

Therapeutische Ansätze basieren teilweise auf direkten Eingriffen in den Metabolismus, daher müssen derartige Wirkstoffe oft als Monophosphate appliziert werden. Um die polaren, phosphorylierten Wirkstoffe in die Zelle zu schleusen, wird die Phosphateinheit mit lipophilen Alkoholen maskiert. Diese Phosphatester müssen intrazellulär wieder spaltbar sein. Derartig maskierte Wirkstoffe werden als Prodrugs bezeichnet.

Beim Bis-[AB]-konzept von S. FREEMAN und A. GLAZIER wird als Maske eine Bis-(Acyloxybenzyl)-einheit verwendet, deren Hydrolyse enzymatisch induziert wird.

Das *cycloSal*-Konzept nach C. MEIER basiert auf unterschiedlich stabilen Phenyl-, Benzyl- und Alkylphosphatestern. Somit gelingt es chemisch zwischen den einzelnen Phosphatesterbindungen zu diskriminieren und das Monophosphat in einer gekoppelten Hydrolyse freizusetzen.

Als Wirkstoffe wurden sowohl Analoga körpereigener Substanzen, wie sie die, in der HIV-Therapie angewendeten d4T-monophosphate darstellen, als auch geschützte Mannopyranosylmonophosphate, die zur Behandlung von CDG (Congenital Disorder of Glycosylation) erstrebenswert sind, untersucht.

Die Beobachtung, dass Substituenten in der Benzylposition von *cycloSal*-d4TMP deren Hydrolyseverhalten immens beeinflusste, initiierte die Darstelleng acyclischer Bis-(benzyl)-phosphat-Triester, deren Benzylposition durch Donor- und Akzeptor-Substituenten modifiziert wurde. Des weiteren wurden die Bis-[AB]-phosphat-Triester nach FREEMAN und GLAZIER synthetisiert sowie der *ortho*-Acetoxybenzylphosphat-Triester, der ein strukturelles Verbindungsglied zwischen den acyclischen Benzyl-phosphat-Triestern und den *cycloSal*-phosphat-Triestern darstellt. Die Synthese der Phosphat-Triester erfolgte nach der Phosphoramidit-Methode.

Die Hydrolysestabilität der Verbindungen wurde im Phosphatpuffer und in Zellextrakten bei pH 7.3 getestet und die Hydrolyseprodukte wurden durch <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie identifiziert. Die Bis(benzyl)-phosphat-Triester hydrolysieren unter chemischen Bedingungen nur bis zum Phosphatdiester. Die enzymatisch-gesteuerten Bis-[AB]-Verbindungen hydrolysieren bereits unter chemischen Bedingungen zum d4TMP. Die in humanen Zellextrakten bestimmten Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  der Bis(benzyl)-phosphat-Triester stimmen mit denen der chemischen Hydrolyse sehr gut überein, indessen verkürzen sich die Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  der Bis-[AB]-Verbindungen drastisch. Insgesamt erlauben die Hydrolysedaten den Schluß, daß eine S<sub>N</sub>P-Reaktion ausgeschlossen werden kann und dem Hydrolysemechanismus eine S<sub>N</sub>1-Reaktion zu Grunde liegt.

Die Daten der chemischen Hydrolysestudien genauso wie die der Zellextraktstudien stimmen sehr gut mit den Daten der antiviralen Tests überein. Lediglich die Bis-[AB]-phosphat-Triester weisen eine antivirale Aktivität in TK-defizienten CEM-Zellen auf.

Die Toxizitätsdaten unterstreichen die Fragwürdigkeit, die, in den untersuchten Prodrug-Systemen auftretenden Chinonmethide als potentielle Quelle der Cytotoxizität anzunehmen.

Die Prodrug-Konzepte von S.FREEMAN und C.MEIER wurden erstmalig auf Glycosylmonophosphate angewendet. Den therapeutischen Ansatz stellt die erbliche Stoffwechselkrankheit CDG (Congenital Disorder of Glycosylation) dar; bedingt durch einen genetischen Defekt steht Phosphomannomutase 2 (PMM 2) nicht zur Verfügung, wodurch die Umwandlung von Mannose-6-phosphat in Mannose-1-phosphat beeinträchtigt ist.

Um Einblicke in den Hydrolysemechanismus dieser neuen Klasse von „Kohlenhydrat-Prodrugs“ zu gewinnen, wurden sowohl die epimeren Glucose-Verbindungen der Mannose-1-phosphate dargestellt, als auch auf Grund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu den *cycloSal*-5'-Nucleosidmonophosphaten, die *cycloSal*-Mannose-6-phosphate. Die *cycloSal*-Hexosephosphate (*cycloSal*-H-phosphate) wurden durch die etablierte Methode zur Darstellung von *cycloSal*igenyl-Nucleosidmonophosphaten mittels *cycloSal*igenylchlorphosphit und anschließender Oxidation erhalten. Die Bis[AB]-Mannose-1-phosphate wurden nach der Phosphoramidit-Methode dargestellt.

Die HPLC-analytisch bestimmten Halbwertszeiten sowie die <sup>31</sup>P-NMR-spektroskopisch untersuchte Verteilung der Hydrolyseprodukte gestatteten Rückschlüsse auf den Hydrolysemechanismus. Bezüglich ihres Hydrolyseverhaltens sind die *cycloSal*-H-6-MP zwischen den *cycloSal*-H-1-MP und den *cycloSal*-NMP einzuordnen, wobei die Halbwertszeiten stärker denen der *cycloSal*-NMP, die Produktverteilung wiederum mehr denen der *cycloSal*-H-1-MP gleicht. Die Untersuchung des Hydrolysemechanismus der Epimere zeigt, dass es aufgrund des Nachgruppeneffekts bei der *manno*-Verbindung zu einer anchimeren Beschleunigung kommt.

Anhand einer ESI-MS/MS-Untersuchung konnten 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose und 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannose-1-phosphat als Hydrolyseprodukte identifiziert werden. Ebenso bewies das Massenspektrum eines zuvor mit <sup>18</sup>O-markiertem Wasser hydrolysierten *cycloSal*-H-1-MP, dass sowohl der Phenylester als auch die glykosidische Bindung bricht.

Darüber hinaus wurde die biologische Aktivität an PMM2-defizienten Fibroblasten *in vitro* getestet. Von allen getesteten Verbindungen zeigte 3-Methyl-*cycloSal*-2,3,4,6-tetraacetyl- $\alpha$ -D-mannopyranose-1-phosphate eine Totalkorrektur des Phänotyps.