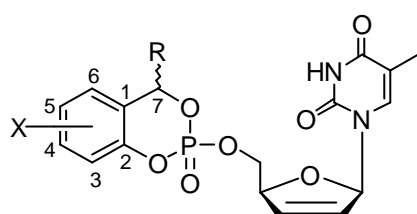


5 Zusammenfassung

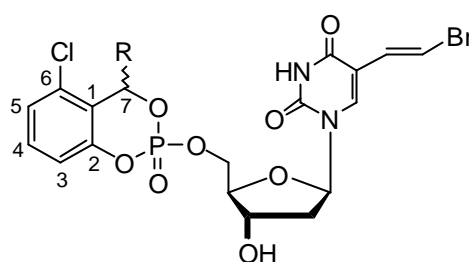
In der vorliegenden Arbeit wird erstmals die Synthese Benzyl-substituierter cyclischer Phosphatriester der Nucleosid-Analoga d4T **4**, BVDU **13** und ddA **21** sowie F-*ara*-ddA beschrieben. In Abbildung 100 sind alle dargestellten Prodrugs zusammengefasst.



16d, 33-40

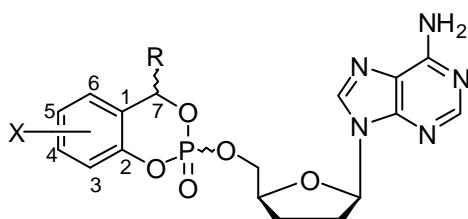
X = H, 3-Me, 5-Cl, 6-Cl

R = H, CH₂CO₂Et, CH₂SO₂Me, Me, *n*Bu, CCl₃, CHCl₂, CH₂Cl, CN



116a-d

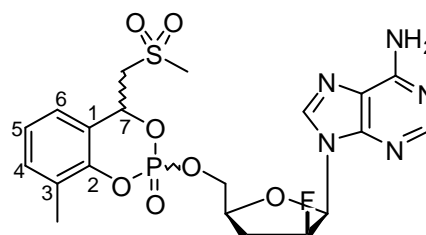
R = CH₂CO₂Et, Me, *n*-Bu, H



117a-c

X = 3-Me, 5-Cl

R = CH₂CO₂Et, CH₂SO₂Me



118

Abb. 100: Dargestellte *cycloSal*-Phosphatriester **33-40** und **116-118**

Die Synthese dieser Verbindungen gelang, ausgehend von den entsprechenden Salicylalkoholderivaten **63-70**, in zweistufigen Ansätzen. Die Salicylalkohole **63-66**, **68** und **70** konnten zuvor durch nucleophile Additionen an die Carbonylgruppe der entsprechenden Salicylaldehyde **103** erhalten werden (Abb. 101, S. 127). So wurden die 7-Methyl-salicylalkohole **65** sowie die 7-Butyl-salicylalkohole **66** in sehr guten Ausbeuten nach Umsetzungen von **103** mit einem Überschuss von Methyllithium bzw. *n*-Butyllithium erhalten. In analogen Ansätzen konnten auch die 7-Methansulfonylmethyl-salicylalkohole **64** zugänglich gemacht werden, nachdem zunächst aus Dimethylsulfon und der starken Base Methyllithium das entsprechenden Lithiumorganyl

generiert worden war. Anschließende Addition dieses Nucleophils an **103** lieferte die Diole **64** in guten bis sehr guten Ausbeuten.

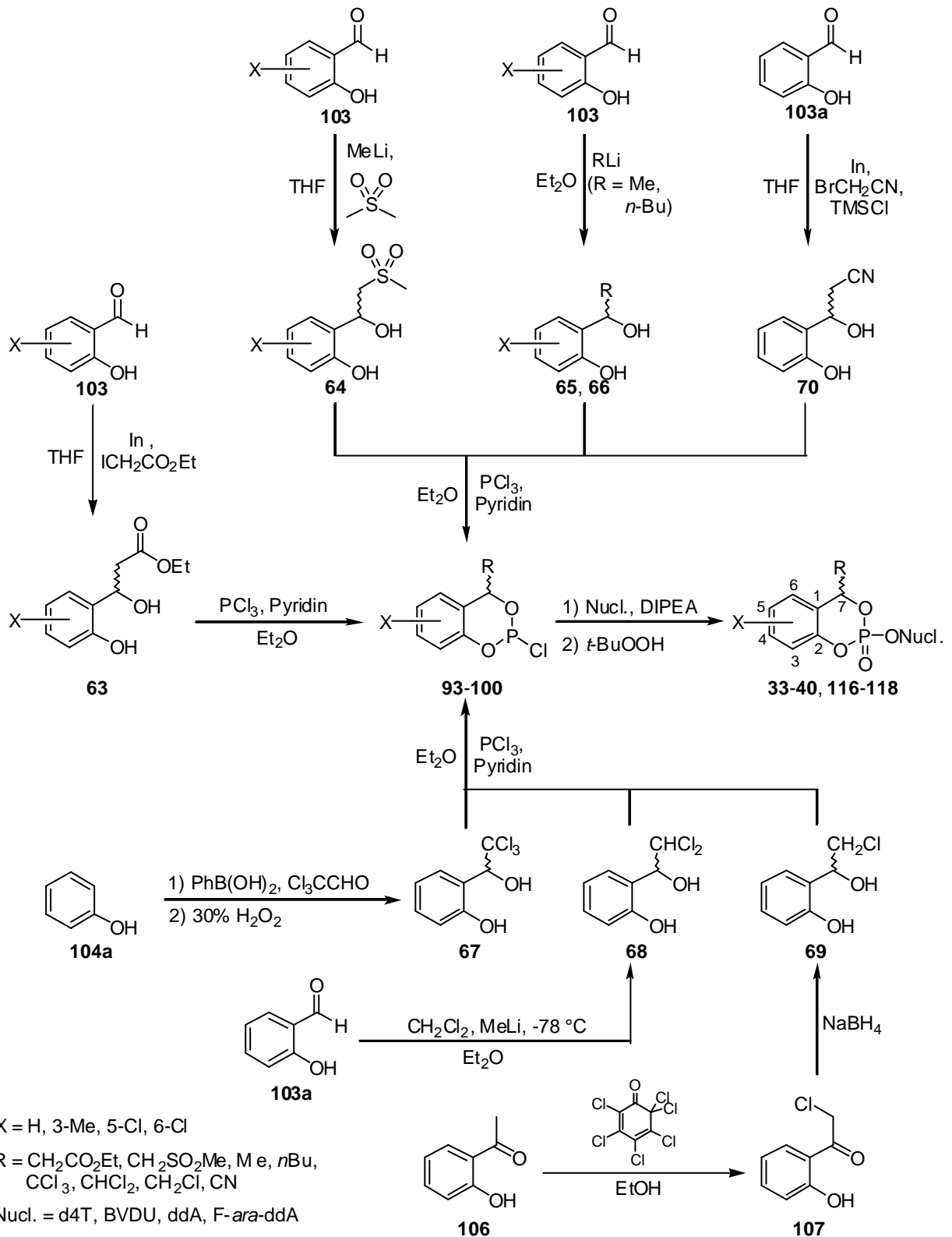


Abb. 101: Der Syntheseweg zu den Prodrugs **33-40** und **116-118**

Auch das Diol **68** konnte in Anlehnung an den soeben für die Diole **64** beschriebenen Ansatz erhalten werden (Abb. 101, S. 127). So wurde aus Dichlormethan mit der starken Base Methyllithium *in situ* zunächst Dichlormethylithium erzeugt. Eine potentielle Entstehung von Carbenen konnte durch Temperaturkontrolle verhindert werden^[89]. Nach anschließender nucleophiler Addition an den Salicylaldehyd **103a** konnte **68** in quantitativer Ausbeute erhalten werden.

Die Synthese der 7-Ethoxycarbonylmethyl-salicylalkohole **63** gelang in einer Variante der Reformatsky-Reaktion von **103** mit Indium und Ethyliodacetat in guten Ausbeuten (Abb. 101, S. 127). Durch analoge Umsetzung des Salicylaldehyds **103a** mit Indium und Bromacetonitril in Gegenwart von Trimethylsilylchlorid gelang entsprechend die Darstellung von 7-Cyanomethyl-salicylalkohol **70**, allerdings für diesen Fall nur in mäßiger Ausbeute^[90].

Die Darstellung des 7-Trichlormethyl-salicylalkohols **67** gelang nach einer von Nagata^[85] *et al.* beschriebenen Variante zur Darstellung von Salicylalkoholen durch *ortho*-Hydroxymethylierung von Phenol **104a** mit Trichlormethyl-acetaldehyd in Gegenwart von Phenylboronsäure (Abb. 101, S. 127). Nach oxidativer Spaltung des als Zwischenprodukt isolierten Phenylboronsäurediesters **105** konnte **67** in mäßiger Gesamtausbeute isoliert werden. Der entsprechende 7-Monochlormethyl-salicylalkohol **69** wurde durch α -Monochlorierung von *ortho*-Hydroxy-acetophenon **106** mit 2,3,4,5,6,6-Hexachloro-2,4-cyclohexadien-1-on^[68] und anschließender Reduktion in ebenfalls mäßiger Ausbeute erhalten.

Zur Darstellung der *cycloSal*-Triester (Abb. 101, S. 127) wurden die Salicylalkohole **63-70** anschließend mit Phosphortrichlorid nach einer im Arbeitskreis ausgearbeiteten Vorschrift^[53] phosphoryliert. Umsetzung der so erhaltenen Chlorphosphane **93-100** mit den Nucleosiden d4T **4**, BVDU **13** und ddA **21** bzw. F-*ara*-ddA in Gegenwart der Base DIPEA lieferte nach Oxidation der intermediären Phosphor(III)-Addukte mit *tert*-Butylhydroperoxid die entsprechenden *cycloSal*-NMPs **33-40** sowie **116-118** in moderaten bis guten Ausbeuten.

Nach erfolgreicher Synthese wurde das Hydrolyseverhalten der Benzyl-funktionalisierten *cycloSal*-d4TMPs **33-40** detailliert untersucht. Zunächst wurden die Halbwertszeiten in Phosphatpufferlösung (pH 7.3, Gesamtkonzentrationen der Hydrolyselösungen: $c_{\text{Puffer}} = 12.5 \text{ mM}$, $c_{\text{Triester}} = 1.0 \text{ mM}$) gemessen. Als Referenz wurden außerdem die Halbwertszeiten der am Benzyl-Kohlenstoffatom nicht funktionalisierten d4T-Prodrugs **16a** und **16d** bestimmt. HPLC-Chromatogramme der Hydrolyselösungen

erster Benzyl-substituierter *cycloSal*-d4TMPs **33a-35a** deuteten neben der Freisetzung von d4TMP und den Abbauprodukten der *cycloSal*-Masken auf die Entstehung eines weiteren Konkurrenzproduktes hin. Weitere Indizien für die Beschaffenheit dieses Konkurrenzproduktes lieferten die entsprechenden UV-Absorptionsspektren sowie die von den Hydrolysaten aufgenommenen Massenspektren. So konnte die zur Freisetzung von d4TMP aus **33a-35a** konkurrierende Bildung der Phenylphosphatdiester ("falsche Diester") **83'a-84'a** bzw. **85a** nachgewiesen werden. Diese "falschen Diester" waren unter den schwach basischen Hydrolysebedingungen (pH 7.3, 37 °C) stabil und nicht mehr zur Freisetzung von d4TMP in der Lage (vgl. Kap. 4.4).

Mit Hilfe der ^{31}P -NMR-Spektroskopie konnte die Hydrolyse der Benzyl-funktionalisierten *cycloSal*-d4TMPs **33-40** zeitlich verfolgt werden. Außerdem war es mit Hilfe dieser Methodik möglich, die Phosphor-haltigen Hydrolyseprodukte sowie Intermediate aufgrund der natürlichen Isotopenhäufigkeit von ^{31}P (nahezu 100 %) zu quantifizieren. So konnten nach vollständiger Hydrolyse von **33-40** genaue Produktverhältnisse ("falsche Diester" : d4TMP) bestimmt werden. Des Weiteren konnten qualitative Einflüsse sowohl der Benzyl- als auch der Aryl-Substituenten auf bei der Hydrolyse von **33-40** durchlaufene Reaktionsschritte beobachtet werden. Für ausgewählte Benzyl-funktionalisierte *cycloSal*-d4TMPs konnten, nach erneuter Durchführung der Hydrolysen in Ammoniumacetat-Pufferlösung (pH 7.3, 37 °C), nach vollständiger Hydrolyse zunächst das Puffersalz durch Gefriertrocknung entfernt werden. Anschließend aufgenommene ^1H -NMR-Spektren gaben insbesondere Aufschluss über das dabei entstandene Abbauprodukt der *cycloSal*-Maske (vgl. Kap. 4.4.4.4 und 4.4.4.5).

Schließlich wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit DFT-Rechnungen durchgeführt, die weitere Belege für den Einfluß von Benzyl-Substituenten in *cycloSal*-d4TMPs auf die Bildung der unerwünschten Phenylphosphatdiester ("falsche Diester") lieferten. Grundlage der Berechnungen war die Überlegung, dass die nachgewiesenen Phenylphosphatdiester als typische Konkurrenzprodukte einer $\text{S}_{\text{N}}1$ - bzw. $\text{E}1$ -Reaktion aufgefasst werden konnten. Den gemeinsamen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt stellt in beiden Fällen die spontane Dissoziation zu einem Ionenpaar dar^[102]. Dieser erste Schritt wurde für ausgewählte Modellverbindungen (*cycloSal*-Methylmonophosphate, *cycloSal*-MeMPs) der jeweiligen *cycloSal*-d4TMPs in DFT-Berechnungen mit dem Programm *Gaussian* '98^[103] unter Verwendung des Funktionals B3LYP^[77,78] und der Basissätze 6-31G(d) bzw. 6-311G(d,p)^[82-84] untersucht (vgl. Kap. 4.5).

Während der Hydrolysemechanismus des Prototyps 7-H-*cycloSal*-d4TMP **16a** unter physiologischen Bedingungen (pH 7.3, 37 °C) selektiv über die Spaltung der Phenylphosphatester-Bindung im ersten Schritt nach einem $S_N(P)$ -Mechanismus verläuft^[53], muss bei Anwesenheit von Substituenten in Benzyl-Position alternativ auch eine Konkurrenzreaktion in Betracht gezogen werden, die zur Bildung von Phenylphosphatdiestern ("falsche Diester") führt. Die Art der gefundenen "falschen Diester" lässt, in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus der kinetischen Analyse der basischen Hydrolyse von sekundären und tertiären Alkylphosphatresten^[101], auf eine Entstehung nach einem S_N1 - bzw. $E1$ -Mechanismus mit einem heterolytischen Benzyl-C-O-Bindungsbruch als geschwindigkeitsbestimmendem Schritt^[102] schließen. Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Einflüsse auf die Konkurrenzreaktion erhalten:

- 1) Benzyl-Substituenten, die eine positive Ladung am Benzyl-Kohlenstoffatom durch Hyperkonjugation stabilisieren können, begünstigen eine heterolytische Benzyl-C-O-Fragmentierung (vgl. Kap. 4.4-4.5). Die Benzyl-Substituenten lassen sich nach abnehmender Fähigkeit zur Stabilisierung in folgende Reihung bringen: 7-Me ~ 7-Bu > 7-MSM > 7-ECM ~ 7-CM.
- 2) Auch der Aryl-Ring liefert einen elektronischen Beitrag zur Stabilisierung einer sich entwickelnden positiven Ladung am Benzyl-C-Atom (vgl. Kap. 4.5). Dies dokumentiert sich vor allem auch in dem erhöhten Anteil an Konkurrenzprodukt bei der Hydrolyse der 3-Methyl-substituierten Derivate **33b** und **34b** bzw. in den verringerten Anteilen nach 5-Chlor- bzw. 6-Chlor-Substitution am Aromaten (vgl. Kap. 4.4.4.2 und 4.4.4.5).
- 3) Chlormethyl-Gruppen als Benzyl-Substituenten (7-MM, 7-DM und 7-TM) sind nicht mehr dazu in der Lage, eine positive Ladung am Benzyl-Kohlenstoff zu stabilisieren (vgl. Kap. 4.5). Der dennoch bei den Hydrolysen von 7-DM- bzw. 7-TM-*cycloSal*-d4TMP **37** bzw. **38** gemessene Anteil an "falschem Diester" (vgl. Kap. 4.4.4.4) sollte daher auf vergrößerte Ringspannungseffekte zurückzuführen sein, die durch die sterisch besonders anspruchsvollen Dichlor- bzw. Trichlormethyl-Gruppen ausgelöst werden.
- 4) Die nach der Benzyl-C-O-Fragmentierung entstehenden Ionenpaare stellen endotherme Zwischenprodukte dar (vgl. Kap. 4.5). Es erscheint deshalb sinnvoll, für ihre Bildung aus den jeweiligen Substraten eine Gleichgewichtsreaktion an-

zunehmen. Im Folgeschritt werden diese dann durch Wasser zu den Phenylphosphatdiestern ("falsche Diester") des Typs **83-90** abgefangen. Sofern zusätzlich noch C-H-acidifizierende Gruppen (7-ECM, 7-MSM, 7-CM) in der Benzyl-Seitenkette anwesend sind, kann alternativ auch ein acidifiziertes Proton eliminiert werden und es entstehen "falsche Diester" des Typs **83'-84'** bzw. **90'**.

Vor dem Hintergrund dieser Einflüsse kann die Bildung der "falschen Diester" **85a** und **86a** bei der Hydrolyse in Benzyl-Position alkylierter *cycloSal*-d4TMPs **35a** und **36a** nach dem in Abbildung 102 gezeigten Reaktionsschema beschrieben werden (vgl. Kap. 4.8).

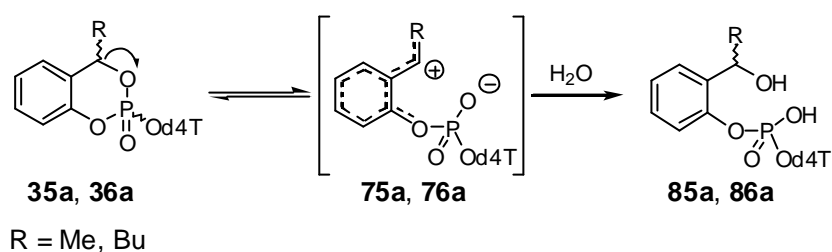


Abb. 102: Konkurrenzreaktion für die Alkyl-substituierten Derivate **35a** und **36a**

Die nach Benzyl-C-O-Bindungsbruch entstandenen Ionenpaare **75a** bzw. **76a** stehen im Gleichgewicht mit den jeweiligen Substraten **35a** bzw. **36a**. Die am Benzyl-C-Atom entstehende positive Ladung wird durch das Aryl-System und zusätzlich durch Hyperkonjugation mit dem Alkyl-Substituenten in Benzyl-Position stabilisiert (in Abb. 102 durch die gestrichelte Linie in **75a** bzw. **76a** angedeutet). In einer Folgereaktion werden die Ionenpaare durch Wasser zu "falschen Diestern" des Typs **85a** bzw. **86a** abgefangen.

Die Stabilisierung der Ladung am Benzyl-C-Atom durch die Alkyl-Substituenten in **35a** und **36a** durch Hyperkonjugation alleine reicht jedoch nicht aus, auch der Beitrag zur Stabilisierung durch das Aryl-System ist erforderlich. Dies wird insbesondere daran deutlich, dass durch zusätzliches Anbringen des 6-Chlor-Substituenten (Verbindungen **35d** und **36d**) der stabilisierende Effekt des Aromaten verringert wird und es als Folge nicht mehr zur Bildung der "falschen Diester" **85d** und **86d** kommen kann (vgl. Kap. 4.4.4.5, Kap. 4.5).

Wie wichtig aber gleichzeitig der zusätzliche stabilisierende Effekt der Alkyl-Gruppen ist, wird deutlich, wenn statt der Alkyl-Substituenten Chloralkyl-Substituenten in Benzyl-Position angebracht werden (Verbindungen **37-39**). Diese Substituenten sind

nicht mehr dazu in der Lage, eine positive Ladung am Benzyl-C-Atom zu stabilisieren. Dies hat zur Folge, dass die Bildung von "falschem Diester" weitestgehend unterbleibt. Für 7-MM-cycloSal-d4TMP **39** konnte die Entstehung von "falschem Diester" nicht mehr beobachtet werden (vgl. Kap. 4.4.4.4).

Einen vom in Abbildung 102 gezeigten Mechanismus abweichenden Verlauf nimmt die Bildung der "falschen Diester", sofern der Benzyl-Substituent zusätzlich eine C-H-acidifizierende Gruppe (7-ECM **33**, 7-MSM **34**, 7-CM **40**) trägt. Die nach Benzyl-C-O-Fragmentierung entstandenen Ionenpaare **73**, **74** bzw. **70** können neben der Reaktion mit einem Nucleophil (S_N1 -Produkte **83**, **84** bzw. **90**) alternativ auch eines der aciden Protonen eliminieren (E1-Produkte **83'**, **84'** bzw. **90'**; Abb. 103). Der Beitrag der Benzyl-Substituenten 7-ECM, 7-MSM und 7-CM zur Stabilisierung der Ionenpaare **73**, **74** bzw. **70** wird in Abbildung 103 durch die gestrichelte Linie in **73**, **74** bzw. **70** angedeutet. Er sollte allerdings für die Benzyl-Substituenten 7-ECM, 7-MSM und 7-CM kleiner sein als der Beitrag der Alkyl-Substituenten 7-Me bzw. 7-Bu (vgl. DFT-Studien: Kap. 4.5; vgl. geringerer Anteil der "falschen Diester" an den Hydrolyseprodukten: Kap. 4.4.4).

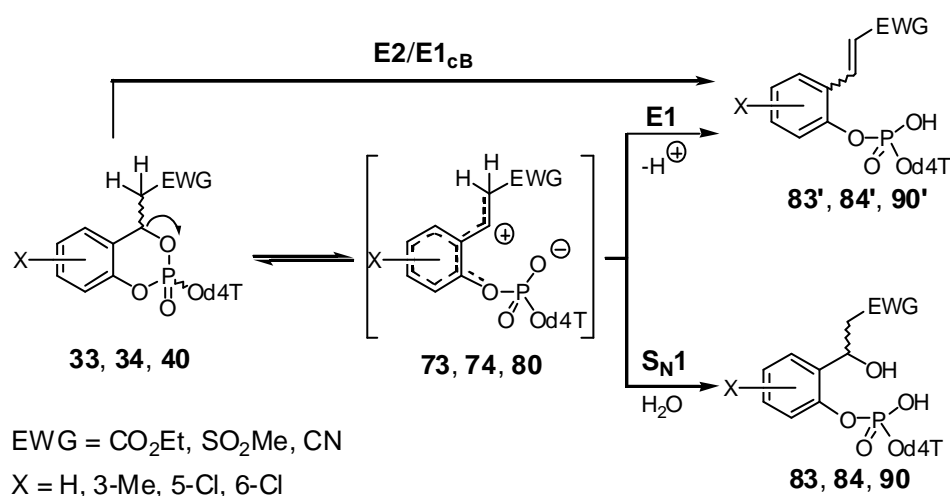


Abb. 103: Bildung der Konkurrenzprodukte bei der Hydrolyse von **33**, **34** und **40**

Im Gegensatz zu den in Benzyl-Position alkylierten Derivaten gelang es im Fall von 7-ECM-cycloSal-d4TMP **33a** nicht, die Entstehung der "falschen Diester" durch Anbringen des 6-Chlor-Substituenten in **33d** vollständig zu unterbinden (vgl. Kap. 4.4.4). Aus diesem Grunde wird für die Bildung der "falschen Diester" bei Anwesenheit C-H-acidifizierender Gruppen im Benzyl-Substituenten noch ein weiterer Mechanismus angenommen, der nicht mehr nur durch einen Benzyl-C-O-Bindungsbruch bestimmt

wird. In Frage kommen sowohl ein E2- wie auch ein E1_{cB}-Mechanismus. Beide Mechanismen erfordern die Eliminierung eines aciden Protons. Eine Spezies, in der der Benzyl-Kohlenstoff eine positive Ladung trägt, wird hingegen nicht mehr durchlaufen (vgl. Abb. 103, S. 132).

Neben den beschriebenen Substituenteneinflüssen auf die Benzyl-C-O-Fragmentierung wurden auch Einflüsse verschiedener Substitutionen auf die bei der Freisetzung des Nucleotids durchlaufene Reaktionssequenz (Abb. 104, S. 134) beobachtet:

- 1) Eine 3-Methyl-Gruppe am aromatischen System^[53] verlangsamt die Spaltung der Phenylphosphatester-Bindung im ersten Schritt der Hydrolyse, begünstigt aber die daran anschließende Spaltung des Benzylphosphatesters (vgl. Kap. 4.4.1 und Kap. 4.4.4.2).
- 2) Demgegenüber beschleunigen der 5-Chlor-Substituent^[53] bzw. auch der 6-Chlor-Substituent am Aromaten die Phenylphosphatester-Hydrolyse im ersten Schritt, verlangsamt aber die daran anschließende Spaltung des Benzylphosphatesters (vgl. Kap. 4.4.1, Kap. 4.4.4.2 und Kap. 4.4.4.5).
- 3) Der Benzyl-Substituent 7-TM (Verbindung **37**) verhindert selbst nach zusätzlicher Aktivierung durch Spaltung der Phenylphosphatester-Bindung im ersten Schritt die anschließende Spaltung der Benzyl-C-O-Bindung, so dass eine Freisetzung von d4TMP nicht nachgewiesen werden konnte. Auch bei der Hydrolyse von 7-DM-*cycloSal*-d4TMP **38** ist die Freisetzung von d4TMP im zweiten Reaktionsschritt stark verlangsamt ($t_{1/2} > 250$ h für den zweiten Reaktionsschritt). Dagegen konnte für 7-MM-*cycloSal*-d4TMP **39** die selektive Freisetzung von d4TMP nachgewiesen werden (vgl. Kap. 4.4.4.4).

In Abbildung 104 ist die Freisetzung von d4TMP aus den Benzyl-funktionalisierten in Form eines Reaktionsschemas wiedergegeben.

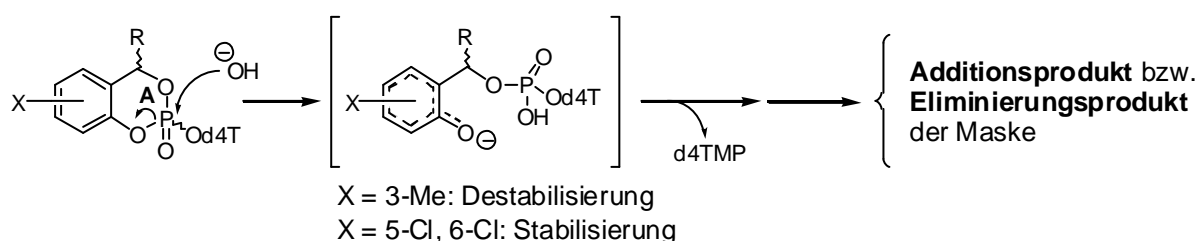


Abb. 104: Freisetzung von d4TMP aus Benzyl-funktionalisierten Pronucleotiden

Die nach der Spaltung am Phenyl-Sauerstoffatom auftretende negative Ladung wird im Aryl-Ring delokalisiert. Die Anwesenheit einer 3-Methyl-Gruppe am Aromaten begünstigt die anschließende Freisetzung von d4TMP (vgl. Kap. 4.4.4.2). Dagegen verringern die Aryl-Substituenten 5-Chlor und 6-Chlor die Elektronendichte im aromatischen System, die anschließende Folgereaktion zu d4TMP wird dadurch verlangsamt (vgl. Kap. 4.4.4.2 und 4.4.4.5). Als Abbauprodukte der Maske konnten bei Anwesenheit der C-H-acidifizierenden Gruppen 7-ECM, 7-MSM bzw. 7-CM in der Benzyl-Seitenkette die Eliminierungsprodukte **63'**, **64'** bzw. **70'** nachgewiesen werden. In den übrigen Fällen wurden dagegen nur die Salicylalkohole (Additionsprodukte) **65**, **66**, **68** und **69** erhalten (vgl. Kap. 4.4.2, 4.4.3, 4.4.4).

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Jan Balzarini am Rega Institut der Universität Leuven, Belgien wurden *in vitro* Zelltests mit allen im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Prodrugs durchgeführt (vgl. Kap. 4.9). Dabei wurden als Testsystem humane T-Lymphozyten (CEM/O) verwendet, die mit HIV-1 bzw. HIV-2 infiziert wurden. Die d4T-Prodrugs wurden zusätzlich auch in Thymidin-Kinase defizienten (CEM/TK⁻), HIV-2 infizierten Zellen auf ihre anti-HIV-Aktivität getestet. Die Untersuchungen ergaben für alle Benzyl-funktionalisierten *cycloSal*-NMPs – im Vergleich zu den für nicht Benzyl-substituierte 7-H-*cycloSal*-NMP's gemessenen Daten – leider nur mäßige Aktivitäten. Doch steht die erfolgreiche Beeinflussung des Hydrolyseverhaltens, d. h. die Verhinderung der Entstehung "falscher Diester", mit den gemessenen Aktivitäten in Thymidin-Kinase defizienten Zellen in gutem Einklang. Hauptursache für die dennoch nur mäßigen Aktivitäten sollten somit die im Vergleich zu entsprechenden Prototyp-Verbindungen zu geringen Halbwertszeiten sein.

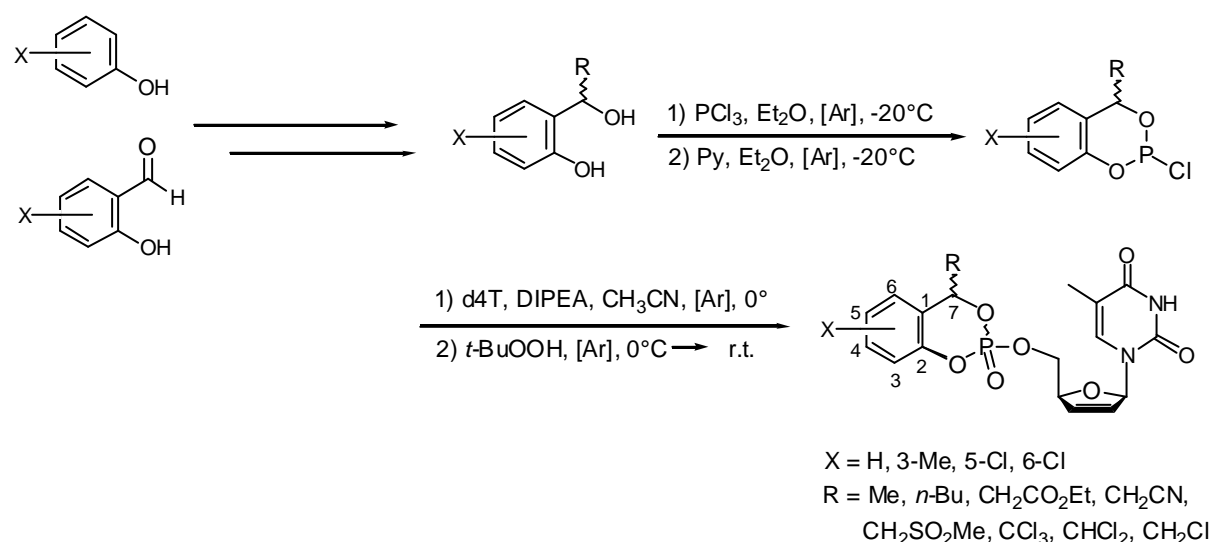
Aufgrund der in den Zelltests gemessenen Cytotoxizitäten, die sich – unabhängig von der Beschaffenheit des Abbauproduktes der *cycloSal*-Masken (Additionsprodukt vs. Eliminierungsprodukt) und dem damit verbundenen Abbaumechanismus des Chinonmethid-Intermediats (nucleophiler Abfang vs. Eliminierung eines acidifizierten Protons) – nur unwesentlich unterscheiden, erscheint es nicht länger angebracht, die Chinonmethid-Intermediate als Quelle für Cytotoxizität anzunehmen.

Summary

CycloSaligenyl-(cycloSal-) pronucleotides have been shown to deliver anti-HIV active nucleotides in cells *via* a pH-driven selective chemical hydrolysis^[54]. During hydrolysis most probably a quinone methide intermediate is formed that is trapped by water to yield a salicylic alcohol as the by-product.

Benzyl-functionalized *cycloSal*-d4TMPs as a new type of *cycloSal* pronucleotides have been developed to influence the hydrolysis pathway towards forming a styrene-type derivative as the by-product instead (see chapter 2.2).

The benzyl-functionalized prodrugs have been synthesized in a three-step synthesis each, starting either from salicylic aldehyde- or phenol-derivatives. First the salicylic alcohols were obtained either after aldol-type additions of appropriate nucleophiles to the salicylic aldehydes or after *ortho*-hydroxyalkylations of phenols. These alcohols then were used to prepare cyclic chlorophosphites by condensation reactions with trichlorophosphite. Once obtained the cyclic chlorophosphites were used as phosphitylating agents for d4T in the third step. The synthesis was completed by oxidation of the intermediately obtained phosphite triesters to the corresponding phosphotriesters with *tert*-butyl hydroperoxide (see chapters 4.1-4.3).



The prodrugs were tested for their anti-HIV activity and their hydrolysis half-lives were determined in phosphate buffer solution (see chapters 4.4.1 and 4.9). The formation of two different types of hydrolysis products was observed and could be rationalized on

the basis of two competing degradation pathways (see chapter 4.8). The relevant products were identified by their HPLC retention times, UV-spectra, ESI⁺-MS as well as ESI⁺-MS/MS spectrometry and ³¹P-NMR-spectroscopy (see chapters 4.4.2-4.4.4). The product ratio was determined by their corresponding ³¹P-NMR integrals at the end of hydrolysis (see chapter 4.4.4). The different product ratios could be correlated to the different benzyl substituents. Further support for that correlation was obtained by *ab initio* calculations with GAUSSIAN 98 (see chapter 4.5).