

Synthese von Isoxanthopterin-N⁸-Nucleosiden

fluoreszierende 2'-Desoxy-Guanosin-Analoga
als Bausteine für die Oligodesoxyribonucleotid-Synthese

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
an der Universität Konstanz

vorgelegt von

Jörg Lehbauer

Konstanz, im Juni 1997

..., und wenn man das Isoxanthopterin, das tatsächlich ein Desoxy-leukopterin ist zunächst für ein Anhydro-leukopterin hielt, dann sind das Schwierigkeiten, die zwar auch in anderen Naturstoffgruppen auftreten, die aber doch in dieser Häufung für die Chemie der Pteridine charakteristisch sind, und die einen Referenten dieses Gebietes, J.C.E. Simpson^[1], zu der Feststellung veranlassten

„the practical difficulties of the problem were unusually formidable !“

Man wundert sich nach diesen Erfahrungen nicht mehr, daß es auch ...

Clemens Schöpf*

* Clemens Schöpf : Die Anfänge der Pterin-Chemie, in „Pteridine Chemistry, Proceedings of the Third International Symposium held at the Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Stuttgart, September 1962“; Pfeleiderer, W.; Taylor, E.C. (eds.) : Pergamon Press, Oxford, London, Edinburgh, New York, Paris, Frankfurt 1964, S 3-13, Seite 6

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde zwischen Oktober 1993 und Dezember 1996 an der Fakultät für Chemie der Universität Konstanz im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Pfeleiderer angefertigt.

Meinem Doktorvater und Lehrer, Herrn Prof. Pfeleiderer, danke ich für die Überlassung des Themas, für zahlreiche interessante Gespräche innerhalb und außerhalb des Arbeitsgebietes und die intensive Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. G. Müller danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei meinen Laborkollegen Heiner, Oliver, Gunter und Quizeng möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Ein besonderer Dank geht dabei an Oliver für die Idee der DBU-Methode.

Weiterhin danke ich Frau Burkhardt-Boer für die Durchführung der Elementaranalysen, Herrn Krienitz für die Aufnahme der ^{31}P -Spektren und Frau Quelle für die Aufnahme des MS-Spektrums.

Desweiteren bedanke ich mich bei Geeta, Olli, Gunter, Marion, Marita und Elias für die Überlassung von Reagentien und Phosphitamiden für die Oligonucleotid-Synthese sowie einiger Vergleichssubstanzen.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für das kollegiale Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit bedanken, mein besonderer Dank gilt Gunter, Heiner, Olli, Shari und Tommi für die außeruniversitären Unternehmungen.

Verwendete Abkürzungen

3-MI	3-Methyl-Isoxanthopterin
Abb.	Abbildung
ABI	Applied Biosystems
abs	absolut
AcOH	Essigsäure
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
b (NMR)	breit
ber.	berechnet
Bz	Benzoyl
CDCl ₃	Deuteriochloroform
CE	2-Cyanoethyl
CHCl ₃	Chloroform
CH ₃ CN	Acetonitril
CPG	Controlled Pore Glass
d (NMR)	Dublett
D ₂ O	Deuteriumoxid
DBN	1,5-Diazabicyclo-[4,3,0]-non-5-en
DBU	1,8-Diazabicyclo-[5,4,0]-undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie / -chromatogramm
dd (NMR)	Doppel-Dublett
DMAP	4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin
DMD	Dimethyldioxiran
dmf-	N,N-Dimethylaminomethylen- (Schutzgruppe)
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMTr-	4,4'-Dimethoxytrityl-
DMSO-d ₆	Dimethylsulfoxid (deutert)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EE	Essigsäureethylester

EI	Elektronenstoß Ionisation
EMME	Ethoxymethylen-malonsäurediethylester
Et	Ethyl
EtOAc	Essigsäureethylester
eq	Mol-Equivalente
gef.	gefunden
GHA	Glyoxylsäureethylester-ethylhalbacetal
h	Stunde(n)
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HV	Hochvakuum
LCAA	Long Chain Alkyl Amine
LCMAA	Long Chain Methyl Alkyl Amine
LM	Lösungsmittel
m (NMR)	Multipllett
Me	Methyl
min	Minunte(n)
MS	Massenspektrometer / Massenspektrum
MW	Molekulargewicht
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NPE	2-(4-Nitrophenyl)ethyl
NPEOC-	2-(4-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl-
NPEOH	2-(4-Nitrophenyl)ethanol
OD	Optische Dichte
p-CIBz	p-Chlorbenzoyl-
Ph	Phenyl
ppm	parts per million
pq (NMR)	Pseudo-Quartett
q (NMR)	Quartett

RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
s (NMR)	Singulett
Smp	Schmelzpunkt
t (NMR)	Triplett
TBDMS	tert.-Butyldimethylsilyl
TCA	Trichloressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
Tol	Toluen, p-Toluoyl-
UV	Ultraviolett
Zers.	Zersetzung
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
[]	Schulter im UV

INHALTSVERZEICHNIS

I	THEORETISCHER TEIL	1
1.	Einleitung	1
1.1.	Die Bausteine der Nucleinsäuren	1
1.2.	Anwendungsbereiche der Nucleinsäurechemie	4
1.3.	Pteridine und Pteridin-Nucleoside	6
1.3.1.	Pteridine	6
1.3.2.	Pteridin-Nucleoside	8
1.4.	Das Isoxanthopterin	10
2.	Aufgabenstellung	13
3.	Synthesekonzept	15
4.	Synthese der heterocyclischen Basen	18
4.1.	Allgemeine Synthesestrategien zum Aufbau von Pteridinen	18
4.1.1.	Die Boon-Polonovski-Synthese	18
4.1.2.	Die Timmis-Synthese	19
4.1.3.	Die Gabriel-Isay-Synthese	20
4.2.	Darstellung der benötigten Pteridine	23
4.2.1.	Synthesen der 6-H-substituierten Pteridin-Derivate	23
4.2.2.	Synthesen der 6-phenylsubstituierten Pteridin-Derivate	24

4.2.3.	Einführung zusätzlicher Schutzgruppen	30
4.3.	Pyrido-[2,3-d]-pyrimidin-Synthesen	34
4.3.1.	Methoden zur Darstellung von Pyrido-[2,3-d]-pyrimidinen	34
4.3.2.	2-Alkylmercapto-4,7(3H,8H)-pyrido-[2,3-d]-pyrimidindion-Synthesen	35
4.4.	Spektroskopische Daten	38
4.4.1.	UV-Absorptions-Spektren	38
4.4.2.	pK _a -Werte einiger Pteridinderivate	42
4.4.3.	¹ H-NMR-Spektren	43
5.	Nucleosidsynthesen	46
5.1.	Methoden zur Darstellung von Nucleosiden	46
5.1.1.	Die Schmelzkondensations-Methode nach Helferich	46
5.1.2.	Die Koenigs-Knorr-Methode	47
5.1.3.	Die Hilbert-Johnson-Methode und ihre Silylvarianten	48
5.1.4.	Selektivität bei der Glycosidierung von 7(8H)-Pteridinonen	50
5.2.	Glycosidierung der heterocyclischen Basen	51
5.2.1.	Die Zuckerkomponenten	52
5.2.2.	Glycosidierung der Pteridin-Derivate	53
5.2.3.	Glycosidierungsversuche am Pyrido-[2,3-d]-pyrimidin	57
5.3.	Konfiguration der Nucleoside	58
5.4.	Spektroskopische Daten	61
5.4.1.	UV-Absorptions-Spektren	61
5.4.2.	¹ H-NMR-Spektren	64
6.	Synthese- und Schutzgruppen-Strategien zum Aufbau von Oligo-	68

	desoxyribonucleotiden	
6.1.	Methoden der Oligodesoxyribonucleotidsynthese	68
6.1.1.	Die Phosphodiester-Methode	68
6.1.2.	Die Phosphotriester-Methode	69
6.1.3.	Die H-Phosphonat-Methode	69
6.1.4.	Die Phosphitchlorid-Methode	70
6.1.5.	Die Phosphitamid-Methode	70
6.2.	Schutzgruppen-Strategien für die Oligodesoxyribonucleotidsynthese	71
6.2.1.	Schutzgruppen für das Aglycon	72
6.2.2.	Schutzgruppen für die Phosphatbrücke	73
6.2.3.	Schutzgruppen für die Zuckereinheit	74
6.3.	Auswahl der Schutzgruppen für die Isoxanthopterin-Bausteine	75
7.	Synthese eines O⁴-geschützten Isoxanthopterin-N⁸-Nucleosids	76
7.1.	Die Isoxanthopterin-Route	76
7.1.1.	Entschützung der O ⁴ -Position	76
7.1.2.	Versuche zur Einführung neuer Schutzgruppen an O ⁴ bzw. der 2-Aminofunktion	79
7.1.3.	Weitere Entschützung der DMF-geschützten Nucleoside 90 und 91	80
7.2.	Die 2-Methylmercapto-Isoxanthopterin-Route	82
7.2.1.	Einführung der NPE-Gruppe	82
7.2.2.	Die Oxidation der Methylmercaptogruppe	82
7.2.3.	Austausch des Substituenten in Position 2	88
7.2.4.	Abspaltung der Zuckerschutzgruppen	89
7.3.	Spektroskopische Daten	91

7.3.1.	UV-Absorptionsspektren	91
7.3.2.	¹ H-NMR-Spektren	94
8.	Synthese eines O⁴-geschützten 6-Phenylisoxanthopterin-N⁸-Nucleosids	99
8.1.	Die 6-Phenylisoxanthopterin-Route	99
8.1.1.	Abspaltung der O ⁴ -Benzyl-Schutzgruppe	99
8.1.2.	Einführung der NPE-Gruppe in die O ⁴ -Position von 116	100
8.1.3.	Abspaltung der Zuckerschutzgruppen	101
8.2.	Die 2-Methylmercapto-6-phenylisoxanthopterin-Route	102
8.2.1.	Einführung der NPE-Gruppe	102
8.2.2.	Die Oxidation der Methylmercaptogruppe	102
8.2.3.	Austausch des Substituenten in Position 2	103
8.3.	Spektroskopische Daten	104
8.3.1.	UV-Absorptionsspektren	104
8.3.2.	¹ H-NMR-Spektren	106
9.	Darstellung der Phosphitamid-Bausteine	109
9.1.	Einführung der Dimethoxytrityl-Funktion	109
9.2.	Phosphitylierung	110
9.3.	Spektroskopische Daten	112
9.3.1.	UV-Absorptions-Spektren	112
9.3.2.	¹ H-NMR-Spektren	114
9.3.3.	³¹ P-NMR-Spektren	117

10.	Die automatisierte Festphasensynthese von Oligonucleotiden	119
10.1.	Die Festphasensynthese	119
10.2.	Die automatisierte Festphasensynthese	121
10.3.	DNA-Syntheseautomaten	123
10.4.	Reagentien	124
10.5.	Syntheseprogramme	125
10.6.	Analytik	126
10.6.1.	Bestimmung der Kondensations-Ausbeute	127
10.6.1.	Bestimmung der Oligonucleotid-Ausbeute	127
10.6.1.	Reversed-Phase-HPLC	127
11.	Oligonucleotidsynthesen	129
11.1.	Die Wahl der Zielsequenz	129
11.2.	Erste Modell-Synthesen	130
11.3.	Synthesen der 21-meren Zielsequenz	132
11.4.	Qualität der Synthesen	133
11.5.	Bestimmung der Schmelztemperaturen	137
12.	Zusammenfassung	143
12.1.	Ergebnisse	143
12.2.	Ausblick	148
12.3.	Veröffentlichungen	150
II.	EXPERIMENTELLER TEIL	151

A.	Allgemeine Hinweise	151
B.	Synthese der heterocyclischen Basen	153
C.	Synthese der Nucleoside	166
D.	Derivatisierung der Nucleoside	177
E.	Oligonucleotidsynthesen	196
E.1.	Verwendete Synthese und Abspaltungsbedingungen	196
E.1.1.	Reagentien und Lösungen	196
E.1.2.	Syntheseprogramme	197
E.2.	Analytik der Oligonucleotidsequenzen	204
E.2.1.	Kondensationsausbeuten	204
E.2.2.	Oligonucleotid-Ausbeute bei der Abspaltung vom Träger	204
E.2.3.	HPLC	204
E.2.4.	Schmelzkurven	205
III	LITERATURVERZEICHNIS	207

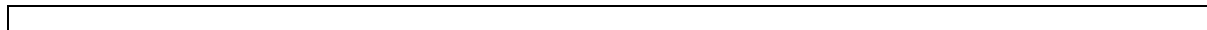
I. THEORETISCHER TEIL

1. EINLEITUNG

Eine einzigartige Stellung unter den Biomolekülen kommt den Nucleinsäuren zu, welche als Speichersystem genetischer Information eine zentrale Rolle in lebenden Organismen ausfüllen. Nach ihrer Entdeckung in den Jahren 1868/69^[2] vergingen 85 Jahre, ehe die Bestandteile und Bindungsverhältnisse dieser Makromoleküle geklärt waren und Watson und Crick 1953^[3] mit dem Postulat der α -doppelhelicalen B-DNA-Struktur einen Wandel in der Nucleinsäurechemie einleiteten. Die auf dieser Struktur basierenden Einblicke in Biochemie und Funktionsweise der DNA bilden die Grundlagen, auf denen die Entwicklungen der Molekularbiologie aufbauen.

1.1. Die Bausteine der Nucleinsäuren

Die Substanz, die Miescher^[2] 1868/69 in Tübingen während Untersuchungen an den Kernen von Eiterzellen isolierte, wies für die damals bekannten Biomoleküle so ungewöhnliche Eigenschaften auf, daß der Leiter des Institutes die Ergebnisse erst 2 Jahre später nach eingehender eigener Prüfung veröffentlichte. Neben der Entwicklung besserer Methoden zur Isolierung und Reinigung dieser Nucleinsäuren, wie sie nach einem Vorschlag von Altmann^[4], der 1889 erstmals proteinfreie DNA isolieren konnte, benannt wurden, erfolgte nach und nach die Charakterisierung ihrer einzelnen Bestandteile. Kossel^[5-8] isolierte und identifizierte die Purinderivate Adenin und Guanin. Die Pyrimidine Thymin und Cytosin wurden ebenfalls in der Arbeitsgruppe um Kossel^[9,10] gefunden, ebenso Hinweise auf einen Kohlenhydratbestandteil^[11]. Ascoli^[12] schließlich fand 1901 mit dem Uracil die letzte der fünf wichtigsten heterocyclischen Basen der Nucleinsäuren.



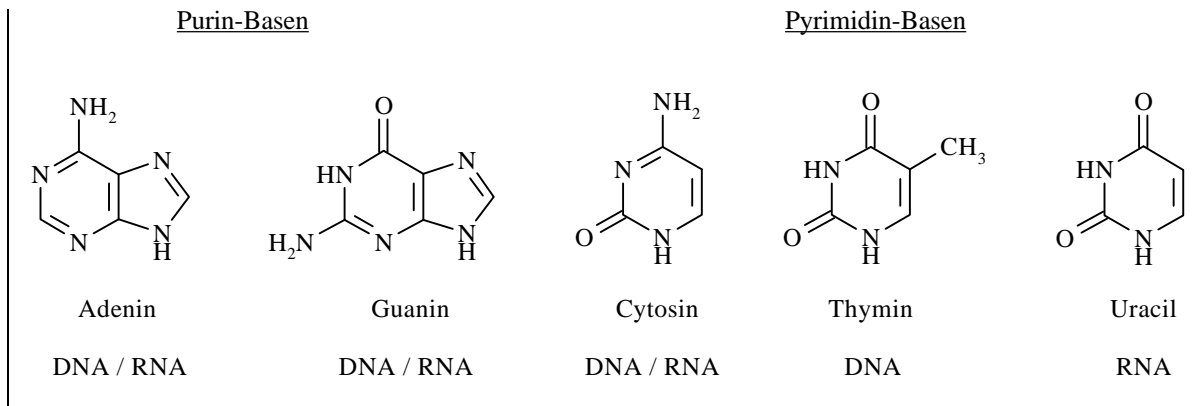


Abb.1.1 : die 5 wichtigsten heterocyclischen Basen der Nucleinsäuren DNA und RNA

Die Isolierung und Identifizierung der Kohlenhydratbestandteile gelang Levene und Mitarbeitern. Nach Entdeckung von D-Ribose^[13,14] 1909 und 2-Desoxy-D-ribose 20 Jahre später^[15,16] wurden die Nucleinsäuren fortan in zwei Klassen unterteilt, die Ribonucleinsäuren (RNA) und die Deoxyribonucleinsäuren (DNA). Von diesen konnte die DNA 1944 durch Avery, MacLeod und McCarty^[17] über Transformationsexperimente an Bakterien als genetisches Speichermedium identifiziert werden.

Nucleinsäure-Typ	Zucker	heterocycl.Basen / Nucleosid (Kurzschreibweise)
DNA	2-Deoxy-D-ribose	Adenin / 2'-Desoxy-adenosin (dA) Guanin / 2'-Desoxy-guanosin (dG) Cytosin / 2'-Desoxy-cytidin (dC) Thymin / Thymidin od. 2'-Desoxy-thymidin (T/dT)
RNA	D-Ribose	Adenin / Adenosin (A) Guanin / Guanosin (G) Cytosin / Cytidin (C) Uracil / Uridin (U)

Tab.1.1 : DNA-/ RNA-Bestandteile

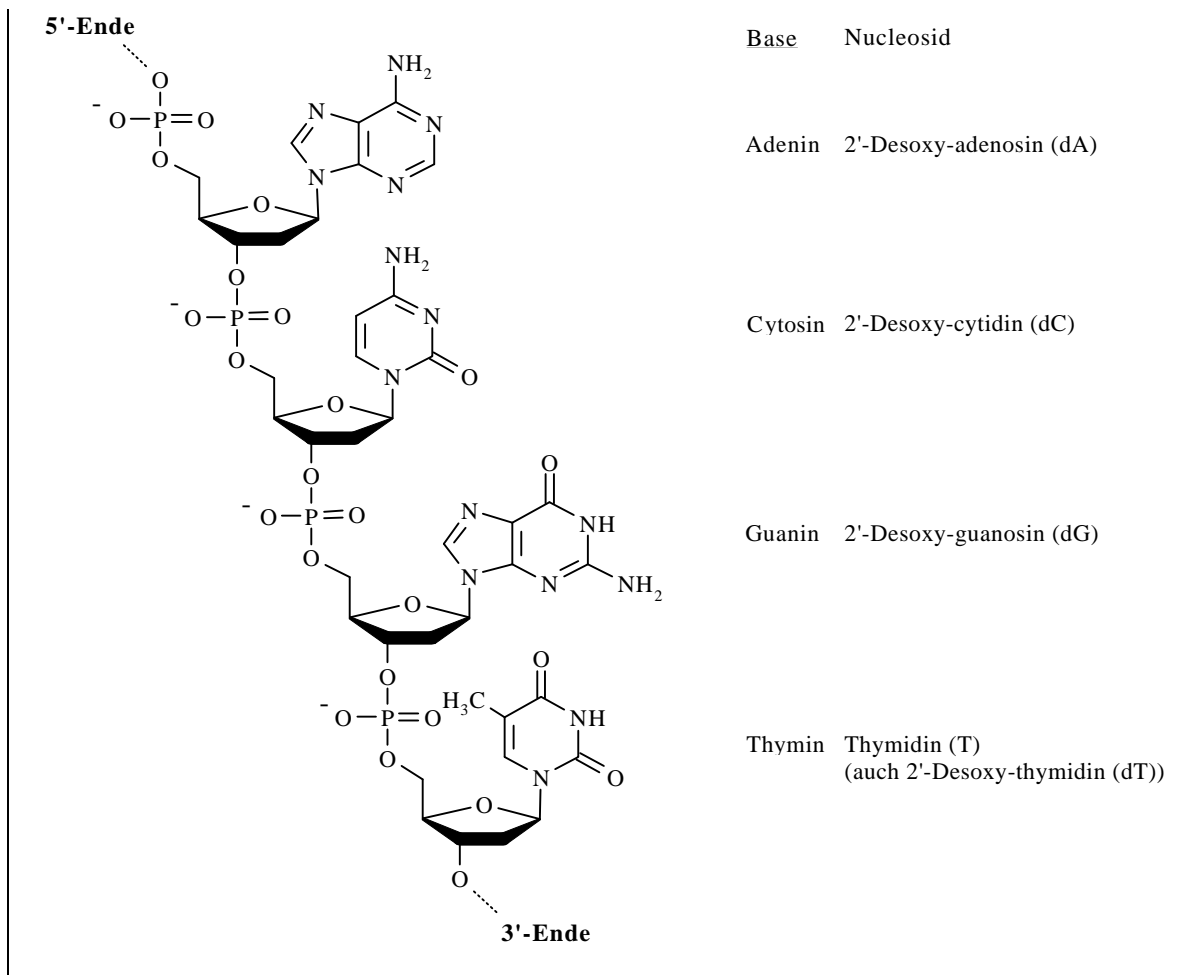


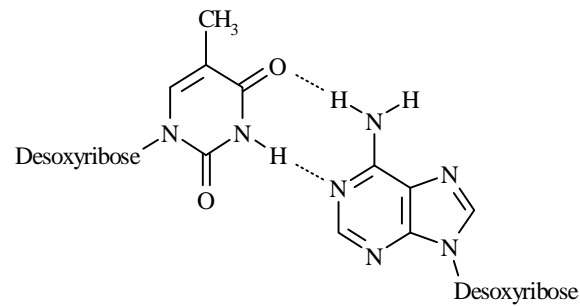
Abb.1.2: DNA-Einzelstrang-Modell nach Todd^[18,19]

Die Klärung der genauen Bindungsverhältnisse zwischen den einzelnen Bausteinen gelang dann bis 1952/53 der Arbeitsgruppe von Todd^[18,19]. Nucleinsäuren sind eindimensionale Polymerketten, die sich aus über Phosphodiesterbrücken verknüpften Nucleosidbausteinen zusammensetzen (Abb.1.2). Als Nucleosid bezeichnet man dabei eine über das anomere Zentrum der Pentofuranose β -N-glycosidisch verknüpfte Einheit aus Zucker und heterocyclischer Base. In der DNA

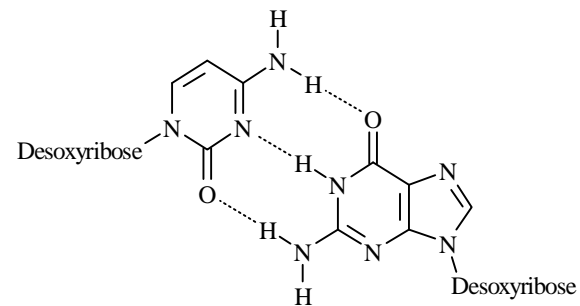
kommen dabei im Wesentlichen vier verschiedene Nucleoside vor (dA, dG, dC und T), lediglich bei einigen Phagen (Bakterienviren) treten noch andere Bausteine auf. So ist beispielsweise in der DNA des Phagen SP 8 das Thymin durch 5-Hydroxymethyl-deoxyuridin ersetzt.

Diese Kenntnisse, zusammen mit der Chargaff-Regel^[20], wonach in DNA grundsätzlich die Menge an Guanin gleich der von Cytosin und die Menge an Adenin gleich der von Thymin ist, sowie den Ergebnissen der Röntgenbeugungsexperimente an DNA durch Franklin und Wilkins^[21,22], bildeten die Basis, auf der Watson und Crick^[3] ihren Vorschlag der doppelhelicalen B-DNA-Sekundärstruktur erstellten. Demnach liegt die natürliche DNA in Form eines Doppelstranges vor, der über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen sich gegenüberliegenden Heterocyclen zusammengehalten wird. Die beiden einzelnen Polynucleotidstränge sind gegenläufig und zueinander komplementär. Das heißt, einem Guanin liegt über drei H-Brücken assoziiert stets ein Cytosin, einem Adenin über zwei H-Brücken verknüpft ein Thymin gegenüber, was die Chargaff-Regel erklärt. Dieser strickleiterartige Doppelstrang liegt schraubenförmig gewunden als rechtsgängige α -Helix vor, wie in Abb.1.3 gezeigt ist.





T-A-Paar (2 Wasserstoffbrücken)



C-G-Paar (3 Wasserstoffbrücken)

entnommen aus Bennett & Frieden : Modern Topics in Biochemistry,
New York, Macmillan Publishing Co.Inc., 1966 ©

Abb.1.3 : B-DNA-Doppelhelix-Struktur und Basenpaarung nach Watson und Crick^[3]

Über das Basenpaarmodell von Watson und Crick wurde es nun auch möglich, beispielsweise die Mechanismen der Replikation und Translation zu erklären. Es erfolgte die Entschlüsselung des genetischen Codes in den Arbeitsgruppen von Nirenberg^[23] und Khorana^[24]. Die chemische Nucleinsäure-Forschung konzentrierte sich auf die Entwicklung von Methoden zur Sequenzanalyse, sowie der gezielten Darstellung von Nucleosidbausteinen und Oligonucleotiden. Der wachsende Bedarf sowohl an naturidentischen als auch an modifizierten synthetischen Oligonucleotiden in der biochemischen und medizinischen Forschung trug

dazu bei, daß für die Oligodesoxyribonucleotidsynthese immer bessere und schnellere Methoden entwickelt wurden, ein Prozeß, der bis zur Automatisierung führte. Heutzutage können oligomere DNA-Sequenzen routinemäßig an Syntheseautomaten hergestellt werden.

1.2. Anwendungsbereiche der Nucleinsäurechemie

Aufgrund der Bedeutung von Nucleinsäuren und Nucleinsäurebausteinen innerhalb lebender Organismen fehlt es nicht an möglichen Anwendungen der Nucleinsäurechemie. Einerseits bilden Nucleosid-Analoga eine wichtige Klasse von Chemotherapeutika mit anticarcinogener^[25], antiviraler^[26] oder auch antibiotischer^[27] Wirkung. Am bekanntesten dürften die Didesoxynucleoside^[28] und das AZT^[29] (3'-Azido-3'-desoxythymidin) sein, welche die Zulassung als Medikamente gegen AIDS erhielten. Andererseits finden auch synthetische Oligonucleotide breite Anwendung, wie bei der Identifikation genetischer Defekte und genetisch bedingter Krankheiten über das sogenannte „DNA-probing“^[30,31], als Primer für Sequenzierungen^[32,33], sowie molekularbiologische Verfahren wie die PCR-Technologie^[34] und die Mutagenese^[35]. Ein weiteres Feld ist die Synthese und Expression von Strukturgenen^[36], d.h. von Genen die wichtige Proteine oder Peptide codieren, wie z.B. das Insulin^[37] oder das Interferon- α ^[38].

Ein weiteres aktuelles Anwendungsgebiet bildet die Antisense-Technik^[39,40]. Dabei wird ein Oligonucleotid, das zu einem Abschnitt zelleigener Nucleinsäure komplementär ist, in eine Zelle eingebracht, um dort durch Hybridisierung hochselektiv diese Zielsequenz zu blockieren. Da biochemische Prozesse wie Replikation bei DNA oder Translation bei RNA über einzelsträngige Nucleinsäuren ablaufen, ist das Antisense-Konzept ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Behandlung viraler Erkrankungen durch Regulation der viralen Genexpression. Um entsprechende Effekte zu zeigen, werden in der Regel chemisch modifizierte Oligonucleotide eingesetzt, die neben guten Hybridisierungseigenschaften und einer erhöhten Stabilität gegenüber zelleigenen Nucleasen auch ein gutes Zellpenetrationsvermögen besitzen müssen. Die Modifikationen umfassen dabei die ganze Palette von Phosphat- (Thiophosphate, Methylphosphate,...) und Zucker-Variationen (2'-O-Methyl-oligoribonucleotide), sowie Veränderungen an den heterocyclischen Basen.

Auch das DNA-probing ist eine Hybridisierungstechnik, welche die spezifische Bindung zweier komplementärer Nucleinsäuresequenzen ausnutzt. Eine gesuchte Zielsequenz (target) wird dabei mittels eines markierten Komplements (probe) identifiziert. An die Stelle der auch heute noch vielfach verwendeten radioaktiven Marker (³²P) treten mehr und mehr andere Systeme. Die Bedingungen für derartige Alternativen sind neben der leichten Einführbarkeit in Oligomere eine gute Detektierbarkeit bei möglichst geringer Beeinträchtigung der Hybridisierungseigenschaften des Oligonucleotids. Zu nennen sind hierbei das Biotin-Streptavidin-

System^[41-51] und farbstoffmarkierte Systeme, bei denen ein fluoreszierendes oder lumineszierendes Markermolekül über einen Spacer kovalent an das 5'-Ende der Probe gebunden ist. Alternativ zur 5'-OH-Funktion können derartige Derivatisierungen auch an der C⁵-Position von Pyrimidinen^[52-54], der C⁸-Position von Purinen^[55] und den exocyclischen Aminofunktionen des Adenins^[56,57] und des Cytosins^[58,59] vorgenommen werden. Als Marker eignen sich dabei neben Fluorescein^[60-70] auch Rhodamine^[71,72] oder Pyrenderivate^[45,46].

Ein Oligonucleotidgemisch muß zum Probing gelchromatographisch aufgetrennt werden. Nach Übertragen der Gelbanden auf eine Matrix wird das markierte Oligomer zugesetzt, wobei zueinander komplementäre Sequenzen hybridisieren. Überschüssige nicht gebundene probe muß ausgewaschen werden (bound free separation), um lediglich die probe-target-Duplexe in der anschließenden Detektion nachzuweisen.

Einen Schritt weiter gehen Energietransfer-Systeme, die neben einem Fluoreszenzmarker einen Cofaktor enthalten, dessen Interaktion mit dem Fluorophor Rückschlüsse auf den Hybridisierungszustand der Probe erlaubt. So fanden Bannwarth und Müller^[73] bei Hybridisierungsexperimenten mit einem Markersystem aus 6.7-Dimethylumazin und einem Bathophenanthrolin-Ruthenium(II)-Komplex eine Verdopplung der Fluoreszenzintensität, wenn sich die beiden Marker fixiert in doppelsträngiger DNA räumlich nahe kommen. Ein von T.Maier^[74] entwickeltes Guanosinderivat vereinigt Donor und Acceptor in einem Baustein. Sowohl ein Fluorescein als auch ein 2.4-Dinitroanilin sind über Spacer an den Heterocyclus gebunden. In einzelsträngiger DNA können sich die beiden Marker aufgrund der flexiblen Spacer räumlich nahe kommen, wobei das Anilinderivat als Fluoreszenzquencher fungieren kann. Im Doppelstrang kommt der Fluorophor in der kleinen, der Quencher in der großen Furche zu liegen. Diese Fixierung in räumlicher Distanz unterbindet den Quenchprozess und führt so zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität.

Beide Methoden erlauben über die Messung der Fluoreszenzintensität die Detektion einer Zielsequenz auch in heterogener Lösung, was gegenüber dem normalen Probing-Konzept deutliche Zeitersparnis bringt, da sowohl die gelchromatographische Trennung als auch die ebenfalls zeitaufwendige bound-free-separation entfallen können.

Eine weitere Möglichkeit zur Nucleinsäuremarkierung stellen basenmodifizierte Nucleoside mit Eigenfluoreszenz dar. In diesem Gebiet kann auch die vorliegende Arbeit angesiedelt werden. Ziel ist es, anstelle einer der natürlichen Basen einen fluoreszierenden Heterocyclus direkt in ein Oligomer einzufügen. Die Positionierung einer solchen Verbindung im Basenstapel des Oligomers kann aufgrund sterischer Einflüsse die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen im Duplex stören, was die Hybridisierungseigenschaften beeinträchtigt. Um dies zu vermeiden muß ein geeigneter Marker neben guten Fluoreszenzeigenschaften auch eine strukturelle Nähe zu den normalen DNA-Bausteinen besitzen. Als Beispiele seien das 3-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2,7-dioxo-

pyrido[2,3-d]-pyrimidin von Lin und Brown^[75] und das 6-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-3,4-dihydro-7(8H)-pyrimido[4,5-c]-[1,2]-oxazinon von Inoue^[76,77] genannt (Abb.1.4), welche beide eine cytidinanaloge Struktur (Abb.1.4) aufweisen.

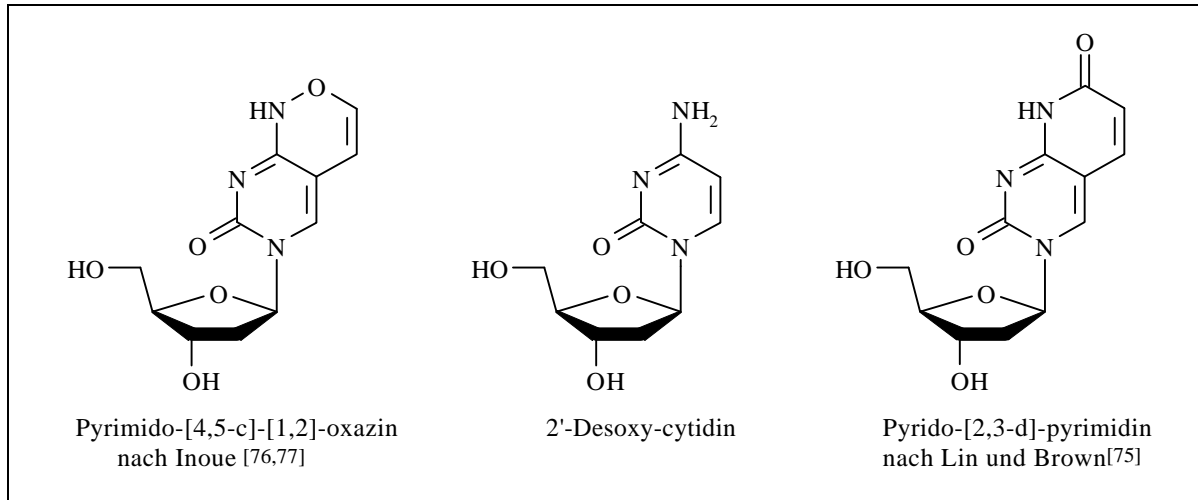


Abb.1.4 : fluoreszierende basenmodifizierte Nucleoside als 2'-Desoxycytidinanaloga

Aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften und des Pyrazino-[2,3-d]-pyrimidinstruktur eignet sich das Pteridinsystem zur Darstellung von Strukturanaloga sowohl der Pyrimidin- als auch der Purin-Nucleoside.

1.3. Pteridine und Pteridin-Nucleoside

1.3.1. Pteridine

Erweitert man das Pyrimidinsystem um einen Pyrazinring bzw. vergrößert man den Imidazolring eines Purins um eine Kohlenstoffeinheit, so gelangt man zu einer weiteren in der Natur häufig vorkommenden Heterocyclenklasse, den Pteridinen (Abb.1.5).

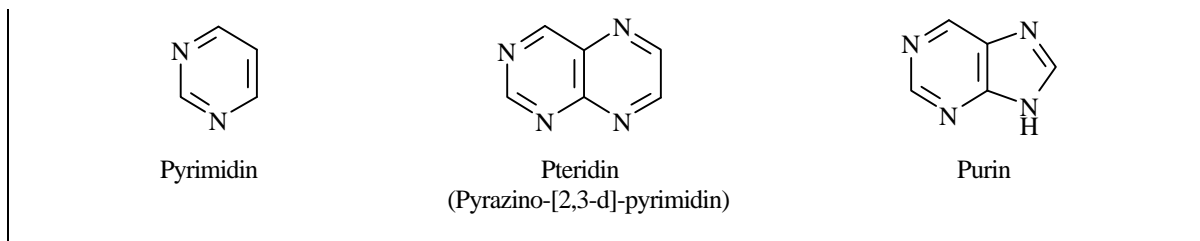


Abb. 1.5 : Struktur des Pteridins im Vergleich zu Pyrimidin und Purin

In Insektenflügeln^[78], der Haut und den Augen von Reptilien und Fischen^[79], sowie in Augen von Insekten wie der Fruchtfliege^[80,81] findet sich eine Vielzahl teilweise strukturell sehr aufwendiger Pteridinderivate. Deren Isolierung, Strukturanalytik und chemische Totalsynthese ist wegen der physikalischen und chemischen Eigenheiten dieser Stoffklasse oft mit größeren experimentellen Schwierigkeiten verbunden.

Neben der Rolle als Pigmentgrundlage ist das Pteridingerüst unter anderem auch Bestandteil des Riboflavins (Vitamin B₂), einem essentiellen Wachstumsfaktor, und dem Provitamin Folsäure, welches in Form seines 5,6,7,8-Tetrahydro-Derivats (Coenzym F) als prosthetische Gruppe von Formyltransferasen fungiert. Als Überträger von C₁-Bausteinen verschiedener Oxidationsstufen spielen diese Transferasen eine wichtige Rolle, beispielsweise in der Purin- und Thymidin-Biosynthese. Ein weiteres wichtiges Derivat ist das Biopterin, welches als Cofaktor von Monooxygenasen bei der enzymatischen Hydroxylierung aromatischer Aminosäuren sowie als Cofaktor der NO-Synthase dient. Dieses Enzym führt in einer 5-Elektronen-Oxidation unter NO-Freisetzung die Umwandlung von L-Arginin in L-Citrullin durch.

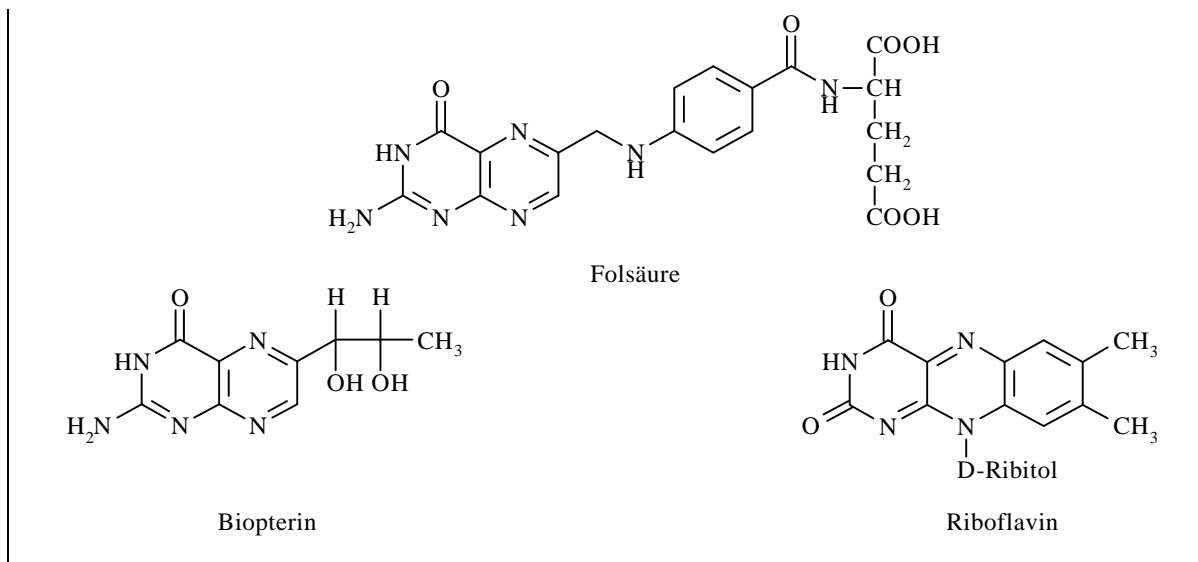


Abb. 1.6 : Strukturformeln von Folsäure, Biopterin und Riboflavin

Die chemische Geschichte der Pteridine beginnt mit dem Namen Hopkins^[82,83], der bereits im vorigen Jahrhundert xanthopterin- und leukopterinreiche Extrakte aus den Flügeln von Schmetterlingen gewann. Die Isolierung und Reinigung der Verbindungen gelang allerdings erst 1924 durch Wieland und Schöpf^[84,85], ebenso wie 1933 die des ebenfalls als Flügelpigment vorkommenden Isoxanthopterins^[86] (Abb.1.7).

Durch eindeutige chemische Synthesen konnte R.Purmann^[87,88] zeigen, daß es sich bei diesen Substanzen nicht wie angenommen um Purine handelt, sondern daß mit den Pteridinen, wie sie später nach einen Vorschlag von Wieland benannt wurden, eine chemisch längst bekannte bicyclische Heterocyclenklasse nun auch in der Natur entdeckt worden war. Bereits vor der Jahrhundertwende wurden von Kühling in Berlin erste chemische Synthesen von Pyrazino-[2.3-d]-pyrimidinen durchgeführt^[89,90].

Später wurden in der Natur zahlreiche Pteridine gefunden, isoliert und charakterisiert. Dabei zeigte es sich, daß die natürlich vorkommenden Vertreter dieser Substanzklasse auf zwei Grundkörper zurückführbar sind, das 2-Amino-4(3H)-pteridinon und das 2,4(1H,3H)-Pteridindion, welche unter den Trivialnamen Pterin und Lumazin bekannt sind.

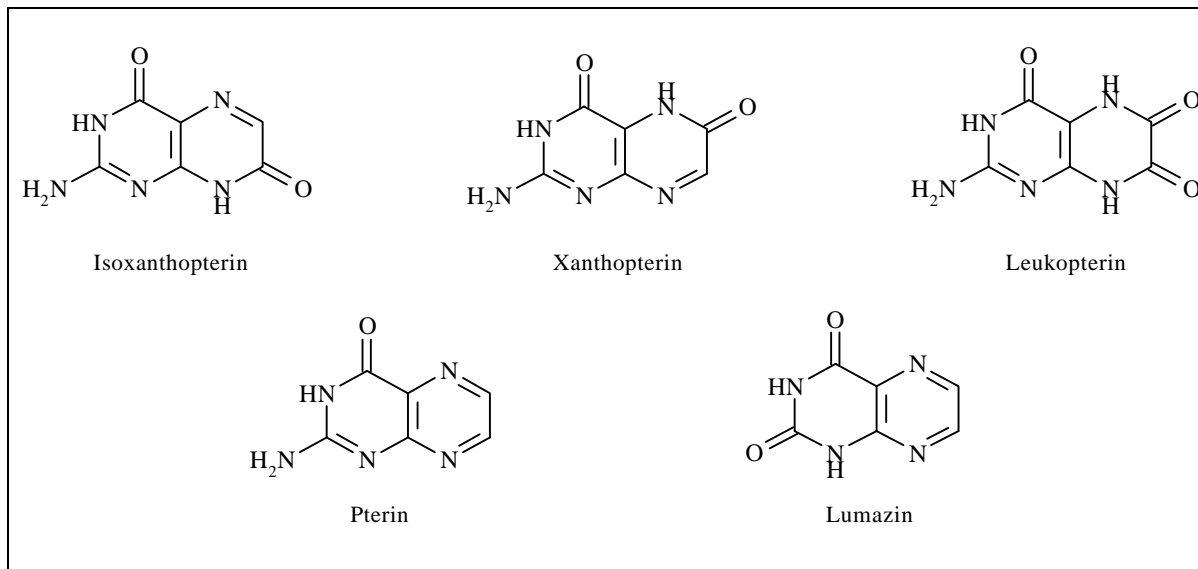


Abb. 1.7: Strukturen der Schmetterlingspigmente Isoxanthopterin, Xanthopterin und Leukopterin, sowie der Grundkörper der natürlich vorkommenden Pteridine Pterin und Lumazin

1.3.2. Pteridin-Nucleoside

Wenngleich das phosphorylierte Riboflavin die Bezeichnung „Flavinmononucleotid“ trägt, so handelt es sich bei dieser Verbindung und ihren biogenetischen Vorstufen lediglich um ribitylierte Pteridine. Echte Nucleosid- oder Nucleotid-Derivate dieser Heterocyclenklasse konnten in der Natur bislang nicht gefunden werden.

Allerdings wurden bis heute zahlreiche Pteridin-Glycoside auf chemischem Wege dargestellt, wobei man das Hauptaugenmerk auf N¹- und N⁸-Nucleoside legte, welche aufgrund ihrer strukturellen Nähe zu den natürlichen Bausteinen der RNA und der DNA eventuelle biologische Aktivität erwarten ließen. Die erste Synthese eines Pteridin-N⁸-glucosids stammt bereits aus dem Jahr 1951 von Forrest^[91] in der Gruppe um A.R.Todd. Das Gros der Arbeiten auf diesem Gebiet

wurde jedoch im Arbeitskreis von W.Pfleiderer durchgeführt. Genannt seien an dieser Stelle die Darstellungen N¹-ribosidierter Lumazine^[92,93] bzw. Isopterine^[94] als Uridin- bzw. Cytidin-Analoga, sowie das N⁸-ribosidierte 4-Amino-7(8H)-pteridinon^[95] bzw. Isoxanthopterin^[96] als Adenosin- bzw. Guanosin-Analoga (Abb.1.8). Entgegen den Erwartungen fanden sich bei den Pteridin-Nucleosiden allerdings weder antivirale noch antibakterielle oder Antitumor-Eigenschaften. Mehr und mehr rückte daher die Fluoreszenz dieser heterocyclischen Stoffklasse in den Mittelpunkt der Arbeiten auf diesem Gebiet. Die Verbindung von Fluoreszenzeigenschaften mit struktureller Nähe zu den natürlichen DNA-Bausteinen macht Pteridin-Nucleoside zu idealen Kandidaten für Markierungsexperimente an Oligonucleotiden.

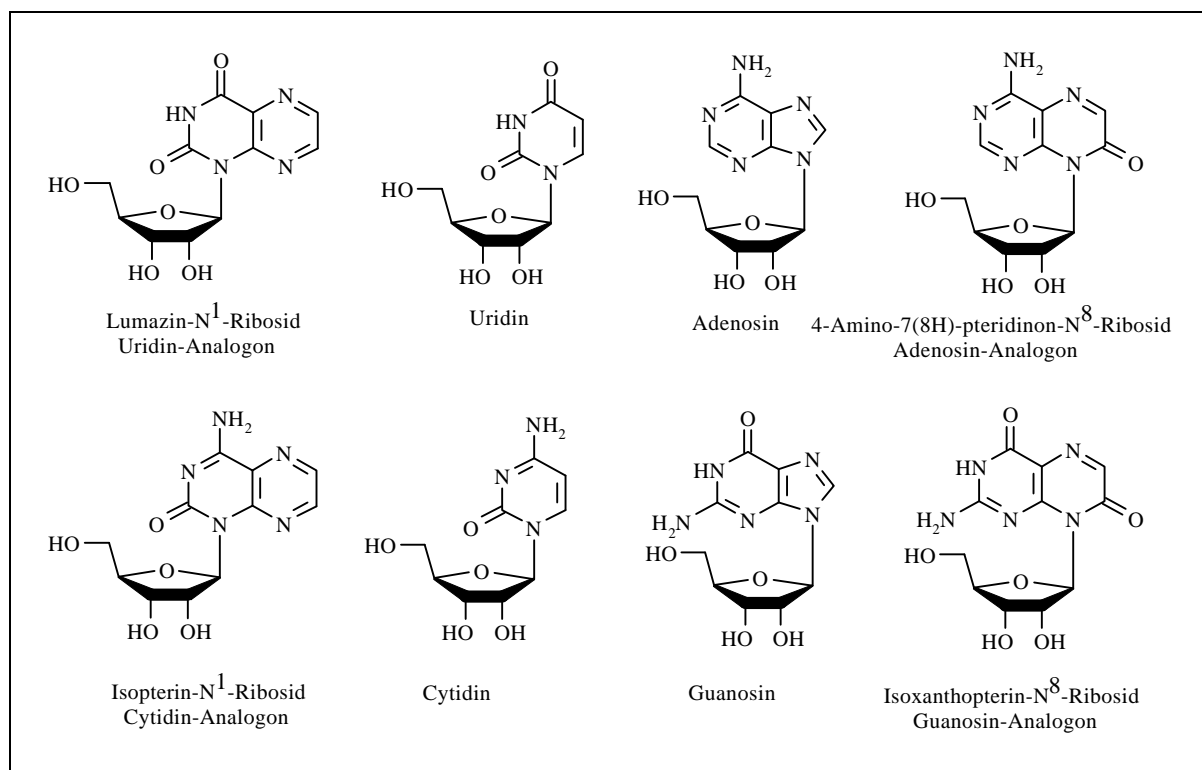


Abb.1.8 : Pteridin-Riboside^[92-96] als Strukturanaloga natürlicher RNA-Bausteine

In den Jahren vor Beginn dieser Arbeit wurde daher begonnen synthetische Zugänge zu Pteridin-Nucleosiden, als Strukturanaloga zu den natürlich vorkommenden Bausteinen in Oligonucleotiden, zu entwickeln. Thymidin- bzw. Desoxycytidin-Analoga aus der Reihe der Lumazin- bzw. Isopterin-N¹-2'-desoxyriboside wurden im Arbeitskreis Pfeleiderer^[97] von Rösler^[98] und Maurinsh^[99] synthetisiert. Als 2'-Desoxyadenosin-Analoga wurde eine Reihe von 4-Amino-7(8H)-pteridinon-N⁸-desoxyribosiden durch Jungmann^[100] synthetisiert, während meine Diplomarbeit^[101] das entsprechende Isoxanthopterin-Nucleosid als Ersatz für das 2'-Desoxyguanosin zum Inhalt hatte. Synthesen weiterer Isoxanthopterin-Nucleoside erfolgten ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe durch Charubala^[97], Matysiak^[102], Waldscheck^[103], sowie Melguizo, Gottlieb und Pfeleiderer^[104,105].

Bereits 1979 gelang Charubala, Bannwarth und Pfeleiderer die erstmalige Synthese pteridinmodifizierter Oligonucleotide^[106-108]. Auch die von Rösler und Maurinsh dargestellten Nucleoside wurden mittels der automatisierten Festphasen-Oligonucleotidsynthese in Oligomere eingebaut.

Mit dem 3-Methyl-isoxanthopterin (3-MI) als Fluoreszenzmarker entwickelten Hawkins et al.^[105] ein Screening-Verfahren für Inhibitoren der HIV-1-Integrase, ein Enzym, welches für den Einbau der viralen DNA in das Erbgut der Wirtszelle verantwortlich ist. Der erste Schritt dieses Prozesses (Integrase-3'-Processing) ist die Abspaltung eines Dinucleotids (dGT) am 3'-Ende im U5-Terminus der HIV-DNA. Das 3-MI wurde anstelle des Guanins in die entsprechende vorletzte Position eines 21-meren Substrats eingebaut, dessen Sequenz der 3'-Endsequenz des U5-Terminus der HIV-DNA entspricht. Bei der Processing-Reaktion an diesem Substrat spaltet die Integrase das nunmehr den Marker tragende terminale 3'-Dinucleotid (d(3-MI)T) ab. Aufgrund der hohen Sensitivität von Fluorophoren gegenüber Änderungen in ihrer unmittelbaren chemischen Umgebung läßt sich dieser Prozeß durch einen deutlich meßbaren Anstieg der Fluoreszenzintensität spektroskopisch verfolgen. Auf diese Weise läßt sich die Aktivität des Enzyms bei Zugabe potentieller Inhibitoren zeitabhängig in einfacher Weise verfolgen.

1.4. Das Isoxanthopterin

Das 2-Amino-4,7-dioxo-3,4,7,8-tetrahydropteridin oder Isoxanthopterin ist neben dem Xanthopterin und dem Leukopterin das dritte der drei klassischen Schmetterlingsflügelpigmente, durch deren Strukturaufklärung ein Zugang zu der in der Natur verbreiteten bicyclischen Heterocyclenklasse der Pteridine erschlossen wurde.

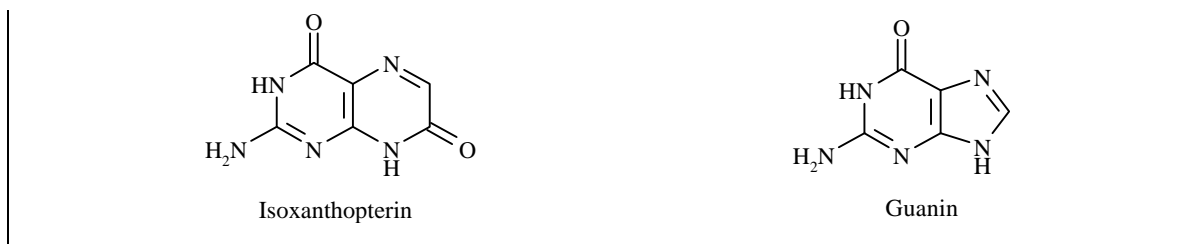


Abb. 1.10 : Das Isoxanthopterin im Vergleich zum Guanin

Charakteristisch für diese Verbindung sind, bedingt durch die Einführung von einer Amino- und zwei Hydroxyfunktionen in das Pteridingerüst, hohe Polarität, geringe Löslichkeit und niedrige Reaktivität. Besonders das Löslichkeitsverhalten erschwert das Arbeiten mit Isoxanthopterin-Derivaten sowohl in Wasser als auch in organischen Solventien. So ist die Löslichkeit in Wasser bei 20°C mit 1/400000 sogar noch um den Faktor 2 niedriger als die des Guanins, das für seine schlechten Solvatationseigenschaften bekannt ist. Die Einführung hydrophiler Substituenten, wie Hydroxy-, Mercapto- oder Aminogruppen, in Stickstoffheterocyclen führt in der Regel zu geringerer Löslichkeit. Bei Hydroxy- und Mercaptofunktionen in ortho- oder para-Stellung zu Ringstickstoffatomen bilden die Heterocyclen zumeist die energetisch stabilere Lactamform aus (Abb.1.10), deren Mesomeriestabilisierung den Verlust an aromatischer Stabilisierung überwiegt.

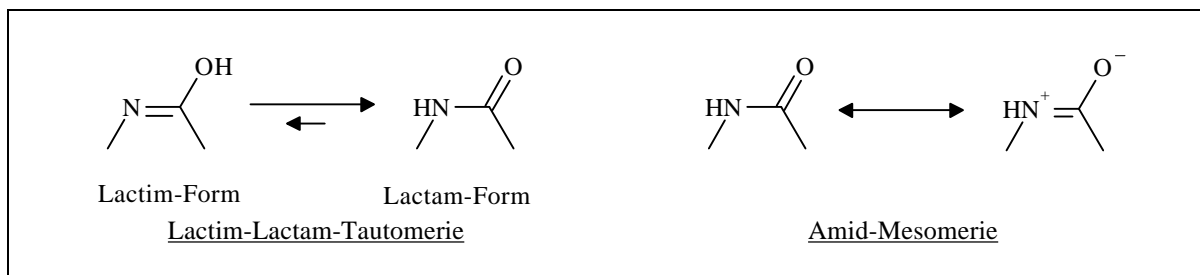


Abb.1.10 : Lactim-Lactam-Tautomerie bzw. Amid-Mesomerie

In dieser Amid-Form fungiert die Oxofunktion als Wasserstoffbrücken-Akzeptor und der Amidstickstoff entsprechend als Donor. Nimmt man dazu noch Aminofunktionen als weitere Donoren und die verbliebenen Ringstickstoffatome als Akzeptoren, bieten sich eine Fülle von Möglichkeiten der Selbstaggregation derartig substituierter Pteridine über Wasserstoffbrücken, was die geringe Löslichkeit erklärt. So ist beispielsweise von Pterin-Derivaten wie der Folsäure bekannt, daß sie dimere oder ähnlich wie das Guanin über Hoogsteen-Basenpaarung tetramere Strukturen ausbilden können^[109].

Ein weiterer charakteristischer Punkt des Isoxanthopterin ist die, im Vergleich zum Guanin, geringe Reaktivität der exocyclischen Aminofunktion. Die 2-Aminogruppe und die 7-Oxofunktion liegen an den Enden eines konjugierten Doppelbindungssystems und bilden demnach ein vinyloges Säureamid. Dieser lineare Chromophor (Abb.1.11) bestimmt auch die Absorptionseigenschaften des Moleküls.

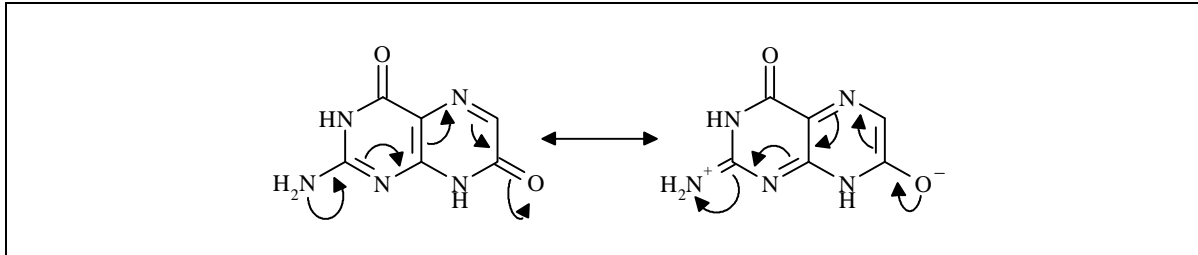


Abb. 1.11 : Der mesomeriestabilisierte Haupt-Chromophor im Isoxanthopterin

In niedrigen Konzentrationen findet sich das Isoxanthopterin in vielen Organismen, allerdings konnte bislang keine biologische Relevanz der Verbindung aufgezeigt werden. Diese Tatsache zusammen mit den physikalischen und chemischen Eigenschaften des Moleküls kann erklären, weshalb verglichen mit anderen Pteridinen bislang nur wenig Chemie mit dieser heterocyclischen Verbindung betrieben wurde.

Aufgrund der Strukturbeziehung zum Guanin wurden dennoch bereits Versuche unternommen, das Isoxanthopterin zu glycosidieren. 1973 gelang es Schmidt ^[96,110] durch Ribosidierung von persilyliertem O⁴-Benzyl-isoxanthopterin und nachfolgende Entschützungsstufen das N⁸-Ribosid des Isoxanthopterins darzustellen (Abb.1.12).

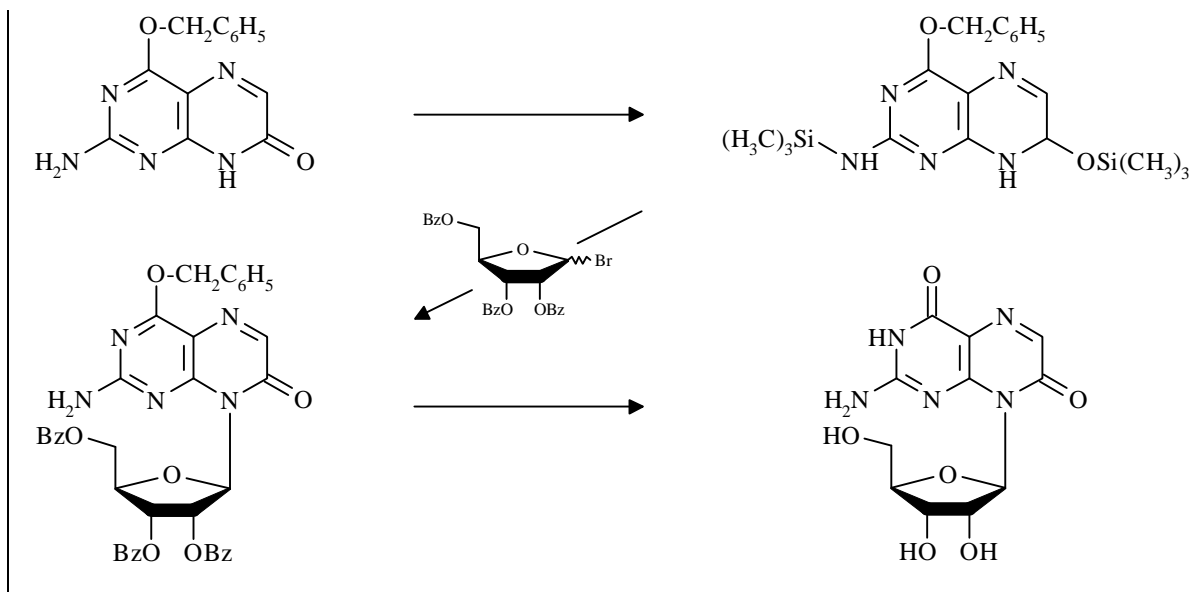


Abb.1.12 : Synthese des Isoxanthopterin-Ribosids nach Schmidt, Schraner und Pfeleiderer^[96,110]

Spätere Versuche durch Kyriases^[111,112] eine alternative Syntheseroute über 2-methylmercaptosubstituierte Pteridin-Derivate zu erschließen, scheiterten. Dagegen gelangen parallel zur vorliegenden Arbeit Melguizo, Gottlieb und Pfeleiderer^[104,105], sowie Waldscheck^[103] und Charubala^[97] die Synthesen verschiedener substituierter Isoxanthopterin-Nucleoside.

Wie in Kapitel 1.3.2. erwähnt, gelang es mittlerweile auch, die entsprechenden N⁸-2'-Desoxy-β-D-ribofuranoside des 3-Methylisoxanthopterins (3-MI) und des 3-Methyl-2-(2-phenylethyl-amino)-4,7(3H,8H)-pteridindions weiter zu den entsprechenden Phosphitamid-Bausteinen zu modifizieren (Abb.1.13) und sie über die automatisierte Festphasensynthese anstelle von 2'-Desoxyguanosin in Oligonucleotide als Marker-Moleküle einzubauen^[97,105].

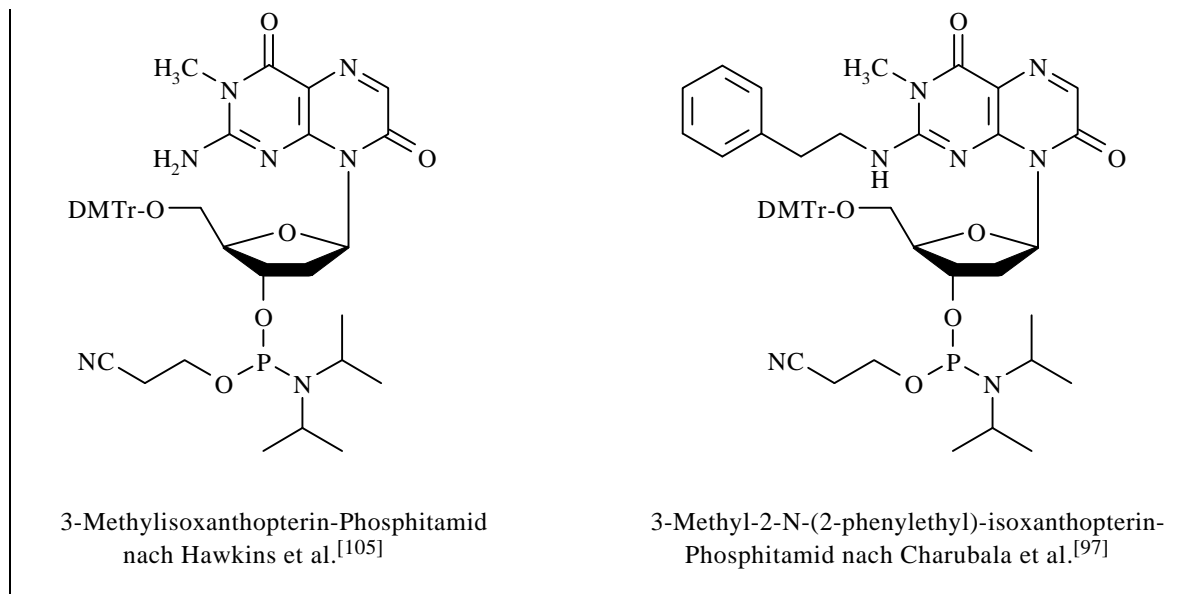


Abb.1.13 : Isoxanthopterin-Phosphitamid-Bausteine für die Oligonucleotid-Synthese^[97,105]

2. AUFGABENSTELLUNG

Die Festphasen-Synthese von Oligonucleotid-Sequenzen ermöglicht den gezielten Einbau modifizierter Nucleoside in Oligomere. Pteridin-2'-desoxyriboside, als fluoreszierende und strukturell den natürlichen Nucleinsäure-Bausteinen verwandte Moleküle, stellen für Markierungsexperimente an Oligo-2'-desoxyribonucleotiden eine interessante Alternative zu herkömmlichen Marker-Systemen dar.

In einer Vielzahl von Oligonucleotidsynthesen unter Anwendung der Phosphoramidit-Methode konnten eine Reihe von zum Thymidin bzw. 2'-Desoxycytidin analogen Lumazin- bzw. Isopterin-N¹-2'-desoxyribosiden^[98,99] in Oligonucleotide eingebaut werden. In einigen Fällen ergaben diese Substitutionen einen stabilisierenden Einfluß auf die Hybridisierungseigenschaften der Sequenz, was insbesondere für den Einsatz in der Antisense-Technologie gute Voraussetzungen in sich birgt.

Erwartungsgemäß mußte festgestellt werden, daß die Positionierung des Fluorophors im Basenstapel des Oligonucleotids durch Wechselwirkungen des π -Systems mit denen der Nachbarheterocyclen zu einer teilweisen Löschung der Fluoreszenz führt. Dies bedeutet einen Nachteil bezüglich der Nachweisempfindlichkeit gegenüber anderen Markersystemen, bei welchen der Fluorophor an das Ende der Sequenz angehängt wird.

Dennoch eröffnet die Möglichkeit das Pteridinsystem in das Oligomer zu integrieren, aufgrund der Sensitivität von Fluorophoren gegenüber ihrer unmittelbaren chemischen Umgebung, neue interessante Anwendungsbereiche, wie zuletzt am Beispiel des 3-Methylisoxanthopterin durch Hawkins et al.^[105] gezeigt werden konnte.

Zur Komplettierung der Palette an Pteridin-Analoga zu den natürlichen DNA-Bausteinen wurden im Anschluß an die Arbeiten von Rösler^[98] und Maurinsh^[99] eine Reihe von entsprechenden purinverwandten Pteridin-N⁸-Nucleosiden synthetisiert. Derivate des 4-Amino-7(8H)-pteridinons^[100] als 2'-Desoxyadenosin-Analoga und Isoxanthopterin-Nucleoside^[101-103] als Varianten zum 2'-Desoxyguanosin bildeten die Ziele dieser Arbeiten.

Die strukturellen Ähnlichkeiten des Isoxanthopterin (**1**) zum Guanin (**2**) (Abb.2.1) lassen dieses Pteridinderivat auf den ersten Blick als eine ideale Alternative für Markierungsexperimente erscheinen, da das für die Hybridisierungseigenschaften über Watson-Crick-Basenpaarung verantwortliche Substitutionsmuster am Pyrimidinring beider Heterocyclen identisch ist. Allerdings bedingt die Geometrie des anellierten Rings eine unterschiedliche Stellung des Zuckers zur Base im entsprechenden Nucleosid. Dies könnte die Ausbildung einer Watson-Crick-Paarung in doppelsträngiger DNA zwischen einem Isoxanthopterin-Nucleosid und einem dC-Baustein stören. Bei den erwähnten Lumazinen zeigte sich jedoch, daß der base-stacking-Effekt der Pteridine einen nicht unerheblichen Einfluß auf die Stabilität des Doppelstranges und somit die Hybridisierungseigenschaften besitzt.

Deshalb sollten auch Isoxanthopterin-N⁸-Nucleoside interessante Markermoleküle darstellen, zumal sie durch Substitution an der C(6)-Position in ihren Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften variierbar sind.

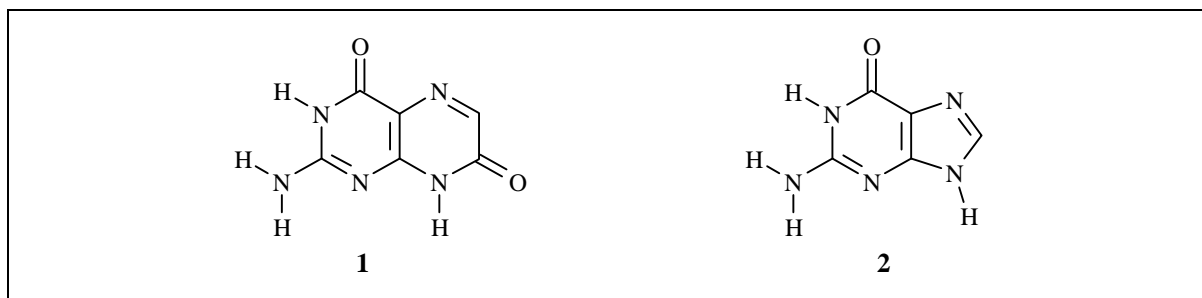


Abb.2.1 : Strukturformeln von Isoxanthopterin (**1**) und Guanin (**2**)

In Fortsetzung meiner Diplomarbeit^[101] bildete das Ziel dieser Dissertation die Synthese von N⁸-2'-Desoxyribosid-Derivaten des Isoxanthopterin. Diese sollten an ihrem Pyrimidinteil unmodifiziert sein, um eine größtmögliche Nähe zum 2'-Desoxy-guanosin aufzuweisen. Die Nucleoside sollten entsprechend der Phosphoramidit-Methode modifiziert werden, um als Bausteine in der automatisierten Festphasensynthese von Oligonucleotiden eingesetzt zu werden.

Als Zielmoleküle fiel die Auswahl dabei auf ein entsprechend modifiziertes Isoxanthopterin-Phosphitamid (**3**) und einen 6-Phenylisoxanthopterin-Baustein (**4**) (Abb.2.2).

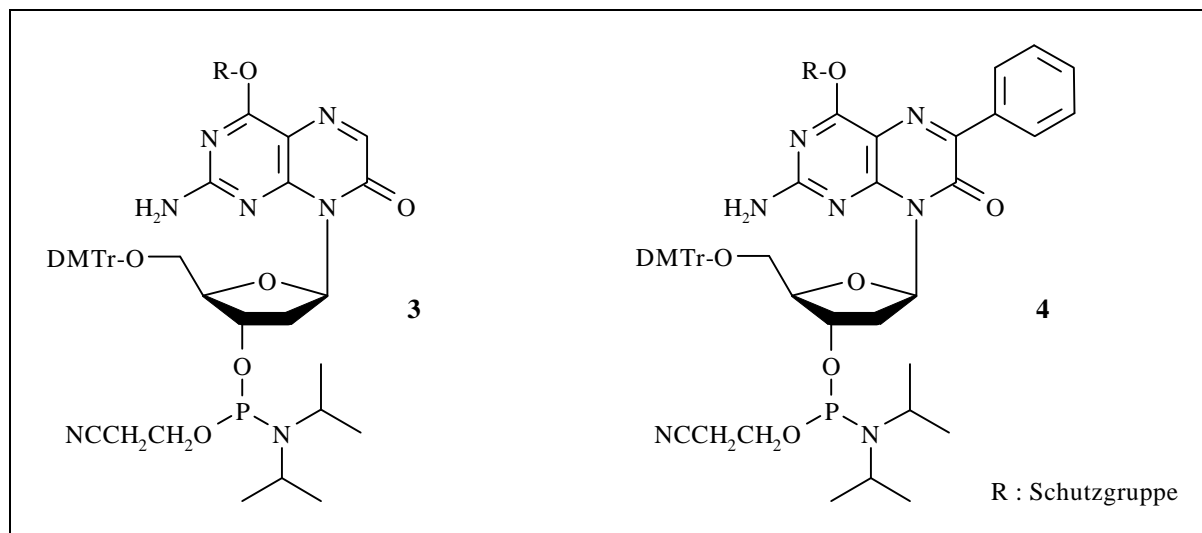


Abb.2.2 : Die auf Isoxanthopterin bzw. 6-Phenylisoxanthopterin basierenden Zielbausteine **3** und **4**

3. SYNTHESKONZEPT

Das Konzept zur Synthese pteridinmodifizierter Bausteine für die Oligonucleotid-Synthese lässt sich in vier Schritte untergliedern (Abb.3.1) : die Darstellung der heterocyclischen Base {A}, die Nucleosid-Synthese {B}, Modifikationen am Aglycon des Bausteins sowie Entschützung am Zucker {C} und zuletzt die Tritylierung und Phosphitylierung der Zuckerhydroxyfunktionen {D}.

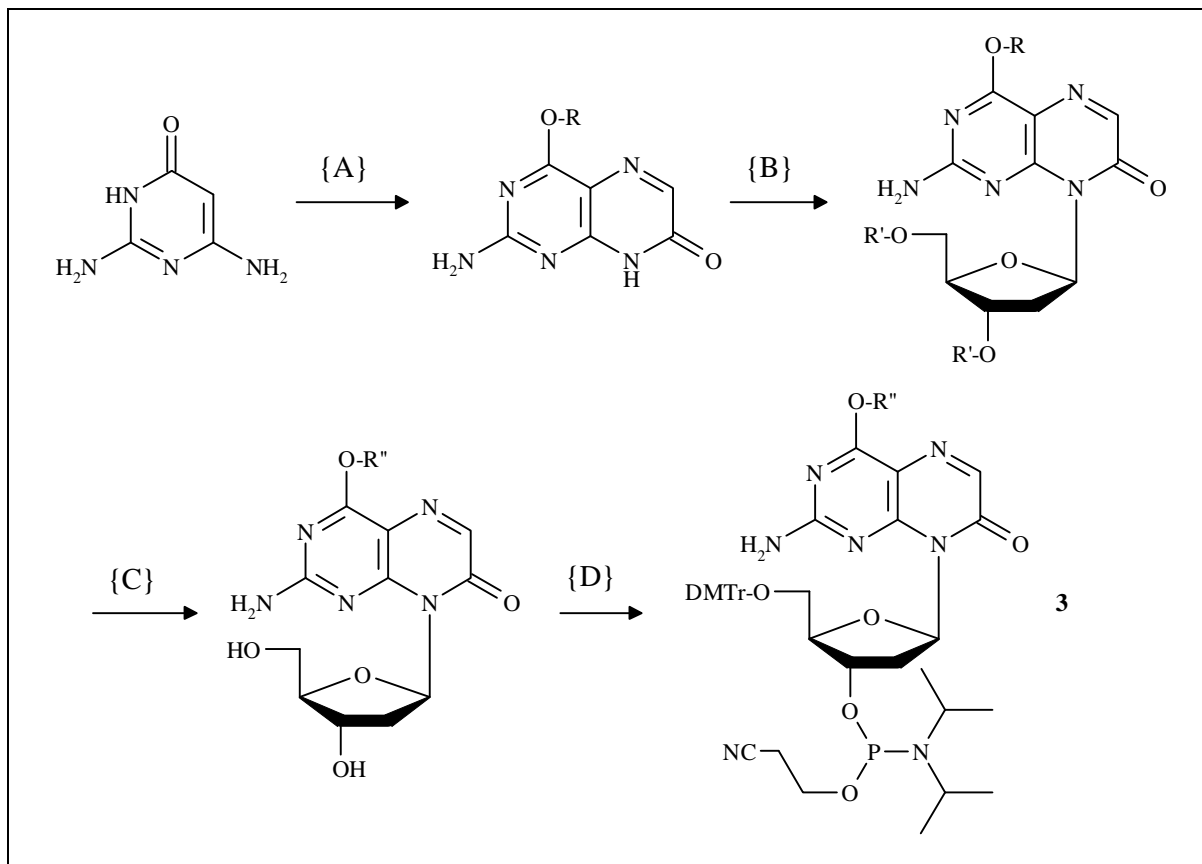


Abb.3.1 : Allgemeine Synthesestrategie für die Darstellung eines Isoxanthopterin-Phosphoramidits **3**

Auf dieser allgemeinen Synthesestrategie basierend, wurden für die Ziel-Bausteine, das Isoxanthopterin-Phosphitamid (**3**) und sein 6-Phenylderivat (**4**), parallel verschiedene Darstellungsrouten verfolgt, deren Auswahl nachstehend erläutert werden soll.

Das Isoxanthopterin (**1**) ist charakterisiert durch hohe Polarität, geringe Löslichkeit und niedrige Reaktivität. Gründe für diese physikalischen Eigenschaften sind die beiden cyclischen Säureamidfunktionen und die exocyclische Aminofunktion, wie in Kapitel 1.4 bereits beschrieben wurde. Weiterhin besitzen die Lactamfunktionen zwar verschiedene pK_a -Werte, liegen aber in ihrer Reaktivität nicht deutlich genug auseinander, um eine wirklich selektive Glycosidierung am Pyrazinring zu gewährleisten. Aus diesen genannten Gründen ist es notwendig, die reaktiven Positionen am Pyrimidinteil des heterocyclischen Systems soweit möglich zu blockieren (vgl. Abb.3.2).

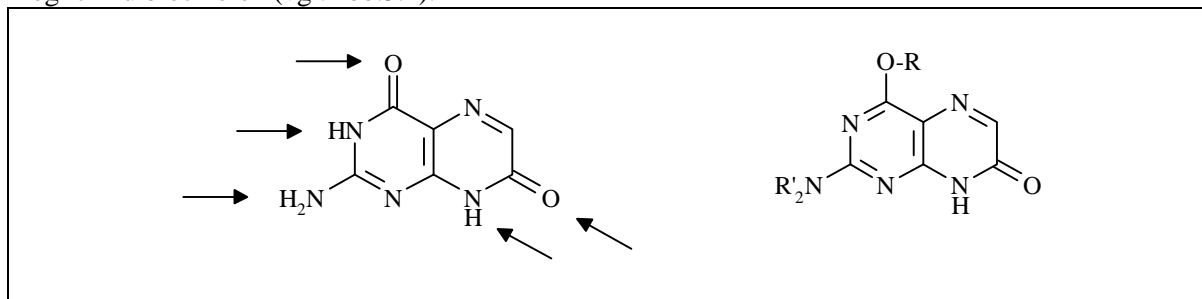


Abb.3.2 : Reaktive Positionen am Isoxanthopterin / Beispiel eines zur Glycosidierung geeigneten Bausteins

Um die genannten Probleme zu umgehen, wurde zur Synthese eines Isoxanthopterin-Bausteins auf der Grundlage der Arbeiten von H.Schmid^[96,110] begonnen. Diesem war die Darstellung des Isoxanthopterin- N^8 -ribosids ausgehend von 2-Amino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**5**) gelungen. Die Übertragung dieses Syntheseweges auf die 2'-Desoxy-Reihe war Teil meiner Diplomarbeit^[101], wobei die Ergebnisse der Glycosidierung durch die zusätzliche Einführung einer N,N-Dimethylaminomethylen-Schutzgruppe an der 2-Aminofunktion (**6**) und die Wahl einer anderen Glycosidierungsmethode verbessert werden konnten.

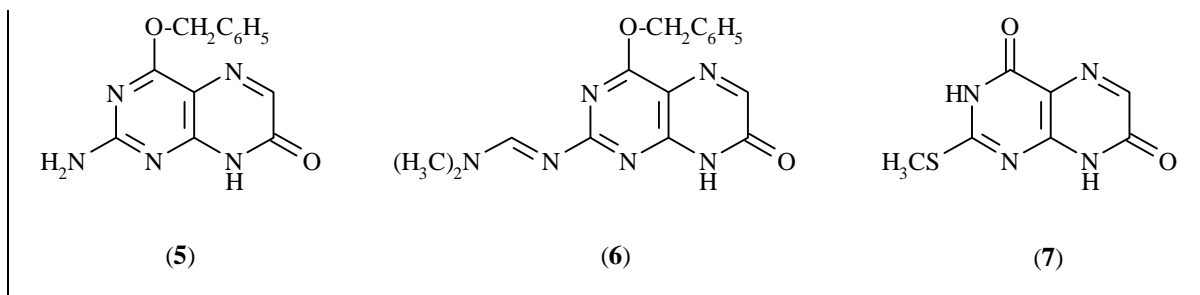


Abb.3.3 : Pteridin-Derivate **5**, **6** und **7**

Eine interessante Alternative zu diesem 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**6**) bietet das 2-Methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion (**7**) (Abb.3.3). Die Einführung einer Methylthiofunktion erhöht die Löslichkeit des Pteridins, da die Ausbildung von Wasserstoffbrücken verhindert wird. Nach Oxidation zur Methylsulfonylfunktion läßt sich der ansonsten stabile Substituent unter milden Bedingungen gegen Nucleophile austauschen^[102,104,105,110,111], womit bei nucleophiler Substitution durch Amine die Reihe der Isoxanthopterine wieder erreicht werden kann.

Dieses Konzept wurde erfolgreich von Melguizo^[104] bei der Synthese eines O^4 -geschützten 6-Methyl-isoxanthopterin- N^8 - β -D-2'-desoxyribosids angewandt. Versuche von Kyriases und Pfeleiderer^[110,111], die Methode auf das entsprechende 6-H-substituierte Derivat zu übertragen, scheiterten dagegen. Den Grund bildet eine Folgeoxidation an der C(6)-Position, wobei nach Austausch der Methylsulfonylfunktion ein Leukopterinsystem erhalten wurde (Abb.3.4). Trotz dieser absehbaren Schwierigkeiten wurde der Syntheseweg in die Arbeit miteinbezogen.

Dieser Nebenreaktion geht vermutlich eine kovalente Hydratation am Pyrazinteil des 2-Methylsulfonyl-Pteridins voraus (Abb.3.4). Das Hydrat wird anschließend durch überschüssiges Oxidationsreagenz weiter oxidiert. Unter Ausschluß von Wasser oder durch andere Oxidationsmittel sollte sich diese Nebenreaktion unterdrücken lassen.

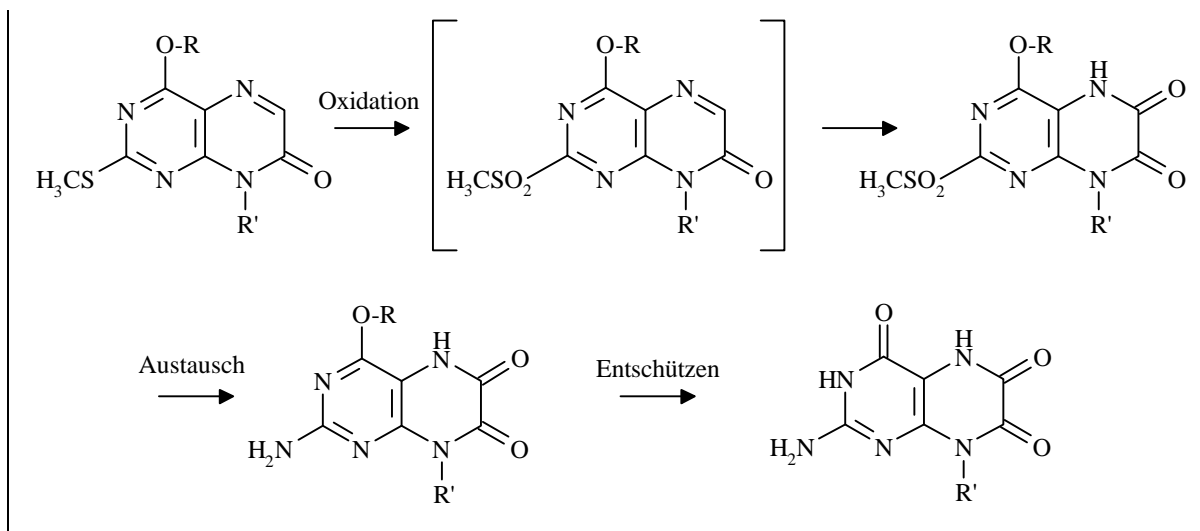


Abb.3.4 : Bildung des Leukopterinsystems nach Kyriases und Pfeleiderer^[110,111]

Daneben wurde als Modellsubstanz ein 5-Deaza-Pteridin, das 2-Methylmercapto-4,7(3H,8H)-pyrido-[2,3-d]-pyrimidindion (**8**), in die Arbeit miteinbezogen (Abb.3.5), bei dem die genannten Oxidationsprobleme keinesfalls auftreten können.

Für die Synthese des entsprechenden 6-Phenyl-substituierten Bausteins **4** wurden analoge Routen ausgewählt. Zum einen ein Weg ausgehend von 2-Amino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**9**), bei welchem die Aminofunktion noch zusätzlich geschützt werden sollte. Zum anderen eine Route über das 2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**10**), bei dem die O⁴-Position weiter zu derivatisieren war.

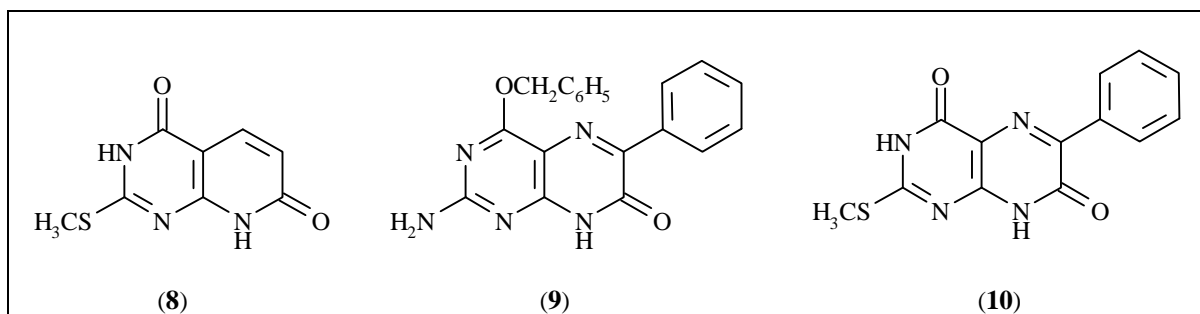


Abb. 3.5: Das 2-Methylmercapto-4,7(3H,8H)-pyrido-[2,3-d]-pyrimidindion (**8**) sowie die beiden 6-Phenylpteridine **9** und **10**

NEBEN DIESEN HETEROCYCLLEN WURDE IM VERLAUF DER ARBEIT NOCH EINE REIHE ANDERER DERIVATE ALS VERGLEICHS- BZW. MODELLVERBINDUNGEN SYNTHETISIRT, DEREN ZWECK AN ENTSPRECHENDER STELLE ERWÄHNT WIRD.

4. SYNTHESE DER HETEROCYCLISCHEN BASEN

4.1. Allgemeine Synthesestrategien zum Aufbau von Pteridinen

Die Betrachtung des Pyrazino-[2,3-d]-pyrimidin-Grundgerüsts der Pteridine eröffnet zwei alternative Synthesestrategien für den chemischen Zugang zu dieser Substanzklasse. So lässt sich der Bicyclus entweder ausgehend von Pyrimidinen oder Pyrazinen aufbauen (Abb.4.1).

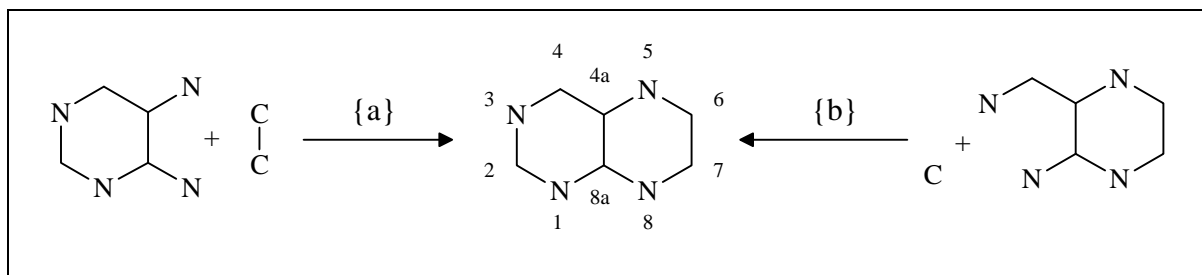


Abb.4.1 : chemische Hauptzugangswege zu Pteridinen und Nummerierung der Gerüstpositionen

Während die auf Pyrazinen basierende Taylor-Synthese {b}^[113-115] nur in speziellen Fällen Anwendung findet, erfolgen Pteridin-Synthesen wegen der vergleichsweise leichteren Verfügbarkeit der benötigten Edukte in der Regel über Pyrimidine {a}. Zu nennen sind dabei die Boon-Polonovski^[115,116], die Timmis^[117,118] und die Gabriel-Isay-Synthese^[119,120], von denen die letztgenannte am häufigsten angewendet wird. Daneben gibt es noch eine Reihe anderer, synthetisch eher unbedeutender Methoden, wie Ringerweiterungen ausgehend von Purinen, oder Abbaureaktion komplexerer Moleküle.

Die Biosynthese der natürlich vorkommenden Pteridine beginnt mit dem Guanosin-triphosphat (GTP), welches durch die GTP-Cyclohydrolase über mehrere Zwischenstufen (Öffnung des Imidazolrings, Verlust des C⁸-Kohlenstoffs und letztlich Kondensation zum Pteridin mit der Zuckereinheit nach einer Amadori-Umlagerung der Ribose zu einer Ribulose) in das 7,8-Dihydro-D-neopterin-3'-triphosphat überführt wird, welches als Grundkörper für weitere Derivatisierungen dient.

4.1.1. Die Boon-Polonovski-Synthese^[115,116]

Die erste Stufe dieser Reaktion bildet die Umsetzung eines 6-Chlor-5-nitro-pyrimidins (**11**) mit einer α -Amino-carbonylverbindung (**12**) (Abb.4.2). Diese Substitution gibt die Orientierung der Substituenten in den Positionen 6 und 7 des Pteridins eindeutig vor. Nach Reduktion der Nitrofunktion zum Amin erfolgt zumeist direkt die Cyclisierung zum 7,8-Dihydropteridin (**13**). Das Verfahren eignet sich besonders zur Darstellung 6-substituierter 7,8-Dihydropteridine, aus denen durch Oxidation bzw. Reduktion die entsprechenden Pteridine bzw. Tetrahydropteridine zugänglich sind. Die Vorteile liegen in der Eindeutigkeit des Syntheseweges, was die regioselektive Einführung der Substituenten betrifft. Die Grenzen hingegen bestehen bei der Verfügbarkeit geeigneter α -Amino-carbonylverbindungen. Die in dieser Arbeit benötigten 7(8H)-Pteridinone lassen sich daher auf diesem Wege nicht darstellen, da ein Glyoxylsäureamid eingesetzt werden müsste, bei dem die geringe Nucleophilie des Amid-Stickstoffs nicht ausreichen würde, um das Chlor am Pyrimidin zu substituieren.

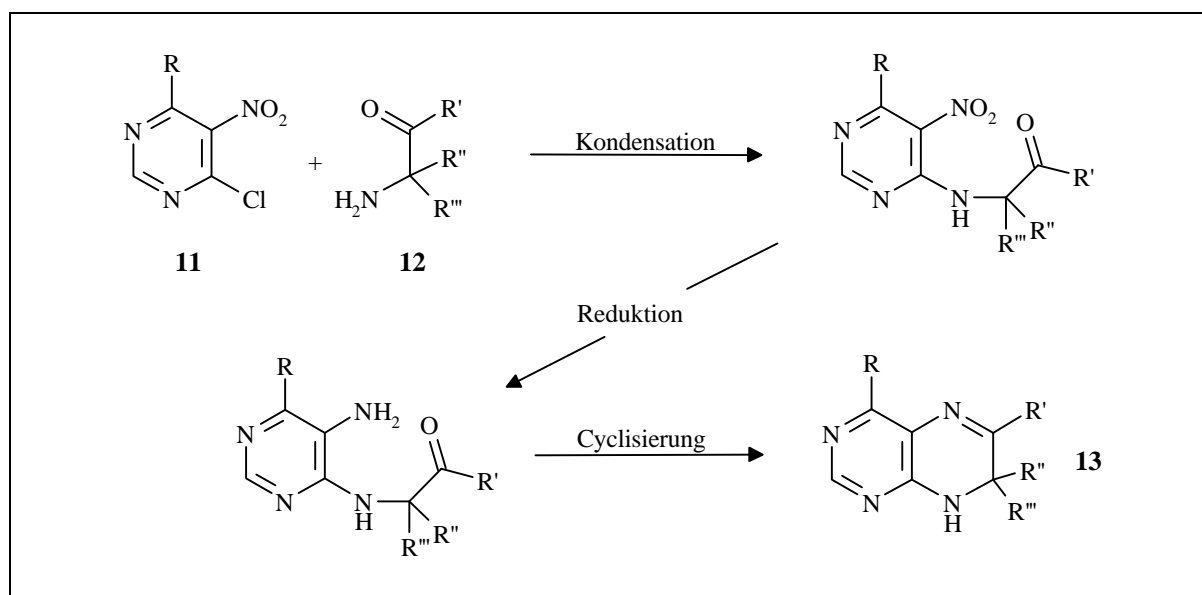


Abb.4.2 : Pteridinsynthese nach Polonovski und Boon^[115,116]

4.1.2. Die Timmis -Synthese^[117,118]

Auch die Timmis-Synthese erlaubt die isomerenreine Darstellung von Pteridinderivaten. Dazu kondensiert man α -Methylen-ketone (**14**) unter basischen Bedingungen mit 6-Amino-5-nitroso-pyrimidinen (**15**) (Abb.4.3).

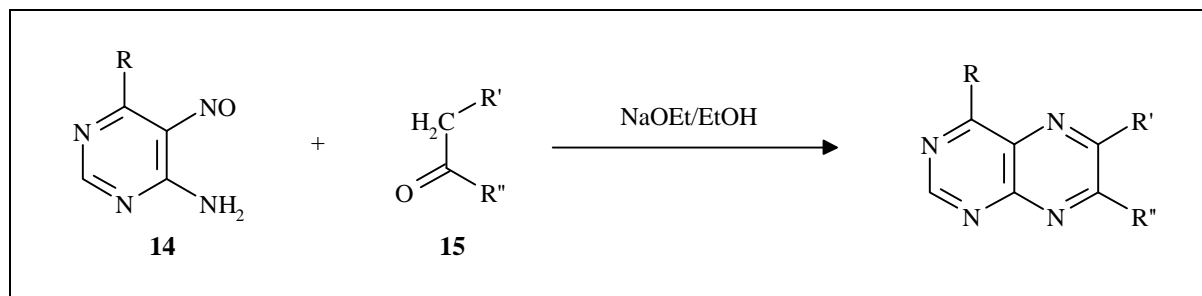


Abb.4.3 : Pteridinsynthese nach Timmis^[117,118]

Dabei erfolgt einerseits ein nucleophiler Angriff der Aminogruppe des Pyrimidins am Carbonylkohlenstoff des α -Methylenketons. Zum anderen erlaubt die Acidität der benachbart zur Ketogruppe stehenden Wasserstoffatome die Deprotonierung durch die eingesetzte Base (meist Methanolat oder Ethanolat) und so ebenfalls einen nucleophilen Angriff am Stickstoff der Nitrosfunktion. Somit wird in eindeutiger Orientierung unter Wasserabspaltung der Ring zum Pteridin geschlossen.

Diesem Prinzip folgend wurden bereits 7(8H)-Pteridinone dargestellt^[121,122] (mit R''=O-Alkyl), gleiches gilt für eine „Wittig-Horner-Variante“ dieses Syntheseweges. Nach einem Verfahren von Youssefyeh und Kalmus wird dabei anstelle des α -Methylenketons Triethyl-phosphonacetat (**16**) in THF/NaH^[123,124] verwendet (Abb.4.4).

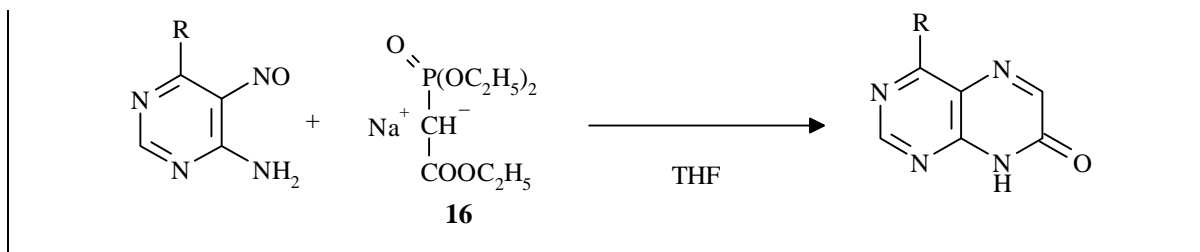


Abb.4.4 : 7(8H)-Pteridinonsynthese nach einer Wittig-Horner-Reaktion^[123,124]

4.1.3. Die Gabriel-Isay-Synthese^[119,120]

Unter dieser Bezeichnung werden Kondensationen von 5,6-Diaminopyrimidinen mit 1,2-Dicarbonylverbindungen zusammengefasst, wie sie bei der Synthese des 4-Methyl-pterins durch Gabriel^[119] sowie der des 6,7-Diphenylpterins durch Isay^[120] durchgeführt wurden. Die Verwendung unsymmetrischer Dicarbonyle, wie beispielsweise α -Keto-aldehyde oder α -Keto-säuren, kann dabei allerdings zur Bildung von Gemischen der beiden in Position 6 und 7 isomeren Pteridine führen. Da die Trennung derartiger Isomerengemische neben dem Zeitaufwand oft auch mit erheblichen Ausbeuteverlusten verbunden ist, blieb der Erfolg des Verfahrens rund 40 Jahre auf symmetrische Dicarbonyle beschränkt.

Die beiden Aminofunktionen in Position 5 und 6 am Pyrimidin besitzen aufgrund ihrer Positionierung gegenüber den Ringstickstoffatomen (Abb.4.5) unterschiedliche Nucleophilie, woraus die Beeinflussbarkeit der Regioselektivität der Gabriel-Isay-Kondensation über den pH-Wert resultiert. Purrmann^[126] erkannte dieses Prinzip als erster. Später wurde es von Elion, Hitchings und Russel^[127] noch verallgemeinert.

Wie in Abb.4.5 gezeigt, kann die 6-Aminogruppe mesomer Elektronendichte auf die elektronenziehenden Ringstickstoffatome (N^1 und N^3) übertragen. Dadurch wird ihre Reaktivität gegenüber der 5-Aminofunktion, die wegen ihrer meta-Position zu N^1 und N^3 keine mesomeren Wechselwirkungen eingehen kann, herabgesetzt. Noch deutlicher wird diese Reaktivitätsdifferenz bei 5,6-Diamino-4(3H)-pyrimidinonen, bei welchen im Molekül ein vinyloges Säureamid ($O=C(4)-C(5)=C(6)-NH_2$) vorliegt, das den Effekt der Ringstickstoffatome an Wirkung übertrifft.

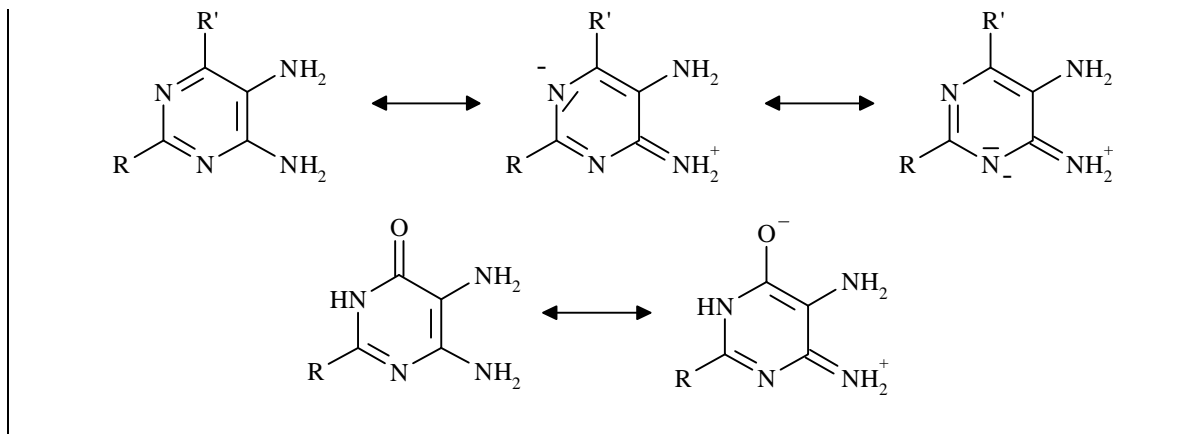
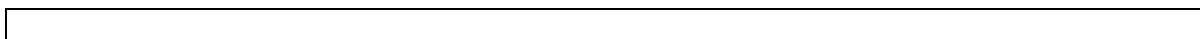


Abb.4.5 : mögliche mesomere Wechselwirkungen der 6-Aminofunktion in 5,6-Diaminopyrimidinen

Unterscheiden sich nun die Reaktivitäten der Carbonylfunktionen des Diketons, so wird wegen der unsymmetrischen Anordnung der Aminogruppen bevorzugt ein Isomer gebildet. Im neutralen oder schwach basischen Milieu findet die Primärkondensation an der reaktiveren 5-Aminofunktion statt. Im sauren Milieu hingegen wird diese protoniert, weshalb nunmehr die 6-Aminofunktion eine höhere Nucleophilie aufweist und die erste Kondensation eingeht.

Die Entdeckung dieser allgemeinen Kondensationsregeln verhalf der Gabriel-Isay-Kondensation zu ihrer heutigen Bedeutung. Ausgehend von den zumeist relativ einfach zugänglichen 5,6-Diaminopyrimidinen lassen sich durch Kondensation mit ein und derselben Dicarboxylkomponente in vielen Fällen beide isomeren Pteridine selektiv darstellen, wie das folgende Beispiel (Abb.4.6) zeigt.



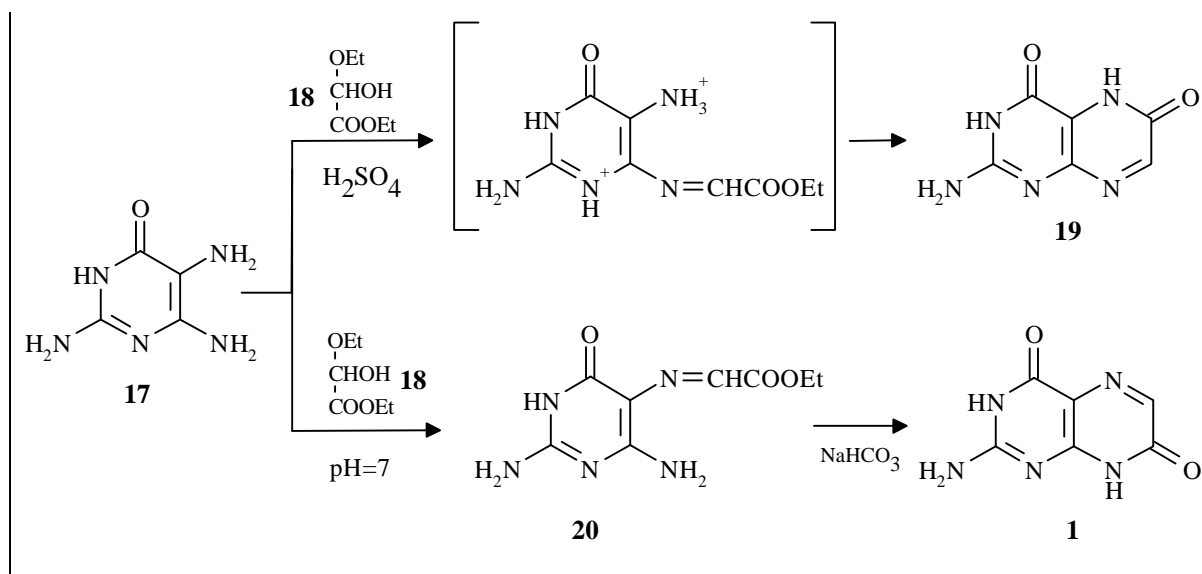


Abb.4.6 : pH-abhängige Gabriel-Isay-Synthese von Xanthopterin und Isoxanthopterin nach Pfeleiderer^[128-130]

Die Kondensation von 2,5,6-Triamino-4(3H)-pyrimidinon (**17**) mit Glyoxylsäureethylester-halfacetal (**18**) kann über den pH-Wert der Synthese gesteuert werden^[128-130]. Während bei der Reaktion in 80%-iger H₂SO₄ die direkte Bildung des Xanthopterins (**19**) beobachtet wird, führen neutrale Bedingungen zum Isoxanthopterin (**1**). Bei der letztgenannten Synthese ist es dabei von Vorteil, die entstehende schwerlösliche Azomethin-Zwischenstufe (**20**) zu isolieren und in einer zweiten Stufe zu cyclisieren. Dadurch kann eine sehr hohe Reinheit des Produktes erreicht werden, da Nebenprodukte und unumgesetztes Edukt vor dem Pteridinringschluß weitgehend abgetrennt werden.

In der Literatur finden sich zwei weitere Methoden, welche zwar wie die Gabriel-Isay-Synthese von 5,6-Diaminopyrimidinen ausgehen, jedoch auch ohne Kontrolle des pH-Wertes einen regioselektiven Zugang zu 6-substituierten Pteridinen eröffnen.

Yoneda und Higuchi^[131] cyclisierten die durch Kondensation von 5,6-Diaminouracil-Derivaten (**21**) mit aromatischen Aldehyden erhaltenen 6-Amino-5-benzylidenamino-Verbindungen (**22**) mit Orthoameisensäureestern, wobei sie zu 6-Aryl-lumazinen (**23**) gelangten.

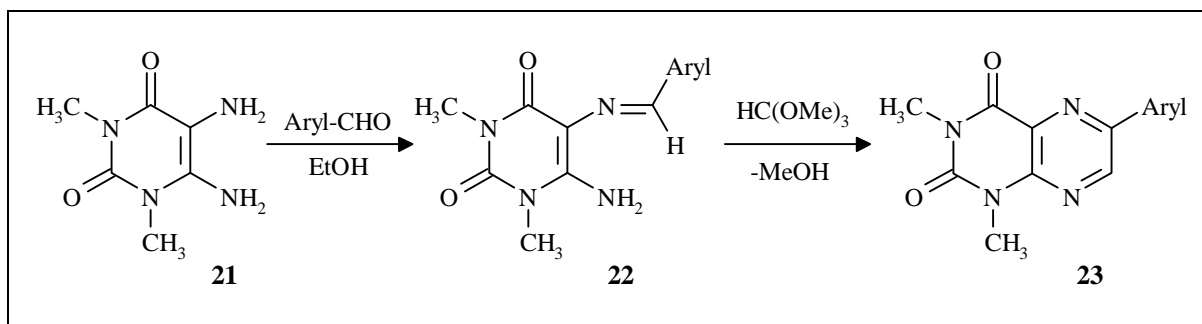


Abb.4.7 : 6-Aryl-1,3-dimethyl-lumazin-Synthese von Yoneda und Higuchi^[131]

Größere Nähe zur Gabriel-Isay-Kondensation weist eine von Kang, Soyka und Pfeleiderer^[132] ausgearbeitete Methode auf. Zur Erhöhung der Reaktivitätsdifferenz zwischen den beiden Ketofunktionen setzten sie anstelle eines Dicarbonyls das Oxoiminoacetone (**24**) zur Kondensation mit 5,6-Diaminouracil-Derivaten (**21**) ein, wobei die entsprechenden 6-Methyl-lumazine (**25**) erhalten wurden.

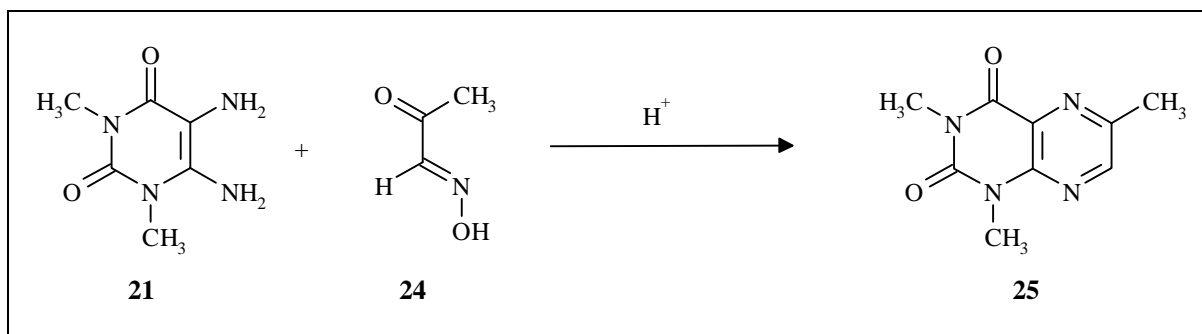


Abb.4.8 : 6-Methyl-1,3-dimethyl-lumazin-Synthese nach Kang, Soyka und Pfeleiderer^[132]

Beide Methoden wurden in jüngster Zeit in unserer Arbeitsgruppe durch Taghavi-Moghadam^[133] neu aufgegriffen und ausgearbeitet, wobei insbesondere die Synthese von 6-Halomethylpteridinen von Interesse war. So gelang beispielsweise die Synthese des 2,4-Diamino-6-brommethyl-pteridins (**26**), eines Ausgangsmaterials zur Darstellung von Folsäureanaloga wie dem Methotrexat, isomerenrein und in 88% Ausbeute.

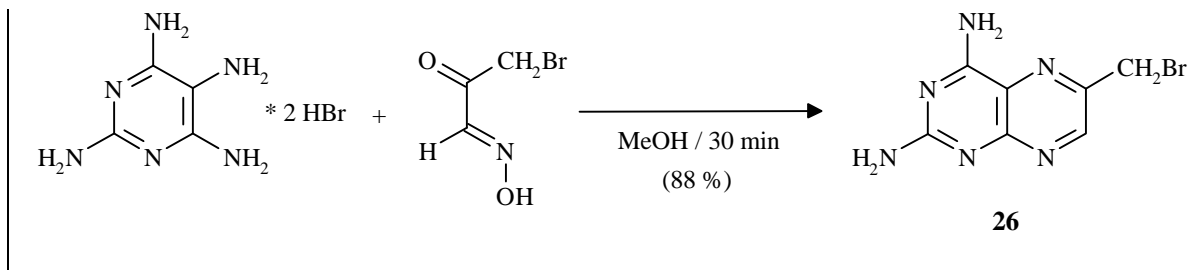


Abb.4.9 : 2,4-Diamino-6-bromomethyl-pteridin-Synthese nach Taghavi-Moghadam^[133]

7(8H)-Pteridinone lassen sich auf diesem Wege allerdings nicht darstellen, da hierfür keine entsprechenden Ausgangsmaterialien verfügbar sind.

4.2. Darstellung der benötigten Pteridine

4.2.1. Synthesen der 6-H-substituierten Pteridin-Derivate

Das 2-Amino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**5**) ist literaturbekannt und wurde von Schmid^[96,110] bei der Darstellung des Isoxanthopterin-N⁸-β-D-ribosids eingesetzt. Die beim 2,6-Diamino-4(3H)-pyrimidinon (**27**) beginnende, sechs-stufige Synthese nach Lohrmann^[134], Roth^[135] und Reisser^[136] (Abb.4.10) folgt der Gabriel-Isay-Strategie und wurde nur in einer Stufe wesentlich abgeändert.

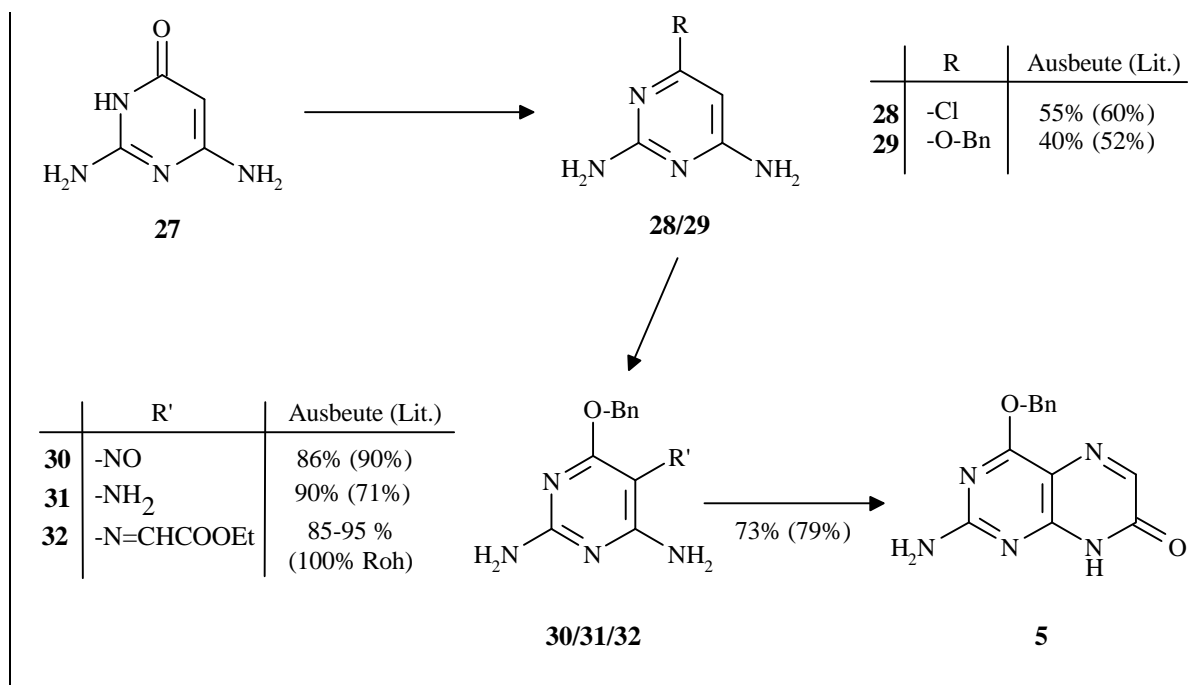


Abb.4.10 : Syntheseweg zur Darstellung 2-Amino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**5**)^[134-136]

Für die Reduktion des 2,6-Diamino-4-benzyloxy-5-nitroso-pyrimidins (**30**) zum 2,5,6-Triamino-4-benzyloxy-pyrimidin (**31**) wurde anstelle des Dithionit-Verfahrens^[134] eine katalytische Hydrierung gewählt. Benzyloxy-Schutzgruppen werden in der Regel zwar unter Palladium-Katalyse hydrogenolytisch abgespalten, im vorliegenden Imidoester sind sie jedoch gegenüber Platin-Katalysatoren stabil. **30** ließ sich in Methanol unter Zugabe von Platin-(II)-oxid-hydrat mit Wasserstoff in 12h zur entsprechenden 2,5,6-Triaminoverbindung **31** reduzieren. Dabei konnte **30** nach Umkristallisation aus Wasser in einer Ausbeute von 90% (Lit.^[134]: 71%) erhalten werden. Anstelle von Platin kann auch Raney-Nickel eingesetzt werden, wobei sich die Reaktionszeiten allerdings deutlich verlängern.

Alternativ kann das bei der Reduktion von **30** erhaltene Rohprodukt **31** auch ohne Reinigung direkt weiter in der Synthese der Schiff'schen Base **32** eingesetzt werden, wobei diese ausgehend von der Nitroso-Verbindung **30** über beide Stufen in 95% Ausbeute und genügender Reinheit für die Cyclisierung zu **5** erhalten wurde.

Die anderen synthetisierten Vertreter aus der Reihe der 6-H-substituierten Pteridinderivate, das 2-Methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion (**7**)^[137] und die für Modellreaktionen benötigten Verbindungen 2-N,N-Dimethylamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**33**)^[138] und 3,8-Dimethyl-2-methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion (**34**)^[139] wurden nach den entsprechenden Literatur-Vorschriften^[137-139] ohne weitere Modifikationen dargestellt.

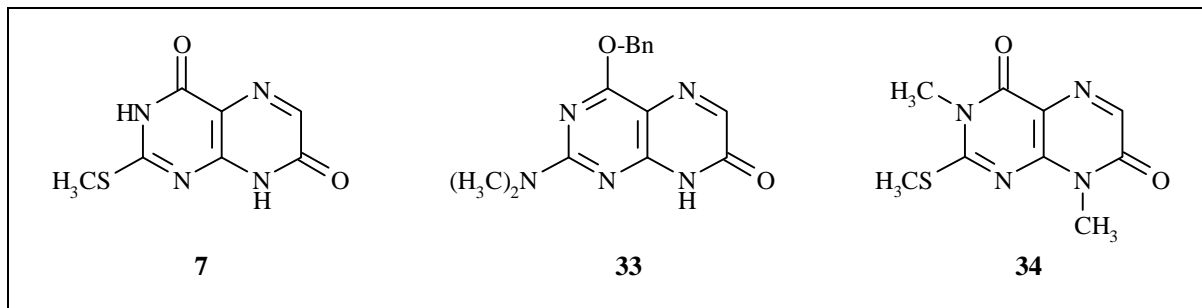


Abb.4.11: 2-Methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion^[137] (**7**), 2-N,N-Dimethylamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon^[138] (**33**) und 3,8-Dimethyl-2-methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion^[139] (**34**)

4.2.2. Synthese der 6-phenylsubstituierten Pteridin-Derivate **9** und **10**

Für die Darstellung von 6-Phenyl-7(8H)-pteridinonen finden sich in der Literatur drei Routen : eine Gabriel-Isay-Kondensation mit Phenylglyoxylsäureestern als Kondensationsreagentien^[140], eine Timmis-Synthese unter Verwendung von Phenylelessigsäureester^[95,100] und die saure Umlagerung eines 6-Phenylpterin-8-N-oxids^[141]. Der letztgenannte Weg ist nur mechanistisch von Interesse und wurde wegen der geringen Ausbeute und der größeren Anzahl von Synthesestufen nicht in Betracht gezogen.

Aufgrund der Instabilität der entsprechenden als Ausgangsmaterialien benötigten 5-Nitroso-pyrimidine gegenüber den Reaktionsbedingungen ließ sich das Timmis-Verfahren bei den Synthesen der beiden 6-Phenylpteridine **9** und **10** nicht anwenden. Substitutionsreaktionen am Pyrimidin durch das als Base benötigte Natriumalkoholat führen in beiden Fällen zur Bildung von Nebenprodukten.

Beim 2,6-Diamino-4-benzyloxy-5-nitroso-pyrimidin (**30**) ist die Benzylschutzgruppe gegenüber einer Substitution durch das verwendete Alkoholat zu labil. So konnte bei dem Versuch, **30** mit Phenylessigsäureethylester (**35**) und Natriummethanolat in Methanol zu **9** umzusetzen, lediglich eine Verbindung isoliert werden, die sich über DC und $^1\text{H-NMR}$ als 2,6-Diamino-4-methoxy-5-nitroso-pyrimidin (**36**) indentifizieren ließ (Abb.4.12). Im DC des Reaktionsgemisches fand sich in geringer Menge auch eine fluoreszierende Verbindung, die jedoch nicht weiter charakterisiert werden konnte.

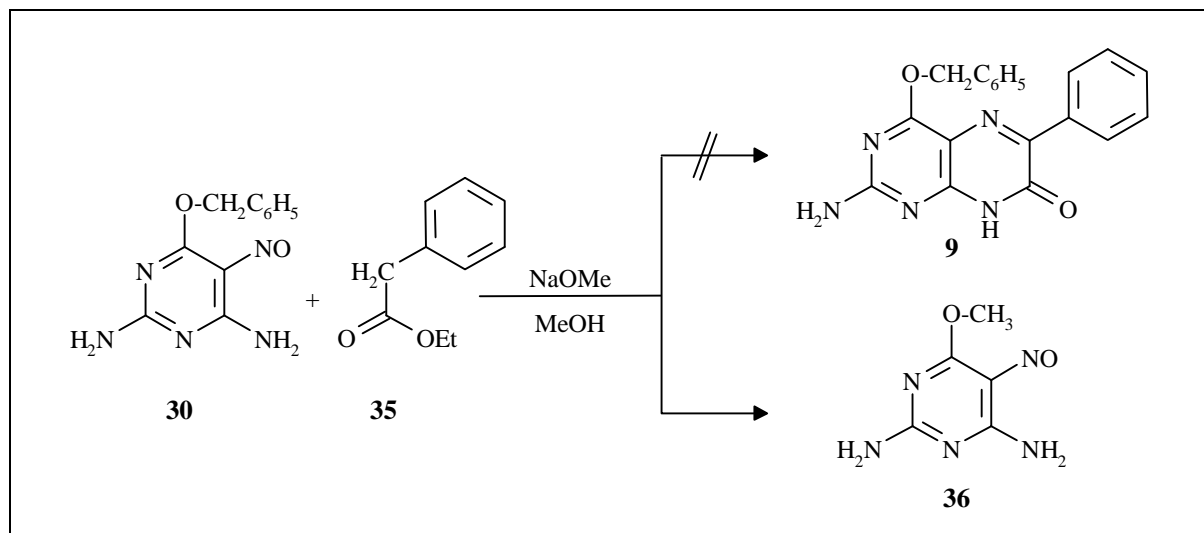


Abb.4.12 : Versuch einer Timmis-Synthese^[117,118] ausgehend von **30**

Daher erfolgte die Darstellung des 2-Amino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinons (**9**) über eine Gabriel-Isay-Kondensation. Die Reaktion von 2,5,6-Triamino-4-benzyloxy-pyrimidin (**31**) mit Phenylglyoxylsäure-methylester (**37**) in 20%-iger Essigsäure bei 70°C führt dabei in einer Ausbeute von 75% zu **9** (Abb.4.14). Die Esterfunktion der Dicarboxylkomponente ist reaktiver als die α -Ketogruppe, weshalb entsprechend den Kondensationsregeln für 5,6-Diaminopyrimidine saure Bedingungen gewählt wurden.

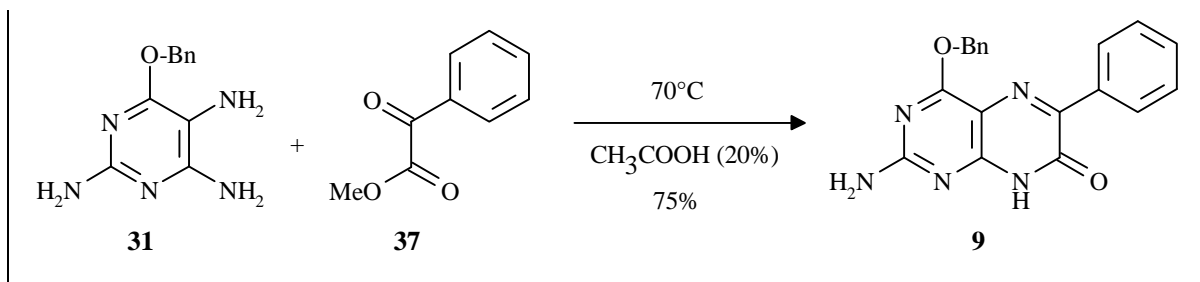


Abb.4.13 : Synthese von 2-Amino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon **9**

Für die Darstellung des 2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindions (**10**) mußte ebenfalls der Weg über eine saure Gabriel-Isay-Kondensation eingeschlagen werden. Eine Timmis-Reaktion ausgehend von der entsprechenden Nitroso-Vorstufe wurde in diesem Fall nicht versucht. Vom 6-Amino-2-methylmercapto-5-nitroso-4(3H)-pyrimidinon ist bekannt, daß sich die 2-Methylmercaptofunktion bereits unter sehr milden Bedingungen gegen Nucleophile austauschen läßt^[103,142].

Die ersten Versuche nach Gabriel-Isay in Eisessig führten allerdings zu Gemischen der beiden isomeren 6- und 7-Phenylpteridine (Abb.4.14). Auch Änderungen des pH-Wertes der Reaktionslösung ergaben in gleicher Weise Isomerengemische mit variierenden Anteilen beider Verbindungen. In der Regel wurde ein Überschuß an 2-Methylmercapto-7-phenyl-4,6(3H,5H)-pteridindion (**38**) erhalten. Das günstigste Verhältnis bezüglich **38** wurde bei der Durchführung der Reaktion in 1N HCl beobachtet. Nach Umkristallisation aus Ethanol konnte das 7-Phenyl-Isomer **38** in 67% Ausbeute isoliert werden.

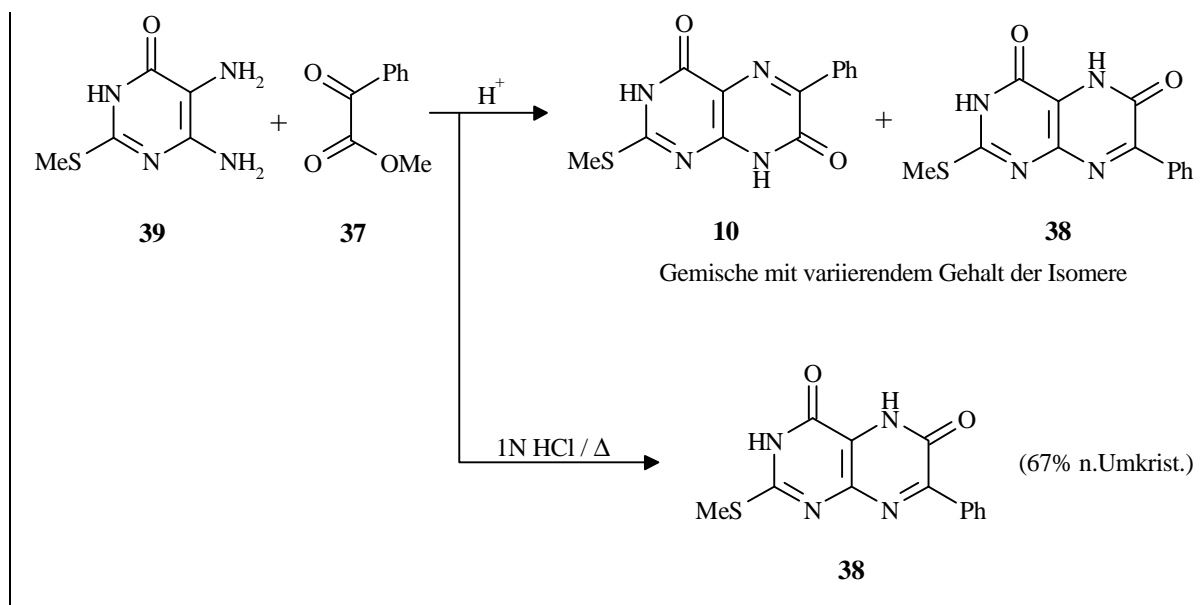


Abb.4.14 : saure Direktkondensation von **39** mit Phenylglyoxylsäuremethylester **37**

Die Kondensation in Eisessig ergab Gemische mit vergleichsweise hohen Anteilen des 6-Phenyl-Isomers **10**, allerdings konnten diese durch Umkristallisation nicht getrennt werden, so daß nach anderen Wegen gesucht werden mußte um das 2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**10**) in reiner Form darzustellen.

Das oben beschriebene, den Kondensationsregeln von Purmann entgegenlaufende Kondensationsverhalten des 5,6-Diaminopyrimidins **39** findet sich auch in einem anderen Fall. So beobachtete S.Matysiak^[102] bei der Kondensation von Brenztraubensäureestern mit 5,6-Diamino-2-methylmercapto-4(3H)-pyrimidinon (**39**) in einem pH-Bereich von 0-13 ausschließlich die Bildung des 7-Methyl-2-methylmercapto-4,6(3H,5H)-pteridindions.

Andere Fälle aus der Literatur^[143-147] zeigen, daß für die Orientierung bei der Kondensation auch die Substituenten am Pyrimidin und am Cyclisierungsreagenz von Bedeutung sein können.

Ein weiteres Beispiel ist die Kondensation von 5,6-Diamino-4(3H)-pyrimidinon (**40**) mit Glyoxylsäureethylesterhalbacetal (**18**) nach Pfeleiderer^[147], die im pH-Bereich von 0-7 ausschließlich zum 4,6(3H,5H)-Pteridindion (**41**) führt. Zu dem in direkter Synthese nicht zugänglichen 4,7(3H,8H)-Pteridindion (**42**) gelangt

man nur, wenn die intermediär entstehende Schiff'sche Base **43** isoliert wird. Diese läßt sich anschließend basisch zum 7-Oxopteridin **42** cyclisieren oder sauer über eine Umlagerung in das 6-Oxoderivat **41** überführen (Abb.4.15).

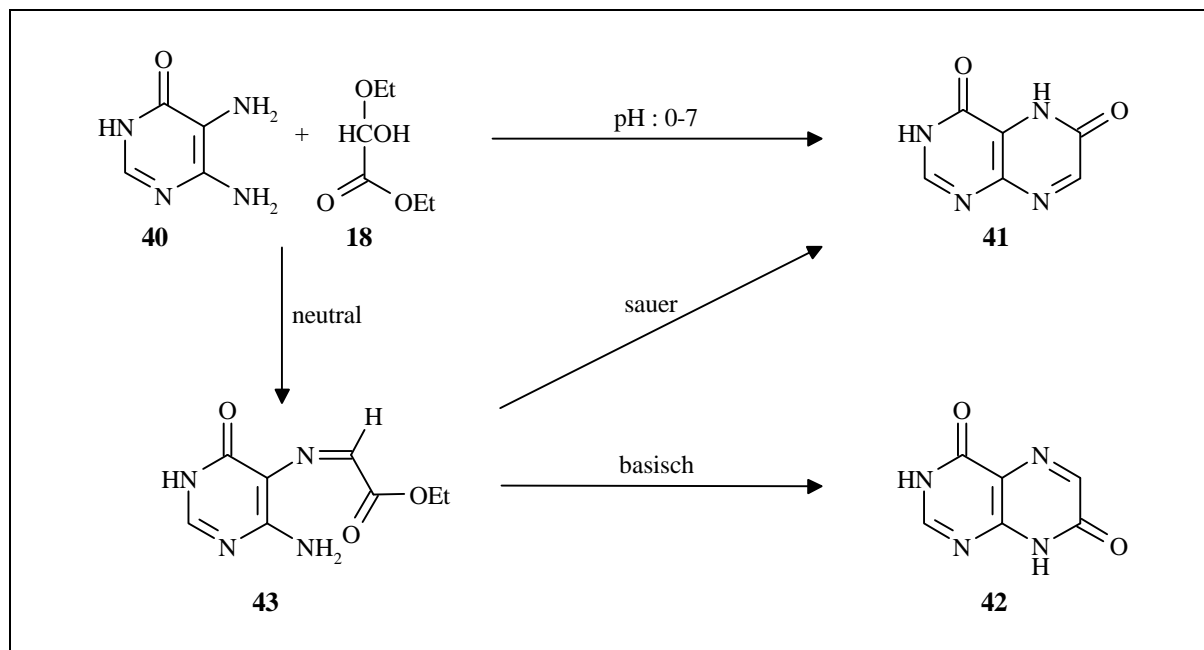
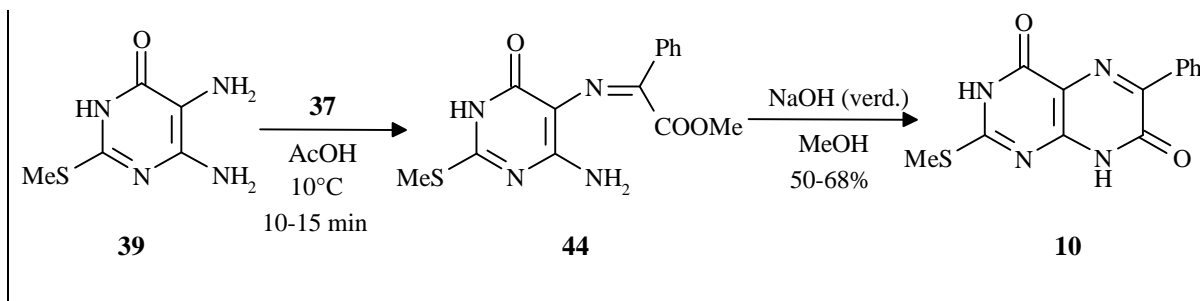


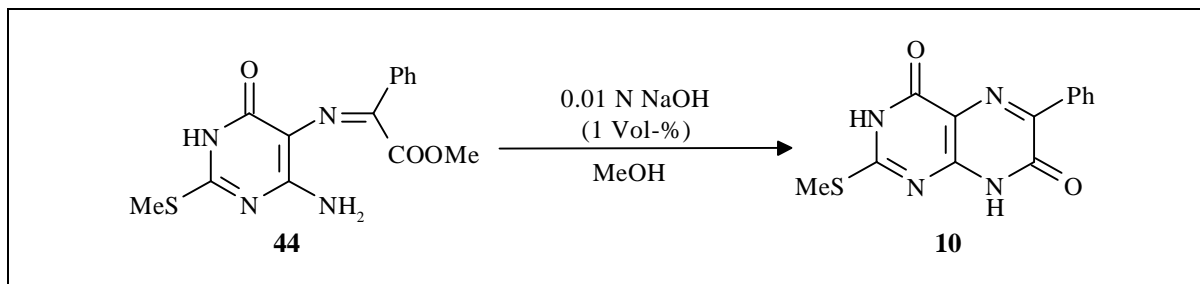
Abb.4.15 : Bildung der isomeren 4.6- und 4.7-Dioxopteridine **41** und **42** nach Pfeleiderer^[147]

Zur Darstellung von isomerenreinem **10** mußte ebenfalls die Zwischenstufe, das 6-Amino-5-(α -methoxycarbonyl- α -phenyl-methylenamino)-2-methylmercapto-4(3H)-pyrimidinon (**44**) isoliert werden (Abb.4.16). Nach 10-15 min Reaktionsdauer in Eisessig bei 10°C wurde das gebildete **44** abgesaugt und anschließend basisch zum 6-Phenylpteridin-Derivat **10** cyclisiert. Aufgrund der guten Löslichkeit der Schiff'schen Base **44** in Eisessig liegen die Ausbeuten dieser Reaktion über beide Stufen nur zwischen 50 und 68%.



Bei längerer Reaktionszeit bzw. höherer Temperatur erfolgt die partielle Umlagerung zu **38**, was wegen der schlechten Abtrennbarkeit dieses Derivats vermieden werden muß.

Betrachtet man das Verhalten einer Lösung von **44** im UV (Abb.4.17), so zeigt sich im Basischen eine rasche und nebenreaktionsfreie Cyclisierung zum 2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**10**). Dabei wurde der methanolischen Lösung von **44** 1 Volumenprozent 0.01N NaOH zugesetzt. Bei 0.1N NaOH war die Reaktion bereits nach 10 min beendet. Dagegen wurde bei Zugabe von 1N HCl ein Spektrum erhalten, dessen Bandenlage dem des 5,6-Diaminopyrimidins (**39**) unter gleichen Bedingungen entspricht.



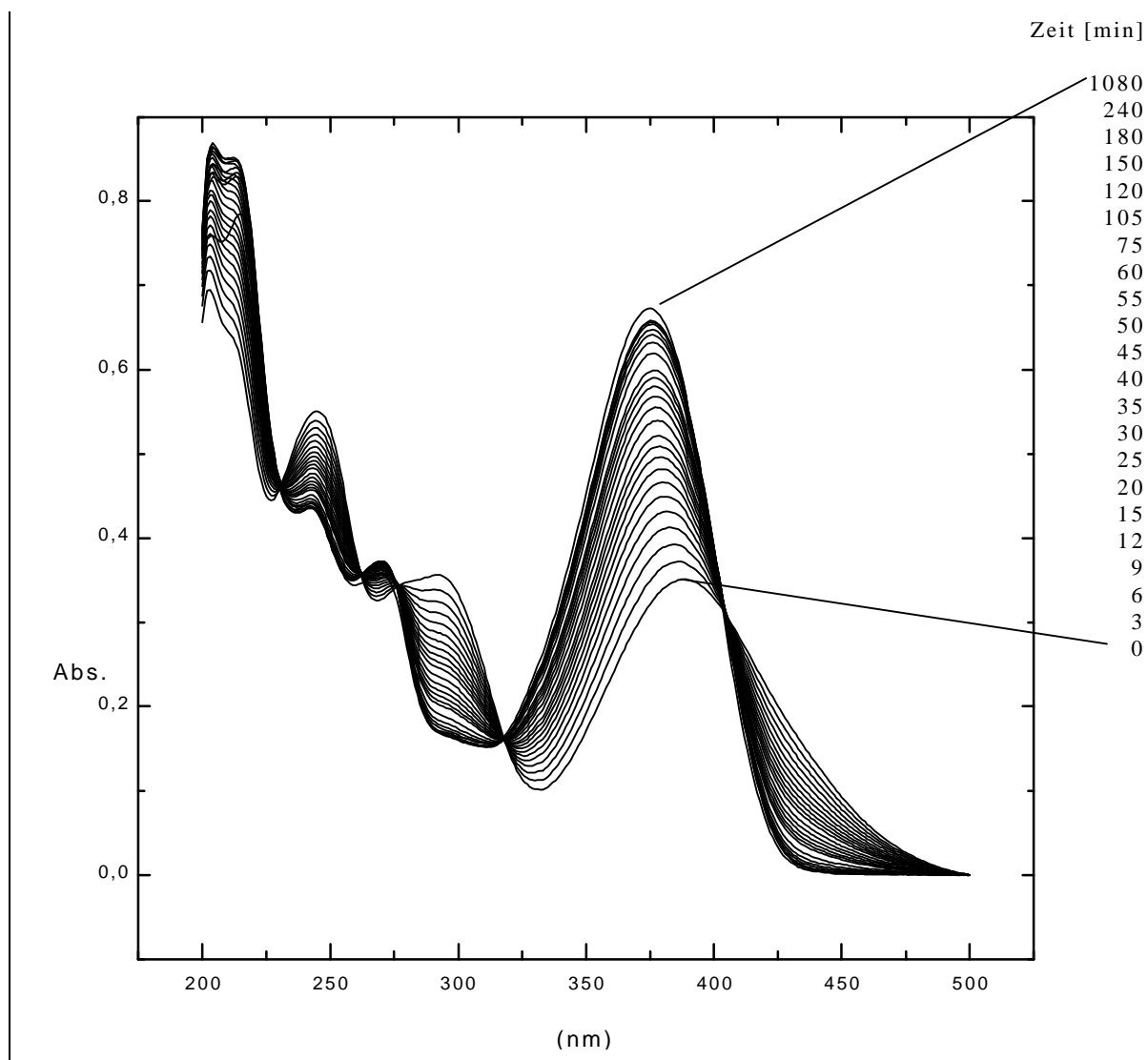
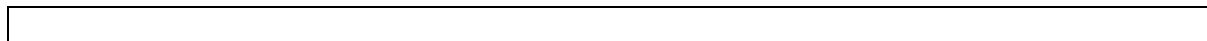


Abb.4.17 : Verhalten von **44** in MeOH unter Zugabe von 1 Volumenprozent 0.01N NaOH

Pfleiderer^[147] schlug für die Isomerenbildung bei der Synthese von 4,7(3H,8H)-Pteridindionen unter sauren Bedingungen einen Mechanismus vor, der übertragen auf die vorliegende Reaktion in Abb.4.18 dargestellt ist.

Als Konkurrenzreaktion zur Bildung des 2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindions (**10**) kann im sauren Mileau, begünstigt durch die Protonierung an N⁵, der Angriff der 6-Aminofunktion auch am Iminokohlenstoff von **45** stattfinden. Dabei entsteht als Intermediat das 7,8-Dihydropurin **46**, dessen Fünfring nach Protonenwanderung von N⁶ zum basischeren N⁵ zur anderen Seite hin aufgehen kann. Das so gebildete Intermediat **47** cyclisiert letztlich zum 2-Methylmercapto-7-phenyl-4,6(3H,5H)-pteridindion (**38**).



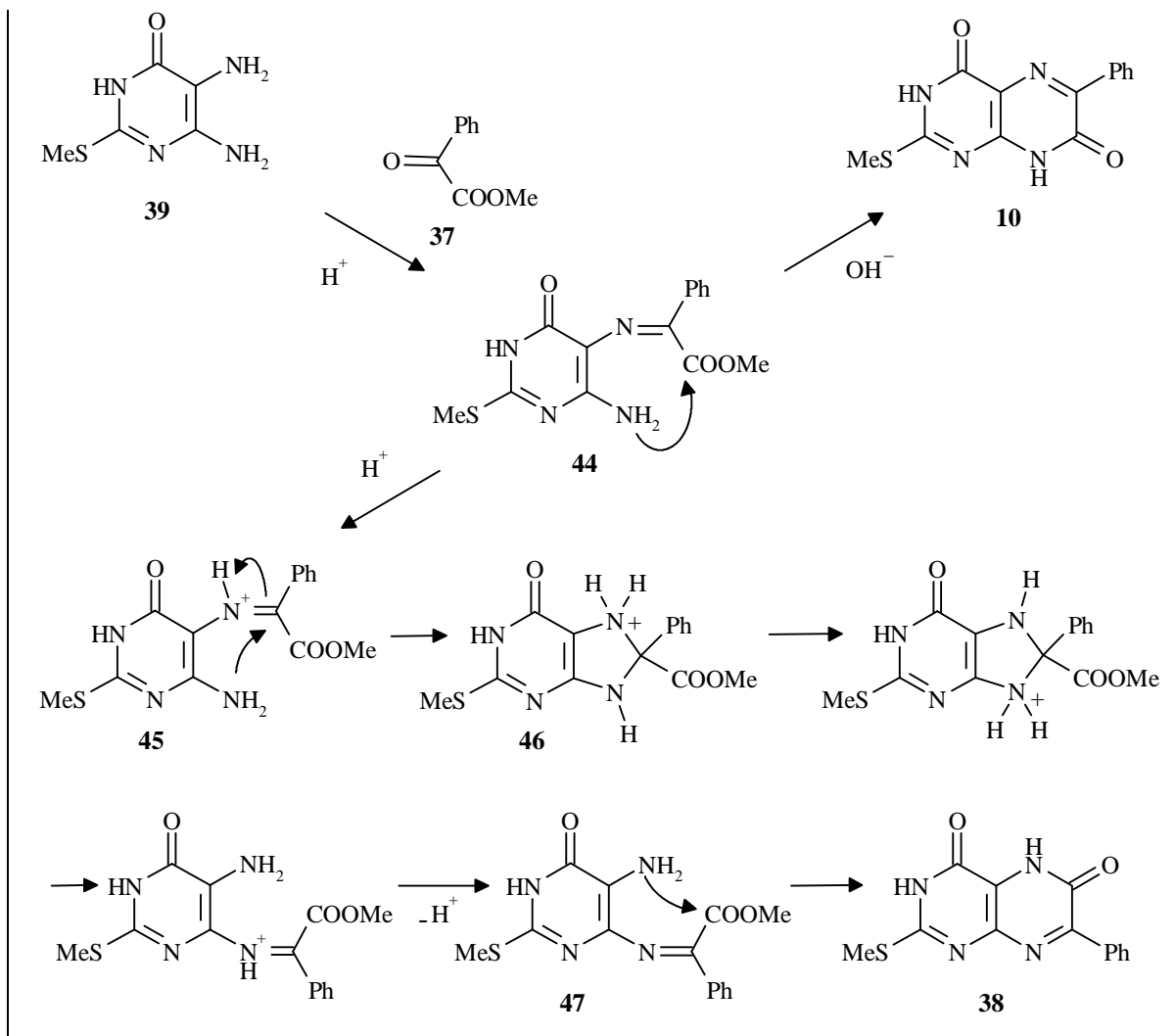


Abb.4.18 : säurekatalysierte Umlagerung von **44** unter Bildung von **38** analog Literatur^[147]

Dabei kann nicht geklärt werden, welches der fünf gezeigten Intermediate im UV-Spektrum der Lösung von **44** nach Säurezugabe beobachtet worden war. Bereits die Protonierung an N^5 unterbricht das chromophore System der Schiff'schen Base, was zu einem Pyrimidin-Spektrum führen würde.

Als Vergleichssubstanzen für die Zuordnung der pK_a -Werte der beiden 6-Phenylpteridin-Derivate **10** und **38**, wurden ausgehend von 5,6-Diamino-3-methyl-2-methylmercapto-4(3H)-pyrimidinon^[105,148-150] (**48**) die beiden Isomeren 3-Methyl-2-methylmercapto-7-phenyl-4,6(3H,5H)-pteridindion (**49**) und 3-Methyl-2-methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**50**) dargestellt (Abb.4.19).

Während die Synthese von **49** ohne Schwierigkeiten in 72 % durchgeführt werden konnte, ließ sich **50** nur in einer Ausbeute von 48 % erhalten. Dies lag an der durch die zusätzliche Methylfunktion nochmals erhöhten Löslichkeit der Schiff'schen Base **51**, welche zur Vermeidung der Umlagerungsreaktion auch in diesem Fall isoliert werden mußte. **51** wurde ohne weitere Reinigung durch Behandlung mit verdünnter Natronlauge in Methanol zu **50** cyclisiert.

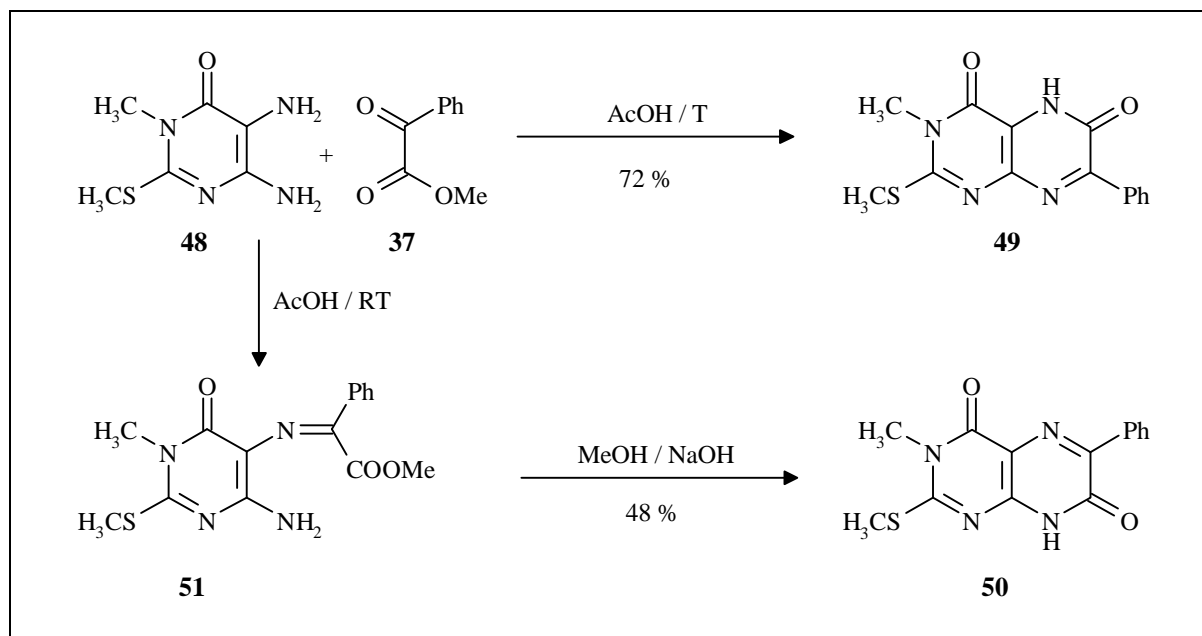


Abb.4.19 : Synthesen der 3-Methylderivate **49** und **50**

4.2.3. Einführung zusätzlicher Schutzgruppen

Wie in Kapitel 3 erläutert wurde, ist es für die Glycosidierung aus Gründen der Löslichkeit und der Reaktionsselektivität von Vorteil, wenn neben der O⁴-Position des Isoxanthopterin auch die exocyclische Aminofunktion blockiert ist. Anders als bei einem O⁶-geschützten Guanin besitzt die 2-Aminofunktion des Isoxanthopterinderivates **5** als vinyloges Säureamid nur geringe nucleophile Eigenschaften. Dennoch wurde von Schmid und Pfeleiderer ausgehend vom 2-Amino-4-isopropoxy-7(8H)-pteridinon (**52**) das acetylierte Derivat **53** durch Behandlung mit Essigsäureanhydrid/Pyridin in DMF erfolgreich in 45 % Ausbeute dargestellt^[96].

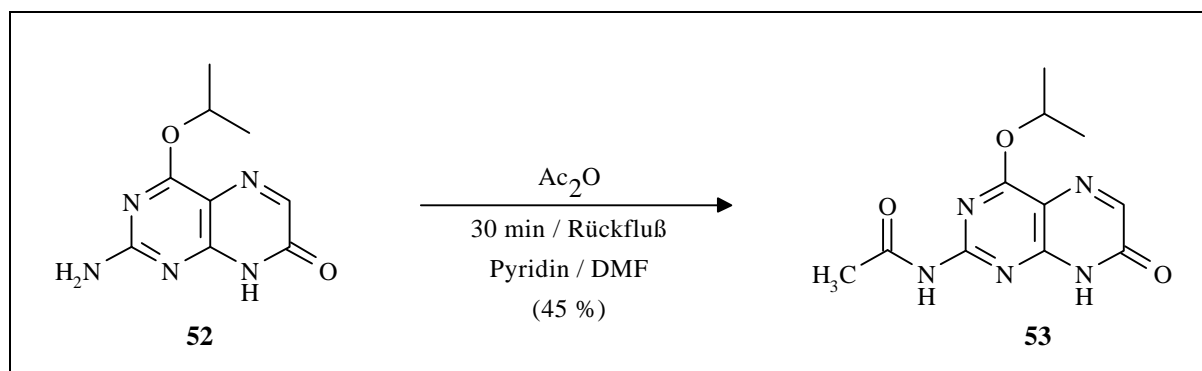


Abb.4.20 : Acetylierung von 2-Amino-4-isopropoxy-7(8H)-pteridinon (**52**) nach Schmid und Pfeleiderer^[96]

Versuche dieses Verfahren auf das 2-Amino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**5**) zu übertragen scheiterten, auch die Katalyse durch DMAP anstelle von Pyridin brachte keinen Erfolg. Dagegen gelang durch Variation des Acylierungsreagenzes die erfolgreiche Blockierung der 2-Aminofunktion. 15 minütiges Erhitzen von **5** mit Isobuttersäureanhydrid unter DMAP-Katalyse in DMF führten zum 2-Isobutyroylamido-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**54**) in einer Ausbeute von 53% (Abb.4.21).

Eine Alternative zur Acylierung stellt die von Zemlicka^[151] in die Nucleosidchemie eingeführte N,N-Dimethylaminomethylen-Funktion dar. Zur Einführung in einer Umacetalisierungs-Amidierungs-Reaktion wird gewöhnlich das N,N-Dimethylformamid-dimethylacetal verwendet. Dieses kann jedoch wegen seiner guten

Alkylierungseigenschaften auch zu methylierten Produkten führen ^[152,153], während sterisch umfangreichere Alkoxysubstituenten im Acetal die Alkylierung unterdrücken.

Schon im Verlauf meiner Diplomarbeit^[101] hatte sich gezeigt, daß mit dem N,N-Dimethylformamid-diethylacetal (**55**) die Nebenreaktionen beim vorliegenden Pteridinderivat (**5**) unterdrückt werden können, wobei das 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**6**) in 50% Ausbeute erhalten werden konnte. Durch Verbesserung der Aufarbeitungsprozedur ließ sich während der vorliegenden Arbeit das Ergebnis auf 96% steigern.

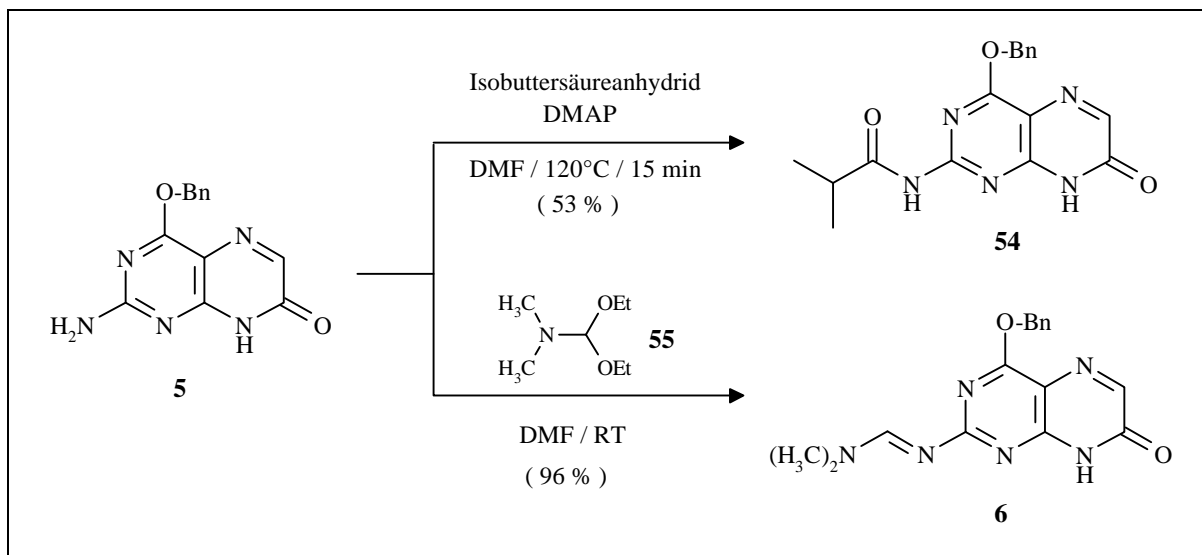


Abb.4.21 : Schutzgruppeneinführung an der exocyclischen Aminofunktion von **5**

Das 2-Methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion (**7**) wurde bereits erfolgreich zur Synthese eines entsprechenden N⁸-2'-Desoxyribosids eingesetzt^[154]. Daher wurde trotz der zu erwartenden geringen Selektivität und Ausbeute bei der Glycosidierung von einer weiteren Blockierung der O⁴-Position abgesehen.

Dagegen erschien eine Schützung dieser Position beim 2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**10**) durchaus sinnvoll. Ein räumlich anspruchsvoller Substituent, wie ein Phenylring oder auch eine Alkyl-Gruppe, in Position 6 sollte bei einer Acylierung bzw. einer anderen oxophilen Reaktion eine Begünstigung der O⁴-Position gegenüber der sterisch abgeschirmten O⁷-Position bewirken.

Diese Selektivität nutzte Melguizo^[104,154] bei der Pivaloylierung von 6-Methyl-2-methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion (**56**). Nach Umsetzung dieses Pteridinderivats mit Pivaloylchlorid in trockenem Pyridin bei Raumtemperatur für 2h und säulenchromatographischer Auftrennung des erhaltenen Produktgemisches konnte er das 6-Methyl-2-methylmercapto-4-pivaloyloxy-7(8H)-pteridinon (**57**) in einer Ausbeute von 68% isolieren.

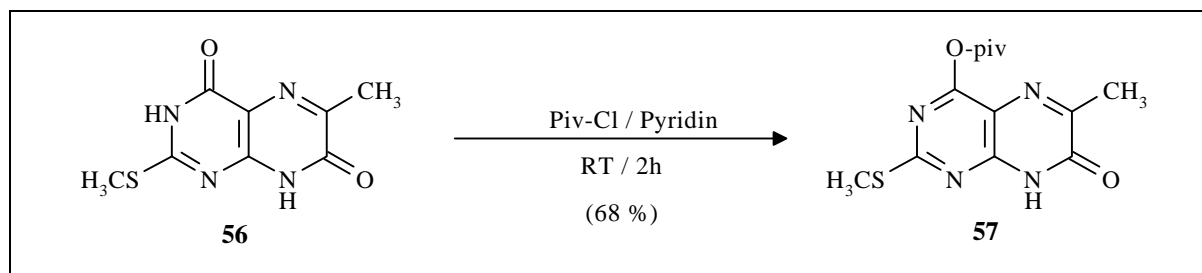


Abb.4.22 : Pivaloylierung der O⁴-Position am 6-Methyl-2-methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion (**56**) nach Melguizo^[104,154]

Unter analogen Bedingungen wurden ausgehend von 2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**10**) mit Pivaloylchlorid jedoch nur Ausbeuten um 30-40% an 2-Methylmercapto-6-phenyl-4-pivaloyloxy-7(8H)-pteridinon (**58**) erzielt. Die Zugabe von Triethylamin ergab bei verkürzter Reaktionszeit eine Steigerung der Ausbeute auf 62 %.

Triethylamin als starke Base ($pK_a=11,01$ ^[155]) kann im Gegensatz zu Pyridin ($pK_a=5,2$ ^[155]) das Pteridin **10** ($pK_1(N^8)=5,60$; $pK_2(N^3)=8,99$) vollständig, also auch an N³ deprotonieren. Das Dianion von **10** weist gegenüber dem entsprechenden Monoanion an der O⁴-Position eine höhere Reaktivität auf. Dies erleichtert den nucleophilen Angriff am Carbonylkohlenstoff des Acylierungsreagenzes, was zu der beobachteten höheren Reaktivität führt.

Dagegen erbrachte die Variation des Acylierungsreagenzes keine Verbesserung. Bei der Verwendung von Diphenylcarbamoylechlorid lag die Ausbeute sogar bei nur 10% an 2-Methylmercapto-4-(N,N-diphenylcarbamoyleoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**59**).

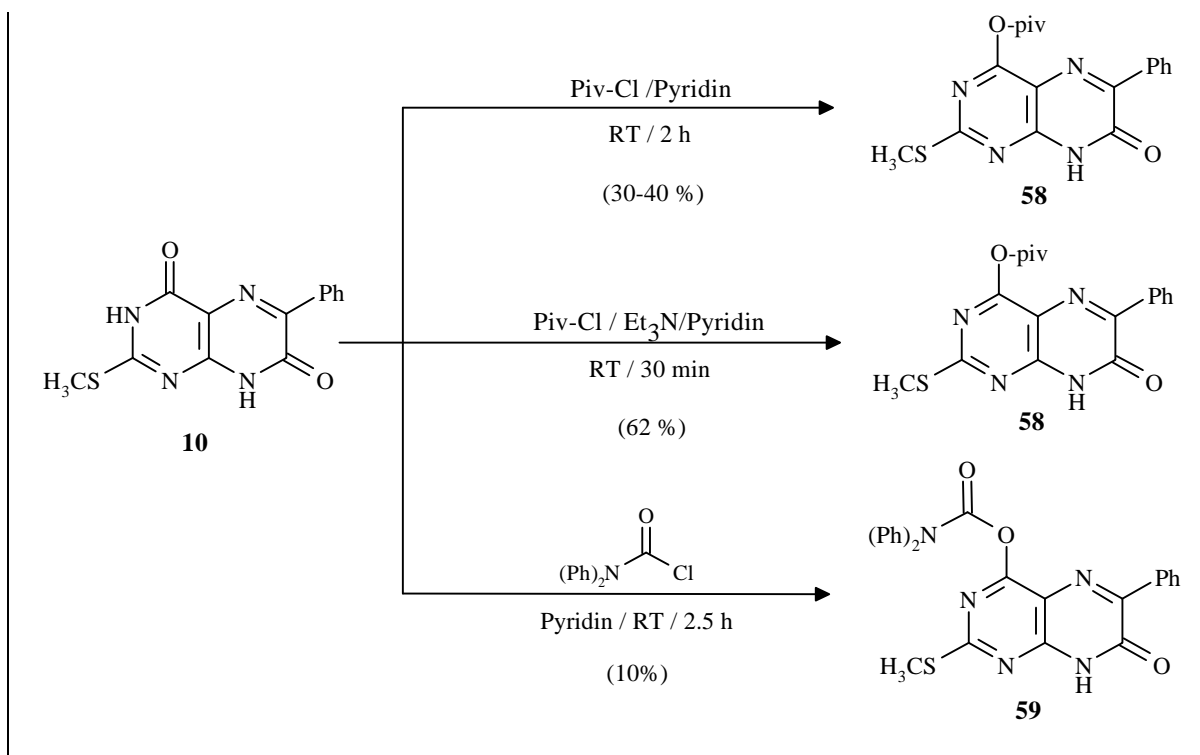


Abb.4.23 : Schützung der O⁴-Position des 2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindions (**10**)

Analog den Darstellungen der beiden 6-H-substituierten Pteridin-Derivate 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**6**) und 2-Isobutyroylamido-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**54**) wurden auch die entsprechenden 6-Phenylderivate dargestellt. Dabei gelang die Synthese von 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**60**) durch Behandlung von **9** mit N,N-Dimethylformamid-diethylacetal (**55**) in 95% (Abb.4.24).

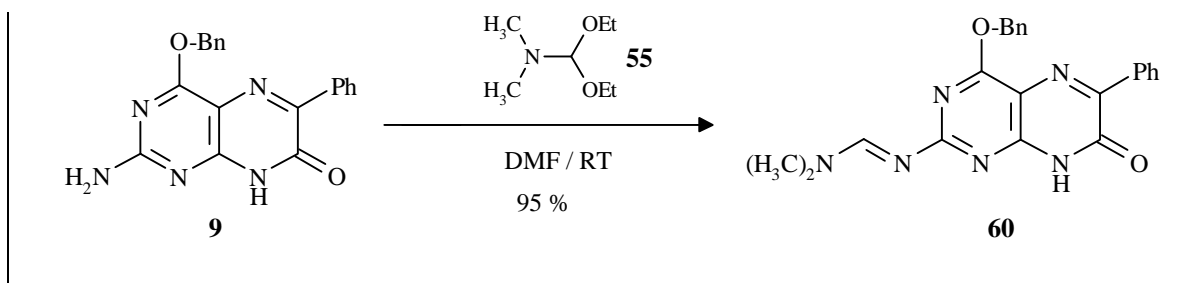


Abb.4.24: Einführung der dmf-Schutzgruppe in die exocyclische Aminofunktion des 2-Amino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinons (**9**)

Analog der Synthese von **54** ließ sich auch das 2-Isobutyrylamido-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**61**) durch 15 minütige Umsetzung von 2-Amino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**9**) mit Isobuttersäureanhydrid in DMF bei 120°C unter DMAP-Katalyse in 46% Ausbeute darstellen (Abb.4.25).

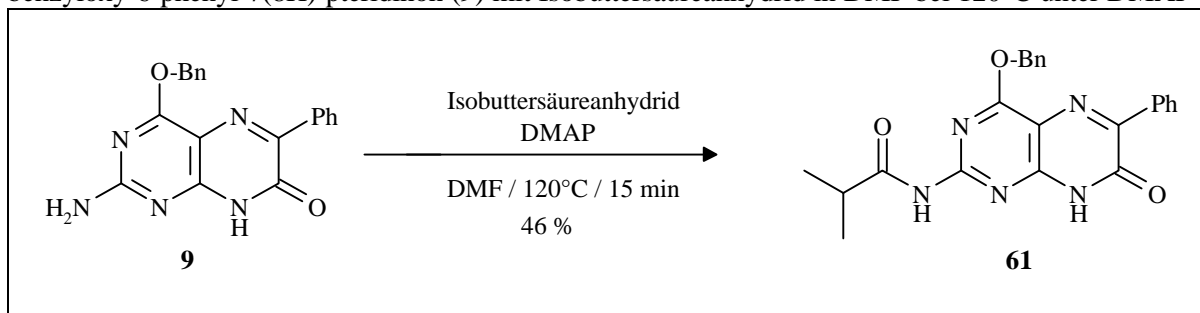


Abb.4.25 : Einführung der Isobutyryl-Schutzgruppe in die exocyclische Aminofunktion des 2-Amino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinons (**9**)

4.3. Pyrido-[2,3-d]-pyrimidin-Synthesen

Einige Pyrido-[2,3-d]-pyrimidine und ihre Nucleosid-Derivate besitzen interessante biologische Eigenschaften^[156,157]. In der Natur wurde jedoch bislang lediglich ein Vertreter dieser Substanzklasse gefunden. Es handelt sich dabei um das in einem Methanobakterium bei der Reduktion von CO₂ zu Methan als Elektronencarrier fungierende Coenzym F₄₂₀^[158-160], welches strukturell dem Riboflavin ähnelt. Trotz dieser geringen natürlichen Häufigkeit stimulierte die Nähe zu den biologisch bedeutsamen Pteridinen (5-Deazapteridin) schon früh die Forschung in diesem Arbeitsfeld.

Bereits 1923 berichteten Klinsiecki und Sucharda^[161] von der Synthese des 4(3H)-Pyrido-[2,3-d]-pyrimidinons. Erste größere Arbeiten wurden dann in den Jahren 1955-58 von R.K.Robins et al.^[162,163] und V.Oakes et al.^[164] publiziert. Für einen breiteren Überblick über Chemie und Literatur dieser Substanzklasse sei an dieser Stelle auf die Übersichtsartikel von Irwin und Newton verwiesen^[165-166].

4.3.1. Methoden zur Darstellung von Pyrido-[2,3-d]-pyrimidinen

Wie bei den Pteridinen sind auch bei ihren 5-Deazaderivaten zwei alternative Zugangsmöglichkeiten durch das Gerüst vorgegeben. Die ersten Pyrido-[2,3-d]-pyrimidin-Synthesen gingen von 2-Amino-nicotinsäure aus, die mit Harnstoffen oder Guanidinen zur Reaktion gebracht wurde. Mittlerweile haben sich jedoch auch für Synthesen der 5-Deazapteridine die auf Pyrimidinen basierenden Darstellungswege allgemein durchgesetzt.

Prinzipiell gibt es dabei zwei Alternativen, bei denen je nach eingesetztem Pyrimidin entweder eine C₂- oder eine C₃-Komponente ankondensiert wird (Abb.4.26). Bei Synthesen nach Weg {a} werden 5-Acyl- oder 5-Ethoxycarbonyl-6-amino-pyrimidine mit α -Methylen-ketonen, -estern oder -nitrilen umgesetzt. Analog den Pteridin-Synthesen nach Timmis (5-NO/6-NH₂) wird durch die unterschiedliche Pyrimidinsubstitution (5-C(O)-R/6-NH₂) ein eindeutiger Syntheseverlauf erreicht.

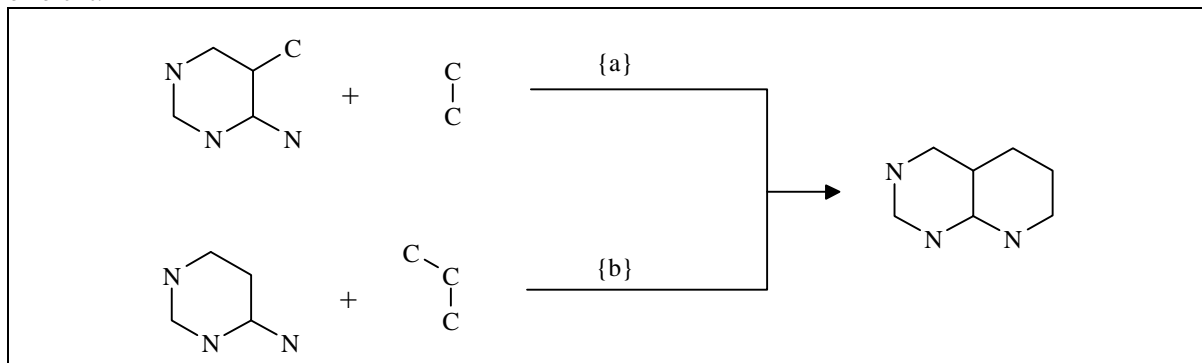


Abb.4.26 : Pyrido-[2,3-d]-pyrimidin-Synthese-Strategien ausgehend von Pyrimidinen

Reaktionen nach Weg {b} gelingen zumeist nur, wenn das 6-Amino-Pyrimidin in 2- und 4-Stellung elektronenschiebende Substituenten (z.B.: Hydroxy-, Mercapto-,...) trägt, welche die C⁵-Position für eine elektrophile Substitution aktivieren. Diese Heterocyclen reagieren mit unterschiedlichen C₃-Komponenten wie beispielsweise Alkoxymethylen-malonaten, 3-Amino-acroleinen oder Acetylcarbonsäureestern. Aufgrund der Tatsache, daß sowohl über C⁵ als auch über die 6-Aminofunktion ein nucleophiler Angriff an der C₃-Komponente erfolgt, führen diese Reaktionen in manchen Fällen zur Bildung von Isomergemischen.

Nach Auswertung der vorhandenen Literatur^[162-168] schien zur Synthese eines 2-Alkylmercapto-4,7(3H,8H)-pyrido-[2,3-d]-pyrimidindions besonders der Weg über eine Kondensation von 6-Amino-2-alkylmercapto-4(3H)-pyrimidinonen mit Ethoxymethylen-malonsäurediethylester (EMME) erfolgversprechend.

4.3.2. 2-Alkylmercapto-4,7(3H,8H)-pyrido-[2,3-d]-pyrimidindion-Synthesen

Garcia et al.^[167] untersuchten die Reaktion von 6-Amino-2-methoxy-4(3H)-pyrimidinon (**62**) mit Ethoxymethylen-malonsäurediethylester (**63**) unter verschiedenen Synthesebedingungen. Nach 24-stündigem Rückflußkochen in Eisessig erhielten sie dabei in 68% das 2-Methoxy-4,7(3H,8H)-pyrido-[2,3-d]-pyrimidinon (**64**) neben rund 12% eines Nebenproduktes, dem die Struktur des N-(6-Pyrimidinyl)-aminomethylenmalonats **65** zugeordnet wurde (Abb.4.27). Das Hauptprodukt **64** ließ sich aufgrund seiner Schwerlöslichkeit leicht von **65** abtrennen, welches nachfolgend in 12% aus der Mutterlauge der Reaktion gewonnen wurde.

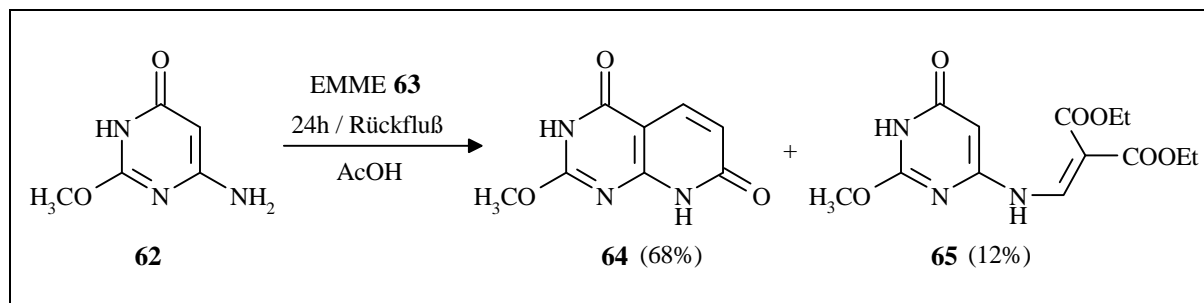


Abb.4.27: Reaktion von 6-Amino-2-methoxy-4(3H)-pyrimidinon (**62**) mit **63** in Eisessig

nach Garcia^[167]

Übertragen auf das 2-Methylmercapto-Analoge **66** konnten die entsprechenden Produktverhältnisse der obigen Synthese jedoch nicht erreicht werden (Abb.4.28). Es wurde in rund 70% ein Gemisch aus 2-Methylmercapto-4,7(3H,8H)-pyrido-[2,3-d]-pyrimidindion (**8**) und N-(3,4-Dihydro-2-methylmercapto-4-oxo-6-pyrimidinyl)-aminomethylenmalonsäurediethylester (**67**) erhalten, aus dem **8** nur unter größeren Ausbeuteeinbußen durch mehrmaliges Umkristallisieren aus DMF/Wasser in knapp 10% erhalten werden konnte.

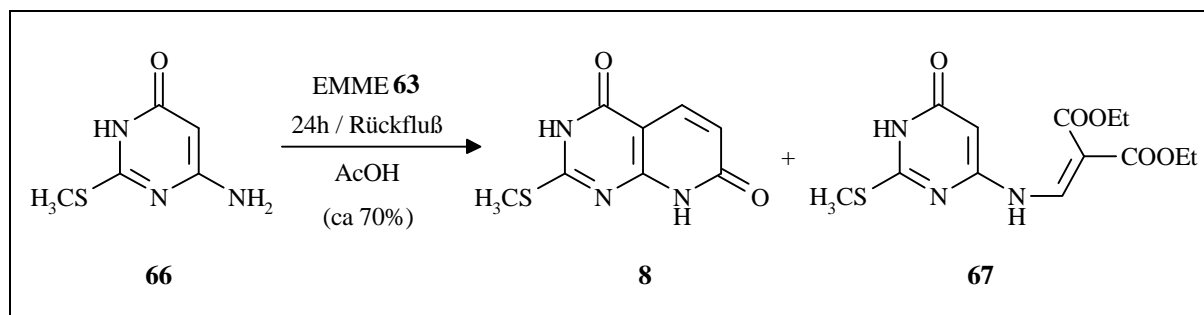


Abb.4.28 : Synthese von 2-Methylmercapto-4,7(3H,8H)-pyrido-[2,3-d]-pyrimidindion (**8**) analog der von Garcia^[167] beschriebenen Methode

Der erste Syntheseschritt bei der Bildung von **8** (Abb.4.29) ist der nucleophile Angriff des Pyrimidins über C⁵ am ethoxysubstituierten Methylenkohlenstoff des Ethoxymethylenmalonsäurediethylesters (**63**). Die Zwischenstufe **68** reagiert unter Abspaltung von Ethanol zu **69**. Diese Verbindung cyclisiert zum Pyrido-[2,3-d]-pyrimidin, wobei nach Verseifung des verbleibenden Esters und Decarboxylierung der entstehenden β -Keto-carbonsäure das 2-Methylmercapto-4,7(3H,8H)-pyrido-[2,3-d]-pyrimidindion (**8**) gebildet wird.

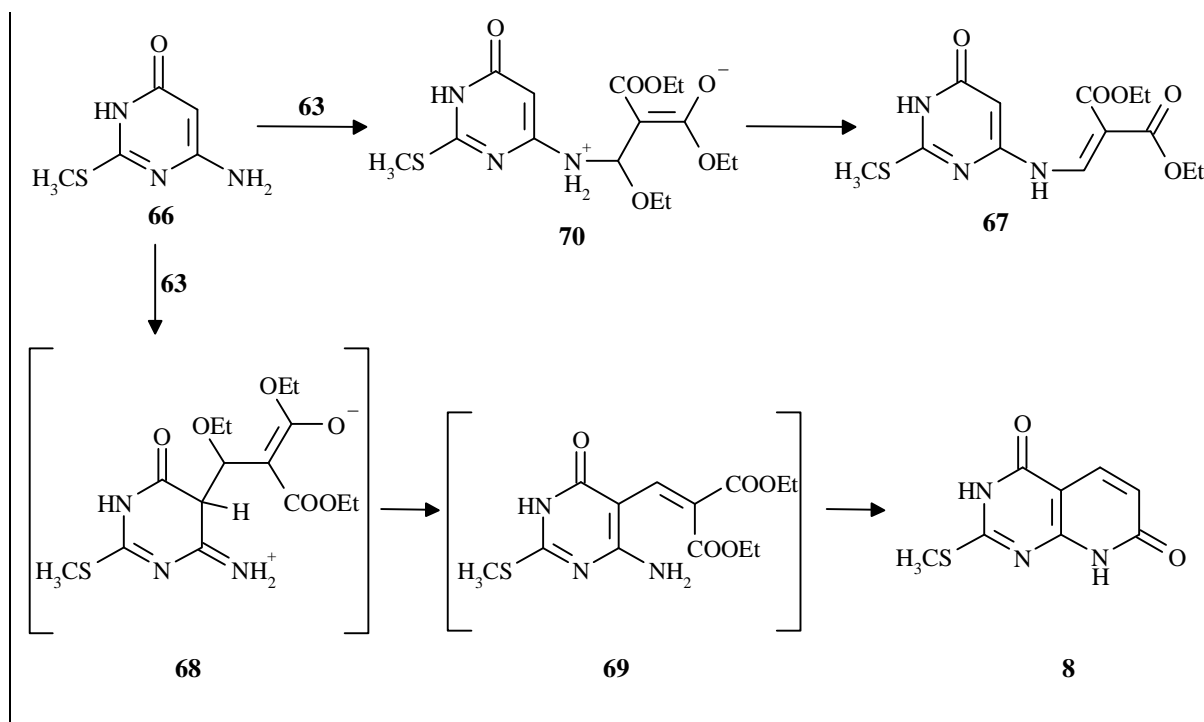


Abb.4.29 : Mechanismen zur Bildung von **8** und **67**

Anstelle über C⁵ kann die Addition des Malonsäurederivats **63** jedoch ebenso über die 6-Aminofunktion erfolgen, die auch als vinyloges Säureamid noch eine gewisse Reaktivität besitzt. Über die Zwischenstufe **70** kommt es zur Bildung des 6-Pyrimidinyl-aminomethylen-malonsäure-diethylesters **67**. Verbindungen dieses Typs cyclisieren im Gegensatz zu **69** nach Garcia et al.^[164] erst unter basischen Bedingungen bzw. bei sehr hohen Temperaturen. Der 6-(2-Methylmercapto-4-oxo-3,4-dihydro-pyrimidinyl)-aminomethylen-malonsäurediethylester **67** ist bekannt und wurde von Rizkalla und Broom^[168] als Zwischenstufe zusammen mit einer Reihe analoger Verbindungen beschrieben. Durch den Vergleich mit den angegebenen ¹H-NMR-Literaturdaten konnte die Verbindung **67** identifiziert werden.

Auch im Falle des 6-Amino-2-ethylmercapto-4(3H)-pyrimidinons (**71**) wurde bei analoger Reaktionsführung ein Produktgemisch erhalten (Abb.4.30). Allerdings war der Anteil des entsprechenden Nebenprodukts (**72**) im Vergleich zum Hauptprodukt, dem 2-Ethylmercapto-4,7(3H,8H)-pyrido-[2,3-d]-pyrimidindion (**73**)

geringer als bei den Synthesen des 2-Methylmercapto-4,7(3H,8H)-pyrido-[2,3-d]-pyrimidindions (**8**). In diesem Fall konnte das Nebenprodukt nicht isoliert und nur im NMR des Rohprodukts nachgewiesen werden.

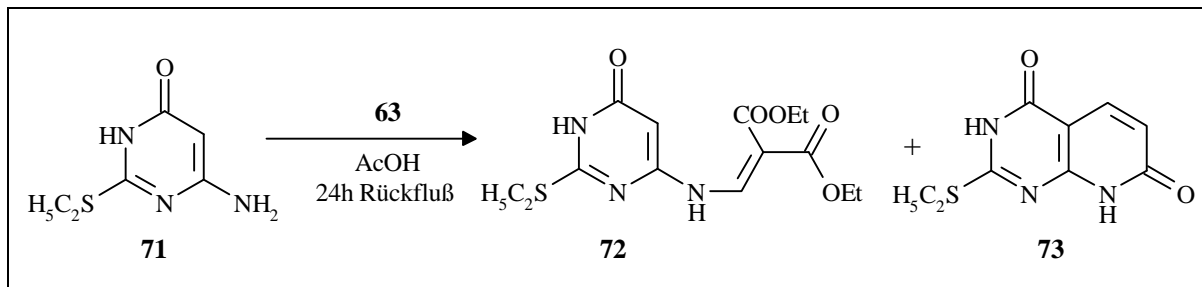


Abb.4.30 : Erste Versuche zur Synthese des 2-Ethylmercapto-4,7(3H,8H)pyrido-[2,3-d]-pyrimidindions (**73**)

Eine deutliche Verbesserung der Synthese konnte erreicht werden, wenn das Reaktionsgemisch vor dem Erhitzen für 48h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach 16h Rückflußkochen wurde der gebildete Niederschlag abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen, wobei das 5-Deazapteridin **73** in 38% nebenproduktfrei erhalten werden konnte.

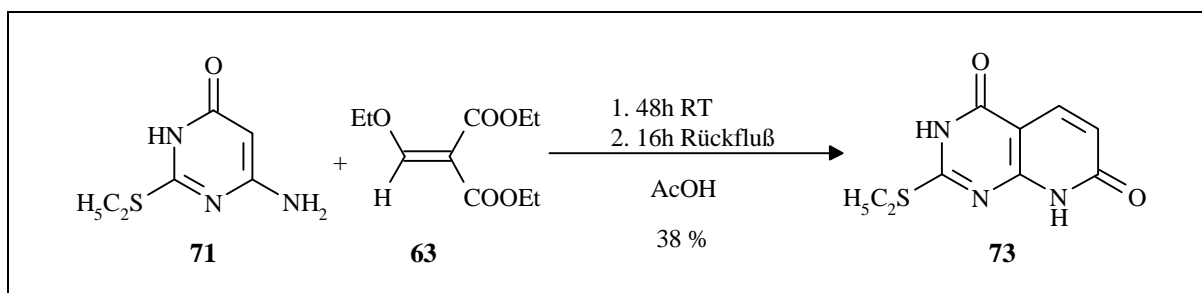


Abb.4.31 : Erfolgreiche Synthese des 2-Ethylmercapto-4,7(3H,8H)pyrido-[2,3-d]-pyrimidindions (**73**)

4.4. Spektroskopische Daten

4.4.1. UV-Absorptions-Spektren

Das Isoxanthopterin (**1**) besitzt in seiner Neutralform eine längstwellige Absorption bei 340 nm, deren Ursache die vinyloge Säureamidstruktur (vgl. Abb.1.10) zwischen 2-NH₂ und der 7-Oxofunktion ist. Deprotonierung an N⁸ stört diese Mesomerie und führt zu einer hypsochromen Verschiebung der längstwelligsten Absorption auf 332 nm, was sich durch die Bildung eines neuen chromophoren Systems (Abb.4.32) erklären läßt. Bei der zweiten Deprotonierung (N³) zeigt das Spektrum hingegen den für Anionenbildung normalerweise erwarteten bathochromen Shift.

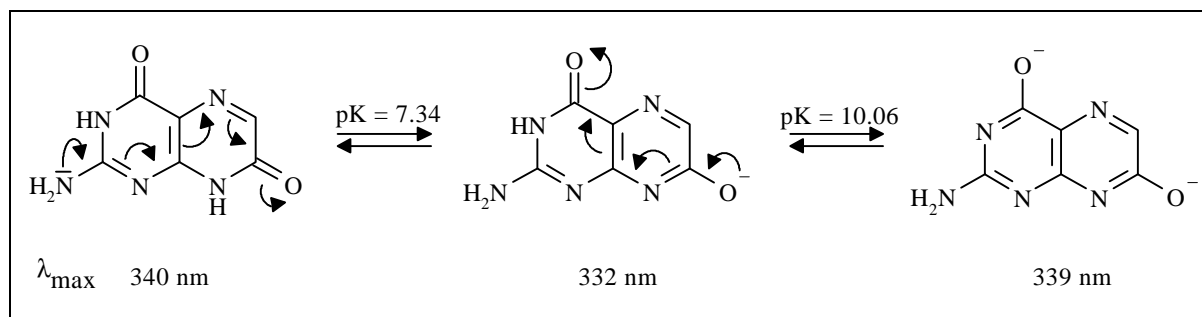


Abb. 4.32 : Hauptchromophore des Isoxanthopterins in Neutral-, Monoanionform, sowie das Dianion

Somit ist bei Substitution oder Derivatisierungen an der 2-Aminofunktion besonders ein Einfluß auf die Absorption der Neutralform zu erwarten (Tab.4.1). Die Einführung der Methylmercaptogruppe (**6**) anstelle der Aminofunktion im Isoxanthopterin (**1**) ergibt nur geringfügige Änderungen.

Nr.	R			Nr.	R		
	R	R'	R''		R	R'	R''
1	-NH ₂	-OH	-H	33	-NMe ₂	-OBn	-H
5	-NH ₂	-OBn	-H	54	-NH ^{ibu}	-OBn	-H
6	-N=CHNMe ₂	-OBn	-H	60	-N=CHNMe ₂	-OBn	-Ph
7	-SCH ₃	-OH	-H	61	-NH ^{ibu}	-OBn	-Ph
9	-NH ₂	-OBn	-Ph				

Nr.	λ_{\max} [nm]				log ϵ				LM/pH		
1	210	286	340		4,48	4,00	4,14		4 ^[128]		
5	209	[231]	277	344	4,65	[4,15]	3,64	4,19	MeOH		
6	209	228	[259]	350	4,43	4,35	[4,05]	4,39	MeOH		
7	220	[244]	295	339	4,34	[3,97]	3,97	4,18	2 ^[137]		
9	209	239	288	370	4,60	4,14	3,85	4,34	MeOH		
33		243	290	362		4,21	3,66	4,23	MeOH		
54	216	[229]	322	332	[349]	4,60	[4,41]	4,19	4,20	[4,05]	MeOH
60	207	243	288	378		4,46	4,05	3,83	4,38	MeOH	
61	216	[227]	287	359		4,55	[4,33]	3,78	4,34	MeOH	

Tab.4.1 : Einfluß der Substitution in Position 2 (R)

Im Vergleich der O⁴-benzylgeschützten Derivate zeigen sich dagegen mehr Unterschiede. Die Derivatisierung der 2-Aminofunktion in **5** zum Isobutyroylamid **54** ergibt einen hypsochromen Shift der länstwelligen Absorption und eine zusätzliche Schulter bei 349 nm. Dagegen führt Dimethylaminosubstitution (Verbindung **33**) zu einer deutlichen bathochromen Verschiebung. Verwunderlich ist allerdings, daß die Blockierung der Aminofunktion durch die dmf-Schutzgruppe beim Vergleich von **5** mit **6** keinen Einfluß auf die Lage der längstwelligen Absorption ausübt. Es wird lediglich eine Intensitätszunahme beobachtet.

In Beispielen der Literatur^[100] finden sich bathochrome Effekte von rund 20 nm. Daher ist anzunehmen, daß die π -Systeme der Dimethylaminomethylenamino-Gruppe und des Pteridins nicht völlig planar zueinander stehen.

Bei den entsprechenden phenylsubstituierten Pteridinen **9**, **60** und **61** dagegen finden sich sowohl beim Isobutyroylamido- (**61**) als auch beim Dimethylaminomethylenamino-Derivat (**60**) die erwarteten Änderungen im Spektrum. **60** zeigt eine bathochrome Verschiebung von allerdings nur knapp 10 nm, die von einer Intensitätszunahme begleitet wird. Für das acylierte Derivat **60** findet sich ein hypsochromer Shift von 10 nm (siehe auch Abb.4.33), der ebenfalls mit höherer Intensität verbunden ist.

Die Einführung eines Phenylsubstituenten in die Position 6 am Isoxanthopterin ergibt nach Renfrew et al.^[140] einen bathochromen Shift um etwa 20-25 nm, was sowohl im Vergleich der 2-aminosubstituierten Pteridine (**5/9**) als auch bei den 2-Methylmercaptoderivaten (**7/10**) festgestellt werden konnte (Tab.4.2). Einen Vergleich der Spektren von 2-Amino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**5**) und 2-Amino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**9**) finden sich in Abb.4.34.

Nr.	λ_{\max} [nm]				log ϵ				LM/pH
5	209	[231]	277	344	4,65	[4,15]	3,64	4,19	MeOH
9	209	239	288	370	4,60	4,14	3,85	4,34	MeOH
7	232	254	336	[348]	4,54	4,21	4,13	[4,08]	11 ^[137]
10	234	[257]		358	4,55	[4,21]		4,29	13

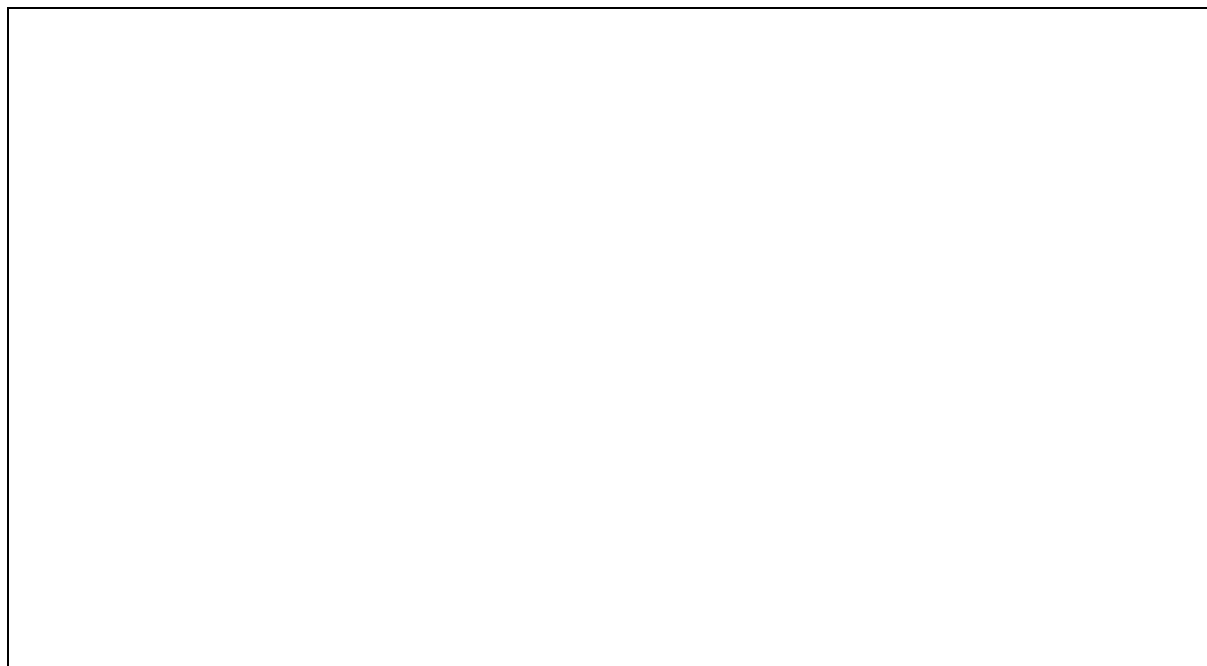
Tab.4.2 : Einfluß der Phenylsubstitution (UV-Daten der 6-H-substituierten Verbindungen **5** und **7** mit ihren entsprechenden 6-phenylsubstituierten Analoga **9** und **10**)

Die Unterscheidung der bei der Gabriel-Isay-Kondensation von 5,6-Diamino-2-methylmercapto-4(3H)-pyrimidinon und Phenylglyoxylsäure entstandenen zueinander isomeren Pteridinderivate **10** und **38** läßt sich am schnellsten über die UV-Spektren treffen. Allgemein läßt sich feststellen, daß die 6-Oxo-Pteridine gegenüber ihren 7-Oxo-Analoga in der Regel eine Rotverschiebung der längstwelligsten Absorption um etwa 40-50 nm mit deutlich geringerer Extinktion aufweisen. Daher können die Strukturen der Pteridine **10** und **38** sowie ihrer 3-Methylderivate **49** und **50** anhand der UV-Spektren zugeordnet werden (Tab.4.3, Abb.4.35/4.36).

Nr.	λ_{\max} [nm]				log ϵ				LM/pH
10	219	[237]	302	362	4,43	[4,20]	3,89	4,37	5
38	214		287	395	4,24		3,96	3,63	5

49	203	290	396	4,18	4,01	3,56	5
50	221	[240]	303 364	4,41	[4,24]	3,96 4,39	5

Tab.4.3 : UV-Daten der 6-Oxo- und 7-Oxo-Pteridine **10, 38, 49** und **50**



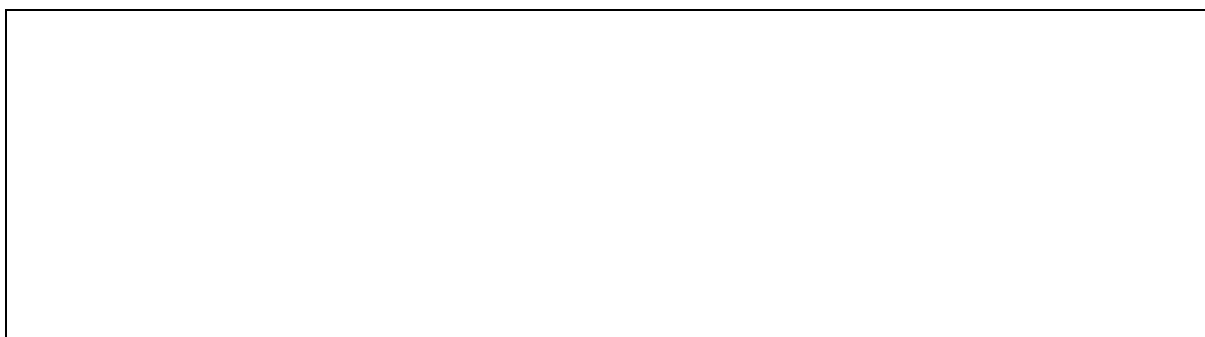
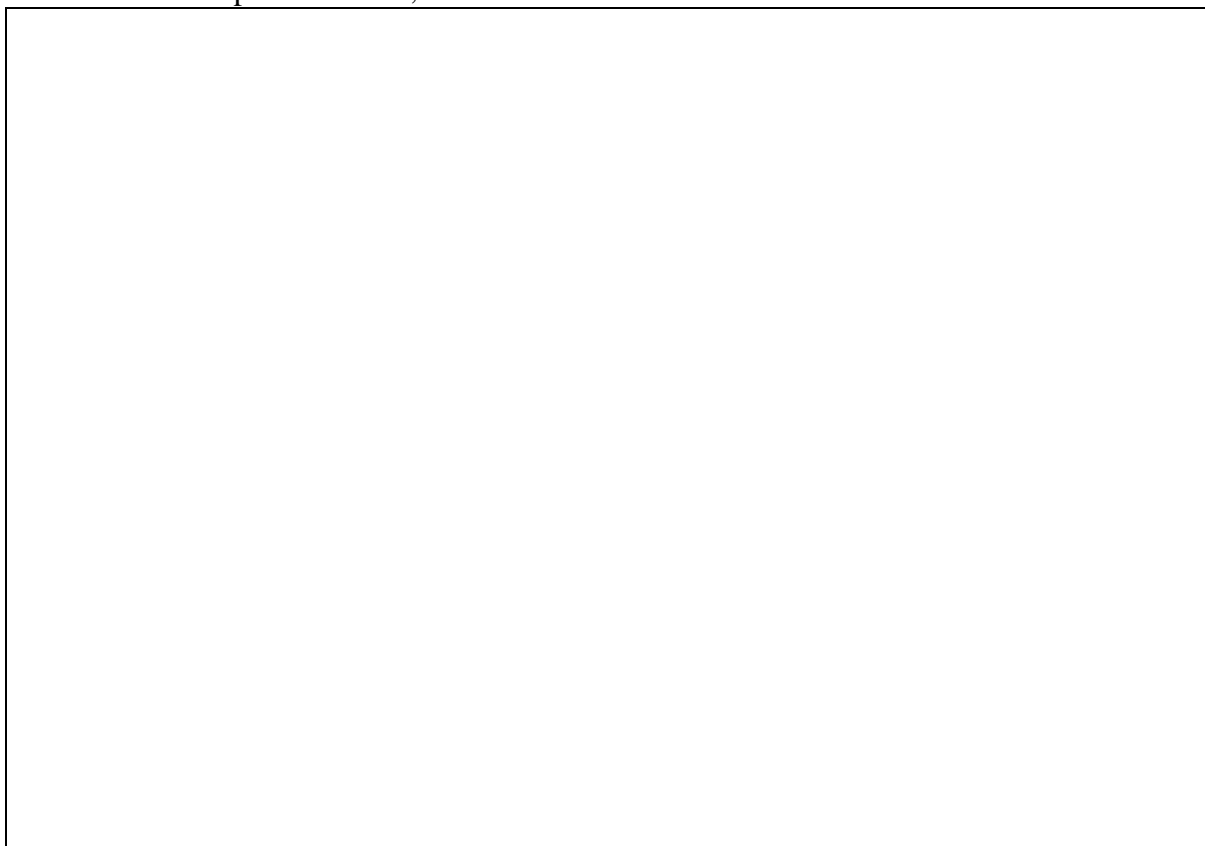


Abb.4.33 : UV-Spektren von **9**, **60** und **61** in MeOH



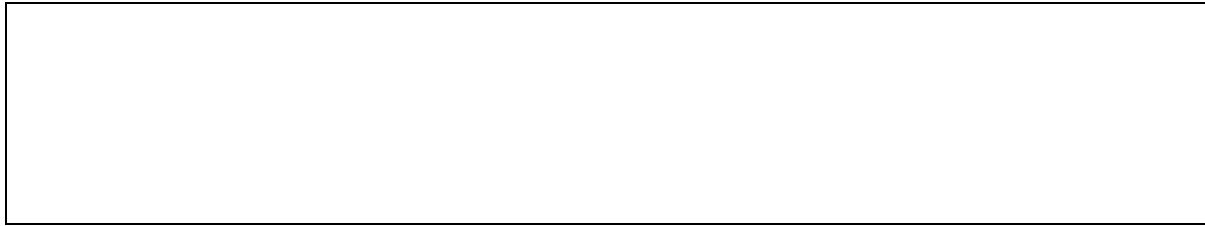


Abb.4.34 : UV-Spektren von **5** und **9** in MeOH; Beispiel für den Einfluß der 6-Phenylsubstitution

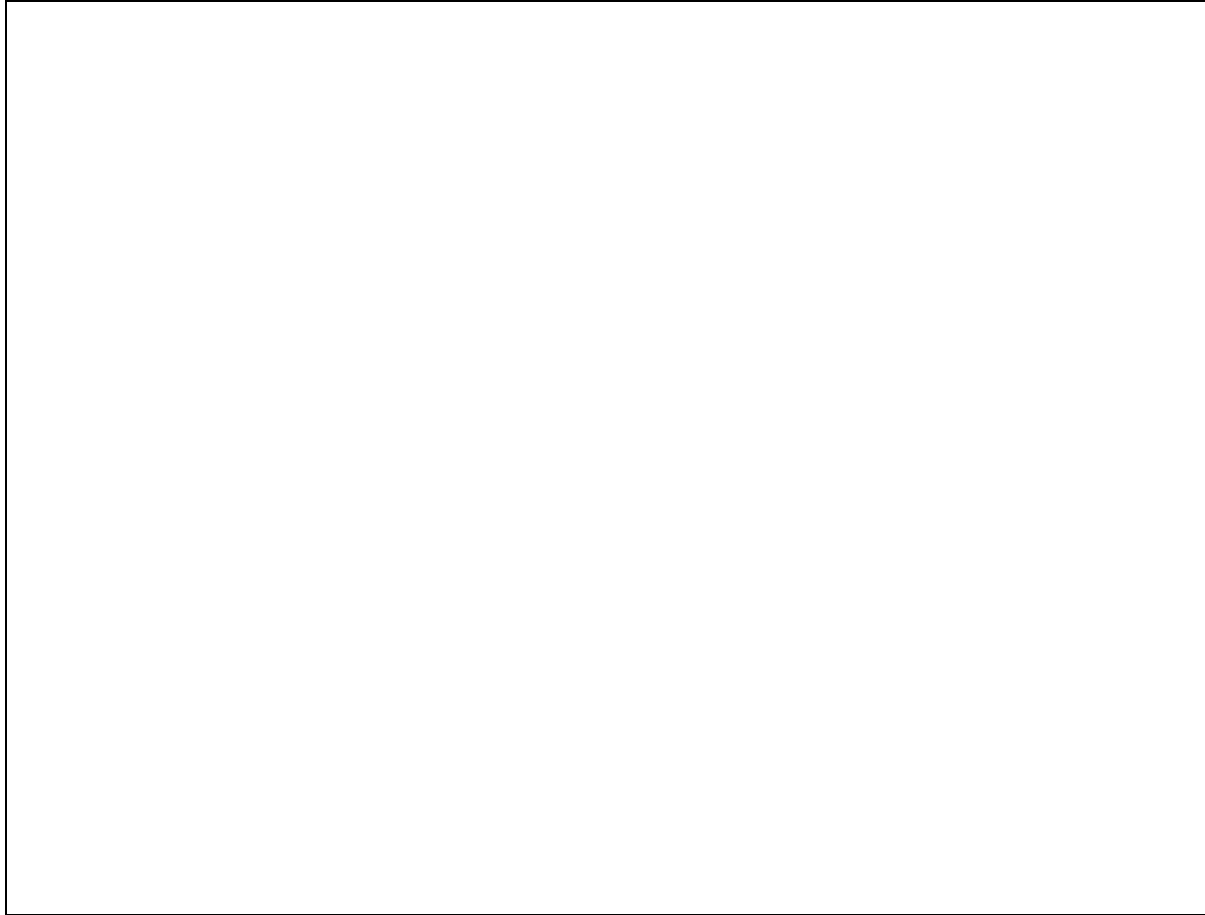




Abb.4.35 : UV-Spektren von **10** und **38** bei pH 5



Abb.4.36 : UV-Spektren der 3-Methylderivate **49** und **50** bei pH 5

4.4.2. pK_a-Werte der phenylsubstituierten Verbindungen **10**, **38**, **49** und **50**

Von den vier phenylsubstituierten 2-Methylmercaptopteridinen (**10**, **38**, **49** und **50**) wurden für spätere Vergleiche die pK_a-Werte bestimmt. Angewandt wurde dabei eine spektrophotometrische Methode, wie sie von Albert und Serjeant beschrieben ist^[169]. Die gemessenen Werte und die entsprechenden Zuordnungen sind in Abb.4.37 zusammengestellt.

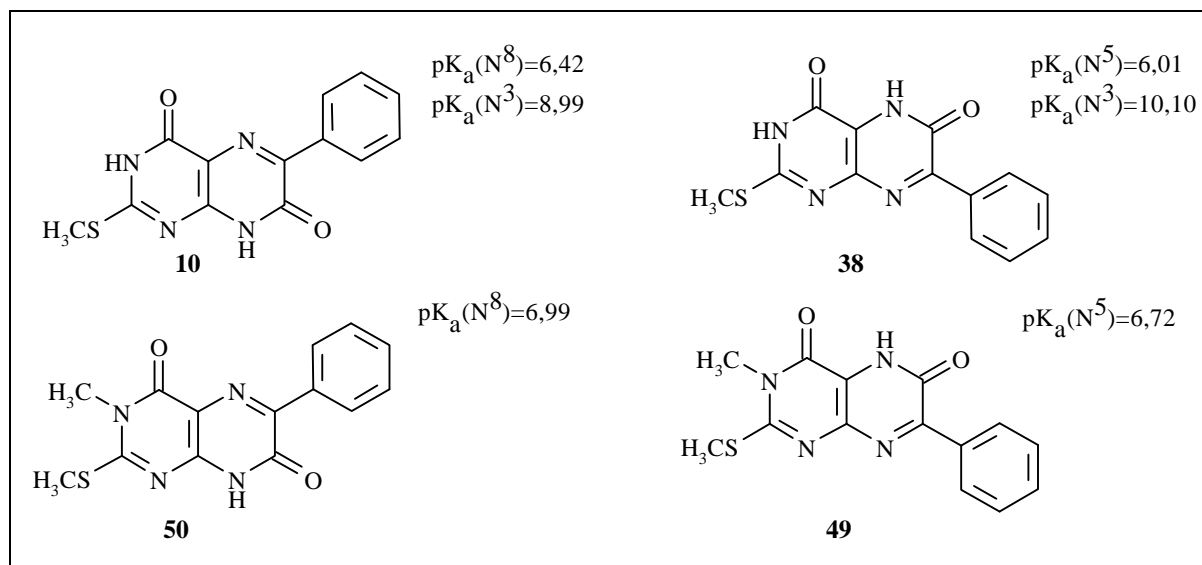


Abb. 4.37 pK_a-Werte von **10**, **38**, **49** und **50**

Vergleicht man mit literaturbekannten pK_a-Daten für 4,6(3H,5H)- bzw. 4,7(3H,8H)-Pteridindione, so bestätigen diese das Ergebnis. In der Regel liegen die pK_a-Werte für die Deprotonierung am Pyrazinteil, also an N⁵ bzw. an N⁸, zwischen 5,5 und 7. Für die Deprotonierung an N³ dagegen werden Werte zwischen 8,5 und 10 gemessen. Die Differenzen zwischen den entsprechenden Konstitutionsisomeren (6-/7-substituiert) sind dabei meist nur sehr gering und lassen sich als brauchbares Kriterium zur Unterscheidung solcher Isomere nicht heranziehen.

Die bei den 3-Methylderivaten gemessenen Werte lagen im Bereich zwischen 5,5 und 7. Für das 6-Phenyl-Isomer **50** fand sich ein Wert von 6,99 (pK_a(N⁸)). Im Falle des 7-Phenyl-Isomers **49** wurde ein pK_a(N⁵)-Wert von 6,72 erhalten.

Entsprechend diesen Werten erfolgte die Zuordnung der Meßergebnisse bei den 3-H-Derivaten, also für das 2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**10**) ($pK_a = 6,03 (N^8) / 8,99 (N^3)$) und das 2-Methylmercapto-7-phenyl-4,6(3H,5H)-pteridindion (**38**) ($pK_a = 6,42(N^5) / 10,10(N^3)$), wie sie in Abb.4.34 aufgeführt sind.

4.4.3. $^1\text{H-NMR-Spektren}$

Die Aufnahme der $^1\text{H-NMR-Spektren}$ der synthetisierten Pteridine erfolgte durchgehend in DMSO, die Zuordnung der Signale durch Vergleich mit der entsprechenden Literatur. Die Spektren weisen kaum Besonderheiten auf und zeichnen sich in der Regel durch ihre Übersichtlichkeit aus. Wie aus Tab.4.4 ersichtlich ist, finden sich in den meisten Fällen charakteristische Daten.

So findet sich eine 2-Aminofunktion bei etwa 7,24 ppm, eine 2-Methylmercaptofunktion bei 2,55-2,65 ppm. Die Signale der dmf-Schutzgruppe erscheinen zwischen 3,07 und 3,19 ppm für die Methylgruppen (ein Signal bei **6**, zwei Signale bei **60**) sowie 8,75 ppm für das Methylenproton. Die Isobutyrylgruppe ergibt ein Singulett bei 10,6 ppm für das N-H, ein Multiplett bei 3 ppm für das Methinproton und ein Dublett bei 1,15 ppm für die Methylgruppen.

In Position 4 nicht blockierte Pteridine liefern ein NH-Signal zwischen 12,9 und 13 ppm bzw. im Fall der N^3 -methylierten Derivate ein CH_3 -Signal bei 3,5 ppm. Eine Benzyl-Schutzgruppe ergibt ein oder zwei Multipletts zwischen 7,6 und 7,3 ppm für die aromatischen Protonen und das 4-O- CH_2 -Signal als Singulett im Bereich von 5,4-5,65 ppm. Interessant dabei ist, daß sowohl die Blockierung der 2-Amino-Funktion mit der dmf-Schutzgruppe wie auch die Einführung des 6-Phenylsubstituenten (vgl. Verbindungen **5**, **6**, **9** und **60**) jeweils eine Tieffeldverschiebung dieses Signals um 0,1 ppm bewirkt. Die anderen beiden O^4 -Schutzgruppen ergaben erwartete Werte, ein Singulett für die Pivaloylfunktion (Verbindung **58**) bei 1,35 ppm und ein Multiplett im Aromatenbereich bei der N,N-Diphenylcarbamoylegruppe (Verbindung **59**).

Das Amidproton des Pyrazinrings (H-(N⁵)/H-(N⁸)) wurde als breites Singulett im Bereich von 11,8 bis 13,4 ppm gefunden. Unterschiede zwischen 5(6H)- / und 7(8H)-Pteridinonen wurden dabei nicht beobachtet. Mit 13,36 ppm am stärksten tieffeldverschoben liegen die Signale bei den 2-Methylmercapto-6-phenyl-O⁴-geschützten Derivaten **58** und **61**.

Bei den 6-H-substituierten Pteridinen findet sich für das H-C(6) ein Singulett zwischen 7,6 und 7,9 ppm. Phenylsubstituierte Derivate ergeben zwei Multipletts bei 8,1 und 7,4 ppm, wobei die Werte bei 7-Phenyl-Pteridinen verglichen mit ihren 6-Phenyl-Isomeren geringfügig tieffeldverschoben liegen.

Bei den Pyrido-[2,3-d]-pyrimidinen **8** und **73** finden sich um etwa 0,6 ppm separierte Werte für die N-H-Resonanzen. Charakteristisch jedoch sind die Dubletts für das H-C(5) und das H-C(6), die bei 7,8 ppm bzw. 6,25 ppm erscheinen.

Nr.	Pos. 2	Pos. 3/4	Pos. 5/8	Pos. 6/7	LM
5	7,20 (2-NH ₂)	7,55-7,30 (H _{Ar} (Bn)) 5,40 (4-O-CH ₂)	12,45 (H-(N ⁸))	7,60 (H-C(6))	DMSO
6	8,75 (2-N=CH-NMe ₂) 3,19 (N(CH ₃) ₂)	7,55-7,30 (H _{Ar} (Bn)) 5,50 (4-O-CH ₂ -)	11,80 (H-(N ⁸))	7,75 (H-C(6))	DMSO
7	2,53 (2-SCH ₃)	12,91 (H-(N ³))	12,91 (H-(N ⁸))	7,83 (H-C(6))	DMSO
9	7,28 (2-NH ₂)	7,59-7,33 (H _{Ar} (Bn)) 5,52 (4-O-CH ₂)	12,56 (H-(N ⁸))	8,13-8,08 (H _{Ar} (6-Ph)) 7,59-7,33 (H _{Ar} (6-Ph))	DMSO
10	2,57 (2-SCH ₃)	12,94 (H-(N ³))	12,94 (H-(N ⁸))	8,26-8,22 (H _{Ar} (6-Ph)) 7,46-7,42 (H _{Ar} (6-Ph))	DMSO
33	3,14 (2-N(CH ₃) ₂)	7,45-7,30 (H _{Ar} (Bn)) 5,46 (4-O-CH ₂)	12,42 (H-(N ⁸))	7,58 (H-C(6))	DMSO
34	2,65 (2-SCH ₃)	3,53 + 3,46 (N-CH ₃)		7,93 (H-C(6))	DMSO
38	2,57 (2-SCH ₃)	12,94 (H-(N ³))	12,94 (H-(N ⁵))	8,26-8,22 (H _{Ar} (7-Ph)) 7,46-7,42 (H _{Ar} (7-Ph))	DMSO
49	2,65 (2-SCH ₃)	3,52 (N ³ -CH ₃)	12,83 (H-(N ⁵))	8,31 (H _{Ar} (7-Ph)) 7,48 (H _{Ar} (7-Ph))	DMSO
50	2,62 (2-SCH ₃)	3,51 (N ³ -CH ₃)	12,90 (H-(N ⁸))	8,29-8,23 (H _{Ar} (6-Ph)) 7,48-7,40 (H _{Ar} (6-Ph))	DMSO
54	10,60 (2-NH ^{ibu}) 3,10-2,91 (CH(CH ₃) ₂) 1,15 (CH(CH ₃) ₂)	7,61-7,29 (H _{Ar} (Bn)) 5,55 (4-O-CH ₂)	? (H-(N ⁸))	7,90 (H-C(6))	DMSO
58	2,66 (2-SCH ₃)	1,38-1,32 (4-OC(CH ₃) ₃)	13,35 (H-(N ⁸))	8,16-8,12 (H _{Ar} (6-Ph)) 7,56-7,49 (H _{Ar} (6-Ph))	DMSO
59	2,57 (2-SCH ₃)	7,59-7,21 (H _{Ar} (N(Ph) ₂))	13,37 (H-(N ⁸))	8,32-8,28 (H _{Ar} (6-Ph)) 7,59-7,21 (H _{Ar} (6-Ph))	DMSO
60	8,78 (2-N=CH-) 3,19 (NCH ₃) 3,07 (NCH ₃)	7,54-7,35 (H _{Ar} (Bn)) 5,65 (4-O-CH ₂ -)	? (H-(N ⁸))	8,13 ((6-Ph)) 7,54-7,35 (H _{Ar} (6-Ph))	DMSO
61	10,63 (2-NH) 3,03-2,90 (CH(CH ₃) ₂) 1,12-1,07 (CH(CH ₃) ₂)	7,63-7,55 (2 H _{Ar} (Bn)) 7,49-7,32 (H _{Ar} (Bn)) 5,59 (4-O-CH ₂ -)	12,96 (H-(N ⁸))	8,21-8,12 (H _{Ar} (6-Ph)) 7,49-7,32 (H _{Ar} (6-Ph))	DMSO
8	2,51 (2-SCH ₃)	12,82 + 12,18 (H-(N ³) bzw. H-(N ⁸))		7,84-7,80 (H-C(5)) 6,25-6,21 (H-C(6))	DMSO
73	3,22-3,12 (2-SCH ₂ -CH ₃) 1,35-1,26 (2-SCH ₂ -CH ₃)	12,73 + 12,15 (H-(N ³) bzw. H-(N ⁸))		7,79-7,75 (H-C(5)) 6,27-6,23 (H-C(6))	DMSO

Tab. 4.4 : ¹H-NMR-Daten der synthetisierten Pteridin-Derivate **5-7**, **9**, **10**, **33**, **34**, **38**, **49**, **50**, **54** und **58-61** und Pyrido-[2,3-d]-pyrimidine **8** und

