

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Synthese neuer, antiviral aktiver Nucleotid Prodrugs und die Charakterisierung ihrer Eigenschaften mit der Aufgabe die Wirksamkeit bereits etablierter, antiviral aktiver Nucleosidanaloga zu erhöhen oder das Anwendungsspektrum dieser Verbindungen zu erweitern.

Ausgangsverbindungen für die Synthese aller *cycloSal*-Derivate waren die entsprechenden Salicylalkohole **34a-f** und verschiedene, gegen Herpes Viren aktive Nucleosidanaloga. Als Salicylalkohol-Derivate wurden die Akzeptor-substituierte Verbindung **34a** (5-Cl) und die Donor-modifizierten Verbindungen **34c** (5-OMe), **34d** (3-Me), **34e** (3,5-DiMe) und **34f** (3-*t*Bu) sowie das unsubstituierte Derivat **34b** verwendet. Diese waren aus den jeweiligen Salicylsäuren oder -aldehyden in guten Ausbeuten von 73 - 99 % darstellbar (Kapitel 4.1.2., Seite 29). Aus den Alkoholen konnten in 40 - 79 % Ausbeute die für die spätere Synthese der *cycloSal*-Derivate benutzten Chlorphosphite **35a,b,d,e** dargestellt werden.

Ein Beispiel eines Nucleosids mit 3'-Hydroxyfunktion ist das gegen die Herpes-Virus-Familie aktive BVDU **4**. Im Rahmen dieser Arbeit gelang erstmals sowohl die Darstellung einiger 3'-unmodifizierten als auch einer Serie von 3'-*O*-modifizierten 3-Methyl-*cycloSal*-BVDUMP Phosphattriestern. Die Synthese der 3'-unmodifizierten Derivate **25a-f** gelang sowohl über die direkte Umsetzung mit dem Phosphitylierungsreagens (Kapitel 4.2.1.2., Seite 34) als auch unter Verwendung einer 3'-Schutzgruppe (Kapitel 4.2.1.3., Seite 35). Die Vorteile der Schutzgruppenstrategie wurden allerdings durch die Notwendigkeit dreier weiterer Reaktionsschritte aufgewogen.

Die 3'-modifizierte 3-Methyl-*cycloSal*-BVDUMP **25g-z** konnte dargestellt werden, indem Carbonsäuren unterschiedlicher Kettenlänge (Lipophilie) und α -Aminosäuren mittels Dicyclohexylcarbodiimid-Kupplung mit der 3'-Hydroxyfunktion des zuvor 5'-*O*-TBDMS geschützten Nucleosidanalogs BVDU in 45 - 83 % Ausbeute verestert wurden (Kapitel 4.2.2.1., Seite 36). Aus den so synthetisierten Vorstufen konnten die Zielverbindungen mittels der bekannten „Ein-Topf“-Reaktion in 23 - 73 % Ausbeute erhalten werden (Kapitel 4.2.3., Seite 38). Es wurden Diastereomerenpaare im Verhältnis von nahezu 1:1 erhalten, die auch HPLC chromatographisch nicht getrennt werden konnten.

Die Synthese der 5-H-*cycloSal*-BVDUMP-Derivate **25 α - ϵ** gelang sowohl durch Umsetzung der 3'-*O*-modifizierten Nucleoside **41g,i,m,o,p** mit dem cyclischen Chlorphosphit **35b** als auch durch Umsetzung mit dem cyclischen Phosphoramidit **36b**, das durch Umsetzung des Chlorphosphites **35b** mit Diisopropylamin in guten Ausbeuten zu erhalten war. Eine Präferenz hinsichtlich Ausbeute der Reaktion konnte im Gegensatz zu früheren Untersuchungen mit dem Nucleosidanalogen d4T nicht gefunden werden (Kapitel 4.2.4, Seite 39ff).^[113]

Als qualitativer Anhaltspunkt für die Lipophilie der *cycloSal*-Derivate dienten die Nernst'schen Verteilungskoeffizienten (PC-, log*P*-Werte). Der Verteilungskoeffizient von AZT **6** (PC-Wert = 1.09, log*P* = 0.04) diente in diesen Untersuchungen als Richtwert für einen möglichen passiven Membrantransport. Die Verteilungskoeffiziente der 3'-unmodifizierten *cycloSal*-BVDU Phosphattriester **25a-f** waren 27 - 728 mal höher (Kapitel 4.2.5.1., Seite 41ff), die der 3'-Acyl-modifizierten Phosphattriester **25g-m** waren 138 - 939 mal höher und die der 3'-Aminoacyl-modifizierten Phosphattriester **25n-z** waren 0.16 - 3 mal höher als der von AZT **6**. Bedacht werden sollte, daß bei sehr hohen PC-Werten wie sie hier gemessen wurden die Bildung von Micellen oder einer Lipidähnlichen Struktur nicht ausgeschlossen werden kann, diese können das Hydrolyseverhalten maßgeblich beeinflussen. Durch die polare Aminogruppe der 3'-Aminoacyl-modifizierten *cycloSal*-BVDUMP Phosphattriester **25n-z** wird die Lipophilie kompensiert und die Verbindungen sind wieder sehr gut wasserlöslich. Die 5-H-*cycloSal*-BVDUMP-Derivate **25 α - ϵ** verhielten sich analog zu den 3-Methyl-modifizierten Triestern.

Das Hydrolyseverhalten aller *cycloSal*-BVDUMP Phosphattriester **25a-z** wurde in wässrigem Phosphatpuffer mit verschiedenen pH-Werten, in unterschiedlichen biologischen Medien und in humanem Serum untersucht (Kapitel 4.2.5.2., Seite 47ff). Bei diesen Untersuchungen lag ein besonderes Augenmerk auf der Detektion der Hydrolyseprodukte mittels ³¹P-NMR Spektroskopie, ESI-Massenspektrometrie und durch HPLC-analytische Coinjektionsuntersuchungen mit separat synthetisierten Referenzverbindungen. Es konnte gezeigt werden, daß alle unmodifizierten *cycloSal*-BVDUMP Phosphattriester **25a-f** unabhängig vom benutztem Medium selektiv zu BVDUMP **44** und den entsprechenden Salicylalkoholen **34a-f** hydrolysierten. Dabei konnte eine eindeutige Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit vom jeweiligen Substituenten im aromatischen Ring beobachtet werden. Außerdem konnte eine Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit vom pH-Wert beobachtet werden. Die Phosphattriester **25d-f** zeigten sowohl im leicht saurem (pH 6.8) als auch im leicht basischen

Phosphatpuffer (pH 7.3) ausreichende Stabilität, während die Verbindungen **25a-c** sehr schnell hydrolysierten.

Für die 3'-*O*-Acyl-modifizierten Derivate **25g-m** konnte eine Korrelation des Hydrolyseverhaltens mit der Lipophilie der Verbindungen gefunden werden: Je lipophiler die Verbindung, desto stabiler war der Triester in den Hydrolyseuntersuchungen. Zusätzlich wurde beobachtet, daß alle Verbindungen **25g-m** unabhängig vom Medium zuerst die Maske hydrolysieren und im folgenden stabil waren. Das bedeutet, die Hydrolyse dieser Verbindungen führt in eine Sackgasse, da sie sowohl im Zellextrakt als auch im Serum nicht BVDUMP **44** freisetzen.

Die 3'-*O*-Aminoacyl-modifizierten *cycloSal*-BVDUMPs **25n-z** verhielten sich in allen Untersuchungen in verschiedenen Medien gleich ungewöhnlich. Die Halbwertszeiten waren in allen Fällen sehr kurz. Die in den HPLC Chromatogrammen detektierten Produkte zeigten, daß zuerst die 3'-Esterbindung gebrochen wurde bevor die gebildete Prototypverbindung **25d** zum 3-Methylsalicylalkohol **34d** und zu BVDUMP **44** hydrolysiert. Dies könnte durch die Tatsache erklärt werden, daß die Aminogruppe der Aminosäure bis zu pH = 9 protoniert vorliegt. Durch die positive Ladung wird zusätzlich Elektronendichte von der Carbonylgruppe abgezogen und dadurch der Carbonsäureester leichter hydrolysiert.

Die 5-*H-cycloSal*-BVDUMP Phosphatriester **25α-ε** verhielten sich in allen Hydrolyseuntersuchungen mit verschiedenen Medien analog zu den entsprechend modifizierten 3-Methyl-*cycloSal*-BVDUMP Phosphatriestern. Die Halbwertszeiten der Verbindungen **25α-ε** waren dabei in jedem Fall niedriger als die der 3-Methyl-*cycloSal*-Derivate.

In den antiviralen Zelltests gegen HSV-1 erwiesen sich die *cycloSal*-BVDUMPs als selektive Inhibitoren des Wildtyp Virus (Kapitel 4.2.5.9., Seite 86). In dem Thymidin Kinase-defizienten Virusstamm wurde für die *cycloSal*-Derivate genau wie für BVDU **4** keine Aktivität gefunden. Da der viralen HSV-1 Thymidin Kinase Thymidylat Kinase Funktion assoziiert ist, kann das aus den *cycloSal*-Phosphatriestern freigesetzte BVDUMP nicht zu BVDUDP metabolisiert werden.

In den antiviralen Zelltests gegen EBV zeigten alle 3'-unmodifizierten *cycloSal*-BVDUMPs **25a-f** sowohl im DNA Synthese Assay als auch im VCA Expressions Assay hohe Aktivität (Kapitel 4.2.5.10., Seite 88). Dabei wurde die Effektivität der Referenzverbindung ACV von den aktivsten Verbindungen **25c** und **25d** übertroffen. Alle 3'-*O*-acylierten *cycloSal*-BVDUMPs **25g-m** besaßen genauso wie BVDU **4** keine Aktivität. Nur einige der

3'-aminoacylierten *cycloSal*-BVDUMPs zeigten in dem Test Aktivität, die im besten Fall genauso hoch war, wie die der Referenzverbindung.

Um Ergebnisse aus der Diplomarbeit zu verifizieren, wurde das acyclische Nucleosid-analogon Penciclovir **2** in einer nur drei Schritte umfassenden Reaktionsfolge in sehr guter Ausbeute von 44 % synthetisiert (Kapitel 4.3.2., Seite 94). Anschließend wurde 3-Methyl-*cycloSal*-*O*-acetyl-PCVMP **26b** sowohl über die Acetylierung von 3-Methyl-*cycloSal*-PCVMP **26a** mit Essigsäureanhydrid (Kapitel 4.4.1.2., Seite 96), als auch in einer kürzeren Synthese über 9-(4-*O*-Acetoxy-3-hydroxymethylbut-1-yl)guanin **54** als Zwischenprodukt dargestellt (Kapitel 4.4.1.3., Seite 97). Im Vergleich der Synthesewege ist die Darstellung des Zwischenproduktes **54** mit anschließender Phosphitylierung/Oxidation dem sechsstufigem Reaktionsweg mit Acetylierung im letztem Schritt sowohl in der Ausbeute als auch im zeitlichem Anspruch überlegen.

Zusätzlich wurde 3-Methyl-*cycloSal*-Ganciclovirmonophosphat **27**, das sich nur durch einen 2'-Sauerstoff von der Penciclovirverbindung **26a**, auf dem selben Reaktionsweg unter Verwendung der schon bei **26a** verwendeten Schutzgruppenstrategie in 19 % Ausbeute über fünf Reaktionsschritte dargestellt (Kapitel 4.4.2.2., Seite 98). In allen Synthesen wurden die *cycloSal*-Derivate als 1:1 Gemische zweier Diastereomere erhalten.

Ebenfalls wurde für alle acyclischen *cycloSal*-Derivate die Verteilungskoeffizienten bestimmt. Sie waren etwas kleiner oder lagen im gleichen Bereich wie der von AZT **6** (Kapitel 4.4.4.1., Seite 102). Die passive Zellmembrandurchquerung sollte gegenüber den acyclischen Nucleosiden deutlich erleichtert sein.

In Hydrolysestudien konnte mittels ^{31}P -NMR Spektroskopie und ESI Massenspektrometrie nachgewiesen werden, daß die sehr kurze Hydrolysehalbwertszeit ($t_{1/2} = 1.62$ h) von 3-Methyl-*cycloSal*-PCVMP **26a** in wässrigem Phosphatpuffer durch einen intramolekularen Angriff der freien 4'-Hydroxylgruppe am Phosphatphosphor hervorgerufen wurde. Das resultierende cPCVMP **33** konnte auch in HPLC analytischen Coinjektionsversuchen einer separat synthetisierten Referenz detektiert werden.

Das Hydrolyseverhalten der beiden GCV-Triester **27fast** und **27slow** wurde in wässrigem Phosphatpuffer bei pH 7.3 untersucht (Kapitel 4.4.4.2., Seite 104). Dabei konnten für die GCV-Verbindungen **27fast** und **27slow** genauso wie im Fall des PCV-Triesters **26a** eine sehr schnelle Hydrolyse festgestellt werden. Im Gegensatz zum PCV-Triester **26a** hydrolysieren beide acyclische Verbindungen selektiv zum entsprechenden Nucleosidmonophosphat.

In den antiviralen Zelltests gegen HSV-1 erwiesen sich die *cycloSal*-ACVMPs **28a** bzw. **28b** als selektive Inhibitoren sowohl des Wildtyp Virus als auch des Thymidin Kinase-defizienten Virusstammes. Das Ganciclovir-Derivat **27** erreichte zwar nicht ganz die Aktivität des Nucleosides GCV **3**, erhielt diese aber im TK⁻-Stamm. Beide Penciclovir Prodrugs waren gegen HSV-1 inaktiv (Kapitel 4.4.4.3., Seite 108).

Auch in den Zelltests gegen EBV zeigten die *cycloSal*-ACVMPs **28a** bzw. **28b** antivirale Aktivität, die in der gleichen Größenordnung lag wie die des gegen EBV aktiven Acyclovirs **1**. Die *cycloSal*-PCVMPs **26a** und **26b** waren wiederum inaktiv. Dies kann mit der Bildung des cPCVMPs **31** erklärt werden, das intrazellulär nicht metabolisiert wird (Kapitel 4.4.4.4., Seite 111).

Die 3'-unmodifizierten BVDUMP Phosphatriester sind, soweit es bekannt ist, die ersten Beispiele für eine erfolgreiche Anwendung der Pro-Nucleotid Strategie auf ein Nucleosidanalogen, das eine freie 3'-Hydroxyl Funktion aufweist. Besonders erwähnt werden muß, daß hier das zuvor gegen EBV vollständig inaktive Nucleosid BVDU **4** in eine jetzt aktive Form überführt wurde und somit das Anwendungsspektrum erweitert werden konnte.

Die BVDUMP-, ACVMP- und GCVMP-Verbindungen sind die ersten Beispiele für die erfolgreiche Anwendung des *cycloSal*-Konzeptes auf den viralen Thymidin Kinase Bypass.