

5. NUCLEOSIDSYNTHESEN

5.1. Methoden zur Darstellung von Nucleosiden

Vergleicht man die aus der Literatur bekannten Synthesen zur Glycosidierung heterocyclischer Basen, so lassen sie sich mehrheitlich in drei Klassen unterteilen: die Schmelzkondensationen nach Helferich^[170-173], die Schwermetallsalz-Verfahren nach Koenigs und Knorr^[174], sowie die Silyl-Varianten^[175-178] der Methode von Hilbert und Johnson^[179,180]. Neben diesen Synthesekonzepten werden auch Ringschlußreaktionen N-substituierter Ribosylamine oder Transglycosidierungen zur Nucleosid-Synthese verwendet.

5.1.1. Die Schmelzkondensations-Methode nach Helferich^[170-173]

Auf der Basis einer von Helferich^[170-173] entwickelten Arylglycosidsynthese gelang es Sato et al.^[181] eine Reihe von Purin-Nucleosiden darzustellen. Durch Zusammenschmelzen eines peracylierten Zuckers (tetra-O-Acetyl- β -D-ribose) mit verschiedenen Purin-Derivaten unter Vakuum in Gegenwart katalytischer Mengen p-Toluolsulfonsäure (TsOH) für 10-20 min ließen sich die entsprechenden Purin-N⁹-Nucleoside in Ausbeuten von 3%-74% erhalten.

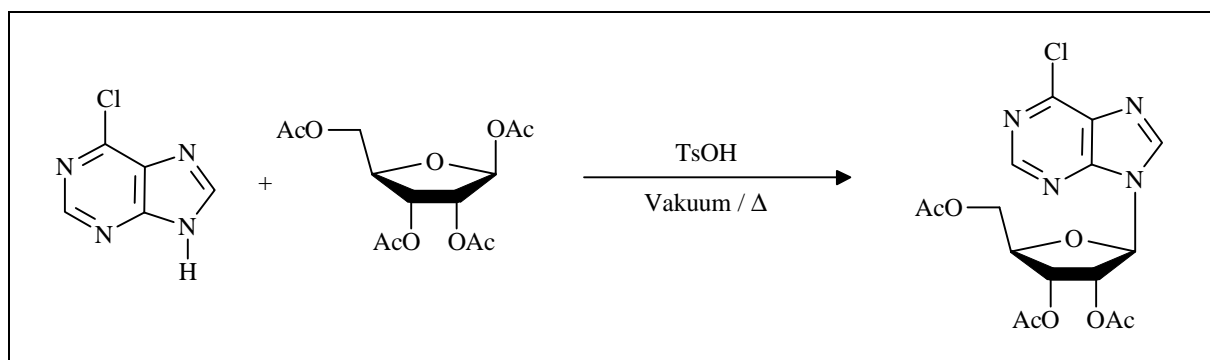


Abb.5.1 : Beispiel einer Schmelzkondensation nach Sato^[181]

Der synthetische Vorteil dieser Methode liegt besonders in der Verwendbarkeit der im Vergleich zu den Halogenosen deutlich stabileren Peracylzucker. Allerdings ist die Anwendbarkeit des Konzeptes sehr beschränkt. In der Regel ergeben nur niedrigschmelzende Purine, wie z.B. das in Abb.5.1 gezeigte 6-Chlorpurin, Ausbeuten über 40%, während hydroxy- und aminosubstituierte Purine, sowie Pyrimidine und Pteridine mit hohen Schmelzpunkten zu schlechten Resultaten führen.

Anstelle von TsOH wurden später auch andere Lewissäuren wie $ZnCl_2$ ^[182] und $AlCl_3$ ^[183], oder SO_3 ^[183] als Katalysatoren eingesetzt. In einigen Fällen reicht bereits die geringe Acidität der Purin-Derivate aus, um die Reaktion auch ohne zusätzlichen Katalysator durchführen zu können. Hochschmelzende Heterocyclen lassen sich nach Überführung in die entsprechenden

acetylierten oder silylierten Derivate glycosidieren, dennoch konnte sich das Helferich-Verfahren nicht durchsetzen und findet heute vergleichsweise selten Anwendung.

5.1.2. Die Koenigs-Knorr-Methode^[174]

Bei der Behandlung von Acetobromglucose in Methanol mit Silber-(I)-carbonat erhielten Koenigs und Knorr 1901 das Methyl- β -D-glucose-tetraacetat^[174]. Fischer und Helferich^[184] übertrugen diese Methode auf verschiedene chlosubstituierte Purine (siehe Abb.5.2) und konnten auf diesem Weg erstmals synthetische Nucleoside darstellen.

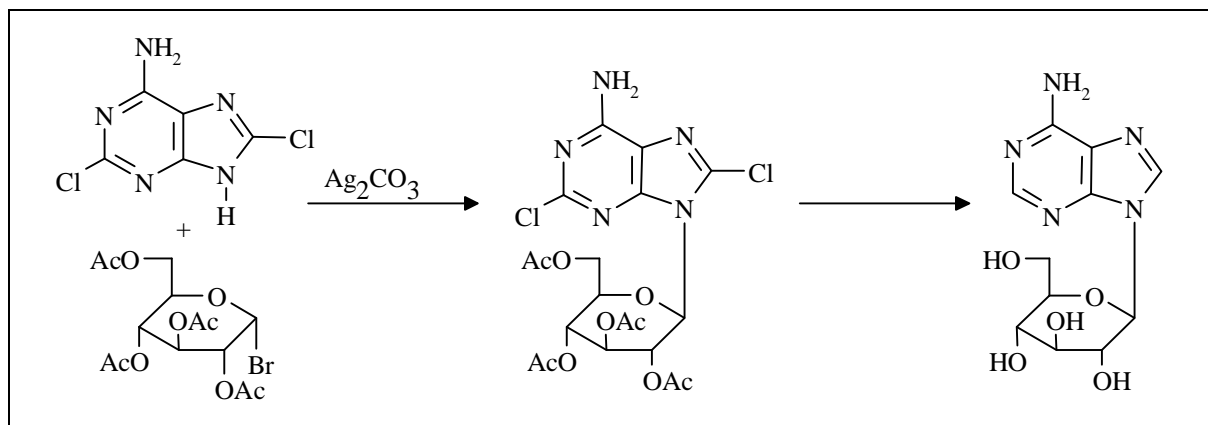


Abb.5.2 : Synthese von N⁹- β -D-(Glucopyranosyl)-adenin nach Fischer und Helferich^[184]

Dieses klassische Verfahren besitzt zumeist nur geringe Glycosidierungsraten und ist nicht auf Pyrimidine übertragbar. Levene und Sobotka erhielten bei entsprechenden Versuchen ausgehend von Pyrimidinonen bzw. -thionen keine N-, sondern die labilen O- bzw. S-Glycoside^[185]. Die entscheidende Verbesserung dieser Methode erreichten Davoll und Lowy^[186-188], indem sie anstelle der Silber- die entsprechenden Quecksilbersalze der Purin-Basen einsetzten. Fox et al.^[189] konnten später zeigen, daß die Verwendung von Quecksilbersalzen auch die Darstellung von Pyrimidin-N-Glycosiden erlaubt, womit sich synthetische Zugangsmöglichkeiten zu den natürlich vorkommenden Nucleosiden Thymin, Uridin und Cytidin eröffneten.

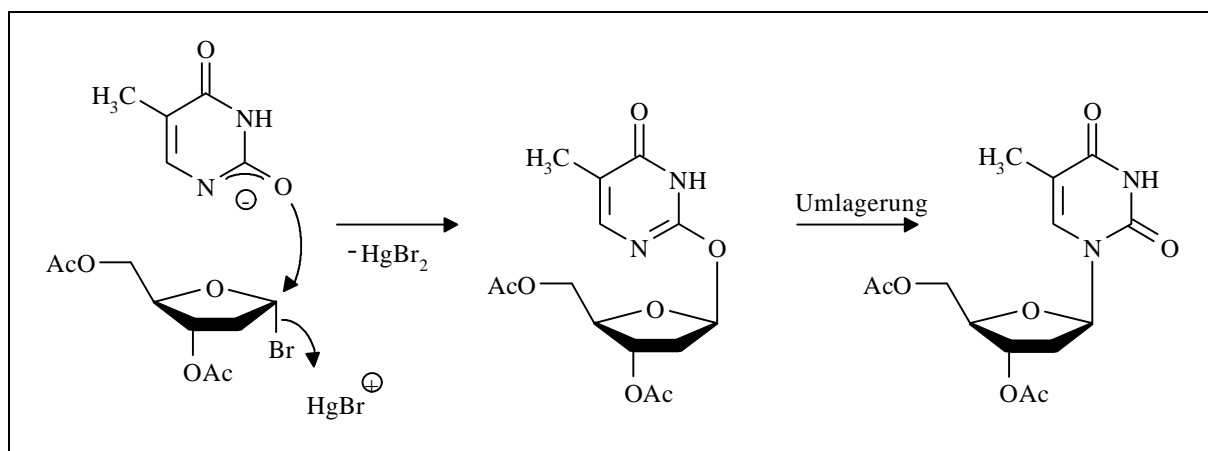


Abb.5.3 : Quecksilber-Verfahren nach Davoll und Lowy^[186-188]

Mechanistische Studien der Arbeitsgruppe von Ulbricht^[190-192] belegen, daß bei Glycosidierung von Pyrimidinonen über Hg-salze zuerst in einer kinetisch kontrollierten S_N2-Reaktion die O-Glycoside gebildet werden, die sich anschließend unter Quecksilber-Katalyse in die thermodynamisch stabileren N-Glycoside umlagern (Abb.5.4). Das große Manko des Verfahrens ist allerdings die Verwendung des hochtoxischen Quecksilbers, das besonders bei der Synthese potentiell biologisch aktiver Verbindungen vermieden werden sollte.

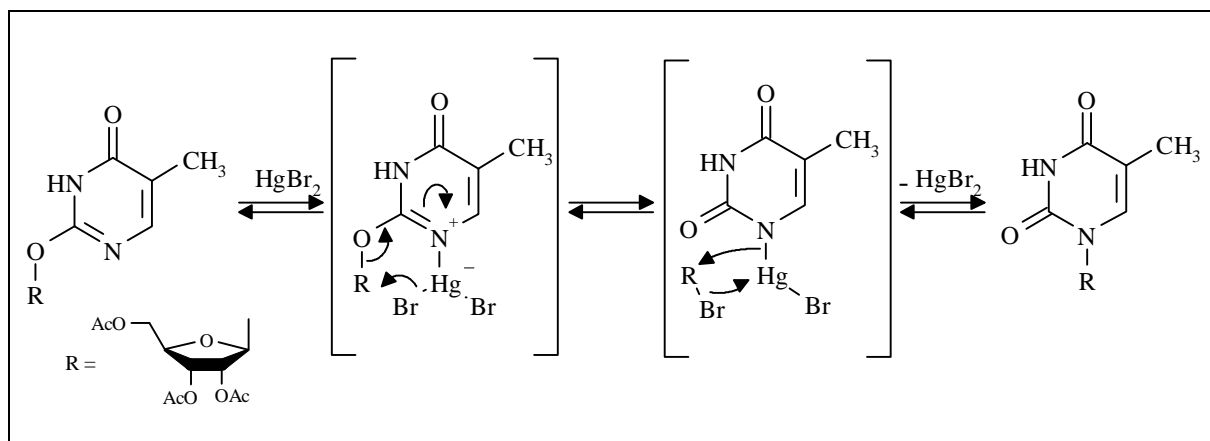


Abb.5.4 : Quecksilber-katalysierte Umlagerung nach Ulbricht^[190-192]

Dem gleichen Prinzip folgen auch zwei vergleichsweise neue Varianten der Nucleosid-Synthese, die Natriumsalz-Methode von Kazimierczuk et al.^[193] und das Phasentransferverfahren von Seela^[194-196], die beide zur Darstellung von Purin-N⁹-2'-desoxyribosiden entwickelt wurden. Anstelle der Hg- oder Ag-salze verschiedener chloresubstituierter Purine und Purin-Analoga verwendete Kazimierczuk^[193] die Natriumsalze, welche sich einfach durch Behandlung der Base mit Natriumhydrid in Acetonitril erhalten lassen. Zugabe einer Halogenose (1-Chlor-2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl- α -D-ribofuranose^[197,198]) bei 50°C führte zur Bildung der N⁹- β -D-Nucleoside in Ausbeuten zwischen 32 und 82%.

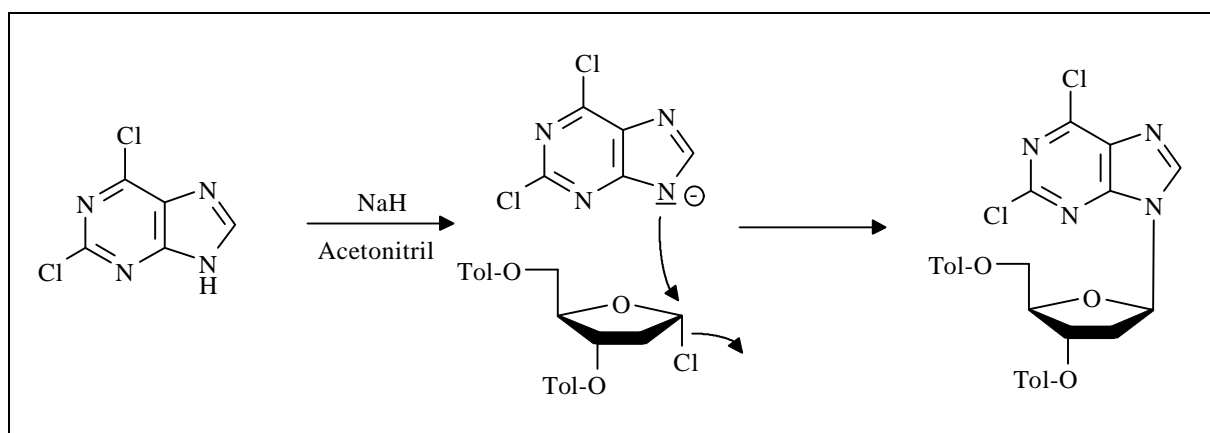


Abb.5.5 : Natriumsalz-Verfahren nach Kazimierczuk et al.^[193]

Bei dem Verfahren nach Seela^[194-196] wird der Heterocyclus in einem Zweiphasensystem aus 50%-iger NaOH und Methylenchlorid mit der Halogenose umgesetzt. Als Transferkatalysatoren dienen quaternäre Ammoniumsalze, wobei Ausbeuten der entsprechenden N⁹-β-D-Nucleoside zwischen 7 und 47% erreicht werden konnten.

Besonders das letztgenannte Verfahren ist interessant, da hier ein in organischen Solventien lösliches quaternäres Ammoniumsalz gebildet wird. Auf diese Weise lassen sich aus der Lösung heraus sehr kurze Reaktionszeiten erreichen. Dabei wird die mögliche Anomerisierung oder Hydrolyse der Halogenose verhindert und somit bevorzugt in einer nucleophilen Substitutionsreaktion (S_N2) das β-Anomere gebildet.

5.1.3. Die Hilbert-Johnson-Methode^[179,180] und ihre Silylvarianten^[175-178]

1930 zeigten Hilbert und Johnson^[179], daß bei der Umsetzung von 2,4-Dialkoxypyrimidinen mit Alkylhalogeniden das N¹-alkylsubstituierte Pyrimidin entsteht (Abb.5.6).

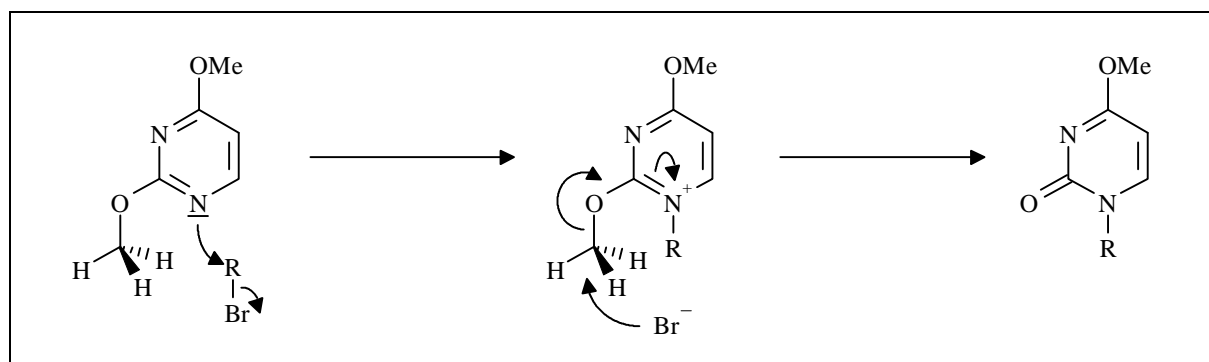


Abb.5.6 : Die Hilbert-Johnson-Reaktion^[179]

In Erweiterung dieser Arbeiten gelang ihnen durch Verwendung von Acetobromglucose als „Alkylierungsreagenz“ die Synthese der N¹-β-D-glucoside des Uracils^[199] und des Cytosins^[180]. Obwohl auf diesem Wege eine Vielzahl von Nucleosiden dargestellt wurde, hatte das Verfahren neben oftmals geringen Ausbeuten weitere gravierende Nachteile. Die Dialkoxypyrimidine sind schwer zugänglich, in manchen Fällen erwies sich die Dealkylierung der Produkte als problematisch^[200] und die Methode ließ sich nicht auf 6-substituierte Pyrimidine anwenden^[201-203]. Die meisten dieser Probleme kann man durch Verwendung der entsprechenden O-Silyl-derivate der heterocyclischen Basen umgehen, wie es parallel von Nishimura und Iwai^[175,176], sowie von Birkofer et al.^[177,178] berichtet wurde. Diese Silylierung erfolgt in einfacher Weise durch Umsetzung mit HMDS oder anderen Silylierungsreagentien.

In umfangreichen Arbeiten untersuchte Wittenburg^[204,205] den Einfluß von Lösungsmitteln und Katalysatoren auf die Hilbert-Johnson-Reaktion. Die besten Ergebnisse erbrachten Synthesen in absoluten, inerten Solventien unter Silberperchlorat-^[206,207] oder Quecksilbersalz-

Katalyse^[205,208]. Dabei bewirken die Schwermetalle die Dehalogenierung des Zuckers und erleichtern so den nucleophilen Angriff der heterocyclischen Base an der Halogenose.

Die wohl gängigste Variante der Hilbert-Johnson-Reaktion wurde von Vorbrüggen und Niedballa^[209-213] entwickelt. Bei der Umsetzung von peracetylierten Zuckern oder Halogenosen mit silylierten Heterocyclen verwendeten sie anstelle der Schwermetall-Salze Lewisäuren als Katalysatoren. Der Einsatz von SnCl₄, TiCl₄, Trimethylsilyltriflat oder auch Trimethylsilylperchlorat^[214] ermöglicht die Nucleosidsynthese in homogener Reaktion in oftmals sehr guten Ausbeuten. Aus diesen Gründen setzte sich dieses Verfahren generell durch und bildete über viele Jahre die Methode der Wahl bei Glycosidierungsreaktionen an Heterocyclen.

5.1.4. Selektivität bei der Glycosidierung von 7(8H)-Pteridinonen

Die Reaktion eines 7(8H)-Pteridinons mit einem 2-Desoxy-D-ribofuranosyl-halogenid birgt drei Hauptprobleme: die Löslichkeit des Pteridins, sowie die Regio- und Stereoselektivität der Synthese. Durch Einführung von Schutzgruppen am Pyrimidinring des Pteridinsystems kann sowohl dessen Löslichkeit gesteigert als auch eine gewisse Regioselektivität erreicht werden. Dennoch bietet die freie Lactamfunktion am Pyrazinring als ambidenten Nucleophil immer noch die Möglichkeit zur Bildung von N⁸- und 7-O-Glycosiden. Wegen des fehlenden Nachbargruppeneffekts einer 2'-O-Acyfunktion, welcher im Fall der D-Ribose zur bevorzugten Ausbildung von β -Glycosiden führt^[215-217], ergeben Reaktionen mit 2-Desoxy-D-ribose-Derivaten zudem Mischungen aus α - und β -konfigurierten Nucleosiden (Abb.5.7). Die Halogenose kann sowohl von der Unter- als auch von der Oberseite her angegriffen werden, da keine sterische Abschirmung vorliegt. Aus diesen Gründen sind bei derartigen Synthesen vier Isomere zu erwarten, von denen jedoch nur das β -N⁸-Isomer von Interesse ist.

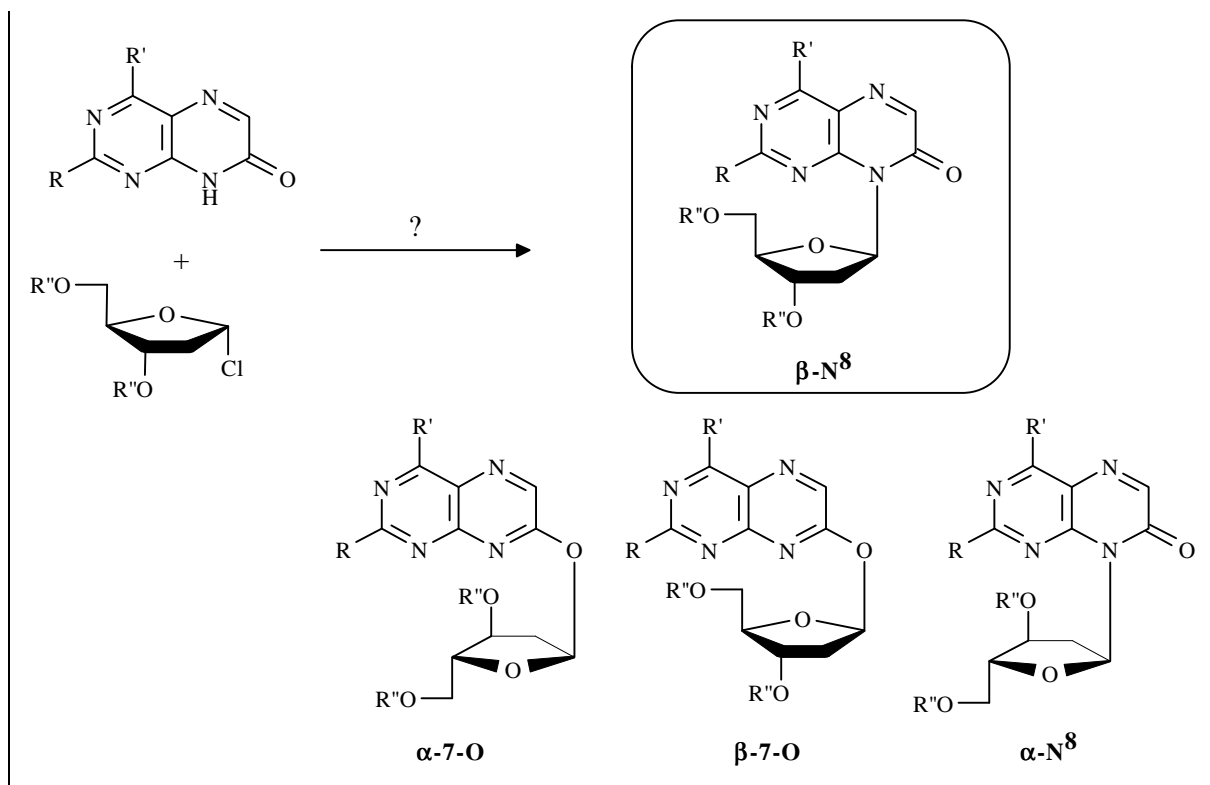


Abb.5.7 : Problemstellung bei der Glycosidierung eines 7(8H)-Pteridinons

Für die erfolgreiche Darstellung der benötigten Pteridin-Nucleoside sind daher Methoden nötig, welche bevorzugt zur Bildung des in Abb.5.7 hervorgehobenen $\beta\text{-N}^8$ -Anomeren führen, also Reaktionen die sowohl regio- als auch stereoselektiv ablaufen.

In einer Variation des Natriumsalz-Verfahrens von Kazimierczuk^[193] gelang es Jungmann und Pfeleiderer^[218] einen Weg zu finden, der dieses Problem bei den 7(8H)-Pteridinonen löst (Abb.5.8). Anstelle von Natriumhydrid wird dabei das 1,8-Diaza-bicyclo-[5,4,0]-7-undecen (DBU, (**74**)) zur Deprotonierung der heterocyclischen Base verwendet. Das Pteridin wird in abs. Acetonitril suspendiert und mit 1-1,25 Äquivalenten DBU versetzt. Das entstehende DBU-Salz ist ähnlich wie die Ammoniumsalze von Seela^[190-192] in organischen Solventien gut löslich, daher kann das Pteridinanion aus der Lösung heraus mit der eingesetzten α -Halogenose reagieren. Die Vorteile dieses Verfahrens sind daher kurze Reaktionszeiten und ein gutes Anomerenverhältnis.

In einer Reihe von Beispielen konnte mittlerweile gezeigt werden, daß speziell bei der Glycosidierung von 7(8H)-Pteridinonen in einer hochgradig stereo- und regioselektiven Reaktion bevorzugt die $\beta\text{-N}^8$ -Isomeren gebildet werden. Verglichen mit den bekannten Verfahren erwies sich die Methode in den meisten Fällen als überlegen.

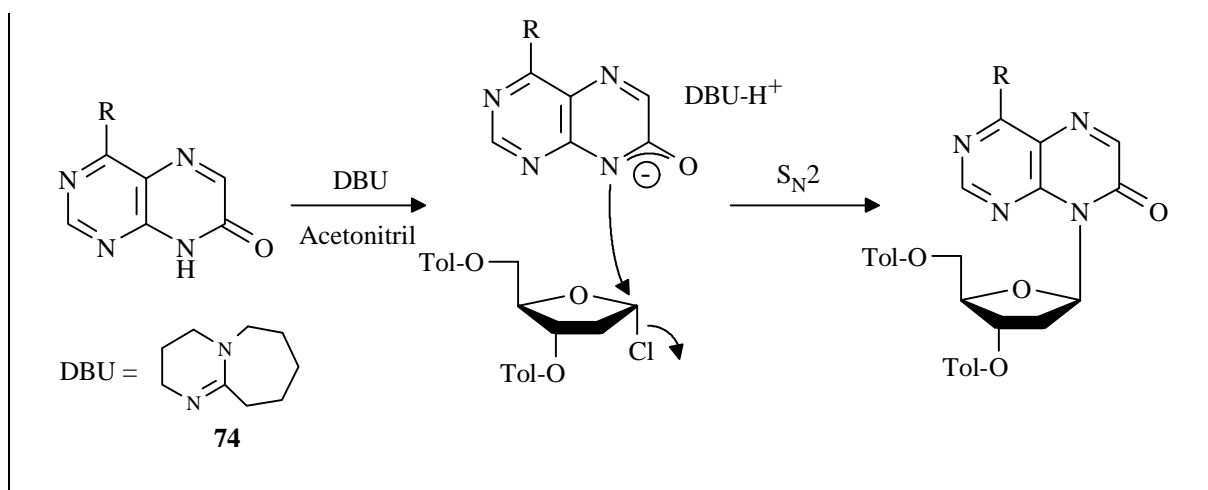


Abb.5.8 : „DBU-Verfahren“ nach Jungmann und Pfeleiderer^[218]

Anstelle von Acetonitril lassen sich auch Dichlormethan oder DMF, als starke Base auch Hünig's Base oder DBN mit ähnlich guten Ergebnissen verwenden^[101], dennoch wird die Methode im Folgenden als „DBU-Verfahren“ bezeichnet.

5.2. Glycosidierung der heterocyclischen Basen

Zur Synthese eines Isoxanthopterin-N⁸-Ribosids folgten sowohl Schmid^[96,110] ausgehend vom 2-Amino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**5**) als auch Kyriases^[110,111] bei den Versuchen über das 2-Methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion (**7**) der Silyl-Hilbert-Johnson-Methode zur Glycosidierung der Pteridin-Derivate.

Bereits während meiner Diplomarbeit^[101] hatte sich gezeigt, daß das „DBU-Verfahren“ nach Jungmann und Pfeleiderer^[218] bei den vorliegenden 7(8H)-Pteridinon-Derivaten aus der Isoxanthopterin-Reihe dem Silyl- und auch den anderen Verfahren deutlich überlegen ist.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Pteridin-Derivate **6**, **7**, **9**, **10**, **33**, **54**, **58** und **60**, sowie das 5-Deaza-Pteridin **73** (Abb.5.9) ohne Ausnahme über diese Reaktion glycosidiert.

	R	R'	R''		R	R'	R''	
	6	-N=CH-NMe ₂	-OBn	-H	33	-NMe ₂	-OBn	-H
	7	-SCH ₃	-OH	-H	54	-NH ⁱ But	-OBn	-H
	9	-NH ₂	-OBn	-Ph	58	-SCH ₃	-O-piv	-Ph
	10	-SCH ₃	-OH	-Ph	60	-N=CH-NMe ₂	-OBn	-Ph

Abb.5.9 : Pteridin-Edukte für die Nucleosid-Synthesen

Aufgrund der schlechten Ausbeuten während der Heterocyclensynthesen bzw. während der Einführung der zusätzlichen Schutzgruppen wurden ausgehend von den Verbindungen **8**, **59** und **61** keine Glycosidierungsversuche durchgeführt.

5.2.1. Die Zuckerkomponenten

Als Zuckerkomponente fanden bei den Glycosidierungen 3,5-di-O-acylierte 2-Desoxy- α -D-ribofuranosylchloride Verwendung. Zu Beginn wurde ausschließlich das 3,5-di-O-p-Toluoyl-2-desoxy- α -D-ribofuranosylchlorid (**75**) von Hoffer^[197] bzw. Bhat^[198] eingesetzt. Es zeigte sich jedoch, daß das entsprechende p-Chlor-benzoyl-Derivat **76**^[105] wegen seiner guten Kristallisationseigenschaften die gleichen und teilweise auch bessere Ergebnisse erbrachte. So kristallisierte das Hauptprodukt der Glycosidierungsreaktion des 2-N,N-Dimethylamino-methylenamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinons (**6**) bereits fast vollständig aus dem Reaktionsgemisch aus und mußte nicht über chromatographische Methoden gereinigt und isoliert werden.

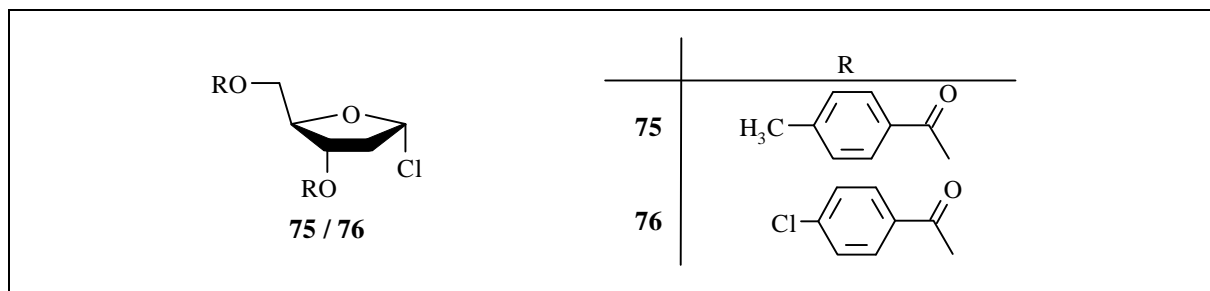


Abb.5.10 : Die zur Glycosidierung verwendeten Halogenosen **75** und **76**^[105,197,198]

Die Synthese von **75** und **76** (Abb.5.11) beginnt entsprechend der Literatur^[197,198] bei der 2-Desoxy-D-ribose (**77**), die zuerst unter Säurekatalyse in das 1-O-Methyl-2-desoxy-D-ribofuranosid (**78**) überführt wird. Nach Acylierung der verbleibenden Hydroxylfunktionen in Pyridin mit dem entsprechenden Säurechlorid, wobei der Aufarbeitungsschritt ein wenig modifiziert wurde, erfolgt die Einführung des Chlors durch Behandlung mit HCl in Eisessig. Die Halogenosen **75** und **76** werden in 65-73 % Ausbeute (Lit.: 70-86%) kristallin erhalten und fallen aufgrund elektronischer Wechselwirkungen zwischen dem Ringsauerstoff und dem Chloratom (anomerer Effekt) bevorzugt in der energetisch günstigeren α -Form an.

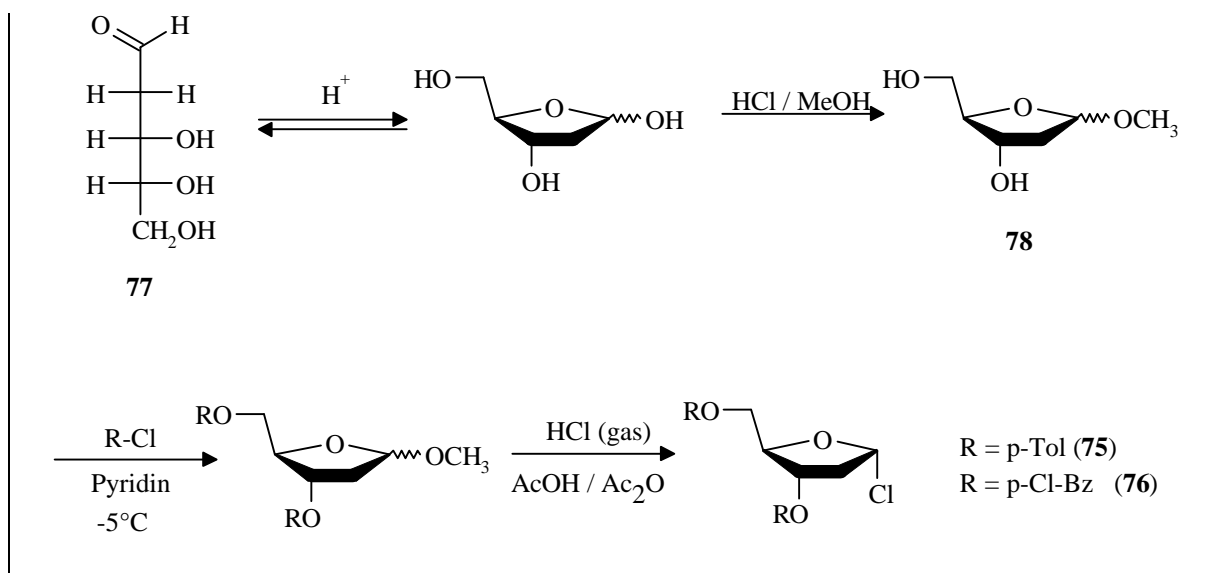


Abb.5.11 : Synthese der Halogenosen **75** und **76**^[197,198]

Auch wenn gelegentlich auf die Instabilität dieser Zucker hingewiesen wird, lassen sie sich bei tiefen Temperaturen ohne Einbußen an Reaktivität über mehrere Monate lagern. Bedingung ist, daß die Kristalle am Ende der Synthese gründlich mit trockenem Ether gewaschen und anschließend für mindestens 1 Woche über KOH/P₂O₅ im Exsikkator getrocknet werden, um die letzten Reste an Wasser und Essigsäure zu entfernen.

5.2.2. Glycosidierung der Pteridin-Derivate

Nach einer allgemeinen Vorgehensweise (vgl. Abb.5.8) wurden die Pteridine in absolutem Acetonitril suspendiert und mit 1,1 Äquivalenten DBU (**74**) pro freier Lactamfunktion versetzt. In einigen Fällen mußte die Menge an zugesetzter Base noch etwas erhöht werden um vollständige Lösung zu erreichen. Nach Zugabe der α -Halogenose **75** bzw. **76** und Reaktionszeiten zwischen 30 und 150 min konnten die entsprechenden N⁸-Nucleoside über chromatographische Methoden isoliert werden.

Größere Abweichungen von dieser allgemeinen Arbeitsweise wurden nur in zwei Fällen vorgenommen. Bei der Glycosidierung des 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinons (**6**) mit dem p-chlorbenzoyl-geschützten Zucker **76** konnte die chromatographische Reinigung entfallen. Das Produkt kristallisierte direkt aus dem Reaktionsgemisch, wobei das 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy- β -D-ribofuranosyl]-7(8H)-pteridinon (**79**) nach Umkristallisation in 48% Ausbeute erhalten werden konnte (Abb.5.12).

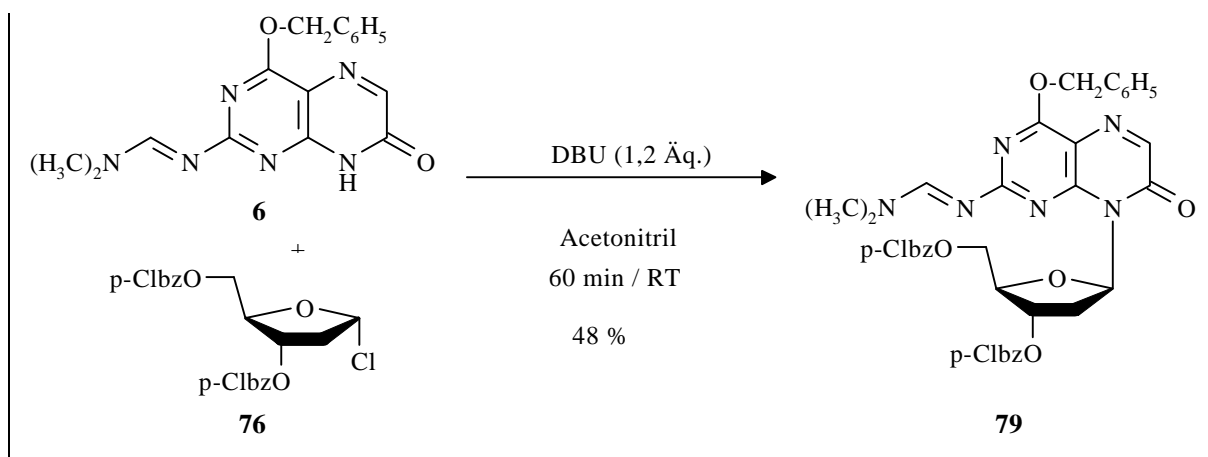


Abb.5.12 : Glycosidierung des 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinons (**6**)

Im Fall des 2-Methylmercapto-6-phenyl-4-pivaloyloxy-7(8H)-pteridinons (**58**) ließ sich bereits während der Glycosidierung eine teilweise Abspaltung der Pivaloylschutzgruppe beobachten. Gleiches wurde bereits bei der analogen 6-Methylverbindung von Melguizo^[154] berichtet. Aus diesem Grund wurde das Rohprodukt dieser Glycosidierungsreaktion an **58** zuerst einer Entschützung der O⁴-Position mit methanolischem Ammoniak unterworfen. Anschließend wurde das entschützte Produkt **80** säulenchromatographisch gereinigt. Das N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-6-phenyl-4-pivaloyloxy-7(8H)-pteridinon (**80**) konnte auf diesem Weg in 54 % Ausbeute gewonnen werden (Abb.5.13).

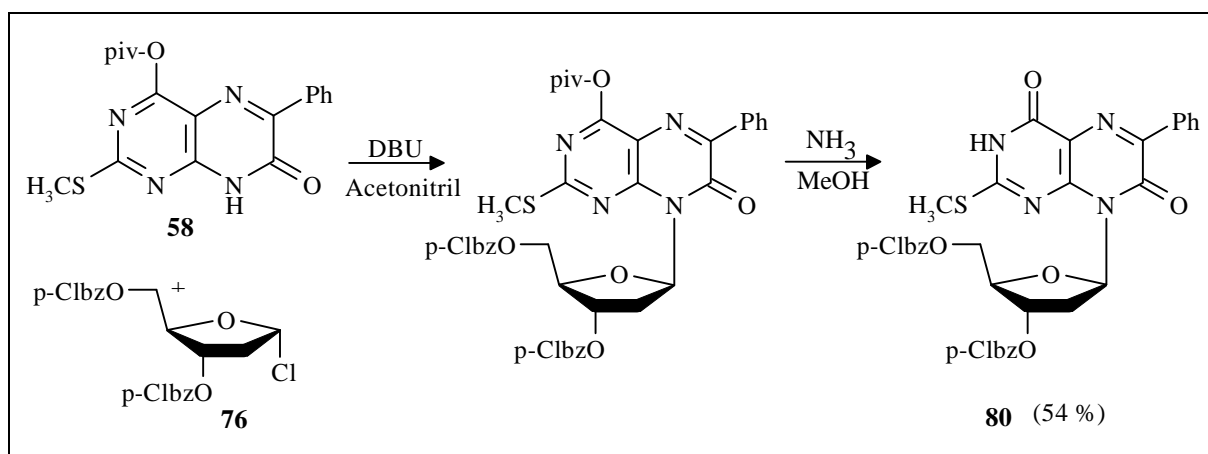


Abb.5.13 : Glycosidierung von 2-Methylmercapto-6-phenyl-4-pivaloyloxy-7(8H)-pteridinon (**58**) mit nachfolgender Entschützung durch methanolischen Ammoniak

Bei allen Pteridin-Glycosidierungen ließ sich als Hauptprodukt das β-Anomer isolieren, nur im ¹H-NMR des Rohproduktes konnte über die charakteristische Lage der 2'-Protonen-Signale meist auch das entsprechende α-Anomer nachgewiesen werden. Lediglich in einem Fall, bei der Glycosidierung des 2-Isobutyroylamido-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinons (**54**) ließ sich das α-Anomer neben dem β-Glycosid rein isolieren. So ergab die säulenchromatographische Aufarbeitung des Reaktionsgemisches 15 % 2-Isobutyroylamido-4-benzyloxy-8-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-α-D-ribofuranosyl]-7(8H)-pteridinon (**81**) neben 57 % des als Hauptprodukt

anfallenden 2-Isobutyroylamido-4-benzyloxy-8-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl- β -D-ribofuranosyl]-7(8H)-pteridinons (**82**) (Abb.5.14).

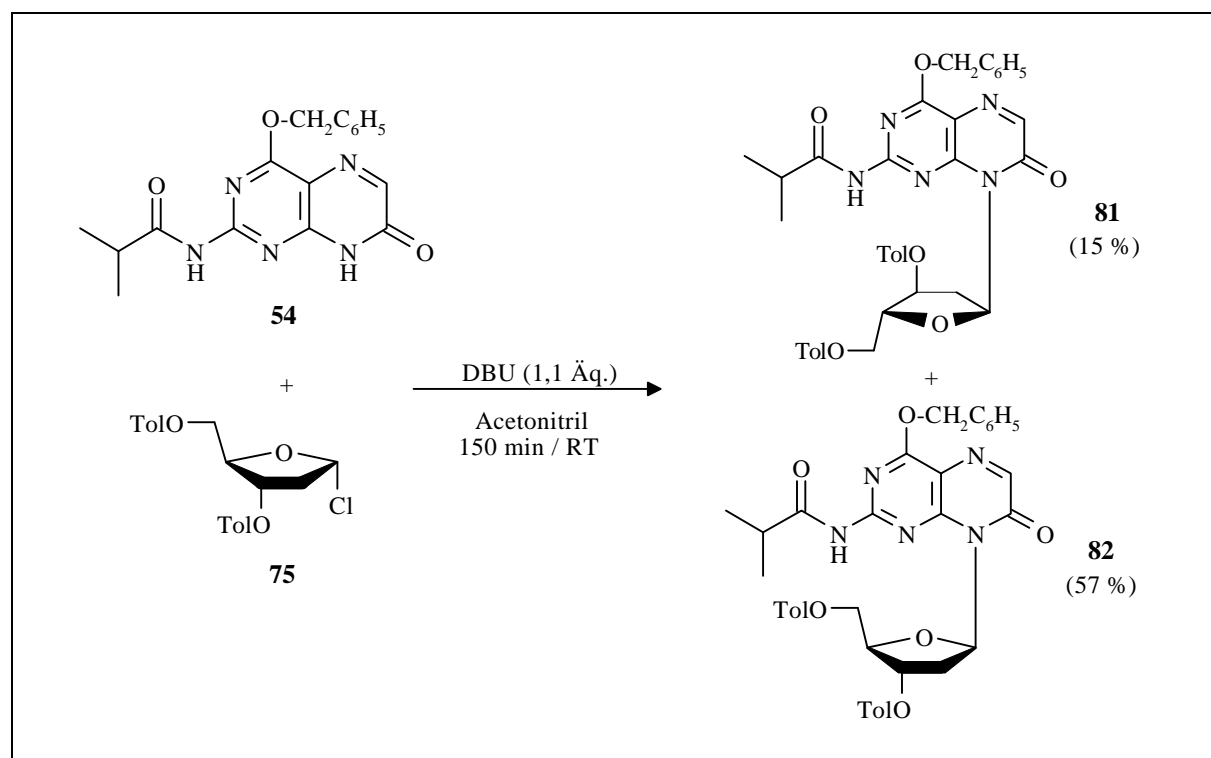


Abb.5.14 : Glycosidierung des 2-Isobutyroylamido-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinons (**54**)

Eine Zusammenstellung aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Glycosidierungsreaktionen an Pteridin-Derivaten, den dabei erhaltenen Produkten, den Reaktionsbedingungen und Ausbeuten findet sich nachstehend in Tab.5.1 und Abb.5.15.

Edukt	DBU (Äq.)	Zucker (Äq.)	Zeit [min]	Produkt	Ausbeute	Bemerkungen
6	1,2	75 (1)	30	79	49 %	
6	1,2	76 (1)	60	83	48 %	Produkt kristallisiert während der Reaktion aus
7	2,5	76 (0,9)	60	84	32 %	
9	1,1	76 (1)	60	86	30 %	
10	2,2	76 (0,9)	60	80	30 %	
33	1,1	75 (1)	60	85	45 %	schlechte Anomerentrennung,
54	1,1	75 (1,1)	150	81	15 %	α -Anomer
54	1,1	75 (1,1)	150	82	57 %	β -Anomer
58	1	76 (1)	60	80	54 %	zusätzliche Behandlung mit NH ₃ /MeOH (10min)

60	1,1	76 (1)	60	87	32 %	
-----------	-----	---------------	----	-----------	------	--

Tab.5.1 : Glycosidierungen der Pteridinderivate

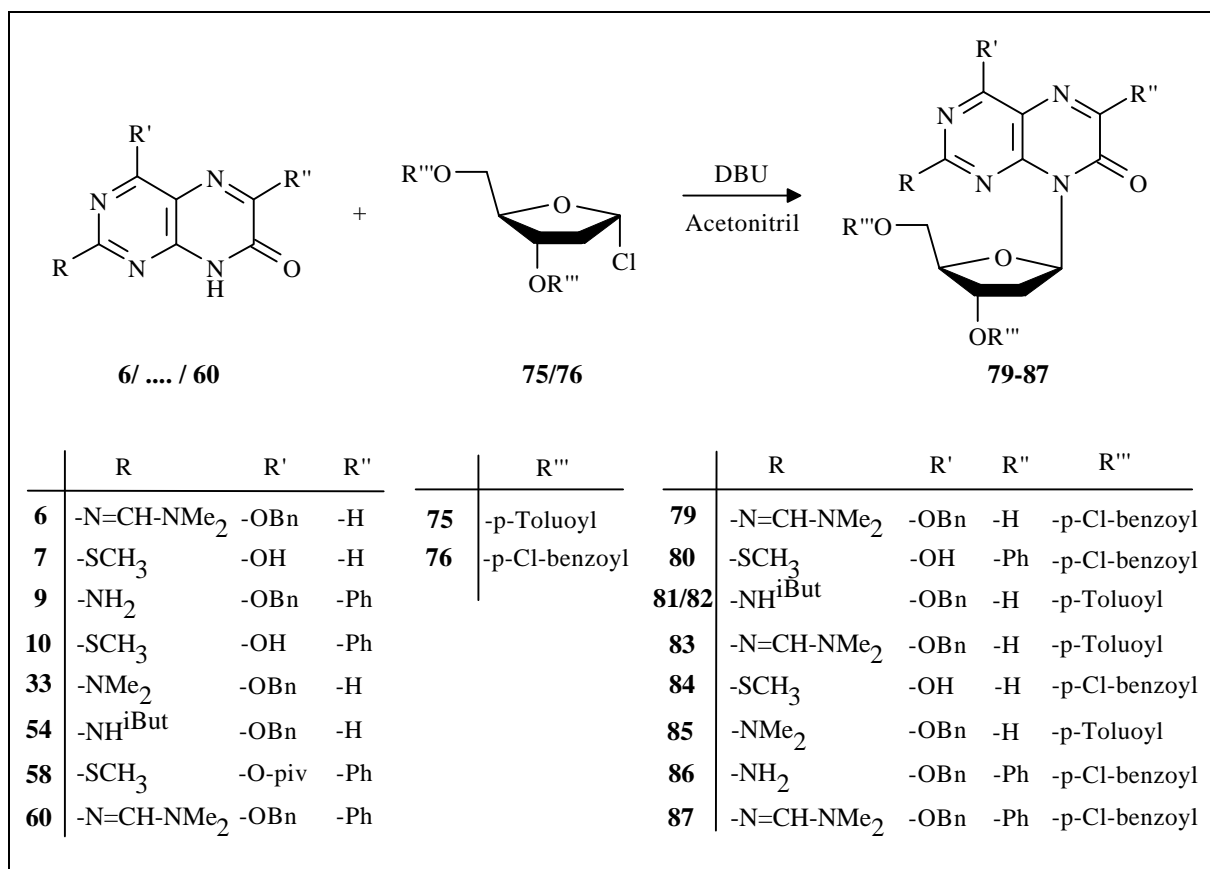


Abb.5.15 : Pteridin-Nucleosid-Synthesen

Bei der Direktglycosidierung des 2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindions (**10**) konnte das N⁸-Glycosid **80** in einer Ausbeute von 30% erhalten werden, während beim O⁴-geschützten 2-Methylmercapto-6-phenyl-4-pivaloyloxy-7(8H)-pteridinon (**58**) 54% erreicht wurden. Da jedoch die Einführung der Pivaloyl-Gruppe nur mit 62% gelang (Synthese von **58**) und somit die Ausbeute über beide Stufen mit 33% im selben Bereich der Direktglycosidierung von **10** lag, wurde letztere in der Regel bevorzugt.

Die von 2-Amino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**9**) und 2-N,N-Dimethylamino-methylenamino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**60**) ausgehenden Nucleosid-Synthesen ergaben beidesmal Ausbeuten von 30%, so daß hier ebenfalls der direkte Weg der Glycosidierung von **9** zu bevorzugen ist, was den Syntheseaufwand um eine Stufe reduziert. Die Modellverbindung, das 2-N,N-Dimethylamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**33**), ließ sich in hoher Ausbeute glycosidieren, doch konnte aufgrund einer schlechten Anomerentrennung das β-Anomer **85** nur in 45% Ausbeute isoliert werden.

5.2.3. Glycosidierungsversuche am Pyrido-[2,3-d]-pyrimidin

In der Literatur finden sich keine Nucleosid-Synthesen ausgehend von 7(8H)-Pyrido-[2,3-d]-pyrimidinonen. Bislang wurden lediglich einige 5(8H)-Pyrido-[2,3-d]-pyrimidinone von Rizkalla und Broom^[168] sowie Anderson und Broom^[219] ribosidiert. In diesen Fällen gelang die Glycosidierung durch Schmelzkondensation der silylierten Basen mit peracylierter Ribose^[168] bzw. über eine Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion^[219].

Aufgrund der guten Erfahrungen mit dem DBU-Verfahren^[218] in der analogen Pteridin-Reihe wurde für die Glycosidierungsversuche an der Modellverbindung **73** ebenfalls diese Methode angewendet. Das Pyrido-[2,3-d]-pyrimidin **73** wurde in Acetonitril nacheinander mit DBU und dem Chlorzucker (**76**) versetzt. Nach zweistündiger Reaktionszeit wurde chromatographisch aufgearbeitet, wobei ein Nucleosid, Verbindung **88**, in 28 % Ausbeute als Hauptprodukt isoliert werden konnte.

Edukt	DBU (Äq.)	Zucker (Äq.)	Zeit [min]	Produkt	Ausbeute	Bemerkungen
73	2,2	76 (1)	120	88	28 %	keine genaue Strukturzuordnung

Tab.5.2 : Glycosidierung des Pyrido-[2,3-d]-pyrimidinderivats **73**

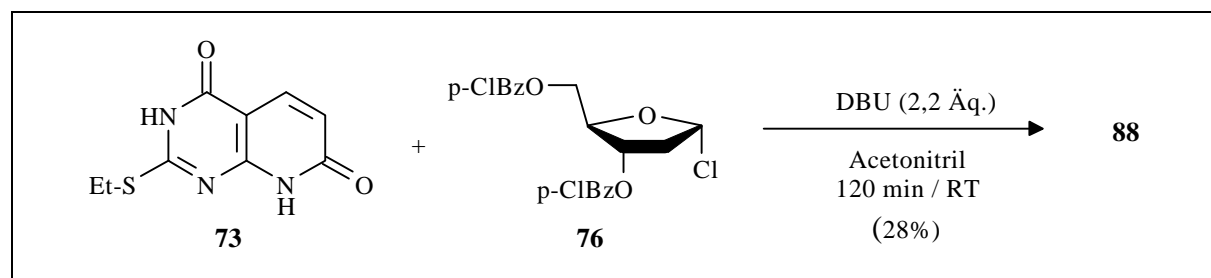


Abb.5.16 : Glycosidierungsversuch beim 5-Deaza-Pteridin **73**

Bei der Verbindung **88** konnte jedoch keine Strukturzuordnung getroffen werden, da das ¹H-NMR-Spektrum dieses Nucleosids nicht die bei den Pteridin-N⁸-β-Glycosiden typischen Signale (vgl. Kap. 5.4.2) der Zuckerprotonen zeigt.

Während der Durchführung dieser Glycosidierungsreaktion konnte parallel das Problem der selektiven Oxidation der Methylmercapto-Funktion bei den Pteridin-Nucleosiden gelöst werden (siehe Kap.7.2.2.). Da das eigentliche Ziel der Arbeit mit einem Isoxanthopterin-Baustein auf Pteridine ausgerichtet war und die 5-Deaza-Verbindungen **8** und **73** als Modell- oder Vergleichsverbindungen speziell für diesen Oxidationsschritt bzw. im Falle des Scheiterns bei der Synthese in der Pteridin-Reihe gedacht waren, wurden die Arbeiten auf diesem Gebiet an dieser Stelle abgebrochen und nicht weiter verfolgt.

5.3. Konfiguration der Nucleoside

Die Darstellung von 2'-Desoxyribosiden durch Direktglycosidierung heterocyclischer Basen kann zu zwei isomeren Verbindungen führen, dem α -konfigurierten und dem β -konfigurierten Nucleosid. Es ist daher wichtig, diese leicht und schnell unterscheiden zu können. Die ersten Methoden bedienten sich hierzu chiroptischer Verfahren wie ORD und CD-Spektroskopie. Hudson^[220,221] fand eine Korrelation zwischen Konfiguration und Vorzeichen des Cotton-Effekts. Später zeigten Lemieux und Hoffer^[222] allerdings, daß einige Ausnahmen von dieser Regel existieren.

Während UV-spektroskopische Methoden zur Konfigurationsermittlung bei Nucleosiden heutzutage nur noch eine untergeordnete Rolle spielen, bieten die Vergleiche der Spektren eines Nucleosids mit denen bekannter Methyl-derivate der heterocyclischen Base eine gute Möglichkeit die Bindungsstelle zwischen Base und Zucker zu bestimmen.

Im Fall des 2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindions (**10**) können bei der Glycosidierung acht Isomere entstehen. Die erste Frage, ob die Anknüpfung des Zuckers am Pyrimidin- oder am Pyrazinring erfolgt, läßt sich über den pK_a -Wert des Nucleosids bestimmen. Der gemessene Wert für das N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy- β -D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**80**) lag bei 8,71. Verglichen mit den Daten der heterocyclischen Base **9** und deren 3-Methyl-Derivat **50** (vgl. Kap.4.4.2) spricht dies eindeutig für ein N⁸- oder O⁷-Glycosid, also eine Glycosidierung am Pyrazinring.

Dies wird durch den zweiten synthetischen Zugang zu **80** bekräftigt. In diesem Fall wurde das O⁴-pivaloylierte Pteridin-Derivat **58** in der Glycosidierung eingesetzt, welches nur am Pyrazinring glycosidierbar ist und zum selben Produkt führte.

Die Frage einer O- oder N-glycosidischen Bindung kann ebenfalls über die UV-Spektren geklärt werden, wenn die entsprechenden O- und N-Methyl-Derivate der heterocyclischen Base bekannt sind. In diesem Fall kann durch Vergleich der längstwelligsten Absorptionsbande, deren Lage hauptsächlich durch das chromophore System des Pteridingerüsts bestimmt wird, zumeist zwischen den beiden Konstitutionsisomeren unterschieden werden.

Während sich also die Bindungsstelle zwischen Heterocyclus und Zucker schnell durch Vergleich der UV-Spektren entsprechender alkylierter Basen-Derivate bestimmen läßt, finden zur Konfigurationsermittlung des anomeren Zentrums heutzutage in der Regel Kernresonanz-Methoden Anwendung.

Die Bestimmung der vicinalen Kopplungskonstanten zwischen C(1')- und C(2')-Protonen erlaubt über die Karplus-Regel^[223] Rückschlüsse auf die Konfiguration am anomeren Zentrum. Dieser Ansatz stammt von Imbach^[224] und wurde später von M.J.Robins^[225] aufgegriffen. Sowohl Lemieux^[226] als auch M.J.Robins und R.K.Robins^[227] postulierten eine Korrelation von

Konfiguration und Resonanzsignalstruktur des C(1')-Protons im $^1\text{H-NMR}$. Demnach sollten unabhängig von der heterocyclischen Base bei α -Nucleosiden ein Doppeldublett, bei β -Nucleosiden hingegen ein Pseudotriplett gefunden werden (Abb.5.17).

Neuere Untersuchungen im Arbeitskreis Seela^[228-230] belegen dagegen, daß Modifikationen an der heterocyclischen Base die Konformation des Zuckerringes und damit auch die C(1')-Protonensignale deutlich beeinflussen können. Aufgrund dessen wundert es im Nachhinein nicht, daß Cao^[231,232] feststellte, daß die Befunde von Lemieux und Robins nicht auf Pteridin-Nucleoside übertragbar sind. Eine Reihe von auf dieser Basis getroffenen Konfigurationszuordnungen mußte nach genauerer Analyse revidiert werden.

Ein weiteres Problem bildet die Tatsache, daß das H-C(1')-Resonanzsignal bei mit Benzoyl-Derivaten geschützten Nucleosiden in vielen Fällen von Protonensignalen der aromatischen Schutzgruppen überdeckt wird. Eine einfachere Methode der Konfigurationsermittlung von Pteridin-2'-deoxyribosiden bedient sich daher der Lage der beiden C(2')-Protonensignale. Erfahrungsgemäß kann nach Cao^[231,232] folgende Aussage getroffen werden: während bei β -konfigurierten Pteridin-Nucleosiden die Signale der beiden C(2')-Protonen als zwei mit 0,75-Ippm stark separierte Signale auftreten, liegen sie bei den entsprechenden α -Anomeren deutlich näher beieinander und fallen in vielen Fällen sogar zusammen (Abb.5.18).

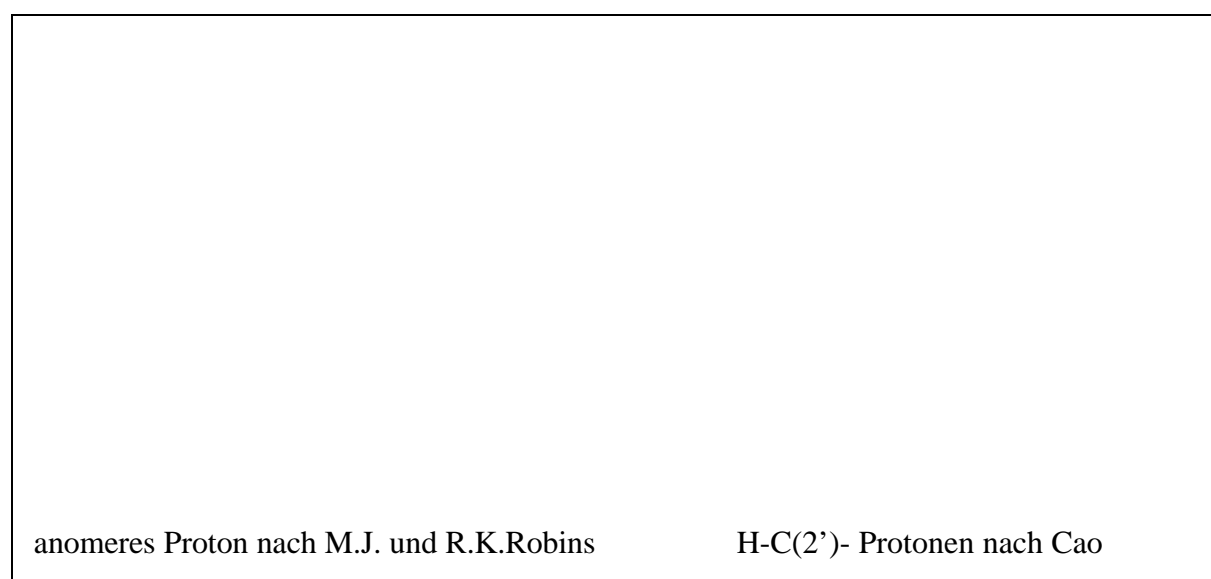


Abb.5.17 : Signalaufspaltung des anomeren Protons im $^1\text{H-NMR}$ nach M.J. und R.K.Robins^[227] bzw. der H-C(2')- Protonen bei Pteridin-2'-desoxyribosiden im $^1\text{H-NMR}$ nach Cao^[231,232]

Eine sichere Methode zur Konfigurationsermittlung bietet die Kristallstrukturanalyse, wobei die Darstellung „geeigneter“ Kristalle bei den Nucleoside problematisch ist. Eine weitere Methode ist die NOE-Spektroskopie. Einstrahlung im Frequenzbereich des anomeren Protonensignals beeinflußt das Relaxationsverhalten räumlich naher Kerne, was zu einer Intensitätserhöhung dieser Signale führt. Im Fall eines α -konfigurierten 2'-Desoxyribosids

ändern sich die Signale von H_{β} -C(2') und H-C(3'), bei einem β -Anomeren hingegen die von H_{α} -C(2')- und H-C(4') (Abb.5.18). Das Problem hierbei ist wiederum die mögliche Überlagerung des H-C(1')-Signals durch die Protonen-Resonanzen der aromatischen Schutzgruppen am Zucker, weshalb in diesen Fällen zuerst die Entschützung am Zucker erfolgen muß, um NOE-Experimente zu ermöglichen.

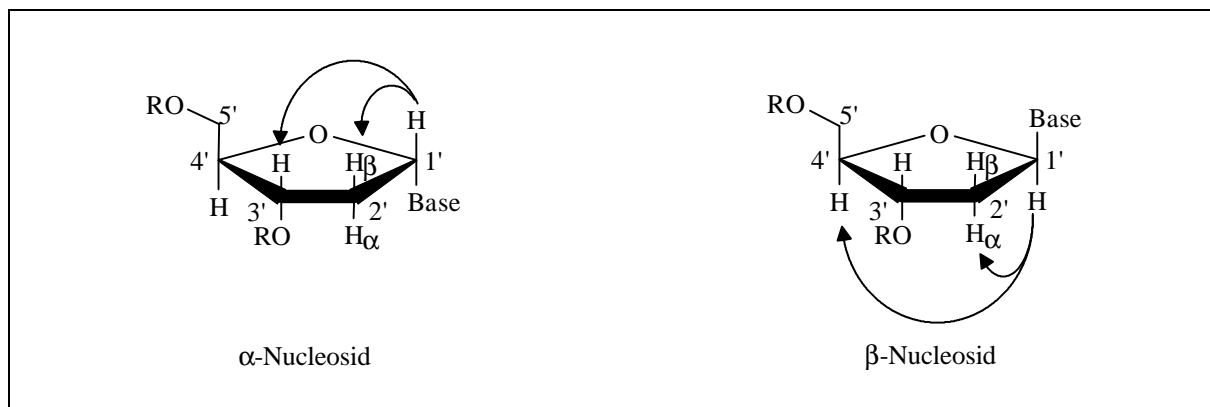


Abb.5.18 : NOE-Effekte in 2'-Desoxyribosiden bei Einstrahlung auf das anomere Proton

Über die NOE-Spektroskopie gelang die eindeutige Konfigurationsbestimmung einer Reihe von Pteridin-Nucleosiden, unter anderem auch die der beiden anomeren N⁸-[2-Desoxy-D-ribofuranosyl]-3-methyl-2-methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindione **89** und **90**, die von M.Gottlieb^[105,340] ausgehend von den entsprechenden toluoylgeschützten Derivaten **91** und **92** dargestellt wurden (Abb.5.19).

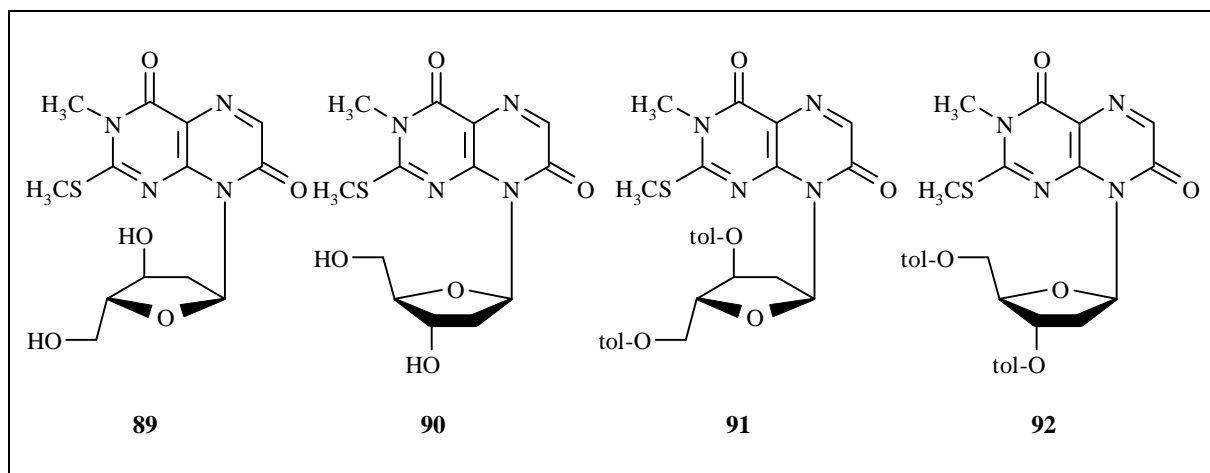


Abb.5.19 : über NOE gesicherte Strukturen der Vergleichssubstanzen **89** - **92**

Die Lage der ¹H-NMR-Resonanzen der beiden Verbindungen **91** und **92** entspricht den Ergebnissen von Cao^[231,232]. Das Spektrum des α -Anomeren **91** in CDCl₃ zeigte ein Multiplett bei etwa 3ppm, während die C-(2')-Protonen des β -Anomeren **92** in CDCl₃ als um fast 1ppm getrennte Multipletts auftreten (Abb.5.20). Aus diesen Gründen erfolgte die

Konfigurationszuordnung der neu synthetisierten Nucleoside anhand des Vergleichs der ^1H -NMR-Spektren mit den beiden Referenzen **91** und **92**.

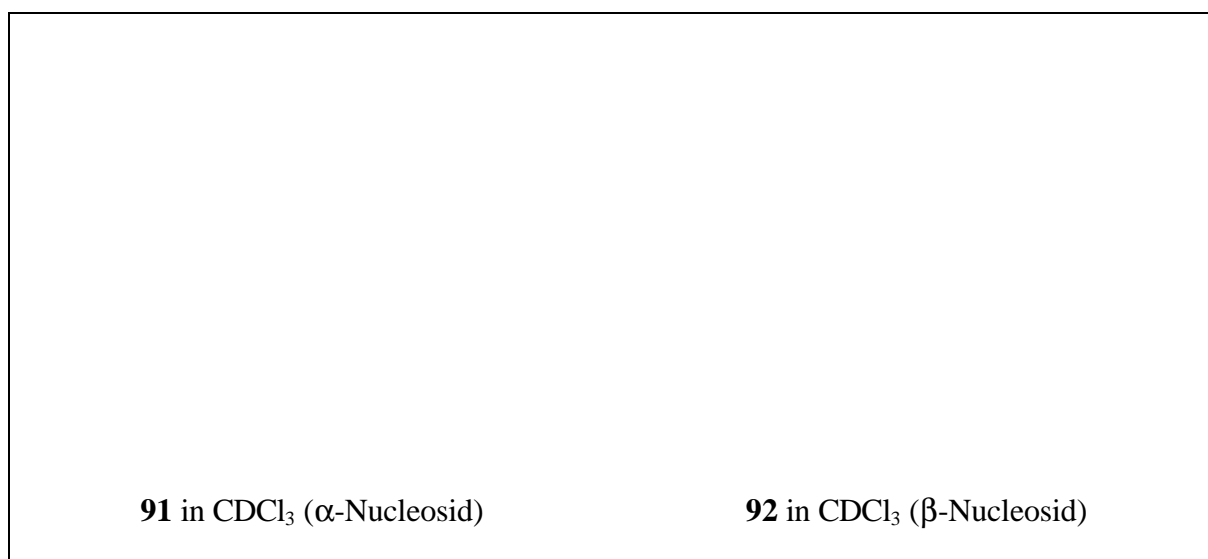


Abb.5.20 : Signalaufspaltung der C-(2')- Protonen der Verbindungen **91** und **92**

5.4. Spektroskopische Daten

In dieser Arbeit wurde zur Zuordnung der Nucleosid-Struktur das ^1H -NMR (vgl.Kap.5.3) der Verbindungen verwendet, da die entsprechenden methylierten heterocyclischen Basen aus der Literatur nicht bekannt waren und auch im Rahmen dieser Arbeit nicht synthetisiert werden konnten.

5.4.1. UV-Absorptions-Spektren

N ^o	λ_{max} [nm]					log ϵ					LM/pH
79	202		239		356	4,73		4,68		4,39	MeOH
80	202	[221]	240	[267]	378	4,68	[4,49]	4,63	[4,09]	4,31	MeOH
81	202	217	238		323	4,71	4,49	4,66		4,14	MeOH
82	202	217	238		323	4,69	4,50	4,66		4,15	MeOH
83	202	221		[272]	356	4,78	4,62		4,21	4,28	MeOH
84	202		239		352	4,70		4,64		4,06	MeOH
85	202	[214]	239	282	362	4,79	[4,59]	4,68	3,73	4,23	MeOH
86	202		242		372	4,57		4,49		4,12	MeOH
87	202	[217]	240	271	383	4,63	[4,36]	4,49	4,01	4,14	MeOH

Tab.5.3 : UV-Daten der Nucleoside **79-87** in Methanol

Die Vergleiche der UV-Absorptions-Spektren der Nucleoside in Methanol untereinander zeigen die zu erwartenden Ergebnisse. Die längstwellige Absorption stimmt mit der derjenigen des Edukts in der Lage überein. Die Zuckerschutzgruppen ergeben im kurzwelligen Bereich zusätzliche Banden. Dabei zeigt sich kein Unterschied zwischen den toluoylgeschützten Derivaten und Nucleosiden mit p-Chlorbenzoyl-Schutzgruppen, wie ein Vergleich der beiden Nucleosid-Derivate des 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinons, den Verbindungen **79** und **83** zeigt (Abb.5.21).

Abbildung 5.22 zeigt den Einfluß der Phenylsubstitution am Beispiel der Spektren von N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**80**) und N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion (**84**), ein ähnlicher Effekt zeigt sich auch beim Vergleich der UV-Spektren von 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-7(8H)-pteridinon (**79**) und 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**87**) in Abb.5.23.

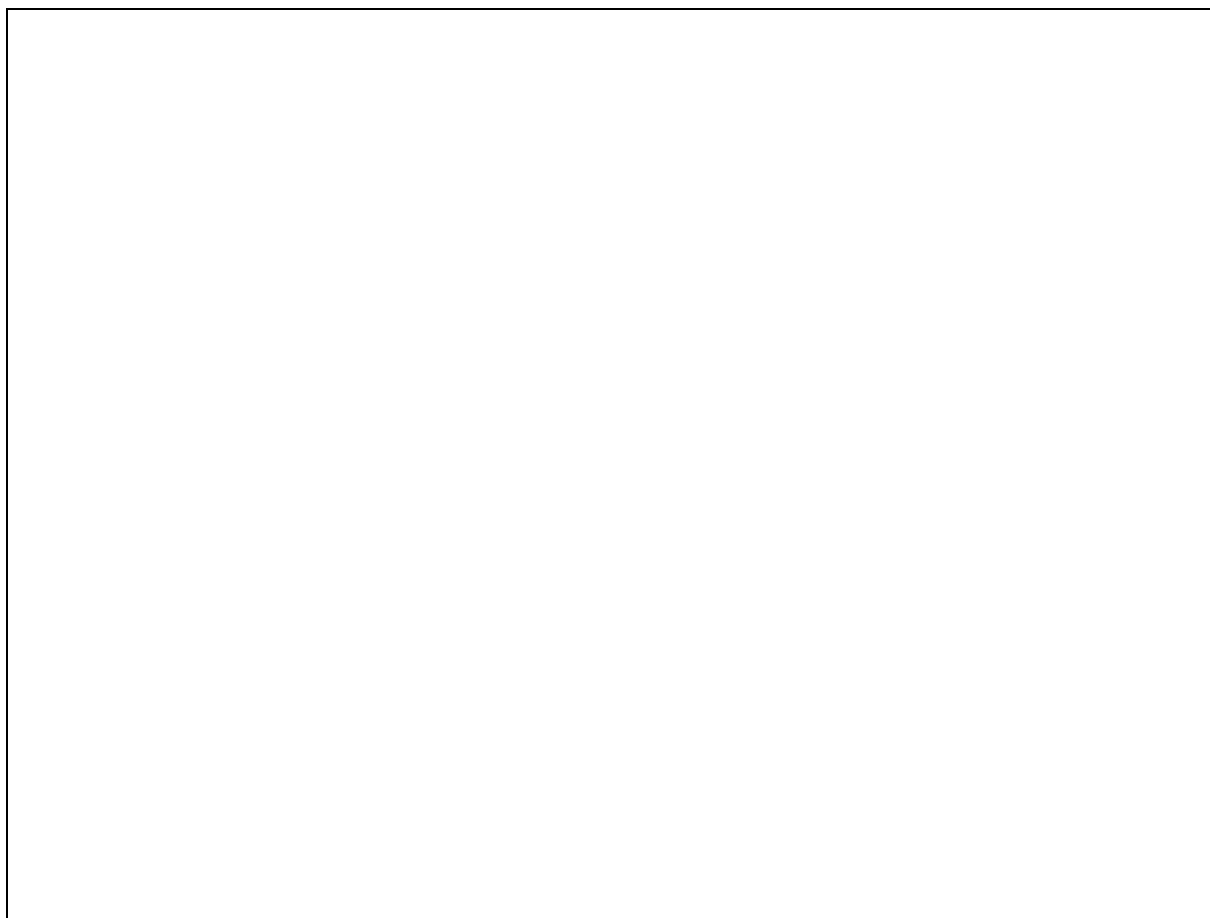


Abb.5.21 : UV-Spektren der Nucleoside **79** und **83** in Methanol

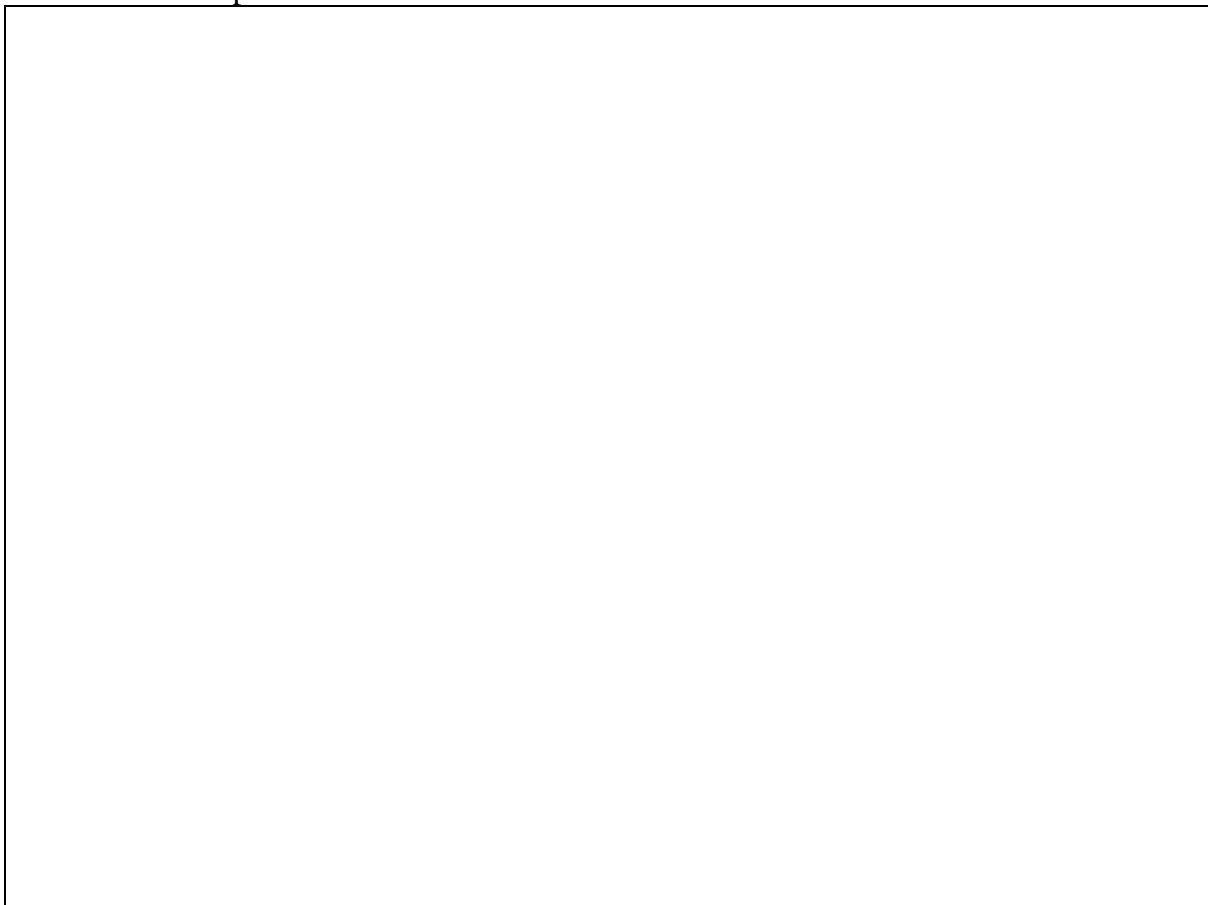


Abb.5.22 : UV-Spektren der Nucleoside **80** und **84** in Methanol

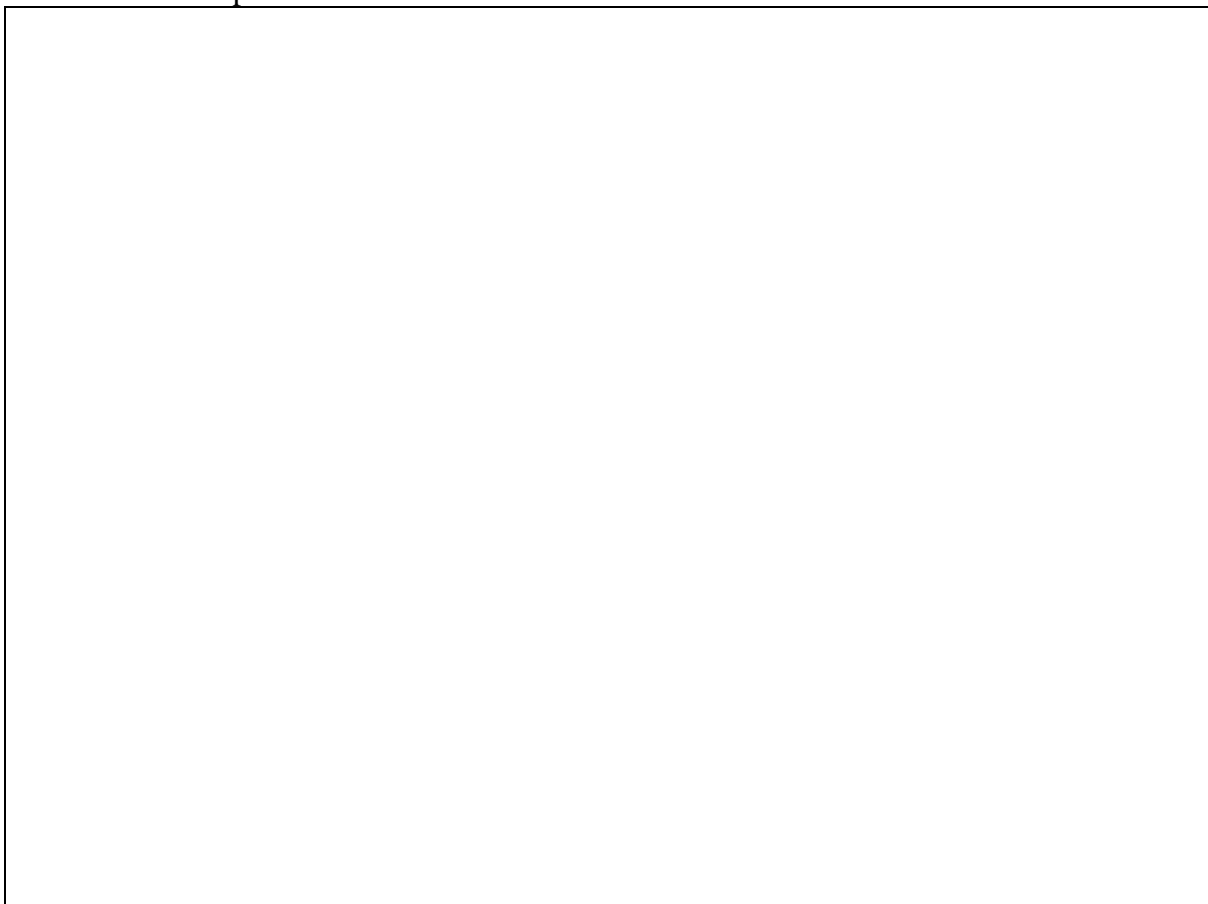


Abb.5.23 : UV-Spektren der Nucleoside **79** und **87** in Methanol

5.4.2. ¹H-NMR-Spektren

Die Signale der Protonen der heterocyclischen Basen sowie der Schutzgruppen am Aglycon finden sich mit Ausnahme des H-(N⁸) unverändert auch auf der Nucleosid-Stufe wieder.

Aus diesem Grund beschränkt sich die Übersichtstabelle (Tab.5.4) auf der folgenden Seite auf die Angaben zur Lage der Resonanzen der Protonen am Zucker. Die Aufnahme sämtlicher Spektren erfolgte in deuteriertem Chloroform bei Raumtemperatur.

Bei toluoylgeschützten Nucleosiden finden sich dabei Dubletts bei etwa 7,9 ppm (4H), weitere Dubletts im Aromatenbereich zwischen 7,5 und 7,1 ppm (4H) und die Methylgruppen als zwei Singulettts bei etwa 2,4 ppm. Die p-Chlorbenzoyl-Derivate weisen ebenfalls Dubletts im Aromatenbereich zwischen 7,5 und 7,1 ppm (4H) auf, der zweite Satz findet sich ein wenig tiefer als zuvor bei 8 ppm (4H).

Betrachtet man die Zuckerprotonen, so findet man für die β-Nucleoside in CDCl₃ eine charakteristische Separation der C(2′)-Protonensignale (H_α: 2,5 ppm , H_β: 3,4 ppm), das H-C(3′)-Signal bei ca. 6 ppm und eine oft nur teilweise Separation der Resonanzen von H-C(4′), H-C(5′) und H-C(5′′).

Beim α-Anomeren **81** findet sich analog zum Vergleichsmaterial **91** die charakteristische Lage der C(2′)-Protonen-Signale, deren Signalsätze in CDCl₃ fast zusammenfallen. Nimmt man das Spektrum derselben Verbindung in DMSO-d₆ auf, so findet sich sogar nur ein Multiplett. Die Signale von H-C(3′) und H-C(1′) treten verglichen mit dem β-Anomeren bei höherem Feld auf.

Nr.	H-C(1′)	H _α -C(2′)	H _β -C(2′)	H-C(3′)	H-C(4′), H-C(5′), H-C(5′′)	LM
79	7,54 / m	2,53 / m	3,36 / m	6,10 / m	4,87-4,49 / 3m	CDCl ₃
80	7,47 / m	2,54 / m	3,39 / m	6,12 / m	4,90-4,56 / 3m	CDCl ₃
81	7,04 /pq	2,98-2,72 / 2m		5,75 / m	4,73-4,47 / m	CDCl ₃
82	verdeckt	2,43 / m	3,53 / m	6,06 / m	4,78 / m (1H) // 4,54 / m (2H)	CDCl ₃
83	verdeckt	2,43 / m	3,29 / m	5,99 / m	4,75 / m (1H) // 5,58 / 2m (2H)	CDCl ₃
84	verdeckt	2,55 / m	3,35 / m	5,99 / m	4,83-4,54 / 3m	CDCl ₃
85	verdeckt	2,44 / m	3,39 / m	5,94 / m	4,79-4,52 / 3m	CDCl ₃
86	verdeckt	2,50 / m	3,42 / m	6,12 / m	4,98 / m (1H) // 4,57 / m (2H)	CDCl ₃
87	7,64 / q	2,55 / m	3,38 / m	6,16 / m	4,86-4,47 / 3m	CDCl ₃
88	6,95 / m	2,93-2,64 / 2m		5,72 / m	4,70-4,51 / 2m	CDCl ₃

Tab. 5.4 : Lage der Zuckerprotonen-Signale der Nucleoside **79-88** im ¹H-NMR in CDCl₃ in ppm (δ-Skala)

Interessanterweise tritt beim α -konfigurierten 2-Isobutyroylamido-4-benzyloxy-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl- α -D-ribofuranosyl]-7(8H)-pteridinon (**81**) das anomere Proton H-(1') entsprechend der Regel von Lemieux^[226] bzw. Robins^[227] (vgl.Kap.5.3) als Pseudoquartett auf. Dagegen findet sich beim β -konfigurierten 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy- β -D-ribofuranosyl]-7(8H)-pteridinon (**87**) zwar ebenfalls ein Quartett für das H-(1'), allerdings weisen hier die C-(2')-Protonen-Signale auf das Vorliegen des β -Anomers hin.

Als Beispiele sind auf den folgenden beiden Seiten die Spektren der beiden Nucleosid-Derivate des 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinons **79** (Abb.5.24) und **83** (Abb.5.25) als Vergleich von toluoylgeschütztem und p-chlorbenzoylgeschütztem Nucleosid gezeigt. Zudem sind auch die Spektren des α -konfigurierten 2-Isobutyroylamido-4-benzyloxy-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl - α -D-ribofuranosyl]-7(8H)-pteridinons (**81**) und des β -konfigurierten 2-Isobutyroylamido-4-benzyloxy-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl- β -D-ribofuranosyl]-7(8H)-pteridinons (**82**) (Abb.5.26 bzw. 5.27) als Vergleich eines α - mit einem β -Glycosid abgebildet.

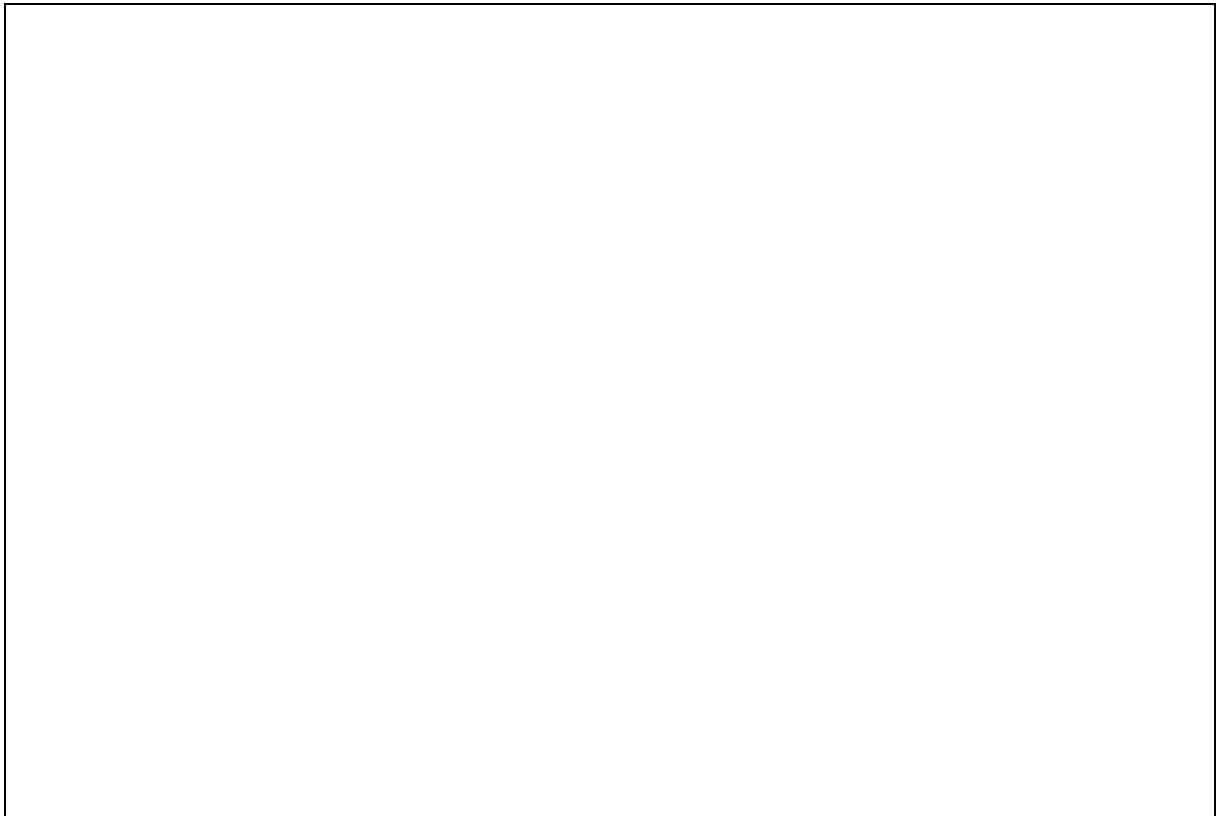




Abb.5.24 : $^1\text{H-NMR}$ von **79** in CDCl_3

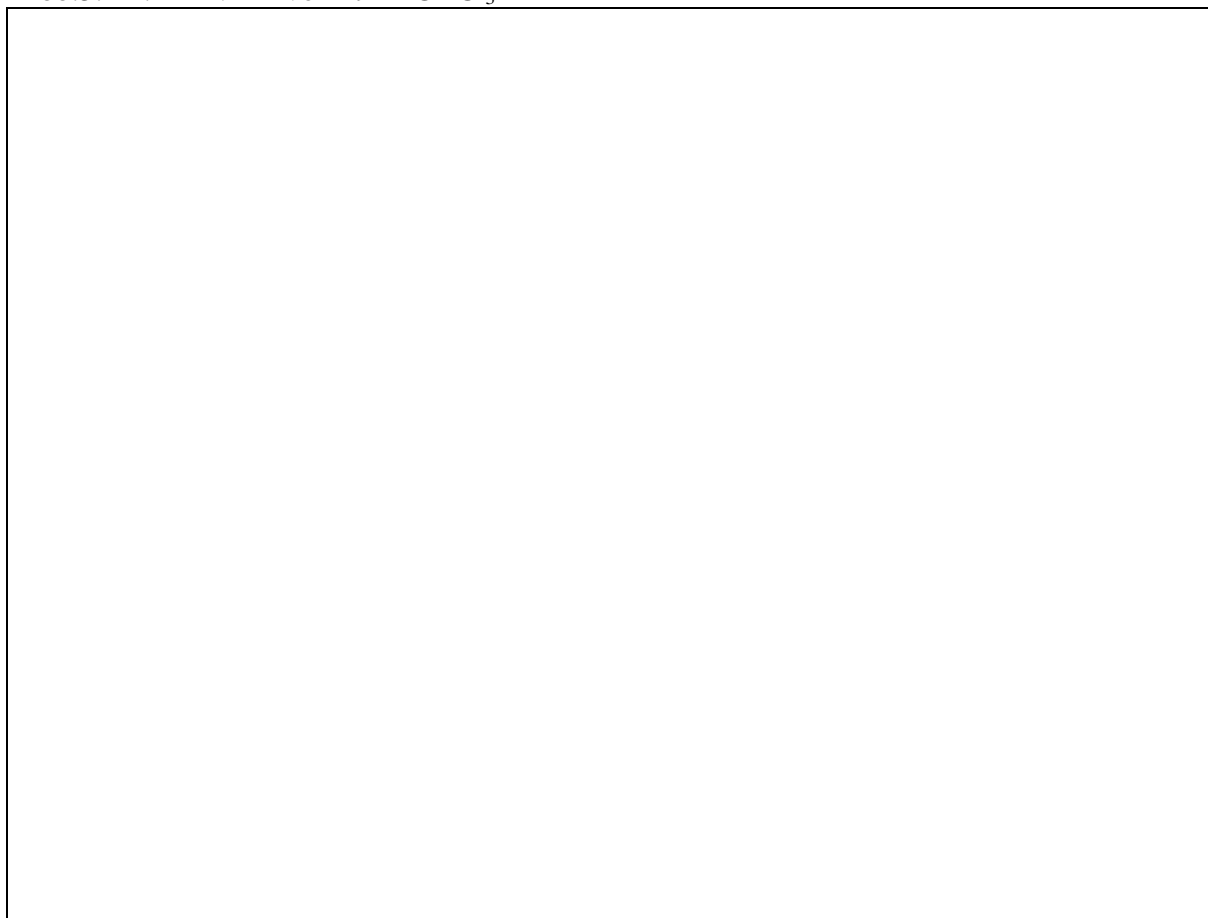


Abb.5.25 : $^1\text{H-NMR}$ von **83** in CDCl_3





Abb.5.26 : ¹H-NMR von **81** in DMSO-d₆

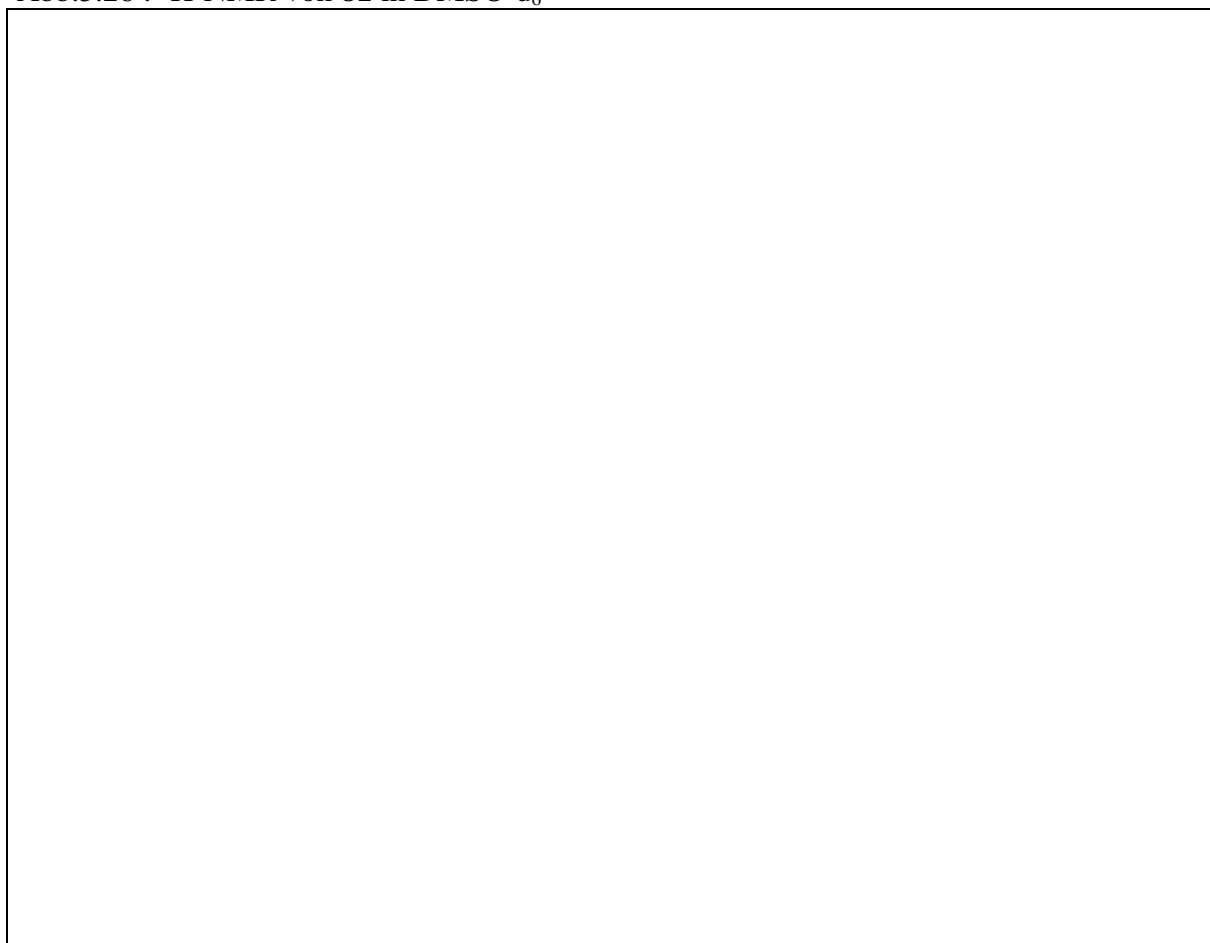


Abb.5.27 : ¹H-NMR von **82** in CDCl₃

6. SYNTHESE- UND SCHUTZGRUPPEN-STRATEGIEN ZUM AUFBAU VON OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDEN

Die Arbeiten zur Entwicklung effektiver Methoden zum gezielten chemischen Aufbau von Oligonucleotidsequenzen nahmen vor mehr als 40 Jahren ihren Anfang. Nur 2 Jahre nach der DNA-Strukturaufklärung durch Watson und Crick^[3] datiert der erste Bericht einer erfolgreichen, aber mit unter 2% Ausbeute noch ineffektiven Synthese eines Thymidindinucleotids durch Michelson und Todd^[233].

6.1. Methoden der Oligodesoxyribonucleotidsynthese

Bedingt durch die immer größer werdende Nachfrage an synthetischen Oligonucleotidsequenzen in Medizin und Molekularbiologie wurden eine Reihe von Methoden entwickelt, die den gezielten Aufbau derartiger Verbindungen in immer schnellerer und besserer Weise ermöglichen. Oligonucleotide sind Polymere, welche durch Verknüpfung von Nucleosidbausteinen über 3'-5'-Phosphorsäurediesterbrücken erhalten werden, womit sich zwei mögliche Syntheserichtungen ergeben. Während die Natur auf den 5'-Triphosphaten basierend die 5'-3'-Richtung benutzt, verlaufen die chemischen Verfahren, die höhere Reaktivität der primären 5'-Hydroxylfunktion nutzend, in der Regel in 3'-5'-Richtung, die Kettenverlängerung findet also am 5'-Ende statt.

Für die Synthese längerer Oligomere kann als Alternative zur gebräuchlichen schrittweisen Addition der monomeren Bausteine auch eine Blockkondensation erfolgen. Dabei werden zuvor dargestellte Teilsequenzen zur Gesamtsequenz verknüpft. Abzuwägen dabei ist die Ausbeute der Monomeraddition gegen den Syntheseaufwand für die Oligonucleotidblöcke. Da in vielen Fällen gute Kondensationsausbeuten von über 99.5% erreicht werden können, haben sich in der Praxis die Monomeradditionsverfahren durchgesetzt, da so lediglich 4 Standardbausteine benötigt werden.

Die chemischen Synthesemethoden unterscheiden sich in der Art der zur Knüpfung der Internucleotidbindung verwendeten Phosphorkomponente und lassen sich in 5 Hauptklassen, zwei Phosphor-(V)- und drei Phosphor-(III)-Methoden einteilen, die nachstehend kurz tabellarisch beschrieben sind.

6.1.1. Die Phosphodiester-Methode^[234-241]

– entwickelt von:	Khorana et al. ^[234-238]
-------------------	-------------------------------------

– Phosphorkomponente	Nucleosid-3'-phosphat, P(V)
– Aktivierungsreagenz	Phosphataktivatoren wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) ^[239] , Mesitylsulfonsäurechlorid (MSCl) ^[240] oder 2.4.6-Triisopropylbenzolsulfonsäure-chlorid (TPSCI) ^[241]
– Oxidationsreagenz	keine Oxidation notwendig
– Vorteile	stabile Edukte
– Nachteile	lange Reaktionszeiten, schlechte Ausbeuten, Tendenz zu Nebenreaktionen, aufwendige Reinigung der Produkte

6.1.2. Die Phosphotriester-Methode^[233,242-252]

– entwickelt von:	Michelson und Todd ^[233] , verbessert durch Letsinger ^[242] , Reese ^[243] , Eckstein ^[244] und Narang ^[245]
– Phosphorkomponente	Nucleosid-3'-phosphorsäuretriester, P(V) (eine Funktion basenlabiles Cyanoethyl-)
– Aktivierungsreagenz	Base (Abspaltung der Cyanoethylgruppe -> Diester), Mesitylsulfonyl-3-nitro-1.2.4-triazol (MSNT) ^[246,247] oder 4.6-Dinitro-1-(mesityl-2-sulfonyloxy)benzotriazol (DMBT) ^[248] als Kupplungsreagentien zur Phosphataktivierung
– Oxidationsreagenz	keine Oxidation notwendig
– Vorteile	stabile Edukte und Produkte, nicht umgesetztes Edukt läßt sich als Bariumsalz rückgewinnen ^[249] , gut zu reinigende Oligomere, Eignung zur Blockkondensation ^[250-252]
– Nachteile	Nebenprodukte bei der Kupplung (Sulfonylierung der 5'-OH), relativ lange Kondensationszeiten

6.1.3. Die H-Phosphonat-Methode^[253-259]

– entwickelt von:	Todd et al. ^[253] , verbessert von Garegg ^[254-256] und Matteucci ^[257,258]
– Phosphorkomponente	Nucleosid-3'-(1-H-phosphonat), P(III)
– Aktivierungsreagenz	Pivaloylchlorid ^[258] , Adamantoylchlorid ^[259] , Arylsulfonylchloride
– Oxidationsreagenz	Jod in Pyridin/Wasser (am Ende der Synthese)
– Vorteile	hohe Stabilität der Edukte, schnelle Reaktion, kein intermediärer Phosphatschutz nötig
– Nachteile	gelegentlich Acylierungen durch die Aktivierungereagentien,

	Kondensationsausbeuten nur geringfügig schlechter als beim Phosphitamid-Verfahren.
--	--

6.1.4. Die Phosphitchlorid-Methode^[260,261]

– entwickelt von:	Letsinger ^[260] , verbessert von Matteucci und Caruthers ^[261]
– Phosphorkomponente	Nucleosid-3'-phosphorigsäure-monochlorid, P(III)
– Aktivierungsreagenz	nicht nötig
– Oxidationsreagenz	Jod in Pyridin/Wasser (nach jeder Kondensation)
– Vorteile	extrem schnelle Reaktion wegen der hohen Reaktivität als Säurechlorid, benötigt keine Kupplungsreagentien
– Nachteile	Empfindlichkeit der Edukte erlaubt keine Lagerung oder Isolation, Unselektivität der Kondensation wegen der hohen Reaktivität

6.1.5. Die Phosphitamid-Methode^[262-274]

– entwickelt von:	Caruthers und Beaucage ^[262,263]
– Phosphorkomponente	Nucleosid-3'-phosphoramidit, P(III)
– Aktivierungsreagenz	1-H-Tetrazol oder Pyridin-Hydrochlorid
– Oxidationsreagenz	Jod in Pyridin/Wasser (nach jeder Kondensation)
– Vorteile	vernünftige Stabilität der Edukte, gute Ausbeuten, schnelle Reaktionszeiten, milde Kupplungsreagentien -> wenig Nebenreaktionen, gute Eignung zur Automatisierung
– Nachteile	keine nennenswerten

Die Phosphitamid-Methode nach Caruthers und Beaucage^[262,263] stellt das heute in den meisten Fällen eingesetzte Verfahren zur Oligonucleotid-Synthese dar. Die Umsetzung eines in der 5'-Position säurelabil geschützten 3'-OH-Nucleosids mit einem Alkoxy-dialkylamino-chloro- oder einem Alkoxy-bis-(dialkylamino)-phosphan liefert die benötigten monomeren Bausteine, die 3'-Phosphoramidite (Abb.6.1).

--

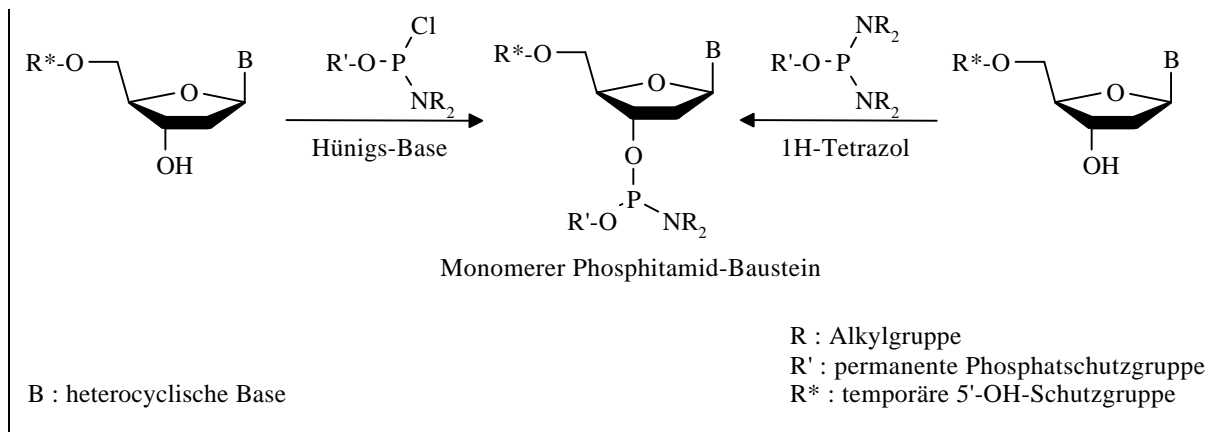


Abb.6.1. : Synthese eines Phosphitamid-Bausteins

Diese sind gegenüber Hydrolyse und Luftoxidation relativ stabil, lassen sich daher anders als die Phosphitchloride isolieren und lagern. Die vergleichsweise gute Handhabbarkeit dieser Bausteine ermöglichte den Ausbau und die Kommerzialisierung dieses Verfahrens bis hin zur automatisierten Routine-Oligonucleotidsynthese.

Weiter vorteilhaft sind die milden Reaktionsbedingungen des Kondensationschritts der Phosphitamid-Methode, aufgrund der praktisch nebenreaktionsfreien Aktivierung durch schwache Säuren wie Tetrazol oder Pyridinium-chlorid. Im Anschluß an die Knüpfung der Internucleotidbindung muß die Diesterzwischenstufe mit Iod zum stabilen Phosphatester oxidiert werden, bevor die nächste Kondensation erfolgen kann (Abb.6.2).

Nach verschiedensten Variationen wurde in der allgemein verwendeten Kombination aus β -Cyanoethoxy-^[264,265] und N,N-Diisopropylamino-resten^[266] am Phosphorzentrum ein guter Kompromiß zwischen Reaktivität und Lagerfähigkeit bei Phosphitamidern gefunden. Daneben finden sich auch die Diethylamino-^[267,268] oder die Morpholinofunktion ^[262-271] als Amidkomponente sowie die ebenfalls β -eliminierbare 2-(4-Nitrophenyl)ethoxy-^[270,272-274] anstelle der 2-Cyanoethoxy-gruppe.

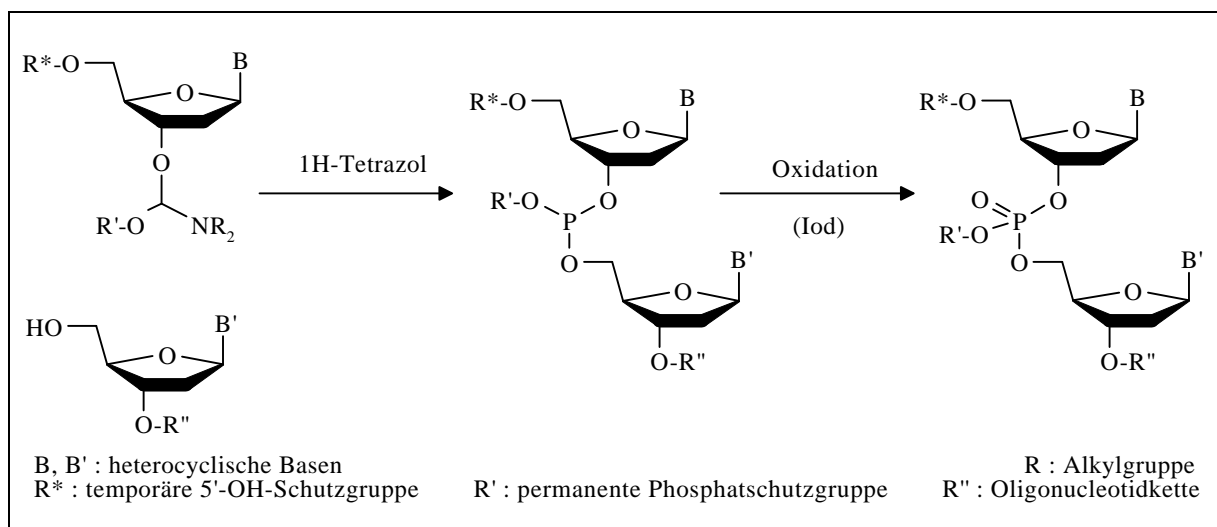


Abb.6.2 : Kettenverlängerung bei der Phosphitamid-Methode^[262-274]

6.2. Schutzgruppen-Strategien für die Oligodesoxyribonucleotidsynthese

Der Erfolg einer Oligonucleotidsynthese hängt in großem Maße von der Wahl einer geeigneten Schutzgruppen-Strategie ab. Die schrittweise Anknüpfung von monomeren Bausteinen an eine wachsende Kette verlangt dabei eine Kombination von permanenten und temporären Schutzfunktionen. Potentiell reaktive, jedoch an der Kondensation unbeteiligte Positionen müssen für die Dauer der Synthese (permanent) blockiert werden und sich nach deren Beendigung mild und quantitativ wieder entschützen lassen. Die 5'-Position des Monomers muß dagegen temporär geschützt werden., da sie sich nach der Kettenverlängerung für den folgenden Kondensationsschritt ohne Beeinträchtigung des Oligomers und der vorhandenen permanenten Schutzgruppen mild und quantitativ wieder freisetzen lassen muß.

Dies erfordert ein sogenanntes orthogonales Schutzgruppenmuster, also unterschiedliche Typen von Schutzfunktionen die sich unabhängig voneinander abspalten lassen. Im Fall der 2'-Desoxyribonucleotide müssen die reaktiven Positionen des Aglycons sowie die Phosphatbrücke permanent, die 5'-Hydroxylfunktion hingegen temporär blockiert werden. Im Lauf der Jahre wurde eine Vielzahl von Schutzgruppenkombinationen getestet, wobei sich in Folge der Automatisierung und Kommerzialisierung der DNA-Synthese nur einige wenige behaupten konnten.

6.2.1. Schutzgruppen für das Aglycon

Bei der kommerziell gängigen Acyl-Strategie nach Khorana et al.^[275] werden Benzoyl- oder Anisoylgruppen zum Schutz der exocyclischen Aminofunktionen in Adenosin und Cytosin^[276,277] eingesetzt. Beim Guanosin dagegen findet die Isobutyrylgruppe Verwendung^[278]. Die Nucleophilie der Lactamfunktionen ist deutlich geringerer als die der Aminofunktionen, daher ist ein Schutz an dieser Stelle nicht unbedingt notwendig. Während Thymidin bzw. Uridin (pK_A : 9.8) ohne Schutzgruppen eingesetzt werden, hat sich beim Guanosin (pK_A : 9.2) die Verwendung einer zusätzlichen Acylgruppe an O⁶ in vielen Fällen bewährt.

Andere Acylschutzgruppen, wie die Phenoxyacetyl-^[279] und die t-Butylphenoxyacetyl-Gruppe^[280] oder die ebenfalls basisch abspaltbare Dimethylformamidin-schutzgruppe^[281], welche verglichen mit den oben genannten Schutzgruppen mildere Abspaltungsprozeduren erlauben, konnten sich wegen anderer Nachteile kommerziell nicht durchsetzen.

Die Abspaltung sämtlicher Schutzfunktionen nach der Acylstrategie erfolgt durch mehrstündige Behandlung mit konzentriertem Ammoniak (25%) bei 55°C.

Eine Alternative zum Acyl-Konzept^[275] stellt die NPE-/NPEOC-Strategie^[282-296] dar, die in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde. Dabei wird die 2-(4-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl-(NPEOC)-Gruppe zum Schutz exocyclischer Aminofunktionen in Adenosin, Cytidin und Guanosin eingesetzt. Zur Einführung werden als Reagentien sowohl das entsprechende Säurechlorid (NPEOC-Cl) wie auch das Imidazoliumchlorid (NPEOC-Im) verwendet (Abb.6.3). Zusätzlich wird die O⁶-Position des Guanosins mit der 2-(4-Nitrophenyl)ethoxy-(NPE)-Gruppe geschützt, was in der Regel über eine Mitsunobu-Reaktion mit 2-(4-Nitrophenyl)ethanol (NPEOH) erreicht wird. Die Abspaltung sämtlicher NPE-Schutzgruppen erfolgt mit starken, nichtnucleophilen Basen (in der Regel 1M DBU in Acetonitril) über einen β -Eliminierungsmechanismus. Eine neuere Entwicklung in diesem Konzept stellt die 2-(4-Nitrophenyl)ethylsulfonyl- (NPES)-Gruppe dar.

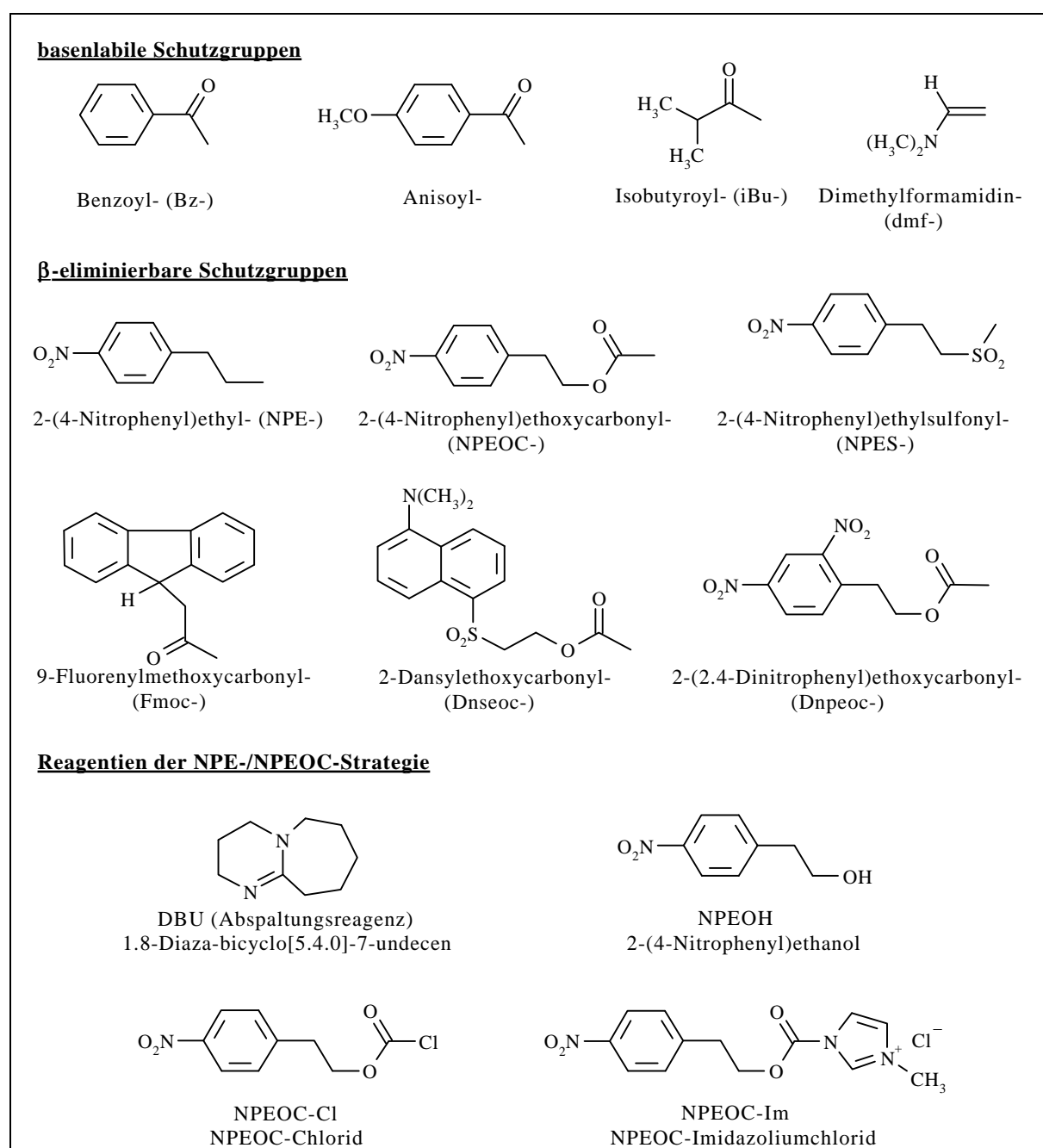


Abb.6.3. : Auswahl von Aglycon-Schutzgruppen (und Reagentien der NPE-/NPEOC-Strategie^[282-296])

Weitere Schutzgruppenvarianten bieten sich mit der ebenfalls β -eliminierbaren 9-Fluorenylmethoxycarbonyl- (Fmoc)-Gruppe von Chladek und Chattopadhyaya^[297-300], sowie den metallkatalysiert entfernbaren Allyloxy-carbonyl-funktionen von Noyori^[301].

6.2.2. Schutzgruppen für die Phosphatbrücke

Für den Schutz der Phosphatfunktion haben sich β -eliminierbare Gruppen durchgesetzt. Kommerziell gebräuchlich ist dabei die β -Cyanoethylfunktion^[264,265,302], in unserer Arbeitsgruppe wird gelegentlich auch die etwas stabilere NPE-Funktion verwendet (Abb.6.4). Der β -eliminierbare Schutzgruppentyp erlaubt die Entschützung ohne dabei wie bei anderen Varianten das Phosphatzentrum angreifen zu müssen. Dies vermindert die Gefahr von Nebenreaktionen wie der Spaltung von Internucleotid-Bindungen.

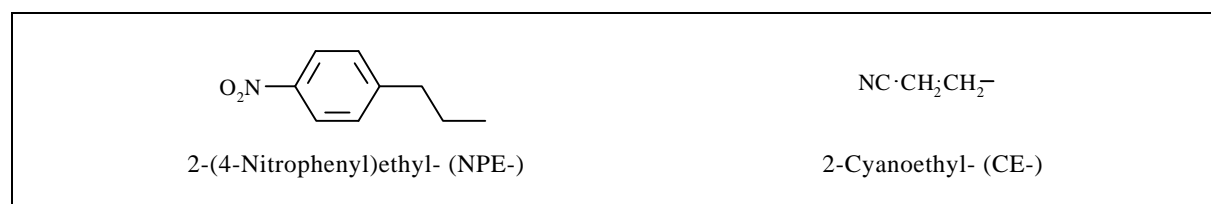


Abb.6.4. : β -eliminierbare Schutzgruppen für die Phosphatbrücke

Die Abspaltung β -eliminierbarer Schutzgruppen erfolgt in beiden Fällen zusammen mit den übrigen permanenten Basenschutzfunktionen in einem Schritt. Bei der Acyl-Strategie wird das fertige Oligomer nach Beendigung der Synthese für mehrere Stunden bei 55°C mit konzentriertem Ammoniak behandelt. Die durchgehende Verwendung β -eliminierbarer permanenter Schutzgruppen im Rahmen der NPE-/NPEOC-Strategie ermöglicht dagegen einen wesentlich milderen Prozess. In den meisten Fällen genügt eine mehrstündige Behandlung mit 1M DBU in Acetonitril bei Raumtemperatur um das Oligomer vollständig zu entschützen. Dieses Verfahren eignet sich daher besser für die automatisierte Festphasensynthese, ein Vorteil auf den an späterer Stelle genauer eingegangen wird.

6.2.3. Schutzgruppen für die Zuckereinheit

Im Fall der 2'-Desoxyribose verbleibt nur die 5'-Hydroxyfunktion, die temporär geschützt werden muß, da sie nach erfolgter Kondensation bei der gängigen 3'-5'-Syntheserichtung für die nächste Kettenverlängerung wieder freigesetzt werden muß. Bewährt haben sich hierfür die säurelabilen Mono- und Dimethoxytritylgruppen von Khorana^[236,275,303]. Ihre Vorteile liegen in

der leichten Einführbarkeit in die Nucleosidbausteine, sowie in der Tatsache, daß die Absorptionseigenschaften der Tritylkationen nach der Abspaltung in einfacher Weise die Bestimmung der Kondensationsausbeuten erlauben. Weitere Alternativen sind die ebenfalls säurelabilen 9-Phenyl-xanthen-9-yl- (Pixyl)^[304] und 9-(4-Methoxyphenyl)-xanthen-9-yl- (Mox)^[305], sowie die basenlabilen Fmoc^[297], Dansylethoxycarbonyl- (Dnsec)^[306,307] und 2-(2,4-Dinitrophenyl)-ethoxycarbonyl- (Dnpeoc)-gruppen^[296].

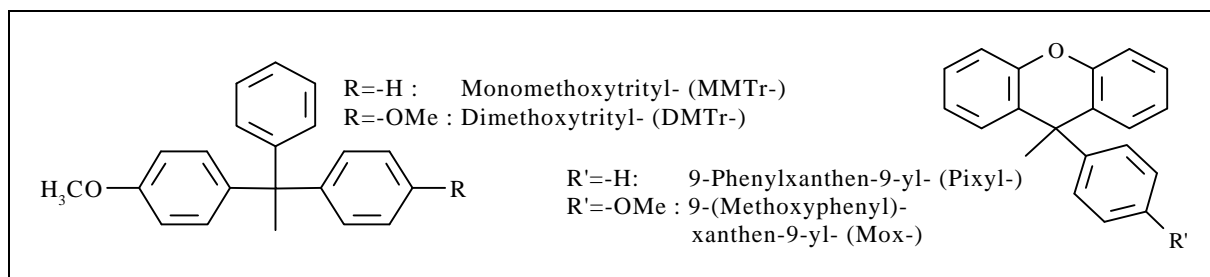


Abb.6.5. : Auswahl gängiger 5'-OH-Schutzgruppen für die Oligonucleotidsynthese

Neuere Arbeiten zielen darauf, anstelle der säurelabilen Tritylfunktionen für die 5'-Hydroxylfunktion photolabile Schutzgruppen^[308-312] zu verwenden. Insbesondere im Hinblick auf diagnostische Anwendungen bieten licht- oder lasergesteuerte Methoden interessante neue Möglichkeiten im Bereich der Oligonucleotidsynthese.

Für eine ausführlichere Übersicht über die Schutzgruppenvarianten in der Oligonucleotidchemie sei an dieser Stelle auf den Review von Beaucage und Iyer verwiesen^[313].

6.3. Auswahl der Schutzgruppen für die Isoxanthopterin-Bausteine

Wenngleich eine Aminoschutzgruppe beim Guanosin aufgrund von Basizität oder Nucleophilie dieser Funktion nicht unbedingt erforderlich ist, wird aus Löslichkeitsgründen üblicherweise am Aglycon sowohl die exocyclische Aminofunktion als auch die Amidfunktion des Pyrimidinringes blockiert. Bei Synthesen nach der Acylstrategie wird dabei zumeist die Isobutyryl-Funktion benützt, welche einen guten Kompromiß zwischen Einführbarkeit, Stabilität während und Abspaltbarkeit nach der Synthese bietet. Im Fall der NPE-Strategie wird die Aminofunktion mit der NPEOC-Gruppe und zusätzlich die O⁶-Position mit der NPE-Gruppe blockiert.

Für Isoxanthopterin-Derivate ist ein Schutz der Aminogruppe wegen ihrer bekannt niedrigen Reaktivität nicht nötig. Eine Blockierung der Amidfunktion muß dagegen aus zwei Gründen vorgenommen werden. Einerseits schützt die Blockierung diese Position gegen mögliche Nebenreaktionen, andererseits wird die Löslichkeit des Nucleosid erhöht. Als mögliche Schutzgruppen kommen dabei in Analogie zum Guanin die Isobutyryl- oder die NPE-Gruppe

in Frage, wobei letztendes die NPE-Gruppe ausgewählt wurde, da die späteren Oligonucleotid-Synthesen nach der NPE-Strategie durchgeführt werden sollten.

Um die Isoxanthopterin-Phosphitamide darstellen zu können, müssen nach der Einführung der NPE-Schutzgruppe in die O⁴-Position die Acylgruppen am Zucker abgespalten werden. Danach kann die Einführung der Dimethoxytrityl-Funktion, die wegen guter Erfahrungen bei anderen Pteridin-Nucleosiden ausgewählt wurde, zur temporären Blockierung der 5'-Position erfolgen. Für die Phosphorkomponente in der 3'-Position wurde die ebenfalls bewährte Kombination aus 2-Cyanoethoxy- und N,N-Diisopropylamino-Gruppen verwendet.

7. SYNTHESE EINES O⁴-GESCHÜTZTEN ISOXANTHOPTERIN-N⁸-NUCLEOSIDS

Entsprechend den in Kap.3 aufgezeigten Syntheserouten bildete die Synthese eines an der O⁴-Position NPE-geschützten OH-freien Isoxanthopterin-Nucleosids ausgehend von den 6-H-substituierten Nucleosiden **79** und **81**, **83** und **84** das nächste Ziel dieser Arbeit.

7.1 Die Isoxanthopterin-Route

Im Falle der aminosubstituierten Pteridin-Nucleoside (**79**, **81**, **80**) sind drei Schritte durchzuführen: die Abspaltung der Schutzgruppen am Aglycon bzw. sofern möglich nur die Entschützung an der O⁴-Position, die Einführung der NPE-Funktion an dieser Stelle, sowie die Abspaltung der Zuckerschutzgruppen.

7.1.1. Entschützung der O⁴-Position

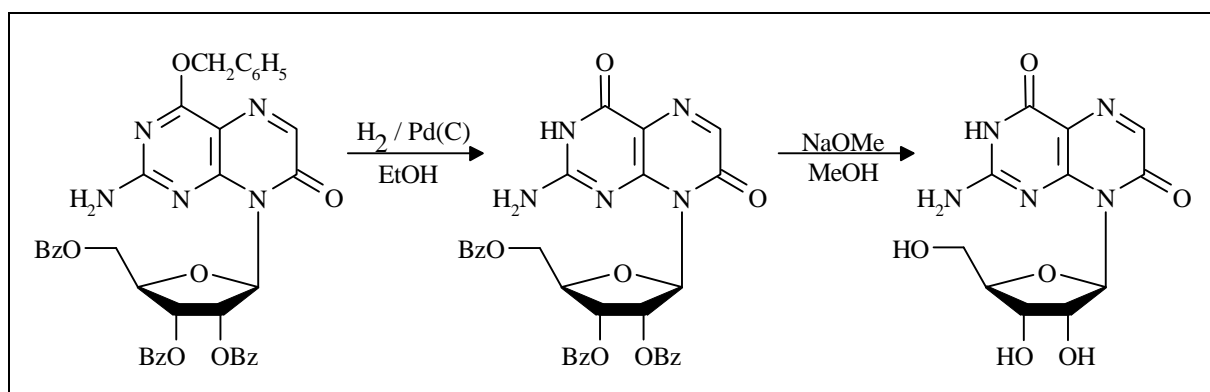


Abb.7.1: Entschützungsschritte bei der Isoxanthopterin-Ribosid-Synthese nach Schmid, Schraner und Pfeleiderer^[96]

Analog der von Schmid, Schraner und Pfeleiderer^[96] beschriebenen Methode (Abb.7.1) wurde mit der Entschützung der Nucleosid-Derivate des 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinons, den Verbindungen **79** und **83**, begonnen. An erster Stelle stand hierbei die Entschützung der O⁴-Position, um die NPE-Funktion einführen zu können. Den mildesten Weg zur Abspaltung von Benzylschutzgruppen^[314] bieten hydrogenolytische Methoden, wobei zumeist Palladium in Ethanol, in einigen Fällen auch Raney-Nickel, als Katalysator eingesetzt wird.

Wegen der schlechten Löslichkeit des toluoylgeschützten Nucleosids **83** in Alkohol wurde für die ersten Versuche ein Gemisch aus CH₂Cl₂ und Methanol (1:2) verwendet (Abb.7.2). Bei der Hydrierung wurden zwei Äquivalente Wasserstoff aufgenommen, wobei neben der Abspaltung der Benzyl- auch die Entfernung der dmf-Schutzgruppe beobachtet wurde. Das am Aglycon vollständig entschützte N⁸-[2-Desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-isoxanthopterin (**89**) ließ sich zwar in hoher Ausbeute (Rohprodukt >95%), aber nur in verunreinigter Form

erhalten. Eine Abtrennung des Katalysators vom Produkt konnte selbst über Kieselgurbett-Filtration bzw. eine Filtersäule nicht erreicht werden.

Möglicherweise bildet sich dabei ein Pteridin-Metall-Komplex aus. Derartige Verbindungen sind bei anderen Pteridin-Derivaten bekannt. Die Identifizierung von **89** erfolgte über das ^1H -NMR-Spektrum, welches die vollständige Abspaltung der Schutzgruppen am Aglycon belegte.

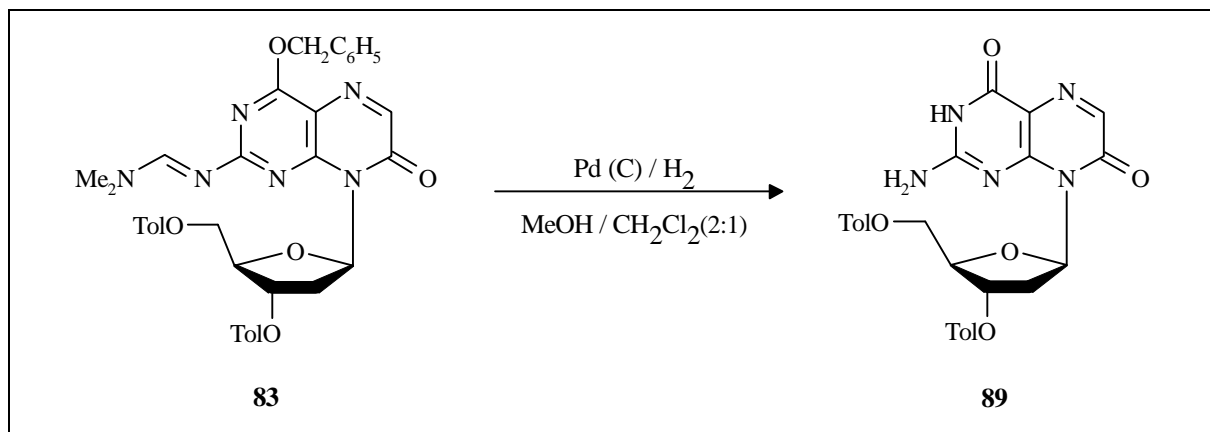


Abb.7.2 : hydrogenolytische Abspaltung der Schutzgruppen am Aglycon von **83**

Über die Variation des Lösungsmittels gelang es nach einer Reihe von Versuchen, die Verbindung **83** selektiv ohne Beeinflussung der Aminoschutzgruppe zu debenzylisieren. In einer Mischung aus CH_2Cl_2 und MeOH (2:1) konnte das 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino- N^8 -[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl- β -D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (**90**) in einer Ausbeute von 97% erhalten werden. Auf die gleiche Weise gelang es das entsprechende 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino- N^8 -[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy- β -D-ribofuranosyl]-4,7-(3H,8H)-pteridindion **91** ausgehend von Verbindung **79** in einer Ausbeute von 96% darzustellen (Abb.7.3).

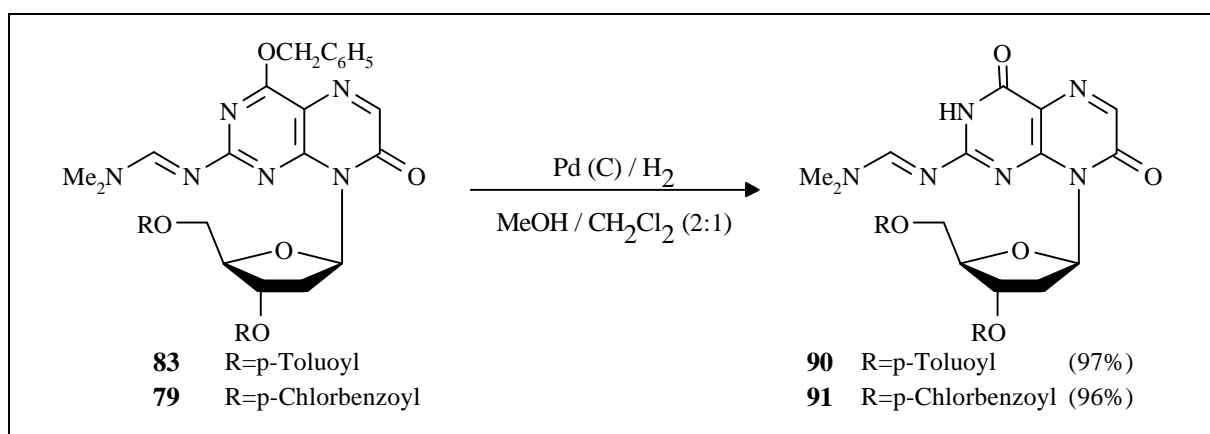


Abb.7.3 : Darstellung von **90** bzw. **91** durch Hydrogenolyse der Benzylimidoester von **83** bzw. **79**

In beiden Fällen konnte der Katalysator durch einen einfachen Filtrationsschritt aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Dabei konnten ohne weitere chromatographische Reinigung sehr reine Produkte gewonnen werden.

Bei den Versuchen, das isobutyrylgeschützte Nucleosid **82** zu debenzylisieren, wurden keine optimalen Abspaltungsbedingungen erreicht. Entgegen den Erwartungen fand unter den zur Darstellung von **90** und **91** analogen Bedingungen eine nur sehr langsame Spaltung des Benzylimidoesters statt. Zudem wurde festgestellt, daß bei dieser Reaktion (Abb.7.4) neben der Debenzylisierung zu **92** auch die Acylschutzgruppe langsam abgespalten wurde. Das 2-Isobutyrylamido-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (**92**) wurde über das ¹H-NMR-Spektrum identifiziert. Durch DC-Vergleich konnte die Bildung des am Aglycon vollständig entschützten Isoxanthopterin-Nucleosids **89** nachgewiesen werden.

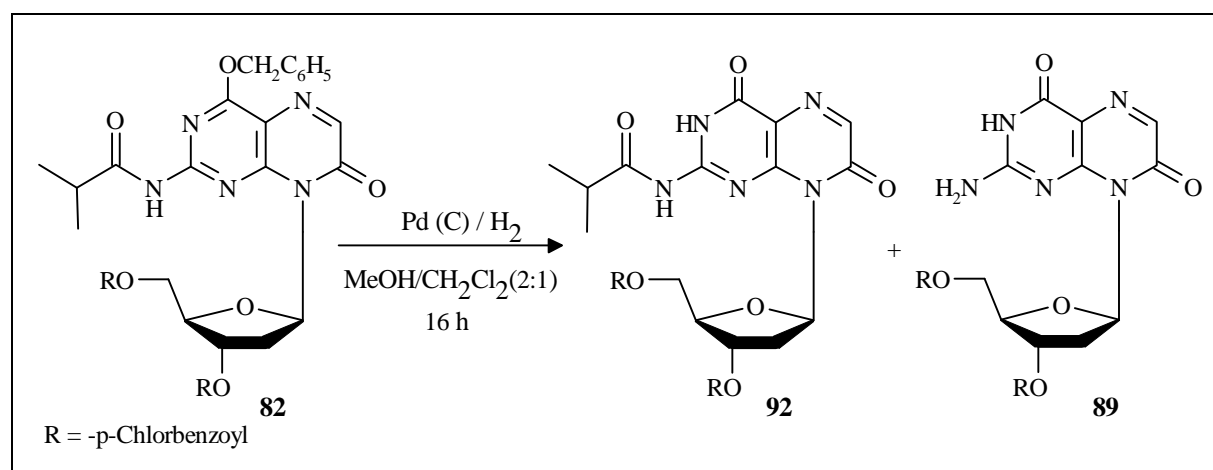


Abb.7.4 : Entschützungsversuch an Verbindung **82**

Da zu diesem Zeitpunkt der Syntheseweg über das 2-methylmercaptosubstituierte Pteridin-Derivat **84** bereits zum Erfolg geführt hatte (vgl. Kap.7.2), wurden die Versuche am isobutyryl-geschützten Nucleosid **82** nicht weiter verfolgt.

Dagegen ließ sich die Modellsubstanz, das 2-N,N-Dimethylamino-4-benzyloxy-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (**85**), ohne Probleme debenzylisieren (Abb.7.5). Die hydrogenolytische Abspaltung der Benzylschutzgruppe in MeOH/CH₂Cl₂ (2:1) führte in 84% zum entsprechenden 2-N,N-Dimethylamino-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (**93**).

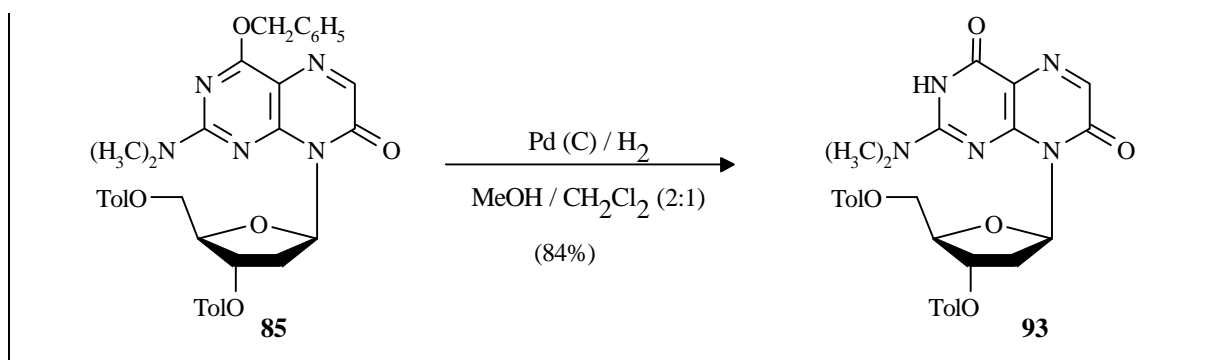


Abb.7.5: Debenzylierung des 2-N,N-Dimethylamino-4-benzyloxy-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindions (**85**)

7.1.2. Versuche zur Einführung neuer Schutzgruppen an **Ö** bzw. der 2-Aminofunktion

Ein an der heterocyclischen Base vollständig entschütztes Isoxanthopterin-Nucleosid, wie Verbindung **89**, besitzt in gängigen organischen Lösungsmitteln ein schlechtes Löslichkeitsverhalten. Dies erfordert für die Verwendung des Moleküls als Baustein bei der Oligonucleotidsynthese die Einführung einer Schutzgruppe am Aglycon, um so die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu unterbinden.

Wegen der geringen Reaktivität der 2-Aminofunktion erschien es sinnvoll die Amidfunktion, entsprechend der NPE-Strategie, durch Einführung der 2-(4-Nitrophenyl)ethylgruppe in den NPE-Imidoester zu überführen. In der Regel wird das Amid dabei nach Trichtinger, Charubala und Pfeleiderer^[285] in einer Mitsunobu-Reaktion^[315] mit dem NPE-Alkohol umgesetzt.

Bei der Behandlung des 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindions (**90**) mit 2-(4-Nitrophenyl)ethanol, Triphenylphosphin und Azodicarbonsäureestern in Dioxan oder auch Methylenchlorid nach Trichtinger^[285] wurden im DC nur sehr geringe Umsätze beobachtet. Da die Versuche jeweils nur in sehr kleinem Maßstab durchgeführt wurden, konnte in keinem Fall ein Produkt isoliert werden.

Dagegen konnte das Modellnucleosid, das 2-N,N-Dimethylamino-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (**93**), ohne Probleme umgesetzt werden. Die Reaktion der Verbindung mit jeweils 1,1 Äquivalenten 2-(4-Nitrophenyl)ethanol, Triphenylphosphin und Azodicarbonsäure-diisopropylester führte in glatter Synthese zum 2-N,N-Dimethylamino-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**94**). Die N³-Position ist aus sterischen Gründen nur schwer zugänglich. An der Aminofunktion können aufgrund der Dialkyl-Substitution keine Nebenreaktionen auftreten. Daher wurde **94** in einer Ausbeute von 82% erhalten (Abb.7.6).

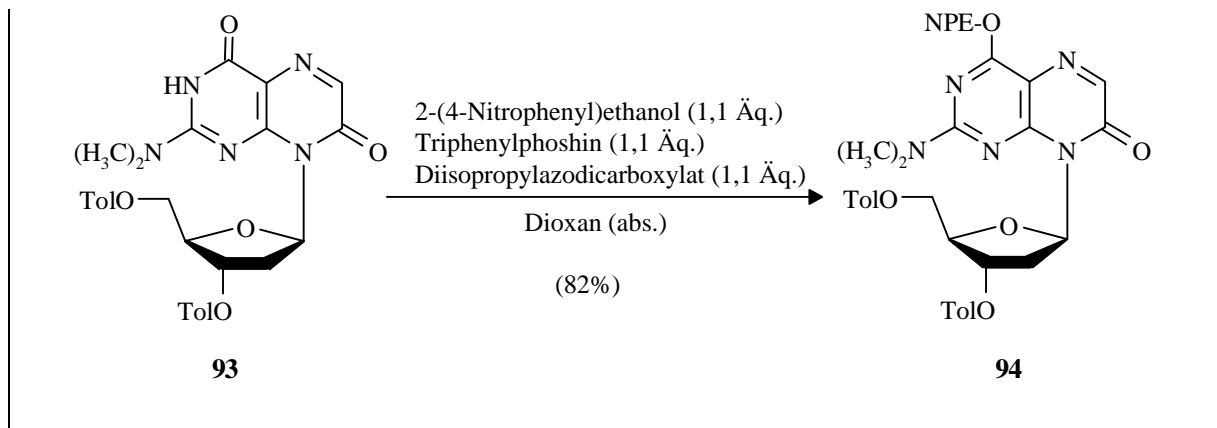


Abb.7.6 : Einführung der NPE-Gruppe über eine Mitsunobu-Reaktion in **93**

Sowohl ausgehend von **89** als auch ausgehend von Verbindung **90** mißlang die Einführung der NPE-Gruppe in die O⁴-Position unter Mitsunobu-Bedingungen. Aus diesem Grunde wurde für die Blockierung der 2-Aminofunktion nach alternativen Schutzgruppen gesucht.

Für das Guanin (**2**) wurden von Hata und Mitarbeitern^[318-320] drei relativ ungewöhnliche Varianten von 2-Amino-Schutzgruppen vorgeschlagen: das Phthalimid-Derivat **95**^[318], die Umsetzung mit Glyoxal und Isobuttersäureanhydrid zu **96**^[319], sowie die Tritylierung^[320] in trockenem Pyridin bei 100°C zum Mono-N-Tritylderivat **97** (Abb.7.7).

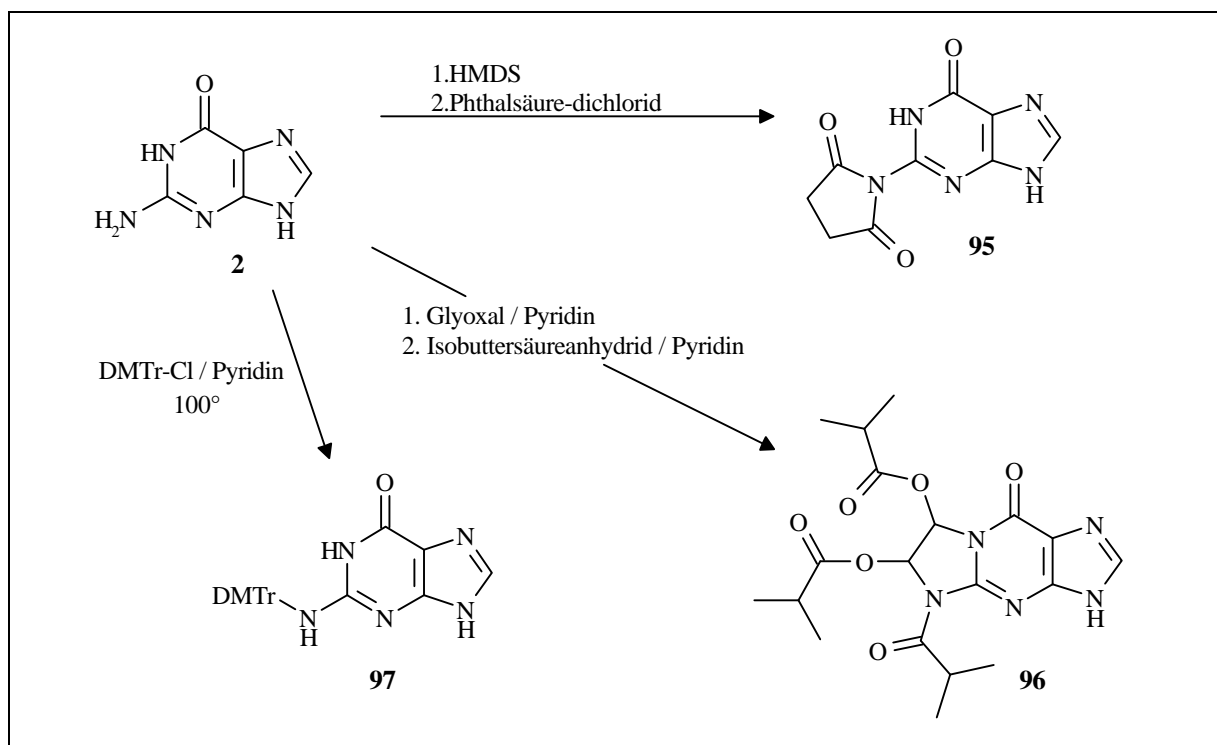


Abb.7.7 : Blockierungsmöglichkeiten für die 2-Aminofunktion des Guanins (**2**) nach Hata^[318-320]

Von den genannten drei Möglichkeiten ließ sich keine auf das Isoxanthopterin (**1**) bzw. das Isoxanthopterin-Nucleosid **89** übertragen, was die geringe Reaktivität der exocyclischen

Aminofunktion belegt. Einzig die dmf-Schutzgruppe läßt sich in guten Ausbeuten einführen. Im Verlauf meiner Diplomarbeit^[101] gelang die Blockierung der 2-Amino-Funktion des Isoxanthopterin (**1**) in 95% Ausbeute.

Allerdings zeigte es sich im Fall des dmf-geschützten Isoxanthopterin-Nucleosids **90**, daß diese Schutzgruppe an der 2-Amino-Funktion für die Blockierung der O⁴-Position über eine Mitsunobu-Reaktion keine Vorteile bringt.

7.1.3. Weitere Entschützung der dmf-geschützten Nucleoside **90** und **91**

Zur Abspaltung der Zuckerschutzgruppen in benzoylgeschützten Nucleosiden werden in der Literatur zumeist die Bedingungen nach Zemplen^[321,322] angewandt. Weitere Möglichkeiten bieten Metallcarbonate^[323,324], Ammoniak oder NaCN^[325-327], oder auch die Verwendung des stark nucleophilen Thiophenolats^[328].

Die zwölfstündige Behandlung der beiden Nucleoside **90** bzw. **91** mit konzentriertem Ammoniak bei 50°C führte zur Abspaltung aller vorhandenen Schutzgruppen. Auf diese Weise wurde in beiden Fällen das totalentschützte Isoxanthopterin-2'-desoxyribosid, das 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (**98**) erhalten. Die Ausbeuten lagen bei 47% im Fall der Entschützung von **90** bzw. 49% beim p-chlorbenzoyl-geschützten Nucleosid **91** (Abb.7.8).

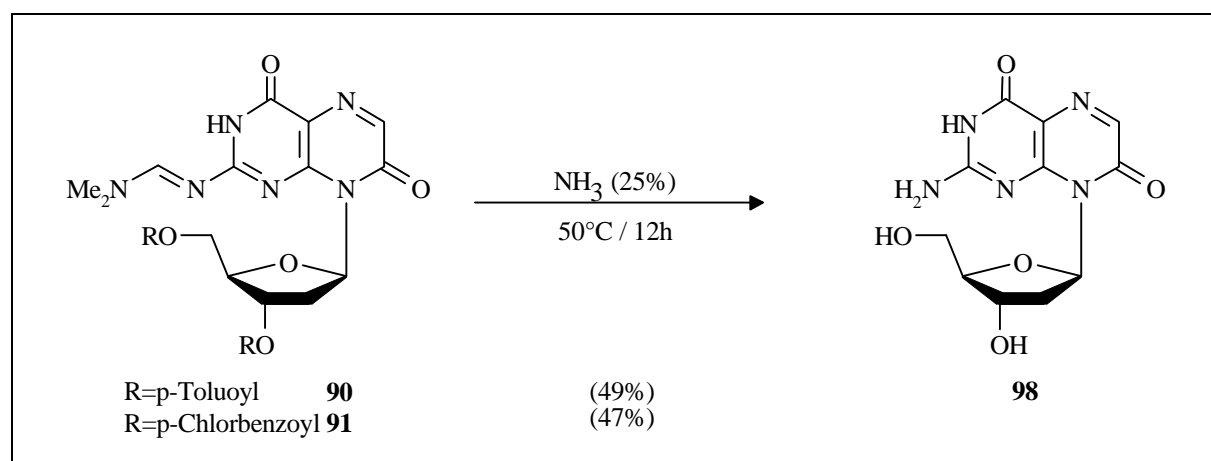


Abb.7.9 : Totalentschützung von **90/91** mit konz. Ammoniak zu **98**

Jede der anderen genannten Methoden ergab bei der Anwendung nur Produktgemische, wobei neben den Acylschutzgruppen am Zucker auch die dmf-Gruppe partiell entfernt wurde. Aufgrund der Schwerlöslichkeit der heterocyclischen Base lassen sich diese Gemische nur unter hohen Ausbeuteverlusten auftrennen. In kleinem Maßstab gelang es jedoch, bei der Behandlung von **91** nach Zemplen^[321,322], das 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-N⁸-[2-desoxy-β-

D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (**99**) über eine Kieselsäule in 44% Ausbeute zu isolieren (Abb.7.9).

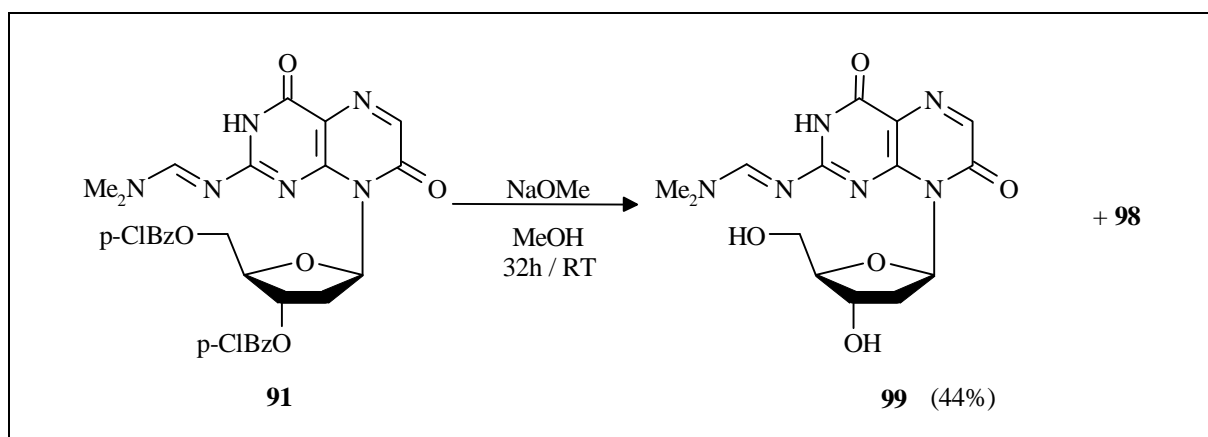


Abb.7.8 : Teilentschützung von **91** mit Natriummethanolat in Methanol nach Zemplen^[321,322]

Die Umsetzung des Nucleosids mit Natriummethanolat in Methanol führt bevorzugt zur Abspaltung der Acylschutzgruppen am Zucker, während in einer Nebenreaktion auch die dmf-Gruppe teilweise mitabgespalten wird. Nach einer Reaktionszeit von 32h konnte das Nucleosid **99** in einer Ausbeute von 44% chromatographisch isoliert werden.

7.2. DIE 2-METHYLMERCAPTO-ISOXANTHOPTERIN-ROUTE

Die Synthese eines O⁴-NPE-geschützten OH-freien Isoxanthopterin-Nucleosids ausgehend vom methylmercaptosubstituierten Nucleosid **84** erfordert vier Schritte: die Einführung der NPE-Gruppe, die Oxidation der Methylthio-Funktion und ihren Austausch gegen eine Aminofunktion, sowie die Entschützung des Zuckers. Vorlage dieses Syntheseweges bildeten die Arbeiten von Kyriases^[111,112] und Melguizo^[104,154].

7.2.1. Einführung der NPE-Gruppe

Die Darstellung des O⁴-NPE-Derivats von **84** erfolgte über eine Mitsunobu-Reaktion^[315] in Analogie zu den Arbeiten in der 6-Methyl-Reihe von Melguizo^[104,154]. Dabei wurde das N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-4,7(3H,8H)-pteridindion (**100**) nach chromatographischer Aufarbeitung in 78% Ausbeute erhalten (Abb.7.10).

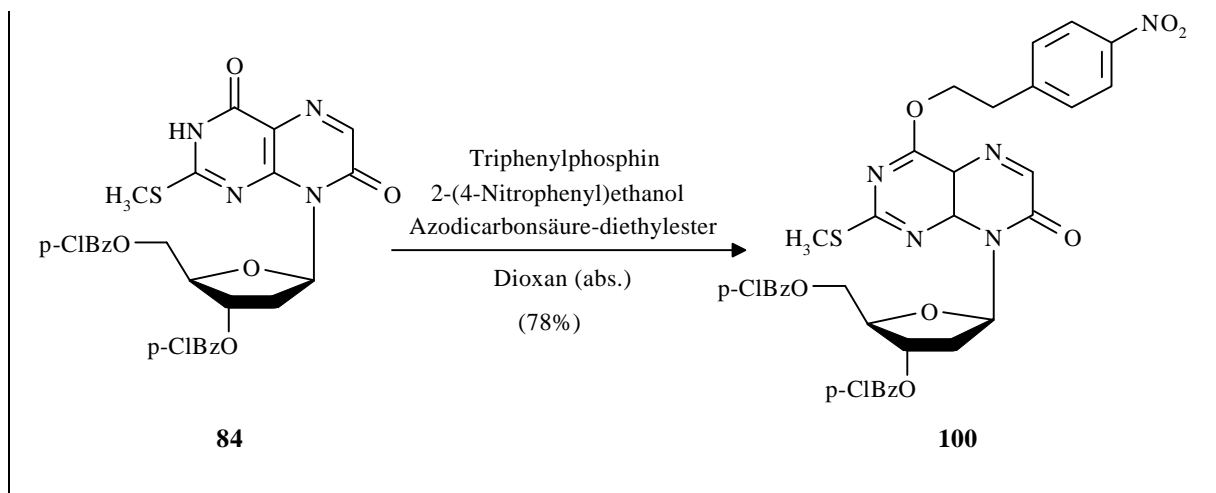


Abb.7.10 : Einführung der NPE-Gruppe in **84** über eine Mitsunobu-Reaktion^[315]

7.2.2. Die Oxidation der Methylmercaptogruppe

Im Zuge der Erarbeitung einer alternativen Synthesestrategie für die Darstellung des von Schmid^[96] bekannten Isoxanthopterin-Ribosids, benutzten auch Kyriases und Pfeleiderer^[112] den Weg über eine 2-Methylmercaptosubstitution.

Durch Oxidation der Methylthiofunktion von **101** (Abb.7.1) und nachfolgenden Austausch gegen ein Amin sollte dies erreicht werden. Aus früheren Modellstudien^[111] war bekannt, daß sich die Schwefelfunktionen in 2-Alkylsulfonyl-Pteridinen leicht und unter milden Bedingungen nucleophil austauschen lassen. Doch scheiterte dieser Zugang aufgrund einer Nebenreaktion, der Oxidation des Pteridingerüsts an der C(6)-Position. Es wurden daher statt Isoxanthopterin-Derivaten die entsprechenden Leukopterin-Nucleoside erhalten.

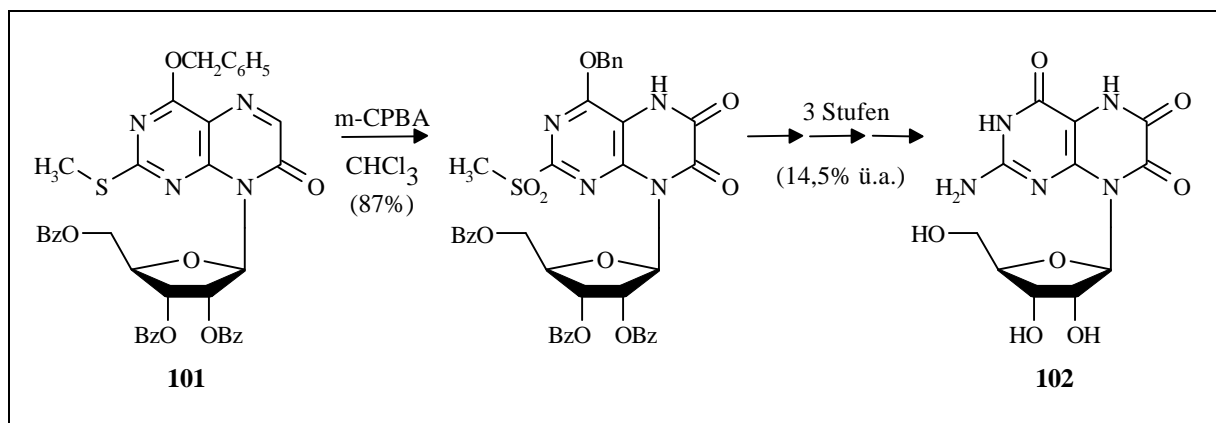


Abb.7.11 : Synthese des Leukopterin-N⁸-Ribosids **102** nach Kyriases und Pfeleiderer^[112]

Bei einer Reihe von Oxidationsversuchen mit meta-Chlorperbenzoesäure (m-CPBA) an Modellverbindungen durch Kyriases und Pfeleiderer^[112] wurde festgestellt, daß der Oxidationsprozeß im Fall bestimmter 4,7-Dioxo-Pteridin-Derivate nicht auf der Stufe der

entsprechenden 2-Methylsulfonyl-Derivate stehenbleibt, sondern zusätzlich eine Oxidation des Pteridinsystems an C(6) stattfindet. Dies führt, wie in Abb.7.12 am Beispiel der Oxidation des 3,8-Dimethyl-2-methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindions (**34**) gezeigt, nach der Substitution an **103** zu dem Leukopterin-Derivat **104**.

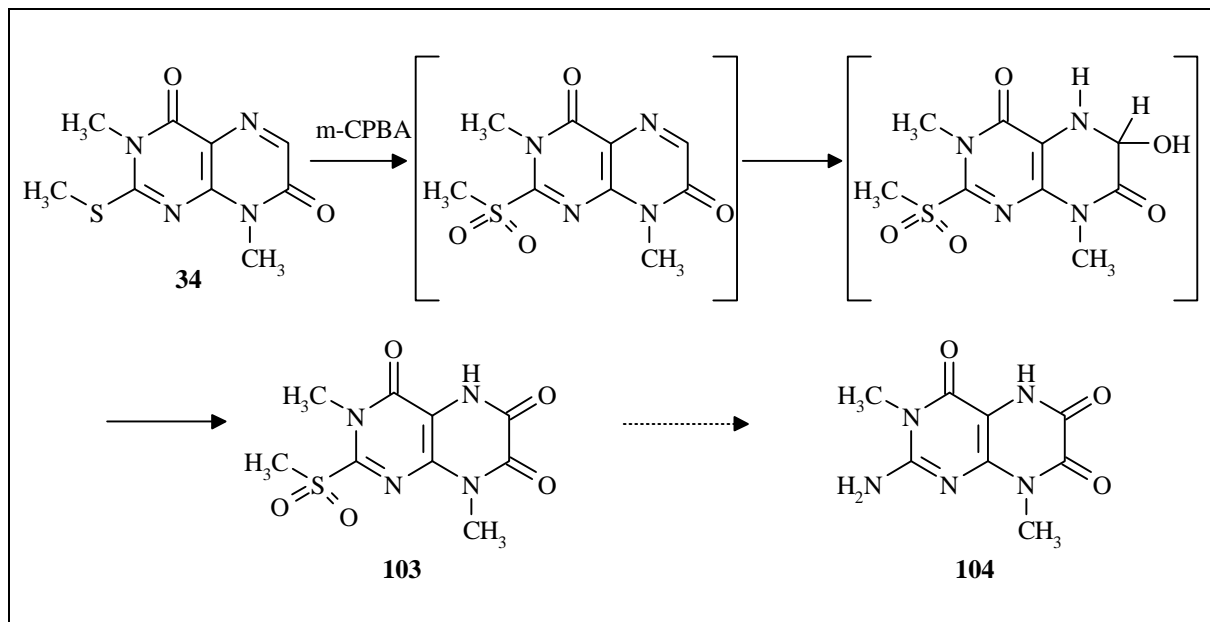


Abb.7.12 : Bildung des Leukopterin-Systems **104** nach Kyriases und Pfeleiderer^[112]

Die Oxidation des Schwefels überführt den Donorsubstituenten an der Position 2 (-SCH₃) in einen starken Elektronenakzeptor (-S(O)₂CH₃). Infolgedessen unterliegt das stark elektronen-defiziente Pteridin einer kovalenten Hydratation an der Doppelbindung N(5)=C(6). Das Hydrat wird anschließend weiter zum Amid aufoxidiert.

Aus diesem Grund konnten Kyriases und Pfeleiderer^[112] ausgehend von **101** zwar kein Isoxanthopterin-Nucleosid erhalten werden, doch eröffnete die Syntheseroute einen eleganten Zugang zu einem durch Direktglycosidierung nur schlecht zugänglichen Leukopterin-N⁸-Glycosid **102** (Abb.7.11).

Für eine erste Serie von Oxidationsversuchen (Tab.7.1) wurde das 8-Methyl-2-methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion (**105**) als Modellverbindung gewählt. In allen Versuchen wurden jedoch die Ergebnisse von Kyriases und Pfeleiderer^[112] bestätigt, selbst bei Verwendung gereinigter und getrockneter^[329] m-CPBA.

Die Identifikation der Produkte erfolgte im DC über Vergleich mit authentischem Material, dem 8-Methyl-2-methylsulfoxy-4,6,7(3H,5H,8H)-pteridintrion (**106**) und dem 8-Methyl-2-methylsulfonyl-4,6,7(3H,5H,8H)-pteridintrion (**107**).

Nr.	Oxidationsmittel	Äquiv.	LM	Zeit [min]	Temperatur	Produkt
1	m-CPBA	4	CH ₂ CL ₂	60	RT	107
2	m-CPBA*	ca. 4	CH ₂ CL ₂	60	RT	107
3	PBA	2,25	CH ₂ CL ₂	300	RT	106
4	PBA	4	CH ₂ CL ₂	300	RT	106
5	^t BuOOH (80%)	2,25	CH ₂ CL ₂	300	RT	105
6	m-CPBA	2,25	CH ₂ CL ₂	30	RT	106
7	m-CPBA	2,25	Puffer pH6	240	RT	106
8	m-CPBA	2,25	Puffer pH5	240	RT	106
9	m-CPBA	2,25	Puffer pH4	240	RT	106
10	^t BuOOH (80%)	2,25	Puffer pH6	240	RT	106
11	^t BuOOH (80%)	2,25	Puffer pH5	240	RT	106
12	^t BuOOH (80%)	2,25	Puffer pH4	240	RT	106

Tab.7.1 : erste Oxidationsversuche an der Modellverbindung **105** / *: m-CPBA gereinigt und getrocknet^[329]

Da auch der Ausschluß von Wasser aus der m-CPBA^[329] keinen Einfluß auf das Reaktionsergebnis hatte, mußte nach anderen Oxidationsreagentien gesucht werden. In der neueren Literatur finden sich zwei Vertreter, das Dimethyldioxiran (DMD) (**106**) von Murray und Jeyaraman^[330], sowie perfluorierte cis-2,3-Dialkyl-oxaziridine nach Petrow und DesMarteau^[331,332].

Bei den Oxaziridinen von Petrow und DesMarteau^[331,332] handelt es sich um gut handhabbare, hochselektive Reagenzien. Sie wurden erfolgreich bei der Oxidation von Schwefelverbindungen^[333] eingesetzt und lassen sich in einer zweistufigen Synthese aus perfluorierten Trialkylaminen durch Behandlung mit SbF₅ und anschließende Oxidation mit m-CPBA darstellen.

Wesentlich instabiler und apparativ etwas aufwendiger in der Darstellung ist das Dimethyldioxiran (**106**), welches allerdings deutlich kostengünstiger herzustellen ist. Nach ihrem Nachweis in der Gasphase^[334] und der ersten Isolation in einer Tieftemperaturmatrix^[335] gelang Murray^[330] mit der Synthese des DMD die Darstellung eines vergleichsweise stabilen Vertreters dieser Substanzklasse. Die geminalen Methylgruppen des Moleküls stabilisieren den Dreiring sowohl in kinetischer als auch thermodynamischer Hinsicht^[336].

Nach den Synthesevorschriften von Murray et al.^[330,337] läßt sich **106** als ca. 0,1 M Lösung in Aceton durch Oxidation von Aceton mit Kaliumpersulfat-Tripelsalz bei pH=7,4 unter Schutzgas erhalten. Die gelbe Lösung von **106** kann bei -25°C über Molsieb für einige Tage gelagert werden.

Nach einer alternativen Vorschrift von Adam et al.^[336,338,339] kann auch ohne Schutzgas und mit technischem Aceton gearbeitet werden, wenn die Reaktionstemperatur permanent unter 15°C gehalten wird. Dabei werden Lösungen von **106** in Aceton mit Konzentrationen um 0,09-0,11 M erhalten. Versuche die Konzentration dieser Lösung durch Einengen zu erhöhen, führen zur Zersetzung des Oxirans, so daß dies im Temperaturbereich zwischen -20 und +20°C einen Maximalgehalt darstellt.

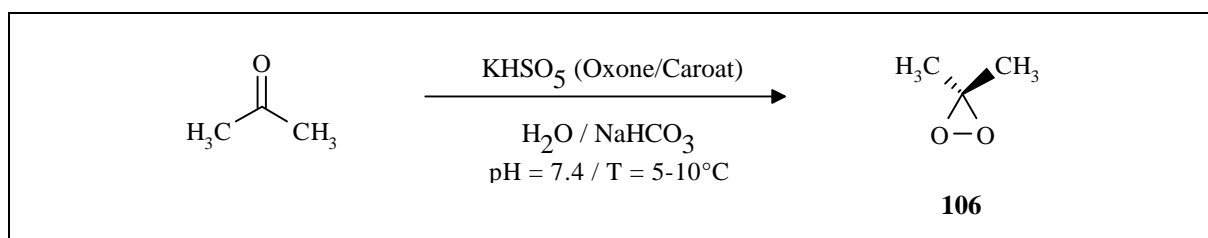


Abb.7.13 : Darstellung von Dimethyldioxiran (**106**) nach Adam^[336,338,339]

Die Synthese des verwendeten Dimethyldioxirans erfolgte nach den Vorgaben von Adam et al.^[336,338,339], wobei Ausbeuten von etwa 5% in Form von ca. 0,07 M Lösungen erreicht wurden. Eine genaue Konzentrationsbestimmung konnte nicht durchgeführt werden. Die Konzentrationsangabe wurde aus den erhaltenen Reaktionsumsätzen rückgerechnet.

In einem ersten Versuch wurde das 3,8-Dimethyl-2-methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion (**34**) in trockenem Methylenchlorid mit 2 Äquivalenten Oxidationsreagenz (angenommene Konzentration an **106** = 0,1M) umgesetzt, wobei ein Gemisch zweier Verbindungen (**107** und **108**) im Verhältnis 6:4 erhalten wurde (Abb.7.14).

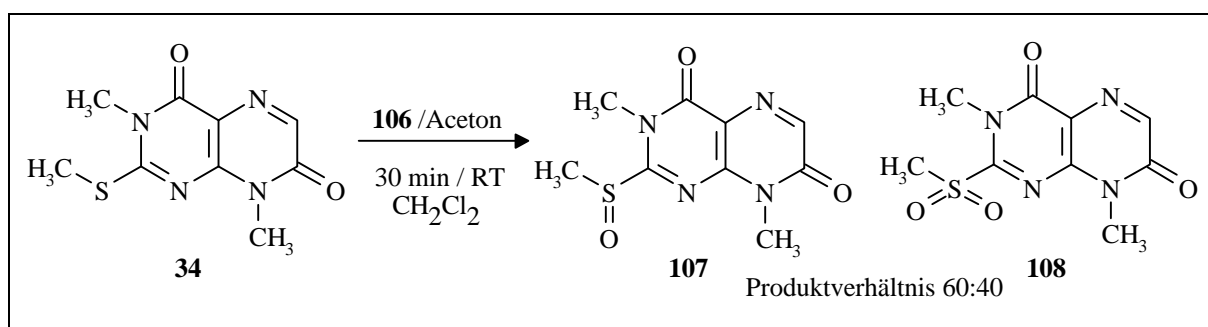


Abb.7.14 : Modell-Oxidation von **34** mit **106**

Im ¹H-NMR-Spektrum dieses Produktgemischs in CDCl₃ (Abb.7.15) fanden sich je zwei Signalsätze für die N³- bzw. N⁸-Methyl-Protonen und das H-C(6), sowie ein Methylsulfoxyl- und ein Methylsulfonyl-Signal, jeweils im Verhältnis 6:4.

Dabei ergab die Oxidation am Schwefel jeweils eine deutlich Tieffeldverschiebung des Signals der Methylgruppe am Schwefel von 2,71 ppm (**34**) über 3,09 ppm bei **107**, bis hin zu 3,52 ppm beim Methylsulfonylderivat **108**. Ebenfalls erfährt eines der beiden N-Methyl-Signale (vermutlich N(3)-CH₃) eine Änderung um 0,4 ppm zu tieferem Feld, jedoch ergibt die zweite Oxidationsstufe hier nur eine gerinfügige zusätzliche Differenz. Die Tieffeldverschiebungen der zweiten N-Methylgruppe und des H-C(6)-Signals (8,10ppm (**34**), 8,24ppm (**107**) bzw. 8,28ppm(**108**)) fallen dagegen weniger deutlich aus.

Das EI-Massenspektrum des Gemischs (Abb.7.16) zeigte die erwarteten Peaks für das 3,8-Dimethyl-2-methylsulfoxyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**107**) bei m/z=254 und das 3,8-Dimethyl-2-methylsulfoxyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**108**) bei m/z=270. Der 100%-Peak bei m/z=191 entspricht jeweils der Abspaltung des Substituenten an der Position 2, also eines S(O)CH₃-Fragments (-63) ausgehend von **107** bzw eines S(O)₂CH₃-Fragments (-79) ausgehend von **108**.

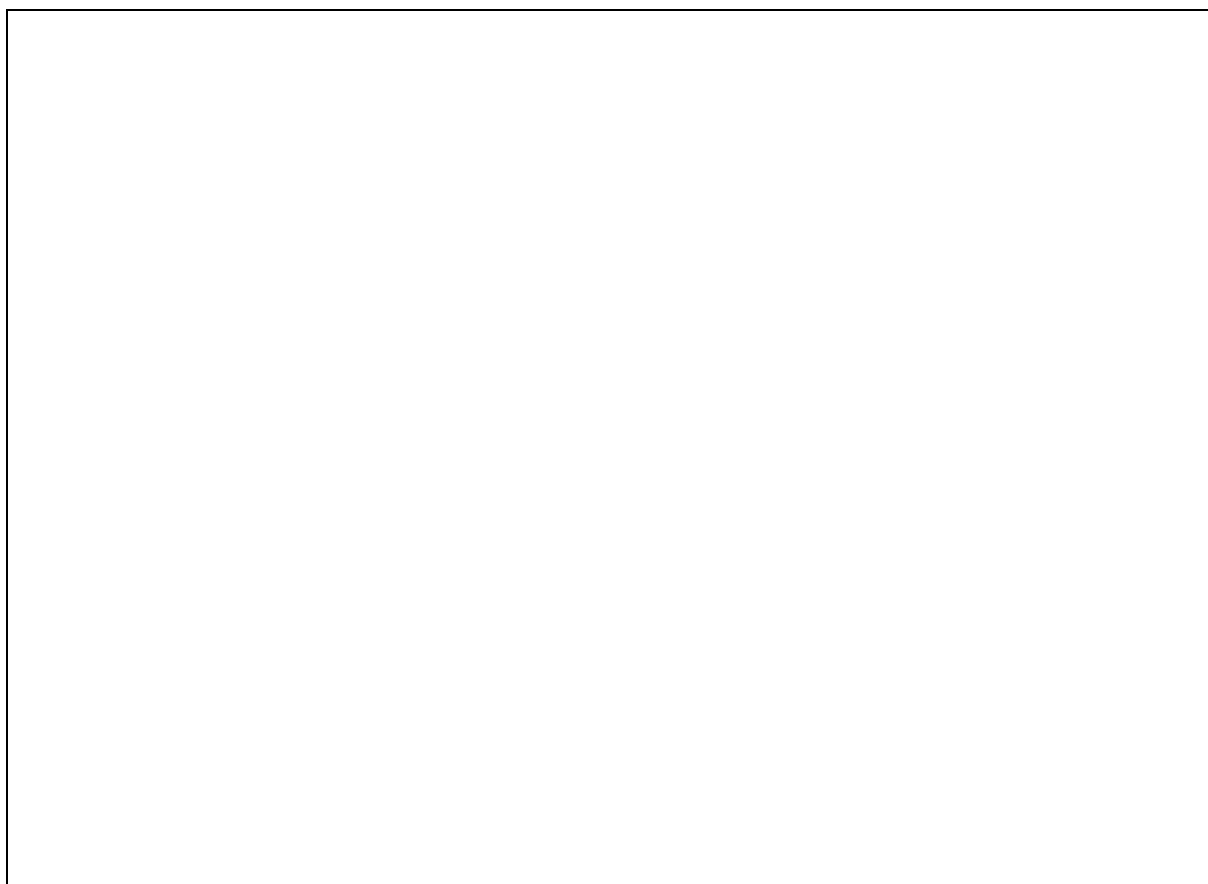


Abb.7.16. EI-MS-Plot des Oxidationsgemischs (**107/108**)

In Tabelle 7.2 sind nochmals die wichtigsten Daten der Verbindungen **34**, **107** und **108** zusammengestellt.

Nr.	Signallagen im ¹ H-NMR in CDCl ₃			MW	m/z-Peak im EI-MS
	2-S(O) _n CH ₃	N ³ CH ₃ bzw. N ⁸ CH ₃	H-C(6)		
34	2,71 ppm	3,53 ppm + 3,46 ppm	8,10 ppm	238,27	
107	3,09 ppm	3,89 ppm + 3,73 ppm	8,24 ppm	254,27	254
108	3,52 ppm	3,95 ppm + 3,68 ppm	8,28 ppm	270,27	270

Tab. 7.2 : ausgewählte Substanzdaten von **34**, **107** und **108**

In analoger Weise wurde auch das N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-β-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**100**) oxidiert (Abb.7.17). Dazu wurde eine Lösung des Nucleosids solange mit frischer Dimethyldioxiran-Lösung versetzt, bis nur noch ein Produkt im DC nachgewiesen werden konnte. Die Reaktion verläuft über eine im DC sichtbare Zwischenstufe, das N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylsulfoxyl-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**109**). Bei der Synthese werden keinerlei Nebenreaktionen beobachtet. Nach vollständigem Umsatz (DC) wird das Lösungsmittel abgezogen, wobei das N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylsulfonyl-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**110**) in einer Ausbeute von 97% in sehr hoher Reinheit isoliert werden kann.

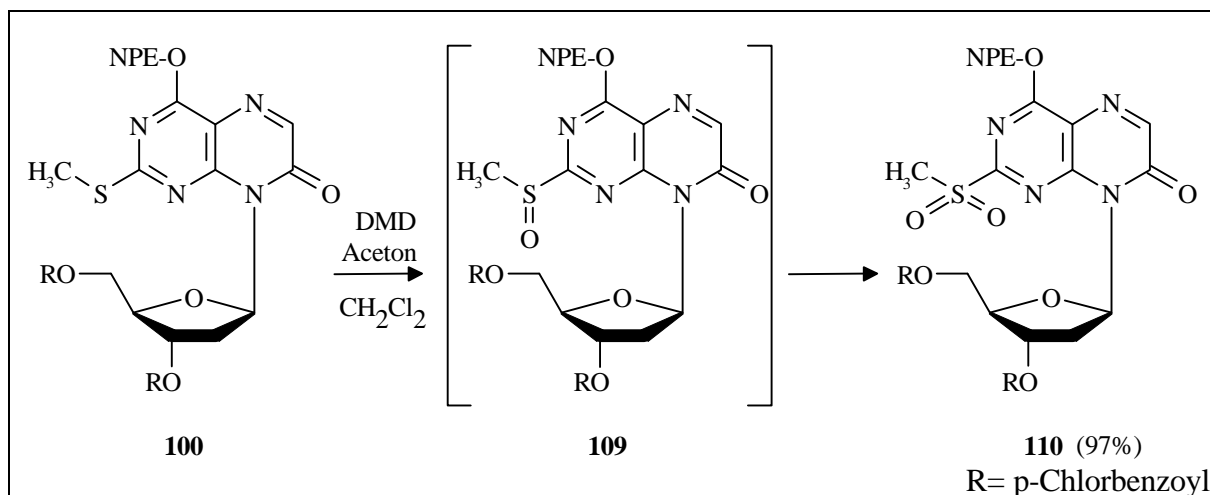


Abb.7.17 : Oxidation von **100** mit Dimethyldioxiran

Auch bei Zugabe eines Überschusses der Dimethyldioxiran-Lösung wurde keine Weiteroxidation von **110** zu einem entsprechenden Leukopterinssystem beobachtet.

7.2.3. Austausch des Substituenten in Position 2

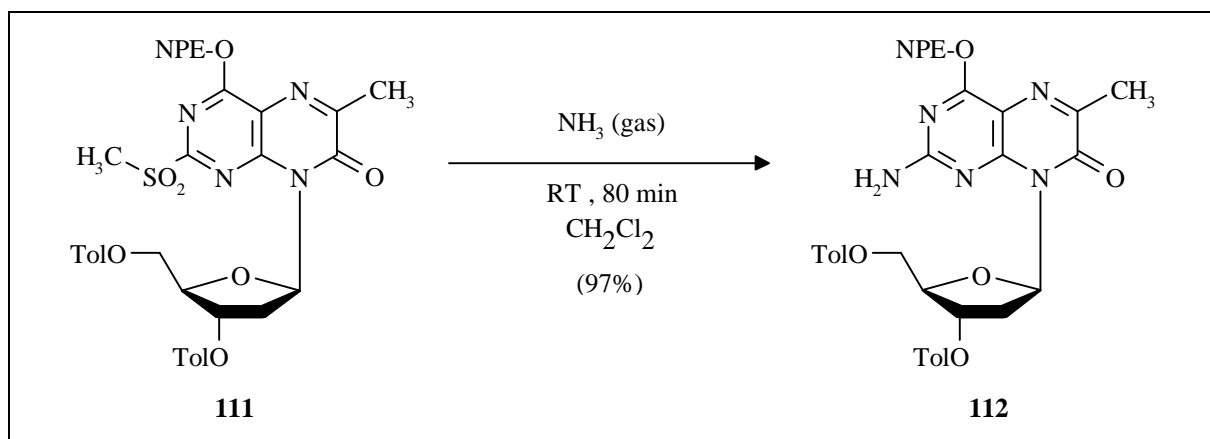


Abb.7.18 : Darstellung des 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-6-methyl-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinons (**112**) durch Melguizo^[104,154]

Melguizo^[104,154] führte durch Substitution mit gasförmigem Ammoniak in CH₂Cl₂ am analogen N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-6-methyl-2-methylsulfonyl-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**111**) die Aminofunktion in das Molekül ein und gelangte so zum geschützten 6-Methylisoxanthopterin-Nucleosid **112** (Abb.7.18).

Diese Methode ließ sich ohne Modifikationen auf Verbindung **110** übertragen (Abb.7.19). Nach einstündigem Einleiten von Ammoniak in eine Lösung des Nucleosids in Methylenchlorid wurde das 2-Amino-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**113**) in einer Ausbeute von 89% isoliert.

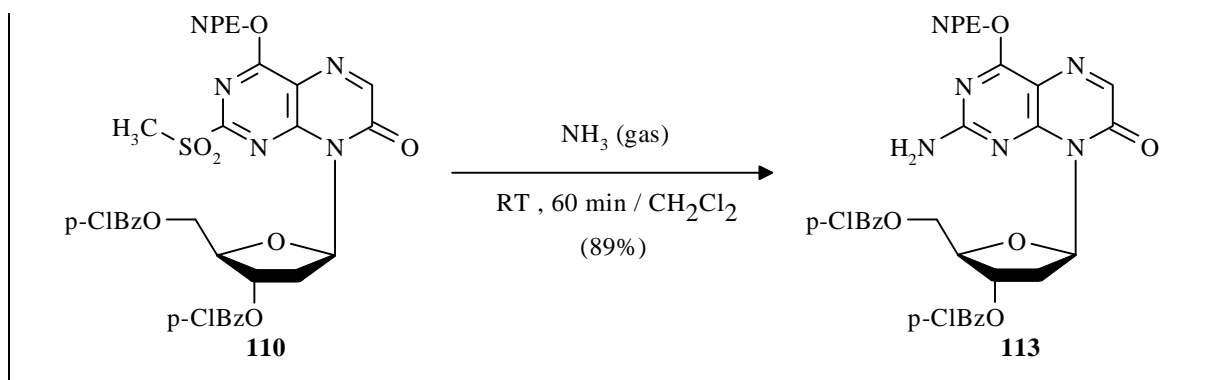


Abb.7.19 : Austausch der Methylsulfonylfunktion im Nucleosid **110**

7.2.4. Abspaltung der Zuckerschutzgruppen

Bei der NPE-Gruppe handelt es sich um eine basenlabile Schutzgruppe. Ein NPE-Imidoester kann dabei nach zwei Möglichkeiten gespalten werden, einerseits in einer β -Eliminierung unter Freisetzung der Amidfunktion, als Ester aber andererseits auch in einer nucleophilen Substitution.

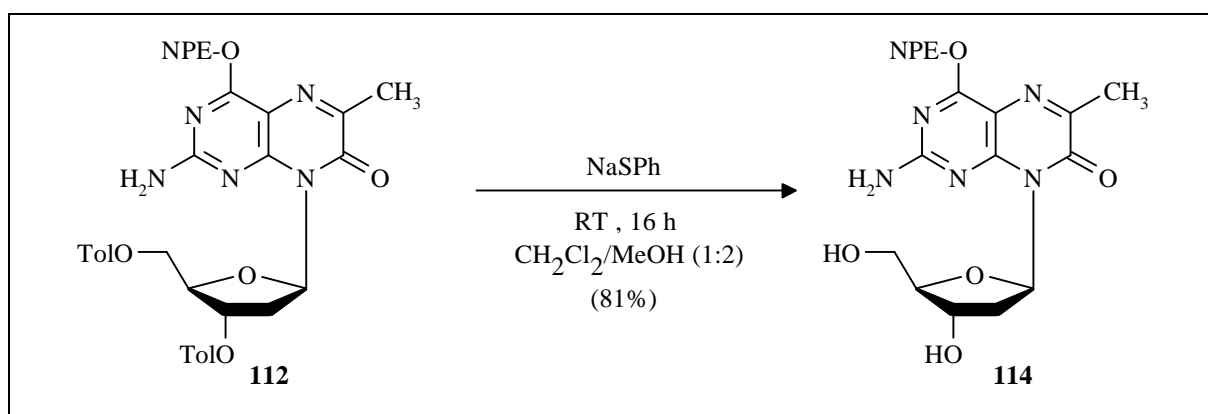


Abb.7.20 : Abspaltung der Zuckerschutzgruppen in **114** nach Melguizo^[154] mit Natriumthiophenolat

So erhielt Melguizo^[154] bei der Behandlung von **112** mit methanolischem Ammoniak auch ein 4-aminosubstituiertes Produkt (Abb.7.20). Daher verwendete er zur Abspaltung der Zuckerschutzgruppen 2 Äq. Thiophenolat in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:2). Dieses Reagenz verbindet geringe Basizität mit guten nucleophilen Eigenschaften (bei $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktionen in MeOH bei 25°C ^[328]). Auf diesem Wege gelang die Darstellung des 2-Amino- N^8 -[2-desoxy- β -D-ribofuranosyl]-6-methyl-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinons (**114**) in einer Ausbeute von 81% nach chromatographischer Auftrennung^[154].

Die Übertragung dieser Bedingungen auf das 2-Amino- N^8 -[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy- β -D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**113**) schlug fehl. Einerseits wurde nur ein geringer Reaktionsumsatz beobachtet, andererseits entstanden eine Reihe von

Nebenprodukten. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch von Gottlieb^[340] aus unserer Arbeitsgruppe bei Entschützungsversuchen an einem anderen Nucleosid beobachtet.

Aufgrund der Basenlabilität der NPE-Gruppe war die Verwendung von Natriummethanolat oder methanolischem Ammoniak von vorneherein auszuschließen. Gute Ergebnisse in Vorversuchen lieferten dagegen die Reaktionen von **113** mit Kaliumcarbonat bzw. Natriumcyanid in Methanol. Aufgrund der schnelleren Reaktionszeiten wurde letztlich mit Cyanid gearbeitet, wobei nach Behandlung des 2-Amino-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinons (**113**) mit 5 Äquivalenten Natriumcyanid in Methanol bei Raumtemperatur für 12h das 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**115**) in einer Ausbeute von 86% isoliert werden konnte (Abb.7.20). **115** ist wegen der Blockierung der O⁴-Position deutlich besser löslich als das totalentschützte Isoxanthopterin-Nucleosid **99** und konnte daher problemlos chromatographisch über Kieselgel gereinigt werden (Abb.7.21).

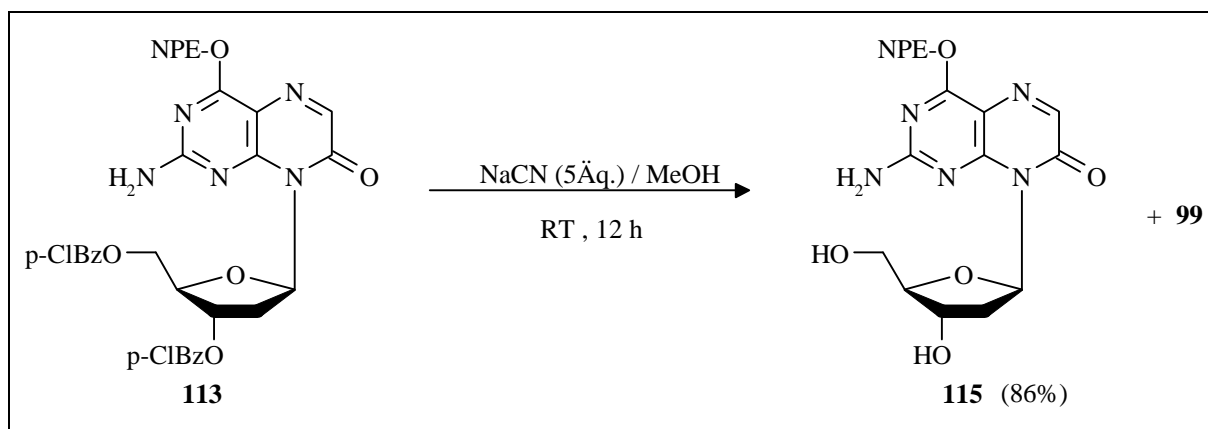


Abb.7.21 : Abspaltung der Zuckerschutzgruppen von **113** mit NaCN/MeOH

Als Nebenprodukt bildete sich bei dieser Reaktion in geringer Menge eine sehr polare Verbindung mit hellblauer Fluoreszenzfarbe. O⁴-alkylierte Isoxanthopterine fluorescieren zumeist dunkelblau, während nicht blockierte Derivate einen deutlich helleren und intensiveren Fluoreszenzton besitzen. Im DC-Vergleich auf Cellulose konnte das Nebenprodukt auch folgerichtig als das totalentschützte 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (**99**) identifiziert werden. Dies deutete auf eine Instabilität der NPE-Gruppe gegenüber den Cyanidionen hin.

7.3. Spektroskopische Daten

7.3.1. UV-Absorptionsspektren

Wie schon in Kapitel 5.4. erwähnt wurde, wird die Lage der längstwelligeren UV-Absorption von der heterocyclischen Base bestimmt. Im kürzerwelligen Bereich findet sich wiederum die durch die Zuckerschutzgruppen bedingte Strukturierung. In Tabelle 7.3 finden sich die UV-

Daten der neu synthetisierten Pteridin-Nucleoside zusammen mit denen der entsprechenden Edukte aus Kap.5.

Nr.	λ_{\max} [nm]					log ϵ				LM/pH	
79	202		239		356	4,73		4,68		4,39	MeOH
83	202	221		[272]	356	4,78	4,62		4,21	4,28	MeOH
84	202		239		352	4,70		4,64		4,06	MeOH
85	202	[214]	239	282	362	4,79	[4,59]	4,68	3,73	4,23	MeOH
89	202	[210]	237	286	351	4,70	[4,55]	4,56	3,85	4,06	MeOH
90	203		239		360	4,72		4,66		4,33	MeOH
93	202		236	297	357	4,69		4,63	3,94	4,12	MeOH
94	202	[212]	240	[268]	362	4,79	[4,62]	4,67	[4,16]	4,19	MeOH
98		210	247	290	360		4,19	4,04	3,99	4,22	MeOH
99			258	[279]	356			4,07	[3,65]	4,13	pH 12
100	202	221	241	336	[350]	4,75	4,60	4,69	4,18	[4,10]	MeOH
110	202	217	240	278	[292]	4,76	4,52	4,64	4,21	[4,18]	MeOH
113	203		239	[269]	348	4,78		4,64	[4,19]	4,13	MeOH
115	210	[229]	[267]	278	347	4,57	[4,11]	[4,01]	4,02	4,18	MeOH

Tab.7.3 : UV-Daten der neusynthetisierten Nucleoside, sowie der Ausgangsnucleoside **79** und **83-85**

Auf den folgenden Seite sind an drei Beispielen die Änderungen im UV-Spektrum bei Abspaltung bzw. Einführung von Schutzgruppen dargestellt.

In Abb.7.22 sind die Spektren der 2-N,N-Dimethylamino-Reihe **85-93-94** dargestellt. Es zeigt die für die toluoylgeschützten und O⁴-blockierten Nucleoside charakteristische Strukturierung der kurzwelligen Region, welche bei der Debenzylierung vorübergehend verlorengeht. Daneben zeigt sich die unterschiedliche Strukturierung der Region zwischen 250 und 300 nm. Zudem zeigt sich eine schwache bathochrome Verschiebung, in Kombination mit einer Intensitätserhöhung der längstwelligen Absorption bei Blockierung der O⁴-Position gegenüber Verbindung **93**.

Abb.7.23 zeigt den Übergang von **83** über Debenzylierung zu **90** und die nachfolgende Abspaltung entweder der dmf Schutzgruppe zum am Aglycon entschützten Nucleosid **89** oder der Zuckerschutzgruppen zu Verbindung **99**.

Abb.7.24 zeigt die Spektren der auf der „2-Methylmercapto-Route“ erhaltenen Verbindungen **84**, **100**, **110** und **113**. Die Reihe weist zwei Besonderheiten auf, einmal die hypsochrome Verschiebung der längstwelligen Absorption bei Einführung der NPE-Gruppe (**84** -> **100**) auf

336 nm, wobei bei 350 nm nur noch eine Schulter zu sehen bleibt. Dieser Effekt wurde bereits von Melguizo^[104,154] und Kyriases^[112] bei entsprechenden analogen Nucleosiden und Vergleichssubstanzen berichtet.

Die zweite Besonderheit ist das UV-Spektrum der Methylsulfonyl-Verbindung **110**, das keine Ähnlichkeiten mit einem normalen Pteridin-Spektrum aufweist, sondern eher Pyrimidin-Charakter zeigt. Die Analogie der Bandenlage zu literaturbekannten vergleichbaren 5,6-Dihydropteridinen könnte vermuten lassen, daß sich analog einer kovalenten Hydratation ein Lösungsmittelmolekül (MeOH) an die N⁵-C⁶-Bindung angelagert hat. Doch findet sich auch bei der von Melguizo^[154] synthetisierten 6-Methyl-Verbindung ein identisches Verhalten. Bei 6-substituierten Verbindungen ist bekannt, daß die Ausbildung kovalenter Hydrate nicht stattfindet. Aufgrund dessen ist anzunehmen, daß der Effekt im Spektrum von **110** auf den starken Elektronenzug des Methylsulfonylsubstituenten zurückzuführen ist.

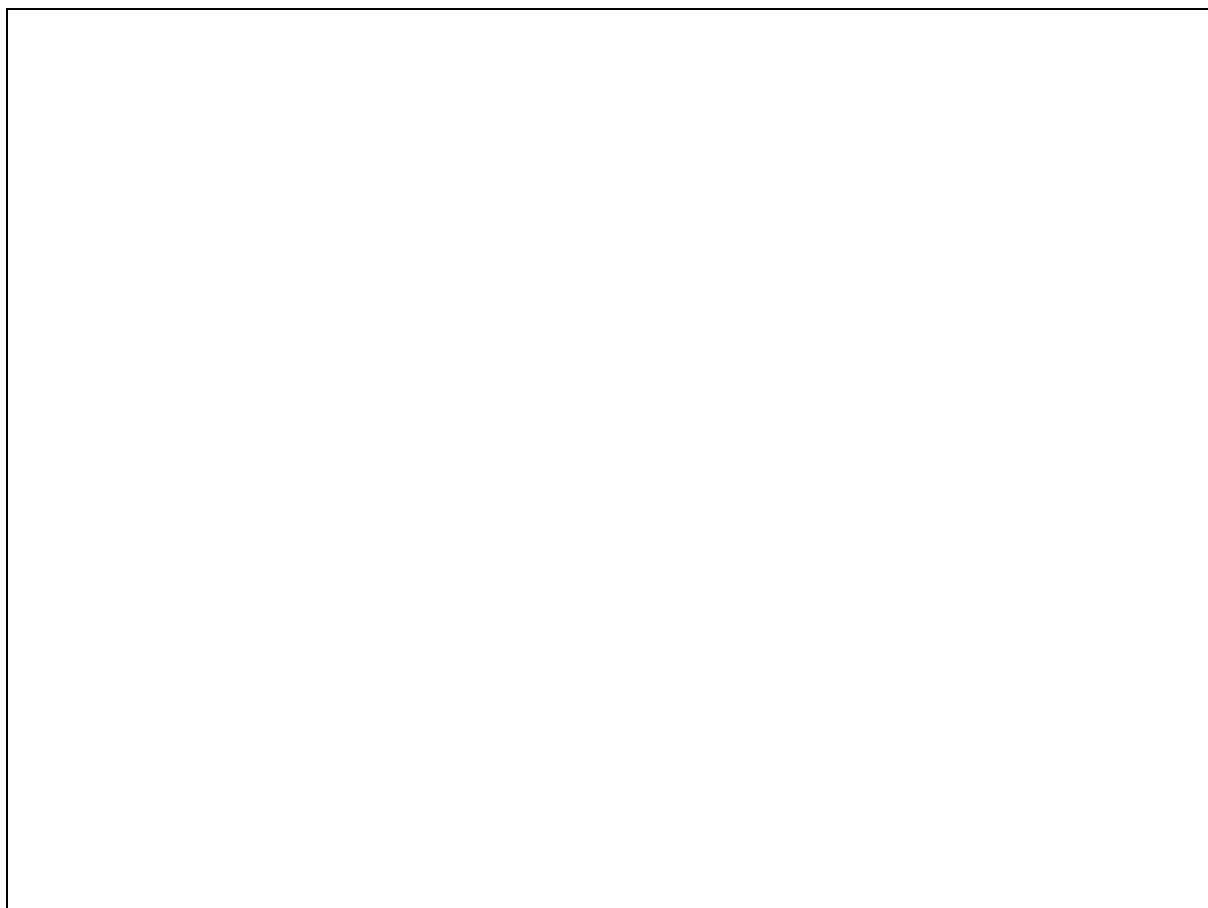


Abb.7.22 : UV-Spektren-Vergleich der Verbindungen **85**, **93** und **94** in Methanol



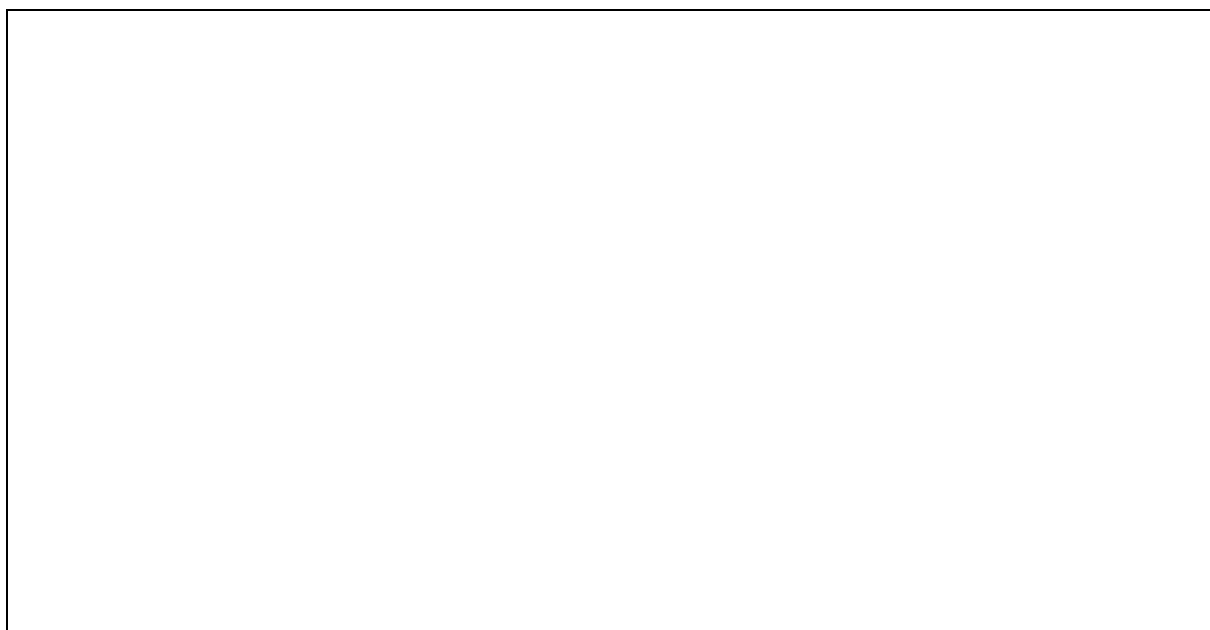


Abb.7.23 : UV-Spektren-Vergleich der Verbindungen **83**, **89**, **90** und **99** in Methanol

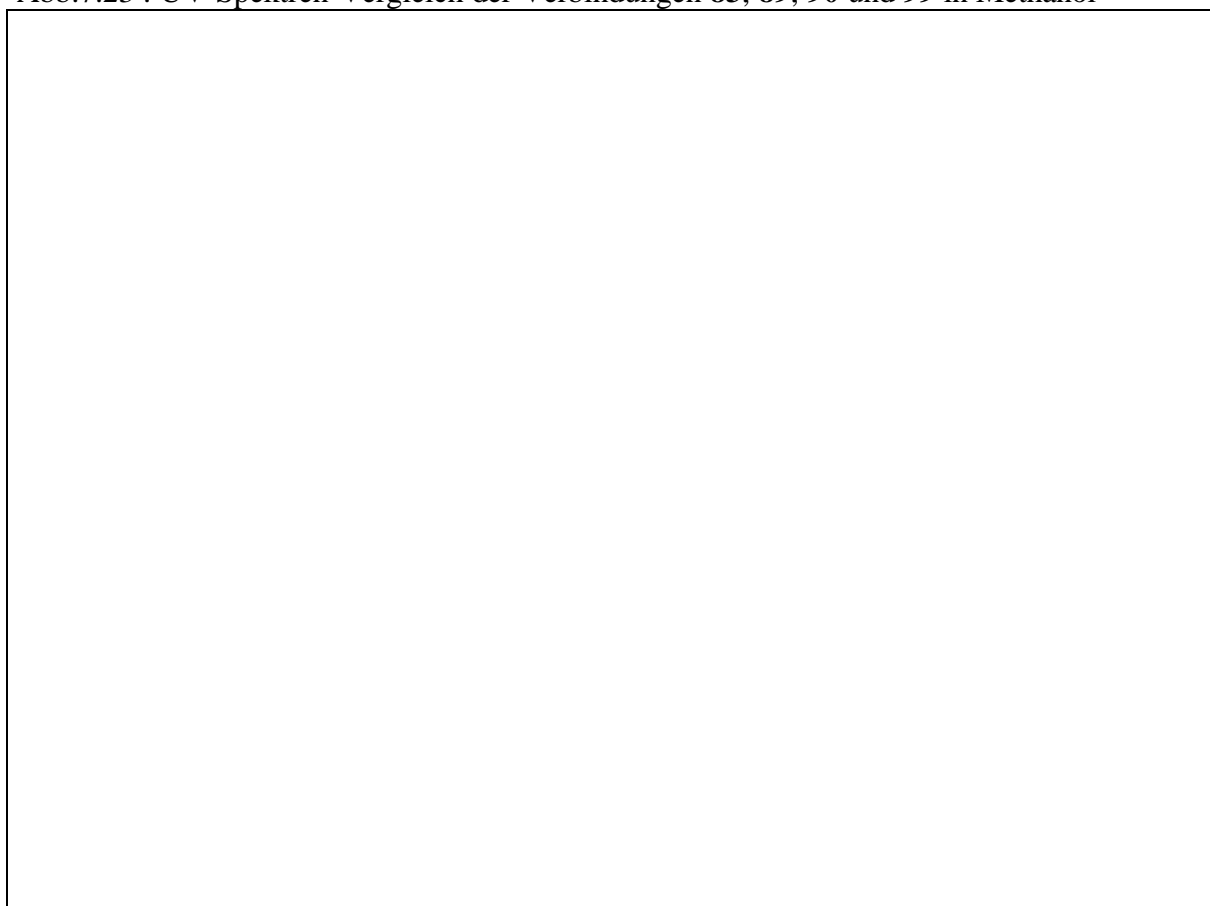


Abb.7.24 : UV-Spektren-Vergleich der Verbindungen **84**, **100**, **110** und **113** in Methanol

7.3.2. ¹H-NMR-Spektren

Für die ¹H-NMR-Spektren der neu synthetisierten Nucleoside **89**,...,**115** gilt im Wesentlichen das gleiche wie bereits in Kapitel 5.4.2. beschrieben wurde. Neue Signale ergeben sich nur durch die Einführung der NPE-Schutzgruppe, die Oxidation der Schwefelfunktion und die Abspaltung der Zuckerschutzgruppen.

Wie sich aus der Tabelle 7.4 (A+B) ablesen läßt ergeben sich für die Signallagen der Protonen am Aglycon mit der Ausnahme der Methylsulfonylverbindung **110** keine Änderungen. Die Tieffeldverschiebung des Methylsignals bei der Oxidation von **100** zu **110** um rund 0,8 ppm entspricht dabei dem Wert, der bereits bei der Modellsubstanz erhalten worden war.

Die NPE-Gruppe bedingt zwei Dubletts bei etwa 8,2 und 7,5 ppm, welche den zur Nitrogruppe ortho- bzw. metaständigen Wasserstoffatomen zuzuordnen sind. Daneben finden sich zwei Triplets für die beiden CH₂-Gruppen der Ethylenbrücke. Dabei wird das zwischen 4,6 und 4,9 ppm erscheinende Signal der zum Sauerstoff α-ständigen, das zwischen 3,4 und 3,2 ppm liegende der zum Sauerstoff β-ständigen CH₂-Gruppe zugeordnet.

Die Lage der Resonanzsignale-Signale der Zuckerprotonen ändert sich in den meisten Fällen nicht. Bei den am Zucker entschützten Nucleosiden **98**, **99** und **115** zeigt sich jedoch eine allgemeine Hochfeldverschiebung der anderen Signale der Protonen am Zucker durch den Wegfall der aromatischen Zuckerschutzgruppen. Die beiden Hydroxyl-Protonen erscheinen als breite Dubletts bei etwa 5,15 ppm (5'-OH) und rund 4,5 ppm (3'-OH), wenn die Spektren in deuteriertem DMSO aufgenommen werden.

Als Beispiele sind die ¹H-NMR-Spektren des 2-Methylmercapto-Syntheseweges abgebildet, also diejenigen der Verbindungen **100**, **110**, **113** und **115** (Abb.7.25-7.28).

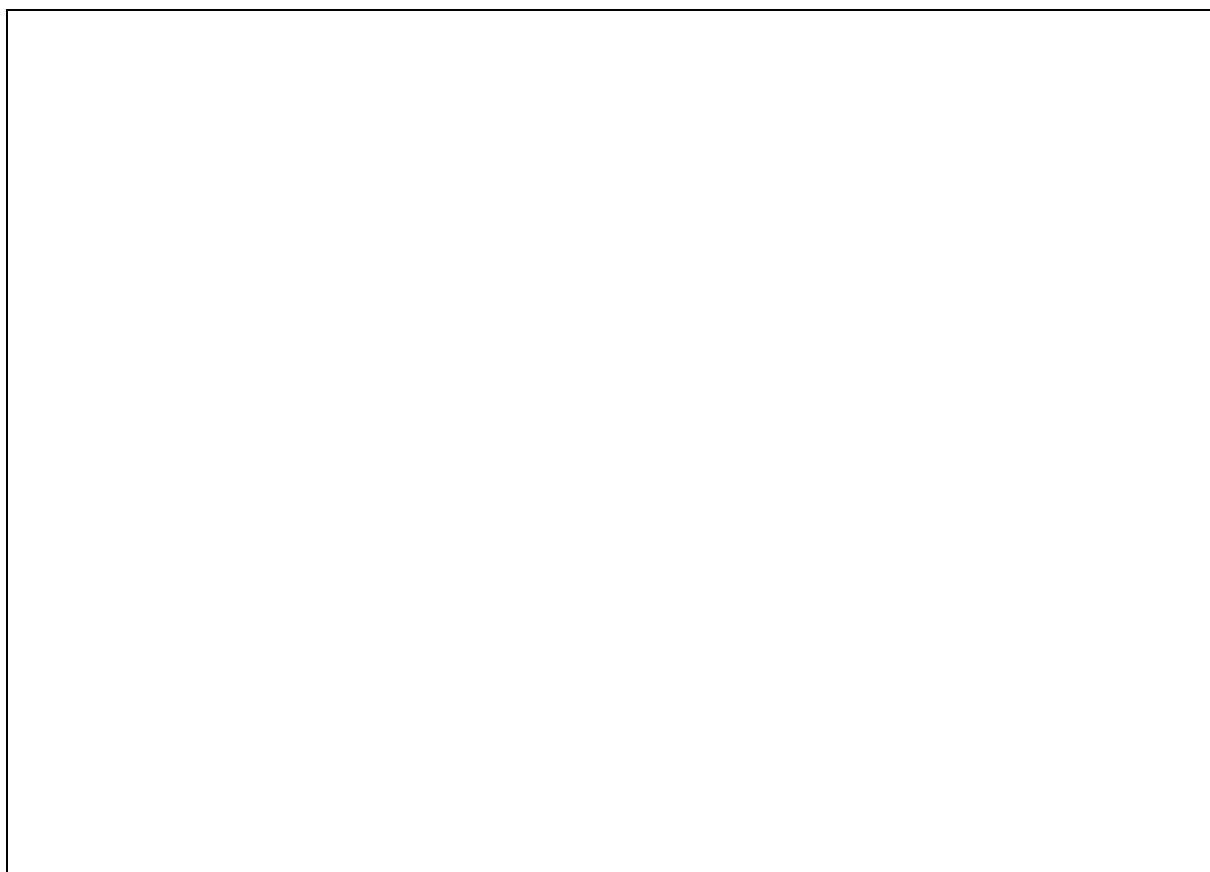


Abb.7.25 : ^1H -NMR-Spektrum des N^8 -[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy- β -D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinons (**100**) in DMSO-d_6

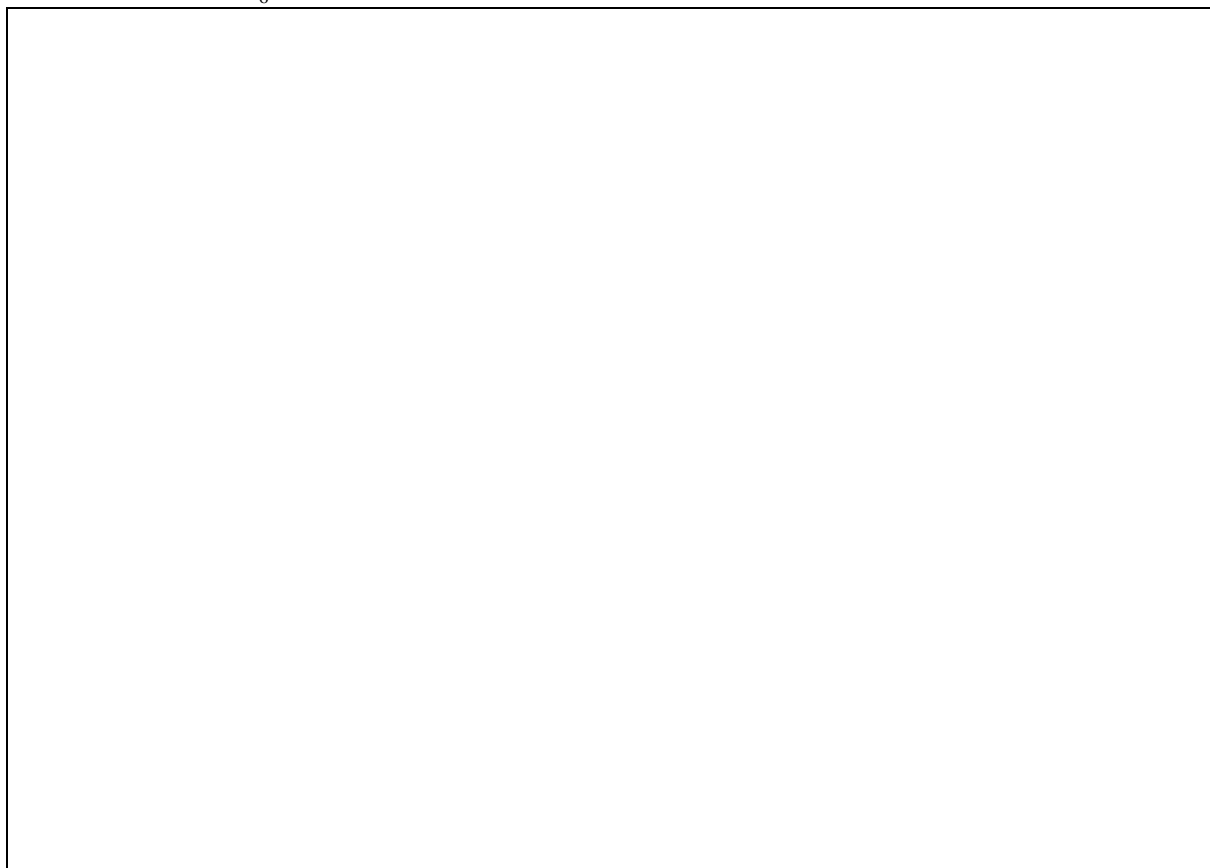


Abb.7.26 : ^1H -NMR-Spektrum des N^8 -[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy- β -D-ribofura-

nosyl]-2-methylsulfonyl-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinons (**110**) in CDCl₃

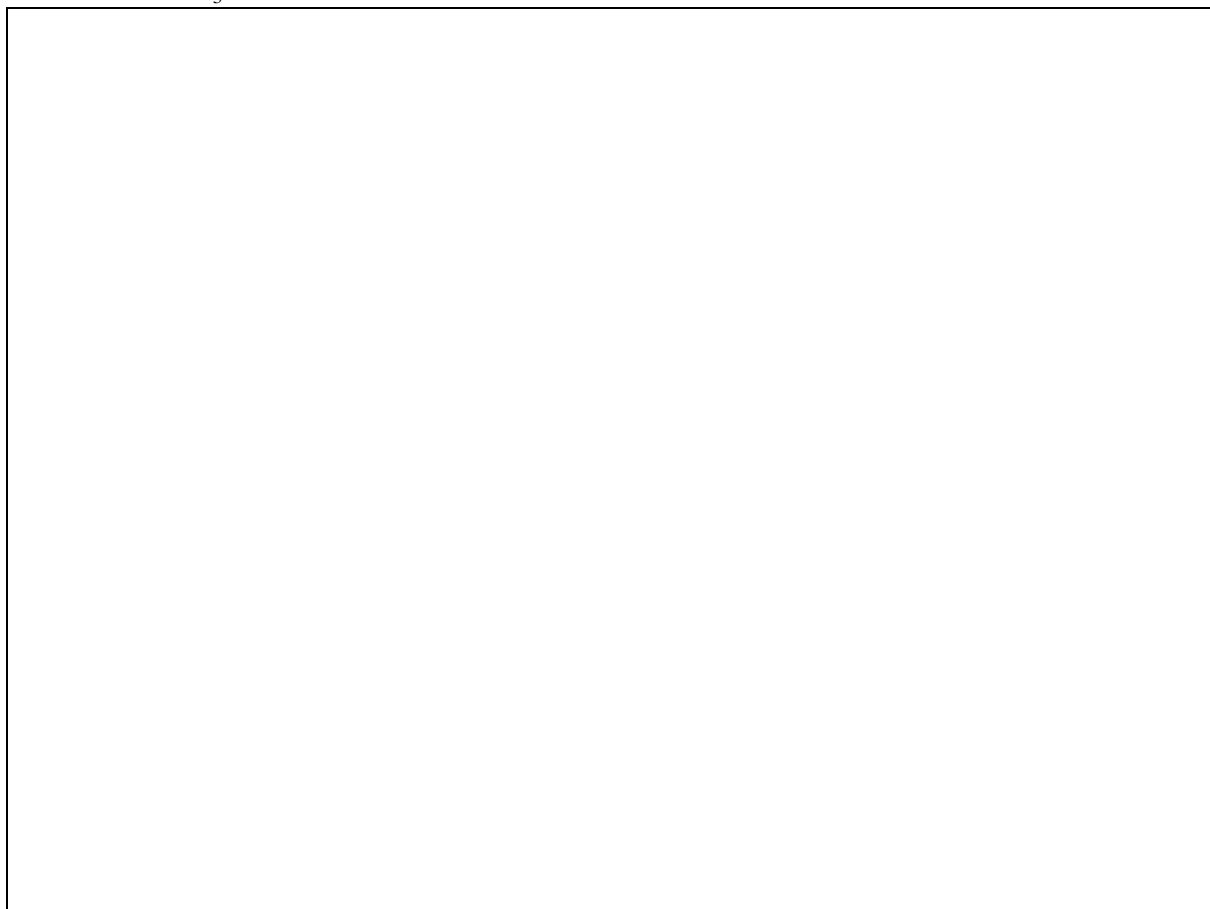


Abb.7.27 : ¹H-NMR-Spektrum des 2-Amino-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinons (**113**) in CDCl₃



Abb.7.28 : $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des 2-Amino- N^8 -[2-desoxy- β -D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinons (**115**) in DMSO-d_6

Nr.	Aglycon	Aglycon-Schutzgruppen	Zucker	Z
89	11,31 (H-(N ³)) 7,48 (H-C(6))		7,30-7,14 (H-C(1'), verd.) 5,86 (H-C(3')) 4,67-4,61 (H-C(4')) 4,50-4,41 (H-C(5')) 3,23 (H _β -C(2')) 2,45-2,34 (H _α -C(2'), verd.)	7,9 7,3 2,4
90	9,23 (H-(N ³)) 7,92-7,87 (H-C(6), verd.)	8,64 (2-N=CH-, (dmf)) 3,25 (N-CH ₃ , (dmf)) 3,10 (N-CH ₃ , (dmf))	7,45-7,35 (H-C(1')) 6,0-5,85 (H-C(3')) 4,8-4,55 (H-C(4') (+ 2 * H-C(5')) 3,45-3,33 (H _β -C(2')) 2,55-2,45 (H _α -C(2'))	7,9 7,2 7,1 2,4 2,3
91	9,74 (H-(N ³)) 7,98-7,91 (H-C(6), verd.)	8,65 (2-N=CH-, (dmf)) 3,27 (N-CH ₃ , (dmf)) 3,16 (N-CH ₃ , (dmf))	7,44-7,31 (H-C(1'), verd.) 6,04 (H-C(3')) 4,84-4,55 (H-C(4'), 2 * H-C(5')) 3,36 (H _β -C(2')) 2,54 (H _α -C(2'))	7,9 7,4
93	11,37 (H-(N ³)) 7,76 (H-C(6)) 3,42-3,28 (2-N(CH ₃) ₂)		7,35 (H-C(1')) 5,93 (H-C(3')) 4,83-4,52 (H-C(4')+ 2 H-C(5')) 3,42-3,28 (H _β -C(2'), verd.) 2,53-2,35 (H _α -C(2'), verd.)	7,9 7,2 2,5
94	7,78 (H-C(6)) 3,25 (2-N(CH ₃) ₂)	8,20-8,16 (H _{Ar} (NPE)) 7,48-7,40 (H _{Ar} (NPE)) 4,80-4,53 (4-O-CH ₂ -CH ₂ - ,verd.) 3,45-3,28 (4-O-CH ₂ -CH ₂ -)	7,48-7,40 (H-C(1'), verd.) 5,98-5,92 (H-C(3')) 4,80-4,53 (H-C(4')+ 2 H-C(5')) 3,45-3,28 (H _β -C(2'), verd.) 2,52-2,34 (H _α -C(2'), verd.)	7,9 7,2 2,5
98	11,93 (H-(N ³)) 7,61 (H-C(6))	8,86 (2-N=CH-, (dmf)) 3,22 (N-CH ₃ , (dmf)) 3,07 (N-CH ₃ , (dmf))	7,25 (H-C(1')) 4,42 (H-C(3')) 3,75-3,40 (H-C(4')+ 2 H-C(5')) 2,75 (H _β -C(2')) 2,09 (H _α -C(2'))	5,1 4,6

Tab.7.4(A) : ¹H-NMR-Daten der 6-H-substituierten Pteridin-Nucleoside, Angaben in ppm (δ-Skala)

Nr.	Aglycon	Aglycon-Schutzgruppen	Zucker	Z
99	11,25 (H-(N ³)) 7,53 (H-C(6))		7,12 (H-C(1')) 4,92 (H-C(3')) 3,75-3,40 (H-C(4') + 2 * H-C(5')) 2,88 (H _β -C(2')) 1,95 (H _α -C(2'))	5,1 4,6

100	8,03 (H-C(6)) 2,67-2,55 (2-SCH ₃)	8,18-8,14 (H _{Ar} (NPE)) 7,64-7,55 (H _{Ar} (NPE), verd.) 4,81-4,71 (4-O-CH ₂ -CH ₂) 3,31-3,25 (4-O-CH ₂ -CH ₂)	7,31-7,26 (H-C(1')) 5,93-5,85 (H-C(3')) 4,71-4,53 (H-C(4') + 2 * H-C(5')) 3,18-3,08 (H-2' _β) 2,67-2,55 (H _α -C(2'), verd.)	7,9 7,6 7,5
110	8,29 (H-C(6)) 3,38-3,20 (2-SO ₂ -CH ₃)	8,20-8,14 (H _{Ar} (NPE)) 7,50-7,28 (H _{Ar} (NPE)) 4,93-4,87 (4-O-CH ₂ -CH ₂ -) 3,38-3,20 (4-O-CH ₂ -CH ₂ -)	7,50-7,28 (H-C(1'), verd.) 6,12-6,05 (H-C(3')) 4,75-4,48 (H-C(4') + 2 * H-C(5')) 3,38-3,20 (H _β -C(2'), verd.) 2,65-2,50 (H _α -C(2'))	7,9 7,5
113	7,85 (H-C(6)) 5,53 (2-NH ₂)	8,17-8,10 (H _{Ar} (NPE)) 7,50-7,05 (2H _{Ar} (NPE), verd.) 4,71-4,63 (4-O-CH ₂ -CH ₂ -) 3,31-3,25 (4-O-CH ₂ -CH ₂)	7,50-7,05 (H-C(1'), verd.) 6,10-6,02 (H-C(3')) 5,02-4,93 (H-C(4')) 4,58-4,52 (2 * H-C(5')) 3,43-3,32 (H _β -C(2')) 2,52-2,42 (H _α -C(2'))	7,9 7,5
115	7,64-7,58 (H-C(6) , verd.) 7,40 (2-NH ₂)	8,19-8,14 (H _{Ar} (NPE)) 7,64-7,58 (H _{Ar} (NPE) ,verd.) 4,62 (4-O-CH ₂ -CH ₂ -) 3,72-3,21 (4-O-CH ₂ -CH ₂ , verd.)	7,10 (H-C(1')) 4,62 (H-C(3'), verd.) 3,72-3,21 (H-C(4') + 2 * H-C(5')) 2,85 (H _β -C(2')) 1,93 (H _α -C(2'))	5,15 4,40

Tab.7.4(B) : ¹H-NMR-Daten (Fortsetzung) der 6-H-substituierten Pteridin-Nucleoside, Angaben in ppm