Aktivität des TriPPPro-BCNATP-Prodrugs.....	209
4.19	Fazit der Synthese und Studien des TriPPPro-BCNATP-Prodrugs.....	210
4.20	Gesamtfazit.....	210
5	Experimenteller Teil.....	215
5.1	Allgemeines.....	215
5.1.1	Lösungsmittel für Chromatographie.....	215
5.1.2	Deuterierte Lösungsmittel.....	215
5.1.3	Absolute Lösungsmittel.....	215

5.1.4	Edukte und Reagenzien.....	216
5.1.5	Chromatographie.....	216
5.1.6	Spektroskopie und Spektrometrie.....	219
5.1.7	Weitere Geräte.....	220
5.2	Synthesen.....	221
5.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV).....	221
5.2.2	Synthese der Nukleophile und Reagenzien.....	228
5.2.3	Synthese von Saligenylchlorphosphiten.....	236
5.2.4	Synthese von 4-Hydroxybenzylderivaten.....	238
5.2.5	Synthese von symmetrischen Phosphoramiditen.....	251
5.2.6	Synthese von d4T-Di- und -Triphosphat-Prodrugs.....	264
5.2.7	Synthese des asymmetrisch maskierten d4TTP-Prodrugs.....	287
5.2.8	Synthese von Mono(alkanoyloxybenzyl)-d4TTP-Prodrugs.....	288
5.2.9	Synthese eines AZT-Triphosphat-Prodrugs.....	293
5.2.10	Synthese eines ddT-Triphosphat-Prodrugs.....	298
5.2.11	Synthese eines <i>carba</i> -dT-Triphosphat-Prodrugs.....	301
5.2.12	Synthese eines Thymidin-Triphosphat-Prodrugs.....	304
5.2.13	Synthese eines AZU-Triphosphat-Prodrugs.....	307
5.2.14	Synthese eines d4U-Di- und -Triphosphat-Prodrugs.....	311
5.2.15	Synthese eines ddU-Triphosphat-Prodrugs.....	319
5.2.16	Synthese eines FddCIU-Triphosphat-Prodrugs.....	323
5.2.17	Synthese eines BVdU-Triphosphat-Prodrugs.....	324
5.2.18	Synthese eines ddC-Triphosphat-Prodrugs.....	327
5.2.19	Synthese eines Abacavir-Triphosphat-Prodrugs.....	332
5.2.20	Synthese eines ddl-Triphosphat-Prodrugs.....	334
5.2.21	Synthese von ddA-Monophosphat (ddAMP).....	336
5.2.22	Synthese eines ddG-Triphosphat-Prodrugs.....	340
5.2.23	Synthese eines BCNA-Triphosphat-Prodrugs.....	346
5.3	Hydrolysestudien Di- und Triphosphat-Prodrugs.....	352
5.3.1	Hydrolysestudien in Phosphatpuffer (PBS) bei pH 7.3 und pH 6.0.....	352
5.3.2	Hydrolysestudien mit Schweineleberesterase (PLE) in PBS.....	353
5.3.3	Hydrolysestudien in CEM/0-Zellextrakten.....	353
5.3.4	Hydrolysestudien im RPMI-Medium.....	354
5.3.5	¹ H- und ³¹ P-NMR-spektroskopische Hydrolysestudien.....	354
5.3.6	Analyse der Hydrolysenproben durch MALDI-MS.....	354
5.4	Zellaufnahmestudien.....	355
5.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	357

5.6	Primer-Extension-Assays.....	357
8	Literaturverzeichnis.....	358

Anhang

Gefahrstoffliste.....	I
Lebenslauf.....	IX
Betreuung von Bachelorarbeiten.....	X
Danksagung.....	XI
Verbindungsliste I.....	XII
Verbindungsliste II.....	XIII
Eidesstattliche Erklärung.....	XIV

Abkürzungen und Symbole

δ	chemische Verschiebung (NMR)
λ	Wellenlänge
AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ABC	Abacavir
AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
Äquiv.	Äquivalent
ART	Antiretrovirale Therapie (<i>antiretroviral therapy</i>)
AZT	3'-Azido-3'-desoxythymidin, Zidovudin
AZU	3'-Azido-2',3'-didesoxyuridin
BAB	Bis(4-acyloxybenzyl)
BCNA	Bicyclisches Nukleosidanalogen
ber.	berechnet
bs	breites Singulett (NMR)
BVdU	(<i>E</i>)-5-(2-Bromovinyl)-2'-desoxyuridin, Brivudin
<i>carba</i> -dT	<i>carba</i> -D-2'-Desoxythymidin
CAN	Ammoniumcer(IV)-nitrat
cART	<i>combination antiretroviral therapy</i>
CEM/0	humane T-Lymphozyten-Zelllinie (Wildtyp)
CMV	Cytomegalie-Virus
<i>cyclo</i> Sal	<i>cyclo</i> Saligenyl
d	Dublett (NMR)
d4A	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydroadenosin
d4T	3'-Desoxy-2',3'-didehydrothymidin, Stavudin
d4U	2',3'-Desoxy-2',3'-didehydrouridin
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCEMH	1,3-Dichlor-5,5-dimethylhydantoin
DCI	Dicyanoimidazol
dCK	Desoxycytidinkinase
dd	Dublett eines Dubletts (NMR)
ddA	2',3'-Didesoxyadenosin
ddC	2',3'-Didesoxycytidin, Zalcitabin
ddG	2',3'-Didesoxyguanosin

ddl	2',3'-Didesoxyinosin, Didanosin
ddT	3'-Desoxythymidin
ddU	2',3'-Didesoxyuridin
DIAD	Azodicarbonsäurediisopropylester
DIPA	Diisopropylamin
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminophenol
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP	Diphenylphosphonat
dquint	Dublett vom Quintett
ds	Diastereomere
EE	Ethylacetat
EI	Elektronenstoßionisation (<i>electron ionization</i>)
ESI ^{+/-}	Elektrosprayionisation (<i>electrospray ionization</i>); positiver/negativer Modus
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FddCIU	3'-Fluoro-2',3'-dideoxy-5-chloruridin
gef.	gefunden
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie (<i>highly active antiretroviral therapy</i>)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatografie (<i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus (<i>human immunodeficiency virus</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie (<i>high resolution mass spectrometry</i>)
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HWZ	Halbwertszeit
<i>i</i> Pr	<i>iso</i> -Propyl
IR	Infrarot
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante (NMR)
m	Multipllett (NMR)

MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie (<i>mass spectrometry</i>)
Ms	Mesyl
nb	nicht bestimmt
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
(N)DP	(Nukleosid-)Diphosphat
NDPK	Nukleosiddiphosphatkinase
(N)MP	(Nukleosid-)Monophosphat
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NNRTI	nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NRTI	nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
(N)TP	(Nukleosid-)Triphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Petrolether (50-70)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Ph	Phenyl
PLE	Schweineleberesterase (<i>pig liver esterase</i>)
q	Quartett (NMR)
qd	Quartett vom Dublett
quint	Quintett (NMR)
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
Rt	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
t _{1/2}	Halbwertszeit
t _R	Retentionszeit (HPLC)
t	Triplett (NMR)
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TBAA	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumacetat
TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl

<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCCA	Trichlorisocyanursäure
TCDI	1,1'-Thiocarbonyldiimidazol
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
TK ⁽⁻⁾	Thymidinkinase (defizient)
TMS	Trimethylsilyl
TMPK	Thymidylatkinase
UV	ultraviolett
v/v	Volumenanteile
VZV	Varizella-Zoster-Virus

Zusammenfassung

Seit Jahrzehnten finden zahlreiche Analoga natürlicher Nucleoside in der onkologischen und antiviralen Therapie Anwendung und nehmen heutzutage insbesondere bei der Behandlung von HIV, Herpes, Hepatitis B und Hepatitis C eine Schlüsselrolle ein. Allerdings verläuft die Biotransformation in die biologisch aktive Triphosphatform aufgrund der hohen Substratspezifität der beteiligten zellulären Enzyme meist sehr ineffizient. Der Verlust der therapeutischen Aktivität muss durch eine hohe Dosierung des Medikaments ausgeglichen werden, die teilweise schwerwiegende Nebenwirkungen zur Folge haben kann. Eine Möglichkeit, die Effizienz der Nucleosidanaloga zu erhöhen, stellt die Verabreichung von bioreversibel maskierten, phosphorylierten Wirkstoffen, sogenannten Prodrugs, dar.

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung des *TriPPPro*-Konzepts als erster vielversprechender Ansatz zur Maskierung von Nucleosidtriphosphat (NTP)-Prodrugs. Um die generelle Anwendbarkeit des Konzepts zu unterstreichen, wurden Triphosphat-Prodrugs sowohl mit unterschiedlichen Maskierungs- als auch Nucleosidstrukturen synthetisiert und hinsichtlich ihres chemischen sowie enzymatischen Hydrolyseverhaltens charakterisiert. Eine Serie von Nucleosidtriphosphat-Prodrugs auf Basis des Anti-HIV-Wirkstoffs d4T variierte dabei in der Länge und Modifikation der als Maskierungseinheiten verwendeten Acylreste, um die Auswirkungen auf die Zellpermeabilität zu untersuchen. Die Darstellung erfolgte über eine für *DiPPPro*-Nucleosiddiphosphat (NDP)-Prodrugs konzipierte konvergente Syntheseroute. Da die Gewinnung des nach diesem Protokoll notwendigen NDPs mit niedrigen Ausbeuten einherging sowie sehr zeitintensiv war, wurde eine alternative Synthesemöglichkeit entwickelt. Nach dieser konnte ausgehend von dem leichter zugänglichen Nucleosidmonophosphat (NMP) eine Vielzahl von *TriPPPro*-Verbindungen synthetisiert werden, deren Nucleoside sich sowohl am Glykon als auch an der Nucleobase in der Art der Modifikation unterscheiden.

Bei Hydrolyseuntersuchungen in Phosphatpuffer (PBS, pH 7.3) wurde nachgewiesen, dass die Nucleosidtriphosphate überwiegend den dominierenden Metaboliten darstellen. Die konkurrierende Hydrolyse der Phosphoranhydridbindung zwischen dem β - und γ -Phosphat führte jedoch mit einer zunehmenden Hydrolysehalbwertszeit des Prodrugs zu einer ansteigenden Bildung von NDP. Die enzymatische Aktivierung mit isolierter Schweineleberesterase (PLE) erlaubte eine schnelle und selektive Freisetzung des NTPs, wie mithilfe von Primer-Extension-Assays sowie Polymerasekettenreaktionen bewiesen werden konnte. Bei der enzymatischen Spaltung in CEM-Zellextrakten war eine kontinuierliche Abhängigkeit der Hydrolysehalbwertszeiten von der Kettenlänge festzustellen. Allerdings lagen die Halbwertszeiten signifikant niedriger als in PBS. Gleichzeitig konnte in den Zellextrakten die

Freisetzung von NTP aus TriPPPro-NTP-Prodrugs bestätigt werden, obgleich die zellulären Enzyme einen schnellen Abbau zu den jeweiligen NDP bewirkten.

Erwartungsgemäß korrelierte die antivirale Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 mit der Lipophilie der TriPPPro-d4TTP-Prodrugs. Durch eine intrazelluläre Freisetzung der höher phosphorylierten Metabolite konnten EC_{50} -Werte erreicht werden, die von einer bis zu dreimal höheren Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 als d4T zeugten. Ebenso war eine Abhängigkeit der antiviralen Aktivität von der Lipophilie der TriPPPro-Verbindungen in TK-defizienten Zellen festzustellen, in denen d4T keine antivirale Wirkung besitzt. Mit zunehmender Lipophilie zeigten die Prodrugs eine verbesserte antivirale Aktivität. In einer Zellaufnahmestudie mit einem fluoreszierenden Prodrug konnte die erfolgreiche intrazelluläre Freisetzung des biologisch aktiven Triphosphatmetaboliten belegt werden. Die Prodrugs weiterer Nucleosidanaloga offenbarten im Vergleich zum Nucleosid signifikante Verbesserungen der Anti-HIV-Aktivität. So konnte die Aktivität von Nucleosiden durch Anwendung des TriPPPro-Konzepts um das bis zu 21-Fache gesteigert werden. Es gelang sogar, inaktive Nucleoside in hochaktive Wirkstoffe gegenüber HIV-1 umzuwandeln.

Demzufolge wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Synthese unterschiedlich modifizierter NTP-Prodrugs die generelle Anwendbarkeit des TriPPPro-Konzepts bestätigt. Diese Methodik könnte einen Durchbruch in der Prodrugentwicklung darstellen, da sie die biologische Aktivität der heutigen sowie zukünftigen Nucleoside erhöhen und somit zu einer Verbesserung der antitumoralen und antiviralen Therapie beitragen kann.

Abstract

Over the last decades a variety of nucleoside analogues were widely applied in antitumor and antiviral therapy. Moreover, they build the backbone for treatment of HIV, herpesvirus, hepatitis B and hepatitis C virus infections nowadays. However, the therapeutic activity of these compounds is often limited by an ineffective stepwise phosphorylation to the pharmaceutical active nucleoside triphosphate form performed by kinases. The nucleoside therapy implies therefore high dosage of drug involving severe side effects. This drawback can be overcome by developing bioreversible masked phosphorylated nucleoside prodrugs.

The aim of this thesis was to establish the *TriPPP*Pro-approach, as the first promising nucleoside triphosphate prodrug concept. The concept was transferred to a large number of different modified antiviral agents in order to demonstrate the general applicability. Both, the chemical and enzymatic hydrolysis behavior should be investigated. A series of NTP prodrugs based on d4T as a model nucleoside analogue was prepared using a convergent synthesis strategy previously applied to the synthesis of *DiP*Pro-nucleoside diphosphate (NDP) prodrugs. The acyl moieties as the masking units were varied by its chain length and modification for testing the prodrug permeability through cell membrane. Unfortunately, problems in the synthesis and purification of the needed nucleoside diphosphate (NDP) building block limited that route. A synthetic pathway was developed based on the nucleoside monophosphates (NMP) in order to achieve a more efficient conversion of the parent nucleoside. In general, NMPs are easier to access than NDPs. Thereby, a wide range of *TriPPP*Pro-compounds of different nucleoside analogues could be prepared via this new method.

The analysis of the hydrolysis behavior in phosphate buffer (PBS, pH 7.3) revealed that the desired NTP was formed as the predominant compound. A concurrent reaction that involved breakage of the phosphoanhydride bond between β - and γ -phosphate led to the formation of NDP. The amount of NDP rose with increasing half-lives of the *TriPPP*Pro-compound. The hydrolysis studies conducted in the presence of isolated *pig liver esterase* (PLE) clearly led to a rapid and selective delivery of the biologically active NTP, if the substrate specificity is established. The release of NTPs was proven by primer extension assays and polymerase chain reactions. Hydrolysis half-lives in CEM cell extracts of the prodrugs correlated well with chain length and were significantly lower than the half-lives in PBS buffer. Additionally, the release of NTP was detected in biological media despite a rapid degradation by cellular enzymes such as phosphatases.

As expected, the antiviral activity of the *TriPPP*Pro-d4TTP compounds against HIV-1 and HIV-2 also increased with increasing lipophilicity. Due to successful cell membrane penetration and the direct intracellular delivery of the higher phosphorylated metabolites an

antiviral activity was accomplished, which was up to 3-fold higher than anti-HIV activity of the parent nucleoside. The dependence of lipophilicity and antiviral activity also retained in TK-deficient cells whereas d4T lacked anti-HIV activity. The successful intracellular delivery of NTP prodrugs was confirmed by a cellular uptake study using a fluorescent NTP prodrug. The investigation of further nucleoside analogues revealed a significant improvement of their inhibition effects against HIV replication by using the TriPPPPro-concept. The activity of a prodrug can be up to 21-fold higher than the activity of its parent nucleoside. Even, completely inactive nucleosides were converted to highly active NTP prodrugs against HIV-1.

In conclusion, this thesis displays a general applicability of the TriPPPPro-concept allowing the synthesis of different modified NTP prodrugs. This methodology might be a breakthrough which allows the currently active nucleosides either the future ones to rise their biological activity leading to improvements in antitumor and antiviral therapies.

1 Einleitung

Daten aus dem Jahr 2012 der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) legen offen, dass neben Herzerkrankungen und Malignomen virale Infektionen weltweit die häufigste Todesursache der Gegenwart bilden.^[1] Dabei stellen vor allem die verschiedenen Virus-Hepatitisen als Erreger von Lebererkrankungen und die Subtypen des Humanen Immundefizienz-Virus (*human immunodeficiency virus*, HIV) als Auslöser des erworbenen Immunschwächesyndroms (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) die bedrohlichsten Infektionskrankheiten dar. In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf dem HI-Virus, weshalb einleitend lediglich auf die Krankheitsform AIDS eingegangen werden soll. AIDS beschreibt das Endstadium einer verzögert verlaufenden Erkrankung, die, resultierend aus einer lang andauernden Persistenz des Virus im Wirt und einer damit einhergehenden Hyperreaktivität des Immunsystems, schrittweise zu einer Zerstörung desselben führt.^[2] Durch die Degeneration der CD4-positiven Zellen, die dem HI-Virus als Wirtszellen dienen, ist das Immunsystem anfällig für sekundäre Infektionen, die im Extremfall zum Tod des Wirts führen können.^[3] Seit der erstmaligen klinischen Beschreibung des Krankheitsbilds AIDS im Jahr 1981 infizierten sich 75 Millionen Menschen mit dem Erreger der Pandemie.^[4,5] Die aktuelle Mortalitätsrate liegt bei etwa 1.8 Millionen Menschen pro Jahr.^[6] Der ätiologische Zusammenhang zwischen dem HI-Virus und der Infektionskrankheit konnte 1984, im Jahr nach der Isolation und Identifizierung des Virus^[7], hergestellt werden.^[8] Zwei Jahre später wurde ein weiteres Virus beschrieben, das als Auslöser für AIDS ausgemacht werden konnte, sodass die Kategorisierung in HIV-1 und HIV-2 erfolgte.^[9] Für den Ursprung beider Virenstämme wird eine unabhängige Übertragung vom Affen auf den Menschen angenommen, worauf die genetischen Gemeinsamkeiten mit dem Simianen Immundefizienz-Virus (*simian immunodeficiency virus*, SIV) als Immunschwächevirus des Affen hindeuten.^[10] Im Fall von HIV-1 gilt eine Übertragung Anfang der 1920er-Jahre in der Gegend um Kinshasa in der heutigen Demokratischen Republik Kongo als wahrscheinlich.^[5] Eine erstmalige Infektion des Menschen mit den Subtypen von HIV-2 wird dagegen in den 1940er-Jahren vermutet.^[10] Infolge der Globalisierung konnten sich sowohl HIV-1 als auch HIV-2 über die Kontinentalgrenzen hinweg ausbreiten (Abb. 1).^[1] Allerdings stellt das leichter übertragbare HIV-1 mit etwa 33 Millionen Infizierten bereits eine globale Bedrohung dar, während HIV-2 epidemisch in Westafrika und Asien auftritt und mit etwa zwei Millionen Menschen eine vergleichsweise geringe Infektionszahl aufweist.^[11] Trotz der getrennten naturhistorischen Entwicklung besitzen beide Virusstämme Gemeinsamkeiten, wie beispielsweise ihre fast identische Struktur, aber auch deutliche Unterschiede. So erlaubt HIV-2, basierend auf der langsameren Progressionsrate, im Gegensatz zu HIV-1 eine weitaus höhere Überlebenswahrscheinlichkeit des Infizierten.^[2,10] Neben rückläufigen Infektionszahlen in Asien und Afrika ist die ansteigende Tendenz der Infizierten in Europa und Nordamerika alarmierend,

wo nach Schätzungen der WHO 2013 etwa 2.3 Millionen Menschen mit HIV lebten. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich die Hälfte der Betroffenen einer Infektion nicht bewusst ist. Dies hat zur Folge, dass eine Behandlung oftmals erst in einem Krankheitsstadium aufgenommen werden kann, in dem das Immunsystem bereits merklich geschädigt ist.^[1]

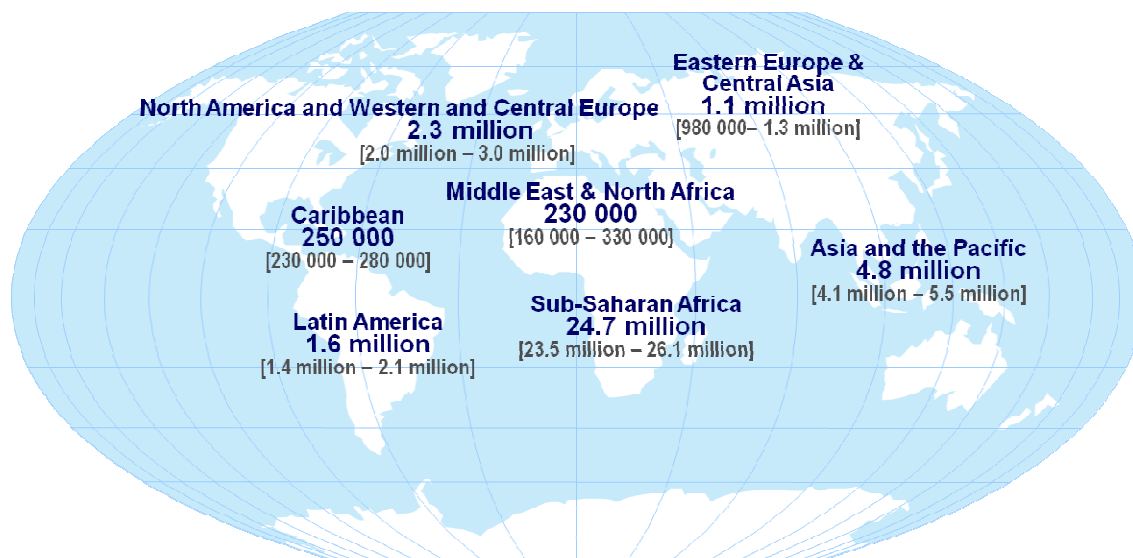


Abb. 1: Statistische Verteilung der HIV-Infizierten im Jahr 2013.^[1]

In der Summe aber gelang es der UN nach der zur Jahrtausendwende formulierten Zielsetzung, bis 2015 eine Trendwende in der Verbreitung von HIV einzuleiten (enthalten in den *Millennium Development Goals*), mithilfe globaler Aufklärungskampagnen die Zahl der jährlichen Neuinfizierungen von 3.4 auf 2.1 Millionen zu reduzieren.^[13,14] Trotzdem gilt es weiterhin, die Übertragung des Virus einzudämmen sowie die medikamentöse Versorgung und eine kompetente Behandlung der Infizierten vor allem in den Niedriglohnländern zu sichern. Gelingt dies nicht, scheinen die angestrebten Ziele der UN, bis 2030 die Zahl der Infizierten und der AIDS zum Opfer fallenden Menschen im Vergleich zu 2010 um jeweils 95% zu reduzieren, nicht realisierbar.^[15]

Bereits 1985 konnte 3'-Azidothymidin **1** (AZT) als erste pharmakologisch aktive Verbindung gegenüber HIV identifiziert werden.^[16] Nachdem der Beweis für eine Kontrolle der HIV-Replikation durch Chemotherapie erbracht und das Verständnis für die Vermehrung des Virus erweitert worden war, begann die Entwicklung einer Vielzahl von antiretroviralen Medikamenten, die später auch klinische Anwendung fanden.^[17] Da es bei der Monotherapie jedoch in Verbindung mit einer hohen Mutationsrate des HI-Virus zu einem Höchstmaß an Resistenzbildungen kommt, wird in der modernen Behandlung die *highly active antiretroviral therapy* (HAART) bzw. mit der neutraleren Bezeichnung die *combination antiretroviral therapy* (cART) eingesetzt.^[18,19] Bei dieser Therapieform, die seit Ende des letzten

Jahrhunderts angewendet wird, kann simultan durch die Kombination von Wirkstoffen in unterschiedliche Stadien des Replikationszyklus des Virus eingegriffen werden. Hierdurch kann eine weitere Schädigung des Immunsystems verhindert werden. Zwar können die Betroffenen trotz intensiver Forschung weiterhin nicht geheilt werden, aber die Viruslast kann zumindest unter die Nachweisgrenze gesenkt werden, wodurch die Lebensqualität der Patienten deutlich verbessert wird. Allerdings machen Nebenwirkungen wie Neuropathien, Leber- und Nierenerkrankungen, unzureichende Effizienz der Arzneimittel und bedingt durch eine jahrelange Behandlungszeit auftretende Resistenzen seitens des Erregers gegen die Wirkstoffe weitere Forschungsarbeit auf dem Gebiet der antiretroviralen Therapie (ART) unumgänglich.^[20]

2 Kennnisstand

Seit Jahrzehnten werden, basierend auf dem verbesserten Verständnis über den Replikationszyklus des Erregers, Agenzien zur Therapie von AIDS entwickelt und eingesetzt. Da die therapeutischen Ansatzpunkte verschieden ausfallen, sind die Variabilität der Therapeutika sowie deren theoretische Kombinierbarkeit in der antiretroviralen Therapie sehr vielfältig. Es sollen im Folgenden das HI-Virus, dessen Replikation sowie Möglichkeiten für Behandlungsansätze vorgestellt und diskutiert werden.

2.1 Das HI-Virus

Im Gegensatz zu Bakterien besitzen Viren keinen eigenen Stoffwechsel und sind somit auf die intrazelluläre Vermehrung durch einen geeigneten Wirt angewiesen, indem zuvor deren genetisches Material in das Genom der Wirtszelle integriert wurde. Das HI-Virus mit einem Durchmesser von rund 100 nm gehört zur Familie der Retroviren. Sein Genom liegt in Form von einzelsträngiger RNA vor, die unter anderem zusammen mit den viralen Enzymen Reverse Transkriptase, Integrase und Protease von einem zweischichtigen Kapsid sowie einer Phospholipid-Doppelschicht umhüllt ist (Abb. 2).^[3]

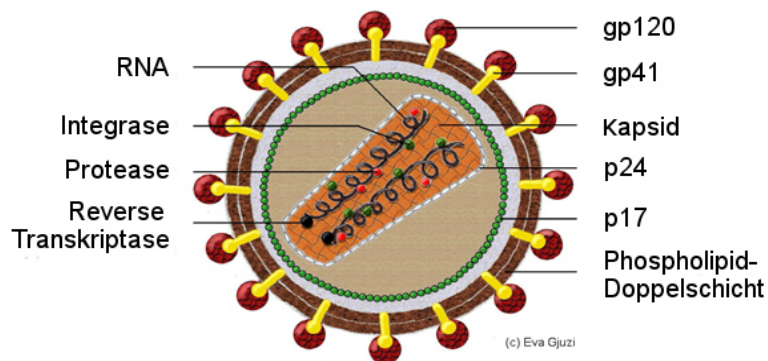


Abb. 2: Schematischer Aufbau des HI-Virus.

Da die Überlebenschancen des Virus außerhalb des Wirtsorganismus sehr gering sind, erfolgt die Übertragung primär über Körperflüssigkeiten wie Sperma, Vaginalsekret und Blut. Dementsprechend zählen Geschlechtsverkehr und perinatale Infektionen zu den häufigsten Übertragungsursachen. Aber auch die Verwendungen kontaminierter Injektionsnadeln bei Drogenkonsum sorgten in der Vergangenheit für eine vermehrte Verbreitung von AIDS. Nach dem Eindringen des Virus in den Wirt und der Aufnahme durch die Schleimhaut werden zunächst die Dendritischen Zellen befallen. Diese sind direkt unterhalb der Schleimhautoberfläche angesiedelt und dienen dem Erreger als Träger zum eigentlichen Zielort. Denn statt eines Abbaus durch die Dendritischen Zellen treten diese mit anderen Immunzellen in Kontakt und übertragen das Virus. Als Wirtszellen fungieren CD4-positive T-Lymphozyten,

die für die Erlangung von Immunität des Wirts gegenüber spezifischen Pathogenen entscheidend sind. Resultierend aus deren Verlust sterben Patienten an opportunistischen Infektionen, denen HIV-negative Personen nicht erliegen würden.^[3,21]

Bei der Erkennung der zur Vermehrung notwendigen CD4-Zellen spielen die viralen Glykoproteine gp120 und gp41 eine entscheidende Rolle. Im ersten Schritt der Interaktion adsorbiert das Virus über das gp120 an das Transmembranprotein CD4 der Wirtszelle, wodurch eine konformationelle Änderung von CD4 hervorgerufen wird (Abb. 3, I).^[3,21]

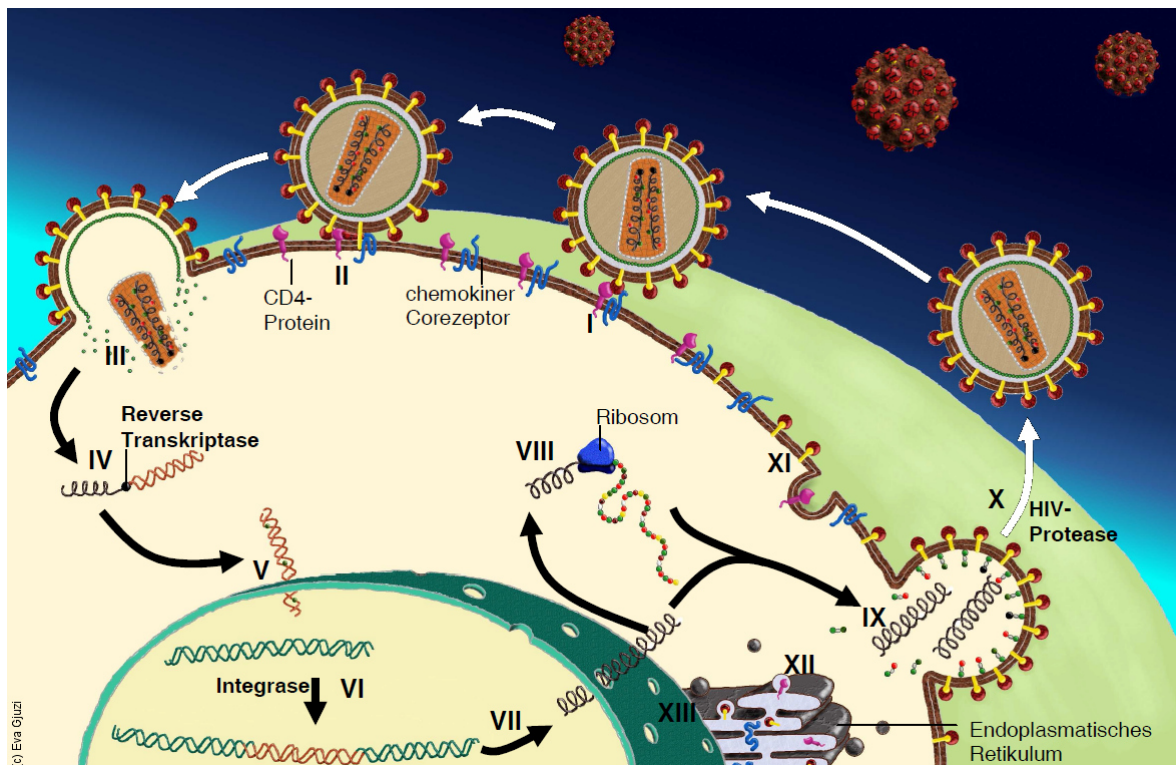


Abb. 3: Stadien des Replikationszyklus des HI-Virus.

Gleichzeitig bindet gp120 an die chemokinen Rezeptoren CCR5 (bei Monozyten) und CXCR4 (bei T-Lymphozyten). Anschließend Konformationsänderungen von gp120 und gp41 führen zu einem engen Kontakt beider Membranen, sodass eine Fusion zwischen HIV-Partikel und Wirtszelle einsetzen kann (II).^[22,23] Beim *uncoating* wird das Kapsid durch zelluläre Kinasen gespalten und die viralen Bestandteile werden in das Zytoplasma entlassen (III). Hier wird die virale RNA durch die Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben (IV), das virale Genom in den Zellkern transportiert (V) und dort anschließend durch die Integrase an einer beliebigen Stelle des Wirtsgenoms eingefügt (VI). Ab diesem Zeitpunkt gilt die Zelle als infiziert, womit die frühe Phase der Replikation abgeschlossen ist. An beiden Termini des HIV-Genoms befinden sich regulatorische Domänen, die Anfang und Ende der Transkription unabhängig von der Position im Genom steuern können. Die RNA-Polymerase leitet durch die Transkription die späte Phase der

Replikation ein. Unterstützung erfährt sie dabei durch die viralen Proteine Tat und Rev. Während Tat als Transkriptionsfaktor agiert und die virale Genexpression um bis zu zwei Größenordnungen beschleunigt, sorgt Rev für den Transport ungespleißter und nicht vollständig gespleißter RNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma (VII). Im Rahmen der Translation, die an den zellulären Ribosomen stattfindet, wird die erhaltene mRNA in virale Proteine umgesetzt (VIII). Anschließend lagern sich die Proteinkomponenten mit zwei ungespleißten RNA-Molekülen an der Wirtsmembran zusammen (IX). Nach posttranslationalen Modifikationen durch die Protease wird das Virus schließlich abgeschnürt und aktiviert, womit die Reifung eines neuen infektiösen Virus abgeschlossen ist (X).^[2,3,21]

2.2 Antiretrovirale Therapie

Durch die Beteiligung unterschiedlicher Enzyme und Proteine bietet der Replikationszyklus von HIV verschiedene Ansätze zur Therapie, denen unterschiedliche Wirkmechanismen zugrunde liegen. Ein Heilmittel gegen HIV konnte bisher zwar noch nicht entwickelt werden, jedoch erlaubt die ART die Verminderung der Krankheitsprogression und eine Reduktion der infektionsbedingten Symptome, wodurch die Lebenserwartung und -qualität der Infizierten deutlich verbessert werden konnte.^[24] Den Ursprung hat die Anti-HIV-Therapie in der Identifikation von AZT Mitte der 1980er-Jahre. Dessen *In-vivo*-Aktivität beruht auf der Inhibition der Reversen Transkriptase, der eine Schlüsselrolle bei der Replikation des HI-Virus zuteilwird.^[16] AZT 1 wurde 1987 von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassen und, basierend auf dem damaligen Status als Alleinvertreter, in Monotherapie verabreicht. Doch aufgrund von Behandlungsfehlern, zu denen zu hohe Dosierungen zählten, kam es bei den Patienten vermehrt zum Auftreten von Anämie und anderen Nebenwirkungen. Einen weiteren Fortschritt ermöglichte die Entwicklung weiterer Anti-HIV-Wirkstoffe, wie zum Beispiel 2',3'-Didesoxyinosin (ddI 2, Didanosin, 1991) oder 3'-Desoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T 3, Stavudin, 1994), die ebenfalls eine Hemmung des Enzyms Reverse Transkriptase induzieren, sowie die Entdeckung von Proteaseinhibitoren. Frühzeitig wurde die Erkenntnis gewonnen, dass die kombinierte Einnahme verschiedener Wirkstoffe erfolversprechender ist.^[25] Seit der Einführung der HAART wurde diese Therapieform sukzessive optimiert, wodurch die Infektiosität und das Transmissionsrisiko merklich gesenkt werden konnten.^[26] Außerdem wird durch die Anwendung verschiedener Inhibitoren die Resistenzbildung minimiert. Allerdings lässt sich die Viruslast trotz jahrelanger Behandlung lediglich unter die Nachweisgrenze senken.

Auch wenn sich durch Protease-, Fusions- und Integraseinhibitoren die Möglichkeiten, in den Replikationszyklus des Virus einzugreifen, heutzutage sehr variabel darstellen, so liegt weiterhin die Inhibierung der für HIV charakteristischen und essenziellen Reversen Transkriptase im Fokus der therapeutischen Ansätze. Dabei wird bei den nukleosidischen

Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) der Umstand genutzt, dass das Enzym im Gegensatz zu der wirtseigenen DNA-Polymerase keine Korrekturlesefunktion (*proof-reading*) besitzt.^[27] Das bedeutet zum einen, dass zwar die Zahl der fehlplatzierten Nukleoside und damit folglich die Mutationsrate des Virus erhöht sind, aber auch zum anderen, dass gezielt unnatürlich modifizierte Nukleosidanaloga eingebaut werden können, die einen sofortigen Kettenabbruch erzwingen können. Dementsprechend weisen die NRTI im Vergleich zu den natürlichen Nukleosiden überwiegend keine freie 3'-Hydroxylfunktion auf, wodurch nach erfolgtem Einbau in den wachsenden Strang die Möglichkeit einer Kettenverlängerung nicht mehr gegeben ist. Somit stellen die Inhibitoren zu den natürlichen Nukleosiden Adenosin, Guanosin, Thymidin und Cytidin alternative Substrate für die Reverse Transkriptase dar.^[28] Die Inhibierung des Enzyms kann ebenso durch den Einsatz von nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) erfolgen. Dabei handelt es sich um hydrophobe Verbindungen, die direkt und nicht-kompetitiv nahe des aktiven Zentrums des Enzyms mit diesem in Wechselwirkungen treten und es durch Konformationsänderung deaktivieren.^[29] Da sich in der Therapie von HIV vor allem die NRTI bewährt haben und diese auch Thema dieser Arbeit sind, sollen nur diese nachstehend näher vorgestellt werden.^[30] Nach AZT **1** folgten bis heute sechs weitere durch die FDA zugelassene NRTI, die in Abbildung 4 chronologisch entsprechend ihres Zulassungsjahrs in den USA aufgeführt sind.

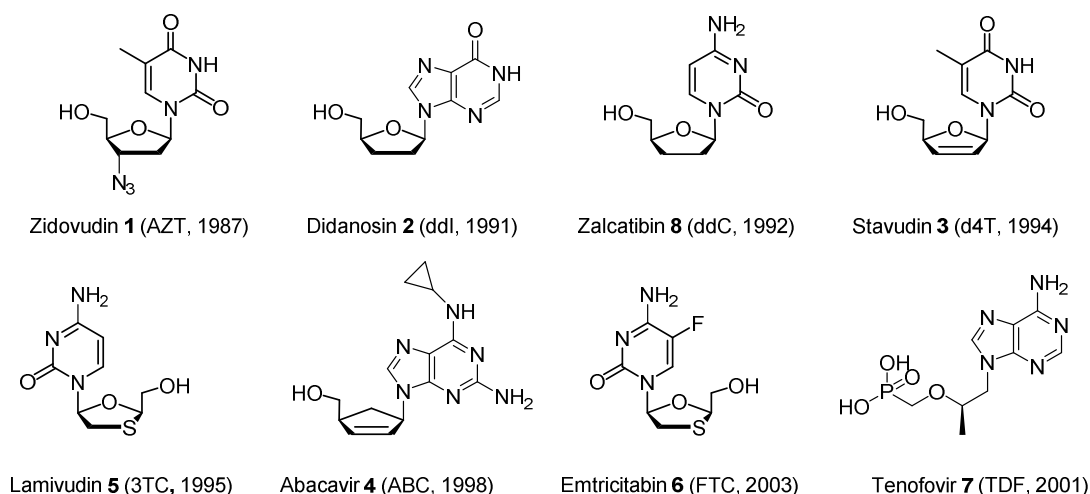


Abb. 4: Von der FDA zur Behandlung zugelassene N(t)RTI (Abkürzung, Zulassungsjahr).^[31-33]

Die strukturellen Unterschiede im Vergleich zueinander, aber auch zu den natürlichen Nukleosiden sind dabei vielfältig. Neben den bereits vorgestellten Analoga ddl **2** und d4T **3** findet sich mit Abacavir **4** (ABC) auch eine carbozyklische Verbindung, die anstelle des Ringsauerstoffs eine Methyleinheit trägt, in der Auflistung wieder. Ebenso können L-Nukleoside (3TC **5**, FTC **6**) in der Lage sein, die Reverse Transkriptase zu hemmen.^[31] Eine Besonderheit stellt ebenfalls das azyklische Tenofovir **7** (TDF) dar, das in der Form

seines Disoproxilfumarats verabreicht wird und zu den nukleotidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NtRTI) zählt.^[32,33]

In Abbildung 5 sind weitere potenzielle Anti-HIV-Nukleoside wie Apricitabin **9**, Elvucitabin **10** und Festinavir **11** zusammengefasst, die sich aktuell in den klinischen Phasen II und III befinden.^[33] Vor allem die Erweiterung des Riboserings mit einer Ethinylgruppe in 4'-Position ergab verglichen mit den unsubstituierten Derivaten eine niedrigere mitochondriale Toxizität sowie eine erhöhte antivirale Aktivität.^[34,35] Anhand von EFdA **12** lässt sich erkennen, dass trotz des Vorhandenseins einer 3'-Hydroxylfunktion ein inhibitorischer Effekt erzielt werden kann. Dieses Phänomen beruht auf einem verzögerten Kettenabbruch (*delayed chain termination*): Nach dem Einbau des Wirkstoffs in den zu elongierenden DNA-Strang werden weitere Nukleoside integriert, bevor die unnatürliche Konformation der DNA, die von dem Analogon hervorgerufen wird, für einen Abbruch der Replikation sorgt.^[36]

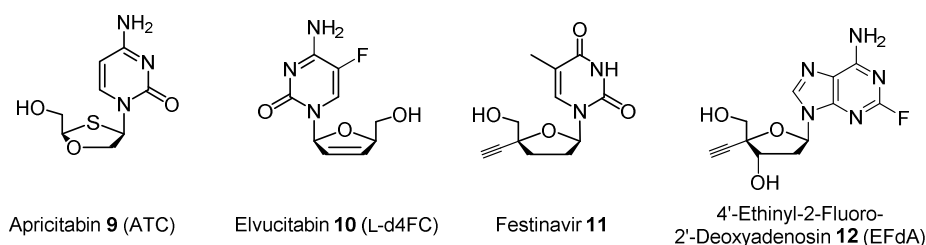


Abb. 5: Gegen HIV in der Entwicklung befindliche NRTI.^[32]

2.3 Grundlage von Pronukleotidkonzepten

Seit mehreren Jahrzehnten liegt das Konzipieren neuer antiviraler Therapeutika durch das Modifizieren von Glykon und Aglykon von Nukleosiden im Fokus der Wissenschaft. Damit Nukleosidanaloga jedoch pharmakologisch aktiv sein können, müssen sie zunächst in ihre 5'-Triphosphate überführt werden. Da die entsprechenden Phosphorylierungsprozesse durch substratspezifische zelluläre Enzyme katalysiert werden und somit eine effiziente Umsetzung nicht grundlegend gegeben ist, kann die antivirale Aktivität der Nukleoside nicht entfaltet werden oder sogar vollständig ausbleiben. Außerdem erhöhen eine ineffiziente Phosphorylierung der Nukleosidanaloga in ihre Triphosphatform und die sich daraus entwickelnde unzureichende Inhibierung die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Resistenzen.^[30,37,38] Dieser Sachverhalt soll im Folgenden erörtert und bereits entwickelte Lösungsansätze sollen vorgestellt werden.

Im Hinblick auf eine Verbesserung der Wirksamkeit von Therapeutika gewinnt die Entwicklung von Pronukleotiden bzw. Prodrugs zunehmend an Bedeutung. Diese modifizierten und pharmakologisch inaktiven Vorläuferverbindungen von aktiven Wirkstoffen setzen erst durch *In-vivo*-Biotransformationen das aktive Agens frei. Dadurch lassen sich die physikochemischen, biopharmazeutischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der

Wirkstoffe positiv beeinflussen und unterschiedlichste biochemische Barrieren überwinden. So können beispielsweise die Wasserlöslichkeit und chemische Stabilität erhöht, toxische Wirkungen minimiert oder First-Pass-Effekte umgangen werden. Funktionelle Prodrugs müssen nach einer oralen Aufnahme bei verschiedenen pH-Werten (z. B. Magensaft, Blutplasma) stabil sein. Gleichzeitig sollte eine gute Membrangängigkeit gegeben sein, um sowohl eine gute Bioverfügbarkeit in Zellen als auch ein Durchdringen der Blut-Hirn-Schranke, hinter der sich speziell bei HIV Reservoirs bilden können, zu gewährleisten. Des Weiteren muss eine schnelle Freisetzung des Wirkstoffs am Zielort erfolgen, um eine unerwünschte Verarbeitung im Stoffwechsel zu unterbinden.^[39,40]

Da bei nukleosidischen Analoga in der Regel die Nukleosid-5'-triphosphate die bioaktiven Spezies sind, ist eine intrazelluläre Metabolisierung durch die entsprechenden humanen oder auch viralen Kinasen essenziell. Allerdings erlaubt die Substratspezifität der involvierten zellulären Enzyme bei der schrittweisen Phosphorylierung überwiegend nur eine ineffiziente Umsetzung, wodurch die antivirale Aktivität der Nukleoside bzw. deren klinischer Nutzen reduziert wird.^[37,38] Die Problematik wird anhand zweier Beispiele deutlich: Im Fall des Anti-HIV-Therapeutikums d4T **3** stellt die erste Phosphorylierung zum d4TMP **13**, katalysiert von der zellulären Thymidinkinase (TK), den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (Abb. 6).^[41] Im Vergleich dazu ist bei AZT **1** die Umsetzung zum AZTMP **14** zwar effektiv, jedoch ist der zweite Phosphorylierungsschritt, der durch die Thymidylatkinase (TMPK) katalysiert wird, gehemmt.^[42] Dies hat jeweils zur Folge, dass eine höhere Dosis des Medikaments aufgenommen werden muss, um die Ineffizienz der Kinasen auszugleichen und zumindest einen ansprechenden inhibitorischen Effekt zu erzielen. Eine stärkere Dosierung erhöht wiederum die Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen.

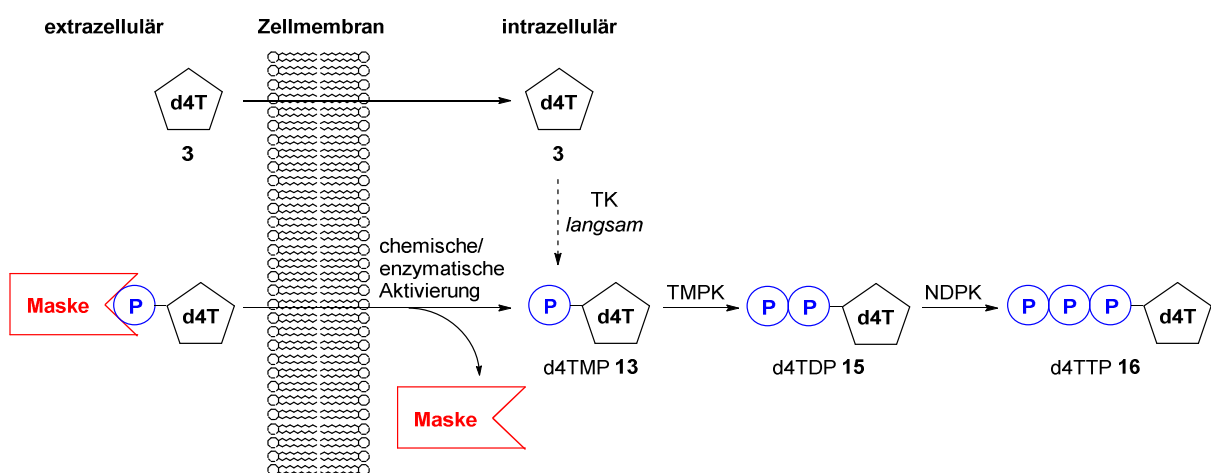


Abb. 6: Metabolismus und TK-Bypass am Beispiel von d4T **3**.

In der Vergangenheit wurde daher dazu übergegangen, primär Prodrugkonzepte zu entwerfen, die einen TK-Bypass, das heißt die Freisetzung einer monophosphorylierten

Verbindung, ermöglichen.^[40] Aber auch die Entwicklung mehrfach phosphorylierter Nucleosid-Prodrugs wurde angestrebt. Eine Verabreichung eines unmaskierten Nucleotids wäre aufgrund der vorliegenden negativen Ladungen nicht Erfolg versprechend, da die Permeabilität für hydrophile Substanzen durch passive Diffusion nicht gegeben ist. Dementsprechend ist eine lipophile Maskierung der Phosphateinheit(en) für das Gelingen eines Prodrugsystems notwendig. Im Folgenden sollen einige wegweisende Konzepte vorgestellt werden.

2.3.1 Nucleosidmonophosphat-Prodrugs

Das erste Pronucleotidkonzept, das die intrazelluläre Freisetzung von Nucleosidmonophosphaten und somit einen TK-Bypass erlaubte, wurde 1984 von FARQUHAR ET AL. entwickelt (Abb. 7).^[43]

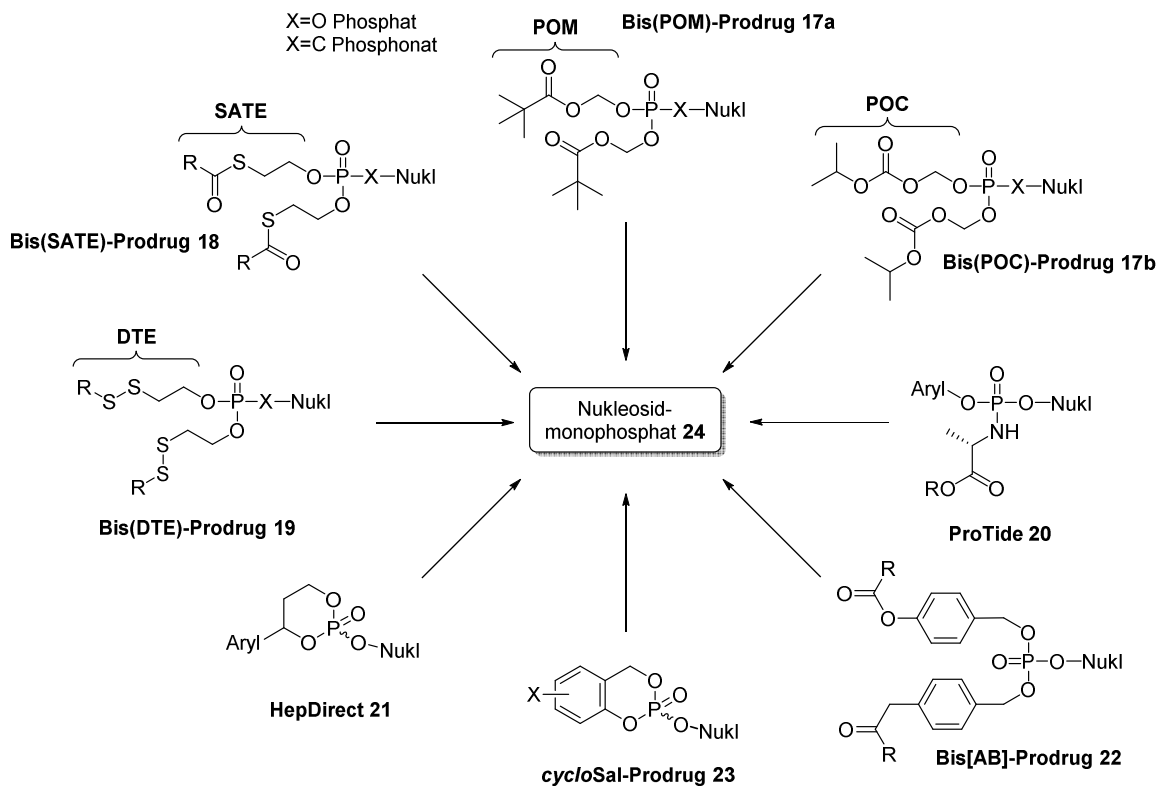


Abb. 7: Prodrugkonzepte für Nucleosidmonophosphate und -phosphonate.

Durch die zweifache Maskierung der Phosphatgruppe mit unterschiedlichen biolabilen Acyloxyalkylesterseinheiten wurden die Bis(POM)-Prodrugs **17a** erhalten. Ebenso war die Übertragung dieses Konzepts auf Nucleosidphosphonate möglich. Die Degradation der lipophilen Masken erfolgt durch enzymatische Spaltung des Esters, wodurch zunächst ein instabiles Hydroxymethylalkoholat gebildet wird. Dieses zerfällt schließlich durch Umlagerung zu Formaldehyd und dem monomaskierten Prodrug, wobei im Anschluss die

zweite Maske analog abgebaut wird. In struktureller Verwandtschaft stehen die Bis(POC)-Prodrugs **17b**, die anstelle einer Ester- eine Carbonatfunktion aufweisen. Auch in diesem Fall initiieren Esterasen den Abbau der Masken, wenngleich letztlich das intermediäre Carboxylat zur Bildung von Kohlenstoffdioxid und Formaldehyd führt.^[40] Mit dem azyklischen Tenofovir Disopropylfumarat **7** (Viread) wurde 2001 von der FDA sogar ein Vertreter der Bis(POC)-Prodrugs **17b** für die Behandlung von HIV zugelassen.^[32,44]

Anfang der 1990er-Jahre folgte das Bis(SATE)-Konzept **18**, bei dem der Phosphatriester mit zwei veresterten Thioethyleinheiten ausgestattet ist.^[45] Die Spaltung der Masken verläuft erneut über eine enzymatische Aktivierung mittels Esterasen, wobei ein *O*-2-Mercaptoethylphosphotriester spontan über intramolekulare Substitution zur Freisetzung von Thiiran führt. Ähnlich vollzieht sich auch der Abbau der Bis(DTE)-Prodrugs **19**. Allerdings wird die integrierte Disulfidbrücke mithilfe einer Reduktase gespalten.^[40,45]

In demselben Zeitraum publizierten MCGUIGAN ET AL. das Konzept der Phosphoramidat-Prodrugs **20** (ProTide). Dieses zählt bis heute zu den am meisten angewandten und am intensivsten erforschten Ansätzen.^[46] ProTide **20** besitzen ein chirales Phosphoratom, das sowohl einen Arylsubstituenten trägt als auch mit einer Aminosäure verestert ist. Die intrazelluläre Metabolisierung der Maske wird durch die Spaltung des Aminosäureesters durch Esterasen oder Cathepsine eingeleitet. Eine spontane intramolekulare Zyklisierung führt zur Bildung eines Fünfrings sowie zur Eliminierung des Aryloxysubstituenten. Durch Hydrolyse schließt sich die Ringöffnung an. Das dabei erhaltene Phosphoramidat wiederum wird durch intrazelluläre Phosphoramidasen zum Phosphat umgesetzt. Begünstigt durch die unkomplizierte Synthese sowie eine Vielzahl von Studien unterschiedlicher ProTide **20** konnten schnelle Fortschritte bezüglich einer therapeutischen Anwendung gemacht werden. Dadurch befinden sich aktuell entsprechende Pronukleotide zur Behandlung von HIV, Hepatitis C (HCV) und zur Tumorbekämpfung sowohl im Einsatz als auch in klinischen Studien.^[47-49]

Die HepDirect-Prodrugs **21** ermöglichen eine selektive Freisetzung des Wirkstoffs in der Leber, da die Aktivierung über Cytochrom P450 induzierte Oxidation erfolgt. Mechanistisch wird durch die enzymatische Initiierung ein Hemiketal generiert, dessen Ringsystem sich spontan öffnet und nach einer β -Eliminierung die entsprechende Phosphorspezies freisetzt. Dadurch stellt dieses Konzept eine interessante Option dar, um gezielt Lebererkrankungen zu behandeln.^[50]

Die Bis[AcyloxyBenzyl]-Nukleotide **22** (BAB-Prodrugs) erlauben eine Freisetzung des Nucleosidmonophosphats **24** durch die von Carboxyesterasen katalysierte Spaltung einer *para*-ständigen Acylgruppe des Phenylrings.^[51] Dieses Konzept bildet die Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Prodrugs und wird im Zusammenhang mit den Nucleosiddiphosphat-Prodrugs ausführlicher vorgestellt (Kapitel 2.3.2).

Das ebenfalls intensiv untersuchte *cycloSal*-Konzept von MEIER ET AL. beruht auf einer bisher einzigartigen Strategie. Der zyklische Salicylalkohol als Maskierung des *cycloSal*-Prodrugs **23** ermöglicht einen gleichzeitigen Schutz beider Ladungen des Phosphats und lässt sich zusätzlich durch flexible Substitutionsmuster in seiner Reaktivität beeinflussen. Zudem kommen die Prodrugs **23** ohne eine enzymatische Aktivierung aus. Das Konzept wurde bisher auf eine Vielzahl von antiviralen Wirkstoffen übertragen, wobei intrazellulär die erfolgreiche Freisetzung des gewünschten NMPs beobachtet werden konnte. Der in Abbildung 8 gezeigte Mechanismus beschreibt die pH-abhängige chemische Initiierung. Die phenylische Esterbindung wird nach einer nukleophilen Substitution am Phosphorzentrum gespalten und die Bildung eines Benzylphosphatdiesters **25** findet statt. Dabei wird der zum Benzylester in 2'-Position angeordnete Substituent von einem schwachen (Phosphat) zu einem starken Donor (Hydroxyl) umgewandelt. Diese Umpolung bewirkt einen spontanen Bruch der Benzylesterbindung sowie die Freisetzung des Nucleosidmonophosphats **24** und des Salicylalkohols **26**, der aus der Hydrolyse des intermediär gebildeten Chinonmethids hervorgeht. Allerdings entsteht auch der vergleichsweise hydrolysestabile Phenylphosphatdiester **27**, der auf die Spaltung der Benzylesterbindung des *cycloSal*-Triesters **23** zurückzuführen ist.^[52,53]

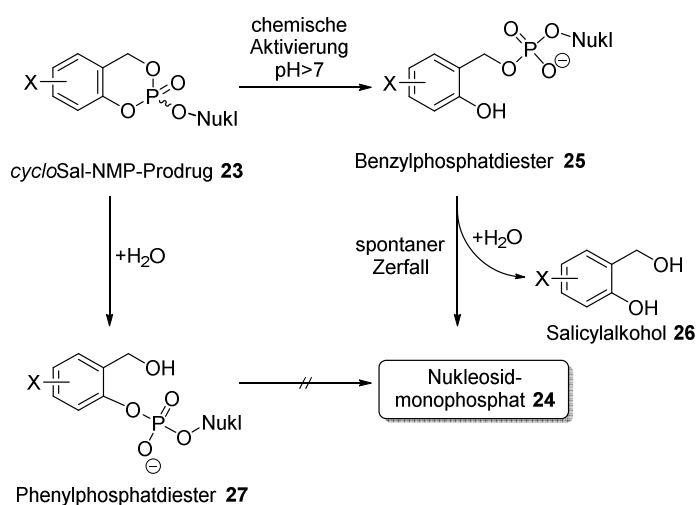


Abb. 8: Chemisch induzierter Hydrolysemechanismus der *cycloSal*-Pronukleotide.

Sowohl durch die Wahl der Substituenten als auch deren Position am Aromaten lässt sich vor allem die Geschwindigkeit der Hydrolyse gezielt steuern. Während Donorsubstituenten in 3'-Position zu einer Erhöhung der Hydrolysehalbwertszeit führen, sorgt die erhöhte Elektrophilie am Phosphor bei Akzeptorsubstituenten in 5'-Position für eine beschleunigte Hydrolyse.^[53] In der Vergangenheit wurde dieses Konzept weiter optimiert. Einen neuartigen Ansatz stellten dabei die enzymatisch aktivierbaren und mit „lock-in“-Modifikationen versehenen Prodrugs dar (Abb. 9).^[54,55]

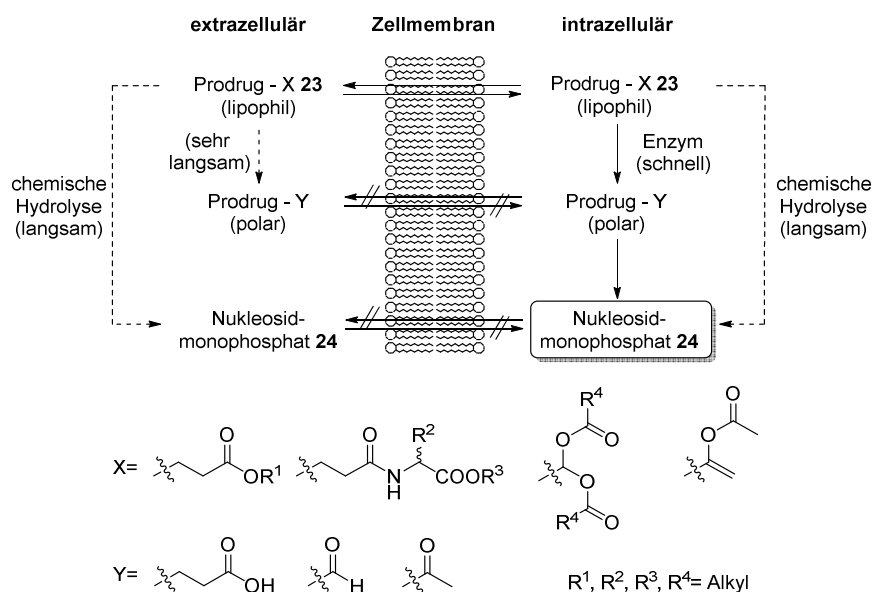


Abb. 9: Konzept der enzymatischen Aktivierung von in 5'-Position am Aromaten mit X substituierten *cycloSal*-NMP-Prodrugs **23** (bearbeitet nach [40]).

Basierend auf dem lipophilen Charakter der *cycloSal*-Verbindungen **23** in Kombination mit einem langsamen chemischen Aktivierungsschritt war ein Konzentrationsgleichgewicht im intra- und extrazellulären Medium anzunehmen. Um eine Rückdiffusion durch die Zellmembran zu unterbinden, wurde die Salicylmaske mit Substituenten versehen, die sich in der Zelle enzymatisch zu Verbindungen höherer Polarität überführen lassen. Ein erneutes Passieren der Membran ist somit nicht mehr möglich. Hierfür wurden mit POM, POC und Aminosäureestern funktionalisierte Verbindungen verwendet.^[54-57] Ein Ethylenspacer am Phenylring verhindert einen direkten Einfluss der enzymatisch spaltbaren Gruppe auf die Stabilität des Triesters. Für diese Pronucleotide wurde ein erfolgreicher Verlauf der intrazellulären Freisetzung des Nucleosidmonophosphats **24** nachgewiesen. Allerdings konnte keine Verbesserung der antiviralen Aktivität erzielt werden, was auf eine extrazelluläre Degradation schließen lässt.

Bisher einmalig unter den Prodrugkonzepten ist die Entwicklung von *cycloSal*-Prodrugs **23** mit einem effizienten Verhältnis von Maske zu Nucleosid von 1:2.^[58]

Interessante Resultate lieferten auch Studien der einzelnen Diastereomere, die aufgrund des Stereozentrums am Phosphoratom generiert werden. Sowohl die Hydrolysegeschwindigkeit als auch die antivirale Aktivität der Diastereomere zeigten signifikante Unterschiede. Da die chromatographische Trennung der Diastereomere mit einem hohen Aufwand verbunden ist, wurden unter Verwendung von chiralen Auxiliaren stereoselektive Synthesen erarbeitet.^[59]

Zudem wurden die präparativen Möglichkeiten dieses Konzepts erkannt (Abb. 10), die auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden. Durch die Elektrophilie am Phosphorzentrum kommt analog zu einer hydrolytischen Spaltung ein Angriff eines anderen geeigneten

Nukleophils in Betracht. Begünstigend auf die Reaktionsgeschwindigkeit und Umsetzungsraten wirken sich dabei Akzeptorsubstituenten in 5'-Position (Cl, NO₂) aus. Als geeignete Nukleophile stellten sich unter anderem Phosphatsalze heraus, wodurch verschiedene phosphorylierte Biomoleküle, wie NDP und NTP, über diese Methode zugänglich waren.^[60] Außerdem konnte die Synthese von polyphosphorylierten (Oligo-) Nucleotiden an der Festphase etabliert werden. Basierend auf der Immobilisierung der *cycloSal*-Verbindungen **23** war dadurch eine effiziente und unkomplizierte Reinigung von teilweise instabilen Zielverbindungen realisierbar.^[61] Aber auch in der Kohlenhydratchemie fand das Konzept Anwendung, als beispielsweise deprotonierte Zucker und Zuckerphosphate erfolgreich zu Nucleosidmono- und -diphosphatzuckern umgesetzt werden konnten.^[62,63] Die gelungene Präparation von Pyranonucleosid-6'-triphosphaten unterstreicht die breite synthetische Anwendbarkeit der *cycloSal*-Technik.^[64]

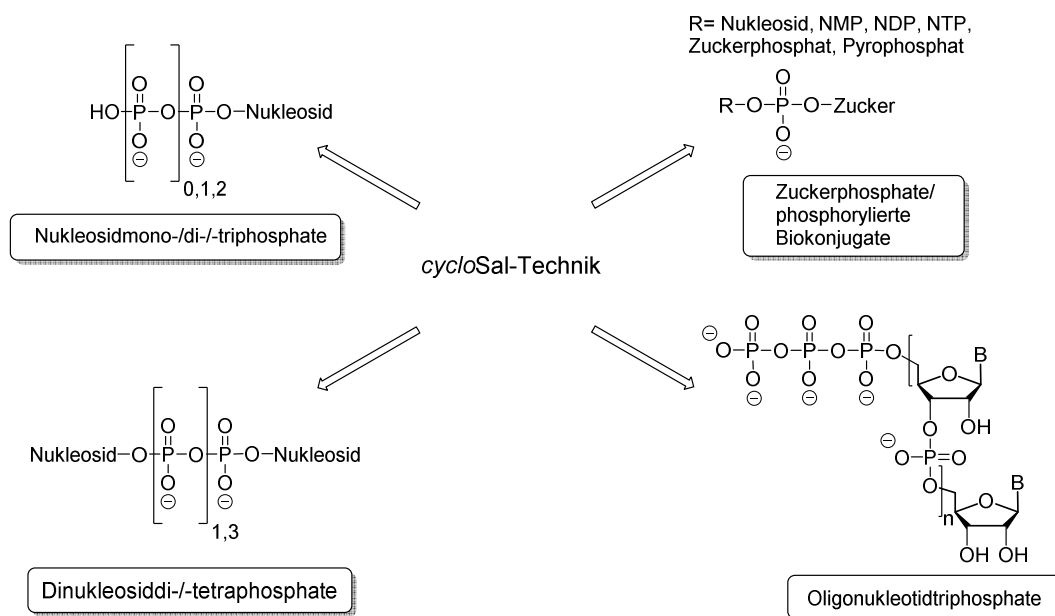


Abb. 10: Über die *cycloSal*-Technik zugängliche phosphorylierte Biokonjugate.^[60-64]

2.3.2 Nucleosiddiphosphat-Prodrugs

Im Gegensatz zu dT **3** stellt bei AZT **1** die enzymkatalysierte Phosphorylierung des AZTMPs **14** zum AZTDP **28** den geschwindigkeitslimitierenden Schritt der Biotransformation dar (Abb. 11).^[42,65] Neben der daraus resultierenden ineffizienten Bildung des bioaktiven AZTTPs **29** kommt hinzu, dass AZTMP **14** im Zellmedium akkumuliert und zu Nebenwirkungen wie einer Schädigung von pluripotenten Stammzellen führen kann.^[66] Folglich wäre die direkte intrazelluläre Freisetzung des Diphosphatmetaboliten über ein Prodrugsystem wünschenswert.

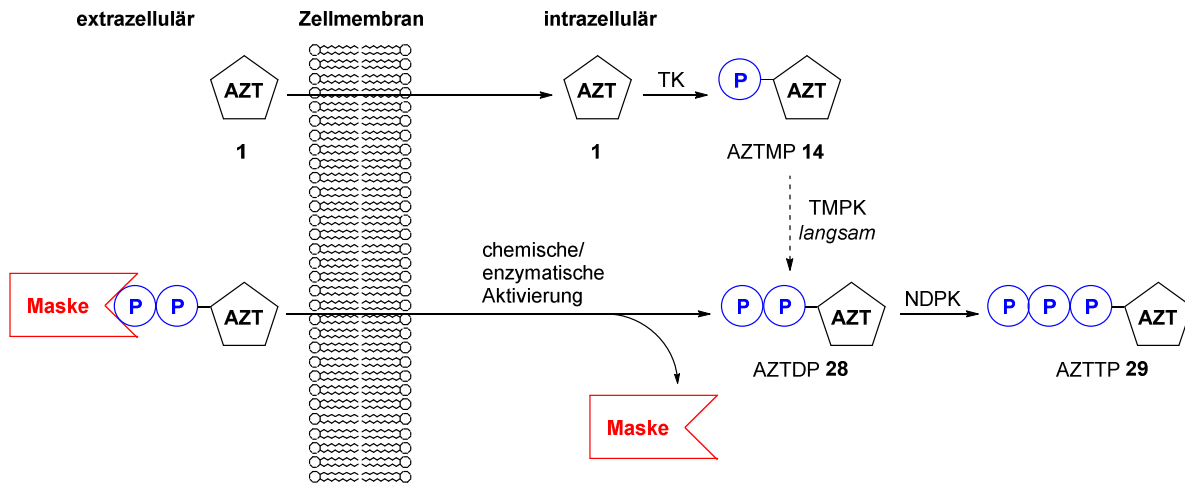


Abb. 11: Metabolismus und TMPK-Bypass am Beispiel von AZT 1.

Erste Ansätze in den 1980er-Jahren basierten auf der Einführung einer einfachen lipophilen Maskierung des β -Phosphats, wodurch zwei Ladungen des Diphosphats erhalten blieben. Die von HOSTETLER ET AL. entwickelten NDP-Prodrugs **30** trugen zunächst lipophile Dialkanoylglycerole als Masken (Abb. 12). Studien dieser Phospholipidanaloga auf Basis von AZT **1**, ddT **31** und ddC **8** ergaben jedoch nur die Freisetzung der monophosphorylierten Form **24** des HIV-Agens, was mit einem hydrolytischen Bruch der Phosphoranhydridbindung erklärt wurde.^[67,68] Eine ähnliche Strategie verfolgten BONNAFFÉ ET AL., indem die endständige Phosphateinheit mittels einer Acylfunktion maskiert wurde.^[69,70] Die Entschützung des Acyl-NDP-Prodrugs **32** sollte intrazellulär über Hydrolasen erfolgen. Allerdings konnte lediglich in Triethylammoniumacetat-Puffer (TEAA) bei pH 7.0 die selektive Freisetzung von NDP nachgewiesen werden. Im Kulturmedium fand dagegen eine signifikant schnellere Abspaltung der Maske statt. Mit der Instabilität des Prodrugs im Kulturmedium und der damit einhergehenden verminderten Permeabilität wurde auch die im Vergleich zum Nukleosid gleichbleibende bzw. verschlechterte antivirale Aktivität begründet.^[71]

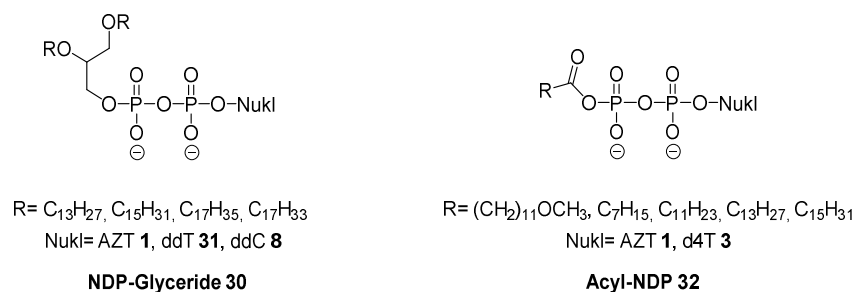


Abb. 12: Nukleosiddiphosphat-Glyceride **30**^[67,68] und Acyl-Nukleosiddiphosphate **32**.^[69-71]

Eine Übertragung der *cycloSal*-Methode auf Nucleosiddiphosphate ließ sich aufgrund einer zu hohen Instabilität der Prodrugs nicht realisieren. Zwar konnten *cycloSal*-AZTDP-Prodrugs **33** synthetisiert werden, jedoch zeigte die Analyse des Hydrolysewegs bei einem chemisch induzierten Aktivierungsschritt, dass unabhängig von dem Substitutionsmuster keine selektive Freisetzung des gewünschten Nucleosiddiphosphats **28** erreicht werden kann.^[72] Während eine Methylfunktion in 3'-Position nur 1% AZTDP **28** freisetzte, ergab ein Chlorsubstituent in 5'-Position eine verbesserte Ausbeute von 25%. Gleichzeitig sorgte der elektronenziehende Effekt des Halogens allerdings für eine Verringerung der Hydrolysehalbwertszeit. Als dominierender Reaktionsverlauf stellte sich durchgehend die Hydrolyse der Phosphoranhydridbindung heraus (Abb. 13).^[73]

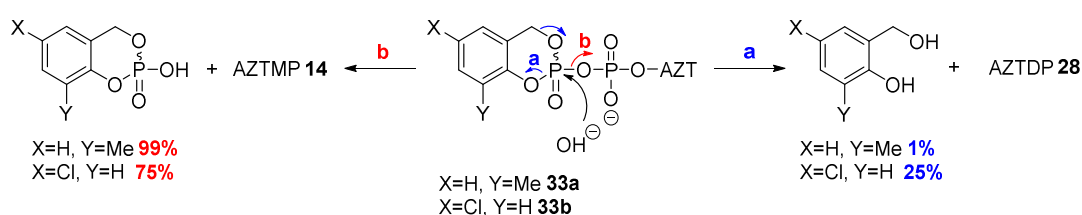


Abb. 13: Beobachtete Hydrolysewege der *cycloSal*-NDP **33**.^[72]

Ein innovatives System lieferte dagegen ein ursprünglich für Monophosphat-Prodrugs entwickelter Ansatz. Als Grundlage dienten dabei zwei 4-Acyloxybenzyl-Einheiten, die im Fall der Monophosphate eine vollständige Maskierung der negativen Ladungen zur Folge hatten.^[51] JESSEN gelang jedoch mit der Synthese von Bis(acyloxybenzyl)-Diphosphat-Prodrugs **34** eine erfolgreiche Übertragung des Konzepts auf Nucleosiddiphosphate **35**, wobei sich der Verbleib der unmaskierten Ladung als vorteilhaft herausstellen sollte.^[72]

Die Grundlage des sogenannten DiPPro-Konzepts (**Di**Phosphat-**Pro**drug) bildet die räumliche Distanz der enzymatisch zu spaltenden Acylfunktion zu den energiereichen Phosphateinheiten, die über einen Benzylspacer miteinander verbrückt vorliegen. Dadurch wird die Repulsion zwischen der Esterase und den negativen Ladungen vermindert. Nach der enzymatischen Aktivierung findet, resultierend aus einer Umpolung vom Elektronenakzeptor (Acylester) zu einem -donor (Phenolat), eine 1,6-Eliminierung statt (Abb. 14). Diese führt zur Bildung eines mesomeriestabilisierten Chinonmethids **36**, das in Verbindung mit Wasser zu 4-Hydroxybenzylalkohol **37** reagiert.^[71,72] Eine erhöhte Toxizität, bedingt durch eine Reaktion des Chinonmethids **36** mit Proteinen, konnte bisher nicht festgestellt werden. Allerdings sind Reaktionen mit den Nucleobasen der DNA oder weiteren zellulären Nucleophilen nicht gänzlich auszuschließen.^[74-76] Das aus der Abspaltung der ersten Maskierungseinheit hervorgehende monomaskierte Intermediat **38** folgt dem gleichen Spaltungsmechanismus, der schließlich zur Bildung des NDPs **35** führt.

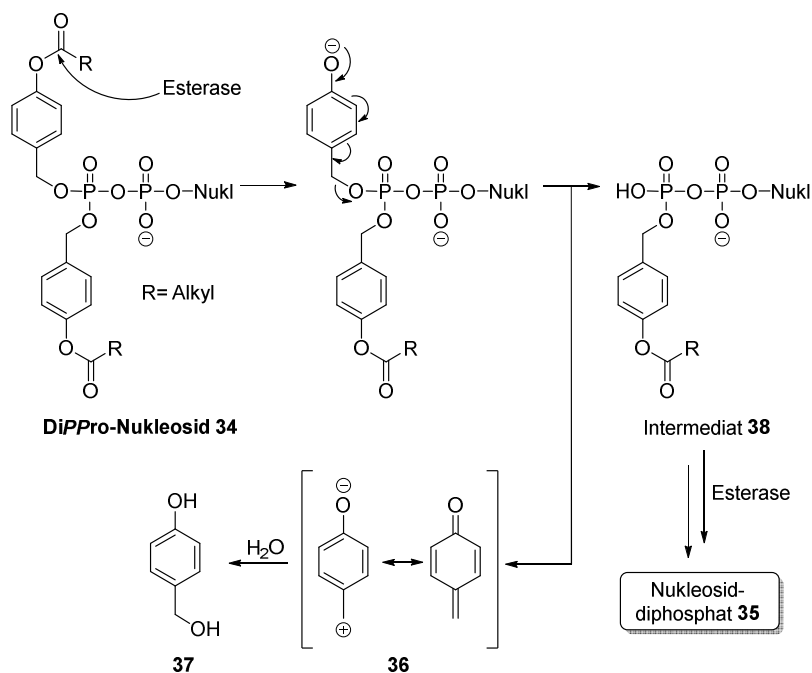


Abb. 14: Postulierter Hydrolysemechanismus von NDP-Prodrugs **34** nach dem BAB-Konzept.^[72,73]

Gleichermaßen wurde in der Vergangenheit auch eine chemisch induzierte Freisetzung von Nucleosiddiphosphaten **35** nach der analogen Hydrolysekaskade beobachtet. Dabei wurde ergänzend festgestellt, dass sich die zusätzliche negative Ladung merklich auf die Stabilität des Intermediats auswirkt, die deutlich höher als die des entsprechenden zweifach-maskierten Prodrugs **34** liegt und sogar eine hydrolytische Spaltung der Phosphoranhydridbindung verhindert.^[77] Die Gegenüberstellung der Hydrolysehalbwertszeiten in CEM/0-Zell-extrakten und in Phosphatpuffer (pH 7.3) zeigte signifikante Differenzen. Ein deutlich beschleunigter Abbau der DiPPro-Verbindungen in Zellextrakten ließ die Schlussfolgerung einer erfolgreichen enzymatischen Initiierung zu.^[72,77] Außerdem kann sowohl die Stabilität als auch die antivirale Aktivität der Prodrugs mit zunehmender Länge der Acylreste verbessert werden, wie eine umfangreiche Untersuchung mit dem Modellnucleosid d4T **3** ergab. Eine Erhöhung der Lipophilie bzw. der Stabilität führt allerdings bei der chemischen Hydrolyse zu einem verstärkten Bruch der Phosphoranhydridbindung und somit zur Freisetzung von d4TMP **13**. Durch die im Vergleich zu d4T **3** signifikant verbesserten EC_{50} -Werte in TK-defizienten Zellen konnte indirekt nachgewiesen werden, dass die DiPPro-Verbindungen **34** in der Lage sind, die Zellmembran zu passieren und intrazellulär phosphorylierte Metabolite freizusetzen.^[77,78]

Einen wichtigen Faktor stellt außerdem die verbliebene Ladung am α -Phosphat dar, wie Versuche der Synthese eines Tris(acyloxybenzyl)-Prodrugs gezeigt haben. Dieser Umstand ist darauf zurückzuführen, dass die geringeren elektronischen Repulsionswechselwirkungen einen Angriff von Nucleophilen erleichtern.^[72]

2.3.3 Nukleosidtriphosphat-Prodrugs

An einer Entwicklung von Nukleosidtriphosphat-Prodrugs haben sich augenscheinlich bisher nur sehr wenige Arbeitsgruppen mit mäßigem Erfolg versucht. Die wenigen beschriebenen Konzepte gingen meist weder mit einer Freisetzung von NTP **39** noch mit einer Verbesserung der antiviralen Aktivität einher.^[69,79,80] Als Ursache für diesen Sachverhalt wurde frühzeitig, wie bei den Diphosphat-Prodrugs **34**, die hohe Instabilität der energie-reichen und lediglich kinetisch stabilen Phosphoranhydridbindungen erkannt.^[81] Daher wurde der Erforschung von derartigen Prodrugs seit der Jahrtausendwende kaum Aufmerksamkeit gewidmet. Dabei wäre die direkte intrazelluläre Freisetzung des bioaktiven Triphosphats **39** erstrebenswert, um alle von Kinasen katalysierten Prozesse zu umgehen und die Konzentration des NTPs **39** im Zytoplasma zu maximieren (Abb. 15). Dadurch könnten möglicherweise Triphosphat-Prodrugs von ursprünglich als inaktiv angenommenen Nukleosidanaloga in wirksame Therapeutika umgewandelt werden. Studien haben bereits zeigen können, dass selbst Nukleosiddiphosphate **35** schlechte Substrate für die relativ unspezifische Nukleosiddiphosphatkinase (NDPK) darstellen können. Kürzlich wurde beispielsweise nachgewiesen, dass die Diphosphate der Uridinanaloga d4U **40** und ddU **41** nur unzureichend von der NDPK zum Nukleosidtriphosphat **39** phosphoryliert werden.^[82] Dieser Umstand begründete nicht nur die fehlende Anti-HIV-Aktivität der Nukleoside, sondern auch die der *cycloSal*- und *DiPPro*-Verbindungen. Vorherige Untersuchungen mit isolierter Reversen Transkriptase zeigten hingegen eine hohe inhibitorische Effizienz der entsprechenden Triphosphate gegen das Enzym des HI-Virus.^[83]

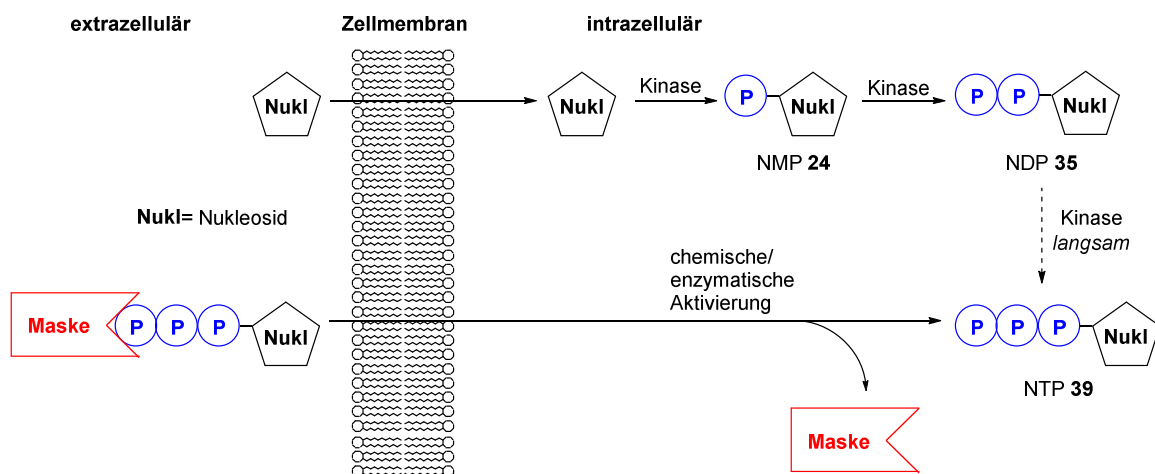
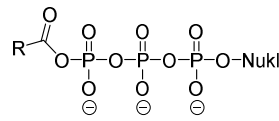


Abb. 15: Genereller Metabolismus von NRTI und NDPK-Bypass durch Triphosphat-Prodrugs.

Die ersten potenziellen NTP-Prodrugs wurden ebenfalls von BONNAFFÉ ET AL. entwickelt, die ihr synthetisches Konzept von den Nukleosiddiphosphat-Prodrugs erweiterten, indem das γ -Phosphat monoacyliert wurde (Abb. 16).^[69,70] Allerdings wurde in Analogie zu den Acyl-

NDP **32** (Abb. 12) nur in TEAA-Puffer die Freisetzung vom NTP **39** beobachtet. Die geringe Halbwertszeit im Kulturmedium verhinderte eine Verbesserung der antiviralen Aktivität im Vergleich zum Nukleosid.^[71]



Acyl-NTP **42**

Abb. 16: Acyl-NTP **42** nach BONNAFFÉ ET AL..^[69-71]

Einen alternativen Ansatz stellte das Cholesterolcarbonat-ATP-Prodrug **43a** von KREIMEYER ET AL. dar (Abb. 17). Dabei erlaubte das Steroid sogar eine erfolgreiche Zellaufnahme des Prodrugs.^[80] Eine Übertragung des Konzepts auf potenzielle Anti-HIV-Nukleoside sollte folgen, konnte jedoch scheinbar nicht realisiert werden, wie das Fehlen weiterer Publikationen vermuten lässt. Als Ursachen sind zum einen die geringe Ausbeute der bis dato einmalig erfolgten finalen Dicyclohexylcarbodiimid-Kupplung, zum anderen ein intrazellulär ablaufender unselektiver Zerfall des Chol-ATPs **43a** zu vermuten.

Als ein weiteres zellpermeables ATP-Prodrug ist das ATP-Polyamin-Biotin **43b** (APB) beschrieben (Abb. 17). APB wurde erfolgreich als Cosubstrat für die Kinase-katalysierte Biotinylierung eingesetzt.^[84] Diese Prodrugstrategie soll in Zukunft zwar primär zur Aufklärung von zellulären Kommunikationsprozessen genutzt werden, zeigt gleichzeitig aber auch, dass kationische Gruppen in der Lage sind, die Zellmembran zu penetrieren.

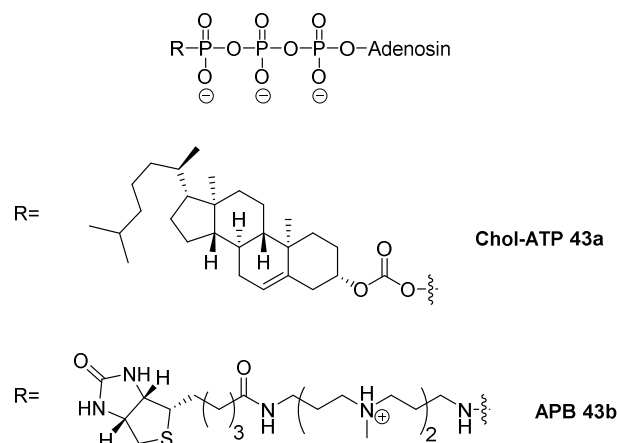


Abb. 17: Zellpermeable ATP-Prodrugs: Cholesterolcarbonat- **43a**^[80] und Polyamin-Biotin-Prodrug **43b**.^[84]

Ein erstes vielversprechendes Triphosphat-Prodrug (TriPPPro-d4TTP **44**) wurde von SCHULZ durch Anwendung des BAB-Konzepts auf Basis des antiviralen Wirkstoffs d4T **3** erhalten (Abb. 18).^[78] Dabei wurde die endständige γ -Phosphateinheit in Analogie zu dem bereits vorgestellten DiPPPro-Konzept mit zwei akzeptorsubstituierten Benzylestern bioreversibel verknüpft. In chemischen Hydrolysestudien wurde eine bevorzugte Freisetzung des Nucleosidtriphosphats **16** über das intermediär gebildete, monomaskierte Zwischenprodukt **45** festgestellt. Ebenso wurde in CEM/0-Zellextrakten eine schnelle Bildung des monomaskierten Prodrugs **45** beobachtet, was auf eine erfolgreiche enzymatische Initiierung zurückgeführt wurde. Eine enzymatisch induzierte Freisetzung des d4TTPs **16** konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren ließ ein in TK-defizienten Zellen erhaltener EC_{50} -Wert indirekt den Rückschluss zu, dass das intakte Prodrug **44** die Zellmembran durchdringen kann. Allerdings fiel die Aktivität in TK-Zellen im Vergleich zu TK⁺-Zellen um den Faktor acht niedriger aus.^[78]

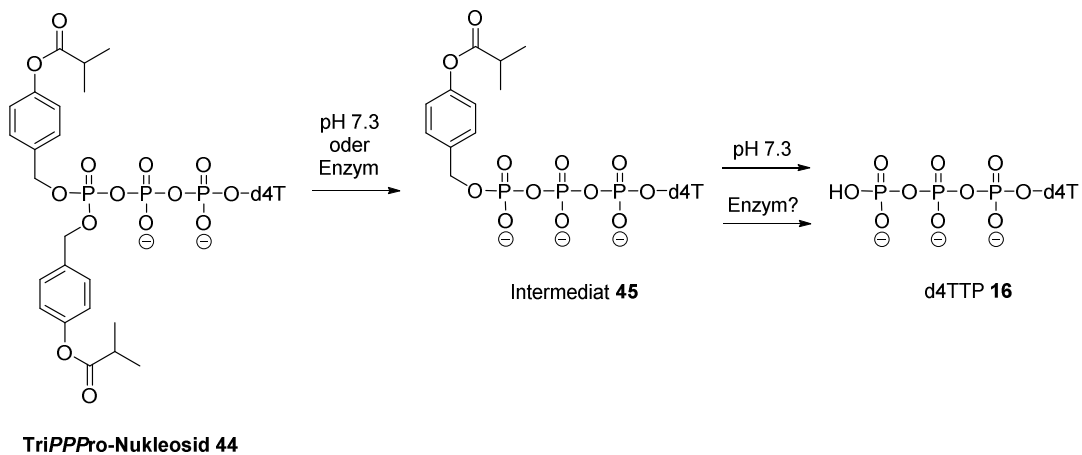


Abb. 18: Erste Resultate der Hydrolyse einer TriPPPro-Verbindung.^[78]

2.4 Anwendungsspektrum von Nucleosidtriphosphat-Prodrugs

In dem letzten Jahrzehnt wurden neben dem Nucleosidtriphosphat-Prodrug **44** (Abb. 18) in der Arbeitsgruppe von MEIER verschiedene Prodrugkonzepte entwickelt. Diese besitzen in der Summe das Potenzial, gezielt einen Bypass der jeweiligen Kinasen zu ermöglichen. Somit können die phosphorylierten Metabolite freigesetzt und geschwindigkeitslimitierende Biotransformationen von nucleosidischen Wirkstoffen umgangen werden (Abb. 19). Dementsprechend könnte für jedes Nucleosid, in Abhängigkeit von seiner/n Limitierung/en bei der enzymatischen Metabolisierung, das geeignete Prodrugdesign verwendet und somit die antivirale Aktivität erhöht werden.

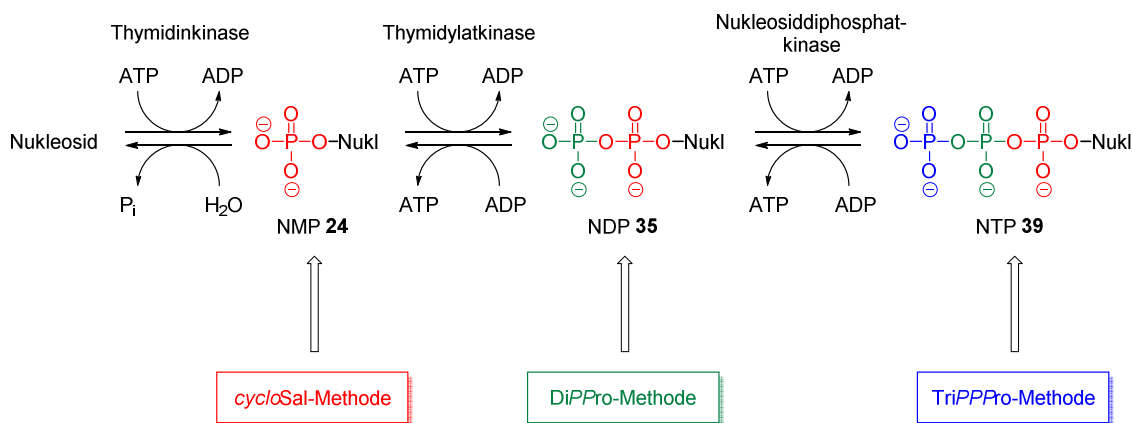


Abb. 19: Intrazelluläre Metabolisierung von Thymidinderivaten und die in der Arbeitsgruppe von MEIER entwickelten Prodrugkonzepte.

Vor allem die TriPPro-Methode könnte bei einer generellen Anwendbarkeit den Zugang zu einer Vielzahl von neuen Anti-HIV-Wirkstoffen realisieren. Aber auch eine Erweiterung auf andere Anwendungsgebiete wäre denkbar. So kommen bei der Therapie von Hepatitis B ebenfalls Nucleosidanaloga zum Einsatz. Das Genom des Hepatitis-B-Virus (HBV), mit dem 2015 weltweit 240 Millionen Menschen infiziert sind^[1], liegt im Gegensatz zum HI-Virus nicht als RNA, sondern als DNA vor. Dennoch besitzt auch das Hepadnavirus eine Reverse Transkriptase. Dieses Enzym schreibt die aus dem Kern der Wirtszelle kommende virale mRNA in DNA um, sodass Letztere zurück in den Zellkern transportiert und dort als Template für die Bildung weiterer viraler DNA verwendet werden kann. Folglich wird auch im Fall des HBV die Möglichkeit genutzt, gezielt mit NRTI in den Replikationszyklus einzugreifen.^[85] Gleiches gilt hinsichtlich des Hepatitis-C-Virus (HCV), für das 2015 weltweit 150 Millionen Infizierte registriert sind^[1] und dessen Erbinformation wie das HI-Virus als RNA vorliegt. Der bekannteste Vertreter zur Inhibierung der viruseigenen RNA-Polymerase NS5B ist das Ribonucleosid Ribavirin **46** (Abb. 20), dessen antivirale Wirkung auf verschiedenen Mechanismen beruht: Durch Umwandlung des Nucleosids **46** zum Ribavintriphosphat kommt es zu einer direkten Unterbindung der HCV-Replikation oder zur Auslösung von RNA-Mutagenese. Eine Inhibierung der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) durch Ribavirinmonophosphat zieht eine Verringerung der Konzentration von Guanosintriphosphat (GTP) nach sich, das einen natürlichen Baustein der RNA darstellt. Außerdem konnte für Ribavirin **46** ein immunmodulatorischer Einfluss festgestellt werden.^[86]

In Abbildung 20 ist mit einer Auswahl von für die Therapie zugelassenen Virostatika das breite Spektrum dargestellt, in dem Nucleosidanaloga zum Einsatz kommen. So zeigen die unterschiedlich modifizierten Verbindungen Idoxuridin **47**, Acyclovir **48**, Brivudin **49**, Entecavir **50**, Ganciclovir **51** und Penciclovir **52** Wirkung gegen das Herpes-Simplex-Virus (HSV), das Varizella-Zoster-Virus (VZV) oder das Cytomegalie-Virus (CMV).^[87]

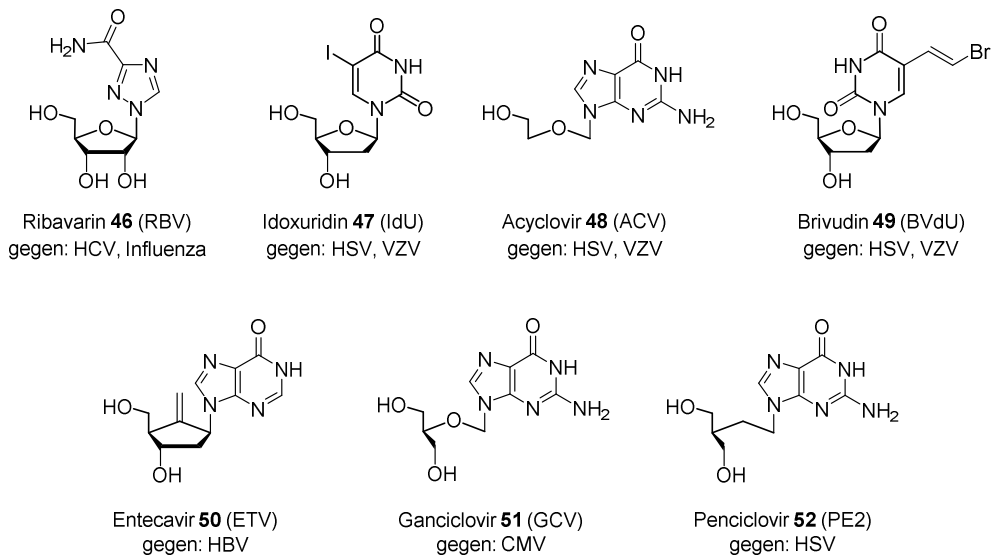


Abb. 20: Aktuell gegen Virusinfektionen zugelassene Nucleosidanaloga.

Hinzukommend werden Nucleosidanaloga nicht nur zur Behandlung von antiviralen Erkrankungen, sondern auch in der Onkologie eingesetzt. Die exemplarisch in Abbildung 21 gezeigten Zytostatika müssen analog zu den bereits vorgestellten Virostatika durch zytosolische Kinasen zum Triphosphat phosphoryliert werden.

Der erste Phosphorylierungsschritt des in der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie eingesetzten Clofarabins **53** (CAFdA) wird durch die Desoxycytidinkinase (dCK) katalysiert, die auch eine Schlüsselrolle im *salvage pathway* der DNA-Synthese einnimmt. Interessanterweise ist die dCK-Konzentration in malignen Zellen höher als in gesunden Zellen. Zusätzlich erhöhen DNA-Synthese-Inhibitoren die Aktivität des Enzyms. Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Metabolisierung von Clofarabin **53** stellt die anschließende Umsetzung zum Diphosphat dar, wobei die Katalyse von einer Purin-Nucleosidmonophosphatkinase übernommen wird. Kann dennoch die Triphosphatform in der Zelle aufgebaut werden, setzen drei Inhibierungsmechanismen ein: Erstens ist CAFdA **53** bei der DNA-Elongation durch die DNA-Polymerasen ein potenter Konkurrent zu dATP, was bei erfolgreicher Inkorporation die Bildung von DNA-Abbruchsträngen zur Folge hat. Zweitens bindet der Wirkstoff an der allosterischen Seite der Ribonucleotid-Reduktase, wodurch die Menge von dCTP und dATP minimiert und folglich die DNA-Synthese limitiert wird. Drittens werden durch die DNA-Abbruchstränge Folgeprozesse initiiert, die zur Freisetzung von Cytochrom c führen, welches wiederum die Apoptose der Zelle einleitet.^[88]

Ähnliche Wirkungsweisen besitzen die zwei ebenfalls in Abbildung 21 aufgeführten anti-karzinogenen Wirkstoffe Gemcitabin **54** (dFdC) und Cladribin **55** (2CdA). Diese beiden Substanzen sind in ihrer Triphosphatform gleichermaßen in der Lage, nach einem Einbau, bedingt durch Konformationsänderungen im Strang, die DNA-Replikation zum Abbruch zu

bringen.^[89,90] Ebenso können entsprechend zu CAFdA **53** neben Polymerasen andere an der DNA-Replikation beteiligte Enzyme inhibiert werden. Es ist allerdings noch nicht endgültig geklärt, welcher Wirkmechanismus die wichtigste klinische Relevanz besitzt.^[89] Gleichwohl ist die Bildung des Triphosphatmetaboliten notwendig, um eine therapeutische Wirkung zu erzielen. Daher wäre auch für die Behandlung von Tumoren eine erfolgreiche Anwendung eines Triphosphat-Prodrugkonzepts vielversprechend.

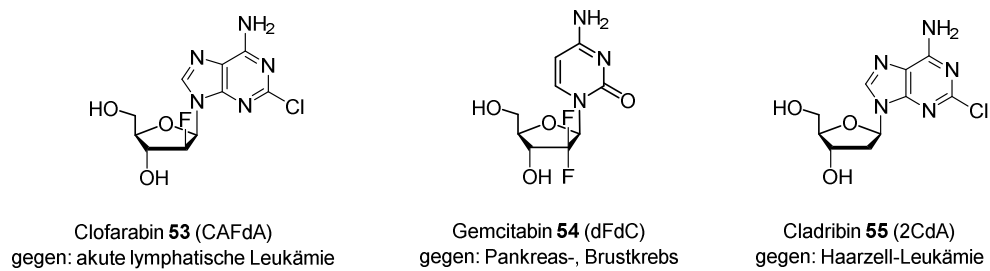


Abb. 21: Zugelassene antikanzerogene Nukleoside.

Die in diesem Kapitel vorgestellte Auswahl von Nukleosidanaloga verdeutlicht das medizinische Potenzial, das diese Substanzen in der antiviralen und antikanzerogenen Therapie besitzen. Die Ineffizienz der intrazellulären Kinasen bei der Überführung der Nukleoside in ihre pharmakologisch aktive Triphosphatform limitiert jedoch die medizinische Wirksamkeit. Daher muss eine Weiterentwicklung des TriPPP-Pro-Konzepts von Interesse sein, um nicht nur die direkte intrazelluläre Freisetzung von NTP **39**, sondern auch eine generelle Anwendbarkeit auf verschieden modifizierte Nukleoside zu ermöglichen.

3 Aufgabenstellung

Nukleosidtriphosphatanaloga nehmen eine entscheidende Rolle sowohl in der antiviralen als auch antikanzerogenen Therapie ein. Bisher wurden diese als Medikamente in Form ihrer Nukleoside oder als Monophosphat-Prodrugs verabreicht. Aufgrund der Substratspezifität der intrazellulären Kinasen werden die Verbindungen häufig nur unzureichend zum Triphosphat metabolisiert. Mit der Übertragung des DiPPro-Konzepts auf Triphosphate konnten schon die ersten Schritte zu einem Prodrugsystem vollzogen werden,^[78,91] das eine direkte Freisetzung des biologisch aktiven Nukleosidtriphosphats im Zellmedium ermöglicht. Eine Phosphorylierung durch Kinasen ist somit nicht notwendig. Dadurch erscheinen eine Maximierung der Wirkstoffkonzentration und folglich ein größerer inhibitorischer Effekt realisierbar. Zum anderen könnte mit dem Konzept das Spektrum an nukleosidischen Inhibitoren durch Nukleosidanaloga erweitert werden, bei denen der Phosphorylierungsschritt vom Di- zum Triphosphat limitiert ist. Die Intensivierung der Forschungsarbeit auf diesem Gebiet ist daher vor allem in Bezug auf den medizinischen Nutzen von Relevanz.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer breit anwendbaren und effizienten Syntheseroute für TriPPPro-Verbindungen. Außerdem galt es, die Auswirkung der Lipophilie auf die Stabilität bzw. das chemische und enzymatische Hydrolyseverhalten der Prodrugs zu untersuchen (Abb. 22). Dafür sollten Synthesen von TriPPPro-d4TTP-Prodrugs **56a-k** mit verschiedenen aliphatischen Acylresten durchgeführt und bezüglich ihrer Hydrolyseigenschaften charakterisiert werden. Gleichermaßen sollten TriPPPro-d4TTP **56l-q** mit modifizierten Maskierungseinheiten synthetisiert und der Effekt der Modifikation auf die Stabilität sowie den hydrolytischen Abbau des Prodrugs untersucht werden. Entsprechend den Verbindungen **56l-q** wurden carbonat- und carbamatmodifizierte Reste als funktionelle Gruppen für eine potenzielle Anwendung als Prodrug ausgewählt.

Die monomaskierten Intermediate nehmen bei der Hydrolyse sowohl von DiPPro- als auch von TriPPPro-Verbindungen eine entscheidende Rolle ein. Aus diesem Grund sollte die Entwicklung eines Synthesewegs für Mono(alkanoyloxybenzyl)-d4TTP-Prodrugs **57** die Aufklärung des Hydrolysemechanismus von TriPPPro-Verbindungen unterstützen.

Da bei asymmetrisch maskierten DiPPro-Prodrugs eine selektive Freisetzung des NDPs festgestellt wurde, galt es in dieser Arbeit ebenfalls, eine asymmetrische TriPPPro-Verbindung **58** zu synthetisieren und diese bezüglich ihres Hydrolyseverhaltens zu charakterisieren (Abb. 22).

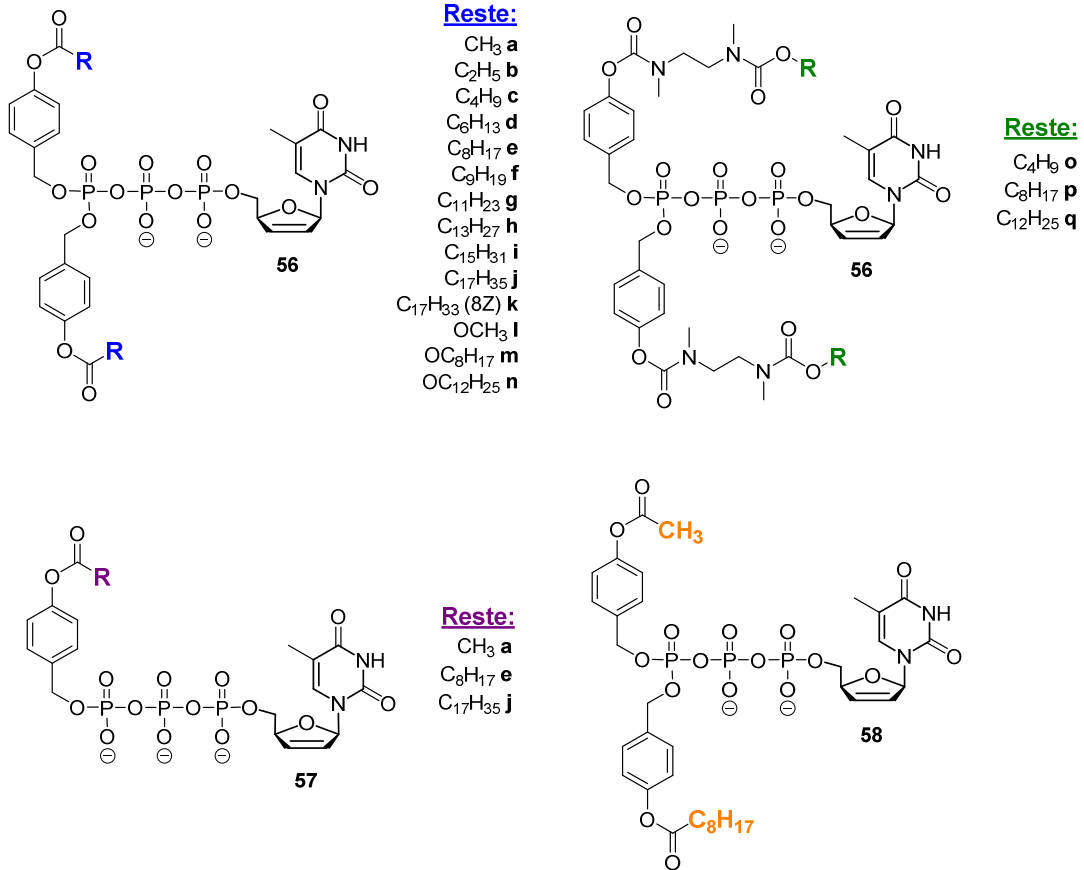


Abb. 22: Unterschiedlich funktionalisierte TriPPPPro-Zielstrukturen **56** und **58** sowie drei monomaskierte Intermediate **57**.

Des Weiteren sollte das Konzept, das zunächst lediglich auf dem kostengünstigen Modellnukleosid d4T **3** entwickelt wurde, auf verschiedene Nukleoside übertragen werden, die sowohl Unterschiede am Glykon als auch an der Nukleobase aufweisen (Abb. 23). Eine Analyse des Hydrolyseverhaltens sowie die Bestimmung der antiviralen Aktivität sollten die generelle Anwendbarkeit des TriPPPPro-Konzepts auf unterschiedliche Virostatika unterstreichen bzw. wenn möglich, das Spektrum an potenziellen Wirkstoffen erweitern.

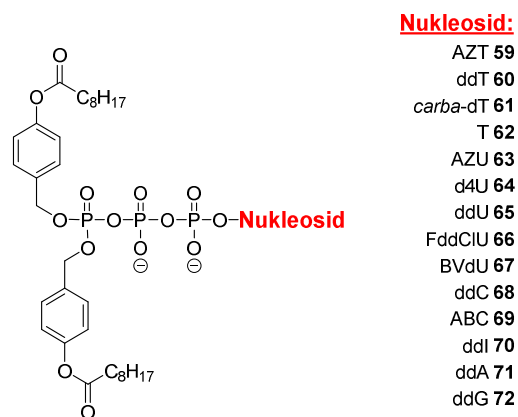


Abb. 23: In ihrer Nukleosidstruktur unterschiedliche TriPPPPro-Zielstrukturen **59-72**.

Ein weiteres Ziel stellte der Nachweis einer enzyminduzierten Freisetzung von Nukleosidtriphosphat aus den Triphosphat-Prodrugs dar. Dafür sollten die nach enzymatischer Hydrolyse von TriPPPPro-Verbindungen gewonnenen Hydrolysate für Primer-Extension-Assays und Polymerasekettenreaktionen (PCR) eingesetzt werden, um die enzymaktivierte Bildung des biologisch aktiven Triphosphatmetaboliten zu visualisieren.

Außerdem sollte ein Prodrug **73** mit einem unnatürlichen Absorptionsmaximum sowie autofluoreszierenden Eigenschaften synthetisiert werden, um dieses für Zellinkubationsstudien verwenden zu können (Abb. 24).

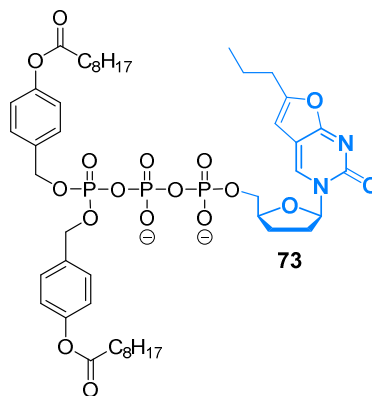


Abb. 24: Für Zellinkubationsstudien darzustellendes autofluoreszierendes TriPPPPro-NTP-Prodrug **73**.

Durch das unnatürliche Absorptionsverhalten des Prodrugs **73** wurde trotz des Vorliegens von natürlichen Nukleosiden eine unkomplizierte Auswertung der Resultate mittels HPL-Chromatographie erwartet. Auf diese Weise sollten erstmalig Rückschlüsse über die Diffusionseigenschaften von TriPPPPro-Verbindungen durch die Zellmembran gezogen sowie Erkenntnisse sowohl über die intra- als auch extrazelluläre *In-vivo*-Metabolisierung von derartigen Prodrugs gewonnen werden.

4 Resultate und Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit stand zunächst die Synthese einer Reihe von Bis(alkanoyloxybenzyl)-d4T-Triphosphaten **56** (BAB-, TriPPPro-d4TTP-Prodrugs), um den Einfluss der Lipophilie auf die Stabilität in unterschiedlichen Hydrolysemedien sowie die antivirale Aktivität untersuchen zu können. In vorhergehenden Studien konnte bei DiPPPro-d4TDP-Prodrugs **74** eine korrelierende Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit sowie der Anti-HIV-Aktivität von der Lipophilie der aliphatischen Masken festgestellt werden: Mit steigender Lipophilie wurde eine Erhöhung der Hydrolysehalbwertszeiten der Prodrugs sowohl im chemischen als auch im enzymhaltigen Medium beobachtet (Abb. 25, **A+B**). Außerdem wurde bei längeren Alkylketten unter anderem in TK-defizienten CEM-Zellen tendenziell eine verbesserte antivirale Aktivität ermittelt (**C**).^[77,78]

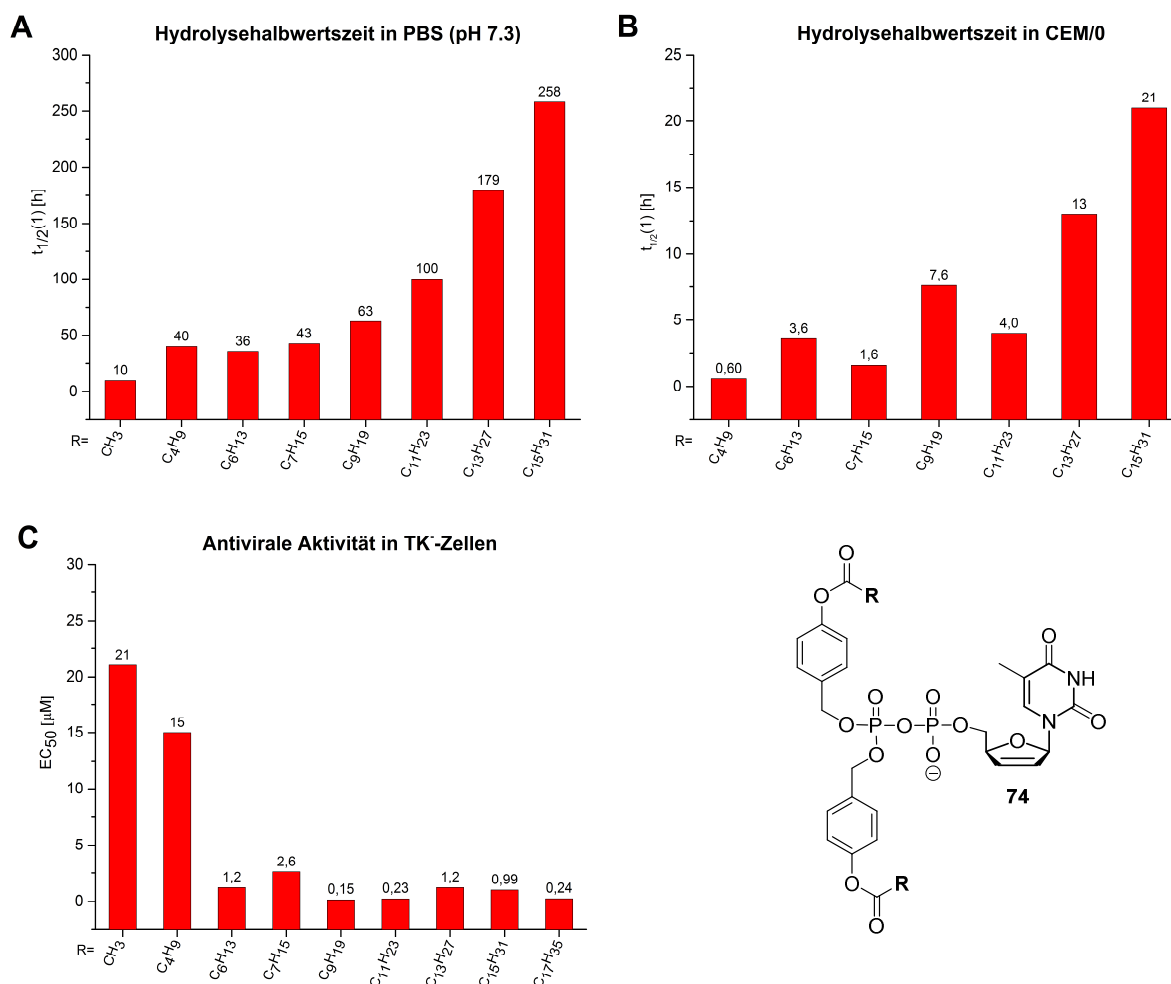


Abb. 25: Für DiPPPro-d4TDP-Prodrugs **74** von SCHULZ ermittelte Daten. **A:** Hydrolysehalbwertszeit in Phosphatpuffer bei pH 7.3; **B:** Hydrolysehalbwertszeit in CEM/0-Zellextrakten; **C:** Anti-HIV-Aktivität in TK-defizienten CEM/0-Zellen.

Eine weitere Klasse von NDP-Prodrugs stellen die donor- bzw. akzeptorsubstituierten aromatisch maskierten DiPPPro-d4TDPs dar. Allerdings behindert die hohe Instabilität bzw.

die unzureichende Abschirmung der freien negativen Ladung am Phosphat die Zellaufnahme merklich. Hierdurch fiel die Anti-HIV-Aktivität signifikant niedriger als bei den aliphatischen Derivaten aus.^[92]

Aufgrund dieser Vorarbeiten und der von SCHULZ^[78] unter Anwendung des BAB-Konzepts erstmalig beschriebenen Synthese eines reversibel zweifachmaskierten Nukleosid-triphosphats wurde zum Verständnis der Lipophilie-Aktivitätsbeziehung von TriPPPro-Verbindungen die Darstellung einer Serie von aliphatisch funktionalisierten Derivaten angegangen. Zur besseren Interpretation der Resultate wurden die gleichen Alkylkettenlängen ausgewählt (Kapitel 4.1.1), die bereits von SCHULZ für die DiPPPro-Nukleoside verwendet wurden. Des Weiteren wurde auch die Synthese modifizierter Maskierungen (Carbonate und Carbamate) auf ihre Anwendungsmöglichkeit untersucht (Kapitel 4.1.3).

Die Darstellung der Zielverbindungen auf Basis von d4T **3** als Modellnukleosid erfolgte über eine konvergente Syntheseroute, die ursprünglich von JESSEN für die Synthese von NDP-Prodrugs entwickelt und seitdem erfolgreich für deren Synthese appliziert wurde. Allerdings gab die Übertragung auf NTP-Prodrugs durch hohe Ausbeutenverluste bei der Darstellung der Synthesebausteine für die finale Kupplung Anlass zu Optimierungsversuchen. Die aufgetretenen Schwierigkeiten werden in Kapitel 4.1 ausführlich diskutiert. Denn vor allem in Bezug auf die generelle Anwendbarkeit des Konzepts und somit auf die Synthese verschiedenartiger potenzieller Nukleoside als Wirkstoffe, die nur in geringen Mengen zugänglich oder mit hohen Kosten verbunden sind, galt es, eine geeignete Syntheseroute zu entwickeln. Da d4T **3** zu der Reihe von Wirkstoffen gehört, deren erster Phosphorylierungsschritt des enzymkatalysierten Metabolismus bereits der geschwindigkeitsbestimmende ist, ist dieses Nukleosid für die spätere Beweisführung des Konzepts prinzipiell ungeeignet (Kapitel 2.3). Daher müsste zur endgültigen Beweisführung des TriPPPro-Konzepts konsequenterweise auch die Analyse weiterer Nukleoside in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Interessant wären in dem Zusammenhang die zu d4T **3** in enger struktureller Verwandtschaft stehenden Uridinanaloga d4U **40** und ddU **41**. Diesen wird in Form ihrer Triphosphate ausgeprägte antivirale Aktivität zugeschrieben,^[83] die Phosphorylierung durch die Nukleosiddiphosphatkinase vom NDP zum biologisch aktiven NTP läuft jedoch nur unzureichend ab.^[82] Aus diesem Grund konnten vermutlich auch die bisher von PERTENBREITER untersuchten Mono- und Diphosphat-Prodrugs von d4U **40** bzw. ddU **41** keine Verbesserung der Anti-HIV-Aktivität bewirken. Die entsprechenden NTP-Prodrugs sollten prinzipiell in der Lage sein, alle intrazellulären Phosphorylierungsschritte zu umgehen, was eine effiziente Inhibierung der Reversen Transkriptase zur Folge haben könnte.

In Abbildung 26 sind schematisch die auftretenden Schwierigkeiten bei der Zellaufnahme und ihrer weiteren Metabolisierung von Wirkstoffen in ihrer Nukleosidform bzw. als polare

Nukleotide beispielhaft an d4T **3** gezeigt. Im Gegensatz dazu könnten TriPPP-Verbindungen mit ausreichend lipophilen Masken durch die Zellmembran diffundieren und nach der Aktivierung durch Esterasen intrazellulär d4T-Triphosphat **16** freisetzen.

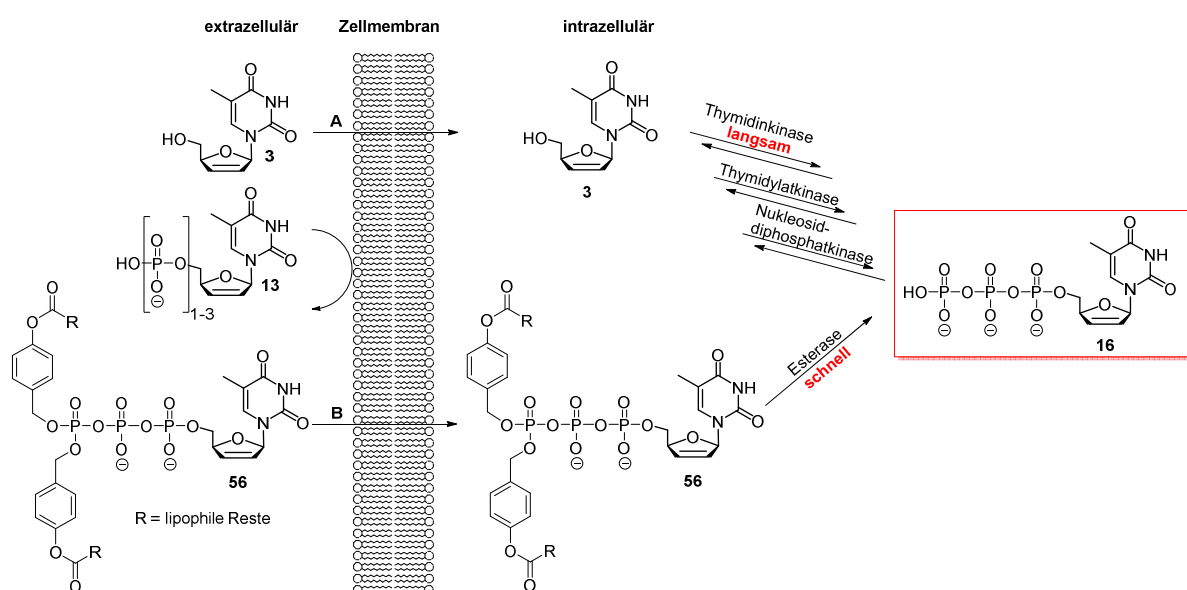


Abb. 26: Zellaufnahme und Metabolismus von nukleosidischen Wirkstoffen am Beispiel von d4T **3**.

A: Enzymatische Phosphorylierung von d4T **3**; **B:** Freisetzung von d4TTP **16** aus Prodrug **56**.

In den nachfolgenden Kapiteln wird zunächst die Synthese von d4TTP-Prodrugs **56** vorgestellt, bevor die Diskussion des Hydrolyseverhaltens der Prodrugs **56** in verschiedenen Medien erfolgt. Außerdem werden die Ergebnisse der Präparation und Hydrolyse von sich in ihrer Nucleosidstruktur unterscheidenden Prodrugs dargestellt (Kapitel 4.5). Abschließend findet die Vorstellung der Resultate einer erstmalig durchgeführten Zellaufnahmestudie einer TriPPP-Verbindung **91** statt (Kapitel 4.12).

4.1 Synthese von d4T-Triphosphat-Prodrugs

Bei der etablierten Phosphoramiditmethode zur Synthese von DiPPP-Verbindungen wird die Verknüpfung der energiereichen Phosphoranhydridbindung erst im finalen Schritt vollzogen, indem ein säureaktiviertes Phosphoramidit mit dem passenden Nucleosidmonophosphat verknüpft wird.^[72] Ein analoges Vorgehen hatte sich ebenfalls bei den entsprechenden NTP-Prodrugs bewährt, wobei in diesem Fall ein Nucleosiddiphosphat als Nucleophil fungierte.^[78,91] Das Retrosyntheschema ist in Abbildung 27 am Beispiel von d4T **3** gezeigt. Dabei ist der Baustein d4TDP **15** durch die präparativ eingesetzte *cycloSal*-Methode ausgehend vom 5'-OH freien Nucleosid **3** zugänglich.^[60] Allerdings offenbarte sich in ersten Ansätzen, dass vor allem die Generierung des Nucleosiddiphosphats **15** einen limitierenden Faktor in dieser Route darstellt.^[91] Die Phosphoramidite **75** können durch eine Substitutionsreaktion der entsprechenden Phenylester **76** mit dem reaktiven Phosphor(III)-Reagenz **77**

erhalten werden. Die Phenylester **76** können wiederum durch die Acylierung von 4-Hydroxybenzylalkohol **37** mit einem Säurechlorid **78** dargestellt werden.

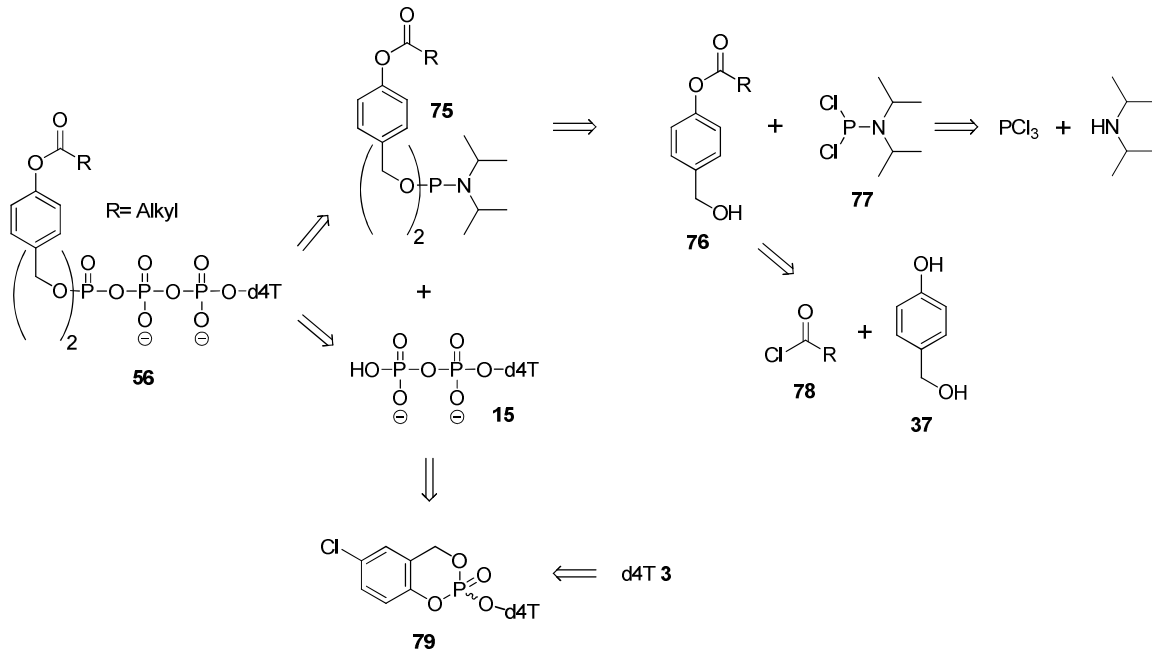


Abb. 27: Retrosyntheseschema zur Darstellung von d4TTP-Prodrugs **56**.

4.1.1 Synthese der Bausteine zur Darstellung der Bis(alkanoyloxybenzyl)-d4TTP-Prodrugs

Wie dem retrosynthetischen Schema (Abb. 27) zu entnehmen ist, gehen dem finalen Kupplungsschritt die Darstellung der symmetrischen Phosphoramidite **75**, die sich in der lipophilen Funktionalisierung unterscheiden, sowie des d4T-Diphosphats **15** voraus. Die Synthese dieser Bausteine soll im Folgenden vorgestellt werden.

4.1.1.1 Synthese der Bis(alkanoyloxybenzyl)-diisopropylphosphoramidite

Zunächst galt es, die bereits im DiPPro-Konzept von SCHULZ^[77,78] eingesetzten Alkanoyloxybenzylgruppen als Maskierungseinheiten darzustellen. Dafür wurde die von JESSEN und SCHULZ^[72] beschriebene und etablierte Synthese mit leichten Veränderungen der Stoffmengenverhältnisse verwendet. Ausgehend von 4-Hydroxybenzylalkohol **37** wurde die phenolische Hydroxylfunktion in Gegenwart von Triethylamin mit dem entsprechenden Carbonsäurechlorid **78a-k** verestert (Abb. 28).

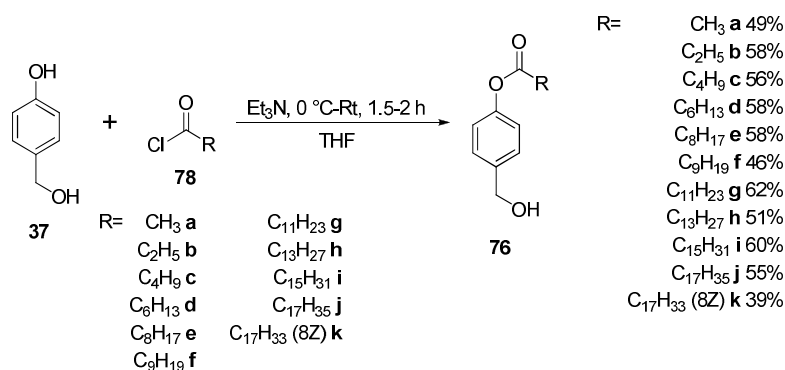


Abb. 28: Darstellung der 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkanoate **76**.

Durch einen Überschuss an 4-Hydroxybenzylalkohol **37** konnte die Bildung des zweifach acylierten Nebenprodukts **80** vermindert und die Ausbeute folglich etwas erhöht werden. Nichtsdestotrotz konnten ebenso verschiedene Nebenreaktionen beobachtet werden, wie anhand der Ergebnisse bei der Umsetzung des Edukts **37** mit Nonansäurechlorid **78e** veranschaulicht werden soll (Abb. 29). Während die Entstehung der benzylsubstituierten Verbindung **81** auf eine unzureichende Selektivität der Reaktion zurückzuführen war, erstaunte der nach säulenchromatographischer Reinigung isolierte Dibenzylether **82**, der NMR-spektroskopisch wie massenspektrometrisch charakterisiert werden konnte. Ein Mechanismus für die Bildung des Nebenprodukts **82** kann an dieser Stelle jedoch nicht vorgeschlagen werden. Direkte Dehydratisierungsreaktionen zweier Alkohole unter Bildung des entsprechenden Ethers sind zwar aus der Literatur bekannt, finden allerdings in der Regel unter Säure- oder Metallkatalyse statt.^[93] Ein zumindest theoretisch möglicher Einfluss durch Säure sollte unter Berücksichtigung des entsprechenden S_N-Mechanismus aufgrund des eingesetzten Triethylamins auszuschließen sein. Eine Quantifizierung der Nebenprodukte wurde nicht vorgenommen.

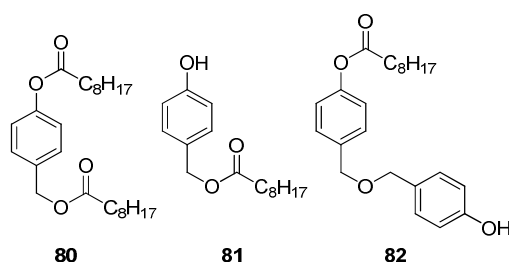


Abb. 29: Isolierte Nebenprodukte bei der Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-phenylnonanoat **76e**.

Für die Synthese der Diisopropylaminophosphoramidite **75** ist im Vorwege die Darstellung des Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidits **77** notwendig. Dieses Reagenz **77** ist durch Umsetzung von frisch destilliertem Phosphor(III)-chlorid mit 2.1 Äquivalenten

Diisopropylamin zugänglich (Abb. 30). Letzteres fungiert damit in der Reaktion sowohl als Nukleophil als auch als Base zum Neutralisieren des entstehenden Chlorwasserstoffs.

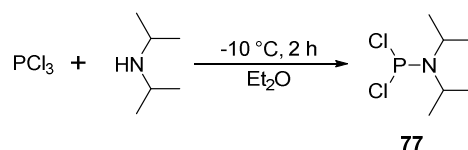


Abb. 30: Darstellung des Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidits **77**.

Zur Umsetzung der 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkanoate **76** mit dem Phosphor(III)-Reagenz **77** konnten schließlich die entsprechenden Phosphoramidite **75** synthetisiert werden (Abb. 31). Bedingt durch die starke Säurelabilität der Zielverbindungen ist der Zusatz von Base während der Reaktion sowie bei der anschließenden Chromatographie unabdingbar. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass die Phosphoramidite **75** selbst unter basischen Bedingungen über Tage stabil sind. Die Reinigung war je nach Größe des Ansatzes über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™) oder säulenchromatographisch an Kieselgel möglich. Bezüglich des Charakterisierungsverfahrens der Amidite **75** ist Folgendes zu beachten: Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen mit CDCl_3 als Lösungsmittel sollte dieses vor der Benutzung mit basischem Aluminiumoxid behandelt werden. Bei der massenspektrometrischen Untersuchung dürfen ebenfalls keine sauren Ionisierungsreagenzien zugesetzt werden, da ansonsten eine vollständige Umsetzung zum H-Phosphonat erfolgt.

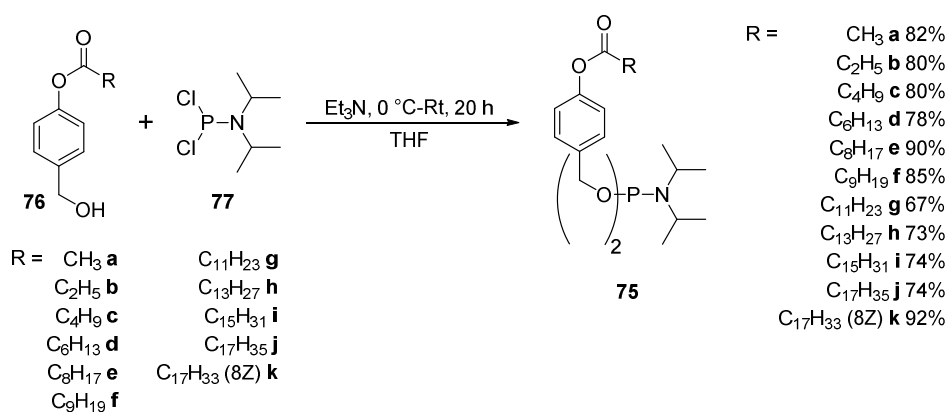


Abb. 31: Darstellung der Diisopropylaminophosphoramidite **75**.

4.1.1.2 Synthese von d4TMP, d4TDP und d4TTP

Den zweiten Schlüsselbaustein für die Kupplung zum TriPPPPro-d4TTP **56** stellte das d4T-Diphosphat **15** dar. Dessen Synthese sollte sich insgesamt als limitierender Faktor in der vollständigen Syntheseroute herausstellen. Dieser Sachverhalt soll in diesem Kapitel ausführlich thematisiert werden. Des Weiteren sollten die zusätzlichen potenziellen

Metabolite (d4TMP **13**, d4TTP **16**) der Prodrugs **56** präpariert werden, um diese unter anderem bei den späteren Hydrolysestudien bei den Analysen mittels HPLC für Coinjektionen verwenden zu können.

4.1.1.2.1 Synthese von 3'-Desoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T)

Ausgehend von Thymidin **83** ist das Nucleosidanalogon d4T **3** nach einer im letzten Schritt leicht abgewandelten dreistufigen Synthesevorschrift nach HORWITZ ET AL. zugänglich.^[94] Durch Umsetzung mit Methansulfonylchlorid wurde im ersten Schritt 3',5'-Di-O-mesylthymidin **84** erhalten (Abb. 32), das bereits als Rohprodukt in hoher Reinheit vorlag. Neben der Möglichkeit der Umkristallisation aus Aceton konnte daher auch alternativ im wässrig basischen Milieu durch intramolekulare nukleophile Substitution eine direkte Überführung in das 3',5'-Anhydrothymidin **85** vollzogen werden. Da sich in der Vergangenheit die Kombinationen aus Dimethylformamid (DMF) und Natriumhydrid bzw. Dimethylsulfoxid (DMSO) und Kalium-*tert*-butanolat, bedingt durch schlechte Umsetzungsraten oder erschwerte quantitative Entfernung der hochsiedenden Lösungsmittel, als nachteilig herausgestellt hatten, wurde für die Darstellung von d4T **3** in Anlehnung an die Vorschrift von PARAMASHIVAPPA ET AL.^[95] Kaliumhydroxid in *tert*-Butanol verwendet. Durch die schlechte Löslichkeit der Base sowie des 3',5'-Anhydrothymidins **85** in *tert*-Butanol waren jedoch erhöhte Reaktionstemperaturen notwendig. Bei einer langsamen Umsetzung des Edukts (DC-Kontrolle) konnte der Reaktion zur Beschleunigung jederzeit weitere Base zugesetzt werden.

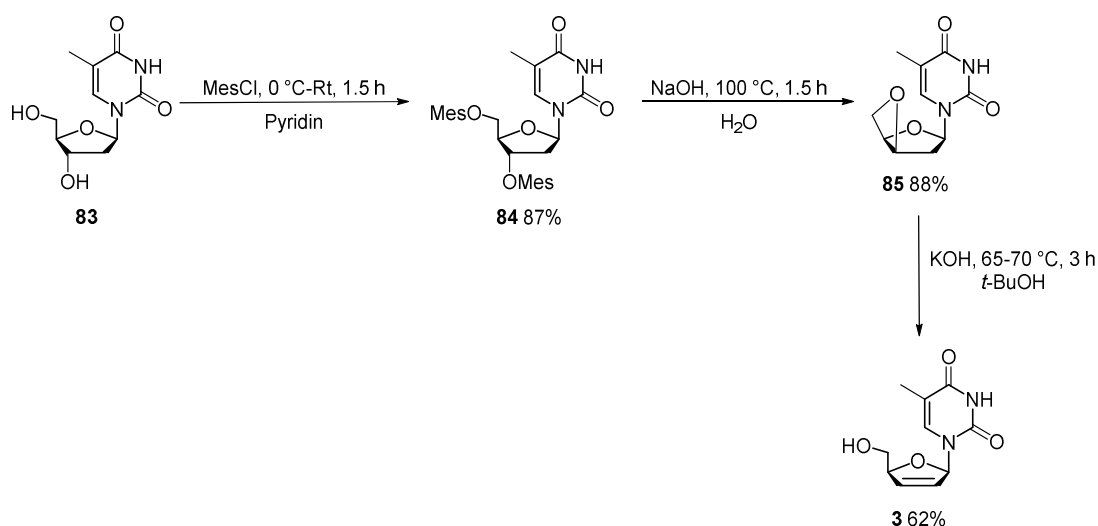


Abb. 32: Darstellung von 3'-Desoxy-2',3'-didehydrothymidin **3** (d4T).

Für die säulenchromatographische Reinigung stellte sich, resultierend aus dem schlechten Löslichkeitsverhalten des Nucleosids **3**, die Durchführung eines *dry loads* als vorteilhaft

heraus, um eine starke Bandenverbreiterung während der Chromatographie zu vermeiden. Bei einem *dry load* wird die Substanz in einem geeigneten Lösungsmittel aufgenommen und mit Silicagel vermengt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, wodurch die Substanz auf dem Silicagel adsorbiert. Auf diese Weise konnte das Rohprodukt als Feststoff auf die Chromatographiesäule aufgetragen werden und das Produkt **3** in guter Ausbeute als farbloser Feststoff erhalten werden.

4.1.1.2.2 Synthese von d4TMP

Die Synthese von Nucleosidmonophosphaten nach einem Protokoll von SOWA und OUCHI^[96] hatte sich in der Arbeitsgruppe bewährt und sollte bei der Darstellung von d4TMP **13** angewendet werden (Abb. 33). Dafür wurde ein auf 0 °C gekühltes Gemisch aus Phosphorylchlorid, Wasser und Pyridin (2:1:2 v/v/v) unter Bildung des eigentlichen Phosphorylierreagenzes Tetrachlorpyrophosphat **86** für fünf Minuten gerührt, bevor die Zugabe des Nucleosids **3** erfolgte. Durch die Reaktion mit der freien Hydroxylfunktion wurde zunächst intermediär ein Nucleosid-Pyrophosphat-Addukt erhalten, das durch Umsetzung mit Eiswasser zum entsprechenden d4TMP **13** hydrolysierte.

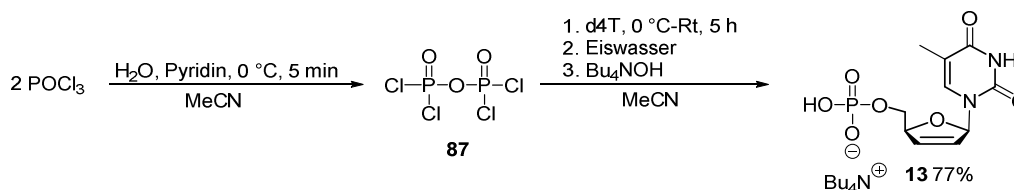


Abb. 33: Darstellung von d4TMP nach SOWA und OUCHI.^[96]

Nach der etablierten Vorschrift schloss sich die Neutralisation mit Ammoniumhydrogencarbonat an, wodurch das Ammoniumsalz des d4TMPs **13** nach zweimaliger Chromatographie an RP18-Silicagel gewonnen wurde.^[73] Es wurde trotz des nachteiligen Elutionsverhaltens der lipophilen Tetra-*n*-butylammoniumsalze jedoch vorgezogen, die Neutralisation mit Bu₄NOH-Lösung vorzunehmen. Ansonsten wäre für Folgereaktionen als weiterer Schritt ein Ionenaustausch notwendig gewesen, da sich lipophile Gegenionen für die Synthese in organischen Lösungsmitteln als essenziell erwiesen haben.^[97] Das Produkt **13** ließ sich über automatisierte RP18-Chromatographie reinigen, auch wenn diese, resultierend aus dem hohen Anteil an anfallendem Phosphatsalz und in Kombination mit dem erwarteten Tailing von (Bu₄N)⁺-Phosphatsalzen, einmal wiederholt werden musste. Im Gegensatz zu bisherigen Arbeiten ist nach der Reinigung somit kein weiterer Ionenaustausch notwendig. Allerdings wurde festgestellt, dass eine erfolgreiche Anwendung dieser Vorgehensweise stark von dem verwendeten Nucleosid abhängig ist. Auf diesen Sachverhalt wird in dem Kapitel 4.5.3 genauer eingegangen.

4.1.1.2.3 Synthese von d4TDP

In der Literatur werden einige Verfahren zur Phosphorylierung von Nucleosiden beschrieben, wobei der Fokus auf der Synthese von Nucleosidtriphosphaten liegt. Nach den nicht zufriedenstellenden Ergebnissen aus Voruntersuchungen galt es, potenzielle Darstellungswege für das d4T-Diphosphat **15** kritisch zu untersuchen. Die in der Literatur beschriebenen Synthesen mehrfach phosphorylierter Nucleoside beschränken sich dabei nahezu vollständig auf die Umsetzung aktivierter Nucleosid-5'-monophosphate mit einem geeigneten Nucleophil (Abb. 34).

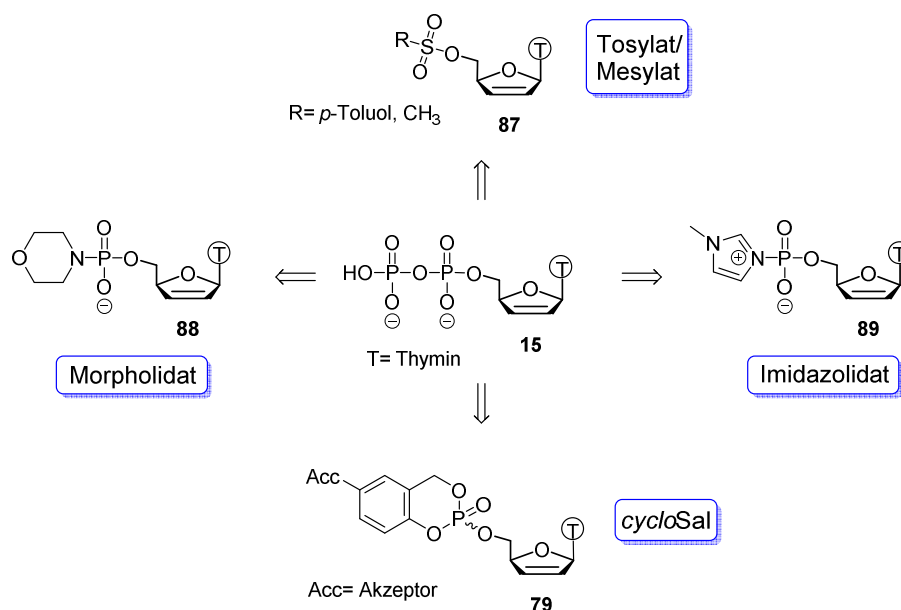


Abb. 34: Mögliche Darstellungswege von d4TDP **15**.

Eine Ausnahme bilden dabei die von DAVISSON ET AL. eingesetzten 5'-O-tosylierten Nucleoside **87**, die sowohl die Darstellung von Nucleosiddi- als auch -triphosphaten in guten Ausbeuten erlauben sollen.^[98] In Vorarbeiten konnte jedoch festgestellt werden, dass die Tosylatmethode trotz intensiver Optimierungsversuche, wie einer Temperaturerhöhung oder der Veränderung der Stoffmengenverhältnisse, bei der Umsetzung mit Tetra-*n*-butylammoniumpyrophosphat nur Ausbeuten von maximal 22% lieferte, da die Reaktion unerklärlicherweise frühzeitig zum Erliegen kam. Eine weitere Zugabe des Nucleophils ermöglichte ebenfalls keinen fortschreitenden Umsatz.^[91] Das gleiche Phänomen wurde bei der Synthese von Nucleosid-5'-monophosphaten beobachtet, die durch den Einsatz einer Mikrowelle nach dieser Methode nur in geringen Ausbeuten zugänglich waren. Vermutlich, resultierend aus den hohen Temperaturen, wurde im Fall des verwendeten BCNA-Nucleosids unter Mikrowellenbedingungen ein Bruch der glykosidischen Bindung beobachtet, was gegen eine generelle Anwendbarkeit dieser Methode spricht.^[99] Auch die

Wahl einer anderen Abgangsgruppe wie Mesylat mit einer im Vergleich zu Tosylat höheren Austrittstendenz führte nicht zu den gewünschten Ergebnissen.^[91]

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die oftmals im Zusammenhang mit der Darstellung von polyphosphorylierten Verbindungen eingesetzte Morpholidatmethode untersucht.^[100] Allerdings wurde bei der Reaktion von Nukleosid-5'-morpholidaten **88** mit Tetra-*n*-butylammoniumphosphat ein langsamer und geringer Umsatz beobachtet, was folglich mit einer schlechten Ausbeute von nur 15-20% einherging.

Als ein Meilenstein bei der Synthese von Phosphatverbindungen hatte sich in den vergangenen Jahren die Verwendung der *cycloSal*-Methode herausgestellt, die sich vor allem aufgrund ihrer universellen Anwendbarkeit auf verschiedenste Nukleoside zur Darstellung von Triphosphaten hervorgetan hat.^[60] Zwar ließ sich die Technik des Aktivestersystems auf die Synthese von NDP anwenden, allerdings verlief die chromatographische Aufarbeitung nur unzureichend. Zurückzuführen war dies auf das schlechte Elutionsverhalten phosphathaltiger Verbindungen sowie die erschwerte Separation des als Nukleophil eingesetzten Phosphatsalzes und der entstandenen Nebenprodukte. Dadurch konnten auch hier nur Ausbeuten um 30% erzielt werden.^[91]

Eine weitere in der Literatur beschriebene Option zur Gewinnung von NDPs stellen die Nukleosid-5'-imidazolate dar. Jedoch zeichnen sich die Folgereaktionen mit Nukleophilen meist durch einen schleppenden sowie ungenügenden Umsatz aus.^[101,102] Als sehr effektiv wurde allerdings die Prozedur von MOHAMADY ET AL. beschrieben.^[103] Diese beinhaltet eine schrittweise Aktivierung von Nukleosidmonophosphaten mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) und 1-Methylimidazol, wodurch es zur Bildung eines hoch reaktiven Nukleosid-5'-monophosphat-*N*-methylimidazoliumsalzes **90** als Donor kommt. Bisher konnte die Methode erfolgreich für die Synthese von NTP^[103] sowie Dinukleosidpolyphosphaten^[104] angewandt werden. Außerdem war die dreistufige Synthese durch gute Ausbeuten und kurze Reaktionszeiten geprägt. Daher sollte die Methode auf das Potenzial bezüglich der Synthese von NDPs untersucht werden.

Als vorteilhaft erschien diese Methode auch in Bezug auf eine Übertragung auf weitere Nukleotide, da der Einsatz von TFAA in Gegenwart von Triethylamin nicht nur die Phosphat-einheit, sondern auch ungeschützte Hydroxyl- und Aminogruppen acyliert und somit Nebenreaktionen verhindert.^[103,104] Die sich bei der Reaktion mit d4TMP **13** bildenden gemischten Anhydride wurden nach dem Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum direkt mit in Acetonitril gelöstem 1-Methylimidazol zum elektrophilen *N*-Methylimidazolidsalz **90** umgesetzt (Abb. 35).

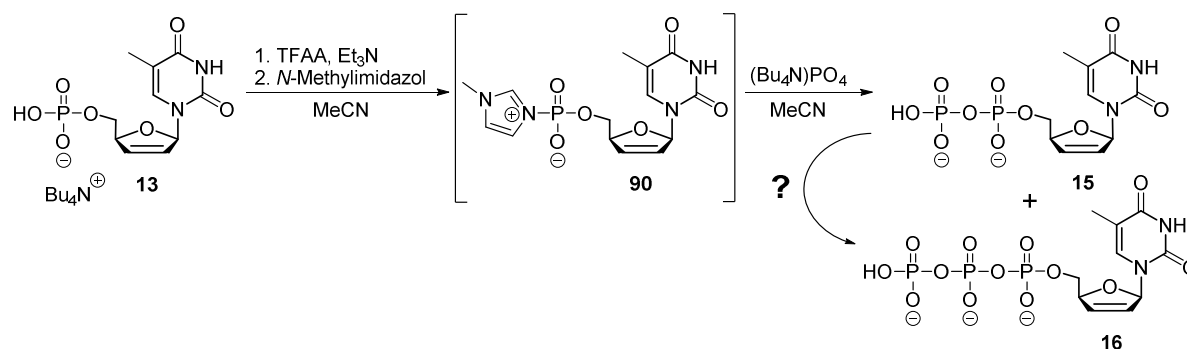


Abb. 35: Darstellung von d4TDP **15** in Anlehnung an MOHAMADY ET AL..^[103]

Nach dem erneuten Abziehen aller im Vakuum flüchtigen Komponenten schlossen sich die Aufnahme des Rückstands in Acetonitril sowie die Zugabe einer Lösung von 1.5 Äquivalenten an intensiv getrocknetem Phosphatsalz in seiner Tetra-*n*-butylammoniumform an. Über ³¹P-NMR-Spektroskopie ließ sich bereits nach 1.5 Stunden ein vollständiger Verbrauch des reaktiven Intermediats **90** beobachten. Allerdings wurde bei mehreren Ansätzen neben dem gewünschten d4TDP **15** auch immer die Bildung nicht unerheblicher Mengen des d4TTPs **16** (10-40%) festgestellt. Die Reaktion wurde mit 0.25 M Ammoniumacetatlösung gequenchet, dreimal mit Chloroform gewaschen und die wässrige Phase gefriergetrocknet. Bei der chromatographischen Aufarbeitung an RP18-Kieselgel kam es, bedingt durch das Vorliegen verschiedener Phosphatsalze, zu erheblichen Schwierigkeiten bei der Isolation der Zielverbindung **15**. Am vielversprechendsten stellte sich im Zuge der Versuche, bei denen verschiedene Laufmittel als auch Ionenpaarreagenzien getestet wurden, der vorgeschobene Ionenaustausch an Dowex-NH₄⁺ heraus. Doch selbst in diesem Fall wurde der Hauptanteil an d4TDP **15** in Mischfraktionen mit d4TTP **16** eluiert. Als Ursache für den zusätzlichen Phosphorylierungsschritt und damit der Bildung des d4TTPs **16** kam lediglich eine Aktivierung des d4TDPs **15** durch das im Überschuss eingesetzte reaktive *N*-Methylimidazol in Frage. In ³¹P-NMR- und HPLC-Studien sollte herausgefunden werden, ob eine erhöhte Äquivalentenzahl an Phosphatsalz das unerwünschte *N*-Methylimidazol abfangen kann. Aber auch die Auswirkung von Temperaturveränderungen sollte betrachtet werden.

Die Studie mit einer Variierung der Monophosphatmenge bekräftigte bereits den Verdacht einer Aktivierung des gebildeten Nukleosiddiphosphats **15** gefolgt von dem Aufbau des Triphosphats **16**. Experimentell wurde d4TMP **13**, wie beschrieben, mit TFAA und *N*-Methylimidazol aktiviert und der Ansatz gedrittelt. Anschließend wurden 1.5, 2.0 oder 3.0 Äquivalente Phosphatsalz hinzugefügt und zu drei unterschiedlichen Reaktionszeiten Proben entnommen. Diese wurden über HPL-Chromatographie analysiert und anschließend wurde über die Integrale das Verhältnis an d4TDP **15** zu d4TTP **16** bestimmt. Die Ergebnisse sind als Säulendiagramme in Abbildung 36 dargestellt.

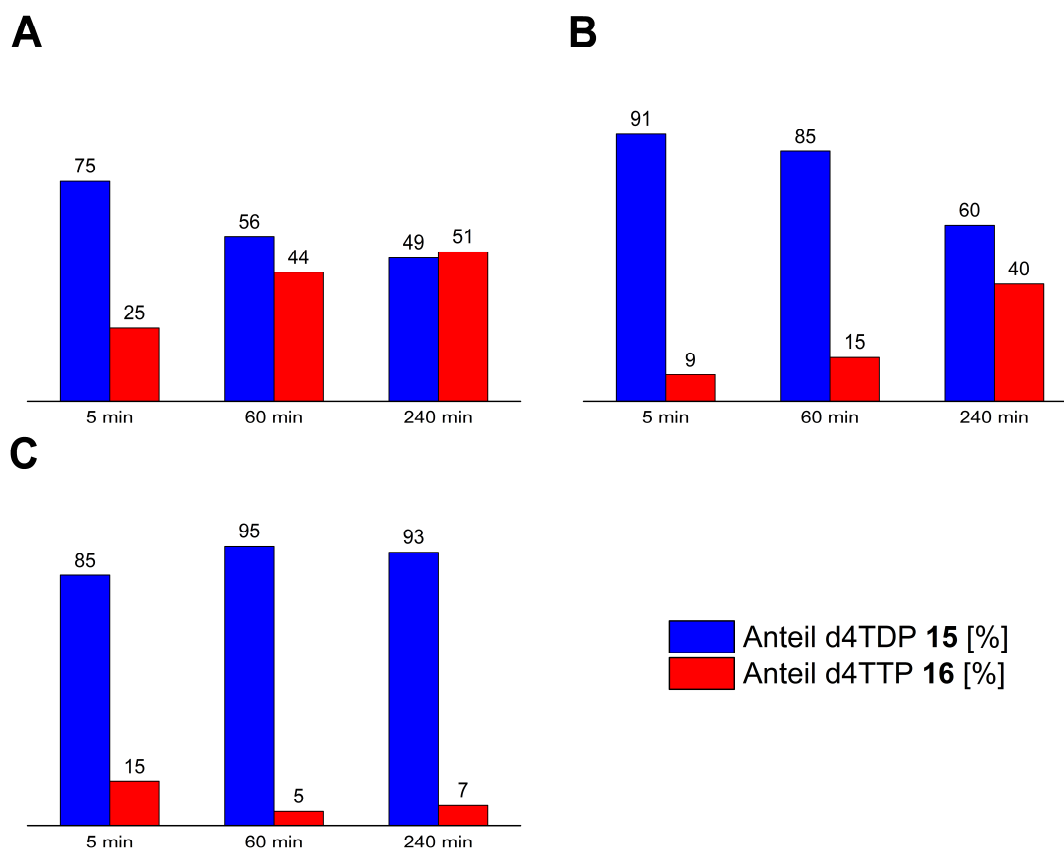


Abb. 36: Prozentuales Verhältnis von d4TDP **15** zu d4TTP **16** in Abhängigkeit von der Reaktionszeit und der Menge des Phosphatsalzes: 1.5 (**A**), 2.0 (**B**) und 3.0 Äquivalente (**C**) an $(\text{Bu}_4\text{N})\text{H}_2\text{PO}_4$.

Es ist deutlich ein Anstieg des d4TDP-Anteils bei zunehmender Äquivalentenzahl an Nukleophil zu erkennen. Mit zunehmender Reaktionszeit (zumindest bei **A** und **B**) findet aber auch eine Erhöhung des Anteils an unerwünschtem d4TTP **16** statt. Anhand der Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass das überschüssige Phosphatsalz tatsächlich in der Lage ist, das freigesetzte *N*-Methylimidazol erfolgreich zu deaktivieren bzw. abzufangen und dadurch die Bildung des Nebenprodukts zu reduzieren. Erwähnenswert ist auch die Detektion eines Peaks im Chromatogramm, der mit fortlaufender Reaktionszeit nahezu vollständig verschwindet und sich von der Retentionszeit her zwischen d4TDP **15** und d4TTP **16** einordnet. Die dazugehörige Substanz konnte zwar nicht isoliert und weiter charakterisiert werden, könnte aber die *N*-Methylimidazol aktivierte Diphosphatspezies darstellen.

Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 37 mit den einzelnen ^{31}P -NMR-Spektren die Zusammensetzung der Rohprodukte der jeweiligen Ansätze nach 240 Minuten veranschaulicht. Es ist korrelierend mit den HPLC-Untersuchungen bei erhöhter Äquivalentenzahl eine deutliche Verschiebung der Produktverteilung zum gewünschten Diphosphat zu erkennen.

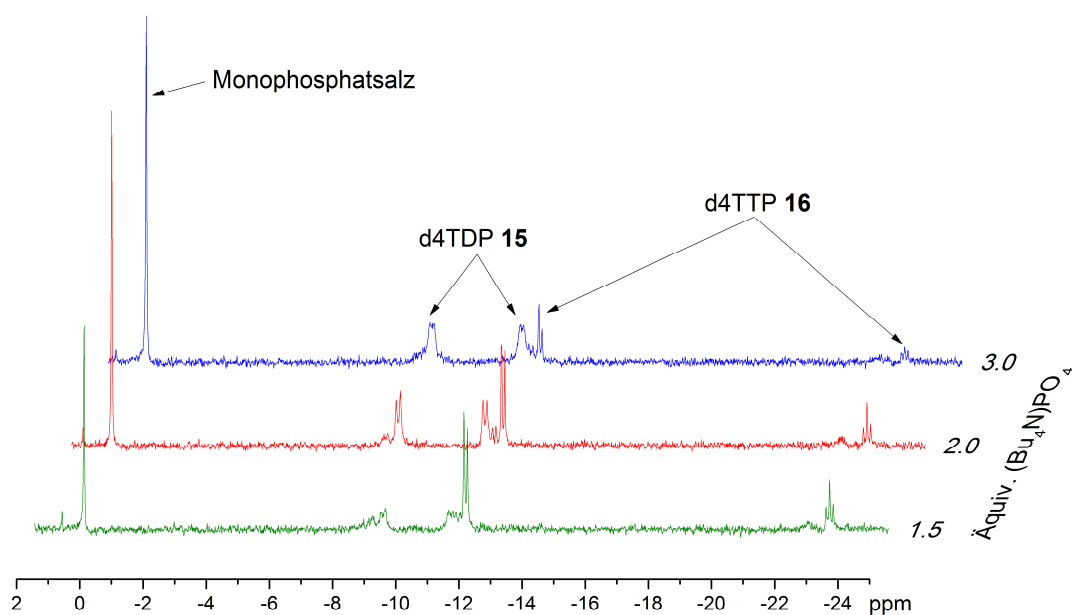


Abb. 37: ^{31}P -NMR-Analyse der Rohprodukte bei unterschiedlich eingesetzter Menge von Phosphatsalz (D_2O , 162 MHz, entkoppelt).

Analog wurde die Auswirkung einer veränderten Reaktionstemperatur untersucht. Dafür wurde die obige Synthesevorschrift angewendet, wobei der Ansatz nach Aktivierung des d4TMPs **15** zum Imidazolidat **90** erneut aufgeteilt wurde und die drei Lösungen auf Temperaturen von $-20\text{ }^\circ\text{C}$, $0\text{ }^\circ\text{C}$ sowie Raumtemperatur eingestellt wurden. Anschließend wurden jeweils 3.0 Äquivalente des Phosphatsalzes hinzugefügt. Nach bestimmten Zeitspannen wurden erneut Proben entnommen und mittels HPLC analysiert. Die Quantifizierung der Produkte ergab die in Abbildung 38 gezeigten Verhältnisse von d4TDP **15** zu d4TTP **16**. Als Resultat kann nur ein geringer Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Produkt- bzw. Nebenproduktbildung festgestellt werden. Die höchste Selektivität ist jedoch bei einer Temperatur von $0\text{ }^\circ\text{C}$ (**E**) zu erzielen.

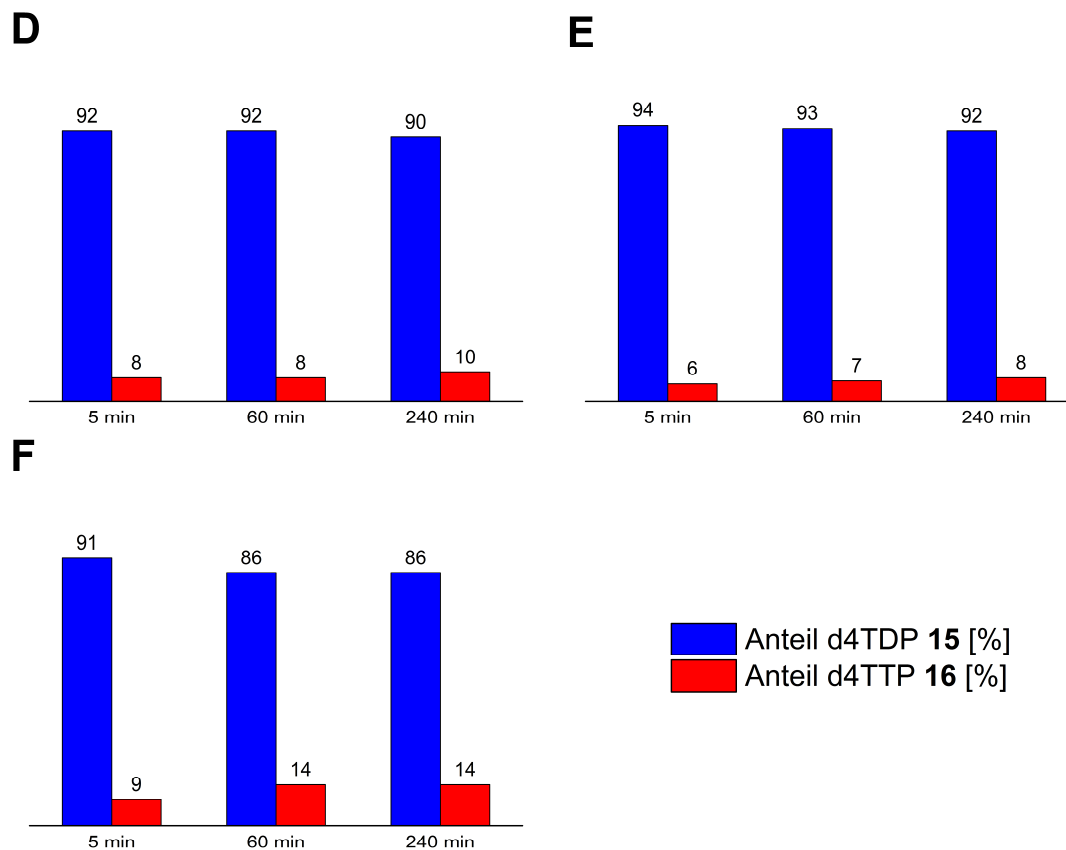


Abb. 38: Prozentuales Verhältnis von d4TDP 15 zu d4TTP 16 in Abhängigkeit von der Reaktionszeit und der Reaktionstemperatur: -20 °C (D), 0 °C (E) und Rt (F).

In der Summe konnte zwar die Nebenreaktion zum d4TTP 16 nicht vollständig unterbunden werden, was jedoch durch eine weitere Erhöhung an Monophosphatmenge realisierbar erscheint, aber zumindest der Anteil an d4TTP 16 auf unter 10% reduziert werden. Im nächsten Schritt sollten die optimierten Synthesebedingungen auch präparativ angewendet werden. Während die synthetischen Ergebnisse auch im größeren Maßstab reproduzierbar waren, erwies sich erneut die chromatographische Aufarbeitung des Rohprodukts als schwierig. Zwar konnte der Großteil an d4TDP 15, mit geringen Ausbeuteverlusten einhergehend, vom d4TTP 16 erfolgreich separiert werden, allerdings stellte sich die Abtrennung des im Überschuss vorliegenden Phosphatsalzes als zeitintensiver Prozess heraus. Die Isolierung des gewünschten Produkts in hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 31-40% gelang nur durch mehrfache RP18-Säulenchromatographie inklusive eines Ionenaustauschs mit Dowex-NH₄⁺. Die langwierige Reinigung in Kombination mit der nicht zufriedenstellenden Ausbeute machte die Erprobung weiterer chromatographischer Trennverfahren unumgänglich. Schließlich konnten aber sowohl die Wahl veränderter Elutionsmittel als auch der Einsatz von Sephadex LH-20 keine verbesserte Trennleistung erwirken.

Nach ökonomischen Gesichtspunkten erschien es in der Folge sinnvoll, die weniger zeitaufwendige *cycloSal*-Technik zur Synthese von d4TDP **15** einzusetzen. Eine Schlüsselrolle bei dieser Methode nimmt der *cycloSal*-Triester ein, der ursprünglich zur Verwendung als Pronukleotid entwickelt wurde (Kapitel 2.3.1). Durch die flexible Maskierung mit Salicylalkoholen unterschiedlicher Substitutionsmuster wurde zudem sein präparativer Nutzen erkannt. Durch den Angriff eines geeigneten Nucleophils am elektrophilen Phosphorzentrum waren unter anderem Nucleosidtriphosphate aber auch eine Vielzahl von Biomolekülen zugänglich.^[60-64] Begünstigend auf eine schnelle Umsetzung mit den Nucleophilen wirkten sich in 5-Position akzeptorsubstituierte Masken aus. Dabei haben sich vor allem eine elektronenziehende Chlor- oder Nitrosubstitution hervorgetan. In dieser Arbeit wurde für die Diphosphatsynthese der etwas reaktionsträgere Chlortriester eingesetzt, der mehrere Vorteile im Vergleich zum nitrosubstituierten Triester bietet, auf die im Laufe der nachstehenden Diskussion noch eingegangen wird. Der Zugang zu derartigen Triestern wurde in der Literatur ausführlich thematisiert. Der am häufigsten angewandte Syntheseweg basiert auf der Umsetzung des entsprechenden Nucleosids mit 5-Chlorsaligenylchlorphosphit und anschließender Oxidation zum Phosphatriester.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde analog verfahren. Hierfür wurde zunächst der 5-Chlorsalicylalkohol **91** durch Reduktion von 5-Chlorsalicylsäure **92** mit Lithiumaluminiumhydrid dargestellt (Abb. 39). Daraufhin war das entsprechende Phosphit **93** durch zwei aufeinanderfolgende S_NP-Reaktionen des 5-Chlorsalicylalkohols **91** an Phosphor(III)-chlorid zugänglich. Durch die Zugabe von Pyridin bei -20 °C konnte der sich bildende Chlorwasserstoff als Pyridiniumchlorid präzipitiert und unter Inertgas abgetrennt werden. Der Chlorsubstituent am Aromaten erlaubte, im Gegensatz zu einer Nitrosubstitution, eine destillative Aufarbeitung des Rohprodukts. Dadurch konnte das gewünschte 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** in hoher Reinheit als Enantiomergemisch erhalten werden, was die Bildung von Verunreinigungen in den Folgereaktionen auf ein Minimum reduzieren sollte. Im Anschluss erfolgte die Kupplung des in leichtem Überschuss vorliegenden Phosphits **93** mit d4T **3** zum 5-Chlor-*cycloSal*-Phosphatriester **79**. Entgegen der bereits etablierten Methode der Oxidation mit dem Tripelsalz Oxone[®] schloss sich die Zugabe von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan an. Dieses Oxidationsmittel ermöglichte ein Entfernen seines Überschusses im Vakuum und erleichterte die anschließende Extraktion zur Abtrennung der anfallenden DIPEA-Salze. Eine Übertragung auf das Nitroderivat ist war allerdings nicht möglich. Die säulenchromatographische Isolierung des Produkts **79** war auch im Grammmaßstab in nahezu quantitativer Ausbeute durchführbar.

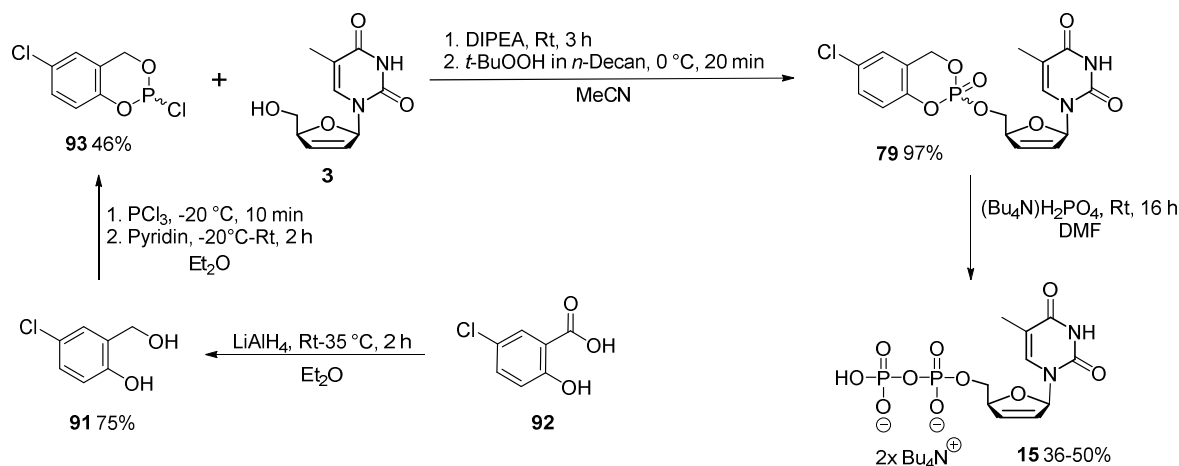


Abb. 39: Darstellung von d4TDP **15** mit Hilfe der *cycloSal*-Methode.

Nach dem Syntheseprotokoll von WARNECKE^[60] konnte ausgehend von dem 5-Cl-*cycloSal*-Triester **79** durch Umsetzung mit Tetra-*n*-butyammoniumphosphat als Nukleophil das d4TDP **15** dargestellt werden. Dafür wurde der in DMF gelöste Triester **79** zu einer Lösung des im 2.5-fachen Überschuss vorliegenden Phosphatsalzes getropft. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch Extraktion und ohne einen vorgeschobenen Ionenaustausch mittels Umkehrphasenchromatographie gereinigt. Dabei konnte das überschüssige Phosphatsalz bereits nach zweimaliger Durchführung einer automatisierten RP18-Chromatographie vollständig abgetrennt werden, was nach den zuvor gewonnenen Erkenntnissen über das Chromatographieverhalten der enthaltenen Komponenten unerwartet war.

Allerdings konnte die Bildung eines Benzylphosphats **94** (³¹P-NMR: 2.2 ppm), resultierend aus einer Reaktion des Chinonmethids **95** mit dem überschüssigen Nukleophil, beobachtet werden, das bereits in Vorarbeiten charakterisiert werden konnte (Abb. 40).^[91] Zusätzlich wurden auch große Mengen des Phenylphosphats **96** ("falscher Phosphatdiester") detektiert (³¹P-NMR: -6.1 ppm), der ebenso in der Literatur beschrieben ist.^[97]

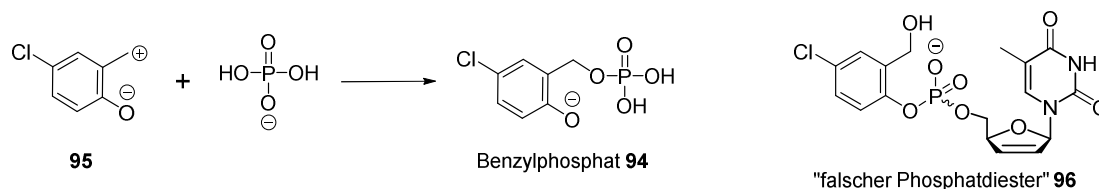


Abb. 40: Nebenprodukte bei der Darstellung von d4TDP **15** nach der *cycloSal*-Methode.

Beide Nebenprodukte erschwerten die Isolierung der Zielverbindung **15**. Letztendlich lag das d4TDP **15** jedoch nach einer weiteren Chromatographie in seiner Tetra-*n*-butylammoniumform in hoher Reinheit vor und stand damit als in organischen Lösungsmitteln löslicher und reaktiver Baustein für die Darstellung der TriPPP-Pro-Zielverbindungen **56** zur Verfügung. Die

Ausbeute fiel im Grammmaßstab mit 36% zwar nur moderat aus, allerdings konnten bei kleineren Ansätzen Ausbeuten von 50% erzielt werden. Als Hauptursache ist das verbesserte Trennverhalten der einzelnen Substanzen bei kleineren Ansätzen anzusehen. Somit stellt die beschriebene Vorgehensweise eine gute Methode zur Synthese von d4TDP **15** dar. Allerdings war eine Übertragung auf andere Nucleoside mit Komplikationen verbunden (Kapitel 4.5.3.1).

4.1.1.2.4 Synthese von d4TTP

Mit d4TTP **16** wurde auch die Synthese des Metaboliten durchgeführt, der im Idealfall das Hauptprodukt bei den Hydrolyseuntersuchungen bilden sollte. Wie bereits im vorherigen Abschnitt thematisiert, erlaubt die *cycloSal*-Technik auch den Zugang von triphosphorylierten Nucleotiden, indem bei analoger Vorgehensweise der entsprechende Triester **95** mit Pyrophosphat als Nucleophil zur Reaktion gebracht wird (Abb. 41). Korrelierend mit der Synthese von d4TDP **15** wurde das Rohprodukt von d4TTP **16** zunächst in der Form seines Tetra-*n*-butylammoniumsalzes an RP18-Silicagel chromatographiert, um das im Überschuss eingesetzte Pyrophosphatsalz leichter abtrennen zu können. Anschließend wurde der Rückstand über eine Ionenaustauschersäule Dowex-NH₄⁺ in sein Ammoniumsalz überführt und mittels automatisierter RP18-Chromatographie mit Wasser als Eluenten gereinigt. Die Zielverbindung **16** konnte auf diese Weise in guter Ausbeute von 64% isoliert werden.

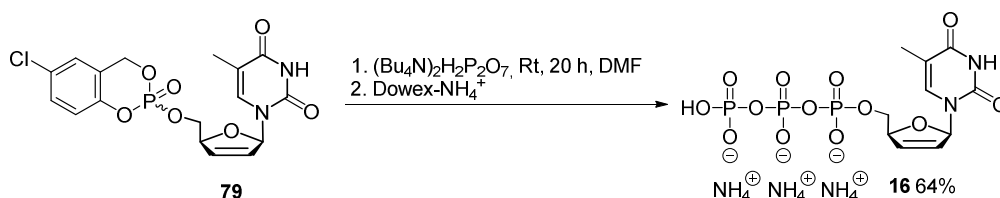


Abb. 41: Darstellung von d4TTP **16** über die *cycloSal*-Methode.

4.1.2 Synthese der Mono(alkanoyloxybenzyl)-d4TTP-Prodrugs

Eine entscheidende Rolle bei der Hydrolyse von DiPPro-Nucleotiden **34** nehmen die einfach-maskierten Intermediate ein, da sie im Vergleich zu den doppeltmaskierten Prodrugs eine deutlich höhere chemische Stabilität aufweisen und selektiv das NDP freisetzen.^[72,77] Ein synthetischer Ansatz derartiger Verbindungen wurde in vorherigen Arbeiten jedoch nicht vorgeschlagen. Die Isolierung von monomaskierten Triphosphaten gelang bis dato allein durch die chemische Hydrolyse von Bis(alkanoyloxybenzyl)-d4TDP-Prodrugs **74** und anschließender chromatographischer Reinigung.^[77] Diese Methode ist jedoch sehr zeitaufwendig und bedarf einer permanenten Kontrolle des Hydrolysestatus. Außerdem verlief die chemische Hydrolyse keinesfalls selektiv, da die Instabilität der Phosphoranhydridbindung der DiPPro-Verbindungen **74** generell immer die Bildung großer Mengen des

d4TMPs **13** zur Folge hatte. Aufgrund der Ineffizienz der bisherigen Darstellungsmöglichkeit der Intermediate wurde nach einer präparativen Alternative gesucht. Dafür wurde dem Thema dieser Arbeit entsprechend die Synthese von Mono(alkanoyloxybenzyl)-d4TTP-Verbindungen **57** (MAB-Intermediate) durchgeführt.

Einen zufriedenstellenden Lösungsansatz lieferte eine neuartige Variante der *cycloSal*-Technik. Durch die Umsetzung von nitrosubstituierten *cycloSal*-(4-Alkanoyloxybenzyl)-monophosphaten **97** mit d4TDP **15** gelang die erfolgreiche Synthese der jeweiligen TriPPP-Intermediate **57a,e,j** (Abb. 42). Die Entwicklung dieser Methode soll im Folgenden kurz vorgestellt werden.

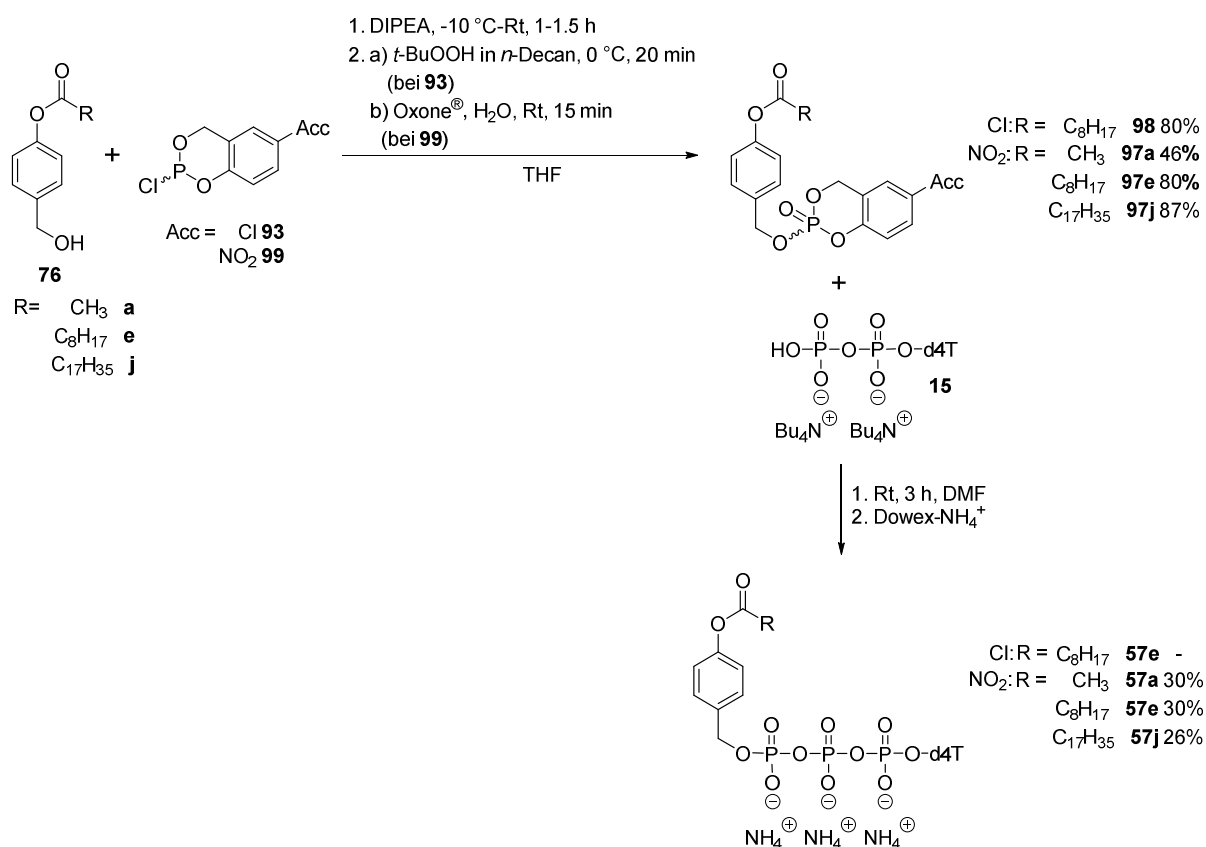


Abb. 42: Darstellung der Mono(alkanoyloxybenzyl)-d4TTP-Intermediate **57**.

In einem ersten Ansatz wurde 4-(Hydroxymethyl)-phenylnonanoat **76e** mit 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** zur Reaktion gebracht und im Anschluss mit *tert*-Butylhydroperoxid oxidiert. Das Rohprodukt wurde extrahiert und über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie das chlorsubstituierte *cycloSal*-(4-Nonanoyloxybenzyl)-monophosphat **98** in 80%iger Ausbeute isoliert. Da die Synthese von d4TDP **15**, wie im vorherigen Kapitel ausführlich diskutiert, aufwendig und die Substanzmenge damit limitiert war, wurde der Triester **98** in zweifachem Überschuss eingesetzt. Dies sollte nach Möglichkeit zum einem quantitativen Verbrauch des Edukts **15** führen. Somit wurde in diesem Fall entgegen der

publizierten *cycloSal*-Technik das Nukleophil im Unterschuss verwendet. Die Reaktionslösung wurde für 20 Stunden gerührt, ohne dass mittels HPLC eine Reaktion oder ein Zerfall der Reagenzien beobachtet werden konnte. Durch eine Temperaturerhöhung auf 50 °C konnte dagegen die Bildung der gewünschten Zielverbindung **57e** festgestellt werden. Allerdings wiesen unter diesen Bedingungen weder das Produkt **57** noch die Reagenzien über einen längeren Zeitraum eine ausreichende Stabilität auf, was ein Chromatogramm mit einer Reihe phosphathaltiger d4T-Metabolite, wie d4TMP **13** und d4TDP **15**, sowie weiteren undefinierten Signalen zur Folge hatte. Eine deutliche Reduzierung der Reaktionszeit durch den Einsatz einer Mikrowelle war ebenso wenig zielführend wie ein Wechsel des Lösungsmittels.

Daher sollte der Versuch unternommen werden, den entsprechenden 5-Nitrotriester **97** einzusetzen, um die Elektrophilie am Phosphoratom und somit die Reaktivität zu erhöhen, wodurch eine Umsetzung bei Raumtemperatur ermöglicht werden sollte. Das für die Darstellung des Nitrotriesters **97** notwendige 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **99** war über die Reduktion des 5-Nitrobenzaldehyds **100** zum entsprechenden Alkohol **101** und darauffolgender Reaktion mit Phosphor(III)-chlorid zugänglich (Abb. 43). Eine Destillation des Phosphits **99** war jedoch nicht möglich, weshalb das Enantiomergemisch als Rohprodukt für die nachfolgenden Synthesen eingesetzt wurde. Die Reinheit variierte je nach Ansatz zwischen 80-90%.

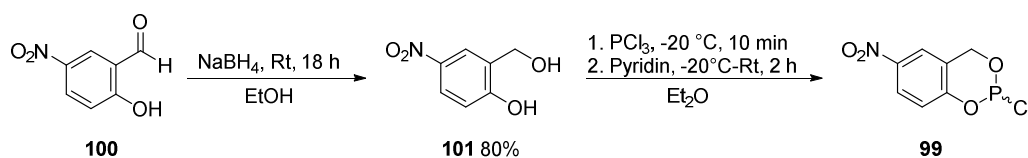


Abb. 43: Darstellung des 5-Nitrosaligenylchlorphosphits **99**.

Die Synthese des 5-Nitro-*cycloSal*-(4-nonanoyloxybenzyl)-monophosphats **97e** erfolgte abgesehen von der Verwendung des milderen Oxone[®] als Oxidationsmittel analog zum Chlorderivat **98**. Nach einer chromatographischen Aufarbeitung konnte eine Ausbeute von 80% erzielt werden. In der anschließenden Zielreaktion wurde mittels HPLC nach einer Stunde die Bildung geringer Mengen des monomaskierten Intermediats **57e** festgestellt (Abb. 42). Durch die langsame Umsetzung konnten selbst nach 20 Stunden Reaktionszeit noch etwa 25% des unverbrauchten Edukts **15** detektiert werden. Allerdings konnte auch die Freisetzung von d4TTP **16** beobachtet werden, das aus dem Zerfall der Zielverbindung **57e** resultieren musste, obgleich unter wasserfreien Bedingungen gearbeitet wurde. Um eine weitere Zersetzung des MAB-Prodrugs **57e** zu vermeiden, wurde das Lösungsmittel trotz des nicht vollständigen Umsatzes des d4TDPs **15** im Vakuum entfernt und der Rückstand extrahiert. Die wässrige Phase wurde gefriergetrocknet und das Produkt **57e** durch

automatisierte RP18-Chromatographie von Verunreinigungen wie d4TDP **15**, d4TTP **16** und 5-Nitrosalicylalkohol **101** separiert. Aufgrund unbekannter Kontaminationen war eine weitere Chromatographie notwendig, wobei das Rohprodukt zunächst über Dowex-NH₄⁺ eluiert und erst im Anschluss erneut chromatographiert wurde. Wegen des nicht vollständigen Umsatzes und des beschriebenen Zerfalls zum d4TTP **16** konnte die Zielverbindung **57e**, dessen ³¹P-NMR-Spektrum in Abbildung 44 gezeigt ist, nur in einer Ausbeute von 30% dargestellt werden.

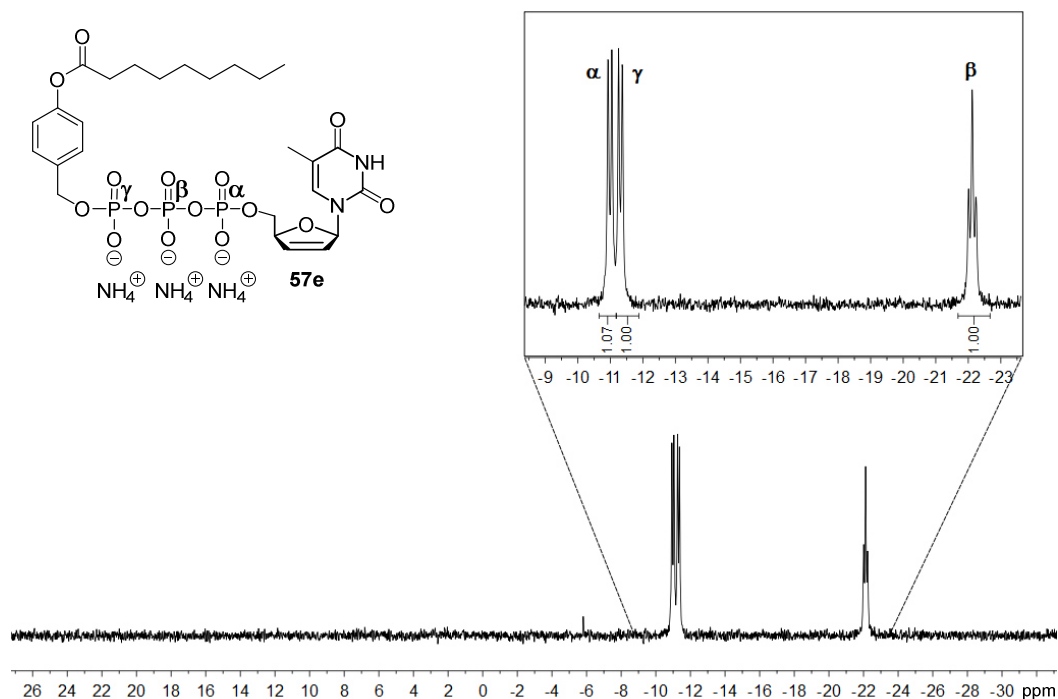


Abb. 44: ³¹P-NMR-Spektrum des MAB-Intermediate **57e** (MeOD-*d*₄, 162 MHz, entkoppelt).

In der gleichen Größenordnung lagen mit 26% und 30% auch die Ausbeuten der beiden Derivate mit kürzerem (R= CH₃ **57a**) bzw. längerem Rest (R= C₁₇H₃₅ **57j**), was auf eine Unabhängigkeit des Reaktionsumsatzes von der Lipophilie des Triesters **97** hindeutet. Trotz der moderaten Ausbeuten bildet die vorgestellte Methode den ersten synthetischen Weg zur Darstellung von Mono(alkanoyloxybenzyl)-d4TTP-Prodrugs **57**, die für das Verständnis des Hydrolyseverhaltens von TriPPPro-Verbindungen unerlässlich sind. Darüber hinaus konnte die vielfältig einsetzbare *cycloSal*-Technik in ihrem Anwendungsspektrum erweitert werden. Die Syntheseroute wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich auf Diphosphat-Prodrugs übertragen.

4.1.3 Synthese neuartiger Maskierungseinheiten

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch die Veränderung des Hydrolyseverhaltens von Prodrugs durch die Verwendung verschieden funktionalisierter Maskierungseinheiten

untersucht werden. Dafür sollten die funktionellen Gruppen Carbonat und Carbamat eingeführt werden. Für die Synthese der TriPPPro-d4TTP-Prodrugs **56l-q** waren gemäß dem Retrosyntheschema aus Kapitel 4.1 (Abb. 27, S. 30) die entsprechenden Phosphoramidite **75l-q** notwendig, deren Synthesemöglichkeiten nachstehend vorgestellt werden.

4.1.3.1 Synthese der 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkylcarbonate

In naher struktureller Verwandtschaft zu den Carbonsäureestern stehen die Carbonate, die bereits erfolgreich Anwendung in der Prodrugentwicklung gefunden haben. Das Virostatikum Tenofovir **7**, das zur Behandlung von Infektionen mit HIV und Hepatitis eingesetzt wird, ist einer der bekanntesten Vertreter, der auf eine Maskierung mit Carbonateestern basiert. Dementsprechend wäre auch für das BAB-Konzept eine Applikation von carbonat-funktionalisierten Verbindungen von Interesse.

Durch die Möglichkeit des kommerziellen Erwerbs der Chlorformiate **78l-n** konnte für die Darstellung der 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkylcarbonate **76l-n** nach dem in Abschnitt 4.1.1.1 beschriebenen Syntheseprotokoll verfahren werden (Abb. 45).

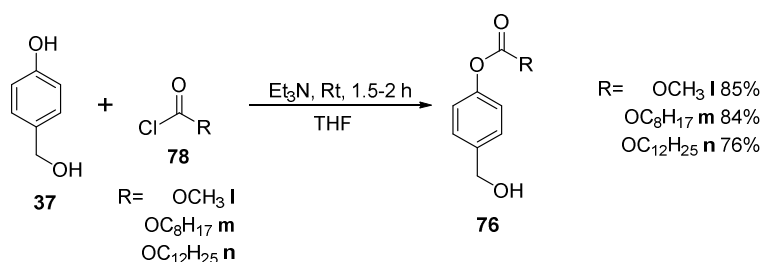


Abb. 45: Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkylcarbonaten.

Auffällig sind die verbesserten Ausbeuten von 76-85% im Vergleich zu einer Veresterung von 4-Hydroxybenzylalkohol **37** mit den in Abschnitt 4.1.1.1 verwendeten Carbonsäurechloriden **78a-k** (39-62%). Als Ursache kann der positive Mesomerieeffekt des zusätzlichen Sauerstoffs, der zu einer Verminderung der Elektrophilie am Carbonyl-Kohlenstoff führt, angenommen werden. Dadurch ist die Reaktion mit der nukleophileren Phenolatfunktion des 4-Hydroxybenzylalkohols **37** deutlich begünstigt. Dennoch konnte ebenso die Bildung des doppelsubststituierten Nebenprodukts durch eine zusätzliche Reaktion mit der weniger nukleophilen benzyllischen Hydroxylgruppe beobachtet werden.

4.1.3.2 Synthese der 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkylcarbamate

DEWIT und GILLIES entwickelten eine auf Carbamaten und 4-Hydroxybenzylalkohol **37** basierende, biologisch abbaubare Polymerstruktur **102**. Aus der chemische Initiierung und somit der Entfernung der *End cap* an einem Terminus resultieren intramolekulare

Zyklisierungen und Eliminierungen, wodurch ein vollständiger Abbau der Kette stattfindet (Abb. 46).^[105]

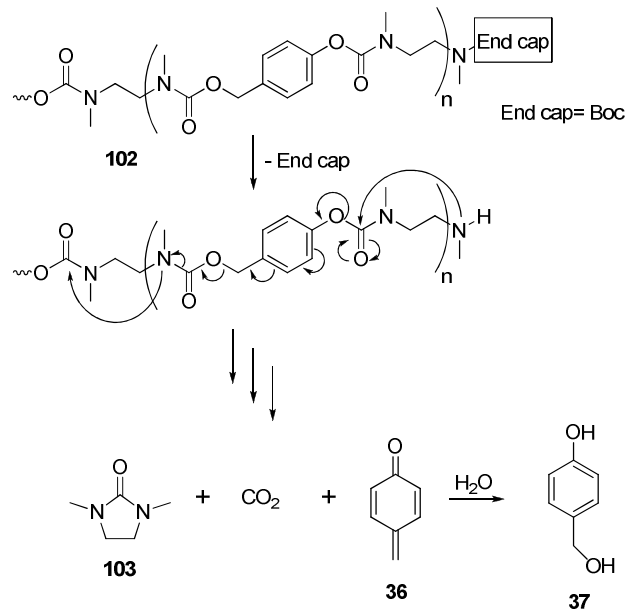


Abb. 46: Auf Basis von Carbamaten und 4-Hydroxybenzylalkohol **37** linear aufgebaute und biologisch abbaubare Polymerstruktur **102**.^[105]

Dieser Umstand sollte auf seine Anwendbarkeit zur Maskierung von NTP-Prodrugs untersucht werden. Bei der in Abbildung 47 gezeigten modifizierten Monomerstruktur sind die gewünschten Carbamateinheiten (**A+B**) in die Maskierungseinheit für Triphosphat-Prodrugs integriert. Im Gegensatz zur Literatur^[105] ist die endständige Boc-Gruppe gegen einen variablen Alkyloxycarbonylrest ausgetauscht, wodurch die Flexibilität zur Anpassung einer geeigneten Lipophilie gegeben ist.

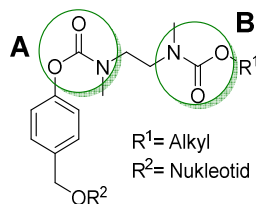


Abb. 47: Grundstruktur der 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkylcarbamate als Maskierungseinheit für TriPPPro-Verbindungen.

Mittels basischer oder saurer Aktivierung ist bei einer der beiden Carbamatfunktionen (**A+B**) ein Hydrolyseverlauf formulierbar, der einen entweder eine Abspaltung (**A**) oder einen Abbau (Abb. 48, **B**) der Maske zur Folge hat. Nachdem bisher lediglich eine Spaltung der Prodrugs bei physiologischem pH-Wert von 7.3 diskutiert wurde, wäre in diesem Zusammenhang auch eine selektive saure Aktivierung von Interesse. Denn in Tumorzellen liegt der pH-Wert um

eine Einheit niedriger als in dem umgebenden gesunden Gewebe, womit schwach acide Bedingungen herrschen. Da auch Nukleosidanaloga in der Behandlung von Krebs eingesetzt werden, wäre eine saure Initiierung zur Wirkstofffreigabe aus therapeutischer Sicht von hoher Relevanz und der Anwendungsbereich der TriPPP_{ro}-Verbindungen könnte entsprechend erweitert werden.

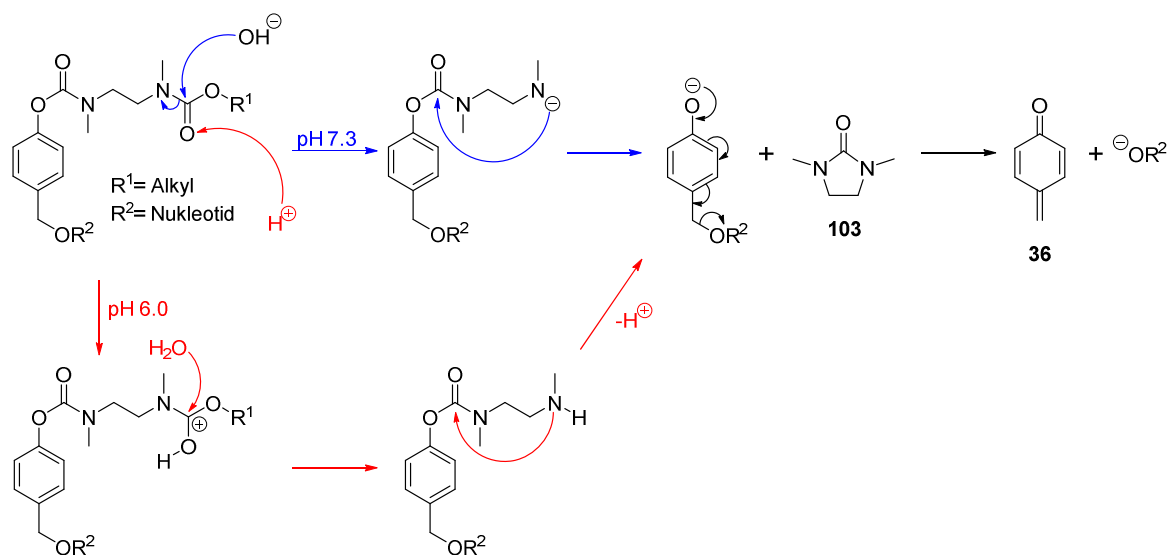


Abb. 48: Hydrolysewege nach basischer oder saurer Initiierung der 4-(Hydroxymethyl)-phenylcarbamate als Maskierungseinheiten.

Während eine Spaltung von **A** (Abb. 47) eine direkte Freisetzung des Phenolats und folglich des Nukleotids nach dem postulierten Mechanismus^[72] erlauben würde, würde bei **B** ein Abbau der Maskierungseinheit stattfinden. Die in Abbildung 48 für **B** aufgeführten Kaskadenreaktionen basieren unabhängig vom pH-Wert des Mediums auf einem Angriff des entsprechenden Nucleophils am Carbonylkohlenstoff. Dabei kommt es, der Übersicht halber nicht schematisch dargestellt, zur Abspaltung eines Carbonats, das spontan in Kohlenstoffdioxid und den entsprechenden Alkohol zerfällt. Der intramolekularen Zyklisierung schließt sich die bereits im Kenntnisstand (Abb. 14, S. 17) beschriebene Umpolung der *para*-ständigen Benzylgruppe an, was einen Bruch der Benzylesterbindung bewirkt. Außerdem findet die Freisetzung von 1,3-Dimethyl-2-imidazolidinon **103** statt, das gemäß GHS als gesundheitsschädlich eingestuft wird.^[106] Konsequenterweise muss, eine erfolgreiche Synthese und geeignete Hydrolyseeigenschaften eines Carbamat-Prodrugs vorausgesetzt, über Alternativen nachgedacht werden, um die Toxizität der Spaltprodukte zu verringern. Da im späteren Verlauf dieser Arbeit erneut die Auswirkungen der Lipophilie auf das chemische sowie enzymatische Hydrolyseverhalten überprüft werden sollten, galt es, drei Verbindungen mit unterschiedlichen aliphatischen Resten darzustellen. Die Synthesvorschrift von DEWIT und GILLIES wurde für das Schützen und Aktivieren des 4-Hydroxy-

benzylalkohols **37** übernommen.^[105] Hierbei erfolgte zunächst die Silylierung der primären benzyllischen Hydroxylfunktion, die gegenüber der phenolischen eine höhere Nukleophilie aufweist und folglich bevorzugt geschützt wird (Abb. 49). Anschließend wurde, ausgehend von dem TBDMS-geschützten 4-Hydroxybenzylalkohol **104**, durch die Zugabe von 4-Nitrophenylchlorformiat unter Verwendung von Triethylamin als Base das Phenylcarbonat **105** in moderater Ausbeute von 53% erhalten. Entsprechend der Literatur wurde zum Deaktivieren des im Überschuss eingesetzten Reagenzes nach erfolgter Reaktion Triethylenglykolmonomethylether zugesetzt, um die chromatographische Reinigung zu vereinfachen.

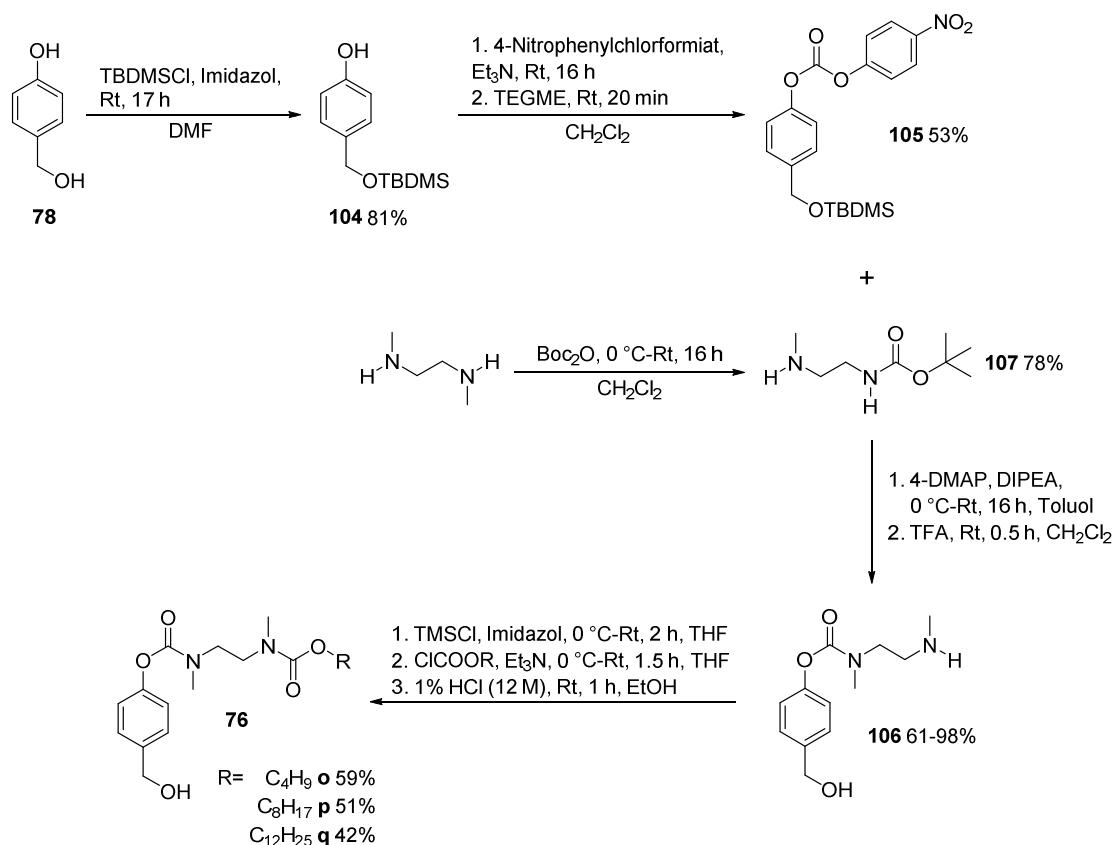


Abb. 49: Darstellung der 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkylcarbamate **76o-q**.

Das aktivierte Carbonat **105** konnte in der Folge in einer zweistufigen Reaktion nahezu quantitativ zum Carbamat **106** umgesetzt werden. Dafür wurde im ersten Schritt das einfach boc-geschützte *N,N*-Dimethylethylendiamin **107** als Nukleophil verwendet, wobei dem Reaktionsgemisch katalytische Mengen 4-Dimethylaminophenol (4-DMAP) zugesetzt wurden. Im zweiten Schritt wurden nach einer Extraktion die säurelabilen Schutzgruppen in einem Gemisch aus Trifluoressigsäure/Dichlormethan (1:1 v/v) entfernt. Während die Normalphasenchromatographie, bedingt durch das schlechte Elutionsverhalten des Produkts **106**, mit großen Ausbeuteverlusten einherging, erwies sich der Einsatz der automatisierten RP18-Chromatographie deutlich effizienter. Resultierend aus der Umsetzung des

sekundären Amins und der Kupplung zum Carbamat fand die Bildung von Konformationsisomeren statt. Das Vorliegen von Rotameren ließ sich sowohl an den doppelten Signalsätzen im ^1H -NMR- als auch im ^{13}C -NMR-Spektrum erkennen. Die Rotationsisomere konnten in allen nun folgenden carbamathaltigen Verbindungen NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.

In einer dreistufigen Eintopfreaktion konnten anschließend die 4-(Hydroxymethyl)-phenylcarbamate **76o-q** in guten Ausbeuten von 42-59% synthetisiert werden. Nach einer TMS-Schätzung der freien Hydroxylgruppe erfolgte die Umsetzung mit dem entsprechenden Chlorformiat **78o-q**, gefolgt von einer Desilylierung mit 1%iger 12 M Salzsäure in Ethanol. Als entscheidender Faktor für den Erfolg der Synthese erwies sich dabei der Einsatz von 3.0 Äquivalenten Alkylchlorformiat **78o-q**, da das Reagenz auch mit dem für die Silylierung notwendigen Imidazol reagierte. Von einer eingeschobenen Isolierung der TMS-geschützten Verbindung wurde aufgrund der Hydrolyseanfälligkeit allerdings ebenso abgesehen wie von anderweitigen Optimierungsversuchen, da allein die erfolgreiche Synthese der drei Verbindungen im Vordergrund stand.

4.1.3.3 Synthese carbonat- und carbamatfunktionalisierter Phosphoramidite

Die Darstellung der unterschiedlich modifizierten Phosphoramidite **75l-q** folgte dem Protokoll der Umsetzung der 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkanoate **76a-k** mit Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** (Kapitel 4.1.1.1). Unabhängig von der Art der Modifikation konnten auch hier gute Umsetzungsraten festgestellt und entsprechend gute Ausbeuten erzielt werden (Abb. 50). Die negativ abweichenden Ausbeuten der beiden Carbamatphosphoramidite **75l** und **75q** beruhen auf Schwierigkeiten bei der chromatographischen Aufarbeitung.

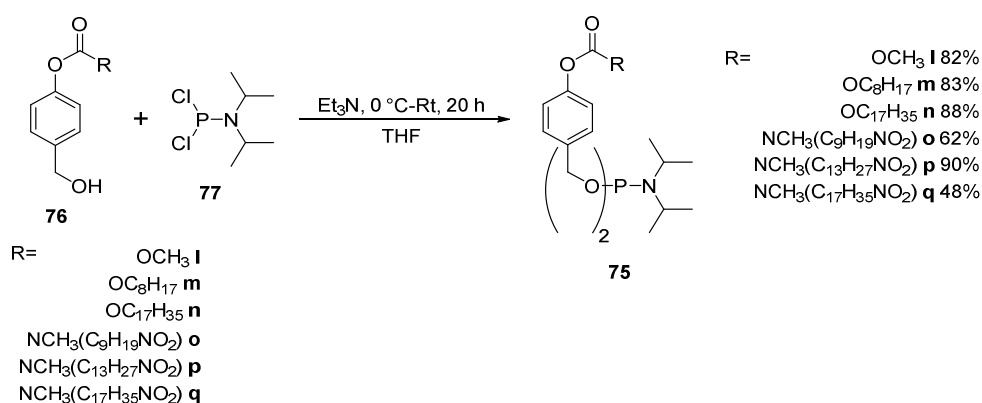


Abb. 50: Darstellung der carbonat- und carbamatmodifizierten Phosphoramidite **75l-q**.

4.1.4 Synthese der Bis(alkanoyloxybenzyl)-d4TTP-Prodrugs

Die Synthese der Zielverbindungen **56a-q**, deren Masken sich sowohl in der Länge der aliphatischen Reste als auch durch die Art der Modifikationen unterschieden, wurde nach einer angepassten Vorschrift nach JESSEN und SCHULZ^[72] vorgenommen. Da in

vorangegangenen Versuchen bei der Darstellung von AZTTP-Prodruqs durch die Kupplung von DCI-aktivierten Phosphoramiditen mit AZTDP nur Ausbeuten von unter 20% erzielt werden konnten^[91], wurden Möglichkeiten der Optimierung des Versuchsprotokolls untersucht.

Einleitend sind in Abbildung 51 die Ergebnisse der Synthese aller d4TTP-Prodruqs **56** zusammengefasst, die über optimierte Synthesebedingungen und ein angepasstes Chromatographieverfahren erfolgreich dargestellt werden konnten. Die Ausbeuten rangieren dabei zwischen 26-70%, wobei weder eine Abhängigkeit der Ausbeuten von der Art der Modifikation noch von der Länge des Rests zu erkennen sind. Die Schwankungen sind unter anderem auf die beobachtete Hydrolyse während der Aufarbeitung und die fehlende Berücksichtigung von geringen Mengen von mit Phosphatdiester (Abb. 53, S. 55) verunreinigten Mischfraktionen zurückzuführen. Des Weiteren spielen die Erfahrungswerte eine entscheidende Rolle. So wurden die angegebenen Werte über einen Zeitraum von zwei Jahren primär in einmalig durchgeführten Ansätzen bei schrittweiser Optimierung der Chromatographiemethode ermittelt.

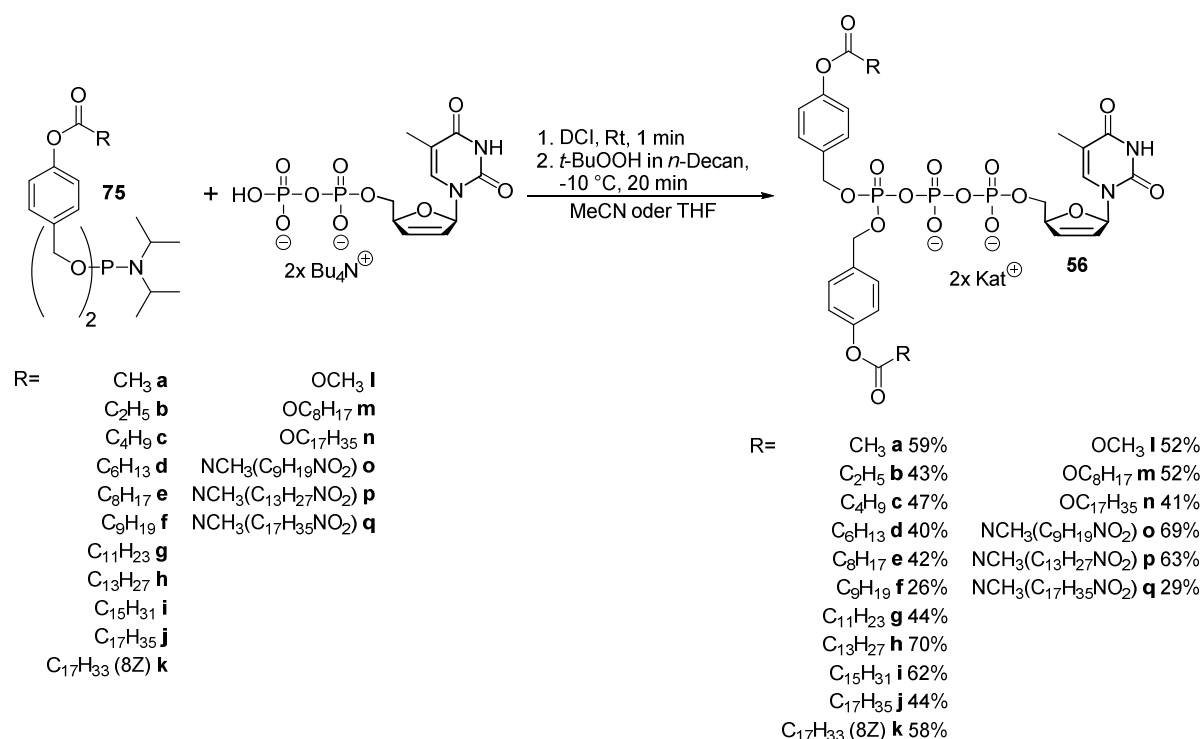


Abb. 51: Darstellung der d4T-Triphosphat-Prodruqs **56a-q**.

Im Folgenden soll der Prozess zur Entwicklung eines unkomplizierten und reproduzierbaren Syntheseprotokolls für die Gewinnung von unterschiedlichen d4TTP-Prodruqs **56a-q** im Detail vorgestellt werden.

Im ersten Schritt galt es, eine zuverlässige Methode zur Reaktionsverfolgung zu finden. Da in der Vergangenheit bei der dünnschichtchromatographischen Kontrolle zwar eine Produkt-

bildung detektierbar war, gleichzeitig eine Quantifizierung des Verbrauchs des Edukts aber nicht zuverlässig festgestellt werden konnte, wurde die HPL-Chromatographie als alternative Analysemethode in Betracht gezogen. In einem ersten Ansatz zur Synthese des d4TTP-Prodrugs **56e** mit $R = C_8H_{17}$ führte die Verwendung der für die Hydrolyse von AZTTP-Prodrugs^[91] etablierten HPLC-Methode A mit Tetra-*n*-butylammoniumacetatpuffer als Ionenpaarreagenz zu einer Überlagerung der Peaks von DCI und d4TDP **15**. Durch einen Wechsel des Laufpuffers auf Triethylammoniumacetat (Methode B) konnte jedoch eine problemlose Reaktionsverfolgung durchgeführt werden, bei der alle Komponenten der Reaktion als basisliniengetrennte Peaks vorlagen (Abb. 52).

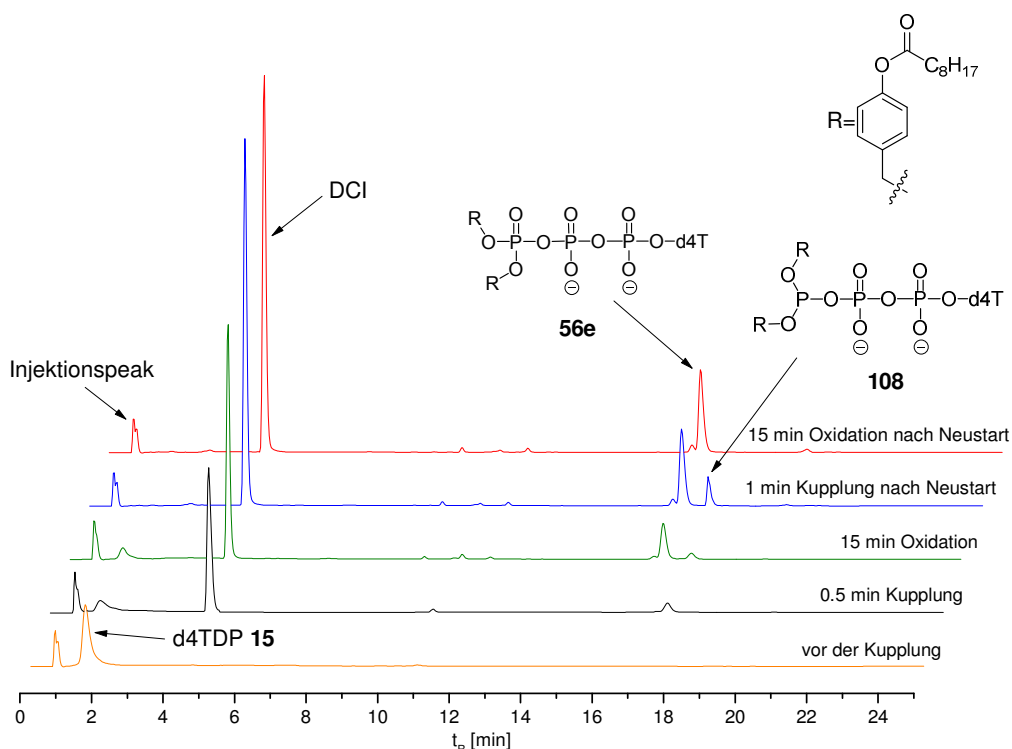


Abb. 52: HPLC-Reaktionsverfolgung zur Darstellung des TriPPPPro-d4TTPs **56e** (HPLC-Methode B).

Die Chromatogramme zeigen, dass nicht nur das Oxidationsprodukt **56e**, sondern auch die unoxidierte P(III)-Spezies **108** unter den HPLC-Bedingungen eine ausreichende Stabilität besitzen, da keine Zerfalls- oder Hydrolyseprodukte detektierbar sind. In dieser Abbildung sind bereits alle optimierten Synthesebedingungen integriert, die nachfolgend erläutert werden.

Da die Reaktionskontrolle mittels HPLC realisiert werden konnte, sollten Testversuche durchgeführt werden, die umfangreiche Informationen bezüglich einer verbesserten Durchführung der finalen Kupplungsreaktion lieferten. Es stellte sich heraus, dass für eine erfolgreiche Synthese nicht nur trockene Reagenzien und Lösungsmittel entscheidend sind. Zum einen bildet die Verwendung einer 0.25 M 4,5-Dicyanoimidazolösung (DCI) in Acetonitril, die auch in der Oligonukleotidsynthese Anwendung findet, die Grundlage für einen quantitativen

Umsatz. Zum anderen wurde festgestellt, dass sich ein im Vergleich zum Phosphoramidit **75** im Unterschuss eingesetzter Aktivator positiv auf die Produktbildung auswirkte. Des Weiteren konnte mit der DCI-Lösung als Aktivator die Kupplungsreaktion zwischen dem entsprechenden Phosphoramidit **75** und d4TDP **15** binnen einer einminütigen Reaktionszeit durchgeführt werden. Die Reaktionszeiten bei der Synthese von DiPPro-d4T-Diphosphaten **74** betragen bei Zugabe von ungelöstem DCI aufgrund einer geringeren Umsatzrate meist mehrere Stunden bis hin zu Tagen.^[77,78] Warum DCI als Feststoff nur einen unvollständigen sowie langsameren Umsatz erlaubt, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Allerdings konnte ein quantitativer Umsatz lediglich erzielt werden, wenn alle Reagenzien vollständig gelöst vorlagen. Daher war die Verwendung von d4TDP **15** in seiner Tetra-*n*-butylammoniumform unverzichtbar. Gleichmaßen war, bedingt durch die hohe Lipophilie der langkettigen Phosphoramidite **75** ($R \geq C_{12}H_{25}$), der Einsatz eines Lösungsmittelgemisches aus MeCN/THF unabdingbar. Hierbei war das Lösen der Reagenzien in einem Minimum an Lösungsmittel ebenso ausschlaggebend für einen erfolgreichen Verlauf der Reaktion wie die Durchführung bei Temperaturen zwischen 15-22 °C. Bei höheren Temperaturen konnte eine Zersetzung des Zielprodukts **56** und bei niedrigeren Temperaturen eine schlechtere Umsetzung des d4TDPs **15** beobachtet werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Reaktionsverfolgungen offenbarten jedoch ebenfalls, dass vor allem bei langkettigen Phosphoramiditen ($R \geq C_{12}H_{25}$) nach einer Reaktionszeit von einer Minute nicht immer ein vollständiger Verbrauch des d4TDPs **15** gegeben ist. Allerdings brachte eine verlängerte Reaktionszeit keine weitere Produktbildung mit sich. In diesen Fällen wurde dazu übergegangen, trotz des nicht vollständigen Umsatzes die Oxidation des γ -Phosphats mit *tert*-Butylhydroperoxid durchzuführen. Um dennoch einen quantitativen Verbrauch des d4TDPs **15** zu erzielen, wurden erneut Phosphoramidit **75** und Aktivator hinzugegeben. Zuvor wurden alle flüchtigen Bestandteile nach der erstmaligen Oxidation im Vakuum entfernt, der Rückstand wurde in dem entsprechenden Lösungsmittel aufgenommen und die Reaktion durch Zugabe weiteren Phosphoramidits **75** mit DCI neu gestartet. Anschließend konnte wieder nach dem Protokoll verfahren werden. Dieser Sachverhalt ist ebenfalls in Abbildung 52 veranschaulicht, in der letztendlich neben dem vollständigen Verbrauch des Edukts **15** auch eine selektive Produktbildung zu beobachten ist.

Nach der erfolgreichen Optimierung der Synthesebedingungen galt es, die Aufarbeitung des Rohprodukts zu verbessern. Nachdem sich verschiedene Extraktionsversuche aufgrund unzureichender Phasentrennung als nicht zielführend erwiesen hatten, wurde eine automatisierte säulenchromatographische Reinigung mit RP18-Silicagel angestrebt. Eine *dry load*-Präparation ermöglichte ein zuverlässiges Auftragen des teilweise klebrigen und

schwer löslichen Rohprodukts, wofür die Substanz auf pH-neutralem Celite[®] 545 mittels Gefriertrocknung aufgezogen wurde. Allerdings ist dieser Prozess aufgrund des Entfernens des Wassers durch die langsame Gefriertrocknung zeitintensiv. Durch eine Anpassung der Lösungsmittelgemische aus MeCN/Wasser oder THF/MeCN/Wasser an die Lipophilie der TriPPPro-Verbindungen **56** gelang in der Folge jedoch auch das quantitative Auftragen der gelösten Rohsubstanz.

Zur Elution wurde zunächst ein stetiger Wasser/Acetonitril-Gradient (5-100%, 0-40 min) verwendet, was bei den d4TTP-Prodrugs **56** mit $R \leq C_{11}H_{23}$ eine wenig problematische Isolation des Produkts erlaubte. Allerdings war die Reinigung der hochlipophilen Verbindungen **56h-k** mit $R \geq C_{13}H_{27}$ mit dieser Methode nicht realisierbar, da ihr amphiphiler Charakter zur Formierung von Mizellen führte, was auch die starke Schaumbildung produkthaltiger Fraktionen demonstrierte. Eine Elution des Produkts **56** erfolgte erst bei einem 100%igen Anteil des organischen Lösungsmittels (Acetonitril). Bei der Verwendung von einem Wasser/THF-Laufmittelgemisch (5-100%, 0-40 min) und durch die damit einhergehenden Retentionszeitverkürzungen konnten jedoch auch diese TriPPPro-Verbindungen **56h-k** erfolgreich isoliert werden.

Erschwerend bei der Reinigung nahezu aller Prodrugs **56** stellte sich der teilweise auftretende Bruch der Phosphoranhydridbindung zwischen dem β - und γ -Phosphat heraus (Abb. 53). Die daraus resultierenden Phosphatdiester **109**, deren Bildung bereits bei den DiPPPro-Verbindungen festgestellt worden war^[72,77], wiesen ähnliche Retentionszeiten wie die Prodrugs **56** auf. Da der automatisierte Puriflash 430 jedoch auch UV/VIS-Spektren (DAD-Detektor) der einzelnen Fraktionen lieferte, konnte das entsprechende Nebenprodukt **109** problemlos detektiert und separiert werden. Dadurch kam es nur in geringem Maße zu Ausbeuteverlusten.

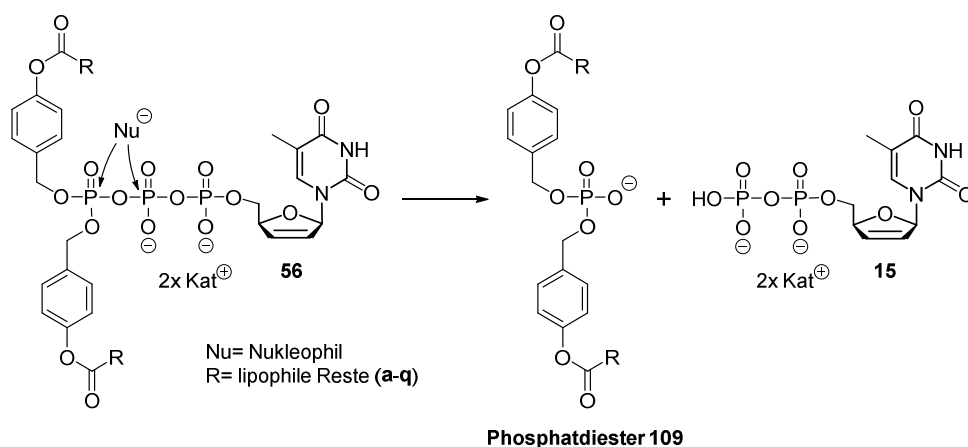


Abb. 53: Bei der Chromatographie von Triphosphat-Prodrugs **56** partiell auftretende Hydrolyse.

Für eine Verbesserung der Reinheit wurde die Mehrzahl der Prodrugs **56** über einen Kationenaustausch an Dowex-NH₄⁺ in ihre Ammoniumform überführt und die Chromatographie wiederholt. Obwohl sich ein quantitativer Ionenaustausch NMR-spektroskopisch nachweisen ließ, konnten die Zielverbindungen **56** letztendlich nicht immer als reine Ammoniumsalze erhalten werden. Dieses Phänomen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass während der RP18-Chromatographie ein erneuter teilweiser Austausch auf Tetra-*n*-butylammoniumionen stattfand, die sich im Vorwege trotz intensiven Spülens nur unvollständig von der Säule entfernen ließen. Bei den TriPPPro-Verbindungen **56h-k** mit R ≥ C₁₃H₂₇ wurde, bedingt durch das schlechte Löslichkeitsverhalten, auf einen Ionenaustausch verzichtet und lediglich die Chromatographie wiederholt. Durch den Einsatz von Tetrahydrofuran (THF) als organische Komponente im Laufmittel wurde teilweise auch die zum Produkt zeitgleiche Elution von Diisopropylammoniumsalzen festgestellt, die aber nicht unterbunden werden konnte. Auswirkungen der Salze auf das Hydrolyseverhalten oder die antivirale Aktivität waren nicht zu erwarten.

Exemplarisch sind nachstehend die NMR-spektroskopischen Aufnahmen des d4TTP-Prodrugs **56e** mit R= C₈H₁₇ gezeigt. Das ¹H-NMR-Spektrum weist das erwartete Verhältnis der Masken-Protonen zu den nukleosidischen Protonen von 2:1 auf (Abb. 54). Signale der Tetra-*n*-butylammoniumionen sind dagegen keine zu erkennen, weshalb von einem Vorliegen der reinen Ammoniumform ausgegangen wird.

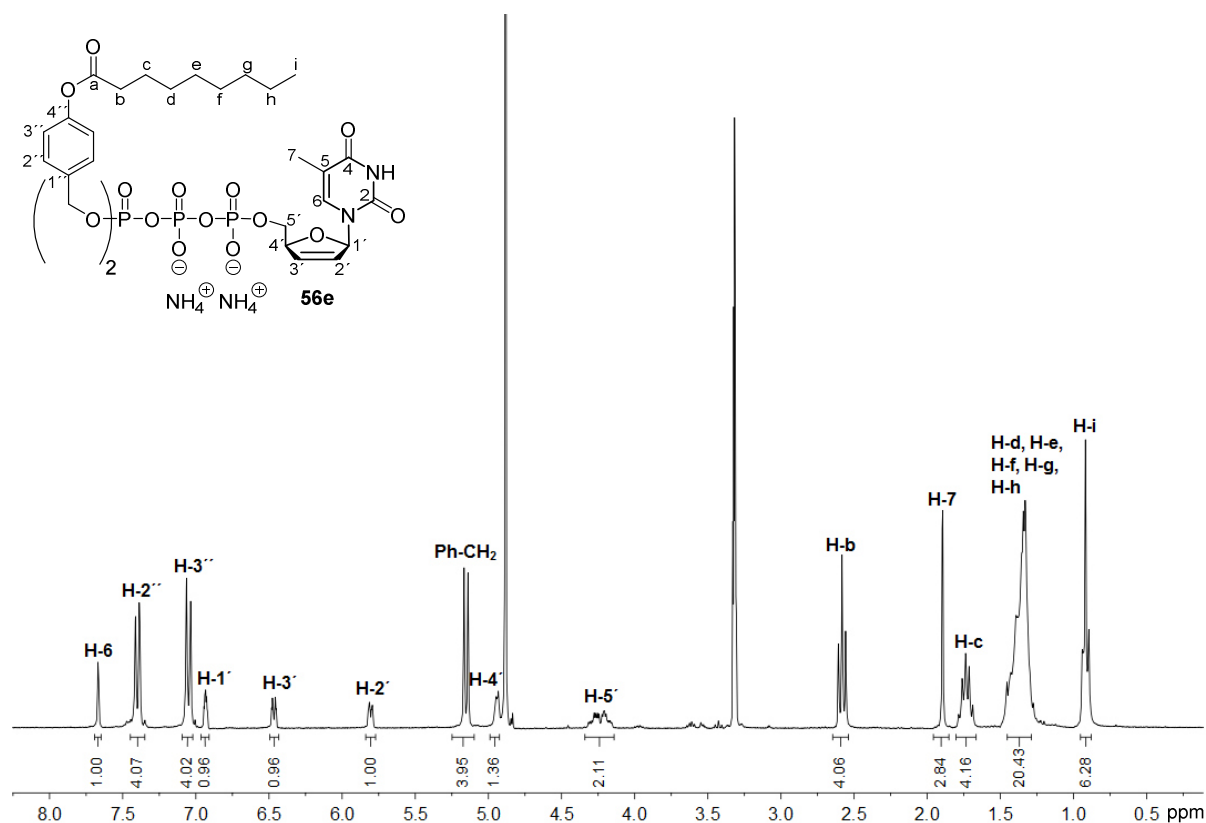


Abb. 54: ¹H-NMR-Spektrum des TriPPPro-d4TTPs **56e** (MeOD-*d*₄, 300 MHz).

Das ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 55) beinhaltet Kohlenstoffatome sowohl der Masken als auch des Nucleosids. Allerdings sind aufgrund der schwachen Intensität der Signale keine quartären Kohlenstoffatome erkennbar, weshalb deren Zuordnung, wie im Experimentellen Teil dieser Arbeit angegeben, über die 2D-Methode HMBC erfolgte. Die in Abbildung 55 hervorgehobenen J_{CP} -Kopplungen bekräftigen die erfolgreiche Isolierung der gewünschten Zielverbindung. Dabei sei das Dublett eines Dubletts des benzylichen Kohlenstoffs erwähnt, das sowohl aus einer $^2J_{\text{CP}}$ - als auch einer $^4J_{\text{CP}}$ -Kopplung zum γ - bzw. β -Phosphat resultiert.

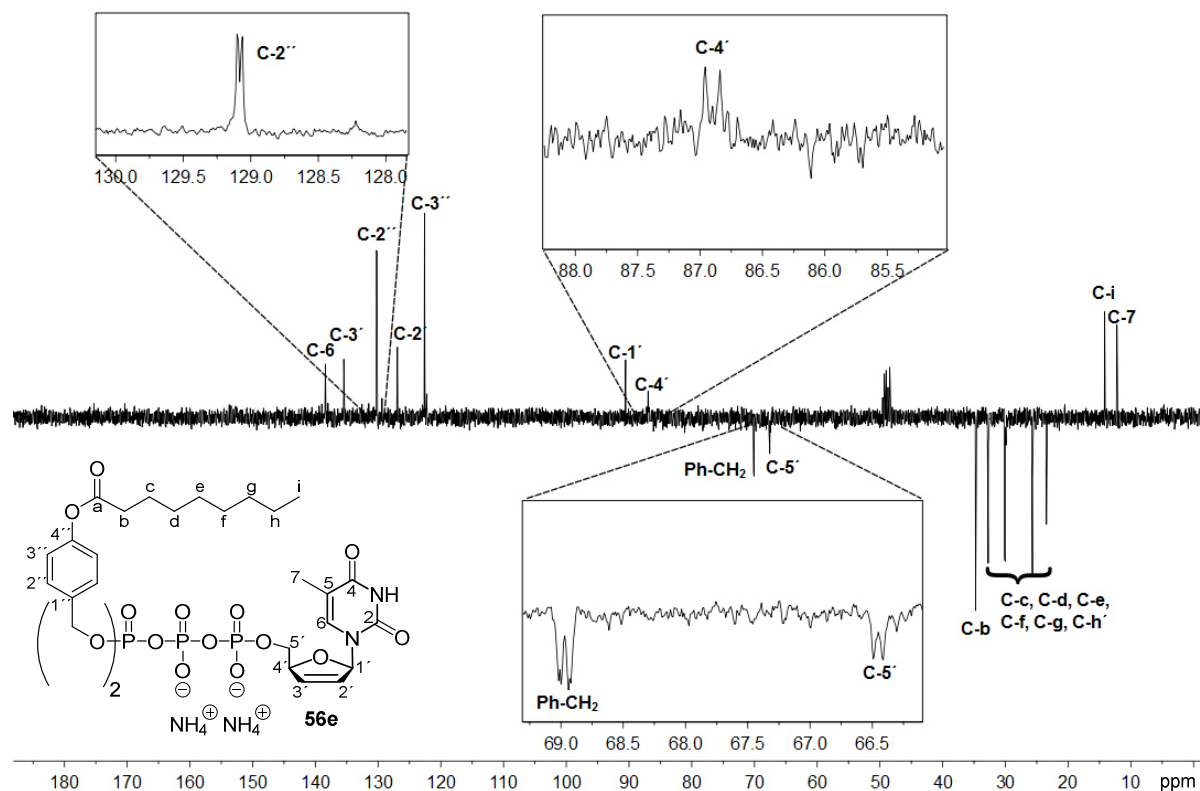


Abb. 55: ^{13}C -NMR-Spektrum des TriPPPPro-d4TTPs **56e** (MeOD- d_4 , 75 MHz).

Das in Abbildung 56 dargestellte ^{31}P -NMR-Spektrum rundet die NMR-Spektroskopie als Analysemethode ab. Es zeigt die charakteristischen Aufspaltungen zweier Dubletts für das α - und γ -Phosphat sowie ein Pseudo-Triplett des β -Phosphats, wobei auch in Ausnahmen das erwartete Dublett eines Dubletts erkannt werden konnte. Die Zuordnung von α - und γ -Phosphat erfolgte bereits von SCHULZ^[78] durch Aufnahme eines $^1\text{H},^{31}\text{P}$ -COSY-Spektrums und wurde im Rahmen dieser Arbeit bestätigt.

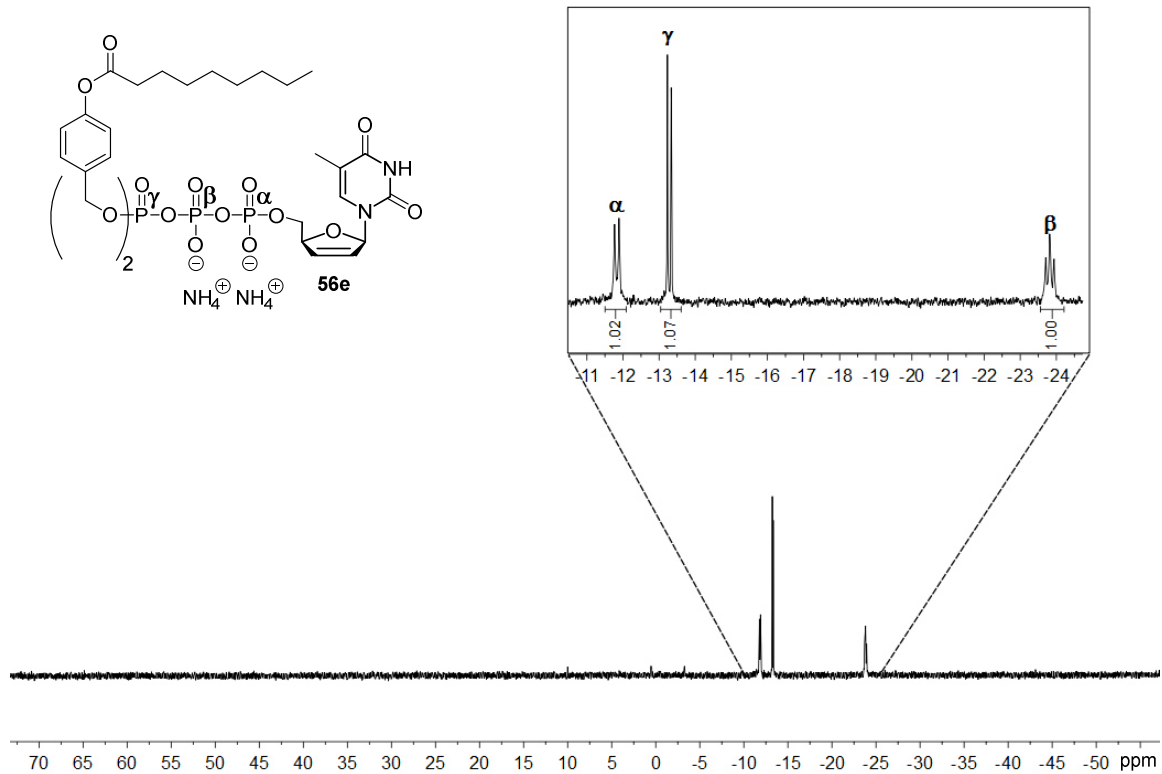


Abb. 56: ^{31}P -NMR-Spektrum des TriPPPro-d4TTPs **56e** (MeOD- d_4 , 162 MHz, entkoppelt).

Die massenspektrometrische Analyse gestaltete sich schwierig. Während die *Elektrospray-ionisations*-Technik (ESI $^{+/-}$) keinerlei verwertbare Resultate lieferte, wurde versucht, reproduzierbare Ergebnisse mit der schonenderen *Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation* (MALDI) zu produzieren. Aber selbst mit dieser vergleichsweise milden Ionisierungsmethode wurde der Großteil der Zielverbindung fragmentiert, sodass primär die Zerfallsprodukte, wie Intermediat **57**, Phosphatdiester **109e**, d4TDP **15** und d4TTP **16**, detektiert wurden. Eine Variation der Ionisierungsenergie sowie die Verwendung unterschiedlicher Matrizen (9AA, DHB) führten zu keiner Verbesserung der Ergebnisse. Nichtsdestotrotz war im MALDI-Massenspektrum durchgehend auch eine Detektion des entsprechenden Prodrugs **56** möglich. Als Beispiel ist in Abbildung 57 das MS-Spektrum des Bis(nonanoyloxybenzyl)-d4TTPs **56e** gezeigt.

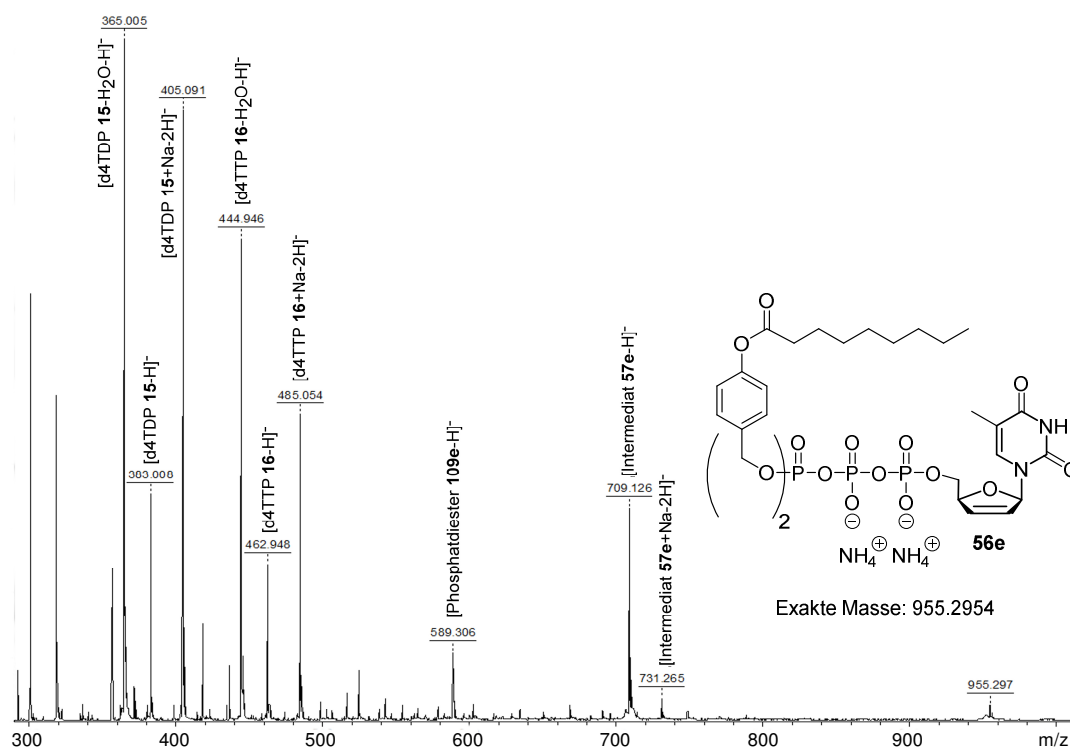


Abb. 57: MALDI-Massenspektrum des TriPPPro-d4TTPs **56e** (Matrix: 9AA).

4.1.5 Synthese eines Bis(nonanoyloxybenzyl)-d4TDP-Prodrugs

Um in den bevorstehenden Analysemethoden zur Charakterisierung des Hydrolyseverhaltens sowie der antiviralen Aktivität eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu den DiPPPro-Verbindungen **74** gewährleisten zu können, wurde die Präparation eines exemplarischen DiPPPro-d4TDPs **74e** als vorteilhaft empfunden. Die Synthese der hierfür benötigten Reagenzien wurde bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben. Die Kupplungsreaktion zwischen dem Phosphoramidit **75e** und d4TMP **13** zum Diphosphat-Prodrug **74e** wurde unter den für die Synthese von d4T-Triphosphat-Prodrugs **56** (Kapitel 4.1.4) optimierten Bedingungen durchgeführt (Abb. 58).

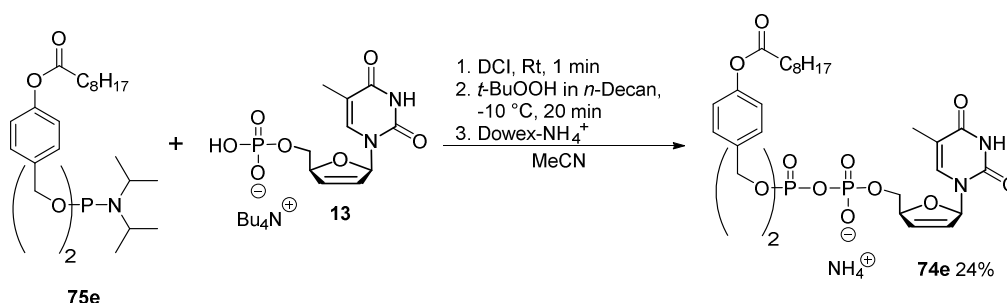


Abb. 58: Darstellung eines DiPPPro-d4TDPs **74e** nach der für d4T-Triphosphat-Prodrugs **56** optimierten Vorschrift.

Allerdings wurde das Prodrug **74e** nur in einer Ausbeute von 24% erhalten. Die geringe Ausbeute ist sowohl auf eine nicht vollständige Umsetzung des Edukts **13** als auch auf die fehlende Berücksichtigung von Mischfraktionen des Produkts mit dem erneut zu beobachtenden Phosphatdiester **109** zurückzuführen. Auf einen Neustart der Reaktion in Analogie zu den langkettigen TriPPPro-Verbindungen, um einen quantitativen Umsatz zu erzielen, wurde verzichtet, da der Fokus allein auf der Isolierung des Prodrugs **74e** für die besagten analytischen Zwecke lag. Somit kann resümiert werden, dass sich die synthetischen Bedingungen der TriPPPro-Verbindungen sowie die automatisierte chromatographische Reinigung mithilfe des Puriflashed auf die DiPPPro-d4TDP-Prodrugs übertragen lassen.

4.2 Hydrolyseverhalten der d4TTP-Prodrugs

Nach der erfolgreichen Darstellung einer Reihe der TriPPPro-d4TTP **56a-q** sollte deren hydrolytisches Verhalten in verschiedenen Medien untersucht werden. Basierend auf der Zielsetzung, die intrazellulären Phosphorylierungsschritte vollständig zu umgehen, wurde eine maximale intrazelluläre Freisetzung des d4T-Triphosphats **16** angestrebt. Außerdem sollte eine hohe extrazelluläre Stabilität erzielt werden.

Zur Simulation der *In-vivo*-Bedingungen wurden verschiedene Hydrolyseansätze verfolgt: Erstens wurde die chemische Stabilität bei einem physiologischen pH-Wert von 7.3 im Phosphatpuffer (*phosphate buffered saline*, PBS) analysiert. Zweitens wurde eine potenzielle enzymatische Aktivierung durch die Verwendung von CEM/0-Zellextrakten untersucht, um die intrazelluläre Metabolisierung der Prodrugs möglichst realitätsnah zu simulieren. Drittens wurden, um die enzymatische Initiierung des Hydrolysemechanismus von Triphosphat-Prodrugs **56** zu verdeutlichen, Analysen mit dem isolierten Enzym Schweineleberesterase (*pig liver esterase*, PLE) durchgeführt.

Die Verfolgung der Hydrolysen und die Quantifizierung der Abbauprodukte wurden unter Verwendung der HPL-Chromatographie durchgeführt. Bedingt durch das bereits bei der Reinigung der Prodrugs **56** beobachtete unterschiedliche Elutionsverhalten waren Anpassungen der HPLC-Methoden an die jeweiligen Verbindungen notwendig. Die Details der unterschiedlichen Methoden sind dem Experimentellen Teil dieser Arbeit zu entnehmen. Allerdings sei erwähnt, dass für die Analyse überwiegend die HPLC-Methode A (RP18) mit einem Tetra-*n*-butylammoniumlaufpuffer eingesetzt wurde, da sie eine Basislinientrennung und Identifikation aller nukleosidischen Hydrolyseprodukte gewährleistete. Bei den kurz-kettigen d4TTP-Prodrugs **56a**, **56b** und **56l** kam es jedoch durch die ähnlichen Retentionszeiten der Prodrugs **56**, deren Intermediate **57** und d4TTP **16** zu einer Überlagerung der Peaks. Da sich Experimente mit der hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC) bei den besagten Hydrolysen wegen Peakverbreiterungen, unkontinuierlicher Retentionszeiten

und Überlagerungen nicht bewähren konnten, wurde alternativ unter Verwendung einer RP18-Säule Triethylammoniumacetat als Ionenpaarreagenz verwendet. Dadurch eluierten zwar d4TDP **15** sowie d4TTP **16** zeitgleich und teilweise überlagernd mit dem Injektionspeak, jedoch war eine Bestimmung der Halbwertszeiten der Prodrugs **56a**, **56b** und **56l** sowie deren Intermediate **57a**, **57b** und **57l** möglich.

Des Weiteren war im Fall des Prodrugs **56j** mit R= C₁₇H₃₅ bei Verwendung einer RP18-Säule in Kombination mit der HPLC-Methode A keine Elution möglich. Daher wurde die Interaktion der Verbindung **56j** mit der stationären Phase verringert, indem eine RP8-Säule zur Analyse eingesetzt wurde (HPLC-Methode C).

4.2.1 Hydrolyseverhalten der d4TTP-Prodrugs in Phosphatpuffer (PBS, pH 7.3)

Die rein chemische Untersuchung des Hydrolyseverhaltens in PBS stellte ein unnatürliches System dar. Jedoch sollte sie erste Hinweise auf die Stabilität von Prodrugs im extrazellulären Medium im Organismus, in dem die chemische Hydrolyse eine relevante Rolle einnimmt, in Abhängigkeit von der Lipophilie und Modifikation der Maskierungseinheiten liefern. Hierbei wurden Proben der zu analysierenden Verbindungen in Phosphatpuffer bei pH 7.3 angesetzt und über mehrere Wochen bis Monate bei 37 °C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben zur Analyse mittels HPL-Chromatographie entnommen. Dadurch waren zum einen die Identifikation der Hydrolyseprodukte und zum anderen die Bestimmung der Kinetik der stattfindenden Abbaureaktionen durch Integration der Peakflächen möglich.

Wie bereits einleitend beschrieben, konnte SCHULZ für DiPPro-d4TDP **74** einen direkten Einfluss der aliphatischen Reste auf die Stabilität feststellen: Je länger Alkylketten des Prodrugs waren, desto höher fiel auch dessen Stabilität aus. Allerdings wirkten sich die erhöhten Hydrolysehalbwertszeiten auch negativ auf die Produktbildung aus, da vermehrt eine Hydrolyse der Phosphoranhydridbindung und somit die Freisetzung des unerwünschten d4TMPs **13** beobachtet werden konnten. Im Umkehrschluss setzten dagegen die DiPPro-Verbindungen **74**, die eine geringere Stabilität aufwiesen, bevorzugt das erwünschte d4TDP **15** frei. Außerdem erwiesen sich die Phosphoranhydridbindungen der nach Abspaltung der ersten Maskierungseinheit erhaltenen Intermediate als wesentlich hydrolysestabiler, was letztendlich die Bildung des d4TDPs **15** begünstigte. Als Ursache dafür war die zusätzliche negative Ladung am β-Phosphat anzunehmen, die einen nukleophilen Angriff unterbindet.

Im Fall der TriPPro-d4TTP **56** müssen die zusätzliche Phosphoranhydridbindung und die aus deren Bruch resultierende Nebenreaktion Berücksichtigung finden. Damit wäre die Bildung von drei phosphorylierten d4T-Metaboliten über verschiedene Hydrolysewege denkbar, die in Abbildung 59 zusammengefasst sind. Neben einer hohen chemischen

Stabilität der Prodrugs **56** und in geringerem Umfang stattfindenden Spaltung der energiereichen Anhydridbindungen, die zur Freisetzung von d4TDP **15** (Weg B) und d4TMP **13** (Weg C) führen, wurde eine Begünstigung der Bildung des Intermediats **57** (Weg A) erhofft. Für die Abspaltung der ersten Maske ist eine Hydrolyse der Acylesterfunktion mit anschließender spontaner 1,6-Eliminierung (Weg A) beschrieben.^[72] Unter der Voraussetzung, dass bei einer Halbwertszeit von $t_{1/2}(1)$ das intermediär gebildete monomaskierte Prodrug **57** aufgrund der Repulsionswirkungen der drei vorliegenden negativen Ladungen keine Hydrolyse der Phosphoranhydridbindungen erlaubt, soll es schließlich mit einer zweiten Halbwertszeit $t_{1/2}(2)$ zur Freisetzung des d4TTPs **16** kommen.

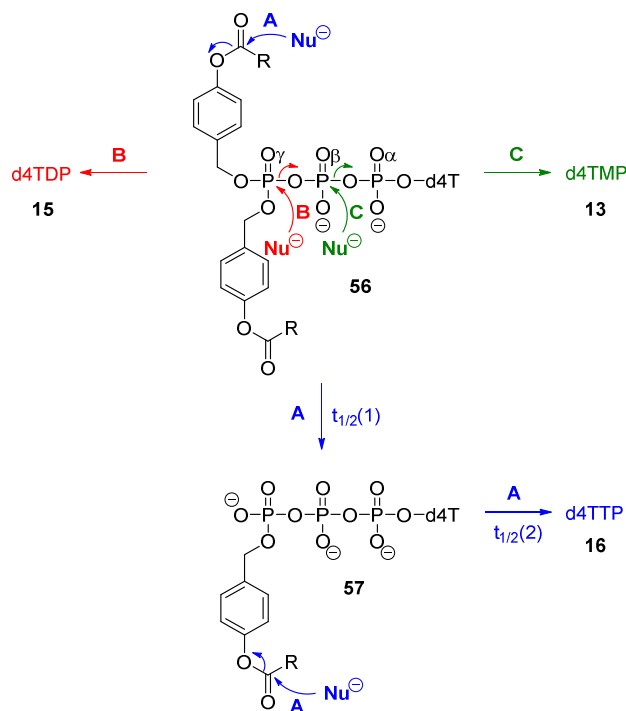


Abb. 59: Potenzielle Hydrolysewege von TriPPPro-d4TTP **56**.

In Abbildung 60 ist exemplarisch die Hydrolyse in Phosphatpuffer des d4TTP-Prodrugs **56e** mit $R = C_8H_{17}$ dargestellt. Die Zuordnung aller Hydrolyseprodukte erfolgte durch Coinjektion, da unter anderem auch das Intermediat **57e** im Vorwege erfolgreich synthetisiert werden konnte (Kapitel 4.1.2). Das Wasserfalldiagramm zeigt Chromatogramme der zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben. Es ist eine deutliche Abnahme des Prodrugs **56e** mit gleichzeitiger Freisetzung des einfachmaskierten Intermediats **57e** zu beobachten. Außerdem ist schon frühzeitig die Bildung von d4TDP **15** zu erkennen, was gemäß dem Hydrolyseweg B in Abbildung 59 einen Bruch der Phosphoranhydridbindung zwischen dem β - und γ -Phosphat vermuten lässt. Erwartungsgemäß ist eine signifikante Abhängigkeit der freigesetzten Menge des d4TDPs **15** von der Menge des vorliegenden Prodrugs **56e** feststellbar. Nach der beinahe vollständigen Hydrolyse des Prodrugs **56e** nach

263 Stunden kommt es nur noch zu einer geringen Zunahme der Peakfläche von d4TDP **15**. Diese Beobachtung stützt die Annahme, dass das d4TDP **15** aufgrund der unzureichenden repulsiven Wirkung gegenüber Nukleophilen nahezu ausschließlich aus dem doppelt-maskierten Prodrug **56e** resultiert. Im Vergleich dazu setzt das an den Phosphoreinheiten elektronenreichere Intermediat **57e** mit zunehmender Inkubationsdauer durch Abspaltung der zweiten Maske d4TTP **16** frei, das auch beim letzten gemessenen Wert bei 841 Stunden das vorwiegende Hydrolyseprodukt darstellt. Für den publizierte Hydrolyseweg A spricht dabei die erfolgreiche Detektion des 4-Hydroxybenzylalkohols **37**, der aus der Hydrolyse des freigesetzten reaktiven Chinonmethids **36** hervorgeht. Der Bruch der durch die zwei negativen Ladungen gut abgeschirmten Phosphoranhydridbindung zwischen dem α - und β -Phosphat nahm bei allen durchgeführten Hydrolysestudien nur eine untergeordnete Rolle ein. Dieser Umstand ist an der geringen Menge von d4TMP **13** zu erkennen, die während der in Abbildung 60 gezeigten Studie freigesetzt wird. Dabei ist, bedingt durch die lange Hydrolysedauer, allerdings auch von einer langsamen chemischen Dephosphorylierung von d4TDP **15** (HWZ= 1152 Stunden) und d4TTP **16** (HWZ= 1440 Stunden) auszugehen.

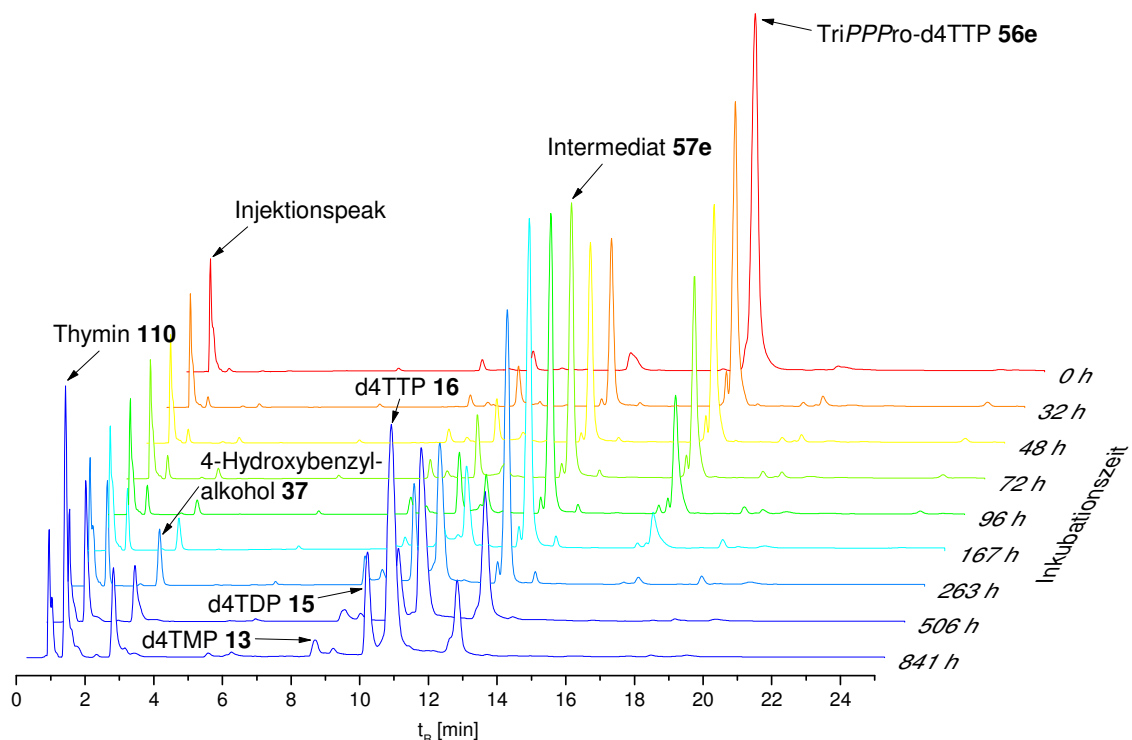


Abb. 60: Hydrolyseverlauf des d4TTP-Prodrugs **56e** in PBS bei pH 7.3 (HPLC-Methode A, 266 nm).

Als nachteilig stellte sich der Einsatz von d4T **3** als Modellverbindung heraus. Die Detektion der Nukleobase Thymin **110** offenbart, dass eine chemische Stabilität des Nukleosids über Wochen nicht gegeben ist. Allerdings ergab eine Untersuchung des Hydrolyseverhaltens von

d4T **3** einen linearer Zerfall, weshalb der Bruch der glykosidischen Bindung keinen Einfluss auf die Berechnung der Halbwertszeiten der Prodrugs **56** hat.

Um die Größenordnung der konkurrierenden Hydrolysereaktionen zu visualisieren, wurden die Peakflächen der Ausgangsverbindung **56e** sowie deren Hydrolyseprodukte gegen die Hydrolysedauer aufgetragen (Abb. 61). Die dafür benötigten Daten wurden aus einem zweiten Hydrolyseansatz gewonnen, sodass der Untersuchungszeitraum noch erweitert werden konnte und gleichzeitig die Reproduzierbarkeit des Experiments verdeutlicht werden kann. In Analogie zu Abbildung 60 ist in Abbildung 61 die bevorzugte Freisetzung von d4TTP **16** aus dem Intermediat **57e** zu erkennen. Diese Beobachtung soll bei der Analyse der zweiten Halbwertszeit näher diskutiert werden (S. 74). Darüber hinaus ist die bereits vermutete Abhängigkeit der Zunahme an d4TDP **15** von der vorliegenden Menge des d4TTP-Prodrugs **56e** festzustellen.

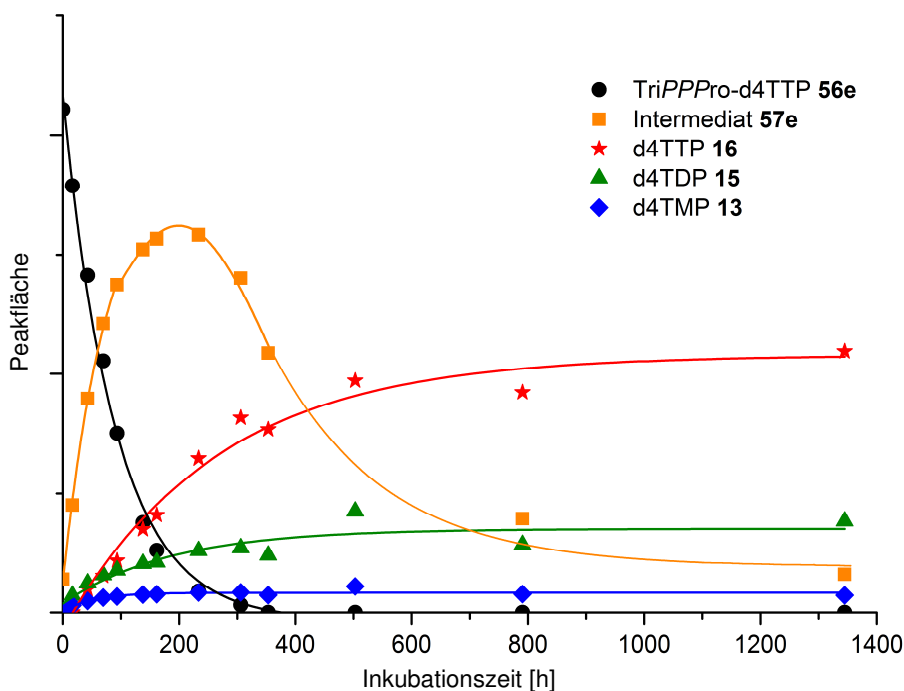


Abb. 61: Verlauf der Hydrolyse des d4TTP-Prodrugs **56e** in PBS bei pH 7.3.

Entsprechend der bisher vorgestellten Verbindungen **56e** und **57e** wurden auch alle anderen synthetisierten d4T-Triphosphat-Prodrugs **56a-q** und **57a,j** im PBS-Medium untersucht. Die ermittelten chemischen Halbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ sind in Abbildung 62 als Säulendiagramm aufgeführt. Die Daten wurden überwiegend aus einmalig durchgeführten Experimenten erhalten. Im Folgenden sollen zunächst die ersten Halbwertszeiten vorgestellt und diskutiert werden, bevor explizit auf die zweiten Hydrolysehalbwertszeiten (S. 74). eingegangen wird.

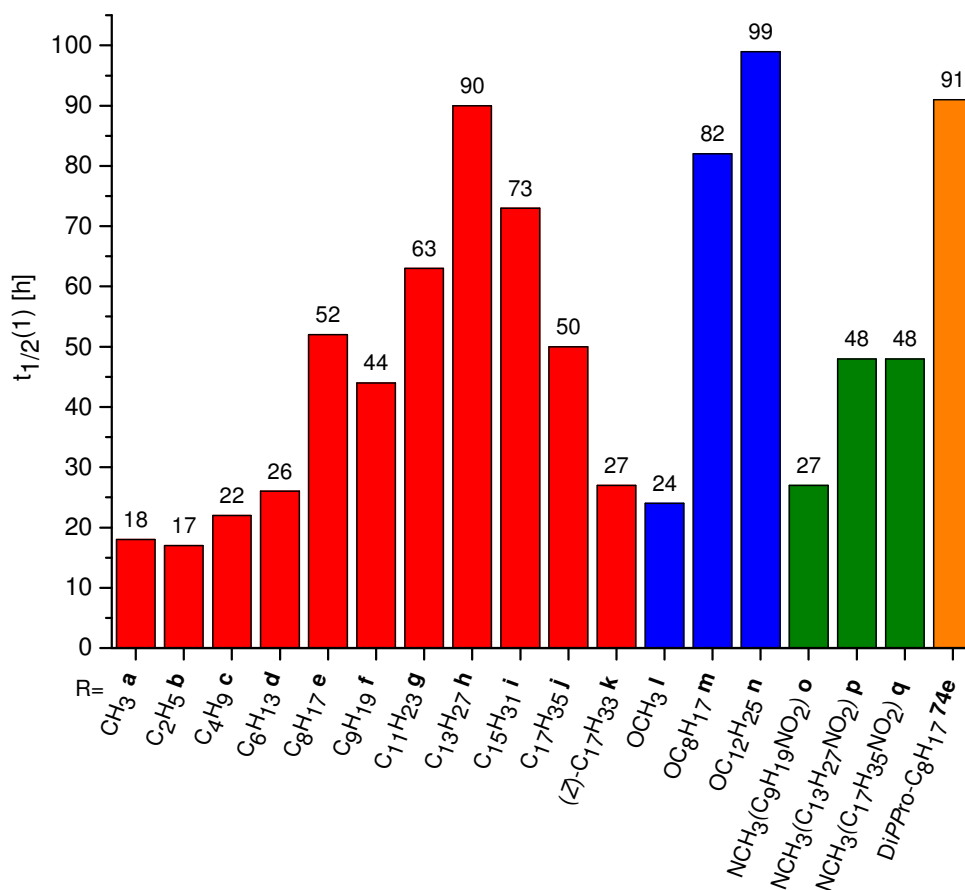


Abb. 62: Erste Hydrolysehalbwertszeit der TriPPPro-d4TTP **56a-q** und des DiPPPro-d4TDPs **74e** in PBS bei pH 7.3.

Erwartungsgemäß ist zumindest bis zu Prodrug **56h** eine tendenzielle Zunahme der Stabilität mit ansteigender Kettenlänge zu erkennen. Für die abweichende erhöhte Halbwertszeit des Prodrugs **56e** mit R= C₈H₁₇ konnte keine Ursache gefunden werden. Eine Wiederholung des Hydrolyseexperiments führte zu einem Ergebnis im Bereich der Fehlertoleranz (HWZ= 56 h). Eine schrittweise Abnahme der Halbwertszeiten tritt jedoch ab einer Kettenlänge von R= C₁₅H₃₂ auf. Diese Beobachtung beruht aller Voraussicht nach auf dem Löslichkeitsverhalten der Verbindungen im wässrigen Medium. Durch deren amphiphilen Charakter kommt es zur Formierung von Mizellen. Im hydrophoben Kern wird zwar die Spaltung der Acylesterfunktion verlangsamt, die Phosphoranhydridbindungen an der hydrophilen Oberfläche erfahren dagegen eine geringere Abschirmung vor nukleophilen Angriffen. Dies würde auch den vermehrt auftretenden hydrolytischen Bruch der Bindung zwischen dem β - und γ -Phosphat und die bevorzugte Bildung von d4TDP **15** erklären (Abb. 63).

Eine andere räumliche Orientierung des lipophilen Rests und ein verbesserter nukleophiler Angriff auf die zu spaltende Esterfunktion könnten bei dem Ölsäurederivat **56k** (R= C₁₇H₃₃) für die Verringerung der Stabilität verantwortlich sein. Folglich wirkt sich das Vorliegen von einer Doppelbindung signifikant auf das Hydrolyseverhalten aus. Dementsprechend waren

zwar eine verglichen mit dem TriPPPro-d4TTP **56j** (gleiche Kettenlänge) niedrigere Halbwertszeit von 27 Stunden, aber auch ein erhöhter Anteil an d4TTP **16** festzustellen (Abb. 63).

Um zu veranschaulichen, inwieweit die Kettenlänge einen Einfluss auf die Menge von durch Hydrolyse freigesetztem d4TDP **15** hat, sind in Abbildung 63 die prozentualen Anteile der dominierenden nukleosidischen Hydrolyseprodukte nach dem vollständigen Abbau der jeweiligen TriPPPro-Verbindung **56** dargestellt. Da die freigesetzte Menge von d4TMP **13** durchgehend vernachlässigbar klein ausfiel, wurde diese nicht in das Säulendiagramm aufgenommen. Außerdem spielt die chemische Dephosphorylierung von d4TTP **16** zu d4TDP **15** in diesem Zeitrahmen keine relevante Rolle.

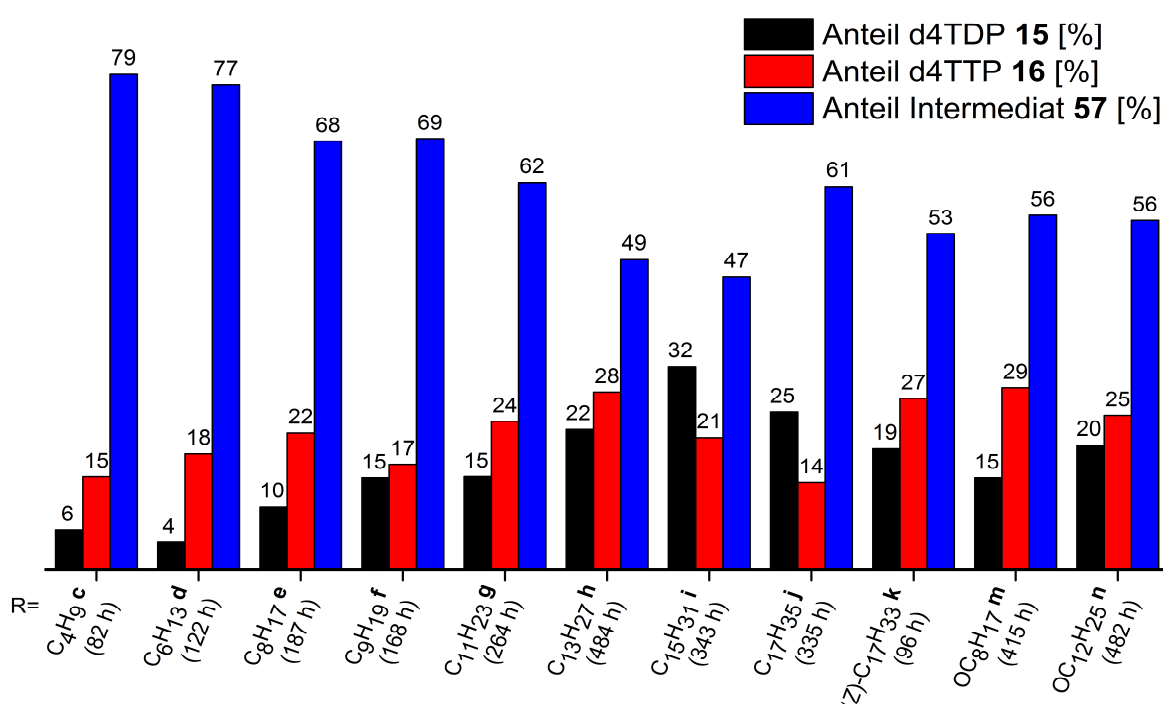


Abb. 63: Prozentuales Verhältnis der nukleosidischen Hydrolyseprodukte von d4TTP-Produgs **56** in PBS bei pH 7.3 nach dem vollständigen Verbrauch von **56** (in Klammern: Inkubationsdauer).

Korrelierend mit den Hydrolysehalbwertszeiten weichen die Inkubationszeiten bis zu einem vollständigen Abbau des TriPPPro-d4TTPs **56** deutlich voneinander ab. Eine Aufführung der Prodrugs mit kurzen Resten **56a,b,i** konnte nicht vorgenommen werden, da die für derartige Verbindungen verwendete HPLC-Methode B keine vollständige Separation des Injektionspeaks von d4TDP **15** und d4TTP **16** gewährte. Es ist aber aufgrund einer schnellen Aktivierung anzunehmen, dass aus den kurzkettingen TriPPPro-d4TTP **56a,b,i** nahezu selektiv das dazugehörige Intermediat **57a,b,i** und somit nur eine geringe Menge von d4TDP **15** freigesetzt wurden. Dieser Umstand wird durch die übrigen Verbindungen verdeutlicht, die eine Zunahme des d4TDP-Anteils mit steigender Kettenlänge aufweisen.

Dies unterstreicht, dass die Hydrolyse der Phosphoranhydridbindung der TriPPP-Pro-Verbindungen als Konkurrenzreaktion mit einer Erhöhung der Lipophilie und entsprechend schlechterer Löslichkeit an Bedeutung gewinnt. Bei der Bewertung der Ergebnisse aus Abbildung 63 ist zu beachten, dass sich die Zunahme des d4TDP-Anteils durch den exponentiellen Abbau des TriPPP-Pro-d4TTPs **56** mit zunehmender Hydrolysedauer verlangsamt. Gleichzeitig erhöht sich aber durch die Hydrolyse des Intermediats der Anteil an d4TTP **16** (2. HWZ, S. 74). Dementsprechend ist die Freisetzung von d4TDP **15** aus den Prodrugs **56** vor allem in der frühen Phase der chemischen Hydrolyse von Relevanz, in der große Mengen des Prodrugs **56** vorliegen. Dieses Phänomen lässt sich an den Verbindungen **56c-h** erkennen, bei denen eine höhere Halbwertszeit zur einer verstärkten Freisetzung von d4TDP **15** führt. Ausnahmen bilden die langkettigen TriPPP-Pro-d4TTP **56i** und **56j**. Trotz geringer Hydrolysehalbwertszeiten kommt es zu einer vermehrten Bildung von d4TDP **15**. Dieses Phänomen wird auf die bereits beschriebene Formierung von Mizellen zurückgeführt (S. 65).

Zusammenfassend konnten für die aliphatisch maskierten d4TTP-Prodrugs **56a-k** bezüglich ihrer ersten Hydrolysehalbwertszeit dieselben Tendenzen wie für die entsprechenden DiP-Pro-Verbindungen **74** von SCHULZ beobachtet werden.^[77] Die Halbwertszeiten der d4TTP-Prodrugs **56** fielen mit Ausnahme des kurzkettingsten Vertreters **56a** geringer aus. Dies wird auch anhand des zur Kontrolle während dieser Testreihe untersuchten d4T-Diphosphat-Prodrugs **73e** belegt, das eine um 1.8-fach höhere Halbwertszeit als das analoge Triphosphat-Prodrug **56e** besitzt. Allerdings führte die mit zunehmender Kettenlänge begünstigte Mizellenbildung bei **56i** und **56j** zu einem Bruch der Phosphoranhydridbindung zwischen β - und γ -Phosphat und somit zu einem erhöhten Anteil an d4TDP **15**.

Die Untersuchungen der carbonatfunktionalisierten Prodrugs **56l-n** zeigen bei Betrachtung der ersten Halbwertszeit (Abb. 62, S. 65) die für die Prodrugs **56a-j** mit unmodifizierten Resten beschriebenen Tendenzen. Durch den elektronenschiebenden Effekt des zusätzlichen Sauerstoffatoms kommt es zu einer Verminderung der Elektrophilie am Carbonylkohlenstoff und zu einer Stabilisierung der funktionellen Gruppe. Daraus resultiert bei der chemischen Hydrolyse bei pH 7.3 im Vergleich zu den aliphatischen d4TTP-Prodrugs gleicher Kettenlänge eine Erhöhung der Halbwertszeit.

Überraschende Resultate lieferten jedoch die carbamatfunktionalisierten Prodrugs **56o-q**. Trotz des Vorliegens zweier potenziell hydrolytisch spaltbarer Carbamatfunktionen in jeder Maske wurden für diese Prodrugs signifikant höhere Halbwertszeiten als für die bereits diskutierten Derivate erwartet. Denn Carbamatfunktionen weisen durch den aus der Mesomerie heraus resultierenden Doppelbindungscharakter eine hohe Hydrolysestabilität

auf. Im Widerspruch dazu standen die ermittelten Halbwertszeiten (Abb. 62, S. 65), die in der gleichen Größenordnung wie die der rein aliphatischen Prodrugs lagen. Zudem wiesen die beiden langkettigen Carbamat-Prodrugs **56p** und **56q** mit 48 Stunden die gleiche Halbwertszeit auf. Da auch die kontinuierliche Bildung der Intermediate **57** vermutet werden konnte, wie die Chromatogramme für das Prodrug **56o** zeigen (Abb. 64), wurde zunächst von einer erfolgreichen Initiierung der in Abbildung 48 (S. 49) vorgestellten Kaskadenreaktion oder einer Hydrolyse der neben den Aromaten befindlichen Carbamatfunktion ausgegangen. Jedoch konnte die Bildung des 4-Hydroxybenzylalkohols **37** nicht festgestellt werden, die nach dem postulierten Mechanismus angenommen wurde. Ebenso überraschend war die Tatsache, dass das mutmaßliche Intermediat **57o** auch nach 1416 Stunden (= 59 Tage) nicht weiter zu den d4T-Metaboliten d4TTP **16** oder d4TDP **15** hydrolysierte. Die ungewöhnlichen Beobachtungen ließen demzufolge einen alternativen Hydrolyseweg vermuten.

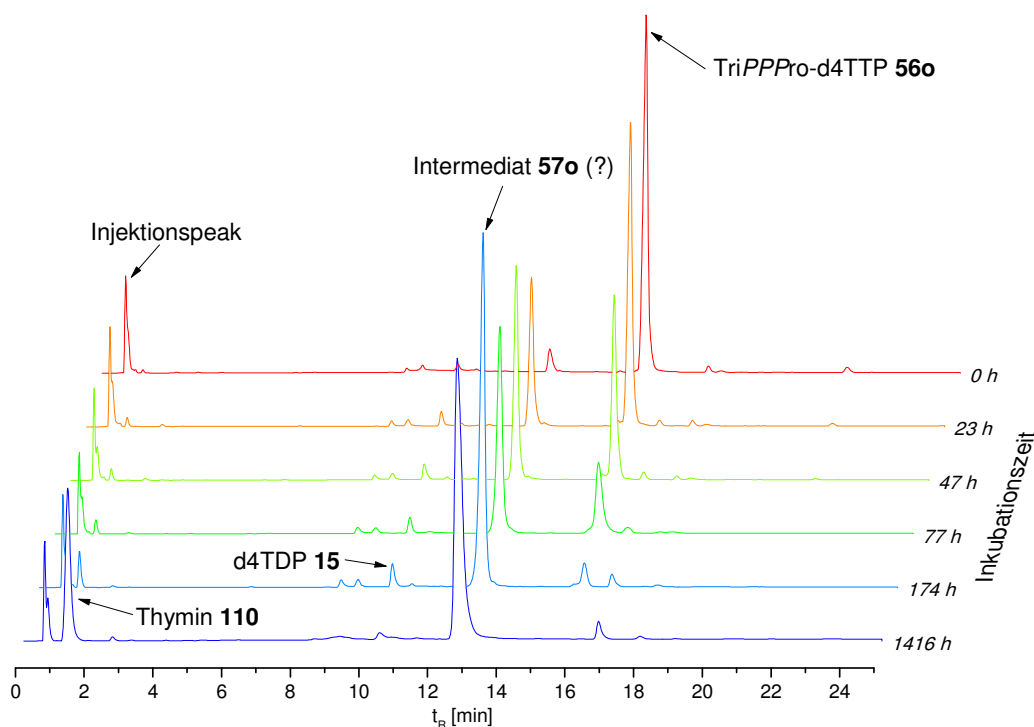


Abb. 64: Hydrolyseverlauf des Carbamat-d4TTP-Prodrugs **56p** in PBS bei pH 7.3 (HPLC-Methode A, 266 nm).

Ein erstes Indiz lieferte die Betrachtung derselben Chromatogramme bei einer Wellenlänge von 220 nm anstatt 266 nm (Abb. 65). Bei einer zur TriPPPPro-Verbindung **56o** ungleich höheren Retentionszeit von 16.8 min lässt sich deutlich ein zum potenziellen Intermediat **57o** simultan ansteigender Peak erkennen, dem durch Coinjektion die entsprechende intakte Carbamatmaske **76o** zugeordnet werden konnte. Bei einer Retentionszeit von 17.9 min ist der sich durch Hydrolyse der Phosphoranhydridbindung bildende Phosphatdiester **109o** zu vermuten.

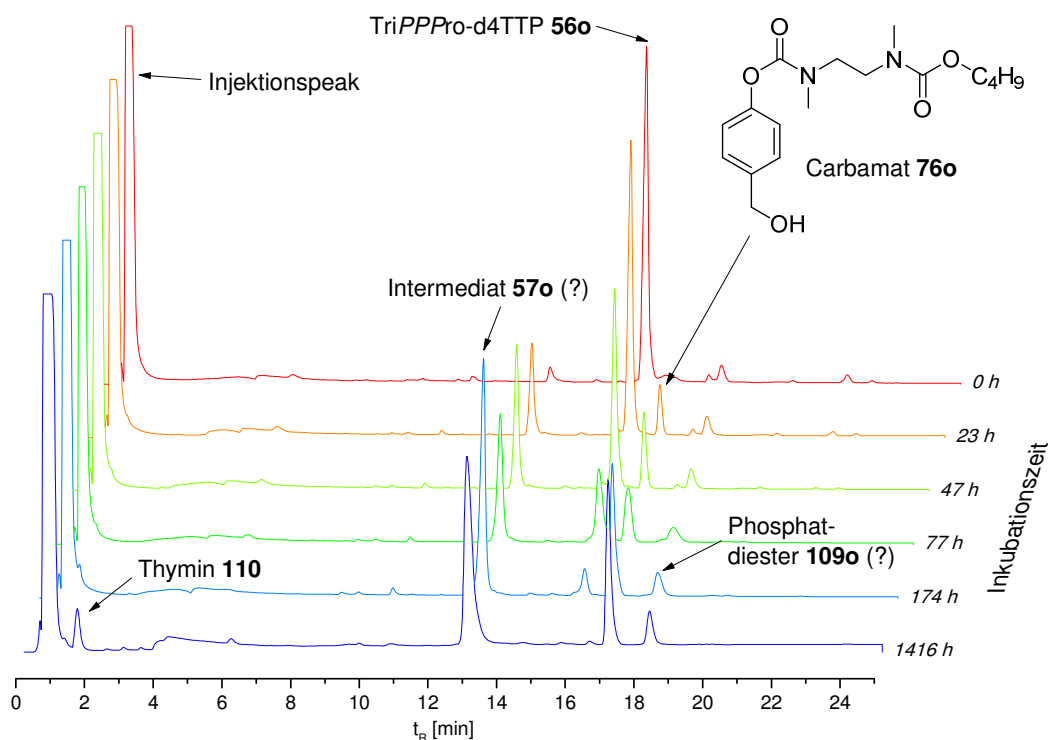


Abb. 65: Hydrolyseverlauf des Carbamat-d4TTP-Produgs **56p** in PBS bei pH 7.3 (HPLC-Methode A, 220 nm).

Während die Bildung des Phosphatdiesters **109o**, dessen eindeutiger Nachweis allerdings noch ausstand, begründbar erschien, galt es, einen plausiblen Mechanismus für die selektive Freisetzung des Carbamats **76o** zu formulieren. Dafür kamen entsprechend Abbildung 66 zwei Ansätze in Frage. So sind zwei unterschiedliche Substitutionsreaktionen aufgrund eines nukleophilen Angriffs eines Hydroxidions an der Benzylgruppe (Weg A) oder am γ -Phosphat (Weg B_a) denkbar. Allerdings ist die Hydrolysevariante B_a im Vergleich zu einer nukleophilen Substitution an der Benzylfunktion nach Hydrolyseweg A als unwahrscheinlicher einzuschätzen, da der Bruch der Phosphoranhydridbindung B_b thermodynamisch begünstigt sein müsste. Für die Variante A sind wiederum zwei Reaktionsmechanismen möglich: Erstens wäre nach einer nukleophilen Substitution erster Ordnung (S_N1) die Bildung eines mesomeriestabilisierten Benzylkations mit anschließender Addition von Wasser denkbar. Zweitens würde auch eine Hydrolyse nach einem S_N2-Mechanismus die Spaltung zum Intermediat **57o** erklären. Eine weitere Hydrolyse des Intermediats **57o** in Analogie zu Weg A würde durch die räumliche Nähe der erhaltenen negativen Ladung am γ -Phosphat zur Benzylfunktion verhindert werden. Ein Abbau des Intermediats **57o** über Weg B kann nach den bereits vorgestellten Ergebnissen bezüglich des Hydrolyseverhaltens von monomaskierten Prodrugs **57** ausgeschlossen werden. Folglich würde der Mechanismus A ebenso die hohe Stabilität von **57o** erklären.

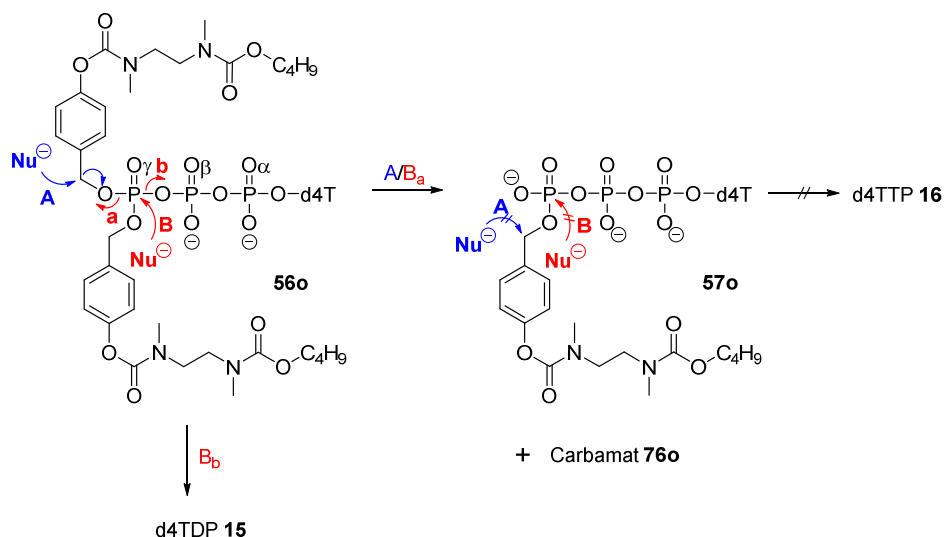


Abb. 66: Mögliche Hydrolysewege der Carbamate-d4TTP-Prodrugs **56p-q** in PBS bei pH 7.3.

Zur Aufklärung des Hydrolysemechanismus sollten eine NMR-Hydrolysestudie durchgeführt und die anschließend säulenchromatographisch isolierten Produkte charakterisiert werden. Dadurch sollte gleichzeitig eine eindeutige Zuordnung der Peaks in den Chromatogrammen ermöglicht werden.

Die ¹H-NMR-Verfolgung des Carbamate-Prodrugs **56o** unterstrich die These, dass die Carbamatefunktionen unter den vorliegenden Bedingungen keine hydrolytische Spaltung erfahren (Abb. 67). Weder die Bildung der potenziellen Hydrolyseprodukte, wie 4-Hydroxybenzylalkohol **37** oder 1,3-Dimethyl-2-imidazolidinon **103**, noch eine Verschiebung der carbamatnahen Protonen zwischen 4.3-0.9 ppm waren zu beobachten. Um eine gegenseitige Beeinflussung der Hydrolyseprodukte auf ihre chemische Verschiebung auszuschließen, wurden zur Kontrolle die beiden Verbindungen **37** und **106** einmal zusammen mit dem intakten Prodrug vermessen. Jedoch konnten anhand der Veränderungen der benzylichen Protonen wichtige Erkenntnisse über den Hydrolyseverlauf gewonnen werden: Mit dem Abbau des TriPPPro-d4TTPs **56o** (**B**) ging die Bildung des Intermediats **57o** (**C**), das in den gezeigten Spektren von einem nukleosidischen Proton überlagert wird, und des Carbamats **76o** (**A**) einher.

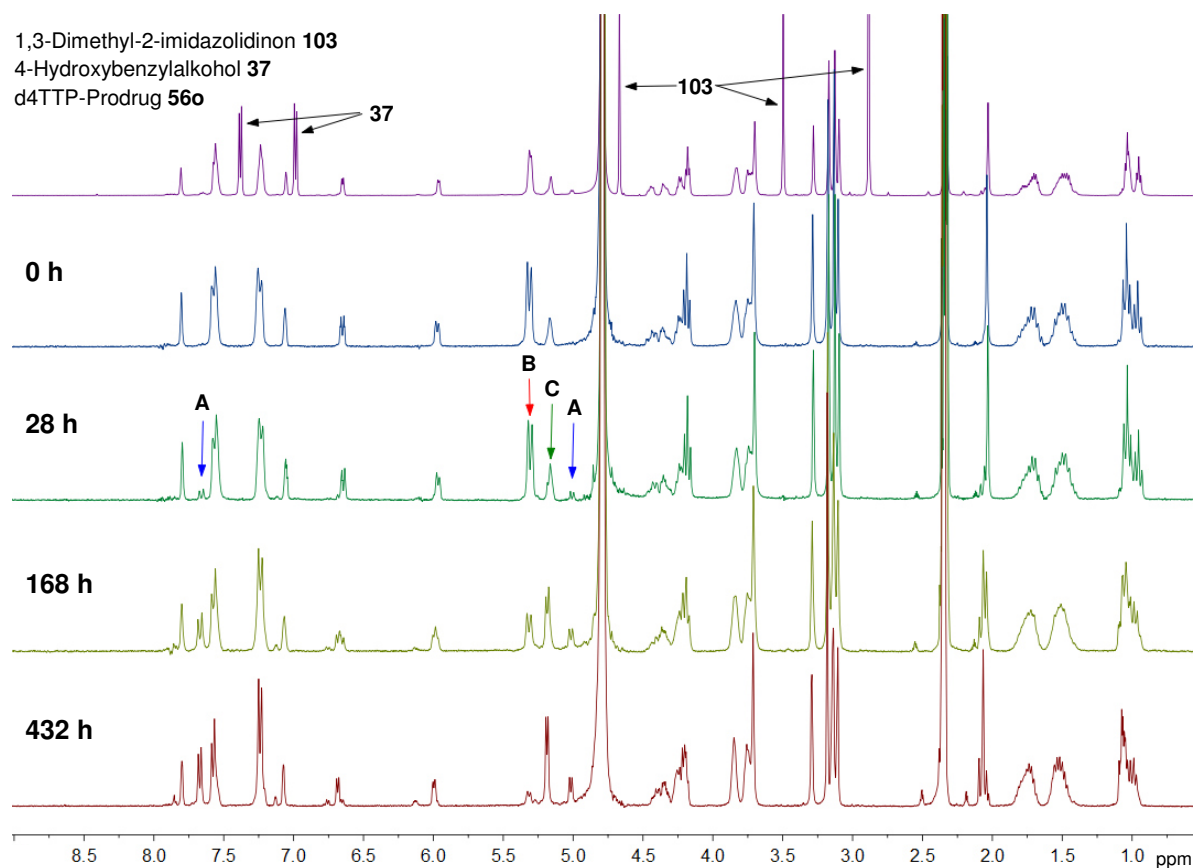


Abb. 67: Hydrolyseverlauf des Carbamat-d4TTP-Prodrugs **56o** in PBS bei pH 7.3 ($D_2O/Aceton-d_6$ 3:2, 400 MHz).

Korrelierende Resultate lieferten auch die dazugehörigen ^{31}P -NMR-Spektren, in denen neben geringen Mengen von d4TDP **15** lediglich die Freisetzung des Intermediats **57o** zu erkennen war. Die endgültige Aufklärung erbrachte die NMR-spektroskopische Analyse aller über Chromatographie isolierten Hydrolyseprodukte. Dadurch konnten die in den Abbildungen 64 und 65 noch in Frage gestellten HPLC-Peaks erwartungsgemäß dem Intermediat **57o** und dem Phosphatdiester **109o** zugeordnet werden.

Abschließend galt es, den exakten Hydrolysemechanismus aufzuklären. Für die Untersuchung erschien eine Isotopenmarkierung in Kombination mit Massenspektrometrie am praktikabelsten. Dafür wurde bei 37 °C die Hydrolyse des Carbamat-Prodrugs **56o** in einem DMSO/PBS (pH 7.3)-Gemisch durchgeführt, wobei sich der Puffer abweichend zu 85% aus $H_2^{18}O$ zusammensetzte. In Verbindung mit dem bereits gewonnenen Wissen über die auftretenden Hydrolyseprodukte war davon auszugehen, dass das ^{18}O -Sauerstoffisotop nach der hydrolytischen Spaltung des TriPPPPro-d4TTPs **56o** entweder am Carbamat **76o** oder am γ -Phosphat des einfachmaskierten Intermediats **57o** gebunden sein müsste. Tatsächlich konnten im Rohprodukt über ESI⁺-MS das Carbamat **76o** mit einer um zwei Masseneinheiten erhöhten Molekularen Masse (Abb. 68) nachgewiesen werden. Mittels MALDI-MS ließen sich zudem die phosphorylierten Verbindungen, wie das Intermediat **57o**,

d4TDP **15** und der Phosphatdiester **109o**, mit ihren natürlichen mittleren Massen detektieren. Es kann somit geschlossen werden, dass die Hydrolyse zur Freisetzung des Intermediats **57o** über eine an der Benzylgruppe stattfindende S_N -Reaktion erfolgt. Mit der aus der Abspaltung der ersten Maske resultierenden hohen Ladungsdichte nahe dem reaktiven Zentrum, in Kombination mit der hohen Stabilität der Carbamatfunktionen, lässt sich ebenso begründen, warum eine Hydrolyse der Carbamat-Intermediate **57o-q** nicht festgestellt werden konnte.

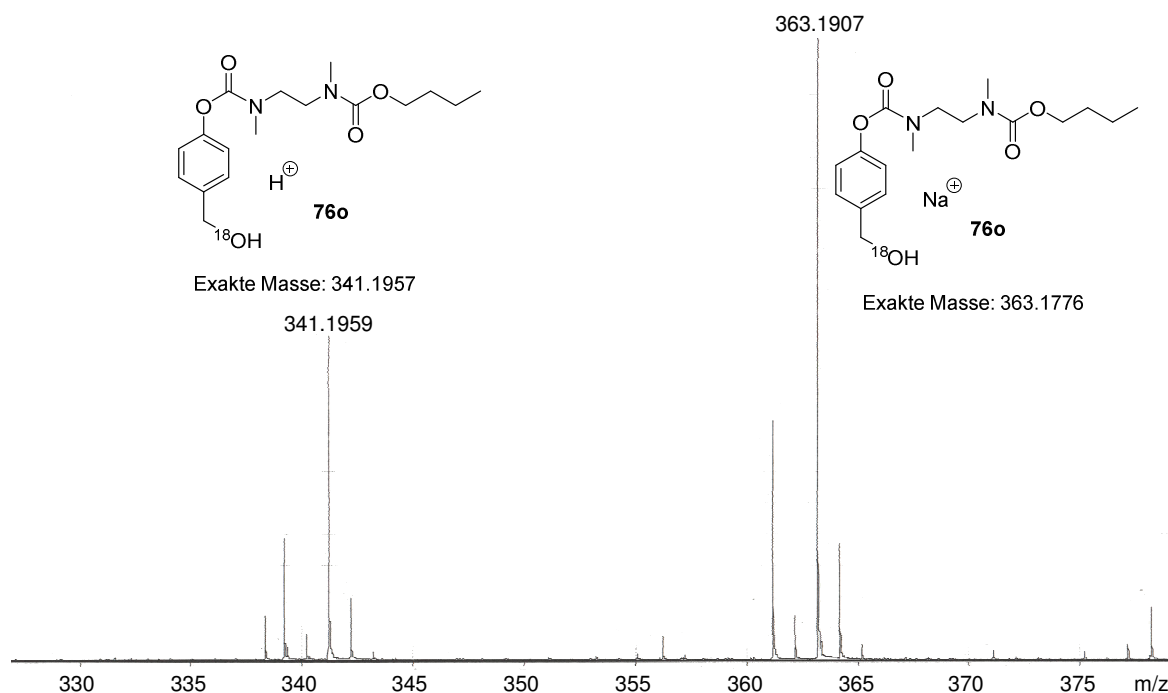


Abb. 68: ESI⁺-Massenspektrum nach der chemischen Hydrolyse des Carbamat-d4TTP-Prodrugs **56o** in DMSO/PBS (H₂¹⁸O, pH 7.3) bei 37 °C.

Folglich ist eine Spaltung der Carbamatfunktionen bei physiologischem pH-Wert von 7.3-7.4 nicht möglich. Jedoch ist in der Literatur eine Initiierung der Kaskadenreaktion im sauren Milieu beschrieben.^[105] Dementsprechend wurde eine Hydrolysestudie mit dem Carbamat-Prodrug **57p** unter Verwendung eines Phosphatpuffers bei pH 6.0 durchgeführt, dessen pH-Wert somit dem in Tumorgewebe entspricht. Allerdings konnten keine Auswirkungen des veränderten pH-Werts auf den Hydrolysemechanismus festgestellt werden.

Der Erfolg der biologisch abbaubaren Polymerstrukturen von DEWIT und GILLIES^[105] muss verglichen mit den Carbamat-TriPPPPro-d4TTP **56o-q** differenziert betrachtet werden, da das Entfernen der in der Literatur eingesetzten endständigen Boc-Schutzgruppe bei deutlich saureren Bedingungen vorgenommen wurde. Außerdem stellt Boc durch die Möglichkeit der Bildung eines tertiären Carbokations im Gegensatz zu aliphatischen Alkylketten eine sehr gute Abgangsgruppe dar. Auf eine Hydrolyse der Prodrugs **56o-q** bei niedrigeren pH-Werten

wurde verzichtet, da die Bedingungen in Bezug auf die Prodrugs nicht anwendungsspezifisch gewesen wären.

Natürlich galt es, der Vollständigkeit halber zu überprüfen, ob dieser Mechanismus auch bei den aliphatisch maskierten bzw. carbonatfunktionalisierten TriPPPPro-d4TTP-Prodrugs **56a-n** berücksichtigt werden muss. So wurden über HPLC bei den Chromatogrammen (220 nm) der entsprechenden Verbindungen **56** mit geringer Intensität die Phenylester **76** detektiert. Für eine exaktere Untersuchung der Hydrolyse wurde das Triphosphat-Prodrug **56e** für eine Woche in Analogie zu dem beschriebenen Experiment der Isotopenmarkierung in PBS (in H_2^{18}O) inkubiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom wurde das Rohprodukt massenspektrometrisch untersucht. Dabei konnten über MALDI-MS die mittleren Massen der phosphorylierten Metabolite, wie das Intermediat **57e**, d4TTP **16** und d4TDP **15**, detektiert werden. Die HRMS-ESI lieferte dagegen keine verwertbaren Ergebnisse. Es sei jedoch angemerkt, dass die ESI-Messtechnik generell für Verbindungen mit einer geringen Molekularen Masse (< 200 m/z) ungeeignet ist. Da in Bezug auf die Hydrolyse der Maskierungseinheit vor allem von dem kleinmassigen 4-Hydroxybenzylalkohol **37** als Spaltprodukt ausgegangen wurde, war dieses Resultat nicht überraschend. Als Alternative diene mit der Elektronenstoß-Ionisation (EI) die klassische Ionisationsmethode, über die neben einer geringen Menge des ^{18}O -markierten Phenylesters **76e** der ^{18}O -markierte 4-Hydroxybenzylalkohol **37** als Basispeak nachgewiesen werden konnte (Abb. 69). Unabhängig von dem hohen Grad der Fragmentierung beim EI kann geschlossen werden, dass auch die Hydrolyse der ersten Maskierungseinheit der TriPPPPro-d4TTP **56a-n** bevorzugt über eine nukleophile Substitution an der Benzylgruppe abläuft. Der 4-Hydroxybenzylalkohol **37**, dessen Bildung in den Chromatogrammen stets zu beobachten war, entstand folglich primär durch einen verzögert stattfindenden Zerfall des entsprechenden Phenylesters **76**.

Eine Bestätigung dieses Sachverhalts ergaben auch Untersuchungen mit einer asymmetrisch maskierten TriPPPPro-Verbindung (Kapitel 4.9). Es zeigte sich, dass die Geschwindigkeit der Abspaltung der ersten Maske nicht in dem Maße von der Konstitution des aliphatischen Rests abhängig ist, wie es nach dem postulierten Mechanismus zu erwarten gewesen wäre.^[72]

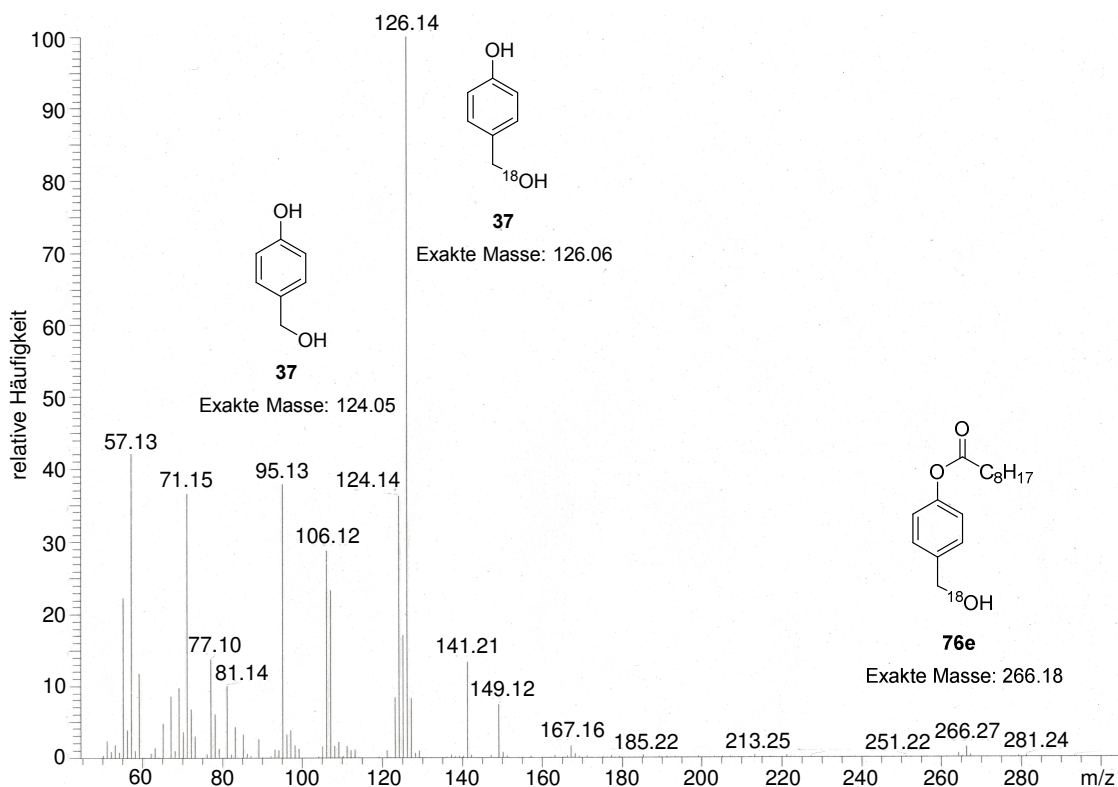


Abb. 69: EI-MS nach der chemischen Hydrolyse des d4TTP-Prodrugs **56e** in DMSO/PBS (H_2^{18}O , pH 7.3) bei 37 °C.

Nach der Bestimmung der ersten Hydrolysehalbwertszeit $t_{1/2}(1)$ der d4TTP-Prodrugs **56** in Phosphatpuffer und der Aufklärung des Hydrolysemechanismus sollte gleichermaßen der Abbau des monomaskierten Intermediats **57** mit $t_{1/2}(2)$ untersucht werden. Dafür musste zunächst die jeweilige TriPPPro-Verbindung **56** vollständig umgesetzt worden sein. Zum Vergleich sollten die drei synthetisch dargestellten Intermediate **56a,e,j** einer Hydrolyse unterzogen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 70 gezeigt.

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den Abbildungen 62 (S. 65) und 70 sind signifikante Differenzen zwischen den Halbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ und $t_{1/2}(2)$ der Prodrugs **56a-k** zu erkennen. Diese stehen im Einklang mit den Hydrolyseergebnissen der DiPPPro-Verbindungen.^[72,77,92] Außerdem folgte die Hydrolyse der zweiten Maskierungseinheit der TriPPPro-d4TTP **56** selektiv über eine Hydrolyse der Acylesterfunktion und somit dem beschriebenen Mechanismus. Die carbamatfunktionalisierten Intermediate **57o-q** erfuhren jedoch, wie bereits erwähnt (S. 68), keine weitere Hydrolyse, weshalb auf eine Integration in Abbildung 70 verzichtet wird. Dennoch sei in diesem Zusammenhang erwähnt, dass die chemische Stabilität der Phosphoranhydridbindungen der Carbamat-Intermediate **57o-q** erstaunlich hoch ausfiel. So blieben die Intermediate **57o-q** über einen Zeitraum von zwei Monaten vollständig intakt. Damit besitzen sie eine höhere Stabilität als Tri- oder Diphosphatnukleoside.

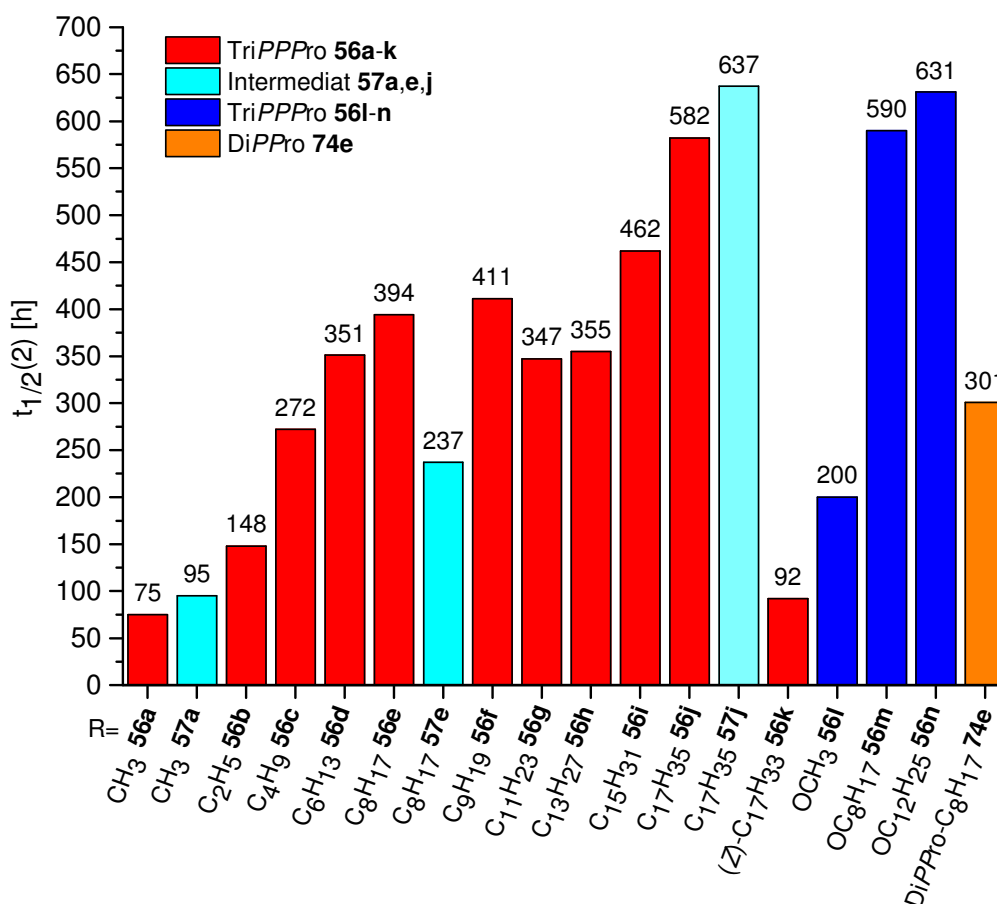


Abb. 70: Zweite Hydrolysehalbwertszeit der TriPPPro-d4TTP **56a-q** und des DiPPPro-d4TDPs **74e** sowie die Halbwertszeit der Intermediate **57a,e,j** in PBS bei pH 7.3.

Im Gegensatz zu den ersten Halbwertszeiten ist für $t_{1/2(2)}$ bei den TriPPPro-d4TTP **56a-j** tendenziell eine Zunahme der Stabilität in Korrelation mit der Kettenlänge zu beobachten. Eine Ausnahme bildet, wie bei der ersten Hydrolysehalbwertszeit, erneut das Ölsäurederivat **56k**, das trotz seiner hohen Kettenlänge mit 92 Stunden eine ähnliche Stabilität wie das kurzkettigste Derivat **56a** (HWZ= 75 h) besitzt. Die im Vergleich zur ersten Halbwertszeit der TriPPPro-d4TTP **56i,j** mögliche Einordnung der zweiten Halbwertszeit ergibt sich aus der erhöhten Polarität und somit verbesserten Löslichkeit. Eine Mizellenbildung ist dadurch ausgeschlossen. Auch $t_{1/2(2)}$ der carbonatfunktionalisierten Prodrugs **56l-n** zeigen den erwarteten Trend und weisen zudem erwartungsgemäß höhere Werte als die unmodifizierten Derivate entsprechender Kettenlänge auf.

Die Daten wurden in einmalig durchgeführten Experimenten ermittelt, weshalb Unregelmäßigkeiten wie bei **56g** und **56h** auf experimentelle Fehler zurückzuführen sein könnten. Nichtsdestotrotz konnte ein direkter Einfluss der Länge der Alkylkette auf die Stabilität der Acylesterfunktion bestätigt werden. Einzig überraschend war die Halbwertszeit des synthetisch dargestellten Intermediats **57e** mit R= C₈H₁₇, dessen Wert deutlich unter dem des aus der Hydrolyse erhaltenen Intermediats lag. Eine Wiederholung des Experiments

bestätigte die Korrektheit der Werte. Dieses Phänomen wurde jedoch auch in bisher unveröffentlichten Studien beobachtet. Eine Erklärung konnte dagegen bislang nicht gefunden werden, vor allem da der Unterschied bei den Intermediaten **57a** und **57j** weniger deutlich ausfiel.

Außerdem scheint die im Vergleich zu den DiPPro-NDP-Prodruks zusätzliche Phosphat-einheit bzw. die additive Elektronendichte einen positiven Einfluss auf die Stabilität zu haben, wie die erhöhte Halbwertszeit von **56e** gegenüber dem DiPPro-Analogon **74e** demonstriert.

Um die Dimensionen der Unterschiede in den Halbwertszeiten noch etwas besser zu veranschaulichen, sind die Daten in Abbildung 71 zusammengefasst. Die Werte von $t_{1/2}(2)$ liegen 4-15-fach über den Werten von $t_{1/2}(1)$, was unter anderem auf die unterschiedlichen Hydrolysemechanismen zurückgeführt werden kann.

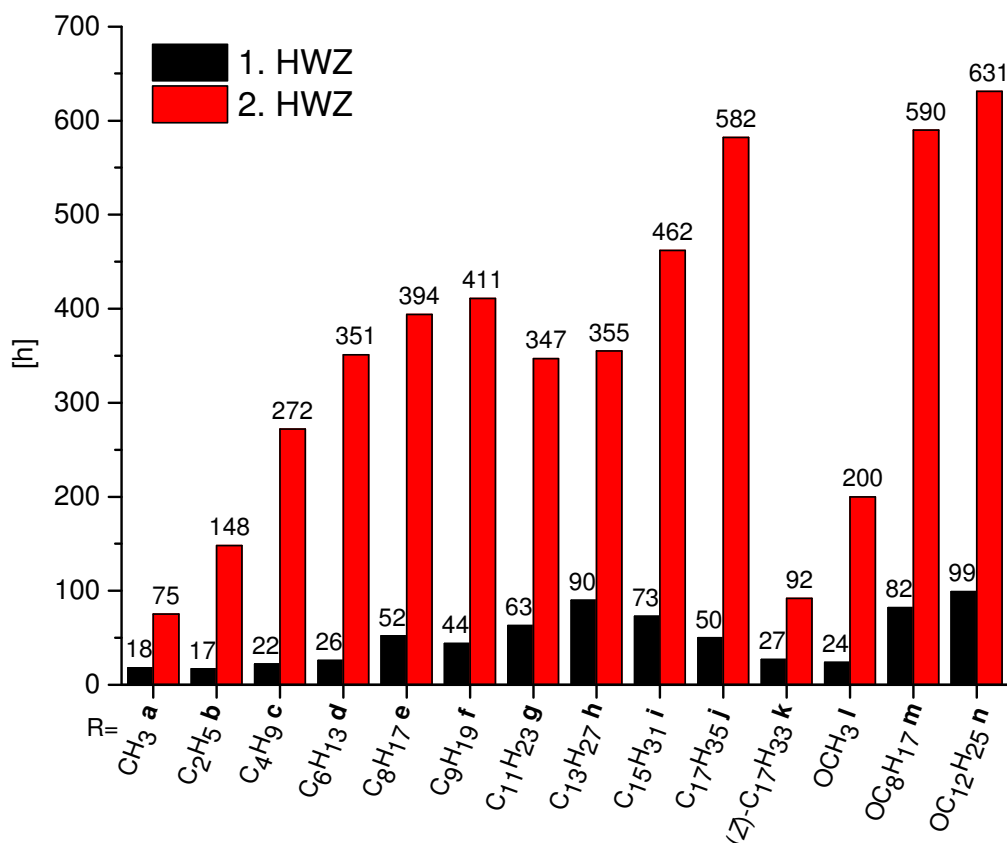


Abb. 71: Vergleich der Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ und $t_{1/2}(2)$ der d4TTP-Prodruks **56a-n** in PBS bei pH 7.3.

Trotz der langen Inkubationszeiten wurde durchgehend eine Akkumulation von d4TTP **16** festgestellt (Abb. 72). Eine Limitierung der Anzahl der Proben machte es unmöglich, einen idealen Zeitpunkt für die Datenerfassung zu ermitteln, wodurch sich die Unterschiede in der Inkubationsdauer in Abbildung 72 erklären lassen. In Bezug auf die voranschreitende chemische Hydrolyse vom d4TTP **16** zum d4TDP **15**, die in diesem Zeitrahmen eine entscheidende Rolle einnimmt, ist eine Interpretation der Ergebnisse nur bedingt möglich.

Nichtdestotrotz demonstriert auch dieses Diagramm in Analogie zu Abbildung 63 (S. 66) die Abnahme des d4TTP-Anteils mit zunehmender Kettenlänge.

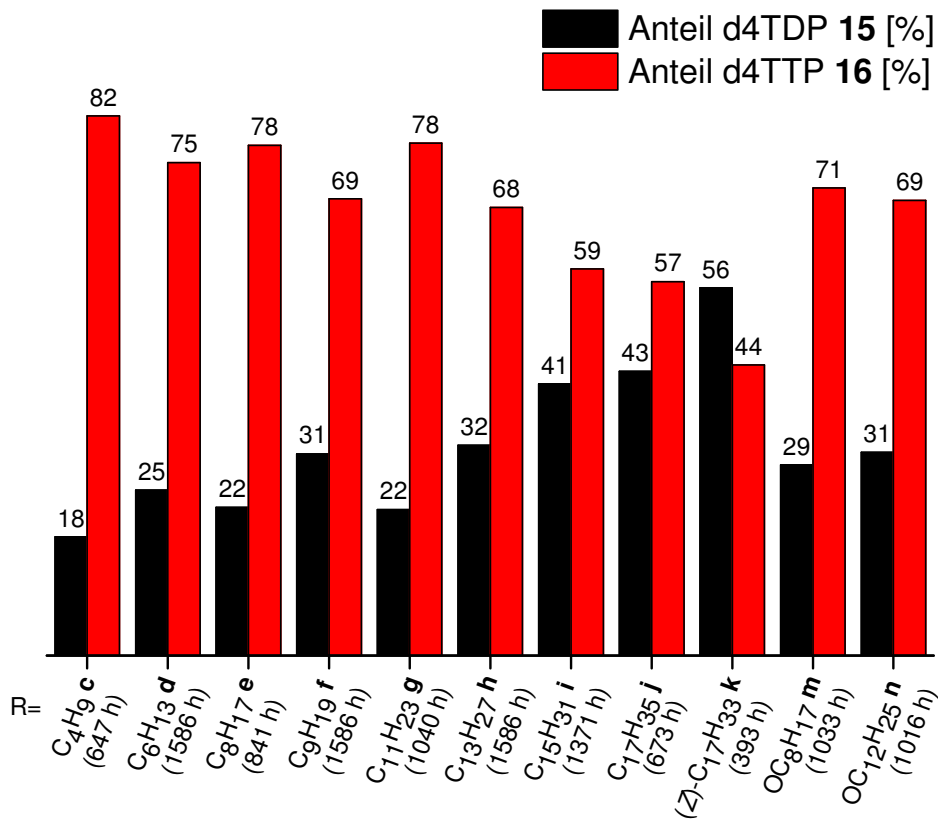


Abb. 72: Verhältnis von d4TDP 15 zu d4TTP 16 (in Klammern: Inkubationsdauer).

Da der Bruch der Phosphoranhydridbindung beim Intermediat **57** als Konkurrenzreaktion zu dem postulierten Mechanismus, der die Hydrolyse der Acylesterfunktion vorsieht, elektrostatisch gehindert ist, ist der erhöhte Anteil an d4TTP **16** wenig überraschend. Abschließend soll Abbildung 73 die Hypothese unterstreichen, dass bei der chemischen Hydrolyse des Intermediats **57** selektiv d4TTP **16** freigesetzt wird. Dafür wurde das synthetisch dargestellte Mono(alkanoyloxybenzyl)-d4TTP-Intermediat **57e** in Phosphatpuffer bei pH 7.3 inkubiert. Die erhaltenen Chromatogramme sind erneut als Wasserfalldiagramm zusammengefasst. Hierbei ist nur eine geringe Menge von d4TDP **15** detektierbar, wobei dieses mit großer Wahrscheinlichkeit als ein Resultat des Abbaus von dem zuvor freigesetzten d4TTP **16** anzunehmen ist. Wie bereits erwähnt, bekräftigt eine hydrolytische Studie in PBS mit d4TTP **16** diese These, indem sie mit einer Halbwertszeit von 1440 Stunden eine langsame Dephosphorylierung des d4TTPs **16** zum d4TDP **15** zeigt.

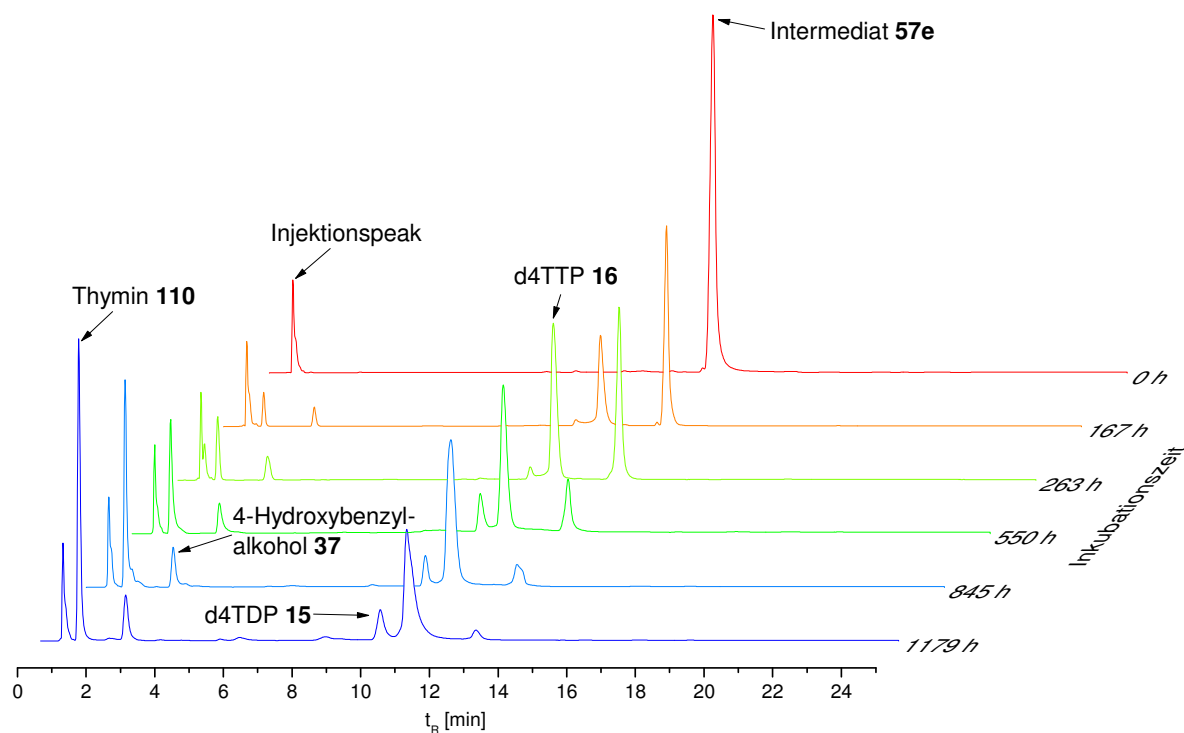


Abb. 73: Hydrolyseverlauf des MAB-d4TTP-Prodrugs **57e** in PBS bei pH 7.3 (HPLC-Methode A, 266 nm).

Hiermit konnte bestätigt werden, dass nach dem vollständigen Verbrauch des zweifach-maskierten Prodrugs **56** aus dem Intermediat **57** selektiv das Triphosphat **16** freigesetzt wird.

4.2.2 Hydrolyseverhalten der d4TTP-Prodrugs in CEM/0-Zellextrakten

Für eine möglichst realitätsnahe Simulation der Hydrolyse im biologischen Medium wurden Studien in CEM/0-Zellextrakten durchgeführt. Die Extrakte wurden von PROF. BALZARINI und PROF. SCHOLS von der Universität Leuven (Belgien) zur Verfügung gestellt und dort auch zur Evaluierung der antiviralen Aktivität der Prodrugs gegenüber HIV verwendet (Kapitel 4.3). Es sollte festgestellt werden, welche Auswirkungen eine enzymatische Aktivierung der Acyl-esterfunktion oder einer Modifikation auf die Hydrolysegeschwindigkeit sowie auf die Zusammensetzung der Hydrolyseprodukte hat. Im Fall der d4T-Diphosphat-Prodrugs **74** wurde durch die in den Extrakten enthaltenen Enzyme, wie Esterasen und Lipasen, eine im Vergleich zur chemisch induzierten Hydrolyse im Mittel um den Faktor elf verringerte Hydrolysehalbwertszeit bestimmt.^[77] Diesen Effekt galt es, gleichermaßen für die TriPPP-rodrugs **56** zu untersuchen. Dafür wurden erneut Lösungen der Prodrugs **56** in einem DMSO/Wasser-Gemisch angesetzt und nach der Zugabe von Zellextrakten für definierte Zeiträume bei 37 °C inkubiert. Abweichend zu dem im Arbeitskreis etablierten Verfahren wurde allerdings auf Magnesiumchlorid als Zusatz verzichtet. In der Vergangenheit wurden bei einer Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration eine Labilisierung und folglich eine vermehrte

Spaltung von Phosphoranhydridbindungen beobachtet.^[73] Gleichzeitig zeigte sich, dass das Fehlen des zusätzlichen Magnesium-Cofaktors keine Auswirkung auf die Halbwertszeiten der Prodrugs und somit keinen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme hat. Die Ermittlung der Hydrolysekinetiken erfolgte, wie im vorherigen Kapitel 4.2.1 beschrieben, mittels HPLC. Abweichend mussten aber zur Beendigung der Hydrolysereaktion die Enzyme deaktiviert werden. Die Durchführung gestaltete sich jedoch mit zunehmender Lipophilie der Prodrugs schwieriger. Während die Proteine im Fall der kurzkettigen Prodrugs **56a-g** ($R \leq C_{11}H_{23}$) nach der etablierten Methode durch Zugabe von Methanol präzipitiert werden konnten, lagen die langkettigen TriPPPro-d4TTP **56h-k** unter diesen Bedingungen nur unvollständig gelöst vor. Um die Reproduzierbarkeit sowie aussagekräftige Ergebnisse zu gewährleisten, mussten Alternativen gesucht werden. Als zielführend stellten sich Denaturierungsprozesse heraus, die allein auf physikalischen Einflüssen basieren. Die Ansätze der Prodrugs **56h,i,k** wurden mit dem Ziel eines Reaktionsabbruchs umgehend mit flüssigem Stickstoff auf -196 °C gekühlt. Zudem wurden die Proben nach dem Auftauen für zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt. Durch das Einfrieren sollte eine Kältedenaturierung der Proteine bewirkt werden. Die anschließende Ultraschalleinwirkung sollte die Denaturierung unterstützen und beim Auftauen die vollständige Solvation des unverbrauchten Prodrugs sowie gegebenenfalls dessen Hydrolyseprodukte ermöglichen. Tatsächlich konnten nach dieser Prozedur die Ergebnisse erfolgreich reproduziert werden. Eine Ausnahme stellte das TriPPPro-d4TTP **56j** mit $R = C_{17}H_{35}$ dar, bei dem über die beschriebene Methode nur minimale Mengen mittels HPLC detektiert werden konnten. Die unzureichende Löslichkeit und die Mizellenbildung sorgten vermutlich für einen Verbleib im Inkubationsgefäß oder im Spritzenfilter. Da eine Filtration vor der Injektion in die HPLC zum Entfernen der unlöslichen Zellbestandteile unumgänglich war, wurden die entsprechenden Hydrolysereaktionen durch Zugabe von THF, das sich im Vorwege bei der Synthese und Chromatographie des Prodrugs **56j** als Lösungsmittel bewährt hatte, und durch Kühlung auf -196 °C abgebrochen. Nach einer Ultraschallbehandlung konnte anschließend auch die Untersuchung des hochlipophilen Prodrugs **56j** erfolgreich durchgeführt werden. Alle weiteren Informationen zur Durchführung sind im Experimentellen Teil dieser Arbeit ausführlich beschrieben.

Im Vergleich zu den Halbwertszeiten der chemischen Hydrolyse lässt sich die erwartete starke Beschleunigung eines enzymkatalysierten Abbaus der TriPPPro-Verbindungen **56** feststellen (Abb. 74). Basierend auf der hohen Geschwindigkeit ist davon auszugehen, dass die chemische Hydrolyse in Zellextrakten nur eine untergeordnete Rolle einnimmt. Dieser Umstand sollte durch einen nahezu neutralen pH-Wert der Extrakte von 6.9 verstärkt werden. Allerdings darf dieser Effekt insbesondere bei der Betrachtung des d4TTP-Prodrugs **56j** in Zellextrakten nicht gänzlich vernachlässigt werden, da schon bei der

Hydrolyse in Phosphatpuffer ein vergleichsweise schneller Zerfall zum d4TDP **15** durch einen Bruch der Phosphoranhydridbindung zu beobachten war.

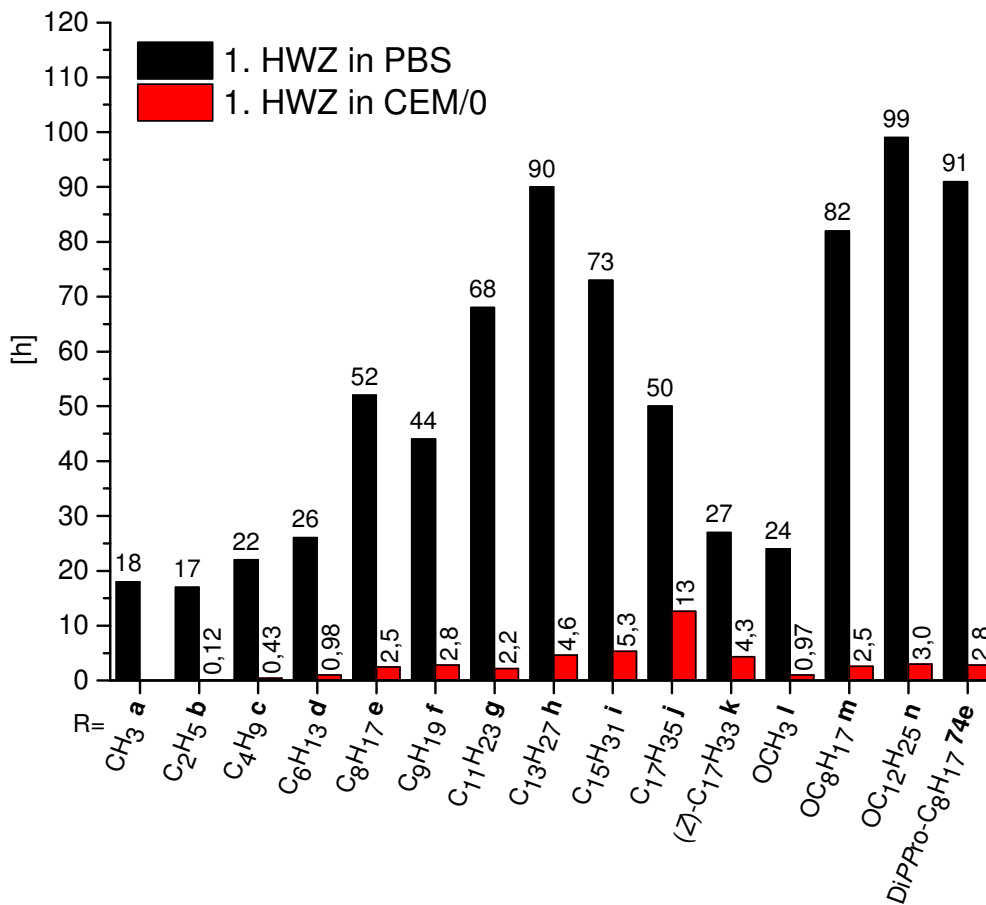


Abb. 74: Vergleich der Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ der TriPPPro-d4TTP **56a-n** und des DiPPPro-d4TDPs **74e** in PBS bei pH 7.3 und in CEM/0-Zellextrakten.

Beispielsweise verläuft die Hydrolyse des kurzkettigsten d4T-Prodrugs **56a** in den Extrakten 360-mal schneller als in Phosphatpuffer. Eine derart schnelle intrazelluläre Abspaltung der Masken würde die Rückdiffusion des Prodrugs **56** durch die Zellmembran, resultierend aus der erhöhten Polarität der Hydrolyseprodukte, nach dem "lock-in"-Effekt unterbinden. Allerdings werden gerade die kurzkettigen Prodrugs, bedingt durch die geringe Lipophilie, in einer späteren Anwendung keine Rolle spielen. Erstens ist die Wahrscheinlichkeit deutlich geringer, dass die Prodrugs wegen ihrer chemischen Instabilität ihren Wirkungsort intakt erreichen. Zweitens sind derartige Prodrugs selbst mit zwei Masken aufgrund eines unzureichenden Ausgleichs der negativen Ladungen an den Phosphateinheiten nicht in der Lage, in die Zellen zu diffundieren. Einen indirekten Nachweis für die ineffiziente Zellaufnahme liefern die antiviralen Daten (Kapitel 4.3). Diese und eine Zellaufnahmestudie (Kapitel 4.13) zeigen, dass nur Prodrugs mit $R \geq C_8H_{17}$ eine ausreichende Lipophilie für eine gute Permeabilität besitzen und somit von höherer medizinischer Relevanz sind. Der

Umstand, dass die Differenz zwischen der chemischen und der enzymatischen Stabilität mit zunehmender Kettenlänge tendenziell abnimmt, erscheint dagegen unerheblich. Denn die enzymitierten Hydrolysen der Prodrugs **56e-h** mit $R \geq C_8H_{17}$ verlaufen 15-30-mal schneller. Merklich schlechter fallen dagegen die Unterschiede bei den Prodrugs **56i-k** aus, die allerdings auch in der geringen Halbwertszeit bzw. der niedrigen chemischen Stabilität begründet liegen.

Bei der vollständigen Betrachtung aller Hydrolysehalbwertszeiten der d4T-Triphosphat-Prodrugs **56a-j** lässt sich ein stetiger Anstieg mit zunehmender Kettenlänge feststellen (Abb. 74). Dieses Phänomen ist womöglich auf den durch den verstärkten sterischen Anspruch erschwerten Zugang des Enzyms zur Acylfunktion zurückzuführen. Gleichzeitig würde dies aber auf das Fehlen von Lipasen in den Zellextrakten hindeuten, die die entsprechende Substratspezifität besitzen sollten, die Spaltung der langkettigen Prodrugs zu katalysieren. Möglicherweise kann der Effekt aber auch mit einer Verschlechterung des Löslichkeitsverhaltens der mit zunehmender Kettenlänge lipophiler werdenden Prodrugs begründet werden. Dies wurde bereits sowohl bei der chemischen Hydrolyse (Kapitel 4.2.1) als auch in diesem Kapitel im Zusammenhang mit der Aufarbeitung der Hydrolyselösungen diskutiert.

Die besten Ergebnisse lieferten die carbonatfunktionalisierten Verbindungen **56l-n**, bei denen die enzymkatalysierte Hydrolyse konstant um den Faktor 33 schneller ablief. Damit zeichnen sie sich durch eine hohe chemische Stabilität aus, lassen sich aber zugleich durch die in den Extrakten vorliegenden Esterasen schnell spalten. Außerdem weisen sie unabhängig von ihrer Kettenlänge Halbwertszeiten in der gleichen Größenordnung auf.

Auf detaillierte Studien der carbamatmodifizierten Prodrugs **56o-q** wurde aus Kostengründen bezüglich der Zellextrakte verzichtet, da Carbamate keine Substrate für die vorliegenden Esterasen darstellen. Erstaunlicherweise war jedoch in einem Testansatz die Halbwertszeit des Carbamat-TriPPPro-d4TTPs **56o** mit 5.5 Stunden verglichen mit der Halbwertszeit der chemischen Hydrolyse (27 h) beinahe um den Faktor fünf erniedrigt. Allerdings wurde im Gegensatz zu allen weiteren Prodrugs **56a-n** eine Akkumulation des monomaskierten Intermediats **57o** beobachtet. Selbst nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden konnte in Zellextrakten kein Zerfall der Verbindung **57o** festgestellt werden, was somit auch gegen eine enzymatische Spaltung der ersten Maske spricht. Daher kann angenommen werden, dass die in den Zellextrakten vorliegenden Salze einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Stabilität der Prodrugs haben. Eine hohe Hydrolysestabilität der Intermediate **56o-q** wurde bereits bei der Untersuchung der Hydrolyse in Phosphatpuffer ermittelt (Kapitel 4.2.1).

Ebenso wurde in dieser Studie nur ein minimaler Unterschied zwischen der Hydrolysegeschwindigkeit des DiPPPro-d4TDP-Prodrugs **74e** und des TriPPPro-d4TTP-Prodrugs **56e**

bestimmt. Dies lässt darauf schließen, dass das aktive Zentrum der Enzyme keine negative Beeinflussung durch die zusätzliche Phosphateinheit erfährt.

Exemplarisch soll die in Abbildung 75 gezeigte Hydrolyse des d4TTP-Prodrugs **56e** vorgestellt und diskutiert werden. Die Bildung einer geringen Menge des einfachmaskierten Intermediats **57e** findet bereits nach einer Inkubationszeit von einer halben Stunde in den Zellextrakten statt. Gleichzeitig ist auch die Freisetzung von d4TDP **15** und d4TTP **16** zu erkennen, obwohl beide Peaks mit Komponenten der Zellextrakte überlagern. Die im Vergleich zu den Zellbestandteilen geringfügig abweichenden Absorptionsmaxima der Nukleotide ermöglichen jedoch den Nachweis, dass die d4T-Metabolite die Hauptfläche dieser Peaks ausmachen. Eine Differenzierung von d4TMP **13** und den zeitgleich eluierenden Hauptbestandteilen der Extrakte ist dagegen nicht möglich.

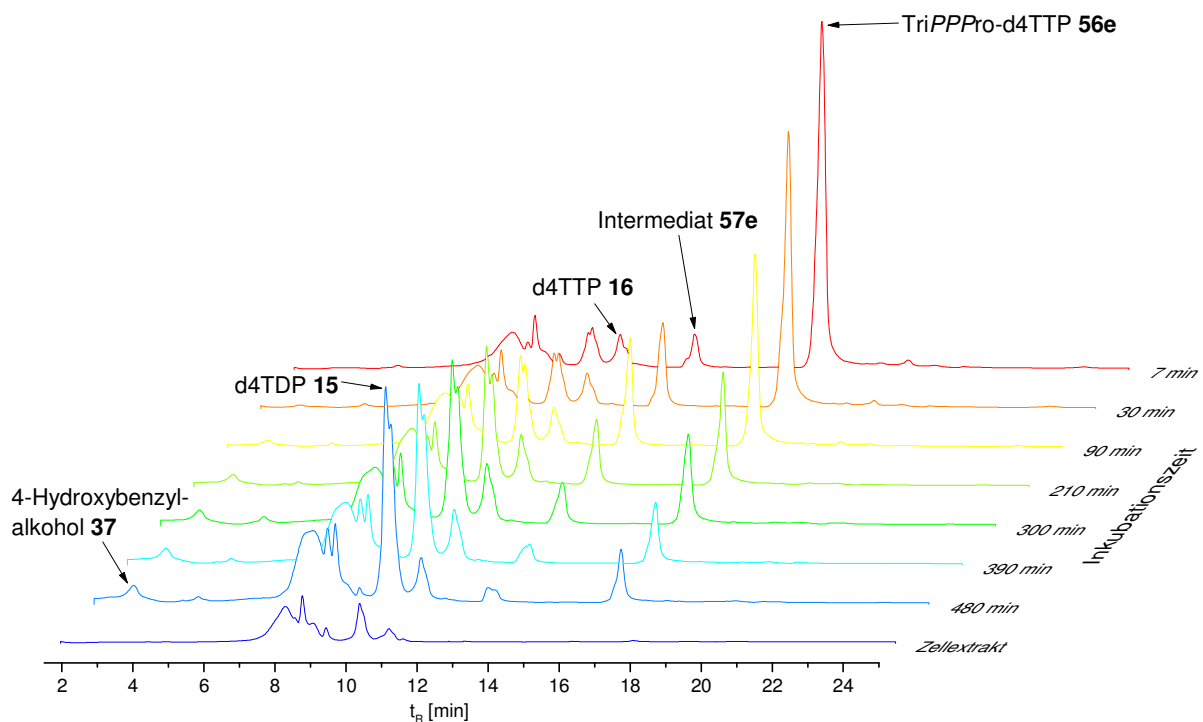


Abb. 75: Hydrolyseverlauf des d4TTP-Prodrugs **56e** in CEM/0-Zellextrakten.

Über einen Zeitraum von 480 Minuten findet eine voraussichtlich schrittweise Degradation des TriPPPPro-d4TTPs **56e** über das Intermediat **57e** bis hin zum d4TTP **16** statt. Das freigesetzte Intermediat **57e** wird simultan abgebaut, was auf eine niedrigere oder zumindest ähnliche Hydrolysehalbwertszeit im Vergleich zur Ausgangsverbindung **56e** hindeutet. Folglich war eine Bestimmung der Halbwertszeit der hydrolytisch erhaltenen Intermediate **57** in den Zellextrakten nicht möglich. Auch wenn die Hydrolyse noch nicht vollständig beendet war, wurde das Experiment nach acht Stunden abgebrochen, da aufgrund von Denaturierungsprozessen eine kontinuierliche Aktivität der Zellextrakte in der Folge nicht

mehr gewährleistet werden konnte. Bis zu diesem Zeitpunkt ist die Akkumulation von d4TDP **15** zu erkennen, was aller Voraussicht nach auf das Vorhandensein von Phosphatasen zurückzuführen ist, die die Dephosphorylierung des d4TTPs **16** katalysieren. Eine unabhängige Untersuchung der d4T-Metabolite ergab, dass d4TDP **15** mit 60 Stunden im Vergleich zu d4TTP **16** mit nur 38 min eine wesentlich höhere Halbwertszeit in den Zellextrakten besitzt. Damit könnte die Anreicherung von d4TDP **15** erklärt werden. Zusätzlich bestätigt dieser Umstand aber auch den Erfolg des Konzepts. Da die Konzentration an d4TTP **16** über den kompletten Hydrolysezeitraum nahezu stabil bleibt, obgleich eine rasche Dephosphorylierung zum d4TDP **15** erfolgt, muss konsequenterweise permanent auch die Bildung des Triphosphats **16** aus dem MAB-Intermediat **57e** stattfinden. Des Weiteren wurde der Versuch unternommen, mit Phosphataseinhibitoren der Firma Sigma-Aldrich eine kontinuierliche Dephosphorylierung des d4TTPs **16** zu unterbinden. Dafür wurden den Hydrolyselösungen 2 μ L eines 1:1-Gemisches aus den Cocktails 2 (Cat. No. P5726: Natriumorthovanadat, Natriummolybdat, Natriumtatriat, Imidazol) und des Cocktails 3 (Cat. No. P0044: Cantharidin, (-)-*p*-Bromtetramisol, Calyculin A) zugesetzt. Allerdings fielen die Resultate bei der Hydrolyse des d4T-Prodrugs **57e** nicht gänzlich zufriedenstellend aus (Abb. 76).

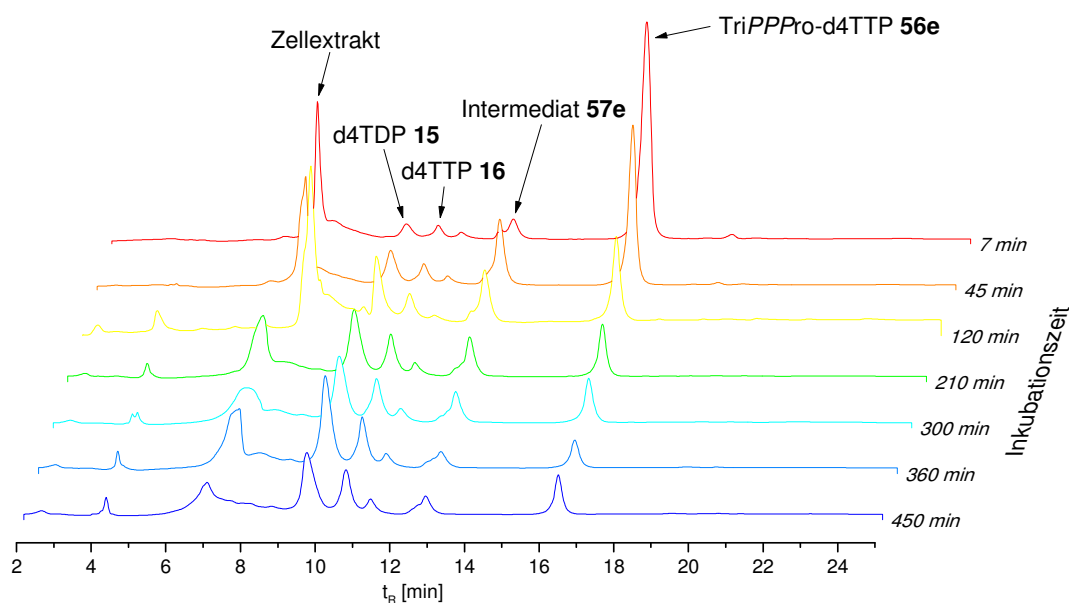


Abb. 76: Hydrolyseverlauf des TriPPPro-d4TTPs **56e** in CEM/0-Zellextrakten unter Verwendung von Phosphataseinhibitoren.

Eine Inhibierung der Phosphatasen müsste entsprechend die Konzentration an d4TTP **16** maximieren. Jedoch wurden schon zu Beginn der Hydrolyseuntersuchung große Mengen von d4TDP **15** detektiert. Eine Destabilisierung der Phosphoranhydridbindung durch die Salzzusätze, wie sie für Magnesiumchlorid beschrieben wurde^[73], und somit der Zerfall des

Prodrugs **56e** zum d4TDP **15** sind nicht auszuschließen. Ein Indiz dafür stellt die Verringerung der Halbwertszeit des Prodrugs **56e** von 150 min auf 96 min in Verbindung mit dem Inhibierungscocktail dar. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit einer chemischen Hydrolyse in diesem Zeitrahmen auch unter salzhaltigen Bedingungen sehr gering. Diese These wird dadurch bekräftigt, dass keine Bildung des Phosphatdiesters **109e** beobachtet werden konnte, der, resultierend aus einem Bruch zwischen β - und γ -Phosphat, zumindest temporär hätte nachweisbar sein müssen.

In einem Kontrollexperiment wurde bei der alleinigen Betrachtung der Hydrolyse des d4T-Triphosphats **16** durch das Vorhandensein der Inhibitoren eine Erhöhung der Halbwertszeit um den Faktor fünf auf 180 min ermittelt. Dies spricht zumindest für eine Wirksamkeit der Zusätze, jedoch für keine quantitative Inhibierung der Phosphatasen. Auch in diesem Zusammenhang ist eine chemische Dephosphorylierung aufgrund der Salzzusätze nicht auszuschließen. Sie erscheint in dieser Zeitspanne allerdings unwahrscheinlich.

Letztendlich konnte die Konzentration an d4TTP **16** in diesem Experiment (Abb. 76) im Vergleich zu den vorherigen Hydrolyseansätzen von d4TTP-Prodrugs **56** zwar erhöht werden, der Beweis einer selektiven Freisetzung von d4TTP **16** aus der TriPPP-Verbindung **56e** bzw. dem Intermediat **57e** in den Zellextrakten konnte jedoch nicht erbracht werden.

Einen wichtigen Hinweis auf einen gewünschten Verlauf der enzymatischen Hydrolyse lieferte die Auswertung der Hydrolysen der kurzkettigen Prodrugs **56** mit $R \leq C_8H_{17}$. So konnte bei einer Verkürzung der Kettenlänge eine Erhöhung des Anteils an d4TTP **16** im Verhältnis zu d4TDP **15**, bedingt durch die geringeren Halbwertszeiten, beobachtet werden. Der Anteil des d4TDPs **15** stieg erst mit zunehmender Inkubationszeit an. Dieser Umstand spricht für einen erfolgreichen Ablauf des postulierten Mechanismus und den Erfolg des auf d4T-Triphosphate übertragenen BAB-Konzepts.

Die Prodrugs **56a,b,l** mussten entsprechend der Hydrolyse in Phosphatpuffer mittels HPLC mit einem TEAA-Puffer untersucht werden, um eine Basenlinientrennung von Prodrug und Intermediat zu erzielen (Kapitel 4.2.1). Eine Separation von d4TDP **15** und d4TTP **16** war mit diesem Ionenpaarreagenz nicht möglich. Daher wurde die MALDI-MS als eine alternative Analysemethode zur qualitativen Bestimmung der d4T-Metabolite eingesetzt. Exemplarisch wurde die HPLC-Eluatfraktion des d4T-Prodrugs **56a** mit $R = CH_3$ (15 Minuten Inkubationszeit), in der die entsprechenden Hydrolyseprodukte **15** und **16** zu vermuten waren, isoliert und durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene MALDI-Spektrum der Fraktion zeigt neben d4TDP **15** ebenfalls d4TTP **16** (Abb. 77), was auf eine erfolgreiche Freisetzung Letzteren aus dem Prodrug **56a** während der Zellextrakthydrolyse schließen lässt. Eine quantitative Aussage über die Zusammensetzung konnte über diese Methode

allerdings nicht vorgenommen werden, da Triphosphate mit MALDI-MS generell schwieriger als Diphosphate zu ionisieren sind.

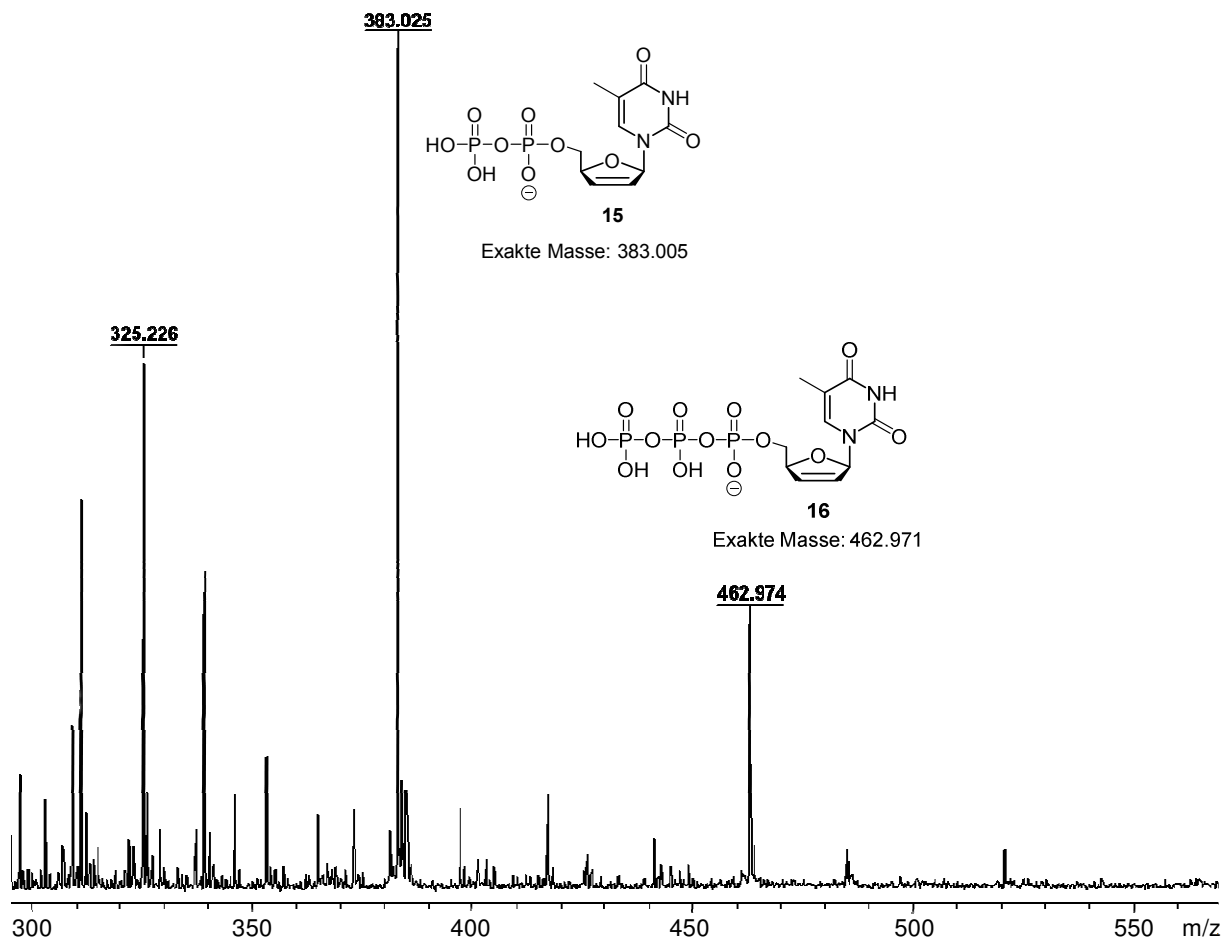


Abb. 77: MALDI-MS von d4TDP **15** und d4TTP **16** als Produkte der Hydrolyse des TriPPPro-d4TTPs **56a** in CEM/0-Zellextrakten.

Nach den bisher gewonnenen Erkenntnissen bezüglich des Verhaltens der Intermediate **57** während der Hydrolyse der TriPPPro-Verbindungen **56** im Zellmedium fielen die Ergebnisse der synthetisch dargestellten Intermediate **57a,e,j** wenig überraschend aus (Abb. 78). Wie vermutet, weisen die MAB-Prodrugs **57** in den Zellextrakten geringere Halbwertszeiten als die entsprechenden zweifachmaskierten Verbindungen **56** auf. Somit ist die im Gegensatz zu der Hydrolyse in PBS ausbleibende Anreicherung der Intermediate **57** bei der Hydrolyse der TriPPPro-d4TTP **56** im Zellmedium zu erklären. Vermutlich ist die geringere Stabilität der einfachmaskierten Intermediate **57** auf die bessere Zugänglichkeit der Enzyme im Vergleich zu den sterisch anspruchsvolleren TriPPPro-d4TTP **56** zurückzuführen. Aufgrund der großen Differenz zwischen der chemischen und der enzymatischen Stabilität bei den hochlipophilen Intermediaten **57** besäßen derartige monomaskierte Verbindungen die idealen Grundvoraussetzungen für einen "lock-in"-Effekt. Natürlich müsste die Permeabilität der mit drei negativen Ladungen augenscheinlich sehr polaren Substanzen gegeben sein.

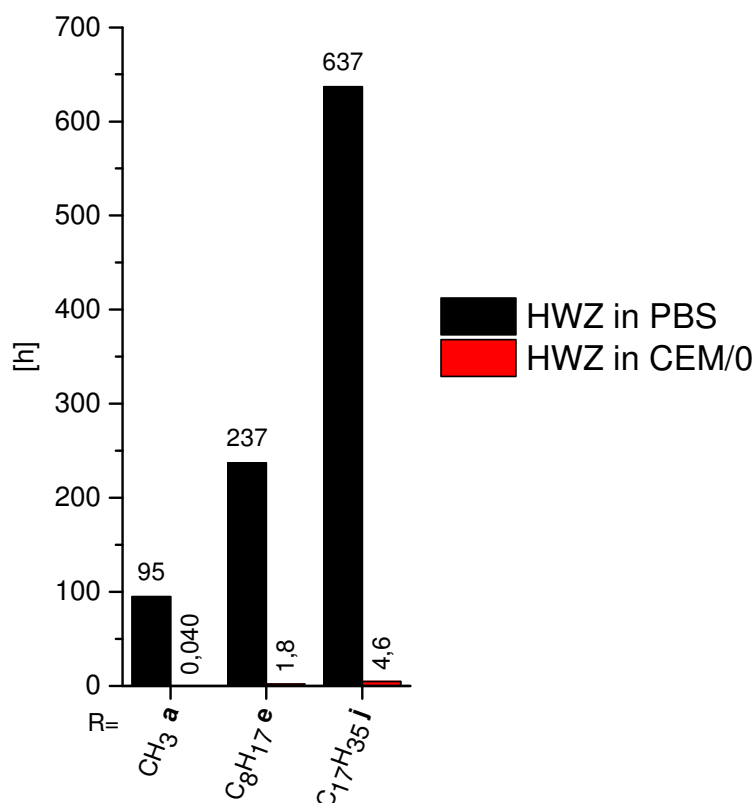


Abb. 78: Vergleich der Hydrolysehalbwertszeiten der MAB-Prodrugs **57a,e,j** in PBS bei pH 7.3 und in CEM/0-Zellextrakten.

4.2.3 Hydrolyseverhalten der d4TTP-Prodrugs im PLE-Medium

Obwohl in CEM/0-Zellextrakten und somit im biologischen Medium eine erfolgreiche Freisetzung des Nucleosidtriphosphats **16** nachgewiesen werden konnte, wurde ein zusätzlicher Versuch unternommen, den Grad der Selektivität der enzymatischen Spaltung zu visualisieren. Dafür wurde erneut eine Hydrolyselösung der Prodrugs **56a-n** in einem DMSO/PBS-Gemisch angesetzt. Durch Zugabe einer Lösung, bestehend aus isolierter Schweineleberesterase (*pig liver esterase*, PLE) und Phosphatpuffer (pH 7.3), wurde die Hydrolysereaktion gestartet. Die PLE wurde bereits von JESSEN^[73] zum Nachweis des "lock-in"-Verhaltens entsprechender *cycloSal*-Prodrugs eingesetzt und erschien aufgrund ihrer Stabilität und Selektivität ebenso für Experimente mit Triphosphat-Prodrugs geeignet. Die verwendete Menge der PLE wurde so gewählt, dass sowohl die erste als auch die zweite Hydrolysehalbwertszeit des TriPPPro-d4TTPs **56e** binnen eines Tages bestimmt werden konnte. Über dieselbe Methode wurden anschließend alle weiteren Prodrugs bezüglich ihres Hydrolyseverhaltens im PLE-Medium untersucht. Wie sich dabei herausstellte, wurde mit dem Modellprodrug **56e** eine gute Wahl getroffen. Durch die Substratspezifität des Enzyms katalysiert dieses insbesondere die Spaltung von Acyl- und Carbonat ester mit einer Länge von 6-8 Kohlenstoffeinheiten ($t_{1/2}(1) = 0.8$ min). Zudem erscheint die Aktivität unabhängig von der Anzahl der Phosphateinheiten, wie die Analyse des DiPPPro-d4TDP-Prodrugs **74e** mit

einer Halbwertszeit von 0.9 min ergab. Die Selektivität der PLE kann durch die Aufführung der ersten Hydrolysehalbwertszeiten aus Abbildung 79 entnommen werden.

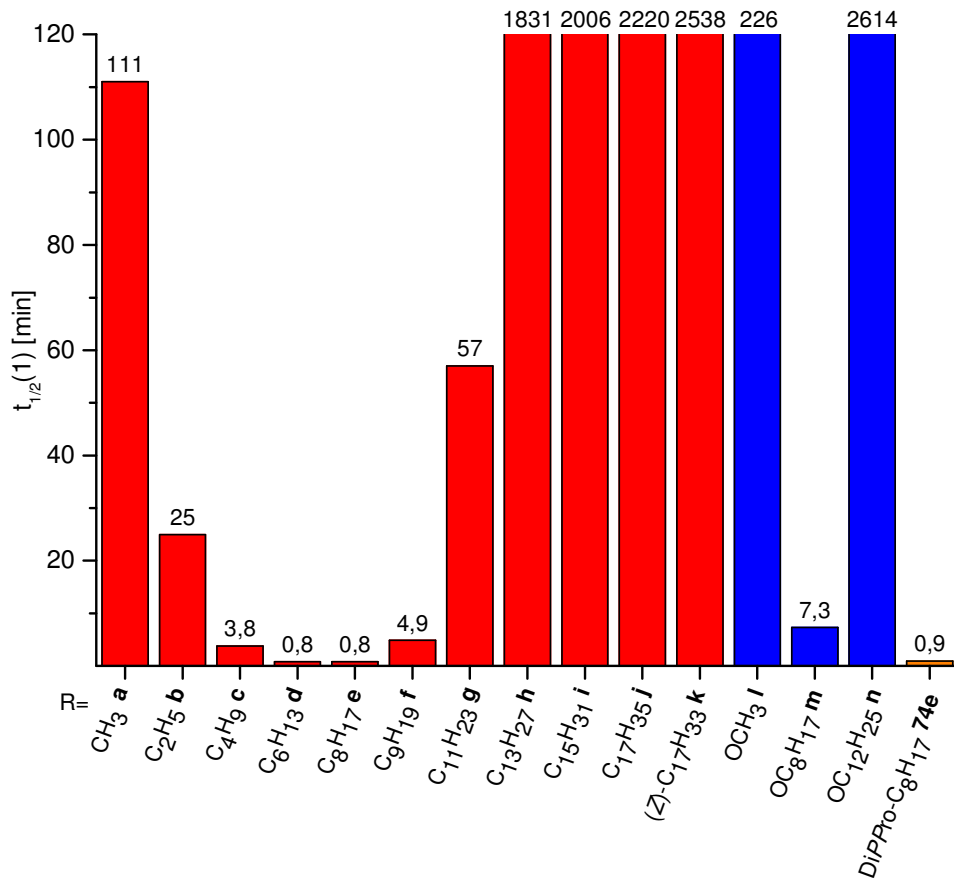


Abb. 79: Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ der TriPPPro-d4TTP **56a-n** mit PLE in PBS (pH 7.3).

Wie angegeben, besitzen die Halbwertszeiten der Prodrugs **56d** und **56e** die geringsten Werte, während kleinere und größere Reste zu einer exponentiellen Zunahme der Stabilitäten führen. Bei den Prodrugs mit $R \geq C_{13}H_{28}$ war zusätzlich ein verstärkter Einfluss der chemischen Hydrolyse als Konkurrenzreaktion anzunehmen. Entsprechend wurde mit zunehmender Inkubationsdauer auch die Bildung von d4TDP **15**, resultierend aus dem Zerfall des TriPPPro-d4TTPs **56**, beobachtet. Interessanterweise besitzt das Ölsäurederivat unter den enzymatischen Bedingungen eine 1.5-fach höhere Halbwertszeit als bei der Untersuchung in Phosphatpuffer (Kapitel 4.2.1). Dabei gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass die Untersuchungen der langkettigen Verbindungen im PLE-Medium, bedingt durch die an die Studien in den Zellextrakten angepasste Prozedur zur Aufarbeitung der Hydrolyselösungen, mit einem größeren Fehler belastet sind. Dies wird durch die Standardabweichungen der exponentiellen Ausgleichskurven belegt, die der Übersichtlichkeit halber nicht aufgeführt sind.

Als Beispiel einer esterasekatalysierten Spaltung soll der Hydrolyseverlauf des d4T-Prodrugs **56e** diskutiert werden (Abb. 80). Bereits nach drei Minuten ist das TriPPPro-

d4TTP **56e** selektiv zum Intermediat degradiert worden. Die Geschwindigkeit in Kombination mit der Selektivität bestätigt deutlich die bereits vermutete enzymatische Spaltung der Acyl-esterfunktion. Die rasch ablaufende und selektive Hydrolyse des Intermediats **57e** sowie die Freisetzung des 4-Hydroxybenzylalkohols **37** belegt zudem die Initiierung des Spaltprozesses nach dem postulierten Mechanismus durch die Esterase. Wie zu erkennen ist, ist die geringe Menge von d4TDP **15** bereits vor dem Reaktionsstart in der Lösung enthalten und erfährt während der Verfolgung nur eine unbedeutende Zunahme.

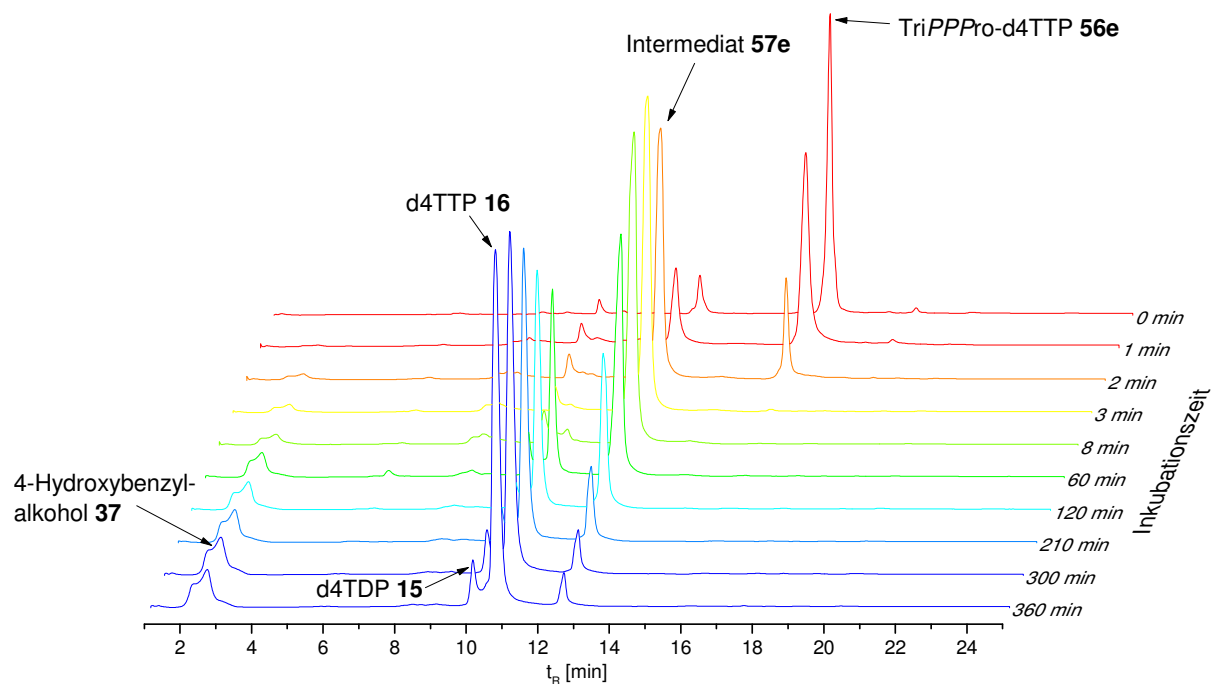


Abb. 80: Hydrolyseverlauf des TriPPPPro-d4TTPs **56e** mit PLE in PBS (pH 7.3).

Neben der Möglichkeit der Coinjektion von d4TTP **16** bei der HPLC-Untersuchung wurde die Etablierung einer weiteren Analysemethode zum Nachweis der erfolgreichen Freisetzung des Nucleosidtriphosphats angestrebt. Um den pharmakologisch aktiven Triphosphatmetaboliten nachzuweisen, wurde in Zusammenarbeit mit THIAGO DINIS DE OLIVEIRA eine Primer-Verlängerungsstudie (*primer-extension-assay*) durchgeführt (Abb. 81). Dafür muss ein entsprechender Primer, der eine radioaktive Markierung trägt, an einer RNA-Sequenz hybridisieren. In Gegenwart der natürlichen Nucleosidtriphosphate ist die Reverse Transkriptase in der Lage, den zum RNA-Template komplementären DNA-Einzelstrang zu synthetisieren. Mittels einer denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese (*polyacrylamid gel electrophoresis*, PAGE) ist die Analyse der spezifischen DNA möglich.

Für die Durchführung wurde zunächst das TriPPPPro-d4TTP **56e** in einem zweiten Ansatz bis zum vollständigen Verbrauch von Prodrug **56e** und Intermediat **57e** im PLE-Medium hydrolysiert und anschließend das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Für den Assay

wurde die HIV-Reverse-Transkriptase zusammen mit den Triphosphaten von 2'-Desoxyadenosin, 2'-Desoxyguanosin sowie 2'-Desoxycytidin und dem PLE-Hydrolysat anstelle des natürlichen Thymidintriphosphats inkubiert. Erwartungsgemäß führte die Inkorporation von d4TTP **16** aufgrund der fehlenden 3'-OH-Funktion zu einem sofortigen Kettenabbruch (Bahnen 3-6). Das Kontrollexperiment mit allen vier natürlichen Nucleosiden ergab dagegen eine vollständige Elongation (Bahn 2). Mit dem Primer-Extension-Assay konnte somit die erfolgreiche Freisetzung des d4TTPs **16** über das TriPPPPro-Konzept verdeutlicht werden.

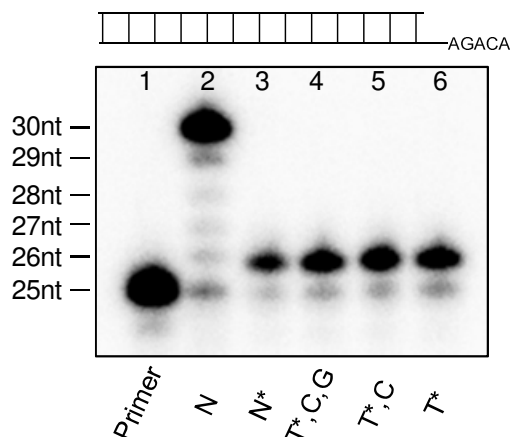


Abb. 81: Primer-Extension-Assay mit HIV-Reverse-Transkriptase: PLE-Hydrolysat, basierend auf TriPPPPro-d4TTP **56e** (T*); dCTP (C); dGTP (G); allen natürlichen Triphosphaten (N); dATP, dCTP, dGTP und dem Hydrolysat von **56e** (N*).

Für die Bestimmung der zweiten Hydrolysehalbwertszeit wurden lediglich die relevanten Prodrug-Verbindungen herangezogen, das heißt diejenigen, deren erste Halbwertszeit in PLE noch eindeutig von den chemischen Halbwertszeiten zu differenzieren war ($R \leq C_{11}H_{23}$). Entgegen der Resultate in den Zellextrakten, in denen die Intermediate **57** geringere Halbwertszeiten als die entsprechenden TriPPPPro-d4TTP **56** aufwiesen, ist voraussichtlich durch die repulsive Wechselwirkung der polaren Intermediate **57** mit der Esterase eine Erhöhung der Halbwertszeiten festzustellen. Allerdings muss vergleichend berücksichtigt werden, dass in den Extrakten ein Enzymgemisch vorliegt, das in der Summe deutlich unspezifischer fungiert. Die Schweineleberesterase lieferte dagegen für beide Halbwertszeiten korrelierende, aus der Substratspezifität resultierende Ergebnisse (Abb. 82). Dabei wurde dennoch auch bei den beiden besten Substraten **56d** und **56e** die zweite Maske um etwa den Faktor 120 langsamer als die erste Maske gespalten. Weiterhin fällt die im Vergleich zu der passenden TriPPPPro-Verbindung **56e** um den Faktor neun erniedrigte Halbwertszeit des DiPPPPro-d4TDPs **74e** auf. Diese lässt darauf schließen, dass sich im Fall der PLE das Vorhandensein der additiven Phosphateinheit bei Triphosphat-Prodrugs zumindest bei der Abspaltung der zweiten Maskierungseinheit negativ auf die Interaktion mit dem Enzym auswirkt.

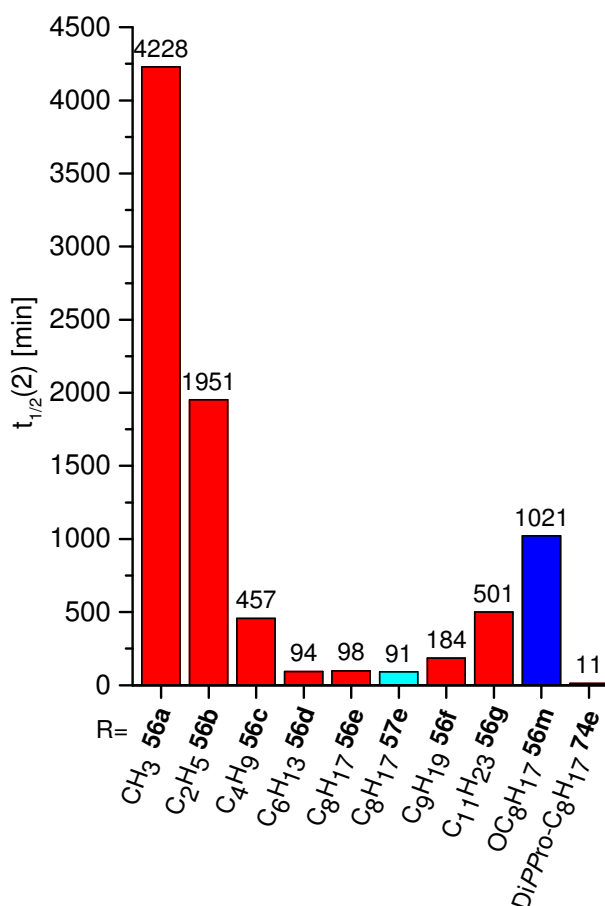


Abb. 82: Zweite Hydrolysehalbwertszeiten der TriPPPPro-d4TTP **56a-g** mit PLE in PBS (pH 7.3).

Durch die Experimente mit PLE konnte die enzymatische Initiierung nach dem postulierten Hydrolysemechanismus bewiesen werden, wodurch erstmalig ein Triphosphat-Prodrug-Konzept die direkte Freisetzung des biologisch aktiven Wirkstoffs ohne limitierende intrazelluläre Phosphorylierungsschritte ermöglicht.

4.3 Antivirale Aktivität der d4TTP-Prodrugs

Für einen indirekten Nachweis einer Penetration der Zellmembran von Anti-HIV-Substanzen kann die Bestimmung der antiviralen Aktivität herangezogen werden. Folglich wurden in Kooperation mit PROF. BALZARINI und PROF. SCHOLS von der Universität Leuven (Belgien) die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Prodrugs **56a-q** auf ihre Aktivität gegenüber den beiden HI-Virustypen untersucht. Dafür wurden mit HIV-1 bzw. HIV-2 infizierte T-Lymphozyten des Wildtyps (CEM/0) und eine Zelllinie (CEM/TK), in der keine Expression der Thymidinkinase stattfindet, verwendet. In CEM/TK-Zellen können dementsprechend keine Thymidinderivate, wie beispielsweise d4T **3**, in ihre Monophosphate überführt werden. Ein Verlust der antiviralen Aktivität der TriPPPPro-Verbindungen **56** in dieser Zelllinie wäre, eine

effektive intrazelluläre Freisetzung des Triphosphats **16** aus dem Prodrug vorausgesetzt, mit einer unzureichenden Membrangängigkeit oder einem extrazellulären Zerfall gleichzusetzen. Es war anzunehmen, dass die Lipophilie der zu untersuchenden Verbindungen in diesem Assay den entscheidenden Faktor darstellt, da sie bei passiver Diffusion die Permeabilität gewährleistet. Um die verschiedenen Verbindungen bezüglich ihrer Polarität im Verhältnis zueinander abzuschätzen, können die Retentionszeiten der Prodrugs bei der RP18-HPLC in Relation gesetzt werden.^[107] In Abbildung 83 sind die Chromatogramme der Reinsubstanzen aufgeführt.

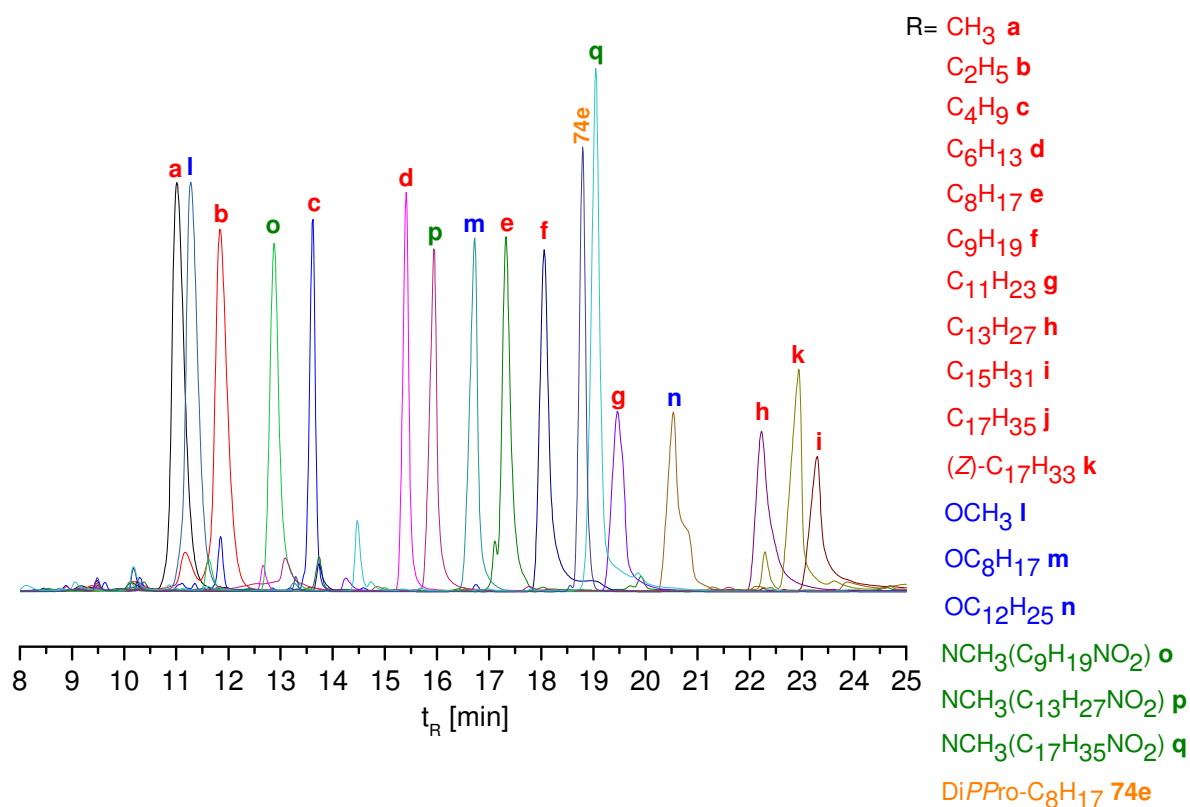


Abb. 83: Retentionszeiten der TriPPPro-d4TTP **56a-q** (HPLC-Methode A, 266 nm).

Da das d4T-Prodrug **56j** bei der Verwendung einer RP18-Säule nicht eluierte und daher mit einer RP8-Säule analysiert wurde, ist diese Verbindung nicht in Abbildung 83 integriert. Erwartungsgemäß führt eine zunehmende Länge der Alkylkette zu einer Verschiebung zu höheren Retentionszeiten, was folglich einer Erhöhung der Lipophilie gleichkommt. Dies gilt ebenso für die modifizierten Reste. Allerdings weisen die Carbonate in Bezug auf die absolute Kettenlänge, bedingt durch das zusätzliche Sauerstoffatom, eine verminderte Lipophilie im Vergleich zu den rein aliphatischen Derivaten auf.

Die erhaltenen Resultate der antiviralen Tests sollen im Folgenden anhand von Säulendiagrammen veranschaulicht werden. Dabei sind die EC_{50} -Werte angegeben, d. h. die effektive Konzentration eines Wirkstoffs, bei der bei 50% der Zellen die Virusreplikation

unterdrückt ist. Bei der Betrachtung der Werte für die TriPPPro-d4TTP **56** gegenüber HIV-1 (Abb. 84) sowie HIV-2 (Abb. 85) ist bei den aliphatischen Prodrugs **56a-k** die Tendenz zu höheren Aktivitäten mit zunehmender Lipophilie zu erkennen. Diese ist vermutlich auf die verbesserte Membrangängigkeit zurückzuführen. Ausnahmen stellen die Prodrugs **56h** und **56i** dar. Diese Unregelmäßigkeit könnte auf dem schlechten Löslichkeitsverhalten der beiden Prodrugs im Kulturmedium beruhen. Im Gegensatz dazu scheint das Prodrug **56j** mit $R = C_{17}H_{35}$ aufgrund der günstigeren Mizellenbildung die Zellmembran wieder besser durchdringen zu können, worauf ein zu d4T **3** halbiertes EC_{50} -Wert hindeutet. Insgesamt weisen alle Prodrugs gegenüber HIV-1 nur eine geringfügig schlechtere oder sogar eine verbesserte Anti-HIV-Aktivität im Vergleich zum Nukleosid d4T **3** auf.

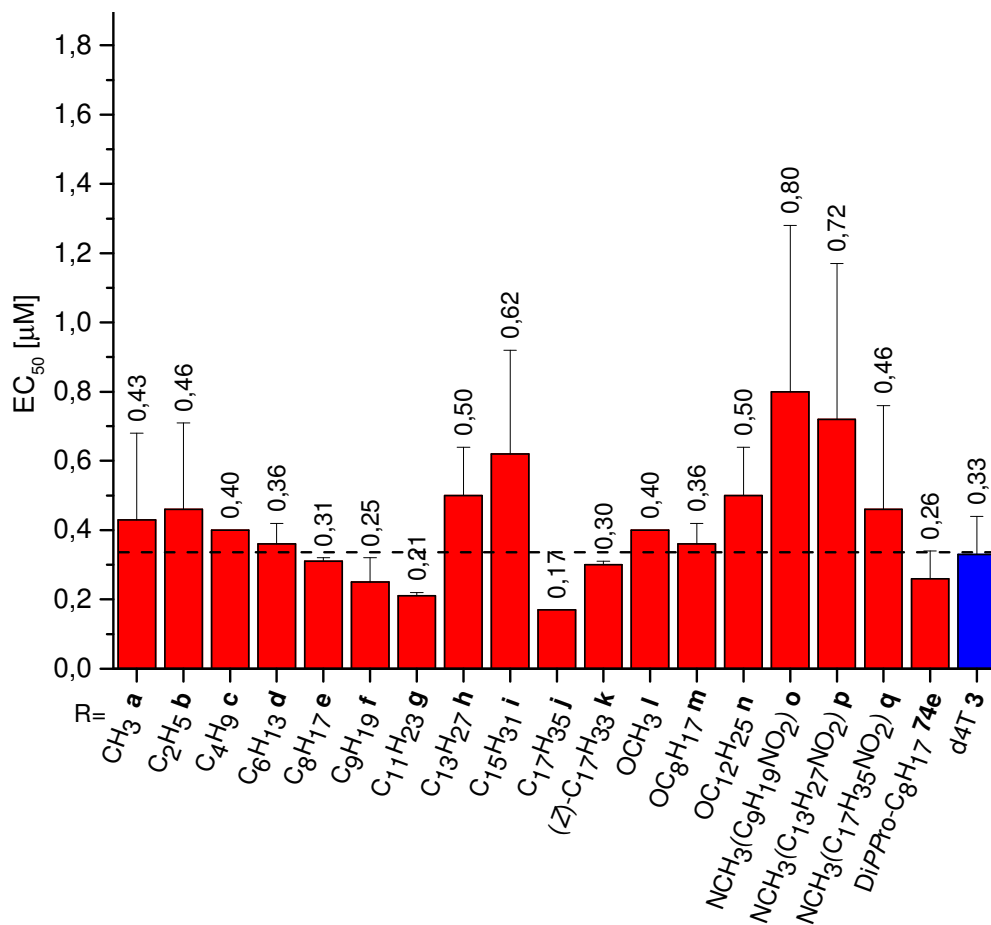


Abb. 84: Antivirale Aktivität der TriPPPro-d4TTP **56a-q** gegenüber HIV-1 in CEM/O-Zellen;
 EC_{50} : 50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation.

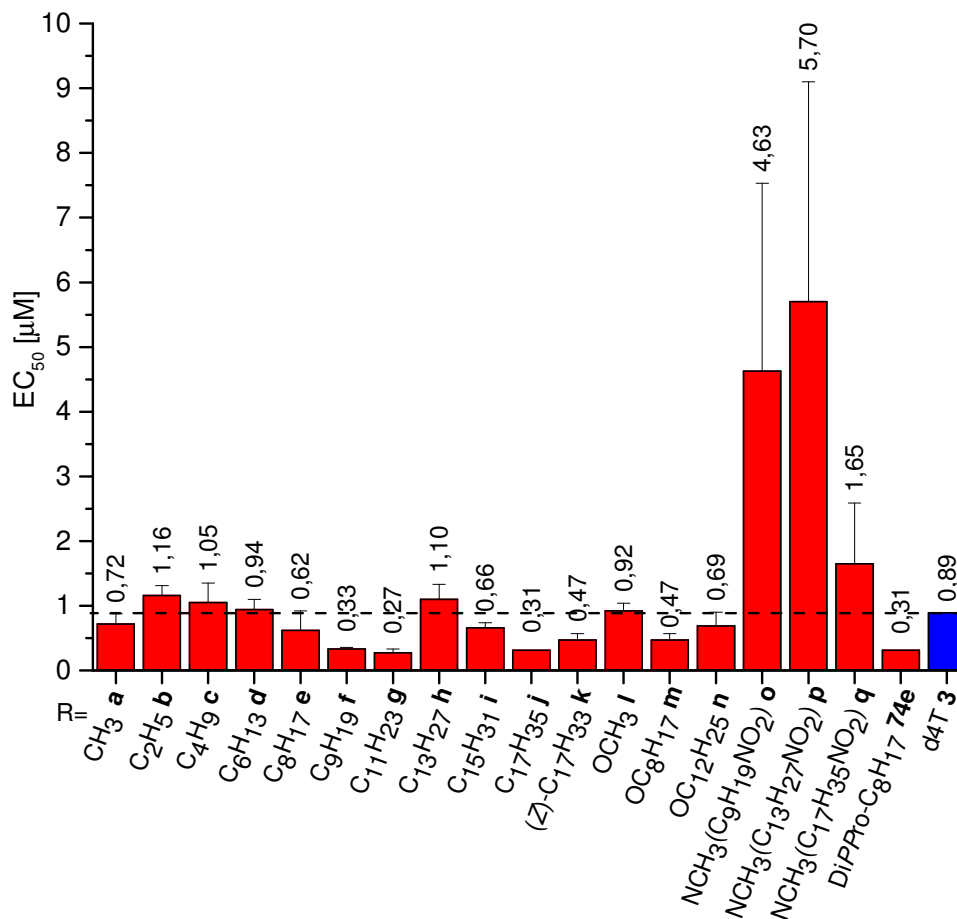


Abb. 85: Antivirale Aktivität der TriPPPro-d4TTP **56a-q** gegenüber HIV-2 in CEM/0-Zellen; EC₅₀: 50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation.

Auch die Werte der Carbonat-Verbindungen **56l-n** liegen in der gleichen Größenordnung, wenngleich keine Tendenz erkennbar ist. Das DiPPPro-d4TDP **74e** lässt sich entsprechend der Lipophilie (Abb. 83, S. 91) einordnen und zeigt eine mit dem TriPPPro-d4TTP **56f** vergleichbare Aktivität.

Unter dem Gesichtspunkt der Polarität zeigen die carbamatfunktionalisierten Prodrugs **56o-q** im Vergleich zu allen weiteren Triphosphat-Prodrugs **56a-n** gegenüber beiden Virustypen die schlechteste antivirale Aktivität. Allerdings erschwert die große Standardabweichung im Fall der Carbamat-Prodrugs **56o-q** eine zuverlässige Interpretation der Ergebnisse. Unter Einbeziehung der Resultate aus den Hydrolysestudien (Kapitel 4.2.1 und 4.2.2) sind diese EC₅₀-Werte auf den ersten Blick erstaunlich, da sowohl in den chemischen als auch den enzymatischen Untersuchungen lediglich eine nahezu selektive Degradation der Prodrugs **56o-q** zu den entsprechenden Intermediaten **57o-q** zu beobachten war. Ein Abbau zu weiteren Metaboliten, wie d4TDP **15** oder d4TTP **16**, fand nur in sehr untergeordnetem Maße statt. Ob die geringe Menge von d4TDP **15** und eine intrazelluläre Phosphorylierung desselben zum d4TTP **16** durch die NDPK für einen inhibitorischen Effekt ausreicht, ist als unwahrscheinlich anzunehmen. Es ist daher davon auszugehen, dass im intrazellulären

Medium das monomaskierte Prodrug **57q** das dominierende Abbauprodukt von der entsprechenden TriPPPro-Verbindung **56q** darstellt.

Für die Bestätigung eines TK-Bypasses gilt es, die antiviralen Daten heranzuziehen, die bei der Verwendung von CEM/TK-defizienten Zellen erhalten wurden. Eine Aktivität wäre einer erfolgreichen Diffusion des Prodrugs **56** durch die Zellmembran gleichzusetzen, da die phosphorylierten d4T-Metabolite d4TMP **13**, d4TDP **15** und d4TTP **16** die Membran nicht durchdringen können und von d4T **3** als Nukleosid keine antivirale Wirkung ausgehen kann. Aus den Resultaten lassen sich jedoch keine Erkenntnisse bezüglich der Metabolisierung des Prodrugs in der Zelle gewinnen, da neben der Freisetzung von d4TTP **16** auch diejenige von d4TDP **15** oder d4TMP **13** eine antivirale Aktivität bewirken würde. Denn durch die vorhandenen Kinasen TMPK und NDPK könnten auch d4TMP **13** und d4TDP **15** zum Triphosphat **16** phosphoryliert werden. Für einen direkten Beweis, dass die TriPPPro-Verbindungen **56** intrazellulär das Reverse Transkriptase inhibierende d4T-Triphosphat **16** freisetzen, müsste eine Zelllinie verwendet werden, die keine Nukleosiddiphosphatkinase exprimiert. Eine derartige Zelllinie steht der Forschung bisher allerdings nicht zur Verfügung. Eine Alternative ist die Verwendung eines Nukleosids, dessen Phosphorylierung vom Di- zum Triphosphat ineffizient katalysiert wird. Dieser Sachverhalt wird in Kapitel 4.5 aufgegriffen.

In Abbildung 86 ist zu erkennen, dass auch in TK-Zellen mit einer Erhöhung der Lipophilie die Zunahme der antiviralen Aktivität einhergeht, was insbesondere durch die hohe Aktivität des d4TTP-Prodrugs **56j** verdeutlicht wird. Folglich sind langkettige Prodrugs eher in der Lage, die Zellmembran zu penetrieren. Ein Eindringen der kurzkettigen Prodrugs **56a-d** mit $R \leq C_6H_{13}$ durch passive Diffusion erscheint aufgrund einer zu geringen Lipophilie dagegen nur geringfügig möglich. Die Resultate legen offen, dass bei den aliphatischen Derivaten eine Kettenlänge von $R \geq C_8H_{17}$ benötigt wird, um die Membrangängigkeit zu gewährleisten. Analoge Tendenzen sind bei den TriPPPro-d4TTP **56l-q** mit modifizierten Resten zu erkennen. Für Carbonat-Prodrugs **56l-n** erscheint eine Kette mit acht Kohlenstoffeinheiten zum Ausgleich der geladenen Phosphateinheiten als ausreichend. Im Gegensatz dazu zeigt bei den carbamatfunktionalisierten Prodrugs **56o-q** nur das langkettigste Prodrug **56q** eine Aktivität in TK-Zellen.

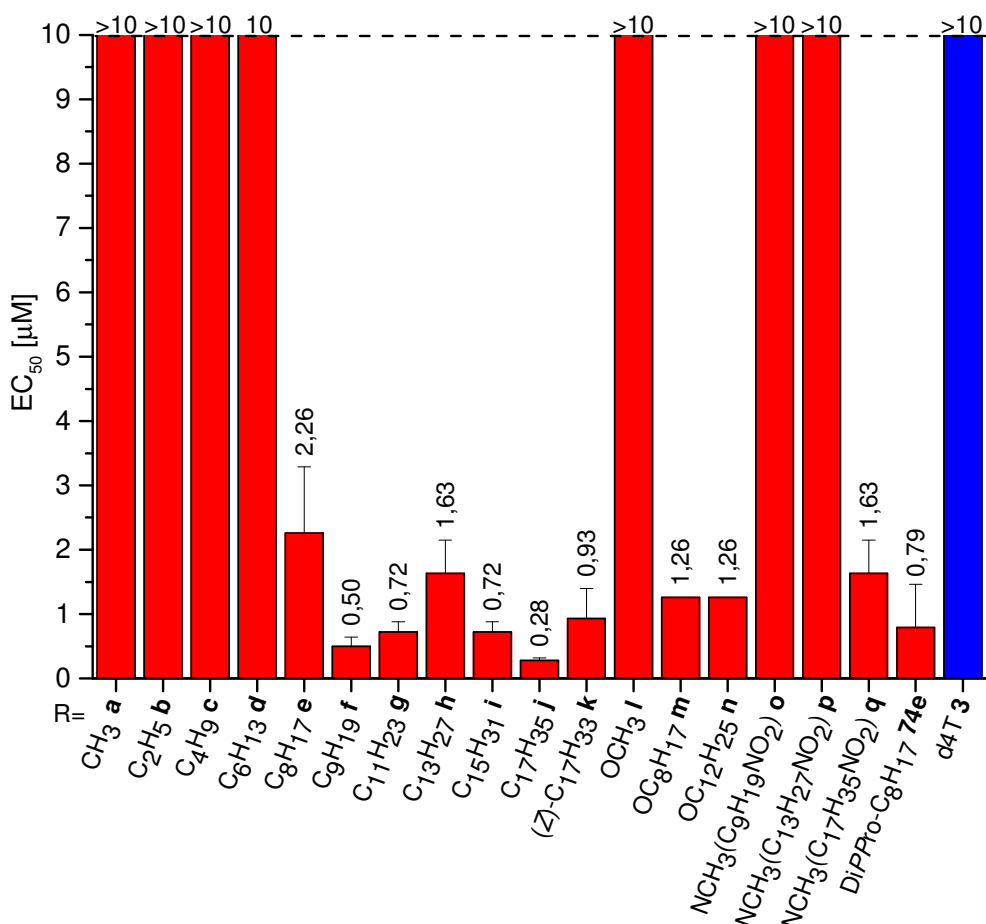


Abb. 86: Antivirale Aktivität der TriPPPPro-d4TTP **56a-q** in CEM/TK-Zellen;
 EC₅₀: 50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation.

In einer unabhängigen Testreihe wurde das MAB-Prodrug **57j** mit R= C₁₇H₃₅ bezüglich seiner antiviralen Aktivität untersucht. Die Ergebnisse in Tabelle 1 zeigen, dass auch diese Verbindung trotz der drei vorliegenden negativen Ladungen eine ausreichende Lipophilie zu besitzen scheint, um die Zellmembran durchdringen zu können. Dies unterstreichen die im Vergleich zu d4T **3** um den Faktor drei verbesserten EC₅₀-Werte in den mit HIV-1 und HIV-2 infizierten Zellen. Des Weiteren lässt sich eine überraschend gute Aktivität in TK-Zellen feststellen. Eine repräsentative Beurteilung ist mit dieser bisher einmaligen Untersuchung jedoch nicht möglich. Allerdings sollte in Zukunft eine Charakterisierung von lipophilen Intermediaten **57** in Bezug auf die antiviralen Eigenschaften der TriPPPPro-Verbindungen **56** weiter verfolgt werden.

Tab. 1: Antivirale Aktivität des MAB-Prodrugs **57j** gegenüber HIV-1 und HIV-2 in CEM/0- und in CEM/TK⁻-Zellen.

Verbindung	EC ₅₀ [μM] ^[a]			CC ₅₀ [μM] ^[b]
	HIV-1	CEM/0	CEM/TK ⁻	CEM/0
		HIV-2	HIV-2	
MAB-Prodrug 57j	0.24 ± 0.14	1.04 ± 0.38	1.55 ± 1.3	25 ± 9
d4T	0.76 ± 0.38	3.37 ± 1.4	> 50	79 ± 3

[a] 50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation. [b] 50% zytotoxische Konzentration. Die Werte wurden jeweils aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

Bezüglich der Zytotoxizität konnten CC₅₀-Werte bestimmt werden, die für Prodrugs in einem moderaten Bereich und teilweise in der gleichen Größenordnung wie d4T **3** liegen (Abb. 87).

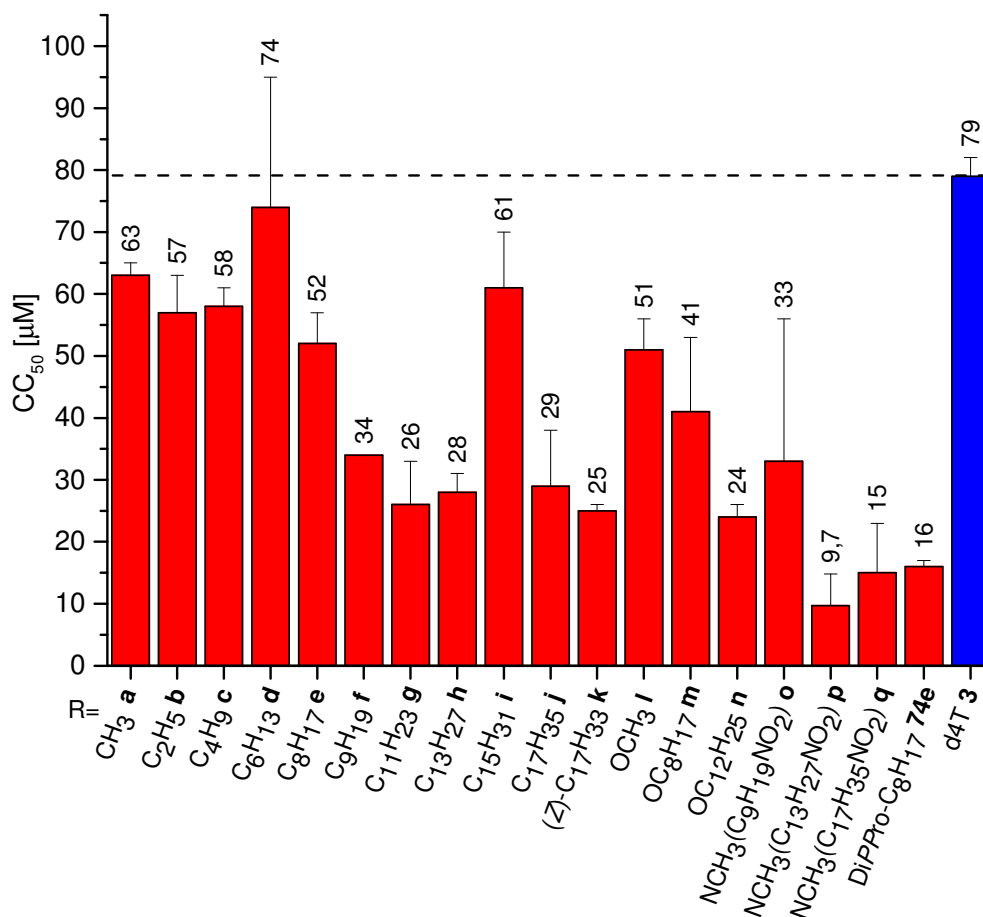


Abb. 87: Zytotoxizitäten der TriPPPro-d4TTP **56a-q** in CEM/0-Zellen;
CC₅₀: 50% zytotoxische Konzentration.

Interessanterweise ist auch hier eine tendenzielle Zunahme des Toxizitätswerts – mit Ausnahme des Prodrugs **56i** – korrelierend mit der Lipophilie der Prodrugs **56** zu erkennen. Dieser Umstand könnte auf den begünstigten Zelleintritt lipophiler Substanzen zurück-

zuführen sein, wodurch intrazellulär die freigesetzte Menge von d4TTP **16** erhöht wird. Eine zu hohe d4TTP-Konzentration könnte wiederum den zellulären Stoffwechsel negativ beeinflussen. Die höchsten Toxizitätswerte zeigten neben dem d4TDP-Prodrug **74e** die carbamatmodifizierten Prodrugs **56p** und **56q**. Für Letztere ist bei der Metabolisierung die Bildung von gesundheitsschädlichen Verbindungen nicht auszuschließen.

4.4 Fazit der Synthese und Charakterisierung der d4TTP-Prodrugs

Durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen und des chromatographischen Verfahrens konnte in dem ersten Teil dieser Arbeit ein effizienter Zugang zu TriPPP-Pro-Verbindungen entwickelt werden. Innerhalb der Syntheseroute ergab lediglich die Synthese des Diphosphatbausteins trotz unterschiedlicher Ansätze keine zufriedenstellenden Resultate. Dennoch gelang die erfolgreiche Darstellung einer Reihe von d4T-Triphosphat-Prodrugs **56a-q**. Die chemischen und enzymatischen Hydrolysestudien verdeutlichen die bisherige Einmaligkeit des Konzepts. Insbesondere die enzymatische und damit für den medizinischen Einsatz relevante Freisetzung des biologisch aktiven Triphosphats konnte nachgewiesen werden. Korrelierend wurde auch eine antivirale Aktivität gegenüber den beiden Virustypen HIV-1 und HIV-2 beobachtet, die erwartungsgemäß von der Lipophilie der Maskierungseinheiten abhängig ist. Des Weiteren blieb die Anti-HIV-Aktivität in TK-Zellen erhalten, was sowohl auf eine Permeabilität der Prodrugs schließen als auch die intrazelluläre Freisetzung von phosphorylierten Verbindungen vermuten lässt.

4.5 Erweiterung des TriPPP-Pro-Konzepts auf verschiedene Nukleosidanaloga

Nach der erfolgreichen Synthese einer Serie von d4TTP-Prodrugs **56a-q** und der Analyse ihres Hydrolyseverhaltens sowie der antiviralen Aktivität sollte das TriPPP-Pro-Konzept nach d4T **3** ebenso auf weitere Nukleoside übertragen werden. Um eine generelle Anwendbarkeit des Konzepts zu verdeutlichen, sollten Nukleoside verwendet werden, die ein breites Spektrum an Modifikationen am Glykon und an der Nukleobase vorzuweisen haben. Somit wurde auch erstmals die Darstellung eines Purinanalogs nach dem BAB-Konzept angestrebt, nachdem in der Vergangenheit lediglich die chemisch stabileren Thymidin- und Uridinanaloga Anwendung gefunden hatten.^[72,78,82,91,92]

In Abbildung 88 ist die Auswahl von Nukleosiden gezeigt, auf die das TriPPP-Pro-Konzept angewendet werden sollte. Dabei wurden die Verbindungen nach drei Kategorien geordnet: Gruppe A umfasst die Nukleoside, die in der antiviralen Therapie bereits zugelassen sind und folglich eingesetzt werden. Neben den gegen HIV wirksamen RT-Inhibitoren AZT **1**, ddi **2**, ABC **4** und ddC **8** wurde mit BVdU **49** auch ein Anti-HSV-Wirkstoff in die Untersuchungen einbezogen. Gruppe B schließt sowohl Thymidinderivate, wie ddT **31** und das carbozyklische *carba*-dT **111**, als auch unterschiedliche Uridinderivate, wie AZU **112**,

d4U **40**, ddU **41** und FddCIU **113**, ein. Den Pyrimidinanaloga stehen zuzüglich zu dem in der Therapie eingesetzten ddl **2** die potenziellen NRTI ddA **114** und ddG **115** mit Purin als Grundgerüst gegenüber. Für weitere analytische Studien sollte auch eine TriPPP-Verbindung des natürlichen Nukleosids Thymidin **83** (Gruppe C) synthetisiert werden, wodurch unter anderem die aus den Maskierungseinheiten resultierende toxische Wirkung ermittelt werden sollte.

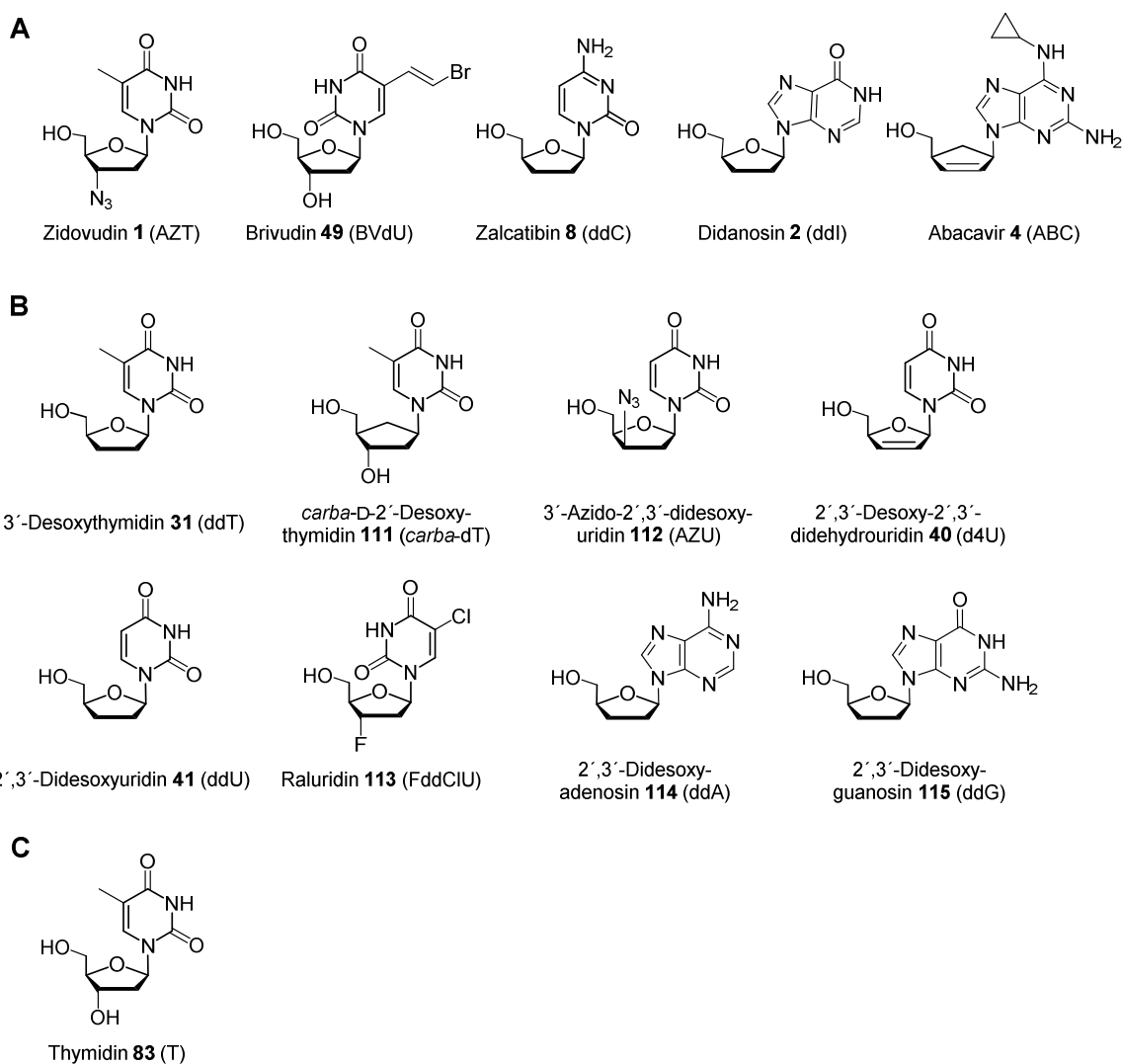


Abb. 88: Nukleoside zur Darstellung von TriPPP-NTP-Prodrugs. **A:** Zur antiviralen Therapie zugelassen; **B:** Potenzielle NRTI ohne Zulassung; **C:** Natürliches Nukleosid.

4.5.1 Metabolisierung der Nukleoside

In dem folgenden Abschnitt werden zunächst die intrazelluläre Metabolisierung sowie die Besonderheiten der verschiedenen nukleosidischen Inhibitoren diskutiert. Entscheidend für eine antivirale Aktivität der beschriebenen Nukleoside ist eine von intrazellulären Kinasen katalysierte Überführung in ihre Triphosphatform.

4.5.1.1 Metabolisierung von verschiedenen Thymidin- und Uridinanaloga

Als ein natürliches Substrat wird Thymidin **83** von Kinasen im Zytoplasma effizient zum Triphosphat **116** phosphoryliert. Hierbei übernehmen die Thymidin-, die Thymidylat- und die Nukleosiddiphosphatkinase die schrittweise Phosphorylierung zum bioaktiven Thymidin-triphosphat **116** (Abb. 89). Der Metabolismus des unnatürlichen Thymidinderivats AZT **1** wurde bereits in Kapitel 2.3 vorgestellt und diskutiert. Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt stellt dabei die Umsetzung des AZTMPs **14** zum AZTDP **28** mittels der TMPK dar.^[42,64]

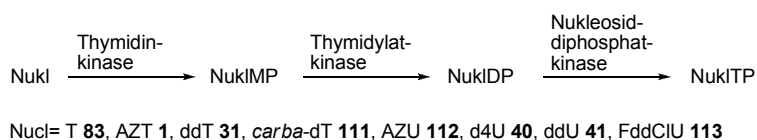


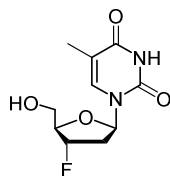
Abb. 89: Metabolismus von Thymidin- und Uridinanaloga.

Für die Metabolisierung der Thymidinanaloga ddT **31** und *carba*-dT **111** kann die Beteiligung der gleichen Enzyme angenommen werden (Abb. 88). Carbozyklische Nucleoside, wie *carba*-dT **111**, besitzen im Glykon anstelle des Ringsauerstoffs eine Methylengruppe. Diese Substitution bewirkt signifikante Differenzen in Bezug auf Struktur und Reaktivität im Vergleich zu glykosidischen Nucleosiden. Die hohe Stabilität des Cyclopentanrings verhindert nicht nur die chemische Hydrolyse, sondern auch den enzymatischen Abbau durch die Thymidin-Phosphorylase und folglich auch die Verstoffwechslung des Nucleosids.^[108,109] Der antiviralen Wirksamkeit liegt im Gegensatz zu AZT **1** und d4T **3** ein abweichender Wirkmechanismus zugrunde. Da eine 3'-Hydroxylfunktion vorliegt, findet nach dem Einbau von *carba*-dT **111** kein sofortiger Kettenabbruch (*immediate chain termination*) statt. In Inhibitionsstudien konnte gezeigt werden, dass die Transkription durch die Reverse Transkriptase aufgrund eines verzögerten Kettenabbruchmechanismus (*delayed chain termination*) zum Erliegen kommt.^[110] Vor allem für D-Analoga wurden vielversprechende Aktivitäten gegenüber HIV nachgewiesen.^[111,112]

Des Weiteren legten Untersuchungen offen, dass an den Phosphorylierungen der Uridinanaloga d4U **40**, ddU **41** und AZU **112** ebenfalls die Enzyme Thymidin- bzw. Thymidylatkinase beteiligt sind.^[113-115] Allerdings zeigte sich eine merklich geringere katalytische Effizienz, die unter anderem mithilfe von *molecular modeling* auf konformative Unterschiede im aktiven Zentrum der Enzyme im Gegensatz zu den Thymidinanaloga zurückgeführt werden konnte. Aber auch die Phosphorylierung durch die NDPK zur pharmakologisch aktiven Triphosphatform, die im Fall von d4U **40** und ddU **41** eine hohe antivirale HIV-Aktivität besitzt^[83], läuft nur unzureichend ab.^[82] Dementsprechend besitzen die DiPPro-Verbindungen dieser Nucleoside nur sehr geringe Anti-HIV-Aktivitäten. Für derartige

Substanzen könnte die Anwendung des TriPPPro-Konzepts hilfreich sein, um einen erfolgreichen Bypass aller Phosphorylierungsschritte zu gewährleisten.

Das gleiche Repertoire an Enzymen wird ebenfalls für die Phosphorylierung von 2',3'-Dideoxy-3'-fluor-5-halogenuridinen zu deren Triphosphatspezies angenommen.^[116] Ursprünglich hatte 3'-Desoxy-3'-fluorthymidin **117** (FLT, Abb. 90) zur Intensivierung der Entwicklung halogenierter Analoga geführt. FLT **117** besitzt eine im Vergleich zu AZT **1** geringfügig bessere Metabolisierungsrate, wie eine zwei- bis dreifach höhere Triphosphatkonzentration in Inkubationsstudien mit MT4-Zellen demonstrierte.^[117] Aufgrund der guten Anti-HIV-Aktivität *in vitro* wurde FLT **117** in klinischen Studien getestet, zeigte dabei allerdings eine hämatologisch toxische Wirkung. In weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass das chloresubstituierte Raluridin **113** (FddCIU) eine gute Affinität zur Thymidinkinase und gleichzeitig geringe Toxizitätswerte aufweist. Wie bei AZT **1** ist auch bei FddCIU **113** die Umsetzung zum Diphosphat gehemmt.^[116,118]



3'-Desoxy-3'-fluorthymidin **117** (FLT)

Abb. 90: FLT **117** als Ausgangssubstanz für die Entwicklung halogenierter Nukleosidanaloga.

4.5.1.2 Metabolisierung von BVdU

In Abbildung 88 (S. 98) ist mit Brivudin **49** (BVdU) auch ein hochselektives Herpes-Therapeutikum aufgeführt. Aufgrund seiner hohen Aktivität sowohl gegenüber dem Varizella-Zoster-Virus (VZV) als auch dem Herpes-Simplex-Virus Typ-I (HSV-I) findet sich BVdU **49** heutzutage in den meisten gängigen Herpes-Medikamenten wieder. Herpes-Viren gehören im Gegensatz zu HI-Viren zu der Klasse der DNA-Viren und besitzen keine Reverse Transkriptase. Der Wirkstoff ist in seiner Triphosphatform dagegen in der Lage, die viruseigene DNA-Polymerase zu inhibieren.^[119] Ein weiterer Inhibierungseffekt resultiert aus der Formierung von sogenannter "Nonsense-DNA", die auf der Ausbildung von Quervernetzungen der Bromvinyleinheiten beruht.^[120] Eine Besonderheit von BVdU **49** stellen die Phosphorylierungsschritte über das BVdUMP **118** zum BVdUDP **119** dar, die allein durch virale Kinasen katalysiert werden (Abb. 91). Lediglich die Umwandlung zum BVdUTP **120** erfolgt mittels der sehr unspezifischen zellulären Kinase NDPK. Somit kann eine Aktivierung des Nukleosids **49** nur in infizierten Zellen eintreten.^[119] Trotz dieser vermeintlich hohen Selektivität bezüglich Herpes-infizierter Zellen gelang es JESSEN durch Anwendung des DiPPPro-Konzepts, eine geringe Anti-HIV-Aktivität nachzuweisen.^[73] BVdU **49** könnte damit ein interessantes Beispiel dafür sein, inwieweit eine Überführung eines antiviral inaktiven

Nukleosids in eine antiviral aktive Form möglich ist, indem ein entsprechendes Prodrug-Konzept zum Umgehen der Phosphorylierungsschritte eingesetzt wird.

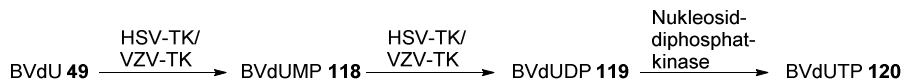


Abb. 91: Metabolismus von BVdU 49.

4.5.1.3 Metabolisierung von ddC

Seit 1992 ist 2',3'-Didesoxycytidin **8** (ddC) aus der Gruppe der Cytidinanaloge in der ART zugelassen und zählt damit zu einem der am längsten in der HIV-Therapie eingesetzten NRTI. Der biologisch aktive Metabolit ddCTP **121** besitzt eine zehnmal höhere Aktivität gegen die Reverse Transkriptase als AZTTP **29**.^[121] Trotzdem findet die klinische Anwendung in der Therapie nur noch selten statt. Dies beruht auf einer hohen Toxizität des Wirkstoffs ddC **8**. Des Weiteren ist ddC **8** durch eine starke Tendenz zu Arzneiwechselwirkungen sowie eine geringe Halbwertszeit (1-2 Stunden) gekennzeichnet, weshalb eine hohe Dosierung notwendig ist.^[122,123] Der erste Phosphorylierungsschritt wird durch die zelluläre Desoxycytidinkinase katalysiert (Abb. 92). Auch wenn ddC **8** im Vergleich zu dem natürlichen Nukleosid Cytidin ein relativ schlechtes Substrat für die Desoxycytidinkinase darstellt, konnte in der Vergangenheit eine rasche Umsetzung bis zur Triphosphatform durch zelluläre Kinasen beobachtet werden.^[124]

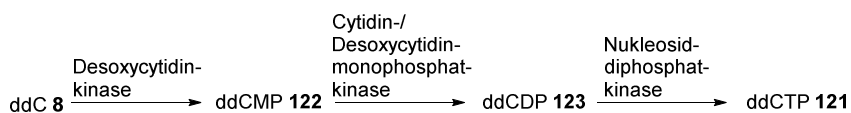


Abb. 92: Metabolismus von ddC **8**.

4.5.1.4 Metabolisierung von ABC

Einen weiteren Vertreter der Purinnukleoside stellt das seit 1999 von der FDA zur Behandlung des HI-Virus zugelassene carbozyklische Abacavir **4** (ABC) dar. Es ist das aktuell einzig verfügbare Medikament, das nach seiner Metabolisierung mit dem natürlichen DNA-Baustein 2'-Desoxyguanosin um eine Integration in den DNA-Strang konkurriert. Seine Aktivität basiert auf einer komplexen Phosphorylierungssequenz, für die die geschwindigkeitslimitierende enzymatische Stufe bisher noch nicht bestimmt werden konnte.^[125] Einzigartig bei der Metabolisierung von ABC **3** ist, dass keines der für die Phosphorylierung verantwortlichen Enzyme an der Phosphorylierung anderer NRTI beteiligt ist. Im ersten Schritt wird ABC **3** durch die Adenosin-Phosphotransferase zum ABCMP **124** umgesetzt (Abb. 93). Nach einer Desaminierung durch zytosolische Enzyme zum Carbovirmonophosphat **125** (CBVMP) schließt sich die enzymkatalysierte Umwandlung über das

CBVDP **126** bis hin zum entsprechenden Triphosphat **127** an. Die direkte Verabreichung von Carbovir **128** ist dagegen trotz seiner hohen antiviralen Aktivität nicht zielführend, da es neben einer geringen Bioverfügbarkeit hohe Toxizitätswerte besitzt.^[126]

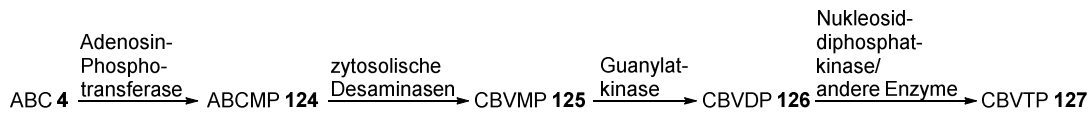


Abb. 93: Metabolismus von ABC **3**.

4.5.1.5 Metabolisierung von ddl und ddA

Beispiele für NRTI mit Purinbasen sind 2',3'-Didesoxyinosin **2** (ddl) und 2',3'-Didesoxyadenosin **114** (ddA). Für das ddA-Triphosphat **129** konnte in Experimenten mit der isolierten Reversen Transkriptase ein vergleichbar hoher inhibitorischer Effekt wie für AZTTP **29** festgestellt werden.^[127] Als nachteilig hatte sich bei ddA **114** jedoch die erste Phosphorylierungsstufe zum ddAMP **130** herausgestellt, die von den Enzymen Desoxycytidin- und Adenosinkinase katalysiert wird (Abb. 94). In beiden Fällen liegt nur eine sehr geringe Substrat-Enzym-Affinität vor, wodurch bei ddA **114** nur ein minimaler Teil des absorbierten Analogons eine inhibitorische Wirkung entfalten kann.

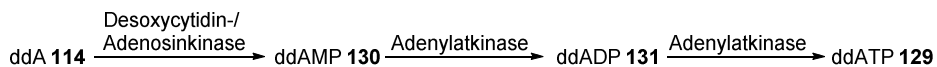


Abb. 94: Metabolismus von ddA **114**.

Zusätzlich unterliegt ddA **114** im Gegensatz zu den Nukleosidanaloga mit Pyrimidinbase einem ausgeprägten Katabolismus. So wird ddA **114** intrazellulär mit etwa 95% nahezu vollständig enzymatisch zum Nukleosid 2',3'-Didesoxyinosin **2** (ddl) desaminiert. Dieses wiederum wird teilweise zu Hypoxanthin umgesetzt, was einer Deaktivierung gleichzusetzen ist. Zwar besteht ausgehend von ddl **2** die Möglichkeit der Phosphorylierung durch die 5'-Nukleotidase zum ddIMP **132** mit anschließender Reaminierung durch die Enzyme Adenylosuccinat-Synthetase und Adenylosuccinat-Lyase zum ddAMP **130**, doch ist der letztgenannte Schritt wenig effizient.^[128,129] Nichtsdestotrotz hat sich in der ART die Behandlung mit ddl **2** bewährt, da bei der Verabreichung verglichen mit ddA **114** eine höhere ddAMP-Konzentration erreicht werden kann. Die Metabolisierung von ddl **2** beruht folglich auf einer Phosphorylierung zu ddIMP **132** mit darauffolgender Aminierung zu ddAMP **130** (Abb. 95). Daher konnte intrazellulär bisher allein ddIMP **132** als ddl-Metabolit nachgewiesen werden. Die weiteren Phosphorylierungsschritte durch die Adenylatkinase bis hin zum bioaktiven ddATP **129** laufen dagegen unproblematisch ab.^[129,130]

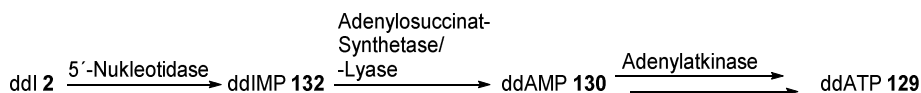


Abb. 95: Metabolismus von ddl **2**.

Neben dem enzymatischen Abbau der Purinderivate hat sich auch deren hohe Säurelabilität als nachteilig herausgestellt. Bereits im schwach sauren Medium findet eine Protonierung der N^9 -Position statt, woraufhin sich ein Bruch der glykosidischen Bindung und die Bildung eines intermediären Kations **133** sowie der Nukleobase **134** ereignen (Abb. 96). Das Intermediat **133** wiederum reagiert zum Halbacetal **135** weiter.

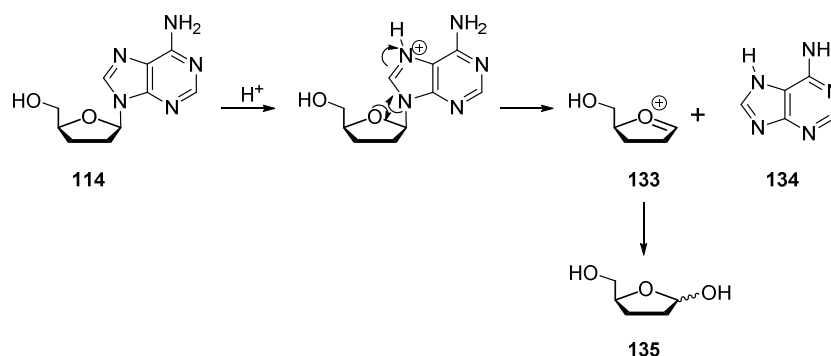


Abb. 96: Säurekatalysierter Zerfall von Purinanaloga am Beispiel von ddA **114**.

4.5.1.6 Metabolisierung von ddG

2',3'-Dideoxyguanosin **115** (ddG) ist als Anti-HIV-Wirkstoff wenig erforscht, dennoch wird eine Aktivierung ausgehend von ddGMP **136** über das entsprechende Diphosphat **137** zum Triphosphat **138** ähnlich dem Metabolismus von Carbovir **128** angenommen (Abb. 97).^[128]

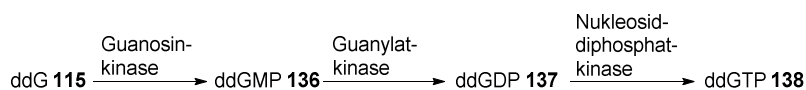


Abb. 97: Metabolismus von ddG **115**.

4.5.2 Synthese der verschiedenen Nukleosidanaloga

Da mit Didanosin **2** (ddl) und Raluridin **113** (FddCIU) nur eine geringe Anzahl der zur Anwendung kommenden Nukleoside kostengünstig kommerziell erhältlich war bzw. der Arbeitsgruppe zur Verfügung stand, mussten die meisten Verbindungen in Anlehnung an Literaturvorschriften synthetisiert werden. Zudem wurden die Nukleoside, bei denen neben der 5'-Hydroxylfunktion weitere nukleophile funktionelle Gruppen vorlagen, mit einer geeigneten Schutzgruppe versehen. Dadurch sollte die Zahl der auftretenden Neben-

reaktionen bei den anschließenden Phosphorylierungsschritten minimiert werden. Die Synthesen der nukleosidischen Verbindungen werden nachstehend im Einzelnen vorgestellt.

4.5.2.1 Synthese von 3'-Azido-3'-desoxythymidin (AZT)

Die Darstellung von AZT **1** wurde nach einer Vorschrift von HIEBL ET AL.^[131] vollzogen (Abb. 98). Im ersten Schritt erfolgte die Schützung der freien 5'-Hydroxylfunktion von Thymidin **83** mithilfe von TBDMSCl. Im Anschluss wurde durch Behandlung des TBDMS-geschützten Thymidins **139** mit Triphenylphosphan und Azodicarbonsäurediisopropylester (DIAD) über eine intramolekulare Mitsunobu-Reaktion der Ringschluss zwischen dem Glykon und der Nucleobase durchgeführt. Das Nebenprodukt Triphenylphosphanoxid ließ sich durch Verwendung von Ethylacetat als Laufmittel per Säulenchromatographie leicht separieren, bevor das 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2,3'-anhydrothymidin **140** mit Aceton eluiert wurde. Bei einer Temperatur von 110 °C gelang die Einführung der Azidogruppe an der 3'-Position durch eine Öffnung der Ringstruktur mit Natriumazid. Nach der Zersetzung des überschüssigen Natriumazids mit Iod und einer säulenchromatographischen Aufarbeitung wurde das TBDMS-geschützte AZT **141** in einer Ausbeute von 68% erhalten. Die Abspaltung der Schutzgruppe wurde über die Standardprozedur durch Umsetzung mit TBAF erzielt.

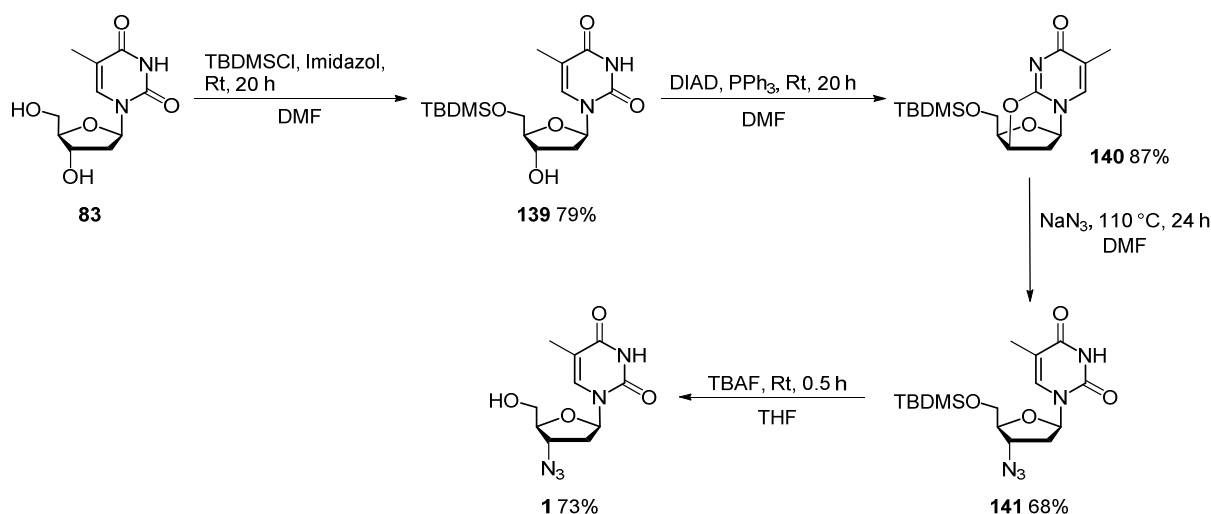


Abb. 98: Synthese von AZT **1**.^[131]

4.5.2.2 Synthese von 3'-Desoxythymidin (ddT)

Als Ausgangssubstanz diente d4T **3**, dessen Synthese in Kapitel 4.1.1.2.1 beschrieben ist. Dieses wurde unter Wasserstoffatmosphäre an Palladium auf Aktivkohle (10% Pd) zum Thymidinanalogon ddT **31** hydriert (Abb. 99). Zur Reaktionsverfolgung wurde hierbei die ¹H-NMR-Spektroskopie eingesetzt. Das Produkt ddT **31** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 78% erhalten werden.

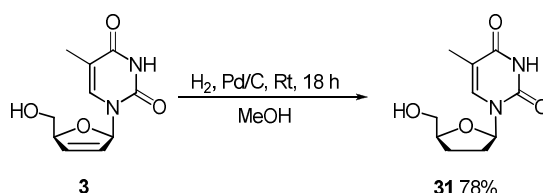


Abb. 99: Synthese von ddT **31**.

4.5.2.3 Synthese von 3'-O-Acetylthymidin **142** und 3'-O-Acetyl-*carba*-dT

Zur Vermeidung von Nebenreaktionen bei den Phosphorylierungsschritten (Kapitel 4.5.3) wurde eine Schützung der freien 3'-Hydroxylfunktion des natürlichen DNA-Bausteins Thymidin **83** und des Analogons *carba*-dT **111** vorgenommen. Als geeignet erwies sich in diesem Zusammenhang die unter basischen Bedingungen leicht abzuspaltende Acetyl-schutzgruppe, die bereits bei der Synthese von zahlreichen phosphorylierten Biomolekülen Anwendung gefunden hatte.^[97] Einer Silylierung der sekundären 5'-Hydroxylfunktion mit TBDMSCl folgte in einer Eintopfreaktion die Veresterung mit Essigsäureanhydrid (Abb. 100). Nach fünf Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in THF aufgenommen und mit einer 1 M TBAF-Lösung behandelt. Die Aufarbeitung der 3'-O-Acetyl-geschützten Nucleoside **142** und **143** erfolgte säulenchromatographisch. Die Gesamtausbeuten über die zwei Stufen betragen sehr gute 79% bzw. 77%. Die in derselben Größenordnung liegenden Ausbeuten, unabhängig von der Nucleosidstruktur, verdeutlichen die generelle Anwendbarkeit dieser Methode. Das eingesetzte *carba*-dT **111** wurde von THIAGO DINIS DE OLIVEIRA zur Verfügung gestellt.

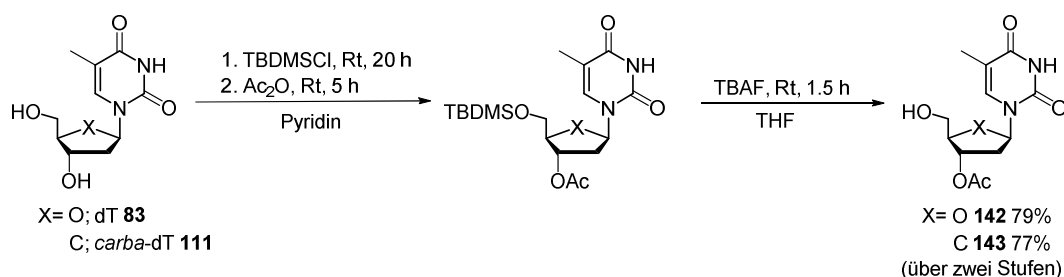


Abb. 100: Synthese von 3'-O-Acetylthymidin **142** und 3'-O-Acetyl-*carba*-dT **143**.

4.5.2.4 Synthese von 3'-Azido-2',3'-dideoxyuridin (AZU)

Die Synthese von AZU **112** mit einer im Vergleich zu den anderen Analoga untypischen (*R*)-Konfiguration an der 3'-Position wurde nach einer Vorschrift durchgeführt, die vielfach in der Literatur mit verschiedenen Abwandlungen zur Synthese von AZT **1** beschrieben ist. In Anlehnung an CUI ET AL.^[132] wurde 2'-Desoxyuridin **144** in einer Eintopfreaktion zunächst an der 5'-Position TBDMS-geschützt und im Anschluss die 3'-Hydroxylfunktion mesyliert (Abb. 101). Das erhaltene Mesylat **145** wurde in einer sehr guten Ausbeute von 95%

gewonnen und ließ sich durch Umsetzung mit Natriumazid bei 100 °C nach einem S_N2 -Mechanismus in das entsprechende Azid überführen. Dabei kam es verglichen mit der Ausgangssubstanz **83** zu einer Inversion der Konfiguration. Die azido-funktionalisierte Verbindung **146** wurde durch Präzipitation in kaltem Wasser in guter Reinheit erhalten. Die Entschützung erfolgte erneut mit einer TBAF-Lösung. Die säulenchromatographische Aufarbeitung war jedoch aufgrund der enthaltenen Salze trotz mehrmaliger Durchführung nicht möglich. Erst durch Umkristallisation in Methanol konnte AZU **112** erfolgreich separiert werden.

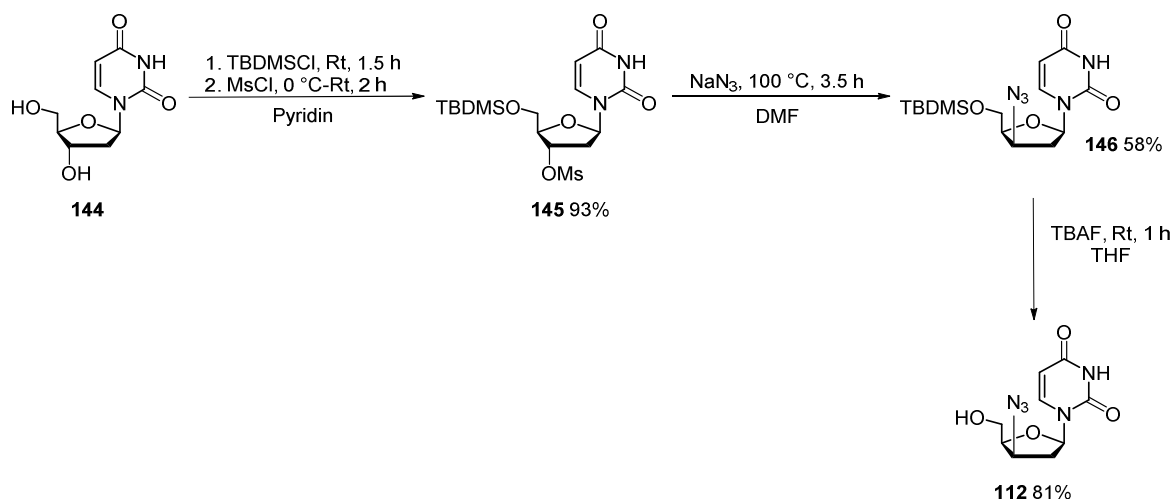


Abb. 101: Synthese von AZU **112**.^[132]

4.5.2.5 Synthese von 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydroxyuridin (d4U) und 2',3'-Dideoxyuridin (ddU)

Für die Darstellung von d4U **40** und ddU **41** wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Synthesemöglichkeiten bezüglich ihrer Wirtschaftlichkeit miteinander verglichen.

Bei der ersten Variante wurde d4U **40** nach der beschriebenen Syntheseroute für d4T **3** synthetisiert, indem 2'-Desoxyuridin **144** als Ausgangssubstanz in Pyridin mit Methansulfonylchlorid zur Reaktion gebracht wurde (Abb. 102).^[94] Das mesylierte Nucleosid **147** wurde mit Eiswasser präzipitiert und konnte bereits auf diesem Wege in hoher Reinheit sowie in einer guten Ausbeute von 83% gewonnen werden. Die Umsetzung zum 3',5'-Anhydro-2'-desoxyuridin **148** erfolgte durch Behandlung mit heißer Natronlauge. Nach der Neutralisation mit konzentrierter Salzsäure schloss sich eine mehrmalige Extraktion mit Ethylacetat an, sodass das Produkt **148** schließlich in einer Ausbeute von 94% isoliert werden konnte. Für die Eliminierungsreaktion zum d4U **40** wurden abweichend von HORWITZ ET AL.^[94] Synthesebedingungen gewählt, die sich bereits bei der Darstellung von d4T **3** bewährt hatten. Hierbei wurde das Anhydrouridin **148** mit Kaliumhydroxid in *tert*-Butanol behandelt und die Zielverbindung **40** nach säulenchromatographischer Reinigung in einer

Ausbeute von 64% erhalten. Der Ausbeuteverlust ist vor allem auf den Bruch der glykosidischen Bindung zurückzuführen, der durch die Detektion der abgespaltenen Nucleobase Uridin nachgewiesen wurde. Eine Quantifizierung des Zerfallsprodukts erfolgte allerdings nicht.

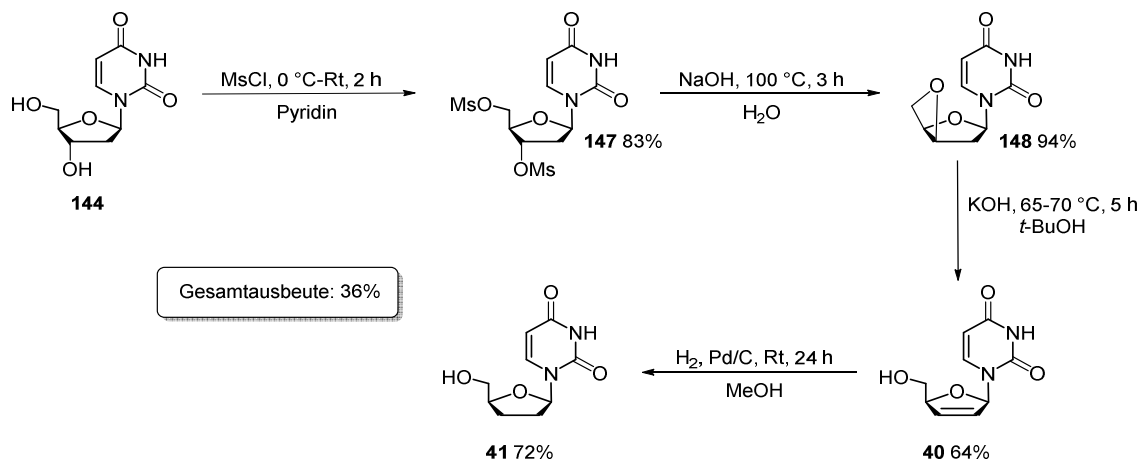


Abb. 102: Synthese von d4U **40** und ddU **41**.^[94]

Die Hydrierung zum ddU **41** wurde nach der Standardprozedur mit Palladium auf Aktivkohle als Katalysator durchgeführt. Dabei wurde durch die Zugabe einiger Tropfen Triethylamin der Versuch unternommen, die Passivierung der Metalloberfläche des Katalysators aufzuheben und folglich seine Aktivität zu erhöhen. Tatsächlich konnte auch eine deutliche Steigerung der Aktivität festgestellt werden, die im signifikanten Grad zu einer zusätzlichen Hydrierung der Nucleobase führte. Korrelierend fiel die Ausbeute für diesen Reaktionstyp mit 72% vergleichsweise moderat aus.

Bei der zweiten Variante sollte das im Vergleich zu 2'-Desoxyuridin **144** kostengünstigere Uridin **149** als Ausgangssubstanz dienen. CHU ET AL. publizierten eine Synthesemöglichkeit von verschiedenen 2',3'-Didesoxynucleosiden, nach der die Produkte durch eine *syn*-Eliminierung entsprechender *O,O'*-Thiocarbonylnucleoside zugänglich sind.^[133] Die Übertragung dieser Methode auf die Synthese von d4U **40** bzw. ddU **41** soll im Folgenden vorgestellt werden.

Im ersten Schritt wurde die 5'-Position durch Umsetzung mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMSCl) in Pyridin silyliert (Abb. 103). Daran schloss sich die Umsetzung des TBDMS-geschützten Uridins **150** mit 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol zum Thiocarbonat **151** an, das nach Säulenchromatographie in einer Ausbeute von 82% isoliert werden konnte.

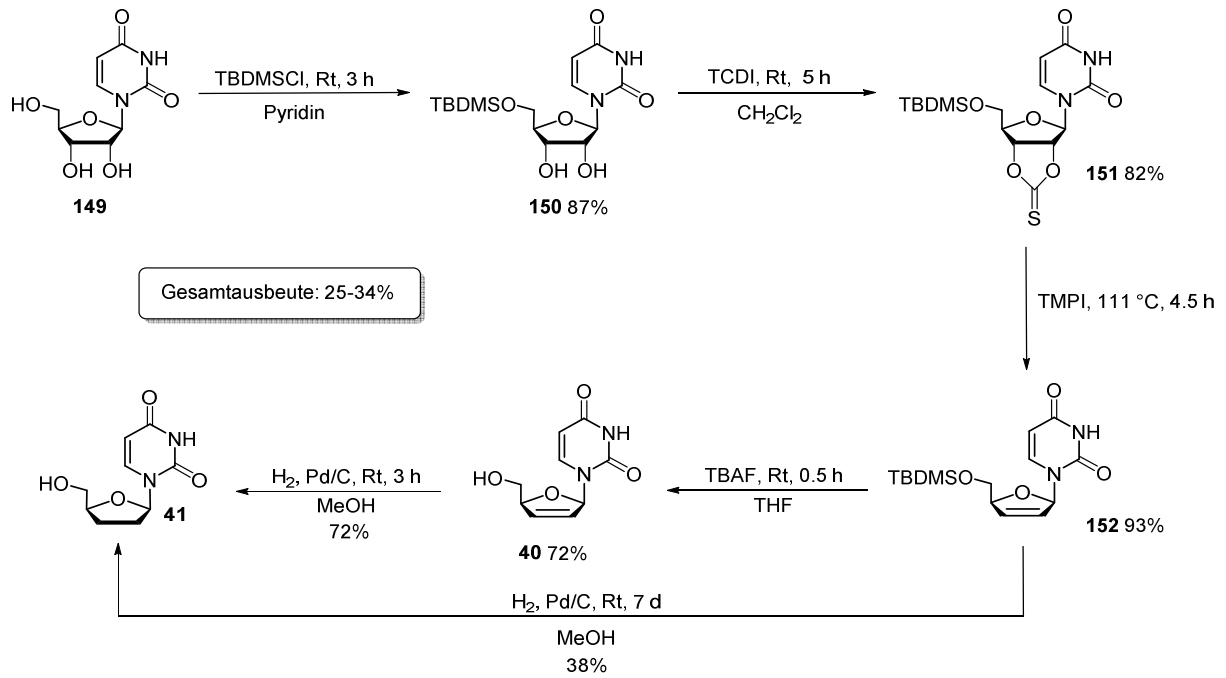


Abb. 103: Synthese von d4U **40** und ddU **41** nach CHU ET AL..^[133]

Den entscheidenden Schritt bei der Syntheseroute stellt die Eliminierung des zyklischen Thiocarbonats **151** zum TBDMS-geschützten d4U **152** dar. Der Mechanismus folgt der Corey-Winter-Olefin-Synthese (Abb. 104).^[134,135]

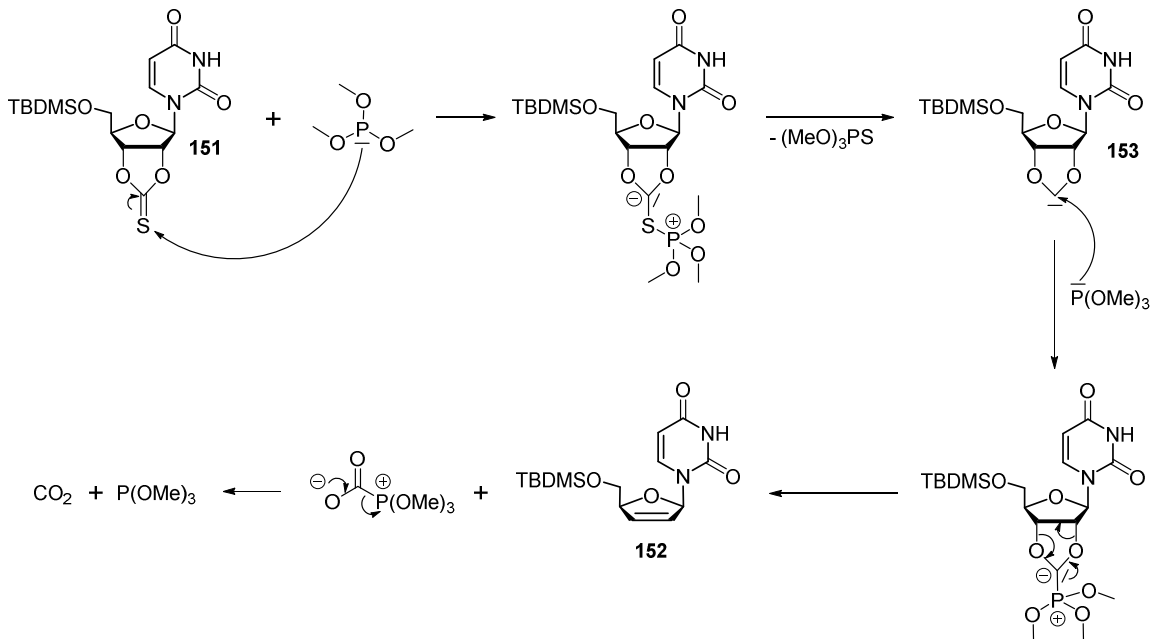


Abb. 104: Mechanismus der Corey-Winter-Olefin-Synthese zur Darstellung des d4U-Derivats **152**.^[134,135]

Dabei findet durch Umsetzung des Thiocarbonats **152** mit dem geruchsintensiven Trimethylphosphit unter Desulfurierung und Abspaltung von Kohlenstoffdioxid die Olefinierung statt. Das Phosphit initiiert als Nukleophil die Reaktion und katalysiert anschließend auch den Zerfall des Carbens **153** zum Alken **40**. Die Freisetzung des gasförmigen Kohlenstoffdioxids konnte während der Reaktion deutlich beobachtet werden. Nach der säulenchromatographischen Aufarbeitung konnte d4U **40** in einer sehr guten Ausbeute von 93% erhalten werden. Die Hydrierung der Doppelbindung des 5'-TBDMS-geschützten d4Us **152** zum entsprechend silylierten ddU mit Palladium auf Aktivkohle misslang dagegen. Scheinbar behinderte die sterisch anspruchsvolle Schutzgruppe eine geeignete Positionierung des Katalysators. Dadurch waren nach sieben Tagen noch große Mengen des Edukts mittels ¹H-NMR-Spektroskopie nachweisbar. Allerdings wurde durch die lange Reaktionszeit und vermutlich aufgrund des schwach sauren Charakters des Methanols die Abspaltung der säurelabilen TBDMS-Gruppe beobachtet. Das dabei freigesetzte d4U **40** wurde erwartungsgemäß umgehend hydriert. Demzufolge konnte nach säulenchromatographischer Reinigung zumindest das bereits ungeschützte ddU **41** isoliert werden. Ein alternativer Weg, der zunächst die Desilylierung des Nucleosids **152** mit Tetra-*n*-butylammoniumfluorid gefolgt von der Hydrierung vorsieht, stellte sich mit kurzen Reaktionszeiten und einer Ausbeute von 52% über zwei Stufen als deutlich profitabler heraus.

Bei der Gegenüberstellung der zur Synthese der Uridinanaloga d4U **40** und ddU **41** eingesetzten Methoden nach HORWITZ ET AL.^[94] und CHU ET AL.^[133] erwies sich trotz vergleichbarer Gesamtausbeuten die Erstgenannte als vorteilhaft. Zum einen fällt die Route um einen Syntheseschritt kürzer aus, zum anderen lassen sich die Zwischenprodukte überwiegend ohne Säulenchromatographie in hoher Reinheit isolieren. Durch die damit verbundene Zeitersparnis sowie den geringeren Verbrauch an Lösungsmitteln scheint auch der ökonomische Aspekt, der ursprünglich den Anlass für die Suche nach einer alternativen Syntheseroute darstellte, für die Variante von HORWITZ ET AL.^[94] zu sprechen.

4.5.2.6 Synthese von 3'-O-Acetyl-BVdU

Die Acetylierung des Anti-Herpes-Medikaments BVdU **49** erfolgte entsprechend der bereits für Thymidin **83** und *carba*-dT **111** vorgestellten Syntheseroute (Kapitel 4.5.2.3). Nach der aufeinanderfolgenden Silylierung und Umsetzung mit Essigsäureanhydrid von BVdU **49** wurde das erhaltene Rohprodukt **155** zum vollständigen Entfernen von Pyridinresten zweimal mit Toluol coevaporiert (Abb. 105). Einer Desilylierung mit TBAF schloss sich die säulenchromatographische Aufarbeitung an, sodass 3'-O-Acetyl-BVdU **154** über zwei Stufen in einer Gesamtausbeute von 83% erhalten wurde.

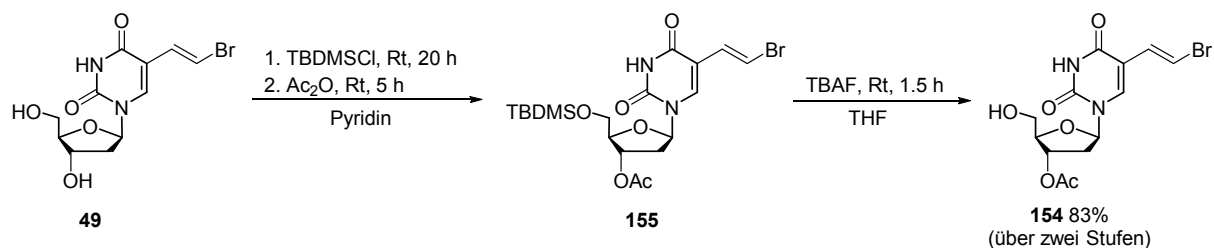


Abb. 105: Synthese von 3'-O-Acetyl-BVdU **154**.

4.5.2.7 Synthese von *N*⁴-Acetyl-2',3'-didesoxycytidin

Da nach CHU ET AL.^[133] eine Darstellung von ddC **8** durch Desoxygenierung mit Trimethylphosphit aufgrund der Instabilität des Thiocarbonats als nicht realisierbar beschrieben war, wurde zur Synthese eine alternative Route gewählt.^[136] Hierfür wurde Cytidin **157** mit 1.2 Äquivalenten Essigsäureanhydrid selektiv zum *N*⁴-Acetylcytidin **158** umgesetzt, das sich aus einem Diethylether/Methanol-Gemisch (10:1 v/v) erfolgreich umkristallisieren ließ (Abb. 106).^[137] Anschließend erfolgte durch Umsetzung mit Bromwasserstoffsäure in Essigsäure bei 50 °C eine Bromacetylierung zu einem Regioisomerengemisch **159**.^[136] Nach Extraktion schloss sich ohne Aufarbeitung mithilfe eines frisch präparierten Zn-Cu-Kupplungsreagenzes, dessen Synthese dem Experimentalteil (Kapitel 5.2.18) dieser Arbeit zu entnehmen ist, eine reduktive Eliminierung an. Das erhaltene Rohprodukt **160** konnte darauffolgend mit Ammoniak quantitativ deacetyliert werden. Basierend auf der hohen Polarität des Nucleosids d4C **161** konnte die Säulenchromatographie nur mit einem Laufmittelgemisch aus Dichlormethan/Methanol im Verhältnis 4:1 durchgeführt werden. Der erhöhte Anteil an Methanol stellt vermutlich das Polaritätslimit für das Silicagel der Normalphasenchromatographie dar und erschwert dadurch die Separation, was sich in dem auftretenden Tailing widerspiegelt. Möglicherweise wäre die Verwendung einer RP18-Säule mit einem entsprechenden Laufmittel in Zukunft ratsamer. Allerdings wies d4C **161** in seiner Monophosphatform unter wässrigen Bedingungen eine hohe Hydrolyseempfindlichkeit auf (Kapitel 4.5.3.5), die gegen eine Reinigung mit RP18-Chromatographie sprechen würde. Dennoch konnte das Produkt **161** nach zweimaliger NP-Chromatographie über drei Stufen in einer Ausbeute von 33% erhalten werden. Dieser Syntheseweg ermöglicht somit in der Summe einen unkomplizierten und schnellen Zugang zu d4C **161**.^[136] Für die Darstellung von ddC **8** wurde zunächst die exozyklische Aminofunktion reacetyliert und im Anschluss die Doppelbindung des *N*⁴-Acetyl-d4Cs **162** hydriert. Nach den unbefriedigenden Erfahrungen bei der Reinigung von d4C **161** wurde die Aufarbeitung von ddC **8** über automatisierte RP18-Säulenchromatographie mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten durchgeführt, wodurch das Zielnucleosid **156** problemlos in hoher Reinheit in einer Ausbeute von 67% isoliert werden konnte.

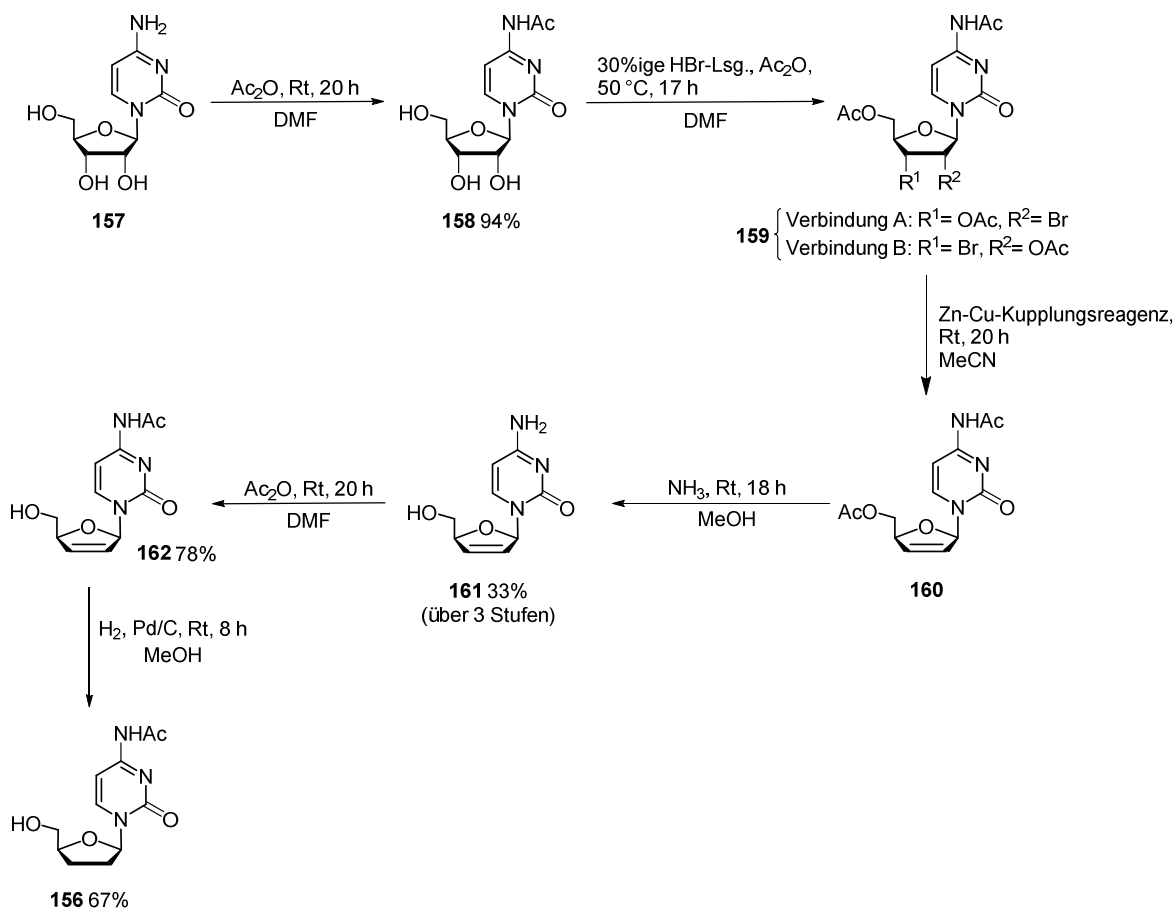


Abb. 106: Synthese von *N*⁴-Acetyl-ddC **156**.^[136]

4.5.2.8 Synthese von Abacavir (ABC)

Ausgehend von dem 6-Chloro-Derivat **163**, das dem Arbeitskreis als Hydrochloridsalz zur Verfügung stand, ließ sich das carbozyklische Abacavir **4** nach einer literaturbekannten Synthese darstellen.^[135] Dafür wurde das Edukt **163** in Methanol suspendiert, mit Cyclopropylamin versetzt und für 20 Stunden zum Rückfluss erhitzt (Abb. 107). Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie sowie anschließender Umkristallisation aus Dichlormethan, wodurch das Produkt **4** in einer guten Ausbeute von 84% erhalten wurde.

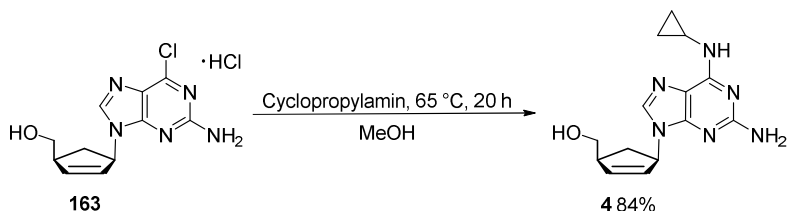


Abb. 107: Synthese von ABC **4**.^[135]

4.5.2.9 Synthese von 2',3'-Dideoxyadenosin (ddA)

In Analogie zu der Darstellung von ddU **41** wurde die Synthese von ddA **114** ausgehend von Adenosin **164** durchgeführt (Abb. 108).^[133] Das nach der Standardprozedur erhaltene an der 5'-Position TBDMS-geschützte Adenosin **165** wies nach der chromatographischen Reinigung noch signifikante Mengen von Imidazol als Verunreinigung auf. Da Imidazol jedoch in der darauffolgenden Reaktion ebenfalls freigesetzt werden sollte, wurde von einer vollständigen Reinigung des Nucleosids **165** abgesehen. Durch die Umsetzung mit 1,1-Thiocarbonyl-diimidazol wurde das Thiocarbonat **166** erhalten, das wiederum binnen 1.5 Stunden unter Verwendung von Trimethylphosphit in das entsprechende Alken **167** umgewandelt wurde. Nach Desilylierung zum d4A **168** und Hydrierung konnte ddA **114** in einer guten Gesamtausbeute von 34% gewonnen werden. Anschließend wurde der Versuch der Schützung der exozyklischen Aminofunktion von ddA **114** mit Essigsäureanhydrid unternommen. Allerdings konnte durch dünnschichtchromatographische Kontrolle auch nach Tagen keine Reaktion festgestellt werden. Aufgrund der Labilität der glykosidischen Bindung wurde bei einer Umsetzung mit dem reaktiveren Acetylchlorid ein Zerfall des Edukts **114** beobachtet. Daher wurde dazu übergegangen, ddA **114** in den Folgereaktionen ungeschützt einzusetzen.

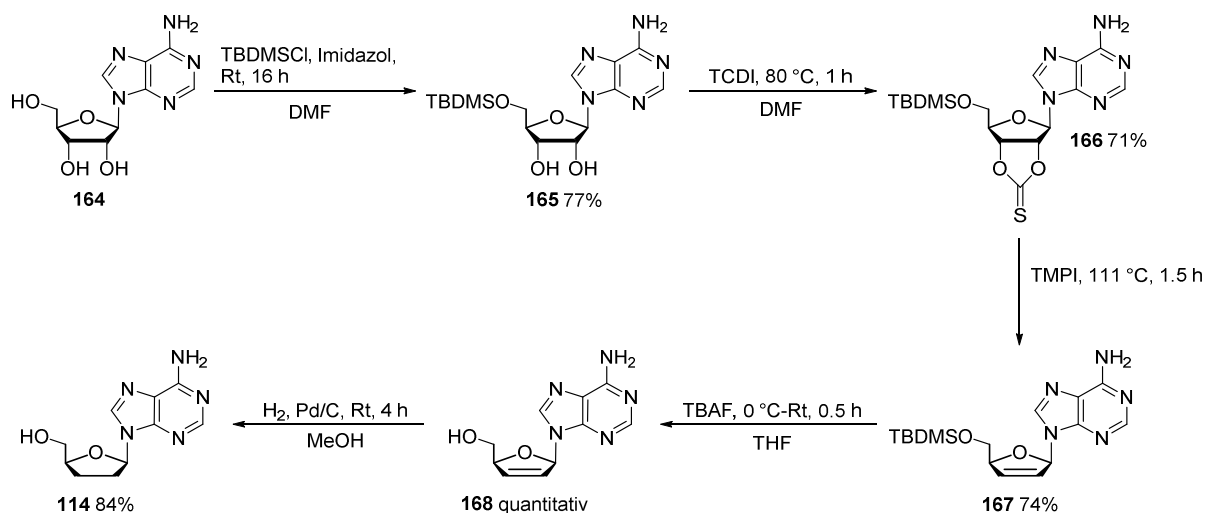


Abb. 108: Synthese von ddA **114**.^[133]

4.5.2.10 Synthese von *N*²-Acetyl-2',3'-dideoxyguanosin **169**

Für die Synthese des an *N*²-Position acetylierten ddGs **169** wurde erneut die Anwendung einer von CHU ET AL. publizierten Methode angestrebt.^[133] Allerdings stellte sich die Synthese entsprechend Abbildung 109 nicht nur bedingt durch das generell schlechte Löslichkeitsverhalten von Guanosinanaloga als problematisch heraus.

Ein wichtiger Faktor im ersten Syntheseschritt war das Coevaporieren der Ausgangssubstanz Guanosin **170** mit Pyridin. Scheinbar führten Wassereinschlüsse in dem Edukt **170** während der ersten Syntheseversuche dazu, dass das gewünschte *N*²-Acetylguanosin **171**,

sowohl resultierend aus einer Hydrolyse des Silylierungsreagenzes als auch des Säurechlorids, nur in einem geringen Maße gebildet wurde. Durch das Coevaporieren und intensive Trocknen wurde dagegen bei der TMS-Schätzung, Acetylierung und Desilylierung ein nahezu quantitativer Umsatz zum gewünschten Produkt **171** ermöglicht. Die Reinigung des Rohprodukts **171** erfolgte durch Umkristallisation aus Methanol.

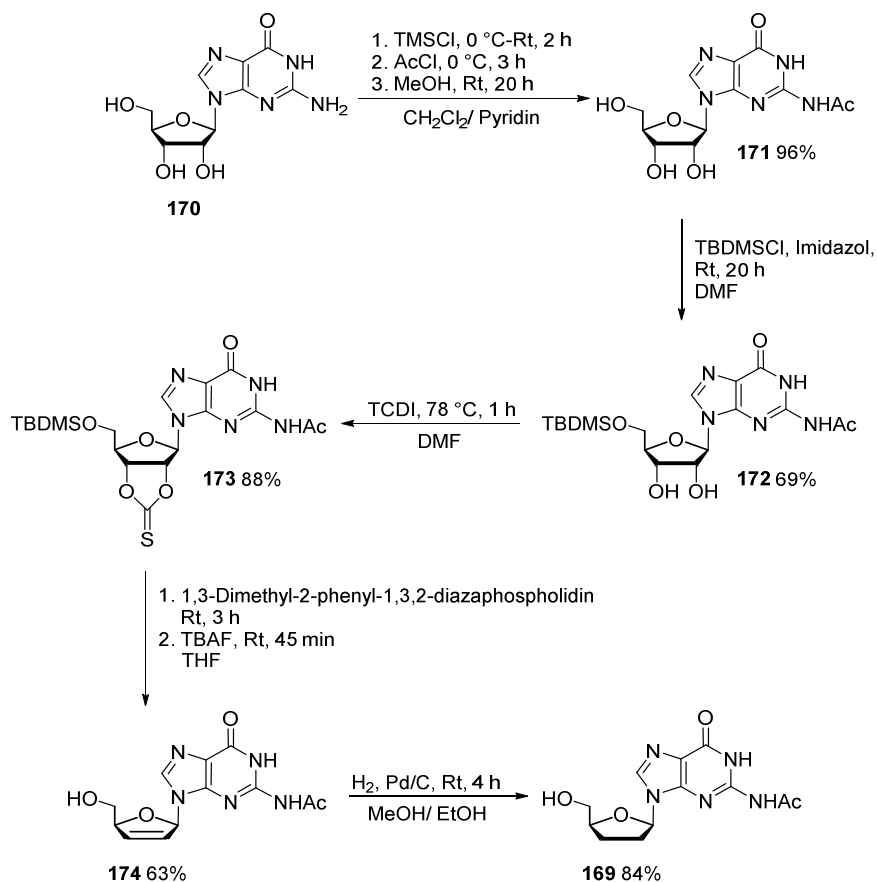


Abb. 109: Synthese von *N*²-Acetyl-ddG **170**.^[133,136]

Entsprechend der Synthese von ddA **114** wurde die 5'-OH-Funktion des *N*²-Acetyl-guanosins **171** mit einer TBDMS-Schutzgruppe versehen. Daran schloss sich die Umsetzung des Nucleosids **172** mit 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol zum Thiocarbonat **173** an. Im Gegensatz zu ddA **114** misslang hierbei die Corey-Winter-Olefin-Synthese in siedendem Trimethylphosphit zum Alken. Dieses Phänomen wurde auch bereits in der Literatur^[133] beschrieben, in der ein Zerfall des potenziellen Produkts **175** unter den verwendeten Reaktionsbedingungen als Ursache angenommen wurde. Eine Desoxygenierung unter milderen Bedingungen erlaubte dagegen die Nutzung von 1,3-Dimethyl-2-phenyl-1,3,2-diazaphospholidin als Reagenz.^[136] Da die säulenchromatographische Reinigung keine Isolierung des Produkts **174** ermöglichte, wurden alle produkthaltigen Fraktionen vereinigt und zur Desilylierung mit TBAF zur Reaktion gebracht. Anschließend konnte das *N*²-Acetyl-2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydroguanosin **174** erfolgreich mittels Säulenchromatographie

separiert werden. Bezüglich der Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle zum *N*²-acetylgeschützten ddG **169** stellte sich ein Lösungsmittelgemisch aus Ethanol und Methanol (1:1 v/v) als effizient heraus.

4.5.3 Entwicklung einer neuartigen Syntheseroute zur Darstellung von TriPPPro-NTP-Prodrugs

Die in Kapitel 4.5.1 vorgestellten Nucleoside sollten nach einer effizienten Synthesestrategie zu den entsprechenden TriPPPro-NTP-Prodrugs umgesetzt werden. Zunächst sollte die bewährte Prozedur (Kapitel 4.1.4), die im Folgenden als „Phosphoramiditroute“ umschrieben wird, für die Synthese ausgewählter TriPPPro-Verbindungen genutzt werden. Als Auswahlkriterien für die Nucleoside dienten die zur Verfügung stehenden Nucleosidstoffmengen sowie der synthetische Aufwand zur Darstellung des Nucleosids. Im Zusammenhang mit d4T **3** wurden jedoch bereits die Schwierigkeiten bei der Synthese von d4T-Diphosphat **15** thematisiert (Kapitel 4.1.1.2.3), welches einen elementaren Baustein dieser Methode bildet. Somit war die Entwicklung einer alternativen Route zur Synthese von NTP-Prodrugs sinnvoll, bei der eine vorherige Darstellung der Nucleosiddiphosphate nicht notwendig ist.

4.5.3.1 Synthese von Nucleosiddiphosphaten

In Analogie zu d4TDP **15** wurden die Synthesen der Diphosphate von AZT **1**, ddT **31**, Thymidin **83**, d4U **40**, ddU **41** und AZU **112** unter Verwendung der *cycloSal*-Technik durchgeführt (Abb. 110).

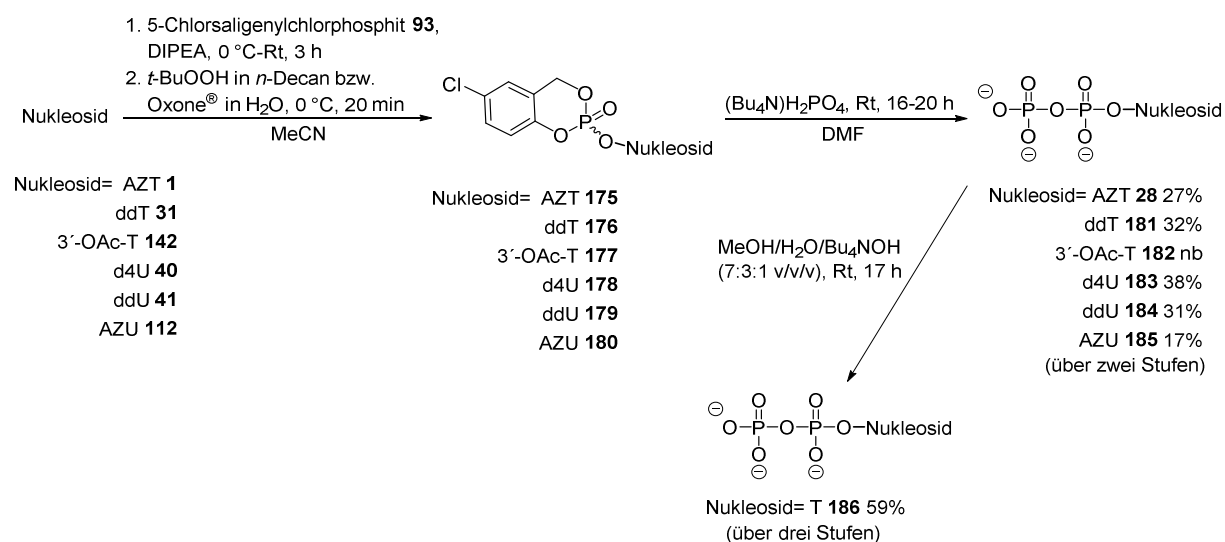


Abb. 110: Synthese von Nucleosiddiphosphaten über die *cycloSal*-Technik.

Hierfür wurden die Nucleoside ddT **31**, Thymidin **83**, d4U **40** und ddU **41** mit frisch destilliertem 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** umgesetzt und der erhaltene Phosphitriester

wurde mit *t*-BuOOH oxidiert. Durch Extraktion mit Dichlormethan/Ammoniumacetat (1 M) konnten die Phosphatriester in nahezu quantitativer Ausbeute sowie hoher Reinheit erhalten werden. Auf eine chromatographische Aufarbeitung konnte folglich verzichtet werden. Im Gegensatz dazu war bei den azidhaltigen Derivaten AZT **1** und AZU **112**, bei denen aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit der Azidofunktion das vergleichsweise milde Oxone[®] anstelle des *t*-BuOOH eingesetzt wurde, eine zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie zur Abtrennung der Salze des Oxidationsmittels nicht zu vermeiden.

Im Anschluss wurden die *cyclo*Sal-Triester **175-180** mit einem in deutlichem Überschuss verwendeten Phosphatsalz in seiner Tetra-*n*-butylammoniumform zur Reaktion gebracht. Dünnschichtchromatographisch ließ sich nach einem Tag zwar teilweise noch Edukt nachweisen, allerdings führte eine Verlängerung der Reaktionszeit zu keiner Verbesserung des Umsatzes des entsprechenden Triesters. Nach Extraktion und chromatographischer Aufarbeitung wurden die NDP nur in geringen Ausbeuten von 17-38% erhalten. Dieser Umstand war erstens einem nicht quantitativen Umsatz geschuldet, dessen Ursache nicht zu ermitteln war. Zweitens konnte die Bildung großer Mengen des falsch geöffneten Diesters beobachtet werden und drittens war die vollständige Isolation der Nukleosiddiphosphate **28, 181-185** durch das im Unterschied zu d4TDP **15** teilweise sehr schlechte Elutionsverhalten auf der RP18-Säule nur mit hohem Aufwand zu realisieren. So mussten Chromatographien wiederholt und/oder Ionenaustauscher eingesetzt werden, um die Separation von dem überschüssigen Phosphatsalz sowie anderen Verunreinigungen, die schon bei der Synthese von d4TDP **15** analysiert wurden (Kapitel 4.1.1.2.3), zu ermöglichen. Eine generelle Übertragbarkeit der Methode, die sich bei der Darstellung von d4TDP **15** bewährt hatte, zur Synthese von Nukleosiddiphosphaten in ihrer Tetra-*n*-butylammoniumform war somit nicht gegeben.

Im Fall des 3'-Acetylthymidindiphosphats **182** wurde auf eine Isolation und Charakterisierung verzichtet. Stattdessen wurde es vorgezogen, die Acetyl-Schutzgruppe zu entfernen. Eine basenkatalysierte Deacetylierung nach der Umsetzung des geschützten Nukleosids **182** zum basenlabilen Prodrug **62** wäre nicht durchführbar gewesen. Um TDP **186** nach der Reinigung in seiner Tetra-*n*-butylammoniumform ohne zusätzlichen Ionenaustausch vorliegen zu haben, wurde die Hydrolyse entgegen der Standardprozedur^[97] mit einer Methanol/Wasser/Bu₄NOH-Lösung (7:3:1 v/v/v) vorgenommen. Damit wurde Bu₄NOH anstelle von Triethylamin als Base verwendet. Nach einer RP18-Chromatographie wurde das entschützte TDP **186** über drei Stufen in einer Gesamtausbeute von 59% erhalten. Interessanterweise fällt die Ausbeute somit doppelt so hoch aus als der Mittelwert von 29% der weiteren NDP. Nichtsdestoweniger konnte das primäre Ziel, die Nukleosiddiphosphate verschiedener Thymidin- und Uridinanaloga in der Form ihrer Tetra-*n*-butylammoniumsalze darzustellen, erreicht werden.

4.5.3.2 Synthese von Bis(nonanoyloxybenzyl)-NTP-Prodrugs über die Phosphoramiditrout

Die in Kapitel 4.5.3.1 vorgestellten Nukleosiddiphosphate, wie AZTDP **21**, ddTDP **181**, TTP **186** und AZUDP **185**, wurden durch die Kupplung mit einem säureaktivierten Phosphoramidit **75e** zu den entsprechenden Triphosphat-Prodrugs umgesetzt. Leider lagen zu Beginn der Synthesen der unterschiedlich modifizierten NTP-Prodrugs keine antiviralen Daten der TriPPP_{ro}-d4TTP-Prodrugs **56** (Kapitel 4.3) vor, wodurch eine Beurteilung bezüglich der Kettenlänge für eine ideale Permeabilität nicht vorgenommen werden konnte. Um die Prodrugs hinsichtlich der Hydrolyseeigenschaften sowie der antiviralen Aktivität vergleichen zu können, war die Verwendung der gleichen Maskierungseinheiten jedoch unabdingbar. Da die ersten Prodrugs über eine neu entwickelte Synthesemethode (Kapitel 4.5.3.6) mit einer Kettenlänge von R= C₈H₁₇ synthetisiert wurden, sollten auch die weiteren TriPPP_{ro}-NTP-Prodrugs entsprechend maskiert werden.

Die Synthese der Prodrugs wurde nach der für d4T **3** optimierten Vorschrift durchgeführt, indem das NDP mit dem Phosphoramidit **75e** versetzt und die Reaktion durch die Zugabe von DCI gestartet wurde (Abb. 111). Nach einer einminütigen Reaktionszeit erfolgte der Abbruch der Reaktion mit *t*-Butylhydroperoxid als Oxidationsmittel. Die Verfolgung konnte mittels der HPLC-Methode A durchgeführt werden, da im Gegensatz zu d4TDP **15** eine ausreichende Separation zwischen den Peaks der NDP **21**, **181**, **185** und **186** und dem Aktivator gegeben war. In allen Fällen wurden ein nahezu vollständiger Umsatz des Edukts sowie die selektive Bildung des Prodrugs festgestellt. In Analogie zu den d4TTP-Prodrugs **56** wurde die Reinigung der Rohprodukte durch zweimalige Umkehrphasenchromatographie vollzogen. Allerdings war die Aufarbeitung des AZT-Prodrugs **59** mit Schwierigkeiten verbunden. So misslang nach einmaliger RP18-Chromatographie der obligatorische Ionenaustausch an Dowex-NH₄⁺, wie die weiterhin vorhandenen Tetra-*n*-butylammoniumionen im ¹H-NMR-Spektrum belegten. Dennoch wurde eine zweite RP18-Chromatographie durchgeführt. Hierbei konnte mit einer Ausbeute von 19% nur eine vergleichsweise geringe Menge des Prodrugs **59** erhalten werden. Es wurde zunächst vermutet, dass bei der Oxidation mit dem Peroxid eine Nebenreaktion an der Azidfunktion stattgefunden haben könnte. Dieses Phänomen war bereits bei der Synthese des *cyclo*Sal-AZT-Triesters **175** zu beobachten gewesen, woraufhin Oxone[®] als Oxidationsmittel eingesetzt wurde. Beim Abziehen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum kam es zu einer Erhöhung der lokalen Konzentrationen an Peroxid, wodurch eine Nebenreaktion begünstigt worden sein könnte. Allerdings war diese These nicht mit der guten Ausbeute von 57% des AZU-Prodrugs **63** in Einklang zu bringen. Daher war davon auszugehen, dass der Verlust der AZT-Verbindung **59** auf die Schwierigkeiten bei der Ionenaustauschchromatographie zurückzuführen war. Da die

Isolation der Zielverbindungen im Vordergrund stand, wurde die Aufklärung des Ausbeuteverlusts nicht weiter verfolgt.

Die Prodrugs der Thymidinderivate ddT **31** und T **83** wurden dagegen in sehr guten Ausbeuten von 71% und 74% erhalten. Eine Reaktion der freien 3'-Hydroxyfunktion des TDPs **186** mit dem aktivierten Phosphoramidit **75e** konnte nicht beobachtet werden.

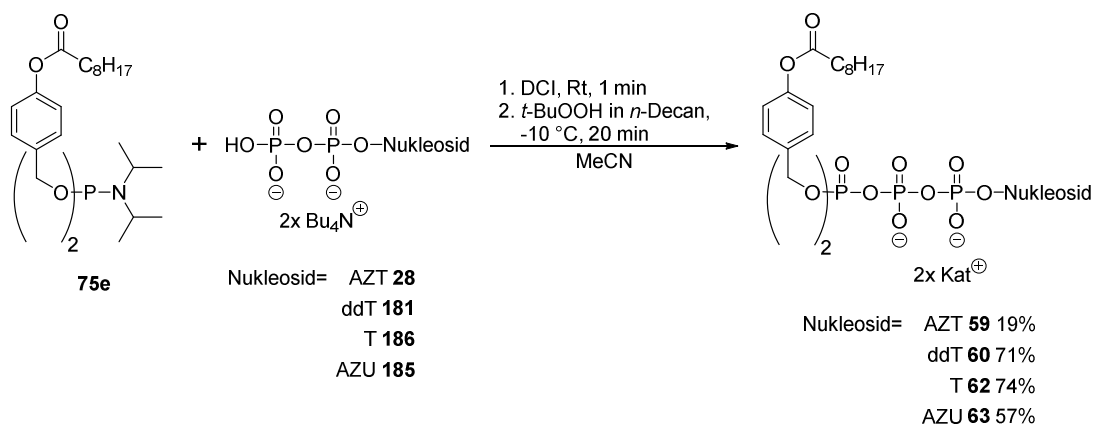


Abb. 111: Synthese von TriPPPro-NTP-Prodrugs über die Phosphoramiditmethode.

4.5.3.3 Synthese eines DiPPPro-d4UDP-Prodrugs über die Phosphoramiditmethode

Um eine gute Vergleichbarkeit zwischen DiPPPro- und TriPPPro-Verbindungen zu gewährleisten, wurde das d4UDP-Prodrug **187** mit R= C₈H₁₇ hergestellt. Das Uridinanalogon **40** hatte sich sowohl als *cycloSal*- als auch DiPPPro-d4UDP-Prodrug in vorherigen Studien durch eine niedrige antivirale Aktivität ausgezeichnet, was auf eine unzureichende Substratspezifität des Enzyms NDPK zurückgeführt wurde, das die Umsetzung des Di- zum Triphosphat katalysiert.^[82] Durch Anwendung des TriPPPro-Konzepts wurde eine verbesserte Anti-HIV-Aktivität des d4Us **40** erwartet. Die Synthese der entsprechenden TriPPPro-Verbindung wird in Kapitel 4.5.3.6 vorgestellt.

Die Präparation des d4UDP-Prodrugs **187** erfolgte analog zu der für TriPPPro-Verbindungen optimierten Syntheseroute (Kapitel 4.1.4), indem das DCI-aktivierte Phosphoramidit **75e** mit d4UMP **188** verknüpft und oxidiert wurde (Abb. 112). Die Synthese des d4UMPs **188** wird in Kapitel 4.5.3.5 beschrieben. Da auch in diesem Fall mit Phosphatdiester **109e** verunreinigte Fraktionen erhalten wurden, gelang die Isolierung des Prodrugs **187** nur in einer Ausbeute von 22%. Die unzureichende Trennung beruhte unter anderem auf einem nicht quantitativ ablaufenden Ionenaustausch an Dowex-NH₄⁺. Dadurch wies das Zielprodukt **187** sowohl Ammonium als auch Tetra-*n*-butylammoniumgegenionen auf, wie durch ¹H-NMR-Spektroskopie nachweisbar war. Hierbei sei darauf hingewiesen, dass die Zusammensetzung der hier verwendeten Gegenionen keine Auswirkung auf die antivirale Aktivität hat.^[78]

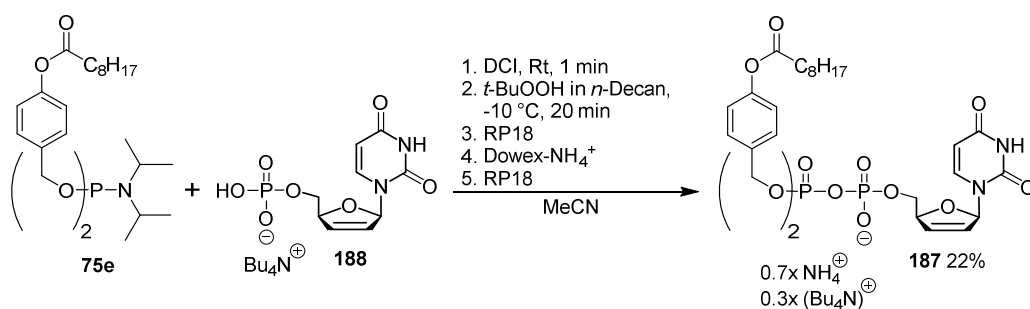


Abb. 112: Darstellung des DiPPro-d4UDP-Prodrugs **187** über Phosphoramiditchemie.

4.5.3.4 Diskussion unterschiedlicher Ansätze zur Darstellung von NTP-Prodrugs

Da neben Schwierigkeiten bei der Synthese und Isolation des d4TDPs **15** (Kapitel 4.1.1.2.3) auch die Darstellung der Nucleosiddiphosphate anderer Nucleoside (Kapitel 4.5.3.1) mit niedrigen Ausbeuten und umständlichen Chromatographien einherging, wurde die Entwicklung einer alternativen Syntheseroute von TriPPPro-NTP-Prodrugs angestrebt. Kernziel war eine Unabhängigkeit von NDP als Synthesebaustein. Ein erster Ansatz war an die Methode von AHMADIBENI und PARANG angelehnt, die eine Synthese von Di- und Triphosphaten, aber auch Polyphosphoramidaten an der Festphase ermöglicht.^[139,140] Hierbei nimmt zur Darstellung von Strukturen mit drei Phosphateinheiten das Triphosphitylierungsreagenz **189** eine Schlüsselrolle ein, welches durch Reaktion mit einem polymergebundenen Salicylalkohol **190** an die Festphase gekuppelt wird (Abb. 113).

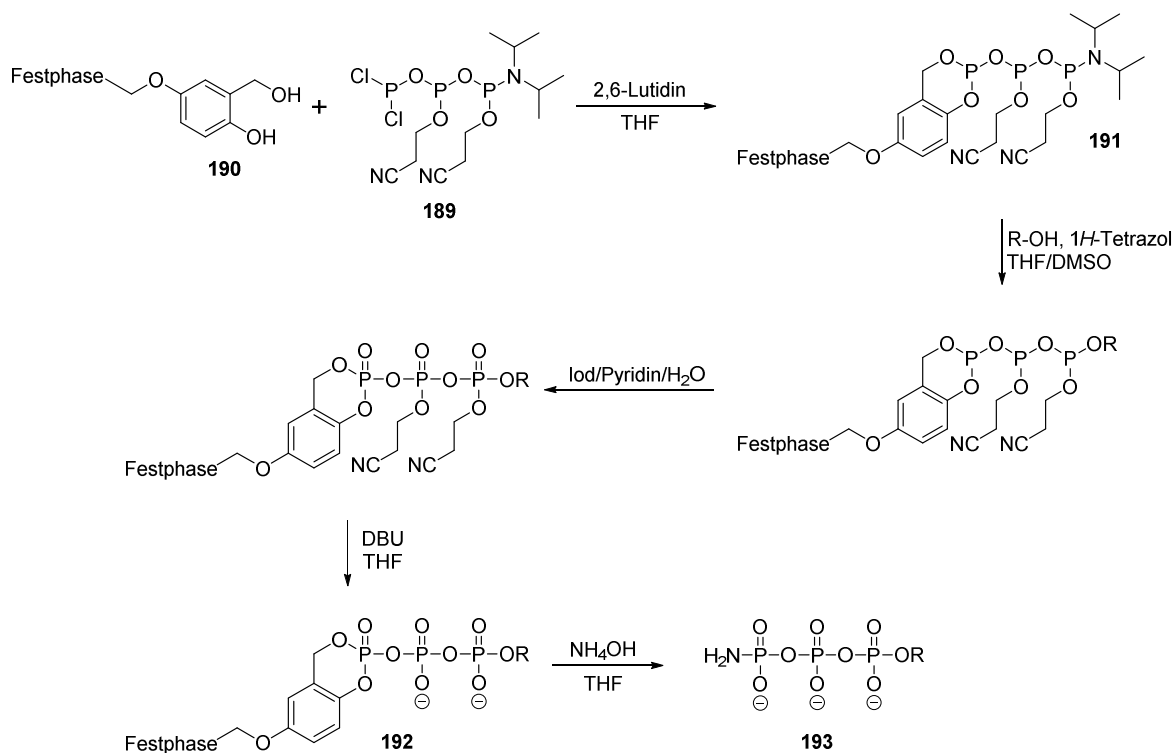


Abb. 113: Synthese eines Polyphosphoramidats nach AHMADIBENI und PARANG.^[140]

Das dadurch erhaltene *cycloSal*-Triphosphitylierungsreagenz **191** wird in der Folge über eine Tetrazol-vermittelte Kupplungsreaktion mit einem Nukleosid verknüpft. Durch anschließende Oxidation und Abspaltung der 2-Cyanoethylgruppen mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) wird das *cycloSal*-Triphosphat **192** zugänglich. Die Abtrennung von der Festphase erfolgt beispielsweise durch die Hydrolyse mit Ammoniak, wodurch das Polyphosphoramidat **193** in einer sehr guten Gesamtausbeute von bis zu 73%, bezogen auf das *cycloSal*-Triphosphitylierungsreagenz **191**, generiert werden kann.^[140]

Es galt, das Reagenz **189** auf seine Anwendbarkeit zur Synthese von TriPPPPro-NTP-Prodrugs zu überprüfen. Dafür sollte anstelle einer Verknüpfung mit dem festphasengebundenen Salicylalkohol **190** eine Verknüpfung mit den entsprechenden Phenylestern **76** erfolgen (Abb. 114). Hinsichtlich des Erfolgs der Synthese war ein quantitativer Ausschluss von Wasser und Sauerstoff als elementar anzunehmen. Bei der Entfernung der CE-Gruppen mit der Base DBU waren trotz kurzer Reaktionszeiten in Verbindung mit Feuchtigkeit entweder ein Bruch der Phosphoranhydridbindungen des Prodrugs oder eine Spaltung der Phenylestermasken durch basische Hydrolyse zu erwarten.

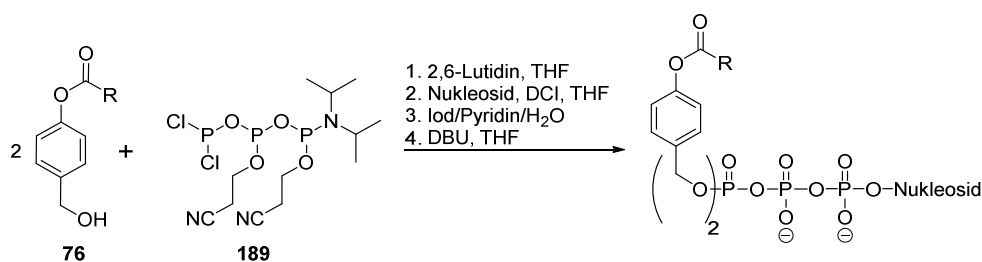


Abb. 114: Theoretischer Ansatz zur Darstellung von TriPPPPro-Verbindungen in Anlehnung an AHMADIBENI und PARANG.^[139,140]

Das Triphosphitylierungsreagenz **189** ist entsprechend der Literatur durch Kupplung verschiedener Phosphor(III)-Reagenzien zugänglich, wobei selektive Hydrolysen eine entscheidende Rolle bei der Synthese einnehmen (Abb. 115).^[140]

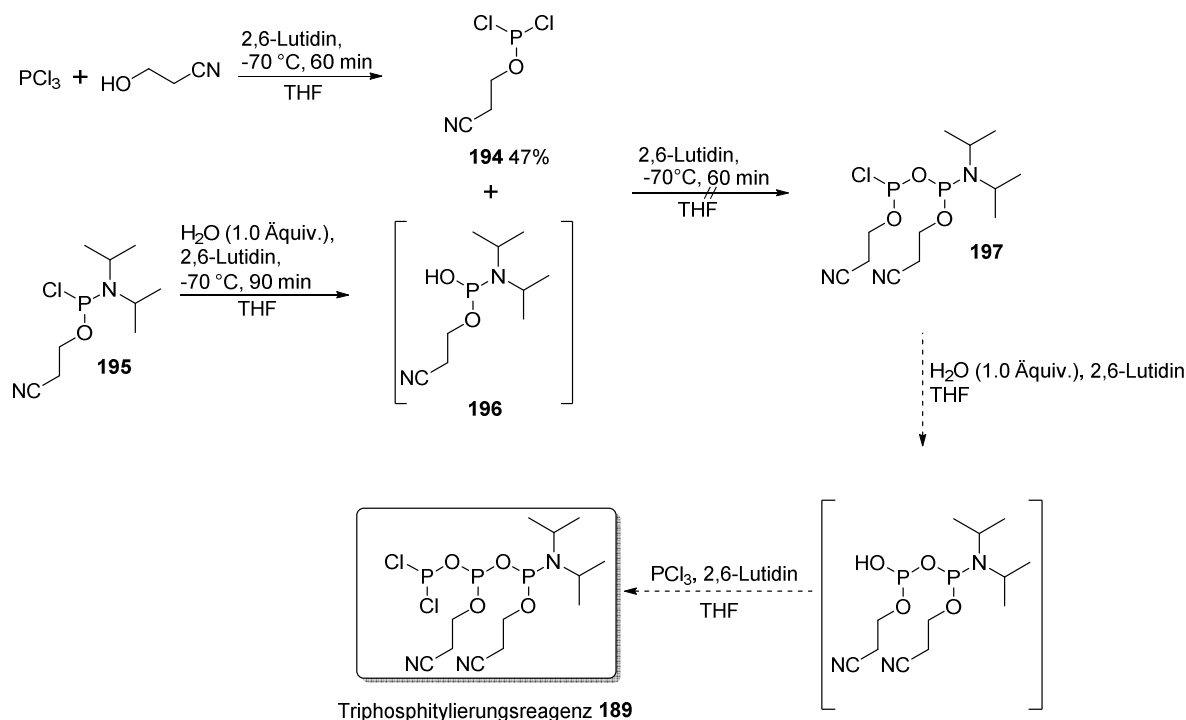


Abb. 115: Versuch der Darstellung des Triphosphitylierungsreagenzes **189** in Anlehnung an AHMADIBENI und PARANG.^[140]

Dem publizierten Syntheseprotokoll^[139] folgend wurde im ersten Schritt frisch destilliertes Phosphor(III)-chlorid durch langsames Zutropfen von 1.0 \u00c4quivalenten 3-Hydroxypropionitril bei -70°C zu 2-Cyanoethyl dichlorophosphit **194** umgesetzt. Obwohl die gleichen Einwaagen und L\u00f6sungsmittelvolumina wie in der Literatur^[139] verwendet wurden, bildete sich derartig viel Niederschlag, dass ein R\u00fchren des Reaktionsgemisches nicht mehr m\u00f6glich war. Aus diesem Grund wurde entgegen der Vorschrift das Salz durch Filtration unter Inertgas abgetrennt. Das Rohprodukt wurde zudem destillativ aufgearbeitet, da, basierend auf der hohen lokalen Konzentration beim Zutropfen des 3-Hydroxypropionitrils, davon ausgegangen wurde, dass sich nicht nur das Produkt **194** gebildet hatte, sondern auch Mehrfachsubstitutionen stattgefunden hatten. Anschließend wurde der Versuch unternommen, das bereits im Arbeitskreis vorhandene 2-Cyanoethyl diisopropylchlorophosphoramidit **195** mit 1.0 \u00c4quivalenten Wasser bei tiefen Temperaturen partiell zu hydrolysieren. Die Reaktionsl\u00f6sung, in der das nukleophile Intermediat **196** h\u00e4tte gebildet werden sollen, wurde umgehend mit dem Dichlorophosphit **194** zur Reaktion gebracht, was wiederum eine starke Salzbildung mit sich brachte. Zur Reaktionskontrolle wurde das Rohprodukt ^{31}P -NMR-spektroskopisch in wasserfreiem CDCl_3 analysiert. Zwar konnte die Bildung des Diphosphitylierungsreagenzes **196** mithilfe von NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden, doch wurde auch die Bildung gro\u00dfer Mengen verschiedener Phosphor(III)-Verbindungen, wie Phosphiten und H-Phosphonaten, aber auch von Phosphaten festgestellt. Da sich zum Erhalt des Triphosphitylierungsreagenzes **189** noch eine weitere partielle Hydrolyse sowie

eine Kupplung mit PCl_3 angeschlossen hätten, was voraussichtlich die Generierung weiterer Nebenprodukte zur Folge gehabt hätte, wurde erneut eine Destillation in den Versuchsverlauf integriert. Eine Isolation des gewünschten Produkts **197** misslang jedoch. Dementsprechend wäre eine Optimierung der Reaktionsbedingungen unumgänglich gewesen. Allerdings erschien auch die Reproduzierbarkeit der Synthese des gewünschten Reagenzes aufgrund der bisher gewonnenen Erkenntnisse über das Reaktionsverhalten der Phosphite sehr fraglich, weshalb von dieser Methode Abstand genommen wurde.

Nachdem der erste alternative Lösungsansatz zur Darstellung von TriPPP_{ro}-Substanzen nicht erfolgreich war, wurde die Triphosphatstruktur noch einmal unter retrosynthetischen Gesichtspunkten analysiert. Entsprechend Abbildung 116 lassen sich die Zielverbindungen theoretisch über vier Wege aufbauen, wenn nur Phosphor(V)-einheiten als Bausteine fungieren sollen. Weg A erschien nicht realisierbar, da zum einen in der Vergangenheit nur wenige synthetische Ansätze zur Verknüpfung von Alkoholen und Phosphaten publiziert wurden und zum anderen das γ -Phosphat zweimal selektiv hätte verestert werden müssen. Weg B ähnelt der bisher eingesetzten Phosphoramiditroute und benötigt das schwierig herzustellende NDP als Synthesebaustein. Weg C folgt einer Verknüpfung zwischen zwei Phosphateinheiten. Derartige Reaktionen sind in der Literatur umfangreich beschrieben, womit Weg C ein vielversprechendes Realisierungspotenzial aufwies. Denn auch Weg D erlaubt nur durch Verknüpfung eines Alkohols mit einer Phosphateinheit den Zugang zu Triphosphat-Prodrugs. Da Weg D jedoch keinen synthetischen Aufwand bezüglich der Präparation des Nukleosids bedeutete, wurde dieser dennoch auf seine Eignung untersucht.

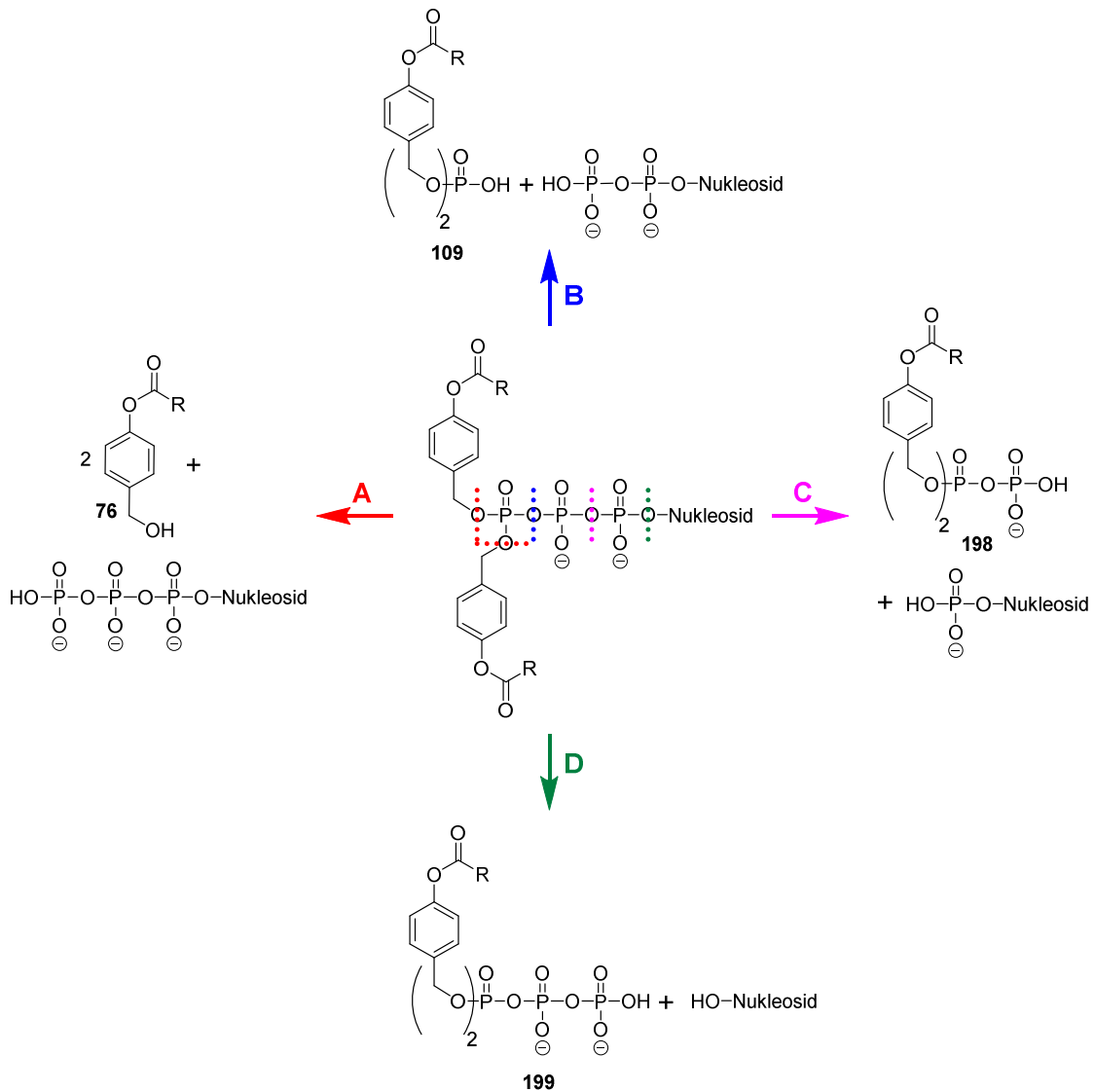


Abb. 116: Retrosyntheseansätze von TriPPPPro-NTP-Prodrugs. **A:** Kupplung von NTP mit zwei Phenylestern **76**; **B:** Kupplung von NDP mit Phosphatdiester **109**; **C:** Kupplung von NMP mit einem zweifach veresterten Pyrophosphatsalz **198**; **D:** Kupplung von Nucleosid mit Triphosphatreagenz **199**.

Entsprechend Weg D (Abb. 116) sollte das Triphosphatreagenz **199** hergestellt und mit dem Modellnucleosid d4T **3** verknüpft werden. Dafür war eine Aktivierung der 5'-Hydroxylfunktion des d4Ts **3** mit einer geeigneten Abgangsgruppe notwendig (Abb. 117).

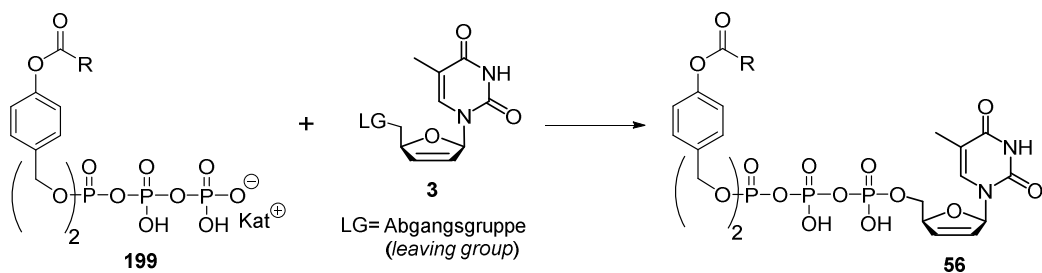


Abb. 117: Ansatz zur Synthese von TriPPPPro-NTP-Prodrugs **56**.

Einen interessanten Ansatz zur Synthese des Triphosphatreagenzes **199** bildete eine von GUPTA ET AL. entwickelte effiziente Eintopfsynthese, mit der bereits zahlreiche Phosphoramidate und Phosphate synthetisiert werden konnten. Dabei wurden zweifach alkylierte H-Phosphonate sowohl mit 1,3-Dichlor-5,5-dimethylhydantoin (DCDMH) als auch mit Trichlorisocyanursäure (TCCA, Abb. 118) zum reaktiven Chlorphosphat und im Anschluss mit einem geeigneten Nukleophil umgesetzt.^[141,142]

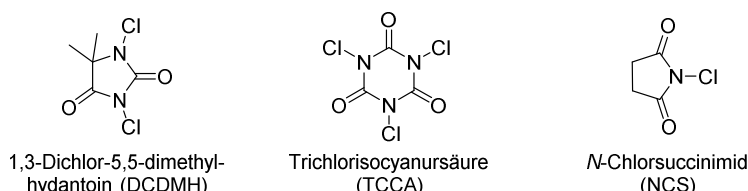


Abb. 118: Chlorierungsmittel zur Aktivierung von H-Phosphonaten.

Zur Synthese des H-Phosphonats **200** fand eine von XIAO ET AL. publizierte und an die eigenen Ansprüche angepasste Methode Anwendung.^[143] Durch Umsetzung von 2.0 Äquivalenten des Phenylesters **76e** mit Diphenylphosphonat (DPP) gelang die Herstellung des H-Phosphonats **200** in einer Ausbeute von 61% (Abb. 119). Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Umkristallisation aus Methanol.

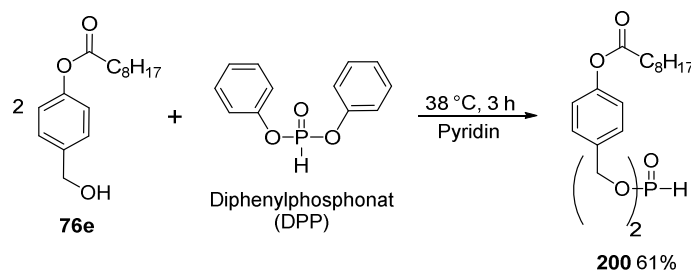


Abb. 119: Synthese des H-Phosphonats **200** in Anlehnung an XIAO ET AL..^[143]

Anschließend galt es, das H-Phosphonat **200** in ein Elektrophil zu überführen, um einen Angriff durch geeignete nukleophile Phosphatsalze zu erlauben. Die in Abbildung 118 gezeigten Chlorierungsmittel DCDMH und TCCA wurden zur Aktivierung des H-Phosphonats **200** getestet. Zwar konnte in beiden Fällen eine Umsetzung zum Chlorphosphat **201** beobachtet werden, allerdings wirkte sich die Bildung unlöslicher Succinimide als Nebenprodukte negativ auf den Reaktionsverlauf aus, da die daraus resultierenden Niederschläge die Reaktion zum Erliegen zu bringen schienen. Im Gegensatz dazu traten bei der Verwendung von N-Chlorsuccinimid (Abb. 118) keine Löslichkeitsprobleme auf, woraufhin ein quantitativer Umsatz des Phosphonats **200** festgestellt wurde.

Am Beispiel von NCS soll im Folgenden der angenommene Mechanismus der oxidativen Chlorierung vorgestellt werden (Abb. 120). Im Allgemeinen liegen Mono- und Diester von

Phosphonsäuren **202** (H-Phosphonate) im tautomeren Gleichgewicht mit den jeweiligen Phosphiten **203** vor. Das Gleichgewicht liegt bevorzugt auf der Seite des stabileren H-Phosphonats, obwohl Solvatisierungseffekte zu einer Verschiebung des Gleichgewichts führen können. Bei der NCS-Aktivierung ist das freie Elektronenpaar des trikoordinierten Phosphits **203** in der Lage, das positiv polarisierte Chloratom des Aktivators nukleophil anzugreifen. Dadurch wird das Phosphoniumion **204** erhalten, das nach Deprotonierung das gewünschte Phosphorchloridat **205** liefert.^[144]

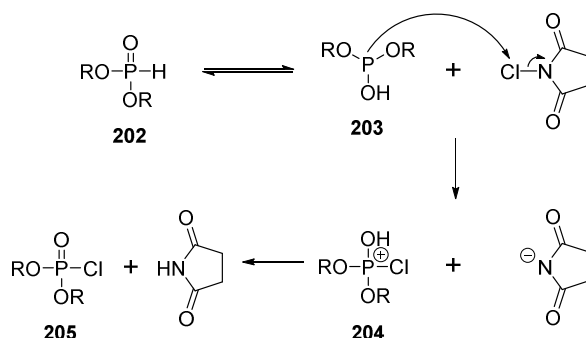


Abb. 120: Mechanismus zur Bildung von Chlorphosphaten **205** aus H-Phosphonaten **202**.^[144]

Für die Synthese des Chlorphosphats **201** wurde das H-Phosphonat **200** unter leichtem Erwärmen (~30 °C) in Acetonitril gelöst. Der Aktivator NCS wurde als Feststoff in einfachem Überschuss hinzugegeben und die Reaktionslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt (Abb. 121). In weiteren Experimenten, die auf Seite 126 diskutiert werden, stellte sich heraus, dass eine geringere Anzahl von Äquivalenten zu keinem quantitativen Umsatz führt. Die Reaktionslösung des Chlorphosphats **201** wurde in der Folge zu 2.0 Äquivalenten Pyrophosphatsalz hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für eine weitere Stunde gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum schloss sich eine säulenchromatographische Reinigung an RP18-Silicagel mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten an. Dabei konnte das gewünschte *P,P*-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-triphosphat **199** erfolgreich in einer 43%igen Ausbeute isoliert werden. Zusätzlich eluierten signifikante Mengen von *P¹,P¹,P⁴,P⁴*-Tetra(4-nonanoyloxybenzyl)-tetraphosphat **206** mit lediglich Acetonitril als Laufmittel. Die Bildung dieser Nebenverbindung **206** ist auf die Reaktion einer Einheit Pyrophosphat mit zwei Einheiten Chlorphosphat **201** zurückzuführen. Eine vollständige Quantifizierung des Nebenprodukts **206** konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da der Hauptanteil verunreinigt eluierte. In darauffolgenden Ansätzen zeigte sich, dass eine Erhöhung der Äquivalente an Nukleophil erwartungsgemäß mit einer Reduktion der Nebenproduktmenge einhergeht. Aufgrund der hohen Lipophilie des Produkts **199** stellte die Separation von überschüssigem Pyrophosphatsalz kein Problem dar.

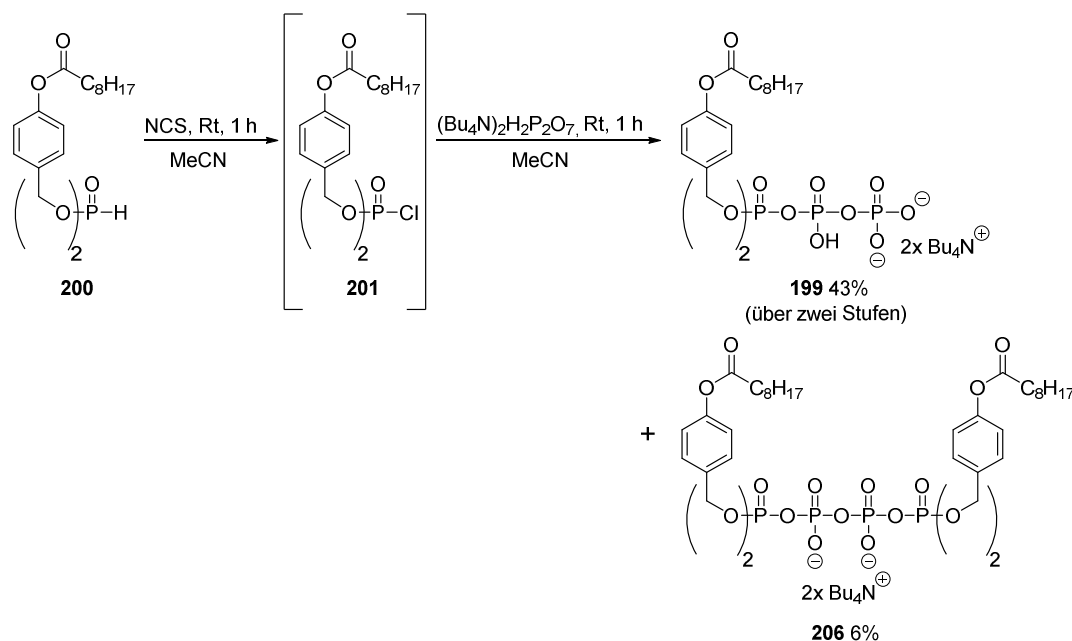


Abb. 121: Darstellung des Triphosphatreagenzes **199**.

Nach der Synthese des dimaskierten Triphosphats **199** galt es, dieses mit einem aktivierten Nucleosid zu verknüpfen. Wie bereits angemerkt, sind nur wenige Veröffentlichungen zur effizienten Kupplung von Alkoholen mit Phosphaten bekannt.

Eine Option bildet die bereits im Zusammenhang mit der Synthese von d4TDP **15** diskutierte Methode nach DAVISSON ET AL.^[98] Nach dieser sollte das elektrophile 5'-O-Tosyl-d4T **87** einen nukleophilen Angriff des Reagenzes **199** ermöglichen und unter Abspaltung von Tosylat die Bildung des TriPPPPro-d4TTP-Prodrugs **56e** erlauben (Abb. 122). Allerdings konnten mit *P,P*-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-triphosphat **199** als Nukleophil mittels HPLC nicht einmal Spuren des Prodrugs **56e** detektiert werden. Stattdessen lagen die Reaktanten nach 48 Stunden unverändert vor. Bei der Erwärmung auf 50 °C wurde lediglich der Bruch der Phosphoranhydridbindung durch die Detektion des Phosphatdiesters **109e** nachgewiesen.

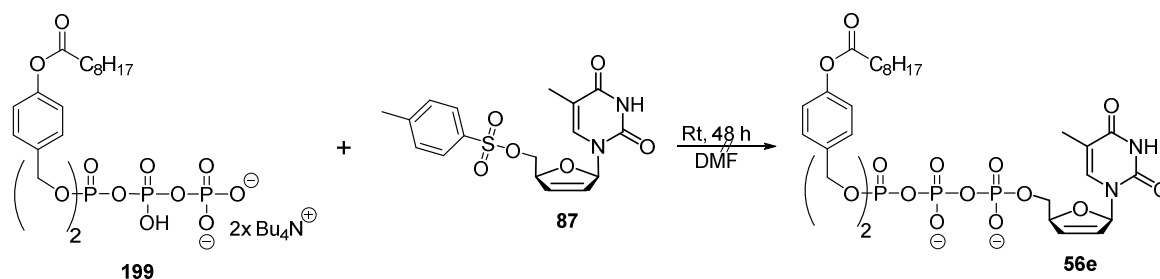


Abb. 122: Versuch der Darstellung von Prodrug **56e** durch Kupplung des Triphosphatreagenzes **199** mit tosyliertem d4T **87**.

Eine weitere Möglichkeit der Verknüpfung eines Nucleosids mit einem Phosphatsalz wurde in der Literatur von SAADY ET AL. beschrieben. Über eine Mitsunobu-Reaktion konnte dabei eine Vielzahl von maskierten Adenosin-5'-phosphaten dargestellt werden.^[145] Eine Über-

tragung der Methode auf die Synthese von TriPPP-Verbindungen konnte allerdings nicht realisiert werden (Abb. 123). Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden war erneut keine Produktbildung festzustellen.

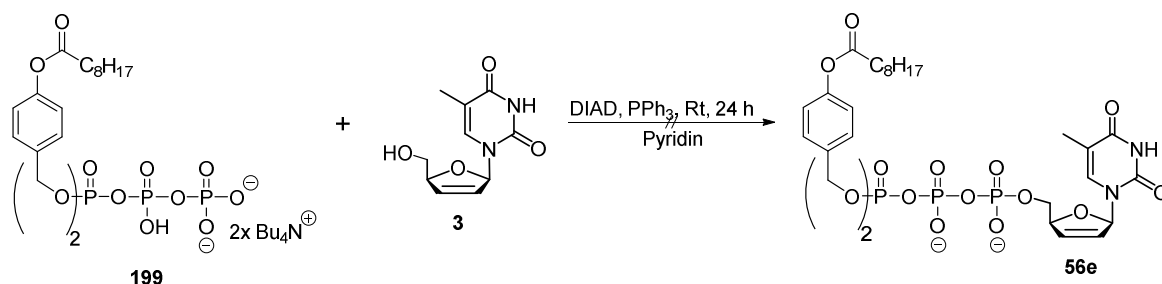


Abb. 123: Versuch der Kupplung des Triphosphatreagenzes **199** und d4T **3** unter Mitsunobu-Bedingungen.

Bedingt durch die grundsätzliche Hürde, Alkohole und Phosphate effizient zur Reaktion zu bringen, wurde die Suche einer geeigneten Verknüpfungsvariante entsprechend Weg D (Abb. 116, S. 122) nicht weiter intensiviert. Stattdessen wurde die Aufmerksamkeit Weg C gewidmet, der aufgrund der hohen Zahl an Kupplungsmöglichkeiten zwischen zwei Phosphatderivaten eine aussichtsreiche Variante darstellte.

Entsprechend sollte zunächst in Anlehnung an die Synthese des Triphosphatreagenzes **199** das *P,P*-Bis(4-nonyloxybenzyl)-pyrophosphat **198**, das einen Baustein des Wegs C bildet (Abb. 116, S. 122), zugänglich gemacht werden. Dafür wurde das H-Phosphonat **200** mit NCS chloriert und mit einem Überschuss an Phosphatsalz zur Reaktion gebracht (Abb. 124). Die Verfolgung der einzelnen Syntheseschritte **A-D** über ³¹P-NMR-Spektroskopie legte weitere Details über das Reaktionsverhalten der Reaktanten offen (Abb. 125). So konnte unter anderem die ideale Äquivalentenzahl an Chlorierungsmittel zur Aktivierung des Phosphonats **200** bestimmt werden. Während bei einem Äquivalent NCS nur die Hälfte des Edukts **200** (**A**) in das Chlorphosphat **201** überführt wurde (**B**), wurde durch Zugabe von einem weiteren Äquivalent des Aktivators der vollständige Umsatz erzielt (**C**). Dementsprechend wurde der Aktivator in der Folge im einfachen Überschuss eingesetzt. Die in Abbildung 124 angegebenen Ausbeuten wurden durch Integration der Peakflächen der jeweiligen ³¹P-NMR-Spektren (Abb. 125) ermittelt.

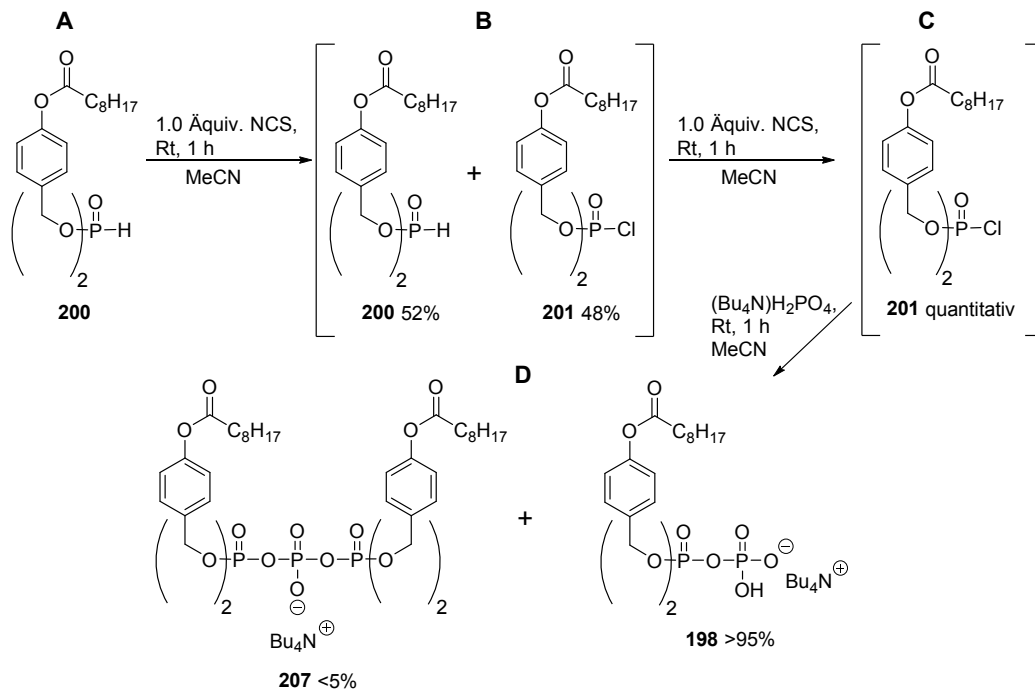


Abb. 124: Darstellung des Diphosphatreagenzes **198**.

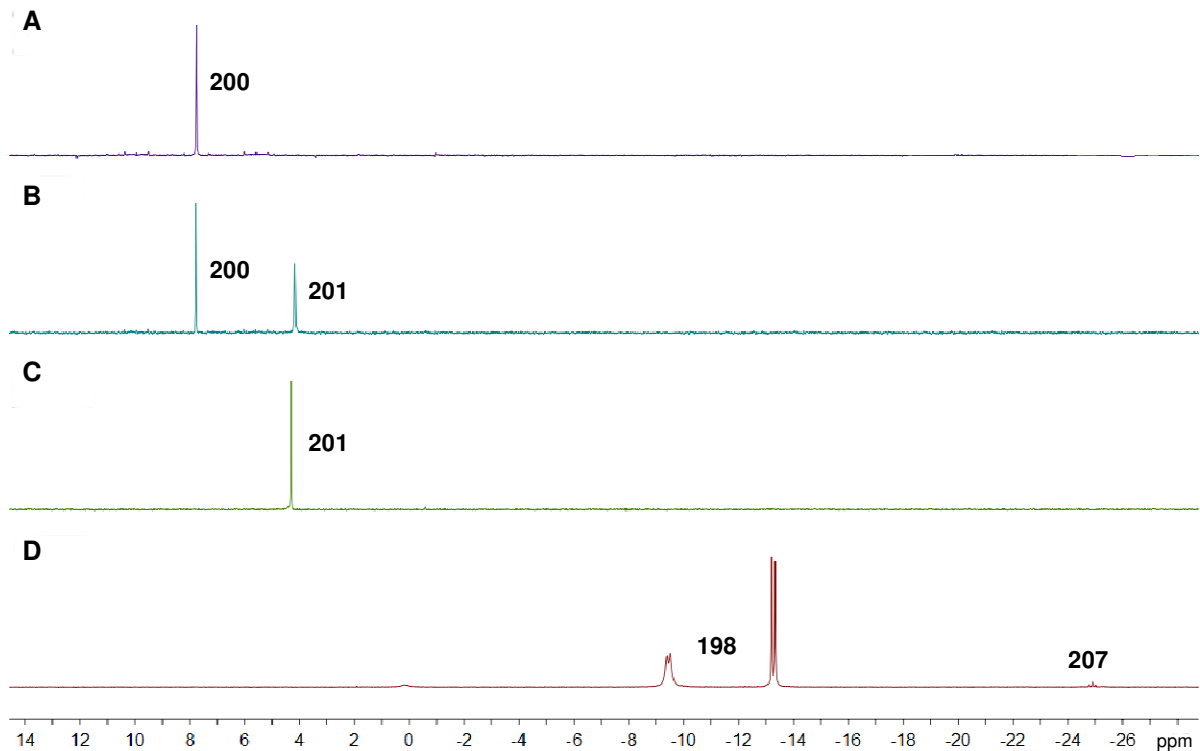


Abb. 125: ^{31}P -NMR-Reaktionsverfolgung zur Darstellung des Diphosphatreagenzes **198**. Die Zuordnung **A-D** erfolgt entsprechend den Reaktionsschritten in Abbildung 124.

Nach Zugabe des im Überschuss eingesetzten Nukleophils wurde in hoher Selektivität das gewünschte zweifach veresterte Pyrophosphat **198** erhalten. Als Nebenprodukt wurden sehr

geringe Mengen von P^1, P^1, P^3, P^3 -Tetra(4-nonanoyloxybenzyl)-triphosphat **207** detektiert, wie das dazugehörige Triplet bei -25 ppm nahelegt (**D**). Es sei allerdings angemerkt, dass die Spektren **A-C** aus der Reaktionslösung entnommene Proben zeigen, während Spektrum **D** das bereits durch Extraktion aufgearbeitete Produkt darstellt. Aufgrund des überschüssigen Phosphatsalzes war eine Reinigung des Rohprodukts notwendig, bevor weitere Syntheseschritte folgen konnten. Allerdings stellte sich die Reinigung als Kernproblem dieser Syntheseroute heraus. Der Einsatz einer RP18-Säulenchromatographie, analog zu der zuvor beschriebenen Synthese des zweifach veresterten Triphosphats **199**, erwies sich als ungeeignet, da quantitativ ein Bruch der Phosphoranhydridbindung stattfand. Dieser Umstand ließ sich anhand des gebildeten Phosphatdiesters **109e** nachweisen. Ein Wechsel des Elutionsmittelgemisches sowie die Verwendung von Puffern unterschiedlicher pH-Werte führten zu keiner Stabilisierung des Produkts **198**. Als weitere Reinigungsmethode wurde die Trituration des Phosphatsalzes mit Lösungsmitteln wie Dichlormethan, Toluol, Diethylether und *n*-Hexan untersucht. Allerdings waren entweder das Phosphatsalz sowie das veresterte Pyrophosphat **198** in dem jeweiligen Lösungsmittel löslich oder beide Substanzen gleichermaßen unlöslich. Scheinbar wirkte sich auch das Vorhandensein von NCS auf die Löslichkeit der Phosphatverbindungen aus, da das prinzipiell in Toluol unlösliche Phosphatsalz unter den vorliegenden Bedingungen teilweise in Lösung ging. Präzipitierungsversuche mit gasförmigem Ammoniak, Triethylamin und Tributylamin waren ebenfalls nicht zielführend, da ein Zerfall des gewünschten Produkts **198** zu beobachten war. Möglicherweise könnte jedoch das Einleiten von Ammoniakgas eine interessante Option für die Abtrennung des Phosphatsalzes in anderen Synthesen darstellen, da das Salz auf diese Weise bei den beschriebenen Testversuchen quantitativ gefällt werden konnte. In Anlehnung an diese Beobachtung sollte ein Ionenaustausch durch Extraktion mit 1 M Ammoniumacetat und Dichlormethan vollzogen werden. Erste Versuche, die zwar mit einer teilweisen Hydrolyse der Zielverbindung **198**, resultierend aus einer sehr langsam ablaufenden Phasentrennung, einhergingen, verliefen vielversprechend. Die Isolation des Produkts **198** gelang schließlich durch Verwendung der Zentrifugalkraft, mit der eine zügige Phasentrennung erwirkt werden konnte. Die wässrige Phase, die sowohl das Phosphatsalz als auch NCS bzw. Succinimid beinhaltete, wurde nach einmaligem Zentrifugieren entfernt und die organische Phase zusätzlich mit kaltem Wasser gewaschen. Es schlossen sich umgehend die Trocknung mit Natriumsulfat, das Entfernen des Lösungsmittels sowie intensives Trocknen im Vakuum an. Auf diese Weise wurde das *P,P*-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **198** („DP-Reagenz“) reproduzierbar in sehr guter Ausbeute von > 95% und in hoher Reinheit erhalten (Abb. 125, **D**). Damit konnte, ausgehend von einem H-Phosphonat durch Aktivierung mit NCS, einer anschließenden Umsetzung mit einem nukleophilen Phosphatsalz sowie einer angepassten Extraktions-

methode, ein effizienter Syntheseweg zur Darstellung von *P,P*-Bis(4-alkanoyloxybenzyl)-pyrophosphaten entwickelt werden.

Da NMR-spektroskopisch beobachtet wurde, dass das DP-Reagenz **198** sowohl in nukleophilen als auch nicht-nukleophilen Lösungsmitteln unter Inertgas binnen eines Tages zu einem großen Teil zerfällt, wird die Lagerung als ungelöster Reinstoff bei tiefen Temperaturen empfohlen. Allerdings wurde frühzeitig dazu übergangen, die Substanz für die in der Folge beschriebenen Experimente durchgehend jeweils frisch zu synthetisieren, um ein sich wiederholendes Lösen und Entfernen des Lösungsmittels zu vermeiden.

Zum Beweis, dass es sich bei dem einzigen Nebenprodukt um das vierfachmaskierte Triphosphat **207** handelt, wurden 0.5 Äquivalente Phosphatsalz mit dem Chlorphosphat **201** umgesetzt (Abb. 126). Das erhaltene Hauptprodukt konnte mittels RP18-Chromatographie gereinigt und als die erwartete Verbindung **207** über NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Die Ausbeute von 80% bestätigt die gute Zugänglichkeit derartiger Substanzen über die beschriebene H-Phosphonatmethode. Durch die Variation des Nukleophils sowie eine Anpassung der Stoffmengenverhältnisse sind damit asymmetrische (Kapitel 4.9), dimaskierte und tetramaskierte Polyphosphate darstellbar.

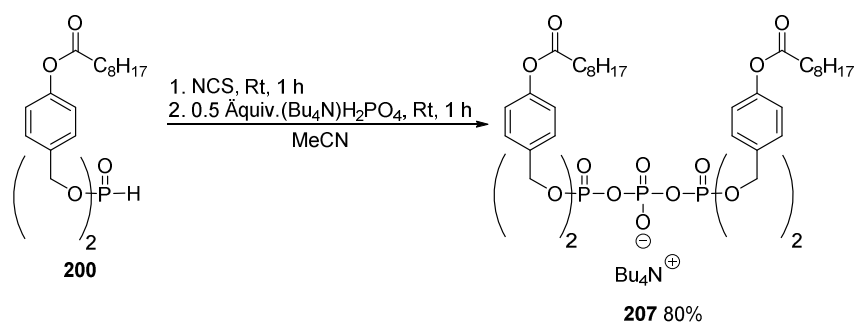


Abb. 126: Darstellung von P^1, P^1, P^3, P^3 -Tetra(4-nonanoyloxybenzyl)-triphosphat **207**.

Nach der erfolgreichen Synthese des DP-Reagenzes **198** wurde die Suche nach einer geeigneten Darstellungsmethode der TriPPP-Verbindungen angegangen. Dabei musste die beschriebene Instabilität der Verbindung **198**, durch die deren experimenteller Nutzen limitiert ist, berücksichtigt werden.

In den ersten Ansätzen wurde der Versuch unternommen, ein passendes nukleosidisches Phosphorderivat zu aktivieren, um eine Kupplung mit dem DP-Reagenz erwirken zu können. Dafür wurde zunächst der im Arbeitskreis vorliegende d4T-Fm-Phosphonsäureester **208** mit NCS zum elektrophilen Chlorphosphat umgesetzt (Abb. 127). Die Schutzgruppe war notwendig, um eine Chlorierung mit NCS realisieren zu können, da diese bei einfach veresterten Phosphaten nicht durchführbar ist. Durch Zugabe des DP-Reagenzes **198** konnte jedoch keine Verknüpfung der Reaktanten zum gewünschten Fm-geschützten Prodrug **209** erreicht werden. Stattdessen wurde über NMR-Spektroskopie lediglich die

Bildung des Phosphatdiesters **109e** nachgewiesen. Dieses Phänomen war einer langsamen Zersetzung des DP-Reagenzes **198** geschuldet. Allerdings ist der beobachtete Zerfall unter den verwendeten Synthesebedingungen erstaunlich, da das Lösungsmittel, die Reaktionstemperatur und -zeit denen der Synthese des DP-Reagenzes **198** entsprachen, bei der das Reagenz **198** eine ausreichende Stabilität aufwies.

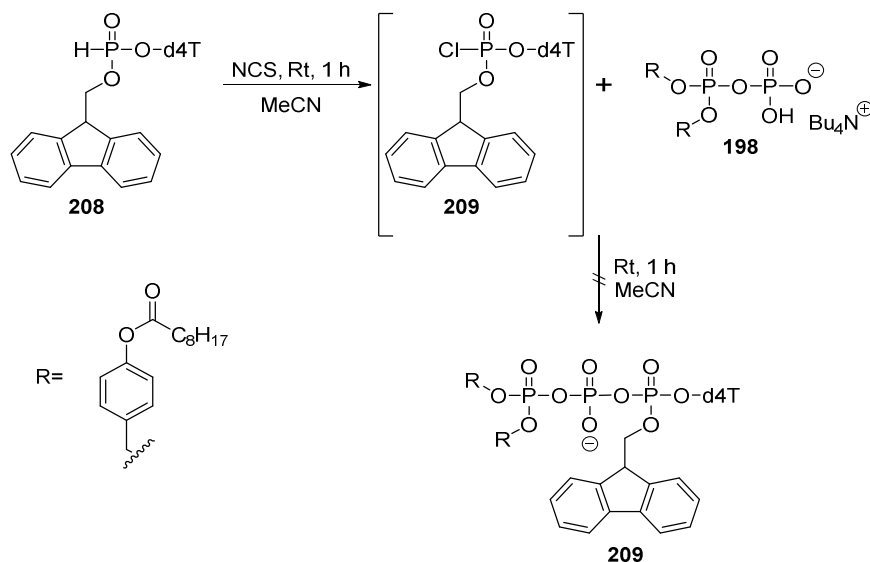


Abb. 127: Versuch der Synthese des Fm-geschützten TriPPPro-d4TTP-Prodrugs **209**.

Um eine Zersetzung von Reaktanten zu vermeiden, wurde ein alternativer Ansatz gewählt. Bei diesem sollte die Einführung einer Cyanoethyl-Schutzgruppe die Stabilität der Pyrophosphateinheit erhöhen. Strukturell ähnelt das dreifach veresterte Pyrophosphat mit seiner freien negativen Ladung somit den DiPPPro-Verbindungen. Die Synthese des P^1, P^1 -Bis(4-nonyloxybenzyl)- P^2 -2-cyanoethylpyrophosphats **210** erfolgte in Analogie zu der Darstellung des DP-Reagenzes **198**, wobei Triethylammonium-2-cyanoethylphosphat als Nukleophil eingesetzt wurde (Abb. 128). Dieses in Acetonitril lösliche Phosphatsalz wurde durch Elution von Bariumcyanoethylphosphat-Dihydrat über eine Dowex- H^+ -Säule und Neutralisation mit Triethylamin in Ethanol gewonnen. Die Umsetzung mit dem Phosphorchloridat **201** ergab schließlich die gewünschte Zielverbindung **210** in einer Ausbeute von 85%. Eine erhöhte Stabilität des Produkts **210** im Vergleich zum DP-Reagenz **198** wurde bereits dadurch ersichtlich, dass es durch Säulenchromatographie gereinigt werden konnte.

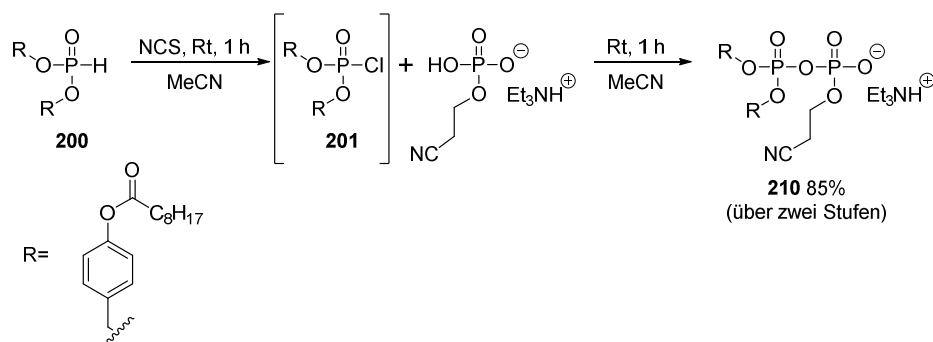


Abb. 128: Darstellung von P^1, P^1 -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)- P^2 -2-cyanoethylpyrophosphat **210**.

Im Anschluss wurde das d4T-H-Phosphonat **208** in das entsprechende Chlorphosphat **209** überführt und der Versuch einer Kupplung mit dem Reagenz **210** und anschließender Entschützung unternommen (Abb. 129). Dabei wurde mittels HPLC eine geringe Umsetzung zum Fm-geschützten TriPPPro-d4TTP-Prodrug beobachtet. Allerdings erlaubte die Entschützung zum TriPPPro-d4T-Prodrug **56e** mit der nicht-nukleophilen Base DBU trotz kurzer Reaktionszeiten lediglich einen Umsatz im unteren einstelligen Prozentbereich. Die Umsatzberechnung basiert hierbei auf den HPLC-Ergebnissen. Dagegen wurde die dominierende Bildung von d4TMP **13** und d4TDP **15** festgestellt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass zwar die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgreich verlief, die Phosphoranhydridbindungen unter diesen Bedingungen jedoch keine ausreichende Stabilität besitzen.

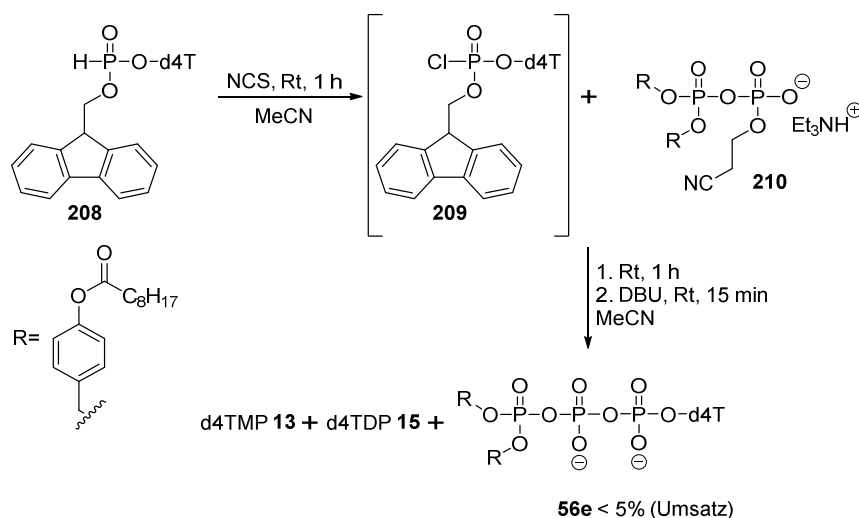


Abb. 129: Darstellung des TriPPPro-d4TTP-Prodrugs **56e** durch Verwendung des Reagenzes **208**.

Dementsprechend sollten geeignete Reaktionsbedingungen durch Verwendung eines Modellsystems ermittelt werden, um die beobachteten Spaltungen innerhalb der Phosphatstruktur bei der Entschützung zu vermeiden. Hierzu wurden verschiedene Untersuchungen auf Basis der Synthese von d4TDP **15** zur Abspaltung der Schutzgruppen durchgeführt. Die

Kontrolle der einzelnen Syntheseschritte erfolgte per HPLC. Die Problematik wurde in diesem Modellsystem sehr deutlich (Abb. 130). Durch Kupplung des d4T-Fm-Chlorphosphats **209** mit dem Phosphatsalz konnte zwar quantitativ das α -fluorenyl-geschützte d4TDP **211** erhalten werden, jedoch stellte bei der basischen Abspaltung der Schutzgruppe nach dem E1cB-Mechanismus d4TMP **13** das Hauptprodukt dar. Das gewünschte d4TDP **15** lag nur mit einem Anteil von etwa 20% vor. Eine Verringerung der Reaktionszeit von einer Stunde auf fünf Minuten zeigte keine Auswirkungen auf die relativen Anteile der beiden Produkte. Dadurch konnte der Reaktionsverlauf über eine selektive Freisetzung des d4TDPs **15** mit anschließender chemischer Dephosphorylierung zum d4TMP **13** ausgeschlossen werden.

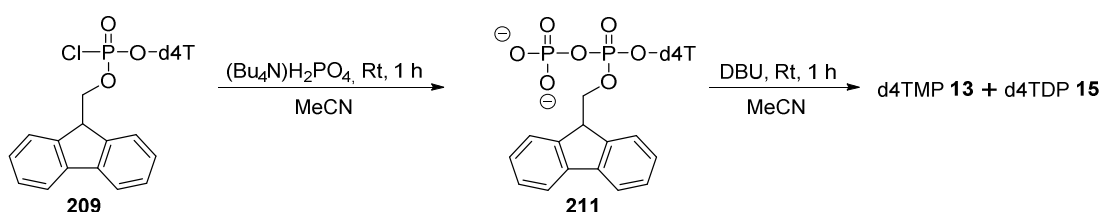


Abb. 130: Modellsystem zur Untersuchung der Reaktionsbedingungen bei der Abspaltung der Fm-Schutzgruppe.

Im Gegensatz zur Reaktionszeit konnte hinsichtlich der Reaktionstemperatur kein wesentlicher Einfluss auf die Produktzusammensetzung festgestellt werden. So konnte belegt werden, dass eine schrittweise Verminderung der Temperatur von Raumtemperatur auf $-40\text{ }^\circ\text{C}$ die Bildung des gewünschten d4TDPs **15** in linearer Abhängigkeit begünstigt. Abbildung 131 veranschaulicht diesen Zusammenhang, indem die über HPLC ermittelten prozentualen Anteile an d4TDP **15** gegen die Reaktionstemperatur aufgetragen sind. Zwischen $-40\text{ }^\circ\text{C}$ und $-80\text{ }^\circ\text{C}$ blieb der d4TDP-Anteil dagegen konstant. Es muss darauf hingewiesen werden, dass zum Erreichen von $-80\text{ }^\circ\text{C}$ das Lösungsmittel von DMF auf Dichlormethan gewechselt werden musste, da DMF einen Schmelzpunkt von $-61\text{ }^\circ\text{C}$ besitzt. Doch scheinen Solvatisierungseffekte generell nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, wie ein Testansatz mit Dichlormethan bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ belegt. Dementsprechend konnte anhand dieses Modellsystems gezeigt werden, dass durch Absenkung der Temperatur die prozentuale Zusammensetzung der Produkte beeinflusst werden kann.

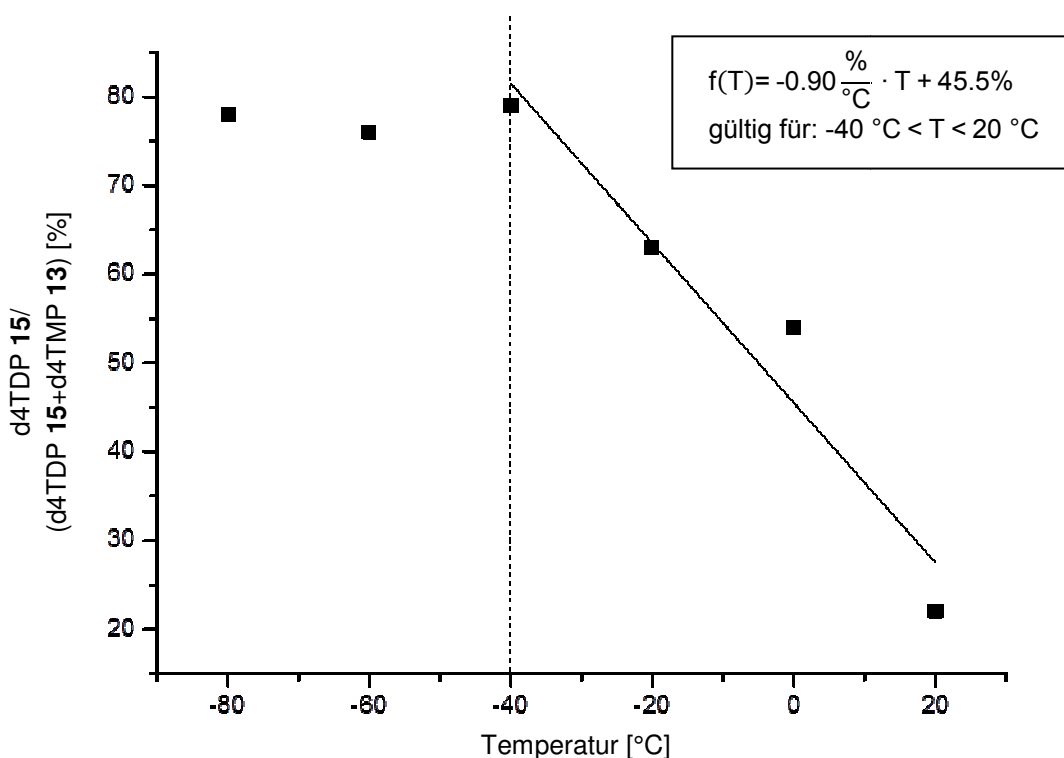


Abb. 131: Modellsystem zur Bestimmung der Abhängigkeit des Anteils an d4TDP **15** von der Temperatur bei der Umsetzung des Zwischenprodukts **211** mit DBU.

Gleichwohl sind diese Ergebnisse zur Anwendung für einen generellen Syntheseweg von Triphosphat-Prodrugs nicht zufriedenstellend. Denn selbst bei tiefen Temperaturen ist nach zuvor beschriebenen Beobachtungen bei der basischen Abspaltung der Schutzgruppen von einer Bildung großer Mengen von Nebenprodukten auszugehen, die aus Zerfallsprozessen an der Phosphatstruktur resultieren. Des Weiteren ist bei der Synthese der Prodrugs entsprechend Abbildung 129 ein verstärkter destabilisierender Effekt zu erwarten. Das Fehlen einer negativen Ladung würde im Fall des mit je einer CE- und einer Fm-Gruppe vollgeschützten TriPPPPro-d4TTP-Prodrugs einen Bruch der Phosphoranhydridbindungen zusätzlich begünstigen. Eine erhebliche Destabilisierung von Pyrophosphatbrücken bei einer vollständigen Maskierung wurde bereits von JESSEN bei dem Versuch der Synthese von Tris(4-acetoxybenzyl)-d4TDP festgestellt.^[73] Als Konsequenz dieser Untersuchungen ist die Option des Aufbaus der Triphosphateinheit unter Verwendung von Schutzgruppen generell als problematisch einzustufen.

In einem weiteren Ansatz sollte der Versuch unternommen werden, das einfach CE-geschützte Pyrophosphatreagenz **210** und d4TMP **13** miteinander zu verknüpfen, um eine negative Ladung zur Stabilisierung des Zwischenprodukts vor der Entschützung zum TriPPPPro-d4TTP-Prodrug **56** vorliegen zu haben. Dafür wurde auf die Imidazole als

Aktivierungsform von Phosphaten zurückgegriffen. Schon Mitte der 1960er-Jahre war das Potenzial von Imidazoliden in der synthetischen Chemie bekannt. Exemplarisch konnten mithilfe von Carbonyldiimidazol (CDI) Phosphorsäureimidazolide dargestellt werden, die eine erhöhte Elektrophilie am Phosphoratom aufweisen.^[146] Analog wurde im Rahmen dieser Arbeit d4TMP **13** durch den Einsatz von CDI in das entsprechende Imidazolidat **212** überführt (Abb. 132).

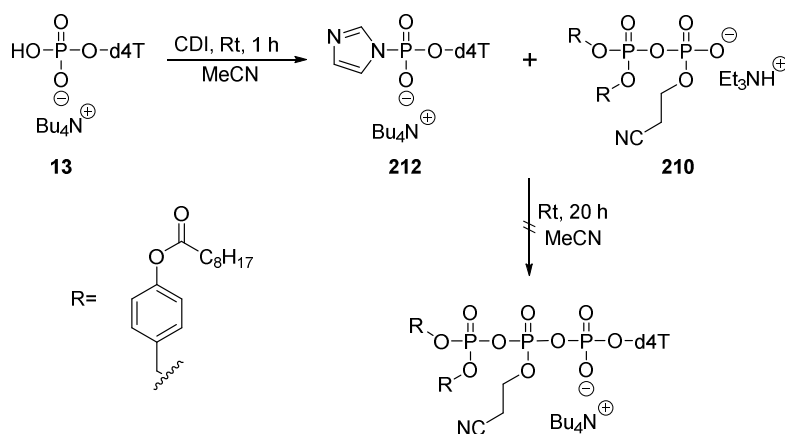


Abb. 132: Versuch der Synthese eines TriPPPro-d4TTP-Prodrugs über CDI-Aktivierung.

Die Aktivierung wurde dabei ³¹P-NMR-spektroskopisch verfolgt. Abbildung 133 zeigt zum einen nach Zugabe von 5.0 Äquivalenten CDI den quantitativen Umsatz des Edukts **13**, zum anderen aber auch die Bildung von zwei Phosphorspezies bei -8.1 ppm und -10.0 ppm (**B**). In der Literatur beschriebene Daten lassen vermuten, dass das Signal bei -8.1 ppm dem gewünschten d4T-Phosphormonoimidazolidat **212** zuzuordnen ist, während das Signal bei etwa -10.0 ppm von dem Diimidazolidat **213** verursacht werden könnte.^[101,147,148] Allerdings berichteten TANAKA ET AL. bei CDI-vermittelten Kupplungen von einer Formierung von Nukleosidphosphatdimeren **214**, die im ³¹P-NMR-Spektrum Signale bei einer chemischen Verschiebung von etwa -10.0 ppm erzeugen.^[149] Die Bildung des Dimers **214** ist als wahrscheinlicher anzunehmen, wie die weiteren Resultate zeigen. Denn nach einer Deaktivierung des im Überschuss eingesetzten CDIs mit Methanol schloss sich der Zugabe des Phosphatreagenzes **210** auch nach 20 Stunden keine Folgereaktion an (**C**). Im Fall des Vorhandenseins von Diimidazolidat **213** wäre dagegen eine Reaktion mit dem Nukleophil **210** zu erwarten gewesen. Auch die Variation der eingesetzten Äquivalente an CDI führte zu keiner bevorzugten Bildung des d4T-Phosphormonoimidazolids **212**. Somit verhindert die Dimerisierung von d4TMP **13** die Anwendung dieser Synthesestrategie.

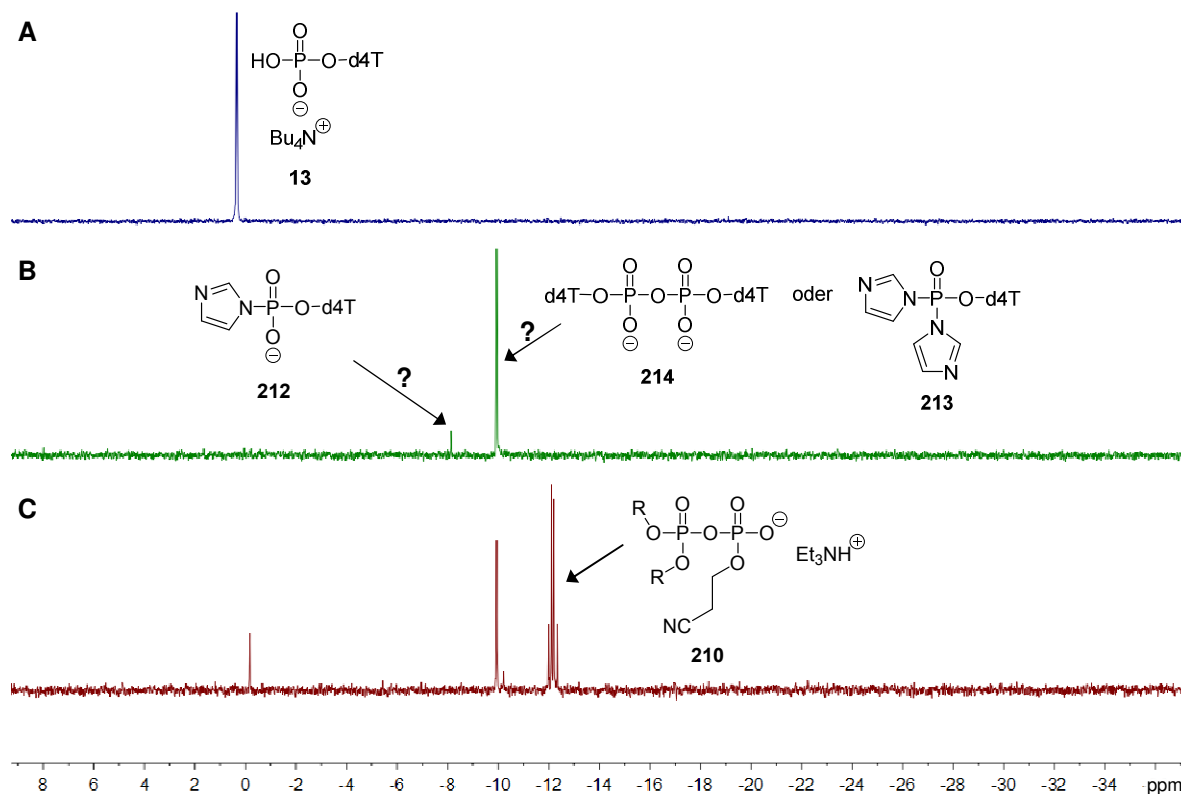


Abb. 133: ^{31}P -NMR-Reaktionsverfolgung bei dem Versuch der Synthese von TriPPPro-d4TTP-
 Prodrug **56e** über CDI-Aktivierung (CDCl_3 , 162 MHz, entkoppelt). **A:** Edukt d4TMP **13**;
B: Aktivierung mit CDI; **C:** Umsetzung mit Reagenz **210**.

Nachdem sich in den zuvor beschriebenen Experimenten die Schutzgruppen als hinderlich herausgestellt hatten, wurde der Ansatz verfolgt, das ungeschützte instabile Diphosphat-Reagenz **198** in Lösung zu stabilisieren. Hierfür wurde die Prozedur von MOHAMADY ET AL.^[103] wieder aufgegriffen. Diese konnte zwar nicht bei der Synthese von d4TDP **15** etabliert werden (Kapitel 4.1.1.2.3), gewährleistete jedoch sehr gute Kupplungsraten zwischen zwei Phosphateinheiten. Des Weiteren wurde in diesem Zusammenhang keine Dimerisierung, wie sie bei der CDI-aktivierten Imidazolidatbildung festgestellt wurde, beobachtet.

Das DP-Reagenz **198** sollte durch Reaktion mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) in ein gemischtes Anhydrid **215** überführt werden, das durch die zusätzliche Veresterung der Pyrophosphateinheit im Vergleich zum Edukt **198** an Stabilität gewinnt. Tatsächlich konnte durch einmalige Zugabe von 5.0 Äquivalenten TFAA zum DP-Reagenz **198** nicht nur selektiv das TFA-veresterte Pyrophosphat **215** erhalten (Abb. 134), sondern bei diesem auch nach mehreren Stunden kein Zerfall im NMR-Lösungsmittel ermittelt werden. Die Selektivität der Synthese ist in Abbildung 135 durch Aufführung der Resultate der ^{31}P -NMR-spektroskopischen Reaktionsverfolgung veranschaulicht. Die Zuordnung der Spektren **A-D** erfolgt entsprechend den Syntheseschritten in Abbildung 134. Eine signifikante Hochfeldverschiebung der beiden Dubletts des gemischten Anhydrids **215** (**B**) im Vergleich zum

Edukt **198 (A)** ist deutlich zu erkennen. Nach einer Reaktionszeit von zehn Minuten wurde das überschüssige TFAA im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Acetonitril aufgenommen und mit 1-Methylimidazol zur Reaktion gebracht. In Analogie zu dem Aktivierungsschritt mit TFAA zeichnet sich die Umsetzung zum Methylimidazolidat **216** durch eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit und Selektivität aus (**C**).

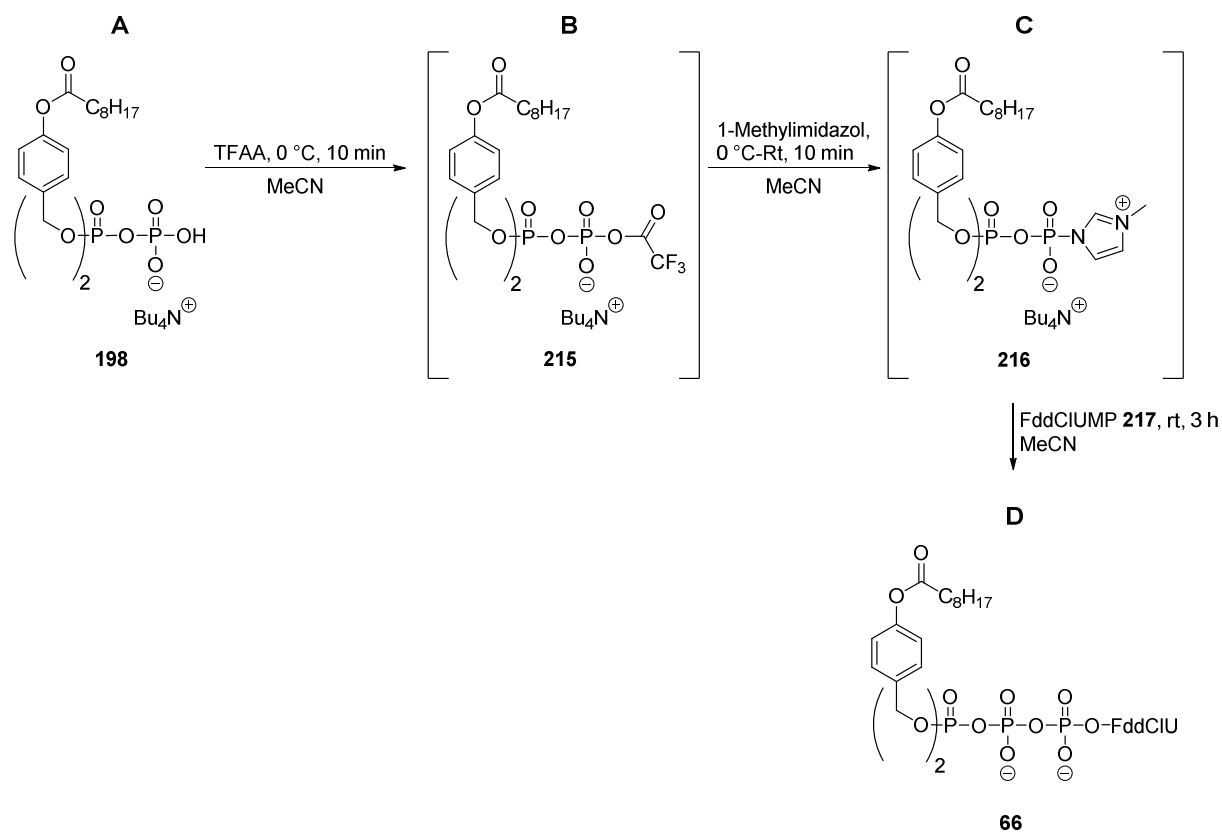


Abb. 134: Darstellung des FddCIUTP-Prodrugs **66** durch Aktivierung des DP-Reagenzes **198** in Anlehnung an MOHAMADY ET AL..^[103] **A:** Edukt DP-Reagenz **198**; **B:** Aktivierung mit TFAA; **C:** Überführung zu dem Imidazolidat **216**; **D:** Umsetzung zum FddCIUTP-Prodrug **66**.

Das elektrophile Pyrophosphat **216** wurde im finalen Schritt mit einem Nucleosidmonophosphat zur Reaktion gebracht. Zwar wurde für die ersten Versuche d4TMP **13** als Nucleophil verwendet, allerdings wurde die Reaktionsverfolgung in diesen Ansätzen lediglich mittels HPLC durchgeführt. Für die Reaktionskontrolle über ^{31}P -NMR-Spektroskopie wurde stattdessen das FddCIU-Monophosphat **217** eingesetzt (Abb. 135). Die Synthese von FddCIUMP **217** wird in Kapitel 4.5.4 vorgestellt. Wie dem ^{31}P -NMR-Spektrum **D** zu entnehmen ist, erfolgte nach dem Zutropfen des Rohprodukts des Imidazolidats **216** zu 0.5 Äquivalenten gelöstem FddCIUMP **217** der Aufbau des gewünschten TriPPP-FddCIUTP-Prodrugs **66**. Die erfolgreiche Bildung des Prodrugs **66** wird am besten an dem für Triphosphate charakteristischen *pseudo*-Triplet bei -22.7 ppm erkennbar. Aber auch die Dubletts bei -12.0 ppm und -12.7 ppm bestätigen die Prodrugbildung, wenngleich Letzteres

deutlich von einem Signal des überschüssigen Imidazolidats **216** überlagert wird. Die Aufnahme des Spektrums **D** erfolgte nach einer Reaktionszeit von einer Stunde und zeigte weiterhin vorliegendes FddCIUMP **217**, womit die Umsetzung zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen war. Erst nach drei Stunden konnte per HPLC kein Edukt **217** mehr detektiert werden.

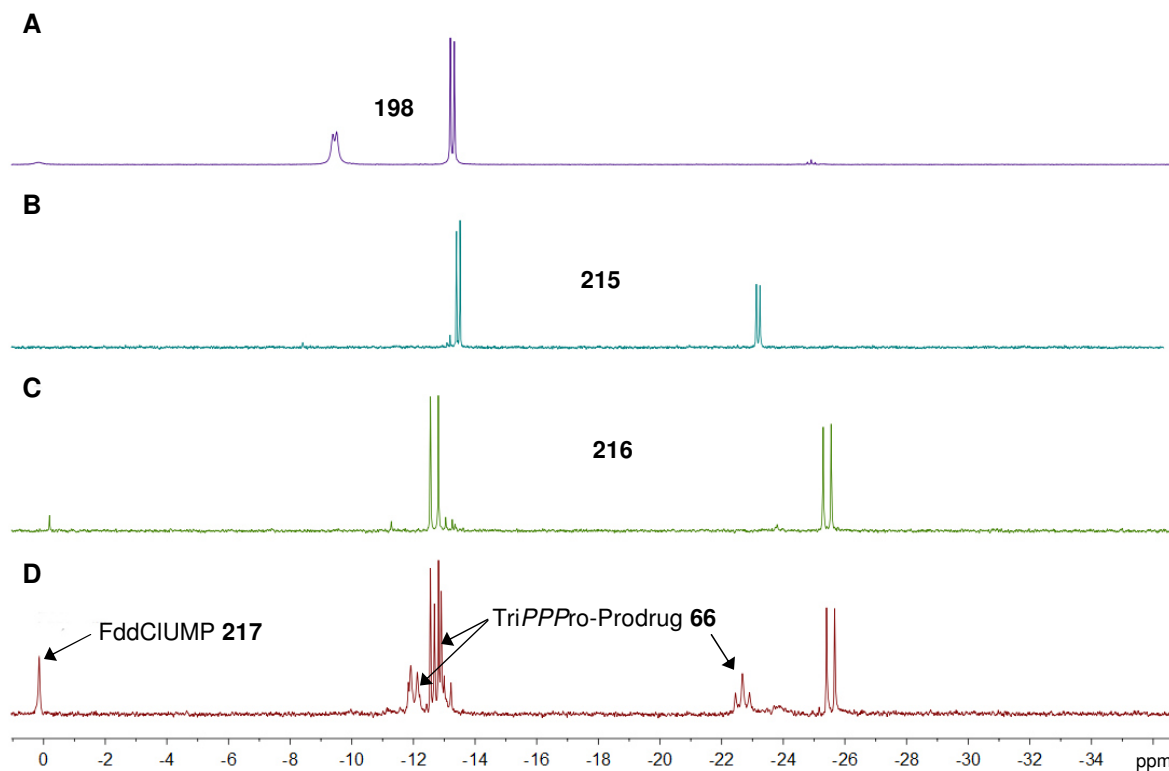


Abb. 135: ^{31}P -NMR-Reaktionsverfolgung zur Synthese des TriPPPPro-FddCIUTP-Prodrugs **66** (CDCl_3 , 162 MHz, entkoppelt). Zuordnung **A-D** erfolgt entsprechend den Reaktionsschritten in Abbildung 134.

Die Aufarbeitung folgte der für die Phosphoramiditroute etablierten Methode (Kapitel 4.1.4). Nach einer automatisierten RP18-Säulenchromatographie, einem Ionenaustausch an Dowex- NH_4^+ und erneuter Chromatographie konnten sowohl das d4TTP- **56e** als auch das FddCIUTP-Prodrug **66** isoliert werden. Im Gegensatz zur der Phosphoramiditroute fällt die chromatographische Reinigung hierbei merklich schwieriger aus. Als Ursache sind mit einer dem Prodrug vergleichbaren Retentionszeit eluierende unidentifizierte Imidazolidate zu nennen. Trotz der damit einhergehenden geringfügigen Ausbeuteverluste konnte das Prodrug **66**, bezogen auf FddCIUMP **217**, mit einer Ausbeute von 35% erhalten werden. Die erfolgreiche Isolierung der Verbindung **66** soll durch das ^{31}P -NMR-Spektrum veranschaulicht werden (Abb. 136).

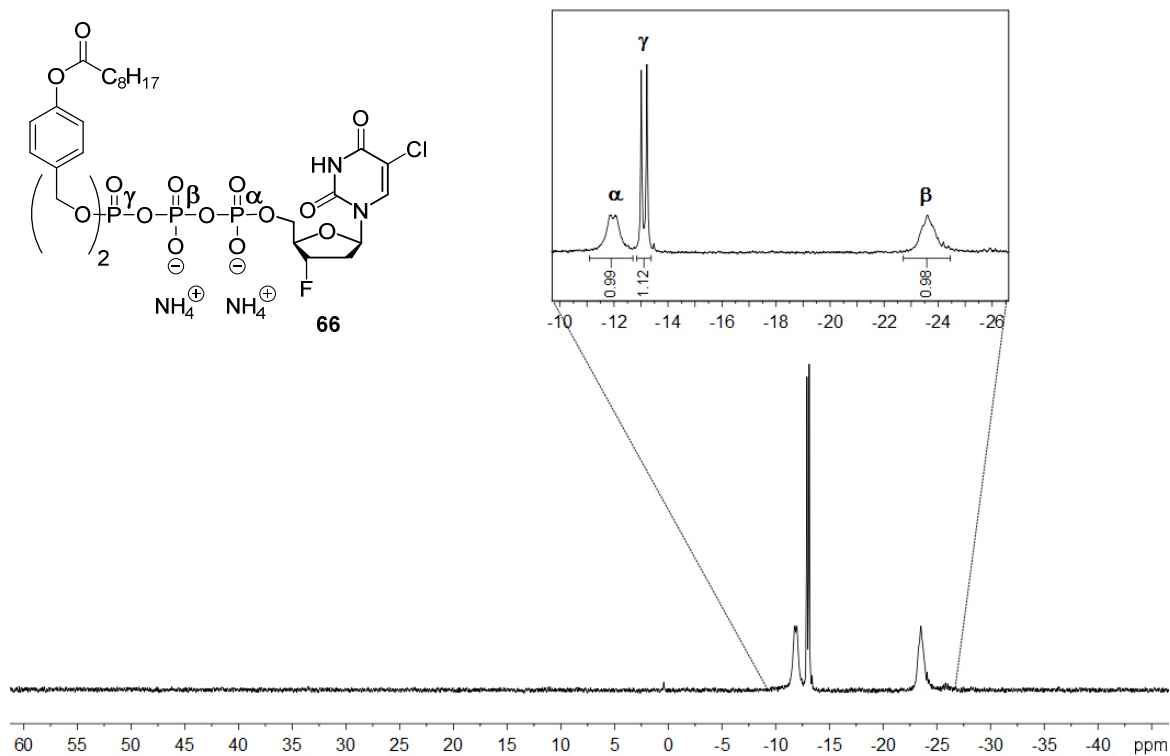


Abb. 136: ^{31}P -NMR-Spektrum des gereinigten TriPPPPro-FddCIUTP-Prodrugs **66** (MeOD- d_4 , 162 MHz, entkoppelt).

Die genauen Reaktionsbedingungen der Synthesen des FddCIUTP-Prodrugs **66** sowie des d4TTP-Prodrugs **56e** unter Verwendung des DP-Reagenzes **198** sind in Abbildung 137 zusammengefasst. Im Fall des d4T-Derivats **56e** wurde eine Ausbeute von 42% erzielt.

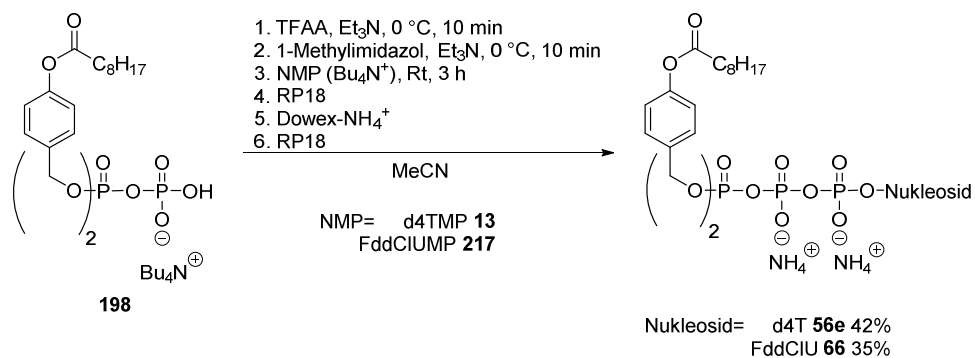


Abb. 137: Darstellung von TriPPPPro-NTP-Prodrugs durch Aktivierung des DP-Reagenzes **198**.

Eine Bestätigung, dass eine Stabilisierung des DP-Reagenzes **198** ausschlaggebend für den Erfolg dieser im Folgenden als "H-Phosphonatroute" bezeichneten Methode ist, lieferte der Versuch, das d4T-5'-Monophosphat-*N*-methylimidazoliumsalz **90** mit dem Reagenz **198** zur Reaktion zu bringen (Abb. 138). Nach fünf Stunden konnte lediglich der Bruch der Phosphoranhydridbindung, jedoch keine Produktbildung festgestellt werden. Dieser Umstand unterstreicht, dass das DP-Reagenz **198** als Nucleophil ungeeignet ist.

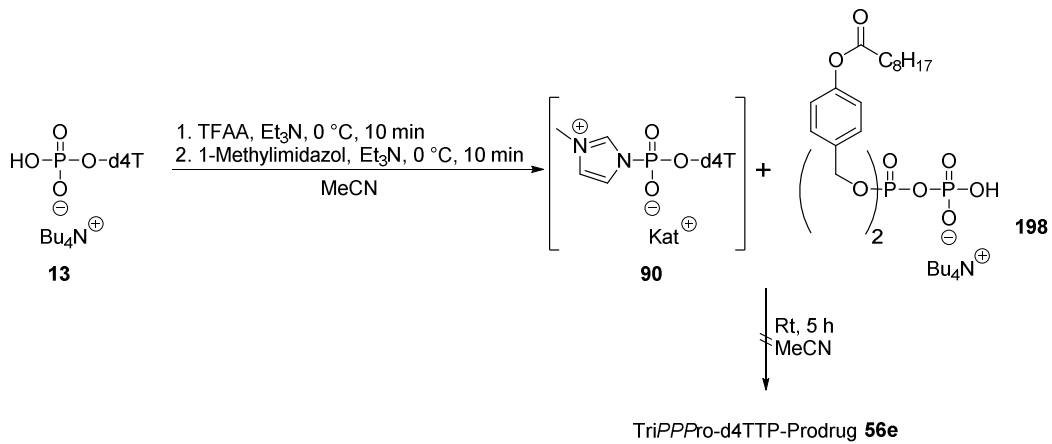
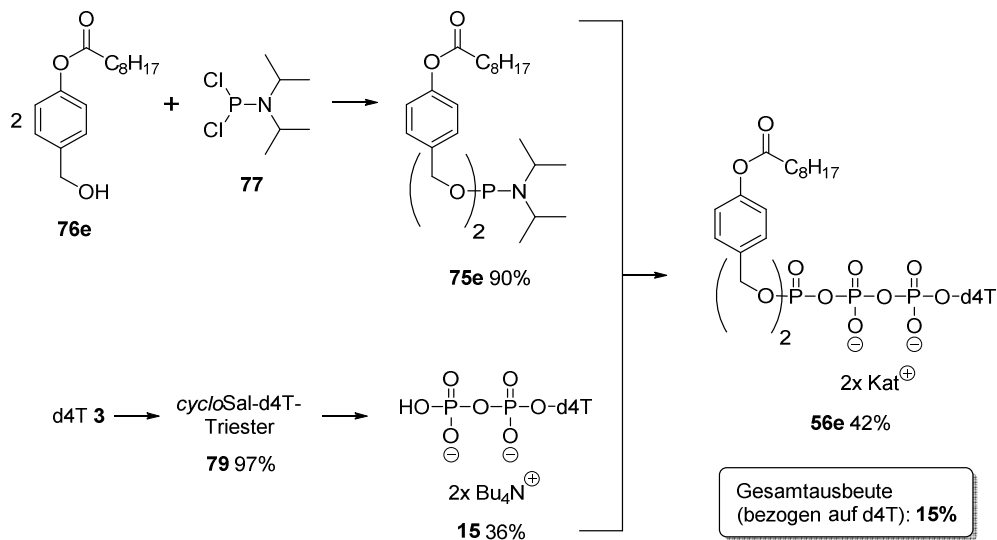


Abb. 138: Versuch der Darstellung des TriPPPPro-d4TTP-Prodrugs **56e** durch Umsetzung von d4TMP-Imidazolidat **90** mit dem DP-Reagenz **198**.

Abschließend galt es zu klären, ob die Synthese über die H-Phosphonatroute im Vergleich zu der etablierten Phosphoramiditstrategie (Kapitel 4.1.4) in Bezug auf die Umsetzung des Nukleosids effizienter verläuft. Zur Vergleichbarkeit wurden nur die Ergebnisse der Darstellung des d4TTP-Prodrugs **56e** berücksichtigt. Im Folgenden sind die Vor- und Nachteile beider Methoden stichwortartig zusammengefasst (Abb. 139, 140).



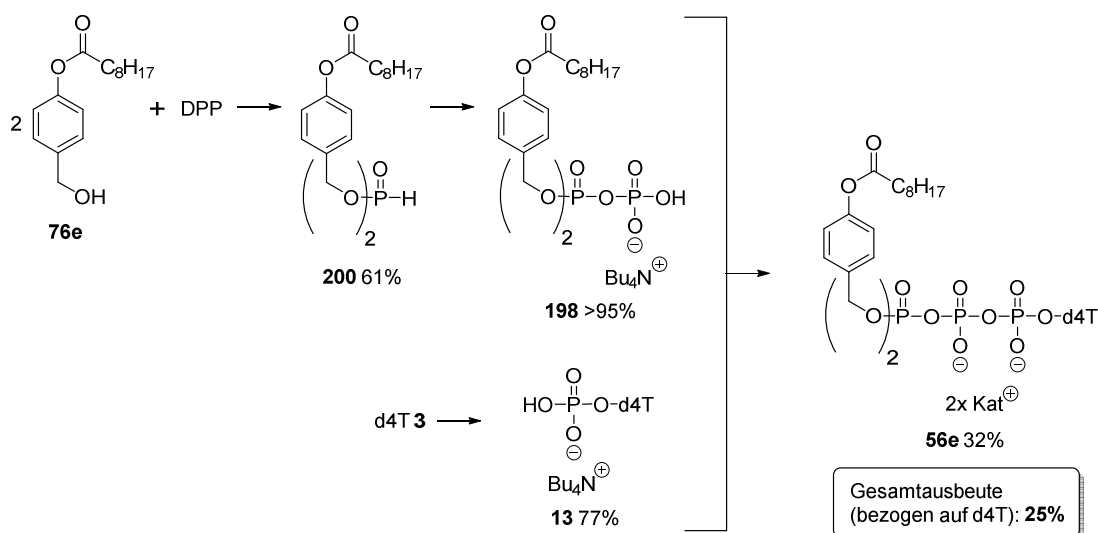
Vorteile:

- Phosphoramidit **75e**: hohe Ausbeute
- TriPPPPro-d4TTP-Prodrug **56e**: kurze Reaktionszeit (<1 min), gute Separation auf RP18

Nachteile:

- d4TDP **15**: niedrige Ausbeute, umständliche und teilweise schwierige Chromatographie

Abb. 139: Vor- und Nachteile der Phosphoramiditroute bei der Darstellung von TriPPPPro-NTP-Prodrugs am Beispiel von d4T **3**.


Vorteile:

- H-Phosphonat **200**: Reinigung durch Umkristallisation
- DP-Reagenz **198**: Ausbeute >95%, gute Reproduzierbarkeit, Reinigung durch Extraktion
- TriPPPPro-d4TTP-Produg **56e**: keine zeitintensiven Synthesen des Edukts **13** notwendig
- höhere Gesamtausbeute bezogen auf das Nucleosid **3** als bei der Phosphoramiditroute

Nachteile:

- H-Phosphonat **200**: etwas niedrigere Ausbeute im Vergleich zum Phosphoramidit **75e**
- TriPPPPro-d4TTP-Produg **56e**: längere Reaktionszeit und etwas geringere Ausbeute als bei der Kupplung des Phosphoramidits **75e** mit d4TDP **15**, erschwerte Separation auf RP18

Abb. 140: Vor- und Nachteile der H-Phosphonatroute bei der Darstellung von TriPPPPro-NTP-Produgs am Beispiel von d4T **3**.

Der Hintergrund der Entwicklung einer zur Phosphoramiditroute alternativen Synthesestrategie war die Vermeidung der Darstellung des Nucleosiddiphosphatbausteins, da dessen Synthese eine niedrige Ausbeute und zeitintensive Reinigung implizierte. Dieser limitierende Schritt konnte bei der H-Phosphonatroute erfolgreich umgangen werden, wodurch eine höhere Gesamtausbeute erzielt werden konnte. Unter Einbeziehung aller in den Abbildungen 139 und 140 angegebenen Faktoren empfiehlt es sich, die H-Phosphonatroute bei Nucleosiden anzuwenden, die nur in geringen Mengen zur Verfügung stehen. Besteht die Möglichkeit der Synthese von größeren Mengen NDP, ist dagegen die Anwendung der Phosphoramiditroute von Vorteil, da vor allem der finale Kupplungsschritt rasch abläuft und die Reinigung des Produgs über (automatisierte) RP18-Chromatographie sehr einfach durchzuführen ist.

4.5.3.5 Synthese von Nucleosid-5'-monophosphaten

Für die Darstellung von TriPPPPro-NTP-Produgs nach der H-Phosphonatroute mussten die in Kapitel 4.5.1 vorgestellten Nucleoside in ihre Monophosphatform überführt werden.

Die Phosphorylierung der Pyrimidinderivate ddT **31**, d4U **40** und ddU **41** erfolgte über die optimierte Methode von SOWA und OUCHI^[96], die sich bei der Synthese von d4TMP **13**

bewährt hatte (Kapitel 4.1.1.2.2). Während auf diese Weise ddTMP **218** und d4UMP **188** in guten Ausbeuten von 65% bzw. 64% in Form ihrer Tetra-*n*-butylammoniumsalze dargestellt wurden, fiel die Ausbeute im Fall von ddUMP **219** mit 33% moderat aus. Dieser Umstand ist jedoch einer erschwerten Separation der Salzrückstände bei der säulenchromatographischen Aufarbeitung geschuldet (Abb. 141).

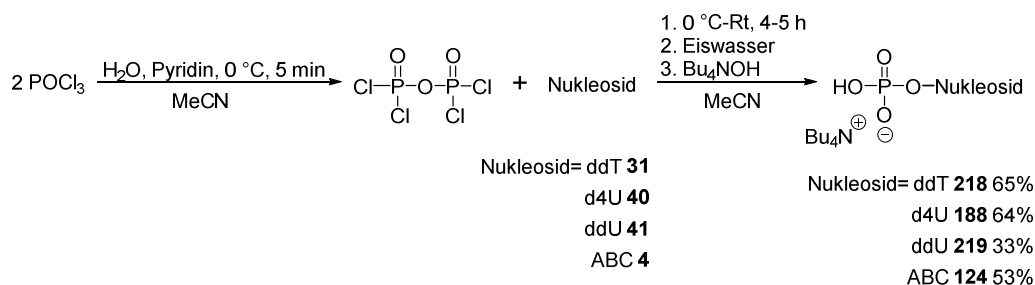


Abb. 141: Synthese von NMP in Anlehnung an SOWA und OUCHI.^[96]

Mit ABCMP **125** gelang auch die Synthese eines Analogons mit Puringerüst. Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass carbozyklische im Gegensatz zu glykosidischen Verbindungen eine erheblich höhere Stabilität unter sauren Bedingungen aufweisen. Aus diesem Grund war bei der Anwendung der Vorschrift von SOWA und OUCHI^[96] bei den säurelabilen Nukleosidanaloga wie ddA **114**, ddG **115** und ddl **2** von einer Eliminierung der Nukleobase auszugehen – bei der Hydrolyse mit Eiswasser werden pH-Werte von 1-2 erreicht. Um den Zerfall der Nukleosidstrukturen zu vermeiden, wurde die sehr milde *cycloSal*-Technik als eine alternative Option zur Synthese von NMP eingesetzt. Ausgehend von dem entsprechenden *cycloSal*-Triester konnte durch Hydrolyse das NMP erhalten werden.

Die Synthese der *cycloSal*-Triester erfolgte nach der Standardprozedur (Kapitel 4.1.1.2.3), wobei die Oxidation bei allen Nukleosiden mit *t*-BuOOH durchgeführt werden konnte (Abb. 142). An die Entfernung aller flüchtigen Bestandteile im Vakuum schloss sich eine Extraktion in Dichlormethan/Ammoniumacetat (1 M) an. Abgesehen von der im Folgenden beschriebenen Aufarbeitung des ddA-Triesters **220** wurden für die Hydrolyse zu den Nukleosidmonophosphaten die Rohprodukte der Triester verwendet.

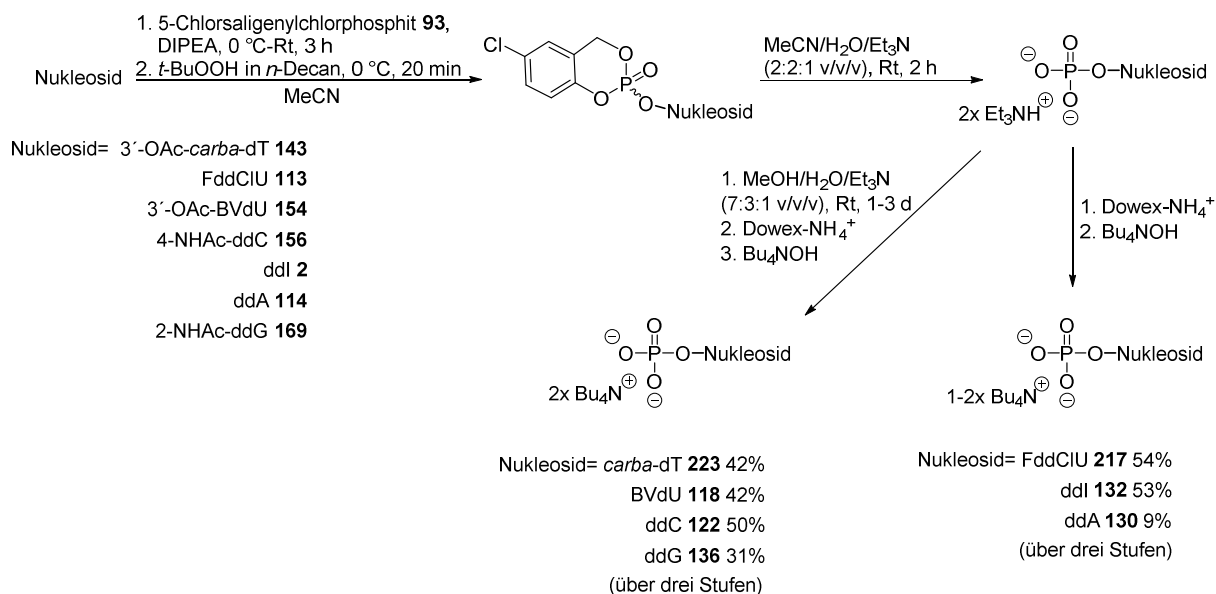


Abb. 142: Synthese von NMP durch Anwendung der *cycloSal*-Technik.

Da das zur Darstellung des Triesters verwendete 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** eine hohe Reaktivität gegenüber Nukleophilen aufweist, war die in Kapitel 4.5.2 beschriebene Schützung funktioneller Gruppen der Nucleoside, mit Ausnahme der 5'-Hydroxylfunktion, notwendig. Nebenreaktionen bei der Umsetzung mit dem elektrophilen Reagenz **93** waren somit bei den entsprechend präparierten Analoga auszuschließen. Die Auswirkungen eines Verzichts einer Schützung zur 5'-OH-Gruppe zusätzlicher reaktiver Zentren offenbarten sich im Fall von ddA **114**. Durch die freie exozyklische Aminofunktion wurde die Bildung großer Mengen des zweifach *cycloSal*-maskierten ddAs **221** beobachtet (Abb. 143). Nach der Isolation über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie wurde die Verbindung **221** NMR-spektroskopisch (³¹P: δ [ppm]= -10.3, -10.6) sowie MS-spektrometrisch (ESI⁺: m/z = ber.: 659.9978 [M+Na]⁺, gef.: 659.9975) identifiziert. Eine saubere Separation des gewünschten *cycloSal*-ddA-Triesters **220** misslang, weshalb dieser in der Folgereaktion verunreinigt eingesetzt wurde.

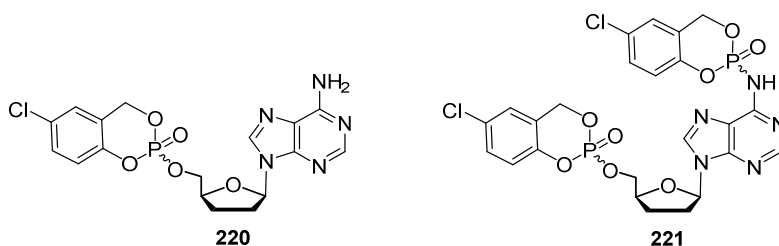


Abb. 143: Isolierte Produkte bei der Umsetzung von ddA **114** mit 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93**.

Die Vorgehensweise zum Erhalt der verschiedenen Nucleosidmonophosphate ist ebenfalls in Abbildung 142 gezeigt. Die Rohprodukte der *cycloSal*-Triester wurden in einem Gemisch aus Acetonitril/Wasser/Triethylamin (2:2:1 v/v/v) aufgenommen, wodurch die Hydrolyse eingeleitet wurde. Die Reaktionslösung wurde über einen Zeitraum von zwei Stunden gerührt. Der Einsatz von Triethylamin als Base diente zum einen dazu, die Phosphatsalze in ihrer Triethylammoniumform vorliegen zu haben, wodurch das beste Elutions- und Trennverhalten auf der RP18-Säule erzielt werden konnte. Zum anderen konnte der Überschuss an Triethylamin im Vakuum entfernt werden. Falls notwendig wurden im Anschluss an die Öffnung des Triesters die Acetylschutzgruppen mit Acetonitril/Wasser/Triethylamin (7:3:1 v/v/v) abgespalten.^[97] Die Deacetylierungszeit variierte dabei zwischen ein bis drei Tagen.

Um die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln zu gewährleisten, musste ein Ionenaustausch auf Tetra-*n*-butylammonium vollzogen werden. Erste Protonierungsversuche von ddCMP **122** und ddGMP **136** durch den Einsatz von Dowex-H⁺, denen sich die Neutralisation mit Bu₄NOH anschließen sollte, scheiterten. Als Ursache konnte die Protonierung der freien exozyklischen Aminofunktionen der Nucleobasen ausgemacht werden. Durch diese fand eine derart starke Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial statt, dass eine Elution mit Wasser verhindert wurde. Erst mit großen Mengen von wässrigem Bu₄NOH als Laufmittel gelang eine sehr langsame Elution von der stationären Phase. Einen erfolgreichen Lösungsansatz bildete die Elution der NMP **122** und **136** in ihrer Triethylammoniumform über Dowex-NH₄⁺ sowie das direkte Zutropfen des Eluats zu einer Bu₄NOH-Lösung (2.0 Äquiv.). Über Gefriertrocknung wurden ddCMP **122** und ddGMP **136** in ihrer Tetra-*n*-butylammoniumform erhalten. Zur Abtrennung unkoordinierter Gegenionen ist eine zusätzliche automatisierte RP18-Chromatographie mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten empfehlenswert. Der beschriebene Syntheseweg ermöglichte einen unkomplizierten Zugang zu unterschiedlich modifizierten Nucleosidmonophosphaten. Die Gesamtausbeute der dreistufigen Synthese lag ausgehend vom Nucleosid im Mittel bei etwa 45%. Lediglich die Ausbeute von ddAMP **130** lag deutlich unter dem Durchschnitt, was neben der chemischen Instabilität vor allem aus der Bildung des doppeltmaskierten Nebenprodukts resultierte.

Zudem sei darauf hingewiesen, dass Versuche unternommen wurden, die Monophosphate der 2',3'-Dideoxy-2',3'-dideoxyanaloga d4C **161**, d4A **168** und d4G zu synthetisieren. Zwar wurde deren Bildung bei der Hydrolyse der entsprechenden *cycloSal*-Triester dünnschichtchromatographisch und NMR-spektroskopisch festgestellt, im Gegensatz zu den Derivaten d4T **3** und d4U **40** gelang eine Isolation jedoch nicht. So wurde bei der RP18-Chromatographie eine Hydrolyse der glykosidischen Bindung in einer Größenordnung beobachtet, die eine Abtrennung der Monophosphate in hoher Reinheit verhinderte. Die hohe Hydrolyseempfindlichkeit dieser Verbindungen ließ sich anhand des d4AMPs

nachweisen, das sich bereits nach einer zweitägigen Lagerung in D₂O nahezu vollständig zersetzte. Die Tendenz zur Abspaltung der Nukleobase ist im Vergleich zu den 2',3'-Dideoxynanaloga durch die zusätzlichen π -Elektronen, die zur Mesomeriestabilisierung des bei der chemischen Hydrolyse gebildeten intermediären Kations beitragen, begünstigt. Aufgrund dieser Instabilitäten wurden diese Nukleoside für die Verwendung als antivirale Wirkstoffe und zur Prodrugsynthese als prinzipiell ungeeignet eingeschätzt, weshalb keine weiteren Optimierungs- bzw. Stabilisierungsversuche zur Isolation der NMP vorgenommen wurden. Allerdings ist es erstaunlich, dass d4C **161**, d4A **168** und d4G eine signifikant niedrigere Stabilität als d4T **3** und d4U **40** aufweisen.

4.5.3.6 Synthese von Bis(nonanoyloxybenzyl)-NTP-Prodrugs über die H-Phosphonatroute

In Abschnitt 4.5.3.4 wurde bereits die Synthese der Prodrugs **56e** und **66** über die H-Phosphonatroute beschrieben. Ausgehend von den Nukleosidmonophosphaten (Kapitel 4.5.3.5) sollte diese Methode zur Darstellung von Nukleosidtriphosphat-Prodrugs eingesetzt werden. Wie ausführlich diskutiert (Kapitel 4.5.3.4), bildet das hydrolyseempfindliche Diphosphat-Reagenz **198** das Schlüsselement dieser Syntheseroute. Auf dessen schrittweisen Aktivierung mit Trifluoressigsäureanhydrid und Methylimidazol folgte die Zugabe des jeweiligen Nukleosidmonophosphats (Abb. 144).

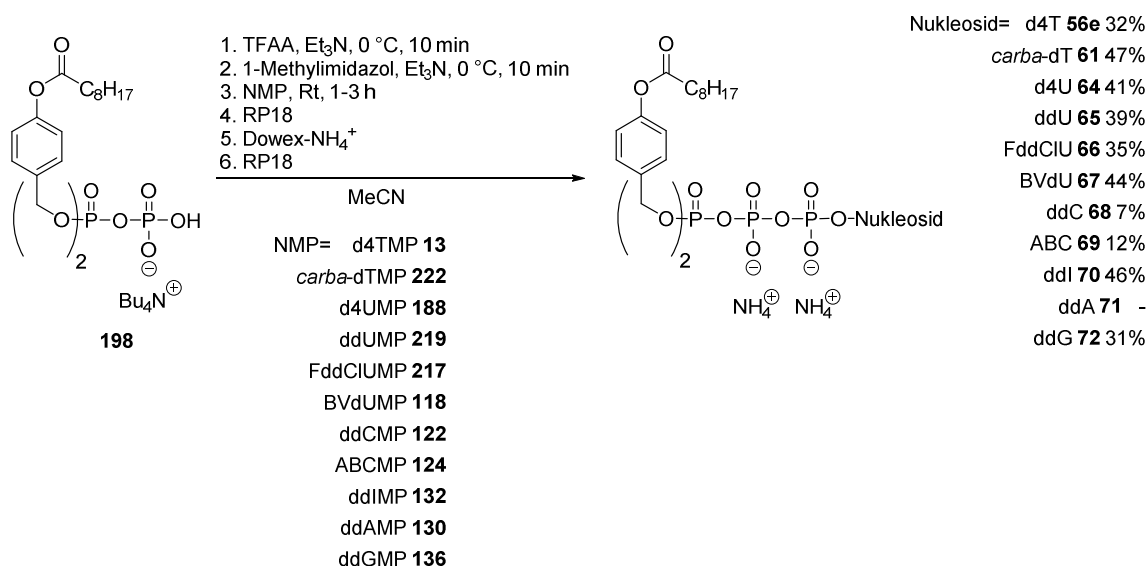


Abb. 144: Darstellung von TriPPP-Pro-NTP-Prodrugs durch Kupplung des NMPs mit dem DP-Reagenz **198**.

Als Lösungsmittel wurde bevorzugt Acetonitril verwendet. Allerdings mussten bei ddGMP **136**, um die vollständige Löslichkeit der Verbindung zu gewährleisten, wenige Tropfen Methanol hinzugegeben werden. Auswirkungen auf den Reaktionsverlauf durch das

vergleichsweise nukleophile Lösungsmittel konnten nicht beobachtet werden. Nach Reaktionszeiten von bis zu drei Stunden konnte durch Kontrolle mittels HPLC in fast allen Fällen ein zufriedenstellender Reaktionsumsatz (>90%) festgestellt werden. Am Beispiel der Reaktionsverfolgung des ddCTP-Prodrugs **68** ist die Effizienz und Selektivität dieser Kupplungsreaktion gezeigt (Abb. 145).

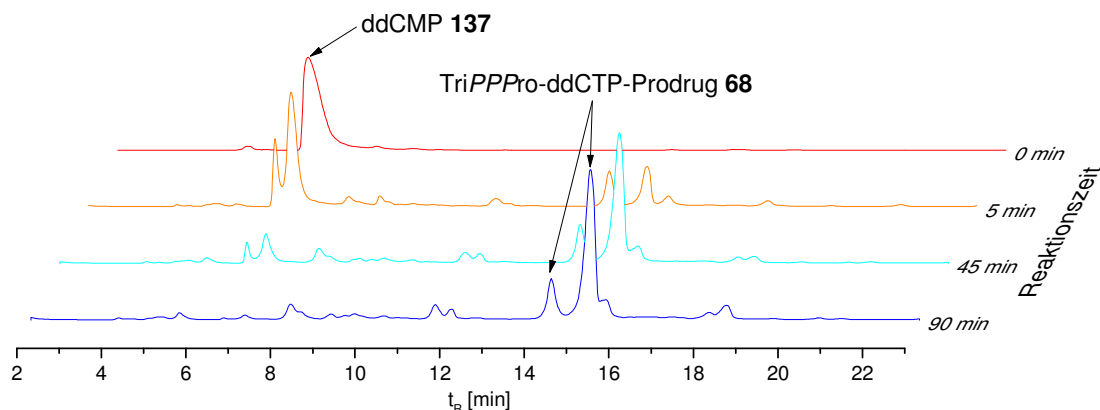


Abb. 145: Reaktionsverfolgung der Synthese des TriPPPro-ddCTP-Prodrugs **68**.

Nach 90 Minuten ist das Edukt ddCMP **137** quantitativ umgesetzt worden. Als Hauptprodukt ist das ddCTP-Prodrug **68** zu erkennen. Dabei konnten der Zielverbindung **68** zwei Peaks zugeordnet werden. Während der Peak mit einer höheren Retentionszeit ein für TriPPPro-Verbindungen charakteristisches Absorptionsspektrum aufweist, kennzeichnet sich der zweite Peak lediglich durch eine für 1-Methylimidazol spezifische UV-Absorption. Da die Bildung eines Peaks mit dem gleichen für Nucleoside untypischen Absorptionsmaximum und vergleichbarer Retentionszeit ebenso bei den Synthesen der weiteren NTP-Prodrugs beobachtet werden konnte, wurde diesem Peak bis zum Abschluss der synthetischen Durchführungen im Rahmen dieser Arbeit fälschlicherweise ein Salz des Methylimidazols zugeschrieben. Eine NMR-spektroskopische Analyse zeigte jedoch, dass es sich dabei ebenfalls um das entsprechende NTP-Prodrug handelt, wobei Methylimidazolium eines der Gegenionen darstellt. Die effizientere Absorption des Methylimidazoliums verhinderte gänzlich die Detektion des für TriPPPro-Verbindungen spezifischen Absorptionsverlaufs. Da die Zuordnung der Produktfraktionen bei der automatisierten chromatographischen Reinigung der Rohprodukte ebenfalls mittels UV-Absorption erfolgte, wurden bei allen im Folgenden diskutierten TriPPPro-Verbindungen, die über die H-Phosphonatmethode synthetisiert wurden, große Produktmengen irrtümlicherweise ignoriert. Dementsprechend können mithilfe dieser Methode noch signifikant höhere als die angegebenen Ausbeuten erzielt werden.

Des Weiteren nehmen nukleosidische Nebenprodukte bei der Synthese des ddCTP-Prodrugs **68** in der Summe nur eine untergeordnete Rolle ein. Somit ist eine Reaktion des

aktivierten DP-Reagenzes **198** mit der freien exozyklischen Aminofunktion der Nucleobase zwar nicht gänzlich auszuschließen, aber für die Produktverteilung nicht von Bedeutung.

Trotz der vorhandenen freien 3'-Hydroxyfunktion verlief auch die Synthese des *carba*-dTTP-Prodrugs ohne merkliche Nebenreaktionen (Abb. 146). Dies verdeutlicht, dass das Diphosphat-Reagenz **198** selektiv mit Phosphatgruppen reagiert, wodurch keine Schützung der nukleophilen Amino- und Hydroxyfunktionen notwendig ist.

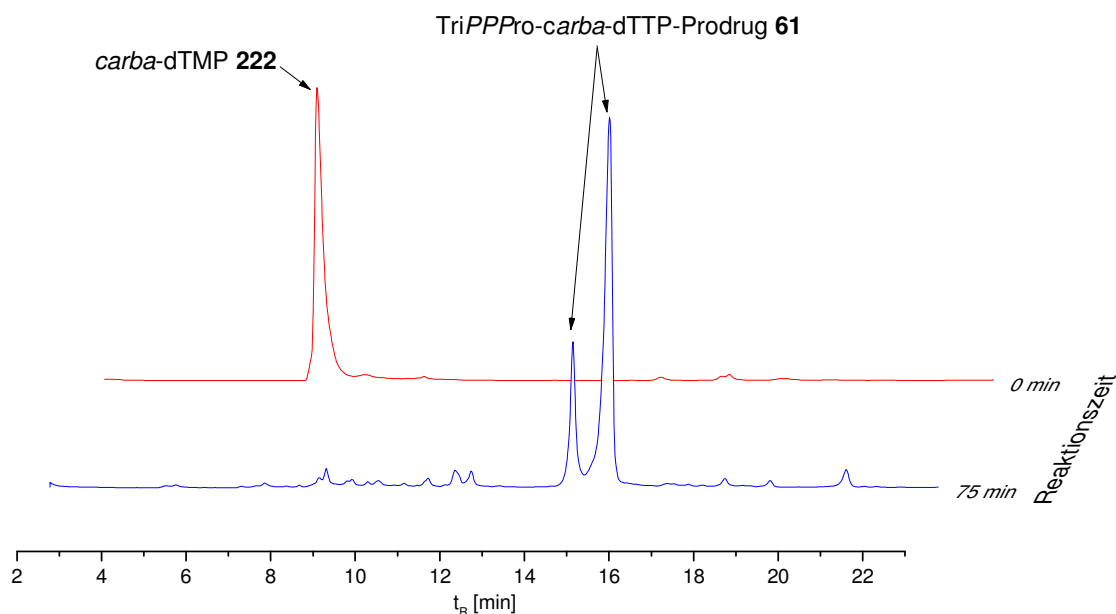


Abb. 146: Reaktionsverfolgung der Synthese des TriPPPro-*carba*-dTTP-Prodrugs **61**.

Während der einzelnen Durchführungen der Prodrugsynthesen wurde durch geringe Veränderungen versucht, die Anzahl der Äquivalente der Reagenzien zu optimieren. Dabei zeigte sich, dass gerade für eine schnelle und effiziente Stabilisierung des Reagenzes **198** ein deutlicher Überschuss an Trifluoressigsäureanhydrid (4.0-5.0 Äquivalente) notwendig ist. Schwierigkeiten verursachte punktuell das Zuführen der Nucleosidmonophosphate zum Methylimidazolidat **216**. Unerklärlicherweise misslang es zuweilen, die NMP quantitativ in Lösung zu bringen, sodass geringe Mengen ungelöst im Kolben zurückblieben. Folglich lagen im Reaktionskolben nicht immer die gewünschten Stoffmengenverhältnisse vor. Durch erneutes Wiegen des Rückstands an Edukt wurde die tatsächlich zugesetzte Menge bestimmt.

Die Aufarbeitung der Rohprodukte über automatisierte RP18-Chromatographie, Ionenaustausch an Dowex-NH₄⁺ sowie erneuter Chromatographie erfolgte in den meisten Fällen ohne Komplikationen. Dadurch wurden die Prodrugs überwiegend in Ausbeuten von 31-47% erhalten. Exemplarisch ist in Abbildung 147 das ³¹P-NMR-Spektrum des TriPPPro-*carba*-dTTP-Prodrugs **61** gezeigt.

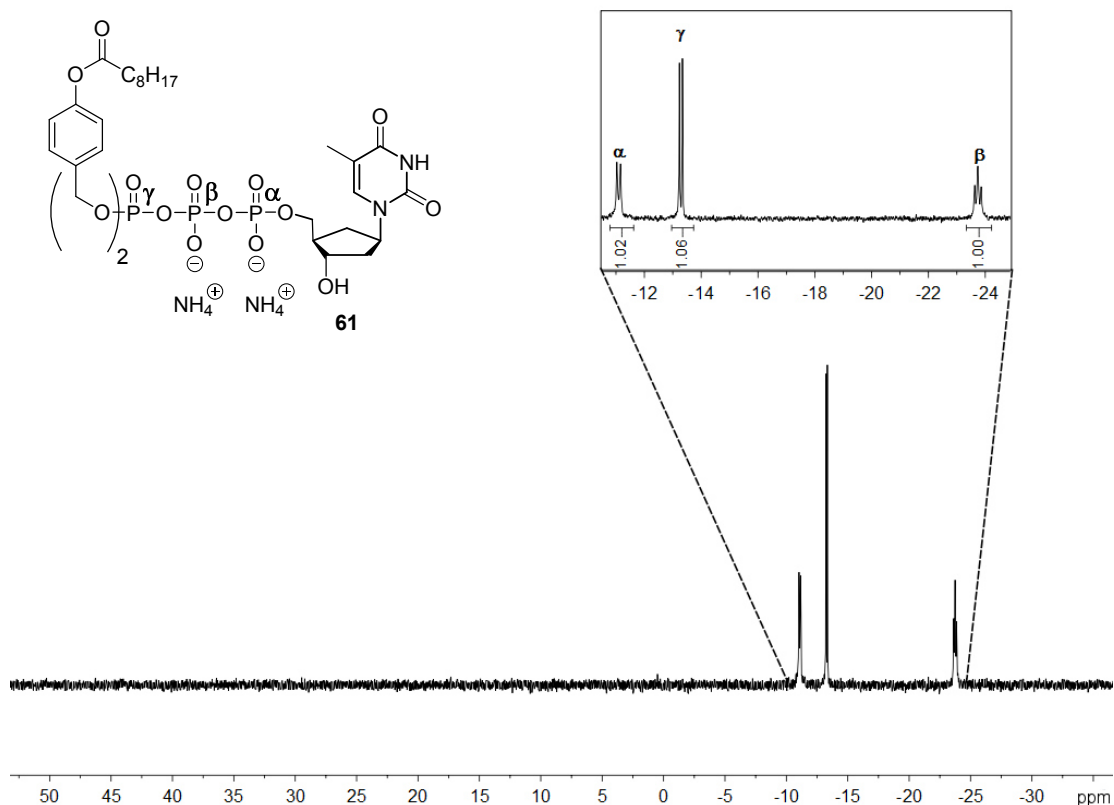


Abb. 147: ³¹P-NMR-Spektrum des TriPPPro-*carba*-dTTP-Prodrugs **61**
(MeOD-*d*₄, 162 MHz, entkoppelt).

Ausnahmen bildeten die TriPPPro-Verbindungen von ddC **68**, ABC **69** und ddA **71**, bei denen die chromatographische Separation von Verunreinigungen nur unzureichend oder gar nicht gelang. So lag das Prodrug des Adenosinanalogs **71** lediglich in Mischfraktionen vor. Eine Wiederholung der Chromatographie führte unerklärlicherweise zu einer vollständigen Zersetzung der Zielverbindung. Das ddC-Prodrug **61** wurde im Gegensatz dazu zumindest in einer Ausbeute von 7% in hoher Reinheit gewonnen. Der Großteil der Substanz konnte jedoch nicht von den Kontaminationen befreit werden und fand daher keine Berücksichtigung bei der Ausbeutebestimmung. Im Fall des TriPPPro-ABCTP-Prodrugs **69** ist die vergleichsweise niedrige Ausbeute von 12% ebenfalls primär auf chromatographische Trennprobleme zurückzuführen. Hinzu kommt, dass während der Reaktion nur etwa 80% des Edukts **124** umgesetzt wurden. Dies könnte das Resultat des mit 1.4 Äquivalenten im Vergleich zu den übrigen Prodrugsynthesen niedrigsten Überschusses an aktiviertem DP-Reagenz **216** sein.

Aufgrund dieses Ergebnisses ist ein einfacher Überschuss an Methylimidazolidat **216** zum NMP zu empfehlen, um einen vollständigen Umsatz des NMPs zu gewährleisten.

Gleichwohl gelang die erfolgreiche Darstellung einer Serie von verschiedenen modifizierten Triphosphat-Prodrugs, wodurch die generelle Anwendbarkeit der H-Phosphonatroute bestätigt wurde.

4.5.3.7 Synthese eines DiPPro-d4TDP-Prodrugs über H-Phosphonatchemie

Nach der Synthese des DP-Reagenzes **198** (Kapitel 4.5.3.4), bei der ein Chlorphosphat **201** mit einem Phosphatsalz effizient zur Reaktion gebracht wurde, sollte diese Kupplungsvariante von zwei Phosphateinheiten auf ihre Verwendungsmöglichkeit zur Darstellung von DiPPro-Verbindungen untersucht werden. Hierfür wurde das mit *N*-Chlorsuccinimid aktivierte H-Phosphonat **200** direkt mit d4TMP **13** versetzt (Abb. 148). Nach einer dreistündigen Reaktionszeit wurde mittels HPLC ein nahezu vollständiger Umsatz des Edukts **13** festgestellt. An das Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum schloss sich die säulenchromatographische Reinigung an. Die Zielverbindung **74e** wurde in einer Ausbeute von 16% isoliert. Weiteres Produkt **74e** lag in mit Phosphatdiester **109e** verunreinigten Mischfraktionen vor. Da allein die Anwendbarkeit der Methode überprüft werden sollte, blieben die Mischfraktionen bezüglich der Ausbeutebestimmung unbeachtet.

Somit wurde bewiesen, dass alternativ zu der im Arbeitskreis etablierten Phosphoramiditchemie ebenso über H-Phosphonate die Synthese von NDP-Prodrugs möglich ist.

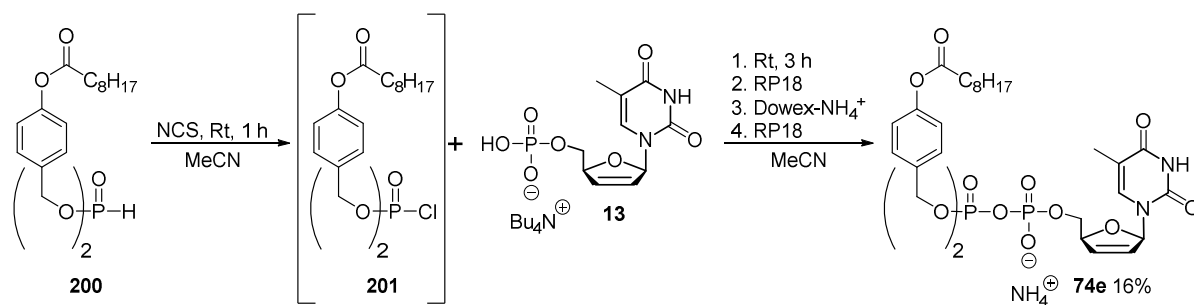


Abb. 148: Darstellung des DiPPro-d4TDP-Prodrugs **74e** über H-Phosphonatchemie.

4.6 Hydrolyseverhalten von Bis(nonanoyloxybenzyl)-NTP-Prodrugs

In Analogie zu den in Kapitel 4.1 vorgestellten TriPPro-d4TTP-Prodrugs **56** sollten die Prodrugs unterschiedlicher Nucleosidanaloga bezüglich ihres chemischen und enzymatischen Hydrolyseverhaltens charakterisiert werden. Dabei sollte ermittelt werden, inwieweit die Modifikationen am Glykon und an der Nucleobase Einfluss auf den Hydrolyseverlauf der TriPPro-Verbindungen nehmen.

4.6.1 Hydrolyse von Bis(nonanoyloxybenzyl)-NTP-Prodrugs in PBS

Entsprechend zu der in Kapitel 4.2.1 beschriebenen experimentellen Durchführung wurden die Prodrugs zur Untersuchung der chemischen Stabilität in Phosphatpuffer (pH 7.3) bei 37 °C inkubiert und die kinetischen Daten mittels HPLC bestimmt. Dabei war nicht für alle TriPPP_{ro}-NTP-Prodrugs ein bevorzugter Hydrolyseverlauf über das monomaskierte Intermediat bis hin zum Nucleosidtriphosphat zu beobachten. Die auftretenden Differenzen sollen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

Da die Hydrolyseprodukte nur in Ausnahmefällen durch Coinjektion bestätigt werden konnten, wurde die Zuordnung der HPLC-Peaks durch Massenspektrometrie vorgenommen. Als Beispiel dient das MALDI-Massenspektrum der aus der Hydrolyse des BVdUTP-Prodrugs **67** gewonnenen Hauptmetabolite, die gemeinsam als HPLC-Eluat fraktioniert wurden (Abb. 149). Das Spektrum zeigt die Massen von BVdUDP **119** und BVdUTP **120** mit dem für Bromderivate charakteristischen Isotopenverhältnis von [⁷⁹Br (51%)/⁸¹Br (49%)].

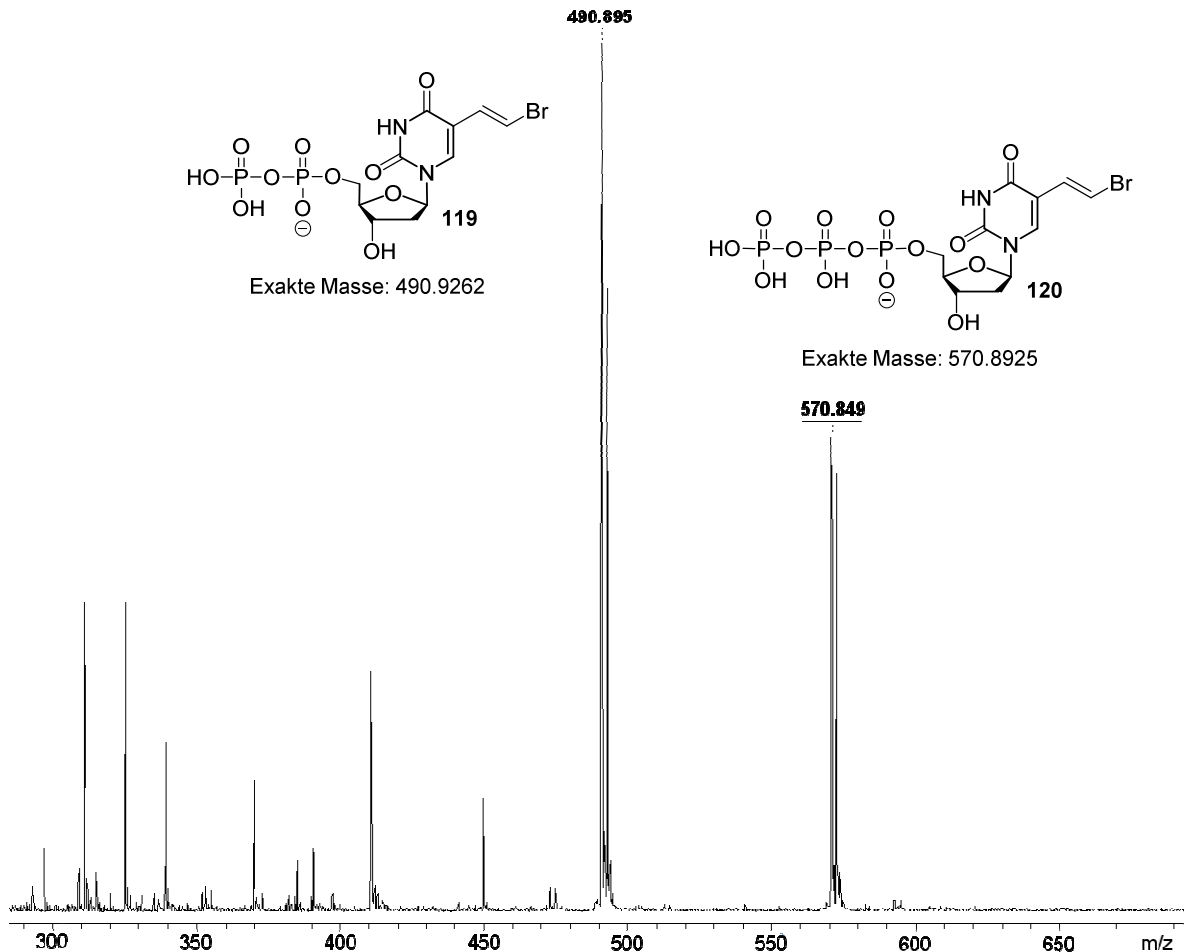


Abb. 149: MALDI-Massenspektrum der bei der Hydrolyse des TriPPP_{ro}-BVdUTP-Prodrugs **67** in PBS im HPLC-Chromatogramm dominierenden Metabolite.

Die in PBS ermittelten ersten Hydrolysehalbwertszeiten der TriPPPPro-Verbindungen sind in Abbildung 150 zusammengefasst. Zum Vergleich ist auch das in Kapitel 4.2.1 vorgestellte und charakterisierte d4TTP-Prodrug **56e** aufgeführt, das mit $R = C_8H_{17}$ die identischen aliphatischen Masken wie die anderen Prodrugs besitzt.

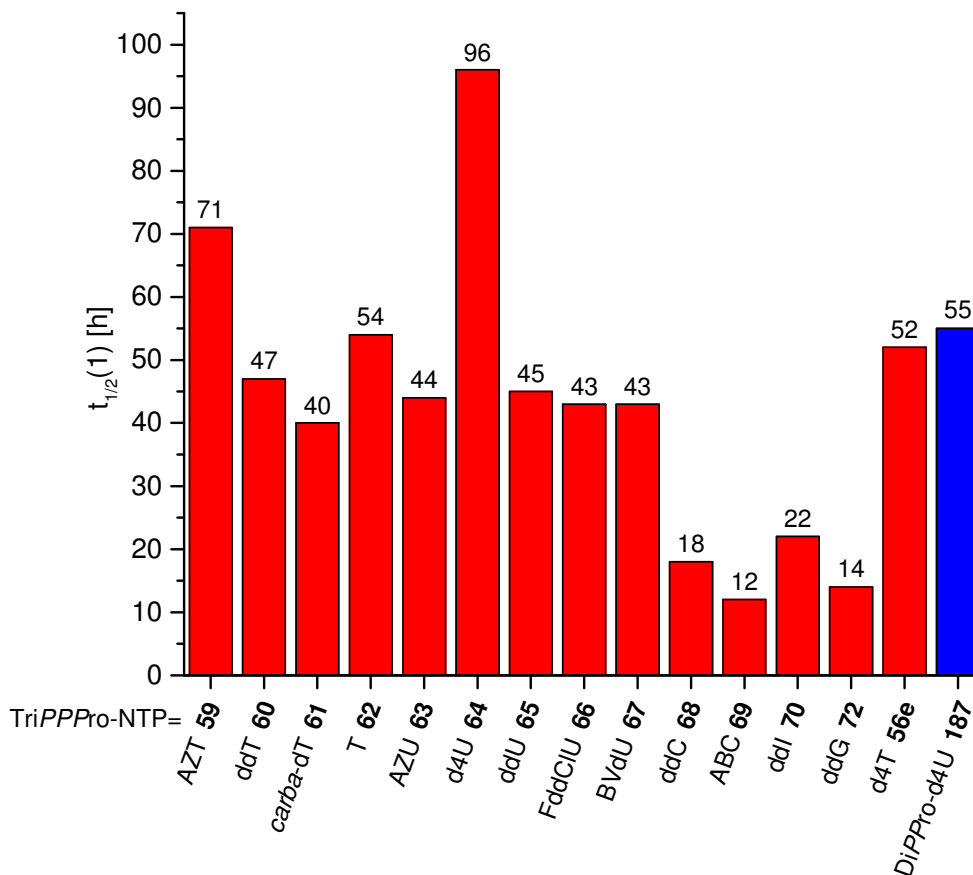


Abb. 150: Erste Hydrolysehalbwertszeit der unterschiedlichen TriPPPPro-NTP-Prodrugs und des DiPPPPro-d4UDPs **187** in PBS bei pH 7.3.

Für die bezüglich der Nukleobase in naher Verwandtschaft stehenden Uridin- und Thymidinanaloga **59-67** wurden für $t_{1/2}(1)$ überwiegend Werte zwischen 40-55 Stunden bestimmt. Dementsprechend scheinen die betrachteten Modifikationen am Glykon keinen signifikanten Einfluss auf die Prodrugstabilität auszuüben. Im Gegensatz dazu ist eine Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von der Struktur der Nukleobase auszumachen. Ein gutes Beispiel stellt der Vergleich der Prodrugs der 2',3'-Didesoxyanaloga ddU **65** und ddG **72** dar. Mit einer Halbwertszeit von 45 Stunden wird das ddUTP-Prodrug **65** mehr als dreimal so langsam abgebaut wie das ddGTP-Prodrug **72** mit $t_{1/2}(1) = 14$ h. Die Retentionszeiten an einer HPLC-RP18-Säule lassen erkennen, dass alle charakterisierten TriPPPPro-Verbindungen eine ähnliche Lipophilie aufweisen (Abb. 151). Jedoch muss berücksichtigt werden, dass es sich bei dieser Methode nur um einen indirekten Beweis bezüglich der Polarität handelt. Demzufolge ist ein Einfluss von Solvatisierungseffekten auf die Hydrolysehalbwertszeit, wie

er schon im Zusammenhang mit den TriPPPPro-d4TTP-Prodrugs **56** diskutiert wurde, nicht auszuschließen.

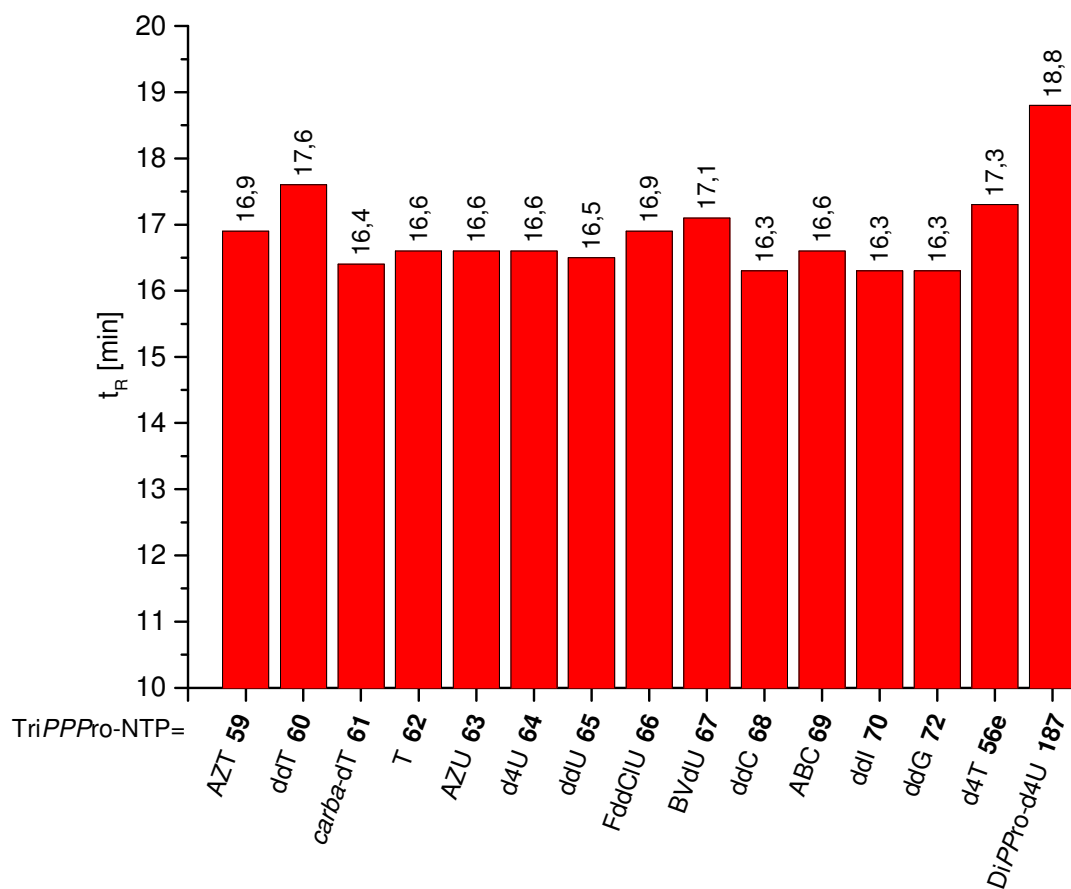


Abb. 151: Retentionszeiten verschieden modifizierter TriPPPPro-NTP-Prodrugs und des DiPPPPro-d4UDPs **187** (HPLC-Methode A).

4.6.1.1 Chemische Hydrolyse von Uridin- und Thymidinanaloga **59-67**

Die Hydrolysen in Phosphatpuffer (pH 7.3) der Prodrugs sowohl der Thymidin- als auch der Uridinderivate **59-67** verliefen erwartungsgemäß über das monomaskierte Intermediat zum NTP. Des Weiteren fand partiell ein hydrolytischer Bruch der Phosphoranhydridbindung zwischen dem β - und γ -Phosphat der TriPPPPro-Verbindung statt, worauf die Bildung des jeweiligen NDPs hindeutete. Exemplarisch ist in Abbildung 152 der Hydrolyseverlauf von *carba*-dTTP **61** gezeigt. Neben der Bildung des Intermediats **223** ist im späteren Verlauf der Hydrolyse die Freisetzung von *carba*-dTTP **224** zu erkennen.

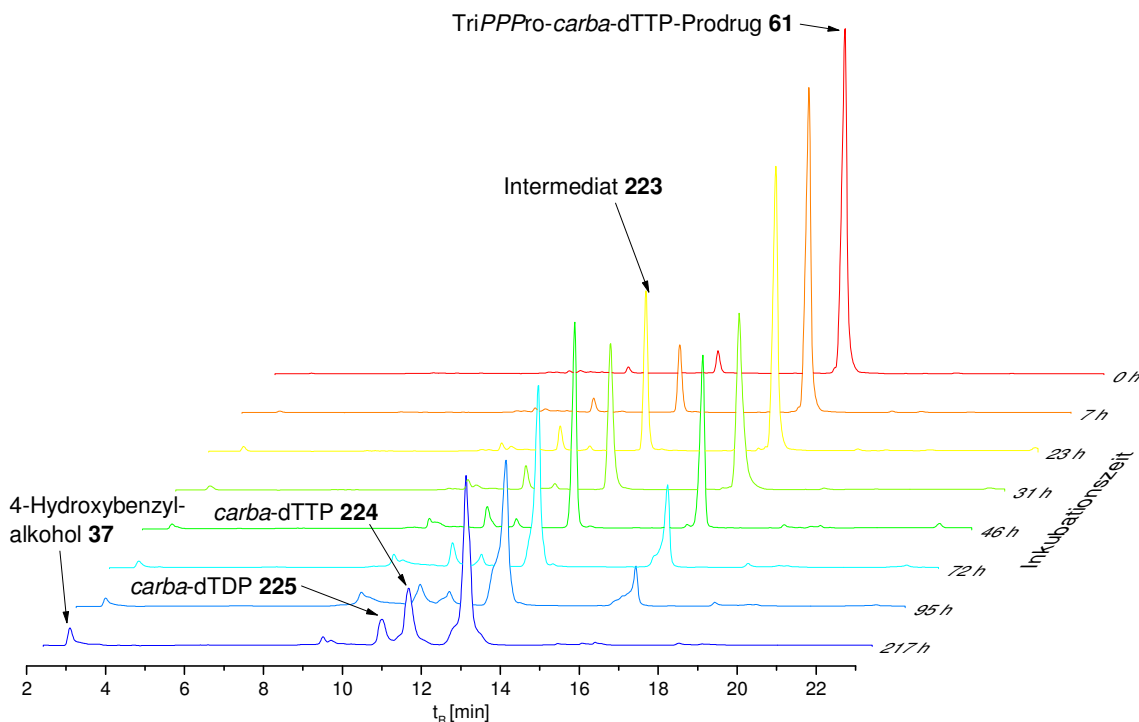


Abb. 152: Hydrolyseverlauf des *carba*-dTTP-Prodrugs **61** in PBS (HPLC-Methode A, 271 nm).

Allein bei der Hydrolyse des DiPPro-d4UDP-Prodrugs **187** sowie des TriPPro-d4UTP-Prodrugs **64** wurde auch die Abspaltung der Nukleobase als Nebenreaktion beobachtet. Die Spaltung der glykosidischen Bindung konnte schon im Rahmen der Charakterisierung des Hydrolyseverhaltens der strukturell verwandten d4T-Prodrugs **56a-q** festgestellt werden (Kapitel 4.2.1). Trotzdem wurde für das d4UTP-Prodrug **64** eine vergleichsweise hohe erste Hydrolysehalbwertszeit von 96 Stunden bestimmt. Eine Begründung für diese Abweichung kann an dieser Stelle nicht erbracht werden. Allerdings sei darauf hingewiesen, dass alle Werte aus Einpunktbestimmungen resultieren und dementsprechend fehlerbelastet sein können. Für die DiPPro-d4UDP-Verbindung **187** wurde mit $t_{1/2}(1) = 55$ h eine mit den TriPPro-Verbindungen vergleichbare Stabilität ermittelt. Dies ist dahingehend erstaunlich, da bei der Gegenüberstellung der TriPPro-d4TTP-Prodrugs **56a-n** und der DiPPro-d4TDP-Prodrugs^[77] für Letztere signifikant höhere erste Hydrolysehalbwertszeiten erhalten wurden.

4.6.1.2 Chemische Hydrolyse der NTP-Prodrugs von ABC, ddl und ddG

Wie Abbildung 150 (S. 150) zu entnehmen ist, haben die drei untersuchten TriPPro-Verbindungen, die ein Purin als Grundgerüst besitzen, eine niedrige Hydrolysehalbwertszeit gemein. Einen interessanten Vertreter stellt vor allem das ABCTP-Prodrug **69** dar, das anders als das ddG-Prodrug **72** und ddl-Prodrug **70** zu den carbozyklischen und folglich hydrolysestabilen Nucleosidanaloga zählt. Ein Zerfall des Nucleotids in PBS ist daher auszuschließen. Bemerkenswerterweise wurde im Fall des ABCTP-Prodrugs **69** die Demaskierung

zum monomaskierten Intermediat **226** im Vergleich zu allen charakterisierten Prodrugs mit einer Halbwertszeit von zwölf Stunden am schnellsten vollzogen. Dieses Phänomen legte den Verdacht nahe, dass die Nukleobase einen Einfluss auf den Hydrolysemechanismus oder auf die Stabilität der Prodrugs ausüben kann.

Zudem konnte bei der Hydrolyse des ABCTP-Prodrugs **69** neben der Freisetzung von ABCMP **124**, ABCDP **228**, ABCTP **229** sowie dem Intermediat **226** die Bildung eines Nebenprodukts **227** beobachtet werden (Abb. 153), das sich durch ein von Abacavir-metaboliten abweichendes Absorptionsmaximum auszeichnet. Aus diesem Grund konnte eine Quantifizierung der ablaufenden Nebenreaktion über die Peakintegrale nicht durchgeführt werden. Gleichzeitig weist ein verändertes Absorptionsverhalten auf eine Reaktion an der Nukleobase hin, die das für die hier diskutierten Prodrugs im Wellenlängenbereich von 220-300 nm charakteristische Chromophor darstellt.

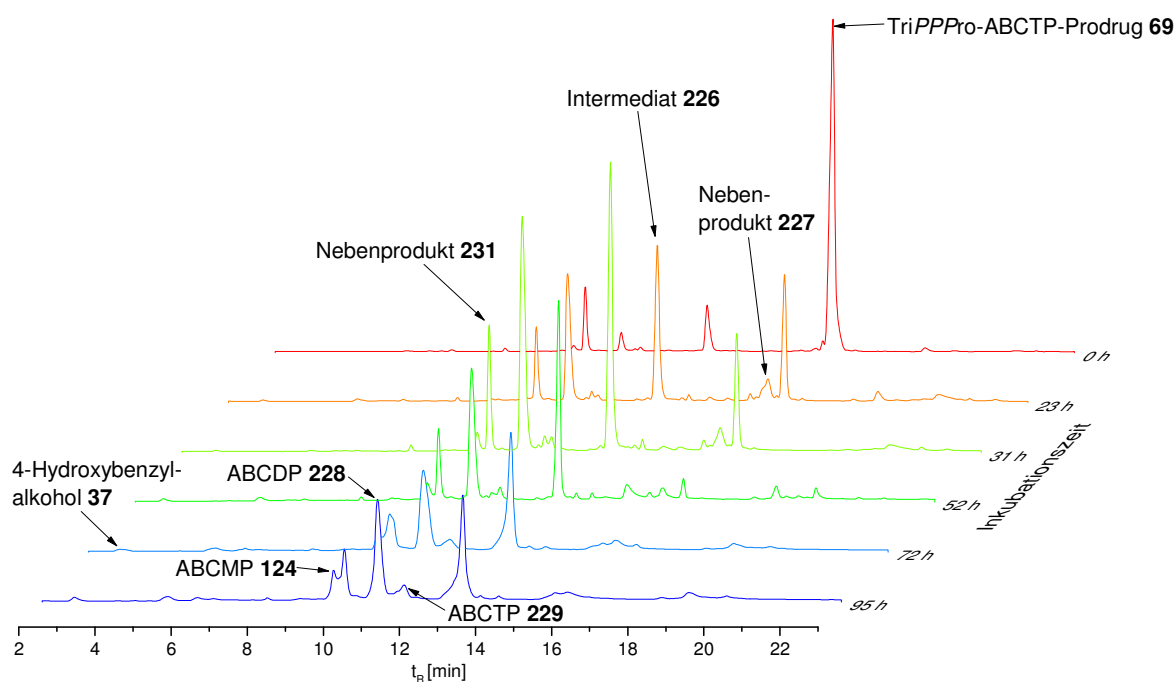


Abb. 153: Hydrolyseverlauf des ABCTP-Prodrugs **69** in PBS bei pH 7.3 (HPLC-Methode A, 260 nm).

Leider konnte keine Trennung des Nebenprodukts **227** und Prodrugs **69** bei der Elution von der HPLC-Säule erzielt werden, weshalb nur Mischfraktionen erhalten wurden. Dennoch konnten durch massenspektrometrische Analyse des Eluats der Nebenverbindung **227** eine Masse und entsprechend eine Struktur zugeordnet werden (Abb. 154).

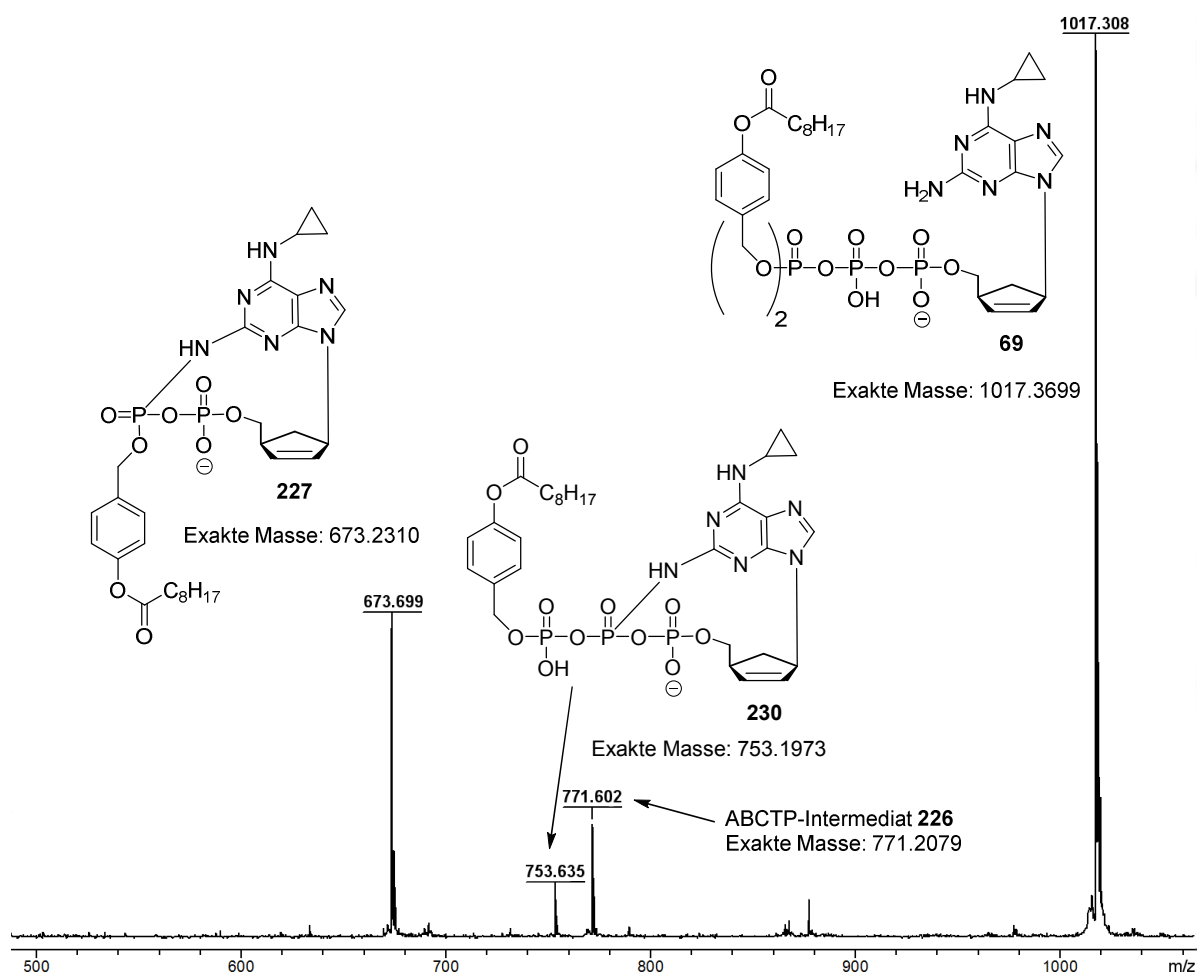


Abb. 154: MALDI-Massenspektrum der Mischfraktion des Nebenprodukts **230** und des ABCTP-Prodrugs **69**.

Mithilfe des bei der MALDI-MS-Analyse beobachteten Fragmentierungsverhaltens des reinen Prodrugs **69** und der massenspektrometrischen Untersuchung der Mischfraktion kann ein möglicher Mechanismus zur Bildung des Nebenprodukts **227** postuliert werden (Abb. 155). Ausgehend vom Prodrug **69** in seiner *syn*-Konformation erfolgt im ersten Schritt eine intramolekulare Zyklisierung durch einen nukleophilen Angriff des freien Elektronenpaares der exozyklischen Aminofunktion am β -Phosphat. Theoretisch wäre aufgrund der räumlichen Distanz ein Angriff auf das α -Phosphat zwar wahrscheinlicher, allerdings wären die folgenden Prozesse nicht begründbar. Anschließend wird die erste Maskierungseinheit durch eine Hydrolyse an der Benzylfunktion (Kapitel 4.2.1) abgespalten, wodurch der intakte Benzylalkohol **76e** freigesetzt und das Zwischenprodukt **230** gebildet werden. Die Verbindung **230** ließ sich als Fragment bei der MALDI-Untersuchung der Prodrugfraktion nachweisen. Eine Bildung des Zwischenprodukts **230**, ausgehend von dem monomaskierten Intermediat **226**, wurde dagegen massenspektrometrisch nicht festgestellt. Der Benzylalkohol **76e** ist im nächsten Schritt scheinbar in der Lage, nukleophil am β -Phosphat anzugreifen. Daraufhin wird die Bindung zwischen β - und γ -Phosphat gebrochen und das

besagte Nebenprodukt **227** erhalten. Die vorliegende Phosphoramidatbindung verursacht eine Veränderung des Chromophors, wodurch sich der abweichende Absorptionsverlauf der Verbindung **227** im Vergleich zu den Abacavirmetaboliten erklären lässt.

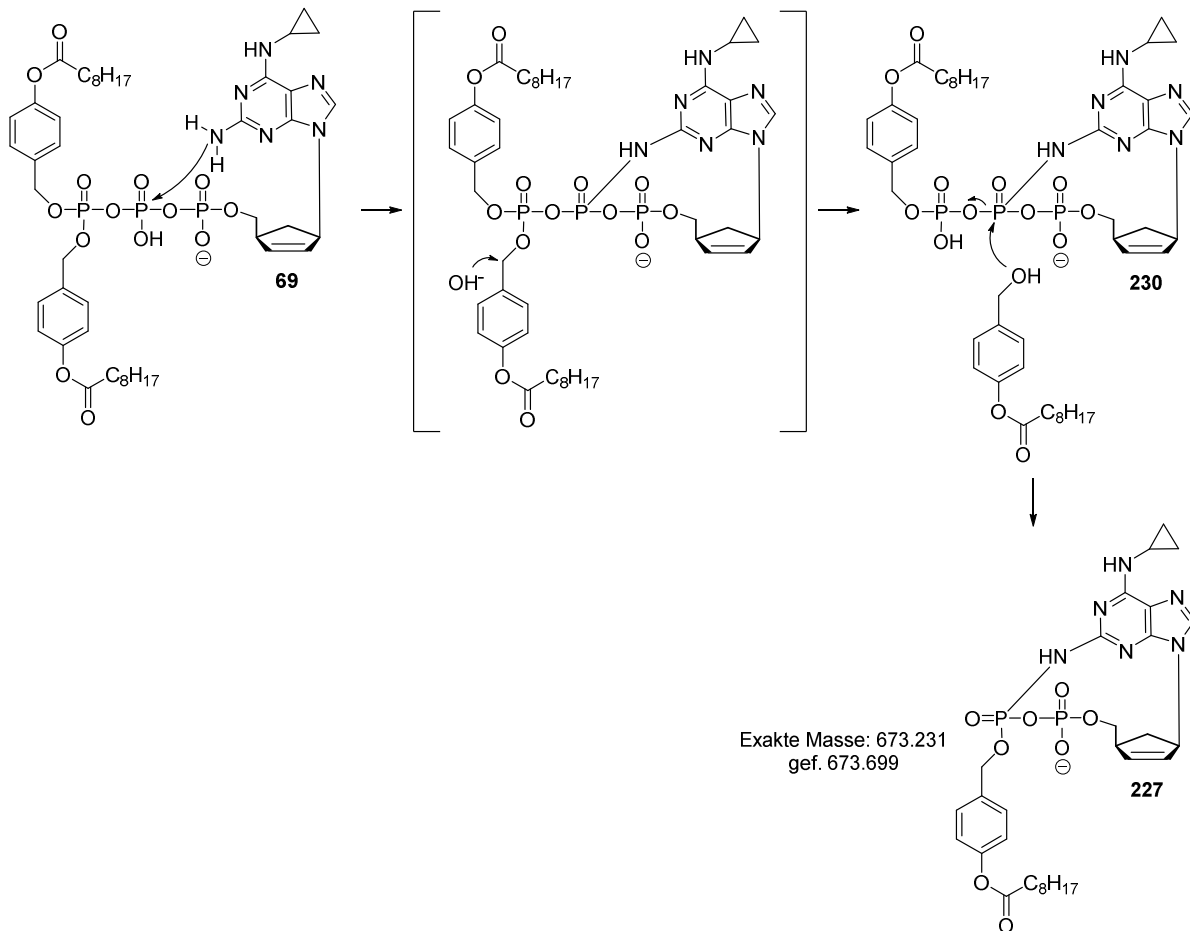


Abb. 155: Möglicher Mechanismus zur Formierung des Nebenprodukts **227** in PBS.

Der Hydrolyseverlauf in Abbildung 153 (S. 153) zeigt, dass die Nebenverbindung **227** ebenfalls hydrolysiert wird. Gleichzeitig werden keine Verbindungen erhalten, die ein von Abacavirmetaboliten abweichendes Absorptionsmaximum aufweisen. Dagegen ist primär die Zunahme der Peakflächen des ABCMPs **125** und ABCDPs **228** zu beobachten, was für einen hydrolytischen Bruch sowohl der Phosphoramidatbindung als auch der Phosphoranhydridbindung spricht. Demzufolge würde die Hydrolyse über das Nebenprodukt **227** begründen, warum bei der chemischen Hydrolyse des TriPPPro-ABCTP-Prodrugs **69** trotz der geringen Hydrolysehalbwertszeit ungewöhnlich hohe Anteile an ABCMP **124** und ABCDP **228** gebildet werden. Allerdings kommt hinzu, dass nicht nur ein Zerfall des Nebenprodukts **227**, sondern auch eine Spaltung der Phosphoranhydridbindung des ABCTP-Prodrugs **69** zu einer Freisetzung von ABCDP **227** führen. Als Beleg dafür dient der Phosphatdiester **109e**, der sich bei Betrachtung der Chromatogramme bei einer Wellenlänge von 220 nm detektieren lässt. In der Summe muss festgehalten werden, dass die

Formierung des gewünschten ABCTPs **229** nur eine untergeordnete Rolle bei der chemischen Hydrolyse des Prodrugs **69** einnimmt.

Ein weiteres Nebenprodukt **231** bei einer Retentionszeit von 10.2 Minuten lag bereits als Verunreinigung in der Stammlösung vor. Durch MALDI-Analyse des entsprechenden Eluats konnte für die Verbindung **231** eine Masse von $m/z = 462.201$ g/mol $[M-H]^-$ bestimmt werden. Die Retentionszeit, die Masse und das Absorptionsspektrum lassen vermuten, dass es sich dabei um ein phosphoryliertes Abacavirderivat handelt. In der Literatur sind Zerfallsstudien von Abacavir **4** in unterschiedlichen Medien beschrieben. Dabei wurden massenspektrometrisch Verunreinigungen nachgewiesen, die mit einer Koordination eines Sauerstoffatoms an der Nukleobase begründet wurden.^[150] Allerdings konnte kein Degradationsprodukt mit der oben für das Nebenprodukt **231** angegebenen Masse formuliert werden.

Ein Erklärungsansatz für die beschleunigte Hydrolyse des ABCTP-Prodrugs **69** wurde somit vorgestellt. Eine Übertragung auf das ddGTP-Prodrug **72** wäre plausibel, denn in seiner *syn*-Konformation wäre gleichermaßen ein Angriff des an der C2-Position der Nukleobase befindlichen Amins auf die Phosphateinheiten denkbar. Entsprechend war der Nachweis des Zyklisierungsprodukts zwischen der Nukleobase und den Phosphateinheiten zu erbringen. Tatsächlich konnte bei der Hydrolyse des ddGTP-Prodrugs **72** bei einer Retentionszeit von 15.0 Minuten die Bildung eines Nebenprodukts **232** beobachtet werden (Abb. 156). Diese Verbindung **232** zeichnete sich ebenfalls durch ein von Guanosinderivaten deutlich abweichendes Absorptionsmaximum aus.

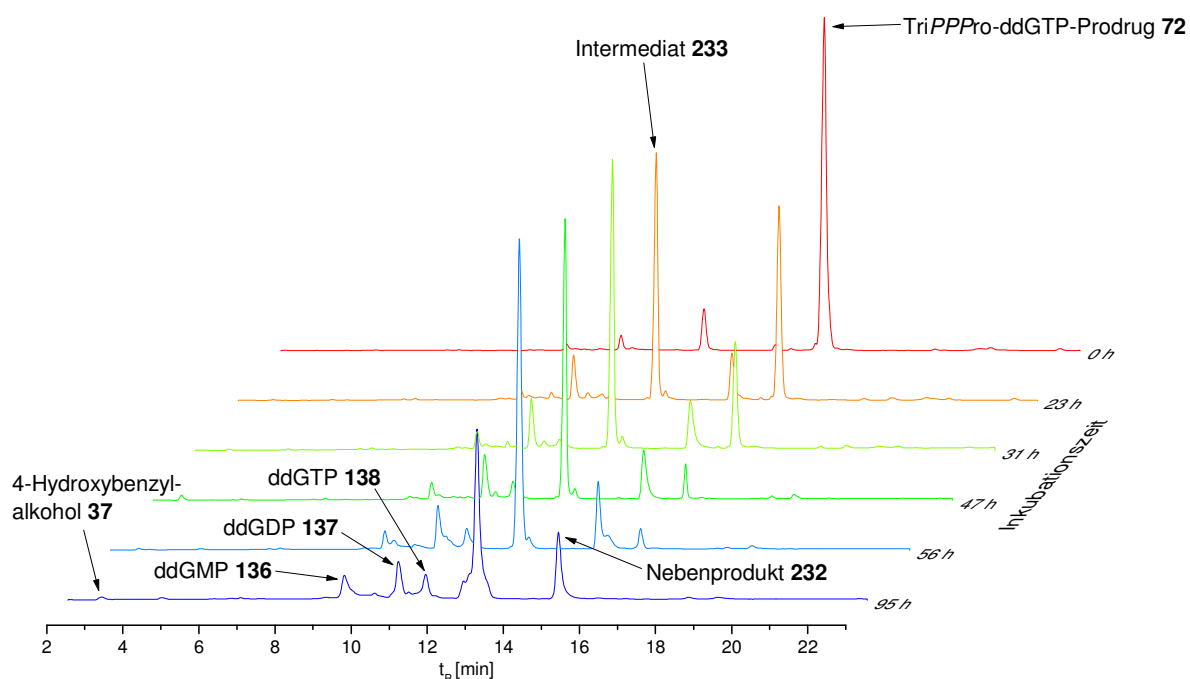


Abb. 156: Hydrolyseverlauf des ddGTP-Prodrugs **72** in PBS bei pH 7.3 (HPLC-Methode A, 253 nm).

Allerdings konnten bei der Untersuchung der über HPLC fraktionierten Nebenverbindung **232** durch MALDI-MS lediglich die für das ddG-Prodrug **72** erwarteten Metabolite nachgewiesen werden. Zu diesen zählen das monomaskierte ddGTP-Intermediat **233** sowie der Phosphatdiester **109e**. Außerdem wurden die Fragmente **234** und **235** detektiert (Abb. 157), die aus einem Bruch der *N*-glykosidischen Bindung des Intermediats **233** bzw. des Prodrugs **72** resultieren. Eine Trennung der Bindung zwischen Glykon und Purinbase kann jedoch erst während des MALDI-Experiments stattgefunden haben.

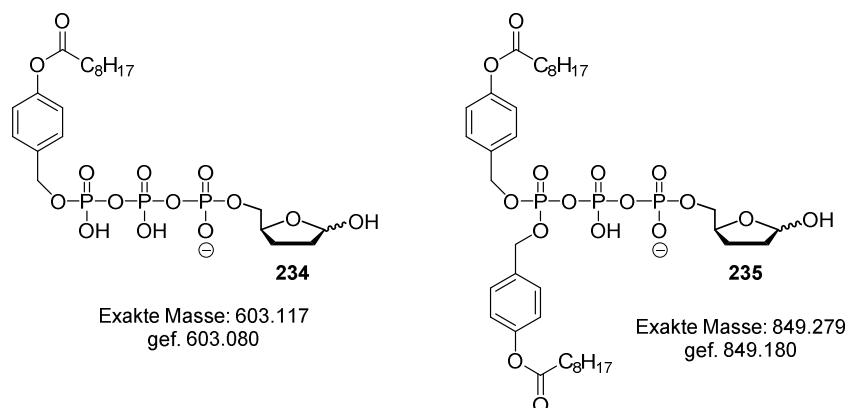


Abb. 157: Im MALDI-MS-Spektrum neben dem ddGTP-Intermediat **233** und Phosphatdiester **109e** detektierte Fragmente **234** und **235** der Nebenverbindung **232**.

Die Frage, warum das Nebenprodukt **232** im MALDI-Spektrum ein vergleichbares Fragmentierungsmuster wie das ddGTP-Prodrug **72** zeigt, konnte abschließend nicht geklärt werden. Da der Verbindung **232** kein Massenpeak zugeordnet werden konnte, war keine Identifizierung möglich. Allerdings sei darauf hingewiesen, dass für das Nebenprodukt **232** in Phosphatpuffer eine deutlich höhere Stabilität im Vergleich zum Prodrug **72** festgestellt wurde. Nichtsdestoweniger fand im späteren Verlauf der Hydrolysestudie mittels HPLC auch ein Zerfall des Nebenprodukts **232** statt. Eine Bildung von Hydrolyseprodukten mit einem zu Verbindung **232** korrelierenden Absorptionsmuster wurde jedoch nicht beobachtet. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Nebenprodukt **232** entweder zu den für das ddGTP-Prodrug **72** charakteristischen phosphorylierten Metaboliten abgebaut wurde oder zu UV-inaktiven Verbindungen zerfallen ist. Der Hydrolyseverlauf des TriPPPPro-ddGTP-Prodrugs **72** macht jedoch deutlich, dass die ablaufende Konkurrenzreaktion nicht nur zu einer Verminderung der Hydrolysehalbwertszeit des Prodrugs **72**, sondern vor allem zu einer geringeren absoluten Menge von gebildetem ddGTP **138** führt.

Eine nur geringfügig höhere Hydrolysehalbwertszeit wurde für das TriPPPPro-ddITP-Prodrug **70** festgestellt, dessen Nukleobase keine exozyklische Aminofunktion aufweist. Dennoch zeichnete es sich durch nahezu identische Hydrolyseeigenschaften wie das ddGTP-Prodrug **72** aus. Neben der Freisetzung des entsprechenden Intermediats **236** war

die etwas langsamer ablaufende Bildung eines nicht identifizierbaren Nebenprodukts **237** zu beobachten. Allerdings wird im Gegensatz zum ddG-Derivat **72** der Bruch der glykosidischen Bindung in PBS vermutet. Ein massenspektrometrischer Nachweis der Nucleobase gelang jedoch nicht, weshalb der Verdacht der Bildung allein auf Beobachtungen bei den HPLC-Untersuchungen beruht.

Interessanterweise erfolgte beim ddITP-Prodrug **70** im Unterschied zu den Prodrugs von ABC **69** und ABC **72** primär die Bildung des Intermediats **236** sowie des Nebenprodukts **237**, während eine Bildung von ddIDP weitgehend ausblieb.

Wenngleich die Charakterisierung der Nebenprodukte bei der Hydrolyse der Nucleosidtriphosphat-Prodrugs **69**, **70** und **72** in Phosphatpuffer nur unzureichend gelang, lieferte die Aufklärung der Nebenreaktion im Fall des ABC-TP-Prodrugs **69** wichtige Erkenntnisse über den Einfluss der Nucleobasen auf die Stabilität von TriPPPro-Verbindungen.

4.6.1.3 Chemische Hydrolyse des TriPPPro-ddCTP-Prodrugs

Dass die aminofunktionalisierte Nucleobase einen entscheidenden Faktor in Bezug auf die Hydrolysehalbwertszeit darstellt, belegte die Studie des pyrimidinhaltigen TriPPPro-ddCTP-Prodrugs **68**. Im Gegensatz zu den anderen Prodrugs der Pyrimidinanaloge hydrolysierte das ddCTP-Prodrug **68** mit $t_{1/2}(1) = 18$ h zweieinhalbmal schneller. Im strukturellen Vergleich der Verbindungen fällt die bei ddC vorliegende exozyklische Aminofunktion auf, die bereits bei den Purinderivaten für die verminderte Hydrolysehalbwertszeit verantwortlich zu sein schien. Im Unterschied zu den aminofunktionalisierten Prodrugs von ABC **69** und ddG **72** wurden im Fall des ddCTP-Prodrugs **68** jedoch lediglich die erwarteten Hydrolyseprodukte wie ddCDP **138**, ddCTP **136** und das monomaskierte Intermediat **238** gebildet.

Aufgrund der Position der Aminofunktion bei dem ddC-Prodrug **68** ist eine Annäherung an die Phosphatgruppen allerdings nicht möglich. Dieser Umstand legt den Verdacht nahe, dass nicht nur intramolekulare, sondern auch intermolekulare Wechselwirkungen die Stabilität von TriPPPro-Verbindungen beeinflussen können. Die Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminogruppen und Phosphateinheiten in biologischen Strukturen, wie der DNA und RNA, sind literaturbekannt.^[151,152]

4.6.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der ersten Hydrolysehalbwertszeit von NTP-Prodrugs in PBS

In Abbildung 158 sind die endgültigen Verhältnisse von NDP zu NTP nach dem nahezu vollständigen Abbau der entsprechenden Prodrugs dargestellt. Diese unterstützen die vorher diskutierten Ergebnisse der Hydrolysestudien. So wurde bei der chemischen Hydrolyse der Prodrugs von ddC **68**, ABC **69** und ddG **72** nur ein geringer Anteil an NTP freigesetzt, was

auf Konkurrenzreaktionen und/oder auf die Destabilisierung der Phosphoranhydridbindungen, bedingt durch intra- und intermolekulare Wechselwirkungen, zurückzuführen ist. Dabei ist unter anderem von einem signifikanten Einfluss der exozyklischen Aminofunktionen an der Nukleobase auf die Stabilität auszugehen. Der hohe NTP-Anteil bei der Hydrolyse des ddITP-Produgs **70** nach einer Inkubationsdauer von 95 Stunden ist mit Abstand zu betrachten, da insgesamt nur geringe Mengen der phosphorylierten Metabolite ddIDP und ddITP freigesetzt wurden. Damit fielen die absoluten Werte im Vergleich zu den anderen Prodrugs sehr niedrig aus.

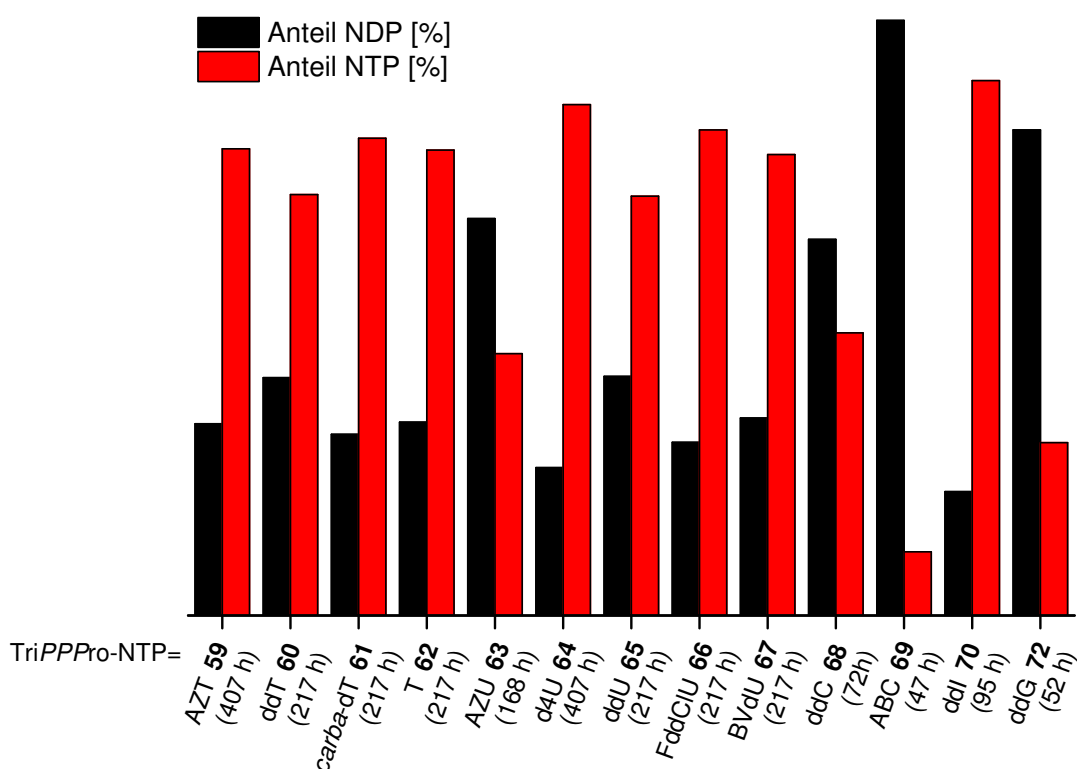


Abb. 158: Endgültiges Verhältnis von NDP zu NTP (in Klammern: Inkubationsdauer).

Für die TriPPPPro-Verbindungen der Thymidin- und Uridinanaloge wurden Nukleotidverhältnisse bestimmt, die verglichen mit den Prodrugs von ddC **68**, ABC **69** und ddG **72** das jeweilige NTP als dominierenden Metaboliten bei den Hydrolysen zeigten. Die Ausnahme stellte das AZU-Produg **63** dar. Dieser Umstand ist zum einen der niedrigen Hydrolysehalbwertszeit des Prodrugs **63** und der damit einhergehenden geringen Inkubationszeit von 168 Stunden geschuldet. Dadurch fällt die aus dem Intermediat freigesetzte NTP-Menge im Gegensatz zu den anderen Prodrugs mit einer Inkubationszeit von > 217 Stunden geringer aus. Zum anderen scheint jedoch auch die Azidofunktion in (*R*)-Konfiguration eine destabilisierende Wirkung auf die Phosphateinheiten auszuüben, da die absolute Menge von freigesetztem AZUDP **185** sehr hoch ist.

4.6.1.5 Zweite Hydrolysehalbwertszeit von NTP-Prodrugs in PBS

Bei der Betrachtung der zweiten Hydrolysehalbwertszeit (Abb. 159) fallen die großen Unterschiede zur ersten Halbwertszeit (Abb. 150, S. 150), wie sie schon bei den d4TTP-Prodrugs **56** (Kapitel 4.2.1) zu beobachten waren, auf. Die signifikante Erhöhung resultiert aus der zunehmenden Ladungsdichte an den Phosphatbrücken des monomaskierten Intermediats. Bemerkenswert ist, dass die Intermediate der TriPPPro-Verbindungen, die eine exozyklische Aminofunktion in der Nucleosidstruktur besitzen, in einer vergleichbaren Geschwindigkeit wie alle weiteren Intermediate hydrolysieren. In Bezug auf die erste Hydrolysehalbwertszeit waren dagegen noch deutliche Unterschiede festgestellt worden (Kapitel 4.6.1.2). Des Weiteren traten bei der Hydrolyse der monomaskierten Intermediate keine Nebenreaktionen auf. Somit unterbindet die im Vergleich zum TriPPPro-NTP-Prodrug gewonnene negative und repulsive Ladung am γ -Phosphat des Intermediats einen nukleophilen Angriff sowie die destabilisierenden Wechselwirkungen mit den Aminofunktionen. Dadurch war nicht nur bei den Thymidin- und Uridinderivaten, sondern auch bei allen weiteren Prodrugs, ausgehend von den einfachmaskierten Intermediaten, ohne Ausnahme die bevorzugte Freisetzung des Nucleosidtriphosphats zu beobachten.

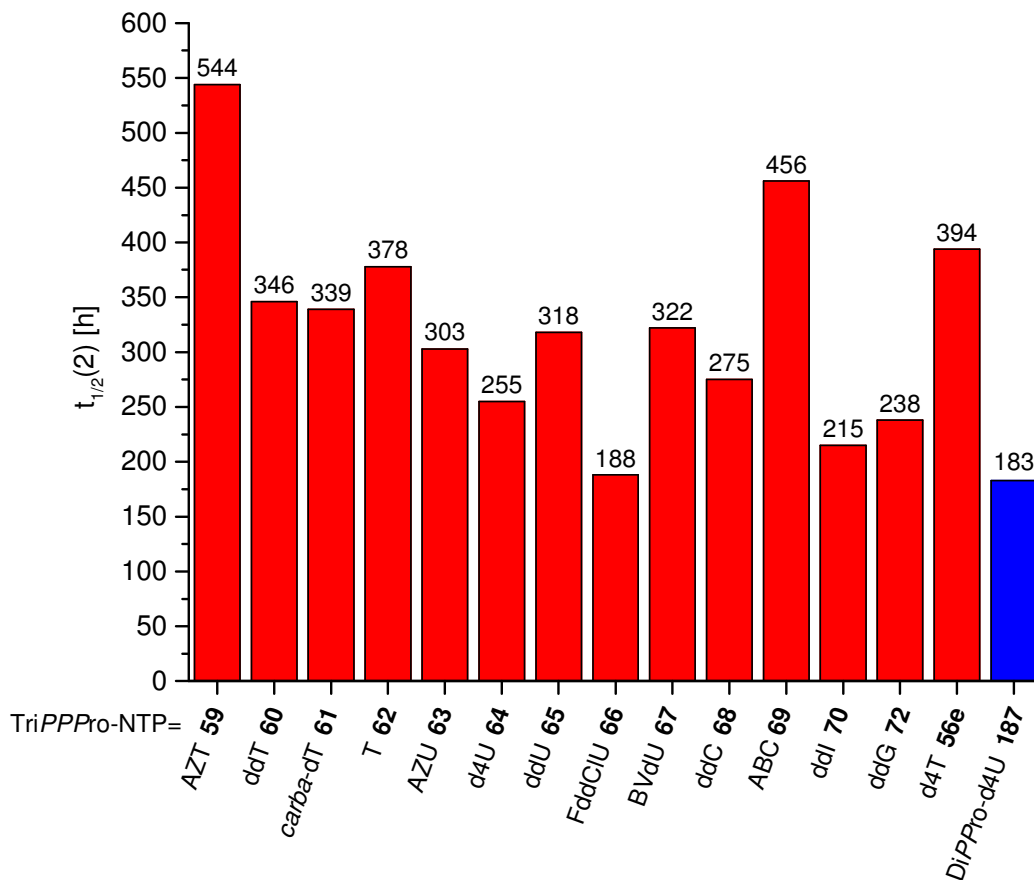


Abb. 159: Zweite Hydrolysehalbwertszeit der unterschiedlichen TriPPPro-NTP-Prodrugs und des DiPPPro-d4UDPs **187** in PBS bei pH 7.3.

4.6.2 Hydrolyseverhalten von NTP-Prodrugs in CEM/0-Zellextrakten

Aus Kostengründen wurde nicht mit allen der in Kapitel 4.5 synthetisierten TriPPP-Pro-Verbindungen eine Untersuchung des Hydrolyseverhaltens in CEM/0-Zellextrakten durchgeführt. In der Auswahl sind allerdings mit den Prodrugs **68**, **69** und **70** unter anderem TriPPP-Pro-Verbindungen enthalten, die bei den Untersuchungen in Phosphatpuffer ungewöhnliche Hydrolyseeigenschaften offenbarten. Die experimentelle Durchführung erfolgte analog zu dem in Kapitel 4.2.2 für das d4T-Prodrug **56e** mit $R = C_8H_{17}$ verwendeten Protokoll. In Abbildung 160 sind die Hydrolysehalbwertszeiten im Vergleich zu den für die chemische Hydrolyse gewonnenen Werten aufgeführt.

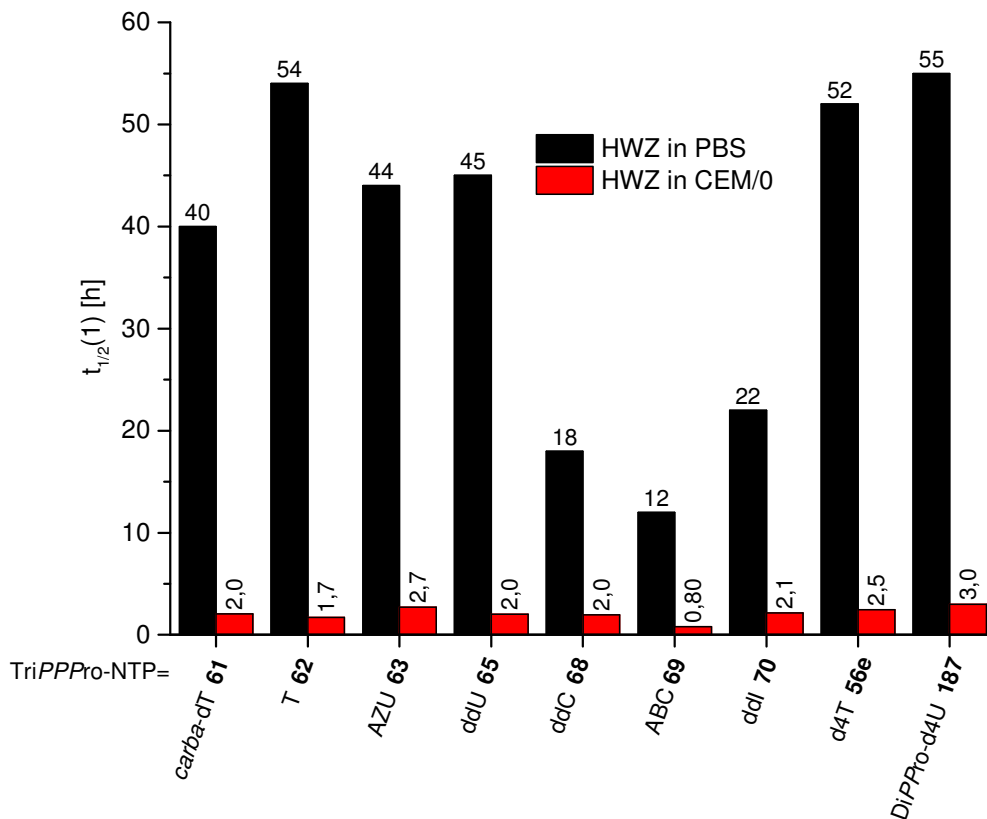


Abb. 160: Vergleich der Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}(1)$ der NTP-Prodrugs und des d4UDP-Prodrugs **187** in PBS bei pH 7.3 und in CEM/0-Zellextrakten.

Es ist die erwartete große Differenz zwischen der chemisch und der enzymatisch induzierten Abspaltung der ersten Maske zu erkennen. Die in Zellextrakten bestimmten Hydrolysehalbwertszeiten liegen im Mittel in einer Größenordnung von zwei bis drei Stunden, womit die Hydrolyse in CEM/0-Extrakten 15-32-fach schneller als in PBS abläuft. Ausnahmen bilden das ddC-Prodrug **68** und das ddl-Prodrug **69** mit einer nur 9-10-fachen Beschleunigung, wobei dieser Umstand auf die in Kapitel 4.6.1 ermittelte geringe Halbwertszeit in PBS zurückzuführen ist.

Im Folgenden sollen die Hydrolyseverläufe von strukturell deutlich unterschiedlichen TriPPPPro-Verbindungen im biologischen Medium vorgestellt werden. Hierfür werden die erhaltenen Chromatogramme und der Zellextrakt als Kontrolle in Form von Wasserfall-diagrammen abgebildet. Es gilt, die unterschiedlichen Wellenlängen, die dem Absorptionsmaximum des jeweiligen Nucleosids angepasst sind, zu beachten.

Der enzymatische Abbau des TriPPPPro-*carba*-dTTP-Prodrugs **61** zeigt ein Hydrolyseverhalten, wie es bereits für die Prodrugs des Thymidinanalogs d4T **3** beobachtet wurde (Kapitel 4.2.2). So führt eine sukzessive Hydrolyse des Prodrugs **61** über das Intermediat **223** zum *carba*-dTTP **224** (Abb. 161). Da das Triphosphat **224** jedoch nicht akkumuliert, kann davon ausgegangen werden, dass es in Analogie zum d4TTP **16** von Phosphatasen schnell zum *carba*-dTDP **225** dephosphoryliert wird. Dessen Halbwertszeit erscheint dagegen deutlich erhöht, weshalb das *carba*-dTDP **225** nach einer Inkubationsdauer von 480 Minuten den dominierenden Metaboliten darstellt.

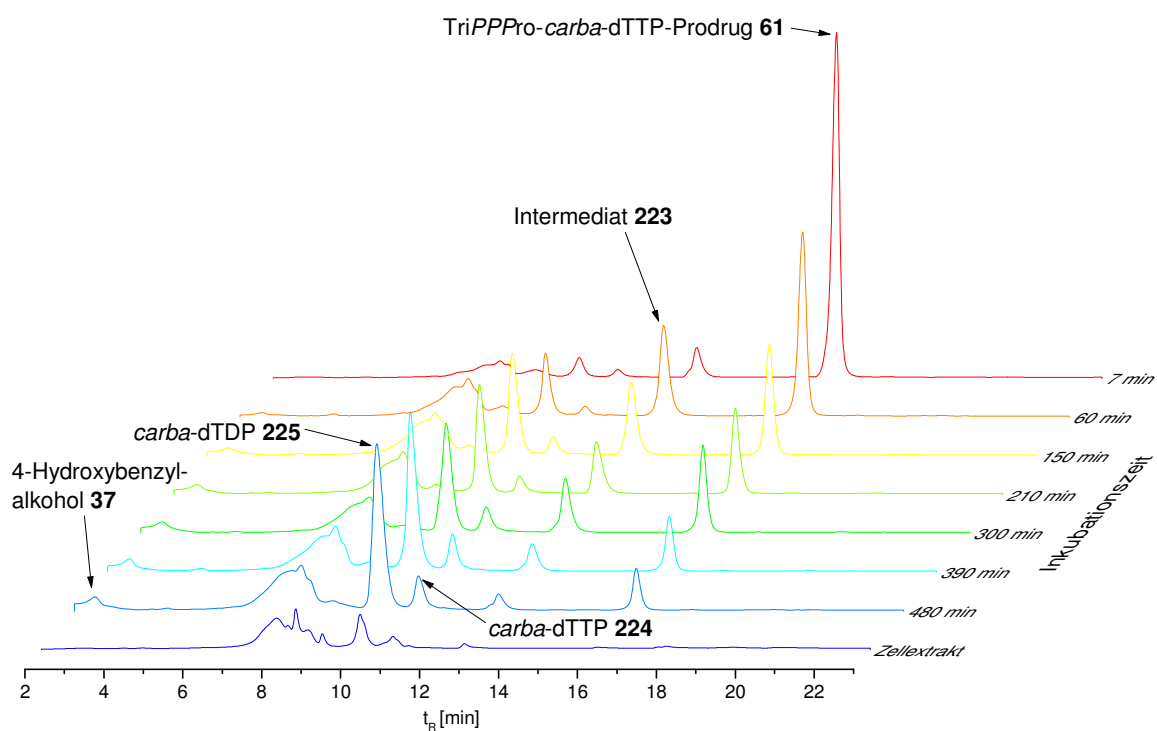


Abb. 161: Hydrolyseverlauf des *carba*-dTTP-Prodrugs **61** in CEM/0 (HPLC-Methode A, 271 nm).

Ein mit dem des TriPPPPro-*carba*-dTTP-Prodrugs **61** vergleichbares Hydrolyseprofil zeigt das AZU-Derivat **63**, bei dem die Freisetzung von monomaskiertem Intermediat **239**, AZUTP **240** und AZUDP **185** erfolgt (Abb. 162). Dabei belegt das Hydrolyseverhalten der sich bildenden AZU-Metabolite indirekt die Substratspezifität der zellulären Phosphatasen. Denn trotz einer höheren Hydrolysehalbwertszeit des Prodrugs **63** im Vergleich zum *carba*-dT-Analogon **61** fällt die absolute Menge von freigesetztem AZUTP **240** im Unterschied zu *carba*-dTTP **237** über die gesamte Inkubationszeit signifikant höher aus. Dieser Umstand beruht voraus-

sichtlich auf einer verschlechterten Substrat-Enzym-Affinität des AZUTPs **240**, wodurch die enzymatische Dephosphorylierung zum Diphosphat **185** langsamer als beim *carba*-dTTP **224** abläuft. Dennoch zeigt der spätere Verlauf der Hydrolyse, dass auch im Fall des AZUTP-Prodrugs **63** der Diphosphatmetabolit **185** eine deutlich höhere Halbwertszeit als der Triphosphatmetabolit **240** aufweist.

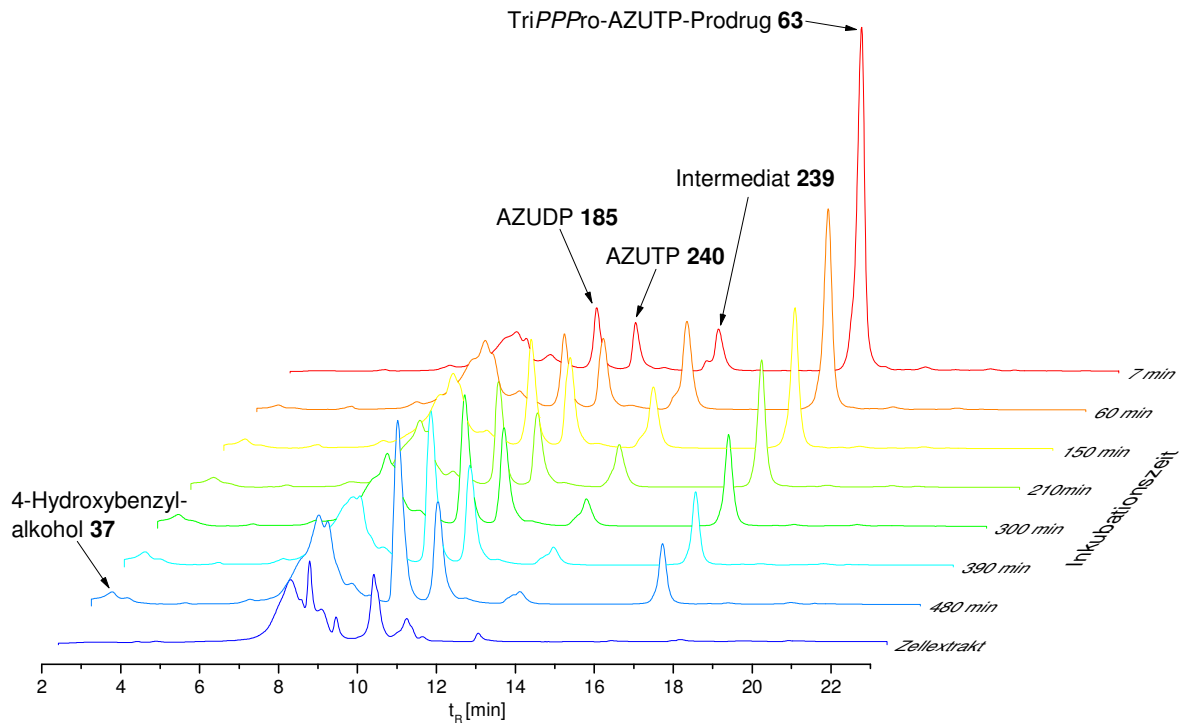


Abb. 162: Hydrolyseverlauf des AZUTP-Prodrugs **63** in CEM/0 (HPLC-Methode A, 262 nm).

Im Gegensatz dazu konnte bei der Hydrolyseuntersuchung des ddU-Prodrugs **65** das ddUTP **241** nicht eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 163). Es lassen sich lediglich Spuren anhand des Adsorptionsverlaufs bei einer Retentionszeit von 10.8 min erahnen. Gleichzeitig sind keine signifikanten Differenzen zum postulierten Hydrolysemechanismus festzustellen. Erwartungsgemäß finden die Abspaltung der ersten Maske und somit die Bildung des Intermediats **242** statt. Zudem können geringe Mengen von ddUDP **184** belegt werden. Allerdings scheint ein ddU-Metabolit im Retentionsbereich von 7-9 Minuten zu akkumulieren. Aufgrund der Überlagerung mit den Zellextraktkomponenten konnte eine exakte Identifizierung des Haupthydrolyseprodukts nicht vorgenommen werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass es sich dabei um ddUMP **219** handelt. Dieser Sachverhalt ist bei der Beurteilung der antiviralen Aktivität von Bedeutung und wird entsprechend in Kapitel 4.7 aufgegriffen.

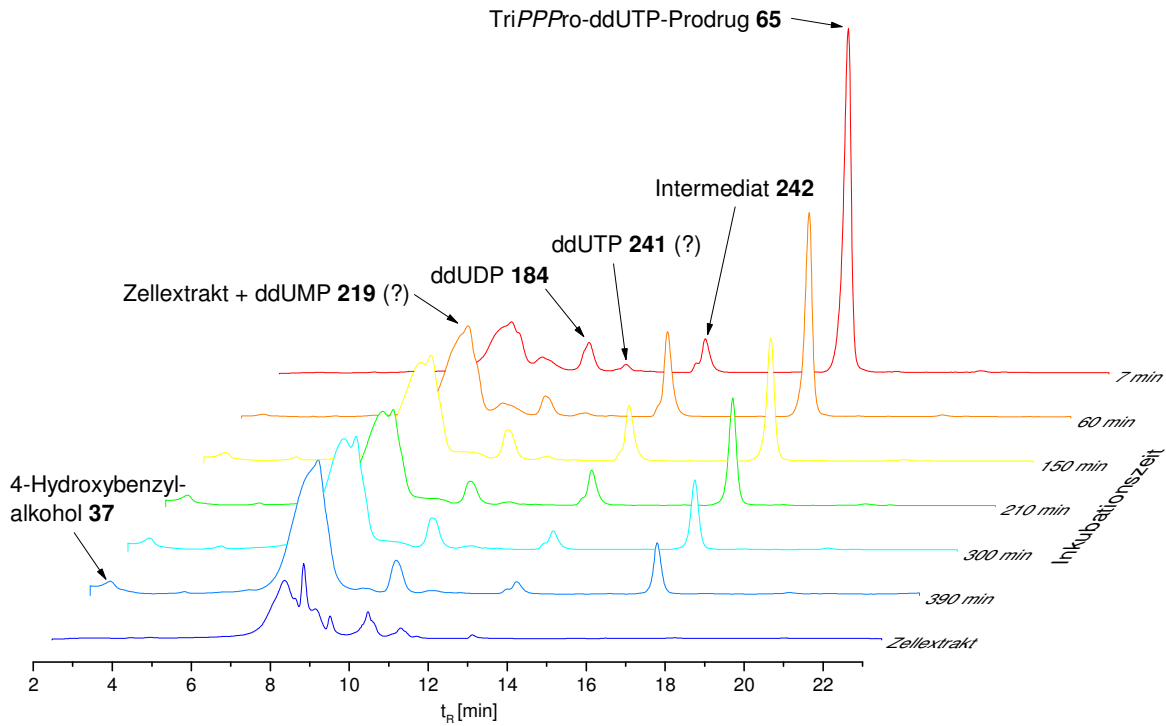


Abb. 163: Hydrolyseverlauf des ddUTP-Prodrugs **65** in CEM/0 (HPLC-Methode A, 260 nm).

Mit dem ddC-Prodrug **68** wurde ein Vertreter bezüglich seines Hydrolyseverhaltens in Zellextrakten untersucht, den in Phosphatpuffer eine sehr geringe Halbwertszeit kennzeichnete. Eine Auswirkung auf die Stabilität oder den Spaltungsmechanismus, resultierend aus der exozyklischen Aminofunktion, ist in CEM/0 allerdings nicht zu beobachten. Abbildung 164 zeigt den erwarteten Abbau des Prodrugs **68** über das Intermediat **238** zum ddCTP **121**. Zudem erfolgt trotz enzymatischer Dephosphorylierungsprozesse eine temporäre Zunahme der absoluten ddCTP-Menge, bis nach 225 Minuten ein Höchstwert erreicht ist. Resultierend aus der Reduktion des Prodrugs **68** bzw. Intermediats **238** kommt es in der Folge zu einer verminderten Freisetzung des Triphosphats **121**. Dadurch, dass die Degradation durch Phosphatasen kontinuierlich abläuft, verringert sich im weiteren Verlauf der Studie die Menge von ddCTP **121**. Somit stellt letztendlich ddCDP **123** den dominierenden Metaboliten dar. Diese Ergebnisse verstärken den generellen Verdacht, dass die Nucleosiddiphosphate bei der Hydrolyse in Zellextrakten hauptsächlich aus dem enzymatischen Abbau der Nucleosidtriphosphate gebildet werden.

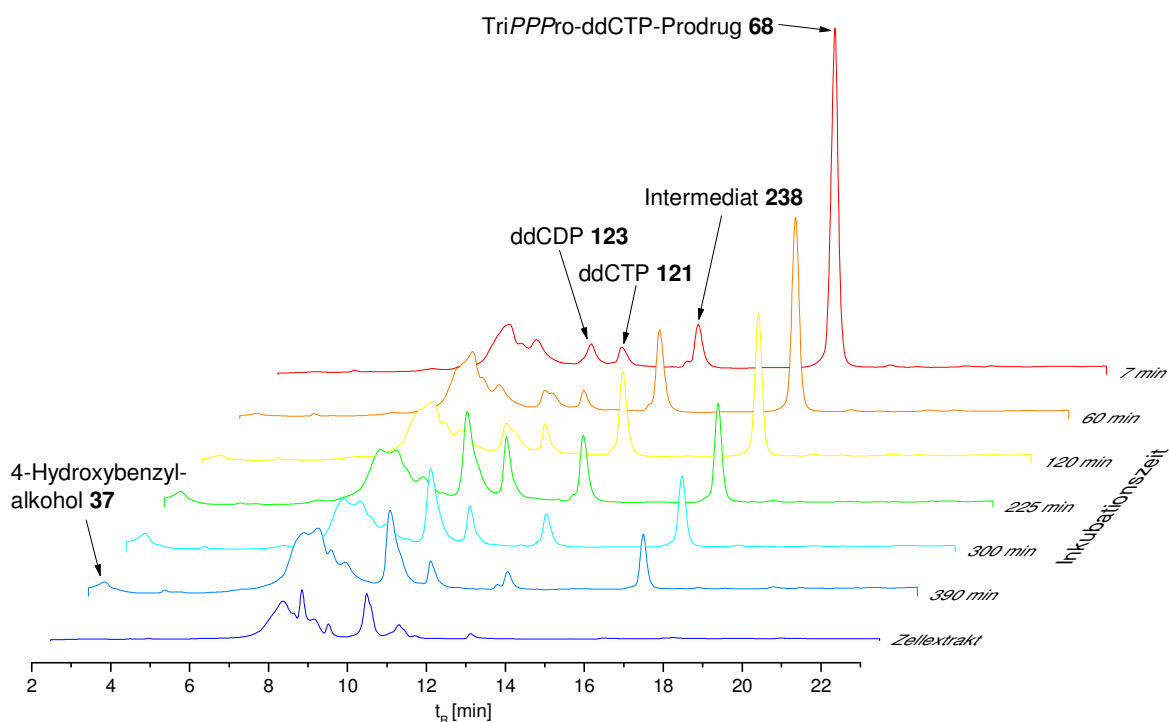


Abb. 164: Hydrolyseverlauf des ddCTP-Prodrugs **68** in CEM/0 (HPLC-Methode A, 272 nm).

Ein bisher einzigartiges Hydrolyseprofil zeigt das TriPPPPro-ABCTP-Prodrug **69**. Abbildung 165 verdeutlicht, dass auch das ABC-Prodrug **69** zum entsprechenden mono-maskierten Intermediat **226** abgebaut wird. Eine gleichzeitig ablaufende Konkurrenzreaktion, wie sie bei der Hydrolyse in PBS beobachtet wurde, war nicht festzustellen. Das gebildete Intermediat **226** setzt wiederum ABCTP **229** frei, das anschließend durch Phosphatasen zum ABCDP **228** dephosphoryliert wird. Im Unterschied zu den zuvor diskutierten Prodrugs weist der Hydrolyseverlauf des TriPPPPro-ABCTP-Prodrugs **69** eine Besonderheit auf. Neben den erwarteten ABC-Metaboliten wurden im späteren Verlauf der Hydrolyse zusätzliche Hydrolyseprodukte gebildet. Zudem ist das bereits in der Stammlösung befindliche und nicht zu identifizierende Nebenprodukt **231** detektierbar (Kapitel 4.6.1.2). Bei der Analyse des Hydrolyseverhaltens des Prodrugs **69** stellte sich als vorteilhaft heraus, dass die Chromatogramme aufgrund des untypischen Absorptionsmaximums der Abacavirmetabolite bei einer Wellenlänge von 285 nm aufgenommen wurden. In diesem Wellenlängenbereich besitzen die Komponenten der Zellextrakte keine UV-Absorption, wodurch es zu keiner sichtbaren Überlagerung mit Peaks der Hydrolyseprodukte kommt.

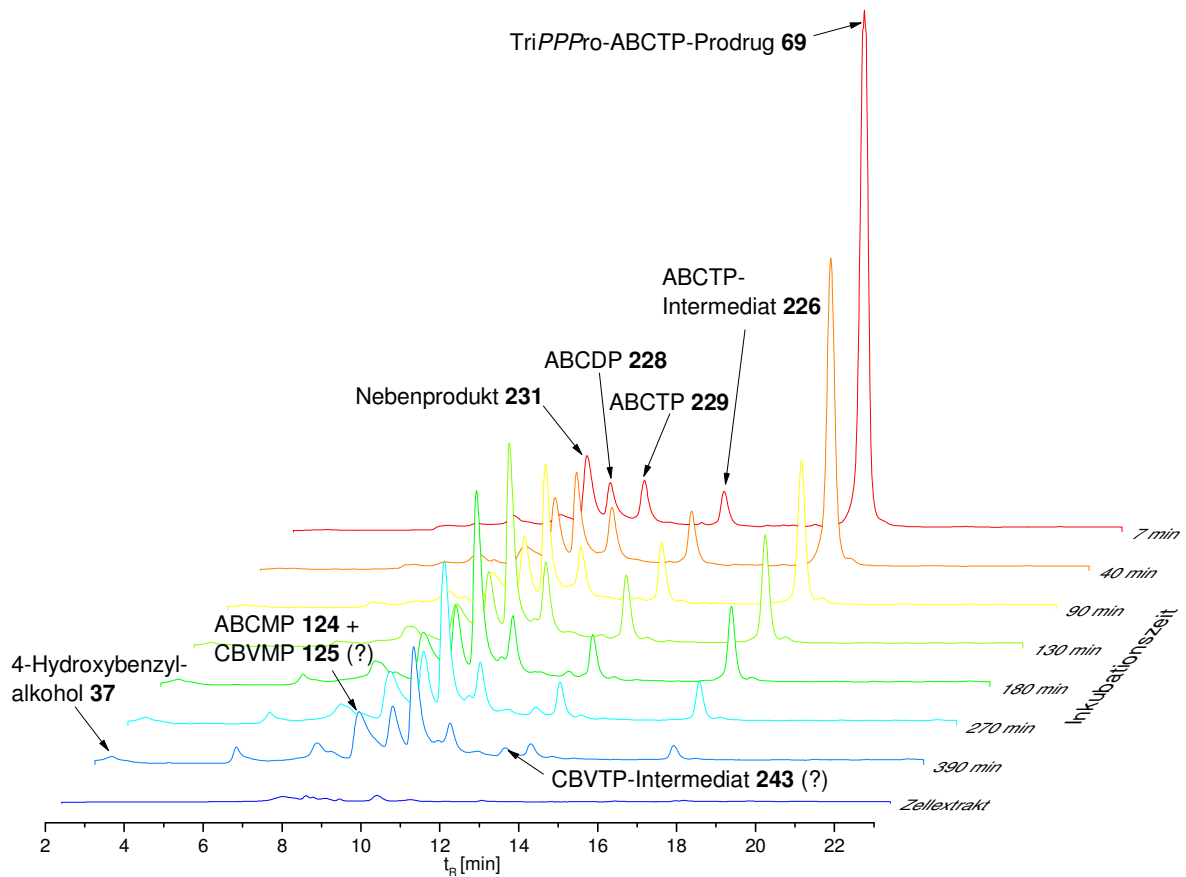


Abb. 165: Hydrolyseverlauf des ABCTP-Prodrugs **69** in CEM/0 (HPLC-Methode A, 285 nm).

Bei der Auswertung der Resultate gilt es, den in Kapitel 4.5.1.4 vorgestellten Metabolisierungsprozess von Abacavir **4** einzubeziehen. Denn in diesem stellt die enzymkatalysierte Desaminierung des ABCMPs **124** zum CBVMP **125** einen Schlüsselschritt dar. Zwar findet ausgehend von dem Prodrug **69** keine direkte Freisetzung von ABCMP **124** statt, dennoch scheint dieses, resultierend aus einem Abbau des ABCDPs **228**, zu akkumulieren. Allerdings eluiert zeitgleich mit dem ABCMP **124** eine Verbindung mit einem abweichenden Absorptionsverlauf, über deren Struktur nur spekuliert werden kann. Es könnte sich dabei um das besagte CBVMP **125** handeln, das durch die zytosolischen Enzyme aus ABCMP **124** gebildet wird. Unter Berücksichtigung der katalysierten Desaminierungsreaktion könnte auch die ungewöhnlich hohe Zahl von Nebenprodukten erklärt werden, da bei den höher phosphorylierten Metaboliten, wie dem Intermediat **226**, ABCDP **228** und ABCTP **229**, gleichermaßen eine Umsetzung zu dem entsprechenden Carbovirderivat denkbar ist. Ein Indiz für diese Hypothese liefert ein Peak bei 12.4 Minuten, der folglich eine ähnliche Retentionszeit wie das ABCTP-Intermediat **226** ($t_R = 12.9$ min), aber ein verändertes Adsorptionsmaximum besitzt. Dabei könnte es sich um das monomaskierte CBVTP **243** handeln. Es kann zwar keinem Nebenprodukt eine Struktur zugeordnet werden, allerdings erscheint eine langsame Desaminierung der ABC-Metabolite zu den jeweiligen CBV-Derivaten als wahrscheinlich.

Somit konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der Art der Modifikation am Nukleosid in CEM/0-Zellextrakten aus den TriPPPPro-Verbindungen die gewünschten pharmakologisch aktiven Nukleosidtriphosphate freigesetzt werden. Ein Einfluss von funktionellen Gruppen wie Amino- und Hydroxylfunktionen auf den Hydrolyseverlauf oder die Hydrolysegeschwindigkeit war nicht festzustellen.

4.6.3 Hydrolyseverhalten von NTP-Prodrugs im PLE-Medium

Die experimentelle Durchführung zur Charakterisierung des Hydrolyseverhaltens der verschiedenen NTP-Prodrugs im PLE-Medium erfolgte entsprechend den Untersuchungen der TriPPPPro-d4TTP-Prodrugs **56** (Kapitel 4.2.3). Für die Prodrugs wurden überwiegend erste Halbwertszeiten zwischen 1-2 Minuten erhalten (Abb. 166), die bei der Kettenlänge von R= C₈H₁₇ sehr gut mit t_{1/2}(1)= 0.8 min des d4T-Prodrugs **56e** korrelieren. Somit ist von einer Induktion der Hydrolyse durch die Schweineleberesterase auszugehen.

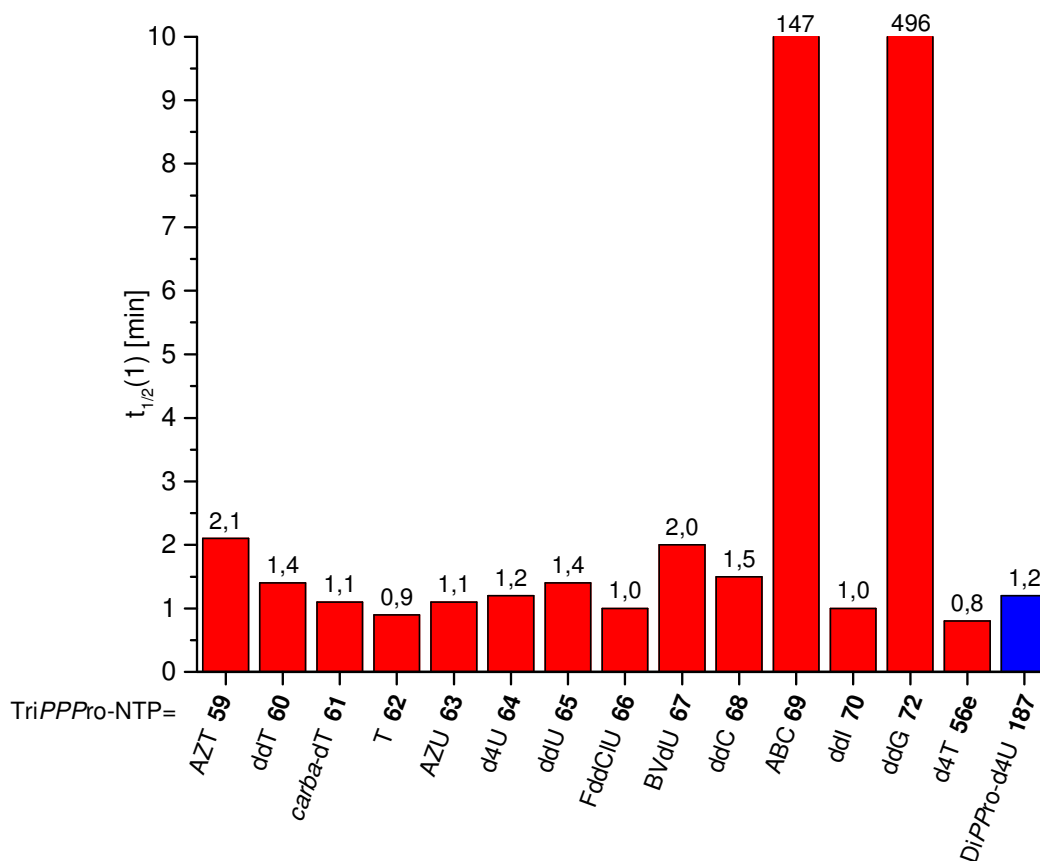


Abb. 166: Erste Hydrolysehalbwertszeit der unterschiedlichen TriPPPPro-NTP-Prodrugs und des DiPPPPro-d4UDPs **187** im PLE-Medium.

Besonderheiten stellen das ABC-Prodrug **69** und ddG-Prodrug **72** mit Halbwertszeiten von 147 bzw. 496 Minuten dar. Um experimentelle Fehler auszuschließen, wurden die jeweiligen Untersuchungen wiederholt, wodurch die Korrektheit der Daten bestätigt werden konnte.

Dementsprechend erlaubt die Substratspezifität der PLE in diesen beiden Fällen nur eine langsame enzymatische Spaltung der Acylesterfunktion. Gleichzeitig muss bei Hydrolysehalbwertszeiten in dieser Größenordnung berücksichtigt werden, dass als Konkurrenzreaktionen sowohl die chemische Hydrolyse zum Intermediat als auch die Bildung der Diphosphate durch einen Bruch der Phosphoranhydridbindung an Bedeutung gewinnen.

Als Ursache für die verschlechterte Enzym-Substrat-Affinität ist die exozyklische Aminofunktion an der C2-Position der Nukleobase anzunehmen, deren Einfluss auf die Stabilität bereits im Zusammenhang mit der chemischen Hydrolyse diskutiert wurde (Kapitel 4.6.1.2). Repulsive Wechselwirkungen mit polaren Aminosäuren im aktiven Zentrum der Esterase könnten eine ideale Interaktion mit dem Enzym erschweren. Im Gegensatz dazu kommt es beim Vorliegen einer Aminofunktion an C4-Position, wie sie beim ddC-Prodrug **68** vorhanden ist, zu keiner Verminderung der Substratspezifität.

Bei Betrachtung der zweiten Hydrolysehalbwertszeit zeigt sich jedoch, dass beim Cytidinanalogon **68** die Wechselwirkung mit der Esterase eingeschränkt ist, wodurch das monomaskierte ddCTP-Intermediat **238** mit 842 Minuten im Vergleich zu allen anderen Intermediaten 3-11-mal langsamer zum NTP umgesetzt wird (Abb. 167). Auf eine Darstellung der Ergebnisse des ABC-Prodrugs **69** sowie des ddG-Prodrugs **72** wurde verzichtet, da die Hydrolysegeschwindigkeiten der jeweiligen Intermediate im Bereich der Hydrolysehalbwertszeiten in PBS liegen.

Bei allen weiteren Prodrugs wurden für die zweite Hydrolysehalbwertszeit Werte zwischen 77-343 Minuten ermittelt. Trotz dieser deutlichen Unterschiede wurde weder eine Abhängigkeit von der Modifikation am Glykon noch von der Nukleobase ausgemacht.

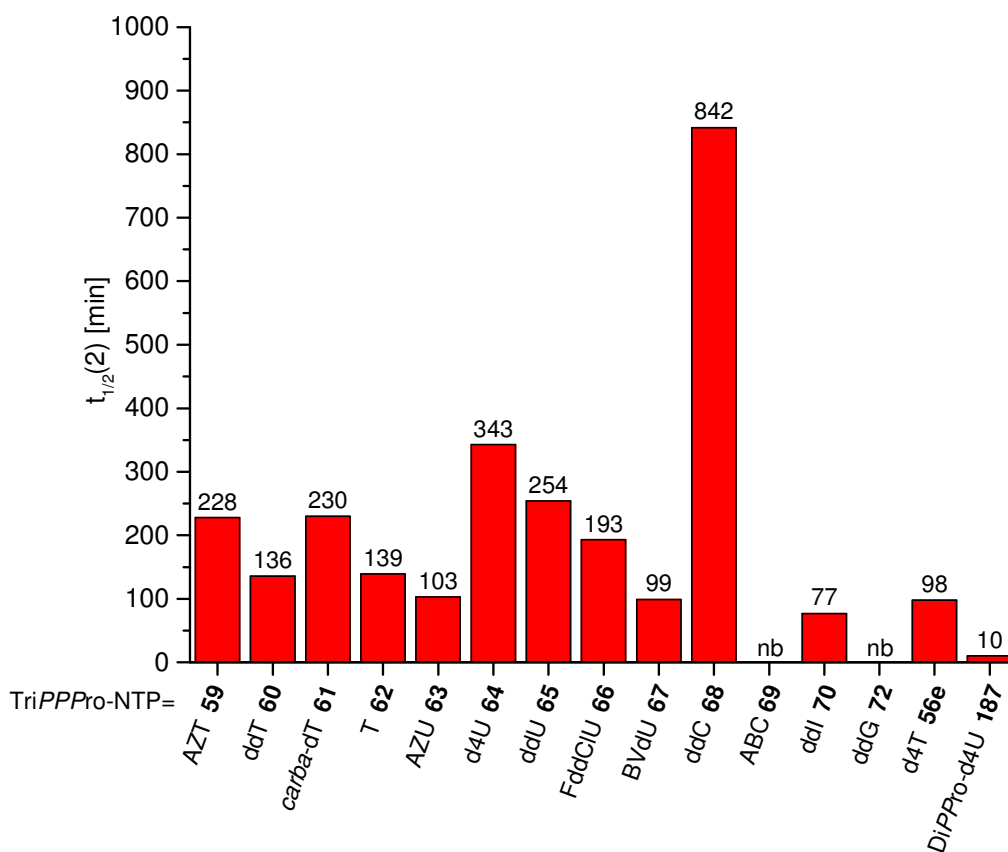


Abb. 167: Zweite Hydrolysehalbwertszeit der unterschiedlichen TriPPPro-NTP-Prodrugs und des DiPPPro-d4UDPs **187** im PLE-Medium.

Unabhängig davon konnten abgesehen von den besagten Verbindungen **69** und **72** für alle Prodrugs vergleichbare Hydrolyseverläufe festgestellt werden: Nach einer schnellen Abspaltung der ersten Maskierungseinheit war eine selektive Freisetzung des Triphosphat-metaboliten aus dem Intermediat zu beobachten. Als Beispiel ist in Abbildung 168 die Hydrolyse des *carba*-dTTP-Prodrugs **61** gezeigt. Die geringe Menge von *carba*-dTDP **225** nach einer Inkubationszeit von 1200 min ist vermutlich der chemischen Hydrolyse des *carba*-dTTPs **224** zuzuschreiben.

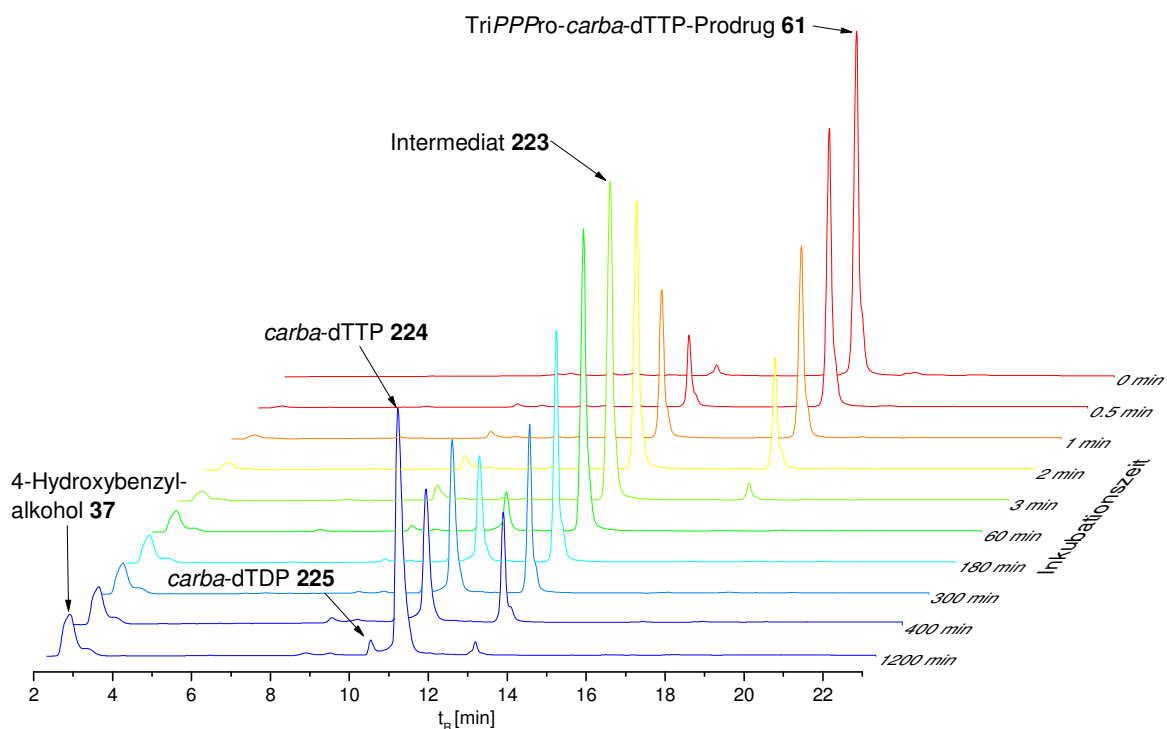


Abb. 168: Hydrolyseverlauf des *carba*-dTTP-Prodrugs **61** mit PLE (HPLC-Methode A, 271 nm).

Die HPLC-Studie in Kombination mit der massenspektrometrischen Analyse der PLE-Hydrolyselösung bewies – nach dem vollständigen Verbrauch des Prodrugs **61** und des Intermediats **223** – die erfolgreiche und selektive Freisetzung von *carba*-dTTP **224**.

4.6.3.1 Nachweis von NTP durch Primer-Extension-Assay

In den Studien in PBS und CEM/0-Zellextrakten wurde die Freisetzung von Nucleosidtriphosphaten bislang nur durch Coninjektionen und massenspektrometrische Analysen bestätigt. Als eine weitere alternative Methode zum Nachweis des biologisch aktiven Metaboliten wurde in Kapitel 4.2.3 im Zusammenhang mit den d4T-Prodrugs **56** der Primer-Extension-Assay vorgestellt. In Kooperation mit THIAGO DINIS DE OLIVEIRA wurde dieses Experiment zur Beweisführung der erfolgreichen Freisetzung des natürlichen biologisch aktiven Thymidintriphosphats **116** aus der TriPPPro-Verbindung **62** eingesetzt. Dafür wurde das TTP-Prodrug **62** bis zu seinem quantitativen Verbrauch und dem des TTP-Intermediats **244** mit PLE hydrolysiert und anschließend das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Für den Assay wurde die HIV-Reverse-Transkriptase (RT) zusammen mit den Triphosphaten von 2'-Desoxyadenosin, 2'-Desoxyguanosin sowie 2'-Desoxycytidin und dem PLE-Hydrolysat inkubiert (Abb. 169). Das Kontrollexperiment bei Zugabe aller kommerziell erworbenen natürlichen Nucleoside zeigte eine vollständige Elongation des neuen Strangs (Bahn 2). Aber auch die Inkubation mit dem Hydrolysat des Prodrugs **62**, in dem das TTP **116** zu vermuten war, führte in Verbindung mit den ATP, GTP und CTP zu einer

vollständigen Elongation (Bahnen 3+4). Beim Fehlen von GTP (Bahn 5) und GTP/CTP (Bahn 6) kam der Verlängerungsprozess dagegen nach Inkorporation des aus der Hydrolyse des Prodrugs **62** gewonnenen TTPs **116** zum Erliegen, was der Sequenz des Templates folgend zu erwarten war. Allerdings belegte das Resultat auf Bahn 5 indirekt die hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase, indem trotz der Abwesenheit des notwendigen GTPs teilweise eine vollständige Elongation des Strangs festzustellen war. Dennoch konnte mit diesem biochemischen Experiment die erfolgreiche Freisetzung des TTPs **116** über das TriPPPPro-Konzept visualisiert werden.

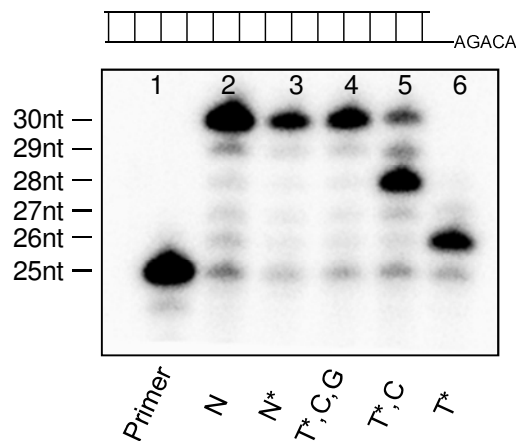


Abb. 169: Primer-Extension-Assay mit HIV-Reverse-Transkriptase: PLE-Hydrolysat basierend auf TriPPPPro-TTP **62** (T*); dCTP (C); dGTP (G); allen natürlichen Triphosphaten (N); dATP, dCTP, dGTP und dem Hydrolysat von **62** (N*).

4.6.3.2 Nachweis von NTP durch Polymerasekettenreaktion

Neben dem Primer-Extension-Assay wurde auch die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) als Analysemethode in Betracht gezogen. Mithilfe der PCR können DNA-Sequenzen *in vitro* repliziert werden. Die Grundlage bildet eine thermostabile Polymerase. Weitere Komponenten stellen ein Primerpaar, das mit den flankierenden Sequenzen der Zielsequenz hybridisieren kann, und alle vier natürlichen Nucleosidtriphosphate dar. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch Erhitzen auf 95 °C (Abb. 170). Anschließend findet bei Abkühlung auf 54 °C die Hybridisierung der Primer an den 3'-Enden der beiden Stränge (*primer annealing*) statt. Bei 72 °C schließt sich ausgehend von den angelagerten Primern die Elongation der beiden Stränge an. Diese drei Schritte lassen sich zu einem Amplifizierungszyklus zusammenfassen und beliebig oft wiederholen. Dadurch sind exponentiell Kopien der Zielsequenz herstellbar, sofern alle notwendigen Komponenten vorhanden sind.^[153]

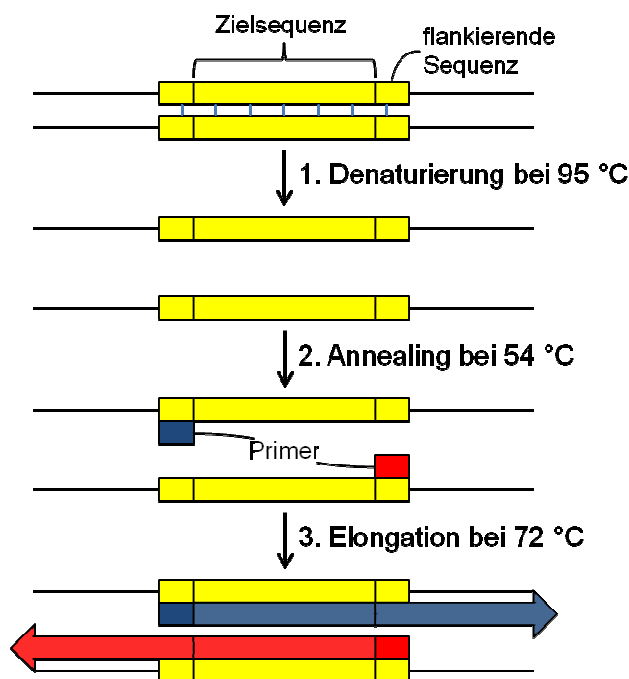


Abb. 170: Schritte eines Zyklus der Polymerasekettenreaktion (PCR).^[153]

Liegen nicht alle dem Template entsprechenden komplementären Nucleosidtriphosphate vor, können keine Elongation und demnach keine Amplifikation der DNA-Sequenz erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten unter anderem Experimente mit den Triphosphaten von Thymidinanaloga durchgeführt werden, die nach Integration einen Kettenabbruch verursachen und somit eine Vervielfältigung des Templates verhindern. Die Triphosphate der Analoga sollten wiederum aus der durch PLE katalysierten Hydrolyse der jeweiligen TriPPP-Verbindung gewonnen werden.

In Abbildung 171 ist das über Gelelektrophorese erhaltene Agarosegel der einzelnen PCR gezeigt, das in Zusammenarbeit mit DR. ANNA RATH und THIAGO DINIS DE OLIVEIRA erarbeitet wurde. Als Polymerase wurde die *Fire Pol*-Polymerase eingesetzt. Für die Studien wurden die Hydrolysate des d4TTP-Prodrugs **56e**, *carba*-d4TTP-Prodrugs **62** sowie TTP-Prodrugs **61** als Thymidinderivate verwendet. Erwartungsgemäß zeigt der Kontrollansatz (Bahn 2) die Amplifikation des DNA-Templates. Dasselbe Ergebnis mit einer vergleichbaren Intensität ergab die PCR mit dem Hydrolysat des TTP-Prodrugs **62** (Bahn 4). Hierdurch wurde die erfolgreiche Freisetzung des biologisch aktiven TTP **116** aus dem Prodrug **62** bewiesen. Dagegen ist bei der Verwendung der Hydrolysate des d4TTP-Prodrugs **56e** (Bahn 5) und *carba*-d4TTP-Prodrugs **61** (Bahn 6) keine Vervielfältigung der Zielsequenz zu beobachten, was ebenfalls den Erwartungen entspricht. Allerdings setzt dieses Resultat nicht notwendigerweise eine Inkorporation der antiviralen NTP-Wirkstoffe voraus. Nach den zuvor gewonnenen Erkenntnissen aus den HPLC-Untersuchungen ist das Vorliegen der Triphosphate **16** und **224** aber als wahrscheinlich anzunehmen. Um mittels PCR einen

Nachweis zu erbringen, dass die entsprechenden Triphosphate der Analoga freigesetzt wurden, müsste der Versuch unternommen werden, verschiedene Abbruchstränge zu generieren. Dafür müsste ein Gemisch aus dem natürlichen TTP **116** und dem NTP des Analogons eingesetzt werden, wobei das TTP **116** einen höheren Anteil einnimmt. Möglicherweise würden so unterschiedlich lange Amplifikate in einer ausreichenden Konzentration gebildet, die eine elektrophoretische Trennung und Detektion erlauben.

Bahn	NTP
1	PCR Marker
2	dA, dG, dC, T
3	dA, dG, dC
4	dA, dG, dC + T aus Prodrug-Hydrolyse
5	dA, dG, dC + d4T aus Prodrug-Hydrolyse
6	dA, dG, dC + <i>carba</i> -dT aus Prodrug-Hydrolyse

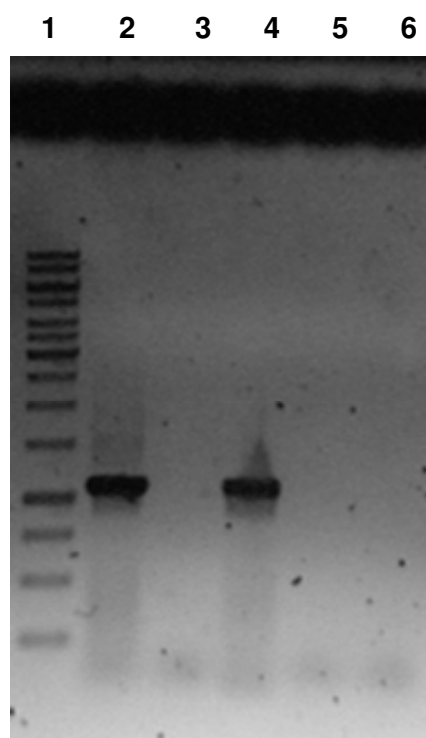


Abb. 171: PCR mit aus der Hydrolyse von TriPPPro-NTP-Prodrugs im PLE-Medium gewonnenen Nukleosidtriphosphaten.

Nichtsdestoweniger konnte durch verschiedene Analysemethoden, wie HPLC, Primer-Extension-Assay und PCR, die Bildung von NTP durch eine schnelle enzymatische Hydrolyse von TriPPPro-Verbindungen bestätigt werden.

4.7 Antivirale Aktivität von Bis(nonanoyloxybenzyl)-NTP-Prodrugs

Für einen indirekten Nachweis des Passierens der Zellmembran von antiviralen Substanzen können die antiviralen Aktivitäten genutzt werden. Korrelierend mit der Charakterisierung der TriPPPro-d4TTP-Verbindungen **56** (Kapitel 4.3) wurden auch die NTP-Prodrugs der verschiedenen Nukleosidanaloga bezüglich ihrer Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 in CEM/0-Zellen untersucht. Obgleich nicht alle Nukleoside Substrate für die Thymidinkinase darstellen und durch andere zelluläre Enzyme in die NMP-Form umgewandelt werden (Kapitel 4.5.1), wurden der Vollständigkeit halber alle TriPPPro-Verbindungen auch in TK-defizienten CEM-Zellen auf ihre Anti-HIV-Aktivität untersucht.

Vor allem sollte ermittelt werden, inwiefern sich die antivirale Aktivität der TriPPP_{ro}-NTP-Verbindungen im Vergleich zu den dazugehörigen Nucleosiden verändert. Leider standen nicht alle Werte der Nucleoside zur Verfügung. Für eine gute Vergleichbarkeit hätte die antivirale Aktivität der Prodrugs und ihrer Nucleoside in derselben Zellcharge ermittelt werden müssen. Daher werden die TriPPP_{ro}-Verbindungen im Folgenden in zwei Gruppen diskutiert.

Die Resultate der ersten Gruppe sind in Tabelle 2 aufgeführt. Zu dieser Gruppe zählen lediglich Prodrugs von Thymidin- sowie Uridinanaloga, hinsichtlich derer keine Werte der dazugehörigen Nucleoside vorliegen.

Tab. 2: Antivirale Aktivität verschiedener NTP-Prodrugs gegenüber HIV-1 und HIV-2 in CEM/0- und in CEM/TK⁻-Zellen.

Verbindung	EC ₅₀ [μM] ^[a]		CC ₅₀ [μM] ^[b]	
	HIV-1	HIV-2	CEM/TK ⁻ HIV-2	CEM/0
AZT 1 ^[73]	0.54 ± 0.03	0.54 ± 0.03	> 250	> 250
AZT-Prodrug 59	0.06 ± 0.06	0.53 ± 0.4	> 1	30 ± 6
ddT 31 ^[154]	> 200	-	-	-
ddT-Prodrug 60	4.65 ± 2.3	> 10	> 10	32 ± 7
d4U 40 ^[82]	> 250	> 250	> 250	> 250
d4U-Prodrug 64	> 10	> 10	> 10	39 ± 11
ddU 41 ^[82]	> 250	> 250	> 250	> 250
ddU-Prodrug 65	> 10	> 10	> 10	57 ± 9
BVdU 49 ^[73]	> 250	> 250	> 250	> 250
BVdU-Prodrug 67	> 10	> 10	> 10	50 ± 10
d4U-Prodrug 187 (DiPPP _{ro})	> 10	> 10	> 10	50 ± 27

[a] 50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation. [b] 50% zytotoxische Konzentration. Die Werte wurden jeweils aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

Aus Vorarbeiten ist allerdings bekannt, dass die Nucleosidanaloga d4U **40** und ddU **41** keine Aktivität gegenüber HIV aufweisen, da die Phosphorylierungsprozesse nicht effizient ablaufen.^[82] Für BVdU **49** konnte in der Vergangenheit ebenso wenig ein inhibitorischer Effekt festgestellt werden.^[73] Gleiches gilt für ddT **31**, das als inaktiv bezüglich einer

Inhibierung des Wachstums von mit HIV infizierten CEM-T4-Lymphozyten eingestuft wurde.^[154] Im Gegensatz dazu wurde für das Thymidinanalogon AZT **1** eine hohe antivirale Aktivität ermittelt.^[73,77]

Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass alle im Folgenden diskutierten Prodrugs bei den Hydrolysestudien in Zellextrakten – soweit untersucht – die pharmakologisch aktive Triphosphatspezies freisetzen, wenngleich diese unterschiedlich schnell zum NDP metabolisiert wurde. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Prodrugs nach Aufnahme im Zytoplasma ein ähnliches Hydrolyseverhalten zeigen.

Erwartungsgemäß weist das AZT-Prodrug **59** eine hohe antivirale Aktivität gegenüber beiden HIV-Typen auf. Diese hohe Wirksamkeit wurde auch in TK-defizienten Zellen festgestellt. Dies lässt nicht nur darauf schließen, dass das Prodrug **59** in die Zelle eindringen kann, sondern auch AZTTP **29** oder zumindest AZTDP **28** freisetzt. Im Fall von AZT **1** stellt die Umsetzung des AZTMPs **14** zum AZTDP **28** den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des AZT-Metabolismus dar (Kapitel 4.5.1.1). Nur ein Zerfall des Prodrugs **59** zum AZTMP **28** hätte somit einen Verlust der Aktivität zur Folge.

Interessante Eigenschaften offenbart das ddT-Prodrug **60**, das scheinbar eine gute Aktivität gegenüber HIV-1 besitzt. Gegen HIV-2 ist sowohl in CEM/TK⁺- als auch in CEM/TK⁻-Zellen kein signifikanter inhibitorischer Effekt festzustellen. Dennoch konnte das inaktive Nukleosid ddT **31**^[154] als TriPPPro-Verbindung in einen aktiven antiviralen Wirkstoff umgewandelt werden.

JESSEN hatte trotz der hohen Selektivität von BVdU **49** gegenüber mit Herpes infizierten Zellen durch Anwendung des DiPPPro-Konzepts eine geringe Anti-HIV-Aktivität beobachtet.^[73] Das als Erweiterung anzusehende TriPPPro-BVdUTP-Prodrug **67** besitzt dagegen unabhängig vom HIV-Stamm keine Aktivität. Dieser Umstand lässt schlussfolgern, dass BVdUTP **120** kein geeignetes Substrat für die Reverse Transkriptase darstellt und somit zur Behandlung von HIV ungeeignet ist. Dies gilt zumindest unter der Annahme, dass das BVdUTP **120** in der Zelle freigesetzt wird und akkumuliert.

Erstaunliche Resultate geben die Untersuchungen sowohl des d4U-Prodrugs **64** als auch des ddU-Prodrugs **65** preis. Wie Studien mit isolierter Reverser Transkriptase zeigten, besitzen die entsprechenden Triphosphate eine hohe antivirale Aktivität gegenüber dem Enzym.^[83] Allerdings konnte in der Vergangenheit zum einen für die Nukleoside und zum anderen bei der Anwendung verschiedener Prodrugsysteme kein oder nur ein geringer inhibitorischer Effekt beobachtet werden.^[155-158] Des Weiteren konnte PERTENBREITER nachweisen, dass d4UDP **183** und ddUDP **184** ungeeignete Substrate für das Enzym NDPK darstellen.^[82] Diese Limitierung wurde für die Inaktivität der DiPPPro-Verbindungen beider Uridinanaloga verantwortlich gemacht. In der Konsequenz bedeutet dies, dass die entsprechenden TriPPPro-NTP-Prodrugs **64** und **65**, eine Hydrolyse der Prodrugs zum

Triphosphat nach dem postulierten Mechanismus vorausgesetzt, eine Inhibierung der Reversen Transkriptase realisieren müssten. Die in Tabelle 2 aufgeführten Resultate widerlegen diese Annahme, da beide Prodrugs **64** und **65** keine Aktivität gegenüber HIV zeigen. Eine Studie von ddUTP **241** in Zellextrakten lieferte die Erklärung für dieses Phänomen. So konnte für den Triphosphatmetaboliten **241** im Zellmedium eine Halbwertszeit von < 1 Minute bestimmt werden. Das hat zur Folge, dass das bei der intrazellulären Metabolisierung des Prodrugs **65** freigesetzte Triphosphat **241** umgehend dephosphoryliert wird und eine für einen inhibitorischen Effekt ausreichende ddUTP-Konzentration im Zellplasma nicht erreicht werden kann. Diese These deckt sich sehr gut mit den Ergebnissen der Hydrolyseuntersuchungen in Zellextrakten (Kapitel 4.6.2). In diesen konnten bei dem enzymatischen Abbau des ddU-Prodrugs **65** nur Spuren von ddUTP **241** nachgewiesen werden. Folglich scheinen die Nukleoside d4U **40** und ddU **41** als RT-Inhibitoren nicht geeignet, da die zytosolischen Enzyme eine Anreicherung des Wirkstoffs unterbinden.

Für die zweite Gruppe an TriPPPPro-NTP-Prodrugs lagen neben den antiviralen Daten der Prodrugs auch die der Nukleoside zum Vergleich vor. In Abbildung 172 sind die für HIV-1 ermittelten Werte in einem Säulendiagramm zusammengefasst. Es ist deutlich zu erkennen, dass durch die Anwendung des TriPPPPro-Konzepts die antivirale Aktivität der Nukleoside signifikant gesteigert werden kann. Besonderheiten bilden das ddC-Prodrug **68** sowie das ddG-Prodrug **72**, wobei in diesen Fällen bereits die Nukleoside einen sehr hohen inhibitorischen Effekt ausüben. Die effiziente Phosphorylierung von ddC **8** zu ddCTP **121** wurde in Kapitel 4.5.1.3 thematisiert. Ein repräsentativer Wert kann für ddG **115** an dieser Stelle leider nicht angegeben werden, allerdings wurden in ersten Untersuchungen in allen Zelllinien EC₅₀-Werte von 1-2 µM ermittelt.

Ansonsten weist das ddl-Prodrug **70** eine 7-mal, das ABC-Prodrug **69** eine 21-mal und das *carba*-dTTP-Prodrug **61** ebenfalls eine 21-mal höhere Aktivität als das jeweilige Nukleosid auf. Die Resultate beweisen, dass die Prodrugs erfolgreich die Zellmembran penetrieren können und einen Bypass des geschwindigkeits-bestimmenden Schritts ermöglichen.

Für die drei Nukleoside ddl **2**, *carba*-dT **111** und ABC **3** ist mit dem *cycloSal*-Konzept die Anwendung eines alternativen Prodrugsystems beschrieben, wodurch eine bessere Einordnung der Ergebnisse möglich wird. So wurde für 3-Methyl-*cycloSal*-ddIMP eine 3-mal und für 3-Methyl-*cycloSal*-ABCMP eine 7-mal erhöhte Anti-HIV-Aktivität im Vergleich zu dem dazugehörigen Nukleosid festgestellt.^[159,160] Dagegen führte die Verwendung der 3-Methyl-*cycloSal*-Maske bei *carba*-dT **111** zu keiner Verbesserung der antiviralen Wirkung.^[161] Dementsprechend lieferte das TriPPPPro-Konzept durchgehend effizientere Prodrugs.

Allerdings können für ddl **2** und ABC **3** keine Aussagen darüber getroffen werden, welche Nukleosidtriphosphate die inhibitorische Wirkung hervorrufen. Nach den publizierten

Metabolismen der Nucleoside bildet bei **ddl 2** das **ddATP 129** und bei **ABC 3** das **CBVTP 127** den eigentlichen Wirkstoff (Kapitel 4.5.1). Da bei den Hydrolysestudien in Zell-extrakten jedoch bevorzugt **ddITP** bzw. **ABCTP 229** freigesetzt wurden, ist davon auszu-gehen, dass diese Verbindungen für die Wirksamkeit verantwortlich sind.

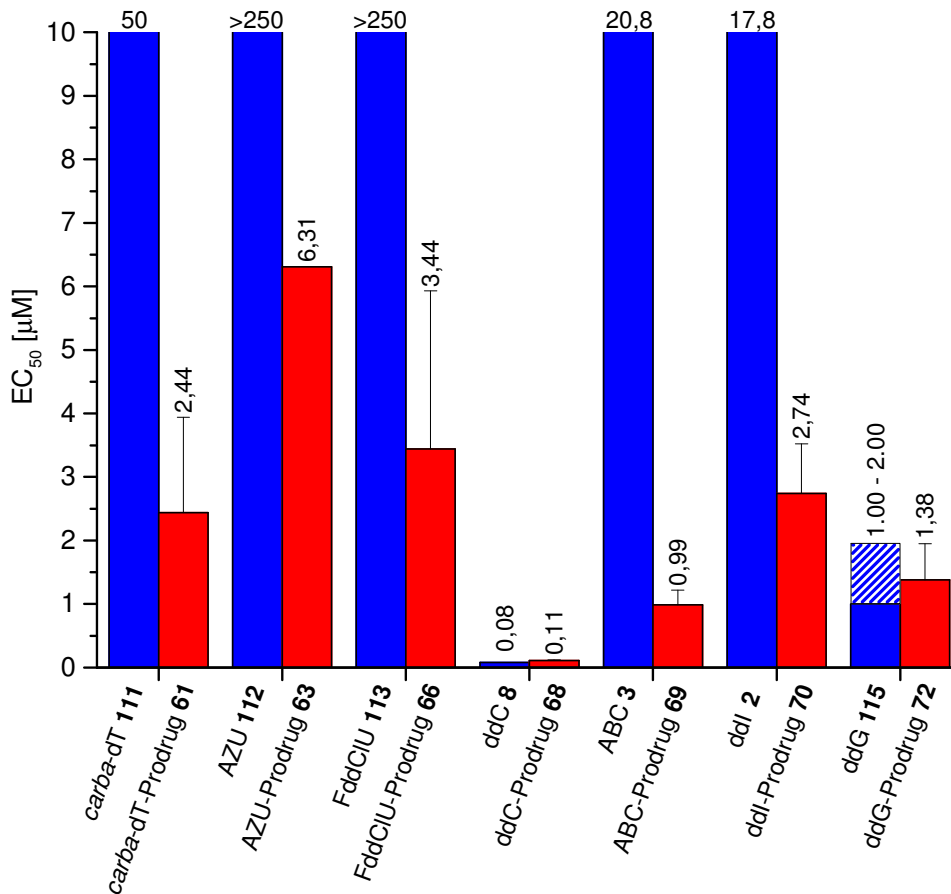


Abb. 172: Antivirale Aktivität unterschiedlicher NTP-Prodrugs gegenüber HIV-1 in CEM/0-Zellen; EC₅₀: 50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation.

Bemerkenswerte Ergebnisse legen das **AZU- 63** und das **FddCIU-Prodrug 66** offen. Durch die Anwendung des **TriPPPro**-Konzepts wurden die inaktiven Nucleoside **AZU 112** und **FddCIU 113** in höchsteffiziente Inhibitoren gegenüber HIV-1 umgewandelt. Im Gegensatz dazu zeigen sie in mit HIV-2 infizierten CEM/0-Zellen keine signifikante Aktivität (Abb. 173). Dies ist dahingehend erstaunlich, da bisher keine NRTI bekannt sind, die zwar die Reverse Transkriptase von HIV-1, jedoch nicht diejenige von HIV-2 inhibieren. Aufgrund struktureller Unterschiede der Enzyme sind bisher nur NNRTI, die allosterisch die RT hemmen, gegenüber HIV-2 unwirksam, während sie das Zellwachstum von HIV-1 unterbinden. Die Inaktivität der **TriPPPro**-Verbindungen lässt vermuten, dass auch Differenzen im katalytischen Zentrum der Reversen Transkriptase beider HIV-Typen vorliegen. Die Prodrugs **61**, **68**, **69**, **70** und **72** sind im Gegensatz dazu in der Lage, nicht nur die RT von HIV-1, sondern auch das Enzym von HIV-2 effizient zu inhibieren (Abb. 173).

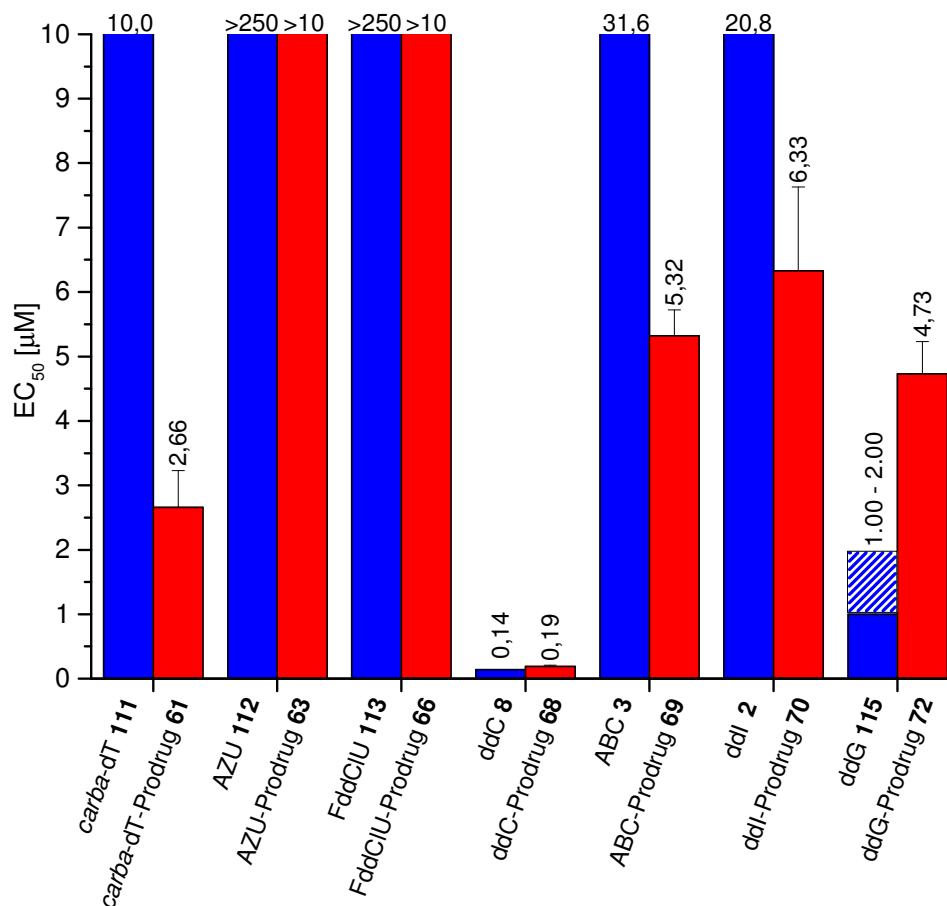


Abb. 173: Antivirale Aktivität unterschiedlicher NTP-Prodrugs gegenüber HIV-2 in CEM/0-Zellen; EC₅₀: 50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation.

Da die zur Bestimmung der TK-Aktivität verwendete Zelllinie mit HIV-2 infiziert ist, weisen entsprechend sowohl das AZU-Prodrug **63** als auch das FddCIU-Prodrug **66** keine antivirale Aktivität in TK-defizienten Zellen auf (Abb. 174). Des Weiteren zeigt sich in der Testreihe in TK-Zellen zusätzlich der Verlust der antiviralen Aktivität des carbozyklischen Prodrugs **61**. Die Korrektheit der Daten vorausgesetzt würde das bedeuten, dass die TriPPPro-Verbindung **61** intrazellulär das Nukleosid **111** freisetzen müsste. Dieses Szenario ist allerdings, basierend auf dem beobachteten Hydrolyseverhalten in Zellextrakten, als sehr unwahrscheinlich anzunehmen.

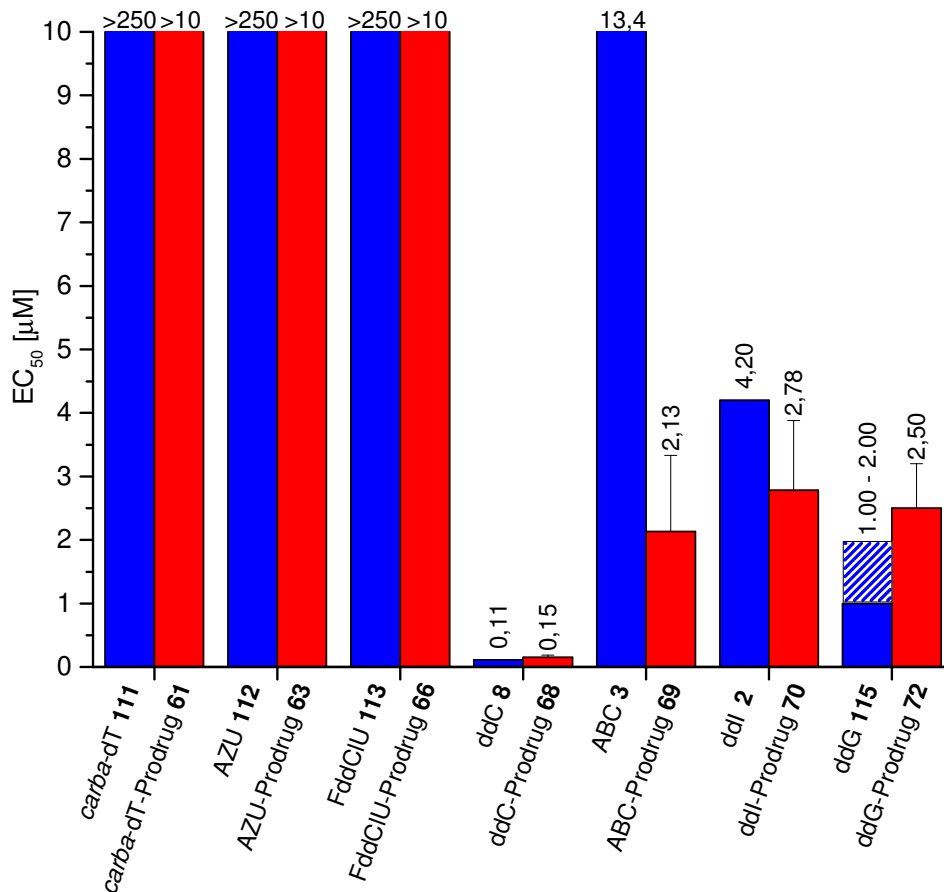


Abb. 174: Antivirale Aktivität unterschiedlicher NTP-Prodrugs in CEM/TK-Zellen;
EC₅₀: 50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation.

Bei den Purinderivaten **69**, **70**, **72** sowie dem ddC-Prodrug **68**, die im Gegensatz zu den Uridin- und Thymidinanaloga nicht auf eine Metabolisierung durch die Thymidinkinase angewiesen sind, bleibt die biologische Aktivität erhalten.

In Abbildung 175 sind die Toxizitätswerte der TriPPP-Pro-NTP-Prodrugs zusammengefasst. Während die CC₅₀-Werte mit einer Konzentration von 26-56 µM überwiegend in einer vergleichbaren Größenordnung liegen, fällt die hohe Toxizität der Prodrugs von *carba*-dT **61** und ddC **68** auf. Der Selektivitätsindex (SI= EC₅₀/CC₅₀), der die relative Effizienz eines Wirkstoffs definiert, zeigt allerdings, dass die Toxizität des ddCTP-Prodrugs **68** mit SI= 34 als akzeptabel einzustufen ist. Im Gegensatz dazu liegt der SI-Wert im Fall des *carba*-dT-Prodrugs **61** bei 1.0, weshalb die Substanz therapeutisch ungeeignet ist. Die dazugehörigen Nucleoside ddC **8** und *carba*-dT **111** weisen mit 2.6 bzw. 8.0 µM ebenfalls sehr niedrige CC₅₀-Werte auf. Dies lässt vermuten, dass die Toxizität nicht durch die Maskierungseinheiten, sondern primär durch die Nucleoside selbst oder durch eine Störung des Zellstoffwechsels, resultierend aus einer hohen Triphosphatkonzentration der Analoga, verursacht wird. Diese These wird durch den hohen Zytotoxizitätswert des Thymidin-Prodrugs **62** von

11±9 mM bekräftigt. Der inhibitorische Effekt bezüglich des Zellstoffwechsel resultierend aus einer hohen TTP-Konzentration wurde bereits Mitte der 1960er Jahren beschrieben.^[162] Eine Bestimmung der Toxizität der Maskierungseinheiten war somit auch unter Anwendung des TriPPP-Pro-Konzepts auf das natürliche Nukleosid Thymidin **83** nicht möglich. Allerdings impliziert dieses Ergebnis, dass das Prodrug **62** effizient in die Zelle eingedrungen ist und den entsprechenden Triphosphatmetaboliten **116** freigesetzt hat.

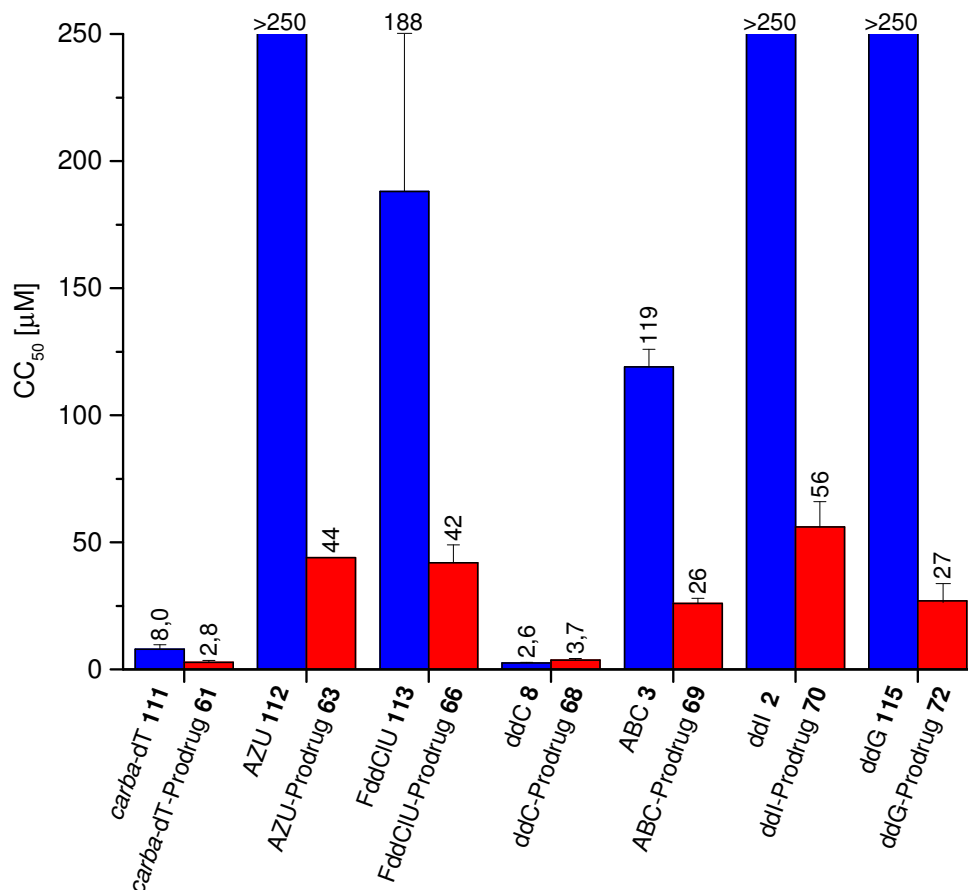


Abb. 175: Zytotoxizitäten von TriPPP-Pro-NTP-Prodrugs in CEM/0-Zellen;
CC₅₀: 50% zytotoxische Konzentration.

4.8 Fazit der Synthese und Charakterisierung von verschiedenen TriPPP-Pro-NTP-Prodrugs

Sowohl über die etablierte Phosphoramiditmethode als auch über die neu entwickelte H-Phosphonatroute war eine Vielzahl von TriPPP-Pro-NTP-Prodrugs zugänglich. Gleichzeitig konnte durch die Verwendung verschieden modifizierter Nukleosidstrukturen die generelle Anwendbarkeit des TriPPP-Pro-Konzepts veranschaulicht werden. Durch Hydrolysestudien in CEM/0-Zellextrakten wurde gezeigt, dass sich die NTP-Prodrugs **59-72** enzymatisch aktivieren lassen und den biologisch aktiven Triphosphatmetaboliten freisetzen. Allerdings war die von Phosphatasen katalysierte Dephosphorylierung der Nukleosidtriphosphate zu beobachten, wodurch primär die Akkumulation der entsprechenden Nukleosiddiphosphate

stattfind. In Experimenten mit isolierter Schweineleberesterase wurde bevorzugt eine schnelle Spaltung der Acylesterfunktion der Maskierungseinheiten festgestellt. Dabei konnte durch Primer-Extension-Assays sowie PCR der Nachweis einer Freisetzung der biologisch aktiven Nukleosidtriphosphate erbracht werden. Die ermittelten Anti-HIV-Aktivitäten legen offen, dass bei der Anwendung des TriPPPro-Konzepts die Aktivität im Vergleich zum Nukleosid um das bis zu 21-Fache gesteigert werden kann. Zudem können inaktive Nukleoside in hochwirksame Verbindungen umgewandelt werden.

4.9 Synthese eines asymmetrischen d4T-Triphosphat-Prodrugs 58

Bei der chemisch induzierten Hydrolyse von DiPPPro-Verbindungen werden neben der Freisetzung von NDP signifikante Mengen von NMP als Folge eines Bruchs der hydrolyseempfindlichen Phosphoranhydridbindung gebildet.^[72,77] Dabei korreliert die Menge von NMP mit der Stabilität des Prodrugs, weshalb vor allem die stabileren Substanzen vermehrt NMP liefern.^[77] Im Gegensatz dazu führen das Entfernen einer Maskierungseinheit zum monomaskierten Intermediat und die dadurch gewonnene negative Ladung zu einer signifikanten Erhöhung der Stabilität zwischen den Phosphateinheiten. Dieses Intermediat hydrolysiert unabhängig von der Struktur der verbleibenden Maske selektiv zum gewünschten NDP.^[72,77] WEINSCHENK gelang die Synthese asymmetrischer DiPPPro-NDP-Prodrugs, das heißt von Prodrugs, deren Masken unterschiedliche lipophile Reste tragen.^[163] Der Regelmäßigkeit der Hydrolysehalbwertszeiten symmetrischer Prodrugs folgend wird ein kürzerer aliphatischer Esterrest dieser asymmetrischen Prodrugs schneller enzymatisch gespalten und somit das einfachmaskierte Intermediat im Gegensatz zu einem symmetrisch maskierten Prodrug schneller gebildet. Das entstandene Intermediat liefert erneut selektiv das NDP, womit dessen Gesamtmenge im Vergleich zu den symmetrischen Prodrugs gesteigert wird. Zudem zeigen die asymmetrischen Prodrugs eine verbesserte antivirale Aktivität.^[163]

Auf Basis der vielversprechenden Ergebnisse dieser DiPPPro-Verbindungen sollte auch die Anwendung einer asymmetrischen Maskierung bei den TriPPPro-NTP-Prodrugs untersucht werden. Während die Synthese der DiPPPro-NDP-Prodrugs durch Verwendung der Phosphoramiditchemie erfolgte^[163], wurde für die Darstellung eines asymmetrischen Triphosphat-Prodrugs im Rahmen dieser Arbeit eine Weiterentwicklung der H-Phosphonatroute angestrebt.

Für die Synthese des asymmetrischen H-Phosphonats **245** wurde der Phenylester **76e** mit $R = C_8H_{17}$ bei -10 °C mit Diphenylphosphonat (DPP) zur Reaktion gebracht (Abb. 176). Die verminderte Temperatur sowie ein Überschuss an DPP sollten die Wahrscheinlichkeit einer Disubstitution verringern. Anschließend wurde der kurzketige Phenylester **76a** mit $R = CH_3$ hinzugegeben. Diese Reihenfolge wurde bewusst gewählt, da bei den kleineren Resten aufgrund der Sterik eine doppelte Substitutionsreaktion am DPP als wahrscheinlicher

angenommen wurde. Des Weiteren erfolgte die Zugabe des Phenylesters **76a** im Überschuss, sodass ein quantitativer Verbrauch des DPPs gegeben war. Nach dem Rühren für zwei Stunden bei 38 °C wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt. Dabei stellte sich heraus, dass sich das Produkt **245** bei einem geringen Anteil an Triethylamin im Laufmittel zu den entsprechenden Phenylestern zersetzte. Ein Ansäuern mit 0.5% Essigsäure erlaubte dagegen eine Isolation des asymmetrischen H-Phosphonats **245**. Allerdings spricht die Ausbeute von nur 38% noch von einem Optimierungsbedarf.

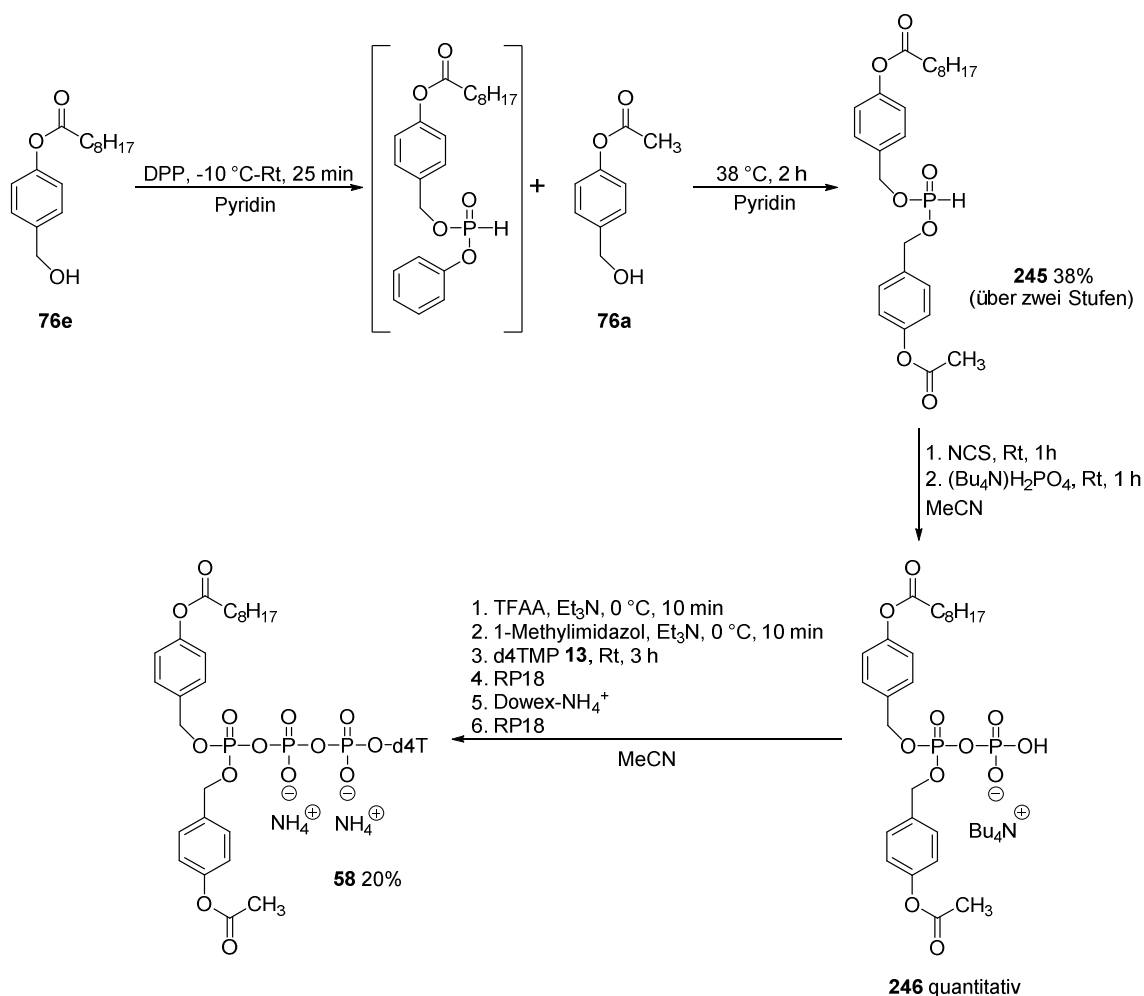


Abb. 176: Darstellung des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs **58** über die H-Phosphonatmethode.

Die Umsetzung zum Prodrug **58** wurde analog zu der in Kapitel 4.5.3 vorgestellten H-Phosphonatmethode durchgeführt. Dabei waren keine Auswirkungen der geringeren Lipophilie des H-Phosphonats **245** auf den Reaktionsverlauf und die Extraktion zur Reinigung im Vergleich zu den bisherigen Experimenten mit dem Phosphonat **200** festzustellen. Demzufolge konnte das asymmetrische DP-Reagenz **246** in quantitativer Ausbeute dargestellt werden. Lediglich die Ausbeute des asymmetrischen Triphosphat-Prodrugs **58** von 20% blieb etwas hinter den Erwartungen zurück. Möglicherweise kam es

während der Chromatographie, basierend auf dem sehr hydrolyselabilen Acetylrest, zu einer Zersetzung der Zielverbindung **58**. Gleichwohl konnte bewiesen werden, dass über die H-Phosphonatroute auch die Synthese asymmetrischer TriPPPro-Verbindungen realisierbar ist. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Prodrugs **58** ist unter anderem der jeweils einmalige Datensatz des Methyl- bzw. des Octylrests zu erkennen (Abb. 177). Das Auftreten von Diastereomeren, resultierend aus dem Stereozentrum am γ -Phosphat, ließ sich dagegen NMR-spektroskopisch in keiner Messmethode feststellen.

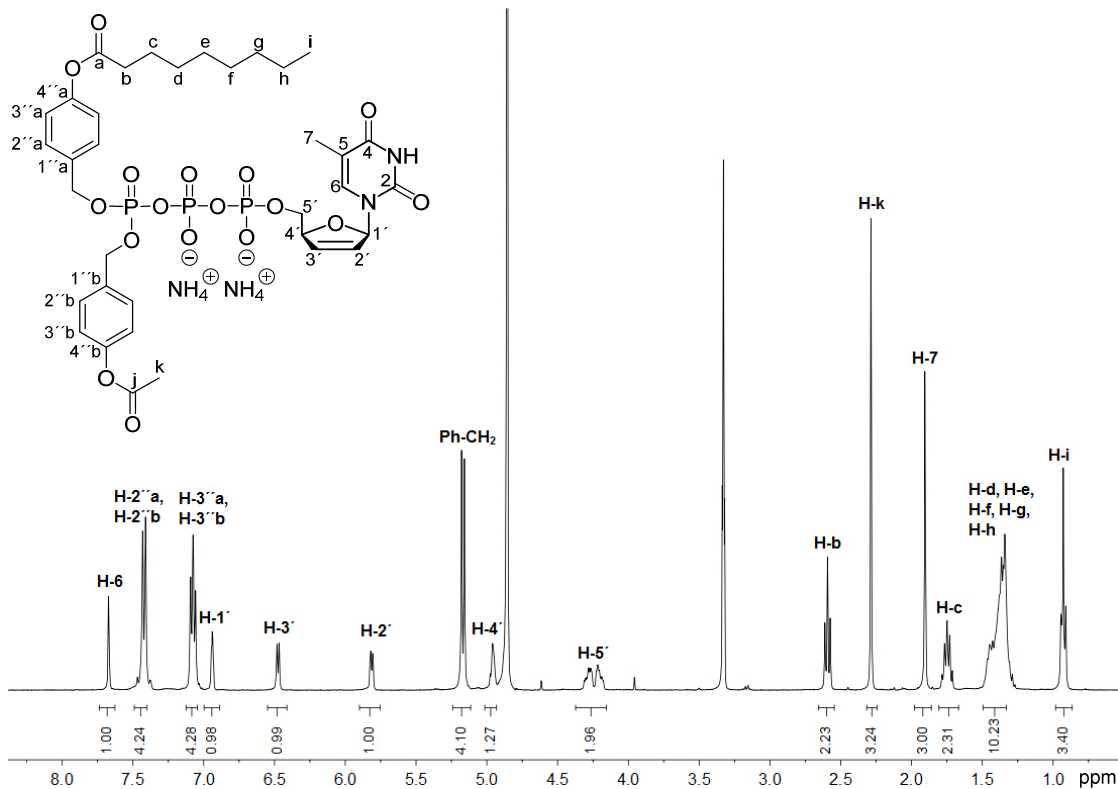


Abb. 177: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs **58** (MeOD- d_4 , 400 MHz).

4.10 Hydrolyseverhalten des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs

Interessante Ergebnisse lieferten die chemischen wie enzymatischen Hydrolyseuntersuchungen der asymmetrischen TriPPPro-Verbindung **58**. Theoretisch war bei der Hydrolyse des Prodrugs **58** die Freisetzung zweier Intermediate möglich (Abb. 178), wenngleich die Formierung des Intermediats **57e** im Zellextrakt aufgrund einer schnelleren Spaltung des Acetylrests bevorzugt ablaufen sollte. Da allerdings bei der chemischen Hydrolyse ebenso mit einer Bildung des Intermediats **57a** zu rechnen war, wurde die HPLC-Methode B zur Verfolgung herangezogen, um Überlagerungen von Metaboliten, wie dem Intermediat **57a** und d4TTP **16**, zu vermeiden.

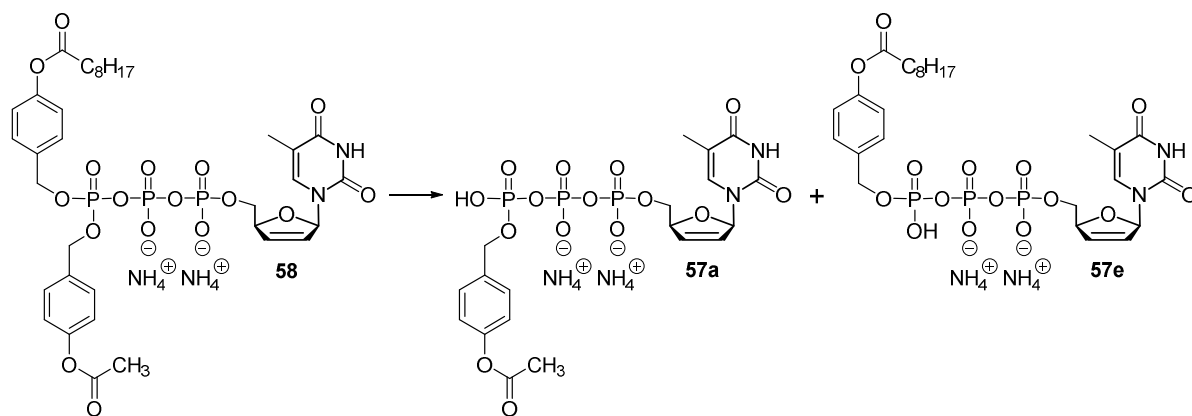


Abb. 178: Bei der Hydrolyse des Prodrugs **58** mögliche monomaskierte Intermediate **57a** und **57e**.

4.10.1 Hydrolyseverhalten des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs in PBS

In Abbildung 179 ist der Hydrolyseverlauf des Prodrugs **58** in PBS (pH 7.3) gezeigt. Bereits im frühen Stadium der Hydrolyse ist die Freisetzung beider Intermediate **57a** und **57e** zu erkennen. Unter dem Aspekt, dass in Kapitel 4.2.1 eine Abspaltung der ersten Maskierungseinheit unabhängig von einer Initiierung des Acylesters beschrieben wurde, erscheint diese Beobachtung durchaus plausibel. Die simultane Zunahme beider Intermediatspezies bis zum vollständigen Verbrauch der TriPPP-Verbindung bekräftigt, dass die erste Maske durch Hydrolyse an der Benzylfunktion eliminiert wird. Gleiches gilt für die zeitlich verzögerte Bildung signifikanter Mengen von 4-Hydroxybenzylalkohol. Dieser scheint dementsprechend aus der Hydrolyse der zuvor abgespaltenen 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkanoate **76a** und **76e** hervorzugehen.

Etwas ungewöhnlich fiel die Peakstruktur des Intermediats **57e** aus. Durch Coinjektion konnten beide Peaks allein der Verbindung **57e** zugeordnet werden. Möglicherweise ist diese Gestalt das Resultat eines nicht gleichmäßigen Austauschs der Gegenionen durch den Laufpuffer. Da die Interpretation der Hydrolyseergebnisse auf diese Weise möglich war, wurde die Suche nach einer verbesserten Pufferkonzentration nicht durchgeführt.

Leider erlaubt der verwendete TEAA-Laufpuffer keine zuverlässigen Rückschlüsse über die Freisetzung der phosphorylierten Metabolite. Zwar beweisen die beiden Peaks zwischen einer Retentionszeit von 1.5-2.0 Minuten die Bildung von d4TDP **15** und d4TTP **16**, jedoch weisen sowohl der Absorptionsverlauf als auch die Flächenzunahme des Injektionspeaks auf überlagerte nukleosidische Komponenten hin. Folglich ist anzunehmen, dass das d4TDP **15** sowie d4TTP **16** nicht vollständig vom Injektionspeak separiert vorliegen.

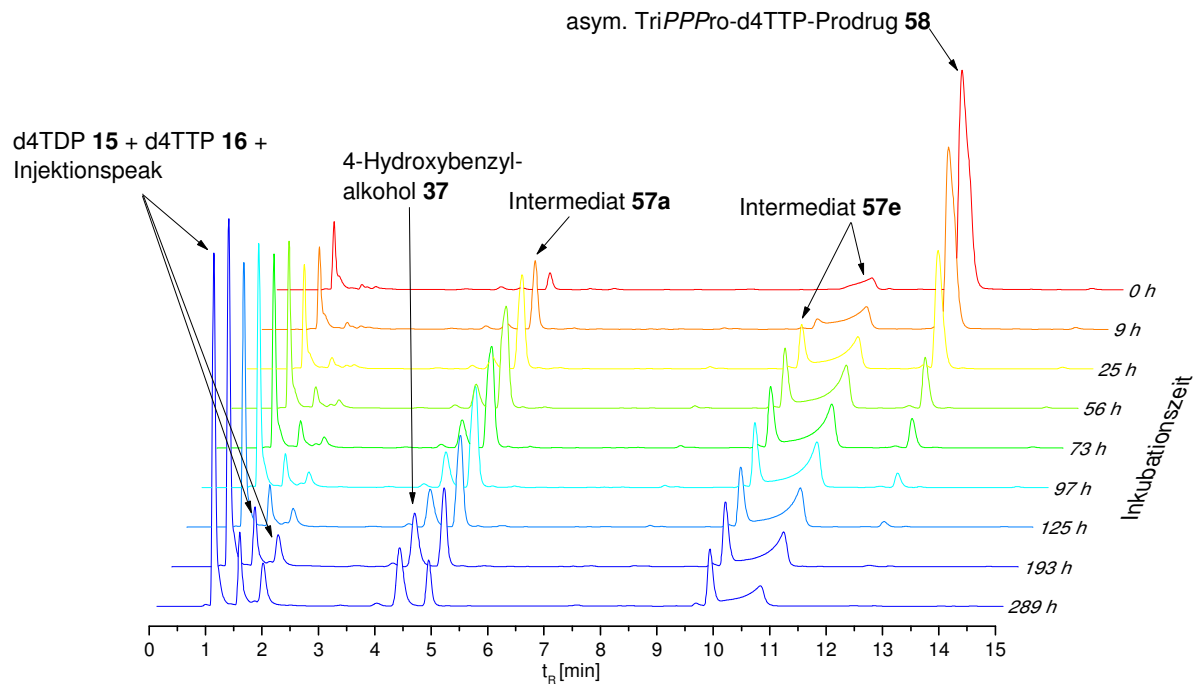


Abb. 179: Hydrolyseverlauf des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs **58** in PBS bei pH 7.3 (HPLC-Methode B, 266 nm).

Bei der Betrachtung der Hydrolysehalbwertszeit in Tabelle 3 mit $t_{1/2}(1) = 19$ h fällt auf, dass diese mit der für das symmetrische TriPPPro-d4TTP-Prodrug **56a** ermittelten Hydrolysehalbwertszeit von 18 Stunden nahezu übereinstimmt. Diese Beobachtung belegt den Zusammenhang zwischen der Halbwertszeit und der Länge der aliphatischen Reste der Masken, obwohl eine nukleophile Substitution an der Benzylfunktion stattfindet. Da jedoch beide Intermediate in signifikanten Mengen gebildet werden, ist die Stabilität der Acylesterfunktionen für die Abspaltungstendenz der ersten Maskierungseinheit nicht relevant. Daher erscheint es am wahrscheinlichsten, dass das aus der Lipophilie der Acylreste resultierende Löslichkeitsverhalten den entscheidenden Faktor in Bezug auf die Stabilität des Prodrugs darstellt.

Tab. 3: Hydrolysehalbwertszeiten des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs **58** im Vergleich zu denen der symmetrischen d4TTP-Prodrugs **56a** und **56e**.

TriPPP_{ro}-NTP	Prodrug/ Intermediat	t_{1/2} in PBS [h]	t_{1/2} in CEM/0 [min]	t_{1/2} in PLE [min]
asym. d4T 58 (R= CH ₃ /C ₈ H ₁₇)	58	19	2.1	1.7
	57a	139	-	4942
	57e	548	-	n.b. ^[a]
sym. d4T 56a (R= CH ₃)	56a	18	3.0	111
	57a	75	-	4228
sym. d4T 56e (R= C ₈ H ₁₇)	56e	52	147	0.8
	57e	394	-	98

[a] nicht bestimmbar.

Die Hydrolysegeschwindigkeiten der Intermediate **57a** und **57e**, ausgehend von dem asymmetrischen Prodrug **58**, waren erwartungsgemäß von der Kettenlänge des aliphatischen Rests abhängig (Tab. 3). Allerdings wichen die Halbwertszeiten deutlich von denen der bei der Hydrolyse der symmetrischen Triphosphat-Prodrugs **56a** und **56e** freigesetzten Intermediate ab. So hydrolysierten die Intermediate **57a** und **57e**, die aus dem asymmetrischen Prodrug **58** hervorgingen, um den Faktor 1.9 bzw. 1.4 langsamer als die aus der Hydrolyse der vergleichbaren symmetrischen Prodrugs **56a** bzw. **56e** gewonnenen Intermediate. Eine Erklärung für dieses ungewöhnliche Verhalten konnte aktuell noch nicht gefunden werden.

4.10.2 Hydrolyseverhalten des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs **58** in CEM/0-Zellextrakten

Bei der Hydrolyseverfolgung in CEM/0-Zellextrakten (Abb. 180) ist die begünstigte Spaltung des kurzkettigen Acylesters festzustellen. Demgemäß dominiert die Freisetzung des Intermediats **57e**, obgleich auch geringe Mengen des Intermediats **56a** gebildet werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass sich bereits vor der Zugabe des Zellextrakts Intermediat **56a** in der Probe befand, wie ein Vergleich mit Abbildung 179 zum Startzeitpunkt beweist.

Die beschleunigte enzymatische Hydrolyse des kurzkettigen Rests steht im Einklang mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.2.2. Mit einer Hydrolysehalbwertszeit von 2.1 Minuten liegt das asymmetrische Prodrug **58** in derselben Größenordnung wie das symmetrische Prodrug **56a**. Die Abweichung um den Faktor 1.4 kann sowohl auf den vergleichsweise hohen Fehler in diesem Zeitrahmen als auch auf einen Einfluss des zweiten Rests auf die Enzym-Substrat-Interaktion zurückgeführt werden.

Erneut konnten, wie schon in den vorherigen Studien mit CEM/0 beobachtet, nur geringe Mengen von 4-Hydroxybenzylalkohol **37** detektiert werden. Vermutlich wird dieser bei der Aufarbeitung zusammen mit dem Hauptanteil des Zellextrakts präzipitiert.

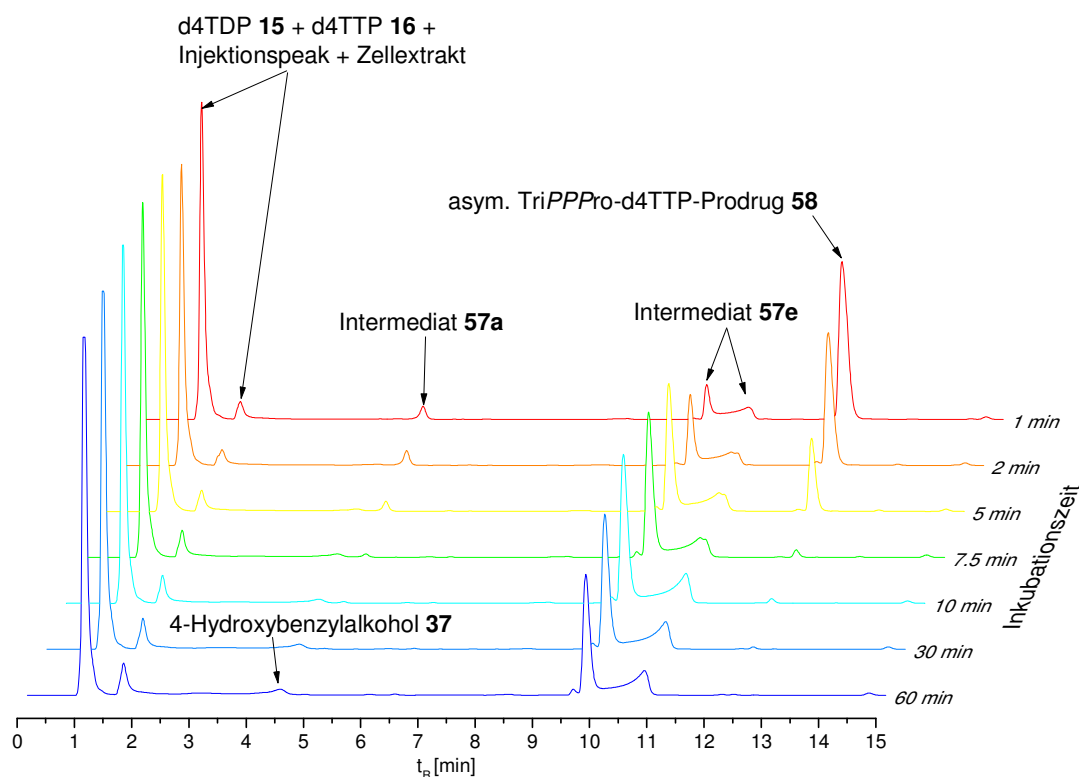


Abb. 180: Hydrolyseverlauf des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs **58** in CEM/0-Zellextrakten (HPLC-Methode B, 266 nm).

4.10.3 Hydrolyseverhalten des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs im PLE-Medium

Der Vollständigkeit halber wurde eine Hydrolyse im PLE-Medium durchgeführt. Auch in diesem Fall korrelierten die Ergebnisse mit den aus den Untersuchungen der symmetrischen d4TTP-Prodrugs **56** gewonnenen Erkenntnissen. So wurde eine hohe Spezifität der Esterase gegenüber Heptanoyl- oder Nonanoylestern beobachtet (Kapitel 4.2.3). Gleichmaßen erfolgte bei der Hydrolyse des asymmetrischen Prodrugs **58** die selektive Freisetzung des Intermediats **57a** (Abb. 181), was auf eine Spaltung des Nonanoylesters durch die PLE zurückzuführen ist. Leider beinhaltete schon die Ausgangssubstanz Verunreinigungen an Intermediat **57e**. Allerdings findet in den ersten zehn Minuten lediglich eine Zunahme der Peakfläche des Intermediats **57a** statt. Auch die kontinuierliche Zunahme des 4-Hydroxybenzylalkohols **37** dient erneut der Beweisführung einer enzymatisch initiierten Abspaltung der Masken.

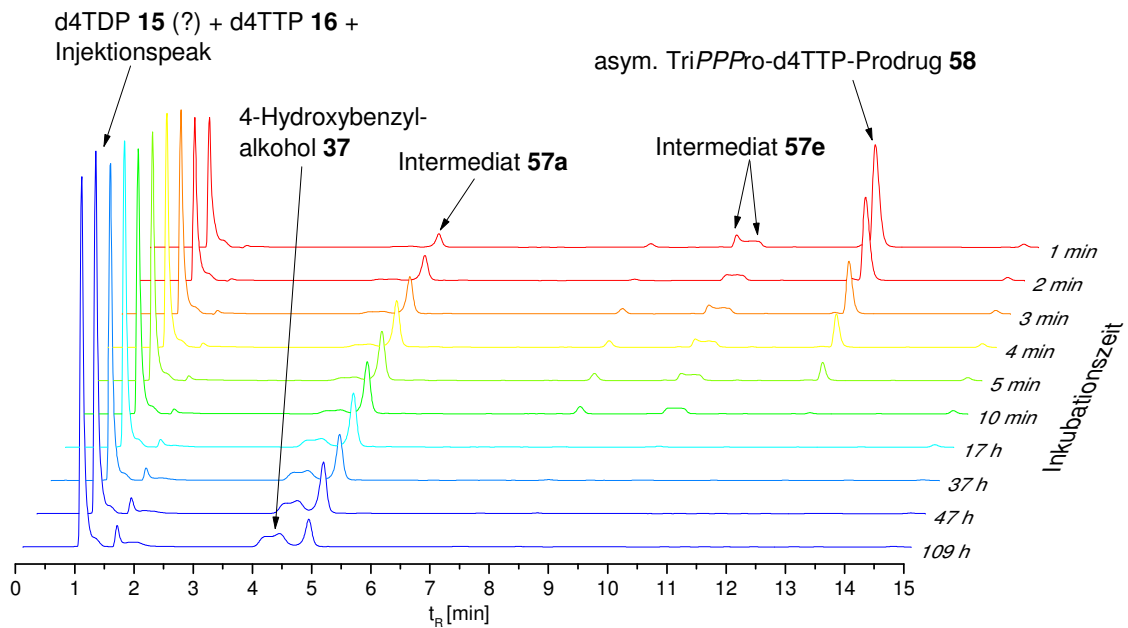


Abb. 181: Hydrolyseverlauf des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs **58** im PLE-Medium (HPLC-Methode B, 266 nm).

4.11 Antivirale Aktivität des asymmetrischen Prodrugs **58**

Wie auch die symmetrisch maskierten NTP-Prodrugs wurde das asymmetrische TriPPPro-d4TTP-Prodrug **58** auf seine Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 untersucht. Es wurde erwartet, dass die Liphophilie der beim Prodrug **58** eingesetzten Masken für eine vollständige Abschirmung der freien Ladungen des Phosphatgerüsts nicht ausreichen und ein Passieren der Zellmembran somit nur schwerlich möglich sein würde. Die ermittelten EC_{50} -Werte sprechen jedoch für eine erfolgreiche Zellaufnahme, wenngleich die Anti-HIV-Aktivität geringer als bei d4T **3** ausfällt. Zur Einordnung der Effektivität der asymmetrischen Verbindung **58** sind in Tabelle 4 die antiviralen Daten der symmetrischen d4TTP-Prodrugs **56a** und **56e** mit $R = CH_3$ bzw. $R = C_8H_{17}$ aufgeführt. Die unterschiedlichen Angaben für das Nukleosid d4T **3** ergeben sich aus den verschiedenen Chargen an Zellkulturen, in denen die antiviralen Tests der Prodrugs **58**, **56a** und **56e** durchgeführt wurden.

Tab. 4: Antivirale Aktivität des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs **58** gegenüber HIV-1 und HIV-2 in CEM/0- und in CEM/TK⁻-Zellen im Vergleich zu den symmetrischen Prodrugs **56a** und **56e**.

Verbindung	EC ₅₀ [μM] ^[a]		CC ₅₀ [μM] ^[b]	
		CEM/0	CEM/TK ⁻	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
asym. d4TTP 58 (R= CH ₃ /C ₈ H ₁₇)	1.31 ± 0.82	4.76 ± 2.7	9.86 ± 5.0	18 ± 5
d4T 3	0.76 ± 0.38	3.37 ± 1.4	> 50	-
sym. d4TTP 56a (R= CH ₃)	0.43 ± 0.25	0.72 ± 0.16	> 10	63 ± 2
sym. d4TTP 56c (R= C ₄ H ₉)	0.40 ± 0.00	1.05 ± 0.30	> 10	58 ± 3
sym. d4TTP 56e (R= C ₈ H ₁₇)	0.31 ± 0.01	0.62 ± 0.30	2.26 ± 1.03	52 ± 5
d4T 3	0.33 ± 0.11	0.89 ± 0.00	> 10	79 ± 3

[a] 50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation. [b] 50% zytotoxische Konzentration. Die Werte wurden jeweils aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

Erwartungsgemäß besitzt das asymmetrische Prodrug **58** – bezogen auf den jeweiligen EC₅₀-Wert von d4T **3** – sowohl in TK⁺- als auch in TK⁻-Zellen einen geringeren Inhibierungseffekt als das symmetrische d4TTP-Prodrug **56e**. Dies ist vermutlich die Folge der erwähnten geringeren Lipophilie. Ein Indiz dafür sind die Retentionszeiten der Prodrugs (Abb. 182). Basierend auf der Gesamtkettenlänge ist die Verbindung **58** bezüglich der Lipophilie mit dem symmetrischen d4TTP-Prodrug **56c** vergleichbar. Gleichmaßen wurde für beide in den TK⁻-Zellen keine signifikante antivirale Aktivität ermittelt. Bereits für die asymmetrischen DiPPro-NTP-Prodrugs, die eine Maske mit R= CH₃ trugen, wurde überwiegend nur eine geringe antivirale Aktivität festgestellt.^[163] Neben einer schwächeren Permeabilität könnte dies aber auch das Resultat einer zu schnellen Abspaltung der Maske im Kulturmedium sein.

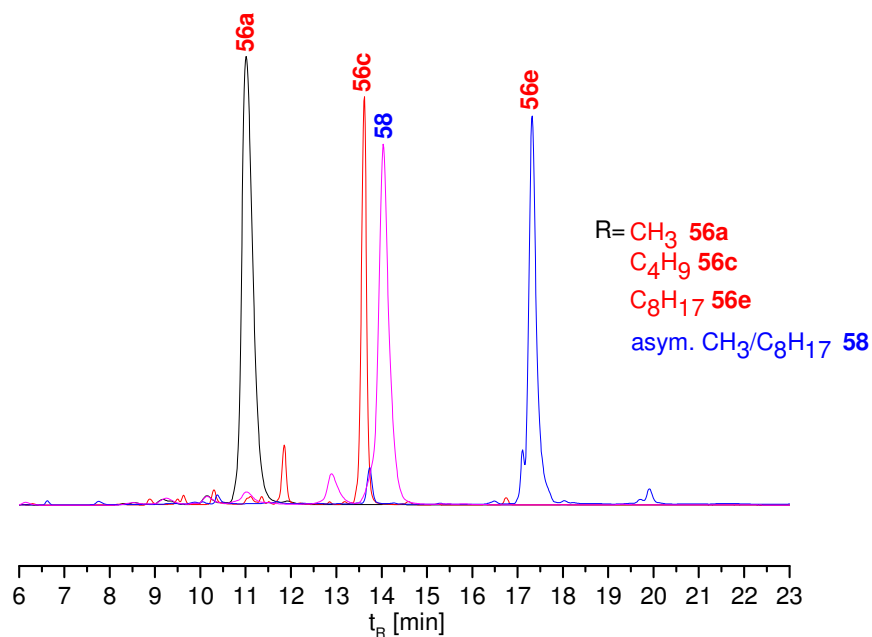


Abb. 182: Retentionszeiten vergleichbarer d4TTP-Prodrugs (HPLC-Methode A, 266 nm).

4.12 Fazit der Synthese und Charakterisierung des asymmetrischen d4TTP-Prodrugs 58

Resümierend lässt sich festhalten, dass die erstmalige Synthese eines asymmetrischen Triphosphat-Prodrugs **58** möglich war. Für die Darstellung wurde die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte H-Phosphonatmethode von symmetrischen TriPPPPro-Verbindungen erweitert. Sowohl hinsichtlich des Hydrolyseverhaltens als auch der antiviralen Aktivität wurden für das Prodrug **58** Ergebnisse erhalten, die nach den Beobachtungen bei den symmetrischen TriPPPPro-d4TTP-Prodrugs **56** aufgrund der Lipophilie zu erwarten gewesen waren.

4.13 Fluoreszierendes Nukleosidanalogue als analytische Sonde für TriPPPPro-NTP-Prodrugs

Um einen Eindruck bezüglich des Resorptions- und Metabolisierungsverhaltens von Wirkstoffen *in vivo* zu gewinnen, ist die Durchführung eines *therapeutic drug monitoring* (DTM) sinnvoll. Dadurch können, beispielsweise bei der *combination antiretroviral therapy* (cART), Arzneimittelinteraktionen oder die Variabilität der Konzentration eines Medikaments festgestellt und demzufolge toxische Nebenwirkungen minimiert werden.^[164] Die zur Verfügung stehenden analytischen Verfahren zur Quantifizierung von nukleosidischen Metaboliten im Plasma sind jedoch begrenzt. Bei Untersuchungen mit Zellkulturen werden bevorzugt isotonenmarkierte Nukleoside eingesetzt, wodurch niedrige Nachweisgrenzen gewährleistet sind. Für *cycloSal*-Prodrugs konnte diese Methode bereits erfolgreich angewendet werden, indem die intrazelluläre Freisetzung der entsprechenden Nukleosid-

monophosphate nachgewiesen wurde.^[165,166] Neben dem Nachteil eines hohen experimentellen Aufwands steht diese Analyseoption aufgrund ihrer Radiotoxizität allerdings nicht für ein Monitoring bei mit HIV infizierten Menschen zur Verfügung. Damit ist sie in ihrer Anwendbarkeit beschränkt. Hervorgetan haben sich zur Quantifizierung intrazellulärer Nukleotidkonzentrationen bisher nur Verfahren, bei denen die Analyse über HPLC oder MS erfolgte.^[167] Eine Ergänzung dazu stellt die Fluoreszenzmarkierung dar, die durch ihre Vielfältigkeit in der Bioanalytik an Bedeutung gewonnen hat. Durch die Anregung mit spezifischen Wellenlängen erlauben es unnatürliche Fluorophore, das Verständnis über *in vivo* ablaufende biochemische Prozesse zu erweitern.^[168]

Die Entstehung von Fluoreszenz basiert auf der Absorption von Strahlung, wodurch ein Elektron binnen Femtosekunden von einem Schwingungszustand niedriger Energie (S_0) in einen Zustand höherer Energie (S_1) überführt wird. Die Energie des eingestrahnten Photons muss mit der Differenz der Energieniveaus korrelieren. Dabei handelt es sich überwiegend um $n \rightarrow \pi^*$ - oder $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge, weshalb es des Vorliegens von konjugierten π -Elektronensystemen bedarf. Das Elektron kann den angeregten Zustand durch Energieabgabe wieder verlassen. Die elementaren Prozesse sind in dem Jablonski-Diagramm in Abbildung 183 schematisch zusammengefasst. Die Energieabgabe erfolgt zunächst durch strahlungslose Relaxation, wobei das Elektron durch elastische Stöße, Rotation oder Schwingungen in den Grundzustand von S_1 gelangt. Um den Grundzustand zu erreichen, kann der Energieunterschied des Elektrons ebenfalls durch strahlungslose Deaktivierung (*Quenching*) ausgeglichen werden. Aus analytischer Sicht ist jedoch die Relaxation durch Lumineszenz interessanter, bei der zwei Arten zu unterscheiden sind. Zum einen kann die Energieabgabe durch Fluoreszenz erfolgen, wobei die emittierte Wellenlänge im Vergleich zur Anregungswellenlänge entsprechend dem *Stokes Shift* rotverschoben ist. Zum anderen besteht die Möglichkeit einer Spiumkehr, womit das Elektron aus dem angeregten Singulettzustand (S_1) in den energieärmeren Triplettzustand (T_1) überführt wird (*intersystem crossing*). Die anschließende Abgabe eines Photons nennt sich Phosphoreszenz, die ebenfalls eine Überführung in das Schwingungsniveau des Singulettzustands S_0 ermöglicht. Dieser Übergang ist spinverboten und tritt dementsprechend mit geringer Wahrscheinlichkeit auf. Somit verläuft er im Unterschied zur Fluoreszenz deutlich langsamer und ist bei der Analyse von Biomolekülen nicht von Relevanz.^[169]

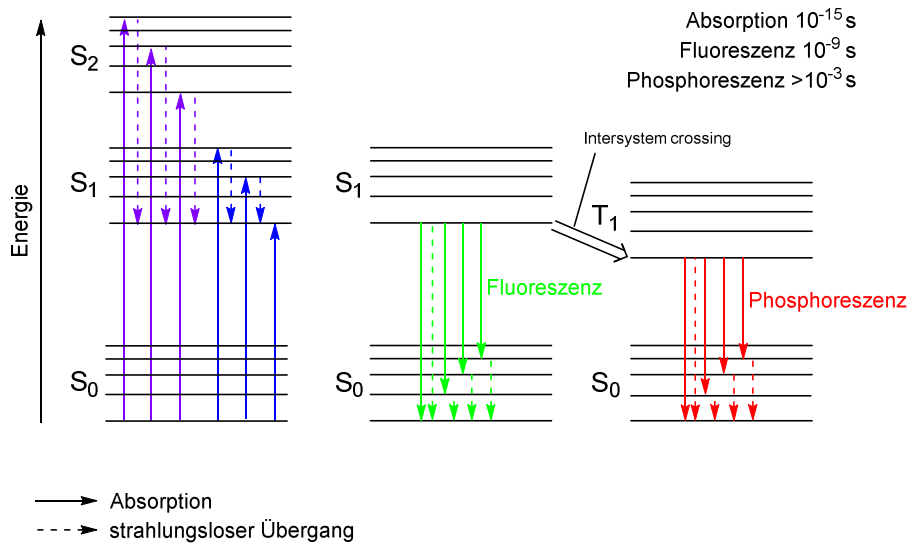


Abb. 183: Jablonski-Diagramm (bearbeitet nach Lit. [170]). S_0 : Singulettgrundzustand, S_x : x-ter angeregter Singulettzustand; T_1 : erster angeregter Triplettzustand.

Die Grundvoraussetzung für den Einsatz eines Fluorophors, um *in vivo* biochemische Prozesse verfolgen zu können, bildet eine ausreichende Differenz der Anregungswellenlänge bezüglich der endogenen Aminosäuren wie Tryptophan (308-350 nm). Falls die Selektivität nicht gegeben sein sollte und die Versuchsbedingungen es erlauben, kann alternativ auch eine vollständige Abtrennung der Proteine erfolgen. Des Weiteren ist bei der Fluoreszenzmarkierung nur eine minimale strukturelle Veränderung des Analyten wünschenswert, damit die chemischen Eigenschaften der zu untersuchenden Verbindung vergleichbar bleiben.

Im Zusammenhang mit Nukleotiden bietet sich der Einsatz von bicyklischen Nukleosidanaloga **247** (BCNA, Abb. 184) an. Bereits kurz nach ihrer Entdeckung wurde aufgrund ihrer intrinsischen Fluoreszenz ein Nutzen bei pharmakokinetischen Studien erhofft.^[171] BCNA **247** besitzen nur geringfügig abweichende strukturelle Modifikationen im Vergleich zu Pyrimidin- oder Purinbasen und sollten sich von diesem Standpunkt her als Modellsystem für Nukleoside eignen.

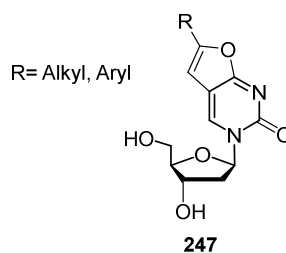


Abb. 184: Grundstruktur von BCNA **247**.

Darüber hinaus zeichnen sich einige BCNA durch eine antivirale Aktivität gegenüber dem Varizella-Zoster-Virus (VZV) aus. Das in Abbildung 185 gezeigte Cf1743 **248** gilt als der potenteste Vertreter dieser Stoffklasse und befindet sich aktuell in klinischen Studien.^[172] Die Aktivität gegen das Virus, das den Auslöser für Gürtelrose und Windpocken darstellt, ist 10.000-mal höher als die des Wirkstoffs ACV **48**, der aktuell für die Therapie von VZV eingesetzt wird. Vor allem das Prodrug FV100 **249** als 5'-O-Valinylester von Cf1743 **248** weist eine hohe Aktivität und Selektivität gegenüber VZV auf.^[173] Außerdem konnte über Zellaufnahmestudien mit HeLa-Zellen unter Verwendung von Fluoreszenzmikroskopie eine verbesserte Bioverfügbarkeit des Prodrugs **249** im Vergleich zum Nucleosid **248** festgestellt werden.^[174]

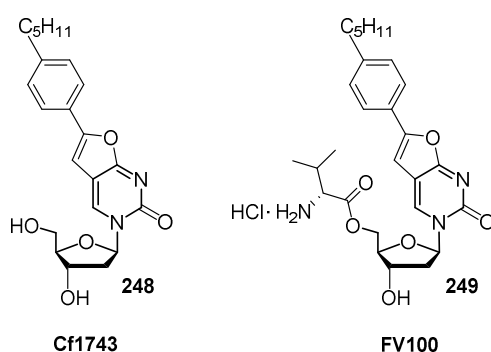


Abb. 185: Das fluoreszierende Nucleosidanalogen **248** und sein Prodrug **249**.

Interessanterweise wurde der Wirkmechanismus der BCNA **247** trotz der vielfältigen Analysemöglichkeiten bisher nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte lediglich nachgewiesen werden, dass die virale Thymidinkinase (VZV-TK) als einzig bekanntes Enzym eine Phosphorylierung des Nucleosids katalysiert und somit für die Selektivität der BCNA **247** gegenüber VZV verantwortlich ist (Abb. 186). Eine Umsetzung zum BCNAMP **250** durch andere Kinasen, wie HSV-1, HSV-2 oder der humanen TK, konnte nicht beobachtet werden. Außerdem ist die von VZV codierte TK in der Lage, eine weitere Phosphateinheit zum BCNADP **251** anzuknüpfen. Die Gegenprobe zeigte, dass bei einem Fehlen der viralen TK keine antivirale Aktivität von den BCNA **247** ausgeht. Eine Umwandlung in das Triphosphat **252** konnte aber weder die VZV-TK noch die unspezifische humane NDPK realisieren. In letzter Konsequenz wurde daher auch nicht aufgeklärt, ob die Inhibierung durch einen Einbau des BCNATPs **252** in die zelluläre oder in die virale DNA hervorgerufen wird. Da das Triphosphat **252** allerdings noch nie im Zellplasma nachgewiesen werden konnte, sind selbst Wirkmechanismen nicht auszuschließen, nach denen ein inhibitorischer Effekt durch das BCNADP **251** verursacht wird.^[172,175]

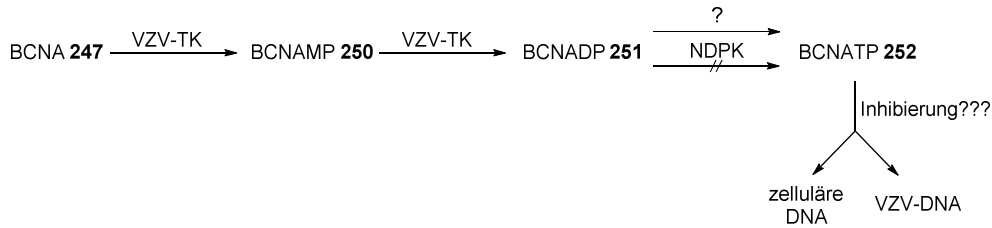


Abb. 186: Metabolismus von BCNA 247.

PERTENBREITER wollte die bicyklischen Nukleosidanaloga (Abb. 187) als Fluoreszenzsonden einsetzen, um unter anderem Erkenntnisse über *cycloSal*- und *DiPPro*-Verbindungen bezüglich ihrer Permeabilität zu gewinnen. In Voruntersuchungen wurde ein erwartungsgemäßer Verlauf der chemischen Hydrolyse (PBS, pH 7.3) der BCNA-*DiPPro*-Verbindungen, auf Basis von 2'-Desoxy- und 2',3'-Didesoxyanaloga, über das monomaskierte Intermediat festgestellt. Die Hydrolysehalbwertszeiten lagen in der gleichen Größenordnung wie die der in derselben Arbeit charakterisierten d4U- und ddU-Derivate. Dagegen traten bei der Hydrolyse in CEM/0-Zellextrakten deutliche Differenzen auf. Zwar ähnelten die Hydrolysehalbwertszeiten erneut denen der Uridinanaloga, jedoch wurde die Bildung unterschiedlicher Hydrolyseprodukte beobachtet. Während die Prodrugs des 6-Prop-2'-dBCNA die Freisetzung der Mono- sowie Diphosphatform zeigten, fand bei 6-H-ddBCNA nur der Zerfall zu undefinierbaren Produkten statt.^[99]

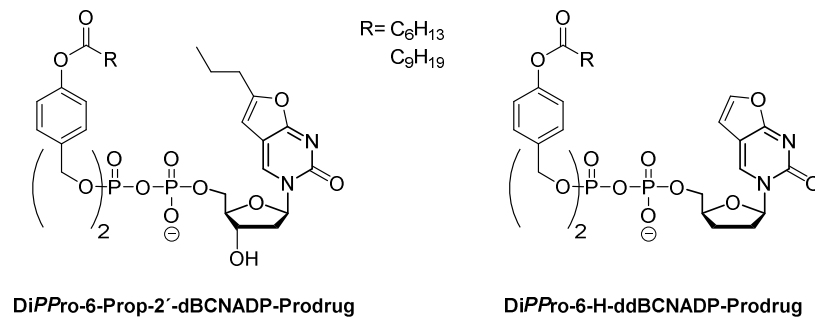


Abb. 187: Von PERTENBREITER verwendete analytische Sonden.^[99]

In Zellaufnahmestudien mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde nachgewiesen, dass die *DiPPro*-BCNA-Verbindungen die Zellmembran passierten und im Zytosol in ausreichendem Maße akkumulierten, wenngleich nur ein schwaches Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte. Das Phänomen der schwachen Intensitäten wurde sowohl auf die gerätebedingte Anregungswellenlänge von 350 nm (ideal: 335-340 nm) als auch auf ein schnelles Photobleaching der Fluorophore zurückgeführt. In der Summe verhinderten diese Faktoren verlässliche *In-vivo*-Konzentrationsbestimmungen über diese Methode. Als Alternative versuchte PERTENBREITER, die Metabolitenzusammensetzung über HPLC-MS zu ermitteln. Tatsächlich ließ sich nach der Entwicklung von universell einsetzbaren RP18- und HILIC-

HPLC-Methoden in Kombination mit ESI-MS ein phosphorylierter Metabolit in einem Zelllysate von CEM-Zellen nachweisen. Allerdings beschränkte es sich dabei auf der Grundlage der Inkubation einer DiPPPro-d4UDP-Verbindung auf das d4UMP **188**. Das gewünschte d4UDP **183** wurde dagegen nicht detektiert.^[99]

Auf dieser durch die Zellinkubationsstudien gewonnenen Expertise aufbauend sollten im Rahmen dieser Arbeit durch die Untersuchung eines TriPPPro-BCNATP-Prodrugs **73** weitere Erkenntnisse bezüglich des *In-vivo*-Verhaltens derartiger Verbindungen gewonnen werden. Im Gegensatz zu PERTENBREITER^[99] wurde die Massenspektrometrie nicht als Analysemethode verwendet, nachdem die Detektion nukleotidischer Komponenten mittels ESI-MS bei den Hydrolysestudien der d4TTP-Prodrugs nicht zuverlässig war (Kapitel 4.2). Stattdessen wurde nach einer Zellinkubation die Detektion der Hydrolyseprodukte allein über HPLC angestrebt. Das unnatürliche Absorptionsmaximum im Wellenlängenbereich von $\lambda = 320\text{-}340\text{ nm}$ sollte eine isolierte Betrachtung von BCNA-Metaboliten mittels UV- oder Fluoreszenz-Detektion gewährleisten.

4.14 Synthese eines BCNA-Triphosphat-Prodrugs

Die Darstellung eines geeigneten TriPPPro-BCNATP-Prodrugs **73** erfolgte nach dem in Abbildung 188 gezeigten Retrosyntheschema in Anlehnung an den veröffentlichten DiPPPro-Syntheseweg.^[99] Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass die finale Kupplung entsprechend der Phosphoramiditroute verlief. Als Nukleosid wurde das 6-Prop-ddBCNA **253** ausgewählt, um Nebenreaktionen bei den Phosphorylierungsschritten durch das Vorhandensein einer 3-Hydroxyfunktion zu vermeiden. Zudem hat sich das Nukleosid **253** mit einem Propylrest im Vergleich zu einer unalkylierten Nukleobase bei den DiPPPro-Verbindungen in Bezug auf das Hydrolyseverhalten als vorteilhaft herausgestellt.^[99] Das als Baustein notwendige BCNADP **254** sollte durch die Umsetzung des *cycloSal*-Triesters **255** mit Phosphatsalz zugänglich sein. Die Syntheseroute des Nukleosids **256** sollte einer von MCGUIGAN ET AL. entwickelten Prozedur zur Darstellung von 2',3'-Didesoxyanaloga der BCNA folgen.^[176] Als Schlüsselschritt bei dieser Synthese fungiert die Sonogashira-Kupplung des an der 5-Position iodierten ddUs **257** mit einem geeigneten Alkin sowie eine anschließende kupfervermittelte 5-*endo-dig*-Zyklisierung. Das 2',3'-Dideoxy-5-ioduridin **257** sollte ausgehend von ddU **41**, dessen Synthese bereits in Kapitel 4.5.2.5 vorgestellt wurde, erhalten werden.

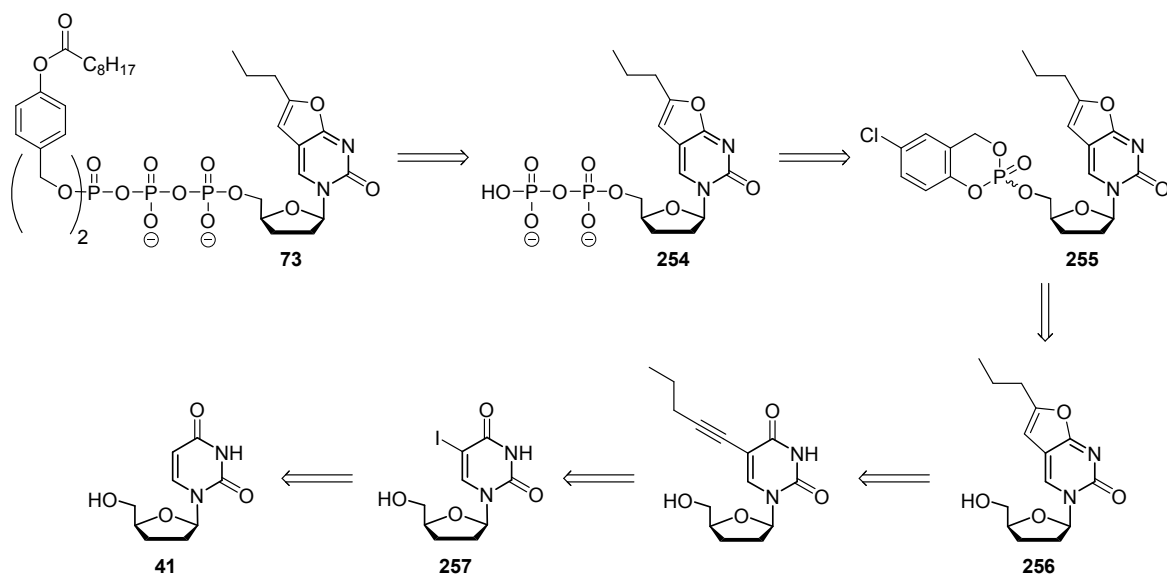


Abb. 188: Retrosyntheseschema zur Darstellung des TriPPPro-BCNATP-Prodrugs **73**.

Die Iodierung von ddU **41** erfolgte in der Arbeitsgruppe in der Vergangenheit in Anlehnung an die von MCGUIGAN ET AL. beschriebene Möglichkeit der Umsetzung mit Iodmonochlorid (ICI).^[176] Zwar überzeugte diese elektrophile aromatische Substitutionsreaktion durch gute und selektive Umsatzzraten, dafür stellte sich die Aufarbeitung des Rohprodukts vor allem bei größeren Ansätzen als problematisch heraus. Aus diesem Grund wurde die Vorschrift von HUNTER ET AL. auf seinen praktischen Nutzen im Grammmaßstab überprüft.^[177] Zur Iodierung der Uridinbase in 5-Position wurde dafür das Nucleosid ddU **41** in Essigsäure gelöst und mit 0.5 Äquivalenten Ammoniumcer(IV)-nitrat sowie 0.7 Äquivalenten Iod zur Reaktion gebracht (Abb. 189). Bereits nach 45 Minuten bei 80 °C konnte dünnschichtchromatographisch kein Edukt **41** mehr detektiert werden. Die Aufarbeitung des Rohprodukts wurde säulenchromatographisch durchgeführt, wodurch das Produkt **258** in einer Ausbeute von 47% isoliert wurde. Im Gegensatz zur Iodierungsmethode mit Iodmonochlorid stellte sich die beschriebene Synthese folglich auch für größere Ansätze als praktikabel heraus. Allerdings erscheint bei einer Ausbeute von 73% für kleinere Ansätze die Verwendung des Iodierungsreagenzes Iodmonochlorid von Vorteil.^[99]

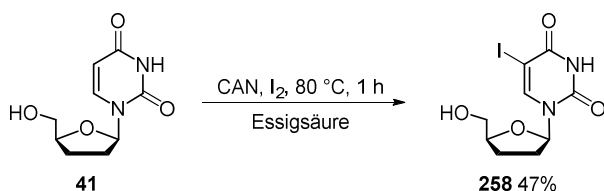


Abb. 189: Darstellung von 2',3'-Dideoxy-5-ioduridin **258**.

Es schlossen sich in einer Eintopfreaktion die Sonogashira-Kupplung gefolgt von einer Zyklisierung an (Abb. 190). Bei der Kreuzkupplungsreaktion mit Pent-1-in diente Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium(0) als Katalysator sowie Kupfer(I)-iodid als Co-Katalysator zur Aktivierung des Alkyls. Der Ringschluss zum 6-Prop-ddBCNA **256** erfolgte gemäß den Baldwin-Regeln über eine basenkatalysierte *5-endo-dig*-Zyklisierung.^[178] Hierbei steht das Präfix für die Ringgröße, die Kennzeichnung *endo* berücksichtigt, dass sich die zum Ringschluss gespaltene Bindung innerhalb des Ringsystems befindet, und *dig* beschreibt die Hybridisierung (*dig* von diagonal= linear= sp-hybridisiert) des angegriffenen Zentrums. Die Reaktionslösung wurde dafür mit weiteren 0.4 Äquivalenten Kupfer(I)-iodid sowie einem großen Überschuss an Triethylamin (30 Äquiv.) versetzt und bei 90 °C für 18 Stunden gerührt. Das BCNA-Derivat **256** wurde nach Säulenchromatographie in einer guten Ausbeute von 67% (51%^[99]) über zwei Stufen erhalten. Dabei zeigte sich im Zuge der dünnschichtchromatographischen Kontrolle mittels UV-Detektion die charakteristische blaue Fluoreszenz.

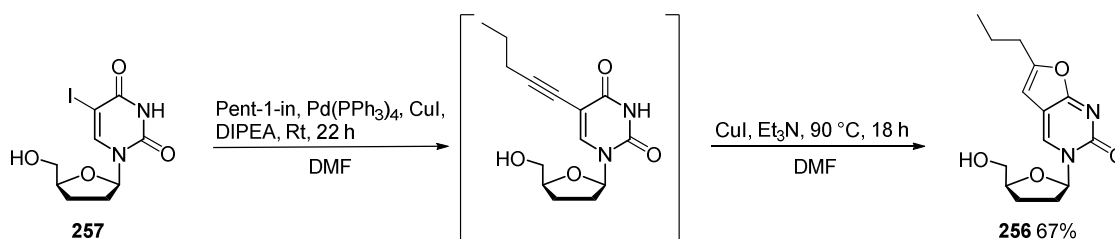


Abb. 190: Darstellung von 6-Prop-ddBCNA **256**.

Die Synthese von TriPPPro-Verbindungen über die Phosphoramiditroute wurde bereits ausführlich diskutiert (Kapitel 4.1), weshalb auf eine detaillierte Beschreibung der Darstellung des *cycloSal*-Triesters **255** und Nukleosiddiphosphats **254** an dieser Stelle verzichtet wird (Abb. 191). Erwähnenswert ist der sich erneut als sehr vorteilhaft auswirkende Einsatz von destilliertem 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93**, wodurch der Phosphattriester **255** schon durch Extraktion des Rohprodukts mit Dichlormethan/Ammoniumacetat (1 M) in hoher Reinheit vorlag und folglich auf eine chromatographische Reinigung verzichtet werden konnte.

Die Aufarbeitung des BCNADPs **254** war dagegen mit Schwierigkeiten verbunden. So führte erst der Einsatz verschiedener Ionenaustauscher in Kombination mit mehreren RP18-Chromatographieläufen zu einer Isolierung des gewünschten Produkts **254**, was sich auch negativ auf die Ausbeute von nur 17% auswirkte.

Gleichermaßen gestaltete sich, zuzüglich eines nicht vollständigen Umsatzes des Edukts **255** bei der DCI-vermittelten Kupplungsreaktion mit dem Phosphoramidit **75e**, die chromatographische Reinigung der TriPPPro-Verbindung **73** als problematisch. Dieser Umstand schien lediglich dem bereits mehrfach eingesetzten RP18-Silicagel geschuldet,

sodass die Zielverbindung trotz eines vollständigen Ionenaustauschs an Dowex-NH₄⁺ mit 1.5 Tetra-*n*-butylammoniumgegenionen eluierte. Das daraus resultierende Tailing führte zur Bildung großer Mengen von mit dem Phosphatdiester **109e** verunreinigten Mischfraktionen. Diese fanden bei der Bestimmung der Ausbeute von 25% keine Berücksichtigung. Ausgehend von dem Nucleosid **256** wäre unter Anwendung der H-Phosphonatmethode eine höhere Gesamtausbeute wahrscheinlich, weshalb diese Alternative in Zukunft für die Darstellung weiterer fluoreszierender TriPPP_{ro}-NTP-Verbindungen untersucht werden sollte.

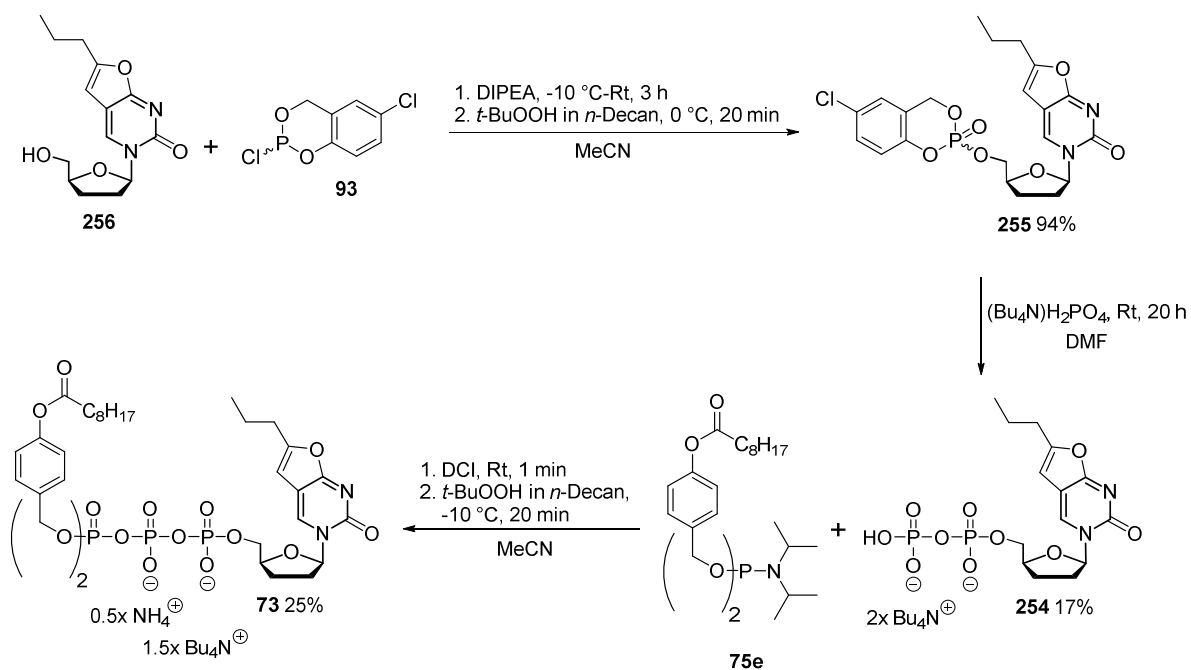


Abb. 191: Darstellung des TriPPP_{ro}-BCNATP-Prodrugs **73**.

Das ¹H- und ³¹P-NMR-Spektrum in den Abbildungen 192 und 193 belegen die erfolgreiche Darstellung des TriPPP_{ro}-BCNATP-Prodrugs **73**, das somit sowohl für Hydrolyse- als auch Zellaufnahmestudien zur Verfügung stand.

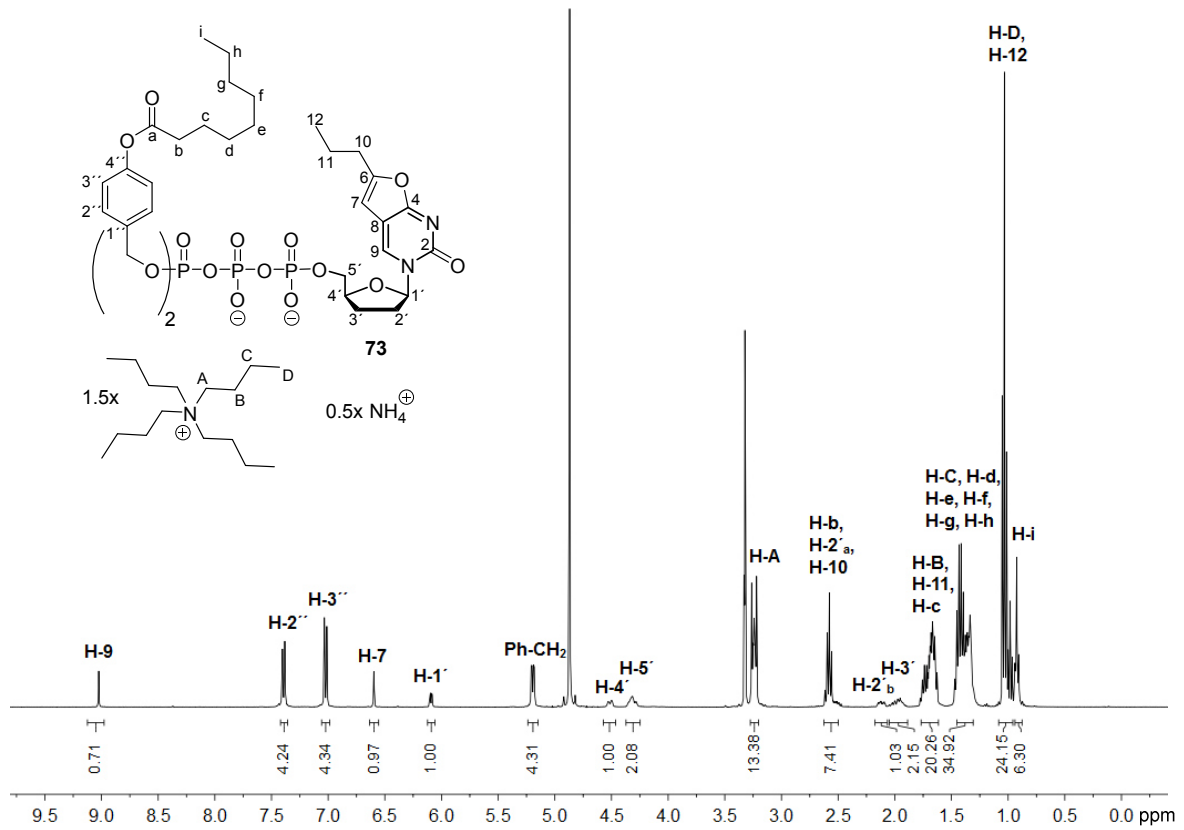


Abb. 192: ¹H-NMR-Spektrum des TriPPPPro-BCNATP-Prodrugs **73** (MeOD-*d*₄, 400 MHz).

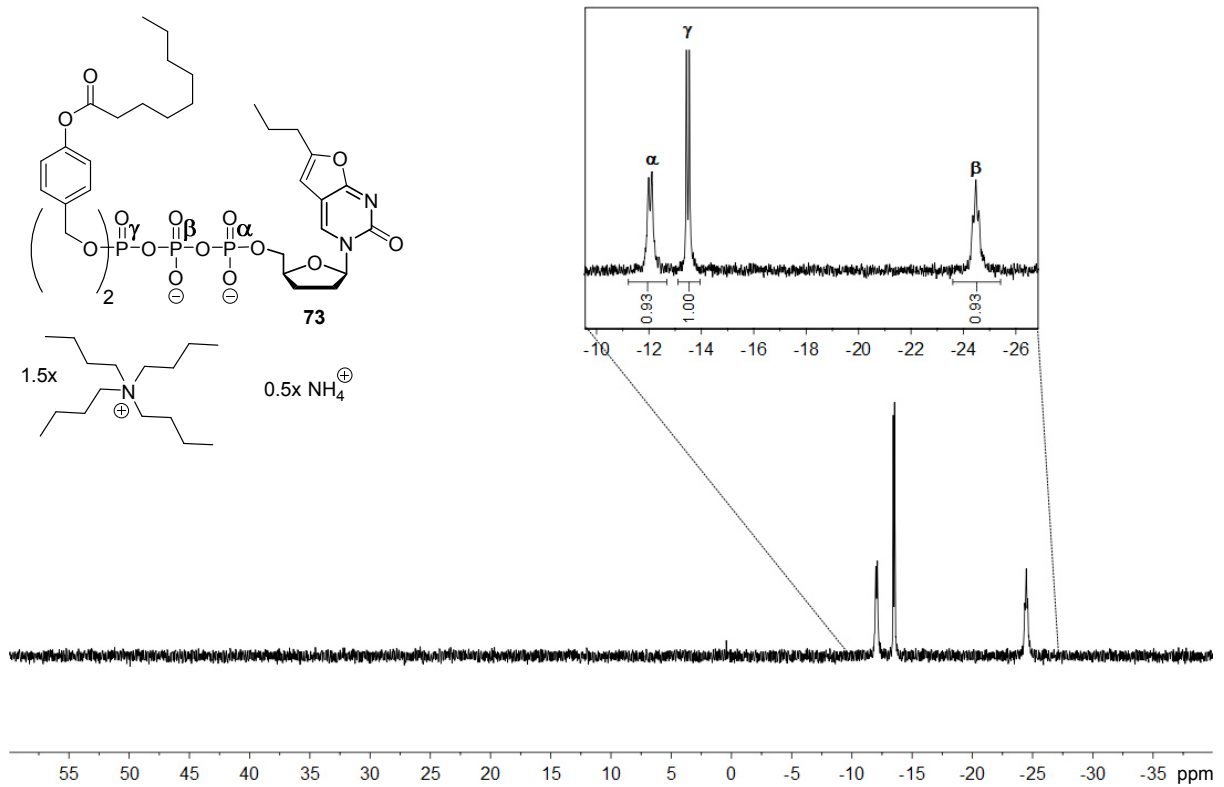


Abb. 193: ³¹P-NMR-Spektrum des TriPPPPro-BCNATP-Prodrugs **73** (MeOD-*d*₄, 162 MHz).

4.15 Synthese von BCNAMP und BCNATP

Um bei den bevorstehenden Studien des BCNA-Triphosphat-Prodrugs **73** Referenzverbindungen vorliegen zu haben, wurden in Ergänzung zu dem bereits als Synthesebaustein notwendigen BCNADP **254** die weiteren potenziellen phosphathaltigen Metabolite synthetisiert. Über die basische Hydrolyse des *cyclo*Sal-Triesters **255** gelang die Darstellung des BCNAMPs **258** (Abb. 194). Als Hydrolyselösung wurde ein Acetonitril/Wasser/Triethylamin-Gemisch (2:2:1 v/v/v) verwendet, wodurch das Nukleotid **258** in einer Ausbeute von 44% als Triethylammoniumsalz gewonnen wurde. Neben der Bildung des BCNAMPs **258** war auch die Bildung signifikanter Mengen von falsch geöffnetem Phosphatdiester **260** zu beobachten. Eine Quantifizierung wurde allerdings nicht vorgenommen.

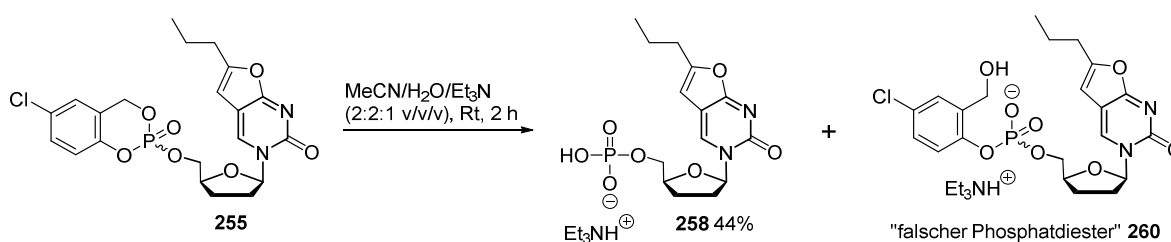


Abb. 194: Darstellung des BCNAMPs **258**.

Ebenfalls ausgehend von dem *cyclo*Sal-Triester **255** wurde nach dem literaturbekannten Syntheseprotokoll^[97] durch einen nukleophilen Angriff von Pyrophosphatsalz das BCNATP **259** in einer 44%igen Ausbeute erhalten, wenngleich auch in diesem Fall die Bildung großer Mengen des falsch geöffneten Phosphatdiesters **260** nachgewiesen wurde. Um die Abtrennung des im Überschuss eingesetzten Nucleophils zu erleichtern, erschien der Einschub eines Ionenaustauschs an Dowex-NH₄⁺ während der Aufarbeitung durchaus ratsam. Dadurch war die Isolation der Zielverbindung **259** problemlos möglich (Abb. 195).

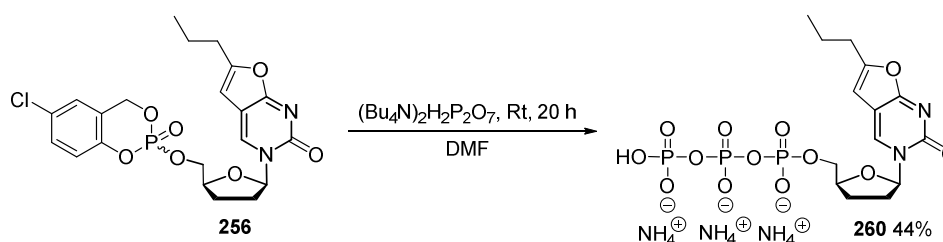


Abb. 195: Darstellung des BCNATPs **260**.

4.16 Hydrolyseverhalten des TriPPPro-BCNATP-Prodrugs **73**

Zwar war die Untersuchung der Zellaufnahme des BCNA-Prodrugs **73** vorrangig als Ziel ausgegeben, doch war gleichermaßen eine umfangreiche Analyse des *In-vitro*-Hydrolyseverhaltens notwendig. Dadurch sollte in erster Linie die Tauglichkeit des Modellsystems

abgesichert werden. Besonders galt es, die Frage zu beantworten, ob über eine HPLC-Hydrolyseverfolgung mittels UV-Absorption eine Detektion aller BCNA-Metabolite in Zell-extrakten durchführbar ist, ohne dass es im Chromatogramm zu Überlagerungen mit zellulären Nucleosiden oder Proteinen kommt. Das UV-Spektrum des zu untersuchenden BCNA-Prodrugs **73** weist im Gegensatz zu natürlichen Nucleosiden (λ_{\max} = 260-265 nm), wie sie auch im dem verwendeten Zellextrakt vorliegen, mit λ_{\max} = 329 nm ein zu höheren Wellenlängen verschobenes Absorptionsmaximum auf (Abb. 196).

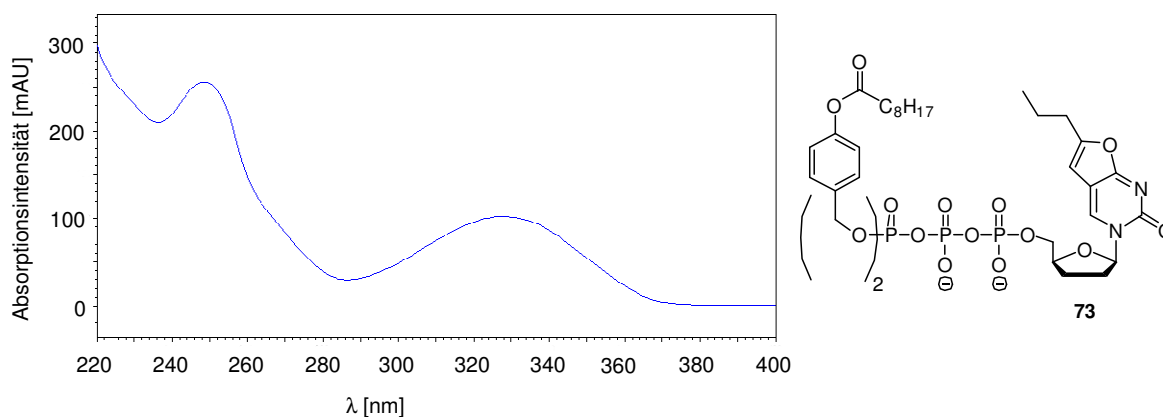


Abb. 196: Absorptionsverlauf des BCNA-Prodrugs **73**.

Das chemische Hydrolyseverhalten des Prodrugs **73** wurde durch Inkubation in PBS (pH 7.3) untersucht. Die dabei ermittelte erste Halbwertszeit von 45 Stunden liegt in derselben Größenordnung wie die des in Bezug auf die Maskierung vergleichbaren d4TTP-Prodrugs **56e** (Tab. 5). Im Unterschied dazu weichen die zweiten Hydrolysehalbwertszeiten um den Faktor 1.4 voneinander ab. Ein Einfluss von Modifikationen an der Nucleobase auf die Hydrolysekinetik wurde schon bei der Untersuchung der Serie verschiedener NTP-Prodrugs in Kapitel 4.6 festgestellt. Ein verglichen mit den d4TTP-Prodrugs **56** veränderter Hydrolyseverlauf konnte dagegen nicht beobachtet werden. So wurde das BCNA-Prodrug **73** zum monomaskierten Intermediat **262** umgesetzt, das wiederum zum BCNATP **253** demaskiert wurde. Dadurch stellt das BCNATP **253** den dominierenden Metaboliten bei der chemischen Hydrolyse dar.

Tab. 5: Hydrolysehalbwertszeiten des BCNATP-Prodrugs **73** im Vergleich zum d4TTP-Prodrug **56e**.

TriPPP-Pro-NTP	$t_{1/2}$ in PBS		$t_{1/2}$ in PLE	
	$t_{1/2}$ (1)	$t_{1/2}$ (2)	$t_{1/2}$ (1)	$t_{1/2}$ (2)
	[h]	[h]	[min]	[min]
d4T 56e	52	394	0.8	98
BCNA 73	45	539	1.5	86

Die Analyse im PLE-Medium ergab ebenfalls die zu erwartenden Ergebnisse (Tab. 5). Sowohl die erste als auch die zweite Hydrolysehalbwertszeit wich nur geringfügig von den kinetischen Daten des d4TTP-Prodrugs **56e** ab. Die selektive Freisetzung des BCNATPs **253** unterstreicht die erfolgreiche enzymatische Aktivierung des Prodrugs **73**.

Von hoher Relevanz bei Zellaufnahmestudien ist die Lipophilie einer Verbindung. Nur eine ausreichende Lipophilie gewährleistet eine Permeabilität über passive Diffusion. Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, erlaubt die Gegenüberstellung von Retentionszeiten an einer RP18-Säule über HPLC eine Einschätzung der Polarität. Mit 17.7 min eluiert das BCNA-Prodrug **253** etwas später als die TriPPPro-Verbindung **56e** (17.3 min) und ist folglich als die Substanz mit der höheren Lipophilie anzusehen. Die Auswirkungen auf das Diffusionsverhalten sollten bei diesen Differenzen allerdings vergleichsweise gering ausfallen.

Da keine Abweichungen bezüglich des chemisch wie enzymatisch induzierten Metabolismus vom postulierten Hydrolysemechanismus zu beobachten waren, erschien das BCNA-Prodrug **73** als Sonde für Inkubationsstudien geeignet. Zuvor sollte geklärt werden, ob bei einem für das BCNA vorliegenden Anregungsmaximum von 329 nm detektierbare Überlagerungen von Hydrolyseprodukten mit Signalen der Zellextrakte vorliegen. Dafür wurde die Verbindung **73** in CEM/0-Zellextrakten inkubiert und der Hydrolyseverlauf über HPLC (UV-Detektor) analysiert. Der gleiche Zelltyp sollte auch für die späteren Zellaufnahmestudien eingesetzt werden, womit auf diesem Wege das spätere Experiment bestmöglich simuliert wurde.

Das Chromatogramm nach einer siebenminütigen Inkubationszeit zeigt, dass die für den Wellenlängenbereich relevanten Verbindungen erfolgreich separiert und sichtbare Überlagerungen mit Zellextraktkomponenten ausgeschlossen werden können (Abb. 197). Zudem liegt die Halbwertszeit des Prodrugs **73** mit 123 Minuten in der Größenordnung des d4TTP-Prodrugs **56e** mit einer Hydrolysehalbwertszeit von 147 Minuten. Gleichzeitig gibt die Untersuchung einen sehr detaillierten Einblick in den enzymatischen Hydrolyseverlauf. Neben dem TriPPPro-BCNA-Prodrug **73** und dessen Intermediat **261** ist nach den ersten sieben Minuten lediglich das BCNATP **259** als Abbauprodukt detektierbar. Anschließend setzt zunehmend die Dephosphorylierung zum BCNADP **254** ein, dessen Anteil sich in der Folge sukzessive erhöht. Deutlich zeitversetzt erfolgt im späteren Verlauf der Hydrolyse gleichermaßen die Bildung von BCNAMP **258**. Warum die Nukleotide als Doppelpeaks eluierten, konnte nicht geklärt werden. Dennoch zeigen die Resultate, dass durch die enzymatische Hydrolyse in Zellextrakten selektiv der Triphosphatmetabolit **259** aus dem Prodrug **73** freigesetzt wird. Die vorliegenden Phosphatasen sorgen jedoch für eine schrittweise Dephosphorylierung bis zum Nukleosid **256**, wie das nach 24.5 Stunden aufgenommene Chromatogramm belegt.

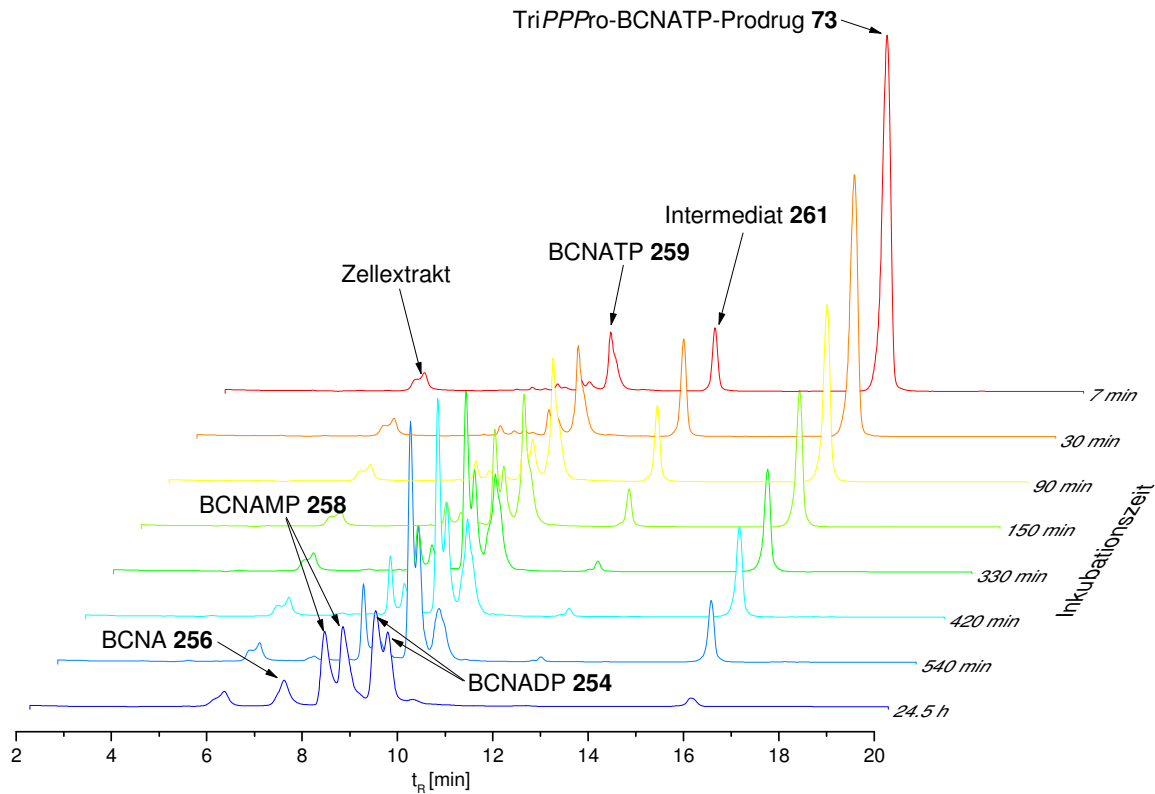


Abb. 197: Hydrolyseverlauf des BCNATP-Prodrugs **73** in CEM/0-Zellextrakten (HPLC-Methode A, 329 nm).

4.17 Zellaufnahmestudien mit dem TriPPPro-BCNATP-Prodrug **73**

Aufgrund der Hydrolysestudien (Kapitel 4.16) wurde das BCNATP-Prodrug **73** bezüglich eines Einsatzes als Sonde als geeignet eingestuft. Die Zellaufnahmestudien wurden von DR. ILONA HAUBER am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie in Hamburg, durchgeführt. Dabei wurden CEM-Zellen im Zellkulturmedium (RPMI-1640 Medium, pH 7.5, 10% fötales Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamin), das das BCNA-Prodrug **73** mit einer Konzentration von 100 μ M beinhaltete, über unterschiedlich lange Zeiträume inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach gewaschen und lysiert. Es galt, sowohl die Waschlösungen als auch die durch Zentrifugation abgetrennten Zellpellets auf BCNA-Metabolite zu untersuchen. Während die Waschlösungen der HPLC-Analyse durch einmalige Filtration gereinigt wurden, wurden die Pellets jeweils in einem Methanol/Wasser-Gemisch (2:1 v/v) aufgenommen und für zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt, auf Eis gelagert und zentrifugiert (8000 rpm). Der Überstand wurde filtriert und die Proben wurden mittels HPLC analysiert. Die über UV-Detektion erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 198 zusammengefasst.

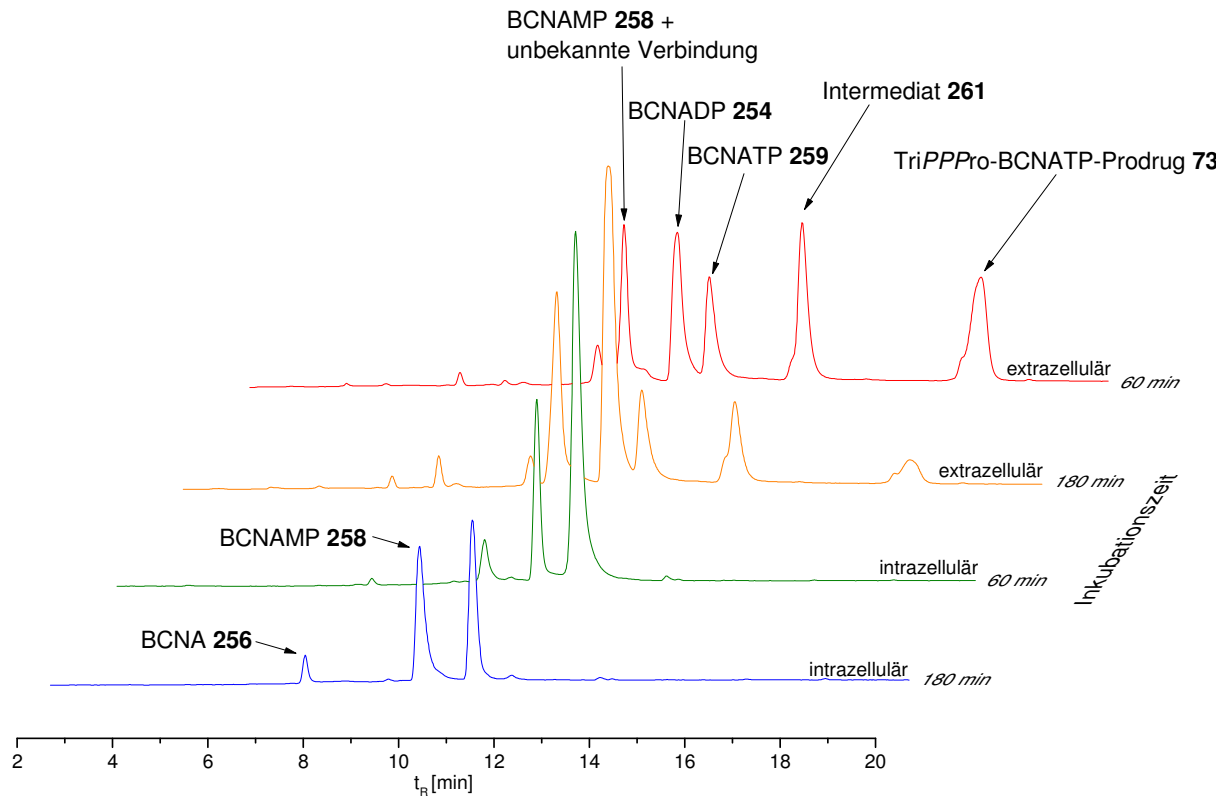


Abb. 198: Ergebnisse der Zellaufnahmestudien des BCNATP-Prodrugs **73** (HPLC-Methode A, 329 nm).

Bei Betrachtung der Waschlösungen, die den extrazellulären Zerfall des BCNA-Prodrugs **73** offenlegen, zeigt sich, dass sich schon nach 60 Minuten ein Gemisch aus allen phosphorylierten Metaboliten gebildet hat. Diese Beobachtung ist wenig überraschend, da das RPMI-Kulturmedium einen basischen pH-Wert von > 7.5 aufweist und damit sowohl eine Hydrolysekaskade nach dem postulierten Mechanismus über das Intermediat **261** zum Triphosphat **259** als auch einen Bruch der Phosphoranhydridbindungen induziert. Außerdem setzt sich RPMI-1640 aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Salzen zusammen, die sich destabilisierend auf die Anhydridbindungen auswirken können. Des Weiteren sind auch Zerfallsprozesse durch das fötale Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) nicht auszuschließen. Folglich bildet nach drei Stunden das BCNADP **254** das dominierende Hydrolyseprodukt. Erstaunlich ist die scheinbare Freisetzung großer Mengen von BCNAMP **258**. Eine Bildung von NMP in dieser Größenordnung wurde zuvor bei keiner TriPPPPro-Verbindung unabhängig vom Inkubationsmedium festgestellt. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass der Peak des BCNAMPs **258** bei einer Retentionszeit von 9.5 Minuten mit einer undefinierbaren Verbindung überlagert. Dies ergab eine Analyse des entsprechenden UV-Adsorptionsspektrums. Da es sich bei der Kontamination nicht um eine nukleosidische Verbindung handelt, muss diese dem Kulturmedium zuzuordnen sein.

Im Gegensatz zum extrazellulären Zerfall ist im Zellplasma nach 60 Minuten das gewünschte BCNATP **259** als Hauptprodukt nachweisbar. Dieser Umstand hebt nicht nur die gelungene Diffusion des Prodrugs **73** durch die Zellmembran, sondern auch den erfolgreichen Verlauf des postulierten Hydrolysemechanismus hervor. Bei einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 180 Minuten tritt, korrelierend mit den Beobachtungen bei den Zellextrakthydrolysen (Abb. 197, S. 203), eine Dephosphorylierung des Nukleotids **259** auf. Die Geschwindigkeit der Prozesse lässt erneut die Beteiligung von Phosphatasen vermuten. Bereits nach drei Stunden ist das BCNATP **259** nahezu vollständig zum BCNADP **254** umgewandelt worden. Dieses wird zudem zum BCNAMP **258** dephosphoryliert. Sogar die Bildung geringer Mengen von Nukleosid **256** ist festzustellen.

Um eine mögliche Generierung phosphathaltiger Metabolite, ausgehend vom BCNA-Nukleosid **256**, durch Kinasen auszuschließen, wurde das Nukleosid **256** analog mit CEM/0-Zellen inkubiert (Abb. 199).

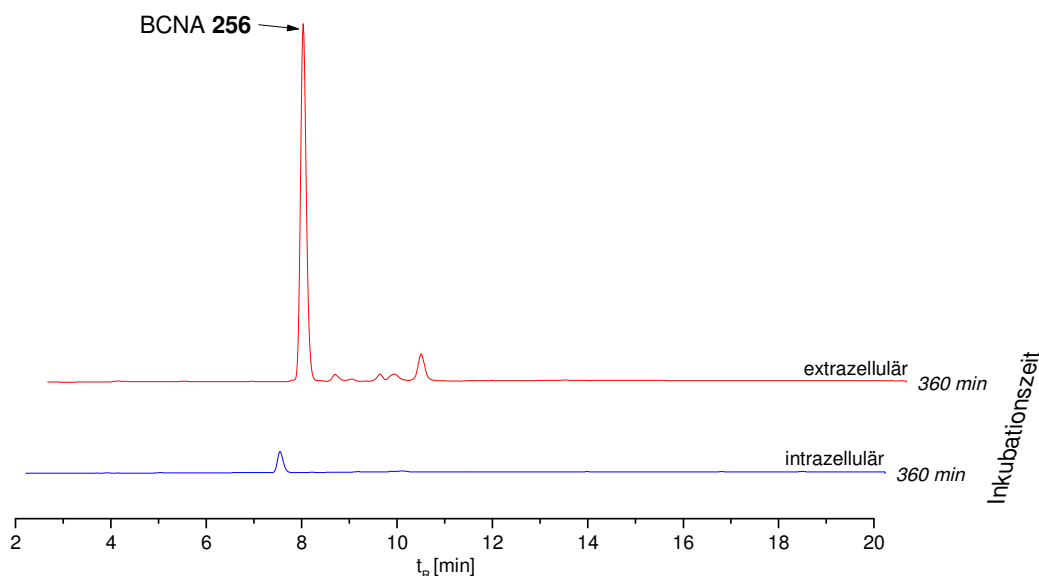


Abb. 199: Ergebnisse der Zellaufnahmestudien des BCNA-Nukleosids **256** (HPLC-Methode A, 329 nm).

Wie erwartet, kann die Verbindung **256** zwar die Zellmembran durchdringen, ein Aufbau von BCNAMP **258**, BCNADP **254** oder gar BCNATP **259** ist dagegen nicht zu erkennen. Dieses Resultat entspricht den im Zusammenhang mit BCNA publizierten Enzymstudien, nach denen nur die virale VZV-Kinase in der Lage ist, BCNA-Nukleoside zu phosphorylieren.^[172,175] Aufgrund dieser Ergebnisse könnte das TriPPP-Pro-Drugsystem auch für die Aufklärung des inhibitorischen Wirkmechanismus von BCNA von Interesse sein, da erstmals intrazellulär BCNA-Triphosphat freigesetzt werden kann.

Des Weiteren liefert auch die Gegenüberstellung der Intensitäten der einzelnen Chromatogramme relevante Resultate. Während die Summe der Peakflächen aller BCNA-Metabolite

(Abb. 198) bei den injizierten Volumina im extra- wie intrazellulären Medium in einer ähnlichen Größenordnung liegt, weichen die Integrale beim Nukleosid **256** (Abb. 199) um den Faktor 15 (extrazellulär > intrazellulär) voneinander ab. Das legt den Verdacht nahe, dass das Prodrug **73** aufgrund seiner Lipophilie deutlich besser als das BCNA-Nukleosid **256** in die Zelle aufgenommen werden kann.

Die UV-Detektion erlaubte somit eine erste Auswertung der Inkubationsstudien. Allerdings verhinderte die Überlagerung des Peaks des BCNAMPs **258** mit einer unbekannten Substanz aus dem Kulturmedium eine Bestimmung des relativen Anteils. Da sich auch die Möglichkeit der Fluoreszenzanalyse bot, konnte dieses Problem behoben werden. In Abbildung 200 ist das Wasserfalldiagramm der entsprechenden Proben dargestellt, wobei die Detektion an der HPLC über einen Fluoreszenzdetektor erfolgte.

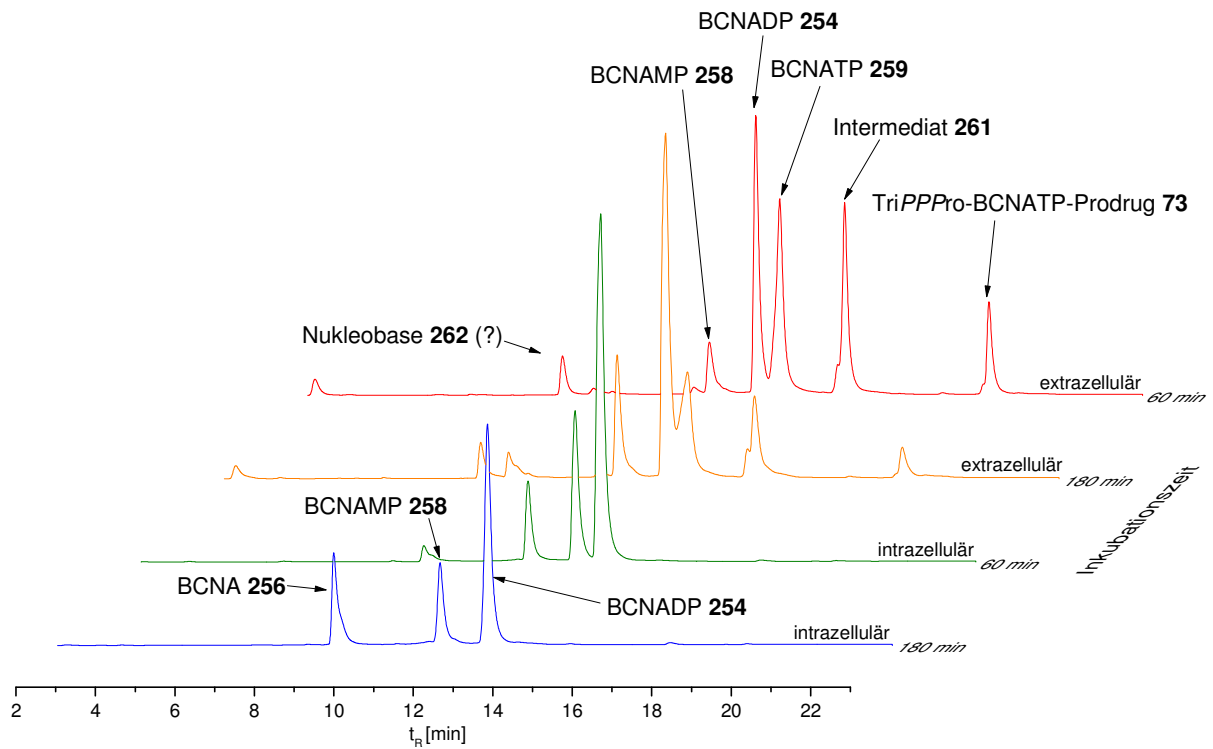


Abb. 200: Ergebnisse der Zellaufnahmestudien des BCNATP-Prodrugs **73**
(HPLC-Methode A, $\lambda_{\text{ex}} = 329 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$).

Aufgrund des fehlenden Fluorophors trägt die unbekannte Verbindung aus dem Kulturmedium nicht zur Peakbildung bei, weshalb das erhaltene Signal bei $t_R = 11.4$ Minuten allein von dem BCNAMP **258** erzeugt wird. Die Verschiebung der Retentionszeiten im Vergleich zu den erhaltenen Werten der UV-Detektion ist auf den Einsatz eines anderen HPLC-Geräts sowie einer anderen Trennsäule zurückzuführen. Somit zeigt die Fluoreszenzanalyse, dass nur eine geringe Menge von BCNAMP **258** im extrazellulären Medium gebildet wird. Diese resultiert vermutlich aus einem Bruch der Phosphoranhydridbindung zwischen dem α - und β -

Phosphat des Prodrugs **73**. Allerdings hebt die Fluoreszenzanalyse die Bildung einer weiteren fluoreszierenden Verbindung bei $t_R = 8.0$ min hervor. Möglicherweise handelt es sich dabei um die Nukleobase **262**, die aus dem Bruch der glykosidischen Bindung resultiert. Neben der beschriebenen verbesserten Quantifizierung bietet die Fluoreszenzdetektion für zukünftige Untersuchungen einen weiteren Vorteil. Mit einer im Zellkulturmedium vorhandenen TriPPPPro-BCNATP-Prodrugkonzentration von $100 \mu\text{M}$ ist der mittlere Zytotoxizitätswert für TriPPPPro-d4TTP-Prodrugs von $45 \mu\text{M}$ mehr als das Doppelte überschritten (Kapitel 4.3). Toxische Nebenwirkungen, die sich negativ auf das Diffusionsverhalten und die zellulären Enzyme auswirken, sind damit nicht ausgeschlossen. Durch die im Vergleich zur UV-Detektion sensitivere Fluoreszenzanalyse sollte eine Inkubation mit niedrigeren Prodrugkonzentrationen durchführbar sein. Folglich könnte dadurch das Risiko von toxisch bedingten Einflüssen auf die Zellaufnahme minimiert werden.

Des Weiteren galt es, den raschen extrazellulären Zerfall des Prodrugs genauer zu betrachten. Dafür wurden sowohl das BCNATP-Prodrug **73** als auch zur Gegenüberstellung das d4TTP-Prodrug **56e** in RPMI-1640-Medium (pH 7.5) inkubiert und die Hydrolyse zeitlich verfolgt (Abb. 201).

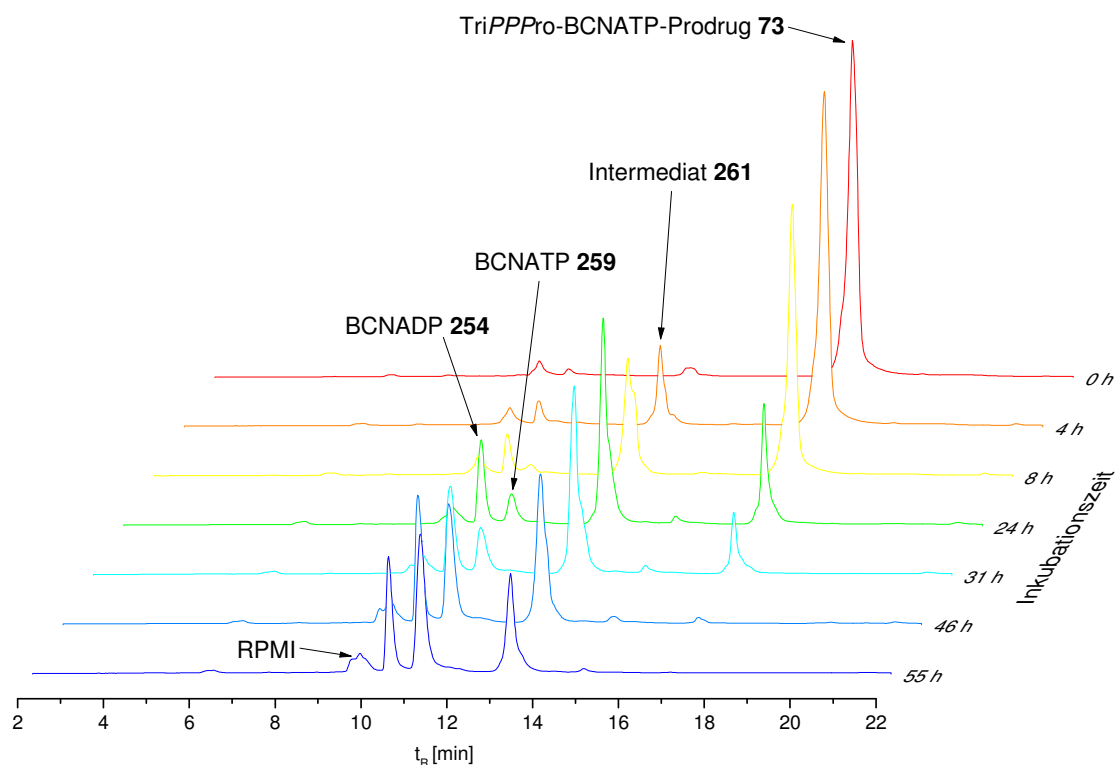


Abb. 201: Hydrolyseverlauf des BCNATP-Prodrugs **73** im RPMI-Medium (Methode A, 329 nm).

Erwartungsgemäß fand ein beschleunigter Zerfall der Prodrugs aufgrund des erhöhten pH-Werts und des hohen Anteils an zweiwertigen Erdalkalitionen im RPMI-Medium im

Vergleich zur Hydrolyse in Phosphatpuffer statt (Tab. 6). Im Fall des BCNATP-Prodrugs **73** verringerte sich die Halbwertszeit um den Faktor 3.8. Abgesehen von einer Beschleunigung der Hydrolyse sind jedoch nur geringfügige Unterschiede in der Metabolisierung zu erkennen. Somit wurde auch keine Freisetzung des BCNAMPs **258**, sondern lediglich die Bildung von BCNADP **254** und BCNATP **259** beobachtet. Ein vergleichbarer Effekt wurde ebenfalls bei der Untersuchung des d4TTP-Prodrugs **56e** im RPMI-Medium festgestellt. Neben der Verminderung der Hydrolysehalbwertszeit fand primär die Bildung von d4TDP **15** und d4TTP **16** statt.

Tab. 6: Hydrolysehalbwertszeiten des BCNATP-Prodrugs **73** und des d4TTP-Prodrugs **56e** in PBS und RPMI-Medium.

NTP-Prodrug	PBS (pH 7.3)		RPMI-1640 (pH 7.5)	
	$t_{1/2}$ (1)	$t_{1/2}$ (2)	$t_{1/2}$ (1)	$t_{1/2}$ (2)
d4T 56e	52 h	394 h	34 h	n.b.
BCNA 73	45 h	539 h	12 h	n.b.

Im Gegensatz dazu wurde bei den Zellaufnahmestudien des Prodrugs **73** im extrazellulären Medium die Freisetzung von BCNAMP **259** nachgewiesen. Dementsprechend müssen neben dem RPMI-Medium weitere Faktoren eine Rolle bei den Degradationsprozessen spielen. Mit 10% fötalem Kälberserum beinhaltet das Zellkulturmedium auch eine Komponente, die sich aus über tausend verschiedenen Substanzen, wie Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten, Hormonen, Elektrolyten und Enzymen, zusammensetzt. Das Serum dient unter anderem der Aufrechterhaltung der Permeabilität der Zellen und hat gleichzeitig einen Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften des Kulturmediums, zu denen pH-Wert, Viskosität und Osmolarität zählen.^[179] Ein destabilisierender Einfluss durch das FCS auf die Prodrugs wäre folglich möglich. Um die Auswirkung des FCSs zu untersuchen, wurde eine weitere Zellaufnahmestudie ohne den Zusatz des Serums durchgeführt. Abbildung 202 bestätigt die Notwendigkeit des Serums als Supplement in Zellkultursystemen. Das BCNA-Prodrug **73** konnte beim Vorhandensein von FCS selbst bei einer sechsständigen Inkubationszeit nur in geringen Mengen von den Zellen aufgenommen werden, wodurch die Bedeutung des Serums für die Permeabilität bekräftigt wird. Das Fehlen des FCSs scheint auch zu einer Verminderung der Enzymaktivität zu führen, da nach 360 Minuten im Zellplasma ein verglichen mit den anderen Hydrolyseprodukten relativ hoher Anteil an BCNATP **259** erkennbar war. Beim Vorliegen des Kälberserums waren intrazellulär bereits nach 180 Minuten neben BCNADP **254** als dominierendes Produkt lediglich Spuren von BCNATP **259** nachweisbar (Abb. 200, S. 206). Gleichzeitig wurde aber auch extrazellulär

ohne FCS-Zusatz die rasche Bildung verschiedener BCNA-Metabolite, inklusive BCNAMP **258**, beobachtet (Abb. 202).

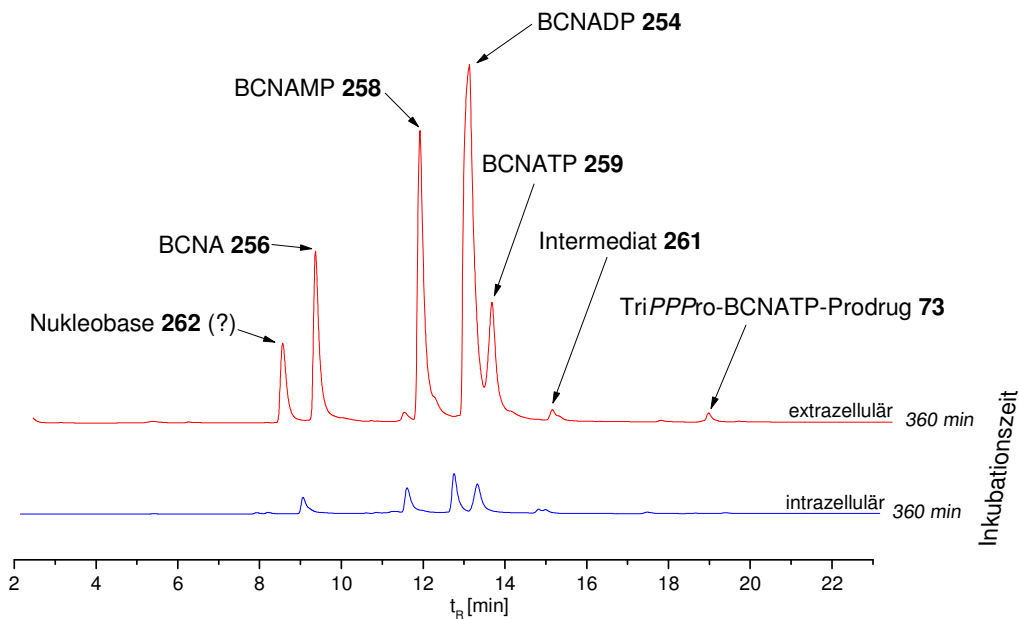


Abb. 202: Ergebnisse der Zellaufnahmestudie des BCNATP-Prodrugs **73** in Abwesenheit von fötalem Kälberserum (HPLC-Methode A, 329 nm).

Demzufolge konnten die extrazellulären Hydrolyseprozesse zwar nicht endgültig aufgeklärt werden, dennoch scheint die Summe verschiedener Zusätze im Kulturmedium, wie RPMI und FCS, eine entscheidene Rolle beim beschleunigten Zerfall der Prodrugs einzunehmen.

4.18 Antivirale Aktivität des TriPPPPro-BCNATP-Prodrugs **73**

Einige Vertreter der BCNA zeichnen sich durch eine hohe antivirale Aktivität gegenüber VZV aus. Die Selektivität gegen VZV beruht auf der viralen Thymidinkinase, die als einziges bekanntes Enzym die Phosphorylierung der BCNA-Nukleoside katalysiert. Durch die Bestimmung der Anti-HIV-Aktivität des BCNATP-Prodrugs **73** sollte untersucht werden, ob das BCNATP **259** auch in der Lage ist, die Reverse Transkriptase der HI-Viren zu inhibieren. Allerdings ließ sich für das BCNA-Prodrug **73** kein inhibitorischer Effekt gegen die beiden HIV-Typen feststellen, wie die Daten in Tabelle 7 belegen. Unter Voraussetzung einer intrazellulären Freisetzung des BCNATPs **259** aus dem Prodrug **73** während des Assays stellt das verwendete BCNA **256** somit in seiner Triphosphatform **259** kein Substrat für die Reverse Transkriptase dar. Eine Untersuchung der Wirkung des TriPPPPro-BCNATP-Prodrugs **73** gegen Herpes-Viren wurde nicht durchgeführt.

Tab. 7: Antivirale Aktivität des BCNATP-Prodrugs **73** gegenüber HIV-1 und HIV-2 in CEM/0- und in CEM/TK⁻-Zellextrakten.

	EC ₅₀ [μM] ^[a]		CC ₅₀ [μM] ^[b]	
	CEM/0	CEM/TK ⁻	CEM/0	CEM/0
NTP-TriPPPro	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
BCNA 73	> 10	> 10	> 10	43 ± 18

[a] 50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation. [b] 50% zytotoxische Konzentration. Die Werte wurden jeweils aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

4.19 Fazit der Synthese und Studien des TriPPPro-BCNATP-Prodrugs **73**

In diesem Kapitel wurden die Synthese und Charakterisierung des ersten intrinsisch fluoreszierenden BCNA-Triphosphat-Prodrugs **73** beschrieben. Mithilfe des unnatürlichen Absorptionsverhaltens sowie der fluoreszierenden Eigenschaften dieser Verbindung **73** wurde in Zellaufnahmestudien gezeigt, dass ausreichend lipophile TriPPPro-Verbindungen in der Lage sind, in die Zelle zu diffundieren und dort metabolisiert zu werden. Im Zellplasma konnte allein über HPLC-Analysen nach einer Stunde die gewünschte Triphosphatform als der dominierende Metabolit ausgemacht werden, der in der Folge sukzessive durch zelluläre Enzyme dephosphoryliert wurde. Damit konnte erstmalig bewiesen werden, dass das TriPPPro-Konzept auch im Zellplasma die Freisetzung von Nucleosidtriphosphaten ermöglicht.

4.20 Gesamtfazit

Das Anwendungsspektrum von Analoga natürlicher Nucleoside erstreckt sich über die Therapie einer Vielzahl von viralen Erkrankungen bis hin zum Einsatz in der Onkologie. Allerdings ist die biologische Aktivität der Verbindungen durch enzymatische Prozesse limitiert, da diese am Wirkungsort von zellulären Kinasen in ihre Triphosphatform überführt werden müssen. Die hohe Substratspezifität der beteiligten Enzyme unterbindet in den meisten Fällen eine effiziente Phosphorylierung zur bioaktiven Triphosphatspezies. Dieser Umstand bedeutet wiederum eine verminderte therapeutische Effizienz und macht hohe Dosierungen der Medikamente notwendig. Um die Wirksamkeit der Nucleosidanaloga zu erhöhen, rückt die Verabreichung von sogenannten Prodrugs, d.h. bioreversibel maskierten, phosphorylierten Wirkstoffen zunehmend in den Fokus.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das TriPPPro-Konzept als erster vielversprechender Ansatz zur Maskierung von Nucleosidtriphosphat-Prodrugs (NTP) etabliert werden. Um die generelle Anwendbarkeit des Konzepts zu demonstrieren, galt es, Triphosphat-Prodrugs mit unterschiedlichen Maskierungs- sowie Nucleosidstrukturen zu synthetisieren und hinsichtlich ihres chemischen sowie enzymatischen Hydrolyseverhaltens zu charakterisieren. Zudem

sollte die intrazelluläre Freisetzung des biologisch aktiven Triphosphatmetaboliten durch *In-vivo*-Experimente belegt werden.

Mithilfe einer für DiPPro-NDP-Prodrugs entwickelten konvergenten Syntheseroute konnte eine Serie von Nukleosidtriphosphat-Prodrugs auf Basis des Anti-HIV-Wirkstoffs d4T **3** dargestellt werden (Kapitel 4.1). Dabei wurde bei den TriPPro-d4TTP-Verbindungen **56a-k** in erster Linie die Länge der Acylreste variiert. Aber auch Prodrugs mit Carbonat- und Carbamatmodifikationen in der Maskierungseinheit waren zugänglich. Mittels HPLC-Analyse konnte gezeigt werden, dass sich die Kupplung eines säureaktivierten Phosphoramidits **75** mit einem entsprechenden Nukleosiddiphosphat **15** durch eine sehr kurze Reaktionszeit (< 1 min) auszeichnet. Durch automatisierte säulenchromatographische Reinigung gelang die Isolierung der Zielverbindungen **56a-q** in Ausbeuten von 26-70%.

Zur Aufklärung des Hydrolysemechanismus der NTP-Prodrugs wurden die potenziellen Metabolite als Vergleichssubstanzen synthetisiert. Hierbei konnte unter Verwendung der *cycloSal*-Technik der erste synthetische Zugang zu den einfachmaskierten Intermediaten **57** geschaffen werden.

Die Hydrolyseuntersuchungen in Phosphatpuffer (PBS, pH 7.3) ergaben, dass das d4TTP **16** nach dem vollständigen Abbau des Prodrugs **56** und dessen Intermediats **57** den dominierenden Metaboliten darstellt. Allerdings führte die Hydrolyse der Phosphoranhydridbindung zwischen dem β - und γ -Phosphat als Konkurrenzreaktion mit zunehmender Stabilität des Prodrugs zu einer ansteigenden Bildung von d4TDP **15**. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die chemisch induzierte Abspaltung der ersten Maskierungseinheit nicht nur über eine Spaltung der Acylesterfunktion erfolgt. Hydrolyseexperimente mit ^{18}O -markiertem Wasser zeigten, dass bei der chemischen Hydrolyse die Eliminierung der ersten Maske über eine nukleophile Substitution an der Benzylfunktion in ausgeprägtem Maße stattfindet.

Die enzymatische Aktivierung mit der isolierten Schweineleberesterase (PLE) erlaubte die selektive Freisetzung von d4TTP **16**, wobei die schnellste Umsetzung für Alkylreste mit $\text{R} = \text{C}_6\text{H}_{13}$ bzw. $\text{R} = \text{C}_8\text{H}_{17}$ beobachtet wurde. Dieser Umstand ist auf die Substratspezifität des Enzyms zurückzuführen. Dagegen erhöhten sich die Hydrolysehalbwertszeiten bei der enzymatischen Spaltung in CEM-Zellextrakten kontinuierlich mit zunehmender Kettenlänge, lagen aber dennoch signifikant niedriger als die Halbwertszeiten in PBS. Gleichzeitig konnte im Zellmedium die Freisetzung von d4TTP **16** aus TriPPro-d4TTP-Prodrugs **56** bestätigt werden, obgleich die zellulären Enzyme einen schnellen Abbau zum d4TDP **15** bewirkten.

Erwartungsgemäß korrelierte die antivirale Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 mit der Lipophilie der Prodrugs **56**. Durch eine intrazelluläre Freisetzung der höher phosphorylierten Metabolite konnten EC_{50} -Werte erreicht werden, die von einer bis zu dreimal höheren Aktivität gegen

HIV-1 und HIV-2 als d4T **3** zeugen. Ebenso war eine Abhängigkeit der antiviralen Aktivität von der Lipophilie der TriPPP-Verbindungen in TK-defizienten Zellen festzustellen, in denen d4T **3** keine antivirale Wirkung besitzt. Mit zunehmender Lipophilie zeigten die Prodrugs eine verbesserte antivirale Aktivität. Dieser Umstand lässt darauf schließen, dass die hochlipophilen Verbindungen erwartungsgemäß eher in der Lage sind, die Zellmembran zu durchdringen und anschließend in der Zelle phosphorylierte Metabolite freizusetzen.

Um eine generelle Anwendbarkeit des TriPPP-Konzepts zu demonstrieren, wurden zahlreiche NTP-Verbindungen synthetisiert, deren Nucleoside sich sowohl am Glykon als auch an der Nucleobase in der Art der Modifikation unterschieden. Unter Anwendung der Phosphoramiditroute wurden die in Abbildung 203 aufgeführten Verbindungen synthetisiert.

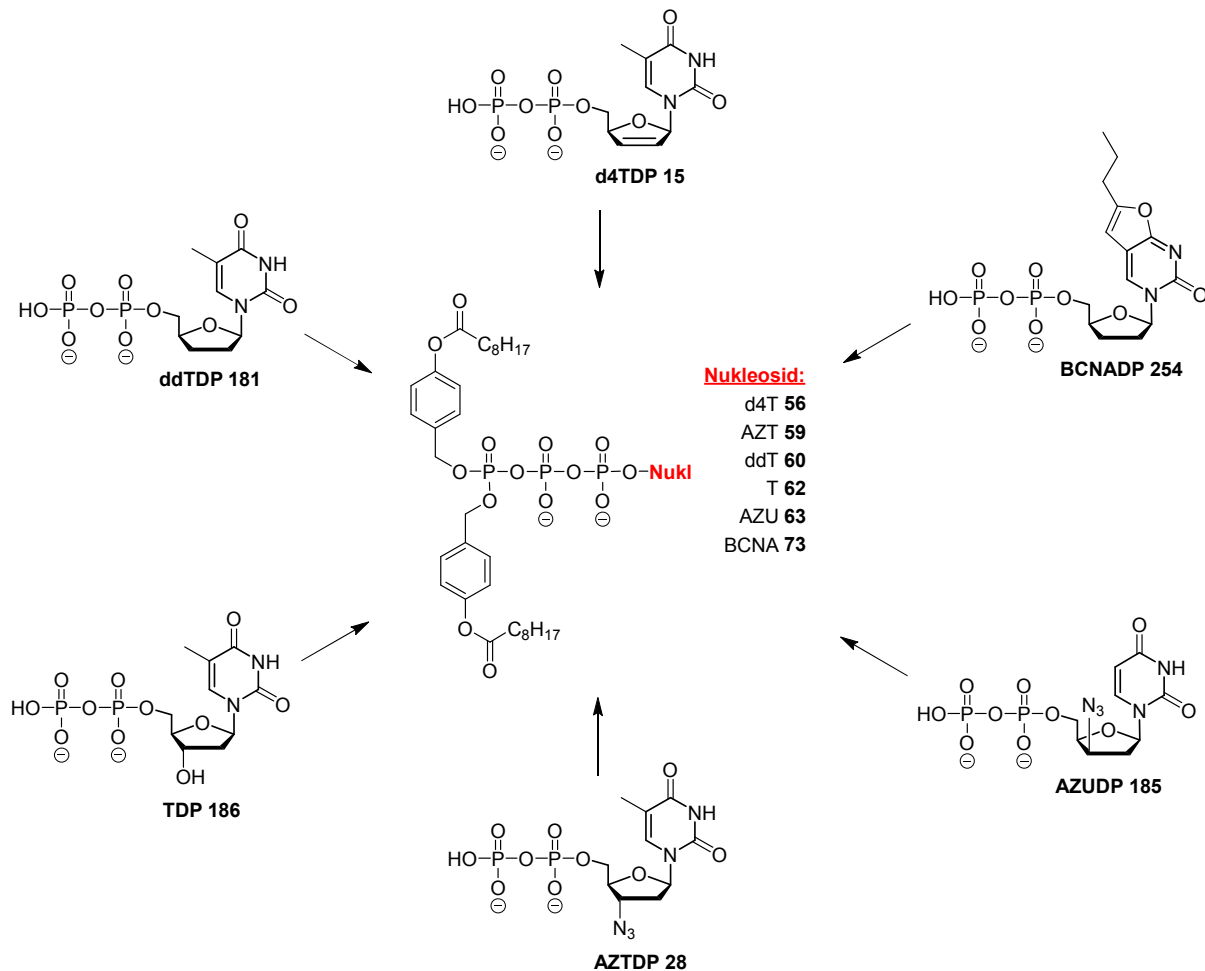


Abb. 203: Über die Phosphoramiditroute dargestellte TriPPP-NTP-Prodrugs.

Aufgrund von Komplikationen bei der Präparation und Reinigung des für die Phosphoramiditroute notwendigen NDP-Bausteins wurde ein alternativer Syntheseweg ausgearbeitet, der lediglich den Aufbau der Nucleosidmonophosphate (NMP) benötigt (Kapitel 4.5). Das dafür verwendete *P,P*-Bis(4-alkanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **198** als Kupplungsreagenz war

ausgehend von einem entsprechenden H-Phosphonat über oxidative Chlorierung mit anschließender Phosphorylierung und einer spezifischen Extraktionsmethode in quantitativer Ausbeute zugänglich. Eine Aktivierung des DP-Reagenzes **198** und eine Kupplung mit einem passenden NMP ermöglichte die Darstellung einer Vielzahl von TriPPPPro-Verbindungen in Ausbeuten von überwiegend 31-47% (Abb. 204).

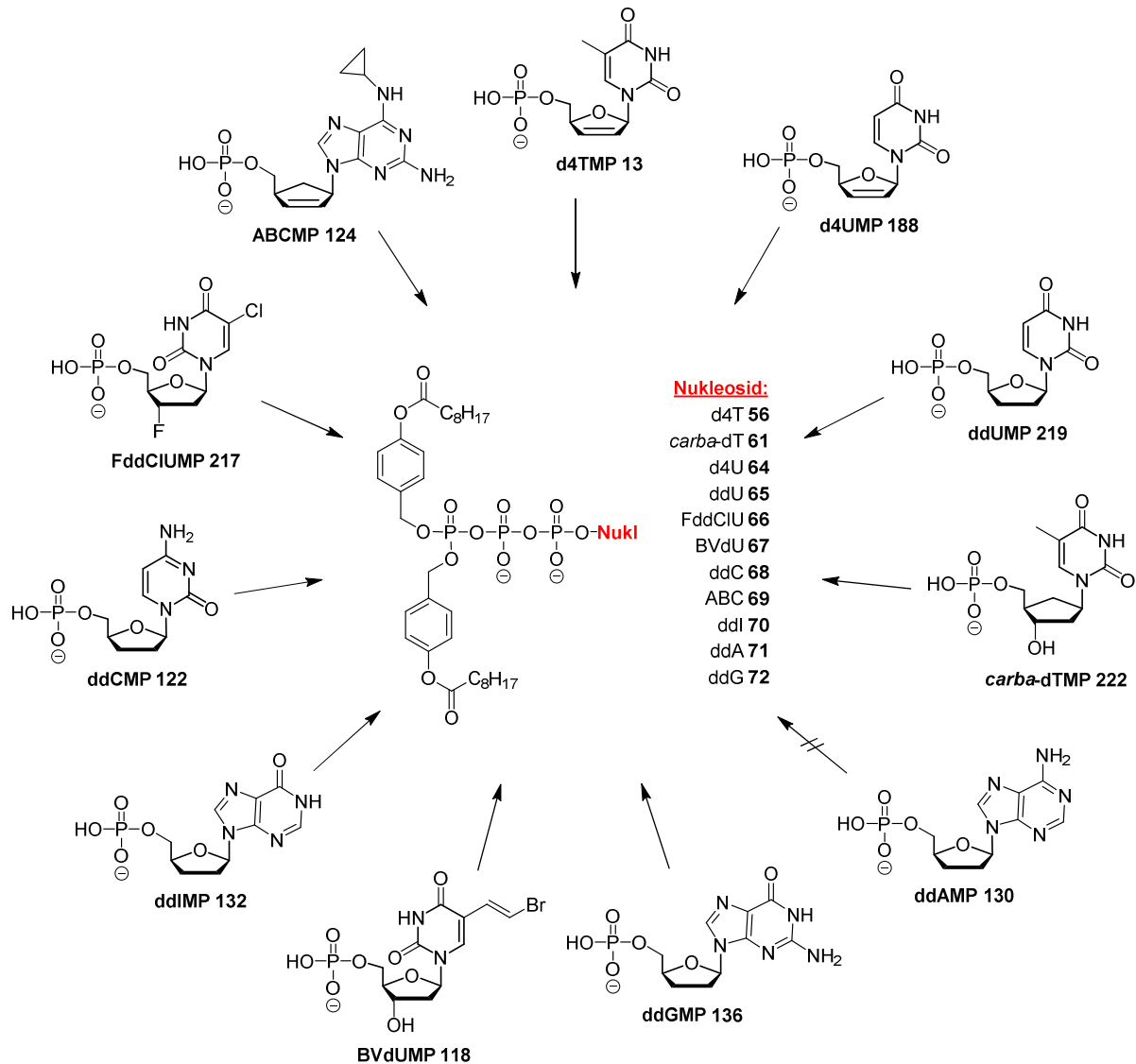


Abb. 204: Über die H-Phosphonatroute dargestellte TriPPPPro-NTP-Prodrugs.

Wenngleich der chemisch induzierte Hydrolyseverlauf in PBS nicht immer gänzlich aufgeklärt werden konnte, zeigten sich die TriPPPPro-Verbindungen bei der enzymatischen Aktivierung durch einen erfolgreichen Abbau zu höher phosphorylierten Metaboliten aus. Im PLE-Medium konnte allerdings beobachtet werden, dass das ABCTP-Prodrug **69** und das ddGTP-Prodrug **72** keine Substrate für das Enzym darstellen. Alle weiteren Prodrugs setzten beim Vorliegen der PLE selektiv das monomaskierte Intermediat sowie im Anschluss das jeweilige bioaktive Nucleosidtriphosphat frei. In CEM-Zell-extrakten war ebenfalls die Bildung

der Nucleosidtriphosphate festzustellen. In diesem Zusammenhang wurde erneut die schnelle enzymatisch katalysierte Dephosphorylierung der Triphosphate durch Phosphatasen deutlich, weshalb primär die entsprechenden Nucleosiddiphosphate akkumulierten.

Bezüglich der Anti-HIV-Aktivität waren bei den Prodrugs im Vergleich zum Nucleosid signifikante Verbesserungen zu erkennen. So lagen die Aktivitäten der TriPPPro-NTP-Prodrugs gegenüber HIV-1 bis zu 21-mal höher als beim Nucleosid. Des Weiteren konnten inaktive Nucleoside wie FddCIU **113** durch Anwendung des TriPPPro-Ansatzes in hochaktive Wirkstoffe umgewandelt werden.

Zudem konnte die erstmalige Darstellung eines asymmetrischen Triphosphat-Prodrugs **58** realisiert werden (Kapitel 4.9). Dabei zeigte sich bei der chemischen Hydrolyse, dass in PBS eine gleichmäßige Freisetzung der beiden potenziellen Intermediate **57a** und **57e** stattfindet. Diese Beobachtung deckt sich mit dem für symmetrische d4TTP-Prodrugs **56** beschriebenen Hydrolysemechanismus, nach dem die Spaltung der ersten Maskierungseinheit über eine Hydrolyse an der Benzylfunktion abläuft. Ebenso konnte im PLE-Medium aufgrund der Substratspezifität die bevorzugte Spaltung des Acylrests $R = C_8H_{17}$ nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde in Zellextrakten erwartungsgemäß zunächst der kürzere Acylrest mit $R = CH_3$ gespalten. Basierend auf einer nicht ausreichenden Lipophilie konnte für das asymmetrisch maskierte Prodrug **58** lediglich eine moderate antivirale Aktivität ermittelt werden.

Ein weiteres Ziel war die Verfolgung der Zellaufnahme von TriPPPro-Verbindungen, durch die die Beweisführung der intrazellulären Freisetzung der Nucleosidtriphosphate erreicht werden sollte (Kapitel 4.13). Dafür wurde eine TriPPPro-Verbindung **73** eines bizyklischen Nucleosidanalogs (BCNA) synthetisiert. Diese Verbindung **73** wies neben einem unnatürlichen UV-Absorptionsverhalten auch Autofluoreszenz auf. Diese Eigenschaften wurden zum Nachweis der Metabolite mittels HPLC genutzt. In einer Hydrolysestudie in CEM/0-Zell-extrakt wurde der fortschreitende enzymkatalysierte Abbau des zuvor aus dem Prodrug **73** freigesetzten Triphosphats **259** beobachtet. Das gleiche Phänomen trat auch in der Zellaufnahmestudie auf. In dieser konnten dementsprechend einerseits die erfolgreiche Aufnahme des Prodrugs **73** und andererseits das gewünschte BCNATP **259** als dominierender Metabolit nachgewiesen werden. Dieser wurde allerdings in Analogie zu den Ergebnissen im Zellextrakt mit zunehmender Inkubationsdauer schrittweise durch Phosphatasen bis zum Nucleosid **256** dephosphoryliert.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines

5.1.1 Lösungsmittel für Chromatographie

Die für die Chromatographie eingesetzten Lösungsmittel wurden in technischer Qualität bezogen und gegebenenfalls vor ihrer Verwendung wie angegeben behandelt.

Acetonitril (MeCN, HPLC grade): Ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Dichlormethan (CH₂Cl₂): Unter Normaldruck destilliert.

Ethylacetat (EE): Unter Normaldruck destilliert.

Methanol (MeOH): Unter Normaldruck destilliert.

Petrolether 50-70 (PE): Unter Normaldruck destilliert.

Tetrahydrofuran (THF, HPLC grade): Zur Abtrennung der Stabilisatoren unter Normaldruck destilliert.

Wasser (H₂O): Als Reinstwasser (Milli-Q) eingesetzt.

5.1.2 Deuterierte Lösungsmittel

Die verwendeten deuterierten Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie, zu denen *Chloroform-d₁ (CDCl₃)*, *Deuteriumoxid (D₂O)*, *Dimethylsulfoxid-d₆ (DMSO-d₆)*, *Methanol-d₄ (MeOD-d₄)* und *Tetrahydrofuran-d₈ (THF-d₈)* zählten, wurden von Euriso-Top erworben. Nur *Aceton-d₆* wurde von der Deutero GmbH bezogen. *CDCl₃* wurde für das Vermessen hydrolyselabiler und oxidationsempfindlicher Verbindungen absolutiert. Dafür wurde das Lösungsmittel einen Tag über Phosphorpentoxid zum Sieden erhitzt und unter Inertgas destilliert. Die Lagerung erfolgte unter Inertgas und Lichtausschluss bei 3 °C über Molsieb.

5.1.3 Absolute Lösungsmittel

Für Reaktionen unter Feuchtigkeits- und/oder Sauerstoffausschluss wurden die nachstehenden Lösungsmittel wie angegeben erworben oder getrocknet:

Acetonitril (MeCN): a) Von Sigma-Aldrich (≤ 0.01% Wasser, über Molsieb) erworben.

b) Mehrere Tage über Calciumhydrid zum Rückfluss erhitzt, unter Inertgas destilliert und über Molekularsieb (3Å) gelagert.

Dichlormethan (CH₂Cl₂): Von Sigma-Aldrich (≤ 0.005% Wasser, über Molsieb) erworben.

Diethylether (Et₂O): a) Von Sigma-Aldrich (≤ 0.005% Wasser, über Molsieb) erworben.

b) Mehrere Tage über Natrium/Benzophenon zum Rückfluss erhitzt, unter Inertgas destilliert und über Molsieb (4Å) gelagert.

Ethanol (EtOH): Von Acros Organics (Extra Dry, $\leq 0.005\%$ Wasser) erworben.

N,N-Dimethylformamid (DMF): Von Acros Organics (Extra Dry, $\leq 0.005\%$ Wasser, über Molsieb) erworben.

Methanol (MeOH): Von Acros Organics (Extra Dry, $\leq 0.005\%$ Wasser, über Molsieb) erworben.

Pyridin: Von Sigma-Aldrich ($\leq 0.005\%$ Wasser, über Molsieb) erworben.

Tetrahydrofuran (THF): Mehrere Tage über Kaliumhydroxid vorgetrocknet, drei Tage über Kalium/Benzophenon zum Rückfluss erhitzt, unter Inertgas destilliert und über Molsieb (4Å) gelagert.

Toluol: Von Acros Organics (Extra Dry, $\leq 0.005\%$ Wasser, über Molsieb) erworben.

5.1.4 Edukte und Reagenzien

Alle Edukte und Reagenzien wurden von den Firmen Acros Organics, Alfa Aesar, Fluka, Grüssing GmbH, Molekula, Sigma-Aldrich, TCI und VWR in Synthesequalität bezogen und, abgesehen von den nachstehenden Verbindungen, ohne weitere Reinigung für die Synthesen verwendet.

Diisopropylamin (DIPA)/N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA)/Triethylamin (Et₃N): Drei Tage über Calciumhydrid zum Rückfluss erhitzt, unter Inertgas destilliert und unter Lichtausschluss gelagert.

Methylimidazol: Drei Tage über Natrium getrocknet, unter Inertgas destilliert und gelagert.

Phosphor(III)chlorid (PCl₃)/Phosphorylchlorid (POCl₃): Unter Inertgas destilliert und gelagert.

Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA): Eine Stunde über Phosphorpentoxid getrocknet, unter Inertgas destilliert und gelagert.

5.1.5 Chromatographie

Automatisierte NP-/RP-Chromatographie:

Sowohl für Normal- als auch für Umkehrphasenchromatographie (RP18) wurde der automatisierte Puriflash 430 der Firma Interchim mit UV-Detektor verwendet. Für säulenchromatographische Normalphasentrennungen wurden self-packed Kartuschen bevorzugt, die mit Macherey-Nagel Kieselgel 60 M (siehe *Säulenchromatographie*) befüllt wurden. Für die RP18-Chromatographie wurden Chromabond® Flash RS40 C₁₈ ec Säulen (Macherey-Nagel) eingesetzt.

Dünnschichtchromatographie (DC):

Es wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (Macherey-Nagel Alugram® Xtra Sil G/UV₂₅₄ Nr. 818333, Schichtdicke: 0.2 mm) verwendet. Die Laufstrecke betrug 6-8 cm. Alle R_f -Werte wurden bei Kammerfüllung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe bei Wellenlängen von 254 und 366 nm. Zuckerhaltige Verbindungen ließen sich mithilfe eines Schwefelsäure-Anisaldehyd-Anfärbereagens (4-Methoxybenzaldehyd/Ethanol/Schwefelsäure/Eisessig 5/90/5/0.1 v/v/v/v) und anschließende Wärmebehandlung visualisieren. Phosphathaltige Substanzen konnten mit einer Ammoniummolybdatlösung (1 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ in 7 mL halbkonzentrierter Salpetersäure und 13 mL Wasser) und darauf folgende Befeuchtung mit einer Zinn(II)-Lösung (0.1 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 20 mL Salzsäure (0.5 M)) angefärbt werden.

Zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™):

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

Säulenchromatographie:

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

Umkehrphasenchromatographie (RP18-Chromatographie):

Für die *Reversed-Phase-Chromatography* wurde LiChrorep® RP-18 (40-63 μm) der Firma Merck als stationäre Phase verwendet.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC):

Für die analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde eine VWR-Hitachi-Anlage, Modell Elite LaChrom, eingesetzt.

Software: EZChrom Elite

Pumpe: L-2130

Autosampler: L-2200

Detektor: L-2455, Diode Array Detector (DAD)

Analytische Säulen: EC 125/3 Nukleodur 100-5 C₁₈ ec, EC 125/3 Nukleodur 100-5 C₈ ec, EC 125/4 Nukleodur HILIC (5 μm) (alle von der Firma Macherey-Nagel)

Für alle HPLC-Anwendungen wurde Acetonitril des Reinheitsgrades "HPLC grade" der Firma VWR sowie Reinstwasser (Milli-Q) zum Ansetzen der Pufferlösungen verwendet.

HPLC-Methoden:

Methode A: Von 0 min bis 20 min: TBAA-Laufpuffer (2 mM) mit einem Acetonitrilgradienten (5-80%), von 20 min bis 30 min: isokratisch (20% Laufpuffer, 80% Acetonitril), von 30 min bis 33 min: Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (80-5%), von 33 min bis 38 min: isokratisch (95% Laufpuffer, 5% Acetonitril). Flussrate: 1.0 mL/min, HPLC-Säule: Nukleodur 100-5 C₁₈ ec, UV-Detektion bei einer dem Nukleosid angepassten Wellenlänge.

Methode B: Von 0 min bis 20 min: TEAA-Laufpuffer (10 mM) mit einem Acetonitrilgradienten (5-90%), von 20 min bis 30 min: isokratisch (10% Laufpuffer, 90% Acetonitril), von 30 min bis 33 min: Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (90-5%), von 33 min bis 38 min: isokratisch (95% Laufpuffer, 5% Acetonitril). Flussrate: 1.0 mL/min, HPLC-Säule: Nukleodur 100-5 C₁₈ ec, UV-Detektion bei 265 nm.

Methode C: Von 0 min bis 25 min: TBAA-Laufpuffer (2 mM) mit einem Acetonitrilgradienten (5-80%), von 25 min bis 30 min: isokratisch (20% Laufpuffer, 80% Acetonitril), von 30 min bis 33 min: Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (80-5%), von 33 min bis 38 min: isokratisch (95% Laufpuffer, 5% Acetonitril). Flussrate: 1.0 mL/min, HPLC-Säule: Nukleodur 100-5 C₈ ec, UV-Detektion bei 265 nm.

Methode D: Von 0 min bis 8 min: isokratisch (5% NH₄Ac-Laufpuffer (10 mM), 95% Acetonitril), von 8 min bis 12 min: Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (95-70%), von 12 min bis 25 min: isokratisch (30% Laufpuffer, 70% Acetonitril), von 25 min bis 30 min: Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (70-95%), von 30 min bis 38 min: isokratisch (5% Laufpuffer, 95% Acetonitril). Flussrate: 1.0 mL/min, HPLC-Säule: Nukleodur HILIC, UV-Detektion bei 265 nm.

Methode E: Von 0 min bis 5 min: isokratisch (95% TEAA-Laufpuffer (10 mM), 5% Acetonitril), von 5 min bis 20 min: Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (5-90%), von 20 min bis 30 min: isokratisch (10% Laufpuffer, 90% Acetonitril), von 30 min bis 33 min: Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (90-5%), von 33 min bis 38 min: isokratisch (95% Laufpuffer, 5% Acetonitril). Flussrate: 1.0 mL/min, HPLC-Säule: Nukleodur 100-5 C₁₈ ec, UV-Detektion bei 265 nm.

HPLC-Laufpuffer:

TBAA-Laufpuffer (2 mM): 3000 mL Reinstwasser wurden mit 4.05 mL einer 1.5 M Lösung von Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid in Wasser (ca. 40%) versetzt und mit verdünnter Essigsäure auf einen pH-Wert von 6.3 eingestellt.

TEAA-Laufpuffer (10 mM): 3000 mL Reinstwasser wurden mit 4.16 mL Triethylamin versetzt und mit verdünnter Essigsäure auf einen pH-Wert von 6.2 eingestellt.

NH₄Ac-Laufpuffer (10 mM): 1.54 g Ammoniumacetat wurden in 2000 mL Reinstwasser gelöst und mit verdünnter Essigsäure auf einen pH-Wert von 6.5 eingestellt.

5.1.6 Spektroskopie und Spektrometrie

Kernresonanzspektroskopie (NMR):

Die bei Raumtemperatur erstellten NMR-Spektren wurden in der spektroskopischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie sowie des Instituts der Anorganischen Chemie des Departments Chemie an der Universität Hamburg aufgenommen. Hierfür wurden die folgenden Geräte genutzt: Varian Gemini 2000BB, Bruker Fourier 300, Bruker AMX 400, Bruker DRX 500 und Bruker AVIII 600.

Die chemische Verschiebung δ [ppm] wurde auf die Lösungsmittelsignale bezogen, wobei CDCl₃ auf 7.26 ppm (¹H) bzw. 77.16 ppm (¹³C), D₂O auf 4.79 ppm (¹H), DMSO-*d*₆ auf 2.50 ppm (¹H) bzw. 39.52 ppm (¹³C), MeOD-*d*₄ auf 3.31 ppm (¹H) bzw. 49.00 ppm (¹³C) und THF-*d*₈ auf 3.58 ppm (¹H) bzw. 67.57 ppm (¹³C) gesetzt wurden. Bei ¹³C-Aufnahmen in D₂O wurde keine Kalibrierung durchgeführt. Bei den ³¹P-Spektren wurden die Signale zur Kalibrierung gegen einen externen 85%igen Phosphorsäurestandard angegeben. Die Verschiebungen der ¹⁹F-NMR-Signale wurden gegen Trichlorfluormethan als externen Standard angegeben.

Infrarotspektroskopie (IR):

Die Messungen der IR-Spektren wurden an einem Alpha-P FT-IR-Spektrometer der Firma Bruker bei Raumtemperatur in einem Messbereich von 400-4000 cm⁻¹ aufgenommen. Die Verbindungen wurden als Reinsubstanzen durch abgeschwächte Totalreflexion (ATR) vermessen.

Massenspektrometrie (MS):

Die Massenspektren wurden in der massenspektrometrischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie der Universität Hamburg aufgenommen. Die EI-Massenspektren wurden an einem VG 70S EI doppelt fokussierenden Sektorfeldmassenspektrometer der Firma VG

Analytical gemessen. Die hochaufgelösten (HR: *high resolution*) ESI-Messungen im negativen wie auch positiven Modus wurden an einem Agilent 6224 ESI-TOF-Massenspektrometer der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Die MALDI-Messungen erfolgten an einem Bruker UltrafleXtreme™ MALDI-TOF-TOF-Spektrometer, wobei 9-Aminoacridin (9AA) als Matrix diente.

5.1.7 Weitere Geräte

Gefriertrocknung:

Wässrige Lösungen wurden an einer Christ Alpha 2-4 LD_{Plus} Gefriertrocknungsanlage in Kombination mit einer Drehschieberpumpe der Firma Vacuubrand lyophilisiert.

Reinstwasseranlage:

Reinstwasser (Milli-Q) wurde durch ein arium® pro UV-Reinstwassersystem der Firma Sartorius gewonnen.

pH-Messgerät:

Zum Einstellen des pH-Werts von Pufferlösungen wurde ProLab 3000 der Firma Schott eingesetzt.

Thermomixer:

Zur Inkubation der Hydrolyselösungen kam ein Thermomixer 5436 der Firma Eppendorf zum Einsatz.

Ultraschallbad:

Das Entgasen und Durchmischen von HPLC-Lösungsmitteln sowie das spezielle Behandeln von Hydrolyselösungen und Suspensionen erfolgte mit dem Ultraschallbad Sonorex RK512H der Firma Bandelin.

Zentrifugation:

Zur Abtrennung oder Verbesserung der Phasentrennung bei Extraktionen wurde eine Heraeus Biofuge Pimo R bei 8000 u/min verwendet. Zum Zentrifugieren von Volumina < 2 mL in Eppendorftubes wurde eine Heraeus Biofuge Pico bei 13000 u/min eingesetzt.

5.2 Synthesen

5.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkanoaten und 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkylcarbonaten

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.1 Äquiv. 4-Hydroxybenzylalkohol **37** in abs. THF gelöst, mit 1.0 Äquiv. abs. Triethylamin versetzt und auf 0 °C gekühlt. Im Anschluss wurden tropfenweise 1.0 Äquiv. des jeweiligen Säurechlorids **78a-k** oder Alkylchlorformiats **78l-n**, gelöst in abs. THF, hinzugegeben. Nach einer Reaktionsdauer von 1.5-2.0 Stunden wurde das Reaktionsgemisch filtriert. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und je einmal mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck schloss sich die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel an.

AAV 2 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-phenylcarbamaten

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquiv. 4-(Hydroxymethyl)-phenyl-methyl(2-(methylamino)ethyl)-carbamate **106** in abs. THF gelöst und bei 0 °C mit 1.3 Äquiv. Imidazol sowie 1.2 Äquiv. Trimethylsilylchlorid versetzt. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Lösung für zwei Stunden gerührt und im Anschluss nach dem erneuten Abkühlen auf 0 °C mit 3.1 Äquiv. abs. Triethylamin sowie 3.0 Äquiv. des entsprechenden Alkylchlorformiats zur Reaktion gebracht. Nach 1.5-stündigem Rühren bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 30 mL einer 1%ig konzentrierten Salzsäurelösung (12 M) in Ethanol. Die Reaktionsmischung wurde für eine Stunde gerührt und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel.

AAV 3 Synthese von Phosphoramiditen

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquiv. Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in abs. THF gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit einem in abs. THF gelösten Gemisch aus 2.3 Äquiv. abs. Triethylamin und 2.0-2.2 Äquiv. des entsprechenden 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkanoats, -carbonats oder -carbamats zur Reaktion gebracht. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 20 Stunden gerührt. Nach Filtration und dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt durch

zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™) oder säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

AAV 4 Synthese von Saligenylchlorphosphiten

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquiv. Salicylalkohol in abs. Diethylether gelöst, auf -20 °C gekühlt und mit 1.2 Äquiv. Phosphortrichlorid versetzt. Nach zehnmütigem Rühren wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten 2.3 Äquiv. abs. Pyridin, gelöst in abs. Diethylether, hinzugegeben. Die daraus resultierende Suspension wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere zwei Stunden gerührt. Zur quantitativen Fällung des Pyridiniumsalzes wurde der Ansatz 16 Stunden bei -20 °C gelagert. Das Salz wurde unter Schutzgas filtriert und dem Filtrat wurde im Vakuum das Lösungsmittel entzogen. Während das 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **99** ohne weitere Reinigung für die folgenden Synthesen eingesetzt wurde, wurde das Chlorderivat **93** destillativ aufbereitet.

AAV 5 Synthese von Nukleosid-5'-monophosphaten (NMP)

Variante A: SOWA und OUCHI

Es wurden 4.4 Äquiv. Phosphorylchlorid in abs. Acetonitril unter Stickstoff als Inertgas gelöst und bei 0 °C langsam mit 4.4 Äquiv. Pyridin und 2.2 Äquiv. Wasser zur Reaktion gebracht. Nach fünfminütigem Rühren erfolgte die Zugabe von 1.0 Äquiv. des entsprechenden Nukleosids. Die Reaktionslösung wurde für 4-5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, bevor durch Gießen auf Eiswasser die einstündige Hydrolyse eingeleitet wurde. Die Neutralisation der Lösung wurde über zwei Wege erreicht: Der erste Weg umfasste die Neutralisation durch Zugabe von festem Ammoniumhydrogencarbonat sowie die Chromatographie an RP18-Kieselgel mit Wasser als Eluenten. Im Anschluss wurde ein Austausch der Kationen durch Protonierung an einer Ionenaustauschersäule Dowex-H⁺ (50WX8) und eine Neutralisation mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (40% in Wasser) vollzogen. Den zweiten Weg bildete eine direkte Neutralisation mit einer Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (40% in Wasser). Die Reinigung erfolgte durch automatisierte RP18-Chromatographie mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten.

Variante B: Hydrolyse von 5-Chlor-cycloSal-Nukleosidmonophosphaten

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquiv. des entsprechenden Nukleosids in abs. Acetonitril oder abs. DMF aufgenommen und mit 1.4 Äquiv. abs. *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Sofern bei den Nukleosidanaloga neben der freien 5'-OH-Funktion weitere reaktive funktionelle Gruppen vorlagen, wurden die folgenden Reaktionsschritte bei -40 °C durchgeführt. Ansonsten wurde die Reaktion bei 0 °C durch die tropfenweise Zugabe von 1.2-1.5 Äquiv. destilliertem 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** realisiert. Nach dreistündigem

Rühren erfolgte bei 0 °C die Oxidation mit 1.4-1.5 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan). Nach 20 Minuten schloss sich das Abziehen aller flüchtigen Bestandteile im Vakuum an. Bei azidhaltigen Nucleosiden wurden 4.0 Äquiv. Oxone[®], gelöst in Wasser, als Oxidationsmittel eingesetzt. In diesen Fällen wurde die Reaktionslösung einmal mit Dichlormethan/Ammoniumacetat (1 M) extrahiert und die organische Phase unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene ungereinigte *cycloSal*-Triester wurde in einem Gemisch aus Acetonitril/Wasser/Triethylamin (2:2:1 v/v/v) aufgenommen und für zwei Stunden gerührt. Galt es außerdem, Acetyl-Schutzgruppen zu entfernen, so wurde im Anschluss zusätzlich ein Gemisch aus Methanol/Wasser/Triethylamin (7:3:1 v/v/v) hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 1-3 Tage gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und eine automatisierte RP18-Chromatographie mit Wasser als Eluenten oder einem Acetonitril/Wasser-Gradienten wurde zur Reinigung durchgeführt, sodass die Nucleotide zunächst in der Form ihrer Triethylammoniumsalze erhalten wurden. Zur Überführung in die Tetra-*n*-butylammoniumform wurden die Nucleotide über eine Ionenaustauschersäule Dowex-NH₄⁺ mit Wasser eluiert und direkt zu 2.0 Äquiv. Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid in Wasser getropft. Es schlossen sich eine Gefriertrocknung sowie eine weitere automatisierte RP18-Chromatographie mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten (5-100%, 0-70 min, Flussrate 1 mL/min) an.

AAV 6 Synthese von Nucleosid-5'-diphosphaten (NDP)

Analog der Synthesevorschrift für die Nucleosid-5'-monophosphate über die *cycloSal*-Methode wurde zunächst der 5-Cl-*cycloSal*-Triester ausgehend von den Nucleosiden dargestellt. Auf eine weitere Reinigung des Triesters oder eine Charakterisierung wurde teilweise verzichtet. Unter Stickstoff als Inertgas wurde der Triester nach einmaligem Coevaporieren mit abs. DMF in abs. DMF aufgenommen und zu einer Lösung mit 2.0-2.5 Äquiv. Mono(tetra-*n*-butylammonium)-dihydrogenphosphat, gelöst in abs. DMF, getropft. Nach 16-20 Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und einmal mit Wasser/EE extrahiert. Die wässrige Phase wurde gefriergetrocknet und das Rohprodukt in der Form seines Tetra-*n*-butylammoniumsalzes mittels Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel oder automatisierter RP18-Chromatographie mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten gereinigt. In Abhängigkeit von den verschiedenen Nucleosidanaloga kam es jedoch teilweise zu Schwierigkeiten beim Separieren der einzelnen Verbindungen, weshalb unterschiedliche Ionenaustauschchromatographien in den Reinigungsprozess integriert werden mussten. Das Produkt wurde einmal mit abs. DMF coevaporiert und über mehrere Stunden im Vakuum getrocknet.

AAV 7 Synthese von Nukleosid-5'-triphosphaten (NTP)

Die Synthese erfolgte unter Stickstoff als Inertgas ausgehend von 1.0 Äquiv. des entsprechenden 5-Cl-*cycloSal*-Nukleosidmonophosphats. Dieses wurde mit abs. DMF coevaporiert und anschließend zu 1.2 Äquiv. einer in einem Minimum an abs. DMF gelösten Bis(tetra-*n*-butylammonium)-pyrophosphatlösung getropft. Nach 20 Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand einmal mit Wasser/EE gewaschen und die wässrige Phase gefriertrocknet. Das Rohprodukt wurde in der Form seines Tetra-*n*-butylammoniumsalzes mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten an RP18-Kieselgel chromatographiert, bevor es über eine Ionenaustauschersäule Dowex-NH₄⁺ in sein Ammoniumsalz überführt und mittels automatisierter RP18-Chromatographie mit Wasser als Eluenten gereinigt wurde.

AAV 8 Synthese von DiPPro-NDP-Prodrugs

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 1.0 Äquiv. des entsprechenden Nukleosid-5'-monophosphats wurden zusammen mit 1.7-2.0 Äquiv. des jeweiligen Phosphoramidits mit abs. Acetonitril coevaporiert und zwei Stunden im Vakuum getrocknet. Nach Aufnahme in einem Minimum an abs. Acetonitril erfolgte die Aktivierung durch Zugabe von 1.3 Äquiv. 4,5-Dicyanoimidazol (0.25 M in Acetonitril). Das Reaktionsgemisch wurde nach einer einminütigen Reaktionszeit auf -10 °C gekühlt und mit 2.0 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) oxidiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels automatisierter RP18-Chromatographie mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten (5-100%, 0-45 min, Flussrate 1 mL/min) gereinigt. Die Kationen wurden durch die Verwendung einer Dowex-NH₄⁺-Säule getauscht und die Reinigung an RP18-Kieselgel wurde wiederholt.

AAV 9 Synthese von TriPPro-NTP-Prodrugs

Variante A: "Phosphoramiditrout"

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zunächst wurden 1.0 Äquiv. Nukleosid-5'-diphosphat in der Form seines Tetra-*n*-butylammoniumsalzes gemeinsam mit 1.7-2.0 Äquiv. des entsprechenden Phosphoramidits **75** mit abs. Acetonitril coevaporiert und zwei Stunden im Vakuum getrocknet. Nach Aufnahme in einem Minimum an abs. Acetonitril wurden 1.3-1.4 Äquiv. 4,5-Dicyanoimidazol (0.25 M in Acetonitril) hinzugegeben. Für die Synthese von langkettigen TriPPro-Verbindungen (R≥C₁₂H₂₅) wurde zur quantitativen Löslichkeit des entsprechenden Phosphoramidits **75** abs. THF als Lösungsmittel zugesetzt. Nach einer Minute wurde das Reaktionsgemisch auf -10 °C gekühlt und mit 2.0-2.2 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) für 20 Minuten oxidiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zeigte die HPLC-Kontrolle noch

große Mengen von unverbrauchtem Edukt, so wurde der Rückstand in abs. Acetonitril gelöst und erneut mit Phosphoramidit **75**, DCI-Lösung und *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) versetzt.

Das Rohprodukt wurde über automatisierte RP18-Chromatographie (25 g Kartusche) mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten (5-100%, 0-40 min, Flussrate 1 mL/min) oder Wasser/THF-Gradienten ($R \geq C_{14}H_{29}$; 5-80%, 0-40 min, Flussrate 1 mL/min) gereinigt. Während die langkettigen Prodrugs ($R \geq C_{14}H_{29}$) zweimal in ihrer Tetra-*n*-butylammoniumform chromatographiert wurden, wurden die übrigen Zielverbindungen im Anschluss an die erste Chromatographie durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex-NH₄⁺ in das Ammoniumsalz überführt und die RP-Chromatographie wurde wiederholt.

Variante B: "H-Phosphonatroute"

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 1.0 Äquiv. des entsprechenden *P,P*-Bis(4-alkanoyloxybenzyl)-pyrophosphats wurden in abs. Acetonitril aufgenommen, auf 0 °C gekühlt und mit einer eisgekühlten Lösung aus 4.0-5.0 Äquiv. Trifluoressigsäureanhydrid und 6.8-8.0 Äquiv. abs. Triethylamin, ebenfalls in abs. Acetonitril gelöst, umgesetzt. Nach zehn Minuten wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und mit Acetonitril coevaporiert. Der Rückstand wurde erneut in abs. Acetonitril aufgenommen und bei 0 °C mit 4.0-5.0 Äquiv. abs. Triethylamin sowie 2.4-3.0 Äquiv. 1-Methylimidazol versetzt. Die auftretende Suspension wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für zehn Minuten gerührt. Anschließend erfolgte umgehend die tropfenweise Zugabe von 0.5-0.7 Äquiv. des in abs. Acetonitril gelösten Nukleosid-5'-monophosphats. Falls das Nukleotid, wie im Fall der Analoga mit Purinbasen, kein gutes Löslichkeitsverhalten aufwies, wurden noch einige Tropfen Methanol bis zur vollständigen Löslichkeit hinzugegeben. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels HPL-Chromatographie (Methode A). Nach maximal dreistündiger Reaktionszeit wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde entsprechend Variante A säulenchromatographisch aufgearbeitet.

AAV 10 Synthese von akzeptorsubstituierten *cycloSal*-(4-Alkanoyloxybenzyl)-monophosphaten

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Um die nitrosubstituierten Derivate **97** zu erhalten, wurden 1.5-2.0 Äquiv. 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **99** in abs. Acetonitril oder abs. THF gelöst und tropfenweise zu einer auf -20 °C gekühlten Lösung aus 1.0 Äquiv. 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkanoat **76** sowie 2.0-2.2 Äquiv. *N,N*-Diisopropylethylamin in abs. Acetonitril oder abs. THF hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und mit 3.0-4.0 Äquiv. Oxone[®], gelöst in Wasser, für 15 Minuten oxidiert.

Für die Darstellung des chlosubstituierten Derivats **98** wurden 1.2 Äquiv. 5-Chloresaligenylchlorphosphit **93** mit 4-(Hydroxymethyl)-phenylalkanoat **76** und 1.3 Äquiv. *N,N*-Diisopropylethylamin in abs. Acetonitril umgesetzt. Die Oxidation erfolgte mit 1.5 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) über 20 Minuten. Im Anschluss wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wurde mit EE/Wasser gewaschen, die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck schloss sich die Reinigung durch zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie oder automatisierte Säulenchromatographie an Kieselgel an. Das Produkt wurde in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch aufgenommen und gefriergetrocknet.

AAV 11 Synthese von Mono(alkanoyloxybenzyl)-d4TTP-Prodrugs

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äquiv. d4TDP **15** mit abs. DMF coevaporiert und für zwei Stunden im Vakuum getrocknet. Im Anschluss wurden 2.0-2.5 Äquiv. des entsprechenden 5-Nitro-*cyclo*Sal-(4-alkanoyloxybenzyl)-monophosphats **97** in einem Minimum an abs. DMF oder abs. THF gelöst und tropfenweise mit dem Nukleotid, gelöst in abs. DMF, versetzt. Nach erfolgter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, das Rohprodukt einmal mit Dichlormethan/Ammoniumacetat (1 M) gewaschen und die wässrige Phase gefriergetrocknet. Es schloss sich eine erste Reinigung über automatisierte RP18-Chromatographie mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten (5-100%, 0-40 min, Flussrate 1 mL/min) an. Nach einem Kationenaustausch an Dowex-NH₄⁺ wurde das entsprechende Ammoniumsalz erneut an RP-18 Kieselgel gereinigt.

AAV 12 Synthese von *P,P*-Bis(4-alkanoyloxybenzyl)-pyrophosphaten

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zunächst wurden 1.0 Äquiv. des jeweiligen H-Phosphonats unter leichtem Erwärmen (30-40 °C) in abs. Acetonitril gelöst. Anschließend wurde das H-Phosphonat nach Zugabe von 2.0 Äquiv. *N*-Chlorsuccinimid für eine Stunde gerührt. Es folgte umgehend das Zutropfen von 2.5 Äquiv. Tetra-*n*-butylammoniumphosphatsalz, gelöst in abs. Acetonitril. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunde gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und je einmal mit kalter wässriger Ammoniumacetatlösung (1 M) und kaltem Wasser gewaschen. Zur Phasentrennung war der Einsatz einer Zentrifuge notwendig. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

AAV 13 Acetylierung von 3'-OH-Funktionen

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äquiv. des entsprechenden Nucleosids in abs. Pyridin coevaporiert und im Anschluss in abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 1.2 Äquiv. *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMSCl) wurde die Lösung für 20 Stunden gerührt, bevor 4.0-5.0 Äquiv. Essigsäureanhydrid (Ac₂O) hinzugegeben wurden. Nach fünfstündiger Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Toluol coevaporiert. Nach Aufnahme in THF und Kühlung auf 0 °C wurde das Nucleosid durch Umsetzen mit 1.5-2.0 Äquiv. Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (1 M in THF) für 1.5 Stunden desilyliert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

Allgemeine Hinweise:

a) Aufgrund einer teilweise zu gering ausfallenden Signalintensität wurde die Bestimmung der chemischen Verschiebung von quartären Kohlenstoffatomen gelegentlich über das HMBC-Experiment ermittelt. Auf explizite Hinweise wird im Folgenden allerdings verzichtet.

b) Bei Stereoisomeren (Diastereomere/Rotamere mit einem Verhältnis von 1:1) mit ähnlicher Verschiebung des gleichen Atoms im NMR-Experiment (Proton, Kohlenstoff, Phosphor) erfolgt zwar die vollständige Angabe der Signale, jedoch nur eine einmalige Zuordnung, wobei die nachstehenden Angaben zur Multiplizität sowie zur Anzahl von Atomen jeweils separat auf die Signale bezogen sind. Bsp.: 3.02, 2.90 (s, 3H, **H-b**, Rotamere)= 3.02 (s, 3H, **H-b**, rotamer **1**), 2.90 (s, 3H, **H-b**, rotamer **2**).

5.2.2 Synthese der Nukleophile und Reagenzien

Darstellung von Tetra-*n*-butylammoniumphosphat

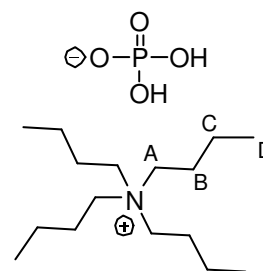
Es wurden 1.0 g (7.0 mmol) Dinatriumhydrogenphosphat in Wasser gelöst und durch Säulenchromatographie an Ionenaustauscherharz Dowex-H⁺ (50WX8) in seine protonierte Form überführt. Das Eluat wurde mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (40% in Wasser) auf pH 3.5 eingestellt und gefriertrocknet. Der Rückstand wurde einmal mit abs. DMF covaporisiert und so lange im Wechsel zerrieben sowie im Vakuum getrocknet, bis ein feines Pulver erhalten wurde. Die Lagerung erfolgte unter Stickstoff.

Ausbeute: Es wurden 1.7 g (5.0 mmol, 71%) eines farblosen hygroskopischen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 339.46 g/mol
Summenformel: H₂O₄P⁻.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 3.22-3.18 (m, 8H, **H-A**), 1.70-1.62 (m, 8H, **H-B**), 1.35 (sext, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 8H, **H-C**), 0.95 (t, ³J_{HH}= 7.3 Hz, 12H, **H-D**).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm]= 58.1 (**C-A**), 23.1 (**C-B**), 19.0 (**C-C**), 12.8 (**C-D**).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= 0.10.



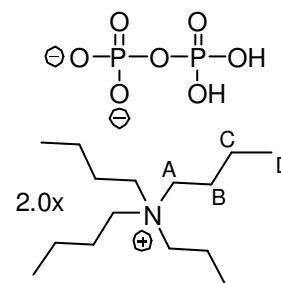
Darstellung von Bis(tetra-*n*-butylammonium)-pyrophosphat

Es wurden 2.5 g (11 mmol) Dinatriumdihydrogenpyrophosphat in Wasser gelöst und durch Säulenchromatographie an Ionenaustauscherharz Dowex-H⁺ (50WX8) in seine protonierte Form überführt. Das Eluat wurde mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (40% in Wasser) auf pH 3.5 eingestellt und gefriertrocknet. Der Rückstand wurde einmal mit abs. DMF covaporisiert und so lange im Wechsel zerrieben sowie im Vakuum getrocknet, bis ein feines Pulver erhalten wurde. Die Lagerung erfolgte unter Stickstoff.

Ausbeute: Es wurden 5.4 g (8.2 mmol, 73%) eines farblosen hygroskopischen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 660.90 g/mol
Summenformel: H₂O₇P₂²⁻.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 3.27-3.17 (m, 16H, **H-A**), 1.73-1.63 (m, 16H, **H-B**), 1.39 (sext, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 16H, **H-C**), 0.98 (t, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 24H, **H-D**).

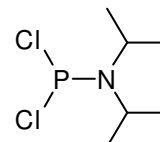
³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= -10.63 (s, 2P).



Darstellung von Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 77

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 4.0 mL (6.3 g, 46 mmol, 1.0 Äquiv.) Phosphortrichlorid in 30 mL abs. Diethylether gelöst und auf -20 °C gekühlt. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe von 14 mL (9.7 g, 96 mmol, 2.1 Äquiv.) Diisopropylamin. Die Reaktionslösung wurde auf -10 °C erwärmt und für zwei Stunden gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde unter Inertgas filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Auf eine weitere Reinigung wurde aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Produkts verzichtet.

Ausbeute: Es wurden 7.1 g (35 mmol, 77%) eines schwach gelben Öls erhalten. **Molmasse:** 202.06 g/mol **Summenformel:** C₆H₁₄Cl₂NP.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 4.00-3.86 (m, 2H, **NC-H**), 1.28 (d, ²J_{HH}= 6.8 Hz, 12H, **iPr-(CH₃)₂**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 48.2 (d, ²J_{CP}= 14.7 Hz, **N-C**), 23.4 (d, ³J_{CP}= 7.2 Hz, **iPr-(CH₃)₂**).

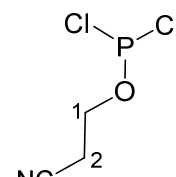
³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 169.6.

Darstellung von 2-Cyanoethyldichlorophosphit 194

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 8.8 mL (14 g, 0.10 mol, 1.0 Äquiv.) Phosphortrichlorid in 200 mL abs. THF aufgenommen, auf -70 °C gekühlt und mit 12 mL (11 g, 0.10 mol, 1.0 Äquiv.) 2,6-Lutidin versetzt. Anschließend erfolgte über einen Zeitraum von 15 Minuten die tropfenweise Zugabe von 6.8 mL (7.1 g, 0.10 mol, 1.0 Äquiv.) frisch destilliertem 3-Hydroxypropionitril. Die Reaktionslösung wurde für weitere 15 Minuten gerührt und im Anschluss unter Inertgas filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt destillativ aufgearbeitet (Hochvakuum, 80 °C Ölbadtemperatur).

Ausbeute: Es wurden 8.11 g (47.2 mmol, 47%) eines farblosen Öls erhalten.

Molmasse: 171.95 g/mol **Summenformel:** C₃H₄Cl₂NOP.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 4.42 (dt, ³J_{HP}= 7.7 Hz, ³J_{HH}= 6.3 Hz, 2H, **H-1**), 2.80 (td, ²J_{HH}= 6.8 Hz, ⁴J_{HP}= 0.7 Hz, 2H, **H-2**).

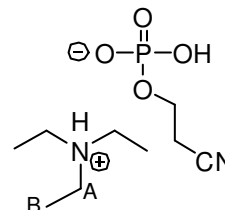
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 116.1 (**CN**), 61.8 (d, ²J_{CP}= 11.1 Hz, **C-1**), 19.5 (d, ³J_{CP}= 3.4 Hz, **C-2**).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 179.0.

Darstellung von Triethylammoniumcyanoethylphosphat

1.7 g (5.2 mmol, 1.0 Äquiv.) des kommerziell (Sigma-Aldrich) erhältlichen Bariumcyanoethylphosphat-Dihydrats wurden in 50 mL Wasser aufgenommen und auf den Ionenaustauscher Dowex-H⁺ 50WX8 aufgetragen. Nach Vermischung wurde mit Wasser als Laufmittel eluiert. Das Eluat wurde umgehend in eine auf 0 °C gekühlte Lösung aus 1.1 mL (0.80 g, 7.6 mmol, 1.5 Äquiv.) Triethylamin in 30 mL Ethanol getropft. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und gefriertrocknet.

Ausbeute: Es wurden 1.0 g (4.0 mmol, 78%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 252.25 g/mol **Summenformel:** C₃H₅NO₄P⁻.



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 4.02 (dt, ³J_{HP}= 7.3 Hz, ³J_{HH}= 6.0 Hz, 2H, **H-1**), 3.15 (q, ³J_{HH}= 6.3 Hz, 6H, **H-A**), 2.79 (td, ³J_{HH}= 6.0 Hz, ⁴J_{HP}= 0.7 Hz, 2H, **H-2**), 1.23 (t, ³J_{HH}= 7.3 Hz, 9H, **H-B**).

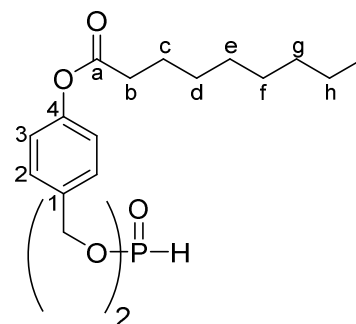
³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= -0.16.

Darstellung von Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat 200

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zunächst wurden 2.7 g (10 mmol, 2.0 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylnonanoat **76e** einmal mit abs. Pyridin coevaporiert und anschließend in 10 mL abs. Pyridin aufgenommen. Nach Zugabe von 1.0 mL (5.0 mmol, 1.0 Äquiv) Diphenylphosphonat (95%ig) wurde die Reaktionslösung für drei Stunden bei 38 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte mittels Umkristallisation aus Methanol.

Ausbeute: Es wurden 1.75 g (3.05 mmol, 61%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 574.70 g/mol

Summenformel: C₃₂H₄₇O₇P **R_f-Wert:** 0.60 (PE/EE 3:2 v/v + 0.5% HOAc) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 597.2952 [M+Na]⁺, gef.: 597.2960.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.39-7.32 (m, 4H, **H-2**), 7.11-7.05 (m, 4H, **H-3**), 6.94 (d, ¹J_{HP}= 708.0 Hz, 1H, **PH**), 5.11-4.97 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 4H, **H-b**), 1.75 (quint, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 4H, **H-c**), 1.47-1.21 (m, 20H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.89 (t, ³J_{HH}= 6.9 Hz, 6H, **H-i**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 172.3 (**C-a**), 151.1 (**C-4**), 133.1 (d, $^3J_{\text{CP}}= 6.2$ Hz, **C-1**), 129.4 (**C-2**), 122.1 (**C-3**), 66.8 (d, $^2J_{\text{CP}}= 5.8$ Hz, **Ph-CH₂**), 34.5 (**C-b**), 31.9, 29.4, 29.3, 29.3, 22.8 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 25.1 (**C-c**), 14.2 (**C-i**).

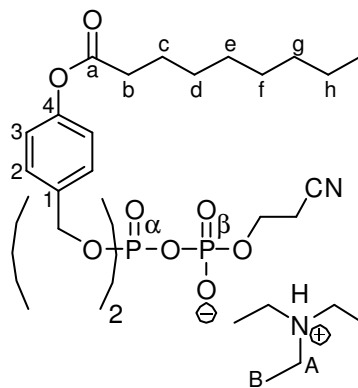
$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 7.68.

IR: ν [cm^{-1}]= 2956, 2918, 2849, 1749, 1607, 1510, 1468, 1411, 1382, 1302, 1251, 1238, 1218, 1167, 1119, 996, 925, 769, 721, 693, 540, 414, 446, 423, 409.

Darstellung von Triethylammonium- P^1, P^1 -bis(4-nonanoyloxybenzyl)- P^2 -2-cyanoethylpyrophosphat **208**

Die Reaktion wurde in Analogie zu der **AAV 12** durchgeführt. Es wurden 0.15 g (0.26 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **200** in 3.0 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 70 mg (0.52 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid sowie 0.20 g (0.78 mmol, 3.0 Äquiv.) Triethylammoniumcyanoethylphosphat, gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, versetzt.

Ausbeute: Es wurden 0.18 g (0.22 mmol, 85%) eines rötlichen Öls erhalten. **Molmasse:** 824.93 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{NO}_{11}\text{P}_2^-$ **HRMS (ESI⁺):** $m/z=$ ber.: 746.2757 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, gef.: 746.2837.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 7.43-7.36 (m, 4H, **H-2**), 7.07-7.01 (m, 4H, **H-3**), 5.12 (dd, $^3J_{\text{HP}}= 7.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 2.4$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.13 (dt, $^3J_{\text{HP}}= 8.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 6.3$ Hz, 2H, **H-5**), 3.08-2.97 (m, 6H, **H-A**), 2.67 (t, $^3J_{\text{HH}}= 6.3$ Hz, 2H, **H-6**), 2.54 (t, $^3J_{\text{HH}}= 6.3$ Hz, 4H, **H-b**), 1.74 (quint, $^3J_{\text{HH}}= 7.5$ Hz, 4H, **H-c**), 1.45-1.23 (m, 29H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-B**), 0.89 (t, $^3J_{\text{HH}}= 6.8$ Hz, 6H, **H-i**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= -12.13 (d, $^2J_{\text{PP}}= 17.8$ Hz, **P- α**), -12.58 (d, $^2J_{\text{PP}}= 17.8$ Hz, **P- β**).

Darstellung von Tetra-*n*-butylammonium- P, P -bis(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **198**

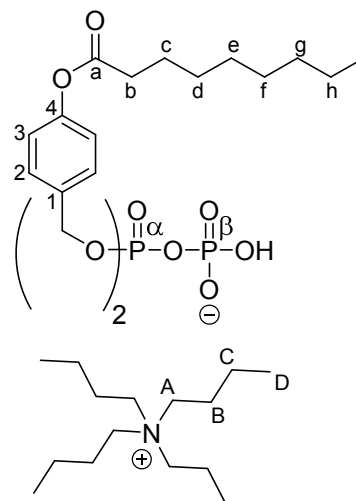
Die Reaktion wurde nach der **AAV 12** durchgeführt. Es wurden 0.25 g (0.44 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **200** in 5.0 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 0.12 g (0.87 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid sowie 0.37 g (1.1 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat, gelöst in 10 mL abs. Acetonitril, versetzt.

Ausbeute: Es wurden 0.40 g (0.44 mmol, quantitativ) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 912.14 g/mol **Summenformel:** C₃₂H₄₇O₁₁P₂⁻.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.42-7.36 (m, 4H, **H-2**), 7.01-6.93 (m, 4H, **H-3**), 5.19-5.14 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 3.27-3.16 (m, 8H, **H-A**), 2.52 (t, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 4H, **H-b**), 1.70 (quint, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 4H, **H-c**), 1.66-1.52 (m, 8H, **H-B**), 1.45-1.21 (m, 28H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-C**), 0.93 (t, ³J_{HH}= 7.2 Hz, 12H, **H-D**), 0.88 (t, ³J_{HH}= 6.9 Hz, 6H, **H-i**).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 172.2 (**C-a**), 150.5 (**C-4**), 134.6 (d, ³J_{CP}= 7.9 Hz, **C-1**), 129.2 (**C-2**), 121.5 (**C-3**), 68.6 (d, ²J_{CP}= 5.2 Hz, **Ph-CH₂**), 58.9 (**C-A**), 34.5 (**C-b**), 31.9, 29.4, 29.3, 29.3, 22.8 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h**), 25.1 (**C-c**), 24.1 (**C-B**), 19.8 (**C-C**), 13.8 (**C-D**), 12.8 (**C-i**).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= -9.44 (d, ²J_{PP}= 20.5 Hz, **P-α**), -12.96 (d, ²J_{PP}= 20.5 Hz, **P-β**).



Darstellung von (4-Acetyloxybenzyl)-(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat 245

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zunächst wurden 0.33 g (1.3 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylnonanoat **76e** und 0.36 g (2.2 mmol, 1.8 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylacetat **76a** je einmal mit abs. Pyridin coevaporiert. 4-(Hydroxymethyl)-phenylnonanoat **76e** wurde in 8.0 mL abs. Pyridin aufgenommen und zu einer auf -10 °C gekühlten Lösung aus 0.32 mL (1.6 mmol, 1.3 Äquiv.) Diphenylphosphonat (95%ig) in 10 mL abs. Pyridin getropft. Die Reaktionslösung wurde für 15 min gerührt und auf Raumtemperatur erwärmt. Nach weiteren zehn Minuten des Rührens erfolgte die Zugabe des ungelösten 4-(Hydroxymethyl)-phenylacetats **76a**. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für zwei Stunden bei 40 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 3:2 v/v + 0.5% Essigsäure).

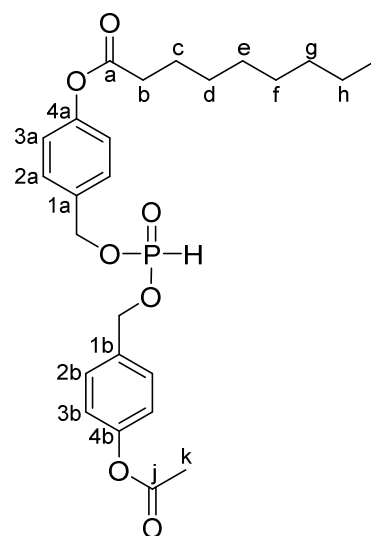
Ausbeute: Es wurden 0.24 g (0.50 mmol, 38%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 476.51 g/mol **Summenformel:** C₂₅H₃₃O₇P **R_f-Wert:** 0.35 (PE/EE 3:2 v/v + 0.5% HOAc) **HRMS (ESI⁺):** m/z= ber.: 499.1856 [M+Na]⁺, gef.: 499.1854.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 7.39-7.33 (m, 4H, **H-2a**, **H-2b**), 7.12-7.05 (m, 4H, **H-3a**, **H-3b**), 6.93 (d, $^1J_{\text{HP}}=708.5$ Hz, 1H, **PH**), 5.10-4.98 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{\text{HH}}=7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 2.30 (s, 3H, **H-k**), 1.75 (quint, $^3J_{\text{HH}}=7.5$ Hz, 2H, **H-c**), 1.46-1.23 (m, 10H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.89 (t, $^3J_{\text{HH}}=6.8$ Hz, 6H, **H-i**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 172.3 (**C-a**), 169.4 (**C-j**), 151.2, 151.1 (**C-4a**, **C-4b**), 133.3, 133.1 (d, $^3J_{\text{CP}}=6.1$ Hz, **C-1a**, **C-1b**), 129.4, 129.4 (**C-2a**, **C-2b**), 122.1, 122.1 (**C-3a**, **C-3b**), 66.9, 66.8 (d, $^2J_{\text{CP}}=5.7$ Hz, **Ph-CH₂**), 34.5 (**C-b**), 31.9, 29.4, 29.3, 29.3, 22.8 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 25.1 (**C-c**), 21.2 (**C-k**), 14.2 (**C-i**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 7.70.

IR: ν [cm^{-1}]= 2955, 2927, 2856, 1759, 1609, 1509, 1464, 1420, 1370, 1259, 1216, 1197, 1167, 1141, 1106, 1045, 960, 912, 854, 912, 655, 551, 446, 390.

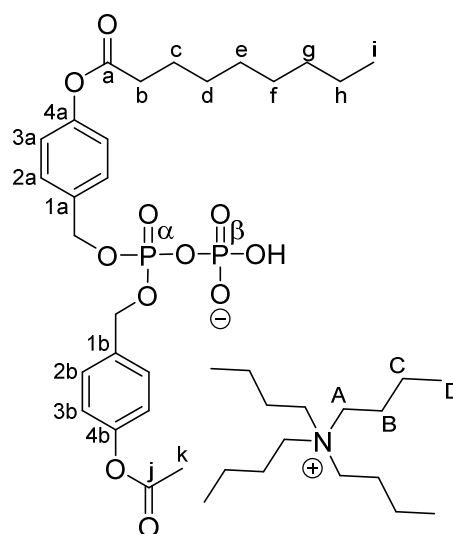


Darstellung von Tetra-*n*-butylammonium-*P,P*-(4-acetyloxybenzyl)-(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat 246

Die Reaktion wurde nach der **AAV 12** durchgeführt. Es wurden 0.15 g (0.32 mmol, 1.0 Äquiv.) (4-Acetyloxybenzyl)-(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **245** in 5.0 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 84 mg (0.63 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid sowie 0.27 g (0.79 mmol, 2.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat, gelöst in 10 mL abs. Acetonitril, versetzt.

Ausbeute: Es wurden 0.26 g (0.32 mmol, quantitativ) eines gelben Öls erhalten. **Molmasse:** 813.95 g/mol
Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_{11}\text{P}_2^-$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 7.42-7.33 (m, 4H, **H-2a**, **H-2b**), 7.02-6.93 (m, 4H, **H-3a**, **H-3b**), 5.17 (d, $^3J_{\text{HP}}=7.1$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 3.28-3.17 (m, 8H, **H-A**), 2.53 (t, $^3J_{\text{HH}}=7.4$ Hz, 2H, **H-b**), 2.27 (s, 3H, **H-k**), 1.70 (quint, $^3J_{\text{HH}}=7.4$ Hz, 2H, **H-c**), 1.66-1.54 (m, 8H, **H-B**), 1.44-1.22 (m, 18H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-C**), 0.95 (t, $^3J_{\text{HH}}=7.3$ Hz, 12H, **H-D**), 0.88 (t, $^3J_{\text{HH}}=6.8$ Hz, 6H, **H-i**).



$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 172.6 (**C-a**), 169.9 (**C-j**), 150.7, 150.7 (**C-4a**, **C-4b**), 134.6, 134.6 (**C-1a**, **C-1b**), 129.2, 129.2 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.7$ Hz, **C-2a**, **C-2b**), 121.5, 121.5 (**C-3a**, **C-3b**), 68.6-68.4 (m, **Ph-CH₂**), 58.9 (**C-A**), 34.5 (**C-b**), 31.9, 29.3, 29.2, 29.3, 22.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 25.1 (**C-c**), 24.0 (**C-B**), 21.3 (**C-k**), 19.8 (**C-C**), 13.8 (**C-D**), 12.8 (**C-i**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= -9.61 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.6$ Hz, **P- α**), -13.10 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.6$ Hz, **P- β**).

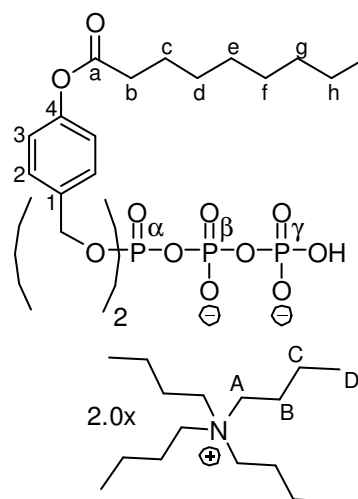
Darstellung von Bis(tetra-*n*-butylammonium)-*P,P*-bis(4-nonanoyloxybenzyl)-triphosphat **199**

Die Reaktion wurde in Analogie zu der **AAV 12** durchgeführt. Es wurden 0.33 g (0.57 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **200** in 5.0 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 0.15 g (1.1 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid sowie 1.1 g (1.7 mmol, 3.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-pyrophosphat, gelöst in 5.0 mL abs. Acetonitril, versetzt. Nach Extraktion ließ sich die Zielverbindung **199** über automatisierte RP18-Chromatographie (Wasser/Acetonitril-Gradient) isolieren.

Ausbeute: Es wurden 0.30 g (0.24 mmol, 43%) eines rötlichen Öls erhalten. **Molmasse:** 1233.58 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{O}_{14}\text{P}_3^{2-}$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 7.45-7.35 (m, 4H, **H-2**), 7.01-6.93 (m, 4H, **H-3**), 5.23 (d, $^3J_{\text{HP}} = 6.8$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 3.39-3.14 (m, 16H, **H-A**), 2.52 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 4H, **H-b**), 1.73 (quint, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 4H, **H-c**), 1.67-1.52 (m, 16H, **H-B**), 1.48-1.18 (m, 36H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-C**), 0.94 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, 24H, **H-D**), 0.88 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, 6H, **H-i**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= -9.89 (bs, **P- γ**), -13.03 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.4$ Hz, **P- α**), -21.31 (bs, **P- β**).

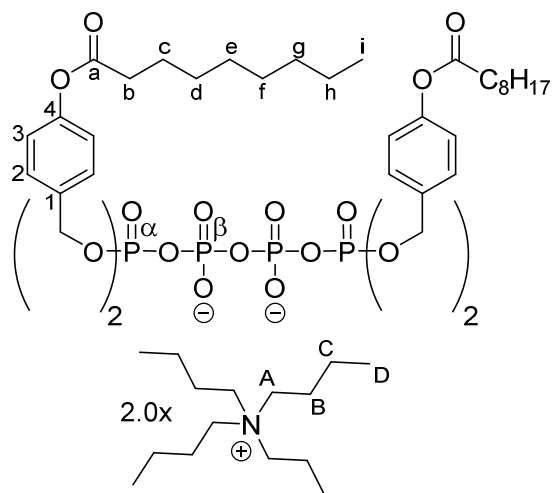


Außerdem konnte die Verbindung Bis(tetra-*n*-butylammonium)-*P*¹,*P*¹,*P*⁴,*P*⁴-tetra(4-nonanoyloxybenzyl)-tetraphosphat **206** mit Acetonitril als Elutionsmittel isoliert werden.

Ausbeute: Es wurden 60 mg (33 μmol , 6%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 1806.26 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{64}\text{H}_{92}\text{O}_{21}\text{P}_4^{2-}$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 7.43-7.34 (m, 8H, **H-2**), 7.00-6.89 (m, 8H, **H-3**), 5.23 (d, $^3J_{\text{HP}}= 6.8$ Hz, 8H, **Ph-CH₂**), 3.36-3.14 (m, 16H, **H-A**), 2.52 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.6$ Hz, 8H, **H-b**), 1.72 (quint, $^3J_{\text{HH}}= 7.5$ Hz, 8H, **H-c**), 1.65-1.52 (m, 16H, **H-B**), 1.45-1.20 (m, 56H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-C**), 0.91 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.2$ Hz, 24H, **H-D**), 0.88 (t, $^3J_{\text{HH}}= 6.9$ Hz, 12H, **H-i**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= -13.15 (dd, $^2J_{\text{PP}}= 12.5$ Hz, $^4J_{\text{PP}}= 4.5$ Hz, 2P, **P- α**), -23.83 (dd, $^2J_{\text{PP}}= 12.5$ Hz, $^4J_{\text{PP}}= 4.5$ Hz, 2P, **P- β**).



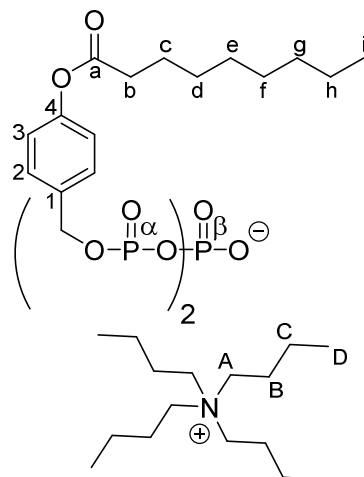
Darstellung von Tetra-*n*-butylammonium- P^1, P^1, P^3, P^3 -tetra(4-nonanoyloxybenzyl)-triphosphat **207**

Die Reaktion in Analogie zu der **AAV 12** durchgeführt. Es wurden 88 mg (0.15 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **200** in 2.0 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 41 mg (0.31 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid sowie 26 mg (77 μmol , 0.50 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumphosphat, gelöst in 2.0 mL abs. Acetonitril, versetzt. Nach Extraktion ließ sich die Zielverbindung **207** über automatisierte RP18-Chromatographie (Wasser/ Acetonitril-Gradient) isolieren.

Ausbeute: Es wurden 90 mg (62 μmol , 80%) eines rötlichen Öls erhalten. **Molmasse:** 1484.81 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{64}\text{H}_{93}\text{O}_{18}\text{P}_3$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 7.44-7.28 (m, 8H, **H-2**), 7.11-6.96 (m, 8H, **H-3**), 5.13 (d, $^3J_{\text{HP}}= 8.2$ Hz, 8H, **Ph-CH₂**), 3.26-3.16 (m, 8H, **H-A**), 2.59 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.4$ Hz, 8H, **H-b**), 1.75 (quint, $^3J_{\text{HH}}= 7.6$ Hz, 8H, **H-c**), 1.70-1.59 (m, 8H, **H-B**), 1.50-1.30 (m, 48H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-C**), 1.03 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.4$ Hz, 12H, **H-D**), 0.94 (t, $^3J_{\text{HH}}= 6.9$ Hz, 12H, **H-i**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= -12.95 (d, $^2J_{\text{PP}}= 19.2$ Hz, 2P, **P- α**), -26.15 (t, $^2J_{\text{PP}}= 19.2$ Hz, 1P, **P- β**).

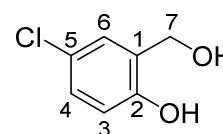


5.2.3 Synthese von Saligenylchlorphosphiten

Darstellung von 5-Chlorsalicylalkohol **91**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.65 g (43.5 mmol, 1.5 Äquiv.) Lithiumaluminiumhydrid in 60 mL abs. Diethylether suspendiert und tropfenweise über einen Zeitraum von 30 Minuten mit 5.00 g (29.0 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Chlorsalicylsäure **92** in 50 mL abs. Diethylether versetzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 1.5 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde langsam mit Wasser zugesetzt, bevor 100 mL Schwefelsäure (20%) hinzugegeben wurden. Die wässrige Phase wurde in der Folge dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Die Umkristallisation des Rohproduktes erfolgte aus Chloroform.

Ausbeute: Es wurden 3.45 g (21.8 mmol, 75%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 158.58 g/mol **Summenformel:** C₇H₇ClO₂
R_f-Wert: 0.47 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **MS (EI):** m/z= ber.: 158.1 [M]⁺, gef.: 158.1 (38%), 140.1 (100%), 112.1 (97%), 77.1 (70%).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 9.62 (s, 1H, **Ph-OH**), 7.27 (d, ⁴J_{HH}= 2.8 Hz, 1H, **H-6**), 7.06 (dd, ³J_{HH}= 8.6 Hz, ⁴J_{HH}= 2.8 Hz, 1H, **H-4**), 6.76 (d, ³J_{HH}= 8.6 Hz, 1H, **H-3**), 5.09 (t, ³J_{HH}= 8.6 Hz, 1H, **Bn-OH**), 4.44 (d, ⁴J_{HH}= 4.6 Hz, 2H, **H-7**).

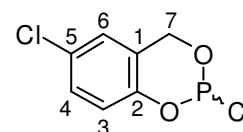
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 152.8 (**C-2**), 131.0 (**C-1**), 126.6 (**C-4**), 126.5 (**C-6**), 122.3 (**C-5**), 116.0 (**C-3**), 57.6 (**C-7**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3435, 3157, 2975, 2957, 2909, 1609, 1499, 1484, 1436, 1409, 1363, 1303, 1269, 1244, 1216, 1185, 1012, 1002, 886, 821, 567, 437.

Darstellung von 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 4** durchgeführt. Es wurden 2.50 g (15.8 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Chlorsalicylalkohol **91** in 80 mL abs. Diethylether mit 1.66 mL (2.60 g, 18.9 mmol, 1.2 Äquiv.) Phosphortrichlorid und 2.93 mL (2.87 g, 36.3 mmol, 2.3 Äquiv.) abs. Pyridin, gelöst in 10 mL abs. Diethylether, versetzt. Die Reinigung erfolgte durch Destillation im Vakuum bei einer Ölbadtemperatur von 140-150 °C.

Ausbeute: Es wurden 1.61 g (7.22 mmol, 46%) eines farblosen Öls als Gemisch zweier Enantiomere erhalten **Molmasse:** 222.99 g/mol
Summenformel: C₇H₅Cl₂O₂P.



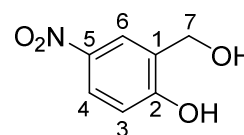
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 7.23 (dd, $^3J_{\text{HH}}= 8.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 2.5$ Hz, 1H, **H-4**), 7.00-6.97 (m, 1H, **H-6**), 6.93 (d, $^3J_{\text{HH}}= 8.7$ Hz, 1H, **H-3**), 5.44-5.38 (m, 1H, **H-7_a**), 5.00 (dd, $^2J_{\text{HH}}= 14.5$ Hz, $^3J_{\text{HP}}= 9.6$ Hz, 1H, **H-7_b**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 138.9.

Darstellung von 5-Nitrosalicylalkohol **101**

In 300 mL Ethanol wurden 10.0 g (66.1 mmol, 1.0 Äquiv) 5-Nitrobenzaldehyd **100** gelöst und langsam mit 2.25 g (59.6 mmol, 0.9 Äquiv.) Natriumborhydrid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 10 mL Wasser wurde mit konz. Salzsäure titriert, bis die Bildung eines farblosen Feststoffs auftrat. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert und das Filtrat unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wurde dreimal mit Methanol coevaporiert und aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: Es wurden 8.89 g (52.6 mmol, 80%) eines gelben Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 169.14 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_4$ **R_f-Wert:** 0.51 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) **MS (EI):** $m/z=$ ber.: 169.0 $[\text{M}]^+$, gef.: 169.1 (50%), 151.1 (100%), 79.1 (53%), 65.1 (64%).



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ [ppm]= 11.06 (s, 1H, **Ph-OH**), 8.21 (d, $^4J_{\text{HH}}= 3.0$ Hz, 1H, **H-6**), 8.01 (dd, $^3J_{\text{HH}}= 8.9$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 3.0$ Hz, 1H, **H-4**), 6.93 (d, $^3J_{\text{HH}}= 8.9$ Hz, 1H, **H-3**), 5.27 (bs, 1H, **Bn-OH**), 4.51 (s, 2H, **H-7**).

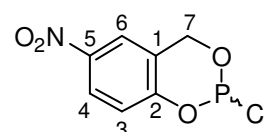
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ [ppm]= 160.4 (**C-2**), 139.6 (**C-5**), 130.2 (**C-1**), 123.9 (**C-4**), 122.6 (**C-6**), 114.6 (**C-3**), 57.4 (**C-7**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3455, 2953, 2891, 2753, 2565, 1617, 1590, 1521, 1482, 1436, 1399, 1383, 1316, 1288, 1194, 1177, 1084, 986, 961, 932, 843, 753, 733, 640, 616, 491, 436.

Darstellung von 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **99**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 4** durchgeführt. Es wurden 2.06 g (12.2 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Nitrosalicylalkohol **101** in 80 mL abs. Diethylether mit 1.28 mL (2.01 g, 14.6 mmol, 1.2 Äquiv.) Phosphortrichlorid und 2.26 mL (2.22 g, 28.0 mmol, 2.3 Äquiv.) abs. Pyridin, gelöst in 8.0 mL abs. Diethylether, versetzt. Auf eine Reinigung wurde verzichtet.

Ausbeute: Es wurden 1.28 g eines verunreinigten gelben Öls als Gemisch zweier Enantiomere erhalten. **Molmasse:** 233.54 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_7\text{H}_5\text{ClINO}_4\text{P}$.



$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 8.18-8.06 (m, 1H, **H-4**), 7.97-7.92 (m, 1H, **H-6**), 7.13-7.06 (m, 1H, **H-3**), 5.30 (d, $^3J_{\text{HP}} = 6.2$ Hz, 2H, **H-7**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (81 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 133.8.

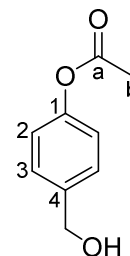
5.2.4 Synthese der 4-Hydroxybenzyl-derivate **76a-o**

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenylacetat **76a**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 4.10 g (33.0 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** und 4.17 mL (3.04 g, 30.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 30 mL abs. THF mit 2.15 mL (2.36 g, 30.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Acetylchlorid **78a**, gelöst in 10 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 3:2 v/v).

Ausbeute: Es wurden 2.44 g (14.7 mmol, 49%) eines farblosen Öls erhalten.

Molmasse: 166.17 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$ **R_f -Wert:** 0.37 (PE/EE 3:2 v/v) **HRMS (ESI⁺):** $m/z = \text{ber.}: 189.0522$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, $\text{gef.}: 189.0397$.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 7.37-7.31 (m, 2H, **H-3**), 7.09-7.03 (m, 2H, **H-2**), 5.22 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, 1H, **OH**), 4.49 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5.5$ Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 2.25 (s, 3H, **H-b**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 169.3 (**C-a**), 149.2 (**C-1**), 140.1 (**C-4**), 127.5 (**C-3**), 121.4 (**C-2**), 62.4 (**Ph-CH₂**), 20.9 (**C-b**).

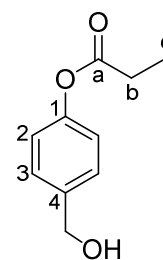
IR: ν [cm^{-1}]= 3532, 2900, 2862, 1731, 1505, 1370, 1224, 1188, 1100, 1014, 950, 917, 848, 809, 634, 501.

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenylpropanoat **76b**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 4.04 g (32.5 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** und 4.10 mL (2.99 g, 29.6 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 30 mL abs. THF mit 2.58 mL (2.74 g, 29.6 mmol, 1.0 Äquiv.) Propanoylchlorid **78b**, gelöst in 10 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 3:2 v/v).

Ausbeute: Es wurden 3.08 g (17.1 mmol, 58%) eines farblosen Öls erhalten.

Molmasse: 180.20 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$ **R_f -Wert:** 0.44 (PE/EE 3:2 v/v) **HRMS (ESI⁺):** $m/z = \text{ber.}: 203.0679$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, $\text{gef.}: 203.0553$.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 7.38-7.30 (m, 2H, **H-3**), 7.09-7.01

(m, 2H, **H-2**), 5.22 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, 1H, **OH**), 4.49 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 2.59 (q, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.13 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 3H, **H-c**).

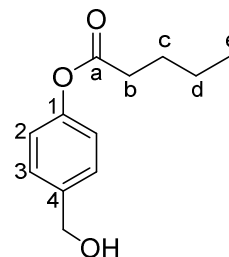
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 173.5 (**C-a**), 149.9 (**C-1**), 140.8 (**C-4**), 127.2 (**C-3**), 121.1 (**C-2**), 62.1 (**Ph-CH₂**), 26.6 (**C-b**), 8.64 (**C-c**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3379, 2984, 2943, 2881, 1755, 1507, 1355, 1164, 1139, 1076, 1013, 891, 806, 702, 499.

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenylpentanoat **76c**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 4.01 g (32.3 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** und 4.07 mL (2.97 g, 29.4 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 30 mL abs. THF mit 3.58 mL (3.54 g, 29.4 mmol, 1.0 Äquiv.) Valerylchlorid **78c**, gelöst in 10 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 3:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 3.41 g (16.4 mmol, 56%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 208.25 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$ **R_f-Wert:** 0.25 (PE/EE 4:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** $m/z =$ ber.: 231.0992 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, gef.: 231.0848.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 7.38-7.31 (m, 2H, **H-3**), 7.08-7.02 (m, 2H, **H-2**), 5.23 (bs, 1H, **OH**), 4.49 (bs, 2H, **Ph-CH₂**), 2.56 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 2H, **H-b**), 1.69-1.56 (m, 2H, **H-c**), 1.45-1.31 (m, 2H, **H-d**), 0.92 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 3H, **H-e**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 172.0 (**C-a**), 149.2 (**C-1**), 140.1 (**C-4**), 127.5 (**C-3**), 121.4 (**C-2**), 62.4 (**Ph-CH₂**), 33.2 (**C-b**), 26.5 (**C-c**), 21.6 (**C-d**), 13.7 (**C-e**).

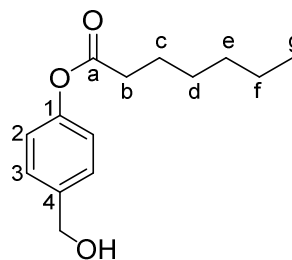
IR: ν [cm^{-1}]= 3379, 2959, 2933, 2873, 1754, 1507, 1380, 1198, 1163, 1142, 1100, 1014, 919, 826, 753, 502.

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenylheptanoat **76d**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 6.00 g (48.3 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** und 6.10 mL (4.45 g, 44.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 50 mL abs. THF mit 6.81 mL (6.53 g, 44.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Heptanoylchlorid **68d**, gelöst in 20 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 6.03 g (25.5 mmol, 58%) eines gelblichen Öls erhalten. **Molmasse:** 236.31 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_3$ **R_f-Wert:** 0.27 (PE/EE 4:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** $m/z =$ ber.: 259.1305 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, gef.: 259.1184.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 7.38-7.28 (m, 2H, **H-3**), 7.08-7.01 (m, 2H, **H-2**), 5.23 (t, ³*J*_{HH}= 5.2 Hz, 1H, **OH**), 4.49 (d, ³*J*_{HH}= 5.3 Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 2.56 (t, ³*J*_{HH}= 7.4 Hz, 2H, **H-b**), 1.63 (quint, ³*J*_{HH}= 7.5 Hz, 2H, **H-c**), 1.42-1.22 (m, 6H, **H-d**, **H-e**, **H-f**), 0.88 (t, ³*J*_{HH}= 6.6 Hz, 3H, **H-g**).



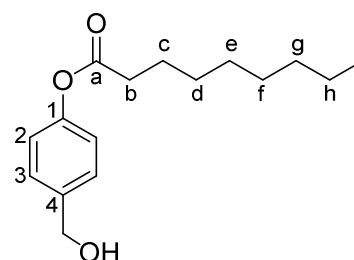
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 171.9 (**C-a**), 149.2 (**C-1**), 140.0 (**C-4**), 127.5 (**C-3**), 121.4 (**C-2**), 62.4 (**Ph-CH₂**), 33.5 (**C-b**), 31.0, 28.1, 22.0 (**C-c**, **C-d**, **C-e**), 24.4 (**C-f**), 14.0 (**C-g**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3380, 2955, 2928, 2859, 1755, 1507, 1459, 1417, 1377, 1196, 1164, 1141, 1014, 848, 811, 503.

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenylnonanoat 76e

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 5.76 g (46.4 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** und 5.84 mL (4.26 g, 42.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 30 mL abs. THF mit 7.60 mL (7.46 g, 42.2 mmol, 1.0 Äquiv.) Nonanoylchlorid **78e**, gelöst in 10 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 6.50 g (24.6 mmol, 58%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 264.37 g/mol
Summenformel: C₁₆H₂₄O₃ **R_f-Wert:** 0.29 (PE/EE 4:1 v/v)
HRMS (ESI⁺): *m/z*= ber.: 265.1798 [M+H]⁺, 287.1618 [M+Na]⁺, gef.: 265.1796, 287.1600.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 7.40-7.28 (m, 2H, **H-3**), 7.09-6.99 (m, 2H, **H-2**), 5.23 (bs, 1H, **OH**), 4.49 (bs, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, ³*J*_{HH}= 7.4 Hz, 2H, **H-b**), 1.63 (quint, ³*J*_{HH}= 7.4 Hz, 2H, **H-c**), 1.48-1.17 (m, 10H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.87 (t, ³*J*_{HH}= 6.7 Hz, 3H, **H-i**).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 171.9 (**C-a**), 149.2 (**C-1**), 140.0 (**C-4**), 127.5 (**C-3**), 121.4 (**C-2**), 62.4 (**Ph-CH₂**), 33.5 (**C-b**), 31.3, 28.7, 28.6, 28.5, 22.1 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 24.4 (**C-c**), 14.0 (**C-i**).

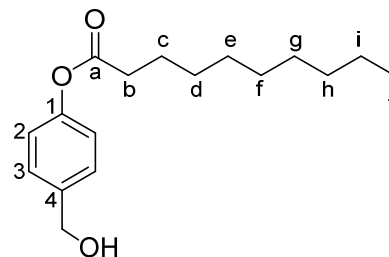
IR: ν [cm⁻¹]= 3333, 2955, 2920, 2850, 1749, 1507, 1464, 1412, 1380, 1260, 1202, 1165, 1144, 1013, 847, 816, 509.

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenyldecanoat 76f

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 4.05 g (32.6 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** und 4.11 mL (3.00 g, 29.7 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 30 mL abs. THF mit 6.08 mL (5.66 g, 29.7 mmol, 1.0 Äquiv.) Decanoylchlorid **78f**, gelöst in

10 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 3.75 g (13.5 mmol, 46%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 278.39 g/mol
Summenformel: $C_{17}H_{26}O_3$ **R_f-Wert:** 0.29 (PE/EE 4:1 v/v)
HRMS (ESI⁺): m/z = ber.: 301.1774 $[M+Na]^+$, gef.: 301.1759.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.40-7.31 (m, 2H, **H-3**), 7.09-7.01 (m, 2H, **H-2**), 4.65 (s, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, ³ J_{HH} = 7.5 Hz, 2H, **H-b**), 1.75 (quint, ³ J_{HH} = 7.5 Hz, 2H, **H-c**), 1.48-1.17 (m, 12H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i**), 0.89 (t, ³ J_{HH} = 6.7 Hz, 3H, **H-j**).

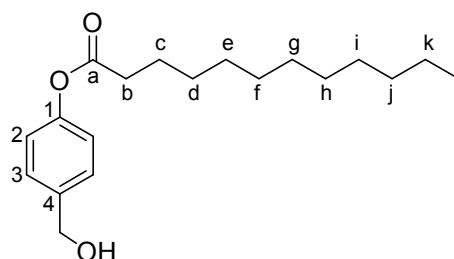
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 172.6 (**C-a**), 150.2 (**C-1**), 138.9 (**C-4**), 128.1 (**C-3**), 121.7 (**C-2**), 64.7 (**Ph-CH₂**), 34.4 (**C-b**), 31.9, 29.4, 29.3, 29.3, 29.1, 22.7 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i**), 24.9 (**C-c**), 14.1 (**C-j**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3318, 2954, 2916, 2848, 1748, 1508, 1412, 1383, 1216, 1166, 1151, 1014, 818, 721, 514.

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenyldodecanoat 76g

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 5.98 g (48.2 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** und 6.08 mL (4.43 g, 43.8 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 50 mL abs. THF mit 9.09 mL (8.36 g, 43.8 mmol, 1.0 Äquiv.) Laurinsäurechlorid **78g**, gelöst in 20 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 8.27 g (27.0 mmol, 62%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 306.44 g/mol
Summenformel: $C_{19}H_{30}O_3$ **R_f-Wert:** 0.29 (PE/EE 4:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** m/z = ber.: 307.2268 $[M+H]^+$, 329.2087 $[M+Na]^+$, gef.: 307.2269, 329.2076.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.40-7.33 (m, 2H, **H-3**), 7.09-7.03 (m, 2H, **H-2**), 4.67 (s, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, ³ J_{HH} = 7.5 Hz, 2H, **H-b**), 1.75 (quint, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 2H, **H-c**), 1.49-1.17 (m, 16H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k**), 0.88 (t, ³ J_{HH} = 6.6 Hz, 3H, **H-l**).

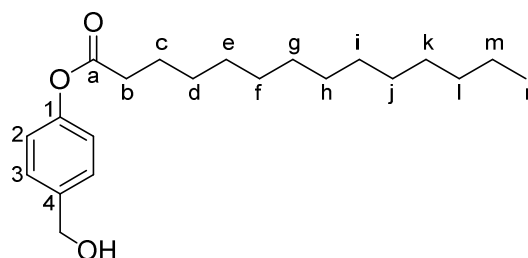
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 172.6 (**C-a**), 150.3 (**C-1**), 138.5 (**C-4**), 128.2 (**C-3**), 121.8 (**C-2**), 64.9 (**Ph-CH₂**), 34.5 (**C-b**), 32.1, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 22.8 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k**), 25.1 (**C-c**), 14.3 (**C-l**).

IR: ν [cm⁻¹] = 3318, 2955, 2914, 2847, 1748, 1508, 1464, 1411, 1383, 1328, 1297, 1266, 1215, 2258, 1035, 1013, 949, 871, 847, 719, 511.

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenyltetradecanoat **76h**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 4.02 g (32.4 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** und 4.08 mL (2.98 g, 29.5 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 40 mL abs. THF mit 7.97 mL (7.27 g, 29.5 mmol, 1.0 Äquiv.) Myristinsäurechlorid **78h**, gelöst in 15 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 8.27 g (14.9 mmol, 51%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 334.50 g/mol **Summenformel:** C₂₁H₃₄O₃ **R_f-Wert:** 0.35 (PE/EE 4:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** m/z = ber.: 335.2581 [M+H]⁺, 357.2400 [M+Na]⁺, gef.: 335.2563, 357.2342.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 7.37-7.30 (m, 2H, **H-3**), 7.07-7.00 (m, 2H, **H-2**), 5.22 (t, ³ J_{HH} = 5.7 Hz, 1H, **OH**), 4.48 (d, ³ J_{HH} = 5.2 Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, ³ J_{HH} = 7.3 Hz, 2H, **H-b**), 1.62 (quint, ³ J_{HH} = 7.3 Hz, 2H, **H-c**), 1.41-1.16 (m, 20H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m**), 0.88 (t, ³ J_{HH} = 6.7 Hz, 3H, **H-n**).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 171.9 (**C-a**), 149.2 (**C-1**), 140.0 (**C-4**), 127.5 (**C-3**), 121.4 (**C-2**), 62.4 (**Ph-CH₂**), 33.5 (**C-b**), 31.4, 29.1, 29.0, 28.9, 28.8, 28.7, 28.4, 22.2 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m**), 24.6 (**C-c**), 14.0 (**C-n**).

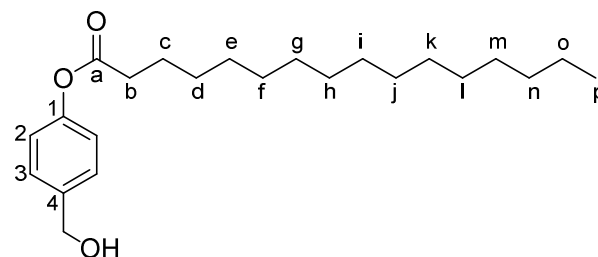
IR: ν [cm⁻¹] = 3332, 2954, 2914, 2871, 2848, 1750, 1728, 1605, 1509, 1472, 1388, 1346, 1304, 1253, 1216, 1201, 1166, 1151, 1015, 923, 717, 501.

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenylhexadecanoat **76i**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 6.00 g (48.3 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** und 6.10 mL (4.45 g, 44.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 50 mL abs. THF mit 13.3 mL (12.1 g, 44.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Palmitinsäurechlorid **78i**, gelöst in 20 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 9.50 g (26.2 mmol, 60%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 362.55 g/mol **Summenformel:** C₂₃H₃₈O₃ **R_f-Wert:** 0.35 (PE/EE 4:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** m/z = ber.: 363.2894 [M+H]⁺, 385.2713 [M+Na]⁺, gef.: 363.2893, 385.2708.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.40-7.32 (m, 2H, **H-3**), 7.09-7.02 (m, 2H, **H-2**), 4.66 (s, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 2H, **H-b**), 1.75 (quint, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 2H, **H-c**), 1.49-1.14 (m, 24H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m, H-n, H-o**), 0.88 (t, ³J_{HH}= 6.6 Hz, 3H, **H-p**).



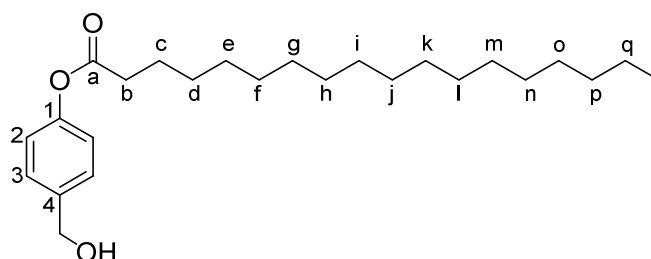
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 172.6 (**C-a**), 150.3 (**C-1**), 138.5 (**C-4**), 128.2 (**C-3**), 121.8 (**C-2**), 64.9 (**Ph-CH₂**), 34.5 (**C-b**), 32.1, 29.8, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 22.8 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n, C-o**), 25.1 (**C-c**), 14.3 (**C-p**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3328, 2956, 2914, 2848, 1747, 1509, 1463, 1410, 1379, 1219, 1150, 1039, 1015, 846, 817, 638, 519.

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenyloctadecanoat **76j**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 4.03 g (32.5 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** und 4.10 mL (2.99 g, 29.5 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 50 mL abs. THF mit 9.94 mL (8.95 g, 29.5 mmol, 1.0 Äquiv.) Stearinsäurechlorid **78j**, gelöst in 30 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 6.30 g (16.1 mmol, 55%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 390.61 g/mol **Summenformel:** C₂₅H₄₂O₃ **R_f-Wert:** 0.35 (PE/EE 4:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** m/z= ber.: 391.3207 [M+H]⁺, 413.3026 [M+Na]⁺, gef.: 391.3206, 413.3026.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.37-7.32 (m, 2H, **H-3**), 7.08-7.02 (m, 2H, **H-2**), 4.63 (s, 2H, **Ph-CH₂**), 2.54 (t, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 2H, **H-b**), 1.75 (quint, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 2H, **H-c**), 1.48-1.19 (m, 28H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q**), 0.88 (t, ³J_{HH}= 6.7 Hz, 3H, **H-r**).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 172.6 (**C-a**), 150.2 (**C-1**), 138.5 (**C-4**), 128.1 (**C-3**), 121.7 (**C-2**), 64.8 (**Ph-CH₂**), 34.5 (**C-b**), 32.1, 29.8, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 22.8 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n, C-o, C-p, C-q**), 25.1 (**C-c**), 14.3 (**C-r**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3328, 2956, 2914, 2848, 1748, 1509, 1464, 1386, 1218, 1166, 1150, 1038, 1015, 847, 817, 719, 511.

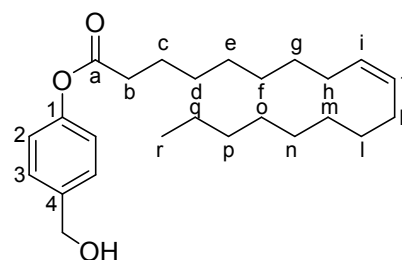
Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenyl-(Z)-octadec-9-enoat 76k

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 4.02 g (32.4 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** und 4.09 mL (2.98 g, 29.5 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 50 mL abs. THF mit 12.2 mL (29.5 mmol, 1.0 Äquiv.) einer 80%igen Ölsäurechloridlösung **78k**, gelöst in 30 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 3:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 4.42 g (11.4 mmol, 39%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 388.59 g/mol

Summenformel: C₂₅H₄₀O₃ **R_f-Wert:** 0.41 (PE/EE 3:1 v/v)

HRMS (ESI⁺): *m/z*= ber.: 411.2870 [M+Na]⁺, gef.: 411.2865.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.39-7.32 (m, 2H, **H-3**), 7.09-7.03 (m, 2H, **H-2**), 5.42-5.30 (m, 2H, **H-i**, **H-j**), 4.67 (s, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 2H, **H-b**), 2.08-2.02 (m, 4H, **H-h**, **H-k**), 1.75 (quint, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 2H, **H-c**), 1.48-1.21 (m, 20H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-l**, **H-m**, **H-n**, **H-o**, **H-p**, **H-q**), 0.87 (t, ³J_{HH}= 6.7 Hz, 3H, **H-r**).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 172.4 (**C-a**), 150.1 (**C-1**), 138.3 (**C-4**), 130.0, 129.7 (**C-i**, **C-j**), 128.1 (**C-3**), 121.7 (**C-2**), 64.7 (**Ph-CH₂**), 34.4 (**C-b**), 31.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.3, 29.2, 29.1, 29.1, 22.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-l**, **C-m**, **C-n**, **C-o**, **C-p**, **C-q**), 27.2, 27.2 (**C-h**, **C-k**), 24.9 (**C-c**), 14.1 (**C-r**).

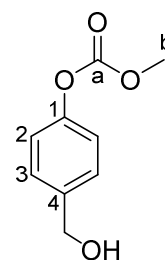
IR: ν [cm⁻¹]= 3377, 2922, 2853, 1758, 1507, 1463, 1417, 1376, 1197, 1164, 1135, 1015, 849, 722, 503.

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenylmethylcarbonat 76l

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 4.0 g (33 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** und 4.1 mL (3.0 g, 30 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 35 mL abs. THF mit 2.3 mL (2.8 g, 30 mmol, 1.0 Äquiv.) Methylchlorformiat **78l**, gelöst in 20 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:3 v/v).

Ausbeute: Es wurden 4.6 g (25 mmol, 85%) eines farblosen Öls erhalten.

Molmasse: 182.18 g/mol **Summenformel:** C₉H₁₀O₄ **R_f-Wert:** 0.35 (PE/EE 3:2 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 205.0471 [M+Na]⁺, gef.: 205.0337.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 7.39-7.31 (m, 2H, **H-3**), 7.20-7.13 (m, 2H, **H-2**), 5.22 (t, $^3J_{\text{HH}}= 5.7$ Hz, 1H, **OH**), 4.50 (d, $^3J_{\text{HH}}= 5.7$ Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 3.82 (s, 3H, **H-b**).

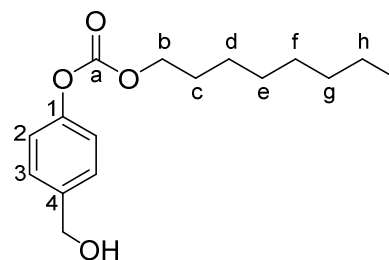
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 153.7 (**C-a**), 149.5 (**C-1**), 140.5 (**C-4**), 127.5 (**C-3**), 121.4 (**C-2**), 62.3 (**Ph-CH₂**), 55.4 (**C-b**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3375, 2959, 2873, 1758, 1508, 1440, 1254, 1210, 1060, 1013, 931, 821, 778, 506.

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenyloctylcarbonat **76m**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 3.1 g (25 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** und 3.1 mL (2.3 g, 23 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 35 mL abs. THF mit 4.4 mL (4.4 g, 23 mmol, 1.0 Äquiv.) Octylchlorformiat **78m**, gelöst in 20 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:3 v/v).

Ausbeute: Es wurden 5.3 g (19 mmol, 84%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 280.36 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$ **R_f-Wert:** 0.45 (PE/EE 3:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** $m/z=$ ber.: 303.1567 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, gef.: 303.1567.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 7.39-7.31 (m, 2H, **H-3**), 7.21-7.12 (m, 2H, **H-2**), 5.22 (t, $^3J_{\text{HH}}= 5.7$ Hz, 1H, **OH**), 4.49 (d, $^3J_{\text{HH}}= 5.7$ Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 4.18 (t, $^3J_{\text{HH}}= 6.6$ Hz, 2H, **H-b**), 1.72-1.64 (m, 2H, **H-c**), 1.41-1.18 (m, 10H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.87 (t, $^3J_{\text{HH}}= 6.7$ Hz, 3H, **H-i**).

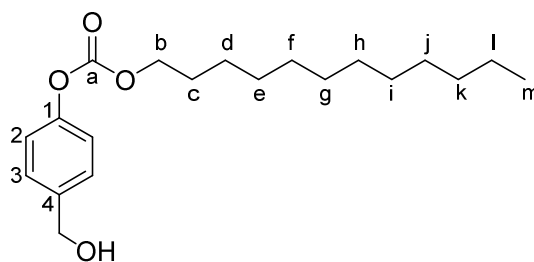
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 153.2 (**C-a**), 149.5 (**C-1**), 140.4 (**C-4**), 127.5 (**C-3**), 120.8 (**C-2**), 68.5 (**C-b**), 62.3 (**Ph-CH₂**), 31.2, 28.6, 28.0, 25.2, 22.1 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 28.6 (**C-c**), 14.0 (**C-i**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3377, 2955, 2925, 2856, 1758, 1508, 1466, 1420, 1247, 1210, 1048, 1014, 955, 821, 780, 507.

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenyldodecylcarbonat **76n**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 4.1 g (33 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** und 4.2 mL (3.0 g, 30 mmol, 1.0 Äquiv.) Triethylamin in 40 mL abs. THF mit 8.1 mL (7.5 g, 30.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Dodecylchlorformiat **78n**, gelöst in 20 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 7.7 g (23 mmol, 76%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 336.47 g/mol **Summenformel:** C₂₀H₃₂O₄ **R_f-Wert:** 0.48 (PE/EE 3:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 359.2193 [M+Na]⁺, gef.: 359.2195.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.42-7.33 (m, 2H, **H-3**), 7.21-7.12 (m, 2H, **H-2**), 4.68 (s, 2H, **Ph-CH₂**), 4.24 (t, ³J_{HH}= 6.7 Hz, 2H, **H-b**), 1.80-1.69 (m, 2H, **H-c**), 1.47-1.19 (m, 18H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l**), 0.88 (t, ³J_{HH}= 6.7 Hz, 3H, **H-m**).

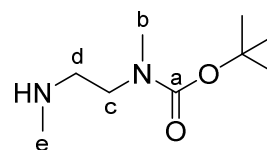
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 153.9 (**C-a**), 150.7 (**C-1**), 138.8 (**C-4**), 128.2 (**C-3**), 121.1 (**C-2**), 69.2 (**C-b**), 64.8 (**Ph-CH₂**), 32.1, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 28.7, 25.8, 22.8 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l**), 28.6 (**C-c**), 14.3 (**C-m**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3355, 2955, 2917, 2848, 1747, 1508, 1471, 1273, 1215, 1027, 1014, 960, 720, 504.

Darstellung von *tert*-Butylmethyl(2-(methylamino)ethyl)-carbammat 107

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 4.6 g (3.7 g, 42 mmol, 3.8 Äquiv.) *N,N*-Dimethylethylendiamin in 40 mL abs. Dichlormethan gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit 2.4 g (11 mmol, 1.0 Äquiv.) Di-*tert*-butyldicarbonat, gelöst in 20 mL abs. Dichlormethan, versetzt. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung für 16 Stunden gerührt und im Anschluss das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einem Ethylacetat/Wasser-Gemisch (2:1 v/v) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen sowie über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Auf eine weitere Reinigung konnte verzichtet werden.

Ausbeute: Es wurden 1.6 g (8.6 mmol, 78%) eines schwach gelben Öls erhalten. **Molmasse:** 188.27 g/mol **Summenformel:** C₉H₂₀N₂O₂ **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 211.1417 [M+Na]⁺, gef.: 211.1411.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 3.35-3.25 (m, 2H, **H-c**, Rotamere), 2.85 (s, 3H, **H-b**), 2.70 (t, ³J_{HH}= 6.7 Hz, 2H, **H-d**), 2.42 (s, 3H, **H-e**), 1.43 (s, 9H, ***t*Bu-(CH₃)₃**).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 156.1 (**C-a**), 79.5 (**C-*t*Bu**), 49.8 (**C-d**), 48.8, 48.3 (**C-c**, Rotamere), 36.4 (**C-e**), 34.9, 34.8 (**C-b**, Rotamere), 28.6 (***t*Bu-(CH₃)₃**).

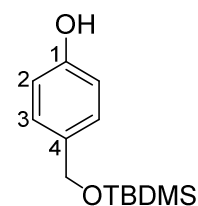
IR: ν [cm⁻¹]= 2974, 2931, 2792, 1687, 1479, 1424, 1391, 1364, 1247, 1153, 1050, 877, 771.

Darstellung von 4-(((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenol 104

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 5.1 g (41 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol **37** in 40 mL abs. DMF gelöst und mit 6.8 g (45 mmol, 1.1 Äquiv.) TBDMSCl und 6.1 g (89 mmol, 2.2 Äquiv.) Imidazol versetzt. Nach einer Reaktionsdauer von 17 Stunden wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und einmal mit 0.1 M Salzsäure gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 6:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 7.9 g (33 mmol, 81%) eines farblosen Öls erhalten.

Molmasse: 238.40 g/mol **Summenformel:** C₁₃H₂₂O₂Si **R_f-Wert:** 0.34 (PE/EE 4:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 261.1287 [M+Na]⁺, gef.: 261.1285.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 9.28 (s, 1H, OH), 7.12-7.06 (m, 2H, H-3), 6.74-6.68 (m, 2H, H-2), 4.56 (s, 2H, Ph-CH₂), 0.87 (s, 9H, *t*Bu-(CH₃)₃), 0.04 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 139.2 (C-4), 131.6 (C-1), 127.5 (C-3), 114.6 (C-2), 64.0 (Ph-CH₂), 25.6 (*t*Bu-(CH₃)₃), 17.6 (C-*t*Bu), -5.4 (Si(CH₃)₂).

IR: ν [cm⁻¹]= 3355, 2954, 2929, 2884, 2857, 1707, 1614, 1515, 1251, 1209, 1105, 1005, 831, 774, 748, 666, 496, 405.

Darstellung von 4-(((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenyl-(4-nitrophenyl)-carbonat 105

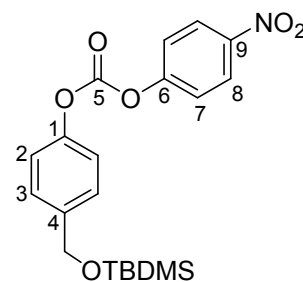
Unter Stickstoff als Inertgas wurden 7.6 g (32 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-methyl)phenol **104** in 100 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 11 mL (8.1 g, 80 mmol, 2.5 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Nach portionsweiser Zugabe von 12.8 g (64.0 mmol, 2.0 Äquiv.) 4-Nitrophenylchlorformiat wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur für 16 Stunden gerührt. Anschließend wurden der Suspension 7.5 mL (7.9 g, 48 mmol, 1.5 Äquiv.) Triethylenglykolmonomethylether zugesetzt und die Lösung für weitere 20 Minuten gerührt. Es schlossen sich die Aufnahme in Dichlormethan und ein einmaliges Waschen mit Salzsäure (1 M) an. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 6:1).

Ausbeute: Es wurden 6.8 g (17 mmol, 53%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 403.51 g/mol **Summenformel:** C₂₀H₂₅NO₆Si **R_f-Wert:** 0.73 (PE/EE 6:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 426.1349 [M+Na]⁺, gef.: 426.1340.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 8.38-8.33 (m, 2H, **H-8**), 7.73-7.67 (m, 2H, **H-7**), 7.43-7.36 (m, 4H, H-2, **H-3**), 4.73 (s, 2H, **Ph-CH₂**), 0.91 (s, 9H, ***t*Bu-(CH₃)₃**), 0.09 (s, 6H, **Si(CH₃)₂**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 155.2 (**C-9**), 150.7 (**C-5**), 149.3 (**C-1**), 145.4 (**C-6**), 139.6 (**C-4**), 127.2 (**C-3**), 125.4 (**C-8**), 122.7 (**C-7**), 120.9 (**C-2**), 63.6 (**Ph-CH₂**), 25.8 (***t*Bu-(CH₃)₃**), 18.0 (**C-*t*Bu**), -5.3 (**Si(CH₃)₂**).

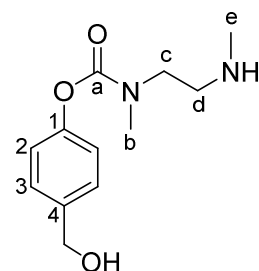
IR: ν [cm⁻¹]= 2954, 2929, 2884, 2857, 1768, 1526, 1347, 1260, 1105, 1086, 1007, 834, 780, 670, 502.



Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)-phenyl-methyl(2-(methylamino)ethyl)-carbamat **106**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.6 g (8.6 mmol, 1.2 Äquiv.) *tert*-Butyl-methyl(2-(methylamino)ethyl)-carbamate **107** in 30 mL abs. Toluol gelöst und mit 1.9 mL (1.4 g, 11 mmol, 1.6 Äquiv.) Diisopropylethylamin und katalytischen Mengen 4-Dimethylamino-phenol versetzt. Bei 0 °C erfolgte die tropfenweise Zugabe von 2.8 g (7.0 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(((*tert*-Butyldimethylsilyloxy)methyl)phenyl)-(4-nitrophenyl)-carbonat **105**, gelöst in 40 mL abs. Toluol. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Lösung für 16 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Ethylacetat verdünnt und jeweils einmal mit Salzsäure (1 M) sowie gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einem Gemisch aus Dichlormethan/Trifluoressigsäure (1:1 v/v) aufgenommen und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und zweimaligem Coevaporieren mit Toluol wurde das Rohprodukt durch automatisierte RP18-Chromatographie gereinigt (Wasser/Acetonitril-Gradient).

Ausbeute: Es wurden 1.6 g (6.9 mmol, 98%) eines schwach gelben Öls erhalten. **Molmasse:** 238.29 g/mol **Summenformel:** C₁₂H₁₈N₂O₃
R_f-Wert: 0.67 (CH₂Cl₂/MeOH 4:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** m/z = ber.: 239.1390 [M+Na]⁺, gef.: 239.1391.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 8.72, 8.62 (bs, 2H, **N-H**, Rotamere), 7.34-7.28 (m, 2H, **H-3**), 7.14-7.07 (m, 2H, **H-2**), 4.48 (s, 2H, **Ph-CH₂**), 3.69, 3.57 (t, ³J_{HH}= 6.0 Hz, 2H, **H-c**, Rotamere), 3.24-3.10 (m, 2H, **H-d**, Rotamere), 3.05, 2.93 (s, 3H, **H-b**, Rotamere), 2.68-2.57 (m, 3H, **H-e**, Rotamere).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 154.7, 153.8 (**C-a**, Rotamere), 149.9 (**C-1**), 139.7 (**C-4**), 127.2 (**C-3**), 121.7, 121.4 (**C-2**, Rotamere), 62.4 (**Ph-CH₂**), 46.3, 46.0 (**C-d**, Rotamere), 45.2 (**C-c**), 34.6, 34.4 (**C-b**, Rotamere), 32.9, 32.8 (**C-e**, Rotamere).

IR: ν [cm^{-1}]= 3401, 2975, 2871, 1671, 1509, 1462, 1400, 1300, 1199, 1172, 1125, 1053, 1015, 872, 830, 798, 756, 720, 630, 596, 516.

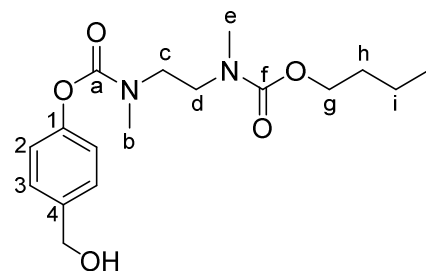
Darstellung von *n*-Butyl-(4-(hydroxymethyl)phenyl)ethan-1,2-diylbis(methylcarbammat) 76o

Die Reaktion wurde nach der **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 2.1 g (8.8 mmol, 1.0 Äquiv.) Carbamat **106** mit 0.78 mg (11 mmol, 1.3 Äquiv.) Imidazol und 1.3 mL (1.1 g, 11 mmol, 1.2 Äquiv.) Trimethylsilylchlorid in 15 mL abs. THF versetzt. Es folgte die Zugabe von 3.8 mL (2.8 g, 27 mmol, 3.1 Äquiv.) Triethylamin und 3.4 mL (3.6 g, 26 mmol, 3.0 Äquiv.) Butylchlorformiat. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 1:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 1.8 g (5.3 mmol, 59%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 338.40 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$ **R_f-Wert:** 0.56

($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** m/z = ber.: 339.1914 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, 361.1734 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, gef.: 339.1918, 361.1737.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 7.34-7.27 (m, 2H, **H-3**), 7.04-6.97 (m, 2H, **H-2**), 5.17 (t, $^3J_{\text{HH}}= 5.6$ Hz, 1H, **OH**), 4.48 (d, $^3J_{\text{HH}}= 4.3$ Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 4.02-3.91 (m, 2H, **H-g**), 3.57-3.40 (m, 4H, **H-c**, **H-d**, Rotamere), 3.02, 2.90 (s, 3H, **H-b**, Rotamere), 2.90-2.82 (m, 3H, **H-e**, Rotamere), 1.60-1.44 (m, 2H, **H-h**, Rotamere), 1.39-1.22 (m, 2H, **H-i**, Rotamere), 0.87, 0.80 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.3$ Hz, 3H, **H-j**, Rotamere).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 155.8 (**C-f**), 153.9 (**C-a**), 150.0 (**C-1**), 139.3 (**C-4**), 127.2 (**C-3**), 121.4, 121.3 (**C-2**, Rotamere), 64.5, 64.4 (**C-g**, Rotamere), 62.4 (**Ph-CH₂**), 46.5, 46.2, 46.0, 45.6 (**C-c**, **C-d**, Rotamere), 35.2, 35.0, 34.7, 34.5 (**C-b**, **C-e**, Rotamere), 30.6, 30.6 (**C-h**, Rotamere), 18.6 (**C-i**), 13.6 (**C-j**).

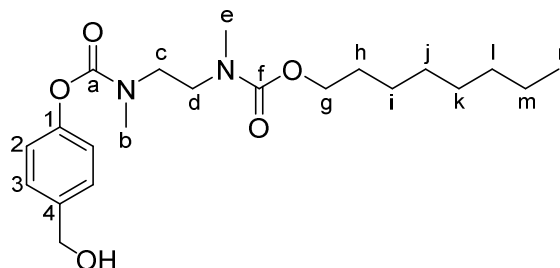
IR: ν [cm^{-1}]= 3445, 2958, 2933, 2872, 1694, 1460, 1400, 1202, 1165, 1117, 1048, 1015, 770.

Darstellung von *n*-Octyl-(4-(hydroxymethyl)phenyl)ethan-1,2-diylbis(methylcarbammat) 76p

Die Reaktion wurde nach der **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 0.86 mg (3.6 mmol, 1.0 Äquiv.) Carbamat **106** mit 0.32 mg (4.7 mmol, 1.3 Äquiv.) Imidazol und 0.55 mL (0.47 g,

4.3 mmol, 1.2 Äquiv.) Trimethylsilylchlorid in 5.0 mL THF versetzt. Es folgte die Zugabe von 1.6 mL (1.1 g, 11 mmol, 3.1 Äquiv.) Triethylamin und 2.1 mL (2.1 g, 11 mmol, 3.0 Äquiv.) Octylchlorformiat **78m**. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 1:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 0.72 g (1.8 mmol, 51%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 394.51 g/mol **Summenformel:** C₂₁H₃₄N₂O₅ **R_f-Wert:** 0.60 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 395.2540 [M+H]⁺, 811.4828 [M+Na]⁺ gef.: 395.2540, 811.4886.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 7.34-7.27 (m, 2H, **H-3**), 7.02-6.98 (m, 2H, **H-2**), 5.17 (t, ³*J*_{HH}= 5.7 Hz, 1H, **OH**), 4.47 (d, ³*J*_{HH}= 5.6 Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 4.01-3.90 (m, 2H, **H-g**), 3.57-3.39 (m, 4H, **H-c**, **H-d**, Rotamere), 3.02, 2.90 (s, 3H, **H-b**, Rotamere), 2.90-2.81 (m, 3H, **H-e**, Rotamere), 1.62-1.44 (m, 2H, **H-h**, Rotamere), 1.36-1.12 (m, 10H, **H-i**, **H-j**, **H-k**, **H-l**, **H-m**), 0.89-0.80 (m, 3H, **H-n**, Rotamere).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 155.7 (**C-f**), 154.0 (**C-a**), 150.0 (**C-1**), 139.2 (**C-4**), 127.2 (**C-3**), 121.4, 121.3 (**C-2**, Rotamere), 64.8, 64.7 (**C-g**, Rotamere), 62.4 (**Ph-CH₂**), 46.5, 46.2, 45.9, 45.5 (**C-c**, **C-d**, Rotamere), 34.6, 34.5 (**C-b**, **C-e**, Rotamere), 31.2, 28.7, 28.6, 25.4, 22.0 (**C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**, **C-m**), 28.6, 28.6 (**C-h**, Rotamere), 13.9 (**C-n**).

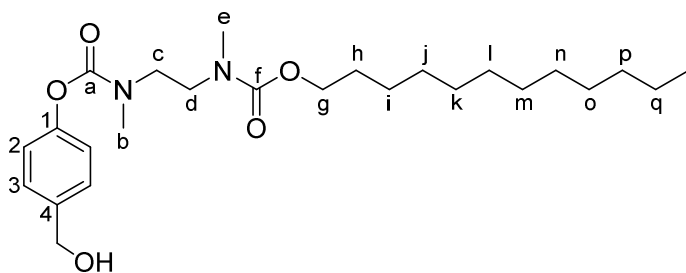
IR: ν [cm⁻¹]= 3447, 2926, 2856, 1698, 1509, 1461, 1428, 1401, 1294, 1203, 1165, 1118, 1049, 1015, 925, 844, 802, 770, 753, 724, 593, 506.

Darstellung von *n*-Dodecyl-(4-(hydroxymethyl)phenyl)ethan-1,2-diylbis(methylcarbamate) **76q**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 0.95 g (4.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Carbmat **106** mit 0.35 mg (5.2 mmol, 1.3 Äquiv.) Imidazol und 0.61 mL (0.52 g, 4.8 mmol, 1.2 Äquiv.) Trimethylsilylchlorid in 15 mL THF versetzt. Es folgte die Zugabe von 1.7 mL (1.3 g, 12 mmol, 3.1 Äquiv.) Triethylamin und 3.2 mL (3.0 g, 12 mmol, 3.0 Äquiv.) Dodecylchlorformiat **78n**. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 1:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 0.75 g (1.7 mmol, 42%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 450.62 g/mol **Summenformel:** C₂₅H₄₂N₂O₅ **R_f-Wert:** 0.65 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 451.3172 [M+H]⁺, gef.: 451.3167.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.36-7.31 (m, 2H, **H-3**), 7.10-7.05 (m, 2H, **H-2**), 4.64 (s, 2H, **Ph-CH₂**), 4.12-4.02 (m, 2H, **H-g**), 3.63-3.44 (m, 4H, **H-c, H-d**, Rotamere), 3.15-2.89 (s, 6H, **H-b, H-e**, Rotamere), 1.68-1.54



(m, 2H, **H-h**, Rotamere), 1.43-1.13 (m, 10H, **H-i, H-j, H-k, H-l, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q**), 0.88 (t, ³J_{HH}= 6.8 Hz, 3H, **H-r**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 157.1 (**C-f**), 154.9 (**C-a**), 151.0 (**C-1**), 138.3 (**C-4**), 128.0 (**C-3**), 121.9, 121.3 (**C-2**, Rotamere), 65.9, 65.8 (**C-g**, Rotamere), 64.9 (**Ph-CH₂**), 47.4, 47.3, 47.1, 46.4 (**C-c, C-d**, Rotamere), 35.4, 35.3, 35.0, 34.8 (**C-b, C-e**, Rotamere), 32.1, 29.8, 29.7, 29.7, 29.4, 29.2, 29.2, 26.1, 22.8 (**C-i, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n, C-o, C-q**), 29.5, 29.5 (**C-h**, Rotamere), 14.2 (**C-r**).

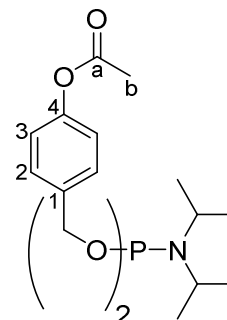
IR: ν [cm⁻¹]= 3459, 2923, 2853, 1699, 1463, 1428, 1401, 1203, 1166, 1118, 1050, 1016, 753, 507.

5.2.5 Synthese der symmetrischen Phosphoramidite 75a-o

Darstellung von Bis(4-acetyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 75a

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.60 g (3.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 20 mL abs. THF mit 0.95 mL (0.69 g, 6.9 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 1.0 g (6.1 mmol, 2.0 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylacetat **76a**, gelöst in 20 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™) gereinigt (PE/EE 5:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 1.1 g (2.5 mmol, 82%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 461.50 g/mol **Summenformel:** C₂₄H₃₂NO₆P **R_r**
Wert: 0.75 (PE/EE 1:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** m/z= ber.: 462.2040 [M+H]⁺, gef.: 462.2020.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 7.41-7.33 (m, 4H, **H-2**), 7.13-7.06 (m, 4H, **H-3**), 4.77-4.60 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 3.65 (dq, ²J_{HP}= 10.0 Hz, ³J_{HH}= 6.8 Hz, 2H, **NC-H**), 2.26 (s, 6H, **H-b**), 1.16 (d, ³J_{HH}= 6.8 Hz, 12H, ***i*Pr-(CH₃)₂**).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 169.2 (**C-a**), 149.6 (**C-4**), 136.8 (d, ³J_{CP}= 7.7 Hz, **C-1**), 127.9 (**C-2**), 121.6 (**C-3**), 64.2 (d, ²J_{CP}= 17.4 Hz, **Ph-CH₂**), 42.5 (d, ²J_{CP}= 12.0 Hz, **NC**), 24.4 (***i*Pr-(CH₃)₂**), 20.8 (**C-b**).

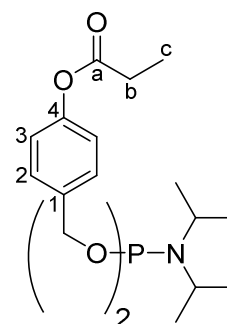
³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 147.5.

IR: ν [cm⁻¹] = 2966, 2930, 2860, 1759, 1608, 1507, 1461, 1418, 1396, 1367, 1214, 1194, 1164, 1127, 1028, 1008, 975, 909, 848, 803, 754, 711, 696, 644, 595, 564, 542, 528, 502, 464, 422, 393.

Darstellung von Bis(4-propanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75b**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.72 g (3.6 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 20 mL abs. THF mit 1.1 mL (0.83 g, 8.2 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 1.4 g (7.8 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylpropanoat **76b**, gelöst in 20 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™) gereinigt (PE/EE 6:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 1.4 g (2.9 mmol, 80%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 489.55 g/mol **Summenformel:** C₂₆H₃₆NO₆P **R_r** **Wert:** 0.83 (PE/EE 1:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** m/z = ber.: 490.2353 [M+H]⁺, gef.: 490.2337.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 7.39-7.33 (m, 4H, **H-2**), 7.12-7.06 (m, 4H, **H-3**), 4.75-4.62 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 3.65 (qd, ² J_{HP} = 10.1 Hz, ³ J_{HH} = 6.8 Hz, 2H, **NC-H**), 2.60 (q, ³ J_{HH} = 7.5 Hz, 4H, **H-b**), 1.16 (d, ³ J_{HH} = 6.8 Hz, 12H, ***i*Pr-(CH₃)₂**), 1.13 (t, ³ J_{HH} = 7.6 Hz, 6H, **H-c**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 172.6 (**C-a**), 149.7 (**C-4**), 136.8 (d, ³ J_{HP} = 7.4 Hz, **C-1**), 127.9 (**C-2**), 121.6 (**C-3**), 64.2 (d, ² J_{CP} = 17.9 Hz, **Ph-CH₂**), 42.6 (d, ² J_{CP} = 12.3 Hz, **NC**), 26.9 (**C-b**), 24.4 (d, ³ J_{CP} = 7.1 Hz, ***i*Pr-(CH₃)₂**), 8.87 (**C-c**).

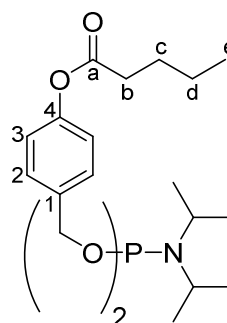
³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 147.5.

IR: ν [cm⁻¹] = 2967, 2932, 2869, 1758, 1608, 1507, 1461, 1419, 1396, 1363, 1267, 1198, 1184, 1164, 1139, 1076, 1053, 1026, 1003, 972, 890, 852, 804, 736, 703, 640, 520, 502, 470.

Darstellung von Bis(4-pentanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75c**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.63 g (3.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 20 mL abs. THF mit 1.0 mL (0.73 g, 7.2 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 1.4 g (6.9 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylpentanoat **76c**, gelöst in 10 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™) gereinigt (PE/EE 10:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 1.4 g (2.5 mmol, 80%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 545.66 g/mol **Summenformel:** C₃₀H₄₄NO₆P **R_fWert:** 0.88 (PE/EE 1:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 546.2979 [M+H]⁺, gef.: 546.2975.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 7.40-7.33 (m, 4H, **H-2**), 7.11-7.05 (m, 4H, **H-3**), 4.76-4.61 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 3.65 (qd, ²*J*_{HP}= 9.7 Hz, ³*J*_{HH}= 6.7 Hz, 2H, **NC-H**), 2.56 (t, ³*J*_{HH}= 7.4 Hz, 4H, **H-b**), 1.67-1.57 (m, 4H, **H-c**), 1.44-1.32 (m, 4H, **H-d**), 1.16 (d, ³*J*_{HH}= 7.0 Hz, 12H, ***i*Pr-(CH₃)₂**), 0.92 (t, ³*J*_{HH}= 7.4 Hz, 6H, **H-e**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 171.8 (**C-a**), 149.6 (**C-4**), 136.7 (d, ³*J*_{HP}= 7.5 Hz, **C-1**), 127.9 (**C-2**), 121.6 (**C-3**), 64.2 (d, ²*J*_{CP}=17.7 Hz, **Ph-CH₂**), 42.6 (d, ²*J*_{CP}= 12.5 Hz, **NC**), 33.2 (**C-b**), 26.4 (**C-c**), 24.4 (d, ³*J*_{CP}= 7.2 Hz, ***i*Pr-(CH₃)₂**), 21.6 (**C-d**), 13.6 (**C-e**).

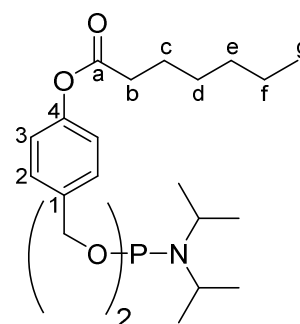
³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 147.5.

IR: ν [cm⁻¹]= 2963, 2932, 2871, 1758, 1608, 1507, 1461, 1364, 1198, 1182, 1163, 1141, 1101, 1049, 1026, 1006, 852, 756, 504.

Darstellung von Bis(4-heptanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75d**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.71 g (3.5 mmol, 1.0 Äquiv.) Di *N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 14 mL abs. THF mit 1.2 mL (0.82 g, 8.1 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 1.8 g (7.7 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylheptanoat **76d**, gelöst in 10 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (ChromatotronTM) gereinigt (PE/EE 10:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 1.7 g (2.7 mmol, 78%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 601.77 g/mol **Summenformel:** C₃₄H₅₂NO₆P **R_fWert:** 0.48 (PE/EE 6:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 602.3605 [M+H]⁺, gef.: 602.3583.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 7.41-7.32 (m, 4H, **H-2**), 7.11-7.04 (m, 4H, **H-3**), 4.69 (qd, ²*J*_{HP}= 12.8 Hz, ³*J*_{HP}= 8.5 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 3.65 (dq, ²*J*_{HP}= 10.0 Hz, ³*J*_{HH}= 6.7 Hz, 2H, **NC-H**), 2.56 (t, ³*J*_{HH}= 7.3 Hz, 4H, **H-b**), 1.63 (quint, ³*J*_{HH}= 7.4 Hz, 4H, **H-c**), 1.42-1.22 (m, 12H, **H-d**, **H-e**, **H-f**), 1.16 (d, ³*J*_{HH}= 6.8 Hz, 12H, ***i*Pr-(CH₃)₂**), 0.88 (t, ³*J*_{HH}= 6.8 Hz, 6H, **H-g**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 171.8 (**C-a**), 149.6 (**C-4**), 136.6 (d, ³*J*_{HP}= 7.2 Hz, **C-1**), 127.9 (**C-2**), 121.5 (**C-3**), 64.1 (d, ²*J*_{CP}=18.0 Hz, **Ph-CH₂**), 42.6 (d, ²*J*_{CP}= 12.3 Hz, **NC**),

33.4 (**C-b**), 30.9, 28.0, 21.9 (**C-d**, **C-e**, **C-f**), 24.4 (d, $^3J_{CP} = 7.3$ Hz, $iPr-(CH_3)_2$), 24.3 (**C-c**), 13.8 (**C-g**).

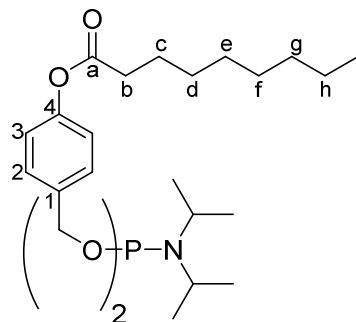
^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 147.5.

IR: ν [cm^{-1}] = 2962, 2929, 2860, 1756, 1608, 1507, 1460, 1417, 1396, 1364, 1296, 1197, 1163, 1139, 1102, 1051, 1026, 1006, 973, 916, 852, 803, 752, 640, 521, 504, 470.

Darstellung von Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 75e

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.58 g (2.9 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 20 mL abs. THF mit 0.92 mL (0.67 g, 6.6 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 1.6 g (6.0 mmol, 2.1 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylnonanoat **76e**, gelöst in 20 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (ChromatotronTM) gereinigt (PE/EE 10:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 1.7 g (2.6 mmol, 90%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 657.87 g/mol **Summenformel:** C₃₈H₆₀NO₆P **R_f-Wert:** 0.50 (PE/EE 6:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** $m/z =$ ber.: 658.4231 [M+H]⁺, 680.4050 [M+Na]⁺, gef.: 658.4126, 680.3947.



1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.40-7.32 (m, 4H, **H-2**), 7.11-7.03 (m, 4H, **H-3**), 4.78-4.59 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 3.73-3.56 (m, 2H, **NC-H**), 2.55 (t, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 4H, **H-b**), 1.63 (quint, $^3J_{HH} = 7.3$ Hz, 4H, **H-c**), 1.42-1.20 (m, 20H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 1.16 (d, $^3J_{HH} = 6.7$ Hz, 12H, $iPr-(CH_3)_2$), 0.86 (t, $^3J_{HH} = 6.7$ Hz, 6H, **H-i**).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 172.2 (**C-a**), 150.3 (**C-4**), 137.3 (d, $^3J_{CP} = 7.2$ Hz, **C-1**), 127.7 (**C-2**), 121.3 (**C-3**), 63.9 (d, $^2J_{CP} = 18.0$ Hz, **Ph-CH₂**), 42.3 (d, $^2J_{CP} = 12.6$ Hz, **NC**), 33.2 (**C-b**), 31.0, 28.4, 28.3, 28.2, 21.9 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 24.2 (d, $^3J_{CP} = 6.7$ Hz, $iPr-(CH_3)_2$), 24.1 (**C-c**), 13.7 (**C-i**).

^{31}P -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 172.2 (**C-a**), 150.3 (**C-4**), 137.3 (d, $^3J_{CP} = 7.2$ Hz, **C-1**), 127.7 (**C-2**), 121.3 (**C-3**), 63.9 (d, $^2J_{CP} = 18.0$ Hz, **Ph-CH₂**), 42.3 (d, $^2J_{CP} = 12.6$ Hz, **NC**), 33.2 (**C-b**), 31.0, 28.4, 28.3, 28.2, 21.9 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 24.2 (d, $^3J_{CP} = 6.7$ Hz, $iPr-(CH_3)_2$), 24.1 (**C-c**), 13.7 (**C-i**).

^{31}P -NMR (202 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 147.5.

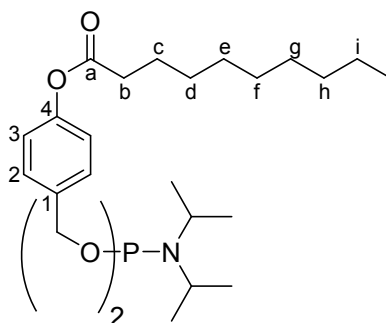
IR: ν [cm^{-1}] = 2961, 2925, 2855, 1758, 1608, 1507, 1460, 1417, 1396, 1363, 1299, 1196, 1163, 1138, 1104, 1052, 1026, 1006, 973, 941, 917, 891, 875, 851, 802, 754, 640, 521, 504.

Darstellung von Bis(4-decanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 75f

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.72 g (3.6 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 14 mL abs. THF mit 1.2 mL (0.84 g, 8.3 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 2.2 g (7.8 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenyldecanoat **76f**, gelöst in 10 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde über

zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™) gereinigt (PE/EE 10:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 2.1 g (3.1 mmol, 85%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 685.93 g/mol **Summenformel:** C₄₀H₆₄NO₆P **R_f-Wert:** 0.50 (PE/EE 6:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 686.4544 [M+H]⁺, gef.: 686.4499.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 7.40-7.32 (m, 4H, **H-2**), 7.10-7.04 (m, 4H, **H-3**), 4.77-4.59 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 3.64 (dq, ²J_{HP}= 9.9 Hz, ³J_{HH}= 6.7 Hz, 2H, **NC-H**), 2.55 (t, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 4H, **H-b**), 1.63 (quint, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 4H, **H-c**), 1.42-1.19 (m, 24H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**), 1.16 (d, ³J_{HH}= 6.7 Hz, 12H, **iPr-(CH₃)₂**), 0.86 (t, ³J_{HH}= 6.7 Hz, 6H, **H-j**).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 171.9 (**C-a**), 149.6 (**C-4**), 136.7 (d, ³J_{HP}= 7.3 Hz, **C-1**), 127.9 (**C-2**), 121.6 (**C-3**), 64.0 (**Ph-CH₂**), 42.6 (d, ²J_{CP}= 12.7 Hz, **NC**), 33.5 (**C-b**), 31.3, 28.4, 28.9, 28.8, 28.7, 28.4, 22.1 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**), 24.4 (**C-c**), 24.3 (**iPr-(CH₃)₂**), 14.0 (**C-j**).

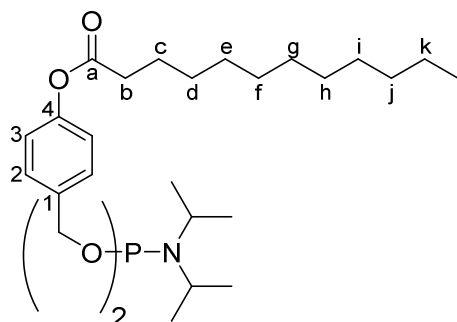
³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 147.5.

IR: ν [cm⁻¹]= 2960, 2924, 2854, 1759, 1608, 1507, 1460, 1417, 1396, 1364, 1299, 1197, 1164, 1137, 1105, 1052, 1026, 1006, 973, 914, 852, 780, 754, 640, 521, 504.

Darstellung von Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 75g

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.65 g (3.2 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 14 mL abs. THF mit 1.0 mL (0.73 g, 7.2 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 2.1 g (6.7 mmol, 2.1 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenyldodecanoat **76g**, gelöst in 10 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™) gereinigt (PE/EE 10:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 1.6 g (2.2 mmol, 67%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 742.04 g/mol **Summenformel:** C₄₄H₇₂NO₆P **R_f-Wert:** 0.52 (PE/EE 6:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 742.5170 [M+H]⁺, gef.: 742.5170.



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.38-7.33 (m, 4H, **H-2**), 7.07-7.01 (m, 4H, **H-3**), 4.78-4.64 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 3.74-3.64 (m, 2H, **NC-H**), 2.55 (t, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 4H, **H-b**), 1.75 (quint, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 4H, **H-c**), 1.46-1.17 (m, 32H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k**), 1.16 (d, ³J_{HH}= 6.9 Hz, 12H, **iPr-(CH₃)₂**), 0.89 (t, ³J_{HH}= 6.7 Hz, 6H, **H-l**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 173.8 (**C-a**), 150.1 (**C-4**), 137.0 (**C-1**), 128.1 (**C-2**), 121.5 (**C-3**), 64.9 (d, ²J_{CP}= 18.9 Hz, **Ph-CH₂**), 43.2 (d, ²J_{CP}= 12.0 Hz, **NC**), 34.6 (**C-b**), 32.0, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 22.9 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k**), 25.1 (**C-c**), 24.8 (**iPr-(CH₃)₂**), 14.3 (**C-l**).

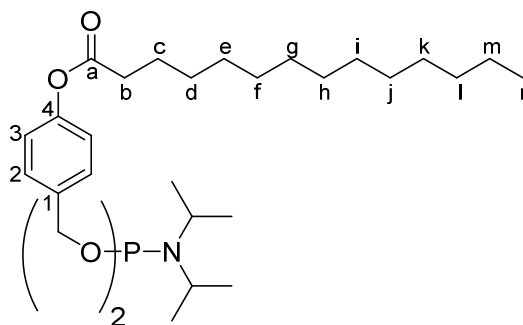
³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 147.9.

IR: ν [cm⁻¹]= 2962, 2922, 2854, 1761, 1509, 1465, 1394, 1364, 1249, 1217, 1201, 1127, 1102, 1056, 1011, 974, 821, 765, 523.

Darstellung von Bis(4-tetradecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75h**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.82 g (4.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 20 mL abs. THF mit 1.3 mL (0.95 g, 9.4 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 3.0 g (8.9 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenyltetradecanoat **76h**, gelöst in 20 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™) gereinigt (PE/EE 10:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 2.4 g (3.0 mmol, 73%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 798.14 g/mol **Summenformel:** C₄₈H₈₀NO₆P **R_r Wert:** 0.57 (PE/EE 6:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** m/z = ber.: 798.5796 [M+H]⁺, 820.5615 [M+Na]⁺, gef.: 798.5759, 820.5575.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.40-7.31 (m, 4H, **H-2**), 7.08-6.99 (m, 4H, **H-3**), 4.79-4.61 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 3.69 (dq, ²J_{HP}= 9.9 Hz, ³J_{HH}= 6.8 Hz, 2H, **NC-H**), 2.54 (t, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 4H, **H-b**), 1.75 (quint, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 4H, **H-c**), 1.46-1.22 (m, 40H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m**), 1.20 (d, ³J_{HH}= 6.8 Hz, 12H, **iPr-(CH₃)₂**), 0.88 (t, ³J_{HH}= 6.8 Hz, 6H, **H-n**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 172.5 (**C-a**), 150.1 (**C-4**), 137.1 (d, ³J_{HP}= 7.3 Hz, **C-1**), 128.1 (**C-2**), 121.5 (**C-3**), 64.9 (d, ²J_{CP}=18.2 Hz, **Ph-CH₂**), 43.2 (d, ²J_{CP}= 12.5 Hz, **NC**), 34.6 (**C-b**), 32.1, 29.8, 29.8, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 22.8 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m**), 24.8 (d, ³J_{CP}= 7.2 Hz, **iPr-(CH₃)₂**), 24.8 (**C-c**), 14.3 (**C-n**).

^{31}P -NMR (162 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 147.9.

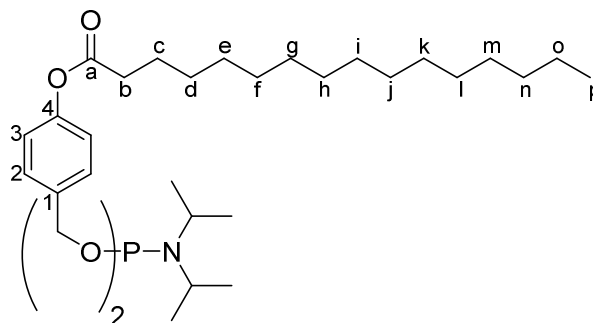
IR: ν [cm^{-1}]= 2956, 2915, 2848, 1753, 1734, 1606, 1509, 1464, 1412, 1387, 1362, 1329, 1303, 1278, 1253, 1225, 1152, 1142, 1126, 1091, 1017, 970, 850, 786, 760, 727, 693, 571, 522, 498.

Darstellung von Bis(4-hexadecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75i**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 1.0 g (5.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 30 mL abs. THF mit 1.6 mL (1.17 g, 12 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 4.0 g (11 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylhexadecanoat **76i**, gelöst in 25 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (ChromatotronTM) gereinigt (PE/EE 10:1 v/v + 5% Et_3N).

Ausbeute: Es wurden 3.2 g (3.8 mmol, 74%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Molmasse: 854.25 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{52}\text{H}_{88}\text{O}_6\text{P}$ **R_f-Wert:** 0.57 (PE/EE 6:1 v/v + 5% Et_3N) **HRMS (ESI⁺):** m/z ber.: 854.6422 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, 876.6241 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, gef.: 854.6382, 876.6225.



^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 7.37-7.32 (m, 4H, **H-2**), 7.06-7.01 (m, 4H, **H-3**), 4.79-4.61 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 3.75-3.62 (m, 2H, **NC-H**), 2.54 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.5$ Hz, 4H, **H-b**), 1.75 (quint, $^3J_{\text{HH}}= 7.5$ Hz, 4H, **H-c**), 1.45-1.19 (m, 48H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**, **H-j**, **H-k**, **H-l**, **H-m**, **H-n**, **H-o**), 1.20 (d, $^3J_{\text{HH}}= 6.8$ Hz, 12H, ***i*Pr-(CH₃)₂**), 0.88 (t, $^3J_{\text{HH}}= 6.8$ Hz, 6H, **H-p**).

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 172.5 (**C-a**), 150.1 (**C-4**), 137.1 (d, $^3J_{\text{CP}}= 7.3$ Hz, **C-1**), 128.1 (**C-2**), 121.5 (**C-3**), 65.0 (d, $^2J_{\text{CP}}=18.2$ Hz, **Ph-CH₂**), 43.3 (d, $^2J_{\text{CP}}= 11.9$ Hz, **NC**), 34.6 (**C-b**), 32.1, 29.8, 29.8, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 22.8 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**, **C-m**, **C-n**, **C-o**), 25.1 (**C-c**), 24.8 (d, $^3J_{\text{CP}}= 7.3$ Hz, ***i*Pr-(CH₃)₂**), 14.3 (**C-p**).

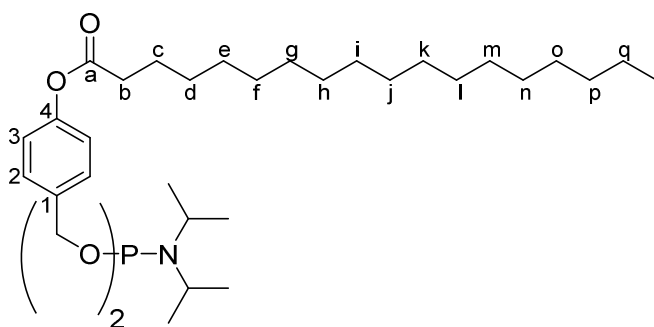
^{31}P -NMR (162 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 148.0.

IR: ν [cm^{-1}]= 2957, 3914, 2848, 1750, 1605, 1508, 1463, 1411, 1388, 1362, 1330, 1309, 1286, 1264, 1241, 1221, 1198, 1167, 1152, 1126, 1098, 1034, 1018, 998, 969, 925, 863, 849, 805, 727, 720, 693, 522, 509.

Darstellung von Bis(4-octadecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75j**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.80 g (4.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 20 mL abs. THF mit 1.3 mL (0.91 g, 9.1 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 3.3 g (8.3 mmol, 2.1 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenyloctadecanoat **76j**, gelöst in 15 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™) gereinigt (PE/EE 10:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 2.7 g (2.8 mmol, 74%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 910.36 g/mol **Summenformel:** C₅₆H₉₆NO₆P **R_r-Wert:** 0.59 (PE/EE 6:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 910.7048 [M+H]⁺, gef.: 901.6746.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.42-7.30 (m, 4H, **H-2**), 7.09-6.99 (m, 4H, **H-3**), 4.81-4.60 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 3.68 (dq, ²J_{HP}= 10.0 Hz, ³J_{HH}= 6.8 Hz, 2H, **NC-H**), 2.54 (t, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 4H, **H-b**), 1.63 (quint, ³J_{HH}= 7.5 Hz, 4H, **H-c**), 1.47-1.23 (m, 56H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m, H-n, H-o, H-p, H-q**), 1.20 (d, ³J_{HH}= 6.8 Hz, 12H, **iPr-(CH₃)₂**), 0.88 (t, ³J_{HH}= 6.7 Hz, 6H, **H-r**).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 172.5 (**C-a**), 150.0 (**C-4**), 137.1 (d, ³J_{CP}= 7.9 Hz, **C-1**), 128.1 (**C-2**), 121.5 (**C-3**), 65.0 (d, ²J_{CP}= 18.8 Hz, **Ph-CH₂**), 43.3 (d, ²J_{CP}= 11.9 Hz, **NC**), 34.6 (**C-b**), 29.9, 29.8, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 22.8 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n, C-o, C-p, C-q**), 25.1 (**C-c**), 24.8 (d, ³J_{CP}= 7.1 Hz, **iPr-(CH₃)₂**), 14.3 (**C-r**).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 147.9.

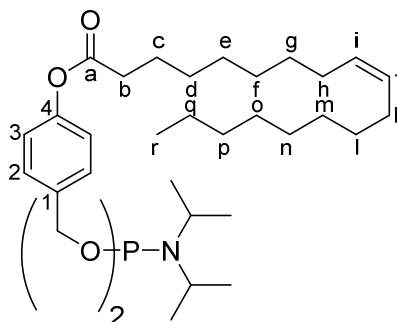
IR: ν [cm⁻¹]= 2958, 2915, 2848, 1753, 1606, 1509, 1464, 1412, 1381, 1362, 1330, 1309, 1287, 1264, 1252, 1220, 1199, 1167, 1152, 1031, 1018, 992, 924, 819, 761, 720, 694, 640, 572, 522, 504.

Darstellung von Bis(4-(*Z*)-octadec-9-enoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75k**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.65 g (3.2 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 25 mL abs. THF mit 1.0 mL (0.75 g, 7.4 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 2.7 g (7.0 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenyl-(*Z*)-octadec-9-enoat **76k**, gelöst in 15 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde

über zirkuläre präparative Dünnschicht-chromatographie (Chromatotron™) gereinigt (PE/EE 10:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 2.68 g (2.96 mmol, 92%) eines schwach gelben Öls erhalten. **Molmasse:** 906.33 g/mol **Summenformel:** C₅₆H₉₂NO₆P **R_r-Wert:** 0.57 (PE/EE 6:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 906.6735 [M+H]⁺, gef.: 906.6746.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.37-7.32 (m, 4H, **H-2**), 7.05-6.99 (m, 4H, **H-3**), 5.40-5.30 (m, 4H, **H-i**, **H-j**), 4.78-4.63 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 3.74-3.61 (m, 2H, **NC-H**), 2.57-2.50 (m, 4H, **H-b**), 2.09-1.95 (m, 8H, **H-h**, **H-k**), 1.79-1.64 (m, 4H, **H-c**), 1.43-1.20 (m, 40H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-l**, **H-m**, **H-n**, **H-o**, **H-p**, **H-q**), 1.19 (d, ³J_{HH}= 6.9 Hz, 12H, ***i*Pr-(CH₃)₂**), 0.87 (t, ³J_{HH}= 6.7 Hz, 6H, **H-r**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 172.5 (**C-a**), 150.0 (**C-4**), 137.2 (d, ³J_{CP}= 6.8 Hz, **C-1**), 130.2, 129.9 (**C-i**, **C-j**), 128.1 (**C-2**), 121.5 (**C-3**), 65.1 (**Ph-CH₂**), 43.3 (d, ²J_{CP}= 12.4 Hz, **NC**), 34.5 (**C-b**), 32.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 22.8 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-l**, **C-m**, **C-n**, **C-o**, **C-p**, **C-q**), 27.4, 27.3 (**C-h**, **C-k**), 25.1 (**C-c**), 24.7 (***i*Pr-(CH₃)₂**), 14.3 (**C-r**).

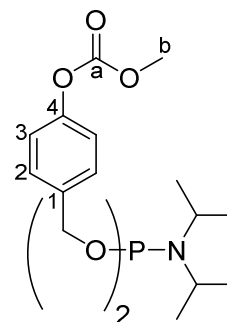
³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 147.9.

IR: ν [cm⁻¹]= 3003, 2923, 2853, 1760, 1609, 1507, 1461, 1417, 1396, 1364, 1299, 1198, 1164, 1129, 1053, 1026, 1005, 974, 915, 876, 852, 808, 754, 723, 640, 521, 504.

Darstellung von Bis(4-methyloxycarbonyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 751

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.74 g (3.7 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 15 mL abs. THF mit 1.2 mL (0.85 g, 8.4 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 1.5 g (8.2 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylmethylcarbonat **76I**, gelöst in 15 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™) gereinigt (PE/EE 4:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 1.5 g (3.0 mmol, 82%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 493.49 g/mol **Summenformel:** C₂₄H₃₂NO₈P **R_r-Wert:** 0.77 (PE/EE 1:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 494.1938 [M+H]⁺, gef.: 494.2276.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 7.42-7.34 (m, 4H, **H-2**), 7.18-7.07 (m, 4H, **H-3**), 4.78-4.61 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 3.82 (s, 6H, **H-b**), 3.72-3.57 (m, 2H, **NC-H**), 1.16 (d, ³*J*_{HH}= 6.8 Hz, 12H, ***i*Pr-(CH₃)₂**).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 153.7 (**C-a**), 149.9 (**C-4**), 137.2 (d, ³*J*_{CP}= 7.4 Hz, **C-1**), 128.0 (**C-2**), 121.1 (**C-3**), 64.1 (d, ²*J*_{CP}= 18.1 Hz, **Ph-CH₂**), 55.4 (**C-b**), 42.6 (d, ²*J*_{CP}= 12.5 Hz, **NC**), 24.4 (d, ⁴*J*_{CP}= 6.7 Hz, ***i*Pr-(CH₃)₂**).

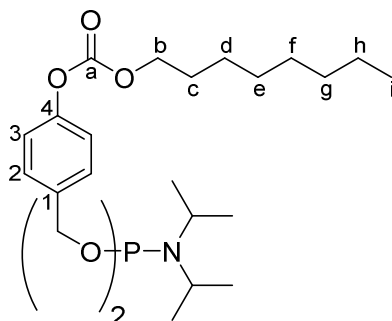
³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 147.5.

IR: ν [cm⁻¹]= 2965, 2916, 2849, 1760, 1608, 1508, 1439, 1396, 1364, 1254, 1217, 1200, 1126, 1059, 1027, 1004, 972, 946, 930, 852, 821, 751, 723, 692, 641, 597, 522, 503, 469.

Darstellung von Bis(4-octyloxycarbonyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75m**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.76 g (3.8 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 15 mL abs. THF mit 1.3 mL (0.88 g, 8.7 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 2.3 g (8.3 mmol, 2.2 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenyloctylcarbonat **76m**, gelöst in 15 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™) gereinigt (PE/EE 6:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 2.2 g (3.2 mmol, 83%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 689.87 g/mol **Summenformel:** C₃₈H₆₀NO₈P **R_f-Wert:** 0.43 (PE/EE 6:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 690.4129 [M+H]⁺, gef.: 690.4086.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.39-7.31 (m, 4H, **H-2**), 7.20-7.13 (m, 4H, **H-3**), 4.80-4.62 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.24 (t, ³*J*_{HH}= 6.7 Hz, 4H, **H-b**), 3.69 (dq, ²*J*_{HP}= 10.0 Hz, ³*J*_{HH}= 6.8 Hz, 2H, **NC-H**), 1.82-1.66 (m, 4H, **H-c**), 1.48-1.23 (m, 16H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h**), 1.20 (d, ³*J*_{HH}= 6.8 Hz, 12H, ***i*Pr-(CH₃)₂**), 0.89 (t, ³*J*_{HH}= 6.7 Hz, 6H, **H-i**).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 153.9 (**C-a**), 150.4 (**C-4**), 137.4 (d, ³*J*_{CP}= 7.5 Hz, **C-1**), 128.2 (**C-2**), 121.0 (**C-3**), 69.1 (**C-b**), 64.9 (d, ²*J*_{CP}= 18.7 Hz, **Ph-CH₂**), 42.2 (d, ²*J*_{CP}= 12.6 Hz, **NC**), 31.9, 29.3, 29.3, 25.8, 22.8 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h**), 28.7 (**C-c**), 24.8 (d, ⁴*J*_{CP}= 7.6 Hz, ***i*Pr-(CH₃)₂**), 14.2 (**C-i**).

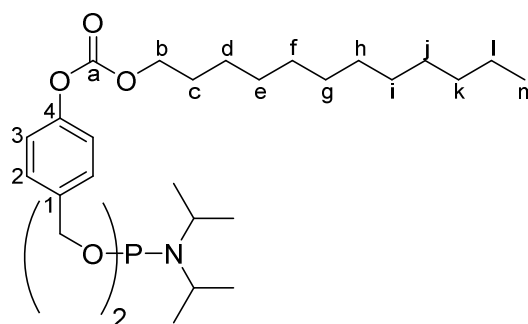
³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 148.0.

IR: ν [cm⁻¹]= 2961, 2926, 2856, 1759, 1508, 1461, 1393, 1364, 1245, 1215, 1201, 1126, 1053, 1027, 1007, 973, 852, 821, 753, 696, 641, 522, 505.

Darstellung von Bis(4-dodecyloxycarbonyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75n**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.50 g (2.5 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 14 mL abs. THF mit 0.80 mL (0.58 g, 5.8 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 1.8 g (5.2 mmol, 2.1 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenyldodecylcarbonat **76n**, gelöst in 10 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde über zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron™) gereinigt (PE/EE 10:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 1.8 g (2.2 mmol, 88%) eines farblosen Farbstoff erhalten. **Molmasse:** 802.09 g/mol **Summenformel:** C₄₆H₇₆NO₈P **R_r Wert:** 0.53 (PE/EE 6:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 802.5381 [M+H]⁺, gef.: 802.5352.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.39-7.32 (m, 4H, **H-2**), 7.17-7.09 (m, 4H, **H-3**), 4.80-4.62 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.24 (t, ³J_{HH}= 6.7 Hz, 4H, **H-b**), 3.75-3.57 (m, 2H, **NC-H**), 1.80-1.67 (m, 4H, **H-c**), 1.47-1.23 (m, 36H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l**), 1.20 (d, ³J_{HH}= 6.8 Hz, 12H, ***i*Pr-(CH₃)₂**), 0.88 (t, ³J_{HH}= 6.7 Hz, 6H, **H-m**).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 153.9 (C-a), 150.4 (C-4), 137.4 (d, ³J_{CP}= 7.8 Hz, **C-1**), 128.2 (**C-2**), 121.0 (**C-3**), 69.1 (**C-b**), 64.9 (d, ²J_{CP}= 18.2 Hz, **Ph-CH₂**), 43.2 (d, ²J_{CP}= 12.5 Hz, **NC**), 32.1, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 25.8, 22.8 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l**), 28.6 (**C-c**), 24.8 (d, ⁴J_{CP}= 7.4 Hz, ***i*Pr-(CH₃)₂**), 14.3 (**C-m**).

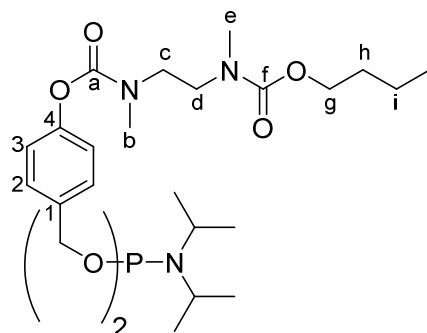
³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 148.0.

IR: ν [cm⁻¹]= 2961, 2923, 2853, 1760, 1509, 1462, 1393, 1363, 1245, 1216, 1201, 1127, 1056, 1027, 1010, 973, 853, 821, 779, 754, 722, 522, 506.

Darstellung von Bis(4-(butyl-ethan-1,2-diylbis(methylcarbamat))-oxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75o**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.20 g (0.99 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 4.0 mL abs. THF mit 0.32 mL (0.23 g, 2.3 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 0.75 g (2.2 mmol, 2.2 Äquiv.) Butyl-(4-(hydroxymethyl)-phenyl)ethan-1,2-diylbis(methylcarbamat) **76o**, gelöst in 5.0 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 1:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 0.49 g (0.61 mmol, 62%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 805.95 g/mol **Summenformel:** C₄₀H₆₄N₅O₁₀P **R_f-Wert:** 0.30 (PE/EE 1:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 806.4464 [M+H]⁺, 828.4283 [M+Na]⁺, gef.: 806.4440, 828.4259.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.39-7.30 (m, 4H, **H-2**), 7.10-7.01 (m, 4H, **H-3**), 4.78-4.60 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.14-4.02 (m, 4H, **H-g**), 3.76-3.61 (m, 2H, **NC-H**), 3.62-3.42 (m, 8H, **H-c**, **H-d**, Rotamere), 3.15-2.89 (m, 12H, **H-b**, **H-e**, Rotamere), 1.65-1.56 (m, 4H, **H-h**, Rotamere), 1.46-1.30 (m, 4H, **H-i**, Rotamere), 1.19 (d, ³J_{HH}= 6.9 Hz, 12H, **iPr-(CH₃)₂**), 0.93, 0.88 (t, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 6H, **H-j**, Rotamere).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 156.9 (**C-f**), 154.8 (**C-a**), 150.5 (**C-4**), 136.5 (**C-1**), 128.0 (**C-2**), 121.6, 121.6 (**C-3**, Rotamere), 65.7, 65.6 (**C-g**, Rotamere), 65.0 (d, ²J_{CP}= 18.1 Hz, **Ph-CH₂**), 47.8, 47.4, 47.0, 46.4 (**C-c**, **C-d**, Rotamere), 43.3 (d, ²J_{CP}= 12.2 Hz, **NC**), 35.4, 35.3, 35.2, 34.8 (**C-b**, **C-e**, Rotamere), 31.3, 31.3 (**C-h**, Rotamere), 24.8 (d, ²J_{CP}= 7.5 Hz, **iPr-(CH₃)₂**), 19.3 (**C-i**), 13.9 (**C-j**).

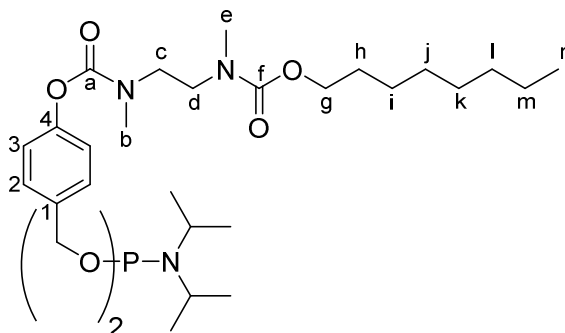
³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 147.4.

IR: ν [cm⁻¹]= 2962, 2932, 2871, 1719, 1695, 1460, 1427, 1400, 1364, 1199, 1165, 1117, 1050, 1025, 1003, 972, 860, 790, 769, 751, 522, 506.

Darstellung von Bis(4-(octyl-ethan-1,2-diylbis(methylcarbamat))-oxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 75p

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.14 g (0.71 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 10 mL abs. THF mit 0.23 mL (0.17 g, 1.6 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 0.59 g (1.5 mmol, 2.1 Äquiv.) Octyl-(4-(hydroxymethyl)-phenyl)ethan-1,2-diylbis(methylcarbamat) **76p**, gelöst in 5.0 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 1:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 0.59 g (0.64 mmol, 90%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 918.17 g/mol **Summenformel:** C₄₈H₈₀N₅O₁₀P **R_f-Wert:** 0.41 (PE/EE 1:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 918.5716 [M+H]⁺, gef.: 918.6124.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.37-7.29 (m, 4H, **H-2**), 7.10-7.02 (m, 4H, **H-3**), 4.78-4.61 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.12-4.02 (m, 4H, **H-g**), 3.74-3.63 (m, 2H, **NC-H**), 3.62-3.43 (m, 8H, **H-c**, **H-d**, Rotamere), 3.15-2.89 (m, 12H, **H-b**, **H-e**, Rotamere), 1.69-1.55 (m, 4H, **H-h**, Rotamere), 1.40-1.19 (m, 36H, **H-i**, **H-j**, **H-k**, **H-l**, **H-m**, Rotamere), 1.19 (d, ³J_{HH}= 6.8 Hz, 12H, **iPr-(CH₃)₂**), 0.87 (t, ³J_{HH}= 6.8 Hz, 6H, **H-n**, Rotamere).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 156.6 (**C-f**), 154.8 (**C-a**), 150.7 (**C-4**), 136.6 (**C-1**), 128.0 (**C-2**), 121.6, 121.5 (**C-3**, Rotamere), 65.9, 65.8 (**C-g**, Rotamere), 65.0 (d, ²J_{CP}= 18.0 Hz, **Ph-CH₂**), 47.6, 47.4, 47.0, 46.4 (**C-c**, **C-d**, Rotamere), 43.2 (d, ²J_{CP}= 12.6 Hz, **NC**), 35.4, 35.3, 35.1, 34.8 (**C-b**, **C-e**, Rotamere), 31.9, 29.4, 29.3, 26.1, 22.8 (**C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**, **C-m**), 29.2, 29.2 (**C-h**, Rotamere), 24.8 (d, ²J_{CP}= 7.2 Hz, **iPr-(CH₃)₂**), 14.2 (**C-n**).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 147.7.

IR: ν [cm⁻¹]= 2958, 2927, 2856, 1722, 1699, 1509, 1461, 1401, 1202, 1167, 1120, 1026, 1007, 770, 753, 641, 588, 523.

Darstellung von Bis(4-(dodecyl-ethan-1,2-diylbis(methylcarbammat))-oxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75q**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.15 g (0.75 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 3.0 mL abs. THF mit 0.24 mL (0.17 g, 1.7 mmol, 2.3 Äquiv.) Triethylamin sowie 0.71 g (1.6 mmol, 2.1 Äquiv.) Dodecyl-(4-(hydroxymethyl)-phenyl)ethan-1,2-diylbis(methylcarbammat) **76q**, gelöst in 5.0 mL abs. THF, versetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 1:1 v/v + 5% Et₃N).

Ausbeute: Es wurden 0.37 g (0.36 mmol, 48%) eines farblosen Öls erhalten.

Molmasse: 1030.38 g/mol

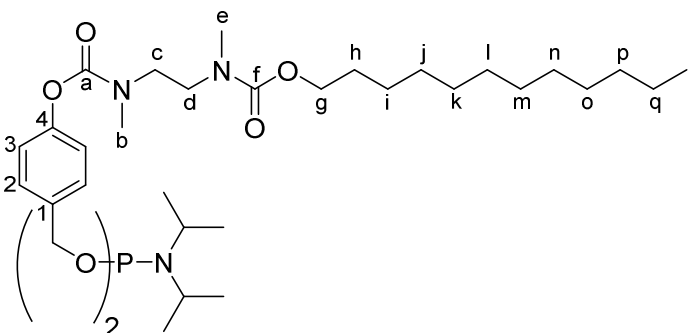
Summenformel: C₅₆H₉₆N₅O₁₀P

R_f-Wert: 0.50 (PE/EE

1:1 v/v + 5% Et₃N) **HRMS (ESI⁺):**

m/z= ber.: 1030.6982 [M+H]⁺,

1052.6807 [M+Na]⁺, gef.: 1030.6968, 1052.6787.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 7.36-7.30 (m, 4H, **H-2**), 7.08-7.03 (m, 4H, **H-3**), 4.76-4.62 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.11-4.02 (m, 4H, **H-g**), 3.73-3.62 (m, 2H, **NC-H**), 3.61-3.42 (m, 8H, **H-c**, **H-d**, Rotamere), 3.14-2.90 (m, 12H, **H-b**, **H-e**, Rotamere), 1.67-1.56 (m, 4H, **H-h**, Rotamere), 1.37-1.21 (m, 36H, **H-i**, **H-j**, **H-k**, **H-l**, **H-m**, **H-n**, **H-o**, **H-p**, **H-q**), 1.19 (d, ³J_{HH}= 6.8 Hz, 12H, **iPr-(CH₃)₂**), 0.87 (t, ³J_{HH}= 6.9 Hz, 6H, **H-r**, Rotamere).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 157.0 (**C-f**), 154.7 (**C-a**), 150.7, 150.6 (**C-4**, Rotamere), 136.6 (**C-1**), 128.0, 128.0 (d, $^4J_{\text{CP}}= 2.6$ Hz, **C-2**), 121.6, 121.5 (**C-3**, Rotamere), 65.9, 65.8 (**C-g**, Rotamere), 65.0 (d, $^2J_{\text{CP}}= 18.3$ Hz, **Ph-CH₂**), 47.4, 47.3, 46.9, 46.4 (**C-c**, **C-d**, Rotamere), 43.2 (d, $^2J_{\text{CP}}= 12.3$ Hz, **NC**), 35.4, 35.3, 35.0, 34.6 (**C-b**, **C-e**, Rotamere), 32.0, 29.8, 29.7, 29.7, 29.7, 29.5, 29.4, 26.1, 22.8 (**C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**, **C-m**, **C-n**, **C-o**, **C-p**, **C-q**), 29.2, 29.2 (**C-h**, Rotamere), 24.8 (d, $^2J_{\text{CP}}= 7.4$ Hz, ***i*Pr-(CH₃)₂**), 14.2 (**C-r**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 147.3.

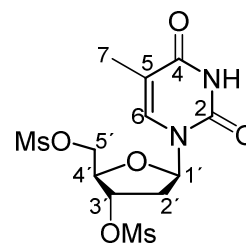
IR: ν [cm^{-1}]= 2923, 2853, 1721, 1699, 1510, 1460, 1428, 1400, 1364, 1294, 1252, 1200, 1166, 1118, 1051, 1026, 1004, 973, 925, 861, 769, 752, 641, 588, 523, 507.

5.2.6 Synthese von d4T-Di- 74 und -Triphosphat-Prodrugs 56a-q

Darstellung von 3',5'-Di-O-mesylythymidin 84

Unter Stickstoff als Intergas wurden 11.1 g (45.8 mmol, 1.0 Äquiv.) Thymidin **83** in 40 mL abs. Pyridin suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Im Anschluss wurden 9.60 mL (14.2 g, 124 mmol, 2.7 Äquiv.) Methansulfonylchlorid hinzugegeben. Nach 30 Minuten des Rührens bei 0 °C wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und für eine weitere Stunde gerührt. Darauffolgend wurde die Lösung in Eiswasser gegossen und für 30 Minuten hydrolysiert. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert und mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Umkristallisation aus Aceton.

Ausbeute: Es wurden 15.9 g (39.9 mmol, 87%) eines beigen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 398.40 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_2$ **R_f** **Wert:** 0.21 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** $m/z=$ ber.: 399.0526 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, 421.0346 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, 819.0800 [$2\text{M}+\text{Na}$]⁺, gef.: 399.0492, 421.0308, 819.0807.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 11.39 (bs, 1H, **NH**), 7.51 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.2$ Hz, 1H, **H-6**), 6.23 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.1$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.35-5.28 (m, 1H, **H-3'**), 4.51-4.42 (m, 2H, **H-5'**), 4.41-4.35 (m, 1H, **H-4'**), 3.33 (s, 3H, **Ms-CH₃**), 3.26 (s, 3H, **Ms-CH₃**), 2.56-2.48 (m, 2H, **H-2'**), 1.80 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.2$ Hz, **H-7**).

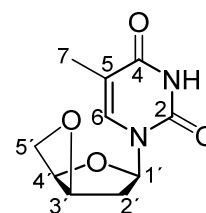
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 163.6 (**C-4**), 150.4 (**C-2**), 135.8 (**C-6**), 110.1 (**C-5**), 84.1 (**C-1'**), 80.6 (**C-4'**), 79.24 (**C-3'**), 68.5 (**C-5'**), 37.7 (**Ms-CH₃**), 36.9 (**Ms-CH₃**), 36.1 (**C-2'**), 12.0 (**C-7**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3157, 3094, 3021, 2939, 2827, 1711, 1673, 1476, 1428, 1340, 1321, 1278, 1164, 1087, 967, 954, 933, 879, 836, 822, 795, 759, 737, 675, 628, 570, 547, 523, 492, 468, 455, 430, 411.

Darstellung von 3',5'-Anhydrothymidin 85

15.8 g (39.7 mmol, 1.0 Äquiv.) 3',5'-Di-*O*-mesylthymidin **84** wurden portionsweise zu einer Lösung aus 4.76 g (119 mmol, 3.0 Äquiv.) Natriumhydroxid in 100 mL Wasser gegeben und für 1.5 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit Salzsäure neutralisiert und unter vermindertem Druck auf das halbe Volumen eingengt. Anschließend wurde dreimal mit größeren Volumina Dichlormethan (3-faches Volumen im Vergleich zur wässrigen Phase) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Auf eine weitere Reinigung konnte verzichtet werden.

Ausbeute: Es wurden 7.83 g (34.9 mmol, 88%) eines beigen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 224.22 g/mol **Summenformel:** C₁₀H₁₂N₂O₄ **R_f-Wert:** 0.72 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 247.0689 [M+Na]⁺, gef. 247.0694.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.34 (bs, 1H, **NH**), 8.02 (d, ⁴*J*_{HH}= 1.4 Hz, 1H, **H-6**), 6.51 (dd, ³*J*_{HH}= 6.1 Hz, ⁴*J*_{HH}= 4.7 Hz, 1H, **H-1'**), 5.50-5.45 (m, 1H, **H-3'**), 4.90 (td, ³*J*_{HH}= 4.1 Hz, ⁴*J*_{HH}= 1.9 Hz, 1H, **H-4'**), 4.69 (dd, ²*J*_{HH}= 8.1 Hz, ³*J*_{HH}= 4.1 Hz, 1H, **H-5'_a**), 4.04 (dd, ²*J*_{HH}= 8.1 Hz, ³*J*_{HH}= 2.0 Hz, 1H, **H-5'_b**), 2.50-2.45 (m, 2H, **H-2'**), 1.79 (d, ⁴*J*_{HH}= 1.4 Hz, 3H, **H-7**).

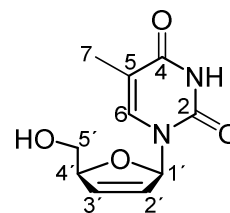
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 163.4 (**C-4**), 151.1 (**C-2**), 136.6 (**C-6**), 109.6 (**C-5**), 88.3 (**C-1'**), 86.8 (**C-3'**), 79.8 (**C-4'**), 75.1 (**C-5'**), 37.1 (**C-2'**), 12.3 (**C-7**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3155, 3041, 2989, 1829, 2794, 1713, 1681, 1461, 1421, 1380, 1330, 1269, 1246, 1217, 1204, 1161, 1108, 1087, 1057, 1035, 1004, 982, 966, 929, 892, 877, 860, 833, 802, 754, 718, 624, 550, 525, 420.

Darstellung von 3'-Desoxy-2',3'-dihydrothymidin 3 (d4T)

Zu einer Lösung aus 7.60 g (33.9 mmol, 1.0 Äquiv.) 3',5'-Anhydrothymidin **85** in 200 mL *tert*-Butanol wurden bei 65 °C über einen Zeitraum von einer halben Stunde portionsweise 7.61 g (136 mmol, 4.0 Äquiv.) Kaliumhydroxid gegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für drei Stunden gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 30 mL Methanol, wodurch eine klare Lösung erhalten wurde. Diese wurde mit Salzsäure neutralisiert, die resultierenden Kaliumsalze filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH erst 19:1, dann 9:1 v/v) vollzogen, wobei die Beladung über einen "dry-load" mit Kieselgel erfolgte.

Ausbeute: Es wurden 4.71 g (21.0 mmol, 62%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 224.22 g/mol **Summenformel:** $C_{10}H_{12}N_2O_4$ **R_f-Wert:** 0.48 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** $m/z=$ ber.: 247.0689 $[M+Na]^+$, gef.: 247.0692.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.30 (bs, 1H, **NH**), 7.64 (d, ⁴ J_{HH} = 1.2 Hz, 1H, **H-6**), 6.82 (dt, ³ J_{HH} = 3.4 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, **H-1'**), 6.39 (dt, ³ J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, **H-3'**), 5.91 (ddd, ³ J_{HH} = 6.0 Hz, ³ J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.4 Hz, 1H, **H-2'**), 5.01 (t, ³ J_{HH} = 5.1 Hz, 1H, **OH**), 4.80-4.73 (m, 1H, **H-4'**), 3.64-3.56 (m, 2H, **H-5'**), 1.72 (d, ⁴ J_{HH} = 1.2 Hz, 3H, **H-7**).

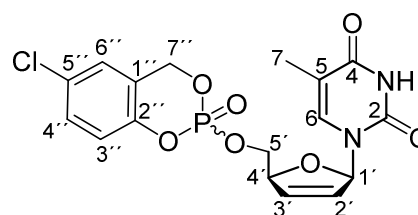
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 163.9 (**C-4**), 150.8 (**C-2**), 136.8 (**C-6**), 134.8 (**C-3'**), 126.0 (**C-2'**), 109.0 (**C-5**), 88.9 (**C-1'**), 87.3 (**C-4'**), 62.3 (**C-5'**), 12.2 (**C-7**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3447, 3152, 3095, 3024, 2931, 2822, 1681, 1455, 1421, 1342, 1285, 1267, 1251, 1225, 1180, 1141, 1113, 1089, 1071, 1039, 974, 956, 902, 877, 850, 816, 779, 758, 742, 694, 660, 644, 580, 487, 470, 427, 406.

Darstellung von 5-Chlor-cycloSal-3'-dideoxy-2',3'-dihydrothymidinmonophosphat 79 (cycloSal-d4T)

Die Reaktion wurde analog zu der **AAV 5 (Variante B)** durchgeführt. Es wurden 0.50 g (2.2 mmol, 1.0 Äquiv.) d4T **3** in 8.0 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 0.60 g (2.7 mmol, 1.2 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** sowie 0.53 mL (0.54 g, 3.1 mmol, 1.4 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 0.57 mL (3.1 mmol, 1.4 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan). Die Reinigung des Rohprodukts wurde säulenchromatographisch an Kieselgel ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v) durchgeführt.

Ausbeute: Es wurden 0.91 g (2.1 mmol, 97%) eines farblosen Feststoffs in Form zweier Diastereomere erhalten. **Molmasse:** 426.75 g/mol **Summenformel:** $C_{17}H_{16}ClN_2O_7P$ **R_f-Wert:** 0.29 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** $m/z=$ ber.: 449.0276 $[M+Na]^+$, gef.: 449.0287.



¹H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm]= 8.92, 8.92 (bs, 1H, **NH**, Diastereomere), 7.33-7.26 (m, 1H, **H-4''**, ds), 7.20, 7.18 (s, 1H, **H-6**, ds), 7.12-7.07 (m, 1H, **H-6''**, ds), 7.04-6.95 (m, 2H, **H-3''**, **H-1'**, ds), 6.40-6.32 (m, 1H, **H-3'**, ds), 5.94, 5.94 (d, ³ J_{HH} = 5.8 Hz, **H-2'**, ds), 5.43-5.18 (m, 2H, **H-7''**, ds), 5.06-4.99 (m, 1H, **H-4'**, ds), 4.47-4.30 (m, 2H, **H-5'**, ds), 1.82, 1.73 (s, 3H, **H-7**, ds).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 163.9, 163.8 (**C-4**, Diastereomere), 150.9, 150.8 (**C-2**, ds), 148.7, 148.7 (**C-5''**, ds), 135.8, 135.6 (**C-6**, ds), 132.8, 132.7 (**C-3'**, ds), 130.3, 130.3 (**C-4''**, ds), 130.1, 130.1 (**C-1''**, ds), 128.1, 128.0 (**C-2'**, ds), 125.7, 125.6 (**C-6''**, ds), 122.3, 122.3 (**C-2''**, ds), 120.1, 120.0 (d, $^3J_{\text{CP}}= 5.3$ Hz, **C-3''**, ds), 111.5, 111.4 (**C-5**, ds), 90.0, 89.9 (**C-1'**, ds), 84.6, 84.5 (**C-4'**, ds), 68.7, 68.6 (**C-5'**, ds), 68.1, 67.9 (d, $^2J_{\text{CP}}= 6.7$ Hz, **C-7''**, ds), 12.4, 12.3 (**C-7**, ds).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= -9.80, -9.87 (s, Diastereomere).

IR: ν [cm^{-1}]= 3168, 3050, 2886, 2818, 1684, 1480, 1359, 1245, 1187, 1137, 1085, 1025, 992, 939, 868, 849, 818, 781, 729, 692, 674, 547, 419.

Darstellung von 3'-Desoxy-2',3'-dihydrothymidinmonophosphat 13 (d4TMP)

Die Reaktion wurde nach der **AAV 5 (Variante A)** durchgeführt. Das Phosphorylierungsreagenz wurde aus 2.7 mL (4.5 g, 29 mmol, 4.4 Äquiv.) Phosphorylchlorid, gelöst in 10 mL abs. Acetonitril, 2.4 mL (2.5 g, 29 mmol, 4.4 Äquiv.) Pyridin sowie 0.27 mL (0.27 g, 15 mmol, 2.2 Äquiv.) Wasser erhalten und anschließend mit 1.5 g (6.7 mmol, 1.0 Äquiv.) d4T **3** zur Reaktion gebracht (Reaktionszeit: Fünf Stunden). Die Neutralisation erfolgte mit 40%iger wässriger Tetra-*n*-butylammoniumhydroxidlösung.

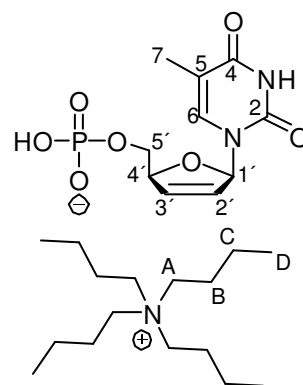
Ausbeute: Es wurden 2.8 g (5.1 mmol, 77%) eines schwach bräunlichen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 545.65 g/mol
Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}^-$ **R_f-Wert:** 0.42 (*iso*-Propanol/ NH_3 / H_2O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** $m/z=$ ber.: 303.039 [M-H], gef.: 303.102.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ [ppm]= 7.60 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.2$ Hz, 1H, **H-6**), 6.93 (dt, $^3J_{\text{HH}}= 3.3$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 1.7$ Hz, 1H, **H-1'**), 6.47 (dt, $^3J_{\text{HH}}= 6.2$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 1.8$ Hz, 1H, **H-3'**), 5.90 (ddd, $^3J_{\text{HH}}= 6.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}}= 2.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 1.4$ Hz, 1H, **H-2'**), 5.08-5.02 (m, 1H, **H-4'**), 3.99-3.93 (m, 2H, **H-5'**), 3.23-3.11 (m, 8H, **H-A**), 1.85 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.3$ Hz, 3H, **H-7**), 1.70-1.54 (m, 8H, **H-B**), 1.45-1.22 (m, 8H, **H-C**), 0.92 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.3$ Hz, 12H, **H-D**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ [ppm]= 166.7 (**C-4**), 152.1 (**C-2**), 138.1 (**C-6**), 134.4 (**C-3'**), 124.9 (**C-2'**), 111.2 (**C-5**), 89.9 (**C-1'**), 86.2 (d, $^3J_{\text{CP}}= 8.2$ Hz, **C-4'**), 65.2 (d, $^2J_{\text{CP}}= 5.0$ Hz, **C-5'**), 58.1 (**C-A**), 23.0 (**C-B**), 19.1 (**C-C**), 12.8 (**C-D**), 11.4 (**C-7**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O): δ [ppm]= 0.34.

IR: ν [cm^{-1}]= 3240, 2959, 2874, 1687, 1663, 1620, 1529, 1486, 1462, 1335, 1286, 1248, 1184, 1105, 1044, 890, 782, 734, 642, 516, 422.

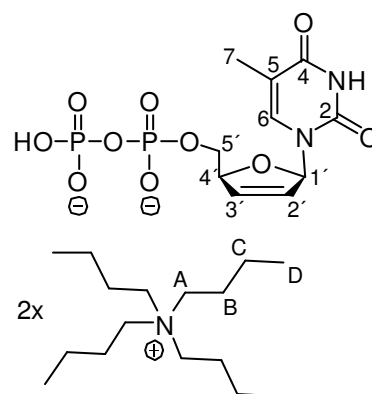


Darstellung von 3'-Desoxy-2',3'-dihydrothymidindiphosphat 15 (d4TDP)

Die Reaktion wurde nach der **AAV 6** durchgeführt. Es wurden 1.1 g (2.5 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Cl-*cycloSal*-d4T **79**, in 10 mL abs. DMF gelöst, mit 2.1 g (6.2 mmol, 2.5 Äquiv.) Mono-(tetra-*n*-butylammonium)-phosphat, gelöst in 12 mL abs. DMF, versetzt und für 16 Stunden gerührt. Die automatisierte RP18-Säulenchromatographie (Wasser/Acetonitril-Gradient: 5-100%, 0-90 min, Flussrate 1 mL/min) musste dreimal durchgeführt werden.

Ausbeute: Es wurden 0.78 g (0.90 mmol, 36%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 867.09 g/mol

Summenformel: C₁₀H₁₂N₂O₁₀P₂²⁻ **R_r-Wert:** 0.16 (*iso*-Propanol/NH₃/H₂O 4:1:2.5 v/v) **MALDI-MS (neg.):** *m/z*= ber.: 383.005 [M-H]⁻, gef.: 382.928.



¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ [ppm]= 7.60 (d, ⁴J_{HH}= 1.3 Hz, 1H, **H-6**), 6.93 (dt, ³J_{HH}= 3.3 Hz, ⁴J_{HH}= 1.7 Hz, 1H, **H-1'**), 6.48 (dt, ³J_{HH}= 6.2 Hz, ⁴J_{HH}= 1.8 Hz, 1H, **H-3'**), 5.91 (ddd, ³J_{HH}= 6.1 Hz, ³J_{HH}= 2.4 Hz, ⁴J_{HH}= 1.4 Hz, 1H, **H-2'**), 5.10-5.04 (m, 1H, **H-4'**), 4.11 (dt, ³J_{HH}= 6.2 Hz, ⁴J_{HH}= 3.3 Hz, 2H, **H-5'**), 3.25-3.05 (m, 16H, **H-A**), 1.86 (d, ⁴J_{HH}= 1.3 Hz, 3H, **H-7**), 1.73-1.49 (m, 16H, **H-B**), 1.22 (sext, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 16H, **H-C**), 0.91 (t, ³J_{HH}= 7.3 Hz, 24H, **H-D**).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O): δ [ppm]= 166.8 (**C-4**), 152.2 (**C-2**), 138.1 (**C-6**), 134.2 (**C-3'**), 125.1 (**C-2'**), 111.2 (**C-5**), 89.8 (**C-1'**), 85.8 (d, ³J_{CP}= 8.5 Hz, **C-4'**), 66.2 (d, ²J_{CP}= 5.6 Hz, **C-5**), 58.0 (**C-A**), 23.0 (**C-B**), 19.0 (**C-C**), 12.8 (**C-D**), 11.4 (**C-7**).

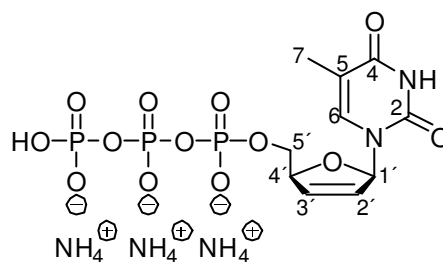
³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= -8.32 (d, ²J_{PP}= 21.7 Hz, **P-α**), -11.23 (d, ²J_{PP}= 21.7 Hz, **P-β**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3333, 3220, 3042, 2971, 2929, 2899, 1705, 1688, 1645, 1622, 1565, 1498, 1486, 1439, 1392, 1314, 1297, 1243, 1169, 1099, 1039, 999, 938, 851, 794, 784, 691, 668, 660, 638, 594, 535, 504.

Darstellung von 3'-Desoxy-2',3'-dihydrothymidintriphosphat 16 (d4TTP)

Die Reaktion wurde nach der **AAV 7** durchgeführt. Es wurden 54 mg (0.13 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Cl-*cycloSal*-d4T **79** in 1.0 mL abs. DMF gelöst und mit 0.10 g (0.15 mmol, 1.2 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-pyrophosphat, gelöst in 1.2 mL abs. DMF, versetzt.

Ausbeute: Es wurden 43 mg (83 μ mol, 64%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 515.25 g/mol
Summenformel: $C_{10}H_{12}N_2O_{10}P_3^{3-}$ **R_f-Wert:** 0.08 (*iso*-Propanol/ NH_3/H_2O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 462.971 [M-H]⁻, gef.: 462.985.



¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ [ppm]= 7.58 (d, ⁴ J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, **H-6**), 6.93 (dt, ³ J_{HH} = 3.3 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, **H-1'**), 6.51 (dt, ³ J_{HH} = 6.1 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, **H-3'**), 5.93 (ddd, ³ J_{HH} = 6.0 Hz, ³ J_{HH} = 2.3 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.4 Hz, 1H, **H-2'**), 5.13-5.06 (m, 1H, **H-4'**), 4.22-4.08 (m, 2H, **H-5'**_{a,b}), 1.87 (d, ⁴ J_{HH} = 1.3 Hz, 3H, **H-7**).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O): δ [ppm]= 166.7 (**C-4**), 152.1 (**C-2**), 138.1 (**C-6**), 134.2 (**C-3'**), 125.1 (**C-2'**), 111.4 (**C-5**), 89.9 (**C-1'**), 85.8 (d, ³ J_{CP} = 8.8 Hz, **C-4'**), 66.5 (d, ² J_{CP} = 6.0 Hz, **C-5'**), 11.4 (**C-7**).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O): δ [ppm]= -10.49 (d, ² J_{PP} = 19.3 Hz, **P- α**), -11.46 (d, ² J_{PP} = 19.8 Hz, **P- γ**), -23.03 (d, ² J_{PP} = 19.5 Hz, **P- β**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3178, 2989, 2884, 2828, 1682, 1660, 1427, 1218, 1113, 1071, 1042, 998, 956, 893, 836, 807, 785, 769, 738, 697, 644, 489.

Darstellung von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-d4TDP 74e

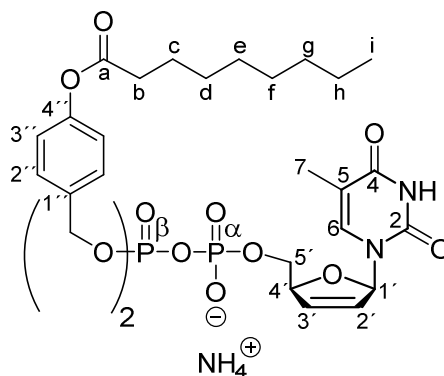
Variante A: "Phosphoramiditroute"

Die Reaktion wurde nach der **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 0.11 g (0.20 mmol, 1.0 Äquiv.) Mono(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP **13**, in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.27 g (0.40 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(nonanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75e** sowie 1.1 mL (0.26 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 73 μ L (0.40 mmol, 2.0 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Variante B: "Phosphonatroute"

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zunächst wurden 0.13 g (0.23 mmol, 1.5 Äquiv.) Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-phosphonat **198** einmal in abs. Acetonitril coevaporiert. Nach Aufnahme in 5.0 mL abs. Acetonitril schloss sich die Aktivierung mit 60 mg (0.45 mmol, 3.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid über einen Zeitraum von einer Stunde an. Es wurden 82 mg (0.15 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15** hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für drei Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt durch automatisierte RP18-Säulenchromatographie (Wasser/Acetonitril-Gradient) gereinigt. Nach einem Ionenaustausch mit Dowex-NH₄⁺ wurde die Chromatographie wiederholt.

Ausbeute: Es wurden 44 mg (49 μmol , 24%, *Variante A*) bzw. 21 mg (24 μmol , 16%, *Variante B*) eines farblosen Feststoffs erhalten. Sowohl bei *Variante A* als auch bei *Variante B* blieben Mischfraktionen unberücksichtigt. **Molmasse:** 893.95 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{42}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{P}_2^-$ **UV (HPLC):** $\lambda_{\text{max}} = 265 \text{ nm}$ **HPLC:** $t_{\text{R}} = 18.78 \text{ min}$ (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** $m/z = \text{ber.: } 875.329$ $[\text{M-H}]^-$, gef.: 875.457.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.69 (s, 1H, **H-6**), 7.47-7.37 (m, 4H, **H-2''**), 7.13-7.05 (m, 4H, **H-3''**), 7.01-6.96 (m, 1H, **H-1'**), 6.46-6.39 (m, 1H, **H-3'**), 5.91-5.84 (m, 1H, **H-2'**), 5.14 (dd, $^3J_{\text{HP}} = 8.5 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 5.5 \text{ Hz}$, 4H, **Ph-CH₂**), 5.02-4.96 (m, 1H, **H-4'**), 4.28-4.16 (m, 2H, **H-5'**), 2.61 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, 4H, **H-b**), 1.93 (s, 3H, **H-7**), 1.77 (quint, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, 4H, **H-c**), 1.53-1.28 (m, 20H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 1.00-0.90 (m, 6H, **H-i**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.7 (**C-a**), 166.5 (**C-4**), 152.4 (**C-2**), 151.7 (**C-4''**), 138.7 (**C-6**), 135.3 (**C-3'**), 134.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6.8 \text{ Hz}$, **C-1''**), 130.4 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.2 \text{ Hz}$, **C-2''**), 127.6 (**C-2'**), 122.9 (**C-3''**), 112.1 (**C-5**), 90.8 (**C-1'**), 86.8 (**C-4'**), 70.4-70.2 (m, **Ph-CH₂**), 67.7 (**C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.0, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 26.70 (**C-c**), 14.5 (**C-i**), 12.5 (**C-7**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = -12.07 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.2 \text{ Hz}$, **P- α**), -12.89 (d, $^2J_{\text{PP}} = 21.3 \text{ Hz}$, **P- β**).

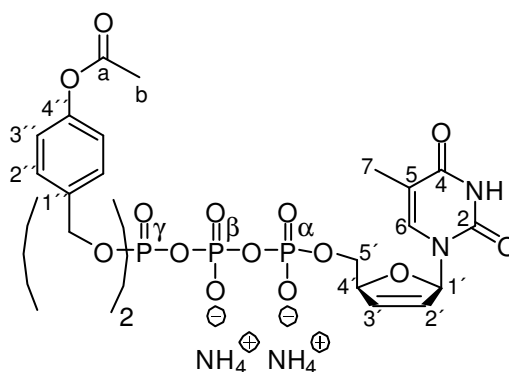
IR: ν [cm^{-1}] = 3419, 3190, 2957, 2926, 2856, 1757, 1691, 1610, 1509, 1465, 1422, 1379, 1332, 1261, 1218, 1201, 1167, 1141, 1112, 1087, 1045, 1027, 1008, 980, 915, 837, 807, 783, 767, 739, 696, 641, 576, 513.

Darstellung von γ -Bis(4-acetyloxybenzyl)-d4TTP 56a

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 86 mg (99 μmol , 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 0.7 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 92 mg (0.20 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(acetyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75a** und 0.55 mL (0.14 mmol, 1.4 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 40 μL (0.22 mmol, 2.2 Äquiv.) *t*-BuOOH-Lösung (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 46 mg (58 μmol , 59%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 794.54 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{P}_3^{2-}$ **UV (HPLC):** $\lambda_{\text{max}} = 265 \text{ nm}$ **HPLC:** $t_{\text{R}} = 11.00 \text{ min}$ (Methode A); 8.75 min (Methode B) **MALDI-MS (neg.):** $m/z = \text{ber.: } 759.076$ $[\text{M-H}]^-$, gef.: 759.131.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 7.67 (d, ⁴J_{HH}= 1.3 Hz, 1H, **H-6**), 7.46-7.40 (m, 4H, **H-2'**), 7.13-7.06 (m, 4H, **H-3'**), 6.94 (dt, ³J_{HH}= 3.4 Hz, ⁴J_{HH}= 1.8 Hz, 1H, **H-1'**), 6.48 (dt, ³J_{HH}= 5.9 Hz, ⁴J_{HH}= 1.9 Hz, 1H, **H-3'**), 5.82 (dt, ³J_{HH}= 5.9 Hz, ⁴J_{HH}= 1.9 Hz, 1H, **H-2'**), 5.18 (d, ³J_{HP}= 8.1 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.99-4.93 (m, 1H, **H-4'**), 4.32-4.17 (m, 2H, **H-5'**), 2.30 (s, 6H, **H-b**), 1.92 (d, ⁴J_{HH}= 1.3 Hz, 3H, **H-7**).



¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 171.1 (**C-a**), 166.5 (**C-4**), 152.8 (**C-2**), 152.3 (**C-4'**), 138.7 (**C-6**), 134.9 (**C-3'**), 134.9 (d, ³J_{CP}= 6.8 Hz, **C-1'**), 130.4 (d, ⁴J_{CP}= 2.7 Hz, **C-2'**), 127.3 (**C-2'**), 122.9 (**C-3'**), 112.0 (**C-5**), 90.8 (**C-1'**), 87.1 (d, ³J_{CP}= 8.8 Hz, **C-4'**), 70.3 (d, ²J_{CP}= 6.1 Hz, **Ph-CH₂**), 67.6 (**C-5'**), 20.9 (**C-b**), 12.5 (**C-7**).

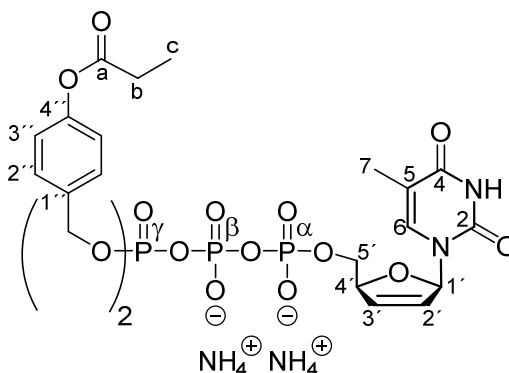
³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= -11.69 (d, ²J_{PP}= 19.4 Hz, **P-α**), -13.11 (d, ²J_{PP}= 17.1 Hz, **P-γ**), -23.51 (t, ²J_{PP}= 17.8 Hz, **P-β**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3465, 3191, 2988, 2901, 2826, 1757, 1687, 1509, 1426, 1370, 1217, 1193, 1167, 1127, 1080, 999, 903, 838, 808, 784, 768, 734, 696, 647, 561, 489, 430.

Darstellung von γ-Bis(4-propanoyloxybenzyl)-d4TTP 56b

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 87 mg (0.10 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 0.5 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 93 mg (0.20 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(propanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylamino-phosphoramidit **75b** und 0.48 mL (0.12 mmol, 1.2 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 38 µL (0.21 mmol, 2.1 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 35 mg (43 µmol, 43%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 822.59 g/mol **Summenformel:** C₃₀H₃₃N₂O₁₇P₃²⁻ **UV (HPLC):** λ_{max}= 265 nm **HPLC:** t_R= 11.83 min (Methode A); 10.09 min (Methode B) **MALDI-MS (neg.):** m/z= ber.: 787.108 [M-H]⁻, gef.: 787.275.



¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 7.63 (d, ⁴J_{HH}= 1.3 Hz, 1H, **H-6**), 7.44-7.32 (m, 4H, **H-2'**), 7.09-6.99 (m, 4H, **H-3'**), 6.90 (dt, ³J_{HH}= 3.4 Hz, ⁴J_{HH}= 1.6 Hz, 1H, **H-1'**), 6.43 (dt, ³J_{HH}= 5.9 Hz, ⁴J_{HH}= 1.7 Hz, 1H, **H-3'**), 5.77 (ddd, ³J_{HH}= 5.9 Hz, ³J_{HH}= 2.4 Hz, ⁴J_{HH}= 1.4 Hz, 1H, **H-2'**), 5.12 (d, ³J_{HP}= 8.0 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.94-

4.89 (m, 1H, **H-4'**), 4.31-4.08 (m, 2H, **H-5'**), 2.58 (q, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 4H, **H-b**), 1.86 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, 3H, **H-7**), 1.20 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 6H, **H-c**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 174.5 (**C-a**), 166.5 (**C-4**), 152.8 (**C-2**), 152.4 (**C-4''**), 138.7 (**C-6**), 135.7 (**C-3'**), 134.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.6$ Hz, **C-1''**), 130.4 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, **C-2''**), 127.2 (**C-2'**), 122.9 (**C-3''**), 112.0 (**C-5**), 90.8 (**C-1'**), 87.2 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.0$ Hz, **C-4'**), 70.3 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.6$ Hz, **Ph-CH₂**), 67.6 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.3$ Hz, **C-5'**), 28.3 (**C-b**), 12.5 (**C-7**), 9.3 (**C-c**).

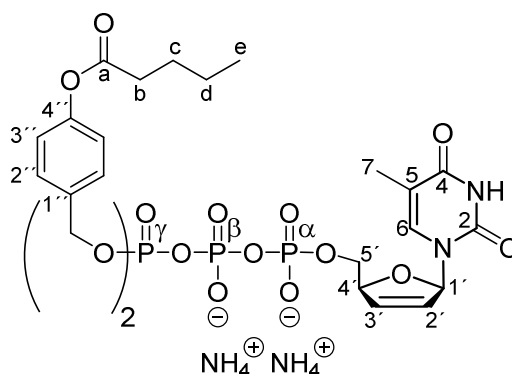
$^{31}\text{P-NMR}$ (81 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= -11.76 (d, $^2J_{\text{PP}} = 19.4$ Hz, **P- α**), -13.19 (d, $^2J_{\text{PP}} = 17.1$ Hz, **P- γ**), -23.51 (t, $^2J_{\text{PP}} = 18.4$ Hz, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3454, 3195, 2988, 2901, 1759, 1691, 1510, 1462, 1423, 1254, 1220, 1168, 1131, 1114, 1078, 1027, 1013, 932, 913, 838, 808, 785, 734, 491.

Darstellung von γ -Bis(4-pentanoyloxybenzyl)-d4TTP 56c

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 90 mg (0.10 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 0.5 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.11 g (0.21 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(pentanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylamino-phosphoramidit **75c** und 0.50 mL (0.13 mmol, 1.2 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 40 μL (0.22 mmol, 2.1 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 43 mg (49 μmol , 47%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 878.70 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{P}_3^{2-}$ **UV (HPLC):** $\lambda_{\text{max}} = 265$ nm **HPLC:** $t_{\text{R}} = 13.61$ min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** $m/z = \text{ber.}: 843.170$ [M-H], gef.: 843.267.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 7.59 (d,

$^4J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, 1H, **H-6**), 7.38-7.32 (m, 4H, **H-2''**), 7.04-6.97 (m, 4H, **H-3''**), 6.87 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, 1H, **H-1'**), 6.39 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, 1H, **H-3'**), 5.77 (ddd, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.4$ Hz, 1H, **H-2'**), 5.12 (d, $^3J_{\text{HP}} = 8.1$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.94-4.84 (m, 1H, **H-4'**), 4.26-4.08 (m, 2H, **H-5'**), 2.57-2.50 (m, 4H, **H-b**), 1.84 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, 3H, **H-7**), 1.71-1.61 (m, 4H, **H-c**), 1.47-1.26 (m, 4H, **H-d**), 0.93 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 6H, **H-e**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 173.8 (**C-a**), 166.5 (**C-4**), 152.7 (**C-2**), 152.3 (**C-4''**), 138.6 (**C-6**), 135.6 (**C-3'**), 134.8 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz, **C-1''**), 130.5 (d, $^4J_{\text{CP}} = 3.1$ Hz, **C-2''**), 127.2 (**C-2'**), 122.9 (**C-3''**), 112.0 (**C-5**), 90.8 (**C-1'**), 87.1 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.8$ Hz, **C-4'**), 70.4 (dd, $^2J_{\text{CP}} = 6.0$ Hz, $^4J_{\text{CP}} = 2.1$ Hz, **Ph-CH₂**), 67.9 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.4$ Hz, **C-5'**), 34.7 (**C-b**), 28.1 (**C-c**), 23.2 (**C-d**), 14.1 (**C-e**), 12.5 (**C-7**).

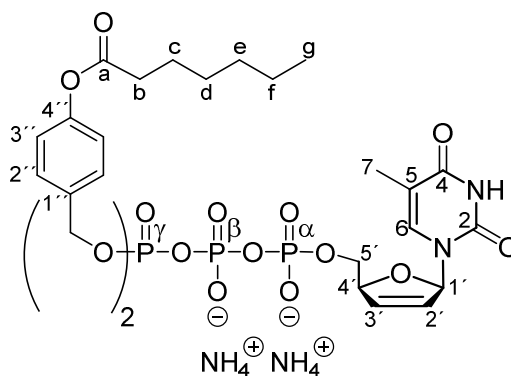
^{31}P -NMR (81 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= -11.76 (d, $^2J_{\text{PP}}= 19.3$ Hz, **P- α**), -13.19 (d, $^2J_{\text{PP}}= 17.1$ Hz, **P- γ**), -23.51 (t, $^2J_{\text{PP}}= 18.2$ Hz, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3428, 3183, 3040, 2959, 2933, 2873, 1755, 1688, 1509, 1462, 1382, 1219, 1202, 1167, 1128, 1082, 1009, 909, 838, 808, 784, 734, 697, 644, 520, 495.

Darstellung von γ -Bis(4-heptanoyloxybenzyl)-d4TTP 56d

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 99 mg (0.11 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 0.5 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.14 g (0.23 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(heptanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylamino-phosphoramidit **75d** und 0.55 mL (0.14 mmol, 1.2 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 44 μL (0.24 mmol, 2.1 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 41 mg (44 μmol , 40%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 934.81 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{38}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{P}_3^{2-}$
UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}}= 265$ nm **HPLC:** $t_{\text{R}}= 15.40$ min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** $m/z=$ ber.: 899.233 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$, gef.: 899.229.



^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 7.68 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.2$ Hz, 1H, **H-6**), 7.46-7.39 (m, 4H, **H-2'**), 7.11-7.05 (m, 4H, **H-3'**), 6.95 (dt, $^3J_{\text{HH}}= 3.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 1.6$ Hz, 1H, **H-1'**), 6.48 (dt, $^3J_{\text{HH}}= 6.1$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 1.7$ Hz, 1H, **H-3'**), 5.86-5.80 (m, 1H, **H-2'**), 5.18 (d, $^3J_{\text{HP}}= 8.2$ Hz, 4H, **Ph-CH $_2$**), 5.01-4.94 (m, 1H, **H-4'**), 4.34-4.16 (m, 2H, **H-5'**), 2.60 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.4$ Hz, 4H, **H-b**), 1.92 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.2$ Hz, 3H, **H-7**), 1.76 (quint, $^3J_{\text{HH}}= 7.4$ Hz, 4H, **H-c**), 1.51-1.34 (m, 12H, **H-d**, **H-e**, **H-f**), 0.96 (t, $^3J_{\text{HH}}= 6.8$ Hz, 6H, **H-g**).

^{13}C -NMR (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 173.8 (**C-a**), 166.5 (**C-4**), 152.8 (**C-2**), 152.3 (**C-4'**), 138.4 (**C-6**), 135.8 (**C-3'**), 134.9 (d, $^3J_{\text{CP}}= 7.8$ Hz, **C-1'**), 130.5 (d, $^4J_{\text{CP}}= 2.9$ Hz, **C-2'**), 127.2 (**C-2'**), 122.9 (**C-3'**), 112.1 (**C-5**), 90.8 (**C-1'**), 87.2 (d, $^3J_{\text{CP}}= 8.9$ Hz, **C-4'**), 70.4 (d, $^2J_{\text{CP}}= 6.8$ Hz, **Ph-CH $_2$**), 67.9 (d, $^2J_{\text{CP}}= 4.9$ Hz, **C-5'**), 35.0 (**C-b**), 32.7, 29.9, 23.6 (**C-d**, **C-e**, **C-f**), 25.9 (**C-c**), 14.4 (**C-g**), 12.5 (**C-7**).

^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= -11.64 (bs, **P- α**), -13.08 (d, $^2J_{\text{PP}}= 17.5$ Hz, **P- γ**), -23.47 (bs, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3190, 3066, 2956, 2928, 2858, 1756, 1689, 1509, 1459, 1379, 1250, 1218, 1200, 1167, 1129, 1111, 1083, 1010, 909, 839, 808, 784, 730, 644, 520.

Darstellung von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-d4TTP 56e*Variante A: "Phosphoramiditroute"*

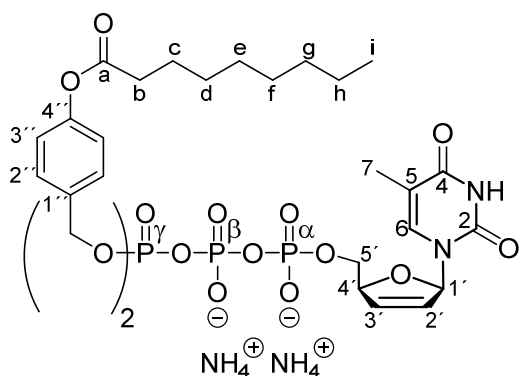
Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 0.15 g (0.17 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 3.0 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.22 g (0.34 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(nonanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylamino-phosphoramidit **75e** und 0.88 mL (0.22 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 68 μ L (0.37 mmol, 2.2 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Variante B: "Phosphonatroute"

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante B)** durchgeführt. Zunächst wurden 0.18 g (0.20 mmol, 1.0 Äquiv.) *P,P*-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **198**, gelöst in 1.0 mL abs. Acetonitril, mit 0.14 mL (0.21 g, 0.98 mmol, 5.0 Äquiv.) TFAA und 0.22 mL (0.16 g, 1.6 mmol, 8.0 Äquiv.) Triethylamin, gelöst in 2.0 mL abs. Acetonitril, verestert. Aufgenommen in 2.0 mL abs. Acetonitril folgte die Aktivierung mit 47 μ L (48 mg, 0.59 mmol, 3.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 0.14 mL (0.16 g, 0.98 mmol, 5.0 Äquiv.) Triethylamin, bevor 50 mg (98 μ mol, 0.5 Äquiv.) Mono(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP **13**, gelöst in 1.0 mL abs. DMF, hinzugegotropft wurden.

Ausbeute: Es wurden 70 mg (71 μ mol, 42%, *Variante A*) bzw. 31 mg (31 μ mol, 32%, *Variante B*) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Molmasse: 990.91 g/mol **Summenformel:** $C_{42}H_{57}N_2O_{17}P_3^{2-}$ **UV (HPLC):** $\lambda_{max} = 265$ nm **HPLC:** $t_R = 17.31$ min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** $m/z = \text{ber.}: 955.295$ [M-H]⁻, $\text{gef.}: 955.296$.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.65 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, 1H, **H-6**), 7.42-7.35 (m, 4H, **H-2'**), 7.07-7.00 (m, 4H, **H-3'**), 6.92 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, 1H, **H-1'**), 6.45 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, 1H, **H-3'**), 5.79 (ddd, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, 1H, **H-2'**), 5.14 (d, $^3J_{\text{HP}} = 8.1$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.96-4.90 (m, 1H, **H-4'**), 4.31-4.13 (m, 2H, **H-5'**), 2.57 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 4H, **H-b**), 1.88 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.3$ Hz, 3H, **H-7**), 1.72 (quint, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 4H, **H-c**), 1.49-1.24 (m, 20H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.96-0.85 (m, 6H, **H-i**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.4 (**C-a**), 166.5 (**C-4**), 152.9 (**C-2**), 152.3 (**C-4'**), 138.4 (**C-6**), 135.5 (**C-3'**), 134.5 (**C-1'**), 130.2 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, **C-2''**), 126.9 (**C-2'**), 122.6 (**C-3''**), 111.9 (**C-5**), 90.5 (**C-1'**), 86.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.5$ Hz, **C-4'**), 69.0 (dd, $^2J_{\text{CP}} = 5.2$ Hz, $^4J_{\text{CP}} = 2.3$ Hz, **Ph-CH₂**), 66.5 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.6$ Hz, **C-5'**), 34.7 (**C-b**), 32.7, 30.1, 30.1, 29.9, 23.5 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 25.7 (**C-c**), 14.2 (**C-i**), 12.2 (**C-7**).

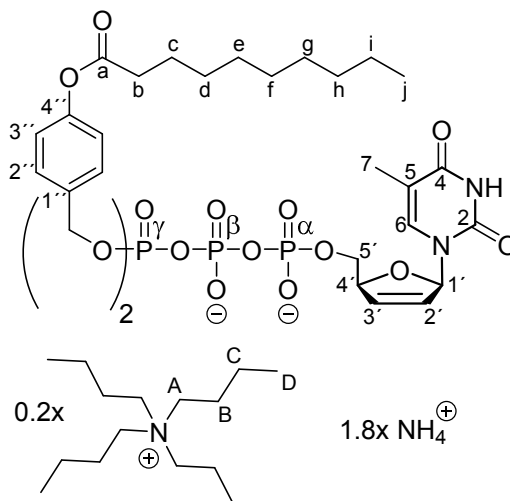
^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= -11.83 (d, $^2J_{\text{PP}}= 20.1$ Hz, **P- α**), -13.28 (d, $^2J_{\text{PP}}= 17.5$ Hz, **P- γ**), -23.82 (t, $^2J_{\text{PP}}= 18.8$ Hz, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3192, 3062, 2955, 2926, 2855, 1757, 1694, 1610, 1509, 1465, 1378, 1250, 1219, 1168, 1133, 1111, 1088, 1027, 1012, 914, 838, 784, 724, 520.

Darstellung von γ -Bis(4-decanoyloxybenzyl)-d4TTP 56f

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 71 mg (82 μmol , 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 1.2 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.11 g (0.16 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(decanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75f** und 0.40 mL (0.10 mmol, 1.2 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 32 μL (0.18 mmol, 2.2 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 23 mg (21 μmol , 26%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1063.86 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{44}\text{H}_{61}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{P}_3^{2-}$
UV (HPLC): $\lambda_{\text{max}}= 265$ nm **HPLC:** $t_{\text{R}}= 18.06$ min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** $m/z=$ ber.: 983.327 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$, gef.: 983.512.



^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 7.69 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.4$ Hz, 1H, **H-6**), 7.46-7.39 (m, 4H, **H-2'**), 7.12-7.05 (m, 4H, **H-3'**), 6.96 (dt, $^3J_{\text{HH}}= 3.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 1.6$ Hz, 1H, **H-1'**), 6.50 (dt, $^3J_{\text{HH}}= 6.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 1.7$ Hz, 1H, **H-3'**), 5.86-5.81 (m, 1H, **H-2'**), 5.19 (d, $^3J_{\text{HP}}= 8.1$ Hz, 4H, **Ph-CH $_2$**), 5.00-4.95 (m, 1H, **H-4'**), 4.35-4.17 (m, 2H, **H-5'**), 3.30-3.23 (m, 1.5H, **H-A**), 2.61 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.4$ Hz, 4H, **H-b**), 1.93 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.4$ Hz, 3H, **H-7**), 1.76 (quint, $^3J_{\text{HH}}= 7.3$ Hz, 4H, **H-c**), 1.73-1.64 (m, 1.5H, **H-B**), 1.52-1.28 (m, 25.5H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-C**), 1.06 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.4$ Hz, 2.3H, **H-D**), 0.97-0.90 (m, 6H, **H-j**).

^{13}C -NMR (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 173.7 (**C-a**), 166.7 (**C-4**), 152.6 (**C-2**), 152.6 (**C-4'**), 138.7 (**C-6**), 135.8 (**C-3'**), 135.0 (d, $^3J_{\text{CP}}= 7.8$ Hz, **C-1'**), 130.5 (d, $^4J_{\text{CP}}= 2.9$ Hz, **C-2'**), 127.1 (**C-2'**), 122.9 (**C-3'**), 112.1 (**C-5**), 90.9 (**C-1'**), 87.2 (d, $^3J_{\text{CP}}= 9.7$ Hz, **C-4'**), 70.4 (dd, $^2J_{\text{CP}}= 5.6$ Hz, $^4J_{\text{CP}}= 1.7$ Hz, **Ph-CH $_2$**), 67.9 (d, $^2J_{\text{CP}}= 4.8$ Hz, **C-5'**), 59.5 (**C-A**), 35.0 (**C-b**), 33.0, 30.6, 30.4, 30.4, 30.2, 23.7 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i**), 26.0 (**C-c**), 24.8 (**C-B**), 19.4 (**C-C**), 14.4 (**C-j**), 13.9 (**C-D**), 12.5 (**C-7**).

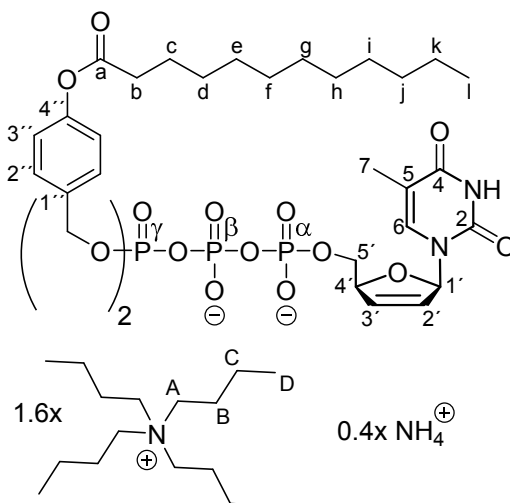
^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= -11.80 (d, $^2J_{\text{PP}}= 19.9$ Hz, **P- α**), -13.07 (d, $^2J_{\text{PP}}= 17.5$ Hz, **P- γ**), -23.82 (bs, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3401, 3174, 2956, 2925, 2855, 1758, 1690, 1509, 1466, 1397, 1379, 1249, 1201, 1167, 1133, 1111, 1090, 1027, 1013, 930, 914, 838, 811, 783, 736, 722, 643, 518.

Darstellung von γ -Bis(4-dodecanoyloxybenzyl)-d4TTP 56g

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 74 mg (85 μ mol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 1.2 mL abs. Acetonitril und 1.0 mL abs. THF gelöst, mit 0.13 g (0.17 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(dodecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75g** und 0.41 mL (0.11 mmol, 1.2 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 33 μ L (0.18 mmol, 2.1 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 44 mg (37 μ mol, 44%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1434.17 g/mol **Summenformel:** C₄₈H₆₉N₂O₁₇P₃²⁻
UV (HPLC): λ_{\max} = 265 nm **HPLC:** t_R = 20.15 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 1039.389 [M-H]⁻, gef.: 1039.561.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 7.74 (d, ⁴ J_{HH} = 1.5 Hz, 1H, **H-6**), 7.47-7.39 (m, 4H, **H-2'**), 7.10-7.03 (m, 4H, **H-3'**), 6.96 (dt, ³ J_{HH} = 3.4 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.6 Hz, 1H, **H-1'**), 6.56 (dt, ³ J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, **H-3'**), 5.83-5.78 (m, 1H, **H-2'**), 5.22 (dd, ³ J_{HP} = 8.0 Hz, ⁴ J_{HH} = 2.0 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 5.01-4.95 (m, 1H, **H-4'**), 4.43-4.19 (m, 2H, **H-5'**), 3.31-3.19 (m, 12.8H, **H-A**), 2.61 (t, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 4H, **H-b**), 1.93 (d, ⁴ J_{HH} = 1.5 Hz, 3H, **H-7**), 1.76 (quint, ³ J_{HH} = 6.7 Hz, 4H, **H-c**), 1.73-1.63 (m, 12.8H, **H-B**), 1.44 (sext, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 12.8H, **H-C**), 1.51-1.28 (m, 32H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k**), 1.05 (t, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 19.2H, **H-D**), 0.98-0.89 (m, 6H, **H-I**).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 173.7 (**C-a**), 166.5 (**C-4**), 152.8 (**C-2**), 152.2 (**C-4'**), 138.8 (**C-6**), 136.2 (**C-3'**), 135.2 (d, ³ J_{CP} = 7.8 Hz, **C-1'**), 130.5 (d, ⁴ J_{CP} = 2.8 Hz, **C-2'**), 126.9 (**C-2'**), 122.8 (**C-3''**), 112.1 (**C-5**), 90.8 (**C-1'**), 87.4 (d, ³ J_{CP} = 6.3 Hz, **C-4'**), 70.4 (d, ² J_{CP} = 5.7 Hz, **Ph-CH₂**), 67.8 (**C-5'**), 59.4 (**C-A**), 35.0 (**C-b**), 33.1, 30.7, 30.7, 30.6, 30.4, 30.4, 30.2, 23.7 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k**), 26.0 (**C-c**), 24.8 (**C-B**), 20.7 (**C-C**), 14.5 (**C-I**), 14.0 (**C-D**), 12.5 (**C-7**).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= -11.91 (bs, **P- α**), -13.28 (d, ² J_{PP} = 17.6 Hz, **P- γ**), -23.99 (bs, **P- β**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3203, 2959, 2925, 2873, 2854, 1757, 1690, 1509, 1466, 1380, 1262, 1202, 1167, 1132, 1112, 1090, 1027, 1013, 929, 838, 720, 643, 573, 514.

Darstellung von γ -Bis(4-tetradecanoyloxybenzyl)-d4TTP 56h

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 48 mg (53 μ mol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 0.5 mL abs. Acetonitril und 0.7 mL abs. THF gelöst, mit 85 mg (0.11 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(tetradecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75h** und 0.28 mL (69 μ mol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 21 μ L (0.12 mmol, 2.2 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan). Die Reaktion wurde einmal neu gestartet, um einen höheren Umsatz des Edukts **15** zu erzielen.

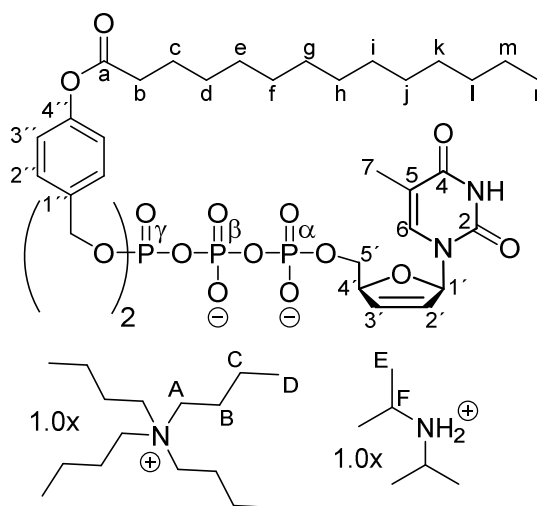
Ausbeute: Es wurden 72 mg (37 μ mol, 70%) eines mit Tetra-*n*-butylammonium- (1.6x) bzw. Diisopropylammoniumsalzen (4.5x) verunreinigten farblosen Feststoffs erhalten.

Molmasse: 1439.78 g/mol (entsprechend der Struktur rechts) **Summenformel:**

$C_{52}H_{77}N_2O_{17}P_3^{2-}$ **UV (HPLC):** $\lambda_{max} = 265$ nm

HPLC: $t_R = 22.22$ min (Methode A) **MALDI-MS**

(neg.): $m/z =$ ber.: 1095.452 $[M-H]^-$, gef.: 1095.503.



1H -NMR (300 MHz, THF- d_8): δ [ppm]= 10.10 (s, 1H, **NH**), 7.88 (d, $^4J_{HH} = 1.2$ Hz, 1H, **H-6**), 7.53-7.44 (m, 4H, **H-2'**), 7.04-6.96 (m, 4H, **H-3'**), 6.91 (dt, $^3J_{HH} = 3.3$ Hz, $^4J_{HH} = 1.6$ Hz, 1H, **H-1'**), 6.62 (dt, $^3J_{HH} = 5.9$ Hz, $^4J_{HH} = 1.7$ Hz, 1H, **H-3'**), 5.61-5.56 (m, 1H, **H-2'**), 5.26-5.17 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.85-4.78 (m, 1H, **H-4'**), 4.44-4.31 (m, 1H, **H-5'a**), 4.14-4.01 (m, 1H, **H-5'b**), 3.50-3.39 (m, 8H, **H-A**), 3.33-2.85 (m, 2H, **H-E**), 2.52 (t, $^3J_{HH} = 7.5$ Hz, 4H, **H-b**), 1.91 (d, $^4J_{HH} = 1.2$ Hz, 3H, **H-7**), 1.77-1.59 (m, 12H, **H-c**, **H-B**), 1.50-1.23 (m, 60H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**, **H-j**, **H-k**, **H-l**, **H-m**, **H-C**, **H-F**), 0.94 (t, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 12H, **H-D**), 0.89 (t, $^3J_{HH} = 6.8$ Hz, 6H, **H-n**).

^{13}C -NMR (75 MHz, THF- d_8): δ [ppm]= 172.2 (**C-a**), 164.9 (**C-4**), 152.1 (**C-2**), 151.8 (**C-4'**), 138.2 (**C-6**), 136.9 (**C-3'**), 136.1 (d, $^3J_{CP} = 8.5$ Hz, **C-1'**), 130.1 (d, $^4J_{CP} = 1.6$ Hz, **C-2'**), 126.2 (**C-2'**), 122.3 (**C-3'**), 111.3 (**C-5**), 90.1 (**C-1'**), 87.8 (d, $^3J_{CP} = 8.5$ Hz, **C-4'**), 69.2 (d, $^2J_{CP} = 5.4$ Hz, **Ph-CH₂**), 67.2 (**C-5'**), 59.3 (**C-A**), 47.2 (**C-E**), 34.9 (**C-b**), 33.1, 30.8, 30.8, 30.8, 30.8, 30.7, 30.5, 30.5, 30.2, 23.8 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**, **C-m**), 26.0 (**C-c**), 25.0 (**C-B**), 20.7 (**C-C**), 19.9 (**C-F**), 14.6 (**C-n**), 14.4 (**C-D**), 12.8 (**C-7**).

^{31}P -NMR (162 MHz, THF- d_8): δ [ppm]= -14.16 (d, $^2J_{PP} = 20.8$ Hz, **P- α**), -14.65 (d, $^2J_{PP} = 17.8$ Hz, **P- γ**), -23.82 (t, $^2J_{PP} = 19.1$ Hz, **P- β**).

IR: ν [cm⁻¹] = 3400, 2963, 2924, 2875, 2854, 1757, 1689, 1509, 1466, 1380, 1263, 1219, 1200, 1167, 1131, 1112, 1082, 1047, 1028, 1013, 934, 915, 881, 837, 805, 783, 768, 721, 695, 641, 574, 491, 418.

Darstellung von γ -Bis(4-hexadecanoyloxybenzyl)-d4TTP 56i

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 90 mg (0.10 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 0.3 mL abs. Acetonitril und 0.9 mL abs. THF gelöst, mit 0.18 g (0.21 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(hexadecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75i** und 0.50 mL (0.13 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 42 μ L (0.23 mmol, 2.2 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan). Die Reaktion wurde einmal neu gestartet, um einen höheren Umsatz des Edukts **15** zu erzielen.

Ausbeute: Es wurden 96 mg (64 μ mol, 62%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

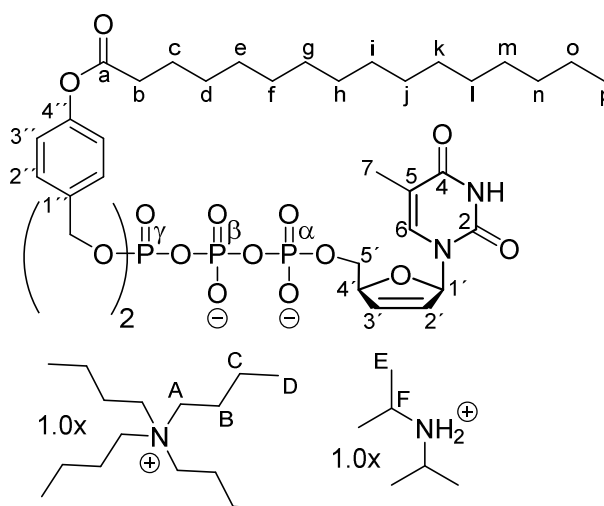
Molmasse: 1495.89 g/mol

Summenformel: C₅₆H₈₃N₂O₁₇P₃²⁻ **UV (HPLC):** λ_{\max} = 265 nm

HPLC: t_R = 23.28 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 1151.515 [M-H]⁻, gef.: 1151.663.

¹H-NMR (500 MHz, THF-*d*₈): δ [ppm] = 10.22 (s, 1H, **NH**), 7.88 (d, ⁴ J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, **H-6**), 7.48-7.42 (m, 4H, **H-2'**), 7.05-6.99 (m, 4H, **H-3'**), 6.92 (dt, ³ J_{HH} = 3.4 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.6 Hz, 1H, **H-1'**), 6.55 (dt, ³ J_{HH} = 5.8 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.6 Hz, 1H, **H-3'**), 5.67-5.61 (m, 1H, **H-2'**), 5.22-5.13 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.87-4.82 (m, 1H, **H-4'**), 4.38-4.29 (m, 1H, **H-5'**_a), 4.15-4.07 (m, 1H, **H-5'**_b), 3.43-3.27 (m, 8H, **H-A**), 3.31-3.15 (m, 2H, **H-E**), 2.53 (t, ³ J_{HH} = 7.5 Hz, 4H, **H-b**), 1.90 (d, ⁴ J_{HH} = 1.0 Hz, 3H, **H-7**), 1.74-1.62 (m, 12H, **H-c**, **H-B**), 1.48-1.20 (m, 68H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**, **H-j**, **H-k**, **H-l**, **H-m**, **H-n**, **H-o**, **H-C**, **H-F**), 0.95 (t, ³ J_{HH} = 7.2 Hz, 12H, **H-D**), 0.89 (t, 6H, ³ J_{HH} = 6.8 Hz, 6H, **H-p**).

¹³C-NMR (75 MHz, THF-*d*₈): δ [ppm] = 172.1 (**C-a**), 164.9 (**C-4**), 152.1 (**C-2**), 152.0 (**C-4'**), 137.8 (**C-6**), 136.3 (**C-3'**), 135.5 (d, ³ J_{CP} = 8.6 Hz, **C-1'**), 130.1 (**C-2''**), 126.6 (**C-2'**), 122.5 (**C-3'**), 111.3 (**C-5**), 90.2 (**C-1'**), 87.3 (d, ³ J_{CP} = 7.7 Hz, **C-4'**), 69.4 (d, ² J_{CP} = 7.2 Hz, **Ph-CH₂**), 67.0 (**C-5'**), 59.3 (**C-A**), 47.4 (**C-E**), 34.9 (**C-b**), 33.0, 30.8, 30.8, 30.8, 30.8, 30.7, 30.5, 30.5, 30.2, 23.6 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**, **C-m**, **C-n**, **C-o**), 26.1 (**C-c**), 24.8 (**C-B**), 20.7 (**C-C**), 19.8 (**C-F**), 14.6 (**C-p**), 14.4 (**C-D**), 12.8 (**C-7**).



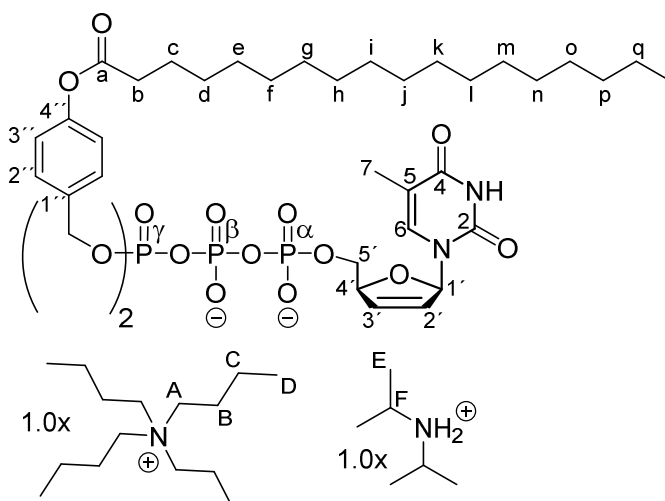
^{31}P -NMR (202 MHz, THF- d_6): δ [ppm]= -12.56 (d, $^2J_{\text{PP}}= 19.6$ Hz, **P- α**), -13.38 (d, $^2J_{\text{PP}}= 17.5$ Hz, **P- γ**), -24.17 (t, $^2J_{\text{PP}}= 18.5$ Hz, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 2987, 2970, 2916, 2850, 1756, 1692, 1467, 1451, 1407, 1394, 1382, 1251, 1226, 1169, 1075, 1066, 1056, 1028, 892, 721, 420.

Darstellung von γ -Bis(4-octadecanoyloxybenzyl)-d4TTP 56j

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 87 mg (0.10 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 0.3 mL abs. Acetonitril und 0.9 mL abs. THF gelöst, mit 0.19 g (0.20 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(hexadecanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75j** und 0.52 mL (0.13 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 38 μL (0.21 mmol, 2.1 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan). Die Reaktion wurde einmal neu gestartet, um einen höheren Umsatz des Edukts **15** zu erzielen.

Ausbeute: Es wurden 69 mg (44 μmol , 44%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1551.99 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{60}\text{H}_{93}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{P}_3^{2-}$ **UV (HPLC):** $\lambda_{\text{max}}= 265$ nm **HPLC:** $t_{\text{R}}= 19.45$ min (Methode C) **MALDI-MS (neg.):** $m/z=$ ber.: 1207.577 [M-H], gef.: 1207.670.



^1H -NMR (300 MHz, THF- d_6): δ [ppm]=

10.16 (s, 1H, **NH**), 7.84 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.4$ Hz, 1H, **H-6**), 7.50-7.41 (m, 4H, **H-2'**), 7.05-6.96 (m, 4H, **H-3'**), 6.91 (dt, $^3J_{\text{HH}}= 3.3$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 1.5$ Hz, 1H, **H-1'**), 6.62-6.53 (m, 1H, **H-3'**), 5.65-5.57 (m, 1H, **H-2'**), 5.24-5.13 (m, 4H, **Ph-CH $_2$**), 4.89-4.79 (m, 1H, **H-4'**), 4.43-4.30 (m, 1H, **H-5'a**), 4.17-4.04 (m, 1H, **H-5'b**), 3.51-3.28 (m, 8H, **H-A**), 3.30-3.09 (m, 2H, **H-E**), 2.51 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.4$ Hz, 4H, **H-b**), 1.91 (d, $^4J_{\text{HH}}= 0.7$ Hz, 3H, **H-7**), 1.77-1.60 (m, 13H, **H-c**, **H-B**), 1.49-1.19 (m, 76H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**, **H-j**, **H-k**, **H-l**, **H-m**, **H-n**, **H-o**, **H-p**, **H-q**, **H-C**, **H-F**), 1.00-0.82 (m, 18H, **H-r**, **H-D**).

^{13}C -NMR (75 MHz, THF- d_6): δ [ppm]= 172.1 (**C-a**), 164.8 (**C-4**), 152.1 (**C-2**), 151.9 (**C-4'**), 138.0 (**C-6**), 136.6 (**C-3'**), 135.8 (d, $^3J_{\text{CP}}= 7.8$ Hz, **C-1'**), 130.1 (**C-2'**), 126.5 (**C-2'**), 122.4 (**C-3'**), 111.3 (**C-5**), 90.2 (**C-1'**), 87.5 (d, $^3J_{\text{CP}}= 8.4$ Hz, **C-4'**), 69.2 (d, $^2J_{\text{CP}}= 5.3$ Hz, **Ph-CH $_2$**), 67.1 (**C-5'**), 59.3 (**C-A**), 47.2 (**C-E**), 34.9 (**C-b**), 33.1, 30.8, 30.8, 30.7, 30.5, 30.5, 30.3, 23.8 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**, **C-m**, **C-n**, **C-o**), 26.0 (**C-c**), 24.9 (**C-B**), 20.8 (**C-C**), 19.8 (**C-F**), 14.6 (**C-p**), 14.4 (**C-D**), 12.8 (**C-7**).

^{31}P -NMR (162 MHz, THF- d_8): δ [ppm]= -12.74 (d, $^2J_{\text{PP}}= 19.2$ Hz, **P- α**), -12.83 (d, $^2J_{\text{PP}}= 18.3$ Hz, **P- γ**), -23.46 (t, $^2J_{\text{PP}}= 18.7$ Hz, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3174, 2959, 2916, 2849, 1756, 1688, 1510, 1466, 1413, 1393, 1381, 1252, 1220, 1169, 1128, 1079, 1066, 1047, 1027, 1013, 922, 837, 783, 767, 720, 576, 423.

Darstellung von γ -Bis(4-(*Z*-octadec-9-enoyloxybenzyl)-d4TTP 56k

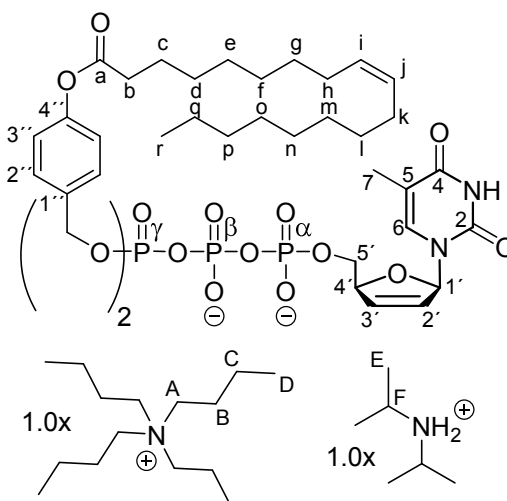
Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 96 mg (0.11 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 0.3 mL abs. Acetonitril und 0.9 mL abs. THF gelöst, mit 0.20 g (0.22 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(4-(*Z*-octadec-9-enoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75k** und 0.53 mL (0.13 mmol, 1.2 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 42 μL (0.23 mmol, 2.1 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan). Die Reaktion wurde einmal neu gestartet, um einen höheren Umsatz des Edukts **15** zu erzielen.

Ausbeute: Es wurden 99 mg (64 μmol , 58%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1547.96 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{60}\text{H}_{89}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{P}_3^{2-}$ **UV (HPLC):** $\lambda_{\text{max}}= 265$ nm **HPLC:** $t_{\text{R}}= 22.92$ min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** $m/z=$ ber.: 1203.557 [M-H] $^-$, gef.: 1203.546.

^1H -NMR (300 MHz, THF- d_8): δ [ppm]= 10.20 (s, 1H, **NH**), 7.86 (s, 1H, **H-6**), 7.52-7.42 (m, 4H, **H-2''**), 7.07-6.96 (m, 4H, **H-3''**), 6.94-6.88 (m, 1H,

H-1'), 6.67-6.53 (m, 1H, **H-3'**), 5.68-5.54 (m, 1H, **H-2'**), 5.44-5.27 (m, 4H, **H-i**, **H-j**), 5.24-5.14 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.90-4.79 (m, 1H, **H-4'**), 4.43-4.31 (m, 1H, **H-5'a**), 4.18-4.03 (m, 1H, **H-5'b**), 3.57-3.25 (m, 8H, **H-A**), 3.32-3.02 (m, 2H, **H-E**), 2.52 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.5$ Hz, 4H, **H-b**), 2.14-1.95 (m, 8H, **H-h**, **H-k**), 1.91 (s, 3H, **H-7**), 1.80-1.58 (m, 12H, **H-c**, **H-B**), 1.54-1.16 (m, 60H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-l**, **H-m**, **H-n**, **H-o**, **H-p**, **H-q**, **H-C**, **H-F**), 1.05-0.75 (m, 18H, **H-r**, **H-D**).

^{13}C -NMR (75 MHz, THF- d_8): δ [ppm]= 172.1 (**C-a**), 164.8 (**C-4**), 152.1 (**C-2**), 151.9 (**C-4'**), 138.0 (**C-6**), 137.3 (**C-3'**), 135.9 (d, $^3J_{\text{CP}}= 7.9$ Hz, **C-1''**), 130.7, 130.7 (**C-i**, **C-j**), 130.1 (d, $^4J_{\text{CP}}= 1.5$ Hz, **C-2''**), 126.3 (**C-2'**), 122.4 (**C-3''**), 111.2 (**C-5**), 90.2 (**C-1'**), 87.6 (d, $^3J_{\text{CP}}= 8.8$ Hz, **C-4'**), 69.1 (**Ph-CH₂**), 67.1 (**C-5'**), 59.3 (**C-A**), 47.2 (**C-E**), 34.9 (**C-b**), 33.0, 30.9, 30.7, 30.5, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-l**, **C-m**, **C-n**, **C-o**, **C-p**, **C-q**), 28.2, 28.2 (**C-h**, **C-k**), 25.9 (**C-c**), 25.0 (**C-B**), 20.8 (**C-C**), 19.8 (**C-F**), 14.7 (**C-p**), 14.4 (**C-D**), 12.8 (**C-7**).



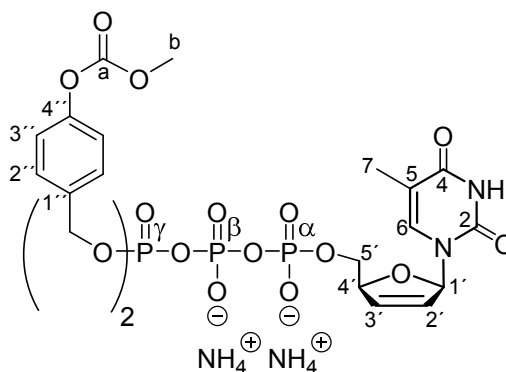
^{31}P -NMR (162 MHz, THF- d_6): δ [ppm]= -14.44 (d, $^2J_{\text{PP}}= 19.0$ Hz, **P- α**), -14.94 (d, $^2J_{\text{PP}}= 18.0$ Hz, **P- γ**), -25.55 (t, $^2J_{\text{PP}}= 18.5$ Hz, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3663, 3358, 2965, 2924, 2854, 1758, 1689, 1509, 1464, 1394, 1380, 1262, 1200, 1167, 1129, 1114, 1082, 1047, 1028, 1013, 934, 913, 881, 837, 805, 782, 767, 721, 695, 572, 490, 426.

Darstellung von γ -Bis(4-methyloxycarbonyloxybenzyl)-d4TTP 56I

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 99 mg (0.11 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 0.7 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.11 g (0.23 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(methyloxycarbonyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75I** und 0.59 mL (0.15 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 46 μL (0.25 mmol, 2.2 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 49 mg (59 μmol , 52%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 826.53 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_{19}\text{P}_3^{2-}$ **UV (HPLC):** $\lambda_{\text{max}}= 265$ nm **HPLC:** $t_{\text{R}}= 11.28$ min (Methode A); 9.17 min (Methode B) **MALDI-MS (neg.):** $m/z=$ ber.: 791.066 [M-H] $^-$, gef.: 791.003.



^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 7.68 (d,

$^4J_{\text{HH}}= 1.2$ Hz, 1H, **H-6**), 7.43-7.38 (m, 4H, **H-2'**), 7.16-7.11 (m, 4H, **H-3'**), 6.92 (dt, $^3J_{\text{HH}}= 3.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 1.8$ Hz, 1H, **H-1'**), 6.47 (dt, $^3J_{\text{HH}}= 6.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 1.7$ Hz, 1H, **H-3'**), 5.82 (ddd, $^3J_{\text{HH}}= 6.1$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 2.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 1.4$ Hz, 1H, **H-2'**), 5.18 (d, $^3J_{\text{HP}}= 8.0$ Hz, 4H, **Ph-CH $_2$**), 4.96-4.90 (m, 1H, **H-4'**), 4.31-4.15 (m, 2H, **H-5'**), 3.86 (s, 6H, **H-b**), 1.88 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.2$ Hz, 3H, **H-7**).

^{13}C -NMR (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 166.7 (**C-4**), 155.7 (**C-a**), 152.8 (**C-2**), 152.7 (**C-4'**), 138.7 (**C-6**), 135.8 (**C-3'**), 135.4 (d, $^3J_{\text{CP}}= 7.6$ Hz, **C-1'**), 130.5 (d, $^4J_{\text{CP}}= 3.5$ Hz, **C-2''**), 127.1 (**C-2'**), 122.3 (**C-3''**), 112.1 (**C-5**), 90.8 (**C-1'**), 87.3 (d, $^3J_{\text{CP}}= 9.5$ Hz, **C-4'**), 70.3 (dd, $^2J_{\text{CP}}= 5.8$ Hz, $^4J_{\text{CP}}= 2.1$ Hz, **Ph-CH $_2$**), 67.6 (d, $^2J_{\text{CP}}= 5.9$ Hz, **C-5'**), 56.0 (**C-b**), 12.5 (**C-7**).

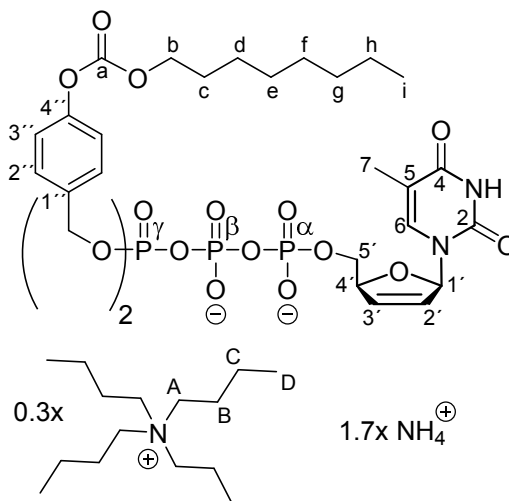
^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= -11.79 (d, $^2J_{\text{PP}}= 19.8$ Hz, **P- α**), -13.23 (d, $^2J_{\text{PP}}= 17.6$ Hz, **P- γ**), -23.71 (t, $^2J_{\text{PP}}= 18.5$ Hz, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3440, 3191, 3050, 1764, 1692, 1510, 1441, 1263, 1226, 1172, 1129, 1082, 1013, 933, 914, 838, 783, 736, 525, 402.

Darstellung von γ -Bis(4-octyloxycarbonyloxybenzyl)-d4TTP 56m

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 0.11 g (0.13 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 0.7 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.18 g (0.26 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(octyloxycarbonyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75m** und 0.68 mL (0.17 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 53 μ L (0.29 mmol, 2.2 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 75 mg (69 μ mol, 52%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1090.23 g/mol **Summenformel:** C₄₂H₅₇N₂O₁₉P₃²⁻
UV (HPLC): λ_{\max} = 265 nm **HPLC:** t_R = 16.72 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 987.285 [M-H]⁻, gef.: 987.396.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 7.65 (d, ⁴ J_{HH} = 1.1 Hz, 1H, **H-6**), 7.43-7.36 (m, 4H, **H-2''**), 7.17-7.09 (m, 4H, **H-3''**), 6.91 (dt, ³ J_{HH} = 3.5 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.9 Hz, 1H, **H-1'**), 6.44 (dt, ³ J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, **H-3'**), 5.82 (ddd, ³ J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴ J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, **H-2'**), 5.14 (d, ³ J_{HP} = 8.2 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.96-4.90 (m, 1H, **H-4'**), 4.29-4.13 (m, 2H, **H-5'**), 4.22 (t, ³ J_{HH} = 6.6 Hz, 4H, **H-b**), 3.25-3.15 (m, 2.5H, **H-A**), 1.88 (d, ⁴ J_{HH} = 1.1 Hz, 3H, **H-7**), 1.77-1.64 (m, 4H, **H-c**), 1.67-1.57 (m, 2.5H, **H-B**), 1.47-1.22 (m, 22.5H, **H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-C**), 1.00 (t, ³ J_{HH} = 7.3 Hz, 3.8H, **H-D**), 0.90 (t, ³ J_{HH} = 6.7 Hz, 6H, **H-i**).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 166.5 (**C-4**), 155.1 (**C-a**), 152.7 (**C-2**), 152.7 (**C-4'**), 138.6 (**C-6**), 135.7 (**C-3'**), 135.2 (d, ³ J_{CP} = 7.6 Hz, **C-1'**), 130.5 (d, ⁴ J_{CP} = 2.3 Hz, **C-2'**), 127.2 (**C-2'**), 122.3 (**C-3''**), 112.0 (**C-5**), 90.8 (**C-1'**), 87.3 (d, ³ J_{CP} = 9.5 Hz, **C-4'**), 70.3 (dd, ² J_{CP} = 5.4 Hz, ⁴ J_{CP} = 1.4 Hz, **Ph-CH₂**), 70.0 (**C-b**), 67.8 (d, ² J_{CP} = 5.6 Hz, **C-5'**), 59.4 (**H-A**), 32.9, 30.3, 30.3, 26.8, 23.7 (**C-d, C-e, C-f, C-g, C-h**), 29.7 (**C-c**), 24.7 (**C-B**), 20.7 (**C-C**), 14.5 (**C-i**), 14.0 (**C-D**), 12.5 (**C-7**).

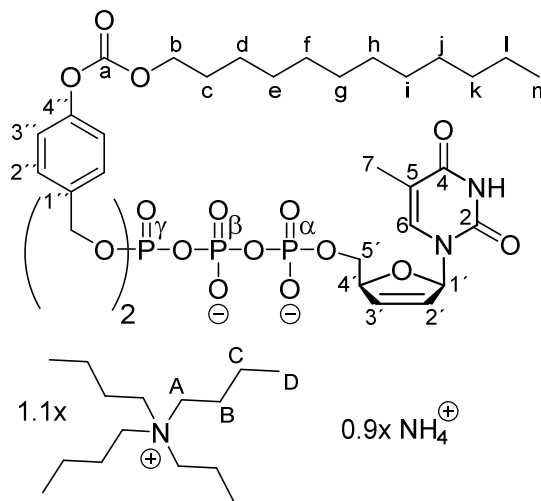
³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= -11.68 (d, ² J_{PP} = 19.3 Hz, **P- α**), -13.15 (d, ² J_{PP} = 16.1 Hz, **P- γ**), -23.53 (t, ² J_{PP} = 18.0 Hz, **P- β**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3198, 3062, 2957, 2626, 2856, 1760, 1690, 1510, 1465, 1393, 1250, 1223, 1129, 1081, 1026, 1012, 932, 911, 839, 782, 735.

Darstellung von γ -Bis(4-dodecyloxycarbonyloxybenzyl)-d4TTP 56n

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 80 mg (92 μ mol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 0.5 mL abs. Acetonitril und 0.5 mL abs. THF gelöst, mit 0.15 g (0.19 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(dodecyloxycarbonyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75n** und 0.48 mL (0.12 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 37 μ L (0.20 mmol, 2.1 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 52 mg (38 μ mol, 41%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1382.00 g/mol **Summenformel:** C₅₀H₇₃N₂O₁₉P₃²⁻ **UV (HPLC):** λ_{\max} = 265 nm **HPLC:** t_R = 20.53 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 1099.410 [M-H]⁻, gef.: 1099.083.



¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 7.70 (d, ⁴ J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, **H-6**), 7.43-7.36 (m, 4H, **H-2''**), 7.19-7.11 (m, 4H, **H-3''**), 6.94 (dt, ³ J_{HH} = 3.4 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, **H-1'**), 6.52 (dt, ³ J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, **H-3'**), 5.80 (ddd, ³ J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴ J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.4 Hz, 1H, **H-2'**), 5.19 (d, ³ J_{HP} = 8.0 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 5.00-4.93 (m, 1H, **H-4'**), 4.37-4.15 (m, 2H, **H-5'**), 4.25 (t, ³ J_{HH} = 6.6 Hz, 4H, **H-b**), 3.29-3.14 (m, 9H, **H-A**), 1.92 (d, ⁴ J_{HH} = 1.3 Hz, 3H, **H-7**), 1.80-1.66 (m, 4H, **H-c**), 1.71-1.58 (m, 9H, **H-B**), 1.50-1.25 (m, 45H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**, **H-j**, **H-k**, **H-l**, **H-C**), 1.03 (t, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 13.5H, **H-D**), 0.92 (t, ³ J_{HH} = 6.6 Hz, 6H, **H-m**).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 166.5 (**C-4**), 155.1 (**C-a**), 152.7 (**C-2**), 152.6 (**C-4''**), 138.7 (**C-6**), 136.0 (**C-3'**), 135.4 (d, ³ J_{CP} = 7.8 Hz, **C-1''**), 130.5 (d, ⁴ J_{CP} = 2.4 Hz, **C-2''**), 127.0 (**C-2'**), 122.3 (**C-3''**), 112.1 (**C-5**), 90.8 (**C-1'**), 87.3 (d, ³ J_{CP} = 9.2 Hz, **C-4'**), 70.2 (d, ² J_{CP} = 5.6 Hz, **Ph-CH₂**), 70.0 (**C-b**), 67.8 (d, ² J_{CP} = 6.0 Hz, **C-5'**), 59.5 (**H-A**), 33.1, 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.3, 26.8, 23.7, 20.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**), 29.7 (**C-c**), 24.8 (**C-B**), 19.4 (**C-C**), 14.5 (**C-m**), 13.9 (**C-D**), 12.5 (**C-7**).

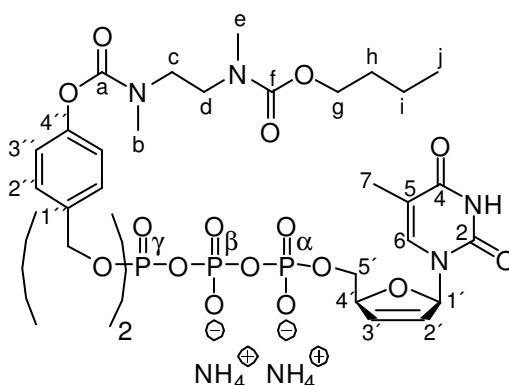
³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = -12.07 (d, ² J_{PP} = 21.7 Hz, **P- α**), -13.38 (d, ² J_{PP} = 18.1 Hz, **P- γ**), -24.20 (dd, ² J_{PP} = 21.7 Hz, ² J_{PP} = 18.1 Hz, **P- β**).

IR: ν [cm⁻¹] = 3401, 2957, 2923, 2854, 1760, 1689, 1510, 1466, 1392, 1248, 1222, 1170, 1130, 1114, 1087, 1026, 1012, 932, 912, 837, 781, 738, 721, 574, 509, 419.

Darstellung von γ -Bis(4-(butyl-ethan-1,2-diylbis(methylcarbamat))-oxybenzyl)-d4TTP 56o

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 75 mg (87 μ mol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 1.5 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.12 g (0.15 mmol, 1.7 Äquiv.) Bis(4-(butyl-ethan-1,2-diylbis(methylcarbamat))-oxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75o** und 0.45 mL (0.11 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 32 μ L (0.18 mmol, 2.1 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 68 mg (60 μ mol, 69%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1138.99 g/mol **Summenformel:** C₄₄H₆₁N₆O₂₁P₃²⁻ **UV (HPLC):** λ_{\max} = 265 nm **HPLC:** t_R = 12.88 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 1103.319 [M-H]⁻, gef.: 1103.383.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 7.68 (d,

⁴ J_{HH} = 1.0 Hz, 1H, **H-6**), 7.48-7.42 (m, 4H, **H-2''**), 7.15-7.09 (m, 4H, **H-3''**, Rotamere), 6.96 (dt, ³ J_{HH} = 3.5 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, **H-1'**), 6.49 (dt, ³ J_{HH} = 6.1 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, **H-3'**), 5.86-5.82 (m, 1H, **H-2'**), 5.22-5.16 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 5.00-4.96 (m, 1H, **H-4'**), 4.34-4.19 (m, 2H, **H-5'**), 4.17-4.05 (m, 4H, **H-g**), 3.71-3.53 (m, 8H, **H-c**, **H-d**, Rotamere), 3.15-2.96 (m, 12H, **H-b**, **H-e**), 1.93 (d, ⁴ J_{HH} = 1.0 Hz, 3H, **H-7**), 1.72-1.56 (m, 4H, **H-h**, Rotamere), 1.50-1.34 (m, 4H, **H-i**, Rotamere), 0.96, 0.90 (t, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 6H, **H-j**, Rotamere).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 166.5 (**C-4**), 158.3 (**C-f**), 156.4 (**C-a**), 152.8 (**C-4''**), 152.7 (**C-2**), 138.6 (**C-6**), 135.7 (**C-3'**), 134.6 (**C-1''**), 130.4 (d, ⁴ J_{CP} = 2.7 Hz, **C-2''**), 127.2 (**C-2'**), 123.1, 122.9 (**C-3''**, Rotamere), 112.0 (**C-5**), 90.8 (**C-1'**), 87.2 (d, ⁴ J_{CP} = 9.1 Hz, **C-4'**), 70.4 (dd, ² J_{CP} = 5.4 Hz, ⁴ J_{CP} = 2.5 Hz, **Ph-CH₂**), 67.9 (d, ² J_{CP} = 5.8 Hz, **C-5'**), 66.8, 66.6 (**C-g**, Rotamere), 48.1, 47.8, 47.6, 47.3 (**C-e**, **C-d**, Rotamere), 35.5, 35.3, 35.1, 34.9 (**C-b**, **C-e**, Rotamere), 32.2, 32.2 (**C-h**, Rotamere), 20.2 (**C-i**), 14.1, 14.1 (**C-j**, Rotamere), 12.5 (**C-7**).

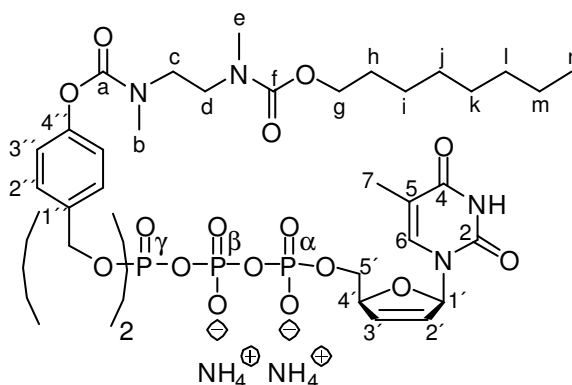
³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = -11.72 (d, ² J_{PP} = 19.5 Hz, **P- α**), -13.16 (d, ² J_{PP} = 17.8 Hz, **P- γ**), -23.55 (t, ² J_{PP} = 18.1 Hz, **P- β**).

IR: ν [cm⁻¹] = 3452, 3191, 2959, 1688, 1460, 1428, 1402, 1250, 1204, 1170, 1126, 1078, 1009, 908, 893, 804, 771, 753, 698, 644, 519, 491.

Darstellung von γ -Bis(4-(octyl-ethan-1,2-diylbis(methylcarbamat))-oxybenzyl)-d4TTP 56p

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 80 mg (92 μ mol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 0.8 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.15 g (0.16 mmol, 1.7 Äquiv.) Bis(4-(octyl-ethan-1,2-diylbis(methylcarbamat))-oxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75p** und 0.48 mL (0.12 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 37 μ L (0.20 mmol, 2.2 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 73 mg (58 μ mol, 63%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1251.21 g/mol **Summenformel:** $C_{52}H_{77}N_6O_{21}P_3^{2-}$ **UV (HPLC):** λ_{\max} = 265 nm **HPLC:** t_R = 15.98 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 1215.444 $[M-H]^-$, gef.: 1215.630.



1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 7.69 (bs, 1H, **H-6**), 7.47-7.42 (m, 4H, **H-2''**), 7.15-7.08 (m, 4H, **H-3''**, Rotamere), 6.96 (dt, $^3J_{HH}$ = 3.5 Hz, $^4J_{HH}$ = 1.6 Hz, 1H, **H-1'**), 6.49 (dt, $^3J_{HH}$ = 6.0 Hz, $^4J_{HH}$ = 1.7 Hz, 1H, **H-3'**), 5.83 (dt, $^3J_{HH}$ = 6.0 Hz, $^4J_{HH}$ = 1.7 Hz, 1H, **H-2'**), 5.22-5.16 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 5.00-4.96 (m, 1H, **H-4'**), 4.34-4.19 (m, 2H, **H-5'**), 4.15-4.05 (m, 4H, **H-g**), 3.72-3.53 (m, 8H, **H-c**, **H-d**, Rotamere), 3.18-2.96 (m, 12H, **H-b**, **H-e**), 1.93 (s, 3H, **H-7**), 1.74-1.59 (m, 4H, **H-h**, Rotamere), 1.47-1.22 (m, 20H, **H-i**, **H-j**, **H-k**, **H-l**, **H-m**), 0.92 (t, $^3J_{HH}$ = 6.2 Hz, 6H, **H-n**).

^{13}C -NMR (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 166.3 (**C-4**), 158.4 (**C-f**), 156.5 (**C-a**), 152.8 (**C-4''**), 152.8 (**C-2**), 138.6 (**C-6**), 135.7 (**C-3'**), 134.6 (**C-1''**), 130.4 (d, $^4J_{CP}$ = 2.7 Hz, **C-2''**), 127.2 (**C-2'**), 123.2, 123.0 (**C-3''**, Rotamere), 112.0 (**C-5**), 90.8 (**C-1'**), 87.2 (d, $^4J_{CP}$ = 9.2 Hz, **C-4'**), 70.5-70.3 (m, **Ph-CH₂**), 67.9 (d, $^2J_{CP}$ = 5.9 Hz, **C-5'**), 67.1, 66.9 (**C-g**, Rotamere), 48.2, 47.9, 47.7, 47.3 (**C-e**, **C-d**, Rotamere), 35.5, 35.4, 35.2, 35.0 (**C-b**, **C-e**, Rotamere), 32.9, 30.3, 30.3, 27.0, 23.7 (**C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**, **C-m**), 30.2, 30.1 (**C-h**, Rotamere), 14.5 (**C-n**), 12.5 (**C-7**).

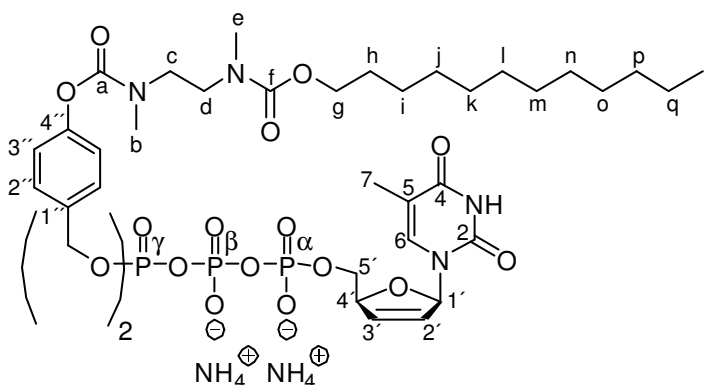
^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= -11.71 (d, $^2J_{PP}$ = 19.2 Hz, **P- α**), -13.16 (d, $^2J_{PP}$ = 16.7 Hz, **P- γ**), -23.54 (bs, $^2J_{PP}$ = 17.2 Hz, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3191, 2953, 2925, 2856, 1693, 1461, 1428, 1402, 1251, 1205, 1169, 1126, 1080, 1010, 910, 840, 805, 771, 754, 644, 528, 493.

Darstellung von γ -Bis(4-(dodecyl-ethan-1,2-diylbis(methylcarbamat))-oxybenzyl)-d4TTP 56q

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 78 mg (90 μ mol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 3.0 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.22 g (0.15 mmol, 1.7 Äquiv.) Bis(4-(dodecyl-ethan-1,2-diylbis(methylcarbamat))-oxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75q** und 0.47 mL (0.12 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 36 μ L (0.20 mmol, 2.2 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 36 mg (26 μ mol, 29%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1363.42 g/mol **Summenformel:** $C_{60}H_{93}N_6O_{21}P_3^{2-}$ **UV (HPLC):** λ_{max} = 265 nm **HPLC:** t_R = 19.04 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 1327.569 $[M-H]^-$, gef.: 1327.607.



1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 7.66 (bs, 1H, **H-6**), 7.46-7.39 (m, 4H, **H-2''**), 7.13-7.06 (m, 4H, **H-3''**, Rotamere), 6.95-6.92 (m, 1H, **H-1'**), 6.47 (dt, $^3J_{HH}$ = 6.1 Hz, $^4J_{HH}$ = 1.7 Hz, 1H, **H-3'**), 5.83-5.79 (m, 1H, **H-2'**), 5.20-5.13 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.98-4.93 (m, 1H, **H-4'**), 4.33-4.16 (m, 2H, **H-5'**), 4.14-4.01 (m, 4H, **H-g**), 3.71-3.53 (m, 8H, **H-c**, **H-d**, Rotamere), 3.17-2.93 (m, 12H, **H-b**, **H-e**), 1.91 (s, 3H, **H-7**), 1.72-1.55 (m, 4H, **H-h**, Rotamere), 1.45-1.21 (m, 36H, **H-i**, **H-j**, **H-k**, **H-l**, **H-m**, **H-n**, **H-o**, **H-p**, **H-q**), 0.91 (t, $^3J_{HH}$ = 6.6 Hz, 6H, **H-r**).

^{13}C -NMR (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 166.4 (**C-4**), 158.3 (**C-f**), 156.4 (**C-a**), 152.8 (**C-4''**), 152.7 (**C-2**), 138.6 (**C-6**), 135.7 (**C-3'**), 134.7-134.4 (m, **C-1''**), 130.4 (d, $^4J_{CP}$ = 2.5 Hz, **C-2''**), 127.2 (**C-2'**), 123.2, 123.0 (**C-3''**, Rotamere), 112.0 (**C-5**), 90.8 (**C-1'**), 87.2 (d, $^4J_{CP}$ = 9.2 Hz, **C-4'**), 70.4 (dd, $^2J_{CP}$ = 5.3 Hz, $^4J_{CP}$ = 2.2 Hz, **Ph-CH₂**), 67.9 (d, $^2J_{CP}$ = 5.0 Hz, **C-5'**), 67.1, 66.9 (**C-g**, Rotamere), 48.2, 47.9, 47.6, 47.3 (**C-e**, **C-d**, Rotamere), 35.5, 35.4, 35.2, 34.9 (**C-b**, **C-e**, Rotamere), 33.1, 30.7, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.3, 27.0, 23.7 (**C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**, **C-m**, **C-n**, **C-o**, **C-p**, **C-q**), 30.2, 30.1 (**C-h**, Rotamere), 14.5 (**C-r**), 12.5 (**C-7**).

^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= -11.74 (bs, **P- α**), -13.10 (d, $^2J_{PP}$ = 16.1 Hz, **P- γ**), -23.51 (bs, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3191, 2948, 2923, 2853, 1721, 1699, 1510, 1460, 1428, 1400, 1364, 1294, 1252, 1200, 1166, 1118, 1051, 1003, 861, 769, 752, 523, 506.

5.2.7 Synthese des asymmetrisch maskierten d4TTP-Prodrugs 58

Darstellung von γ -(4-Acetyloxybenzyl)-(4-nonanoyloxybenzyl)-d4TTP 58

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante B)** durchgeführt. Zunächst wurden 0.20 mg (0.24 mmol, 1.0 Äquiv.) *P,P*-(4-Acetyloxybenzyl)-(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **246**, gelöst in 5.0 mL abs. Acetonitril, mit 0.16 mL (0.24 g, 1.1 mmol, 4.6 Äquiv.) TFAA und 0.26 mL (0.19 g, 1.8 mmol, 7.5 Äquiv.) Triethylamin, gelöst in 5.0 mL abs. Acetonitril, verestert. Aufgenommen in 2.0 mL abs. Acetonitril folgte die Aktivierung mit 55 μ L (56 mg, 0.69 mmol, 2.8 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 0.16 mL (0.11 g, 1.1 mmol, 4.6 Äquiv.) Triethylamin, bevor 62 mg (0.11 mmol, 0.5 Äquiv.) Mono(tetra-*n*-butylammonium)-d4TMP **13**, gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, hinzuge tropft wurden.

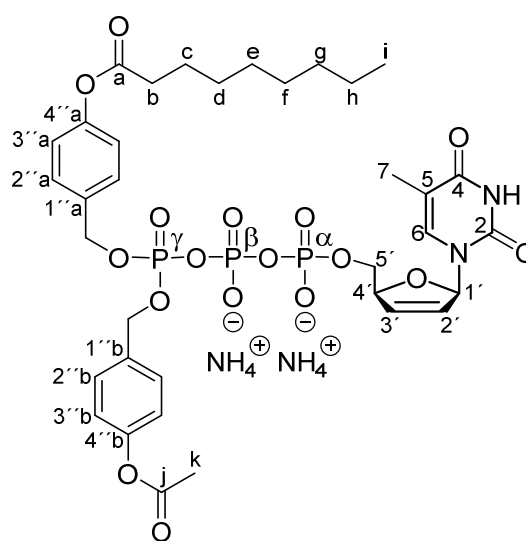
Ausbeute: Es wurden 21 mg (24 μ mol, 20%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 892.73 g/mol **Summenformel:** C₃₅H₄₃N₂O₁₇P₃²⁻
UV (HPLC): λ_{\max} = 265 nm **HPLC:** t_R = 14.03 min (Methode A), 13.36 min (Methode C) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 857.186 [M-H]⁻, gef.: 857.256.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 7.68 (d, ³ J_{HH} = 1.3 Hz, **H-7**), 7.50-7.35 (m, 4H, **H-2''a**, **H-2''b**), 7.14-7.03 (m, 4H, **H-3''a**, **H-3''b**), 6.95 (dt, ³ J_{HH} = 3.4 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.6 Hz, 1H, **H-1'**), 6.49 (dt, ³ J_{HH} = 6.0 Hz, ³ J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, **H-3'**), 5.86-5.80 (m, 1H, **H-2'**), 5.18 (d, ³ J_{HP} = 8.1 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 5.00-4.94 (m, 1H, **H-4'**), 4.30 (ddd, ² J_{HH} = 10.5 Hz, ³ J_{HH} = 6.6 Hz, ⁴ J_{HH} = 3.3 Hz, 1H, **H-5'a**), 4.21 (ddd, ² J_{HH} = 11.5 Hz, ³ J_{HH} = 5.4 Hz, ⁴ J_{HH} = 3.1 Hz, 1H, **H-5'b**), 2.61 (t, ³ J_{HH} = 7.3 Hz, 2H, **H-b**), 2.30 (s, 3H, **H-k**), 1.91 (d, ⁴ J_{HH} = 1.3 Hz, 3H, **H-7**), 1.76 (quint, ³ J_{HH} = 7.3 Hz, 2H, **H-c**), 1.51-1.29 (m, 10H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.94 (t, ³ J_{HH} = 6.9 Hz, 3H, **H-i**).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 173.5 (**C-a**), 170.7 (**C-j**), 166.2 (**C-4**), 152.8 (**C-2**), 152.3, 152.3 (**C-4''a**, **C-4''b**), 138.6 (**C-6**), 135.7 (**C-3'**), 135.0-134.8 (m, **C-1''a**, **C-1''b**), 130.4, 130.4 (d, ⁴ J_{CP} = 3.5 Hz, **C-2''a**, **C-2''b**), 127.2 (**C-2'**), 122.8, 122.8 (**C-3''a**, **C-3''b**), 112.1 (**C-5**), 90.9 (**C-1'**), 87.1 (d, ³ J_{CP} = 8.2 Hz, **H-4'**), 70.4 (d, ² J_{CP} = 5.5 Hz, **Ph-CH₂**), 67.9 (d, ² J_{CP} = 5.5 Hz, **H-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.0, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 26.0 (**C-c**), 20.9 (**C-k**), 14.4 (**C-i**), 12.5 (**C-7**).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = -11.78 (bs, **P- α**), -13.19 (d, ² J_{PP} = 17.5 Hz, **P- γ**), -23.68 (bs, **P- β**).

IR: ν [cm⁻¹] = 3189, 2956, 2926, 2857, 1759, 1692, 1509, 1463, 1370, 1250, 1220, 1200, 1168, 1129, 1112, 1082, 1027, 1012, 913, 838, 785, 738, 651, 509, 492.

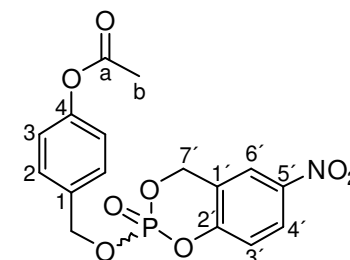


5.2.8 Synthese von Mono(alkanoyloxybenzyl)-d4TTP-Prodrugs 57

Darstellung von 5-Nitro-cycloSal-(4-acetyloxybenzyl)-monophosphat 97a

Die Reaktion wurde nach der **AAV 10** durchgeführt. Es wurden 0.31 g (1.3 mmol, 2.0 Äquiv.) 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **99** in 15 mL abs. Acetonitril aufgenommen und zu 0.11 g (0.67 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylacetat **76a** und 0.25 mL (0.19 g, 1.5 mmol, 2.2 Äquiv.) Diisopropylethylamin, gelöst in 12 mL abs. Acetonitril, getropft. Die Oxidation erfolgte mit 1.7 g (2.7 mmol, 4.0 Äquiv.) Oxone[®] und die Reinigung durch zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v + 0.1% Essigsäure).

Ausbeute: Es wurden 0.12 g (0.31 mmol, 46%) eines schwach gelben Öls erhalten. **Molmasse:** 379.26 g/mol **Summenformel:** C₁₆H₁₄NO₈P **R_f-Wert:** 0.45 (PE/EE 1:1 v/v + 0.1% HOAc) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 402.0349 [M+Na]⁺, gef.: 402.0306.



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 8.15-8.05 (m, 1H, **H-4'**), 7.99-7.94 (m, 1H, **H-6'**), 7.38-7.29 (m, 2H, **H-2**), 7.08-6.95 (m, 3H, **H-3**, **H-3'**), 5.42-5.27 (m, 2H, **H-7'**), 5.18 (d, ³J_{HP}= 10.1 Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 2.25 (s, 3H, **H-b**).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 172.2 (**C-a**), 154.3 (d, ²J_{CP}= 6.8 Hz, **C-2'**), 151.2 (**C-4**), 143.8 (**C-5'**), 132.2 (d, ³J_{CP}= 5.6 Hz, **C-1**), 129.6 (**C-2**), 125.4 (**C-4'**), 122.0 (**C-3**), 121.4 (**C-6'**), 121.4 (**C-1'**), 119.7 (d, ³J_{CP}= 9.2 Hz, **C-3'**), 70.2 (d, ²J_{CP}= 6.0 Hz, **Ph-CH₂**), 67.9 (d, ²J_{CP}= 7.1 Hz, **C-7'**), 21.0 (**C-b**).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= -10.30.

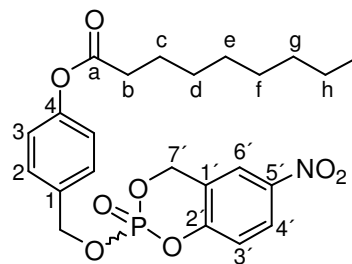
IR: ν [cm⁻¹]= 3100, 3075, 3052, 2936, 1753, 1587, 1526, 1510, 1481, 1456, 1434, 1369, 1305, 1217, 1193, 1167, 1085, 1003, 970, 910, 849, 836, 818, 789, 746, 710, 640, 568, 534, 505, 458, 453, 433.

Darstellung von 5-Nitro-cycloSal-(4-nonanoyloxybenzyl)-monophosphat 97e

Die Reaktion wurde nach der **AAV 10** durchgeführt. Es wurden 0.69 g (3.0 mmol, 2.0 Äquiv.) 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **99** in 20 mL Acetonitril aufgenommen und zu 0.39 g (1.5 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylnonanoat **76e** und 0.55 mL (0.42 g, 3.3 mmol, 2.2 Äquiv.) Diisopropylethylamin, gelöst in 10 mL Acetonitril, getropft. Die Oxidation erfolgte mit 3.6 g (5.9 mmol, 4.0 Äquiv.) Oxone[®] und die Reinigung durch zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v + 0.1% Essigsäure).

Ausbeute: Es wurden 0.57 g (1.2 mmol, 80%) eines beigen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 477.45 g/mol **Summenformel:** C₂₃H₂₈NO₈P **R_f-Wert:** 0.66 (PE/EE 1:1 v/v + 0.1% HOAc) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 500.1445 [M+Na]⁺, gef.: 500.1469

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 8.19-8.11 (m, 1H, **H-4'**), 8.02-7.95 (m, 1H, **H-6'**), 7.42-7.32 (m, 2H, **H-2**), 7.12-6.98 (m, 3H, **H-3**, **H-3'**), 5.45-5.29 (m, 2H, **H-7'**), 5.22 (d, $^3J_{\text{HP}}= 10.3$ Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 2.54 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.74 (quint, $^3J_{\text{HH}}= 7.5$ Hz, 2H, **H-c**), 1.46-1.17 (m, 10H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.87 (t, $^3J_{\text{HH}}= 6.8$ Hz, 3H, **H-i**).



$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 172.2 (**C-a**), 154.6 (d, $^2J_{\text{CP}}= 6.9$ Hz, **C-2'**), 151.5 (**C-4**), 143.9 (**C-5'**), 132.2 (d, $^3J_{\text{CP}}= 5.7$ Hz, **C-1**), 129.8 (**C-2**), 125.6 (d, $^5J_{\text{CP}}= 1.4$ Hz, **C-4'**), 122.2 (**C-3**), 121.6 (**C-6'**), 121.4 (**C-1'**), 119.9 (d, $^3J_{\text{CP}}= 9.1$ Hz, **C-3'**), 70.4 (d, $^2J_{\text{CP}}= 5.6$ Hz, **Ph-CH₂**), 67.9 (d, $^2J_{\text{CP}}= 6.8$ Hz, **C-7'**), 34.4 (**C-b**), 31.9, 29.3, 29.2, 29.2, 22.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 24.9 (**C-c**), 14.2 (**C-i**).

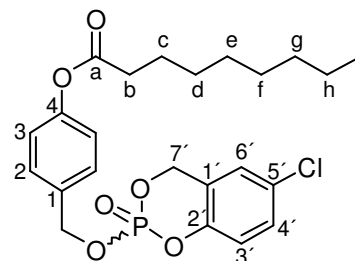
$^{31}\text{P-NMR}$ (81 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= -10.73.

IR: ν [cm^{-1}]= 2956, 2921, 2852, 1749, 1625, 1588, 1535, 1509, 1482, 1462, 1416, 1346, 1297, 1249, 1231, 1214, 1195, 1166, 1143, 1090, 1023, 976, 944, 916, 907, 841, 818, 761, 745, 684, 611, 584, 521, 470, 439, 409.

Darstellung von 5-Chlor-cycloSal-(4-nonyloxybenzyl)-monophosphat 98

Die Reaktion wurde nach der **AAV 10** durchgeführt. Es wurden 0.56 g (2.5 mmol, 1.2 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** in 8.0 mL abs. Acetonitril aufgenommen und zu 0.55 g (2.1 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylnonanoat **76e** und 0.46 mL (0.35 g, 2.7 mmol, 1.3 Äquiv.) Diisopropylethylamin, gelöst in 12 mL abs. Acetonitril, getropft. Die Oxidation erfolgte mit 0.57 mL (3.1 mmol, 1.5 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) und die Reinigung durch zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (1) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30:1 v/v + 0.1% Essigsäure; (2) PE/EE 4:1 + 0.1% Essigsäure.

Ausbeute: Es wurden 0.80 g (1.2 mmol, 80%) eines beigen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 466.90 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{ClO}_6\text{P}$ **R_f-Wert:** 0.74 (PE/EE 1:1 v/v + 0.1% HOAc) **HRMS (ESI⁺):** $m/z=$ ber.: 489.1204 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, gef.: 489.1180.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 7.40-7.35 (m, 2H, **H-2**), 7.27-7.22 (m, 1H, **H-4'**), 7.09-7.05 (m, 2H, **H-3**), 7.05-7.02 (m, 1H, **H-6'**), 6.88 (d, $^3J_{\text{HH}}= 8.8$ Hz, 2H, **H-3'**), 5.32-5.20 (m, 2H, **H-7'**), 5.19 (d, $^3J_{\text{HP}}= 9.8$ Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.75 (quint, $^3J_{\text{HH}}= 7.4$ Hz, 2H, **H-c**), 1.46-1.22 (m, 10H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.89 (t, $^3J_{\text{HH}}= 6.8$ Hz, 3H, **H-i**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ [ppm]= 172.3 (**C-a**), 151.3 (**C-4**), 148.9 (**C-2'**), 132.6 (d, $^3J_{\text{CP}}= 6.2$ Hz, **C-1**), 130.9 (**C-5'**), 129.9 (d, $^2J_{\text{CP}}= 1.4$ Hz, **C-4'**), 129.7 (**C-2**), 125.3 (**C-6'**), 122.8

(**C-1'**), 122.1 (**C-3**), 120.3 (d, $^3J_{CP} = 8.9$ Hz, **C-3'**), 69.9 (d, $^2J_{CP} = 6.1$ Hz, **Ph-CH₂**), 68.1 (d, $^2J_{CP} = 7.1$ Hz, **C-7'**), 34.5 (**C-b**), 31.9, 29.3, 29.2, 29.2, 22.8 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 25.0 (**C-c**), 14.2 (**C-i**).

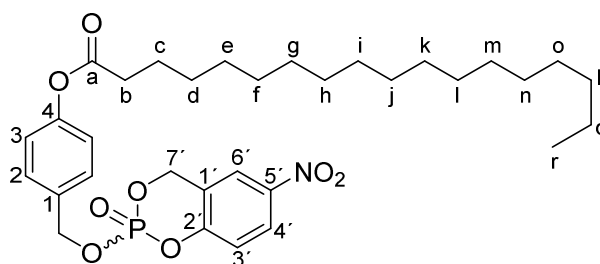
$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -9.91.

IR: ν [cm^{-1}] = 2956, 2920, 2851, 1749, 1603, 1508, 1480, 1462, 1417, 1380, 1359, 1295, 1261, 1246, 1214, 1197, 1165, 1144, 1116, 1092, 1027, 1006, 975, 946, 925, 881, 858, 915, 789, 760, 724, 690, 617, 584, 483, 469, 437, 413.

Darstellung von 5-Nitro-cycloSal-(4-octadecanoyloxybenzyl)-monophosphat **97j**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 10** durchgeführt. Es wurden 0.39 g (1.7 mmol, 1.5 Äquiv.) 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **99** in 15 mL abs. THF aufgenommen und zu 0.43 g (1.1 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenyloctadecanoat **76j** und 0.38 mL (0.29 g, 2.2 mmol, 2.0 Äquiv.) Diisopropylethylamin, gelöst in 20 mL abs. THF, getropft. Die Oxidation erfolgte mit 2.0 g (3.3 mmol, 3.0 Äquiv.) Oxone[®] und die Reinigung durch automatisierte Säulenchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30:1 v/v + 0.1% Essigsäure).

Ausbeute: Es wurden 0.58 g (0.96 mmol, 87%) eines schwach gelben Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 603.69 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{NO}_8\text{P}$ **R_r-Wert:** 0.72 (PE/EE 1:1 v/v + 0.1% HOAc) **HRMS (ESI⁺):** $m/z = \text{ber.}: 626.2853$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, gef.: 626.2821.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.19-8.14 (m, 1H, **H-4'**), 8.00 (d, $^4J_{HH} = 2.7$ Hz, 1H, **H-6'**), 7.41-7.35 (m, 2H, **H-2**), 7.10-7.02 (m, 3H, H-3, **H-3'**), 5.43-5.29 (m, 2H, **H-7'**), 5.23 (d, $^3J_{HP} = 10.4$ Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 2.55 (t, $^3J_{HH} = 7.5$ Hz, 2H, **H-b**), 1.74 (quint, $^3J_{HH} = 7.5$ Hz, 2H, **H-c**), 1.46-1.19 (m, 28H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**, **H-j**, **H-k**, **H-l**, **H-m**, **H-n**, **H-o**, **H-p**, **H-q**), 0.87 (t, $^3J_{HH} = 6.8$ Hz, 3H, **H-r**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 172.2 (**C-a**), 154.6 (**C-2'**), 151.6 (**C-4**), 144.0 (**C-5'**), 132.2 (d, $^3J_{CP} = 5.5$ Hz, **C-1**), 129.9 (**C-2**), 125.7 (**C-4'**), 122.2 (**C-3**), 121.6 (**C-6'**), 121.3 (**C-1'**), 120.0 (d, $^3J_{CP} = 9.4$ Hz, **C-3'**), 70.5 (d, $^2J_{CP} = 5.8$ Hz, **Ph-CH₂**), 68.1 (d, $^2J_{CP} = 7.1$ Hz, **C-7'**), 34.5 (**C-b**), 32.0, 29.8, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 22.8 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**, **C-m**, **C-n**, **C-o**, **C-p**, **C-q**), 25.0 (**C-c**), 14.2 (**C-r**).

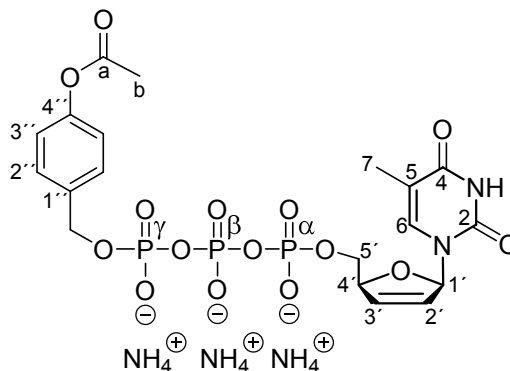
$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -10.30.

IR: ν [cm^{-1}] = 2955, 2918, 2849, 1746, 1588, 1534, 1467, 1345, 1295, 1253, 1231, 1199, 1167, 1146, 1099, 1026, 1012, 977, 944, 906, 862, 818, 731, 648, 611, 585, 522, 471, 440.

Darstellung von γ -Mono(4-acetyloxybenzyl)-d4TTP 57a

Die Reaktion wurde nach der **AAV 11** durchgeführt. Es wurden 70 mg (81 μ mol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 1.0 mL abs. DMF gelöst, mit 77 mg (0.20 mmol, 2.5 Äquiv.) 5-Nitro-*cycloSal*-(4-acetyloxybenzyl)-monophosphat **97a**, in 0.5 mL abs. DMF gelöst, versetzt.

Ausbeute: Es wurden 16 mg (24 μ mol, 30%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 663.41 g/mol **Summenformel:** C₁₉H₂₀N₂O₁₅P₃³⁻ **UV (HPLC):** λ_{\max} = 265 nm **HPLC:** t_R = 10.88 min (Methode A), 5.23 min (Methode B) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 611.024 [M-H]⁻, gef.: 611.044.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 7.69 (d,

⁴ J_{HH} = 1.2 Hz, 1H, **H-6**), 7.52-7.48 (m, 2H, **H-2**), 7.10-7.04 (m, 2H, **H-3**), 6.95 (dt, ³ J_{HH} = 3.5 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.6 Hz, 1H, **H-1'**), 6.53 (dt, ³ J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, **H-3'**), 5.85 (ddd, ³ J_{HH} = 6.1 Hz, ⁴ J_{HH} = 2.4 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, **H-2'**), 5.07 (d, ³ J_{HP} = 6.2 Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 5.02-4.97 (m, 1H, H-4'), 4.32-4.17 (m, 2H, **H-5'**), 2.29 (s, 3H, **C-b**), 1.93 (d, ⁴ J_{HH} = 1.2 Hz, 3H, **H-7**).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 171.3 (**C-a**), 166.7 (**C-4**), 153.0 (**C-2**), 151.7 (**C-4'**), 138.7 (**C-6**), 137.4 (d, ³ J_{CP} = 8.7 Hz, **C-1''**), 135.9 (**C-3'**), 129.7 (**C-2''**), 127.0 (**C-2'**), 122.5 (**C-3''**), 112.0 (**C-5**), 90.9 (**C-1'**), 87.3 (d, ³ J_{CP} = 9.1 Hz, **C-4'**), 68.2 (d, ² J_{CP} = 5.3 Hz, **Ph-CH₂**), 67.8 (d, ² J_{CP} = 6.1 Hz, **C-5'**), 20.9 (**C-b**), 12.5 (**C-7**).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= -10.95 (d, ² J_{PP} = 19.0 Hz, **P- α**), -11.27 (d, ² J_{PP} = 18.8 Hz, **P- γ**), -22.04 (t, ² J_{PP} = 18.8 Hz, **P- β**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3190, 2988, 2901, 1756, 1687, 1663, 1508, 1431, 1371, 1217, 1127, 1091, 1067, 1045, 994, 908, 870, 838, 786, 770, 739, 647, 492, 424, 402.

Darstellung von γ -Mono(4-nonanoyloxybenzyl)-d4TTP 57e

Die Reaktion wurde nach der **AAV 11** durchgeführt. Es wurden 57 mg (66 μ mol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 1.0 mL abs. DMF gelöst, mit 63 mg (0.13 mmol, 2.0 Äquiv.) 5-Nitro-*cycloSal*-(4-nonanoyloxybenzyl)-monophosphat **97e**, in 0.5 mL abs. DMF gelöst, versetzt.

Ausbeute: Es wurden 15 mg (20 μ mol, 30%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 761.60 g/mol **Summenformel:** C₂₆H₃₄N₂O₁₅P₃³⁻ **UV (HPLC):** λ_{\max} = 265 nm

HPLC: $t_R = 13.03$ min (Methode A) **MALDI-MS**

(neg.): $m/z =$ ber.: 709.133 $[M-H]^-$, gef.: 709.238.

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.70 (d,

$^4J_{HH} = 1.4$ Hz, 1H, **H-6**), 7.53-7.47 (m, 2H, **H-2**),

7.08-7.03 (m, 2H, **H-3**), 6.96 (dt, $^3J_{HH} = 3.4$ Hz,

$^4J_{HH} = 1.6$ Hz, 1H, **H-1'**), 6.53 (dt, $^3J_{HH} = 5.9$ Hz,

$^4J_{HH} = 1.7$ Hz, 1H, **H-3'**), 5.88-5.82 (m, 1H, **H-2'**),

5.08 (d, $^3J_{HP} = 6.1$ Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 5.02-4.97 (m, 1H, **H-4'**), 4.34-4.17 (m, 2H, **H-5'**), 2.60

(t, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 2H, **H-b**), 1.94 (s, 3H, **H-7**), 1.76 (quint, $^3J_{HH} = 7.3$ Hz, 2H, **H-c**), 1.50-1.29 (m,

10H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.94 (t, $^3J_{HH} = 6.7$ Hz, 3H, **H-i**).

^{13}C -NMR (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.9 (**C-a**), 166.5 (**C-4**), 152.8 (**C-2**), 151.7 (**C-4'**),

138.7 (**C-6**), 137.4 (**C-1'**), 135.9 (**C-3'**), 129.7 (**C-2''**), 127.0 (**C-2'**), 122.5 (**C-3''**), 112.0

(**C-5**), 90.9 (**C-1'**), 87.3 (d, $^3J_{CP} = 5.2$ Hz, **C-4'**), 68.2 (d, $^2J_{CP} = 5.3$ Hz, **Ph-CH₂**), 67.8 (d, $^2J_{CP} =$

5.4 Hz, **C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.0, 30.4, 30.2, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 26.0 (**C-c**),

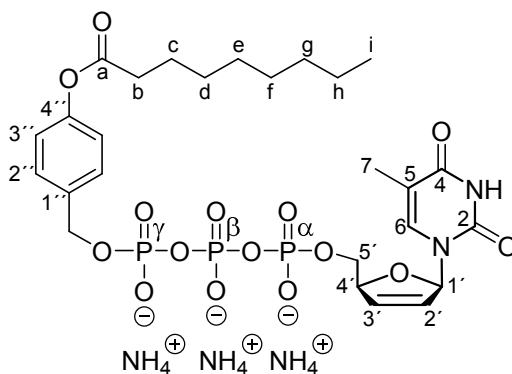
14.4 (**C-i**), 12.5 (**C-7**).

^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = -10.99 (d, $^2J_{PP} = 19.5$ Hz, **P- α**), -11.31 (d, $^2J_{PP} =$

18.8 Hz, **P- γ**), -22.12 (t, $^2J_{PP} = 18.7$ Hz, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}] = 3258, 2973, 2925, 2901, 1756, 1692, 1452, 1409, 1394, 1381, 1230, 1130,

1080, 1066, 1046, 908, 879, 521, 428.



Darstellung von γ -Mono(4-octadecanoyloxybenzyl)-d4TTP **57j**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 11** durchgeführt. Es wurden 56 mg (65 μ mol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-d4TDP **15**, in 1.0 mL abs. DMF gelöst, mit 98 mg (0.16 mmol, 2.5 Äquiv.) 5-Nitro-*cyclo*Sal-(4-octadecanoyloxybenzyl)-monophosphat **97j**, in 0.5 mL abs. THF gelöst, versetzt.

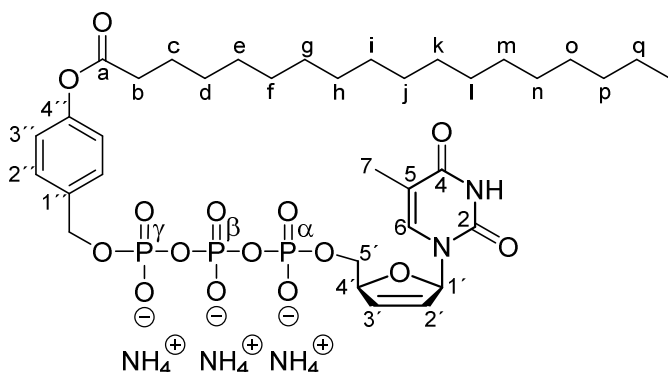
Ausbeute: Es wurden 15 mg (17 μ mol, 26%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Molmasse: 887.84 g/mol

Summenformel: $C_{35}H_{52}N_2O_{15}P_3^{3-}$ **UV**

(HPLC): $\lambda_{max} = 265$ nm **HPLC:** $t_R = 14.79$ min (Methode A) **MALDI-MS**

(neg.): $m/z =$ ber.: 835.274 $[M-H]^-$, gef.: 835.398.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 7.70 (d, ⁴J_{HH}= 1.3 Hz, 1H, **H-6**), 7.55-7.47 (m, 2H, **H-2''**), 7.10-7.02 (m, 2H, **H-3''**), 6.96 (dt, ³J_{HH}= 3.4 Hz, ⁴J_{HH}= 1.6 Hz, 1H, **H-1'**), 6.53 (dt, ³J_{HH}= 6.0 Hz, ⁴J_{HH}= 1.7 Hz, 1H, **H-3'**), 5.87-5.83 (m, 1H, **H-2'**), 5.09 (d, ³J_{HP}= 5.8 Hz, 2H, **Ph-CH₂**), 5.02-4.97 (m, 1H, **H-4'**), 4.36-4.16 (m, 2H, **H-5'**), 2.60 (t, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 2H, **H-b**), 1.94 (d, ⁴J_{HH}= 1.3 Hz, 3H, **H-7**), 1.76 (quint, ³J_{HH}= 7.3 Hz, 2H, **H-c**), 1.52-1.27 (m, 28H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-i**, **H-j**, **H-k**, **H-l**, **H-m**, **H-n**, **H-o**, **H-p**, **H-q**), 0.93 (t, ³J_{HH}= 6.6 Hz, 3H, **H-r**).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 174.0 (**C-a**), 166.6 (**C-4**), 152.8 (**C-2**), 151.7 (**C-4''**), 138.7 (**C-6**), 137.2 (d, ³J_{CP}= 7.6 Hz, **C-1''**), 135.9 (**C-3'**), 129.8 (**C-2''**), 127.1 (**C-2'**), 122.5 (**C-3''**), 112.0 (**C-5**), 90.9 (**C-1'**), 87.2 (d, ³J_{CP}= 8.1 Hz, **C-4'**), 68.3 (**Ph-CH₂**), 67.8 (**C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.0, 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**, **C-i**, **C-j**, **C-k**, **C-l**, **C-m**, **C-n**, **C-o**, **C-p**, **C-q**), 26.0 (**C-c**), 14.4 (**C-r**), 12.5 (**C-7**).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= -11.14 (d, ²J_{PP}= 18.2 Hz, **P- γ**), -11.44 (d, ²J_{PP}= 19.9 Hz, **P- α**), -23.82 (t, ²J_{PP}= 18.6 Hz, **P- β**).

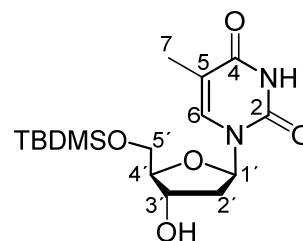
IR: ν [cm⁻¹]= 3209, 3066, 2956, 2925, 2854, 1757, 1704, 1509, 1461, 1379, 1251, 1220, 1203, 1168, 1134, 1113, 1027, 1012, 924, 825, 525.

5.2.9 Synthese eines AZT-Triphosphat-Prodrugs 59

Darstellung von 5'-O-*tert*-Butyldimethylsilylthymidin 139

Unter Stickstoff als Intergas wurden 10.1 g (41.4 mmol, 1.0 Äquiv.) Thymidin **83** in 200 mL abs. DMF suspendiert. Nach Zugabe von 6.9 g (46 mmol, 1.1 Äquiv.) TBDMSCI und 6.3 g (95 mmol, 2.3 Äquiv.) Imidazol wurde das Reaktionsgemisch für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung in Eiswasser gekippt und für weitere zehn Minuten gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Filtration separiert, mit viel kaltem Wasser gewaschen und gefriertrocknet. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 11.6 g (32.5 mmol, 79%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 356.49 g/mol **Summenformel:** C₁₆H₂₈N₂O₅Si **R_f-Wert:** 0.50 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** m/z = ber.: 357.1840 [M+H]⁺, 379.1660 [M+Na]⁺, gef.: 357.1901, 379.1727.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 8.68 (bs, 1H, **NH**), 7.50 (d, ⁴J_{HH}= 0.9 Hz, 1H, **H-6**), 6.37 (dd, ³J_{HH}= 8.1 Hz, ³J_{HH}= 5.7 Hz, 1H, **H-1'**), 4.46 (dt, ³J_{HH}= 5.3 Hz, ³J_{HH}= 2.3 Hz, 1H, **H-3'**), 4.05-4.01 (m, 1H, **H-4'**), 3.86 (dq, ²J_{HH}= 11.3 Hz, ³J_{HH}= 2.8 Hz, 2H, **H-5'**), 2.37 (ddd, ²J_{HH}= 13.5 Hz, ³J_{HH}= 5.6 Hz, ³J_{HH}= 2.3 Hz, 1H, **H-2'a**), 2.10 (ddd, ²J_{HH}= 13.6 Hz, ³J_{HH}= 8.1 Hz, ³J_{HH}=

5.9 Hz, 1H, **H-2'**_b), 1.92 (d, ⁴J_{HH} = 0.9 Hz, 3H, **H-7**), 0.92 (s, 9H, **tBu-(CH₃)₃**), 0.11 (d, ⁴J_{HH} = 2.5 Hz, 6H, **Si(CH₃)₂**).

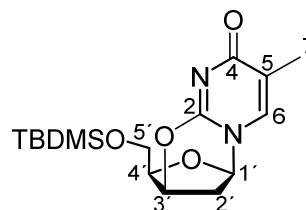
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 163.5 (**C-4**), 150.0 (**C-2**), 135.5 (**C-6**), 110.9 (**C-5**), 87.1 (**C-1'**), 85.0 (**C-4'**), 72.8 (**C-3'**), 63.7 (**C-5'**), 41.3 (**C-2'**), 26.1 (**tBu-(CH₃)₃**), 18.5 (**C-tBu**), -5.3 (**Si(CH₃)₂**).

IR: ν [cm⁻¹] = 3167, 3045, 2950, 2927, 2896, 2855, 1668, 1470, 1433, 1392, 1361, 1333, 1314, 1291, 1255, 1205, 1118, 1059, 1002, 940, 830, 778, 708, 671, 643, 612, 555, 494, 424.

Darstellung von 5'-O-*tert*-Butyldimethylsilyl-2,3'-anhydrothymidin **140**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 5.0 g (14 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)thymidin **139** und 7.4 g (28 mmol, 2.0 Äquiv.) Triphenylphosphan in 40 mL abs. DMF gelöst. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe von 5.9 mL (6.1 g, 30 mmol, 2.1 Äquiv.) Azodicarbonsäurediisopropylester (DIAD). Das Reaktionsgemisch wurde für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt, wobei zunächst durch den Einsatz von Ethylacetat das Triphenylphosphanoxid abgetrennt wurde. Durch Aceton als Laufmittel konnte schließlich das Produkt **140** eluiert werden.

Ausbeute: Es wurden 4.1 g (12 mmol, 87%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 338.17 g/mol **Summenformel:** C₁₆H₂₆N₂O₄Si **R_f-Wert:** 0.50 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z* = ber.: 339.1735 [M+H]⁺, gef.: 339.1742.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.95 (d, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, 1H, **H-6**), 5.48 (d, ³J_{HH} = 3.9 Hz, 1H, **H-1'**), 5.18-5.15 (m, 1H, **H-3'**), 4.28-4.23 (m, 1H, **H-4'**), 3.83-3.70 (m, 2H, **H-5'**), 2.63 (d, ²J_{HH} = 12.6 Hz, 1H, **H-2'**_a), 2.43 (ddd, ²J_{HH} = 12.6 Hz, ³J_{HH} = 4.1 Hz, ³J_{HH} = 2.6 Hz, 1H, **H-2'**_b), 1.92 (d, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, 3H, **H-7**), 0.86 (s, 9H, **tBu-(CH₃)₃**), 0.04 (d, ⁴J_{HH} = 4.4 Hz, 6H, **Si(CH₃)₂**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.9 (**C-4**), 153.4 (**C-2**), 135.2 (**C-6**), 118.7 (**C-5**), 87.6 (**C-1'**), 86.0 (**C-4'**), 76.5 (**C-3'**), 61.4 (**C-5'**), 33.8 (**C-2'**), 25.9 (**tBu-(CH₃)₃**), 18.4 (**C-tBu**), -5.4 (**Si(CH₃)₂**).

IR: ν [cm⁻¹] = 3013, 2952, 2926, 2855, 1659, 1614, 1527, 1470, 1378, 1359, 1299, 1137, 1094, 1074, 1037, 962, 937, 881, 834, 814, 776, 751, 669, 544.

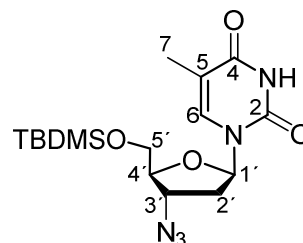
Darstellung von 5'-O-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-azido-3'-desoxythymidin **141**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 4.4 g (12 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-O-*tert*-Butyldimethylsilyl-2,3'-anhydrothymidin **140** und 4.2 g (64 mmol, 5.2 Äquiv.) Natriumazid in 50 mL abs. DMF

suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 110 °C erwärmt und für 24 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v).

WICHTIG: Die nach Extraktion erhaltene wässrige Phase wurde mit Iod und Natriumthiosulfat als Katalysator zur Umsetzung des überschüssigen Natriumazids bearbeitet. Dafür wurde das Iod in Ethanol gelöst und so lange tropfenweise zu der Lösung gegeben, bis eine durchgehende Braunfärbung eintrat!

Ausbeute: Es wurden 3.2 g (8.4 mmol, 68%) eines farblosen Schaums erhalten. **Molmasse:** 381.51 g/mol **Summenformel:** C₁₆H₂₇N₅O₄Si **R_f-Wert:** 0.70 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 382.1905 [M+H]⁺, 404.1725 [M+Na]⁺, gef. 382.1906, 404.1722.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.35 (bs, 1H, **NH**), 7.47 (d, ⁴*J*_{HH}= 1.1 Hz, 1H, **H-6**), 6.09 (t, ³*J*_{HH}= 6.5 Hz, 1H, **H-1'**), 4.44-4.34 (m, 1H, **H-3'**), 3.89-3.73 (m, 3H, **H-4'**, **H-5'**), 2.43-2.20 (m, 2H, **H-2'**), 1.78 (d, ⁴*J*_{HH}= 1.1 Hz, 3H, **H-7**), 0.88 (s, 9H, ***t*Bu-(CH₃)₃**), 0.08 (d, ⁴*J*_{HH}= 1.2 Hz, 6H, **Si(CH₃)₂**).

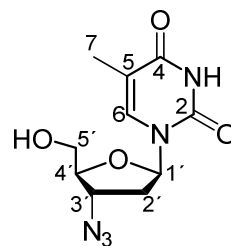
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 163.6 (**C-4**), 150.3 (**C-2**), 135.7 (**C-6**), 109.6 (**C-5**), 83.4 (**C-1'**), 83.4 (**C-4'**), 62.6 (**C-5'**), 60.3 (**C-3'**), 36.1 (**C-2'**), 25.8 (***t*Bu-(CH₃)₃**), 18.0 (**C-*t*Bu**), 12.2 (**C-7**), -5.5 (**Si(CH₃)₂**).

IR: *ν* [cm⁻¹]= 3163, 2953, 2929, 2857, 2819, 2102, 1683, 1464, 1438, 1405, 1388, 1362, 1321, 1256, 1194, 1121, 1070, 1027, 1005, 958, 926, 886, 832, 777, 721, 696, 670, 606, 541, 490, 415.

Darstellung von 3'-Azido-3'-desoxythymidin 1 (AZT)

Es wurden 6.7 g (17 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-azido-3'-desoxythymidin **141** in 150 mL abs. THF gelöst und mit 70 mL (70 mmol, 4.1 Äquiv.) einer 1 M TBAF-Lösung zur Reaktion gebracht. Nach 30 Minuten wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt zunächst säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) gereinigt. Es schloss sich außerdem eine zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 30:1 v/v) an.

Ausbeute: Es wurden 3.3 g (12 mmol, 73%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 267.25 g/mol **Summenformel:** C₁₀H₁₃N₅O₄ **R_fWert:** 0.52 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 266.0895 [M-H]⁺, gef.: 266.1056.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.30 (bs, 1H, **NH**), 7.67 (d, ⁴*J*_{HH}= 1.2 Hz, 1H, **H-6**), 6.09 (t, ³*J*_{HH}= 6.5 Hz, 1H, **H-1'**), 5.20 (bs, 1H, **OH**), 4.44-4.33 (m, 1H, **H-3'**), 3.81 (dt, ³*J*_{HH}= 5.0 Hz, ³*J*_{HH}= 3.9 Hz, 1H, **H-4'**), 3.69-3.54 (m, 2H, **H-5'**), 2.43-2.20 (m, 2H, **H-2'**), 1.77 (d, ⁴*J*_{HH}= 1.2 Hz, 3H, **H-7**), 0.88 (s, 9H, ***t*Bu-(CH₃)₃**), 0.08 (d, ⁴*J*_{HH}= 1.2 Hz, 6H, **Si(CH₃)₂**).

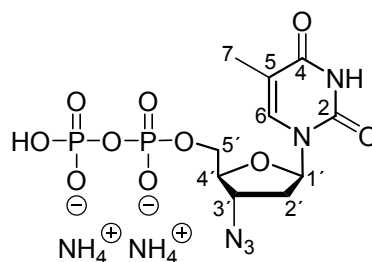
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 163.7 (**C-4**), 150.4 (**C-2**), 136.1 (**C-6**), 109.5 (**C-5**), 84.0 (**C-4'**), 83.4 (**C-1'**), 60.8 (**C-5'**), 60.2 (**C-3'**), 36.2 (**C-2'**), 12.3 (**C-7**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3458, 3153, 3072, 2972, 2934, 2884, 2812, 2112, 2080, 1669, 1641, 1463, 1402, 1363, 1333, 1298, 1258, 1208, 1142, 1087, 1020, 1006, 955, 896, 845, 759, 677, 651, 597, 526, 491, 419.

Darstellung von 3'-Azido-3'-desoxythymidindiphosphat 28 (AZTDP)

Die Reaktion wurde analog zu der **AAV 5 (Variante B)** in Kombination mit der **AAV 6** durchgeführt. Zur Darstellung des *cycloSal*-Triesters **175** wurden 0.50 g (1.9 mmol, 1.0 Äquiv.) AZT **1** in 30 mL abs. Acetonitril vorgelegt und mit 0.55 g (2.5 mmol, 1.3 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** sowie 0.48 mL (0.36 g, 2.8 mmol, 1.5 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 4.6 g (7.5 mmol, 4.0 Äquiv.) Oxone[®] in Wasser. Nach Extraktion wurde das resultierende 5-Cl-*cycloSal*-3'-azido-3'-desoxythymidinmonophosphat **175** durch zirkuläre präparative Dünnschichtchromatografie (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v+0.1% HOAc) gereinigt (Ausbeute: 0.73 g (1.6 mmol, 83%)). Anschließend wurden nach **AAV6** 0.30 g (0.63 mmol, 1.0 Äquiv.) Triester **175** mit 0.54 g (1.6 mmol, 2.5 Äquiv.) Mono(tetra-*n*-butyammonium)-monophosphat in 4.0 mL abs. DMF versetzt. Die Reinigung erfolgte zunächst durch automatisierte RP18-Chromatographie (Wasser/Acetonitril-Gradient). Es wurde am Ionenaustauscher Dowex-NH₄⁺ ein Wechsel der Gegenionen vorgenommen und die automatisierte RP18-Chromatographie wiederholt.

Ausbeute: Es wurden 96 mg (0.21 mmol, 27% (über zwei Stufen)) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 461.27 g/mol **Summenformel:** C₁₀H₁₃N₅O₁₀P₂²⁻ **R_fWert:** 0.21 (*iso*-Propanol/NH₃/H₂O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** *m/z*= ber.: 426.021 [M-H]⁻, gef.: 426.022.



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 7.68 (d, ⁴J_{HH}= 0.9 Hz, 1H, **H-6**), 6.20 (dd, ³J_{HH}= 7.0 Hz, ³J_{HH}= 6.8 Hz, 1H, **H-1'**), 4.52-4.48 (m, 1H, **H-3'**), 4.16-4.13 (m, 1H, **H-4'**), 4.12-4.08 (m, 2H, **H-5'**), 2.43-2.40 (m, 2H, **H-2''**), 1.85 (d, ⁴J_{HH}= 0.9 Hz, 3H, **H-7**).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm]= 166.4 (**C-4**), 151.6 (**C-2**), 137.3 (**C-6**), 111.8 (**C-5**), 84.9 (**C-1'**), 83.0 (d, ³J_{CP}= 9.2 Hz, **C-4'**), 64.4 (d, ²J_{CP}= 5.5 Hz, **C-5'**), 60.9 (**C-3'**), 36.3 (**C-2'**), 11.6 (**C-7**).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O): δ [ppm]= -9.91 (d, ²J_{PP}= 20.8 Hz, **P-α**), -11.46 (d, ²J_{PP}= 20.8 Hz, **P-β**).

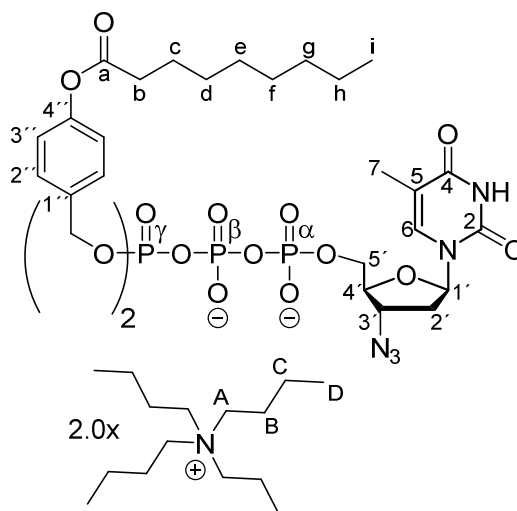
IR: ν [cm⁻¹]= 3380, 3189, 2990, 2104, 1702, 1652, 1452, 1222, 1101, 1056, 911, 521, 498.

Darstellung von γ-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-AZTTP 59

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Da das AZTDP **28** noch in der Ammoniumform vorlag, wurde dieses zunächst mit Dowex-H⁺ mit Wasser als Eluenten protoniert und mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxidlösung in Wasser (40%) auf pH 6.8 eingestellt, wodurch nach Gefriertrocknung Bis(tetra-*n*-butylammonium)-AZTDP **28** erhalten wurde. Davon wurden 96 mg (0.11 mmol, 1.0 Äquiv.), in 1.5 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.14 g (0.21 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(nonanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75e** und 0.55 mL (0.14 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 42 µL (0.23 mmol, 2.2 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan). Die Reaktion wurde einmal neu gestartet, um einen höheren Umsatz des Edukts **28** zu erzielen. Nach einem misslungenen Ionenaustausch an Dowex-NH₄⁺ wurden zwei automatisierte RP18-Chromatographien durchgeführt.

Ausbeute: Es wurden 30 mg (20 µmol, 19%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1482.81 g/mol **Summenformel:** C₄₂H₅₈N₅O₁₇P₃²⁻
UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm **HPLC:** t_R= 16.87 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z= ber.: 998.312 [M-H]⁻, gef.: 998.471.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 7.90 (d, ⁴J_{HH}= 1.4 Hz, 1H, **H-6**), 7.47-7.42 (m, 4H, **H-2''**), 7.09-7.03 (m, 4H, **H-3''**), 6.28 (dd, ³J_{HH}= 8.7 Hz, ³J_{HH}= 5.6 Hz, 1H, **H-1'**), 5.23 (d, ³J_{HP}= 8.1 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.71 (dd, ³J_{HH}= 6.4 Hz, ³J_{HH}= 2.1 Hz, 1H, **H-3'**), 4.35-4.22 (m, 2H, **H-5'**), 4.11-4.06 (m, 1H, **H-4'**), 3.31-3.21 (m, 16H, **H-A**), 2.60 (t, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 4H, **H-b**), 2.54-2.44 (m, 1H, **H-2'a**), 2.30-2.22 (m, 1H, **H-2'b**), 1.96 (d,



$^4J_{\text{HH}} = 1.1$ Hz, 3H, **H-7**), 1.81-1.71 (m, 4H, **H-c**), 1.73-1.63 (m, 16H, **H-B**), 1.51-1.29 (m, 36H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-C**), 1.05 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 24H, **H-D**), 0.94 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, **H-i**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.7 (**C-a**), 166.4 (**C-4**), 152.5 (**C-2**), 152.2 (**C-4'**), 138.1 (**C-6**), 135.2 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.8$ Hz, **C-1'**), 130.4 (**C-2'**), 122.7 (**C-3'**), 112.4 (**C-5**), 85.7 (**C-1'**), 84.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.8$ Hz, **C-4'**), 70.3 (dd, $^2J_{\text{CP}} = 5.9$ Hz, $^4J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, **Ph-CH₂**), 67.2 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.1$ Hz, **C-5'**), 63.6 (**C-3'**), 59.5 (**C-A**), 37.8 (**C-2'**), 35.0 (**C-b**), 33.0, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 26.0 (**C-c**), 24.8 (**C-B**), 20.7 (**C-C**), 14.4 (**C-i**), 13.9 (**C-D**), 12.7 (**C-7**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = -12.11 (d, $^2J_{\text{PP}} = 21.6$ Hz, **P- α**), -13.38 (d, $^2J_{\text{PP}} = 17.8$ Hz, **P- γ**), -24.04 (dd, $^2J_{\text{PP}} = 21.6$ Hz, $^2J_{\text{PP}} = 17.8$ Hz, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}] = 3351, 2960, 2929, 2874, 2092, 1756, 1691, 1611, 1509, 1466, 1380, 1271, 1199, 1131, 1106, 1087, 1062, 1032, 1013, 921, 827, 738, 557, 507, 431.

5.2.10 Synthese eines ddT-Triphosphat-Prodrugs 60

Darstellung von 3'-Desoxythymidin 31 (ddT)

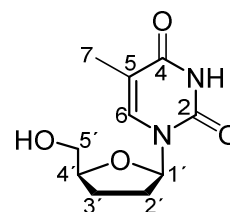
In Gegenwart von 0.10 g Pd/C (10%) wurden 0.23 g (1.0 mmol) d4T **3**, gelöst in 6.0 mL abs. Methanol, in Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach 18 Stunden wurde das Reaktionsgemisch über Celite 545 (0.01-0.02 mm) filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 0.18 g (0.78 mmol, 78%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Molmasse: 226.23 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$

R_f-Wert: 0.29 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** $m/z = \text{ber.}: 249.0846$

$[\text{M}+\text{Na}]^+$, gef.: 249.0816.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 11.21 (s, 1H, **NH**), 7.80 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, 1H, **H-6**), 5.96 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.6$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.04 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5.3$ Hz, 1H, **OH**), 4.05-3.95 (m, 1H, **H-4'**), 3.68 (ddd, $^2J_{\text{HH}} = 11.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, 1H, **H-5'_a**), 3.53 (ddd, $^2J_{\text{HH}} = 11.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.9$ Hz, 1H, **H-5'_b**), 2.32-2.14 (m, 1H, **H-2'_a**), 2.00-1.81 (m, 3H, **H-2'_b**, **H-3'**), 1.77 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, 3H, **H-7**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 163.9 (**C-4**), 150.4 (**C-2**), 136.4 (**C-6**), 108.7 (**C-5**), 84.7 (**C-1'**), 81.3 (**C-4'**), 62.1 (**C-5'**), 31.6 (**C-2'**), 24.9 (**C-3'**), 12.3 (**C-7**).

IR: ν [cm^{-1}] = 3437, 3171, 3036, 2977, 2896, 2820, 1379, 1462, 1420, 1403, 1382, 1366, 1271, 1232, 1198, 1181, 1098, 1083, 1055, 996, 927, 892, 863, 822, 762, 727, 681, 603, 590, 572, 538, 483, 421.

Darstellung von 3'-Desoxythymidinmonophosphat 218 (ddTMP)

Die Reaktion wurde nach **AAV 5 (Variante A)** durchgeführt. Das Phosphorylierungsreagenz wurde aus 0.26 mL (0.43 g, 2.8 mmol, 4.4 Äquiv.) Phosphorylchlorid, gelöst in 5.0 mL abs. Acetonitril, 0.23 mL (0.22 g, 2.8 mmol, 4.4 Äquiv.) Pyridin sowie 25 μ L (25 mg, 1.4 mmol, 2.2 Äquiv.) Wasser erhalten und anschließend mit 0.14 g (0.64 mmol, 1.0 Äquiv.) ddT **31** versetzt (Reaktionszeit: 5 h). Die Neutralisation erfolgte mit Tetra-*n*-butyl-ammoniumhydroxid (40% in Wasser).

Ausbeute: Es wurden 0.33 g (4.1 mmol, 65%) eines gelben Öls

erhalten. **Molmasse:** 789.14 g/mol **Summenformel:**

$C_{10}H_{13}N_2O_7P^{2-}$ **R_f-Wert:** 0.42 (*iso*-Propanol/ NH_3/H_2O 4:1:2.5 v/v/v)

MALDI-MS (neg.): m/z = ber.: 305.054 [M-H]⁻, gef.: 305.159.

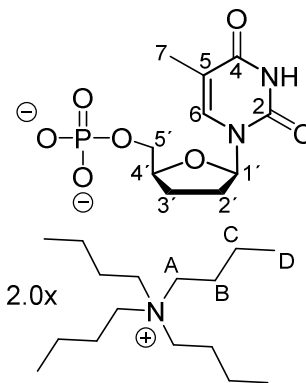
¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 7.82 (d, $^4J_{HH}$ = 1.2 Hz, 1H, **H-6**), 6.10 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.9 Hz, $^3J_{HH}$ = 3.7 Hz, 1H, **H-1'**), 4.37-4.30 (m, 1H, **H-4'**), 4.12 (ddd, $^2J_{HH}$ = 11.4 Hz, $^3J_{HP}$ = 4.8 Hz, $^3J_{HH}$ =

2.8 Hz, 1H, **H-5'a**), 3.97 (ddd, $^2J_{HH}$ = 11.4 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.4 Hz, $^3J_{HP}$ = 4.5 Hz, 1H, **H-5'b**), 3.26-3.10 (m, 16H, **H-A**), 2.48-2.35 (m, 1H, **H-2'a**), 2.17-2.06 (m, 2H, **H-2'b**, **H-3'a**), 2.07-1.95 (m, 1H, **H-3'b**), 1.92 (d, $^4J_{HH}$ = 1.2 Hz, 3H, **H-7**), 1.64 (quint, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, 16H, **H-B**), 1.35 (sext, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, 16H, **H-C**), 0.94 (t, $^3J_{HH}$ = 7.4 Hz, 24H, **H-D**),

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm]= 166.4 (**C-4**), 151.5 (**C-2**), 137.8 (**C-6**), 111.0 (**C-5**), 86.1 (**C-1'**), 80.5 (d, $^3J_{CP}$ = 8.6 Hz, **C-4'**), 65.8 (d, $^2J_{CP}$ = 5.1 Hz, **C-5'**), 58.1 (**C-A**), 31.3 (**C-2'**), 24.9 (**C-3'**), 23.1 (**C-B**), 19.2 (**C-C**), 12.9 (**C-D**), 11.7 (**C-7**).

³¹P-NMR (243 MHz, D₂O): δ [ppm]= 0.74.

IR: ν [cm⁻¹]= 3392, 2961, 2875, 1679, 1658, 1467, 1382, 1267, 1178, 1107, 1056, 988, 883, 844, 769, 682, 635, 606, 521, 490, 419.

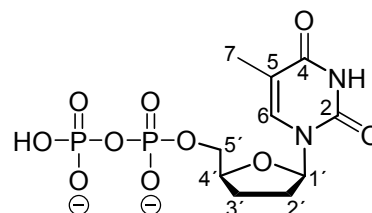
**Darstellung von 3'-Desoxythymidindiphosphat 181 (ddTDP)**

Die Reaktion wurde analog zu der **AAV 5 (Variante B)** in Kombination mit der **AAV 6** durchgeführt. Zur Darstellung des *cycloSal*-Triesters **176** wurden 0.22 g (0.97 mmol, 1.0 Äquiv.) ddT **31** in 18 mL abs. Acetonitril vorgelegt und mit 0.28 g (1.3 mmol, 1.3 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** sowie 0.25 mL (0.19 g, 1.5 mmol, 1.5 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 0.27 mL (1.5 mmol, 1.5 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan). Nach Extraktion wurde das 5-Cl-*cycloSal*-2',3'-didesoxythymidinmonophosphat **176** bei quantitativer Umsetzung in guter Reinheit erhalten und direkt weiter eingesetzt. Dafür wurden nach **AAV 6** 0.20 g (0.47 mmol, 1.0 Äquiv.) Triester **176** mit 0.40 g (1.2 mmol, 2.5 Äquiv.) Mono(tetra-*n*-butylammonium)-monophosphat in 2.0 mL abs. DMF zur

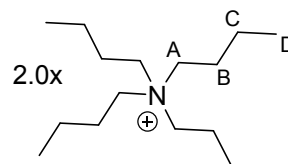
Reaktion gebracht. Die Reinigung erfolgte durch automatisierte RP18-Chromatographie (Wasser/Acetonitril-Gradienten).

Das Produkt **181** wies nach der Säulenchromatographie noch 1.0 Äquiv. Mono(tetra-*n*-butylammonium)-phosphat als Verunreinigung auf. Die nachfolgenden Angaben und Berechnungen verstehen sich exklusive der Verunreinigung.

Ausbeute: Es wurden 0.13 g (0.15 mmol, 32%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 869.12 g/mol
Summenformel: C₁₀H₁₄N₂O₁₀P₂²⁻ **R_f-Wert:** 0.19 (*iso*-Propanol/NH₃/H₂O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** *m/z*=ber.: 385.021 [M-H]⁻, gef.: 385.022.



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 7.79 (d, ⁴J_{HH}= 1.1 Hz, 1H, **H-6**), 6.09 (dd, ³J_{HH}= 6.9 Hz, ³J_{HH}= 3.9 Hz, 1H, **H-1'**), 4.38-4.32 (m, 1H, **H-4'**), 4.22 (ddd, ²J_{HH}= 11.6 Hz, ³J_{HP}= 5.3 Hz, ³J_{HH}= 2.8 Hz, 1H, **H-5'a**), 4.07 (ddd, ²J_{HH}= 11.4 Hz, ³J_{HP}= 6.2 Hz, ³J_{HH}= 4.5 Hz, 1H, **H-5'b**), 3.23-3.11 (m, 16H, **H-A**), 2.46-2.36 (m, 1H, **H-2'a**), 2.16-2.07 (m, 2H, **H-2'b**, **H-3'a**), 2.07-1.99 (m, 1H, **H-3'b**), 1.92 (d, ⁴J_{HH}= 1.2 Hz, 3H, **H-7**), 1.62 (quint, ³J_{HH}= 8.0 Hz, 16H, **H-B**), 1.34 (sext, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 16H, **H-C**), 0.93 (t, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 36H, **H-D**).



¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm]= 166.5 (**C-4**), 151.6 (**C-2**), 137.7 (**C-6**), 111.2 (**C-5**), 86.0 (**C-1'**), 80.3 (d, ³J_{CP}= 8.5 Hz, **C-4'**), 66.6 (d, ²J_{CP}= 5.4 Hz, **C-5'**), 58.1 (**C-A**), 31.2 (**C-2'**), 24.9 (**C-3'**), 23.1 (**C-B**), 19.1 (**C-C**), 12.9 (**C-D**), 11.7 (**C-7**).

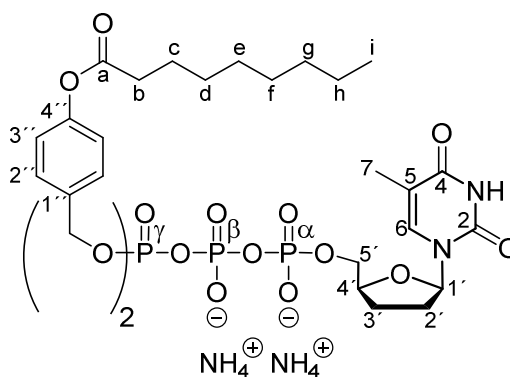
³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= -10.90 (d, ²J_{PP}= 20.3 Hz, **P-α**), -11.27 (d, ²J_{PP}= 20.3 Hz, **P-β**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3212, 2960, 2875, 1681, 1660, 1481, 1467, 1430, 1382, 1227, 1137, 1103, 1062, 937, 882, 843, 779, 736, 510, 419.

Darstellung von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-ddTTP **60**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 0.10 g (86 μ mol, 1.0 Äquiv. (inkl. 1.0 Äquiv. (Bu₄N)PO₄)) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-ddTDP **15**, in 0.6 mL Acetonitril gelöst, mit 0.11 g (0.17 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(nonanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75e** und 0.45 mL (0.11 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 34 μ L (0.19 mmol, 2.2 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 61 mg (61 μmol , 71%) eines beige Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 992.93 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{P}_3^{2-}$ **UV (HPLC):** $\lambda_{\text{max}} = 268 \text{ nm}$ **HPLC:** $t_{\text{R}} = 17.63 \text{ min}$ (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** $m/z = \text{ber.: } 957.311 [\text{M-H}]^-$, gef.: 957.341.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.82 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.1 \text{ Hz}$, 1H, **H-6**), 7.48-7.36 (m, 4H, **H-2''**), 7.12-7.03 (m, 4H, **H-3''**), 6.05 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 6.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HP}} = 3.8 \text{ Hz}$, 1H, **H-1'**), 5.18 (d, $^3J_{\text{HP}} = 8.1 \text{ Hz}$, 4H, **Ph-CH₂**), 4.35-4.27 (m, 1H, **H-5'a**), 4.26-4.11 (m, 2H, **H-4'**, **H-5'b**), 2.60 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, 4H, **H-b**), 2.36-2.23 (m, 1H, **H-2'a**), 2.12-1.97 (m, 3H, **H-2'b**, **H-3'**), 1.94 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.1 \text{ Hz}$, 3H, **H-7**), 1.75 (quint, $^3J_{\text{HH}} = 7.3 \text{ Hz}$, 4H, **H-c**), 1.51-1.26 (m, 20H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.93 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.6 \text{ Hz}$, 6H, **H-i**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.7 (**C-a**), 166.5 (**C-4**), 152.4 (**C-2**), 152.4 (**C-4''**), 138.2 (**C-6**), 134.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.0 \text{ Hz}$, **C-1''**), 130.4 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.1 \text{ Hz}$, **C-2''**), 122.9 (**C-3''**), 111.4 (**C-5**), 87.2 (**C-1'**), 81.1 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.1 \text{ Hz}$, **C-4'**), 70.4 (dd, $^2J_{\text{CP}} = 5.9 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{CP}} = 1.6 \text{ Hz}$, **Ph-CH₂**), 68.2 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.9 \text{ Hz}$, **C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.0, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 32.9 (**C-2'**), 26.4 (**C-3'**), 26.0 (**C-c**), 14.5 (**C-i**), 12.6 (**C-7**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = -11.53 (bs, **P- α**), -13.16 (d, $^2J_{\text{PP}} = 17.1 \text{ Hz}$, **P- γ**), -23.67 (bs, **P- β**).

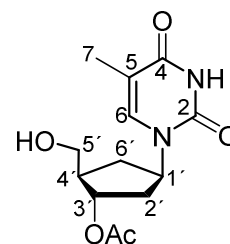
IR: ν [cm^{-1}] = 3189, 3045, 2955, 2924, 2854, 1757, 1688, 1509, 1461, 1378, 1262, 1217, 1201, 1167, 1131, 1105, 1086, 1008, 925, 849, 768, 722, 520.

5.2.11 Synthese eines *carba*-dT-Triphosphat-Prodrugs 61

Darstellung von 3'-O-Acetyl-*carba*-dT 143

Die Reaktion wurde nach der **AAV 13** durchgeführt. Es wurden 0.16 g (0.67 mmol, 1.0 Äquiv.) *carba*-dT **111**, gelöst in 5.0 mL abs. Pyridin, mit 0.12 g (0.80 mmol, 1.2 Äquiv.) TBDMSCl und 0.32 mL (0.34 g, 3.3 mmol, 5.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid versetzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels und der Aufnahme des Rückstands in 5.0 mL abs. THF wurden 1.3 mL (1.3 mmol, 2.0 Äquiv.) TBAF (1 M in THF) hinzugegeben. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 0.15 g (0.51 mmol, 77%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 282.30 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$ **R_f-Wert:** 0.37 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** $m/z = \text{ber.: } 283.1288 [\text{M+H}]^+$, 305.1108 [M+Na]⁺, gef.: 283.1294, 305.1108.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 7.56 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.2$ Hz, 1H, **H-6**), 5.12 (dt, $^3J_{\text{HH}}= 6.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}}= 3.1$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.08-5.00 (m, 1H, **H-3'**), 3.73-3.66 (m, 2H, **H-5'**), 2.31-2.20 (m, 3H, **H-2'a**, **H-4'**, **H-6'a**), 2.09-2.04 (m, 1H, **H-6'b**), 2.07 (s, 3H, **Ac-CH₃**), 1.91 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.2$ Hz, 3H, **H-7**), 1.76-1.68 (m, 1H, **H-2'b**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 172.5 (**CH₃CO**), 166.3 (**C-4**), 153.0 (**C-2**), 139.4 (**C-6**), 111.7 (**C-5**), 77.1 (**C-1'**), 63.8 (**C-5'**), 55.9 (**C-3'**), 47.6 (**C-4'**), 37.7 (**C-6'**), 32.9 (**C-2'**), 21.0 (**Ac-CH₃**), 12.3 (**C-7**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3437, 3182, 3041, 2930, 2881, 2824, 1654, 1471, 1435, 1373, 1314, 1204, 1161, 1129, 1044, 943, 901, 838, 782, 765, 641, 597, 487, 422.

Darstellung von *carba*-dT-Monophosphat 221 (*carba*-dTMP)

Die Reaktion wurde nach **AAV 5 (Variante B)** durchgeführt. Es wurden zunächst 0.14 g (0.50 mmol, 1.0 Äquiv.) 3'-*O*-Acetyl-*carba*-dT **143**, gelöst in 5.0 mL abs. Acetonitril, mit 0.15 mL (0.12 g, 0.89 mmol, 1.8 Äquiv.) Diisopropylethylamin und 0.17 g (0.74 mmol, 1.5 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** versetzt. Nach der Oxidation mit 0.16 mL (0.89 mmol, 1.8 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) und Extraktion erfolgte die Hydrolyse des Triesters in 5.0 mL eines Acetonitril/Wasser/Ammoniak-Gemisches (2:2:1 v/v/v). Anschließend wurde die Reaktionslösung nach Zugabe von 11 mL eines Gemisches aus Methanol/Wasser/ Triethylamin (7:3:1 v/v/v) für drei Tage gerührt.

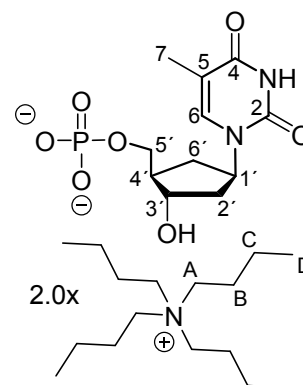
Ausbeute: Es wurden 0.17 g (0.21 mmol, 42%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 803.16 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}^{2-}$ **R_f-Wert:** 0.46 (*iso*-Propanol/ $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ 4:1:2.5 v/v/v). **MALDI-MS (neg.):** $m/z=$ ber.: 319.070 [M-H], gef.: 319.101.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 7.59 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.2$ Hz, 1H, **H-6**), 5.17-5.05 (m, 1H, **H-3'**), 4.38-4.29 (m, 1H, **H-1'**), 3.98-3.90 (m, 1H, **H-5'a**), 3.83-3.74 (m, 1H, **H-5'b**), 3.28-3.09 (m, 16H, **H-A**), 2.14-1.97 (m, 3H, **H-2'a**, **H-4'**, **H-6'a**), 1.94-1.82 (m, 1H, **H-6'b**), 1.87 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.2$ Hz, 3H, **H-7**), 1.72-1.52 (m, 17H, **H-2'b**, **H-B**), 1.37 (sext, $^3J_{\text{HH}}= 7.4$ Hz, 16H, **H-C**), 0.97 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.4$ Hz, 24H, **H-D**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 166.9 (**C-4**), 153.5 (**C-2**), 139.6 (**C-6**), 111.7 (**C-5**), 73.8 (**C-1'**), 65.3 (d, $^2J_{\text{CP}}= 4.9$ Hz, **C-5'**), 59.5 (**C-A**), 54.6 (**C-3'**), 49.5 (d, $^3J_{\text{CP}}= 7.4$ Hz, **C-4'**), 39.6 (**C-6'**), 33.5 (**C-2'**), 24.8 (**C-B**), 20.7 (**H-C**), 13.9 (**C-D**), 12.5 (**C-7**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 4.64.

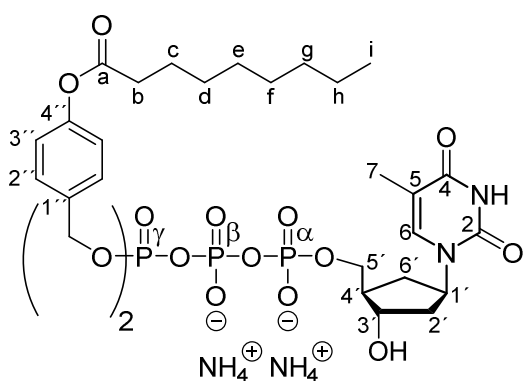
IR: ν [cm^{-1}]= 3245, 2960, 2874, 1657, 1607, 1516, 1486, 164, 1380, 1347, 1292, 1056, 887, 787, 740, 527.



Darstellung von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-*carba*-dTTP 61

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante B)** durchgeführt. Zunächst wurden 0.36 g (0.39 mmol, 1.0 Äquiv.) *P,P*-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **198**, gelöst in 5.0 mL abs. Acetonitril, mit 0.24 mL (0.35 g, 1.7 mmol, 4.4 Äquiv.) TFAA und 0.37 mL (0.27 g, 2.7 mmol, 6.8 Äquiv.) Triethylamin, gelöst in 2.0 mL abs. Acetonitril, verestert. Aufgenommen in 3.0 mL abs. Acetonitril folgte die Aktivierung mit 78 μ L (80 mg, 0.98 mmol, 2.5 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 0.23 mL (0.17 g, 1.6 mmol, 4.2 Äquiv.) Triethylamin, bevor 0.15 g (0.19 mmol, 0.5 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-*carba*-dTMP **221**, gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, hinzugetropt wurden.

Ausbeute: Es wurden 89 mg (88 μ mol, 47%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1006.96 g/mol **Summenformel:** C₄₃H₆₁N₂O₁₇P₃²⁻ **UV (HPLC):** λ_{\max} = 271 nm **HPLC:** t_R = 16.43 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 971.327 [M-H]⁻, gef.: 971.353.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 7.55 (d,

⁴ J_{HH} = 1.1 Hz, 1H, **H-6**), 7.46-7.40 (m, 4H, **H-2''**), 7.11-7.05 (m, 4H, **H-3''**), 5.19 (d, ³ J_{HP} = 8.2 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 5.14-5.02 (m, 1H, **H-3'**), 4.36-4.29 (m, 1H, **H-1'**), 4.20-4.04 (m, 2H, **H-5'**), 2.60 (t, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 4H, **H-b**), 2.25-2.12 (m, 2H, **H-2'a**, **H-4'**), 2.12-2.04 (m, 1H, **H-6'a**), 2.01-1.91 (m, 1H, **H-6'b**), 1.91 (d, ⁴ J_{HH} = 1.1 Hz, 3H, **H-7**), 1.76 (quint, ³ J_{HH} = 7.3 Hz, 4H, **H-c**), 1.72-1.62 (m, 1H, **H-2'b**), 1.52-1.27 (m, 20H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.94 (t, ³ J_{HH} = 6.8 Hz, 6H, **H-i**).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 173.7 (**C-a**), 166.4 (**C-4**), 152.9 (**C-2**), 152.3 (**C-4'**), 139.9 (**C-6**), 134.9 (d, ³ J_{CP} = 7.5 Hz, **C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.9 (**C-3''**), 111.6 (**C-5**), 73.3 (**C-1'**), 70.4 (d, ³ J_{CP} = 5.5 Hz, **Ph-CH₂**), 67.9 (d, ² J_{CP} = 5.5 Hz, **C-5'**), 55.3 (**C-3'**), 48.7 (**C-4'**), 39.7 (**C-6'**), 35.0 (**C-b**), 33.1, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 33.0 (**C-2'**), 25.6 (**C-c**), 14.4 (**C-i**), 12.4 (**C-7**).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= -11.05 (d, ² J_{PP} = 19.4 Hz, **P- α**), -13.24 (d, ² J_{PP} = 16.1 Hz, **P- γ**), -23.63 (t, ² J_{PP} = 18.4 Hz, **P- β**).

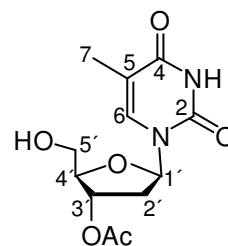
IR: ν [cm⁻¹]= 3055, 2956, 2925, 2855, 1757, 1685, 1509, 1466, 1257, 1218, 1130, 1025, 1010, 925, 516.

5.2.12 Synthese eines Thymidintriphosphat-Prodrugs 62

Darstellung von 3'-O-Acetylthymidin 142

Die Reaktion wurde nach der **AAV 13** durchgeführt. Es wurden 5.1 g (21 mmol, 1.0 Äquiv.) Thymidin **83**, gelöst in 95 mL abs. Pyridin, mit 3.7 g (25 mmol, 1.2 Äquiv.) TBDMSCl und 8.9 mL (9.6 g, 94 mmol, 4.5 Äquiv.) Essigsäureanhydrid versetzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels und der Aufnahme des Rückstands in 50 mL abs. THF wurden 31 mL (31 mmol, 1.5 Äquiv.) TBAF (1 M in THF) hinzugegeben. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 4.7 g (17 mmol, 79%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 284.27 g/mol **Summenformel:** C₁₂H₁₆N₂O₅ **R_f-Wert:** 0.59 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 307.0901 [M+Na]⁺, gef.: 307.0882.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.32 (bs, 1H, **NH**), 7.73 (d, ⁴*J*_{HH}= 1.4 Hz, 1H, **H-6**), 6.17 (dd, ³*J*_{HH}= 8.7 Hz, ³*J*_{HH}= 5.9 Hz, 1H, **H-1'**), 5.24-5.19 (m, 1H, **H-3'**), 5.20 (t, ³*J*_{HH}= 5.1 Hz, 1H, **OH**), 3.99-3.95 (m, 1H, **H-4'**), 3.62 (dd, ³*J*_{HH}= 5.3 Hz, ³*J*_{HH}= 3.5 Hz, 2H, **H-5'**), 2.33-2.15 (m, 2H, **H-2'**), 2.06 (s, 3H, **Ac-CH₃**), 1.78 (d, ⁴*J*_{HH}= 1.4 Hz, 3H, **H-7**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 170.0 (CH₃CO), 163.7 (**C-4**), 150.5 (**C-2**), 135.8 (**C-6**), 109.7 (**C-5**), 84.6 (**C-4'**), 83.7 (**C-1'**), 74.7 (**C-3'**), 61.3 (**C-5'**), 36.5 (**C-2'**), 20.8 (**Ac-CH₃**), 12.3 (**C-7**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3468, 3181, 3102, 3059, 3030, 2927, 2877, 1706, 1659, 1475, 1407, 1389, 1331, 1304, 1290, 1239, 1204, 1128, 1024, 955, 895, 894, 878, 788, 649, 625, 567, 494, 427, 413.

Darstellung von Thymidin-5'-monophosphat

Es wurden 0.24 g Dinatrium-Thymidin-5'-monophosphat (xH₂O) kommerziell von der Firma Sigma-Aldrich bezogen und zunächst über eine Ionenaustauschersäule Dowex-H⁺ mit Wasser eluiert, um die freie Säure zu erhalten. Anschließend wurde mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (40% in Wasser) ein pH-Wert von 6.8 eingestellt. Nach Gefrier-trocknung wurde das Produkt für vier Stunden im Vakuum getrocknet.

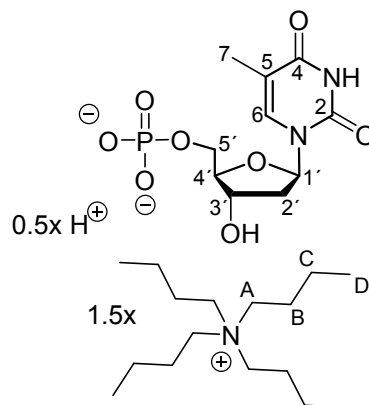
Ausbeute: Es wurden 0.38 g (0.55 mmol) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 684.40 g/mol **Summenformel:** C₁₀H₁₃N₂O₈P²⁻ **R_f-Wert:** 0.40 (*iso*-Propanol/NH₃/H₂O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** *m/z*= ber.: 321.049 [M-H]⁻, gef.: 321.049.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ [ppm]= 7.81 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.3$ Hz, 1H, **H-6**), 6.32 (dd, $^3J_{\text{HH}}= 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}}= 6.4$ Hz, 1H, **H-1'**), 4.58 (dt, $^3J_{\text{HH}}= 5.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}}= 3.1$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.16-4.12 (m, 1H, **H-4'**), 4.05-3.99 (m, 2H, **H-5'**), 3.23-3.10 (m, 10H, **H-A**), 2.40-2.27 (m, 2H, **H-2'**), 1.91 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.3$ Hz, 3H, **H-7**), 1.70-1.56 (m, 10H, **H-B**), 1.35 (sext, $^3J_{\text{HH}}= 7.3$ Hz, 10H, **H-C**), 0.94 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.3$ Hz, 18H, **H-D**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ [ppm]= 166.3 (**C-4**), 151.5 (**C-2**), 137.5 (**C-6**), 111.6 (**C-5**), 85.9 (d, $^3J_{\text{CP}}= 9.0$ Hz, **C-4'**), 84.9 (**C-1'**), 71.2 (**C-3'**), 64.4 (d, $^2J_{\text{CP}}= 5.0$ Hz, **C-5'**), 58.1 (**C-A**), 38.7 (**C-2'**), 23.1 (**C-B**), 19.1 (**C-C**), 12.9 (**C-D**), 11.7 (**C-7**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ [ppm]= 1.24.

IR: ν [cm^{-1}]= 3160, 3065, 2960, 2875, 1682, 1661, 1520, 1465, 1381, 1347, 1272, 1246, 1178, 1105, 1054, 960, 937, 786, 739, 516, 418.



Darstellung von Thymidin-5'-diphosphat **186**

Die Reaktion wurde analog nach der **AAV 5 (Variante B)** in Kombination mit der **AAV 6** durchgeführt. Zur Darstellung des *cycloSal*-Triesters **177** wurden 1.4 g (1.8 mmol, 1.0 Äquiv.) 3'-*O*-Acetylthymidin **142** in 30 mL abs. Acetonitril vorgelegt und mit 1.4 g (6.1 mmol, 1.2 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** sowie 1.3 mL (0.98 g, 7.6 mmol, 1.5 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 1.4 mL (7.6 mmol, 1.3 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan). Nach Extraktion wurde das 5-Cl-*cycloSal*-3'-*O*-acetyl-thymidin-monophosphat **177** bei quantitativer Umsetzung in guter Reinheit erhalten und direkt weiter eingesetzt. Dafür wurden nach der **AAV 6** 0.51 g (1.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Triester **177** mit 0.89 g (2.6 mmol, 2.5 Äquiv.) Mono(tetra-*n*-butylammonium)-monophosphat in 10 mL abs. DMF zur Reaktion gebracht. Zur Deacetylierung wurde das Reaktionsgemisch nach erfolgter Phosphorylierung mit einem Methanol/Wasser/Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (40% in Wasser)-Gemisch (7:3:1 v/v/v) versetzt und für 17 Stunden gerührt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an RP18-Kieselgel mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten (8:1 bis 4:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 0.46 g (0.52 mmol, 59%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Molmasse: 885.12 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{P}_2^{2-}$ **R_f -Wert:** 0.19 (*iso*-Propanol/ $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** $m/z=$ ber.: 401.016 $[\text{M-H}]^-$, gef.: 400.789.

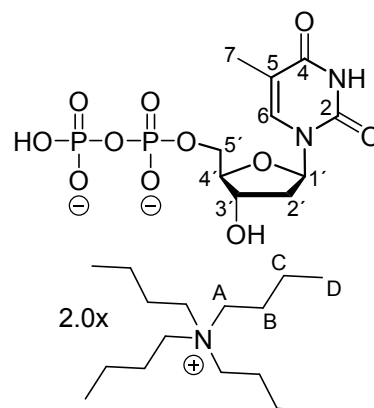
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ [ppm]= 7.76 (d, $^4J_{\text{HH}}= 1.4$ Hz, 1H, **H-6**), 6.32 (dd, $^3J_{\text{HH}}= 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}}= 6.4$ Hz, 1H, **H-1'**), 4.67-4.58 (m, 1H, **H-3'**), 4.22-4.08 (m, 3H, **H-4'**, **H-5'**), 3.30-2.25 (m,

16H, **H-A**), 2.43-2.24 (m, 2H, **H-2'**), 1.91 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.4$ Hz, 3H, **H-7**), 1.74-1.51 (m, 16H, **H-B**), 1.35 (sext, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 16H, **H-C**), 0.93 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 24H, **H-D**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ [ppm]= 166.3 (**C-4**), 151.6 (**C-2**), 137.3 (**C-6**), 111.7 (**C-5**), 85.5 (**C-4'**), 84.9 (**C-1'**), 71.0 (**C-3'**), 65.3 (**C-5'**), 58.1 (**C-A**), 38.6 (**C-2'**), 23.1 (**C-B**), 19.1 (**C-C**), 12.8 (**C-D**), 11.6 (**C-7**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ [ppm]= -10.89 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.0$ Hz, **P- α**), -11.53 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.0$ Hz, **P- β**).

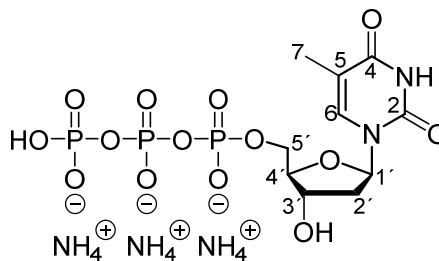
IR: ν [cm^{-1}]= 3165, 3070, 2960, 2875, 1683, 1468, 1382, 1270, 1224, 1108, 1075, 1054, 1008, 932, 880, 799, 769, 738, 710, 653, 635, 514, 422.



Darstellung von Thymidin-5'-triphosphat 116

Die Reaktion wurde nach der **AAV 7** durchgeführt. Dafür wurden 0.41 g (0.84 mmol, 1.0 Äquiv.) des als Zwischenprodukt bei der Synthese von Thymidin-5'-diphosphat **186** anfallenden 5-Cl-*cycloSal*-3'-*O*-acetyl-thymidinmonophosphats **177** mit 1.1 g (1.7 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-dihydrogenpyrophosphat in 6.0 mL abs. DMF versetzt. Die Deacetylierung erfolgte über 20 Stunden.

Ausbeute: Es wurden 0.16 g (0.29 mmol, 35%) eines farblosen Feststoffs erhalten. Mit Pyrophosphat verunreinigte Mischfraktionen wurden nicht berücksichtigt. **Molmasse:** 533.26 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{10}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_{14}\text{P}_3^{3-}$ **R_f-Wert:** 0.12 (*iso*-Propanol/ $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** $m/z = \text{ber.}: 480.982$ [M-H] $^-$, gef.: 481.046.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ [ppm]= 7.73 (s, 1H, **H-6**), 6.34 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 1H, **H-1'**), 4.67-4.58 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.25-4.15 (m, 3H, **H-4'**, **H-5'**), 2.44-2.29 (m, 2H, **H-2'**), 1.92 (s, 3H, **H-7**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ [ppm]= 166.4 (**C-4**), 151.5 (**C-2**), 137.4 (**C-6**), 111.7 (**C-5**), 85.5 (**C-4'**), 85.0 (**C-1'**), 71.0 (**C-3'**), 65.9 (**C-5'**), 38.6 (**C-2'**), 11.6 (**C-7**).

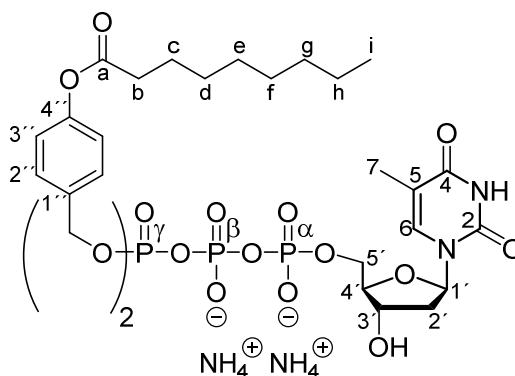
$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ [ppm]= -9.51 (d, $^2J_{\text{PP}} = 19.5$ Hz, **P- α**), -11.47 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.6$ Hz, **P- γ**), -22.80 (d, $^2J_{\text{PP}} = 19.8$ Hz, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3204, 2988, 2901, 1692, 1679, 1665, 1462, 1442, 1411, 1394, 1228, 1077, 1067, 1057, 900, 826, 538, 430.

Darstellung von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-TTP 62

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 0.11 g (0.13 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-TDP **186**, in 0.7 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.17 g (0.25 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(nonanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylamino-phosphoramidit **75e** und 0.66 mL (0.17 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) umgesetzt. Die Oxidation erfolgte mit 46 μ L (0.25 mmol, 2.0 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 95 mg (94 μ mol, 74%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1008.93 g/mol **Summenformel:** C₄₂H₅₉N₂O₁₈P₃²⁻
UV (HPLC): λ_{\max} = 266 nm **HPLC:** t_R = 16.56 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 973.306 [M-H]⁻, gef.: 973.491.



¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 7.83 (d,

⁴ J_{HH} = 1.3 Hz, 1H, **H-6**), 7.42-7.33 (m, 4H, **H-2''**), 7.03-6.96 (m, 4H, **H-3''**), 6.28 (dd, ³ J_{HH} = 7.6 Hz, ⁴ J_{HH} = 6.0 Hz, 1H, **H-1'**), 5.17 (d, ³ J_{HP} = 8.0 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.65-4.58 (m, 1H, **H-3'**), 4.30 (ddd, ² J_{HH} = 11.4 Hz, ³ J_{HP} = 5.9 Hz, ³ J_{HH} = 2.8 Hz, 1H, **H-5'a**), 4.24-4.14 (m, 1H, **H-5'b**), 4.01-3.90 (m, 1H, **H-4'**), 2.54 (t, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 4H, **H-b**), 2.31-2.18 (m, 1H, **H-2'a**), 2.12 (ddd, ² J_{HH} = 13.5 Hz, ³ J_{HH} = 6.1 Hz, ³ J_{HH} = 3.3 Hz, 1H, **H-2'b**), 1.89 (d, ⁴ J_{HH} = 1.3 Hz, 3H, **H-7**), 1.75-1.51 (m, 4H, **H-c**), 1.47-1.21 (m, 20H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.93 (t, ³ J_{HH} = 6.7 Hz, 6H, **H-i**).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 173.7 (**C-a**), 166.7 (**C-4**), 152.4 (**C-2**), 152.2 (**C-4'**), 138.3 (**C-6**), 135.2 (d, ³ J_{CP} = 7.1 Hz, **C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 112.0 (**C-5**), 87.6 (**C-4'**), 85.8 (**C-1'**), 72.2 (**C-3'**), 70.2 (d, ² J_{CP} = 5.4 Hz, **Ph-CH₂**), 67.0 (**C-5'**), 40.5 (**C-2'**), 35.0 (**C-b**), 33.0, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 26.0 (**C-c**), 14.5 (**C-i**), 12.7 (**C-7**).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = -13.62 (d, ² J_{PP} = 22.0 Hz, **P- α**), -15.17 (d, ² J_{PP} = 17.8 Hz, **P- γ**), -23.67 (d, ² J_{PP} = 20.0 Hz, **P- β**).

IR: ν [cm⁻¹] = 3394, 3185, 3078, 2956, 2928, 2873, 1754, 1688, 1509, 1465, 1380, 1271, 1198, 1130, 1086, 1026, 1009, 884, 806, 507.

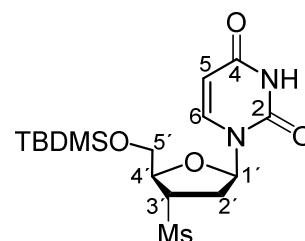
5.2.13 Synthese eines AZU-Triphosphat-Prodrugs 63

Darstellung von 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-*O*-mesyluridin 145

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 5.0 g (22 mmol, 1.0 Äquiv.) 2'-Desoxyuridin **144** in 80 mL abs. Pyridin gelöst und mit 3.6 g (24 mmol, 1.1 Äquiv.) TBDMSCl zur Reaktion gebracht. Nach 1.5 Stunden wurde die Lösung auf 0 °C gekühlt und mit 2.2 mL (3.3 g,

32 mmol, 1.5 Äquiv.) Methansulfonylchlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für zwei Stunden gerührt. Es schloss sich das Kippen auf Eiswasser sowie das Rühren für weitere 0.5 Stunden an. Daraufhin wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in einem Wasser/Acetonitril-Gemisch (4:1 v/v) aufgenommen und gefriertrocknet.

Ausbeute: Es wurden 8.2 g (20 mmol, 93%) eines beigeen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 404.55 g/mol **Summenformel:** $C_{16}H_{28}N_2O_6SSi$ **R_f-Wert:** 0.47 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v)



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.40 (d, ⁴*J*_{HH}= 2.2 Hz, 1H, **NH**), 7.71 (d, ³*J*_{HH}= 8.1 Hz, 1H, **H-6**), 6.16 (dd, ³*J*_{HH}= 7.7 Hz, ³*J*_{HH}= 6.2 Hz, 1H, **H-1'**), 5.63 (dd, ³*J*_{HH}= 7.7 Hz, ⁴*J*_{HH}= 2.2 Hz, 1H, **H-5**), 5.18 (dt, ³*J*_{HH}= 5.6 Hz, ³*J*_{HH}= 2.7 Hz, 1H, **H-3'**), 4.19 (td, ³*J*_{HH}= 3.9 Hz, ³*J*_{HH}= 2.4 Hz, 1H, **H-4'**), 3.86-3.72 (m, 2H, **H-5'**), 3.29 (s, 3H, **Ms-CH₃**), 2.60-2.35 (m, 2H, **H-2'**), 0.88 (s, 9H, **tBu-(CH₃)₃**), 0.08 (s, 6H, **Si(CH₃)₂**).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 163.0 (**C-4**), 150.3 (**C-2**), 140.0 (**C-6**), 101.9 (**C-5**), 84.2 (**C-1'**), 84.0 (**C-4'**), 80.3 (**C-3'**), 62.4 (**C-5'**), 37.9 (**Ms-CH₃**), 37.1 (**C-2'**), 25.8 (**tBu-(CH₃)₃**), 18.0 (**C-tBu**), -5.6 (**Si(CH₃)₂**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3399, 3100, 3029, 2935, 2857, 1667, 1462, 1418, 391, 1352, 1274, 1238, 1169, 1106, 1042, 992, 927, 895, 813, 774, 761, 718, 525, 425.

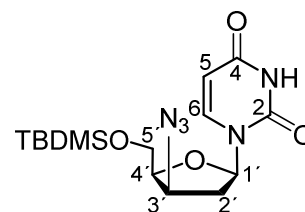
Darstellung von 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-azido-3'-desoxyuridin **146**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 8.2 g (22 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-*O*-mesyluridin **145** in 60 mL abs. DMF gelöst und mit 5.1 g (79 mmol, 3.6 Äquiv.) Natriumazid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 100 °C erhitzt und für 3.5 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung in Eiswasser gekippt, wodurch die Bildung eines farblosen Feststoffs auftrat. Dieser wurde durch Filtration separiert, in Dichlormethan aufgenommen, über Natriumsulfat getrocknet, erneut filtriert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit.

Wichtig: Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend der Anmerkung zur Behandlung der natriumazidhaltigen wässrigen Phase bei der Synthese von 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-azido-3'-desoxythymidin **141** (Kapitel 5.2.9)!

Ausbeute: Es wurden 4.7 g (13 mmol, 58%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 367.48 g/mol **Summenformel:** $C_{15}H_{25}N_5O_4Si$ **R_f-Wert:** 0.91 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.31 (bs, 1H, **NH**), 7.66 (d, ³*J*_{HH}= 8.1 Hz, 1H, **H-6**), 6.01 (dd, ³*J*_{HH}= 7.9 Hz, ³*J*_{HH}= 3.1 Hz, 1H, **H-1'**), 5.68 (dd, ³*J*_{HH}= 8.1 Hz, ⁴*J*_{HH}= 2.2 Hz, 1H, **H-5**), 4.50-4.43 (m, 1H, **H-3'**), 4.03 (td, ³*J*_{HH}= 6.0 Hz, ³*J*_{HH}= 3.9 Hz, 1H, **H-4'**), 3.69 (d, ³*J*_{HH}= 6.0 Hz, 2H, **H-5'**), 2.72 (ddd, ²*J*_{HH}= 14.9 Hz, ³*J*_{HH}= 7.9 Hz,



³*J*_{HH}= 3.6 Hz, 1H, **H-2'a**), 2.13-2.03 (m, 1H, **H-2'b**), 0.85 (s, 9H, ***t*Bu-(CH₃)₃**), 0.01 (s, 6H, **Si(CH₃)₂**).

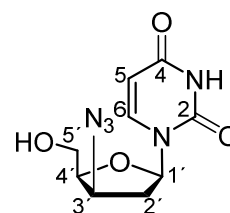
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 163.1 (**C-4**), 150.4 (**C-2**), 140.1 (**C-6**), 101.6 (**C-5**), 83.6 (**C-1'**), 82.7 (**C-4'**), 60.7 (**C-3'**), 59.5 (**C-5'**), 37.5 (**C-2'**), 25.8 (***t*Bu-(CH₃)₃**), 18.6 (**C-*t*Bu**), -2.9 (**Si(CH₃)₂**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3478, 3122, 3012, 2955, 2858, 2127, 2100, 1701, 1649, 1471, 1416, 1389, 1370, 1346, 1304, 1264, 1231, 1193, 1170, 1101, 1084, 1060, 1034, 966, 834, 771, 733, 618, 558, 530, 422.

Darstellung von 3'-Azido-3'-desoxyuridin **112 (AZU)**

Es wurden 4.6 g (13 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-azido-3'-desoxyuridin **146** in 100 mL abs. THF gelöst und mit 38 mL (38 mmol, 3.0 Äquiv.) TBAF (1 M in THF) zur Reaktion gebracht. Nach einer Stunde wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) gereinigt. Außerdem schlossen sich eine zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 30:1 v/v) sowie eine Umkristallisation aus Methanol an.

Ausbeute: Es wurden 2.6 g (10 mmol, 81%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 253.22 g/mol **Summenformel:** C₉H₁₁N₅O₄ **R_f-Wert:** 0.35 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI):** *m/z*= ber.: 252.0738 [M-H]⁻, gef.: 252.0592.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.32 (bs, 1H, **NH**), 7.66 (d, ³*J*_{HH}= 8.1 Hz, 1H, **H-6**), 6.01 (dd, ³*J*_{HH}= 7.8 Hz, ³*J*_{HH}= 3.0 Hz, 1H, **H-1'**), 5.68 (d, ³*J*_{HH}= 8.1 Hz, 1H, **H-5**), 5.03 (t, ³*J*_{HH}= 5.3 Hz, 1H, **OH**), 4.50-4.44 (m, 1H, **H-3'**), 4.06-3.99 (m, 1H, **H-4'**), 3.69 (t, ³*J*_{HH}= 5.7 Hz, 2H, **H-5'**), 2.79-2.65 (m, 1H, **H-2'a**), 2.13-2.03 (m, 1H, **H-2'b**).

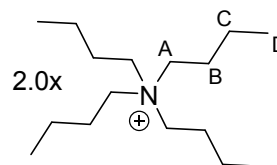
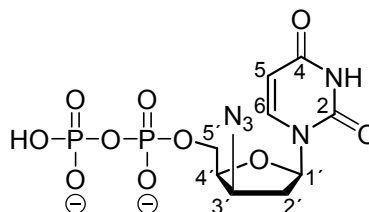
¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 163.6 (**C-4**), 150.8 (**C-2**), 140.6 (**C-6**), 102.1 (**C-5**), 84.1 (**C-1'**), 83.1 (**C-4'**), 61.1 (**C-5'**), 59.9 (**C-3'**), 38.0 (**C-2'**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3475, 3137, 3009, 2960, 2903, 2875, 2797, 2126, 2099, 1697, 1647, 1472, 1415, 1389, 1370, 1265, 1230, 1192, 1101, 1085, 1060, 1034, 1003, 967, 954, 823, 785, 770, 733, 636, 559, 530, 480, 417.

Darstellung von 3'-Azido-3'-desoxyuridindiphosphat 185 (AZUDP)

Die Reaktion wurde analog zu der **AAV 5 (Variante B)** in Kombination mit der **AAV 6** durchgeführt. Zur Darstellung des *cycloSal*-Triesters **180** wurden 0.50 g (2.0 mmol, 1.0 Äquiv.) AZU **112** in 30 mL abs. Acetonitril vorgelegt und mit 0.57 g (2.6 mmol, 1.3 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** sowie 0.50 mL (0.38 g, 3.0 mmol, 1.5 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 4.9 g (7.9 mmol, 4.0 Äquiv.) Oxone[®] in Wasser. Nach Extraktion wurde das 5-Cl-*cycloSal*-3'-azido-3'-desoxyuridinmonophosphat **180** durch je eine einmalige automatisierte Säulenchromatographie an Kieselgel sowie einer zirkulär präparativen Dünnschichtchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v + 0.1% HOAc) gereinigt (Ausbeute: 0.44 g (0.96 mmol, 49%)). Anschließend wurden nach der **AAV 6** 0.20 g (0.44 mmol, 1.0 Äquiv.) Triester **180** mit 0.37 g (1.1 mmol, 2.5 Äquiv.) Mono(tetra-*n*-butylammonium)-monophosphat in 2.0 mL abs. DMF zur Reaktion gebracht. Die Reinigung erfolgte durch automatisierte RP18-Chromatographie (Wasser/Acetonitril-Gradient).

Ausbeute: Es wurden 0.13 g (0.15 mmol, 17% (über zwei Stufen)) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 896.10 g/mol **Summenformel:** C₉H₁₁N₅O₁₀P₂²⁻ **R_f-Wert:** 0.15 (*iso*-Propanol/NH₃/H₂O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** *m/z*= ber.: 412.007 [M-H]⁻, gef.: 411.947.



¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ [ppm]= 7.96 (d, ³J_{HH}= 8.1 Hz, 1H, **H-6**), 6.08 (dd, ³J_{HH}= 7.6 Hz, ³J_{HH}= 2.2 Hz, 1H, **H-1'**), 5.84 (d, ³J_{HH}= 8.1 Hz, 1H, **H-5**), 4.38 (t, ³J_{HH}= 4.6 Hz, 1H, **H-3'**), 4.44-4.35 (m, 1H, **H-4'**), 4.35-4.16 (m, 2H, **H-5'**), 3.27-3.04 (m, 16H, **H-A**), 2.87-2.75 (m, 1H, **H-2'a**), 2.36-2.26 (m, 1H, **H-2'b**), 1.71-1.47 (m, 16H, **H-B**), 1.42-1.20 (m, 16H, **H-C**), 0.90 (t, ³J_{HH}= 7.3 Hz, 24H, **H-D**).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O): δ [ppm]= 166.1 (**C-4**), 151.3 (**C-2**), 142.0 (**C-6**), 101.4 (**C-5**), 85.5 (**C-1'**), 82.1 (d, ³J_{CP}= 8.7 Hz, **C-4'**), 64.0 (d, ²J_{CP}= 4.1 Hz, **C-5'**), 60.4 (**C-3'**), 58.0 (**C-A**), 37.7 (**C-2'**), 23.0 (**C-B**), 19.1 (**C-C**), 12.8 (**C-D**).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O): δ [ppm]= -10.81 (d, ²J_{PP}= 17.1 Hz, **P-α**), -11.33 (d, ²J_{PP}= 17.1 Hz, **P-β**).

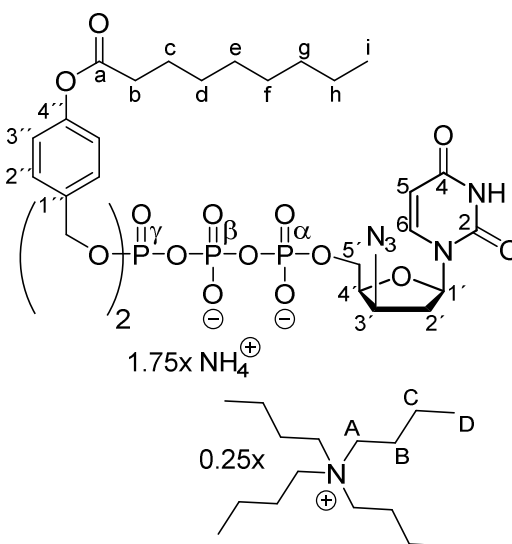
IR: ν [cm⁻¹]= 3198, 2960, 2874, 2104, 1683, 1463, 1382, 1265, 1225, 1101, 1057, 930, 880, 804, 507, 420.

Darstellung von γ-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-AZUTP 63

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 0.12 g (0.13 mmol, 1.0 Äquiv.) AZUDP **185** (2.0x Bu₄N⁺), in 1.5 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.15 g

(0.23 mmol, 1.8 Äquiv.) Bis(nonanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75e** und 0.67 mL (0.17 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 47 μ L (0.26 mmol, 2.0 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan). Die Reaktion wurde einmal neu gestartet, um einen höheren Umsatz des Edukts **185** zu erzielen.

Ausbeute: Es wurden 79 mg (73 μ mol, 57%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1076.02 g/mol **Summenformel:** C₄₁H₅₆N₅O₁₇P₃²⁻
UV (HPLC): λ_{\max} = 262 nm **HPLC:** t_R = 16.56 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 984.297 [M-H]⁻, gef.: 984.463.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 7.83 (d, ³ J_{HH} = 8.1 Hz, 1H, **H-6**), 7.47-7.39 (m, 4H, **H-2''**), 7.12-7.03 (m, 4H, **H-3''**), 6.28 (dd, ³ J_{HH} = 7.7 Hz, ³ J_{HH} = 2.5 Hz, 1H, **H-1'**), 5.72 (d, ³ J_{HH} = 8.1 Hz, 1H, **H-5**), 5.19 (d, ³ J_{HP} = 8.1 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.38-4.28 (m, 4H, **H-3'**, **H-4'**, **H-5'**), 3.27-3.18 (m, 2H, **H-A**), 2.76-2.66 (m, 1H, **H-2'a**), 2.59 (t, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 4H, **H-b**), 2.24-2.17 (m, 1H, **H-2'b**), 1.75 (quint, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 4H, **H-c**), 1.70-1.61 (m, 2H, **H-B**), 1.50-1.25 (m, 22H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-C**), 1.03 (t, ³ J_{HH} = 7.3 Hz, 3H, **H-D**), 0.93 (t, ³ J_{HH} = 6.8 Hz, **H-i**).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 173.7 (**C-a**), 166.2 (**C-4**), 152.3 (**C-4''**), 152.1 (**C-2**), 142.2 (**C-6**), 134.9 (d, ³ J_{CP} = 7.4 Hz, **C-1''**), 130.5 (**C-2''**), 122.9 (**C-3''**), 102.3 (**C-5**), 86.4 (**C-1'**), 83.1 (d, ³ J_{CP} = 8.4 Hz, **C-4'**), 70.4 (d, ² J_{CP} = 5.6 Hz, **Ph-CH₂**), 65.6 (d, ² J_{CP} = 6.0 Hz, **C-5'**), 62.2 (**C-3'**), 59.5 (**C-A**), 39.3 (**C-2'**), 35.0 (**C-b**), 33.0, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 26.0 (**C-c**), 24.7 (**C-B**), 20.7 (**C-C**), 14.5 (**C-i**), 14.0 (**C-D**).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= -11.61 (d, ² J_{PP} = 19.5 Hz, **P- α**), -13.19 (d, ² J_{PP} = 16.3 Hz, **P- γ**), -24.04 (t, ² J_{PP} = 18.1 Hz, **P- β**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3428, 3199, 3044, 2956, 2924, 2855, 2107, 1756, 1687, 1508, 1459, 1379, 1266, 1216, 1199, 1167, 1131, 1106, 1057, 1005, 921, 814, 765, 722, 556, 502, 433.

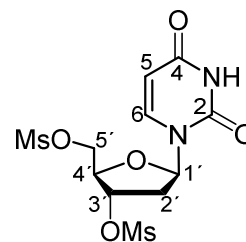
5.2.14 Synthese eines d4U-Di- 187 und -Triphosphat-Prodrugs 64

Darstellung von 3',5'-Di-O-mesyluridin 147

Unter Stickstoff als Intergas wurden 10.0 g (43.8 mmol, 1.0 Äquiv.) 2'-Desoxyuridin **144** in 70 mL abs. Pyridin suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Im Anschluss wurden 9.50 mL (14.1 g, 123 mmol, 2.8 Äquiv.) Methansulfonylchlorid hinzugegeben. Nach 30 Minuten des Rührens bei 0 °C wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere zwei Stunden gerührt. Darauffolgend wurde die Lösung in Eiswasser gegossen und für eine

Stunde hydrolysiert. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert und mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen. Zur quantitativen Entfernung des Pyridins wurde dreimal mit Toluol coevaporiert. Auf eine weitere Reinigung konnte verzichtet werden.

Ausbeute: Es wurden 14.0 g (36.4 mmol, 83%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 384.37 g/mol **Summenformel:** $C_{11}H_{16}N_2O_9S_2$ **R_f-Wert:** 0.56 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** m/z = ber.: 385.0370 [M+H]⁺, 407.0189 [M+Na]⁺, gef.: 385.0367, 407.0188.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.41 (bs, 1H, **NH**), 7.67 (d, ³ J_{HH} = 8.1 Hz, 1H, **H-6**), 6.19 (t, ³ J_{HH} = 7.1 Hz, 1H, **H-1'**), 5.68 (dd, ³ J_{HH} = 8.1 Hz, ⁴ J_{HH} = 2.2 Hz, 1H, **H-5**), 5.31-5.26 (m, 1H, **H-3'**), 4.51-4.32 (m, 3H, **H-4'**, **H-5'**), 3.32 (s, 3H, **Ms-CH₃**), 3.24 (s, 3H, **Ms-CH₃**), 2.55 (dd, ³ J_{HH} = 7.1 Hz, ³ J_{HH} = 5.0 Hz, 2H, **H-2'**).

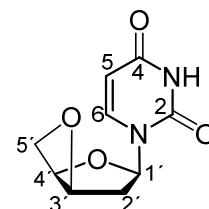
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 162.9 (**C-4**), 150.3 (**C-2**), 140.7 (**C-6**), 102.5 (**C-5**), 84.6 (**C-1'**), 80.6 (**C-4'**), 79.2 (**C-3'**), 68.3 (**C-5'**), 37.7 (**Ms-CH₃**), 36.8 (**Ms-CH₃**), 36.0 (**C-2'**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3401, 3061, 3029, 2929, 1770, 1711, 1602, 1495, 1453, 1411, 1267, 1182, 1069, 1028, 734, 699, 471.

Darstellung von 3',5'-Anhydro-2'-desoxyuridin 148

14.0 g (36.4 mmol, 1.0 Äquiv.) 3',5'-Di-*O*-mesyluridin **147** wurden portionsweise zu einer Lösung aus 4.4 g (0.11 mol, 3.0 Äquiv.) Natriumhydroxid in 70 mL Wasser gegeben und für 1.5 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit Salzsäure neutralisiert und unter vermindertem Druck auf das halbe Volumen eingeeengt. Anschließend wurde sechsmal mit größeren Volumina Ethylacetat (3-faches Volumen im Vergleich zur wässrigen Phase) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Auf eine weitere Reinigung konnte verzichtet werden.

Ausbeute: Es wurden 7.2 g (34 mmol, 94%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 210.19 g/mol **Summenformel:** $C_9H_{10}N_2O_4$ **R_f-Wert:** 0.80 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** m/z = ber.: 233.0533 [M+Na]⁺, gef.: 233.0536.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.35 (bs, 1H, **NH**), 8.16 (d, ³ J_{HH} = 8.1 Hz, 1H, **H-6**), 6.51 (t, ³ J_{HH} = 5.3 Hz, 1H, **H-1'**), 5.71 (dd, ³ J_{HH} = 8.1 Hz, ⁴ J_{HH} = 2.2 Hz, 1H, **H-5**), 5.51-5.46 (m,

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 4.93-4.88 (m, 1H, **H-4'**), 4.68 (dd, $^2J_{\text{HH}}= 8.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}}= 4.1$ Hz, 1H, **H-5'**_a), 4.01 (dd, $^2J_{\text{HH}}= 8.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}}= 2.1$ Hz, 1H, **H-5'**_b), 2.50-2.46 (m, 2H, **H-2'**).

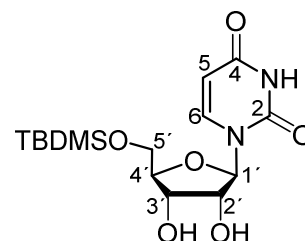
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 163.1 (**C-4**), 151.2 (**C-2**), 141.1 (**C-6**), 102.2 (**C-5**), 88.5 (**C-1'**), 87.0 (**C-3'**), 80.1 (**C-4'**), 75.2 (**C-5'**), 37.2 (**C-2'**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3157, 3040, 2989, 2954, 2828, 2794, 1714, 1683, 1462, 1422, 1380, 1305, 1229, 1203, 1149, 1107, 1087, 1058, 1035, 980, 929, 892, 860, 753, 639, 624, 550, 524, 420.

Darstellung von 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-uridin **150**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 8.0 g (33 mmol, 1.0 Äquiv.) Uridin **149** in 65 mL abs. Pyridin gelöst und mit 6.2 g (41 mmol, 1.3 Äquiv.) TBDMSCl versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für drei Stunden gerührt und die Lösung anschließend auf ein Viertel des ursprünglichen Volumen eingengt. Nach Aufnahme in Dichlormethan/Wasser wurde die organische Phase zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 19:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 10.2 g (28.5 mmol, 87%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 358.47 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{Si}$ **R_f-Wert:** 0.36 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** m/z = ber.: 359.1633 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, 381.1452 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, gef.: 359.1634, 381.1456.



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 11.35 (bs, 1H, **NH**), 7.63 (d, $^3J_{\text{HH}}= 8.0$ Hz, 1H, **H-6**), 6.83-6.78 (m, 1H, **H-1'**), 6.39 (dd, $^3J_{\text{HH}}= 6.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 1.8$ Hz, 1H, **H-2'**), 5.96 (dt, $^3J_{\text{HH}}= 6.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 1.8$ Hz, 1H, **H-3'**), 5.53 (dd, $^3J_{\text{HH}}= 8.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 1.8$ Hz 1H, **H-5**), 4.84-4.79 (m, 1H, **H-4'**), 3.79 (dq, $^2J_{\text{HH}}= 11.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}}= 3.3$ Hz, 2H, **H-5'**), 0.86 (s, 9H, **tBu-(CH₃)₃**), 0.04 (s, 6H, **Si(CH₃)₂**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 163.0 (**C-4**), 150.6 (**C-2**), 140.8 (**C-6**), 134.5 (**C-3'**), 126.2 (**C-2'**), 101.6 (**C-5**), 89.1 (**C-1'**), 86.9 (**C-4'**), 64.3 (**C-5'**), 25.9 (**tBu-(CH₃)₃**), 18.0 (**C-tBu**), -5.4 (**Si(CH₃)₂**).

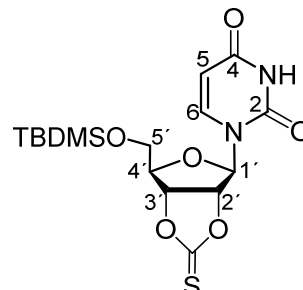
IR: ν [cm^{-1}]= 3449, 3100, 3045, 2929, 2857, 1668, 1454, 1417, 1392, 1339, 1283, 1251, 1236, 1140, 1106, 1081, 1065, 1036, 992, 834, 812, 759, 562, 543, 425, 402.

Darstellung von 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-O'-thiocarbonyluridin **151**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 9.9 g (28 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-uridin **150** in 80 mL abs. Dichlormethan gelöst und tropfenweise mit 5.6 g (31 mmol,

1.1 Äquiv.) 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol, gelöst in 100 mL abs. Dichlormethan, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für vier Stunden gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 9.0 g (23 mmol, 82%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 400.52 g/mol **Summenformel:** C₁₆H₂₄N₂O₆SSi **R_f-Wert:** 0.88 (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 401.1197 [M+H]⁺, 423.1017 [M+Na]⁺, gef.: 401.1205, 423.1022.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.51 (bs, 1H, **NH**), 7.73 (d, ³*J*_{HH}= 8.0 Hz, 1H, **H-6**), 6.00 (d, ³*J*_{HH}= 1.7 Hz, 1H, **H-1'**), 5.93 (dd, ³*J*_{HH}= 7.4 Hz, ⁴*J*_{HH}= 1.6 Hz, 1H, **H-2'**), 5.65 (dd, ³*J*_{HH}= 8.0 Hz, ⁴*J*_{HH}= 2.1 Hz, 1H, **H-5**), 5.54 (dd, ³*J*_{HH}= 7.4 Hz, ³*J*_{HH}= 3.2 Hz, 1H, **H-3'**), 4.41-4.36 (m, 1H, **H-4'**), 3.81 (d, ³*J*_{HH}= 5.9 Hz, 2H, **H-5'**), 0.85 (s, 9H, ***t*Bu-(CH₃)₃**), 0.04, 0.03 (s, 6H, **Si(CH₃)₂**).

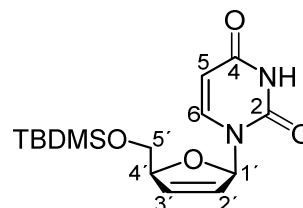
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 190.2 (**C=S**), 163.2 (**C-4**), 150.4 (**C-6**), 143.1 (**C-2**), 101.7 (**C-5**), 93.0 (**C-1'**), 88.9 (**C-2'**), 86.8 (**C-4'**), 86.5 (**C-3'**), 62.5 (**C-5'**), 25.7 (***t*Bu-(CH₃)₃**), 17.9 (**C-*t*Bu**), -5.5 (**Si(CH₃)₂**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3137, 3095, 3006, 2952, 2929, 2802, 1681, 1619, 1463, 1402, 1372, 1353, 1335, 1307, 1269, 1251, 1143, 1129, 1087, 1054, 1020, 990, 964, 913, 863, 913, 863, 826, 776, 764, 730, 683, 659, 650, 622, 608, 526, 516, 439, 401.

Darstellung von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxy-2',3'-didesoxyuridin 152

Es wurden 5.6 g (14 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-*O*,*O'*-thiocarbonyluridin **151** in 40 mL (42 g, 0.34 mol, 24 Äquiv.) Trimethylphosphit suspendiert und für 4.5 Stunden zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit *n*-Hexan coevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 4.2 g (13 mmol, 93%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 324.45 g/mol **Summenformel:** C₁₅H₂₄N₂O₄Si **R_f-Wert:** 0.42 (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 347.1398 [M+Na]⁺, gef.: 347.1407.



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.35 (bs, 1H, **NH**), 7.63 (d, ³*J*_{HH}= 8.0 Hz, 1H, **H-6**), 6.83-6.78 (m, 1H, **H-1'**), 6.39 (dd, ³*J*_{HH}= 6.0 Hz, ⁴*J*_{HH}= 1.8 Hz, 1H, **H-2'**), 5.96 (dt, ³*J*_{HH}=

6.0 Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, 1H, **H-3'**), 5.53 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz 1H, **H-5**), 4.84-4.79 (m, 1H, **H-4'**), 3.79 (dq, $^2J_{\text{HH}} = 11.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, 2H, **H-5'**), 0.86 (s, 9H, **tBu-(CH₃)₃**), 0.04 (s, 6H, **Si(CH₃)₂**).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 163.0 (**C-4**), 150.6 (**C-2**), 140.8 (**C-6**), 134.5 (**C-3'**), 126.2 (**C-2'**), 101.6 (**C-5**), 89.1 (**C-1'**), 86.9 (**C-4'**), 64.3 (**C-5'**), 25.9 (**tBu-(CH₃)₃**), 18.0 (**C-tBu**), -5.4 (**Si(CH₃)₂**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3449, 3100, 3045, 2929, 2857, 1668, 1454, 1417, 1392, 1339, 1283, 1251, 1236, 1140, 1106, 1081, 1065, 1036, 992, 834, 812, 759, 562, 543, 425, 402.

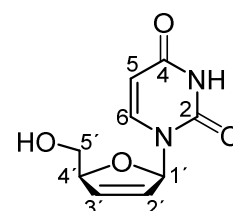
Darstellung von 2',3'-Desoxy-2',3'-dideoxyuridin 40 (d4U)

Variante A: Zu einer Lösung aus 7.2 g (34 mmol, 1.0 Äquiv.) 3',5'-Anhydro-2'-desoxyuridin **148** in 250 mL *tert*-Butanol wurden bei 65 °C portionsweise 7.7 g (0.14 mol, 4.0 Äquiv.) Kaliumhydroxid über einen Zeitraum von einer halben Stunde gegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde die Suspension für drei Stunden bei 65 °C gerührt. Da über DC-Kontrolle weiterhin Edukt **148** zu detektieren waren, wurde weitere 1.0 g (18 mmol, 0.5 Äquiv.) Kaliumhydroxid zugeführt und für eine zusätzliche Stunde gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 30 mL Methanol und die Neutralisation mit Salzsäure. Die Kaliumsalze wurden filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung wurde zweimal säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) durchgeführt, wobei die Beladung über einen "dry-load" mit Kieselgel erfolgte.

Variante B: Eine Lösung aus 4.1 g (0.13 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyuridin **152** in 75 mL abs. THF wurde mit 35 mL (0.35 mmol, 2.8 Äquiv.) TBAF (1 M in THF) versetzt und für eine halbe Stunde gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) gereinigt. Zur quantitativen Entfernung der TBAF-Salze wurde abschließend aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: Es wurden 4.6 g (22 mmol, 64%, *Variante A*) bzw. 1.9 g (9.0 mmol, 72%, *Variante B*) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Molmasse: 210.19 g/mol **Summenformel:** C₉H₁₀N₂O₄ **R_f-Wert:** 0.43 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** $m/z =$ ber.: 233.0533 [M+Na]⁺, gef.: 233.0523.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.29 (bs, 1H, **NH**), 7.74 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, 1H, **H-6**), 6.81 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, 1H, **H-1'**), 6.40 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, 1H,

H-3'), 5.94-5.90 (m, 1H, **H-2'**), 5.59 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, 1H, **H-5**), 4.96 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5.3$ Hz, 1H, **OH**), 4.80-4.76 (m, 1H, **H-4'**), 3.58 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 5.5$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, 2H, **H-5'**).

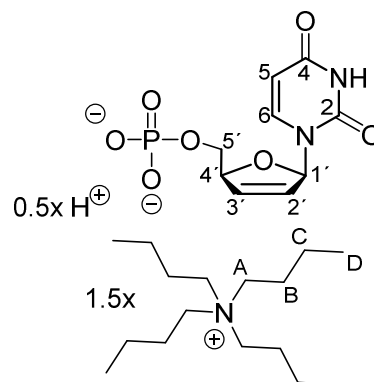
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm]= 163.1 (**C-4**), 150.7 (**C-2**), 141.1 (**C-6**), 134.1 (**C-3'**), 125.7 (**C-2'**), 101.5 (**C-5**), 89.1 (**C-1'**), 87.4 (**C-4'**), 62.2 (**C-5'**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3447, 3171, 3101, 3042, 2921, 2883, 1695, 1673, 1623, 1454, 1393, 1340, 1283, 1265, 1251, 1229, 1166, 1140, 1106, 1083, 1065, 1035, 990, 969, 850, 812, 769, 759, 705, 666, 562, 544, 426, 403.

Darstellung von 2',3'-Dideoxy-2',3'-dihydrouridinmonophosphat 188 (d4UMP)

Die Reaktion wurde nach der **AAV 5 (Variante A)** durchgeführt. Das Phosphorylierungsreagenz wurde aus 0.37 mL (0.62 g, 4.1 mmol, 4.4 Äquiv.) Phosphorylchlorid, gelöst in 5.0 mL Acetonitril, 0.33 mL (0.32 g, 4.1 mmol, 4.4 Äquiv.) Pyridin sowie 37 μL (37 mg, 2.0 mmol, 2.2 Äquiv.) Wasser erhalten und anschließend mit 0.19 g (0.92 mmol, 1.0 Äquiv.) d4U **40** versetzt (Reaktionszeit: 4 h). Die Neutralisation erfolgte mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (40% in Wasser). Nach automatisierter RP18-Chromatographie wurden die Gegenionen mit Dowex-NH $_4^+$ in die Ammoniumform überführt und die Chromatographie wiederholt. Anschließend wurde das Produkt mit Dowex-H $^+$ protoniert und mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (40% in Wasser) auf pH 6.8 eingestellt.

Ausbeute: Es wurden 0.39 g (0.59 mmol, 64%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 652.36 g/mol
Summenformel: C $_9$ H $_9$ N $_2$ O $_7$ P $^{2-}$ **R $_f$ -Wert:** 0.35 (*iso*-Propanol/
 NH $_3$ /H $_2$ O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** $m/z = \text{ber.}: 289.023$
 [M-H] $^-$, gef.: 289.056.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D $_2$ O): δ [ppm]= 7.83 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, 1H, **H-6**), 6.96 (m, 1H, **H-1'**), 6.49 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, 1H, **H-3'**), 5.96 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, 1H, **H-2'**), 5.85 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, 1H, **H-5**), 5.12-5.07 (m, 1H, **H-4'**), 4.09-3.99 (m, 2H, **H-5'**), 3.34-3.00 (m, 12H, **H-A**), 1.77-1.53 (m, 12H, **H-B**), 1.45-1.23 (m, 12H, **H-C**), 0.94 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 18H, **H-D**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, D $_2$ O): δ [ppm]= 166.4 (**C-4**), 152.2 (**C-2**), 143.0 (**C-6**), 134.5 (**C-3'**), 125.0 (**C-2'**), 102.1 (**C-5**), 90.1 (**C-1'**), 86.1 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.3$ Hz, **C-4'**), 65.4 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.5$ Hz, **C-5'**), 58.1 (**C-A**), 23.1 (**C-B**), 19.1 (**C-C**), 12.8 (**C-D**).

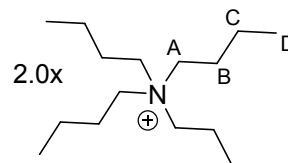
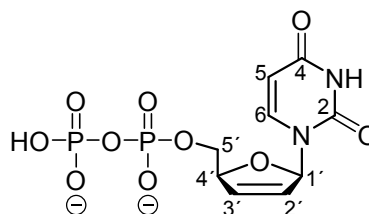
$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, D $_2$ O): δ [ppm]= 0.11.

IR: ν [cm^{-1}]= 2961, 2936, 2875, 2687, 1626, 1521, 1454, 1380, 1329, 1265, 1190, 1101, 1047, 892, 741, 524.

Darstellung von 2',3'-Didesoxy-2',3'-dihydrouridindiphosphat 183 (d4UDP)

Die Reaktion wurde analog zu der **AAV 5 (Variante B)** in Kombination mit **AAV 6** durchgeführt. Zur Darstellung des *cycloSal*-Triesters **178** wurden 0.40 g (1.9 mmol, 1.0 Äquiv.) d4U **40** in 25 mL abs. Acetonitril vorgelegt und mit 0.55 g (2.5 mmol, 1.3 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** sowie 0.49 mL (0.37 g, 2.9 mmol, 1.5 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 0.52 mL (2.9 mmol, 1.5 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan). Nach Extraktion wurde das 5-Cl-*cycloSal*-2',3'-didesoxy-2',3'-dihydrouridinmonophosphat **178** bei quantitativer Umsetzung in guter Reinheit erhalten und direkt weiter eingesetzt. Dafür wurden nach der **AAV 6** 0.20 g (0.49 mmol, 1.0 Äquiv.) Triester **178** mit 0.36 g (1.2 mmol, 2.5 Äquiv.) Mono(tetra-*n*-butyammonium)-monophosphat in 2.0 mL abs. DMF zur Reaktion gebracht. Die Reinigung erfolgte durch automatisierte RP18-Chromatographie (Wasser/Acetonitril-Gradienten: 5-100%, 0-90 min, Flussrate 1 mL/min).

Ausbeute: Es wurden 0.16 g (0.19 mmol, 38% (über zwei Stufen)) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 853.07 g/mol **Summenformel:** C₉H₁₀N₂O₁₀P₂²⁻ **R_f-Wert:** 0.17 (*iso*-Propanol/NH₃/H₂O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** *m/z*= ber.: 368.989 [M-H]⁻, gef.: 369.019.



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 7.88 (d, ³J_{HH}= 8.1 Hz, 1H, **H-6**), 6.98 (dt, ³J_{HH}= 3.3 Hz, ⁴J_{HH}= 1.7 Hz, 1H, **H-1'**), 6.56 (dt, ³J_{HH}= 6.1 Hz, ⁴J_{HH}= 1.8 Hz, 1H, **H-3'**), 5.98 (dt, ³J_{HH}= 6.0 Hz, ⁴J_{HH}= 1.8 Hz, 1H, **H-2'**), 5.91 (d, ³J_{HH}= 8.1 Hz, 1H, **H-5**), 5.16-5.11 (m, 1H, **H-4'**), 4.22-4.09 (m, 2H, **H-5'**), 3.31-3.11 (m, 16H, **H-A**), 1.75-1.59 (m, 16H, **H-B**), 1.38 (sext, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 16H, **H-C**), 0.97 (t, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 24H, **H-D**).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm]= 166.4 (**C-4**), 152.1 (**C-2**), 143.0 (**C-6**), 134.7 (**C-3'**), 124.9 (**C-2'**), 102.3 (**C-5**), 90.1 (**C-1'**), 86.1 (d, ³J_{CP}= 8.1 Hz, **C-4'**), 66.1 (d, ²J_{CP}= 6.0 Hz, **C-5'**), 58.1 (**C-A**), 23.1 (**C-B**), 19.2 (**C-C**), 12.9 (**C-D**).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= -10.91 (d, ²J_{PP}= 19.8 Hz, **P-α**), -11.45 (d, ²J_{PP}= 19.8 Hz, **P-β**).

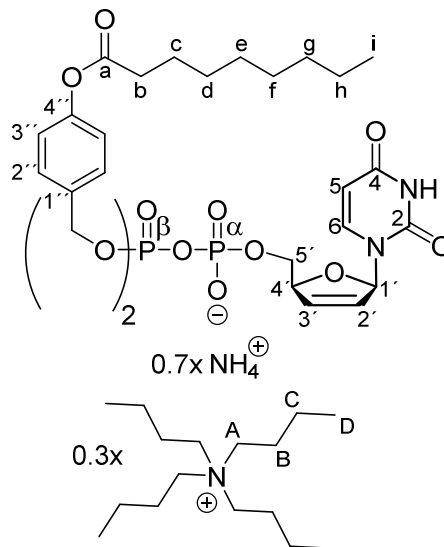
IR: ν [cm⁻¹]= 3215, 2960, 2875, 1684, 1487, 1463, 1381, 1243, 1102, 1072, 1045, 881, 833, 738, 509.

Darstellung von γ-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-d4UDP 187

Die Reaktion wurde nach der **AAV 8** durchgeführt. Es wurden 56 mg (86 μmol, 1.0 Äquiv.) d4UMP **188** (1.5x Bu₄N⁺), in 0.7 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.11 g (0.17 mmol, 2.0 Äquiv.) Bis(nonanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75e** und 0.48 mL (0.12 mmol,

1.4 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 34 μL (0.21 mmol, 2.2 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 18 mg (19 μmol , 22%) eines farblosen Feststoffs erhalten. Es blieben allerdings Mischfraktionen unberücksichtigt. **Molmasse:** 947.21 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{P}_2^-$ **UV (HPLC):** $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ **HPLC:** $t_{\text{R}} = 18.75 \text{ min}$ (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** $m/z = \text{ber.}: 861.313$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, gef.: 861.448.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.85 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, **H-6**), 7.47-7.38 (m, 4H, **H-2'**), 7.12-7.06 (m, 4H, **H-3'**), 6.98 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 3.5 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.6 \text{ Hz}$, 1H, **H-1'**), 6.42 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 6.1 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, **H-3'**), 5.89 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 6.1 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, **H-2'**), 5.79 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.0 \text{ Hz}$, 1H, **H-5**), 5.14 (dd, $^3J_{\text{HP}} = 8.5 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 5.0 \text{ Hz}$, 4H, **Ph-CH₂**), 5.01-4.97 (m, 1H, **H-4'**), 4.26-4.14 (m, 2H, **H-5'**), 3.30-3.22 (m, 2.5H, **H-A**), 2.61 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, 4H, **H-b**), 1.77 (quint, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, 4H, **H-c**), 1.74-1.64 (m, 2.5H, **H-B**), 1.53-1.27 (m, 22.5H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-C**), 1.06 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, 3.75H, **H-D**), 0.99-0.91 (m, 6H, **H-i**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.8 (**C-a**), 166.4 (**C-4**), 152.4 (**C-2**), 152.2 (**C-4'**), 143.3 (**C-6**), 135.9 (**C-3'**), 134.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.2 \text{ Hz}$, **C-1'**), 130.4 (d, $^4J_{\text{CP}} = 3.1 \text{ Hz}$, **C-2'**), 127.3 (**C-2'**), 122.9 (**C-3'**), 103.3 (**C-5**), 91.1 (**C-1'**), 87.0 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.1 \text{ Hz}$, **C-4'**), 70.3 (dd, $^2J_{\text{CP}} = 5.9 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{CP}} = 2.1 \text{ Hz}$, **Ph-CH₂**), 68.0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.6 \text{ Hz}$, **C-5'**), 59.5 (**C-A**), 35.0 (**C-b**), 33.0, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 26.0 (**C-c**), 24.8 (**C-B**), 20.7 (**C-C**), 14.4 (**C-i**), 13.9 (**C-D**).

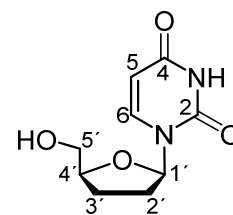
$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = -12.12 (d, $^2J_{\text{PP}} = 20.1 \text{ Hz}$, **P- α**), -12.90 (d, $^2J_{\text{PP}} = 21.3 \text{ Hz}$, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}] = 3190, 3053, 2956, 2926, 2855, 1757, 1691, 1509, 1462, 1426, 1379, 1248, 1216, 1201, 1167, 1142, 1107, 1044, 1009, 979, 917, 839, 768, 697, 653, 624, 510, 477, 431.

Darstellung von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-d4UTP 64

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante B)** durchgeführt. Zunächst wurden 0.28 g (0.31 mmol, 1.0 Äquiv.) *P,P*-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **198**, gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, mit 0.22 mL (0.32 g, 1.5 mmol, 5.0 Äquiv.) TFAA und 0.34 mL (0.25 g, 2.5 mmol, 8.0 Äquiv.) Triethylamin, gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, verestert. Aufgenommen

Ausbeute: Es wurden 4.8 g (23 mmol, 72%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 212.21 g/mol **Summenformel:** C₉H₁₂N₂O₄ **R_f Wert:** 0.34 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI):** *m/z*= ber.: 211.0724 [M-H]⁻, gef.: 211.0610.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.23 (bs, 1H, **NH**), 7.93 (d, ³*J*_{HH}= 8.0 Hz, 1H, **H-6**), 5.94 (dd, ³*J*_{HH}= 6.8 Hz, ³*J*_{HH}= 3.7 Hz, 1H, **H-1'**), 5.58 (dd, ³*J*_{HH}= 8.0 Hz, ⁴*J*_{HH}= 2.2 Hz, 1H, **H-5**), 5.01 (t, ³*J*_{HH}= 5.3 Hz, 1H, **OH**), 4.05-3.97 (m, 1H, **H-4'**), 3.70-3.63 (m, 1H, **H-5'_a**), 3.56-3.49 (m, 1H, **H-5'_b**), 2.34-2.21 (m, 1H, **H-2'_a**), 2.01-1.76 (m, 3H, **H-2'_b**, **H-3'**).

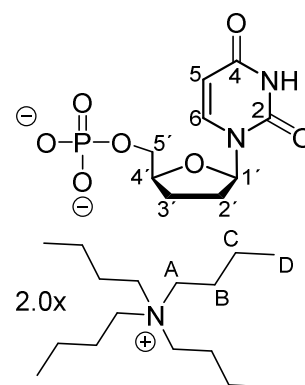
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 163.2 (**C-4**), 150.4 (**C-2**), 140.6 (**C-6**), 101.0 (**C-5**), 85.1 (**C-1'**), 81.5 (**C-4'**), 62.0 (**C-5'**), 31.8 (**C-2'**), 24.8 (**C-3'**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3369, 3169, 3095, 3050, 2995, 2968, 2952, 2909, 1686, 1656, 1618, 1468, 1409, 1397, 1373, 1315, 1295, 1271, 1179, 1100, 1065, 1044, 1025, 1000, 989, 968, 855, 831, 816, 784, 718, 654, 611, 578, 558, 520, 450, 416.

Darstellung von 2',3'-Dideoxyuridinmonophosphat 219 (ddUMP)

Die Reaktion wurde nach der **AAV 5 (Variante A)** durchgeführt. Das Phosphorylierungsreagenz wurde aus 0.31 mL (0.51 g, 3.3 mmol, 4.4 Äquiv.) Phosphorylchlorid, gelöst in 5.0 mL Acetonitril, 0.27 mL (0.26 g, 3.3 mmol, 4.4 Äquiv.) Pyridin sowie 30 µL (30 mg, 1.7 mmol, 2.2 Äquiv.) Wasser erhalten und anschließend mit 0.16 g (0.76 mmol, 1.0 Äquiv.) ddU **41** zur Reaktion gebracht (Reaktionszeit: 4 h). Die Neutralisation erfolgte mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (40% in Wasser). Die automatisierte RP18-Chromatographie musste zweimal durchgeführt werden.

Ausbeute: Es wurden 0.19 g (0.25 mmol, 33%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 775.11 g/mol **Summenformel:** C₉H₁₁N₂O₇P²⁻ **R_f-Wert:** 0.32 (*iso*-Propanol/NH₃/H₂O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** *m/z*= ber.: 291.039 [M-H]⁻, gef.: 291.049.



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 8.09 (d, ³*J*_{HH}= 8.1 Hz, 1H, **H-6**), 6.12 (dd, ³*J*_{HH}= 6.6 Hz, ⁴*J*_{HH}= 3.5 Hz, 1H, **H-1'**), 5.92 (d, ³*J*_{HH}= 8.1 Hz, 1H, **H-5**), 4.41-4.33 (m, 1H, **H-4'**), 4.12 (ddd, ²*J*_{HH}= 11.4 Hz, ³*J*_{HH}= 4.9 Hz, ³*J*_{HP}= 3.1 Hz, 1H, **H-5'_a**), 3.98-3.90 (m, 1H, **H-5'_b**), 3.27-3.12 (m, 16H, **H-A**), 2.51-2.38 (m, 1H, **H-2'_a**), 2.22-2.08 (m, 2H, **H-3'**), 2.07-1.95 (m, 1H, **H-2'_b**), 1.73-1.59 (m, 16H, **H-B**), 1.36 (sext, ³*J*_{HH}= 7.5 Hz, 16H, **H-C**), 0.95 (t, ³*J*_{HH}= 7.4 Hz, 24H, **H-D**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ [ppm]= 166.4 (**C-4**), 151.6 (**C-2**), 142.3 (**C-6**), 101.7 (**C-5**), 86.5 (**C-1'**), 80.9 (d, $^3J_{\text{CP}}= 8.4$ Hz, **C-4'**), 65.5 (d, $^2J_{\text{CP}}= 5.1$ Hz, **C-5'**), 58.1 (**C-A**), 31.5 (**C-2'**), 24.7 (**C-3'**), 23.1 (**C-B**), 19.1 (**C-C**), 12.8 (**C-D**).

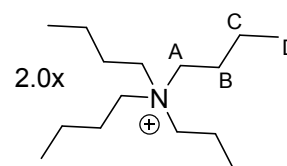
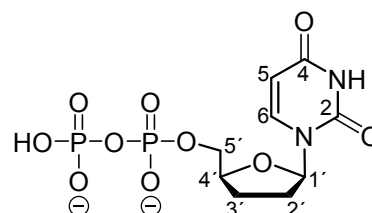
$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ [ppm]= 0.30.

IR: ν [cm^{-1}]= 3239, 2959, 2873, 1682, 1518, 1460, 1381, 1240, 1101, 1057, 930, 886, 808, 790, 714, 520.

Darstellung von 2',3'-Dideoxyuridindiphosphat 184 (ddUDP)

Die Reaktion wurde analog zu der **AAV 5 (Variante B)** in Kombination mit der **AAV 6** durchgeführt. Zur Darstellung des *cycloSal*-Triesters **179** wurden 0.14 g (0.66 mmol, 1.0 Äquiv.) ddU **41** in 18 mL abs. Acetonitril vorgelegt und mit 0.20 g (0.91 mmol, 1.4 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** sowie 0.18 mL (0.14 g, 1.1 mmol, 1.6 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 0.18 mL (0.99 mmol, 1.5 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan). Nach Extraktion wurde das 5-Cl-*cycloSal*-2',3'-dideoxyuridinmonophosphat **179** bei quantitativer Umsetzung in guter Reinheit erhalten und direkt weiter eingesetzt. Dafür wurden nach der **AAV 6** 0.12 g (0.29 mmol, 1.0 Äquiv.) Triester **179** mit 0.24 g (0.72 mmol, 2.5 Äquiv.) Mono(tetra-*n*-butylammonium)-monophosphat in 2.0 mL abs. DMF zur Reaktion gebracht. Die Reinigung erfolgte durch automatisierte RP18-Chromatographie (Wasser/Acetonitril-Gradienten: 5-100%, 0-90 min, Flussrate 1 mL/min).

Ausbeute: Es wurden 75 mg (88 μmol , 31% (über zwei Stufen)) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 855.09 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{P}_2^{2-}$ **R_f -Wert:** 0.18 (*iso*-Propanol/ $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** $m/z=$ ber.: 371.005 [M-H] $^-$, gef.: 371.018.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ [ppm]= 8.02 (d, $^3J_{\text{HH}}= 8.1$ Hz, 1H, **H-6**), 6.10 (dd, $^3J_{\text{HH}}= 6.8$ Hz, $^4J_{\text{HH}}= 3.8$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.92 (d, $^3J_{\text{HH}}= 8.1$ Hz, 1H, **H-5**), 4.42-4.35 (m, 1H, **H-4'**), 4.27-4.21 (m, 1H, **H-5'a**), 4.11-4.05 (m, 1H, **H-5'b**), 3.27-3.11 (m, 16H, **H-A**), 2.51-2.38 (m, 1H, **H-2'a**), 2.20-2.08 (m, 2H, **H-3'**), 2.11-1.95 (m, 1H, **H-2'b**), 1.72-1.57 (m, 16H, **H-B**), 1.36 (sext, $^3J_{\text{HH}}= 7.4$ Hz, 16H, **H-C**), 0.94 (t, $^3J_{\text{HH}}= 7.4$ Hz, 24H, **H-D**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ [ppm]= 166.3 (**C-4**), 151.5 (**C-2**), 142.3 (**C-6**), 101.8 (**C-5**), 86.5 (**C-1'**), 80.6 (**C-4'**), 66.5 (**C-5'**), 58.1 (**C-A**), 31.5 (**C-2'**), 24.7 (**C-3'**), 23.1 (**C-B**), 19.1 (**C-C**), 12.8 (**C-D**).

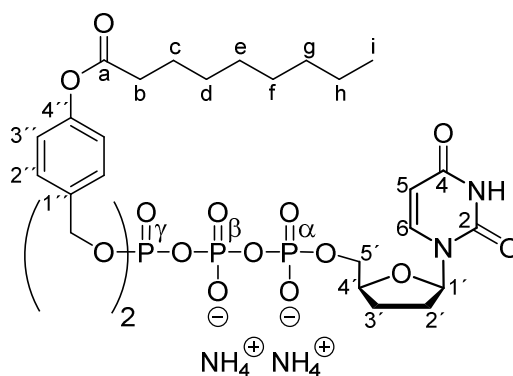
$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ [ppm]= -10.60- -11.40 (m, **P- α** , **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}] = 3202, 2960, 2874, 1682, 1487, 1464, 1381, 1222, 1099, 1057, 930, 880, 808, 737, 714, 508.

Darstellung von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-ddUTP 65

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante B)** durchgeführt. Zunächst wurden 0.23 g (0.25 mmol, 1.0 Äquiv.) *P,P*-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **198**, gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, mit 0.18 mL (0.26 g, 1.3 mmol, 5.0 Äquiv.) TFAA und 0.28 mL (0.20 g, 2.0 mmol, 8.0 Äquiv.) Triethylamin, gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, verestert. Aufgenommen in 4.0 mL abs. Acetonitril folgte die Aktivierung mit 60 μL (62 mg, 0.75 mmol, 3.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 0.17 mL (0.13 g, 1.5 mmol, 5.0 Äquiv.) Triethylamin, bevor 78 mg (91 μmol , 0.36 Äquiv.) ddUMP **219** ($2.0\times \text{Bu}_4\text{N}^+$), gelöst in 5.0 mL abs. Acetonitril, hinzugeotropft wurden.

Ausbeute: Es wurden 35 mg (36 μmol , 39%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 978.90 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{P}_3^{2-}$ **UV (HPLC):** λ_{max} = 263 nm **HPLC:** t_{R} = 16.47 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 943.295 $[\text{M}-\text{H}]^-$, gef.: 943.433.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 8.03 (d,

$^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, 1H, **H-6**), 7.48-7.36 (m, 4H, **H-2'**), 7.14-7.01 (m, 4H, **H-3'**), 6.07-6.00 (m, 1H, **H-1'**), 5.79 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, 1H, **H-5**), 5.19 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.34-4.20 (m, 2H, **H-5'_a**, **H-4'**), 4.20-4.11 (m, 1H, **H-5'_b**), 2.60 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 4H, **H-b**), 2.39-2.27 (m, 1H, **H-2'_a**), 2.11-1.95 (m, 3H, **H-2'_b**, **H-3'**), 1.76 (quint, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 4H, **H-c**), 1.51-1.27 (m, 20H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.94 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, 6H, **H-i**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.7 (**C-a**), 166.4 (**C-4**), 152.4 (**C-2**), 152.3 (**C-4'**), 142.7 (**C-6**), 134.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.6$ Hz, **C-1'**), 130.5 (d, $^4J_{\text{CP}} = 2.4$ Hz, **C-2'**), 122.9 (**C-3'**), 102.5 (**C-5**), 87.6 (**C-1'**), 81.5 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.8$ Hz, **C-4'**), 70.4 (dd, $^2J_{\text{CP}} = 5.8$ Hz, $^4J_{\text{CP}} = 2.1$ Hz, **Ph-CH₂**), 68.0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.8$ Hz, **C-5'**), 35.0 (**C-b**), 33.2 (**C-2'**), 33.0, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 26.3 (**C-3'**), 26.0 (**C-c**), 14.4 (**C-i**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = -11.43 (bs, **P- α**), -13.16 (d, $^2J_{\text{PP}} = 17.5$ Hz, **P- γ**), -23.63 (bs, **P- β**).

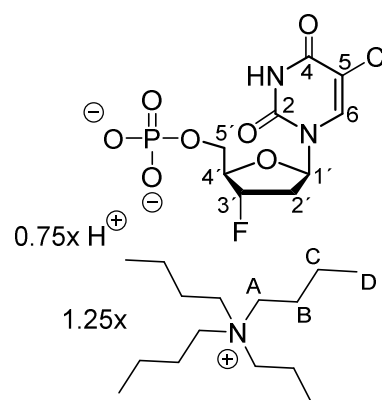
IR: ν [cm^{-1}] = 3204, 3052, 2956, 2925, 2855, 1757, 1692, 1509, 1463, 1379, 1264, 1218, 1203, 1168, 1133, 1106, 1085, 1026, 1009, 927, 816, 721, 524.

5.2.16 Synthese eines FddCIU-Triphosphat-Prodrugs 66

Darstellung von 3'-Fluoro-2',3'-didesoxy-5-chloruridinmonophosphat 217 (FddCIUMP)

Die Reaktion wurde nach der **AAV 5 (Variante B)** durchgeführt. Es wurden zunächst 0.20 g (0.75 mmol, 1.0 Äquiv.) FddCIU **113**, gelöst in 8.0 mL abs. Acetonitril, mit 0.20 mL (0.16 g, 1.2 mmol, 1.6 Äquiv.) Diisopropylethylamin und 0.22 g (0.97 mmol, 1.3 Äquiv.) 5-Chlor-saligenylchlorophosphit **93** zur Reaktion gebracht. Nach der Oxidation mit 0.22 mL (1.2 mmol, 1.6 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) und Extraktion erfolgte die Hydrolyse des erhaltenen Triesters in 10 mL eines Acetonitril/Wasser/Triethylamin-Gemisches (2:2:1 v/v/v).

Ausbeute: Es wurden 0.26 g (0.40 mmol, 54%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 646.45 g/mol
Summenformel: C₉H₉ClFN₂O₇P²⁻ **R_r-Wert:** 0.38 (*iso*-Propanol/NH₃/H₂O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** *m/z*= ber.: 342.990 [M-H]⁻, gef.: 342.998.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 8.18 (s, 1H, **H-6**), 6.33 (dd, ³J_{HH}= 9.4 Hz, ³J_{HH}= 5.3 Hz, 1H, **H-1'**), 5.50 (dd, ²J_{HF}= 53.7 Hz, ³J_{HH}= 4.4 Hz, 1H, **H-3'**), 4.37 (ddt, ³J_{HF}= 27.3 Hz, ³J_{HH}= 4.0 Hz, ⁴J_{HH}= 2.3 Hz, 1H, **H-4'**), 4.13 (ddd, ²J_{HH}= 11.4 Hz, ³J_{HH}= 6.3 Hz, ⁴J_{HH}= 2.7 Hz, 1H, **H-5'a**), 4.04-3.97 (m, 1H, **H-5'b**), 3.29-3.17 (m, 10H, **H-A**), 2.57-2.29 (m, 2H, **H-2'**), 1.75-1.56 (m, 10H, **H-B**), 1.42 (sext, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 10H, **H-C**), 1.03 (t, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 15H, **H-D**).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 163.1 (**C-4**), 152.5 (**C-2**), 138.8 (**C-6**), 110.3 (**C-5**), 96.3 (d, ¹J_{CF}= 175.0 Hz, **C-3'**), 86.8 (**C-1'**), 86.0 (dd, ²J_{CF}= 24.9 Hz, ³J_{CP}= 8.7 Hz, **C-4'**), 65.5 (dd, ²J_{CF}= 11.7 Hz, ²J_{CP}= 5.1 Hz, **C-5'**), 59.5 (**C-A**), 39.2 (d, ²J_{CF}= 21.2 Hz, **C-2'**), 24.8 (**C-B**), 20.7 (**C-C**), 13.9 (**C-D**).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 1.36.

¹⁹F-NMR (188 MHz (gekoppelt), CD₃OD): δ [ppm]= -175.3- -176.5.

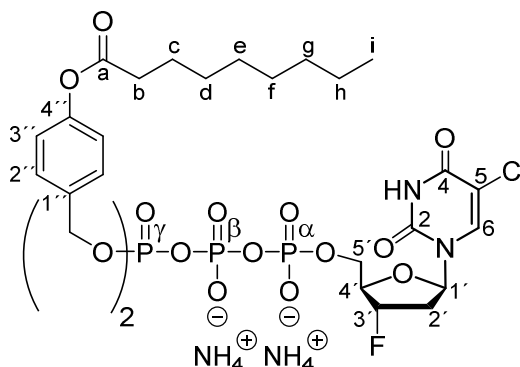
IR: ν [cm⁻¹]= 2961, 2942, 2875, 1694, 1650, 1626, 1539, 1486, 1461, 1438, 1382, 1352, 1278, 1183, 1146, 1107, 1056, 986, 962, 963, 926, 892, 793, 774, 757, 737, 698, 639, 602, 548, 519, 450, 424.

Darstellung von γ-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-FddCIUTP 66

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante B)** durchgeführt. Zunächst wurden 0.26 g (0.29 mmol, 1.0 Äquiv.) *P,P*-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **198**, gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, mit 0.19 mL (0.28 g, 1.3 mmol, 4.6 Äquiv.) TFAA und 0.30 mL (0.22 g, 2.2 mmol, 7.6 Äquiv.) Triethylamin, gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, verestert. Aufgenommen in 2.0 mL abs. Acetonitril folgte die Aktivierung mit 64 µL (66 mg, 0.80 mmol, 2.8 Äquiv.)

1-Methylimidazol und 0.19 mL (0.14 g, 0.68 mmol, 4.7 Äquiv.) Triethylamin, bevor 0.14 g (0.21 mmol, 0.7 Äquiv.) Mono(tetra-*n*-butylammonium)-FddCIUMP **217**, gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, hinzugetropft wurden.

Ausbeute: Es wurden 75 mg (73 μ mol, 35%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1031.34 g/mol **Summenformel:** $C_{41}H_{55}ClFN_2O_{17}P_3^{2-}$ **UV (HPLC):** λ_{max} = 273 nm **HPLC:** t_R = 16.90 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 995.245 [M-H]⁻, gef.: 995.247.



¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 8.13 (s, 1H, **H-6**), 7.46-7.37 (m, 4H, **H-2''**), 7.11-7.01 (m, 4H, **H-3''**), 6.29 (dd, ³ J_{HH} = 9.3 Hz, ³ J_{HH} = 5.4 Hz, 1H, **H-1'**), 5.48 (dd, ² J_{HF} = 53.4 Hz, ³ J_{HH} = 4.4 Hz, 1H, **H-3'**), 5.17 (d, ³ J_{HP} = 8.1 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.44-4.10 (m, 3H, **H-4'**, **H-5'**), 2.58 (t, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 4H, **H-b**), 2.55-2.21 (m, 2H, **H-2'**), 1.74 (quint, ³ J_{HH} = 7.3 Hz, 4H, **H-c**), 1.51-1.22 (m, 20H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.96-0.86 (m, 6H, **H-i**).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 173.7 (**C-a**), 161.4 (**C-4**), 152.3 (**C-4''**), 151.3 (**C-2**), 139.0 (**C-6**), 134.9 (d, ³ J_{CP} = 7.5 Hz, **C-1''**), 130.5 (d, ⁴ J_{CP} = 2.6 Hz, **C-2''**), 122.9 (**C-3''**), 110.0 (**C-5**), 96.1 (d, ¹ J_{CF} = 177.1 Hz, **C-3'**), 85.5 (**C-1'**), 85.4 (d, ² J_{CF} = 25.3 Hz, **C-4'**), 70.4 (dd, ² J_{CP} = 5.5 Hz, ⁴ J_{CP} = 3.1 Hz, **Ph-CH₂**), 66.5 (**C-5'**), 39.0 (d, ² J_{CF} = 21.4 Hz, **C-2'**), 35.0 (**C-b**), 33.0, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 26.0 (**C-c**), 14.4 (**C-i**).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = -11.94 (d, ² J_{PP} = 19.7 Hz, **P- α**), -13.11 (d, ² J_{PP} = 17.4 Hz, **P- β**), -23.59 (bs, **P- β**).

¹⁹F-NMR (188 MHz (gekoppelt), CD₃OD): δ [ppm] = -175.3- -176.2.

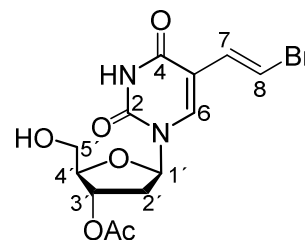
IR: ν [cm⁻¹] = 3178, 3054, 2955, 2924, 2854, 1757, 1703, 1509, 1458, 1253, 1201, 1131, 1111, 1075, 1010, 922, 525.

5.2.17 Synthese eines BVdU-Triphosphat-Prodrugs 67

Darstellung von 3'-O-Acetyl-BVdU 154

Die Reaktion wurde nach der **AAV 13** durchgeführt. Es wurden 0.30 g (0.90 mmol, 1.0 Äquiv.) (*E*)-5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxyuridin **49**, gelöst in 7.0 mL abs. Pyridin, mit 0.16 g (1.1 mmol, 1.2 Äquiv.) TBDMSCl und 0.34 mL (0.37 g, 3.6 mmol, 4.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid versetzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels und der Aufnahme des Rückstands in 5.0 mL abs. THF wurden 1.5 mL (1.5 mmol, 1.7 Äquiv.) TBAF (1 M in THF) hinzugegeben. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 0.28 g (0.75 mmol, 83%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 375.18 g/mol **Summenformel:** $C_{13}H_{15}BrN_2O_6$ **R_f-Wert:** 0.71 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** m/z = ber.: 397.0006 $[M+Na]^+$, gef.: 396.9990.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.62 (s, 1H, **NH**), 8.07 (s, 1H, **H-6**), 7.25 (d, ² J_{HH} = 13.6 Hz, 1H, **H-8**), 6.85 (d, ² J_{HH} = 13.6 Hz, 1H, **H-7**), 6.15 (dd, ³ J_{HH} = 7.8 Hz, ³ J_{HH} = 6.3 Hz, 1H, **H-1'**), 5.25-5.20 (m, 2H, **H-3'**, **OH**), 4.04-3.99 (m, 1H, **H-4'**), 3.70-3.59 (m, 2H, **H-5'**), 2.38-2.25 (m, 2H, **H-2'**), 2.06 (s, 3H, **Ac-CH₃**).

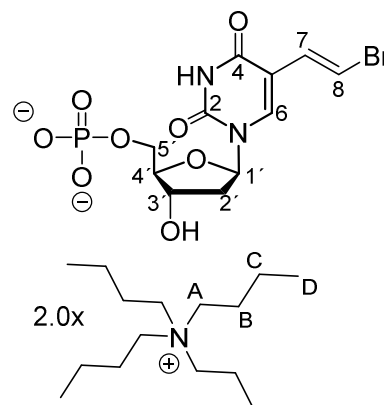
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 170.0 (**CH₃CO**), 161.6 (**C-4**), 149.3 (**C-2**), 139.1 (**C-6**), 129.7 (**C-7**), 110.0 (**C-5**), 106.8 (**C-8**), 84.9 (**C-4'**), 84.4 (**C-1'**), 74.4 (**C-3'**), 61.2 (**C-5'**), 37.0 (**C-2'**), 20.9 (**Ac-CH₃**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3401, 3196, 3056, 2933, 1675, 1596, 1464, 1369, 1232, 1194, 1098, 1063, 1017, 934, 801, 556, 531, 396.

Darstellung von BVdU-Monophosphat 118 (BVdUMP)

Die Reaktion wurde nach der **AAV 5 (Variante B)** durchgeführt. Es wurden zunächst 0.20 g (0.54 mmol, 1.0 Äquiv.) 3'-*O*-Acetyl-BVdU **154**, gelöst in 5.0 mL abs. Acetonitril, mit 0.14 mL (0.11 g, 0.81 mmol, 1.5 Äquiv.) Diisopropylethylamin und 0.15 g (0.68 mmol, 1.3 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** zur Reaktion gebracht. Nach der Oxidation mit 0.15 mL (0.83 mmol, 1.5 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) und Extraktion erfolgte die Hydrolyse des Triesters in 10 mL eines Acetonitril/Wasser/Triethylamin-Gemisches (2:2:1 v/v/v). Anschließend wurde die Reaktionslösung nach Zugabe von 11 mL eines Gemisches aus Methanol/Wasser/Triethylamin (7:3:1 v/v/v) für 20 Stunden gerührt.

Ausbeute: Es wurden 0.20 g (0.22 mmol, 42%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 896.04 g/mol **Summenformel:** $C_{11}H_{12}BrN_2O_8P^{2-}$ **R_f-Wert:** 0.53 (*iso*-Propanol/ NH_3/H_2O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 410.960 $[M-H]^-$, gef.: 410.932.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 8.06 (s, 1H, **H-6**), 7.42 (d, ² J_{HH} = 13.6 Hz, 1H, **H-8**), 7.02 (d, ² J_{HH} = 13.6 Hz, 1H, **H-7**), 6.33 (dd, ³ J_{HH} = 8.0 Hz, ³ J_{HH} = 5.9 Hz, 1H, **H-1'**), 4.59-4.52 (m, 1H, **H-3'**), 4.11-3.97 (m, 3H, **H-4'**, **H-5'**), 3.28-3.17 (m, 16H, **H-A**), 2.38-2.27 (m, 1H, **H-2'**_a), 2.22 (ddd, ² J_{HH} = 13.5 Hz, ³ J_{HH} = 5.9 Hz, ³ J_{HH} = 2.7 Hz, 1H, **H-2'**_b), 1.73-1.59 (m, 16H, **H-B**), 1.42 (sext, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 16H, **H-C**), 1.02 (t, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 24H, **H-D**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 163.9 (**C-4**), 151.3 (**C-2**), 140.6 (**C-6**), 130.9 (**C-7**), 112.4 (**C-5**), 108.9 (**C-8**), 88.4 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.7$ Hz, **C-4'**), 86.5 (**C-1'**), 73.0 (**C-3'**), 65.5 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.1$ Hz, **C-5'**), 59.5 (**C-A**), 41.0 (**C-2'**), 24.8 (**C-B**), 20.7 (**C-C**), 13.9 (**C-D**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 2.37.

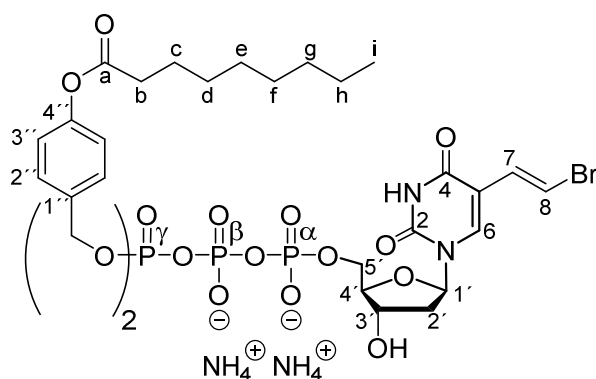
IR: ν [cm^{-1}]= 3168, 2960, 2934, 2874, 1676, 1638, 1534, 1485, 1380, 1279, 1239, 1176, 1091, 1051, 999, 965, 941, 882, 804, 759, 737, 667, 614, 529, 510, 431.

Darstellung von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-BVdUTP 67

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante B)** durchgeführt. Zunächst wurden 0.29 g (0.32 mmol, 1.0 Äquiv.) *P,P*-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **198**, gelöst in 4.0 mL abs. Acetonitril, mit 0.22 mL (0.33 g, 1.6 mmol, 5.0 Äquiv.) TFAA und 0.35 mL (0.26 g, 2.5 mmol, 8.0 Äquiv.) Triethylamin, gelöst in 2.0 mL Acetonitril, verestert. Aufgenommen in 3.0 mL abs. Acetonitril folgte die Aktivierung mit 76 μL (78 mg, 0.95 mmol, 3.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 0.22 mL (0.16 g, 1.6 mmol, 5.0 Äquiv.) Triethylamin, bevor 0.15 g (0.17 mmol, 0.5 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-BVdUMP **118**, gelöst in 5.0 mL abs. Acetonitril, hinzugegotft wurden.

Ausbeute: Es wurden 82 mg (75 μmol , 44%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Molmasse: 1099.84 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{43}\text{H}_{58}\text{BrN}_2\text{O}_{18}\text{P}_3^{2-}$ **UV (HPLC):** $\lambda_{\text{max}(1)} = 250$ nm, $\lambda_{\text{max}(2)} = 294$ nm **HPLC:** $t_{\text{R}} = 17.05$ min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z ber.: 1063.217 [M-H] $^-$, gef.: 1063.223.



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 7.95 (s, 1H, **H-6**), 7.45-7.35 (m, 5H, **H-8**, **H-2''**), 7.09-6.97 (m, 5H, **H-7**, **H-3''**), 6.29 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.18 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.59-4.53 (m, 1H, **H-3'**), 4.31-4.17 (m, 2H, **H-5'**), 4.07-4.01 (m, 1H, **H-4'**), 2.58 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 4H, **H-b**), 2.27-2.20 (m, 2H, **H-2'a**), 1.74 (quint, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, **H-c**), 1.51-1.27 (m, 20H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.97-0.87 (m, 6H, **H-i**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 173.8 (**C-a**), 163.6 (**C-4**), 152.3 (**C-2**), 151.2 (**C-4'**), 140.2 (**C-6**), 134.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.3$ Hz, **C-1''**), 130.7 (**C-7**), 130.5 (d, $^4J_{\text{CP}} = 3.8$ Hz, **C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 112.4 (**C-5**), 108.9 (**C-8**), 87.4 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.2$ Hz, **C-4'**), 86.5 (**C-1'**), 72.2 (**C-3'**), 70.4 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.9$ Hz, **Ph-CH₂**), 66.7 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.7$ Hz, **C-5'**), 40.8 (**C-2'**), 35.0 (**C-b**), 33.0, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 26.0 (**C-c**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= -11.56 (d, $^2J_{\text{PP}} = 19.4$ Hz, **P- α**), -13.18 (d, $^2J_{\text{PP}} = 17.0$ Hz, **P- γ**), -23.57 (d, $^2J_{\text{PP}} = 18.7$ Hz, **P- β**).

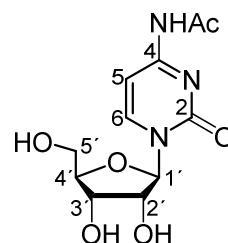
IR: ν [cm^{-1}] = 3200, 2955, 2924, 2854, 1755, 1684, 1509, 1463, 1252, 1216, 1167, 1008, 924, 723, 510.

5.2.18 Synthese eines ddC-Triphosphat-Prodrugs 68

Darstellung von *N*⁴-Acetylcytidin 158

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zunächst wurden 8.0 g (33 mmol, 1.0 Äquiv.) Cytidin **157** einmal in abs. DMF coevaporiert. Nach Aufnahme in 80 mL abs. DMF wurden tropfenweise 3.7 mL (4.0 g, 39 mmol, 1.2 Äquiv.) Essigsäureanhydrid hinzugefügt und die Lösung wurde für 20 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mL Methanol gequenchet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Außerdem wurde der Rückstand dreimal mit Toluol coevaporiert, bevor eine Umkristallisation aus Diethylether/Methanol (10:1 v/v) durchgeführt wurde.

Ausbeute: Es wurden 8.8 g (31 mmol, 94%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 285.26 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_6$ **R_f** **Wert:** 0.29 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) **MALDI-MS (ESI⁺):** m/z = ber.: 308.0853 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, 593.1814 [$2\text{M}+\text{Na}$]⁺, gef.: 308.0849, 593.1831.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.85 (s, 1H, **NH**), 8.41 (d, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 1H, **H-6**), 7.17 (d, ³ J_{HH} = 7.4 Hz, 1H, **H-5**), 5.78 (d, ⁴ J_{HH} = 2.8 Hz, 1H, **H-1'**), 5.45 (d, ³ J_{HH} = 4.7 Hz, 1H, **2'-OH**), 5.13 (t, ³ J_{HH} = 5.1 Hz, 1H, **5'-OH**), 5.02 (d, ³ J_{HH} = 5.3 Hz, 1H, **3'-OH**), 4.02-3.92 (m, 2H, **H-2'**, **H-3'**), 3.92-3.86 (m, 1H, **H-4'**), 3.73 (ddd, ² J_{HH} = 12.3 Hz, ³ J_{HH} = 5.2 Hz, ⁴ J_{HH} = 2.8 Hz, 1H, **H-5'_a**), 3.59 (ddd, ² J_{HH} = 12.3 Hz, ³ J_{HH} = 5.1 Hz, ⁴ J_{HH} = 3.2 Hz, 1H, **H-5'_b**), 2.10 (s, 3H, **Ac-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 171.0 (**CH₃CO**), 162.3 (**C-4**), 154.7 (**C-2**), 145.4 (**C-6**), 95.2 (**C-5**), 90.2 (**C-1'**), 84.2 (**C-4'**), 74.5 (**C-2'**), 68.7 (**C-3'**), 60.0 (**C-5'**), 24.4 (**Ac-CH₃**).

IR: ν [cm^{-1}] = 3469, 3260, 2677, 2936, 2841, 1715, 1638, 1603, 1579, 1488, 1429, 1397, 1325, 1305, 1272, 1226, 1193, 1130, 1110, 1099, 1070, 1044, 1023, 998, 969, 815, 775, 740, 653, 627, 575, 543, 503, 449.

Darstellung von 2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxycytidin 161 (d4C)

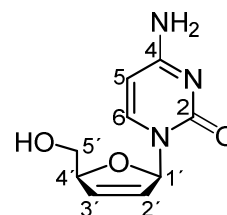
Es wurden 8.5 g (30 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*⁴-Acetylcytidin **158** mit 8.5 mL (9.1 g, 90 mmol, 3.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid für 17 Stunden bei 50 °C in 85 mL Bromwasserstoffsäure (30%) in Essigsäure gerührt. Anschließend wurde einmal mit 400 mL Dichlormethan extrahiert und die organische Phase vorsichtig zweimal mit je 200 mL einer 0.05 M Kaliumphosphatlösung sowie einmal mit 200 mL einer gesättigten Natriumhydrogen-

carbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 100 mL Acetonitril aufgenommen und mit 4.0 g eines Zn-Cu-Kupplungsreagenzes (s. unten) unter starkem Rühren versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 Stunden gerührt und im Anschluss über Celite 545 (0.1-0.02 mm) filtriert. Der Filterkuchen wurde mit 200 mL Acetonitril gespült und das Filtrat unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in 200 mL Dichlormethan gelöst und mit 8.0 g Dinatriummethylen-diamin-tetraacetat (EDTA) sowie 8.0 g Natriumhydrogencarbonat, gelöst in 80 mL Wasser, für 1.5 Stunden unter starkem Rühren behandelt. Die Reaktionslösung wurde erneut über Celite filtriert und das Filtermaterial mit 200 mL Dichlormethan gespült. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, wodurch ein rot-brauner Schaum erhalten wurde. Dieser wurde mit 100 mL Methanol und 50 mL konzentriertem Ammoniak versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 18 Stunden gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch zweimalige Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 4:1 v/v) gereinigt.

Darstellung des Zink-Kupfer-Kupplungsreagenzes:

10.0 g Zinkstaub wurden dreimal für fünf Minuten mit je 10 mL 3%iger Salzsäure behandelt und anschließend viermal mit 6.0 mL Wasser gewaschen. Es folgte die Behandlung mit 0.53 g Kupfer(II)-sulfat, gelöst in 17 mL Wasser. Zudem schlossen sich weitere Waschvorgänge an: Je Viermal mit 7.0 mL Wasser, Ethanol und Diethylether. Abschließend wurde das Reagenz für 20 Stunden im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: Es wurden 2.1 g (9.9 mmol, 33%) eines farblosen Schaums erhalten. **Molmasse:** 209.21 g/mol **Summenformel:** C₉H₁₁N₃O₃ **R_f-Wert:** 0.23 (CH₂Cl₂/MeOH 4:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 210.0873 [M+H]⁺, 232.0693 [M+Na]⁺, 419.1674 [2M+H]⁺, 441.1493 [2M+Na]⁺, gef.: 210.0878, 232.0699, 419.1681, 441.1470.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 7.67 (d, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 1H, **H-6**), 7.19, 7.13 (bs, 2H, **NH₂**), 6.88 (dt, ³J_{HH}= 3.3 Hz, ⁴J_{HH}= 1.6 Hz, 1H, **H-1'**), 6.33 (d, ³J_{HH}= 6.0 Hz, ⁴J_{HH}= 1.7 Hz, 1H, **H-3'**), 5.88 (ddd, ³J_{HH}= 5.9 Hz, ⁴J_{HH}= 2.8 Hz, ⁴J_{HH}= 1.4 Hz, 1H, **H-2'**), 5.69 (d, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 1H, **H-5**), 4.94 (t, ³J_{HH}= 5.2 Hz, 1H, **OH**), 4.78-4.72 (m, 1H, **H-4'**), 3.59-3.53 (m, 2H, **H-5'**).

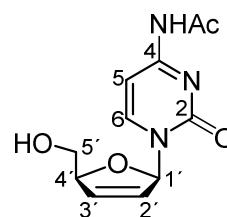
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 165.7 (**C-4**), 155.4 (**C-2**), 141.6 (**C-6**), 134.0 (**C-3'**), 126.8 (**C-2'**), 94.1 (**C-5**), 89.8 (**C-1'**), 87.1 (**C-4'**), 62.7 (**C-5'**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3319, 3188, 2921, 1722, 1639, 1603, 1524, 1481, 1404, 1359, 1277, 1226, 1182, 1123, 1067, 1037, 984, 850, 783, 691, 616, 593, 542, 391.

Darstellung von *N*⁴-Acetyl-2',3'-didehydro-2',3'-didesoxycytidin **162**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 2.0 g (9.3 mmol, 1.0 Äquiv.) d4C **161** in 50 mL abs. DMF aufgenommen, mit 0.97 mL (1.1 g, 10 mmol, 1.1 Äquiv.) Essigsäureanhydrid versetzt und die Reaktionslösung für 20 Stunden gerührt. Da dünnschichtchromatographisch noch Edukt **161** detektiert werden konnte, wurden weitere 0.10 mL (0.11 g, 1.0 mmol, 0.1 Äquiv.) Essigsäureanhydrid hinzugefügt und die Reaktionszeit um drei Stunden verlängert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand einmal mit Toluol coevaporiert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 4:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 1.8 g (7.3 mmol, 78%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 251.24 g/mol **Summenformel:** C₁₁H₁₃N₃O₄ **R_rWert:** 0.92 (CH₂Cl₂/MeOH 4:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 274.0798 [M+Na]⁺, gef.: 274.0801.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.87 (bs, 1H, **NH**), 8.21 (d, ³*J*_{HH}= 7.5 Hz, 1H, **H-6**), 7.15 (d, ³*J*_{HH}= 7.5 Hz, 1H, **H-5**), 6.89-6.85 (m, 1H, **H-1'**), 6.39 (dt, ³*J*_{HH}= 6.1 Hz, ⁴*J*_{HH}= 1.6 Hz, 1H, **H-3'**), 5.98 (dt, ³*J*_{HH}= 6.1 Hz, ⁴*J*_{HH}= 1.6 Hz, 1H, **H-2'**), 5.00 (t, ³*J*_{HH}= 5.3 Hz, 1H, **OH**), 4.88-4.82 (m, 1H, **H-4'**), 3.66-3.56 (m, 2H, **H-5'**), 2.10 (s, 3H, **Ac-CH₃**).

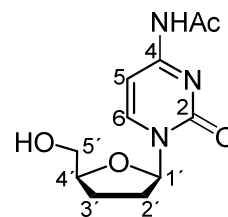
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 171.0 (CH₃CO), 162.5 (**C-4**), 154.9 (**C-2**), 145.8 (**C-6**), 134.5 (**C-3'**), 126.2 (**C-2'**), 95.4 (**C-5**), 90.7 (**C-1'**), 87.9 (**C-4'**), 62.3 (**C-5'**), 24.3 (**Ac-CH₃**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3212, 3036, 2976, 2927, 2899, 1705, 1688, 1643, 1564, 1500, 1487, 1440, 1393, 1382, 1337, 1315, 1297, 1245, 1168, 1128, 1084, 1039, 1002, 988, 940, 897, 851, 814, 794, 785, 706, 692, 666, 596, 548, 488, 451.

Darstellung von *N*⁴-Acetyl-2',3'-dideoxycytidin **156**

In Gegenwart von 70 mg Pd/C (10%) wurden 0.70 g (2.8 mmol) *N*⁴-Acetyl-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidin **162**, gelöst in 10 mL abs. Methanol, in Wasserstoffatmosphäre für acht Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite 545 (0.1-0.02 mm) filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierte RP18-Säulenchromatographie mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 0.48 g (1.9 mmol, 67%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 253.26 g/mol **Summenformel:** C₁₁H₁₅N₃O₄ **R_fWert:** 0.34 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 254.1135 [M+H]⁺, 276.0937 [M+Na]⁺, gef.: 254.1134, 276.0937.



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.81 (bs, 1H, **NH**), 8.46 (dd, ³*J*_{HH}= 7.5 Hz, ⁴*J*_{HH}= 1.4 Hz, 1H, **H-6**), 7.17 (dd, ³*J*_{HH}= 7.5 Hz, ⁴*J*_{HH}= 1.4 Hz, 1H, **H-5**), 5.94-5.90 (m, 1H, **H-1'**), 5.09 (bs, 1H, **OH**), 4.12-4.06 (m, 1H, **H-4'**), 3.77-3.72 (m, 1H, **H-5'a**), 3.61-3.52 (m, 1H, **H-5'b**), 2.40-2.32 (m, 1H, **H-2'a**), 2.09 (s, 3H, **Ac-CH₃**), 1.99-1.92 (m, 1H, **H-2'b**), 1.88-1.82 (m, 1H, **H-3'a**), 1.80-1.72 (m, 1H, **H-3'b**).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 170.9 (CH₃CO), 162.2 (**C-4**), 154.5 (**C-2**), 145.1 (**C-6**), 95.6 (**C-5**), 86.7 (**C-1'**), 82.7 (**C-4'**), 61.6 (**C-5'**), 32.8 (**C-2'**), 24.4 (**Ac-CH₃**), 24.0 (**C-3'**).

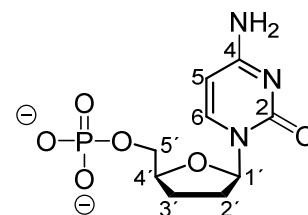
IR: ν [cm⁻¹]= 3371, 3291, 3128, 2917, 2878, 1692, 1642, 1552, 1493, 1429, 1377, 1308, 1245, 1181, 1159, 1095, 1074, 994, 966, 944, 932, 825, 812, 790, 772, 717, 658, 591, 543, 454, 408.

Darstellung von 2',3'-dideoxycytidinmonophosphat 122 (ddCMP)

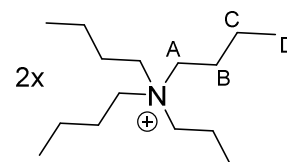
Die Reaktion wurde nach der **AAV 5 (Variante B)** durchgeführt. Es wurden zunächst 0.30 g (1.2 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*⁴-Acetyl-2',3'-dideoxycytidin **156**, gelöst in 10 mL abs. Acetonitril, mit 0.36 mL (0.28 g, 2.1 mmol, 1.8 Äquiv.) Diisopropylethylamin und 0.40 g (1.8 mmol, 1.5 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** zur Reaktion gebracht. Nach der Oxidation mit 0.39 mL (2.2 mmol, 1.8 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) und Extraktion erfolgte die Hydrolyse des gebildeten Triesters in 12.5 mL Acetonitril/Wasser/Triethylamin (2:2:1 v/v/v). Außerdem wurde die Lösung mit 22 mL eines Gemisches aus Methanol/Wasser/Triethylamin (7:3:1 v/v/v) für zwei Tage gerührt.

Das Produkt wies nach Ionenaustausch- und RP18-Säulenchromatographie noch 0.5 Äquiv. Tetra-*n*-butylammoniumacetat (TBAA) als Verunreinigung auf. Die nachfolgenden Angaben und Berechnungen verstehen sich exklusive der Verunreinigung.

Ausbeute: Es wurden 0.46 g (0.59 mmol, 50%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 774.13 g/mol **Summenformel:** C₉H₁₂N₃O₆P²⁻ **R_fWert:** 0.39 (*iso*-Propanol/NH₃/H₂O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** *m/z*= ber.: 290.055 [M-H]⁻, gef.: 290.122.



¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 8.40 (d, ³*J*_{HH}= 7.4 Hz, 1H, **H-6**), 6.01 (dd, ³*J*_{HH}= 6.7 Hz, ³*J*_{HH}= 3.4 Hz, 1H, **H-1'**), 5.98 (d, ³*J*_{HH}=



7.4 Hz, 1H, **H-5**), 4.28-4.19 (m, 1H, **H-4'**), 4.14 (dt, $^2J_{\text{HH}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.5$ Hz, 1H, **H-5'a**), 3.98 (ddd, $^2J_{\text{HH}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.2$ Hz, 1H, **H-5'b**), 3.26-3.16 (m, 16H, **H-A**), 2.38-2.23 (m, 1H, **H-2'a**), 2.19-1.98 (m, 3H, **H-2'b**, **H-3'**), 1.73-1.54 (m, 16H, **H-B**), 1.40 (sext, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 16H, **H-C**), 1.00 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 24H, **H-D**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 167.8 (**C-4**), 158.5 (**C-2**), 144.1 (**C-6**), 95.7 (**C-5**), 88.3 (**C-1'**), 83.0 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.1$ Hz, **C-4'**), 65.5 (**C-5'**), 59.4 (**C-A**), 34.1 (**C-2'**), 24.8 (**H-B**), 23.4 (**C-3'**), 20.7 (**C-C**), 13.9 (**C-D**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 4.50.

IR: ν [cm^{-1}]= 3339, 2961, 2875, 1646, 1580, 1488, 1383, 1279, 1106, 1067, 967, 885, 793, 535.

Darstellung von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-ddCTP **68**

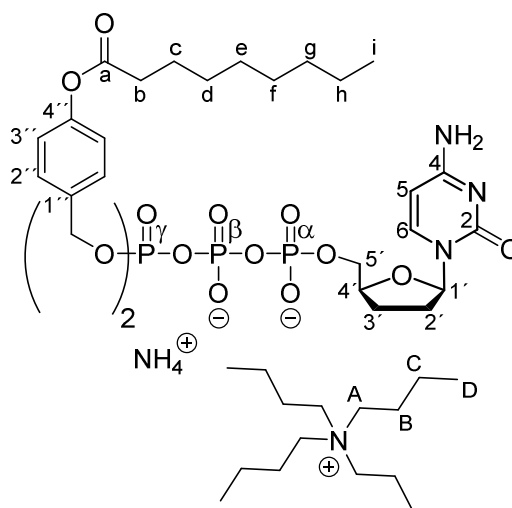
Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante B)** durchgeführt. Zunächst wurden 0.32 g (0.35 mmol, 1.0 Äquiv.) *P,P*-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **198**, gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, mit 0.22 mL (0.33 g, 1.6 mmol, 4.5 Äquiv.) TFAA und 0.35 mL (0.25 g, 2.5 mmol, 7.2 Äquiv.) Triethylamin, gelöst in 2.0 mL abs. Acetonitril, verestert. Aufgenommen in 3.0 mL abs. Acetonitril folgte die Aktivierung mit 78 μL (80 mg, 0.98 mmol, 2.8 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 0.22 mL (0.16 g, 1.6 mmol, 4.5 Äquiv.) Triethylamin, bevor 0.17 g (0.18 mmol, 0.5 Äquiv. inkl. 1.0 Äquiv. TBAA) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-ddCMP **122**, gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, hinzugegeben wurden.

Ausbeute: Es wurden 15 mg (12 μmol , 7%) eines farblosen Feststoffs erhalten, wobei eine größere Mischfraktion nicht weiter berücksichtigt wurde.

Molmasse: 1202.35 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{41}\text{H}_{58}\text{N}_3\text{O}_{16}\text{P}_3^{2-}$ **UV (HPLC):** $\lambda_{\text{max}} = 272$ nm **HPLC:** $t_{\text{R}} = 16.29$ min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** $m/z = \text{ber.}: 942.311$ [M-H], $\text{gef.}: 942.357$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 8.35 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 1H, **H-6**), 7.44-7.35 (m, 4H, **H-2''**),

7.07-7.00 (m, 4H, **H-3''**), 6.07 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 1H, **H-5**), 5.91 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.6$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.18 (d, $^3J_{\text{HP}} = 8.0$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.41-4.32 (m, 1H, **H-5'a**), 4.31-4.22 (m, 1H, **H-4'**), 4.21-3.12 (m, 1H, **H-5'b**), 3.27-3.17 (m, 8H, **H-A**), 2.56 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 4H, **H-b**), 2.43-2.28 (m, 1H, **H-2'a**), 2.16-2.00 (m, 2H, **H-2'b**, **H-3'a**), 2.00-1.88 (m, 1H, **H-3'b**), 1.72 (quint, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 4H, **H-c**), 1.71-1.56 (m, 8H, **H-B**), 1.49-1.22 (m, 28H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-C**), 1.02 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 12H, **H-D**), 0.91 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, 6H, **H-i**).



$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 173.7 (**C-a**), 163.6 (**C-4**), 152.3 (**C-2**), 152.3 (**C-4'**), 145.4 (**C-6**), 135.0 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.5$ Hz, **C-1'**), 130.5 (d, $^4J_{\text{CP}} = 1.5$ Hz, **C-2'**), 122.8 (**C-3'**), 94.7 (**C-5**), 88.9 (**C-1'**), 82.7 (**C-4'**), 70.3 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5.4$ Hz, **Ph-CH₃**), 67.3 (**C-5'**), 59.5 (**C-A**), 35.0 (**C-b**), 34.2 (**C-2'**), 33.0, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 26.0 (**C-c**), 25.5 (**C-3'**), 24.8 (**C-B**), 20.7 (**C-C**), 14.5 (**C-i**), 13.9 (**C-D**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= -11.67 (d, $^2J_{\text{PP}} = 17.8$ Hz, **P- α**), -13.29 (d, $^2J_{\text{PP}} = 17.1$ Hz, **P- γ**), -23.90 (bs, **P- β**).

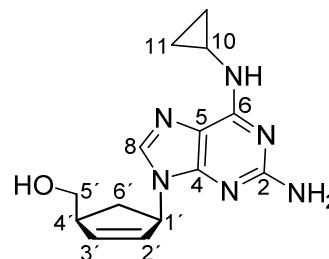
IR: ν [cm^{-1}]= 3225, 2959, 2929, 2873, 2857, 1758, 1713, 1653, 1509, 1464, 1276, 1200, 1135, 1090, 1027, 1012, 928, 503.

5.2.19 Synthese eines Abacavir-Triphosphat-Prodrugs 69

Darstellung von Abacavir 4 (ABC)

Es wurden 1.0 g (3.4 mmol, 1.0 Äquiv.) (1*S*,4*R*)-4-(2-Amino-6-chloro-9H-purin-9-yl)-2-cyclopenten-1-methanol Hydrochlorid **163** in 60 mL abs. Methanol suspendiert und mit 5.0 mL (4.1 g, 72 mmol, 21 Äquiv.) Cyclopropylamin versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 20 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 5.0 mL einer Natriumhydroxidlösung (1 M) hinzugefügt und alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 19:1 v/v). Außerdem schloss sich eine Umkristallisation aus Dichlormethan an.

Ausbeute: Es wurden 0.82 g (2.9 mmol, 84%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 286.39 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}$ **R_f-Wert:** 0.39 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** $m/z = \text{ber.}: 287.1615$ [$\text{M}+\text{H}$]⁺, $\text{gef.}: 287.1624$.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 7.60 (s, 1H, **H-8**), 7.27 (s, 1H, **NH**), 6.10 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5.4$ Hz, 1H, **H-3'**), 5.86 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5.4$ Hz, 1H, **H-2'**), 5.82 (s, 2H, **NH₂**), 5.39 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 1H, **H-1'**), 4.74 (bs, 1H, **OH**), 3.44 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, 2H, **H-6'**), 3.12-3.95 (m, 1H, **H-10**), 2.92-2.80 (m, 1H, **H-4'**), 2.60 (ddd, $^2J_{\text{HH}} = 13.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ Hz, 1H, **H-5'_a**), 1.58 (ddd, $^2J_{\text{HH}} = 13.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, 1H, **H-5'_b**), 0.70-0.53 (m, 4H, **H-11**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm]= 160.0 (**C-2**), 155.9 (**C-6**), 151.0 (**C-4**), 138.0 (**C-3'**), 134.8 (**C-8**), 130.0 (**C-2'**), 113.6 (**C-5**), 64.1 (**C-6'**), 58.1 (**C-1'**), 47.7 (**C-4'**), 34.3 (**C-5'**), 23.9 (**C-10**), 6.4 (**C-11**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3495, 3436, 3313, 3187, 2926, 1681, 1591, 1530, 149, 1450, 1386, 1354, 1257, 1218, 1204, 1173, 1095, 1041, 969, 924, 832, 788, 734, 700, 642, 601, 436.

Darstellung von Abacavir-Monophosphat 124 (ABCMP)

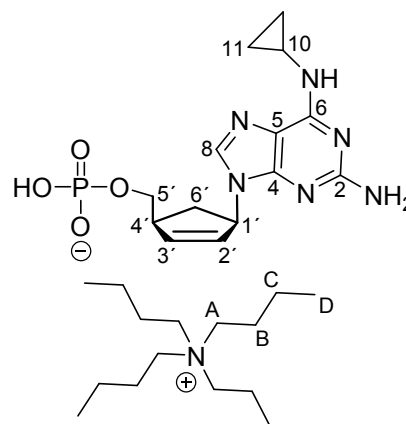
Die Reaktion wurde nach der **AAV 5 (Variante A)** durchgeführt. Das Phosphorylierungsreagenz wurde aus 0.28 mL (0.47 g, 3.1 mmol, 4.4 Äquiv.) Phosphorylchlorid, gelöst in 5.0 mL abs. Acetonitril, 0.25 mL (0.24 g, 3.1 mmol, 4.4 Äquiv.) Pyridin sowie 28 μ L (28 mg, 1.5 mmol, 2.2 Äquiv.) Wasser erhalten und anschließend mit 0.20 g (0.70 mmol, 1.0 Äquiv.) Abacavir **4** zur Reaktion gebracht (Reaktionszeit: 4 h). Die Neutralisation erfolgte mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (40% in Wasser).

Ausbeute: Es wurden 0.23 g (0.37 mmol, 53%) eines

farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 607.78 g/mol

Summenformel: $C_{14}H_{18}N_6O_4P^-$ **R_fWert:** 0.56 (*iso*-Propanol/ NH_3/H_2O 4:1:2.5 v/v/v)

MALDI-MS (neg.): $m/z=$ ber.: 365.113 $[M-H]^-$, gef.: 365.132.



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 7.90 (s, 1H, **H-8**), 6.27

(dt, $^3J_{HH}= 5.7$ Hz, $^4J_{HH}= 2.1$ Hz, 1H, **H-3'**), 5.96 (dt, $^3J_{HH}=$

5.7 Hz, $^4J_{HH}= 2.1$ Hz, 1H, **H-2'**), 5.52-5.44 (m, 1H, **H-1'**),

3.98-3.84 (m, 2H, **H-6'**), 3.27-3.15 (m, 9H, **H-4'**, **H-A**), 2.90-2.76 (m, 2H, **H-5'**_a, **H-10**), 1.75-

1.59 (m, 9H, **H-5'**_b, **H-B**), 1.38 (sext, $^3J_{HH}= 7.3$ Hz, 20H, **H-C**), 0.97 (t, $^3J_{HH}= 8.4$ Hz, 12H,

H-D), 0.95-0.90 (m, 2H, **H-11**_a), 0.74-0.69 (m, 2H, **H-11**_b).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ [ppm]= 160.0 (**C-2**), 154.3 (**C-6**), 149.2 (**C-4**), 138.3 (**C-3'**),

138.2 (**C-8**), 129.2 (**C-2'**), 112.6 (**C-5**), 67.5 (d, $^4J_{CP}= 5.5$ Hz, **C-6'**), 59.5 (**C-1'**), 58.0 (**C-A**),

45.7 (d, $^3J_{CP}= 7.9$ Hz, **C-4'**), 34.0 (**C-5'**), 23.1 (**C-10**), 23.1 (**C-B**), 19.1 (**C-C**), 12.8 (**C-D**), 6.8

(**C-11**).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= 0.66.

IR: ν [cm^{-1}]= 3299, 3189, 3087, 2960, 2874, 1592, 1482, 1385, 1353, 1261, 1172, 1062, 964, 883, 789, 757, 739, 643, 536, 446, 419, 410, 390.

Darstellung von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-ABCTP 69

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante B)** durchgeführt. Zunächst wurden 0.15 g (0.17 mmol, 1.0 Äquiv.) *P,P*-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **198**, gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, mit 98 μ L (0.15 g, 0.70 mmol, 4.2 Äquiv.) TFAA und 0.16 mL (0.12 g, 1.1 mmol, 6.8 Äquiv.) Triethylamin, gelöst in 2.0 mL abs. Acetonitril, verestert. Aufgenommen in 2.0 mL abs. Acetonitril folgte die Aktivierung mit 35 μ L (36 mg, 0.43 mmol, 2.6 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 95 μ L (69 mg, 0.68 mmol, 4.1 Äquiv.) Triethylamin, bevor 71 mg (0.12 mmol, 0.7 Äquiv.) Mono(tetra-*n*-butylammonium)-ABCMP **124**, gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, hinzugegotft wurden.

Ausbeute: Es wurden 15 mg (14 μ mol, 12%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Molmasse: 1081.09 g/mol **Summen-**

formel: $C_{46}H_{63}N_6O_{14}P_3^{2-}$ **UV (HPLC):**

$\lambda_{\max(1)} = 260$ nm, $\lambda_{\max(2)} = 285$ nm **HPLC:** $t_R =$

16.59 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):**

$m/z =$ ber.: 1017.370 $[M-H]^-$, gef.: 1017.413.

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm]=

7.99 (s, 1H, **H-8**), 7.46-7.31 (m, 4H, **H-2''**),

7.09-6.96 (m, 4H, **H-3''**), 6.28-6.11 (m, 1H, **H-3'**), 5.82-5.74 (m, 1H, **H-2'**), 5.54-5.45 (m, 1H,

H-1'), 5.24-5.08 (m, 4H, **Ph-CH₂**), 4.25-4.07 (m, 2H, **H-6'**), 3.29-3.22 (m, 1H, **H-A**), 3.18-

3.08 (m, 1H, **H-4'**), 2.72 (ddd, $^2J_{HH} = 13.9$ Hz, $^3J_{HH} = 8.9$ Hz, $^3J_{HH} = 8.9$ Hz, 1H, **H-5'a**), 2.59 (t,

$^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 1H, **H-b**), 1.92 (ddd, $^2J_{HH} = 12.8$ Hz, $^3J_{HH} = 5.8$ Hz, $^3J_{HH} = 5.8$ Hz, 1H, **H-5'b**), 1.75

(quint, $^3J_{HH} = 7.3$ Hz, 4H, **H-c**), 1.73-1.59 (m, 1H, **H-B**), 1.51-1.27 (m, 21H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**,

H-h, **H-C**), 1.24 (t, $^3J_{HH} = 7.3$ Hz, 1.5H, **H-D**), 1.00-0.88 (m, 8H, **H-i**, **H-11a**), 0.79-0.68 (m, **2H**,

H-11b).

^{13}C -NMR (126 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 173.8 (**C-a**), 152.3 (**C-4''**), 134.6 (**C-1''**), 130.4

(**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 70.3 (d, $^2J_{CP} = 5.2$ Hz, **Ph-CH₂**), 69.2 (**C-6'**), 47.5 (**C-4'**), 35.1 (**C-b**),

35.0 (**C-5'**), 33.0, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 26.0 (**C-c**), 14.5 (**C-i**).

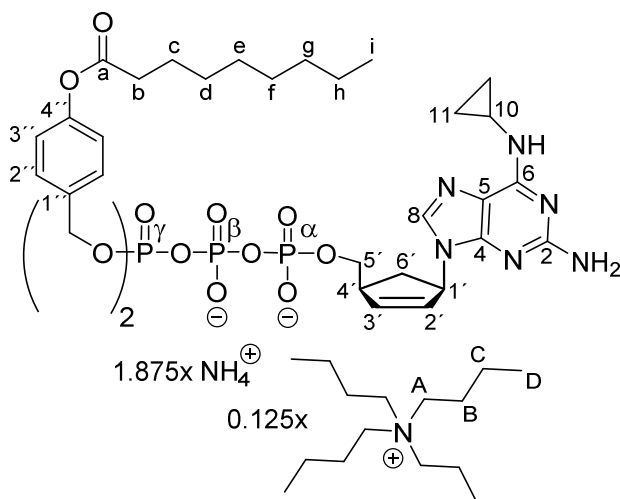
Alle weiteren Kohlenstoffatome konnten nicht detektiert werden.

^{31}P -NMR (162 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= -10.97 (d, $^2J_{PP} = 19.2$ Hz, **P- α**), -13.19 (d, $^2J_{PP} =$

16.4 Hz, **P- γ**), -24.47 (bs, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3084, 2955, 2924, 2855, 1758, 1647, 1509, 1465, 1414, 1378, 1253, 1216,

1202, 1167, 1132, 1026, 1011, 510.

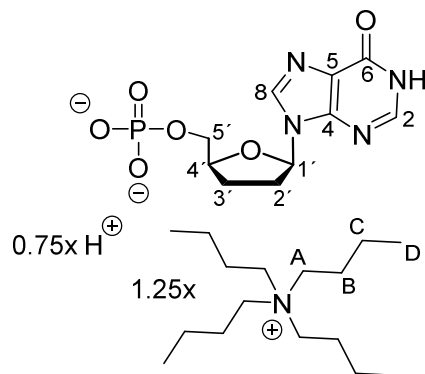


5.2.20 Synthese eines ddl-Triphosphat-Prodrugs 70

Darstellung von 2',3'-Dideoxyinosinmonophosphat 132 (ddIMP)

Die Reaktion wurde nach der **AAV 5 (Variante B)** durchgeführt. Es wurden 0.20 g (0.83 mmol, 1.0 Äquiv.) 2',3'-Dideoxyinosin **2**, gelöst in je 5.0 mL abs. Acetonitril und abs. DMF, mit 0.21 mL (0.16 g, 1.3 mmol, 1.5 Äquiv.) Diisopropylethylamin und 0.22 g (1.0 mmol, 1.2 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** zur Reaktion gebracht. Nach der Oxidation mit 0.23 mL (1.2 mmol, 1.5 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) und Extraktion wurde der erhaltene Triester mit 12.5 mL Acetonitril/Wasser/Triethylamin (2:2:1 v/v/v) hydrolysiert.

Ausbeute: Es wurden 0.27 g (0.44 mmol, 53%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 618.03 g/mol **Summenformel:** $C_{10}H_{11}N_4O_6P^{2-}$ **R_f-Wert:** 0.35 (*iso*-Propanol/ NH_3/H_2O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 315.050 $[M-H]^-$, gef.: 315.127.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 8.35 (s, 1H, **H-8**), 8.03 (s, 1H, **H-2**), 6.28 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.3 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.5 Hz, 1H, **H-1'**), 4.40-4.32 (m, 1H, **H-4'**), 4.11-3.99 (m, 2H, **H-5'**), 3.28-3.18 (m, 10H, **H-A**), 2.58-2.43 (m, 2H, **H-2'**), 2.29-2.14 (m, 2H, **H-3'**), 1.71-1.58 (m, 10H, **H-B**), 1.40 (sext, $^3J_{HH}$ = 7.4 Hz, 10H, **H-C**), 1.01 (t, $^3J_{HH}$ = 7.4 Hz, 18H, **H-D**).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 159.9 (**C-6**), 149.5 (**C-4**), 147.3 (**C-2**), 139.9 (**C-8**), 125.5 (**C-5**), 86.9 (**C-1'**), 82.1 (d, $^3J_{CP}$ = 8.8 Hz, **C-4'**), 67.5 (**C-5'**), 59.5 (**C-A**), 33.6 (**C-2'**), 27.5 (**C-3'**), 24.8 (**C-B**), 20.7 (**H-C**), 13.9 (**H-D**).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= 1.48.

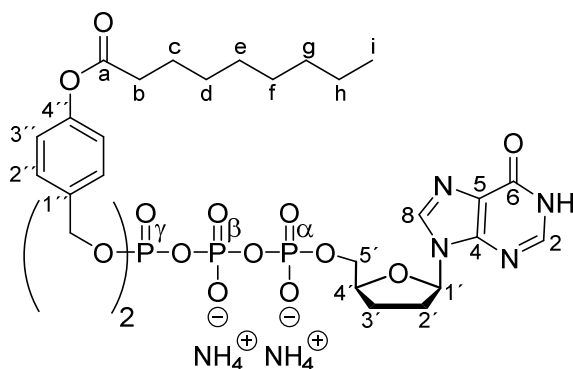
IR: ν [cm⁻¹]= 3383, 3111, 2959, 2874, 1683, 1585, 1541, 1466, 1415, 1380, 1339, 1212, 1170, 1096, 1054, 986, 892, 792, 739, 714, 684, 652, 603, 520.

Darstellung von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-ddITP 70

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante B)** durchgeführt. Zunächst wurden 0.40 g (0.44 mmol, 1.0 Äquiv.) *P,P*-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **198**, gelöst in 6.0 mL abs. Acetonitril, mit 0.31 mL (0.46 g, 2.2 mmol, 5.0 Äquiv.) TFAA und 0.49 mL (0.36 g, 3.5 mmol, 8.0 Äquiv.) Triethylamin, gelöst in 5.0 mL abs. Acetonitril, verestert. Aufgenommen in 4.0 mL abs. Acetonitril folgte die Aktivierung mit 0.11 mL (0.11 g, 1.3 mmol, 3.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 0.31 mL (0.22 g, 2.2 mmol, 5.0 Äquiv.) Triethylamin, bevor 0.16 g (0.25 mmol, 0.6 Äquiv.) ddIMP **132** (1.25x Bu₄N⁺), gelöst in 3.0 mL abs. Acetonitril, hinzugegeben wurden.

Ausbeute: Es wurden 0.12 g (0.12 mmol, 46%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

Molmasse: 1002.93 g/mol **Summenformel:** $C_{42}H_{57}N_4O_{16}P_3^{2-}$ **UV (HPLC):** λ_{max} = 248 nm **HPLC:** t_R = 16.33 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 967.307 $[M-H]^-$, gef.: 967.372.



¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 8.52 (s, 1H, **H-8**), 8.01 (s, 1H, **H-2**), 7.40-7.32 (m, 4H, **H-2'**), 7.04-6.96 (m, 4H, **H-3'**), 6.23 (dd, ³J_{HH}= 6.5 Hz, ³J_{HH}= 3.2 Hz, 1H, **H-1'**), 5.12 (d, ³J_{HP}= 8.2 Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.40-4.24 (m, 2H, **H-4'**, **H-5'**_a), 4.20-4.07 (m, 1H, **H-5'**_b), 2.56 (t, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 4H, **H-b**), 2.56-2.28 (m, 2H, **H-2'**), 2.26-1.92 (m, 2H, **H-3'**), 1.71 (t, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 4H, **H-c**), 1.51-1.21 (m, 20H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.97-0.85 (m, 6H, **H-i**).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 173.7 (**C-a**), 158.8 (**C-6**), 152.4 (**C-4'**), 146.8 (**C-2**), 146.4 (**C-4**), 140.5 (**C-8**), 134.8 (d, ³J_{CP}= 5.5 Hz, **C-1'**), 130.4 (d, ⁴J_{CP}= 2.4 Hz, **C-2'**), 124.8 (**C-5**), 122.8 (**C-3'**), 87.1 (**C-1'**), 82.3 (**C-4'**), 70.4 (d, ³J_{CP}= 6.0 Hz, **Ph-CH₂**), 68.2 (**C-5'**), 35.0 (**C-b**), 34.0 (**C-2'**), 33.0, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 26.2 (**C-3'**), 26.0 (**C-c**), 14.4 (**C-i**).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= -11.43 (d, ²J_{PP}= 19.4 Hz, **P- α**), -13.09 (d, ²J_{PP}= 18.9 Hz, **P- γ**), -23.45 (t, ²J_{PP}= 17.9 Hz, **P- β**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3047, 2925, 2854, 1758, 1673, 1580, 1421, 1261, 1132, 1008, 921, 890, 791, 618, 559.

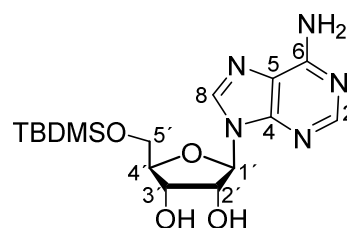
5.2.21 Synthese von ddA-Monophosphat 130 (ddAMP)

Darstellung von 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)adenosin 165

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 10.0 g (37 mmol, 1.0 Äquiv.) Adenosin **164** in 120 mL abs. DMF gelöst und mit 6.2 g (41 mmol, 1.1 Äquiv.) TBDMSCl sowie 5.9 g (86 mmol, 2.3 Äquiv.) Imidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 16 Stunden gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Ethylacetat/Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) gereinigt.

Das Produkt wies nach der Säulenchromatographie noch 1.5 Äquiv. Imidazol als Verunreinigung auf. Da bei der Folgereaktion ebenfalls Imidazol freigesetzt wurde, wurde an dieser Stelle auf eine weitere Reinigung verzichtet. Die nachfolgenden Angaben und Berechnungen verstehen sich exklusive der Verunreinigung.

Ausbeute: Es wurden 10.9 g (29 mmol, 77%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 381.51 g/mol **Summenformel:** C₁₆H₂₇N₅O₄Si **R_f-Wert:** 0.55 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 382.1905 [M+H]⁺, gef.: 382.1909.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 8.29 (s, 1H, **H-8**), 8.15 (s, 1H, **H-2**), 7.29 (bs, 2H, **NH₂**), 5.90 (d, ³*J*_{HH}= 4.9 Hz, 1H, **H-1'**), 5.42 (bs, 2H, **2'-OH, 3'-OH**), 4.55 (t, ³*J*_{HH}= 6.0 Hz, 1H, **H-2'**), 4.19 (t, ³*J*_{HH}= 6.0 Hz, 1H, **H-3'**), 3.96 (q, ³*J*_{HH}= 4.1 Hz, 1H, **H-4'**), 3.87 (dd, ²*J*_{HH}= 11.4 Hz, ³*J*_{HH}= 3.9 Hz, 1H, **H-5'_a**), 3.75 (dd, ²*J*_{HH}= 11.4 Hz, ³*J*_{HH}= 4.1 Hz, 1H, **H-5'_b**), 0.87 (s, 9H, ***t*Bu-(CH₃)₃**), 0.04 (s, 6H, **Si(CH₃)₂**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 156.1 (**C-6**), 152.7 (**C-2**), 149.4 (**C-4**), 139.0 (**C-8**), 119.0 (**C-5**), 87.4 (**C-1'**), 84.4 (**C-4'**), 73.7 (**C-2'**), 69.9 (**C-3'**), 62.9 (**C-5'**), 25.8 (***t*Bu-(CH₃)₃**), 18.1 (**C-*t*Bu**), -5.4 (**Si(CH₃)₂**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3424, 3306, 3140, 3954, 2928, 2901, 2857, 1675, 1603, 1568, 1471, 1443, 1414, 1392, 1374, 1334, 1296, 1252, 1209, 1177, 1117, 1063, 993, 965, 822, 776, 746, 722, 699, 594, 539.

Darstellung von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-*O,O'*-thiocarbonyladenosin **166**

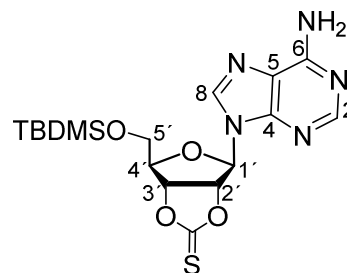
Unter Stickstoff als Inertgas wurden 6.7 g (14 mmol, 1.0 Äquiv. (inkl. 1.5 Äquiv. Imidazol)) 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)adenosin **165** in 60 mL abs. DMF gelöst und mit 2.7 g (15 mmol, 1.1 Äquiv.) 1,1'-Carbonyldiimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunde bei 80 °C gerührt und im Anschluss das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zur Reinigung aus Chloroform umkristallisiert.

Ausbeute: Es wurden 4.1 g (9.7 mmol, 71%) farbloser Nadeln

erhalten. **Molmasse:** 423.56 g/mol **Summenformel:**

C₁₇H₂₅N₅O₄SSi **R_f-Wert:** 0.83 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS**

(ESI⁺): *m/z*= ber.: 424.1469 [M+H]⁺, gef.: 424.1474.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 8.26 (s, 1H, **H-8**), 8.15

(s, 1H, **H-2**), 7.41 (bs, 2H, **NH₂**), 6.60-6.56 (m, 1H, **H-1'**), 6.38 (dd, ³*J*_{HH}= 7.2 Hz, ³*J*_{HH}= 1.8 Hz, 1H, **H-2'**), 5.82 (dd, ³*J*_{HH}= 7.3 Hz, ³*J*_{HH}= 2.5 Hz, 1H, **H-3'**), 4.53 (td, ³*J*_{HH}= 6.0 Hz, ³*J*_{HH}= 2.5 Hz, 1H, **H-4'**), 3.80-3.63 (m, 2H, **H-5'**), 0.77 (s, 9H, ***t*Bu-(CH₃)₃**), -0.09 (s, 6H, **Si(CH₃)₂**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 190.1 (**C=S**), 165.2 (**C-6**), 152.6 (**C-2**), 148.4 (**C-4**), 140.0 (**C-8**), 119.0 (**C-5**), 88.6 (**C-1'**), 88.1 (**C-2'**), 86.8 (**C-3'**), 86.3 (**C-4'**), 62.1 (**C-5'**), 25.6 (***t*Bu-(CH₃)₃**), 17.8 (**C-*t*Bu**), -5.7 (**Si(CH₃)₂**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3306, 3115, 2952, 2927, 2855, 1807, 1677, 1601, 1471, 1361, 1332, 1237, 1139, 1085, 992, 833, 812, 722, 670, 647, 574, 539, 516.

Darstellung von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyadenosin **167**

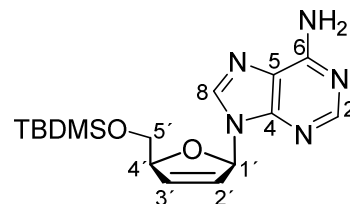
Es wurden 3.7 g (8.7 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-*O*,*O'*-thiocarbonyl-adenosin **166** in 27 mL (29 g, 0.23 mol, 27 Äquiv.) Trimethylphosphit aufgenommen und für 1.5 Stunden zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit *n*-Hexan coevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH erst 19:1, dann 9:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 2.2 g (6.4 mmol, 74%) eines farblosen

Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 347.49 g/mol **Summenformel:**

C₁₆H₂₅N₅O₂Si **R_f-Wert:** 0.39 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS**

(ESI*): *m/z*= ber.: 348.1850 [M+H]⁺, gef.: 348.1850.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 8.16 (s, 1H, **H-8**), 8.10 (s, 1H, **H-2**), 7.27 (bs, 2H, **NH₂**), 6.96-6.93 (m, 1H, **H-1'**), 6.46 (dt, ³*J*_{HH}= 6.0 Hz, ⁴*J*_{HH}= 1.7 Hz, 1H, **H-3'**), 6.18 (d, ³*J*_{HH}= 6.0 Hz, ⁴*J*_{HH}= 1.8 Hz, 1H, **H-2'**), 4.94-4.88 (m, 1H, **H-4'**), 3.83-3.72 (m, 2H, **H-5'**), 0.83 (s, 9H, ***t*Bu-(CH₃)₃**), -0.03 (s, 6H, **Si(CH₃)₂**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 156.0 (**C-6**), 152.7 (**C-2**), 149.2 (**C-4**), 138.7 (**C-8**), 133.7 (**C-3'**), 125.8 (**C-2'**), 118.7 (**C-5**), 87.6, 87.4 (**C-1'**, **C-4'**), 64.7 (**C-5'**), 25.8 (***t*Bu-(CH₃)₃**), 18.1 (**C-*t*Bu**), -5.4 (**Si(CH₃)₂**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3277, 3151, 2955, 2926, 2880, 2855, 1808, 1675, 1601, 1574, 1479, 1471, 1419, 1392, 1371, 1329, 1299, 1251, 1207, 1167, 1140, 1098, 1083, 1067, 1048, 992, 970, 938, 904, 879, 827, 794, 781, 716, 671, 607, 587, 537, 448.

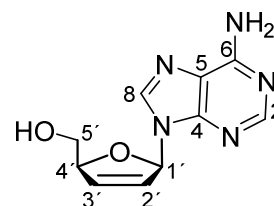
Darstellung 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxyadenosin (**d4A**) **168**

Bei 0 °C wurden 1.6 g (4.6 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyadenosin **167** in 20 mL abs. THF gelöst und mit 9.5 mL (9.5 mmol, 2.2 Äquiv.) einer 1 M TBAF-Lösung versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für eine halbe Stunde gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) gereinigt. Es schloss sich eine Umkristallisation aus Methanol an.

Ausbeute: Es wurden 1.1 g (4.6 mmol, quantitativ) eines farblosen

Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 233.23 g/mol **Summenformel:**

C₁₀H₁₁N₅O₂ **R_f-Wert:** 0.27 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v).



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 8.17 (s, 1H, **H-8**), 8.16 (s, 1H, **H-2**), 7.28 (bs, 2H, **NH₂**), 6.97-6.91 (m, 1H, **H-1'**), 6.47 (d, ³*J*_{HH}= 6.0 Hz, 1H, **H-3'**), 6.14 (d, ³*J*_{HH}= 6.0 Hz, 1H, **H-2'**), 5.05 (t, ³*J*_{HH}= 5.5 Hz, 1H, **OH**), 4.91-4.86 (m, 1H, **H-4'**), 3.59 (t, ³*J*_{HH}= 4.7 Hz, 2H, **H-5'**).

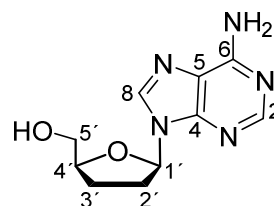
¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 156.0 (**C-6**), 152.6 (**C-2**), 149.1 (**C-4**), 139.1 (**C-8**), 134.3 (**C-3'**), 125.5 (**C-2'**), 118.8 (**C-5**), 88.0 (**C-4'**), 87.8 (**C-1'**), 62.8 (**C-5'**).

IR: ν [cm⁻¹]= 3255, 3124, 2962, 2873, 1656, 1599, 1475, 1412, 1374, 1330, 1303, 1243, 1207, 1122, 1068, 1040, 1009, 985, 966, 939, 849, 829, 818, 795, 721, 643, 585, 537, 499, 481, 448, 435.

Darstellung von 2',3'-Didesoxyadenosin 114 (ddA)

In Gegenwart von 100 mg Pd/C (10%) wurden 0.42 g (0.18 mmol) 2',3'-Didehydro-2',3'-didesoxyadenosin **168**, gelöst in 40 mL abs. Ethanol und 20 mL abs. Methanol, in Wasserstoffatmosphäre für vier Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend über Celite 545 (0.1-0.02 mm) filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 0.35 g (1.5 mmol, 84%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 235.25 g/mol **Summenformel:** C₁₀H₁₃N₅O₂ **R_fWert:** 0.13 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 236.1142 [M+H]⁺, gef.: 236.1144.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 8.34 (s, 1H, **H-8**), 8.13 (s, 1H, **H-2**), 7.24 (bs, 2H, **NH₂**), 6.21 (t, ³*J*_{HH}= 5.4 Hz, 1H, **H-1'**), 4.16-4.06 (m, 1H, **H-4'**), 3.63 (dd, ²*J*_{HH}= 11.8 Hz, ³*J*_{HH}= 3.9 Hz, 1H, **H-5'**_a), 3.50 (dd, ²*J*_{HH}= 11.8 Hz, ³*J*_{HH}= 4.5 Hz, 1H, **H-5'**_b), 2.46-2.37 (m, 2H, **H-2'**), 2.15-1.96 (m, 2H, **H-3'**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 156.0 (**C-6**), 152.3 (**C-2**), 148.8 (**C-4**), 139.0 (**C-8**), 119.1 (**C-5**), 84.4 (**C-1'**), 81.6 (**C-4'**), 62.9 (**C-5'**), 31.7 (**C-2'**), 25.7 (**C-3'**).

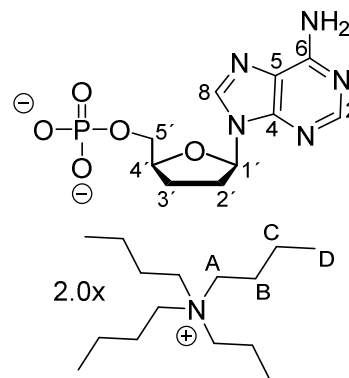
IR: ν [cm⁻¹]= 3333, 3269, 3203, 3106, 2968, 2900, 2853, 1657, 1605, 1575, 1475, 1408, 1313, 1230, 1199, 1156, 1054, 1034, 997, 966, 943, 905, 885, 824, 798, 725, 699, 643, 614, 554, 537, 503, 483.

Darstellung von 2',3'-Dideoxyadenosinmonophosphat 130 (ddAMP)

Die Reaktion wurde nach der **AAV 5 (Variante B)** durchgeführt. Bei -40 °C wurden 0.22 g (0.95 mmol, 1.0 Äquiv.) ddA **114**, gelöst in 10 mL abs. DMF, mit 0.29 mL (0.22 g, 1.7 mmol, 1.8 Äquiv.) Diisopropylethylamin und 0.28 g (1.2 mmol, 1.3 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** zur Reaktion gebracht. Nach der Oxidation mit 0.31 mL (1.7 mmol,

1.8 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) in *n*-Decan und Extraktion schloss sich eine zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) an, wobei alle produkthaltigen Fraktionen vereint und mit 12.5 mL Acetonitril/Wasser/Triethylamin (2:2:1 v/v/v) hydrolysiert wurden. Es folgte eine automatisierte RP18-Säulenchromatographie.

Ausbeute: Es wurden 70 mg (88 µmol, 9%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 798.15 g/mol **Summenformel:** C₁₀H₁₂N₅O₅P²⁻ **R_f-Wert:** 0.48 (*iso*-Propanol/NH₃/H₂O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** *m/z*= ber.: 314.066 [M-H], gef.: 314.273.



¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm]= 8.43 (s, 1H, **H-8**), 8.09 (s, 1H, **H-2**), 6.22 (dd, ³*J*_{HH}= 6.8 Hz, ⁴*J*_{HH}= 3.3 Hz, 1H, **H-1'**), 4.36-4.29 (m, 1H, **H-4'**), 3.92 (ddd, ²*J*_{HH}= 11.3 Hz, ³*J*_{HH}= 5.1 Hz, ⁴*J*_{HH}= 3.4 Hz, 1H, **H-5'a**), 3.80 (dt, ²*J*_{HH}= 11.8 Hz, ³*J*_{HH}= 5.4 Hz, 1H, **H-5'b**), 3.13-2.95 (m, 16H, **H-A**), 2.53-2.45 (m, 1H, **H-2'a**), 2.37-2.31 (m, 1H, **H-2'b**), 2.16-2.08 (m, 1H, **H-3'a**), 2.05-1.97 (m, 1H, **H-3'b**), 1.58-1.49 (m, 16H, **H-B**), 1.25 (sext, ³*J*_{HH}= 7.4 Hz, 16H, **H-C**), 0.84 (t, ³*J*_{HH}= 7.4 Hz, 24H, **H-D**).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O): δ [ppm]= 155.4 (**C-6**), 152.3 (**C-2**), 148.2 (**C-4**), 140.1 (**C-8**), 118.7 (**C-5**), 84.9 (**C-1'**), 81.7 (d, ³*J*_{CP}= 8.7 Hz, **C-4'**), 65.3 (d, ²*J*_{CP}= 4.5 Hz, **C-5'**), 58.1 (**H-A**), 32.1 (**C-2'**), 25.3 (**C-3'**), 23.1 (**H-B**), 19.1 (**H-C**), 12.8 (**H-D**).

³¹P-NMR (243 MHz, D₂O): δ [ppm]= 3.71.

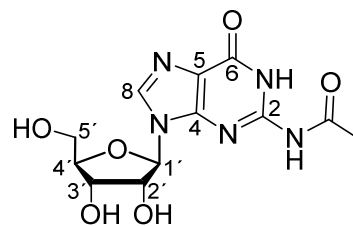
IR: ν [cm⁻¹]= 3239, 2661, 2875, 1674, 1602, 1487, 1382, 1306, 1188, 1116, 1105, 1086, 965, 887, 697, 534.

5.2.22 Synthese eines ddG-Triphosphat-Prodrugs 72

Darstellung von *N*²-Acetylguanosin 171

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zunächst wurden 7.0 g (2.5 mmol, 1.0 Äquiv.) Guanosin **170** einmal mit abs. Pyridin coevaporiert und im Anschluss in einem Gemisch aus 300 mL abs. Dichlormethan sowie 60 mL abs. Pyridin suspendiert. Bei 0 °C erfolgte die Zugabe von 15.7 mL (13.4 g, 124 mmol, 5.0 Äquiv.) Trimethylsilylchlorid. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für zwei Stunden gerührt. Bei 0 °C folgte die Zugabe von (2.3 g, 30 mmol, 1.2 Äquiv.) Acetylchlorid an. Nach drei Stunden wurden 150 mL Methanol zugeführt und das Reaktionsgemisch für weitere 20 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: Es wurden 7.7 g (24 mmol, 96%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 325.28 g/mol **Summenformel:** $C_{12}H_{15}N_5O_6$ **R_f-Wert:** 0.15 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 6:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** m/z = ber.: 348.0915 $[M+Na]^+$, gef.: 348.1898.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 12.04 (s, 1H, **NH-Ac**), 11.72 (s, 1H, **NH**), 8.27 (s, 1H, **H-8**), 5.80 (d, ³ J_{HH} = 5.6 Hz, 1H, **H-1'**), 4.47 (bs, 2H, **2'-OH, 3'-OH**), 4.44 (t, ³ J_{HH} = 5.3 Hz, 1H, **H-2'**), 4.13 (t, ³ J_{HH} = 4.3 Hz, 1H, **H-3'**), 3.91 (q, ³ J_{HH} = 4.0 Hz, 1H, **H-4'**), 3.64 (dd, ² J_{HH} = 11.9 Hz, ³ J_{HH} = 4.0 Hz, 1H, **H-5'a**), 3.54 (dd, ² J_{HH} = 11.9 Hz, ³ J_{HH} = 4.0 Hz, 1H, **H-5'b**), 2.18 (s, 3H, **Ac-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 173.5 (**CH₃CO**), 154.8 (**C-6**), 148.8 (**C-4**), 148.0 (**C-2**), 138.2 (**C-8**), 120.1 (**C-5**), 86.7 (**C-1'**), 85.3 (**C-4'**), 74.0 (**C-2'**), 70.2 (**C-3'**), 61.2 (**C-5'**), 23.8 (**Ac-CH₃**).

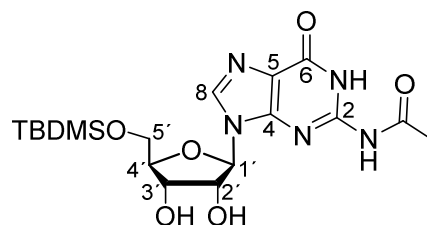
IR: ν [cm^{-1}]= 3462, 3151, 3120, 2971, 2926, 2886, 1664, 1620, 1563, 1484, 1472, 1403, 1363, 1319, 1266, 1234, 1203, 1156, 1127, 1091, 1051, 1026, 800, 768, 723, 686, 645, 626, 529, 385.

Darstellung von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*²-acetylguanosin **172**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 7.5 g (23 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*²-Acetylguanosin **171** in 100 mL abs. DMF aufgenommen und mit 3.8 g (25 mmol, 1.1 Äquiv.) TBDMSCl sowie 3.5 g (51 mmol, 2.2 Äquiv.) Imidazol zur Reaktion gebracht. Nach 20 Stunden wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v) gereinigt.

Das Produkt wies nach der Säulenchromatographie noch 1.2 Äquiv. Imidazol als Verunreinigung auf. Da bei der Folgereaktion ebenfalls Imidazol freigesetzt wurde, wurde auf eine weitere Reinigung verzichtet. Die nachfolgenden Angaben und Berechnungen verstehen sich exklusive der Verunreinigung.

Ausbeute: Es wurden 7.0 g (16 mmol, 69%) eines schwach gelben Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 439.54 g/mol **Summenformel:** $C_{18}H_{29}N_5O_6Si$ **R_f-Wert:** 0.45 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** m/z = ber.: 440.1960 $[M+H]^+$, gef.: 440.2079.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.80 (bs, 2H, **NH-Ac, NH**), 8.16 (s, 1H, **H-8**), 5.81 (d, ³ J_{HH} = 5.1 Hz, 1H, **H-1'**), 5.59 (bs, 1H, **2'-OH**), 5.23 (bs, 1H, **3'-OH**), 4.40 (t, ³ J_{HH} = 5.0 Hz,

1H, **H-2'**), 4.14 (t, $^3J_{\text{HH}} = 4.6$ Hz, 1H, **H-3'**), 3.95 (q, $^3J_{\text{HH}} = 4.0$ Hz, 1H, **H-4'**), 3.84 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 11.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.9$ Hz, 1H, **H-5'**_a), 3.74 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 11.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.9$ Hz, 1H, **H-5'**_b), 2.18 (s, 3H, **Ac-CH₃**), 0.88 (s, 9H, **tBu-(CH₃)₃**), 0.05 (s, 6H, **Si(CH₃)₂**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 173.5 (**CH₃CO**), 154.8 (**C-6**), 148.7 (**C-4**), 148.0 (**C-2**), 135.1 (**C-8**), 120.2 (**C-5**), 86.8 (**C-1'**), 84.5 (**C-4'**), 74.0 (**C-2'**), 69.8 (**C-3'**), 62.8 (**C-5'**), 25.8 (**tBu-(CH₃)₃**), 23.7 (**Ac-CH₃**), 18.0 (**C-tBu**), -5.5 (**Si(CH₃)₂**).

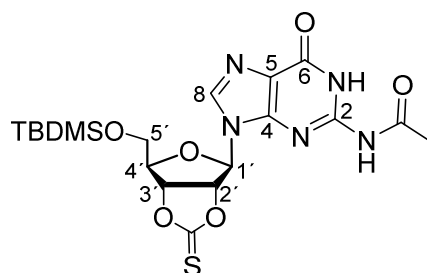
IR: ν [cm⁻¹]= 3377, 3165, 2951, 2927, 2856, 1678, 1660, 1612, 1555, 1478, 1401, 1367, 1331, 1259, 1231, 1130, 1092, 1057, 1031, 993, 955, 885, 831, 785, 740, 720, 680, 662, 646, 632, 530.

Darstellung von 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-*O*,*O'*-thiocarbonyl-*N*²-acetylguanosin **173**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 8.1 g (16 mmol, 1.0 Äquiv. (inkl. 1.2 Äquiv. Imidazol)) 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*²-acetylguanosin **172** in 80 mL abs. DMF gelöst und mit 3.3 g (19 mmol, 1.2 Äquiv.) 1,1'-Carbonyldiimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunde bei 78 °C gerührt und im Anschluss das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v) gereinigt.

Das Produkt wies nach der Säulenchromatographie noch 1.0 Äquiv. DMF auf, das sich trotz mehrtägiger Trocknung im Vakuum nicht entfernen ließ. Die nachfolgenden Angaben und Berechnungen verstehen sich exklusive des Lösungsmittels.

Ausbeute: Es wurden 6.6 g (14 mmol, 88%) eines gelben Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 481.60 g/mol
Summenformel: C₁₉H₂₇N₅O₆SSi **R_fWert:** 0.74
 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI*):** $m/z =$ ber.: 482.1524 [M+H]⁺, gef.: 482.1625.



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 12.05 (bs, 1H, **NH-Ac**), 11.60 (bs, 1H, **NH**), 8.13 (s, 1H, **H-8**), 6.47 (d, $^3J_{\text{HH}} = 1.5$ Hz, 1H, **H-1'**), 6.20 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, 1H, **H-2'**), 5.99 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.8$ Hz, 1H, **H-3'**), 4.57-4.50 (m, 1H, **H-4'**), 3.73 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz, 2H, **H-5'**), 2.21 (s, 3H, **Ac-CH₃**), 0.78 (s, 9H, **tBu-(CH₃)₃**), -0.07 (d, $^4J_{\text{HH}} = 5.0$ Hz, 6H, **Si(CH₃)₂**).

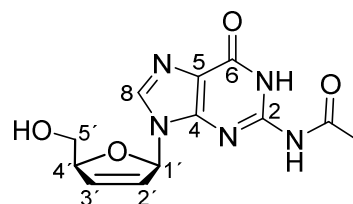
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 190.0 (**C=S**), 173.3 (**CH₃CO**), 154.6 (**C-6**), 147.8 (**C-4**), 147.6 (**C-2**), 138.1 (**C-8**), 120.5 (**C-5**), 88.5 (**C-2'**), 88.3 (**C-1'**), 86.6 (**C-4'**), 86.3 (**C-3'**), 62.5 (**C-5'**), 25.6 (**tBu-(CH₃)₃**), 23.9 (**Ac-CH₃**), 17.8 (**C-tBu**), -5.8 (**Si(CH₃)₂**).

IR: ν [cm^{-1}] = 3140, 2952, 2928, 2855, 1811, 1673, 1608, 1556, 1472, 1387, 1361, 1314, 1279, 1250, 1144, 1085, 997, 894, 833, 777, 723, 641, 530.

Darstellung von *N*²-Acetyl-2',3'-didehydro-2',3'-didesoxyguanosin **174**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 4.6 g (8.3 mmol, 1.0 Äquiv. (inkl. 1.0 Äquiv. DMF)) 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-*O,O'*-thiocarbonyl-*N*²-acetylguanosin **173** in 20 mL abs. THF gelöst und mit 5.0 mL (5.3 g, 27 mmol, 3.3 Äquiv.) 1,3-Dimethyl-2-phenyl-1,3,2-diazaphospholidine versetzt. Die Reaktionslösung wurde für drei Stunden gerührt und im Anschluss das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 19:1 v/v) gereinigt, wobei jedoch überwiegend Mischfraktionen erhalten wurden. Daraufhin wurden alle produkthaltigen Fraktionen vereinigt und nach dem Abziehen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck in 20 mL abs. THF gelöst. Bei 0 °C erfolgte die Zugabe von 9.0 mL (9.0 mmol, 1.1 Äquiv.) einer 1 M TBAF (1 M in THF) an. Die Reaktionslösung wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 1.5 g (5.2 mmol, 63%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 291.27 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$ **R_r-Wert:** 0.25 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** $m/z =$ ber.: 314.0860 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, 605.1827 [$2\text{M}+\text{Na}$]⁺, gef.: 314.0874, 605.1845.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 12.31-11.46 (m, 2H, **NH-Ac**, **NH**), 7.99 (s, 1H, **H-8**), 6.77 (dt, ³ J_{HH} = 3.1 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, **H-1'**), 6.49 (dt, ³ J_{HH} = 6.0 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.7 Hz, 1H, **H-3'**), 6.18-6.13 (m, 1H, **H-2'**), 4.96-4.84 (m, 1H, **H-4'**), 4.08 (s, 1H, **OH**), 3.59-3.51 (m, 2H, **H-5'**), 2.18 (s, 3H, **Ac-CH₃**).

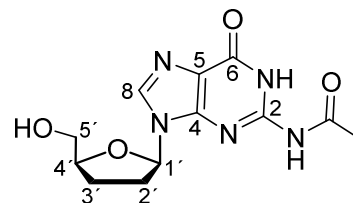
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 173.5 (**CH₃CO**), 154.9 (**C-6**), 148.3 (**C-4**), 148.0 (**C-2**), 137.6 (**C-8**), 134.8 (**C-3'**), 125.0 (**C-2'**), 120.0 (**C-5**), 88.3 (**C-4'**), 87.7 (**C-1'**), 62.7 (**C-5'**), 23.8 (**Ac-CH₃**).

IR: ν [cm^{-1}] = 3386, 3166, 3075, 2919, 2856, 1716, 1675, 1613, 1557, 1480, 1399, 1364, 1253, 1208, 1137, 1094, 1084, 1069, 1029, 988, 972, 850, 914, 779, 732, 722, 706, 668, 638, 618, 563, 528, 461, 400.

Darstellung von *N*²-Acetyl-2',3'-dideoxyguanosin 169

In Gegenwart von 50 mg Pd/C (10%) wurden 0.18 g (0.62 mmol) *N*²-Acetyl-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyguanosin **174**, gelöst in 20 mL abs. Ethanol und 20 mL abs. Methanol, in Wasserstoffatmosphäre für vier Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend über Celite 545 (0.1-0.02 mm) filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Es wurden 0.15 g (0.52 mmol, 84%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 293.28 g/mol
Summenformel: C₁₂H₁₅N₅O₄ **R_f-Wert:** 0.08 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 316.1016 [M+Na]⁺, 609.2140 [2M+Na]⁺, gef.: 316.1013, 609.2199.



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.93 (bs, 2H, **NH-Ac, NH**), 8.24 (s, 1H, **H-8**), 6.08 (dd, ³*J*_{HH}= 6.8 Hz, ³*J*_{HH}= 3.0 Hz, 1H, **H-1'**), 4.95 (bs, 1H, **OH**), 4.12-4.06 (m, 1H, **H-4'**), 3.62 (dd, ²*J*_{HH}= 11.8 Hz, ³*J*_{HH}= 3.8 Hz, 1H, **H-5'a**), 3.51 (dd, ²*J*_{HH}= 11.8 Hz, ³*J*_{HH}= 4.4 Hz, 1H, **H-5'b**), 2.45-2.37 (m, 1H, **H-2'a**), 2.36-2.29 (m, 1H, **H-2'b**), 2.17 (s, 3H, **Ac-CH₃**), 2.07-1.96 (m, 2H, **H-3'**).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 173.6 (CH₃CO), 155.0 (**C-6**), 148.0 (**C-4**), 148.0 (**C-2**), 137.2 (**C-8**), 120.3 (**C-5**), 84.2 (**C-1'**), 82.1 (**C-4'**), 62.5 (**C-5'**), 32.1 (**C-2'**), 25.3 (**C-3'**), 23.9 (**Ac-CH₃**).

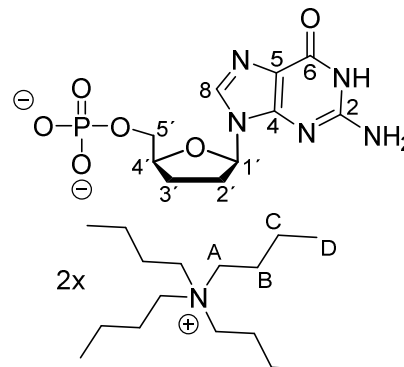
IR: ν [cm⁻¹]= 3164, 2972, 2919, 2855, 1717, 1689, 1611, 1556, 1532, 1503, 1480, 1448, 1404, 1360, 1314, 1250, 1207, 1134, 1082, 1074, 1050, 1038, 989, 966, 852, 841, 831, 814, 777, 725, 706, 666, 638, 618, 594, 559, 527.

Darstellung von 2',3'-Dideoxyguanosinmonophosphat 136 (ddGMP)

Die Reaktion wurde nach der **AAV 5 (Variante B)** durchgeführt. Es wurden zunächst 0.14 g (0.48 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*²-Acetyl-2',3'-dideoxyguanosin **169**, gelöst in 10 mL abs. Acetonitril, mit 0.15 mL (0.11 g, 0.86 mmol, 1.8 Äquiv.) Diisopropylethylamin und 0.16 g (0.72 mmol, 1.5 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** zur Reaktion gebracht. Nach der Oxidation mit 0.16 mL (0.88 mmol, 1.8 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan) und Extraktion erfolgte die Hydrolyse des Triesters in 12.5 mL Acetonitril/Wasser/Triethylamin (2:2:1 v/v/v). Außerdem wurde mit 22 mL eines Gemisches aus Methanol/Wasser/Triethylamin (7:3:1 v/v/v) für zwei Tage deacetyliert.

Das Produkt wies nach Ionenaustausch- und RP18-Säulenchromatographie noch 0.3 Äquiv. Tetra-*n*-butylammoniumacetat (TBAA) als Verunreinigung auf. Die nachfolgenden Angaben und Berechnungen verstehen sich exklusive der Verunreinigung.

Ausbeute: Es wurden 0.12 g (0.15 mmol, 31%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 814.15 g/mol
Summenformel: $C_{10}H_{12}N_5O_6P^{2-}$ **R_r-Wert:** 0.28 (*iso*-Propanol/NH₃/H₂O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** *m/z*= ber.: 330.061 [M-H]⁻, gef.: 330.136.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 7.94 (s, 1H, **H-8**), 6.06 (t, ³J_{HH}= 5.8 Hz, 1H, **H-1'**), 4.37-4.28 (m, 1H, **H-4'**), 4.03 (t, ³J_{HH}= 5.5 Hz, 2H, **H-5'**), 3.29-3.14 (m, 16H, **H-A**), 2.44-2.36 (m, 2H, **H-2'**), 2.24-2.15 (m, 2H, **H-3'**), 1.73-1.57 (m, 16H, **H-B**), 1.40 (sext, ³J_{HH}= 7.3 Hz, 16H, **H-C**), 1.00 (t, ³J_{HH}= 7.3 Hz, 24H, **H-D**).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 160.9 (**C-6**), 156.2 (**C-2**), 152.5 (**C-4**), 137.0 (**C-8**), 118.0 (**C-5**), 86.0 (**C-1'**), 82.0 (d, ³J_{CP}= 9.1 Hz, **C-4'**), 67.3 (d, ²J_{CP}= 5.0 Hz, **C-5'**), 59.4 (**H-A**), 33.0 (**C-2'**), 28.1 (**C-3'**), 24.8 (**H-B**), 20.7 (**H-C**), 14.0 (**C-D**).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= 0.48.

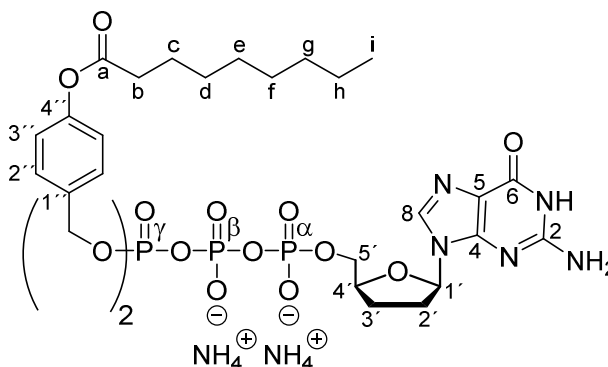
IR: ν [cm⁻¹]= 3394, 2961, 2875, 1663, 1614, 1568, 1486, 1383, 1348, 1106, 1068, 969, 882, 786, 739, 689, 541.

Darstellung von γ-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-ddGTP 72

Die Reaktion wurde nach der **AAV 9 (Variante B)** durchgeführt. Zunächst wurden 0.26 g (0.29 mmol, 1.0 Äquiv.) *P,P*-Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-pyrophosphat **198**, gelöst in 6.0 mL abs. Acetonitril, mit 0.16 mL (0.24 g, 1.1 mmol, 4.0 Äquiv.) TFAA und 0.25 mL (0.19 g, 1.8 mmol, 7.6 Äquiv.) Triethylamin, gelöst in 4.0 mL abs. Acetonitril, verestert. Aufgenommen in 2.0 mL abs. Acetonitril folgte die Aktivierung mit 55 µL (56 mg, 0.68 mmol, 2.4 Äquiv.) 1-Methylimidazol und 0.16 mL (0.12 g, 1.1 mmol, 4.0 Äquiv.) Triethylamin, bevor 0.13 g (0.14 mmol, 0.5 Äquiv. inkl. 0.3 Äquiv. TBAA) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-ddGMP **136**, gelöst in 4.0 mL abs. Acetonitril, hinzugegeben wurden.

Ausbeute: Es wurden 46 mg (45 µmol, 31%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1017.94 g/mol **Summenformel:** $C_{42}H_{58}N_5O_{16}P_3^{2-}$ **UV (HPLC):** λ_{max}= 253 nm
HPLC: t_R= 16.27 min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** *m/z*= ber.: 982.318 [M-H]⁻, gef.: 982.413.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.77 (bs, 1H, **NH**), 7.92 (s, 1H, **H-8**), 7.46-7.37 (m, 4H, **H-2'**), 7.10-6.99 (m, 4H, **H-3'**), 6.59 (bs, 2H, **NH₂**), 5.95 (t, ³*J*_{HH}= 5.6 Hz, 1H, **H-1'**), 5.08 (d, ³*J*_{HP}= 7.4 Hz, **Ph-CH₂**), 4.19-4.10 (m, 1H, **H-4'**), 4.08-4.00 (m, 1H, **H-5'_a**), 3.94-3.85 (m, 1H, **H-5'_b**), 2.56 (t, ³*J*_{HH}= 7.3 Hz, 4H, **H-b**), 2.34-



2.23 (m, 2H, **H-2'**), 2.14-1.90 (m, 2H, **H-3'**), 1.63 (quint, ³*J*_{HH}= 7.3 Hz, **H-c**), 1.41-1.17 (m, 20H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**), 0.92-0.82 (m, 6H, **H-i**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 171.7 (**C-a**), 156.9 (**C-6**), 153.6 (**C-2**), 150.6 (**C-4**), 150.2 (**C-4'**), 135.4 (**C-8**), 134.0 (d, ³*J*_{CP}= 8.0 Hz, **C-1'**), 129.1 (**C-2'**), 121.6 (**C-3'**), 116.7 (**C-5**), 84.2 (**C-1'**), 79.7 (**C-4'**), 67.9-67.7 (m, **Ph-CH₂**), 66.3 (**C-5'**), 33.5 (**C-b**), 31.2, 28.6, 28.5, 28.4, 22.1 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**), 31.0 (**C-2'**), 26.3 (**C-3'**), 24.3 (**C-d**), 13.9 (**C-i**).

³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= -12.24 (d, ²*J*_{PP}= 19.5 Hz, **P- α**), -12.71 (d, ²*J*_{PP}= 18.7 Hz, **P- γ**), -23.34 (d, ²*J*_{PP}= 18.9 Hz, **P- β**).

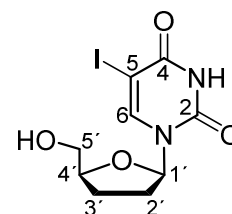
IR: ν [cm⁻¹]= 3145, 2956, 2926, 2855, 1758, 1692, 1608, 1576, 1464, 1260, 1135, 1026, 1012, 930, 512.

5.2.23 Synthese eines BCNA-Triphosphat-Prodrugs 73

Darstellung von 2',3'-Dideoxy-5-ioduridin 257

Es wurden 5.40 g (25.5 mmol, 1.0 Äquiv.) 2',3'-Dideoxyuridin **41** in 100 mL Essigsäure (99.5%) gelöst und langsam mit 6.98 g (12.7 mmol, 0.5 Äquiv.) Ammoniumcer(IV)-nitrat sowie 4.53 g (17.9 mmol, 0.7 Äquiv.) Iod versetzt. Die bordeauxfarbene Lösung wurde für 45 Minuten bei 80 °C gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit Toluol/Ethanol (2:1 v/v) und einmal mit Ethanol/Wasser (2:1 v/v) coevaporiert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 4.06 g (12.0 mmol, 47%) eines gelben Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 338.10 g/mol **Summenformel:** C₉H₁₁I N₂O₄ **R_r** **Wert:** 0.44 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** *m/z*= ber.: 360.9656 [M+Na]⁺, gef.: 360.9644.



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 11.60 (bs, 1H, **NH**), 8.57 (s, 1H, **H-6**), 5.89 (dd, ³*J*_{HH}= 6.7 Hz, ³*J*_{HH}= 3.0 Hz, 1H, **H-1'**), 5.19 (bs, 1H, **OH**), 4.05 (ddt, ³*J*_{HH}= 9.1 Hz, ³*J*_{HH}= 6.1 Hz, ³*J*_{HH}= 2.9 Hz, 1H, **H-4'**), 3.75 (dd, ²*J*_{HH}= 12.1 Hz, ³*J*_{HH}= 2.9 Hz, 1H, **H-5'_a**), 3.53 (dd,

$^2J_{\text{HH}} = 12.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 2.9 \text{ Hz}$, 1H, **H-5'**), 2.30-2.22 (m, 1H, **H-2'**_a), 2.05-1.98 (m, 1H, **H-2'**_b), 1.90-1.79 (m, 2H, **H-3'**).

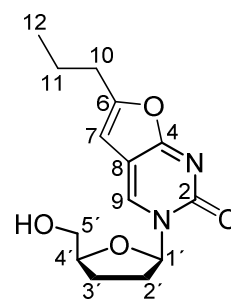
$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 160.6 (**C-4**), 150.1 (**C-2**), 145.2 (**C-6**), 101.0 (**C-5**), 85.8 (**C-1'**), 82.1 (**C-4'**), 68.1 (**C-5'**), 61.2 (**C-5'**), 32.5 (**C-2'**), 23.9 (**C-3'**).

IR: ν [cm^{-1}] = 3400, 3172, 2988, 2817, 1680, 1607, 1443, 1344, 1271, 1174, 1073, 1049, 1025, 1002, 857, 825, 762, 613, 536.

Darstellung von 3-(2',3'-Dideoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-*d*]-pyrimidin-2-on (6-Prop-ddBCNA) 253

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 4.0 g (12 mmol, 1.0 Äquiv.) 2',3'-Dideoxy-5-ioduridin **257** in 40 mL abs. DMF gelöst und mit 1.4 g (1.2 mmol, 0.1 Äquiv.) Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0), 0.90 g (4.7 mmol, 0.4 Äquiv.) Kupfer(I)-iodid, 3.3 mL (2.4 g, 24 mmol, 2.0 Äquiv.) abs. Diisopropylethylamin und 3.5 mL (2.4 g, 36 mmol, 3.0 Äquiv.) 1-Pentin zur Reaktion gebracht. Die schwarze Lösung wurde für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss mit weiteren 0.90 g (4.7 mmol, 0.4 Äquiv.) Kupfer(I)-iodid sowie 49 mL (36 g, 0.36 mol, 30 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 18 Stunden zum Sieden erhitzt, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v).

Ausbeute: Es wurden 2.2 g (8.0 mmol, 67%) eines gelben Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 278.31 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$ **R_FWert:** 0.45 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) **HRMS (ESI⁺):** $m/z = \text{ber.}: 301.1159$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, gef. 301.1173.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 8.84 (s, 1H, **H-9**), 6.43 (t, $^4J_{\text{HH}} = 1.1 \text{ Hz}$, 1H, **H-7**), 6.00 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 6.8 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 2.4 \text{ Hz}$, 1H, **H-1'**), 5.18 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5.3 \text{ Hz}$, 1H, **OH**), 4.17-4.12 (m, 1H, **H-4'**), 3.81 (ddd, $^2J_{\text{HH}} = 12.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 5.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 3.2 \text{ Hz}$, 1H, **H-5'**_a), 3.63 (ddd, $^2J_{\text{HH}} = 12.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 5.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 3.7 \text{ Hz}$, 1H, **H-5'**_b), 2.62 (td, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.1 \text{ Hz}$, 2H, **H-10**), 2.48-2.39 (m, 1H, **H-2'**_a), 2.03-1.97 (m, 1H, **H-2'**_b), 1.88-1.74 (m, 2H, **H-3'**), 1.64 (sext, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, **H-11**), 0.94 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, 3H, **H-12**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 171.1 (**C-4**), 157.8 (**C-6**), 153.8 (**C-2**), 137.0 (**C-9**), 105.8 (**C-8**), 99.9 (**C-7**), 88.0 (**C-1'**), 83.0 (**C-4'**), 61.3 (**C-5'**), 33.1 (**C-2'**), 29.3 (**C-10**), 23.6 (**C-3'**), 19.8 (**C-11**), 13.3 (**C-12**).

IR: ν [cm^{-1}] = 3368, 3106, 2961, 2932, 2874, 1663, 1616, 1568, 1447, 1429, 1383, 1332, 1257, 1223, 1169, 1080, 1048, 916, 784, 547.

Darstellung von 5-Chlor-cycloSal-3-(2',3'-didesoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]-pyrimidin-2-on 255 (5-Cl-cycloSal-6-Prop-ddBCNA)

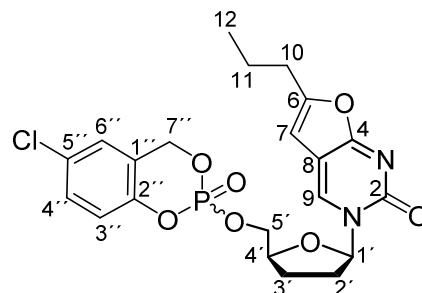
Die Reaktion wurde analog zu der **AAV 5 (Variante B)** durchgeführt. Es wurden 0.83 g (3.0 mmol, 1.0 Äquiv.) 6-Prop-ddBCNA **256** in 10 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 0.80 g (3.6 mmol, 1.2 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **93** sowie 0.71 mL (0.54 g, 4.2 mmol, 1.4 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 0.76 mL (4.2 mmol, 1.4 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan). Auf eine säulenchromatographische Reinigung konnte verzichtet werden.

Ausbeute: Es wurden 1.35 g (2.81 mmol, 94%) eines gelben Feststoffs in Form zweier Diastereomere erhalten.

Molmasse: 480.84 g/mol **Summenformel:**

$C_{21}H_{22}ClN_2O_7P$ **R_f-Wert:** 0.60 (CH₂Cl₂/MeOH 19:1 v/v)

HRMS (ESI⁺): *m/z*= ber.: 503.0745 [M+Na]⁺, gef. 503.0738.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 8.39, 8.38 (s, 1H, **H-9**, Diastereomere), 7.32-7.27 (m, 1H, **H-4''**, ds), 7.12-7.07 (m, 1H, **H-6''**, ds), 7.00, 6.99 (d, ³*J*_{HH}= 4.5 Hz, 1H, **H-3''**, ds), 6.17-6.11 (m, 1H, **H-1'**, ds), 5.98, 5.93 (s, 1H, **H-7**, ds), 5.41-5.23 (m, 2H, **H-7''**, ds), 4.61-4.48 (m, 1H, **H-4'**, ds), 4.47-4.36 (m, 2H, **H-5'**, ds), 2.73-2.54 (m, 3H, **H-2'_a**, **H-10**, ds), 2.20-2.12 (m, 1H, **H-2'_b**, ds), 2.12-2.00 (m, 1H, **H-3'_a**, ds), 1.85-1.62 (m, 3H, **H-3'_b**, **H-11**, ds), 0.98 (t, ³*J*_{HH}= 7.2 Hz, 3H, **H-12**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 171.7 (**C-4**), 159.7 (**C-6**), 154.9 (**C-2**), 148.6 (**C-5''**), 134.8, 134.7 (**C-9**, Diastereomere), 130.2, 130.2 (**C-4''**, ds), 129.9 (**C-1''**), 125.6, 125.6 (**C-6''**, ds), 122.1 (**C-2''**), 120.2, 120.1 (d, ³*J*_{CP}= 7.8 Hz, **C-3''**, ds), 107.6, 107.5 (**C-8**, ds), 99.2, 99.1 (**C-7**, ds), 89.4, 89.3 (**C-1'**, ds), 80.0, 80.0 (d, ³*J*_{CP}= 6.4 Hz, **C-4'**, ds), 69.5, 69.1 (d, ²*J*_{CP}= 6.0 Hz, **C-5'**, ds), 68.2, 68.1 (d, ²*J*_{CP}= 6.8 Hz, **C-7''**, ds), 33.4, 33.3 (**C-2'**, ds), 30.3 (**C-10**), 24.9, 24.7 (**C-3'**, ds), 20.3 (**C-11**), 13.7 (**C-12**).

³¹P-NMR (243 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= -9.02, -9.32 (s, Diastereomere).

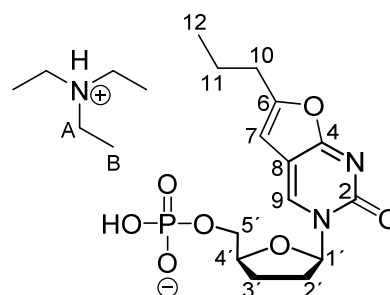
IR: ν [cm⁻¹]= 3102, 2959, 2900, 1707, 1667, 1632, 1583, 1479, 1422, 1404, 1383, 1229, 1185, 1122, 991, 909, 815, 780, 707, 649, 525, 482.

Darstellung von 3-(2',3'-Dideoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]-pyrimidin-2-on-5'-monophosphat 258 (6-Prop-ddBCNAMP)

Die Hydrolysereaktion wurde analog zu der **AAV 5 (Variante B)** durchgeführt. Es wurden 95 mg (0.20 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Cl-cycloSal-6-Prop-ddBCNA **255** in 7.5 mL eines Acetonitril/Wasser/Triethylamin-Gemisches (2:2:1 v/v/v) hydrolysiert. Die Reinigung des Rohprodukts

mittels automatisierter RP18-Chromatographie erfolgte mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten.

Ausbeute: Es wurden 40 mg (0.087 mmol, 44%) eines schwach gelben Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 459.48 g/mol **Summenformel:** C₁₄H₁₉N₂O₇P⁻ **R_F-Wert:** 0.67 (*iso*-Propanol/NH₃/H₂O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** *m/z*= ber.: 357.086 [M-H]⁻, gef.: 357.097.



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 8.86 (s, 1H, **H-9**), 6.50

(t, ⁴J_{HH}= 1.0 Hz, 1H, **H-7**), 6.20 (dd, ³J_{HH}= 6.8 Hz, ⁴J_{HH}= 2.3 Hz, 1H, **H-1'**), 4.54-4.46 (m, 1H, **H-4'**), 4.33 (ddd, ²J_{HH}= 11.8 Hz, ³J_{HH}= 5.0 Hz, ³J_{HP}= 2.7 Hz, 1H, **H-5'a**), 4.11 (ddd, ²J_{HH}= 11.8 Hz, ³J_{HH}= 5.6 Hz, ³J_{HP}= 4.0 Hz, 1H, **H-5'b**), 3.22 (q, ³J_{HH}= 7.3 Hz, 6H, **H-A**), 2.70 (t, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 2H, **H-10**), 2.68-2.57 (m, 1H, **H-2'a**), 2.26-2.17 (m, 1H, **H-2'b**), 2.15-2.05 (m, 1H, **H-3'a**), 2.01-1.87 (m, 1H, **H-3'b**), 1.72 (sext, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 2H, **H-11**), 1.30 (t, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 9H, **H-B**), 0.98 (t, ³J_{HH}= 7.4 Hz, 3H, **H-12**).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm]= 171.2 (**C-4**), 160.7 (**C-6**), 156.0 (**C-2**), 137.5 (**C-9**), 109.3 (**C-8**), 99.9 (**C-7**), 89.2 (**C-1'**), 82.1 (d, ³J_{CP}= 8.2 Hz, **C-4'**), 65.1 (d, ²J_{CP}= 4.9 Hz, **C-5'**), 46.7 (**C-A**), 32.9 (**C-2'**), 29.4 (**C-10**), 23.6 (**C-3'**), 19.7 (**C-11**), 12.8 (**C-12**), 8.2 (**C-B**).

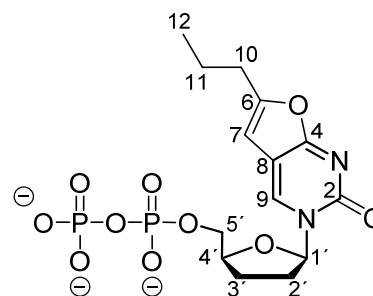
³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= 0.45.

IR: ν [cm⁻¹]= 3108, 2961, 2876, 1666, 1641, 1572, 1460, 1384, 1332, 1167, 1097, 1073, 991, 916, 786, 519.

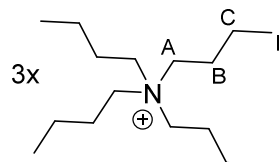
Darstellung von 3-(2',3'-Dideoxy-β-D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]-pyrimidin-2-on-5'-diphosphat 254 (6-Prop-ddBCNADP)

Die Reaktion wurde nach der **AAV 6** durchgeführt. Es wurden 0.84 g (1.8 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Cl-*cyclo*Sal-6-prop-ddBCNA **255**, in 10 mL abs. DMF gelöst, und mit 1.3 g (3.8 mmol, 2.2 Äquiv.) Mono(tetra-*n*-butylammonium)-phosphat, gelöst in 10 mL abs. DMF, versetzt. Das Rohprodukt wurde je einmal in Form seines Triethylammonium- als auch seines Ammoniumsalzes mittels automatisierter RP18-Chromatographie aufbereitet. Dafür mussten vor den einzelnen Chromatographien die nacheinander eingesetzten Ionenaustauscher Dowex-NH₄⁺ sowie Dowex-H⁺ mit anschließender Neutralisation mit Triethylamin (Überführung in Triethylammoniumform) bzw. der Ionenaustauscher Dowex-NH₄⁺ (direkte Überführung in Ammoniumform) verwendet werden. Abschließend wurde mit dem Ionenaustauscher Dowex-H⁺ und Neutralisation mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid (40% in Wasser) die entsprechende Salzform erhalten.

Ausbeute: Es wurden 0.35 mg (0.30 mmol, 17%) eines orangen Harzes erhalten. **Molmasse:** 1162.66 g/mol
Summenformel: $C_{14}H_{17}N_2O_{10}P_2^{3-}$ **R_f-Wert:** 0.33 (*iso*-Propanol/ NH_3/H_2O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 437.052 $[M-H]^-$, gef.: 436.967.



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 8.80 (s, 1H, **H-9**), 6.49 (s, 1H, **H-7**), 6.14 (d, $^3J_{HH}$ = 6.6 Hz, 1H, **H-1'**), 4.48-4.40 (m, 1H, **H-4'**), 4.36-4.28 (m, 1H, **H-5'a**), 4.18-4.10 (m, 1H, **H-5'b**), 3.23-3.05 (m, 24H, **H-A**), 2.64 (t, $^3J_{HH}$ = 7.4 Hz, 2H, **H-10**), 2.60-2.49 (m, 1H, **H-2'a**), 2.19-2.09 (m, 1H, **H-2'b**), 2.08-1.98 (m, 1H, **H-3'a**), 1.95-1.79 (m, 1H, **H-3'b**), 1.72-1.50 (m, 26H, **H-11**, **H-B**), 1.38-1.22 (m, 24H, **H-C**), 0.94-0.85 (m, 39H, **H-12**, **H-D**).



¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm]= 171.2 (**C-4**), 160.5 (**C-6**), 155.8 (**C-2**), 137.6 (**C-9**), 109.3 (**C-8**), 100.2 (**C-7**), 89.1 (**C-1'**), 82.2 (**C-4'**), 65.7 (**C-5'**), 58.0 (**C-A**), 32.9 (**C-2'**), 29.4 (**C-10**), 23.7 (**C-3'**), 23.0 (**C-B**), 19.7 (**C-11**), 19.1 (**H-C**), 12.8 (**C-12**), 12.8 (**H-D**).

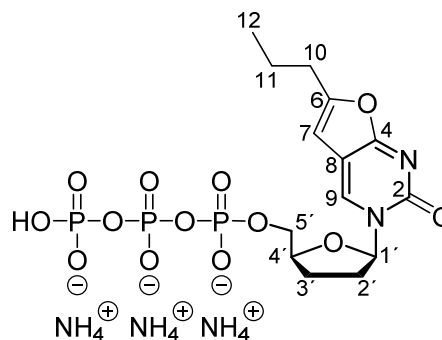
³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm]= -8.46 (d, $^2J_{PP}$ = 21.8 Hz, **P- α**), -10.99 (d, $^2J_{PP}$ = 21.8 Hz, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3381, 2961, 2875, 1666, 1572, 1487, 1463, 1382, 1225, 1100, 1073, 932, 885, 789, 740, 516.

Darstellung von 3-(2',3'-Dideoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-propyl-2,3-dihydrofuro[2,3-d]-pyrimidin-2-on-5'-triphosphat 259 (6-Prop-ddBCNATP)

Die Reaktion wurde nach der **AAV 7** durchgeführt. Es wurden 85 mg (0.18 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Cl-*cycloSal*-6-Prop-ddBCNA **255**, in 2.0 mL abs. DMF gelöst, mit 0.14 mg (0.21 mmol, 1.2 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-pyrophosphat, gelöst in 0.8 mL abs. DMF, versetzt.

Ausbeute: Es wurden 44 mg (87 μ mol, 44%) eines schwach gelben Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 569.34 g/mol **Summenformel:** $C_{14}H_{18}N_2O_{13}P_3^{3-}$ **R_f-Wert:** 0.15 (*iso*-Propanol/ NH_3/H_2O 4:1:2.5 v/v/v) **MALDI-MS (neg.):** m/z = ber.: 517.018 $[M-H]^-$, gef.: 517.037.



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm]= 8.81 (s, 1H, **H-9**), 6.49 (t, $^4J_{HH}$ = 1.0 Hz, 1H, **H-7**), 6.21 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.7 Hz, $^4J_{HH}$ = 2.3 Hz, 1H, **H-1'**), 4.57-4.49 (m, 1H, **H-4'**), 4.48-4.40 (m, 1H, **H-5'a**), 4.31-4.22 (m, 1H, **H-5'b**), 2.71 (t, $^3J_{HH}$ = 7.3 Hz, 2H, **H-10**), 2.68-2.58 (m, 1H, **H-2'a**), 2.28-2.18

(m, 1H, **H-2'**), 2.18-2.08 (m, 1H, **H-3'**), 2.01-1.88 (m, 1H, **H-3'**), 1.73 (sext, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 2H, **H-11**), 0.98 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 3H, **H-12**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ [ppm]= 171.3 (**C-4**), 160.7 (**C-6**), 156.1 (**C-2**), 137.5 (**C-9**), 109.4 (**C-8**), 100.1 (**C-7**), 89.3 (**C-1'**), 82.0 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.7$ Hz, **C-4'**), 66.4 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.9$ Hz, **C-5'**), 32.8 (**C-2'**), 29.4 (**C-10**), 23.8 (**C-3'**), 19.7 (**C-11**), 12.8 (**C-12**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ [ppm]= -10.73 (d, $^2J_{\text{PP}} = 19.7$ Hz, **P- α**), -11.21 (d, $^2J_{\text{PP}} = 19.7$ Hz, **P- γ**), -23.07 (t, $^2J_{\text{PP}} = 19.7$ Hz, **P- β**).

IR: ν [cm^{-1}]= 3180, 2961, 2872, 1665, 1617, 1570, 1427, 1385, 1333, 1217, 1173, 1121, 1508, 996, 949, 894, 808, 782, 750, 448.

Darstellung von γ -Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-BCNATP 73

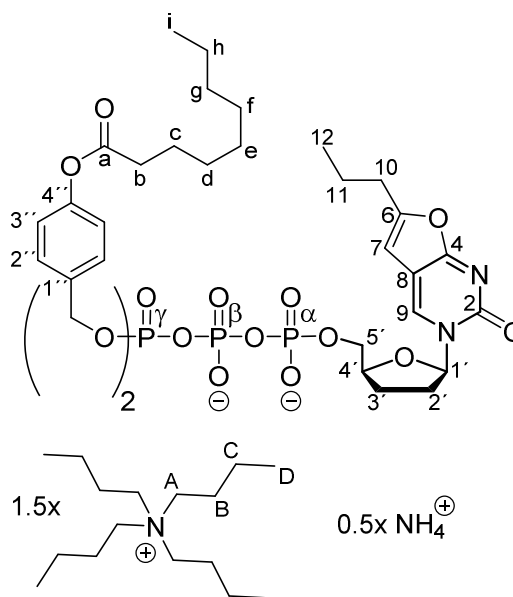
Die Reaktion wurde nach **AAV 9 (Variante A)** durchgeführt. Es wurden 0.10 mg (87 μmol , 1.0 Äquiv.) Bis(tetra-*n*-butylammonium)-BCNADP **254**, in 0.7 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.10 g (0.16 mmol, 1.8 Äquiv.) Bis(nonanoyloxybenzyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **75e** und 0.45 mL (0.11 mmol, 1.3 Äquiv.) DCI (0.25 M in Acetonitril) versetzt. Die Oxidation erfolgte mit 32 μL (0.18 mmol, 2.0 Äquiv.) *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan).

Ausbeute: Es wurden 30 mg (22 μmol , 25%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 1381.65 g/mol **Summenformel:** $\text{C}_{46}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{P}_3$ **UV (HPLC):** $\lambda_{\text{max}(1)} = 245$ nm, $\lambda_{\text{max}(2)} = 329$ nm **HPLC:** $t_{\text{R}} = 17.74$ min (Methode A) **MALDI-MS (neg.):** $m/z = \text{ber.}: 1009.342$ [M-H], gef.: 1009.396.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 9.02 (s, 1H, **H-9**), 7.43-7.34 (m, 4H, **H-2''**), 7.05-6.96 (m, 4H, **H-3''**), 6.60 (t, $^4J_{\text{HH}} = 0.9$ Hz, 1H, **H-7**), 6.09 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, 1H, **H-1'**), 5.14 (dd, $^3J_{\text{HP}} = 8.0$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 3.1$ Hz, 4H, **Ph-CH₂**), 4.55-4.47

(m, 1H, **H-4'**), 4.37-4.25 (m, 2H, **H-5'**), 3.29-3.18 (m, 12H, **H-A**), 2.58 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 4H, **H-b**), 2.63-2.46 (m, 3H, **H-2'a**, **H-10**), 2.16-2.07 (m, 1H, **H-2'b**), 2.06-1.89 (m, 2H, **H-3'**), 1.79-1.59 (m, 18H, **H-11**, **H-c**, **H-B**), 1.50-1.25 (m, 32H, **H-d**, **H-e**, **H-f**, **H-g**, **H-h**, **H-C**), 1.03 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 18H, **H-D**), 0.98 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 3H, **H-12**), 0.92 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 6H, **H-i**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ [ppm]= 173.6 (**C-a**), 172.8 (**C-4**), 160.2 (**C-6**), 156.8 (**C-2**), 152.3 (**C-4'**), 139.3 (**C-9**), 135.1 (**C-1''**), 130.4 (**C-2''**), 122.8 (**C-3''**), 109.5 (**C-8**), 102.0 (**C-7**), 90.5 (**C-1'**), 83.2 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.4$ Hz, **C-4'**), 70.3 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.9$ Hz, **Ph-CH₂**), 67.3 (**C-5'**), 59.5 (**C-A**), 35.0 (**C-b**), 34.7 (**C-2'**), 33.0, 30.4, 30.3, 30.2, 23.7 (**C-d**, **C-e**, **C-f**, **C-g**, **C-h**),



30.9 (C-10), 26.0 (C-c), 25.0 (C-3'), 24.8 (C-B), 21.4 (C-11), 20.7 (C-C), 14.4 (C-i), 13.9 (C-12), 13.9 (C-D).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): δ [ppm]= -12.06 (d, ²J_{PP}= 19.9 Hz, P-α), -13.49 (d, ²J_{PP}= 17.8 Hz, P-γ), -24.47 (t, ²J_{PP}= 18.1 Hz, P-β).

IR: ν [cm⁻¹]= 3410, 3190, 3044, 2957, 2925, 2855, 1758, 1666, 1617, 1572, 1509, 1461, 1380, 1332, 1256, 1218, 1202, 1168, 1131, 1066, 1026, 1010, 786, 723, 519.

5.3 Hydrolysestudien von Di- und Triphosphat-Prodrugs

Um Informationen über das chemische (PBS, RPMI) wie auch enzymatische (PLE, CEM/0 Zellextrakt) Hydrolyseverhalten von allen in der Arbeit dargestellten DiPPro- und TriPPro-Verbindungen zu erhalten, wurden zunächst jeweils 50 mM DMSO-Stammlösungen angesetzt. Für die Auswertung wurden die mittels HPLC aufgenommenen Chromatogramme bei nukleosidspezifischen Wellenlängen verwendet. Durch das Auftragen der Integrale entsprechender Peaks gegen die Hydrolysedauer und unter der Annahme einer Reaktion pseudo-erster-Ordnung wurden mithilfe eines kommerziell erhältlichen Kalkulationsprogramms (OriginPro 9.0G) exponentielle Ausgleichskurven ermittelt. Die Exponentialfunktion lässt sich dabei wie folgt beschreiben:

$$[A]_t = [A]_0 \cdot e^{-kt}$$

[A]_t = Konzentration zum Zeitpunkt t

[A]₀ = Anfangskonzentration

k = Reaktions- bzw. Geschwindigkeitskonstante

Durch die Bestimmung der Konstante k konnte mit nachstehender Formel die Halbwertszeit t_{1/2} berechnet werden:

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

5.3.1 Hydrolysestudien in Phosphatpuffer (PBS) bei pH 7.3 und pH 6.0

Herstellung des verwendeten Phosphatpuffers (50 mM, pH 7.3)

Es wurden 0.55 g (3.9 mmol) Dinatriumhydrogenphosphat und 0.16 mg (0.89 mmol) Kaliumdihydrogenphosphat wurden mit Reinstwasser auf ein Volumen von 100 mL aufgefüllt und mit 1 M Natronlauge bzw. verdünnter Phosphorsäure auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.

Für die Hydrolysestudien wurde eine 1.9 mM Lösung der Prodrugs angesetzt. Dafür wurden 11 µL der 50 mM DMSO-Stammlösung mit 189 µL Reinstwasser und 100 µL DMSO

verdünnt. Anschließend wurden 300 µL Phosphatpuffer hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte ohne internen Standard bei 37 °C im Thermomixer. Nach bestimmten Zeitpunkten wurden der Hydrolyselösung Aliquote (30 µL) entnommen und umgehend mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Nach dem Auftauen wurden die Proben direkt über analytische RP-HPLC analysiert, wozu 25 µL Probe injiziert wurden. Mit den synthetisch dargestellten Mono(alkanoyloxybenzyl)-Derivaten **57a,e,j** wurde analog verfahren. Für die Ermittlung der Halbwertszeiten aller weiteren Intermediate wurden den Hydrolyselösungen erst nach vollständiger Umsetzung des Prodrugs zu verschiedenen Zeitpunkten weitere Aliquote entnommen und mittels HPLC analysiert.

5.3.2 Hydrolysestudien mit Schweineleberesterase (PLE) in PBS

Für die enzymatische Hydrolyse im PLE-Medium wurden 20 µL der 50 mM Stammlösung mit jeweils 83.3 µL DMSO sowie Reinstwasser auf eine Konzentration von 6 mM verdünnt. Anschließend wurden 140 µL dieser Probe mit weiteren 105 µL DMSO sowie 700 µL des in Kapitel 5.3.1 beschriebenen Phosphatpuffer (pH 7.3) versetzt. Es wurden 52.5 µL einer Lösung aus PLE in PBS (3 mg/mL) hinzugegeben und die Hydrolyselösung bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquote (125 µL) entnommen, wobei die Aufarbeitung bedingt durch die großen Unterschiede in der Lipophilie der zu charakterisierenden Substanzen auf verschiedene Weise vorgenommen werden musste:

- a) Die Proben der Prodrugs **56a-g,l,m,o-q**, **57a,e**, **58** und **59-72** wurden mit 132.5 µL Methanol versetzt und für fünf Minuten auf Eis gelagert. Nach fünfminütigen Zentrifugieren (13000 rpm) wurde der Überstand filtriert (Chromafil® RC-20/15 MS, 0.2 µm) und in flüssigem Stickstoff gelagert.
- b) Die Proben der Prodrugs **56h,i,k,n** und **57j** wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff gekühlt. Nach dem Auftauen wurden die Proben für zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt, zentrifugiert und filtriert (Chromafil® AO-20/3, 0.2 µm), bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.
- c) Die Proben des Prodrugs **56j** wurden mit 70 µL THF (HPLC grade) versetzt und in flüssigem Stickstoff gekühlt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog zu b).

Nach dem Auftauen wurden 50-80 µL der Probe mittels analytischer HPLC untersucht, wobei mit Ausnahme der Prodrugs **56a,b**, **57a** und **58** (Methode B) und **56j** und **57j** (Methode C) immer Methode A eingesetzt wurde.

5.3.3 Hydrolysestudien in CEM/0-Zellextrakten

Die verwendeten Zellextrakte wurden von J. BALZARINI und D. SCHOLS, Katholieke Universiteit Leuven (Belgien), zur Verfügung gestellt.

Für die Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse in CEM/0-Zellextrakten wurde eine 6 mM Stammlösung angesetzt, indem 30 µL der 50 mM DMSO Stammlösung der zu analysierenden Substanz mit 220 µL DMSO verdünnt wurden. Für jeden Messwert wurde anschließend 10 µL 6 mM Stammlösung, 10 µL Reinstwasser und 50 µL CEM/0-Zellextrakt bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Der Abbruch der Hydrolysen musste bedingt durch die großen Unterschiede in der Lipophilie der zu charakterisierenden Substanzen auf verschiedene Weise vorgenommen werden:

- a) Der Abbruch der Hydrolyse bei den Proben der Prodrugs **56a-f,i,m,p**, **57a,e**, **58** und **59-72** wurde durch Zugabe von 150 µL Methanol vollzogen. Anschließend wurde die Suspension für fünf Minuten auf Eis gelagert, fünf Minuten zentrifugiert (13000 rpm), der Überstand filtriert (Chromafil® RC-20/15 MS, 0.2 µm) und in flüssigem Stickstoff gelagert.
- b) Die Aufarbeitung der Proben der Prodrugs **56g-i,k,n** und **57j** erfolgte entsprechend Abschnitt b) der Hydrolysestudien mit PLE (Kapitel 5.3.2).
- c) Die Aufarbeitung der Proben des Prodrugs **56j** erfolgte entsprechend Abschnitt c) der Hydrolysestudien mit PLE (Kapitel 5.3.2).

Nach dem erneuten Auftauen wurden 50-80 µL Probe mittels analytischer HPLC untersucht, wobei mit Ausnahme der Prodrugs **56a** (Methode D), **56b**, **58** (Methode B) und **56j,57j** (Methode C) immer Methode A eingesetzt wurde.

5.3.4 Hydrolysestudien im RPMI-Medium

Die Hydrolyseuntersuchungen der Verbindungen **56e** und **73** wurden analog zu den Studien im Zellextrakt (Kapitel 5.3.3, Aufarbeitung nach a)) durchgeführt, wobei RPMI-1640 Medium anstelle des Zellextrakts eingesetzt wurde.

5.3.5 ¹H- und ³¹P-NMR-spektroskopische Hydrolysestudien

Hierfür wurden 10-13 mg der TriPPP_{ro}-Verbindung in 1.0 mL PBS (50 mM, pH 7.3, in D₂O/Aceton-*d*₆ (3:2)) aufgenommen und nach zweiminütigem Durchmischen filtriert (Chromafil® RC-20/15 MS, 0.2 µm). Die Proben wurden im Wasserbad bei 37 °C (Thermostat) im NMR-Röhrchen gelagert und regelmäßig NMR-spektroskopisch untersucht.

5.3.6 Analyse der Hydrolyseproben durch MALDI-MS

Zur Charakterisierung von Hydrolyseprodukten mittels MALDI-MS wurden die einzelnen Verbindungen beim Eluieren von der analytischen RP18-Säule (HPLC, Methode A) fraktioniert und gefriergetrocknet. Durch den hohen Anteil an nicht flüchtigem Tetra-*n*-butylammoniumacetat konnten jedoch die isolierten Substanzen mittels MALDI-MS nicht

detektiert werden, weshalb sich eine weitere Chromatographie mit einer HILIC-Säule in Kombination mit einem Ammoniumformiatlaufpuffer (Methode D) anschloss. Alternativ hat sich auch der Triethylammoniumacetatpuffer (Methode E) als zielführend herausgestellt. Nach erneuter Gefriertrocknung war eine massenspektrometrische Detektion der Hydrolyseprodukte möglich.

5.4 Zellaufnahmestudien

Die Zellinkubationen wurden von DR. ILONA HAUBER am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie in Hamburg vorgenommen. Dafür wurden CEM-SS-Zellen im Zellkulturmedium (RPMI-1640 Medium, pH 7.5, 10% fötales Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin, 200 mM L-Glutamin) in T175-Zellkulturflaschen expandiert, bis ca. 10^9 -Zellen vorlagen. Die Zellen wurden in 20 mL des Zellkulturmediums aufgenommen und für die entsprechende Dauer mit dem TriPPPPro-BCNATP-Prodrug **73** (100 μ M) inkubiert (37 °C, 5% CO₂, 90% RH). Anschließend wurden die Zellen zweimal intensiv mit PBS gewaschen, zentrifugiert und bei -78 °C gelagert. Während die erhaltene Waschlösung vor der weiteren Analyse lediglich einmal filtriert (Chromafil® RC-20/15 MS, 0.2 μ m) wurde, wurde das Zellpellet in 150 μ L eines Methanol/Wasser-Gemisches (2:1 v/v) aufgenommen, zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt, zehn Minuten auf Eis gelagert und für zehn Minuten zentrifugiert (8000 rpm). Der Überstand wurde ebenfalls durch einen Spritzenfilter filtriert und das Filtrat mittels analytischer RP18-HPLC (Methode A) untersucht. Sowohl von den Waschlösungen als auch von den durch Zellyse gewonnenen Filtraten wurde ein Injektionsvolumen von 80 μ L verwendet.

5.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zunächst wurden 170 μ L einer 6 mM DMSO-Lösung der TriPPPPro-Verbindung mit 100 μ L PBS (50 mM, pH 7.3) verdünnt und die Reaktion durch Zugabe von 60 μ L einer Lösung des Enzyms PLE in PBS (3 mg/mL) gestartet. Die Inkubation erfolgte in einem Thermomixer bei 37 °C für 20 Stunden. Die Hydrolyselösung wurde über einen Spritzenfilter (Chromafil® AO-20/3, 0.2 μ m) filtriert und im Anschluss im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in 40 μ L Tris-HCl-Puffer (10 mM) aufgenommen und eine PCR unter Verwendung des pET22b-Vektors durchgeführt, wobei neben dATP, dCTP und dGTP als Thymidinanalogon das aus der Hydrolyse gewonnene NTP eingesetzt wurde (Tab. 8). Das verwendete PCR-Programm ist Tabelle 9 zu entnehmen. Parallel wurde ein Kontrollansatz unter den gleichen Bedingungen mit käuflich erworbenem TTP erstellt.

Tabelle 8: PCR-Ansätze.

PCR-Ansatz (Kontrolle)	PCR-Ansatz (Hydrolysat)
1 µL dNTP-Mix (25 mM)	0.25 µL dATP (100 mM)
1 µL Fire Pol	0.25 µL dCTP (100 mM)
10 µL PCR-Puffer	0.25 µL dGTP (100 mM)
10 µL MgCl ₂ -Lösung (50 mM)	1 µL Hydrolyselösung (~25 mM)
1 µL Primer Pumilio_Ndel_fwd	1 µL Fire Pol
1 µL Primer HsPumHD_Xhol_rev	10 µL PCR-Puffer
1 µL pET22b+HsPumHD	10 µL MgCl ₂ -Lösung (50 mM)
75 µL ddH ₂ O	1 µL Primer Pumilio_Ndel_fwd
	1 µL Primer HsPumHD_Xhol_rev
	1 µL pET22b+HsPumHD
	74.25 µL ddH ₂ O

Tabelle 9: Verwendetes PCR-Programm.

1. Primäre Denaturierung	bei 95 °C	5 min
2. Denaturierung	bei 95 °C	30 s
3. Annealing	bei 54 °C	30 s
4. Elongation	bei 72 °C	60 s
5. Finale Elongation	bei 72 °C	5 min

Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte in Flachgelapparaturen mit 1%igem Agarosegel. Die PCR-Ansätze wurden jeweils mit 1 µL Beladungspuffer („Loading Dye“) versetzt, mit welchem die elektrophoretische Trennung beobachtet wurde. Eine Tasche des Agarosegels wurde mit einem DNA-Standard beladen, mit dem die erfolgreiche Amplifikation der DNA-Fragmente überprüft wurde. Nach der elektrophoretischen Trennung erfolgte durch Verwendung von Ethidiumbromid die Visualisierung, wobei unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 300$ nm die DNA-Fragmente sichtbar wurden.

5.6 Primer-Extension-Assay

Die verwendete Polymerase HIV-RT wurde von der Firma Roboklon und die Primer sowie das Template von Life Technologies bezogen.

Primer-Sequenz:

5'-T TGG ATA GGA GGA AGT CCT GGT TGC-3'

Template-Sequenz:

5'-AGA CAA ACC TAT CCT CCT TCA GGA CCA ACG-3'

Die Durchführung des Primer-Extension-Assays erfolgte unter den folgenden Bedingungen: Die Markierung des Primers [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP wurde nach Standardvorschriften durchgeführt. Nach fünf Minuten Inkubationszeit bei 95 °C in 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.6) und 50 mM NaCl-Lösung wurde die Hybridisierung und das Annealing des Primers am Templatestrang durch Abkühlung von 95 °C auf 20 °C über drei Stunden erreicht. Durch das langsame Abkühlen wurde ein optimales Anlagern komplementärer Oligonukleotide gewährleistet. Die finale Reaktionslösung mit einem Gesamtvolumen von 20 μL setzte sich aus 2.5 μM dNTPs bzw. Hydrolysat, 1x Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.6), 10 mM MgCl_2 und 40 mM KCl), 0.02 μM des Hybridisierungsansatzes und 0.2 units des Enzyms zusammen (Angaben= Endkonzentrationen). Die Inkubationszeit bei 37 °C betrug zehn Minuten. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 80 °C für drei Minuten beendet, bevor sich die Trennung mit einer denaturierenden PAGE (15%) anschloss. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte autoradiographisch.

6 Literaturverzeichnis

- [1] World Health Organization, zu finden unter: www.who.int (letzter Zugriff 30.08.2015).
- [2] J.-F. Fortin, C. Barat, Y. Beaujourn, B. Barbeau, M. J. Tremblay; Hyper-responsiveness to stimulation of human immunodeficiency virus-infected CD4-T cells requires nef and tat virus gene products and results from higher NFAT, NF- κ B, and AP-1 induction; *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 39520-39531.
- [3] K. Arasteh, H.-W. Baenkler, C. Bieber; Innere Medizin; 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2009**, S. 1104-1106.
- [4] M. S. Gottlieb, R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, A. Saxon; Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency; *New Engl. J. Med.* **1981**, *305*, 1425-1431.
- [5] N. R. Nuno, A. Rambaut, M. A. Suchard, G. Baele, T. Bedford, M. J. Ward, A. J. Tatem, J. D. Sousa, N. Arinaminpathy, J. Pépin, D. Posada, M. Peeters, O. G. Pybus, P. Lemey; The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations; *Science* **2014**, *346*, 56-61.
- [6] UNAIDS, *Report on the global AIDS epidemic 2013*, zu finden unter: www.unaids.org (letzter Zugriff 29.08.2015).
- [7] R. C. Gallo, S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster, P. D. Markham; Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS; *Science* **1984**, *224*, 500–503.
- [8] F. Barré-Sinoussi, J. C. Chermann, F. Rey, T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Daugey, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, L. Montagnier; Isolation of a T-Lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS); *Science* **1983**, *220*, 868-871.
- [9] F. Clavel, D. Guétard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Daugey, C. Katlama, C. Rouzioux; Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS; *Science* **1986**, *233*, 343-6.
- [10] P. Lemey, O. G. Pybus, B. Wang, N. K. Saksena, M. Salemi, A. M. Vandamme; Tracing the origin and history of HIV-2 epidemic; *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6588-6592.
- [11] G. S. Gottlieb, S. P. Eholié, J. Nkengasong, S. Jallow, S. Rowland-Jones, H. C. Whittle, P. S. Sow; A call for randomized controlled trials of antiretroviral therapy for HIV-2 infection in West Africa; *AIDS* **2008**, *22*, 2069-2072.
- [12] S. Nyamweya, A. Hegedus, A. Jaye, S. Rowland-Jones, K. L. Flanagan, D. C. Macallan; Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis; *Rev. Med. Virol.* **2013**, *23*, 221-240.

- [13] United Nations, *Millennium Development Goals*, zu finden unter: www.un.org (letzter Zugriff: 29.08.2015).
- [14] UNAIDS, *The Gap Report 2014*, zu finden unter: www.unaids.org (letzter Zugriff 29.08.2015).
- [15] UNAIDS, *Ending the AIDS epidemic by 2030*, zu finden unter: www.unaids.org (letzter Zugriff 29.08.2015).
- [16] H. Mitsuya, K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St. Clair, S. N. Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, S. Broder; 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 7096-7100.
- [17] Y. El Safadi, V. Vivet-Boudou, R. Marquet; HIV-1 reverse transcriptase inhibitors; *Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 723-737.
- [18] S. M. Schader, M. A. Wainberg; Insights into HIV-1 pathogenesis through drug discovery: 30 years of basic research and concerns for the future; *HIV & AIDS Review* **2011**, *10*, 91-98.
- [19] AIDSinfo, *Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents*, zu finden unter: www.aidsinfo.nih.gov (letzter Zugriff: 27.08.1015).
- [20] V. Montessori, N. Press, M. Harris, L. Akagi, J. S. G. Montaner; Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection; *Can. Med. Assoc. J.* **2005**, *170*, 229-238.
- [21] F. Horn; *Biochemie des Menschen*; 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2012**, S. 320-323.
- [22] H. Choe, M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. Ponath, L. Wu, C. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, J. Sodroski; The betachemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates; *Cell* **1996**, *85*, 1135-1148.
- [23] M. J. Endres, P. Clapham, M. Marsh, M. Ahuja, J. D. Turner, A. McKnight, J. F. Thomas, B. Stoebenau-Haggarty, S. Choe, P. J. Vance, T. N. Wells, C. Power, S. S. Sutterwala, R. W. Doms, N. R. Landau, J. A. Hoxie; CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusion/CXCR4; *Cell* **1996**, *87*, 745-756.
- [24] F. J. Torriani, L. Komarow, R. A. Parker, B. R. Cotter, J. S. Currier, M. P. Dubè, C. J. Fichtenbaum, M. Gerschenson, C. K. C. Mitchell, R. L. Murphy, K. Squires, J. H. Stein; Endothelial function in HIV-infected antiretroviral naive subjects before and after starting potent antiretroviral therapy: AIDS clinical trials group study 5152s; *J. Am. Coll. Cardiol.* **2008**, *52*, 569-576.
- [25] F. J. Piacenti; An update and review of antiretroviral therapy; *Pharmacotherapy* **2006**, *26*, 1111-1133.
- [26] G. Chene, J. A. Sterne, M. May, D. Costagliola, B. Ledergerber, A. N. Phillips, F. Dabis, J. Lundgren, A. D'Arminio Monforte, F. de Wolf, R. Hogg, P. Reiss, A. Justice, C. Leport, S.

- Staszewski, J. Gill, G. Fatkenheuer, M. E. Egger; Prognostic importance of initial response in HIV-1 infected patients starting potent antiretroviral therapy: Analysis of prospective studies; *Lancet*. **2003**, *362*, 679-686.
- [27] L. M. Mansky; Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation; *J. Gen. Virol.* **1998**, *79*, 1337-1345.
- [28] J. Balzarini; Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine derivatives; *Pharm. World Sci.* **1994**, *16*, 113-126.
- [29] N. Sluis-Cremer, N. A. Temiz, I. Bahar; Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding; *Curr. HIV Res.* **2004**, *2*, 323-332.
- [30] T. Chilar, A. S. Ray; Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine; *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 39–58.
- [31] S. Broder; The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic; *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 1-18.
- [32] E. De Clercq, A. Holý; Acyclic nucleoside phosphonates: A key class of antiviral drugs; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 928-940.
- [33] L. P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, C. Dumontet; Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 447-464.
- [34] T. Nitanda, X. Wang, H. Kumamoto, K. Haraguchi, H. Tanaka, Y. C. Cheng, M. Baba; Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and resistance profile of 2',3'-didehydro-3'-deoxy-4'-ethynylthymidine *in vitro*; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 3355-3360.
- [35] G. E. Dutschman, S. P. Grill, E. A. Gullen, K. Haraguchi, S. Takeda, H. Tanaka, M. Baba, Y. C. Cheng; Novel 4'-substituted stavudine analog with improved anti-human immunodeficiency virus activity and decreased cytotoxicity; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1640-1646.
- [36] D. Jochmans; Novel HIV-1 reverse transcriptase inhibitors; *Virus Res.* **2008**, *134*, 171-185.
- [37] A. R. Van Rompay, M. Johansson, A. Karlsson; Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases; *Pharmacol. Therapeut.* **2000**, *87*, 189–198.
- [38] P. J. Piliero; Pharmacokinetic properties of nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors; *J. Acq. Immun. Def. Synd.* **2004**, *37*, S2-S12.
- [39] Y. Zhang, Y. Gao, X. Wen, H. Ma; Current strategies for improving oral absorption of nucleoside analogues; *Asian J. Pharm. Sci.* **2014**, *9*, 65-74.
- [40] U. Pradere, E. C. Garnier-Amblard, S. J. Coats, F. Amblard, R. F. Schinazi; Synthesis of nucleoside phosphate and phosphonate prodrugs; *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154-9218.

- [41] H.-T. Ho, M. J. M. Hitchcock; Cellular pharmacology of 2',3'-Dideoxy-2',3'-dideoxythymidine, a nucleoside analog active against human immunodeficiency virus; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, *33*, 344-349.
- [42] J. Balzarini, R. Pauwels, M. Baba, P. Herdewijn, E. De Clercq, S. Broder, D. G. Johns; The in vitro and in vivo anti-retrovirus activity, and intracellular metabolism of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine are highly dependent on the cell species; *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 2065-2068.
- [43] D. Farquhar, D. N. Srivastva, N. J. Kuttesch; Biologically reversible phosphate-protective groups; *J. Pharmacol. Sci.* **1983**, *72*, 324-325.
- [44] E. De Clercq; Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections; *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 569-596.
- [45] F. Puech, G. Gosselin, I. Lefebvre, A. Pompon, A.-M. Aubertin, A. Kirn, J.-L. Imbach; Intracellular delivery of nucleoside monophosphates through a reductase-mediated activation process; *Antiviral Res.* **1993**, *22*, 155-174.
- [46] C. McGuigan, R. N. Pathirana, N. Mahmood, K. G. Devine, A. J. Hay; Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV-1 in cell lines which are resistant to the action of AZT; *Antiviral Res.* **1992**, *17*, 311-321.
- [47] P. Cahn, M. J. Rolon, A. M. Gun, I. Ferrari, I. Dibirdik, S. Qazi, O. D'Cruz, K. Sahin, F. Uckun; Preclinical and first-in-human phase I clinical evaluation of stampidine, a potent anti-HIV pharmaceutical drug candidate; *J. AIDS Clinic. Res.* **2012**, *3*, 1-8.
- [48] J. H. Vernachio, B. Bleiman, K. D. Bryant, S. Chamberlain, D. Hunley, J. Hutchins, B. Ames, E. Gorovits, B. Ganguly, A. Hall, A. Kolykhalov, Y. Liu, J. Muhammad, N. Raja, C. R. Walters, J. Wang, K. Williams, J. M. Patti, G. Henson, K. Madela, M. Aljarah, A. Gilles, C. McGuigan; INX-08189, a phosphoramidate prodrug of 6-O-methyl-2'-C-methyl guanosine, is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication with excellent pharmacokinetic and pharmacodynamic properties; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1843-1851.
- [49] W. Chang, D. Bao, B.-K. Chun, D. Naduthambi, D. Nagarathnam, S. Rachakonda, P. G. Reddy, B. S. Ross, H.-R. Zhang, S. Bansal, C. L. Espiritu, M. Keilman, A. M. Lam, C. Niu, H. M. Steuer, P. A. Furman, M. J. Otto, M. J. Sofia; Discovery of PSI-353661, a novel purine nucleotide prodrug for the treatment of HCV infection; *J. ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *2*, 130-135.
- [50] M. D. Erion, K. R. Reddy, S. H. Boyer, M. C. Matelich, J. Gomez-Galeno, R. H. Lemus, B. G. Ugarkar, T. J. Colby, J. Schanzer, P. D. Van Poelje; Design, synthesis and characterization of a series of cytochrome P(450) 3A-activated prodrugs (HepDirect prodrugs) useful for targeting phosph(on)ate-based drugs to the liver; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5154-5163.

- [51] W. Thomson, D. Nicholls, W. J. Irwin, J. Al-Mushadani, S. Freeman, A. Karpas, J. Petrik, N. Mahmood, A. J. Hay; Synthesis, bioactivation and anti-HIV activity of the bis(4-acyloxybenzyl) and mono(4-acyloxybenzyl) esters of the 5'-monophosphate of AZT; *J. Chem. Soc., PerkinTrans. 1* **1993**, 1239-1245.
- [52] C. Meier, J. Balzarini; Application of the *cycloSal*-prodrug approach for improving the biological potential of phosphorylated biomolecules; *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 282-292.
- [53] C. Meier; *cycloSal* phosphates as chemical Trojan horses for intracellular nucleotide and glycosylmonophosphate delivery - chemistry meets biology; *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *5*, 1081-1102.
- [54] N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier; Studies on enzyme-cleavable dialkoxymethyl-*cycloSaligenyl*-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine monophosphates; *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6752-6760.
- [55] N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier; Enzymatically activated *cycloSal*-d4T-monophosphates: The third generation of *cycloSal*-pronucleotides; *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1658-1667.
- [56] N. Gisch, F. Pertenbreiter, J. Balzarini, C. Meier; 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cycloSaligenyl*-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine monophosphates, a second type of new, enzymatically activated *cycloSaligenyl* pronucleotides; *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 8115-8123.
- [57] H.J. Jessen, J. Balzarini, C. Meier; Intracellular Trapping of *cycloSal*-pronucleotides: Modification of prodrugs with amino acid esters; *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6592-6598.
- [58] C. Ducho, U. Gorbig, S. Jessel, N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier; Bis-*cycloSal*-d4T-monophosphates: Drugs that deliver two molecules of bioactive nucleotides; *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1335-1346.
- [59] E. H. Rios Morales, J. Balzarini, C. Meier; Diastereoselective Synthesis of *cycloSaligenyl*-nucleosyl-phosphotriesters; *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1649-1659.
- [60] S. Warnecke, C. Meier; Synthesis of nucleoside di- and triphosphates and dinucleoside polyphosphates with *cycloSal*-nucleotides; *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3024-3030.
- [61] V. C. Tonn, C. Meier; Solid-phase synthesis of (poly)phosphorylated nucleosides and conjugates; *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9832-9842.
- [62] S. Wolf, T. Zismann, N. Lunau, C. Meier; Reliable synthesis of various nucleoside diphosphate glycopyranoses; *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7656-7664.
- [63] S. Wendicke, S. Warnecke, C. Meier; Efficient synthesis of nucleoside diphosphate glycopyranoses; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1500-1502.
- [64] J. Huchting, C. Meier; Synthesis of pyranonucleoside-6'-triphosphates through the *cycloSal*-method; *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *16*, 3423-3429.
- [65] J. Balzarini, P. Herdewijn, E. de Clercq; Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds; *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6127-6133.

- [66] J. P. Sommadossi, R. Carlisle, Z. Zhou; Cellular pharmacology of 3'-azido-3'-deoxythymidine with evidence of incorporation into DNA of human bone marrow cells; *Mol. Pharmacol.* **1989**, *36*, 9-14.
- [67] G. M. T. van Wijk, K. Y. Hostetler, H. van den Bosch; Lipid conjugates of antiretroviral agents: Release of antiretroviral nucleoside monophosphates by a nucleoside diphosphate diglyceride hydrolase activity from rat liver mitochondria; *Biochim. Biophys. Acta.* **1991**, *1084*, 307-310.
- [68] G. M. T. van Wijk, K. Y. Hostetler, M. Schlame, H. van den Bosch; Cytidine diphosphate diglyceride analogs of antiretroviral dideoxynucleosides: Evidence for release of dideoxynucleoside-monophosphates by phospholipid biosynthetic enzymes in rat liver subcellular fractions; *Biochim. Biophys. Acta.* **1991**, *1086*, 99-105.
- [69] D. Bonnaffé, B. Dupraz, J. Ughetto-Monfrin, A. Namane, T. Huynh-Dinh; Synthesis of acyl pyrophosphates-application to the synthesis of nucleotide lipophilic prodrugs; *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 531-534.
- [70] D. Bonnaffé, B. Dupraz, J. Ughetto-Monfrin, A. Namane, T. Huynh-Dinh; Synthesis of nucleotide lipophilic prodrugs containing two inhibitors targeted against different phases of the HIV replication cycle; *Nucleos. Nucleot.* **1995**, *14*, 783-787.
- [71] D. Bonnaffé, B. Dupraz, J. Ughetto-Monfrin, A. Namane, Y. Henin, T. Huynh-Dinh; Potential lipophilic nucleotide prodrugs: Synthesis, hydrolysis and antiretroviral activity of AZT and d4T acyl nucleotides; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 895-902.
- [72] H. J. Jessen, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier; Bioreversible protection of nucleoside diphosphates; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8719-8722.
- [73] H. J. Jessen; Untersuchungen zur intrazellulären Freisetzung von Nucleosidphosphaten; *Dissertation* **2008**, Universität Hamburg.
- [74] L. J. Filar, S. Winstein; Preparation and behavior of simple quinone methides; *Tetrahedron Lett.* **1960**, 9-16.
- [75] C. R. Wagner, V. V. Iyer, E. J. McIntee; Pronucleotides: Toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides; *Inc. Med. Res. Rev.* **2000**, *6*, 417-451.
- [76] S. J. Hecker, M. D. Erion; Prodrugs of phosphates and phosphonates; *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2328-2345.
- [77] T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier; The DiPPro approach: Synthesis, hydrolysis, and antiviral activity of lipophilic d4T diphosphate prodrugs; *ChemMedChem* **2014**, *9*, 762-775.
- [78] T. Schulz; Synthese und Untersuchung von Nucleosiddiphosphat Prodrugs; *Dissertation* **2011**, Universität Hamburg.
- [79] A. Kreimeyer, J. Ughetto-Monfrin, A. Namane, T. Huynh-Dinh; Synthesis of acylphosphates of purine ribonucleosides; *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8739-8742.

- [80] A. Kreimeyer, F. Andre, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh; Transmembrane transport of adenosine 5'-triphosphate using a lipophilic cholesteryl derivative; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2853-2855.
- [81] X. Tan, C. K. Chu, F. D. Boudinot; Development and optimization of anti-HIV nucleoside analogs and prodrugs: A review of their cellular pharmacology, structure-activity relationships and pharmacokinetics; *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **1999**, *39*, 117-151.
- [82] F. Pertenbreiter, J. Balzarini, C. Meier; Nucleoside mono- and diphosphate prodrugs of 2',3'-dideoxyuridine and 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrouridine; *ChemMedChem* **2015**, *10*, 94-106.
- [83] Z. Hao, D. A. Cooney, D. Farquhar, C. F. Perno, K. Zhang, R. Masood, Y. Wilson, N. R. Hartman, J. Balzarini, D. G. Johns; Potent DNA chain termination activity and selective-inhibition of human-immunodeficiency-virus reverse-transcriptase by 2',3'-dideoxyuridine-5'-triphosphate; *Mol. Pharmacol.* **1990**, *37*, 157-163.
- [84] A. E. Fouda, M. K. H. Pflum; A cell-permeable ATP analogue for kinase-catalyzed biotinylation; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9618-9621.
- [85] E. Michailidis, K. A. Kirby, A. Hachiya, W. Yoo, S. P. Hong, S. O. Kim, W. R. Folk, S. G. Sarafianos; Antiviral therapies: Focus on hepatitis B reverse transcriptase; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 1060-1071.
- [86] H. S. Te, G. Randall, D. M. Jensen; Mechanism of action of ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C; *Gastroenterol. hepato.* **2007**, *3*, 218-225.
- [87] L. P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, C. Dumontet; Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 447-464.
- [88] P. L. Bonate, L. Arthaud, W. R. Cantrell jr., K. Stephenson, J. A. Secrist III, S. Weitman; Discovery and development of clofarabine: A nucleoside analogue for treating cancer; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 855-863.
- [89] J. B. Johnston; Mechanism of action of pentostatin and cladribine in hairy cell leukemia; *Leukemia Lymphoma* **2011**, *52*, 43-45.
- [90] L. W. Hertel, G. B. Boder, J. S. Kroin, S. M. Rinzel, G. A. Poore, G. C. Todd, G. B. Grindey; Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine); *Cancer Res.* **1990**, *50*, 4417-4422.
- [91] T. Gollnest; Synthese und Charakterisierung von biologisch aktiven Nucleosid-triphosphat-Prodrugs; *Diplomarbeit* **2011**, Universität Hamburg.
- [92] L. Weinschenk, T. Gollnest, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier; Bis(benzoyloxybenzyl)-DiPPro nucleoside diphosphates of anti-HIV active nucleoside analogues; *ChemMedChem* **2015**, *10*, 891-900.

- [93] C. J. Forsyth, H. Adolfsson; Science of synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations; Thieme-Verlag, Stuttgart, 1. Auflage, **2008**, S. 74-89.
- [94] J. P. Horwitz, J. Chua, M. A. Da Roo, M. Noel, I. L. Klundt; Nucleosides. XI. The formation of 2',3'-unsaturated pyrimidine nucleosides via a novel β -elimination reaction; *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 205-211.
- [95] R. Paramashivappa, P. Phani Kumar, P. V. Subba Rao, A. Srinivasa Rao; Simple and efficient method for the synthesis of 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine; *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1003-1005.
- [96] T. Sowa, S. Ouchi; Facile synthesis of 5'-nucleotides by selective phosphorylation of a primary hydroxyl group of nucleosides with phosphoryl chloride; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, *48*, 2084-2090.
- [97] S. Warnecke; Neue Synthese phosphorylierter Biokonjugate aus *cycloSal*-aktivierten Nucleotiden; Dissertation **2010**, Universität Hamburg.
- [98] V. J. Davisson, D. R. Davis, V. M. Dixit, C. D. Poulter; Synthesis of nucleotide 5'-diphosphates from 5'-*O*-tosyl nucleosides; *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1794-1801.
- [99] F. Pertenbreiter; Fluoreszenzmarkierte *cycloSal*- und *DiPPro*-Nucleotide; Dissertation **2013**, Universität Hamburg.
- [100] J. G. Moffatt; A general synthesis of nucleoside-5'-triphosphates; *Can. J. Chem.* **1964**, *42*, 599-604.
- [101] F. Cramer, H. Schaller, H. A. Staab; Darstellung von Imidazoliden der Phosphorsäure; *Ber.* **1962**, *95*, 1612-1621.
- [102] D. E. Hoard, D. G. Ott; Conversion of mono- and oligodeoxyribonucleotides to 5'-Triphosphates; *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1785-1788.
- [103] S. Mohamady, D. L. Jakeman, An improved method for the synthesis of nucleoside triphosphate analogues, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10588-10591.
- [104] S. Mohamady, S. D. Taylor, General procedure for the synthesis of dinucleoside polyphosphates, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6344-6349.
- [105] M. A. De Wit, E. R. Gillies, A cascade biodegradable polymer based on alternating cyclization and elimination reactions, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18327-18334.
- [106] Merck Millipore, zu finden unter: www.merckmillipore.com (letzter Zugriff: 29.08.2015).
- [107] J. Balzarini, M. Cools, E. De Clerq, Estimation of the lipophilicity of anti-HIV nucleoside analogues by determination of the partition-coefficient and retention time on a Lichrospher-60 Rp-8 Hplc Column, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *158*, 413-422.
- [108] M. T. Crimmins; New developments in the enantioselective synthesis of cyclopentyl carbocyclic nucleosides; *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9229-9272.
- [109] V. E. Marquez, M. I. Lim; Carbocyclic nucleosides; *Med. Res. Rev.* **1986**, *6*, 1-40.

- [110] P. L. Boyer, B. C. Vu, Z. Ambrose, J. G. Julias, S. Warnecke, C. Liao, C. Meier, V. E. Marquez, S. H. Hughes; The nucleoside analogue D-carba T blocks HIV-1 reverse transcriptase; *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5356-5364.
- [111] Y. F. Shealy, C. A. O'Doll; Synthesis of the carbocyclic analogs of uracil nucleosides; *J. Heterocycl. Chem.* **1976**, *13*, 1015-1020.
- [112] Y. F. Shealy, C. A. O'Doll, W. M. Shannon, G. Arnett; Carbocyclic analogues of 5-substituted uracil nucleosides: Synthesis and antiviral activity; *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 156-161.
- [113] Z. Zhu, R. F. Schinazi, C. K. Chu, G. J. Williams, C. B. Colby, J.-P. Sommadossi; Cellular metabolism of 3'-azido-2',3'-dideoxyuridine with formation of 5'-O-diphosphohexose derivatives by previously unrecognized metabolic pathways for 2'-deoxyuridine analogs; *Mol. Pharmacol.* **1990**, *38*, 929-938.
- [114] Y. Mehellou, J. Balzarini, C. McGuigan; An investigation into the anti-HIV activity of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyuridine (d4U) and 2',3'-dideoxyuridine (ddU) phosphoramidate 'ProTide' derivative; *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2548-2553.
- [115] Y. Mehellou, C. McGuigan, A. Brancale, J. Balzarini; Design, synthesis, and anti-HIV activity of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyuridine (d4U), 2',3'-dideoxyuridine (ddU) phosphoramidate 'ProTide' derivatives; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3666-3669.
- [116] J. Balzarini, A. Van Aerschot, R. Pauwels, M. Baba, D. Schols, P. Herdewijn, E. De Clercq; 5-Halogeno-3'-fluoro-2',3'-dideoxyuridines as inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV): Potent and selective anti-HIV activity of 3'-fluoro-2',3'-dideoxy-5-chlorouridine; *Mol. Pharmacol.* **1989**, *35*, 571-577.
- [117] X.-B. Kong, Q.-Y. Zhu, P.M. Vidal, K. A. Watanabe, B. Polsky, D. Armstrong, M. Ostrander, S. A. Lang, E. Muchmore, T.-C. Chou; Comparison of antihuman immunodeficiency virus activities, cellular transport, and plasma and intracellular pharmacokinetics of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine; *Antimicrob. Agents & Chemother.* **1992**, *36*, 808-818.
- [118] E. Matthes, C. Lehmann, M. von Janta-Lipinski, D. Scholz; Inhibition of HIV-replikation by 3'-fluoro-modified nucleosides with low cytotoxicity; *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1989**, *165*, 488-495
- [119] P. Wutzler; Antiviral therapy of herpes simplex and varicella-zoster virus infections; *Intervirology* **1997**, *40*, 343-356.
- [120] E. De Clercq, J. Descamps, P. De Somer, P. J. Barr, A. S. Jones, R. T. Walker; (*E*)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: A potent and selective anti-herpes agent; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 2947-2951.

- [121] D. A. Cooney, M. Dalal, H. Mitsuya, J. B. McMahon, M. Nadkarni, J. Balzarini, S. Broder, D. G. Johns; Initial studies on the cellular pharmacology of 2',3'-dideoxycytidine, an inhibitor of HTLV-III infectivity; *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *65*, 2065-2068.
- [122] J. C. Adkins, D. H. Peters, D. Faulds; Zalcitabine; *AIDS Drug Evaluation* **1997**, *53*, 1054-1080.
- [123] P. J. Piliero; Pharmacokinetic properties of nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors; *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2004**, *37*, S2-S12.
- [124] G. J. Veal, M. G. Barry, D. J. Back; Zalcitabine (ddC) phosphorylation and drug interactions; *Antiviral Chem. Chemother.* **1995**, *6*, 379-84.
- [125] D. S. Stein, K. H. P. Moore; Phosphorylation of nucleoside analog antiretrovirals: A review for clinicians; *Pharmacotherapy* **2001**, *21*, 11-34
- [126] R. Vince, M. Hua, J. Brownell, S. Daluge, F. Lee, W. M. Shannon, G. C. Lavelle, J. Qualls, O. S. Weislow, R. Kiser, P. G. Canonico, R. H. Schultz, V. L. Narayanan, J. G. Mayo, R. H. Shoemaker, M. R. Boyd; Potent and selective activity of a new carbocyclic nucleoside analog (Carbovir: NSC 614846) against human immunodeficiency virus in vitro; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *156*, 1046-1053.
- [127] Z. Hao, D. A. Cooney, N. R. Hartman, C.F. Perno, A. Friedland, A. L. DeVico, M. G. Sarngadharan, S. Broder, D. G. Johns; Factors determining the activity of 2',3'-dideoxynucleosides in suppressing human immunodeficiency virus in vitro; *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 431-435.
- [128] M. K. Kukhanova, A.A. Kraevskii; Cellular metabolism of modified nucleosides that suppress production of human immunodeficiency virus; *Pharm. Chem.* **1992**, *26*, 99-105.
- [129] M. A. Johnson, G. Ahluwalia, M. C. Connelly, D. A. Conney, S. Broder, D. G. Johns, A. Friedland; Metabolic pathways for the activation of the antiretroviral agent 2',3'-deoxy-andenosine in human lymphoid cells; *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 15354-15357.
- [130] A. Friedland, M. A. Johnson, D. A. Cooney, G. Ahluwalia, V. E. Marquez, J. S. Driscoll, D. G. Johns; Metabolism in human leukocytes of anti-HIV dideoxypurine nucleosides; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1990**, *616*, 205-216.
- [131] J. Hiebl, E. Zbiral, J. Balzarini, E. De Clerq; Synthesis, antiretrovirus effects, and phosphorylation kinetics of 3'-isocyano-3'-deoxythymidine and 3'-isocyano-2',3'-dideoxyuridin; *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 845-848.
- [132] H. Cui, L. M. Ruiz-Pérez, D. González-Pacanowska, I. H. Gilbert; Potential application of thymidylate kinase in nucleoside analogue activation in *Plasmodium falciparum*; *Bioorgan. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7302-7309.
- [133] C. K. Chu, V. S. Bhadti, B. Doboszewski, Z. P. Gu, Y. Kosugi, K. C. Pullaiah, P. Van Roey; General syntheses of 2',3'-dideoxynucleosides and 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxynucleosides; *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2217-2225.

- [134] E. J. Corey, R. A. E. Winter; A new, stereospecific olefin synthesis from 1,2-diols; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2677-2678.
- [135] E. J. Corey, P. B. Hopkins; A mild procedure for the conversion of 1,2-diols to olefins; *Tetrahedron Lett.* 1982, *23*, 1979-1982.
- [136] P. S. Manchand, P. S. Belica, M. J. Holman, T.-N. Huang, H. Maehr, S. Y.-K. Tam, R. T. Yang; Syntheses of the anti-AIDS drug 2',3'-dideoxycytidine from cytidine; *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3473-3478.
- [137] V. Bhat, B. G. Ugarkar, V. A. Sayeed, K. Grimm, N. Kosora, P. A. Domenico, E. Stocker; A simple and convenient method for the selective *N*-acylations of cytosine nucleosides; *Nucleos. Nucleot.* **1989**, *8*, 179-183
- [138] S. M. Daluge, M. T. Martin, B. R. Sickles, D. A. Livingston; An efficient, scalable synthesis of the HIV reverse transcriptase inhibitor Ziagen[®]; *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2000**, *19*, 297-327.
- [139] Y. Ahmadibeni, K. Parang; Selective diphosphorylation, dithiodiphosphorylation, triphosphorylation, and trithiotriphosphorylation of unprotected carbohydrates and nucleosides; *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5589-5592.
- [140] Y. Ahmadibeni, R. K. Tiwari, G. Sun, K. Parang; Synthesis of nucleoside mono-, di-, and triphosphoramidates from solid-phase *cycloSaligenyl* phosphitylating reagents; *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2157-2160.
- [141] A. K. Gupta, J. Acharya, D. K. Dubey, M. P. Kaushik; Efficient and convenient one-pot synthesis of phosphoramidates and phosphates; *Synthetic. Commun.* **2007**, *37*, 3403-3407.
- [142] A. K. Gupta, D. K. Dubey, M. P. Kaushik; Dichlorodimethyl hydantoin: An efficient reagent for one-pot synthesis of CWC-related *O,O*-dialkyl, *N,N*-dialkyl phosphoramidates; *Phosphorus Sulfur* **2008**, *183*, 1641-1658.
- [143] Q. Xiao, J. Sun, Q. Sun, Y. Ju, Y. Zhao, Y. Cui; Synthesis of AZT 5'-*O*-hydrogen phospholipids and their derivatives; *Synthesis* **2003**, *1*, 107-111.
- [144] V. Kumar, M. P. Kaushik; *Tert*-butyl-*N*-chlorocyanamide: A novel and versatile reagent in organic synthesis; *Synlett* **2007**, *19*, 2937-2951.
- [145] M. Saady, L. Lebeau, C. Mioskowski; Synthesis of adenosine-5'-phosphates and 5'-alkylphosphonates *via* the Mitsunobu reaction; *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2236-2242.
- [146] H. A. Staab; New methods of preparative organic chemistry IV; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *1*, 351-367.
- [147] A. V. Lebedev, A. I. Rezvukhin; *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 5547-5566.
- [148] M. Maeda, A. D. Patel, A. Hampton, Formation of ribonucleotide 2',3'-cyclic carbonates during conversion of ribonucleotide 5'-phosphates to diphosphates and triphosphates by phosphorimidazolidate procedure; *Nucleic Acids Res.* **1977**, *4*, 2843-2854.

- [149] H. Tanaka, Y. Yoshimura, M. R. Jorgensen, J. A. Cuesta-Seijo, O. Hindsgaul; A simple synthesis of sugar nucleoside diphosphates by chemical coupling in water; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11531-11534.
- [150] P. Vukkum, G. R. Deshpande, J. M. Babu, R. Muralikrishna, P. Jagu; Stress degradation behavior of abacavir sulfate and development of a suitable stability-indicating UHPLC method for the determination of abacavir, its related substances, and degradation products; *Sci. Pharm.* **2012**, *80*, 903-921.
- [151] G. A. Jeffrey, W. Saenger; Hydrogen bonding in biological structures; 2. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, **1994**, 296-305.
- [152] N. B. Ulyanov, T. L. James; RNA structural motifs that entail hydrogen bonds involving sugar-phosphate backbone atoms of RNA; *New J. Chem.* **2010**, *34*, 910-917.
- [153] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer; Biochemie; 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2007**, S. 154-156.
- [154] K. C. Calvo, X. Wang, G. F. Koster; Bis-ketol nucleoside triesters as prodrugs of the antiviral nucleoside triphosphate analogues of 3'-deoxythymidine and 3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine; *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2004**, *23*, 637-646.
- [155] C. McGuigan, P. Bellevergue, H. Sheeka, N. Mahmood, A. J. Hay;. Certain phosphoramidate derivatives of dideoxyuridine (ddU) are active against HIV and successfully by-pass thymidine kinase; *FEBS Lett.* 1994, *351*, 11-14.
- [156] O. Zelphati, G. Degols, H. Loughrey, L. Leserman, A. Pompon, F. Puech, A.-F. Maggio, J.-L. Imbach, G. Gosselin; Inhibition of HIV-1 replication in cultured cells with phosphorylated dideoxyuridine derivatives encapsulated in immunoliposomes; *Antiviral Res.* 1993, *21*, 181-195.
- [157] J. Romanowska, M. Sobkowski, A. Szymańska-Michalak, K. Kolodziej, A. Dabrowska, A. Lipniacki, A. Piasek, Z. M. Pietrusiewicz, M. Figlerowicz, A. Guranowski, J. Boryski, J. Stawiński, A. Kraszewski; Aryl H-phosphonates 17: (n-Aryl)phosphoramidates of pyrimidine nucleoside analogues and their synthesis, selected properties, and anti-HIV activity; *J. Med. Chem.* 2011, *54*, 6482-6491.
- [158] C. Périgaud, G. Gosselin, I. Lefebvre, J.-L. Girardet, S. Benzaria, I. Barber, J.-L. Imbach; Rational design for cytosolic delivery of nucleoside monophosphates: "SATE" and "DTE" as enzyme-labile transient phosphate protecting groups; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1993, *3*, 2521-2526.
- [159] C. Meier, T. Knispel, E. De Clercq, J. Balzarini; CycloSal-pronucleotides of 2',3'-dideoxyadenosine and 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydroadenosine: Synthesis and antiviral evaluation of a highly efficient nucleotide delivery system; *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1604-1614.

- [160] J. Balzarini, F. Haller-Meier, E. De Clercq, C. Meier; Antiviral activity of *cycloSaligenyl* prodrugs of acyclovir, carbovir and abacavir; *Antivir. Chem. Chemoth.* **2002**, *12*, 301-306.
- [161] O. R. Ludek, J. Balzarini, C. Meier; Synthesis and antiviral evaluation of carbocyclic 3'-azidothymidine (AZT) analogues and their *cycloSal*-phosphate triesters; *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 932-940.
- [162] E. C. Moore, R. B. Hurlbert; Regulation of mammalian deoxyribonucleotide biosynthesis by nucleotides as activators and inhibitors; *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 4802-4809.
- [163] L. Weinschenk, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier; Nucleoside diphosphate prodrugs: Nonsymmetric DiPPro-nucleotides; *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6114-6130.
- [164] J. G. Gerber, E. P. Acosta; Therapeutic drug monitoring in the treatment of HIV-infection; *J. Clin. Virol.* **2003**, *27*, 117-128.
- [165] J. Balzarini, L. Naesens, S. Aquaro, T. Knispel, C.-F. Perno, E. De Clercq, C. Meier; Intracellular metabolism of *cycloSaligenyl*-3'-azido-2',3'-dideoxythymidine monophosphate, a prodrug of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (Zidovudine); *Mol. Pharmacol.* **1999**, 1354-1361.
- [166] J. Balzarini, S. Aquaro, T. Knispel, C. Rampazzo, V. Bianchi, C.-F. Perno, E. De Clercq, C. Meier; CycloSaligenyl-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine monophosphate: Efficient intracellular delivery of d4TMP; *Mol. Pharmacol.* **2000**, 928-935
- [167] G. Kruse; Therapeutisches Drug Monitoring von Nukleosidalen Reverse Transkriptase Inhibitoren; *Dissertation* **2006**, Universität Berlin.
- [168] M. S. T. Goncalves; Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes; *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190-212.
- [169] R. Plessow; Entwicklung und Charakterisierung einer Methode zur Untersuchung von Makromolekülen mit Hilfe zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenz und Anregungs-Emissionsspektroskopie; 1. Auflage, Cuvillier Verlag Göttingen, **2004**.
- [170] A. J. W. G. Visser, O. J. Rolinski; Basic photophysics; zu finden unter: www.photobiology.info (letzter Zugriff 25.08.2015).
- [171] C. McGuigan, H. Barucki, S. Blewett, A. Carangio, J. T. Erichsen, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini; Highly potent and selective inhibition of varicella-zoster virus by bicyclic furopyrimidine nucleosides bearing an aryl side chain; *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4993-4997.
- [172] J. Balzarini, C. McGuigan; Chemotherapy of varicella-zoster virus by a novel class of highly specific anti-VZV bicyclic pyrimidine nucleosides; *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1587*, 287-295.
- [173] C. McGuigan, J. Balzarini; FV100 as a new approach for the possible treatment of varicella-zoster virus infection; *J. Antimicrob. Chemoth.* **2009**, *64*, 671-673.
- [174] C. McGuigan, R. N. Pathirana, M. Migliore, R. Adak, G. Luoni, A. T. Jones, A. Diez-Torrubia, M.J. Camarasa, S. Velazquez, G. Henson, E. Verbeken, R. Sienaert, L. Naesens, R.

Snoeck, G. Andrei, J. Balzarini; Preclinical development of bicyclic nucleoside analogues as potent and selective inhibitors of varicella zoster virus; *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 1316-1330.

[175] J. Balzarini, C. McGuigan; Bicyclic pyrimidine nucleoside analogues (BCNAs) as highly selective and potent inhibitors of varicella-zoster virus replication; *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *50*, 5-9.

[176] C. McGuigan, R. N. Pathirana, R. Snoeck, G. Andrei, E. De Clercq, J. Balzarini; Discovery of a new family of inhibitors of human cytomegalovirus (HCMV) based upon lipophilic alkyl furano pyrimidine dideoxy nucleosides: Action via a novel non-nucleosidic mechanism; *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1847-1851.

[177] R. Hunter, C. I. Muhanji, I. Hale, C. M. Bailey, A. Basavapathruni, K. S. Anderson; [d4U]-butyne-[HI-236] as a non-cleavable, bifunctional NRTI/NNRTI HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor; *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2614-2617.









[178] J. E. Baldwin, R. C. Thomas, L. I. Kruse, L. Silberman; Rules for ring closure: Ring formation by conjugate addition of oxygen nucleophiles; *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3846-3852.

[179] D. W. Jayme, D.A. Epstein, D. R. Conrad; Fetal bovine serum alternatives; *Nature* **1988**, *334*, 547-548.












Anhang










Gefahrstoffverzeichnis

Die folgende Liste umfasst die Reagenzien und Lösungsmittel, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden. Für die Gefahrstoffe sind die gültigen Gefahrensymbole sowie die H- und P-Sätze angegeben. Die Stoffe, für die keine bekannte Einstufung existiert, sind als gefährlich einzustufen. Es ist unbedingt zu vermeiden, sich oder andere Personen mit diesen Verbindungen zu kontaminieren und sie in die Umwelt einzubringen.











Substanz	Piktogramm(e)	H-Sätze	P-Sätze
Aceton- d_6		225-319-336- EUH066	210-233- 305+351+338
Acetonitril		225-302-312-319- 332	305+351+338, 403+235
Acetylchlorid		225-314-EUH014	210-240-280-310- 301+312- 301+330+331- 305+351+338- 402+404
Ammoniak 25%		290-314-335-400	273-280- 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Ammoniumacetat	Kein gefährliches Produkt gemäß der Richtlinie 67/548/EWG.		
Ammoniumcer(IV)-nitrat		272-315-319-335	261-305+351+338
Azodicarbonsäure- diisopropylester		315-319-335-411	261-273-280- 302+352- 305+351+338
Bariumcyanoethyl- phosphat-Dihydrat		302-332	-
Bromwasserstoffsäure (30%) in Essigsäure		226-314-335	210-280-310- 301+330+331- 303+361+353- 305+351+338

Anhang













Substanz	Piktogramm(e)	H-Sätze	P-Sätze
Butylchlorformiat		226-314-331	261-280-305+351+338-310
<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid		228-314	210-280-305+351+338-310
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid in <i>n</i> -Decan		226-242-302-304-311+331-314-317-341-411	201-210-234-261-280-305+351+338
1,1'-Carbonyldiimidazol		302-314	280-305+351+338-310
Celite 545 (0.1-0.02 mm)	Kein gefährliches Produkt gemäß der Richtlinie 67/548/EWG.		
Chloroform		351-302-373-315	302+352-314
5-Chlorsalicylalkohol		315-319-335	280-305+351+338
5-Chlorsalicylsäure		301-315-319	301+310-305+351+338
<i>N</i> -Chlorsuccinimid		302-314	305+351+338-310
Cyclopropylamin		225-302-314	210-280-305+351+338-310
Decanoylchlorid		290-314	280-301+330+331-305+351+338-309+310
Dichlormethan		351	281-308+313








Substanz	Piktogramm(e)	H-Sätze	P-Sätze
4,5-Dicyanoimidazol (0.25 M) in Acetonitril		225-302-312-315- 318-332-335	210-261-280- 305+351+338
Diethylether		224-302-336- EUH019-EUH066	210-240-403+235
<i>N,N</i> -Diisopropylamin		225-332-302-314	210-280-301+330- 305+351+338
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin		225-302-318-331- 335	210-361-280- 305+351+338
4-Dimethylaminophenol	Kein gefährliches Produkt gemäß der Richtlinie 67/548/EWG.		
<i>N,N'</i> - Dimethylethylendiamin		226-314	280-305+351+338- 310
<i>N,N</i> -Dimethylformamid		226-312+332-319- 360D	201-280- 305+351+338- 308+313
1,3-Dimethyl-2-phenyl- 1,3,2-diazaphospholidine	Kein gefährliches Produkt gemäß der Richtlinie 67/548/EWG.		
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆	Kein gefährliches Produkt gemäß der Richtlinie 67/548/EWG.		
Dinatriummethyldiamin- tetraacetat		319	305+351+338
Dinatriumhydrogen- phosphat	Kein gefährliches Produkt gemäß der Richtlinie 67/548/EWG.		
Dinatriumdihydrogen- pyrophosphat		319	305+351+338
Dodecylchlorformiat		290-300+310+330- 314	234-260-262-264- 270-271-280-284- 301+310+330- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338-310- 361-363-390- 403+233-405-501

Substanz	Piktogramm(e)	H-Sätze	P-Sätze
Dowex-H ⁺ (50WX8)		315-319-335	261-305+351+338
Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat		226-330-315-319-317	210-280-309-310-304+340-305+351+338-302+352
Essigsäure ≥90%		226-314	280-305+351+338-310
Essigsäureanhydrid		226-302-314-331	261-280-303+361+353-304+340+310-305+351+338-403+233
Ethanol		225-319	210-280-305+351+338-337+313-403+235
Ethylacetat		225-319-336-EUH066	210-240-305+351+338
Heptanoylchlorid		330-314	260-280-284-305+351+338-310
4-Hydroxybenzylalkohol		319	305+351+338
Imidazol		302-314-360D	201-280-301+330+331-305+351+338
Iod		312+332-315-319-335-372-400	261-273-280-305+351+338+314
Kaliumphosphat		315-318	280-305+351+338
Kieselgel	-	-	260
Kupfer(I)-iodid		302-315-319-335-400	223-231+232-280-305+351+338-370+378-422

Substanz	Piktogramm(e)	H-Sätze	P-Sätze
Kupfer(II)-sulfat		302-319-315-410	273- 305+351+338- 302+352
Laurinsäurechlorid		314	280- 305+351+338-310
Lithiumaluminiumhydrid		260-314	223-231+232-280- 305+351+338- 370+378-422
Methanol		225-301+311+331- 370	210-260-280- 301+310-311
Methansulfonylchlorid		300-311-330-314	301+310- 303+361+353- 305+351+338- 320-361-405-501
Methylchlorformiat		225-330-312-302- 314	210-280- 305+351+338-310
1-Methylimidazol		302-311-314	280- 301+312+330- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
Myristinsäurechlorid		314	280- 305+351+338-310
Natriumazid		300+310-373-410	273-280- 301+310+330- 302+252+310- 391-501
Natriumborhydrid		260-301+311-314	280- 301+330+331- 302+352- 305+351+338- 309+310-402+404
Natriumchlorid	Kein gefährliches Produkt gemäß der Richtlinie 67/548/EWG.		
Natriumhydrogencarbonat	Kein gefährliches Produkt gemäß der Richtlinie 67/548/EWG.		

Substanz	Piktogramm(e)	H-Sätze	P-Sätze
Natriumhydroxid		314-290	280-301+330+331-305+351+338
Natriumsulfat	Kein gefährliches Produkt gemäß der Richtlinie 67/548/EWG.		
Natriumthiosulfat	Kein gefährliches Produkt gemäß der Richtlinie 67/548/EWG.		
5-Nitrobenzaldehyd		302-315-319	305+351+338
4-Nitrophenylformiat	Kein gefährliches Produkt gemäß der Richtlinie 67/548/EWG.		
Nonanoylchlorid		314	280-305+351-338-310
Octylchlorformiat		301+311+331-314	261-280-301+310-305+351+338-310
Oxone®		272-314-317-334-335	220-261-280-305+351+338-310
Palmitinsäurechlorid		314-335-EUH014	280-301+351+331-305+351+338-308+310
Palladium/Kohle		315-319	305+351+338
Petrolether 50-70		225-315-319-335-304	210-261-301+310-305+351+338-331
Phosphor(III)-chlorid		300+330-373-314-EUH014-EUH029	280-301+330+331-304+340-305+351+228-309-310
Phosphorylchlorid		330-302-314-372-EUH014-EUH029	233-271-280-301+330+331-305+351+338-309+310

Substanz	Piktogramm(e)	H-Sätze	P-Sätze
2-Propanol		225-319-336	210-261-305+351+338
Propionsäurechlorid		225-310-EUH014	210-280-301+330+331-305+351+338-309+310-403+235
Pyridin		225-302+312+332	210-233-302+352
Salzsäure ≤37%		290-314-335	234-260-304+340-303+361+353-305+351+338-309+311-501
Schwefelsäure ≥95%		290-314	280-301+330+331-305+351+338
Stearinsäurechlorid		314	280-305+351+338-310
Tetra- <i>n</i> -butylammonium-fluorid (1 M in THF)		225-314-335	210-261-280-305+351+338-310
Tetra- <i>n</i> -butylammonium-hydroxid (40% in H ₂ O)		314	280-301+330+331-305+351+331-309+310
Tetrahydrofuran		225-319-335-EUH019	210-233-243-305+351+338
Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0)		302-315-317-319	280-302+352-305+351+338
Toluol		225-304-315-336-361D-373	210-261-281-301+310-331
Triethylamin		225-302-311+331-314-335	210-261-280-303+361+353-305+351+338-370+378

Substanz	Piktogramm(e)	H-Sätze	P-Sätze
Triethylenglykolmono- methylether		Kein gefährliches Produkt gemäß der Richtlinie 67/548/EWG.	
Trifluoressigsäure- anhydrid		314-332	280-305+351+338- 310
Trimethylphosphit		226-280-315-318- 335	261-280- 305+351+338
Trimethylsilylchlorid		225-312-314-331- 335	210-261-280- 305+351+338-310
Triphenylphosphan		302-317-413	262-273-280- 302+352
Valerylchlorid		226-314-331	261-280- 305+351+338-310
Wasserstoff		220-280	210-377-381-403
Zinkstaub		410	273-391-501

Lebenslauf

Dipl.-Chem. Tristan Gollnest

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 26. September 1985

Geburtsort: Hamburg

Nationalität: deutsch

AUSBILDUNG

Universität Hamburg

Ph. D. in Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Chris Meier
Oktober 2011-November 2015

Thema: "Das TriPPPro-Konzept: Entwicklung und
Charakterisierung von antiviralen Nukleosidtriphosphat-
Prodrugs"

Universität Hamburg

Diplomarbeit in Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Chris
Meier

Januar-September 2011

Thema: "Synthese und Charakterisierung von biologisch
aktiven Nukleosidtriphosphat-Prodrugs"

Note: "sehr gut"

Universität Hamburg

Diplomprüfungen

Dezember 2010

Note: "sehr gut"

Universität Hamburg

Vordiplomprüfungen

April 2008

Note: "gut"

Gymnasium Stormarnschule, Ahrensburg

Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Juli 2005

Note: "befriedigend"

BERUFSERFAHRUNG **Universität Hamburg**

Oktober 2011 - Oktober 2015

Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Assistent im Integrierten Synthesepraktikum für Anorganische und Organische Chemie (ISP), im Forschungspraktikum Organische Chemie sowie im Modul Naturstoffchemie

Januar-März 2010

Wissenschaftliche Hilfskraft in der Anorganischen Chemie

PATENT

C. Meier, T. Gollnest, T. Nack, L. Weinschenk; Di- und Triphosphat-Propharmaka; WO 2016026493 (A1) 2016-02-25; DE 102014112055 (A1) 2014-08-22

POSTERBEITRÄGE

T. Gollnest, J. Balzarini, C. Meier; The TriPPPPro-approach: development of nucleoside triphosphate prodrugs; Poster und Vortrag bei der 27th *International Conference on Antiviral Research (ICAR)*, 12.-16. Mai 2014, Raleigh, North Carolina, USA.

Betreuung von Bachelorarbeiten

Die im Folgenden aufgeführten Bachelorarbeiten wurden unter meiner Betreuung angefertigt und bereits veröffentlicht:

- Marcel Busch; Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-phenylcarbamat-d4TTP-Prodrugs; Bachelorarbeit, Universität Hamburg, **2014**.
- Mathias Schacht; Darstellung von Bis(4-nonanoyloxybenzyl)-Thymidintriphosphat-Prodrugs; Bachelorarbeit, Universität Hamburg, **2013**.
- Eva Gjuzi; Darstellung eines fluoreszierenden Nukleosidanalogons zur Verwendung als analytische Sonde von Triphosphat-Prodrugs; Bachelorarbeit, Universität Hamburg, **2012**.
- Tobias Reimer; Synthese und Charakterisierung von Bis(4-alkoxycarbonyloxybenzyl)-d4TTP-Prodrugs; Bachelorarbeit, Universität Hamburg, **2012**.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Chris Meier danke ich für die freundliche Begleitung binnen der letzten Jahre, die interessante Themenstellung und den uneingeschränkten wissenschaftlichen Freiraum bei der Bearbeitung des Themas.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dem technischen Personal der NMR-Teams um Herrn Dr. Thomas Hackl (Organische Chemie) und Herrn Dr. Erhard T. K. Haupt (Anorganische Chemie) danke ich für die Hilfestellungen bei analytischen Problemen und vor allem für das Vermessen von tausenden NMR-Proben. Gleichermäßen danke ich der gesamten MS-Abteilung von Frau Dr. Maria Riedner. Mein besonderer Dank gilt dabei aber auch Ivo Sarac für die Bereitschaft für die Aufnahme Dutzender MALDI-Spektren.

Herrn Prof. Dr. Jan Balzarini und Herrn Prof. Dr. Dominique Schols danke ich für die Durchführung der antiviralen Assays und die Bereitstellung der Zellextrakte. Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Ilona Hauber für die Durchführung von Inkubationsstudien und Dr. Anna Rath sowie Thiago Dinis de Oliveira für die biochemische Analyse von Hydrolyseprodukten bedanken.

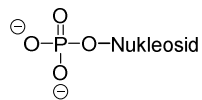
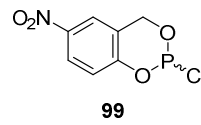
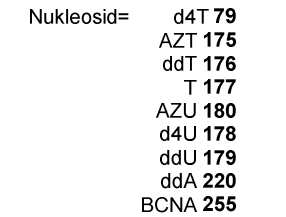
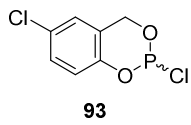
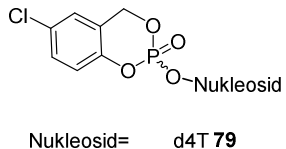
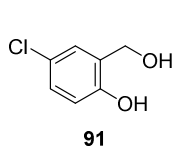
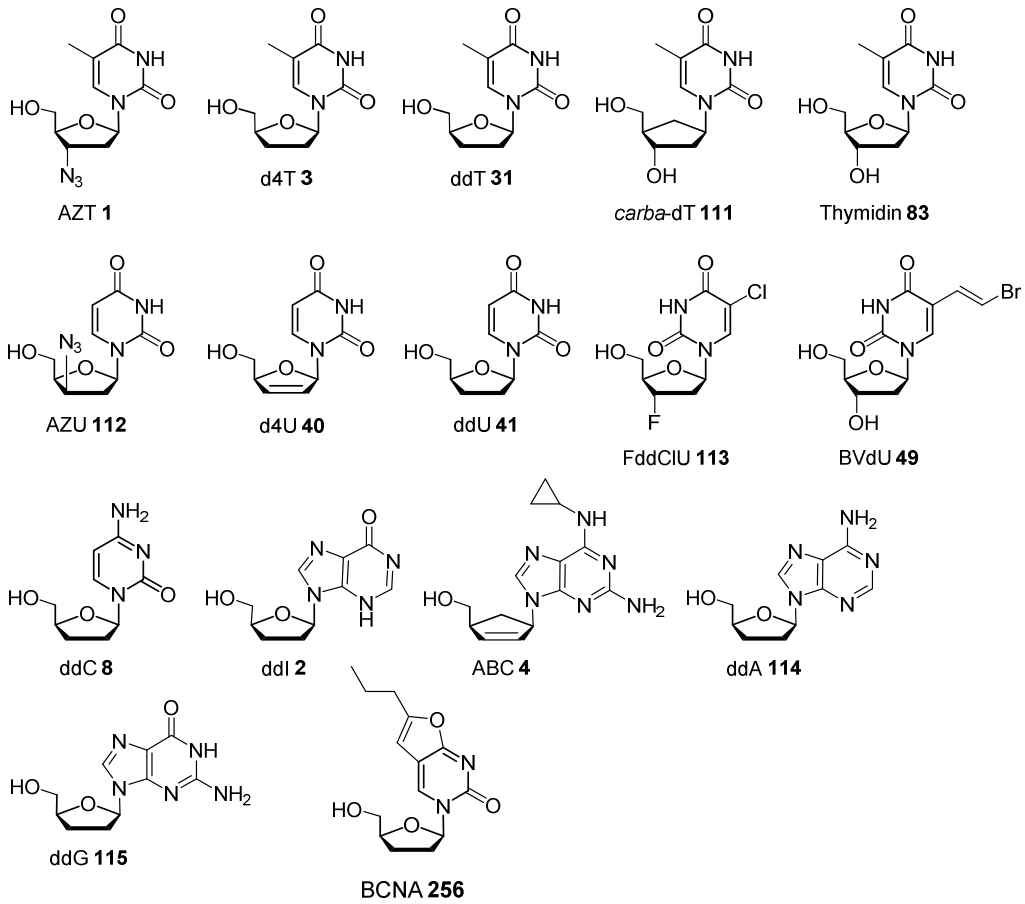
Dem gesamten Arbeitskreis – mit seinen aktiven wie ehemaligen Mitgliedern – danke ich für die entspannte (Arbeits-)Atmosphäre, dem wissenschaftlichen Fachgeplänkel und der stetigen Hilfsbereitschaft bei Fragestellungen jeglicher Art. Hervorzuheben ist dabei die Truppe aus Labor 515 um Frederic Ting, Katharina Höfler, Ivo Sarac und Rosmirt Sielaff, die die Basis für ein gesundes Arbeitsklima darstellte und so manches Gefluce ertragen musste.

Für die tatkräftige Unterstützung bei experimentellen Arbeiten möchte ich mich bei allen Studenten bedanken, die in den letzten Jahren Experimente für mich durchgeführt haben. Besonders die Bachelorarbeiten von Tobias Reimer, Eva Gjuzi, Mathias Schacht und Marcel Busch seien dabei hervorgehoben.

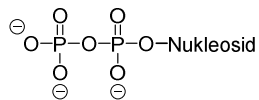
Für die fachspezifische und kritische Durchsicht dieser Arbeit geht mein herzlicher Dank an Inga Reimer. Für die nicht minder wertvolle Korrektur auf Rechtschreibung und Grammatik bedanke ich mich bei meiner Freundin Lena.

Meinen Eltern und meinen Schwestern danke ich für die Unterstützung und Rücksicht während des gesamten Studiums. Zu unbeschreiblichem Dank bin ich Lena für ihren liebevollen Beistand während der gesamten Promotionszeit verpflichtet...!

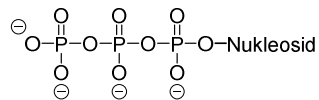
Verbindungsübersicht Teil I



- Nukleosid=
- d4T 13
 - AZT 14
 - ddT 218
 - carba-dT 222
 - d4U 188
 - ddU 219
 - FddCIU 217
 - BVdU 118
 - ddC 122
 - ABC 124
 - ddl 132
 - ddA 130
 - ddG 136
 - BCNA 258

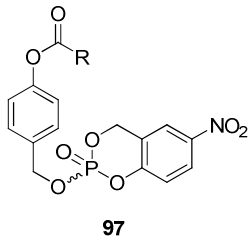


- Nukleosid=
- d4T 15
 - AZT 28
 - ddT 181
 - carba-dT 225
 - T 186
 - AZU 185
 - d4U 183
 - ddU 184
 - BVdU 119
 - ddC 123
 - ABC 228
 - ddA 131
 - ddG 137
 - BCNA 254

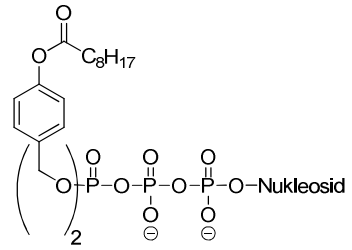
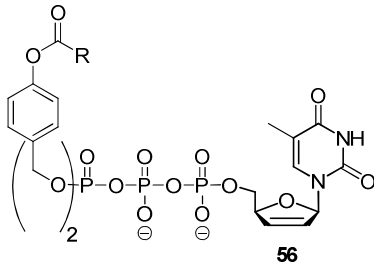
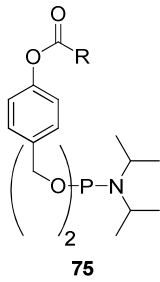
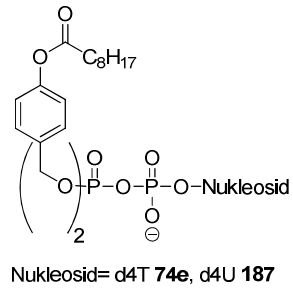
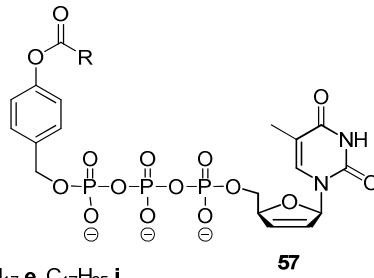


- Nukleosid=
- d4T 16
 - AZT 29
 - carba-dT 224
 - T 116
 - AZU 240
 - ddU 241
 - BVdU 120
 - ddC 121
 - ABC 229
 - ddA 129
 - ddG 138
 - BCNA 259

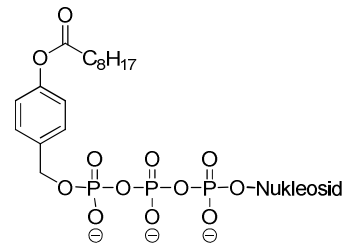
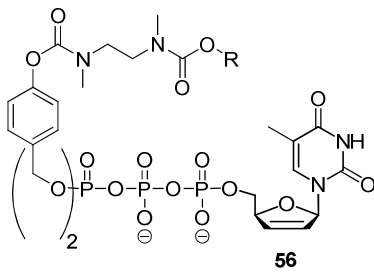
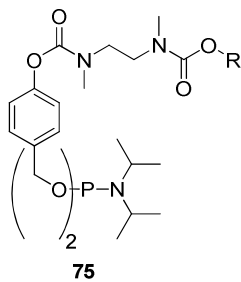
Verbindungsübersicht Teil II



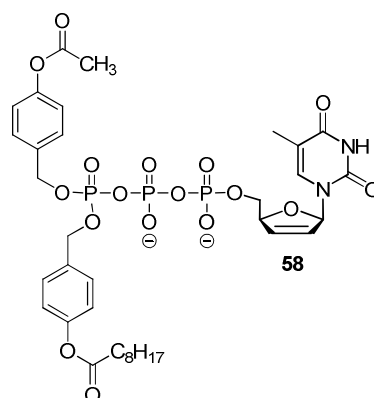
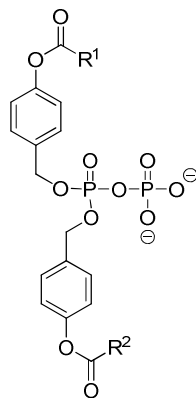
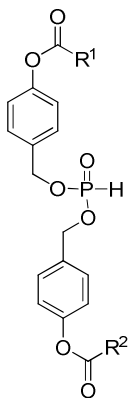
R= CH₃ **a**, C₈H₁₇ **e**, C₁₇H₃₅ **j**



R= CH₃ **a**, C₂H₅ **b**, C₄H₉ **c**, C₆H₁₃ **d**, C₈H₁₇ **e**, C₉H₁₉ **f**, C₁₁H₂₃ **g**, C₁₃H₂₇ **h**,
C₁₅H₃₁ **i**, C₁₇H₃₅ **j**, C₁₇H₃₃ (8Z) **k**, OCH₃ **l**, OC₈H₁₇ **m**, OC₁₂H₂₅ **n**



R= C₄H₉ **o**, C₈H₁₇ **p**, C₁₂H₂₅ **q**



R¹=R²= C₈H₁₇ **200**
R¹= CH₃; R²= C₈H₁₇ **245**

R¹=R²= C₈H₁₇ **198**
R¹= CH₃; R²= C₈H₁₇ **246**

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation "Das TriPPP-Konzept: Entwicklung und Charakterisierung von antiviralen Nukleosidtriphosphat-Prodrugs" selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen verwendet habe.

Ich erkläre zudem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Ort, Datum

Dipl.-Chem. Tristan Gollnest

