

Darstellung und Charakterisierung von
Uracil- und Adeninnucleotid-Mimetika
als
selektive Ectonucleotidase-Inhibitoren

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Andreas Brunschweiler

aus Kiel

Bonn 2007

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Christa E. Müller
2. Referent: PD Dr. Daniela Gündisch

Tag der Promotion: 06.07.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online als PDF-Datei elektronisch publiziert.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2003 bis November 2006 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

Ich danke sehr herzlich Frau Prof. Dr. Christa E. Müller für die Schaffung eines stimulierenden wissenschaftlichen Umfelds, stete Unterstützung und viele fruchtbringende Diskussionen, durch die diese Arbeit gelingen konnte.

Gleichfalls möchte ich mich an dieser Stelle bei Frau PD Dr. Daniela Gündisch für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Für Manuela

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Ectonucleotidasen: Struktur, Funktion und Medizinische Chemie	9
2.1 Freisetzung und extrazelluläre Synthese von Nucleotiden	10
2.2 Extrazelluläre Hydrolyse von Nucleotiden	11
2.3 Ecto-Nucleotidpyrophosphatasen	11
2.4 Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen und Ecto-5'-Nucleotidase	13
2.4.1 Hydrolytische Eigenschaften der NTPDasen 1-3, 8 und der Ecto-5'-Nucleotidase	13
2.4.2 Interaktionen von E-NTPDasen, Ecto-5'-Nucleotidase, P1- und P2-Rezeptoren	14
2.4.3 Struktur der NTPDasen 1-3 und 8	17
2.4.4 Struktur der Ecto-5'-Nucleotidase	20
2.4.5 Physiologische Funktionen der E-NTPDasen und der Ecto-5'-Nucleotidase und therapeutisches Potential von Inhibitoren	22
2.5 Medizinische Chemie der E-NTPDasen und der Ecto-5'-Nucleotidase	33
2.5.1 E-NTPDase-Inhibitoren	34
2.5.2 Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitoren	44
2.5.3 Zusammenfassung und Bewertung	45
2.6 Ziele dieser Arbeit	46
3. Synthesen	48
3.1 Zielstruktur	49
3.2 Entwicklung und Umsetzung der Synthesestrategie	50
3.1.1 Schutzgruppen für die 2',3'-Positionen der Ribose	51
3.1.2 Derivatisierungsmöglichkeiten der Nucleosid-5'-Position	54
3.1.3 Design von Triphosphatmimetika	61
3.1.4 Synthese von Nucleosid-5'-Amiden	66
3.1.5 Abspaltung der Schutzgruppen	74
3.1.6 Darstellung von Nucleosid-5'-phosphoramidaten	82
3.3 Analytik der neu dargestellten Verbindungen	83
3.4 Zusammenfassung und Bewertung der Synthesestrategie	84

4. Aktivitäten der neu dargestellten Verbindungen in verschiedenen biologischen Testsystemen	89
4.1 Testung an Ecto-Nucleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen (E-NTPDasen)	89
4.2 Testung an der Ecto-5'-Nucleotidase	102
4.3 Testung an P2Y-Rezeptoren	105
4.4 Zusammenfassung und Vergleich mit Standardverbindungen	106
5. Zusammenfassung und Ausblick	113
6. Experimenteller Teil	117
6.1 Allgemeine Angaben	117
6.2 Einführung der Ribose-Schutzgruppen durch 2',3'-Acetalisierung und Oxidation der Nucleosid-5'-Position	120
6.3 Darstellung und Charakterisierung von ω -Aminocarbonsäureamiden als Di- und Triphosphatmimetika	129
6.4 Darstellung und Charakterisierung von Nucleosid-Carboxamiden	157
6.5 Spaltung von Carbonsäureestergruppen in der Nucleosid-5'-Seitenkette	202
6.6 Spaltung der (Bis-)Phosphonsäureestergruppe in der Nucleosid-5'-Seitenkette	211
6.7 Darstellung und Charakterisierung von Nucleosid-5'-phosphorsäureamidaten	223
6.8 Ectonucleotidase-Assays und Testung an P2Y-Rezeptoren	223
6.8.1 Kapillarelektrophorese-gestützter Assay zur Testung von E-NTPDase-Inhibitoren	227
6.8.2 Kapillarelektrophorese-gestützter Assay zur Testung von Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitoren	229
6.8.3 Radioligandbindungsassay am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor	229
6.8.4 Calcium-Assays an humanen P2Y _{2,4} -Rezeptoren und am Ratten-P2Y ₆ -Rezeptor	230
6.8.5 Tabellarische Darstellung der Testergebnisse an P2Y-Rezeptoren	231
7. Anhang	235
Verzeichnis der Tabellen	
Verzeichnis der Abbildungen	
Abkürzungsverzeichnis	

Literaturverzeichnis

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

Nucleotide wie ATP (1), ADP (2), UTP (3) und UDP (4) und das Nucleosid Adenosin (5) (Abbildung 1.1) sind wichtige physiologische Moleküle, die im Körper eine Vielzahl von Funktionen wahrnehmen.

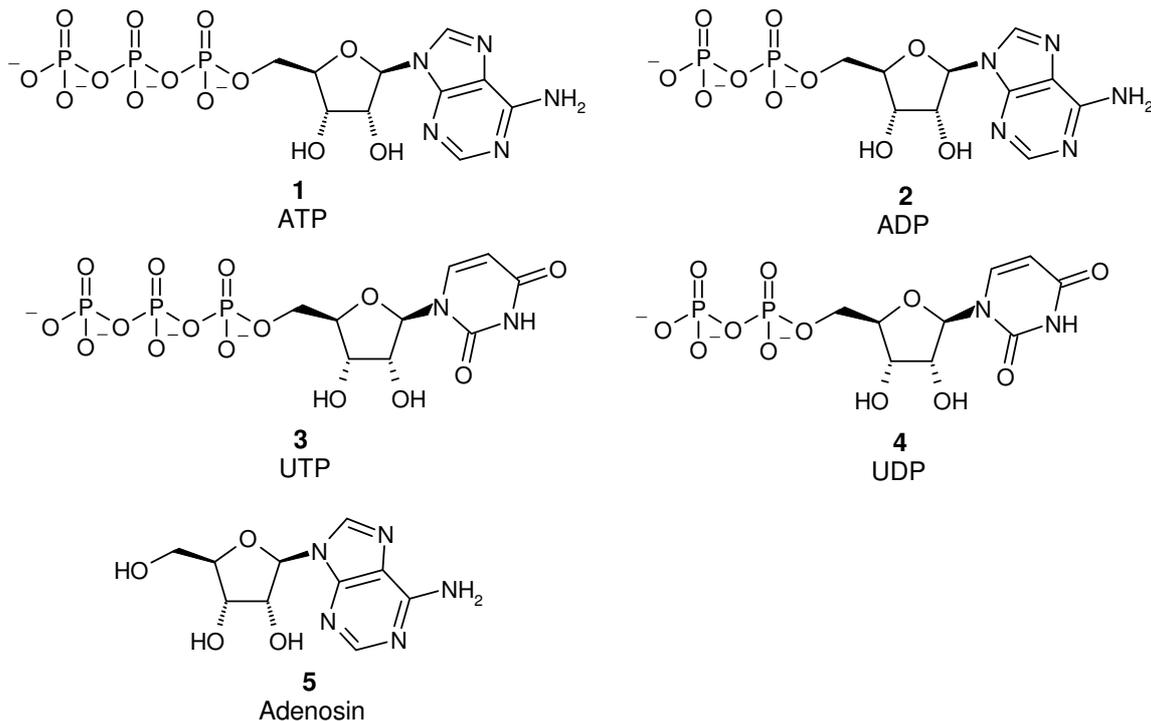


Abbildung 1.1: Nucleotide und das Nucleosid Adenosin

Sie können ubiquitär in signifikanten Konzentrationen im extrazellulären Raum nachgewiesen werden. Dort interagieren sie mit membranständigen, sog. purinergen Rezeptoren: P1-Rezeptoren, die von Adenosin aktiviert werden, und P2X- und P2Y-Rezeptoren, welche sich von Nucleotiden aktivieren lassen.¹⁻⁷ Extrazelluläre Nucleotide und Adenosin nehmen durch diese Rezeptoren vermittelt Einfluß auf viele physiologische und auch pathophysiologische Prozesse. Über das rein akademische Interesse an diesen Molekülen und ihren Wirkungen hinaus sind sie daher schon seit längerem in den Focus der medizinischen Chemie gerückt. Ein therapeutisches Prinzip auf der Grundlage eines purinergen Rezeptors konnte bereits auf dem Markt etabliert werden, einige weitere befinden sich in unterschiedlichen Phasen der klinischen Entwicklung.⁸⁻¹¹ Irreversible P2Y₁₂-Antagonisten wie *Clopidogrel* (6,

Abbildung 1.2) finden klinische Anwendung als Thrombozytenaggregationshemmer mit Milliardenumsätzen. *Clopidogrel* wurde allerdings ohne Kenntnis des Targets entwickelt, daß es den Thrombozyten-P2Y₁₂-Rezeptor irreversibel allosterisch hemmt, sind nachträgliche Erkenntnisse. Der P2Y₂-Agonist *Denufosol* (**7**, Abbildung 1.2) steht vor der Markteinführung zur symptomatischen Behandlung der Mukoviszidose.

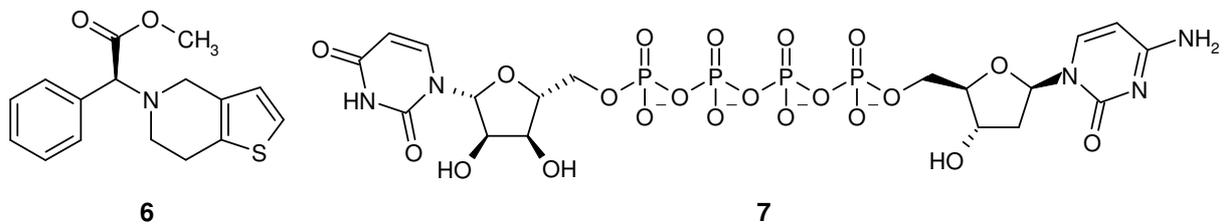


Abbildung 1.2: P2-Rezeptorliganden als Arzneistoffe

Nucleotide und Nucleoside unterliegen im extrazellulären Raum dem Metabolismus durch ein elaboriertes System, das aus verschiedenen Enzymen besteht.¹²⁻¹⁹ Diese Enzyme modulieren die purinerge Signaltransduktion und besitzen daher ebenfalls Potential als Arzneistoff-Targets.

Um zu dem heutigen Kenntnisstand zu gelangen, waren wissenschaftliche Anstrengungen vonnöten, deren Anfänge sich auf die zwanziger Jahre des letzten Jahrhunderts datieren lassen. Die Pionierarbeiten auf diesem Gebiet sind eng verbunden mit *Albert von Szent-Györgyi*, der 1937 den Nobelpreis für Medizin erhielt, *Alan Drury* und *Pamela Holton*. *Drury* und *Szent-Györgyi* beschrieben als erste bereits 1929, daß die Injektion von ATP und Adenosin in das Meerschweinchenherz negativ inotrop wirkt und die Koronarien dilatiert.²⁰ Eine Reihe weiterer Publikationen aus der Zeit zeigt, daß in der Frühzeit der modernen pharmakologischen Forschung - die bahnbrechenden Forschungen von *Dale* zum Acetylcholin liegen gerade einmal zwei Jahrzehnte zurück - großes Interesse an den Wirkungen von Nucleotiden and Nucleosiden auf Organe bestand.²¹⁻²⁴ Die in Tierversuchen gewonnenen Erkenntnisse konnten erfolgreich am Menschen bestätigt werden: *Honey et al.* stellten nach intravenöser Gabe von Adenosin einen massiven Blutdruckabfall fest.²⁵ Schließlich unternahm *Gillespie* vergleichende Untersuchungen der Wirkung von ATP, ITP, AMP, IMP, Adenosin, Adenin und Hypoxanthin auf Blutdruck, Herzschlagrate und Tonus der Intestinal- und Uterusmuskulatur von Kaninchen.²⁶ Er stellte fest, daß ATP den stärksten

kontrahierenden Effekt an der glatten Muskulatur besaß. Adenosin hingegen bewirkte die stärkste Blutdrucksenkung. Die Desaminierung der Nucleobase Adenin führte zu grundsätzlich schwächer wirksamen Verbindungen. Diese Publikation kann man mithin als erste Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen auf diesem Gebiet bezeichnen. Ein weiterer Meilenstein wurde 1954 gesetzt. *Pamela Holton* publizierte eine Arbeit im *Journal of Physiology*, in der sie Experimente mit Extrakten aus Wurzelzellen („dorsal root“) und Motorneuronen („ventral root“) von Pferden beschrieb.²⁷ Die Extrakte enthielten nachweislich Adenosin-Nucleotide, sie bewirkten im Kaninchenohr genauso wie zugesetztes ATP eine starke Vasodilatation. Im Vergleich zu den von *Drury* und *Szent-György* veröffentlichten Arbeiten ging Holton den einen entscheidenden Schritt weiter, daß sie Nucleotide im Nervengewebe und deren physiologische Wirkung spezieübergreifend nachwies. Explizit ist am Schluß ihrer Veröffentlichung zu lesen: „It is tentatively suggested that in certain sensory nerves, ATP is similarly liberated by the arrival of the action potential at the nerve ending, and that it acts either on a blood vessel (as in antidromic vasodilatation), or, in the central nervous system, as a synaptic transmitter.“

Geoffrey Burnstock faßte 1972 in einem „Purinergetic Nerves“ betitelten Übersichtsartikel den Stand der Forschung zu den Wirkungen von extrazellulärem ATP zusammen.⁷ Er postulierte in diesem Artikel die Existenz von Rezeptoren für ATP und prägte für Nerven, die sich durch ATP stimulieren ließen, den Begriff „purinerge Nerven“. Aus heutiger Sicht stellt dieser Artikel den entscheidenden Durchbruch dar. Die Existenz von extrazellulären Rezeptoren für Nucleotide ist heute allgemein anerkannt. In der Zeit der Veröffentlichung des Review-Artikels und noch lange danach war sie jedoch ein heißumstrittenes Thema auf Kongressen und in der Literatur. In einem Interview über die damalige Zeit beschrieb *Burnstock* eine Szene am Rande eines Kongresses, in der er befürchtete, von ihm regelrecht feindlich gesonnenen Wissenschaftlern körperlich angegriffen zu werden, „and being an ex-boxer, I got very worried because I had the sense that it was going to become physical.“²⁸

Kritiker führten das ubiquitäre Vorkommen von ATP, dessen Beteiligung an vielen intrazellulären metabolischen Vorgängen und nicht zuletzt die hohen intrazellulären Konzentrationen als Hauptargumente gegen eine zusätzliche Rolle als Neurotransmitter ins Feld.²⁹

Die Arbeitsgruppe von *Burnstock* selbst beschäftigte sich Anfang der 60er Jahre mit elektrophysiologischen Experimenten an der taenia coli – glatter Muskulatur am Dickdarm. Sie konnte diese Muskulatur auch nach Zusatz des Anticholinergicums Atropin und von Guanethidin, das Noradrenalin entspeichert, durch Stimulierung des Vagus zur Relaxation bringen.^{30,31} Ein dritter Transmitter, ein sog. nicht-adrenerger, nicht-cholinерger, kurz *NANC*-Transmitter, mußte für die Muskelrelaxation verantwortlich sein. ATP zeigte hier den stärksten Effekt. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, daß Nerven ³H-Adenosin aufnehmen, in ³H-ATP umwandeln und als solches freisetzen.⁷ Die Schlußfolgerung aus diesen Experimenten und weiteren Arbeiten, in dem Übersichtsartikel „Purinergeric Nerves“ dargelegt, mündete in ein Modell des purinergeren Nervs: ATP wird vesikulär gespeichert, auf einen Reiz hin freigesetzt, es findet auf dem Erfolgsorgan Rezeptoren, die Inaktivierung findet durch Dephosphorylierung statt und das entstandene Adenosin kann durch einen Reuptake-Mechanismus wieder in die präsynaptische Zelle gelangen (Abbildung 1.3).

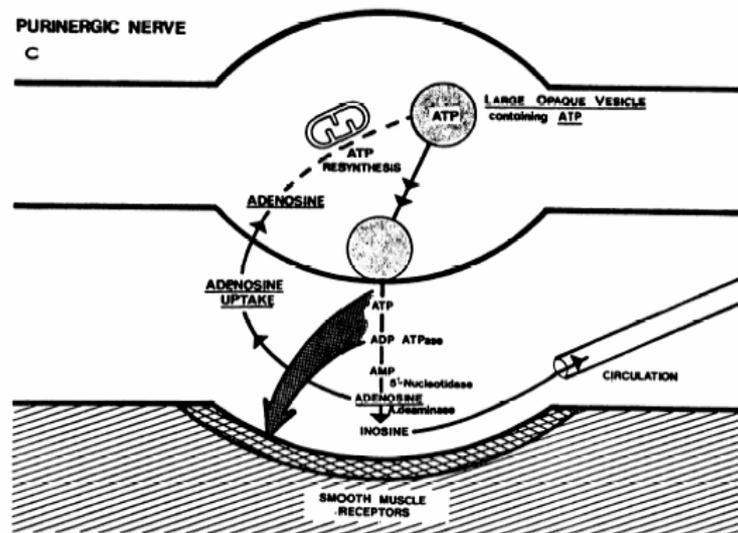


Abbildung 1.3: Modell der purinergeren Transmission⁷

Dieses frühe Modell zeigt schon die beiden Stellen, an denen in die purinerger Transmission eingegriffen werden kann: Rezeptoren und verschiedene dephosphorylierende Enzyme. Die Enzyme werden hier von Burnstock nur sehr grob unterschieden in solche, die Phosphorsäureanhydridbindungen spalten („ATPase“) und solche, die Nucleosid-5'-Phosphorsäureesterbindungen hydrolysieren („5'-

Nucleotidase“). Der heutige Kenntnisstand ist deutlich umfassender, er ist Thema des zweiten Kapitels.

Während um die Akzeptanz von Rezeptoren für Nucleotide zunächst massiv gekämpft werden mußte, fand die Rolle des Adenosins als ein physiologischer Neuromodulator mit eigenen Rezeptoren sehr viel schneller Anerkennung.³²

Nachdem evident wurde, daß ATP und Adenosin jeweils eigene Rezeptoren aktivieren, schlug Burnstock für diese eine neue Nomenklatur vor: P1-Rezeptoren für Adenosin und P2-Rezeptoren für ATP.^{33,34} Er stützte sich bei der Unterscheidung dieser Rezeptoren im wesentlichen auf vier Kriterien: die relative Potenz von ATP und Adenosin zu den verschiedenen Rezeptoren, den selektiven Antagonismus von Methylxanthinen gegen Adenosin-induzierte Wirkungen, die Modulierung von cAMP nur durch Adenosin und die Induktion der Prostaglandinsynthese ausschließlich durch ATP.³

Der nächste Schritt wurde 1985 getan, als es auf der Basis pharmakologischer Studien gelang, die Familie der P2-Rezeptoren in ionotrope P2X-Rezeptoren und metabotrope P2Y-Rezeptoren zu unterscheiden.³⁵ Diese Unterscheidung konnte nach der erfolgreichen Klonierung der ersten P2-Rezeptoren bestätigt werden.¹ In den folgenden zwei Jahrzehnten wurden insgesamt vier humane P1-Rezeptoren, sieben humane P2X-Rezeptoren und acht humane P2Y-Rezeptoren kloniert:^{5,36,10} die G-Protein-gekoppelten $A_{1,2A,2B,3}$ -Rezeptoren, die $Na^+/K^+/Ca^+$ -Ionenkanal-Rezeptoren P2X₁₋₇ und die G-Protein-gekoppelten P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}-Rezeptoren (Abbildung 1.4). Eine Erweiterung dieser Überfamilie könnten die P0 genannten Rezeptoren für Adenin (**8**, Abbildung 1.4) darstellen.^{37,38} Die Abbildung 1.4 repräsentiert den derzeitigen Stand des Wissens um diese Rezeptorfamilien und ihre physiologischen Agonisten. Während P2X-Rezeptoren durch ATP aktiviert werden, sind für die P2Y-Rezeptoren mehrere endogene Agonisten beschrieben.³⁶ ATP ist ein Agonist an P2Y₂- und P2Y₁₁-Rezeptoren, ADP an P2Y₁-, P2Y₁₂- und P2Y₁₃-Rezeptoren. Pyrimidinerge Rezeptoren stellen die durch UTP aktivierten P2Y₂ und P2Y₄-Rezeptoren, der UDP-aktivierte P2Y₆-Rezeptor und der Rezeptor für UDP-Glucose (**9**) P2Y₁₄ dar. Zu diesen P2Y-Agonisten gesellt sich eine wachsende Zahl von sowohl physiologisch vorkommenden als auch synthetisch dargestellten (Abbildung 1.2) metabolisch stabileren Dinucleotiden.³⁹⁻⁴¹ Dinucleotide bestehen aus zwei gleichen oder verschiedenen Nucleosiden, die an ihrer 5'-Position über eine Phosphatkette unterschiedlicher Länge miteinander verbunden sind. Up₄A wurde als

EDCF (Endothelium-derived constrictive factor) beschrieben.⁴² In Abbildung 1.4 ist beispielhaft das Dinucleotid Ap₄A (**10**) dargestellt.

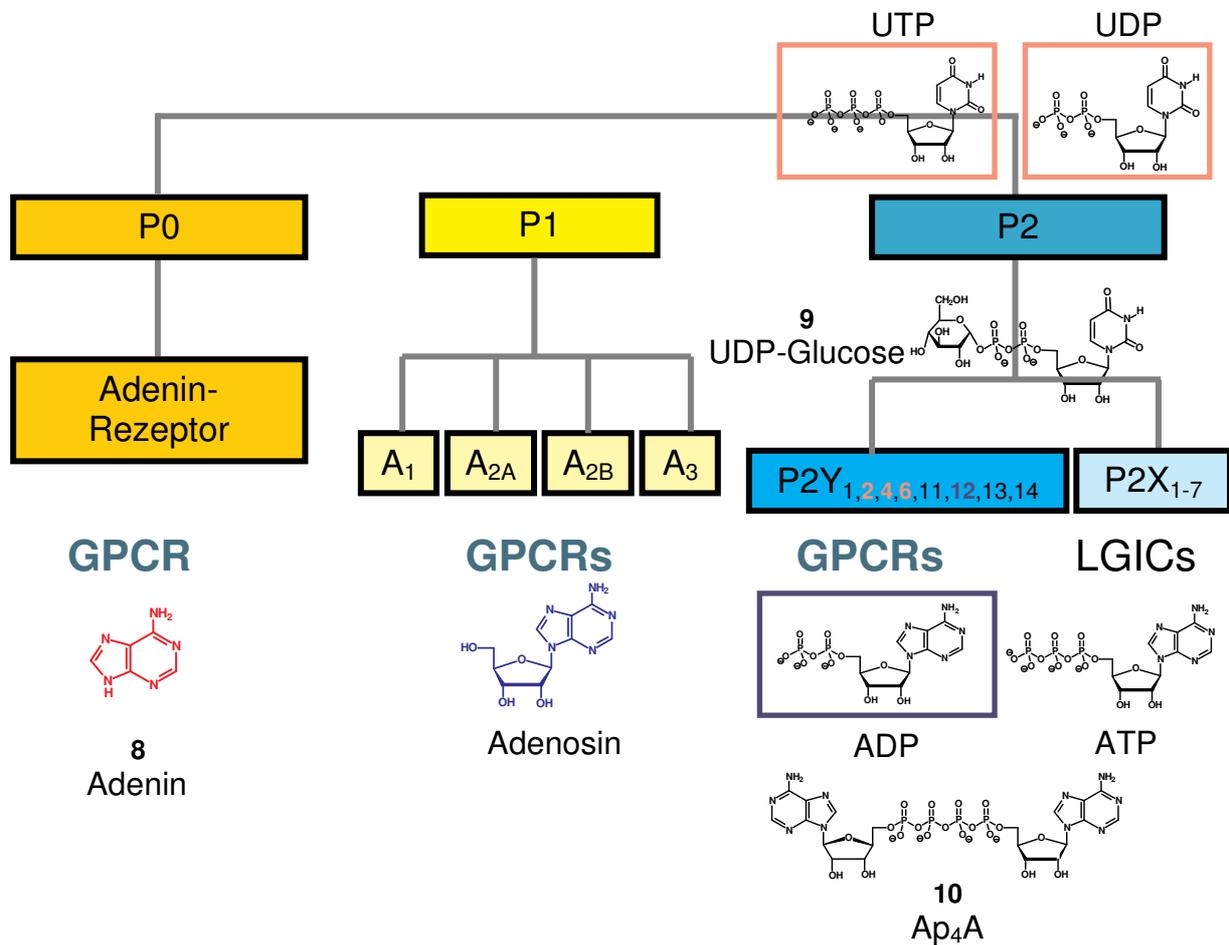


Abbildung 1.4: Purinerge Rezeptoren und ihre physiologischen Agonisten

Neben dem anfänglichen Widerstand, der dem Konzept von der purinergen Transmission entgegenschlug, wurden auch Irrwege beschritten. So erwiesen sich einige zunächst als P2-Rezeptoren bezeichnete Rezeptoren nicht als Nucleotid-Rezeptoren: Der p2y7-Rezeptor beispielsweise ist ein Leukotrien B₄-Rezeptor, der p2y9-Rezeptor gehört zu den Lysophosphatidsäure-Rezeptoren.^{43,44} Der den P2Y-Rezeptoren verwandte *orphan-receptor* GPR80 wurde von *Inbe et al.* P2Y₁₅ genannt, da die Autoren zunächst annahmen, daß er von AMP und Adenosin aktiviert wird.⁴⁵ Mittlererweile hat er sich als Rezeptor für α -Ketoglutarat erwiesen.⁴⁶ Auch wurde zeitweise irrtümlich eine P₃ genannte Familie von Rezeptoren für ATP und Adenosin postuliert.³

Die pharmakologische Charakterisierung der P2-Rezeptoren ist dadurch erschwert, daß:

- kommerziell erhältliche Nucleotide Verunreinigungen aufweisen können,
- Zellen durch mechanischen Streß, wie er bei der Arbeit mit Kulturen entsteht, Nucleotide freisetzen können,
- Nucleotide der schnellen enzymatischen Interkonversion durch Ectokinasen und dem Abbau durch Ectonucleotidasen unterliegen.⁴⁷

Trotz dieser Probleme hat man mittlererweile ein recht detailliertes Bild von der physiologischen Bedeutung der P2-Rezeptorfamilie. Möglicherweise eröffnen einige Rezeptorsubtypen neue Therapieoptionen (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten für P2-Rezeptorliganden

Rezeptor	Therapeutisches Potential	
	Agonist	Antagonist
P2Y ₁	Neuroprotektion ⁴⁸	Thrombocytenaggregation; ⁴⁹ Schmerz; ⁵⁰ Osteoporose ⁵¹
P2Y ₂	Neuroprotektion; ⁵² Glaukom; ⁵³ Tumore; ⁵⁴⁻⁵⁶ Immunstimulierung; ⁵⁷ Prinzmetal-Angina; ⁵⁸ Gallensekretion; ⁵⁹ Mukoviszidose; ⁶⁰ Dry Eye Disease ⁸	Arteriosklerose; ⁶¹⁻⁶³ Inhibition der Chemotaxis; ⁶⁴ Bluthochdruck; ⁶⁵ Polycystische Nierenerkrankung ⁶⁶
P2Y ₄	Tumore ⁵⁵	
P2Y ₆	Mukoviszidose ⁶⁰	Entzündliche Darmerkrankungen; ³⁶ Osteoporose ⁵¹
P2Y ₁₁		Inhibition der Chemotaxis ⁶⁴
P2Y ₁₂		Thrombocytenaggregation ⁶⁷
P2X ₁		Kontrazeptivum; ⁶⁸ Vasospasmus ⁵
P2X ₂		Epilepsie; ⁶⁹ Neuroprotection ⁷⁰
P2X ₃		Chronischer Schmerz; ⁷¹ Reizdarmsyndrom; ⁷² Dranginkontinenz ⁷³
P2X ₄		Epilepsie; ⁶⁹ Neuropathischer Schmerz; ^{6,74} Bluthochdruck
P2X ₆		Epilepsie ⁶⁹
P2X ₇	Bakterielle Infektionen ^{75,76}	Neurodegenerative Erkrankungen; ⁷⁷ Entzündungen, Schmerz ⁷⁸

Für einzelne P2-Rezeptoren sind suptypselektive Liganden in der Literatur beschrieben.^{8,36,47,79-83} Allerdings sind viele unter ihnen metabolisch instabil und

scheinen peroral nicht bioverfügbar zu sein. Weitere Anstrengungen sind daher notwendig, um das therapeutische Potential der vollen Bandbreite der P2-Rezeptoren untersuchen zu können.

Neben der direkten P2- oder P1-Rezeptorblockade oder -stimulierung gewinnt immer mehr der Eingriff in die indirekte Modulation der purinergen Rezeptoren z.B. durch Hemmung von Ectonucleotidasen an Interesse. Auch hier befindet sich die medizinische Chemie in einem sehr frühen Stadium der Wirkstoffsuche.

2. Ectonucleotidasen: Struktur, Funktion und Medizinische Chemie

Nucleoside und Nucleotide befinden sich im extrazellulären Raum in einem Konzentrationsgleichgewicht, das wesentlich durch Freisetzung, Metabolisierung durch Ectokinase, Ectonucleotidasen und Adenosin-Desaminase sowie Adenosin-Reuptake aufrechterhalten wird (Abb. 2.1). Sie entfalten dort physiologische Wirkungen über P1- und P2-Rezeptoren. Durch verschiedenartige Ereignisse, u. a. durch Zelltod, können die extrazellulären Konzentrationen der Nucleotide und Nucleoside potentiell pathophysiologische Werte erreichen. Das in Abbildung 2.1 skizzierte komplexe Zusammenspiel der Nucleotide und Nucleoside, ihrer Rezeptoren und ihrer extrazellulären metabolisierenden Enzyme ist Thema dieses Kapitels.

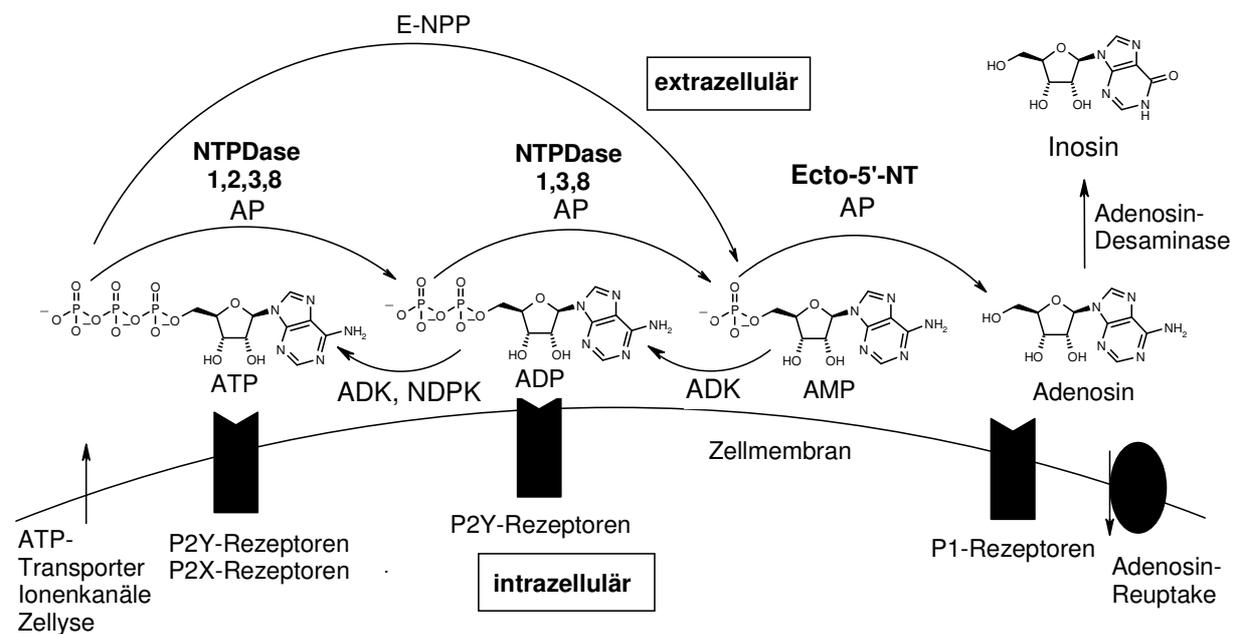


Abbildung 2.1: Extrazellulärer Metabolismus von ATP

(ADK: Adenylatkinase; AP: Alkalische Phosphatase; Ecto-5'-NT: Ecto-5'-Nucleotidase; E-NPP: Ecto-Nucleotidpyrophosphatase; NDPK: Nucleosiddiphosphokinase; NTPDase: Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolase)

Der Schwerpunkt liegt auf den membranständigen **Ectonucleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen 1, 2, 3, 8 (NTPDase1,2,3,8)** und der **Ecto-5'-Nucleotidase (Ecto-5'-NT)**. Ihr Aufbau, ihre katalytischen Eigenschaften, ihr Zusammenspiel mit

P1- und P2-Rezeptoren, ihre (patho)physiologische Bedeutung und das sich daraus ergebende therapeutische Potential werden beschrieben. Die Nomenklatur der beteiligten Enzyme sei noch erläutert: Mit dem Terminus Ectonucleotidasen sollen diejenigen Ectoenzyme, die bevorzugt Phosphoresterbindungen in Nucleotiden spalten, bezeichnet werden. Man spricht von E-NTPDasen, E-NPPs einzelne Isoenzyme werden z.B. NTPDase1 oder NPP1 usw. genannt.¹⁵ Gemeint sind im folgenden, wenn nicht explizit anders angegeben, immer die humanen E-NTPDasen, E-NPPs und Ecto-5'-Nucleotidase.

2.1 Freisetzung und extrazelluläre Synthese von Nucleotiden

Nucleotide wie ATP sind kleine, ionische, sehr hydrophile Biomoleküle. Sie werden deswegen kaum in nennenswertem Umfang intakte Zellmembranen durch passive Diffusion passieren. ATP, ADP, UTP und UDP können aber in signifikanten Konzentrationen im extrazellulären Raum nachgewiesen werden.^{84,85} In humanem Plasma wurde eine ATP-Konzentration von 28 nM gemessen.⁸⁵ Es stellt sich also die Frage, durch welche Mechanismen Nucleotide aus dem Cytosol dorthin befördert werden. Durch Zellyse werden nach Verletzungen, bei entzündlichen Prozessen oder bei der Apoptose der gesamte Zellinhalt, damit auch Nucleotide, freigesetzt. Beispielsweise wurden in früheren Publikationen Plasmakonzentrationen von ATP bis zu 1,2 µM angegeben.⁸⁶ Solche hohen Werte lassen sich auf Hämolyse bei der Blutentnahme zurückführen.⁸⁵ In der Nähe von Zellwänden intakter Zellkulturen wurde ATP in Konzentrationen von 1-25 µM mit einem empfindlichen Luciferase-Assay gemessen, UTP wurde in nanomolaren Konzentrationen nachgewiesen.^{2,87,88} Dies vergleicht sich mit einer vesikulären ATP-Konzentration von 150 mM in der synaptischen Endplatte.⁸⁸ Ectokinasen wie die Ecto-Adenylatkinase (ADK) und die Nucleosiddiphosphokinase (NDPK) können verschiedene Interphosphorylierungen von Adeninnucleotiden, Nucleosidtri- (NTP) und -diphosphaten (NDP) durchführen (Abbildung 2.1): $2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$ (ADK), $\text{NTP} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{NDP} + \text{ATP}$ (NDPK). Sie tragen je nach Expressionsmuster beispielsweise im Pankreas, in der Lunge, in Keratinozyten, in Osteoblasten, in Hepatocyten, in Gefäßen und in Krebszelllinien zur Synthese von Nucleotiden im extrazellulären Raum bei.^{2,89-94} Viele Zelltypen können cytosolisches ATP und UTP basal und auf einen Reiz hin sekretieren.^{2,88}

Lungenepithel, Gefäßendothel und glatte Muskulatur beantworten Scherkräfte, Druckschwankungen und osmotische Reize mit der Freisetzung von ATP und UTP.⁹⁵⁻⁹⁷ Blutzellen wie Erythrozyten und Thrombozyten setzen ATP und UTP unter hypoxischen Bedingungen bzw. nach Aktivierung frei.⁹⁸⁻¹⁰⁰ An der neuronalen Endplatte dient ATP als Co-Transmitter von Noradrenalin oder Acetylcholin nach Depolarisation.⁸⁴ Die Mechanismen der Freisetzung sind noch nicht abschließend aufgeklärt. Neben der vesikulären Freisetzung an der neuronalen Endplatte werden vor allem Connexine, ABC-Transporterproteine (ATP Binding Cassette Proteins) und Anionenkanäle diskutiert.^{84,95,101}

2.2 Extrazelluläre Hydrolyse von Nucleotiden

Nucleotide unterliegen im extrazellulären Raum nur zu einem geringen Teil der spontanen, chemischen Hydrolyse. Vor allem werden sie durch verschiedene membranständige oder lösliche Ectohydrolasen abgebaut (Abbildung 2.1). Zu diesen gehören unspezifische Phosphatasen wie die Familie der alkalischen Phosphatasen (AP), vor allem aber Enzymfamilien, deren Mitglieder evolutionär den Nucleotiden gegenüber Substratspezifität entwickelt haben: Ecto-Nucleotidpyrophosphatasen (E-NPPs), Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen (E-NTPDasen) und die Ecto-5'-Nucleotidase (Ecto-5'-NT).^{12,14-18}

2.3 Ecto-Nucleotidpyrophosphatasen

Die Familie der Ecto-Nucleotidpyrophosphatasen besteht aus sieben Isoenzymen: NPP1-7.¹⁷ Sie zeichnet sich durch eine breite Substratspezifität aus. Einfluß auf die extrazelluläre Nucleotidkonzentration nehmen die membranständigen NPP1 und 3 und die lösliche NPP2. Sie hydrolysieren bevorzugt Phosphoranhydridbindungen der Nucleosidtriphosphate, Dinucleosidoligophosphate und UDP-Glucose (Abbildung 2.2).^{16,102} Nucleosidtriphosphate wie ATP und UTP werden unter Freisetzung von Pyrophosphat (PP_i) zu den entsprechenden Monophosphaten AMP (**11**) und UMP (**12**) abgebaut. UDP-Glucose und die Dinucleosidtetraphosphate werden ebenfalls in der Weise gespalten, daß ein Nucleosidmonophosphat entsteht. Gerade die

Fähigkeit zur Hydrolyse von Dinucleotiden soll hier hervorgehoben werden, andere Ectonucleotidasen scheinen diese Fähigkeit nicht zu besitzen.¹⁰² NPP6, 7 und auch NPP2 hydrolysieren Phosphodiester in Lysophospholipiden.¹⁰³ NPP2 besitzt also Affinität sowohl zu Nucleotiden als auch zu Lysophospholipiden. Vor diesem Hintergrund soll Erwähnung finden, daß auch der CysLT1-Rezeptor duale Affinität zu Nucleotiden und sauren lipidartigen Strukturen aufweist. Er wird sowohl vom Cysteinyl-Leukotrien LTC₄ als auch von UDP aktiviert.¹⁰⁴ Die NPP4 und 5 sind bislang noch nicht funktionell charakterisiert.¹⁷

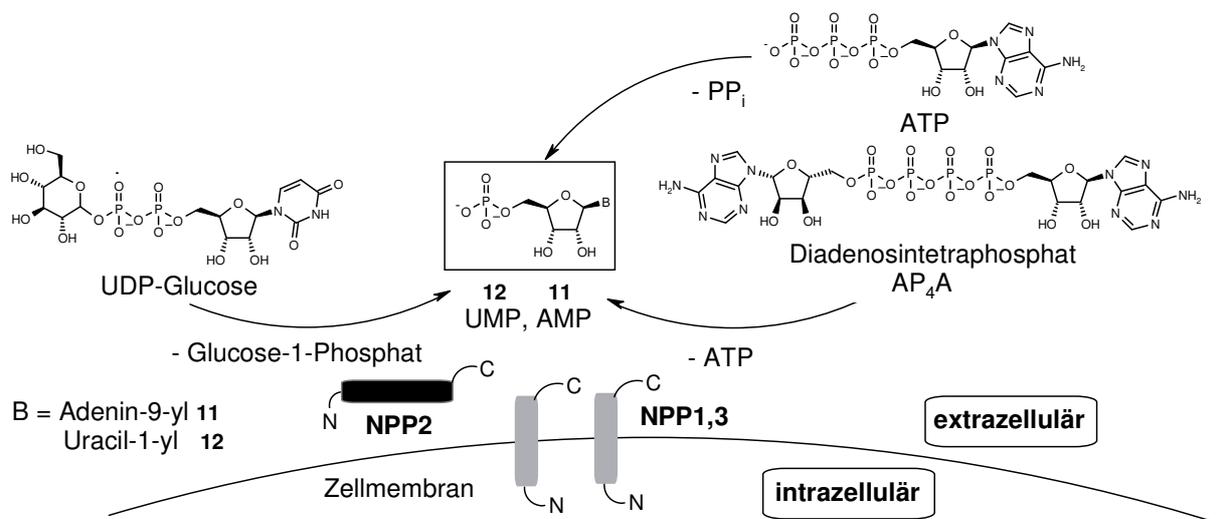


Abbildung 2.2: Substrate für NPP1-3

NPP1-3 können ubiquitär nachgewiesen werden. Sie tragen beispielsweise in unterschiedlichen Expressionsmustern auf der apikalen Seite von Epithelien bzw. Endothelien in Lunge, Leber, Darm zur Hydrolyse von Nucleotiden und Dinucleotiden bei.^{105,106}

Die NPP2 wird von Oligodendrocyten exprimiert. Ihr wird eine Rolle bei der Myelinisierung zugeschrieben.¹⁰⁷ E-NPPs scheinen auch bei einigen Krankheitszuständen beteiligt zu sein. In der cerebrospinalen Flüssigkeit von Multiple-Sklerose-Patienten konnte die NPP2 im Gegensatz zu Gesunden nachgewiesen werden.¹⁰⁸ Die bekannte C6-Rattengliom-Zelllinie exprimiert die NPP1. Diese wird unter physiologischen Bedingungen in Glia-Zellen nicht gefunden.^{109,110} Andere Krebszelllinien sekretieren die NPP2. Sie soll zum Tumorwachstum beitragen können, indem sie die proliferationsfördernde Lysophosphatidsäure (LPA) aus Lysophosphatidylcholin freisetzt.¹⁷ E-NPPs stellen möglicherweise ein interessantes Arzneistofftarget dar.

2.4 Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen und Ecto-5'-Nucleotidase

Zu den Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen (E-NTPDasen) gehören die zellmembranständigen NTPDasen 1-3 und 8 (Tabelle 2.1), die löslichen, sekretierten NTPDasen 5, 6 und die intrazellulär vorkommenden NTPDasen 4 und 7.^{15,19,111} Die Ecto-5'-Nucleotidase ist strukturell deutlich von den E-NTPDasen zu unterscheiden, bildet aber insbesondere mit der NTPDase1 eine funktionelle Einheit zur Generierung von Adenosin aus ATP.^{14,18}

Tabelle 2.1 Nomenklatur der membranständigen E-NTPDasen und Ecto-5'-Nucleotidase^{14,15}

Enzym	Weitere Bezeichnungen	Genbezeichnung	Genbank-zugangsnummer
NTPDase1	CD39, ATPDase, Ecto-Apyrase	<i>ENTPD1</i>	U87967
NTPDase2	CD39L1, Ecto-ATPase	<i>ENTPD2</i>	AF144748
NTPDase3	CD39L3, HB6	<i>ENTPD3</i>	AF034840
NTPDase8	hATPDase	<i>ENTPD8</i>	AY430414
Ecto-5'-NT	CD73, Ecto-5'-Nucleotidase	<i>NT5E</i>	X55740

2.4.1 Hydrolytische Eigenschaften der NTPDasen 1-3, 8 und der Ecto-5'-NT

E-NTPDase-Isoenzyme weisen unterschiedliche Substratspezifitäten auf.¹¹² Uracil-Nucleotide werden meist mit niedrigerer Rate umgesetzt als die entsprechenden Adenin-Nucleotide. NTPDase1,3,8 können sowohl ATP als auch UTP sequentiell über die Diphosphate zu den entsprechenden Monophosphaten hydrolysieren (Tabelle 2.2, Abbildung 2.3). Die NTPDase1 hydrolysiert Nucleosidtriphosphate (NTPs) etwa im gleichen Ausmaß wie Nucleosiddiphosphate (NDPs). Die NTPDase2

hingegen ist eine Nucleosidtriphosphatase. Sie wurde deshalb früher auch Ecto-ATPase genannt.

Tabelle 2.2: Katalytische Eigenschaften der E-NTPDasen¹¹²

Isoenzym	ATP	ADP	ATP/ADP	UTP	UDP	UTP/UDP
	K_m (μM) ^a			K_m (μM) ^a		
NTPDase1	17 ± 1	22 ± 1	1.8	47 ± 4	135 ± 10	1.7
NTPDase2	70 ± 2	n.d. ^b	7.2	393 ± 30	n.d. ^b	9.3
NTPDase3	75 ± 10	31 ± 1	4.3	58 ± 6	67 ± 3	6.2
NTPDase8	46 ± 5	256 ± 20	2.2	124 ± 10	1780 ± 140	4.8

^a Werte mit rekombinanten humanen Enzymen aus transfizierten COS-7-Zellen bestimmt

^b nicht bestimmt

Für die NTPDase2 sind mindestens zwei verschiedene Spleißvarianten mit katalytischen Eigenschaften, die sich leicht unterscheiden, beschrieben.¹¹³ Die katalytischen Eigenschaften der NTPDase3 und 8 liegen zwischen denen der NTPDase1 und 2. Das von den NTPDasen 1, 3 und 8 zur Verfügung gestellte AMP und UMP wird durch die Ecto-5'-NT (K_m [AMP] = 1-50 μM) weiter zu Adenosin bzw. Uridin hydrolysiert.¹⁴ Nach neueren Untersuchungen liegt der K_m -Wert der Ecto-5'-NT eher zwischen 20 und 40 μM .¹¹⁴ Das Expressionsmuster an Ectonucleotidasen in einem Organ nimmt also entscheidenden Einfluß auf das Gleichgewicht, in dem die Nucleotide und Nucleoside extrazellulär vorliegen.

2.4.2 Interaktionen von E-NTPDasen, Ecto-5'-Nucleotidase, P1- und P2-Rezeptoren

Die NTPDasen 1, 3 und 8 hydrolysieren die physiologischen P2-Rezeptoragonisten ATP, ADP, UTP und UDP zu AMP bzw. UMP (Abbildungen 2.1, 2.3).¹¹² Sie beenden damit das P2-Rezeptorsignal und stellen der Ecto-5'-Nucleotidase AMP und UMP als Substrate zur Verfügung.¹¹⁵⁻¹¹⁸ Durch die Ecto-5'-Nucleotidase wird AMP weiter zum P1-Agonisten Adenosin, UMP zu Uridin (**13**) dephosphoryliert. Adenosin kann über Nucleosid-Transporter wieder in die Zelle aufgenommen werden. Somit stellt die

konzertierte Aktivität von E-NTPDasen und Ecto-5'-NT einen *Salvage-Pathway* für Nucleoside dar.

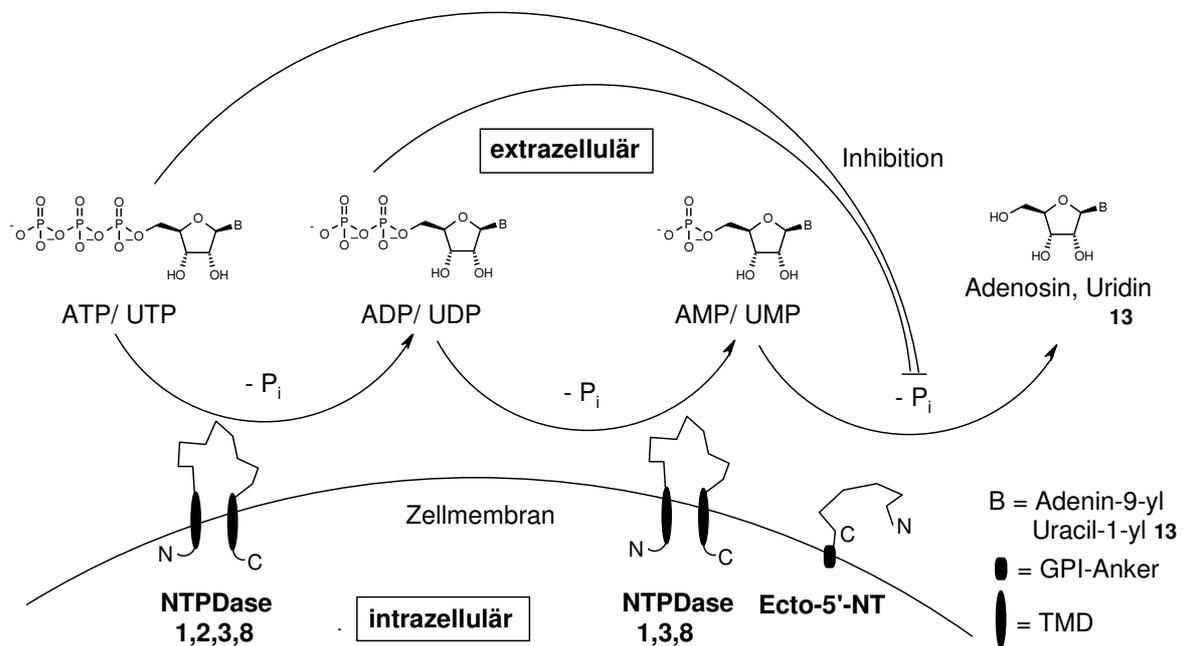


Abbildung 2.3: Durch E-NTPDasen und Ecto-5'-Nucleotidase bewirkte Dephosphorylierungskaskade (TMD: Transmembrandomäne; GPI: Glycosylphosphatidylinositol)

Die NTPDase2 dagegen hydrolysiert nur ATP und UTP. In Geweben, die hauptsächlich diese Ectonucleotidase exprimieren, kann somit eine erhöhte ADP- und UDP-Konzentration zu beobachten sein. Diese Nucleotide wirken als Agonisten an P2Y_{1,12,13}-(ADP)-Rezeptoren und P2Y₆-(UDP)-Rezeptoren.³⁶ Darüber hinaus inhibiert ADP ebenso wie ATP die Ecto-5'-Nucleotidase.¹⁴ Daneben üben E-NTPDasen noch weitere, diskretere Funktionen auf P2-Rezeptoren aus. Manche P2-Rezeptor-Subtypen neigen zur schnellen Desensibilisierung.³⁶ *Cauwenberghs et al.* untersuchten die Thrombozyten-P2-Rezeptoren P2X₁, P2Y₁ und P2Y₁₂.¹¹⁹ Durch diese Rezeptoren aktivieren ATP (P2X₁) und ADP (P2Y_{1,12}) die Blutplättchen. Die Autoren wiesen nach, daß die Rezeptoren funktionsfähig blieben, wenn die Thrombozyten in der Gegenwart von Leukozyten gelagert wurden. In Plasma isoliert aufbewahrte Thrombozyten hingegen konnten nicht durch Zusatz von ATP oder ADP aktiviert werden. Die Autoren begründeten ihre Beobachtungen damit, daß Leukozyten Ectonucleotidasen besitzen, die die Desensibilisierung insbesondere des P2Y₁- und P2X₁-Rezeptors durch Hydrolyse der im Plasma befindlichen Nucleotide verhindern.

Alvarado-Castillo et al. untersuchten die Interaktionen der NTPDase1 und 2 mit dem P2Y₁-Rezeptor.¹¹⁸ Die NTPDase1 hydrolysiert den physiologischen P2Y₁-Agonisten ADP, die NTPDase2 bewirkt eine Anreicherung desselben (Abbildung 2.4).

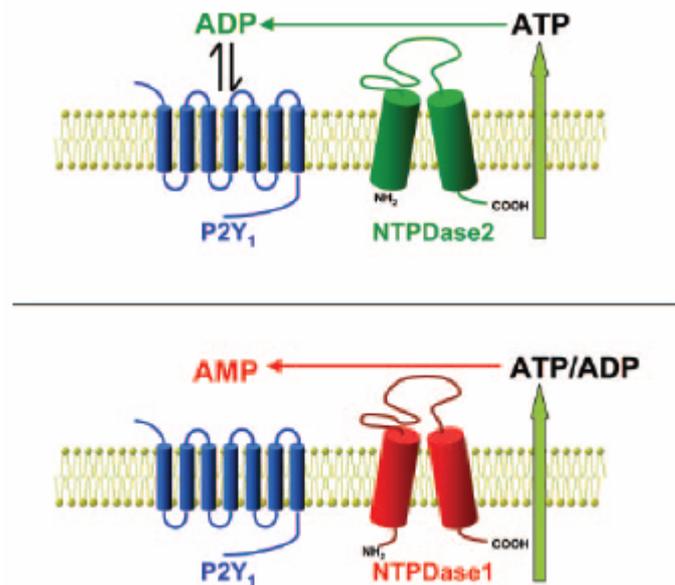


Abbildung 2.4: Interaktion der NTPDase1 und 2 mit dem P2Y₁-Rezeptor¹¹⁸

Die Autoren co-exprimierten den Rezeptor und ein Isoenzym in der gleichen Zelle. Desweiteren co-kultivierten sie zwei Zelllinien, von denen die eine den Rezeptor und die andere ein Isoenzym exprimierte. Als Vergleich dienten isoliert kultivierte P2Y₁-Rezeptor-exprimierende Zellen. Ein basaler Rezeptortonus, gemessen als [³H]Inositoltrisphosphat-Akkumulation, war in P2Y₁-exprimierenden Zellen zu verzeichnen. Dieser konnte durch den P2Y₁-Antagonisten *MRS2179* gesenkt werden. In Co-Kulturen von P2Y₁-Rezeptor-exprimierenden Zellen und NTPDase2-exprimierenden (ADP-generierenden) Zellen wiesen erstere eine deutlich erhöhte [³H]Inositoltrisphosphatakkumulation auf. Diese war in den Co-Kulturen mit NTPDase1-exprimierenden, also ADP-hydrolysierenden Zellen gesenkt. Zwischen co-kultivierten Zellen und co-exprimierenden Zellen bestand kein Unterschied. In Zellen, die sowohl P2Y₁-Rezeptor als auch die NTPDase1 exprimierten, wurde der Rezeptor fünffach überexprimiert im Vergleich zu NTPDase2-co-exprimierenden Zellen. Der EC₅₀-Wert des enzymatisch stabileren P2Y₁-Agonisten ADPβS war in Zellen, die den Rezeptor und die NTPDase1 co-exprimierten, ca. 20fach niedriger als in NTPDase2-co-exprimierenden Zellen oder in den Co-Kulturen von NTPDase1 bzw. NTPDase2 und P2Y₁-Rezeptor. Offensichtlich verringert die NTPDase1 den basalen

ADP-Tonus und verhindert so die Downregulation des Rezeptors. Für diesen Effekt scheint die räumliche Nähe zwischen Enzym und Rezeptor von Bedeutung.

2.4.3 Struktur der NTPDasen 1-3 und 8

Eine sehr aussagekräftige Methode, Enzyme zu charakterisieren, ist die Röntgenstrukturanalyse des kristallisierten Proteins, bzw. des mit einem Substrat oder Inhibitor co-kristallisierten Enzyms. Die Erkenntnisse aus einer solchen Struktur helfen, Inhibitoren zielgenau zu entwerfen. Bis dato existiert noch keine Röntgenstruktur einer humanen E-NTPDase. Daher müssen andere Techniken zur Struktur- und Funktionsaufklärung von aktivem Zentrum, Transmembrandomänen und intrazellulären N- und C-Termini zum Einsatz kommen. Hierzu gehören zuvorderst Mutagenesestudien, wie sie an der E-NTPDase3 umfangreich durchgeführt wurden.¹²⁰ Ein Abgleich der Gensequenzen zeigt, daß zahlreiche Sequenzabschnitte der NTPDasen 1-3 und 8 konserviert sind.¹⁵ Bestimmte Gensequenzen konnten in funktionell ähnlichen Enzymen wiedergefunden werden. Gerade der Vergleich mit solchen Enzymen liefert Aufschlüsse über die funktionelle Bedeutung bestimmter Aminosäuresequenzen.¹²¹ Studien mit Inhibitoren und Substraten geben Hinweise auf die Beschaffenheit der Bindungstasche.¹¹²

E-NTPDasen sind 70-80 kDa große, glycosylierte Proteine mit zwei am C- bzw. N-Terminus befindlichen transmembranspannenden Domänen.¹⁹ Der C- und N-Terminus befindet sich im Cytosol. Die Enzyme sind in der Lage, Homodimere bis Homotetramere zu bilden.¹⁵ Das Detergens Triton X-100 verhinderte die Oligomerbildung der Ratten-NTPDase1. Es verringerte die Hydrolyserate des Enzyms und veränderte noch dazu die Substratspezifität: ATP wurde besser umgesetzt als ADP.¹²² Die NTPDase1 erwies sich als sehr empfindlich gegenüber oxidativem Streß.¹²³ Die Aktivität der NTPDasen hängt stark von der Ca^{2+} - bzw. Mg^{2+} -Konzentration ab. In Medien ohne diese Ionen geht sie verloren.^{112,124} Das auffälligste Strukturmerkmal aller Enzyme stellen die fünf Apyrase-konservierten Regionen (Apyrase Conserved Regions, ACR) 1-5 dar (Abbildung 2.5). Punktmutationen in diesen Bereichen führten meist zu weniger aktiven oder inaktiven Enzymen.¹²⁰ In ACR1 und 4 findet sich je eine konservierte „DXG“-Phosphat-

bindungssequenz, wie sie auch in der Actin/HSP 70/Zuckerkinase-Familie vorkommt.¹²¹

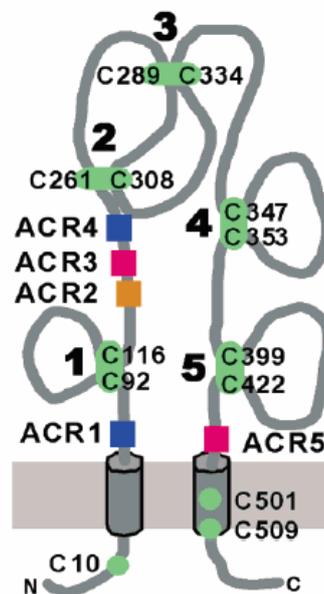


Abbildung 2.5: Struktur der NTPDase3¹²⁰

Der Austausch verschiedener Aminosäuren im DXG-Motiv der ACR4 (D219E) und 5 (W459A) ließ die mutierten Enzyme ihre NDPase-Funktion verlieren.^{125,126} Mutationen im DXG-Motiv der ACR1 (D62A, G64A) und auch der ACR4 (D219A, G221A) resultierten in totalem Aktivitätsverlust.¹²⁵ Möglicherweise sorgen Unterschiede in der Tertiär- oder auch Quartärstruktur für eine leichtere oder schwerere Zugangsmöglichkeit des Substrates zu den Nucleosiddiphosphat-erkennenden DXG-Motiven in den ACR4 und 5. Diese würden die in Tabelle 2.1 aufgeführten unterschiedlichen NTP/NDP-Umsetzungskapazitäten der E-NTPDase-Isoenzyme erklären.

In der extrazellulären Domäne wird die Tertiärstruktur durch fünf Disulfidbrücken 1-5 (Abbildung 2.5) erhalten. Die Enzyme tolerierten nicht oder nur schlecht einen Austausch der beteiligten Cysteine.¹²⁷ Zwischen der ACR1 und der Disulfidbrücke 1 (Abbildung 2.5) befindet sich die Glycosylierungsposition der Enzyme. Mutationen in diesem Bereich verringerten die Aktivität.¹²⁸ Die Autoren führten den Aktivitätsverlust auf eine geringere Fähigkeit der Enzyme, Oligomere zu bilden, zurück. *Murphy et al.* konnten zeigen, daß das Reagenz *p*-Chlormercuribenzolsulfonsäure (*p*CMBS) die NTPDase3 durch Reaktion mit dem in der Transmembrandomäne befindlichen Cystein 501 inhibiert (Abbildung 2.6).¹²⁹

In Einklang mit diesem Befund und der Wirkung von Triton X-100 steht eine Reihe weiterer Publikationen, die sich mit den Interaktionen von Ectonucleotidasen mit ihrer Membrenumgebung befassen. *Papanikolaou et al.* wiesen den Einfluß der Membranbeschaffenheit auf die Aktivität der NTPDase1 nach.¹³⁰ Nachdem den Membranen Cholesterol mit β -Methylcyclodextrin entzogen worden war, konnte nur noch 20 % der Ausgangs-ATPase-Aktivität erreicht werden. Umgekehrt war das Aktivitätsoptimum des Enzyms in cholesterolreichen Domänen sog. *lipid rafts* zu verzeichnen. Auf der Grundlage dieser Informationen zum Aufbau der Ectonucleotidasen konstruierten *Kirley et al.* das in Abbildung 2.6 dargestellte Wechselspiel zwischen Substrat und NTPDase3.¹²⁰

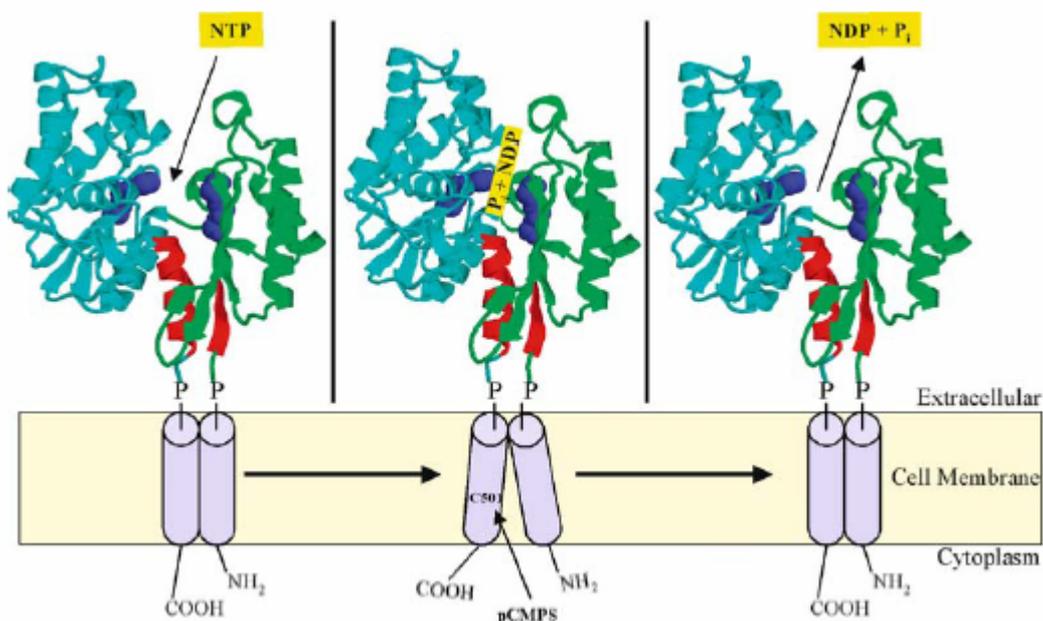


Abbildung 2.6: Vermuteter Hydrolysemechanismus der NTPDase3¹²⁰ (P: Prolin; C: Cystein; pCMPS: *p* Chlormercuribenzolsulfonsäure)

Das Nucleosidtriphosphat (NTP) gelangt in einen Spalt zwischen N- und C-Terminus und interagiert dort mit den beiden DXG-Motiven in ACR1 und ACR4. Der extrazelluläre Bereich ist über konservierte Proline (P) mit den Transmembrandomänen verbunden. Diese Aminosäuren sorgen für Rigidität. Daher zieht die Interaktion des Substrates mit dem katalytischen Zentrum wahrscheinlich eine Rotationsbewegung der Transmembrandomänen nach sich. Eine Kritik an diesem Modell besteht darin, daß es die für die katalytische Aktivität wichtige Oligomerisierung und Glycosylierung des Enzyms nicht berücksichtigt.

Wu *et al.* wiesen nach, daß das cytosolische Protein RanBPM (Ran Binding Protein M) einen Komplex mit der NTPDase1 bildet.¹³¹ Der RanBPM-Ectonucleotidase-Komplex hat eine geringere katalytische Aktivität als das ungebundene Enzym. Möglicherweise verhindert RanBPM die Bewegung der Transmembrandomänen. Umgekehrt wirkt die Ectonucleotidase auch auf RanBPM ein. Die Interaktion dieser beiden Proteine stimuliert den proliferationsstimulierenden ERK/Ras-Signalweg. Wenn diese Interaktion durch die Bindung eines Nucleotids an die NTPDase1 ausgelöst werden sollte, könnte man dem Enzym rezeptorartige Funktionen zusprechen.

2.4.4 Struktur der Ecto-5'-Nucleotidase

Die Ecto-5'-Nucleotidase ist deutlich besser untersucht als die E-NTPDasen. Eine Röntgenstruktur der bakteriellen cytosolischen 5'-Nucleotidase wurde publiziert.¹³² Die Ecto-5'-NT und die bakterielle cytosolische 5'-Nucleotidase besitzen konservierte Strukturen, die die Erstellung eines Homologiemodells für das humane Ectoenzym erlauben.¹¹⁴ Das membrangebundene Enzym weist eine Größe von 61 kDa auf und ist am C-Terminus und an vier Asparaginresten glycosyliert.¹³³ Die Tertiärstruktur wird durch vier Disulfidbrücken stabilisiert.¹³⁴ Das aktive Zentrum weist Bindungsstellen für zwei Metallionen auf.¹³⁵ In Analogie zu den E-NTPDasen bildet die Ecto-5'-NT Homodimere.¹³⁶ Möglicherweise spielen die Glucanketten dabei eine Rolle.¹¹⁴ Die Ecto-5'-NT wird über einen GPI-Anker (Glycosylphosphatidylinositol) am C-Terminus in der Zellmembran gehalten.¹¹⁴ Dieser kann hydrolytisch durch Phospholipase C entfernt werden, wodurch das Enzym löslich wird.¹³⁷ Anders als die E-NTPDasen besitzt die Ecto-5'-Nucleotidase keine transmembranspannenden Domänen.¹¹⁴ Durch die Röntgenstruktur der bakteriellen 5'-Nucleotidase konnte ein Modell des aktiven Zentrums und des katalytischen Mechanismus erstellt werden.¹¹⁴ Das Enzym existiert in einer inaktiven offenen und einer aktiven geschlossenen Konformation. Es enthält zwei Domänen, die gegeneinander um 96° verdrehbar sind. Der Pfeil in Abbildung 2.7 repräsentiert die Drehachse, um die sich der C-Terminus bewegt.¹³⁸ Die Bewegung des C-Terminus ist wahrscheinlich notwendig zur Aufnahme und Freisetzung des Substrats.

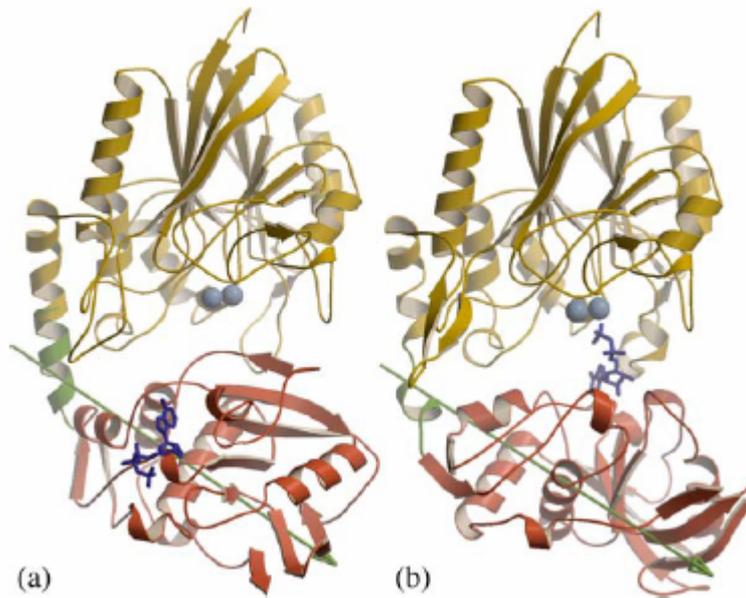


Abbildung 2.7: Offene (a) und geschlossene (b) Form der bakteriellen 5'-Nucleotidase mit Inhibitor ATP¹¹⁴

Das aktive Zentrum in der geschlossenen Konformation wurde so postuliert, wie in Abbildung 2.8 mit dem Inhibitor α,β -Methylen-ADP dargestellt. Das Substrat wird durch die C-terminale Domäne fixiert.

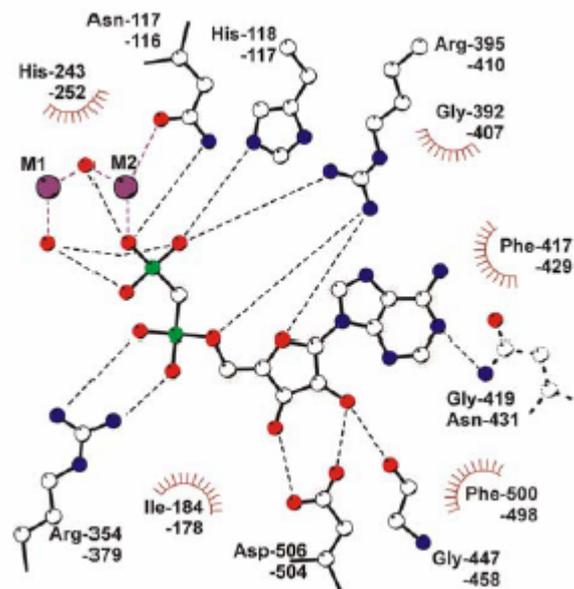


Abbildung 2.8: Aktives Zentrum der Ecto-5'-Nucleotidase mit dem Inhibitor α,β -Methylen-ADP;¹¹⁴ die obere Zahl gibt die Position der Aminosäure im humanen Enzym, die untere diejenige der homologen im bakteriellen Enzym an.

Von zentraler Bedeutung ist dabei das hydrophobe *Stacking* zwischen Adenin und zwei Phenylalaninresten. Der N1-Stickstoff interagiert mit dem Carboxamid eines

Asparagins (bakterielles Enzym) bzw. mit Glycin (humane Ecto-5'-NT), die Ribose mit Aspartat, Glycin und Arginin. Das 5'-Phosphat tritt mit zwei Argininresten in Wechselwirkung. Die N-terminale Domäne bindet die Metallionen M1 und M2 über Histidin, Aspartat und Asparagin (Abbildung 2.9). Die Ionen, möglicherweise Mn^{2+} , nehmen Teil am katalytischen Prozeß.¹¹⁴

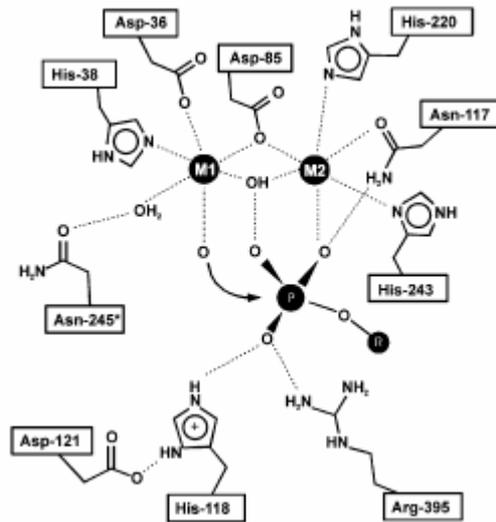


Abbildung 2.9: Katalytischer Mechanismus der Ecto-5'-Nucleotidase¹¹⁴

Das Ion M2 bindet das Phosphat. Histidin und Arginin polarisieren es. M1 dirigiert den nucleophilen (Rückseiten-)Angriff eines Moleküls Wasser auf das Phosphat („In-line-attack“). Der Winkel zwischen angreifendem Wasser, Phosphat und Abgangsgruppe Nucleosid beträgt 155° . Die Hydrolyse der Nucleosid-5'-Phosphorsäureesterbindung vollzieht sich dann im Sinne eines Additions-Eliminierungs-Mechanismus. Die Übertragung eines Protons auf die Nucleosid-5'-Oxyfunktion könnte aus der wäßrigen Umgebung erfolgen, eine diesbezüglich geeignete Aminosäure fehlt im aktiven Zentrum.

2.4.5 Physiologische Funktionen der E-NTPDasen und der Ecto-5'-Nucleotidase und therapeutisches Potential von Inhibitoren

Die Aktivität von E-NTPDasen und Ecto-5'-Nucleotidase läßt sich ubiquitär nachweisen. Organe, Organellen und einzelne Zellen, wie Blutzellen exprimieren

meist ein NTPDase-Isoenzym oder ein bestimmtes Isoenzymmuster, um extrazelluläre Nucleosidtri- und -diphosphate zu hydrolysieren. Das Isoenzymmuster kann durch pathophysiologische Prozesse verändert werden. In den folgenden Abschnitten soll die Rolle der E-NTPDasen und der Ecto-5'-Nucleotidase in verschiedenen Organen und ihr therapeutisches Potential beleuchtet werden.

Lunge

Eine wichtige Funktion des Lungenepithels ist die Aufrechterhaltung der mucociliären Clearance (MC). Sie trägt zum effizienten Gasaustausch bei und gewährt Schutz vor pathogenen Keimen und anderen Noxen. Patienten, die an Cystischer Fibrose (Mukoviszidose, CF) oder COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) leiden, weisen Störungen in der transepithelialen Elektrolytbalance auf: verminderte Cl⁻-Sekretion und erhöhte Na⁺-Reabsorption. Diese äußert sich u. a. in einer Austrocknung des Schleims, verringerter Mucinsekretion und gehemmter Zilienaktivität. In der Summe ist die MC gestört. Die Lunge wird zu einem idealen Nährboden für pathogene Keime. Die CF-Patienten besitzen Mutationen im *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Gen* (CFTR), die diese Elektrolytimbalancen und die verminderte Aktivität der Zilien verursachen.¹³⁹ Der kausale Zusammenhang zwischen Rauchen und gestörter MC bei COPD-Patienten liegt noch im Dunkeln. Es existiert mittlerweile eine sehr umfangreiche Literatur, die die Rolle der extrazellulären Nucleotide und ihrer Rezeptoren am Lungenepithel belegt. Sie aktivieren über apikale P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆-Rezeptoren die Phospholipase C (PLC) (Abbildung 2.10). Die PLC erhöht die cytosolische Ca²⁺-Konzentration. Die erhöhte Ca²⁺-Konzentration bewirkt direkt und indirekt über die Stimulierung der Proteinkinase C (PKC) die Öffnung alternativer Chloridkanäle (CRCC, Ca²⁺-regulated Cl⁻-channel). Der Chloridausstrom sorgt durch osmotische Effekte für eine Befeuchtung des epithelialen Milieus. Zusätzlich stimuliert der erhöhte Ca²⁺-Tonus sowohl Zilientätigkeit als auch Mucinsekretion.^{60,140} Der P2Y₂-Rezeptoragonist *Denufosol* (Abbildung 1.2) zur Behandlung der Cystischen Fibrose befindet sich bereits in einer fortgeschrittenen Phase der klinischen Entwicklung.¹⁴¹ Ein Problem bei diesem Ansatz könnte darin liegen, daß P2Y-Rezeptoren zur schnellen Desensibilisierung neigen.¹⁴² Neben der direkten P2Y₂-Rezeptorstimulation ist auch

eine indirekte Strategie, diesen Rezeptor anzusprechen, denkbar. *Burch* und *Picher* konnten per real-time PCR die mRNA der NTPDasen 1 und 3 im Epithel von Bronchiolen nachweisen.¹⁴³ *Button et al.* entwickelten ein In-vitro-Modell für Bronchialepithelzellen, das rhythmische Atembewegungen und den damit verbundenen mechanischen Streß simulierte.¹⁴⁴ Es konnte der Nachweis erbracht werden, daß durch einen solchen mechanischen Streß der Abbau von extrazellulärem ATP gebremst wurde. Diese Hemmung des Abbaus von ATP ging in kultivierten CF-Bronchialepithelzellen mit einer Normalisierung der Elektrolytbalance einher.¹⁴⁴

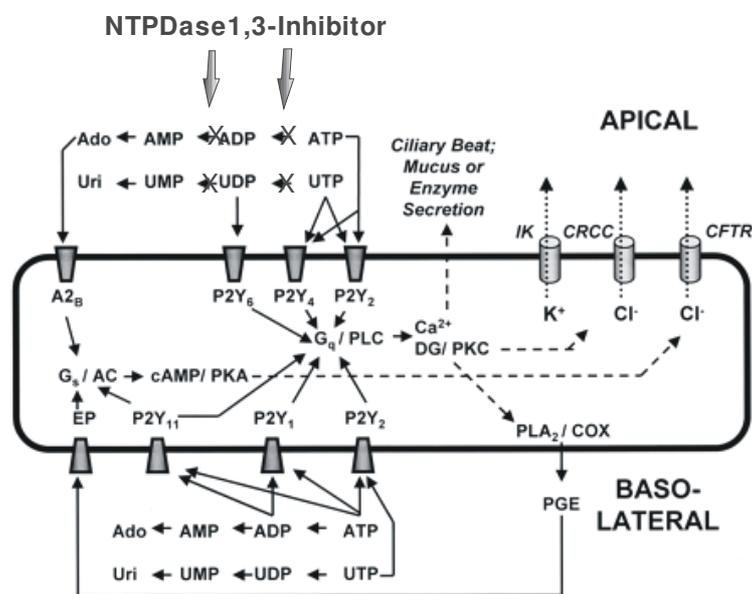


Abbildung 2.10: Stimulierung der mucociliären Clearance durch NTPDase1,3-Hemmer⁶⁰ (Ado: Adenosin; CFTR: cystic fibrosis transmembrane regulator channel; CRCC: Ca²⁺-regulated Cl⁻-channel; DG: Diacylglycerol; IK: Kaliumkanal; PKC: Proteinkinase C; PLC: Phospholipase C; Uri: Uridin)

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen stehen Bronchialgewebeuntersuchungen an CF-Patienten. Im Vergleich zu gesunden Probanden zeigten die Erkrankten ein um das Dreifache erhöhtes Expressionsniveau an Ectonucleotidasen.¹⁴⁵ Sie wiesen eine dementsprechend deutlich höhere Abbauraten von ATP auf als gesunde Probanden. Das in dessen Folge vermehrt entstehende Adenosin steht zusätzlich im Verdacht, pro-inflammatorisch zu wirken.¹⁴⁶ Die Hemmung der NTPDase1 und/oder 3 scheint ein vielversprechender Ansatz zu sein, die mucociliäre Clearance bei Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen zu normalisieren.

Gefäße

Extrazelluläre Nucleotide beeinflussen die Hämostase und den Vasotonus. ATP ist ein kompetitiver Antagonist, ADP der physiologische Agonist an Thrombozytenständigen P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptoren.^{67,147} Die Aufrechterhaltung der Balance zwischen antiaggregatorisch wirksamem ATP auf der einen Seite und Thrombozyten-stimulierendem ADP auf der anderen Seite leistet zur Kontrolle der Hämostase einen wichtigen Beitrag. Diese Balance wird wesentlich durch das Muster an E-NTPDasen, dem das Blutplasma ausgesetzt ist, bestimmt (Abbildung 2.11). Gesundes Endothel exprimiert die NTPDase1.¹⁴⁸ Da diese in gleichem Ausmaß ATP und ADP hydrolysiert, stellt sie ein wichtiges antiaggregatorisch wirkendes Enzym dar.^{149,150} Nach Ischämie kann sie hochreguliert werden.¹⁵¹

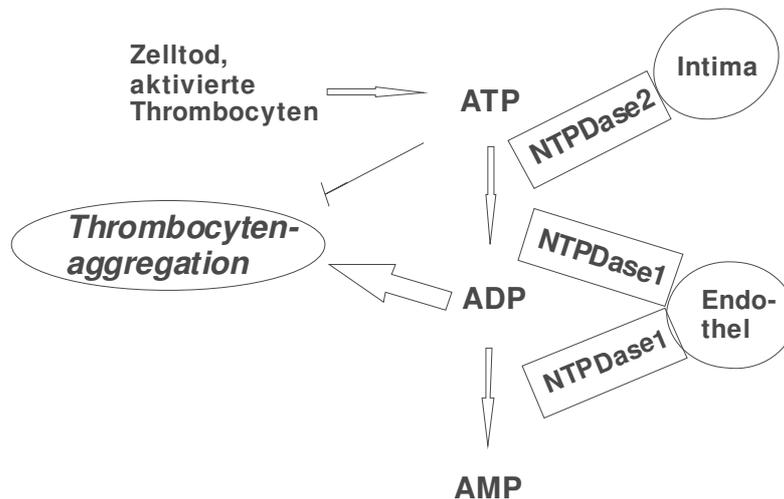


Abbildung 2.11: Einfluß der NTPDasen 1 und 2 auf die Thrombozytenaggregation

In Untersuchungen von Krötz *et al.* wurde die NTPDase1 durch oxidativen Streß infolge chronischer Depolarisation von Endothelzellen inaktiviert.¹²³ Die Autoren konnten daraufhin eine erhöhte Thrombozytenreagibilität feststellen. CD39^{-/-}-Mäuse (NTPDase1-Knock-out-Mäuse) wiesen nach experimentell herbeigeführtem Schlaganfall eine größere Penumbra, eine größeres durch die Ischämie in Mitleidenschaft gezogenes Gebiet, auf. Sie zeigten eine schlecht regulierte Hämostase mit stärkerer Thromboseneigung und eine gestörte Interaktion von Thrombozyten mit verletztem Gewebe.^{152,153} Letzteres ist möglicherweise auf desensitivierte Thrombozyten-P2Y₁- und -P2X₁-Rezeptoren zurückzuführen.¹⁵⁰ Umgekehrt konnte die arterielle Thrombusbildung durch Überexpression der NTPDase1 in der glatten Gefäß-

muskulatur mit Hilfe eines viralen Vektors *in vivo* reduziert werden.¹⁵⁴ *solCD 39* ist eine lösliche Mutante der NTPDase1. Sie wurde als neue Strategie zur Behandlung des Herzinfarkts und des Schlaganfalls entwickelt und patentiert.^{149,150,153} In Tiermodellen für Schlaganfall und Herzinfarkt konnte der *proof of principle* erbracht werden.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷

Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Dialysepatienten besitzen eine höhere Thrombozytenreagibilität als Gesunde.^{158,159} *El-Omar et al.* und *Silva et al.* wiesen in solchen Patienten ein verschobenes ATPase/ADPase-Gleichgewicht nach, das eine höhere Plasmakonzentration von ADP bedingt. Diese könnte die höhere Thrombozytenreagibilität erklären. *El-Omar et al.* diskutierten als Ursache eine höhere Expression der NTPDase3 und/oder gleichzeitig eine geringere Expression der NTPDase1 durch Lymphocyten.

In der Adventitia und in microvaskulären Pericyten findet sich die NTPDase2.¹⁴⁸ Bei vaskulärer Inflammation, also endothelialer Dysfunktion, z. B. als Folge des metabolischen Syndroms, kann Plasma in Kontakt mit diesem Enzym treten.¹⁶⁰ Als Folge wird das pro-aggregatorische Nucleotid ADP vermehrt gebildet und die Thromboseneigung kann sich erhöhen, die Einblutungsgefahr ins Gewebe sich verringern (Tabelle 2.2).¹⁴⁸

Auch der Einfluß der Ecto-5'-NT auf die Blutgerinnung wurde untersucht. Adenosin hemmt die Thrombozytenaggregation A_{2A}-Rezeptor-vermittelt.¹⁶¹ Erste Untersuchungen der Hämostase von CD73^{-/-}-Mäusen zeigten, daß die Thrombozyten durch ADP weiterhin normal stimulierbar waren, allerdings konnten Symptome der Thrombozytendysfunktion beobachtet werden. Der basale cAMP-Spiegel der Blutplättchen war verringert. Damit ging eine erhöhte Aggregationsneigung einher, die sich in einer signifikant kürzeren Blutungszeit nach äußerlicher Verletzung manifestierte.¹⁶²

Nucleotide und Nucleoside greifen auch in die lokale Regulation des Vasotonus ein. Nucleotide vermitteln über endotheliale P2Y₁-, P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren Vasodilatation.¹⁶³⁻¹⁶⁵ Aktivierung von P2X₁-, P2Y₂ und P2Y₆-Nucleotidrezeptoren an der glatten Muskulatur wirkt hingegen vasokonstriktorisch.^{58,115,166,167} Adenosin kann durch den A_{2A}-Rezeptor eine Vasodilatation induzieren.¹⁶⁸

Endothel exprimiert neben der NTPDase1 auch die Ecto-5'-NT.^{169,170} Mit Hilfe dieser beiden Enzyme kann ATP schrittweise zu Adenosin hydrolysiert werden. Die Expression der Ecto-5'-Nucleotidase wird im hypoxischen Medium durch HIF-1

(Hypoxia-Inducible Factor) stimuliert.¹⁷¹ HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Adaptation an Sauerstoffarmut reguliert. Die Ecto-5'-NT trägt zum Adenosin-vermittelten ischämischen *Pre-conditioning* des Myocards und anderer Gewebe bei. Gesichert ist, daß sie die Barrierefunktion des Endothels stützt.¹⁷² CD73^{-/-}-Mäuse litten an einem um 70 % erhöhtem Interstitialwassergehalt in der Lunge als die Kontrolle.

Die NTPDase2 generiert UDP in der Media, das dort eine P2Y₆-vermittelte Vasokonstriktion auslösen kann.⁵⁸

Die Hemmung der endothelialen NTPDase1 hätte potentiell eine erhöhte Sterblichkeit etwa von Versuchstieren zur Folge, da das Thrombozyten-stimulierende ADP weniger effizient abgebaut wird. Allerdings zeigten *Gündüz et al.*, daß die Hemmung des Abbaus von ATP durch *ARL67156*, einem NTPDase1-Inhibitor, Reperfusionsschäden nach Ischämie verhindert.¹⁷³ Die Verschiebung des ATPase/ADPase-Gleichgewichts könnte einen neuen Ansatzpunkt zur Behandlung von Gefäßkrankheiten darstellen. Die Targets wären hier vor allem die NTPDase3, aber auch die NTPDase2. Eine Gefahr bei der Hemmung des letzteren Enzyms läge möglicherweise in einer Erhöhung der Blutungsneigung.

Zellproliferation und Krebs

Ectonucleotidasen werden von Tumorzelllinien exprimiert. Leider wurden bislang aber nur wenige Untersuchungen in dieser Hinsicht publiziert. *Dzhandzhugazyan et al.* wiesen nach, daß die NTPDase1 in differenzierten FM3 Melanomzellen, einem aggressivem, nicht behandelbarem Hautkrebs, hochreguliert ist.¹⁷⁴ Diese Überexpression war am ausgeprägtesten im frühen Stadium des Tumorstadiums, mit zunehmender Progression verlor sie sich. Möglicherweise verhindert das Enzym die Erkennung der Krebszellen durch T-Zellen, s. hierzu auch den folgenden Abschnitt „Immunsystem“. Andererseits konnten *Morrone et al.* das Wachstum von in Ratten implantierten Gliomzellen durch Zugabe von Apyrase *in vivo* hemmen.¹⁷⁵

Nucleotide sind an der Kontrolle der Proliferation von Gallenkanalepithelzellen, sog. Cholangiocyten beteiligt. Ihre Signale werden durch basolaterale P2Y-Rezeptoren vermittelt. Die Fehlsteuerung der Proliferation dieser Zellen ist in einige Cholangiopathien wie der biliären Zirrhose involviert.¹⁷⁶ Sie kann zur posthepatischen Gelb-

sucht führen. *Jhandier et al.* zeigten, daß mesenchymale Fibroblasten über die NTPDase2 das proliferative Geschehen beeinflussen.^{177,178} Durch Co-Kultivierung von Fibroblasten mit als Modell verwendeten Cholangiocarcinomzellen konnten sie die Proliferation letzterer um 50 % senken. Nach Transfektion der Fibroblasten mit NTPDase2-siRNA stieg die Proliferationsrate der Carcinomzellen wieder fast auf den Ausgangswert an.

Solide Tumore benötigen zum Wachstum Sauerstoff und Nährstoffe. Ab einer bestimmten Tumorgroße reicht bloße Diffusion zur Versorgung der schnell wachsenden Zellen nicht mehr aus. Daher bilden sie eigene Blutgefäße (sog. Angiogenese). Adenosin-A₂-Rezeptoren sind in diesen Prozeß involviert.¹⁷⁹ Die Ecto-5'-NT wird unter hypoxischen Bedingungen induziert.¹⁷¹ Sie könnte von soliden Tumoren überexprimiert werden, um Angiogenese-förderndes Adenosin zu bilden.¹⁸ Die Hemmung von Ectonucleotidasen auf Krebszellen könnte einen neuen chemotherapeutischen Ansatz zur Behandlung von bestimmten Tumoren darstellen. NTPDasen und Ecto-5'-Nucleotidase scheinen vielversprechende Zielstrukturen, da sie im Zusammenspiel Adenosin generieren, das immunsuppressiv wirkt und wahrscheinlich die Angiogenese zu fördern vermag. P2-Rezeptor-Agonisten wurden als antineoplastische Agentien patentiert.¹⁸⁰

Immunsystem

Immunzellen besitzen Adenosin-P1- und Nucleotid-P2-Rezeptoren. Nucleotide dienen beispielsweise als Signale für Immunzellaktivierung, zur Einleitung und Lenkung der Chemotaxis, und zur Erkennung von Noxen.^{64,181-185} ATP stimuliert die Sekretion von Cytokinen wie IL-2 und IFN- γ durch CD8⁺ T-Zellen.¹⁸³ Adenosin hingegen schwächt die Immunantwort A_{2A}-Rezeptor-vermittelt ab.^{18,186-188} Patienten mit vererbter Adenosindesaminase-Defizienz leiden an Immunschwäche.¹⁸⁹ Der extrazelluläre Metabolismus der Nucleotide wird somit modulatorisch in das Immunsystem eingreifen.^{15,187}

Die NTPDase1 wurde ursprünglich als Marker für aktivierte B-Lymphozyten erkannt und „CD39“ genannt (Tabelle 2.1). Man findet sie außerdem auf Monocyten, aktivierten CD8⁺ T-Zellen, Natürlichen Killerzellen und Langerhans'schen Zellen.^{183,187} Sie dient neben der rein enzymatischen Funktion auch als zusätzliche

Erkennungsstruktur für cytotoxische T-Zellen.¹⁹⁰ Ihre Rolle wurde anhand von CD39^{-/-}-Mäusen studiert.¹⁹¹ Die Reaktion der T-Zellen auf Haptene war gestört. In der Folge reagierten die Mäuse deutlich weniger sensibel auf Allergene. Andererseits fiel die inflammatorische Antwort der Haut auf Reizstoffe wie Crotonöl oder Benzalkoniumchlorid stärker aus.

Das Gefäßendothel ist eine wichtige Schnittstelle zwischen zirkulierenden Leukocyten und entzündetem Gewebe. Es kann das Einwandern der Immunzellen in das Gewebe regulieren. Gesundes Endothel generiert über die NTPDase1 und die Ecto-5'-Nucleotidase einen basalen Adenosin-Tonus. Dieser verhinderte in einer Studie von *Eltzschig et al.* die Adhäsion von Leukocyten.¹⁷⁰ ATP und UTP dagegen induzierten die Chemotaxis von Neutrophilen.¹⁹² Verringerte Adenosin-Produktion erhöhte die Lymphocyten-Transmigration.¹⁹³

Kobie et al. untersuchten die immunsupprimierende Wirkung der zur Gruppe der CD4-T-Zellen gehörenden T_{Reg}-Zellen und Th-Precursor-Zellen (Abbildung 2.12).¹⁹⁴

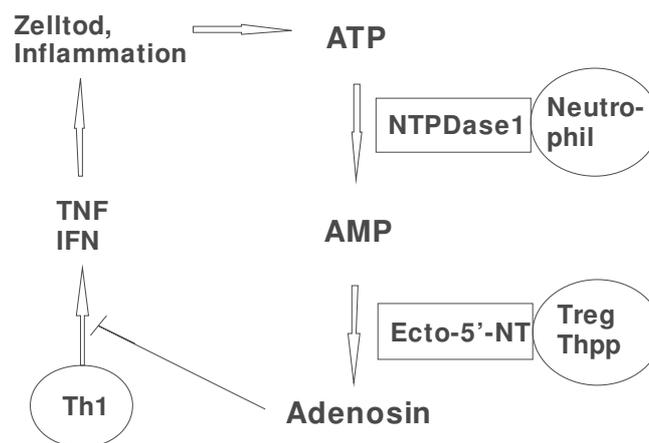


Abbildung 2.12: Immunmodulierung durch NTPDase1 und Ecto-5'-NT (Treg: T-regulatorische Zelle; Thpp: T-Helfer-Vorläuferzelle)

Sie wandern in entzündetes Gewebe ein und können dort von Neutrophilen generiertes AMP mittels der Ecto-5'-NT zu Adenosin hydrolysieren. Effektor-T-Zellen, die die Entzündung vorantreiben, exprimieren Adenosin-A_{2A}-Rezeptoren.¹⁹⁵ Stimulierung dieser Rezeptoren hemmte das T-Zellwachstum und inhibierte die Freisetzung von Cytokinen wie IFN- γ .¹⁹⁴ Es gibt Hinweise, daß B-Zellen den A_{2A}-Rezeptor und die Ecto-5'-Nucleotidase aufeinander abgestimmt induzieren.¹⁹⁶ Cytomegalovirus-infizierte Zellen überexprimierten die Ecto-5'-Nucleotidase und schwächten so die Immunantwort durch Neutrophile ab.^{169,197} Die Hemmung der NTPDase1 wirkt immunstimulierend, da Nucleotide wie ATP Immunzellen aktivieren.

Zusätzlich hemmt ATP die Ecto-5'-NT und bedingt so wahrscheinlich die Senkung der Konzentration des immunsupprimierenden Adenosins. Die direkte Hemmung der Ecto-5'-NT hätte somit ebenfalls eine Immunstimulierung zur Folge. Möglicherweise kann man diesen Effekt bei der Behandlung von Infekten aber auch von Tumorerkrankungen ausnutzen.

Nervengewebe

E-NTPDasen finden sich im ZNS und im peripheren Nervengewebe sowohl an der neuronalen Endplatte als auch im unterstützenden Gewebe wie z.B. Gliazellen und Astrocyten.

Belcher et al. untersuchten die Verteilung der NTPDase3 im Gehirn der Ratte mit markierten Antikörpern.¹⁹⁸ Sie fanden diese Ectonucleotidase in Axonen und in der Präsynapse exprimiert. Die höchsten Expressionsdichten konnten in Hirnregionen mit endokrinen und autonomen (noradrenergen) Funktionen wie dem Hypothalamus, dem Locus Coeruleus (LC) und dem lateralen Periaqueductalen Grau (PAG) festgestellt werden. Die Autoren vermuten, daß die NTPDase3 aufgrund dieses Verteilungsmusters an der Regulierung des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt ist. Im Cortex und im Hippocampus ließen sich dagegen im Widerspruch zu früheren Veröffentlichungen nur vereinzelte NTPDase3-exprimierende Neuronen mit Antikörpern markieren.^{15,199} Aus Cortex-Synaptosomen des Schweins konnten die NTPDasen 1 und 2 isoliert werden.²⁰⁰ An der neuronalen Endplatte von sympathischen Nerven wird die NTPDase1 exprimiert (Abbildung 2.13). Dort wirkt ATP als Co-Transmitter der Catecholamine.¹¹⁶ Es löst über präsynaptische P2X-Rezeptoren ein positives Feedback für die Noradrenalin-Exocytose aus. Überschießende Sympathikusaktivität (positiv inotrop und chronotrop) verstärkt die Folgen eines Myokardinfarktes. Die NTPDase1 schwächt das positive P2X-Rezeptor-vermittelte Feedback ab. *Sesti et al.* konnten nachweisen, daß die verstärkte Hydrolyse von ATP durch Gabe von *so/CD39* die Exocytose von Noradrenalin im ischemischen Herz senkt (Abbildung 2.13).¹¹⁷ Das entstehende AMP wird von der Ecto-5'-Nucleotidase weiter zu Adenosin abgebaut. Adenosin hemmt die Noradrenalinfreisetzung über präsynaptische A₁-Rezeptoren.²⁰¹

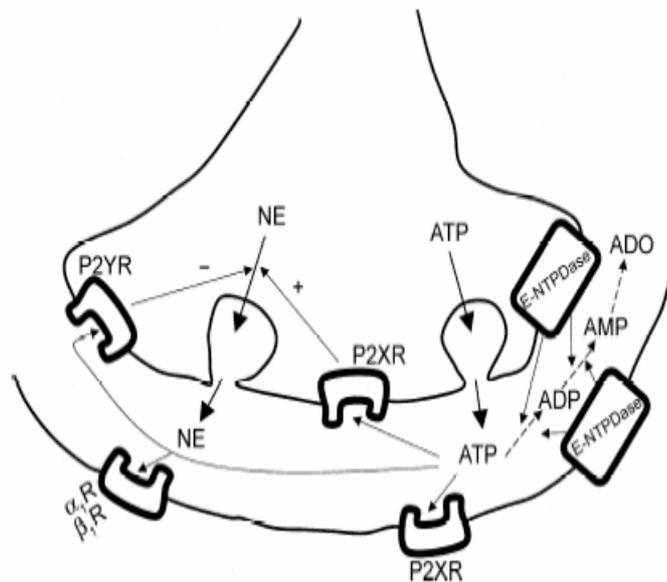


Abbildung 2.13: Feedbackmechanismus durch Nucleotide¹¹⁶

Astrocyten zählen zum unterstützenden Nervengewebe. Sie hydrolysieren niedrige Konzentrationen von ATP mittels E-NPPs.¹⁰⁹ Bei hohen Konzentrationen, wie sie durch Traumata entstehen, kommen E-NTPDasen zum Tragen. *Wink et al.* konnten an diesen Zellen mit RT-PCR und immunocytochemischen Methoden hauptsächlich die NTPDase2 nachweisen.²⁰² Einerseits kann ATP cytotoxisch wirken, so daß die Ectonucleotidasen eine das Nervengewebe schützende Funktion ausüben.¹⁵¹ Sie generieren das cytoprotektive Adenosin.²⁰³ Andererseits stimuliert ATP die Gewebsregeneration.²⁰⁴

In Gliazellen des peripheren Nervengewebes wird die NTPDase2 exprimiert, in der Microglia des ZNS hingegen die NTPDase1.^{13,205} *Braun et al.* fanden in Rattenembryos, daß die NTPDase2 nur mit nicht-myelinisierenden Schwannschen Zellen assoziiert blieb. Auf myelinisierenden Zellen konnte das Enzym nicht detektiert werden. Vermutlich besitzt es auch eine entwicklungsphysiologische Funktion.²⁰⁶

Parasitäre und bakterielle E-NTPDasen

Leishmanien sind Protozoen, die in südlichen Ländern äußerlich Exantheme und innerlich Kala-Azar hervorrufen. *Pinheiro et al.* untersuchten die *Leishmania amazonensis*.²⁰⁷ Diese Parasiten besitzen Ectonucleotidasen, die mit Säugetier-

CD39-Antikörpern reagieren. Vermutlich benötigen Leishmanien die Enzyme, um Nucleotide zu aufnehmbaren Nucleosiden hydrolysieren zu können. Die auf diesem Wege erhöhte Adenosin-Konzentration wirkt noch zusätzlich immunsupprimierend. *Sansom et al.* konnten auf der Oberfläche des pathogenen Keims *Legionella pneumophila* ein Enzym nachweisen, das Eigenschaften der NTPDase1 besitzt. Mutationen dieses Enzyms störten die Fähigkeit der Bakterien, in Makrophagen zu gelangen und sich dort zu vermehren.²⁰⁸

Therapeutisches Potential

Ectonucleotidasen stellen zu dem Zeitpunkt, da diese Arbeit geschrieben wird, noch kein validiertes medizinisches Target dar. Die Literatur gibt Hinweise auf einige mögliche therapeutische Anwendungen für die zielgerichtete Überexpression von Ectonucleotidasen wie auch für Ectonucleotidase-Inhibitoren. Ein Problem der systemischen Applikation könnte darin begründet sein, daß die Enzyme ubiquitär exprimiert werden und somit Nebenwirkungen nicht auszuschließen sind.

Eine lösliche Mutante der E-NTPDase1, *so/CD39*, ist patentiert als neues Prinzip zur Hemmung der Thrombozytenaggregation. Sie könnte zur akuten Behandlung des Herzinfarkts und Schlaganfalls zum Einsatz kommen.

Zur symptomatischen Behandlung der Cystischen Fibrose und der COPD wäre die topische Applikation von NTPDase1 und/oder 3-Inhibitoren denkbar.

Patienten mit endothelialer Dysfunktion, etwa bei Koronarer Herzkrankheit, profitieren möglicherweise von einer Beeinflussung der ATP/ADP-Balance in Richtung des antiaggregatorischen ATPs. Ein NTPDase2- oder 3-Inhibitor würde vielleicht die Thrombozytenreagibilität senken.

Manche Tumorerkrankungen könnten auf eine Hemmung der NTPDase1 und auch der Ecto-5'-NT ansprechen, da diese Enzyme immunsupprimierendes Adenosin zur Verfügung stellen. Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitoren stellen möglicherweise zusätzlich einen interessanten neuen Ansatz zur Verhinderung der Angiogenese dar.

Das Immunsystem wird durch Ectonucleotidasen moduliert. Ecto-5'-Nucleotidasehemmer könnten als Immunstimulanzien bei verschiedenen Infekten und Immunschwächesyndromen zum Einsatz kommen.

Hemmstoffe parasitärer und bakterieller Ectonucleotidasen stellen möglicherweise neue Chemotherapeutika zur Behandlung bestimmter Infektionskrankheiten, z.B. Kala-Azar, dar.

2.5 Medizinische Chemie der E-NTPDasen und der Ecto-5'-Nucleotidase

Das Interesse am gezielten Eingriff in den extrazellulären Metabolismus von Nucleotiden hat mehrere Substanzklassen hervorgebracht, welche E-NTPDasen bzw. die Ecto-5'-Nucleotidase hemmen.²⁰⁹⁻²¹⁷

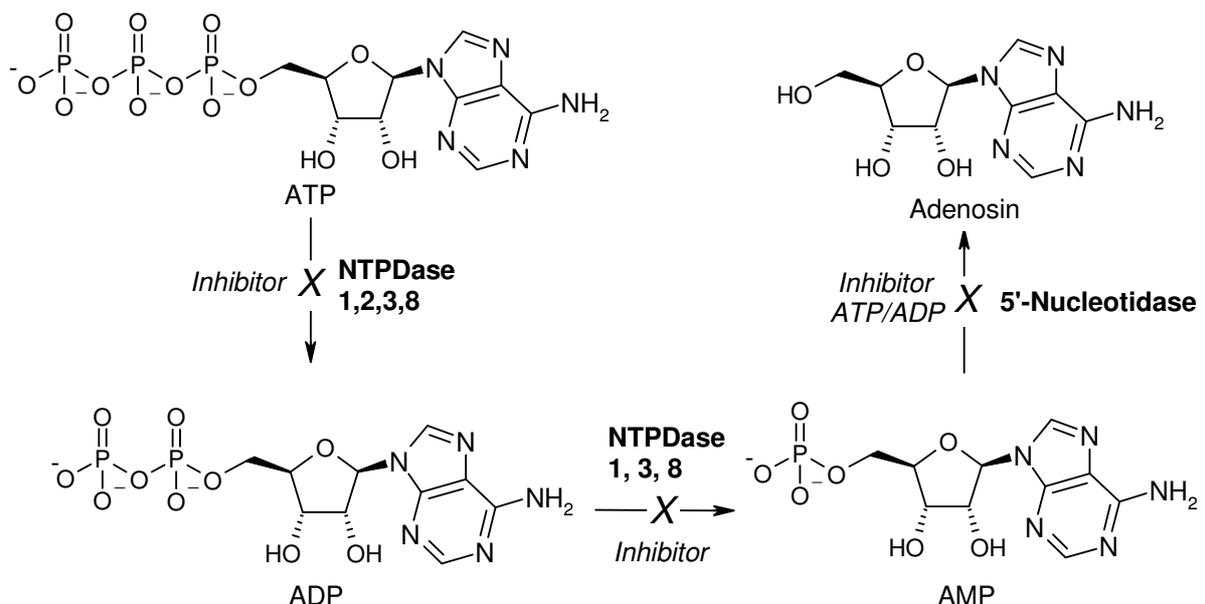


Abbildung 2.14: Wirkungsweise von Ectonucleotidase-Inhibitoren

Sie entfalten damit im biologischen System die in Abbildung 2.14 dargestellten Wirkungen: Sie verhindern die sequentielle Hydrolyse der Nucleosidtriphosphate zu den entsprechenden Di- und Monophosphaten und weiter zu den Nucleosiden. Sie lassen ATP und UTP akkumulieren. Man kann solche Verbindungen als indirekte P2-Rezeptor-Agonisten und P1-Rezeptor-Antagonisten bezeichnen. Da ATP die Ecto-5'-Nucleotidase hemmt, stellen E-NTPDase-Hemmer gleichzeitig indirekte Ecto-5'-NT-Inhibitoren dar. Ebenso ist ein Ecto-5'-NT-Hemmer ein indirekter Adenosin-Rezeptor-Antagonist.

2.5.1 E-NTPDase-Inhibitoren

Um das Ergebnis der Diskussion der publizierten E-NTPDase-Inhibitoren vorweg zu nehmen: Es gelang bisher nicht, E-NTPDase-Hemmer zu synthetisieren, die als Leitstrukturen für die Arzneistoffentwicklung dienen könnten. Eine wesentliche Ursache liegt in den Testsystemen, die bisher zur Verfügung standen. Diese fußen auf recht zeit- und arbeitsaufwendigen HPLC-Methoden.²⁰⁹ Erst neuerdings sind effizientere CE-Methoden entwickelt worden.²¹² Solche Assays bieten allerdings keinesfalls die Möglichkeit, umfangreiche Substanzbibliotheken in kürzester Zeit zu screenen. Hinzu kommt, daß rekombinante humane Enzyme, die eine gute Vergleichbarkeit der Testergebnisse erlauben, erst seit kürzerem zugänglich sind.²¹² Die publizierten Substanzen sind in recht heterogenen Testsystemen untersucht worden. Die Literaturdaten kann man aus mehreren Gründen nur mit starkem Vorbehalt vergleichen. Potentielle Inhibitoren wurden an isoliertem Enzymmaterial unterschiedlicher Spezies, respektive verschiedener Organe getestet.²¹¹ Gleiche E-NTPDase-Isoenzyme unterschiedlicher Spezies können aber ein deutlich voneinander abweichendes katalytisches Verhalten (K_m -Werte, Verhältnis zwischen ATP- und ADP-Hydrolyse) besitzen.¹¹² Verschiedene Organe exprimieren unterschiedliche E-NTPDase-Isoenzyme.¹⁵ Weiter wird die Testung noch dadurch kompliziert, daß das katalytische Verhalten von E-NTPDasen empfindlich auf Änderungen in der Konzentration von Mg^{2+} und Ca^{2+} reagiert: K_m -Werte und das Verhältnis von ATP- zu ADP-Hydrolyse ändern sich.¹¹² Teilweise sind Verbindungen auch an Zellmaterial bzw. Organpräparationen getestet worden.²¹³⁻²¹⁷ Solches Material weist mit hoher Wahrscheinlichkeit mehrere Abbauwege für Nucleotide auf. Eine einheitliche Nomenklatur der E-NTPDasen existiert erst seit dem Jahr 2000.¹⁹ Insofern ist es oft schwierig, in der früheren Literatur verwendete Bezeichnungen von Ecto-Enzymen wie z.B. „ATPase“, „ADPase“ oder „NTPDase“ usw. mit einer der heute gültigen Isoenzymbezeichnungen, wie z.B. „E-NTPDase1“ zur Deckung zu bringen. Soweit die katalytischen Eigenschaften der publizierten Enzyme dargestellt sind, ist dies versucht worden. Die Inhibitoren gingen meist aus Untersuchungen von P2-Rezeptorliganden hervor, wie z.B. dem *Suramin* und dem *Reactive Blue2* (*RB2*).^{216,217} Man kann sie grob einteilen in Nucleotidderivate und Nicht-Nucleotid-Verbindungen.

Gendron *et al.* publizierten eine Reihe von Adenosintriphosphaten, die in der 8-Stellung einen Alkylthio-Substituenten aufweisen (Tabelle 2.3).²⁰⁹ Diese besitzen weder Affinität zu endothelständigen P2X-Rezeptoren noch zum P2Y₁-Rezeptor. Die Verbindungen wurden an einer aus Rindermilz isolierten Ectonucleotidase, „NTPDase“ genannt, getestet. Dieses Enzym weist Eigenschaften der NTPDase1 auf.^{218,219}

Tabelle 2.3: 8-Alkylthio-ATP-Derivate²⁰⁹

Verbindung	14	15	16	17
	K _i [μM]			
„NTPDase“ ^a	10	16	45	31

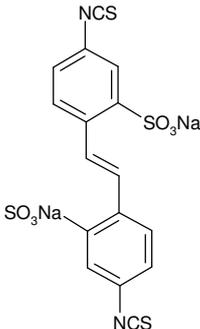
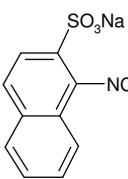
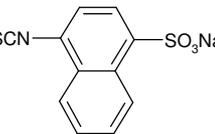
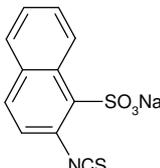
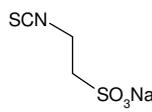
^a Getestet wurde an einer isolierten Ectonucleotidase aus Rindermilz; K_m (ATP): 18 μM; K_m (ADP): 33 μM; Konzentration an ATP: 100 μM.

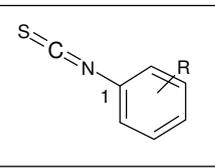
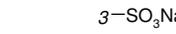
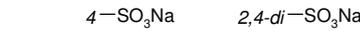
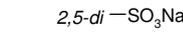
Obgleich die Verbindungen mit der Triphosphatseitenkette das hydrolysierbare Strukturmerkmal besitzen, konnten sie doch die „NTPDase“ hemmen. Die Autoren begründen dies mit dem 8-Alkylthioest, der die Basenkonformation von *anti* nach *syn* verschiebt und dadurch das 5'-Triphosphat vom katalytischen Zentrum weg dirigieren soll. Die Alkylkette findet vermutlich eine kleine hydrophobe Bindungstasche.

Bültmann *et al.* untersuchten, in wieweit verschiedene Isothiocyanate den Abbau von exogen zugeführtem ATP am isolierten vas deferens der Ratte hemmen können (Tabelle 2.4).²¹⁴ Diese Ergebnisse sind mit Vorsicht zu bewerten, da das vas deferens kein spezifisches Testsystem für E-NTPDasen darstellt, sondern hier auch andere Ecto-Hydrolasen zum Tragen kommen können. Die Ectonucleotidaseaktivität ist in diesem Fall der NTPDase1 zuzuschreiben, da nur sie endothelständig exprimiert wird.¹⁴⁸ Bei der Isolierung des vas deferens wird allerdings das Gewebe verletzt, wodurch möglicherweise auch die in der Intima exprimierte NTPDase2 zur Hydrolyse des exogen zugeführten ATPs beitragen kann.¹⁴⁸ Diese Arbeit zeigte, daß man mit geeignet substituierten aromatischen Strukturen die NTPDase1 hemmen

kann. Die Grundstrukturen sind zum einen das Stilben (**18**) und zum anderen das Naphthalin (**19-21**). Geeignet heißt hier, daß das Naphthalin einen Sulfonsäurerest und ein Isothiocyanat mit dem passenden Substitutionsmuster (hier: *para*-ständig) aufweisen sollte.

Tabelle 2.4: Isothiocyanate²¹⁴

Verbindung	18	19	20	21	22
					
	18	19	20	21	22
	IC _{25%} [µM]				
Abbau ATP ^a	10	174	25	208	3320

Verbindung	23	24	25	26	27
					
	23	24	25	26	27
	IC _{25%} [µM]				
Abbau ATP ^a	464	174	242	412	100

^a Im *in vitro* Assay der Ratte gemessen; Konzentration an zugesetztem ATP: 10 µM. Kontrolle: 89 % des zugesetzten ATPs wurden innerhalb einer halben Stunde hydrolysiert.

Im Fall der Stilbenverbindung ist keine Untersuchung des Substitutionsmusters durchgeführt worden. Als Grundgerüst war der einfache Phenylring (**23-27**) ungeeignet, ebenso konnte mit einer Alkylkette als Linker zwischen Isothiocyanat und Sulfonsäure (**22**) kein Erfolg erzielt werden. Nach den Hemmexperimenten konnte das Gewebe nicht wieder die vorherige Kapazität zur Hydrolyse des ATPs erreichen, die Hemmung war also irreversibel. Die Autoren diskutieren die Möglichkeit, daß das Isothiocyanat eine kovalente Bindung im Sinne eines Thioharnstoffs mit einer Aminofunktion der E-NTPDase gebildet haben könnte. Sämtliche Verbindungen waren nicht E-NTPDase-selektiv, sie zeigten auch

signifikante Affinität zu P2-Rezeptoren. Die vom P2X-Rezeptor-Agonisten α,β -MethylenATP hervorgerufene Kontraktion des vas deferens wurde von ihnen mit IC_{50} -Werten zwischen 3 und 50 μM irreversibel gehemmt. Die ADP βS - (P2Y $_1$ -Rezeptor-) vermittelte Relaxation der taenia coli des Meerschweinchens wurde von sämtlichen Verbindungen reversibel mit K_d -Werten zwischen 10 und 70 μM antagonisiert.

In einer weiteren Arbeit untersuchten *Bültmann et al.* im selben Testsystem den P2-Rezeptorantagonisten *Suramin* und davon abgeleitete Substanzen (Tabelle 2.5).^{216,220}

Tabelle 2.5: *Suramin* und davon abgeleitete Verbindungen²¹⁶

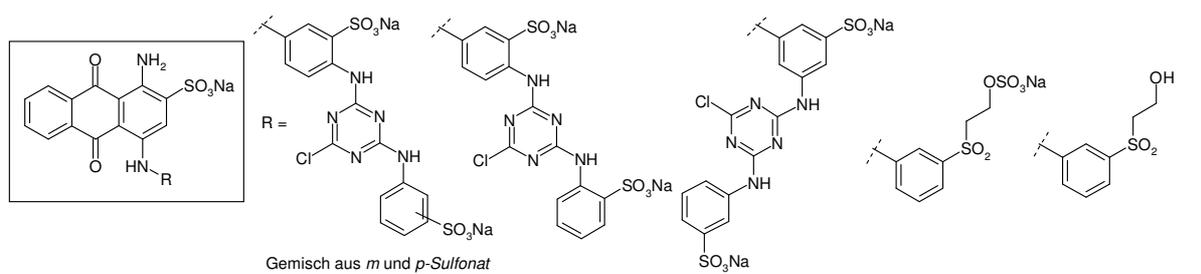
Strukturformel	Verbindung	$IC_{25\%}$ [μM] ^a
	<i>Suramin</i> (28)	170
	<i>NF023</i> (29)	590
	<i>Bst101</i> (30)	450
	<i>NF019</i> (31)	> 1000
	<i>ANTS</i> (32)	> 10000

^a Im vas deferens der Ratte gemessen; Konzentration an zugesetztem ATP: 10 μM ; Kontrolle: 89 % des zugesetzten ATPs wurden innerhalb einer halben Stunde hydrolysiert.

Suramin (28) ist ein komplexes, symmetrisches Molekül, das zwei sehr hydrophile endständige Naphthalinringsysteme mit Sulfonsäureresten aufweist. Diese werden durch eine Kette von lipophilen Arylamiden, bzw. einem N,N-Biarylharnstoff miteinander verbunden. Das Molekül erhält so amphiphile Eigenschaften, die zu seiner Wirkung beitragen sollen: Es wird vermutet, daß es die Oligomerisierung der

E-NTPDasen verhindert.²¹¹ Die Verkleinerung dieses Moleküls verringerte die Wirkung auf den Abbau von ATP. ANTS (**32**) schließlich wies keine Hemmung der beteiligten Enzyme mehr auf. Moleküle des Suramintyps wurden zuerst als P2-Rezeptor-Antagonisten beschrieben, sie sind also ebenfalls nicht Ectonucleotidase-selektiv. *Suramin*, *NF023* (**29**), *Bst101* (**30**) und *NF019* (**31**) hemmten in Untersuchungen der Autoren die vom P2X-Rezeptoragonisten α,β -MethylenATP hervorgerufene Kontraktion des *vas deferens* mit K_d -Werten zwischen 1 und 5 μM (*NF019*: 94 μM). ADP βS wurde mit K_i -Werten zwischen 7 und 77 μM von seinen Bindungsstellen an Truthahn-Erythrozyten verdrängt. Die von ADP βS über den P2Y₁-Rezeptor bewirkte Relaxation der Meerschweinchen-*taenia coli* wurde mit K_D -Werten zwischen 10 und 30 μM antagonisiert.

Tabelle 2.6 *Reactive Blue 2* und davon abgeleitete Verbindungen²¹⁷



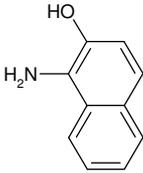
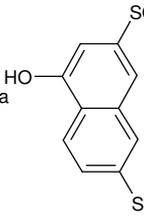
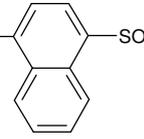
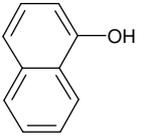
Verbindung	<i>Reactive Blue 2</i> (RB 2) (33)	<i>Cibacron Blue 3GA</i> (34)	<i>Reactive Blue 5</i> (35)	<i>Reactive Blue 19</i> (36)	<i>Reactive Blue 19 Alcohol</i> (37)
	IC _{25%} [μM]				
Abbau ATP ^a	50.5	40.2	> 100	62.2	> 100

^a Im *vas deferens* der Ratte gemessen; Konzentration an zugesetztem ATP: 10 μM ; Kontrolle: 88 % des zugesetzten ATPs wurden innerhalb einer halben Stunde hydrolysiert.

Reactive Blue 2 (**33**) und die davon abgeleiteten Verbindungen, besitzen als zentralen Pharmakophor das sulfonsäuresubstituierte Anthrachinonringgerüst (Tabelle 2.6).²¹⁷ Dieses wurde an der 4-Position mit verschiedenen Seitenketten verknüpft. Die Glieder dieser Seitenkette sind über Aminfunktionen miteinander verbunden. *Reactive Blue 2* selbst gehörte zu den potentesten Inhibitoren. Es weist eine Seitenkette mit drei Gliedern auf, die *para*, *meta* zueinander stehen: proximal und distal je ein Phenylsulfonat, in der Mitte zwischen diesen ein chloresubstituiertes Triazin. Die distale Sulfonsäure liegt in einem *para*-, *meta*-Gemisch vor. Diese ist im

etwas wirksameren *Cibacron Blue 3GA* (**34**) *ortho*-ständig. Eine andere Orientierung der einzelnen Glieder zueinander, wie im *Reactive Blue 5* (**35**) verwirklicht, verschlechterte die Hemmaktivität deutlich. Die Verkürzung der Seitenkette erwies sich als möglich. Allerdings scheint die Lage der Sulfonate zum Anthrachinon eine entscheidende Rolle zu spielen. *Reactive Blue 19* (**36**) war dem *Reactive Blue 2* vergleichbar. Es trägt an einem C-2-Spacer einen Schwefelsäureester, ohne diesen fiel die Hemmaktivität drastisch ab (*Reactive Blue 19 alcohol*, **37**). Auch *Acid Blue 25*, das an der 4-Position als Rest R nur einen Phenylring aufweist, besaß keinerlei Hemmaktivität. Alle Verbindungen waren auch Antagonisten an den P2X-Rezeptoren des *vas deferens* mit K_i -Werten im Bereich zwischen 1 und 17 μM (Antagonisierung des Effekts von α,β -MethylenATP). Sie antagonisierten die Relaxation der Meerschweinchen-*taenia coli* durch ADP βS , einem P2Y₁-Agonisten, ebenfalls im Bereich zwischen 1 und 10 μM . Weitere *Reactive Blue 2*-Derivate sind weiter unten beschrieben, da sie in einem anderen Testsystem charakterisiert wurden.

Tabelle 2.7: Naphthalinsulfonate²¹¹

Verbindung	 <i>BG0124</i> (38)	 <i>BG0136</i> (39)	 <i>BG041</i> (40)	 <i>BG010</i> (41)
	Hemmung ^{b,c}			
„ATPase“ ^a	49	50	77	64
„ADPase“ ^a	50	42	69	69

^a Getestet wurde an einer aus Rindermilz isolierten Ectonucleotidase; K_m (ATP): 18 μM ; K_m (ADP): 33 μM ; Konzentration an ATP: 100 μM .

^b Senkung der Hydrolyserate von zugesetztem ATP, bzw. ADP (auf % der Kontrolle)

^c Konzentration des Inhibitors: 100 μM

Basierend auf den Erfahrungen, die man mit den Isothiocyanaten und *Suramin* gesammelt hatte, synthetisierten *Gendron et al.* eine Reihe von Naphtholen mit Sulfonsäuresubstituenten.²¹¹ Aus diesen Untersuchungen ging die Verbindung *BG0136* (**39**) vor, ein α -Naphthol mit zwei Sulfonsäureresten. Sie hemmte eine aus Rindermilz isolierte „NTPDase“ (vermutlich E-NTPDase1) und „NDPDase“ mit von

den Autoren geschätzten K_i -Werten von 380 μM bzw. 300 μM . Die Autoren bestätigten im Wesentlichen die Ergebnisse von *Bültmann et al.* Zur Hemmung der E-NTPDase stellt das Naphthalinringgerüst ein geeignetes Grundgerüst dar. Das Substitutionsmuster von Sulfonsäuren und anderen Gruppen bestimmt entscheidend über das Hemmpotential. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund der Verbindung *ANTS* (Tabelle 2.5) zu sehen, die prinzipiell sehr ähnlich aufgebaut ist, allerdings den Abbau von ATP im *in vivo* von Ratten nicht hemmen konnte. *BG0136* ist ein Antagonist am $P2Y_2$ -Rezeptor mit einem K_i -Wert, der von den Autoren mit größer als 380 μM angegeben wurde.

Tabelle 2.8: Pyrimidin-Derivate²¹³

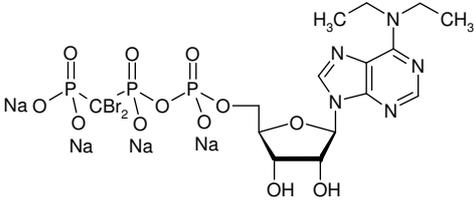
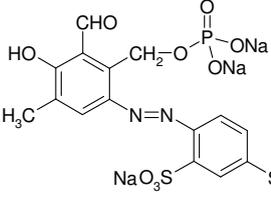
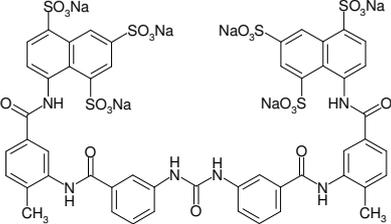
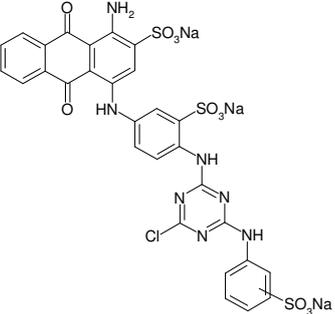
Verbindung	42	43	44	45
	K_i [μM]			
Abbau ADP ^a	1800	1500	700	550
Abbau ATP ^a	600	800	1200	180

^a Gemessen an Ratten-Cortex-Synaptosomen, vermutlich NTPDase1

Cechin et al. schließlich testeten vier Pyrimidinderivate mit lipophilen Substituenten an Ratten-Cortex-Synaptosomen.²¹³ Die Verbindungen sind sehr inhomogen, so daß man keine Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten kann. Sie hemmten die synaptosomale(n) Ectonucleotidase(n) lediglich im höheren mikromolaren Konzentrationsbereich. Das lipophilste Pyrimidin-Derivat **45** war am aktivsten. Es besitzt lediglich in der 1-Position eine H-Akzeptorfunktion. Die 2-, 3- und 4-Substituenten können hydrophobe Wechselwirkungen durch ihre Methylthio-, N-Methyl- und Trichlormethylsubstituenten eingehen. Die Substanzen wurden bislang nicht weiter an P2-Rezeptoren untersucht.

Mit einem im Arbeitskreis Prof. Müller entwickelten Kapillarelektrophorese- (CE-) gestützten Enzymassay für rekombinante E-NTPDasen wurden die K_i -Werte der Standardinhibitoren *ARL67156* (**46**), *PPADS* (**47**), *Suramin* und *Reactive Blue 2* an den Ratten-NTPDasen 1-3 ermittelt (Tabelle 4.1).²¹²

Tabelle 2.9: An E-NTPDasen untersuchte Standardinhibitoren²¹²

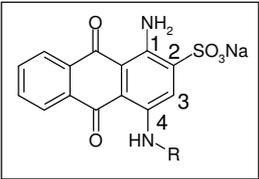
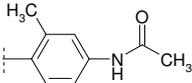
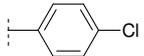
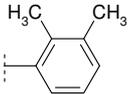
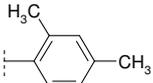
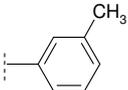
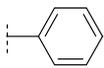
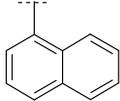
Strukturformel	Verbindung	NTP-Dase1 ^a	NTP-Dase2 ^a	NTP-Dase3 ^a
		K _i [μM]		
	<i>ARL 67156</i> (46)	27.0	>> 600	112.1
	<i>PPADS</i> (47)	46.0	44.2	3.0
	<i>Suramin</i> (28)	300	65.4	12.7
	<i>Reactive Blue 2 (RB 2)</i> (33)	20.0	24.2	1.10

^a Getestet wurde am rekombinanten Enzym der Ratte; K_m (NTPDase1): 76 μM; K_m (NTPDase2): 203 μM; K_m (NTPDase3): 311 μM; ATP-Konzentration: 320 μM.

Alle vier Substanzen inhibieren diese Ectonucleotidasen im mittleren (300 μM) bis unteren (1,1 μM) mikromolaren Konzentrationsbereich. *PPADS*, *Suramin* und *RB2* weisen dabei eine Präferenz für die NTPDase3 auf, während *ARL67156* die NTPDase1 stärker hemmt. *ARL67156* hemmte die NTPDase2 nicht. Der K_i-Wert an diesem Enzym muß über 600 μM liegen, da in der zur Errechnung des K_i-Werts herangezogenen Cheng-Prusoff-Gleichung (s. 6.8.1) der K_m-Wert des Enzyms von 203 μM und die Substratkonzentration von 320 μM berücksichtigt werden müssen. Eine Subtyp-selektive Enzymhemmung kann mit keiner der Verbindungen erzielt werden, da die maximalen Unterschiede der K_i-Werte lediglich im Bereich einer Zehnerpotenz liegen. Das ATP-Analogon *ARL67156* besitzt im β,γ-Dibrommethylene-

bisphosphonat eine Gruppe, die von E-NTPDasen nicht angreifbar ist. Sie ist zusätzlich sehr raumfüllend und kann hydrophobe Interaktionen mit Aminosäuren in der Nähe des katalytischen Zentrums bzw. im katalytischen Zentrum selbst eingehen. Die Diethylaminogruppe in 6-Position wird vermutlich mit hydrophoben Aminosäuren im Bereich der Bindungsstelle für Nucleobasen in Interaktion treten. Sie soll die Selektivität gegenüber P2-Rezeptoren bewirken. Demgegenüber stellen *PPADS*, *Suramin* und *RB2* nichtnucleosidische Inhibitoren dar. Insbesondere *Suramin* und *RB2* sind sehr raumfüllende Moleküle.

Tabelle 2.10: *RB2*-Derivate als E-NTPDase-Inhibitoren²²¹

	Verbindung	NTP-Dase1 ^a	NTP-Dase2 ^a	NTP-Dase3 ^a	Maus-P2Y ₂
R		K _i [μM]			IC ₅₀ [μM]
	48	>> 250 (15 %) ^b	486	343	12
	49	16	18	16	21
	50	> 100 ^c (67 %) ^b	23	38	14
	51	18	16	41	10
	52	>> 250 (25 %) ^b	26	23	11
	53	52	13	19	22
	54	49	36	14	11
	55	>> 250 (0 %) ^b	>> 600 (0 %) ^b	1.5	11

^a Getestet wurde am rekombinanten Enzym der Ratte; K_m (NTPDase1): 76 μM; K_m (NTPDase2): 203 μM; K_m (NTPDase3): 311 μM; ATP-Konzentration: 320 μM.

^b Inhibition bei 1 mM

^c Inhibition war nicht konzentrationsabhängig.

Ihre Eigenschaften in Bezug auf die Interaktion mit den Enzymen werden durch Arylsulfonate und (hetero-)aromatische Strukturen bestimmt. Es fällt auf, daß *PPADS* und *Suramin* amphiphile Eigenschaften aufweisen. Möglicherweise verhindern sie die Oligomerisation der E-NTPDasen, indem sie als Detergentien wirken.²¹¹ Da sich *Reactive Blue 2* als vergleichsweise potenter Inhibitor von E-NTPDasen herauskristallisierte (K_i [NTPDase3]: 1.1 μM), wurde es als Leitstruktur zur Darstellung weiterer potentieller Ectonucleotidasehemmer herangezogen (Tabelle 2.10). Der Grundkörper des *RB2* wurde an der 4-Position stark verkleinert. An Stelle des sehr raumfüllenden, sulfonierten Ringsystems der Leitstruktur trat ein unsubstituierter, bzw. mit kleinen, unpolaren Substituenten versehener Phenylring und auch ein Naphthalinring. Mit dieser Art der Derivatisierung konnte keine Selektivität in der Enzymhemmung gegenüber der Affinität zum P2Y₂-Rezeptor erreicht werden. Aus der Reihe der dargestellten Verbindungen sticht aber das Anthrachinonderivat **55** heraus, welches an der 4-Position einen Naphthalinring trägt. Es hemmte die NTPDase3 mit einem K_i -Wert von 1.5 μM potent und selektiv den anderen Isoenzymen gegenüber. Diese Verbindung zeigte auch moderate (siebenfache) Selektivität dem Maus-P2Y₂-Rezeptor gegenüber (IC_{50} : 11 μM).

Tabelle 2.11: Polyoxometalate als Inhibitoren von E-NTPDasen²²²

Summenformel	Verbindung	NTP-Dase1 ^a	NTP-Dase2 ^a	NTP-Dase3 ^a
K_i [μM]				
$\text{Na}_6[\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}]$	56	2.58	28.8	3.26
$\text{H}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}] \cdot \text{H}_2\text{O}$	57	3.49	6.17	8.72
$\text{K}_7[\text{Ti}_2\text{W}_{10}\text{PO}_{40}]$	58	2.00	37.4	4.00
$\text{K}_6\text{H}_2[\text{TiW}_{11}\text{CoO}_{40}] \cdot 13 \text{H}_2\text{O}$	59	0.14	0.91	0.563
$\text{K}_{10}[\text{Co}_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{PW}_9\text{O}_{34})_2] \cdot 22 \text{H}_2\text{O}$	60	0.48	1.53	2.61
$(\text{NH}_4)_{18}[\text{NaSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}]$	61	>> 250	3.94	3.77

^a Getestet wurde an rekombinanten Enzymen der Ratte; K_m (NTPDase1): 76 μM ; K_m (NTPDase2): 203 μM ; K_m (NTPDase3): 311 μM ; ATP-Konzentration: 320 μM .

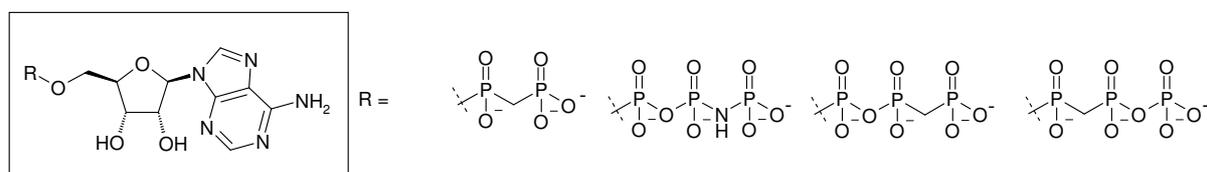
Eine chemisch von den oben beschriebenen Verbindungen sehr verschiedene Gruppe stellen die Polyoxometalate dar.²²² Einige Vertreter aus dieser Familie von hoch geladenen Metallionenkomplexen erwiesen sich Inhibitoren an Ratten-E-

NTPDasen teilweise im submikromolaren Bereich (Tabelle 2.11). Mit dem Polyoxowolframat **61**, der die NTPDase1 kaum hemmt, könnte es möglich sein, die physiologische Bedeutung der NTPDasen 2 und 3 selektiv auch in Gegenwart der NTPDase1 zu untersuchen. Die Polyoxometalate wurden bislang am P2Y₁₂-Rezeptor untersucht und waren an ihm mit Ausnahme von **60** ($K_i = 1.30 \mu\text{M}$) nur schwach affin.

2.5.2 Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitoren

Die Ecto-5'-Nucleotidase der Ratte wird durch ATP ($K_i: 8.9 \mu\text{M}$) und ADP ($K_i: 0.91 \mu\text{M}$) gehemmt (noch nicht veröffentlichte Daten, Jamshed Iqbal).¹⁴ Diese stellen allerdings keine idealen Inhibitoren dar, da sie selbst dem enzymatischen Abbau durch E-NTPDasen, E-NPPs und unspezifischen Phosphatasen unterliegen. Als stabileres Analogon des ADPs wurde α,β -Methylen-ADP (**62**) entwickelt (Tabelle 2.12).²²³

Tabelle 2.12: Kompetitive Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitoren²²⁴



Verbindung	62	63	64	65
	Hemmung ^{b,c}	Hemmung ^{b,c}	Hemmung ^{b,c}	Hemmung ^{b,c}
„Ecto-5'-Nucleotidase“ ^a	92	54	56	73

^a Getestet wurde an einer rekombinanten Ecto-5'-Nucleotidase der Ratte; K_m (AMP): $25 \mu\text{M}$

^b Senkung der Hydrolyserate von 0.5 mM zugesetztem AMP (% der Kontrolle)

^c Konzentration des Inhibitors: $100 \mu\text{M}$

An der isolierten Ecto-5'-NT von *Torpedo marmorata* wurde ein K_i -Wert für das α,β -Methylen-ADP von $0,85 \mu\text{M}$ bestimmt.²²⁵ Die Ecto-5'-NT der Ratte hemmte diese Substanz mit einem K_i -Wert von $0.87 \mu\text{M}$. Auch einige ATP-Derivate hemmten die Ecto-5'-Nucleotidase (Tabelle 2.12).²²⁴ Neben den kompetitiven Inhibitoren wurden aus den Samen von *Areca Catechu* (Betelpalme) Polyphenole mit hohem Molekulargewicht isoliert, die die Ecto-5'-NT aus Rattenleber und dem Gift aus *Crotalus atrox* (Klapperschlange) nicht-kompetitiv inhibierten (Tabelle 2.13).²²⁶ Die Struktur dieser Polyphenole wurde von den Autoren nicht weiter aufgeklärt. Die Ecto-

5'-NT aus *Crotalus atrox* wurde wahrscheinlich ausgewählt, da das Gift dieser Schlange kommerziell erhältlich und das Enzym somit leicht zugänglich ist.

Tabelle 2.13: Nicht-kompetitive Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitoren²²⁶

Bezeichnung	Verbindung	M (g/mol)	Ratten-Ecto-5'- NT	Schlangen-Ecto- 5'-NT
IC ₅₀ (µM) ^a				
NPF-86IA	66	5620	3600	17
NPF-86IB	67	5000	4700	38
NPF-86IIA	68	29400	6300	2
NPF-86IIB	69	8610	2000	9

^a Testsystem siehe²²⁷

2.5.3 Zusammenfassung und Bewertung

Der ideale Inhibitor sollte eine Ectonucleotidase isoenzymselektiv im nanomolaren Bereich hemmen und keine Affinität zu Nucleotid- oder Nucleosidrezeptoren aufweisen. Es ist nicht wünschenswert, daß er gleichzeitig Substrat einer Ectonucleotidase ist. Desweiteren sollten auch seine Abbauprodukte nicht etwa mit P1-Rezeptoren interagieren. Diese die Pharmakodynamik betreffenden Forderungen werden kaum von den bislang entwickelten Substanzklassen erfüllt. Alle Verbindungen hemmen Ectonucleotidasen im mikromolaren Bereich, zwei der Polyoxometalate auch im höheren submikromolaren Bereich. Alle vom *Suramin* und von Farbstoffen wie *Reactive Blue 2* abgeleiteten Arylsulfonate sind auch Antagonisten an verschiedenen P2-Rezeptoren. Die 8-Alkylthio-ATP-Derivate könnten einem enzymatischen Abbau unterliegen, sie sind noch nicht vollständig charakterisiert. *ARL67156* scheint gegenüber P2-Rezeptoren selektiv zu sein und hemmt auch die NTPDase2 nicht. Allerdings hemmt es sowohl E-NTPDase1 als auch 3. Es stellt damit keinen Isoenzym-selektiven Inhibitor dar. Möglicherweise inhibiert es auch E-NPPs.²²⁸ Die Polyoxometalate sind vermutlich ebenfalls selektiv gegenüber P2-Rezeptoren. Sie eignen sich allerdings ebenfalls nicht zur selektiven Hemmung eines E-NTPDase-Isoenzym. $(\text{NH}_4)_{18}[\text{NaSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}]$ stellt möglicher-

weise ein interessantes pharmakologisches Werkzeug dar, da es selektiv die NTPDase2 und 3 hemmt.

In Bezug auf die Bioverfügbarkeit sollten oral verabreichte Ectonucleotidase-Inhibitoren nicht geladen sein, ein niedriges Molekulargewicht aufweisen und chemisch und metabolisch stabil sein. Auch diese Forderungen werden von keiner der bislang publizierten Substanzen erfüllt, alle enthalten geladene Gruppen wie Phosphate oder Sulfonate. Ihr Molekulargewicht, insbesondere das der Polyoxometalate, liegt meist deutlich über 500 g/mol. Die Nucleotidanaloga zeichnen sich nicht durch metabolische Stabilität aus, da sie zumindest durch unspezifische Phosphatasen gespalten werden können. *ARL67156* könnte wie auch das verwandte β,γ -Methylen-ATP durch E-NPPs abgebaut werden.^{228,229} Polyoxometalate sind chemisch nicht sehr stabil und zerfallen teilweise mit Halbwertszeiten im Bereich weniger Stunden bis weniger Tage.

Sicherlich stellen die publizierten Verbindungen noch nicht den Stand dar, den man als medizinischer Chemiker erreichen möchte. Ein Arzneistoffkandidat ist bisher nicht unter ihnen. Man muß sie allerdings auch vor dem Hintergrund beurteilen, daß die einsetzbaren Testsysteme lange Zeit auf aufwendigen HPLC-Methoden beruhten. Erst neuerdings sind effizientere CE-Methoden entwickelt worden, die sich auch zum Aufbau eines High-Throughput-Systems eignen. Da Ectonucleotidasen noch keine validierten Arzneistofftargets darstellen, das kommerzielle Interesse an einem Inhibitor also noch gering ist, bestand von Seiten der pharmazeutischen Industrie offensichtlich noch nicht der Anreiz, ein solches recht kostspieliges System aufzubauen.

2.6 Ziele dieser Arbeit

Sowohl P2Y-Rezeptoren als auch Ectonucleotidasen stellen für den medizinischen Chemiker sehr interessante Zielstrukturen dar. Mit Ausnahme des P2Y₁₂-Rezeptors sind sie allerdings noch keine validierten Arzneistofftargets. Aus Tabelle 1.1 „Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten für P2-Rezeptorliganden“ und Abschnitt 2.4.5 „Physiologische Funktionen der E-NTPDasen und der Ecto-5'-Nucleotidase und therapeutisches Potential von Inhibitoren“ geht hervor, daß es sowohl für potente, selektive P2-Rezeptoragonisten und -antagonisten als auch für potente und selektive

Inhibitoren der verschiedenen Ectonucleotidasen potentielle medizinische Anwendungsmöglichkeiten gibt. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher durch zielgerichtete Synthese - ausgehend von UTP und ATP als Leitstrukturen - neue Liganden für die pyrimidinergen P2-Rezeptoren P2Y₂, P2Y₄ und P2Y₆ sowie insbesondere Hemmstoffe für E-NTPDasen und die Ecto-5'-Nucleotidase zur Verfügung gestellt werden. Angestrebt werden dabei Molekülstrukturen, die sich im Vergleich zu Nucleotiden durch höhere metabolische Stabilität und bessere pharmakokinetische Eigenschaften auszeichnen.

3. Synthesen

Etablierte Leitstrukturen für die Entwicklung von P2Y-Rezeptorliganden und E-NTPDase-Inhibitoren sind zum einen Nucleotide, zum anderen verschiedene aromatische Sulfonate, wie *Suramin* und *Reactive Blue 2*. Wie bereits diskutiert, besitzen Vertreter dieser Substanzklassen als Wirkstoffe inhärente Schwächen, die sowohl in der Pharmakodynamik (Affinität, Selektivität) als auch in der Pharmakokinetik (Stabilität, perorale Bioverfügbarkeit) liegen. Es erscheint deswegen notwendig, neue Leitstrukturen für die genannten Targets zu finden. Ein schon in der Literatur beschriebener Ansatz ist das Design von Nucleotid-Mimetika. Nucleotid-Mimetika sind Verbindungen, in denen ein Nucleosid an der 5'-Position ein Mimikry der Nucleosid-5'-Phosphatkette trägt. Dieses Mimikry wird Phosphat-Mimetikum genannt. *Uri et al.* publizierten eine Reihe von Adenosinderivaten als P2Y₁-Antagonisten, die an der 5'-Position Oligopeptide trugen.²³⁰ Eine dieser Verbindungen, AdoCasp₄ (**70**) genannt, hemmte den P2Y₁-Rezeptor-induzierten cytosolischen Ca²⁺-Anstieg mit einem K_i-Wert von 80 μM (Abbildung 3.1). Ein weiteres Nucleotid-Mimetikum, Verbindung **71**, hemmte den P2Y₁₂-Rezeptor mit einem K_i-Wert von 9 nM.²³¹

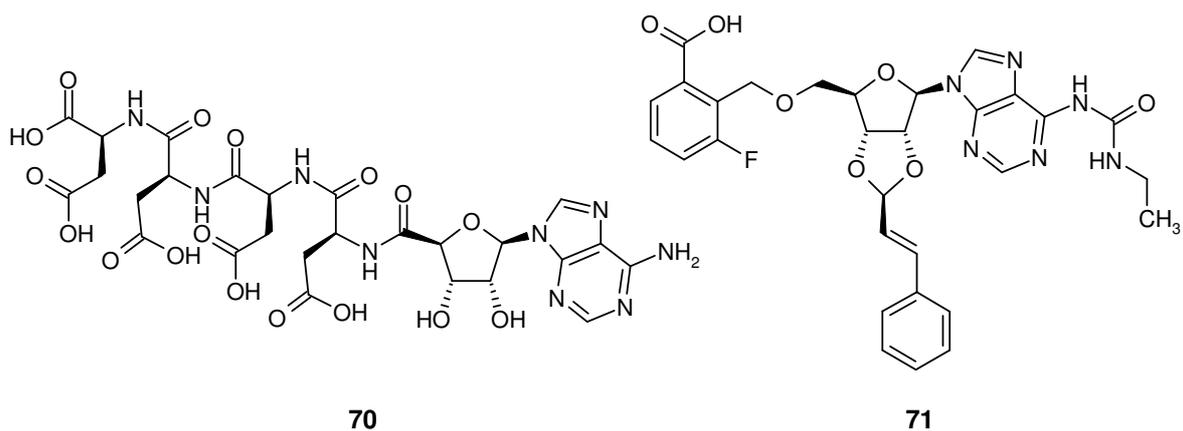


Abbildung 3.1: Beispiele für Nucleotidmimetika

3.1 Zielstruktur

Zielstrukturen zur Darstellung neuer Liganden für pyrimidinerge P2-Rezeptoren bzw. Ectonucleotidase-Inhibitoren sind Uracilnucleotid-Mimetika der in Abbildung 3.2 dargestellten allgemeinen Strukturformel **72**. In Molekülen dieser Art ist das Nucleosid Uridin an der 5'-Position oxidiert und mit einem Triphosphatmimetikum, bestehend aus aliphatischem Linker L und Kopfgruppe K, verbunden. K seien verschiedene polare Gruppen wie Dicarbonsäuren oder Phosphonsäuren sowie auch deren Ester. Diese sind über ein Carboxamid mit den aliphatischen Linkern unterschiedlicher Länge verknüpft.

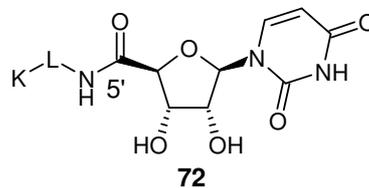


Abbildung 3.2: Uracilnucleotid-Mimetika (K: Aminodicarbonsäuren, Amino-phosphonsäuren; L: ω -Aminocarbonsäuren)

Uridin wurde als Nucleosid gewählt, da zunächst die Suche nach Liganden für die P2Y_{2,4}-(UTP)-Rezeptoren und den UDP-Rezeptor P2Y₆ im Mittelpunkt unserer Untersuchungen stand. Diese Uracilnucleotide besitzen nur Affinität zu den genannten P2Y-Rezeptor-Subtypen, ein weiteres Uracil-Nucleotid, die UDP-Glucose aktiviert den P2Y₁₄-Rezeptor. Adeninnucleotide können alle P2X- und die P2Y_{1,2,11,12,13}-Rezeptor-Subtypen aktivieren. Überdies besteht bei Adeninnucleotid-Mimetika die Gefahr, daß sie Affinität zu intrazellulären ATP-Bindungsstellen besitzen, z.B. Tyrosinkinasen. Die Chance, selektivere Verbindungen zu erhalten, scheint also bei Analoga der Uracilnucleotide größer.

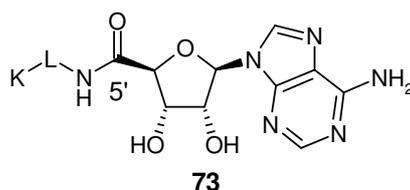


Abbildung 3.3: Analoge Adeninnucleotid-Mimetika (K= Aminophosphonsäuren; L= ω -Aminocarbonsäuren)

Trotzdem ergab sich im Verlaufe der vorliegenden Arbeit der Anreiz, analog zu den Uracilnucleotid-Mimetika auch solche mit Adenin als Base darzustellen (**73**, Abbildung 3.3). Die Entwicklung von Uracilnucleotid-Mimetika ist vom Standpunkt der medizinischen Chemie reizvoller, da solche Verbindungen bislang in deutlich geringerem Umfang beschrieben wurden als Mimetika anderer Nucleotide. Die chemischen Verfahren sind jedoch nicht einfach von der teilweise sehr gut etablierten Chemie anderer Nucleoside wie Adenosin auf die des Uridins übertragbar. Teilweise gilt es, neue Verfahren zur Darstellung von Uridinderivaten zu entwickeln.

3.2 Entwicklung und Umsetzung der Synthesestrategie

Folgende Anforderungen werden an die Syntheseprotokolle gestellt, die in dem zu den Nucleotid-Mimetika führenden Synthesepfad eingesetzt werden sollen: Jeder einzelne Reaktionsschritt soll eine hohe Ausbeute erbringen. Die Reaktionssequenz soll möglichst wenige Schritte umfassen und eine für die Auswertung von Struktur-Wirkungsbeziehungen ausreichende Anzahl von Verbindungen zur Verfügung stellen. Gerade in diesem frühen Stadium der Leitstrukturfindung ist es wichtig, eine möglichst große Breite an Verbindungen schnell darzustellen. Schließlich müssen alle Reaktionen mit den eingesetzten Nucleosiden kompatibel sein. Insbesondere Pyrimidin-Nucleoside wie Uridin sind diesbezüglich sehr empfindliche Strukturen. Sie neigen unter Umständen rasch zu Zersetzung bzw. unterliegen unerwünschten Konkurrenzreaktionen zu störenden Nebenprodukten.²³²⁻²³⁵

Am Anfang der Entwicklung einer Synthesestrategie steht daher, wie in Abbildung 3.4 anhand des Uridins (**13**) gezeigt, eine Analyse der Reaktivitäten von Nucleosiden.

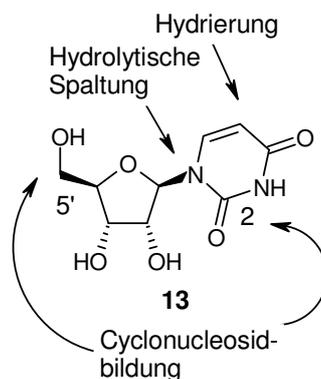


Abbildung 3.4: Reaktivitäten des Uridins

Insbesondere bei der Auswahl von Schutzgruppen ist die Labilität der nucleosidischen Bindung zu berücksichtigen, grundsätzlich können alle Nucleoside in mehr oder weniger großem Ausmaß im sauren (wäßrigen) Medium in Nucleobase und Ribose gespalten werden.^{232,233} Die Base Cytosin kann unter diesen Bedingungen zusätzlich noch der Desaminierung zu Uracil unterliegen. Die Pyrimidinbasen, besonders Uracil, werden bereits unter sehr milden Bedingungen hydriert, während Purine auch unter erhöhtem Wasserstoffdruck verschiedenen Hydrierungskatalysatoren gegenüber stabil bleiben.^{232,236,237} Alkylierungen finden immer eher an der Nucleobase als an der 5'-Position des Zuckers statt.^{238,238} Vielen Synthesemethoden, die zu sehr interessanten Produkten führen könnten, bleibt der Einsatz verwehrt, da Nucleoside zur Cyclisierung befähigt sind. Hier sei vor allem die Mitsunobu-Reaktion erwähnt.²³⁹ In einer solchen Nebenreaktion bildet die aktivierte 5'-Position der Ribose eine kovalente Bindung mit der 2-Position der Pyrimidinbasen, bzw. mit der 3-Position oder 8-Position der Purinbasen.^{235,240-247} Besonders 2',3'-Ketal- oder Acetal-geschützte Nucleoside sind der Gefahr dieser Nebenreaktion ausgesetzt, da die Schutzgruppe die Basenorientierung von *anti* nach *syn* verschiebt.²⁴⁸ Desweiteren wurde die Addition von Nucleophilen in der 5'-Position, z.B. eines Thiols, an die 5,6-Doppelbindung des Uracils beschrieben.²⁴⁹ Ein Ausweg aus diesem Dilemma besteht in der Einführung von Schutzgruppen in der Nucleobase, durch die ihre nucleophilen Eigenschaften verändert werden. Die Synthese verschiedener Purinnucleosid-5'-Ether und -Amine gelang beispielsweise nach Einführung eines Harnstoffs in der 6-Position des Purins (Abbildung 3.1).²³¹

3.2.1. Schutzgruppen für die 2',3'-Positionen der Ribose

Als Ausgangsprodukt für die oben skizzierte Synthesestrategie diente Uridin, später kam Adenosin hinzu. Die Nucleoside wurden an der 2'- und 3'-Position - dieses Strukturfragment stellt ein cis-Diol dar - geschützt, um die 5'-Position selektiv derivatisieren zu können und die Löslichkeit in organischen Solventien zu erhöhen. Viel genutzte Schutzgruppen für ein solches cis-Diol sind verschiedene Ketone und Aldehyde (Tabelle 3.1), die mit diesem zu einem Ketal bzw. Acetal reagieren. Nucleoside werden am häufigsten mit Aceton geschützt, da es kostengünstig und sehr einfach mit hohen Ausbeuten einzuführen ist.^{230,250-252} Das entstandene Ketal,

das sogenannte Acetonid, besitzt außerdem den Vorteil, nur geringe sterische Ansprüche zu stellen. Ein großer Nachteil hingegen ist seine relativ große Hydrolysebeständigkeit. Die sauren Bedingungen, unter denen das Ketal gespalten wird, können auch zu massivem Ausbeuteverlust durch Spaltung der nucleosidischen Bindung oder anderer hydrolyseempfindlicher Partialstrukturen führen.^{233,253,254}

Der Wunsch, dieses Problem zu umgehen, führt zur Erwägung von Schutzgruppen, die durch andere, nichthydrolytische Entschützungsprozeduren entfernt werden. Ähnlich, wie man Benzylester und -ether durch Hydrogenolyse spalten kann, wird auch die Benzylidenstruktur mit H_2 und Pd/C entfernt. Allerdings schließt sich der Einsatz dieser Schutzgruppe im Fall der Pyrimidin-Nucleoside aus, da ihre hydrogenolytische Entfernung recht drastische Bedingungen erfordert, die 5,6-Doppelbindung der Pyrimidinbasen aber allzu leicht hydriert werden kann.^{232,237} Ein Ausweg aus diesem Dilemma besteht in der Verwendung der Benzyloxycarbonylgruppe (*O*-Cbz), die unter den sehr milden Bedingungen der Transferhydrogenolyse mit Pd/C und Cyclohexadien abgespalten wird.²³⁷ Ihre Einführung erfordert allerdings eine Dreistufensynthese und den Einsatz vergleichsweise teurer Reagentien.

Aus diesen Überlegungen heraus wurde nach einer alternativen Schutzgruppe gesucht, die sich hydrolytisch mit niedrigen Säurekonzentrationen abspalten läßt. *Smith et al.* veröffentlichten bereits 1962 eine Arbeit mit umfangreichen Untersuchungen zur Stabilität von Schutzgruppen für die 2'- und 3'-Position der Nucleoside. Unter den von ihnen eingesetzten verschieden substituierten Arylaldehyden konnten sie das mit *p*-Methoxybenzaldehyd (Anisaldehyd) gebildete Acetal besonders leicht hydrolysieren.²³³ Eigenen Experimenten zufolge eignet sich eine 3-5 %ige Lösung von Trifluoressigsäure in Dichlormethan in Anwesenheit von katalytischen Mengen an Wasser am besten zur Entschützung.²⁵⁵ In den meisten Fällen konnte das gewünschte Nucleosid-Derivat ohne dünnschichtchromatographisch nachweisbare Bildung von Neben- oder Zersetzungsprodukten glatt erhalten werden. Sowohl die nucleosidische Bindung als auch hydrolysierbare Gruppen wie Ester und Amide in der neu eingeführten 5'-Seitenkette tolerieren die Bedingungen problemlos. Der Anisaldehyd erwies sich damit als eine Schutzgruppe, die mit hohen Ausbeuten in einer einfachen Synthese eingeführt werden kann (Abbildung 3.5), die die Bedingungen aller folgenden Schritte toleriert und die sich

schließlich sehr leicht abspalten läßt. Allerdings gab die von den Autoren publizierte Originalvorschrift nur schlechte Ausbeuten von unter 20 %. Deshalb wurde die Synthese optimiert.

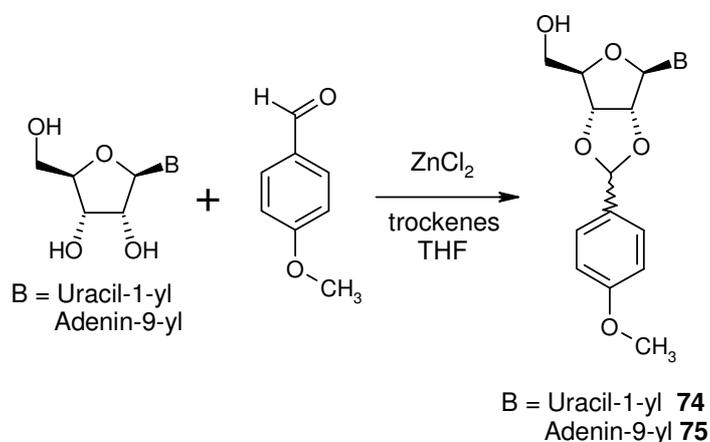


Abbildung 3.5: Einführung der Anisylidenschutzgruppe

Die in der Literatur angegebene Mischung aus Nucleosid, Anisaldehyd und Zinkchlorid war sehr zähflüssig und ließ sich schlecht rühren. Sie wurde deshalb um trockenes THF als Co-Solvens ergänzt. Durch diese einfache Maßnahme konnten die Verbindungen **74** (2',3'-*p*-Methoxybenzylidenuridin) und **75** (2',3'-*p*-Methoxybenzylidenadenosin) gemäß Abbildung 3.5 in Ausbeuten von über 90 % als Gemisch von *endo*- und *exo*-Diastereomeren dargestellt werden. Im Fall des Uracilnucleosids lag das Verhältnis von *endo* zu *exo* bei 2:3 während sich bei Adenosin ein 1:1-Gemisch ergab, wie die Auswertung der Integrale im ¹H-NMR-Spektrum zeigte (Abschnitt 3.3)

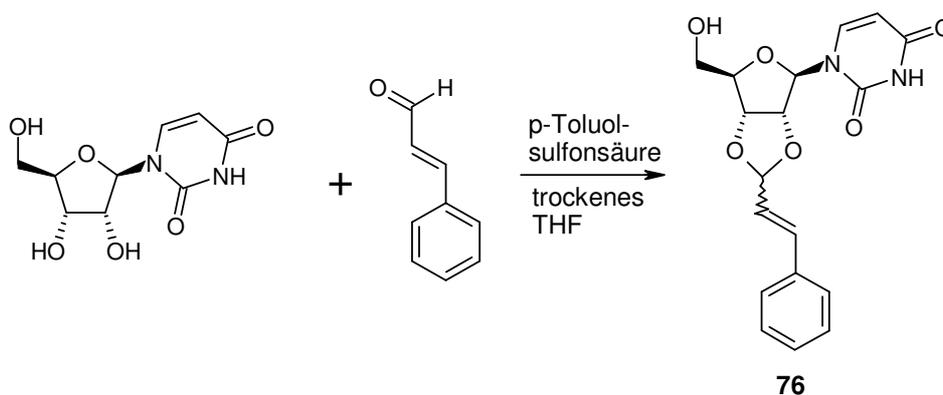


Abbildung 3.6: Darstellung von 2',3'-Cinnamylidenuridin **76**

Die so eingeführten Schutzgruppen können wie in Verbindung **71** (Abbildung 3.1) auch als pharmakophore Partialstrukturen dienen.²⁵⁶ Daher sollte Uridin außerdem

mit Zimtaldehyd zur Verbindung **76** umgesetzt werden (Abbildung 3.6). Erste Versuche, die analog zur Einführung der Anisylidenschutzgruppe mit ZnCl_2 als Lewisäure durchgeführt wurden, schlugen fehl. Erst die Verwendung von *p*-Toluolsulfonsäure als Katalysator bei leicht erhöhter Temperatur brachte den gewünschten Erfolg. Verbindung **76** ließ sich in guter Ausbeute von 80 % als 1:1-Gemisch der *endo*- und *exo*-Diastereomeren erhalten.

Tabelle 3.1 führt einige Schutzgruppen, die man in die 2',3'-Positionen von Nucleosiden einführen kann, mit einem kurzen Kommentar zu deren Eigenschaften auf.

Tabelle 3.1: Bewertung einiger Schutzgruppen für die 2',3'-Positionen der Ribose

Schutzgruppe	Bewertung
2',3'-Acetonid	Hydrolytische Abspaltung mit hohen Säurekonzentrationen birgt die Gefahr der Produktzersetzung
2',3'-Benzylidenacetal	Hydrogenolytische Abspaltung birgt die Gefahr der Hydrierung der 5,6-Doppelbindung von Pyrimidinbasen
2',3'-Dibenzylloxycarbonylester	Schonende Transferhydrogenolyse möglich, aber eher umständliche Einführung der Schutzgruppe
2',3'-Anisylidenacetal	Hydrolytische Abspaltung unter sehr milden Bedingungen möglich

3.2.2 Derivatisierungsmöglichkeiten der Nucleosid-5'-Position

In diesem Abschnitt soll die Funktionalisierung der Nucleosid-5'-Position diskutiert werden, da die Art der Bindung zwischen Nucleosid und einzuführender 5'-Seitenkette einen entscheidenden Einfluß auf die pharmakodynamischen Eigenschaften haben kann.²⁵¹ Die chemische und evtl. auch metabolische Stabilität des Endproduktes bleiben ebenfalls nicht unbeeinflusst. Gerade dieser Schritt ist ein sehr empfindliches Glied in der Synthesekette, weil hier die Fähigkeit der Nucleoside zur Cyclisierung berücksichtigt werden muß. In der Literatur findet sich eine große Bandbreite an verschiedensten Reaktionen, die erfolgreich durchgeführt wurden und Möglichkeiten und Grenzen umreißen. So sind Nucleosid-5'-Ether,^{231,238,257,258}

und -Thioether,²⁴⁷ acylierte und alkylierte Nucleosid-5'-Amine,^{231,246,247,259} Nucleosid-5'-Carbamate,²⁵¹ Nucleosid-5'-Vinyl-derivate^{231,261-263} und Nucleosid-5'-Amide^{230,231,251,252} beschrieben, s. auch Tabelle 3.2. Es stellt sich die Frage, welche dieser Derivate als Leitstrukturen für die eigene Strategie herangezogen werden können.

Nucleosid-5'-Ether sollten sich auf den ersten Blick sehr einfach direkt aus dem Nucleosid mit einer starken Hilfsbase wie NaH und einem Elektrophil, z. B. einem Alkylbromid, im Sinne einer Williamson-Ethersynthese darstellen lassen. In der Praxis wird allerdings eher die Nucleobase alkyliert. Daher wurden solche Ether entweder über einen vielstufigen Weg von Ribose ausgehend mit anschließender Nucleosidkopplung oder nach Derivatisierung der 6-Position des Adenosins aufgebaut.²³⁸ Die Derivatisierungsstrategien umfaßten Darstellung des 6-Chlorpurins mit abschließender Aminierung, Einführung einer Dimethoxytritylschutz-gruppe und Darstellung von Purin-6-Harnstoffen.^{231,247,264} Bisher wurden so die Synthese sehr einfacher Purinnucleosid-5'-ether, wie dem 5'-Methyl- oder dem -Benzylether beschrieben, in der Patentliteratur finden sich auch Adeninnucleosid-Mimetika (Abbildung 3.1). Entsprechende Uracilnucleosid-Derivate fehlen.

Denkbar scheint auch der umgekehrte Weg, bei dem die 5'-Hydroxyfunktion in ein Elektrophil überführt wird, z. B. ein 5'-Chlorid, -Tosylat oder -Mesylat (Abbildung 3.7).

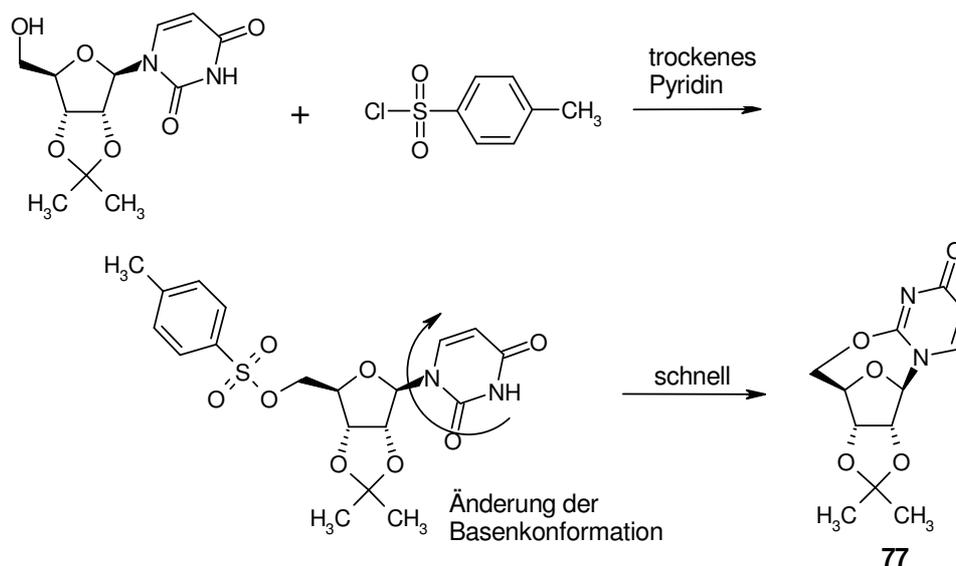


Abbildung 3.7: Bildung von 2,5'-Cyclouridin nach 5'-Tosylierung

Die so aktivierte Nucleosid-5'-Position könnte dann mit S- oder N-Nukleophilen zur Reaktion gebracht werden. Obgleich in der Literatur viel beschrieben, ist auch dieser

Ansatz mit Problemen behaftet. Nucleosid-5'-Tosylate und Mesylate neigen massiv zur Cyclonucleosidbildung (**77**, Abbildung 3.7), wobei sich die Basenkonformation ändert und die *syn*-Konformation fixiert wird.^{247,248} Die 5'-Chloride besitzen eine geringere Reaktivität, und so wurden bislang zumindest Purin-Nucleosid-5'-Chloride mit einfachen Thiolen wie z. B. Methan-, Ethan- und Propanthiol erfolgreich zur Reaktion gebracht, nie aber mit als Linker geeigneten bifunktionellen Thiolen, die dann weiteren Derivatisierungen gegenüber zugänglich wären.^{247,257,258} Der Nachweis eines breiter anwendbaren Zugangs zu den entsprechenden Pyrimidin-derivaten blieb ebenfalls aus.

Eine recht erfolgversprechende Option dagegen scheint die Einführung einer 5'-Aminogruppe zu sein. Der Engpaß liegt hier darin, eine genügende Menge des Nucleosid-5'-Amins bereitzustellen, da dessen Synthese sich vergleichsweise aufwendig gestaltet.^{245,246} *Liu et al.* haben die Darstellung gemäß Abbildung 3.8 mit Acetonid-geschützten Nucleosiden veröffentlicht. Die Ausbeute für das Uridin-Derivat **78** lag vor Abspaltung der Acetonidschutzgruppe bei 76 %.²⁴⁶ Ob die Reaktionsbedingungen auch auf hydrolyseempfindlichere und sterisch anspruchsvollere Anisyliden-geschützte Nucleoside übertragbar sind, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung.

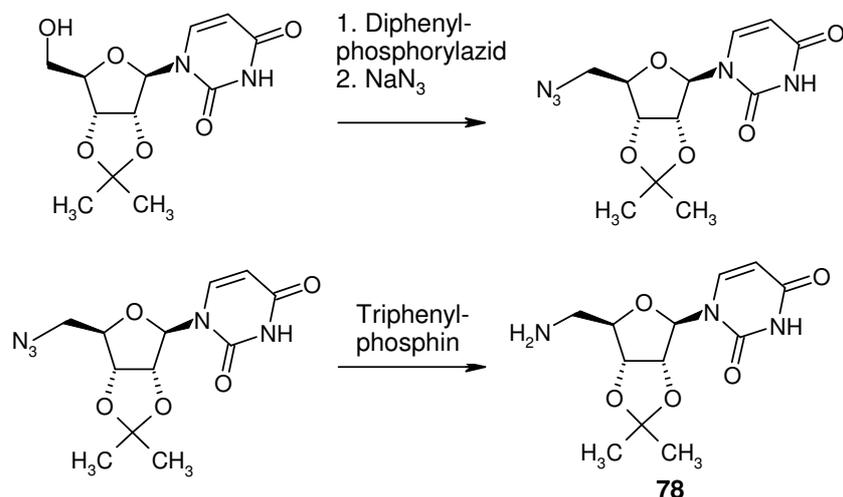


Abbildung 3.8: Einführung der Nucleosid-5'-Aminogruppe²⁴⁶

Da die Einführung der Nucleosid-5'-Aminogruppe präparativ aufwendig ist, bietet dieser Ansatz eher die Basis zur Herstellung von vielversprechenden Einzelsubstanzen als zur Generierung von Substanzbibliotheken. Das kann z.B. durch Acylierung der 5'-Aminogruppe (**79**, Abbildung 3.9) geschehen.

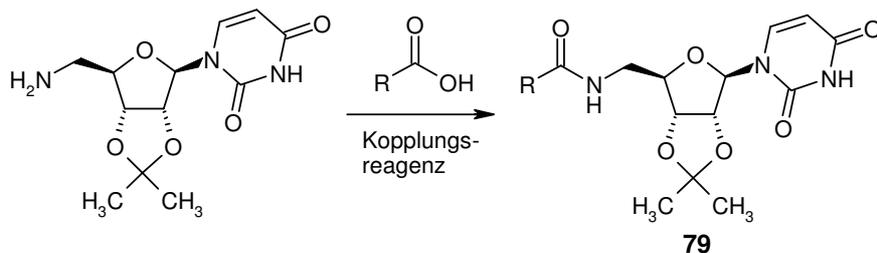


Abbildung 3.9: Acylierung des Uridin-5'-Amins (Lit)

Das Nucleosid-5'-Carbamat ist eine präparativ leicht zugängliche Struktur, die die Einführung einer großen Bandbreite von 5'-Seitenketten erlaubt (**80**, Abbildung 3.10).²⁵¹ *Sak et al.* stellten eine Reihe solcher Verbindungen her und verglichen sie mit den analogen Carboxamiden.

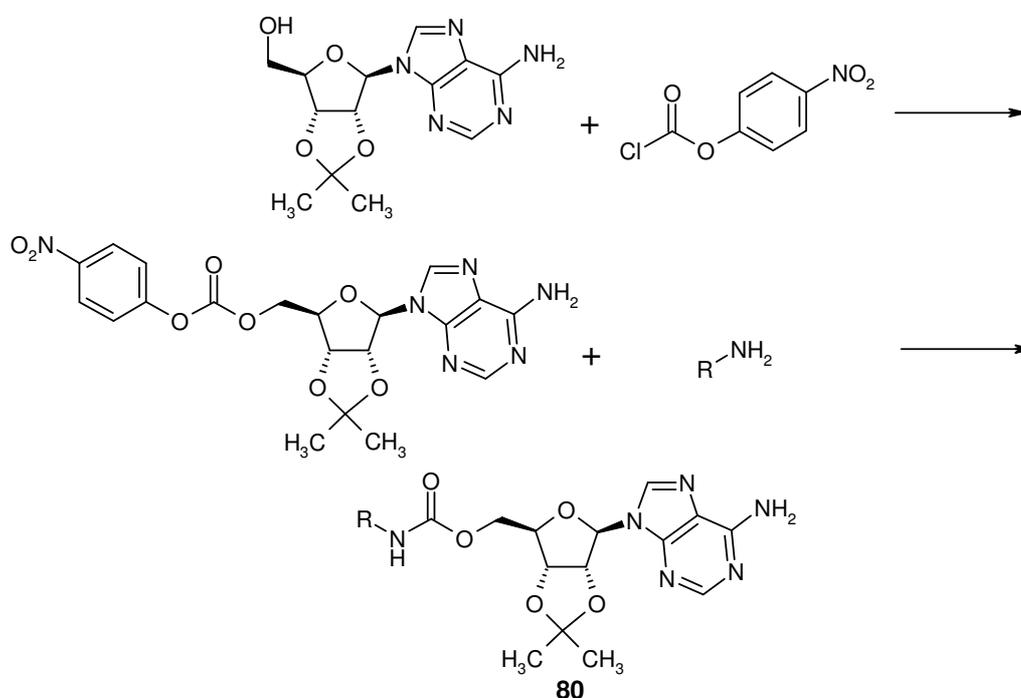


Abbildung 3.10: Darstellung von Adenosin-5'-carbamaten²⁵¹

Die so dargestellten Produkte besaßen aufgrund der flexibleren 5'-Verknüpfung eine größere räumliche Ähnlichkeit mit Nucleotiden als die entsprechenden 5'-Carboxamide und banden mit höherer Affinität am P2Y₁-Rezeptor. Von Vorteil ist sicherlich, daß sich auf diesem Wege sehr schnell viele Produkte synthetisieren lassen. Ihre vermutlich geringe metabolische und chemische Stabilität ist allerdings als entscheidender Nachteil anzusehen.

Schumacher beschrieb in seiner Dissertation die Synthese und Stabilität von Nucleosid-5'-Acylderivaten (**81**, Abb. 3.11).²⁵⁴ Er bewertete ihre Darstellbarkeit, Aufreinigung und auch Stabilität als mangelhaft, daher wurde von der Synthese solcher Ester Abstand genommen.

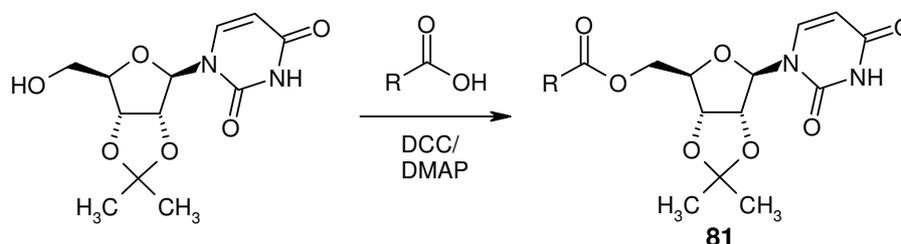


Abbildung 3.11: Acylierung von Uridin

Eine recht gut untersuchte Reaktion ist die Darstellung des Uridin-5'-aldehyds **82**, der direkt weiter umgesetzt wird (Abbildung 3.12).^{236,254,260,265} *Schumacher* und *Wnuk et al.* führten beispielsweise als Folgereaktion die Wittig-Olefinierung erfolgreich durch.^{254,260-263} Sie vermag unter Einsatz von als Linker geeigneten bifunktionellen Phosphonium-Yliden den Zugang zu einer großen Bandbreite an Nucleotid-Mimetika der allgemeinen Struktur **83** zu eröffnen. Allerdings wird durch diese Synthesestrategie in die räumliche Struktur des Nucleosids eingegriffen.

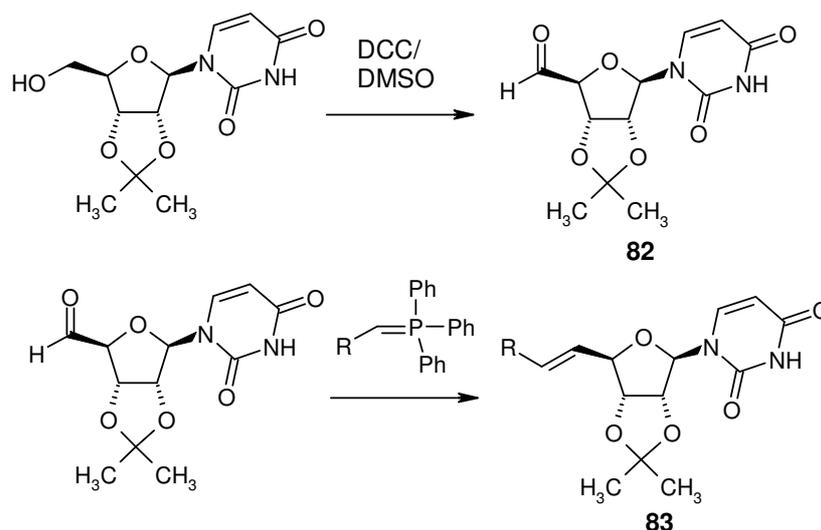


Abbildung 3.12: Pfitzner-Moffatt-Oxidation und anschließende Wittig-Reaktion²⁶⁰

Die Wahl fiel schließlich auf die Oxidierung der Nucleosid-5'-Position zur Carbonsäure, da sie präparativ einfach und mit vielen Nucleosiden durchführbar ist

und im Hinblick auf effiziente Führung der Synthesestrategie und Kompatibilität aller weiteren Reaktionsbedingungen mit den Substraten der erfolgversprechendste Weg zu sein schien. Aus der Peptidsynthese steht eine große Bandbreite an Kopplungsreagentien zur Verfügung, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die erfolgreiche weitere Umsetzung zum entsprechenden Nucleosid-5'-Amid erlauben, s. Abschnitt 3.4.^{230,231,266-268} Die Vielzahl an einsetzbaren Nucleosiden, bzw. deren Derivate, und der über eine Amidverknüpfung einzuführenden Seitenketten bietet damit ein hohes Maß an Produktvariabilität. Im Hinblick auf die räumliche Struktur der so dargestellten Nucleotidanaloga wird aber durch die 5'-Carboxylfunktion sicherlich eine deutlichere Abkehr vom physiologischen Vorbild UTP erzwungen als durch die vorgenannten Funktionalisierungen, da das 5'-Kohlenstoffatom nun nicht mehr sp^3 - sondern sp^2 -konfiguriert vorliegt.^{251,269} Zusätzlich induziert die folgende Darstellung des Amides eine gewisse Rigidität, die auf der Amidtautomerie beruht.

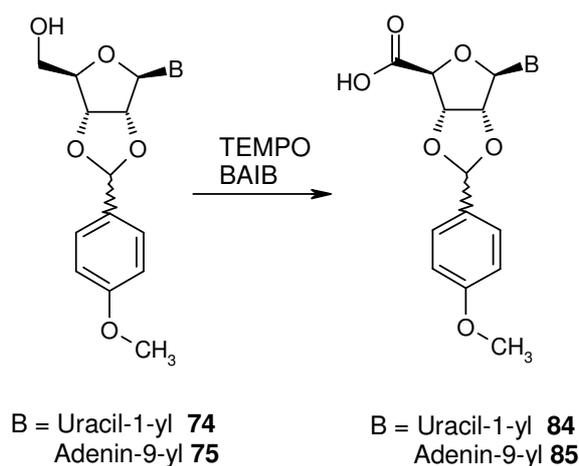


Abbildung 3.13: Darstellung der Anisyliden-geschützten Nucleosid-Carbonsäuren **84** und **85**

Die Oxidation der Nucleosid-4'-Hydroxymethylengruppe zur Carbonsäure gelang nach einer sehr eleganten Vorschrift mit katalytischen Mengen des stabilen Radikals Tetramethylpiperidinyloxid (TEMPO) als Oxidationsmittel und Bis-(Acetoxy)iodbenzen (BAIB), um jenes wieder zu regenerieren.²⁷⁰

In der Originalvorschrift wurden verschiedene 2',3'-Acetonid-geschützte Nucleoside, u.a. auch Uridin und Adenosin, in 1 mmol-Ansätzen umgesetzt. Das Syntheseprotokoll war problemlos auf die hier eingesetzten, mit Anisaldehyd geschützten Nucleoside Uridin und Adenosin entsprechend Abbildung 3.13 übertragbar. Es führte zu den Nucleosid-Carbonsäuren **84** und **85**. Die Ausbeuten betrugen 78 % (**84**), bzw.

71 % (**85**). Die Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren dieser beiden Verbindungen ergab, daß die *endo*- und *exo*-Diastereomeren annähernd im gleichen Ausmaß oxidiert wurden. Auch die Cinnamyliden-geschützte Uridin-carbonsäure **86** konnte so dargestellt werden und lieferte genau wie ihre Ausgangsverbindung ein 1:1-Diastereomerenmischung, s. Abbildung 3.14.

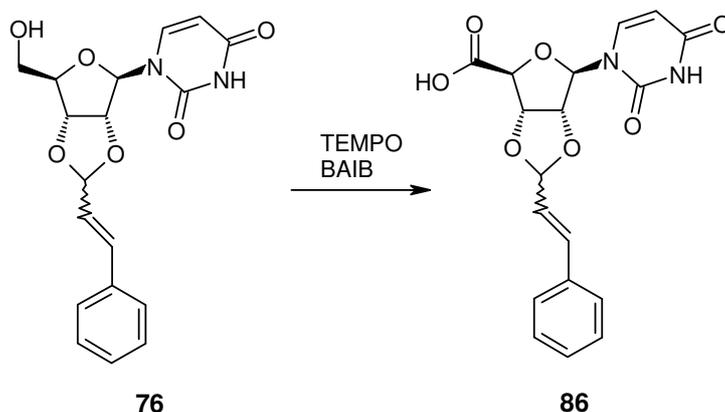


Abbildung 3.14: Darstellung von 2',3'-Cinnamylidenuridincarbonsäure **86**

Die Produkte fielen entweder direkt aus der Lösung aus oder wurden nach Entfernen des Lösungsmittelgemisches durch Zugabe von Diethylether in guter Reinheit und Ausbeute zur Kristallisation gebracht. Auch das für diese frühe Synthesestufe notwendige Upscaling auf 6 mmol-Ansätze gelang ohne Verluste an Ausbeute. So stand eine ausreichende Menge der gewünschten Nucleosid-Carbonsäuren in guter Reinheit für die folgende Amidkopplung zur Verfügung.

Zusammenfassend sind die verschiedenen Funktionalisierungen in Tabelle 3.2 mit einer kurzen Bewertung aufgelistet.

Tabelle 3.2: Bewertung einiger Funktionalisierungsmöglichkeiten der Nucleosid-5'-Position

Funktionalisierung	Vor- und Nachteile
Ether	Vielstufige Synthese als notwendig beschrieben; bislang keine Einführung bifunktioneller Gruppen berichtet
Thioether	Kein effizienter Zugang zu Pyrimidin-Nucleosid-5'-Thioethern publiziert; kein Einsatz von bifunktionellen Gruppen berichtet
Amin	Amin kann breit mit Carbonsäuren und Aldehyden umgesetzt werden; Darstellung ist aber aufwendig
Carbamat	Leicht, schnell und mit großer Produktvielfalt darstellbar; chemische und metabolische Stabilität eher gering
Acylderivate	Ähnlich zu bewerten wie das Carbamat
Carbonsäure	Sehr effizient aus allen Nucleosiden darstellbar; vielfältige Umsetzung zu stabilen 5'-Carboxamiden möglich; Eingriff in die räumliche Struktur des Nucleosids
Aldehyd	Effiziente Darstellung durch Moffatt-Oxidation und vielfältige weitere Umsetzung, z. B. Wittig-Reaktion, publiziert; Eingriff in die Stereochemie des Nucleosids

3.2.3 Design von Triphosphatmimetika

Wie schon oben diskutiert, sind Phosphatmimetika Strukturfragmente, mit denen ein Mimikry der Nucleosid-5'-Phosphatseitenkette erreicht werden soll. Die hier gewählte Synthesestrategie setzt nur eine notwendige Eigenschaft des Phosphatmimetikums voraus: Es muß eine terminale Aminogruppe enthalten, die mit der Nucleosid-Carboxyfunktion kondensiert werden kann.

Zur Erhöhung der Strukturvielfalt wurde das Phosphatmimetikum aus zwei frei kombinierbaren Blöcken durch Amidsynthese chemisch stabil aufgebaut: der polaren Kopfgruppe K und dem Linker L, der K in verschiedene Abstände zum Nucleosid bringt, s. auch **72** (Abbildung 3.15).

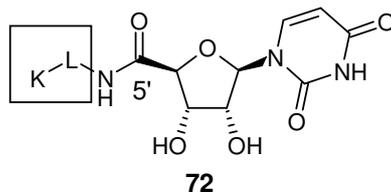


Abbildung 3.15: Kopfgruppe K und Linker L

Die ausgewählten Kopfgruppen K kann man in zwei Gruppen einteilen: Aminodicarbonsäureester **87-91** (Abbildung 3.16) und Aminophosphonsäureester **92-95** (Abbildung 3.17). Phosphonate und Dicarbonsäuren wurden bereits erfolgreich als Phosphat-Mimetika zur Darstellung von Tyrosinphosphatase-Inhibitoren und von P2Y₁-Rezeptor-Antagonisten (Abbildung 3.1) eingesetzt.^{230,271}

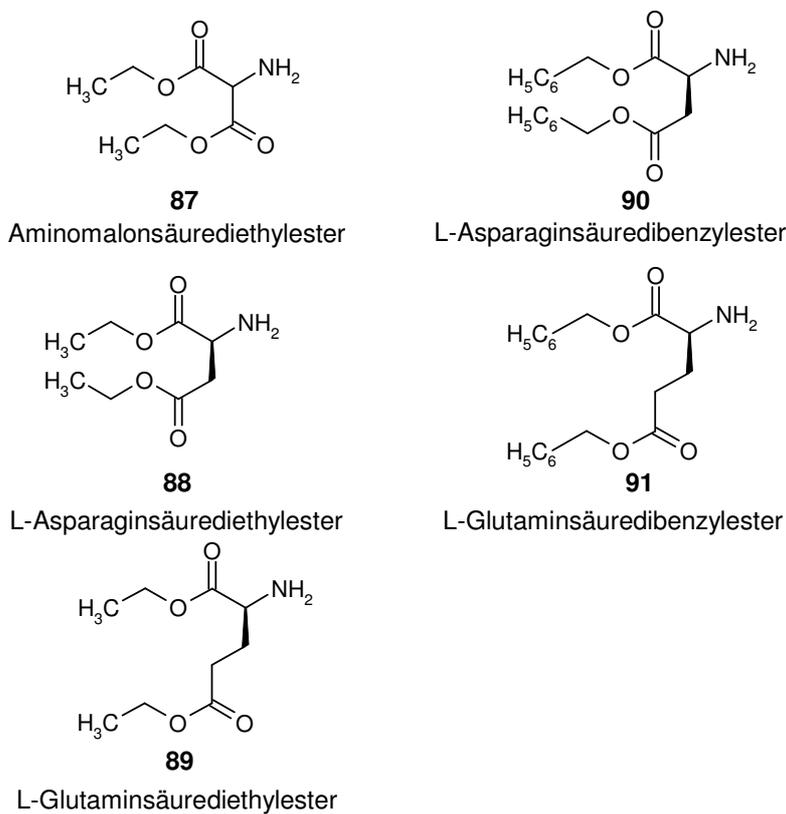


Abbildung 3.16: Aminodicarbonsäureester als hydrophile Kopfgruppen K

Die Aminosäureester wurden im Hinblick auf spätere Esterspaltungsstrategien sowohl als Benzyl- als auch als Ethylester eingesetzt. Sie sind sämtlich als Salze der *p*-Toluolsulfonsäure bzw. als Hydrochloride kommerziell erhältlich.

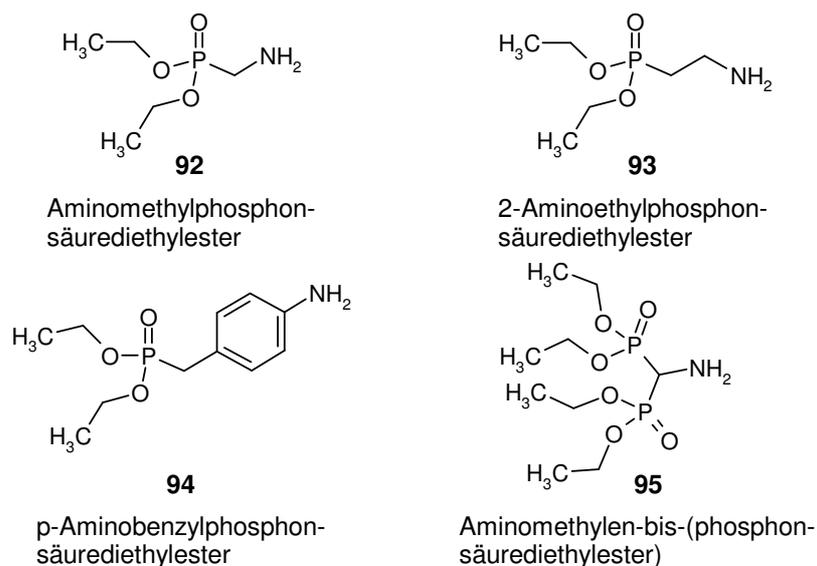


Abbildung 3.17: Aminophosphonsäureester als hydrophile Kopfgruppen K

Die Aminophosphonsäureester sind ebenfalls kommerziell erhältlich, nur der Aminomethylbisphosphonsäureester wurde nach einer Literaturvorschrift *de novo* aus Dibenzylamin, Orthoameisensäuretriethylester und Diethylphosphit synthetisiert.²⁷²

Beide Gruppen zeichnen sich durch die angestrebte Polarität in der Estergruppe aus und bieten darüber hinaus die Möglichkeit einer abschließenden Esterspaltung und damit Überführung in ionische Spezies. Im Fall der Benzyl- und Phosphonsäureester stehen zusätzlich zur klassischen Hydrolyse weitere präparative Optionen zur Spaltung des Esters offen.

Der Linker L muß eine bifunktionelle Struktur aufweisen: eine Carboxyfunktion zur Amidverknüpfung mit der polaren Kopfgruppe und eine Aminogruppe zur Kopplung an die Nucleosid-Carbonsäure. Die Wahl fiel deswegen auf die ω -Aminoalkylcarbonsäuren Glycin, β -Alanin und γ -Aminobuttersäure. Zweckmäßig für die Synthesestrategie werden diese in einer an der Aminofunktion mit der *tert*-Butyloxycarbonylschutzgruppe versehenen Form erworben (**96-98**, Abbildung 3.18).

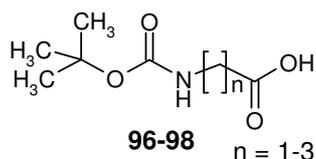


Abbildung 3.18: *t*Boc-geschützte ω -Aminosäuren als Linker

In Zukunft bietet sich die Erweiterung der Strategie um ω -Aminoalkylalkohole und α,ω -Diaminoalkane an, mit denen sich weitere Phosphatmimetika auch mit anderen

hydrophilen Kopfgruppen darstellen lassen. Mehrere Gründe sprachen für die Wahl der drei homologen ω -Aminosäuren: Sie sind mit der leicht abspaltbaren N-*t*-Boc-Schutzgruppe kostengünstig erhältlich, eröffnen den Zugang zu im Sinne der Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen gut vergleichbaren Strukturen und lassen sich problemlos mit den oben aufgezählten Aminosäure- und Aminophosphonsäureestern umsetzen. Hierbei bewährte sich die Methode des sogenannten gemischten Anhydrids, also die Aktivierung der Carbonsäure mit Chlorameisensäureisobutylester.²⁷³ Die Carbodiimide EDC und DCC wurden alternativ erwogen, besitzen aber wichtige Nachteile: Hohe Kosten, die Bildung eines unreaktiven Acylharnstoffes als Nebenprodukt, und zumindest im Fall des DCC ist die Abtrennung des Produktes vom gebildeten Harnstoff mitunter problematisch.²⁶⁶ Die Aminosäuren mit Oxalylchlorid oder Thionylchlorid in die entsprechenden Säurechloride zu überführen, verbat sich wegen der säurelabilen Schutzgruppe. Der Reaktionsmechanismus, der bei der gemischten Anhydridmethode zum Tragen kommt, ist in Abbildung 3.19 abgebildet, seine Durchführung erlaubt Synthese und Aufreinigung des gewünschten Amides innerhalb eines Arbeitstages.

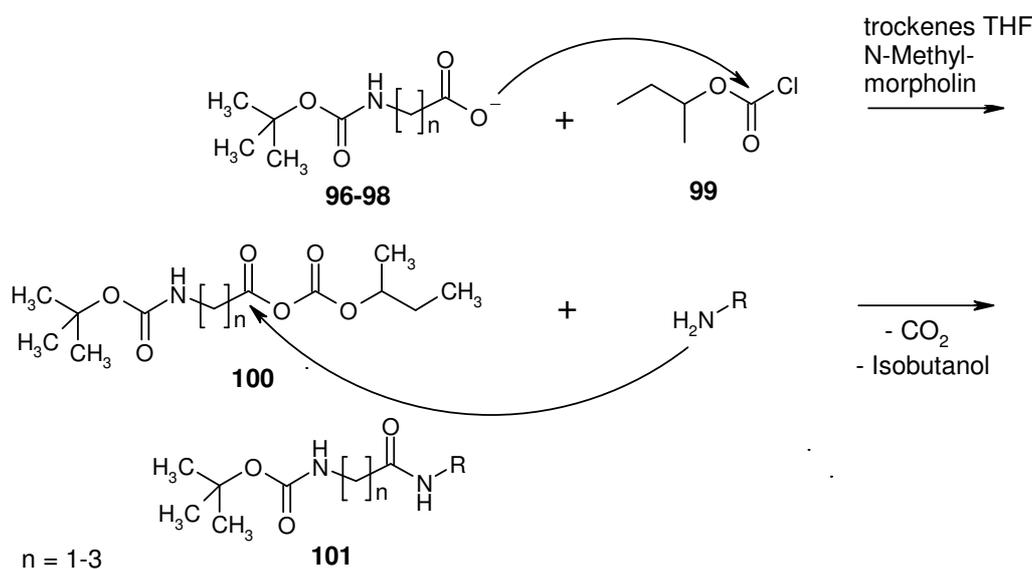


Abbildung 3.19: Darstellung von Amiden aus boc-geschützten Aminosäuren mittels gemischtem Anhydrid

N-*t*-Boc-geschützte Aminosäuren **96-98** wurden in trockenem THF durch Zugabe einer äquimolaren Menge an N-Methylmorpholin in ein lösliches Salz überführt und auf eine Temperatur zwischen -20 °C und -30 °C abgekühlt. Die Säure wurde daraufhin durch schnelles Zupipettieren von Chlorameisensäureisobutylester **99** in

das gemischte Anhydrid **100** überführt. Ein voluminöser weißer Niederschlag von N-Methylmorpholinhydrochlorid zeigte die erfolgreiche Umsetzung an. Entscheidend für den Syntheseerfolg waren hierbei Wasserfreiheit des Lösungsmittels und korrektes Einhalten der Temperatur. Nach einer Minute wurde die Aminkomponente zugegeben. Als Lösungsmittel diente entweder wäßrige 1N-NaOH-Lösung für als Hydrochloride, Tosylate oder Oxalate vorliegende Aminkomponenten oder trockenes THF für ungeladene Amine. Da das gemischte Anhydrid chemoselektiv durch N-Nucleophile angegriffen wird, können Wasser oder Alkohole als Lösungsmittel für das Amin verwendet werden. Das Reaktionsgemisch ließ man langsam auf Raumtemperatur erwärmen und noch drei Stunden rühren. Zur Abtrennung der Produkte **101** von den sehr hydrophilen Verunreinigungen, wie nicht umgesetzte Edukte, die Hilfsbase und Isobutylalkohol, reichte einfaches Ausschütteln mit Ethylacetat sowie Waschen mit NaHCO₃-Lösung und Wasser. Präparative Säulenchromatographie war nicht vonnöten.

Für die Abspaltung der *t*-boc-Schutzgruppe existieren verschiedene Synthesemethoden: Sie wird entweder im wäßrigen oder wasserfreien sauren Medium oder durch Thermolyse der trockenen oder in hochsiedendem Diphenylether gelösten Substanz durchgeführt.^{274,275} Die Anwendung der Mikrowelle ist ebenfalls beschrieben.²⁷⁶ In wasserfreiem Medium wird die Eliminierung zu Isobuten und CO₂ beobachtet.

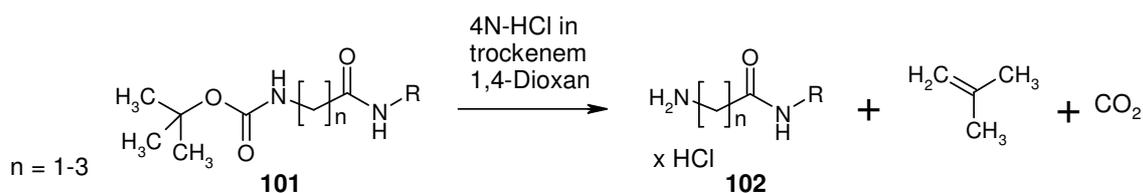
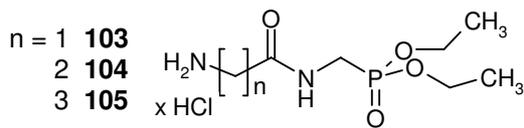
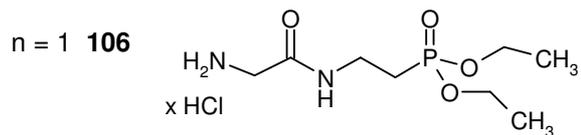


Abbildung 3.20: Abspaltung der *t*-boc-Schutzgruppe

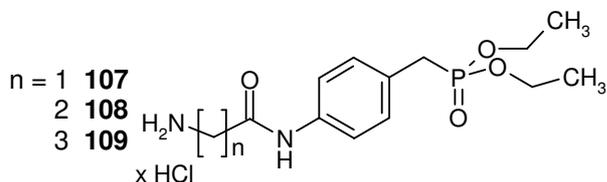
Die gemäß Abbildung 3.19 dargestellten Amide der allgemeinen Strukturformel **101** wurden zur Abspaltung der N-*tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe in kommerziell erhältlicher 4N-HCl-Dioxanlösung gelöst und fielen nach Zugabe von Diethylether als Hydrochloride **102** sauber aus (Abbildung 3.21).



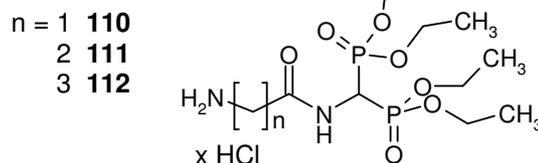
ω -Aminoalkylcarboxamidomethylphosphonsäurediethylester-Hydrochloride



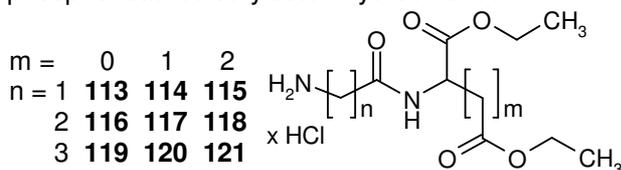
2-(Aminomethylcarboxamido)ethylphosphonsäurediethylester-Hydrochlorid



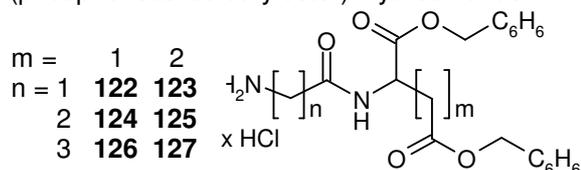
p-(ω -Aminoalkylcarboxamido)phenylmethanophosphonsäurediethylester-Hydrochloride



ω -Aminoalkylcarboxamidomethylen-bis(phosphonsäurediethylester)-Hydrochloride



2-(ω -Aminoalkylcarboxamido)alkandicarbonsäurediethylester-Hydrochloride



2-(ω -Aminoalkylcarboxamido)alkandicarbonsäuredibenzylester-Hydrochloride

Abbildung 3.21: Dargestellte Reihen von Phosphatmimetika

Dadurch erhielt man die in Abbildung 3.21 aufgeführten Verbindungen **103-127**, die im nächsten Schritt als Phosphatmimetika in der Nucleosid-5'-Position per Amidkopplung eingeführt werden sollen.

3.2.4 Synthese von Nucleosid-5'-Amiden

Die Überführung von Carbonsäuren in ihre Amide ist eine sehr gut ausgearbeitete Standardoperation in der präparativen organischen Chemie. Obwohl Nucleosid-5'-Amide schon in der Literatur beschrieben sind, stellte die Umsetzung der Carbonsäuren **84**, **85** und **86** zu den entsprechenden Amiden aus mehreren Gründen einen problembehafteten Schritt dar:^{230,231,250} Die Aminkomponente, die ja selbst aus teilweise sehr teuren Ausgangsprodukten synthetisiert wurde, stand nicht unbegrenzt, sondern höchstens in doppeltem Überschuss zur Verfügung. Die Carboxyfunktion wird durch die Nucleobase und die Zuckerschutzgruppe sterisch gehindert, ist also deutlich weniger reaktiv als etwa N-geschützte Aminosäuren oder Alkancarbonsäuren. Zusätzlich verhindert die säurelabile Nucleosidstruktur die

naheliegendste Aktivierung der Nucleosid-Carbonsäure: ihre Überführung in ein Säurechlorid mittels Oxalylchlorid oder Thionylchlorid. Es mußte also nach sehr effizienten Kopplungsreagentien gesucht werden, um die Uridincarbonsäure **84** und die Amin Komponente **120**, die zur Methodenfindung verwendet wurde, miteinander zur Reaktion zu bringen (Abbildung 3.22).

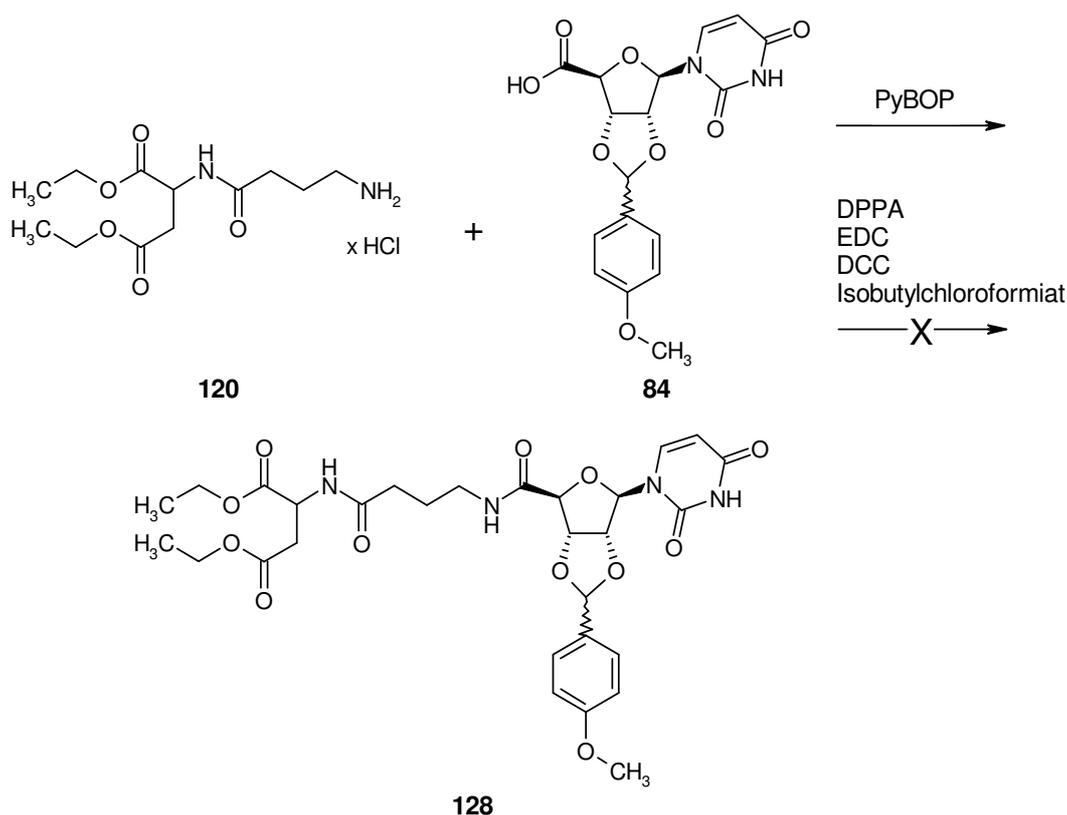


Abbildung 3.22: Ermittlung des geeigneten Kopplungsreagenzes zur Darstellung von Anisyliden-geschütztem Uridincarboxamid **128**

Die Anwendung der Carbodiimide 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC) bzw. Dicyclohexyldicarbodiimid (DCC) und auch der Einsatz von Chlorameisensäureisobutylester als Kopplungsreagenzien führte nicht zum gewünschten Produkt (Abbildung 3.22).²⁵⁰ Ein erster Teilerfolg stellte sich mit Diphenylphosphorylazid (DPPA) ein, über das bereits *Montgomery et al.* berichteten.²⁵⁰ Die Autoren hatten 2',3'-Isopropylidenuridin-4'-carbonsäure mit dem zehnfachen Überschuß der Aminkomponente umgesetzt. Ein solcher Überschuß kann im vorliegenden Projekt nicht eingesetzt werden, da sich sonst die Synthese übermäßig verteuern würde, auch sind Löslichkeitsprobleme zu erwarten. DPPA gab

in den eigenen Untersuchungen nur sehr unbefriedigende Ausbeuten von unter 10 %. Die Synthese ließ sich schlecht reproduzieren.

Uri et al. konnten erfolgreich 2',3'-Isopropylidenadenosin-4'-carbonsäure mit dem N-Terminus von an Wang-Harz gebundenen kleinen Peptiden unter Verwendung des Kopplungsreagenzes 1-Benzotriazolyl-oxyl-tri-pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP, **129**), des Acylierungskatalysators Hydroxybenzotriazol (HOBt, **132**) und der Hilfsbase Diisopropylethylamin umsetzen.²³⁰ Die Strukturformeln von PyBOP und HOBt sind in den Abbildungen 3.23 und 3.27 aufgeführt.

An diese Arbeit angelehnt wurde die in Abbildung 3.22 dargestellte Reaktion mit PyBOP (**129**) unternommen, der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 3.23 dargestellt.²⁷⁷⁻²⁷⁹ Das Carboxylat-Anion **84** bildet mit Hydroxybenzotriazol einen aktiven Ester **130** unter Substitution des Phosphorsäuretriamides **131**. Der aktive Ester wird durch die Aminkomponente zum Produkt substituiert, dabei entsteht Hydroxybenzotriazol (**132**). Dieser Versuch verlief erfolgreich und stellte den Durchbruch dar. Die Versuchsbedingungen wurden allerdings vor der breiten Anwendung im Hinblick auf folgende Parameter zur Optimierung der Ausbeute variiert: Lösungsmittel, Hilfsbase und Reaktionszeit. Um die universelle Anwendbarkeit der ermittelten Methode zu überprüfen, kamen die homologen 2- ω -Aminoalkylcarboxamidoalkandicarbonsäurediethylesterhydrochloride **113-121** (Abbildung 3.21) auf gleiche Weise zum Einsatz. Da die Nucleosid-Carbonsäure als Diastereomergemisch eingesetzt wird, stellt sich natürlich die Frage, ob die Amidkopplung mit dem *endo*- oder *exo*-Ausgangspunkt bevorzugt abläuft, sich eines der beiden Diastereomere also anreichert. Diese Frage konnte nach Auswertung der ¹H-NMR-Integrale verneint werden, *endo*- und *exo*-Produkt liegen wie bei Verbindung **84** im Verhältnis von 1:1 vor. Die Trennung der bei der Synthese von **74** bzw. **75** (Abbildung 3.5) entstehenden Diastereomere oder auch ihrer Oxidationsprodukte **84** und **85** ist daher nicht notwendig. Als Lösungsmittel wurde wasserfreies DMF verwendet, da es gute Lösungseigenschaften für alle eingesetzten Komponenten besitzt. Das von *Uri et al.* in ihrer Publikation eingesetzte Diisopropylethylamin (DIPEA, auch Hünig-Base genannt) erwies sich den Aminen N-Methylmorpholin und Triethylamin gegenüber als drastisch überlegen, denn in den Syntheseansätzen, in denen die letztgenannten Hilfsbasen verwendet wurden, konnte die Bildung des gewünschten Produkts nicht festgestellt werden. Die in der Literatur angegebenen Reaktionszeiten, die typischerweise im Bereich von einer

Viertelstunde liegen, führten zu unbefriedigenden Ausbeuten und wurden daher schrittweise auf ca. 16 Stunden verlängert.

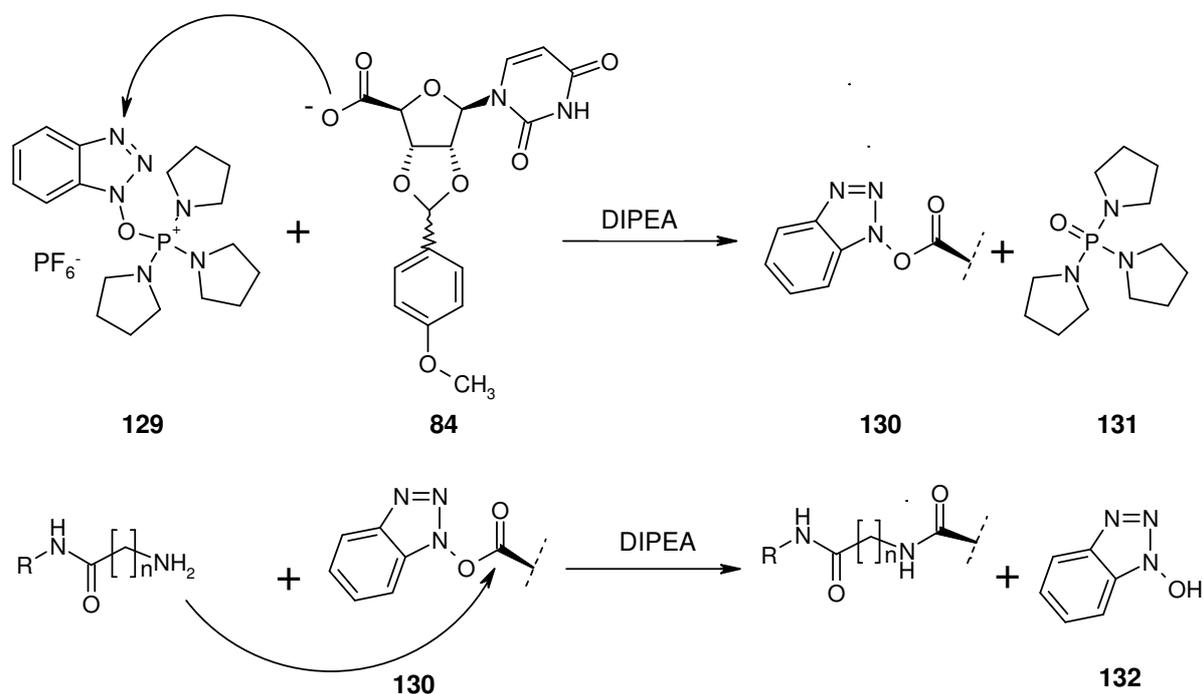


Abbildung 3.23: Reaktionsmechanismus der Amidsynthese mit PyBOP

Das Syntheseprotokoll wurde zunächst analog zu der Arbeit von *Uri et al.* ausschließlich unter Verwendung von PyBOP als Kopplungsreagenz entwickelt. Als alle oben genannten Parameter optimiert waren, ließ sich Verbindung **120** (Abbildung 3.21) damit hervorragend umsetzen. Die Ausbeute betrug nach Abspaltung der 2',3'-Schutzgruppe, also über zwei Schritte, 53 % (zur Ausbeutenberechnung s.u.). Die Kopplungsreaktionen mit den homologen Triphosphatmimetika liefen unter gleichen Bedingungen ab, lieferten aber sehr unterschiedliche Ausbeuten: je kürzer der Linker, desto geringer die Ausbeute. Triphosphatmimetika mit Glycin als Linker und Dicarbonsäuredibenzylester oder Phosphonsäureester als Kopfgruppen (**110**, **122**, **123**, Abbildung 3.21) konnten in vielen Fällen nicht mit Uridincarbonsäure **84** gekoppelt werden. Solche mit Dicarbonsäurediethylester als Kopfgruppe (**113-115**, Abbildung 3.21) gaben nur eine Ausbeute von 6 – 10 %. Zudem war die Synthese nicht gut reproduzierbar. Auch Adenosincarbonsäure **75** konnte mittels PyBOP nicht mit **107** (Abbildung 3.21) zur Reaktion gebracht werden. Die Strategie, die hier zum Erfolg führte, bestand im Einsatz von Kopplungsreagentien, die dem PyBOP verwandt sind: 2-(6-Chlor-1*H*-benzotriazolyl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HCTU, **136**, Abbildungen 3.26, 3.27) wird in der Literatur für Amid-

synthesen mit sterisch gehinderten Reaktionspartnern und wenig reaktiven N-Methyl-aminosäuren verwendet.²⁸⁰ Mit diesem Reagenz konnte auf Anhieb die Reaktion zwischen den Carbonsäuren **84-86** und allen mit Glycin als Linker versehenen Triphosphatmimetika durchgeführt werden. In Abbildung 3.24 ist beispielhaft die Umsetzung der Nucleosidcarbonsäuren **84** und **85** mit **107** dargestellt.

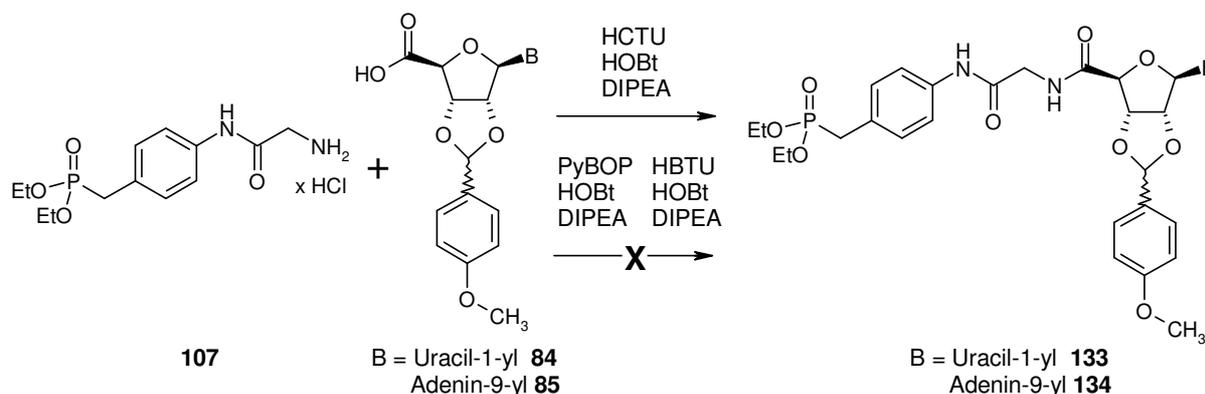


Abbildung 3.24: Umsetzung von Triphosphatmimetikum **107** (Linker: Gly) mittels HCTU

Auch die analoge Reaktion mit Uridincarbonsäure **86** (Abb. 3.14) zu **135** gelang (Abb. 3.25).

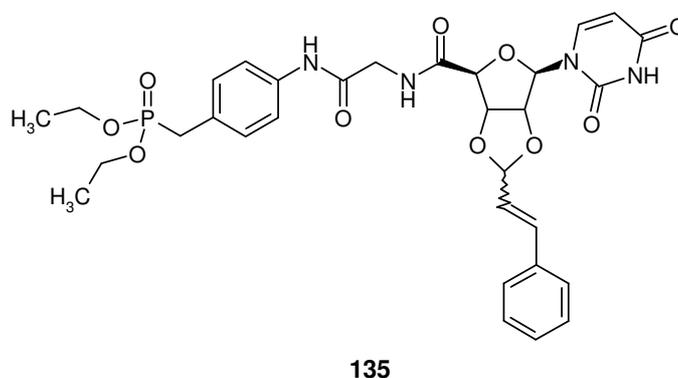


Abbildung 3.25: Cinnamyliden-geschütztes Uracilnucleotid-Analogon **135**

Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 3.26 beschrieben.²⁸¹ Die deprotonierte Carbonsäure **84** greift das Uroniumsalz HCTU (**136**) unter Verdrängung des 6-Chlorbenzotriazoloxids (**138**) an. Der intermediär entstehende O-Acylisoharnstoff **137** reagiert mit 6-Chlorhydroxybenzotriazol (**138**) unter Bildung des aktiven Esters **139** und des Harnstoffs **140**. Der aktive Ester **139** wiederum reagiert mit N-Nukleophilen zum gewünschten Amid und zu 6-Chlorhydroxybenzotriazol (**138**).

HCTU lieferte gute Ausbeuten (meist > 50 %) in der scheinbar schwierigsten Kopplungsreaktion und wurde deshalb auch versuchsweise zur Umsetzung mit einigen homologen Phosphatmimetika eingesetzt (s.u.). Überraschenderweise war hier allerdings kein Erfolg zu verzeichnen.

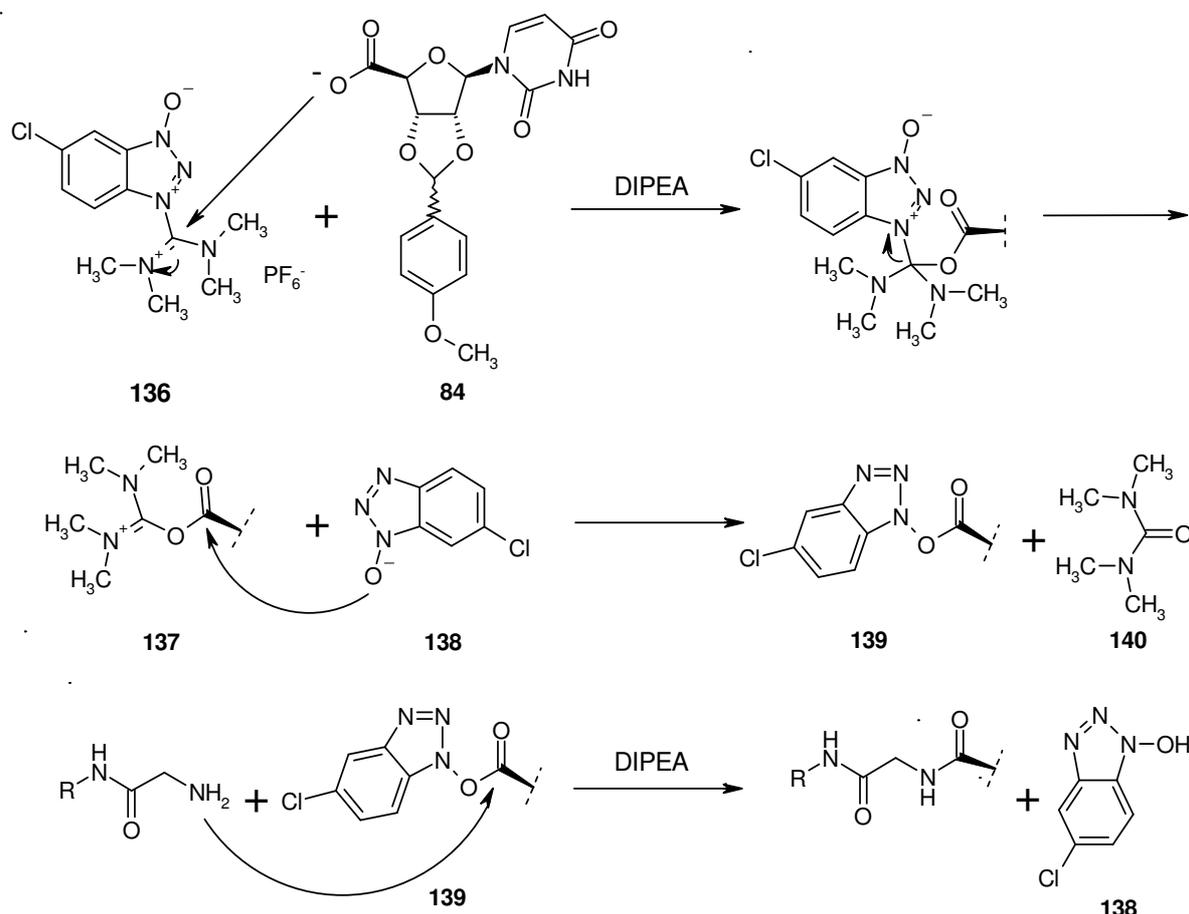


Abbildung 3.26: Reaktionsmechanismus der Amidsynthese mit HCTU

Einige der mit β -Alanin als Linker versehenen Triphosphatmimetika ließen sich nur unter Verwendung von HBTU umsetzen (s. experimenteller Teil).

Die Untersuchung der drei Kopplungsreagenzien auf Eignung wurde nicht mit allen Amin- und Carbonsäurekomponenten durchgeführt. Zum Einsatz kamen hier Uridincarbonsäure **84** und die Amine **107**, **114** und **122** (Linker: Glycin); **108**, **117**, **124** (Linker: β -Alanin); **109**, **120** und **126** (Linker: γ -Aminobuttersäure) (Abbildung 3.21).

Dabei konnte die in Tabelle 3.3 zusammengefaßte Gesetzmäßigkeit festgestellt werden, die bei der Darstellung von Adeninnucleotid-Mimetika bestätigt wurde. Es gab nur eine Ausnahme von dieser Gesetzmäßigkeit: Die Aminkomponente **109** (Abbildung 3.21) ließ sich mit Uridincarbonsäure **84** und Adenosincarbonsäure **85**

nicht mittels dem erwarteten PyBOP sondern mit 2-(1*H*-Benzotriazolyl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU, **141**, Abbildung 3.27) umsetzen.

Tabelle 3.3: Eignung von Kopplungsreagentien

Anzahl der Methylengruppen im Linker	Optimales Kopplungsreagenz
1	HCTU
2	PyBOP oder HBTU
3	PyBOP

Die Synthese von Nucleosid-Carboxamiden gelang also durch die Verwendung von drei verschiedenen Kopplungsreagentien (Abbildung 3.27), die in erster Linie je nach Beschaffenheit der Aminkomponente zum Einsatz kamen.

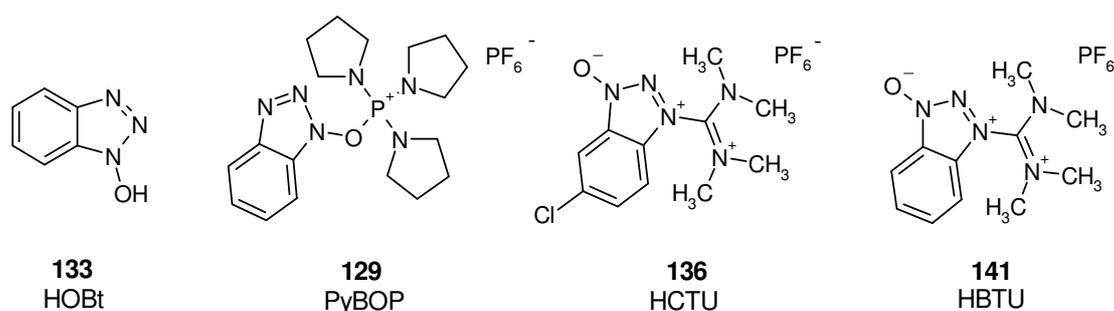


Abbildung 3.27: Auf Hydroxybenzotriazol (HOBt) basierende Kopplungsreagentien^{277,281-284}

Mit den in der Methodenentwicklung gewonnenen Erfahrungen ließ sich die im experimentellen Teil beschriebene Vorschrift ausarbeiten. Die Produktisolierung geschah durch Abziehen des Lösungsmittels und anschließende Flash-Chromatographie auf Kieselgel. Das Produkt kristallisierte in Diethylether aus, enthielt meist aber noch Rückstände des Kopplungsreagenzes. Insbesondere Phosphorsäuretripyrrolidinoamid aus PyBOP ließ sich per Kieselgelchromatographie nur unvollständig abtrennen. Deshalb wurde frühzeitig dazu übergegangen, die Verbindungen erst nach Abspaltung der Zuckerschutzgruppe und damit verbundener weiterer Produktaufreinigung spektroskopisch zu charakterisieren (s.u.).

Die Verbindung **135** (Abbildung 3.23), die als Endprodukt die 2',3'-Cinnamylidengruppe enthält, mußte zur Aufreinigung einer Flash-Chromatographie mit Dichlormethan und Methanol und anschließend einer RP-HPLC mit Methanol und Wasser (Gradient) unterzogen werden. Sie lag wie ihr Ausgangsprodukt **86** als 1:1-

Gemisch der *endo*- und *exo*-Diastereomeren vor. Eine solche zweistufige Vorgehensweise bei der Produktisolierung empfiehlt sich grundsätzlich, wenn per Amidkopplung ein Endprodukt dieser Art dargestellt werden soll.

Einige der so dargestellten und anschließend an der Ribose entschützten Produkte erwiesen sich als gute E-NTPDase-Inhibitoren. Da diese Enzyme eher Adeninnucleotide als Substrate akzeptieren, lag es nahe, das in Abbildung 3.30 aufgelistete Produktspektrum von Uridincarboxamiden um die Analogsubstanzen mit Adenin als Nucleobase zu erweitern. Die Darstellung der dazu notwendigen Ausgangssubstanz 2',3'-Anisylidenadenosincarbonsäure **85** (Abbildung 3.13) glückte problemlos. Ihre weitere Umsetzung mit den Triphosphatmimetika **105** und **107** (Abbildung 3.21) nach der oben entwickelten Vorschrift endete allerdings zunächst in einem Fehlschlag. Weder mit PyBOP, noch HBTU, noch mit HCTU konnte nennenswerte Produktbildung festgestellt werden. Den gewünschten Erfolg brachte erst eine Umstellung in der Reihenfolge, in der die Reagentien zur Carbonsäure zugegeben werden: Während die Uridincarbonsäure und die Kopplungsreagentien zusammen gelöst werden konnten, mußte die Adenosincarbonsäure separat in einer Mischung aus trockenem DMF und Diisopropylethylamin in Lösung gebracht werden. Möglicherweise reagiert die freie Aminogruppe des Adenins mit dem Kopplungsreagenz. Die Carbonsäure wurde dann durch Zugabe der in DMF gelösten Kopplungsreagentien aktiviert. Interessanterweise versagte umgekehrt die für Adenosincarbonsäure modifizierte Vorschrift völlig, als mit ihr Uridincarbonsäure **84** (Abbildung 3.13) mit den Aminkomponenten **109** und **120** (Abbildung 3.21) zur Umsetzung gebracht werden sollte. Die Ursache dafür ist unbekannt.

Die durch Amidkopplung erhaltenen Produktreihen wurden mit der Ausnahme des Endproduktes **135** direkt weiter zur Abspaltung der 2',3'-Schutzgruppe umgesetzt und sind deshalb in Abschnitt 3.2.5 in den Abbildungen 3.30 und 3.31 dargestellt.

Man kann also zu diesem experimentell sehr anspruchsvollen Schritt abschließend feststellen: Die Probleme, die bei der Darstellung der Zielstrukturen auftraten, konnten durch flexible Handhabung der Versuchsbedingungen und der eingesetzten Reagentien erfolgreich bewältigt werden. Es gibt kein universell anwendbares Syntheseprotokoll und kein universell verwendbares Reagenz zur Darstellung von Nucleosid-Carboxamiden. Für die Umsetzung der Adenosin- und Uridincarbonsäure mußte je eine eigene Vorschrift entwickelt werden. Die Ursache dafür ist unbekannt. Die Auswahl des Kopplungsreagentes richtet sich in erster Linie nach dem Charakter

des Amins. Die verwendeten Reagentien besitzen alle den Nachteil, daß sie oft eine RP-HPLC-gestützte Trennung zur Produktaufreinigung notwendig machten. Bislang konnten auf diese Weise verschiedenste Uridin- und Adenosincarboxamide dargestellt werden. Eine Übertragung der Methode auch auf andere Nucleoside bietet sich an.

3.2.5 Abspaltung der Schutzgruppen

Die vorherigen aufbauenden Synthesen lieferten Substanzreihen mit zwei unterschiedlichen Arten von Schutzgruppen, die entsprechend eine zweistufige Entschützungsstrategie erfordern: Das Nucleosid-2',3'-Acetal und verschiedene Carbonsäure- bzw. Phosphonsäureester. Gerade hier ist man in der Anwendung der verschiedenen Methoden nicht frei, sondern muß die Labilität der Nucleoside berücksichtigen.

Zunächst wurde die Hydrolyse des Nucleosid-2',3'-Anisylidenacetals in Verbindungen der allgemeinen Formel **142** vorgenommen (Abbildung 3.28). Eine publizierte Vorschrift zur Abspaltung von an Harzen acetalisch gebundenen Zuckern mit einer Lösung von 10 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan/Wasser 100:1 konnte erfolgreich auf die Entschützung der Nucleoside übertragen werden.²⁵⁵

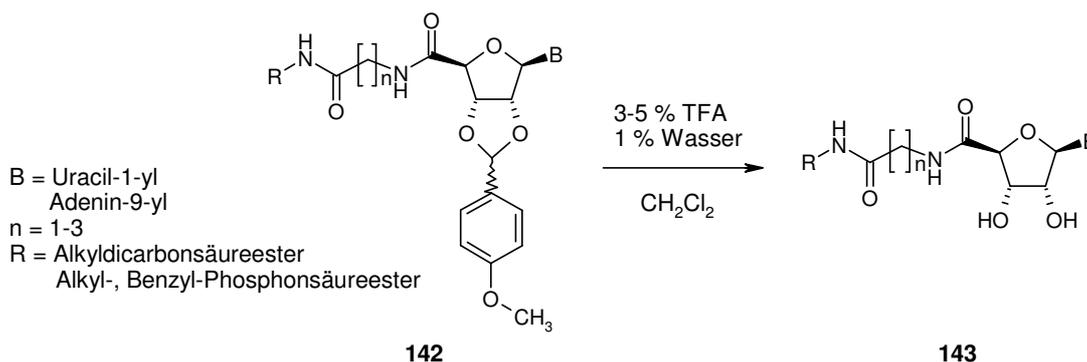


Abbildung 3.28: Spaltung des 2',3'-Anisylidenacetals

Allerdings waren unter diesen Bedingungen dünnschichtchromatographisch erste Anzeichen von Zersetzung sichtbar. Eine Verminderung der Säurekonzentration auf 3-5 % führte unter Vermeidung der Produktzersetzung ebenfalls zum gewünschten Ergebnis, den Verbindungen Formel **143**. Lediglich die Adenosinderivate mit

terminalem Bisphosphonat **172** und **173** neigten auch unter diesen Bedingungen schnell zur Zersetzung durch Hydrolyse der Amidbindung des Bisphosphonats. Die entsprechende Verbindung mit $n = 1$ ließ sich so gar nicht darstellen, Verbindungen **172** und **173** (Abbildung 3.30) konnten nur nach kurzen Reaktionszeiten von ca. 30 Minuten erhalten werden.

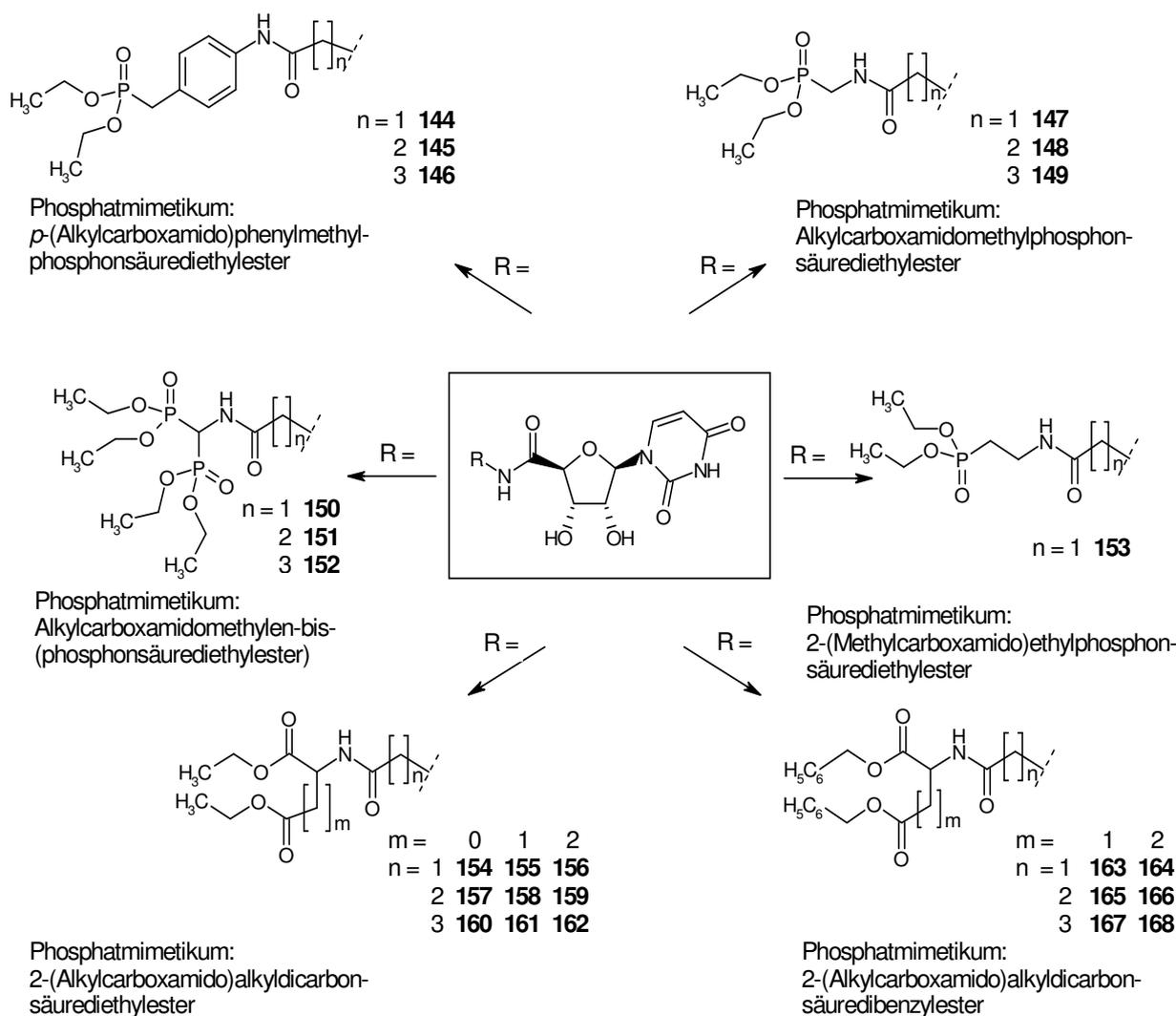


Abbildung 3.29: Nichtionische Uracilnucleotid-Mimetika

Im vorherigen Abschnitt wurde erwähnt, daß die aus der Amidkopplungsreaktion hervorgehenden Produkte oft trotz Kieselgelsäulenchromatographie noch Verunreinigungen aufwiesen. Es wurde daher angestrebt, sich die Abspaltung der Zuckerschutzgruppe auch zur Produktaufreinigung zunutze zu machen.

Bei diesem Schritt fiel eine Reihe von Nucleosidderivaten entweder schon sehr rein aus dem Ansatz aus oder wurde durch Zugabe von Diethylether sauber ausgefällt. In

allen anderen Fällen bewährte sich die präparative RP-HPLC mit Wasser/Methanol-Gradient, da sich sämtliche Produkte in Wasser/Methanol-Gemischen gut lösten. So wurden mehrere Produktreihen basierend auf Uridin (Abbildung 3.29) und auf Adenosin (Abbildung 3.30) rein erhalten. Sie stellen als nichtionische Nucleotidmimetika pharmakologisch interessante Substanzen dar, sind aber auch Ausgangsprodukte für einen weiteren, folgenden Entschützungsprozess.

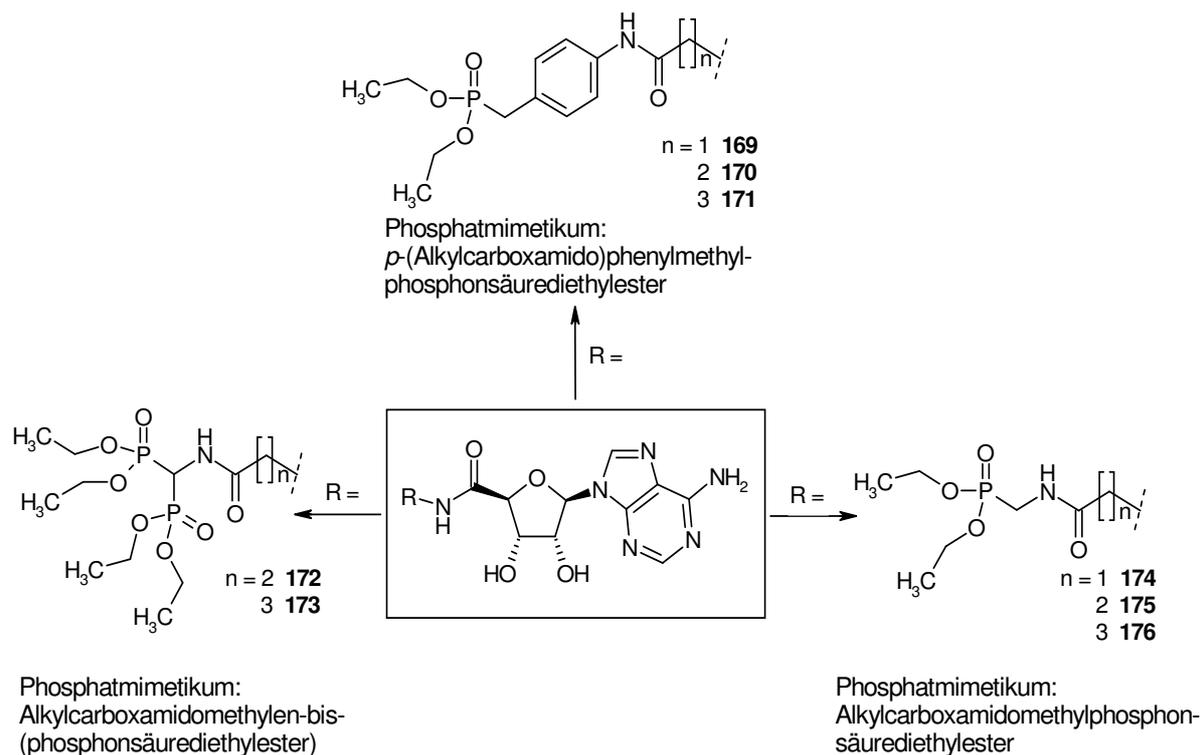


Abbildung 3.30: Nichtionische Adeninnucleotid-Mimetika

Um zu ionischen Verbindungen zu gelangen, mußten die terminal in der Seitenkette befindlichen Carbonsäure- bzw. Phosphonsäureesterstrukturen gespalten werden. Eine zunächst versuchte Esterspaltung der an der Ribose geschützten Derivate scheiterte immer an der Entstehung eines komplexen Produktgemisches, aus dem die Zielverbindung nicht isoliert werden konnte. Daher wurde mit deutlich besserem Erfolg dazu übergegangen, die Carbonsäuren und Phosphonsäuren erst nach vorheriger Acetalspaltung aus ihren Estern freizusetzen.

Die neu eingeführten Dicarbonsäurediethylester der Verbindungen **154-162** sollten gemäß Abbildung 3.31 mit Kaliumhydroxid oder Lithiumhydroxid in Wasser-Ethanol-Gemischen bei Raumtemperatur zu den entsprechenden Verbindungen der

allgemeinen Formel **177** hydrolysiert werden. Unglücklicherweise wurde jedoch in allen Versuchen dünnschichtchromatographisch massive Zersetzung beobachtet.

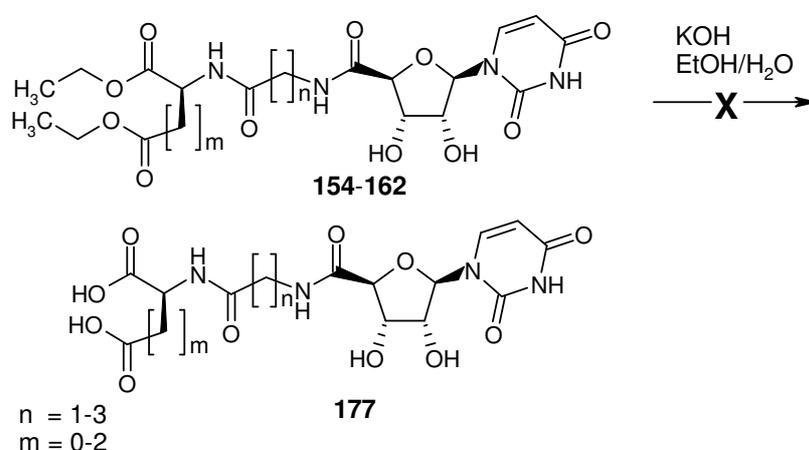


Abbildung 3.31: Fehlgeschlagene Hydrolyse von Carbonsäureethylestern mit KOH

Als Alternative zu dieser sehr aggressiven Methode ist der Einsatz von Schweineleberesterase (PLE, Pig Liver Esterase, E.C. 3.1.1.1) in wässriger, auf pH 8 gepufferter Lösung beschrieben.^{285,286} Unter diesen Bedingungen blieben sowohl die nucleosidische Bindung als auch die Amidpartialstrukturen des eingesetzten Ausgangsproduktes **161** erwartungsgemäß stabil (Abbildung 3.32).

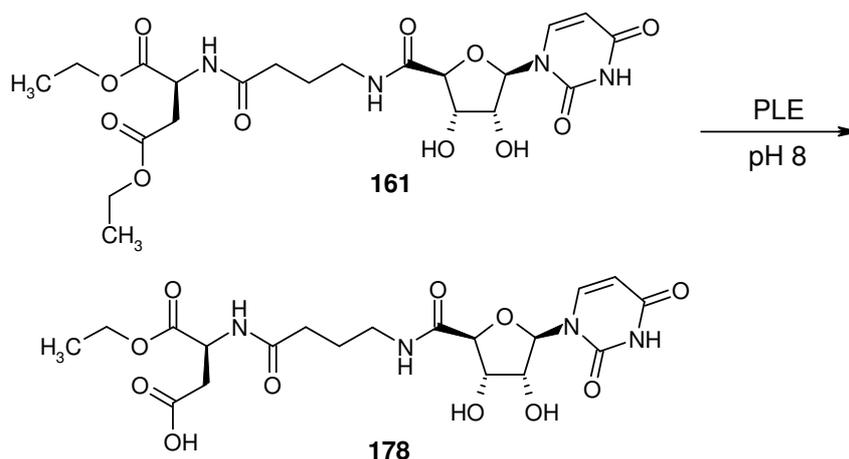


Abbildung 3.32: Enzymatische Esterhydrolyse (PLE: Pig Liver Esterase)

Das nach Abfiltrieren des Enzyms lyophilisierte und durch präparative RP-HPLC sauber isolierte Produkt **178** zeigte im $^1\text{H-NMR}$ allerdings nur die erfolgreiche Spaltung einer Estergruppe an. Aufgrund dieser Fehlschläge wurde eine alternative Schutzgruppenstrategie umgesetzt. Carbonsäuredibenzylester lassen sich durch

katalytische Hydrierung und Transferhydrogenolyse spalten.^{232,237,287} Bei diesem Ansatz muß allerdings die Hydrieranfälligkeit der 5,6-Doppelbindung des Uracils berücksichtigt werden. *Watkins et al.* und *Johnson et al.* publizierten eine Lösung des Problems: Unter Verwendung von Pd/C und Cyclohexadien, der sogenannten Transferhydrogenolyse, konnten sie chemoselektiv in der 2',3'-Position von Uridin als Schutzgruppe eingeführte Benzyloxycarbonylgruppen und andere Benzylgruppen aus Pyrimidinnucleosiden entfernen.^{232,237} Sowohl die Transferhydrogenolyse als auch die klassische katalytische Hydrierung mit verschiedenen Katalysatoren (Pd/C, Pd(OH)₂/C, Pd/BaSO₄, Pd/CaCO₃) und H₂ bei Atmosphärendruck (Ballon) über Nacht und erhöhtem Druck (Wasserstoffgenerator, 2 bar) über zwei Stunden in Methanol/Wasser-Gemischen führte zur glatten Abspaltung der Benzylgruppen, aber immer auch zur vollen Hydrierung der Pyrimidinbase (Abbildung 3.33). Produkte der allgemeinen Formel **185** konnten so nicht erhalten werden. Es entstanden die Dihydrouracilderivate **179-184**. Das 5,6-Dihydrouracil gibt im ¹H-NMR-Spektrum Signale höherer Ordnung und kann daher leicht zugeordnet werden.²³⁷ Auch diese Strategie führte also nicht zum Ziel, ist aber wahrscheinlich mit Erfolg bei Purinnucleosiden anwendbar.

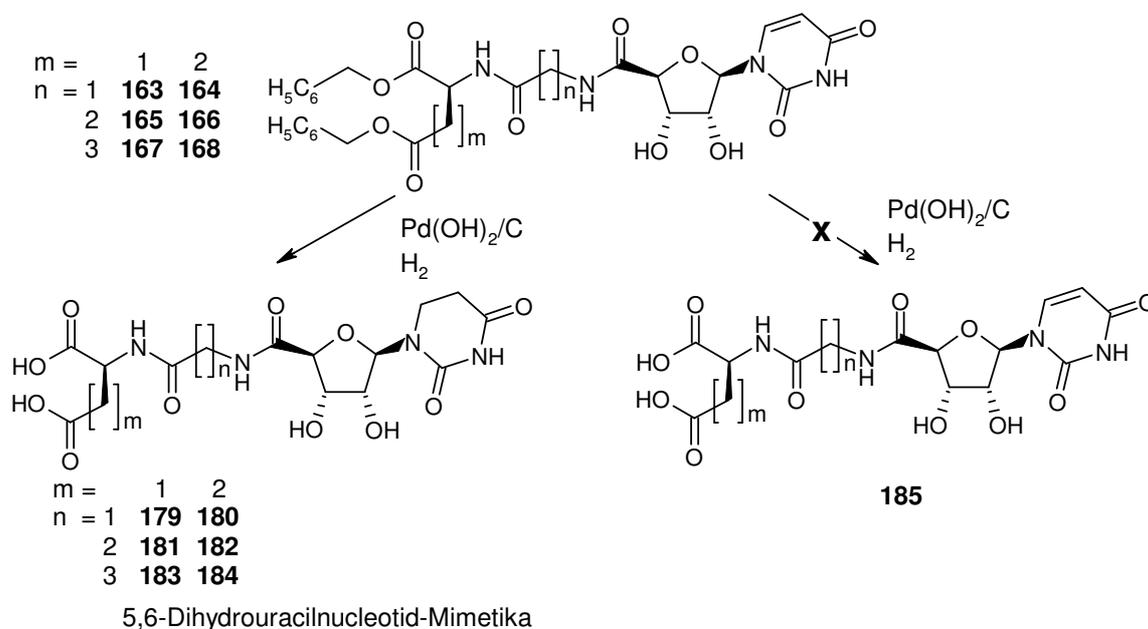


Abbildung 3.33: Hydrogenolyse von Benzylestern der Verbindungen **163-168**

Phosphonsäureester können klassisch im Sauren oder Basischen hydrolysiert werden, also unter Bedingungen, die erwiesenermaßen mit der Nucleosid-partialstruktur nicht gut vereinbar sind. Alternativ bietet sich aber auch eine sehr milde Methode an, um die gewünschten Phosphonsäuren aus ihren Estern freizusetzen: Als chemoselektives Verfahren, das die Nucleosid- und Amidpartialstrukturen unangetastet ließ, erwies sich die Transalkylierung mit Trimethylsilylbromid (TMS-Br, **186**, Abbildung 3.34).^{236,288-291} Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 3.34 dargestellt.^{146,292}

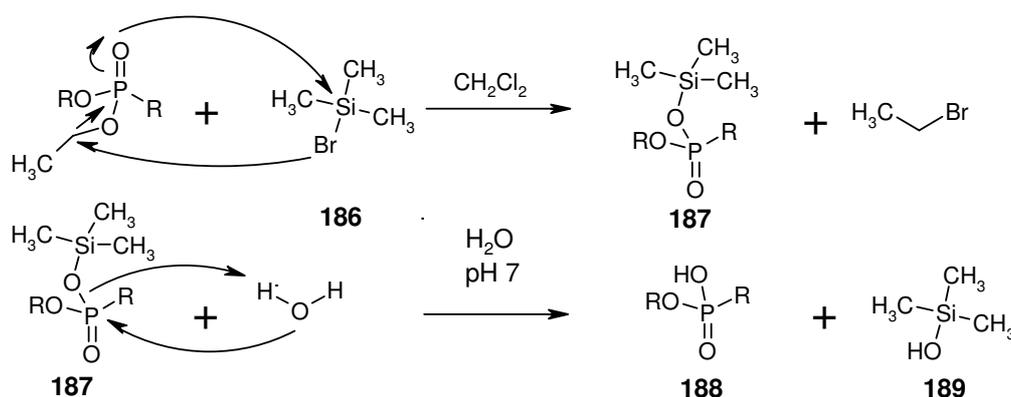


Abbildung 3.34: Mechanismus der Desalkylierung von Phosphonsäureestern

In trockenem Dichlormethan findet zunächst die Transalkylierung statt, bei der Ethylbromid und ein labiler Phosphorsäuretrimethylsilylester **187** entstehen. Das Lösungsmittel wird dann am Rotationsverdampfer entfernt und zum Rückstand wird Wasser gegeben. Dieses hydrolysiert den Trimethylsilylester zur Phosphonsäure **188**. Als Nebenprodukt entsteht Trimethylsilanol (**189**).

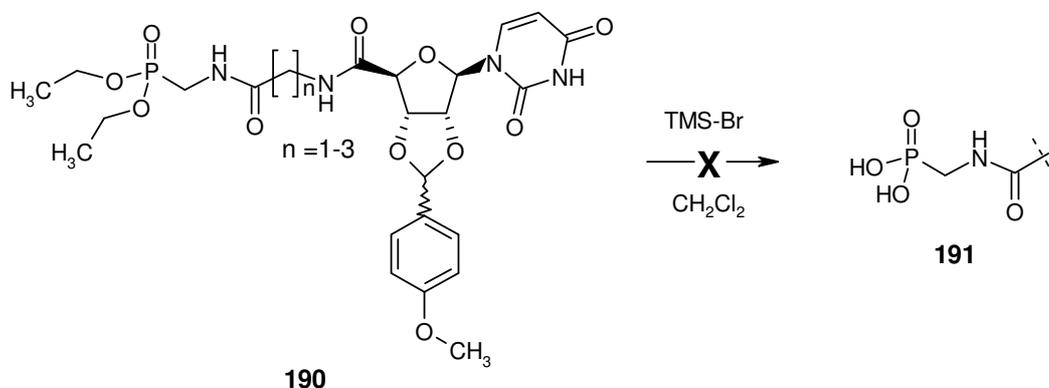


Abbildung 3.35: Gescheiterte Versuche, Phosphonsäureester zu desalkylieren

Zunächst wurde diese Reaktion wie in der Literatur beschrieben mit den an der 2',3'-Position geschützten Nucleotidmimetika **190** durchgeführt und lieferte lediglich komplexe Produktgemische, nicht die Phosphonate **191** (Abbildung 3.35).^{236,290} Die nach Spaltung des 2',3'-Acetals per RP-HPLC aufgereinigten Ausgangsprodukte **192** ließen sich jedoch hervorragend in fast quantitativer Ausbeute mit TMS-Br zu den entsprechenden Phosphonsäurederivaten **193** umsetzen (Abbildung 3.36).

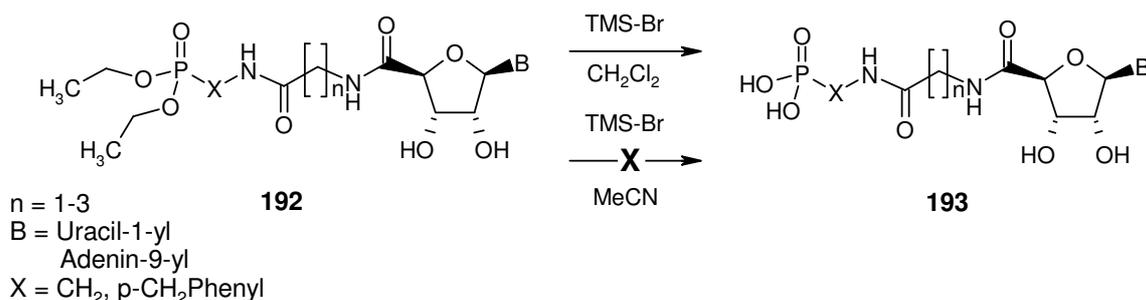


Abbildung 3.36: Spaltung des Phosphonsäurediethylesters nach vorangegangener Entschützung der Nucleosid-2',3'-Positionen

Als geeignete Lösungsmittel für diese Reaktion kann man der Literatur neben dem hier verwendeten Dichlormethan auch Acetonitril entnehmen. Es förderte aber hier die Zersetzung des Produktes.

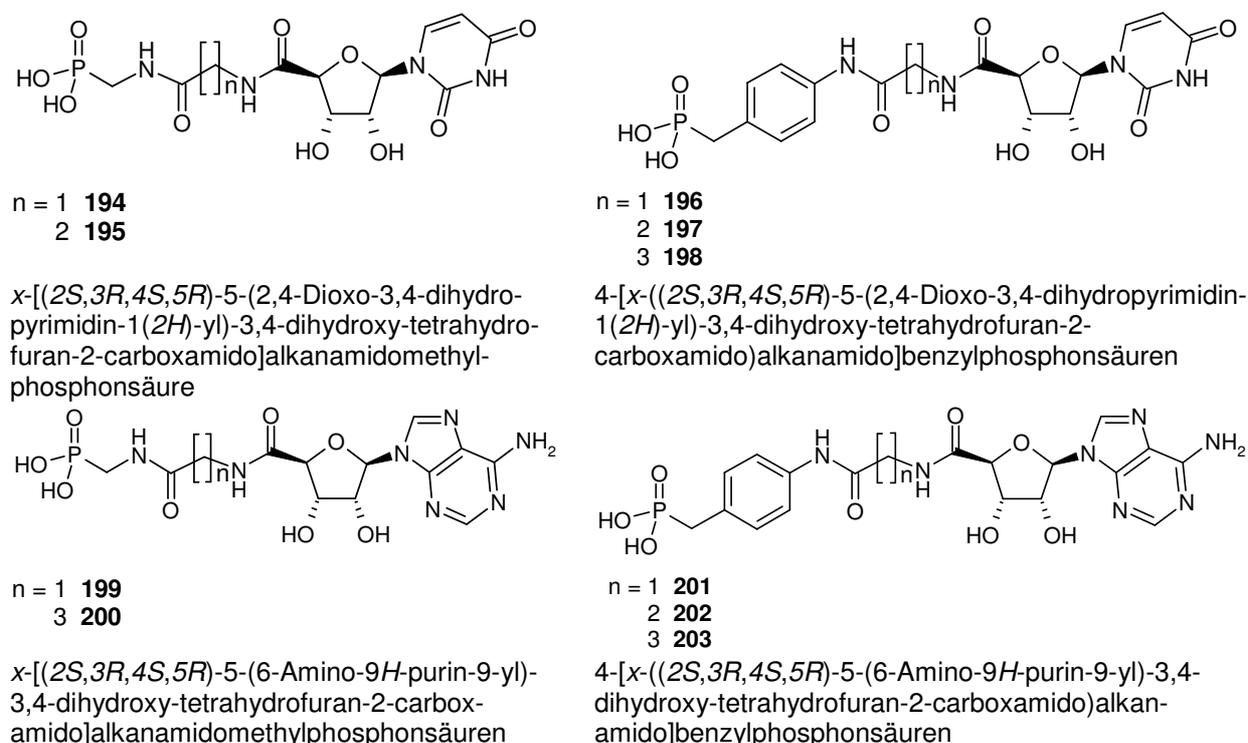


Abbildung 3.37: Nach Desalkylierung der Phosphonsäureester erhaltene Produkte

Die Menge an TMS-Br wurde ebenfalls variiert, ein pro Esterbindung zwanzigfacher Überschuß erwies sich schließlich als optimal. Das Verfahren eignete sich gleichermaßen für Adenosin- wie auch für Uridin-Derivate. Die Produkte sind in Abbildung 3.37 aufgeführt. Auch der Bisphosphonsäuretetraethylester **152** konnte desalkyliert werden (Abbildung 3.38). Die Umsetzung der homologen Uridinderivate mit kürzeren Linkern **150** und **151** (Abbildung 3.29) gelang allerdings nicht, ebensowenig diejenige der Adenosinanaloga **172** und **173** (Abbildung 3.30). Hier wurde in der anschließenden Aufreinigung durch RP-HPLC im Chromatogramm ein komplexes Produktgemisch beobachtet.

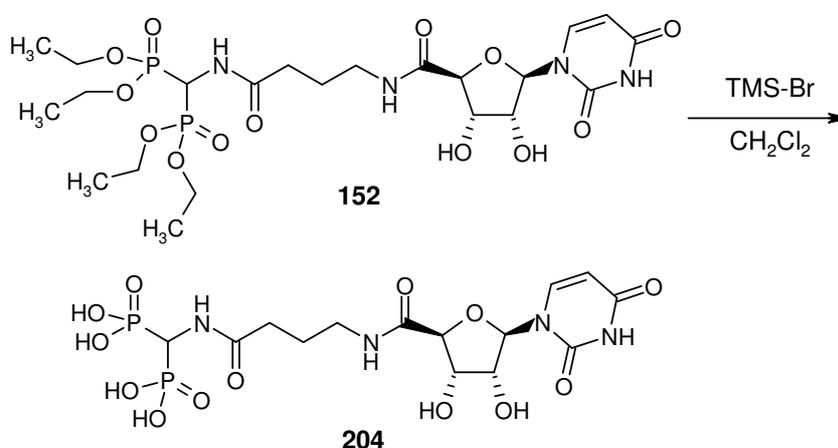


Abbildung 3.38: Entschützung eines Bisphosphonsäuretetraethylesters

In Tabelle 3.4 sind die Entschützungsmethoden aufgelistet, die mit guter Aussicht auf Erfolg bei Nucleosidderivaten eingesetzt werden können.

Tabelle 3.4: Methoden zur Abspaltung von Schutzgruppen aus Nucleosidderivaten

Schutzgruppe	Methoden
Anisylidenacetal, vermutlich auch <i>t</i> Butylester	TFA in CH ₂ Cl ₂ , bis 5 %
Carbonsäureester	Hydrolasen
Benzylester und Benzylidenacetal, nur bei Purinnucleosiden anwendbar	Pd/C, H ₂ oder Cyclohexadien
Phosphonsäureester	TMS-Br

3.2.6 Darstellung von Nucleosid-5'-phosphoramidaten

Einige der Kopfgruppen K zeigten besonders interessante pharmakologische Eigenschaften in der Testung an E-NTPDasen. Deshalb wurde nach Möglichkeiten gesucht, sie stabil, aber auf den physiologischen Vorbildern ähnlichere Weise mit Uridin und Adenosin zu verknüpfen. Hier bot sich ein im Arbeitskreis etabliertes Verfahren zur direkten Darstellung von Phosphoramidaten aus Nucleosid-5'-phosphaten mit 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC) als Kopplungsreagenz an. UMP und AMP wurden mit dem Oxalsäuresalz des Aminomethylphosphonsäurediethylesters **92** (Abbildung 3.39) umgesetzt.

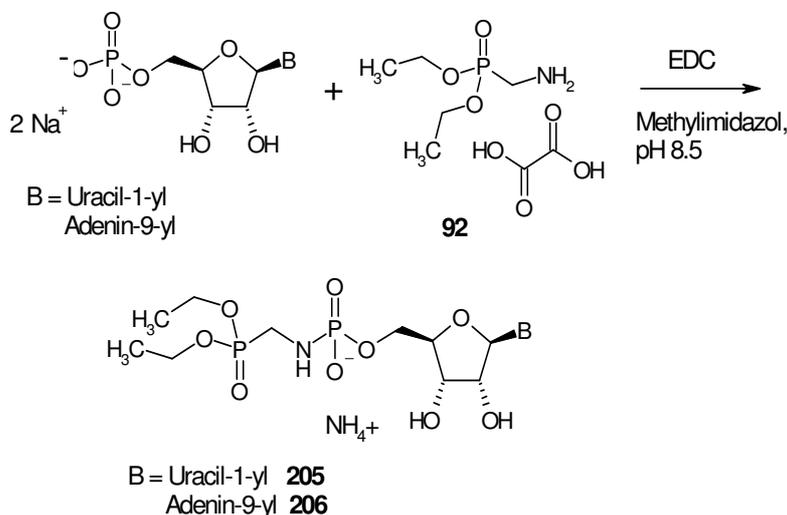


Abbildung 3.39: Darstellung von Nucleosidmonophosphoramidaten

Darüberhinaus wurde AMP erfolgreich mit p-Aminobenzylphosphonsäurediethylester zu Verbindung **207** umgesetzt, das entsprechende UMP-Amidat darzustellen gelang nicht (Abbildung 3.40).

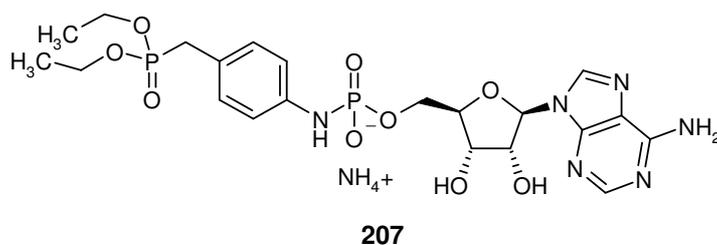


Abbildung 3.40: Adenosin-5'-Arylphosphoramidat

Die Ausbeuten bei dieser Reaktion lagen nur bei 19-32 %. Ein Grund für die niedrigen Ausbeuten liegt sicherlich in der eher langwierigen Aufreinigungsprozedur. Die Endprodukte werden zunächst einer Ionenaustauschchromatographie unterzogen. Auf diese folgt ein weiterer Aufreinigungsschritt mit der RP-HPLC, der hauptsächlich dem Entsalzen dient.

3.3 Analytik der neu dargestellten Verbindungen

Sämtliche neu synthetisierten Verbindungen wurden umfassend durch ^1H -, ^{13}C -, die Phosphonate zusätzlich durch ^{31}P -NMR-Spektren charakterisiert. Desweiteren wurden Identität und Reinheit mit LC-MS und durch Elementaranalysen überprüft. Die mit HPLC aufgereinigten Produkte wiesen eine Reinheit von über 95 % meist über 99 % auf.

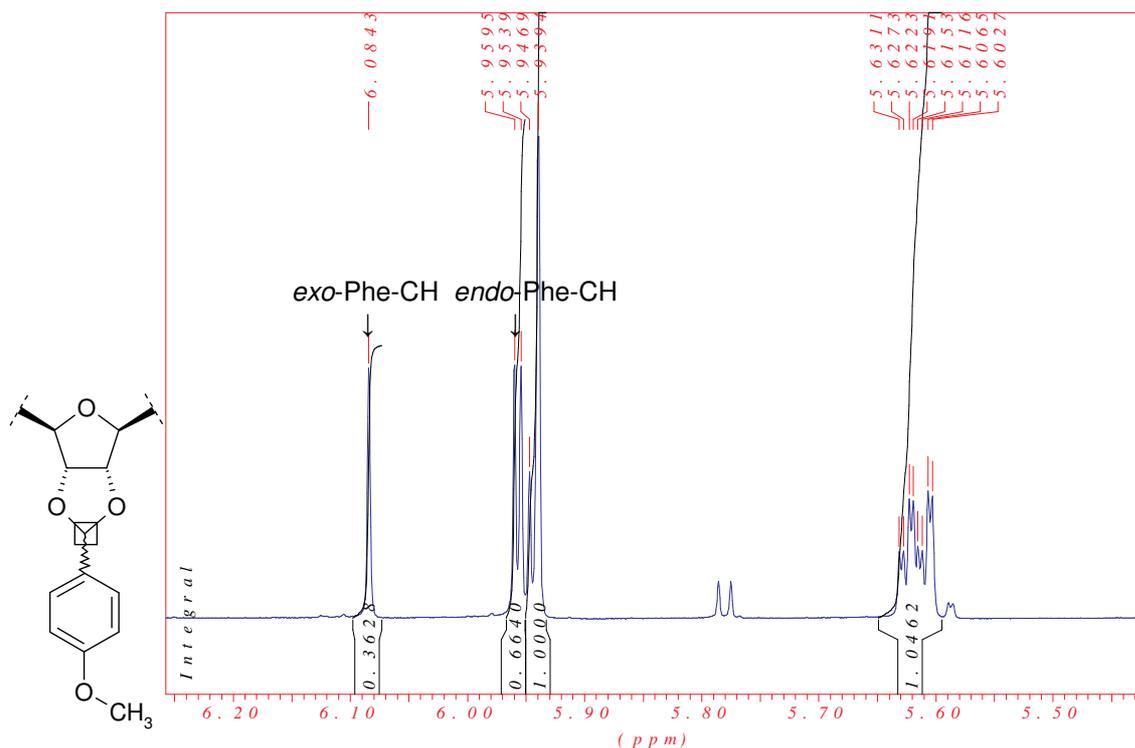


Abbildung 3.41: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **85** (Lösungsmittel: DMSO-d_6)

Die ^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR-Spektren der Nucleosidderivate zeigen einige Besonderheiten, die hier Erwähnung finden sollen. Bei der Darstellung der am Zucker als Acetal geschützten Verbindungen **74-76** entsteht ein Gemisch aus *exo*-

und *endo*-Diastereomeren. In Abbildung 3.41 ist ein Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **85** dargestellt. Das Verhältnis, in dem die *exo*- und *endo*-Diastereomeren vorliegen, kann im ^1H -Spektrum bestimmt werden. Das neu eingeführte asymmetrisch substituierte C-Atom der Anisylidenschutzgruppe gibt zwei Signale, eines bei 5.95 ppm (*endo*) und eines bei 6.08 ppm (*exo*). Die Integrale beider Signale geben das Verhältnis der beiden Diastereomere an.²⁶⁴ Hier liegen *endo*- und *exo*-Diastereomere in einem Verhältnis von etwa 3:2 vor.

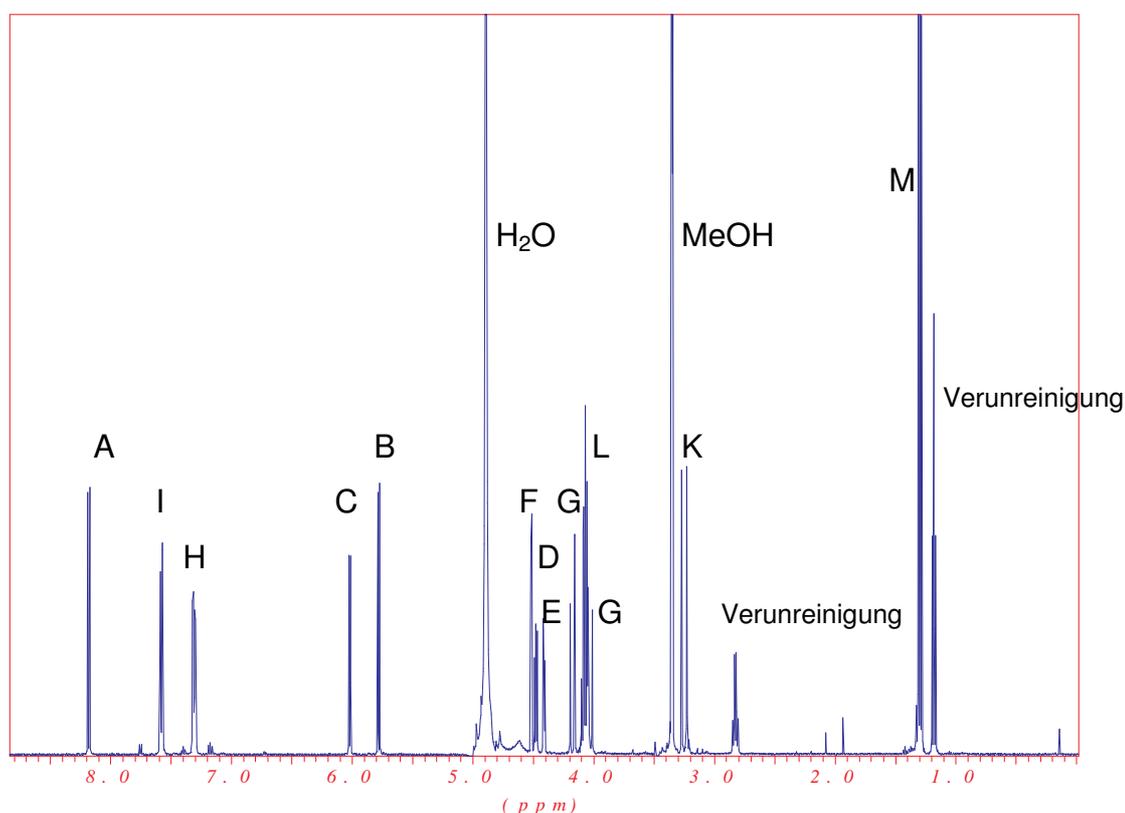
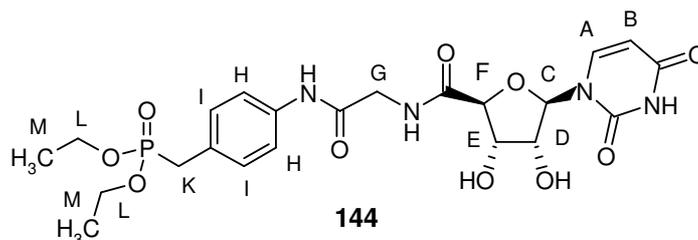


Abbildung 3.42: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **144** (Lösungsmittel: MeOD)

Beispielhaft für die neu synthetisierten Verbindungen **144-176**, **179-184** und **194-203** sind ^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR-Spektren der Verbindung **144** abgebildet (Abbildungen 3.42, 3.44, 3.45). Die Nucleobase Uracil zeigt im ^1H -Spektrum sehr leicht zuzuordnende Signale im aromatischen Bereich (Abbildung 3.42, H-6: 8.2 ppm, A; H-5: 5.9 ppm, B).

Durch die Hydrierung des Uracils entsteht ein Dihydrouracil wie z.B. in Verbindung **183**. Es zeigt im ^1H -NMR-Spektrum Signale höherer Ordnung bei 3.6 ppm (A) und 2.8 ppm (B) (Abbildung 3.43). Dies ist auf ^1J -Kopplungen der beteiligten Methylengruppen zurückzuführen.

Verbindung **144** stellt ein Nucleosid-4'-Carboxamid dar. Für solche Nucleosidderivate ist in der Literatur beschrieben, daß sie im Gegensatz zur *anti*-Konformation der physiologischen Nucleoside in der *syn*-Konformation vorliegen können.²⁹³ Hier kann das ^1H -NMR-Spektrum herangezogen werden, um die Konformation zu bestimmen. Liegt das Nucleosid in der *syn*-Konformation vor, so findet sich das Signal für das H-2'-Proton bei 5.2 ppm, in der *anti*-Konformation um 4.2 ppm.^{209,293} Sämtliche Produkte liegen demzufolge, wie auch am Spektrum von Verbindung **144** zu sehen (Abbildung 3.42, H-2': 4.4 ppm, D), in der *anti*-Konformation vor. Als Linker wurde u.a. die Aminosäure Glycin verwendet. Die Methylengruppe dieser Aminosäure zeigt bei 4 ppm (Abbildung 3.41, G, teilweise überlagert vom Ethylester) nicht das erwartete Singulett sondern ein durch Diastereotopie bedingtes AB-System mit einer ^1J -Kopplungskonstante von 16.40 Hz.

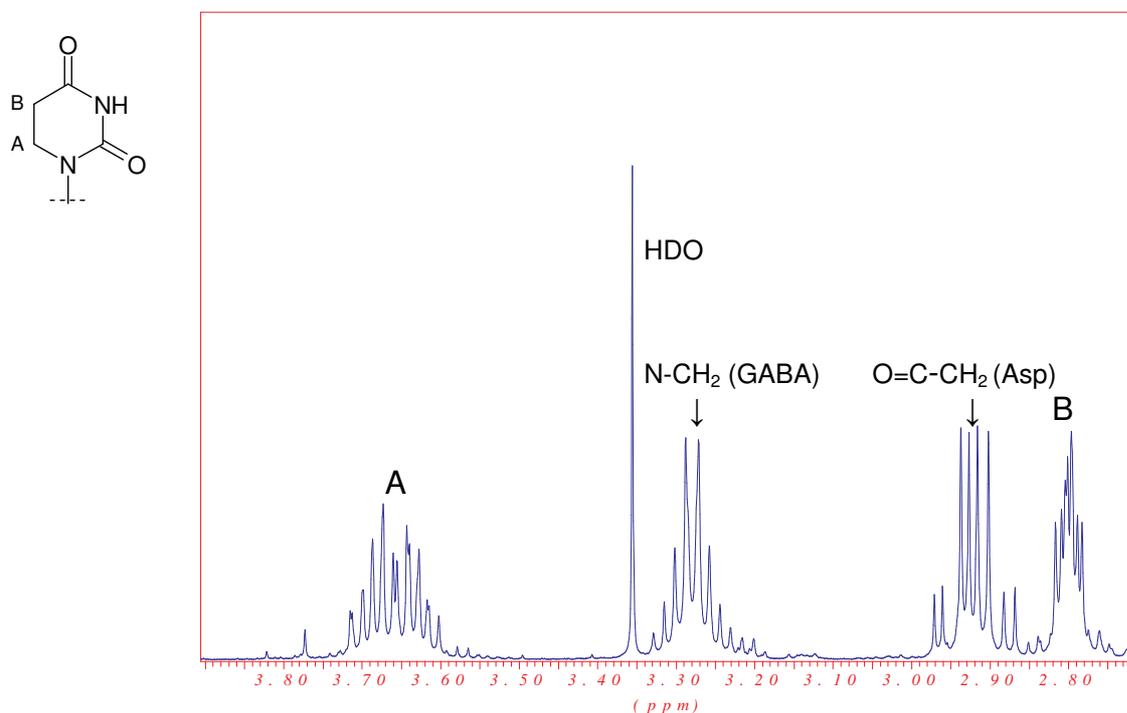


Abbildung 3.43: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **183** (Lösungsmittel: D_2O)

Die Phosphonate der Verbindungen **144-176** und **194-203** lassen sich sehr leicht anhand der $\text{CH}_2\text{-P}$ -Gruppe zuordnen. Im ^1H -Spektrum findet sich eine $^2\text{J}_{\text{H,P}}$ -

Kopplung von ca. 21 Hz für das Benzylphosphonat, wie in Verbindung **144** (Abbildung 3.42, 3.3 ppm, K), und von ca. 12 Hz für das Methylphosphonat, z.B. in Verbindung **149**. Im ^{13}C -Spektrum gibt das entsprechende Strukturfragment des Benzylphosphonats und des Methylphosphonats eine $^1\text{J}_{\text{C,P}}$ -Kopplung von 157 Hz (Abbildung 3.44, 32 ppm, Q).

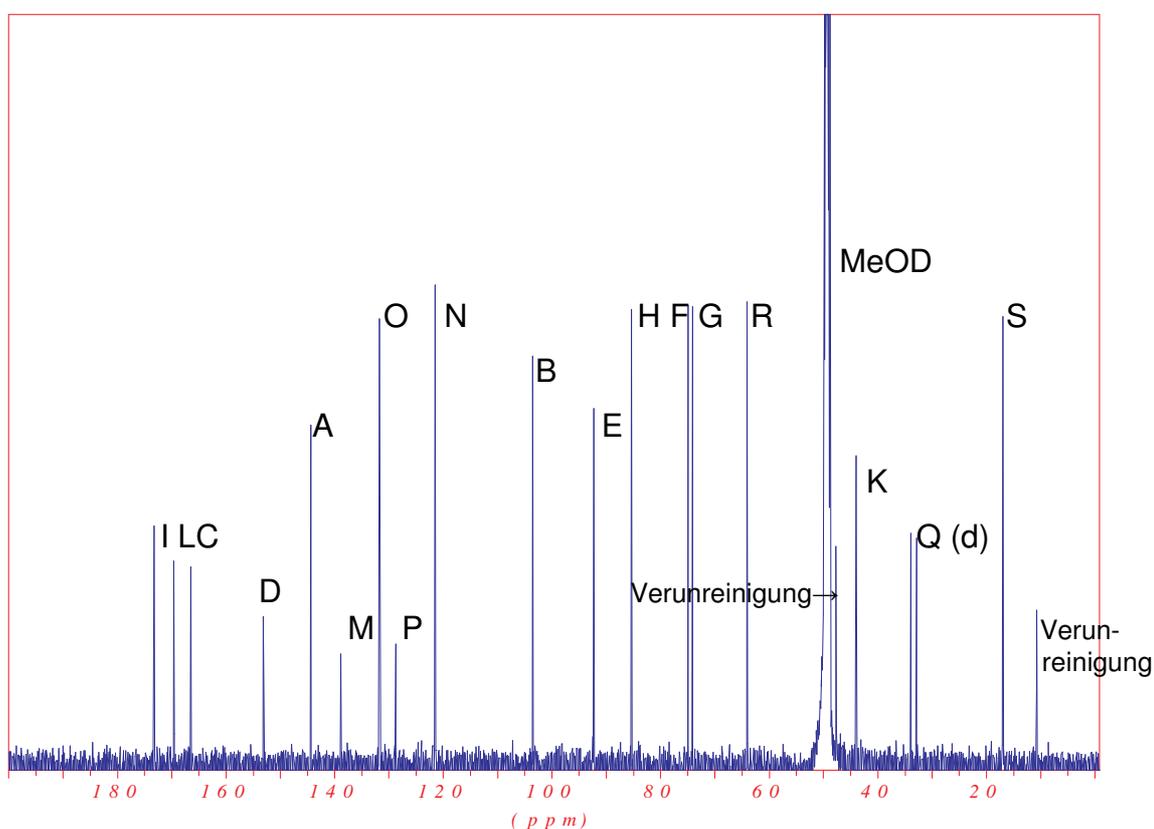
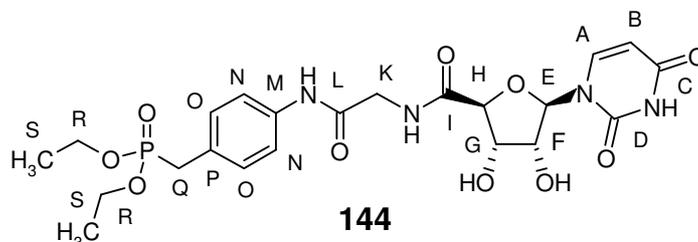


Abbildung 3.44: ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **144** (Lösungsmittel: MeOD)

Das ^{31}P -Spektrum zeigt ein Singulett bei 27 ppm beim Benzylphosphonat (Abbildung 3.45), von 18-22 ppm beim Methylphosphonat, z.B. in Verbindung **149** und ein Singulett bei 16 ppm für das Bisphosphonat, z.B. in Verbindung **152**.

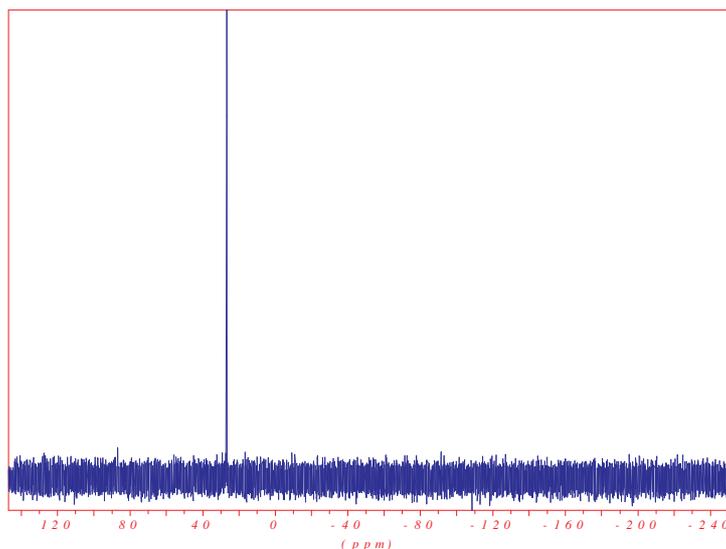


Abbildung 3.45: ^{31}P -NMR-Spektrum der Verbindung **144** (Lösungsmittel: MeOD)

3.4 Zusammenfassung und Bewertung der Synthesestrategie

Die in Abschnitt 3.2 en detail beschriebene Synthesestrategie führte zu den in den Abbildungen 3.29, 3.30, 3.33 sowie 3.37 dargestellten Substanzreihen und den in Abbildungen 3.25, 3.32, 3.38, 3.39 und 3.40 vorgestellten Einzelsubstanzen. Um das Prinzip dieser konvergenten Synthese hervorzuheben, ist sie in Schema 3.41 zusammengefaßt.

Zuerst wurde das Nucleosid an der 2',3'-Position der Ribose als Acetal geschützt (1a), dann an der 5'-Position zur entsprechenden Riburonsäure oxidiert (1b). Parallel dazu wurde das Triphosphatmimetikum aus dem Linker ω -Aminocarbonsäure und den hydrophilen Kopfgruppen Aminodicarbonsäurester bzw. Aminophosphonsäurester, hier einfach als R-NH₂ abgekürzt, durch Amidsynthese (2a) und anschließende boc-Entschützung (2b) aufgebaut. Die beiden Synthesestränge, aus denen die Nucleosid-Carbonsäuren und die Triphosphatmimetika hervorgingen, wurden im konvergenten Schritt (**3**), einer Amidkopplung, zusammengeführt. Darauf folgten die Abspaltung der Zuckerschutzgruppe (4) und evtl. noch die Abspaltung der Estergruppen (5). Diese Reaktionssequenz bietet die Vorteile vergleichsweise weniger Synthesestufen und der Anwendung etablierter Synthesemethoden. Durch die Amidkopplung konnte die Problematik der Bildung von Cyclonucleosiden umgangen werden. Das Triphosphatmimetikum wurde separat aufgebaut, somit

mußte bei seiner Synthese keine Rücksicht auf die Reaktivität der Nucleoside genommen werden. Da Nucleosid, Linker und Kopfgruppe, gleichsam nach dem Baukastenprinzip in sehr weiten Grenzen wählbar sind, liegt eine große Stärke gerade in der realisierbaren Produktvariabilität. Man geht natürlich durch den Eingriff in die räumliche Struktur des Nucleosids ein gewisses Risiko ein, hat aber dadurch auch die große Chance, wie im nächsten Kapitel diskutiert, selektive Affinitäten zu bestimmten Targets zu erzielen.

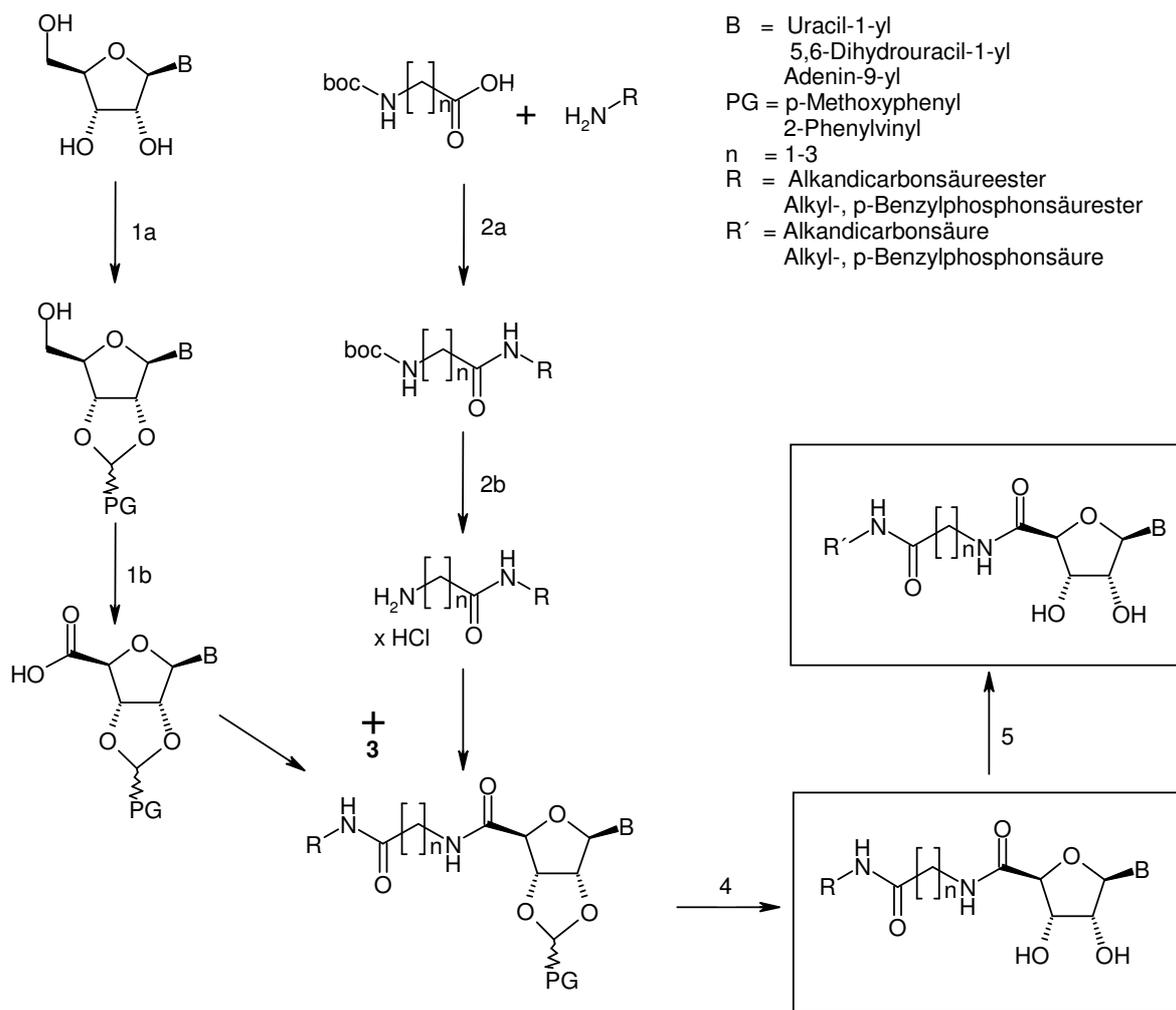


Abbildung 3.46: Synthesestrategie

4. Aktivitäten der neu dargestellten Substanzen in verschiedenen biologischen Systemen

Die biologischen Eigenschaften der im vorangehenden Kapitel vorgestellten Nucleotidanaloga wurden von Kollegen im Arbeitskreis charakterisiert. Im Sinne der Aufgabenstellung standen die folgenden purinergeren bzw. pyrimidinergeren Targets im Mittelpunkt: Untersuchung des inhibitorischen Potentials an rekombinanten, humanen Ecto-Nucleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen (hE-NTPDasen, im Text E-NTPDasen genannt, gemeint ist immer das humane Enzym) sowie an der rekombinanten Ecto-5'-Nucleotidase der Ratte sowie der Affinität zu den Nucleotidrezeptor-Subtypen P2Y_{2,4,6,12}. Darauf erfolgte die Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen, die in diesem Kapitel diskutiert werden.

Durch die Zusammenführung der aus den Testungen an Enzymen und Rezeptoren gewonnenen Daten gelangt man zu Aktivitätsprofilen, die über ein weiteres Kriterium, die Selektivität, Aufschluß geben. In der Literatur wird oft die Forderung betont, daß Substanzen nicht nur E-NTPDase-Isoenzym- bzw. P2-Rezeptorsubtyp-selektiv sein sollten. Gerade die Aktivität der Enzymhemmung verglichen mit der Affinität zu P2-Rezeptoren ist ein sehr wichtiger Parameter, der den pharmakologischen Wert einer Substanz entscheidend mitbestimmt.^{8,15,211} Beispielsweise bewirkt ein P2-Rezeptorantagonist, der auch E-NTPDasen hemmt, in der Zellkultur oder im Organ Effekte, die sich gegenseitig aufheben können. Da E-NTPDasen und P2-Rezeptoren auf komplexe Art miteinander interagieren, ist es eher schwierig, die Herkunft der Effekte, die eine solche Substanz verursacht, zu beurteilen.

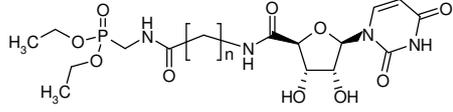
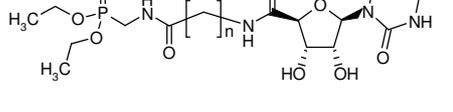
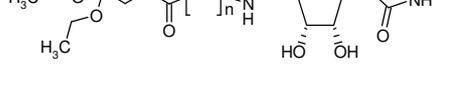
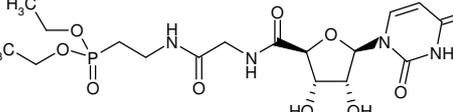
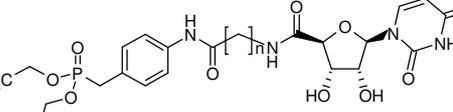
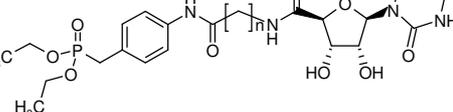
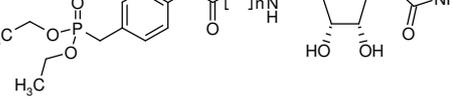
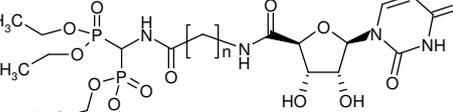
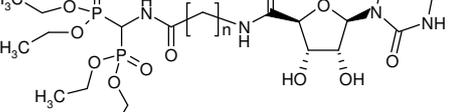
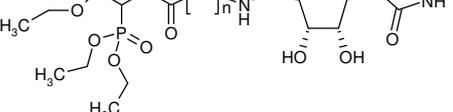
4.1. Testung an Ecto-Nucleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen (E-NTPDasen)

Isolierte, rekombinante E-NTPDasen stehen zur Testung von potentiellen Inhibitoren erst seit kürzerem zur Verfügung. An diesen wurden die neu synthetisierten Verbindungen untersucht. Die Enzyme stammten aus den Arbeitsgruppen von Dr. Jean Sévigny und Dr. Aileen F. Knowles. Die Testungen an diesen Enzymen wurden

von Dr. Jamshed Iqbal im Arbeitskreis Prof. Müller, Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn, an einem von ihm entwickelten Kapillarelektrophorese- (CE-) gestützten Enzymassay durchgeführt.²¹² Die hohe Trennleistung und Auflösung der CE erlaubte unter minimalem Substanzverbrauch eine schnelle Überprüfung von Substanzen auf inhibitorisches Potential, das sogenannte Screening, und die nachfolgende Ermittlung der K_i -Werte.

Die Tabellen 4.1, 4.5, 4.7 und 4.8 listen die K_i -Werte von jeweils chemisch verwandten Substanzklassen an E-NTPDasen auf. Eine Analyse dieser Daten in den Tabellen 4.2–4.4 und 4.6 zeigt, daß man das Zusammenspiel bestimmter Strukturfragmente sehr gut mit der Stärke der Hemmung von Ectonucleotidase-Isoenzymen korrelieren kann.

Tabelle 4.1: Uridinderivate mit 5'-Phosphonsäureesterpartialstruktur^a

Strukturformel	n	Verbindung	NTPDase1	NTPDase2	NTPDase3	NTPDase8
			K_i [μ M] \pm SEM			
	1	147	786 \pm 33	71.7 \pm 13.5	>> 200 (0) ^b	>> 100 (0) ^b
	2	148	>> 50 (0) ^b	167 \pm 21.3	>> 200 (0) ^b	>> 100 (0) ^b
	3	149	>> 50 (45) ^b	29.2 \pm 2.7	>> 200 (0) ^b	>> 100 (0) ^b
		150	>> 50	116 \pm 24.3	>> 200 (22) ^b	>> 100 (0) ^b
	1	144	>> 50 (50) ^b	8.2 \pm 2.1	>> 200 (0) ^b	>> 100 (0) ^b
	2	145	55.2 \pm 2.6	173 \pm 17.3	>> 200 (40) ^b	>> 100 (0) ^b
	3	146	182 \pm 24.3	210 \pm 25.3	>> 200 (48) ^b	242 \pm 39.3
	1	150	93 \pm 14	ca. 165 (54) ^b	n.d. ^c	n.d. ^c
	2	151	325 \pm 25	ca. 175 (51) ^b	n.d. ^c	n.d. ^c
	3	152	32.4 \pm 1.1	242 \pm 22.3	n.d. ^c	n.d. ^c

^a Alle Werte wurden in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt; K_m (NTPDase1): 17 μ M; K_m (NTPDase2): 70 μ M; K_m (NTPDase3): 75 μ M; K_m (NTPDase8): 46 μ M; ATP-Konzentration: 320 μ M.

^b % Inhibition bei 1 mM

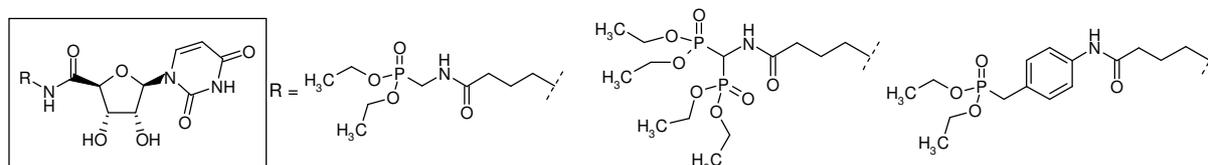
^c nicht bestimmt

Zunächst wurden verschiedene Uridinderivate mit 5'-terminaler Dicarbonsäureester-partialstruktur (Verbindungen **113-120**, Abbildung 3.29) an den NTPDasen 1 und 2 in einer Konzentration von 1 mM getestet. Sie hemmten beide Enzyme in dieser Konzentration nicht. Der K_i -Wert der Inhibitoren wird mit der in Abschnitt 6.8.1 dargestellten Cheng-Prusoff-Gleichung ermittelt. In diese Gleichung gehen der K_m -Wert des Enzyms (Tab. 6.1) und die Substratkonzentration (ATP) von 320 μM ein. Für die NTPDase1 (K_m : 17 μM) folgt daraus, daß die K_i -Werte der Verbindungen **113-120** an diesem Enzym deutlich über 50 μM liegen müssen, diejenigen an der NTPDase2 (K_m : 70 μM) deutlich über 200 μM .

Demgegenüber konnte mit den in Tabelle 4.1 aufgeführten Uridinderivaten, die 5'-terminal verschiedene Phosphonsäureester tragen, zwei Arten von E-NTPDase-Inhibitoren gefunden werden. Es lassen sich hier Substanzen, die jeweils das Isoenzym NTPDase1 und 2 potent und selektiv hemmen und Substanzen, die die E-NTPDasen 1, 2 und 8 unselektiv aber mit geringerer Potenz inhibieren, unterscheiden. Mit diesen Substanzreihen konnte die NTPDase3 nicht und die NTPDase8 eher schwach und nicht selektiv gehemmt werden.

Tabelle 4.2 zeigt die Gegenüberstellung von zwei Isoenzym-selektiven (**149**, **152**) und einem unspezifischen Inhibitor (**146**). In den in dieser Tabelle beschriebenen Verbindungen ist das Nucleosid Uridin jeweils am C-5' zur Carbonsäure oxidiert und über Amid-Verknüpfung mit einem drei Methylengruppen und eine endständige Carboxamidogruppe umfassenden Linker verbunden.

Tabelle 4.2: Gegenüberstellung von selektiven und unselektiven E-NTPDase-Inhibitoren^a



Verbindung	149	152	146
	K_i [μM] \pm SEM	K_i [μM] \pm SEM	K_i [μM] \pm SEM
NTPDase1	ca. 56 (45) ^b	32.4 \pm 1.1	182 \pm 24.3
NTPDase2	29.2 \pm 2.7	242 \pm 22.3	210 \pm 25.3
NTPDase3	\gg 200 (0) ^b	n.d. ^c	\gg 200 (48) ^b
NTPDase8	\gg 100 (0) ^b	n.d. ^c	242 \pm 39.3

^a Alle Werte wurden in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt.

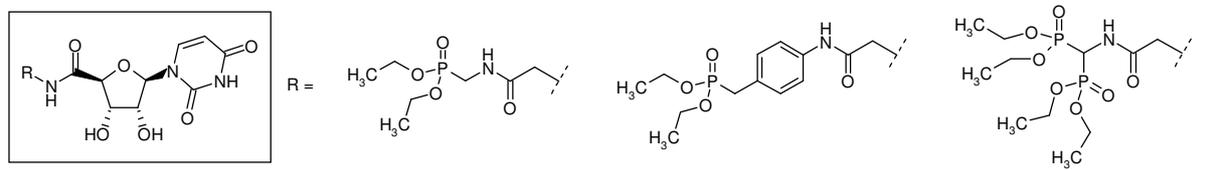
^b % Inhibition bei 1 mM

^c nicht bestimmt

Als polare Kopfgruppen dienen hier Phosphonsäureester. Das Uracil und der Tetrahydrofuranheterocyclus mit dem 2,3-Diol der Riburonsäure besitzen wahrscheinlich Affinität zur Bindungstasche für die Nucleosid-Partialstruktur, während der Linker in der Lage ist, hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums oder im aktiven Zentrum selbst auszuüben. Die beiden Carboxamidgruppen können je nach Umgebung sowohl als H-Donoren (N-H) als auch als H-Akzeptoren (Oxo-Funktion) fungieren. Unterschiede in der Wirkung lassen sich bei den verglichenen drei Uracilnucleotid-Mimetika also ausschließlich auf die verschiedenen Phosphonsäureester, die sich im gleichen Abstand zum Nucleosid befinden, zurückführen. Man kann erwarten, daß sie mit der Phosphatbindungsstelle der Nucleotide interagieren. Unter diesen hemmt der Methylphosphonsäurediethylester in Verbindung **149** bevorzugt die NTPDase2. Er stellt räumlich die geringsten Anforderungen. Seine Ethylgruppen können möglicherweise an der Phosphatbindungsstelle hydrophobe Wechselwirkungen eingehen, während die Oxo-Funktion einen H-Akzeptor darstellt. Der deutlich raumfüllendere Bisphosphonsäuretetraethylester in Verbindung **152** bevorzugt hingegen die NTPDase1. Vier Ethylgruppen können hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden, während die beiden Oxo-Sauerstoffatome des Bisphosphonats als H-Akzeptoren fungieren können. Im Unterschied zu den vorgenannten Phosphonaten könnte das Benzylphosphonat in Verbindung **146** noch zusätzlich π -Wechselwirkungen mit Aminosäuren im aktiven Zentrum eingehen. Die Affinität dieser Substanz zur NTPDase1 ist um den Faktor 6 geringer als diejenige der Verbindung **152** und zur NTPDase2 um den Faktor 7 schwächer als diejenige der Verbindung **149**. NTPDase1, 2 und 8 werden mit ähnlicher Potenz von **146** gehemmt. Die mit diesem Molekül erzielte eher schwächere Hemmung der E-NTPDasen läßt sich vermutlich mit einem Parameter erklären: Der Länge des Linkers. Offenbar schiebt das C₃-Fragment des Linkers die Phosphonsäureester-Partialstruktur des *p*-Benzylphosphonats aus der optimalen Position im aktiven Zentrum heraus. Umgekehrt könnte man auch postulieren, daß das Phosphatmimetikum weiterhin optimal in der Phosphatbindungstasche liegt, dafür aber das Nucleosid nicht mehr die besten Bedingungen zur Bindung findet (s.u.). Aus dieser Annahme ergeben sich Ansatzpunkte für eine künftige Optimierungsstrategie. Man könnte das Triphosphatmimetikum **109** (Abbildung 3.21) an der ω -Aminofunktion mit anderen, nicht-nucleosidischen Partialstrukturen versehen.

In Tabelle 4.3 werden Analoge der Verbindungen aus Tabelle 4.2, jedoch mit Glycin statt γ -Aminobuttersäure als Linker versehen, miteinander verglichen. Der Abstand zwischen polarer Kopfgruppe und Nucleosid ist dadurch geringer.

Tabelle 4.3: Selektive Hemmer der NTPDase1 und 2^a



Verbindung	147	144	150
	K_i [μM] \pm SEM	K_i [μM] \pm SEM	K_i [μM] \pm SEM
NTPDase1	786 \pm 33	$\gg 50$ (50) ^b	93 \pm 14
NTPDase2	71.7 \pm 13.5	8.2 \pm 2.1	$\gg 200$ (54) ^b

^a Alle Werte wurden in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt.

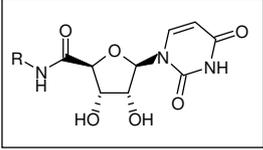
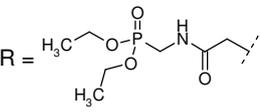
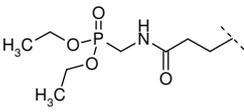
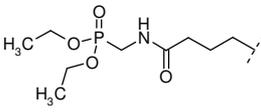
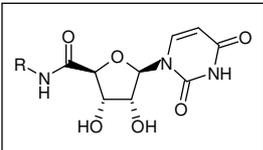
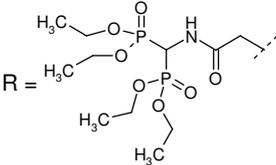
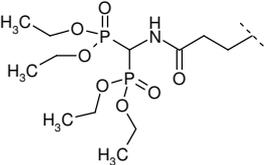
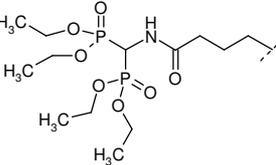
^b % Inhibition bei 1 mM

Auch wird dieser deutlich kürzere Linker schwächere hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden können. Hier zeigt sich ebenfalls die Tendenz, daß die Verbindung **147**, die den Methylphosphonsäurediethylester aufweist, die NTPDase2 bevorzugt hemmt, hingegen **150**, die den Bisphosphonsäuretetraethylester enthält, bevorzugt die NTPDase1 inhibiert. Allerdings sind beide Verbindungen schwächere Inhibitoren als ihre Homologen. Die Länge des Linkers besitzt offenbar große Bedeutung für die Hemmaktivität.

Verbindung **144** (Tabelle 4.3) besitzt wie **149** (Tabelle 4.2) einen Monophosphonsäurediethylester. Diese Verbindung bestätigt die Vermutung, daß der Abstand zwischen terminaler Phosphonsäureester-Partialstruktur und Nucleosid eine wichtige Rolle spielt. Mit dem größeren *p*-Benzylphosphonsäurediethylester, in einen geeigneteren Abstand zum Nucleosid gebracht, konnte ebenso wie mit dem Methylphosphonsäurediethylester selektiv und in guter Potenz die NTPDase2 gehemmt werden. Die π -Wechselwirkungen des Aromaten scheinen dabei von Vorteil zu sein. Neben einem Vergleich der polaren Endgruppen wurde weiterhin der schon oben angedeutete Einfluß der Länge des Linkers auf die Hemmaktivität untersucht (Tabelle 4.4). Die Hemmaktivität an den Isoenzymen NTPDase1 und NTPDase2 ließ sich modulieren, indem Linker mit verschiedener Anzahl an Methylengruppen den terminalen Methylphosphonsäureester bzw. den Methylenbisphosphonsäuretetra-

ethylester in unterschiedliche Abstände zum Nucleosid brachten. Die Aktivität änderte sich dabei jeweils nicht linear sondern nach dem Muster $n = 2 < 1 < 3$.

Tabelle 4.4: Einfluß des Linkers auf die inhibitorische Potenz von Uracilnucleotid-Mimetika an NTPDase1 und 2^a

			
Verbindung	147	148	149
	K_i [μM] \pm SEM	K_i [μM] \pm SEM	K_i [μM] \pm SEM
NTPDase2	71.7 \pm 13.5	167 \pm 21.3	29.2 \pm 2.7
			
Verbindung	150	151	152
	K_i [μM] \pm SEM	K_i [μM] \pm SEM	K_i [μM] \pm SEM
NTPDase1	93 \pm 14	325 \pm 25	32.4 \pm 1.1

^a Alle Werte wurden in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt.

Einen Erklärungsversuch für dieses Phänomen liefert der Vergleich der Verbindungen **147** und **149** mit dem Substrat ATP (Abbildung 4.1) und die Betrachtung des aktiven Zentrums. Dieses enthält die aus der Actin/HSP70/Zuckerkinase-Familie bekannte β,γ -Phosphatbindungsstelle.¹⁵ Die Aminosäuren der Bindungsstelle sind dabei so angeordnet, daß sie das β - und γ -Phosphat des Triphosphats gleichzeitig binden (s. hierzu Kapitel 2). Eine Verlängerung des Linkers um zwei Methylengruppen vergrößert den Abstand zwischen terminalem Phosphonat und Nucleosid um ca. 300 pm (Länge der C-C-Einfachbindung: 153 pm). Man kann vermuten, daß das terminale Phosphonat der Verbindung **149** mit der Bindungsstelle für das γ -Phosphat, das der Verbindung **147** hingegen mit der Bindungsstelle des β -Phosphats interagiert. Abbildung 4.3 liefert auch eine mögliche Erklärung für den niedrigeren K_i -Wert von **149**: Das Carboxamid des Linkers kann wahrscheinlich eine weitere Interaktion mit der Bindungsstelle für das β -Phosphat eingehen.

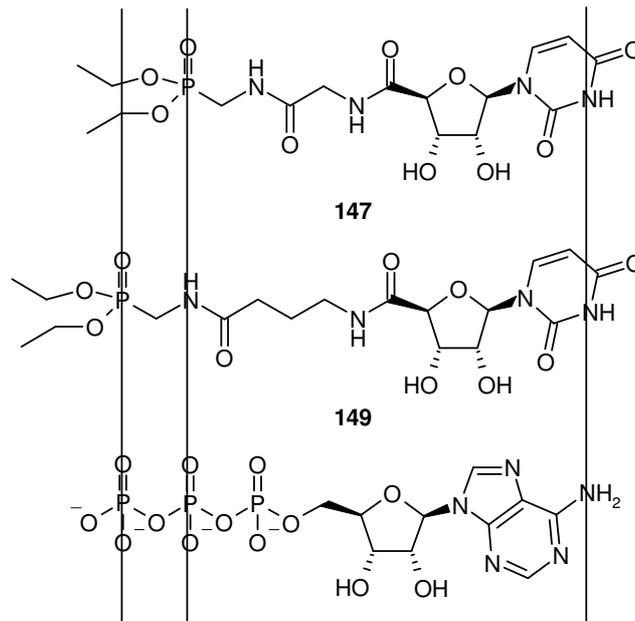


Abbildung 4.1: Vergleich der NTPDase2-Inhibitoren **147** und **149** mit ATP

Im Fall des *p*-Benzylphosphonsäurediethylesters war eine solche Gesetzmäßigkeit nicht erkennbar (vgl. Tabellen 4.2 und 4.3). Die Verbindung **144** mit Glycin als Linker konnte die NTPDase 2 selektiv mit guter Potenz hemmen. Eine Verlängerung des Linkers führt zu den schwächer wirksamen Verbindungen **145** und **146**. In diesen Verbindungen bindet entweder die Phosphonsäureester- oder die Nucleosid-Partialstruktur schlechter an der Targetstruktur.

Alle diese Beispiele belegen, daß die Phosphonat-Partialstruktur und der Abstand zwischen ihr und der Uracilnucleosid-Partialstruktur ein wichtiger Parameter für die inhibitorische Aktivität der Verbindungen ist. Die Interaktionsmöglichkeiten dieser Uracilnucleotid-Mimetika mit ihren biologischen Targetstrukturen (hier: E-NTPDasen) sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

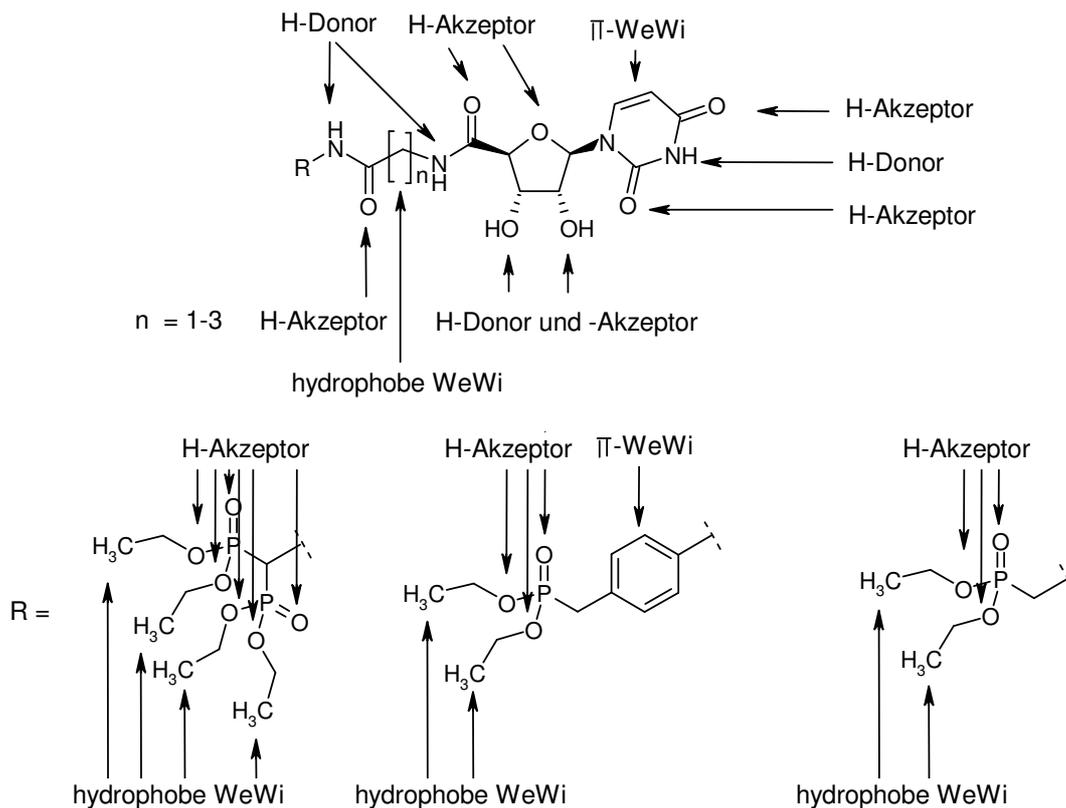
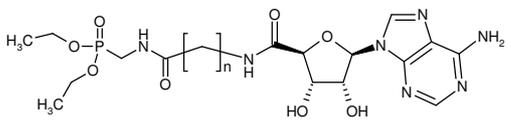
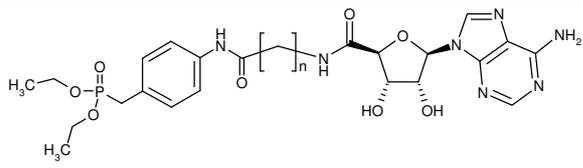
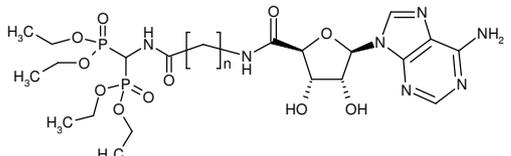


Abbildung 4.2: Interaktionsmöglichkeiten der Uracilnucleotid-Mimetika aus Tabelle 4.1 (WeWi = Wechselwirkungen)

Da E-NTPDasen die Adenin-Nucleotide ATP bzw. ADP mit einer höheren Rate als UTP bzw. UDP umsetzen (Tabelle 2.2), lag die Entscheidung nahe, Adenin-Analoga der oben aufgeführten Uridinderivate zu synthetisieren und ebenfalls zu testen. Durch den Austausch der Nucleobase Uracil gegen das von den Enzymen vermutlich bevorzugte Adenin sollten höhere Inhibitionspotenzen erreicht werden. Wie Tabelle 4.5 zeigt, ist diese Erwartung enttäuscht worden. Mit Ausnahme der eher schwach wirksamen Strukturen **170** und **171** brachte der Basentausch keinen E-NTPDase-Hemmer hervor. Vermutlich sind die E-NTPDasen evolutionär stärker an Adeninnucleotide angepaßt. Diese werden mit deutlich niedrigeren K_m -Werten hydrolysiert als die entsprechenden Uracilnucleotide (Tabelle 2.2). Die Nucleosidbindungstasche akzeptiert offensichtlich im Fall des Adenosins nicht die Änderung der räumlichen Struktur des Nucleosids, die die Oxidation der 5'-Position mit sich bringt. Möglicherweise beansprucht in den Adeninnucleotid-Mimetika (Tabelle 4.5) die Nucleobase zu viel Raum, um von der Nucleosidbindungsstelle akzeptiert zu werden.

Tabelle 4.5: Adeninnucleotid-Mimetika mit terminaler 5'-Phosphonsäureesterpartialstruktur^a

Strukturformel	n	Verbindung	NTPDase1	NTPDase2	NTPDase3	NTPDase8
K _i [μM] ± SEM						
	1	174	>> 50 (0) ^b	ca.600 (15) ^b	>> 200 (25) ^b	>> 100 (0) ^b
	2	175	>> 50 (0) ^b	>> 200 (0) ^b	>> 200 (0) ^b	>> 100 (0) ^b
	3	176	>> 50 (0) ^b	>> 200 (0) ^b	>> 200 (0) ^b	>> 100 (0) ^b
	1	169	>> 50 (0) ^b	>> 200 (0) ^b	>> 200 (0) ^b	>> 100 (0) ^b
	2	170	154 ± 37	1440 ± 64	>> 200 (0) ^b	>> 100 (0) ^b
	3	171	161 ± 24	213 ± 34	>> 200 (0) ^b	255 ± 25.3
	2	172	>> 50 (0) ^b	>> 200 (0) ^b	n.d. ^c	n.d. ^c
	3	173	>> 50 (0) ^b	>> 200 (0) ^b	n.d. ^c	n.d. ^c

^a Alle Werte wurden in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt; K_m (NTPDase1): 17 μM; K_m (NTPDase2): 70 μM; K_m (NTPDase3): 75 μM; K_m (NTPDase8): 46 μM; ATP-Konzentration: 320 μM.

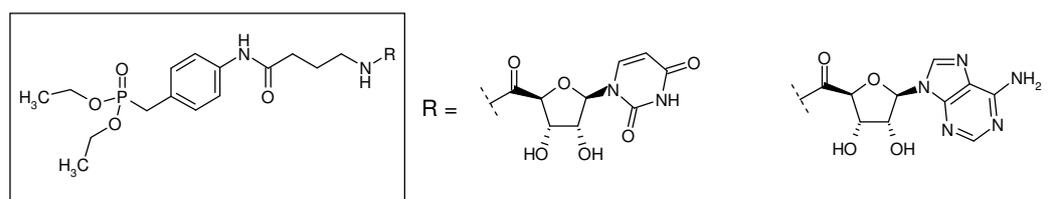
^b % Inhibition bei 1 mM

^c nicht bestimmt

Vor dem Hintergrund, daß die Verbindungen **144**, **149** und **152** (Tabelle 4.1) sehr gute E-NTPDase-Inhibitoren darstellten, ihre Adenosin-Analoga aber bei der getesteten hohen Konzentration von 1 mM keine oder nur eine geringe E-NTPDase-Hemmung zeigten, ist ein Vergleich der beiden Verbindungen **88** und **113** interessant (Tab. 4.6). Sie besitzen beide das Phosphatmimetikum mit Benzylphosphonsäurediethylester als polarer Endgruppe und γ-Aminobuttersäure als Linker. Insofern sind in diesem Teil der Verbindungen gleiche Interaktionen mit den E-NTPDasen zu erwarten: Hydrophobe Wechselwirkungen durch die Alkylkette des Linkers und Wasserstoffbrückenbindungen der beiden Carboxamide. Die Kopfgruppe weist hydrophobe Wechselwirkungen durch die Ethylgruppen des Phosphonsäureesters auf, dazu noch π-Wechselwirkungen durch den Aromaten. Das Phosphonat kann mit seiner Oxofunktion als H-Akzeptor fungieren. Bei diesen beiden Verbindungen spielt die Nucleobase keine Rolle. Adenin ist der Wirkung nicht abträglich: Beide Verbindungen weisen ein fast identisches Inhibitionsprofil an den E-NTPDasen 1, 2 und 8 auf. Sie wirkten allerdings deutlich schlechter als die bislang potentesten

Uridinderivate **144**, **149** und **152**. Man kann spekulieren, daß das Phosphatmimetikum dieser Verbindungen mit seiner polaren Kopfgruppe und dem Linker sehr gut mit der Phosphatbindungsstelle interagiert. Die beiden Nucleoside können auf ähnliche Weise, aber eher schlecht mit der Nucleosidbindungsstelle in Wechselwirkungen treten. Möglicherweise bietet dieses Phosphatmimetikum einen Ansatzpunkt, um die Nucleosidstruktur zu ersetzen.

Tabelle 4.6: Vergleich der Verbindungen **146** und **171**^a



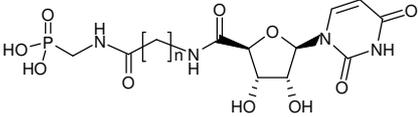
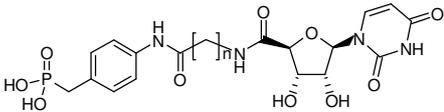
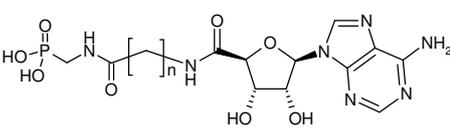
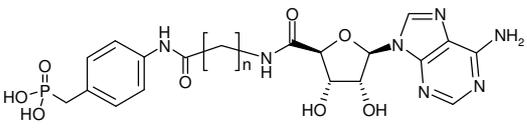
	146	171
	K_i [μ M] \pm SEM	K_i [μ M] \pm SEM
NTPDase1	182 \pm 24	161 \pm 24
NTPDase2	210 \pm 25	213 \pm 34
NTPDase3	>> 200 (48) ^b	>> 200 (0) ^b
NTPDase8	242 \pm 39	255 \pm 25

^a Alle Werte wurden in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt.

^b % Inhibition bei 1 mM

Eine zweite Strategie bestand darin, die Phosphonsäureester der aktiven Verbindungen in die entsprechenden freien Phosphonsäuren zu spalten (Tabelle 4.7). Die so gewonnenen Produkte tragen wie ihre physiologischen Vorbilder UTP und ATP negative Ladungen. Sie sollten daher in ihren elektrostatischen Eigenschaften den Enzymsubstraten noch stärker ähneln und entsprechend mit höherer Affinität E-NTPDasen hemmen. Hier können bislang nur vorläufige Aussagen getroffen werden, da die entsprechenden Testergebnisse noch ausstehen. Es fällt immerhin auf, daß das Phosphonat **196** eine höhere Affinität als der entsprechende Ester **144** zur NTPDase1 besitzt. Die homologen Phosphonsäuren **197** und **198** erwiesen sich allerdings als inaktiv an diesem Enzym.

Tabelle 4.7: Hemmung von E-NTPDasen durch Uracil- und Adeninnucleotidmimetika mit 5'-Phosphonsäurepartialstruktur^a

Strukturformel	n	Verbindung	NTPDase1	NTPDase2	NTPDase3	NTPDase8
K _i [μM] ± SEM						
	1	194	>> 50 (40 ± 0) ^b	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
	2	195	>> 50 (33 ± 1) ^b	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
	1	196	151 ± 4	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
	2	197	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
	3	198	>> 50 (34 ± 1) ^b	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
	1	199	>> 50 (0) ^b	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
	3	200	>> 50 (33 ± 1) ^b	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
	1	201	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
	2	202	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
	3	203	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c

^a Alle Werte wurden in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt; K_m (NTPDase1): 17 μM; K_m (NTPDase2): 70 μM; K_m (NTPDase3): 75 μM; K_m (NTPDase8): 46 μM; ATP-Konzentration: 320 μM.

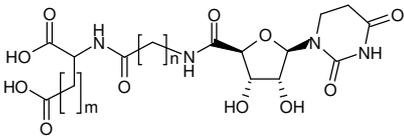
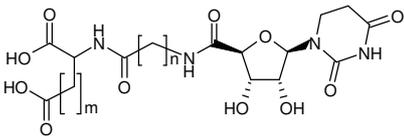
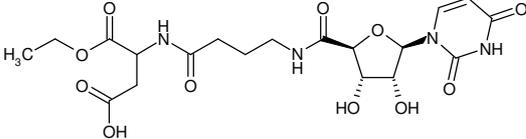
^b % Inhibition bei 1 mM

^c nicht bestimmt

Die gegensätzliche Entwicklung zeichnete sich bei der Evaluierung der Uridinderivate mit peptidartigem Strukturfragment an der 5'-Position ab (Abb. 4.1). Wie oben erwähnt, konnte mit der Dicarbonsäureesterstruktur im Gegensatz zu den verschiedenen (Bis-)Phosphonsäureestern keine Hemmung der E-NTPDasen im getesteten Konzentrationsbereich beobachtet werden. Durch Spaltung der Esterstruktur wurde die Aktivität der Nucleotidmimetika mit Phosphonatpartialstruktur teilweise gesenkt. Der umgekehrte Effekt, eine Aktivitätssteigerung, trat hingegen auf, nachdem aus den in Abbildung 4.1 dargestellten Benzylestern hydrogenolytisch die entsprechenden Dicarbonsäuren **179-184** freigesetzt worden waren. Die dabei gleichzeitig erfolgte Hydrierung der Nucleobase, die zu 5,6-Dihydrouracilderivaten führte, tat der Aktivität an der NTPDase1 keinen Abbruch (5,6-Dihydrouracilnucleotide sind physiologische Verbindungen, die in der tRNA

vorkommen). Ob sich diese Hydrierung negativ auswirkt, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen, nachdem die entsprechenden Uracilderivate verfügbar sind. Auf enzymatischem Weg konnte die Monocarbonsäure **178** erhalten werden. Auch diese Verbindung erwies sich als sehr potenter NTPDase 1-Inhibitor.

Tabelle 4.8: Hemmung von NTPDasen durch Uridinderivate mit terminaler 5'-Carbonsäurestruktur^a

Strukturformel	n	m	Verbindung	NTPDase1	NTPDase2	NTPDase3	NTPDase8
	K _i [μM] ± SEM						
	1	1	179	167 ± 21	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
	2	1	181	55 ± 5	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
	3	1	183	>> 50 (36) ^b	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
	1	2	180	>> 50 (0) ^b	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
	2	2	182	10.8 ± 1	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
	3	2	184	>> 50 (18) ^b	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
			178	29 ± 4	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c

^a Alle Werte wurden in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt; K_m (NTPDase1): 17 μM; K_m (NTPDase2): 70 μM; K_m (NTPDase3): 75 μM; K_m (NTPDase8): 46 μM; ATP-Konzentration: 320 μM.

^b % Inhibition bei 1 mM

^c nicht bestimmt

Die 5,6-Dihydrouridinderivate (Tabelle 4.8) weisen bestimmte Strukturfragmente auf, wie sie auch in den in Tabellen 4.1 - 4.7 beschriebenen Verbindungen zu finden sind: das D-Riburonsäureamid und die Linker. Sie besitzen in diesen Strukturfragmenten eine ähnliche Interaktionsfähigkeit mit der NTPDase1 wie die Uracilnucleotid-Mimetika mit Phosphonatpartialstruktur. Sie unterscheiden sich aber in der polaren Kopfgruppe und in der Nucleobase sehr stark von jenen.

Offenbar toleriert die Bindungsstelle für Nucleoside nicht nur das coplanare Uracil, sondern auch das 5,6-Dihydrouracil, das längere C5-C6-Bindungslängen aufweist und dessen C5- und C6-Atome Torsionswinkel von 45° bzw. 41° zur Ringebene bilden.²⁹⁴ Rohrer und Sundaralingam untersuchten die Röntgenstruktur des 5,6-

Dihydrouracils und fanden, daß es eine von ihnen so genannte „half-chair conformation“ bildet (Abbildung 4.3).

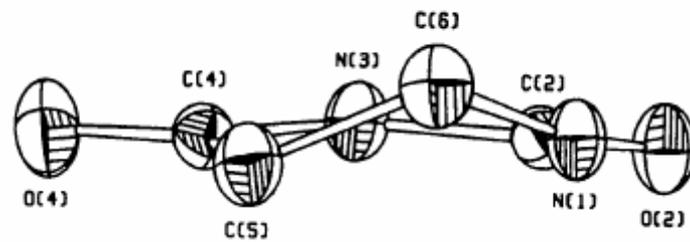


Abbildung 4.3: Modell des 5,6-Dihydrouracils nach Röntgenstrukturanalyse (Rohrer, Sundaralingam, 1969)

Die native Nucleobase kann an der 5,6-Doppelbindung π -Interaktionen eingehen. Das hydrierte aliphatische 5,6-Dihydrouracil dagegen interagiert an gleicher Stelle potentiell über hydrophobe Wechselwirkungen (Abbildung 4.4).

Die Aminosäuren Glutamat und Aspartat können ionische Wechselwirkungen ausüben. Sie sind vielleicht auch in der Lage, die für die hydrolytische Aktivität der E-NTPDasen wichtigen Ionen Ca^{2+} und Mg^{2+} komplex zu binden.

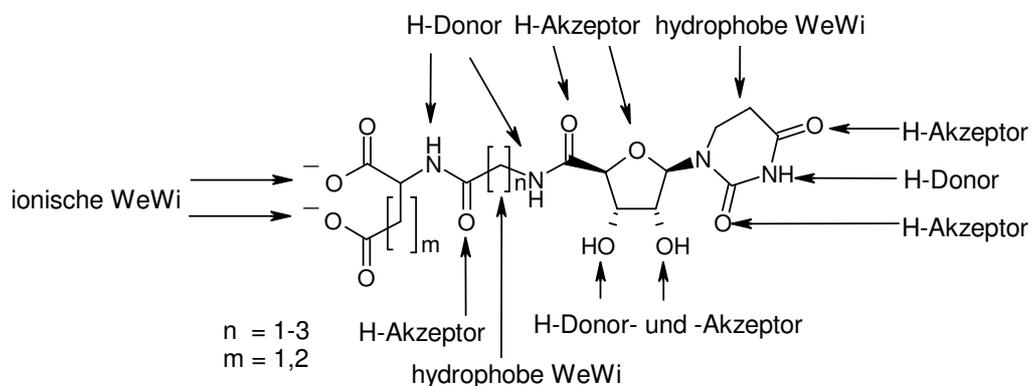


Abbildung 4.4: Interaktionsfähigkeiten der 5,6-Dihydrouracilderivate (WeWi: Wechselwirkungen)

Unter den bislang in die Testung eingegangenen Nucleosid-Carboxamiden fanden sich viele, die die E-NTPDasen hemmten. Aus den Testergebnissen lassen sich die in Abbildung 4.5 dargestellten Struktur-Wirkungsbeziehungen zusammenfassen.

Kopfgruppe K bestimmt Affinität zu E-NTPDase-Isoenzym: toleriert werden Phosphonsäureester und Carbonsäuren nicht oder schlechter toleriert werden Carbonsäureester

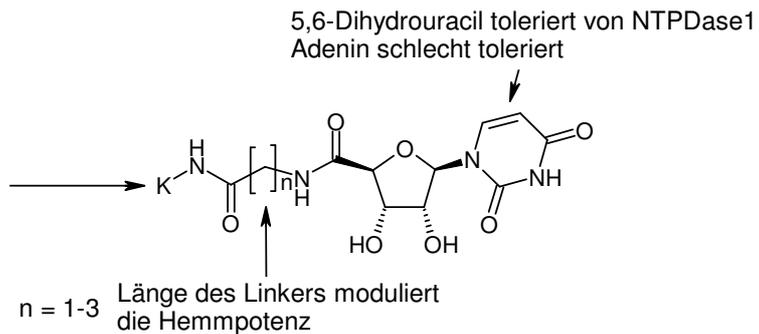


Abbildung 4.5: Struktur-Wirkungsbeziehungen von Nucleosid-4'-Carboxamiden als E-NTPDase-Inhibitoren

4.2 Testung an der Ecto-5'-Nucleotidase

Eine Auswahl von Verbindungen wurde an der Ecto-5'-Nucleotidase der Ratte getestet. Der Arbeitskreis Zimmermann (Institut für Zellbiologie und Neurowissenschaft, Biozentrum der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt a. M.) stellte das rekombinant gewonnene Enzym zur Verfügung.

Tabelle 4.9: Hemmung der Ecto-5'-Nucleotidase durch 5,6-Dihydrouracilderivate mit 5'-terminaler Dicarbonsäurestruktur

Strukturformel	n	m	Verbindung	Ratten-Ecto-5'-NT K_i [μ M] \pm SEM
	1	1	179	1.61 \pm 0.62
	2	1	181	0.60 \pm 0.01
	3	1	183	0.180 \pm 0.014
	1	2	180	34.3 \pm 0.2
	2	2	182	0.78 \pm 0.18
	3	2	184	>> 50 (11.1 \pm 8.5) ^b

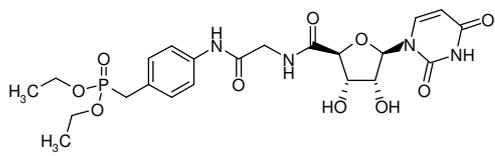
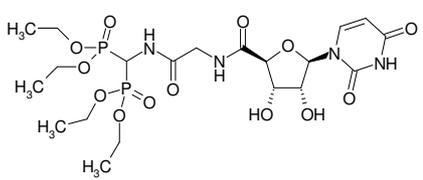
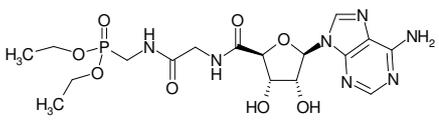
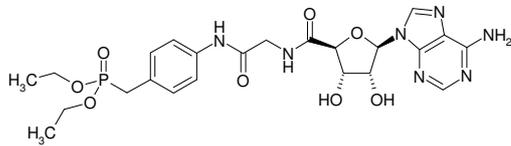
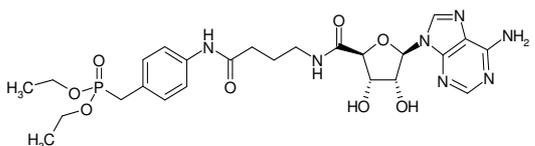
^a Alle Werte wurden in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt; K_m (Ecto-5'-NT): 20 μ M; AMP-Konzentration: 400 μ M.

^b % Inhibition \pm SEM bei 1 mM

Die Testungen führte Sang-Yong Lee im Rahmen seiner Diplomarbeit mit einem von Dr. Jamshed Iqbal neu entwickelten Kapillarelektrophorese-gestützten Enzymassay durch. Eingang fanden hier verschiedene Adenin- und Uracilnucleotidmimetika, die terminal an der 5'-Position Phosphonsäureester, Phosphonsäuren und

Dicarbonsäuren tragen. Unter den verschiedenen Substanzklassen konnten die in Tabelle 4.9 dargestellten 5,6-Dihydrouridinderivate die Ecto-5'-Nucleotidase am stärksten hemmen. Die Interaktionsmöglichkeiten dieser Moleküle mit einer Targetstruktur sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Die Hydrierung der Uracil-5,6-Vinylgruppe scheint der Hemmwirkung zumindest nicht abträglich zu sein. Auch die Oxidation der Nucleosid-5'-Position wird vom Enzym toleriert, ebenso die H-Donor- bzw. Akzeptorfunktion der Carboxamide. Mit steigender Anzahl an Methylengruppen im Linker nimmt die Enzymhemmung zu. L-Aspartat eignete sich besser als L-Glutamat als Kopfgruppe. Das Optimum wurde mit Verbindung **183** (Linker: γ -Aminobuttersäure, Kopfgruppe: L-Aspartat) erreicht. Dessen Analogon **184** mit L-Glutamat als Kopfgruppe hemmt die Ecto-5'-NT praktisch nicht.

Tabelle 4.10: Hemmung der Ecto-5'-NT durch Adenosin- und Uridinderivate mit 5'-terminaler Phosphonsäureesterpartialstruktur^a

Strukturformel	Verbindung	rat Ecto-5'-NT K_i [μ M] \pm SEM
	144	$>> 50$ (3.0 ± 4.1) ^b
	150	$>> 50$ (0) ^b
	174	$>> 50$ (32.8 ± 5.2) ^b
	169	$>> 50$ (0) ^b
	171	$>> 50$ (18.5 ± 7.7) ^b

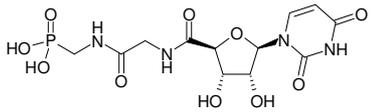
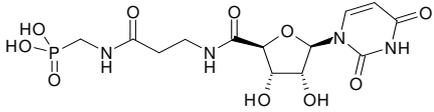
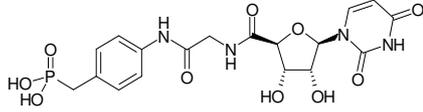
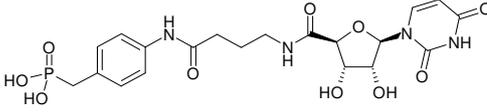
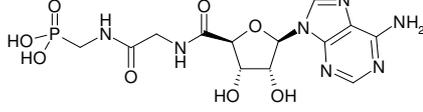
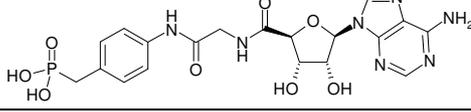
^a Alle Werte wurden in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt; K_m (Ecto-5'-NT): 20 μ M; AMP-Konzentration: 400 μ M.

^b % Inhibition bei 1 mM

Dies war ein zunächst unerwarteter Befund, da die Bindungstasche des Enzyms die relativ kleinen Nucleosid-5'-Monophosphate als Substrate aufnimmt. Allerdings ist bekannt, daß die größeren Nucleotide ADP und ATP die Ecto-5'-Nucleotidase zu hemmen vermögen, was im Einklang mit unseren Ergebnissen steht.

Einige Nucleotidmimetika mit 5'-terminaler Phosphonsäurediethylester- (Tabelle 4.10) bzw. Phosphonsäure-Struktur (Tabelle 4.11) wurden an der Ecto-5'-Nucleotidase getestet. Anhand der Testergebnisse kann man bestimmte Tendenzen erkennen. Die Ester erwiesen sich an diesem Enzym als inaktiv oder höchstens schwach aktiv im getesteten Konzentrationsbereich.

Tabelle 4.11: Hemmung der Ecto-5'-NT durch Adenosin- und Uridinderivate mit 5'-terminaler Phosphonsäurepartialstruktur^a

Strukturformel	Verbindung	rat Ecto-5'-NT K _i [µM] ± SEM
	194	>> 50 (39.1 ± 5.5) ^b
	195	>> 50 (61.1 ± 4.4) ^b
	196	6.47 ± 1.31
	198	>> 50 (46.2 ± 4.2) ^b
	199	>> 50 (42.5 ± 0.7) ^b
	201	>> 50 (55.5 ± 2.1) ^b

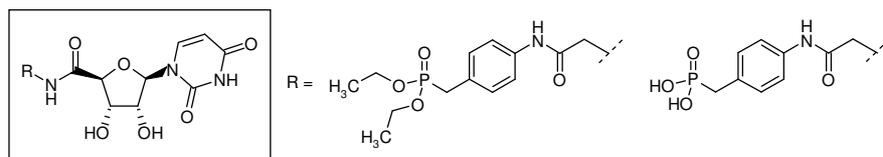
^a Alle Werte wurden in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt;

K_m (Ecto-5'-NT): 20 µM; AMP-Konzentration: 400 µM.

^b % Inhibition bei 1 mM

Durch die Spaltung der Ester hingegen konnte eine Wirkungssteigerung erzielt werden, die sich besonders ausgeprägt im Fall der Verbindungen **144** und **196** zeigte (Tabelle 4.12).

Tabelle 4.12: Vergleich der Ecto-5'-NT-Hemmung durch Uracilnucleotid-Mimetika mit Phosphonsäureester- und Phosphonsäurestruktur^a



Verbindung	144	196
	K_i [μM] \pm SEM	K_i [μM] \pm SEM
Ecto-5'-NT	$\gg 50$ (3.0 ± 4.1) ^b	6.47 ± 1.31

^a Alle Werte wurden in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt.

^b Inhibition bei 1 mM

Verbindungen mit der Nucleobase Uracil scheinen den Adeninnucleotid-Mimetika in der Hemmwirkung überlegen. Dieses Phänomen ist allerdings nicht so ausgeprägt wie im Fall der E-NTPDasen (vgl. Verbindungen **169** und **201** sowie **194** und **199**, Tabelle 4.11). Als polare Kopfgruppe eignet sich die *p*-Benzyl- besser als die Methylphosphonsäurestruktur.

In der Abbildung 4.6 sind die Struktur-Wirkungsbeziehungen an der Ecto-5'-Nucleotidase zusammengefasst.

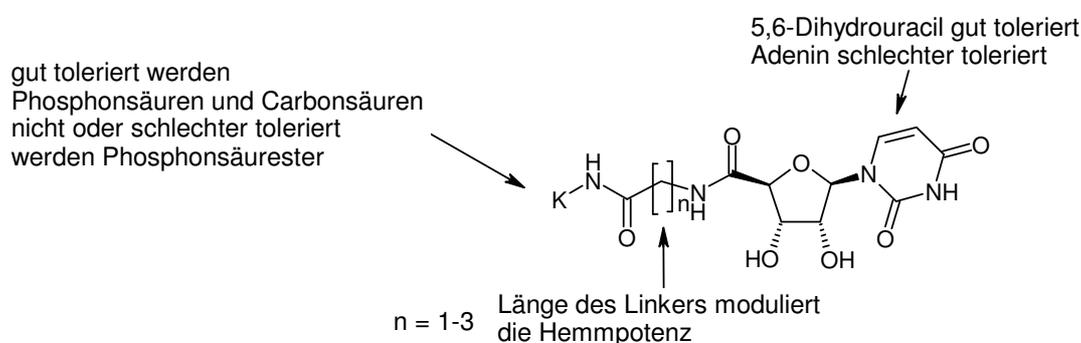


Abbildung 4.6: Struktur-Wirkungsbeziehungen von Nucleosid-4'-Carboxamiden als Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitoren

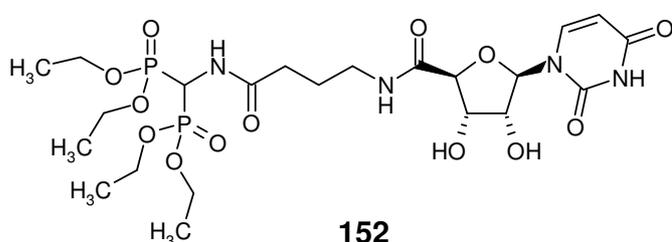
4.3 Testung an P2Y-Rezeptoren

Eine Auswahl an Verbindungen wurde an den P2Y-Rezeptorsubtypen P2Y_{2,4,6,12} getestet. Die Testergebnisse sind im Experimentellen Teil tabellarisch dargestellt. Keine der die Ectonucleotidasen hemmenden Verbindungen besitzt im getesteten Konzentrationsbereich (10 μM bzw. 100 μM) Affinität zu den Rezeptoren.

4.4 Zusammenfassung und Vergleich mit Standardverbindungen

Die Oxidation der Nucleosid-5'-Position zur entsprechenden Carbonsäure und deren Umsetzung mit verschiedenen Phosphatmimetika über eine Amidverknüpfung führte zu mehreren Verbindungsklassen, die neue Ectonucleotidase-Inhibitoren darstellen. Diese Substanzklassen zeigten Selektivität gegenüber P2Y_{2,4,6,12}-Rezeptoren. Das Nucleosid-4'-Carboxamid stellt sich also nach den bisher gewonnenen Erkenntnissen als ein Strukturelement dar, mit dem man eine gewisse Selektivität in der Ectonucleotidasehemmung versus Affinität zu P2-Rezeptoren erreichen kann.

Tabelle 4.13: Selektiver NTPDase1-Inhibitor



	K _i [μM] ± SEM
NTPDase1	32.4 ± 1.1^a
NTPDase2	242 ± 22.3 ^a
hP2Y ₂	(- 44 ± 20) ^b
hP2Y ₄	(27 ± 7) ^c
rP2Y ₆	(18 ± 4) ^d
hP2Y ₁₂	(1 ± 5) ^e

^a Der Wert wurde in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt.

^b Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UTP [3 μM] in hP2Y₂-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM (n = 3)

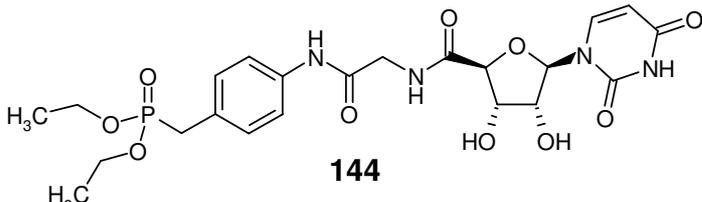
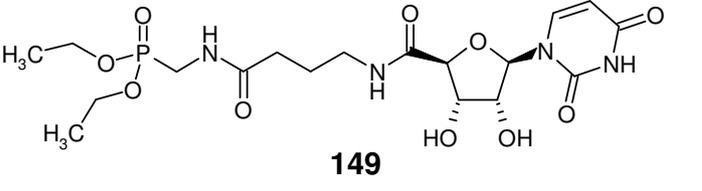
^c Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UTP [3 μM] in hP2Y₄-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM (n = 3)

^d Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UDP [3 μM] in hP2Y₆-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM (n = 3)

^e Prozent Inhibition der Bindung von [³H]PSB-0413 an humane Thrombocyten-Membranen bei 10 μM ± SEM (n = 3)

Durch Einführung des Bisphosphonsäuretetraethylesters, der mit γ-Aminobuttersäure als Linker über ein Amid an die Uridin-5'-Position gebunden wird, gelang die Darstellung des NTPDase1-Inhibitors **152**. Er hemmt dieses Enzym mit einem K_i-Wert von 32,4 μM, die NTPDase2 (K_i-Wert = 242 μM) dagegen deutlich schwächer (Tabelle 4.13). Aussagen über die Selektivität können noch nicht getroffen werden, da diese Verbindung noch nicht an allen E-NTPDasen untersucht worden ist. Erwähnenswert ist das Ergebnis der Testung am P2Y₂-Rezeptor. Hier konnte eine Inhibition des UTP-Effekts durch **152** beobachtet werden, die sogar unter der Kontrolle lag. Möglicherweise läßt sich dieser Effekt auf eine Hemmung von Ectonucleotidasen der Astrocytomzellen zurückführen, die durch endogen vorhandenes ATP eine Stimulation zeigen, wenn dieses akkumuliert.

Tabelle 4.14: Selektive NTPDase2-Inhibitoren

	144	149
	K _i [μM] ± SEM	
	>> 50 ^a (50) ^b	>> 50 ^a (45) ^b
144	8.2 ± 2.1^a	29.2 ± 2.7^a
	>> 200 ^a	>> 200 ^a
149	>> 100 ^a	>> 100 ^a
rP2Y ₆	(- 10 ± 10) ^c	(- 3 ± 11) ^c
hP2Y ₁₂	(2 ± 6) ^d	(2 ± 8) ^e

^a Der Wert wurde in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt.

^b % Inhibition bei 1 mM

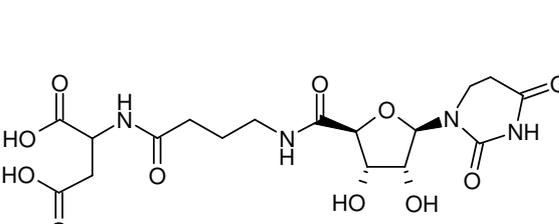
^c % Inhibition ± SEM des Effekts von UDP [3 μM] in hP2Y₆-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM (n = 3)

^d Prozent Inhibition der Bindung von [³H]PSB-0413 an humane Thrombocyten-Membranen bei 100 μM ± SEM (n = 3)

^e % Inhibition der Bindung von [³H]PSB-0413 an humane Thrombocyten-Membranen bei 10 μM ± SEM (n = 3)

Eine selektive Hemmung der NTPDase2 konnte mit den Verbindungen **144** (K_i = 8.2 μM), die einen *p*-Benzylphosphonsäureester aufweist und **149** (K_i = 29.2 μM), die einen Methylphosphonsäureester enthält, erreicht werden (Tabelle 4.14).

Tabelle 4.15: Der submikromolare Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitor **183**

	K _i [μM] ± SEM
	Ratten-Ecto-5'-NT 0.180 ± 0.014^a
183	NTPDase1 >> 50 (36 ± 1) ^b
	hP2Y ₄ (10 ± 5) ^c
	rP2Y ₆ (15 ± 8) ^d
	hP2Y ₁₂ (4 ± 6) ^e

^a Der Wert wurde in zwei unabhängigen Versuchen als Dreifachbestimmungen ermittelt.

^b % Inhibition bei 1 mM

^c % Inhibition ± SEM des Effekts von UTP [3 μM] in hP2Y₄-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM (n = 3)

^d % Inhibition ± SEM des Effekts von UDP [3 μM] in hP2Y₆-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM (n = 3)

^e % Inhibition der Bindung von [³H]PSB-0413 an humane Thrombocyten-Membranen bei 100 μM ± SEM (n = 3)

Das 5,6-Dihydrouracilderivat mit L-Aspartat als Phosphatmimetikum, Verbindung **183**, schließlich wurde als selektiver Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitor charakterisiert, der diese Ectonucleotidase mit einem K_i -Wert von 180 nM, also im submikromolaren Bereich hemmt (Tabelle 4.15).

Die Verbindungen **144**, **149** und **152** weisen unter allen neu dargestellten Substanzen die potenteste Hemmung verschiedener E-NTPDasen auf. Es stellt sich die Frage, ob sie im Vergleich mit den Standardinhibitoren *ARL67156*, *PPADS*, *Suramin* und *Reactive Blue 2* (Tabelle 2.9) einen echten Fortschritt darstellen. Die neuen Verbindungen **144**, **149** und **152** hemmen E-NTPDasen ähnlich potent wie die Standardinhibitoren im unteren mikromolaren Konzentrationsbereich. In Bezug auf die Selektivität in der Hemmung einzelner Isoenzyme weisen sie aber teilweise deutliche Vorteile auf. Mit den Uracilnucleotid-Mimetika **144** und **149** konnte eine selektive Hemmung der NTPDase2 erreicht werden. *PPADS*, *Suramin* und *Reactive Blue 2* sind dagegen unselektive Inhibitoren, die die NTPDase3 leicht präferieren. Verbindung **152** und *ARL67156* inhibieren die NTPDase1 vergleichbar potent. *ARL67156* hemmt zusätzlich die NTPDase3 (Verhältnis NTPDase1/NTPDase3: 4.2), während Verbindung **152** zusätzlich die NTPDase2 hemmt (Verhältnis NTPDase1/NTPDase2: 7.6).

Tabelle 4.16: Affinität der Standardinhibitoren zu ausgewählten P2Y- und P2X-Rezeptoren^{47,295}

Verbindung	P2Y ₂ ⁴⁷	P2Y ₄ ⁴⁷	P2Y ₆ ⁴⁷	P2Y ₁₂ ²⁹⁵	P2X ₁ ²⁹⁵	P2X ₂ ²⁹⁵	P2X ₃ ²⁹⁵	P2X ₅ ²⁹⁵
K_i [μ M] \pm SEM								
PPADS	> 100	(73) ^a	(69) ^b	n.d. ^c	0.13	1.6	0.2	0.2
Suramin	50	> 100	> 100	4	2	10	4	1.6
Reactive Blue 2	1	> 100	31	1.3	2	0.4	50	20

^a % Inhibition der Ca²⁺-Freisetzung durch UTP bei 100 μ M

^b % Inhibition der Ca²⁺-Freisetzung durch UDP bei 100 μ M

^c nicht angegeben

Wie eingangs erwähnt, reicht die bloße Charakterisierung der Hemmung von Ectonucleotidasen nicht aus, um die Einsetzbarkeit einer Substanz als

pharmakologisches Werkzeug zu bestimmen. Man muß zusätzlich die Potenz der Ectonucleotidasehemmung mit der Affinität zu P2-Rezeptoren vergleichen.

Die neuen Verbindungen **144**, **149** und **152** scheinen E-NTPDasen selektiv zu hemmen. Sie zeigen keine Affinität zu den P2Y-Rezeptor-Subtypen, an denen sie bislang getestet worden sind. Sie sind allerdings noch nicht an P2X-Rezeptoren getestet. Affinität zu diesen Adeninnucleotid-Rezeptoren ist aber eher nicht zu erwarten, da die Ectonucleotidase-Inhibitoren Uracil als Nucleobase aufweisen. Demgegenüber stellen *PPADS*, *Suramin* und *Reactive Blue 2* unselektive P2-Rezeptor-Antagonisten dar (Tabelle 4.16). Sie binden an einige P2Y- und P2X-Rezeptor-Subtypen im mikromolaren bis submikromolaren Bereich. *ARL67156* wird als selektiver Ectonucleotidasehemmer in der Literatur beschrieben, ist aber noch nicht an allen P2-Rezeptor-Subtypen evaluiert.⁸

Verbindung **183** hemmt die Ecto-5'-NT mit einem K_i -Wert von 180 nM, der Standardinhibitor α,β -Methylen-ADP hingegen weist an diesem Enzym einen K_i -Wert von 850 nM auf (Tabelle 2.12). Das Hemmpotential des α,β -Methylen-ADPs an E-NTPDasen ist noch nicht bestimmt worden. Verbindung **183** besitzt keine Affinität zu P2Y_{4,6,12}-Rezeptoren bis zu einer Konzentration von 100 μ M, ihr K_i -Wert an der NTPDase1 liegt über 50 μ M. Zur Affinität von α,β -Methylen-ADP an P2-Rezeptoren gibt es keine Literaturangaben.

Soll eine Verbindung Eingang in die Entwicklung als Arzneistoff finden, ist zusätzlich zum pharmakodynamischen Verhalten noch die Charakterisierung der pharmakokinetischen Eigenschaften notwendig: orale Resorbierbarkeit, Verteilung, Metabolisierung und Exkretion (ADME).

Indikatoren für orale Bioverfügbarkeit sind die sog. Lipinsky's rule-of-five:

Wenn mindestens drei der folgenden vier Forderungen erfüllt sind,

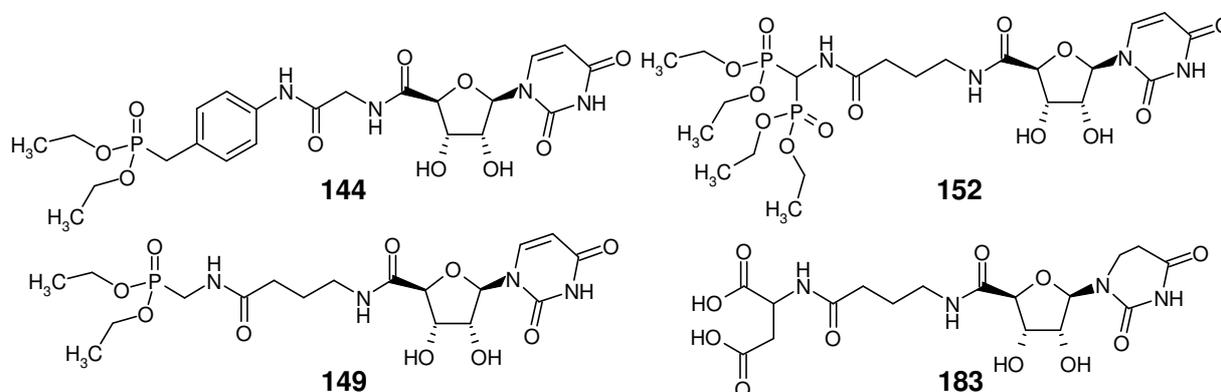
- § Molekulargewicht unter 500
- § Anzahl an Wasserstoffbrückendonatoren unter fünf
- § Anzahl der Wasserstoffbrückenakzeptoren unter zehn
- § $\log P$ (Wasser-Octanol-Verteilungskoeffizient) unter fünf

so ist die Verbindung wahrscheinlich gut oral bioverfügbar.

Ein zusätzlicher Parameter ist die PSA (Polar Surface Area).²⁹⁶ Sie sollte möglichst unter 140 \AA^2 liegen. Tabelle 4.17 listet die Werte dieser fünf Parameter für Verbindungen **144**, **149**, **152** und **183** auf. Die PSA aller Verbindungen liegt über dem postulierten Wert. Verbindungen **144** und **149** kommen den geforderten maximal 140

A^2 noch am nächsten. Der clog P-Wert aller vier Verbindungen liegt im gewünschten Bereich von unter fünf, insbesondere die Verbindungen **144**, **149** und **152** weisen hier sehr gute Werte auf. Das Molekulargewicht aller Verbindungen mit Ausnahme von **152** liegt unter bzw. nahe bei 500 g/mol. Nur Verbindung **183** besitzt deutlich zu viele H-Donatoren und nur Verbindung **152** besitzt deutlich zu viele H-Akzeptoren. Die pharmakokinetischen Werte der Verbindungen **144** und **149** befinden sich damit im Bereich der oben aufgezählten Grenzwerte bzw. nur leicht darüber, so daß man orale Bioverfügbarkeit vermuten kann. Verbindungen **152** und insbesondere **183** scheinen demgegenüber für eine enterale Absorption weniger geeignet zu sein.

Tabelle 4.17: Pharmakokinetische Parameter der Ectonucleotidase-Inhibitoren



Verbindung	PSA	clog P	M (g/mol)	Anzahl H-Donatoren	Anzahl H-Akzeptoren
144	198.3	- 1.165	540	5	11
149	198.3	- 2.671	492	5	11
152	233.8	- 2.651	628	5	14
183	237.4	- 4.345	460	7	10

Die Beurteilung der Substanzen auf der Grundlage dieses Systems macht allerdings nur eine grobe Voraussage, ob sie die Darmbarriere per Diffusion überwinden können. Es ist aber bekannt, daß Substanzen, die bestimmte Strukturelemente wie Nucleoside, Zucker oder Aminosäuren enthalten, trotz großer Hydrophilie, hoher PSA etc. oral gut verfügbar sein können.²⁹⁶ Diese werden über Transportmechanismen wie z.B. Dipeptid-Carrier oder Nucleosid-Transporter aktiv aufgenommen. Beispiele für solche Arzneistoffe sind das Nucleosid-Analogon Zidovudin, das β -Lactam-Antibioticum Amocillin und der ACE-Hemmer Lisinopril. Alle

neuen Verbindungen enthalten eine oder mehrere solcher Teilstrukturen und könnten mithin möglicherweise durch Transporter aktiv aufgenommen werden.

ARL 67156, *PPADS*, *Suramin* und *Reactive Blue 2* entsprechen hingegen überhaupt nicht den fünf Forderungen, sie besitzen ein hohes Molekulargewicht, sie sind geladen und tragen viele Wasserstoffakzeptoren und -donatoren.

Die Metabolisierung der neu synthetisierten Verbindungen ist Gegenstand laufender Untersuchungen (Dissertation Frank Umbach). Vorläufigen Ergebnissen zufolge werden sie von Rattenleber-Mikrosomen glucuronidiert.

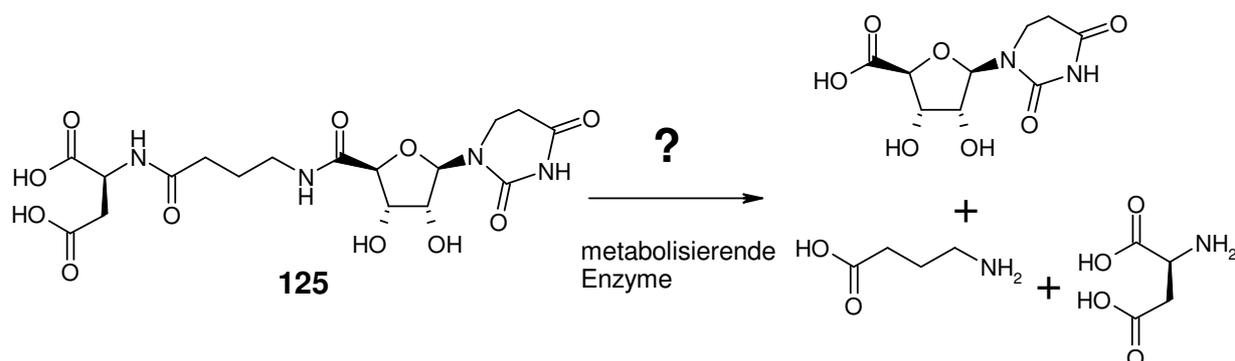


Abbildung 4.7: Mögliche Abbauprodukte von Verbindung **182** durch Einwirkung von Peptidasen

Sollten ihre Amidbindungen durch Peptidasen angegriffen werden, würden Produkte entstehen, die selbst wahrscheinlich keine Affinität zu purinergen Targets besitzen (Abbildung 4.7) und teilweise physiologisch sind. Die Hydrolyse der Phosphonsäureester in Verbindungen **144**, **149** und **152** kann nicht durch Esterasen bewerkstelligt werden. Lediglich Cytochrom P450-Monoxidasen könnten solche Bindungen unter Oxidation des Ethylalkohols zu Acetaldehyd spalten.²⁹⁷

ARL 67156 wird wahrscheinlich durch E-NPPs abgebaut.^{228,229} Diese kommerziell erhältliche Verbindung ist auch chemisch nicht sehr stabil, der Hersteller rät dazu, sie bei -20 °C in einem dicht verschlossenen Gefäß aufzubewahren (Produktinformation A.G. Scientific, Inc.). Der Phosphorsäureester des *PPADS* kann wahrscheinlich durch unspezifische Phosphatasen hydrolysiert werden. *Suramin* und *Reactive Blue 2* scheinen demgegenüber metabolisch stabil zu sein.

Die Vorteile der neuen Verbindungen **144**, **149** und **152** gegenüber dem E-NTPDase-Inhibitor *ARL 67156* sind unter anderem, daß sie:

- § chemisch stabil sind,
- § nicht die in der Nucleotid-Synthese notwendigen langwierigen Aufreinigungsschritte benötigen,
- § E-NTPDasen Isoenzym-selektiv (NTPDase1 oder 2) hemmen und
- § durch metabolischen oder chemischen Abbau keine P1-Rezeptorliganden freisetzen.

Die Vorteile der neuen Verbindungen **144**, **149** und **152** gegenüber den nicht-nucleosidischen E-NTPDase-Inhibitoren *Suramin*, *PPADS* und *Reactive Blue 2* bestehen darin, daß sie:

- § deutlich geringere Affinität zu P2-Rezeptoren aufweisen und
- § E-NTPDasen Isoenzym-selektiv (NTPDase1 und 2) hemmen.

Die Vorteile des neuen 5'-Nucleotidase-Inhibitors **183** gegenüber α,β -Methylen-ADP sind die, daß er:

- § chemisch stabil ist
- § nicht die in der Nucleotid-Synthese notwendigen langwierigen Aufreinigungsschritte benötigt
- § die Ecto-5'-NT potenter hemmt
- § durch metabolischen oder chemischen Abbau keine P1-Rezeptorliganden freisetzt.

Zusätzlich werden die neuen Verbindungen durch bekannte Synthesemethoden aus kommerziell vergleichsweise günstig verfügbaren Ausgangsprodukten dargestellt. Sie bieten viele Ansatzpunkte für Optimierungen der Struktur.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Uracil- und Adeninnucleotid-Mimetika der in Abbildung 5.1 dargestellten Struktur synthetisiert. Nucleotid-Mimetika sind Nucleosid-derivate, die in der Nucleosid-5'-Position statt eines Mono-, Di-, oder Triphosphats ein sogenanntes Phosphatmimetikum tragen. Die neuen Verbindungen wurden an P2Y-Rezeptoren und an Ectonucleotidasen getestet.

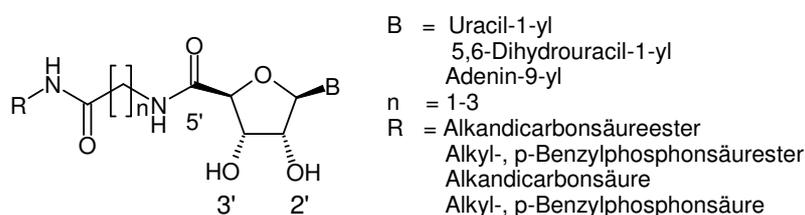


Abbildung 5.1: Dargestellte Nucleotidmimetika

Der Synthesepfad zu den Zielmolekülen beinhaltet zwei Schritte, die für die erfolgreiche Umsetzung der Synthesestrategie von entscheidender Bedeutung sind. Zur selektiven Derivatisierung der 5'-Position muß das 2',3'-Diol des Nucleosids mit einer Schutzgruppe versehen werden. Diese Schutzgruppe soll mit hoher Ausbeute einführbar sein, sie muß die nachfolgenden Reaktionsbedingungen tolerieren und chemoselektiv abspaltbar sein. Eine solche Schutzgruppe wurde im Anisaldehyd gefunden (Abbildung 5.2).

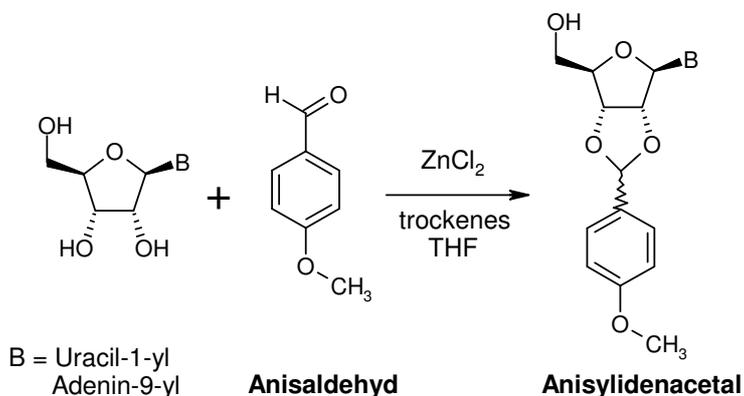


Abbildung 5.2: Einführung der Anisylidenschutzgruppe

Daraufhin gelang die Oxidation der Nucleosid-5'-Position zur Carbonsäure nach einer Literaturvorschrift.²⁷⁰

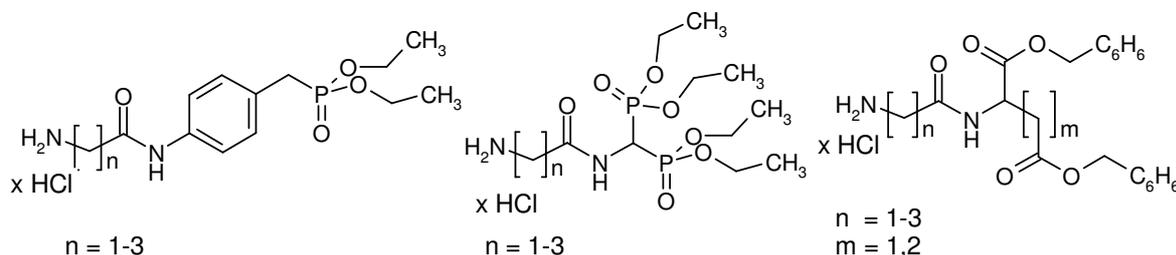


Abbildung 5.3: Beispiele für Triphosphatmimetika

Im entscheidenden Syntheseschritt, der Amidkopplung, wurden die Nucleosid-Carbonsäuren mit verschiedenen Reihen von Phosphatmimetika zu Nucleosid-Carboxamiden umgesetzt. In Abbildung 5.3 sind einige Beispiele für Phosphatmimetika aufgeführt. Die Synthese der Nucleosid-4'-Carboxamide (Abbildung 5.4) konnte effizient mit verschiedenen Kopplungsreagenzien auf Basis des Hydroxybenzotriazols durchgeführt werden.

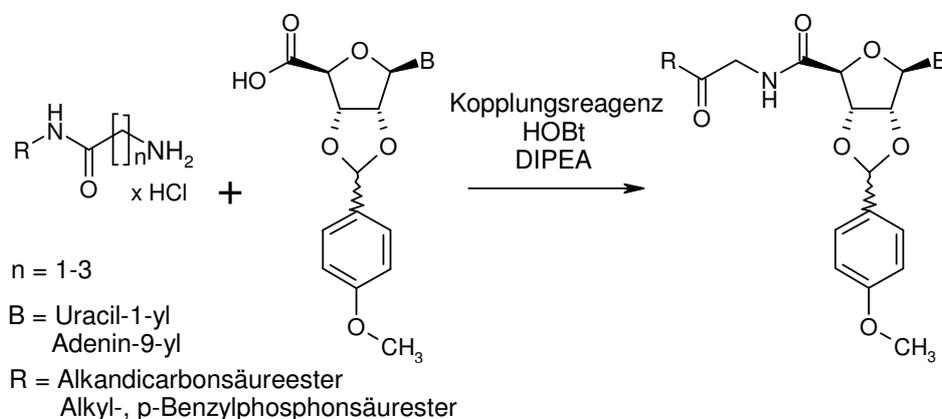


Abbildung 5.4: Amidkopplung

Verwendet wurden in dieser Reaktion die Phosphonium- bzw. Uroniumsalze

- § 1-Benzotriazolyl-oxypyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP)
- § 2-(6-Chlor-1*H*-benzotriazolyl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HCTU)
- § 2-(1*H*-Benzotriazolyl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU).

Sie wurden zusammen mit dem Acylierungskatalysator Hydroxybenzotriazol (HOBT) eingesetzt (Abbildung 5.4). Die Wahl des Kopplungsreagenzes richtete sich grundsätzlich nach der Aminokomponente, nicht nach der Carbonsäure, wie experimentell gezeigt werden konnte.

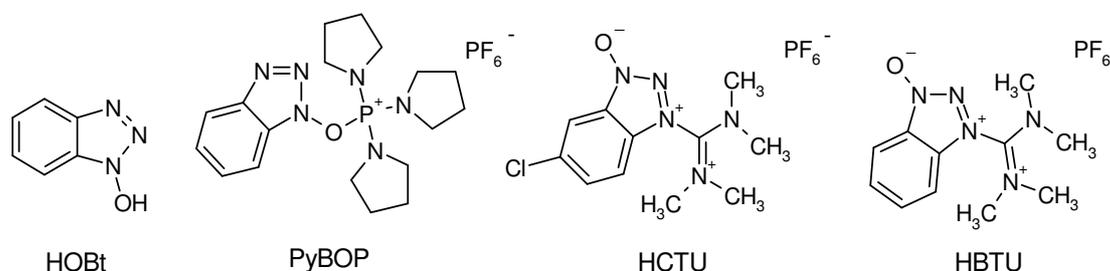


Abbildung 5.5: Kopplungsreagentien und Acylierungskatalysator HOBT

Abschließend wurde die Anisaldehydschutzgruppe unter milden hydrolytischen Bedingungen abgespalten. Es erfolgte zur Erhöhung der Substanzdiversität zusätzlich die Spaltung der terminalen Phosphonsäurediethylester- und Carbonsäurebenzylester-Strukturen.

Aus den so dargestellten Produkten sollen drei Verbindungen herausgestellt werden. Mit Verbindung **183** (Abbildung 5.6) gelang es, die Ecto-5'-Nucleotidase im submikromolaren Bereich zu hemmen. Die Verbindung besitzt im getesteten Konzentrationsbereich keine Affinität zur NTPDase1 und auch nicht zu P2Y₄⁻, P2Y₆⁻ und P2Y₁₂-Rezeptoren.

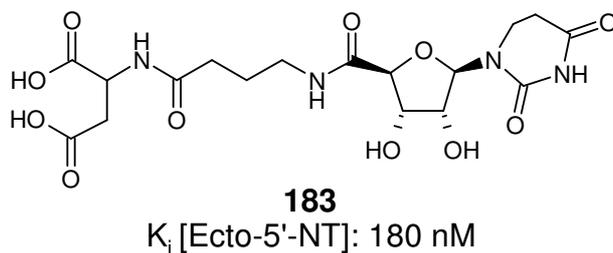
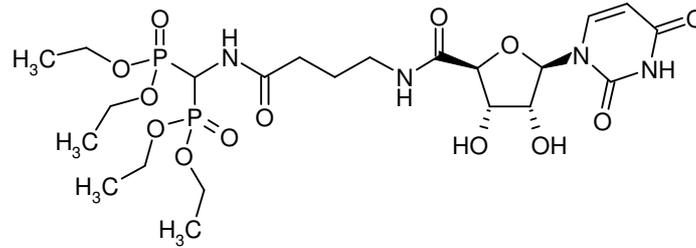


Abbildung 5.6: Selektiver Ecto-5'-Nucleotidaseinhibitor

Mit der in Abbildung 5.7 dargestellten Verbindung **152** gelang es, die NTPDase1 Isoenzym-selektiv zu hemmen. Auch diese Verbindung weist keine Affinität zu den getesteten P2Y-Rezeptorsubtypen P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ und P2Y₁₂ auf.

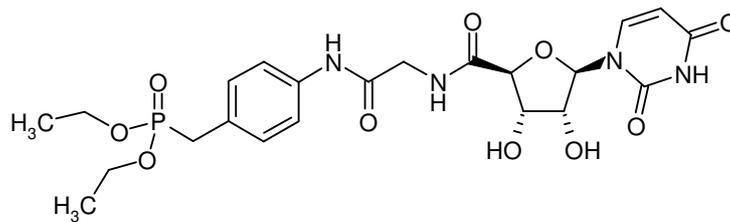


152

K_i [NTPDase1]: 32 μ M

Abbildung 5.7: Selektiver NTPDase1-Inhibitor

Schließlich konnte durch die gewählte Synthesestrategie ein NTPDase2-Inhibitor dargestellt werden, der diese Ectonucleotidase ebenfalls Isoenzym-selektiv und auch gegenüber P2Y₆- und P2Y₁₂-Rezeptoren selektiv hemmt: Verbindung **144** (Abbildung 5.8).



144

K_i [NTPDase2]: 8 μ M

Abbildung 5.8: Selektiver NTPDase2-Inhibitor

Im Rahmen dieser Arbeit konnten somit Hemmstoffe für E-NTPDase-Isoenzyme und für die Ecto-5'-Nucleotidase dargestellt werden. Sie zeichnen sich durch Isoenzym-Selektivität und Selektivität gegenüber P2Y-Rezeptoren aus. Weiterhin sind sie nicht (**144**, **152**) oder nur schwach azide (**183**) und somit im Gegensatz zu allen bisher bekannten Standard-Inhibitoren an diesen Enzymen möglicherweise peroral applizierbar. Die neuen Verbindungen sollten als pharmakologische Werkzeuge die Erforschung des Potentials der Ectonucleotidasen als Arzneistofftargets, z.B. für die Krebs- und Immuntherapie, erlauben. Sie sollten sich darüber hinaus als Leitstrukturen für die weitere Optimierung dieser Wirkstoffklasse eignen. Die gewählte Synthesestrategie läßt Raum für eine solche Optimierung.

6. Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Angaben

Für die Darstellung und Charakterisierung der Verbindungen wurden die folgend aufgeführten Materialien und Geräte verwendet.

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros Organics (über VWR, Siegburg), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Asparaginsäuredibenzylester-Tosylat und Glutaminsäurediethylester-Hydrochlorid wurden von der Firma Senn Chemicals (Dielsdorf, Schweiz) bezogen.

Lösungsmittel

Dichlormethan zur Säulenchromatographie und zur Synthese wurde über Calciumhydrid destilliert. Alle anderen Lösungsmittel wurden in der vom Hersteller gelieferten Qualität verwendet. Trockene Lösungsmittel, z.B. DMF, Pyridin, THF und Acetonitril von der Firma Fluka (Buchs, Schweiz), wurden in Gebinden mit Septum wie bezogen eingesetzt.

Dünnschichtchromatographie

Zur Reaktionskontrolle wurden Kieselgel-beschichtete Aluminiumplatten 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) verwendet.

Säulenchromatographie

Säulenchromatographie wurde als Flash-Chromatographie mit einem System der Firma Büchi (Essen), bestehend aus Pumpe C-601, Pumpensteuergerät C-610 und Fraktionssammelgerät C-660 auf Kieselgel 60, Korngröße 0,040 – 0,063 mm (Merck, Darmstadt), durchgeführt.

Präparative Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Aufreinigung der Endprodukte wurde mit einer HPLC, die folgende Systemkomponenten enthielt, durchgeführt: Pumpe Wellchrome K-1800 (Knauer GmbH, Berlin), Probenauftragsschleife mit 7 Milliliter Fassungsvermögen (Knauer GmbH, Berlin), Spectrophotometer WellChrome K-2600 (Knauer GmbH, Berlin), Fraktionssammelventil (Knauer GmbH, Berlin) und Eurospher 100-Säule, Abmessungen 250 x 20 mm (innerer Durchmesser), gefüllt mit RP-Kieselgel C-18, Korngröße 10 µm (Knauer GmbH, Berlin). Als mobile Phase wurde ein Gradient aus Methanol (HPLC-Grade, Merck, Darmstadt) und deionisiertem Wasser, in einigen Fällen unter Zusatz von je 0,1 % Trifluoressigsäure (> 99 % pur., Merck, Darmstadt) verwendet, die Flußrate betrug 20 ml/min.

Abweichend davon wurden AMP- und UMP-Phosphoramidate mit einem Gradienten aus 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer und Acetonitril gereinigt, die Flußrate betrug 10 ml/min.

Ionenaustauschchromatographie (FPLC)

Zur Ionenaustauschchromatographie kam das Gerät ÄKTA FPLC (Amersham Biosciences) mit einer XK-Säule der Abmessungen 200 x 26 mm (Pharmacia), befüllt mit Sephadex DEAE A-25-Gel, zum Einsatz. Die Flußrate betrug 1,8 – 2,0 ml/min. Als mobile Phase wurde ein Gradient aus deionisiertem Wasser und 1M-Triethylammoniumcarbonat-Puffer verwendet (pH 7,4). Herstellung des Puffers: 80 ml Triethylamin wurden in 1 l deionisiertem Wasser gelöst. Dazu wurde unter ständigem Rühren Trockeneis gegeben, bis der pH-Wert 7,4 betrug.

Gefriertrocknung

Die schonende Isolierung von Produkten aus wäßrigen Lösungsmitteln wurde mit der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, GmbH, Osterode) vorgenommen.

Hydrierapparat

Katalytische Hydrierungen wurden mit dem Wasserstoffgenerator Hogen[®] GC Hydrogen Generator der Firma Proton Energy Systems (Wallingford, CT, USA) durchgeführt. Dieser war über ein Reduzierventil mit einem Reaktionsgefäß, dem „Micro Vial, 5 ml“ der Firma Kimble & Kontes (Owens, IL, USA) verbunden.

NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden mit einem Bruker 500 Spektrometer (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz, ^{31}P : 202 MHz) aufgenommen. Die Kopplungskonstanten werden in Hertz [Hz] und die chemischen Verschiebungen in parts per million [ppm] angegeben. Die verwendeten Lösungsmittel DMSO- d_6 , MeOD, D_2O und CDCl_3 dienten jeweils als interner Standard: ^1H : δ [ppm] DMSO- d_6 : 2,49; MeOD: 3,35; D_2O : 4,65; CDCl_3 : 7,24. ^{13}C : δ [ppm] DMSO- d_6 : 37,7; MeOD: 49,3; D_2O : TMS wurde als interner Standard verwendet; CDCl_3 : 77,0. Bei der Aufnahme der ^{31}P -Spektren diente 85 %ige Phosphorsäure als externer Standard. Signalaufspaltungen werden mit folgenden Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett, br = breit, p = pseudo.

HPLC-MS

Reinheit und Identität der Endprodukte wurden mit einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einer Massenspektrometrie bestimmt. Ein Milligramm der zu prüfenden Substanz wurde in einem Milliliter eines Gemischs aus 75 % 2 mM-Natriumacetat-Puffer und 25 % Acetonitril gelöst. Davon wurden 10 μl in eine HPLC-Anlage (Agilent 1100) mit Phenomenex Luna C-18-Säule, Korngröße 3 μm injiziert und nach Gradientenelution (kontinuierlicher Gradient von Acetonitril 25 % nach 100 % über 15 min) mit einem API 2000 Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt) gemessen. Der Analyt wurde per ESI (Electron Spray Ionisation) ionisiert.

Reinheitsbestimmung per HPLC

In Fällen, in denen eine Elementaranalyse nicht möglich war (zu große Hygroskopizität der betreffenden Substanz), wurde eine Reinheitsbestimmung per HPLC mit folgendem System vorgenommen: 1 mg Substanz wurde in einer Mischung aus 1 ml wässriger 2 mM Ammoniumacetat-Lösung und MeOH (9:1) gelöst. Von dieser Lösung wurden 10 μl in ein HPLC-System (Agilent 1100) mit Phenomenex Luna 3 μ C18 Säule injiziert. Der Analyt wurde mit einem Gradienten aus wässriger 2 mM Ammoniumacetat-Lösung und Methanol von 9:1 nach 0:10 über 15 min bei einer Flußrate von 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ eluiert. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption, wenn nicht anders angegeben ist, bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Elementaranalyse

Elementaranalysen wurden mit einem VarioEL Gerät (ElementarAnalysensysteme GmbH, Hanau) durchgeführt.

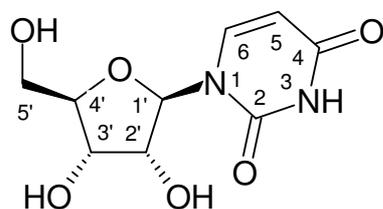
Schmelzpunktsbestimmung

Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi B 545 Schmelzpunktmeßgerät bestimmt und sind unkorrigiert wiedergegeben.

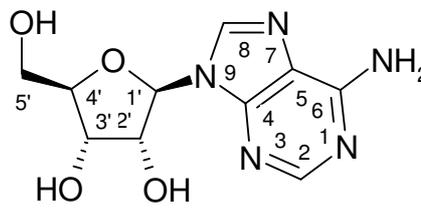
Optische Drehung

Die optische Drehung der Glutaminsäure- und Asparaginsäurederivate wurde mit dem PerkinElmer 241 Polarimeter der Firma PerkinElmer (Waltham, MA, USA) bestimmt. Die Substanzen wurden als 1 %ige Lösungen (Wasser oder Methanol, s. u.) in einer Mikroküvette mit 1 ml Fassungsvermögen und 1 dm Länge gemessen.

IUPAC-Zählweise der Nucleoside



Uridin



Adenosin

6.2 Einführung der Ribose-Schutzgruppen durch 2',3'-Acetalisierung und Oxidation der Nucleosid-5'-Position zur Carbonsäure

Vorschrift A: Einführung der 2',3'-*p*-Methoxybenzyliden- (Anisyliden-) Schutzgruppe²³³

Ein Nucleosid (Uridin, Adenosin) (5 g) und ZnCl₂ (10 g) wurden unter Argon in einer Mischung aus 10 ml trockenem THF und 20 ml *p*-Methoxybenzaldehyd (Anisaldehyd) suspendiert. Eine trübe Lösung entstand, die zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt

wurde. Das Produkt wurde durch Zugabe von 100 ml Diethylether gefällt, abfiltriert und je dreimal mit je 100 ml Wasser und 100 ml Diethylether gewaschen.

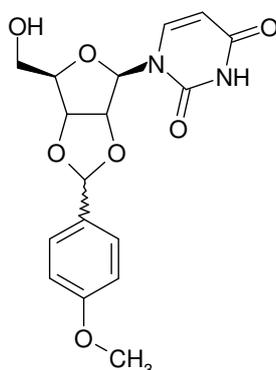
Vorschrift B: Einführung der 2',3'-(3-Phenylprop-2-enyliden)- (Cinnamyliden-) Schutzgruppe²⁵⁶

Uridin (5 g), p-Toluolsulfonsäure (1 g) und (trans)-3-Phenylpropenal (Zimtaldehyd, 20 ml) wurden in 20 ml trockenem THF unter Argon suspendiert und fünf Stunden bei 50 °C gerührt. Das Produkt fiel als Diastereomergemisch nach Zugabe von 100 ml Diethylether aus. Es wurde abfiltriert und je dreimal mit je 100 ml Wasser und Diethylether gewaschen.

Vorschrift C: Oxidation der Nucleosid-5'-Position

2',3'-geschützte Nucleoside wurden nach einer Literaturvorschrift in einer Ansatzgröße von 6 mmol an der 5'-Position zur entsprechenden Carbonsäure oxidiert.²⁷⁰

6.2.1 2',3'-*p*-Methoxybenzylidenuridin (**74**)²³³



Die Verbindung wurde nach Vorschrift A dargestellt.

Ausbeute: 6.9 g (93 %) eines 2:1-Gemischs aus *endo*- und *exo*-Diastereomeren.

Schmelzpunkt: 213 °C (Lit.: 213 °C)²³³

Aussehen: Farblose Kristalle

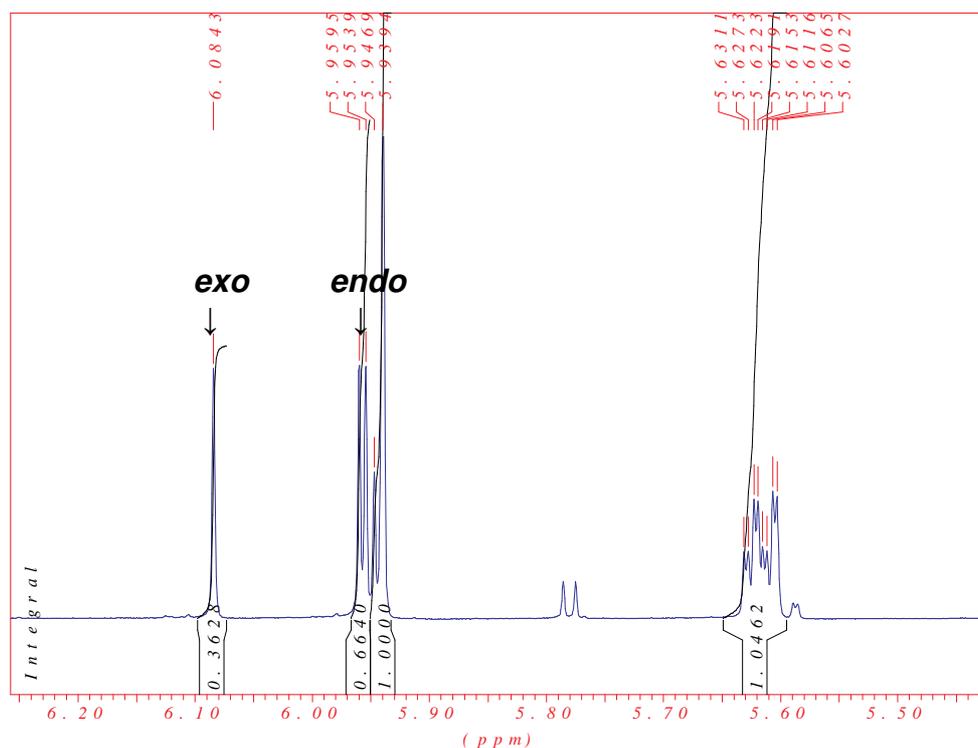
Leicht löslich in: Acetonitril, DMF, Methanol,

Schwer löslich in: Aceton, Diethylether, Dichlormethan, Wasser

UV-Maximum: 254 nm

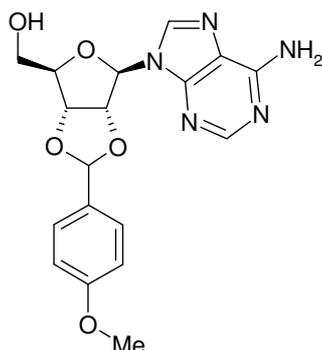
¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ 11.38 (1H, br, s, NH); 7.85 und 7.76 (1 H, 2 x d, ³J = 7.90 Hz, H-6); 7.44 und 7.39 (2H, 2 x dd, ³J = 6.95 Hz und ⁴J = 2.25 Hz, 2 x H_{meta}, Phenyl); 6.97 and 6.95 (2H, 2 x dd, ³J = 6.65 Hz und ⁴J = 2.20 Hz, 2 x H_{ortho}, Phenyl), 6.08 and 5.94 (1H, 2 x s, O-CH-O), 5.94 (1H, 2 x d, ³J = 2.90 Hz und 4.10 Hz, H-1'); 5.64 (1H, pseudo-t, ³J = 7.55 Hz, H-5); 5.09 und 5.05 (1H, 2 x t, ³J = 5.35 Hz, 5'-OH); 5.01 und 4.98 (1H, 2 x dd, ³J = 6.60 Hz und ³J = 2.85 Hz, H-2'); 4.86 und 4.82 (1H, 2 x dd, ³J = 6.60 Hz und ³J = 4.40 Hz, H-3'); 4.23 und 4.15 (1H, 2 x dt, ³J = 4.80 Hz und ³J = 3.15 Hz, H-4'); 3.67 und 3.77 (3H, 2 x s, O-CH₃); 3.67 – 3.61 (2H, m, ³J = 5.35 Hz und ³J = 3.20 Hz, 2 x H-5').

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz) δ 163.3 (C-4); 160.5 (C-O-CH₃, Phenyl); 150.5 (C-2); 142.2 (C-6); 128.5 (2 x C_{meta}, Phenyl); 128.4 (C_{para}, Phenyl); 113.9 und 113.8 (2 x C_{ortho}, Phenyl); 106.6 (Phenyl-CH); 103.6 (C-5); 91.4 and 90.5 (C-1'); 86.5 (C-4'); 84.3 und 84.1 (C-2'); 83.0 und 81.8 (C-3'); 61.5 (C-5'); 55.4 und 55.3 (O-CH₃).



Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **74**.²⁶⁴

6.2.2 2',3'-p-Methoxybenzylidenadenosin (**75**)²⁶⁴



Die Verbindung wurde nach Vorschrift A dargestellt.

Ausbeute: 6.8 g, 94 % eines 1:1-Gemischs aus *endo*- und *exo*-Diastereomeren.

Schmelzpunkt: 215 °C (Lit.: 215 °C)²⁶⁴

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Acetonitril, DMF, Methanol

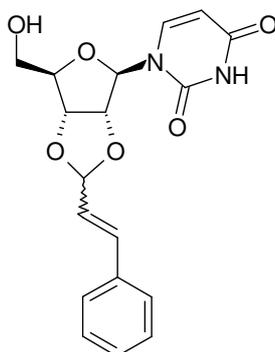
Schwer löslich in: Aceton, Diethylether, Dichlormethan, Wasser

UV-Maximum: 254 nm

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.36 (2 x s, 1H, H-2); 8.15 (2 x s, 1H, H-8); 7.50 und 7.48 (2 x dd, 2H, ³J = 8.85 Hz und ⁴J = 2.85 Hz, 2 x H_{meta}, Phenyl); 7.31 (br s, 2H, 6-NH₂), 6.98 und 6.95 (2 x dd, 2H, ³J = 8.85 Hz und ⁴J = 2.80 Hz, 2 x H_{ortho}, Phenyl); 6.26 (2 x d, 1H, ³J = 3.15 Hz, H-1'); 6.18 und 5.97 (1H, 2 x s, Ph-CH); 5.47 und 5.45 (2 x dd, 1H, ³J = 3.15 Hz und ³J = 6.30 Hz, H-2'); 5.22 und 5.11 (2 x t, 1H, ³J = 5.70 Hz, 5'-OH); 5.06 und 5.05 (2 x dd, 1H, ³J = 6.60 Hz und ³J = 2.85 Hz, H-3'); 4.36 und 4.26 (dt und pseudo-q, ³J = 5.05 Hz und ³J = 2.55 Hz, H-4'); 3.78 und 3.76 (2 x s, 3H, O-CH₃); 3.64 – 3.51 (m, 2H, ³J = 5.00 Hz und ³J = 3.15 Hz, 2 x H-5').

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 160.5 und 160.4 (C-O-CH₃, Phenyl); 156.3 (C-6); 152.8 (C-2); 149.1 und 149.0 (C-4); 140.0 und 139.8 (C-8); 128.6 und 128.5 (2 x C_{meta}, Phenyl); 128.4 und 128.3 (C_{para}, Phenyl); 119.3 und 119.2 (C-5); 113.9 und 113.8 (2 x C_{ortho}, Phenyl); 106.7 und 103.0 (Phenyl-CH); 89.6 und 88.1 (C-1'); 86.4 und 84.6 (C-4'); 83.8 und 83.0 (C-2'); 82.7 und 80.6 (C-3'); 61.7 (C-5'); 55.3 (O-CH₃).

6.2.2 2',3'-(3-Phenylprop-2-enyliden)uridin (76)



Die Verbindung wurde nach Vorschrift B dargestellt.

Ausbeute: 5.9 g, 80 % eines 1:1-Gemisches aus *endo*- und *exo*-Diastereomeren

Schmelzpunkt: 188 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Acetonitril, DMF, Methanol

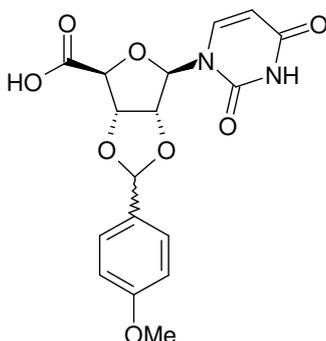
Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Wasser

UV-Maximum: 254 nm

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ 11.33 (1H, s, NH); 7.82 – 7.78 (1 H, 2 x d, ³J = 7.90 Hz, H-6); 7.52 (2H, d, ³J = 7.60 Hz, 2 x H_{ortho}, Phenyl); 7.38 – 7.31 (3H, dd, ³J = 7.25 Hz und ³J = 6.90 Hz, 2x H_{meta}, Phenyl, und t, ³J = 6.95 Hz, H_{para}, Phenyl); 6.87 (d, 1H, ³J = 15.75 Hz, Phenyl-CH=CH); 6.27 (dd, 1H, ³J = 16.10 Hz und ³J = 6.30 Hz, Phenyl-CH=CH); 5.84 (1H, s, H-1'); 5.61 (1H, d, ³J = 7.55 Hz, H-5); 5.66 und 5.52 (1H, 2 x d, ³J = 6.30 Hz, O-CH-O); 5.01 und 4.98 (1H, 2 x dd, ³J = 6.60 Hz und ³J = 2.85 Hz, H-2'); 4.86 und 4.82 (1H, 2 x dd, ³J = 6.60 Hz und ³J = 4.40 Hz, H-3'); 4.23 und 4.15 (1H, 2 x dt, ³J = 4.80 Hz und ³J = 3.15 Hz, H-4'); 3.67 – 3.61 (2H, m, ³J = 5.35 Hz und ³J = 3.20 Hz, 2 x H-5').

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz) δ 163.6 (C-4); 151.0 (C-2); 145.2 (C-6), 135.8 (C_{Phenyl}-C=C); 135.3 (Phenyl-CH=CH); 128.9 (2 x C_{meta}, Phenyl); 127.1 (2 x C_{ortho}, Phenyl); 124.4 (C_{para}, Phenyl); 123.9 (Phenyl-CH=CH); 105.9 und 103.8 (O-CH-O); 101.6 (C-5); 91.4 und 90.5 (C-1'); 86.5 (C-4'); 84.3 und 84.1 (C-2'); 83.0 und 81.8 (C-3'); 61.5 (C-5').

6.2.4. 1 β -Uracilyl-2,3-(*p*-methoxybenzyliden)-D-riburonsäure (**84**)



Die Verbindung **74** wurde in einer Menge von 2,17 g (6 mmol) nach Vorschrift C zur entsprechenden Carbonsäure oxidiert.

Ausbeute: 1.7 g (78 %) eines 1:1.1-Gemisches aus *endo*- und *exo*-Diastereomeren

Schmelzpunkt: 196 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Acetonitril, DMF

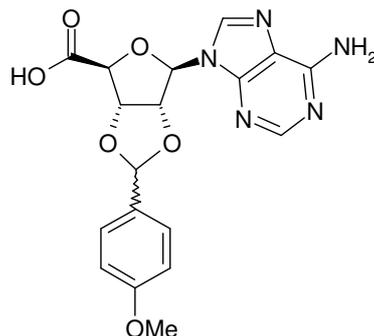
Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Wasser

UV-Maximum: 254 nm

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ 12.70 (br s, 1H, COOH); 11.32 (1H, br, s, NH), 7.82 und 7.74 (1 H, 2 x d, ³J = 7.85 Hz, H-6); 7.44 und 7.39 (2H, 2 x dd, ³J = 6.85 Hz und ⁴J = 1.85 Hz, 2 x H_{meta}, Phenyl); 6.97 und 6.95 (2H, 2 x dd, ³J = 6.60 Hz und ⁴J = 3.15 Hz, 2 x H_{ortho}, Phenyl); 5.98 und 5.83 (1H, 2 x s, Phenyl-CH); 5.96 (1H, s, H-1'); 5.64 (1H, d, ³J = 7.85 Hz, H-5); 5.38 und 5.27 (1H, dd (5.38) und br s (5.19), ³J = 6.00 Hz, ³J = 2.55 Hz, H-3'); 5.27 und 5.19 (1H, br s (5.27) und d (5.19), ³J = 5.70 Hz, H-2'); 4.74 und 4.73 (1H, 2 x d, ³J = 2.50 Hz und ³J = 0.95 Hz, H-4'); 3.67 und 3.77 (3H, 2 x s, O-CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 171.0 und 170.9 (COOH); 163.6 (C-4); 160.5 und 160.4 (C-O-CH₃, Phenyl); 151.1 und 151.0 (C-2); 145.2 und 144.9 (C-6); 128.5 (2 x C_{meta}, Phenyl); 128.1 (C_{para}, Phenyl); 114.2 und 113.8 (2 x C_{ortho}, Phenyl); 105.3 und 103.0 (Ph-CH); 101.6 (C-5); 95.8 und 95.6 (C-1'); 87.0 und 85.1 (C-4'); 84.8 und 84.5 (C-2'); 84.2 und 82.9 (C-3'); 55.5 (O-CH₃).

6.2.5 1 β -Adenin-9-yl-2,3-(*p*-methoxybenzyliden)-D-riburonsäure (**85**)



Die Verbindung **75** wurde in einer Menge von 2,31 g (6 mmol) nach Vorschrift C zur entsprechenden Carbonsäure oxidiert.

Ausbeute: 1.7 g (71 %) eines 1:1.3-Gemischs aus *endo*- und *exo*-Diastereomeren

Schmelzpunkt: 241 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

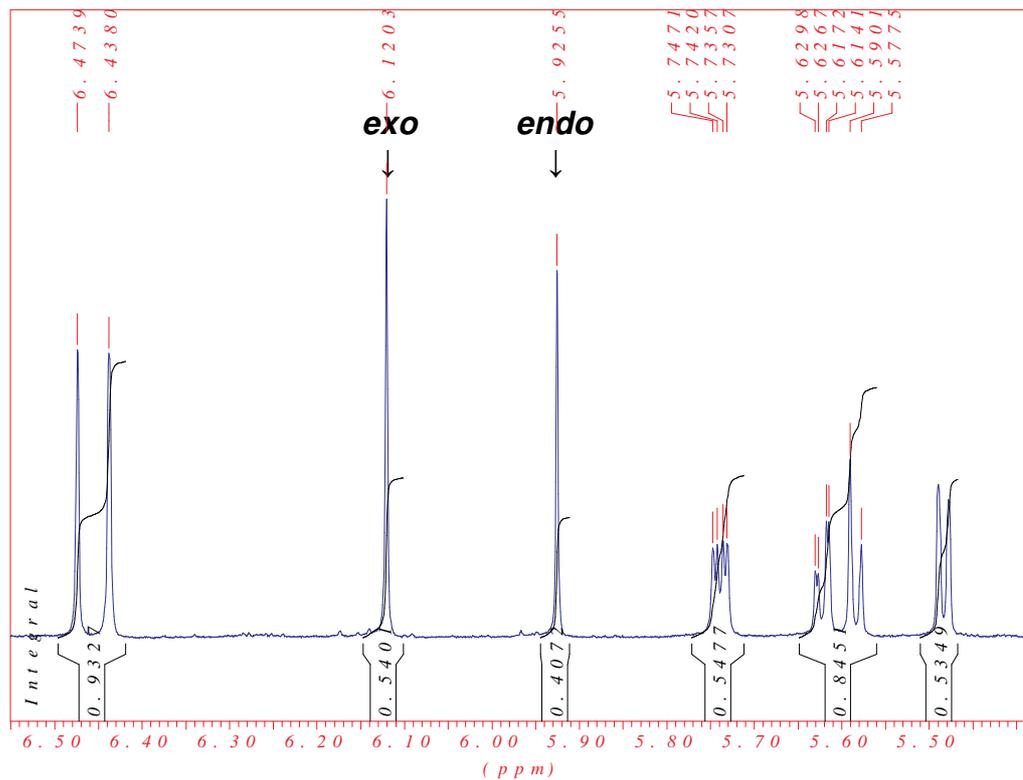
Leicht löslich in: Acetonitril, DMF

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Wasser

UV-Maximum: 254 nm

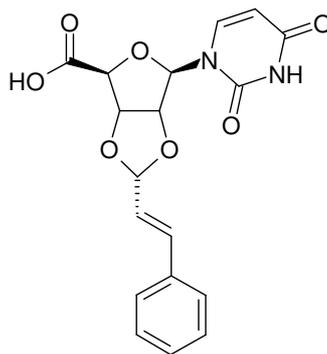
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 12.70 (br s, 1H, COOH); 8.27 (2 x s, 1H, H-2); 8.08 (2 x s, 1H, H-8); 7.48 und 7.45 (2 x dd, 2H, ³J = 8.85 Hz und ⁴J = 2.85 Hz, 2 x H_{meta}, Phenyl); 7.27 (br s, 2H, 6-NH₂); 6.98 und 6.96 (2 x dd, 2H, ³J = 8.85 Hz und ⁴J = 2.80 Hz, 2 x H_{ortho}, Phenyl); 6.47 und 6.44 (2 x s, 1H, H-1'); 6.12 und 5.93 (1H, 2 x s, Ph-CH); 5.74 und 5.62 (2 x dd, 1H, ³J = 6.30 Hz, ³J = 2.55 Hz, H-3'); 5.59 und 5.48 (2 x d, 1H, ³J = 6.30 Hz, H-2'); 4.87 und 4.85 (2 x d, ³J = 2.50 Hz und ³J = 1.55 Hz, H-4'); 3.78 und 3.77 (2 x s, 3H, O-CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.9 und 170.7 (C=O); 160.6 und 160.5 (C-O-CH₃, Phenyl); 156.2 (C-6); 125.6 und 152.5 (C-2); 149.3 (C-4); 140.8 und 140.6 (C-8); 128.7 (2 x C_{meta}, Phenyl); 128.1 und 128.0 (C_{para}, Phenyl); 118.9 (C-5); 113.9 (2 x C_{ortho}, Phenyl); 105.8 und 103.6 (Ph-CH); 89.5 und 89.4 (C-1'); 85.7 und 84.5 (C-4'); 84.2 und 83.9 (C-2'); 83.8 und 82.7 (C-3'); 55.4 (O-CH₃).



Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **85**.²⁶⁴

6.2.6 1β -Uracilyl-2,3 -(3-phenylprop-2-enyliden)-D-riburonsäure (**306**)



Die Verbindung **76** wurde in einer Menge von 2,15 g (6 mmol) nach Vorschrift C zur entsprechenden Carbonsäure oxidiert.

Ausbeute: 2.0 g (90 %) eines 1:1-Gemischs aus *endo*- und *exo*-Diastereomeren

Schmelzpunkt: 203 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

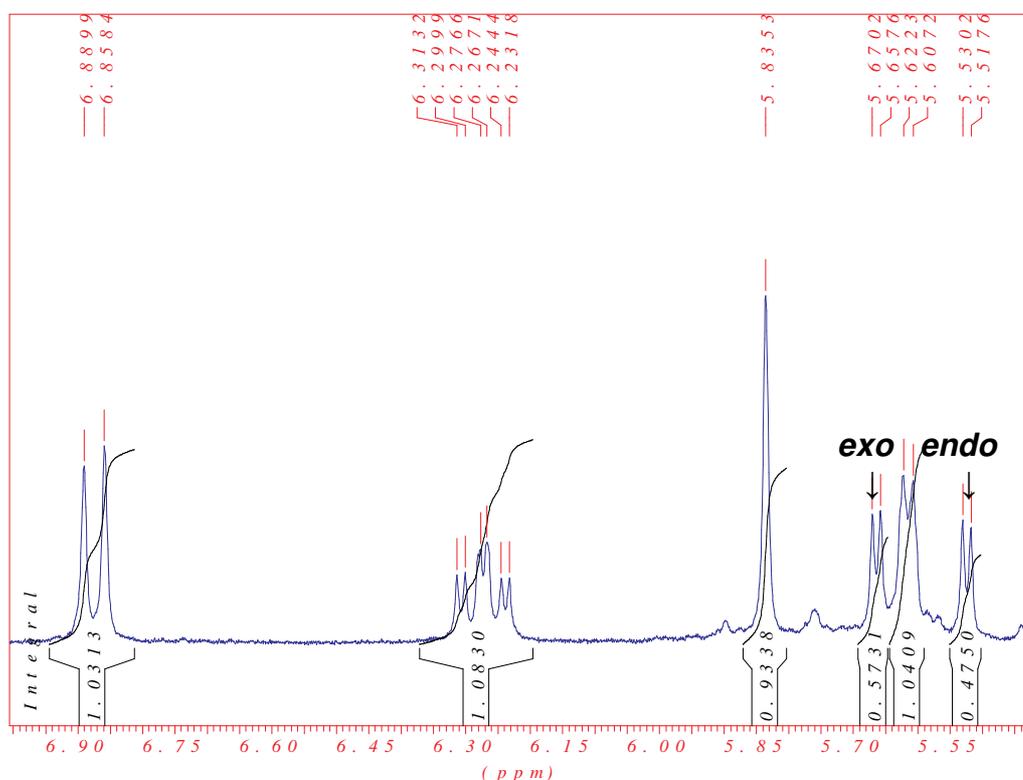
Leicht löslich in: Acetonitril, DMF

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Wasser

UV-Maximum: 254 nm

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 12.80 (1H, br s, COOH); 11.33 (1H, s, NH); 7.82 – 7.78 (1 H, 2 x d, $^3J = 7.90$ Hz, H-6); 7.52 (2H, d, $^3J = 7.60$ Hz, 2 x CH_{ortho}, Phenyl); 7.38 – 7.31 (3H, dd, $^3J = 7.25$ Hz und $^3J = 6.90$ Hz, 2 x CH_{meta}, Phenyl und pseudo-t, $^3J = 6.95$ Hz, CH_{para}, Phenyl); 6.87 (d, 1H, $^3J = 15.75$ Hz, Phenyl-CH=CH); 6.34 und 6.27 (2 x dd, 1H, $^3J = 16.10$ Hz und $^3J = 6.30$ Hz, Phenyl-CH=CH); 5.84 (1H, s, H-1'); 5.61 (1H, d, $^3J = 7.55$ Hz, H-5); 5.66 und 5.52 (2 x d, 1H, $^3J = 6.30$ Hz, O-CH-O); 5.22 (pseudo-q, 1H, $^3J = 5.70$ Hz und $^3J = 6.30$ Hz, H-3'); 5.16 (d, 1H, $^3J = 5.65$ Hz, H-2'); 4.68 (d, 1H, $^3J = 6.95$ Hz, H-4').

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ 170.9 (COOH); 163.6 (C-4); 151.0 (C-2); 145.2 (C-6); 135.8 (C_{Phenyl}-CH=CH); 135.3 (Phenyl-CH=CH); 128.9 (2 x CH_{meta}, Phenyl); 127.1 (2 x CH_{ortho}, Phenyl); 124.4 (CH_{para}, Phenyl); 123.9 (Phenyl-CH=CH); 105.9 und 103.8 (O-CH-O); 101.6 (C-5); 95.8 (C-1'); 86.9 (C-4'); 84.6 (C-3'); 84.1 (C-2').



Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **86**.²⁶⁴

6.3 Darstellung und Charakterisierung von ω -Aminocarbonsäureamiden als Di- und Triphosphatmimetika

Vorschrift D: Darstellung von *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) geschützten ω -Aminocarbonsäureamiden

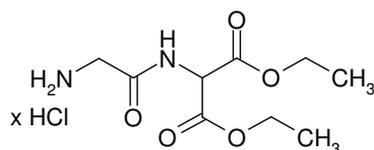
10 mmol einer N-*t*Boc-geschützten Aminosäure (Glycin, β -Alanin, γ -Aminobuttersäure) und 10 mmol (1,1 ml) N-Methylmorpholin wurden in 10 ml trockenem THF gelöst und mit Hilfe einer Mischung aus Isopropanol und Trockeneis auf ca. - 25 °C abgekühlt. Parallel wurden 11 mmol der Aminkomponente (s.u.) in 11 ml einer wäßrigen 1N NaOH-Lösung unter Eiskühlung gelöst. Die N-*t*Boc-geschützte Aminosäure wurde durch schnelle Zugabe von Isobutylchloroformiat 10 mmol (1,3 ml) in das gemischte Anhydrid überführt. Während der Aktivierung der Carbonsäurefunktion mußte die Temperatur unbedingt zwischen - 20 °C und - 30 °C gehalten werden. Die Bildung eines voluminösen, weißen Niederschlags von N-Methylmorpholinhydrochlorid ist ein Indikator für erfolgreiche Umsetzung. Eine Minute nach Zugabe von Isobutylchloroformiat wurde die wäßrige Lösung der Aminkomponente zugegeben. Die Reaktionslösung ließ man langsam auf Raumtemperatur erwärmen. Nach drei Stunden war die Umsetzung zum Amid abgeschlossen, so daß das Produkt aufgearbeitet werden konnte. Dazu wurde das THF mit einem Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur abgezogen und die übrig gebliebene wäßrige Suspension durch Zugabe von wäßriger 10 %iger NaHSO₄-Lösung auf pH 1 angesäuert. Das Produkt wurde mit Ethylacetat (dreimal 30 ml) extrahiert und erst mit gesättigter wäßriger Na₂CO₃-Lösung, dann mit Wasser (je dreimal 30 ml) gewaschen. Durch Entfernen des zuvor mit Na₂SO₄ getrockneten Lösungsmittels am Rotationsverdampfer konnte das Amid rein erhalten werden.

Vorschrift E: Abspaltung der *tert*-Boc-Schutzgruppe

Ca. 2,5 g des nach Vorschrift A erhaltenen Amids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe in 5 ml einer Lösung von 4N HCl in trockenem Dioxan unter Argon gelöst und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Nach Zugabe von 50 ml Diethylether fiel das Produkt aus und konnte abfiltriert und mit Diethylether (ca. 100 ml) gewaschen werden.

6.3.1 N-(2-Aminoacetyl)aminomalonsäurediethylesterhydrochlorid (113)



1,75 g (10 mmol) N-*t*Boc-geschütztes Glycin wurden mit 2,33 g (11 mmol) Aminomalonsäurediethylesterhydrochlorid nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Ausbeute von 2,8 g (84 %) an (*tert*-Butyloxycarbonylaminoacetyl)aminomalonsäurediethylester erzielt.

2,5 g (7,5 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 1,8 g (88 %) N-(2-Aminoacetyl)aminomalonsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 2.1 g (74 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 76 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

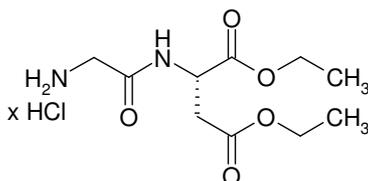
Leicht löslich in: DMF, Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Ethanol

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.31 (d, 1H, ³J = 7.25 Hz, CONH); 8.20 (br s, 3H, NH₃⁺); 5.14 (d, 1H, ³J = 6.95 Hz, N-CH, Aminomalonat); 4.20 (m, 4H, 2 x O-CH₂); 3.62 (br s, 2H, N-CH₂, 2-Aminoethanamid); 1.20 (t, 6H, 2 x CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.6 (C=O); 166.0 (2 x C=O); 62.1 (2 x O-CH₂); 56.4 (N-CH, Aminomalonat); CH₂ (2-Aminoethanamid) unter dem Lösungsmittelsignal bei 40 ppm; 14.0 (2 x CH₃).

6.3.2 (S)-N-(2-Aminoacetyl)asparaginsäurediethylesterhydrochlorid (114)



1,75 g (10 mmol) N-*t*Boc-geschütztes Glycin wurden mit 3,97 g (11 mmol) L-Asparaginsäurediethylester-*p*-tosylsulfonat nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Ausbeute von 2,7 g (78 %) an (S)-(*tert*-Butyloxycarbonylaminoacetyl)asparaginsäurediethylester erzielt.

2,5 g (7,2 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 1,9 g (94 %) (S)-N-(2-Aminoacetyl)asparaginsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 2.1 g (73 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 74 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: - 16.0 (Wasser)

Aussehen: hellgelbe Kristalle

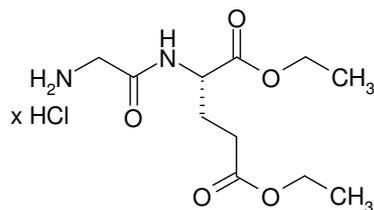
Leicht löslich in: DMF, Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Ethanol

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.88 (d, 1H, $^3\text{J} = 7.90$ Hz, CONH); 8.09 (s, 3H, NH_3^+); 4.68 (dt, 1H, $^3\text{J} = 6.65$ Hz und $^3\text{J} = 7.90$ Hz, N-CH, Asp); 4.09 (m, 4H, O- CH_2); 3.57 (s, 2H, N- CH_2 , 2-Aminoethanamid); 2.82 – 2.73 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, $^3\text{J} = 6.95$ Hz und $^2\text{J} = 16.40$ Hz, O=C- CH_2 , Asp); 1.18 (t, 6H, 2 x CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 172.1 (C=O); 170.2 (C=O); 169.5 (C=O); 61.0 und 60.5 (2 x O- CH_2); 48.8 (N-CH, Asp); 41.6 (N- CH_2 , 2-Aminoethanamid), 36.1 (O=C- CH_2 , Asp), 14.1 (2 x CH_3).

6.3.3 (S)-N-(2-Aminoacetyl)glutaminsäurediethylesterhydrochlorid (115)



1,75 g (10 mmol) *N*-*t*Boc-geschütztes Glycin wurden mit 2,63 g (11 mmol) L-Glutaminsäurediethylesterhydrochlorid nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Ausbeute von 3,1 g (86 %) an (*S*)-(*tert*-Butyloxycarbonylamino-acetyl)-glutaminsäurediethylester erzielt.

2,5 g (6,9 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 1,8 g (88 %) (*S*)-N-(2-Aminoacetyl)glutaminsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 2.2 g (76 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 107 °C

[α]_D²⁰: - 16.9 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle

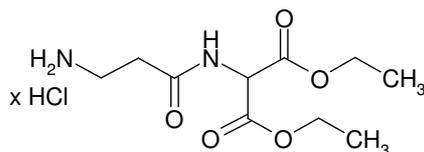
Leicht löslich in: DMF, Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Ethanol

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.83 (d, 1H, ³J = 7.55 Hz, CONH); 8.15 (br s, 3H, NH₃⁺); 4.34 (dt, 1H, ³J = 5.65 Hz und ³J = 7.55 Hz, N-CH, Glu); 4.07 (m, 4H, 2 x O-CH₂); 3.60 (AB-System mit A d und B d, 2H, ²J = 16.10 Hz, N-CH₂, 2-Aminoethanamid); 2.38 (t, 2H, ³J = 7.55 Hz, O=C-CH₂, Glu); 2.04 - 1,97 und 1.88 - 1.80 (2 x m, 1H, ³J = 5.70 Hz und ³J = 7.55 Hz, CH₂, Glu); 1.17 (t, 1H, 2 x CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.0 (C=O); 171.3 (C=O); 166.4 (C=O); 61.0 und 60.1 (2 x O-CH₂); 51.5 (N-CH, Glu); N-CH₂ (2-Aminoethanamid) unter dem Lösungsmittelsignal bei 40 ppm; 29.8 (O=C-CH₂, Glu); 26.4 (CH₂, Glu); 14.2 und 14.1 (2 x CH₃).

6.3.4 N-(3-Aminopropionyl)aminomalonsäurediethylesterhydrochlorid (116)



1,89 g (10 mmol) N-*t*Boc-geschütztes β -Alanin wurden mit 2,33 g (11 mmol) Aminomalonsäurediethylesterhydrochlorid nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Ausbeute von 3,2 g (91 %) an N-(3-*tert*-Butyloxycarbonylaminopropionyl)aminomalonsäurediethylester erzielt.

2,5 g (7,2 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 1,9 g (94 %) N-(3-Aminopropionyl)aminomalonsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 2.4 g (87 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 79 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

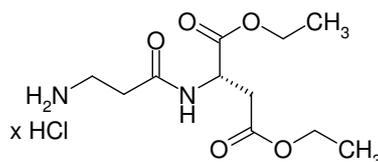
Leicht löslich in: DMF, Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Ethanol

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.06 (d, 1H, $^3J = 7.25$ Hz, CONH); 8.05 (s, 3H, NH_3^+), 5.08 (d, 1H, $^3J = 7.55$ Hz, N-CH, Aminomalonat); 4.16 (m, 4H, 2 x O-CH₂); 2.94 (br t, 2H, $^3J = 6.00$ Hz, N-CH₂, 3-Aminopropanamid); 2.64 (t, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, O=C-CH₂, 3-Aminopropanamid); 1.19 (t, 6H, 2 x CH₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 172.0 (C=O); 170.0 (C=O); 166.4 (C=O); 61.9 (2 x O-CH₂); 56.3 (N-CH, Aminomalonat); 35.1 (N-CH₂, 3-Aminopropanamid); 31.8 (O=C-CH₂, 3-Aminopropanamid); 14.0 (2 x CH₃).

6.3.5 (S)-N-(3-Aminopropionyl)-asparaginsäurediethylesterhydrochlorid (117)



1,89 g (10 mmol) *N*-*t*Boc-geschütztes β -Alanin wurden mit 3,97 g (11 mmol) L-Asparaginsäurediethylester-*p*-tosylsulfonat nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Ausbeute von 2,7 g (75 %) an (*S*)-N-(3-*tert*-Butyloxycarbonylamino-propionyl)asparaginsäurediethylester erzielt.

2,5 g (6,9 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 1,8 g (88 %) (*S*)-N-(3-Aminopropionyl)asparaginsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 1,8 g, 66 % berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 66 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 15.6 (Wasser)

Aussehen: farblose Kristalle (hygroskopisch)

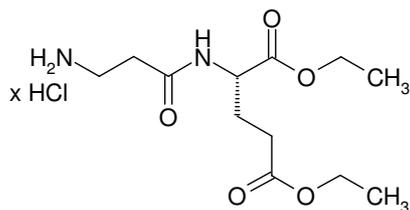
Leicht löslich in: DMF, Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.65 (d, 1H, $^3J = 7.60$ Hz, CONH); 8.04 (br s, 3H, NH_3^+); 4.61 (dt, 1H, $^3J = 6.60$ und $^3J = 7,25$ Hz, N-CH, Asp); 4.07 (m, 4H, 2 x O-CH₂); 2.93 (br s, 2H, N-CH₂, 3-Aminopropanamid); 2.72 (AB-System mit A dd und B dd, 1H, $^3J = 6.90$ und $^2J = 16.40$ Hz, O=C-CH₂, Asp); 2.64 (t, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, O=C-CH₂, 3-Aminopropanamid); 1.17 (t, 6H, 2 x CH₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 172.1 (C=O); 170.2 (C=O); 169.5 (C=O); 60.9 und 60.4 (2 x O-CH₂); 48.8 (N-CH, Asp); 36.0 (N-CH₂, 3-Aminopropanamid); 35.3 (O=C-CH₂, Asp); 32.0 (O=C-CH₂, 3-Aminopropanamid); 14.2 und 14.1 (2 x CH₃).

6.3.6 (S)-N-(3-Aminopropionyl)glutaminsäurediethylesterhydrochlorid (118)



1,89 g (10 mmol) *N*-*t*Boc-geschütztes β -Alanin wurden mit 2,63 g (11 mmol) L-Glutaminsäurediethylesterhydrochlorid nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Ausbeute von 3,0 g (81 %) an (*S*)-*N*-(3-*tert*-Butyloxycarbonylamino-propionyl)glutaminsäurediethylester erzielt.

2,5 g (6,7 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 2,0 g (96 %) (*S*)-*N*-(3-Aminopropionyl)glutaminsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 2.4 g (78 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 85 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 20.4 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle (hygroskopisch)

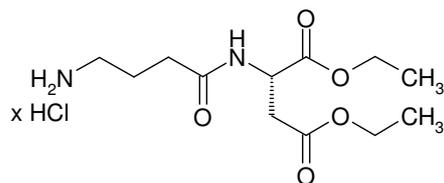
Leicht löslich in: DMF, Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Ethanol

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.53 (d, 1H, $^3J = 7.55$ Hz, CONH); 7.97 (br s, 3H, NH_3^+); 4.25 (dt, 1H, $^3J = 5.65$ Hz and $^3J = 7.55$ Hz, N-CH, Glu); 4.05 (m, 4H; 2 x O-CH₂); 2.94 (t, 2H, $^3J = 6.95$ Hz, N-CH₂, 3-Aminopropanamid); 2.64 (t, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, O=C-CH₂, 3-Aminopropanamid); 2.37 (m, 2H, $^3J = 6.00$ Hz und $^3J = 5.65$ Hz, O=C-CH₂, Glu); 1.99 – 1.88 (m, 1H, $^3J = 6.00$ Hz, CH₂, Glu); 1.17 (t, 6H, 2 x CH₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 172.2 (C=O); 171.7 (C=O); 169.9 (C=O); 60.7 und 60.1 (2 x O-CH₂); 51.4 (N-CH, Glu); 35.3 (N-CH₂, 3-Aminopropanamid); 31.9 (O=C-CH₂, Glu); 30.0 (O=C-CH₂, 3-Aminopropanamid); 26.2 (CH₂, Glu); 14.2 (2 x CH₃).

6.3.8 (S)-N-(4-Aminobutyryl)asparaginsäurediethylesterhydrochlorid (120)



2,03 g (10 mmol) *N*-*t*Boc-geschützte γ -Aminobuttersäure wurden mit 3,97 g (11 mmol) L-Asparaginsäurediethylester-*p*-tosylsulfonat nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Ausbeute von 3,0 g (81 %) an (S)-N-(4-*tert*-Butyloxycarbonylamino)butyryl)asparaginsäurediethylester erzielt.

2,5 g (6,7 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 1,8 g (87 %) (S)-N-(4-Aminobutyryl)asparaginsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 2.2 g (71 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 71 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 11.1 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle (hygroskopisch)

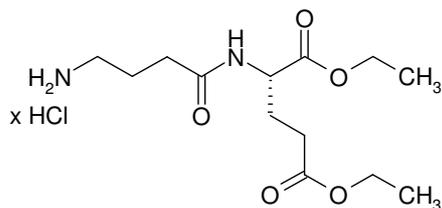
Leicht löslich in: DMF, Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Ethanol

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.45 (d, 1H, $^3J = 7.90$ Hz, CONH); 7.95 (br s, 3H, NH_3^+); 4.58 (dt, 1H, $^3J = 7.55$ Hz und $^3J = 6.00$ Hz, N-CH); 4.08 (m, 4H, 2 x O-CH₂); 2.78 (dd, 1H, $^3J = 7,25$ Hz, 0,5 x O=C-CH₂, Asp); 2.78 – 2.64 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, $^3J = 7.60$ Hz und $^2J = 16.40$ Hz, O=C-CH₂, Asp, teilweise überlappend mit N-CH₂, 4-Aminobutanamid); 2.75 (t, 2H, $^3J = 6.35$ Hz, N-CH₂, 4-Aminobutanamid); 2.22 (t, 2h, $^3J = 7.25$ Hz, O=C-CH₂, 4-Aminobutanamid); 1,77 (tt, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, CH₂, 4-Aminobutanamid); 1.70 (t, 6H, 2 x CH₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO d_6) δ 171.5 (C=O); 170.8 (C=O); 170.0 (C=O); 60.9 und 60.5 (2 x O-CH₂); 48.8 (N-CH, Asp); 38.3 (N-CH₂, 4-Aminobutanamid); 36.0 (O=C-CH₂, Asp); 32.0 (O=C-CH₂, 4-Aminobutanamid); 23.3 (CH₂, 4-Aminobutanamid); 14.12 und 14.1 (2 x CH₃).

6.3.9 (S)-N-(4-Aminobutyryl)glutaminsäurediethylesterhydrochlorid (**121**)



2,03 g (10 mmol) N-*t*Boc-geschützte γ -Aminobuttersäure wurden mit 2,63 g (11 mmol) L-Glutaminsäurediethylesterhydrochlorid nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Ausbeute von 3,3 g (86 %) an (S)-N-(4-*tert*-Butyloxycarbonylaminobutyryl)glutaminsäurediethylester erzielt.

2,5 g (6,5 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 2,0 g (93 %) (S)-N-(4-Aminobutyryl)glutaminsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 2.6 g (80 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 91 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 22.3 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle

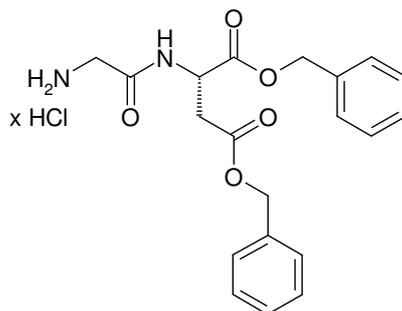
Leicht löslich in: DMF, Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Ethanol

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.40 (d, 1H, $^3J = 7.60$ Hz, CONH); 8.04 (br s, 3H, NH_3^+); 4.21 (m, 1H, $^3J = 5.35$ Hz und $^3J = 7.55$ Hz, N-CH, Glu); 4.06 (m, 4H, 2 x O-CH₂); 2.78 (m, 2H, J = 6.30 Hz, N-CH₂, 4-Aminobutanamid); 2.34 (m, 2H, J = 7.85 Hz, O=C-CH₂, Glu); 2.24 (t, 2H, J = 7.25 Hz; O=C-CH₂, 4-Aminobutanamid); 2.01- 1.79 (m, 1H, J = 7.25 Hz und 5.70 Hz, CH₂, Glu, teilweise überlappend mit CH₂ (4-Aminobutanamid)), 1.79 (tt, 2H, J = 7.25 Hz, CH₂, 4-Aminobutanamid); 1.17 (t, 6H; 2 x CH₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 172.2 (C=O); 171.9 (C=O); 171.8 (C=O); 60.6 und 60.1 (2 x O-CH₂); 51.4 (N-CH, Glu); 38.4 (N-CH₂, 4-Aminobutanamid); 31.8 (O=C-CH₂, Glu); 30.1 (O=C-CH₂, 4-Aminobutanamid); 26.1 (CH₂, Glu); 23.3 (CH₂, 4-Aminobutanamid); 14.2 (2 x CH₃).

6.3.10 (S)-N-(2-Aminoacetyl)asparaginsäuredibenzylesterhydrochlorid (122)



1,75 g (10 mmol) N-*t*Boc-geschütztes Glycin wurden mit 5,34 g (11 mmol) L-Asparaginsäuredibenzylester-*p*-tosylsulfonat nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Ausbeute von 3,5 g (75 %) an (S)-N-(2-*tert*-Butyloxycarbonyl-aminoacetyl)asparaginsäuredibenzylester erzielt.

3,0 g (6,4 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-)Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 2,4 g (93 %) (S)-N-(2-Aminoacetyl)asparaginsäuredibenzylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 2.8 g (70 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 170 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 8.73 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle

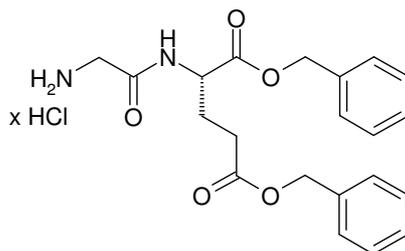
Leicht löslich in: DMF, Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.02 (d, 1H, $^3J = 7.85$ Hz, CONH); 8.14 (br s, 3H, NH_3^+); 7.34 (m, 10 H, 2 x Phenyl); 5.11 und 5.08 (2 x s, 2 x 2H, 2 x O-CH₂); 4.82 (dt, 1H, $^3J = 6.00$ Hz and $^3J = 7.85$ Hz, N-CH, Asp); 3.57 (AB-System mit A d und B d, 2H, $^2J = 16.40$ Hz, N-CH₂, 2-Aminoethanamid); 2.91 – 2.79 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, $^3J = 6.00$ Hz and $^2J = 16.70$ Hz, O=C-CH₂, Asp).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 170.1 (C=O); 169.8 (C=O); 166.3 (C=O); 135.9 und 135.7 (2 x O-CH₂-C_{Phenyl}); 128.6 – 127.9 (10 x CH_{Phenyl}); 66.6 und 66.1 (2 x O-CH₂); 48.8 (N-CH, Asp); N-CH₂ (2-Aminoethanamid) unter dem Lösungsmittelpeak bei 40; 35.9 (O=C-CH₂, Asp).

6.3.11 (S)-N-(2-Aminoacetyl)glutaminsäuredibenzylesterhydrochlorid (123)



1,75 g (10 mmol) N-*t*Boc-geschütztes Glycin wurden mit 3,99 g (11 mmol) L-Glutaminsäuredibenzylesterhydrochlorid nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Ausbeute von 4,2 g (87 %) an (S)-N-(2-*tert*-Butyloxycarbonyl-aminoacetyl)glutaminsäuredibenzylester erzielt.

3,0 g (6,2 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 2,4 g (92 %) (S)-N-(2-Aminoacetyl)glutaminsäuredibenzylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 3.4 g (80 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 115 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 18.2 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle

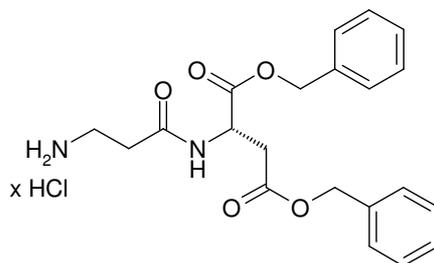
Leicht löslich in: DMF, Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.90 (d, 1H, $^3J = 7.55$ Hz, CONH); 8.15 (br s, 3H, NH_3^+); 7.34 (m, 10H, 2 x Phenyl); 5.13 und 5.08 (2 x s, 2 x 2H, 2 x Ph- CH_2); 4.44 (dt, 1H, $^3J = 5.35$ Hz und $^3J = 7.55$ Hz, N-CH, Glu); 3.59 (AB-System mit A d und B d, 2H, $^2J = 16.10$ Hz, N- CH_2 , 2-Aminoethanamid); 2.45 (m, 2H, $^3J = 6.00$ Hz, O=C- CH_2 , Glu); 2.08 – 1.79 (m, 2H, $^3J = 6.00$ Hz und $^3J = 5.40$ Hz, CH_2 , Glu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 172.0 (C=O); 171.1 (C=O); 166.4 (C=O); 136.2 und 135.9 (2 x O- CH_2 - C_{Phenyl}); 128.6 – 128.0 (10 x $\text{CH}_{\text{Phenyl}}$); 66.4 und 65.7 (2 x O- CH_2); 51.9 (N-CH, Glu); N- CH_2 (2-Aminoethanamid) unter dem Lösungsmittelpeak bei 40.0; 29.8 (O=C- CH_2 , Glu); 26.3 (CH_2 , Glu).

6.3.12 (S)-N-(3-Aminopropionyl)asparaginsäuredibenzylesterhydrochlorid (124)



1,89 g (10 mmol) N-*t*Boc-geschütztes β -Alanin wurden mit 5,34 g (11 mmol) L-Asparaginsäuredibenzylester-*p*-tosylsulfonat nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Ausbeute von 3,2 g (66 %) an (S)-2-(*tert*-Butyloxycarbonylaminopropionyl)asparaginsäuredibenzylester erzielt.

3,0 g (6,2 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 1,8 g (88 %) (S)-N-(3-Aminopropionyl)asparaginsäuredibenzylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 1.9 g (58 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 103 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 10.1 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle

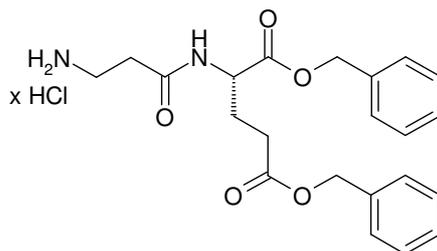
Leicht löslich in: DMF, Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.74 (d, 1H, $^3J = 7.90$ Hz, CONH); 7.97 (br s, 3H, NH_3^+); 7.34 (m, 10H, 10 x $\text{CH}_{\text{Phenyl}}$); 5.09 und 5.07 (2 x s, 2 x 2H, Ph- $\underline{\text{CH}_2}$); 4.74 (dt, 1H, $^3J = 6.95$ Hz und $^3J = 7.90$ Hz, N-CH, Asp); 2.92 (m, 2H, $^3J = 7.60$ Hz, N- CH_2 , 3-Aminopropanamid); 2.91 – 2.79 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, $^3J = 6.95$ Hz und $^2J = 16.40$ Hz, O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, Asp); 2.53 (t, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, 3-Aminopropanamid).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 170.5 (C=O); 169.9 (C=O); 169.7 (C=O); 136.0 und 158.8 (2 x O- CH_2 - $\underline{\text{C}}_{\text{Phenyl}}$); 128.6 – 127.9 (10 x $\text{CH}_{\text{Phenyl}}$); 66.5 und 66.0 (2 x O- $\underline{\text{CH}_2}$); 48.8 (N-CH, Asp); 35.9 (O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, Asp); 35.2 (N- CH_2 , 3-Aminopropanamid); 32.0 (O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, 3-Aminopropanamid).

6.3.13 (S)-N-(3-Aminopropionyl)glutaminsäuredibenzylesterhydrochlorid (125)



1,89 g (10 mmol) *N*-*t*-boc-geschütztes β -Alanin wurden mit 3,99 g (11 mmol) L-Glutaminsäuredibenzylesterhydrochlorid nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Ausbeute von 3,3 g (85 %) an (*S*)-2-(*tert*-Butyloxycarbonylamino-propionyl)glutaminsäuredibenzylester erzielt.

3,0 g (6,0 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 2,3 g (88 %) (*S*)-N-(3-Aminopropionyl)glutaminsäuredibenzylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 2.5 g (75 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 94 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 19.0 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle

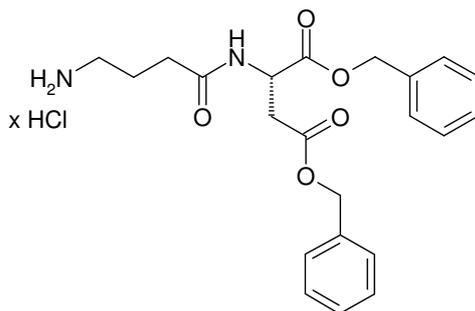
Leicht löslich in: DMF, Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.62 (d, 1H, $^3J = 7.55$ Hz, CONH); 8.01 (br s, 3H, NH_3^+); 7.34 (m, 10H, 10 x $\text{CH}_{\text{Phenyl}}$); 5.11 und 5.07 (2 x s, 2 x 2H, 2 x O- $\underline{\text{CH}_2}$); 4.34 (dt, 1H, $^3J = 5.40$ Hz und $^3J = 7.55$ Hz, N-CH, Glu); 2.94 (t, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, N- CH_2 , 3-Aminopropanamid); 2.58 (m, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, 3-Aminopropanamid); 2.45 (m, 2H, $^3J = 6.60$ Hz, O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, Glu); 2.06 – 1.85 (m 1H, $^3J = 5.65$ Hz and $^3J = 6.95$ Hz, CH_2 , Glu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 172.5 (C=O); 171.5 (C=O); 169.9 (C=O); 136.2 und 136.0 (2 x O- CH_2 - $\underline{\text{C}}_{\text{Phenyl}}$); 128.6 – 127.9 (10 x $\text{CH}_{\text{Phenyl}}$); 66.2 und 65.7 (2 x Ph- $\underline{\text{CH}_2}$); 51.5 (N-CH, Glu); 35.2 (N- CH_2 , 3-Aminopropanamid); 32.0 (O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, 3-Aminopropanamid); 30.0 (O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, Glu); 26.1 (CH_2 , Glu).

6.3.14 (S)-N-(4-Aminobutyryl)asparaginsäuredibenzylesterhydrochlorid (126)



10 mmol (2,03 g) N-*t*Boc-geschützte γ -Aminobuttersäure wurden mit 11 mmol (3,97 g) L-Asparaginsäurediethylester-*p*-tosylsulfonat nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Ausbeute von 3,2 g (83 %) an (S)-N-(3-*tert*-Butyloxycarbonylamino)butyryl)asparaginsäuredibenzylester erzielt.

3,0 g (6,0 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 2,2 g (85 %) (S)-N-(4-Aminobutyryl)asparaginsäuredibenzylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 2.3 g (71 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 163 °C

$[\alpha]_D^{20}$: -12.0 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle

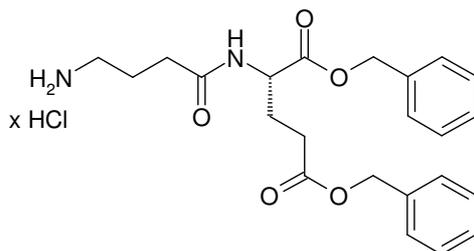
Leicht löslich in: DMF, Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.51 (d, 1H, $^3J = 7.85$ Hz, CONH); 7.80 (br s, 3H, NH_3^+); 7.34 (m, 10H, 10 x $\text{CH}_{\text{Phenyl}}$); 5.07 und 5.01 (2 x s, 2 x 2H, O- CH_2); 4.72 (dt, 1H, $^3J = 6.00$ Hz und $^3J = 7.55$ Hz, N-CH, Asp); 2.92 – 2.76 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, $^3J = 5.95$ Hz und $^2J = 16.70$ Hz, O=C- CH_2 , Asp); 2.75 (m, 2H, $^3J = 7.55$ Hz, N- CH_2 , 4-Aminobutanamid); 2.21 (t, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, O=C- CH_2 , 4-Aminobutanamid); 1.75 (tt, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, CH_2 , 4-Aminobutanamid).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 171.6 (C=O); 170.6 (C=O); 169.9 (C=O); 136.0 und 135.9 (O- CH_2 - C_{Phenyl}); 128.5 – 127.8 (10 x $\text{CH}_{\text{Phenyl}}$); 66.4 und 66.0 (2 x O- CH_2); 48.8 (N-CH, Asp); 38.5 (N- CH_2 , 4-Aminobutanamid); 35.9 (O=C- CH_2 , Asp); 31.8 (O=C- CH_2 , 4-Aminobutanamid); 23.2 (CH_2 , 4-Aminobutanamid).

6.3.15 (S)-N-(4-Aminobutyryl)glutaminsäuredibenzylesterhydrochlorid (127)



2,03 g (10 mmol) N-*t*Boc-geschützte γ -Aminobuttersäure wurden mit 3,99 g (11 mmol) L-Glutaminsäuredibenzylesterhydrochlorid nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Ausbeute von 4,5 g (88 %) an (S)-3-(*tert*-Butyloxycarbonylaminobutyryl)glutaminsäuredibenzylester erzielt.

3,0 g (5,9 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 2,5 g (95 %) (S)-N-(4-Aminobutyryl)glutaminsäuredibenzylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 3.8 g (84 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 129 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 18.6 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle

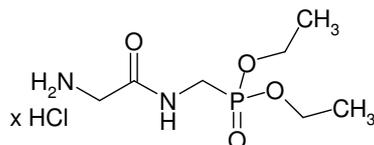
Leicht löslich in: DMF, Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.48 (d, 1H, $^3J = 7.55$ Hz, CONH); 8.06 (br s, 3H, NH_3^+); 7.35 (m, 10H, 10 x $\text{CH}_{\text{Phenyl}}$); 5.11 und 5.08 (2 x s, 2 x 2H, O- $\underline{\text{CH}_2}$); 4.31 (dt, 1H, $^3J = 7.25$ Hz und $^3J = 5.35$ Hz, N-CH, Glu); 2.76 (m, 2H, $^3J = 5.70$ Hz und $^3J = 6.90$ Hz, N- CH_2 , 4-Aminobutanamid); 2.44 (t, 2H, $^3J = 6.60$ Hz, O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, Glu); 2.24 (t, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, 4-Aminobutanamid); 2.04 – 1.83 (m, 2H, $^3J = 6.60$ Hz, Glu); 1.78 (tt, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, CH_2 , 4-Aminobutanamid).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 172.1 (C=O); 171.9 (C=O); 171.7 (C=O); 136.2 und 136.1 (2 x O- CH_2 - $\underline{\text{C}}_{\text{Phenyl}}$); 128.6 – 127.9 (10 x $\text{CH}_{\text{Phenyl}}$); 66.1 und 65.7 (2 x O- $\underline{\text{CH}_2}$); 51.5 (N-CH, Glu); 38.4 (N- CH_2 , 4-Aminobutanamid); 31.8 (O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, 4-Aminobutanamid); 30.0 (O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, Glu); 26.0 (CH_2 , Glu); 23.3 (CH_2 , 4-Aminobutanamid).

6.3.16 Aminomethylcarboxamidomethylphosphonsäurediethylesterhydrochlorid (103)



1,75 g (10 mmol) N-*t*Boc-geschütztes Glycin wurden mit 2,83 g (11 mmol) Aminomethylphosphonsäurediethylesterhydrogenoxalat nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Die Aminkomponente wurde in einer auf 0 °C gekühlten Mischung aus 11 ml 1N NaOH und 10 ml THF gelöst. Es wurde eine Ausbeute von 2,9 g (90 %) an *tert*-Butyloxycarbonylaminomethylcarboxamidomethylphosphonsäurediethylester erreicht. 2,5 g (7,7 mmol) des oben erhaltenen Amides wurden zur Abspaltung der *tert*-butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 1,9 g (95 %) Aminomethylcarboxamidomethylphosphonsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 2.2 g (86 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 153 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: DMF, Wasser

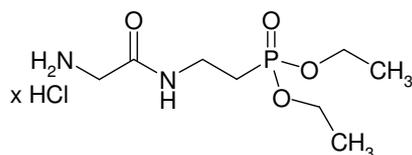
Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Ethanol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.79 (t, 1H, ³J = 5.65 Hz, CONH); 8.23 (br s, 3H, NH₃⁺); 4.06 – 4.00 (2 x q, 4H, 2 x O-CH₂); 3.61 (dd, 2H, ²J = 12.00 Hz und ²J_{H,P} = 17.95 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 3.56 (s, 2H, N-CH₂, 2-Aminoethanamid); 1.22 (t, 6H, 2 x CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.2 (C=O); 62.1 und 62.0 (2 x O-CH₂); N-CH₂ (2-Aminoethanamid) unter dem Lösungsmittelsignal bei 45 ppm; 34.7 (d, ¹J_{C,P} = 154.4 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 16.4 und 16.3 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-*d*₆) δ 22.5.

**6.3.17 2-(Aminomethylcarboxamido)ethylphosphonsäurediethylesterhydrochlorid
(106)**



1,75 g (10 mmol) *N*-*t*Boc-geschütztes Glycin wurden mit 2,98 g (11 mmol) Aminoethylphosphonsäurediethylesterhydrogenoxalat nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Die Aminokomponente wurde in einer auf 0 °C gekühlten Mischung aus 11 ml 1N NaOH und 10 ml THF gelöst. Es wurde eine Ausbeute von 2,5 g (74 %) an 2-(*tert*-Butyloxycarbonylaminomethylcarboxamido)ethylphosphonsäurediethylester erreicht.

2,0 g (5,9 mmol) des oben erhaltenen Amides wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 1,5 g (93 %) 2-(Aminomethylcarboxamido)ethylphosphonsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 1.9 g (69 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 103 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: DMF, Wasser

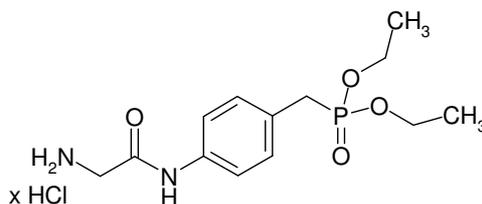
Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Ethanol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.55 (t, 1H, ³J = 5.65 Hz, CONH); 8.12 (br s, 3H, NH₃⁺); 4.02 – 3.98 (2 x q, 4H, 2 x O-CH₂); 3.49 (s, 2H, N-CH₂, 2-Aminoethanamid); 3.30 – 3.18 (m, 2H, ³J = 7.55 Hz und ³J = 5.45 Hz und ³J_{H,P} = 12.95 Hz, N-CH₂, Ethylphosphonat); 1.97 – 1.91 (m, 2H, ³J = 7.55 Hz und ²J_{H,P} = 18.35 Hz, CH₂-P, Ethylphosphonat); 1.23 (t, 6H, 2 x CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.8 (C=O); 61.3 (2 x O-CH₂); N-CH₂ (2-Aminoethanamid) unter Lösungsmittelpeak bei 42 ppm; 33.3 (d, ²J_{C,P} = 14.9 Hz, N-CH₂, Ethylphosphonat); 25.3 (d, ¹J_{C,P} = 135.8 Hz, CH₂-P, Ethylphosphonat); 16.4 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-*d*₆) δ 28.4.

6.3.18 *p*-(Aminomethylcarboxamido)benzylphosphonsäurediethylesterhydrochlorid
(107)



1,75 g (10 mmol) *N*-*t*Boc-geschütztes Glycin wurden mit 2,67 g (11 mmol) *p*-Aminobenzylphosphonsäurediethylester nach modifizierter Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Die Aminokomponente wurde in 10 ml trockenen THFs gelöst und vor der Reaktion in einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Zur Aufarbeitung wurde das THF am Rotationsverdampfer entfernt, das Produkt in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und je drei mal mit je 30 ml 2 %iger NaHSO₄-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Das Ethylacetat wurde über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurde eine Ausbeute von 3,8 g (95 %) an *p*-(*tert*-Butyloxycarbonylaminomethylcarboxamido)benzylphosphonsäurediethylester erreicht.

3,5 g (8,8 mmol) des oben erhaltenen Amides wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 2,8 g (95 %) *p*-(Aminomethylcarboxamido)benzylphosphonsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 3.0 g (90 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 197 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: DMF, Wasser, Ethanol

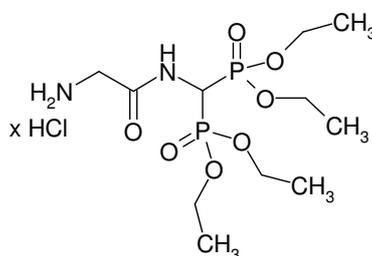
Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.84 (s, 1H, CONH); 8.35 (br s, 3H, NH₃⁺); 7.56 (d, 2H, ³J = 8.20 Hz, 2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 7.13 (dd, 2H, ³J = 8.55 Hz und ⁴J = 2.55 Hz, 2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 4.02 – 3.94 (2 x q, 4H, 2 x O-CH₂); 3.77 (br s, 2H, N-CH₂, 2-Aminoethanamid); 3.15 (d, 2H, ²J = 21.45 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 1.22 (t, 6H, 2 x CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 164.8 (C=O); 137.0 ($C_{\text{phenyl-NH}}$, Benzylphosphonat); 130.3 (2 x C_{meta} , Benzylphosphonat); 127.6 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 9.2$ Hz, $C_{\text{Phenyl-CH}_2\text{-P}}$, Benzylphosphonat); 119.2 (2 x C_{ortho} , Benzylphosphonat); 61.5 (2 x O-CH₂); 41.1 (N-CH₂, 2-Aminoethanamid); 31.9 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 137.8$ Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 16.4 und 16.3 (2 x CH₃).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, DMSO- d_6) δ 26.9.

6.3.19 Aminomethylcarboxamidomethylenbis(phosphonsäurediethylester)-hydrochlorid (**110**)



1,75 g (10 mmol) N-*t*Boc-geschütztes Glycin wurden mit 3,3 g (11 mmol) Aminomethylbis(phosphonsäurediethylester) nach modifizierter Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Die Aminkomponente wurde gemäß Literaturvorschrift von *Kantoci et al.* dargestellt (Lit.). Die Menge an Ausgangsprodukt für die letzte Synthesestufe in dieser Vorschrift wurde so gewählt, daß 11 mmol Aminomethylbis(phosphonsäurediethylester) erhalten werden konnten. Das Aminomethylbisphosphonat wurde ohne weitere Aufarbeitung durch Entfernen des Lösungsmittels Methanol isoliert, direkt zur Amidsynthese in 10 ml trockenen THFs gelöst und vor der Reaktion in einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Zur Aufarbeitung nach erfolgter Amidsynthese wurde das THF abrotiert, das Produkt in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und je drei mal mit je 30 ml 2%iger NaHSO₄-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Das Ethylacetat wurde über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurde eine Ausbeute von 3,5 g (85 %) an *tert*-Butyloxycarbonylaminomethylcarboxamidomethylbis(phosphonsäurediethylester) erreicht.

3,0 g (6,5 mmol) des oben erhaltenen Amides wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen

2,4 g (93 %) Aminomethylcarboxamidomethylbis(phosphonsäurediethylester)hydrochlorid an.

Ausbeute: 3.0 g (79 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 77 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: DMF, Wasser, Ethanol

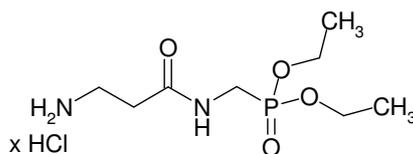
Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹N-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.18 (d, 1H, ³J = 10.10 Hz, CONH); 8.35 (br s, 3H, NH₃⁺); 4.80 (td, 1H, ³J = 9.75 Hz und ²J_{H,P} = 22.40 Hz, N-CH, Methylbisphosphonat); 4.06 (br m, 8H, 4 x O-CH₂); 3.61 (d, 1H, ³J = 5.35 Hz, N-CH₂, 2-Aminoethanamid); 1.23 (m, 12H, 4 x CH₃).

¹³C-NMR (124 MHz, DMSO-d₆) δ 166.2 (C=O); 66.5 (N-CH₂, 2-Aminoethanamid); 63.2 und 63.0 (4 x O-CH₂); 43.8 (t, ¹J_{C,P} = 146.2 Hz, N-CH, Methylbisphosphonat); 16.4 und 16.3 (4 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-d₆) δ 15.7 und 15.8.

6.3.20 2-Aminoethylcarboxamidomethylphosphonsäurediethylesterhydrochlorid (104)



1,89 g (10 mmol) N-tboc-geschütztes β-Alanin wurden mit 2,83 g (11 mmol) Aminomethylphosphonsäurediethylesterhydrogenoxalat nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Die Aminokomponente wurde in einer auf 0 °C gekühlten Mischung aus 11 ml 1N NaOH und 10 ml THF gelöst. Es wurde eine Ausbeute von 2,4 g (71 %) an 2-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)ethylcarboxamidomethylphosphonsäurediethylester erreicht.

2,0 g (5,9 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen

1,5 g (93 %) 2-Aminoethylcarboxamidomethylphosphonsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 1.8 g (66 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 138 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: DMF, Wasser

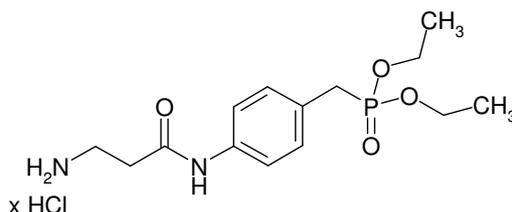
Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Ethanol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.31 (t, 1H, ³J = 5.65 Hz, CONH); 8.01 (br s, 3H, NH₃⁺); 4.04 – 3.93 (2 x q, 4H, 2 x O-CH₂); 3.74 (dd, 2H, ²J = 11.65 Hz und ²J_{H,P} = 17.65 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 3.51 (m, 2H, ³J = 6.65 Hz, N-CH₂, 3-Aminopropanamid); 2.53 (m, 2H, ³J = 6.60 Hz und ³J = 7.55 Hz, O=C-CH₂, 3-Aminopropanamid); 1.27 (2 x t, 6H, 2 x CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 169.4 (C=O); 61.9 und 61.2 (2 x O-CH₂); 35.5 (N-CH₂, 3-Aminopropanamid); 35.2 (d, ¹J_{C,P} = 137.9 Hz, CH₂-P, Aminomethylphosphonat); 33.9 (O=C-CH₂, 3-Aminopropanamid); 16.34 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-d₆) δ 28.8.

6.3.21 *p*-(2-Aminoethylcarboxamido)benzylphosphonsäurediethylesterhydrochlorid (108)



1,89 g (10 mmol) *N*-*t*Boc-geschütztes β-Alanin wurden mit 2,67 g (11 mmol) *p*-Aminobenzylphosphonsäurediethylester nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Die Aminokomponente wurde in 10 ml trockenen THFs gelöst und vor der Reaktion in einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Zur Aufarbeitung wurde das THF abrotiert, das Produkt in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und je drei mal mit je 30 ml 2 %iger NaHSO₄-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Das

Ethylacetat wurde über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurde eine Ausbeute von 3,9 g (95 %) an *p*-(2-*tert*-Butyloxycarbonylminoethylcarboxamido)benzylphosphonsäurediethylester erreicht.

3,5 g (8,5 mmol) des oben erhaltenen Amides wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 2,9 g (98 %) *p*-(2-Aminoethylcarboxamido)benzylphosphonsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 2.4 g (87 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 198 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: DMF, Wasser, Ethanol

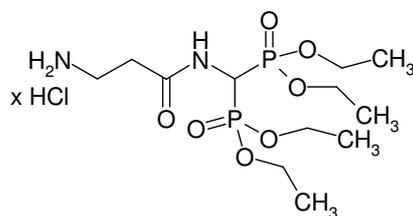
Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10.20 (br s, 1H, CONH); 7.93 (br s, 3H, NH₃⁺); 7.52 (d, 2H, ³J = 8.50 Hz, 2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 7.19 (dd, 2H, ³J = 8.50 Hz und ⁴J = 2.50 Hz, 2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 3.95 – 3.90 (2 x q, 4H, 2 x O-CH₂); 3.13 (d, 2H, ²J_{H,P} = 21.45 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 3.07 (br s, 2H, N-CH₂, 3-Aminopropanamid); 2.71 (t, 2H, ³J = 6.95 Hz, O=C-CH₂, 3-Aminopropanamid); 1.21 (t, 6H, 2 x CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 168.3 (C=O); 137.5 (C_{phenyl}-NH, Benzylphosphonat); 130.2 und 130.1 (2 x C_{meta}, Benzylphosphonat); 127.1 (d, ²J_{C,P} = 8.2 Hz, C_{Phenyl}-CH₂-P, Benzylphosphonat); 119.2 und 119.1 (2 x C_{ortho}, Benzylphosphonat); 61.5 (2 x O-CH₂); 35.0 (N-CH₂, 3-Aminopropanamid); 33.2 (O=C-CH₂, 3-Aminopropanamid); 31.8 (d, ¹J_{C,P} = 134.8 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 16.4 und 16.3 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-d₆) δ 26.3.

6.3.22 2-Aminoethylcarboxamidomethylendiphosphonsäurediethylesterhydrochlorid (**111**)



1,89 g (10 mmol) N-*t*Boc-geschütztes β -Alanin wurden mit 3,3 g (11 mmol) Aminomethylbis(phosphonsäurediethylester) nach modifizierter Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Die Aminokomponente wurde gemäß Literaturvorschrift von *Kantoci et al.* dargestellt (Lit.). Die Menge an Ausgangsprodukt für die letzte Synthesestufe der Vorschrift wurde so gewählt, daß 11 mmol Aminomethylbis(phosphonsäurediethylester) erhalten werden konnten. Das Aminomethylbisphosphonat wurde nach der letzten Synthesestufe ohne weitere Aufreinigung durch Entfernen des Lösungsmittels isoliert, direkt zur Amidsynthese in 10 ml trockenen THFs gelöst und vor der Reaktion in einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Zur Aufarbeitung nach erfolgter Amidsynthese wurde das THF am Rotationsverdampfer entfernt, das Produkt in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und je drei mal mit je 30 ml 2 % NaHSO₄-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Das Ethylacetat wurde über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurde eine Ausbeute von 3,1 g (65 %) an 2-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)-ethylcarboxamidomethylbis(phosphonsäurediethylester) erreicht.

2,5 g (5,3 mmol) des oben erhaltenen Amides wurden zur Abspaltung der *tert*-butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 2,0 g (93 %) Aminomethylcarboxamidomethylbis(phosphonsäurediethylester)hydrochlorid an.

Ausbeute: 2.5 g (60 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 135 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: DMF, Wasser, Ethanol

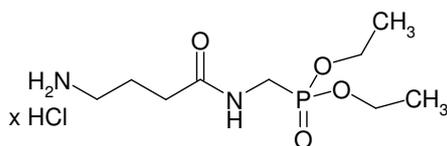
Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 8.96 (d, 1H, ³J = 10.1 Hz, CONH); 7.93 (br s, 3H, NH₃⁺); 4.83 (td, 1H, ³J = 10.10 Hz und ²J_{H,P} = 22.70 Hz, N-CH, Methylbisphosphonat); 4.06 (m, 8H, 4 x O-CH₂); 2.95 (br s, 2H, N-CH₂, 3-Aminopropanamid); 2.63 (t, 2H, ³J = 7.25 Hz, O=C-CH₂, 3-Aminopropanamid); 1.22 (m, 12 H; CH₃).

¹³C-NMR (500 MHz, DMSO d₆) δ 169.6 (C=O); 63.0 und 62.9 (4 x O-CH₂); 43.4 (t, ¹J_{C,P} = 146.5 Hz, N-CH, Methylbisphosphonat); 35.4 (N-CH₂, 3-Aminopropanamid); 31.9 (O=C-CH₂, 3-Aminopropanamid); 16.4 (4 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-d₆) δ 15.7 und 15.8.

6.3.23 3-Aminopropylcarboxamidomethylphosphonsäurediethylesterhydrochlorid (105)



2,03 g (10 mmol) N-*t*Boc-geschützte γ -Aminobuttersäure wurden mit 2,83 g (11 mmol) Aminomethylphosphonsäurediethylesterhydrogenoxalat nach Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Die Aminkomponente wurde in einer auf 0 °C gekühlten Mischung aus 11 ml 1N NaOH und 10 ml THF gelöst. Es wurde eine Ausbeute von 3,2 g (91 %) an 3-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)propylcarboxamidomalonsäurediethylester erreicht.

2,5 g (7,1 mmol) des oben erhaltenen Dipeptids wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 1,9 g (93 %) 3-Aminopropylcarboxamidomethylphosphonsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 2.4 g, 84 % berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 104 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: DMF, Wasser

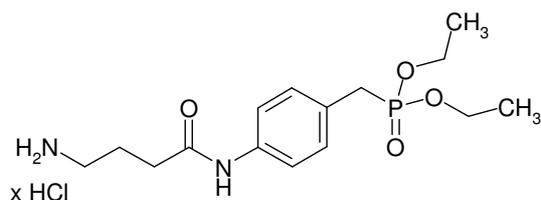
Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan, Ethanol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.29 (t, 1H, ³J = 6.00 Hz, CONH); 7.91 (br s, 3H, NH₃⁺); 4.03 – 3.97 (2 x q, 4H, 2 x O-CH₂); 3.55 – 3.32 (dd, 2H, ²J = 12.30 Hz und ²J_{H,P} = 18.30 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 2.79 – 2.72 (m, 2H, ³J = 6.30 Hz, N-CH₂, 4-Aminobutanamid); 2.22 (t, 2H, ³J = 6.95 Hz, O=C-CH₂, 4-Aminobutanamid); 1.76 (tt, 2H, ³J = 5.70 Hz und ³J = 6.95 Hz, CH₂, 4-Aminobutanamid); 1.21 (t, 6H, 2 x CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 171.7 (C=O); 62.1 (2 x O-CH₂); 38.8 (N-CH₂, 4-Aminobutanamid); 34.3 (d, ¹J_{C,P} = 154.2 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 32.2 (O=C-CH₂, 4-Aminobutanamid); 23.7 (CH₂, 4-Aminobutanamid); 16.4 und 16.3 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-d₆) δ 23.5.

6.3.24 *p*-(3-Aminopropylcarboxamido)benzylphosphonsäurediethylesterhydrochlorid (109)



2,03 g (10 mmol) *N*-*t*Boc-geschützte γ -Aminobuttersäure wurden mit 2,67 g (11 mmol) *p*-Aminobenzylphosphonsäurediethylester nach modifizierter Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Die Aminkomponente wurde in 10 ml trockenen THFs gelöst und vor der Reaktion in einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Zur Aufarbeitung wurde das THF am Rotationsverdampfer entfernt, das Produkt in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und je drei mal mit je 30 ml 2%iger NaHSO₄-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Das Ethylacetat wurde getrocknet über Na₂SO₄ und abrotiert. Es wurde eine Ausbeute von 4,2 g (96 %) an *p*-3-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)propylcarboxamidobenzylphosphonsäurediethylester erzielt. 3,5 g (8,2 mmol) des oben erhaltenen Amides wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 2,9 g (97 %) *p*-(3-Aminopropylcarboxamido)benzylphosphonsäurediethylesterhydrochlorid an.

Ausbeute: 3.5 g (93 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 154 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: DMF, Wasser, Ethanol

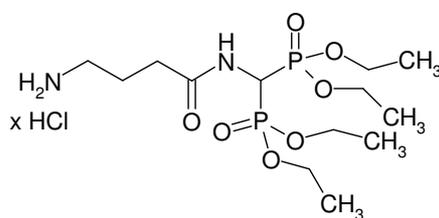
Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10.11 (br s, 1H, CONH); 8.00 (br s, 3H, NH₃⁺); 7.53 (d, 2H, ³J = 8.55 Hz, 2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 7.17 (dd, 2H, ³J = 8.50 Hz und ⁴J = 2.20 Hz, 2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 3.95 – 3.89 (2 x q, 4H, 2 x O-CH₂); 3.36 (m, 2H, ³J = 7.25 Hz, N-CH₂, 4-Aminobutanamid); 3.13 (d, 2H, ²J_{P,H} = 21.10 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 2.42 (t, 2H, ³J = 7.25 Hz, O=C-CH₂, 4-Aminobutanamid), 1.84 (m, 2H, ³J = 7.60 Hz und ³J = 7.25 Hz, CH₂, 4-Aminobutanamid); 1.23 (2 x t, 6H, 2 x CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 170.3 (C=O); 137.8 (C_{phenyl}-NH, Benzylphosphonat); 130.1 und 130.0 (2 x C_{meta}, Benzylphosphonat); 126.4 (d, ²J_{C,P} = 8.9 Hz, C_{Phenyl}-CH₂-P, Benzylphosphonat); 119.1 (2 x C_{ortho}, Benzylphosphonat); 61.5 und 61.4 (2 x Ph-CH₂); 38.4 (N-CH₂, 4-Aminobutanamid); 33.1 (O=C-CH₂, 4-Aminobutanamid); 31.8 (d, ¹J_{C,P} = 134.8 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 23.2 (CH₂, 4-Aminobutanamid); 16.4 und 16.3 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-d₆) δ 26.3.

6.3.25 3-Aminopropylcarboxamidomethylendiphosphonsäuretetraethylesterhydrochlorid (112)



2,03 g (10 mmol) N-*t*Boc-geschützte γ -Aminobuttersäure wurden mit 3,3 g (11 mmol) Aminomethylbis(phosphonsäurediethylester) nach modifizierter Vorschrift D zur Reaktion gebracht. Die Aminokomponente wurde gemäß Literaturvorschrift von *Kantoci et al.* dargestellt (Lit.). Die Menge an Ausgangsprodukt für die letzte

Synthesestufe der Vorschrift wurde so gewählt, daß 11 mmol Aminomethylbis(phosphonsäurediethylester) erhalten werden konnten. Das Methylbisphosphonat wurde nach der letzten Synthesestufe durch Entfernen des Lösungsmittels isoliert, direkt zur Amidsynthese in 10 ml trockenem THF gelöst und vor der Reaktion in einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Zur Aufarbeitung nach der Amidsynthese wurde das THF am Rotationsverdampfer entfernt, das Produkt in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und je drei mal mit je 30 ml 2 % NaHSO₄-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Das Ethylacetat wurde über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurde eine Ausbeute von 4,4 g (91 %) an 3-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)propylcarboxamidomethylbis(phosphonsäurediethylester) erreicht.

3,5 g (7,2 mmol) des oben erhaltenen Amides wurden zur Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl- (*t*Boc-) Schutzgruppe nach Vorschrift E umgesetzt. Dabei fielen 2,9 g (95 %) 3-Aminopropylcarboxamidomethylbis(phosphonsäurediethylester)hydrochlorid an.

Ausbeute: 3.7 g, 87 % berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 148 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: DMF, Wasser, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.72 (d, 1H, ³J = 9.75 Hz, CONH); 8.14 (br s, 3H, NH₃⁺); 4.86 (dt, 1H, ³J = 9.75 Hz und ²J_{H,P} = 22.70 Hz, N-CH, Methylbisphosphonat); 4.05 (m, 8H, 4 x O-CH₂); 2.74 (t, 2H, ³J = 6.00 Hz und ³J = 7.25 Hz, N-CH₂, 4-Aminobutanamid); 2.33 (t, 2H, ³J = 7.25 Hz, O=C-CH₂, 4-Aminobutanamid); 1.79 (tt, 2H, ³J = 7.60 Hz, CH₂, 4-Aminobutanamid); 1.21 (m, 12H, 4 x CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 171.4 (C=O); 63.0 (OCH₂); 43.3 (t, ¹J_{C,P} = 146.5 Hz, N-CH, Methylbisphosphonat); 38.3 (N-CH₂, 4-Aminobutanamid); 31.7 (O=C-CH₂, 4-Aminobutanamid); 23.5 (CH₂, 4-Aminobutanamid); 16.4 und 16.2 (4 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-d₆) δ 15.8 und 15.9.

6.4 Darstellung und Charakterisierung von Nucleosid-Carbonsäureamiden

Vorschrift F: Darstellung von 1- β -Uracilyl-2,3-*p*-methoxybenzyliden-D-riburonsäureamiden (Amidkopplung)

1- β -Uracilyl-2,3-*p*-methoxybenzyliden-D-riburonsäure (1 mmol, 376 mg), ein Kopplungsreagenz (s. u.) (1.1 mmol, [HBTU: 428 mg oder HCTU: 455 mg oder PyBOP: 570 mg]), und 1-Hydroxybenzotriazol (1.1 mmol, 149 mg) wurden zusammen unter Argon in einem mit Septum verschlossenen Mehrhalskolben in 2 ml trockenem DMF bei Raumtemperatur gelöst. Diisopropylethylamin (DIPEA, Hünigs Base) (1.1 mmol, 143 mg) wurde mit einer Spritze mit Kanüle zugegeben. Eine dunkelgelbe Verfärbung der Lösung zeigte die erfolgreiche Aktivierung der Carbonsäure an. Nach einer Minute wurde die entsprechende Aminkomponente (2 mmol, s.u.), gelöst in einer Mischung aus trockenem DMF (2 ml) und Diisopropylethylamin (0,4 ml), mit einer Spritze mit Kanüle zugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Zur Aufarbeitung des Produkts wurden die flüchtigen Bestandteile bei 40 °C im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand per Flash-Chromatographie über Kieselgel 60 mit Dichlormethan:Methanol (40:1) als Eluent aufgereinigt. Die relevanten Fraktionen wurden gesammelt und am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand durch Zugabe von Diethylether (20 ml) zur Kristallisation gebracht.

Vorschrift G: Darstellung von 1- β -Adenin-9-yl-2,3-*p*-methoxybenzyliden-D-riburonsäureamiden (Amidkopplung)

1- β -Adenin-9-yl-2,3-*p*-methoxybenzyliden-D-riburonsäure (1 mmol, 399 mg) wurde unter Argon in einer Mischung aus 2 ml trockenem DMF und 0.4 ml Diisopropylethylamins in einem mit Septum verschlossenen Mehrhalskolben bei Raumtemperatur gelöst. Ein Kopplungsreagenz (s. u.) (1.1 mmol, [HBTU: 428 mg oder HCTU: 455 mg oder PyBOP: 570 mg]) und 1-Hydroxybenzotriazol (1.1 mmol,

149 mg), zusammen gelöst in 2 ml trockenen DMFs, wurde durch eine Kanüle hinzugefügt. Darauf wurde wie unter Vorschrift F beschrieben weiter verfahren.

Vorschrift H: Abspaltung der *p*-Methoxybenzylidengruppe

Zur Abspaltung der Anisyliden-Schutzgruppe wurde das entsprechende 2',3'-*p*-Methoxybenzylidennucleosid-4'-carbonsäureamid (100 mg, s.u.) in einer Mischung aus 3 ml Dichlormethan, 0,09 - 0,15 ml (s.u.) Trifluoressigsäure und einem Tropfen Wasser gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach zwei bis drei Stunden (DC-Kontrolle) wurden 50 ml Diethylether zugegeben, um das Produkt auszufällen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und dreimal mit jeweils 20 ml Diethylether gewaschen. Darauf folgte eventuell eine Aufreinigung per präparativer RP-HPLC. Hierzu wurde das Produkt in einem Gemisch aus Wasser und Methanol (4:1; 7 ml) aufgenommen.

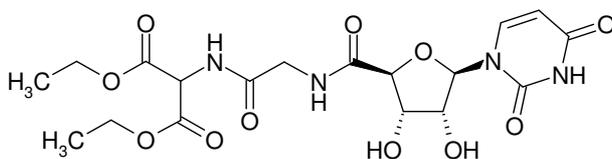
HPLC-Methode:

20 min Wasser:Methanol (4:1), isokratisch, dann

30 min Gradient: Methanol (100 %).

Die das Produkt enthaltende Fraktion wurde gefriergetrocknet.

6.4.1 2-[2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)ethanamido]malonsäurediethylester (**154**)



Die Synthese des Riburonsäureamides aus **84** und **113** gelang nach Vorschrift F mit HCTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 270 mg (57 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 247 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

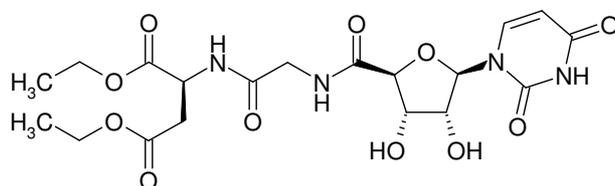
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.30 (d, 1H, ⁴J = 1.90 Hz, NH, Uracil); 8.85 (d, 1H, ³J = 7.25 Hz, CONH); 8.47 (t, 1H, ³J = 5.70 Hz, 5'-CONH); 8.20 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-6); 5.92 (d, 1H, ³J = 6.95 Hz, H-1'); 5.64 (dd, 1H, ³J = 7.90 Hz und ⁴J = 1.90 Hz, H-5); 5.52 (d, 1H, ³J = 4.70 Hz, 3'-OH); 5.50 (d, 1H, ³J = 6.00 Hz, 2'-OH); 5.08 (d, 1H, ³J = 7.25 Hz, N-CH, Aminomalonat); 4.34 (d, 1H, ³J = 1.90 Hz, H-4'); 4.24-4.11 (m, 5H, 2 x O-CH₂ und H-2'); 4.06 (ddd, 1H, ³J = 2.2 Hz und ³J = 4.40 Hz und ³J = 4.75 Hz, H-3'); 3.86 (t, 2H, ³J = 5.35 Hz, CH₂, 2-Amidoethanamid); 1.19 (t, 6H, 2 x CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 170.5 (C=O); 169.0 (C=O); 166.4 (C=O); 163.2 (C-4); 151.2 (C-2); 141.4 (C-6); 102.3 (C-5); 87.7 (C-1'); 83.2 (C-4'); 73.2 (C-2'); 72.9 (3'); 61.9 (2 x O-CH₂); 56.3 (N-CH, Aminomalonat); 41.4 (CH₂, 2-Amidoethanamid); 14.0 (2 x CH₃).

ESI-MS: 471.0 ([M-H]⁻), 473.0 ([M+H]⁺).

C ₁₈ H ₂₄ N ₄ O ₁₁ · 0.5 H ₂ O	ber.:	C: 44.91 %;	H: 5.18 %;	N: 11.64 %
	gef.:	C: 45.26 %;	H: 5.46 %;	N: 11.87 %

6.4.2 2-[2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamidoethanamido)]-(*S*)-asparaginsäurediethylester (155)



Die Synthese des Riburonsäureamides aus **84** und **114** gelang nach Vorschrift F mit HCTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 238 mg (49 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 225 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 13.1 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Wasser, Methanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.30 (d, 1H, $^4\text{J} = 1.60$ Hz, NH, Uracil); 8.46 (t, 1H, $^3\text{J} = 5.65$ Hz, 5'-CONH); 8.38 (d, 1H, $^3\text{J} = 7.90$ Hz, CONH); 8.21 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.15$ Hz, H-6); 5.92 (d, 1H, $^3\text{J} = 6.90$ Hz, H-1'); 5.65 (dd, 1H, $^3\text{J} = 8.20$ Hz und $^4\text{J} = 1.85$ Hz, H-5); 5.52 (d, 1H, $^3\text{J} = 4.45$ Hz, 3'-OH); 5.50 (d, 1H, $^3\text{J} = 6.00$ Hz, 2'-OH); 4.63 (dd, 1H, $^3\text{J} = 7.90$ Hz und $^3\text{J} = 6.30$ Hz, N-CH, Asp); 4.34 (d, 1H, $^3\text{J} = 1.90$ Hz, H-4'); 4.15 (pseudo-q, 1H, $^3\text{J} = 6.00$ Hz und $^3\text{J} = 5.00$ Hz und $^3\text{J} = 6.65$ Hz, H-2'); 4.12-4.02 (m, 5H, 2 x O-CH₂ und H-3'); 3.77 (d, 2H, $^3\text{J} = 6.00$ Hz, CH₂, 2-Amidoethanamid); 2.72 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, $^3\text{J} = 5.95$ Hz und $^2\text{J} = 16.40$ Hz, O=C-CH₂, Asp); 1.16 (t, 6H, 2 x CH₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 170.5 (C=O); 170.0 (C=O); 168.6 (C=O); 163.2 (C-4); 151.2 (C-2); 141.4 (C-6); 102.3 (C-5); 87.7 (C-1'); 83.2 (C-4'); 73.2 (C-2'); 72.9 (C-3'); 61.0 und 60.5 (2 x O-CH₂); 48.8 (N-CH, Asp); 41.6 (N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 36.1 (O=C-CH₂, Asp); 14.1 (2 x CH₃).

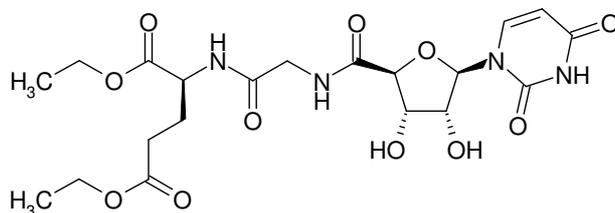
ESI-MS: 485.0 ([M-H]⁻), 487.0 ([M+H]⁺).

C₁₉H₂₆N₄O₁₁ · H₂O

ber.: C: 43.68 %; H: 5.75 %; N: 10.72 %

gef.: C: 43.27 %; H: 4.96 %; N: 10.68 %

6.4.3 2-[2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)ethanamido]-(*S*)-glutaminsäurediethylester (**156**)



Die Synthese des Riburonsäureamides aus **84** und **115** gelang nach Vorschrift F mit HCTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 188 mg (38 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 196 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 27.5 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Wasser, Methanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

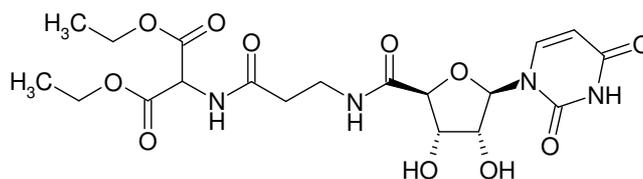
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.30 (br s, 1H, NH, Uracil); 8.43 (t, 1H, $^3J = 6.00$ Hz, 5'-CONH); 8.31 (d, 1H, $^3J = 7.90$ Hz, CONH); 8.23 (d, 1H, $^3J = 7.90$ Hz, H-6); 5.93 (d, 1H, $^3J = 6.95$ Hz, H-1'); 5.65 (d, 1H, $^3J = 7.90$ Hz, H-5); 5.52 (d, 1H, $^3J = 4.75$ Hz, 2'-OH); 5.49 (d, 1H, $^3J = 6.00$ Hz, 3'-OH); 4.35 (d, 1H, $^3J = 1.90$ Hz, H-4'); 4.27 (dt, 1H, $^3J = 5.35$ Hz und $^3J = 7.55$ Hz, N-CH, Glu); 4.14 (pseudo-q, 1H, $^3J = 5.70$ Hz und $^3J = 4.80$ Hz und $^3J = 6.95$ Hz, H-2'); 4.11-4.03 (m, 5H, 2 x O-CH₂ und H-3'); 3.79 (d, 2H, $^3J = 5.35$ Hz, N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 2.34 (t, 2H, $^3J = 7.90$ Hz, O=C-CH₂, Glu); 1.98 und 1.82 (2 x m, 2 x 1H, $^3J = 7.60$ Hz, CH₂, Glu); 1.16 (t, 6H, 2 x CH₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 172.2 (C=O); 171.6 (C=O); 170.4 (C=O); 168.8 (C=O); 163.2 (C-4); 151.2 (C-2); 141.4 (C-6); 102.2 (C-5); 87.7 (C-1'); 83.2 (C-4'); 73.2 (C-2'); 72.9 (C-3'); 60.8 und 60.1 (2 x O-CH₂); 51.3 (N-CH, Glu), N-CH₂ (2-Amidoethanamid) unter dem Lösungsmittelsignal bei 40 ppm; 30.0 (O=C-CH₂, Glu); 26.4 (CH₂, Glu); 14.2 (2 x CH₃).

ESI-MS: 499.1 ($[M-H]^-$), 501.0 ($[M+H]^+$).

$C_{20}H_{28}N_4O_{11} \cdot H_2O$	ber.:	C:48.80 %;	H:5.69 %;	N:10.52 %
	gef.:	C:48.76 %;	H:5.34 %;	N:10.18 %

6.4.4 2-[3-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)propanamido]malonsäurediethylester (**157**)



Die Synthese des Riburonsäureamides aus **84** und **116** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 200 mg (41 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 189 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Wasser, Methanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

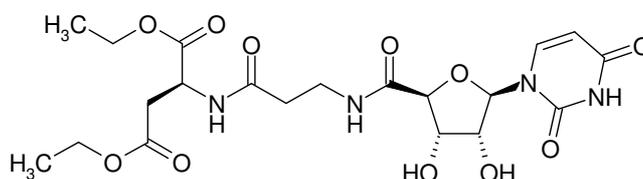
1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.30 (s, 1H, NH, Uracil); 8.82 (d, 1H, $^3J = 7.25$ Hz, CONH); 8.27 (t, 1H, $^3J = 5.35$ Hz, 5'-CONH); 8.23 (d, 1H, $^3J = 7.90$ Hz, H-6); 5.88 (d, 1H, $^3J = 6.60$ Hz, H-1'); 5.69 (d, 1H, $^3J = 7.90$ Hz, H-5); 5.48 (br s, 2H, 2'-OH und 3'-OH); 5.07 (d, 1H, $^3J = 7.25$ Hz, N-CH, Aminomalonat); 4.24 (d, 1H, $^3J = 2.20$ Hz, H-4'); 4.20 - 4.12 (m, 5H, 2 x O-CH₂ und H-2'); 3.99 (dd, 1H, $^3J = 2.20$ Hz und $^3J = 4.40$ Hz, H-3'); 3.29 (dt, 2H, $^3J = 6.65$ Hz und $^3J = 5.35$ Hz, N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 2.43 (t, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 1.19 (t, 6H, 2 x CH₃).

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 170.9 (C=O); 169.9 (C=O); 166.5 (C=O); 163.2 (C-4); 151.1 (C-2); 141.4 (C-6); 102.2 (C-5); 87.9 (C-1'); 83.2 (C-4'); 73.1 (C-2' und C-3'); 61.8 (2 x O-CH₂); 56.3 (N-CH, Aminomalonat); 35.2 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 34.4 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 14.0 (2 x CH₃).

ESI-MS: 485.0 ([M-H]⁻), 486.9 ([M+H]⁺).

C₁₉H₂₆N₄O₁₁ · H₂O ber.: C: 45.23 %; H: 5.55 %; N: 11.11 %
 gef.: C: 45.14 %; H: 5.06 %; N: 11.04 %

6.4.5 2-[3-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)propanamido]-(*S*)-asparaginsäurediethylester
(158)



Die Synthese des Riburonsäureamides aus **84** und **117** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 140 mg (28 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 193 °C

[α]_D²⁰: - 9.86 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Wasser, Methanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.30 (br s, 1H, NH, Uracil); 8.37 (d, 1H, ³J = 7.90 Hz, 5'-CONH); 8.27 (t, 1H, ³J = 5.35 Hz, CONH); 8.23 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-6); 5.88 (d, 1H, ³J = 6.60 Hz, H-1'); 5.68 (d, 1H, ³J = 8.15 Hz, H-5); 5.45 (br s, 2H, 2'-OH und 3'-OH); 4.60 (dd, 1H, ³J = 6.95 Hz und ³J = 7.90 Hz, N-CH, Asp); 4.23 (d, 1H, ³J = 2.55 Hz, H-4'); 4.14 (dd, 1H, ³J = 4.70 Hz und ³J = 1.90 Hz, H-2'); 4.10 - 4.03 (m, 4H, 2 x O-CH₂); 3.99 (dd, 1H, ³J = 2.55 Hz und ³J = 4.75 Hz, H-3'); 3.30 (dt, 2H, ³J = 7.30 Hz und ³J = 7.80 Hz, N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 2.70 (AB-System mit A dd

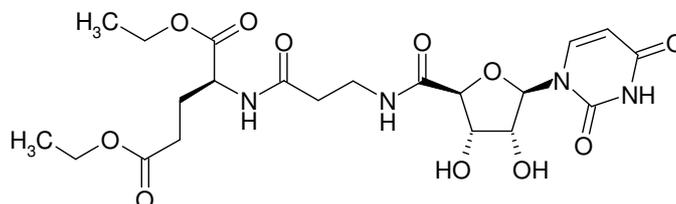
und B dd, 1H, $^3J = 6.60$ Hz und $^2J = 16.40$ Hz, O=C-CH₂, Asp); 2.31 (t, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 1.15 (2 x t, 6H, 2 x CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.6 (C=O); 170.4 (C=O); 170.0 (C=O); 163.2 (C-4); 151.1 (C-2); 141.4 (C-6); 102.2 (C-5); 87.9 (C-1'); 83.2 (C-4'); 73.1 (C-2' und C-3'); 60.9 und 60.4 (2 x O-CH₂); 48.7 (N-CH, Asp); 36.1 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 35.4 (O=C-CH₂, Asp); 34.8 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 14.1 (2 x CH₃).

ESI-MS: 499.1 ([M-H]⁻), 501.0 ([M+H]⁺).

C₂₀H₂₈N₄O₁₁ · 0.5 H₂O ber.: C: 47.24 %; H: 5.71 %; N: 11.02 %
 gef.: C: 47.47 %; H: 5.67 %; N: 10.93 %

6.4.6 2-[3-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)propanamido]-(*S*)-glutaminsäurediethylester (159)



Die Synthese des Riburonsäureamides aus **84** und **118** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 170 mg (33 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 152 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 17.0 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Wasser, Methanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

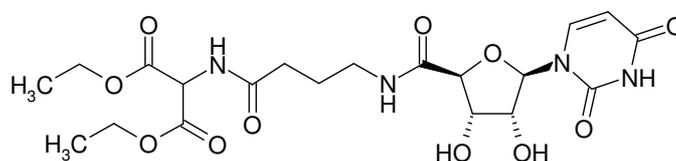
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.29 (d, 1H, ⁴J = 1.55 Hz, NH, Uracil); 8.26 (d, 1H, ³J = 7.25 Hz, CONH); 8.24 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-6); 5.88 (d, 1H, ³J = 6.60 Hz, H-1'); 5.68 (dd, 1H, ³J = 8.20 Hz und ⁴J = 2.20 Hz, H-5); 5.47 (d, 1H, ³J = 5.95 Hz, 2'-OH); 5.46 (d, 1H, ³J = 4.70 Hz, 3'-OH); 4.24 (d, 1H, ³J = 2.55 Hz, H-4'); 4.21 (dt, 1H, ³J = 5.35 Hz, N-CH, Glu); 4.14 (pseudo-q, 1H, ³J = 6.00 Hz and ³J = 5.00 Hz and ³J = 6.00 Hz, H-2'); 4.12-4.02 (m, 4H, 2 x O-CH₂); 3.99 (ddd, 1H, ³J = 2.50 Hz und ³J = 4.75 Hz und ³J = 4.70 Hz, H-3'); 3.26 (t, 2H, ³J = 5.05 Hz, N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 2.35 (m, 4H, O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid und O=C-CH₂, Glu); 1.95 - 1.81 (m, 2H, ³J = 6.60 Hz, CH₂, Glu); 1.16 (2 x t, 6H, 2 x CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 172.2 (C=O); 171.8 (C=O); 170.7 (C=O); 169.8 (C=O); 163.2 (C-4); 151.1 (C-2); 141.4 (C-6); 102.2 (C-5); 88.0 (C-1'); 83.2 (C-4'); 73.1 (C-2'); 73.0 (C-3'); 60.7 und 60.5 (2 x O-CH₂); 51.3 (N-CH, Glu); 35.3 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 34.7 (O=C-CH₂, Glu); 30.0 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 26.2 (CH₂, Glu); 14.2 und 14.1 (2 x CH₃).

ESI-MS: 513.0 ([M-H]⁻), 515.0 ([M+H]⁺).

C ₂₁ H ₃₀ N ₄ O ₁₁ · H ₂ O	ber.:	C: 47.72 %;	H: 6.06 %;	N: 10.60 %
	gef.:	C: 47.69 %;	H: 5.87 %;	N: 10.47 %

6.4.7 2-[4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)butanamido]malonsäurediethylester (**160**)



Die Synthese des Riburonsäureamides aus **84** und **119** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 320 mg (61 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 135 °C

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Wasser, Methanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

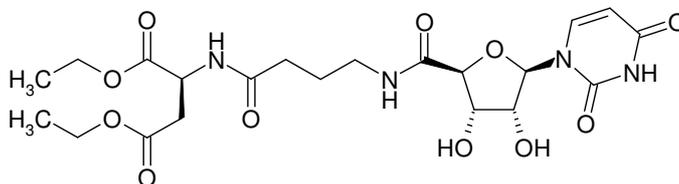
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.29 (br s, 1H, NH, Uracil); 8.73 (d, 1H, ³J = 6.60 Hz, CONH); 8.31 (t, 1H, ³J = 6.90 Hz, 5'-CONH); 8.28 (d, 1H, ³J = 7.90 Hz, H-6); 5.87 (d, 1H, ³J = 6.30 Hz, H-1'); 5.68 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-5); 5.49 (2 x d, 1H, ³J = 6.00 Hz, 2'-OH und ³J = 5.05 Hz, 3'-OH); 5.07 (d, 1H, ³J = 7.55 Hz, N-CH, Aminomalonat); 4.24 (d, 1H, ³J = 2.50 Hz, H-4'); 4.22 – 4.11 (m, 5H, 2 x O-CH₂ und H-2'); 3.99 (ddd, 1H, ³J = 2.85 Hz und ³J = 4.70 Hz und ³J = 4.70 Hz, H-3'); 3.08 (dt, 2H, ³J = 6.95 Hz und ³J = 7.25 Hz, N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 2.22 (t, 2H, ³J = 7.25 Hz, O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.65 (tt, 2H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.18 (t, 6H, 2 x CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 172.3 (C=O); 170.0 (C=O); 169.9 (C=O); 163.6 (C-4); 151.1 (C-2); 141.4 (C-6); 102.1 (C-5); 88.2 (C-1'); 83.3 (C-4); 73.3 (C-2'); 73.1 (C-3'); 63.5 (2 x O-CH₂); 56.3 (N-CH, Aminomalonat); 38.3 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 32.2 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 25.2 (CH₂, 4-Amidobutanamid); 14.0 (2 x CH₃).

ESI-MS: 499.0 ([M-H]⁻), 501.0 ([M+H]⁺).

C ₂₀ H ₂₈ N ₄ O ₁₁ · 1.5 H ₂ O	ber.:	C: 48.00 %;	H: 5.64 %;	N: 11.19 %
	gef.:	C: 48.00 %;	H: 5.85 %;	N: 11.01 %

6.4.8 2-[4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)butanamido]-(*S*)-asparginsäurediethylester
(161)



Die Synthese des Riburonsäureamides aus **84** und **120** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 272 mg (53 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 256 °C

[α]_D²⁰: - 7.20 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Wasser, Methanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.27 (d, 1H, ³J = 1.55 Hz, NH, Uracil); 8.34 (d, 3H, ³J = 8.20 Hz, H-6); 8.30 (t, 1H, ³J = 7.25 Hz, CONH); 8.26 (d, 1H, ³J = 5.70 Hz, 5'-CONH); 5.86 (d, 1H, ³J = 6.30 Hz, H-1'); 5.68 (dd, 1H, ³J = 8.20 Hz und ⁴J = 2.20 Hz, H-5); 5.50 (d, 2H, ³J = 5.70 Hz, 2'-OH); 5.49 (d, 1H, ³J = 3.15 Hz, 3'-OH); 4.59 (dd, 1H, ³J = 7.25 Hz and ³J = 6.60 Hz, N-CH, Asp); 4.24 (d, 1H, ³J = 2.80 Hz, H-4'); 4.17 (pseudo-q, 1H, ³J = 5.65 Hz und 5.05 Hz und ³J = 5,70 Hz, H-2'); 4.10-4.02 (m, 4H, 2 x O-CH₂); 3.98 (pseudo-q, 1H, ³J = 5.70 Hz und ³J = 2.80 Hz und ³J = 3.15 Hz, H-3'); 3.08 (t, 2H, ³J = 6.65 Hz and ³J = 6.95 Hz, N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 2.77-2.63 (AB-System mit A dd und B dd, ³J = 6.30 Hz und ²J = 16.40 Hz, O=C-CH₂, Asp); 2.11 (t, 2H, ³J = 7.25 Hz, O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.63 (tt, 2H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.18-1.13 (2 x t, 6H, 2 x CH₃).

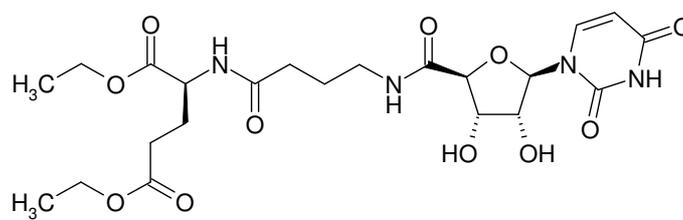
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 171.9 (C=O); 170.8 (C=O); 170.0 (C=O); 169.9 (C=O); 163.2 (C-4); 151.1 (C-2); 141.4 (C-6); 102.1 (C-5); 88.3 (C-1'); 83.3 (C-4'); 73.3 (C-2'); 73.1 (C-3'); 60.9 und 60.4 (2 x O-CH₂); 48.7 (N-CH, Asp); 38.3 (N-CH₂,

4-Amidobutanamid); 36.1 (O=C-CH₂, Asp); 32.6 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 25.2 (CH₂, 4-Amidobutanamid); 14.1 (2 x CH₃).

ESI-MS: 512.8 ([M-H]⁻), 515.0 ([M+H]⁺).

C₂₁H₃₀N₄O₁₁ · 3.5 H₂O ber.: C: 48.81 %; H: 5.97 %; N: 9.54 %
 gef.: C: 48.66 %; H: 5.61 %; N: 9.70 %

6.4.9 2-[4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)butanamido]-(*S*)-glutaminsäurediethylester
(162)



Die Synthese des Riburonsäureamides aus **84** und **121** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 296 mg (56 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 132 °C

[α]_D²⁰: - 11.1 (Wasser)

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.29 (d, 1H, ⁴J = 1.90 Hz, NH, Uracil); 8.31 (t, 1H, ³J = 5.65 Hz, 5'-CONH); 8.28 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-6); 8.18 (d, 1H, ³J = 7.55 Hz, CONH); 5.86 (d, 1H, ³J = 6.30 Hz, H-1'); 5.68 (dd, 1H, ³J = 7.85 Hz und ⁴J = 2.20 Hz, H-5); 5.49 (d, 1H, ³J = 5.65 Hz, 2'-OH); 5.48 (d, 1H, ³J = 4.75 Hz, 3'-OH); 4.24 (d, 1H, ³J = 2.55 Hz, H-4'); 4.21 (dt, 1H, ³J = 7.55 Hz und ³J = 5.35 Hz, N-CH, Glu); 4.16

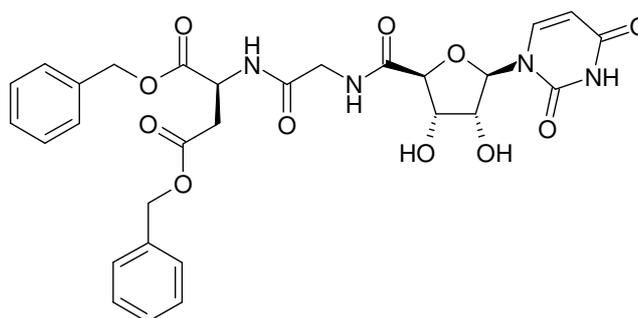
(pseudo-q, 1H, $^3J = 6.00$ Hz und $^3J = 4.70$ Hz und $^3J = 6.00$ Hz, H-2'); 4.09-4.02 (m, 4H, 2 x O-CH₂); 3.99 (ddd, 1H, $^3J = 2.55$ Hz und $^3J = 4.90$ Hz und $^3J = 4.45$ Hz, H-3'); 3.09 (dt, 2H, $^3J = 6.65$ Hz, N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 2.34 (t, 2H, $^3J = 6.60$ Hz, O=C-CH₂, Glu); 2.12 (t, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.96 und 1.86 (2 x m, 2 x 1H, $^3J = 6.60$ Hz, CH₂, Glu); 1.63 (tt, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.16 (2 x t, 6H, 2 x CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) 172.2 (C=O); 172.1 (C=O); 170.0 (C=O); 163.2 (C-4); 151.1 (C-2); 141.4 (C-6); 102.1 (C-5); 88.2 (C-1'); 83.3 (C-4'); 73.3 (C-2'); 73.1 (C-3'); 60.6 und 60.1 (2 x O-CH₂); 51.3 (N-CH, Glu); 38.4 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 32.6 (O=C-CH₂, Glu); 30.0 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 26.2 (CH₂, Glu); 25.2 (CH₂, 4-Amidobutanamid); 14.1 (2 x CH₃).

ESI-MS: 527.0 ([M-H]⁻), 529.0 ([M+H]⁺).

C ₂₂ H ₃₂ N ₄ O ₁₁ · 1.5 H ₂ O	ber.:	C: 47.57 %;	H: 6.31 %;	N: 10.09 %
	gef.:	C: 47.76 %;	H: 6.32 %;	N: 9.67 %

6.4.10 2-[2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)ethanamido]-(*S*)-asparaginsäure-dibenzylester (**163**)



Die Synthese des Riburonsäureamides aus **84** und **122** gelang nach Vorschrift F mit HCTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 250 mg (41 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 187 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 16.3 (Methanol)

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Methanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

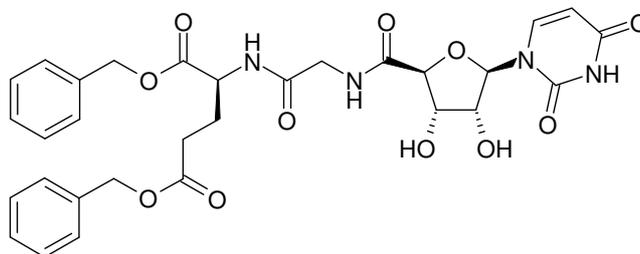
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.30 (s, 1H, NH, Uracil); 8.51 (d, 1H, $^3J = 8.20$ Hz, H-6); 8.47 (t, 1H, $^3J = 5.70$ Hz, 5'-CONH); 8.22 (d, 1H, $^3J = 7.90$ Hz, CONH); 7.37 – 7.31 (m, 10H, 10 x $\text{CH}_{\text{Phenyl}}$); 5.93 (d, 1H, $^3J = 6.95$ Hz, H-1'); 5.63 (d, 1H, $^3J = 8.20$ Hz, H-5); 5.52 und 5.51 (2 x br s, 2H, 2'-OH und 3'-OH); 5.08 und 5.07 (2 x s, 2 x 2H, 2 x O- CH_2); 4.74 (dt, 1H, $^3J = 6.60$ Hz und $^3J = 7.55$ Hz, N-CH, Asp); 4.36 (d, 1H, $^3J = 1.90$ Hz, H-4'); 4.15 (br s, H-2'); 4.07 (br s, H-3'); 3.78 (d, 2H, $^3J = 6.00$ Hz, N- CH_2 , 2-Amidoethanamid); 2.85 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, $^3J = 6.90$ Hz und $^2J = 16.70$ Hz, O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, Asp).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 170.5 (C=O); 170.4 (C=O); 169.9 (C=O); 168.7 (C=O); 163.2 (C-4); 151.2 (C-2); 141.4 (C-6); 135.9 und 135.8 (2 x O- CH_2 - $\underline{\text{C}}_{\text{Phenyl}}$); 128.5 – 127.8 (10 x $\text{CH}_{\text{Phenyl}}$); 102.3 (C-5); 87.7 (C-1'); 83.2 (C-4'); 73.2 (C-2'); 72.9 (C-3'); 66.5 und 66.1 (O- CH_2); 48.8 (N-CH, Asp); 41.6 (N- CH_2 , 2-Amidoethanamid); 35.9 (O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, Asp).

ESI-MS: 608.8 ($[\text{M}-\text{H}]^-$), 611.0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

$\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{11} \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$	ber.:	C: 53.13 %;	H: 5.34 %;	N: 8.55 %
	gef.:	C: 52.87 %;	H: 5.43 %;	N: 8.36 %

6.4.11 2-[2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)ethanamido]-(*S*)-glutaminsäure-dibenzylester (**164**)



Die Synthese des Riburonsäureamides aus **84** und **123** gelang nach Vorschrift F mit HCTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 220 mg (35 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 176 °C

[α]_D²⁰: - 21.7 (Methanol)

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Methanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.30 (br s, 1H, NH, Uracil); 8.44 (t, 1H, ³J = 6.00 Hz, 5'-CONH); 8.39 (d, 1H, ³J = 7.55 Hz, CONH); 8.23 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-6); 7.37 – 7.29 (m, 10H, 10 x CH_{Phenyl}); 5.93 (d, 1H, ³J = 6.95 Hz, H-1'); 5.63 (d, 1H, ³J = 7.90 Hz, H-5'); 5.52 (d, 1H, ³J = 4.40 Hz, 3'-OH); 5.50 (d, 1H, ³J = 5.65 Hz, 2'-OH); 5.11 und 5.07 (2 x s, 2 x 2H, 2 x O-CH₂); 4.37 (dt, 1H, ³J = 5.35 Hz und ³J = 7.55 Hz, N-CH, Glu); 4.35 (d, 1H, ³J = 1.85 Hz, H-4'); 4.14 (pseudo-q, 1H, ³J = 5.70 Hz und ³J = 5.35 Hz und ³J = 5.65 Hz, H-2'); 4.07 (br s, 1H, H-3'); 3.79 (d, 2H, ³J = 5.65 Hz, N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 2.43 (m, 2H, ³J = 7.85 Hz, O=C-CH₂, Glu); 2.04 und 1.88 (2 x m, 2 x 1H, ³J = 5.65 Hz und ³J = 7.90 Hz, 0.5 x CH₂, Glu).

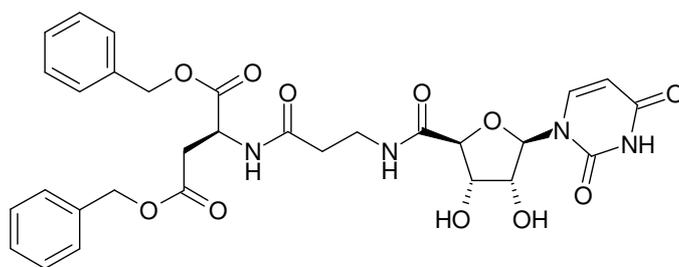
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 172.1 (C=O); 171.5 (C=O); 170.5 (C=O); 168.9 (C=O); 163.2 (C-4); 151.2 (C-2); 141.4 (C-6); 136.2 und 136.0 (2 x O-CH₂-C_{Phenyl}); 128.6 – 127.9 (10 x CH_{Phenyl}); 102.3 (C-5); 87.7 (C-1'); 83.2 (C-2'); 73.2 (C-2'); 72.9

(C-3'); 66.2 und 65.7 (2 x O-CH₂); 51.4 (N-CH, Glu); 41.5 (N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 29.9 (O=C-CH₂, Glu); 26.3 (CH₂, Glu).

ESI-MS: 637.0 ([M-H]⁻), 638.8 ([M+H]⁺).

C₃₀H₃₂N₄O₁₁ · 3 H₂O ber.: C: 53.10 %; H: 5.61 %; N: 8.26 %
 gef.: C: 53.10 %; H: 5.39 %; N: 8.54 %

6.4.12 2-[3-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)propanamido]-(*S*)-asparaginsäuredibenzylester (**165**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **84** und **124** gelang nach Vorschrift F mit HBTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 132 mg (21 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 168 °C

[α]_D²⁰: - 12.3 (Methanol)

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Methanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.29 (br s, 1H, NH, Uracil); 8.48 (d, 1H, ³J = 7.85 Hz, H-6); 8.29 (t, 1H, ³J = 5.95 Hz, 5'-CONH); 8.24 (d, 1H, ³J = 8.15 Hz, CONH); 7.37 - 7.30 (m, 10H, 10 x CH_{Phenyl}); 5.88 (d, 1H, ³J = 6.60 Hz, H-1'); 5.68 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-5); 5.08 und 5.06 (2 x s, 2 x 2H, 2 x O-CH₂); 4.72 (dt, 1H, ³J = 6.95 Hz und ³J =

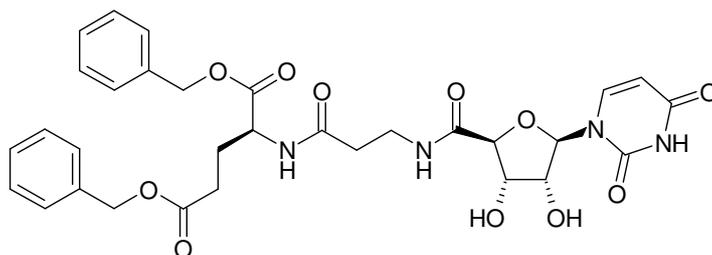
7.55 Hz, N-CH, Asp); 4.25 (d, 1H, $^3J = 2.50$ Hz, H-4'); 4.15 (dd, 1H, $^3J = 4.75$ Hz und $^3J = 6.65$ Hz, H-2'), 4.00 (dd, 1H, $^3J = 4.70$ Hz und $^3J = 2.50$ Hz, H-3'); 3.27 (dt, 2H, $^3J = 7.25$ Hz und $^3J = 6.95$ Hz, N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 2.90 – 2.75 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, $^3J = 6.30$ Hz und $^2J = 16.40$ Hz, O=C-CH₂, Asp); 2.31 (t, 2H, $^3J = 6.90$ Hz, O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 170.6 (C=O); 170.5 (C=O); 170.0 (C=O); 169.9 (C=O); 163.2 (C-4); 151.1 (C-2); 141.3 (C-6); 136.0 und 135.9 (2 x CH₂-C_{Phenyl}); 128.5 – 127.8 (10 x C_{phenyl}); 102.2 (C-5); 88.0 (C-1'); 83.2 (C-4'); 73.1 (C-2' und C-3'); 66.4 und 66.0 (O-CH₂); 48.7 (N-CH, Asp); 36.0 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 35.4 (O=C-CH₂, Asp); 34.8 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid).

ESI-MS: 622.8 ([M-H]⁻), 624.8 ([M+H]⁺).

C ₃₀ H ₃₂ N ₄ O ₁₁ · 4.5 H ₂ O	ber.:	C: 51.06 %;	H: 5.81 %;	N: 7.94 %
	gef.:	C: 50.80 %;	H: 5.13 %;	N: 7.87 %

6.4.13 2-[3-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)propanamido]-(*S*)-glutaminsäure-dibenzylester (**166**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **84** und **125** gelang nach Vorschrift F mit HBTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 110 mg (18 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 170 °C

[α]_D²⁰: - 18.2 (Methanol)

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Methanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

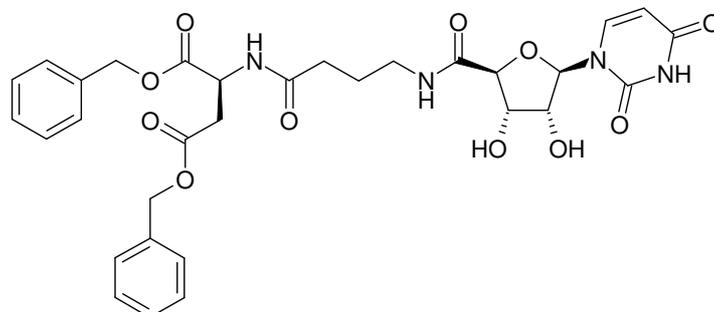
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.29 (br s, NH, Uracil); 8.34 (d, 1H, ³J = 7.55, CONH); 8.30 (t, 1H, ³J = 5.70 Hz, 5'-CONH); 8.25 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-6); 7.37 – 7.30 (m, 10H, 10 x CH_{phenyl}); 5.88 (d, 1H, ³J = 6.35 Hz, H-1'); 5.68 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-5); 5.10 und 5.07 (2 x s, 2 x 2H, 2 x O-CH₂); 4.32 (dt, 1H, ³J = 5.05 Hz und ³J = 8.20 Hz, N-CH, Glu); 4.25 (d, 1H, ³J = 2.20 Hz, H-4'); 4.15 (dd, 1H, ³J = 4.70 Hz und ³J = 6.60 Hz, H-2'); 4.00 (dd, 1H, ³J = 2.20 Hz und ³J = 4.70 Hz, H-3'); 3.28 (dt, 2H, ³J = 6.95 Hz und ³J = 5.65 Hz, N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 2.42 (t, 2H, ³J = 7.55 Hz, O=C-CH₂, Glu); 2.34 (t, 2H, ³J = 6.95 Hz, O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 2.00 und 1.86 (2 x m, 2 x 1H, ³J = 7.60 Hz und ³J = 5.95 Hz, CH₂, Glu).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 172.1 (C=O); 171.7 (C=O); 170.8 (C=O); 170.0 (C=O); 163.2 (C-4); 151.1 (C-2); 141.4 (C-6); 136.2 und 136.0 (2 x O-CH₂-C_{Phenyl}); 128.5 – 127.9 (10 x CH_{Phenyl}); 102.2 (C-5); 88.0 (C-1'); 83.2 (C-4'); 73.1 (C-2' und C-3'); 66.1 und 65.7 (2 x O-CH₂); 51.4 (N-CH, Glu); 35.4 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 34.7 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 30.0 (O=C-CH₂, Glu); 26.1 (CH₂, Glu).

ESI-MS: 637.0 ([M-H]⁻), 639.0 ([M+H]⁺).

C ₃₁ H ₃₄ N ₄ O ₁₁ · 7 H ₂ O	ber.:	C: 48.81 %;	H: 6.30 %;	N: 7.35 %
	gef.:	C: 48.33 %;	H: 6.00 %;	N: 7.77 %

6.4.14 2-[4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)butanamido]-(*S*)-asparginsäure-dibenzylester (**167**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **84** und **126** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 430 mg (68 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 169 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: - 16.4 (Methanol)

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Methanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6), δ 11.29 (d, 1H, $^4\text{J} = 1.55$ Hz, NH, Uracil); 8.38 (d, 1H, $^3\text{J} = 7.85$ Hz, CONH); 8.31 (t, 1H, $^3\text{J} = 5.65$ Hz, 5'-CONH); 8.28 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.20$ Hz, H-6); 7.36 – 7.30 (m, 10H, 10 x $\text{CH}_{\text{phenyl}}$); 5.87 (d, 1H, $^3\text{J} = 6.35$ Hz, H-1'); 5.67 (dd, 1H, $^3\text{J} = 8.20$ Hz und $^4\text{J} = 1.90$ Hz, H-5); 5.49 (br s, 2H, 2'-OH und 3'-OH); 5.08 und 5.07 (2 x s, 2 x 2H, 2 x O- CH_2); 4.71 (dt, 1H, $^3\text{J} = 6.30$ Hz und $^3\text{J} = 7.90$ Hz, N-CH, Asp); 4.25 (d, 1H, $^3\text{J} = 2.50$ Hz, H-4'); 4.17 (br s, H-2'); 3.99 (br s, H-3'); 3.07 (dt, 2H, $^3\text{J} = 6.90$ Hz und $^3\text{J} = 6.00$ Hz, N- CH_2 , 4-Amidobutanamid); 2.82 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, $^3\text{J} = 7.55$ Hz und $^2\text{J} = 16.35$ Hz, O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, Asp); 2.10 (t, 2H, $^3\text{J} = 6.90$ Hz, O=C- $\underline{\text{CH}_2}$, 4-Amidobutanamid); 1.61 (tt, 2H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, CH_2 , 4-Amidobutanamid).

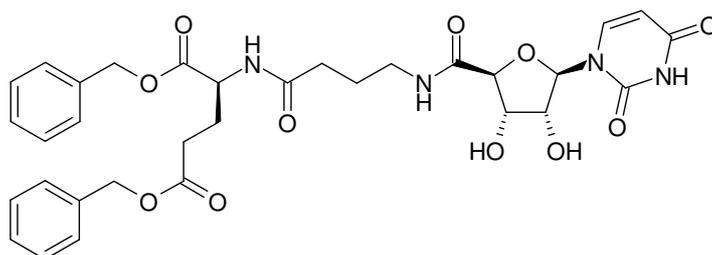
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6), δ 172.0 (C=O); 170.7 (C=O); 170.0 (C=O); 169.9 (C=O); 163.2 (C-4); 151.1 (C-2); 141.4 (C-6); 136.0 und 135.9 (2 x O- CH_2 - $\underline{\text{C}}_{\text{Phenyl}}$);

128.5 – 127.9 (10 x CH_{Phenyl}); 105.2 (C-5); 94.3 (C-1'); 85.6 (C-4'); 73.3 (C-2'); 73.1 (C-3'); 66.4 und 66.0 (2 x O-CH₂); 51.9 (N-CH, Asp); 41.3 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 38.8 (O=C-CH₂, Asp), 35.6 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 27.4 (CH₂, 4-Amidobutanamid).

ESI-MS: 637.0 ([M-H]⁻), 638.8 ([M+H]⁺).

C ₃₁ H ₃₄ N ₄ O ₁₁ · 2 H ₂ O	ber.:	C: 55.19 %;	H: 5.64 %;	N: 8.31 %
	gef.:	C: 55.09 %;	H: 5.30 %;	N: 8.60 %

6.4.15 2-[4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)butanamido]-(*S*)-glutaminsäure-dibenzylester (**168**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **84** und **127** gelang nach Vorschrift F mit HBTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet.

Ausbeute: 420 mg (64 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 160 °C

[α]_D²⁰: - 23.8 (Methanol)

Aussehen: Farblose Kristalle

Leicht löslich in: Methanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ 11.29 (d, 1H, ⁴J = 1.90 Hz, NH, Uracil); 8.31 (t, 1H, ³J = 5.70 Hz, 5'-CONH); 8.28 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-6); 8.24 (d, 1H, ³J = 7.60 Hz,

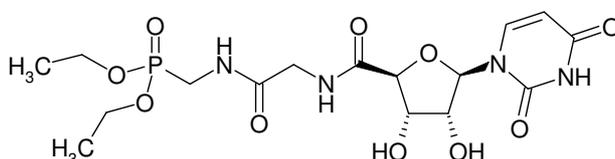
CONH); 7.37 – 7.30 (m, 10H, 10 x CH_{phenyl}); 5.87 (d, 1H, ³J = 6.30 Hz, H-1'); 5.67 (dd, 1H, ³J = 8.20 Hz und ⁴J = 2.20 Hz, H-5); 5.55 (br s, 2H, 2'-OH und 3'-OH); 5.10 und 5.07 (2x s, 2 x 2H, 2 x O-CH₂); 4.31 (dt, 1H, ³J = 5.35 Hz und ³J = 7.55 Hz, N-CH, Glu); 4.25 (d, 1H, ³J = 2.85 Hz, H-4'); 4.17 (dd, 1H, ³J = 4.75 Hz und ³J = 6.30 Hz, H-2'); 3.98 (dd, 1H, ³J = 2.85 Hz und ³J = 4.40 Hz, H-3'); 3.07 (dt, 2H, ³J = 6.60 Hz, N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 2.42 (t, 2H, ³J = 7.25 Hz, O=C-CH₂, Glu); 2.12 (t, 2H, ³J = 7.25 Hz, O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 2.01 und 1.84 (2 x m, 2 x 1H, ³J = 5.65 Hz und ³J = 7.25 Hz, Glu); 1.62 (tt, 2H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, 4-Amidobutanamid).

¹³C-NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ 172.3 (C=O); 172.1 (C=O); 171.8 (C=O); 170.0 (C=O); 163.2 (C-4); 151.1 (C-2); 141.4 (C-6); 136.2 und 136.1 (2 x O-CH₂-C_{phenyl}); 128.5 – 127.9 (10 x CH_{phenyl}); 102.1 (C-5); 88.2 (C-1'); 83.3 (C-4'); 73.3 (C-2'); 73.1 (C-3'); 66.1 und 65.7 (2 x O-CH₂); 51.4 (N-CH, Glu); 38.4 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 32.6 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 30.0 (O=C-CH₂, Glu); 26.1 (CH₂, Glu); 25.2 (CH₂, 4-Amidobutanamid).

ESI-MS: 651.0 ([M-H]⁻), 653.0 ([M+H]⁺).

C ₃₂ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ · H ₂ O	ber.:	C: 57.31 %;	H: 5.67 %;	N: 8.36 %
	gef.:	C: 57.12 %;	H: 5.55 %;	N: 8.55 %

6.4.16 2-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]ethanamidomethylphosphonsäurediethylester
(147)



Die Synthese des Riburonsäureamides aus **84** und **103** gelang nach Vorschrift F mit HCTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 190 mg (41 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 105 °C

HPLC: $t_r = 8,06$ Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ 8.10 (d, 1H, $^3\text{J} = 7.85$ Hz, H-6); 5.91 (d, 1H, $^3\text{J} = 5.95$ Hz, H-1'); 5.77 (d, 1H, $^3\text{J} = 7.85$ Hz, H-5); 4.50 (dd, 1H, $^3\text{J} = 5.35$ Hz und $^3\text{J} = 5.70$ Hz, H-2'); 4.48 (d, 1H, $^3\text{J} = 2.85$ Hz, H-4'); 4.44 (dd, 1H, $^3\text{J} = 5.0$ Hz und $^3\text{J} = 3.15$ Hz, H-3'); 4.22 – 4.15 (2 x q, 4H, 2 x O-CH₂); 4.10 – 3.83 (AB-System mit A d und B d, 2H, $^2\text{J} = 17.00$ Hz, N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 3.84 – 3.72 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, $^2\text{J}_{\text{H,P}} = 11.65$ Hz und $^2\text{J} = 15.75$ Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 1.35 (2 x t, 6H, 2 x CH₃).

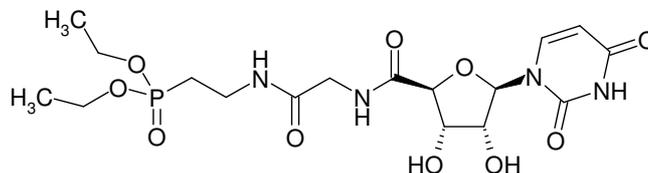
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ 173.2 (C=O); 171.6 (C=O); 166.4 (C-4); 153.1 (C-2); 144.9 (C-6); 103.5 (C-5); 93.9 (C-1'); 85.7 (H-4'); 74.9 (H-2'); 74.2 (H-3'); 64.5 (2 x O-CH₂); 43.4 (N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 35.7 (d, $^1\text{J}_{\text{C,P}} = 157.6$ Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 17.0 (2 x CH₃).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, MeOD) δ 22.1.

ESI-MS: 463.1 ([M-H]⁻), 465.3 ([M+H]⁺).

$\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{P} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	ber.:	C: 38.34 %;	H: 5.79 %;	N: 11.18 %
	gef.:	C: 38.35 %;	H: 5.96 %;	N: 11.25 %

6.4.17 2-[2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)ethanamido]ethylphosphonsäure-diethylester (**153**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **84** und **106** gelang nach Vorschrift F mit HCTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 228 mg (48 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 131 °C

HPLC: $t_r = 9,42$ Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ 8.12 (d, 1H, $^3J = 8.20$ Hz, H-6); 5.93 (d, 1H, $^3J = 5.95$ Hz, H-1'); 5.78 (d, 1H, $^3J = 8.20$ Hz, H-5); 4.48 (dd, 1H, $^3J = 5.35$ Hz und $^3J = 6.00$ Hz, H-2'); 4.48 (d, 1H, $^3J = 3.15$ Hz, H-4'); 4.40 (dd, 1H, $^3J = 5.05$ Hz und $^3J = 3.20$ Hz, H-3'); 4.19 – 4.12 (2 x q, 4H, 2 x O-CH₂); 4.01 - 3.83 (AB-System mit A d und B d, 2H, $^2J = 16.70$ Hz, N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 3.50 (m, 2H, $^3J = 7.55$ Hz und $^3J_{\text{H,P}} = 12.95$ Hz, N-CH₂, Aminoethylphosphonat); 2.16 – 2.09 (m, 2H, $^3J_{\text{X,A}} = 7.55$ und $^2J_{\text{H,P}} = 18.35$ Hz, CH₂-P, Aminoethylphosphonat); 1.37 (t, 6H, 2 x CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ 173.2 (C=O); 171.6 (C=O); 166.4 (C-4); 153.0 (C-2); 144.6 (C-6); 103.4 (C-5); 93.1 (C-1'); 85.4 (C-4'); 74.8 (C-2'); 74.1 (C-3'); 63.8 (2 x O-CH₂); 43.5 (N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 34.9 (N-CH₂, Aminoethylphosphonat); 26.5 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 138.3$ Hz, CH₂-P, Aminoethylphosphonat); 17.0 (2 x CH₃).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, MeOD) δ 28.8.

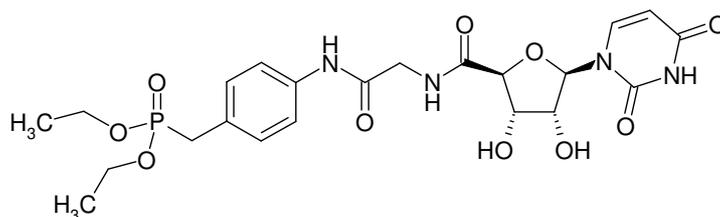
ESI-MS: 477.1 ([M-H]⁻), 479.0 ([M+H]⁺).

C₁₇H₂₇N₄O₁₀P

ber.: C: 42.68 %; H: 5.69 %; N: 11.71 %

gef.: C: 42.54 %; H: 5.76 %; N: 11.56 %

6.4.18 4-[2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)ethanamido]benzylphosphonsäurediethylester (**144**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **84** und **107** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 310 mg (57 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 159 °C

HPLC: t_r = 33,20 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, MeOD) δ 8.18 (d, 1H, ³J = 7.90 Hz, H-6); 7.58 (d, 2H, ³J = 8.85 Hz, 2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 7.31 (dd, 2H, ³J = 8.80 Hz und ⁴J = 2.80 Hz, 2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 6.02 (d, 1H, ³J = 6.30 Hz, H-1'); 5.78 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-5); 4.51 (d, 1H, ³J = 3.20 Hz, H-4'); 4.47 (dd, 1H, ³J = 5.05 Hz und ³J = 5.95 Hz, H-2'); 4.41 (dd, 1H, ³J = 3.20 Hz und ³J = 5.05 Hz, H-3'); 4.19 – 4.01 (AB-system mit A d und B d, teilweise überlappend mit 2 x O-CH₂, 2H, ²J = 16.35 Hz, N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 4.09 – 4.01 (2 x q, 4H, 2 x O-CH₂); 3.25 (d, 2H, ²J_{H,P} = 21.45 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 1.29 (t, 6H, 2 x CH₃).

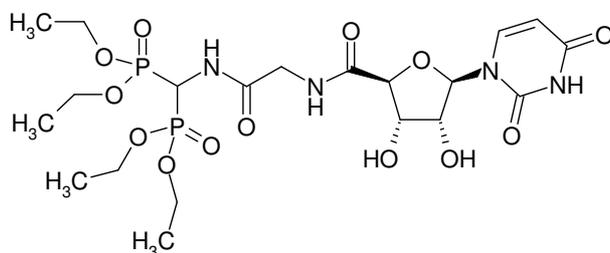
¹³C-NMR (125 MHz, MeOD) δ 173.2 (C=O); 169.5 (C=O); 166.4 (C-4); 153.1 (C-2); 144.3 (C-6); 138.9 (C-NH, Benzylphosphonat); 131.7 (2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 128.7 (d, ²J_{C,P} = 9.4 Hz, C-CH₂-P, Benzylphosphonat); 121.5 (2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 103.5 (C-5); 92.2 (C-1'); 85.3 (C-4); 74.9 (C-2); 74.1 (C-3); 64.1 und 64.0 (2 x O-CH₂); 43.9 (N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 33.4 (d, ¹J_{C,P} = 137.5 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 17.0 und 16.9 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, MeOD) δ 26.7.

ESI-MS: 539.3 ([M-H]⁻), 541.0 ([M+H]⁺).

C₂₂H₂₉N₄O₁₀P · 4.25 H₂O ber.: C: 42.82 %; H: 6.08 %; N: 9.08 %
gef.: C: 42.67 %; H: 5.60 %; N: 8.82 %

6.4.19 2-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]ethanamidomethylendiphosphonsäuretetraethylester (**150**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **84** und **110** gelang nach Vorschrift F mit HCTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 240 mg (40 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 119 °C

HPLC: t_r = 12,20 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ 11.30 (d, 1H, ³J = 1.85 Hz, NH, Uracil); 8.74 (d, 1H, ³J = 9.80 Hz, CONH); 8.51 (t, 1H, ³J = 5.65 Hz, 5'-CONH); 8.23 (d, 1H, ³J = 8.15 Hz, H-6); 5.92 (d, 1H, ³J = 6.90 Hz, H-1'); 5.62 (dd, 1H, ³J = 7.90 Hz und ⁴J = 2.20 Hz, H-5); 5.52 (br s, 2H, 2'-OH und 3'-OH); 4.82 (td, 1H, ³J = 9.75 Hz und ²J_{H,P} = 22.35 Hz, N-CH, Methylbisphosphonat); 4.35 (d, 1H, ³J = 1.90 Hz, H-4'); 4.20 – 3.99 (br s, 10H, 4 x O-CH₂, H-2' und H-3'); 3.85 (AB-System mit A dd und B dd, 1H, ³J = 5.70 Hz und ²J = 17.30 Hz, N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 1.22 (br s, 12H, 4 x CH₃).

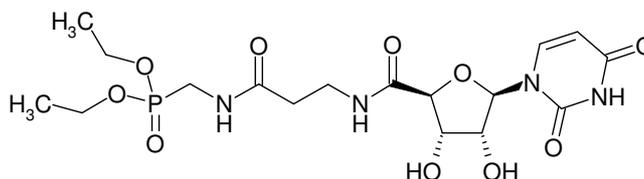
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆), δ 170.5 (C=O); 168.7 (C=O); 163.2 (C-4); 151.2 (C-2); 141.4 (C-6); 102.2 (C-5); 87.8 (C-1'); 83.2 (C-4'); 73.9 (C-2'); 72.2 (C-3'); 63.1 (4 x O-CH₂); 43.5 (t, teilweise vom Lösungsmittelsignal verdeckt, ¹J_{C,P} = 1455.5 Hz, N-CH, Methylbisphosphonat); N-CH₂ (2-Amidoethanamid) unter dem Lösungsmittel-signal bei 42 ppm, 16.3 (4 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-d₆), 15.8

ESI-MS: 598.8 ([M-H]⁻), 601.0 ([M+H]⁺).

C ₂₃ H ₃₁ N ₄ O ₁₀ P · 5 H ₂ O	ber.:	C: 34.78 %;	H: 5.38 %;	N: 8.12 %
	gef.:	C: 34.47 %;	H: 5.09 %;	N: 8.14 %

6.4.20 3-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]propanamidomethylphosphonsäurediethylester (**148**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **84** und **104** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 170 mg (36 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 94 °C

HPLC: t_r = 12,20 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ 8.13 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.20$ Hz, H-6); 5.91 (d, 1H, $^3\text{J} = 6.00$ Hz, H-1'); 5.79 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.20$ Hz, H-5); 4.44 (dd, 1H, $^3\text{J} = 5.05$ Hz und $^3\text{J} = 5.95$ Hz, H-2'); 4.38 (d, 1H, $^3\text{J} = 3.20$ Hz, H-4'); 4.28 (dd, 1H, $^3\text{J} = 5.05$ Hz und $^3\text{J} = 3.15$ Hz, H-3'); 4.21 – 4.15 (2 x q, 4H, 2 x O-CH₂); 3.74 (d, 2H, $^2\text{J}_{\text{H,P}} = 11.65$ Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 3.51 (m, 2H, $^3\text{J} = 6.65$ Hz, N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 2.53 (br m, 2H, $^3\text{J} = 6.60$ Hz, O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 1.37 (2 x t, 6H, 2 x CH₃).

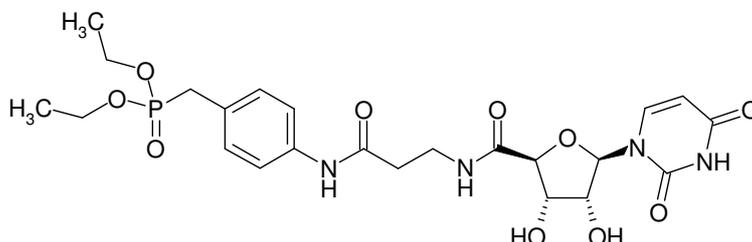
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ 173.7 (C=O); 172.6 (C=O); 166.8 (C-4); 153.2 (C-2); 144.5 (C-6); 103.4 (C-5); 92.8 (C-1'); 85.4 (C-4'); 74.9 (C-2'); 74.0 (C-3'); 64.4 (2 x O-CH₂); 37.1 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 36.4 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 35.7 (d, $^1\text{J}_{\text{C,P}} = 145.7$ Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 17.0 (2 x CH₃).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, MeOD) δ 24.6.

ESI-MS: 477.1 ([M-H]⁻), 479.0 ([M+H]⁺).

$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{P} \cdot 1.5 \text{H}_2\text{O}$	ber.:	C: 40.39 %;	H: 5.94 %;	N: 11.08 %
	gef.:	C: 40.17 %;	H: 5.60 %;	N: 11.25 %

6.4.21 4-[3-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)propanamido]benzylphosphonsäurediethylester (**145**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **84** und **108** gelang nach Vorschrift F mit HBTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 240 mg (43 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 255 °C

HPLC: t_r = 33,20 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ 8.08 (d, 1H, 3J = 8.20 Hz, H-6); 7.55 (d, 2H, 3J = 7.90 Hz, 2 x CH_{meta} , Benzylphosphonat); 7.29 (dd, 2H, 3J = 8.50 Hz und 4J = 2.85 Hz, 2 x CH_{ortho} , Benzylphosphonat); 5.92 (d, 1H, 3J = 6.30 Hz, H-1'); 5.72 (d, 1H, 3J = 7.90 Hz, H-5); 4.41 (dd, 1H, 3J = 5.05 Hz und 3J = 6.30 Hz, H-2'); 4.40 (d, 1H, 3J = 2.85, H-4'); 4.28 (dd, 1H, 3J = 5.05 Hz und 3J = 2.85 Hz, H-3'); 4.10 – 4.03 (m, 4H, 2 x O-CH_2); 3.69 – 3.56 (m, 2H, 3J = 6.30 Hz, N-CH_2 , 3-Amidopropanamid); 3.23 (d, 2H, $^2J_{\text{H,P}}$ = 21.45 Hz, $\text{CH}_2\text{-P}$, Benzylphosphonat); 2.65 (m, 2H, 3J = 6.30 Hz, O=C-CH_2 , 3-Amidopropanamid); 1.29 (t, 6H, 2 x CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ 172.6 (C=O), 172.2 (C=O), 166.3 (C-4), 152.9 (C-2), 144.3 (C-6), 139.1 ($\text{C}_{\text{phenyl-NH}}$, Benzylphosphonat), 131.7 (2 x CH_{meta} , Benzylphosphonat), 128.6 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 9.4 Hz, $\text{C-CH}_2\text{-P}$, Benzylphosphonat), 121.5 (2 x CH_{ortho} , Benzylphosphonat), 103.4 (C-5), 92.4 (C-1'), 85.4 (C-4), 74.9 (C-2'), 74.1 (C-

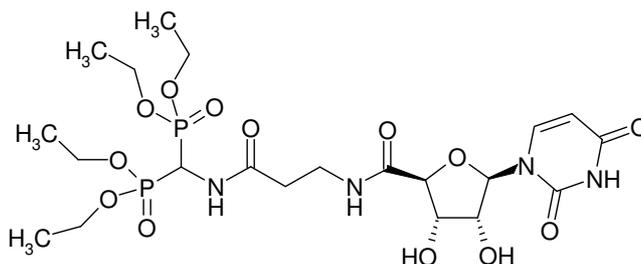
3'), 64.1 und 64.0 (2 x O-CH₂), 36.6 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid), 37.1 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid), 33.4 (d, ¹J_{C,P} = 137.6 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat), 16.9 und 16.8 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, MeOD) δ 26.8

LC/ESI-MS: 553.3 ([M-H]⁻), 555.3 ([M+H]⁺).

C ₂₃ H ₃₁ N ₄ O ₁₀ P · 4 H ₂ O	ber.:	C: 44.08 %;	H: 6.23 %;	N: 8.95 %
	gef.:	C: 43.92 %;	H: 5.99 %;	N: 8.81 %

6.4.22 3-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]propanamidomethylendiphosphonsäuretetraethylester (**151**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **84** und **111** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 166 mg (27 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 125 °C

HPLC: t_r = 15,20 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ 11.30 (d, 1H, ⁴J = 2.25 Hz, NH, Uracil); 8.74 (d, 1H, ³J = 10.05 Hz, CONH); 8.28 (t, 1H, ³J = 5.65 Hz, 5'-CONH); 8.23 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-6); 5.88 (d, 1H, ³J = 6.30 Hz, H-1'); 5.69 (dd, 1H, ³J = 7.90 Hz und ⁴J = 2.20 Hz, H-5'); 5.48 (br s, 2H, 2'-OH und 3'-OH); 4.86 (dt, 1H, ³J = 10.1 Hz und ²J_{P,H} = 22.70 Hz, Methylbisphosphonat); 4.23 (d, 1H, ³J = 2.20 Hz, H-4'); 4.16 (pseudo-t, 1H, ³J = 4.72 Hz und ³J = 6.60 Hz, H-2'); 4.02 (br s, 8H, 4 x O-CH₂); 3.99 (dd, 1H, ³J = 2.20 Hz und ³J = 4.70 Hz, H-3'); 3.40 - 3.20 (N-CH₂ (3-Amidopropanamid) nicht bestimmbar, unter H₂O-Signal); 2.44 (t, 2H, ³J = 6.95 Hz, O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 1.21 (m, 12H, 4 x CH₃).

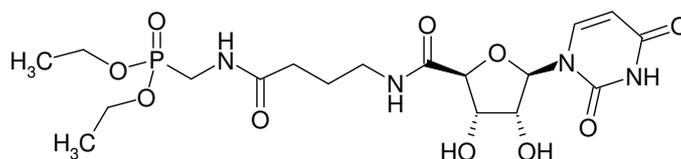
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆), δ 172.1 (C=O); 170.2 (C=O); 163.2 (C-4); 151.1 (C-2); 143.5 (C-6); 102.2 (C-5); 88.0 (C-1'); 83.2 (C-4'); 73.1 (C-2'); 73.0 (C-3'); 63.0 und 62.8 (4 x O-CH₂); 43.3 (t, teilweise vom Lösungsmittelsignal überlagert, ¹J = 145.0 Hz, N-CH, Methylbisphosphonat); 35.4 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 34.4 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 16.4 und 16.3 (4 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-d₆), 15.1.

ESI-MS: 612.8 ([M-H]⁻), 615.0 ([M+H]⁺).

C ₂₄ H ₃₃ N ₄ O ₁₀ P · 4 H ₂ O	ber.:	C: 36.73 %;	H: 6.41 %;	N: 8.16 %
	gef.:	C: 36.70 %;	H: 6.65 %;	N: 8.01 %

6.4.23. 4-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]butanamidomethylphosphonsäurediethylester (**149**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **84** und **105** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 310 mg (63 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 118 °C

HPLC: t_r = 12,50 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ 8.11 (d, 1H, $^3\text{J} = 7.85$ Hz, H-6), 5.84 (d, 1H, $^3\text{J} = 6.00$ Hz, H-1'), 5.78 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.20$ Hz, H-5), 4.50 (dd, 1H, $^3\text{J} = 5.05$ Hz und $^3\text{J} = 5.95$ Hz, H-2'), 4.39 (d, 1H, $^3\text{J} = 3.15$ Hz, H-4'), 4.27 (dd, 1H, $^3\text{J} = 5.05$ Hz und $^3\text{J} = 3.15$ Hz, H-3'), 4.20 – 4.15 (2 x q, 4H, 2 x O-CH₂), 3.75 (d, 2H, $^2\text{J}_{\text{H,P}} = 11.65$ Hz, CH₂-P, Methylphosphonat), 3.38 – 3.26 (m, teilweise unter dem Lösungsmittelsignal, 2H, $^3\text{J} = 6.95$ Hz, N-CH₂ 4-Amidobutanamid), 2.34 (t, 2H, $^3\text{J} = 7.55$ Hz, O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid), 1.88 (tt, 2H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz und $^3\text{J} = 6.95$ Hz, CH₂, 4-Amidobutanamid), 1.36 (2 x t, 6H, 2 x CH₃).

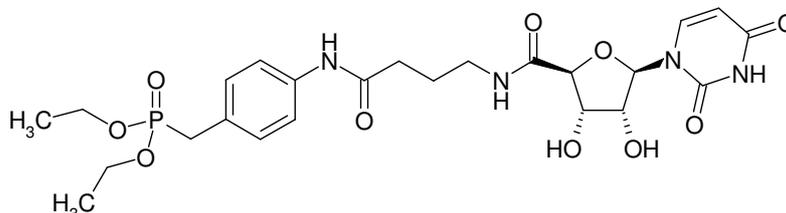
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ 175.5 (C=O), 172.7 (C=O), 166.4 (C-4), 153.0 (C-2), 144.9 (C-6), 103.3 (C-5), 93.6 (C-1'), 85.5 (C-4'), 74.9 (C-2'), 73.9 (C-3), 64.4 (2 x O-CH₂), 39.9 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid), 35.6 (d, $^1\text{J}_{\text{C,P}} = 156.8$ Hz, CH₂-P, Methylphosphonat), 34.3 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid), 26.8 (CH₂, 4-Amidobutanamid), 17.0 (2 x CH₃).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, MeOD) δ 24.6.

ESI-MS: 491.5 ([M-H]⁻), 493.1 ([M+H]⁺).

$\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{P} \cdot \text{H}_2\text{O}$	ber.:	C: 42.35 %;	H: 6.07 %;	N: 10.98 %
	gef.:	C: 42.17 %;	H: 5.88 %;	N: 10.79 %

6.4.24 4-[4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)butanamido]benzylphosphonsäure-diethylester (**146**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **84** und **109** gelang nach Vorschrift F mit HBTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 390 mg (69 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 248 °C

HPLC: t_r = 33,20 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ 8.11 (d, 1H, $^3J = 8.20$ Hz, H-6); 7.55 (d, 2H, $^3J = 7.90$ Hz, 2 x CH_{meta} , Benzylphosphonat); 7.28 (dd, 2H, $^3J = 8.50$ Hz und $^4J = 2.85$ Hz, 2 x CH_{ortho} , Benzylphosphonat); 5.86 (d, 1H, $^3J = 6.30$ Hz, H-1'); 5.75 (d, 1H, $^3J = 7.90$ Hz, H-5); 4.45 (dd, 1H, $^3J = 5.05$ Hz und $^3J = 6.30$ Hz, H-2'); 4.39 (d, 1H, $^3J = 2.85$, H-4'); 4.27 (dd, 1H, $^3J = 5.05$ Hz und $^2J = 2.85$ Hz, H-3'); 4.09 – 4.03 (2 x q, 4H, 2 x O- CH_2); 3.38 (t, teilweise unter dem Lösungsmittelsignal, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, N- CH_2 , 4-Amidobutanamid); 3.23 (d, 2H, $^2J_{\text{H,P}} = 21.45$ Hz, $\text{CH}_2\text{-P}$, Benzylphosphonat); 2.45 (t, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, O=C- CH_2 , 4-Amidobutanamid); 1.95 (tt, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, CH_2 , 4-Amidobutanamid); 1.29 (t, 6H, 2 x CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ 174.0 (C=O); 172.7 (C=O); 166.3 (C-4); 152.9 (C-2); 144.6 (C-6); 139.2 ($\text{C}_{\text{phenyl-NH}}$, Benzylphosphonat); 131.6 (2 x CH_{meta} , Benzylphosphonat); 128.5 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 9.4$ Hz, $\text{C-CH}_2\text{-P}$, Benzylphosphonat); 121.4 (2 x CH_{ortho} , Benzylphosphonat); 103.3 (C-5); 93.1 (C-1'); 85.4 (C-4); 74.8 (C-2); 74.1 (C-

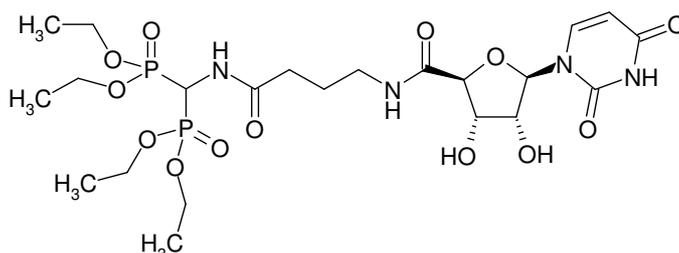
3); 64.0 (2 x O-CH₂); 40.1 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 35.5 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 33.4 (d, ¹J_{C,P} = 137.6 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 26.6 (CH₂, 4-Amidobutanamid); 16.9 und 16.8 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, MeOD) δ 26.8.

ESI-MS: 567.3 ([M-H]⁻), 569.2 ([M+H]⁺).

C ₂₄ H ₃₃ N ₄ O ₁₀ P · 6 H ₂ O	ber.:	C: 41.50 %;	H: 6.47 %;	N: 8.06 %
	gef.:	C: 41.15 %;	H: 6.10 %;	N: 7.89 %

6.4.25 4-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]butanamidomethylendiphosphonsäuretetraethylester (**152**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **84** und **112** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 301 mg (48 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 138 °C

HPLC: t_r = 19,50 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.30 (d, 1H, ³J = 1.85 Hz, NH, Uracil); 8.63 (d, 1H, ³J = 9.75 Hz, CONH); 8.31 (t, 1H, ³J = 5.65 Hz, 5'-CONH); 8.27 (d, 1H, ³J = 8.15 Hz, H-6); 5.86 (d, 1H, ³J = 6.30 Hz, H-1'); 5.62 (dd, 1H, ³J = 8.15 Hz und ⁴J = 2.20 Hz, H-5); 5.50 (br s, 2H, 2'-OH und 3'-OH); 4.87 (td, 1H, ³J = 10.10 Hz und ²J_{H,P} = 23.00 Hz, Methylbisphosphonat); 4.25 (d, 1H, ³J = 2.50 Hz, H-4'); 4.17 (pseudo-t, 1H, ³J = 4.75 Hz und ³J = 5.95 Hz, H-2'); 4.08 – 4.02 (m, 8H, 4 x O-CH₂); 3.98 (dd, 1H, ³J = 2.50 Hz und ³J = 4.40 Hz, H-3'); 3.08 (dt, 2H, ³J = 5.70 Hz und ³J = 7.50 Hz, N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 2.23 (t, 2H, ³J = 7.25 Hz (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.65 (tt, 2H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.22 (br s, 12H, 4 x CH₃).

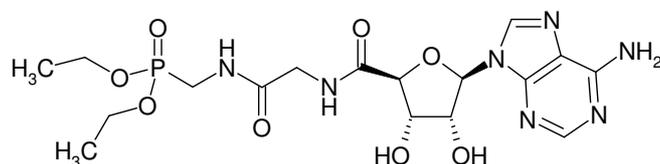
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 171.8 (C=O); 170.0 (C=O); 163.2 (C-4); 151.2 (C-2); 141.4 (C-6); 102.1 (C-5); 88.3 (C-1'); 83.3 (C-4'); 73.2 (C-2'); 73.1 (C-3'); 62.9 (O-CH₂); 43.5 (t, ¹J_{C,P} = 147.5 Hz, N-CH, Methylbisphosphonat); 38.3 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 32.3 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 25.5 (CH₂, 4-Amidobutanamid); 16.3 (CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-d₆) 15.6.

ESI-MS: 627.0 ([M-H]⁻), 629.0 ([M+H]⁺).

C ₂₅ H ₃₅ N ₄ O ₁₀ P · 4 H ₂ O	ber.:	C: 36.73 %;	H: 6.41 %;	N: 8.16 %
	gef.:	C: 36.70 %;	H: 6.65 %;	N: 8.01 %

6.4.26 2-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]ethanamidomethylphosphonsäurediethylester (**174**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **85** und **103** gelang nach Vorschrift F mit HCTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 340 mg (70 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 131 °C

HPLC: $t_r = 10,10$ Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ 8.38 (s, 1H, H-2); 8.25 (s, 1H, H-8); 6.11 (d, 1H, $^3J = 7.85$ Hz, H-1'); 4.91 (dd, teilweise unter dem Lösungsmittelsignal, 1H, $^3J = 7.85$ Hz und $^3J = 4.70$ Hz, H-2'); 4.62 (d, $^3J = 1.60$ Hz, 1H, H-4'); 4.49 (dd, 1H, $^3J = 4.75$ und $^3J = 1.25$ Hz, H-3'); 4.17 – 4.13 (m, 4H, 2 x O-CH₂); 4.14 - 4.03 (AB-System mit A d und B d, 2H, $^2J = 16.40$ Hz, N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 3.24 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, $^2J_{\text{H,P}} = 11.95$ Hz und $^2J = 16.05$ Hz, N-CH₂, Methylphosphonat); 1.32 (t, 6H, 2 x CH₃).

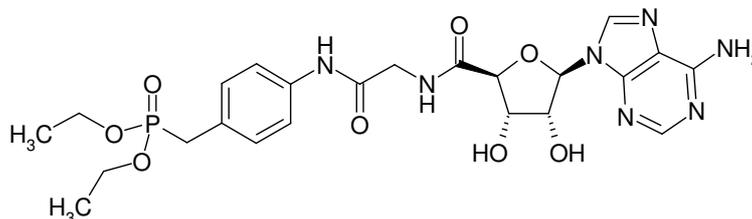
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ 173.3 (C=O); 171.4 (C=O); 157.8 (C-6); 154.1 (C-2); 150.5 (C-4); 142.9 (C-8); 121.4 (C-5); 90.7 (C-1'); 86.7 (C-4'); 75.4 (C-2'); 73.8 (C-3'); 64.5 (2 x O-CH₂); 43.3 (N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 36.3 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 157.1$ Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 17.0 (2 x CH₃).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, MeOD) δ 22.1.

ESI-MS: 486.4 ([M-H]⁻), 488.3 ([M+H]⁺).

C ₁₇ H ₂₆ N ₇ O ₈ P · H ₂ O	ber.:	C: 40.39 %;	H: 5.55 %;	N: 19.41 %
	gef.:	C: 40.54 %;	H: 5.65 %;	N: 19.08 %

6.4.27 4-[2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)ethanamido]benzylphosphonsäurediethylester (**169**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **85** und **107** gelang nach Vorschrift F mit HCTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Positionen des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 310 mg (68 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 146 °C

HPLC: $t_r = 37,30$ Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ 8.42 (s, 1H, H-2); 8.24 (s, 1H, H-8); 7.57 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.20$ Hz, 2 x CH_{meta} , Benzylphosphonat); 7.30 (dd, 2H, $^3\text{J} = 8.80$ Hz und $^4\text{J} = 2.50$ Hz, 2 x CH_{ortho} , Benzylphosphonat); 6.14 (d, 1H, $^3\text{J} = 7.90$ Hz, H-1'); 4.91 (dd, teilweise unter dem Lösungsmittelsignal, 1H, $^3\text{J} = 7.55$ Hz und $^3\text{J} = 4.75$ Hz, H-2'); 4.62 (s, 1H, H-4'), 4.49 (dd, 1H, $^3\text{J} = 4.75$ und $^3\text{J} = 1.60$ Hz, H-3'); 4.29 - 4.10 (AB-system mit A d und B d, 2H, $^2\text{J} = 16.40$ Hz, N- CH_2 , 2-Amidoethanamid); 4.09 – 4.04 (m, 4H, 2 x O- CH_2); 3.24 (d, 2H, $^2\text{J}_{\text{H,P}} = 21.45$ Hz, $\text{CH}_2\text{-P}$, Benzylphosphonat); 1.29 (t, 6H, 2 x CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ 173.4 (C=O); 169.5 (C=O); 157.9 (C-6); 154.2 (C-2); 150.6 (C-4); 142.8 (C-8); 138.9 ($\underline{\text{C}}_{\text{phenyl-NH}}$, Benzylphosphonat); 131.7 (2 x CH_{meta} , Benzylphosphonat); 128.7 (d, $^2\text{J}_{\text{C,P}} = 9.4$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CH}_2\text{-P}$, Benzylphosphonat); 121.5 (2 x CH_{ortho} , Benzylphosphonat); 121.3 (C-5); 90.6 (C-1'); 86.7 (C-4'); 75.5 (C-2'); 73.9 (C-3'); 64.0 (2 x O- CH_2); 44.0 (N- CH_2 , 2-Amidoethanamid); 33.4 (d, $^1\text{J}_{\text{C,P}} = 137.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-P}$, Benzylphosphonat); 17.0 und 16.9 (2 x CH_3).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, MeOD) δ 28.8.

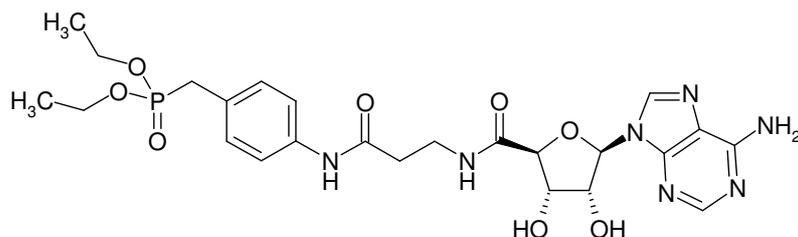
64.4 und 64.3 (2 x O-CH₂); 37.1 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 36.6 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 35.6 (d, ¹J_{C,P} = 157.1 Hz, N-CH₂-P, Methylphosphonat); 17.0 und 16.9 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, MeOD) δ 22.5.

ESI-MS: 500.3 ([M-H]⁻), 502.1 ([M+H]⁺).

C₁₈H₂₈N₇O₈P · 2.75 H₂O ber.: C: 39.23 %; H: 6.09 %; N: 17.80 %
gef.: C: 39.65 %; H: 5.79 %; N: 17.15 %

6.4.29 4-[3-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)propanamido]benzylphosphonsäurediethylester (**170**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **85** und **108** gelang nach Vorschrift F mit HBTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 317 mg (55 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 111 °C

HPLC: t_r = 37,30 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 8.08 (s, 1H, H-2); 7.95 (s, 1H, H-8); 7.57 (d, 2H, ³J = 8.20 Hz, 2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 7.30 (dd, 2H, ³J = 8.80 Hz und ⁴J = 2.50 Hz, 2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 6.14 (d, 1H, ³J = 7.90 Hz, H-1'); 4.91 (dd, teilweise unter

dem Lösungsmittelsignal, 1H, $^3J = 7.55$ Hz und $^3J = 4.75$ Hz, H-2'); 4.62 (s, 1H, H-4'); 4.49 (dd, 1H, $^3J = 4.75$ und $^3J = 1.60$ Hz, H-3'); 4.09 – 4.04 (m, 4H, 2 x O-CH₂); 3.67 – 3.58 (m, 2H, $^3J = 5.35$ Hz, N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 3.24 (d, 2H, $^2J_{H,P} = 21.45$ Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 2.59 – 2.49 (m, 2H, $^3J_{X,A} = 5.35$ Hz, O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 1.29 (t, 6H, 2 x CH₃).

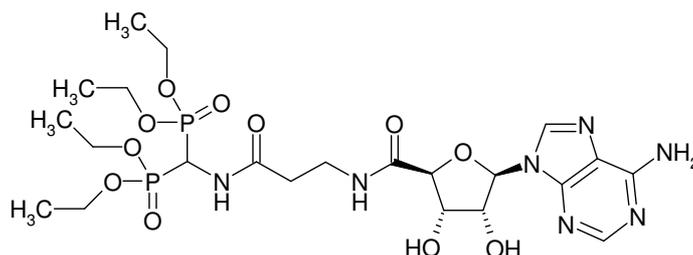
¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 174.9 (C=O); 174.4 (C=O); 157.9 (C-6); 155.3 (C-2); 150.7 (C-4); 143.9 (C-8); 138.8 (C_{Phenyl}-NH, Benzylphosphonat); 133.1 (2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 129.6 (d, $^2J_{C,P} = 9.4$ Hz, C-CH₂-P, Benzylphosphonat); 123.1 (2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 121.9 (C-5); 91.3 (C-1'); 87.4 (C-4'); 75.8 (C-2'); 74.7 (C-3'); 64.0 (2 x O-CH₂); 39.6 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 39.1 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 34.1 (d, $^1J_{C,P} = 137.6$ Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 18.3 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ 30.0.

ESI-MS: 576.3 ([M-H]⁻), 578.2 ([M+H]⁺).

C ₂₄ H ₃₂ N ₇ O ₈ P · 3 H ₂ O · 0.5 MeOH	ber.:	C: 46.80 %;	H: 6.37 %;	N: 15.60 %
	gef.:	C: 47.04 %;	H: 6.39 %;	N: 15.65 %

6.4.30 3-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]propanamidomethylendiphosphonsäuretetraethylester (**172**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **85** und **111** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet. Die Reaktionsdauer betrug 30 Minuten. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 115 mg (18 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 136 °C

HPLC: $t_r = 32,50$ Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ 8.41 (s, 1H, H-2); 8.38 (s, 1H, H-8); 6.06 (d, 1H, $^3J = 7.90$ Hz, H-1'); 5.10 (t, 1H, $^2J_{\text{H,P}} = 23.00$ Hz, N-CH, Methylbisphosphonat); 4.77 (dd, 1H, $^3J = 7.55$ Hz und $^3J = 4.75$ Hz, H-2'); 4.51 (d, 1H, $^3J = 1.55$ Hz, H-4'); 4.36 (dd, 1H, $^3J = 5.05$ Hz und $^3J = 1.25$ Hz, H-3'); 4.23 – 4.07 (m, 8H, 4 x O-CH₂); 3.74 – 3.61 (m, 2H, $^3J = 6.30$ Hz, N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 2.63 (br m, 2H, $^3J = 6.30$ Hz O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 1.31 (m, 12H, 4 x CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ 173.1 (C=O); 172.8 (C=O); 157.9 (C-6); 154.1 (C-2); 150.5 (C-4); 142.8 (C-8); 121.5 (C-5); 90.7 (C-1'); 86.8 (C-4'); 75.3 (C-2'); 73.7 (C-3'); 65.4 (4 x O-CH₂); 47.5 (t, $^1J_{\text{C,P}} = 145.0$ Hz, N-CH, Methylbisphosphonat); 36.7 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 36.2 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 16.9 (4 x CH₃).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, MeOD) δ 15.5.

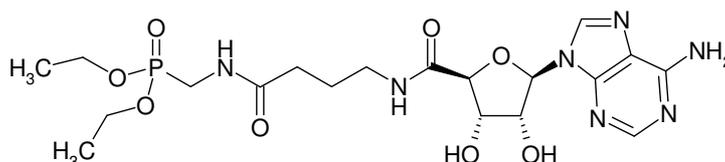
ESI-MS: 636.3 ([M-H]⁻), 638.0 ([M+H]⁺).

C₂₁H₃₅N₇O₁₁P₂ · 2 H₂O

ber.: C: 38.24 %; H: 5.92 %; N: 14.87 %

gef.: C: 38.01 %; H: 6.19 %; N: 14.41 %

6.4.31 4-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]butanamidomethylphosphonsäurediethylester (**176**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **85** und **105** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids

nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 380 mg (65 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 128 °C

HPLC: t_r = 16.20 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.02 (t, 1H, ³J = 5.70 Hz, 5'-CONH); 8.36 (s, 1H, H-2); 8.21 (s, 1H, H-8); 8.18 (t, 1H, ³J = 6.00 Hz, CONH); 7.38 (br s, 2H, 6-NH₂); 5.95 (d, 1H, ³J = 7.55 Hz, H-1'); 5.72 (d, 1H, ³J = 4.10 Hz, 2'-OH); 5.50 (d, 1H, ³J = 6.30 Hz, 3'-OH); 4.91 (dd, 1H, ³J = 6.95 Hz und ³J = 4.70 Hz, H-2'); 4.31 (d, ³J = 0.95 Hz, 1H, H-4'); 4.12 (pseudo-t, 1H, ³J = 7.25 und ³J = 3.75 Hz, H-3'); 4.02 – 3.96 (2 x q, 4H, 2 x O-CH₂); 3.54 (pseudo-q, 2H, ²J_{H,P} = 11.35 Hz und ²J = 17.30 Hz und ³J = 6.00 Hz, N-CH₂, Methylphosphonat); 3.19 (dt, 2H, ³J = 6.90 Hz und ³J = 5.35 Hz, N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 2.15 (t, 2H, ³J = 7.25 Hz, O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.70 (tt, 2H, ³J = 6.95 Hz und 7.55 Hz, CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.32 (t, 6H, 2 x CH₃).

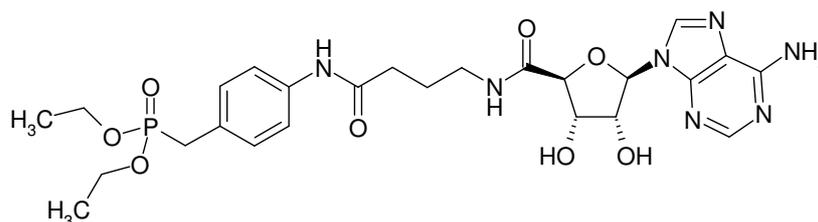
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 171.9 (C=O); 169.6 (C=O); 156.5 (C-6); 152.7 (C-2); 148.9 (C-4); 140.9 (C-8); 119.8 (C-5); 88.1 (C-1'); 84.9 (C-4'); 73.4 (C-2'); 72.1 (C-3'); 61.8 (2 x O-CH₂); 38.2 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 34.0 (d, ¹J_{C,P} = 154.2 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 32.6 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid), 25.6 (CH₂, 4-Amidobutanamid); 16.4 und 16.3 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-d₆) δ 23.6.

ESI-MS: 524.4 ([M-H]⁻), 526.3 ([M+H]⁺).

C ₁₉ H ₃₀ N ₇ O ₈ P · 2 H ₂ O	ber.:	C: 40.07%;	H: 6.33%;	N: 17.22%
	gef.:	C: 40.31%;	H: 6.57%;	N: 16.83%

6.4.32 4-[4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)butanamido]benzylphosphonsäurediethylester (**171**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **85** und **109** gelang nach Vorschrift F mit HBTU als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,15 ml TFA verwendet. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 360 mg (61 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 124 °C

HPLC: $t_r = 37,30$ Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.84 (br s, 1H, 5'-CONH); 9.05 (t, 2H, $^3J = 5.70$ Hz, CONH, 4-Amidobutanamid); 8.36 (s, 1H, H-2); 8.23 (s, 1H, H-8); 7.48 (d, 2H, $^3J = 8.55$ Hz, 2 x CH_{meta} , Benzylphosphonat); 7.38 (br s, 2H, 6-NH₂); 7.16 (dd, 2H, $^3J = 8.85$ Hz und $^4J = 2.20$ Hz, 2 x CH_{ortho} , Benzylphosphonat); 5.95 (d, 1H, $^3J = 7.60$ Hz, H-1'); 5.72 (br d, 1H, $^3J = 2.50$ Hz, 2'-OH); 5.51 (br d, 1H, $^3J = 4.40$ Hz, 3'-OH); 4.61 (dd, 1H, $^3J = 7.55$ Hz und $^3J = 4.75$ Hz, H-2'); 4.32 (d, 1H, $^3J = 1.60$ Hz, H-4'); 4.14 (br s, 1H, H-3'); 3.95 – 3.89 (m, 4H, 2 x O-CH₂); 3.26 (dt, 2H, $^3J = 7.25$ Hz und $^3J = 5.70$ Hz, N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 3.12 (d, 2H, $^2J_{\text{H,P}} = 21.10$ Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 2.32 (t, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.79 (tt, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.29 (t, 6H, 2 x CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 170.8 (C=O); 169.6 (C=O); 156.5 (C-6); 152.6 (C-2); 148.9 (C-4); 140.9 (C-8); 137.9 ($\underline{\text{C}}_{\text{Phenyl-NH}}$, Benzylphosphonat); 130.1 (2 x CH_{meta} , Benzylphosphonat); 126.7 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 9.4$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CH}_2\text{-P}$, Benzylphosphonat); 119.8 (2 x CH_{ortho} , Benzylphosphonat); 119.1 (C-5); 88.0 (C-1'); 84.9 (C-4'); 73.4 (C-2'); 72.0

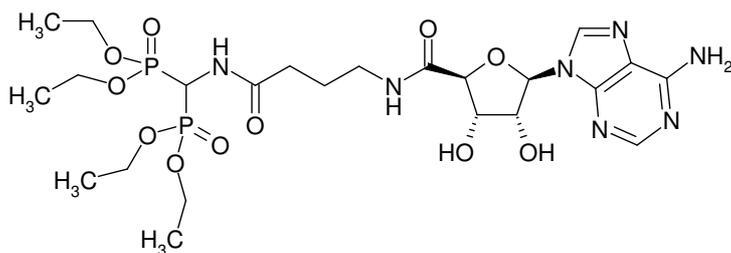
(C-3'); 61.5 (2 x O-CH₂); 38.5 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 33.8 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 33.4 (d, ¹J_{C,P} = 137.6 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 25.3 (CH₂, 4-Amidobutanamid); 16.4 und 16.3 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-d₆) δ 27.1.

ESI-MS: 590.3 ([M-H]⁻), 592.0 ([M+H]⁺).

C₂₅H₃₄N₇O₈P · 2.5 H₂O · 0.5 MeOH ber.: C: 47.59%; H: 6.17%; N: 15.22%
gef.: C: 47.98%; H: 6.46%; N: 15.14%

6.4.33 4-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]butanamidomethylendiphosphonsäuretetraethylester (**173**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **85** und **112** gelang nach Vorschrift F mit PyBOP als Kopplungsreagenz. Zur Entschützung der 2',3'-Position des Nucleosids nach Vorschrift H wurden 0,09 ml TFA verwendet. Die Reaktionsdauer betrug 30 Minuten. Das Produkt wurde mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 234 mg (36 %), berechnete Gesamtausbeute über zwei Stufen

Schmelzpunkt: 114 °C

HPLC: t_r = 35,15 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser, Methanol, Ethanol

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, MeOD), δ 8.36 (s, 1H, H-2); 8.34 (s, 1H, H-8); 6.07 (d, 1H, ³J = 7.85 Hz, H-1'); 5.14 (t, 1H, ²J_{H,P} = 23.00 Hz, N-CH, Methylbisphosphonat); 4.79 (dd,

1H, $^3J = 7.55$ Hz und $^3J = 4.70$ Hz, H-2'); 4.51 (d, 1H, $^3J = 1.25$ Hz, H-4'); 4.36 (dd, 1H, $^3J = 4.70$ Hz und $^3J = 1.25$ Hz, H-3'); 4.26 – 4.19 (m, 8H, 4 x O-CH₂); 3.42 (t, 2H, $^3J = 6.95$ Hz, N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 2.41 (t, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, O=C-CH₂; 4-Amidobutanamid); 1.94 (tt, 2H, $^3J = 7.25$ Hz und $^3J = 6.90$ Hz, CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.36 – 1.25 (m, 12H, 4 x CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, MeOD), δ 175.0 (C=O); 172.7 (C=O); 158.0 (C-6); 154.3 (C-2); 150.5 (C-4); 143.0 (C-8); 121.5 (C-5); 90.9 (C-1'); 86.8 (C-4'); 75.3 (C-2'); 73.7 (C-3'); 65.3 (4 x O-CH₂); 45.0 (t, $^1J_{C,P} = 149.2$ Hz, N-CH, Methylbisphosphonat); 39.9 (N-CH₂; 4-Amidobutanamid); 34.0 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 27.3 (CH₂, 4-Amidobutanamid); 17.0 (4 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, MeOD), δ 15.8.

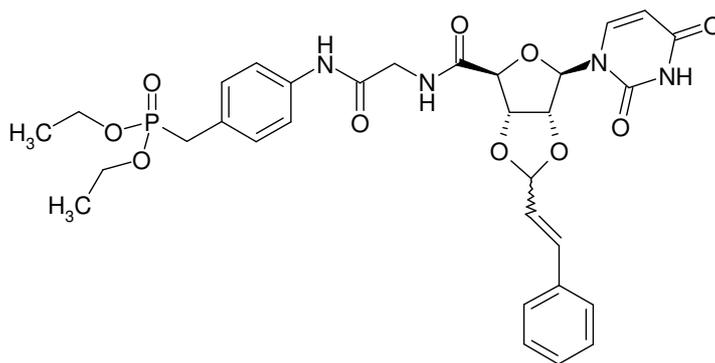
ESI-MS: 650.3 ([M-H]⁻), 652.3 ([M+H]⁺).

C₂₃H₃₉N₇O₁₀P · H₂O

ber.: C: 41.23%; H: 6.12%; N: 14.63%

gef.: C: 41.23%; H: 6.20%; N: 14.86%

6.4.34 4-[2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-(3-phenylprop-2-enylidendioxy)-tetrahydrofuran-2-carboxamido)ethanamido]-benzylphosphonsäurediethylester (**135**)



Die Synthese des Riburonsäureamids aus **86** und **107** gelang nach Vorschrift F mit HCTU als Kopplungsreagenz. Das nach der Flash-Chromatographie gewonnene Produkt wurde in 20 ml eines Gemisches aus Methanol und Wasser (6:4) im Ultraschallbad gelöst und mittels präparativer HPLC mit einem Gemisch aus Wasser

und Methanol in mehreren Läufen aufgereinigt. Die Diastereomeren konnten nicht getrennt werden.

HPLC-Bedingungen:

isokratisch, 10 Minuten Methanol/Wasser (6:4), dann

Gradient 30 Min auf Methanol.

Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und einrotiert. Der Rückstand kristallisierte nach Zugabe von Diethylether (50 ml) aus.

Ausbeute: 260 mg (40 %)

Schmelzpunkt: 270 °C

HPLC: t_r = 18,20 Minuten

Leicht löslich in: Methanol, Dichlormethan (als Lyophilisat löslich in Wasser)

Schwer löslich in: Diethylether

^1NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 10.29 (d, 1H, $^3J = 1.90$ Hz, NH, Uracil); 9.23 (br s, 1H, CONH); 7.50 (br s, 1H, CONH); 7.39 (d, 2H, $^3J = 8.85$ Hz, 2 x CH_{meta} , Benzylphosphonat); 7.37 und 7.31 (2H, 2 x d, $^3J = 6.95$ Hz, 2 x H_{meta} , Phenyl); 7.32 - 7.25 (m, 3H, $^3J = 6.60$ Hz und, 2 x H_{ortho} und $^3J = 7.25$ Hz, H_{para} , Phenyl); 7.19 (d, 1H, $^3J = 7.85$ Hz, H-6); 7.09 (d, 2H, $^3J = 8.50$ Hz, 2 x CH_{ortho} , Benzylphosphonat); 6.80 – 6.75 (2 x d, 1H, $^3J = 16.05$ Hz, Phenyl-CH=CH); 6.18 und 6.09 (2 x dd, 1H, $^3J = 16.10$ Hz und $^3J = 6.30$ Hz, Phenyl-CH=CH); 5.63 und 5.56 (d und s, 1H, $^3J = 5.95$ Hz (5.63), H-1'); 5.61 (1H, dd, $^3J = 7.60$ Hz und $^4J = 3.15$ Hz, H-5); 5.49 (pseudo-t, 1H, $^3J = 6.65$ Hz und $^3J = 4.70$ Hz, H-3'); 5.47 und 5.35 (pseudo-t und d, 1H, $^3J = 5.60$ Hz und $^3J = 6.30$ Hz (5.49) und $^3J = 5.65$ Hz (5.35), H-2'); 5.16 und 5.11 (2 x d, 1H, $^3J = 6.30$ Hz (5.16) und $^3J = 6.00$ Hz (5.11), O-CH-O); 4.75 und 4.65 (s und d, 1H, $^3J = 1.90$ Hz (4.65), H-4'); 4.24 und 3.79 (2 x br AB-System mit A d und B d, 2 x 1H, $^2J = 16.10$ Hz, N- CH_2 , 2-Amidoethanamid); 4.05 – 3.98 (2 x q, 4H, 2 x O- CH_2); 3.03 (2 x d, 2H, $^2J_{\text{H,P}} = 21.45$ Hz, CH_2 -P, Benzylphosphonat); 1.24 (t, 6H, 2 x CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 173.2 (C=O); 169.5 (C=O); 166.4 (C-4); 153.1 (C-2); 144.3 (C-6); 138.9 (C-NH, Benzylphosphonat); 135.8 (C_{Phenyl}-CH=CH); 135.3 (Phenyl-CH=CH); 128.9 (2 x CH_{meta} , Phenyl); 127.1 (2 x CH_{ortho} , Phenyl); 124.4 (CH_{para} , Phenyl); 123.9 (Phenyl-CH=CH); 128.7 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 9.4$ Hz, C- CH_2 -P, Benzylphosphonat); 131.7 (2 x CH_{meta} , Benzylphosphonat); 121.5 (2 x CH_{ortho} , Benzylphosphonat); 105.9 und 103.8 (O-CH-O); 103.5 (C-5); 92.2 (C-1'); 85.3 (C-4); 74.9 (C-2);

74.1 (C-3); 64.1 und 64.0 (2 x O-CH₂); 43.9 (N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 33.4 (d, ¹J_{C,P} = 137.5 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 17.0 und 16.9 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ 27.4.

ESI-MS: 653.0 ([M-H]⁻), 654.8 ([M+H]⁺).

C ₃₁ H ₃₅ N ₄ O ₁₀ P · 3 H ₂ O	ber.:	C: 52.54%;	H: 5.78%;	N: 7.91%
	gef.:	C: 52.39%;	H: 4.96%;	N: 7.52%

6.5 Spaltung von Carbonsäureestergruppen in der Nucleosid-5'-Seitenkette

Vorschrift I: Enzymatische Spaltung von Carbonsäureethylestern

Ein Nucleosid-Derivat (**161**) mit terminalen Carbonsäureethylestergruppen in der 5'-Seitenkette wurde in 5 ml 100 mM wäßrigem Na₂HPO₄-Puffer (mit 85 %iger H₃PO₄ auf pH 8 eingestellt) im Ultraschallbad suspendiert und im Ölbad auf 37 °C erwärmt. Nach Zugabe eines Massenäquivalentes Schweineleberesterase (PLE, E.C. 3.1.1.1) wurde die trübe Lösung mit einem Magnetrührer 24 Stunden langsam gerührt. Zur Aufarbeitung wurde sie durch eine Porzellanfritte filtriert, mit 50 ml demineralisiertem Wasser verdünnt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 7 ml eines Gemischs aus Wasser und Methanol (9:1) aufgenommen und mit präparativer RP-HPLC aufgereinigt. HPLC-Bedingungen:

20 min isokratisch Wasser/Methanol, (9:1), dann

30 min Gradient auf Wasser/Methanol (1:1), dann

20 min Methanol.

Den Eluenten wurde 0,1 % Trifluoressigsäure zugesetzt.

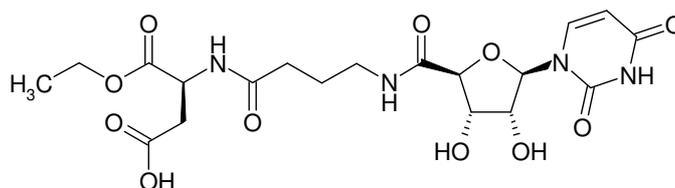
Die Produktfraktion wurde mit Wasser verdünnt und der Gefriertrocknung unterzogen.

Vorschrift J: Hydrogenolytische Spaltung von Carbonsäurebenzylestern

Methode A: Ein Nucleosidderivat mit terminalen Carbonsäurebenzylestergruppen (30 mg) wurde in einem Zweihalskolben in 2 ml einer Mischung aus Methanol und Wasser (4:1) im Ultraschallbad gelöst. Zur Lösung wurden 5 mg Pd(OH)₂/C („Pearlman’s catalyst“, 20 %) oder 10 mg Pd/C (10 %) gegeben und die Suspension wurde dreimal wechselweise mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert und mit Argon aus einem Ballon gespült. Dieses Prozedere wurde mit einem mit Wasserstoff befüllten Ballon wiederholt. Die Suspension wurde schließlich bei Raumtemperatur in einer Wasserstoffatmosphäre (Ballon) 24 Stunden lang stark gerührt. Zur Isolierung des Produktes wurde filtriert und der Katalysator mit Wasser (40 ml) und Methanol (40 ml) gewaschen. Das Filtrat wurde mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet.

Methode B: Ein Nucleosidderivat mit terminalen Carbonsäurebenzylestergruppen (30 mg) wurde in einem 5 ml-Gefäß der Firma Kimble & Kontes in 2 ml einer Mischung aus Methanol und Wasser (4:1) im Ultraschallbad gelöst. Zur Lösung wurden 5 mg Pd(OH)₂/C („Pearlman’s catalyst“) gegeben und die entstandene Suspension unter starkem Rühren 4 Stunden bei 1,2 bar am Wasserstoffgenerator hydriert. Zur Isolierung des Produktes wurde die Suspension filtriert und der Katalysator mit Wasser (40 ml) und Methanol (40 ml) gewaschen. Das Filtrat wurde mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Die Produkte erwiesen sich als sehr hygroskopisch, deshalb wurde auf eine Schmelzpunktbestimmung verzichtet.

6.5.1 2-[4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)butanamido]-L-asparaginsäure-1-ethylester (178)



Die Verbindung **161** (15 mg, 0,03 mmol) wurde mit 15 mg Schweineleberesterase nach Vorschrift I umgesetzt.

Ausbeute: 5,1 mg (36 %).

Schmelzpunkt: Die Substanzmenge reichte nicht aus für eine Schmelzpunktbestimmung.

HPLC: $t_r = 32,06$ Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

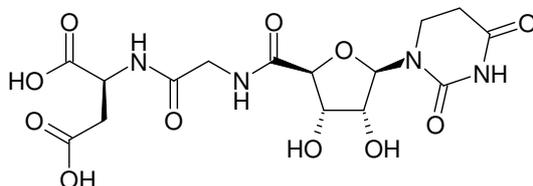
Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 7.97 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.20$ Hz, H-6); 5.91 (d, 1H, $^3\text{J} = 7.90$ Hz, H-5); 5.88 (d, 1H, $^3\text{J} = 5.35$ Hz, H-1'); 4.78 (t, 1H, $^3\text{J} = 6.95$ Hz, N-CH, Asp); 4.51 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 5.35$ Hz und $^3\text{J} = 5.05$ Hz, H-2'); 4.46 (d, 1H, $^3\text{J} = 4.70$ Hz, H-4'); 4.42 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 5.00$ Hz und $^3\text{J} = 4.75$ Hz, H-3'); 4.18 (q, 2H, O- CH_2); 3.28 (t, 2H, $^3\text{J} = 6.95$ Hz, N- CH_2 , 4-Amidobutanamid); 2.91 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, $^3\text{J} = 5.35$ Hz und $^2\text{J} = 16.70$ Hz, O=C- CH_2 , Asp); 2.34 (t, 2H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz, O=C- CH_2 , 4-Amidobutanamid); 1.83 (dt, 2H, $^3\text{J} = 7.25$ Hz und $^3\text{J} = 6.95$ Hz, CH_2 , 4-Amidobutanamid); 1.27 (t, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 178.6 (C=O); 176.8 (C=O); 175.4 (C=O); 174.2 (C=O); 169.0 (C-4); 154.5 (C-2); 146.1 (C-6); 105.2 (C-5); 94.3 (C-1'); 85.6 (C-4'); 73.4 (C-2'); 73.1 (C-3'); 65.1 (O- CH_2); 51.9 (N-CH, Asp); 41.3 (N- CH_2 , 4-Amidobutanamid); 38.8 (O=C- CH_2 , Asp); 35.5 (O=C- CH_2 , 4-Amidobutanamid); 27.4 (CH_2 , 4-Amidobutanamid); 16.1 (CH_3).

6.5.2 2-[2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)ethanamido]-(*S*)-asparaginsäure
(179)



Der Dibenzylester **163** (30 mg, 0,05 mmol) wurde gemäß Vorschrift J hydriert. Sowohl mit Methode A als auch mit Methode B konnte volle Umsetzung erreicht werden. Ein Unterschied zwischen Palladiumhydroxid und Palladium bestand nicht.

Ausbeute: 19 mg (92 %).

Schmelzpunkt: 167 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: - 16.4° (Wasser)

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroscopisch)

Leicht löslich in: Wasser

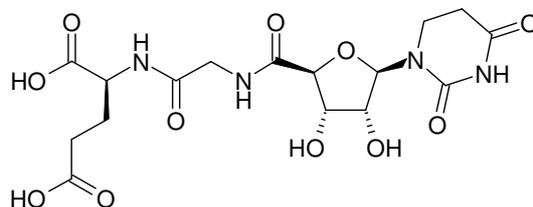
Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 5.87 (d, 1H, $^3\text{J} = 6.30$ Hz, H-1'); 4.70 (t, 1H, $^3\text{J} = 6.00$ Hz, N-CH, Asp); 4.48 (d, 1H, $^3\text{J} = 2.20$ Hz, H-4'); 4.42 (dd, 1H, $^3\text{J} = 5.35$ Hz und $^3\text{J} = 6.35$ Hz, H-2'); 4.41 (dd, 1H, $^3\text{J} = 2.20$ Hz und $^3\text{J} = 5.35$ Hz, H-3'); 4.05 (AB-System mit A d und B d, 2H, $^2\text{J} = 17.00$ Hz, N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 3.61 (m, 2H, $^3\text{J} = 6.60$ Hz, N-CH₂, Dihydrouracil); 2.93 (kein AB-System stattdessen d, $^3\text{J} = 6.00$ Hz, O=C-CH₂, Asp); 2.80 (m, 2H, $^3\text{J} = 6.00$ Hz, O=C-CH₂, Dihydrouracil).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 177.9 (C=O); 177.7 (C=O); 176.6 (C=O); 175.1 (C=O); 173.3 (C-4); 157.6 (C-2); 91.8 (C-1'); 84.8 (C-4'); 75.5 (C-2'); 72.5 (C-3'); 49.5 (N-CH, Asp); 45.4 (N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 40.7 (N-CH₂, Dihydrouracil); 38.9 (O=C-CH₂, Asp); 33.0 (O=C-CH₂, Dihydrouracil).

HPLC (220 nm): 98.9 %

6.5.3 2-[2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4,5,6-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)ethanamido]-(*S*)-glutaminsäure (**180**)



Der Dibenzylester **164** (30 mg, 0,05 mmol) wurde gemäß Vorschrift J, Methode B mit Pd(OH)₂ hydriert.

Ausbeute: 21 mg (95 %).

Schmelzpunkt: 139 °C

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

[α]_D²⁰: - 22.0° (Wasser)

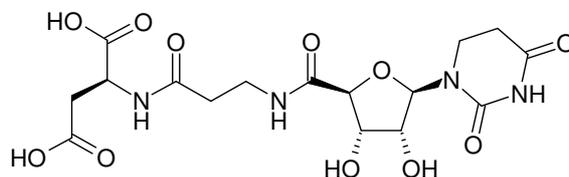
¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 5.87 (d, 1H, ³J = 6.00 Hz, H-1'); 4.49 (d, 1H, ³J = 2.50 Hz, H-4'); 4.43 (dd, 1H, ³J = 5.35 Hz und ³J = 6.65 Hz, H-2'), 4.41 (dd, 1H, ³J = 2.50 Hz and ³J = 5.15 Hz, H-3'), 4.35 (t, 1H, ³J = 4.75 Hz, N-CH, Glu); 4.05 (AB-System mit A d und B d, 2H, ²J = 17.00 Hz, N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 3.61 (m, 2H, ³J = 6.60 Hz, N-CH₂, Dihydrouracil); 2.80 (dt, 2H, ³J = 6.00 Hz und ³J = 3.75 Hz, O=C-CH₂, Dihydrouracil); 2.56 (t, 2H, ³J = 7.55 Hz, O=C-CH₂, Glu); 2.20 und 1.99 (2 x m, 2 x 1H, ³J = 7.25 Hz und ³J = 4.75 Hz, CH₂, Glu).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 180.5 (C=O); 179.5 (C=O); 176.6 (C=O); 175.1 (C=O); 173.4 (C-4); 157.6 (C-2); 91.8 (C-1'); 84.8 (C-4'); 75.5 (C-2'); 72.5 (C-3'); 45.4 (N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 45.0 (N-CH, Glu); 40.7 (N-CH₂, Dihydrouracil); 33.2 (O=C-CH₂, Dihydrouracil); 33.0 (O=C-CH₂, Glu); 29.3 (CH₂, Glu).

ESI-MS: 444.9 ([M-H]⁻), 446.9 ([M+H]⁺).

HPLC (220 nm): 99.6 %

6.5.4 2-[3-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)propanamido]-(*S*)-asparaginsäure
(181)



Der Dibenzylester **165** (30 mg, 0,05 mmol) wurde gemäß Vorschrift J, Methode B mit Pd(OH)₂ hydriert.

Ausbeute: 20 mg (93 %).

Schmelzpunkt:

[α]_D²⁰: - 13.5° (Wasser)

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

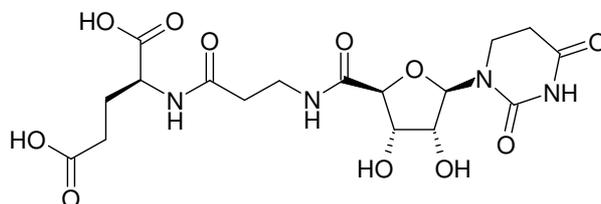
¹H-NMR (500 MHz, D₂O), δ 5.84 (d, 1H, ³J = 6.35 Hz, H-1'); 4.71 (t, 1H, ³J = 5.35 Hz, N-CH, Asp); 4.37 (d, 1H, ³J = 2.55 Hz, H-4'); 4.35 (dd, 1H, ³J = 5.35 Hz und ³J = 6.00 Hz, H-2'); 4.33 (dd, 1H, ³J = 2.50 Hz und ³J = 5.35 Hz, H-3'); 3.71-3.50 (m, 4H, N-CH₂, Dihydrouracil und N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 2.92 (d, 2H, ³J = 5.35 Hz und ²J = 17.00 Hz, O=C-CH₂, Asp); 2.79 (m, 2H, ³J = 6.30 Hz, O=C-CH₂, Dihydrouracil); 2.56 (t, 2H, ³J = 6.30 Hz, O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O), δ 177.6 (C=O); 176.6 (2 x C=O); 176.4 (C=O); 174.3 (C-4); 157.6 (C-2); 91.5 (C-1'); 84.8 (C-4'); 75.4 (C-2'); 72.3 (C-3'); 45.4 (N-CH, Asp); 40.6 (N-CH₂, Dihydrouracil); 39.0 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 38.4 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 37.5 (O=C-CH₂, Asp); 33.0 (O=C-CH₂, Dihydrouracil).

ESI-MS: 444.9 ([M-H]⁻), 446.9 ([M+H]⁺).

HPLC (220 nm): 93.7 %.

6.5.5 2-[3-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)propanamido]-(*S*)-glutaminsäure
(**182**)



Der Dibenzylester **166** (30 mg, 0,05 mmol) wurde gemäß Vorschrift J, Methode B mit Pd(OH)₂ hydriert.

Ausbeute: 20 mg (91 %).

Schmelzpunkt: 154 °C

[α]_D²⁰: - 25.2° (Wasser)

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

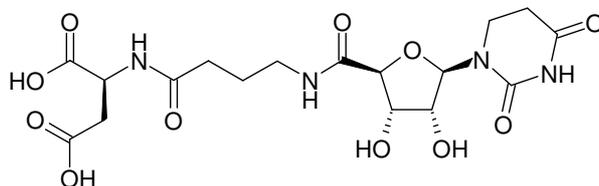
¹H-NMR (500 MHz, D₂O), δ 5.84 (d, 1H, ³J = 6.30 Hz, H-1'); 4.38 (d, 1H, ³J = 2.50 Hz, H-4'); 4.37 (t, 1H, ³J = 6.00 Hz, N-CH, Glu); 4.35 (dd, 1H, ³J = 5.35 Hz und ³J = 6.35 Hz, H-2'); 4.32 (dd, 1H, ³J = 2.20 Hz und ³J = 5.35 Hz, H-3'); 3.74 (t, 2H, ³J = 6.60 Hz, N-CH₂, Dihydrouracil); 3.52 (t, 2H, ³J = 6.30 Hz, N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 2.80 (dt, 2H, ³J = 6.30 Hz und ³J = 2.85 Hz, O=C-CH₂, Dihydrouracil); 2.56 (t, 2H, ³J = 6.30 Hz, O=C-CH₂, Glu); 2.45 (t, 2H, ³J = 7.55 Hz, O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 2.15 und 1.96 (m, 2 x 1H, CH₂, Glu).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O), δ 180.5 (C=O); 179.5 (C=O); 176.6 (C=O); 176.4 (C=O); 174.3 (C-4); 157.6 (C-2); 91.5 (C-1'); 84.8 (C-4'); 75.4 (C-2'); 72.3 (C-3'); 51.7 (N-CH, Glu); 45.4 (N-CH₂, Dihydrouracil); 40.6 (O=C-CH₂, Dihydrouracil); 38.4 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 37.6 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 33.4 (O=C-CH₂, Glu); 29.4 (CH₂, Glu).

ESI-MS: 459.0 ([M-H]⁻), 461.0 ([M+H]⁺).

HPLC (220 nm): 96.1 %.

6.5.6 2-[4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)butanamido]-(*S*)-asparaginsäure
(183)



Der Dibenzylester **167** (30 mg, 0,05 mmol) wurde gemäß Vorschrift J, Methode B mit Pd(OH)₂ hydriert.

Ausbeute: 22 mg (94 %).

Schmelzpunkt: 151 °C

[α]_D²⁰: 15.9° (Wasser)

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

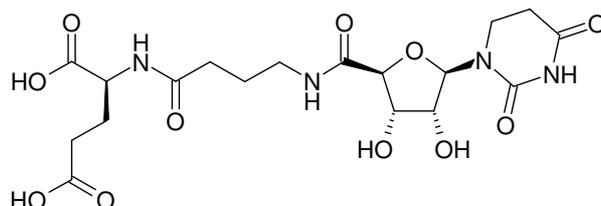
¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 5.82 (d, 1H, ³J = 6.60 Hz, H-1'); 4.71 (t, 1H, ³J = 6.95 Hz, N-CH, Asp); 4.41 (dd, 1H, ³J = 6.60 Hz und ³J = 5.35 Hz, H-2'), 4.38 (d, 1H, ³J = 3.15 Hz, H-4'); 4.35 (dd, 1H, ³J = 3.15 Hz und 5.35 Hz, H-3'); 3.66 (m, 2H, N-CH₂, Dihydrouracil); 3.28 (dt, 2H, ³J = 6.95 Hz und ³J = 7.85 Hz, N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 2.91 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, ³J = 5.05 Hz und ²J = 16.75 Hz, O=C-CH₂, Asp); 2.80 (m, 2H, O=C-CH₂, Dihydrouracil); 2.34 (t, 2H, ³J = 7.25 Hz, O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.83 (dt, 2H, ³J = 7.25 Hz und ³J = 6.95 Hz, CH₂, 4-Amidobutanamid).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 178.4 (C=O); 178.0 (C=O); 177.7 (C=O); 176.6 (C=O); 174.4 (C-4); 157.5 (C-2); 92.0 (C-1'); 84.9 (C-4'); 75.4 (C-2'); 72.5 (C-3'); 52.7 (N-CH, Asp); 41.3 (N-CH₂, Dihydrouracil); 40.9 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 39.1 (O=C-CH₂, Dihydrouracil); 35.6 (O=C-CH₂, Asp); 33.0 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 27.5 (CH₂, 4-Amidobutanamid).

ESI-MS: 459.0 ([M-H]⁻), 460.9 ([M+H]⁺).

HPLC (220 nm): 93.6 %.

6.5.5 2-[4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)butanamido]-(*S*)-glutaminsäure
(**184**)



Der Dibenzylester **168** (30 mg, 0,05 mmol) wurde gemäß Vorschrift J, Methode B mit Pd(OH)₂ hydriert.

Ausbeute: 23 mg (95 %).

Schmelzpunkt: 112 °C

[α]_D²⁰: - 22.4° (Wasser)

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 5.82 (d, 1H, ³J = 6.65 Hz, H-1'); 4.40 (dd, 1H, ³J = 6.60 und ³J = 5.35 Hz, H-2'); 4.38 (d, 1H, ³J = 3.15 Hz, H-4'); 4.36 (t, 1H, ³J = 6.00 Hz, N-CH, Glu); 4.34 (dd, 1H, ³J = 5.70 Hz und ³J = 2.85 Hz, H-3'); 3.73 (m, 2H, N-CH₂, Dihydrouracil); 3.20 (t, 2H, ³J = 7.60 Hz, N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 2.80 (m, 2H, O=C-CH₂, Dihydrouracil); 2.47 (t, 2H, ³J = 7.60 Hz, O=C-CH₂, Glu); 2.34 (t, 2H, ³J = 7.25 Hz, O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 2.18 und 1.98 (2 x m, 2 x 1H, CH₂, Glu); 1.62 (tt, 2H, ³J = 7.25 Hz, CH₂, 4-Amidobutanamid).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 180.2 (C=O); 179.0 (C=O); 178.6 (C=O); 176.5 (C=O); 174.3 (C-4); 157.5 (C-2); 91.9 (C-1'); 84.9 (C-4'); 75.4 (C-2'); 72.5 (C-3'); 51.7 (N-CH, Glu); 41.4 (N-CH₂, Dihydrouracil); 40.8 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 35.6 (O=C-CH₂, Dihydrouracil); 33.2 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 33.0 (O=C-CH₂, Glu); 29.0 (CH₂, Glu); 27.5 (CH₂, 4-Amidobutanamid).

ESI-MS: 472.9 ([M-H]⁻), 475.1 ([M+H]⁺).

HPLC (220 nm): 93.7 %.

6.6 Spaltung der (Bis-)Phosphonsäureestergruppe in der Nucleosid-5'-Seitenkette

Vorschrift K: Spaltung von Phosphonsäurediethylestern mit TMS-Br

Ein Nucleosid-Derivat mit terminaler Phosphonsäurediethylestergruppe oder Diphosphonsäuretetraethylestergruppe (20 mg) wurde in einem mit Septum verschlossenen, trockenen Zweihalskolben unter Argon (Ballon) in trockenem Dichlormethan (3 ml) suspendiert. Die Suspension wurde in einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. Unter starkem Rühren wurden mittels einer Kanüle 0,15 - 0,3 ml TMS-Br (s. u.) über einen Zeitraum von 10 Minuten zugetropft. Die entstehende Lösung wurde noch drei Stunden bei 0 °C gehalten und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurden die flüchtigen Bestandteile bei 0 °C abrotiert, der Rückstand im Eisbad in auf 0 °C temperiertem Wasser (2 ml) gelöst und dessen pH-Wert mit gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung auf 7-8 eingestellt. Die Lösung wurde so zwei Stunden gerührt, mit einem Gemisch aus Wasser und Methanol (10:1) auf sieben ml verdünnt und durch Zugabe von Trifluoressigsäure auf pH 2 angesäuert. Die Aufreinigung des Produktes wurde per RP-HPLC mit folgender Methode vorgenommen:

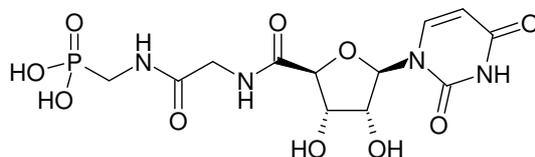
20 min Wasser/Methanol, (9:1), isokratisch, dann

30 min Gradient auf Wasser/Methanol (1:1), dann

20 min Methanol. Den Eluenten wurde 0,1 % Trifluoressigsäure zugesetzt.

Die Produktfraktion wurde mit Wasser verdünnt und der Gefriertrocknung unterzogen.

6.6.1 2-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]ethanamidomethylphosphonsäure (**194**)



Zur Spaltung des Phosphonsäurediethylesters wurden 15 mg (0.03 mmol) **147** mit 0,15 ml (1,2 mmol) TMS-Br umgesetzt.

Ausbeute: 8.4 mg (69 %)

Schmelzpunkt: 271 °C

HPLC: t_r = 4.33 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.96 (d, 1H, $^3J = 8.20$ Hz, H-6); 5.93 (d, 1H, $^3J = 4.75$ Hz, H-1'); 5.92 (d, 1H, $^3J = 7.90$ Hz, H-5); 4.58 (d, 1H, $^3J = 3.80$ Hz, H-4'); 4.50 (pseudo-t, 1H, $^3J = 5.35$ Hz und $^3J = 4.70$ Hz, H-2'); 4.54 (pseudo-t, 1H, $^3J = 5.35$ Hz und $^3J = 3.80$ Hz, H-3'); 4.09 – 3.97 (AB-System mit A d und B d, 2H, $^2J = 16.70$ Hz, N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 3.58 – 3.44 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, $^2J_{H,P} = 12.60$ Hz und $^2J = 15.40$ Hz, N-CH₂, Methylphosphonat).

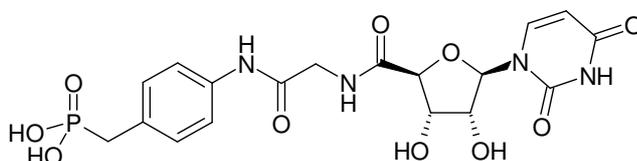
¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 175.2 (C=O); 171.6 (C=O); 166.4 (C-4); 154.7 (C-2); 146.2 (C-6); 105.4 (C-5); 94.8 (C-1'); 85.9 (H-4'); 75.5 (H-2' und H-3'); 45.1 (N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 39.7 (40.0 (d, $^1J_{C,P} = 146.3$ Hz, CH₂-P, Methylphosphonat).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ 16.5.

LC/ESI-MS: 407.3 ([M-H]⁻), 409.1 ([M+H]⁺).

HPLC (254 nm): > 99.9 %

6.6.2 4-[2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)ethanamido]benzylphosphonsäure (**196**)



Zur Spaltung des Phosphonsäurediethylesters wurden 16 mg (0.03 mmol) **144** mit 0,3 ml (2,4 mmol) TMS-Br umgesetzt.

Ausbeute: 12.5 mg (86 %)

Schmelzpunkt: 238 °C

HPLC: $t_r = 4.33$ Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 7.98 (d, 1H, $^3\text{J} = 7.90$ Hz, H-6); 7.39 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.50$ Hz, 2 x CH_{meta} , Benzylphosphonat); 7.33 (dd, 2H, $^3\text{J} = 8.50$ Hz und $^4\text{J} = 2.20$ Hz, 2 x CH_{ortho} , Benzylphosphonat); 5.97 (d, 1H, $^3\text{J} = 5.05$ Hz, H-1'); 5.78 (d, 1H, $^3\text{J} = 8.20$ Hz, H-5); 4.61 (d, 1H, $^3\text{J} = 3.80$ Hz, H-4'); 4.53 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 5.05$ Hz und $^3\text{J} = 5.35$ Hz, H-2'); 4.50 (pseudo-t, 1H, $^3\text{J} = 3.80$ Hz und $^3\text{J} = 5.05$ Hz, H-3'); 4.20–4.10 (AB-System mit A d und B d, 2H, $^2\text{J} = 16.70$ Hz, N- CH_2 , 2-Amidoethanamid); 3.12 (d, 2H, $^2\text{J}_{\text{H,P}} = 20.80$ Hz, $\text{CH}_2\text{-P}$, Benzylphosphonat).

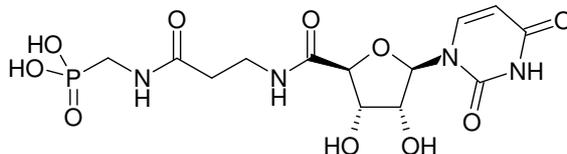
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 175.0 (C=O); 172.3 (C=O); 169.0 (C-4); 154.6 (C-2); 145.8 (C-6); 137.6 ($\underline{\text{C}}_{\text{Phenyl-NH}}$, Benzylphosphonat); 134.3 (d, $^2\text{J}_{\text{C,P}} = 9.2$ Hz, $\underline{\text{C}}_{\text{Phenyl-CH}_2\text{-P}}$, Benzylphosphonat); 133.1 (2 x CH_{ortho} , Benzylphosphonat); 125.0 (2 x CH_{meta} , Benzylphosphonat); 105.4 (C-5); 93.8 (C-1'); 85.6 (C-4); 75.4 (C-2); 75.3 (C-3); 45.5 (N- CH_2 , 2-Amidoethanamid); 37.4 (d, $^1\text{J}_{\text{C,P}} = 129.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-P}$, Benzylphosphonat t).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ 26.7.

LC/ESI-MS: 483.4 ($[\text{M-H}]^-$), 485.3 ($[\text{M+H}]^+$).

HPLC (254 nm): 99.9 %

6.6.3 3-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]propanamidomethylphosphonsäure (**195**)



Zur Spaltung des Phosphonsäurediethylesters wurden 16 mg (0.03 mmol) **148** mit 0,3 ml (2,4 mmol) TMS-Br umgesetzt.

Ausbeute: 10.2 mg, (81 %)

Schmelzpunkt: 284 °C

HPLC: t_r = 7.29 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 8.10 (d, 1H, $^3J = 8.15$ Hz, H-6); 5.89 (d, 1H, $^3J = 6.00$ Hz, H-1'); 5.78 (d, 1H, $^3J = 7.90$ Hz, H-5); 4.50 (dd, teilweise verdeckt von H-4', 1H, $^3J = 5.05$ Hz, H-2'); 4.48 (d, 1H, $^3J = 4.45$ Hz, H-4'); 4.27 (pseudo-t, 1H, $^3J = 4.70$ Hz und $^3J = 4.75$ Hz, H-3'); 3.56 (t, 2H, $^3J = 6.30$ Hz, N- CH_2 , 3-Amidopropanamid); 3.49 (d, 2H, $^2J_{\text{H,P}} = 12.25$ Hz, $\text{CH}_2\text{-P}$, Methylphosphonat); 2.53 (t, 2H, $^3J = 6.30$ Hz, O=C- CH_2 , 3-Amidopropanamid).

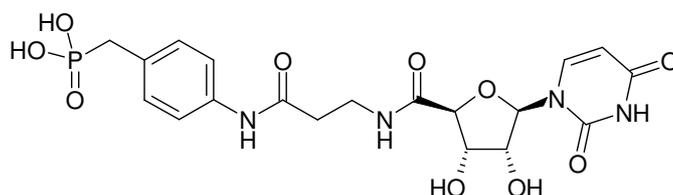
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 173.7 (C=O); 172.6 (C=O); 166.8 (C-4); 153.2 (C-2); 144.5 (C-6); 103.4 (C-5); 92.8 (C-1'); 85.4 (C-4'); 74.9 (C-2'); 74.0 (C-3'); 40.0 (d, $^1J_{\text{C,P}} = 146.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-P}$, Methylphosphonat); 38.6 (N- CH_2 , 3-Amidopropanamid); 37.9 (O=C- CH_2 , 3-Amidopropanamid).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O) δ 17.6.

ESI-MS: 421.3 ($[\text{M-H}]^-$), 423.1 ($[\text{M+H}]^+$).

HPLC (254 nm): > 99.9 %

6.6.4 4-[3-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)propanamido]benzylphosphonsäure (**197**)



Zur Spaltung des Phosphonsäurediethylesters wurden 16 mg (0.03 mmol) **145** mit 0,15 ml (1,2 mmol) TMS-Br umgesetzt.

Ausbeute: 9 mg (60 %)

Schmelzpunkt: 246 °C

HPLC: t_r = 36.38 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.30 (d, 1H, 4J = 1.90 Hz, H-3); 9.85 (s, 1H, CONH); 8.39 (t, 1H, 3J = 5.35 Hz, 5'-CONH); 8.27 (d, 1H, 3J = 8.20 Hz, H-6); 7.45 (d, 2H, 3J = 8.15 Hz, 2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 7.29 (dd, 2H, 3J = 8.85 Hz und 4J = 2.20 Hz, 2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 5.88 (d, 1H, 3J = 6.65 Hz, H-1'); 5.67 (dd, 1H, 3J = 8.20 Hz und 4J = 2.20 Hz, H-5); 5.50 (br s, 2H, 2'-OH, 3'-OH); 4.27 (d, 1H, 3J = 2.55, H-4'); 4.15 (dd, 1H, 3J = 4.75 Hz und 3J = 6.65 Hz, H-2'); 3.99 (dd, 1H, 3J = 4.40 Hz und 2J = 2.50 Hz, H-3'); N-CH₂ (3-Amidopropanamid) unter breitem Wassersignal bei 3.4 ppm; 2.87 (d, 2H, $^2J_{\text{H,P}}$ = 21.15 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); O=C-CH₂ (3-Amidopropanamid) unter dem Lösungsmittelsignal bei 2.5 ppm.

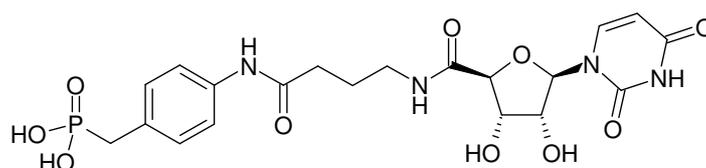
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 170.1 (C=O); 169.1 (C=O); 163.2 (C-4); 151.9 (C-2); 141.3 (C-6); 138.0 (C_{Phenyl}-NH, Benzylphosphonat); 130.0 (d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 9.4 Hz, C_{Phenyl}-CH₂-P, Benzylphosphonat); 129.1 (2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 119.2 (2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 102.2 (C-5); 87.9 (C-1'); 83.2 (C-4); 73.2 (C-2' und C-3'); 36.1 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 35.4 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 34.9 (d, $^1J_{\text{C,P}}$ = 131.6 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, DMSO- d_6) δ 21.6.

ESI-MS: 497.3 ($[M-H]^-$), 499.1 ($[M+H]^+$).

HPLC (254 nm): 98.8 %.

6.6.5 4-[4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)butanamido]benzylphosphonsäure (**198**)



Zur Spaltung des Phosphonsäurediethylesters wurden 17 mg (0.03 mmol) **146** mit 0,15 ml (1,2 mmol) TMS-Br umgesetzt.

Ausbeute: 12.3 mg (80 %)

Schmelzpunkt: 161 °C

HPLC: t_r = 37.40 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 7.84 (d, 1H, $^3J = 8.20$ Hz, H-6); 7.38 (d, 2H, $^3J = 7.85$ Hz, 2 x CH_{meta} , Benzylphosphonat); 7.28 (dd, 2H, $^3J = 8.50$ Hz und $^4J = 2.50$ Hz, 2 x CH_{ortho} , Benzylphosphonat); 5.84 (d, 1H, $^3J = 7.90$ Hz, H-5); 5.81 (d, 1H, $^3J = 5.35$ Hz, H-1'); 4.45 (d, 1H, $^3J = 4.10$ Hz, H-4'); 4.43 (dd, 1H, $^3J = 5.35$ Hz und $^2J = 5.70$ Hz, H-2'); 4.35 (dd, 1H, $^3J = 4.10$ Hz und $^3J = 5.35$ Hz, H-3'); 3.38 (m, 2H, $^3J = 7.25$ Hz, N- CH_2 , 4-Amidobutanamid); 3.23 (d, 2H, $^2J_{\text{H,P}} = 20.80$ Hz, $\text{CH}_2\text{-P}$, Benzylphosphonat); 2.45 (t, 2H, $^3J = 6.95$ Hz, $\text{O}=\text{C}-\underline{\text{CH}_2}$, 4-Amidobutanamid); 1.95 (m, 2H, $^3J = 7.25$ Hz und $^3J = 6.95$ Hz, CH_2 , 4-Amidobutanamid).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O) δ 174.8 (C=O); 172.7 (C=O); 165.2 (C-4); 152.9 (C-2); 140.9 (C-6); 138.3 ($\underline{\text{C}}_{\text{Phenyl-NH}}$, Benzylphosphonat); 132.9 (2 x CH_{ortho} , Benzylphosphonat); 128.5 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 9.4$ Hz, $\underline{\text{C}}_{\text{Phenyl-CH}_2\text{-P}}$, Benzylphosphonat), 124.8 (2 x CH_{meta} , Benzylphosphonat); 102.2 (C-5); 89.9 (C-1'); 84.5 (C-4'); 71.6 (C-

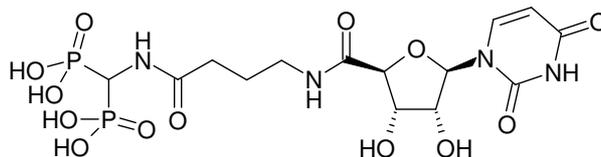
2'); 71.2 (C-3'); 39.9 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 37.8 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 34.4 (d, ¹J_{C,P} = 137.6 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 27.9 (CH₂, 4-Amidobutanamid).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ 23.6.

ESI-MS: 511.1 ([M-H]⁻), 513.0 ([M+H]⁺).

HPLC (254 nm): 99.8 %.

6.6.6 4-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]butanamidomethylendiphosphonsäure (**204**)



Zur Spaltung des Bisphosphonsäuretetraethylesters wurden 20 mg (0.03 mmol) **152** mit 0,3 ml (2,4 mmol) TMS-Br umgesetzt.

Ausbeute: 8 mg (52 %)

Schmelzpunkt: 188 °C

HPLC: t_r = 26.30 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.93 (d, 1H, ³J = 8.20 Hz, H-6); 5.92 (d, 1H, ³J = 7.90 Hz, H-5); 5.82 (d, 1H, ³J = 5.65 Hz, H-1'); N-CH₂ (Methylbisphosphonat) unter dem Lösungsmittelsignal bei 4.8 ppm; 4.61 (pseudo-t, 1H, ³J = 5.35 Hz und ³J = 5.35 Hz, H-2'); 4.48 (d, 1H, ³J = 4.10 Hz, H-4'); 4.43 (dd, 1H, ³J = 4.10 Hz und ³J = 5.05 Hz, H-3'); 3.23 (t, 2H, ³J = 6.95 Hz, N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 2.40 (t, 2H, ³J = 7.25 Hz, O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.86 (tt, 2H, ³J = 7.25 Hz und ³J = 6.90 Hz, CH₂, 4-Amidobutanamid).

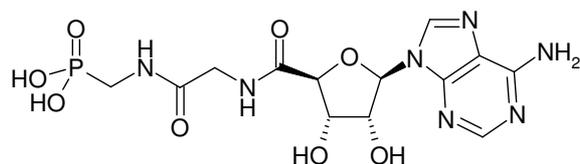
¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 177.9 (C=O); 174.2 (C=O); 169.1 (C-4); 154.6 (C-2); 147.0 (C-6); 105.3 (C-5); 95.1 (C-1'); 85.8 (C-4'); 75.5 (C-2'); 74.6 (C-3'); 49.5 (N-CH, Methylbisphosphonat); 41.2 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 35.7 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 27.6 (CH₂, 4-Amidobutanamid).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ 14.6

ESI-MS: 515.2 ([M-H]⁻), 517.2 ([M+H]⁺).

HPLC (254 nm): 99.3 %.

6.6.7 2-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]ethanamidomethylphosphonsäure (**199**)



Zur Spaltung des Phosphonsäurediethylesters wurden 15 mg (0.03 mmol) **174** mit 0,15 ml (1,2 mmol) TMS-Br umgesetzt.

Ausbeute: 9 mg (70 %)

Schmelzpunkt: 170 °C

HPLC: t_r = 37.40 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 8.61 (s, 1H, H-2); 8.47 (s, 1H, H-8); 6.26 (d, 1H, ³J = 6.60 Hz, H-1'); 4.90 (dd, 1H, ³J = 6.60 Hz und ³J = 5.05 Hz, H-2'); 4.73 (d, ³J = 2.85 Hz, 1H, H-4'); 4.68 (dd, 1H, ³J = 5.05 Hz und ³J = 2.85 Hz, H-3'); 4.06 (AB-System mit A d und B d, 2H, ²J = 16.70 Hz, N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 3.24 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, ²J_{H,P} = 12.60 Hz und ²J = 15.45 Hz, N-CH₂, Methylphosphonat).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 174.7 (C=O), 173.1 (C=O), 153.0 (C-6), 154.2 (C-2); 147.6 (C-4); 146.5 (C-8); 122.1 (C-5); 91.6 (C-1'); 86.7 (C-4'); 75.8 (C-2' und C-3');

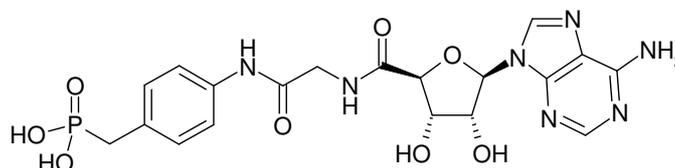
45.0 (N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 40.2 (d, ¹J_{C,P} = 157.1 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ 21.6.

ESI-MS: 430.1 ([M-H]⁻), 432.1 ([M+H]⁺).

HPLC (254 nm): 96.4 %.

6.6.8 4-[2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)ethanamido]benzylphosphonsäure (**201**)



Zur Spaltung des Phosphonsäurediethylesters wurden 17 mg (0.03 mmol) **169** mit 0,3 ml (2,4 mmol) TMS-Br umgesetzt.

Ausbeute: 11 mg (72 %)

Schmelzpunkt: 205 °C

HPLC: t_r = 34.15 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ 9.98 (s, 1H, CONH); 9.04 (t, 1H, ³J = 5.70 Hz, 5'-CONH); 8.56 (s, 1H, H-2); 8.26 (s, 1H, H-8); 7.89 (br s, 2H, 6-NH₂); 7.46 (d, 2H, ³J = 8.50 Hz, 2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 7.17 (dd, 2H, ³J = 8.85 Hz and ⁴J = 2.55 Hz, 2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 6.04 (d, 1H, ³J = 7.55 Hz, H-1'); 5.65 (br s, 2H, 2'-OH, 3'-OH); 4.64 (dd, 1H, ³J = 7.55 Hz und ³J = 4.40 Hz, H-2'); 4.43 (d, 1H, ³J = 1.25 Hz, H-4'); 4.24 (dd, 1H, ³J = 4.40 und ³J = 1.25 Hz, H-3'); 4.07 - 3.94 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, ³J = 5.70 Hz und ²J = 16.40 Hz, N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 2.89 (d, 2H, ²J_{H,P} = 21.15 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat).

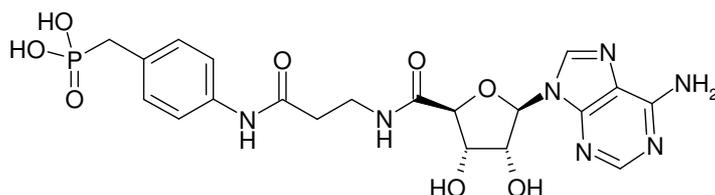
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆), δ 170.2 (C=O); 167.3 (C=O), 157.9 (C-6), 154.2 (C-2), 149.0 (C-4); 141.3 (C-8); 137.0 (C_{Phenyl}-NH, Benzylphosphonat); 130.1 (2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 129.3 (d, ²J_{C,P} = 8.9 Hz, C_{para}-CH₂-P, Benzylphosphonat); 119.4 (2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 119.1 (C-5); 87.6 (C-1'); 84.7 (C-4'); 73.5 (C-2'); 72.7 (C-3'); 42.5 (N-CH₂, 2-Amidoethanamid); 34.9 (d, ¹J_{C,P} = 131.4 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-d₆), δ 21.5.

ESI-MS: 497.3 ([M-H]⁻), 499.4 ([M+H]⁺).

HPLC (254 nm): 98.9 %.

6.6.9 4-[3-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)propanamido]benzylphosphonsäure (**202**)



Zur Spaltung des Phosphonsäurediethylesters wurden 17 mg (0.03 mmol) **170** mit 0,3 ml (2,4 mmol) TMS-Br umgesetzt.

Ausbeute: 13.1 mg (84 %)

Schmelzpunkt: 211 °C

HPLC: t_r = 34.15 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆), δ 9.84 (s, 1H, CONH); 9.08 (t, 1H, ³J = 6.00 Hz, 5'-CONH); 8.39 (s, 1H, H-2); 8.25 (s, 1H, H-8); 7.51 (br s, 2H, 6-NH₂); 7.41 (d, 2H, ³J = 8.20 Hz, 2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 7.12 (dd, 2H, ³J = 8.80 Hz und ⁴J = 2.20 Hz,

2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 5.94 (d, 1H, ³J = 7.85 Hz, H-1'); 4.59 (dd, 1H, ³J = 7.90 Hz und ³J = 4.75 Hz, H-2'); 4.33 (d, 1H, ³J = 1.55 Hz, H-4'); 4.16 (dd, 1H, ³J = 4.40 und ³J = 1.30 Hz, H-3'); 3.54 – 3.44 (m, 2H, ³J = 6.60 Hz, N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 3.24 (d, 2H, ²J_{H,P} = 21.45 Hz, CH₂-P, p-Aminobenzylphosphonat); 2.58 – 2.49 (m, ³J = 6.60 Hz, O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid).

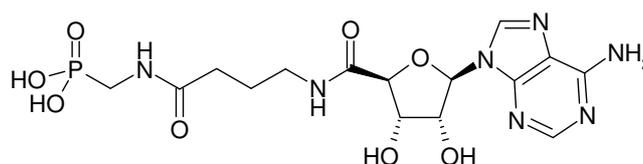
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆), δ 169.8 (C=O); 169.3 (C=O); 156.0 (C-6); 152.3 (C-2); 148.9 (C-4); 140.9 (C-8); 137.3 (C_{Phenyl}-NH, Benzylphosphonat); 129.9 (2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 129.0 (d, ²J_{C,P} = 34.7 Hz, C_{Phenyl}-CH₂-P, Benzylphosphonat); 119.7 (C-5); 119.1 (2 x CH_{meta}, p-Aminobenzylphosphonat); 88.0 (C-1'); 84.9 (C-4'); 73.3 (C-2'); 72.2 (C-3'); 36.5 (N-CH₂, 3-Amidopropanamid); 35.3 (O=C-CH₂, 3-Amidopropanamid); 34.9 (d, ¹J_{C,P} = 131.6 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat).

³¹P-NMR (202 MHz, DMSO-d₆), δ 21.8.

ESI-MS: 522.5 ([M-H]⁻), 524.3 ([M+H]⁺).

HPLC (254 nm): 99.5 %.

6.6.10 4-[(2S,3R,4S,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido]butanamidomethylphosphonsäure (**200**)



Zur Spaltung des Phosphonsäurediethylesters wurden 14.6 mg (0.03 mmol) **176** mit 0,15 ml (1,2 mmol) TMS-Br umgesetzt.

Ausbeute: 13.1 mg (84 %)

Schmelzpunkt: 185 °C

HPLC: t_r = 18.54 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, D₂O), δ 8.56 (s, 1H, H-2); 8.46 (s, 1H, H-8); 6.20 (d, 1H, ³J = 5.65 Hz, H-1'); 4.88 (pseudo-t, 1H, ³J = 5.05 Hz und ³J = 5.60 Hz, H-2'); 4.69 (pseudo-t, 1H, ³J = 5.05 Hz und ³J = 3.80 Hz, H-3'); 4.62 (br s, 1H, H-4'); 3.54 (d, 2H, ²J = 12.60 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 3.33 und 3.22 (2 x m, 2 x 1H, ³J = 6.90 Hz, N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 2.28 (t, 2H, ³J = 6.95 Hz, O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.78 (br t, 2H, ³J = 6.90 Hz, CH₂, 4-Amidobutanamid).

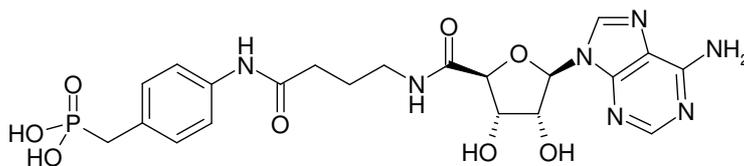
¹³C-NMR (125 MHz, D₂O), δ 174.1 (C=O); 166.3 (C=O); 153.5 (C-6); 151.1 (C-2); 148.2 (C-4); 146.5 (C-8); 122.2 (C-5); 91.9 (C-1'); 86.6 (C-4'); 75.8 (C-2'); 75.7 (C-3'); 41.4 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 40.1 (d, ¹J_{C,P} = 145.5 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 35.8 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 27.6 (CH₂, 4-Amidobutanamid).

³¹P-NMR (D₂O), δ 16.7.

ESI-MS: 458.0 ([M-H]⁻), 459.9 ([M+H]⁺).

HPLC (254 nm): 99.2 %.

6.6.11 4-[4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-carboxamido)butanamido]benzylphosphonsäure (**203**)



Zur Spaltung des Phosphonsäurediethylesters wurden 17 mg (0.03 mmol) **171** mit 0,3 ml (2,4 mmol) TMS-Br umgesetzt.

Ausbeute: 13.8 mg (86 %)

Schmelzpunkt: 224 °C

HPLC: t_r = 37.34 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 8.50 (s, 1H, H-2); 8.32 (s, 1H, H-8); 7.18 (dd, 2H, ³J = 9.10 Hz und ⁴J = 1.90 Hz, 2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 7.16 (d, 2H, ³J = 8.20 Hz, 2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 6.16 (d, 1H, ³J = 7.25 Hz, H-1'); 4.61 (dd, 1H, ³J = 6.95 Hz und ³J = 5.05 Hz, H-2'); 4.65 (d, 1H, ³J = 2.20 Hz, H-4'); 4.57 (dd, 1H, ³J = 5.05 Hz und ³J = 2.50 Hz H-3'); 3.48 und 3.28 (2 x m, 2 x 1H, ³J = 5.65 Hz, N-CH₂ 4-Amidobutanamid); 3.12 (d, 2H, ²J_{H,P} = 20.80 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 2.44 (t, 2H, ³J = 5.35 Hz, O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid); 1.93 (tt, 2H, ³J = 6.00 Hz, CH₂, 4-Amidobutanamid).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ 176.9 (C=O); 174.0 (C=O); 152.5 (C-6); 150.8 (C-2); 147.4 (C-4); 146.3 (C-8); 138.3 (C_{Phenyl}-NH, Benzylphosphonat); 133.1 (d, ²J_{C,P} = 9.4 Hz, C_{Phenyl}-CH₂-P, Benzylphosphonat); 132.9 (2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 123.1 (2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 121.9 (C-5); 91.4 (C-1'); 87.1 (C-4'); 75.7 (C-2'); 75.3 (C-3'); 41.9 (N-CH₂, 4-Amidobutanamid); 37.2 (d, ¹J_{C,P} = 143.3 Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 36.9 (O=C-CH₂, 4-Amidobutanamid), 25.3 (CH₂, 4-Amidobutanamid).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O) δ 23.4.

ESI-MS: 534.3 ([M-H]⁻), 536.2 ([M+H]⁺).

HPLC (254 nm): 98.4 %.

6.7 Darstellung und Charakterisierung von Nucleosid-5'-phosphorsäureamidaten

Vorschrift L: Synthese von Nucleosid-5'-Phosphorsäureamidaten

Das Dinatrium-Salz eines Nucleosidmonophosphats (AMP oder UMP, 0,2 mmol) wurde in 1 ml wässrigem Methylimidazolpuffer (0,25 M, pH 8,5) bei Raumtemperatur gelöst. Dazu wurden EDC (288 mg, 1 mmol) und die Aminokomponente (1,4 mmol), jeweils in 1 ml Methylimidazolpuffer gelöst, gegeben und der Reaktionsansatz 16 Stunden gerührt. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde ein zweites Quantum EDC (288 mg, 1 mmol), gelöst in 1 ml Methylimidazolpuffer, zugegeben und weitere sechs

1H, H-4'); 4.11 – 4.04 (q, 6H, 2 x O-CH₂); 4.06 (m, 2H, 2 x H-5'); 3.32 (AB-System mit A d und B d, 2H, ²J_{H,P} = 11.05 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 3.21 (q, 6H, 3 x N-CH₂); 1.34 (t, 6H, 2 x CH₃, Methylphosphonat); 1.28 (t, 9H, 3 x CH₃, Triethylamin).

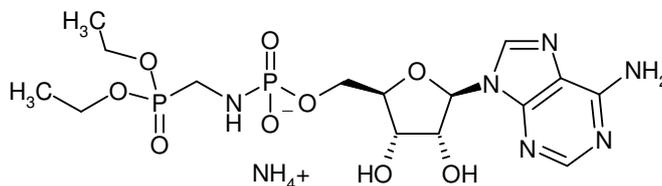
¹³C-NMR (125 MHz, D₂O), δ 169.0 (C-4); 154.7 (C-2); 144.6 (C-6); 105.4 (C-5); 91.5 (C-1'), 86.2 (C-2'); 76.9 (C-3'); 72.7 (C-4'); 66.8 (C-5'); 66.6 und 66.5 (2 x O-CH₂); 49.6 (3 x N-CH₂); 39.3 (d, ¹J_{C,P} = 157.6 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 18.5 und 18.4 (2 x CH₃); 11.1 (3 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O), δ 28.0 (C-P, Methylphosphonat); 7.8 (α-P).

ESI-MS: 472.0 ([M-H]⁻), 474.0 ([M+H]⁺).

HPLC (254 nm): 84.1 %, das Produkt weist eine Verunreinigung mit UMP (14.9 %) auf.

6.7.2. Adenosin-5'-phosphorsäure(diethylphosphonomethyl)amid (205)



100 mg Dinatrium-Adenosin-5'-monophosphat wurden mit 360 mg Aminomethylphosphonsäurediethylester-Oxalsäuresalz gemäß Vorschrift L zur Reaktion gebracht.

Ausbeute: 32 mg (32 %)

Ionenaustauschchromatographie: Vol_r = 170 ml

RP-HPLC: t_r = 17,20 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroskopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, D₂O), δ 8.51 (s, 1H, H-2); 8.25 (s, 1H, H-8); 6.10 (d, 1H, ³J = 5.35 Hz, H-1'); 4.82 (pseudo-t, 1H, ³J = 5.35 Hz und ³J = 5.05 Hz, H-2'); 4.51 (dd, 1H, ³J = 5.05 und ³J = 4.10 Hz, H-3'); 4.37 (d, ³J = 1.90 Hz, 1H, H-4'); 4.11 – 4.04 (m, 6H, 2 x

O-CH₂ und 2 x H-5'); 3.14 (AB-System mit A dd und B dd, 2H, ²J_{H,P} = 11.05 Hz und ²J = 18.00 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 1.25 (2 x t, 6H, 2 x CH₃).

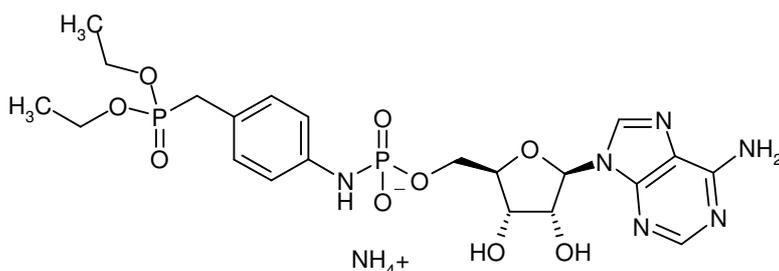
¹³C-NMR (125 MHz, D₂O), δ 156.2 (C-4); 152.7 (C-2); 151.6 (C-6); 143.6 (C-5); 121.3 (C-5); 90.2 (C-1'); 87.0 (C-2'); 76.9 (C-3'); 73.4 (C-4'); 67.2 (C-5'); 66.7 (2 x O-CH₂); 39.1 (d, ¹J_{C,P} = 158 Hz, CH₂-P, Methylphosphonat); 18.5 und 18.4 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O), δ 28.0 (C-P, Methylphosphonat); 7.8 (α-P).

ESI-MS: 495.3 ([M-H]⁻), 497.1 ([M+H]⁺).

HPLC(254 nm): 99.4 %.

6.7.3. Adenosin-5'-phosphorsäure[p-(diethylphosphonomethyl)phenyl]amid (207)



100 mg Dinatrium-Adenosin-5'-monophosphat wurden mit 340 mg p-Aminobenzylphosphonsäurediethylester gemäß Vorschrift L zur Reaktion gebracht.

Ausbeute: 28 mg (25 %)

Ionenaustauschchromatographie: Vol_r = 170 ml

RP-HPLC: t_r = 20,08 Minuten

Aussehen: Farbloses Lyophilisat (hygroscopisch)

Leicht löslich in: Wasser

Schwer löslich in: Ethanol, Diethylether, Dichlormethan

¹H-NMR (500 MHz, D₂O), δ 8.40 (s, 1H, H-2); 8.26 (s, 1H, H-8); 6.87 (dd, 2H, ³J = 8.80 Hz und ⁴J = 2.50 Hz, 2 x CH_{ortho}, Benzylphosphonat); 6.82 (d, 2H, ³J = 8.20 Hz, 2 x CH_{meta}, Benzylphosphonat); 6.05 (d, 1H, ³J = 5.35 Hz, H-1'); 4.85 (pseudo-t, 1H, ³J = 5.35 Hz, H-2'); 4.45 (dd, 1H, ³J = 3.80 Hz und ³J = 5.05 Hz, H-3'); 4.37 (d, ³J =

2.20 Hz und $^3J = 3.75$ Hz, 1H, H-4'); 4.08 (m, 2H, 2 x H-5'); 4.02 – 3.93 (m, 4H, 2 x O-CH₂); 3.14 (d, 2H, $^2J_{H,P} = 20.80$ Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 1.25 (2 x t, 6H, 2 x CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O), δ 156.5 (C-6); 152.7 (C-2); 151.6 (C-4); 143.6 (C-8); 121.3 (C-5); 90.2 (C-1'); 87.0 (C-2'); 76.9 (C-3'); 73.4 (C-4'); 67.2 (C-5'); 66.7 (2 x O-CH₂); 39.1 (d, $^1J_{C,P} = 157.9$ Hz, CH₂-P, Benzylphosphonat); 18.5 und 18.4 (2 x CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O), δ 30.8 (C-P, Benzylphosphonat); 1.5 (α-P).

ESI-MS: 571.0 ([M-H]⁻), 572.8 ([M+H]⁺).

HPLC(254 nm): 94.8 %.

6.8 Ectonucleotidase-Assays und Testung an P2Y-Rezeptoren

6.8.1 Kapillarelektrophorese-gestützter Assay zur Testung von E-NTPDase-Inhibitoren²¹²

Die Testungen an E-NTPDasen wurden von Dr. Jamshed Iqbal durchgeführt. Die rekombinanten humanen NTPDasen 1-3 stammen aus dem Arbeitskreis von Dr. Jean Sévigny (Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada), die NTPDase8 wurde von Dr. Aileen F. Knowles (Department of Chemistry, San Diego State University, San Diego, CA 92182-1030, USA) zur Verfügung gestellt. Dr. Jamshed Iqbal führte die Testungen der Substanzen an den E-NTPDasen durch. Die Enzyminhibitionsassays wurden bei 37 °C in einem Endvolumen von 100 µl Puffer, der maximal 1 % DMSO enthielt, durchgeführt. Das Substrat ATP (320 µM) und der in 10 µl Wasser bzw. Wasser/DMSO gelöste Inhibitor wurden in einem Reaktionspuffer mit 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ und 10 mM HEPES bei pH 7,4 gelöst. Die Lösung wurde nach Zugabe der in 10 µl gelösten Ectonucleotidase bei 37 °C 15 Minuten inkubiert. Das Enzym wurde daraufhin durch vierminütiges Erhitzen auf 99 °C denaturiert und 50 µl der Reaktionslösung in die CE injiziert. Als interner Standard fungierte UMP (20 µM). Alle Elektropherogramme

wurden mit einem P/ACE MDQ Kapillarelektrophoresegerät (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) mit Diodenarray-UV-Detektor aufgenommen. Der Probensammler und die Kapillare wurden auf 25 °C temperiert. Als Kapillare kam eine eCAP Polyacrylamid-überzogene Siliziumkapillare der Maße 20 cm (effektive Länge) x 50 µm (interner Durchmesser) zum Einsatz (CS-Chromatographie (Langerwehe, Deutschland). Die Analyten wurden an der kathodischen Seite der Kapillare injiziert, in ihr mit einer Spannung von 7 kV getrennt und bei 210 nm detektiert. Als Trennmedium diente 50 mM-Phosphatpuffer, pH 6.5. Der Analyt AMP (E-NTPDase2: ADP) wurde bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert. Die UV-Signale wurden mit der P/ACE MDQ-Software 32 KARAT der Firm Beckman Coulter analysiert. Zur Prüfung („Screening“) von potentiellen Inhibitoren wurden diese zunächst in einer Konzentration von 1 mM getestet. Danach wurde gegebenenfalls eine Dosis-Wirkungskurve mit sechs bis acht über mindestens drei Zehnerpotenzen verteilten Konzentrationen des Inhibitors erstellt. Jede IC₅₀-Wertbestimmung wurde in zwei voneinander unabhängigen Experimenten als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die K_i-Werte wurde mit der Cheng-Prusoff-Gleichung aus den mit dem Programm PRISM[®] 3.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) ermittelten IC₅₀-Werten berechnet, wobei von einem kompetitiven Hemmechanismus ausgegangen wurde.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[ATP]}{K_m(ATP)}}$$

Die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) der humanen E-NTPDasen wurden im Arbeitskreis von Dr. Jean Sévigny ermittelt.¹²⁴

Tabelle 6.1: K_m-Werte der humanen E-NTPDasen¹¹²

	NTPDase1	NTPDase2	NTPDase3	NTPDase8
K _m ± SEM [µM]	17 ± 1	70 ± 2	75 ± 10	46 ± 5

6.8.2 Kapillarelektrophorese-gestützter Assay zur Testung von Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitoren

Die Testungen an der Ecto-5'-Nucleotidase der Ratte wurden von Sang-Yong Lee durchgeführt. Die rekombinante Ecto-5'-Nucleotidase der Ratte stammte aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Herbert Zimmermann (AK Neurochemie, Biozentrum der J.W. Goethe-Universität, Frankfurt a. M., Deutschland).

Die Enzyminhibitionsassays wurden bei 37 °C in einem Endvolumen von 100 µl Puffer, der maximal 1 % DMSO enthielt, durchgeführt. Das Substrat AMP (400 µM) und der in 10 µl Wasser bzw. Wasser/DMSO gelöste Inhibitor wurden in einem Reaktionspuffer mit 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ und 10 mM Hepes bei pH 7,4 gelöst. Die Lösung wurde nach Zugabe der in 10 µl Reaktionspuffer gelösten Ecto-5'-Nucleotidase (0.52 µg) bei 37 °C 10 Minuten inkubiert. Das Enzym wurde daraufhin durch vierminütiges Erhitzen auf 99 °C denaturiert und 50 µl der Reaktionslösung wurden in die CE injiziert. Als interner Standard fungierte UMP (20 µM). Die CE-Untersuchungen wurden mit dem gleichen Instrument wie oben beschrieben durchgeführt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 15 kV in einer eCAP fused-silica Kapillare [30 cm (20 cm effektive Länge), x 75 µm interner Durchmesser (I.D), Beckman Coulter] durchgeführt. Als Trennpuffer diente 40 mM Natriumboratpuffer, pH 9.1. Die Kapillare wurde vor jeder Trennung mit 0.1 N NaOH (2 min), deionisiertem Wasser (1 min) und dem Trennpuffer (1 min) gewaschen. Der in der enzymatische Reaktion entstandene Analyt Adenosin wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm detektiert.

Screening, Ermittlung des IC₅₀-Werts und Berechnung des K_i-Werts wurden, wie oben für die E-NTPDase-Inhibitoren beschrieben, durchgeführt.

Der K_m-Wert der humanen 5'-Nucleotidase betrug 20 µM.

6.8.3 Radioligandbindungsassay am humanen P2Y₁₂-Rezeptor

Die Testungen am P2Y₁₂-Rezeptor wurden von Dr. Kerstin Atzler und Younis Baqi durchgeführt. Aus menschlichen Thrombozyten wurden Membranen präpariert. Radioligandbindungsstudien wurden mit 5 nM [³H]PSB-0413 an 100 µg Protein in Tris-HCl Puffer 50 mM, pH 7.4 vorgenommen.^{83,298} Zu testende Substanzen wurden

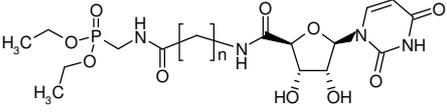
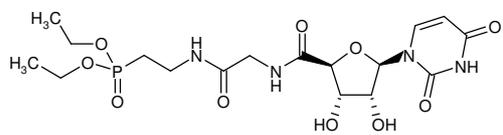
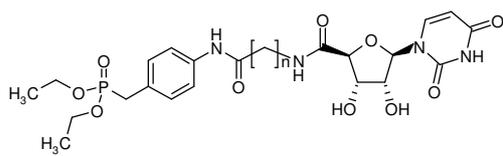
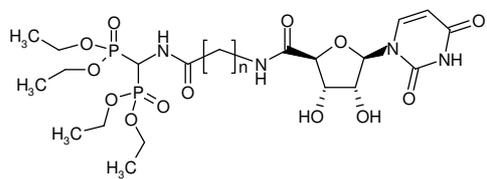
in Konzentrationen von 100 und 10 μM zugegeben. Die Lösung wurde eine Stunde inkubiert und danach durch GF/B Filter filtriert. Die unspezifische Bindung wurde mit 1 mM ADP bestimmt. Es wurden immer mindestens drei voneinander unabhängige Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) analysiert.

6.8.4 Calcium-Assays an humanen P2Y_{2,4}-Rezeptoren und am Ratten-P2Y₆-Rezeptor

Die Testungen am P2Y_{2,4,6}-Rezeptor wurden von Anja Scheiff und Karen Schmeling durchgeführt. Für die Testungen wurden 1321N1-Astrocytomzellen verwendet, die den jeweiligen P2Y-Rezeptor-Subtyp rekombinant exprimieren. Die am Boden der Zellkulturflasche adhären Astrocytomzellen wurden gewaschen, mit Trypsin abgelöst, in Medium aufgenommen und 30 bis 60 Minuten im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂-Gehalt) stehen gelassen. Die Zellen wurden zentrifugiert, in Krebs-HEPES-Puffer resuspendiert und zu einer Mischung aus 3 μl Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 und 3 μl Lösungsvermittler Pluronic[®] F-127 gegeben. Die Testsubstanzen (100 μM), reiner Krebs-HEPES-Puffer als Nullwert-Referenz und der jeweilige Agonist (P2Y_{2,4}: UTP, P2Y₆: UDP, jeweils zugegeben in einer Konzentration, die etwa 80 % des maximalen Effekts hervorruft) als 100 %-Wert wurden in jedes Well der schwarzen 96-well-Mikrotiterplatte zu je 20 μl vorgelegt. Zu diesen wurde pro Well 160 μl Zellsuspension pipettiert. Die Platte wurde 20 Minuten lang bei Raumtemperatur im Fluorimeter (Fluostar Galaxy[®]) inkubiert und anschließend die Fluoreszenz vermessen. In die mit Testsubstanz beschickten Wells wurde ebenfalls der jeweilige Agonist in oben erwähnter Konzentration injiziert, um zu beobachten, ob die Testsubstanz in der Lage ist, die durch den Agonisten ausgelöste Stimulation und in Folge dessen die Calciumausschüttung in der Zelle zu unterbinden. In jedes Well wurden insgesamt 20 μl (Puffer für den Nullwert, Agonist für alle weiteren Wells) injiziert. Die prozentuale Hemmung des Agonist-Effektes durch die Testsubstanz wurde berechnet. Da hierbei auch Agonisten infolge der Rezeptor-Desensibilisierung die Agonist-induzierte Calcium-Mobilisierung hemmen, kann bei in diesem Testsystem inaktiven Verbindungen auf die direkte Agonist-Testung verzichtet werden.

6.8.5 Tabellarische Darstellung der Testergebnisse an P2Y-Rezeptoren

Tabelle 6.2: Uridinderivate mit 5'-Phosphonsäureesterpartialstruktur

Strukturformel	n	Verbindung	hP2Y ₂ ^a	hP2Y ₄ ^b	rP2Y ₆ ^c	hP2Y ₁₂
	1	147	n.d. ^f	n.d. ^e	17 ± 16	31 ± 1 ^d
	2	148	n.d. ^f	n.d. ^e	- 3 ± 2	7 ± 5 ^e
	3	149	n.d. ^f	n.d. ^e	- 3 ± 11	2 ± 8 ^d
			n.d. ^f			
		150	n.d. ^f	n.d. ^e	9 ± 13	2 ± 3 ^e
	1	144	n.d. ^f	n.d. ^e	- 10 ± 10	2 ± 6 ^e
	2	145	n.d. ^f	14 ± 6	7 ± 7	9 ± 4 ^e
	3	146	n.d. ^f	n.d. ^f	- 8 ± 11	6 ± 4 ^e
	1	150	- 38 ± 11	34 ± 15	8 ± 14	2 ± 5 ^d
	2	151	- 12 ± 24	7 ± 20	14 ± 2	1 ± 5 ^d
	3	152	- 44 ± 20	27 ± 7	18 ± 4	1 ± 5 ^d

^a Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UTP [3 µM] in hP2Y₂-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 µM, (n = 3)

^b Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UTP [3 µM] in hP2Y₄-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 µM, (n = 3)

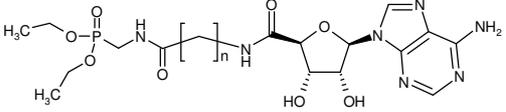
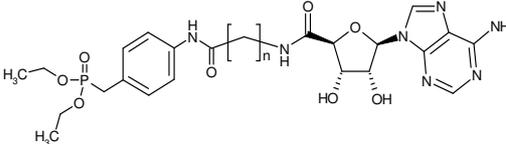
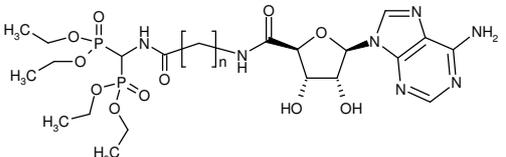
^c Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UDP [3 µM] in hP2Y₆-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 µM, (n = 3)

^d Prozent Inhibition der Bindung von [³H]PSB-0413 an humane Thrombocyten-Membranen bei 10 µM ± SEM (n = 3)

^e Prozent Inhibition der Bindung von [³H]PSB-0413 an humane Thrombocyten-Membranen bei 100 µM ± SEM (n = 3)

^f nicht bestimmt

Tabelle 6.3: Adenosinderivate mit terminaler 5'-Phosphonsäureesterpartialstruktur

Strukturformel	n	Verbindung	hP2Y ₂ ^a	hP2Y ₄ ^b	rP2Y ₆ ^c	hP2Y ₁₂
	1	174	n.d. ^f	n.d. ^f	n.d. ^f	-4 ± 6 ^e
	2	175	n.d. ^f	n.d. ^f	n.d. ^f	5 ± 1 ^e
	3	176	n.d. ^f	n.d. ^f	n.d. ^f	1 ± 6 ^e
	1	169	n.d. ^f	n.d. ^f	6 ± 6	2 ± 4 ^e
	2	170	n.d. ^f	n.d. ^f	- 15 ± 0	3 ± 11 ^e
	3	171	n.d. ^f	n.d. ^f	- 13 ± 8	9 ± 3 ^e
	2	172	n.d. ^f	n.d. ^f	5 ± 8	n.d. ^f
	3	173	n.d. ^f	n.d. ^f	- 5 ± 2	n.d. ^f

^a Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UTP [3 μM] in hP2Y₂-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM, (n = 3)

^b Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UTP [3 μM] in hP2Y₄-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM, (n = 3)

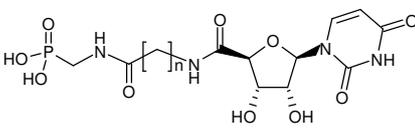
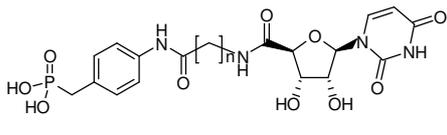
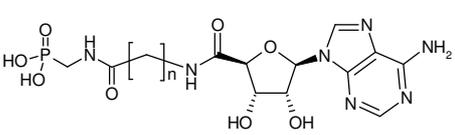
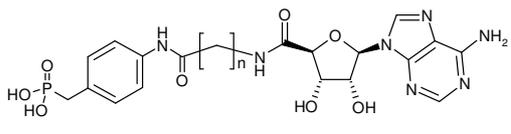
^c Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UDP [3 μM] in hP2Y₆-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM, (n = 3)

^d Prozent Inhibition der Bindung von [³H]PSB-0413 an humane Thrombocyten-Membranen bei 10 μM ± SEM (n = 3)

^e Prozent Inhibition der Bindung von [³H]PSB-0413 an humane Thrombocyten-Membranen bei 100 μM ± SEM (n = 3)

^f nicht bestimmt

Tabelle 6.4: Uridin- und Adenosinderivate mit 5'-Phosphonsäurepartialstruktur

Strukturformel	n	Verbindung	hP2Y ₂ ^a	hP2Y ₄ ^b	rP2Y ₆ ^c	hP2Y ₁₂
	1	194	n.d. ^f	n.d. ^f	n.d. ^f	-5 ± 7 ^e
	2	195	n.d. ^f	n.d. ^f	-19 ± 19	-16 ± 7 ^e
	1	196	n.d. ^f	n.d. ^f	4 ± 2	-7 ± 9 ^d
	2	197	n.d. ^f	n.d. ^f	39 ± 9	32 ± 1 ^d
	3	198	n.d. ^f	n.d. ^f	22 ± 9	11 ± 6 ^d
	1	199	n.d. ^f	n.d. ^f	n.d. ^f	2 ± 3 ^e
	3	200	n.d. ^f	n.d. ^f	n.d. ^f	-3 ± 3 ^e
	1	201	n.d. ^f	n.d. ^f	10 ± 1	30 ± 4 ^d
	2	202	n.d. ^f	n.d. ^f	30 ± 3	17 ± 2 ^d
	3	203	n.d. ^f	n.d. ^f	17 ± 5	18 ± 4 ^d

^a Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UTP [3 μM] in hP2Y₂-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM, (n = 3)

^b Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UTP [3 μM] in hP2Y₄-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM, (n = 3)

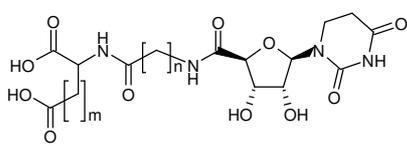
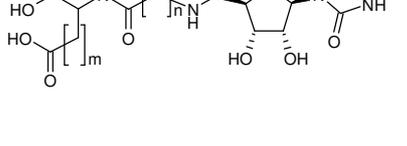
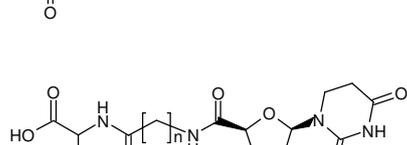
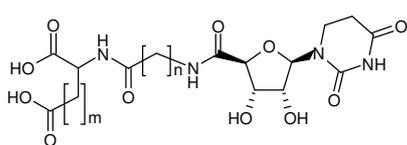
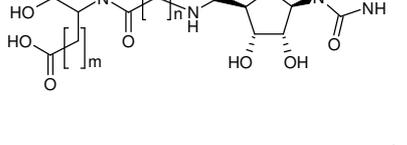
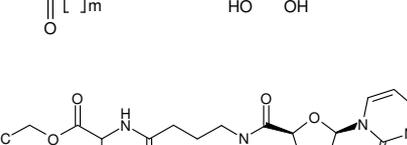
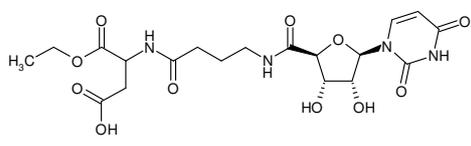
^c Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UDP [3 μM] in hP2Y₆-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM, (n = 3)

^d Prozent Inhibition der Bindung von [³H]PSB-0413 an humane Thrombocyten-Membranen bei 10 μM ± SEM (n = 3)

^e Prozent Inhibition der Bindung von [³H]PSB-0413 an humane Thrombocyten-Membranen bei 100 μM ± SEM (n = 3)

^f nicht bestimmt

Tabelle 6.5 : Uridinderivate mit terminaler Dicarbonsäurepartialstruktur

Strukturformel	n	m	Verbindung	hP2Y ₂ ^a	hP2Y ₄ ^b	rP2Y ₆ ^c	hP2Y ₁₂
	1	1	179	n.d. ^e	27 ± 8	- 3 ± 1	1 ± 6 ^d
	2	1	180	n.d. ^e	n.d. ^e	n.d. ^e	2 ± 5 ^d
	3	1	181	n.d. ^e	10 ± 5	15 ± 8	4 ± 6 ^d
	1	2	182	n.d. ^e	n.d. ^e	n.d. ^e	n.d. ^e
	2	2	183	n.d. ^e	n.d. ^e	n.d. ^e	6 ± 4 ^d
	3	2	184	n.d. ^e	36 ± 25	- 8 ± 6	4 ± 6 ^d
			120	- 28 ± 11	n.d. ^e	n.d. ^e	n.d. ^e

^a Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UTP [3 μM] in hP2Y₂-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM, (n = 3)

^b Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UTP [3 μM] in hP2Y₄-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM, (n = 3)

^c Prozent Inhibition ± SEM des Effekts von UDP [3 μM] in hP2Y₆-1321N1 Astrocytomzellen bei 100 μM, (n = 3)

^d Prozent Inhibition der Bindung von [³H]PSB-0413 an humane Thrombocyten-Membranen bei 10 μM ± SEM (n = 3)

^e nicht bestimmt

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Ado	Adenosin
ADP	Adenosinmonophosphat
AMP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
br	breit
cAMP	Cycloadenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CDCl ₃	deutერიertes Chloroform
CE	Kapillarelektrophorese
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator channel
CF	Cystische Fibrose
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CRCC	Ca ²⁺ -regulated Cl ⁻ -channel
CysLT	Cysteinyl-Leukotrien
d	Duplett
Da	Dalton
DAG, DG	Diacylglycerol
DIPEA	Diisopropylethylamin
D ₂ O	deutერიertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPA	Diphenylphosphorylazid
Ecto-5'-NT	Ecto-5'-Nucleotidase
EDC	1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid
E-NPP	Ecto-Nucleotidpyrophosphatase
E-NTPDase	Ecto-Nucleosidtriphosphatdiphosphohydrolase
ERK	Extracellular-Signal Regulated Kinase
ESI	Electron Spray Ionisation
GPI	Glycosylphosphatidylinositol

h	Stunde
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazolyl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HCTU	2-(6-Chlor-1 <i>H</i> -benzotriazolyl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIF	Hypoxia-Inducible Factor
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
IL	Interleukin
IMP	Inosinmonophosphat
INF	Interferon
ITP	Inosintriphosphat
LC	Liquid Chromatography; Locus Coeruleus
m	Multiplett, meta
MC	Mucociliary Clearance
MeOD	deuteriertes Methanol
MS	Massenspektrometer
NANC	nicht-adrenerg, nicht-cholinerg
NMR	nuclear magnetic resonance, Kernresonanz
NDP	Nucleosiddiphosphat
NTP	Nucleosidtriphosphat
o	ortho
p	para; pseudo
PAG	Periaquaeductales Grau
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLE	Pig Liver Esterase
PyBOP	Benzotriazolylxytrispyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
q	Quartett
r	Ratte
ras	Rat sarcoma
RP	reverse Phase
s	Singulett

SEM	Standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts
<i>solCD39</i>	lösliche Form der NTPDase1
t	Triplet
<i>tBoc</i>	<i>Tert</i> -Butyloxycarbonyl
Th	T-Helferzelle
Thpp	T-Helfer-Vorläuferzelle
THF	Tetrahydrofuran
TMD	Transmembrandomäne
TMS	Tetramethylsilan
TMS-Br	Trimethylsilylbromid
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Treg	T-Regulatorische Zelle
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
Uri	Uridin
UTP	Uridintriphosphat

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten für P2-Rezeptorliganden	7
Tabelle 2.1	Nomenklatur der membranständigen E-NTPDasen und Ecto-5'-Nucleotidase	13
Tabelle 2.2	Katalytische Eigenschaften der E-NTPDasen	14
Tabelle 2.3	8-Alkylthio-ATP-Derivate	35
Tabelle 2.4	Isothiocyanate	36
Tabelle 2.5	<i>Suramin</i> und davon abgeleitete Verbindungen	37
Tabelle 2.6	<i>Reactive Blue 2</i> und abgeleitete Verbindungen	38
Tabelle 2.7	Naphthalinsulfonate	39
Tabelle 2.8	Pyrimidin-Derivate	40
Tabelle 2.9	An E-NTPDasen untersuchte Standardinhibitoren	41
Tabelle 2.10	<i>RB2</i> -Derivate als E-NTPDase-Inhibitoren	42
Tabelle 2.11	Polyoxometalate als Inhibitoren von E-NTPDasen	43
Tabelle 2.12	Kompetitive Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitoren	44

Tabelle 2.13	Nicht-kompetitive Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitoren	45
Tabelle 3.1	Bewertung einiger Schutzgruppen für die 2',3'-Positionen der Ribose	54
Tabelle 3.2	Bewertung einiger Funktionalisierungsmöglichkeiten der Nucleosid-5'-Position	61
Tabelle 3.3	Eignung von Kopplungsreagentien	72
Tabelle 3.4	Methoden zur Abspaltung von Schutzgruppen aus Nucleosidderivaten	81
Tabelle 4.1	Uridinderivate mit 5'-Phosphonsäureesterpartialstruktur	90
Tabelle 4.2	Gegenüberstellung von selektiven und unselektiven E-NTPDase-Inhibitoren	91
Tabelle 4.3	Selektive Hemmer der NTPDase1 und 2	93
Tabelle 4.4	Einfluß des Linkers auf die inhibitorische Potenz von Uracilnucleotid-Mimetika an NTPDase1 und 2	94
Tabelle 4.5	Adeninnucleotid-Mimetika mit terminaler 5'-Phosphonsäureesterpartialstruktur	97
Tabelle 4.6	Vergleich der Verbindungen 146 und 171	98
Tabelle 4.7	Hemmung von E-NTPDasen durch Uracil- und Adeninnucleotid-Mimetika mit 5'-Phosphonsäurepartialstruktur	99
Tabelle 4.8	Hemmung von NTPDasen durch Uridinderivate mit terminaler 5'-Carbonsäurestruktur	100
Tabelle 4.9	Hemmung der Ecto-5'-NT durch 5,6-Dihydrouracilderivate mit 5'-terminaler Dicarbonsäurestruktur	102
Tabelle 4.10	Hemmung der Ecto-5'-NT durch Adenosin- und Uridinderivate mit 5'-terminaler Phosphonsäureesterpartialstruktur	103
Tabelle 4.11	Hemmung der Ecto-5'-NT durch Adenosin- und Uridinderivate mit 5'-terminaler Phosphonsäurepartialstruktur	104
Tabelle 4.12	Vergleich der Ecto-5'-NT-Hemmung durch Uracil-nucleotid-Mimetika mit Phosphonsäureester- und Phosphonsäurestruktur	105
Tabelle 4.13	Selektiver NTPDase1-Inhibitor	106
Tabelle 4.14	Selektive NTPDase2-Inhibitoren	107
Tabelle 4.15	Der submikromolare Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitor 183	107
Tabelle 4.16	Affinität der Standardinhibitoren zu ausgewählten P2Y- und P2X-Rezeptoren	108
Tabelle 4.17	Pharmakokinetische Parameter der Ectonucleotidase-Inhibitoren	110

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Nucleotide und Adenosin	1
Abbildung 1.2	P2-Rezeptorliganden als Arzneistoffe	2
Abbildung 1.3	Modell der purinergen Transmission	4
Abbildung 1.4	Purinerge Rezeptoren und ihre physiologischen Agonisten	6
Abbildung 2.1	Extrazellulärer Metabolismus von ATP	9
Abbildung 2.2	Substrate für NPP1-3	12
Abbildung 2.3	Durch E-NTPDasen und Ecto-5'-Nucleotidase bewirkte Dephosphorylierungskaskade	15
Abbildung 2.4	Interaktion der NTPDase1, 2 mit dem P2Y ₁ -Rezeptor	16
Abbildung 2.5	Struktur der NTPDase3	18
Abbildung 2.6	Vermuteter Hydrolysemechanismus der NTPDase3	19
Abbildung 2.7	Offene (a) und geschlossene (b) Form der bakteriellen 5'-Nucleotidase mit Inhibitor ATP	21
Abbildung 2.8	Aktives Zentrum der Ecto-5'-Nucleotidase mit dem Inhibitor α,β -Methylen-ADP	21
Abbildung 2.9	Katalytischer Mechanismus der Ecto-5'-Nucleotidase	22
Abbildung 2.10	Stimulierung der mucociliären Clearance durch NTPDase1,3-Hemmer	24
Abbildung 2.11	Einfluß der NTPDasen 1 und 2 auf die Thrombozytenaggregation	28
Abbildung 2.12	Immunmodulierung durch NTPDase1 und Ecto-5'-NT	29
Abbildung 2.13	Feedbackmechanismus durch Nucleotide	31
Abbildung 2.14	Wirkungsweise von Ectonucleotidase-Inhibitoren	33
Abbildung 3.1	Beispiele für Nucleotidmimetika	48
Abbildung 3.2	Uracilnucleotid-Mimetika	49
Abbildung 3.3	Analoge Adeninnucleotid-Mimetika	49
Abbildung 3.4	Reaktivitäten des Uridins	50
Abbildung 3.5	Einführung der Anisylidenschutzgruppe	53
Abbildung 3.6	Darstellung von 2',3'-Cinnamylidenuridin	53
Abbildung 3.7	Bildung von 2,5'-Cyclouridin nach 5'-Tosylierung	55
Abbildung 3.8	Einführung der Nucleosid-5'-Aminogruppe	56
Abbildung 3.9	Acylierung des Uridin-5'-Amins	57

Abbildung 3.10	Darstellung von Adenosin-5'-carbamaten	57
Abbildung 3.11	Acylierung von Uridin	58
Abbildung 3.12	Pfitzner-Moffatt-Oxidation und anschließende Wittig-Olefinierung	58
Abbildung 3.13	Darstellung der Anisyliden-geschützten Nucleosid-Carbonsäuren 84 und 85	59
Abbildung 3.14	Darstellung von 2',3'-Cinnamylidenuridin-carbonsäure 86	60
Abbildung 3.15	Kopfgruppe K und Linker L	62
Abbildung 3.16	Aminodicarbonsäureester als hydrophile Kopfgruppen K	62
Abbildung 3.17	Aminophosphonsäureester als hydrophile Kopfgruppen K	63
Abbildung 3.18	<i>t</i> Boc-geschützte ω -Aminosäuren als Linker	63
Abbildung 3.19	Darstellung von Amidinen aus boc-geschützten Aminosäuren mittels gemischtem Anhydrid	64
Abbildung 3.20	Abspaltung der <i>t</i> boc-Schutzgruppe	65
Abbildung 3.21	Dargestellte Reihen von Phosphatmimetika	66
Abbildung 3.22	Ermittlung des geeigneten Kopplungsreagenzes zur Darstellung von Anisyliden-geschütztem Uridincarboxamid 128	67
Abbildung 3.23	Reaktionsmechanismus der Amidsynthese mit PyBOP	69
Abbildung 3.24	Umsetzung von Triphosphatmimetikum 107 (Linker: Glycin) mittels HCTU	70
Abbildung 3.25	Cinnamyliden-geschütztes Uracilnucleotid-Analogon	70
Abbildung 3.26	Reaktionsmechanismus der Amidsynthese mit HCTU	71
Abbildung 3.27	Auf Hydroxybenzotriazol basierende Kopplungs-reagentien	72
Abbildung 3.28	Spaltung des 2',3'-Anisylidenacetals	74
Abbildung 3.29	Nichtionische Uracilnucleotid-Mimetika	75
Abbildung 3.30	Nichtionische Adeninnucleotid-Mimetika	76
Abbildung 3.31	Fehlgeschlagene Hydrolyse von Carbonsäureethylestern mit KOH	77
Abbildung 3.32	Enzymatische Esterhydrolyse	77
Abbildung 3.33	Hydrogenolyse von Benzylestern der Verbindungen 163-168	78
Abbildung 3.34	Mechanismus der Desalkylierung von Phosphonsäureestern	79
Abbildung 3.35	Gescheiterte Versuche, Phosphonsäureester zu desalkylieren	79
Abbildung 3.36	Spaltung des Phosphonsäurediethylesters nach vorangegangener Entschützung der Nucleosid-2',3'-Positionen	80
Abbildung 3.37	Nach Desalkylierung der Phosphonsäureester erhaltene Produkte	80

Abbildung 3.38	Entschützung eines Bisphosphonsäuretetraethylesters	81
Abbildung 3.39	Darstellung von Nucleosidmonophosphoramidaten	82
Abbildung 3.40	Darstellung eines 5'-Arylphosphoramidates	82
Abbildung 3.41	Ausschnitt aus dem ¹ H-NMR-Spektrum der Verbindung 84	83
Abbildung 3.42	¹ H-NMR-Spektrum der Verbindung 144	84
Abbildung 3.43	Ausschnitt aus dem ¹ H-NMR-Spektrum der Verbindung 183	85
Abbildung 3.44	¹³ C-NMR-Spektrum der Verbindung 144	86
Abbildung 3.45	³¹ P-NMR-Spektrum der Verbindung 144	87
Abbildung 3.46	Synthesestrategie	88
Abbildung 4.1	Vergleich der NTPDase2-Inhibitoren 147 und 149 mit ATP	95
Abbildung 4.2	Interaktionsmöglichkeiten der Uracilnucleotid-Mimetika aus Tabelle 4.1	96
Abbildung 4.3	Modell des 5,6-Dihydrouracils nach Röntgenstrukturanalyse	101
Abbildung 4.4	Interaktionsfähigkeiten der 5,6-Dihydrouracilderivate	101
Abbildung 4.5	Struktur-Wirkungsbeziehungen von Nucleosid-4'-Carboxamiden als E-NTPDase-Inhibitoren	102
Abbildung 4.6	Struktur-Wirkungsbeziehungen von Nucleosid-4'-Carboxamiden als Ecto-5'-Nucleotidase-Inhibitoren	105
Abbildung 4.7	Mögliche Abbauprodukte durch Einwirkung von Peptidasen	111
Abbildung 5.1	Dargestellte Nucleotidmimetika	113
Abbildung 5.2	Einführung der Anisylidenschutzgruppe	113
Abbildung 5.3	Beispiele für Triphosphat-Mimetika	114
Abbildung 5.4	Amidkopplung	114
Abbildung 5.5	Kopplungsreagentien und Acylierungskatalysator HOBt	115
Abbildung 5.6	Selektiver Ecto-5'-Nucleotidaseinhibitor	115
Abbildung 5.7	Selektiver NTPDase1-Inhibitor	116
Abbildung 5.8	Selektiver NTPDase2-Inhibitor	116

Literaturverzeichnis

- (1) Abbracchio, M. P.; Burnstock, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* **1994**, *64*, 445-475.
- (2) Lazarowski, E. R.; Boucher, R.C. UTP as an extracellular signaling molecule. *News Physiol Sci.* **2001**, *16*, 1-5.
- (3) Dalziel, H. H.; Westfall, D.P. Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacol Rev* **1994**, *46*, 449-466.
- (4) Communi, D.; Boeynaems, J.M. Receptors responsive to extracellular pyrimidine nucleotides. *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 83-86.
- (5) Khakh, B. S.; Burnstock, G.; Kennedy, C.; King, B.F.; North, R.A.; Seguela, P.; Voigt, M.; Humphrey, P.P.A. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 107-118.
- (6) Khakh, B. S.; North, R.A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* **2006**, *442*, 527-532.
- (7) Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* **1972**, *24*, 509-581.
- (8) Jacobson, K. A.; Jarvis, M.F.; Williams, M. Purine and Pyrimidine (P2) Receptors as Drug Targets. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4057-4093.
- (9) Abbracchio, M. P.; Burnstock, G. Purinergic signaling: pathophysiological roles. *Jap. J. Pharmacol.* **1998**, *78*, 113-145.
- (10) Fredholm, B. B.; Abbracchio, M.P.; Burnstock, G.; Daly, J.W.; Harden, T.K.; Jacobson, K.A.; Leff, P.; Williams, M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* **1994**, *46*, 143-156.
- (11) Fischer, B. Therapeutic applications of ATP-(P2)-receptors agonists and antagonists. *Exp. Op. Ther. Pat.* **1999**, *9*, 385-399.
- (12) Millan, J. L. Alkaline phosphatases. Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Pur. Sign.* **2006**, *2*, 335-341.
- (13) Braun, N.; Zimmermann, H. ATP hydrolysis on the cell surface: new enzymes and functional combinations. *BIOspektrum* **2001**, *7*, 115-116.
- (14) Zimmermann, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* **1992**, *285* (Pt 2), 345-365.
- (15) Robson, S. C.; Sevigny, J.; Zimmermann, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure-function relationships and pathophysiological significance. *Pur. Sig.* **2006**, *2*, 409-430.
- (16) Bollen, M.; Gijssbers, R.; Ceulemans, H.; Stalmans, W.; Stefan, C. Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2000**, *35*, 393-432.
- (17) Stefan, C.; Jansen, S.; Bollen, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 542-550.
- (18) Colgan, S. P.; Eltzschig, H.K.; Eckle, T.; Thompson, L.F. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Pur. Sign.* **2006**, *2*, 351-360.
- (19) Zimmermann, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* **2001**, *52*, 44-56.
- (20) Drury, A. N.; Szent-Gyorgyi, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* **1929**, *68*, 213-237.
- (21) Wedd, A. M.; Drury, A.N. The action of nucleic acid derivatives on the coronary flow in the dog. *J. Pharmacol.* **1934**, *50*, 157-164.
- (22) Wedd, A. M.; Fenn, W.O. The action on cardiac musculature and the vagomimetic behavior of adenosine. *J. Pharmacol.* **1933**, *47*, 365-375.
- (23) Wedd, A. M. The action of adenosine and certain related compounds on the coronary flow of the perfused heart of the rabbit. *J. Pharmacol.* **1931**, *41*, 355-366.
- (24) Lindner, F.; Rigler, R. The effect of nucleic acid products on the coronary vessels. *Pfluegers Archiv fuer die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* **1931**, *226*, 697-708.
- (25) Honey, R. M.; Ritchie, W.T.; Thompson, W.A.R. The action of adenosine upon the human heart. *Quart. J. Med.* **1930**, *23*, 485-489.
- (26) Gillespie, J. H. The biological significance of the linkages in adenosinetriphosphoric acid. *J. Physiol.* **1934**, *80*, 345-359.
- (27) Holton, F. A.; Holton, P. Capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosinetriphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J.Physiol.* **1954**, *126*, 124-140.
- (28) Burnstock G.: Most highly cited scientist. *Mol. Interv.* **2004**, *4*, 192-195.
- (29) Burnstock, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 58-86.

- (30) Burnstock, G.; Campbell, G.; Bennett, M.; Holman, M.E. Innervation of the Guinea-Pig Taenia Coli: Are there intrinsic inhibitory nerves which are distinct from sympathetic nerves? *Int J Neuropharmacol* **1963**, 163-166.
- (31) Burnstock, G.; Campbell, G.; Bennett, M.; Holman, M.E. Inhibition of the smooth muscle on the taenia coli. *Nature* **1964**, 200, 581-582.
- (32) Fredholm, B. B.; IJzerman, A.P.; Jacobson, K.A.; Klotz, K.N.; Linden, J. International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **2001**, 53, 527-552.
- (33) Burnstock, G. In *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A multidisciplinary Approach*; Straub, R.W., Ed. Raven Press: New York, **1978**, 107-108.
- (34) Spedding, M.; Weetman, D.F. Identification of separate receptors for adenosine and adenosine 5'-triphosphate in causing relaxations of the isolated taenia of the guinea-pig cecum. *Br. J. Pharmacol.* **1976**, 57, 305-310.
- (35) Burnstock, G.; Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* **1985**, 16, 433-440.
- (36) Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J.; Barnard, E.A.; Boyer, J.L.; Kennedy, C.; Knight, G.E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K.A.; Weisman, G.A. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* **2006**, 58, 281-341.
- (37) Gorzalka, S.; Vittori, S.; Volpini, R.; Cristalli, G.; von Kuegelgen, I.; Mueller, C.E. Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues. *Mol. Pharmacol.* **2005**, 67, 955-964.
- (38) Bender, E.; Buist, A.; Jurzak, M.; Langlois, X.; Baggerman, G.; Verhasselt, P.; Ercken, M.; Guo, H.Q.; Wintmolders, C.; Van, d.W., I; Van, O., I; Schoofs, L.; Luyten, W. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2002**, 99, 8573-8578.
- (39) Boyer, J. L.; Douglass, J.G.; Shaver, S.R.; Bednarski, K.; Yerxa, B.R.; Olins, G.M. Composition and method for inhibiting platelet aggregation using mononucleoside and dinucleoside phosphates that are purinoceptor P2Y12 antagonists. **2004**, *PCT/US/2004/814007*
- (40) Rideout, J.; Yerxa, B.R.; Shaver, S.R.; Douglass, J.G. Preparation of dinucleoside polyphosphate compositions and their therapeutic use as purinergic receptor agonists. **2001**, *PCT/US/2001/817017*
- (41) Shaver, S. R.; Rideout, J.L.; Pendergast, W.; Douglass, J.G.; Brown, E.G.; Boyer, J.L.; Patel, R.I.; Redick, C.C.; Jones, A.C.; Picher, M.; Yerxa, B.R. Structure-activity relationships of dinucleotides: Potent and selective agonists of P2Y receptors. *Pur. Sign.* **2005**, 1, 183-191.
- (42) Jankowski, V.; Toelle, M.; Vanholder, R.; Schoenfelder, G.; van der Giet, M.; Henning, L.; Schlueter, H.; Paul, M.; Zidek, W.; Jankowski, J. Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium-derived vasoconstrictive factor. *Nature Med.* **2004**, 11, 223-227.
- (43) Herold, C. L.; Li, Q.; Schachter, J.B.; Harden, T.K.; Nicholas, R.A. Lack of nucleotide-promoted second messenger signaling responses in 1321N1 cells expressing the proposed P2Y receptor, p2y7. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1997**, 235, 717-721.
- (44) Noguchi, K.; Ishii, S.; Shimizu, T. Identification of p2y9/GPR23 as a Novel G Protein-coupled Receptor for Lysophosphatidic Acid, Structurally Distant from the Edg Family. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 25600-25606.
- (45) Inbe, H.; Watanabe, S.; Miyawaki, M.; Tanabe, E.; Encinas, J.A. Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y15, for AMP and adenosine. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 19790-19799.
- (46) Gonzalez, N. S.; Communi, D.; Hannedouche, S.; Boeynaems, J.M. The fate of P2Y-related orphan receptors: GPR80/99 and GPR91 are receptors of dicarboxylic acids. *Pur. Sign.* **2004**, 1, 17-20.
- (47) Brunschweiler, A.; Muller, C.E. P2 receptors activated by uracil nucleotides--an update. *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 289-312.
- (48) Shinozaki, Y.; Koizumi, S.; Ishida, S.; Sawada, J.; Ohno, Y.; Inoue, K. Cytoprotection against oxidative stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y1 receptors. *Glia* **2005**, 49, 288-300.
- (49) Gachet, C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacol. Ther.* **2005**, 108, 180-192.
- (50) Ruan, H. Z.; Burnstock, G. Localisation of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. *Histochem. Cell Biol.* **2003**, 120, 415-426.
- (51) Korcok, J.; Raimundo, L.N.; Du, X.; Sims, S.M.; Dixon, S.J. P2Y6 nucleotide receptors activate NF-kappaB and increase survival of osteoclasts. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 16909-16915.
- (52) Chorna, N. E.; Santiago-Perez, L.I.; Erb, L.; Seye, C.I.; Neary, J.T.; Sun, G.Y.; Weisman, G.A.; Gonzalez, F.A. P2Y2 receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells. *J. Neurochem.* **2004**, 91, 119-132.

- (53) Pintor, J.; Peral, A.; Pelaez, T.; Carracedo, G.; Bautista, A.; Hoyle, C.H.V. Nucleotides and dinucleotides in ocular physiology: New possibilities of nucleotides as therapeutic agents in the eye. *Drug Dev. Res.* **2003**, *59*, 136-145.
- (54) Maaser, K.; Hopfner, M.; Kap, H.; Sutter, A.P.; Barthel, B.; von Lampe, B.; Zeitz, M.; Scherubl, H. Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y2-receptors. *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 636-644.
- (55) Hopfner, M.; Maaser, K.; Barthel, B.; von Lampe, B.; Hanski, C.; Riecken, E.O.; Zeitz, M.; Scherubl, H. Growth inhibition and apoptosis induced by P2Y2 receptors in human colorectal carcinoma cells: involvement of intracellular calcium and cyclic adenosine monophosphate. *Int J Colorectal Dis* **2001**, *16*, 154-166.
- (56) Katzur, A. C.; Koshimizu, T.; Tomic, M.; Schultze-Mosgau, A.; Ortmann, O.; Stojilkovic, S.S. Expression and responsiveness of P2Y2 receptors in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* **1999**, *84*, 4085-4091.
- (57) Verghese, M. W.; Kneisler, T.B.; Boucheron, J.A. P2U agonists induce chemotaxis and actin polymerization in human neutrophils and differentiated HL60 cells. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 15597-15601.
- (58) Malmsjo, M.; Hou, M.; Harden, T.K.; Pendergast, W.; Pantev, E.; Edvinsson, L.; Erlinge, D. Characterization of contractile P2 receptors in human coronary arteries by use of the stable pyrimidines uridine 5'-O-thiodiphosphate and uridine 5'-O-3-thiotriphosphate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *293*, 755-760.
- (59) Roman, R. M.; Fitz, J.G. Emerging roles of purinergic signaling in gastrointestinal epithelial secretion and hepatobiliary function. *Gastroenterology* **1999**, *116*, 964-979.
- (60) Dubyak, G. R. Knock-out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 773-776.
- (61) Shen, J.; Seye, C.I.; Wang, M.; Weisman, G.A.; Wilden, P.A.; Sturek, M. Cloning, up-regulation, and mitogenic role of porcine P2Y2 receptor in coronary artery smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 1265-1274.
- (62) Seye, C. I.; Yu, N.; Jain, R.; Kong, Q.; Minor, T.; Newton, J.; Erb, L.; Gonzalez, F.A.; Weisman, G.A. The P2Y2 nucleotide receptor mediates UTP-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary artery endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24960-24965.
- (63) Seye, C. I.; Kong, Q.; Erb, L.; Garrad, R.C.; Krugh, B.; Wang, M.; Turner, J.T.; Sturek, M.; Gonzalez, F.A.; Weisman, G.A. Functional P2Y2 nucleotide receptors mediate uridine 5'-triphosphate-induced intimal hyperplasia in collared rabbit carotid arteries. *Circ.* **2002**, *106*, 2720-2726.
- (64) Schnurr, M.; Toy, T.; Stoitzner, P.; Cameron, P.; Shin, A.; Beecroft, T.; Davis, I.D.; Cebon, J.; Maraskovsky, E. ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling. *Blood* **2003**, *102*, 613-620.
- (65) Wihlborg, A. K.; Balogh, J.; Wang, L.; Borna, C.; Dou, Y.; Joshi, B.V.; Lazarowski, E.; Jacobson, K.A.; Arner, A.; Erlinge, D. Positive inotropic effects by uridine triphosphate (UTP) and uridine diphosphate (UDP) via P2Y2 and P2Y6 receptors on cardiomyocytes and release of UTP in man during myocardial infarction. *Circ. Res.* **2006**, *98*, 970-976.
- (66) Bailey, M. A.; Turner, C.M.; Hus-Citharel, A.; Marchetti, J.; Imbert-Teboul, M.; Milner, P.; Burnstock, G.; Unwin, R.J. P2Y receptors present in the native and isolated rat glomerulus. *Nephron Physiol* **2004**, *96*, 79-90.
- (67) Gachet, C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb. Haemost.* **2001**, *86*, 222-232.
- (68) Mulryan, K.; Gitterman, D.P.; Lewis, C.J.; Vial, C.; Leckie, B.J.; Cobb, A.L.; Brown, J.E.; Conley, E.C.; Buell, G.; Pritchard, C.A.; Evans, R.J. Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature.* **2000**, *403*, 86-89.
- (69) Simon, J.; Webb, T.E.; Barnard, E.A. Distribution of [35S]dATP alpha S binding sites in the adult rat neuraxis. *Neuropharmacology* **1997**, *36*, 1243-1251.
- (70) Cavaliere, F.; Florenzano, F.; Amadio, S.; Fusco, F.R.; Viscomi, M.T.; D'Ambrosi, N.; Vacca, F.; Sancesario, G.; Bernardi, G.; Molinari, M.; Volonte, C. Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neurosci.* **2003**, *120*, 85-98.
- (71) Cook, S. P.; Vulchanova, L.; Hargreaves, K.M.; Elde, R.; McCleskey, E.W. Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature* **1997**, *387*, 505-508.
- (72) Bian, X.; Ren, J.; DeVries, M.; Schnegelsberg, B.; Cockayne, D.A.; Ford, A.P.; Galligan, J.J. Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X3 subunit. *J. Physiol* **2003**, *551*, 309-322.
- (73) Cockayne, D. A.; Hamilton, S.G.; Zhu, Q.M.; Dunn, P.M.; Zhong, Y.; Novakovic, S.; Malmberg, A.B.; Cain, G.; Berson, A.; Kassotakis, L.; Hedley, L.; Lachnit, W.G.; Burnstock, G.; McMahon, S.B.; Ford, A.P. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* **2000**, *407*, 1011-1015.

- (74) Tsuda, M.; Shigemoto-Mogami, Y.; Koizumi, S.; Mizokoshi, A.; Kohsaka, S.; Salter, M.W.; Inoue, K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* **2003**, *424*, 778-783.
- (75) Gu, B. J.; Zhang, W.Y.; Bendall, L.J.; Chessell, I.P.; Buell, G.N.; Wiley, J.S. Expression of P2X(7) purinoceptors on human lymphocytes and monocytes: evidence for nonfunctional P2X(7) receptors. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **2000**, *279*, C1189-C1197.
- (76) Lammas, D. A.; Stober, C.; Harvey, C.J.; Kendrick, N.; Panchalingam, S.; Kumararatne, D.S. ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity*. **1997**, *7*, 433-444.
- (77) Rassendren, F.; Buell, G.N.; Virginio, C.; Collo, G.; North, R.A.; Surprenant, A. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 5482-5486.
- (78) Chizh, B. A.; Illes, P. P2X receptors and nociception. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 553-568.
- (79) Ko, H.; Fricks, I.; Ivanov, A.A.; Harden, T.K.; Jacobson, K.A. Structure-Activity Relationship of Uridine 5'-Diphosphoglucose Analogues as Agonists of the Human P2Y(14) Receptor. *J. Med. Chem.* **2007**,
- (80) Ivanov, A. A.; Ko, H.; Cosyn, L.; Maddileti, S.; Besada, P.; Fricks, I.; Costanzi, S.; Harden, T.K.; Calenbergh, S.V.; Jacobson, K.A. Molecular modeling of the human P2Y2 receptor and design of a selective agonist, 2'-amino-2'-deoxy-2-thiouridine 5'-triphosphate. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1166-1176.
- (81) Costanzi, S.; Joshi, B.V.; Maddileti, S.; Mamedova, L.; Gonzalez-Moa, M.J.; Marquez, V.E.; Harden, T.K.; Jacobson, K.A. Human P2Y(6) receptor: molecular modeling leads to the rational design of a novel agonist based on a unique conformational preference. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 8108-8111.
- (82) Hechler, B.; Nonne, C.; Roh, E.J.; Cattaneo, M.; Cazenave, J.P.; Lanza, F.; Jacobson, K.A.; Gachet, C. MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *316*, 556-563.
- (83) El Tayeb, A.; Qi, A.; Muller, C.E. Synthesis and structure-activity relationships of uracil nucleotide derivatives and analogues as agonists at human P2Y2, P2Y4, and P2Y6 receptors. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7076-7087.
- (84) Bodin, P.; Burnstock, G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem. Res.* **2001**, *26*, 959-969.
- (85) Gorman, M. W.; Feigl, E.O.; Buffington, C.W. Human plasma ATP concentration. *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 318-325.
- (86) Moss, A. H.; Solomons, C.C.; Alfrey, A.C. Elevated plasma adenine nucleotide levels in chronic renal failure and their possible significance. *Proc. Clin. Dial. Transplant. Forum* **1979**, *9*, 184-188.
- (87) Sorensen, C. E.; Novak, I. Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus. Use of fluorescent probes and confocal microscopy. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 32925-32932.
- (88) Lazarowski, E. R.; Boucher, R.C.; Harden, T.K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 785-795.
- (89) Yegutkin, G. G.; Samburski, S.S.; Jalkanen, S.; Novak, I. ATP-consuming and ATP-generating enzymes secreted by pancreas. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29441-29447.
- (90) Lazarowski, E. R.; Boucher, R.C.; Harden, T.K. Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 31061-31068.
- (91) Quillen, E. E.; Haslam, G.C.; Samra, H.S.; Amani-Talessi, D.; Knight, J.A.; Wyatt, D.E.; Bishop, S.C.; Colvert, K.K.; Richter, M.L.; Kitos, P.A. Ectoadenylate kinase and plasma membrane ATP synthase activities of human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 20728-20737.
- (92) Chi, S. L.; Pizzo, S.V. Cell surface F1Fo ATP synthase: a new paradigm? *Ann. Med.* **2006**, *38*, 429-438.
- (93) Fabre, A. C.; Vantourout, P.; Champagne, E.; Terce, F.; Rolland, C.; Perret, B.; Collet, X.; Barbaras, R.; Martinez, L.O. Cell surface adenylate kinase activity regulates the F(1)-ATPase/P2Y (13)-mediated HDL endocytosis pathway on human hepatocytes. *Cell Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 2829-2837.
- (94) Buckley, K. A.; Golding, S.L.; Rice, J.M.; Dillon, J.P.; Gallagher, J.A. Release and interconversion of P2 receptor agonists by human osteoblast-like cells. *FASEB J.* **2003**, *17*, 1401-1410.
- (95) Braunstein, G. M.; Roman, R.M.; Clancy, J.P.; Kudlow, B.A.; Taylor, A.L.; Shylonsky, V.G.; Jovov, B.; Peter, K.; Jilling, T.; Ismailov, I.I.; Benos, D.J.; Schwiebert, L.M.; Fitz, J.G.; Schwiebert, E.M. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6621-6630.
- (96) Pearson, J. D.; Gordon, J.L. Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature* **1979**, *281*, 384-386.
- (97) Bodin, P.; Bailey, D.; Burnstock, G. Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* **1991**, *103*, 1203-1205.
- (98) Bergfeld, G. R.; Forrester, T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc. Res.* **1992**, *26*, 40-47.

- (99) Huang, N.; Wang, D.J.; Heppel, L.A. Extracellular ATP is a mitogen for 3T3, 3T6, and A431 cells and acts synergistically with other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1989**, *86*, 7904-7908.
- (100) Harden, T. K.; Lazarowski, E.R.; Boucher, R.C. Release, metabolism and interconversion of adenine and uridine nucleotides: implications for G protein-coupled P2 receptor agonist selectivity. *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 43-46.
- (101) Stout, C. E.; Costantin, J.L.; Naus, C.C.; Charles, A.C. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 10482-10488.
- (102) Vollmayer, P.; Clair, T.; Goding, J.W.; Sano, K.; Servos, J.; Zimmermann, H. Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 2971-2978.
- (103) Duan, R. D.; Bergman, T.; Xu, N.; Wu, J.; Cheng, Y.; Duan, J.; Nelander, S.; Palmberg, C.; Nilsson, A. Identification of human intestinal alkaline sphingomyelinase as a novel ecto-enzyme related to the nucleotide phosphodiesterase family. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 38528-38536.
- (104) Mellor, E. A.; Maekawa, A.; Austen, K.F.; Boyce, J.A. Cysteinyl leukotriene receptor 1 is also a pyrimidineric receptor and is expressed by human mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2001**, *98*, 7964-7969.
- (105) Picher, M.; Boucher, R.C. Biochemical evidence for an ecto alkaline phosphodiesterase I in human airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2000**, *23*, 255-261.
- (106) Scott, L. J.; Delautier, D.; Meerson, N.R.; Trugnan, G.; Goding, J.W.; Maurice, M. Biochemical and molecular identification of distinct forms of alkaline phosphodiesterase I expressed on the apical and basolateral plasma membrane surfaces of rat hepatocytes. *Hepatology* **1997**, *25*, 995-1002.
- (107) Fox, M. A.; Colello, R.J.; Macklin, W.B.; Fuss, B. Phosphodiesterase-Ialpha/autotaxin: a counteradhesive protein expressed by oligodendrocytes during onset of myelination. *Mol. Cell Neurosci.* **2003**, *23*, 507-519.
- (108) Hammack, B. N.; Fung, K.Y.; Hunsucker, S.W.; Duncan, M.W.; Burgoon, M.P.; Owens, G.P.; Gilden, D.H. Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Mult. Scler.* **2004**, *10*, 245-260.
- (109) Grobбен, B.; Anciaux, K.; Roymans, D.; Stefan, C.; Bollen, M.; Esmans, E.L.; Slegers, H. An ecto-nucleotide pyrophosphatase is one of the main enzymes involved in the extracellular metabolism of ATP in rat C6 glioma. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 826-834.
- (110) Grobбен, B.; Claes, P.; Roymans, D.; Esmans, E.L.; Van Onckelen, H.; Slegers, H. Ecto-nucleotide pyrophosphatase modulates the purinoceptor-mediated signal transduction and is inhibited by purinoceptor antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130*, 139-145.
- (111) Zimmermann, H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20*, 231-236.
- (112) Kukulski, F.; Levesque, S.A.; Lavoie, E.G.; Lecka, J.; Bigonnesse, F.; Knowles, A.F.; Robson, S.C.; Kirley, T.L.; Sevigny, J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3, and 8. *Pur. Sign.* **2005**, *1*, 193-204.
- (113) Wang, C. J.; Vlajkovic, S.M.; Housley, G.D.; Braun, N.; Zimmermann, H.; Robson, S.C.; Sevigny, J.; Soeller, C.; Thorne, P.R. C-terminal splicing of NTPDase2 provides distinctive catalytic properties, cellular distribution and enzyme regulation. *Biochem. J.* **2005**, *385*, 729-736.
- (114) Straeter, N. Ecto-5'-nucleotidase: structure function relationships. *Pur. Sign.* **2006**, *2*, 343-350.
- (115) Westfall, T. D.; Menzies, J.R.; Liberman, R.; Waterston, S.; Ramphir, N.; Westfall, D.P.; Sneddon, P.; Kennedy, C. Release of a soluble ATPase from the rabbit isolated vas deferens during nerve stimulation. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *131*, 909-914.
- (116) Sesti, C.; Broekman, M.J.; Drosopoulos, J.H.; Islam, N.; Marcus, A.J.; Levi, R. EctoNucleotidase in cardiac sympathetic nerve endings modulates ATP-mediated feedback of norepinephrine release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *300*, 605-611.
- (117) Sesti, C.; Koyama, M.; Broekman, M.J.; Marcus, A.J.; Levi, R. Ectonucleotidase in sympathetic nerve endings modulates ATP and norepinephrine exocytosis in myocardial ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *306*, 238-244.
- (118) Alvarado-Castillo, C.; Harden, T.K.; Boyer, J.L. Regulation of P2Y1 receptor-mediated signaling by the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase isozymes NTPDase1 and NTPDase2. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 114-122.
- (119) Cauwenberghs, S.; Feijge, M.A.; Hageman, G.; Hoylaerts, M.; Akkerman, J.W.; Curvers, J.; Heemskerk, J.W. Plasma ectonucleotidases prevent desensitization of purinergic receptors in stored platelets: importance for platelet activity during thrombus formation. *Transfusion* **2006**, *46*, 1018-1028.
- (120) Kirley, T. L.; Crawford, P.A.; Smith, T.M. The structure of the nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) as revealed by mutagenic and computational modeling analyses. *Pur. Sign.* **2006**, *2*, 379-389.
- (121) Handa, M.; Guidotti, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1996**, *218*, 916-923.

- (122) Wang, T. F.; Ou, Y.; Guidotti, G. The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymic activity and quaternary structure. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 24814-24821.
- (123) Kroetz, F.; Sohn, H.Y.; Keller, M.; Gloe, T.; Bolz, S.S.; Becker, B.F.; Pohl, U. Depolarization of Endothelial Cells Enhances Platelet Aggregation Through Oxidative Inactivation of Endothelial NTPDase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 2003-2009.
- (124) Fausther, M.; Lecka, J.; Kukulski, F.; Levesque, S.A.; Pelletier, J.; Zimmermann, H.; Dranoff, J.A.; Sevigny, J. Cloning, purification, and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8. *Am. J. Physiol.* **2007**, *292*, G785-G795.
- (125) Smith, T. M.; Kirley, T.L. Site-Directed Mutagenesis of a Human Brain Ecto-Apyrase: Evidence That the E-Type ATPases Are Related to the Actin/Heat Shock 70/Sugar Kinase Superfamily. *Biochem.* **1999**, *38*, 321-328.
- (126) Smith, T. M.; Carl, S.A.L.; Kirley, T.L. Mutagenesis of Two Conserved Tryptophan Residues of the E-Type ATPases: Inactivation and Conversion of an Ecto-Apyrase to an Ecto-NTPase. *Biochem.* **1999**, *38*, 5849-5857.
- (127) Ivanenkov, V. V.; Meller, J.; Kirley, T.L. Characterization of Disulfide Bonds in Human Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 3 (NTPDase3): Implications for NTPDase Structural Modeling. *Biochem.* **2005**, *44*, 8998-9012.
- (128) Murphy, D. M.; Kirley, T.L. Asparagine 81, an invariant glycosylation site near apyrase conserved region 1, is essential for full enzymatic activity of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3. *Arch. of Biochem. Biophys.* **2003**, *413*, 107-115.
- (129) Murphy, D. M.; Ivanenkov, V.V.; Kirley, T.L. Identification of cysteine residues responsible for oxidative cross-linking and chemical inhibition of human nucleoside-triphosphate diphosphohydrolase 3. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6162-6169.
- (130) Papanikolaou, A.; Papafotika, A.; Murphy, C.; Papamarcaki, T.; Tsolas, O.; Drab, M.; Kurzchalia, T.V.; Kasper, M.; Christoforidis, S. Cholesterol-dependent Lipid Assemblies Regulate the Activity of the Ecto-nucleotidase CD39. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26406-26414.
- (131) Wu, Y.; Sun, X.; Kaczmarek, E.; Dwyer, K.M.; Bianchi, E.; Usheva, A.; Robson, S.C. RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity. *Biochemical Journal* **2006**, *396*, 23-30.
- (132) Knofel, T.; Strater, N. X-ray structure of the Escherichia coli periplasmic 5'-nucleotidase containing a dimetal catalytic site. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 448-453.
- (133) Ogata, S.; Hayashi, Y.; Misumi, Y.; Ikehara, Y. Membrane-anchoring domain of rat liver 5'-nucleotidase: identification of the COOH-terminal serine-523 covalently attached with a glycolipid. *Biochem.* **1990**, *29*, 7923-7927.
- (134) Fini, C.; Amoresano, A.; Andolfo, A.; D'auria, S.; Floridi, A.; Paolini, S.; Pucci, P. Mass spectrometry study of ecto-5'-nucleotidase from bull seminal plasma. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4978-4987.
- (135) Koonin, E. V. Yeast protein controlling inter-organelle communication is related to bacterial phosphatases containing the Hsp 70-type ATP-binding domain. *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 156-157.
- (136) Buschette-Brambrink, S.; Gutensohn, W. Human placental ecto-5'-nucleotidase: isoforms and chemical crosslinking products of the membrane-bound and isolated enzyme. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **1989**, *370*, 67-74.
- (137) Vogel, M.; Kowalewski, H.; Zimmermann, H.; Hooper, N.M.; Turner, A.J. Soluble low-Km 5'-nucleotidase from electric-ray (*Torpedo marmorata*) electric organ and bovine cerebral cortex is derived from the glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoenzyme by phospholipase C cleavage. *Biochem. J.* **1992**, *284* (Pt 3), 621-624.
- (138) Schultz-Heienbrok, R.; Maier, T.; Straeter, N. A large hinge bending domain rotation is necessary for the catalytic function of Escherichia coli 5'-nucleotidase. *Biochem.* **2005**, *44*, 2244-2252.
- (139) Picher, M.; Burch, L.H.; Boucher, R.C. Metabolism of P2 receptor agonists in human airways: implications for mucociliary clearance and cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 20234-20241.
- (140) Leipziger, J. Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **2003**, *284*, F419-F432.
- (141) Yerxa, B. R.; Sabater, J.R.; Davis, C.W.; Stutts, M.J.; Lang-Furr, M.; Picher, M.; Jones, A.C.; Cowlen, M.; Dougherty, R.; Boyer, J.; Abraham, W.M.; Boucher, R.C. Pharmacology of INS37217 [P1-(uridine 5')-P4-(2'-deoxycytidine 5')tetraphosphate, tetrasodium salt], a next-generation P2Y2 receptor agonist for the treatment of cystic fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *302*, 871-880.
- (142) Clarke, L. L.; Harline, M.C.; Otero, M.A.; Glover, G.G.; Garrad, R.C.; Krugh, B.; Walker, N.M.; Gonzalez, F.A.; Turner, J.T.; Weisman, G.A. Desensitization of P2Y2 receptor-activated transepithelial anion secretion. *Am. J. Physiol* **1999**, *276*, C777-C787.
- (143) Burch, L. H.; Picher, M. E-NTPDases in human airways: regulation and relevance for chronic lung diseases. *Pur. Sign.* **2006**, *2*, 399-408.
- (144) Button, B.; Picher, M.; Boucher, R.C. Differential Effects of Cyclic and Constant Stress on ATP Release and Mucociliary Transport by Human Airway Epithelia. *J. Physiol* **2007**, *588*, 577-592

- (145) Picher, M.; Burch, L.H.; Boucher, R.C. Metabolism of P2 receptor agonists in human airways: implications for mucociliary clearance and cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 20234-20241.
- (146) Blackburn, M. R.; Datta, S.K.; Kellems, R.E. Adenosine deaminase-deficient mice generated using a two-stage genetic engineering strategy exhibit a combined immunodeficiency. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5093-5100.
- (147) Hechler, B.; Cattaneo, M.; Gachet, C. The P2 receptors in platelet function. *Semin. Thromb. Hemost.* **2005**, *31*, 150-161.
- (148) Sevigny, J.; Sundberg, C.; Braun, N.; Guckelberger, O.; Csizmadia, E.; Qawi, I.; Imai, M.; Zimmermann, H.; Robson, S.C. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* **2002**, *99*, 2801-2809.
- (149) Marcus, A. J.; Broekman, M.J.; Drosopoulos, J.H.F.; Islam, N.; Pinsky, D.J.; Sesti, C.; Levi, R. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: Implications for ischemic vascular diseases. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **2003**, *305*, 9-16.
- (150) Marcus, A. J.; Broekman, M.J.; Drosopoulos, J.H.F.; Islam, N.; Pinsky, D.J.; Sesti, C.; Levi, R. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J. Thromb. Haem.* **2003**, *1*, 2497-2509.
- (151) Braun, N.; Zhu, Y.; Krieglstein, J.; Culmsee, C.; Zimmermann, H. Upregulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 4891-4900.
- (152) Enjyoji, K.; Sevigny, J.; Lin, Y.; Frenette, P.S.; Christie, P.D.; Schulte Am Esch, J., II; Imai, M.; Edelberg, J.M.; Rayburn, H.; Lechi, M.; Beeler, D.L.; Csizmadia, E.; Wagner, D.D.; Robson, S.C.; Rosenberg, R.D. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 1010-1017.
- (153) Robson, S. C.; Wu, Y.; Sun, X.; Knosalla, C.; Dwyer, K.; Enjyoji, K. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Sem. Thromb. Hemost.* **2005**, *31*, 217-233.
- (154) Furukoji, E.; Matsumoto, M.; Yamashita, A.; Yagi, H.; Sakurai, Y.; Marutsuka, K.; Hatakeyama, K.; Morishita, K.; Fujimura, Y.; Tamura, S.; Asada, Y. Adenovirus-Mediated Transfer of Human Placental Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase to Vascular Smooth Muscle Cells Suppresses Platelet Aggregation in Vitro and Arterial Thrombus Formation in Vivo. *Circ.* **2005**, *111*, 808-815.
- (155) Pinsky, D. J.; Broekman, M.J.; Peschon, J.J.; Stocking, K.L.; Fujita, T.; Ramasamy, R.; Connolly, E.S., Jr.; Huang, J.; Kiss, S.; Zhang, Y.; Choudhri, T.F.; McTaggart, R.A.; Liao, H.; Drosopoulos, J.H.; Price, V.L.; Marcus, A.J.; Maliszewski, C.R. Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J. Clin. Invest* **2002**, *109*, 1031-1040.
- (156) Dwyer, K. M.; Robson, S.C.; Nandurkar, H.H.; Campbell, D.J.; Gock, H.; Murray-Segal, L.J.; Fiscicaro, N.; Mysore, T.B.; Kaczmarek, E.; Cowan, P.J.; d'Apice, A.J. Thromboregulatory manifestations in human CD39 transgenic mice and the implications for thrombotic disease and transplantation. *J. Clin. Invest* **2004**, *113*, 1440-1446.
- (157) Belayev, L.; Khoutorova, L.; Deisher, T.A.; Belayev, A.; Busto, R.; Zhang, Y.; Zhao, W.; Ginsberg, M.D. Neuroprotective Effect of SolCD39, a Novel Platelet Aggregation Inhibitor, on Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Stroke* **2003**, *34*, 758-763.
- (158) El Omar, M. M.; Islam, N.; Broekman, M.J.; Drosopoulos, J.H.; Roa, D.C.; Lorin, J.D.; Sedlis, S.P.; Olson, K.E.; Pulte, E.D.; Marcus, A.J. The ratio of ADP- to ATP-ectonucleotidase activity is reduced in patients with coronary artery disease. *Thromb. Res.* **2005**, *116*, 199-206.
- (159) Silva, A. C.; Morsch, A.L.; Zanin, R.F.; Correa, M.C.; Arantes, L.C.; Araujo, M.C.; Morsch, V.M.; Schetinger, M.R. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in chronic renal failure: relationship between hemostatic defects and renal failure severity. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1741*, 282-288.
- (160) Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **1993**, *362*, 801-809.
- (161) Gessi, S.; Varani, K.; Merighi, S.; Ongini, E.; Borea, P.A. A(2A) adenosine receptors in human peripheral blood cells. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 2-11.
- (162) Koszalka, P.; Ozuyaman, B.; Huo, Y.; Zerneck, A.; Flogel, U.; Braun, N.; Buchheiser, A.; Decking, U.K.; Smith, M.L.; Sevigny, J.; Gear, A.; Weber, A.A.; Molojavyi, A.; Ding, Z.; Weber, C.; Ley, K.; Zimmermann, H.; Godecke, A.; Schrader, J. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ. Res.* **2004**, *95*, 814-821.
- (163) Mistry, H.; Gitlin, J.M.; Mitchell, J.A.; Hiley, C.R. Endothelium-dependent relaxation and endothelial hyperpolarization by P2Y receptor agonists in rat-isolated mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *139*, 661-671.
- (164) Wihlborg, A. K.; Malmjsjo, M.; Eyjolfsson, A.; Gustafsson, R.; Jacobson, K.; Erlinge, D. Extracellular nucleotides induce vasodilatation in human arteries via prostaglandins, nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarising factor. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *138*, 1451-1458.

- (165) Liu, C.; Mather, S.; Huang, Y.; Garland, C.J.; Yao, X. Extracellular ATP facilitates flow-induced vasodilatation in rat small mesenteric arteries. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **2004**, *286*, H1688-H1695.
- (166) Evans, R. J.; Surprenant, A. Vasoconstriction of guinea-pig submucosal arterioles following sympathetic nerve stimulation is mediated by the release of ATP. *Br. J. Pharmacol.* **1992**, *106*, 242-249.
- (167) Borna, C.; Wang, L.; Gudbjartsson, T.; Karlsson, L.; Jern, S.; Malmsjo, M.; Erlinge, D. Contractions in human coronary bypass vessels stimulated by extracellular nucleotides. *Ann. Thorac. Surg.* **2003**, *76*, 50-57.
- (168) Bryan, P. T.; Marshall, J.M. Cellular mechanisms by which adenosine induces vasodilatation in rat skeletal muscle: significance for systemic hypoxia. *J. Physiol* **1999**, *514 (Pt 1)*, 163-175.
- (169) Eltzhig, H. K.; Ibla, J.C.; Furuta, G.T.; Leonard, M.O.; Jacobson, K.A.; Enjyoji, K.; Robson, S.C.; Colgan, S.P. Coordinated adenosine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 783-796.
- (170) Eltzhig, H. K.; Faigle, M.; Knapp, S.; Karhausen, J.; Ibla, J.; Rosenberger, P.; Odegard, K.C.; Laussen, P.C.; Thompson, L.F.; Colgan, S.P. Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood* **2006**, *108*, 1602-1610.
- (171) Synnestvedt, K.; Furuta, G.T.; Comerford, K.M.; Louis, N.; Karhausen, J.; Eltzhig, H.K.; Hansen, K.R.; Thompson, L.F.; Colgan, S.P. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 993-1002.
- (172) Thompson, L. F.; Eltzhig, H.K.; Ibla, J.C.; Van De Wiele, C.J.; Resta, R.; Morote-Garcia, J.C.; Colgan, S.P. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J. Exp. Med.* **2004**, *200*, 1395-1405.
- (173) Gunduz, D.; Kasseckert, S.A.; Hartel, F.V.; Aslam, M.; Abdallah, Y.; Schafer, M.; Piper, H.M.; Noll, T.; Schafer, C. Accumulation of extracellular ATP protects against acute reperfusion injury in rat heart endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **2006**, *71*, 764-773.
- (174) Dzhandzhugazyan, K. N.; Kirkin, A.F.; thor, S.P.; Zeuthen, J. Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Lett.* **1998**, *430*, 227-230.
- (175) Morrone, F. B.; Oliveira, D.L.; Gamermann, P.; Stella, J.; Wofchuk, S.; Wink, M.R.; Meurer, L.; Edelweiss, M.I.; Lenz, G.; Battastini, A.M. In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC. Cancer* **2006**, *6*, 226-231
- (176) Alpini, G.; McGill, J.M.; Larusso, N.F. The pathobiology of biliary epithelia. *Hepatol.* **2002**, *35*, 1256-1268.
- (177) Dranoff, J. A.; Kruglov, E.A.; Toure, J.; Braun, N.; Zimmermann, H.; Jain, D.; Knowles, A.F.; Sevigny, J. Ectonucleotidase NTPDase2 is selectively down-regulated in biliary cirrhosis. *J. Investig. Med.* **2004**, *52*, 475-482.
- (178) Jhandier, M. N.; Kruglov, E.A.; Lavoie, E.G.; Sevigny, J.; Dranoff, J.A. Portal Fibroblasts Regulate the Proliferation of Bile Duct Epithelia via Expression of NTPDase2. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 22986-22992.
- (179) Spychala, J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther.* **2000**, *87*, 161-173.
- (180) Trepel, J. B.; Fang, W.G.; Pirnia, F.; Myers, C.E., Jr. Use of purinergic receptor agonists as antineoplastic agents. **1990**, *PCT/US/90/509183*
- (181) Jin, J.; Dasari, V.R.; Sistare, F.D.; Kunapuli, S.P. Distribution of P2Y receptor subtypes on haematopoietic cells. *Br. J. Pharmacol.* **1998**, *123*, 789-794.
- (182) Di Virgilio, F.; Borea, P.A.; Illes, P. P2 receptors meet the immune system. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 5-7.
- (183) Langston, H. P.; Ke, Y.; Gewirtz, A.T.; Dombrowski, K.E.; Kapp, J.A. Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 2962-2970.
- (184) Idzko, M.; Panther, E.; Bremer, H.C.; Sorichter, S.; Luttmann, W.; Virchow, C.J., Jr.; Di Virgilio, F.; Herouy, Y.; Norgauer, J.; Ferrari, D. Stimulation of P2 purinergic receptors induces the release of eosinophil cationic protein and interleukin-8 from human eosinophils. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *138*, 1244-1250.
- (185) Idzko, M.; Dichmann, S.; Panther, E.; Ferrari, D.; Herouy, Y.; Virchow, C., Jr.; Luttmann, W.; Di Virgilio, F.; Norgauer, J. Functional characterization of P2Y and P2X receptors in human eosinophils. *J. Cell Physiol* **2001**, *188*, 329-336.
- (186) Ohta, A.; Sitkovsky, M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* **2001**, *414*, 916-920.
- (187) Salmi, M.; Jalkanen, S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 760-771.
- (188) Odashima, M.; Bamias, G.; Rivera-Nieves, J.; Linden, J.; Nast, C.C.; Moskaluk, C.A.; Marini, M.; Sugawara, K.; Kozaiwa, K.; Otaka, M.; Watanabe, S.; Cominelli, F. Activation of A2A adenosine

- receptor attenuates intestinal inflammation in animal models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* **2005**, *129*, 26-33.
- (189) Hershfield, M. S. New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *Eur. J. Immunol.* **2005**, *35*, 25-30.
- (190) Stockl, J.; Majdic, O.; Fischer, G.; Maurer, D.; Knapp, W. Monomorphic molecules function as additional recognition structures on haptenated target cells for HLA-A1-restricted, hapten-specific CTL. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 2724-2733.
- (191) Mizumoto, N.; Kumamoto, T.; Robson, S.C.; Sevigny, J.; Matsue, H.; Enjyoji, K.; Takashima, A. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 358-365.
- (192) Kannan, S. Neutrophil chemotaxis: potential role of chemokine receptors in extracellular nucleotide induced Mac-1 expression. *Med. Hypotheses* **2003**, *61*, 577-579.
- (193) Henttinen, T.; Jalkanen, S.; Yegutkin, G.G. Adherent leukocytes prevent adenosine formation and impair endothelial barrier function by Ecto-5'-nucleotidase/CD73-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24888-24895.
- (194) Kobie, J. J.; Shah, P.R.; Yang, L.; Rebhahn, J.A.; Fowell, D.J.; Mosmann, T.R. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 6780-6786.
- (195) Thiel, M.; Caldwell, C.C.; Sitkovsky, M.V. The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes. Infect.* **2003**, *5*, 515-526.
- (196) Napieralski, R.; Kempkes, B.; Gutensohn, W. Evidence for coordinated induction and repression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) and the A2a adenosine receptor in a human B cell line. *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 483-487.
- (197) Kas-Deelen, A. M.; Bakker, W.W.; Olinga, P.; Visser, J.; de Maar, E.F.; van Son, W.J.; The, T.H.; Harmsen, M.C. Cytomegalovirus infection increases the expression and activity of ecto-ATPase (CD39) and ecto-5' nucleotidase (CD73) on endothelial cells. *FEBS Lett.* **2001**, *491*, 21-25.
- (198) Belcher, S. M.; Zsarnovszky, A.; Crawford, P.A.; Hemani, H.; Spurling, L.; Kirley, T.L. Immunolocalization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in rat brain: implications for modulation of multiple homeostatic systems including feeding and sleep-wake behaviors. *Neurosci.* **2006**, *137*, 1331-1346.
- (199) James, S.; Richardson, P.J. Production of adenosine from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse. *J. Neurochem.* **1993**, *60*, 219-227.
- (200) Kukulski, F.; Komoszynski, M. Purification and characterization of NTPDase1 (ecto-apyrase) and NTPDase2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 3447-3454.
- (201) Boehm, S.; Kubista, H. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 43-99.
- (202) Wink, M. R.; Braganhol, E.; Tamajusuku, A.S.K.; Lenz, G.; Zerbini, L.F.; Libermann, T.A.; Sevigny, J.; Battastini, A.M.O.; Robson, S.C. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. *Neurosci.* **2006**, *138*, 421-432.
- (203) Schubert, P.; Kreutzberg, G.W. Cerebral protection by adenosine. *Acta Neurochir. Suppl.* **1993**, *57*, 80-88.
- (204) Di Virgilio, F. Dr. Jekyll/Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. *J. Auton. Nerv. Syst.* **2000**, *81*, 59-63.
- (205) Braun, N.; Sevigny, J.; Robson, S.C.; Hammer, K.; Hanani, M.; Zimmermann, H. Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system. *Glia* **2004**, *45*, 124-132.
- (206) Braun, N.; Sevigny, J.; Mishra, S.K.; Robson, S.C.; Barth, S.W.; Gerstberger, R.; Hammer, K.; Zimmermann, H. Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.* **2003**, *17*, 1355-1364.
- (207) Pinheiro, C. M.; Martins-Duarte, E.S.; Ferraro, R.B.; Fonseca de Souza, A.L.; Gomes, M.T.; Lopes, A.H.; Vannier-Santos, M.A.; Santos, A.L.; Meyer-Fernandes, J.R. Leishmania amazonensis: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. *Exp. Parasitol.* **2006**, *114*, 16-25.
- (208) Sansom, F. M.; Newton, H.J.; Crikis, S.; Cianciotto, N.P.; Cowan, P.J.; d'Apice, A.J.; Hartland, E.L. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of Legionella pneumophila. *Cell Microbiol.* **2007**,
- (209) Gendron, F. P.; Halbfinger, E.; Fischer, B.; Duval, M.; D'Orleans-Juste, P.; Beaudoin, A.R. Novel inhibitors of nucleoside triphosphate diphosphohydrolases: chemical synthesis and biochemical and pharmacological characterizations. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2239-2247.

- (210) Gendron, F. P.; Halbfinger, E.; Fischer, B.; Beaudoin, A.R. Inhibitors of NTPDase: key players in the metabolism of extracellular purines. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2000**, *486*, 119-123.
- (211) Gendron, F. P.; Benrezzak, O.; Krugh, B.W.; Kong, Q.; Weisman, G.A.; Beaudoin, A.R. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. *Curr. Drug Targets.* **2002**, *3*, 229-245.
- (212) Iqbal, J.; Vollmayer, P.; Braun, N.; Zimmermann, H.; Mueller, C.E. A capillary electrophoresis method for the characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) and the analysis of inhibitors by in-capillary enzymatic microreaction. *Pur. Sign.* **2005**, *1*, 349-358.
- (213) Cechin, S. R.; Schetinger, M.R.; Zanatta, N.; Madruga, C.C.; Pacholski, I.L.; Flores, D.C.; Bonacorso, H.G.; Martins, M.A.; Morsch, V.M. Inhibitory effect of novel pyrimidines on ATP and ADP hydrolysis in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1433-1439.
- (214) Bultmann, R.; Pause, B.; Wittenburg, H.; Kurz, G.; Starke, K. P2-purinoceptor antagonists: I. Blockade of P2-purinoceptor subtypes and ecto-nucleotidases by small aromatic isothiocyanato-sulphonates. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1996**, *354*, 481-490.
- (215) Wittenburg, H.; Bultmann, R.; Pause, B.; Ganter, C.; Kurz, G.; Starke, K. P2-purinoceptor antagonists: II. Blockade of P2-purinoceptor subtypes and ecto-nucleotidases by compounds related to Evans blue and trypan blue. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1996**, *354*, 491-497.
- (216) Bultmann, R.; Wittenburg, H.; Pause, B.; Kurz, G.; Nickel, P.; Starke, K. P2-purinoceptor antagonists: III. Blockade of P2-purinoceptor subtypes and ecto-nucleotidases by compounds related to suramin. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1996**, *354*, 498-504.
- (217) Tuluc, F.; Bultmann, R.; Glanzel, M.; Frahm, A.W.; Starke, K. P2-receptor antagonists: IV. Blockade of P2-receptor subtypes and ecto-nucleotidases by compounds related to reactive blue 2. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1998**, *357*, 111-120.
- (218) Leclerc, M. C.; Grondin, G.; Gendron, F.P.; Sevigny, J.; Beaudoin, A.R. Identification, characterization, and immunolocalization of a nucleoside triphosphate diphosphohydrolase in pig liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *377*, 372-378.
- (219) Sevigny, J.; Levesque, F.P.; Grondin, G.; Beaudoin, A.R. Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1334*, 73-88.
- (220) Dunn, P. M.; Blakeley, A.G. Suramin: a reversible P2-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* **1988**, *93*, 243-245.
- (221) Iqbal, J. Development of capillary electrophoresis-based assays for nucleoside and nucleotide metabolizing enzymes. Dissertation, Bonn, **2005**
- (222) Muller, C. E.; Iqbal, J.; Baqi, Y.; Zimmermann, H.; Rollich, A.; Stephan, H. Polyoxometalates--a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5943-5947.
- (223) Burger, R. M.; Lowenstein, J.M. 5'-Nucleotidase from smooth muscle of small intestine and from brain. Inhibition of nucleotides. *Biochem.* **1975**, *14*, 2362-2366.
- (224) Servos, J.; Reilander, H.; Zimmermann, H. Catalytically active soluble ecto-5'-nucleotidase purified after heterologous expression as a tool for drug screening. *Drug Dev. Res.* **1998**, *45*, 269-276.
- (225) Grondal, E. J.; Zimmermann, H. Purification, characterization and cellular localization of 5'-nucleotidase from Torpedo electric organ. *Biochem. J.* **1987**, *245*, 805-810.
- (226) Uchino, K.; Matsuo, T.; Iwamoto, M.; Tonosaki, Y.; Fukuchi, A. New 5'-nucleotidase inhibitors, NPF-86IA, NPF-86IB, NPF-86IIA, and NPF-86IIB from Areca catechu; Part I. Isolation and biological properties. *Planta Med.* **1988**, *54*, 419-422.
- (227) Ogawara, H.; Uchino, K.; Akiyama, T.; Watanabe, S. A new 5'-nucleotidase inhibitor, nucleotidin. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1985**, *38*, 153-156.
- (228) Joseph, S. M.; Pifer, M.A.; Przybylski, R.J.; Dubyak, G.R. Methylene ATP analogs as modulators of extracellular ATP metabolism and accumulation. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 1002-1014.
- (229) Ohkubo, S.; Kumazawa, K.; Sagawa, K.; Kimura, J.; Matsuoka, I. Beta,gamma-methylene ATP-induced cAMP formation in C6Bu-1 cells: involvement of local metabolism and subsequent stimulation of adenosine A2B receptor. *J. Neurochem.* **2001**, *76*, 872-880.
- (230) Uri, A.; Jaerlebark, L.; von Kuegelgen, I.; Schoenberg, T.; Unden, A.; Heilbronn, E. A new class of compounds, peptide derivatives of adenosine 5'-carboxylic acid, includes inhibitors of ATP receptor-mediated responses. *Bioorg Med. Chem* **1994**, *2*, 1099-1105.
- (231) Douglass, J. G.; Plourde, R.; Shaver, S.R.; Watson, P.S.; Boyer, J.L. Non-Nucleotide Composition and Method for Inhibiting Platelet Aggregation. **2006**, *PCT/US/2006/017781*,
- (232) Watkins, B. E.; Kiely, J.S.; Rapoport, H. Synthesis of oligodeoxyribonucleotides using N-(benzyloxycarbonyl)-blocked nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5702-5708.
- (233) Smith, M.; Rammler, D.H.; Goldberg, I.H.; Khorana, H.G. Polynucleotides. XIV. Specific synthesis of the C3'-C5' internucleotide linkage. Synthesis of uridylyl(3' -> 5')-uridine and uridylyl-(3' -> 5')-adenosine. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430-440.

- (234) Bannister, B.; Kagan, F. Synthesis of nucleoside and nucleotide analogs derived from uridine. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3363-3368.
- (235) Musicki, B.; Widlanski, T.S. Synthesis of carbohydrate sulfonates and sulfonate esters. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4231-4233.
- (236) Chen, X.; Wiemer, A.J.; Hohl, R.J.; Wiemer, D.F. Stereoselective synthesis of the 5'-hydroxy-5'-phosphonate derivatives of cytidine and cytosine arabinoside. *J. Org. Chem.* **2003**, *67*, 9331-9339.
- (237) Johnson, D. C., II; Widlanski, T.S. Facile Deprotection of O-Cbz-Protected Nucleosides by Hydrogenolysis: An Alternative to O-Benzyl Ether-Protected Nucleosides. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4643-4646.
- (238) Van Tilburg, E. W.; van der Klein, P.A.M.; von Frijtag Drabbe Kuenzel, J.; de Groote, M.; Stannek, C.; Lorenzen, A.; IJzerman, A.P. 5'-O-Alkyl Ethers of N,2-Substituted Adenosine Derivatives: Partial Agonists for the Adenosine A1 and A3 Receptors. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2966-2975.
- (239) Mitsunobu, O. The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products. *Synthesis* **1981**, 1-28.
- (240) Brown, D. M.; Todd, A.R.; Varadarajan, S. Nucleotides. XL. O2,5'-Cyclouridine and a synthesis of isocytidine. *J. Chem. Soc.* **1957**, 868-872.
- (241) Wada, M.; Mitsunobu, O. Intermolecular dehydration between alcohols and active hydrogen compounds by means of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine. *Tet. Lett.* **1972**, 1279-1282.
- (242) Shibuya, S.; Kuninaka, A.; Yoshino, H. Direct synthesis of 2,5'-anhydropyrimidine nucleosides. *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, *22*, 719-721.
- (243) Kimura, J.; Yagi, K.; Suzuki, H.; Mitsunobu, O. Studies on nucleosides and nucleotides. VIII. Preparation and reactions of triphenylphosphorane diynucleosides. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1980**, *53*, 3670-3677.
- (244) Anzai, K.; Uzawa, J. Cyclonucleoside formation and ring cleavage in the reaction of 2',3'-O-isopropylideneadenosine with benzoyl chloride and its substituted derivatives. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 5076-5080.
- (245) Liu, F.; Austin, D.J. Synthesis of 5'-functionalized adenosine: suppression of cyclonucleoside formation. *Tet. Lett.* **2001**, *42*, 3153-3154.
- (246) Liu, F.; Austin, D.J. A General Synthesis of 5'-Azido-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene Nucleosides. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8643-8645.
- (247) Ashton, T. D.; Scammells, P.J. An expedient synthesis of N6-substituted-5'-modified adenosines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4564-4566.
- (248) Rosemeyer, H.; Toth, G.; Golankiewicz, B.; Kazimierczuk, Z.; Bourgeois, W.; Kretschmer, U.; Muth, H.P.; Seela, F. Syn-anti conformational analysis of regular and modified nucleosides by 1D 1H NOE difference spectroscopy: a simple graphical method based on conformationally rigid molecules. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5784-5790.
- (249) Bannister, B.; Kagan, F. Synthesis of nucleoside and nucleotide analogs derived from uridine. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3363-3368.
- (250) Montgomery, J. A.; Thomas, H.J.; Brockman, R.W.; Wheeler, G.P. Potential inhibitors of nucleotide biosynthesis. 1. Nitrosoureidonucleosides. 2. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 184-189.
- (251) Sak, K.; Uri, A.; Enkvist, E.; Raidaru, G.; Subbi, J.; Kelve, M.; Jarv, J. Adenosine-derived non-phosphate antagonists for P2Y1 purinoceptors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2000**, *272*, 327-331.
- (252) Loog, M.; Uri, A.; Raidaru, G.; Jarv, J.; Ek, P. Adenosine-5'-carboxylic acid peptidyl derivatives as inhibitors of protein kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1447-1452.
- (253) Rozners, E.; Xu, Q. Total synthesis of 3',5'-C-branched nucleosides. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3999-4001.
- (254) Schumacher, T. Synthese und Eigenschaften neuer Nucleosid- und Nucleotid-Rezeptor-Liganden mit Uridin-Partialstruktur. Dissertation, Bonn, **2005**
- (255) Hanessian, S.; Huynh, H.K. Formation of 4-alkoxybenzylidene acetals on solid support and generation of functional diversity with carbohydrate scaffolds. *Synlett* **1999**, 102-104.
- (256) Plourde, R.; Shaver, S.R.; Douglass, J.G.; Watson, P.S.; Boyer, J.L.; Tu, C.; Abreo, M.A.; Alfaro-Lopez, L.J.; Feng, Y.; Harvey, D.F.; Khasanova, T.V. Preparation of tetrahydro-furo-3,4-dioxole nucleosides as anticoagulant and platelet aggregation inhibitors. **2005**, PCT/US 2005/124619
- (257) Van Tilburg, E. W.; von Kuenzel, J.; de Groote, M.; Vollinga, R.C.; Lorenzen, A.; IJzerman, A.P. N6,5'-Disubstituted Adenosine Derivatives as Partial Agonists for the Human Adenosine A3 Receptor. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1393-1400.
- (258) Van Tilburg, E. W.; von Frijtag Drabbe Kuenzel, J.; de Groote, M.; IJzerman, A.P. 2,5'-Disubstituted adenosine derivatives: evaluation of selectivity and efficacy for the adenosine A(1), A(2A), and A(3) receptor. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 420-429.
- (259) Winans, K. A.; Bertozzi, C.R. An Inhibitor of the Human UDP-GlcNAc 4-Epimerase Identified from a Uridine-Based Library. A Strategy to Inhibit O-Linked Glycosylation. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 113-129.
- (260) Wnuk, S. F.; Robins, M.J. Nucleic acid related compounds. 63. Synthesis of 5'-deoxy-5'-methyleneadenosine and related Wittig-extended nucleosides. *Can. J. Chem.* **1991**, *69*, 334-338.

- (261) Wnuk, S. F.; Robins, M.J. Nucleic acid related compounds. 78. Stereocontrolled syntheses of 6'(E and Z)-halovinyl analogs from uridine-derived vinylsulfones via vinyltin intermediates. *Can. J. Chem.* **1993**, *71*, 192-198.
- (262) Wnuk, S. F.; Ro, B.O.; Valdez, C.A.; Lewandowska, E.; Valdez, N.X.; Sacasa, P.R.; Yin, D.; Zhang, J.; Borchardt, R.T.; De Clercq, E. Sugar-Modified Conjugated Diene Analogues of Adenosine and Uridine: Synthesis, Interaction with S-Adenosyl-L-homocysteine Hydrolase, and Antiviral and Cytostatic Effects. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2651-2658.
- (263) Wnuk, S. F.; Lewandowska, E.; Sacasa, P.R.; Crain, L.N.; Zhang, J.; Borchardt, R.T.; De Clercq, E. Stereoselective Synthesis of Sugar-Modified Enyne Analogues of Adenosine and Uridine. Interaction with S-Adenosyl-L-homocysteine Hydrolase and Antiviral and Cytotoxic Effects. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5251-5257.
- (264) Marwood, R. D.; Riley, A.M.; Jenkins, D.J.; Potter, B.V.L. Synthesis of adenophostin A and congeners modified at glucose. *Perkin I* **2000**, 1935-1947.
- (265) Ranganathan, R.; Jones, G.H.; Moffatt, J.G. Novel analogs of nucleoside 3',5'-cyclic phosphates. I. 5'-Mono- and dimethyl analogs of adenosine 3',5'-cyclic phosphate. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 290-298.
- (266) Klausner, Y. S.; Bodansky, M. Coupling reagents in peptide synthesis. *Synthesis* **1972**, 453-463.
- (267) Han, S. Y.; Kim, Y.A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- (268) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- (269) Pehk, T.; Uri, A. Synthesis and structural characterization of conjugates of adenosine and tetra-aspartate, novel analogs of ATP. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2159-2164.
- (270) Epp, J. B.; Widlanski, T.S. Facile Preparation of Nucleoside-5'-carboxylic Acids. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 293-295.
- (271) Bergnes, G.; Gilliam, C.L.; Boisclair, M.D.; Blanchard, J.L.; Blake, K., V; Epstein, D.M.; Pal, K. Generation of an Ugi library of phosphate mimic-containing compounds and identification of novel dual specific phosphatase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **1999**, *9*, 2849-2854.
- (272) Kantoci, D.; Denike, J.K.; Wechter, W.J. Synthesis of aminobisphosphonate. *Synth. Comm.* **1996**, *26*, 2037-2043.
- (273) Wieland, T. Peptide syntheses. *Angew. Chem.* **1951**, *63*, 7-14.
- (274) Houghten, R. A.; Beckman, A.; Ostresh, J.M. Use of 10% sulfuric acid/dioxane for removal of N-tert-butylloxycarbonyl group during solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1986**, *27*, 653-658.
- (275) Kolb, H. C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem., Internat. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- (276) Bose, D. S.; Lakshminarayana, V. An efficient and highly selective cleavage of N-tert-butoxycarbonyl group under microwave irradiation. *Tet. Lett.* **1998**, *39*, 5631-5634.
- (277) Koenig, W.; Geiger, R. New catalysts in peptide synthesis. **1972**
- (278) Najera, C. From α -amino acids to peptides: all you need for the journey. *Synlett* **2002**, 1388-1403.
- (279) Han, S. Y.; Kim, Y.A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- (280) Sabatino, G.; Mulinacci, B.; Alcaro, M.C.; Chelli, M.; Rovero, P.; Papini, A.M. Assessment of new 6-Cl-HOBt based coupling reagents for peptide synthesis. Part 1: Coupling efficiency study. *Let. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 119-123.
- (281) Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El Faham, A.; Ferrer, F.J.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B.M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Mugge, C.; Wenschuh, H.; Klose, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. The uronium/guanidinium peptide coupling reagents: finally the true uronium salts. *Ang. Che., Internat. Ed.* **2002**, *41*, 441-445.
- (282) Castro, B.; Dormoy, J.R.; Evin, G.; Selve, C. B.O.P.: a new peptide coupling reagent exemplified in the synthesis of somatostatin. **1976**
- (283) Dourtoglou, V.; Ziegler, J.C.; Gross, B. O-Benzotriazolyl-N,N-tetramethyluronium hexafluorophosphate: a new and effective reagent for peptide coupling. *Tet. Lett.* **1978**, 1269-1272.
- (284) Coste, J.; Le Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP: a new peptide coupling reagent devoid of toxic byproduct. *Tet. Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- (285) Gewehr, M.; Kunz, H. Comparative lipase-catalyzed hydrolysis of ethylene glycol-derived esters. The 2-methoxyethyl ester as a protective group in peptide and glycopeptide synthesis. *Synthesis* **1997**, 1499-1511.
- (286) Kadereit, D.; Waldmann, H. Enzymatic Protecting Group Techniques. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3367-3396.
- (287) Pearlman, W. M. Noble metal hydroxides on carbon nonpyrophoric dry catalysts. *Tet. Lett.* **1967**, 1663-1664.

- (288) McKenna, C. E.; Higa, M.T.; Cheung, N.H.; McKenna, M.C. The facile dealkylation of phosphonic acid dialkyl esters by bromotrimethylsilane. *Tet. Lett.* **1977**, 155-158.
- (289) Sturtz, G.; Couthon, H.; Fabulet, O.; Mian, M.; Rosini, S. Synthesis of gem-bisphosphonic methotrexate conjugates and their biological response towards Walker's osteosarcoma. *Europ. J. Med. Chem.* **1993**, 28, 899-903.
- (290) Chen, X.; Wiemer, D.F. Synthesis of 5'-Amino-5'-phosphonate Analogues of Pyrimidine Nucleoside Monophosphates. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6108-6114.
- (291) Hillman, J. M. L.; Roberts, S.M. Preparation of carbocyclic, phosphonate analogs of cyclic adenosine monophosphate (cAMP). *J. Chem. Soc., Perkin 1* **1997**, 3601-3608.
- (292) Zygmunt, J.; Kafarski, P.; Mastalerz, P. Preparation of oxoalkanephosphonic acids. *Synthesis* **1978**, 609-612.
- (293) de Zwart, M.; Kourounakis, A.; Kooijman, H.; Spek, A.L.; Link, R.; von Frijtag Drabbe Kunzel JK; IJzerman, A.P. 5'-N-substituted carboxamidoadenosines as agonists for adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1384-1392.
- (294) Rohrer, D.; Sundaralingam, M. The crystal structure of dihydrouracil: an unusual base of transfer ribonucleic acid. *Chem. Comm.* **1968**, 746-747.
- (295) King, B. F.; Townsend-Nicholson, A. Nucleotide and Nucleoside Receptors, Tocris Cookson Inc. **2003**
- (296) Clark, D. E. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration. *J. Pharm. Sci.* **1999**, 88, 815-821.
- (297) Morioka, Y.; Otsu, M.; Naito, S.; Imai, T. Phosphonate O-deethylation of [4-(4-bromo-2-cyano-phenylcarbamoyl) benzyl]-phosphonic acid diethyl ester, a lipoprotein lipase-promoting agent, catalyzed by cytochrome P450 2C8 and 3A4 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* **2002**, 30, 301-306.
- (298) El Tayeb, A.; Griessmeier, K.J.; Muller, C.E. Synthesis and preliminary evaluation of [3H]PSB-0413, a selective antagonist radioligand for platelet P2Y12 receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 5450-5452.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sowohl in Höhen als auch in Tiefen bei mir gewesen sind und meine bisher drei „Bonner Jahre“ zu einer sehr schönen Zeit gemacht haben.

Zuallererst gilt mein Dank meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau Prof. Dr. Christa Müller, da sie mir ermöglicht hat, in ihrem Arbeitskreis dieses Thema zu bearbeiten. Ich konnte dabei sehr eigenständig arbeiten und bekam durch viele hilfreiche Diskussionen Impulse und stete Unterstützung.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau PD Dr. Daniela Gündisch dafür bedanken, daß sie nicht nur das Koreferat übernommen hat, sondern darüber hinaus die Arbeit mit wertvollen Ratschlägen begleitet hat.

Viele hilfreiche Geister erleichterten oder ermöglichten mir die Durchführung der nicht immer einfachen Synthesen. Hier möchte ich besonders Dr. Reik Löser, Dr. Joachim „Dscho“ Burbiel, Dr. Jörg Hockemeyer, Dr. Rhalid Akkari und Fabian Heisig für die vielen Diskussionen danken. Insbesondere das allfreitags zeremoniierte Syntheseseminar war in dieser Hinsicht sehr fruchtbringend. Für die Aufnahme der NMR-Spektren möchte ich mich bei Sabine Terhart-Krabbe, Annette Reiner und Marion Schneider, für die LC-MS-Analysen bei Marion Schneider und Frank Umbach und für die Elementaranalysen bei Herrn Wolfgang Passgang bedanken.

Synthese ist nur ein Standbein in der medizinischen Chemie, die Testung das andere. Dr. Jamshed Iqbal beglückte mich regelmäßig mit guten Nachrichten von den Ectonucleotidasen: „Andreas, your compound is inhibitor.“ avancierte zu einem meiner Lieblingssätze. Für sein Engagement bei der Testung an den Enzymen möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken, ebenfalls bei Sang-Yong Lee. Im Isotopenlabor führten Anja Scheiff, Karen Schmeling, Dr. Kerstin Atzler, Younis Baqi die Testungen an den P2Y-Rezeptoren durch. Bei Frank Umbach möchte ich mich für die Metabolisierungsexperimente bedanken.

Ich habe mich als Assistent im dritten Semester durch die schöne Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Michael Gütschow, Dr. Marcus Hubert und allen Assis sehr wohl gefühlt.

Die Schaffung einer freundschaftlichen Atmosphäre im Institut und viele über die Arbeit hinausgehende Aktivitäten sind eine Gemeinschaftsproduktion von (nach

Büros sortiert, keine Wertung!!!): Fabian, Heiko, Frank, Lenka, Christiane, Merry, Svenja, Claudia, Thomas (noch ein Triathlet), Christoph (Danke für die vielen Rennradausfahrten!), Daniel (Danke für die eine Rennradausfahrt), Reik und Markus. Mein größtes Dankeschön geht natürlich an Manuela!!! Vielen Dank, daß Du alles mitgetragen hast und immer bei mir warst! Auch meine Eltern, mein Bruder Roland und die ganze Familie, inklusive allen Papenburgern!, waren aus der Ferne immer für mich da. Ihr kennt das alles ja teilweise aus eigener Erfahrung...

Die Ferne tat den Freundschaften zum Glück keinen Abbruch, ein großes Dankeschön geht von hier aus gen Norden an Frank (leider hast Du immer noch kein gesteigertes Interesse an der organisch-präparativen Synthese, aber das kriegen wir schon noch hin!) und Sandra, Marcus, Patrick und Janka und Schorsch und gen Moskau an Sascha (bolschoe spasibo!!).

Auch in Bonn sind einige Freundschaften entstanden, hier geht mein Dank für viele schöne Abende am Rhein an Karsten, Wally und Sascha und für viele sportliche Höhepunkte an die Triathlonabteilung der SSF Bonn. Ihr habt es mir leicht gemacht, hier heimisch zu werden.

Publikationen

Brunschweiger, A.; Heber, D. Two approaches to α,α -bis-Mannich salts of N-monosubstituted amides. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42(14), 2653-2655.

A. Brunschweiger, J. Iqbal, A. Scheiff, M. N. Munkonda, J. Sévigny, A. F. Knowles, C. E. Müller. Synthesis and structure-activity relationships of 5'-substituted uridine and adenosine derivatives as ectonucleotidase inhibitors. Abstract in: *Purinergic Signalling* **2006**, 2(2), 170.

Brunschweiger, Andreas; Müller, Christa E. P2 receptors activated by uracil nucleotides - an update. *Current Medicinal Chemistry* **2006**, 13(3), 289-312.

Brunschweiger, Andreas; Müller, Christa E. Medizinische Chemie der Diuretika. *Pharmazie in Unserer Zeit* **2006**, 35(4), 310-320.