

***CycloSaligenyl-Nucleotide:*
Untersuchungen zum TK- und ADA-Bypass antiviral aktiver Pro-Nucleotide**

1. Gutachter: Prof. Dr. C. Meier
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Paulsen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene *cycloSal*-Pro-Nucleotide mittels Phosphor(III)- und Phosphor(V)-Verbindungen synthetisiert und in bezug auf deren Lipophilie ($\log P$), Hydrolyseeigenschaften in verschiedenen Pufferlösungen, enzymatischen Stabilitäten und anti-HIV Aktivitäten (EC_{50} , CC_{50}) untersucht (s. Abbildung). Die ermittelten Verteilungskoeffizienten der *cycloSal*-Pro-Nucleotide weisen alle eine größere Lipophilie als die entsprechenden Nucleoside und AZT auf. Das läßt darauf schließen, daß die Zielverbindungen in der Lage sind durch einen passiven Zellmembrantransport in die Zelle zu gelangen. Weiterhin konnte durch Hydrolysestudien bei pH 7.3 gezeigt werden, daß die *cycloSal*-Phosphatriester unter diesen Bedingungen selektiv das entsprechende Nucleosid freisetzen. Außerdem konnte eine deutliche Korrelation der Donoreigenschaft des Substituenten im aromatischen Ring mit der Hydrolysegeschwindigkeit beobachtet werden. Jedoch hat auch der sterische Anspruch des Substituenten in der 3-Position einen Einfluß auf die Stabilität. Im Fall der Adenin- und Hypoxanthin-haltigen Nucleoside konnte weiterhin gezeigt werden, daß die glycosidische Bindung der *cycloSal*-Pro-Nucleotide im sauren Milieu im Vergleich zu den Nucleosiden stabilisiert ist und somit eine orale Applikation der Pro-Nucleotide begünstigt sein sollte. Bei der Untersuchung der enzymatischen Stabilität der *cycloSal*-Pro-Nucleotide gegenüber Adenosin-Desaminase (ADA) und Adenosin-Monophosphat-Desaminase (AMPDA) konnte kein Abbau zum Hypoxanthin-Phosphatriester detektiert werden. Zusätzliche Experimente mit den natürlichen Substraten 2'-Desoxyadenosin und 2'-Desoxyadenosin-5'-Monophosphat konnten zeigen, daß die untersuchten *cycloSal*-Pro-Nucleotide keine Inhibitoren der verwendeten Enzyme darstellten. Die biologischen Daten der hier diskutierten *cycloSal*-Pro-Nucleotide in HIV-infizierten Lymphozythen, zeigten eine bis zu 600fache Verstärkung der antiviralen Aktivität im Vergleich zu den entsprechenden Nucleosiden.

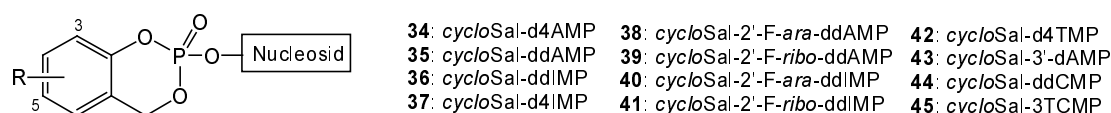
Im zweiten Teil der Arbeit wurde gezeigt, daß mit Hilfe des *cycloSal*-Konzeptes eine Erklärung für die extrem unterschiedlichen antiviralen Aktivitäten von 2'-F-*ara*-ddA **16** und 2'-F-*ribo*-ddA **18** gefunden werden konnte. Durch den Vergleich der antiviralen Aktivitäten der 2'-fluorierten *cycloSal*-Pro-Nucleotide untereinander, konnte eine limitierte Umwandlung innerhalb des vierstufigen Umwegs im Metabolismus des antiviral inaktiven Nucleosids 2'-F-*ribo*-ddA **18** nachgewiesen werden. Um den Einfluß von konformativen Parametern auf die Phosphorylierung der Nucleoside zu untersuchen, wurden zusätzlich die entsprechenden

Tina Knispel

5'-Monophosphate synthetisiert und einer qualitativen und quantitativen Konformationsanalyse unterzogen. Es wurde jedoch festgestellt, daß die Konformation von 2'-F-*ara*-ddA **16** und 2'-F-*ribo*-ddA **18** keinen Einfluß auf deren Phosphorylierung hat, so daß sich die beobachtete antivirale Inaktivität von 2'-F-*ribo*-ddA nicht auf eine Veränderung der Konformation im Metabolismus zurückführen läßt.

Durch die Synthese von extrem lipophilen *cycloSal*-Pro-Nucleotiden der Nucleoside d4T **2**, ddA **7** und 2'-F-*ara*-ddA **16** konnte weiterhin gezeigt werden, daß eine Korrelation von Lipophilie ($\log P$) und antiviraler Aktivität (EC_{50}) nicht zu beobachten ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das *cycloSal*-Pro-Nucleotid Konzept erfolgreich auf Adenin-haltige und Thyminid-haltige Nucleoside angewendet wurde. Es konnte gezeigt werden, daß durch die intramolekulare Freisetzung der Nucleotide die biologische Aktivität im Vergleich zu den entsprechenden Nucleosiden deutlich erhöht werden konnte. Die vorhandene metabolische Blockade wurde in allen Fällen erfolgreich umgangen (ADA-Bypass bzw. TK-Bypass). Durch die Synthese von 2'-fluorierten *cycloSal*-Phosphattriestern (**38-41**) und den Vergleich der antiviralen Aktivitäten untereinander, konnte eine limitierte Umwandlung innerhalb des vierstufigen Umwegs im Metabolismus von 2'-F-*ribo*-ddA **18** nachgewiesen werden. Das *cycloSal*-Pro-Nucleotid-Konzept bewirkte hier nicht nur einen erneuten ADA-Bypass, sondern steuerte in diesem Fall zusätzlich einen wichtigen Beitrag zu der Aufklärung des Metabolismus des Nucleosides 2'-F-*ribo*-ddA **18** bei.



R = H, 5-OMe, 3-Me, 3,5-DiMe, 3-*tert*-Bu, 3-*sek*-Bu, 5-*tert*-Bu, 5-*sek*-Bu

Nucleosid =

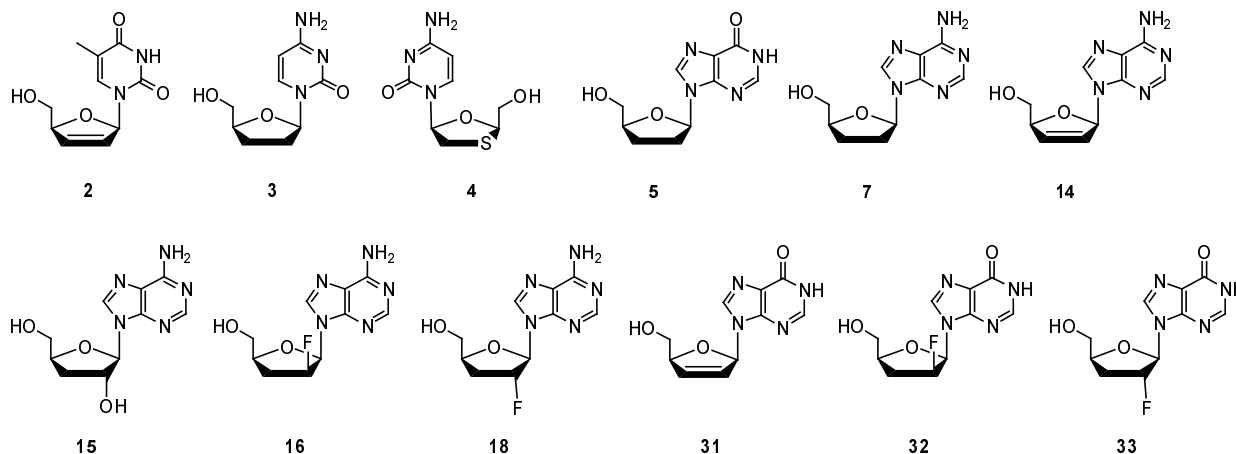


Abbildung: *cycloSal*-Pro-Nucleotide