

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

Di*PP*ro-Nucleotide mit asymmetrischer Maskierung der Pyrophosphateinheit

von

Lina Weinschenk
aus Hamburg

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

Hamburg 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2010 bis Oktober 2015 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier angefertigt.

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

Datum der Disputation: 22.01.2016

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Chris Meier danke ich für die interessante Themenstellung, die intensive fachliche Betreuung und die hervorragenden experimentellen Bedingungen sowie für zahlreiche Diskussionen und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. Dr. Wolfgang Maison und Herrn Dr. Thomas Hackl danke ich für die Teilnahme am Dissertationskolloquium.

Prof. Dr. Jan Balzarini und Prof. Dr. Dominique Schols danke ich für die Durchführung der antiviralen Tests und die Bereitstellung der Zellextrakte.

Allen Mitgliedern der NMR- und MS-Abteilung danke ich für die Durchführung zahlreicher Experimente. Ganz besonders möchte ich mich bei Vera Priegnitz, Eva Juhas und Silke Weidner bedanken, die durch unkomplizierte Absprachen die Messungen meiner instabilen Verbindungen ermöglicht haben.

Dem Arbeitskreis Meier – allen aktiven sowie ehemaligen Mitgliedern – danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre, die stete Hilfsbereitschaft und den regen wissenschaftlichen Austausch. Ein besonderer Dank gilt hierbei meinen Laborpartnerinnen aus 525 sowie meinen Kolleginnen und Kollegen aus dem Computerraum und aus 522. Außerdem bedanke ich mich bei Svenja Warnecke, Maike Jacobsen und Sönke Jessel für die exzellente Einführung in die Organische Chemie. Mirjam Rose danke ich für die herzliche Aufnahme in 514 sowie für die synthetische Unterstützung. Tristan Gollnest danke ich für die experimentelle Unterstützung im Rahmen seines Praktikums und darüber hinaus, sowie für die gute Prodrug-Zusammenarbeit.

Florian Pertenbreiter danke ich sehr für die intensive und kritische Auseinandersetzung mit diesem Manuskript sowie den fachlichen und persönlichen Austausch während der gesamten Zeit der Promotion – auch über Hunderte Kilometer hinweg.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Johanna Huchting für die schöne Zeit während der Diplomarbeit und der Promotion. Und vorallem für die uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen. Danke!

Meiner Mutter und meinen Schwestern danke ich herzlich für ihr stetes Interesse und ihren Zuspruch während der langen Zeit meiner Ausbildung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Hayo, der mir während der gesamten Zeit bedingungslos zur Seite stand.

Meinen Kindern
Aaron Yonah und Ava Minou

Abkürzungen und Symbole

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	<i>ATP-binding-cassette</i> -Transporter
abs.	absolut
Ac	Acetyl
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
ALLINI	<i>allosteric integrase inhibitor</i>
Äquiv.	Äquivalent
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	3'-Azido-3'-desoxythymidin
cART	<i>combined antiretroviral therapy</i>
CC ₅₀	50% zytostatische Konzentration
CCR5	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CDCl ₃	Trichlormethan (einfach deuteriert)
cDNA	<i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i> (komplementäre Desoxyribonucleinsäure)
CEM/0	humane T-Lymphozyten-Zelllinie (Wildtyp)
CH ₃ CN	Acetonitril
CH ₃ OH	Methanol
d4T	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin
d4A	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydroadenosin
d4U	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrouridin
δ	chemische Verschiebung (NMR)
d	Dublett (NMR)
dA	2'-Desoxyadenosin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
dCK	zytosolische Desoxycytidinkinase
dd	Dublett eines Dubletts (NMR)

Abkürzungen und Symbole

ddd	Dublett eines Dubletts eines Dubletts (NMR)
ddC	2',3'-Didesoxycytidin
ddl	2',3'-Didesoxyinosin
DIPA	Diisopropylamin
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
EC ₅₀	50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation
EE	Essigsäureethylester (Ethylacetat)
EI	Elektronenstoßionisation
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et ₂ O	Diethylether
Et ₃ N	Triethylamin
EtOH	Ethanol
FAB	<i>Fast-Atom Bombardement</i>
gp	Glykoprotein
HAART	hochaktive anti-retrovirale Therapie
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSV	Herpes Simplex Virus
InSTI	integrase strand transfer inhibitor
<i>i</i> Pr	<i>Isopropyl</i>
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
LTR	<i>long terminal repeats</i>
M	mol/L

Abkürzungen und Symbole

m	Multiplett (NMR)
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
Me	Methyl
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MsCl	Mesylchlorid
nm.	nicht messbar
NDP	Nucleosiddiphosphat
NDPK	Nucleosiddiphosphatkinase
NMP	Nucleosidmonophosphat
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NNRTI	nicht-nucleosidischer Reverse Transkriptase-Inhibitor
NP	<i>normal phase</i>
NRTI	nucleosidischer Reverse Transkriptase-Inhibitor
Nu ⁻	Nucleophil
Nucl	Nucleosid
<i>p</i>	<i>para</i>
PBS	<i>phosphate saline buffer</i>
PE	Petrolether (50-70)
Ph	Phenyl
ppm	<i>parts per million</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonucleinsäure)
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
sept	Septett (NMR)
t	Triplett (NMR)
t _{1/2}	Halbwertszeit
TBAA	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumacetat

Abkürzungen und Symbole

TBAH	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumhydroxid
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>t</i> BuOOH	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
THF	Tetrahydrofuran
TK	Thymidinkinase
TK ⁻	Thymidinkinase defizient
TMP	Thymidinmonophosphat
TMPK	Thymidylatkinase
TOF	<i>time of flight</i>
<i>t</i> _q	Triplett eines Quartetts (NMR)
<i>t</i> _R	Retentionszeit
<i>t</i> _t	Triplett eines Triplets (NMR)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenkonzentration
VZV	Varicella-Zoster-Virus
w/w	Massenanteil

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Kenntnisstand	3
2.1	Das Retrovirus HIV und die Immunschwächekrankheit AIDS	3
2.2	<i>Combined Antiretroviral Therapy (cART)</i>	5
2.3	Nucleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren	6
2.4	Intrazellulärer Metabolismus von Nucleosidanaloga	8
2.5	Prodrugkonzepte zur Freisetzung von Nucleosiddiphosphaten	10
3	Aufgabenstellung	16
4	Resultate und Diskussion	18
4.1	Aromatische DiPPro-Nucleotide	18
4.1.1	Synthese aromatischer DiPPro-Nucleotide	19
4.1.2	Hydrolysestudien aromatischer DiPPro-Nucleotide	28
4.1.3	Antivirale Aktivität der aromatischen DiPPro-Nucleotide	35
4.2	Asymmetrische DiPPro-Nucleotide	37
4.2.1	Synthese asymmetrischer DiPPro-Nucleotide	37
4.2.2	Synthese der monomaskierten Intermediate	48
4.2.3	Synthese symmetrischer DiPPro-Nucleotide	50
4.2.4	Hydrolysestudien asymmetrischer DiPPro-Nucleotide	52
4.2.5	Antivirale Aktivitäten der asymmetrischen DiPPro-Nucleotide	67
4.3	Maskierung eines NDP-Zuckers, bzw. Einbindung anderer Naturstoffklassen in das asymmetrische Prodrugkonzept	71
4.3.1	Synthese von Acyloxbenzyl-maskiertem D-Mannose-d4TDP 69	72
4.3.2	Hydrolysestudien von Acyloxbenzyl-maskiertem D-Mannose-d4TDP 69	73
5	Zusammenfassung	78
6	Summary	81
7	Experimenteller Teil	84
7.1	Allgemeines	84
7.1.1	Edukte und Reagenzien	84
7.1.2	Lösungsmittel	84
7.1.3	Absolute Lösungsmittel	85
7.1.4	Chromatographie	85
7.1.5	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	86
7.1.6	Spektroskopie	88
7.1.7	Geräte	89

Inhaltsverzeichnis

7.1.8	Zellextrakte	89
7.2	Darstellung der Verbindungen	90
7.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	90
7.2.2	Synthese der Nucleoside/Nucleotide	93
7.2.3	Synthese der 4-(Hydroxymethyl)phenylester	93
7.2.4	Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-mannopyranose 70	95
7.2.5	Synthese der Chlorphosphine	95
7.2.6	Synthese von 5-Nitrosaligenylchlorphosphit	96
7.2.7	Synthese der <i>cycloSal</i> -Triester	96
7.2.8	Synthese der Phosphordiamidite	97
7.2.9	Synthese der symmetrischen Phosphoramidite	99
7.2.10	Synthese der asymmetrischen Phosphoramidite	101
7.2.11	Synthese der <i>DiPPro</i> -Nucleotide	116
7.3	Hydrolysestudien	147
	Gefahrstoffverzeichnis	149
	Literaturverzeichnis	155
	Verbindungsübersicht	162
	Lebenslauf	165
	Publikationsliste	167
	Eidesstattliche Erklärung	169

1 Einleitung

Nucleoside spielen als Bausteine der DNA eine essentielle Rolle bei deren Replikation. Ihr sukzessiver Einbau wird von Polymerasen katalysiert, denen die jeweiligen Nucleosidtriphosphate als Substrate dienen. Sehr spezifisch erfolgt so die Verlängerung des neugebildeten DNA-Stranges entlang des Einzelstranges, was schließlich zu einer exakten Kopie des ursprünglichen DNA-Stranges führt. Die Replikation dient hauptsächlich der Verdopplung des genetischen Materials während der Zellteilung. Einige Viren nutzen die von ihnen initiierte Replikation zur Vermehrung, indem sie ihr Genom in das der Wirtszelle integrieren. Im Fall von Tumoren findet unkontrolliertes Zellwachstum statt, das heißt auch hier spielt die Replikation die entscheidende Rolle.

Analoga der natürlichen Nucleoside finden vielfach Verwendung in der antiviralen und anti-Tumor Therapie und haben sich somit in den letzten zwei Jahrzehnten als eine der wichtigsten Wirkstoffklassen etabliert.

Ihr Wirkmechanismus beruht meist auf ihrem Einbau in die DNA anstelle eines natürlichen Nucleosids, was in letzter Konsequenz einen Abbruch der Kettenverlängerung zur Folge hat. Der Replikationszyklus wird folglich unterbrochen, was bezüglich Tumorzellen zur Wachstumshemmung führt. Liegt hingegen eine virale Infektion vor, wird die nachweisbare Viruslast durch das Hemmen der viralen Zellteilung gesenkt.

In der Kombinationstherapie zur Behandlung von HIV-Infektionen (*combined antiretroviral therapy, cART*) spielen Nucleosidanaloga eine zentrale Rolle und werden zusammen mit weiteren Wirkstoffen, die in andere Stationen des viralen Replikationszyklus eingreifen, eingesetzt. Aber auch Infektionen mit Hepatitis (HBV, HCV), den Herpesviren (VZV, HSV) und vielen weitere Viren werden durch Verabreichung von Nucleosidanaloga therapiert.

Die verabreichten Nucleosidanaloga verfügen jedoch zunächst nicht über biologische Aktivität, sondern stellen lediglich den Precursor der eigentlichen Wirkstoffe dar. Wie auch bei den natürlichen Nucleosiden ist die aktive Spezies das Nucleosidtriphosphat. Der dreistufige Metabolismus wird intrazellulär von Kinasen katalysiert. Aufgrund der strukturellen Unterschiede der Analoga im Vergleich zu den natürlichen Nucleosiden stellen diese teilweise schlechtere Substrate für die Kinasen dar. Aus diesem Grund sind einzelne oder auch mehrere Schritte des dreistufigen Anabolismus zum Triphosphat bei einigen Nucleosidanaloga kinetisch gehemmt. Als Konsequenz sinkt die antivirale Aktivität. In einigen Fällen kommt es in Folge der Akkumulation des Nucleosids/Nucleotids, welches ein schlechtes Substrat darstellt, sogar zu Nebenreaktionen und schließlich zu krankhaften Nebenwirkungen. Die logische Konsequenz ist also der Einsatz der bereits phosphorylierten Nucleoside. Doch diese Nucleotide weisen aufgrund ihrer Ladungen hohe Polaritäten auf, die eine Diffusion durch die lipophile Zellmembran erschweren. Der Einsatz unpolarer Vorstufen, sogenannter Pronucleotide, umgeht dieses Problem. Die Zellgängigkeit wird

gewährleistet und das Nucleotid schließlich in der Zelle freigesetzt. Eine Vielzahl verschiedener Pronucleotidkonzepte ist bereits publiziert worden: Prodrugs von Nucleosidmonophosphaten bzw. -phosphonaten sowie von Nucleosiddiphosphaten.¹ Letztere stellen aufgrund der labilen Phosphoranhydrid-Brücke eine besondere Herausforderung dar. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Weiterentwicklung eines bereits etablierten Nucleosiddiphosphat-Konzepts (DiPPro-Konzept), bei dem die negativen Ladungen des β -Phosphates bioreversibel durch Bis(acyloxybenzyl)-Gruppen maskiert sind. Durch die Modifikation der Maskenstruktur soll es gelingen, Nucleosiddiphosphatprodrugs zu entwickeln, die intrazellulär exklusiv das Nucleosiddiphosphat freisetzen und Monophosphat-bildende Nebenreaktionen weitestgehend umgehen. Die positive Folge wäre dann letztendlich eine Erhöhung der antiviralen Aktivität.

2 Kenntnisstand

2.1 Das Retrovirus HIV und die Immunschwächekrankheit AIDS

Die Immunschwächekrankheit AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) gehört noch immer zu den weltweit bedrohlichsten Pandemien. Obwohl die ersten Fälle der Krankheit schon in den späten 1970'er bzw. den frühen 1980'er Jahren auftraten, sterben jährlich noch immer etwa 1.6 Mio. Menschen an ihren Folgen.² AIDS ist die Folge einer Ansteckung mit dem Retrovirus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), das Mitte der 1980er Jahre erstmals von L. MONTAGNIER und R. C. GALLO isoliert wurde.^{3,4}

Das HI-Virus gehört der Familie der Retroviren (Reverse Transkriptase Onkoviren) an. Es handelt sich um behüllte Einzel(+)-Strang-RNA-Viren, deren Erbinformation in Form von RNA vorliegt. Es sind bisher zwei Typen des HIV bekannt, HIV-Typ-1 und HIV-Typ-2. HIV-2 tritt vor allem in West-Afrika und Asien auf, wohingegen die meisten Fälle von AIDS weltweit auf HIV-1 zurückzuführen sind.

Das Viruspartikel (Virion) des HIV hat einen Durchmesser von etwa 100 nm. Die äußere Hülle ist aus Lipoproteinen aufgebaut, in die Glycoproteine eingelagert sind (Abbildung 1). Zentraler Kern des Virions ist das Capsid. Umhüllt von einer Plasmamembran trägt es zum einen das virale Genom in Form von zwei identischen RNA-Strängen und zum anderen die viralen Enzyme, wie die Reverse Transkriptase, die Integrase und die Protease.^{5,6}

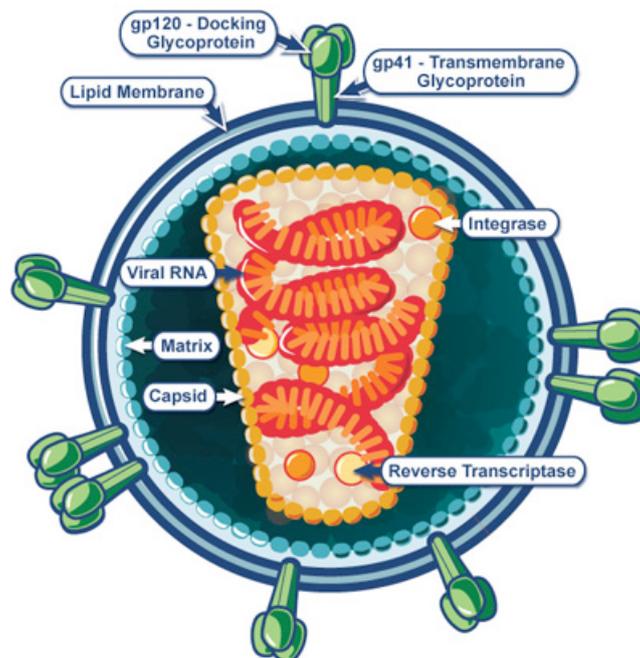


Abbildung 1: Struktureller Aufbau eines HI-Virions.⁷

Nach Infektion mit HIV erfolgt die Vermehrung des Virus sehr rasch. Das Viruspartikel (Virion) tritt durch Bindung des Oberflächenproteins gp120 an den CD4-Rezeptor der Wirtszelle (vor allem T-Lymphozyten) unter Beteiligung von Chemokinrezeptoren (CCR5 bei Monozyten, CXCR4 bei T-Lymphozyten) mit der Wirtszelle in Wechselwirkung, was eine Konformationsänderung in dem Transmembranprotein gp41 zur Folge hat. Hierdurch erfolgt die Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran, wodurch das Capsid in die Zelle gelangt. Im Cytoplasma erfolgt nun die Freisetzung des RNA-Genoms sowie der viruseigenen Proteine. Die RNA kann nicht als solche in das Zellgenom integriert werden und muss zunächst in doppelsträngige DNA umgeschrieben werden. Verantwortlich für diesen Vorgang, der einen entscheidenden Schritt im Replikationszyklus des Virus darstellt, ist die Reverse Transkriptase. Das viruseigene Enzym übersetzt die virale RNA über mehrere komplexe Schritte in die provirale DNA, die cDNA. Diese ist komplementär zur RNA-Matrix, sie verfügt jedoch im Gegensatz zur viralen RNA über terminale Wiederholungen, so genannte „long terminal repeats“ (LTRs). Die LTRs werden zur Integration in die Wirts-DNA benötigt und stellen Bindungsstellen für regulatorische Enzyme dar, die die Genexpression der viralen Gene kontrollieren. Die cDNA bildet zusammen mit verschiedenen viralen und zellulären Faktoren einen Präintegrationskomplex, welcher den Durchtritt durch die Kernhülle in das Nucleoplasma ermöglicht. Am Zielort angelangt, wird das virale Genom mit Hilfe der viralen Integrase in das Genom der Wirtszelle eingebaut. Nun findet die Produktion neuer infektiöser Viruspartikel statt. Hierfür verantwortlich sind sowohl virale als auch zelluläre Transkriptionsfaktoren, die die Transkription des Virusgenoms initiieren. Es kommt somit zum einen zur Vervielfältigung des viralen Genoms, zum anderen werden eine Reihe von viruseigenen Proteinen translatiert, deren Vielfalt aus dem unterschiedlichen Spleißen des viralen Enzyms Rev resultiert, welches ebenfalls für den Transport durch die Kernhülle verantwortlich ist. Das Zusammenspiel dieser viralen Proteine und der viralen RNA ermöglicht die Bildung neuer Virione. Einen erheblichen Anteil an der Virionbildung hat die Protease. Die Abspaltung von Vorläuferproteinen aus diesem viralen Enzym schafft die letzten Voraussetzungen für die Ausknospung und schließlich das Abschnüren des Viruspartikels aus der Plasmamembran. Außerhalb der Zelle erfolgt die Reifung des Virions zum infektiösen HI-Virus.

Hauptsächliches Target des Virus sind CD4⁺-Zellen, das heißt Zellen, die den CD4-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Dazu zählen Makrophagen, dendritische Zellen und vor allem T-Lymphozyten. Die T-Lymphozyten spielen bei der Immunantwort eine signifikante Rolle, weshalb ebenfalls die Antikörperbildung durch sie beeinflusst ist. Eine Infektion mit HIV führt zur Lyse dieser T-Zellen. Die Konsequenz ist eine erhebliche Störung des Immunsystems.^{5,6}

2.2 **Combined Antiretroviral Therapy (cART)**

Die effektivste Behandlung einer Infektion mit HIV stellt derzeit eine Kombinationstherapie, die *combined antiretroviral therapy* (cART), dar, die im Jahr 1996 unter dem Namen *highly active antiretroviral therapy* (HAART) eingeführt wurde. Bestehend aus einer Kombination mehrerer Wirkstoffe, die verschiedene Schritte des Replikationszyklus des HI-Virus hemmen, stellt diese Therapieform eine Möglichkeit dar, die Viruslast soweit zu senken, dass das Virus nicht mehr mit den gängigen Methoden (ELISA, Western Blot) nachzuweisen ist.

In Abbildung 2 sind die verschiedenen Prozesse des Replikationszyklus gezeigt, für die wirksame Inhibitoren bekannt sind. Die Bindungs- und Fusionsinhibitoren verhindern die Aufnahme des Virus durch die Wirtszelle. Dabei konkurrieren die Co-Rezeptor-Antagonisten (*co-receptor antagonists*) (I) durch Bindung an die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 der Zelle mit dem Virion und verhindern somit das Verschmelzen des Viruspartikels mit der Zellmembran und folglich den Eintritt in die Zelle. Die Fusionsinhibitoren (*fusion inhibitors*) (II) hingegen binden an das virale Oberflächenprotein gp41, wodurch die Konformationsänderung, die zum Entlassen des Capsids in die Zelle führt, unterbunden wird.

Die Unterdrückung der Virusreplikation erfolgt zum einen durch Inhibierung der reversen Transkription (III) und zum anderen durch Integraseinhibitoren (IV). Nucleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTIs) verhindern durch ihren Einbau in den DNA-Strang, welcher von der viralen Reversen Transkriptase synthetisiert wird, den Fortlauf der DNA-Synthese, wohingegen die nicht-nucleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs) durch Bindung an die Polymerasedomäne der Reversen Transkriptase zur Hemmung des Enzyms führen. Die Inhibierung der viralen Integrase erfolgt sowohl durch *integrase strand transfer inhibitors* (INSTIs) als auch durch *allosteric integrase inhibitors* (ALLINIs).

Ein letzter Angriffspunkt der cART ist die Ausbildung des neuen Virions und dessen Reifung (V). Da die Protease im Wesentlichen an der Bildung neuer Viruspartikel beteiligt ist, kann dieser Prozess durch Inhibierung dieses Enzyms unterbunden werden. Die eingesetzten Wirkstoffe binden an das aktive Zentrum der viralen Protease und verhindern somit die essentielle proteolytische Spaltung in die Vorläuferproteine.

Individuell auf den Patienten zugeschnitten, werden drei oder mehr verschiedene Wirkstoffe kombiniert verabreicht. An zentraler Stelle stehen hierbei NRTIs, wovon meist zwei unterschiedliche, entweder mit einem NNRTI, einem Proteaseinhibitor oder einem dritten NRTI eingesetzt werden. Welche Kombination schließlich Anwendung findet hängt von diversen Faktoren ab.⁸⁻¹⁰

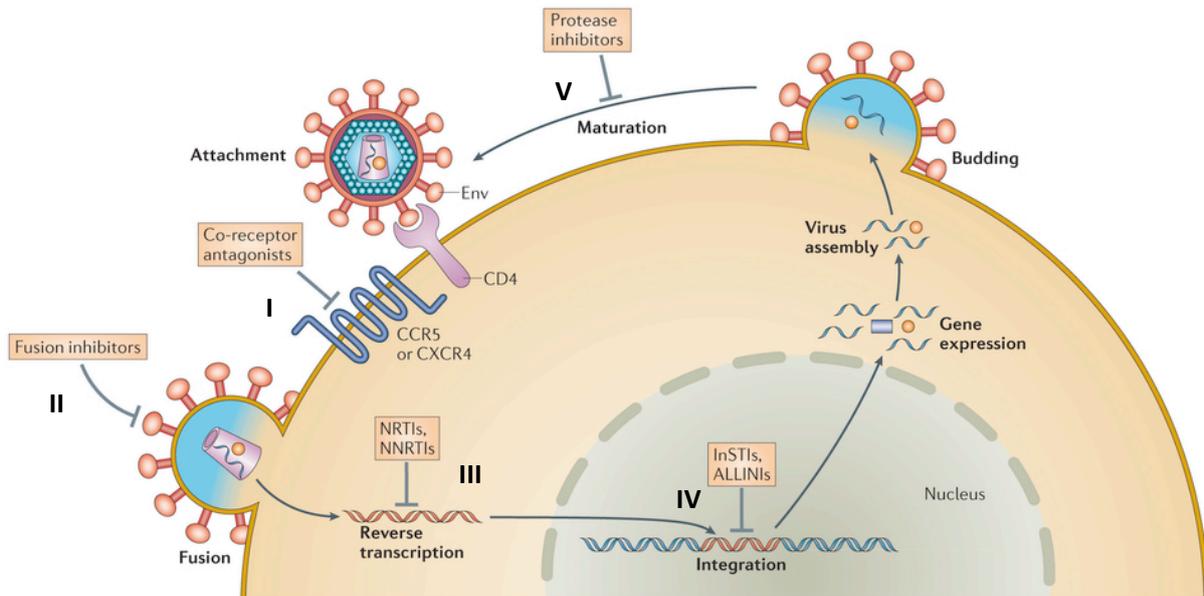


Abbildung 2: Replikationszyklus des HIV mit Angriffspunkten für die cART¹⁰ I Bindungsinhibitoren, II Fusionsinhibitoren, III Reverse Transkriptase Inhibitoren, IV Integraseinhibitoren, V Proteaseinhibitoren.

2.3 Nucleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren

Bereits 1985, zwei Jahre nach Identifikation des HIV-1^{3,4} und nur ein Jahr, nachdem die ursächliche Verbindung von HIV und AIDS gefunden wurde,¹¹ zeigten MITSUYA ET AL., dass das Nucleosidanalogen 3'-Azido-3'-desoxythymidin **1** (AZT, Zidovudine®) *in vitro* anti-HIV Aktivität besitzt.¹² FURMAN ET AL. konnten diese Aktivität darauf zurückführen, dass das Nucleosidanalogen nach Einbau in den wachsenden viralen DNA-Strang die Reverse Transkriptase inhibiert. Hierbei stellt allerdings nicht AZT **1**, sondern, wie auch bei den natürlichen Nucleosiden, das Triphosphat die aktive Spezies dar.¹³ Denn die treibende Kraft der DNA-Synthese ist die Abspaltung von Pyrophosphat, die aus einem nucleophilen Angriff der 3'-Hydroxygruppe auf das β -Phosphoratom des Triphosphates resultiert.

Seitdem AZT **1** im Jahre 1987 als Wirkstoff zugelassen wurde, sind eine Reihe weiterer Nucleosidanaloga publiziert worden. Die sieben bislang von der *United States Food and Drug Administration* zugelassenen Nucleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren sind in Abbildung 3 gezeigt.

Gemeinsames Merkmal dieser Verbindungen ist das Fehlen der 3'-Hydroxygruppe, was zur Folge hat, dass ihr Einbau in den wachsenden DNA-Strang zum sofortigen Abbruch der DNA-Synthese führt, da nun kein weiterer nucleophiler Angriff auf das nächste Triphosphat erfolgen kann.¹⁴

Kenntnisstand

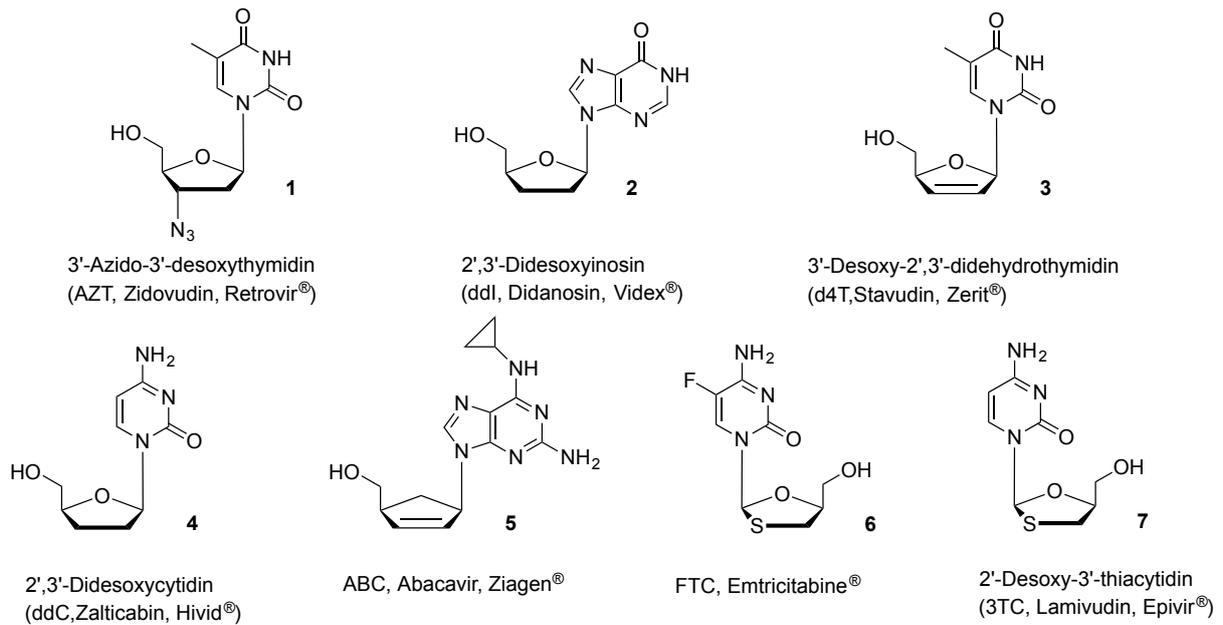


Abbildung 3: Für die anti-HIV Therapie zugelassene NRTIs.

Neben den Nucleosidanaloga mit fehlender 3'-Hydroxygruppe wurden auch andere Nucleosidanaloga als potentielle NRTIs beschrieben (z.B. *carba*-dT), die zwar über eine Hydroxygruppe in 3'-Position verfügen, deren unnatürliche Konformation aber dennoch über einen sogenannten *kinetic chain termination* Mechanismus zum Erliegen der Kettenverlängerung führt.¹⁵

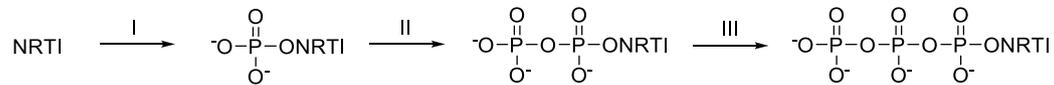
Im Gegensatz zur humanen DNA-Polymerase verfügt die Reverse Transkriptase nicht über eine *proof reading function* durch die Exonuclease, das heißt sie kann das Nucleosidanalogon weder als nicht-natürliches Substrat erkennen noch eliminieren. Somit ist ebenfalls die Selektivität der Wirkstoffe auf die vom Virus befallenen Zellen gewährt.

3'-Desoxy-2',3'-dideohydrothymidin **3** (d4T), welches unter Zerit® oder Stavudin bekannt ist, ist neben ddl **2** und ddC **4** ein weiteres anti-HIV wirksames Nucleosidanalogon, die zwischen 1991 und 1994 zur antiretroviralen Therapie zugelassen wurden. Der ausgeprägte inhibitorische Effekt von 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydronucleosiden wurde bereits 1987 von YAMAMOTO ET AL. beschrieben.¹⁶ d4T **3** findet heute noch häufigen Einsatz in der Kombinationstherapie.

Ein limitierender Faktor bei der Inhibierung der Reversen Transkriptase ist die intrazelluläre Phosphorylierung. Diese kann durch die strukturellen Unterschiede zu den natürlichen Nucleosiden ineffizient verlaufen. Eine geringe Effizienz der intrazellulären Phosphorylierung wirkt sich somit direkt auf die antivirale Aktivität des Nucleosidanalogons aus.

2.4 Intrazellulärer Metabolismus von Nucleosidanaloga

Der dreistufige Anabolismus zum Triphosphat (Schema 1) erfolgt durch phosphorylierende Enzyme. Dabei ist der Erfolg der Phosphorylierung durch das Zusammenspiel von phosphorylierenden und dephosphorylierenden Enzymen bestimmt.



Schema 1: Anabolismus von Nucleosidischen Reversetranskriptaseinhibitoren.

Der erste Schritt, die Phosphorylierung vom NRTI zum NRTI-Monophosphat, wird vorwiegend durch die vier Desoxynucleosidkinasen katalysiert, die die natürlichen Nucleoside im Zuge des Recycling (*salvage*) der nucleotidischen Abbauprodukte in ihre Monophosphate überführen: Thymidinkinase 1 (TK1), Thymidinkinase 2, die mitochondriale Desoxyguanosinkinase, sowie die zytosolische Desoxycytidinkinase (dCK).¹⁷⁻²² Diese Kinasen sind, mit Ausnahme von TK1, auf Grund ihrer Funktion im *salvage pathway* auch außerhalb des Zellzyklus aktiv, was somit eine Zellzyklus-unabhängige Aktivierung der NRTIs gewährleistet. Die Phosphorylierung von AZT **1** und d4T **3** wird durch die TK1 katalysiert. GAO ET AL. zeigten, dass auf Grund der spezifischen Expression in der S-Phase des Zellzyklus die Aktivität dieser NRTIs in ruhenden Zellen gemindert ist.²³ Die zweite Phosphorylierung vom NRTI zu NRTI-Monophosphat wird durch die etwas weniger spezifischen NMP-Kinasen Thymidylatkinase, Uridylat-Cytidylatkinase, Adenylatkinasen 1 bis 5 sowie Guanylatkinase vermittelt.²⁴ Die Katalyse des finalen Phosphorylierungsschrittes zum aktiven NRTI-Triphosphat erfolgt durch eine Vielzahl relativ unspezifischer Enzyme, wie beispielsweise der NDP-Kinase, der Phosphoglyceratkinase, der Pyruvatkinase oder der Creatinkinase.^{25,26} Einen guten Überblick über die Phosphorylierung von nucleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren bietet ein *review* von DEVILLE-BONNE ET AL.²⁷

Generell kann die Enzymaffinität aller phosphorylierenden Enzyme zum Nucleosidanalogon, auf Grund dessen strukturellen Unterschieds zum natürlichen Pendant, gemindert sein.²⁷ In Bezug auf die sukzessive Phosphorylierung von d4T **3** ist schon der erste Schritt, die Umsetzung zum d4T-Monophosphat **8**, wegen der unzureichenden Enzymaffinität von TK1 zu d4T **3** kinetisch gehemmt.²⁸

Im Gegensatz dazu findet die Umsetzung von AZT **1** zum AZT-Monophosphat mit gleicher Geschwindigkeit statt, wie die Umsetzung von Thymidin **10** zu Thymidinmonophosphat **11** (TMP). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist hier auf Grund der unzureichenden Phosphorylierung durch NMP-Kinasen die Addition der zweiten Phosphateinheit.²⁹ Die diesen Schritt katalysierende zelluläre Thymidylatkinase bindet AZTMP **9** zwar besser (doppelt so gut) als das natürliche Thymidinmonophosphat **11**, jedoch ist die

Umsatzgeschwindigkeit deutlich geringer als für TMP **11**.^{30,31} Der Grund für die schlechtere Umsatzgeschwindigkeit (etwa Faktor 200) konnte durch Kristallisation des Enzym-Substrat-Komplexes ermittelt werden: durch sterische Wechselwirkung der im Vergleich zur 3'-Hydroxygruppe sperrigeren 3'-Azidogruppe mit dem Aspartat-14 kommt es zur Änderung der Position der sogenannten P-Loop-Region der Thymidylatkinase. Dadurch wiederum verschiebt sich die Bindungsstelle für das Phosphat-übertragende Adenosintriphosphat **12** (ATP) wodurch der Angriff des AZTMPs **9** auf ATP **12** erschwert wird. Es kommt zur intrazellulären Akkumulation von AZTMP **9**. Ein Anstieg der AZTMP-Konzentration führt zur Inhibierung der Thymidylatkinase, da AZTMP **9** nicht nur an der Nucleotid-Bindungsstelle bindet, sondern ebenfalls an der Bindungsstelle des ATPs.^{32,33} Neben dem inhibitorischen Effekt des AZTMP **9** auf die replizierenden Enzyme, konnten HARRINGTON ET AL. auch die Inhibierung von 3'-Exonucleasen nachweisen, wodurch die Reparatur von AZT-terminierten DNA-Strängen in allen Zellen verhindert wird.³⁴ Des Weiteren scheinen hohe AZTMP-Konzentrationen die zelluläre Glycolysierung zu inhibieren.^{35,36} Somit führt unvollständige Phosphorylierung von AZT **1** zu Nebenwirkungen und ist ein Grund für seine Toxizität.

Bezüglich der von der *United States Food and Drug Administration* zugelassenen NRTIs, konnten DEVILLE-BONNE ET AL. auch für den dritten Phosphorylierungsschritt eine verminderte Enzymaktivität der Nucleosiddiphosphatkinase (NDPK) feststellen, eines der Enzyme, die die Phosphorylierung von Nucleosiddiphosphaten zu -triphosphaten katalysieren. Der Grund hierfür liegt vermutlich an der fehlenden 3'-Hydroxygruppe, die an der Enzym-Substrat-Bindung beteiligt ist.³⁷

Unabhängig von der festgestellten Toxizität von AZTMP **9** weisen auch schon viele unphosphorylierte Nucleosidanaloga toxische Wirkung auf. Die vollständig phosphorylierten aktiven NRTI-Triphosphate konkurrieren mit den natürlichen Nucleotiden um ihren Einbau in den DNA-Strang. Obwohl die Analoga über teilweise stark ausgeprägte strukturelle Abweichungen von den Nucleosiden verfügen, stellen sie gute Substrate für die HIV-Reverse Transkriptase dar, da die relevanten Bindungsstellen der NRTI-TPs analog der NTPs sind.³⁸⁻⁴⁰ Beispielsweise beschrieben VACCARO ET AL., dass d4TTP **13** genauso effizient von der HIV-Reversen Transkriptase in den wachsenden Strang eingebaut wurde, wie das natürliche Pendant Thymidintriphosphat **14**.⁴¹ In den Mitochondrien konkurrieren die Nucleosidanaloga ebenfalls mit den natürlichen Nucleosiden. In diesen subzellulären Organellen, die in allen eukaryotischen Zellen vorhanden sind, wird unter anderem mittels der dort vorliegenden Enzyme bzw. Enzymkomplexe das für die Energieversorgung wichtige Adenosintriphosphat **12** im Zuge der Atmungskette generiert, welches anschließend ins Zytoplasma exportiert wird. Bei der Replikation der mitochondrialen DNA spielt die DNA Polymerase γ eine entscheidende Rolle. Für nahezu alle in der anti-HIV-Therapie zugelassenen NRTIs konnte ein inhibitorischer Effekt auf diese Polymerase nachgewiesen

werden. Die Auswirkungen einer unzureichenden oder fehlerhaften Replikation der mitochondrialen DNA sind eklatant. So kommt es bei längerer Exposition mit NRTIs zu Stoffwechsel- und Organveränderungen, die unter dem Begriff *mitochondriale Toxizität* zusammengefasst werden.⁴² Die Folge sind minderschwere (Myopathie) bis schwere Krankheiten (Lipodystrophie, Pankreatitis, Laktatazidose, Leberversagen, Anämie).

Im Gegensatz zu beispielsweise d4TTP **13** ist AZTTP **15** auf Grund der niedrigen Bindungsstärke ein schlechtes Substrat für die DNA Polymerase γ .⁴³ Das bedeutet, dass die direkte Inhibition der DNA Polymerase γ nicht alleiniger Auslöser der Toxizität sein kann. MCKEE ET AL. konnten für AZT **1** eine indirekte Hemmung der mitochondrialen Replikation finden: durch Inhibierung der Thymidin-phosphorylierenden Enzyme, die bereits oben für die Thymidylatkinase beschrieben ist,^{32,33} kommt es zur Reduktion der mitochondrialen Thymidintriphosphat-Konzentration und folglich zur Hemmung der Replikation.⁴⁴

Der Metabolismus von NRTIs wurde umfassend in einem *review*-Artikel von T. CIHLAR und A. S. RAY zusammengefasst.⁴⁵

Um die Effizienz der NRTIs zu steigern und somit Nebenwirkungen möglichst gering zu halten, ist der Einsatz bereits phosphorylierter NRTIs sinnvoll.

Bezüglich des d4T **3** wäre die Verabreichung von d4T-Monophosphat **8** eventuell ausreichend, um den ersten Phosphorylierungsschritt durch die spezifische Thymidinkinase (TK) zu umgehen (TK-Bypass). Bei AZT **1** bedarf es hingegen der Gabe von AZTDP **16**, um den vielfach als „Flaschenhals“ titulierten zweiten Phosphorylierungsschritt zu vermeiden. Nucleotide liegen jedoch bei physiologischem pH-Wert als Anionen vor und können somit die lipophile Zellmembran nicht durch passiven Transport überwinden. Folglich sind bereits verschiedene Prodrugsysteme publiziert worden, welche die intrazelluläre Freisetzung von NRTI-MPs sowie NRTI-DPs zum Ziel haben.⁴⁶⁻⁵² Darüber hinaus konnte T. SCHULZ bereits erstmals ein Triphosphatprodrug von d4T **3** darstellen, durch das jegliche zelluläre Phosphorylierung umgangen wird.⁵³ Umfangreiche Studien zu diesem Themengebiet wurden während der Erstellung dieser Arbeit von T. GOLLNEST durchgeführt.⁵⁴

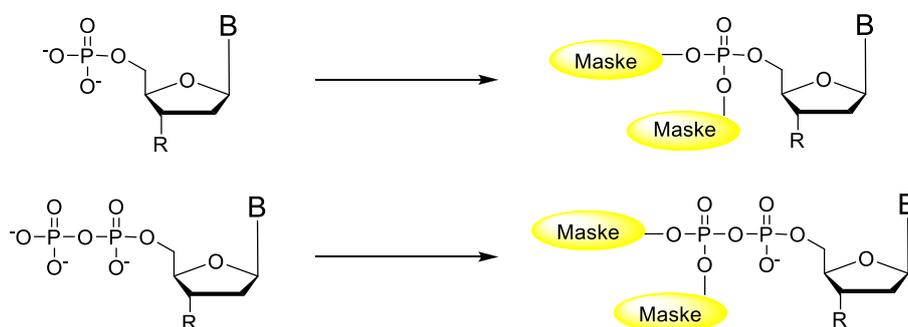
2.5 Prodrugkonzepte zur Freisetzung von Nucleosiddiphosphaten

Der Eintritt eines NRTIs in die Zelle geschieht entweder durch passive Diffusion oder durch *Carrier*-vermittelten Transport. Transporter, die diese Rolle übernehmen können sind vielzählig vorhanden, die wichtigsten stellen die Nucleosid-*Carrier* dar. Des Weiteren ist bekannt, dass Mitglieder der Familie der *ATP-binding-cassette* (ABC)-Transporter nicht nur Nucleoside sondern auch Nucleotide aus der Zelle ins Plasma effluxieren. Schließlich konnten auch andere Carrier (MRP4, MRP5 sowie MRP8) als Transporter der Monophosphate einiger NRTIs bestimmt werden. Die Kombination von in die Zelle

transportierenden *Carrier* und effluxierenden ABC-Transportern kann zum Nachteil der *Carrier* ausgehen und die Wirksamkeit der NRTIs erheblich einschränken.⁴⁵ Ein passiver Transport, unabhängig von der Aktivität der *Carrier* kann also vorteilhaft sein.

Wie in dem vorherigen Kapitel beschrieben, ist es bei der antiviralen Therapie von Vorteil, bereits die Mono- oder Diphosphate der entsprechenden Nucleosidanaloga einzusetzen, um so die Spezifität der Kinasen zu umgehen. Die Nucleosidmono- und -diphosphate liegen bei physiologischem pH-Wert als Dianionen vor, wodurch ein passiver Transport durch die lipophile Zellmembran nicht erfolgen kann. Durch Neutralisieren der Ladungen mittels lipophiler Maskierungen kann der passive Transport ermöglicht werden. Diese Pronucleotide diffundieren durch die Zellmembran und setzen intrazellulär das jeweilige Nucleotid frei. Pronucleotide, die das NRTI-DP freisetzen sind hier besonders interessant: zum einen wird nicht nur der erste Phosphorylierungsschritt umgangen, sondern ebenfalls der zweite (und bei dem Anabolismus von AZT 1 gehemmte). Zum anderen kann das generierte NRTI-Diphosphat nicht gleich mittels der ABC-Transporter effluxiert werden, sondern müsste zunächst durch Phosphatasen zum Monophosphat abgebaut werden.

Schema 2 zeigt, wie durch die Maskierung der Ladungen die hydrophilen Nucleotide zu lipophilen Pronucleotiden werden.



Schema 2: Einsatz von Pronucleotiden.

Die Steigerung der Lipophilie könnte ebenfalls zur Lösung eines weiteren signifikanten Problems beitragen. Der Wirkstofftransport in einige Regionen des menschlichen Körpers, vor allem in das Gehirn, ist erheblich erschwert. Das Resultat sind Virusreservoirs, die zum AIDS-Demenz-Komplex führen, einem medizinischen Phänomen des zentralen Nervensystems, das bei einer Vielzahl von AIDS-Patienten zu einer neurologischen Fehlfunktion führt. Der Grund für die hohe Viruskonzentration, ist der unzureichende Transport der Wirkstoffe durch die Blut-Hirn-Schranke, da diese für hydrophile Substanzen unüberwindbar ist.⁵⁵

Prodrugkonzepte, bei denen ein pharmakologisch inaktives Derivat erst an dem gewünschten Wirkort den aktiven Wirkstoff freisetzt, sind für Nucleosidmonophosphate

weitgehend bekannt und vielfach publiziert.⁴⁶ Die Nucleoside werden in die jeweiligen Nucleosidmonophosphate überführt, wobei die negativen Ladungen durch die Verwendung lipophiler Gruppen maskiert werden. Somit wird die Diffusion des Prodrugs durch die Zellmembran erleichtert und das Nucleosidmonophosphat wird durch pH-abhängige und/oder enzymatische Hydrolyse im Zytoplasma freigesetzt. Dabei muss vor allem gewährleistet sein, dass das Prodrug über eine ausreichende Stabilität außerhalb der Zelle verfügt, intrazellulär aber schnell das Nucleotid freigesetzt wird. Die abgespaltenen Masken dürfen dabei keine Toxizität aufweisen.

Prodrugs von Nucleosiddiphosphaten sind bisher nur wenig beschrieben. Insbesondere die vollständige lipophile Maskierung der Ladungen am Diphosphat kann zu einer deutlichen Abnahme der chemischen Stabilität der Pyrophosphateinheit führen. Infolgedessen ist die Entwicklung von NDP-Prodrugs anspruchsvoller als das Design von NMP-Pronucleotiden.

HOSTETLER ET AL. synthetisierten verschiedene Nucleosiddiphosphat-diglyceride **17** als potentielle NDP-Prodrugs. Bei der Hydrolyse dieser Verbindungen wurde jedoch auf Grund der im vorigen beschriebenen Labilität der Pyrophosphateinheit durch Spaltung der Anhydridbindung lediglich das Nucleosidmonophosphat und nicht das gewünschte Diphosphat freigesetzt.⁵⁶⁻⁵⁹

BONNAFFÉ und HUYNH DINH publizierten Acyl-Nucleotide **18**, bei denen das Nucleosiddiphosphat anstelle eines negativ geladenen Sauerstoffs einen Fettsäureester trägt (Abbildung 4).^{60,61} Die Freisetzung des NDPs erfolgt auf Grund der schnelleren Spaltung der gemischten Carbonsäure-Phosphat-Anhydridbindung gegenüber der Phosphat-anhydridspaltung.

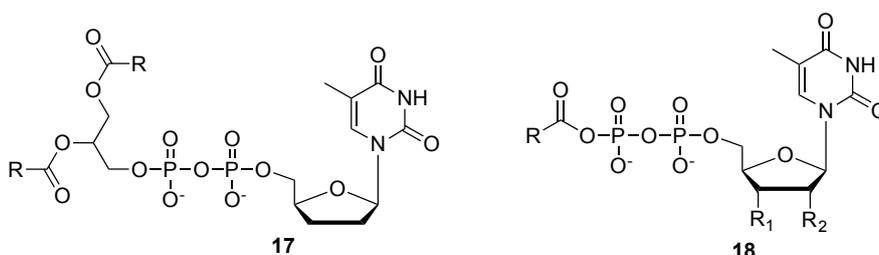
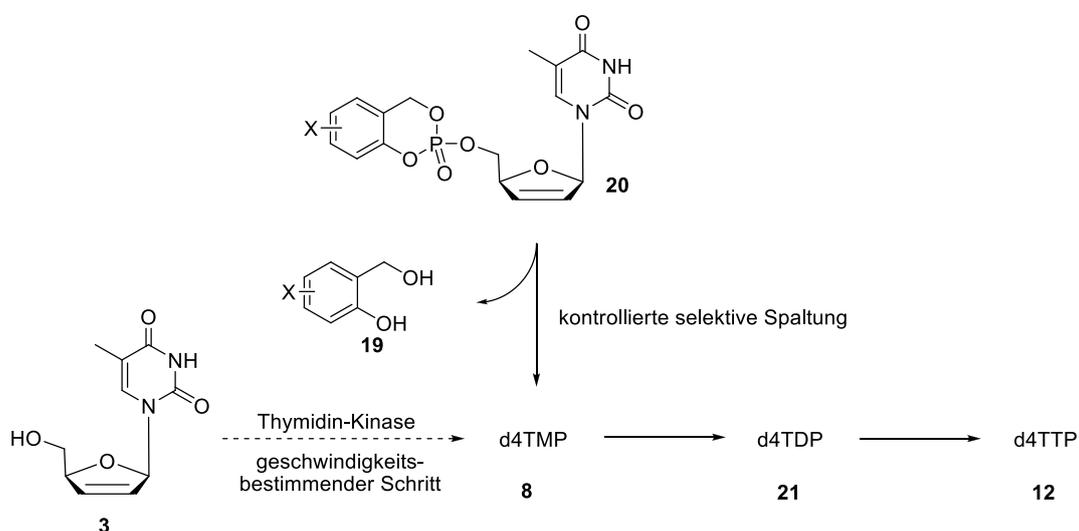


Abbildung 4: Prodrugs nach HOSTETLER ET AL. **17** und nach BONNAFFÉ und HUYNH DINH **18**.⁵⁶⁻⁶²

Dieser postulierte Mechanismus der Freisetzung von Nucleosiddiphosphaten konnte durch chemische Hydrolyse in Phosphatpuffer sowie in RPMI-Kulturmedium bestätigt werden. Allerdings ließ sich das Konzept nicht aufs Zellmedium übertragen. Die antivirale Aktivität konnte nicht durch die Einführung der zusätzlichen Acylgruppe gegenüber der entsprechenden Nucleoside gesteigert werden. Die Autoren vermuteten die geringe Stabilität der Verbindungen **18** in RPMI-Kulturmedium als Grund hierfür. Durch die geringe Stabilität konnte die Diffusion durch die Zellmembran nicht gewährleistet werden, was zu einer geringen Aufnahme der Prodrugs in die Zelle geführt haben könnte.⁶²

In der Arbeitsgruppe von C. MEIER wurde für die pH-abhängige selektive Freisetzung von Nucleosidmonophosphaten das *cycloSal*-Konzept entwickelt.⁶³ Die hier als Pronucleotide verwendeten *cycloSal*igenyl-NMPs sind zyklische Phosphatester-Derivate, in denen ein Salicylalkohol **19** und ein Nucleosidmonophosphat zweifach miteinander verestert sind.

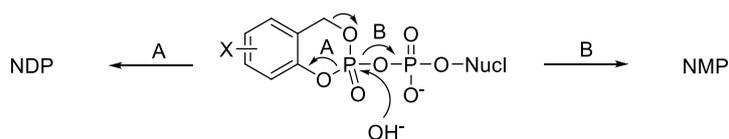
Der besondere Vorteil dieser Struktur liegt in der chemischen Differenzierbarkeit der Phosphatesterbindungen: auf Grund der unterschiedlichen Stabilitäten der Benzyl-, der Phenol- und der Alkylesterbindung erfolgt bei einem nucleophilen Angriff auf das Phosphoratom zunächst die Spaltung der Phenolesterbindung. Die primäre Spaltung der benzylicischen Esterbindung tritt infolge der höheren Stabilität nur in sehr untergeordnetem Maß auf, weshalb der Spaltungsmechanismus letztlich selektiv das Nucleotid freisetzt. Schema 3 zeigt das *cycloSal*-Konzept am Beispiel von d4T **3**.



Schema 3: TK-Bypass am Beispiel von d4T **3**.

Auf Grund der erfolgreichen Anwendung des *cycloSal*-Konzepts auf eine große Bandbreite von Nucleosidanaloga und der Vorteile wie die pH-abhängige Hydrolyse sowie der Modifikation zu „lock-in“-Pronucleotiden^{64,65} machte das Konzept für eine Anwendung auf Nucleosiddiphosphate attraktiv.

Die Anwendung des *cycloSal*-Konzeptes auf Diphosphat-Prodrugs war allerdings nicht erfolgreich (Schema 4). Zwar gelang die Synthese einiger *cycloSal*igenyl-Nucleosiddiphosphate, in Hydrolysestudien zeigte sich jedoch, dass als Hauptprodukt nicht das Diphosphat (Weg A) entstand, sondern, auf Grund der bevorzugten Anhydridspaltung, das Nucleosidmonophosphat und *cycloSal*-Phosphat (Weg B).^{47,49}

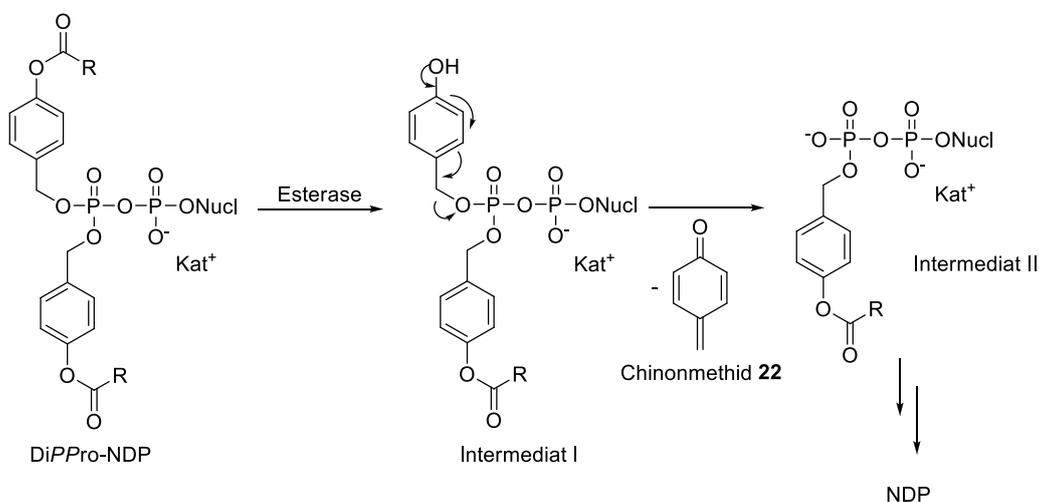


Schema 4: Hydrolyse von *cycloSal*-NDPs.

Die Übertragung eines Systems zur Freisetzung von Nucleosidmonophosphaten auf Diphosphate gelang H. J. JESSEN und C. MEIER schließlich durch die Maskierung mit Bis(4-acyloxybenzyl)-Ethern.⁴⁷⁻⁴⁹ Das Prodrugkonzept zur NMP-Freisetzung wurde erstmals von FREEMAN ET AL. beschrieben: mittels Bis(4-acyloxybenzyl)- oder Mono(4-acyloxybenzyl)-Ester maskierte Nucleosidmonophosphate setzen selektiv das NMP frei.⁶⁶⁻⁶⁸ Die Spaltung beider Masken der Bis(4-acyloxybenzyl)-Verbindungen erfolgt kaskadenartig: Durch Spaltung der im Phenylring *para*-ständigen Acylfunktion wird die Stabilität der Benzylesterbindung labilisiert, sodass es zum spontanen Zerfall des Intermediates zum Mono(4-acyloxybenzyl)-Ester kommt. Die Wiederholung dieses Spaltungsprozesses an der verbliebenen Maske setzt schließlich das Nucleotid frei.

Die Anwendung dieses Systems auf Nucleosiddiphosphate bot zwei besondere Vorteile: die Acylspaltung erfolgt im Zellmedium enzymatisch, sodass die Pronucleotide gegenüber der chemischen Hydrolyse vergleichsweise schnell gespalten werden sollten. Dies stellt sicher, dass die Freisetzung des Nucleotids bevorzugt innerhalb der Zelle erfolgt. Außerdem fungiert das aromatische System als Spacer: die enzymatische Spaltung erfolgt deutlich entfernt von der labilen Phosphatbrücke.

H. J. JESSEN und C. MEIER gelang die Adaption des beschriebenen Systems auf ein funktionierendes Diphosphat-Prodrug-Konzept (DiPPro-Konzept), dessen Prinzip der Freisetzung von NDP, die analog der oben beschriebenen Bis(4-acyloxybenzyl)-NMPs verläuft, in Schema 5 gezeigt ist.



Schema 5: Freisetzung von NDP aus Bis(acyloxybenzyl)-Ester maskierten NDP-Prodrugs.

Freisetzungsmechanismen, Hydrolysehalbwertszeiten und antivirale Aktivität stehen im direkten Zusammenhang zum acylischen Rest. Durch geeignete Wahl des Substituenten R der Acylfunktion der Maske, war es möglich, sowohl die Stabilität als auch die Lipophilie der Prodrugs einzustellen. Die Hydrolyse der Verbindungen (verzweigte, und unverzweigte aliphatische Reste R, sowie R= Phenyl (Schema 5)) in verschiedenen Medien konnte zeigen, dass auf Grund der enzymatischen Initiierung, die Reaktion in Zellextrakten um ein vielfaches schneller verläuft als im Phosphatpuffer. Die Stabilität der Prodrugs stieg dabei mit zunehmender Verzweigung des Restes R, was die Untersuchung von Verbindungen mit aliphatischen verzweigten sowie unverzweigten Resten zeigte.⁴⁷⁻⁴⁹

T. SCHULZ und C. MEIER konnten schließlich durch die Synthese und Untersuchung einer Reihe von DiPPro-d4TDP-Verbindungen **23**, die mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen verestert waren, den Einfluss der Kettenlänge auf das Hydrolyseverhalten, die Stabilität, sowie auf die antivirale Aktivität bestimmen. Es zeigte sich, dass die Stabilität der Prodrugs mit zunehmender Kettenlänge ebenfalls zunahm. Bis zu einer Kettenlänge von C₉ (Schema 5, R = C₉H₁₉) wurde das gewünschte d4TDP **21** sowohl in den Zellextrakten als auch bei der chemischen Hydrolyse bevorzugt gebildet (Verhältnis von d4TDP **21** zu d4TMP **8**: 1.5:1). Mit weiter zunehmender Kettenlänge und somit auch zunehmender Stabilität trat jedoch der unerwünschte nucleophile Angriff auf das β-Phosphoratom als Konkurrenzreaktion zur Spaltung der Acyleinheit in den Vordergrund, wodurch Nucleosidmonophosphat als Hauptprodukt gebildet wurde. DiPPro-Nucleotide mit kürzerer Alkylkette als C₉ hingegen schienen über unzureichende Lipophilie zu verfügen, um die Zellmembran effizient zu durchdringen. Folglich zeigten diese Verbindungen nur geringe antivirale Aktivität.⁵⁰ Die direkte Korrelation von Lipophilie und Stabilität ist daher problematisch. Im Fokus der vorliegenden Arbeit sollte demnach die Weiterentwicklung des DiPPro-Konzeptes hinsichtlich der Unabhängigkeit von Lipophilie und Stabilität stehen.

3 Aufgabenstellung

Das DiPPro-Konzept bietet die Möglichkeit, die Membrangängigkeit von Nucleosiddiphosphaten zu erhöhen, um sie intrazellulär freizusetzen. Zwei der negativen Ladungen am β -Phosphat sind durch zwei gleiche Bis(acyloxybenzyl)-Einheiten neutralisiert. Durch geeignete Wahl des Substituenten R in der Estereinheit der Maske, ist es möglich, die Lipophilie und gleichzeitig die Stabilität der Prodrugs einzustellen. Hierbei korrelieren Lipophilie und Stabilität, das heißt mit zunehmender Lipophilie steigt auch die Stabilität. Die direkte Korrelation von Lipophilie und Stabilität bei dem bisherigen Ansatz des DiPPro-Konzepts ist problematisch, da mit zunehmender Stabilität anstelle des gewünschten NDPs vermehrt das NMP aufgrund eines nucleophilen Angriffs am β -Phosphat gebildet wird. Hohe Lipophilie ist jedoch notwendig, um die Penetration der unpolaren Zellmembran durch die Pronucleotide zu gewährleisten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war also die Weiterentwicklung des DiPPro-Konzepts um die Abhängigkeit von Lipophilie und Stabilität zu entkoppeln. Dabei sollten zwei unterschiedliche Strategien verfolgt werden:

Aromatische DiPPro-Verbindungen

H. J. JESSEN und C. MEIER konnten beobachten, dass Bis(benzoyloxybenzyl)-d4TDP **24a** bzw. AZTDP **25a** anti-HIV-Aktivität zeigen und in chemischer wie enzymatischer Hydrolyse die jeweiligen NDPs freisetzen.^{48,49} Modifikationen an der Benzoylgruppe bieten die Möglichkeit zur Feinabstimmung des Hydrolyseverhaltens ohne erhebliche Veränderung der Lipophilie.

Daher sollten, aufbauend auf den Ergebnissen voriger Arbeiten,^{69,70} verschiedene Akzeptorgruppen in 4-Position des aromatischen Systems eingeführt werden, um die Stabilität zu senken. Die Lipophilie sollte nicht gravierend durch die Substitution beeinflusst werden. Durch Hydrolysestudien sollten Rückschlüsse sowohl auf die chemische als auch auf die enzymatische Stabilität gezogen werden.

Asymmetrische DiPPro-Verbindungen

In früheren Arbeiten konnte wiederholt festgestellt werden, dass nach Abspaltung der ersten Maske der DiPPro-Nucleotide die Bildung von Nucleosidmonophosphat zum Erliegen kam und ausschließlich NDP aus dem monomaskierten DiPPro-Nucleotid (Intermediat II) im weiteren Verlauf der Hydrolyse freigesetzt wurde.^{53,71} Wahrscheinlich erschwert die zusätzliche Ladung am β -Phosphat des Intermediates II einen nucleophilen Angriff auf eben dieses, weshalb die Acylspaltung wieder Priorität gewinnt. Eine schnelle erste Spaltung zum

monomaskierten DiPPro-Nucleotid ist also vorteilhaft, was durch kurze aliphatische Ketten erreicht werden kann. Diese verfügen jedoch nicht über ausreichend Lipophilie, um die Membrangängigkeit der Prodrugs zu gewährleisten. Diese Beobachtungen führten zu der Idee, asymmetrische Maskierungen vorzunehmen: Durch die Wahl einer labilen Maske könnte die schnelle Spaltung zum monomaskierten Intermediat erzielt und folglich die Bildung von Nucleosidmonophosphat verhindert werden, während durch Einsatz einer zweiten lipophilen (und dadurch auch stabileren) Maske die Membrangängigkeit des Prodrugs gewährleistet würde. Es wäre dadurch möglich, Stabilität und Lipophilie unabhängig voneinander einzustellen.

Während dieser Arbeit sollte demnach eine Syntheseroute entwickelt werden, die den Zugang zu asymmetrischen DiPPro-Verbindungen ermöglicht. Die Synthese einer Reihe solcher DiPPro-Nucleotide und die anschließenden Untersuchungen in verschiedenen Medien in Bezug auf das Hydrolyseverhalten stellten die Hauptaufgabe dieser Arbeit dar. Hierbei sollte eine der beiden Masken systematisch modifiziert werden, um den Einfluss sowohl der Substituenten als auch der Nucleoside (d4T **3** und AZT **1**) auf den Freisetzungsmechanismus in einen Kontext zu bringen.

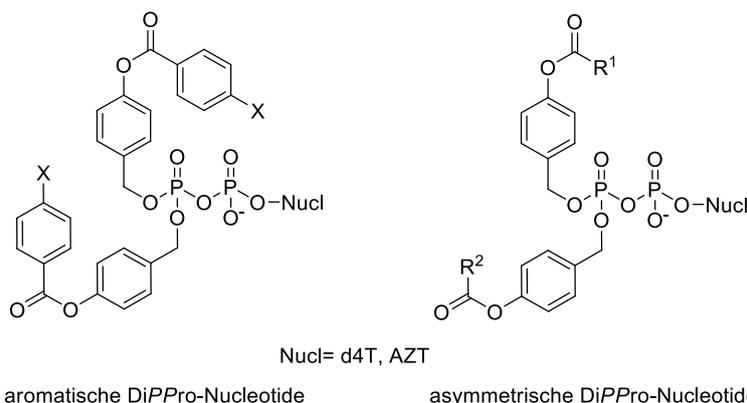


Abbildung 5: Aromatische und asymmetrische DiPPro-Verbindungen.

Die Untersuchungen der antiviralen Aktivitäten aller DiPPro-Nucleotide gegen HIV in Kooperation mit Prof. Dr. J. BALZARINI und Prof. Dr. D. SCHOLS, Universität Leuven, Belgien, schließen die Arbeit ab.

4 Resultate und Diskussion

4.1 Aromatische DiPPro-Nucleotide

In früheren Arbeiten konnten bereits einige Bis(benzoyloxybenzyl)-d4TDPs **24** (X-Ph-DiPPro-d4TDP) mit unterschiedlichen Donor- und Akzeptorsubstituenten in 4-Position des Phenylrings synthetisiert werden und sowohl im Phosphatpuffer (PBS) auf das chemische, als auch in Zellextrakten auf das enzymatische Hydrolyseverhalten hin untersucht werden. Bis(benzoyloxybenzyl)-Nucleotide **24** und **25** sind in Abbildung 6 dargestellt.^{47-49,70}

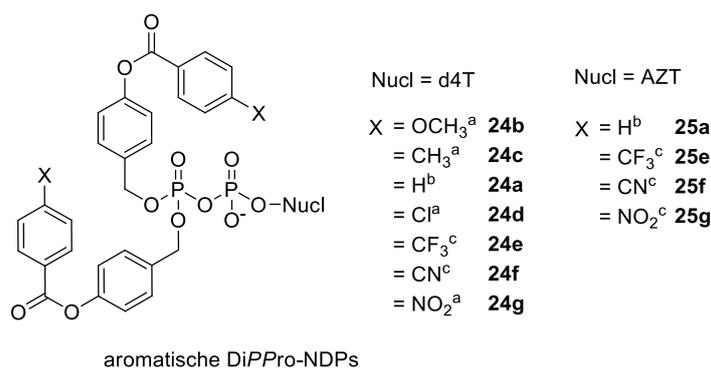


Abbildung 6: Überblick über X-Ph-DiPPro-Nucleotide **24** und **25** (^a L. WEINSCHENK⁷⁰, ^b H. J. JESSEN⁴⁷⁻⁴⁹, ^c in dieser Arbeit).

Die Annahme, dass die Prodrugs mit Donor-Substituenten (-OCH₃ und -CH₃) an Stabilität zunehmen, bestätigte sich. Entsprechend den Untersuchungen des Hydrolyseverhaltens von Bis(acyloxybenzyl)-NDPs konnte auch bei den aromatischen Verbindungen die Bildung von NMP als Produkt des nucleophilen Angriffs auf das β-Phosphat mit zunehmender Stabilität beobachtet werden. Bezüglich des mit einer Halbwertszeit von 480 h in chemischer Hydrolyse äußerst stabilen OCH₃-Ph-DiPPro-d4TDPs **24b** wurde sogar kaum NDP sondern fast ausschließlich NMP freigesetzt. Prinzipiell nahm die Stabilität und folglich die Bildung von NMP sowohl im Phosphatpuffer als auch in Zellextrakten mit zunehmender Desaktivierung des aromatischen Systems ab. Eine Ausnahme bildete CH₃-Ph-DiPPro-d4TDP **24c** bezüglich der enzymatischen Hydrolyse: in Zellextrakten wurde **24c** erstaunlich schnell ($t_{1/2}$ = 3h) hydrolysiert, wobei folglich viel d4TDP **21** freigesetzt wurde. Außerdem erwies sich Cl-Ph-DiPPro-d4TDP **24d** als unerwartet stabil. Folglich war das Verhältnis von in den Hydrolysen freigesetztem d4TDP **21** zu d4TMP **8** gering.^{69,70}

Die antivirale Aktivität der X-Ph-DiPPro-Verbindungen **24** war bezüglich NO₂-Ph-DiPPro-d4TDP **24g**, das exklusiv d4TDP **21** in den Hydrolysestudien freisetzte, erstaunlich gering. Daher lag die Vermutung nahe, dass **24g** zu instabil war, um die lipophile Zellmembran intakt zu überwinden. Wahrscheinlich war bereits außerhalb der Zelle ein Großteil des

Pronucleotids **24g** zu d4TDP **21** hydrolysiert. Ein anderer Grund könnte sein, dass NO₂-Ph-DiPPro-d4TDP **24g** nicht über ausreichende Lipophilie verfügt, um die Zellmembran zu überwinden.^{69,70}

Folglich waren Substituenten von Interesse, die bezüglich ihrer Akzeptorstärke zwischen Chlor und Nitro liegen und somit über geringere Stabilität als Chlor verfügen, um möglichst effizient das NDP freizusetzen, aber über höhere Stabilität als Nitro, um eine extrazelluläre Hydrolyse zu vermeiden. In Tabelle 1 sind die Substituenten der bereits untersuchten DiPPro-Verbindungen zusammen mit einer Auswahl von Akzeptorsubstituenten mit ihren Hammett-Parametern gezeigt.

Tabelle 1: Hammett-Parameter von Substituenten in *para*-Position von Benzoesäuren.⁷²

Substituent	σ_p
-OCH ₃	-0.28
-CH ₃	-0.16
-Cl	0.22
-COOH	0.45
-CF ₃	0.54
-CN	0.70
-SO ₂ CH ₃	0.72
-NO ₂	0.78

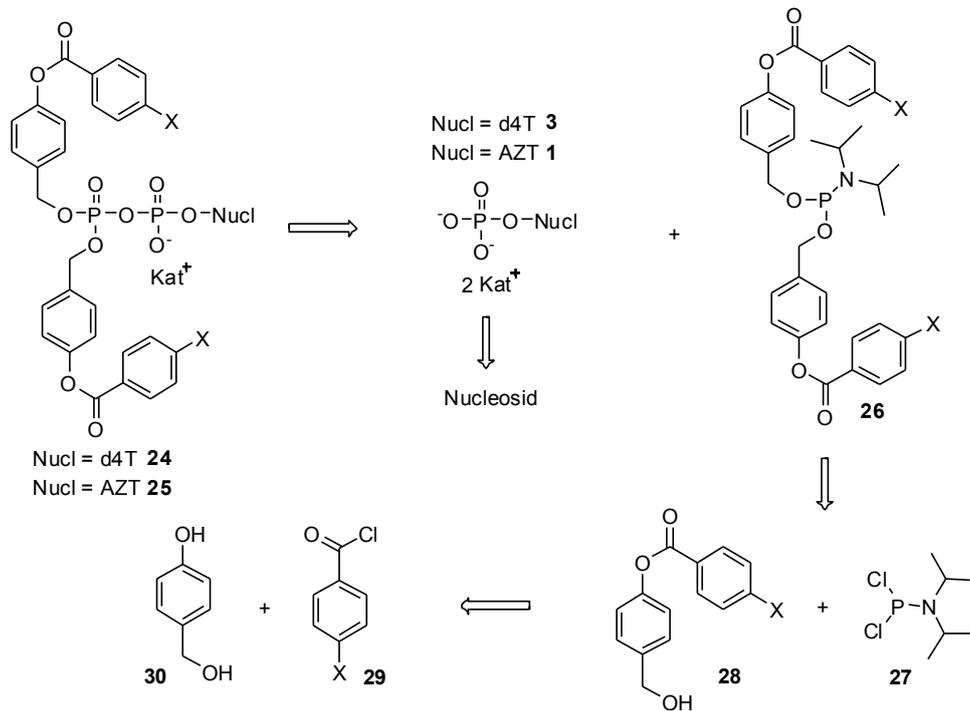
Die Wahl fiel auf die Trifluormethyl- und Cyano-Substituenten. Beide Substituenten sollten keinen erheblichen Einfluss auf die Lipophilie haben. Beide Masken, sowie die Nitro-substituierte Maske sollten sowohl als Maskierung von d4TDP **21** dienen, als auch auf AZTDP **16** übertragen werden.

4.1.1 Synthese aromatischer DiPPro-Nucleotide

Wie bereits in einigen vorangegangenen Arbeiten gezeigt, sind DiPPro-Nucleotide über eine konvergente Phosphoramidit/Oxidations-Route zugänglich.⁴⁷⁻⁵¹ Das Retrosyntheschema ist in Schema 6 gezeigt.

Die Synthese der labilen Phosphoranhydridbrücke erfolgt erst im letzten Syntheseschritt durch sauer-aktivierte Kupplung des Phosphoramidits **26** (Maskeneinheit) mit dem jeweiligen Nucleosidmonophosphat (Nucleosideinheit). Dies macht eine Vielzahl von NDPs mit unterschiedlichen Maskierungen zugänglich. Die benötigten Phosphoramidite **26** können in guten Ausbeuten durch Reaktion von *N,N*-diisopropylaminodichlorphosphin **27** mit zuvor benzylierten 4-Hydroxybenzylalkoholen **28** erhalten werden. Die Nucleoside d4T **3** und

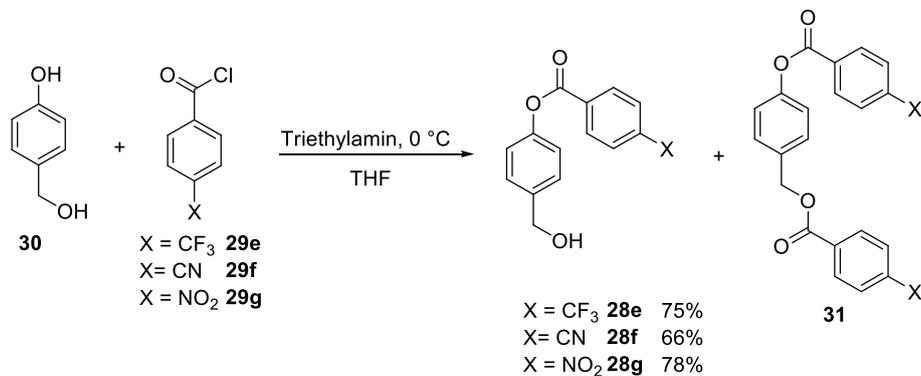
AZT **1** werden mittels Phosphorylierung nach SOWA UND OUCHI in die jeweiligen Nucleotide überführt.⁷³



Schema 6: Retrosyntheseschema von DiPPro-Nucleotiden **24** und **25**.

4.1.1.1 Synthese der Phosphoramidite

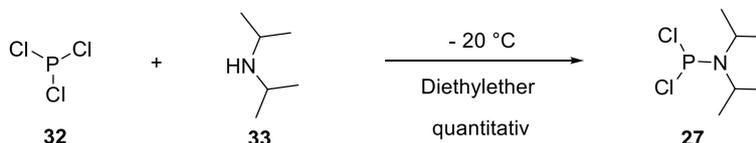
Die Benzoylierung von 4-Hydroxybenzylalkohol **30** zu den verschiedenen Phenylestern **28** erfolgte durch basische Veresterung mittels der jeweiligen Säurechloride **29**. Die phenolische Hydroxygruppe ($pK_A = 11$) wird gegenüber der benzylichen ($pK_A = 18$) bevorzugt deprotoniert, da die negative Ladung des Phenolats durch den mesomeren Effekt stabilisiert wird. Dennoch können bei der Benzoylierung sowohl das einfach benzoylierte als auch das zweifach benzoylierte Produkt **30** gebildet werden (Schema 7).



Schema 7: Benzoylierung von 4-Hydroxybenzylalkohol **30**.

Die Reaktion sollte daher bis zur vollständigen Umsetzung bei 0 °C durchgeführt und lediglich ein Äquivalent der Base Triethylamin sowie ein minimaler Überschuss des Säurechlorids **29** zugegeben werden. Die Benzoate **28** konnten im deutlichen Überschuss gebildet werden. Das zweifach benzylierte Nebenprodukt **31** ließ sich auf Grund der stark unterschiedlichen Polaritäten außerdem ohne Probleme entweder durch Umkristallisation oder Chromatographie von dem Produkt abtrennen. Bei allen Synthesen konnte das Nebenproduktes **31** mit weniger als 10% Ausbeute isoliert werden, wohingegen die gewünschten Benzoate **28** in guten Ausbeuten von 66 – 78% erhalten wurden. Dünnschichtchromatographisch konnte allerdings festgestellt werden, dass 4-Hydroxybenzylalkohol **30**, der quantitativ durch Extraktion von dem Produkt abgetrennt werden konnte, nicht vollständig umgesetzt wurde. Erhöhte Reaktionstemperatur sowie Einengen des Reaktionsgemisches, führten lediglich zur vermehrten Bildung des zweifach benzylierten Nebenproduktes **31**. Und auch längere Reaktionszeiten konnten den Umsatz nicht erhöhen.

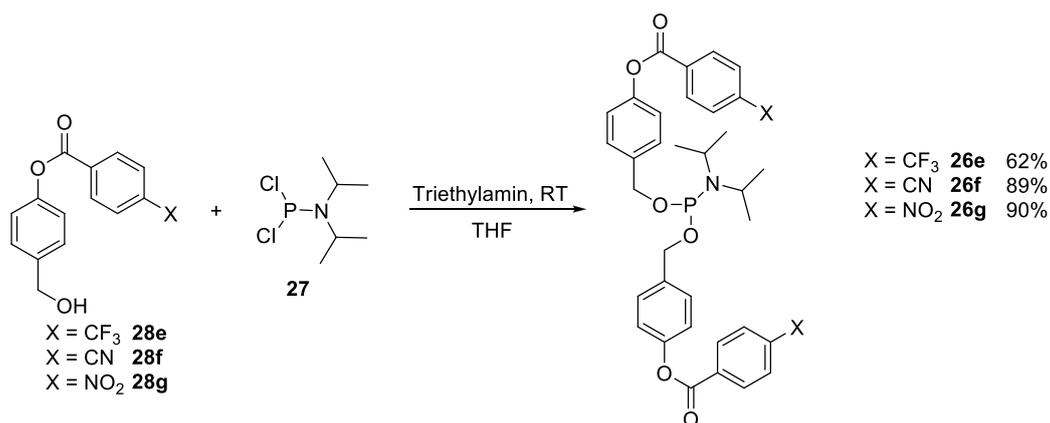
Das Phosphor(III)-Reagenz zur Phosphoramiditsynthese, *N,N*-Diisopropylamino-dichlorphosphin **27**, wurde durch Umsetzung von einem Äquivalent Phosphortrichlorid **32** und zwei Äquivalenten Diisopropylamin **33** nach Abtrennen des Diisopropylammoniumchlorids durch Filtration ohne weitere Reinigung quantitativ erhalten (Schema 8).^{48,49,71}



Schema 8: Synthese des Phosphor(III)-Reagenzes **27**.

Die Synthese der Phosphoramidite **26** gelang in guten Ausbeuten durch Reaktion des Phosphor(III)-Reagenzes **27** mit einem geringen Überschuss von 2.2 Äquivalenten des entsprechenden Benzoates **28**. Zum Neutralisieren der entstehenden Salzsäure wurde Triethylamin verwendet (Schema 9).

Die Reinigung erfolgte durch radiale präparative Chromatographie am Chromatotron. Dem Eluenten wurde 10% Triethylamin zugesetzt, um die säurelabilen Phosphoramidite **25** zu stabilisieren.⁶⁹ Auf diesem Wege konnten die drei Phosphoramidite **26** in guten bis sehr guten Ausbeuten isoliert werden.

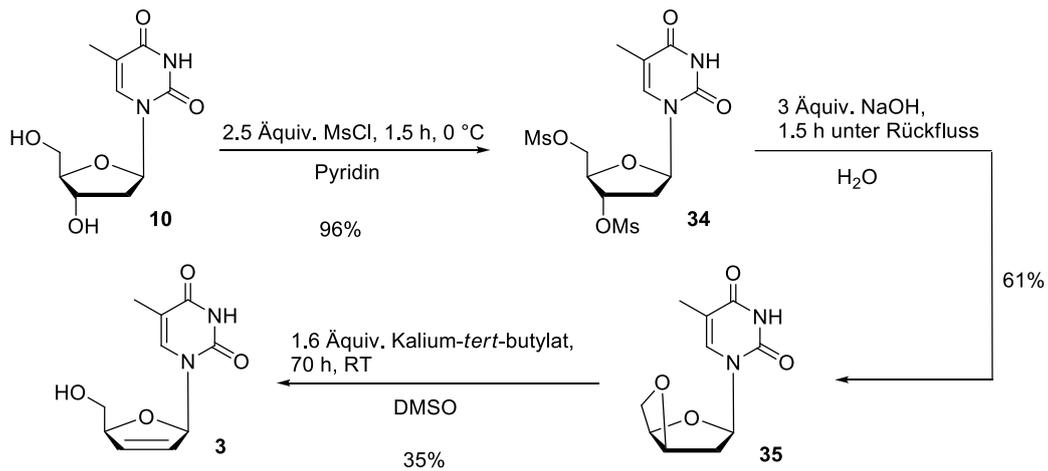


Schema 9: Darstellung der Phosphoramidite **26** als Bausteine für die Zielkupplung.

4.1.1.2 Synthese von Nucleotiden

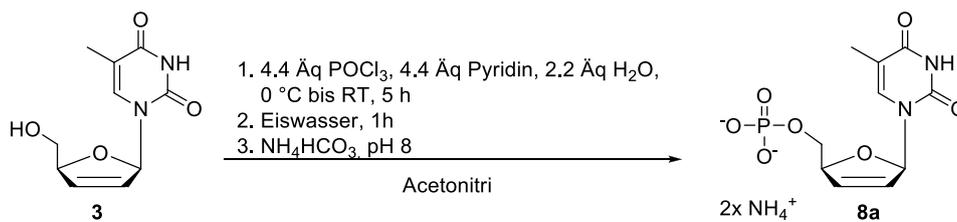
Zweiter Baustein für die Synthese von DiPPro-Verbindungen ist das entsprechende Nucleotid. Die Phosphorylierung nach SOWA UND OUCHI bietet eine zuverlässige Möglichkeit zur 5'-Phosphorylierung von Nucleosiden.⁷³ Ursprünglich entwickelt, um selektiv die 5'-Position an 3'-ungeschützten Nucleosiden zu phosphorylieren, hat sich dieses Protokoll auch bei Nucleosiden mit geschützter bzw. fehlender 3'-Hydroxygruppe bewährt, da die Reaktion in der Regel quantitativ verläuft und hohe Ausbeuten liefert. AZT **1** war kommerziell erhältlich und konnte sogleich in der Phosphorylierungsreaktion eingesetzt werden. d4T **3** wurde ausgehend von Thymidin **10** in einer dreistufigen Synthese erhalten.⁷⁴

Die Synthese von d4T **3** (Schema 10) konnte im Grammaßstab durchgeführt werden. Die Mesylierung von Thymidin **10** in Pyridin lieferte das Dimesylat **34**, das durch Kristallisation in einer annähernd quantitativen Ausbeute erhalten werden konnte. Die anschließende Behandlung mit heißer Natronlauge führte zum bicyclischen 3',5'-Anhydrothymidin **35**, dessen Isolierung in moderater Ausbeute ebenfalls durch Kristallisation gelang. Die Eliminierung zu d4T **3** lieferte eine weniger gute Ausbeute. Hier stellte die Aufarbeitung ein Problem dar. So war es aufgrund der hohen Löslichkeit von d4T **3** in Wasser nicht möglich, die Extraktion des Produktes mit Ethylacetat vorzunehmen. Daher wurde die Lösung bis zur Trockene eingeeengt, in Ethylacetat in der Siedehitze gelöst und anschließend heiß filtriert, sodass das reine Produkt **3** mit einer Ausbeute von 35% isoliert werden konnte.



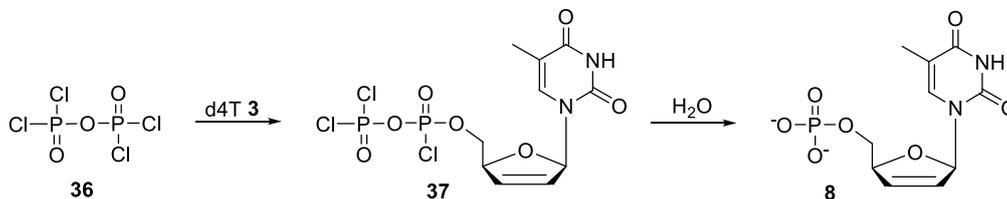
Schema 10: Darstellung von d4T **3**.

Schlie\u00dflich erfolgte die Phosphorylierung nach SOWA UND OUCHI.⁷³ Schema 11 zeigt die Reaktionsbedingungen der Synthese.



Schema 11: Darstellung von d4TMP **8a**.

Durch die Umsetzung von Wasser, Pyridin und Phosphorylchlorid in einem Verh\u00e4ltnis von 1:2:2 bei 0 °C wird zun\u00e4chst *in situ* Tetrachlorpyrophosphat **36** gebildet. Dann erst erfolgt die Zugabe von d4T **3**, wodurch zuerst das Zwischenprodukt **37** gebildet wird, das durch Hydrolyse zum Monophosphat **8a** zerf\u00e4llt (Schema 12).



Schema 12: Prinzip der Phosphorylierung nach SOWA UND OUCHI.

Nach Titration mit Ammoniumhydrogencarbonat, anschließender Gefriertrocknung und Reinigung durch Umkehrphasenchromatographie wurde das Ammoniumsalz von d4TMP **8a** in einer Ausbeute von 87% erhalten.

Die gleichen Reaktionsbedingungen wurden auf AZT **1** angewendet. Erstaunlicherweise konnte bei der chromatographischen Reinigung nicht nur AZTMP **9** mit einer Ausbeute von

53% sondern ebenfalls AZTDP **16** mit geringen Mengen AZTTP **15** gemeinsam isoliert werden. Vermutlich reichte die Trocknung im Vakuum von AZT **1** nicht aus, sodass die verbliebene Restfeuchtigkeit den Reaktionsablauf störte. Wasser kann ebenso wie AZT **1** nucleophil am *in situ* gebildeten Tetrachlorpyrophosphat **36** angreifen, wodurch Phosphat entsteht. Greift dieses wiederum vor der Hydrolyse das intermediär gebildete Zwischenprodukt **37** nucleophil an, wird AZTDP **16** gebildet.

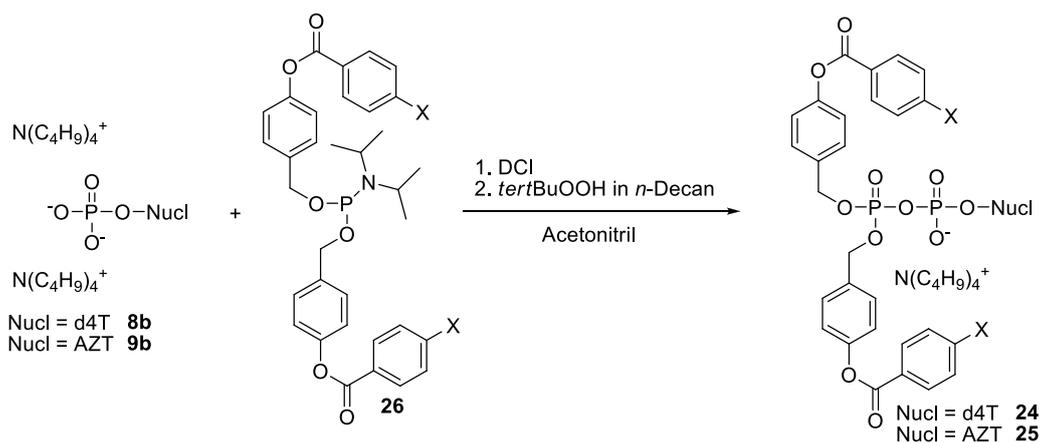
In einem weiteren Syntheseansatz wurde AZT **1** zuvor mittels Acetonitril coevaporiert. In diesem Fall konnte neben AZTMP **9** kein AZTDP **16** isoliert werden. Nach chromatographischer Reinigung wurde AZTMP **9** in einer Ausbeute von 61% erhalten. Grund für die geringe Ausbeute, verglichen mit d4TMP **8**, war die mehrmalige chromatographische Reinigung. Die während der Reaktion gebildeten Phosphatsalze ließen sich schlechter von AZTMP **9** abtrennen, da AZTMP **9** etwas lipophiler ist als d4TMP **8**. Die Produkte verfügen durch die Ladungen über hohe Hydrophilie, weshalb sie bei der Umkehrphasenchromatographie mit ausschließlich Wasser bereits früh eluieren. Variationen des Lösungsmittels bzw. -verhältnis sind also nicht möglich, weshalb die Chromatographie mehrmals durchgeführt werden musste. Dies führte unweigerlich zu Ausbeuteverlusten.

Nun stand der zweite Baustein für die Kupplung zu den DiPPro-Nucleotiden zur Verfügung. Die Kupplung erfolgt allerdings in Acetonitril, in dem die Ammoniumsalze der Nucleotide nur schwer löslich sind. Folglich musste ein Ionenaustausch gegen organische Kationen erfolgen. Durch Elution über eine Ionenaustauschersäule Dowex 50WX8 (H⁺) und anschließender Titration mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid-Lösung bis zu einem pH-Wert von 6 bis maximal 7 wurden die Tetra-*n*-butylammoniumsalze von d4TMP **8b** sowie AZTMP **9b** quantitativ erhalten. Bei der Durchführung der folgenden Kupplungsreaktion stellte sich heraus, dass es notwendig ist, einen pH von 7 keinesfalls zu überschreiten, da sich dies in den Reaktionsausbeuten niederschlägt. So konnte beobachtet werden, dass die Reaktion mit höheren Umsätzen verläuft, wenn der pH des NMPs leicht sauer eingestellt ist. Die Kupplungsreaktion verläuft über eine saure Aktivierung durch 4,5-Dicyanoimidazol (DCI). Es wären folglich größere Mengen des Aktivators notwendig, wenn der pH des NMPs leicht basisch ist. Außerdem wird durch leicht saure Reaktionsbedingungen unterbunden, dass die Produkte während der Reaktion zurück zum Nucleotid hydrolysieren.

4.1.1.3 Synthese von DiPPro-Nucleosiddiphosphaten

Die beiden Bausteine für die Zielsynthese zu den entsprechenden DiPPro-d4TDP **24** sowie DiPPro-AZTDP **25** lagen nun vor. Die Synthese, gezeigt in Schema 13, wurde bisher nach folgender Vorschrift durchgeführt:^{53,69,71}

- Trocknen des gelösten NMPs über Molsieb
- Entfernen des Molsiebs
- Zugabe des Phosphoramidits als Feststoff oder Öl
- Zugabe von festem, an der Ölpumpe getrocknetem 4,5-Dicyanoimidazol
- Rühren für 1 h bis mehrere Tage
- Oxidation bei -25 °C und Rühren für 10-20 min
- Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck
- Chromatographie an RP-18 mit Methanol/Wasser



Schema 13: Zielkupplung zum DiPPro-Nucleotid.

In eigenen Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass das Trocknen über Molsieb besser durch Coevaporation mit Acetonitril ersetzt werden kann.⁶⁹ Außerdem stellte sich heraus, dass im Fall von Bis(benzoyl)-DiPPro-Verbindungen ein Überschuss von 4,5-Dicyanoimidazol nicht förderlich war, sondern gar dazu führte, dass sich bereits gebildetes Produkt wieder zersetzte. Trotz dieser Optimierungsversuche war es nicht gelungen, höhere Ausbeuten als 30 - 40% zu erzielen. Dafür gab es zwei Gründe: Zum einen konnte sowohl durch dünnschichtchromatographische, als auch durch NMR-spektroskopische Verfolgung der Reaktion kein vollständiger Umsatz des NMPs festgestellt werden – unabhängig von der Stoffmenge des Aktivators oder des Phosphoramidits sowie von der Reaktionszeit. Zudem stellte die Reinigung der Verbindungen eine große Herausforderung dar. Die Chromatographie an RP-18 Kieselgel mit Wasser/Methanol als Eluent musste mehrfach erfolgen, was bei jeder Durchführung das Risiko der partiellen Hydrolyse der empfindlichen Verbindungen barg.

Die Synthese der Zielverbindungen sollte also im Rahmen dieser Arbeit optimiert werden. Dabei sollte zum einen die Reaktion und zum anderen die Reinigung verbessert werden, was zunächst anhand der Kupplungen mit d4TMP **8** geschehen sollte.

Nachdem die Variation der zugegebenen Äquivalente an Phosphoramidit **26** und DCI keinen Erfolg brachte, wurde anstelle der Zugabe von festem DCI das DCI gelöst in Acetonitril zugegeben, nachdem es mehrfach coevaporiert wurde, da vermutet wurde, dass eventuell vorhandenes Wasser den Umsatz der Reaktion limitierte. Auch dies erbrachte nicht den erhofften Erfolg. Erst der Einsatz einer DCI-Aktivatorlösung (0.25 molar in Acetonitril), die in der automatischen Festphasensynthese verwendet wird, zeigte eine Steigerung des Umsatzes. Nach wie vor konnte aber kein quantitativer Umsatz beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde die DCI-Aktivatorlösung nicht in einer Portion zur NMP/Phosphoramidit-Lösung hinzugegeben, sondern sukzessive in kleinen Portionen: Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 0.5 Äquivalenten DCI-Aktivatorlösung und nach jeweils fünfminütiger Reaktionszeit erfolgte die Zugabe weiterer 0.25 Äquivalente bis hin zu maximal 1.75 Äquivalenten. Nun endlich konnte dünn-schichtchromatographisch ein vollständiger Umsatz zum DiPPro-d4TDP **24** beobachtet werden, der NMR-spektroskopisch nach Oxidation des Reaktionsansatzes bestätigt wurde. Es zeigte sich, dass die Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid auch bei Raumtemperatur durchgeführt werden konnte. Die Reaktion wurde also fortan nach folgender Vorschrift durchgeführt:

- Coevaporieren des NMPs und lösen in Acetonitril
- Zugabe von 1.5 Äquivalenten Phosphoramidit **26** als Feststoff oder Öl
- Zugabe von 0.5 Äquivalenten DCI, fünfminütiges Rühren
- Zugabe weiterer 0.25 Äquivalente jede weitere 5 min bis zur vollständigen Umsetzung (Prüfung durch Dünnschichtchromatographie) bis maximal 1.75 Äquivalente
- Oxidation bei Raumtemperatur und Rühren für 20 min
- Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck

Dieser neuen Vorschrift folgend konnten alle gewünschten Bis(benzoyl)-DiPPro-d4TDP **24** sowie -AZTDPs **25** mit hohen Umsätzen synthetisiert werden.

Nun sollte die Optimierung der Reinigung erfolgen.

Die ursprüngliche Reinigung sah die Umkehrphasenchromatographie an RP-18 Kieselgel vor, wobei ein Methanol/Wasser-Gradient als Eluent diente. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit der Produkte wurde der Eluent auf Acetonitril/Wasser umgestellt, da Acetonitril im Gegensatz zu Methanol keine nucleophilen Eigenschaften besitzt. Es schien, als würde die Trennung mit dem neuen Eluenten besser gelingen, vor allem dadurch,

dass das während der Reaktion gebildete DCI-Salz konzentrierter eluierte, wodurch es sich besser von dem Produkt abtrennen ließ. Dennoch war das Ergebnis nicht zufriedenstellend. Da die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion zeigte, dass die Lipophilie der DiPPro-Nucleotide durchaus ausreicht, um an Kieselgel mit Ethylacetat/Methanol (7:3) R_f -Werte von 0.5 bis 0.7 zu erreichen, sollte eine Normalphasenchromatographie erprobt werden. Für die genaue Beobachtung des chromatographischen Verhaltens bietet sich bei chromophoren Verbindungen die präparative radiale Dünnschichtchromatographie (Chromatotron) an, da die Trennung vollständig durch UV-Detektion verfolgt werden kann. Die Chromatographie wurde mit Ethylacetat/Methanol in verschiedenen Mischverhältnissen für CF₃-Ph-DiPPro-d4TDP **24e** sowie CN-Ph-DiPPro-d4TDP **24f** getestet. Es zeigte sich jedoch, dass entweder das Produkt zusammen mit den Verunreinigungen eluierte oder die Trennung zu lange dauerte, sodass sich das jeweilige Prodrug während des Reinigungsversuchs zersetzte. Die Zugabe von 1% Triethylamin zum Eluenten brachte einen ersten Erfolg. Durch Verwendung von Ethylacetat/Methanol (8.5:1.5) mit zugesetztem 1% Triethylamin konnte das während der Reaktion ebenfalls entstandene Phosphoramidat vollständig aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Allerdings führte die Zugabe von Triethylamin dazu, dass das DCI-Salz während der gesamten Chromatographie eluierte, was ein vollständiges Abtrennen vom Produkt unmöglich machte. Außerdem konnte durch NMR-Spektroskopie festgestellt werden, dass die gewählten Chromatographiebedingungen zum partiellen Ionenaustausch von Tetrabutylammonium zu Triethylammonium führten. Für die Separation von DiPPro-Nucleotid und DCI-Salz bot sich aufgrund der sehr unterschiedlichen Größen die Anwendung von Gelfiltration an. Das Material Sephadex LH-20 ist auch für organische Lösungsmittel geeignet und sollte somit als stationäre Phase Verwendung finden. Als mobile Phase wurde zunächst Tetrahydrofuran (THF) und Dichlormethan eingesetzt. Beide Lösungsmittel sollten durch ein hohes Säulenvolumen (*bed volume*), das nach Aufschlemmen mit Sephadex LH-20 erreicht wird, geeignet sein für die Gelfiltration.⁷⁵ Der Gelfiltration mit Sephadex LH-20 liegen je nach gewählter mobiler Phase unterschiedliche Prinzipien für die Separation der einzelnen Komponenten des Stoffgemischs zugrunde. So überwiegen je nach Lösungsmittel Größenausschluss oder Adsorption, wobei letztere auf π -Bindungen oder Wasserstoffbrückenbindungen bzw. auf eine Mischung beider zurückzuführen ist.⁷⁶ Daher eluierten die Komponenten auch nicht wie erwartet, zunächst das Prodrug gefolgt von dem DCI-Salz, sondern umgekehrt. Aus dem gleichen Grund war auch hier die Trennung nur ungenügend. Durch Verwendung von Wasser als Lösungsmittel, konnte, allerdings erst nach Ionenaustausch zu den Ammoniumsalzen der DiPPro-d4TDPs **24e,f** eine Isolierung der Prodrugs erreicht werden. Es war also möglich, durch Reinigung am Chromatotron, anschließendem Ionenaustausch und schließlich Gelfiltration die Verbindungen **24e** und **24f** zu isolieren.

Den Durchbruch bezüglich der Reinigung der DiPPro-Nucleotide brachte die Nutzung der automatischen präparativen Umkehrphasenchromatographie am *puri flash* der Firma Interchim. Mit Hilfe dieses Gerätes wurden schließlich durch geringen präparativen Aufwand hohe Reinheiten der Zielverbindungen erhalten, ohne bedeutsamen Ausbeuteverlust. Die Reinigung wurde fortan für die in diesem Kapitel besprochenen sowie alle im Folgenden gezeigten DiPPro-Nucleotide wie folgt durchgeführt:

- Umkehrphasenchromatographie am *puri flash* (Acetonitril/Wasser)
- Ionenaustausch über Dowex 50WX8 (NH₄⁺)
- Umkehrphasenchromatographie am *puri flash* (Acetonitril/Wasser)

Schließlich konnten alle DiPPro-Nucleotide **24** und **25** mit Bis(benzoyloxybenzyl)-Maskierung in guten Ausbeuten erhalten werden. Tabelle 2 zeigt die Ausbeuten all dieser Verbindungen, sowohl die nach der von H. J. JESSEN etablierten Vorschrift⁴⁸ als auch nach der in dieser Arbeit vorgestellten Vorschrift.

Tabelle 2: Erzielte Ausbeuten für die Kupplungsreaktion von Phosphoramidit **26** und Nucleotid.

Pronucleotid	Ausbeute ^{a)} [%]	Ausbeute ^{b)} [%]
OMe-Ph-DiPPro-d4TDP 24b ⁷⁰	27	-
Me-Ph-DiPPro-d4TDP 24c ⁷⁰	38	-
Cl-Ph-DiPPro-d4TDP 24d ⁷⁰	42	-
CF ₃ -Ph-DiPPro-d4TDP 24e	43	58
CN-Ph-DiPPro-d4TDP 24f	30	63
NO ₂ -Ph-DiPPro-d4TDP 24g ⁷⁰	31	-
CF ₃ -Ph-DiPPro-AZTDP 25e	33	53
CN-Ph-DiPPro-AZTDP 25f	28	46
NO ₂ -Ph-DiPPro-AZTDP 25g	-	66

^{a)} Methode nach H. J. JESSEN⁴⁸

^{b)} neue Methode

4.1.2 Hydrolysestudien aromatischer DiPPro-Nucleotide

Die dargestellten Pronucleotide **24e,f** sowie **25e-g** wurden anschließend bezüglich ihres Hydrolyseverhaltens untersucht. Phosphatpuffer (PBS) bei pH 7.3, was dem physiologischen pH-Wert entspricht, diente zur Beobachtung des chemischen Hydrolyseverlaufs. Außerdem wurden Hydrolysestudien in CEM/0-Zellextrakten aus T-Zellen durchgeführt, um die biologische Umgebung zu simulieren und das Hydrolyseverhalten unter dem Einfluss von Enzymen festzustellen. In beiden Fällen wurden Aliquote der Hydrolyselösungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und die Hydrolyseprodukte durch analytische RP-

HPLC detektiert. Die Ergebnisse sollen in diesem Kapitel zusammen mit denen der bereits früher synthetisierten DiPPro-d4TDPs **24b-d,g** besprochen werden.

4.1.2.1 Optimierung des HPLC-Eluenten

Die Chromatographie von stark polaren Verbindungen wie den Nucleosidmono- und -diphosphaten benötigt Ionenpaarreagenzien, die durch Abschirmung der Ladungen für eine Änderung der Polarität sorgen. Als Eluent für die HPL-Chromatographie diente also bislang ein Gradient von 0.55 M wässriger Tetrabutylammoniumphosphat-Lösung (TBAH-Phosphat) und Acetonitril. Phosphatsalze schädigen allerdings bei häufigem Gebrauch das Säulenmaterial, sodass die Gebrauchszeiten dieser so belasteten Säulen recht kurz sind. Daher sollte zunächst geprüft werden, ob die Möglichkeit besteht, andere Solventien einzusetzen. Außerdem bestand der Wunsch, die HPLC-Methoden nicht nur analytisch sondern auch präparativ nutzen zu können. Tetrabutylammonium ist für die präparative HPLC ungeeignet, da es sich nicht von den gesammelten Fraktionen evaporieren lässt.

Es wurden verschiedene Pufferlösungen getestet und gegebenenfalls die verwendete HPLC-Methode, Konzentration oder der pH-Wert geändert. Als Testsubstanz diente d4TMP **8**, dessen Retentionszeit in einem Bereich von 5 bis 10 min liegen sollte. War dies der Fall, wurden außerdem Gemische von d4TMP **8** und d4TDP **21** untersucht, um festzustellen, ob sie getrennt und nicht überlagert eluierten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 gezeigt. Durch die starken Änderungen des Elutionsverhaltens, war es erforderlich die HPLC-Methoden dem jeweiligen Laufmittel anzupassen. Die Methoden sind im Experimentellen Teil dieser Arbeit (Kapitel 7.1.5) detailliert aufgeführt.

Es zeigte sich, dass TBAH-Acetat (2 mM, pH 6.0) einen möglichen Eluenten für die HPL-Chromatographie von Nucleotiden darstellt. Dass es ebenfalls für die analytische HPLC der Hydrolysestudien von DiPPro-Nucleotiden geeignet ist, wurde in HPLC-Läufen der DiPPro-Verbindungen sowie Gemischen von d4TMP **8** und d4TDP **21** bestätigt.

Die HPLC-Methode gegebenenfalls auch präparativ zu nutzen, war durch Wahl von TBAH-Acetat jedoch weiterhin nicht möglich, da sich TBAH-Salze nicht mittels Gefriertrocknung entfernen lassen. Für diesen Zweck wäre Triethylammoniumacetat das Salz der Wahl. Zwar eluieren die hochpolaren NMPs sowie NDPs dann sehr früh, was für analytische Untersuchungen unbrauchbar wäre, für die präparative HPLC von DiPPro-Nucleotiden aber nicht von Nachteil ist.

Tabelle 3: Getestete Ionenpaarreagenzien und Pufferlösungen zur Eignung für die analytischen Untersuchungen an der HPLC.

Ionenpaarreagenz	Konzentration	pH	Methode	R _t von d4TMP [min]	Zusätzliche Probleme
TBAH-Phosphat	0.55 mM	6.5	I	8.0 / 6.8	Reproduzierbarkeit
Ammoniumformiat	10 mM	7.2	II	0.8	
Ammoniumformiat	10 mM	6.3	II	1.3	
Ammoniumformiat	10 mM	6.3	V	1.4	
Ammoniumformiat	10 mM	6.3	VI	2.4	breite Peaks
Triethylammoniumacetat	50 mM	6.9	II	1.8	
Triethylammoniumacetat	50 mM	6.9	V	1.5	
Triethylammoniumacetat	50 mM	6.9	I	1.9	
Triethylammoniumacetat	50 mM	8.0	II	0.8	
Triethylammoniumacetat	50 mM	5.5	II	1.13	
Wasser	-	7	II	0.70	
TBAH-Acetat	50 mM	6.5	II	-	keine akzeptable Grundlinie
TBAH-Acetat	10 mM	5.6	II	-	keine akzeptable Grundlinie
TBAH-Acetat	0.55 mM	6.5	II	10.8	breite Peaks, <i>fronting</i>
TBAH-Acetat	2 mM	6.0	II	8.0	
Triethylammoniumacetat	50 mM	4.4	II	3.30	breite Peaks, <i>tailing</i>

Für die analytische HPLC zur qualitativen sowie quantitativen Untersuchung der Hydrolyseprodukte wurde im Folgenden TBAH-Acetat (2 mM, pH 6.0) als Ionenpaarreagenz verwendet.

4.1.2.2 Hydrolysestudien in Phosphatpuffer (PBS) und in CEM/0-Zellextrakten

Wie erwartet, waren die Halbwertszeiten – berechnet in Bezug auf die Abnahme des Pronucleotids – in Phosphatpuffer signifikant höher als in den Zellextrakten (Tabelle 4).

In Tabelle 4 sind die Hydrolysehalbwertszeiten aller aromatischen DiPPro-Nucleotide **24** und **25** in PBS sowie in CEM/0-Zellextrakten gezeigt.

Die Untersuchungen von DiPPro-d4TDPs **24** zeigten eine direkte Korrelation zwischen der Stabilität der Verbindungen und der Menge des freigesetzten d4TDPs **21**, sowohl in den chemischen Hydrolysen, als auch in den CEM/0-Zellextrakten. Im Fall der DiPPro-d4TDP **24e-f** mit starken Akzeptorsubstituenten wurde neben geringen Mengen von d4TMP **8** hauptsächlich d4TDP **21** nachgewiesen. Hierbei ist anzumerken, dass die Bildung von d4TMP **8** in den Zellextrakten auch das Produkt der Dephosphorylierung von d4TDP **21** durch die in den Zellextrakten vorhandenen Phosphatasen sein kann. Die enzymatische Hydrolyse von OCH₃-Ph-DiPPro-d4TDP **24b** lieferte im Gegensatz zu **24c-g** kein d4TDP **21**.

Es konnte bei Messung der Probe mit der längsten Hydrolysedauer lediglich die Bildung von d4TMP **8** beobachtet werden. Im Vergleich zu den akzeptorsubstituierten Pronucleotiden wurden deutlich geringere Mengen des Intermediates II beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass d4TMP **8** in diesem Fall das Produkt der Anhydridspaltung war.

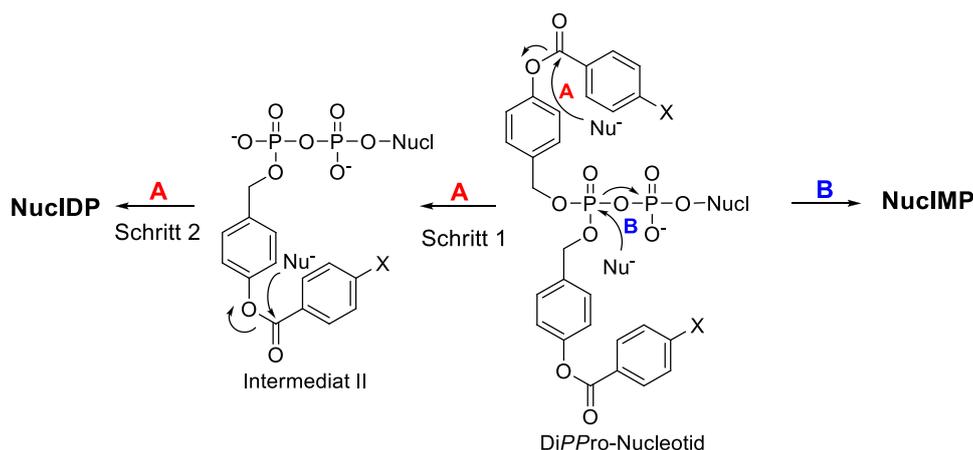
Tabelle 4: Hydrolysehalbwertszeiten von DiPPro-Nucleotiden **24** und **25** in PBS und in CEM/0-Zellextrakten, sowie Retentionszeiten der HPLC-Läufe.

	$t_{1/2}$ [h]	$t_{1/2}$ [h]	R_t [min]
	in PBS (7.3)	in CEM/0	
OCH ₃ -Ph-DiPPro-d4TDP 24b	480	9	14.8 ^{a)}
CH ₃ -Ph-DiPPro-d4TDP 24c	80	3	15.8 ^{a)}
Cl-Ph-DiPPro-d4TDP 24d	13	7	16.1 ^{a)}
CF ₃ -Ph-DiPPro-d4TDP 24e	20	5.5	15.7 ^{a)} /18.3 ^{b)}
CN-Ph-DiPPro-d4TDP 24f	7	4	13.2 ^{a)} /15.2 ^{b)}
NO ₂ -Ph-DiPPro-d4TDP 24g	4	1.25	14.8 ^{a)}
CF ₃ -Ph-DiPPro-AZTDP 25e	12	3.5	18.9 ^{b)}
CN-Ph-DiPPro-AZTDP 25f	6.5	4	15.9 ^{b)}
NO ₂ -Ph-DiPPro-AZTDP 25g	4.5	1.5	16.7 ^{b)}

^{a)} Methode A mit Acetonitril/[N(C₄H₉)₄]-Phosphat (0.55 mM)

^{b)} Methode B mit Acetonitril/[N(C₄H₉)₄]-Acetat (2 mM)

In Schema 14 sind die möglichen Hydrolysewege von DiPPro-Verbindungen zusammengefasst. Neben der Esterhydrolyse (Schema 14, Weg A) erfolgt die Spaltung der Phosphatanhydridbindung als Konkurrenzreaktion (Weg B). Letzteres führt zur oben beschriebenen Bildung von d4TMP **8**.



Schema 14: Mögliche Hydrolysewege von DiPPro-Nucleotiden.

Je schneller die erste Hydrolyse des Pronucleotids zum monomaskierten Intermediat auftrat, desto höher war auch die Menge des gebildeten Nucleosiddiphosphats. Es wurde beobachtet, dass nur sehr geringe Mengen von NMP – sofern vorhanden – aus der Hydrolyse des Intermediates II entstehen. Wahrscheinlich resultiert die Spaltung der

Diphosphatbrücke aus einem nukleophilen Angriff von Wasser oder Hydroxid auf das β -Phosphoratom des doppelt maskierten DiPPro-NDPs. Die zusätzliche negative Ladung am β -Phosphoratom des monomaskierten NDPs (Intermediat II) scheint einen nucleophilen Angriff an der Pyrophosphateinheit zu verhindern. Dies erklärt, warum DiPPro-Verbindungen mit akzeptorsubstituierten Maskierungseinheiten ($X = \text{CF}_3, \text{CN}, \text{NO}_2$) hohe Mengen Nucleosiddiphosphat in beiden Medien freisetzen.

Abbildung 7 und 8 zeigen die Hydrolyse im PBS bzw. in CEM/0-Zellextrakten von CF_3 -Ph-DiPPro-d4TDP **24e**. Deutlich zu erkennen ist, vor allem in PBS, die Bildung von d4TDP **21** über das intermediär entstehende CF_3 -Ph-Intermediat **38**. Daneben kann ebenfalls das Entstehen von geringen Mengen von d4TMP **8** beobachtet werden. Bei der Hydrolyse in den Zellextrakten liegt der Peak des d4TMPs **8** teilweise verdeckt unter den Signalen, die eindeutig den Zellextrakten zugeordnet werden konnten. Diese sind das Resultat der UV-Absorption durch die aromatischen Aminosäuren der Proteine der Zellextrakte. Mittels hydrophiler Interaktionschromatographie (HILIC: *hydrophilic interaction liquid chromatography*), die in Kapitel 4.2.4.2 genauer besprochen wird, konnte die Menge des gebildeten d4TMP **8** trotzdem separat detektiert werden.

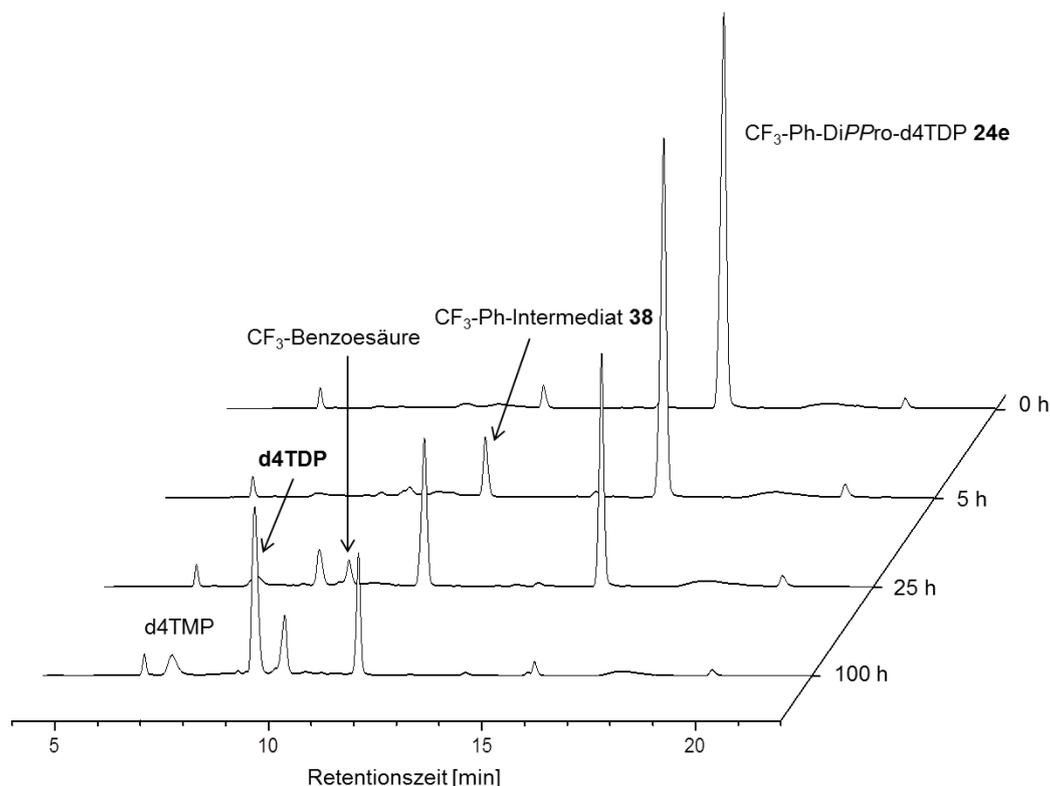


Abbildung 7: RP-18-HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von CF_3 -Ph-DiPPro-d4TDP **24e** in PBS.

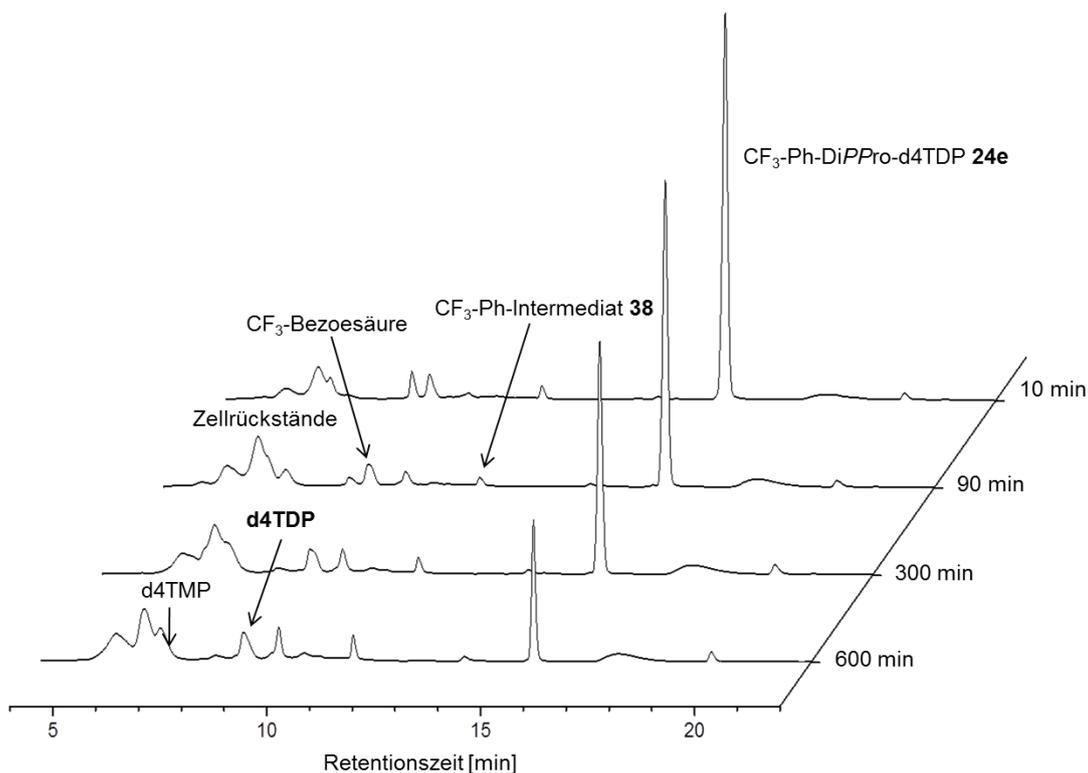


Abbildung 8: RP-18-HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von $\text{CF}_3\text{-Ph-DiPPro-d4TDP 24e}$ in CEM/0-Zellextrakten.

Diese günstigen Eigenschaften der Maskierungen mit stark elektronenziehenden Gruppen wurden – wie in der Einleitung dieses Kapitels erwähnt – ebenfalls für die Freisetzung von AZTDP genutzt. Interessanterweise waren die Stabilitäten von DiPPro-AZTDPs **25** und die Verteilung ihrer Hydrolyseprodukte in PBS sowie in Zellextrakten vergleichbar mit den Beobachtungen, die für die entsprechenden DiPPro-d4TDP-Verbindungen **24** gemacht wurden. Der Vergleich der enzymatischen Hydrolyse von $\text{NO}_2\text{-Ph-DiPPro-d4TDP 24g}$ mit $\text{NO}_2\text{-Ph-DiPPro-AZTDP 25g}$ verdeutlicht diese Beobachtung bildlich (Abbildung 9 und 10). Die Stabilität von $\text{CF}_3\text{-Ph-DiPPro-AZTDP 25e}$ in PBS stellte hier allerdings die Ausnahme dar: erstaunlicherweise war dieses Pronucleotid **25e** mit $t_{1/2} = 12$ h deutlich labiler als das entsprechende d4TDP-Derivat **24e** mit $t_{1/2} = 20$ h (Tabelle 4).

Im Vergleich zu den Bis(acyloxybenzyl)-DiPPro-d4TDPs **23** war die chemische Stabilität für alle akzeptorsubstituierten Bis(benzoyloxybenzyl)-DiPPro-NDPs **24** und **25** deutlich geringer, mit Ausnahme von Bis(acyloxybenzyl)-DiPPro-d4TDPs **23** mit $\text{R} = \text{CH}_3$ ($t_{1/2} = 10$ h).^{48,49} Folglich war auch die Menge des aus dem Prodrug gebildeten d4TDPs **21** höher. Allerdings stellen die DiPPro-Verbindungen **23** mit kurzen aliphatischen Ketten bessere Substrate für die in den Zellextrakten enthaltenen Enzyme dar ($\text{R} = \text{CH}_3$, $t_{1/2} = 0.05$ h^{48,49}, $\text{R} = \text{C}_4\text{H}_9$, $t_{1/2} = 0.6$ h⁵⁰).

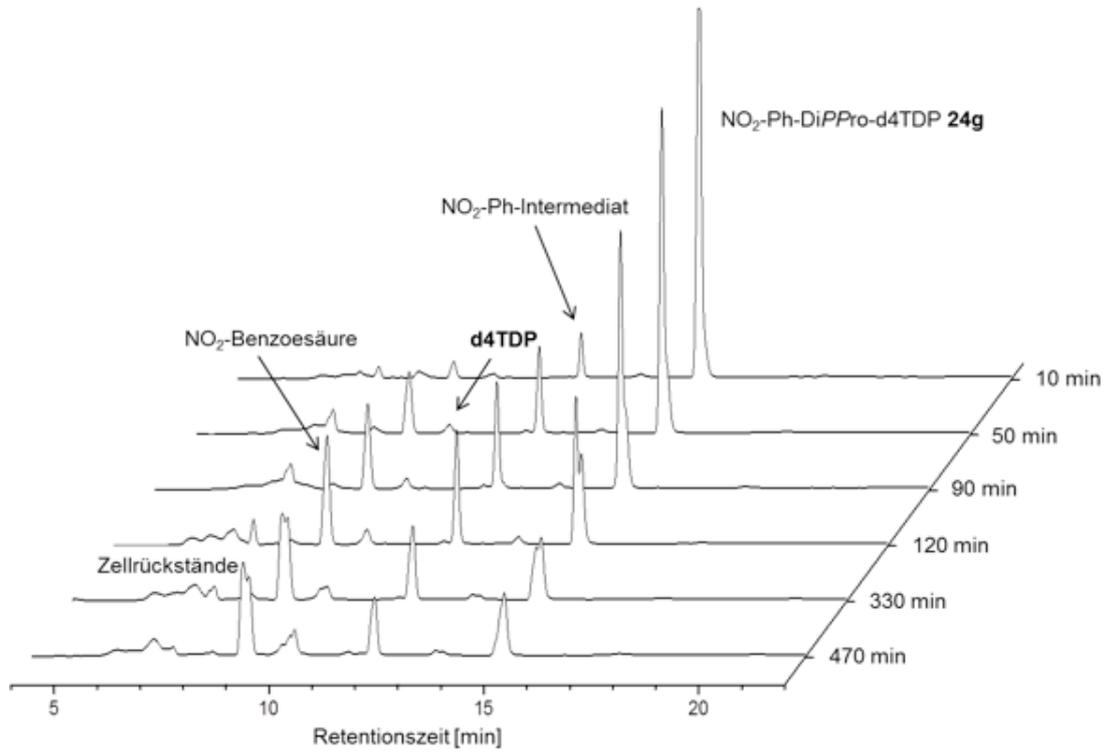


Abbildung 9: RP-18-HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von $\text{NO}_2\text{-Ph-DiPPro-d4TDP 24g}$ in CEM/0-Zellextrakten.

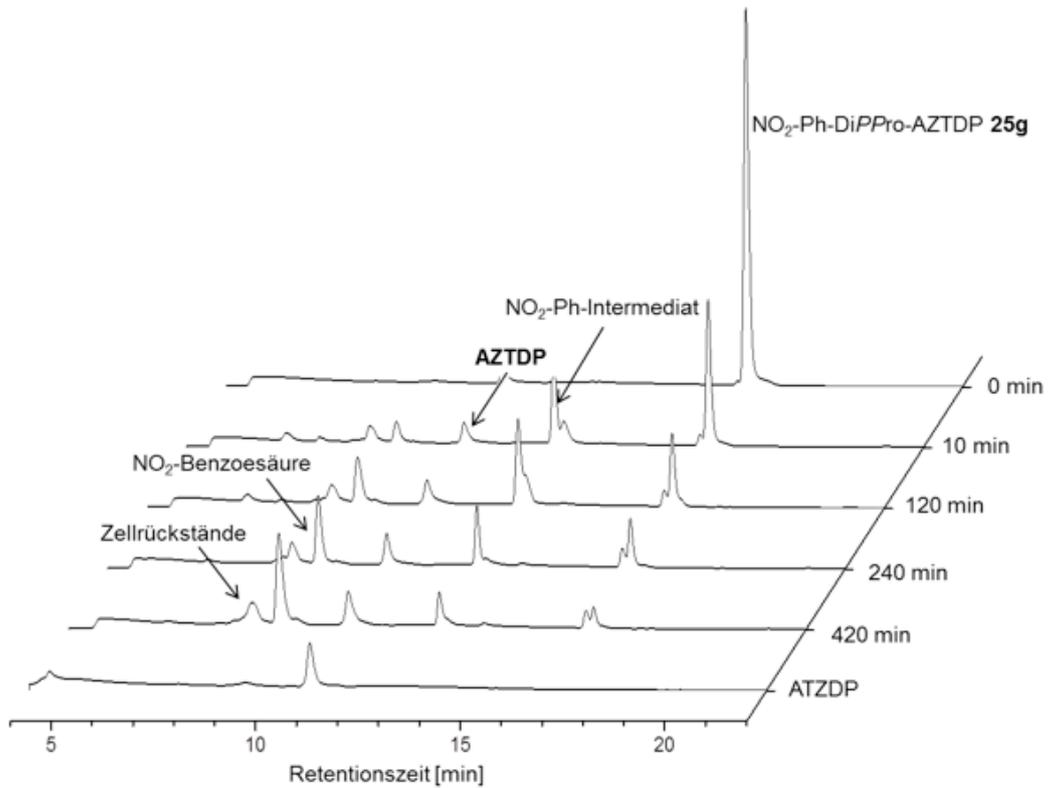


Abbildung 10: RP-18-HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von $\text{NO}_2\text{-Ph-DiPPro-AZTDP 25g}$ in CEM/0-Zellextrakten.

Die Lipophilie der Bis(benzoyloxybenzyl)-DiPPro-Verbindungen **24** und **25** wurde anhand der Retentionszeiten abgeschätzt, die bei der RP-HPL-Chromatographie bestimmt wurden. Die Werte, die in Tabelle 4 zusammengefasst sind, lagen alle ungefähr in demselben Bereich. Die Änderung des Substituenten X hatte nur einen geringen Einfluss auf die Lipophilie des Pronucleotids. Lediglich die Substitution durch die CF₃-Gruppe führte zu einer deutlicheren Verschiebung der Retentionszeit. Wie allerdings in Tabelle 4 ersichtlich ist, hatten die Substituenten einen signifikanten Einfluss auf die Stabilität. Obwohl CF₃-Ph-DiPPro-d4TDP **24e** eine der lipophilsten Verbindungen war, zeigte es geringe Stabilität sowohl in PBS als auch in den Zellextrakten. Dieses Verhalten war genau gegensätzlich zu den aliphatischen Bis(acyl)-DiPPro-Verbindungen **23**.

4.1.3 Antivirale Aktivität der aromatischen DiPPro-Nucleotide

Die DiPPro-Nucleotide **24** und **25** wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, die HIV-Replikation in HIV-1 und HIV-2 infizierten Wildtyp-CEM/0-Zellen und HIV-2 infizierten mutanten Thymidinkinase-defizienten CEM/TK-Zellen zu inhibieren. In Tabelle 5 sind die antiviralen und cytotoxischen Daten der potentiellen Prodrugs **24** und **25** und die der Nucleosidanaloga d4T **3** und AZT **1** als Referenzverbindungen dargestellt.

Alle Verbindungen zeigten antivirale Aktivität in CEM/0-Zellen. Die antivirale Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 war in allen Fällen in der gleichen Größenordnung, wie für die entsprechende Referenzverbindung d4T **3** bzw. AZT **1**. Darüber hinaus wiesen die bereits in eigenen Vorarbeiten untersuchten Donor-benzoyl-DiPPro-Verbindungen in Thymidinkinase-defizienten CEM/TK-Zellen eine im Vergleich zu den Stammnucleosiden um bis zu 60-mal höhere Aktivität auf. Dies deutet darauf hin, dass die intakten Pronucleotide in die Zellen aufgenommen werden und im Zellinneren phosphorylierte Verbindungen freisetzen.

Etwas überraschend war der Verlust der antiviralen Aktivitäten bei fast allen akzeptorsubstituierten DiPPro-Nucleotiden **24e-g** und **25e-g**, da, wie zuvor in den Hydrolysestudien gezeigt, sie alle fast selektiv das NDP freisetzen. Der Verlust der antiviralen Aktivität in CEM/TK-Zellen könnte das Ergebnis einer zu schnellen Hydrolyse außerhalb der Zelle sein, die eine effiziente Aufnahme der intakten Pronucleotide ausschließen würde. Als Folge wurde wahrscheinlich das NDP gebildet, bevor der Durchtritt durch die Zellmembran erfolgen konnte. Das phosphorylierte Hydrolyseprodukt würde dann extrazellulär dephosphoryliert und das Stammnucleosid bilden, das dann von den Zellen aufgenommen würde. Das Resultat wäre – wie im Fall von **24e-g** und **25e-g** – Aktivität in den Wildtyp-Zellen, jedoch ein Verlust der Aktivität in den mutanten Zellen. Eine unzureichende

Permeation der Zellmembran der intakten DiPPro-Nucleotide infolge zu geringer Lipophilie hätte die gleiche Konsequenz zur Folge.

Tabelle 5: Anti-HIV Aktivität von DiPPro-Nucleotiden **24** und **25** in Wildtyp CEM/0-Zellen sowie in mutanten CEM/TK⁻-Zellen.

Pronucleotid	EC ₅₀ ^{a)} [μM]			CC ₅₀ ^{b)} [μM]
	CEM/0		CEM/TK ⁻	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
OMe-Ph-DiPPro-d4TDP 24b ⁷⁰	0.69 ± 0.41	1.1 ± 0.29	3.9 ± 2.3	98 ± 5.7
Me-Ph-DiPPro-d4TDP 24c ⁷⁰	0.80 ± 0.23	0.91 ± 0.28	≥ 2	41 ± 0.0
Cl-Ph-DiPPro-d4TDP 24d ⁷⁰	0.71 ± 0.24	1.0 ± 0.51	2.9 ± 2.3	51 ± 2.8
CF ₃ -Ph-DiPPro-d4TDP 24e	0.97 ± 0.49	4.8 ± 2.5	38 ± 20	193 ± 45
CN-Ph-DiPPro-d4TDP 24f	0.24 ± 0.16	1.4 ± 0.61	14 ± 7.9	108 ± 6.4
NO ₂ -Ph-DiPPro-d4TDP 24g ⁷⁰	1.0 ± 0.64	2.0 ± 1.2	13 ± 5.2	101 ± 3.5
CF ₃ -Ph-DiPPro-AZTDP 25e	0.042 ± 0.015	0.052 ± 0.0057	7.7 ± 2.1	108 ± 6.4
CN-Ph-DiPPro-AZTDP 25f	0.021 ± 0.0046	0.071 ± 0.052	≥ 10	95 ± 7.1
NO ₂ -Ph-DiPPro-AZTDP 25g	0.008 ± 0.003	0.28 ± 0.20	≥ 10	110 ± 8
d4T 3	0.86 ± 0.45	2.3 ± 2.4	173 ± 70	> 250
AZT 1	0.0066 ± 0.0048	0.021 ± 0.018	> 250	> 250

a) 50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; b) 50% zytostatische Konzentration

Beachtenswert ist allerdings, dass alle Pronucleotide **24** und **25** deutlich höhere Wirksamkeit gegen HIV in den CEM/TK⁻-Zellen zeigten als die NRTIs d4T **3** bzw. AZT **1**.

4.2 Asymmetrische DiPPro-Nucleotide

Ein weiterer Ansatz zum Erreichen hoher Lipophilie der Pronucleotide ohne gleichzeitige Erhöhung der Stabilität war die Kombination zweier unterschiedlicher Maskierungseinheiten. Umfangreiche Hydrolysestudien der Bis(acyloxybenzyl)-DiPPro-Nucleotide mit zwei gleichen Maskierungseinheiten (symmetrische DiPPro-NDPs) sowie die Bestimmung der antiviralen Aktivitäten zeigten deutlich einen Zusammenhang der Parameter Lipophilie/antivirale Aktivität: Obwohl die kurzkettigen Bis(acyloxybenzyl)-DiPPro-Nucleotide selektiv das Nucleosiddiphosphat in den Hydrolysestudien freisetzen, war die antivirale Aktivität wegen unzureichender Lipophilie gering. Verfügten die DiPPro-NDPs aber auf Grund einer langkettigen Estereinheit über hohe Lipophilie, die ein Überwinden der Zellmembran ermöglichte, führte die erhöhte Stabilität gleichzeitig zur unerwünschten Bildung von Nucleosidmonophosphat.^{48-50,52} Es zeigte sich, dass die Bildung des NMPs aus einem nucleophilen Angriff auf das β -Phosphoratom resultierte, die mit zunehmender Kettenlänge der Estereinheit als Konkurrenzreaktion zur Spaltung der Acyleinheit an Priorität gewinnt. Diese Konkurrenzreaktion wurde nach Spaltung der ersten Maske an dem mono-maskierten Intermediat II nicht mehr beobachtet.^{48-50,52,70} Die zusätzliche Ladung am β -Phosphoratom scheint hier einen nucleophilen Angriff zu erschweren. Folglich wird aus dem Intermediat II ausschließlich das Nucleosiddiphosphat als Produkt der Acylspaltung der Maskierungseinheit gebildet. Aus diesen Beobachtungen entwickelte sich die Idee, zwei unterschiedliche Maskierungseinheit in einem Pronucleotid zu kombinieren: Eine Maske mit kurzer Alkylkette sollte die schnelle Hydrolyse zum Intermediat II ermöglichen und somit die Bildung von NMP verhindern. Gleichzeitig sollte die für die Penetration der Zellmembran benötigte Lipophilie durch eine zweite Maske mit langer Alkylkette gewährleistet werden.

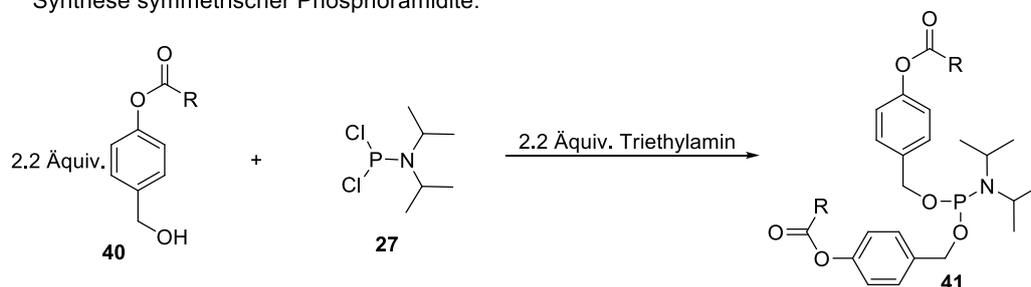
Es wurden asymmetrische DiPPro-NDPs mit unterschiedlichen Kombinationen der Maskierungseinheiten synthetisiert. Als instabile Maske wurden sowohl der Acetyl- als auch der Pentanoyl-ester eingesetzt. Als zweite Maskierungseinheit dienten zum einen Acylester unterschiedlicher Kettenlänge (Abbildung 5, $R^2 = C_7H_{15}$, C_9H_{19} und $C_{11}H_{23}$) und zum anderen Benzoate mit unterschiedlicher Substitution in *para*-Position (Abbildung 5, $X = CF_3$, CH_3).

4.2.1 Synthese asymmetrischer DiPPro-Nucleotide

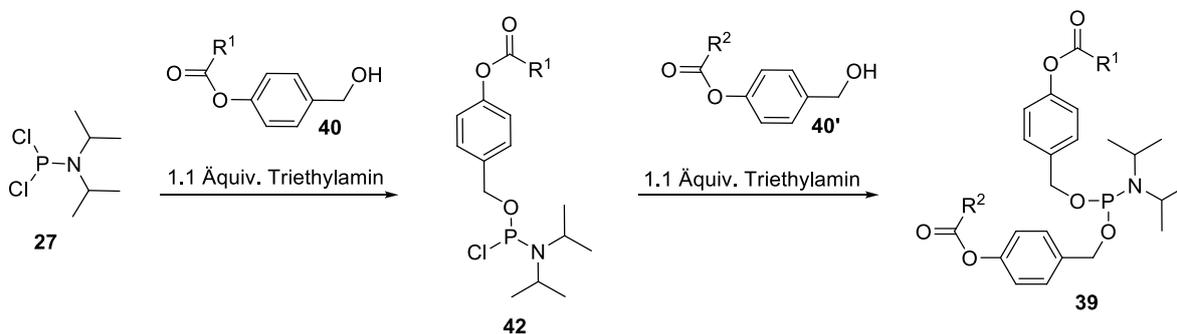
Zur Synthese der asymmetrischen DiPPro-Nucleotide sollte zunächst das Konzept zur Darstellung symmetrischer DiPPro-Nucleotide (Kapitel 4.1.1) adaptiert werden. Die Annahme lag nahe, dass es gelingen sollte, Phosphoramidite **39** mit unterschiedlichen Resten R an der Acyleinheit zu erhalten, indem zunächst ein Phenylester **40** mit $R = R^1$ zum Dichlor-*N,N*-

diisopropylaminophosphoramidit **27** getropft wird und anschließend, nach vollständiger Reaktion, der andere Phenylester **40'** mit $R = R^2$. (Schema 15)

Synthese symmetrischer Phosphoramidite:



Synthese asymmetrischer Phosphoramidite:



Schema 15: Synthese von asymmetrischen Phosphoramiditen **39**. Adaption der symmetrischen Synthese.

In mehreren Reaktionsansätzen, bei denen sowohl zunächst der Ester **40** mit stabilerer Acyleinheit vorgelegt wurde, als auch zunächst der Ester **40** mit labilerer Acyleinheit, konnte nach anschließender Reinigung am Chromatotron das gewünschte Produkt **39** nicht isoliert werden. Durch NMR-spektroskopische Analyse konnte zwar belegt werden, dass das asymmetrische Phosphoramidit **39** gebildet wurde, jedoch entstanden bei der Reaktion ebenfalls beide symmetrischen Phosphoramidite **42**. Alle drei Verbindungen wiesen sehr ähnliche R_f -Werte auf, wodurch eine chromatographische Trennung erschwert wurde.

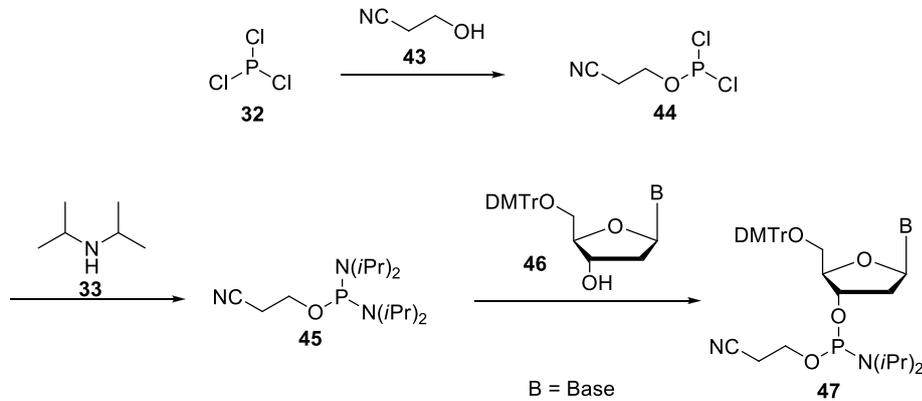
Auf diesem Wege waren asymmetrische DiPPro-Nucleotide also nicht zugänglich.

Die Kupplungsreaktion durch saure Aktivierung von Phosphoramiditen erwies sich, wie in Kapitel 4.1.1.3 gezeigt, durch Optimierung der Reaktionsbedingungen als gut durchführbare, unkomplizierte Reaktion, mit quantitativen Umsätzen und hohen Ausbeuten. Auf sie sollte nicht verzichtet werden. Aus diesem Grund wurde eine Methode benötigt, um asymmetrische Phosphoramidite **39** zu erhalten.

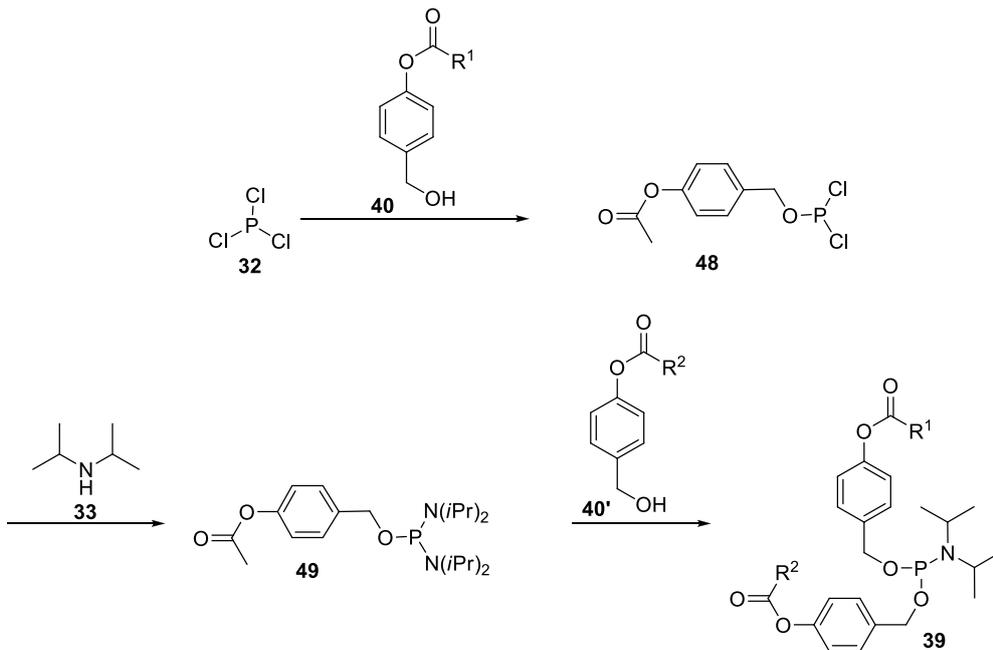
Angelehnt an das Syntheseprotokoll zur Synthese von Phosphoramiditen für die automatische Festphasensynthese in der Oligonucleotidchemie sollte die Darstellung der

Phosphoramidite über Kupplung eines Esters **40** mit einem Bis(diisopropylamino)-phosphoramidit wie **45** möglich sein.⁷⁷ (Schema 16)

Synthese von Nucleosidphosphoramiditen **47**:



Synthese asymmetrischer Phosphoramidite **39**:



Schema 16: Synthese von asymmetrischen P-Amiditen **39**. Adaption des Syntheseprotokolls von Nucleosidphosphoramiditen **47** für die automatische Festphasensynthese.⁷⁷

Hier wurde zunächst durch Reaktion von 3-Hydroxypropionsäurenitril **43** und Phosphortrichlorid **32** das Phosphordichloridit **44** erhalten, welches in einer weiteren Reaktion mit *N,N*-Diisopropylamin **33** zu dem entsprechenden Bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **45** umgesetzt wurde. Durch sauer aktivierte Kupplung von **45** mit einem 5'-defunktionalisierten Nucleosid **46** wurde schließlich das gewünschte Phosphoramidit **47** erhalten.

4.2.1.1 Synthese von Bis(diisopropylamino)phosphoramiditen

Zunächst wurden alle benötigten 4-(Hydroxymethyl)phenylester **40** nach der in Kapitel 4.1.1.1 beschriebenen Synthese (Schema 7) dargestellt. Alle aliphatischen 4-(Hydroxymethyl)phenylester **40** sind bereits in früheren Arbeiten publiziert,⁴⁸⁻⁵¹ weshalb hier nicht näher auf ihre Synthese eingegangen werden soll. 4-Acyloxybenzylalkohol **40a** wurde für die Synthese eines ersten Bis(diisopropylamino)phosphoramidits **49** eingesetzt.

Entsprechend der Synthese von Phosphordichloridit **44** wurde ein Äquivalent Phosphortrichlorid **32** bei -78 °C mit einem Äquivalent Pyridin versetzt und langsam 4-Acyloxybenzylalkohol **40a** hinzugegeben. Als Lösungsmittel diente Diethylether.⁷⁷ Nach vollständiger Reaktion von **40a**, was dünnschichtchromatographisch oder durch NMR-Spektroskopie verfolgt werden konnte, wurde das Reaktionsgemisch vom entstandenen Pyridiniumchlorid befreit und ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt. In dieser wurden die verbliebenen Chloratome durch *N,N*-Diisopropylaminogruppen substituiert, was durch Zutropfen eines hohen Überschusses von 6.1 Äquivalenten *N,N*-Diisopropylamin **33** zum Phosphordichloridit **48** erfolgte. Nach Entfernen des Salzes aus dem Reaktionsgemisch nach der Reaktion gelang die Reinigung des säurelabilen Produktes **49** am Chromatotron. Im Gegensatz zu Bis(diisopropylamino)phosphoramidit **45**, das sowohl säure- als auch basenlabile Gruppen trägt, konnte auf die Durchführung einer Destillation zur Reinigung verzichtet werden. Durch Verwendung von Petrolether/Triethylamin als Eluent wurde eine mögliche Zersetzung auf dem sauren Kieselgel verhindert. Obwohl sowohl Dünnschichtchromatographie als auch die NMR-spektroskopische Analyse auf einen vollständigen Umsatz hindeuteten, konnte das Produkt nur in einer Ausbeute von 37% erhalten werden.

In einem erneuten Reaktionsansatz zeigte sich, dass auf den ersten Filtrationsschritt – das Entfernen des Pyridiniumchlorids – verzichtet werden kann, was einen weiteren Ausbeuteverlust in dieser empfindlichen Reaktionssequenz verhindert. Der Ersatz von Pyridin durch Diisopropylamin **33** wurde ebenfalls getestet. Dies führte jedoch nicht zum Erfolg. Wahrscheinlich bedarf es der Aktivierung des Phosphortrichlorids durch Pyridin, um die Reaktion mit dem Phenylester **40** zu ermöglichen.

Die Umsetzungen von Phenylester **40a** (R= CH₃) und **28b** (R= OCH₃-Ph) mit Phosphortrichlorid **32** verliefen quantitativ in Diethylether. Bei der Reaktion von Phenylpentanoat **40b** (R= C₄H₉) und vor allem von Phenyloctanoat **40c** (R= C₇H₁₅) konnte jedoch eine unzureichende Umsetzung festgestellt werden. Eine Reaktion des Phenylesters **28e** (R= CF₃-Ph) mit Phosphortrichlorid in Diethylether war nicht mehr möglich. Der Grund hierfür lag in der schlechten Löslichkeit des Esters **28e**. Somit bestand Grund zu

der Annahme, dass auch **40b** (R= C₄H₉) und **40c** (R= C₇H₁₅) nicht vollständig in Diethylether löslich waren, was aber auf Grund ihrer öligen Konsistenz nicht sichtbar war. Daher wurde im Weiteren THF als Lösungsmittel eingesetzt, worin alle Phenylester **28** und **40** gute Löslichkeit zeigten. Der Wechsel des Lösungsmittels führte schließlich zu einer Erhöhung der Ausbeute im Fall von Phenylpentanoat **40b** von 41% auf 56% und auch im Fall von Phenylacetat **40a** von 37% auf 53%. Nach wie vor konnten aber keine höheren Ausbeuten als 56% über die zwei Stufen erreicht werden. Wahrscheinlich findet bei der Reinigung am Chromatotron trotz Verwendung von Triethylamin im Eluenten eine teilweise Zersetzung statt. Mögliche Nebenprodukte der Synthese sind die Verbindungen **50** und **41** (Abbildung 11).

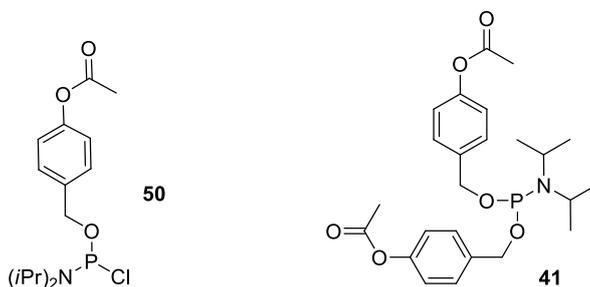
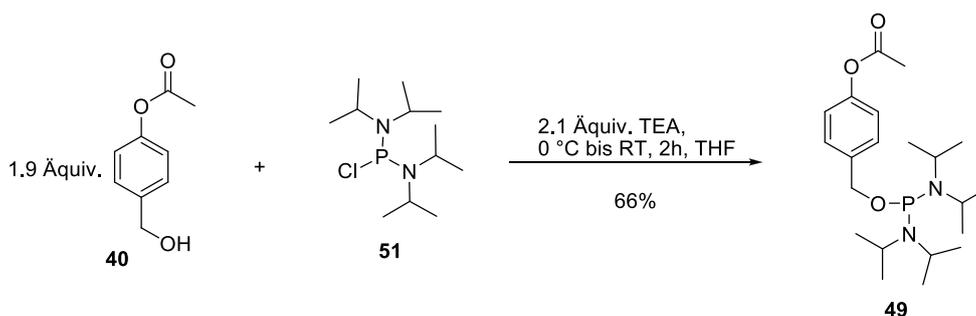


Abbildung 11: Mögliche Nebenprodukte der Bis(diisopropylamino)phosphoramidit-Synthese.

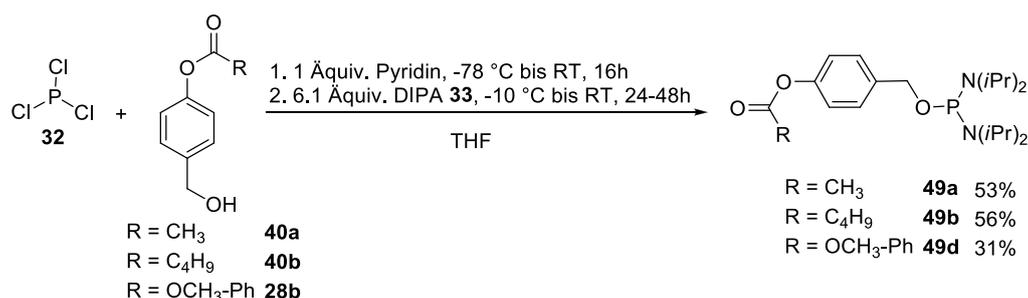
Das Chlorphosphin **50** verfügt über ähnliche Polarität wie das Bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **49**. Beide sind stark apolar. Ein höherer Anteil von Triethylamin im Eluenten, der zum Stabilisieren der säurelabilen Verbindungen dienen könnte, war leider nicht möglich. Das Lösungsmittelgemisch war dann zu polar um das Phosphordiamidit **49** getrennt von dem Chlorphosphin **50** zu eluieren.

Auf Grund der relativ geringen Ausbeuten bei den beschriebenen Reaktionen, wurde alternativ die Substitution an Bis(*N,N*-diisopropylamino)chlorphosphin **51** (bezogen von Sigma Aldrich) durchgeführt. Hierzu wurde das Chlorphosphin **51** in Diethylether vorgelegt und bei -78 °C das gelöste Phenylacetat **40a** hinzugetrofft. Bereits nach zwei Stunden war ein vollständiger Umsatz erzielt. Nach Aufarbeitung und Reinigung konnte das Produkt mit einer Ausbeute von 66% erhalten werden (Schema 17).



Schema 17: Alternative Synthese von Bis(diisopropylamino)phosphoramiditen **49**.

Dieses gute Ergebnis führte zu dem Wunsch, das Bis(*N,N*-diisopropylamino)chlorphosphin **51** selbst zu synthetisieren, da es kommerziell erworben teuer ist. Die literaturbekannte Synthese sollte durch Umsetzung von *N,N*-Diisopropylamin **33** (DIPA) und Phosphortrichlorid **32** in THF erfolgen.⁷⁸ Die Reaktion verläuft über den Austausch eines Chlorids zunächst zu Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **27**. Auf Grund der nunmehr geringeren Reaktivität erfolgt ein weiterer Austausch nur mit einem hohen Überschuss DIPA **33** und sehr langsam (Reaktionszeit 72 h). Das Abtrennen der Salze aus dem Reaktionsgemisch war mittels Filtration nur unzureichend möglich. Daher wurde das Rohprodukt aus wasserfreiem *n*-Hexan umkristallisiert. Nach mehrmaliger Wiederholung dieses Schrittes konnte trotz allem nicht das gesamte Triethylammoniumchlorid entfernt werden. Außerdem sank die Ausbeute bei jedem Kristallisationsschritt. In Anbetracht dessen und der nicht deutlich besseren Ausbeute bei der folgenden Substitution wurden im Weiteren die Synthesen der Phosphordiamidite nach der zuvor beschriebenen Methode durchgeführt, die noch einmal in Schema 18 detailliert gezeigt ist.



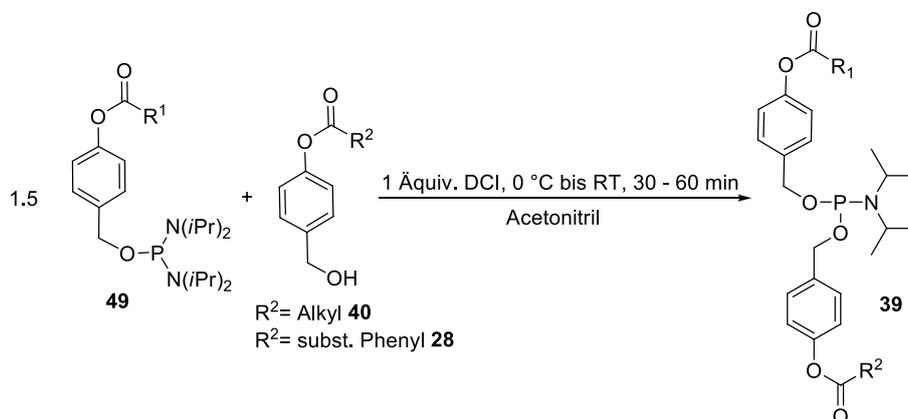
Schema 18: Synthese von Bis(diisopropylamino)phosphoramiditen **49**.

4.2.1.2 Synthese von asymmetrischen Phosphoramiditen

Die Synthese des Nucleosid-Phosphoramidits **47** aus Bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **45** und Nucleosid **46** bei der Oligonucleotidsynthese erfolgt sauer-katalysiert durch Zugabe von 4,5-Dicyanoimidazol. Dabei wird ein Überschuss Bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **45** (1.5 Äquiv.) tropfenweise zu einer Lösung aus Nucleosid **46** und 4,5-Dicyanoimidazol gegeben.⁷⁷ Dieses Protokoll wurde zunächst auch auf die Synthese der asymmetrischen Phosphoramidite **39**, in einem ersten Versuch CH₃/OCH₃-Ph-Phosphoramidit **39h** angewendet. Der Phenylester **28b** mit R= OCH₃-Ph und 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) wurden in trockenem Acetonitril vorgelegt und unter Eiskühlung tropfenweise mit einer Lösung des Bis(diisopropylamino)phosphoramidits **49** versetzt. Da die Reaktion sauer katalysiert wird, war es unbedingt von Nöten, das Bis(diisopropylamino)-phosphoramidit **49** durch Coevaporieren mit Acetonitril von Resten an Triethylamin, die aus

der vorherigen Reinigung stammten, zu befreien. DCI-vermittelte Kupplungen verlaufen sehr schnell, weshalb bereits nach 30 min eine vollständige Reaktion des Phenylesters **28b** erfolgt war. Nach der Extraktion zur quantitativen Entfernung des DCI-Salzes und Reinigung am Chromatotron mit Petrolether/Ethylacetat und einem Zusatz von Triethylamin musste jedoch festgestellt werden, dass hauptsächlich das dreifachsubstituierte Phosphit entstanden war. Das gewünschte asymmetrische Phosphoramidit **39h** konnte lediglich in einer Ausbeute von 17% isoliert werden.

Daher wurde die Reihenfolge der Zugabe geändert: Zu einer verdünnten Lösung des mehrfach mit Acetonitril coevaporierten Bis(diisopropylamino)phosphoramidits **49** wurde unter Eiskühlung eine Lösung des Phenylesters **28** bzw. **40** und 4,5-Dicyanoimidazol getropft. Nach 30 minütiger Reaktionszeit, Extraktion und Reinigung am Chromatotron konnten die gewünschten Phosphoramidite **39** in guten Ausbeuten isoliert werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte sogar gezeigt werden, dass durch das Ersetzen der Extraktion durch einen Filtrationsschritt quantitative Ausbeuten möglich sind. Die Reaktion mit den Ausbeuten für die asymmetrischen Phosphoramidite **39** ist in Schema 19 zusammengefasst.



R ¹	R ²	Verbindung	Ausbeute	R ¹	R ²	Verbindung	Ausbeute
CH ₃	C ₄ H ₉	39a	64%				
CH ₃	C ₇ H ₁₅	39b	82%	C ₄ H ₉	C ₇ H ₁₅	39i	90%**
CH ₃	C ₉ H ₁₉	39c	87%**	C ₄ H ₉	C ₉ H ₁₉	39j	86%
CH ₃	C ₁₁ H ₂₃	39d	72%	C ₄ H ₉	C ₁₁ H ₂₃	39k	34%
CH ₃	CF ₃ -Ph	39e	76%	C ₄ H ₉	CF ₃ -Ph	39l	90%
CH ₃	Cl-Ph	39f	54%				
CH ₃	CH ₃ -Ph	39g	71%	C ₄ H ₉	CH ₃ -Ph	39m	99%**
CH ₃	OCH ₃ -Ph	39h	37%*	C ₄ H ₉	OCH ₃ -Ph	39n	60%

* vorherige Methode

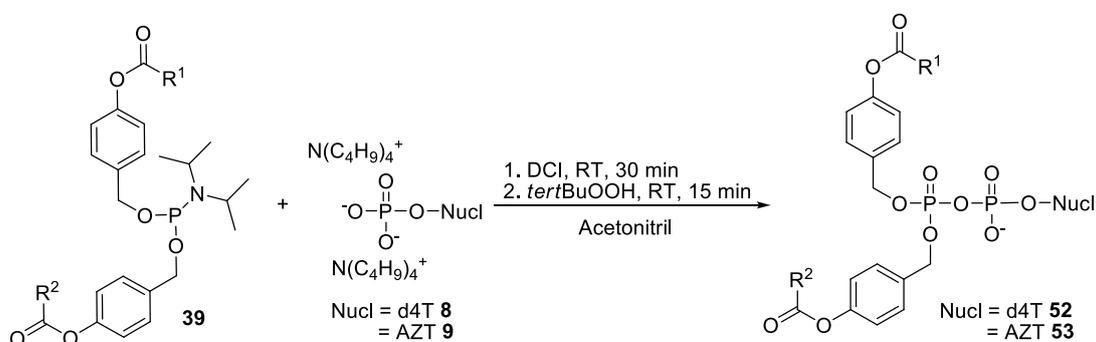
** keine Extraktion

Schema 19: Synthese der asymmetrischen Phosphoramidite **39**.

4.2.1.3 Synthese von asymmetrischen DiPPro-Nucleotiden

Nachdem die asymmetrischen Phosphoramidite alle in ausreichenden Reinheiten vorlagen, konnte nun ihre Kupplung mit den jeweiligen Nucleotiden zu den entsprechenden DiPPro-Nucleotiden erfolgen. Die Reaktionen erfolgten ebenfalls DCI-vermittelt, nach der in Kapitel 4.1.1.3 beschriebenen an den symmetrischen DiPPro-Nucleotiden optimierten Methode (Schema 20).

Auch im Fall der asymmetrischen DiPPro-Nucleotide **52** und **53** verliefen die Kupplungsreaktionen quantitativ. So konnte im ^{31}P -NMR-Spektrum des Rohproduktes vor der chromatographischen Reinigung bei den meisten Reaktionsansätzen kein oder nur sehr geringe Mengen Nucleosidmonophosphat bestimmt werden. (Abbildung 12) In allen Fällen lag der Umsatz bei über 98%.



Nucl	R ¹	R ²	Verbindung	Ausbeute	Nucl	R ¹	R ²	Verbindung	Ausbeute
d4T	CH ₃	C ₇ H ₁₅	52a	79%	AZT	CH ₃	C ₇ H ₁₅	53a	60%
d4T	CH ₃	C ₉ H ₁₉	52b	54%	AZT	CH ₃	C ₉ H ₁₉	53b	45%
d4T	CH ₃	C ₁₁ H ₂₃	52c	23%	AZT	CH ₃	C ₁₁ H ₂₃	53c	48%
d4T	CH ₃	CF ₃ -Ph	52d	30%	AZT	CH ₃	CF ₃ -Ph	53d	61%
d4T	CH ₃	CH ₃ -Ph	52e	48%					
d4T	C ₄ H ₉	C ₇ H ₁₅	52f	71%	AZT	C ₄ H ₉	C ₇ H ₁₅	53f	29%
d4T	C ₄ H ₉	C ₉ H ₁₉	52g	75%	AZT	C ₄ H ₉	C ₉ H ₁₉	53g	85%
d4T	C ₄ H ₉	C ₁₁ H ₂₃	52h	71%	AZT	C ₄ H ₉	C ₁₁ H ₂₃	53h	37%
d4T	C ₄ H ₉	CF ₃ -Ph	52i	53%	AZT	C ₄ H ₉	CF ₃ -Ph	53i	47%
d4T	C ₄ H ₉	CH ₃ -Ph	52j	31%					

Schema 20: Synthese asymmetrischer DiPPro-Nucleotide **52** und **53**.

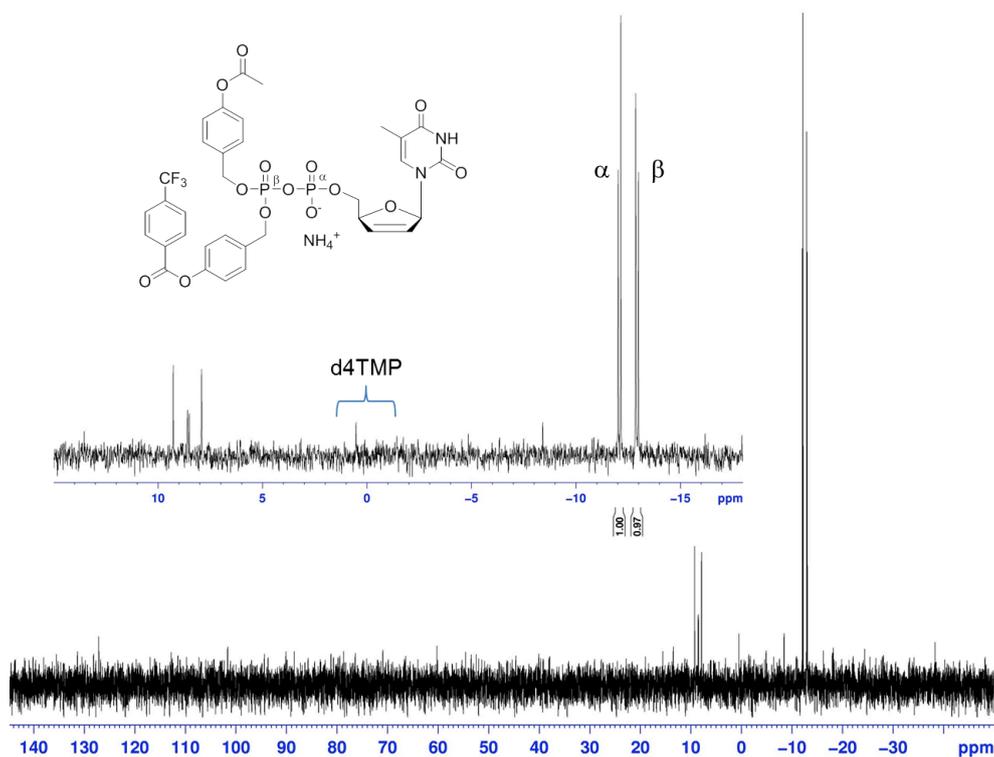
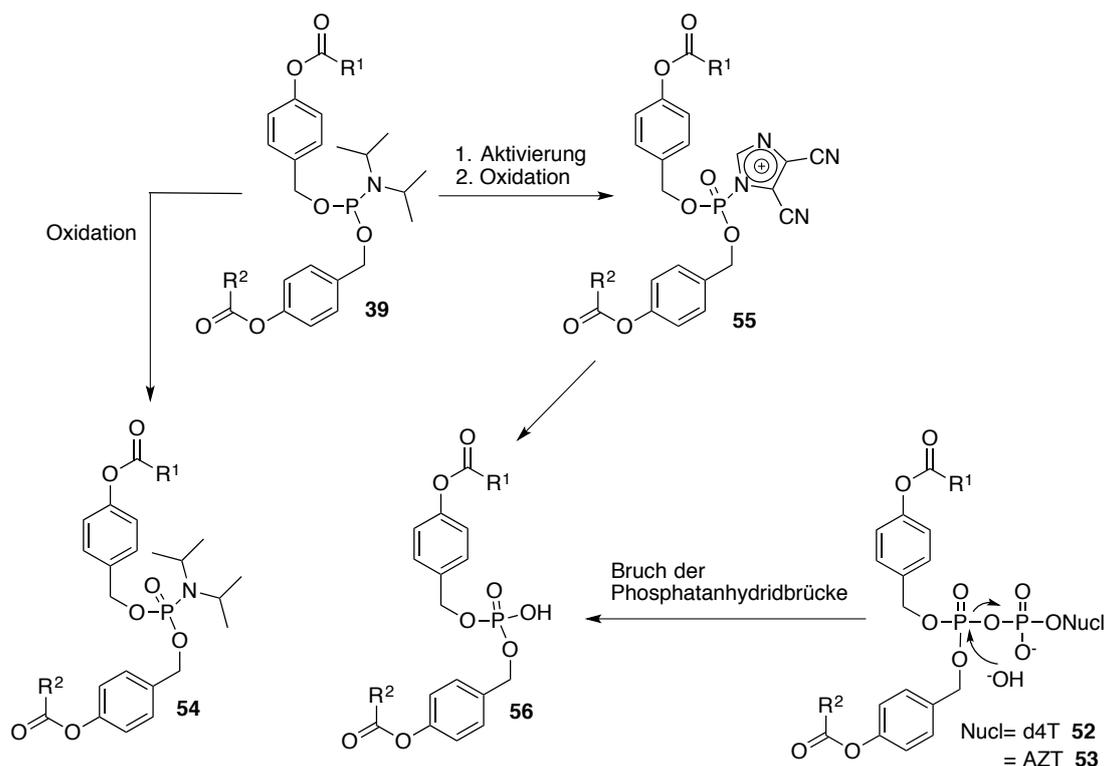


Abbildung 12: ^{31}P -NMR-Spektrum von $\text{CH}_3/\text{CF}_3\text{-Ph-DiPPro-d4TDP 52d}$ vor der Reinigung.

Wie auch schon bei der Synthese der aromatischen DiPPro-Nucleotide lag die größte Schwierigkeit bei der Reinigung des Reaktionsgemisches. Die Optimierung des Syntheseprotokolls ergab, dass der Einsatz von 1.5 Äquivalenten Phosphoramidit, 1.25 bis 1.75 Äquivalenten 4,5-Dicyanoimidazol und 1 Äquivalent NMP die besten Umsätze lieferte. Durch den Überschuss an Phosphoramidit und DCI können durch Oxidation mittels *tert*Butylhydroperoxid, neben dem Salz des eingesetzten sauren Aktivators, zwei Oxidationsprodukte des Phosphoramidits gebildet werden. Schema 21 zeigt die möglichen Nebenprodukte: Zum einen wird überschüssiges Phosphoramidit, das nicht durch DCI aktiviert wurde, zum Phosphoramidat **54** oxidiert. Wird das Phosphoramidit nach Aktivierung mittels DCI oxidiert und somit zum Phosphor-4,5-imidazolidat entsteht durch wässrige Hydrolyse der Phosphatdiester **56**. **56** kann allerdings auch das Produkt eines nucleophilen Angriffs auf das β -Phosphat des DiPPro-Nucleotids sein, dass zum Bruch der Phosphatanhydridbrücke führt. Beide Nebenprodukte **54** und **56** konnten in den NMR-Spektren der Rohgemische (Abb. 12) vermutet und schließlich nach ihrer Isolierung bestätigt werden. Das Abtrennen der genannten Nebenprodukte stellte sich jedoch zunächst schwierig dar.



Schema 21: Mögliche Nebenprodukte bei der Synthese von DiPPro-Nucleotiden.

Die Optimierung der Reinigung wurde bereits hinreichend in Kapitel 4.1.1.3 geschildert. Es ist an dieser Stelle allerdings anzumerken, dass während der Synthese der asymmetrischen Zielverbindungen **52** und **53** die optimalen Reinigungsbedingungen bzw. Schritte noch nicht gefunden waren. Aus diesem Grund wurden auch bei der Isolierung von **52** und **53** verschiedene Reinigungsmethoden angewendet, die im Detail im experimentellen Teil dieser Arbeit (Kapitel 7.2.11.2 und 7.2.11.3) aufgeführt sind.

Ein zusätzliches Problem bei der Reinigung der DiPPro-NDPs **52** und **53** im Vergleich zu den im vorigen Kapitel vorgestellten aromatischen Pronucleotiden **24** und **25** war die geringe UV-Aktivität der Verbindungen, was die Detektion deutlich erschwerte. Hier war die automatisierte Flash-Chromatographie, die einen Diodenarraydetektor verwendet, unabdingbar. Als optimal erwies sich ebenfalls folgende Reinigungssequenz:

- direkt im Anschluss an die Oxidation und das Entfernen des Lösungsmittels Flash-Chromatographie (Acetonitril/Wasser),
- Ionenaustausch, erneute Flash-Chromatographie (Acetonitril/Wasser),
- eventuell erneute Flash-Chromatographie (Acetonitril/Wasser).

Einige DiPPro-Nucleotide, wie z.B. $\text{CH}_3/\text{CF}_3\text{-Ph-DiPPro-d4TDP}$ **52d**, verfügten über das gleiche Elutionsverhalten bei der RP-Chromatographie wie der als Nebenprodukt gebildete Phosphatdiester **56**, sodass eine Größenausschlusschromatographie notwendig war. Diese

wurde mit Wasser an Sephadex LH-20 durchgeführt. Die Gründe für die Wahl des Säulenmaterials und des Eluenten sind in Kapitel 4.1.1.3 erläutert.

In Abbildung 13 und 14 sind exemplarisch für alle asymmetrischen DiPPro-AZTDPs sowohl das ^1H -NMR- als auch das ^{31}P -NMR-Spektrum der isolierten Verbindung $\text{CH}_3/\text{C}_7\text{H}_{15}$ -DiPPro-AZTDP **53a** gezeigt, das als reines Ammoniumsalz vorlag. Im ^{31}P -NMR-Spektrum ist deutlich die charakteristische Aufspaltung der beiden Signale mit der typischen $J_{\text{P,P}}$ -Kopplung zu erkennen.

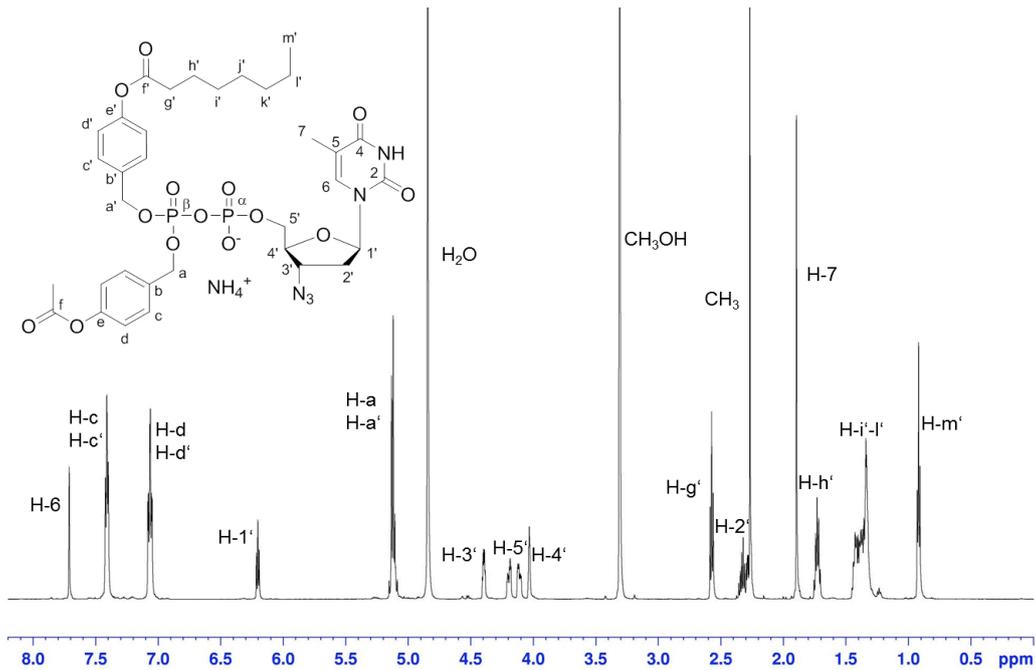


Abbildung 13: ^1H -NMR-Spektrum von $\text{CH}_3/\text{C}_7\text{H}_{15}$ -DiPPro-AZTDP **53a** (Methanol- d_4 , 400 MHz).

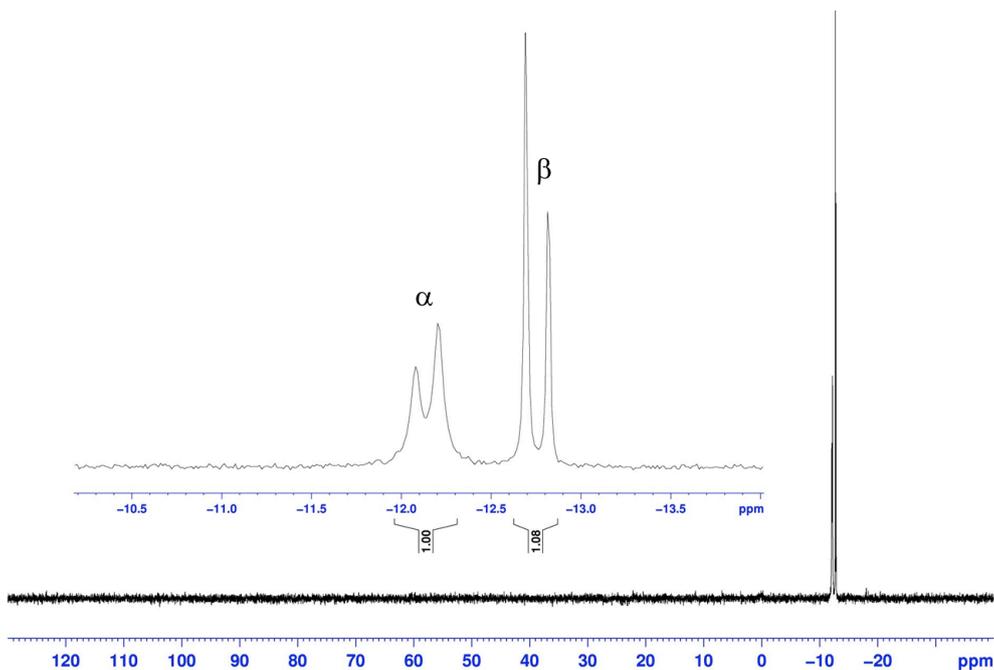


Abbildung 14: ^{31}P -NMR-Spektrum von $\text{CH}_3/\text{C}_7\text{H}_{15}$ -DiPPro-AZTDP **53a** (^1H - und ^{13}C -entkoppelt, Methanol- d_4 , 400 MHz).

Es konnten zehn DiPPro-d4TDPs **52** sowie acht DiPPro-AZTDPs **53** in hoher Reinheit und guten Ausbeuten isoliert werden (Abbildung 15).

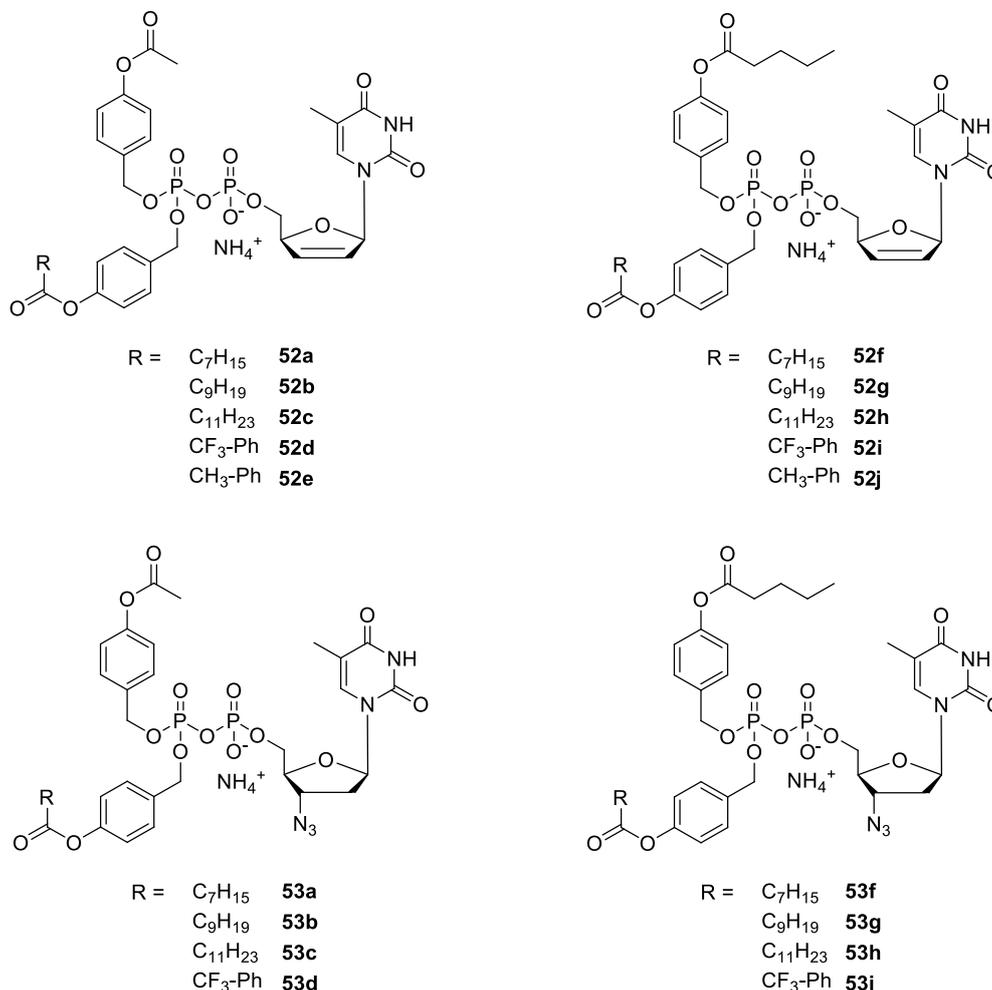


Abbildung 15: Überblick über die dargestellten asymmetrischen DiPPro-Nucleotide **52** und **53**.

Ihre Anwendbarkeit als Prodrugs sollte nun in Hydrolysestudien in verschiedenen Medien sowie in antiviralen Tests geprüft werden.

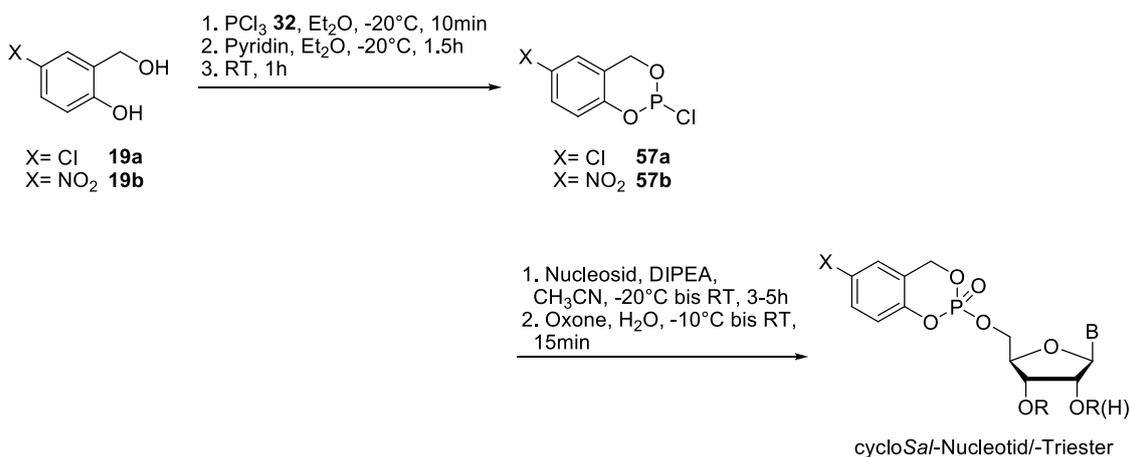
4.2.2 Synthese der monomaskierten Intermediate

Für die Untersuchung der DiPPro-Nucleotide **52** und **53** bezüglich ihres Hydrolyseverhaltens war es von Interesse, ebenfalls einige Intermediate in Hydrolysestudien zu untersuchen. Ihre Synthese soll an dieser Stelle beschrieben werden.

In mehreren Arbeiten konnte bereits die vielfältige synthetische Anwendbarkeit des in Kapitel 2.5 vorgestellten *cycloSal*-Konzeptes gezeigt werden.⁷⁹⁻⁸⁵ Die Phosphatgruppe der *cycloSal*-Nucleotide ist mit den Hydroxylgruppen eines Salicylalkoholderivates verestert und erlangt hierdurch höhere Elektrophilie im Vergleich zu den unsubstituierten Nucleotiden.

Außerdem stellt das Phenolat eine gute Abgangsgruppe dar. Aus diesen Gründen sind die *cycloSal*-Nucleotide neben ihrer Anwendung als Pronucleotide ebenfalls als Bausteine für die Kupplung mit Nucleophilen von Interesse. Die Reaktivität für eine nucleophile Substitution ist abhängig von der Position und des Substituenten X im aromatischen System des *cycloSal*-Nucleotids, dessen allgemeine Struktur Schema 22 zeigt. Durch Wahl des Substituenten ist die Elektrophilie des Phosphoratoms und somit die Reaktionsgeschwindigkeit der nucleophilen Substitution steuerbar. Hydrolysestudien zeigten, dass die Elektrophilie durch Substitution in 5-Position des aromatischen Rings in folgender Reihe zunimmt: $\text{CH}_3 < \text{H} < \text{Cl} < \text{NO}_2$.⁸⁶ Für das Prodrugkonzept wurden folglich Donorsubstituenten, wie die Methylgruppe verwendet, um eine hohe Stabilität der Pronucleotide zu erreichen und die Hydrolyse entfernt vom Wirkort zu vermeiden. Für die Synthese fanden hingegen die akzeptorsubstituierten Verbindungen, wie der 5-Chlor- und der 5-Nitro-*cycloSal*-Triester Anwendung.⁷⁹⁻⁸⁵

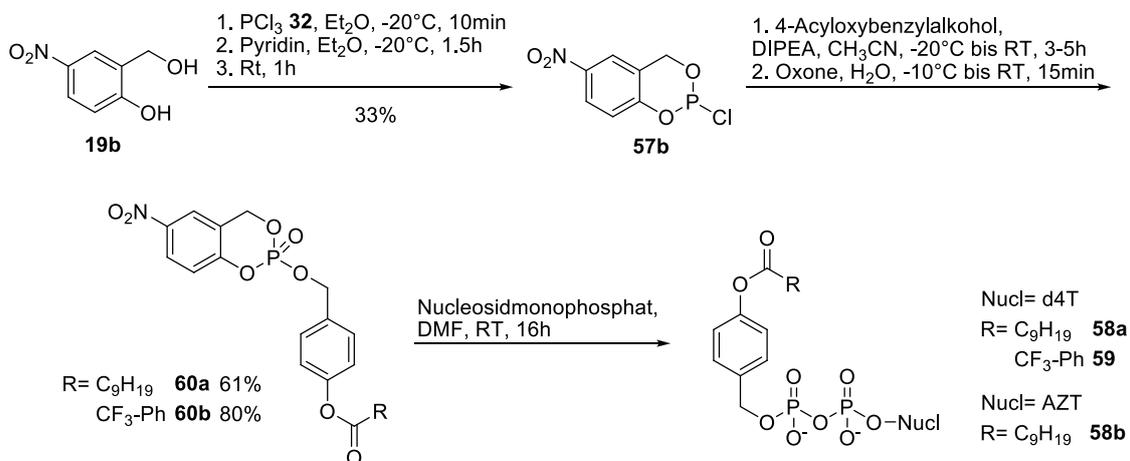
Der Aufbau eines *cycloSal*-Nucleotids erfolgt durch Umsetzung des Nucleosids mit dem entsprechenden Saligenylchlorphosphit **57**, das aus der Reaktion des 5-Chlor- oder 5-Nitro-Salicylalkohols **19a,b** mit Phosphortrichlorid **32** hervorgeht (Schema 22). Die Salicylalkohole **19** sind durch Reduktion von 5-Chlorsalicylsäure⁸⁷ bzw. 5-Nitrosalicylaldehyd⁸⁸ erhältlich. Schließlich liefert der *cycloSal*-Triester durch Reaktion mit einer Vielzahl von Nucleophilen, wie z.B. Zucker, Zuckerphosphat, Phosphat oder Pyrophosphat das entsprechende Produkt.⁷⁹⁻⁸⁵



Schema 22: Allgemeines Schema zur Darstellung von 5-akzeptorsubstituierten *cycloSal*-Nucleotiden.

Entsprechend einiger Vorarbeiten von T. GOLLNEST sollte das *cycloSal*-Konzept auf die Synthese von drei einfach-maskierten DiPPro-Verbindungen (Intermediate) **58-59** angewendet werden.⁵⁴ Als Nucleophil sollte das Nucleosidmonophosphat dienen, das mit einem *cycloSal*-Triester **60** umgesetzt wird, der anstelle eines Nucleosids die

Maskenstruktur, das heißt die Acyloxybenzyl-Einheit trägt. Schema 23 zeigt die detaillierte Syntheseroute.



Schema 23: Synthese der einfach-maskierten Intermediate **58-59**.

Nachdem das Chlorphosphit **57b** in moderater Ausbeute erhalten werden konnte, erfolgte die Substitution durch den jeweiligen 4-Acyloxybenzylalkohol **40** zu den beiden Triestern **60a** und **b** in guten Ausbeuten durch Anwendung des bekannten Syntheseprotokolls. Die finale Kupplung der Triester **60** mit den Nucleotiden **8** und **9** stellte eine Herausforderung dar. In allen Fällen zeigte die chromatographische Kontrolle einen vollständigen Umsatz des Triesters **60**. Nach automatisierter Flash-Chromatographie konnten allerdings jeweils nur geringe Mengen der Zielprodukte isoliert werden. Es bestand Grund zu der Annahme, dass das bei der Reaktion entstehende reaktive *o*-Chinonmethid beim Konzentrieren der Reaktionslösung zu Nebenreaktionen führen könnte. Aus diesem Grund wurde nach vollständiger Reaktion des Triesters **60** Wasser zum Reaktionsgemisch hinzugegeben, um das *o*-Chinonmethid vor dem Einengen der Lösung zum Salicylalkohol **19b** zu hydrolysieren. Dieses Vorgehen brachte jedoch keinen Erfolg bezüglich der Verbesserung der Ausbeuten. Auf weitere Optimierungsversuche der Synthese der einfach-maskierten Diphosphate **58-60** wurde verzichtet. Es waren lediglich geringe Mengen für analytische Zwecke notwendig, die schließlich in ausreichender Reinheit erhalten wurden, sodass die Untersuchung in Hydrolysestudien durchgeführt werden konnte.

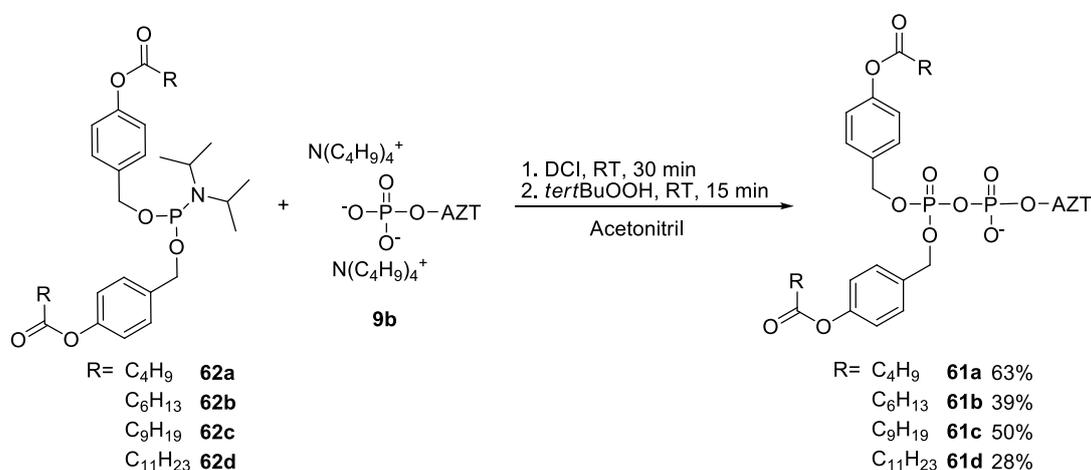
4.2.3 Synthese symmetrischer DiPPro-Nucleotide

Um die angestrebte Verbesserung des DiPPro-Konzeptes durch die in dieser Arbeit entwickelte asymmetrische Maskierung belegen zu können, wurden ebenfalls einige symmetrische DiPPro-AZTDPs **61** mit zwei identischen Masken synthetisiert. In

vergleichenden Hydrolysestudien konnte so der erhoffte Vorteil der asymmetrischen Maskierung festgestellt werden.

Als Referenzen sollten folgende DiPPro-AZTDPs dienen: C₄H₉-DiPPro-AZTDP **61a**, C₆H₁₃-DiPPro-AZTDP **61b**, C₉H₁₉-DiPPro-AZTDP **61c** und C₁₁H₂₃-DiPPro-AZTDP **61d**. Die Synthese erfolgte nach der in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Syntheseroute für die Darstellung symmetrischer DiPPro-Nucleotide **24** und **25**. Alle Bausteine für die Kupplung, die in guten Ausbeuten erhalten wurden, wurden bereits in Vorarbeiten publiziert,⁴⁷⁻⁵¹ weshalb ihre Synthese hier nicht weiter erörtert werden soll. Die Synthese von DiPPro-AZTDP **61b** (R= C₆H₁₃) und **61c** (R= C₉H₁₉) wurde bereits von T. SCHULZ durchgeführt.⁵³ Allerdings konnten beide Verbindungen lediglich in so geringen Mengen isoliert werden, dass umfangreiche analytische Untersuchungen nicht möglich waren.

Durch die optimierte Synthese und vor allem die neue Reinigungsmethode konnten die gewünschten Verbindungen in guten Ausbeuten isoliert werden (Schema 24). Auch im Fall von C₁₁H₂₃-DiPPro-AZTDP **61d** verlief die Reaktion quantitativ. Der Grund für die geringe Ausbeute von **61d** war leider ein technischer Defekt bei der zweiten Durchführung der automatischen präparativen RP-Chromatographie. Trotzdem standen schließlich alle gewünschten symmetrischen DiPPro-AZTDPs **61** für die Charakterisierung ihres Hydrolyseverhaltens zur Verfügung.

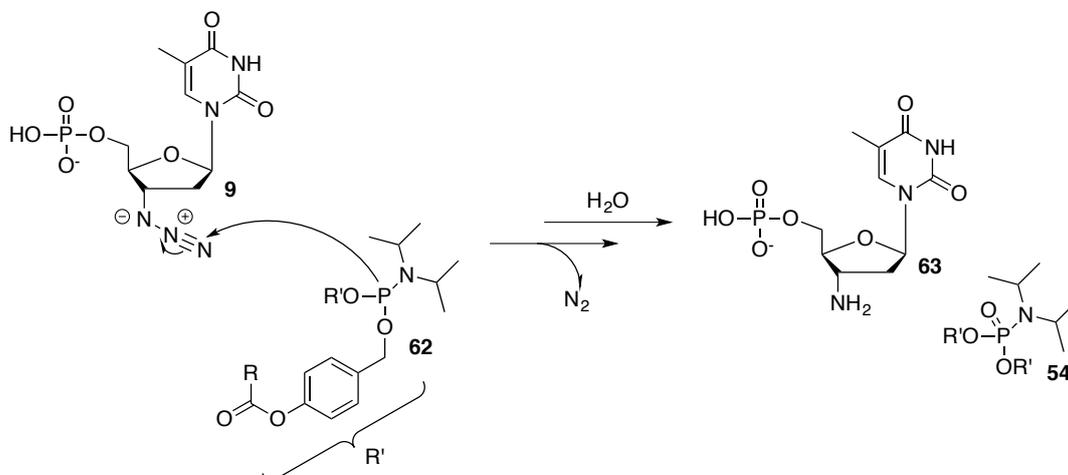


Schema 24: Synthese symmetrischer DiPPro-AZTDPs **61**.

Die von T. SCHULZ beobachteten Probleme bei der Synthese der AZTDP-Prodrugs bestätigten sich glücklicherweise in dieser Arbeit nicht. T. SCHULZ vermutete eine Staudinger-Reaktion als Konkurrenzreaktion unter den Reaktionsbedingungen.⁵³

Die Staudinger-Reaktion wird genutzt um primäre Amine aus Aziden zu synthetisieren. Als Reduktionsmittel dient Triphenylphosphin, das zusammen mit dem Azid zunächst ein *cis*-konfiguriertes Phosphazid bildet, das durch die konzertiert ablaufende Abspaltung von

Stickstoff zum N-P-Ylid umgesetzt wird. Schließlich liefert die Hydrolyse nach einigen Protonentransferschritten das Amin und das Triphenylphosphinoxid als Nebenprodukt.⁸⁹



Schema 25: Von T. SCHULZ vermutete Staudinger-Reaktion an AZTMP **9**.

Für die Kupplung zum DiPPro-AZTDP **61** würde dies bedeuten, dass durch Angriff des Phosphors am Phosphoramidit **62** am finalen Stickstoff des Azids schließlich das Amin **63** sowie das Phosphoramidat **54** gebildet werden würde (Schema 25). Die Bildung desamins **63** konnte auch durch massenspektrometrische Analyse nicht nachgewiesen werden. Allerdings betrug die Reaktionszeit lediglich 30 min, was im Vergleich zu der von T. SCHULZ gewählten Reaktionszeit (Reaktionsansätze rührten teilweise über Nacht) deutlich geringer ist. Es ist also möglich, dass die von ihm vermutete Nebenreaktion erst bei längeren Reaktionszeiten in Konkurrenz tritt.

4.2.4 Hydrolysestudien asymmetrischer DiPPro-Nucleotide

Die dargestellten asymmetrischen DiPPro-Nucleotide **52** und **53** wurden bezüglich ihrer Stabilitäten sowie ihres Hydrolyseverhaltens in verschiedenen Medien untersucht. Die chemischen Stabilitäten wurden in Phosphatpuffer (PBS) und in RPMI-Kulturmedium, jeweils bei physiologischem pH 7.3 bestimmt. Die Hydrolyse der Pronucleotide **52** und **53** durch Enzyme wurde sowohl in CEM/0-Zellextrakten aus T-Zellen, als auch in Schweinelebersterase (*pig liver esterase*, PLE) untersucht. Wie bereits in Kapitel 4.1.2.2 für die aromatischen DiPPro-NDPs **24** und **25** beschrieben, wurden Aliquote der Hydrolyselösungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und die Hydrolyseprodukte durch analytische RP-HPLC detektiert.

Die Hydrolysestudien in PBS wurden außerdem mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie verfolgt, was sich allerdings als ungeeignet erwies, da die entstehenden Intermediate alle die gleiche chemische Verschiebung aufwiesen.

4.2.4.1 Hydrolysestudien in Phosphatpuffer (PBS)

Die Hydrolysestudien in Phosphatpuffer bei pH 7.3 dienten hauptsächlich dem Beleg der Stabilität der Pronucleotide **52** und **53**.

Die Inkubation der DiPPro-Nucleotide **52** und **53** in Phosphatpuffer lieferte gleich zu Beginn der Hydrolysestudien ein überraschendes Ergebnis: Entgegen der Annahme, dass die instabile Maske (kurze Alkylkette) schnell gespalten wird und nahezu ausschließlich das Intermediat mit der stabilen Maskierungseinheit (lange Alkylkette) freigesetzt wird, wurden fast alle DiPPro-Nucleotide zunächst zu beiden Intermediaten hydrolysiert, wenngleich auch deutlich mehr stabiles Intermediat in den Chromatogrammen nachgewiesen werden konnte. Im weiteren Verlauf der Hydrolyse erwies sich das Intermediat mit kurzer Alkylkette allerdings stets als labiler als das gleichfalls gebildete langkettige Intermediat. Abbildung 16 zeigt hierzu exemplarisch den Hydrolyseverlauf der Hydrolyse von $\text{CH}_3/\text{C}_7\text{H}_{15}$ -DiPPro-d4TDP **52a** in PBS.

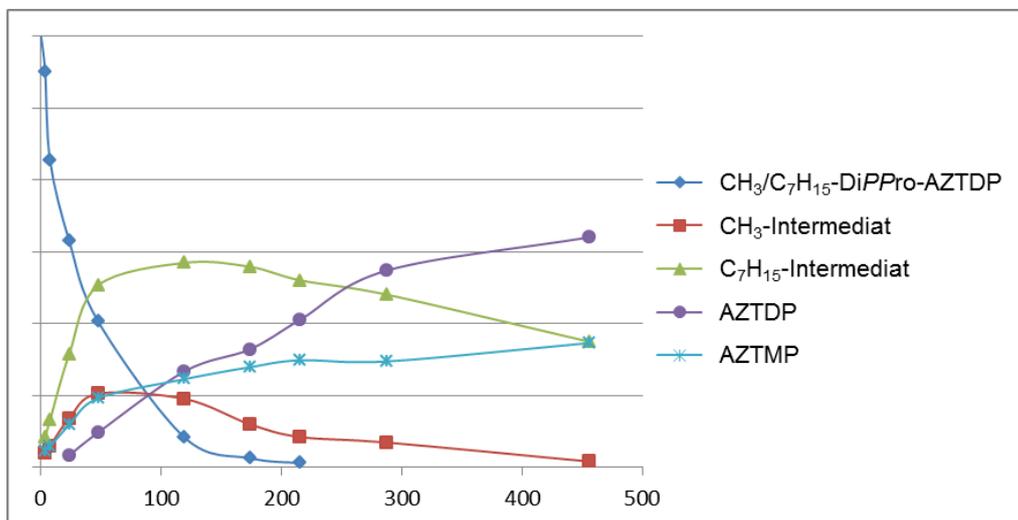


Abbildung 16: Verlauf der Hydrolyse von **52a** in PBS.

Außerdem waren die Halbwertszeiten für die Abnahme der Prodrugs **52** und **53** signifikant höher als die der entsprechenden symmetrischen DiPPro-NDPs. Geht man davon aus, dass die instabile Maskierungseinheit ($\text{R}=\text{R}^1$) vor der stabilen Maske ($\text{R}=\text{R}^2$) gespalten wird, sollte die Hydrolysehalbwertszeit des Prodrugs in der gleichen Größenordnung liegen, wie ein symmetrisches DiPPro-NDP mit $\text{R}=\text{R}^1$. Folglich sollten die Halbwertszeiten von CH_3/R^2 -

DiPPro-d4TDP, wie beispielsweise CH₃/C₉H₁₉-DiPPro-d4TDP **52b**, vergleichbar der Halbwertszeit von CH₃-DiPPro-d4TDP sein. Das asymmetrische CH₃/C₉H₁₉-DiPPro-d4TDP **52b** verfügte jedoch mit einer Halbwertszeit von 40 h über deutlich höhere Stabilität als CH₃-DiPPro-d4TDP mit einer Halbwertszeit von lediglich 10 h.^{48,49} Der Grund für diese Beobachtungen könnten stärkere sterische Hinderungen, hervorgerufen durch die größere Estereinheit (R=R²) sein. Die synthetisierten DiPPro-Nucleotide **52** und **53** verfügten somit über hohe Stabilitäten in Phosphatpuffer. Die Hydrolysehalbwertszeiten der DiPPro-d4TDPs **52** und -AZTDPs **53** sind zusammen mit den Halbwertszeiten der Hydrolyse in CEM/0-Zellextrakten in Tabelle 6 aufgeführt.

Die Stabilität der Verbindungen gegenüber chemischer Hydrolyse ist für den potentiellen Einsatz als Prodrugs von zentraler Bedeutung, soll der Wirkstoff schließlich erst am Zielort freigesetzt werden und nicht bereits extrazellulär durch die unerwünschte pH-abhängige Hydrolyse. Alle DiPPro-Verbindungen **52** und **53** erfüllten diese Bedingung, indem sie sich durch eine hohe Stabilität auszeichneten.

Tabelle 6: Halbwertszeiten von DiPPro-d4TDPs **52** und -AZTDPs **53** in PBS und CEM/0-Zellextrakten.

Pronucleotid	NDP = d4TDP 52		NDP = AZTDP 53	
	t _{1/2} [min]	t _{1/2} [min]	t _{1/2} [min]	t _{1/2} [min]
	in PBS	in CEM/0	in PBS	in CEM/0
CH ₃ /C ₇ H ₁₅ -DiPPro-NDP 52a/53a	2160 (36 h)	2.6	1980 (33 h)	1.3
CH ₃ /C ₉ H ₁₉ -DiPPro-NDP 52b/53b	2400 (40 h)	2.8	2100 (35 h)	2.8
CH ₃ /C ₁₁ H ₂₃ -DiPPro-NDP 52c/53c	2880 (48 h)	10	1920 (32 h)	7
CH ₃ /CF ₃ -Ph-DiPPro-NDP 52d/53d	900 (15 h)	1.8	780 (13 h)	2.8
CH ₃ /CH ₃ -Ph-DiPPro-NDP 52e	3480 (58 h)	2.6	-	-
C ₄ H ₉ /C ₇ H ₁₅ -DiPPro-NDP 52f/53f	2160 (36 h)	43	2760 (46 h)	50
C ₄ H ₉ /C ₉ H ₁₉ -DiPPro-NDP 52g/53g	2400 (40 h)	63	3000 (50 h)	60
C ₄ H ₉ /C ₁₁ H ₂₃ -DiPPro-NDP 52h/53h	4140 (69 h)	115	3780 (63 h)	99
C ₄ H ₉ /CF ₃ -Ph-DiPPro-NDP 52i/53i	900 (15 h)	53	1140 (19 h)	50
C ₄ H ₉ /CH ₃ -Ph-DiPPro-NDP 52j	3000 (50 h)	58	-	-

Wie auch bei den symmetrischen DiPPro-Nucleotiden wurde neben dem gewünschten Nucleosiddiphosphat ebenfalls das Nucleosidmonophosphat erhalten, das aus einem nucleophilen Angriff auf das β-Phosphat resultiert (siehe Abb.14, S.31). Es konnte aber festgestellt werden, dass das Verhältnis von NDP zu NMP bei den asymmetrischen Verbindungen signifikant höher zu Gunsten des Diphosphates ausfällt, als bei den Symmetrischen (wenn R=R²). Die Signifikanz der Differenz der Verhältnisse nahm entsprechend der Zunahme der Kettenlänge R bzw. R² zu. Deutlich zeigen diesen Sachverhalt die HPL-Chromatogramme, die in Abbildung 17 vergleichend dargestellt sind.

Sie zeigen die Hydrolyse zweier asymmetrischer Di*PP*ro-AZTDPs **53b** und **53g** sowie C₉H₁₉-Di*PP*ro-AZTDP **61c** nach 16-tägiger Inkubation mit Phosphatpuffer. Zu diesem Zeitpunkt waren alle Ausgangsverbindungen bereits vollständig zum Intermediat **58b** bzw. den Intermediaten **58b** und **65b**, AZTMP **9** sowie AZTDP **16** abgebaut. Das symmetrische C₉H₁₉-Prodrug **61c** weist im Vergleich zu CH₃/C₉H₁₉-Di*PP*ro-AZTDP **53b** und C₄H₉/C₉H₁₉-Di*PP*ro-AZTDP **53g** eine erheblich höhere Menge an AZTMP **9** zu diesem Hydrolysezeitpunkt auf. Zwar wird im weiteren Verlauf der Hydrolyse aus dem Intermediat **58** bzw. den Intermediaten **58** und **65b** AZTDP **16** hervorgehen, der Anteil an AZTMP **9** bleibt aber bei der Hydrolyse von **61c** signifikant größer als bei den asymmetrischen Verbindungen **53b** und **53g**. Für die symmetrischen CH₃- und C₄H₉-Di*PP*ro-d4TDPs sowie CH₃- und C₄H₉-Di*PP*ro-AZTDPs wurde zwar in früheren Arbeiten gezeigt, dass das Verhältnis von NMP/NDP deutlich zugunsten des NDPs ausgeht. Die Verbindungen zeigten allerdings nur geringe antivirale Aktivitäten, wahrscheinlich aufgrund unzureichender Lipophilie.⁴⁷⁻⁵⁰

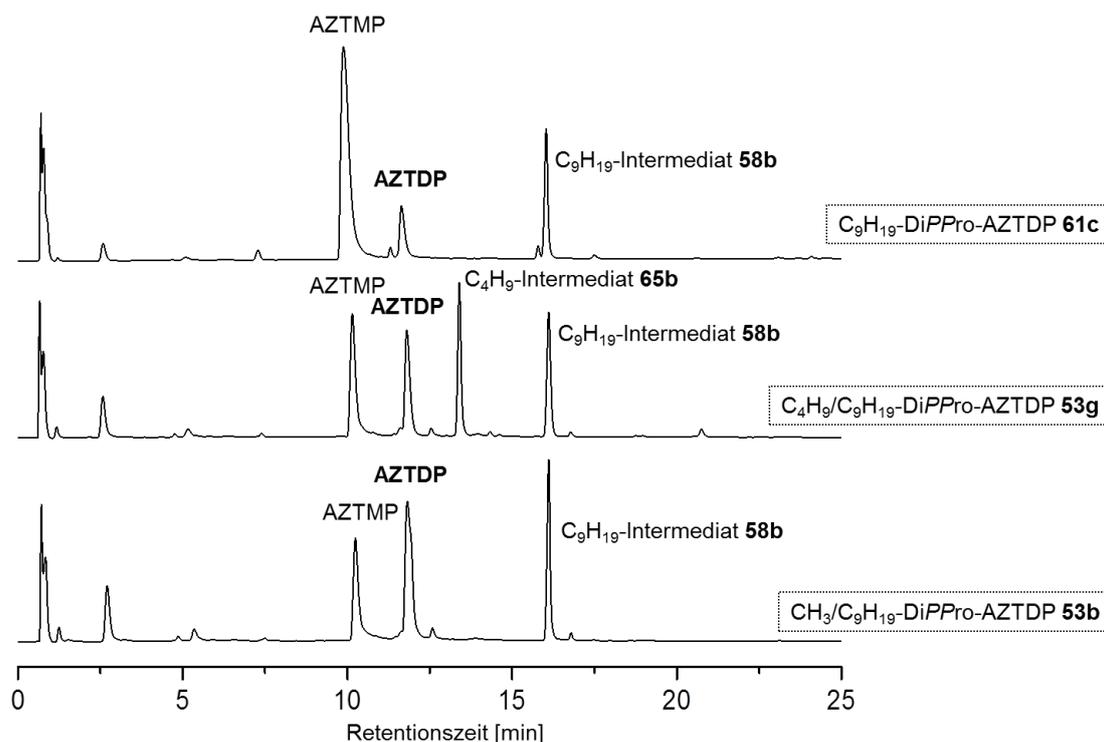


Abbildung 17: RP-HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von **61c** (oben), **53g** (mitte) und **53b** (unten) nach 16 Tagen Inkubation in PBS.

Wie bereits in Kapitel 4.1.2.2 erwähnt, ist ein nucleophiler Angriff auf das einfach-maskierte Intermediat auf Grund der zusätzlichen negativen Ladung unwahrscheinlich. Es besteht also die Annahme, dass aus dem Intermediat kein NMP sondern lediglich das NDP freigesetzt wird. Um diese Annahme zu belegen wurden die beiden dargestellten d4TDP-Intermediate mit R= C₉H₁₉ **58a** und R= CF₃-Ph **59** sowie das AZTDP-Intermediat mit R= C₉H₁₉ **58b** mit Phosphatpuffer inkubiert und die Hydrolysegemische HPL-chromatographisch untersucht. Es

wurden für die Abnahme der mono-maskierten Intermediate folgende Halbwertszeiten bestimmt: C_9H_{19} -DiPPro-d4TDP-Intermediat **58a**, $t_{1/2}$ = 13 Tage, C_9H_{19} -DiPPro-AZTDP-Intermediat **58b**, $t_{1/2}$ = 16 Tage, sowie CF_3 -Ph-DiPPro-d4TDP-Intermediat **59**, $t_{1/2}$ = 1.5 Tage. Exemplarisch zeigt Abbildung 18 einige RP-HPL-Chromatogramme der Hydrolyse des C_9H_{19} -Intermediats **58a**. Unerwarteter Weise konnte in den HPL-Chromatogrammen auch das Nucleosidmonophosphat detektiert werden, wenngleich der Anstieg zunächst recht langsam war und erst nach 40 Tagen sehr deutlich wurde.

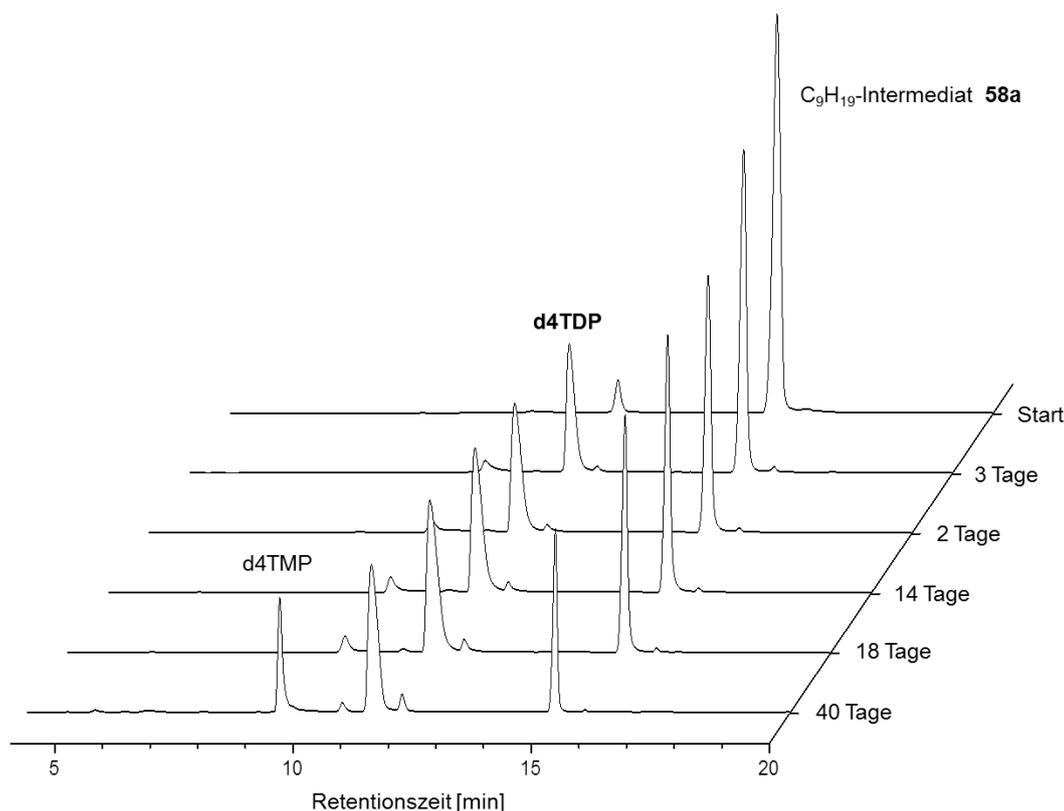


Abbildung 18: RP-HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von C_9H_{19} -DiPPro-d4TDP-Intermediat **58a**.

Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten: zum einen kann das NMP aus der Hydrolyse des mono-maskierten Ausgangsmaterials hervorgehen, was basierend auf dem oben Genannten unwahrscheinlich ist. Zum anderen würde die Hydrolyse des NDPs ebenfalls das NMP liefern. Letzteres konnte durch Inkubation von d4TDP **21** bzw. AZTDP **16** geprüft werden. Abbildung 19 zeigt RP-HPL-Chromatogramme der Inkubation von d4TDP **21** mit Phosphatpuffer. In der Tat zeigte sich, dass beide Nucleosiddiphosphate zwar über hohe Stabilität unter den Hydrolysebedingungen verfügten, aber dennoch mit einer Hydrolysehalbwertszeit von 40 Tagen (AZTDP **16**) bzw. 50 Tagen (d4TDP **21**) zum jeweiligen Nucleosidmonophosphat hydrolysierten. Neben der Bildung von d4TMP **8** konnte bei der Hydrolyse von d4TDP **21** außerdem die Bildung von Thymin beobachtet werden, die aus dem Bruch der glycosidischen Bindung resultiert. Die Bildung von Thymin konnte neben

den bereits genannten Hydrolyseprodukten in allen Phosphatpufferhydrolysen von DiPPro-d4TDPs **52** beobachtet werden.

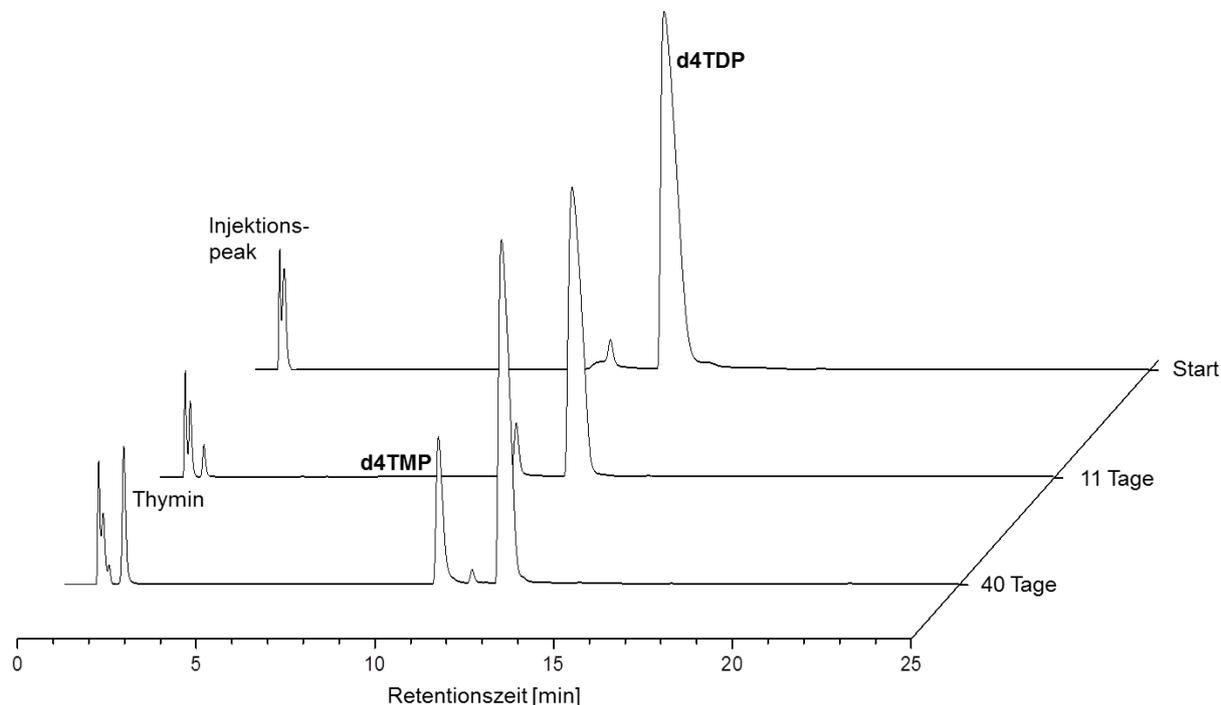


Abbildung 19: RP-HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von d4TDP **21** in PBS.

Das Nucleosid hatte bei der chemischen Hydrolyse in Phosphatpuffer keinen Einfluss auf die gemessenen Halbwertszeiten. Die Stabilitäten der DiPPro-AZTDPs **53** lagen in der gleichen Größenordnung wie die der jeweiligen DiPPro-d4TDPs **52**. Lediglich CH₃/C₁₁H₂₃-DiPPro-AZTDP **53c** wies im Vergleich zu dem entsprechenden d4TDP **52c** eine geringere Stabilität auf. Aber auch im Vergleich mit den anderen DiPPro-Verbindungen mit kürzerer Alkylkette in der stabilen Estereinheit erwies sich CH₃/C₁₁H₂₃-DiPPro-AZTDP **53c** als außergewöhnlich instabil.

4.2.4.2 Hydrolysestudien in CEM/0-Zellextrakten

Die Pronucleotide **52** und **53** wurden in weiteren Studien mit Zellextrakten aus T-Lymphozyten (CEM/0) inkubiert.

Zunächst wurden CH₃/CF₃-Ph-DiPPro-d4TDP **52d** und C₄H₉/CF₃-Ph-DiPPro-d4TDP **52i** nach dem Hydrolyseprotokoll von F. PERTENBREITER mit CEM/0-Zellextrakten inkubiert.⁹⁰ F. PERTENBREITER hatte, im Gegensatz zum früheren Hydrolyseprotokoll^{53,71} die eingesetzten Mengen halbiert: 50 µL der CEM/0-Zellextrakte wurden mit 10 µL einer 70 mM Magnesiumchloridlösung vermischt und durch Zugabe von 10 µL 6 mM DMSO-Lösung des Prodrugs gestartet. Der Abbruch der Hydrolyse erfolgte durch Zugabe von 200 µL Methanol

zur Hydrolyselösung. Im Vergleich dazu wurde nach dem alten Protokoll 300 μL Methanol bei doppeltem Hydrolyseansatz zugegeben. Die Hydrolyse, nach dem Protokoll von F. PERTENBREITER durchgeführt, verlief für beide Verbindungen mit entsprechend erwarteten Halbwertszeiten für die Abnahme des Prodrugs. Allerdings verwunderte es, dass nicht nur recht wenig d4TDP **21** sondern insgesamt nur geringe Mengen nucleosidischer Verbindungen freigesetzt wurden. Die Vermutung lag nahe, dass durch die Zugabe des Methanols die hydrophilen Nucleotide durch zu geringe Löslichkeit ausfallen und beim Filtrieren im Rückstand zurückbleiben. Folglich wurden drei Hydrolyselösungen von **52d** vorbereitet, die durch Zugabe von 200 μL , 150 μL und 125 μL Methanol abgebrochen wurden. In der Tat konnten für alle drei Proben unterschiedliche Mengen des d4TDPs **21** quantifiziert werden, wobei die Zugabe von 200 μL die geringste Menge d4TDP **21** lieferte. Dennoch war dieses Ergebnis nicht zufriedenstellend, da die Quantifizierung des Verlustes an d4TDP **21** bzw. d4TMP **8** bei den einzelnen Hydrolyseproben ungenau ist. Es stellte sich zusätzlich die Frage, ob die Zugabe von Magnesiumchlorid zur Hydrolyselösung notwendig war, da Esterasen kein Magnesiumchlorid benötigen. Vielmehr lag die Vermutung nahe, dass gerade die Zugabe der Magnesiumchloridlösung aufgrund der destabilisierenden Wirkung des Magnesiumions auf Phosphoranhydride ein Teil des Problems war. Folglich wurde auf die Zugabe von Magnesiumchlorid-Lösung verzichtet und stattdessen 10 μL Wasser zugegeben, um die Konzentration des Hydrolyseprotokolls nicht zu verändern. Tatsächlich führte dieses Vorgehen zum Erfolg. Folglich wurden alle Hydrolysestudien in CEM/0-Zellextrakten nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 50 μL der CEM/0-Zellextrakte vermischen mit 10 μL Reinstwasser
- Start der Hydrolyse durch Zugabe von 10 μL 6 mM DMSO-Lösung des Prodrugs
- Abbruch der Hydrolyse durch Zugabe von 150 μL Methanol

Die Zugabe von Reinstwasser im ersten Schritt erfolgte anstelle der Magnesiumchloridlösung und diente lediglich dazu, die Hydrolyse bei gleicher Konzentration wie zuvor durchzuführen. Hierdurch sollte eine Vergleichbarkeit bezüglich der Hydrolysehalbwertszeiten gewährleistet werden.

Auch bei dieser enzymatischen Hydrolyse waren die Halbwertszeiten für die Abnahme des Prodrugs im Allgemeinen unabhängig vom Nucleosid. Innerhalb nur weniger Stunden setzten alle Prodrugs ausschließlich das Nucleosiddiphosphat frei. Dabei führte die Hydrolyse der $\text{CH}_3/\text{R}^2\text{-DiPPro-NDPs}$ mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Minuten zunächst selektiv zu dem stabileren $\text{R}^2\text{-Intermediat}$. Im weiteren Hydrolyseverlauf setzte dieses schließlich selektiv das Nucleosiddiphosphat frei. Im Gegensatz dazu wurde bei der Hydrolyse von

C_4H_9/R^2 -DiPPro-NDPs neben dem stabileren R^2 -Intermediat ebenfalls das C_4H_9 -Intermediat **65** gebildet. Der Grund hierfür liegt offensichtlich in der höheren Stabilität der C_4H_9 -Estereinheit im Vergleich zur CH_3 -Estereinheit. Interessanterweise schien der Einfluss der stabileren Maske auf die Halbwertszeit für die Spaltung der labilen Estereinheit gering zu sein. So waren die Halbwertszeiten der DiPPro-NDPs mit $R^1=CH_3$ (**52a,b,d,e** und **53a,b,d**) beziehungsweise $R^1=C_4H_9$ (**52f,g,i,j** und **53f,g,i**) in der jeweils gleichen Größenordnung. Lediglich die vier DiPPro-Nucleotide mit $R^2=C_{11}H_{23}$ (**52c,h** und **53c,h**) fielen durch höhere Stabilitäten auf, wobei der Grund hierfür wahrscheinlich ebenfalls in dem höheren sterischen Anspruch der $C_{11}H_{23}$ -Estereinheit zu finden ist.

Abbildung 20 zeigt die HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von CH_3/C_9H_{19} -DiPPro-d4TDP **52b** in CEM/0-Zellextrakten.

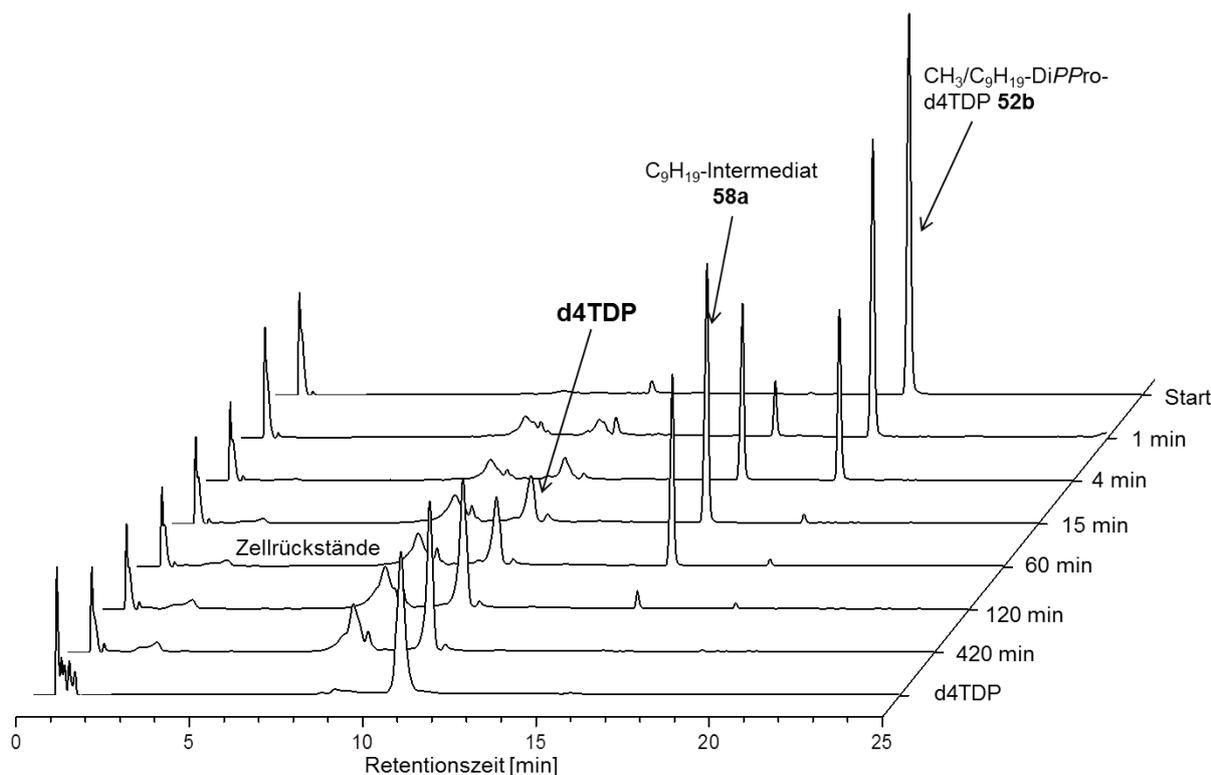


Abbildung 20: RP-HPL-Chromatogramme der enzymatischen Hydrolyse von CH_3/C_9H_{19} -DiPPro-d4TDP **52b** in CEM/0-Zellextrakten.

Binnen 15 min war das Prodrug **52b** nahezu vollständig verbraucht. Als Hydrolyseprodukte wurden lediglich das C_9H_{19} -Intermediat **58a** sowie d4TDP **21** gebildet. Die Detektion von d4TMP **8** war allerdings mittels RP-18-HPL-Chromatographie nicht möglich, da es mit den verwendeten Eluenten die gleiche Retentionszeit besaß, wie die UV-aktiven Rückstände der Zellextrakte. Mittels hydrophiler Interaktionschromatographie (HILIC-HPL-Chromatographie) der Hydrolyselösung gelang es, die Nucleotide als separate Peaks aufzunehmen.

Die Trennung von verschiedenen Verbindungen auf einer HILIC-Säule verhält sich orthogonal zur RP-Chromatographie. Bei dieser Art der Chromatographie handelt es sich um eine Verteilungschromatographie bzw. eine flüssig/flüssig-Extraktion zwischen mobiler und stationärer Phase. Die stationäre Phase besteht aus zwitterionisch-modifiziertem Kieselgel (hier Ammonium-Sulfonat-Liganden) was zu einer gesamtneutralen aber hochpolaren Oberfläche führt. Die unterschiedliche Interaktion der Komponenten mit der „immobilisierten“ wasserreichen Schicht und somit der Verteilung zwischen dieser und der organischen Phase trennen die Komponenten nach ihren Polaritäten. Aufgrund der hohen Lipophilie der Prodrugs gelang es jedoch nicht, durch HILIC-HPLC-Chromatographie sowohl die Nucleotide als auch das Prodrug und die Intermediate in einem HPLC-Lauf zu detektieren. Für die Verfolgung der Hydrolysen war diese Methode somit nicht geeignet. Verwendung fand die HILIC aber für die Bestimmung der Menge von Nucleosidmonophosphat nach vollständigem Abbau der Prodrugs sowie der Intermediate (nach 7 bis 10 h Hydrolysedauer).

Es stellte sich heraus, dass bei der Hydrolyse aller Pronucleotide **52** und **53** neben dem Hauptprodukt NDP ebenfalls geringe Mengen des NMPs gebildet wurden. Die Inkubation der Nucleosiddiphosphate d4TDP **2** und AZTDP **16** in CEM/O-Zellextrakten zeigte aber, dass der Anteil des gebildeten NMPs aus der Dephosphorylierung des jeweiligen NDPs resultiert. Dies ist nicht weiter verwunderlich, befinden sich in Zellextrakten schließlich auch Phosphatasen. Die Nucleosiddiphosphate wurden entsprechend dem oben genannten Hydrolyseprotokoll inkubiert und nach 2, 4, 7 und 10 Stunden auf die Bestandteile der Hydrolyselösung untersucht. Für d4TDP **21** wurde eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 10$ h bestimmt, für AZTDP **16** $t_{1/2} = 19$ h, wobei lediglich d4TMP **8** bzw. AZTMP **9** als Hydrolyseprodukte detektiert wurden.

Das oben beschriebene Hydrolyseverhalten ist exemplarisch für alle asymmetrischen CH_3/R^2 -DiPPro-Nucleotide **52a-e** und **53a-d**.

Aber auch die $\text{C}_4\text{H}_9/\text{R}^2$ -Prodrugs **52f-j** und **53f-i** setzten selektiv das jeweilige Nucleosiddiphosphat frei, wobei natürlich auch, wie für die CH_3/R^2 -Prodrugs **52a-e** und **53a-d** beschrieben, NMP durch Dephosphorylierung der NDPs entstanden ist. Im Gegensatz zu den instabileren CH_3/R^2 -DiPPro-Nucleotiden **52a-e** und **53a-d** wurde aber nicht nur das stabilere R^2 -Intermediat gebildet, sondern ebenfalls das C_4H_9 -Intermediat **65**. Der Unterschied des Hydrolyseverhaltens von CH_3/R^2 -DiPPro-NDPs **52a-e** und **53a-d** und $\text{C}_4\text{H}_9/\text{R}^2$ -DiPPro-NDPs **52f-j** und **53f-i** wird durch die Abbildungen 21 und 22 verdeutlicht. Sie zeigen den zeitlichen Verlauf der Zellextrakthydrolyse von **53a** bzw. **53f**.

Im Vergleich erfolgt der Abbau des doppeltmaskierten $\text{CH}_3/\text{C}_7\text{H}_{15}$ -DiPPro-AZTDP **53a** erheblich schneller als der von **53f**. Es wird nahezu vollständig zum C_7H_{15} -Intermediat **66b**

umgesetzt, welches ebenfalls recht schnell hydrolysiert wird, während sich selektiv AZTDP **16** bildet. Im Gegensatz dazu wird während der Hydrolyse von C_4H_9/C_7H_{15} -DiPPro-AZTDP **53f** sowohl das C_7H_{15} -Intermediat **66b** als auch das C_4H_9 -Intermediat **65b** gebildet, obgleich auch in deutlich geringeren Mengen als das C_7H_{15} -Intermediat **66b** aus der Hydrolyse von **53a**. Gleichzeitig erfolgt die stetige Bildung von AZTDP **16**.

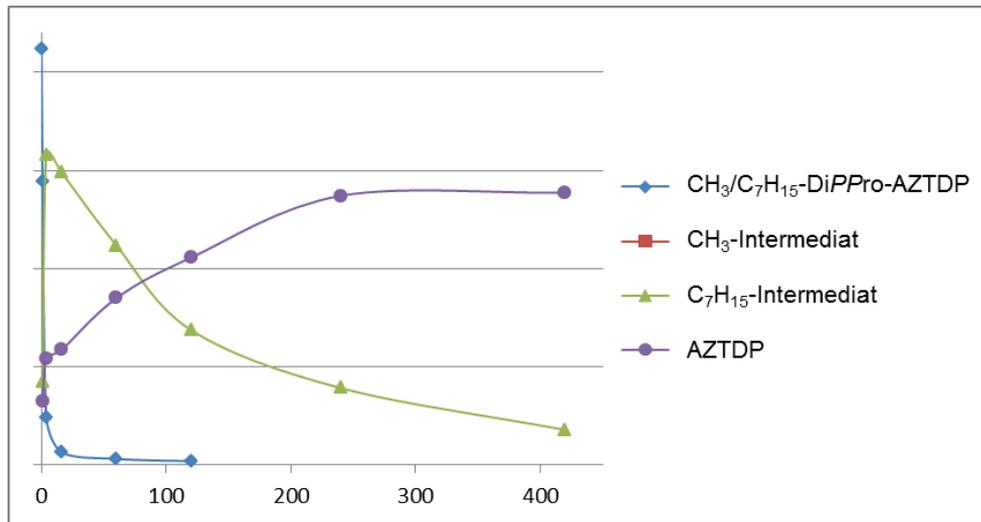


Abbildung 21: Verlauf der enzymatischen Hydrolyse von CH_3/C_7H_{15} -DiPPro-AZTDP **53a** in CEM/0-Zellextrakten.

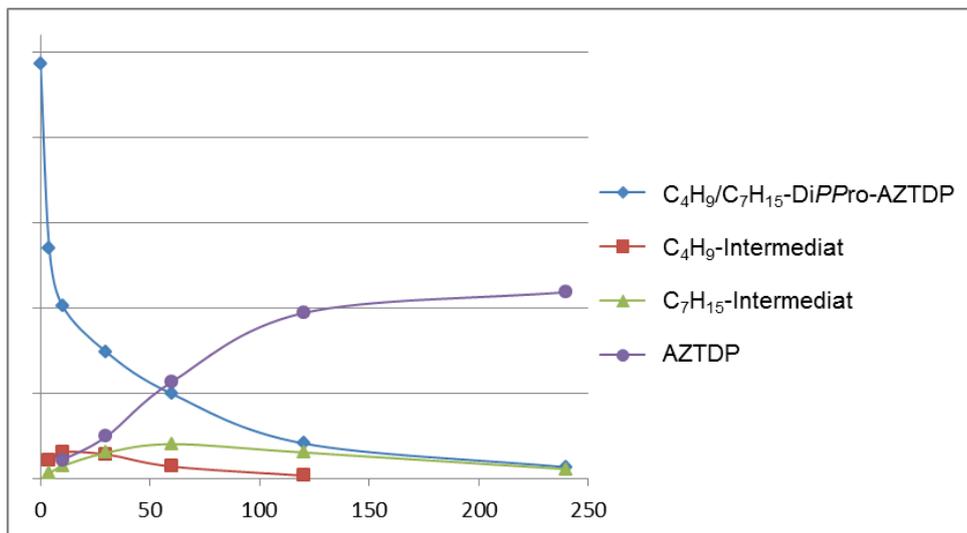


Abbildung 22: Verlauf der enzymatischen Hydrolyse von C_4H_9/C_7H_{15} -DiPPro-AZTDP **53f** in CEM/0-Zellextrakten.

Erwartungsgemäß differierten die Stabilitäten der gebildeten R^2 -Intermediate je nach ihrer Kettenlänge. Neben der Bestimmung der Halbwertszeiten für diese direkt aus der Hydrolyse

der zweifach-maskierten CH_3/R^2 - und $\text{C}_4\text{H}_9/\text{R}^2$ -Prodrugs **52** und **53**, wurde die Hydrolyse in CEM/0-Zellextrakten der drei synthetisierten R^2 -Intermediate **58-59** separat durchgeführt. Die Resultate sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Halbwertszeiten der R^2 -Intermediate in CEM/0-Zellextrakten.

Hydrolysestudie	R^2 -Intermediat	$t_{1/2}$ [min] in CEM/0	
		NDP = d4TDP	NDP = ATZDP
$t_{1/2}$ bestimmt durch Hydrolyse von CH_3/R^2 -DiPPro-NDP	C_7H_{15} -Intermediat 66a/b	99	99
	C_9H_{19} -Intermediat 58a/b	50	50
	$\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ -Intermediat 67a/b	69	63
	Ph- CF_3 -Intermediat 59a/b	690	230
	Ph- CH_3 -Intermediat 68a	870	-
$t_{1/2}$ bestimmt durch Hydrolyse von $\text{C}_4\text{H}_9/\text{R}^2$ -DiPPro-NDP	C_7H_{15} -Intermediat 66a/b	87	99
	C_9H_{19} -Intermediat 58a/b	99	170
	$\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ -Intermediat 67a/b	230	230
	Ph- CF_3 -Intermediat 59a/b	690	230
	Ph- CH_3 -Intermediat 68a	870	-
$t_{1/2}$ bestimmt durch Hydrolyse von R^2 -Intermediat	C_9H_{19} -Intermediat 58a/b	41	26
	Ph- CF_3 -Intermediat 59a	350	-

Die Halbwertszeiten waren in Abhängigkeit der Hydrolysestudie unterschiedlich. Demnach scheinen die Stabilitäten der Intermediate nicht nur von ihrer Kettenlänge sondern ebenfalls von den anderen Komponenten in der Hydrolyselösung abhängig zu sein. Besonders die aliphatischen R^2 -Intermediate **58** und **67**, die bei der Hydrolyse der $\text{C}_4\text{H}_9/\text{R}^2$ -DiPPro-Verbindungen **52** bzw. **53g-h** gebildet wurden, waren deutlich stabiler als diejenigen, die aus der Hydrolyse der CH_3/R^2 -DiPPro-Verbindungen **52** bzw. **53b-c** stammten. Der Grund hierfür war wahrscheinlich das simultane Auftreten zweier Intermediate, C_4H_9 -Intermediat **65** sowie R^2 -Intermediat **58** bzw. **67**. Die kürzeste Halbwertszeit wurde für die mit CEM/0-Zellextrakten hydrolysierten Intermediate bestimmt, die zuvor synthetisiert worden waren. Diese Beobachtung stützt die These, dass die Hydrolysehalbwertszeit abhängig von den Komponenten in der Hydrolyselösung ist.

Ogleich die Halbwertszeiten für die Abnahme des Prodrugs im Allgemeinen unabhängig vom Nucleosid waren, konnte überraschenderweise festgestellt werden, dass die Wahl des Nucleosids einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität des CF_3 -Ph-Intermediates **59** hatte. Das AZT-Intermediat **59b** wies deutlich geringere Stabilität auf als das korrespondierende d4T-Intermediat **59a**. Der wesentliche Unterschied zwischen den Nucleosiden d4T und AZT ist die Azidofunktion in 3'-Position beim AZT. Die Annahme liegt also nahe, dass die

Azidofunktion des AZTs **1** einen Effekt induziert, der einen destabilisierenden Einfluss auf die Trifluormethylbenzoyl-Einheit hat. Aber auch die Hydrolyse der isolierten C₉H₁₉-Intermediate **58** zeigte einen Einfluss des Nucleosids auf die Hydrolysegeschwindigkeit: das AZTDP-Intermediat **58b** wurde nahezu doppelt so schnell abgebaut, wie das d4TDP-Intermediat **58a**. Auch im Vergleich zu den übrigen R²-Intermediaten und vor allem im Vergleich zum C₇H₁₅-Intermediat **66** stellten sich die C₉H₁₉-Intermediate **58** außerdem als äußerst labil heraus. Es scheint also, als sei diese Maske mit der Kettenlänge R= C₉H₁₉ ein besonders gutes Substrat für das spaltende Enzym.

4.2.4.3 Hydrolysestudien in Schweineleberesterase (PLE)

Einige der DiPPro-Nucleotide wurden mit Schweineleberesterase (*pig liver esterase*, PLE) inkubiert, um das Hydrolyseverhalten mit dieser Esterase zu untersuchen. Es wurden die aliphatischen DiPPro-AZTDPs **53a-c** mit R¹= CH₃ sowie **53f-h** mit R¹= C₄H₉ ausgewählt, um den Einfluss der Kettenlänge auf die Spaltung der Estereinheit zu bestimmen. Darüber hinaus wurden CH₃/C₉H₁₉-DiPPro-d4TDP **52b** und C₄H₉/C₉H₁₉-DiPPro-d4TDP **52g** in PLE hydrolysiert, um den eventuellen Einfluss des Nucleosids auf die Spaltung festzustellen. Die Ergebnisse der Hydrolysen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Halbwertszeiten der DiPPro-Nucleotide in PLE.

Pronucleotid	t _{1/2} [min] von DiPPro-NDP	t _{1/2} [min] des R ¹ - Intermediats
CH ₃ /C ₇ H ₁₅ -DiPPro-AZTDP 53a	0.26	nm.*
CH ₃ /C ₉ H ₁₉ -DiPPro-AZTDP 53b	0.21	nm.*
CH ₃ /C ₁₁ H ₂₃ -DiPPro-AZTDP 53c	0.45	nm.*
CH ₃ /C ₉ H ₁₉ -DiPPro-d4TDP 52b	0.14	nm.*
C ₄ H ₉ /C ₇ H ₁₅ -DiPPro-AZTDP 53f	0.27	15
C ₄ H ₉ /C ₉ H ₁₉ -DiPPro-AZTDP 53g	0.27	19
C ₄ H ₉ /C ₁₁ H ₂₃ -DiPPro-AZTDP 53h	1.2	38
C ₄ H ₉ /C ₉ H ₁₉ -DiPPro-d4TDP 52g	0.19	28

*nm. nicht messbar

Die Halbwertszeiten der R¹/C₇H₁₅- und der R¹/C₉H₁₉-maskierten Pronucleotide **53a,b** und **52b** bzw. **53f,g** und **52g** lagen alle im selben Bereich, wobei der Einfluss des Nucleosids marginal war. Die DiPPro-d4TDPs **52b** und **g** waren nur geringfügig instabiler als die DiPPro-AZTDPs **53a,b** und **53f,g**. R¹/C₁₁H₂₃-DiPPro-AZTDP **53c** bzw. **h** verfügten über etwas höhere Stabilitäten als die Prodrugs mit kürzerer Kettenlänge, was mit den Ergebnissen der Hydrolyse im CEM/0-Zellextrakten übereinstimmt.

Bei der Hydrolyse aller CH_3/R^2 -DiPPro-NDPs **53a-c** und **52b** wurde lediglich das R^2 -Intermediat gebildet, aber bemerkenswerterweise in so geringem Maße, dass die Bestimmung der Halbwertszeit des R^2 -Intermediates nicht möglich war. Diese Pronucleotide hydrolysierten alle innerhalb nur weniger Minuten direkt zum Nucleosiddiphosphat. Die HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von **53b** in PLE zeigen dieses Verhalten exemplarisch (Abbildung 23).

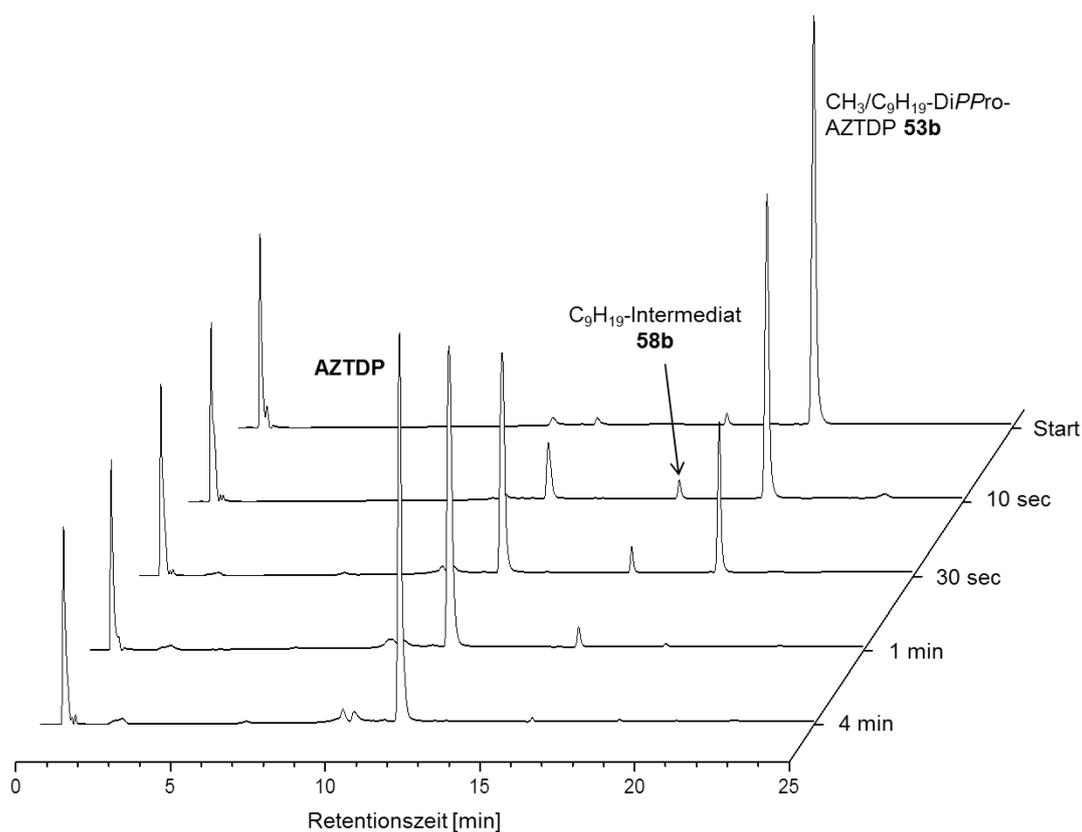


Abbildung 23: RP-18-HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von $\text{CH}_3/\text{C}_9\text{H}_{19}$ -DiPPro-AZTDP **53b** in PLE.

Im Gegensatz dazu lieferte die Inkubation von $\text{C}_4\text{H}_9/\text{R}^2$ -DiPPro-NDPs **53f-h** und **52g** in PLE zunächst große Mengen des C_4H_9 -Intermediates **65**, welches schließlich mit einer deutlich höheren Halbwertszeit das entsprechende Nucleosiddiphosphat als exklusives Hydrolyseprodukt freisetzte. Abbildung 24 zeigt die HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von $\text{C}_4\text{H}_9/\text{C}_9\text{H}_{19}$ -DiPPro-AZTDP **53g** in PLE.

Es scheint so, als sei die Struktur des Valerylesters ein schlechteres Substrat für die PLE als der Acetylester. Dieses Ergebnis ist nicht weiter verwunderlich. Allerdings scheint der Valerylesters auch ein schlechteres Substrat zu sein als die Esterfunktionen mit deutlich längeren Ketten.

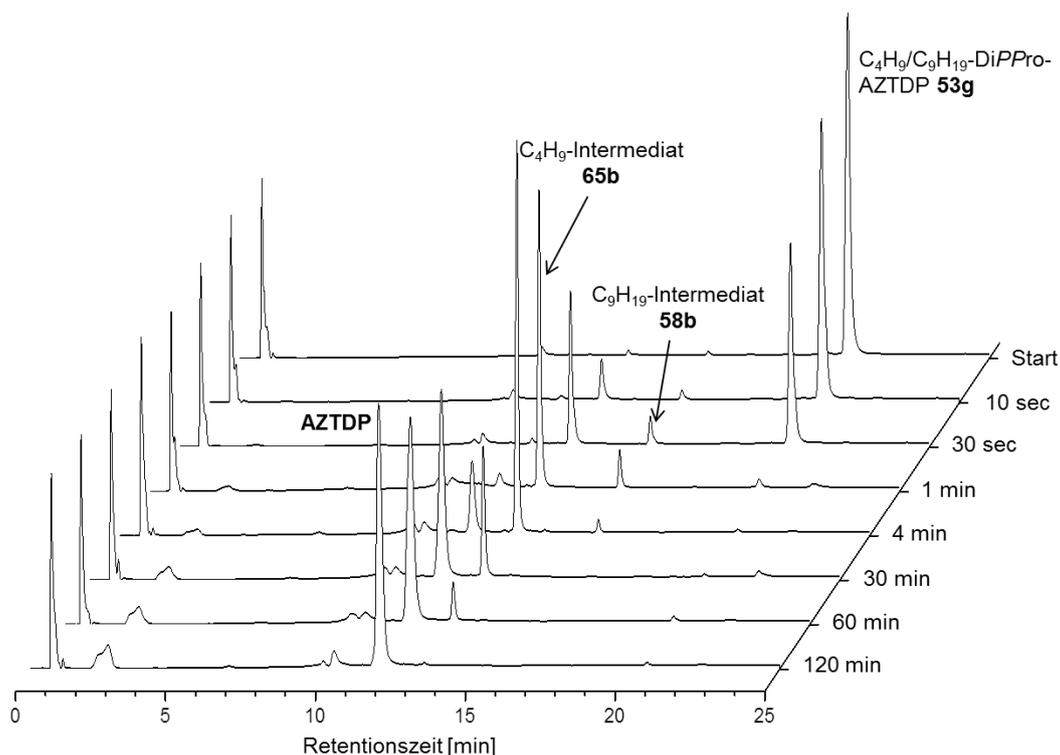


Abbildung 24: RP-18-HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von C_4H_9/C_9H_{19} -DiPPro-AZTDP **53g** in PLE.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen der Zellextrakthydrolyse. Dies legt die Vermutung nahe, dass nicht nur Esterasen, sondern darüber hinaus auch andere Enzyme, wie Lipasen, bei der Esterspaltung in den Zellextrakten involviert sind. Allerdings sollten diese Studien in PLE nur exemplarisch gesehen werden, da Schweineleberesterase und keine humane Esterase verwendet wurde. Die langsame Spaltung des Valerylesters kann ebenfalls auch nur durch die Substratspezifität der PLE begründet sein und somit in humaner Esterase nicht auftreten.

4.2.4.4 Hydrolysestudien in RPMI-Kulturmedium

Zur Prüfung einer Anwendbarkeit der dargestellten Pronucleotide als potentielle Prodrugs werden die Verbindungen in antiviralen Tests untersucht (siehe Kap.4.2.5). Die Zellen, die für diese Tests verwendet werden, werden in RPMI-Kulturmedium gezüchtet. Die Pronucleotide sollten, um aussagekräftige Ergebnisse erhalten zu können, unter den Testbedingungen stabil sein, sodass ausschließlich der Einfluss der in den infizierten Zellen enthaltenen Enzyme ausschlaggebend ist. Um die Stabilität unter den Testbedingungen annähernd zu verifizieren, wurden DiPPro-AZTDP **53b** und **53g** in RPMI-Kulturmedium inkubiert und die Stabilitäten bestimmt. Beide Verbindungen wiesen hohe Stabilitäten ($t_{1/2}$ = 19h für **53b** und $t_{1/2}$ = 77h für **53g**) verglichen mit denen in CEM/0-Zellextrakten auf. Das RPMI-Kulturmedium scheint also keinen Einfluss auf die Erhebung der antiviralen Aktivität zu haben. Um jeglichen Einfluss der Testbedingungen auf die Ergebnisse der antiviralen Tests auszuschließen,

müsste darüberhinaus die Stabilität der Pronucleotide in RPMI-Kulturmedium, dem 10% fötales Kälberserum (FCS) zugesetzt ist, bestimmt werden.

4.2.4.5 Vergleich der Hydrolysestudien von asymmetrischen und symmetrischen DiPPro-Nucleotiden

Schließlich sollten die neuen asymmetrischen DiPPro-Nucleotide mit den bereits bekannten symmetrischen verglichen werden. Daher wurden, wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, die symmetrischen DiPPro-AZTDPs mit R= C₄H₉ (**61a**), R= C₆H₁₃ (**61b**), R= C₉H₁₉ (**61c**) und R= C₁₁H₂₃ (**61d**) synthetisiert und sowohl in Phosphatpuffer als auch in CEM/0-Zellextrakten untersucht. Wie bereits auf den Seiten 54-55 besprochen, war das Verhältnis von gebildetem AZTDP **16** zu AZTMP **9** deutlich höher bei der Hydrolyse in PBS der asymmetrischen Verbindungen als bei der Hydrolyse der symmetrischen. Deutlich interessanter war aber der Vergleich der Verbindungen bei der enzymatischen Hydrolyse in den Zellextrakten. Unter diesen Bedingungen war das Verhältnis von AZTDP/AZTMP zwar für C₄H₉-DiPPro-AZTDP **61a** und C₆H₁₃-DiPPro-AZTDP **61b** noch recht hoch, jedoch verschob sich der Wert mit zunehmender Kettenlänge für C₉H₁₉-DiPPro-AZTDP **61c** und C₁₁H₂₃-DiPPro-AZTDP **61d** deutlich zu Ungunsten des AZTDPs. Im Gegensatz dazu wurde durch die Zellextrakthydrolyse der asymmetrischen DiPPro-Verbindungen selektiv das Nucleosiddiphosphat gebildet. Wie auf den Seiten 59-60 erläutert, wurden die Verhältnisse von Nucleosidmono- und -diphosphat durch HILIC-HPL-Chromatographie bestimmt. Abbildung 25 zeigt die HILIC-HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von CH₃/C₉H₁₉-DiPPro-AZTDP **53b**, C₉H₁₉-DiPPro-AZTDP **53g** und AZTDP **16** nach zehnstündiger Inkubation. Die Unterschiede der NDP/NMP-Verhältnisse der beiden Prodrugs **53b** und **61b** waren signifikant. Die Verhältnisse von AZTDP **16** zu AZTMP **9**, bestimmt aus den Integralflächen der jeweiligen Peaks, waren folgende: CH₃/C₉H₁₉-DiPPro-AZTDP **53b**: 5:1 und C₉H₁₉-DiPPro-AZTDP **61b**: 1.5:1. Für die Hydrolyse von AZTDP **16** in Zellextrakten wurde ein Verhältnis für AZTDP **16** zu AZTMP **9** von 3:1 bestimmt. Dass im Verhältnis deutlich mehr AZTDP **16** bei der Hydrolyse des asymmetrischen Pronucleotids **53b** als Hydrolyseprodukt gebildet wird, deutet darauf hin, dass das maskierte AZTDP **53b** kein Substrat für die NMP-bildenden Phosphatasen ist. Die Bildung von AZTMP **9** fand erst nach Spaltung der Maskierungseinheiten statt, weshalb der Anteil an AZTDP **16** nach zehnstündiger Inkubation mit CEM/0-Zellextrakten entsprechend höher ist als für die Hydrolyse von AZTDP **16**, bei der von Beginn an die NMP-bildende Spaltung durch die Phosphatasen zum Tragen kommt.

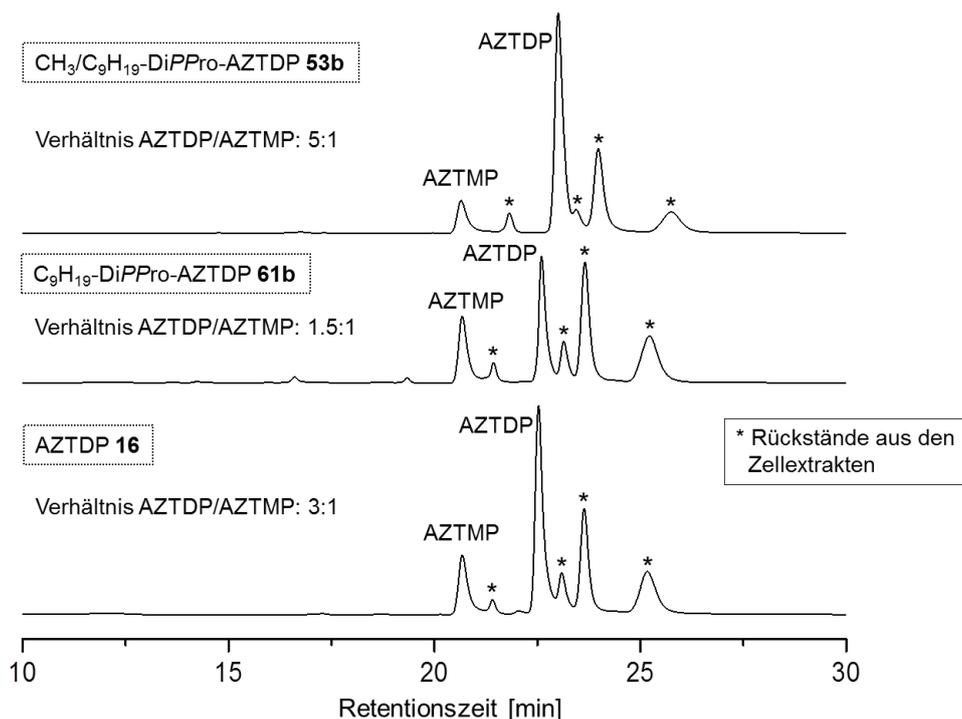


Abbildung 25: HILIC-HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von $\text{CH}_3/\text{C}_9\text{H}_{19}\text{-DiPPro-AZTDP 53b}$ (oben), $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{-DiPPro-AZTDP 61b}$ (mitte) und AZTDP 16 (unten) in CEM/0-Zellextrakten nach zehnstündiger Inkubation.

Darüber hinaus zeigt der Vergleich der Chromatogramme der Hydrolyse von $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{-DiPPro-AZTDP 61b}$ mit der Hydrolyse von AZTDP 16 , dass die Menge des gebildeten AZTMPs **9** kein Produkt der Dephosphorylierung von AZTDP 16 sein kann, wie im Fall von $\text{CH}_3/\text{C}_9\text{H}_{19}\text{-DiPPro-AZTDP 53b}$.

Die Annahme, dass durch den Einsatz zweier unterschiedlicher Maskierungseinheiten, einer labilen Maske und einer lipophilen Maske, der Spaltungsmechanismus vor allem in den Zellextrakten zu Gunsten einer exklusiven Bildung von Nucleosiddiphosphat verändert werden kann, konnte somit erfolgreich bestätigt werden.

4.2.5 Antivirale Aktivitäten der asymmetrischen DiPPro-Nucleotide

Alle DiPPro-Verbindungen wurden bezüglich ihrer anti-HIV Aktivität in HIV-1 und HIV-2 infizierten Wildtyp-CEM-Zellen (CEM/0) und in HIV-2 infizierten mutanten Thymidinkinase-defizienten CEM/TK⁻-Zellen untersucht. Tabelle 9 fasst die antiviralen und die zytotoxischen Daten der potentiellen Prodrugs **52** und **53** sowie der Nucleosidanaloga d4T **3** bzw. AZT **1** als Referenzverbindungen zusammen.

Tabelle 9: Antivirale Daten der DiPPro-Nucleotide **52**, **53**, **58a** und **61**.

Pronucleotid	EC ₅₀ ^{a)} [μM]			CC ₅₀ ^{b)} [μM]
	CEM	CEM	CEM/TK ^{c)}	CEM/0
	HIV-1 (HE)	HIV-2 (ROD)	HIV-2 (ROD)	
CH ₃ /C ₇ H ₁₅ -DiPPro-d4TDP 52a	0.33 ± 0.11	1.05 ± 0.30	6.31 ± 0.00	33 ± 27
CH ₃ /C ₉ H ₁₉ -DiPPro-d4TDP 52b	0.33 ± 0.11	1.36 ± 0.13	2.32 ± 1.16	15 ± 1
CH ₃ /C ₁₁ H ₂₃ -DiPPro-d4TDP 52c	0.29 ± 0.16	0.28 ± 0.04	1.77 ± 0.33	26 ± 0
CH ₃ /CF ₃ -Ph-DiPPro-d4TDP 52d	0.72 ± 0.16	1.38 ± 0.16	> 10	51 ± 15
CH ₃ /CH ₃ -Ph-DiPPro-d4TDP 52e	0.29 ± 0.57	1.47 ± 0.29	10 ± 0.00	11 ± 6
C ₄ H ₉ /C ₇ H ₁₅ -DiPPro-d4TDP 52f	0.33 ± 0.11	1.47 ± 0.29	6.31 ± 0.00	66 ± 15
C ₄ H ₉ /C ₉ H ₁₉ -DiPPro-d4TDP 52g	0.36 ± 0.046	1.17 ± 0.40	0.83 ± 0.00	20 ± 1
C ₄ H ₉ /C ₁₁ H ₂₃ -DiPPro-d4TDP 52h	0.10 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.13 ± 0.07	30 ± 17
C ₄ H ₉ /CF ₃ -Ph-DiPPro-d4TDP 52i	0.40 ± 0.00	0.72 ± 0.16	>10	37 ± 31
C ₄ H ₉ /CH ₃ -Ph-DiPPro-d4TDP 52j	0.3 ± 0.014	1.45 ± 0.00	10 ± 0.00	14 ± 1
C ₉ H ₁₉ -Intermediat-d4TDP 58a	0.5 ± 0.1	1.36 ± 0.13	>10	20 ± 1
CH ₃ /C ₇ H ₁₅ -DiPPro-AZTDP 53a	0.042 ± 0.008	0.16 ± 0.08	>10	29 ± 3
CH ₃ /C ₉ H ₁₉ -DiPPro-AZTDP 53b	0.016 ± 0.0	0.14 ± 0.08	>10	20 ± 9
CH ₃ /C ₁₁ H ₂₃ -DiPPro-AZTDP 53c	0.042 ± 0.008	0.08 ± 0.00	10 ± 2.61	18 ± 3
CH ₃ /CF ₃ -Ph-DiPPro-AZTDP 53d	0.012 ± 0.007	0.06 ± 0.03	>10	100 ± 8
C ₄ H ₉ /C ₇ H ₁₅ -DiPPro-AZTDP 53f	0.036 ± 0.0	0.07 ± 0.01	>10	73 ± 12
C ₄ H ₉ /C ₉ H ₁₉ -DiPPro-AZTDP 53g	0.034 ± 0.018	0.29 ± 0.18	10 ± 0.00	41 ± 23
C ₄ H ₉ /C ₁₁ H ₂₃ -DiPPro-AZTDP 53h	0.013 ± 0.005	0.06 ± 0.02	8.16 ± 2.61	36 ± 28
C ₄ H ₉ /CF ₃ -Ph-DiPPro-AZTDP 53i	0.036 ± 0.0	0.06 ± 0.02	>10	58 ± 54
C ₄ H ₉ -DiPPro-AZTDP 61a	0.011 ± 0.0018	0.054 ± 0.01	>10	60 ± 7
C ₆ H ₁₃ -DiPPro-AZTDP 61b	0.016 ± 0.0	0.058 ± 0.03	3.1 ± 1.5	47 ± 8
C ₉ H ₁₉ -DiPPro-AZTDP 61c	0.026 ± 0.014	0.23 ± 0.15	0.79 ± 0.28	38 ± 10
C ₁₁ H ₂₃ -DiPPro-AZTDP 61d	0.33 ± 0.11	0.65 ± 0.35	>10	≥ 250
C ₄ H ₉ -DiPPro-d4TDP ⁵⁰	2.0 ± 1.8	2.9 ± 2.8	15 ± 7.1	80 ± 0.71
C ₆ H ₁₃ -DiPPro-d4TDP ⁵⁰	0.47 ± 0.28	1.1 ± 0.14	1.2 ± 0.28	85 ± 2.1
C ₉ H ₁₉ -DiPPro-d4TDP ⁵⁰	0.080 ± 0.042	0.32 ± 0.12	0.11 ± 0.042	62 ± 6.4
C ₁₁ H ₂₃ -DiPPro-d4TDP ⁵⁰	0.16 ± 0.042	0.35 ± 0.078	0.23 ± 0.064	39 ± 0.71
d4T 3	0.52 ± 0.32	2.23 ± 1.51	150 ± 9	79 ± 3
AZT 1	0.044 ± 0.01	0.49 ± 0.57	>250	>250

a) 50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; b) 50% zytostatische Konzentration

Die d4T Derivate **52** mit aliphatischen Esterfunktionen der Maskierungseinheiten (**a-c, f-g**) waren in der Lage, den durch HIV-1 und HIV-2 induzierten zytopathogenen Effekt mit der gleichen Konzentration in den Wildtyp-CEM-Zellen zu hemmen wie d4T **3**. In einigen Fällen, war der inhibitorische Effekt sogar stärker als für das Nucleosid. Darüber hinaus war die

antivirale Aktivität der lipophilen Verbindungen **52c,g** und **h** auch in den mutanten Thymidinkinase-defizienten CEM-Zellen (TK⁻) hoch. Dabei nahm die Aktivität mit Steigerung der Lipophilie der Pronucleotide zu. Enttäuschenderweise war die Aktivität gegen HIV der DiPPro-d4TDPs **52** mit aromatischen Esterfunktionen in der Maskierungseinheit (**d,e** und **i,j**) im Vergleich zu d4T **3** niedriger. Darüber hinaus ging die antivirale Aktivität dieser Verbindungen in TK-defizienten CEM-Zellen mehr oder weniger verloren.

Im Gegensatz zu den maskierten d4TDP-Verbindungen **52** zeigten die AZT-Derivate **53** zwar ebenfalls sehr hohe Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 in den Wildtyp-CEM-Zellen. Geringe Konzentrationen der DiPPro-AZTDP-Verbindungen **53** reichten aus, um den zytopathogenen Effekt des Virus zu hemmen. Jedoch ging diese Aktivität in den mutanten Thymidinkinase-defizienten CEM-Zellen sogar im Fall der lipophilen Verbindungen **53c** und **g** verloren. Lediglich C₄H₉/C₁₁H₂₃-AZTDP **53h** zeigte noch geringe Aktivität in den mutanten Zellen. Interessanterweise wurden für die symmetrischen Verbindungen **61b** und **c** die höchsten Aktivitäten in der mutanten Zelllinie gemessen, obwohl die Hydrolysestudien zeigten, dass deutlich weniger AZTDP **16** aus ihnen freigesetzt wird.

Erwartungsgemäß sollte die Lipophilie der Pronucleotide CH₃/C₁₁H₂₃- **53c**, C₄H₉/C₇H₁₅- **53f** sowie C₄H₉/C₉H₁₉-DiPPro-AZTDP **53g** ungefähr im selben Bereich liegen, wie die von C₆H₁₃-DiPPro-AZTDP **61b**. Näherungsweise konnte dies durch Vergleich der Retentionszeiten aus den HPL-Chromatogrammen bestätigt werden. Darüber hinaus wurde für C₄H₉/C₁₁H₂₃-DiPPro-AZTDP **53h** sogar eine höhere Retentionszeit ermittelt als für **61b**; **53h** scheint also, wie vermutet, lipophiler zu sein als **61b**. Die höhere Aktivität der symmetrischen Pronucleotide **61b** und **c** bzw. der Verlust der Aktivität der Pronucleotide **53c, f-h** in der TK-defizienten Zelllinie ist daher ausgesprochen überraschend.

Ebenfalls recht überraschend ist der Verlust der antiviralen Aktivitäten in TK⁻-Zellen der asymmetrischen AZTDP-Prodrugs **53** im Vergleich zu den deutlich höheren Aktivitäten der d4TDP-Prodrugs **52**. AZT **1** ist lipophiler als d4T **3**. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Permeation der Zellmembran durch die DiPPro-AZTDPs **53c, f-h** ungenügend war. Auszuschließen ist es jedoch ohne entsprechende Zellaufnahmestudien nicht.

Die antivirale Aktivität in mutanten TK-defizienten Zellen dient der Überprüfung, ob eine phosphorylierte Spezies des Nucleosidanalogon von der Zelle aufgenommen und schließlich im Zellinnern freigesetzt wird. Ist dies der Fall, sollte die gemessene Aktivität gleich der Aktivität in der Wildtyp-Zelllinie sein, da die Phosphorylierung durch das fehlende Enzym Thymidinkinase nicht notwendig ist. Ob es sich bei der phosphorylierten Spezies um das Nucleosidmono- oder das -diphosphat handelt, kann aus diesem Experiment nicht bestimmt werden. Da die Hydrolysestudien aber deutlich die Bildung der Nucleosiddiphosphate **16** und

21 belegen, kann vermutet werden, dass die Diphosphate freigesetzt werden, die schließlich zum Nucleosidtriphosphat phosphoryliert werden.

Die Hydrolysestudien zeigten, dass alle DiPPro-Verbindungen, die einen Methylrest in der Acyleinheit tragen, sehr schnell hydrolysiert werden. Verfügten diese Pronucleotide über unzureichende Lipophilie, würden sie außerhalb der Zelle zum Nucleosiddiphosphat hydrolysiert, welches schließlich durch Dephosphorylierung extrazellulär das Nucleosid freisetzt. Dies würde durch Aufnahme in die Zellen schließlich ebenfalls antivirale Aktivität in den Wildtyp-Zellen hervorrufen, jedoch nicht in den TK-defizienten Zellen. Gleiches gilt allerdings auch für DiPPro-Nucleotide, die nicht wie gewünscht das NDP sondern das NMP freisetzen, das ebenfalls durch Phosphatasen zum Nucleosid abgebaut würde. Die Konsequenz wäre, dass alle Pronucleotide, die über ausreichend Lipophilie verfügen, um die Zellmembran zu durchdringen, Aktivität in den mutanten Zellen zeigen. All jene hingegen, deren Lipophilie nicht ausreichend ist oder die zu instabil sind um als intakte Pronucleotide in die Zelle zu gelangen, würden keine Aktivität in diesen Zellen aufweisen.

Es ist allgemein anerkannt, dass die Phosphorylierung von AZTMP **9** durch Kinasen unzureichend verläuft.^{30,31} Dennoch könnte ein weiterer Grund für die geringe antivirale Aktivität die gehemmte Phosphorylierung von AZTDP **16** zu AZTTP **15** sein. DEVILLE-BONNE konnte in Aktivitätsstudien des Enzyms Nucleosiddiphosphatkinase (NDPK), das generell bei der Phosphorylierung von Nucleosiddiphosphaten in ihre Triphosphate involviert ist, zeigen, dass neben diesem *bottle-neck* des Metabolismus von AZT **1** auch die weitere Phosphorylierung zum NTP ineffizient verläuft.³⁷ Die Hydrolysestudien in CEM-Zellextrakten belegen, dass das Nucleosiddiphosphat als einziges Produkt aus der Spaltung der Prodrugs gebildet wird. Somit sollte es ebenfalls innerhalb der Zelle nach Diffusion durch die Zellmembran, aus dem Prodrug gebildet werden.

Die Ergebnisse dieser anti-HIV Tests legen die Vermutung nahe, dass die Phosphorylierung von AZTDP **16** zu AZTTP **15** gehemmt verläuft, was mit den Ergebnissen der Aktivitätsstudien der NDPK übereinstimmt.³⁷ Ist dies der Fall, bleibt die Frage, warum die Prodrugs in mutanten Zellen ihre antivirale Aktivität verlieren, obgleich die Phosphorylierung von AZTDP **16** zu AZTTP **15** unabhängig von dem Vorhandensein der Thymidinkinase sein sollte. Es wäre denkbar, dass eine Erhöhung der AZTDP-Konzentration negative Auswirkungen auf die beteiligten Enzyme hat, also beispielsweise die NDPK oder auch die DNA-Polymerase hemmt. Für AZTMP sind Auswirkungen solcher Art bereits hinreichend bekannt.³⁴⁻³⁶ Warum dieses Phänomen allerdings nicht in den Wildtyp-Zellen auftritt, ist verwunderlich.

Im Vergleich zu den Nucleosiden weisen die Pronucleotide **52** und **53** teilweise höhere Zytotoxizitäten auf. Der Grund hierfür ist bislang unklar. Eine Zunahme der Zytotoxizität wurde häufig auch bei anderen Prodrug-Konzepten mit Steigerung der antiviralen Aktivität beobachtet. Es wäre durchaus möglich, dass sich die Erhöhung der Nucleotid- bzw. in unserem Fall der Nucleosiddiphosphat-Konzentration negativ auf die Polymerase-Aktivität oder auf andere intrazelluläre Stoffwechselforgänge auswirkt. Dass das bei der Hydrolyse der DiPPro-Verbindungen intermediär auftretende *p*-Chinonmethid **22**, welches recht schnell zum 4-Hydroxybenzylalkohol **30** hydrolysiert wird, ein Grund für die Erhöhung der CC₅₀-Werte ist, ist allerdings ebenfalls nicht auszuschließen. Zur Klärung der Frage, ob die Hydrolyse der Maskierungseinheit der Grund für die gesteigerte Zytotoxizität ist, wären weitere Experimente notwendig. Beispielsweise könnte das Messen der Zytotoxizität eines DiPPro-Thymidindiphosphats über einen Anteil der Maskierung an der Zytotoxizität Aufschluss geben.

Die Maskierung von Nucleosiddiphosphaten mittels zweier unterschiedlicher Maskierungseinheiten mit unterschiedlichen Stabilitäten bzw. Lipophilie führte, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, zur exklusiven Freisetzung von Nucleosiddiphosphaten. Durch diese Weiterentwicklung des DiPPro-Systems ist es gelungen, die antivirale Aktivität der Verbindungen **52** und **53** gegenüber dem jeweiligen Nucleosid beizubehalten und in vielen Fällen sogar zu steigern. Die antivirale Aktivität der d4T-Verbindungen **52** blieb sogar in den mutanten TK-defizienten Zellen meist erhalten. Die ermittelten antiviralen Daten deuten darauf hin, dass eine weitere Steigerung der Lipophilie sinnvoll wäre, beispielsweise in Form eines C₄H₉/C₁₃H₂₇- oder C₄H₉/C₁₅H₃₁-DiPPro-NDPs.

4.3 Maskierung eines NDP-Zuckers, bzw. Einbindung anderer Naturstoffklassen in das asymmetrische Prodrugkonzept

Die Syntheseroute zur Darstellung asymmetrischer Phosphoramidite, die in Kapitel 4.2.1 vorgestellt wurde, erlaubt die Anwendung einer Vielzahl von Verbindungen, die über ein Sauerstoffatom mit dem Phosphoratom verknüpft werden. Von besonderem Interesse war die Verknüpfung mit einem Kohlenhydrat (besonders D-Mannose), um die in Abbildung 26 gezeigte Verbindung **69** zu erhalten.

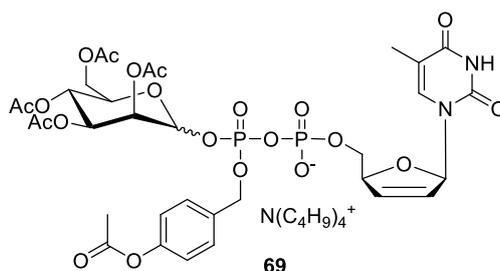


Abbildung 26: CH₃/2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-Mannose-DiPPro-d4TDP **69**.

In Kapitel 2.1 ist der strukturelle Aufbau eines HI-Virions beschrieben. Dieser präsentiert auf seiner Membranoberfläche das Glycoprotein 120 (gp120), ein Protein, das Ketten von verknüpften Kohlenhydrateinheiten trägt. Etwa die Hälfte der Kohlenhydrate auf dem gp120 ist terminal mannosyliert.⁹¹ Die Bindung des gp120 an die CD4-Rezeptoren der Wirtszelle unter Einfluss von Chemokinrezeptoren spielt eine zentrale Rolle bei der Replikation des HI-Virus, da hierdurch die Verschmelzung des Viruspartikels mit der Wirtszelle von CD4⁺-Zellen erfolgt.⁹² Daneben konnte in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen werden, dass auch Zellen die den CD4-Rezeptor nicht exprimieren durch HIV-1 infiziert werden können. Hier dient dann das Glycolipid GalCer als HIV-1-Rezeptor.⁹³ Darüber hinaus konnte bei CD4⁺-Makrophagen der Mannoserezeptor (MMR) als Rezeptor für das gp120 des HIV-1 identifiziert werden.⁹⁴ Interessanterweise führt der auf diese Art induzierte Eintritt des Virions nicht zur Replikation des Virus.⁹⁵

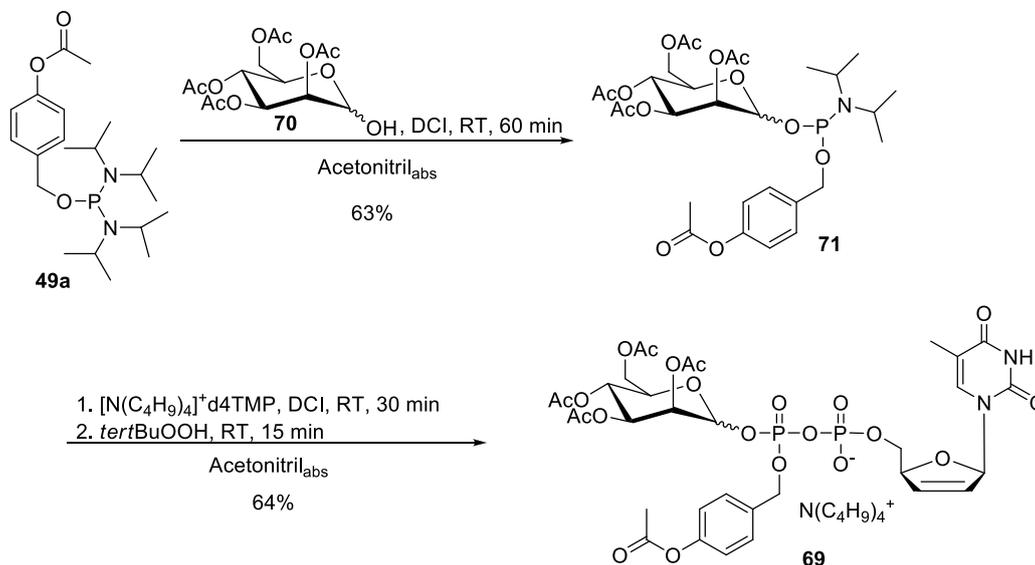
Der Mannoserezeptor scheint also eine wichtige Rolle bei der HIV-Infektion zu spielen. Es wäre daher interessant, diesen als Target anzusprechen. Es ist denkbar, dass die maskierten NRTIs selektiver in die mit HIV infizierten Zellen gelangen, wenn die Prodrug-Einheit nicht nur als Maskierung, sondern ebenfalls als Erkennungsmerkmal diene. VIERLING ET AL. haben daher Mannose-verknüpfte Prodrugs von HIV-Protease-Inhibitoren publiziert, zur Penetration von HIV-infizierten Makrophagen.⁹⁶ Und auch Nucleotide von NRTIs, die mit Kohlenhydraten (Mannose^{97,98} und Glucose⁹⁹) verestert sind, wurden als potentielle Prodrugs untersucht.

Neben einem potentiellen Prodrug, das mit dem Mannoserezeptor in Wechselwirkung treten könnte, handelt es sich bei der in Abbildung 26 gezeigten Verbindung um einen maskierten NDP-Zucker. NDP-Zucker dienen den *LeIoir*-Glycosyltransferasen als aktivierte Zucker, deren Glycosyleinheit unter Abspaltung des Nucleosiddiphosphates auf eine wachsende Oligosaccharidkette oder ein anderes Biomolekül als Aglycon transferiert wird.^{100,101}

4.3.1 Synthese von Acyloxbenzyl-maskiertem D-Mannose-d4TDP **69**

Die Synthese des D-Mannose-verknüpften acyloxbenzyl-maskierten d4TDPs **69** erfolgte analog der in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Syntheseroute zur Darstellung von

asymmetrischen Di*PP*ro-Nucleotiden **52** und **53** (Schema 26). Anstelle des Benzoates **40** wurde in der DCI-vermittelten Reaktion von Bis(diisopropylamino)phosphoramidit **49a** entsprechend 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-Mannopyranose **70** eingesetzt. Die Reaktion lieferte nach chromatographischer Reinigung das Produkt **71** mit einer Ausbeute von 63%.



Schema 26: Darstellung von $CH_3/2,3,4,6$ -Tetra-*O*-acetyl-D-Mannose-Di*PP*ro-d4TDP **69**.

Die Kupplung zum Zielmolekül **69** konnte erfolgreich durchgeführt werden. Das Tetrabutylammonium-Salz von **69** konnte bereits nach einmaliger Reinigung durch automatisierte Flash Chromatographie rein in einer Ausbeute von 64% erhalten werden, weshalb auf den Ionenaustausch gegen Ammoniumionen verzichtet wurde. Als Grund für die unproblematische chromatographische Reinigung wurde angenommen, dass sich die höhere Polarität der kohlenhydrathaltigen Verbindung positiv auf die Trennung von Produkt und Phosphoramidat ausgewirkt hat. Das α/β -Verhältnis konnte aufgrund der Überlagerung der Signale in den NMR-Spektren – es werden vier Diastereomere gebildet – leider nicht ermittelt werden.

4.3.2 Hydrolysestudien von Acyloxbenzyl-maskiertem D-Mannose-d4TDP **69**

Das erhaltene $CH_3/2,3,4,6$ -Tetra-*O*-acetyl-D-Mannose-Di*PP*ro-d4TDP **69** wurde analog der anderen asymmetrischen Di*PP*ro-Verbindungen sowohl im Phosphatpuffer (PBS) als auch in CEM/0-Zell-extrakten bezüglich des Hydrolyseverhaltens untersucht.

Die Hydrolysehalbwertszeit in PBS, bezogen auf die Abnahme des Prodrugs **69** betrug 11 Stunden. Die Stabilität entspricht folglich der des symmetrisches CH_3 -Di*PP*ro-d4TDP ($t_{1/2} =$

10 h).^{48,49} Abbildung 25 zeigt einige HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von **69** in Phosphatpuffer.

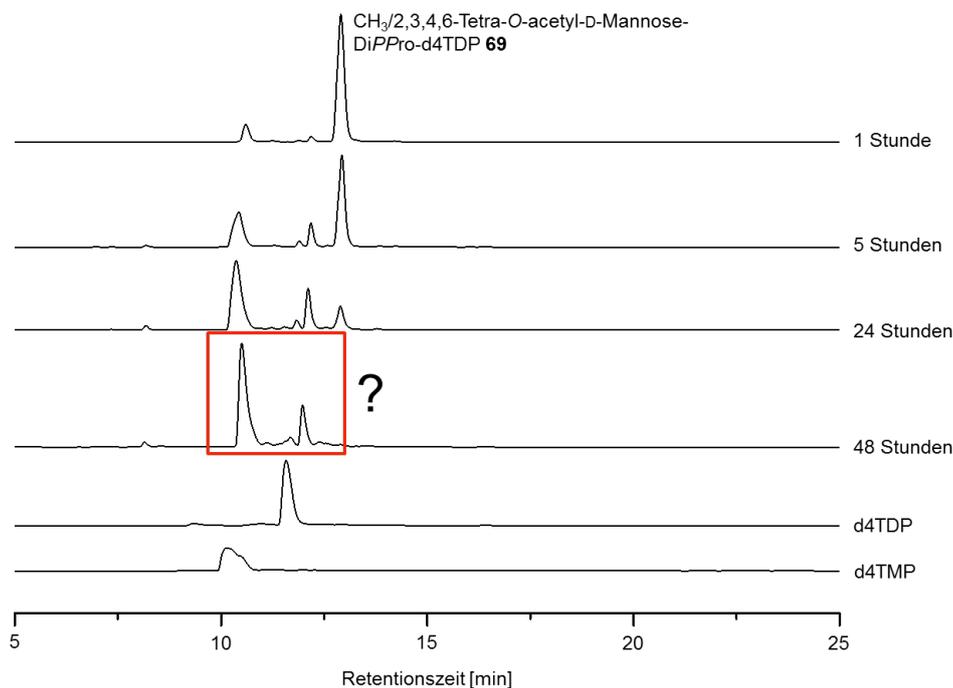
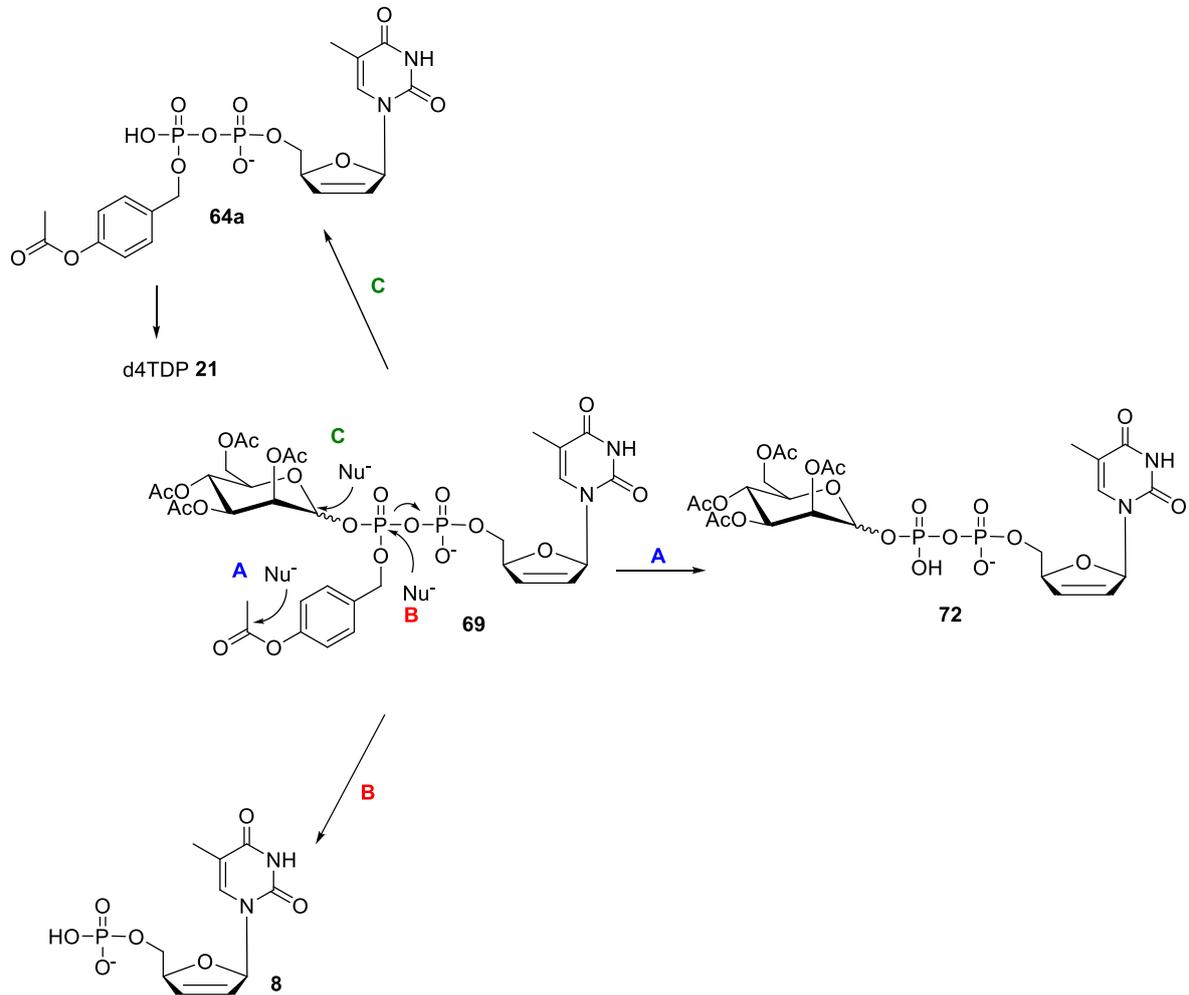


Abbildung 27: RP-18-HPL-Chromatogramme der Hydrolyse von $\text{CH}_3/2,3,4,6\text{-Tetra-O-acetyl-D-Mannose-DiPPro-d4TDP}$ **69** in PBS.

Die Co-Injektion von d4TMP **8** und d4TDP **21** zeigte, dass entgegen der Spaltung der Maskierungseinheit und somit der gewünschten Freisetzung von d4TDP-2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-Mannose **72** scheinbar zwei alternative Spaltungen aufgetreten sind: zum einen ein nucleophiler Angriff auf das β -Phosphat, der zum mehrfach beschriebenen Bruch der Phosphatbrücke und somit zur Bildung von d4TMP **8** führt, welches in deutlichem Überschuss gebildet wurde (Weg B, Schema 27). Zum anderen ein nucleophiler Angriff auf das anomere Zentrum der Mannose **70**, der vor oder nach Spaltung der Acetylgruppe an der Maskierungseinheit erfolgen konnte und demnach das CH_3 -Intermediat **64a** oder d4TDP **21** freisetzt (Weg C, Schema 27). Der Bruch der Phosphatbrücke erfolgte überaus schnell. Als Grund hierfür kann angenommen werden, dass die Nucleophilie des β -Phosphates durch die Substitution mit dem Zucker im Vergleich zu den zuvor beschriebenen DiPPro-Nucleotiden steigt. Die Co-Injektion von d4TMP **8** bzw. d4TDP **21** konnte allerdings nicht vollständig belegen, ob tatsächlich d4TMP **8** und d4TDP **21** als Hauptprodukte aus der Hydrolyse hervorgingen. Es wäre durchaus möglich – wenn auch unwahrscheinlich, dass d4TDP-2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-Mannose **72** bei gleicher Retentionszeit eluiert, wie d4TMP **8** oder d4TDP **21**. Um zu prüfen, ob d4TDP-2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-Mannose **72** bei der Hydrolyse gebildet wurde, wurde die Hydrolyselösung nach vollständigem Abbau der

Ausgangsverbindung **69** durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen (Electron Spray Ionisation).



Schema 27: Mögliche Reaktionswege der chemischen Hydrolyse von $\text{CH}_3/2,3,4,6\text{-Tetra-O-acetyl-D-Mannose-DiPPro-d4TDP}$ **69**

Die mehrmalige Durchführung führte jedoch nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Scheinbar verhinderte die hohe Salzkonzentration im Rückstand die erfolgreiche Messung der Proben, sodass weder d4TDP-2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-Mannose **72** noch d4TMP **8** oder d4TDP **21** detektiert werden konnten. Die Durchführung von RP-HPLC-MS, bei der die gleiche Methode angewendet werden könnte, wie die HPLC-Methode, die zur Aufnahme der HPL-Chromatogramme in Abbildung 25 diente, könnte gewinnbringende Informationen liefern. Die Durchführung war aber zu diesem Zeitpunkt instrumentell nicht möglich.

$\text{CH}_3/2,3,4,6\text{-Tetra-O-acetyl-D-Mannose-DiPPro-d4TDP}$ **69** wurde außerdem in CEM/0-Zellextrakten inkubiert, um das Hydrolyseverhalten der Verbindung in Anwesenheit von Enzymen zu prüfen. Während des Hydrolyseverlaufs – die Halbwertszeit für die Abnahme von **69** betrug 3.2 min – wurde eine Vielzahl nucleosidischer Produkte gebildet, die nicht

eindeutig zugewiesen werden konnten. Dies ist nicht ungewöhnlich, handelt es sich bei ihnen wohl um Derivate der möglichen zuckerhaltigen Verbindungen, die unterschiedlich viele Acetylgruppen tragen, bzw. an unterschiedlicher Position acetyliert sind. Die aufgenommenen HPL-Chromatogramme erwiesen sich daher leider als unbrauchbar, um eine qualitative Aussage über die entstandenen Produkte zu treffen. Auch in diesem Fall brachte die massenspektrometrische Analyse keine weiteren Aufschlüsse.

Nach den unzufrieden stellenden Ergebnissen der Hydrolysestudien wurden zunächst einmal die Tests der antiviralen Aktivität der Verbindung **69** erwartet, um über das weitere Vorgehen zu entscheiden.

Die antivirale Aktivität und die gemessene Zytotoxizität sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Tabelle 10: Antivirale Daten von CH₃/2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-d-Mannose-DiPPro-d4TDP **69**.

	EC ₅₀ ^{a)} [μM]			CC ₅₀ ^{b)} [μM]
	CEM	CEM	CEM/TK ^{c)}	CEM/0
	HIV-1 (HE)	HIV-2 (ROD)	HIV-2 (ROD)	
CH ₃ /2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-Mannose-DiPPro-d4TDP 69	0.40	1.67	>10	14 ± 7
d4T 3	0.4	1.45	>10	

a) 50% effektive Konzentration zur Unterdrückung der Virusreplikation; b) 50% zytostatische Konzentration

Die Verbindung **69** zeigte sowohl gegen HIV-1 als auch gegen HIV-2 eine vergleichbare Aktivität wie d4T **3**. Die Aktivität ging allerdings im Gegensatz zu einigen der anderen asymmetrischen DiPPro-d4TDPs **52** in den mutanten TK-defizienten Zellen verloren. Als Grund für diesen Verlust der antiviralen Aktivität kann angenommen werden, dass **69** über zu geringe Lipophilie verfügt, um die Zellmembran zu durchdringen. Damit hydrolysiert **69** wahrscheinlich außerhalb der Zelle vollständig zu d4T **3**, was schließlich die Zellmembran durchdringt und folglich zur Unterdrückung der Virusreplikation in den Wildtyp-Zellen, nicht aber in den mutanten Zellen führt. Ein weiterer Grund für die schlechte Aktivität in den Wildtyp-Zellen wird allerdings auch die geringe Stabilität von CH₃/2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-Mannose-DiPPro-d4TDP **69** sein, was ebenfalls zur extrazellulären Bildung von d4T **3** führt. Das gleiche Verhalten, das heißt antivirale Aktivität in den Wildtyp-Zellen und Verlust der Aktivität in der mutanten Zelllinie, wurde bereits von H. J. JESSEN für CH₃-DiPPro-d4TDP beobachtet.⁴⁷⁻⁴⁹

Nach den ermittelten Ergebnissen bezüglich der Kohlenhydrat-substituierten DiPPro-Verbindung **69** wäre es sinnvoll, deutlich längere Ketten an der Estereinheit der Maske einzusetzen, um die geringe Lipophilie der Zuckereinheit zu kompensieren. Allerdings stellt die Instabilität der Phosphatbrücke, hervorgerufen durch den Zucker am β-Phosphat nach

wie vor ein Problem dar, dass die allgemeine Anwendbarkeit dieses Systems für Kohlenhydrat-substituierte DiPPro-Verbindungen bezweifeln lässt. Durch die Erweiterung der DiPPro-Verbindung **69** um einen Spacer zwischen dem β -Phosphat und dem Kohlenhydrat, beispielsweise einer Methylengruppe, könnte die Stabilität der Phosphatbrücke allerdings erhöht werden. Ob eine selektive Freisetzung von Nucleosiddiphosphat aus einem solchen Pronucleotid erfolgen kann, müsste in umfassenden Hydrolysestudien untersucht werden. Die Kohlenhydrateinheit der Verbindung konnte jedoch nicht zur verbesserten Zellaufnahme und schließlich zur Steigerung der antiviralen Aktivität von d4T beitragen. Ob das maskierte d4T selektiver in die mit HIV infizierten Zellen gelangt, wenn die Prodrug-Einheit nicht nur als Maskierung, sondern ebenfalls als Erkennungsmerkmal dient, konnte mittels der durchgeführten Tests nicht ermittelt werden. Ob R/2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-Mannose-DiPPro-NDPs für den Einsatz in der anti-HIV-Therapie geeignet sind, bleibt daher offen.

5 Zusammenfassung

Analoga der natürlichen Nucleoside finden vielfach in der antiviralen und antitumor-Therapie Anwendung. Zur Behandlung von Infektionen mit Retroviren, wie HIV, werden sie als Reverse Transkriptase Inhibitoren eingesetzt. Da sie ihre Wirkung erst als Nucleosidtriphosphate entfalten, kann der zelleigene Metabolismus einen stark limitierenden Faktor für die Wirksamkeit dieser Substanzen darstellen. Aus diesem Grund wurden Pronucleotide entwickelt, die die ineffizienten Schritte umgehen, indem sie die hochpolaren Zwischenprodukte des Metabolismus am Wirkort freisetzen (*Bypass*). Ziel ist es hierbei, die Effizienz des Wirkstoffes zu erhöhen und mögliche Nebenwirkungen zu minimieren.

Das DiPPro-Konzept setzt Bis(acyloxybenzyl)-nucleosiddiphosphate ein, um den ersten und zweiten Schritt des Metabolismus zum Nucleosidtriphosphat zu umgehen. In vorangegangenen Studien konnte jedoch festgestellt werden, dass diese Verbindungen, sofern sie über eine ausreichende Lipophilie verfügen, beträchtliche Mengen an Nucleosidmonophosphat als Nebenprodukt freisetzen. Die NMP-Bildung resultiert aus dem Bruch der Phosphatanhydridbrücke, der als Konkurrenzreaktion zur Esterspaltung erfolgt (siehe S.31). Mit wachsender Kettenlänge in der Estereinheit der Maske nimmt die Stabilität der Acylestergruppe zu, wodurch auch die Bildung von NMP zunimmt. Gleichzeitig werden jedoch lange Ketten in der Estereinheit benötigt, um eine für den Zellmembrandurchtritt ausreichend hohe Lipophilie zu erreichen. Die direkte Kopplung von Lipophilie und Stabilität, die bei den aliphatischen Bis(acyloxybenzyl)-nucleosiddiphosphaten mit zwei identischen Masken unumgänglich ist, wirkt sich somit negativ auf die Freisetzung von Nucleosiddiphosphat aus.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer zweiten Generation von DiPPro-Pronucleotiden, die exklusiv das Nucleosiddiphosphat intrazellulär freisetzen sollen. Auf diesem Wege kann prinzipiell eine Effizienzsteigerung der Wirkstoffe erreicht werden. Die selektive Freisetzung von NDP aus den Pronucleotiden setzt das Unterbinden der Nucleosidmonophosphat-liefernden Nebenreaktion voraus. Dies kann durch die Auflösung der gegenseitigen Abhängigkeit von Lipophilie und Stabilität erreicht werden.

Es wurden zwei Lösungsansätze verfolgt: Zum einen wurden aromatische DiPPro-Nucleotide synthetisiert, bei denen Bis(benzoyloxybenzyl)-Einheiten zur Maskierung verwendet wurden, die in *para*-Position desaktivierende Substituenten tragen (Kapitel 4.1). Zum anderen wurden asymmetrische DiPPro-Nucleotide entwickelt, die Estereinheiten unterschiedlicher Stabilität bzw. Lipophilie tragen (Kapitel 4.2). Beide Konzepte wurden auf die anti-HIV-aktiven Nucleosidanaloga d4T und AZT angewendet und ihre Effizienz in umfangreichen Hydrolysestudien in unterschiedlichen Medien und in antiviralen Tests geprüft.

Die aromatischen Di*PP*ro-d4T- bzw. -AZT-Verbindungen konnten nach der Optimierung der bereits bekannten Syntheseroute für Bis(acyloxybenzyl)-Di*PP*ro-Nucleotide – sauer aktivierte Kupplung eines Phosphoramidits mit dem Nucleosidmonophosphat und anschließende Oxidation – in Ausbeuten von bis zu 66% isoliert werden. Ein Schlüsselschritt zur Syntheseoptimierung war die portionsweise Zugabe des sauren Aktivators DCI (Kapitel 4.1.1). Die anschließenden Untersuchungen des Hydrolyseverhaltens in Phosphatpuffer und CEM/0-Zellextrakten zeigten, dass die Pronucleotide das entsprechende Nucleosiddiphosphat in hohem Maße freisetzen. Dies geschah in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Stabilität, die mit zunehmender Akzeptorstärke des Substituenten abnimmt (Kapitel 4.1.2).

Die Bestimmung der antiviralen Aktivitäten der Bis(benzoyloxybenzyl)-Di*PP*ro-Nucleotide gegen HIV-1 und HIV-2 in Wildtypzellen sowie gegen HIV-2 in mutanten Thymidinkinase-defizienten Zellen schlossen diesen Teil der Arbeit ab. Alle Pronucleotide wiesen antivirale Aktivität in der Wildtyp-Zelllinie auf, die vergleichbar der der Stammnucleoside war. Sogar in den Thymidinkinase-defizienten Zellen konnte eine Unterdrückung der Virusaktivität festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine phosphorylierte nucleosidische Verbindung in das Zellinnere gelangt und bis zum Nucleosidtriphosphat metabolisiert wird. Die antivirale Aktivität ging im Vergleich zu den Wildtypzellen jedoch deutlich zurück. Als Gründe hierfür kommen eine unzureichende Lipophilie und/oder eine zu geringe Stabilität der Pronucleotide in Betracht (Kapitel 4.1.3).

Die unerwünschte Freisetzung von Nucleosidmonophosphat ist nach Spaltung der ersten Maskierungseinheit unwahrscheinlich. Folglich ist eine schnelle Hydrolyse zum einfach-maskierten Intermediat wünschenswert. Gleichzeitig darf aber die Lipophilie des Pronucleotids nicht beeinträchtigt werden. Es wurde daher eine Syntheseroute entwickelt, die die Kombination zweier unterschiedlicher Estereinheiten zulässt – einer mit geringer Stabilität und einer mit hoher Lipophilie.

Da die bisher angewendete Syntheseroute nicht zu den asymmetrischen Di*PP*ro-Nucleotiden führte, wurde das konventionelle Protokoll der Oligonucleotidsynthese adaptiert. Durch die sauer-katalysierte Kupplung eines bereits die erste Maskierungseinheit tragenden Phosphordiamidits mit der zweiten Maskierungseinheit, konnte eine Vielzahl asymmetrischer Phosphoramidite in sehr hohen Ausbeuten erhalten werden. Die anhand der Bis(benzoyloxybenzyl)-Nucleotide optimierte Kupplung zu den asymmetrischen Di*PP*ro-Nucleotiden erfolgte schließlich mit hohen Umsätzen, sodass nach einer weiteren Optimierung der chromatographischen Reinigung eine Vielzahl an Di*PP*ro-d4TDP- sowie Di*PP*ro-AZTDP-Verbindungen mit unterschiedlichen Kombinationen von aliphatischen und aromatischen Acylestern in Ausbeuten von bis zu 85% isoliert werden konnten (Kapitel 4.2.1).

Die chemische Hydrolyse in Phosphatpuffer und RPMI-Kulturmedium sowie die enzymatische Hydrolyse durch Schweineleberesterase und in CEM/0-Zellextrakten bestätigten das Konzept: alle Verbindungen wurden enzymatisch katalysiert sehr schnell zum einfach-maskierten Intermediat mit der stabileren Estereinheit hydrolysiert und setzten schließlich exklusiv das gewünschte Nucleosiddiphosphat frei. Gleichzeitig verfügten alle asymmetrischen DiPPro-Nucleotide über eine hohe Stabilität gegenüber chemischer Hydrolyse (Kapitel 4.2.4).

Diese positiven Ergebnisse konnten bezüglich der DiPPro-d4TDPs durch die Bestimmung der antiviralen Aktivität gegen HIV-1 und -2 bestätigt werden. Alle d4TDP-Pronucleotide zeigten sehr gute Aktivitäten in den Wildtypzellen, die teilweise sogar höher waren als die Aktivität des Stammnucleosids d4T. Darüber hinaus konnte auch in den mutanten Thymidinkinase-defizienten Zellen für alle DiPPro-d4TDPs eine Unterdrückung der Virusreplikation bestimmt werden; die Aktivitäten der Verbindungen mit der höchsten Lipophilie, wie bspw. $C_4H_9/C_{11}H_{23}$ -DiPPro-d4TDP **52h** (CEM/TK⁻, HIV-2 (ROD); $EC_{50} = 0.13 \pm 0.07 \mu M$), blieben sogar vollständig erhalten. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine phosphorylierte Spezies – wahrscheinlich das Nucleosiddiphosphat – im Zellinneren freigesetzt und dort durch die entsprechenden Enzyme zum aktiven d4T-Triphosphat metabolisiert wird. Im Gegensatz zu den d4T-Verbindungen zeigten die DiPPro-AZTDPs in den mutanten TK⁻-Zellen keine nennenswerte antivirale Aktivität. In den Wildtyp-CEM-Zellen hingegen wurden für alle AZT-Pronucleotide sehr hohe antivirale Aktivitäten bestimmt. Einige DiPPro-AZTDPs hemmten den durch HIV-1 und HIV-2 induzierten zytopathogenen Effekt sogar mit geringerer Konzentration als AZT selbst (Kapitel 4.2.5).

In dieser Arbeit gelang es erstmals, die dem DiPPro-Konzept zuvor inhärente Korrelation von Stabilität und Lipophilie aufzuheben. Durch die asymmetrische, bioreversible Maskierung der Nucleosiddiphosphate war es möglich, eine zweite Generation von DiPPro-Nucleotiden zu entwickeln, die als selektive NDP-Lieferanten fungieren. Dies kann potentiell zu einer enormen Effizienzsteigerung der Wirkstoffe führen und – besonders im Fall von AZT – eine drastische Minimierung von Nebenwirkungen nach sich ziehen.

6 Summary

Nucleoside analogs are widely applied as anti-tumor and anti-viral agents. As reverse transcriptase inhibitors they play an important role for the treatment of infections by retro viruses, like HIV. The active form being able to inhibit the reverse transcriptase is the nucleoside triphosphate. Therefore, the cellular metabolism often is a limiting factor for the efficiency of these compounds. Pronucleotides have been developed to bypass the inefficient steps by releasing highly polar intermediates of the metabolism at the target site. The main targets of these concepts are an increase of the efficiency of the agent and the avoidance of side effects.

The *DiPPro* concept applies bis(acyloxybenzyl) nucleoside diphosphates to bypass the first and the second step of the metabolism to the nucleoside triphosphate. However, it was found in previous studies that these compounds release considerable amounts of the nucleoside monophosphate as a byproduct, provided they have an adequate lipophilicity. The NMP-formation results from the breakage of the phosphate anhydride bridge, which occurs as a competing reaction to the ester cleavage (see page 31). With increasing chain length in the ester moiety of the mask, the stability of the acyl ester group and therefore also the formation of NMP increased. Nevertheless, long chains are required in the ester moiety in order to achieve a sufficiently high lipophilicity for the passage of the cell membrane. In case of the aliphatic bis(acyloxybenzyl) nucleoside diphosphates with two identical masks the direct coupling of lipophilicity and stability is unavoidable. Therefore, the result is a lower amount of the formed nucleoside diphosphate.

The aim of this study was to develop a second generation of *DiPPro* pronucleotides that would exclusively release the nucleoside diphosphate intracellular. In this way an increase in efficiency of the active ingredients can be realized in principle. The selective release of nucleoside diphosphate from the pronucleotides presupposes the prevention of the nucleoside monophosphate-forming side reaction. This is achievable by avoidance of the correlation of lipophilicity and stability.

Two different approaches were pursued: Firstly, aromatic *DiPPro* nucleotides were synthesized in which bis(benzoyloxybenzyl) units bearing deactivating substituents in the *para*-position were used for masking (chapter 4.1). Secondly, non-symmetric *DiPPro* nucleotides were developed bearing ester units of different stability or lipophilicity (chapter 4.2). Both concepts were applied to the anti-HIV agents d4T and AZT. Their efficiency was tested in extensive hydrolysis studies in different media and in antiviral assays.

After the optimization of the conventional route for the synthesis of bis(acyloxybenzyl)-DiPPro nucleotides – acidic activated coupling of a phosphorus amidite with a nucleoside monophosphate and further oxidation – the aromatic DiPPro-d4TDPs and -AZTDPs were obtained in yields up to 66%. The addition of the acid activator DCI in portions emerged here as the key step (chapter 4.1.1). Further hydrolysis studies of the pronucleotides in phosphate buffer and CEM/0 cell extracts proved the release of high amounts of the corresponding nucleoside diphosphate. This happened according to their stability, which decreased with increasing electron withdrawing effect (chapter 4.1.2).

The antiviral activities against HIV-1 and HIV-2 were determined in wild-type CEM cells and furthermore against HIV-2 in mutant thymidine kinase-deficient CEM cells. All pronucleotides showed antiviral activity in the wild type cell line, which was in the same range as that of the parent nucleosides. A loss of viral activity was found in the thymidine kinase-deficient cells. These results show that a phosphorylated nucleosidic compound enters the cell and is finally metabolized to the nucleoside triphosphate. However, compared to the wild-type cells, the antiviral activity decreased significantly. Insufficient lipophilicity and/or insufficient stability of the pronucleotides are possible reasons for this behavior (chapter 4.1.3).

The unwanted release of the nucleoside monophosphate is not possible after cleavage of the first masking unit. Consequently, a fast hydrolysis to the mono-masked intermediate is useful. Nevertheless, the pronucleotides need to be highly lipophilic. Therefore, a synthetic route was developed that allowed the combination of two different ester units – one with low stability and one with high lipophilicity.

As the synthesis of non-symmetric DiPPro nucleotides via the previous route failed, the standard protocol for the synthesis of oligonucleotides was successfully adapted: By means of acid-catalyzed coupling of a phosphorus diamidite already bearing the first masking unit with the second masking unit, the synthesis of a high number of non-symmetric phosphorus amidites in high yields could be achieved. For the synthesis of non-symmetric DiPPro nucleotides high conversions were reached by applying the coupling conditions that were optimized for bis(benzoyloxybenzyl)-nucleotides. By further optimization of the chromatographic method a range of DiPPro-d4TDP and DiPPro-AZTDP compounds bearing different combinations of aliphatic and aromatic acyl esters could finally be isolated in yields up to 85% (chapter 4.2.1).

The designed NDP-delivery pathway was confirmed by chemical hydrolysis in phosphate buffer and RPMI-culture medium, by enzymatic hydrolysis by pig liver esterase and in CEM/0 cell extracts: After very fast enzymatic hydrolysis of all DiPPro compounds in the cell extracts to give the mono-masked intermediate with the stable ester unit the exclusive product was

the desired nucleoside diphosphate. On the other hand, the chemical stability was high (chapter 4.2.4).

The measured antiviral activity of DiPPro-d4TDPs against HIV-1 and HIV-2 confirmed these results. All d4TDP pronucleotides were as active or even more active in wild-type cells than the corresponding parent nucleoside d4T. Furthermore, high activities were found in mutant thymidine kinase-deficient cells. Even the activity of highly lipophilic compounds, like C₄H₉/C₁₁H₂₃-DiPPro-d4TDP **52h** (CEM/TK⁻, HIV-2 (ROD): EC₅₀ = 0.13 ± 0.07 μM), were fully retained. These results demonstrate that a phosphorylated species – probably the nucleoside diphosphate – is released in the cell and is metabolized to the active d4T triphosphate. In contrast to the pronucleotides of d4TDP, DiPPro-AZTDPs did not show significant antiviral activity in mutant TK⁻ cells. Nevertheless, the antiviral activity in wild-type CEM cells was found to be very high. Some DiPPro-AZTDPs were even more active than AZT itself (chapter 4.2.5).

In conclusion, this thesis proved the possibility to overcome the correlation of stability and lipophilicity, which was previously an inseparable part of the DiPPro concept. By non-symmetrical, bio-reversible masking of the nucleoside diphosphate, a second generation of DiPPro nucleotides was developed that act as a selective nucleoside diphosphate delivery system. This holds great potential of an increase in efficiency of the drugs and – particularly in the case of AZT – of a marked reduction of side effects.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeines

7.1.1 Edukte und Reagenzien

N,N-Diisopropylamin (DIPA): DIPA wurde unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und unter Inertgas destilliert. Die Lagerung erfolgte unter Lichtausschluss und Inertgas.

N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA): DIPEA wurde unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und unter Inertgas destilliert. Die Lagerung erfolgte unter Lichtausschluss und Inertgas.

Phosphor(III)-chlorid (PCl_3): PCl_3 wurde unter Inertgas destilliert. Die Lagerung erfolgte unter Inertgas.

Phosphorylchlorid (POCl_3): POCl_3 wurde unter Inertgas destilliert. Die Lagerung erfolgte unter Inertgas.

Triethylamin (Et_3N): Et_3N wurde unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und unter Inertgas destilliert. Die Lagerung erfolgte unter Lichtausschluss und Inertgas.

7.1.2 Lösungsmittel

Die folgenden Lösungsmittel wurden in technischer Qualität bezogen und vor ihrer Verwendung destillativ gereinigt. Alle hier nicht aufgeführten Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Tetrahydrofuran (THF): THF wurde unter Normaldruck destilliert.

Dichlormethan (CH_2Cl_2): Dichlormethan wurde unter Normaldruck destilliert.

Methanol (CH_3OH): CH_3OH wurde unter Normaldruck destilliert.

Ethylacetat (EE): Ethylacetat wurde unter Normaldruck destilliert.

Petrolether 50-70 (PE): Petrolether wurde unter Normaldruck destilliert.

7.1.3 Absolute Lösungsmittel

Für Reaktionen, die unter Luftausschluss bzw. Feuchtigkeitsausschluss in Inertgas durchgeführt wurden, wurden die im Folgenden aufgeführten Lösungsmittel verwendet.

Acetonitril (CH₃CN): Acetonitril wurde unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und unter Inertgas destilliert. Die Lagerung erfolgte unter Inertgas über Molekularsieb (4 Å).

Diethylether (Et₂O): Diethylether wurde unter Rückfluss über Natrium getrocknet und unter Inertgas destilliert. Die Lagerung erfolgte unter Inertgas über Molekularsieb (4 Å).

N,N-Dimethylformamid wurde von Fluka (40248) absolut über Molekularsieb (3 Å) bezogen.

Dimethylsulfoxid wurde von Fluka (41648) absolut über Molekularsieb (3 Å) bezogen.

Pyridin: Pyridin wurde unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und unter Inertgas destilliert. Die Lagerung erfolgte unter Inertgas über Molekularsieb (4 Å).

Tetrahydrofuran (THF): THF wurde unter Rückfluss über Kalium getrocknet und unter Inertgas destilliert. Die Lagerung erfolgte unter Inertgas über Molekularsieb (4 Å).

7.1.4 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel und Fluoreszenzindikator beschichtete Aluminiumfolien der Firma Macherey & Nagel (Alugram[®] Xtra Sil G/UV₂₅₄, Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Sämtliche R_F-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mittels UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die Detektion der kohlenhydrathaltigen Substanzen erfolgte außerdem durch eintauchen der Folie in 10%ige wässrige Schwefelsäure und anschließendes Erhitzen mit einem Heißluftföhn.

Radiale präparative Dünnschichtchromatographie

Substanzgemische bis zu einer Menge von 4 g konnten an einem Chromatotron der Firma Harrison Research (Modell 7924 T) getrennt werden. Als feste Phase diente Kieselgel der Firma Aldrich (Kieselgel PF₂₅₄, Merck-Typ 7749) mit Gipszusatz und Fluoreszenzindikator. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mittels UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Säulenchromatographie

Für Trennungen mittels Säulenchromatographie wurde Kieselgel der Firma VWR (Kieselgel 60, 0.040-0.063 mm, 230-400 mesh ASTM) und der Firma Macherey & Nagel (Kieselgel 60M, 0.040-0.063 mm, 230-400 mesh) verwendet.

Umkehrphasenchromatographie

Für die Umkehrphasensäulenchromatographie wurde LiChroprep[®] Rp-18 der Firma Merck (40 - 63 µm) verwendet.

Trennungen mittels automatisierter Umkehrphasenchromatographie wurden an einem Puriflash 430 der Firma Intershim durchgeführt. Als Säule diente eine Chromabond Flash RS40 C₁₈ec der Firma Macherey & Nagel.

7.1.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

(high performance liquid chromatography, HPLC)

Die analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde an einer ELITE LaChrom VWR Hitachi-Anlage durchgeführt.

Software:	ELITE LaChrom
Pumpe:	L-2130
Autosampler:	L-2200
Detektor:	L-2455
Säulenofen:	L-2300
Analytische Säule:	RP-HPLC: Macherey & Nagel, EC 125/3 Nucleodur 100-5 C18 EC HILIC-HPLC: Macherey & Nagel, EC 125/4 Nucleodur HILIC, 5 µM

Lösungsmittel:

Es wurde Acetonitril des Reinheitsgrades „HPLC grade“ (Firma VWR) und Reinstwasser verwendet.

Laufpuffer/Ionenpaar-Lösungen:

Tetrabutylammoniumphosphat-Lösung (TBAP):

Stammlösung (9.8 mM TBAP): 1000 mL Reinstwasser wurden mit 6.6 mL einer Lösung von TBAH in Wasser (40% w/w aq.) versetzt und mit konz. Phosphorsäure auf einen pH von 3.8 eingestellt.

Chromatographie Lösung (0.55 mM TBAP): 60 mL der 9.8 mM Stammlösung wurden mit 1000 mL Reinstwasser verdünnt.

Tetrabutylammoniumacetat-Lösung (TBAA, 2 mM, pH 6.0): 2.7 mL einer Lösung von TBAH in Wasser (40% w/w aq.) wurden in etwa 1900 mL Reinstwasser gelöst und der pH-Wert mittels Zugabe von konz. Essigsäure eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit Reinstwasser auf 2000 mL aufgefüllt.

Triethylammoniumacetat-Lösung (TEAA, 50 mM): 69 mL Triethylamin wurden in etwa 900 mL Reinstwasser gelöst und der jeweilige pH-Wert mittels Zugabe von konz. Essigsäure eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit Reinstwasser auf 1000 mL aufgefüllt.

Ammoniumformiat-Puffer (10 mM, pH 8.3): 630 mg Ammoniumformiat wurden in etwa 900 mL Reinstwasser gelöst und der pH-Wert mittels Zugabe von verd. Ammoniaklösung eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit Reinstwasser auf 1000 mL aufgefüllt.

HPLC-Methoden:

Methode I: Hydrolyse aromatischer DiPPro-d4TDPs

Von 0 bis 25 min: TBAP-Lösung mit einem Acetonitril-Gradienten von 5%-100%, 25 bis 35 min: isokratisch (5% TBAP-Lösung, 95% Acetonitril); Flussrate 1 mL/min; Ofentemperatur 25 °C; UV-Detektion bei 265 nm.

Methode II: Hydrolyse aromatischer DiPPro-Nucleotide und asymmetrischer DiPPro-d4TDPs

Von 0 bis 24 min: TBAA-Lösung mit einem Acetonitril-Gradienten von 5%-80%, 24 bis 29 min: isokratisch (20% TBAA-Lösung, 80% Acetonitril); Flussrate 1 mL/min; Ofentemperatur 25 °C; UV-Detektion bei 265 nm.

Methode III: Hydrolyse aliphatischer und asymmetrischer DiPPro-AZTDPs

Von 0 bis 27 min: TBAA-Lösung mit einem Acetonitril-Gradienten von 5%-90%, 27 bis 30 min: isokratisch (10% TBAA-Lösung, 90% Acetonitril); Flussrate 1 mL/min; Ofentemperatur 25 °C; UV-Detektion bei 265 nm.

Methode IV: Zellextrakthydrolyse asymmetrischer DiPPro-Nucleotide

Von 0 bis 5 min: isokratisch (95% Acetonitril, 5% Ammoniumformiat-Puffer), 5 bis 15 min Ammoniumformiat-Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten von 95%-70%, 15 bis 30 min: isokratisch (70% Acetonitril, 30% Ammoniumformiat-Puffer); Flussrate 0.6 mL/min; Ofentemperatur 25 °C; UV-Detektion bei 265 nm.

Methode V:

Von 0 bis 5 min: isokratisch (5% Acetonitril, 95% Puffer), 5 bis 25 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten von 5%-80%, 25 bis 27 min: isokratisch (80% Acetonitril, 20% Puffer); Flussrate 1 mL/min; Ofentemperatur 25 °C; UV-Detektion bei 265 nm.

Methode VI:

Von 0 bis 5 min: isokratisch (2% Acetonitril, 98% Puffer), 5 bis 25 min Puffer mit einem Acetonitril-Gradienten von 2%-80%, 25 bis 27 min: isokratisch (80% Acetonitril, 20% Puffer); Flussrate 1 mL/min; Ofentemperatur 25 °C; UV-Detektion bei 265 nm.

7.1.6 Spektroskopie

Kernresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance, NMR)

Die NMR-Spektren wurden mittels der Bruker Spektrometer AMX 400 oder AV 600 bei 300 K aufgenommen. Die ¹H-Spektren wurden mit 400 MHz bzw. 600 MHz, die ¹³C-Spektren bei 101 MHz bzw. 150 MHz, die ³¹P-Spektren bei 162 MHz bzw. 243 MHz und die ¹⁹F-NMR bei 565 MHz gemessen. Zur Signalzuordnung dienten unter anderem H,H-COSY, HMBC und HSQC.

Massenspektrometrie

FAB-Massenspektren wurden mit einem VG/70-250F Spektrometer (Xenon FAB-Kanone, Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol) der Firma VG Analytical gemessen.

ESI-Massenspektren wurden an einem Agilent 6224 TOF Gerät, im Positiv- oder Negativmodus gemessen.

MALDI-Massenspektren wurden an einem ultrafleXtreme MALDI-TOF-TOF Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonik gemessen, mit 9-AA als Matrix.

Infrarotspektroskopie

Die Infrarot-Spektren wurden an einem Alpha P-Gerät der Firma Bruker bei Raumtemperatur in einem Messbereich von 400 - 4000 cm^{-1} aufgenommen.

7.1.7 Geräte

Gefriertrocknungsanlage

Zur Gefriertrocknung wurden zwei Geräte der Firma Christ verwendet: Alpha 2-4 sowie Alpha 2-4 LD plus

Thermomixer

Die Proben für Hydrolysestudien wurden in einem Eppendorf Thermomixer 5436 inkubiert.

Zentrifuge

Zur Zentrifugation der Proben der Zellextrakthydrolysen wurde eine Biofuge Pico der Firma Heraeus verwendet.

7.1.8 Zellextrakte

Für die Zellextrakthydrolysen wurden CEM/0-Zellextrakte verwendet, die von PROF. DR. J. BALZARINI und PROF. DR. D. SCHOLS, Katholieke Universiteit Leuven, Belgien, zur Verfügung gestellt wurden.

7.2 Darstellung der Verbindungen

7.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV1: Synthese von Nucleosidmonophosphaten

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 2.2 Äquivalente abs. Pyridin und 2.2 Äquivalente Wasser wurden tropfenweise bei 0 °C zu einer Lösung von 4.4 Äquivalenten Phosphorylchlorid in abs. Acetonitril gegeben. Nach fünfminütigem Rühren wurde 1 Äquivalent des entsprechenden Nucleosids zugegeben. Nach etwa 5 h bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von Eiswasser beendet und eine weitere Stunde bei 4 °C gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von festem NH_4HCO_3 auf pH 8 eingestellt. Die Lösungsmittel wurden durch Gefriertrocknung entfernt. Das Rohprodukt wurde in Wasser gelöst und säulenchromatographisch an RP-18 Kieselgel gereinigt. Als Eluent diente Wasser. Elution über DOWEX 50WX8 (H^+) und die anschließende Zugabe einer Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid-Lösung (40% in H_2O w/w) bis pH 7 lieferten nach Gefriertrocknung das Tetra-*n*-butylammonium-Salz des entsprechenden Nucleosidmonophosphates.

AAV2: Acylierung von 4-Hydroxybenzylalkohol

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zu einer schwach konzentrierten Lösung von 1 Äquivalent 4-Hydroxybenzylalkohol in abs. THF wurden bei 0 °C zunächst 1 Äquivalent Triethylamin und nach 5 minütigem Rühren 1.1 Äquivalente des entsprechenden Säurechlorids, gelöst in abs. THF, hinzugegeben. Nach einer Reaktionsdauer von 1.5 bis 24 Stunden bei 0 °C wurde das entstandene Triethylammoniumchlorid durch Filtration und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen, zweimal mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und einmal mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisation, Säulenchromatographie oder am Chromatotron.

AAV3: Synthese von Phosphordiamiditen

AAV3a: Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zu einer Lösung von 1.9 Äquivalenten Bis(*N,N*-diisopropylamino)chlorphosphin **51** in abs. THF wurden bei 0 °C zunächst 2.1 Äquivalente Triethylamin und anschließend 1 Äquivalent des

entsprechenden 4-(Hydroxymethyl)phenylesters, gelöst in abs. THF, getropft. Das Reaktionsgemisch wurde zur Raumtemperatur erwärmt. Nach einer Reaktionsdauer von 3 bis 16 h wurden die Salze durch Filtration sowie die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es folgte die Reinigung mittels Chromatographie am Chromatotron mit einem Petrolether/Triethylamin-Gemisch (97:3).

AAV3b: Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zu einer Lösung von 1 Äquivalent Phosphor(III)-chlorid und 1 Äquivalent Pyridin wurde bei -78 °C langsam 1 Äquivalent des entsprechenden 4-(Hydroxymethyl)phenylesters, gelöst in abs. THF oder abs. Diethylether, getropft. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Sobald die Reaktionsverfolgung mittels Dünnschichtchromatographie zeigte, dass der 4-(Hydroxymethyl)phenylester vollständig verbraucht war, erfolgte die tropfenweise Zugabe von 6.1 Äquivalenten Diisopropylamin bei -10 °C. Nach einer Reaktionsdauer von 24 bis 48 h wurden die Salze durch Filtration sowie die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es folgte die Reinigung mittels Chromatographie am Chromatotron mit einem Petrolether/Triethylamin-Gemisch (99:1 bis 97:3).

AAV4: Synthese von symmetrischen Phosphoramiditen

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Eine Lösung von 2.2 Äquivalenten des entsprechenden 4-(Hydroxymethyl)phenylesters und 2.3 Äquivalenten Triethylamin in abs. THF wurde langsam zu einer Lösung von 1 Äquivalent Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit in abs. THF getropft. Nach einer Reaktionsdauer von 24 bis 72 Stunden wurde das entstandene Triethylammoniumchlorid durch Filtration und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron mit einem Petrolether/Ethylacetat-Gemisch mit einem Gradienten von 5 - 80%, dem 5 - 10% Triethylamin zugesetzt waren.

AAV5: Synthese von asymmetrischen Phosphoramiditen

AAV5a: Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Eine Lösung von 1 Äquivalent des entsprechenden 4-(Hydroxymethyl)phenylesters in abs. THF und 1 Äquivalent 4,5-Dicyanoimidazol (0.25 molare Lösung in Acetonitril) wurde bei 0 °C zu einer schwach konzentrierten Lösung von 1.5 Äquivalenten des zuvor zweimal coevaporierten Phosphordiamidits in abs. Acetonitril getropft. Nach einer Reaktionsdauer von 30 bis 60 min bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen, zweimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung

und einmal mit H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron mit einem Petrolether-Triethylamin-Gemisch (9:1).

AAV5b: Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Eine Lösung von 1 Äquivalent des entsprechenden 4-(Hydroxymethyl)phenylesters in abs. THF und 1 Äquivalent 4,5-Dicyanoimidazol (0.25 molare Lösung in Acetonitril) wurde bei 0 °C zu einer schwach konzentrierten Lösung von 1.5 Äquivalenten des zuvor zweimal coevaporierten Phosphordiamidits in abs. Acetonitril getropft. Nach einer Reaktionsdauer von 30 bis 60 min bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einem Petrolether-Triethylamin-Gemisch (9:1) aufgenommen und filtriert. Nach Einengen des Filtrats erfolgte die Reinigung am Chromatotron mit einem Petrolether-Triethylamin-Gemisch (9:1).

AAV6: Synthese von *cycloSal*-Triestern

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 1 Äquivalent des 4-Acyloxybenzylalkohols wurde in Acetonitril gelöst und auf -20 °C gekühlt. Nach Zugabe von 2.1 Äquivalenten Diisopropylethylamin wurden 2 Äquivalente 5-Nitrosaligenylchlorphosphit, gelöst in Acetonitril, langsam zur Reaktionslösung getropft. Anschließend wurde das Kältebad entfernt und die Reaktion bei Raumtemperatur für 2-4 Stunden gerührt. Dann erfolgte die Oxidation bei -20 °C durch Zugabe von 4 Äquivalenten Oxone, gelöst in kaltem Wasser. Nach 15 minütigem Rühren bei Raumtemperatur wurde das Gemisch einmal mit Ethylacetat extrahiert und schließlich an Kieselgel mit PE/EE (1:1), dem 0.3% Essigsäure zugesetzt war, chromatographisch gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck, wurde der Rückstand in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch aufgenommen und das Produkt nach Gefriertrocknung erhalten.

AAV7: Synthese von DiPPro-Nucleotiden

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 1.5 Äquivalente des zuvor mit Acetonitril coevaporierten Phosphoramidits wurden zu einer Lösung aus 1 Äquivalent Nucleosidmonophosphat in abs. Acetonitril gegeben. Durch Zugabe von 0.5 Äquivalenten 4,5-Dicyanoimidazol (0.25 molare Lösung in Acetonitril) bei Raumtemperatur wurde die Reaktion gestartet. Es erfolgte die erneute Zugabe von jeweils 0.25 Äquivalenten 4,5-Dicyanoimidazol in fünfminütigen Abständen, bis die dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung entweder einen vollständigen Umsatz zeigte, oder bis 1.5 Äquivalente

erreicht waren. Fünf Minuten nach der letzten Zugabe erfolgte die Oxidation durch Zugabe von 1.5 Äquivalenten *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 molare Lösung in *n*-Decan). Die Lösungsmittel wurden nach weiteren 15 min unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend erfolgte die Reinigung durch automatisierte Flash Chromatographie an RP-18-Kieselgel.

7.2.2 Synthese der Nucleoside/Nucleotide

Die Synthese von d4T **3** erfolgte wie in Kapitel 4.1.1.2 beschrieben, entsprechend der zitierten Publikation.⁷⁴ Die Ausbeuten sowie die analytischen Daten entsprachen den Literaturdaten.

Die Darstellung von Tetra-*n*-butylammonium-d4TMP **8** und Tetra-*n*-butylammonium-AZTMP **9** wurde nach bekannter Vorschrift, die als AAV1 hier aufgeführt ist, durchgeführt.^{49,50,73} Es wurde für d4TMP **8** eine Ausbeute von 87% und für AZTMP **9** eine Ausbeute von 61% erzielt. Die analytischen Daten entsprachen den Literaturdaten.^{49,50}

7.2.3 Synthese der 4-(Hydroxymethyl)phenylester

Die Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)phenylacetat **40a**,^{48,49} 4-(Hydroxymethyl)phenylpentanoat **40b**,⁵⁰ 4-(Hydroxymethyl)phenylheptanoat,⁵⁰ 4-(Hydroxymethyl)phenyloctanoat **40c**,^{48,49} 4-(Hydroxymethyl)phenyldecanoat⁵⁰ und 4-(Hydroxymethyl)phenyldodecanoat,⁵⁰ wurde nach den bereits publizierten Vorschriften durchgeführt. Die Ausbeuten und die analytischen Daten entsprachen den Literaturdaten.

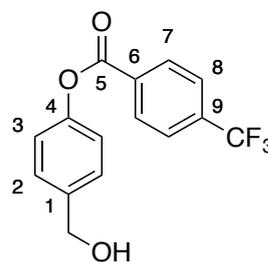
Die Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-nitrobenzoat **28g**, 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-methylbenzoat, 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-methoxybenzoat, 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-chlorbenzoat wurde nach bereits publizierter Vorschrift durchgeführt.⁷⁰ Die Ausbeuten und die analytischen Daten entsprachen den Literaturdaten.

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-trifluormethylbenzoat **28e**

Die Synthese erfolgte nach AAV2. Dabei wurden 1.50 g (12.1 mmol) 4-Hydroxybenzylalkohol **18** in 30 mL THF gelöst und mit 1.70 mL (1.12 g, 12.1 mmol) Triethylamin versetzt. Bei 0 °C wurden dann 1.54 mL (2.77 g, 13.3 mmol) 4-Trifluormethylbenzoylchlorid **29e** in 10 mL THF zugetropft. Nach einer Reaktionsdauer

von 16 Stunden erfolgte die Reinigung am Chromatotron mit Petrolether/Ethylacetat mit einem Gradienten von 5 - 80%.

Ausbeute: Es wurden 2.69 g (9.07 mmol, 75%) eines farblosen Feststoffes erhalten. **Molmasse:** 296.25 g/mol **Summenformel:** C₁₅H₁₁F₃O₃ **R_f-Wert:** 0.85 in CH₂Cl₂/CH₃OH (19:1) **MS:** (EI) *m/z* = berechnet für C₁₅H₁₁F₃O₃ und [C₈H₄F₃O]⁺: 296.07 [M]⁺, 173.02, gefunden: 295.9, 172.9.

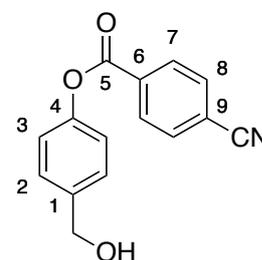


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 8.33-8.32 (m, 2H, H-7); 7.99-7.97 (m, 2H, H-8); 7.42-7.41 (m, 2H, H-2); 7.28-7.26 (m, 2H, H-3); 5.26 (t, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 1H, -OH); 4.53 (d, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 2H, Ph-CH₂). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 163.7 (C-5); 149.1 (C-4); 140.6 (C-1); 133.3 (d, ²J_{C,F} = 32 Hz, C-9); 132.8 (C-6); 130.7 (C-7); 127.6 (C-2); 125.9 (d, ³J_{C,F} = 3.7 Hz, C-8); 125.9 (CF₃); 121.7 (C-3); 64.9 (Ph-CH₂). ¹⁹F-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 61.68. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3345, 2926, 2857, 1736, 1509, 1411, 1375, 1167, 1128, 879, 771, 699.

Darstellung von 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-cyanobenzoat 28f

Die Synthese wurde nach AAV2 durchgeführt. Dabei wurden 1.37 g (11.0 mmol) 4-Hydroxybenzylalkohol **18** in 20 mL THF gelöst und mit 1.56 mL (1.12 g, 11.1 mmol) Triethylamin versetzt. Bei 0 °C wurden dann 2.00 g (12.1 mmol) 4-Cyanobenzoylchlorid **29f** in 10 mL THF zugetropft. Nach einer Reaktionsdauer von 16 Stunden erfolgte die Reinigung am Chromatotron mit Petrolether/Ethylacetat mit einem Gradienten von 5 - 80%.

Ausbeute: Es wurden 1.85 g (7.31 mmol, 66%) eines farblosen Feststoffes erhalten. **Molmasse:** 253.26 g/mol **Summenformel:** C₁₅H₁₁NO₃ **R_f-Wert:** 0.45 in Petrolether/Ethylacetat (1:1) **MS:** (FAB) *m/z* = berechnet für C₁₅H₁₁NO₃: 253.07 [M], gefunden: 253.1.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 8.29-8.27 (m, 2H, H-7); 8.10-8.08 (m, 2H, H-8); 7.42-7.40 (m, 2H, H-2); 7.28-7.26 (m, 2H, H-3); 5.25 (t, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 1H, -OH) 4.53 (d, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, 2H, Ph-CH₂). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 163.2 (C-5); 149.2 (C-4); 140.4 (C-1); 132.9 (C-6); 132.7 (C-8); 130.7 (C-7); 128.4 (C-2); 125.9 (C7); 121.7

(C-3); 118.0 (CN); 115.4 (C-9); 62.3 (Ph-CH₂). IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3380, 3096, 2874, 2231, 1732, 1605, 1508, 1407, 1269, 1212, 1161, 1077, 1036, 1015, 995, 862, 807, 760, 685, 545, 504.

7.2.4 Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-mannopyranose 70

Die Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-mannopyranose **70** wurde nach bekannter Vorschrift durchgeführt.¹⁰² Die Ausbeute sowie die analytischen Daten stimmten mit den Literaturdaten überein.

7.2.5 Synthese der Chlorphosphine

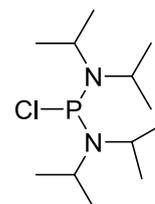
Die Synthese von Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **27** wurde nach bekannter Vorschrift durchgeführt.^{48,49} Die Ausbeute sowie die analytischen Daten stimmten mit den Literaturdaten überein.

Versuch der Darstellung von Bis(*N,N*-diisopropylamino)chlorphosphin **51**

Die Reaktion wurde unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

7.85 g (5.00 mL, 57.2 mmol) Phosphortrichlorid wurden in 35 mL abs. THF, 40.5 g (56.2 mL, 400 mmol) Diisopropylamin in 100 mL abs. THF gelöst und 30 min bei 0 °C gerührt. Die Lösung des Phosphortrichlorids wurde nun mittels Spritze langsam zur Diisopropylamin-Lösung getropft. Nach 72 stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde der Feststoff durch Filtration unter Schutzgas entfernt, wobei mehrfach mit abs. THF gewaschen wurde. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck (Ölpumpe), wurde das Rohprodukt dreimal aus abs. *n*-Hexan umkristallisiert. Dennoch konnte das reine, salzfreie Produkt nicht isoliert werden.

Ausbeute: Das Produkt konnte nicht isoliert werden. **Molmasse:** 266.79 g/mol **Summenformel:** C₁₂H₂₈ClN₂P.



7.2.6 Synthese von 5-Nitrosaligenylchlorphosphit

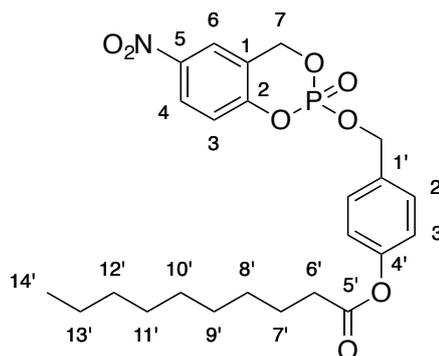
Die Synthese von 5-Nitrosalicylalkohol **19b**⁸⁸ und 5-Nitro-*cyclo*Saligenylchlorphosphit **57b**⁸⁴ erfolgte nach bekannter Vorschrift. Die Ausbeute sowie die analytischen Daten stimmten mit den Literaturdaten überein.

7.2.7 Synthese der *cyclo*Sal-Triester

Darstellung von 5-Nitro-*cyclo*Sal-(4-dodecanoyloxybenzyl)phosphat **60a**

Die Synthese wurde nach AAV6 durchgeführt. Es wurden 139 mg (0.501 mmol) 4-(Hydroxymethyl)phenyldodecanoat in 20 mL Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 184 mL (136 mg, 1.05 mmol) DIPA wurden 234 mg (1.00 mmol) 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **57b**, gelöst in 4 mL Acetonitril hinzugegeben. Nach vierstündiger Reaktionszeit erfolgte die Oxidation durch Zugabe von 1.23 g (2.00 mmol) Oxone.

Ausbeute: Es wurden 150 mg (0.305 mmol, 61%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 491.48 g/mol **Summenformel:** C₂₄H₃₀NO₈P



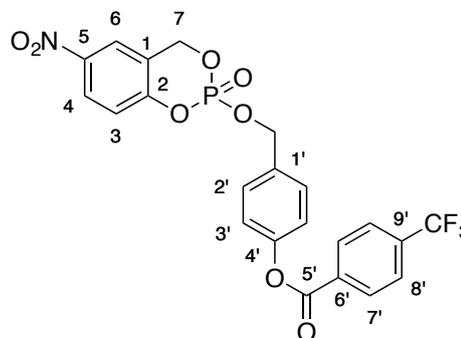
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 8.20-8.17 (m, 2H, H-4); 8.01-8.00 (m, 1H, H-6); 7.40-7.38 (m, 1H, H-2'); 7.09-7.05 (m, 3H, H-3, H-3'); 5.43-5.30 (m, 2H, H-7); 5.24 (d, ³J_{H,H} = 10.4 Hz, 2H, Ph-CH₂); 2.56 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-6'); 1.75 (tt, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-7'); 1.45-1.26 (m, 12H, H-8' – H-13'); 0.89 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, H-14').
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 172.3 (C-5'); 151.2 (C-4'); 143.4 (C-2); 137.2 (C-1'); 128.3 (C-2'); 128.1 (C-5); 126.5 (C-4); 122.5 (C-6); 121.3 (C-3'); 119.1 (C-3); 68.0 (d, ²J_{C,P} = 7.4 Hz, C-7); 65.1 (d, ²J_{C,P} = 5.6 Hz, Ph-CH₂); 34.6 (C-6'); 32.0, 29.6, 29.4, 29.3, 22.8, (C-8' – C-13'); 25.0 (C-7'); 14.4 (C-14').
³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = -10.7.

Darstellung von 5-Nitro-*cyclo*Sal-(4-(4'-trifluormethyl)benzoyloxybenzyl)phosphat **60b**

Die Synthese wurde nach AAV6 durchgeführt. Es wurden 74 mg (0.25 mmol) 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-trifluormethylbenzoat **28e** in 10 mL Acetonitril gelöst. Nach

Zugabe von 92 mL (68 mg, 0.53 mmol) DIPA wurden 117 mg (0.501 mmol) 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **57b**, gelöst in 2 mL Acetonitril hinzutropft. Nach zweistündiger Reaktionszeit erfolgte die Oxidation durch Zugabe von 616 mg (1.00 mmol) Oxone.

Ausbeute: Es wurden 102 mg (0.200 mmol, 80%) eines farblosen Feststoffs erhalten. **Molmasse:** 509.33 g/mol **Summenformel:** C₂₂H₁₅F₃NO₈P



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 8.33-8.31 (m, 2H, H-7'); 8.21-8.20 (m, 2H, H-4); 8.03-8.02 (m, 1H, H-6); 7.81-7.79 (m, 2H, H-8'); 7.48-7.47 (m, 2H, H-2'); 7.26-7.23 (m, 2H, H-3'); 7.10-7.09 (m, 1H, H-3); 5.44-5.35 (m, 1H, H-7); 5.29 (d, ³J_{H,H} = 10.4 Hz, 2H, Ph-CH₂). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 163.8 (C-5'); 154.5 (C-5); 151.3 (C-4'); 143.9 (d, ²J_{C,P} = 6.1 Hz, C-2); 135.4 (C-1'); 132.7 (C-9'); 132.5 (C-6'); 130.6 (C-7'); 130.0 (C-2'); 127.6 (C-5); 125.7 (C-8'); 125.7 (C-4); 125.6 (CF₃); 122.1 (C-6); 121.5 (C-3'); 119.9 (C-3); 70.3 (d, ²J_{C,P} = 6.0 Hz, Ph-CH₂); 67.9 (d, ²J_{C,P} = 7.3 Hz, C-7). ¹⁹F-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 63.19. ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = -10.7.

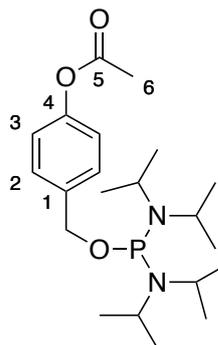
7.2.8 Synthese der Phosphordiamidite

Darstellung von 4-Acetoxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49a**

a) Die Synthese wurde nach AAV3a durchgeführt, mit 529 mg (1.98 mmol) Bis(*N,N*-diisopropylamino)chlorphosphin **51** gelöst in 12 mL abs. Diethylether, 0.57 mL (415 mg, 4.10 mmol) Triethylamin und 625 mg (3.76 mmol) 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-methoxybenzoat, gelöst in 6 mL abs. THF. Die Reaktionsdauer betrug 3 h. Es wurden 517 mg (1.31 mmol, 66%) eines farblosen wachsartigen Feststoffes erhalten.

b) Die Synthese wurde nach AAV3b durchgeführt mit 2.36 g (14.4 mmol) 4-Acyloxybenzylalcohol **40a** gelöst in 15 mL THF, 1.26 mL (14.4 mmol) Phosphortrichlorid und 1.17 mL (14.4 mmol) Pyridin gelöst in 35 mL THF. Im zweiten Schritt erfolgte die Zugabe von 12.4 mL (87.8 mmol) DIPA. Es wurden 3.02 g (7.62 mmol, 53%) eines farblosen wachsartigen Feststoffes erhalten.

Molmasse: 396.25 g/mol **Summenformel:**
 $C_{21}H_{37}N_2O_3P$ **MS:** (MALDI, 9-AA) m/z = berechnet
für $C_{34}H_{46}N_3O_6P$: 589.331 [M-H⁺+Matrix], gefunden:
589.309.



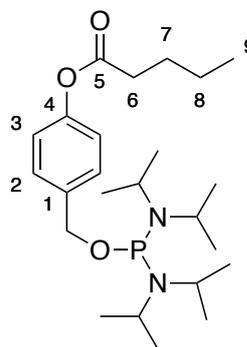
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.39-7.37 (m, 2 H, H-2); 7.05-7.04 (m, 2 H, H-3); 4.64-4.63 (m, 2 H, Ph-CH₂); 3.61-3.54 (m, 4 H, CN-H); 2.29 (s, 3 H, H-6); 1.19 (d, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 12 H, *iso*Pr); 1.19 (d, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 12 H, *iso*Pr); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.6 (C-5); 149.6 (C-4); 138.3 (d, ³J_{C,P} = 10.6 Hz, C-1); 127.9 (C-2); 121.3 (C-3); 65.6 (d, ²J_{C,P} = 23.2 Hz, Ph-CH₂); 44.5 (d, ²J_{C,P} = 12.3 Hz, 2x N-CH); 24.7 (d, ³J_{C,P} = 8.0 Hz, *iso*Pr); 24.0 (d, ³J_{C,P} = 5.6 Hz, *iso*Pr); 21.2 (C-6). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 123.4. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2970, 2923, 2901, 1766, 1506, 1454, 1302, 1114, 1049, 950, 741.

Darstellung von 4-Pentanoyloxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit 49b

Die Synthese wurde nach AAV3b durchgeführt mit 2.25 g (10.8 mmol), 4-(Hydroxymethyl)phenylpentanoat **40b** gelöst in 15 mL THF, 0.94 mL (10.8 mmol) Phosphortrichlorid und 0.88 mL (10.8 mmol) Pyridin gelöst in 35 mL THF. Im zweiten Schritt erfolgte die Zugabe von 9.24 mL (65.8 mmol) DIPA. Die Reinigung erfolgte mittels Chromatographie am Chromatotron mit einem Petrolether/Triethylamin-Gemisch (99:1).

Ausbeute: Es wurden 2.65 g (6.04 mmol, 56%) eines farblosen wachstartigen Feststoffes erhalten.

Molmasse: 438.58 g/mol **Summenformel:**
 $C_{12}H_{28}ClN_2P$ **Drehwert: MS:** (MALDI, 9-AA) m/z =
berechnet für $C_{37}H_{52}N_3O_6P$: 631.386 [M-H⁺+Matrix],
gefunden: 631.368.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.38-7.36 (m, 2H, H-2); 7.04-7.02 (m, 2H, H-3); 4.64-4.62 (m, 2H, Ph-CH₂); 3.62-3.52 (m, 4H, CN-H); 2.29 (t, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 2H, H-6); 1.78-1.70 (m, 2H, H-7); 1.50-1.40 (m, 2H, H-8); 1.18 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 12H, *iso*Pr); 1.18 (d, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 12H, *iso*Pr); 0.97 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-9). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.5 (C-5); 149.7 (C-4); 138.2 (d, ³J_{C,P} = 10.7 Hz, C-1); 127.9 (C-2); 121.3 (C-3);

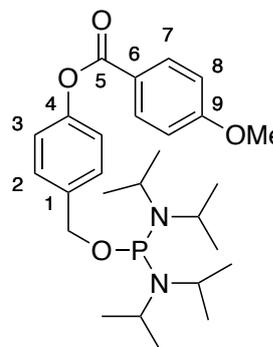
65.7 (d, $^2J_{C,P} = 23.0$ Hz, Ph-CH₂); 44.6 (d, $^2J_{C,P} = 12.4$ Hz, 2x N-CH); 34.3 (C-6); 27.2 (C-7); 24.8 (d, $^3J_{C,P} = 7.9$ Hz, *isoPr*); 24.0 (d, $^3J_{C,P} = 5.7$ Hz, *isoPr*); 22.4 (C-8); 13.9 (C-9). ^{31}P -NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 123.5. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2964, 2930, 2870, 1760, 1507, 1390, 1195, 1182, 1144, 1016, 951, 779.

Darstellung von 4-(4'-Methoxybenzoyloxy)benzylbis(diisopropylamino)phosphordiimidit 49d

Die Synthese wurde nach AAV3a durchgeführt, mit 479 mg (1.80 mmol) Bis(*N,N*-diisopropylamino)chlorphosphin **51** gelöst in 10 mL THF, 0.53 mL (382 mg, 3.78 mmol) Triethylamin und 881 mg (3.41 mmol) 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-methoxybenzoat, gelöst in 6 mL THF. Die Reaktionsdauer betrug 16 h.

Ausbeute: Es wurden 270 mg (0.55 mmol, 31%) eines farblosen wachsartigen Feststoffes erhalten.

Molmasse: 488.61 g/mol **Summenformel:** C₂₇H₄₁N₂O₄P **MS:** (MALDI, 9-AA) *m/z* = berechnet für C₄₀H₅₀N₄O₄P: 681.357, gefunden: 681.339.



^1H -NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.16-8.14 (m, 2H, H-8); 7.42-7.40 (m, 2H, H-2); 7.16-7.14 (m, 2H, H-3); 6.99-6.97 (m, 2H, H-7); 4.67-4.65 (m, 2H, Ph-CH₂); 3.87 (s, 3H, OCH₃); 3.63-3.53 (m, 4 H, CN-H); 1.20 (d, 12H, $^3J_{H,H} = 5.7$ Hz, *isoPr*); 1.18 (d, 12H, $^3J_{H,H} = 6.2$ Hz, *isoPr*). ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 165.0 (C-5); 163.7 (C-8); 149.6 (C4); 137.8 (C-1); 132.3 (C-7); 127.8 (C-2); 121.4 (C-3); 113.8 (C-6); 65.7 (d, $^2J_{C,P} = 22.5$ Hz, Ph-CH₂); 55.5 (OCH₃); 44.5 (d, $^2J_{C,P} = 12.5$ Hz, 2x N-CH); 24.6 (d, $^3J_{C,P} = 8.1$ Hz, *isoPr*); 23.9 (d, $^3J_{C,P} = 5.6$ Hz, *isoPr*). ^{31}P -NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 123.6. IR $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2983, 2934, 2909, 1756, 1511, 1457, 1300, 1009, 1061, 952, 753.

7.2.9 Synthese der symmetrischen Phosphoramidite

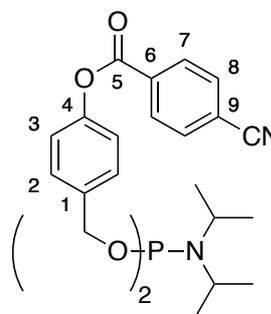
Die Synthese der symmetrischen C₄H₉-, C₆H₁₃-, C₉H₁₉- und C₁₁H₂₃-Phosphoramidite **59a-d** wurde nach der bereits publizierten Vorschrift durchgeführt.⁵⁰ Die analytischen Daten entsprachen den Literaturdaten.

Die Darstellung von Bis[4-(4'-nitrobenzoyloxy)benzyl]-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **26g** wurde nach der bereits publizierten Vorschrift durchgeführt.⁷⁰ Die analytischen Daten entsprachen den Literaturdaten.

Darstellung von Bis[4-(4'-cyanobenzoyloxy)benzyl]-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **26f**

Die Darstellung erfolgte nach AAV4. Es wurden 1.00 g (3.95 mmol) 4-Hydroxymethylphenyl-4'-cyanobenzoat **28f** und 0.58 mL (4.1 mmol) Triethylamin in 20 mL THF gelöst und zu 363 mg (1.80 mmol) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **27**, gelöst in 15 mL THF, getropft.

Ausbeute: Es wurden 1.02 g (1.60 mmol, 89%) eines farblosen Feststoffes erhalten. **Molmasse:** 635.65 g/mol **Summenformel:** C₃₆H₃₄N₃O₆P **MS:** (FAB) *m/z* = berechnet für C₃₆H₃₅N₃O₆P: 636.2 [M+H⁺], gefunden: 636.3.

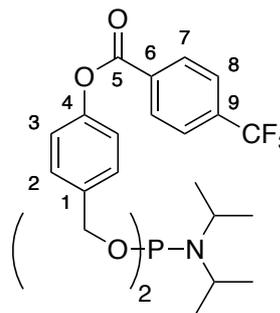


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.31-8.29 (m, 4H, H-7), 7.83-7.81 (m, 4H, H-8), 7.44-7.42 (m, 4H, H-2), 7.20-7.17 (m, 4H, H-3), 4.83-4.70 (m, 4H, Ph-CH₂), 3.77-3.67 (m, 2H, NC-H), 1.23 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 12H, *isoPr*). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 164.6 (C-5), 149.7 (C-4), 137.7 (C-1), 133.5 (C-6), 132.4 (C-8), 130.6 (C-7), 128.2 (C-2), 121.2 (C-3), 117.8 (CN), 117.0 (C-9), 64.8 (d, ²J_{C,P} = 18.4 Hz, Ph-CH₂), 43.3 (d, ²J_{C,P} = 12.3 Hz, N-CH), 24.7 (*isoPr*). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 148.2. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3056, 2968, 2929, 2868, 2228, 1740, 1507, 1365, 1260, 1189, 1172, 1072, 1028, 1013, 975, 876, 776, 685, 506, 485.

Darstellung von Bis[4-(4'-trifluorbenzoyloxy)benzyl]-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **26e**

Die Darstellung erfolgte nach AAV4. Es wurden 808 mg (2.73 mmol) 4-Hydroxymethylphenyl-4'-trifluoromethylbenzoat **28e** und 0.40 mL (2.9 mmol) Triethylamin in 10 mL THF gelöst und zu 250 mg (1.24 mmol) Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **27**, gelöst in 10 mL THF, getropft.

Ausbeute: Es wurden 553 mg (0.766 mmol, 62%) eines farblosen Feststoffes erhalten. **Molmasse:** 721.63 g/mol **Summenformel:** C₃₆H₃₄F₆NO₆P **MS:** (FAB) *m/z* = berechnet für C₃₆H₃₅F₆NO₆P: 722.2 [M+H⁺], gefunden: 722.2.



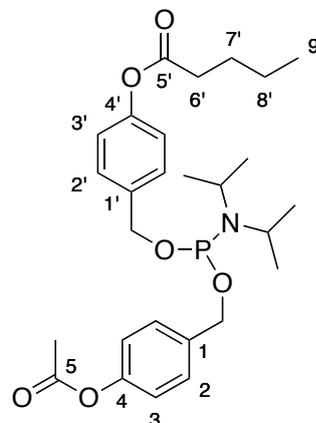
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.33-8.30 (m, 4H, H-7); 7.79-7.77 (m, 4H, H-8); 7.44-7.42 (m 4H, H-2); 7.20-7.18 (m, 4H, H-3); 4.84-4.70 (m, 4H, Ph-CH₂); 3.77-3.68 (m, 2H, NC-H), 1.23 (d, ³J_{HH} = 6.8 Hz, 12H, *isoPr*). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 164.0 (C-5); 150.0 (C-4); 137.7 (d, ³J_{CP} = 7.5 Hz, C-1); 135.0 (d, ²J_{C,F} = 32 Hz, C-9), 133.0 (C-6); 130.7 (C-7); 128.4 (C-2); 125.8 (d, ³J_{CP} = 7.5 Hz, C-8); 122.2 (CF₃); 121.5 (C-3); 64.9 (d, ²J_{C,P} = 18.5 Hz, Ph-CH₂); 43.2 (d, ²J_{C,P} = 12.4 Hz, N-CH); 24.8 (d, ³J_{C,P} = 7.3 Hz, *isoPr*). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 148.2. ¹⁹F-NMR (565 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 67.12. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2972, 2936, 2874, 1736, 1506, 1411, 1324, 1267, 1123, 1082, 1028, 971, 877, 829, 769, 698, 515.

7.2.10 Synthese der asymmetrischen Phosphoramidite

Darstellung von CH₃/C₄H₉-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **39a**

Die Synthese wurde nach AAV5a durchgeführt. Dazu wurden 610 mg (1.54 mmol) 4-Acetoxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49a** in 10 mL Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 4-(Hydroxymethyl)phenylpentanoat **40b** (214 mg, 1.03 mmol) und DCI-Aktivatorlösung (4.12 mL, 1.03 mmol) in 4 mL Acetonitril versetzt.

Ausbeute: Es wurden 331 mg (0.657 mmol, 64%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 503.57 g/mol **Summenformel:** C₂₇H₃₈NO₆P **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₂₇H₃₉NO₆P: 504.2479 [M+H⁺]⁺, gefunden: 504.2515.



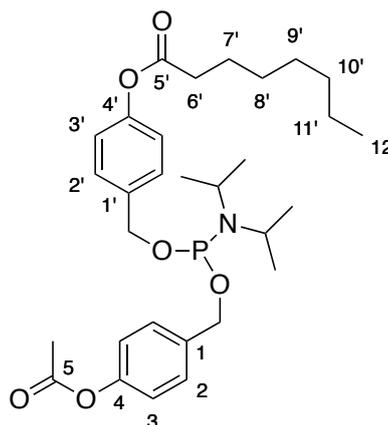
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.35-7.34 (m 4H, H-2, H-2'); 7.05-7.02 (m, 4H, H-3, H-3'); 4.77-4.73 (m, 4H, 2x Ph-CH₂); 3.72-3.65 (m, 2H, 2x NC-H), 2.57-2.54 (m, 2H, H-6');

2.29 (s, 3H, -CH₃); 1.77-1.71 (m, 2H, H-7'); 1.48-1.41 (m, 2H, H-8'); 1.20 (d, ³J_{HH} = 6.8 Hz, 12H, *isoPr*); 0.97 (t, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 3H, H-9'). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.4 (C-5'); 169.7 (C-5); 150.1 (C-4'); 150.0 (C-4); 137.3, 137.1 (C-1, C-1'); 128.2, 128.1 (C-2, C-2'); 121.5, 121.5 (C-3, C-3'); 65.0 (d, ³J_{CP} = 4.4 Hz, Ph-CH₂); 64.9 (d, ³J_{CP} = 4.4 Hz, Ph-CH₂); 43.3 (d, ³J_{CN} = 12.5 Hz, N-CH); 34.3 (C-6'); 27.2 (C-7'); 24.8, 24.8 (2x *isoPr*); 22.4 (C-8'); 21.3 (CH₃); 13.9 (C-9'). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 148.0. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2964, 2932, 2871, 1759, 1608, 1507, 1366, 1193, 1163, 1005, 973, 757, 504.

Darstellung von CH₃/C₇H₁₅-N,N-diisopropylaminophosphoramidit 39b

Die Synthese wurde nach AAV5a durchgeführt. Dazu wurden 1.24 g (3.12 mmol) 4-Acetoxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49a** in 15 mL Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 4-(Hydroxymethyl)phenyloctanoat **40c** (520 mg, 2.08 mmol) und DCI-Aktivatorlösung (8.32 mL, 2.08 mmol) in 5 mL Acetonitril versetzt.

Ausbeute: Es wurden 932 mg (1.71 mmol, 82%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 545.65 g/mol **Summenformel:** C₃₀H₄₄NO₆P **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₀H₄₅NO₆P: 546.2979 [M+H⁺]⁺, gefunden: 546.2951.

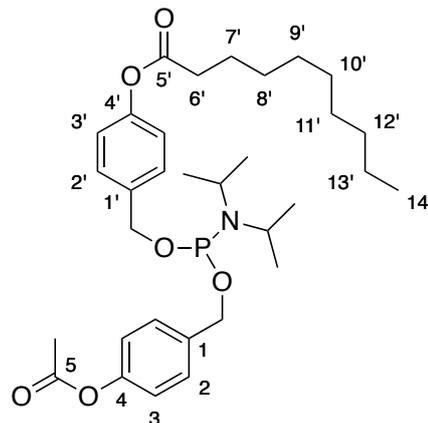


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.36-7.34 (m 4H, H-2, H-2'); 7.05-7.03 (m, 4H, H-3, H-3'); 4.77-4.73 (m, 2H, Ph-CH₂); 4.70-4.66 (m, 2H, Ph-CH₂); 3.72-3.66 (m, 2H, 2x NC-H); 2.56-2.53 (m, 2H, H-6'); 2.29 (s, 3H, -CH₃); 1.78-1.73 (m, 2H, H-7'); 1.44-1.29 (m, 8H, H-8' – H-11'); 1.20 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 12H, *isoPr*); 0.90 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, H-12'). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.5 (C-5'); 169.6 (C-5); 150.1 (C-4'); 150.0 (C-4); 137.3 (d, ³J_{C,P} = 7.6 Hz, C-1'); 137.1 (d, ³J_{C,P} = 7.5 Hz, C-1); 128.1, 128.1 (C-2, C-2'); 121.5, 121.5 (C-3, C-3'); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 4.7 Hz, Ph-CH₂); 64.9 (d, ²J_{C,P} = 4.8 Hz, Ph-CH₂); 43.3 (d, ²J_{C,P} = 12.5 Hz, N-CH); 34.6 (C-6'); 31.8, 29.6, 29.2, 22.7, (C-8' – C-11'); 25.1 (C-7'); 24.8, 24.8 (2x *isoPr*); 21.3 (CH₃); 14.2 (C-12'). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 148.0. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2965, 2929, 2859, 1760, 1608, 1507, 1366, 1192, 1163, 1005, 973, 756, 504.

Darstellung von CH₃/C₉H₁₉-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 39c

Die Synthese wurde nach AAV5b durchgeführt. Dazu wurden 520 mg (1.31 mmol) 4-Acetoxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49a** in 10 mL Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 4-(Hydroxymethyl)phenyldecanoat **40d** (244 mg, 0.88 mmol) und DCI-Aktivatorlösung (3.52 mL, 0.88 mmol) in 6 mL Acetonitril versetzt.

Ausbeute: Es wurden 437 mg (0.762 mmol, 87%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 573.70 g/mol **Summenformel:** C₃₂H₄₈NO₆P **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₂H₄₉NO₆P: 574.3292 [M+H⁺]⁺, gefunden: 574.3196.

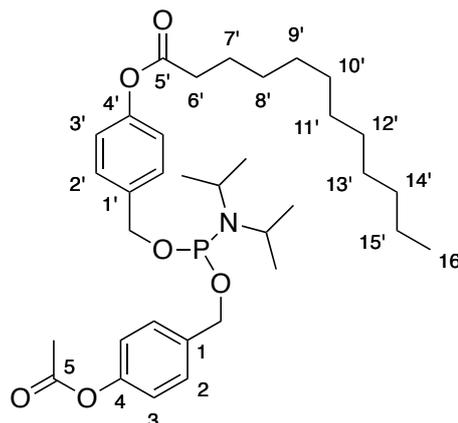


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.36-7.34 (m, 4H, H-2, H-2'); 7.05-7.02 (m, 4H, H-3, H-3'); 4.77-4.64 (m, 4H, 2x Ph-CH₂); 3.73-3.64 (m, 2H, 2x NC-H); 2.56-2.52 (m, 2H, H-6'); 2.29 (s, 3H, -CH₃); 1.79-1.71 (m, 2H, H-7'); 1.44-1.27 (m, 12H, H-8' – H-13'); 1.20 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 12H, *isoPr*); 0.89 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, H-14'). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.5 (C-5'); 169.6 (C-5); 150.2 (C-4'); 150.0 (C-4); 137.2 (d, ³J_{C,P} = 7.4 Hz, C-1, C-1'); 128.2, 128.1 (C-2, C-2'); 121.5, 121.5 (C-3, C-3'); 65.1 (d, ²J_{C,P} = 3.2 Hz, Ph-CH₂); 64.9 (d, ²J_{C,P} = 3.4 Hz, Ph-CH₂); 43.3 (d, ²J_{C,P} = 12.4 Hz, N-CH); 34.6 (C-6'); 32.0, 29.6, 29.4, 29.3, 22.8, (C-8' – C-13'); 25.1 (C-7'); 24.8, 24.8 (2x *isoPr*); 21.3 (CH₃); 14.2 (C-14'). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 148.0. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2964, 2926, 2855, 1759, 1507, 1192, 1005, 972, 755, 503.

Darstellung von CH₃/C₁₁H₂₃-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 39d

Die Synthese wurde nach AAV5a durchgeführt. Dazu wurden 620 mg (1.57 mmol) 4-Acetoxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49a** in 12 mL Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 4-(Hydroxymethyl)phenyldodecanoat **40e** (319 mg, 1.04 mmol) und DCI-Aktivatorlösung (4.16 mL, 1.04 mmol) in 5 mL Acetonitril versetzt.

Ausbeute: Es wurden 453 mg (0.753 mmol, 72%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 601.75 g/mol **Summenformel:** C₃₄H₅₂NO₆P **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₄H₅₃NO₆P: 602.3605 [M+H]⁺, gefunden: 602.4100.

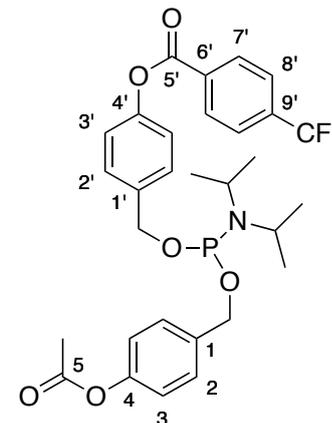


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.36-7.33 (m 4H, H-2, H-2'); 7.05-7.02 (m, 4H, H-3, H-3'); 4.78-4.64 (m, 4H, 2x Ph-CH₂); 3.73-3.64 (m, 2H, 2x NC-H), 2.56-2.52 (m, 2H, H-6'); 2.29 (s, 3H, -CH₃); 1.78-1.71 (m, 2H, H-7'); 1.43-1.26 (m, 16H, H-8' – H-15'); 1.20 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 12H, *isoPr*); 0.89 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, H-16'). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.5 (C-5'); 169.5 (C-5); 150.2 (C-4'); 150.0 (C-4); 137.2 (C-1, C-1'); 128.2 (C-2, C-2'); 121.5 (C-3, C-3'); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.4 Hz, Ph-CH₂); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.9 Hz, Ph-CH₂); 43.3 (d, ²J_{C,P} = 12.2 Hz, N-CH); 34.6 (C-6'); 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 29.3 (C-8' – C-15'); 25.1 (C-7'); 24.8, 24.8 (2x *isoPr*); 21.3 (CH₃); 14.4 (C-16'). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 148.0. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2964, 2925, 2854, 1760, 1608, 1507, 1365, 1192, 1163, 1005, 973, 756, 503.

Darstellung von CH₃/4-CF₃-Ph-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 39e

Die Synthese wurde nach AAV5a durchgeführt. Dazu wurden 544 mg (1.37 mmol) 4-Acetoxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49a** in 12 mL Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-trifluoromethylbenzoat **29e** (271 mg, 0.915 mmol) und DCI-Aktivatorlösung (3.66 mL, 0.915 mmol) in 5 mL Acetonitril versetzt.

Ausbeute: Es wurden 360 mg (0.609 mmol, 76%) eines erhalten. **Molmasse:** 591.56 g/mol
Summenformel: C₃₀H₃₃F₃NO₆P **HRMS:** (ESI⁺)
m/z = berechnet für C₃₀H₃₄F₃NO₆P: 592.2071
 [M+H]⁺, gefunden: 592.2209.

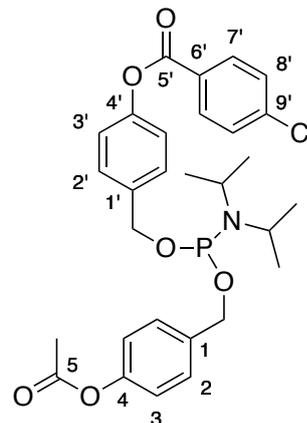


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.33-8.32 (m 2H, H-7'); 7.79-7.78 (m, 2H, H-8'); 7.43-7.41 (m, 2H, H-2'); 7.37-7.36 (m, 2H, H-2); 7.19-7.18 (m, 2H, H-3'); 7.06-7.05 (m, 2H, H-3); 4.81-4.67 (m, 4H, 2x Ph-CH₂); 3.74-3.68 (m, 4H, CN-H); 2.29 (s, 3H, CH₃); 1.22 (d, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 6H, *isoPr*); 1.22 (d, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, 6H, *isoPr*). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.7 (C-5); 164.2 (C-5'); 150.0 (C-4); 149.9 (C-4'); 137.7 (d, ³J_{C,P} = 7.5 Hz, C-1'); 137.2 (d, ³J_{C,P} = 7.8 Hz, C-1); 135.2 (d, ³J_{C,F} = 33 Hz, C-9'), 133.0 (C-6'); 130.7 (C-8'); 128.3 (C-2'); 128.3 (C-2); 125.8 (d, ⁴J_{C,F} = 3.6 Hz, C-7'); 125.7 (CF₃); 121.5, 121.5 (C-3, C-3'); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.5 Hz, Ph-CH₂); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.6 Hz, Ph-CH₂); 43.2 (d, ²J_{C,P} = 12.3 Hz, N-CH); 24.8, 24.8 (d, ³J_{C,P} = 7.3 Hz, 2x *isoPr*); 21.3 (CH₃). ¹⁹F-NMR (565 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 67.1. ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 148.1. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2968, 2932, 2869, 1762, 1741, 1608, 1506, 1324, 1264, 1193, 1129, 1075, 1013, 770, 552.

Darstellung von CH₃/4-Cl-Ph-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 39f

Die Synthese wurde nach AAV5a durchgeführt. Dazu wurden 599 mg (1.51 mmol) 4-Acetoxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49a** in 10 mL Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-chlorbenzoat **28d** (265 mg, 1.01 mmol) und DCI-Aktivatorlösung (4.02 mL, 1.01 mmol) in 8 mL Acetonitril versetzt.

Ausbeute: Es wurden 305 mg (0.548 mmol, 54%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 557.00 g/mol **Summenformel:** C₂₉H₃₃ClNO₆P
HRMS: (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₂₉H₃₄ClNO₆P: 558.1807 [M+H⁺]⁺, gefunden: 558.1845.

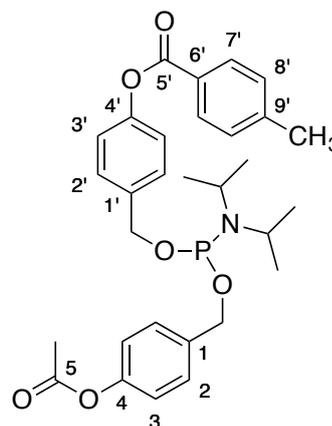


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.15-8.13 (m 2H, H-7'); 7.50-7.48 (m, 2H, H-8'); 7.42-7.40 (m, 2 H, H-2'); 7.38-7.36 (m, 2 H, H-2); 7.18-7.16 (m, 2H, H-3'); 7.07-7.05 (m, 2H, H-3); 4.81-4.67 (m, 4H, Ph-CH₂); 3.75-3.66 (m, 4H, CN-H); 2.29 (s, 3H, CH₃); 1.22 (d, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 12H, 2*iso*Pr). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.6 (C-5); 164.5 (C-5'); 150.2, 150.0 (C-4, C-4'); 140.2 (C-9'); 138.1 (C-6'); 137.5 (d, ³J_{C,P} = 7.5 Hz, C-1'); 137.2 (d, ³J_{C,P} = 8.2 Hz, C-1); 131.7 (C-7'); 129.1 (C-8'); 128.3 (C-2'); 128.2 (C-2); 121.5, 121.5 (C-3, C-3'); 65.1 (d, ²J_{C,P} = 5.6 Hz, Ph-CH₂); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.3 Hz, Ph-CH₂); 43.2 (d, ²J_{C,P} = 12.4 Hz, N-CH); 24.8, 24.8 (2x *iso*Pr); 21.3 (CH₃). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 148.1. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2966, 2930, 2868, 1761, 1737, 1506, 1261, 1164, 1011, 972, 752, 503.

Darstellung von CH₃/4-CH₃-Ph-N,N-diisopropylaminophosphoramidit 39g

Die Synthese wurde nach AAV5a durchgeführt. Dazu wurden 505 mg (1.27 mmol) 4-Acetoxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49a** in 15 mL Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-methylbenzoat **28c** (205 mg, 0.85 mmol) und DCI-Aktivatorlösung (3.40 mL, 0.85 mmol) in 5 mL Acetonitril versetzt.

Ausbeute: Es wurden 323 mg (0.601 mmol, 71%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 537.58 g/mol **Summenformel:** C₃₀H₃₆NO₆P **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₀H₃₇NO₆P: 538.2553 [M+H]⁺, gefunden: 538.2359.



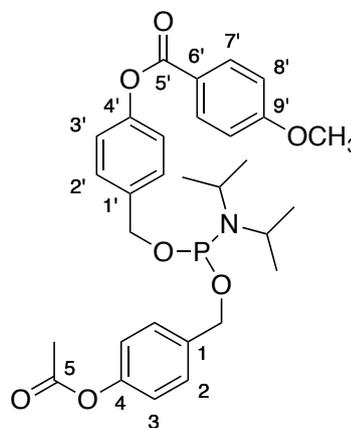
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.11-8.09 (m 2H, H-7'/H-8'); 7.42-7.36 (m, 4H, H-2, H-2'); 7.32-7.30 (m, 2H, H-7'/H-8'); 7.19-7.17 (m, 2H, H-3'); 7.07-7.05 (m, 2H, H-3); 4.81-4.67 (m, 4H, 2x Ph-CH₂); 3.76-3.67 (m, 4H, CN-H); 2.45 (s, 3H, -Ph-CH₃); 2.29 (s, 3H, -CH₃); 1.22 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 6H, *isoPr*); 1.22 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 6H, *isoPr*). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.6 (C-5); 165.4 (C-5'); 150.3 (C-4); 150.0 (C-4'); 144.5 (C-9'); 137.3 (d, ²J_{C,P} = 8.0 Hz, C-1/C-1'); 137.2 (d, ²J_{C,P} = 7.8 Hz, C-1/C-1'); 130.3 (C-7'); 129.4 (C-8'); 128.2, 128.2 (C-2/C-2'); 127.0 (C-6'); 121.7, 121.5 (C-3, C-3'); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.4 Hz, Ph-CH₂); 65.1 (d, ²J_{C,P} = 18.3 Hz, Ph-CH₂); 43.3 (d, ²J_{C,P} = 12.4 Hz, N-CH); 24.8, 24.8 (d, ³J_{C,P} = 7.2 Hz, 2x *isoPr*); 21.9 (Ph-CH₃); 21.3 (CH₃). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 147.9. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2966, 2930, 2868, 1762, 1735, 1610, 1507, 1366, 1192, 1177, 1003, 972, 783, 505.

Darstellung von CH₃/4-OCH₃-Ph-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 39h

Die Reaktion wurde unter Stickstoffatmosphäre und bei Raumtemperatur durchgeführt. 800 mg (2.02 mmol) 4-Acetoxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49a** wurden zu 348 mg (1.35 mmol) 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-methoxybenzoat **28b** und 160 mg (1.35 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol, gelöst in 25 mL abs. Acetonitril, getropft. Nach 30 stündigem Rühren wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen, zweimal mit NaHCO₃-Lösung und einmal mit Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte am Chromatotron mit Petrolether/Ethylacetat (19:1), dem 10% Triethylamin zugesetzt wurden.

Ausbeute: Es wurden 276 mg (0.500 mmol, 37%) eines farblosen wachstartigen Feststoffes erhalten.

Molmasse: 553.58 g/mol **Summenformel:** C₃₀H₃₆NO₇P **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₀H₄₀N₂O₇P: 571.2567 [M+NH₄⁺]⁺, gefunden: 571.2561.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.16-8.14 (m 2H, H-7'); 7.41-7.32 (m, 2H, H-2, H-2'); 7.18-7.16 (m, 2H, H-3/H-3'); 7.05-7.01 (m, 2H, H-3/H-3'); 6.99-6.96 (m, 2H, H-8'); 4.89- 4.86 (m, 4H, Ph-CH₂); 3.89 (m, 3H, -OCH₃); 2.29 (s, 3H, CH₃); 1.26 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 6H, *isoPr*); 1.25 (d, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 6H, *isoPr*). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.4 (C-5); 164.9 (C-5'); 150.6, 150.2 (C-4, C-4'); 149.7 (C-9'); 138.7 (C-6'); 135.6 (C-1'); 135.5 (C-1); 132.3 (C-7'); 128.8 (C-8'); 128.7 (C-2'); 128.1 (C-2); 121.8, 121.6 (C-3, C-3'); 64.1 (Ph-CH₂); 64.0 (Ph-CH₂); 55.5 (OCH₃); 45.3 (NC); 22.9, 22.9 (2x *isoPr*); 21.1 (CH₃). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 148.0. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2961, 2935, 2868, 1760, 1731, 1611, 1503, 1301, 1173, 1123, 970, 761, 502.

Darstellung von CH₃/O-Ac-Man-N,N-diisopropylaminophosphoramidit 67

Die Synthese wurde nach AAV5a durchgeführt. Dazu wurden 649 mg (1.64 mmol) 4-Acetoxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49a** in 10 mL Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-mannose **66** (380 mg, 1.09 mmol) und DCI-Aktivatorlösung (4.36 mL, 1.09 mmol) in 6 mL Acetonitril versetzt.

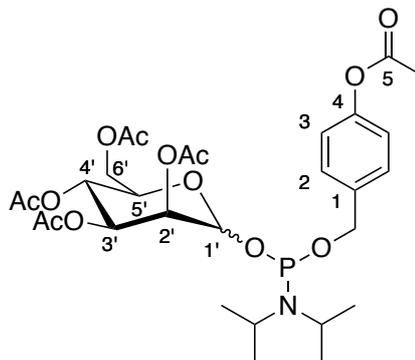
Ausbeute: Es wurden 445 mg (0.691 mmol, 63%)

eines farblosen Sirups erhalten. **Molmasse:**

643.62 g/mol **Summenformel:** C₂₉H₄₂NO₁₃P

HRMS: (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₂₉H₄₃NO₁₃P

644.2467 [M+H⁺]⁺, gef.: 644.2501.

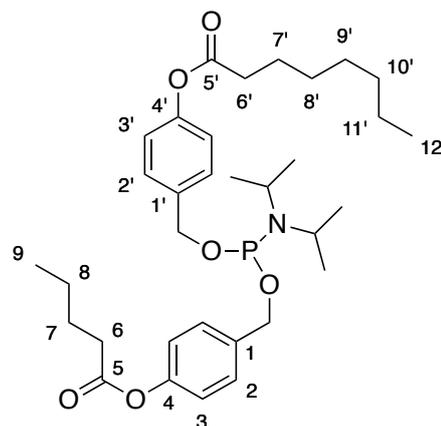


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.37-7.33 (m, 2H, H-2); 7.07-7.03 (m, 2H, H-3); 5.45-5.38 (m, 1H, H-1'); 5.33-4.98 (m, 3H, H-2', H-3', H-4'); 4.80-4.62 (m, 2H, Ph-CH₂); 4.27-4.09 (m, 3H, H-5', H-6'); 3.73-3.58 (m, 2H, NC-H); 2.29 (s, 3H, CH₃); 2.17-2.00 (m, 12H, 4xOAcetyl); 1.27-1.14 (m, 12H, 2x*iso*Pr). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.6, 170.1, 169.8, 169.6, (4xOAcetyl); 169.4 (C-5); 149.6 (C-4); 136.4 (C-1); 128.0, 128.0, 128.0, 127.8 (C-2); 121.5, 121.5, 121.4, 121.3 (C-3); 93.6 (C-1'), 72.7, 71.1, 71.1, 70.4 (C-2', C-3', C-4', C-5'); 69.3, 69.1 (C-6'); 66.1, 66.0; 65.4, 65.4, 65.2, 65.1 (Ph-CH₂); 43.9, 43.8, 43.7, 43.6 (NC); 24.6, 24.5, 24.4, 24.2 (2x *iso*Pr); 21.1 (CH₃); 20.9, 20.7, 20.7, 20.6 (4xAcetyl). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 152.8, 152.3, 149.7, 148.9. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2969, 1744, 1367, 1214, 1165, 1048, 973, 910, 762, 596, 523.

Darstellung von C₄H₉/C₇H₁₅-N,N-diisopropylaminophosphoramidit 39i

Die Synthese wurde nach AAV5b durchgeführt. Dazu wurden 350 mg (0.798 mmol) 4-Pentanoyloxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49b** in 5 mL Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 4-(Hydroxymethyl)phenyloctanoat **40c** (133 mg, 0.532 mmol) und DCI-Aktivatorlösung (2.13 mL, 0.532 mmol) in 4 mL Acetonitril versetzt.

Ausbeute: Es wurden 281 mg (0.478 mmol, 90%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 587.73 g/mol **Summenformel:** C₃₃H₅₀NO₆P **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₃H₅₁NO₆P: 588.3449 [M+H⁺]⁺, gefunden: 588.3379.

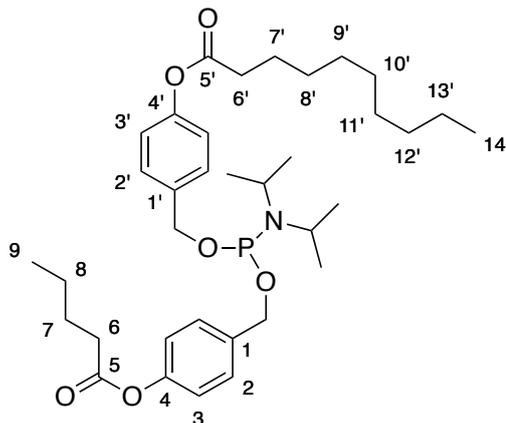


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.35-7.34 (m 4H, H-2, H-2'); 7.04-7.02 (m, 4H, H-3, H-3'); 4.76-4.73 (m, 2H, Ph-CH₂); 4.69-4.65 (m, 2H, Ph-CH₂); 3.72-3.65 (m, 2H, 2x NC-H), 2.56 (t, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, 2H, H-6'); 2.54 (t, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, 2H, H-6); 1.76-1.72 (m, 4H, H-7, H-7'); 1.48-1.29 (m, 10H, H-8, H-8' – 11'); 1.20 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 12H, *isoPr*); 0.97 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, H-9); 0.89 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, H-12'). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.5 (C-5, C-5'); 150.1 (C-4, C-4'); 137.1 (d, ³J_{C,P} = 7.4 Hz, C-1, C-1'); 128.2 (C-2, C-2'); 121.5 (C-3, C-3'); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.1 Hz, 2x Ph-CH₂); 43.3 (d, ²J_{C,P} = 12.4 Hz, N-CH); 34.6, 34.3 (C-6, C-6'); 31.8, 29.2, 29.1, 22.8, 22.4 (C-8, C-8' – C-11'); 27.2, 25.1 (C-7, C-7'); 24.8, 24.8 (2x *isoPr*); 14.2 (C-12'); 13.9 (C-9). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 148.0. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2964, 2929, 2861, 1758, 1608, 1507, 1364, 1197, 1163, 1001, 973, 754, 504.

Darstellung von C₄H₉/C₉H₁₉-N,N-diisopropylaminophosphoramidit 39j

Die Synthese wurde nach AAV5b durchgeführt. Dazu wurden 427 mg (0.974 mmol) 4-Pentanoyloxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49b** in 5 mL Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 4-(Hydroxymethyl)phenyldecanoat **40d** (181 mg, 0.649 mmol) und DCI-Aktivatorlösung (2.60 mL, 0.649 mmol) in 4 mL Acetonitril versetzt.

Ausbeute: Es wurden 344 mg (0.559 mmol, 86%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 615.78 g/mol **Summenformel:** C₃₅H₅₄NO₆P
HRMS: (ESI⁺) m/z = berechnet für C₃₅H₅₅NO₆P: 616.3762 [M+H]⁺, gefunden: 616.3753.



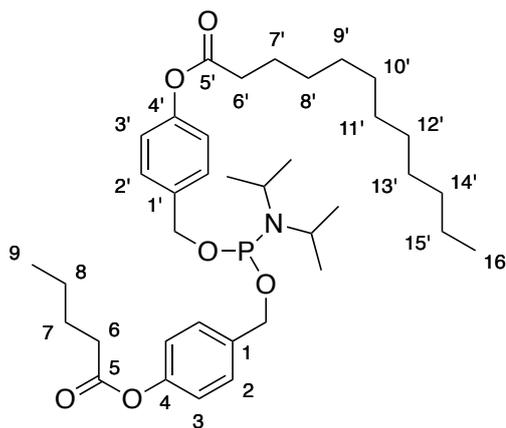
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.35-7.34 (m 4H, H-2, H-2'); 7.04-7.02 (m, 4H, H-3, H-3'); 4.76-4.73 (m, 2H, Ph-CH₂); 4.69-4.65 (m, 2H, Ph-CH₂); 3.72-3.65 (m, 2H, 2x NC-H), 2.56 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, H-6'); 2.54 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, H-6); 1.77-1.72 (m, 4H, H-7, H-7'); 1.48-1.38 (m, 4H, H-8', H-8); 1.35-1.26 (m, 10H, H-9' – H-13'); 1.20 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 12H, *isoPr*); 0.97 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, H-9); 0.89 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 3H, H-14'). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.5 (C-5, C-5'); 150.1 (C-4, C-4'); 137.1 (d, ³J_{C,P} = 7.6 Hz, C-1, C-1'); 128.2 (C-2, C-2'); 121.5 (C-3, C-3'); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.1 Hz, 2x Ph-CH₂); 43.3 (d, ²J_{C,P} = 12.6 Hz, N-CH); 34.6, 34.3 (C-6, C-6'); 32.0, 29.6, 29.4, 22.8, (C-9' – C-13'); 29.3 (C-8/C-8'); 27.2, 25.1 (C-7, C-7'); 24.8, 24.8 (2x *isoPr*); 22.4 (C-8/C-8'); 14.2, 13.9 (C-9, C-14'). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 148.0. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2962, 2927, 2856, 1758, 1507, 1364, 1198, 1138, 1104, 973, 754, 504.

Darstellung von C₄H₉/C₁₁H₂₃-N,N-diisopropylaminophosphoramidit 39k

Die Synthese wurde nach AAV5b durchgeführt. Dazu wurden 376 mg (1.08 mmol) 4-Pentanoyloxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49b** in 5 mL Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 4-(Hydroxymethyl)phenyldodecanoat **40e** (220 mg, 0.72 mmol) und DCI-Aktivatorlösung (2.88 mL, 0.72 mmol) in 4 mL Acetonitril versetzt.

Durch einen Fehler bei der Chromatographie der Verbindung konnte nur eine deutlich geringere Menge als üblich isoliert werden.

Ausbeute: Es wurden 174 mg (0.242 mmol, 34%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 643.83 g/mol **Summenformel:** C₃₇H₅₈NO₆P
HRMS: (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₇H₅₉NO₆P: 644.4075 [M+H]⁺, gefunden: 644.4068.

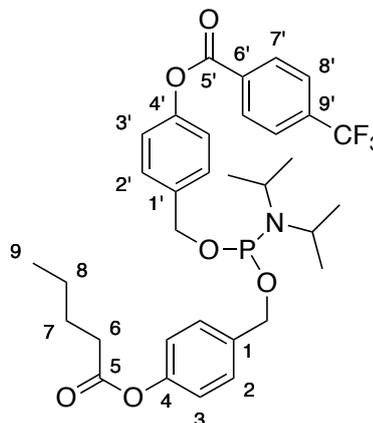


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.35-7.34 (m 4H, H-2, H-2'); 7.04-7.02 (m, 4H, H-3, H-3'); 4.77-4.72 (m, 2H, Ph-CH₂); 4.69-4.65 (m, 2H, Ph-CH₂); 3.72-3.65 (m, 2H, 2x NC-H), 2.57-2.53 (m, 2H, H-6, H-6'); 1.78-1.71 (m, 4H, H-7, H-7'); 1.49-1.26 (m, 18H, H-8, H-8' – H-15'); 1.20 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 12H, *isoPr*); 0.97 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, H-9); 0.88 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 3H, H-16'). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.5 (C-5, C-5'); 150.0 (C-4, C-4'); 136.9 (m, C-1, C-1'); 128.1 (C-2, C-2'); 121.5 (C-3, C-3'); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.1 Hz, 2x Ph-CH₂); 43.3 (d, ²J_{C,P} = 12.5 Hz, N-CH); 34.6, 34.3 (C-6, C-6'); 32.1, 29.7, 29.4, 29.3, 22.8, 22.4 (C8, C-8' – C-15'); 27.1, 25.1 (C-7, C-7'); 24.8, 24.8 (2x *isoPr*); 14.2 (C-16'); 13.9 (C-9). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 148.0. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2962, 2925, 2855, 1758, 1507, 1311, 1198, 1138, 1004, 973, 755, 503.

Darstellung von C₄H₉/ 4-CF₃-Ph-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **39l**

Die Synthese wurde nach AAV5b durchgeführt. Dazu wurden 717 mg (1.64 mmol) 4-Pentanoyloxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49b** in 15 mL Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-trifluoromethylbenzoat **28e** (323 mg, 1.09 mmol) und DCI-Aktivatorlösung (4.36 mL, 1.09 mmol) in 5 mL Acetonitril versetzt.

Ausbeute: Es wurden 622 mg (0.981 mmol, 90%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 633.63 g/mol **Summenformel:** C₃₃H₃₉F₃NO₆P
HRMS: (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₃H₄₀F₃NO₆P: 616.3692 [M+H⁺]⁺, gefunden: 616.3753.

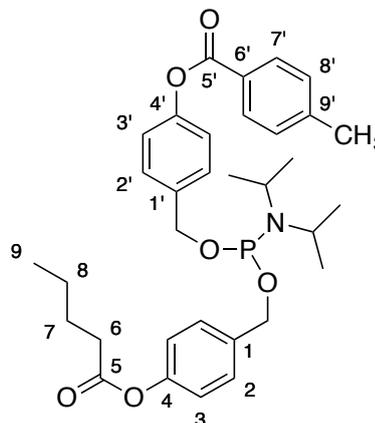


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.33-8.31 (m, 2H, H-7'); 7.79-7.77 (m, 2H, H-8'); 7.43-7.41 (m, 2H, H-2'); 7.37-7.35 (m, 2H, H-2); 7.19-7.17 (m, 2H, H-3'); 7.05-7.03 (m, 2H, H-3); 4.81- 4.66 (m, 4H, 2x Ph-CH₂); 3.75- 3.66 (m, 4H, CN-H); 2.56 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-6); 1.78-1.70 (m, 2H, H-7); 1.49-1.40 (m, 2H, H-8); 1.22 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 6H, *isoPr*); 1.21 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 6H, *isoPr*); 0.97 (t, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 2H, H-9). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.4 (C-5); 164.1 (C-5'); 150.0 (C-4); 149.9 (C-4'); 137.7 (C-1'); 137.1 (C-1); 135.0 (C-6'), 132.9 (C-9'); 130.7 (C-7'); 128.3 (C-2'); 128.2 (C-2); 125.8 (d, ³J_{C,F} = 3.7 Hz, C-8'); 125.5 (CF₃); 121.5, 121.5 (C-3, C-3'); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.5 Hz, Ph-CH₂); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.3 Hz, Ph-CH₂); 43.2 (d, ²J_{C,P} = 12.4 Hz, N-CH); 34.3 (C-6); 27.2 (C-7); 24.8, 24.8 (d, ³J_{C,P} = 7.3 Hz, 2x *isoPr*); 22.4 (C-8); 13.9 (C-9). ¹⁹F-NMR (565 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 63.2. ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 148.1. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2968, 2932, 2872, 1737, 1505, 1325, 1266, 1065, 1014, 969, 712, 504.

Darstellung von C₄H₉/ 4-CH₃-Ph-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 39m

Die Synthese wurde nach AAV5b durchgeführt. Dazu wurden 396 mg (0.903 mmol) 4-Pentanoyloxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49b** in 5 mL Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-methylbenzoat **28c** (146 mg, 0.602 mmol) und DCI-Aktivatorlösung (2.4 mL, 0.60 mmol) in 4 mL Acetonitril versetzt.

Ausbeute: Es wurden 348 mg (0.60 mmol, 99%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 579.66 g/mol **Summenformel:** C₃₃H₄₂NO₆P **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₃H₄₃NO₆P: 616.3692 [M+H⁺]⁺, gefunden: 616.3753.

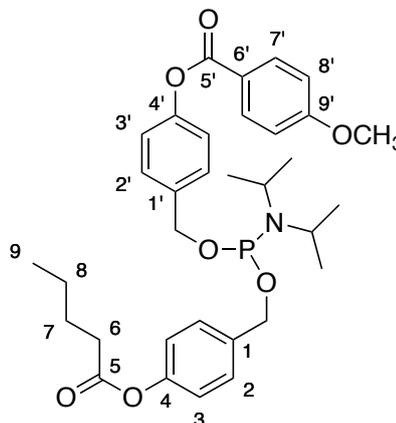


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.10-8.08 (m 2H, H-7'/H-8'); 7.40-7.39 (m, 2H, H-2'); 7.36-7.35 (m, 2H, H-2); 7.31-7.30 (m, 2H, H-7'/H-8'); 7.17-7.16 (m, 2H, H-3'); 7.05-7.03 (m, 2H, H-3); 4.79- 4.67 (m, 4H, 2x Ph-CH₂); 3.73-3.67 (m, 4H, CN-H); 2.55 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-6); 2.45 (s, 3H, -Ph-CH₃); 1.76-1.71 (m, 2H, H-7); 1.48-1.41 (m, 2H, H-8); 1.21 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 6H, *isoPr*); 1.21 (d, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 6H, *isoPr*); 0.97 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-9). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.5 (C-5); 164.4 (C-5'); 150.3 (C-4); 150.1 (C-4'); 144.5 (C-9'); 137.2 (d, ²J_{C,P} = 7.6 Hz, C-1/C-1'); 137.2 (d, ²J_{C,P} = 7.6 Hz, C-1/C-1'); 130.4 (C-7'); 129.4 (C-8'); 128.2, 128.2 (C-2/C-2'); 127.0 (C-6'); 121.7, 121.5 (C-3, C-3'); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.2 Hz, Ph-CH₂); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.1 Hz, Ph-CH₂); 43.2 (d, ²J_{C,P} = 12.4 Hz, N-CH); 34.3 (C-6); 27.2 (C-7); 24.8, 24.8 (d, ³J_{C,P} = 7.3 Hz, 2x *isoPr*); 22.4 (C-8); 21.9 (Ph-CH₃); 13.9 (C-9). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 144.0. IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2965, 2931, 2871, 1758, 1736, 1610, 1507, 1264, 1197, 1007, 972, 756, 506.

Darstellung von C₄H₉/4-OCH₃-Ph-N,N-diisopropylaminophosphoramidit 39n

Die Synthese wurde nach AAV5a durchgeführt. Dazu wurden 431 mg (1.24 mmol) 4-Pentanoyloxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphordiamidit **49b** in 10 mL Acetonitril gelöst und mit einer Lösung von 4-(Hydroxymethyl)phenyl-4'-methoxybenzoat **28b** (213 mg, 0.827 mmol) und DCI-Aktivatorlösung (3.3 mL, 0.83 mmol) in 5 mL Acetonitril versetzt.

Ausbeute: Es wurden 295 mg (0.495 mmol, 60%) eines farblosen Öls erhalten. **Molmasse:** 595.66 g/mol **Summenformel:** C₃₃H₄₂NO₇P **HRMS:** (ESI) m/z = berechnet für C₃₃H₄₃NO₇P: 596.2702 [M+H]⁺, gefunden: 596.2778.



¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.16-8.14 (m 2H, H-7'); 7.40-7.35 (m, 2H, H-2, H-2'); 7.17-7.15 (m, 2H, H-3/H-3'); 7.05-7.03 (m, 2H, H-3/H-3'); 7.00-6.97 (m, 2H, H-8'); 4.80- 4.66 (m, 4H, Ph-CH₂); 3.90 (m, 3H, -OCH₃); 3.75-3.65 (m, 4H, CN-H); 2.57-2.53 (m, 2H, H-6); 1.78-1.70 (m, 2H, H-7); 1.49-1.40 (m, 2H, H-8); 1.21 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 6H, *isoPr*); 1.21 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 6H, *isoPr*); 0.97 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-9). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.2 (C-5); 164.6 (C-5'); 150.5, 150.1 (C-4, C-4'); 149.3 (C-9'); 138.2 (C-6'); 135.5 (C-1'); 135.4 (C-1); 132.1 (C-7'); 128.7 (C-8'); 128.6 (C-2'); 128.1 (C-2); 121.5, 121.3 (C-3, C-3'); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.2 Hz, Ph-CH₂); 65.0 (d, ²J_{C,P} = 18.1 Hz, Ph-CH₂); 55.7 (OCH₃); 43.1 (d, ²J_{C,P} = 12.4 Hz, NC); 34.1 (C-6); 26.9 (C-7); 24.8, 24.8 (d, ³J_{C,P} = 7.3 Hz, 2x *isoPr*); 22.2 (C-8); 13.7 (C-9). ³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 148.0 IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2964, 2932, 2870, 1758, 1731, 1605, 1510, 1255, 1163, 972, 762, 506.

7.2.11 Synthese der DiPPro-Nucleotide

7.2.11.1 Synthese symmetrischer DiPPro-Nucleotide

Darstellung von CF₃-Ph-DiPPro-d4TDP 24e

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 64 mg (0.10 mmol) d4TMP **8** mit 110 mg (0.16 mmol) CF₃-Ph-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **26e** in 2 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 624 µL (160 µmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 28 µL (160 µmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. Zweimalige RP-Chromatographie am Puri Flash lieferte das Produkt.

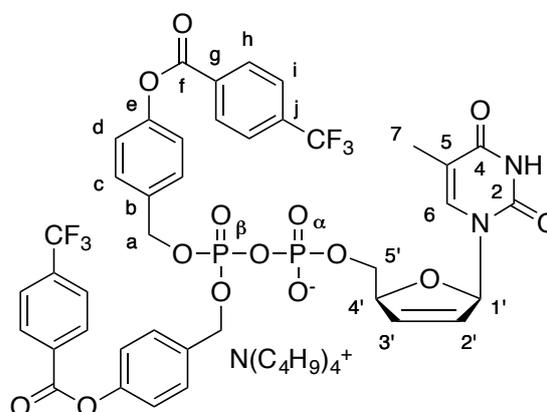
Ausbeute: Es wurden 69 mg (0.058 mmol, 58%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 1182.10 g/mol **Summenformel:**

C₅₆H₆₇F₆N₃O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode I,

R_t = 15.7 min **Drehwert:** [α]_D²³ = +2 (c = 0.1 mg/mL; CH₃OH) **HRMS:** (ESI⁻) *m/z* =

berechnet für C₄₀H₃₁F₆N₂O₁₄P₂: 939.1160 [M-H]⁻ gefunden: 939.1163.



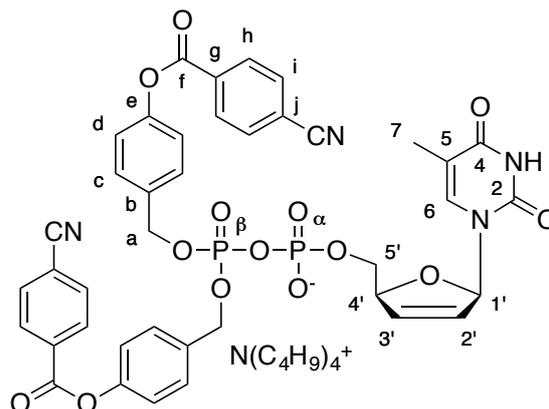
¹H-NMR (600 MHz, MeOH-*d*4): δ [ppm] = 8.32-8.31 (m, 4H, H-h); 7.85-7.83 (m, 4H, H-i); 7.69 (s, 1H, H-6); 7.47-7.44 (m, 4H, H-c); 7.23-7.22 (m, 4H, H-d); 6.97 (bs, 1H, H-1'); 6.43-6.42 (m, 1H, H-3'); 5.87-5.86 (m, 1H, H-2'); 5.18-5.15 (m 4H, H-a); 4.99 (m, 1H, H-4'); 4.28-4.22 (m, 2H, H-5'); 3.25-3.22 (m, 9H, H-A); 1.91 (s, 3H, H-7); 1.69-1.64 (m, 9H, H-B); 1.45-1.39 (m, 9H, H-C); 1.03 (t, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 13.5H, H-D). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-*d*4): δ [ppm] = 166.6 (C-4); 165.2 (C-f); 152.3 (C-2); 151.2 (C-e); 138.7 (C-6); 135.5 (C-j); 135.4 (C-3'); 134.4 (C-g); 131.8 (C-h); 130.6 (d, ⁴J_{C,P} = 5.3 Hz, C-c); 127.6 (C-2'); 126.8 (d, ⁴J_{C,F} = 3.4 Hz, C-i); 124.3 (CF₃); 122.9 (C-d); 112.1 (C-5); 90.8 (C-1'); 87.0 (d, ³J_{C,P} = 9.4 Hz, C-4'); 70.2 (dd, ²J_{C,P} = 4.3 Hz, ⁴J_{C,P} = 3.6 Hz, C-a); 68.1 (d, ²J_{C,P} = 6.0 Hz, C-5'); 59.5 (C-A), 24.8 (C-B); 20.7 (C-C); 13.9 (C-D); 12.5 (C-7). ³¹P-NMR (565 MHz, MeOH-*d*4, entkoppelt): δ [ppm] = -12.0 (d, ²J_{P,P} = 20.7 Hz, P_β), -12.9 (d, ²J_{P,P} = 20.6 Hz, P_α). ¹⁹F-NMR (243 MHz, MeOH-*d*4): δ [ppm] = 64.71.

Darstellung von CN-Ph-DiPPro-d4TDP 24f

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 43 mg (0.07 mmol) d4TMP **8** mit 66 mg (0.104 mmol) CN-Ph-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **26f** in 2 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 416 μ L (0.104 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 19 μ L (0.104 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. Zweimalige RP-Chromatographie am Puri Flash lieferte das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 38 mg (0.044 mmol, 63%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 1096.12 g/mol **Summenformel:** $C_{56}H_{67}N_5O_{14}P_2$ **RP-18-HPLC:** Methode I, $R_t = 13.2$ min **Drehwert:** $[\alpha]_D^{23} = +6$ ($c = 0.1$ mg/mL; CH_3OH) **HRMS:** (ESI⁺) $m/z =$ berechnet für $C_{40}H_{31}F_6N_2O_{14}P_2$: 877.1288 $[M+Na^+]^+$, gefunden: 877.1228.



¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm]= 8.30-8.28 (m 4H, H-h); 7.91-7.90 (m, 4H, H-i); 7.68 (d, ⁴ $J_{H,H} = 1.2$ Hz, 1H, H-6); 7.48-7.44 (m, 4H, H-c); 7.43-7.21 (m, 4H, H-d); 6.97 (ddd, ³ $J_{H,H} = 3.4$ Hz, ³ $J_{H,H} = 3.4$ Hz, ⁴ $J_{H,H} = 3.4$ Hz, 1H, H-1'); 6.42 (ddd, ³ $J_{H,H} = 6.0$ Hz, ³ $J_{H,H} = 3.3$ Hz, ⁴ $J_{H,H} = 3.3$ Hz, 1H, H-3'); 5.87-5.84 (ddd, ³ $J_{H,H} = 6.0$ Hz, ³ $J_{H,H} = 3.5$ Hz, ⁴ $J_{H,H} = 3.5$ Hz, 1H, H-2'); 5.18-5.14 (m, 4H, H-a); 4.97 (bs, 1H, H-4'), 4.28-4.14 (m, 2H, H-5'); 3.26-3.21 (m, 9.5H, H-A), 1.90 (d, ⁴ $J = 1.1$ Hz, 3H, H-7), 1.70-1.62 (m, 9.5H, H-B), 1.46-1.37 (dt, ³ $J_{H,H} = 7.4$ Hz, ³ $J_{H,H} = 7.4$ Hz, 9.5H, H-C), 1.02 (t, ³ $J_{H,H} = 7.3$ Hz, 14.3H, H-D). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm]= 166.4 (C-4); 164.7 (C-f); 152.7 (C-2); 152.2 (C-e); 138.7 (C-6); 135.6 (C-b); 135.3 (C-3'); 134.7 (C-g); 133.7 (C-i); 131.7 (C-h); 130.5 (d, ⁴ $J_{CP} = 3.3$ Hz, C-c); 127.6 (C-2'); 122.8 (C-d); 118.8 (CN); 118.1 (C-j); 112.1 (C-5); 90.8 (C-1'); 87.0 (d, ³ $J_{C,P} = 9.4$ Hz, C-4'); 70.2 (dd, ² $J_{C,P} = 5.8$ Hz, ⁴ $J_{C,P} = 2.0$ Hz, C-a); 68.1 (d, ³ $J_{C,P} = 6.0$ Hz, C-5'); 59.5 (t, ³ $J_{C,N} = 5.5$ Hz, C-A); 24.8 (C-B); 20.7 (C-C); 13.9 (C-D); 12.5 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm]= -12.1 (d, ² $J_{P,P} = 21.1$ Hz, P _{β}), -12.9 (d, ² $J_{P,P} = 21.7$ Hz, P _{α}).

Darstellung von CF₃-Ph-DiPPro-AZTDP 25e

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 140 mg (0.22 mmol) AZTMP **9** mit 238 mg (0.33 mmol) CF₃-Ph-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **26e** in 6 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 1320 µL (0.33 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 60 µL (0.33 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 117 mg (0.117 mmol, 53%) einer farblosen Warte erhalten.

Molmasse: 1000.17 g/mol **Summenformel:**

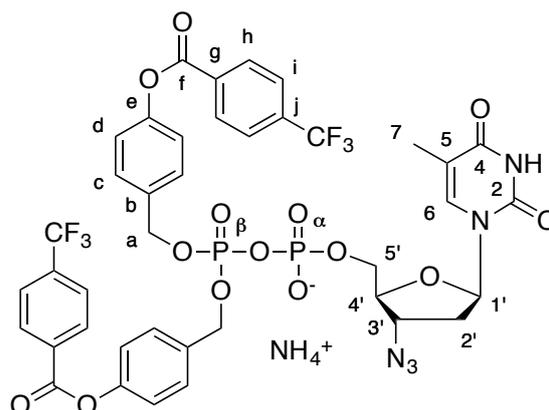
C₄₀H₃₆F₆N₆O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode II,

R_t = 18.9 min **Drehwert:** [α]_D²³ = -8

(c = 0.1 mg/mL; CH₃OH) **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* =

berechnet für C₄₀H₃₄F₆N₅O₁₄P₂: 984.1487

[M+H]⁺, gefunden: 984.1457.



¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 8.32-8.31 (m, 4H, H-h); 7.85-7.83 (m, 4H, H-i); 7.74 (s, 1H, H-6); 7.49-7.47 (m, 4H, H-c); 7.25-7.23 (m, 4H, H-d); 6.22 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-1'); 5.19-5.18 (m, 4H, C-a); 4.45 (dt, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, 1H, H-3'); 4.26-4.23 (m, 1H, H-5'a); 4.19-4.15 (m, 1H, H-5'b); 4.08-4.07 (m, 1H, H-4'); 2.39-2.29 (m, 2H, H-2'); 1.91 (s, 3H, H-7). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 166.6 (C-4); 165.2 (C-f); 152.4 (C-2); 152.3 (C-e); 137.8 (C-6); 136.0 (C-j); 134.4 (C-g); 131.8 (C-h); 130.6 (d, ⁴J_{C,P} = 3.1 Hz, C-c); 126.8 (d, ⁴J_{C,F} = 3.4 Hz, C-i); 124.4 (CF₃); 122.9 (C-d); 112.3 (C-5); 85.8 (C-1'); 84.2 (d, ³J_{C,P} = 9.2 Hz, C-4'); 70.4 (d, ²J_{C,P} = 5.4 Hz, C-a); 67.1 (d, ²J_{C,P} = 6.2 Hz, C-5'); 62.5 (C3'); 38.1 (C2'); 12.6 (C7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.1 (d, ²J_{P,P} = 21.3 Hz, P_β), -12.7 (d, ²J_{P,P} = 21.4 Hz, P_α).

Darstellung von CN-Ph-DiPPro-AZTDP 25f

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 31 mg (0.05 mmol) AZTMP **9** mit 38 mg (0.06 mmol) CN-Ph-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **26f** in 2 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 240 μ L (0.06 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 11 μ L (0.06 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH_4^+ -Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 21 mg (0.023 mmol, 46%) einer farblosen Warte erhalten.

Molmasse: 914.18 g/mol **Summenformel:**

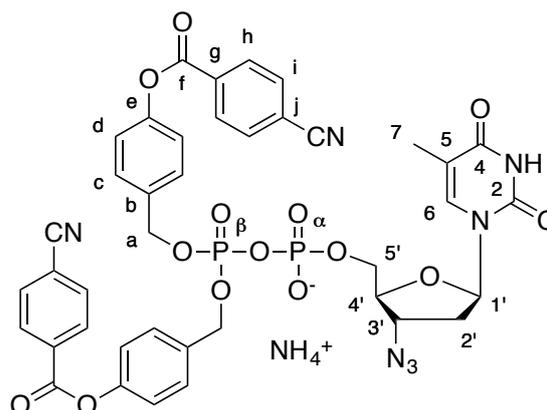
$\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{O}_{14}\text{P}_2$ **RP-18-HPLC:** Methode II,

$R_t = 15.9$ min **Drehwert:** $[\alpha]_D^{23} = -2$

($c = 0.1$ mg/mL; CH_3OH) **HRMS:** (ESI⁺) $m/z =$

berechnet für $\text{C}_{40}\text{H}_{34}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$: 898.1639

$[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 898.1640.



¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 8.29-8.28 (m, 4H, H-h); 7.91-7.90 (m, 4H, H-i); 7.73 (s, 1H, H-6); 7.49-7.47 (m, 4H, H-c); 7.24-7.23 (m, 4H, H-d); 6.22 (d, ³ $J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, ³ $J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 1H, H-1'); 5.20-5.17 (m, 4H, H-a); 4.44-4.42 (m, 1H, H-3'); 4.24-4.22 (m, 1H, H-5'a); 4.17-4.14 (m, 1H, H-5'b); 4.06 (bs, 1H, H-4'); 2.37-2.27 (m, 2H, H-2'); 1.90 (s, 3H, H-7). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 166.4 (C-4); 164.9 (C-f); 152.3 (C-e); 137.8 (C-6); 134.7 (C-b); 133.7 (C-i); 131.7 (C-h); 130.6 (C-g); 130.6 (C-c); 122.9 (C-d); 118.8 (C-j); 118.1 (CN); 112.2 (C-5); 85.8 (C-1'); 84.4 (d, ³ $J_{\text{C,P}} = 9.3$ Hz, C-4'); 70.3 (d, ² $J_{\text{C,P}} = 5.4$ Hz, C-a); 67.3 (d, ² $J_{\text{C,P}} = 6.5$ Hz, C-5'); 62.5 (C-3'); 38.1 (C-2'); 12.6 (C7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.1- -12.1 (m, P_β); -12.7 (d, ² $J_{\text{P,P}} = 19.6$ Hz, P_α).

Darstellung von NO₂-Ph-DiPPro-AZTDP 25g

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.16 mmol) AZTMP **9** mit 160 mg (0.24 mmol) NO₂-Ph-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **26g** in 4 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 1120 μ L (0.28 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 44 μ L (0.24 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 100 mg (0.105 mmol, 66%) einer farblosen Warte erhalten.

Molmasse: 954.16 g/mol **Summenformel:**

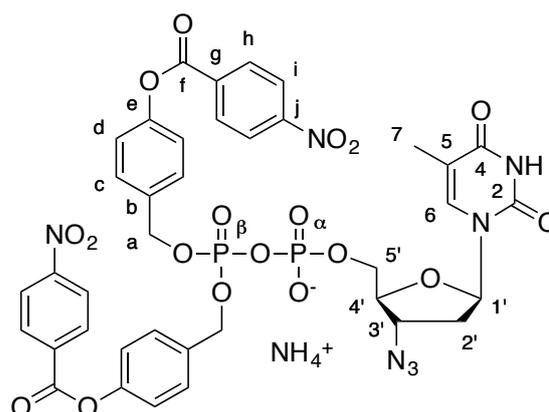
C₃₈H₃₆N₈O₁₈P₂ **RP-18-HPLC:** Methode II,

R_t = 16.7 min **Drehwert:** $[\alpha]_D^{23} = +8$

(c = 0.1 mg/mL; CH₃OH) **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* =

berechnet für C₃₈H₃₄N₇O₁₈P₂: 938.1436

[M+H]⁺ gefunden: 938.1428.



¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 8.29 (bs 8H, H-h, H-i); 7.74 (s, 1H, H-6) 7.50-7.48 (m, 4H, H-c); 7.26-7.24 (m, 4H, H-d); 6.23 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-1'); 5.20 - 5.18 (m, 4H, H-a); 4.45-4.43 (m, 1H, H-3'); 4.26-4.22 (m, 1H, H-5'a); 4.18-4.15 (m, 1H, H-5'b); 4.07-4.06 (m, 1H, H-4'); 2.38-2.29 (m, 2H, H-2'); 1.91 (s 3H, H-7). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 166.5 (C-4); 164.7 (C-f); 152.4 (C-j); 152.3 (C-2); 137.7 (C-6); 136.3 (C-g); 135.5 (C-b); 132.4 (C-h); 130.6 (d, ⁴J_{C,P} = 3.8 Hz, C-c); 124.8 (C-i); 122.9 (C-d); 112.3 (C-5); 85.8 (C-1'); 84.4 (d, ³J_{C,P} = 8.9 Hz, C-4'); 70.3 (d, ²J_{C,P} = 5.7 Hz, C-a); 67.3 (d, ²J_{C,P} = 5.7 Hz, C-5'); 62.5 (C-3'); 38.1 (C-2'); 12.6 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.1 (d, ²J_{P,P} = 20.5 Hz, P_β), -12.7 (d, ²J_{P,P} = 20.5 Hz, P_α).

Darstellung von C₄H₉-DiPPro-AZTDP 61a

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 101 mg (0.162 mmol) AZTMP **9** mit 133 mg (0.243 mmol) C₄H₉-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **59a** in 4 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 970 μ L (0.243 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 44 μ L (0.243 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

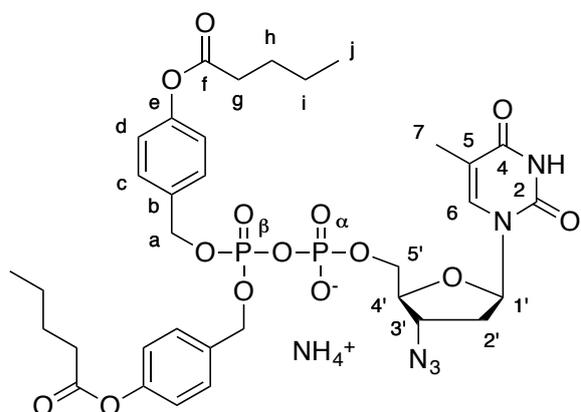
Ausbeute: Es wurden 84 g (0.10 mmol, 63%) einer farblosen Warte erhalten.

Molmasse: 824.72 g/mol **Summenformel:**

C₃₄H₄₆N₆O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode III,

R_t = 17.4 min. **Drehwert:** $[\alpha]_D^{23} = +7$

(c = 0.1 mg/mL; CH₃OH) **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₄H₄₄N₅O₁₄P₂: 808.2355 [M+H]⁺, gefunden: 808.2352.



¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.72 (s, 1H, H-6); 7.42-7.40 (m, 4H, H-c); 7.07-7.05 (m, 4H, H-d); 6.21 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-1'); 5.14-5.11 (m, 4H, H-a); 4.41-4.39 (m, 1H, H-3'); 4.21-4.18 (m, 1H, H-5'a); 4.13-4.10 (m, 1H, H-5'b); 4.04-4.03 (m, 1H, H-4'); 2.58 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-g); 2.36-2.26 (m, 2H, H-2'); 1.90 (s, 3H, H-7); 1.74-1.69 (m, 2H, H-h); 1.49-1.43 (m, 2H, H-i); 0.99 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 6H, H-j). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.7 (C-f); 166.4 (C-4); 152.5 (C-e); 152.3 (C-2); 137.8 (C-6); 134.9 (C-b); 130.5 (d, ⁴J_{C,P} = 2.3 Hz, C-c); 122.9 (C-d'); 122.6 (C-d); 112.2 (C-5); 85.8 (C-1'); 84.4 (d, ³J_{C,P} = 9.0 Hz, C-4'); 70.3 (d, ²J_{C,P} = 6.1 Hz C-a); 67.3 (d, ³J_{C,P} = 5.8 Hz, C-5'); 62.5 (C-3'); 38.0 (C-2'); 34.8 (C-g); 28.1 (C-h); 23.3 (C-i); 14.1 (C-j); 12.6 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt) δ [ppm] = -12.2 (d, ²J_{P,P} = 20.4 Hz, P_β); -12.8 (d, ²J_{P,P} = 20.5 Hz, P_α).

Darstellung von C₆H₁₃-DiPPro-AZTDP 61b

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 150 mg (0.24 mmol) AZTMP **9** mit 217 mg (0.36 mmol) C₆H₁₃-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **59b** in 4 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 1.44 mL (0.36 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 66 µL (0.36 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 83 mg (0.09 mmol, 39%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 880.83 g/mol **Summen-**

formel: C₃₈H₅₄N₆O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:**

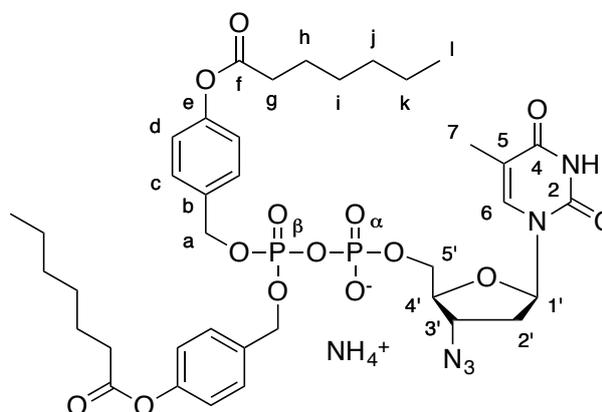
Methode III, R_t = 20.0 min. **Drehwert:**

[α]_D²³ = +12 (c = 0.1 mg/mL; CH₃OH)

HRMS: (ESI⁺) *m/z* = berechnet für

C₃₈H₅₂N₅O₁₄P₂: 864.2991 [M+H]⁺,

gefunden: 864.2978.



¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.72 (s, 1H, H-6); 7.42-7.40 (m, 4H, H-c); 7.07-7.05 (m, 4H, H-d); 6.21 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-1'); 5.14-5.11 (m, 4H, H-a); 4.41-4.39 (m, 1H, H-3'); 4.21-4.18 (m, 1H, H-5'a); 4.13-4.10 (m, 1H, H-5'b); 4.03 (bs, 1H, H-4'); 2.58 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-g); 2.36-2.26 (m, 2H, H-2'); 1.90 (s, 3H, H-7); 1.75-1.70 (m, 2H, H-h); 1.44-1.41 (m, 2H, H-i); 1.37-1.36 (m, 8H, H-j, H-k); 0.93 (t, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 6H, H-l). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.7 (C-f); 166.4 (C-4); 152.5 (C-e); 152.4 (C-2); 137.8 (C-6); 134.9 (C-b); 130.5 (d, ⁴J_{C,P} = 2.2 Hz, C-c); 122.9 (C-d'); 122.6 (C-d); 112.2 (C-5); 85.8 (C-1'); 84.4 (d, ³J_{C,P} = 9.1 Hz, C-4'); 70.3 (d, ²J_{C,P} = 6.0 Hz C-a); 67.3 (d, ³J_{C,P} = 6.1 Hz, C-5'); 62.5 (C-3'); 38.0 (C-2'); 35.0 (C-g); 32.7 (C-j/C-k); 29.9 (C-i); 25.9 (C-h); 23.6 (C-j/C-k); 14.4 (C-l); 12.6 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.2 (d, ²J_{P,P} = 20.9 Hz, P_β); -12.8 (d, ²J_{P,P} = 21.4 Hz, P_α).

Darstellung von C₉H₁₉-DiPPro-AZTDP 61c

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 72 mg (0.12 mmol) AZTMP **9** mit 120 mg (0.18 mmol) C₉H₁₉-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **59c** in 3 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 720 µL (0.18 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 33 µL (0.18 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 58 mg (0.60 mmol, 50%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 964.41 g/mol **Summenformel:**

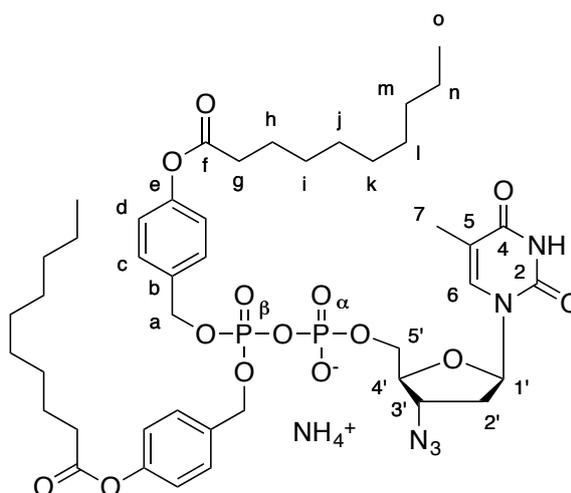
C₄₄H₆₆N₆O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode III,

R_t = 24.4 min **Drehwert:** [α]_D²³ = +37

(c = 0.1 mg/mL; CH₃OH) **HRMS:** (ESI⁺)

m/z = berechnet für C₄₄H₆₄N₅O₁₄P₂:

948.3930 [M+H]⁺, gefunden: 948.3915.



¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.72 (s, 1H, H-6); 7.42-7.39 (m, 4H, H-c); 7.06-7.04 (m, 4H, H-d); 6.21 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-1'); 5.13-5.11 (m, 4H, H-a); 4.41-4.39 (m, 1H, H-3'); 4.21-4.18 (m, 1H, H-5'a); 4.13-4.10 (m, 1H, H-5'b); 4.04 (bs, 1H, H-4'); 2.57 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 4H, H-g); 2.36-2.29 (m, 4H, H-2'); 1.90 (s, 3H, H-7); 1.76-1.71 (m, 4H, H-h); 1.43-1.31 (m, 24H, H-i - H-n); 0.91 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 6H, H-o). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.7 (C-f); 166.5 (C-4); 152.6 (C-e); 152.5 (C-2); 137.8 (C-6); 134.9 (C-b); 130.5 (C-c); 122.9 (C-d); 112.2 (C-5); 85.8 (C-1'); 84.4 (d, ³J_{C,P} = 9.5 Hz, C-4'); 70.4 (d, ²J_{C,P} = 5.8 Hz C-a); 67.3 (d, ³J_{C,P} = 5.9 Hz, C-5'); 62.5 (C-3'); 38.0 (C-2'); 35.0 (C-g); 33.1, 30.6, 30.4, 30.2, 23.7 (C-i - C-n); 26.0 (C-h); 14.4 (C-o); 12.6 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.2 (d, ²J_{P,P} = 20.4 Hz, P_β); -12.8 (d, ²J_{P,P} = 20.4 Hz, P_α).

Darstellung von C₁₁H₂₃-DiPPro-AZTDP 61d

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 29 mg (0.047 mmol) AZTMP **9** mit 52 mg (0.070 mmol) C₁₁H₂₃-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **59d** in 2 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 282 μ L (0.070 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 13 μ L (0.070 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash und Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen lieferten das Produkt leicht verunreinigt mit einer Ausbeute von 50% (24 mg, 0.024 mmol). Nach erneuter RP-Chromatographie am Puri Flash konnten durch einen technischen Fehler lediglich 28% (13 mg, 0.013 mmol) isoliert werden.

Ausbeute: Es wurden 13 mg (0.013 mmol, 28%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 1021.10 g/mol **Summen-**

formel: C₄₈H₇₄N₆O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:**

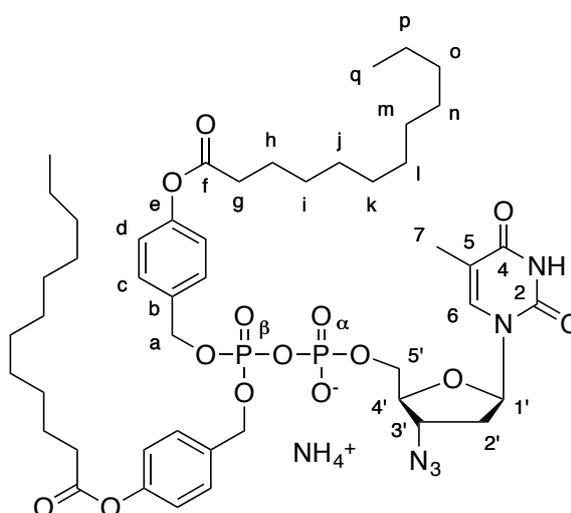
Methode III, 27.3 min **Drehwert:**

$[\alpha]_D^{23} = +10$ (c = 0.1 mg/mL; CH₃OH)

HRMS: (ESI⁺) *m/z* = berechnet für

C₄₈H₇₂N₅O₁₄P₂: 1004.4556 [M+H]⁺,

gefunden: 1004.4536.



¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.72 (s, 1H, H-6); 7.41-7.38 (m, 4H, H-c); 7.06-7.04 (m, 4H, H-d); 6.21 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-1'); 5.13-5.10 (m, 4H, H-a); 4.42-4.40 (m, 1H, H-3'); 4.21-4.18 (m, 1H, H-5'a); 4.13-4.10 (m, 1H, H-5'b); 4.04 (bs, 1H, H-4'); 2.57 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 4H, H-g); 2.36-2.26 (m, 4H, H-2'); 1.90 (s, 3H, H-7); 1.76-1.71 (m, 4H, H-h); 1.44-1.29 (m, 32H, H-i - H-p); 0.90 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 6H, H-q). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.6 (C-f); 166.2 (C-4); 152.4 (C-e); 152.3 (C-2); 137.6 (C-6); 134.7 (C-b); 130.5 (C-c); 122.9 (C-d); 112.1 (C-5); 85.8 (C-1'); 84.2 (C-4'); 70.3 (C-a); 66.9 (C-5'); 62.5 (C-3'); 38.0 (C-2'); 35.0 (C-g); 33.0, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 23.6 (C-i - C-p); 26.0 (C-h); 14.2 (C-q); 12.4 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.2 (d, ²J_{P,P} = 20.4 Hz P_β), -12.8 (d, ²J_{P,P} = 20.5 Hz, P_α).

7.2.11.2 Synthese asymmetrischer Di*PP*ro-d4TDPsDarstellung von CH₃/C₇H₁₅-Di*PP*ro-d4TDP 52a

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 110 mg (0.176 mmol) d4TMP **8** mit 144 mg (0.264 mmol) CH₃/C₇H₁₅-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39b** in 4 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 1.04 mL (0.264 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 47 µL (0.264 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 108 mg (0.138 mmol, 79%) eines farblosen hygroskopischen Feststoffes erhalten.

Molmasse:

781.68 g/mol

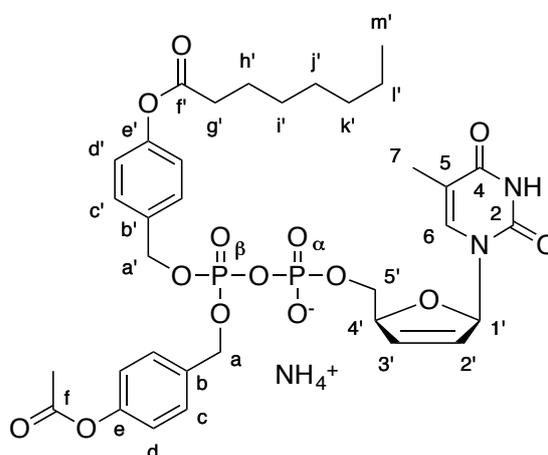
Summenformel:

C₃₄H₄₅N₃O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode II,

R_t = 17.1 min **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet

für C₃₄H₄₂N₂O₁₄P₂Na: 787.2009 [M+Na]⁺,

gefunden: 787.1983.



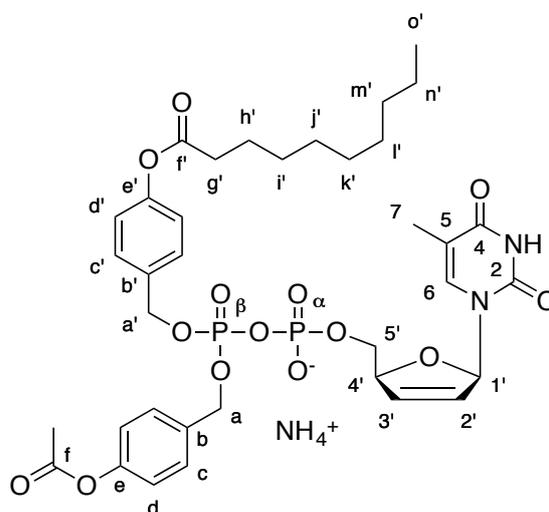
¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.76 (s, 1H, H-6); 7.41-7.37 (m, 4H, H-c, H-c'); 7.08-7.04 (m, 4H, H-d, H-d'); 6.95-6.95 (m, 1H, H-1'); 6.39-6.38 (m, 1H, H-3'); 5.84-5.83 (m, 1H, H-2'); 5.12-5.09 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.95 (bs, 1H, H-4'); 4.22-4.15 (m, 2H, H-5'); 2.58 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-g'); 2.27 (s, 3H, CH₃); 1.89 (s, 3H, H-7); 1.73 (tt, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-h'); 1.45-1.29 (m, 8H, H-i' – H-l'); 0.92 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, H-m'). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.9 (C-f'); 171.2 (C-f); 166.7 (C-4); 152.8 (C-2); 152.5 (C-e, C-e'); 138.7 (C-6); 135.3 (C-3'); 135.0 (C-b', C-b); 130.4 (2xd, ⁴J_{C,P} = 4.8 Hz, ⁴J_{C,P} = 4.8 Hz, C-c, C-c'); 127.6 (C-2'); 122.9 (C-d, C-d'); 112.1 (C-5); 90.8 (C-1'); 86.9 (d, ³J_{C,P} = 9.0 Hz, C-4'); 70.2 (d, ²J_{C,P} = 5.2 Hz, C-a, C-a'); 67.2 (d, ³J_{C,P} = 5.5 Hz, C-5'); 35.0 (C-g'); 32.9, 30.1, 30.1, 23.7 (C-i' – C-l'); 26.0 (C-h'); 20.9 (CH₃); 14.4 (C-m'); 12.5 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.07 (d, ²J_{P,P} = 20.0 Hz, 1P, P_β); -12.92 (d, ²J_{P,P} = 20.7 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von CH₃/C₉H₁₉-DiPPro-d4TDP 52b

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 120 mg (0.192 mmol) d4TMP **8** mit 165 mg (0.288 mmol) CH₃/C₉H₁₉-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39c** in 7 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 1.14 mL (0.288 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 53 µL (0.288 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen, erneute RP-Chromatographie am Puri Flash und anschließende Sephadex lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 106 mg (0.131 mmol, 68%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 809.73 g/mol **Summenformel:** C₃₆H₄₉N₃O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode II, R_t= 18.5 min **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₆H₄₆N₂O₁₄P₂Na: 815.2322 [M+Na]⁺, gefunden: 815.2312.



¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.66 (s, 1H, H-6); 7.41-7.37 (m, 4H, H-c, H-c'); 7.08-7.04 (m, 4H, H-d, H-d'); 6.95-6.95 (m, 1H, H-1'); 6.39-6.38 (m, 1H, H-3'); 5.84-5.83 (m, 1H, H-2'); 5.12-5.09 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.95 (bs, 1H, H-4'); 4.22-4.15 (m, 2H, H-5'); 2.58 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-g'); 2.27 (s, 3H, CH₃); 1.89 (s, 3H, H-7); 1.72 (tt, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-h'); 1.44-1.30 (m, 12H, H-i' – H-n'); 0.91 (t, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 3H, H-o'). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.9 (C-f'); 171.1 (C-f); 166.7 (C-4); 152.8 (C-2); 152.5 (C-e, C-e'); 138.7 (C-6); 135.3 (C-3'); 135.0 (C-b', C-b); 130.4 (2xd, ⁴J_{C,P} = 4.5 Hz, ⁴J_{C,P} = 5.0 Hz, C-c, C-c'); 127.6 (C-2'); 122.9 (C-d, C-d'); 112.1 (C-5); 90.8 (C-1'); 86.9 (d, ³J_{C,P} = 9.4 Hz, C-4'); 70.2 (C-a, C-a'); 68.0 (d, ³J_{C,P} = 6.2 Hz, C-5'); 35.0 (C-g'); 33.1, 30.6, 30.4, 30.2, 23.7 (C-i' – C-n'); 26.0 (C-h'); 20.9 (CH₃); 14.4 (C-o'); 12.5 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.07 (d, ²J_{P,P} = 20.6 Hz, 1P, P_β); -12.92 (d, ²J_{P,P} = 20.5 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von CH₃/C₁₁H₂₃-DiPPro-d4TDP 52c

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 77 mg (0.12 mmol) d4TMP **8** mit 108 mg (0.184 mmol) CH₃/C₁₁H₂₃-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39d** in 7 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 0.72 mL (0.18 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 33 µL (0.18 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. NP-Säulenchromatographie, RP-Säulenchromatographie, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen, RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 24 mg (0.028 mmol, 23%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 837.79 g/mol **Summenformel:**

C₃₈H₅₃N₃O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode II,

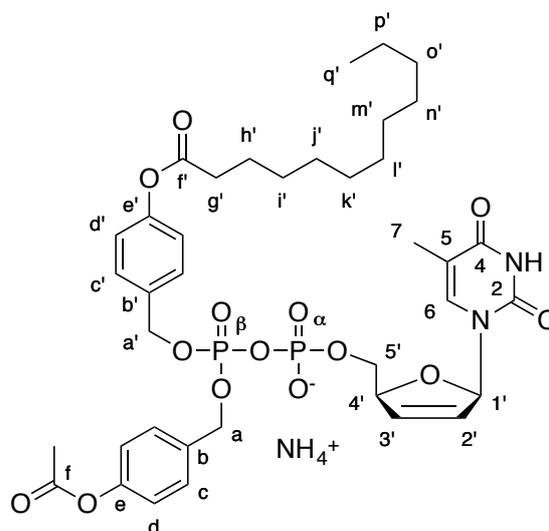
R_t = 19.5 min **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet

für C₃₈H₅₀N₂O₁₄P₂Na: 843.2629 [M+Na]⁺,

gefunden: 843.2542; (ESI⁻) *m/z* = berechnet

für C₃₈H₄₉N₂O₁₄P₂: 819.2665 [M-H]⁻,

gefunden: 819.2604.



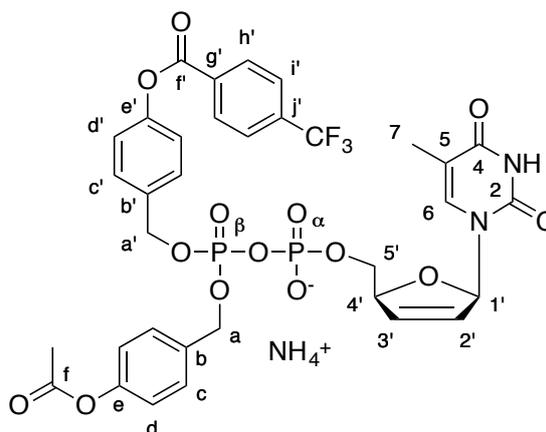
¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.66 (d, ⁴J_{H,H} = 1.0 Hz, 1H, H-6); 7.41-7.37 (m, 4H, H-c, H-c'); 7.08-7.04 (m, 4H, H-d, H-d'); 6.94 (ddd, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, ^{3/4}J_{H,H} = 1.7 Hz, ^{3/4}J_{H,H} = 1.6 Hz, 1H, H-1'); 6.38 (ddd, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ³J_{H,H} = 3.2 Hz, ⁴J_{H,H} = 3.2 Hz, 1H, H-3'); 5.83 (ddd, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 3.4 Hz, 1H, H-2'); 5.12-5.09 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.94 (bs, 1H, H-4'); 4.23-4.15 (m, 2H, H-5'); 2.58 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-g'); 2.27 (s, 3H, CH₃); 1.89 (d, ⁴J_{H,H} = 1.0 Hz, 3H, H-7); 1.73 (m, 2H, H-h'); 1.45-1.29 (m, 12H, H-i' – H-p'); 0.90 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 3H, H-q'). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.8 (C-f'); 171.1 (C-f); 166.5 (C-4); 152.8 (C-2); 152.3 (C-e, C-e'); 138.7 (C-6); 135.3 (C-3'); 134.9 (C-b', C-b); 130.4 (2xd, ⁴J_{C,P} = 4.6 Hz, ⁴J_{C,P} = 5.2 Hz, C-c, C-c'); 127.6 (C-2'); 122.9 (C-d, C-d'); 112.1 (C-5); 90.8 (C-1'); 86.9 (d, ³J_{C,P} = 9.1 Hz, C-4'); 70.2 (C-a, C-a'); 68.1 (d, ³J_{C,P} = 6.6 Hz, C-5'); 35.0 (C-g'); 33.1, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 23.7 (C-i' – C-p'); 26.0 (C-h'); 20.9 (CH₃); 14.4 (C-q'); 12.5 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.08 (d, ²J_{P,P} = 20.8 Hz, P_β); -12.92 (d, ²J_{P,P} = 20.2 Hz, P_α).

Darstellung von CH₃/CF₃-Ph-DiPPro-d4TDP 52d

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.160 mmol) d4TMP **8** mit 140 mg (0.240 mmol) CH₃/CF₃-Ph-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39e** in 8 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 0.96 mL (0.24 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 44 µL (0.24 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. NP-Säulenchromatographie, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen, zweimalige RP-Chromatographie am Puri Flash, sowie Gelfiltration mit Wasser an Sephadex LH-20 lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 40 mg (0.048 mmol, 30%) einer farblosen Warte erhalten.

Molmasse: 827.59 g/mol **Summenformel:** C₃₄H₃₄F₃N₃O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode II, R_t = 15.8 min **HRMS:** (ESI⁻) *m/z* = berechnet für C₃₄H₃₀F₃N₂O₁₄P₂: 809.1130 [M-H⁺], gefunden: 809.1096.



¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 8.38-8.37 (m, 2H, H-h'/H-i'); 7.90-7.89 (m, 2H, H-h'/H-i'); 7.66 (d, ⁴J_{H,H} = 1.2 Hz, 1H, H-6); 7.48-7.39 (m, 4H, H-c', H-c); 7.25-7.22 (m, 2H, H-d'); 7.09-7.07 (m, 2H, H-d); 6.96 (ddd, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, ³J_{H,H} = 1.8 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, H-1'); 6.40-6.39 (m 1H, H-3'); 5.84 (ddd, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 3.4 Hz, 1H, H-2'); 5.16-5.11 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.96 (bs, 1H, H-4'); 4.24-4.17 (m, 1H, H-5'); 2.25 (s, 3H, CH₃); 1.90 (s, 3H, H-7). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 171.1 (C-f); 166.6 (C-4); 165.3 (C-f'); 152.9 (C-2); 152.4 (C-e/Ce'); 152.3 (C-e/C-e'); 138.7 (C-6); 135.9 (C-j'); 135.4 (C-b'); 135.3 (C-3'); 135.0 (C-b); 134.4 (C-g'); 131.8 (C-h'/C-i'); 130.5 (d, ⁴J_{C,P} = 4.6 Hz, C-c'); 130.4 (d, ⁴J_{C,P} = 5.5 Hz, C-c); 127.6 (C-2'); 126.9 (C-h'/C-i'); 124.3 (CF₃); 122.9 (C-d'); 122.9 (C-d); 112.0 (C-5); 90.8 (C-1'); 86.9 (d, ³J_{C,P} = 9.5 Hz, C-4'); 70.2 (C-a, C-a'); 68.1 (C-5'); 20.6 (CH₃); 12.5 (C-7). ¹⁹F-NMR (565 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = -60.75. ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.1 (d, ²J_{P,P} = 20.4 Hz, P_β); -12.9 (d, ²J_{P,P} = 19.8 Hz, P_α).

Darstellung von CH₃/Me-Ph-DiPPro-d4TDP 52e

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 149 mg (0.239 mmol) d4TMP **8** mit 190 mg (0.357 mmol) CH₃/CH₃-Ph-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39g** in 7 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 1.20 mL (0.300 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 64 µL (0.35 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. Zweimalige RP-Chromatographie am Puri Flash lieferte das Produkt.

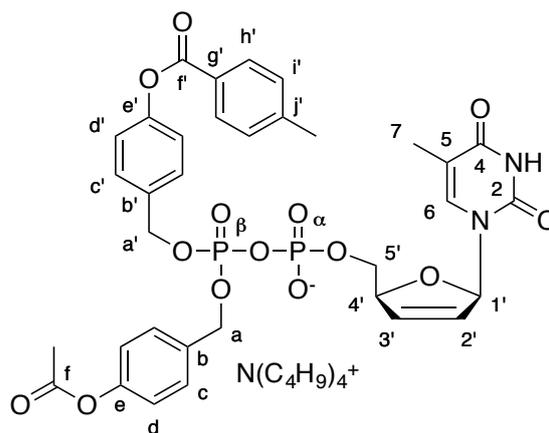
Ausbeute: Es wurden 115 mg (0.115 mmol, 48%) farblosen, hygroskopischen Feststoffes erhalten.

Molmasse: 998.04 g/mol

Summenformel: C₅₀H₆₉N₃O₁₄P₂ **RP-18-**

HPLC: Methode II, R_t = 15.4 min **HRMS:**

(ESI⁻) *m/z* = berechnet für C₃₄H₃₃N₂O₁₄P₂: 755.1413 [M-H]⁻, gefunden: 755.1413.

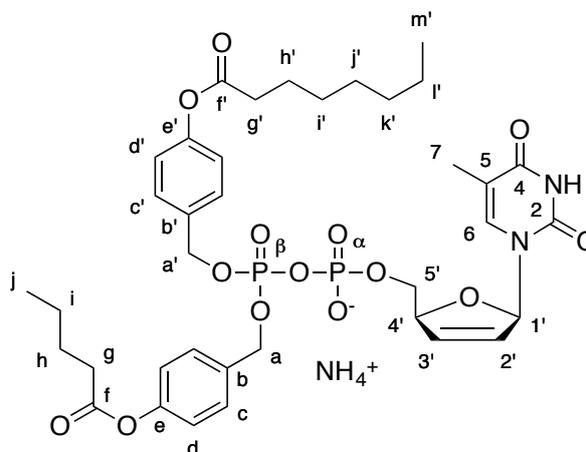


¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 8.07-8.06 (m 2H, H-h'); 7.67 (d, ⁴J_{H,H} = 1.1 Hz, 1H, H-6); 7.47-7.39 (m 4H, H-c, H-c'); 7.38-7.37 (m, 2H, H-d/H-d'); 7.20-7.18 (m, 2H, H-d/H-d'); 7.09-7.07 (m, 2H, H-i'); 6.96 (ddd, ³J_{H,H} = 3.6 Hz, ³J_{H,H} = 1.7 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, 1H, H-1'); 6.40 (ddd, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ³J_{H,H} = 3.2 Hz, ⁴J_{H,H} = 3.2 Hz, 1H, H-3'); 5.84 (ddd, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 3.4 Hz, 1H, H-2'); 5.16-5.11 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.96 (bs, 1H, H-4'); 4.25-4.17 (m, 2H, H-5'); 3.24-3.21 (m, 8H, H-A); 2.45 (s, 3H, H-k'); 2.25 (s, 3H, CH₃); 1.90 (d, ⁴J_{H,H} = 1.1 Hz, 3H, H-7); 1.68-1.62 (m, 8H, H-B); 1.41 (dq, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 8H, H-C); 1.02 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 12H, H-D). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 171.0 (C-f); 166.6 (C-4); 166.5 (C-f'); 152.8 (C-2); 152.6 (C-e/C-e'); 152.4 (C-e/C-e'); 146.2 (C-g'); 138.7 (C-6); 135.3 (C-3'); 135.1 (dd, ³J_{C,P} = 7.5 Hz, ⁵J_{C,P} = 3.3 Hz, C-b/C-b'); 135.1 (dd, ³J_{C,P} = 7.2 Hz, ⁵J_{C,P} = 2.8 Hz, C-b/C-b'); 131.2 (C-h'); 130.5 (C-i'); 130.5 (d, ⁴J_{C,P} = 5.5 Hz, C-c'); 130.4 (d, ⁴J_{C,P} = 4.7 Hz, C-c); 128.0 (C-j'); 127.6 (C-2'); 123.0 (C-d); 122.9 (C-d'); 112.1 (C-5); 90.8 (C-1'); 87.0 (d, ³J_{C,P} = 9.4 Hz, C-4'); 70.2 (d, ²J_{C,P} = 5.6 Hz, C-a); 70.2 (d, ²J_{C,P} = 5.0 Hz, C-a'); 68.1 (d, ²J_{C,P} = 6.2 Hz, C-5'); 59.5 (C-A); 24.8 (C-B); 21.7 (C-k'); 20.9 (CH₃); 20.7 (C-C); 13.9 (C-D); 12.5 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.1 (d, ²J_{P,P} = 20.6 Hz, 1P, P_β); -12.9 (d, ²J_{P,P} = 20.8 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von C₄H₉/C₇H₁₅-DiPPro-d4TDP 52f

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 79 mg (0.13 mmol) d4TMP **8** mit 112 mg (0.190 mmol) C₄H₉/C₇H₁₅-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39i** in 4 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 760 μ L (0.190 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 35 μ L (0.19 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 76 mg (0.092 mmol, 71%) einer farblosen Watte erhalten. **Molmasse:** 823.29 g/mol **Summenformel:** C₃₇H₅₅N₃O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode II, R_t = 18.8 min **HRMS:** (ESI⁺) m/z = berechnet für C₃₇H₄₈N₂O₁₄P₂Na: 829.2478 [M+Na]⁺, gefunden: 829.2411.



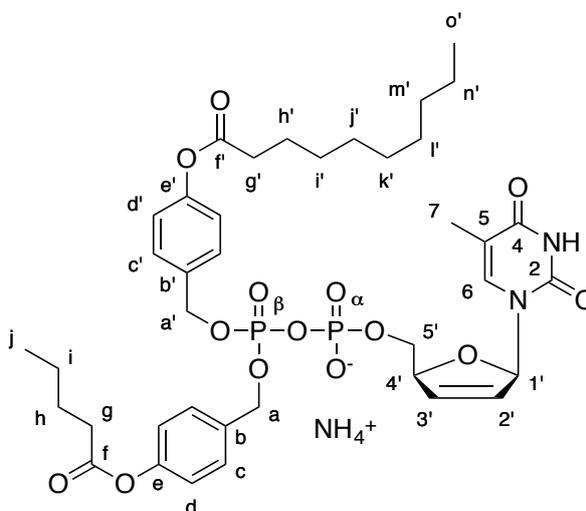
¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.76 (s, 1H, H-6); 7.40-7.37 (m, 4H, H-c, H-c'); 7.06-7.04 (m, 4H, H-d, H-d'); 6.95 (bs, 1H, H-1'); 6.39-6.38 (m, 1H, H-3'); 5.84-5.83 (m, 1H, H-2'); 5.11-5.09 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.95 (bs, 1H, H-4'); 4.22-4.15 (m, 2H, H-5'); 2.60-2.56 (m, 4H, H-g, H-g'); 1.89 (s, 3H, H-7); 1.71 (tt, ³J_{H,H} = 7.7 Hz, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 4H, H-h, H-h'); 1.48-1.30 (m, 10H, H-i, H-i' – H-l'); 0.99 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, H-j); 0.92 (t, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 3H, H-m'). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.8 (C-f, C-f'); 166.7 (C-4); 152.4 (C-2); 152.4 (C-e, C-e'); 138.7 (C-6); 135.3 (C-3'); 134.9 (d, ³J_{C,P} = 2.4 Hz, C-b'/C-b); 134.9 (d, ³J_{C,P} = 3.2 Hz, C-b'/C-b); 130.4 (d, ⁴J_{C,P} = 4.5 Hz, C-c/C-c'); 127.6 (C-2'); 122.9 (C-d, C-d'); 112.1 (C-5); 90.8 (C-1'); 86.9 (d, ³J_{C,P} = 9.0 Hz, C-4'); 70.2 (2xd, ²J_{C,P} = 5.0 Hz, ²J_{C,P} = 4.2 Hz, C-a, C-a'); 68.1 (d, ³J_{C,P} = 6.1 Hz, C-5'); 35.0 (C-g'); 34.8 (C-g); 32.9, 30.1, 30.1, 23.7, (C-i' – C-l'); 28.1 (C-h); 26.0 (C-h'); 23.5 (C-i); 14.4 (C-m'); 14.1 (C-j); 12.5 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.07 (d, ²J_{P,P} = 20.5 Hz, 1P, P_β); -12.91 (d, ²J_{P,P} = 20.5 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von C₄H₉/C₉H₁₉-DiPPro-d4TDP 52g

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 111 mg (0.178 mmol) d4TMP **8** mit 164 mg (0.267 mmol) C₄H₉/C₉H₁₉-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39j** in 4 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 1.07 mL (0.267 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 49 µL (0.27 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen, erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 115 mg (0.135 mmol, 75%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 851.81 g/mol **Summenformel:** C₃₉H₅₅N₃O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode II, R_t = 20.2 min **HRMS:** (ESI⁻) *m/z* = berechnet für C₃₉H₅₁N₂O₁₄P₂: 833.2821 [M-H]⁻, gefunden: 833.2638.

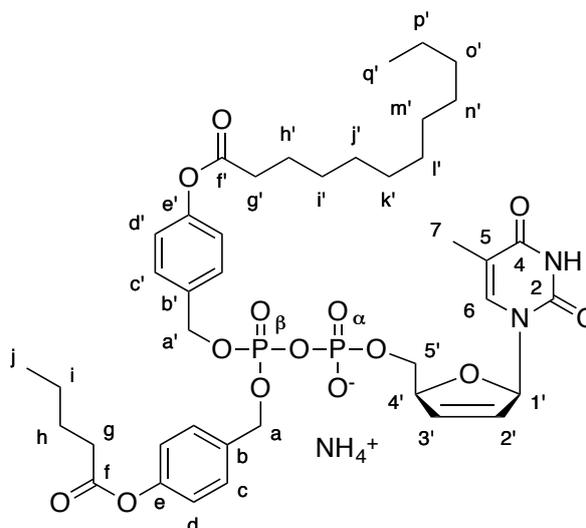


¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.65 (s, 1H, H-6); 7.40-7.37 (m, 4H, H-c, H-c'); 7.06-7.04 (m, 4H, H-d, H-d'); 6.95-9.95 (m, 1H, H-1'); 6.38-6.37 (m, 1H, H-3'); 5.84-5.83 (m, 1H, H-2'); 5.11-5.09 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.95 (bs, 1H, H-4'); 4.22-4.14 (m, 2H, H-5'); 2.58, 2.58 (2xt, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.3 Hz 4H, H-g, H-g'); 1.89 (s, 3H, H-7); 1.72 (tt, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 4H, H-h, H-h'); 1.49-1.31 (m, 14H, H-i, H-i' – H-n'); 0.99 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, H-j); 0.90 (t, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 3H, H-o'). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.8 (C-f/C-f'); 173.8 (C-f/C-f'); 166.5 (C-4); 152.8 (C-2); 152.4 (C-e/C-e'); 152.4 (C-e/C-e'); 138.7 (C-6); 135.3 (C-3'); 134.9 (d, ³J_{C,P} = 7.7 Hz, C-b'/C-b); 134.9 (d, ³J_{C,P} = 6.8 Hz, C-b'/C-b); 130.4 (d, ⁴J_{C,P} = 3.8 Hz, C-c/C-c'); 127.6 (C-2'); 122.9 (C-d, C-d'); 112.1 (C-5); 90.8 (C-1'); 86.9 (d, ³J_{C,P} = 9.3 Hz, C-4'); 70.3 (d, ²J_{C,P} = 5.2 Hz, C-a/C-a'); 70.2 (d, ²J_{C,P} = 5.3 Hz, C-a/C-a'); 68.1 (d, ³J_{C,P} = 6.3 Hz, C-5'); 35.0 (C-g'); 34.8 (C-g); 33.0, 30.6, 30.4, 30.2, 23.7, (C-i' – C-n'); 28.1 (C-h); 26.0 (C-h'); 23.2 (C-i); 14.4 (C-o'); 14.1 (C-j); 12.5 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.06 (d, ²J_{P,P} = 20.5 Hz, 1P, P_β); -12.88 (d, ²J_{P,P} = 20.5 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von C₄H₉/C₁₁H₂₃-DiPPro-d4TDP 52h

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 33 mg (0.053 mmol) d4TMP **8** mit 42 mg (0.058 mmol) C₄H₉/C₁₁H₂₃-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39k** in 3 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 230 μ L (0.058 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 11 μ L (0.058 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. NP-Säulenchromatographie, RP-Säulenchromatographie, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen, RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 33 mg (0.038 mmol, 71%) einer farblosen Watte erhalten. **Molmasse:** 879.87 g/mol **Summenformel:** C₄₁H₅₉N₃O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode II, R_t = 21.4 min **HRMS:** (ESI⁺) m/z = berechnet für C₄₁H₅₃N₂O₁₄P₂Na: 885.3104 [M+Na]⁺, gefunden: 885.3022; (ESI⁻) m/z = berechnet für C₄₁H₅₅N₂O₁₄P₂: 861.3134 [M-H]⁻, gefunden: 861.3073.



¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 7.66 (d, ⁴J_{H,H} = 1.2 Hz, 1H, H-6); 7.40-7.37 (m, 4H, H-c, H-c'); 7.06-7.04 (m, 4H, H-d, H-d'); 6.95 (ddd, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, ³J_{H,H} = 1.7 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, 1H, H-1'); 6.38 (ddd, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 3.4 Hz, 1H, H-3'); 5.83 (ddd, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, ³J_{H,H} = 1.8 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, H-2'); 5.11-5.08 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.95 (bs, 1H, H-4'); 4.23-4.15 (m, 2H, H-5'); 2.60-2.56 (m, 4H, H-g, H-g'); 1.89 (d, ⁴J_{H,H} = 1.1 Hz, 3H, H-7); 1.76-1.69 (m, 4H, H-h, H-h'); 1.49-1.1.27 (m, 18H, H-i, H-i'-H-p'); 0.99 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, H-j); 0.99 (t, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 3H, H-q'). ¹³C-NMR (150 MHz, D₂O): δ [ppm] = 173.6 (C-f, C-f'); 166.5 (C-4); 152.8 (C-2); 152.3 (C-e, C-e'); 138.7 (C-6); 133.9 (C-3'); 134.8 (C-b', C-b); 130.4 (C-c, C-c'); 127.3 (C-2'); 122.9 (C-d, C-d'); 112.1 (C-5); 90.8 (C-1'); 86.9 (C-4'); 70.2 (C-a, C-a'); 68.1 (C-5'); 35.0 (C-g'); 34.8 (C-g); 32.9, 30.7, 30.6, 30.4, 30.2, 23.5, (C-i' – C-p'); 28.0 (C-h); 25.8 (C-h'); 22.9 (C-i); 14.2 (C-q'); 13.8 (C-j); 12.2 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, D₂O, entkoppelt): δ [ppm] = -12.1 (d, ²J_{P,P} = 20.6 Hz, 1P, P_β); -12.9 (d, ²J_{P,P} = 21.5 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von C₄H₉/CF₃-Ph-DiPPro-d4TDP 52i

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 121 mg (0.194 mmol) d4TMP **8** mit 180 mg (0.291 mmol) C₄H₉/CF₃-Ph-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39i** in 8 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 0.95 mL (0.24 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 53 µL (0.29 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. NP-Säulenchromatographie, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen, viermalige RP-Chromatographie am Puri Flash, sowie zweimalige Gelfiltration mit Wasser an Sephadex LH-20 lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 89 mg (0.10 mmol, 53%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 869.67 g/mol

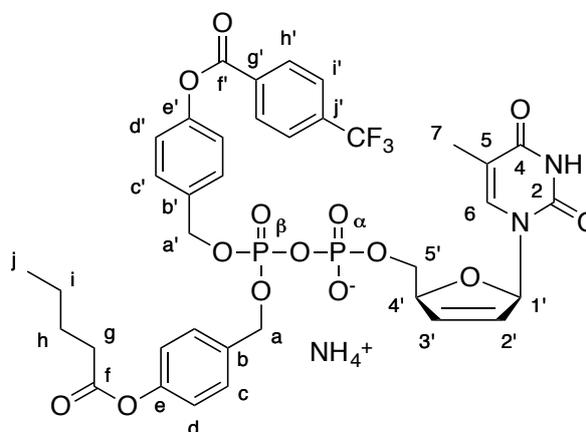
Summenformel: C₃₇H₄₀F₃N₃O₁₄P₂ **RP-18-**

HPLC: Methode II, R_t = 17.4 min **HRMS:**

(ESI) m/z = berechnet für

C₃₇H₃₆F₃N₂O₁₄P₂: 851.1559 [M-H]⁻,

gefunden: 851.1597.

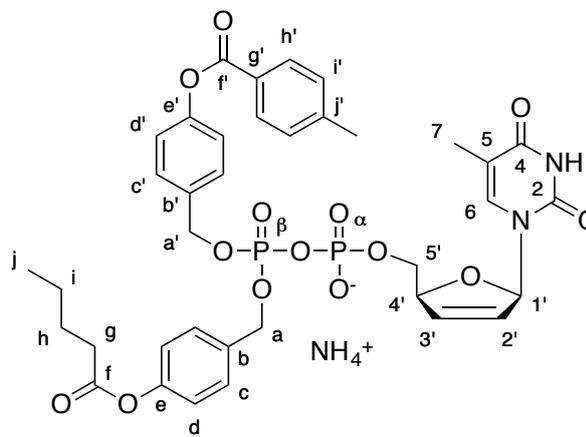


¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 8.38-8.37 (m, 2H, H-h'/H-i'); 7.90-7.89 (m, 2H, H-h'/H-i'); 7.67 (d, ⁴J = 1.0 Hz, 1H, H-6); 7.47-7.44 (m, 2H, H-c'); 7.42-7.38 (m, 2H, H-c); 7.24-7.22 (m, 2H, H,d'); 7.07-7.05 (m, 2H, H-d); 6.96 (ddd, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, ³J_{H,H} = 1.7 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, 1H, H-1'); 6.41-6.39 (m 1H, H-3'); 5.85-5.84 (m, 1H, H-2'); 5.16-5.11 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.96 (bs, 1H, H-4'); 4.25-4.17 (m, 1H, H-5'); 2.56 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-g); 1.90 (s, 3H, H-7); 1.70-1.66 (m, 2H, H-h); 1.46-1.39 (m, 2H, H-i); 0.96 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, H-j). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.9 (C-f); 166.9 (C-4); 165.3 (C-f'); 152.9 (C-2); 152.6 (C-e); 152.4 (C-e'); 138.9 (C-6); 136.1 (C-j'); 135.6 (C-b'); 135.1 (C-b); 135.0 (C-3'); 134.5 (C-g'); 131.8 (C-h'/C-i'); 130.5 (d, ⁴J_{C,P} = 5.5 Hz, C-c'); 130.4 (d, ⁴J_{C,P} = 5.6 Hz, C-c); 127.6 (C-2'); 126.9 (C-h'/C-i'); 124.3 (CF₃); 122.9 (C-d'); 122.9 (C-d); 112.4 (C-5); 90.6 (C-1'); 87.0 (d, ³J_{C,P} = 9.3 Hz, C-4'); 70.2 (C-a, C-a'); 68.1 (C-5'); 34.7 (C-g); 28.0 (C-h); 23.1 (C-i); 14.0 (C-j); 12.5 (C-7). ¹⁹F-NMR (565 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = -60.75. ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.1 (bs, 1P, P_β); -12.9 (d, ²J_{P,P} = 20.8 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von C₄H₉/Me-Ph-DiPPro-d4TDP 52j

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 89 mg (0.143 mmol) d4TMP **8** mit 123 mg (0.214 mmol) C₄H₉/CH₃-Ph-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39m** in 7 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 0.86 mL (0.21 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 39 μ L (0.21 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 36 mg (0.044 mmol, 31%) einer farblosen Warte erhalten. **Molmasse:** 815.70 g/mol
Summenformel: C₃₇H₄₃N₃O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Method II, R_t = 17.0 min **HRMS:** (ESI⁻) *m/z* = berechnet für C₃₇H₃₉N₂O₁₄P₂: 797.1882 [M-H]⁻, gefunden: 797.1855.



¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 8.07-8.06 (m 2H, H-h'); 7.67 (d, ⁴J_{H,H} = 1.2 Hz, 1H, H-6); 7.45-7.38 (m 6H, H-c, H-c', H-d/H-d'); 7.20-7.18 (m, 2H, H-d/H-d'); 7.07-7.04 (m, 2H, H-i'); 6.96 (ddd, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, ³J_{H,H} = 1.7 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, 1H, H-1'); 6.40 (ddd, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ³J_{H,H} = 3.3 Hz, ⁴J_{H,H} = 3.3 Hz, 1H, H-3'); 5.84 (ddd, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, ⁴J_{H,H} = 3.5 Hz, 1H, H-2'); 5.15-5.10 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.96 (bs, 1H, H-4'); 4.25-4.16 (m, 2H, H-5'); 2.56 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-g); 2.46 (s, 3H, H-k'); 1.90 (d, ⁴J_{H,H} = 1.1 Hz, 3H, H-7); 1.72-1.65 (m, 2H, H-h); 1.41 (m, 2H, H-i); 0.96 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, H-j). ¹³C-NMR (150 MHz, D₂O): δ [ppm] = 173.6 (C-f); 166.6 (C-4); 166.5 (C-f'); 152.7 (C-2); 152.5 (C-e/C-e'); 152.3 (C-e/C-e'); 146.2 (C-g'); 138.6 (C-6); 135.2 (C-3'); 135.1 (C-b/C-b'); 134.9 (C-b/C-b'); 131.2 (C-h'); 131.2 (C-c, C-c'); 130.5 (C-i'); 130.4 (C-j'); 127.6 (C-2'); 123.0 (C-d); 122.9 (C-d'); 112.1 (C-5); 90.8 (C-1'); 87.0 (d, ³J_{C,P} = 9.4 Hz, C-4'); 70.3 (C-a, C-a'); 68.1 (C-5'); 34.7 (C-g); 27.9 (C-h); 23.2 (C-i); 21.6 (C-k'); 13.8 (C-j); 12.4 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, D₂O, entkoppelt): δ [ppm] = -12.1 (d, ²J_{P,P} = 20.2 Hz, 1P, P_β); -12.9 (d, ²J_{P,P} = 21.0 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von CH₃/2,3,4,6-Tetra-O-Ac-Man-DiPPro-d4TDP 65

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 70 mg (0.112 mmol) d4TMP **8** mit 108 mg (0.168 mmol) CH₃/2,3,4,6-Tetra-O-Ac-Man-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **67** in 7 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 0.66 mL (0.17 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 31 µL (0.17 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. Dreimalige RP-Chromatographie am Puri Flash lieferte das Produkt.

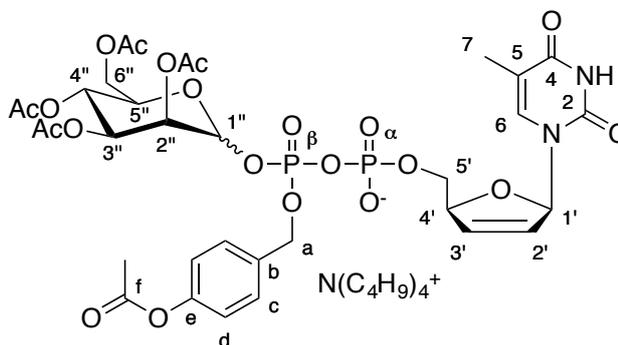
Ausbeute: Es wurden 78 mg (0.071 mmol, 40%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes erhalten.

Molmasse: 1104.08 g/mol

Summenformel: C₄₉H₇₅N₃O₂₁P₂

18-HPLC: Methode II, R_t = 12.9 min

HRMS: (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₃H₄₁N₂O₂₁P₂: 863.1677 [M+H]⁺, gefunden: 863.1608.



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 7.73-7.63 (m, 1H, H-6); 7.51-7.46 (m, 2H, H-c); 7.13-7.06 (m, 2H, H-d); 6.97-6.96 (m, 1H, H-1'); 6.46-6.39 (m, 1H, H-3'); 5.90-5.85 (m, 1H, H-2'); 5.75-5.13 (m, 6H, H-a, H-1'', H-2'', H-3'', H-4''); 4.97-4.95 (m, 1H, H-4'); 4.29-3.93 (m, 5H, H-5'', H-6'', H-5'); 3.25-3.22 (m, 8H, H-A), 2.27-2.26 (m, 3H, CH₃), 2.14-2.13, 2.04-2.03, 1.99, 1.95-1.95 (4xm, 12H, 4xOAcetyl); 1.90-1.89 (m, 3H, H-7), 1.69-1.64 (m, 8H, H-B), 1.45-1.39 (m, 8H, H-C), 1.03 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 12H, H-D). ¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm] = 172.3 (C-f, C-f'); 172.3, 171.5, 171.5, 171.2 (4xOAcetyl); 171.0 (CH₃); 166.6 (C-4); 153.-0 (C-2); 152.4 (C-e, C-e'); 138.7 (C-6); 135.3 (C-3'); 135.1 (C-b); 130.3 (C-c); 127.6 (C-2'); 122.9 (C-d); 111.9 (C-5); 95.7 (C-1''); 90.9 (C-1'); 86.9 (C-2''); 74.0 (C-4''); 72.1 (C-4'); 70.3 (C-a); 68.2 (C-5'); 66.8 (C-3'', C-5''); 63.1 (C-6''); 59.5 (C-A); 24.8 (C-B); 20.6 (C-C); 13.9 (C-D); 12.5 (C-7). ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O, entkoppelt): δ [ppm] = -11.8 (d, ²J_{P,P} = 19.8 Hz, P_β), -11.9 (d, ²J_{P,P} = 19.8 Hz, P_β), -12.1 (d, ²J_{P,P} = 18.0 Hz, P_β), -12.1 (d, ²J_{P,P} = 21.1 Hz, P_β); -14.3 (d, ²J_{P,P} = 19.7 Hz, P_α), -15.1 (d, ²J_{P,P} = 19.8 Hz, P_α), -15.6 (d, ²J_{P,P} = 23.1 Hz, P_α), -15.7 (d, ²J_{P,P} = 20.6 Hz, P_α).

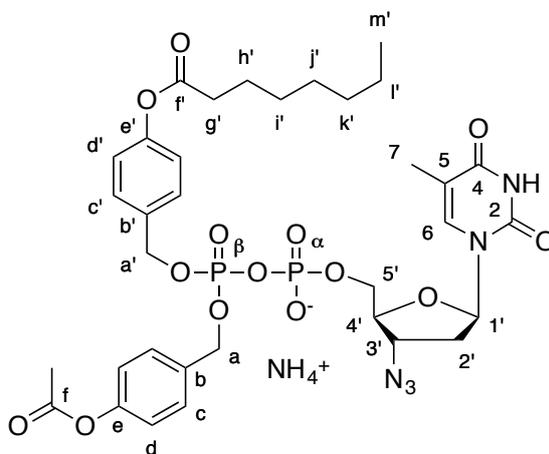
7.2.11.3 Synthese asymmetrischer DiPPro-AZTDPs

Darstellung von CH₃/C₇H₁₅-DiPPro-AZTDP 53a

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 82 mg (0.16 mmol) AZTMP **9** mit 130 mg (0.234 mmol) CH₃/C₇H₁₅-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39b** in 4 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 960 µL (0.234 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 44 µL (0.24 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 79 mg (0.096 mmol, 60%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 824.71 g/mol **Summenformel:** C₃₄H₄₆N₆O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode III, R_t = 17.4 min **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₄H₄₄N₅O₁₄P₂: 808.2355 [M+H]⁺, gefunden: 808.2354.



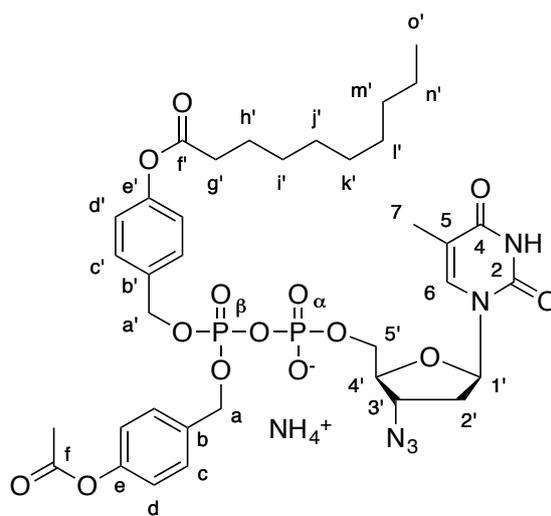
¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.72 (s, 1H, H-6); 7.42-7.40 (m, 4H, H-c, H-c'); 7.08-7.05 (m, 4H, H-d, H-d'); 6.21 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-1'); 5.14-5.11 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.41-4.39 (m, 1H, H-3'); 4.21-4.18 (m, 1H, H-5'a); 4.13-4.10 (m, 1H, H-5'b); 4.04-4.03 (m, 1H, H-4'); 2.58 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-g'); 2.36-2.31 (m, 2H, H-2'a); 2.30-2.26 (m, 2H, H-2'b); 2.27 (s, 3H, CH₃); 1.90 (s, 3H, H-7); 1.73 (tt, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-h'); 1.44-1.30 (m, 8H, H-i' – H-l'); 0.92 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, H-m'). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.8 (C-f'); 171.0 (C-f); 166.4 (C-4); 152.5 (C-e/C-e'); 152.4 (C-e/C-e'); 152.3 (C-2); 137.7 (C-6); 134.9 (C-b', C-b); 130.5 (d, ⁴J_{C,P} = 3.2 Hz, C-c/C-c'); 130.4 (d, ⁴J_{C,P} = 3.3 Hz, C-c/C-c'); 122.9 (C-d, C-d'); 112.2 (C-5); 85.8 (C-1'); 84.4 (d, ³J_{C,P} = 9.4 Hz, C-4'); 70.3 (d, ²J_{C,P} = 5.2 Hz, C-a/C-a'); 67.2 (d, ³J_{C,P} = 5.5 Hz, C-5'); 62.5 (C-3'); 38.0 (C-2'); 35.0 (C-g'); 32.9, 30.1, 30.1, 23.7 (C-i' – C-l'); 26.0 (C-h'); 20.9 (CH₃); 14.4 (C-m'); 12.6 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.14 (d, ²J_{P,P} = 20.1 Hz, 1P, P_β); -12.76 (d, ²J_{P,P} = 20.3 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von CH₃/C₉H₁₉-DiPPro-AZTDP 53b

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 73 mg (0.12 mmol) AZTMP **9** mit 100 mg (0.176 mmol) CH₃/C₉H₁₉-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39c** in 4 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 700 µL (0.176 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 32 µL (0.18 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 45 mg (0.053 mmol, 45%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 852.76 g/mol **Summenformel:** C₃₆H₅₀N₆O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode III, R_t = 18.6 min **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₆H₄₈N₅O₁₄P₂: 836.7384 [M+H]⁺, gefunden: 836.2854.



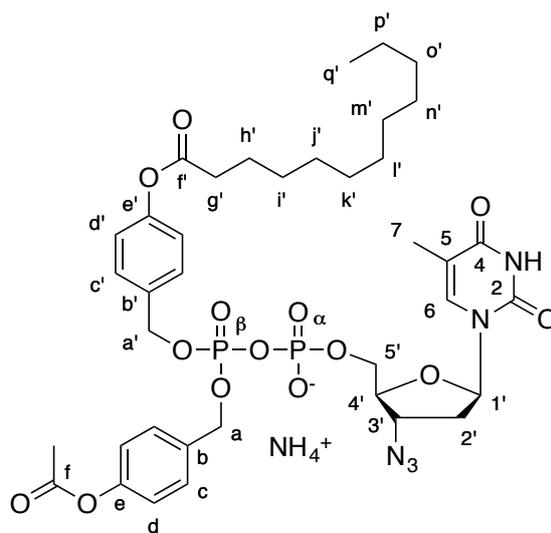
¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.72 (s, 1H, H-6); 7.42-7.40 (m, 4H, H-c, H-c'); 7.08-7.05 (m, 4H, H-d, H-d'); 6.21 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-1'); 5.14-5.11 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.40 (dt, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 1H, H-3'); 4.21-4.18 (m, 1H, H-5'a); 4.13-4.10 (m, 1H, H-5'b); 4.04-4.03 (m, 1H, H-4'); 2.57 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-g'); 2.36-2.31 (m, 2H, H-2'a); 2.30-2.26 (m, 2H, H-2'b); 2.27 (s, 3H, CH₃); 1.90 (s, 3H, H-7); 1.73 (tt, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-h'); 1.45-1.29 (m, 12H, H-i' – H-n'); 0.99 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, H-j); 0.90 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, H-o'). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.7 (C-f'); 170.1 (C-f); 166.3 (C-4); 152.5 (C-e, C-e'); 152.4 (C-2); 137.8 (C-6); 134.9 (C-b', C-b); 130.5 (C-c, C-c'); 122.9 (C-d, C-d'); 112.1 (C-5); 85.8 (C-1'); 84.4 (d, ³J_{C,P} = 9.6 Hz, C-4'); 70.3 (d, ²J_{C,P} = 6.4 Hz, C-a/C-a'); 67.3 (d, ³J_{C,P} = 5.8 Hz, C-5'); 62.5 (C-3'); 38.0 (C-2'); 35.0 (C-g'); 33.0, 30.6, 30.4, 30.2, 23.8 (C-i' – C-n'); 26.0 (C-h'); 14.5 (C-o'); 12.6 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.16 (d, ²J_{P,P} = 20.2 Hz, 1P, P_β); -12.79 (d, ²J_{P,P} = 19.8 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von CH₃/C₁₁H₂₃-DiPPro-AZTDP 53c

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 86 mg (0.14 mmol) AZTMP **9** mit 125 mg (0.207 mmol) CH₃/C₁₁H₂₃-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39d** in 4 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 830 μ L (0.207 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 38 μ L (0.21 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 58 mg (0.066 mmol, 48%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 880.81 g/mol **Summenformel:** C₃₈H₅₄N₆O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode III, R_t = 20.1 min **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₈H₅₁N₅O₁₄P₂Na: 864.2981 [M+H]⁺, gefunden: 864.2982.



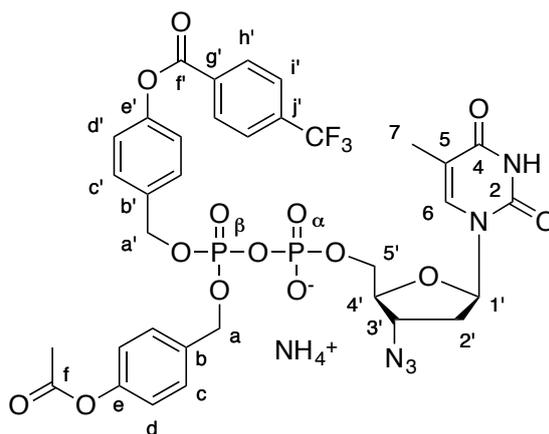
¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.72 (s, 1H, H-6); 7.42-7.40 (m, 4H, H-c, H-c'); 7.08-7.05 (m, 4H, H-d, H-d'); 6.21 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-1'); 5.14-5.12 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.40 (dt, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 1H, H-3'); 4.21-4.18 (m, 1H, H-5'a); 4.13-4.10 (m, 1H, H-5'b); 4.04-4.03 (m, 1H, H-4'); 2.58 (d, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 1H, H-g'); 2.36-2.26 (m, 2H, H-2'a, H-2'b); 2.27 (s, 3H, CH₃); 1.90 (s, 3H, H-7); 1.76-1.71 (m, 2H, H-h'); 1.45-1.25 (m, 16H, H-i' – H-p'); 0.90 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 3H, H-q'). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.8 (C-f); 171.0 (C-f); 166.3 (C-4); 152.5 (C-e, C-e'); 152.3 (C-2); 137.8 (C-6); 134.8 (C-b', C-b); 130.5 (2xd, ⁴J_{C,P} = 2.3 Hz, C-c, C-c'); 122.9 (C-d, C-d'); 112.2 (C-5); 85.8 (C-1'); 84.4 (d, ³J_{C,P} = 8.8 Hz, C-4'); 70.3 (d, ²J_{C,P} = 5.3 Hz, C-a, C-a'); 67.3 (d, ³J_{C,P} = 5.8 Hz, C-5'); 62.5 (C-3'); 38.0 (C-2'); 35.0 (C-g'); 33.1, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 23.7 (C-i' – C-p'); 26.0 (C-h'); 20.9 (CH₃); 12.6 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.17 (d, ²J_{P,P} = 20.5 Hz, 1P, P_β); -12.8 (d, ²J_{P,P} = 20.4 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von CH₃/CF₃-Ph-DiPPro-AZTDP 53d

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 98 mg (0.16 mmol) AZTMP **9** mit 140 mg (0.234 mmol) CH₃/CH₃-Ph-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39e** in 4 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 940 µL (0.234 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 44 µL (0.24 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 83 mg (0.095 mmol, 61%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 870.62 g/mol **Summenformel:** C₃₄H₃₅F₃N₆O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode III, R_t = 16.4 min **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₄H₃₃F₃N₅O₁₄P₂: 854.1451 [M+H]⁺, gefunden: 854.1442.



¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 8.38-8.36 (m, 2H, H-h'/H-i'); 7.90-7.89 (m, 2H, H-h'/H-i'); 7.73 (s, 1H, H-6); 7.50-7.48 (m, 2H, H-c'); 7.45-7.42 (m, 2H, H-c); 7.25-7.23 (m, 2H, H-d'); 7.10-7.08 (m, 2H, H-d); 6.22 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-1'); 5.18-5.14 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.43-4.40 (m, 1H, H-3'); 4.23-4.20 (m, 1H, H-5'a); 4.15-4.12 (m, 1H, H-5'b); 4.06-4.04 (m, 1H, H-4'); 2.36-2.26 (m, 2H, H-2'a, H-2'b); 2.25 (s, 3H, CH₃); 1.90 (s, 3H, H-7). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 171.0 (C-f); 166.4 (C-4); 165.4 (C-f'); 152.4 (C-2); 152.3 (C-e); 152.3 (C-e'); 137.8 (C-6); 135.9 (C-j'); 135.3 (C-b'); 135.1 (C-b); 134.4 (C-g'); 131.8 (C-h'/C-i'); 130.6 (d, ⁵J_{C,P} = 4.2 Hz, C-c'); 130.1 (d, ⁵J_{C,P} = 2.5 Hz, C-c); 126.5 (C-h'/C-i'); 124.4 (CF₃); 123.0 (C-d'); 122.9 (C-d); 112.2 (C-5); 85.8 (C-1'); 84.4 (d, ³J_{C,P} = 9.5 Hz, C-4'); 70.4 (d, ²J_{C,P} = 5.3 Hz, C-a/C-a'); 70.3 (d, ²J_{C,P} = 5.5 Hz, C-a/C-a'); 67.3 (d, ³J_{C,P} = 5.8 Hz, C-5'); 62.5 (C-3'); 38.0 (C-2'); 20.9 (CH₃); 12.6 (C-7). ¹⁷F-NMR (565 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = -64.7. ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.14 (d, ²J_{P,P} = 20.1 Hz, 1P, P_β); -12.68-12.83 (m, 1P, P_α).

Darstellung von C₄H₉/C₇H₁₅-DiPPro-AZTDP 53f

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 96 mg (0.15 mmol) AZTMP **9** mit 132 mg (0.231 mmol) C₄H₉/C₇H₁₅-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39i** in 4 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 900 µL (0.231 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 42 µL (0.23 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 37 mg (0.043 mmol, 29%) einer farblosen Watte erhalten.

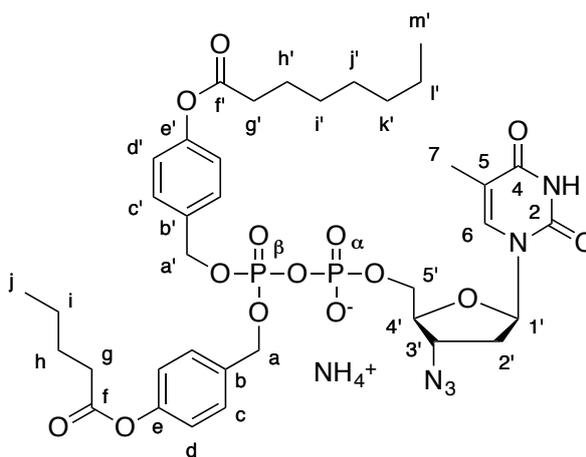
Molmasse: 866.79 g/mol **Summenformel:**

C₃₇H₅₂N₆O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode III,

R_t = 18.8 min **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* =

berechnet für C₃₇H₄₉N₅O₁₄P₂Na: 872.2643

[M+Na]⁺, gefunden: 872.2568.



¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.71 (s, 1H, H-6); 7.42-7.40 (m, 4H, H-c, H-c'); 7.07-7.05 (m, 4H, H-d, H-d'); 6.20 (dd, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 1H, H-1'); 5.13-5.11 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.40-4.38 (m, 1H, H-3'); 4.21-4.18 (m, 1H, H-5'a); 4.13-4.09 (m, 1H, H-5'b); 4.03 (bs, 1H, H-4'); 2.59-2.56 (m, 4H, H-g, H-g'); 2.36-2.31 (m, 2H, H-2'a); 2.30-2.26 (m, 2H, H-2'b); 1.90 (s, 3H, H-7); 1.75-1.69 (m, 4H, H-h, H-h'); 1.48-1.29 (m, 10H, H-i, H-i' – H-l'); 0.98 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, H-j); 0.92 (t, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 3H, H-m'). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.7 (C-f, C-f'); 166.4 (C-4); 152.5 (C-e, C-e'); 152.3 (C-2); 137.8 (C-6); 134.9 (C-b/C-b'); 134.8 (C-b/C-b'); 130.5 (C-c, C-c'); 122.9 (C-d, C-d'); 112.2 (C-5); 85.8 (C-1'); 84.4 (d, ³J_{C,P} = 9.4 Hz, C-4'); 70.4 (d, ²J_{C,P} = 5.6 Hz, C-a/C-a'); 67.2 (d, ³J_{C,P} = 6.1 Hz, C-5'); 62.5 (C-3'); 38.0 (C-2'); 35.0 (C-g/C-g'); 34.8 (C-g/c-g'); 32.9, 30.1, 30.1, 23.7 (C-i' – C-l'); 28.1 (C-h, C-h'); 26.0 (C-h, C-h'); 23.2 (C-i) 14.4 (C-m'); 14.1 (C-j); 12.6 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.07 (d, ²J_{P,P} = 20.5 Hz, 1P, P_β), -12.91 (d, ²J_{P,P} = 20.5 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von C₄H₉/C₉H₁₉-DiPPro-AZTDP 53g

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 79 mg (0.13 mmol) AZTMP **9** mit 117 mg (0.191 mmol) C₄H₉/C₉H₁₉-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39j** in 4 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 760 µL (0.191 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 35 µL (0.19 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 97 mg (0.11 mmol, 85%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 894.84 g/mol

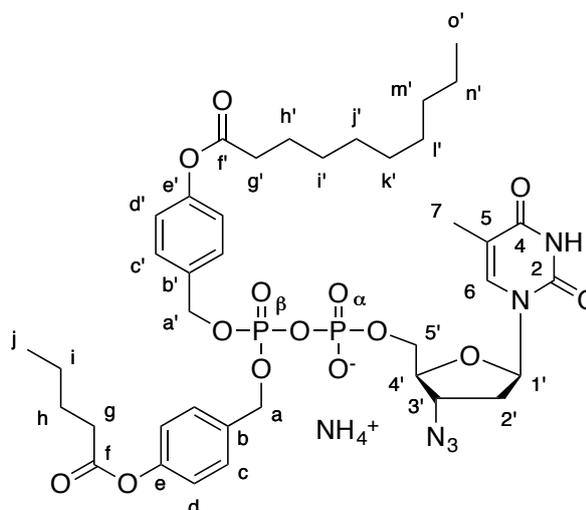
Summenformel: C₃₉H₅₆N₆O₁₄P₂ **RP-18-**

HPLC: Methode III, R_t = 20.5 min **HRMS:**

(ESI⁺) m/z = berechnet für

C₃₉H₅₃N₅O₁₄P₂Na: 900.2962 [M+Na]⁺,

gefunden: 900.2962.



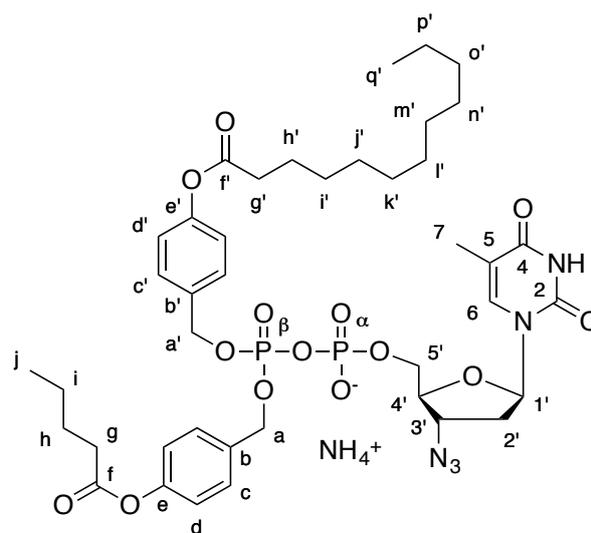
¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.72 (s, 1H, H-6); 7.42-7.40 (m, 4H, H-c, H-c'); 7.06-7.05 (m, 4H, H-d, H-d'); 6.21 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-1'); 5.14-5.11 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.40 (dt, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-3'); 4.21-4.18 (m, 1H, H-5'a); 4.13-4.10 (m, 1H, H-5'b); 4.04-4.03 (m, 1H, H-4'); 2.59-2.56 (m, 4H, H-g, H-g'); 2.36-2.31 (m, 2H, H-2'a); 2.30-2.26 (m, 2H, H-2'b); 1.90 (s, 3H, H-7); 1.75-1.69 (m, 4H, H-h, H-h'); 1.48-1.29 (m, 14H, H-i, H-i' – H-n'); 0.99 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, H-j); 0.91 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, H-o'). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.7 (C-f, C-f'); 166.5 (C-4); 152.5 (C-e, C-e'); 152.4 (C-2); 137.8 (C-6); 134.8 (C-b', C-b); 130.5 (C-c, C-c'); 122.9 (C-d, C-d'); 112.2 (C-5); 85.8 (C-1'); 84.4 (d, ³J_{C,P} = 8.8 Hz, C-4'); 70.4 (d, ²J_{C,P} = 5.5 Hz, C-a/C-a'); 67.3 (d, ³J_{C,P} = 5.5 Hz, C-5'); 62.5 (C-3'); 38.0 (C-2'); 35.0 (C-g/C-g'); 34.8 (C-g/c-g'); 33.0, 30.6, 30.4, 30.2, 23.7 (C-i' – C-n'); 28.1 (C-h, C-h'); 26.0 (C-h, C-h'); 23.3 (C-i); 14.4 (C-o'); 14.1 (C-j); 12.6 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.16 (d, ²J_{P,P} = 20.6 Hz, 1P, P_β); -12.78 (d, ²J_{P,P} = 21.7 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von C₄H₉/C₁₁H₂₃-DiPPro-AZTDP 53h

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 69 mg (0.11 mmol) AZTMP **9** mit 120 mg (0.166 mmol) C₄H₉/C₁₁H₂₃-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39k** in 4 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 550 μ L (0.138 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 31 μ L (0.17 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 37 mg (0.040 mmol, 37%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 922.89 g/mol **Summenformel:** C₄₁H₆₀N₆O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode III, R_t = 21.9 min **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₄₁H₅₇N₅O₁₄P₂Na: 928.3275 [M+Na]⁺, gefunden: 928.3252.



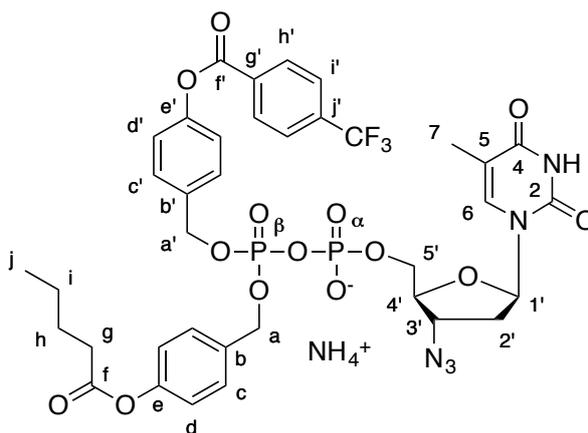
¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.75 (s, 1H, H-6); 7.21-7.12 (m, 4H, H-c, H-c'); 6.85-6.84 (m, 4H, H-d, H-d'); 6.00 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-1'); 4.92-4.90 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.19 (dt, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-3'); 4.00-3.97 (m, 1H, H-5'a); 3.92-3.89 (m, 1H, H-5'b); 3.83-3.82 (m, 1H, H-4'); 2.38-2.35 (m, 4H, H-g, H-g'); 2.15-2.10 (m, 2H, H-2'a); 2.08-2.05 (m, 2H, H-2'b); 1.69 (s, 3H, H-7); 1.55-1.48 (m, 4H, H-h, H-h'); 1.28-1.08 (m, 18H, H-i, H-i' – H-p'); 0.78 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, H-j); 0.69 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 3H, H-q'). ¹³C-NMR (150MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.3 (C-f, C-f'); 166.4 (C-4); 152.5 (C-e, C-e'); 152.4 (C-2); 137.8 (C-6); 134.9 (C-b', C-b); 130.5 (d, C-c, C-c'); 122.9 (C-d, C-d'); 112.1 (C-5); 85.8 (C-1'); 84.4 (d, ³J_{C,P} = 9.4 Hz, C-4'); 70.3 (d, ²J_{C,P} = 5.5 Hz, C-a/C-a'); 67.3 (d, ³J_{C,P} = 5.9 Hz, C-5'); 62.5 (C-3'); 38.0 (C-2'); 35.0 (C-g/c-g'); 34.8 (C-g/c-g'); 33.1, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.2, 23.3 (C-i, C-i' – C-p'); 28.1 (C-h, C-h'); 26.0 (C-h, C-h'); 14.1 (C-j); 14.5 (C-q'); 12.6 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.16 (d, ²J_{P,P} = 20.3 Hz, 1P, P_β); -12.78 (d, ²J_{P,P} = 20.4 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von C₄H₉/CF₃-Ph-DiPPro-AZTDP 53i

Die Reaktion wurde nach AAV7 durchgeführt. Es wurden 117 mg (0.188 mmol) AZTMP **9** mit 179 mg (0.282 mmol) C₄H₉/CF₃-Ph-*N,N*-Diisopropylaminophosphoramidit **39i** in 5 mL abs. Acetonitril umgesetzt, durch Aktivierung mit 1.13 mL (0.282 mmol) 0.25 molarer DCI-Aktivatorlösung. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 51 µL (0.28 mmol) 5.5 molarer *t*BuOOH-Lösung. RP-Chromatographie am Puri Flash, Ionenaustausch gegen NH₄⁺-Ionen und erneute RP-Chromatographie am Puri Flash lieferten das Produkt.

Ausbeute: Es wurden 80 mg (0.088 mmol, 47%) einer farblosen Watte erhalten.

Molmasse: 912.70 g/mol **Summenformel:** C₃₇H₄₁F₃N₆O₁₄P₂ **RP-18-HPLC:** Methode III, R_t = 18.0 min **HRMS:** (ESI⁺) *m/z* = berechnet für C₃₇H₃₉F₃N₅O₁₄P₂: 896.1921 [M+H]⁺, gefunden: 896.1914.



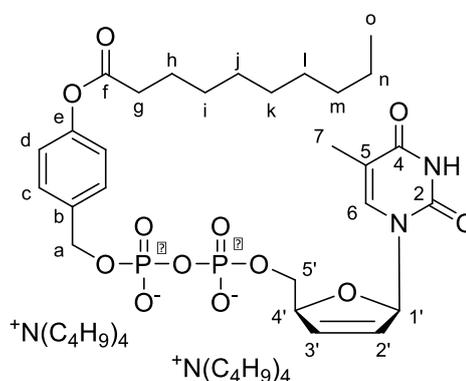
¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 8.38-8.36 (m, 2H, H-h'/H-i'); 7.90-7.89 (m, 2H, H-h'/H-i'); 7.73 (s, 1H, H-6); 7.49-7.47 (m, 2H, H-c'); 7.44-7.41 (m, 2H, H-c); 7.25-7.23 (m, 2H, H-d'); 7.08-7.06 (m, 2H, H-d); 6.22 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, H-1'); 5.18-5.13 (m, 4H, H-a, H-a'); 4.43-4.41 (m, 1H, H-3'); 4.23-4.21 (m, 1H, H-5'a); 4.15-4.12 (m, 1H, H-5'b); 4.06-4.05 (m, 1H, H-4'); 2.56 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-g); 2.37-2.32 (m, 1H, H-2'a); 2.31-2.27 (m, 1H, H-2'b); 1.90 (s, 3H, H-7); 1.68 (tt, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 2H, H-h); 1.43 (dq, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-i); 0.96 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-j). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.6 (C-f); 166.3 (C-4); 166.3 (C-f'); 152.4 (C-2); 152.3 (C-e); 152.2 (C-e'); 137.4 (C-6); 135.9 (C-j'); 135.3 (C-b'); 134.8 (C-b); 134.3 (C-g'); 131.6 (C-h'/C-i'); 130.6 (d, ⁴J_{C,P} = 4.2 Hz, C-c'); 130.1 (d, ⁴J_{C,P} = 2.5 Hz, C-c); 126.5 (C-h'/C-i'); 124.3 (CF₃); 122.6 (C-d'); 122.6 (C-d); 112.1 (C-5); 85.4 (C-1'); 84.4 (d, ³J_{C,P} = 9.2 Hz, C-4'); 70.4 (2xd, ²J_{C,P} = 6.3 Hz, ²J_{C,P} = 4.9 Hz C-a, C-a'); 67.3 (d, ³J_{C,P} = 5.6 Hz, C-5'); 62.2 (C-3'); 37.8 (C-2'b); 37.7 (C-2'a); 34.4 (C-g); 27.7 (C-h); 22.9 (C-i); 14.1 (C-j); 12.4 (C-7). ¹⁹F-NMR (565 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = -65.7. ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -12.14 (d, ²J_{P,P} = 20.2 Hz, 1P, P_β); -12.67-12.81 (m, 1P, P_α).

7.2.11.4 Synthese monomaskierter DiPPro-Nucleotide

Darstellung von monomaskierten C₉H₁₉-DiPPro-d4TDP 58a

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 91 mg (0.15 mmol) Tetra-*n*-butylammonium-d4TMP **8b** wurden in 1 mL trockenem DMF gelöst und für eine Stunde über frisch aktiviertem Molsieb getrocknet. Dann erfolgte die tropfenweise Zugabe von 36 mg (0.073 mmol) 5-Nitro-*cycloSal*-(4-decanoyloxybenzyl)phosphat **60a**, gelöst in 1 mL trockenem DMF. Nach einer Reaktionszeit von 16 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Ethylacetat und Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden gefriergetrocknet und schließlich wurde das Produkt nach Reinigung mittels automatisierter Flash-Chromatographie an RP-18-Kieselgel mit Acetonitril/Wasser-Gradient erhalten.

Ausbeute: Die Ausbeute konnte aufgrund der geringen Menge des hygroskopischen, farblosen Produktes nicht bestimmt werden. **Molmasse:** 1127.48 g/mol **Summenformel:** C₅₉H₁₀₈N₄O₁₂P₂
RP-18-HPLC: Methode II, R_t = 15.3 min.

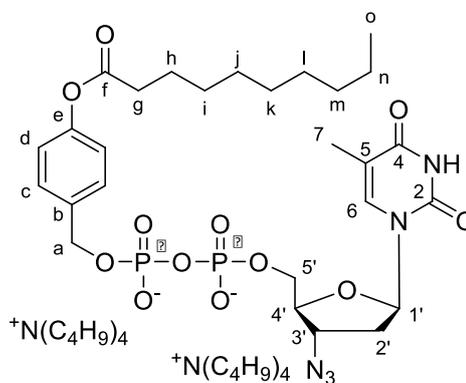


¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.76 (s, 1H, H-6); 7.49-7.46 (m, 2H, H-c); 7.00-6.99 (m, 2H, H-d); 6.94-6.93 (m, 1H, H-1'); 6.55-6.53 (m, 1H, H-3'); 5.78-5.77 (m, 1H, H-2'); 5.09-5.08 (m, 2H, H-a); 4.97 (bs, 1H, H-4'); 4.37-4.34 (m, 2H, H-5'a); 4.22-4.19 (m, 2H, H-5'b); 3.25-3.21 (m, 16H, H-A); 2.56 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-g'); 1.91 (s, 3H, H-7); 1.76-1.62 (m, 18H, H-h, H-B); 1.46-1.30 (m, 28H, H-i – H-n, H-C); 1.02 (t, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 24H, H-D); 0.91 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, H-o). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 172.4 (C-f); 166.6 (C-4); 151.5 (C-2); 151.5 (C-e); 139.0 (C-6); 136.4 (C-3'); 136.4 (C-b); 129.6 (C-c); 126.7 (C-2'); 122.3 (C-d); 112.1 (C-5); 90.8 (C-1'); 87.6 (d, ³J_{C,P} = 9.6 Hz, C-4'); 68.0 (C-a); 67.6 (C-5'); 59.5 (C-A), 35.0 (C-g); 33.1, 30.6, 30.4, 30.2, 24.7 (C-i – C-n); 26.0 (C-h); 24.8 (C-B); 20.7 (C-C); 13.9 (C-o); 13.9 (C-D); 12.5 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -11.28 (d, ²J_{P,P} = 21.9 Hz, 1P, P_β); -11.66 (d, ²J_{P,P} = 21.7 Hz, 1P, P_α).

Darstellung von monomaskierten C₉H₁₉-DiPPro-AZTDP 58b

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 128 mg (0.205 mmol) Tetra-*n*-butylammonium-AZTMP **9b** wurden in 1 mL trockenem DMF gelöst und für eine Stunde über frisch aktiviertem Molsieb getrocknet. Dann erfolgte die tropfenweise Zugabe von 50 mg (0.103 mmol) 5-Nitro-*cycloSal*-(4-decanoyloxybenzyl)phosphat **60a**, gelöst in 1 mL trockenem DMF. Nach einer Reaktionszeit von 16 Stunden bei Raumtemperatur wurde Wasser zur Reaktionslösung gegeben. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Ethylacetat und Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden gefriergetrocknet und schließlich wurde das Produkt nach Reinigung mittels automatisierter Flash-Chromatographie an RP-18-Kieselgel mit Acetonitril/Wasser-Gradient erhalten.

Ausbeute: Die Ausbeute konnte aufgrund der geringen Menge des hygroskopischen, farblosen Produktes nicht bestimmt werden. **Molmasse:** 1170.51 g/mol **Summenformel:** C₅₉H₁₀₉N₇O₁₂P₂
RP-18-HPLC: Methode II, R_t = 15.9 min.



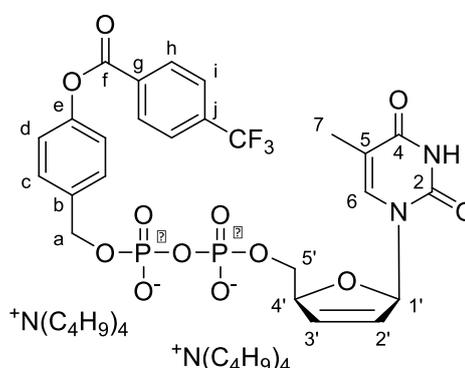
¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 7.89 (s, ⁴J_{H,H} = 1.1 Hz 1H, H-6); 7.51-7.49 (m, 2H, H-c); 7.01-6.99 (m, 2H, H-d); 6.25 (dd, ³J_{H,H} = 8.9 Hz, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, 1H, H-1'); 5.11-5.09 (m, 2H, H-a); 4.70-4.69 (m, 1H, H-3'); 4.31-4.26 (m, 1H, H-5'a); 4.23-4.19 (m, 1H, H-5'b); 4.08-4.06 (m, 1H, H-4'); 3.25-3.21 (m, 16H, H-A); 2.56 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-g); 2.48-2.41 (m, 4H, H-2'a); 2.22-2.17 (m, 4H, H-2'b); 1.90 (d, ³J_{H,H} = 1.0 Hz, 3H, H-7); 1.74-1.62 (m, 18H, H-h, H-B); 1.46-1.37 (m, 16H, H-C); 1.36-1.30 (m, 12H, H-i - H-n); 1.02 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 24H, H-D); 0.91 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 3H, H-o). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-d₄): δ [ppm] = 173.9 (C-f); 166.5 (C-4); 152.6 (C-2); 151.5 (C-e); 138.2 (C-6); 137.9 (d, ³J_{C,P} = 9.5 Hz, C-b); 129.7 (C-c); 122.3 (C-d); 112.4 (C-5); 85.7 (C-1'); 85.0 (d, ³J_{C,P} = 9.8 Hz, C-4'); 68.0 (d, ²J_{C,P} = 5.2 Hz, C-a); 67.2 (d, ³J_{C,P} = 5.5 Hz, C-5'); 63.7 (C-3'); 59.5 (C-A), 37.8 (C-2'); 35.1 (C-g); 33.1, 30.6, 30.4, 30.2, 23.7 (C-i - C-n); 26.0 (C-h); 24.8 (C-B); 20.7 (C-C); 14.4 (C-o); 13.9 (C-D); 12.7 (C-7). ³¹P-NMR (243 MHz, MeOH-d₄, entkoppelt): δ [ppm] = -11.3 (d, ²J_{P,P} = 23.7 Hz, P_β); -11.9 (d, ²J_{P,P} = 23.3 Hz, P_α).

Darstellung von monomaskierten 4-CF₃-Ph-DiPPro-d4TDP 59

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 79 mg (0.13 mmol) Tetra-*n*-butylammonium-d4TMP **8b** wurden in 1 mL trockenem DMF gelöst und für eine Stunde über frisch aktiviertem Molsieb getrocknet. Dann erfolgte die tropfenweise Zugabe von 32 mg (0.063 mmol) 5-Nitro-*cycloSal*-(4-(4'-trifluormethyl)benzoyloxybenzyl)phosphat **60b**, gelöst in 1 mL trockenem DMF. Nach einer Reaktionszeit von 16 Stunden bei Raumtemperatur wurde Wasser zur Reaktionslösung gegeben. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Ethylacetat und Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden gefriergetrocknet und schließlich wurde das Produkt nach Reinigung mittels automatisierter Flash-Chromatographie an RP-18-Kieselgel mit Acetonitril/Wasser-Gradient erhalten.

Ausbeute: Die Ausbeute konnte aufgrund der geringen Menge des hygroskopischen, farblosen Produktes nicht bestimmt werden.

Molmasse: 1145.33 g/mol **Summenformel:** C₅₇H₉₃F₃N₄O₁₂P₂ **RP-18-HPLC:** Methode II, R_t= 13.9 min.



¹H-NMR (600 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm]= 8.38-8.35 (m, 2H, H-h); 7.89-7.87 (m, 2H, H-i); 7.77 (d, ⁴J_{H,H} = 1.2 Hz, 1H, H-6); 7.57-7.55 (m, 2H, H-c); 7.19-7.17 (m, 2H, H-d); 6.95-6.93 (m, 1H, H-1'); 6.58-6.56 (m, 1H, H-3'); 5.79-5.78 (m, 1H, H-2'); 5.14-5.13 (m 2H, H-a); 4.99-98 (m, 1H, H-4'); 4.40-4.36 (m, 2H, H-5'a); 4.25-4.20 (m, 2H, H-5'b); 3.26-3.21 (m, 16H, H-A); 1.92 (d, ⁴J_{H,H} = 1.0 Hz, 3H, H-7); 1.70-1.62 (m, 16H, H-B); 1.46-1.37 (m, 16H, H-C); 1.03 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 24H, H-D). ¹³C-NMR (150 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm]= 166.6 (C-4); 164.4 (C-f); 152.8 (C-2); 150.7 (C-e); 139.0 (C-6); 135.0 (C-j); 134.4 (C-3'); 134.0 (C-g); 131.8 (C-h); 129.7 (C-c); 127.6 (C-2'); 126.8 (C-i); 126.7 (CF₃); 122.2 (C-d); 112.2 (C-5); 90.8 (C-1'); 87.6 (C-4'); 70.2 (C-a); 67.6 (d, ²J_{C,P} = 6.5 Hz, C-5'); 59.5 (C-A), 24.8 (C-B); 20.7 (C-C); 13.9 (C-D); 12.5 (C-7). ³¹P-NMR (565 MHz, MeOH-*d*₄, entkoppelt): δ [ppm]= -12.0 (d, ²J_{P,P}= 20.7 Hz, P_β); -12.9 (d, ²J_{P,P}= 20.6 Hz, P_α). ¹⁹F-NMR (243 MHz, MeOH-*d*₄): δ [ppm]= 64.71.

7.3 Hydrolysestudien

Zur Auswertung wurden Chromatogramme bei einer Wellenlänge von 265 nm aufgenommen und die Integrale der entsprechenden Peaks gegen die Hydrolysedauer aufgetragen. Unter der Annahme, dass aufgrund der geringen Konzentrationen eine Reaktion Pseudo-erster-Ordnung vorliegt, konnten mit Hilfe eines Kalkulationsprogrammes exponentielle Ausgleichskurven ermittelt werden, mit Hilfe derer die Hydrolysehalbwertszeit $t_{1/2}$ nach

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

berechnet wurde.

Hydrolysestudien im Phosphatpuffer bei pH 7.3

Für die Hydrolysestudien wurden 11 μL einer 50 mM DMSO-Stammlösung der DiPPro-NDPs mit 289 μL DMSO verdünnt, sodass 1.9 mM Lösungen erhalten wurden. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 300 μL Phosphatpufferlösung (50 mM Phosphatpuffer: 547 mg (3.85 mol) Dinatriumhydrogenphosphat und 155 mg (0.890 mol) Kaliumdihydrogenphosphat wurden mit Reinstwasser auf ein Volumen von 100 mL aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit NaOH bzw. Phosphorsäure auf pH 7.3 eingestellt.) gestartet. Ein interner Standard wurde nicht zugesetzt. Die Proben wurden bei 37 °C im Thermomixer inkubiert und nach bestimmten Zeitpunkten wurden der Hydrolyselösung Aliquote entnommen, die sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die Proben wurden direkt nach dem Auftauen an der analytischen RP-HPLC analysiert.

Hydrolysestudien in Zellextrakten

15 μL der 50 mM DMSO-Stammlösung der Nucleosiddiphosphat-Prodrugs wurden mit 110 μL DMSO auf eine Konzentration von 6 mM verdünnt. 50 μL der CEM/0-Zellextrakte wurden mit 10 μL Reinstwasser verdünnt und die Hydrolyse durch Zugabe von 10 μL 6 mM DiPPro-Lösung gestartet. Sechs bis acht solcher Proben wurden in einem Thermomixer bei 37 °C für unterschiedliche Zeitperioden inkubiert. Der Abbruch der Hydrolysen erfolgte durch die Zugabe von 150 μL Methanol. Nach fünfminütiger Lagerung auf Eis, fünfminütigem Ultraschallbad und anschließender Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 rpm wurden die Proben über einen Spritzenfilter (Schleicher & Schuell Spartan 13/30, 0.2 μm) filtriert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden direkt nach dem Auftauen an der analytischen RP-HPLC untersucht.

Hydrolysestudien im RPMI-Kulturmedium

15 µL der 50 mM DMSO-Stammlösung der Nucleosiddiphosphat-Prodrugs wurden mit 110 µL DMSO auf eine Konzentration von 6 mM verdünnt. 50 µL RPMI-Kulturmedium ohne fötales Kälberserum (FCS) wurden mit 10 µL Reinstwasser verdünnt und die Hydrolyse durch Zugabe von 10 µL 6 mM DiPPro-Lösung gestartet. Sechs bis acht solcher Proben wurden in einem Thermomixer bei 37 °C inkubiert. Nach der jeweiligen Zeitperiode wurde den Hydrolyselösungen 150 µL Methanol hinzugefügt und die Proben sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Direkt nach dem Auftauen wurden die Proben an der analytischen RP-HPLC untersucht.

Hydrolysestudien mit PLE

15 µL der 50 mM DMSO-Stammlösung der Nucleosiddiphosphat-Prodrugs wurden mit 110 µL DMSO auf eine Konzentration von 6 mM verdünnt. 10 µL der 6 mM DiPPro-Lösung wurden mit 15 µL Reinstwasser und 100 µL 50 mM Phosphatpuffer verdünnt. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 7.5 µL PLE-Lösung (3 mg/mL in PBS, 17 units/mg) gestartet. Sechs bis acht solcher Proben wurden in einem Thermomixer bei 37 °C inkubiert. Der Abbruch der Hydrolyse erfolgte nach der jeweiligen Zeitperiode durch die Zugabe von 132.5 µL Methanol. Nach fünfminütiger Lagerung auf Eis, fünfminütigem Ultraschallbad und anschließender Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 rpm wurden die Proben über einen Spritzenfilter (Schleicher & Schuell Spartan 13/30, 0.2 µm) filtriert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden direkt nach dem Auftauen an der analytischen RP-HPLC untersucht.

Gefahrstoffverzeichnis

Das folgende Verzeichnis umfasst Chemikalien und Lösungsmittel, mit denen während der Anfertigung dieser Arbeit gearbeitet wurde. Die Gefahrstoffe sind mit den jeweiligen Piktogrammen sowie H- und P-Sätzen aufgelistet. Substanzen, für die keine Gefahreinschätzungen bekannt sind, sind als gefährlich einzustufen. Sich oder andere Personen mit ihnen zu kontaminieren sowie die Freisetzung in die Umwelt sind zu vermeiden.

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Aceton		225, 319, 336, EUH066	210, 233, 305+351+338
Acetonitril		225, 302+312+332, 319	210, 305+351+338, 403+235
Acetylchlorid		225, 314, EUH014	210, 280, 301+330+331, 305+351+338, 309+310
Ammoniak		314, 335, 400	280, 273, 304+340, 305+351+338, 310
Ammoniumformiat		315, 319, 335	261, 305+351+338
Ammoniumhydrogencarbonat		302	-
3'-Azido-3'-desoxythymidin		351	281
Benzophenon		373, 412	260, 273, 281, 308+313, 391
Bis(<i>N,N</i> -diisopropylamino)-chlorphosphin		314	280, 305+351+338, 310
<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid		314, 228, EUH029, EUH014	280, 301+330+331, 305+351+338, 310, 402+404
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid (5.5 M in <i>n</i> -Decan)		226, 302, 304, 311+331, 314, 317, 341, 411	261, 273, 280, 301+310, 305+351+338, 310

Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Calciumhydrid		260	223, 231+232, 370+378, 422
4-Chlorbenzoylchlorid	 	314, 335,	260, 264, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340, 305+352+338, 310, 321, 405, 501
4-Cyanobenzoylchlorid		314	280, 305+351+338, 310
Decanoylchlorid		290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 309+310
Dichlormethan		351	281, 308+313
4,5-Dicyanoimidazol	 	315, 318, 335	261, 280, 350+351+338
Diethylether	 	224, 302, 336, EUH019, EUH066	210, 240, 403+235
Diisopropylamin	  	225, 302+332, 314, 412	210, 233, 240, 273, 280, 301+330+331, 305+351+338-309+310, 403+235
N,N-Diisopropylethylamin	  	225, 301, 314, 412	210, 233, 240, 273, 280, 301+330+331, 305+351+338-309+310, 403+235
N,N-Dimethylformamid	  	360D, 226, 312+332, 319	201, 302+352, 305+351+338, 308+313
Dimethylsulfoxid	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Decanoylchlorid		314	280, 305+351+338, 310
Dodecanoylchlorid		314	280, 305+351+338, 310
DOWEX 50WX8		319	280, 264, 305+351+338

Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Essigsäure 100%		226, 314	280, 305+351+338, 310
Essigsäureanhydrid		226, 332, 302, 314, 335	280, 301+330, 331, 305+351+338-309+310
Essigsäureethylester		225, 319, 336, EUH066	210, 240, 305+351+338
Ethanol		225	210, 233, 240, 403+235
Heptanoylchlorid		330, 314	260, 280, 284, 305+351+338, 310
n-Hexan		225, 361f, 304, 373, 315, 336, 411	210, 240, 273, 301,+310, 331, 302+352, 403+235
4-Hydroxybenzyl-alkohol		319	305+351+338
Isobutyrylchlorid		225, 314	210, 280, 301+330+331, 305+351+338, 309+310
Kalium		260, 314, EUH014	280, 301+330+331, 305+351+338, 402+404
Kaliumhydroxid		302, 314, 290	280, 301+330+331, 305+351+338
Kalium-tert-butanolat		261, 302, 314, EUH014	280, 301+330+331, 305+351+338, 402+404
Kieselgel	-	-	260
Mannose	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Methanol		225, 301+311+331, 370	210, 280, 302+352, 403+235
Methanol-d4		225, 301+311+331, 370	210, 280, 302+352, 403+235

Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Methansulfonylchlorid		300, 311, 330, 314	301+310, 303+361+353, 305+351+338, 320, 361, 405, 501
4-Methylbenzoylchlorid		314, 335	280, 301+330+331, 304+340, 305+351+338, 309+310
4-Methoxybenzoylchlorid		314,	280, 305+351+338, 310
Molekularsieb 3A	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Molekularsieb 4A		315, 319, 335,	261, 305+351+338
Natrium		260, 314, EUH014	280, 301+330+331, 305+351+338, 402+404
Natriumhydrid		260	223, 231+232, 370+378, 422
Natriumhydroxid		314, 290	280, 301+330+331, 305+351+338
Natriumsulfit	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Natriumthiosulfat	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
4-Nitrobenzoylchlorid		314	260, 264, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310, 321, 405, 501
5-Nitrosalicylaldehyd		302, 315, 319	302+352-305+351+338
Octanoylchlorid		290, 315, 317, 318, 330	260, 280, 284, 305+351+338, 310
Oxone®		272, 314, 317, 334, 335	220, 261, 280, 305+351+338, 310

Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
<i>n</i> -Pentan		225, 304, 336, 411, EUH066	273, 301+310, 331, 403+235
Petrolether (50-70)		225, 304, 336, 411, EUH066	210, 273, 243, 301+310, 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
Phosphorsäure (85%)		324, 290	280, 301+330+331, 305+351+338-309+310
Pyridin		225, 302+312+332	210, 233, 302+352
Salzsäure (25%)		314, 335	261, 280, 305+351+338, 310
Schwefelsäure (95-97%)		290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338
Tetra- <i>n</i> -butylammonium-hydroxidlösung (40% aq.)		314	280, 301+330+331, 305+351+331, 309+310
Tetrahydrofuran		225, 319, 335, EUH019	210, 233, 243, 305+351+338
Toluol		225, 304, 315, 336, 361d, 373	210, 240, 301+310, 331, 302+352-, 403+235
<i>p</i> -Toluolsulfonylchlorid		315, 318	302+352, 305+351+338, 313
Trichlormethan (deuteriert)		351, 302, 373, 373, 315	201, 202, 260, 264, 270, 280, 281, 301+312-302+352, 308+313, 314, 321, 330, 332+313, 362, 405, 501
Triethylamin		225, 332, 312, 302, 314, 335	210, 280, 301+330+331, 302+352, 305+351+338

Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Triethylamin Trihydrofluorid		300, 310, 314, 318, 330, 335	261, 280, 301+330+331, 302+350, 304+340, 305+351+338, 361
4-Trifluormethyl- benzoylchlorid		314	280, 305+351+338
Thymidin	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Richtlinie 67/548/EWG		
Valerylchlorid		226, 314, 331	261, 280, 305+351+338

Literaturverzeichnis

1. 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* (18), 9154-9218.
2. UNAIDS Global Report 2013 zu finden unter:
http://www.unaids.org/sites/default/files/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf, 03/2015.
3. F. Barré-Sinoussi, J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, L. Montagnier; Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS); *Science* **1983**, *220*, 868-871.
4. R. C. Gallo, P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stah, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, M. Popovic, Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS); *Science* **1983**, *220*, 865-867.
5. Stellungnahme des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit und Soziale Sicherung, Humanes Immunschwächevirus (HIV); *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz, Springer-Verlag*, **2004**, *47*, 83-95.
6. J. M. Coffin, S. H. Hughes, T. H. E. Varmus; *Retroviruses*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1997**.
7. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, U.S. Department of Health and Human Services, zu finden unter:
<http://www.niaid.nih.gov/topics/hivaids/understanding/howhivcausesaids/pages/howhiv.aspx>, 01/2015.
8. M. T. May, J. A. C. Sterne, D. Costagliola, C. A. Sabin, A. N. Phillips, A. C. Justice, F. Dabis, J. Gill, J. Lundgren, R. S. Hogg et al; The Antiretroviral Therapy (ART) Cohort Collaboration; HIV treatment response and prognosis in Europe and North America in the first decade of highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis; *Lancet* **2006**, *368*, 451-458.
9. A. M. d'Arminio, C. A. Sabin, A. Phillips, J. Sterne, M. May, A. Justice, F. Dabis, S. Grabar, B. Ledergerber, J. Gill, P. Reiss, M. Egger; The changing incidence of AIDS events in patients receiving highly active antiretroviral therapy; *Arch. Intern. Med.* **2005**, *165*, 416-423.
10. S. B. Laskey, R. F. Siciliano; A mechanistic theory to explain the efficacy of antiretroviral therapy; *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 772-780.
11. R. C. Gallo, S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, et al.; Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **1984**, *224*, 500-503.
12. 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-2'-deoxythymidin (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.
13. P. A. Furman, J. A. Fyfe, M. H. St. Clair, K. Weinhold, J. L. Rideout, G. A. Freeman, S. N. Lehrman, D. P. Bolognesi, S. Broder, H. Mitsuya; Phosphorylation of 3'-Azido-2'-deoxythymidin and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 8333-8337.
 14. J. Balzarini, P. Herdewijn, E. De Clercq; Differential Patterns of intracellular Metabolism of 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin, two potent Anti-human Immunodeficiency Virus Compounds; *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6127-6133.
 15. 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-I Reverse Transcription; *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5356-5364.
 16. Y. Hamamoto, H. Nakashima, T. Matsuki, A. Matsuda, T. Ueda, N. Yamamoto; Inhibitory Effect of 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydronucleosides on Infectivity, Cytopatic Effects, and Replication of Human Immunodeficiency Virus; *Antimicrob. Agents Chemtherp.* **1987**, *31*, 907-910.
 17. E. S. Arner, S. Eriksson; Mammalian deoxyribonucleoside kinases *Pharmacol. Ther.* **1995**, *67*, 155-186.
 18. J. Balzarini, D. A. Cooney, M. Dalal, G. J. Kang, J. E. Cupp, E. De Clercq, S. Broder, D. G. Johns; 2,3-Dideoxycytidine: regulation of its metabolism and anti-retroviral potency by natural pyrimidine nucleosides and by inhibitors of pyrimidine nucleotide synthesis *Mol. Pharmacol* **1987**, *32*, 798-806.
 19. P. A. Furman, J. A. Fyfe, M. H. St. Clair, K. Weinhold, J. L. Rideout, G. A. Freeman, S. N. Lehrman, D. P. Bolognesi, S. Broder, H. Mitsuya, et al.; Phosphorylation of 3-azido-3-deoxythymidine and selective interaction of the 5-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 8333-8337.
 20. H.-T. Ho, M. J. Hitchcock; Cellular pharmacology of 2,3-dideoxy-2,3-didehydrothymidine, a nucleoside analog active against human immunodeficiency virus *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 844-849.
 21. N. G. Johansson, S. Eriksson; Structure-activity relationships for phosphorylation of nucleoside analogs to monophosphates by nucleoside kinases. *Acta Biochim. Pol.* **1996**, *43*, 143-160.
 22. D. S. Shewach, D. C. Liotta, R. F. Schinazi; Affinity of the antiviral enantiomers of oxathiolane cytosine nucleosides for human 2-deoxycytidine kinase. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *45*, 1540-1543.
 23. W. Y. Gao, T. Shirasaka, D. G. Johns, S. Broder, H. Mitsuya; Differential phosphorylation of azidothymidine, dideoxycytidine, and dideoxyinosine in resting and activated peripheral blood mononuclear cells *J. Clin. Invest.* **1993**, *91*, 2326-2333.
 24. A. R. Van Rompay, M. Johansson, A. Karlsson; Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases. *Pharmacol. Ther.* **2000**, *87*, 189-198.

25. J. Bourdais, R. Biondi, S. Sarfati, C. Guerreiro, I. Lascu, J. Janin, M. Veron; Cellular phosphorylation of anti-HIV nucleosides. Role of nucleoside diphosphate kinase. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 7887-7890.
26. P. Krishnan, Q. Fu, W. Lam, J. Y. Liou, G. Dutschman, Y. C. Cheng; Phosphorylation of pyrimidine deoxynucleoside analog diphosphates: selective phosphorylation of L-nucleoside analog diphosphates by 3-phosphoglycerate kinase *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 5453-5459.
27. D. Deville-Bonne, C. El Amri, P. Meyer, Y. Chen, L. A. Agrofoglio, J. Janin; Human and viral nucleoside/nucleotide kinases involved in antiviral drug activation: structural and catalytic properties *Antiviral Res.* **2010**, 86, 101-120.
28. H.-T. Ho, M. J. M. Hitchcock; Cellular Pharmacology of 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidine, a Nucleoside Analog Active against Human Immunodeficiency Virus; *Antimicrob. Agents Chemotherp.* **1989**, 33, 344-349.
29. 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'-didehydrothymidine and 2',3'-dideoxycytidine are highly dependent on the cell species *Biochem. Pharmacol.* **1988**, 37, 897-903.
30. P. A. Furman, J. A. Fyfe, M. H. St Clair, K. Weinhold, J. L. Rideout, G. A. Freeman; Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 8333-8337.
31. A. Lavie, I. Schlichting, I. R. Vetter, M. Konrad, J. Reinstein, R. S. Goody; The bottleneck in AZT activation *Nature Med.* **1997**, 3, 922-924.
32. A. Lavie, I. R. Vetter, M. Konrad, R. S. Goody, J. Reinstein, I. Schlichting; Structure of thymidylate kinase reveals the cause behind the limiting step in AZT activation *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 601-604.
33. A. Lavie, M. Konrad, R. Brundiers, R. S. Goody, I. Schlichting, J. Reinstein; Crystal structure of yeast thymidylate kinase complexed with bistubstrate inhibitor P1(5'-adenosyl) P5-(5'-thymidyl) pentaphosphate (TP5A) at 2.0 Å resolution: Implications for catalysis and AZT activation *Biochemistry* **1998**, 37, 3677-3686.
34. J. A. Harrington, J. E. Reardon, T. Spector; 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) monophosphate: an inhibitor of exonucleolytic repair of AZT-terminated DNA *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, (4), 918-920.
35. E. T. Hall, J. P. Yan, P. Melanco, R. D. Kuchta; 3'-Azido-3'-deoxythymidine potently inhibits protein glycosylation *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 14355-14358.
36. J. P. Yan, D. D. Ilsley, C. Frohlick, R. Street, E. T. Hall, R. D. Kuchta, P. Melanco; 3'-Azidothymidine (zidovudine) inhibits glycosylation and dramatically alters glycosphingolipid synthesis in whole cells clinically relevant concentrations *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 22836-22841.
37. B. Schneider, R. Sarfati, D. Deville-Bonne, M. Véron; Role of Nucleoside Diphosphate Kinase in the Activation of Anti-HIV Nucleoside Analogs *J. Bioenerg. Biomembr.* **2000**, 32, 317-324.

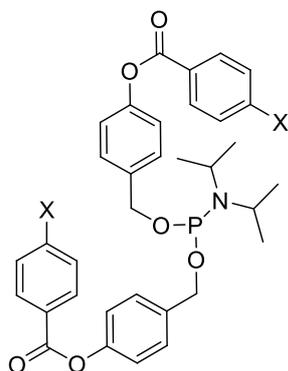
38. Z. Suo, K. A. Johnson; Selective inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by an antiviral inhibitor, (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27250-27258.
39. J. Y. Feng, K. S. Anderson; Mechanistic studies comparing the incorporation of (+) and (-) isomers of 3TCTP by HIV-1 reverse transcriptase *Biochemistry* **1999**, *38*, 55-63.
40. A. S. Ray, Z. Yang, J. Shi, A. Hobbs, R. F. Schinazi, C. K. Chu, K. S. Anderson; Insights into the molecular mechanism of inhibition and drug resistance for HIV-1 RT with carbovir triphosphate *Biochemistry* **2002**, *41*, 5150-5162.
41. J. A. Vaccaro, K. M. Parnell, S. A. Terezakis, K. S. Anderson; Mechanism of inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by d4TTP: an equivalent incorporation efficiency relative to the natural substrate dTTP *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 217-221.
42. K. Brinkman, H. J. M. ter Hofstede, D. M. Burger, J. A. M. Smeitink, P. P. Koopmans; Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway *AIDS* **1998**, *12*, 1735-1744.
43. A. A. Johnson, A. S. Ray, J. Hanes, Z. Suo, J. M. Colacino, K. S. Anderson, K. A. Johnson; Toxicity of antiviral nucleoside analogs ant the human mitochondrial DNA polymerase *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (44), 40847-40857.
44. E. E. McKee, A. T. Bentley, M. Hatch, J. Gingerich, D. Susan-Resiga; Phosphorylation of thymidine and AZT in heart mitochondria: elucidation of a novel mechanism of AZT cardiotoxicity; *Cardiovasc. Toxicol.* **2004**, *4*, 155-167.
45. T. Cihlar, A. S. Ray; Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine, *Antiviral Research*, **2010**, *85*, 39-58.
46. S. J. Hecker, M. D. Erion; Prodrugs of Phosphates and Phosphonates (Perspective) *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2328-2345.
47. C. Meier, H. J. Jessen, J. Balzarini; Nucleoside Diphosphate Prodrugs *Nucleic Acids Symposium Series* **2008**, *52*, 83-84.
48. H. J. Jessen, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier; Bioreversible Maskierung von Nucleosiddiphosphaten *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8847-8850.
49. H. J. Jessen, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier; Bioreversible protection of nucleoside diphosphates; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8719-8722.
50. T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier; The DiPPro Approach: Synthesis, Hydrolysis, and Antiviral Activity of Lipophilic d4T Diphosphate Prodrugs *ChemMedChem* **2014**, *9*, 762-775.
51. 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.
52. C. Meier, H. J. Jessen, T. Schulz, L. Weinschenk, F. Pertenbreiter, J. Balzarini; Rational developement of nucleoside diphosphate prodrugs: DiPPro-compounds, *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22* (34), 3933-3950.
53. T. Schulz, *Dissertation*, **2011**, Universität Hamburg.
54. T. Gollnest, T. Dinis de Oliveira, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier; Lipophilic prodrugs of nucleoside triphosphates as biochemical probes and potential antivirals, *Nature commun.* **2015**, *6*, DOI:10.1038/ncomms9716.

55. R. J. Sawchuk, Z. Yang; Investigation of distribution, transport and uptake of anti-HIV drugs to the central nervous system *Adv. Drug Delivery Rev.* **1999**, *39*, 5-31.
56. K. Y. Hostetler, L. M. Stuhmiller, H. B. M. Lenting, H. van den Bosch, D. D. Richman; Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6112-6117.
57. G. M. T. van Wijk, K. Y. Hostetler, H. van den Bosch; Lipid conjugates of antiretroviral: release of antiretroviral nucleoside monophosphate by a nucleoside diphosphate diglyceride hydrolase activity from rat liver mitochondria *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* **1991**, *1084*, 307-310.
58. K. Y. Hostetler, D. D. Richman, D. A. Carson, L. M. Stuhmiller, G. M. T. van Wijk, H. van den Bosch; Cytidine diphosphate diglyceride analogs *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 2025-2029.
59. K. Y. Hostetler, S. Parker, C. N. Sridhar, M. J. Martin, J. L. Li, L. M. Stuhmiller, G. M. T. van Wijk, H. van den Bosch, M. F. Gardner; Acyclovir diphosphate dimyristoylglycerol: a phospholipid prodrug with activity against acyclovir-resistant herpes simplex virus *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 11835-11839.
60. 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.
61. D. Bonnaffé, B. Dupraz, J. Ughetto-Monfrin, A. Namane, T. Huynh Dinh; Synthesis of Lipophilic Prodrugs containing two inhibitors targeted against different phases of the HIV replication cycle *Nucleosides and Nucleotides* **1995**, *14*, 783-787.
62. D. Bonnaffé, B. Dupraz, J. Ughetto-Monfrin, A. Namane, T. Huynh Dinh; Potential lipophilic nucleotide prodrugs: synthesis, hydrolysis, and antiretroviral activity of AZT and d4T acyl nucleotides; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 895-902.
63. C. Meier; *cycloSal* phosphates as chemical Trojan horses for intracellular nucleotide and glycosyl-monophosphate delivery - chemistry meets biology *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1081-1102.
64. C. Meier, M. F. H. Ruppel, D. Vukadinović, J. Balzarini; Second generation of *cycloSal*-Pronucleotides with Esterase-Cleavable Sites: The „Lock-in“-Concept *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, *23*, 89-115.
65. C. Meier, C. Ducho, D. Vukadinović-Tenter, J. Balzarini; Second generation of *cycloSal*-d4TMP Bearing Esterase-Cleavable Sites: The „Trapping“ Concept *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 197-206.
66. W. Thomson, D. Nicholls, W. J. Irwin, J. S. Al-Mushadani, S. Freeman, A. Karpas, J. Petrik, N. Mahmood, A. J. Hay; Synthesis, bioactivation and anti-HIV activity of the Bis(4-acyloxybenzyl) and Mono(4-acyloxybenzyl) esters of 5'-monophosphate of AZT; *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1* **1993**, *11*, 1239-1245.
67. A. Routledge, I. Walker, S. Freeman, A. Hay, N. Mahmood; Synthesis, bioactivation and anti.HIV activity of 4-acyloxybenzyl bis(nucleoside-5'-yl) phosphates *Nucleosides Nucleotides*, **1995**, *14* (7), 1545-1558.

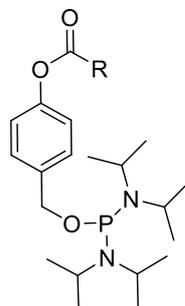
68. S. Freeman, K. C. Ross; Prodrug design for phosphates and phosphonates *Prog. Med. Chem.* **1997**, *34*, 111-147.
69. L. Richter, *Diplomarbeit*, **2010**, Universität Hamburg.
70. L. Weinschenk, T. Gollnest, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, Bis(benzoyloxybenzyl)-DiPPro Nucleoside Diphosphates of Anti-HIV Active Nucleoside Analogues, *ChemMedChem.* **2015**, *10*, 891-900.
71. H. J. Jessen, *Dissertation*, **2008**, Universität Hamburg.
72. J. Shorter, Die Hammett Gleichung – und was daraus in 50 Jahren wurde; *Chem. unserer Zeit* **1985**, *6*, 197-208.
73. T. Sowa, S. Ouchi; The Facile Synthesis of 5'-Nucleotides by the Selective Phosphorylation of a Primary Hydroxyl Group of Nucleosides with Phosphoryl Chloride *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, *48*, 2084-2090.
74. J. C. Horwitz, M. A. Da Rouge, M. Noel, I. L. Klundt; Nucleosides. IX. The formation of 2',3'-unsaturated pyrimidine nucleosides via a novel β -elimination reaction *J. Org.Chem.* **1966**, *31*, 205-211.
75. Amersham Biosciences, Handbook: Gel Filtration: Principles and methods; **2002**, 85.
76. C. A. Streuli; The effect of solvent change on the separation processes of sephadex LH-20 modified dextran *J. Chromatogr.* **1971**, *56*, 225-229.
77. M. Jacobsen, *Dissertation*, **2010**, Universität Hamburg.
78. D. J. Dellinger, D. M. Sheehan, N. K. Christensen, J. G. Lindberg, M. H. Caruthers; Solid-Phase Chemical Synthesis of Phosphonoacetate and Thiophosphonoacetate Oligodeoxynucleotides *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (4), 940-950.
79. S. Wendicke, S. Warnecke, C. Meier; Efficient synthesis of nucleoside diphosphate glycopyranoses *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1500-1502.
80. S. Warnecke, C. Meier; Synthesis of Nucleoside Di- and Triphosphates and Dinucleoside Polyphosphates with cycloSal-Nucleotides *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3024-3030.
81. S. Wolf, T. Zismann, N. Lunau, C. Meier; Reliable Synthesis of Various Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7656-7664.
82. S. Wolf, R. Molina Berrio, C. Meier; Synthesis of Nonnatural Nucleoside Diphosphate Sugars *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6304-6313.
83. V. C. Tonn, C. Meier; Solid-Phase Synthesis of (Poly)phosphorylated Nucleosides and Conjugates *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9832-9842.
84. J. Huchting, A. Ruthenbeck, C. Meier; Synthesis of cycloSal-(Glycopyranosyl-6)-Phosphates as activated Sugar Phosphates *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 6907-6916.
85. J. Huchting, C. Meier; Synthesis of Pyranonucleoside-6'-Triphosphates via the cycloSal-Method *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 3423-3429.
86. C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini; Cyclic saligenyl phosphotriesters of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine (d4T). A new pronucleotide approach; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 99-104.
87. N. M. Yoon, C. S. Pak, H. C. Brown, S. Krishnamurthy, T. P. Stocky; Selective reductions. XIX. Rapid reaction of carboxylic acids with borane-tetrahydrofuran. Remarkably convenient

- procedure for the selective conversion of carboxylic acids to the corresponding alcohols in the presence of other functional groups *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2786-2792.
88. C. Arenz, A. Giannis, Synthesis of the first selective irreversible inhibitor of neutral sphingomyelinase *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *1*, 137-140.
89. H. Staudinger, J. Meyer; Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivativen und Phosphinimine *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
90. F. Pertenbreiter, *Dissertation*, **2013**, Universität Hamburg
91. J. E. Hansen, C. M. Nielsen, C. Nielsen, P. Heegaard, L. R. Mathiesen, et al. Correlation between carbohydrate structures on the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 and HIV-2 and syncytium inhibition with lectins *AIDS* **1989**, *3*, 635-641.
92. E. A. Berger, P. M. Murphy, J. M. Farber, Chemokine receptors as HIV-1 Coreceptors: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 657-700.
93. J. M. Harouse, S. Bhat, S. L. Spitalnik, M. Laughlin, K. Stefano, D. H. Silberberg, F. Gonzalez-Scarano; Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide *Science* **1991**, *253*, 320-323.
94. D. G. Nguyen, J. E. K. Hildreth; Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages *Eur. J. Immunol.* **2003**, *33*, 483-493.
95. J. R. Trujillo, R. Rogers, R. M. Molina, F. Dangond, M. F. McLane, M. Essex, J. D. Brain, Noninfectious entry of HIV-1 into peripheral and brain macrophages mediated by the mannose receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2007**, *104* (12), 5097-5102.
96. D. Roche, J. Greiner, A.-M. Aubertin, P. Vierling; Synthesis and in vitro biological evaluation of mannose-containing prodrugs derived from clinically used HIV-protease inhibitors with improved transepithelial transport *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1568-1581.
97. C. Gouyette, J. M. Neumann, R. Fauve, T. Huynh Dinh; 6- and 1-substituted mannosyl phosphotriesters as lipophilic macrophage-targeted carriers of antiviral nucleosides *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6019-6022.
98. Y. Henin, C. Gouyette, O. Schwartz, J.-C. Debouzy, J. M. Neumann, T. Huynh Dinh; Lipophilic glycosyl phosphotriester derivatives of AZT: synthesis, NMR transmembrane transport study and antiviral activity *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1830-1837.
99. T. Rodriguez-Perez, S. Fernandez, Y. S. Sanghvi, M. Detorio, R. F. Schinazi, V. Gotor, M. Ferrero; Chemoenzymatic syntheses and anti-HIV-1 activity of glucose-nucleoside conjugates as prodrugs *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2239-2249.
100. C. Breton; L. Šnajdrová; C. Jeanneau; J. Koča; A. Imberty; Structures and mechanisms of glycosyltransferases *Glycobiology* **2006**, *16*, 29-37.
101. J. C. Paulson, K. J. Colley; Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 17615-17618.
102. B. Helferich, W. Portz; Über N-Glykoside *Chem. Ber.* **1953**, *86*, 604-612.

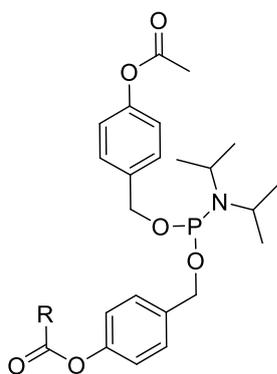
Verbindungsübersicht



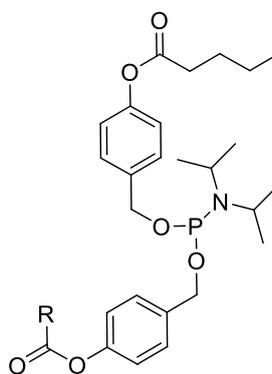
X = CN **26e**
 CF₃ **26f**
 NO₂ **26g**



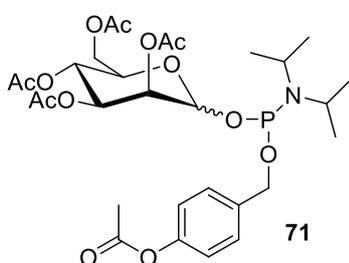
R = CH₃ **49a**
 C₄H₉ **49b**
 OCH₃-Ph **49c**



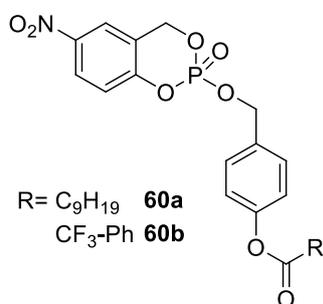
R = C₄H₉ **39a**
 C₇H₁₅ **39b**
 C₉H₁₉ **39c**
 C₁₁H₂₃ **39d**
 CF₃-Ph **39e**
 Cl-Ph **39f**
 CH₃-Ph **39g**
 OCH₃-Ph **39h**



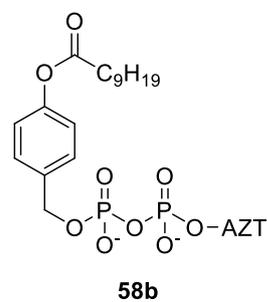
R = C₇H₁₅ **39i**
 C₉H₁₉ **39j**
 C₁₁H₂₃ **39k**
 CF₃-Ph **39l**
 CH₃-Ph **39m**
 OCH₃-Ph **39n**



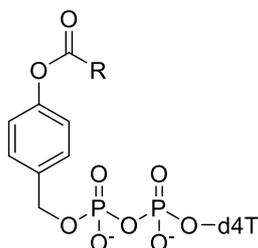
71



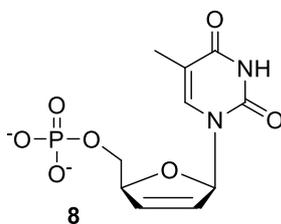
R = C₉H₁₉ **60a**
 CF₃-Ph **60b**



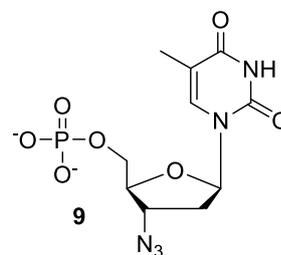
58b



R = C₉H₁₉ **58a**
 CF₃-Ph **59**

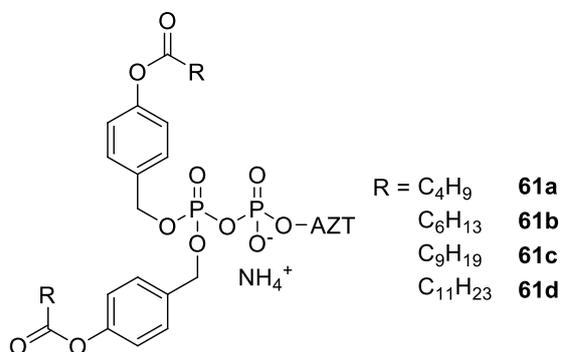
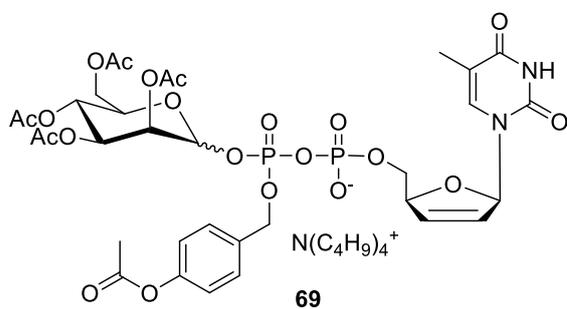
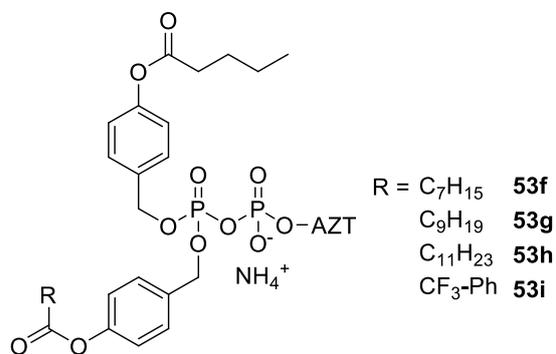
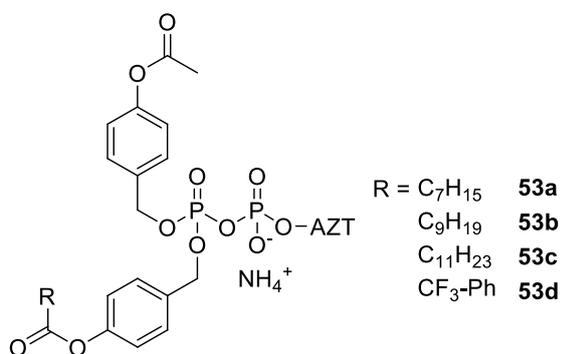
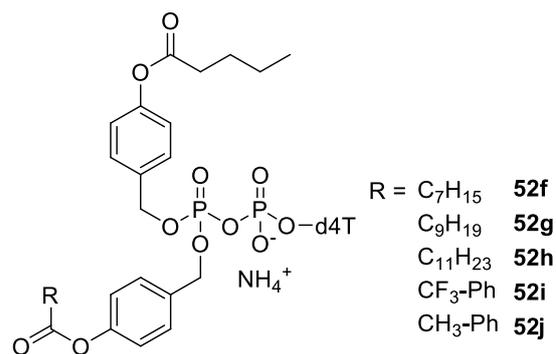
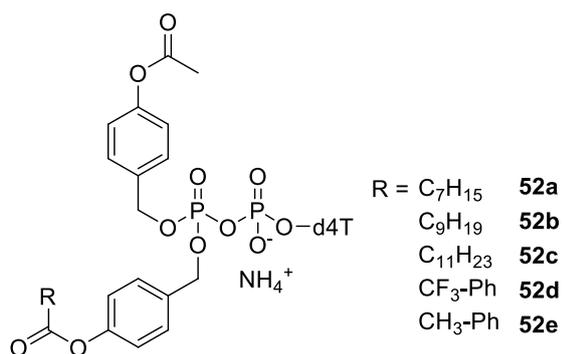
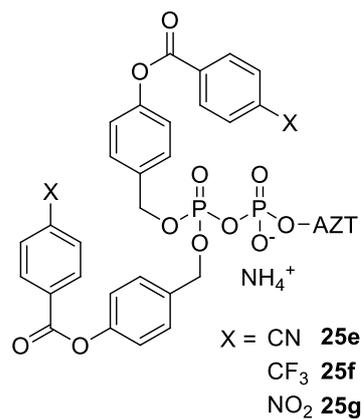
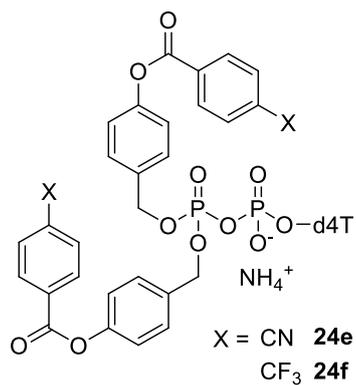


8



9

Verbindungsübersicht



Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

Publikationsliste

Artikel

C. Meier, H. J. Jessen, T. Schulz, L. Weinschenk, F. Pertenbreiter, J. Balzarini, Rational development of nucleoside diphosphate prodrugs: DiPPro-compounds, *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22* (34), 3933-3950.

L. Weinschenk, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, Nucleoside diphosphate prodrugs: non-symmetric DiPPro-nucleotides, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6114-6130.

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.

L. Weinschenk, C. Meier, Chemical Syntheses of nucleoside triphosphates, In *Chemical Synthesis of Nucleoside Analogues*, First ed. P. merino, Ed. John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, **2013**, 209-227.

Posterbeiträge

L. Weinschenk, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, The DiPPro Approach: New Insights in Diphosphate Prodrugs *21st International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2014**, Posen.

L. Weinschenk, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Bis(acyloxybenzyl)-Nucleoside Diphosphate Prodrugs *19th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2010**, Lyon.

Patentanmeldung

deutsche Anmeldenummer: DE 102014112055

internationale Anmeldenummer: PCT/DE2015/200440

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit „DiPPro-Nucleotide mit asymmetrischer Maskierung der Pyrophosphateinheit“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer mit den im Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder erwerben versucht.

Hamburg, im November 2015