

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Oktober 2009 (29.10.2009)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/129798 A2

- (51) **Internationale Patentklassifikation:**
C07F 9/09 (2006.01) A61K 31/00 (2006.01)
- (21) **Internationales Aktenzeichen:** PCT/DE2009/000550
- (22) **Internationales Anmeldedatum:**
24. April 2009 (24.04.2009)
- (25) **Einreichungssprache:** Deutsch
- (26) **Veröffentlichungssprache:** Deutsch
- (30) **Angaben zur Priorität:**
102008020633.4 24. April 2008 (24.04.2008) DE
- (71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US):** UNIVERSITÄT HAMBURG [DE/DE]; Edmund-Siemers-Allee 1, 20146 Hamburg (DE).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder (nur für US):** MEIER, Chris [DE/DE]; Osterladekop 89, 21635 Jork (DE). JESSEN, Henning [DE/CH]; Avenue Druey 14bis, CH-1018 Lausanne (CH).
- (74) **Anwälte:** STÜVEN, Ralf et al.; Pohl & Partner, Kirchenhang 32 b, 21073 Hamburg (DE).
- (81) **Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart):** AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart):** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

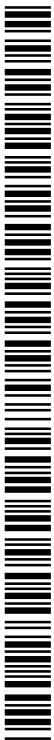
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)

(54) **Title:** DIPHOSPHATE AND TRIPHOSPHATE PRODRUGS, IN PARTICULAR NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE AND TRIPHOSPHATE PRODRUGS

(54) **Bezeichnung:** DI- UND TRIPHOSPHAT-PRODRUGS, INSBESONDERE NUKLEOSIDDI- UND -TRIPHOSPHAT-PRODRUGS

(57) **Abstract:** The invention relates to compounds that can be used as prodrugs, medicaments, pharmaceutical compositions, and pharmaceutical forms of administration produced from said compounds, and a method for producing the compounds according to the invention. The invention proposes bioreversible masked diphosphates and triphosphates, in particular nucleoside diphosphates (NDP) and nucleoside triphosphates (NTP), and corresponding analogues suitable for treating viral diseases such as AIDS, for example.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft als Propharmaka einsetzbare Verbindungen, daraus herstellbare Arzneimittel und pharmazeutische Zusammensetzungen sowie pharmazeutische Darreichungsformen und ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen. Die Erfindung stellt bioreversible maskierte Di- und Triphosphate, insbesondere Nukleosiddiphosphate (NDP) und Nukleosidtriphosphate (NTP) sowie entsprechende Analoga bereit, die beispielsweise zur Behandlung von Viruserkrankungen wie AIDS geeignet sind.



WO 2009/129798 A2

- 1 -

Di- und Triphosphat-Prodrugs, insbesondere Nukleosiddi- und -triphosphat-Prodrugs

Die Erfindung betrifft als Propharmaka einsetzbare Verbindungen, daraus herstellbare Arzneimittel und pharmazeutische Zusammensetzungen sowie pharmazeutische Darreichungsformen und ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen.

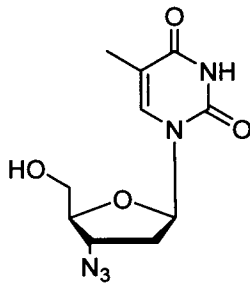
In der Behandlung von viralen Infektionskrankheiten und Krebsleiden ist es vielversprechend, Nukleosidanaloga einzusetzen, welche in die DNA eingebaut werden können.

Zu den besonders bedrohlichen Infektionskrankheiten zählt die Immunschwächekrankheit AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome). Verantwortlich für AIDS ist das HI-Virus, welches zur Gruppe der Retroviren gehört. Inzwischen sind Therapieformen bekannt, welche die Proliferation des Virus unterdrücken. Tatsächlich ist aber kein einziges Medikament bekannt, welches das Virus vollständig aus dem Körper beseitigen könnte. Auch führt die Medikation bei einigen Patienten zu unangenehmen Nebenwirkungen [D. D. Richman, M. A. Fischl, M. H. Grieco, M.S. Gottlieb, P. A. Volberding, O. L. Laskin, J. M. Leedom, J. Groopman, D. Mildvan, M. S. Hirsch, G. G. Jackson, D.T. Durack, D. Phil, S. Nusinoff-Lehrman; The toxicity of AZT in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex; *New Engl. J. Med.* 1987, 317, 192-197.]. Es besteht daher ein Interesse daran, neue Wirkstoffe zu finden und bekannte hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Verträglichkeit zu verbessern. Insbesondere die Optimierung bereits vorhandener Wirkstoffe bringt einige Vorteile mit sich, da diese bereits ausführlich untersucht werden. Gelingt es, ein Medikament durch Optimierung der Eigenschaften niedriger dosieren zu können, sollten auch die Nebenwirkungen nur noch in abgeschwächter Form auftreten.

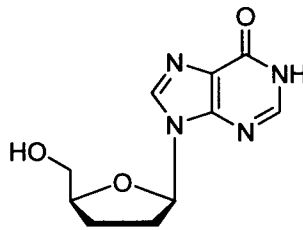
Natürliche Nukleoside wie auch antiviral aktive Nukleosidanaloga müssen zunächst durch bestimmte, mehr oder minder spezifische Enzyme in ihre Triphosphate überführt werden, wenn sie zur Kettenverlängerung in den DNA-Strang eingebaut werden. Der Aufbau des NTP aus dem entsprechenden Nukleosidanalogen erfolgt durch Kinasen über drei Einzelschritte (Nukleosid-> Nukleosidmonophosphat (NMP)->NDP->NTP), von denen jeder wegen der strukturellen Variation des Nukleosidanalogs im Vergleich zum Stamm-Nukleosid gehemmt oder gar nicht ablaufen kann. Das Nukleosidtriphosphat (NTP) stellt somit die aktive Verbindung dar.

Nach dem Einbau wirken die antiviral aktiven Nukleosidanaloga als Kettenterminatoren, d.h. es findet keine weitere Elongation in 3'-Richtung statt [J. Balzarini, P. Herdewijn, E. De Clercq; Differential Patterns of intracellular Metabolism of 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent Anti-human Immunodeficiency Virus Compounds; *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 6127-6133]. Im Folgenden sind einige Beispiele für anti-HIV-aktive Nukleosidanaloga aufgeführt. Ihnen allen ist das Fehlen der 3'-OH Gruppe gemein.

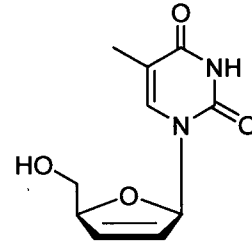
10



3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin (AZT, Zidovudin, Retrovir^(R)) 1

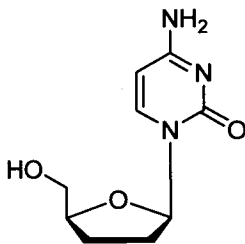


2',3'-Dideoxyinosin (ddI, Didanosin, Videx^(R)) 2

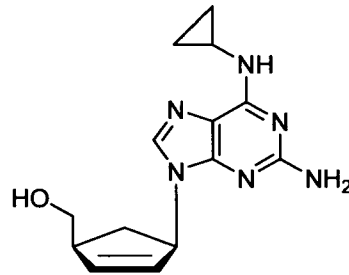


2',3'-Dideoxy-2',3'-dideoxythymidin (d4T, Stavudin, Cert^(R)) 3

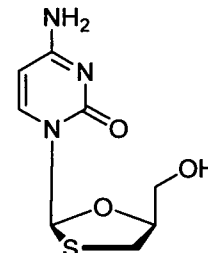
15



2',3'-Didesoxycytidin (ddC, Zalcitabin, Hivid^(R)) 4



ABC, Abacavir, Ziagen^(R) 5



2'-Desoxy-3'-thiacytidin (3TC, Lamuvidin, Epivir^(R)) 6

20

25

Das Passieren der Blut-Hirn-Schranke (BBB; blood brain barrier) stellt bei Erkrankungen, die auch das Gehirn betreffen, eine besondere Herausforderung dar. Es ist daher wichtig, Wirkstoffe so zu gestalten oder dahingehend zu modifizieren, dass sie in der Lage sind, die BBB zu passieren. Einige Untersuchungen zeigten, dass die Diffusion über die BBB mit steigender Lipophilie der Medikamente zunimmt [R. J. Sawchuk, Z. Yang; Investigation of distribution, transport and uptake of anti-HIV drugs to the central nervous system; *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999, 39, 5-31].

35

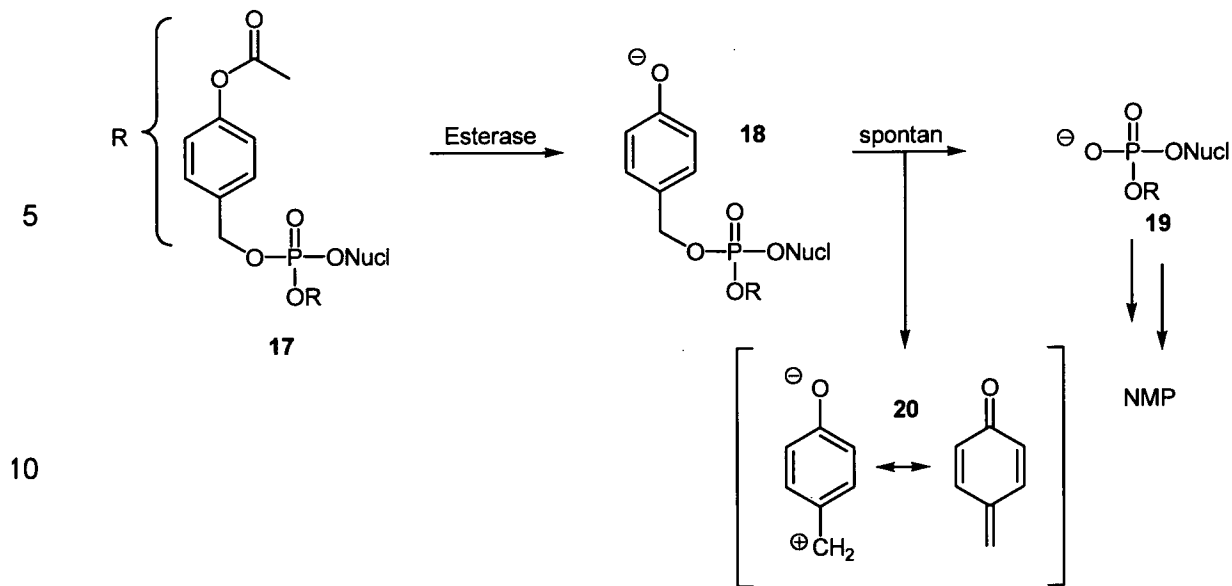
Eine Möglichkeit, die Lipophilie bekannter Medikamente zu erhöhen, liegt in der Verwendung von Propharmaka-Systemen. Propharmaka oder „Prodrugs“ sind Wirkstoffvorläufer, welche

den eigentlichen Wirkstoff erst später unter Abspaltung von Maskierungsgruppen freisetzen. Voraussetzungen für ein solches Prodrug, in diesem Fall ein Pronukleotid, sind eine erhöhte Lipophilie, um die Zellmembranen und die Blut-Hirn-Schranke durchdringen zu können, eine ausreichende Stabilität im extrazellulären Medium und die Freisetzung nicht toxischer

5 Masken.

Für NMP existieren bereits einige Ansätze für enzymatisch-aktivierbare Prodrug-Systeme [A. Pompon, I. Lefebvre, J.-L. Imbach, S. Khan, D. Farquhar; Decomposition Pathways of the Mono-(Pivaloyloxymethyl) and Bis-(Pivaloyloxymethyl) Esters of Azidothymidine-5'-
10 Monophosphate in Cell Extract and in Tissue-Culture Medium - An Application of the Online Isrp-Cleaning HPLC Technique; *Antiviral Chem. Chemother.* 1994, 5, 91-98; I. Lefebvre, C. Perigaud, A. Pompon, A.-M. Aubertin, J.-L. Girardet, A. Kim, G. Gosselin, J.-L. Imbach; MonoNukleoside Phosphotriester Derivates with S-Acyl-2-thioethyl Bioreversible Phosphate-
15 Protecting Groups: Intracellular Delivery of 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine-5'-monophosphate; *J. Med. Chem.* 1995, 38, 3941-3950; W. Thomson, D. Nicholls, W. J. Irwin, J. S. Al-Mushadani, S. Freeman, A. Karpas, J. Petrik, N. Mahmood, A. J. Hay, Synthesis, Bioactivation and Anti-HIV Activity of the Bis(4-acyloxybenzyl) and Mono(4-acyloxybenzyl) Esters of the 5'-Monophosphate of AZT, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1993, 1, 1239-1245]
20 Bis-(4-Acyloxybenzyl)(AB)-Nukleotide wurden von S. Freeman et al. beschrieben [W. Thomson, D. Nicholls, W. J. Irwin, J. S. Al-Mushadani, S. Freeman, A. Karpas, J. Petrik, N. Mahmood, A. J. Hay, Synthesis, Bioactivation and Anti-HIV Activity of the Bis(4-acyloxybenzyl) and Mono(4-acyloxybenzyl) Esters of the 5'-Monophosphate of AZT, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1993, 1, 1239-1245; A. Routledge, I. Walker, S. Freeman, A.
25 Hay, N. Mahmood, Synthesis, Bioactivation and Anti-HIV Activity of 4-Acyloxybenzyl Bis(Nucleosid-5-yl) Phosphates; *Nucl. Nucl.*, 1995, 14(7), 1545-1558]. Um eine hinreichende Substrataffinität von Carboxyesterasen gegenüber dem intermediär auftretenden Phosphatdiester zu erhalten, wird als Spacer ein aromatisches System eingeführt. Die Hydrolysekaskade wird durch Spaltung der Acylgruppe von **17** eingeleitet. Dadurch findet
30 eine Umpolung des zur Benzylgruppe *para*-ständigen Restes vom Elektronenakzeptor zu einem Elektronendonator statt. Diese Umpolung labilisiert die Benzylesterbindung und führt zu einem spontanen Zerfall des Intermediats **18** in den AB-Diester **19** und ein mesomeriestabilisiertes 4-Chinonmethid **20**. Eine Wiederholung der Kaskade setzt das NMP frei. Der Spaltungsmechanismus von Bis-(AB)-Nukleotiden ist im Folgenden dargestellt (Nucl
35 = Nukleosid):

- 4 -



Im Fall von NMP müssen zwei negativ geladene Sauerstoffatome lipophil maskiert werden.

15 Es zeigt sich, dass die Spaltung der Acylreste durch Esterasen für die Abspaltung der zweiten Maske deutlich verlangsamt ist. Dies wird auf die entstehende negative Ladung nach Abspaltung der ersten Maske zurückgeführt.

20 Nachteilig am Einsatz von NMP-Prodrugs ist weiterhin, dass die erforderliche weitere Phosphorylierung zu den Di- und Triphosphaten in der Zelle gehemmt oder vollständig unterbunden sein kann. So ist beispielsweise im Falle des AZT, einem bekannten Anti-HIV-Medikament, die Phosphorylierung zum AZTDP (DP = Diphosphat) gehemmt. Darüber hinaus werden zahlreiche Nebenwirkungen dem entsprechenden Monophosphat AZTMP (MP = Monophosphat) zugeschrieben.

25 Im Gegensatz zu NMP-Prodrugs existiert für die Maskierung von NDP und NTP bislang kein funktionierendes System. Die Anwendung der für NMP-Prodrugs entwickelten Konzepte ist im Stand der Technik als nicht möglich beschrieben [s. Chu und Tan 1999 (Advanced Drug Delivery Reviews)]. Das Problem besteht darin, dass im Fall von NDP und NTP im
 30 Gegensatz zu NMP keine einfache Phosphatgruppe, sondern vielmehr eine energiereiche Phosphorsäureanhydridbindung in Form der Pyrophosphateinheit reversibel maskiert werden muss, ohne dass es zu einem Bruch der Anhydrid-Bindung(en) kommt. Bei der Demaskierung der Pyrophosphateinheit darf keine Reaktion am Phosphoratom stattfinden, da dies zu einem Bruch der Pyrophosphatbrücke führen kann. Dies unterscheidet NDP-und
 35 NTP-Prodrugs essentiell von ihren NMP Verwandten. Hier können auch Hydrolysereaktionen am Phosphoratom stattfinden.

- 5 -

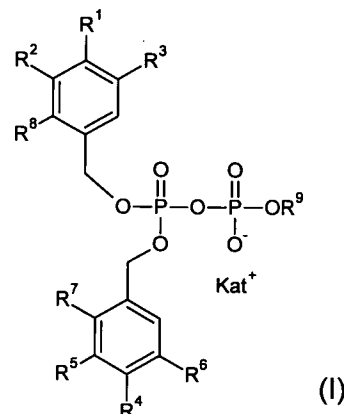
Da bei der Maskierung einer Pyrophosphatbrücke stets eine Ladung mehr auftritt, als bei einem Monophosphat, ist nicht zu erwarten, dass die enzymatische Spaltung an NDP oder NTP-Prodrugs effizient verlaufen könnte. Vielmehr ist bei Betrachtung des Standes der Technik [C. Meier, U. Muus, J. Renze, L. Naesens, E. De Clercq, J. Balzarini; Comparative study of bis(benzyl)phosphate triesters of 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxythymidine (d4T) and *cycloSal*-d4TMP- hydrolysis, mechanistic insights and anti-HIV activity; *Antiviral Chem. Chemother.* 2002, 13, 101-114] zu erwarten, dass die negative Ladung durch eine repulsive Wechselwirkung mit dem Enzym zu einer Verlangsamung der Hydrolyse führt.

10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, verbesserte Di- und/oder Triphosphat-Propharmaka, insbesondere Nucleosid- bzw. Nucleosidanalogen-Propharmaka, bereitzustellen, die die aus dem Stand der Technik bekannten Nachteile nicht aufweisen.

Überraschenderweise gelingt die Lösung dieses Problems durch geeignete Maskierung von Di- und Triphosphatverbindungen, insbesondere von Nucleosiddiphosphaten und Nucleosidtriphosphaten bzw. deren Analoga, wobei die Maskierung nur am endständigen Phosphat durchgeführt wird, während auf die Maskierung des innenständigen Phosphats verzichtet wird. Mit der Erfindung wird erstmals die bioreversible Maskierung von Nucleosiddiphosphaten (NDP) und Nucleosidtriphosphaten (NTP) sowie deren Nucleosidanaloga erreicht.

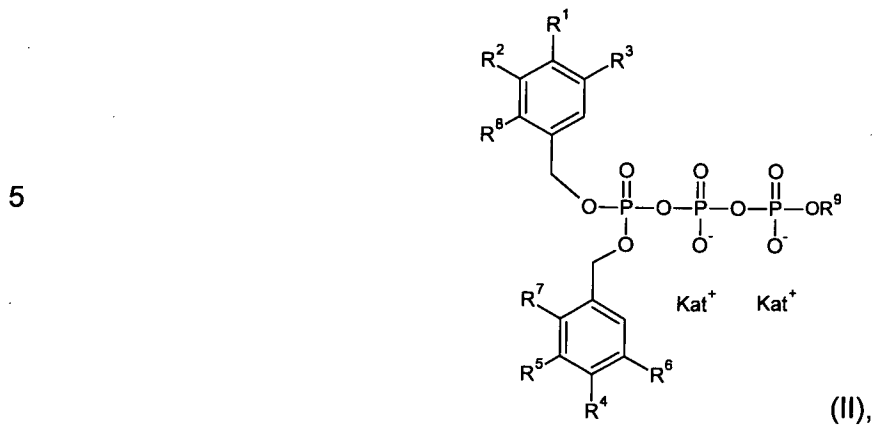
Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung betrifft in einem ersten Aspekt eine Verbindung der allgemeinen Formel (I)



oder der allgemeinen Formel (II)

- 6 -



oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon,

wobei R^1 , R^4 , R^7 und R^8 unabhängig voneinander H, $O-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-R$ oder $HN-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-R$ sind,
 R Alkyl, Aryl oder OAlkyl ist,

R^2 , R^3 , R^5 und R^6 unabhängig voneinander H, Alkyl, Aryl oder OAlkyl sind,

15 R^9 ein Nucleosid, Nucleosidanalogen oder Alkoholrest ist, und
 Kat^+ ein Kation ist,

mit der Maßgabe, dass R^1 , R^4 , R^7 und R^8 nicht alle H sind.

20 Unter einem Nucleosid werden hier organische Moleküle verstanden, die aus einem Zuckerrest und einer organischen Base, insbesondere einer stickstoffhaltigen heterozyklischen Base (Nucleobase) bestehen. Der Zuckerrest ist in der Regel eine Pentose, z.B. Desoxyribose oder Ribose. Bei den Nucleobasen handelt es sich häufig um Purine (R) und Pyrimidine (Y). Beispiele für Purine sind Guanin (G) und Adenin (A), Beispiele für Pyrimidine sind Cytosin (C), Thymin (T) und Uracil (U). Phosphorylierte Nucleoside, 25 beispielsweise Nucleosidmonophosphate (NMP), Nucleosiddiphosphate (NDP) und Nucleosidtriphosphate (NTP), werden auch als Nucleotide bezeichnet. Die Phosphat-, Diphosphat- (Pyrophosphat-) bzw. Triphosphatgruppe ist in der Regel mit dem 5'-C-Atom der Zuckerkomponente des Nucleosids verknüpft.

30 Unter einem Nucleosidanalogen wird hier ein Nucleosid verstanden, das im menschlichen Körper natürlicherweise nicht vorkommt, einem natürlicherweise im menschlichen Körper vorkommenden Nucleosid aber so ähnelt, dass es beispielsweise von der Zelle entsprechend dem natürlichen Nucleosid verarbeitet, beispielsweise phosphoryliert und in einen DNA-Strang eingebaut wird.

35

- 7 -

- Der Begriff "Alkyl" beinhaltet gesättigte aliphatische Gruppen, einschließlich geradkettiger Alkylgruppen (z.B. Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl und Octyl), verzweigt-kettiger Alkylgruppen (z.B. Isopropyl, tert-Butyl, Isobutyl), Cycloalkyl- (z.B. alizyklische) Gruppen (z.B. Cyclopropyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl, Cyclooctyl),
- 5 alky-substituierte Cycloalkylgruppen und cycloalkyl-substituierter Alkylgruppen. "Alkyl" beinhaltet ferner Alkylgruppen, die Sauerstoff-, Stickstoff-, Schwefel- oder Phosphoratom aufweisen, die ein oder mehrere Kohlenstoffatome des Kohlenwasserstoffgerüsts ersetzen. Der Begriff "Alkyl" beinhaltet ebenfalls sowohl unsubstituierte Alkyle als auch substituierte Alkyle, wobei sich das letztere auf Alkylreste bezieht, die Substituenten aufweisen, die ein
- 10 Wasserstoffatom an einem oder mehreren Kohlenstoffatomen des Kohlenwasserstoffgerüsts ersetzen. Solche Substituenten können zum Beispiel beinhalten: Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, Halogen, Hydroxyl, Alkylcarbonyloxy, Arylcarbonyloxy, Alkoxy-carbonyloxy, Aryloxy-carbonyloxy, Carboxylat, Alkylcarbonyl, Arylcarbonyl, Alkoxy-carbonyl, Aminocarbonyl, Alkylaminocarbonyl, Dialkylaminocarbonyl, Alkylthiocarbonyl, Alkoxy, Phosphat,
- 15 Phosphonato, Phosphinato, Cyano, Amino (einschließlich Alkylamino, Dialkylamino, Arylamino, Diarylamino und Alkylarylamino), Acylamino (einschließlich Alkylcarbonylamino, Arylcarbonylamino, Carbamoyl und Ureido), Amidino, Imino, Sulfhydryl, Alkylthio, Arylthio, Thiocarboxylat, Sulfate, Alkylsulfinyl, Sulfonato, Sulfamoyl, Sulfonamido, Nitro, Trifluoromethyl, Cyano, Azido, Heterocyclyl, Alkylaryl oder ein aromatischer oder
- 20 heteroaromatischer Rest. Cycloalkyle können weiter substituiert sein, z.B. mit den oben angegebenen Substituenten. Ein "Alkylaryl"- oder ein "Aalkyl"-Rest ist ein Alkyl, das mit einem Aryl substituiert ist (z.B. Phenylmethyl (Benzyl)). "Alkyl" beinhaltet auch die Seitenketten von natürlichen und unnatürlichen Aminosäuren.
- 25 Unter "Aryl" werden Gruppen mit Aromatizität verstanden, einschließlich 5- und 6-gliedriger aromatischen Einzelringgruppen, die null bis vier Heteroatome beinhalten können, sowie multizyklischen Systemen mit mindestens einem aromatischen Ring. Beispiele für Aryl-Gruppen beinhalten Benzol, Phenyl, Pyrrol, Furan, Thiophen, Thiazol, Isothiazol, Imidazol, Triazol, Tetrazol, Pyrazol, Oxazol, Isooxazol, Pyridin, Pyrazin, Pyridazin und Pyrimidin, und
- 30 dergleichen. Darüber hinaus beinhaltet der Begriff "Aryl" multizyklische Aryl-Gruppen, z.B. trizyklische, bizyklische, z.B. Naphthalen, Benzoxazol, Benzodioxazol, Benzothiazol, Benzoimidazol, Benzothiophen, Methylenedioxyphenyl, Quinolin, Isoquinolin, Napthridin, Indol, Benzofuran, Purin, Benzofuran, Deazapurin oder Indolizin. Unter "Aryl" werden auch Aryl-Gruppen verstanden, die Heteroatome in der Ringstruktur aufweisen ("Heteroaryle").
- 35 Der aromatische Ring kann an ein oder mehreren Ringpositionen substituiert sein. Aryl-Gruppen können auch mit alizyklischen oder heterozyklischen Ringen, die nicht aromatisch

- 8 -

sind, fusioniert oder verbrückt sein, so dass ein multizyklisches System gebildet wird (z.B. Tetralin, Methylenedioxyphenyl).

5 Unter einem "Alkoholrest" wird hier jede organische Kohlenstoffverbindung verstanden, bei der ein Wasserstoffatom am Kohlenstoffgerüst durch eine Hydroxylgruppe ersetzt ist. Beispiele für Alkohole umfassen Zucker wie Glukose, Fruktose, Mannose etc, aber auch andere Verbindungen wie z.B. Geraniol.

10 Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in vorteilhafter Weise als Propharmaka (Prodrugs) eingesetzt werden. Sie ermöglichen erstmals die Einschleusung von Nucleosiden und Nucleosidanaloga sowie anderer organischer Verbindungen mit einer Hydroxylgruppe, z.B. von Zuckern oder Alkoholen, auf dem Niveau von Di- und Triphosphaten in die Zelle. Dadurch wird es beispielsweise erstmals möglich, die von der Zelle verwendeten Nucleosidtriphosphate direkt in die Zelle einzuführen, so dass ansonsten erforderliche
15 weitere intrazelluläre Phosphorylierungsschritte nicht mehr benötigt werden. Dadurch kann nicht nur die tatsächliche Verwendung der eingeschleusten Nucleoside durch die Zelle besser ermöglicht werden, sondern auch Nebenwirkungen, die beispielsweise durch Monophosphate hervorgerufen werden, sind nunmehr vermeidbar. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können sowohl als antivirale als auch als Antitumor-Mittel vorteilhafte
20 Verwendung als Arzneimittel finden. Sie eignen sich besonders als Arzneimittel zur Behandlung von Infektionen durch Viren, insbesondere Retroviren wie den HI-Virus. Die Verbindungen eignen sich aber auch für analytische Zwecke bei biochemischen Untersuchungen, da die phosphorylierten Metaboliten intrazellulär freigesetzt werden. Dadurch werden Untersuchungen ermöglicht, die bislang noch nicht durchgeführt werden
25 konnten. Auch nicht-nucleosidische Alkohole können in Form ihrer Di- oder Triphosphate in die Zelle transportiert und dort freigesetzt werden.

Mit Hilfe der Reste R^2 , R^3 , R^5 , R^6 kann die Lipophilie der erfindungsgemäßen Verbindungen variiert und eingestellt werden. Auf diese Weise ist es möglich, die Verbindungen für
30 verschiedene Einsatzgebiete maßzuschneidern. Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, mit deren Hilfe er die entsprechenden Reste einführen und die Lipophilie bestimmen kann.

In einer erfindungsgemäßen Verbindung sind nicht sämtliche Reste R^1 , R^4 , R^7 und R^8 gleichzeitig Wasserstoffatome. Dies schließt jedoch nicht aus, dass beispielsweise R^1 , R^4
35 und R^7 oder R^1 , R^7 und R^8 oder R^4 , R^7 und R^8 alle H sind.

- 9 -

In einer bevorzugten Ausführungsform sind bei der erfindungsgemäßen Verbindung R¹ und

R⁴ beide $\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$ oder $\text{HN}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$ und R⁷ und R⁸ sind beide H.

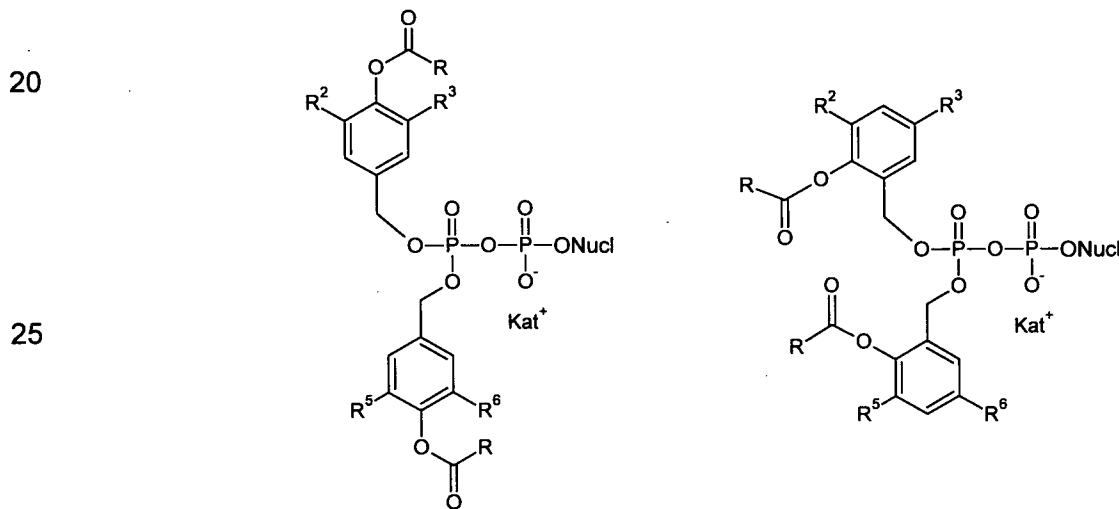
In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform sind bei der erfindungsgemäßen

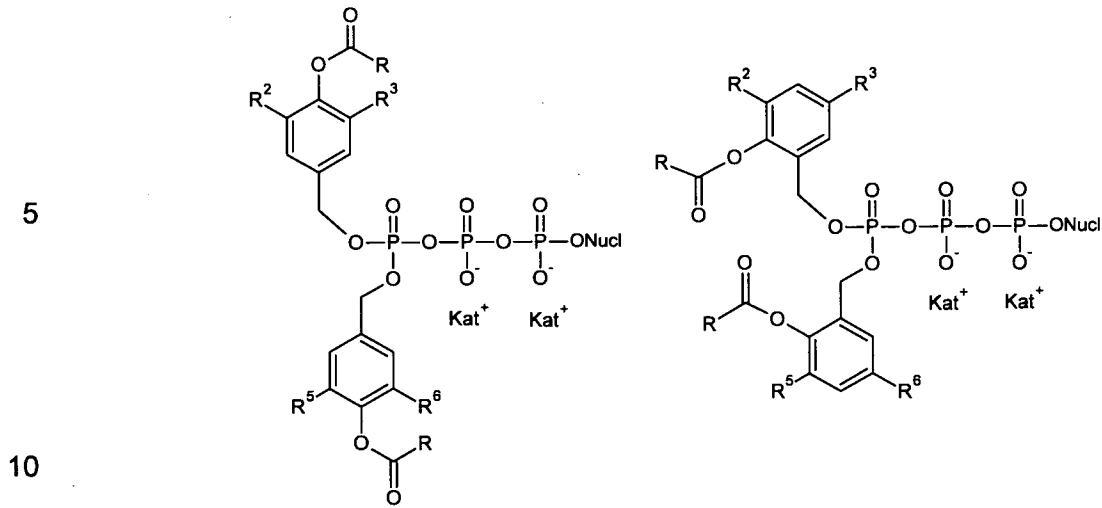
5 Verbindung R⁷ und R⁸ beide $\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$ oder $\text{HN}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$ und R¹ und R⁴ sind H.

Besonders bevorzugt ist R⁹ bei der erfindungsgemäßen Verbindung ein Nukleosid oder Nukleosidanalogen. R⁹ kann aber auch ein beliebiger Alkoholrest sein, wobei der Alkohol

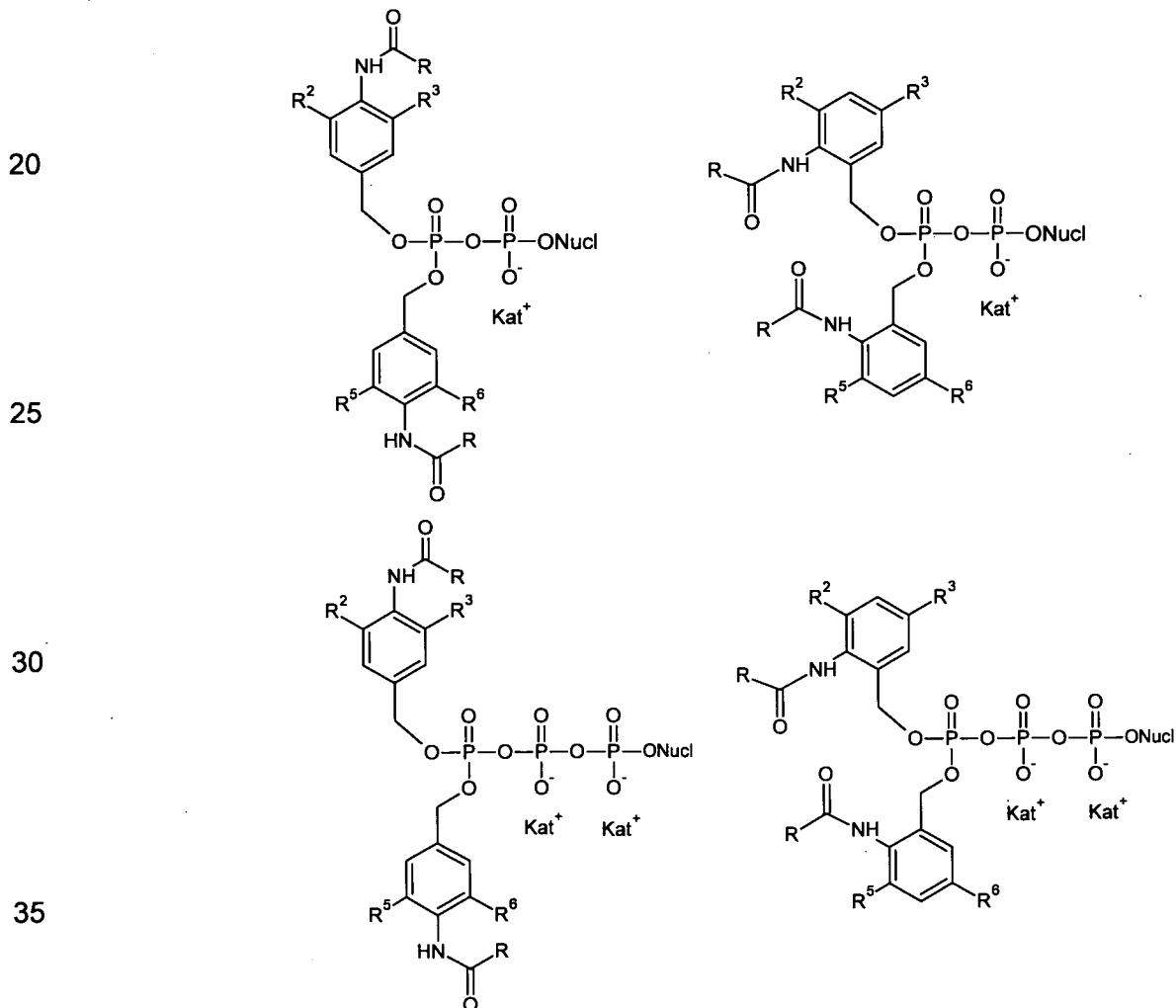
10 besonders bevorzugt ein Alkohol ist, der in der Zelle in Form eines Diphosphats oder Triphosphats verwendet wird. Ein Beispiel für einen solchen Alkohol ist Geraniol, das bei der Biosynthese von Pheromonen in Form seines Diphosphates auftritt.

Beispielhafte erfindungsgemäße Verbindungen sind Bis-(4-Acyloxybenzyl)-Nukleosid-
diphosphat (BAB-NDP) und Bis-(4-Acyloxybenzyl)-Nukleosidtriphosphat (BAB-NTP) sowie
15 die entsprechenden *ortho*-Isomere Bis-(2-Acyloxybenzyl)-Nukleosiddiphosphat (BAB-NDP) und Bis-(2-Acyloxybenzyl)-Nukleosidtriphosphat:





Wenn man bei den oben wiedergegebenen Verbindungen statt eines Acyloxy-Restes der entsprechende Amid-Rest eingesetzt wird, gelangt man zu den erfindungsgemäßen Verbindungen Bis-(4-Acyloxybenzyl)-Nucleosiddiphosphat, Bis-(N-Acyloxybenzyl)-Nucleosiddiphosphat, Bis-(N-Acyloxybenzyl)-Nucleosidtriphosphat und Bis-(N-Acyloxybenzyl)-Nucleosidtriphosphat:

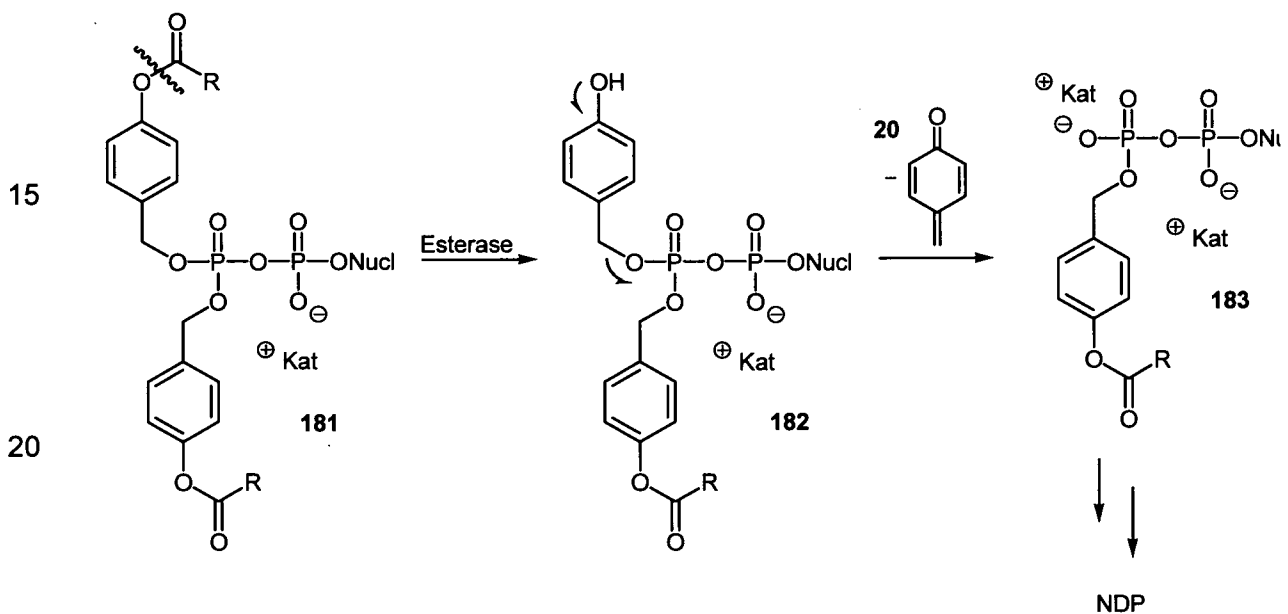


Über den Acylrest R lässt sich die Stabilität in verschiedenen Medien steuern und zugleich die Polarität der Verbindung einstellen, so dass ein effektiver passiver Transport über die Zellmembran erreicht werden kann. Auf eine Maskierung der nicht-endständigen Phosphate wird verzichtet.

5

Die erfindungsgemäßen Prodrugs zeigen eine hohe Stabilität gegenüber chemischer Hydrolyse in wässrigen Puffersystemen sowie eine deutliche Tendenz zur enzymatischen Hydrolyse und damit Freisetzung des Wirkstoffes in humanen Zellextrakten. Damit erfüllen sie wichtige Voraussetzungen für einen Einsatz als Arzneimittel. Der Hydrolysemechanismus des erfindungsgemäßen BAB-NDP-Prodrugs ist im Folgenden dargestellt:

10



20

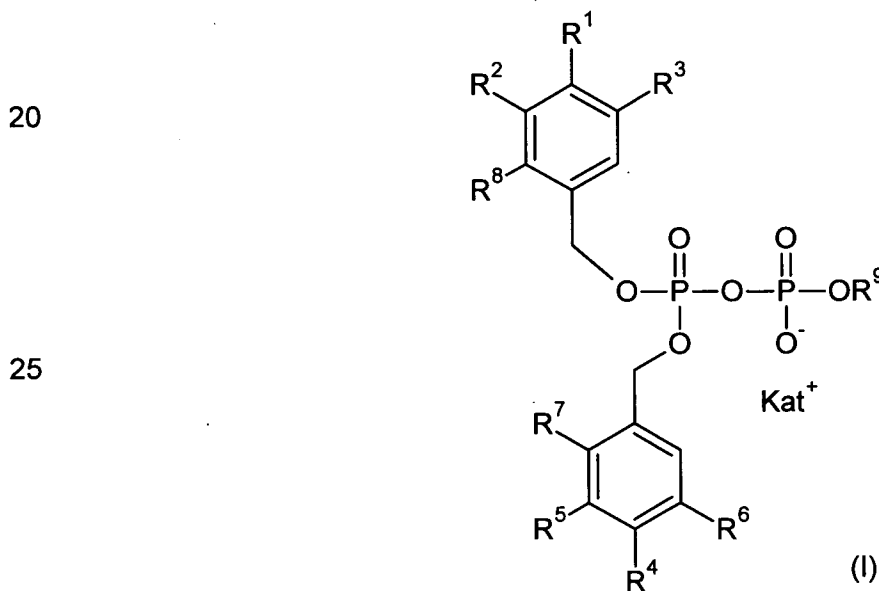
Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine erfindungsgemäße Verbindung und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst. Pharmazeutisch annehmbare Träger sind dem Fachmann bekannt und umfassen einen oder mehrere flüssige, halbfeste oder feste Füllstoffe, Verdünnungsmittel oder andere Substanzen, welche für eine Verabreichung an Säuger, einschließlich den Menschen, geeignet sind. Der Ausdruck "Träger" im Sinne der vorliegenden Erfindung bezeichnet dabei jeglichen organischen oder anorganischen, natürlichen oder synthetischen Stoff, welcher zur Vereinfachung der Applikation mit dem Wirkstoff kombiniert werden kann. Beispiele für derartige Träger umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf, organische oder anorganische Lösungsmittel, Stärke, Laktose, Mannitol, Methylcellulose, Talk, Gelatine, Agar-Agar, Calciumphosphat, Magnesiumstearat, tierische und pflanzliche Fette, höhermolekulare Fettsäuren, oder höhermolekulare Polymere. Der

30

35

- 12 -

- Ausdruck "pharmazeutisch annehmbar" bezeichnet jegliches für Säuger, insbesondere den Menschen, nichttoxische Material, welches die Wirksamkeit der biologischen Aktivität des Wirkstoffes im Wesentlichen nicht beeinträchtigt. Derartige Materialien können pharmazeutisch annehmbare Konzentrationen an Salzen, Puffern, Konservierungstoffen, oder dergleichen umfassen. Nicht-limitierende Beispiele pharmazeutisch annehmbarer Träger schließen Magnesiumcarbonat, Magnesiumstearat, Talk, Zucker, Laktose, Ethanol, Glycerin, Wasser usw ein. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann darüber hinaus auch noch Hilfs- und/oder Verdünnungsmittel umfassen.
- 10 In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung auch eine pharmazeutische Darreichungsform, die eine erfindungsgemäße Verbindung und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst. Besonders bevorzugt handelt es sich dabei um eine Darreichungsform zur oralen Verabreichung, beispielsweise eine Tablette oder Kapsel.
- 15 In noch einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der allgemeinen Formel (I)

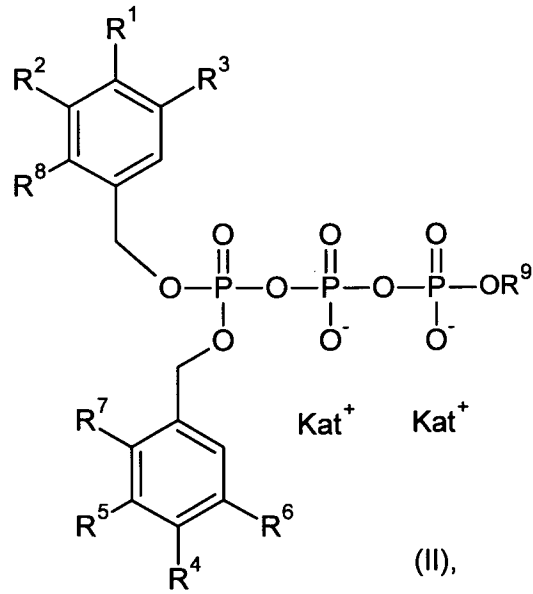


oder der allgemeinen Formel (II)

35

5

10



oder eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes davon,

15

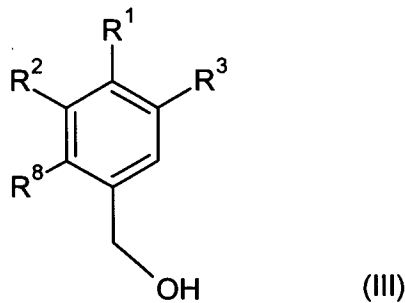
wobei R^1 , R^4 , R^7 und R^8 unabhängig voneinander H, $O=C-R$ oder $HN-C(=O)-R$ sind,
 R Alkyl, Aryl oder OAlkyl ist,
 R^2 , R^3 , R^5 und R^6 unabhängig voneinander H, Alkyl, Aryl oder OAlkyl sind,
 R^9 ein Nukleosid, Nukleosidanalogen oder Alkoholrest ist, und
 Kat^+ ein Kation ist,

20

mit der Maßgabe, dass R^1 , R^4 , R^7 und R^8 nicht alle H sind,
 umfassend die Schritte des

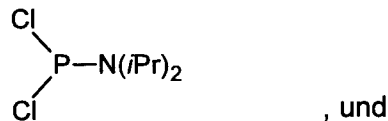
a) Inreaktionbringens eines Phenylesters der allgemeinen Formel (III)

25



30

mit Dichlorophosphoramidit



35

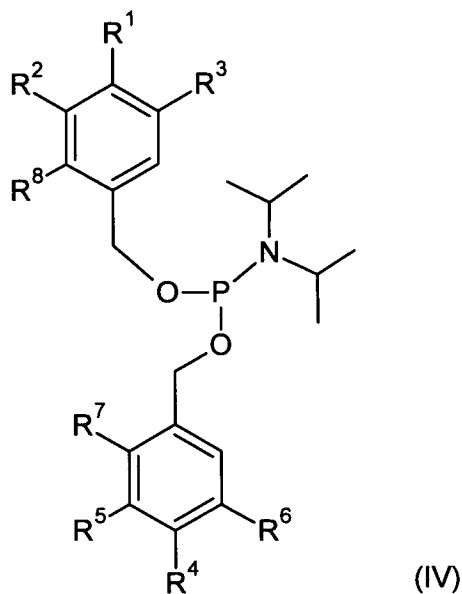
- 14 -

b) Inreaktionbringens des in Schritt a) erhaltenen Phosphoramidits der allgemeinen Formel (IV)

5

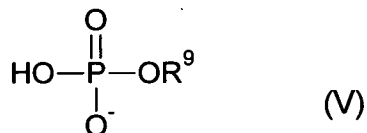
10

15



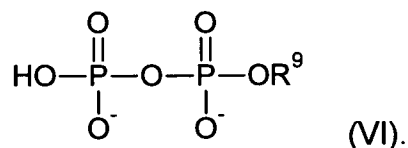
mit einer Verbindung gemäß der allgemeinen Formel (V)

20



oder mit einer Verbindung der allgemeinen Formel (VI)

25



Es resultieren die entsprechenden Diphosphatverbindungen (I) oder Triphosphatverbindungen (II).

30

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden R¹ und

R⁴ so gewählt, dass beide $\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$ oder $\text{HN}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$ sind und R⁷ und R⁸ werden so gewählt, dass beide H sind.

- 15 -

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden

R^7 und R^8 so gewählt, dass beide $O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-R$ oder $HN-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-R$ sind und R^1 und R^4 werden so gewählt, dass beide H sind.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist R^9 ein Nukleosid oder Nukleosidanalogen.

Allein zu Veranschaulichungszwecken wird die Erfindung im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen und den begleitenden Figuren näher erläutert.

10

Fig. 1 Chemische Hydrolyse von BAB-AZTDP **185a** zu AB-AZTDP **186** (oben nach 12 h, unten nach 4 d); Ausschnitte aus den ^{31}P -NMR-Spektren (1H -entkoppelt). AcO = Acyloxy.

Fig. 2 Ausschnitt aus dem ^{31}P -NMR-Spektrum (1H -entkoppelt) der Hydrolyse von **186** nach 8
15 Tagen zu **222**.

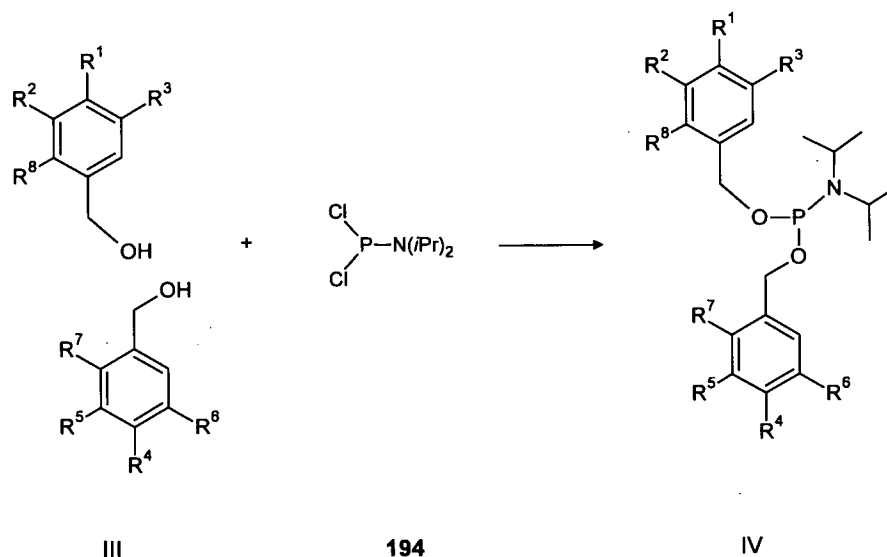
Fig. 3 Vergleich der Hydrolysehalbwertszeiten.

Fig. 4 Stabilität der erfindungsgemäßen Prodrugs in humanem Blutplasma.

20

Ausführungsbeispiele

Allgemein kann die Synthese der erfindungsgemäßen Verbindungen (I) und (II) am Beispiel von Nukleosiddi- und Nukleosidtriphosphaten (R^9 = Nukleosid) nach folgendem Schema
25 erfolgen:

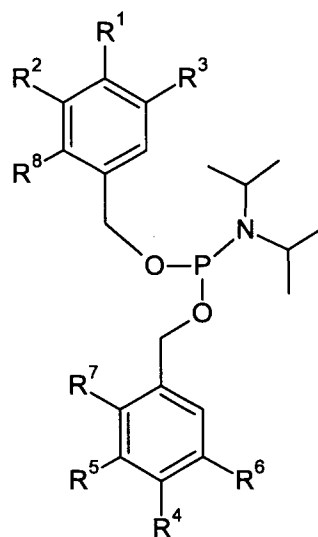


35

- 16 -

5

10



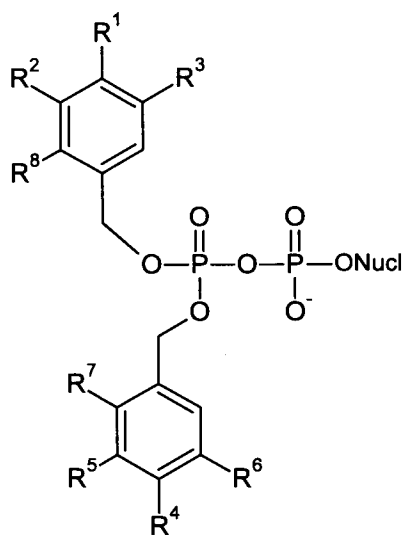
IV

15

+ NuclMP

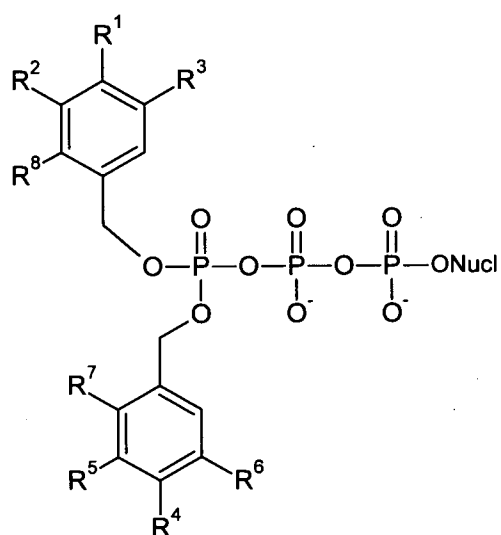
+ NuclDP

20



Ia

25



IIa

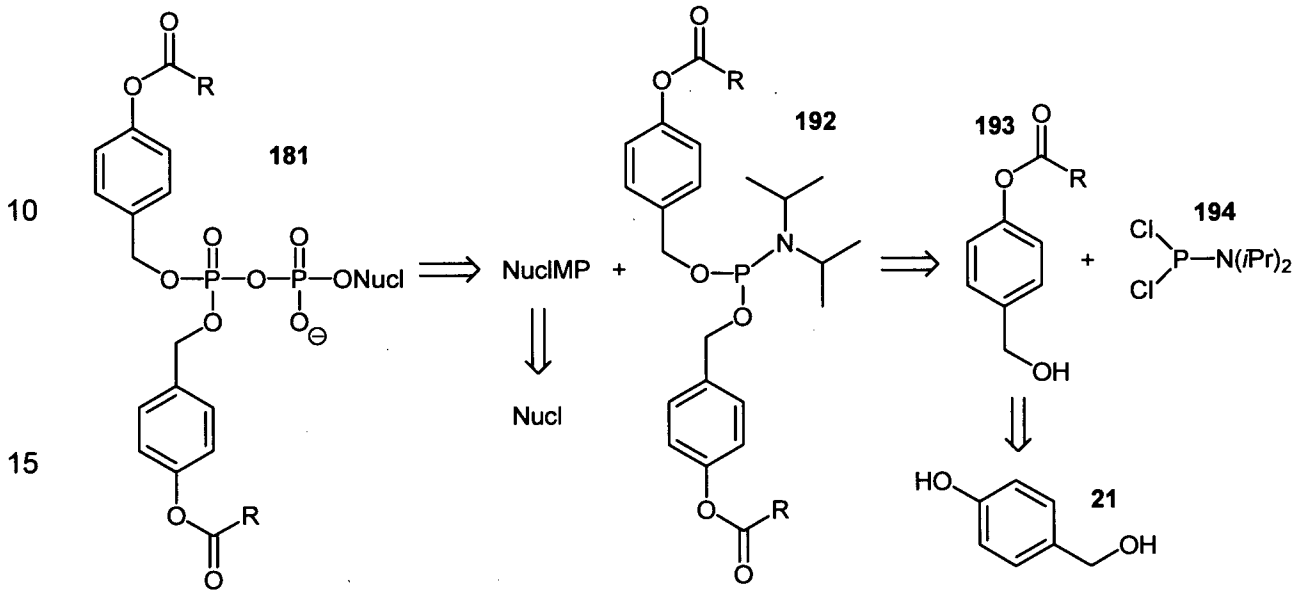
30

35

Phenylester III werden mit Dichlorophosphoramidit 194 zur Reaktion gebracht, vorzugsweise unter Inertgas (z.B. Stickstoff), unter Kühlung (z.B. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$) und in abs. Triethylamin (TEA), gelöst in abs. Tetrahydrofuran (THF). Das resultierende Phosphoramidit IV wird dann mit einem entsprechenden Nucleosidmonophosphat (NuclMP) oder Nucleosiddiphosphat (NuclDP) zu den entsprechenden Nucleosiddi- (Ia) bzw. -triphosphaten (IIa) umgesetzt.

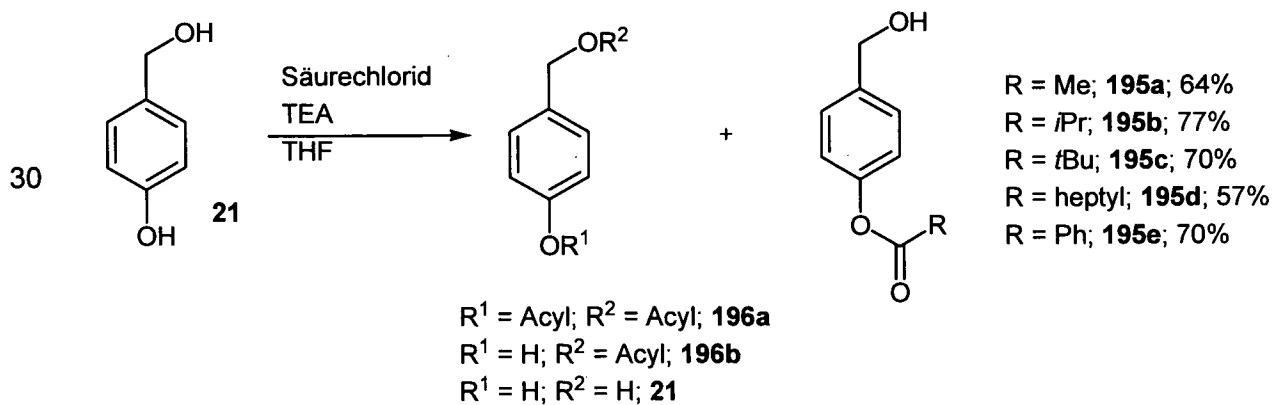
Darstellung von BAB-NDP-Prodrugs

Die grundsätzliche Darstellung von erfindungsgemäßen BAB-NDP-Prodrugs (**181**) ist im folgenden beispielhaft in Form einer retrosynthetischen Analyse von BAB-NDP-Prodrugs **181** veranschaulicht (NuclMP = Nucleosidmonophosphat, Nucl = Nucleosid):



Die entsprechenden NTP-Prodrugs können hergestellt werden, indem statt der Nucleosidmonophosphate (NuclMP) die entsprechenden Nucleosiddiphosphate verwendet werden. Die Synthese aller erfindungsgemäßen Verbindungen I und II kann gemäß dem am Beispiel der BAB-NDP-Prodrugs beschriebenen Verfahren erfolgen.

Die Synthese der Phenylester **193** durch Acylierung ist im Folgenden schematisch dargestellt:



4-Hydroxybenzylalkohol **21** wird mit den entsprechenden Säurechloriden selektiv acyliert. Die Reaktionen werden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es werden 1.0 Äq. *p*-Hydroxybenzylalkohol und 1.0 Äq. abs. Triethylamin (TEA) in abs. Tetrahydrofuran (THF) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung werden über 20 min die jeweiligen

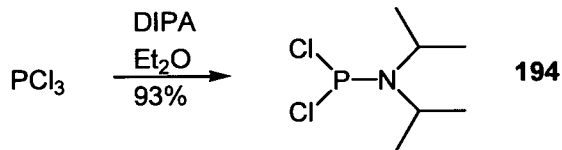
5 Säurechloride (1.1 Äq.), gelöst in abs. THF, getropft. Nach 1-2 h Reaktionsdauer bei 0 °C wird Triethylammoniumchlorid durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel im Vakuum abkondensiert. Der Rückstand wird in Dichlormethan (DCM) aufgenommen, zweimal mit gesättigter Natriumcarbonatlösung und einmal mit H₂O gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Produkte werden

10 entweder durch Kristallisation oder Chromatographie abschließend gereinigt.

Synthese des Dichlorophosphoramidit

Phosphortrichlorid wird mit Diisopropylamin DIPA in Diethylether umgesetzt. Anschließend

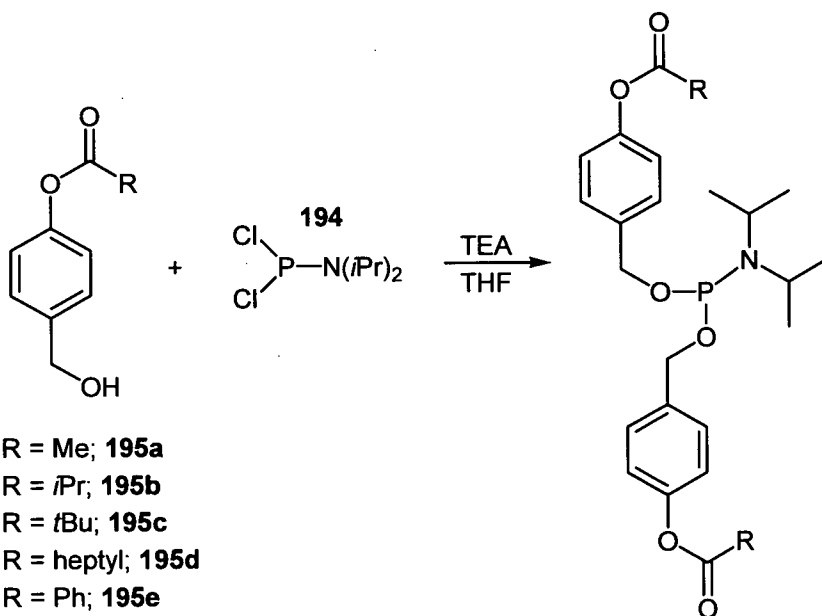
15 folgt Schlenkfiltration. Es resultiert Dichlorophosphoramidit (194).



20

Synthese der Phosphoramidite:

25



R = Me; **197a**; 75%
 R = *i*Pr; **197b**; 54%
 R = *t*Bu; **197c**; 67%
 R = heptyl; **197d**; 52%
 R = Ph; **197e**; 53%

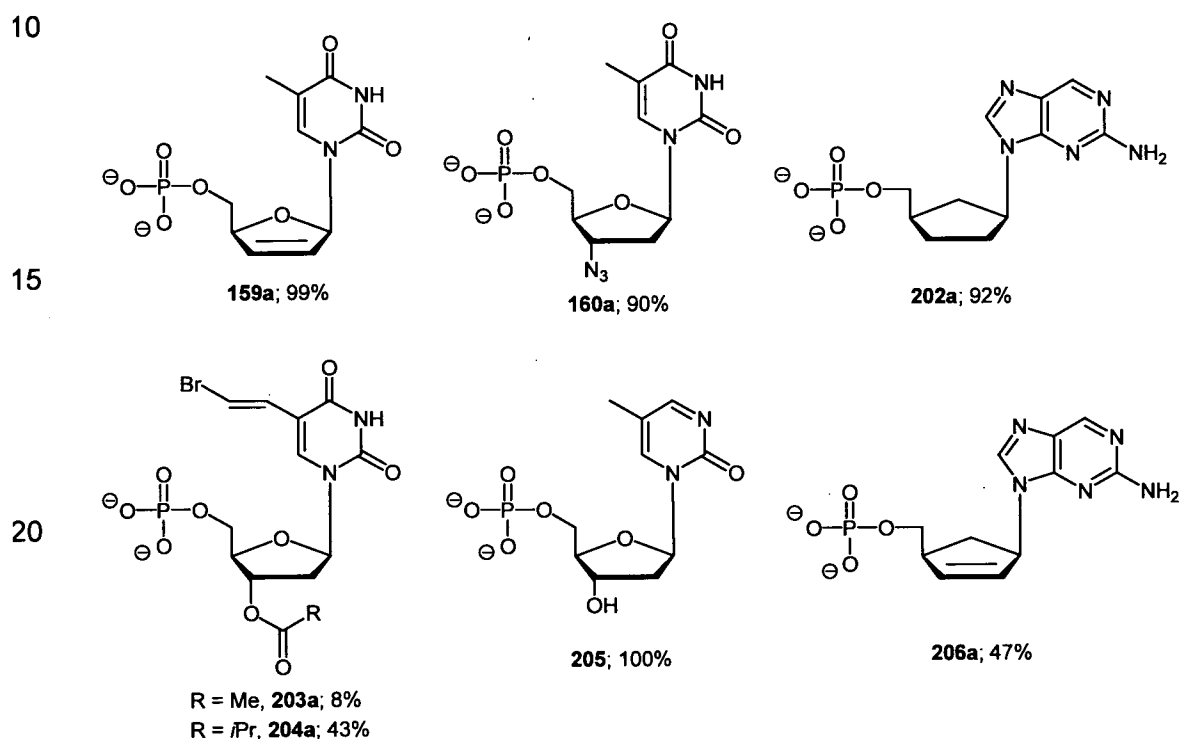
30

R = Me; **195a**
 R = *i*Pr; **195b**
 R = *t*Bu; **195c**
 R = heptyl; **195d**
 R = Ph; **195e**

35

Die Reaktionen werden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zu 1.0 Äq. Dichloro-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit, gelöst in abs. THF und auf -78 °C gekühlt, werden 2.2 Äq. des jeweiligen Esters sowie 2.3 Äq. abs. Triethylamin (TEA), gelöst in THF, über 1 h getropft. Nach beendeter Zugabe wird noch 16-20 h bei RT gerührt. Triethylammoniumchlorid wird unter Inertgas abfiltriert, mit THF gewaschen und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Es ist u.U. nötig, die Filtration zu wiederholen. Die Rohprodukte werden am Chromatotron mit PE und einem Ethylacetat-Gradienten gereinigt.

Synthese von Nucleosidmonophosphaten (NMP):



25

Variante A: Die Reaktion wird unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es werden 2.0 Äq. POCl₃ in Trimethylphosphat gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dazu werden 1.0 Äq. des entsprechenden Nucleosids gegeben und weitere 2h bei 0°C gerührt. Die Reaktionslösung wird dann mit gesättigter Ammoniumhydrogencarbonatlösung auf pH = 8 eingestellt und weitere 10 min gerührt. Die Lösung wird eingefroren und gefriergetrocknet. Abschließend wird über eine RP-18 Phase mit reinem Wasser mehrfach chromatographiert.

35

Variante B: Die Reaktionen werden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es werden 4.4 Äq. POCl₃ in abs. Acetonitril gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dieser Lösung werden 4.4 Äq. abs. Pyridin und 2.2 Äq. destilliertes Wasser vorsichtig hinzugefügt. Nach 5-10 min werden 1.0 Äq. des betreffenden Nucleosides als Feststoff zugegeben. Nach 4 h bei RT (Raum-

- 20 -

temperatur) wird die Reaktion durch Zugabe von Eiswasser beendet und eine weitere Stunde im Kühlschrank gerührt. Durch vorsichtige Zugabe von festem Ammoniumhydrogencarbonat wird ein pH-Wert von 8 eingestellt. Die Lösungsmittel werden durch Gefriertrocknung entfernt. Der Rückstand wird in Wasser gelöst und über eine RP-18 Phase mit Wasser und einem Acetonitril-Gradienten gereinigt.

Ionenaustausch an Nucleosidmonophosphaten (NMP)

Variante A: Die NMP werden über eine protonierte Ionenaustauschersäule Dowex 50WX8 eluiert. Die protonierte Form des NMPs wird mit der jeweiligen Kationenhydroxidlösung bis zum Neutralpunkt titriert oder durch direkte Zugabe von 2.0 Äq. der jeweiligen Lösungen neutralisiert und das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt.

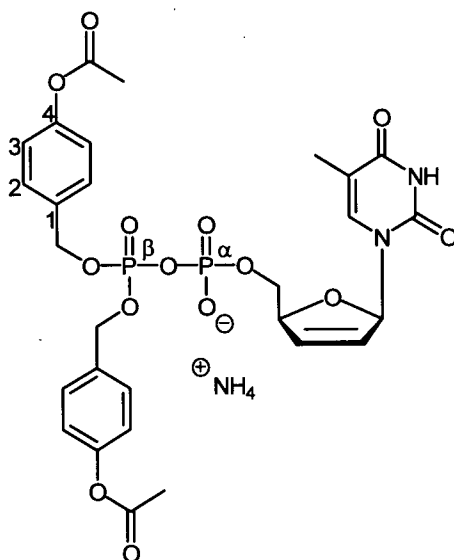
Variante B: Die Diammoniumsalze der NMPs werden in Wasser gelöst. Es werden 2.0 Äq. Tetra-*n*-butylammoniumhydroxidlösung (40% in H₂O, m/m) zugegeben und das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt.

Synthese exemplarischer Bis(4-acyloxybenzyl)-diphosphat-Prodrugs

20 Ammonium- β -bis-(4-acetoxybenzyl)d4TDP; (BAB-d4TDP)

25

30



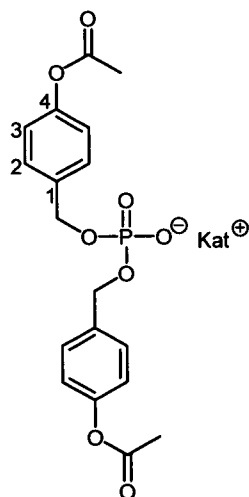
Die Reaktion wird unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es werden 0.16 g Bis-(tetra-*n*-butylammonium) d4TMP (0.20 mmol, 1.0 Äq.) und 94 mg Bis-(4-acetoxybenzyl)*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (0.20 mmol, 1.0 Äq.) in 3 mL abs. Acetonitril gelöst. Zu der Lösung werden 36 mg DCI (0.30 mmol, 1.5 Äq.) gegeben und 0.5 h bei RT gerührt. Die

- 21 -

Lösung wird auf -25 °C gekühlt und mit 51 µL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.28 mmol, 1.4 Äq.) oxidiert. Nach 15 min bei -25 °C wird auf RT erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird über eine RP-18 Säule gereinigt, erst mit Wasser/Methanol 2:1, dann 1:1. Das Produkt wird lyophilisiert. Die Gegenionen werden ausgetauscht (Dowex 50WX8, NH₄⁺). Das Eluat wird lyophilisiert. Das Produkt wird erneut RP-18 chromatographiert, zunächst mit Wasser/Methanol 2:1, dann 1:1. Das Produkt wird erneut gefriergetrocknet. Ausbeute: 14 mg (20 µmol, 10%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes.

10 ¹H-NMR (400 MHz, MeOD)δ/ppm= 7.63 (q, 1H, *J*= 0.5 Hz, H_{het}-6), 7.40-7.34 (m, 4H, H-2), 7.08-7.02 (m, 4H, H-3), 6.94 (ddd, 1H, *J*= 1.5 Hz, *J*= 1.5 Hz, *J*= 3.3 Hz, H-1'), 6.38-6.34 (m, 1H, H-3'), 5.83 (ddd, 1H, *J*=2.0 Hz, *J*= 3.5 Hz, *J*= 6.0 Hz, H-2'), 5.09 (dd, 4H, *J*= 6.2 Hz, *J*= 8.3 Hz, H-Bn), 4.96-4.92 (m, 1H, H-4'), 4.23-4.11 (m, 2H, H-5'), 2.27 (s, 6H, Ac), 1.89 (d, 3H, *J*= 1.0 Hz, Me_{het}); ¹³C-NMR (101 MHz, MeOD)δ/ppm= 171.1 (2xC=O-Ac), 166.6 (C_{het}-4), 152.9 (C_{het}-2), 152.4 (2xC-4), 138.7 (C_{het}-6), 135.3 (C-3'), 134.9 (dd, *J*= 1.4 Hz, *J*= 7.1 Hz, 2xC-1), 130.4 (d, *J*= 2.9 Hz, 4xC-2), 127.6 (C-2'), 123.0 (4xC-3), 112.1 (C_{het}-5), 90.9 (C-1'), 86.9 (d, *J*= 9.2 Hz, C-4'), 70.3 (dd, *J*= 1.7 Hz, *J*= 5.9 Hz, 2xC-Bn), 68.1 (dd, *J*= 6.8 Hz, *J*= 6.8 Hz, C-5'), 21.0 (2xCH₃), 12.5 (Me_{het}); ³¹P-NMR (162 MHz, ¹H-entkoppelt, MeOD)δ/ppm= -12.20 (d, 1P, *J*= 19.6 Hz, P-α), -12.96 (d, 1P, *J*= 19.6 Hz, P-β); IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3435, 2930, 1762, 1701, 1266, 1220, 1190, 1044, 1009, 912; UV (HPLC): λ_{max}= 265 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min]= 9.41; R_f (EE/MeOH 3:2 v/v)= 0.59; MS (HR-ESI): berechn. 679.13 (M⁺); gefunden 679.11; C₂₈H₃₃N₃O₁₄P₂; Mol.-Gew.: 697.52

Es konnte ein Nebenprodukt isoliert werden. Dies entsteht vermutlich schon während der Kupplung bei unvollständiger Trocknung des Nucleosides.



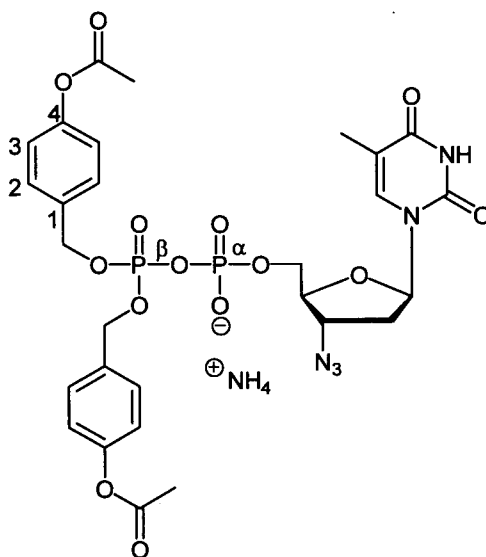
- 22 -

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ /ppm= 7.39-7.34 (m, 4H, H-2), 7.10-7.06 (m, 4H, H-3), 4.82 (d, 4H, J = 7.3 Hz, H-Bn), 2.26 (s, 6H, Ac); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ /ppm= 169.2 (2xC=O), 149.9 (2xC-4), 135.6 (2xC-1), 128.5 (4xC-2), 121.6 (4xC-3), 66.1 (d, J = 5.3 Hz, 2xC-Bn), 20.9 (2xCH₃); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, DMSO-d_6) δ /ppm= -1.42; $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, DMSO-d_6) δ /ppm= -1.20- (-1.60) (m); C₁₈H₁₈O₈P⁻; Mol.-Gew.: 393.31

Ammonium- β -bis-(4-acetoxybenzyl)AZTDP; (BAB-AZTDP)

10

15



20 Die Reaktion wird unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es werden 213 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)AZTMP (0.26 mmol, 1.0 Äq.) in 3 mL abs. Acetonitril gelöst. Nun werden 0.16 g Bis-(4-acetoxybenzyl)*N,N*-diisopropylaminophosphor-amidit (0.35 mmol, 1.4 Äq.) und 44 mg DCI (0.38 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben und 1.5 h bei RT gerührt. Anschließend wird auf -25 °C gekühlt und durch Zugabe von 46 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.25 mmol, 1.0

25 Äq.) oxidiert. Nach 15 min bei -25 °C wird auf RT erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über eine RP-18 Umkehrphase (Wasser/Methanol, zunächst 2:1, dann 1:1, dann reiner Methanol). Die Produktfraktionen werden lyophilisiert. An dem Rohprodukt wird ein Ionenaustausch vollzogen (Dowex 50WX8, NH₄⁺). Das Eluat wird lyophilisiert. Es wird eine abschließende Reinigung an einer

30 RP-18 Umkehrphase vollzogen (Wasser/Methanol 1:2). Das Produkt wird gefriergetrocknet.

Ausbeute: 56 mg (76 μmol , 29%) eines farblosen, hygroskopischen Feststoffes.

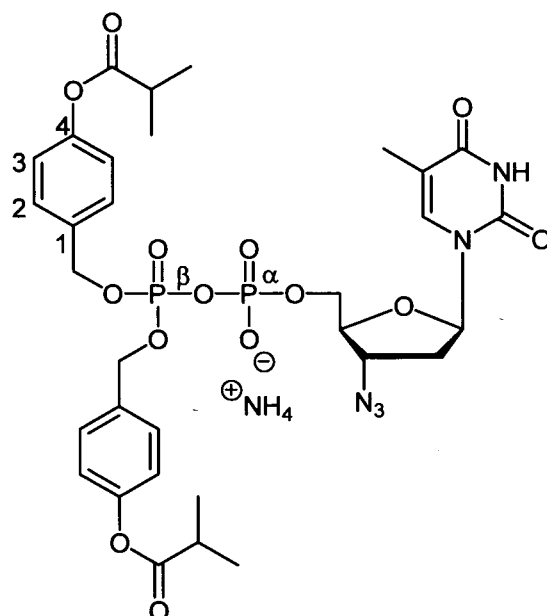
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ /ppm= 7.71 (q, 1H, J = 1.2 Hz, H_{het}-6), 7.45-7.37 (m, 4H, H-2), 7.10-7.05 (m, 4H, H-3), 6.20 (dd, 1H, J = 6.3 Hz, J = 6.0 Hz, H-1'), 5.18-5.08 (m, 4H, H-Bn), 4.40 (ddd, 1H, J = 3.5 Hz, J = 3.5 Hz, J = 7.1 Hz, H-3'), 4.20 (ddd, 1H, J = 3.0 Hz, J = 4.9 Hz, J =

35

- 23 -

11.5 Hz, H-5'), 4.12 (ddd, 1H, $J = 2.7$ Hz, $J = 5.5$ Hz, $J = 11.6$ Hz, H-5'), 4.03 (ddd, 1H, $J = 2.8$ Hz, $J = 2.8$ Hz, $J = 6.0$ Hz, H-4'), 2.40-2.23 (m, 2H, H-2'), 2.27 (s, 6H, CH₃), 1.89 (d, 3H, $J = 1.1$ Hz, Me_{het}); ¹³C-NMR (101 MHz, MeOD) δ /ppm = 171.0 (2xC=O), 166.4 (C_{het}-4), 152.6 (2xC-4), 152.5 (C_{het}-2), 137.8 (C_{het}-6), 134.9 (dd, $J = 1.9$ Hz, $J = 7.5$ Hz, 2xC-1), 130.5 (d, $J = 2.0$ Hz, 4xC-2), 123.0 (4xC-3), 112.2 (C_{het}-5), 85.8 (C-1'), 84.4 (d, $J = 9.0$ Hz, C-4'), 70.4 (d, $J = 5.6$ Hz, 2xC-Bn), 67.3 (d, $J = 6.0$ Hz, C-5'), 62.5 (C-3'), 38.1 (C-2'), 20.1 (2xCH₃), 12.7 (Me_{het}); ³¹P-NMR (162 MHz, ¹H-entkoppelt, MeOD) δ /ppm = -12.17 (d, 1P, $J = 21.1$ Hz, P- α), -12.80 (d, 1P, $J = 20.6$ Hz, P- β); IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3431, 3196, 3071, 1760, 1699, 1509, 1469, 1274, 1220, 1010, 967; UV (HPLC): $\lambda_{\max} = 265$ nm; HPLC, Methode 1: t_R [min] = 10.32; mp = 90-92 °C; R_f (H₂O/MeOH 1:2 v/v, RP-18) = 0.63; MS (HR-ESI): berechn. 722.126 (M⁺); gefunden 722.126; C₂₈H₃₄N₆O₁₄P₂; Mol.-Gew.: 740.55

Ammonium- β -bis-(4-isobutyryloxybenzyl)AZTDP; (BIB-AZTDP)



Die Reaktion wird unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 115 mg Bis-(tetra-
 30 butylammonium)AZTMP (139 μ mol, 1.0 Äq.) werden zunächst 2 h über Molekularsieb 0.3 nm
 in 3 mL abs. Acetonitril getrocknet. Die getrocknete Lösung wird in einen Reaktionskolben
 überführt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Molsieb wird noch zweimal mit
 abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in den Reaktionskolben
 überführt. Das Edukt wird noch dreimal mit wenigen mL abs. Acetonitril coevaporiert, so dass
 35 ein farbloser Schaum entstand. Dieser wird in 1.5 mL abs. Acetonitril aufgenommen. Zu
 dieser Lösung werden 109 mg Bis-(4-isobutyryloxybenzyl)*N,N*-diisopropylamino-

- 24 -

phosphoramidit (211 μmol , 1.5 Äq.) gegeben und die Reaktion durch Zufügen von 26 mg DCI (0.22 mmol, 1.6 Äq.) gestartet. Nach 1.5 h bei RT wird die Reaktionslösung auf $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und durch Zugabe von 38 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.21 mmol, 1.5 Äq.) oxidiert. Nach 15 min bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird auf RT erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es werden zunächst durch RP-18 Chromatographie mit Wasser/Methanol 1:1 restliches Edukt und DCI aus dem Rohprodukt entfernt und dann das Produkt mit reinem Methanol von der RP-18 Phase gewaschen. Teile des Methanols werden am Rotationsverdampfer bei niedriger Temperatur entfernt, dann wird mit dest. Wasser aufgefüllt und gefriergetrocknet. Die auf diese Weise erhaltenen 144 mg Rohprodukt werden über einen Ionentauscher gegeben (Dowex 50WX8, NH_4^+ , dem Wasser werden 10% Acetonitril zugesetzt, um das Rohprodukt zu lösen). Das Eluat wird lyophilisiert. Mit den erhaltenen 102 mg Rohprodukt wird erneut eine RP-18 Chromatographie durchgeführt, diesmal mit Methanol/Wasser 3:1. Das Produkt wird abschließend lyophilisiert.

15 Ausbeute: 53 mg (67 μmol , 48%) eines farblosen Feststoffes.

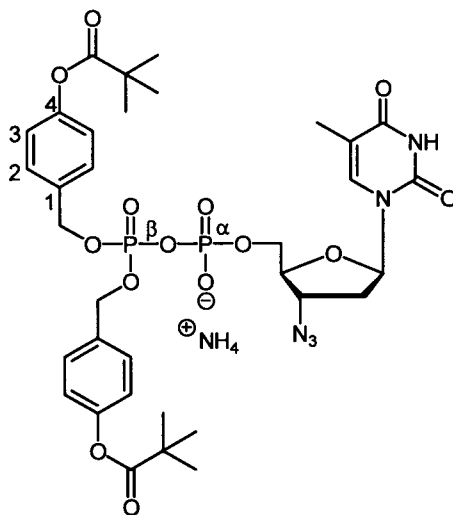
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ/ppm = 7.72 (q, 1H, J = 1.2 Hz, H-6), 7.46-7.34 (m, 4H, H-2), 7.10-7.00 (m, 4H, H-3), 6.21 (dd, 1H, J = 6.2 Hz, J = 6.0 Hz, H-1'), 5.18-5.10 (m, 4H, H-Bn), 4.40 (ddd, 1H, J = 3.2 Hz, J = 3.5 Hz, J = 6.4 Hz, H-3'), 4.26-4.08 (m, 2H, H-5'), 4.04 (ddd, 1H, J = 2.8 Hz, J = 2.8 Hz, J = 5.8 Hz, H-4'), 2.82 (sept., 2H, J = 7.0 Hz, CH-*i*-bu), 2.38-2.20 (m, 2H, H-2') 1.91 (d, 3H, J = 1.1 Hz, Me_{het}), 1.30 (d, 12H, J = 7.0 Hz, CH₃-*i*-bu); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, MeOD) δ/ppm = 177.1 (2xC=O), 165.0 (C_{het}-4), 152.6 (2xC-4), 152.4 (C_{het}-2), 137.8 (C_{het}-6), 134.9 (m, 2xC-1), 130.5 (4xC-2), 122.9 (4xC-3), 112.2 (C_{het}-5), 85.8 (C-1'), 84.4 (d, J = 9.2 Hz, C-4'), 70.4 (d, J = 5.6 Hz, 2xC-Bn), 67.3 (d, J = 5.9 Hz, C-5'), 62.5 (C-3'), 38.1 (C-2'), 35.3 (2xCH-*i*-bu), 19.3 (4xCH₃-*i*-bu), 12.7 (Me_{het}); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, MeOD) δ/ppm = -12.16 (d, 1P, J = 21.1 Hz, P- α), -12.77 (d, 1P, J = 20.9 Hz, P- β); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3431, 3194, 3069, 2976, 2109, 1757, 1700, 1470, 1273, 1112, 1011; UV (HPLC): λ_{max} = 265 nm; HPLC, Methode 2: t_{R} [min] = 17.65; mp = 79 $^{\circ}\text{C}$; R_{f} (EE/MeOH 7:3 v/v) = 0.47; R_{f} (H₂O/MeOH 1:3 v/v, RP-18) = 0.64; MS (HR-ESI): berechn. 778.189 (M⁺); gefunden 778.195; C₃₂H₄₂N₆O₁₄P₂; Mol.-Gew.: 796.66

- 25 -

Ammonium- β -bis-(4-pivaloyloxybenzyl)AZTDP; (BPB-AZTDP)

5

10



Anmerkung: In der Überschrift ist von Ammonium als Gegenion die Rede. Das trifft nur teilweise zu, da das Produkt am Ende mit gemischten Gegenionen in etwa der Zusammensetzung NBu_4/NH_4 1:3 erhalten wird. In dieser Form sind dann auch die NMR-Daten angegeben. Auf einen erneuten Ionenaustausch wird verzichtet, da bei einmaligem Ionenaustausch ca. 7% Zersetzungsprodukt in dem vormals reinen Produkt auftraten.

Variante A: Die Reaktion wird unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 146 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)AZTMP (176 μmol , 1.0 Äq.) werden zunächst 2 h über Molekularsieb 0.3 nm in 3 mL abs. Acetonitril getrocknet. Die getrocknete Lösung wird in einen Reaktionskolben überführt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Molsieb wird noch zweimal mit abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in den Reaktionskolben überführt. Das Edukt wird noch dreimal mit wenigen mL abs. Acetonitril coevaporiert, so dass ein farbloser Schaum entstand. Dieser wird in 2 mL abs. Acetonitril aufgenommen. Zu der Lösung werden 0.15 g Bis-(4-*isobutyryloxybenzyl*)*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (0.28 mmol, 1.6 Äq.) gegeben und die Reaktion durch Zufügen von 36 mg DCI (0.30 mmol, 1.7 Äq.) gestartet. Nach 1.75 h bei RT werden der Reaktionslösung weitere 50 mg Bis-(4-*isobutyryloxybenzyl*)*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (88 μmol , 0.5 Äq.) und 10 mg DCI (88 μmol , 0.5 Äq.) zugefügt und 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung auf -25 °C gekühlt und durch Zugabe von 64 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) oxidiert. Nach 15 min bei -25 °C wird auf RT erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird über eine RP-18 Phase angereichert. Hierzu werden zunächst Edukt und DCI mit Wasser/Methanol 1:1 eluiert, dann wird isokratisch nacheinander zunächst mit Wasser/Methanol 2:1, 3:1 und 5:1 eluiert. Ein Großteil des Produktes wird mit dem letzten

– 26 –

Laufmittelgemisch von der Säule eluiert (F2, 105 mg). Anteilig wird das Produkt jedoch auch schon in den Fraktionen erhalten, die mit Wasser/Methanol 2:1 eluiert worden waren. Interessanterweise waren dies die reineren Fraktionen (F1, 67 mg). F1 und F2 werden getrennt über einen Ionentauscher in das Ammoniumsalz überführt. F1 wird erneut an einer RP-18 Phase getrennt, diesmal mit Methanol/Wasser 2:1, dann 3:1. Es konnten 29 mg des reinen Produktes isoliert werden sowie 20 mg einer Mischfraktion. F2 wird über eine Sephadex G10 Phase eluiert, konnte auf diese Weise aber nicht sauber erhalten werden. Auch eine Trennung über die präparative HPLC (Acetonitril/Wasser 1.5:1, RP-18, 10 mL/min) misslang. Erneute Chromatographie über RP-18 Kieselgel mit Wasser/Methanol 1.00:2.25, dann 1:2.5, dann 1:3 lieferte nicht das reine Produkt.

Die erhaltenen Fraktionen werden stets an der Lyophilie gefriergetrocknet. Das erhaltene reine Produkt wird nochmals an einem Ionentauscher umgesalzen (Dowex 50WX8, NH_4^+) und lyophilisiert. Dabei trat eine anteilige Zersetzung (ca. 7%) des Produktes auf.

Ausbeute: 29 mg (35 μmol , 20%) eines farblosen Feststoffes, sowie erhebliche Mengen Produkt in Mischfraktionen.

Variante B: Die Reaktion wird unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es werden 26 mg Diammonium-AZTMP (68 μmol , 1.0 Äq.) zweimal mit abs. Acetonitril coevaporiert, der Rückstand in 3 mL abs. DMF aufgenommen und einige Kügelchen Molsieb 0.4 nm zugegeben. Zu der Lösung werden 52 mg Bis-(4-isobutyryloxybenzyl)*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (95 μmol , 1.4 Äq.) und 13 mg DCI (0.11 mmol, 1.6 Äq.) gegeben und 1 h bei RT gerührt. Es werden weitere 15 mg Bis-(4-isobutyryloxybenzyl)*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (27 μmol , 0.4 Äq.) und 5 mg DCI (42 μmol , 0.6 Äq.) zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 22 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.12 mmol, 1.8 Äq.) bei -30 °C. Die Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser/Acetonitril aufgenommen und lyophilisiert. Von dem Rohprodukt wird ein ^{31}P -NMR-Spektrum aufgenommen. Obwohl das Produkt entstanden war, zeigte sich, dass *Variante A* deutlich bessere Ausbeuten bei weniger Nebenprodukten lieferte. Auf eine Trennung des Rohgemisches wird daher verzichtet.

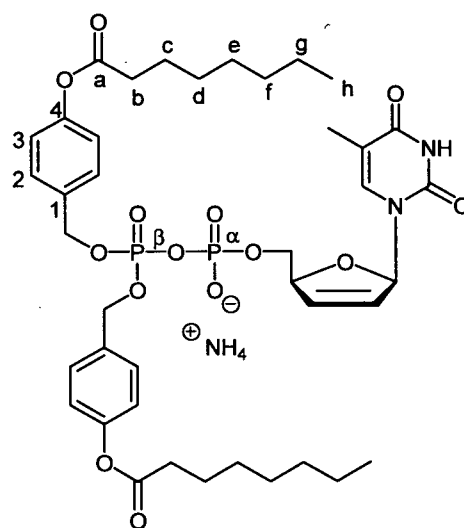
^1H -NMR (400 MHz, MeOD) δ /ppm = 7.72 (q, 1H, J = 1.2 Hz, H-6), 7.45-7.36 (m, 4H, H-2), 7.06-7.00 (m, 4H, H-3), 6.21 (dd, 1H, J = 6.8 Hz, J = 6.8 Hz, H-1'), 5.20-5.08 (m, 4H, H-Bn), 4.42-4.36 (m, 1H, H-3'), 4.20 (ddd, 1H, J = 11.5 Hz, J = 3.0 Hz, J = 4.8 Hz, H-5'), 4.12 (ddd, 1H, J = 11.5 Hz, J = 2.7 Hz, J = 5.3 Hz, H-5'), 4.04 (ddd, 1H, J = 2.7 Hz, J = 2.7 Hz, J = 5.6 Hz,

- 27 -

H-4'), 3.26-3.18 (m, 3.2H, NBU₄), 2.39-2.23 (m, 2H, H-2'), 1.91 (d, 3H, *J* = 1.1 Hz, Me_{het}), 1.70-1.60 (m, 3.2H, NBU₄), 1.46-1.36 (m, 3.2H, NBU₄), 1.35 (s, 18H, *t*-Bu), 1.02 (t, 4.9H, *J* = 7.3 Hz, NBU₄); ¹³C-NMR (101 MHz, MeOD)δ/ppm = 178.5 (2xC=O), 166.4 (C_{het}-4), 152.8 (2xC-4), 152.4 (C_{het}-2), 137.8 (C_{het}-6), 135.0-134.8 (m, 2xC-1), 130.5 (d, *J* = 2.1 Hz, 4xC-2), 122.9 (4xC-3), 112.2 (C_{het}-5), 85.8 (C-1'), 84.4 (d, *J* = 9.1 Hz, C-4'), 70.4 (d, *J* = 5.7 Hz, 2xC-Bn), 67.3 (d, *J* = 5.8 Hz, C-5'), 62.5 (C-3'), 59.6-59.5 (m, NBU₄), 40.1 (2xC-*t*Bu), 38.0 (C-2'), 27.5 (6xCH₃-*t*-Bu), 24.8, 20.8, 13.9 (NBU₄), 12.7 (Me_{het}); ³¹P-NMR (162 MHz, ¹H-entkoppelt, MeOD)δ/ppm = -12.18 (d, 1P, *J* = 20.3 Hz, P-α), -12.76 (d, 1P, *J* = 20.2 Hz, P-β); IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3423, 3186, 2975, 2108, 1751, 1701, 1479, 1277, 1119, 1012, 968; UV (HPLC): λ_{max} = 265 nm; HPLC, Methode 2: t_R [min] = 18.08; mp = 98-101 °C; R_f (EE/MeOH 7:3 v/v) = 0.70; MS (HR-ESI): berechn. 806.221 (M⁺); gefunden 806.222; C₃₄H₄₆N₆O₁₄P₂; Mol.-Gew.: 824.71

15 Ammonium-β-bis-(4-octanoyloxybenzyl)d4TDP; (BOB-d4TDP)

20



25

Die Reaktion wird unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 160 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)d4TMP (203 μmol, 1.0 Äq.) werden zunächst 2 h über Molekularsieb 0.3 nm in 3 mL abs. Acetonitril getrocknet. Die getrocknete Lösung wird in einen Reaktionskolben überführt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Molsieb wird noch zweimal mit abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in den Reaktionskolben überführt. Das Edukt wird noch dreimal mit wenigen mL abs. Acetonitril coevaporiert, so dass ein farbloser Schaum entstand. Dieser wird in 2 mL abs. Acetonitril aufgenommen. Zu der Lösung werden 0.22 g Bis-(4-octanoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (0.35 mmol, 1.7 Äq.) gegeben und die Reaktion durch Zufügen von 43 mg DCI (0.37 mmol, 1.8

- 28 -

Äq.) gestartet. Nach 3 h bei RT wird durch Zugabe von 63 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.35 mmol, 1.7 Äq.) bei -25 °C oxidiert. Nach 15 min wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser/Acetonitril aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird in wenig Methanol gelöst und über eine RP-18 Phase chromatographiert, jeweils isokratisch mit Methanol/Wasser 1:1, 2:1, 5:1 und schließlich 6:1. Bei dem 1:1 Gemisch konnten verbliebenes Edukt und DCI abgetrennt werden. Die Produktfraktionen werden vereint und der Methanol am Rotationsverdampfer bei niedriger Temperatur bis auf einige mL entfernt. Es wird mit Wasser aufgefüllt und die Lösung lyophilisiert. Die erhaltenen 150 mg werden über einen Ionentauscher (Dowex 50WX8, NH_4^+ , 30% Acetonitril in Wasser) gegeben und das Eluat lyophilisiert. Eine weitere RP-18 Chromatographie mit Methanol/Wasser 5:1 lieferte das reine Produkt. Dieses wird erneut gefriergetrocknet. Ausbeute: 114 mg (132 μmol , 65%) eines farblosen Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ /ppm= 11.21 (s, 1H, NH), 7.65 (q, 1H, $J= 1.2$ Hz, $\text{H}_{\text{het-6}}$), 7.44-7.35 (m, 4H, H-2), 7.10-7.03 (m, 4H, H-3), 6.82 (ddd, 1H, $J= 1.7$ Hz, $J= 1.7$ Hz, $J= 3.4$ Hz, H-1'), 6.34 (ddd, 1H, $J= 1.6$ Hz, $J= 1.6$ Hz, $J= 6.0$ Hz, H-3'), 5.86 (ddd, 1H, $J=2.0$ Hz, $J= 3.1$ Hz, $J= 6.0$ Hz, H-2'), 5.02 (dd, 4H, $J= 3.8$ Hz, $J= 6.5$ Hz, H-Bn), 4.88-4.84 (m, 1H, H-4'), 4.10-3.88 (m, 2H, H-5'), 2.56 (t, 4H, $J= 7.4$ Hz, H-b), 1.78 (d, 3H, $J= 1.0$ Hz, Me_{het}), 1.65 (tt, 4H, $J= 7.3$ Hz, $J= 7.3$ Hz, H-c), 1.40-1.20 (m, 16H, H-d, H-e, H-f, H-g), 0.87 (t, 6H, $J= 6.8$ Hz, H-h); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, MeOD) δ /ppm= 173.8 (2xC-a), 166.6 ($\text{C}_{\text{het-4}}$), 152.9 ($\text{C}_{\text{het-2}}$), 152.4 (2xC-4), 138.7 ($\text{C}_{\text{het-6}}$), 135.3 (C-3'), 134.9 (d, $J= 7.0$ Hz, 2xC-1), 130.4 (d, $J=2.7$ Hz, 4xC-2), 127.6 (C-2'), 122.9 (4xC-3), 112.1 ($\text{C}_{\text{het-5}}$), 90.9 (C-1'), 87.0 (d, $J= 9.3$ Hz, C-4'), 70.3 (dd, $J= 1.8$ Hz, $J= 5.6$ Hz, 2xC-Bn), 68.2 (dd, $J= 6.2$ Hz, $J= 6.2$ Hz, C-5'), 35.1 (2xC-b), 32.9, 30.2, 30.1, 23.7 (2xC-d, 2xC-e, 2xC-f, 2xC-g), 26.0 (2xC-c), 14.4 (2xC-h), 12.5 (Me_{het}); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, MeOD) δ /ppm= -12.11 (d, 1P, $J= 20.6$ Hz, P- α), -12.92 (d, 1P, $J= 20.3$ Hz, P- β); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3188, 3071, 2956, 2927, 2856, 1756, 1701, 1467, 1263, 1112, 1010; UV (HPLC): λ_{max} = 264 nm; HPLC, Methode 2: t_{R} [min]= 21.52; mp= 73-75 °C; R_{f} (EE/MeOH 7:3 v/v)= 0.40; R_{f} ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:5 v/v, RP-18)= 0.40; MS (HR-ESI $^-$): berechn. 847.297 (M $^-$); gefunden 847.296; $\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{P}_2$; Mol.-Gew.: 865.84

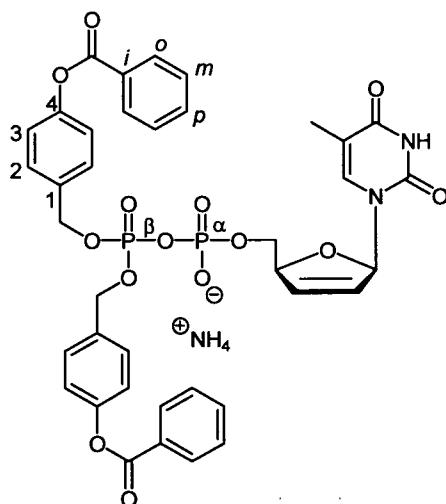
30

35

Ammonium- β -bis-(4-benzoyloxybenzyl)d4TDP; (BBB-d4TDP)

5

10



- 15 Die Reaktion wird unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 178 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)d4TMP (226 μ mol, 1.0 Äq.) werden zunächst 2 h über Molekularsieb 0.3 nm in 3 mL abs. Acetonitril getrocknet. Die getrocknete Lösung wird in einen Reaktionskolben überführt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Molsieb wird noch zweimal mit abs. Acetonitril gewaschen und die Waschlösung ebenfalls in den Reaktionskolben
- 20 überführt. Das Edukt wird noch dreimal mit wenigen mL abs. Acetonitril coevaporiert, so dass ein farbloser Schaum entstand. Dieser wird in 2.0 mL abs. Acetonitril aufgenommen. Zu dieser Lösung werden 216 mg Bis-(4-benzoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylamino-phosphoramidit (369 μ mol, 1.6 Äq.) gegeben und die Reaktion durch Zufügen von 46 mg DCI (0.39 mmol, 1.7 Äq.) gestartet. Nach 1.5 h bei RT wird die Reaktionslösung auf -25 °C
- 25 gekühlt und durch Zugabe von 64 μ L *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.35 mmol, 1.5 Äq.) oxidiert. Nach 15 min bei -25 °C wird auf RT erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird in wenig Methanol gelöst und an einer RP-18 Phase getrennt, zunächst isokratisch mit Wasser/Methanol 1:1, um nicht umgesetztes Edukt und DCI zu entfernen, dann isokratisch mit Wasser/Methanol 5:1. Die Produktfraktionen werden
- 30 lyophilisiert und das Rohprodukt über einen Ionentauscher gegeben (Dowex 50WX8, NH_4^+ , 30% Acetonitril in Wasser). Das Eluat wird erneut lyophilisiert und der Rückstand mit Wasser/Methanol 1:4 erneut an einer RP-18 Phase getrennt. Das Produkt wird abschließend lyophilisiert.
- 35 Ausbeute: 62 mg (75 μ mol, 33%) eines farblosen Feststoffes.

- 30 -

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ/ppm = 8.19-8.13 (m, 4H, H-*ortho*), 7.70-7.64 (m, 3H, H-6, H-*para*), 7.56-7.50 (m, 4H, H-*meta*), 7.50-7.42 (m, 4H, H-2), 7.25-7.19 (m, 4H, H-3), 6.97 (ddd, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 1.8$ Hz, $J = 3.6$ Hz, H-1'), 6.42 (ddd, 1H, $J = 1.7$ Hz, $J = 1.7$ Hz, $J = 6.0$ Hz, H-3'), 5.86 (ddd, 1H, $J = 2.2$ Hz, $J = 3.6$ Hz, $J = 6.0$ Hz, H-2'), 5.16 (dd, 4H, $J = 5.6$ Hz, $J = 8.5$ Hz, H-Bn), 5.01-4.95 (m, 1H, H-4'), 4.28-4.17 (m, 2H, H-5'), 1.92 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz, Me); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, MeOD) δ/ppm = 166.6 (C_{het}-4), 166.5 (2x C=O), 152.9 (C_{het}-2), 152.6 (2xC-4), 138.8 (C_{het}-6), 135.4 (C-3'), 135.2 (d, $J = 7.0$ Hz, 2xC-1), 134.9 (2xC-*para*), 131.1 (4xC-*ortho*), 130.8 (2xC-*ipso*), 130.6 (4xC-2), 130.5 (4xC-*meta*), 127.7 (C-2'), 123.1 (4xC-3), 112.1 (C_{het}-5), 90.9 (C-1'), 87.0 (d, $J = 9.2$ Hz, C-4'), 70.3 (dd, $J = 2.3$ Hz, $J = 5.6$ Hz, 2xC-Bn), 68.2 (d, $J = 6.2$ Hz, C-5'), 12.5 (Me); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, MeOD) δ/ppm = -12.07 (d, 1P, $J = 20.5$ Hz, P- α), -12.86 (d, 1P, $J = 20.5$ Hz, P- β); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3435, 3199, 1734, 1692, 1452, 1268, 1202, 1063, 1025, 704; UV (HPLC): λ_{max} = 263 nm, 231 nm; HPLC, Methode 2: t_{R} [min] = 17.71; mp = 92 °C; R_{f} (EE/MeOH 7:3 v/v) = 0.38; MS (HR-ESI): berechn. 803.141 (M⁻); gefunden 803.139; C₃₈H₃₇N₃O₁₄P₂; Mol.-Gew.: 821.66

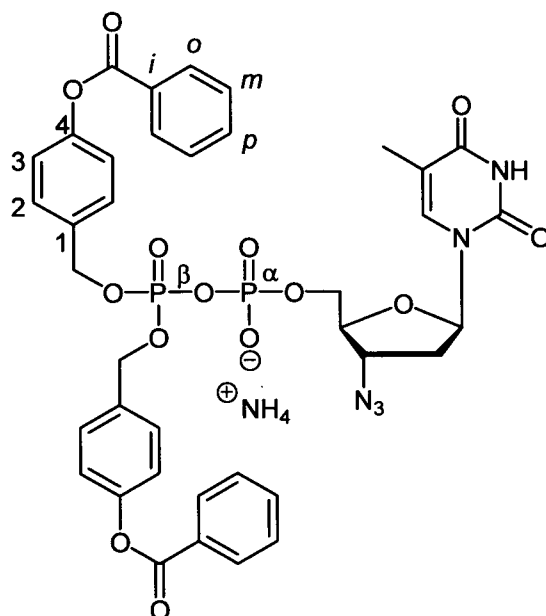
15

Ammonium- β -bis-(4-benzoyloxybenzyl)AZTDP; (BBB-AZTDP)

20

25

30



Die Reaktion wird wie für BBB-d4TDP beschrieben durchgeführt. Es werden folgende Mengen eingesetzt: 96.0 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)AZTMP (116 μmol , 1.0 Äq.), 108 mg Bis-(4-benzoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylaminophosphor-amidit (184 μmol , 1.6 Äq.) und

- 31 -

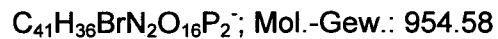
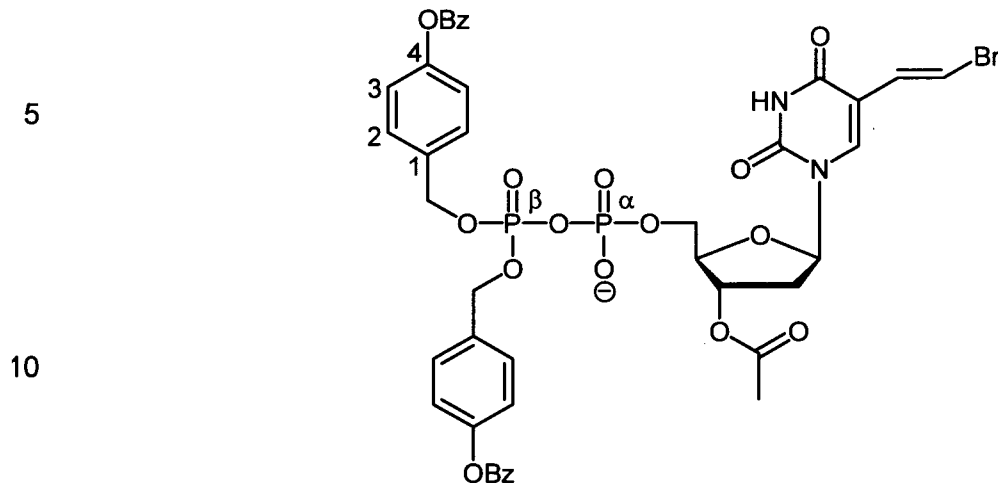
25 mg DCI (0.21 mmol, 1.8 Äq.). Oxidiert wird durch Zugabe von 36 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.20 mmol, 1.7 Äq.).

Die Aufarbeitung wird folgendermaßen durchgeführt: Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in wenig Acetonitril gelöst. Diese Lösung wird an einer RP-18 Phase isokratisch mit Wasser/Methanol 1:1 chromatographiert, bis Edukt und DCI entfernt waren. Nun wird isokratisch mit Wasser/Methanol 3:1 und dann 4:1 eluiert. Bei beiden Mischungen konnte das Produkt nachgewiesen werden. Die sauberen Fraktionen (F1) werden vereint und am Rotationsverdampfer bei niedriger Temperatur vom Methanol befreit, mit Wasser aufgefüllt und gefriergetrocknet. Es werden 58 mg aus den sauberen Fraktionen (F1) als Tetra-*n*-butylammoniumsalz erhalten. Die verunreinigten Fraktionen (F2) werden zweimal über einen Ionentauscher gegeben (Dowex 50WX8, NH_4^+ , 30% Acetonitril in Wasser), lyophilisiert und erneut RP-18 chromatographiert (Acetonitril/Wasser 2:1). Das erhaltene Rohprodukt (F2) wird an der präparativen HPLC chromatographiert (Wasser/Acetonitril 1:1, 10 mL/min, RP-18). Bei einer aufgetragenen Menge von 5 mg konnte das Produkt rein erhalten werden. Bei einer größeren Menge versagte die Trennung jedoch.

Ausbeute: 58 mg (53 μmol , 46%) eines farblosen Feststoffes als Tetra-*n*-butylammoniumsalz; 3 mg (3 μmol , 3%) eines farblosen Feststoffes als Ammoniumsalz. Die NMR-Daten sind für das Ammoniumsalz angegeben.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ/ppm = 8.18-8.13 (m, 4H, H-*ortho*), 7.74 (q, 1H, J = 0.5 Hz, H-6), 7.67 (tt, 2H, J = 7.3 Hz, J = 2.5 Hz, H-*para*), 7.57-7.45 (m, 8H, H-2, H-*meta*), 7.25-7.19 (m, 4H, H-3), 6.23 (dd, 1H, J = 6.8 Hz, J = 6.8 Hz, H-1'), 5.25-5.10 (m, 4H, H-Bn), 4.46-4.40 (m, 1H, H-3'), 4.30-4.11 (m, 2H, H-5'), 4.10-4.02 (m, 1H, H-4'), 2.44-2.26 (m, 2H, H-2'), 1.91 (d, 3H, J = 0.9 Hz, Me_{het}); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, MeOD) δ/ppm = 166.5 ($\text{C}_{\text{het-4}}$), 166.4 (2x $\text{C}=\text{O}$), 152.6 ($\text{C}_{\text{het-2}}$, 2x C-4), 137.8 ($\text{C}_{\text{het-6}}$), 135.1 (d, J = 5.6 Hz, 2x C-1), 134.9 (2x C-para), 131.1 (4x C-ortho), 130.8 (2x C-ipso), 130.6 (d, J = 1.6 Hz, 4x C-2), 129.9 (4x C-meta), 123.1 (4x C-3), 112.2 ($\text{C}_{\text{het-5}}$), 85.9 (C-1'), 84.4 (d, J = 9.1 Hz, C-4'), 70.4 (d, J = 5.4 Hz, 2x C-Bn), 67.3 (d, J = 5.8 Hz, C-5'), 62.5 (C-3'), 38.1 (C-2'), 12.7 (Me_{het}); $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, ^1H -entkoppelt, MeOD) δ/ppm = -12.18 (d, 1P, J = 19.4 Hz, P- α), -12.59 (d, 1P, J = 19.5 Hz, P- β); IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3432, 3191, 3065, 2108, 1736, 1700, 1452, 1268, 1202, 1062, 1011, 707; UV (HPLC): λ_{max} = 261 nm, 231 nm; HPLC, Methode 2: t_{R} [min] = 17.79; mp = 98 °C; R_{f} (EE/MeOH 7:3 v/v) = 0.61; MS (HR-ESI): berechn. 846.158 (M⁺); gefunden 846.157; $\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{P}_2$; Mol.-Gew.: 864.69

- 32 -

Ammonium- β -bis-(4-benzoyloxybenzyl)^{3'}-O-acetyl-BVdUDP

15 Die Reaktion wird unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Die Trocknung des Nukleotides und die Reaktionsdurchführung erfolgten wie in den vorangehenden Versuchen beschrieben. Es werden 50 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)^{3'}-O-acetyl-BVdUMP (53 μmol , 1.0 Äq., *in time* für die Reaktion) mit 48 mg Bis-(4-benzoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylamino-phosphoramidit (85 μmol , 1.6 Äq.) und 12 mg DCI (102 μmol , 1.9 Äq.) umgesetzt. Später werden noch einmal 10 mg Amidit (0.4 Äq.) und 4 mg DCI (0.5 Äq.) zugegeben. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 16 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.90 μmol , 1.7 Äq.) bei -25 °C. Das DC zeigte eindeutig Produktbildung an. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

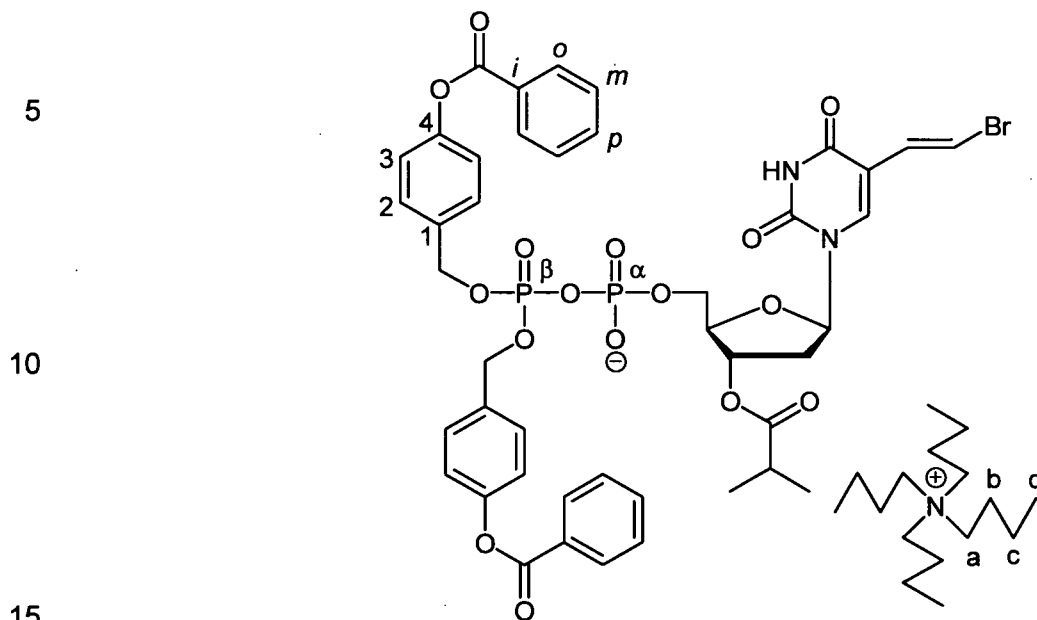
25 Die Reinigung des Rohgemisches wird an einer RP-18 Phase durchgeführt: zunächst isokratisch mit Wasser/Methanol 1:1, dann 1:3. Die Produktfraktionen werden vereint und lyophilisiert. Im ³¹P-NMR-Spektrum konnte das Produkt identifiziert werden. Es war jedoch immer noch verunreinigt. Nach einer weiteren Umkehrphasenchromatographie konnte das Produkt nicht mehr identifiziert werden.

30

35

- 33 -

Tetra-*n*-butylammonium- β -bis-(4-benzoyloxybenzyl)3'-*O*-iso-butyryl-BVdUDP; (*i*bu-BBB-BVdUDP)



Die Reaktion wird unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Die Trocknung des Nucleotides und die Reaktionsdurchführung erfolgten wie in den vorangehenden Versuchen beschrieben. Es werden 134 mg $[\text{NBu}_4]_{1.66}[\text{H}]_{0.34}\text{-BVdUMP}$ (gewichtete Molmasse ca. 926 g/mol, 145 μmol , 1.0 Äq.) in 2 mL abs. Acetonitril mit 136 mg Bis-(4-benzoyloxybenzyl)*N,N*-diisopropylamino-phosphoramidit (232 μmol , 1.6 Äq.) und 30.0 mg DCI (247 μmol , 1.7 Äq.) bei 0° C

20

zusammengegeben und dann auf RT erwärmt. Nach 40 min werden weitere 6.0 mg DCI (51 μmol , 0.4 Äq.) und 26 mg Amidit (44 μmol , 0.3 Äq.) zugegeben und 1 h gerührt. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 50.0 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 276 μmol , 1.9 Äq.)

25

bei -25 °C. Nach 15 min wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in wenig Acetonitril gelöst und an einer RP-18 Phase chromatographiert, zunächst mit Methanol/Wasser 1:1, dann 6:1. Methanol wird am Rotationsverdampfer entfernt, mit Wasser aufgefüllt und lyophilisiert. Das Rohprodukt wird erneut über eine RP-18 Phase mit Methanol/Wasser 5:1 getrennt. Das Produkt wird abschließend lyophilisiert. Eine sehr gute

30

Reinigung wird durch zusätzliche Chromatographie unter Verwendung von 0.25 M Ammoniumformiat-Puffer anstelle von Wasser erzielt.

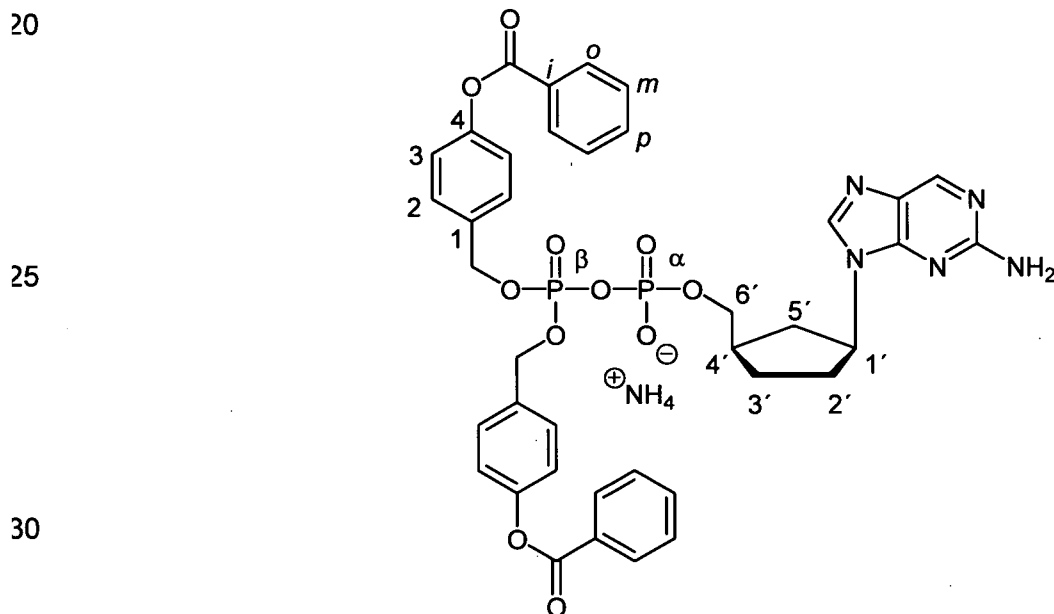
Ausbeute: 128 mg (104 μmol , 72%) eines farblosen Feststoffes.

35 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ /ppm = 8.17-8.12 (m, 4H, H-ortho), 8.02 (s, 1H, H-6), 7.67 (tt, 2H, $J = 7.0$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H-para), 7.56-7.41 (m, 9H, H-2, H-meta, BVU-H-8), 7.25-7.17 (m, 4H,

- 34 -

H-3), 7.05 (d, 1H, $J = 13.5$ Hz, BVU-H-7), 6.33 (dd, 1H, $J = 5.7$ Hz, $J = 9.0$ Hz, H-1'), 5.40-5.36 (m, 1H, H-3'), 5.25-5.15 (m, 4H, H-Bn), 4.32-4.22 (m, 2H, H-5'), 4.22-4.17 (m, 1H, H-4'), 3.25-3.16 (m, 7H, H-a), 2.59 (sept, 1H, $J = 7.0$ Hz, CH-*ibu*), 2.41-2.25 (m, 2H, H-2'), 1.70-1.58 (m, 7H, H-b), 1.40 (tq, 7H, $J = 7.5$ Hz, $J = 7.5$ Hz, H-c), 1.16 (d, 6H, $J = 7.1$ Hz, CH₃-*ibu*), 1.00 (t, 11H, $J = 7.4$ Hz, H-d); ¹³C-NMR (101 MHz, MeOD)δ/ppm= 177.8 (C=O-*ibu*), 166.4 (2xC=O-Bz), 163.6 (C_{het}-4), 152.5 (2xC-4), 151.4 (C_{het}-2), 140.0 (C_{het}-6), 135.1 (dd, $J = 3.2$ Hz, $J = 7.1$ Hz, 2xC-1), 134.9 (2xC-*para*), 131.1 (4xC-*ortho*), 130.8 (BVU-C-7), 130.7 (2xC-*ipso*), 130.6 (d, $J = 2.1$ Hz, 4xC-2), 129.8 (4xC-*meta*), 123.0 (4xC-3), 112.8 (C_{het}-5), 109.4 (BVU-C-8), 86.3 (C-1'), 85.2 (d, $J = 9.0$ Hz, C-4'), 76.8 (C-3'), 70.4 (dd, $J = 2.7$ Hz, $J = 5.7$ Hz, 2xC-Bn), 67.6 (d, $J = 6.1$ Hz, C-5'), 59.6-59.5 (m, 4xC-a), 38.5 (C-2'), 35.0 (CH-*ibu*), 24.8 (C-b), 20.8-20.7 (m, 4xC-c), 19.2 (2xCH₃-*ibu*), 14.0 (C-d); ³¹P-NMR (162 MHz, ¹H-entkoppelt, MeOD)δ/ppm= -12.02 (d, 1P, $J = 20.2$ Hz, P-α), -12.64 (d, 1P, $J = 20.4$ Hz, P-β); IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3434, 3063, 2964, 1876, 1736, 1712, 1682, 1465, 1267, 1200, 968; UV (HPLC): λ_{max} = 284 nm, 234 nm; HPLC, Methode 1: t_R [min] = 15.01; R_f (EE/MeOH 4:1 v/v) = 0.70; R_f (H₂O/MeOH 1:6 v/v, RP-18) = 0.45; MS (HR-ESI⁺): berechn. 981.104 (M⁺); gefunden 981.105; C₅₉H₇₆BrN₃O₁₆P₂; Mol.-Gew.: 1225.10

Ammonium-β-bis-(4-benzoyloxybenzyl)carba-iso-ddADP; (BBB-carba-iso-ddADP)



Die Reaktion wird unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Die Trocknung des Nucleotides und die Reaktionsdurchführung erfolgten wie in den vorangehenden Versuchen beschrieben.

35 Es werden 85.0 mg [NBu₄]_{1.5}[H]_{0.5}-BVdUMP (gewichtete Molmasse ca. 736 g/mol, 115 μmol, 1.0 Äq.) in 2 mL abs. Acetonitril und 2 mL abs. DMF mit 109 mg Bis-(4-benzoyloxy-

– 35 –

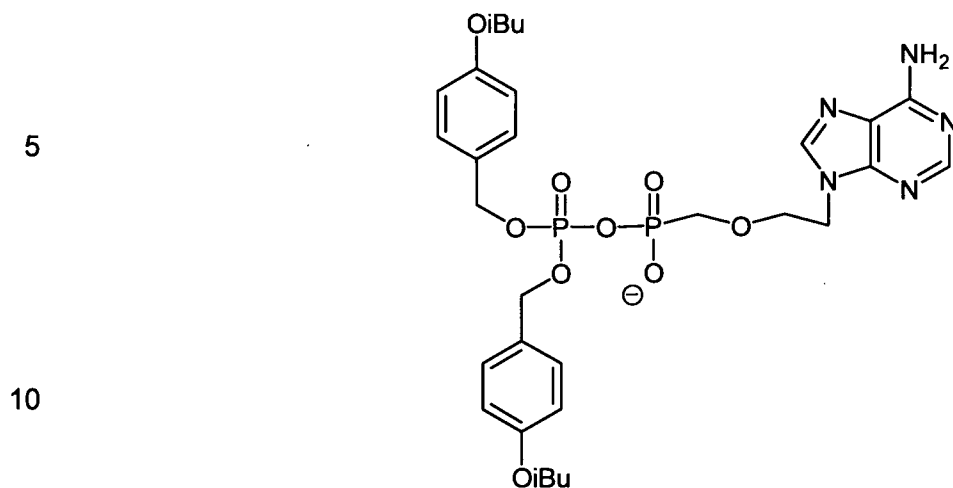
benzyl)*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit (186 μmol , 1.6 Äq.) und 24.0 mg DCI (203 μmol , 1.8 Äq.) bei 0°C zusammengegeben und dann auf RT erwärmt. Nach 40 min werden weitere 6.0 mg DCI (51 μmol , 0.4 Äq.) und 28 mg Amidit (48 μmol , 0.4 Äq.) zugegeben und 1 h gerührt. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 42.0 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 232 μmol , 2.0 Äq.) bei -25 °C. Nach 15 min wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in wenig Acetonitril gelöst und an einer RP-18 Phase chromatographiert, zunächst mit Methanol/Wasser 1:1, dann 4:1. Methanol wird am Rotationsverdampfer entfernt, mit Wasser aufgefüllt und lyophilisiert. Das Rohprodukt wird erneut über eine RP-18 Phase mit Methanol/Wasser 2.5:1.0 getrennt. Das Produkt wird lyophilisiert und an der präparativen HPLC chromatographiert (40 mM Ammoniumformiat in H₂O/Acetonitril 1:1, Flussrate 10 mL/min, RP-18).

Anmerkung: Unter den Bedingungen an der präparativen HPLC wird das Gegenion ausgetauscht. Man erspart sich so einen Ionenaustausch über Dowex. Das Produkt konnte dennoch niemals vollständig rein isoliert werden. Wegen der geringen Mengen, die an der HPLC isoliert werden, ist das ¹³C-NMR für das Tetra-*n*-butylammoniumsalz angegeben. Die anderen Daten gelten für das Ammoniumsalz.

Ausbeute: 36 mg (29 μmol , 25%, NBu₄-Salz) eines farblosen Feststoffes.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ /ppm = 8.48 (s, 1H, H_{het-6}), 8.21 (s, 1H, H_{het-8}), 8.17-8.09 (m, 4H, H-ortho), 7.70-7.63 (m, 2H, H-para), 7.57-7.40 (m, 8H, H-2, H-meta), 7.24-7.15 (m, 4H, H-3), 5.17 (d, 4H, *J* = 8.5 Hz, H-Bn), 4.83-4.73 (m, 1H, H-1'), 4.10-3.95 (m, 2H, H-6'), 2.50-2.27 (m, 2H, H-5', H-4'), 2.25-2.05 (m, 2H, H-2'), 2.04-1.76 (m, 3H, H-3', H-5'); ¹³C-NMR (101 MHz, MeOD) δ /ppm = 166.5 (2xC=O-Bz), 161.6 (C_{het-2}), 152.6 (C_{het-4}), 151.9 (2xC-4), 149.4 (C_{het-6}), 142.3 (C_{het-8}), 135.3 (d, *J* = 7.2 Hz, C-1), 134.9 (2xC-para), 131.1 (4xC-ortho), 130.8 (2xC-*ipso*), 130.6 (4xC-2), 129.8 (4xC-meta), 128.6 (C_{het-5}), 123.0 (4xC-3), 71.0 (d, *J* = 6.5 Hz, C-6'), 70.3 (d, *J* = 5.8 Hz, 2xC-Bn), 59.7-59.5 (m, C-NBu₄), 57.1 (C-1'), 39.7 (d, *J* = 8.3 Hz, C-4'), 35.8 (C-5'), 32.1 (C-2'), 27.6 (C-3'), 24.8 (C-NBu₄), 20.8 (C-NBu₄), 14.0 (C-NBu₄); ³¹P-NMR (162 MHz, ¹H-entkoppelt, MeOD) δ /ppm = -11.18 (d, 1P, *J* = 21.8 Hz, P- α), -13.00 (d, 1P, *J* = 20.9 Hz, P- β); IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3423, 3210, 2955, 1733, 1617, 1510, 1426, 1268, 1202, 1063, 964, 700; UV (HPLC): λ_{max} = 305 nm, 225 nm; HPLC, Methode 4: *t*_R [min] = 12.53; mp = 102 °C; R_f (EE/MeOH 7:3 v/v) = 0.22; MS (HR-ESI⁻): berechn. 812.189 (M⁻); gefunden 812.184; C₃₉H₄₀N₆O₁₁P₂; Mol.-Gew.: 830.72

35

Tetra-*n*-butylammonium- β -bis-(4-isobutyryloxybenzyl)PMEAMP

15

Die Reaktion wird unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Die Trocknung des Nucleosides und die Reaktionsdurchführung erfolgten, wie in den vorangehenden Versuchen beschrieben. Es werden 0.29 g $[\text{NBu}_4]_2\text{PMEA}$ (0.38 mmol, 1.0 Äq.) in 4 mL abs. Acetonitril und 3 mL abs. DMF mit 0.25 g Bis-(4-isobutyryloxybenzyl)*N,N*-diisopropylamino-phosphoramidit (0.49 mmol, 1.3 Äq.) und 63 mg DCl (0.53 mmol, 1.4 Äq.)

20

zusammengegeben und dann auf RT erwärmt. Nach 45 min wird bei -20°C mit 89 μL *t*-BuOOH (5.5 M in *n*-Decan, 0.49 mmol, 1.3 Äq.) oxidiert. Die Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt, der Rückstand in Acetonitril/Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Das ^{31}P -NMR-Spektrum enthielt keine Produktsignale.

25

Charakterisierung von BAB-NDP-Prodrugs

Generell wird für jedes BAB-NDP-Prodrug auf folgende Weise vorgegangen:

30

1. Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ bei verschiedenen pH-Werten (2.0, 6.8, 7.3 und 8.7) in unterschiedlichen Puffersystemen durch HPLC-Analytik.
 2. Bestimmung der Hydrolyseprodukte, die bei der chemischen Hydrolyse entstanden, durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie und durch Auswertung der HPL-Chromatogramme
- 35
- unter Verwendung der synthetisierten Referenzverbindungen.

– 37 –

3. Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeiten $t_{1/2}$ in verschiedenen biologischen Medien (CEM/0, Blutplasma, P3HR1, RPMI-Nährmedium, FCS).
4. Bestimmung der Hydrolyseprodukte, die bei der enzymatischen Hydrolyse entstanden, hauptsächlich durch Auswertung der HPL-Chromatogramme und in
5 einem Fall durch Massenspektrometrie.

Hydrolysestudien

pH-abhängige Hydrolysekinetiken

10 Es werden 50 mM Stammlösungen der Zielverbindungen in DMSO angesetzt. Von diesen Stammlösungen werden je 11 μL mit 189 μL deionisiertem Wasser und weiteren 100 μL DMSO verdünnt, so dass 1.9 mM Hydrolyse-Stammlösungen erhalten werden. Die Hydrolyse wird durch Zugabe von 300 μL Phosphatpufferlösung (PBS, 50 mM, pH=7.3, 37
15 $^{\circ}\text{C}$) gestartet. Auf die Zugabe von internem Standard wird verzichtet. Die Proben werden in einem Thermomixer bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Es werden nun nach verschiedenen Zeiträumen Aliquote der Kinetiklösung entnommen (je 60 μL) und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben werden einzeln aufgetaut und sofort analysiert. Hierzu werden 40 μL
20 in die analytische RP-HPLC injiziert. Zur Auswertung der Kinetiken werden die Chromatogramme bei verschiedenen UV-Wellenlängen ausgewertet. Die Peakflächen werden gegen die Hydrolysedauer graphisch aufgetragen. Zur Auswertung werden mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms exponentielle Ausgleichskurven durch die einzelnen Messpunkte gelegt, so dass die Geschwindigkeitskonstanten k der Hydrolysen ermittelt werden konnten. Die Hydrolysehalbwertszeiten konnten nun mit der Formel

$$25 \quad t_{1/2} = \ln 2 / k$$

ermittelt werden, da es sich durch den großen Wasserüberschuss um Kinetiken pseudo-
erster Ordnung handelte.

30 Diese Versuche werden analog für die Ermittlung der Hydrolysehalbwertszeiten bei anderen pH-Werten durchgeführt.

50 mM Phosphatpuffer (pH= 6.8, pH= 7.3, pH= 7.5, pH= 8.7 nach Sörensen):

35

– 38 –

Es werden 547 mg Dinatriumhydrogenphosphat und 155 mg Kaliumdihydrogenphosphat mit deionisiertem Wasser auf 100 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Der pH-Wert wird kontrolliert und gegebenenfalls mit Phosphorsäure bzw. NaOH eingestellt.

5 50 mM Citrat-HCl-Puffer (pH= 2.0):

Es werden 1.22 g Ammoniumcitrat in 100 mL deionisiertem Wasser gelöst und mit konz. HCl auf pH= 2.0 eingestellt.

10 **Hydrolysekinetiken in Zellextrakten**

Es werden 30 µL der 50 mM DMSO-Stammlösung der Verbindungen mit 220 µL DMSO auf eine Konzentration von 6.0 mM verdünnt. Im Folgenden werden 100 µL Zellextrakt (CEM/0 für d4T, P3HR1 für BVdU und ACV, Mausleberextrakt für verschiedene Verbindungen) mit
15 20 µL 70 mM Magnesiumchloridlösung versetzt und 20 µL der 6.0 mM Stammlösung hinzu pipettiert. Für jeden Messwert wird eine solche Lösung angesetzt und bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Nach den entsprechenden für eine Messung gewählten Zeiträumen werden die Hydrolysen durch Zugabe von 300 µL Methanol abgebrochen und für 5 min bei 0 °C gelagert. Anschließend erfolgte Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm. Der Überstand
20 wird in Spritzen aufgenommen und filtriert (Schleicher & Schuell Spartan 13/30, 0.2 µm) und in flüssigem Stickstoff eingefroren (-196 °C). Die Proben werden an der analytischen RP-HPLC in ihre Bestandteile gespalten (Injektion: 90 µL). Die Auswertung erfolgte ohne Normierung der Peakflächen.

25 **Hydrolysekinetiken in humanem Blutplasma**

Die Hydrolysekinetiken in humanem Blutplasma erfolgten analog den Kinetiken in Zellextrakten. Im Unterschied wird jedoch keine MgCl₂-Lösung zugegeben. Anstelle des Zellextraktes wird verdünntes Blutserum (20% oder 50% in 50 mM PBS pH 6.8, bei den
30 einzelnen Experimenten angegeben) zu den Proben gegeben.

Hydrolysekinetiken in Kulturmedium

Die Hydrolysekinetiken in Kulturmedium erfolgten analog den Kinetiken in Zellextrakten. Im
35 Unterschied wird jedoch keine MgCl₂-Lösung zugegeben. Anstelle des Zellextraktes wird Kulturmedium (RPMI) mit 10% hitzedeaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) zugegeben.

Chemische Hydrolyse am Beispiel des erfindungsgemäßen BAB-NDP-Prodrugs BAB-AZTDP 185a.

5 AZT steht für das Nucleosidanalogen 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin, auch unter dem Namen Retrovir bekannt.

Die NMR-spektroskopische Verfolgung der Hydrolyse (s. Fig. 1) zeigt eindeutig die präferentielle Entstehung von **186** aus **185a**. Wenn überhaupt eine Spaltung der Anhydridbindung zu AZTMP eintritt, dann in einem nur untergeordneten Maß. Die Zuweisung der einzelnen Signale kann für **185a** durch ^{31}P - ^1H -Korrelationsspektroskopie erreicht werden. 10 Dabei tritt ausgehend von **186** ausschließlich AZTDP **222** als Hydrolyseprodukt auf (s. Fig. 2).

Diese Hydrolyse verläuft selektiv. Es wird ausschließlich AZTDP **222** freigesetzt (Fig. 2). Da sie langsamer verläuft, als die erste Hydrolyse, kann auch das Intermediat gut nachgewiesen werden. Mit diesen Ergebnissen lässt sich folgendes feststellen: Die chemische Hydrolyse 15 von BAB-AZTDP **185a** verläuft annähernd ausschließlich über das Intermediat AB-AZTDP **186** unter abschließender quantitativer Freisetzung des Nucleotids AZTDP **222**.

Vergleich zwischen chemischer und enzymatischer Hydrolyse

20 Durch HPLC-Analytik wurden die Hydrolysehalbwertszeiten der Verbindungen bestimmt.

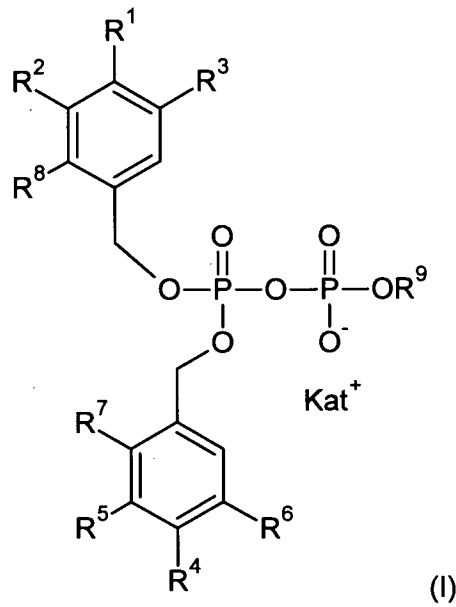
Die Ergebnisse der Hydrolysestudien in Phosphatpuffer bzw. Zellextrakten sind in Fig. 3 zusammengefasst.

25 Aus Fig. 3 wird der große Unterschied zwischen chemischer und enzymatischer Hydrolyse deutlich. Auch erkennt man die Zunahme der Stabilität durch Verzweigung der Estermodifikation. Weiterhin steigt die chemische Stabilität, wenn schon eine Maske abgespalten wurde.

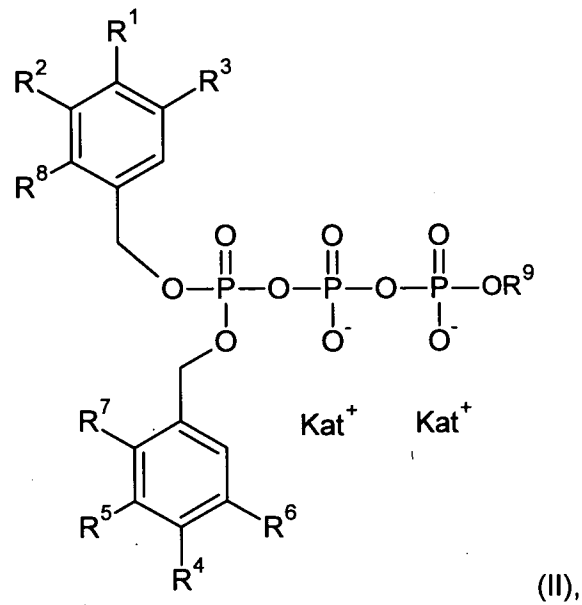
30 Von zusätzlichem Interesse ist die Stabilität der Verbindungen in humanem Blutplasma, um abschätzen zu können, ob ein Transport des intakten Prodrugs zum Wirkort stattfinden kann. Obwohl die untersuchten Verbindungen im Vergleich zur pH-abhängigen Hydrolyse an Stabilität verloren, waren sie dennoch über mehrere Stunden in Inkubationsstudien 35 nachzuweisen, wie Fig. 4 verdeutlicht. Damit sollte eine systemische Verteilung möglich sein.

Patentansprüche

1. Verbindung der allgemeinen Formel (I)



oder der allgemeinen Formel (II)



oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon,

wobei R^1 , R^4 , R^7 und R^8 unabhängig voneinander H, $O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-R$ oder $HN-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-R$ sind,

- 41 -

R Alkyl, Aryl oder OAlkyl ist,

R^2 , R^3 , R^5 und R^6 unabhängig voneinander H, Alkyl, Aryl oder OAlkyl sind,

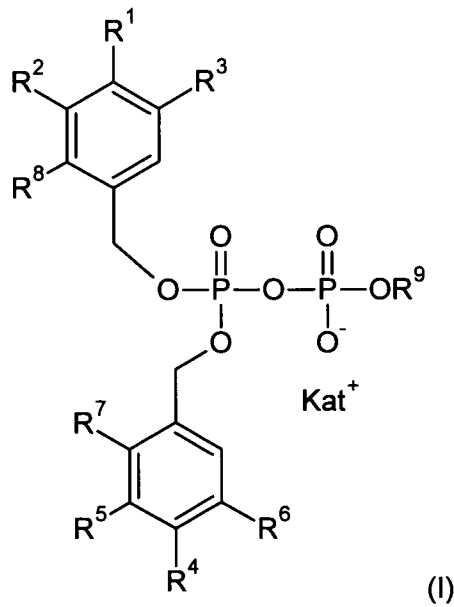
R^9 ein Nukleosid, Nukleosidanalogen oder Alkoholrest ist, und

Kat^+ ein Kation ist,

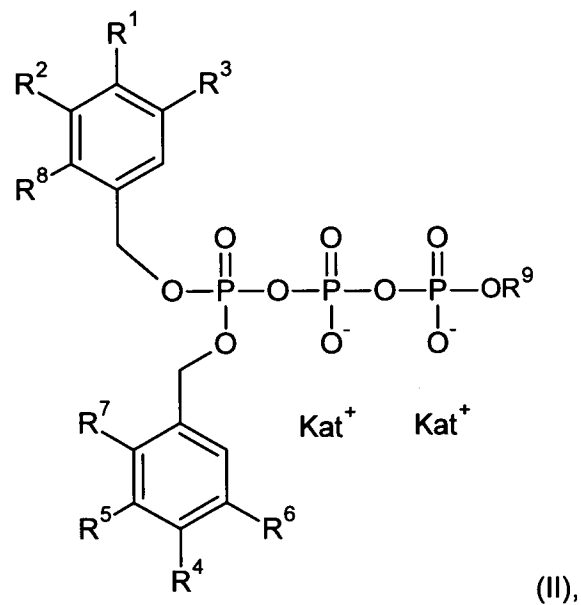
mit der Maßgabe, dass R^1 , R^4 , R^7 und R^8 nicht alle H sind.

2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R^1 und R^4 beide $O-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-R$ oder $HN-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-R$ sind und R^7 und R^8 H sind.
3. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R^7 und R^8 beide $O-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-R$ oder $HN-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-R$ sind und R^1 und R^4 H sind.
4. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass R^9 ein Nukleosid oder Nukleosidanalogen ist.
5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Verwendung als Arzneimittel.
6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Verwendung als antivirales Arzneimittel, bevorzugt als Arzneimittel zur Behandlung einer HIV-Infektion.
7. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Herstellung eines Arzneimittels, bevorzugt eines antiviralen Arzneimittels, besonders bevorzugt eines Arzneimittels zur Behandlung einer HIV-Infektion.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.
9. Pharmazeutische Darreichungsform, insbesondere orale Darreichungsform, umfassend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.
10. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der allgemeinen Formel (I)

- 42 -



oder der allgemeinen Formel (II)



oder eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes davon,

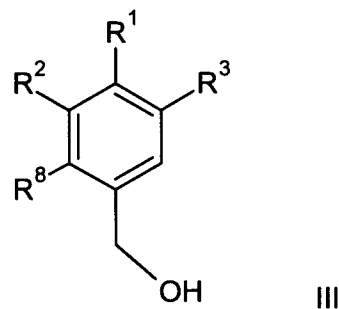
wobei R^1 , R^4 , R^7 und R^8 unabhängig voneinander H, $\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$ oder $\text{HN}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$ sind,
 R Alkyl, Aryl oder OAlkyl ist,
 R^2 , R^3 , R^5 und R^6 unabhängig voneinander H, Alkyl, Aryl oder OAlkyl sind,
 R^9 ein Nukleosid, Nukleosidanalogen oder Alkoholrest ist, und

- 43 -

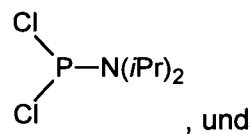
Kat⁺ ein Kation ist,

mit der Maßgabe, dass R¹, R⁴, R⁷ und R⁸ nicht alle H sind,
umfassend die Schritte des

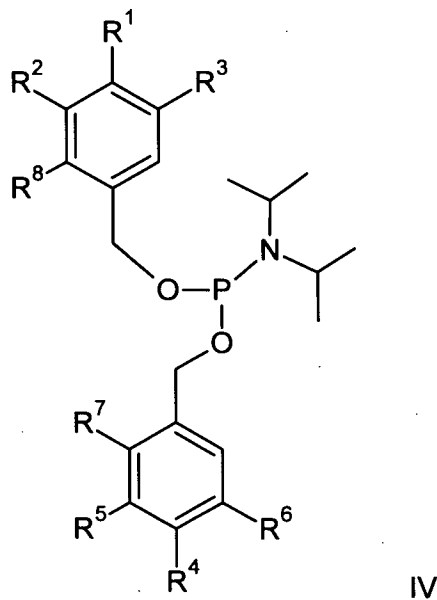
a) Inreaktionbringens eines Phenylesters der allgemeinen Formel (III)



mit Dichlorophosphoramidit

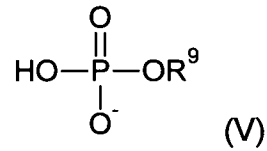


b) Inreaktionbringens des in Schritt a) erhaltenen Phosphoramidits der allgemeinen Formel (IV)

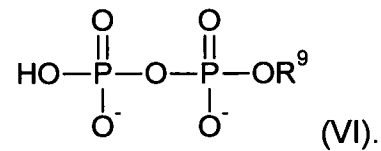


mit einer Verbindung gemäß der allgemeinen Formel (V)

- 44 -



oder mit einer Verbindung der allgemeinen Formel (VI)



11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass R^1 und R^4 beide $\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$ oder $\text{HN}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$ sind und R^7 und R^8 H sind.
12. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass R^7 und R^8 beide $\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$ oder $\text{HN}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$ sind und R^1 und R^4 H sind.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass R^9 ein Nucleosid oder Nucleosidanalogen ist.

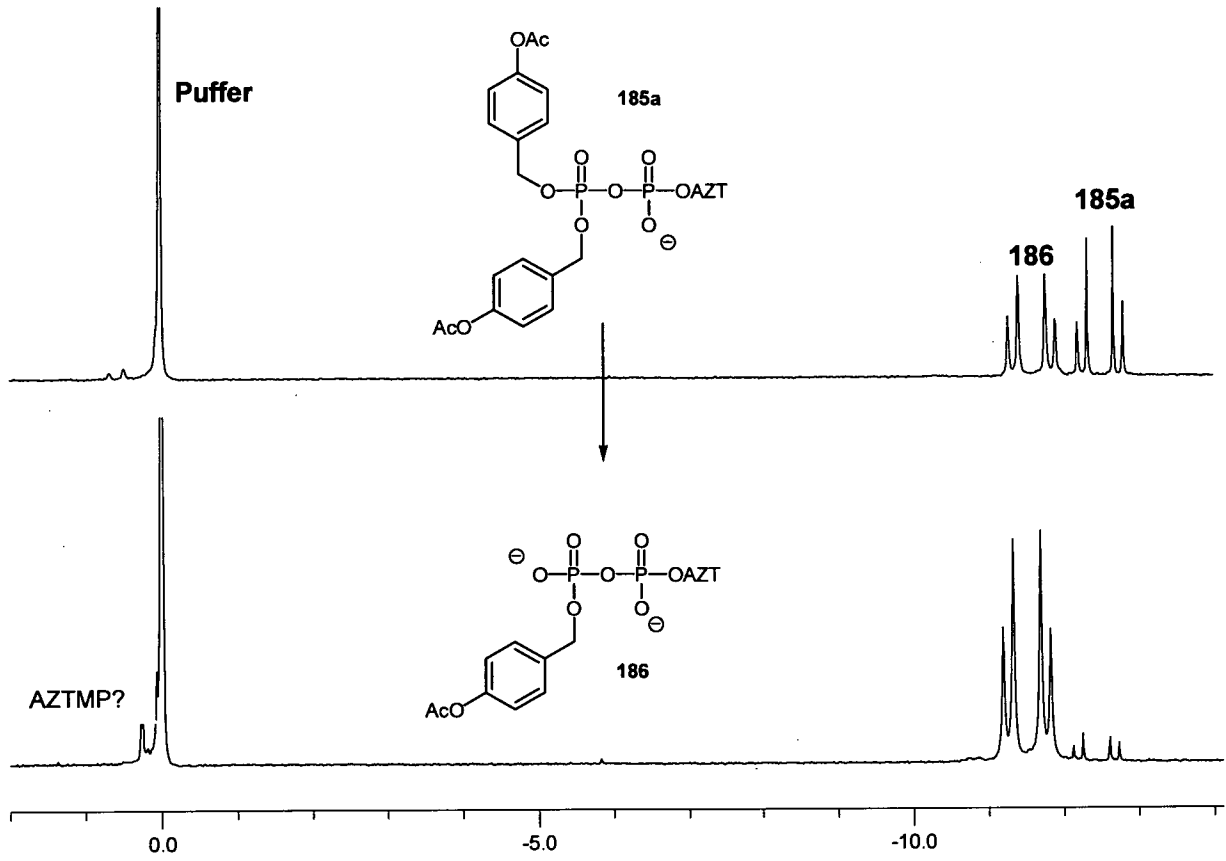


Fig. 1

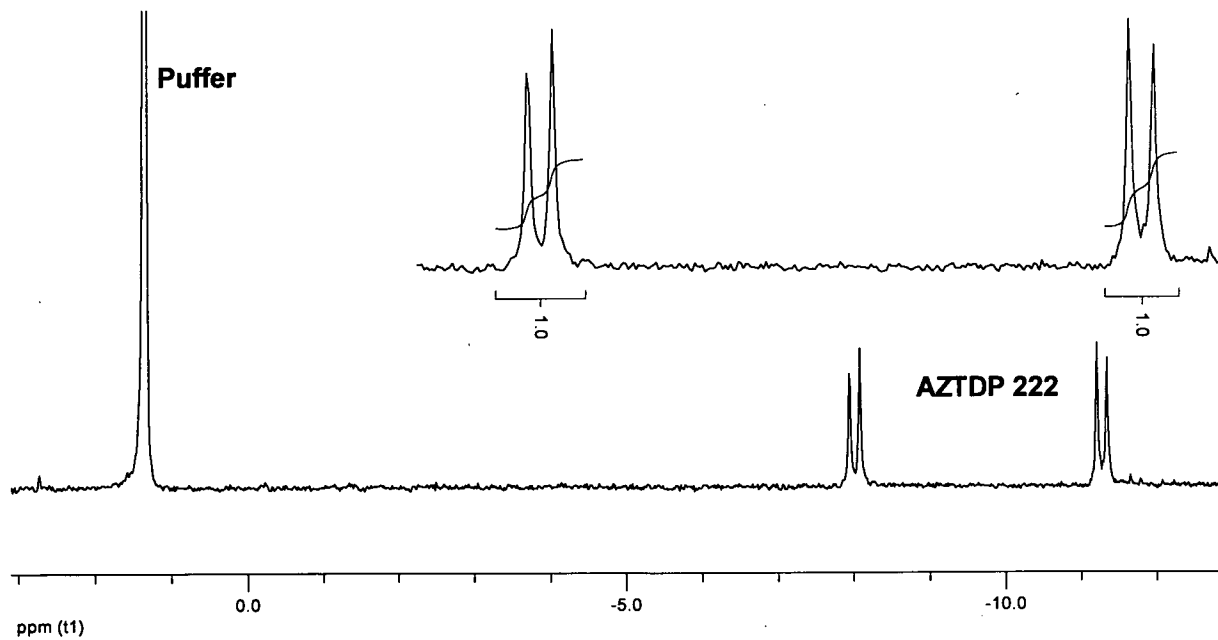


Fig. 2

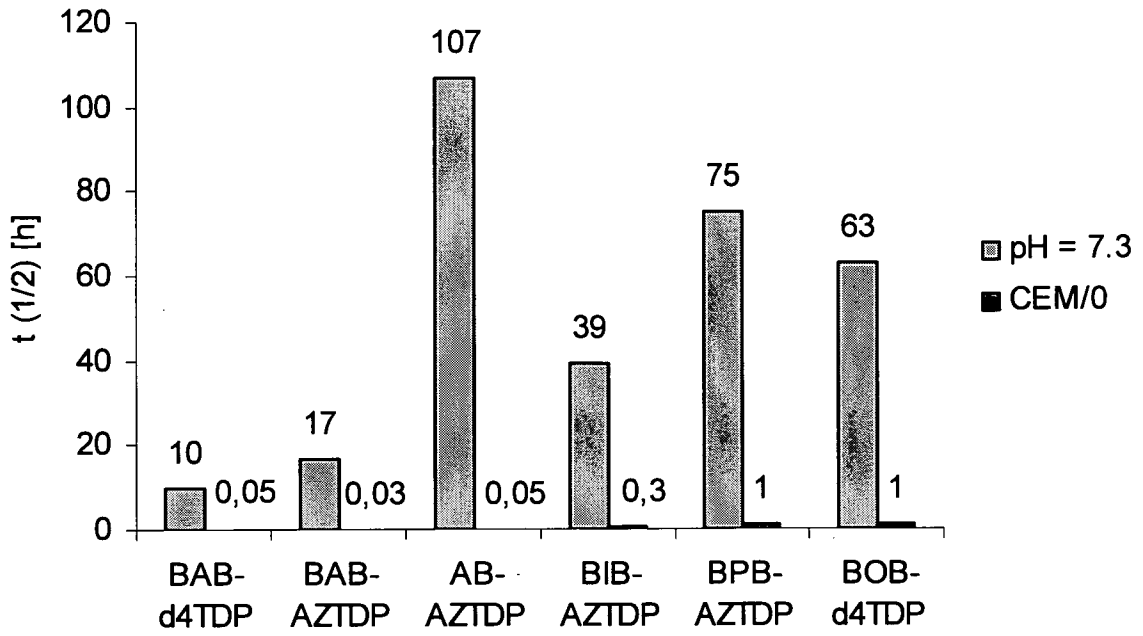


Fig. 3

- 4/4 -

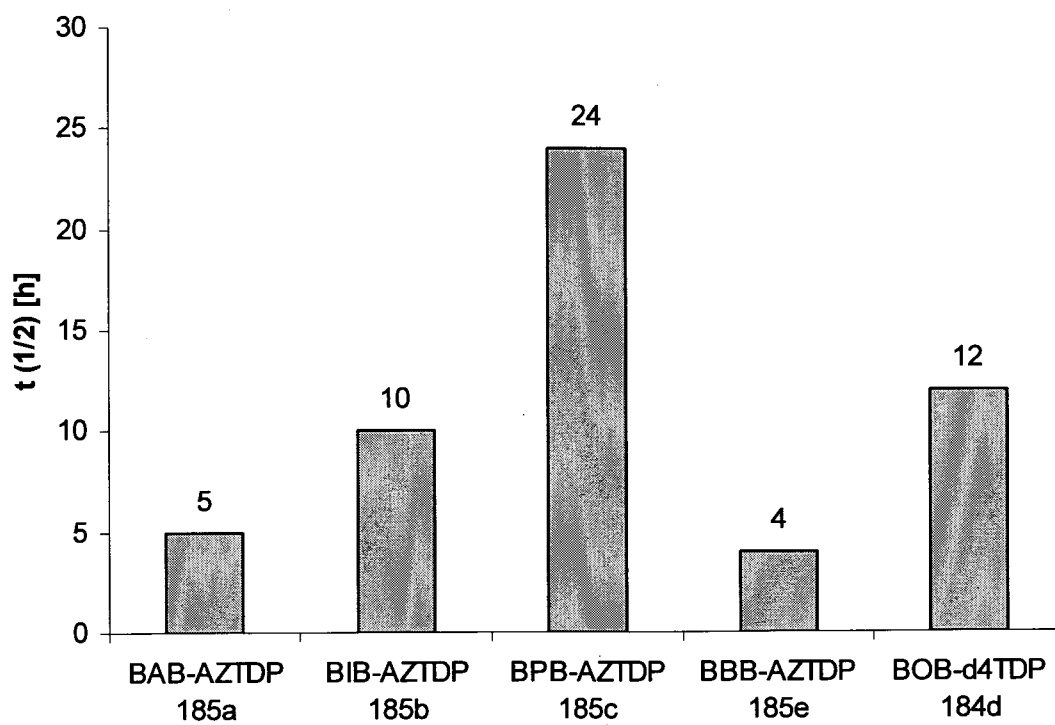
Stabilität in 20% igem Blutplasma

Fig. 4