Universität Osnabrück

Fachbereich Biologie/Chemie

Institut für Chemie neuer Materialien

Dissertation (kumulativ)

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

Nucleolipids and Lipo-Oligonucleotides of 5-Fluorouridine: Synthesis, Biological Applications and Immobilization

von

Edith Malecki

aus

Bad Zwischenahn

Osnabrück 2013

Die vorgelegte Dissertation wurde in der Zeit von November 2008 bis Mai 2013 am Institut für Chemie neuer Materialien des Fachbereichs Biologie/Chemie der Universität unter der Anleitung von apl. Prof. Dr. Helmut Rosemeyer angefertigt.

Hauptberichterstatter: apl. Prof. Dr. Helmut Rosemeyer
Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Piet Herdewijn, KU Leuven, Belgien
weitere Mitglieder der Promotionskommission:
Prof. Dr. Renate Scheibe
Dr. Karsten Kömpe

Declaration: I hereby declare that this thesis is the summary of my PhD work and has not been submitted to any other university. All the sources and materials used in this thesis are duly acknowledged and cited.

Edith Malecki

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit

und

in Gedenken an meinen Großvater

„Gehen, fallen, aufstehen, Krone richten, weitergehen.“

Anonym

DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater apl. Prof. Dr. Helmut Rosemeyer für die wissenschaftliche Betreuung, die vielen anregenden Diskussionen und Gespräche und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation.

Ich danke ihm insbesondere für sein stets uneingeschränktes Vertrauen in mich und für den Freiraum, den er mir gab, nicht nur bei der Gestaltung dieser Arbeit, sondern auch für eine persönliche und wissenschaftliche Entwicklung sowie zum Treffen individueller Entscheidungen.

Ich danke ihm zudem für das interdisziplinäre Thema (das passender nicht hätte sein können), welches mir die Möglichkeit zur Durchführung vieler verschiedener interessanter Projekte mit unterschiedlichen Kooperationspartnern gab und dass dazu führte, dass ich viele besondere Menschen und herausragende Persönlichkeiten kennenlernen durfte.

Im meiner Erinnerung werden für immer die familiäre Atmosphäre seines Arbeitskreises und die tollen Reisen präsent sein.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Piet Herdewijn von der KU in Leuven (Belgien) für die Begutachtung dieser Arbeit und bei Frau Prof. Dr. Renate Scheibe und Herrn Dr. Karsten Kömpe für ihre Teilnahme an der Prüfungskommission.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Uwe Beginn für die zur Verfügung gestellten hervorragenden Laborbedingungen und bei Herrn Prof. Dr. Markus Haase für die freundliche Bereitstellung von Messgeräten.

Für die tollen und gelungen Kooperationen danke ich Herrn Prof. Dr. Ralf Kinscherf (Philipps Universität Marburg, onkologische Studien) und Herrn Prof. Dr. Roland Brandt (Universität Osnabrück, neurobiologische Studien) sowie ihren Arbeitsgruppen.

DANKSAGUNG

Ich danke der Firma B. Braun Melsungen, insbesondere Dr. Jürgen Schmitt, Dr. Doris Röthlein, Dr. Simone Arnold, Dr. Vincenzo Adamo, Dr. Florian Wakenhuth und Dr. Sandra Hewald Dohrmann für die Möglichkeit spannende und herausfordernde Projekte bearbeiten zu dürfen sowie für die finanzielle Unterstützung; darüber hinaus danke ich der Firma Ionovation GmbH, Osnabrück, insbesondere Dr. Karsten Gall und Stefan Dartsch ebenfalls für finanzielle Unterstützung.

Für technische Unterstützung möchte ich danken:

Marianne Gather-Steckhahn für die zahlreich kompetent durchgeführten NMR-Messungen.

Petra Bösel für ihre kompetente Hilfe und ihren Beistand in technischen Angelegenheiten und bei technischen Problemen sowie für die Anweisung in das Arbeiten an der HPLC.

Emma Werz für Messungen am künstlichen Bilayer.

Sandra Schwitke für GPC-Messungen.

Anja Schuster für Elementaranalysen.

Dr. Stefan Walter für ESI MS-Messungen.

Im Weiteren danke ich:

Gertraud Strunk und Monika Dubiel für ihre herzliche Hilfe bei der Erledigung zahlreicher Formalien.

Dr. Gerold Holtkamp und Ursula Butzke (Technologie Kontaktstelle der Universität Osnabrück) für ihren Einsatz im Rahmen unseres B. Braun-Projektes.

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt:

Meinen Praktikanten/innen insbesondere Christine Knies, Vanessa Ottenhaus, Gina Gaßmann und Manuel Meyer für ihr Interesse und großes Engagement.

Den Jungs aus der AC I (Jörg, Benni, Thorben, Simon) für die technische Hilfe, ihr Interesse an meiner Arbeit, den Messraumschlüssel, den Kaffee und das Bier.

Meinen Eltern für all die Dinge, die man nicht mit Worten beschreiben kann.

Meiner ganzen Familie, die stets Interesse an meiner Arbeit zeigte.

Meinen Freunden und Freundinnen insbesondere meinen Mädels aus dem Reitstall (Cathrin, Eve, Dörthe, Manuela, Petra), dafür dass es sie gibt.

Danke auch an alle, die ich hier nicht genannt habe, die aber zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, sei es nur durch ein Wort oder einen Blick.

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit entstand in enger Zusammenarbeit mit anderen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen sowie Unternehmen.

Prof. Dr. Ralf Kinscherf (Onkologische Studien)

Institut für Anatomie und Zellbiologie, Arbeitsgruppe Medizinische Zellbiologie, Philipps Universität Marburg

Prof. Dr. Roland Brandt (Neurobiologische Studien)

Abteilung Neurobiologie, Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Osnabrück

Prof. Dr. Richard Wagner (Biophysikalische Einlagerungsexperimente)

Arbeitsgruppe Biophysik/Elektrophysiologie, Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Osnabrück

Prof. Dr. Hans Reuter (Röntgenkristallstrukturanalyse)

Anorganische Chemie II, Institut für Chemie neuer Materialien, Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Osnabrück

B. Braun Melsungen AG (Chitosane, HES)

Ionovation GmbH, Osnabrück (Biophysikalische Einlagerungsexperimente)

1. Publikationsliste……..…..……1

2. Patentapplikationen……...3

3. Zuordnung der einzelnen Publikation aus der Publikationsliste zu den Patentapplikationen……...….4

4. Vorträge und Kongressteilnahmen……...5

5. Ziele der Arbeit und Problemstellungen..……6

6. Einleitung……..8

7. Wissenschaftlicher Kontext und Zusammenfassungen der Publikationen

O-2',3'-Ketal-Nukleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity and Acidic Stability…….20

Synthesis and Crystal Structures of O-2',3'-Cyclic Cyclopentanone and Cyclohexanone Ketals of the Cytostatic 5-Fluorouridine…….33

Nucleolipide of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers……....…41

Mitsunobu Reactions of 5-Fluorouridine with the Terpenols Phytol and Nerol: DNA Building Blocks for a Biomimetic Lipophilisation of Nucleic Acids……...56

Synthesis of Thymidine-, Uridine- and 5-Methyluridine Nucleolipids: Tools for a Tune Lipophilisation of Oligonucleotides……..……...…….64

Nucleoterpenes of Thymidine and 2'-Deoxyinosine: Synthons for a Biomimetic Lipophilization of Oligonucleotides……..72

Synthesis of 5-Fluorouridine Nucleolipid Derivatives and their cytostatic/cytotoxic Activity on Human HT-29 Colon Carcinoma Cells…..……84

Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter Cells and adult Human Neural Crest-derived Stem Cells…….94

Immobilization of 5-Fluororuridine to Chitosan…….....114

Colloid bonded Medical Compounds (Patent)……132

8. Literaturverzeichnis……..140

9. Anhang

Originalartikel
Patente

Edith Malecki

1. *O*-2',3'-Ketal-Nucleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity, and Acidic Stability, Edith Malecki and Helmut Rosemeyer *Helv. Chim. Acta* **2010**, 93 (8), 1500-1512.

2. Synthesis and Crystal Structures of *O*-2',3'-Cyclic Cyclopentanone and Cyclohexanone Ketals of the Cytostatic 5-Fluorouridine, Edith Malecki, Fei Ye, Hans Reuter, Helmut Rosemeyer *Helv. Chim. Acta* **2009**, 92 (10), 1923-1932.

3. Nucleolipids of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers, Edith Malecki, Vanessa Ottenhaus, Emma Werz, Christine Knies, Malayko Montilla-Martinez, Helmut Rosemeyer *Chemistry & Biodiversity* **2014**, 11 (2), 217-232.

4. *Mitsunobu* Reactions of 5-Fluorouridine with the Terpenols *Phytol* and *Nerol*: DNA Building Blocks for a Biomimetic Lipophilisation of Nucleic Acids, Edith Malecki, Christine Knies, Emma Werz, Helmut Rosemeyer *Chemistry & Biodiversity* **2013**, 10 (12), 2209-2220.

5. Synthesis of Thymidine-, Uridine, and 5-Methyluridine Nucleolipids: Tools for a Tuned Lipophilization of Oligonucleotides, Emma Werz, Rebecca Viere, Gina Gaßmann, Sergei Korneev, Edith Malecki, Helmut Rosemeyer *Helv. Chim. Acta* **2013**, 96 (5), 872-888.

6. Nucleoterpenes of Thymidine and 2'-Deoxyinsoine: Synthons for a Biomimetic Lipophilization of Oligonucleotides, Karl Köstler, Emma Werz, Edith Malecki, Malayko Montilla-Martinez, Helmut Rosemeyer *Chemistry & Biodiversity* **2013**, 10 (1), 39-61.

7. Synthesis of 5-Fluorouridine Nucleolipid Derivatives and Their Cytostatic/Cytotoxic Activities on Human HT-29 Human Carcinoma Cells, Edith Malecki, Anisa Farhat, Gabriel A. Bonaterra, Doris Röthlein, Martin Wolf, Jürgen Schmitt, Ralf Kinscherf, Helmut Rosemeyer *Chemistry & Biodiversity* **2013**, 10 (12), 2235-2246.

8. Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter and Adult Stem Cells, Katharina Raasch, Edith Malecki, Maria Siemann, Malayko Montilla Martinez, Jürgen Heinisch, Janine Müller, Lidia Bakota, Christian Kaltschmidt, Barbara Kaltschmidt, Helmut Rosemeyer, Roland Brandt, submitted for *Nature – Chemical Biology.*

9. Immobilization of 5-Fluorouridine on Chitosan, Edith Malecki, Rebecca Viere, Helmut Rosemeyer *Chemistry & Biodiversity* **2013**, 10 (10), 1828-1841.

1. Helmut Rosemeyer, Edith Malecki, Sergei Korneev, Emma Werz, Karsten Gall
   Reactive, lipophilic nucleoside building blocks for the synthesis of hydrophobic nucleic acids. Europäische Patentanmeldung, 28.09.2012. EP12186576.0

2. Helmut Rosemeyer, Edith Malecki
   5-Fluorouracile Derivatives, Europäische Patentanmeldung, 28.09.2012. EP12186564.6

3. Helmut Rosemeyer, Edith Malecki
   Colloid-bonded Medicinal Compounds, Europäische Patentanmeldung, 28.09. 2012. EP12186555.4

Publikationen 5 und 6 sind Gegenstand der Anmeldung 1.

Publikationen 1, 2, 3, 4, 8 und 9 sind Gegenstand der Anmeldung 2.

Publikation 7 ist keiner Anmeldung zuzuordnen.

Aus der Anmeldung 3 ist noch keine Publikation hervorgegangen.

Edith Malecki, Helmut Rosemeyer, Vielberth-Symposium on Nucleic Acids, Regensburg, 10 – 11.09.2009, Poster Presentation.

Edith Malecki, Helmut Rosemeyer, Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Structure and Interactions, Nova Gorica (Slovenia), 31.5. – 2.6.2010, Poster Presentation.

Edith Malecki, Helmut Rosemeyer, V. Nucleinsäurechemie-Treffen, Frankfurt/Main, 29 – 30.09.2011.

Edith Malecki, Promotionsvortrag am Institut für Chemie neuer Materialien, 06.11.2012.

Edith Malecki, Statusbericht, B. Braun Melsungen AG, 12.06.2010.

Edith Malecki, Statusbericht, B. Braun Melsungen AG, 13.03.2011.

Edith Malecki, Statusbericht, B. Braun Melsungen AG, 20.12.2011.

Edith Malecki, Statusbericht, B. Braun Melsungen AG, 05.12.2012.

Ziel der vorgelegten Dissertation ist die Synthese und analytische Charakterisierung lipophiler Derivate des Cancerostatikums 5-Fluorouridin (5-FU-Nucleolipide) und verwandter kanonischer Nucleoside gewesen, um ihre Permeation durch künstliche und biologische Membranen zu erleichtern. Um dieses Ziel zu erreichen, sollten verschiedene Synthesestrategien verfolgt und ein möglichst optimales und reproduzierbares Verfahren entwickelt werden.

Als Lipidkomponenten dienten verschiedene und weitgehend biomimetische Verbindungen wie acyclische Terpene (Farnesyl, Geranyl etc.), Wachs-Ketone (Palmiton etc.) und makrocyclische Ketone (Exalton etc.). Als Positionen für die Einführung der Lipide sollten die *O*-2‘,3‘-cis-ständigen glyconischen Hydroxylgruppen der Nucleoside und/oder der *N*(3) der Aglycone dienen.

Terpenoide sollten entweder durch Direktalkylierung mittels entsprechender Halogenide am Nucleosid eingeführt werden oder per *Mitsunobu*-Reaktion.

Eine Lipophilisierung am glyconischen Rest des Nucleosids durch cyclische oder acyclische Ketone sollte durch Ketalisierung an der *O*-2‘,3‘-Position erfolgen. In diesem Zusammenhang wurde die Lipophilie der Verbindungen durch Berechnung ihrer log*P*-Werte sowie durch Retentionszeitbestimmungen an einer RP-18 HPLC-Anlage bestimmt und verglichen. Darüber hinaus wurde die Säurestabilität der verschiedenen Ketalgruppen, ebenfalls durch Aufnahme zeitabhängiger RP-18 HPLC-Profile gemessen.

Nach orthogonalem Schutz der resultierenden Nucleolipide sollten diese in entsprechende 2-(Cyanoethyl)-Phosphoramidite als reaktive Bausteine für die automatische Festphasen-Oligonucleotidsynthese umgewandelt werden. Ziel war die Darstellung von *O*-(5‘)- sowie *O*-(3‘)-Amiditen, wobei erstere nur 5‘-terminal an eine wachsende Nucleinsäurekette angehängt werden können; letztere gestatten einen Einbau an jede beliebige Position des Oligonucleotids. Terminal lipophilisierte Oligomere sind hierbei vor einem enzymatischen exonucleolytischen Abbau geschützt.

In einer Arbeitsgruppen-internen Kooperation wurden die verschiedenartig lipophilisierten Oligonucleotide im Hinblick auf die Kinetik und Stabilität einer Immobilisierung in artifiziellen Lipid-Doppelschichten mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht und miteinander verglichen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Funktionalisierung von 5-Fluorouridin mit einem *O*-2‘,3‘-Lävulinsäure-Linker mit terminaler Carboxylfunktion gewesen. Dieses Derivat sowie ein weiteres, *N*(3)-farnesyliertes Nucleolipidderivat, sollten an lösliche Chitosane mit verschiedenem Molekulargewicht sowie an Chitosanfolien immobilisiert werden. Als wesentlicher Reaktionsparameter sollte bei der Reaktion der Einfluss des pH-Wertes untersucht. Die kovalente Verknüpfung der 5-FU-Derivate mit löslichem Chitosan sollte zusätzlich auch mit einem ATTO-488 Fluorophor als Butanoat in einer sequentiellen Kupplung durchgeführt werden. Die Produkte aus den Festphasenreaktionen mit Chitosanfolien wurden in der Folge einem enzymatischen Abbau mittels Chitosanase unterworfen, und der Umsatz in einer *Franz*-Diffusionszelle quantitativ durch UV-VIS-Spektrometrie ermittelt.

Einige ausgewählte Nucleolipide wurden zellbiologisch-onkologischen in-vitro Aktivitätstests auf HT-29 Zellen – einem humanen Dickdarmkarzinom – unterworfen. Hierbei sollte insbesondere untersucht werden, ob durch eine Lipophilisierung des Cancerostatikums 5-Fluorouridin bzw. seiner heterocyclischen Base 5-Fluorouracil eine Erniedrigung der Überlebensrate der HT-29 Zellen erreicht werden kann. In diesem Zusammenhang sollten die zur Verfügung gestellten Verbindungen zusätzlich mit einem H_2O-unlöslichen Fluoreszenzfarbstoff (ATTO-425) kovalent verknüpft werden. Diese Aufgaben wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Medizinische Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg, Leitung: Prof. Dr. R. Kinscherf, bearbeitet.

In einer weiteren externen Kooperation (Arbeitsgruppe Neurobiologie, Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Osnabrück, Leitung: Prof. Dr. R. Brandt) wurde die zelldifferenzierende Wirkung bekannter wie auch erstmals dargestellter Verbindungen auf terato-carcinome NT2-Zellen, einem humanen Hodencarcinom mit pluripotenten Eigenschaften, und deren Entwicklung zu neuronalen Zellen untersucht.

Ein abschließendes Kapitel der Dissertation befasste sich mit der kovalenten Verknüpfung eines lipophilen 2-(Cyanoethyl)-phosphoramidites des 5-Propinyl-uridins mit dem Blutplasmaexpander Hydroxyethylstärke – einem Produkt der B. Braun AG, Melsungen.

Einleitung

„Krebs ist die Todesursache Nummer eins in der EU“[1].

Krebs ist die häufigste Todesursache in den Europäischen Staaten. Ein internationales Team aus Wissenschaftlern wertete rund 4,08 Millionen Totenscheine von EU-Bürgern aus und ermittelte den Anteil verschiedener Todesursachen (grobe Todesrate) der im Jahre 2007 verstorbenen Menschen. Demnach waren 2,02 Millionen der Todesfälle auf nicht-akute Todesursachen wie Krebs und chronische Krankheiten zurückzuführen. Im Jahre 2007 lebten rund 495 Millionen Bürger in der EU, folglich starben in den 27 Mitgliedsstaaten mehr als zwei Millionen Menschen an diesen Erkrankungen. Krebs und chronische Krankheiten sind demnach die zwei häufigsten Todesursachen in der Europäischen Union. Bei rund einem Viertel der Todesfälle wurde eine Tumorerkrankung als Todesursache angegeben. Krebs stellt somit die häufigste Todesursache in der Europäische Union dar [1].

Zur Behandlung von Krebserkrankungen gehören im Rahmen einer zytostatischen Chemotherapie Nukleosid-Analoga und Nukleobasen zu den wichtigsten Wirkstoffen [2].

Nukleoside werden als *N*-Glykoside heterozyklischer Systeme definiert. Die heteromere Einheit des *N*-Glykosids wird dabei entweder durch eine Nukleobase (Pyrimidin- oder Purin-Derivat), oder einen anderen *N*-Heterozyklus dargestellt. Formal handelt es sich bei Nukleosiden um Produkte einer Kondensationsreaktion zwischen einem Wasserstoffatom des *N*-Heterozyklus und der C_1-Hydroxylfunktion eines Kohlenhydratrings (ß-D-Ribose oder ß-D-Desoxyribose) (s. Abbildung 1) [3, 4].

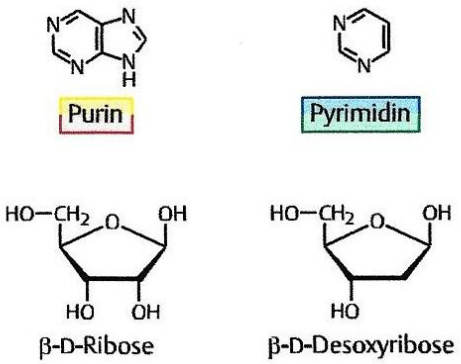


Abbildung 1: Grundstrukturen der Nukleoside [5].

Die Hauptbasen werden durch die Pyrimidine Uracil (U), Thymidin (T) und Cytosin (C) und die Purine Adenin (A) und Guanin (G) gebildet (s. Abbildung 2). Darüber hinaus gibt es zahlreiche seltene Basen (Nebenbasen), bei denen es sich vor allem um Derivate der Pyrimidine handelt, die vornehmlich in ihrer 5-Postition substituiert sind, sowie des Weiteren diverse N-methylierte Derivate der Pyrimidin- und Purinbasen.

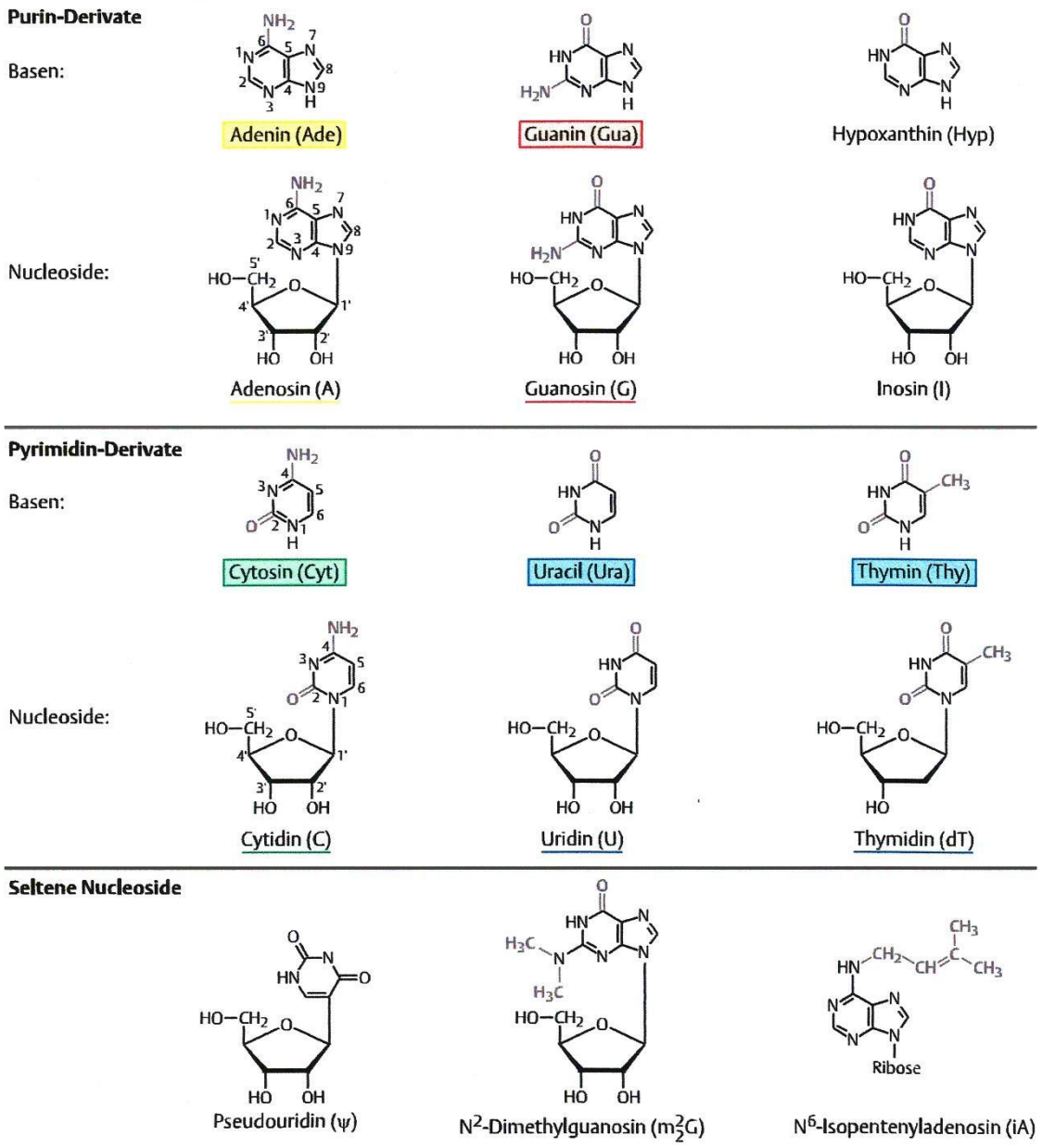


Abbildung 2**:** Wichtige Purine und Pyrimidine sowie Nukleoside [5].

Besonders häufig vertreten sind die Nebenbasen in den Nukleinsäuren von Bakteriophagen und in der *transfer*-RNA (*t*RNA). Im Falle der *t*RNA können diese einen Anteil von bis zu 10 % ausmachen. Nukleoside der Nebenbasen besitzen meistens

besondere Funktionen. So zeigt das 6-Alkyl-Purin-Derivat *N*(6)-Isopentenyladenin (s. Abbildung 2) Cytokinin-Aktivität, und Pseudouridin – ein C-Nucleosid – (s. Abbildung 2) wird speziell an bestimmten Stellen der *t*RNA vorgefunden [3, 5].
Die Hauptnukleoside (Adenosin, Guanosin, Cytidin, Uridin, Thymidin) entstehen durch eine *N*-glykosidische Bindungsknüpfung der entsprechenden Nukleobase (Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil, Thymin) mit einem in ß-Stellung stehenden D-Ribose-, bzw. D-2‘-Desoxyribosering (im Falle des Thymins). Pyrimidin-Basen werden dabei über das N(1)-Atom mit dem anomeren Kohlestoffatom des jeweiligen Pentosezuckers verknüpft, Purinbasen gehen eine Bindung über das N-Atom in der 9-Position ein. Um die C-Atome der Zuckereinheit von denen des Heterozyklus unterscheiden zu können, werden diese mit 1‘ bis 5‘ bezeichnet. Das C(1‘) stellt dabei das anomere C-Atom dar [3, 4].
Nukleoside tragen Trivialnamen, welche sich von denen der Basen ableiten. So enden die Pyrimidin-Nukleoside auf -idin und die Purin-Derivate auf -osin [5]. Die entsprechenden Nukleoside werden dementsprechend als Adenosin, Guanosin, Cytidin, Thymidin und Uridin bezeichnet.

Nukleoside gehören, vor allem in Form ihrer Derivate, zu den in der Natur weit verbreiteten Verbindungen und erfüllen eine Reihe von spezifischen Funktionen bei Stoffwechselprozessen. Sie können hier frei oder als Bestandteile anderer biophysiologisch aktiver Verbindungen agieren. Insbesondere treten sie jedoch als Bestandteile der Nukleinsäuren (DNA und RNA) auf. Man findet des Weiteren Nukleoside als Bestandteile von Vitaminen (Benzimidazolribosid des Vitamin B_{12}) und Co-Enzymen (Nicotinsäureamidribosid) und in Form von Nukleosid-Antibiotika [3].
Von besonderer biologischer Bedeutung sind die 5‘-Monophosphate der Nukleoside, welche durch Veresterung der C(5‘)-ständigen Hydroxylfunktion des Zuckers mit Phosphorsäure gebildet werden. Die daraus resultierenden Phosphorsäureester der Nukleoside werden als Nukleotide bezeichnet und fungieren als Bausteine der Schlüsselmoleküle des Lebens, der DNA und RNA [4, 5].

Nukleosid-Analoga besitzen den natürlichen Nukleosiden ähnliche Strukturen, die sich durch das Vorhandensein kleiner (modified) oder auch erheblicher (hyper-modified) struktureller Modifikationen abgrenzen. Aufgrund der bestehenden Ähnlichkeit können sie als falsche Stoffwechselbausteine mit den natürlichen Nukleosiden konkurrieren und

wirken folglich als Antimetaboliten, indem sie als Enzyminhibitoren auftreten oder an Stelle der natürlichen Nukleoside in die DNA oder RNA eingebaut werden. Nukleosid-Analoga stellen somit eine wichtige Klasse von cancerostatischen und antiviralen Wirkstoffen dar [2, 6, 7, 8].

Die Modifikationen können das Gerüst der Pyrimidin- bzw. Purinbase, die Zuckereinheit oder beiden Einheiten betreffen. So können Hydroxygruppen der D-Ribose-, bzw. 2-Desoxy-D-Ribose in inverser Konfiguration auftreten oder fehlen sowie substituiert sein. Des Weiteren ist eine Spaltung der Kohlenhydratringstruktur möglich.

Der antivirale Wirkstoff Acyclovir (s. Abbildung 3) kann als prominentes Beispiel für ein Zucker-modifiziertes Purin-Derivat aufgeführt werden. Bei Acyclovir handelt es sich um ein Guanosin-Derivat, dessen Riboseeinheit aus einer Zucker-Partialstruktur besteht. Unter der Vielzahl an heute bekannten Hemmstoffen der viralen DNA-Polymerase, stellt Acyclovir das einzig selektiv wirkende dar. Eine hohe Aktivität zeigt es speziell in der Gruppe der Herpes-Vieren [8].

Typische Basenmodifikationen sind Substitutionen. Insbesondere in Position 5 halogenierte Pyrimidin-Nukleoside stellen wichtige Verbindungen dar. So zeigen einige Fluor-substituierte Derivate, wie das 5-Fluoro-2‘-Desoxyuridin (*Floxuridin*) (s. Abbildung 3), eine cancerstatische Aktivität [6].

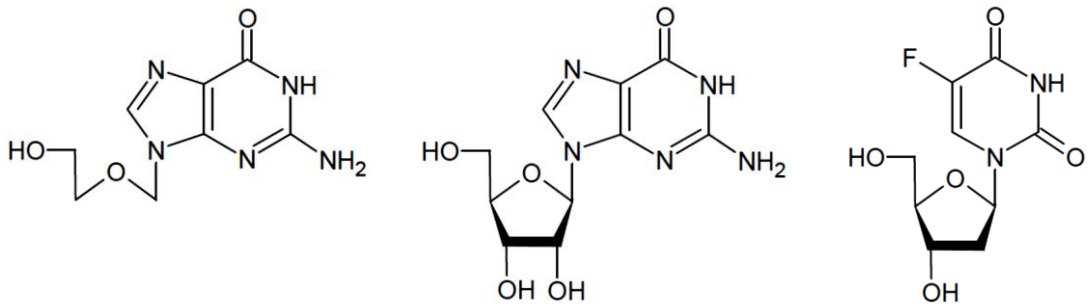


Abbildung 3: Struktur von Acyclovir (links), welches sich vom Nukleosid Guanosin (mitte) ableitet und die Struktur von *Floxuridin* (rechts).

Bei Nukleosiden und den meisten Nukleosid-Analoga handelt es sich um Moleküle mit hydrophilen Eigenschaften. Diese sind nicht in der Lage, biologische Membranen durch gerichtete Diffusion zu überwinden und können nur durch einen vermittelten Transporter über spezielle Nukleosid-Membrantransporter, sogenannter NTs, in die Zelle gelangen. Man unterscheidet zwischen Na^+-Konzentration unabhängigen und Na^+ abhängigen Nukleosid-Membrantransportern – den ENTs (Equilibrative Nucleoside Transporters)

und CNTs (Concentrative Nucleoside Transporters). Die ENTs ermöglichen sowohl den Ein- als auch Austritt von Nukleosiden und Nukleosid-Analoga. Der Transport verläuft dabei entlang des Konzentrationsgefälles und kommt einer passiven Diffusion gleich, so dass keinerlei Energie benötigt wird. ENTs weisen eine geringe Substratspezifität auf und akzeptieren sowohl Purine als auch Pyrimidine. Generell zeigen sie hohe Transportraten. Aufgrund der Sensitivität gegenüber Nitrobenzylmercaptopurinribosiden (NBMPR) findet eine Subunterteilung der ENTs in *es* (equilibrative-sensitive) und *ei* (equilibrative-insensitiv) Transporter statt. Bei den CNTs (Concentrative Nucleoside Transporters) handelt es sich hingegen um Na^+-Symporter, die nur einwärts transportieren können. Der Transport verläuft konzentrationsabhängig, kann aber auch gegen einen Konzentrationsgradienten stattfinden, wenn der transmembrane Na^+-Gradient als Energielieferant genutzt wird. CNTs sind hauptsächlich in Zellen des Darms, der Nieren, der Leber und der Milz zu finden. Aufgrund ihrer Substratspezifität unterteilt man die CNTs in 5 Klassen (s. Tabelle 1) [9].

Tabelle 1: Charakteristika verschiedener Nukleosid-Transporter-Systeme [9].

Transporter	Property	Substrate selectivity[a]	Tissue Distribution[b]	NBMPR[c]	Na^+-dependent?
SPNT	Concentrative	Pu, U	Rat liver, jejunum	No	Yes
rCNT1	Concentrative	Py, A	Intestine, kidney	No	Yes
hCNT1	Concentrative	Pu, U	Kidney, intestine	No	Yes
hCNT2	Concentrative	Py, A	Kidney, brain, heart, liver	No	Yes
hCNT3	Concentrative	Pu, Py	Bone marrow, intestine	No	Yes
N4	Concentrative	Py, G	ND	Yes	Yes
N5	Concentrative	G, FB	ND	Yes	Yes
hENT1	Equilibrative	Pu, Py	ubiquitous	Yes	No
hENT2	Equilibrative	Pu, Py	Skeletal, muscle, heart, pancreas	No	No

Adapted from ref. *44*

[a]Pu, purine; U, uridine; Py, pyrimidines; A, adenosine; G, guanosine; FB, formycine B.

[b]ND, not determined

[c]Denotes whether the selected transporter is sensitive to NBMPR.

Die Proteine der hCNT (Human Concentrative Nucleoside Transporters) Familie bestehen aus über 650 Aminosäuren und besitzen 13 transmembrane Segmente. Kürzlich wurden die Reste 319 und 320 als bedeutsame Elemente für die spezifische Erkennung von Pyrimidin-Nukleosid identifiziert. Der intrazelluläre Transport gastrointestinal pharmakologisch aktiver Nukleoside erfolgt insbesondere durch CNT1 und SPNT [9].

Um biologisch aktiv zu werden, müssen alle Nukleosid-Analoga durch Phosphorylierung in ihre Triphosphatform überführt werden, sprich, es muss eine Umwandlung dieser in die entsprechenden Nukleotide stattfinden. Nur Triphosphat-Analoga können als falsche Substrate für die DNA- und RNA-Synthese fungieren und/oder relevante Enzyme der Nukleinsäuresynthese (DNA-Polymerase und Ribonukleotidreduktase) inhibieren und somit eine Unterbrechung der DNA-Replikation und Unterbindung von DNA-Reparaturmechanismen erwirken, was schließlich zur Apoptose führt [9, 10].
Die Phosphorylierung erfolgt durch zelluläre Enzyme. Zytotoxisch aktive Analoga der Nukleobasen müssen, bevor sie in ihre Triphosphatform konvertiert werden können, zunächst zu den entsprechenden Nukleosid-5‘-monophosphaten umgesetzt werden. Dies geschieht unter Vermittlung von Phosphoribosyltransferasen. Nukleosid-Analoga werden durch Nukleosid-Kinasen direkt in die entsprechenden 5‘-Monophosphate konvertiert. Im Rahmen der Bioaktivierung ist die zytosolische Desoxycytidinkinase ein zentrales Enzym. Dieses ist nicht nur für die Phosphorylierung von Desoxycytidin verantwortlich, sondern phosphoryliert ebenfalls zwei weitere 2‘-Desoxynukleoside, das 2‘-Desoxyadenosin und das 2‘-Desoxyguanosin, sowie deren Derivate. Analoga der Purin-Nukleoside können zudem durch ein mitochondriales Enzym, die Desoxyguanosinkinase, phosphoryliert werden. Die Konvertierung der 5‘-Monophosphate zu 5‘-Diphosphaten wird von Nukleosidmonophosphatkinasen (Thymidylatkinase, Uridylatkinase, Cytidylatkinase, Adenylatkinase 1-5, Guanylatkinase) übernommen. Die schlussendliche Umwandlung zu den entsprechenden 5‘-Triphosphaten erfolgt durch die Nukleosiddiphosphatkinase [6].

Enzyme stellen wichtige Targets nukleosidischer Antimetabolite dar. Unter ihnen gehören die replikativen DNA-Polymerasen zu den bedeutendsten. Bisher konnten 14 dieser Enzyme in humanen Zellen identifiziert werden. Davon stellen die DNA-Polymerase α, δ und ε die primären Ziele der Nukleosid-Analoga dar. Es handelt sich dabei um für den im Zellkern stattfindenden replikatorischen Vorgang essentielle Enzyme. Obwohl den DNA-Polymerasen ß und ɣ, als Reparaturenzym, bzw. als ein Enzym der mitochondrialen DNA-Replikation, ebenfalls wichtige Funktionen zukommen, sind es nicht Targets der Nukleosid-Analoga [6].

Momentan sind in den USA 14 Purin- und Pyrimidin-Antimetabolten zur Tumortherapie zugelassen, 13 davon ebenfalls in der Europäischen Union [6].

Ihren strukturellen Merkmalen nach werden Nukleosid-Analoga in Thiopurine, Fluoropyrimidine oder Desoxynukleosid-Analoga unterteilt. Bei Vertretern der Thiopurine handelt es sich um schwefelhaltige Nukleosid-Analoga, zu den Fluoropyrimidinen gehören alle Fluor-substituierten Antimetaboliten und innerhalb der großen Gruppe der Desoxynukleosid-Analoga findet eine zusätzliche Unterteilung in Pyrimidin- und Purin-Nukleosid-Analoga statt. Bei den Vertretern der Desoxynukleosid-Analoga-Gruppe handelt es sich um relative neue Chemotherapeutika (Ausnahme Cytarabin → Erstzulassung 1969), welche in den letzten zwei Jahrzehnten entwickelt und zugelassen wurden [6].

Der zu den Thiopurinen gehörende Antimetabolit *6-Mercaptopurin* (s. Abbildung 4) war das erste zugelassene Chemotherapeutikum zur Behandlung von Krebserkrankungen. Seit seiner Zulassung im 1953 wird es auch heute noch als Standardtherapeutikum zur Behandlung akuter lymphozytischer Leukämie (ALL), speziell bei Kindern, eingesetzt [6, 7].

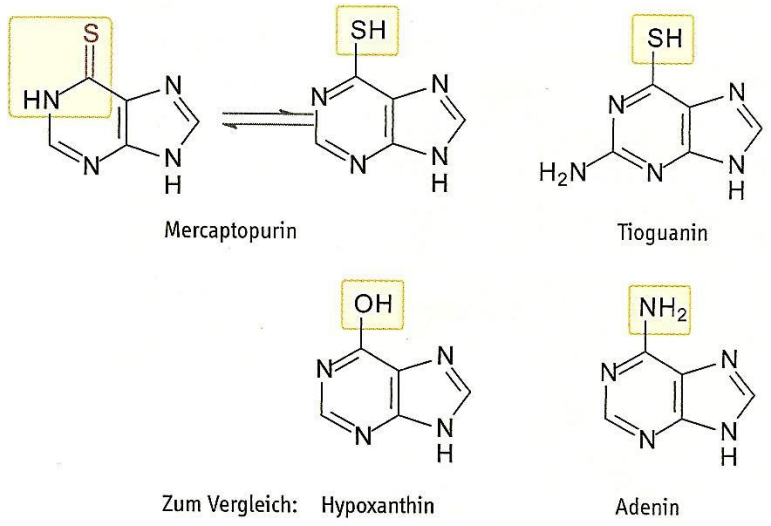


Abbildung 4: Struktur und Herkunft von Mercaptopurin sowie Thioguanin als schwefelhaltige Base zum Vergleich [7].

Beim *6-Mercaptopurin* handelt es sich um ein Adenin- oder Hypoxanthin-Derivat, bei welchem die Amino-, bzw. Hydroxylgruppe durch eine SH-Gruppe substituiert ist. Nach intrazellulärer Aktivierung durch Ribosylierung und Phosphorylierung mittels Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) zum 6-Mercaptopurin-ribonukleotid, beruht die zytostatische Wirkung des 6-Mercaptopurins auf einer

kompetitiven Hemmung zweier zentraler Enzyme (Adenylo-Succinat-Synthase und Phosphoribosyl-pyrophosphat-amido-Transferase) der Purin-Biosynthese und dessen Einbau als falsches Substrat in die DNA [7].

Zu den Fluoropyrimidinen gehören alle fluorierten Analoga des Uracils. Der älteste Wirkstoff unter ihnen ist das 5-Fluorouracil (s. Abbildung 5). Es handelt sich dabei um ein in den 1950er Jahren entwickeltes Analogon, welches sich durch das Vorhandensein eines Fluoratoms in 5-Position vom Uracil unterscheidet. 5-Fluorouracil findet Anwendung im Rahmen einer systemischen Behandlung von fortgeschrittenen und/oder metastasierenden Karzinomen, sowie diverser solider Tumoren, u. a. des Gastro-intestinal-Traktes, der Mamma und des Hals-Kopf-Bereiches [2, 7, 11, 12].

Im Prinzip handelt es sich beim Fluorouracil um ein Prodrug. Erst nach erfolgter biophysiologischer Umsetzung in der Zelle werden drei antimetabolisch wirksame Nukleotide des Fluorouracils generiert. Bei den aktiven Nukleotiden handelt es sich um 5-Fluor-2‘-desoxyuridin-5‘-monophosphat (5-FdUMP), 5-Fluoro-5‘-triphosphat (5-FUTP) und 5-Fluor-2‘-desoxyuridin-5‘-triphosphat (5-FdUTP). Abbildung 5 stellt die Bioaktivierung, sowie den recht komplexen Wirkmechanismus des 5-Fluoro-uracils dar [7].

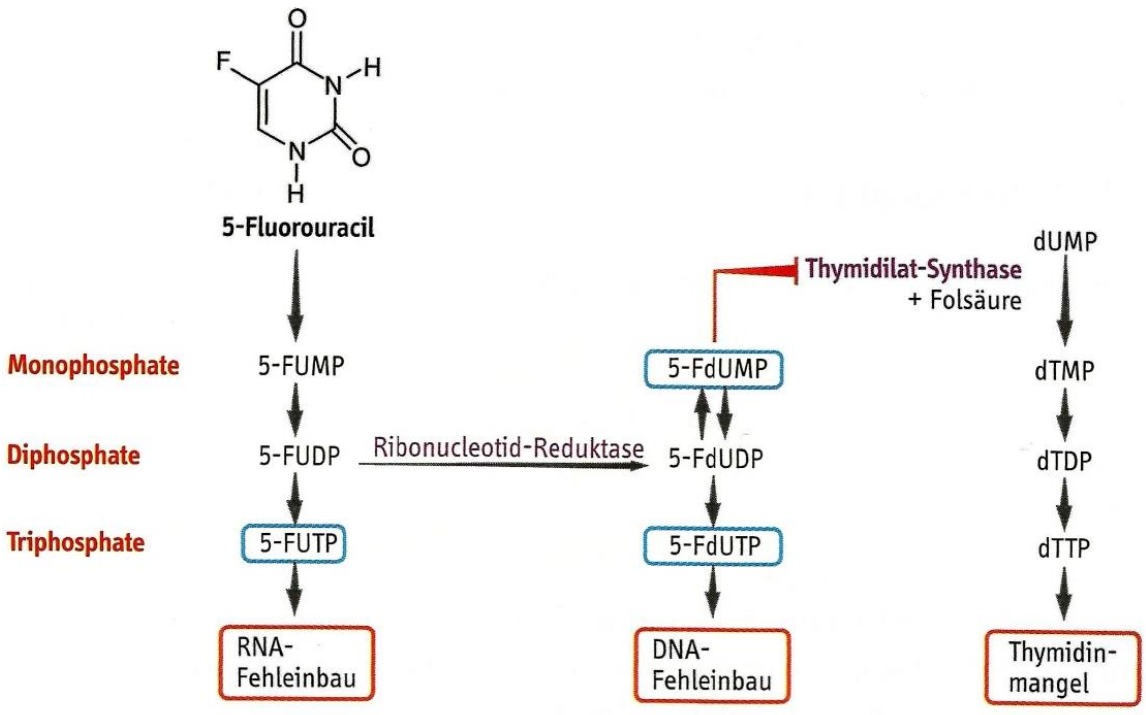


Abbildung 5: 5-Fluorouracil-Bioaktivierung und Wirkmechanismen [7].

Aufgrund nahezu gleich großer *van der Waals* Radien des im Uracil vorhandenen H-Atoms und des im Fluorouracil enthaltenen Fluor-Atoms, wird 5-Fluorouracil in der Zelle als Substrat akzeptiert und in einem ersten Schritt mittels Phosphoribosyltransferase in 5-Fluorouridin-monophosphat (5-FUMP), ein 5‘-Monophosphat, überführt. Dieses wird durch zelluläre Kinasen in ein 5‘-Diphosphat (5-FUDP) umgewandelt, welches im Weiteren durch Ribonukleotid-Reduktase zu 5-Fluoro-2‘-desoxyuridin-diphosphat (5-FdUDP) umgesetzt wird. In einer darauffolgenden Abspaltung von Phosphat kommt es zur Generierung des zytotoxischen 5-Fluoro-2‘-desoxyuridin-monophosphat (5-FdUMP). Das 5-FdUMP bindet im aktiven Zentrum der Thymidylat-Synthase (TS), da es zum Desoxyuridin-monophosphat (dUMP), dem eigentlichen Substrat der TS, analog ist. Die Bindungsaffinität des falschen Substrates zu diesem Enzym ist dabei 250fach höher als die des eigentlichen Substrates. Die TS katalysiert, zusammen mit dem Cofaktor 5,10-Methylen-tetrahydrofolat, die reduktive Methylierung von 2‘-Desoxyuridin-monophosphat (dUMP) zu 2‘-Desoxythymidin-monophosphat (dTMP). Da das gebundene 5-FdUMP am ersten Teilschritt der C_1-Übetragung teilnimmt, erfolgt eine kovalente Fixierung dieses am Enzym, allerdings ohne eine weitere Umsetzung. Aufgrund der am falschen Substrat blockierten Position 5, ist hier eine Methylierung nicht mehr möglich. Die Bildung von Thymidin (Desoxy-ribosyl-thymidin) kann infolgedessen nicht mehr stattfinden und es kommt zur Inhibierung der DNA-Synthese. Die Hemmung der TS kann durch eine kombinierte Gabe von 5-Fluorouracil und dem Folsäureantagonisten Methotrexat verstärkt werden (Synergetische Hemmung). Des Weiteren werden durch zelluläre Kinasen aus den generierten Diphosphaten 5-FUDP und 5-FdUDP die entsprechenden Triphosphate (5-FUTP, bzw. 5-FdUTP) gebildet. Diese fungieren als falsche Nukleotide für RNA-, bzw. DNA-Polymerasen und werden in die RNA und DNA eingebaut. Es kommt infolgedessen zu einer Störung der RNA-Funktion, bzw. Fragmentierung der DNA durch Herausschneiden der falschen Bausteine mittels Uracil-Glycosylase [6, 7, 13].

In die Klasse der Fluoropyrimidin gehört eine ganze Reihe von wichtigen Wirkstoffen. Ein weiterentwickeltes Prodrug des 5-Fluorouracils ist das Desoxynukleosid *Floxuridin* (5-Fluor-2‘-desoxyuridin) (s. Abbildung 3). Im Vergleich zum 5-Fluorouracil zeichnet sich dieses durch eine einfachere Bioaktivierung aus, da es mittels der Thymidinkinase direkt zum metabolisch aktiven 5-FdUMP phosphoryliert wird. *Floxuridin* findet heute

kaum noch Verwendung, da es keinen wesentlichen Vorteil gegen über dem 5-Fluorouridin aufweist [6, 14].

Das unter dem Handelsnamen *Tegafur* oder *Ftorafur* bekannte Tetrahydrofuryl-Derivat des Fluorouracils (s. Abbildung 6) ist ein entwickeltes peroral applizierbares Prodrug. Es handelt sich dabei um das erste lipophile Prodrug des 5-Fluorouracils, welches nach einer Idee von *S. Hiller* synthetisiert worden ist und insbesondere in Japan und Russland in den letzten Jahrzehnten Verwendung fand [15, 16].

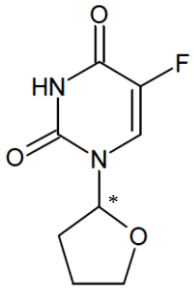


Abbildung 6: Struktur von Tegafur.

Tegafur ist ein Nukleosid-Antimetabolit ohne Hydroxylfunktionen im Pentosebaustein. Es wird auf zwei verschiedenen Wegen metabolisiert, wobei der hauptsächliche Abbau in der Leber stattfindet. Hier wird durch Enzyme des Cytochrom-P_{450}-Systems, die sogenannten CYPs, 5-Fluorouracil gebildet. Ferner findet die Umwandlung zum aktiven Antimetabolit durch nicht membran-gebundene Enzyme statt [7, 16].

Tegafur wird in Kombination mit Uracil in einem molaren Verhältnis von 1:4 verabreicht, zusätzlich findet eine simultane Gabe von Calciumfolinat statt. Dies hat folgenden Hintergrund: Das gebildete 5-Fluorouracil wird in der Leber rasch unter Vermittlung der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) inaktiviert, indem es durch Sättigung der Doppelbindungen in 5,6-Dihydro-5-fluorouracil überführt wird. Diese Metabolisierung kann durch die Gabe von Uracil kompetitiv gehemmt werden, da Uracil als natürliches Substrat dieses Enzyms eine höhere Affinität aufweist als 5-Fluorouracil. Calciumfolinat ist in seiner metabolisierten Form als 5,10-Methylen-tetrahydrofolat Cofaktor der Thymidylat-Synthase und dient der Stabilisierung des FdUMP-Thymidylat-Synthase-Komplexes. Die Begünstigung der Stabilisierung dieses Komplexes, durch eine Calciumfolinat-Gabe, führt zur Verstärkung des inhibitorischen Effektes des FdUMP auf die Thymidylat-Synthase und trägt somit insgesamt zu einer Steigerung der Wirkung von 5-Fluorouracil bei [7, 17].

Neben der geringen Bioverfügbarkeit und aufgrund fehlender Lipophilie, stellt die Zellunspezifiät und die damit verbundene allgemeine Zytotoxizität, bzw. Hemmung der Zellproliferation ein zentrales Problem der Nukleosid-Analoga dar. Während einer Tumortherapie beschränkt sich die Wirkung der Nukleosid-Antimetaboliten nicht nur auf Tumorzellen, sondern betrifft auch unveränderte Zellen, so dass es zur Generierung von erheblichen Nebenwirkungen kommt. Besonders betroffen davon sind Zellen des Knochenmarks, der Keimdrüsen und Darmschleimhaut, sowie Haut- und Haarwurzelzellen, demnach Zellen, die einer schnellen Proliferation unterliegen. Eine typische Nebenwirkung von Nukleosid-Antimetaboliten ist die Myleosuppression (Knochenmarkssupression). Diese macht sich in Form einer gesenkten Anzahl an roten und weißen Blutkörperchen (Erythrozytopenie und Leukopenie), sowie einer Minderung der Anzahl an Blutplättchen (Thrombozytopenie) bemerkbar und führt zu einer erhöhten Blutungsneigung und Infektionsanfälligkeit, sowie Anämie. Ferner treten Magen- und Darmprobleme auf, welche sich in Schleimhautentzündungen, Übelkeit und Erbrechen äußern. Ebenfalls mögliche Nebenwirkungen sind eine Schädigung der Leber (Hepatoxizität), der Nieren (Nephrotoxizität) und der Nerven (Neurotoxizität). Zudem besitzen Zytostatika mutagene und teratogene Eigenschaften [18, 19].

Das erste zur Tumortherapie zugelassene Fluoropyrimidin-Derivat, das 5-Fluorouracil, gehört heute noch, trotz erheblicher Nebenwirkungen, zu den wichtigsten Chemotherapeutika. Bei der Anwendung des 5-Fluorouracils stellt die Myleosupression die dosislimitierende Nebenwirkung dar. Im Rahmen einer Tumortheraphie werden an den Tagen 1-5 zwischen 450-600 mg 5-Fluorouracil pro m^2-Körperoberfläche wiederholt alle 4-5 Wochen verabreicht. Während der Therapie häufig auftretende Nebenwirkung sind Magen-Darm-Probleme, die sich vor allem in Form von Diarhoe und Entzündungen der Mundschleimhaut äußern. Eine selten auftretende Nebenwirkung ist die Neurotoxizität. Die klinische Applikation von 5-Fluorouracil hat sich im Laufe der Jahrzehnte als schwierig erwiesen, da dieses eine unvorhersehbare und hoch variable Bioverfügbarkeit aufweist, zudem eine unzureichende gastrointestinale Resorption. Für eine perorale Gabe ist es daher ungeeignet und muss folglich intravenös verabreicht werden, was nicht unproblematisch ist. Aufgrund der raschen enzymatischen Inaktivierung durch DPD (Dihydropyrimidin-Dehydrogenase) in der Leber weist 5-Fluorouracil eine Halbwertszeit von nur 6-20 Minuten auf. Zudem variiert der physiologische Gehalt an DPD, was eine passende Dosierung erschwert. Bei Patienten

mit einem angeborenen DPD-Mangel treten im Rahmen der Tumortherapie mit 5-Fluorouracil schwere toxische Nebenwirkungen auf [2, 18, 19, 20].

Um den therapeutischen Nutzen des 5-Fluorouracils zu erhöhen, wird eine langsamere und gezieltere Wirkstofffreisetzung angestrebt sowie eine damit zusammenhängende erhöhte Toleranz und Bioverfügbarkeit.
Zahlreiche Bemühungen wurden bisher diesbezüglich unternommen; diese führten nur zu geringfügigen Verbesserungen. So bieten Co-Administrationsstrategien mit Inhibitoren des 5-Fluorouracil-Katabolismus (insbesondere DPD-Inhibitoren) und der Einsatz neuer Prodrug-Formen, wie *Capecitabin*, Möglichkeiten die Wirkung des 5-Fluorouracils zu optimieren. Im Focus der heutigen Forschung steht vor allem die Entwicklung von peroral applizierbaren Prodrugs des 5-Fluorouracils, die eine adäquate Alternative zur intravenösen Infusion darstellen [11, 21].

O-2',3'-Ketal-Nucleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity, and Acidic Stability

Edith Malecki and Helmut Rosemeyer

Helvetica Chimica Acta **2010**, 93 (8), 1500-1512.

DOI: 10.1002/hlca.201000121

O-2',3'-Ketal-Nukleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity and Acidic Stability

Wirkstoffe müssen, um pharmakologisch aktiv werden zu können, in einer bestimmten Minimalkonzentration in Zellen akkumulieren. Da viele von ihnen spezifische intrazelluläre Targets haben, besteht für sie die Notwendigkeit, eine epitheliale Barriere zu passieren, um am Ort des Geschehens wirken zu können. Im Wesentlichen haben biophysiologisch aktive Wirkstoffe zwei Hindernisse zu überwinden – eine biochemische Barriere, die durch metabolische Enzyme dargestellt wird und eine physikalische Barriere, welche durch die biologische Lipidmembran gebildet wird. Erstere kann über die Änderung der Darreichungsform, bzw. eine Umformulierung des Wirkstoffs überwunden werden. Die Lipidmembran stellt hingegen, insbesondere für hydrophile Wirkstoffe mit einem hohen Molekulargewicht, ein großes Hindernis dar [9].

Es gibt verschiedene Methoden, den Transport von Wirkstoffen über Lipidmembranen zu erleichtern. Eine Möglichkeit besteht in der Formulierung oraler Lipid-basierender Wirkstoffe. Eine weitere Möglichkeit ist der Entwurf von Prodrugs mit erhöhter Membranpermeabilität, erzielt durch eine Lipophilisierung des Wirkstoffs oder durch Targeting an ein spezifisches Transportsystem. Einen anderen Angriffspunkt stellt die Lipidmembran selbst dar. So können Penetrationsvermittler Tight junctions öffnen oder eine Änderung der biologischen Struktur der Membran herbeiführen und somit zu einer erhöhten Permeabilität führen. Allerdings weisen Penetrationsvermittler durch ihr nicht-spezifisches Verhalten eine geringe klinische Anwendbarkeit auf. Hingegen stellt die Formulierung von vor allem lipophilen peroralen Prodrugs einen vielversprechenden Ansatz dar. In den letzten Jahren wurde der Entwicklung von Prodrugs viel Aufmerksamkeit gegengebracht [9].

Der Begriff *Prodrug* wurde durch *A. Albert* eingeführt und beschreibt Wirkstoffe, die zunächst eine Biotransformation durchlaufen müssen, um pharmakologisch aktiv zu werden. Gegenwärtig wird dieser Begriff im Zusammenhang mit Wirkstoffen verwendet, die erst nach Verabreichung pharmakologisch aktiv werden. Prodrugs werden heutzutage mit dem Ziel synthetisiert, Probleme bestimmter Wirkstoffkandidaten bezüglich Absorption, Verteilung und Biotransformation zu vermeiden. Die Anwendung des Prodrug-Konzeptes erfolgt beim Vorliegen folgender Wirkstoff-Problematiken:

O-2',3'-Ketal-Nukleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity and Acidic Stability

- Schlechte Lipidlöslichkeit → Erhöhung der Absorption und Verteilung
- Metabolismus → Erhöhung der Stabilität bei oraler Absorption
- Kurze Halbwertszeit → Verlängerung der Wirkungsdauer
- Geringe Akzeptanz → Erhöhung der Akzeptanz
- Geringe Stabilität → Verbesserung der Stabilität
- Selektivität → Selektive Wirkung
- Geringe Hydrophilie → Erhöhung der Wasserlöslichkeit
- Toxizität → Nicht-toxische Verbindungen

Ideale Prodrugs erfüllen bestimmte Kriterien. Sie sind einfach in ihrer Synthese und Aufreinigung und stellen in jeglicher Hinsicht stabile Produkte dar. Des Weiteren sind sowohl die Prodrugs selbst als auch ihre Metabolite und Abbauprodukte nicht-toxisch [9].
Bei den meisten Prodrugs handelt es sich um lipophilisierte Formen polarer Wirkstoffmoleküle. Die Lipophilisierung dient zumeist der Erhöhung der intestinalen Absorption eines Wirkstoffs. Dass lipophile Prodrugs sich mittlerweile bewährt haben, kann am Beispiel von 6-Azauridin (6-AZA), einem Wirkstoff zur Behandlung von Schuppenflechte, deutlich gemacht werden. Diverse Ester dieser Verbindung wurden synthetisiert, so u.a. auch ein 2',3',5'-Triacetyl-6-AZA und ein 2',3',5'-Tribenzoyl-6-AZA. Davon zeigte Ersteres, oral verabreicht, denselben klinischen Effekt wie intravenös injiziertes 6-AZA [9].

Diese Veröffentlichung beschreibt die Synthese lipophiler *O*-2',3'-Ketalderivaten des Nukleosid-Cancerostatikums 5-Fluorouridin. Bei den dargestellten Verbindungen handelt es sind sowohl um zyklische als auch um azyklische *O*-2',3'-Ketalderivate. Im Hinblick darauf, ob derartige Nukleolipide interessante Prodrugs des 5-Fluorouridins darstellen können, wurden diese hinsichtlich ihrer Lipophilie (log *P*, Retentionszeiten in der *RP-18* HPLC) und Säurestabilität (Halbwertszeiten) untersucht. Ferner fand eine Überprüfung der Zelltoxizität (MTT-Assay) statt, sowie die Betrachtung einer bei den zyklischen Ketalen auftretenden Ringspannung und deren Folgen.

O-2',3'-Ketal-Nukleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity and Acidic Stability

Die Ergebnisse stellen die synthetische Basis für eine breit angelegte Studie bezüglich des physikochemischen Verhaltens lipophiler Nukleosid-Derivate dar. Ein Schwerpunkt zukünftiger Untersuchung soll das Studium der Interaktion von Nukleolipiden mit biologischen Membranen sein, ein weiterer die biomedizinische Anwendbarkeit lipophilisierter Nukleoside mit pharmakoloischen Eigenschaften.

Die Motivation für die Synthese der hier vorgestellten Verbindungen lag darin, Nukleosid-Lipid-Derivate zu entwerfen, die aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften einen breiteren Anwendungsbereich finden. So stellen die Lipophilisierung des pharmakologisch aktiven 5-Fluorouridins und die Einlagerung seiner Derivate in z.B. hydrophobisierte TiO_2-Nanoröhren [22] Herausforderungen dar, die in naher Zukunft bewältigt werden sollen. Ziel ist hier die Entwicklung eines *drug delivery systems* in Form eines Implantats, das eine gezielte und kontrollierte Wirkstofffreisetzung ermöglicht und sich besonders für den Einsatz in schwer zugänglichen Krankheitsregionen, wie beispielsweise dem Gehirn, eignet.

Systeme zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung sind eines der wichtigsten Themen der wissenschaftlichen Forschung. Mittlerweile existiert eine Fülle verschiedener *drug delivery systems* [23]. So konnten mit pharmakologisch aktiven Wirkstoffen, wie Sirolimus (Immunsuppressivum), Paclitaxel (Cytostatikum) oder Albumin (Protein) [24], sowie Tetracyclinhydrochlorid (Antibiotikum) beladene TiO_2-Strukturen [25] erfolgreich hergestellt werden und stellen vielversprechende Systeme für die Wirkstofffreisetzung dar.

Die synthetisierten lipophilen Derivate (s. Abbildung 1) erfüllen '*Lipinskis* Rule of Five' und stellen möglicherweise interessante (orale) Prodrugs des 5-Fluorouridins dar. Aus dem Bereich der Pharmaforschung stammend, dient '*Lipinskis* Rule of Five' der Abschätzung, ob ein neuer Wirkstoff als oral anwendbares Arzneimittel geeignet sein könnte. Basierend auf einer im Jahre 1997 durch den Medizinalchemiker *Christopher Lipinski* durchgeführten Studie, in welcher die physikochemischen Eigenschaften von mehr als 2.000 Wirkstoffen und potentiellen Wirkstoffkandidaten im klinischen Stadium analysiert wurden, konnte der Schluss gezogen werden, dass es sich bei den meisten Arzneiwirkstoffen um kleine lipophile Moleküle handelt [26, 27]. Nach Lipinski zeigt

ein Wirkstoff eine bessere orale Anwendbarkeit, Membranpermeabilität bzw. zelluläre Aufnahme, wenn folgende Kriterien erfüllt werden:

- Vorhandensein von maximal fünf Donatoren für Wasserstoffbrückenbindungen (z. B. OH- oder NH-Gruppen)
- Vorhandensein von maximal zehn Akzeptoren für Wasserstoffbrückenbindungen (z. B. Sauerstoff- oder Stickstoffatome)
- Molekülmasse liegt unterhalb von 500 g/mol
- log*P* (n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient) beträgt maximal 5

In den verschiedenen Regeln hat die Bezeichnung '*Lipinskis* Rule of Five' ihren Ursprung im Vorkommen der Zahl 5 und ihrem Vielfachem. Ghose *et al.* publizierten im Jahre 1999 eine Erweiterung der Regeln, um eine bessere Beurteilung der *druglikeness* zu ermöglichen [28]. '*Lipinskis* Rule of Five' ist in seiner Anwendbarkeit limitiert und kann nur zur Charakterisierung von Verbindungen hingezogen werden, die mittels passiver Diffusion die Zellmembran überwinden. Verbindungen, die einem aktiven Membrantransport durch Proteine unterliegen, sind von dieser ausgenommen. Trotz ihrer Einfachheit findet '*Lipinskis* Rule of Five' heutzutage Anwendung durch viele medizinische Chemiker [26].

O-2',3'-Ketal-Nukleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity and Acidic Stability

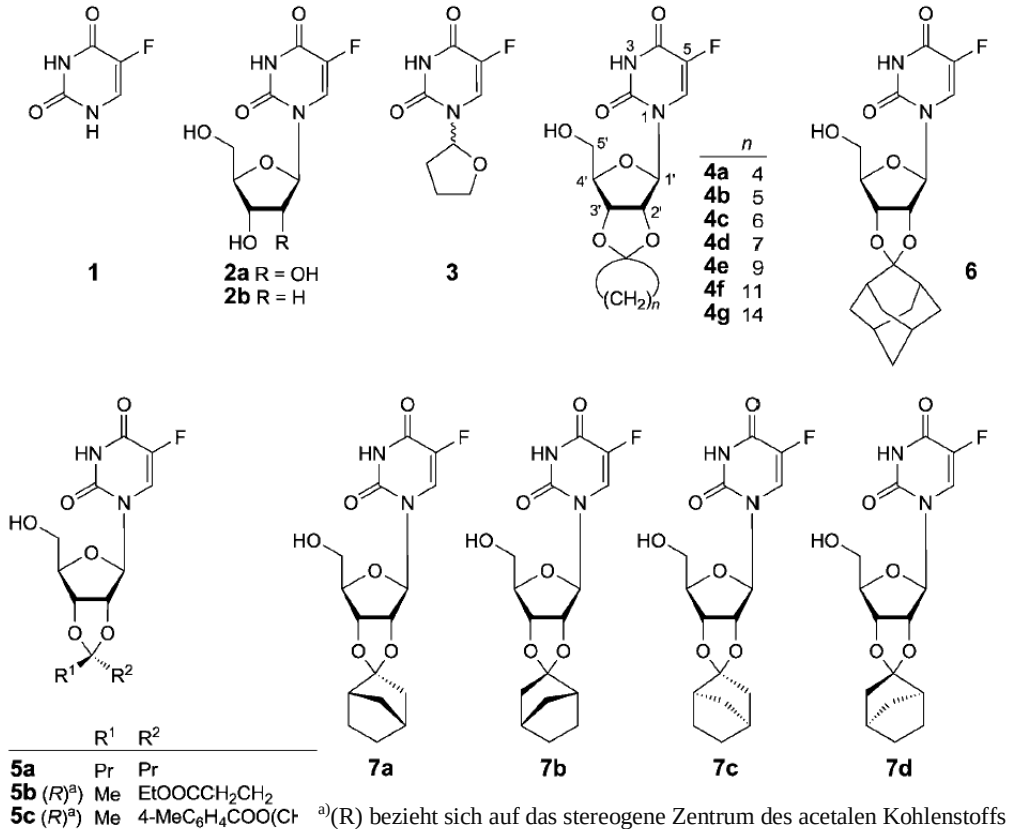


Abbildung 2: Synthetisierte 5-Fluorouridin-Derivate, die '*Lipinskis* Rule of Five' entsprechen.

Zusätzlich zu den oben abgebildeten Cycloheptanon-, Cyclooctanon-, Cyclodecanon-, Cyclododecanon-, Cyclopentadecanon-, Norbornan-2-on- und Adamantan-2-on-Ketalderivaten wurde in einem anderen Zusammenhang ein *O*-2',3'-cyclisches Cyclopentanon- sowie Cyclohexanon-Ketal des 5-Fluorouridins synthetisiert [29].

Die meisten der zur Umsetzung verwendeten Ketone zeichnen sich durch eine Besonderheit aus. So finden das Cyclododecanon und das auch unter dem Namen *Exaltone*® bekannte Cyclopentadecanon Verwendung als Basisdüfte in der Parfümindustrie [30, 31, 32]. Der umgesetzte Lävulinsäureethylester ist ein Derivat der Lävulinsäure, welche einfach und kostengünstig aus Glucose, Fructose oder Stärke gewonnen werden kann. Ein biologisch und pharmakologisch bedeutsames Derivate der Lävulinsäure ist die 5-Aminolävulinsäure. Diese dient als Substrat für die Bildung des Häms in der Porphyrinbiosynthese und stellt folglich ein wichtiges biologisches Zwischenprodukt dieser dar [33]. Da sich 5-Aminolävulinsäure in Tumorzellen stärker anreichert als in unveränderten Zellen, findet sie Verwendung in der Photodynamischen

Therapie (PDT) zur Behandlung diverser Tumore [33, 34] sowie in der frühen Tumordiagnostik [35]. Darüber hinaus dient 5-Aminolävulinsäure vor allem im Bereich der Gehirnchirurgie als nicht-fluoreszierendes Prodrug zur genauen Abgrenzung des Tumorrandes. Erst nach intrazellulärer Aufnahme wird es biophysiologisch zu einem orangerot fluoreszierenden Metaboliten umgewandelt und ermöglicht auf diese Weise eine exaktere Exzerption des Tumors [36]. Aufgrund ihrer pharmakologischen Aktivität sind Amino-Derivate des Adamantans seit langem in der Medizin bekannt und finden Anwendung als Mittel zur Prophylaxe und Behandlung diverser viraler Erkrankungen und dem Morbus Parkinson [37]. Man kennt zudem Adamantanderivate, die antimikrobielle Eigenschaften aufweisen [38]. Des Weiteren konnte Adamantan als Drug-Carrier zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke erfolgreich eingesetzt werden [39]. Norbornan-Derivate finden eine Anwendung als Arzneimittelwirkstoffe und sind interessante Objekte der Arzneimittelforschung. Im Rahmen von Structure-Activity-Relationship-Studien (SAR-Studien) finden sie aufgrund ihrer speziellen Molekularform (voluminöses bicyclisches Kohlenstoff-Skelett) und sterisch starr fixierter Position im Substituenten besondere Verwendung [40].

Die Ketalisierung des 5-Fluorouridins mit dem entsprechenden Keton fand in Gegenwart von Orthoameisensäuretriethylester und 4M HCl in Dioxan bei Raumtemperatur statt. Nach einer Reaktionszeit von 4 – 24 h mit anschließender Aufreinigung konnten die meisten der Verbindungen (**4** – **7**) aus $CHCl_3$ als farblose Nadeln kristallisiert werden. Es ist wichtig hier zu erwähnen, dass einige Nukleolipide während der Aufarbeitung (Details siehe Veröffentlichung, Exp. Teil) in die wässrige Phase rückextrahiert wurden. Folglich liegt die Vermutung nahe, dass einige der synthetisierten Strukturen in der Lage sind, Micellen oder Liposomen zu formen. Da es sich bei den synthetisierten Nukleolipiden um amphiphile Verbindungen handelt, ist die Bildung einer supramolekularen Struktur nicht ungewöhnlich. Eine derartige Feststellung wurde ebenfalls bei Nukleolipiden des Thymidins und 2'-Desoxyinosins gemacht und untersucht [41].

O-2',3'-Ketal-Nukleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity and Acidic Stability

Für eine erfolgreiche Ketalisierung des 5-Fluorouridins mit diversen zyklischen Ketonen (**4a** – **4g**)[1] war das Einhalten bestimmter Reaktionszeiten entscheidend. Die Umsetzung mit kleinen-bis-mittleren Ketonen (Ringgröße 5-8) erforderte lediglich eine Reaktionszeit von ungefähr 4 h; die Umsetzungen von Ketonen mit größerem Ring (10 -15) etwa 24 h. Wurden längere Reaktionszeiten eingehalten, so kam es aufgrund der im Reaktionsgemisch vorhandenen Salzsäure zu einer Konkurrenzreaktion, bei welcher das gebildete Ketal wieder gespalten wurde.

Zu kurze Reaktionszeiten generierten hingegen nicht das gewünschte Produkt und führten zur Bildung von *O*-2'- und 3'-Halbacetalen (s. Abbildung 2). Wurde eine Ketalisierung mit Cyclodecanon und Cyclododecanon bereits nach 4 h abgebrochen, so erhielt man nach Aufarbeitung des Reaktionsansatzes eine Mischung aus den entsprechenden *O*-2'- und 3'-Halbacetalen **8a** und **8b** (s. Abbildung 2). Der Beweis für eine Halbacetalbildung konnte aus den vorliegenden NMR-spektroskopischen Daten der Verbindungen entnommen werden. Hier waren zwei Sets von ^{1}H- und ^{13}C-NMR Signalen vorhanden, welche sowohl auf das Vorhandensein von glykosidischen Atomen als auch von Atomen der Seitenkette schließen ließen, jedoch nicht auf Atome des 5-Fluorouridins. Infolge des Erscheinens zweier 5'-OH Tripletts im Spektrum (bei δ(H) 5.20 und 5.15 ppm) konnte darauf geschlossen werden, dass die Halbacetale an beiden sekundären OH-Gruppen gebildet wurden.

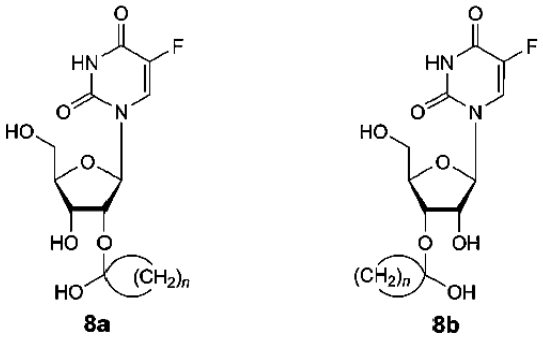


Abbildung 2: *O*-2'- und 3'-Halbacetale des 5-Fluorouridins.

[1]Ringgröße des zyklischen Ketals = *n* + 1; z.B., 2',3'-*O*-Cycloheptane-1,1-diyl-5-fluorouridin (**4c**): *n* = 6

O-2',3'-Ketal-Nukleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity and Acidic Stability

Bei der Ketalisierung mit unsymmetrischen Ketonen kommt es zur Entstehung eines neuen stereogenen Zentrums am Acetal-Kohlenstoff und infolge dessen zur Generierung von Diastereoisomeren. Folglich führte die Ketalisierung des 5-Fluorouridns mit Norbornan-2-on zu einem Gemisch aus Produkten mit drei neuen stereogenen Zentren und theoretisch somit zu acht möglichen Stereoisomere. Vier Strukturen (s. Abbildung 1, Verbindung **7a** – **7d**) konnten aus einer Analyse der NMR-spektroskopischen Daten zum Teil identifiziert werden.

Die Derivatisierung des 5-Fluroruridins mit Ethyllävulinat oder 4-Oxopentyl-4-Methylbenzoate führte ebenfalls zur Generierung eines neuen stereogenen Zentrums am quartären C-Atom. Beide Derivate sind interessante Verbindungen, da sie durch Verseifung der Seitenketten mit funktionellen Gruppen (COOH oder OH) ausgestattet werden können. Das funktionalisierte Säure-Derivat des 5-Fluorouridins konnte für eine kovalente Kupplung an Chitosan als polymeres Trägermaterial genutzt werden (Details siehe Zusammenfassung *Immobilization of 5-Fluororuridine to Chitosan*) [42].

In vorherigen Arbeiten wurde beschrieben, dass es bei der stereoselektiven Ketalisierung von Inosin mit diversen (ω - 1)-Ketoestern wie Ethyllävulinat und unsymmetrischen Ketonen wie Pentan-2-on, bevorzugt oder ausschließlich zur Bildung der (R)-Konfiguration am stereogenen Zentrum kommt [43, 44, 45, 46, 47]. Unsere Untersuchungen zeigten, dass bei der Umsetzung von Inosin mit 4-Oxopentyl 4-Methylbenzoat beide Diastereoisomer ((R) und (S)) zu fast gleichen Teile gebildet werden [48].

Bei der Ketalisierung des 5-Fluoruridins mit Ethyllävulinat wird hingegen die Bildung des (R)-Diastereoisomers begünstigt, das (S)-Diastereoisomer der Verbindung entsteht dabei nur zu 30 %. Dieser Befund konnte aus den dünnschichtchromatographischen R_f - Daten und der NMR-spektroskopischen Analyse des Produktes entnommen werden. Die Umsetzung des 5-Fluororuidins mit 4-Oxopentyl 4-Methylbenzoat führte, unter Einhaltung der Standardreaktionsbedingungen, zur Entstehung eines Diastereoisomeren-Gemisches, in welchem die (S)-Konfiguration nur zu 20% vorlag. In beiden Fällen war eine Trennung beider Diastereoisomere durch mehrfache Säulenchromatographie möglich.

Die hier dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass Ketalisierungsreaktionen von ß-D-Ribonukleosiden mit unsymmetrischen Ketonen stereochemisch kompliziert sind und

O-2',3'-Ketal-Nukleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity and Acidic Stability

dass der Anteil der entstehenden Diastereoisomere sowohl von der Natur des Ketons als auch von der des Nukleosids abhängig ist.

Eine vergleichende Betrachtung der NMR-spektroskopischen Daten aller Verbindungen führte zu einem interessanten Befund. Die zum prochiralen (oder pseudochiralen) acetalen C-Atom benachbarten CH_2- oder CH-Gruppen (H-C(α') und H-C(α)) zeigten unterschiedliche chemische Verschiebungen. Besonders auffällig waren hier die zyklischen Ketalderivate des 5-Fluorouridins (**4a** – **4g**). Die Analyse der ^{13}C-NMR-Spektren dieser Verbindungen zeigte, dass die Unterschiede in der chemischen Verschiebung (Δδ) der C(α')- und C(α)-Atome von der Größe des gewählten Ketalrings abhängen (s. Abbildung 3). So treten die höchsten Δδ-Werte (Ringgröße 8 und 10) bei Verbindungen mit erhöhter Ringspannung auf (s. Tabelle 1).

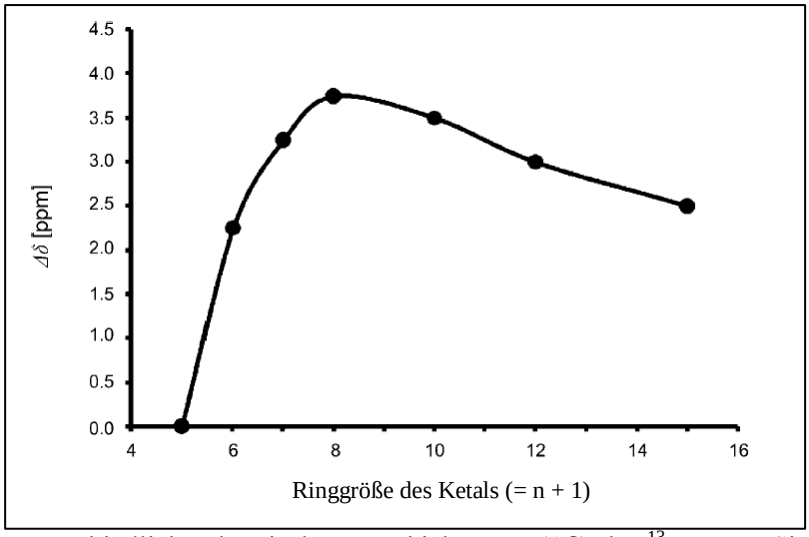


Abbildung 3: Unterschiedliche chemische Verschiebungen (Δδ) der ^{13}C-NMR Signale der C(α') und C(α)-Atome der zyklischen Ketale **4a** – **4g** als Funktion der Ringgröße.

O-2',3'-Ketal-Nukleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity and Acidic Stability

Tabelle 1: Ringspannung (*E*s) der Ketalringe der Verbindungen **4a** – **4g**, Retentionszeiten (*RP-18* HPLC), Halbwertszeiten τ in 1 N aq. HCl/MeCN 1:1, und Toxizität der Verbindungen im MTT-Assay.

Ringgröße (n)	***RP-18* HPLC t_R [min]***	**Ringspannung (*E*s) [kJ/mol]**	**τ [min]****	**Toxizität im MTT-Assay (NT2-Zellen)**
0 5-Fluorouracil	1	-	-	5-Fluorouracil: toxisch
5	3	27.2	24	neutral
6	4	0.4	540	neutral
7	6	26.8	10	neutral
8	8	41.8	15	neutral
10	12	50.3	76	toxisch
12	52	10.0	1260	hoch toxisch
15	190	0.0	340	hoch toxisch
0 5a	24	-	130	neutral
0 5b	3	-	300	neutral
0 5c	9	-	195	toxisch

Die Lipophilie der neuen hydrophoben 5-Fluorouridin-Derivate wurde auf zwei Wegen charakterisiert, durch *i*) die Berechnung der log*P*-Werte für die einzelnen Verbindungen (s. Tabelle 2) und ein Abgleich dieser mit dem log*P*-Wert des unmodfizierten 5-Fluorourodins und durch *ii*) die Ermittlung der Retentionszeiten (t_R [min]) durch eine Bestimmung der chromatographischen Mobilität mittels *RP-18* HPLC. Abbildung 4 zeigt das chromatographische Profil eines Gemisches aus den Verbindungen **4a** – **4g**. Die Abbildungen 5 und 6 stellen den log*P*-Werte sowie die Retentionszeiten (t_R) als Funktion der CH_2-Gruppenanzahl im zyklischen Ketal dar.

O-2',3'-Ketal-Nukleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity and Acidic Stability

Tabelle 2. Kalkulierter log*P*, Parachor und amphiphiles Verhältnis der 5-Fluorouridin Derivate und der zyklischen Ketonhydrate.

Compound	Calc. log *P* of **2–7**	Calc. log *P* of the corresponding ketone hydrates	Calc. parachor of **2a** and of the ketone hydrates [cm³]	Amphiphilic ratio[a])
2a	−1.34±0.46	–	452.5±6.0	–
4a	+1.41±0.67	−0.37±0.26	218.0±4.0	+7.5
4b	+1.97±0.67	+0.19±0.26	258.0±4.0	−12.4
4c	+2.53±0.67	+0.76±0.26	298.1±4.0	−2.7
4d	+3.10±0.67	+1.36±0.26	338.1±4.0	−1.3
4e	+4.23±0.67	+2.45±0.26	418.2±4.0	−0.6
4f	+5.36±0.67	+3.58±0.26	498.3±4.0	−0.34
4g	+7.05±0.67	+5.27±0.26	618.4±4.0	−0.19
5a	+2.62±0.56	+0.90±0.37	339.2±4.0	−1.98
5b	+1.05±0.58	+0.06±0.63	363.9±4.0	−27.8
5c	+3.70±0.64	+1.81±0.40	537.4±4.0	−0.62
6	+2.81±0.68	+1.03±0.27	355.6±4.0	−1.66
7a–7d	+1.82±0.67	+0.05±0.27	266.8±4.0	−45.5

[a]) The amphiphilic ratio is defined as the ratio of the (log *P* · parachor) – value³) of the hydrophilic head group 5-fluorouridine (**2a**) divided by the (log *P* · parachor) – value of the lipophilic hydrate (= geminal diol) of the corresponding ketone, and it characterizes the balance of hydrophilicity and lipophilicity within the amphiphile.

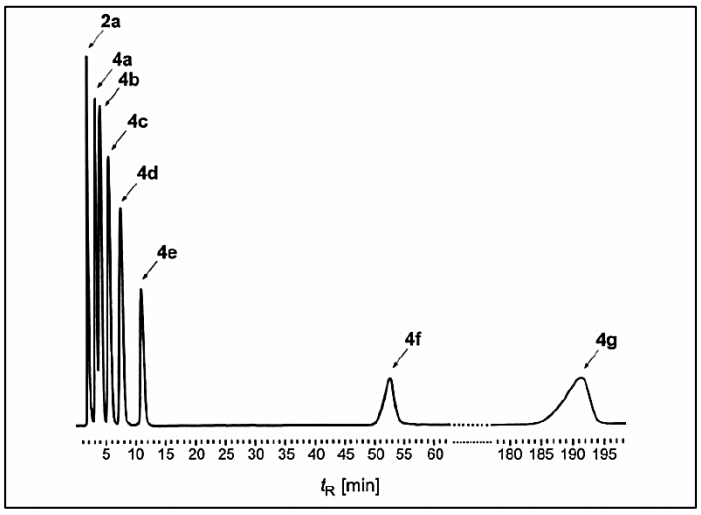


Abbildung 4: *RP-18* HPLC-Elutionsprofil eines Gemisches aus Verbindung **4a** – **4g** (Exp. Details siehe Veröffentlichung Exp. Teil).

O-2',3'-Ketal-Nukleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity and Acidic Stability

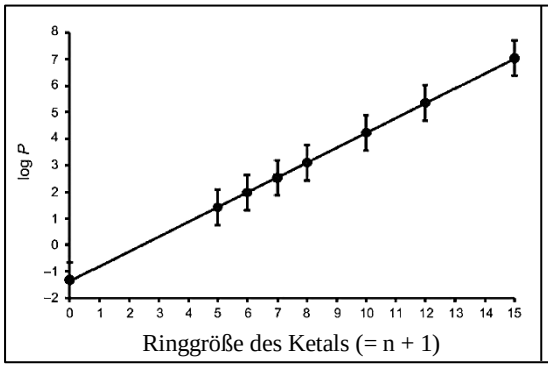


Abbildung 5: log*P*-Werte der zyklischen Ketale als Funktion der Ringgröße.

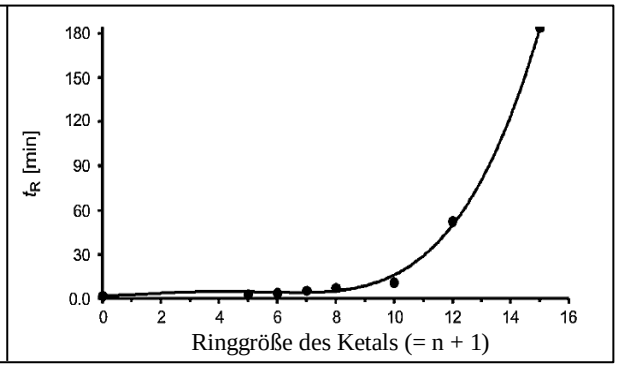


Abbildung 6: Retentionszeiten (t_R [min]) der zyklischen Ketale als Funktion der Ringgröße.

Aus den oberen Darstellungen (Tabelle 1 und Abbildung 5) geht hervor, dass der errechnete log*P*-Wert linear mit zunehmender CH_2-Gruppenanzahl ansteigt. Die Retentionszeiten (s. Abbildung 6) des Cyclododecanon- und des Cyclopentadecanon-Derivates (Verbindung **4f** und **4g**) sind, den Erwartungen widersprechend, signifikant länger und lassen folglich auf ein anderes physikochemisches Verhalten beider Verbindungen schließen. Diese Annahme wird durch den Befund gestützt, dass nur 5-Fluorouridin-Ketalderivate mit einer großen Ringstruktur eine Zelltoxizität im MTT-Assay (mit NT2-Zelllinie) aufwiesen (s. Tabelle 1). Beim MTT-Assay handelt es sich um einen Zytotoxizitätstest zur Bestimmung des zytoxischen Effektes von Wirkstoffen auf Zelllinien. Dabei wird die Zellvitalität anhand der Aktivität eines mitochondrialen Enzymes bestimmt und vergleichend einer Kontrollprobe gegenübergestellt. Die mitochondriale Aktivität einer Zellpopulation ist abhängig von der Anzahl an metabolisierenden Zellen [49]. Lebende Zellen metabolisieren mittels mitochondrialer Reductase-Enzyme den gelben Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid zu blau-violetten Formazan. Dieses wird nach der Inkubationszeit durch die Zugabe eines Lyse-Puffers ins Medium freigesetzt und photometrisch erfasst. Das Absorptionsmaximum des Formazans ist abhängig vom Lösungsmittel und liegt zwischen 500 - 600 nm. Anhand der ermittelten Absorption kann auf die Formazan-Konzentration geschlossen werden und folglich auf die Anzahl lebender Zellen [49, 50].

Die Säurestabilität der Verbindungen **4a** – **4g** wurde durch Inkubation des jeweiligen Derivates in einer Lösung aus 1N HCl und MeCN (1:1; v/v) determiniert. Der

anschließenden Neutralisation, durch Zugabe von Et_3N, folgte eine Analyse durch *RP-18* HPLC (Details siehe Veröffentlichung, Exp. Teil). Als Referenz diente unmodifiziertes 5-Fluorouridin. Die Halbwertszeiten der Ketalderivate wurden aus einer graphischen Darstellung des jeweiligen Signalintegrals, aufgetragen gegen die Reaktionszeit, entnommen. Alle chromatographischen Profile zeigten, nach erfolgter Hydrolyse der zyklischen Ketalderivate, die Entstehung von 5-Fluorouridin und nicht 5-Fluorouracil als Spaltungsprodukt. Des Weiteren konnten innerhalb der Reihe der zyklischen Ketalderivate (**4a** – **4g**) "Stabilitätsinseln" identifiziert werden. Hier zeigten das Cyclohexanon- und Cyclododecanon-Derivat eine erhöhte Säurestabilitäten (Tabelle 1).

Synthesis and Crystal Structures of *O*-2',3'-Cyclic Cyclopentanone and Cyclohexanone Ketals of the Cytostatic 5-Fluorouridine

Edith Malecki, Fei Ye, Hans Reuter, Helmut Rosemeyer

Helvetica Chimica Acta **2009**, 92 (10), 1923-1932.

DOI: 10.1002/hlca.200900115

Synthesis and Crystal Structures of O-2',3'-Cyclic Cyclopentanone and Cyclohexanone Ketals of the Cytostatic 5-Fluorouridine

Im Rahmen von Studien [51, 52] zur Synthese von lipophilen Nukleosid-Derivaten (Nukleolipiden) mit pharmakologischer Aktivität wurde eine Serie von *O*-2',3'-zyklischen Ketalen des Cancerostatikums 5-Fluorouridin dargestellt. Es handelt sich dabei um Verbindungen von pharmakologischem Interesse, da diese lipophile Prodrugs des 5-Fluorouridins, bzw. -uracils mit säurelabilen Eigenschaften darstellen [53].
Obwohl Nukleolipide im Allgemeinen nicht die Tendenz aufweisen, Kristallstrukturen auszubilden, ist es möglich gewesen, einige der synthetisierten Verbindungen zu kristallisieren. Diese Veröffentlichung berichtet über die dreidimensionale Struktur von synthetisierten *O*-2',3'-cyklopentyliden- und cyklohexyliden-Ketalderivaten des 5-Fluorouridins, welche mittels Röntgenstrukturanalyse charakterisiert wurden.
5-Fluorouracil (s. Abbildung 1 Verbindung **1**) und dessen ß-D-Ribo- (s. Abbildung 1 Verbindung **2**) sowie sein 2'-Desoxy-ß-D-Ribo-Nukleosid besitzen starke Antitumoraktivität gegen diverse Arten von Tumoren. Das bekannteste lipophile Derivat des 5-Fluorouracils ist *Tegafur* (s. Abbildung 1 Verbindung **3**), ein Prodrug, das in der Leber abgebaut wird und nach dem gleichen Mechanismus wie 5-Fluorouracil wirkt [54, 55, 56, 57, 58, 59]. Verantwortlich für die Zytotoxizität dieser Verbindungen sind mehrere biochemische Mechanismen (Details siehe Einleitung):

i) Hemmung der Thymidylat-Synthetase und infolge Hemmung der DNA-Synthese durch FdUMP
ii) Einbau in RNA als FUTP
iii) Einbau in DNA als FdUTP

Die genaue Kenntnis über die Struktur und strukturellen Besonderheiten von Molekülen ist insbesondere bei Verbindungen mit pharmakologischer Aktivität wichtig und spielt im Rahmen von structure-activity relationship Studien (SARS) eine zentrale Rolle, in denen es um die Herstellung einer Beziehung zwischen der chemischen Struktur und der biologischen oder physikochemischen Aktivität einer Verbindung geht. Nur durch das genaue Wissen um den "Charakter" von Wirkstoffen können Wirkmechanismen und zelluläre Targets aufgedeckt werden, was wiederum zu einem gezielten Einsatz führt und eine passende Modifikation dieser ermöglicht.

Synthesis and Crystal Structures of O-2',3'-Cyclic Cyclopentanone and Cyclohexanone Ketals of the Cytostatic 5-Fluorouridine

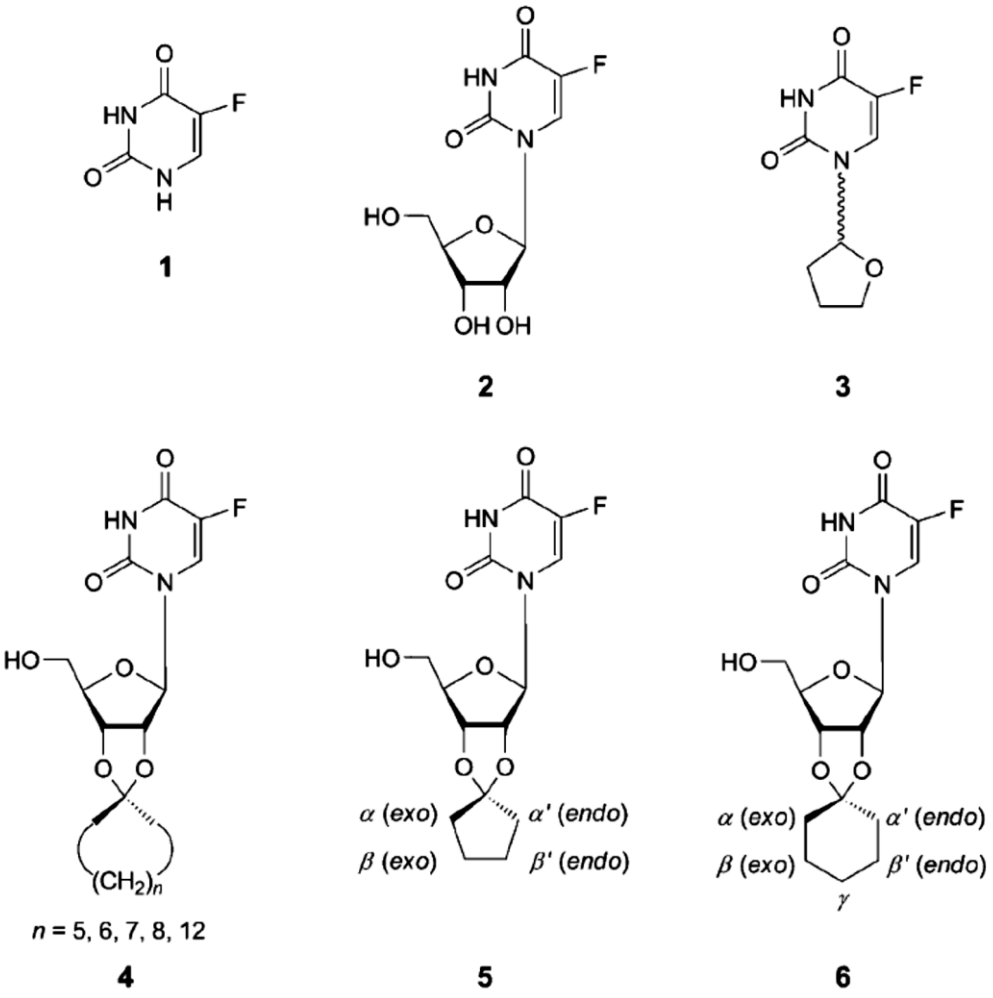


Abbildung 3: 5-Fluorouracil (**1**) und cancerostatisch aktive Derivate 5-Fluorouridin (**2**) und Tegafur (**3**) sowie neu synthetisierte 5-Fluorouridin-Derivate.

Die Kondensation von unsymmetrischen Ketonen, wie Pentan-2-on oder (ω-1)-Oxoestern, wie Lävulinsäureethylester mit Ribonukleosiden in Gegenwart von Orthoameisensäuretriethylester führt zur Ausbildung von (R)- und (S)-*O*-2',3'-Alkylketalen, wobei überwiegend die (R)-diastereoisomere Form gebildet wird [43, 44, 47]. Unter denselben Bedingungen können durch eine analoge Reaktion von zyklischen Ketonen mit 5-Fluorouridin zyklische spiro-verknüpfte *O*-2',3'-Alkylidenderivate mit der allgemeinen Struktur **4** (s. Abbildung 1) dargestellt werden [53]. Dabei handelt es sich um Verbindungen ohne ein zusätzliches stereogenes Zentrum.

Die Synthese der Verbindungen **5** und **6** erfolgte durch Umsetzung von Cyclopentanon bzw. Cyclohexanon mit 5-Fluorouridin in Gegenwart von Orthoameisensäure-triethylester und 4 M HCl in 1,4-Dioxan unter Verwendung von DMF als Lösungsmittel.

Synthesis and Crystal Structures of O-2',3'-Cyclic Cyclopentanone and Cyclohexanone Ketals of the Cytostatic 5-Fluorouridine

Nach Aufarbeitung der Reaktionsansätze konnten beide Verbindungen aus Chloroform, bzw. einer Mischung aus Chloroform und Aceton (4:1, v/v) im Falle von Verbindung **6**, als farblose Nadeln kristallisiert werden, welche sich für eine Röntgenstrukturanalyse eigneten.

Beide *O*-2',3'-zyklischen Ketalderivate wurden mittels ^{1}H-, ^{13}C- und ^{19}F-NMR-Spektoskopie charakterisiert. Die genaue Analyse der ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren lieferte dabei einen interessanten Befund. In beiden Fällen zeigten die direkt am prochiralen (pseudochiralen) acetalen Kohlenstoff (= C(10) in Abbildung 2) liegenden CH_2-Gruppen unterschiedliche chemische Verschiebungen. Dies konnte zuvor ebenfalls bei *O*-2',3'-Isopropyliden-geschützten Ribonukleosiden und anderen unsymmetrischen *O*-2',3'-Alkylidennukleosid-Derivaten festgestellt werden und hat eine bestimmte Ursache. Eine der zum Acetal-Kohlenstoff benachbarten Alkylgruppen ist endo-orientiert und liegt folglich so unterhalb des Riboserings positioniert, dass sie dem Effekt des elektrischen Feldes des N-Heterozyklus ausgesetzt ist, wohingegen die andere Alkylgruppe sich in exo-Position befindet und dadurch nicht von Feldeffekten beeinflusst wird. Zurückliegende röntgenstrukturanalytische Untersuchungen zur chemischen Verschiebung von Alkylidenresten bei (*R*)-*O*-2',3'-(3-Carboxy-1-methylpropyliden)-Adenosin machten eine Zuordnung möglich und zeigten, dass bei unsymmetrischen (*R*)-konfigurierten Verbindungen die Alkyliden-Methylgruppe exo-orientiert ist und bei höherem Feld resoniert [43]. Aufgrund dieser Feststellung konnte eine eindeutige Signalzuordnung für die am prochiralen Kohlenstoff liegenden Methylen-Gruppen der Verbindung **5** und **6** vorgenommen werden. Eine weitere Auswertung der NMR-Spektren ergab einen Δδ-Wert von 0.21 ppm für die exo- und endo-CH_2-Protonen in Nähe des prochiralen Zentrums im Fall von Verbindung **5** und einen Wert von 0.16 ppm für die entsprechenden H-Atome der Verbindung **6**. Beide Werte entsprechen der *Imbach'schen Regel* für ß-D-Ribonukleoside, die seid langem für die Zuordnung anomerer Nukleosid-gemische genutzt wird [60].

Synthesis and Crystal Structures of O-2',3'-Cyclic Cyclopentanone and Cyclohexanone Ketals of the Cytostatic 5-Fluorouridine

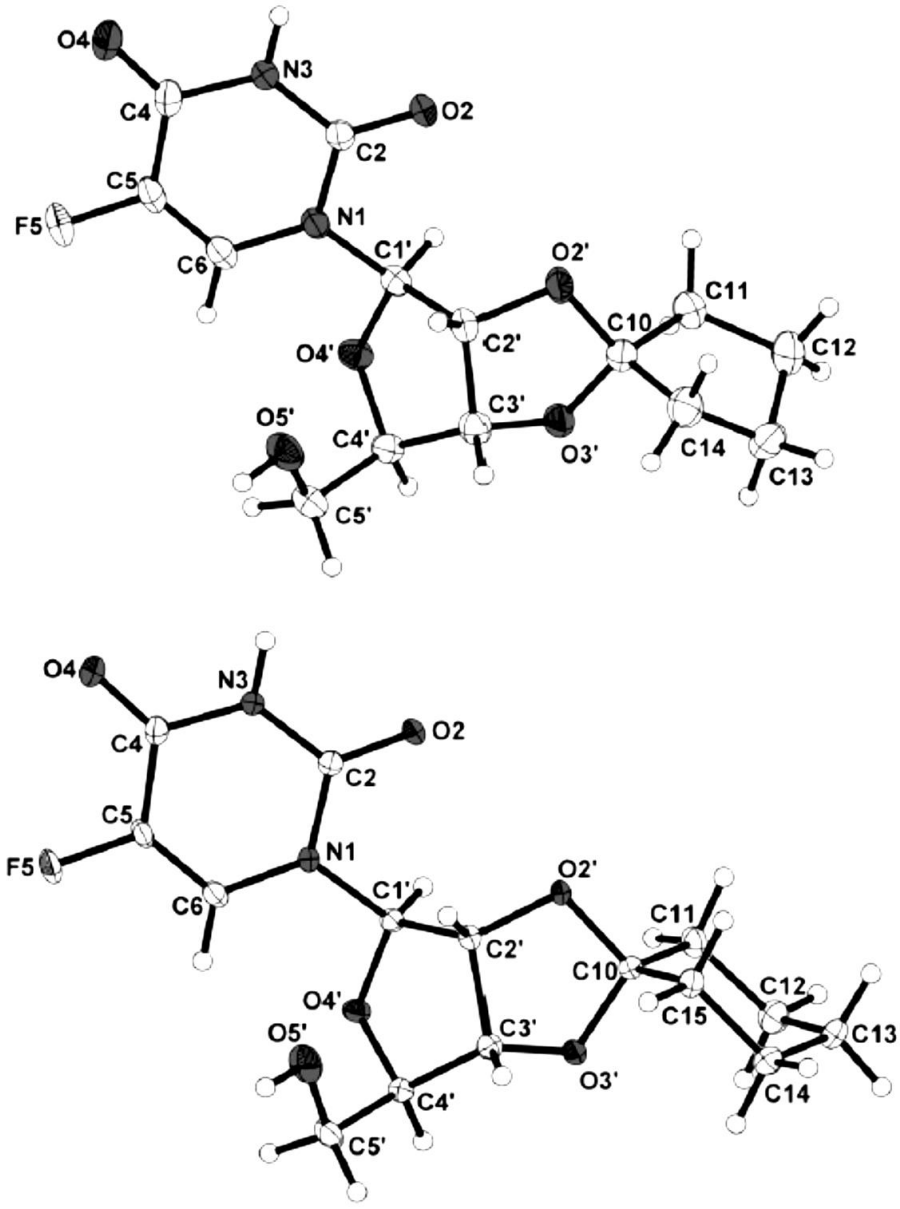


Abbildung 4: Kalottenmodell und Nummerierungsschema der Verbindung **5** und **6**.

Die ß-CH_2-H-Atome (s. Abbildung 1), CH_2 (12) und CH_2 (13) (s. Abbildung 2), der Verbindung **5** traten im NMR-Spektrum als Multiplett auf. Die ^{3}J(H,H)-Kopplung zwischen den α- und ß-CH_2-H-Atomen der CH_2(11)- und CH_2(12)-, sowie CH_2(14)- und CH_2(13)-Gruppen der Verbindung betrug jeweils 7.1 Hz und ließ folglich auf einen Torsionswinkels von 40° (± 5°) mit einer verzogenen Konformation der C(11)-C(12)- und C(13)-C(14)-Achse schließen. Im Fall von Verbindung **6** betrug die entsprechende

Synthesis and Crystal Structures of O-2',3'-Cyclic Cyclopentanone and Cyclohexanone Ketals of the Cytostatic 5-Fluorouridine

^{3}J-Kopplung 5.7 Hz, was auf einen Torsionswinkel von 57° (± 5°) hindeutete und somit auf eine perfekte gauche-Konformation.

Beide Verbindungen zeigten zudem im ^{13}C-NMR-Spektrum Unterschiede in der chemischen Verschiebung der C(α')(endo)- und C(α)(exo)-Signale (s. Abbildung 1). Während für Verbindung **5** ein Wert von 0.03 ppm auftrat, zeigte sich für Verbindung **6** ein Δδ-Wert von 2.3 ppm. Der Unterschied in der chemischen Verschiebung der ß-C-Atome (Verbindung **5**: C(12)/C(13); Verbindung **6** C(13)/C(14)) betrug hingegen 0.3, bzw. 0.4 ppm.

Die ermittelten kristallographischen Daten, sowie die Torsionswinkel, intermolekularen Bindungsdistanzen und Bindungswinkel des 5-Fluorouridins sind zusammen mit den Daten der synthetisierten Verbindungen **5** und **6** in Tabelle 1 – 4 dargestellt.

Tabelle 1: Kristallographische Daten der Verbindungen **5** und **6**.

	5	**6**
Empirical formula	$C_{14}H_{17}FN_2O_6$	$C_{15}H_{19}FN_2O_6$
Formula weight [g mol^{-1}]	328.30	342.32
Temp. [K]	100 (2)	100 (2)
Wavelength [Å]	0.71073	0.71073
Crystal system	Orthorhombic	Orthorhombic
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
a [Å]	5.3090(4)	5.9586(4)
b [Å]	13.5604(7)	13.2524(7)
c [Å]	19.9728(8)	19.4723(9)
V [Å^3]	1437.89(14)	1537.64(15)
Z	4	4
D_x [g cm^{-3}]	1.517	1.479
μ (MoK_α) [mm^{-1}]	0.127	0.122
F (000)	688	720
Crystal size [mm]	0.33 × 0.32 × 0.21	0.49 × 0.21 × 0.13
Crystal description	Bloc	Needle
θ Range for data collection [°]	1.82 – 27.99	1.86 – 28.00
Limiting indices	$-6 \le h \le 6$	$-7 \le h \le 7$
	$-17 \le k \le 17$	$-17 \le k \le 17$
	$-25 \le l \le 25$	$-25 \le l \le 25$
Reflection collected/unique	54649/1988	87416/2147
R_{int}	0.0304	0.0397
Completeness to $\theta = 27.99$ [%]	98.4	100.0
Transmission factors [min; max]	0.9591; 0.9738	0.9427; 0.9845
Data/restraints/parameters	1988/0/213	2147/0/220
Goodness-of-fit on F^2	1.041	1.058
Final R indices [$I > 2\sigma$ (I)]	$R1 = 0.0297$, $wR2 = 0.0755$	$R1 = 0.0276$, $wR2 = 0.0704$
Final R indices [all data]	$R1 = 0.0318$, $wR2 = 0.0769$	$R1 = 0.0306$, $wR2 = 0.0727$
Extinction coefficient	0.0017 (13)	None
Largest diff. peak and hole [e Å^{-3}]	0.224 and −0.194	0.314 and −0.243

Synthesis and Crystal Structures of O-2',3'-Cyclic Cyclopentanone and Cyclohexanone Ketals of the Cytostatic 5-Fluorouridine

Tabelle 2: Torsionswinkel [°] des 5-Fluorouridins (**2**) und der Derivate **5** und **6**.

Torsion angle	Symbol	F^5Urd (**2**)	**5**	**6**
C(2)–N(1)–C(1′)–O(4′)	X[a])	–122.7	–164.6(2)	–167.9(1)
C(2′)–C(1′)–O(4′)–C(4′)	ζ_0	–15.8	2.4(2)	2.1(2)
O(4′)–C(1′)–C(2′)–C(3′)	ζ_1	30.9	12.5(2)	11.2(2)
C(1′)–C(2′)–C(3′)–C(4′)	ζ_2	–33.0	–22.2(2)	–19.6(2)
C(2′)–C(3′)–C(4′)–O(4′)	ζ_3	25.1[b])	24.1(2)	21.4(2)
C(3′)–C(4′)–O(4′)–C(1′)	ζ_4	–6.3	–16.5(2)	–14.9(2)
O(5′)–C(5′)–C(4′)–C(3′)	Φ_{oc}	49.1	53.9(2)	52.2(2)
O(5′)–C(5′)–C(4′)–O(4′)	Φ_{oo}	–69.3	–64.3(2)	–66.0(2)

[a]) The originally published value amounts to 53.1° [10] and refers to an *N*-glycosidic torsion angle C(6)–N(1)–C(1′)–O(4′) but not to C(2)–N(1)–C(1′)–O(4′) as defined for *X* in [16]. [b]) This value has been corrected according to the originally deposited data [10].

Tabelle 3: Intramolekulare Bindungsdistanzen [Å] in den Molekülen **2**, **5** und **6**.

Bond	F^5Urd (**2**)	**5**	**6**
N(1)–C(2)	1.387(4)	1.377(2)	1.374(2)
N(1)–C(6)	1.374(4)	1.375(2)	1.376(2)
N(1)–C(1′)	1.473(3)	1.495(2)	1.495(2)
C(2)–O(2)	1.210(4)	1.222(2)	1.224(2)
C(2)–N(3)	1.387(3)	1.377(2)	1.379(2)
N(3)–C(4)	1.378(4)	1.385(2)	1.379(2)
C(4)–O(4)	1.231(3)	1.223(2)	1.224(2)
C(4)–C(5)	1.420(5)	1.438(3)	1.444(2)
C(5)–C(6)	1.336(3)	1.330(3)	1.336(2)
C(5)–F(5)	[a])	1.354(2)	1.353(2)
C(1′)–O(4′)	1.400(3)	1.406(2)	1.402(2)
C(1′)–C(2′)	1.524(4)	1.544(2)	1.546(2)
C(2′)–O(2′)	1.404(3)	1.422(2)	1.426(2)
C(2′)–C(3′)	1.542(3)	1.522(2)	1.532(2)
O(2′)–C(10)	[a])	1.434(2)	1.435(2)
C(3′)–O(3′)	1.425(4)	1.432(2)	1.431(2)
C(3′)–C(4′)	1.540(4)	1.514(2)	1.518(2)
O(3′)–C(10)	[a])	1.426(2)	1.433(2)
C(4′)–O(4′)	1.447(4)	1.456(2)	1.453(2)
C(4′)–C(5′)	1.492(6)	1.506(2)	1.506(2)
C(5′)–O(5′)	1.423(6)	1.422(2)	1.418(2)

[a]) Not reported.

Synthesis and Crystal Structures of O-2',3'-Cyclic Cyclopentanone and Cyclohexanone Ketals of the Cytostatic 5-Fluorouridine

Tabelle 4: Intramolekulare Bindungswinkel [°] in Molekül **2**, **5** und **6**.

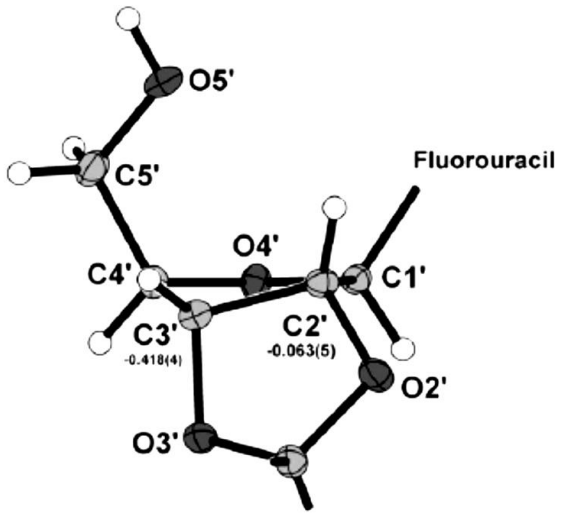
Bond angle	F^{5}Urd (**2**)	**5**	**6**
C(2)–N(1)–C(6)	122.2(2)	121.32(15)	121.91(14)
C(2)–N(1)–C(1′)	113.4(2)	115.97(13)	114.96(12)
C(6)–N(1)–C(1′)	119.3(3)	122.47(14)	122.73(13)
O(2)–C(2)–N(1)	124.2(3)	122.26(16)	122.29(14)
O(2)–C(2)–N(3)	121.3(3)	122.06(16)	122.05(14)
N(1)–C(2)–N(3)	114.3(3)	115.67(14)	115.67(13)
C(4)–N(3)–C(2)	127.3(3)	126.99(15)	127.09(14)
O(4)–C(4)–N(3)	126.4(2)	121.77(17)	121.91(15)
O(4)–C(4)–C(5)	116.6(2)	126.24(15)	125.79(15)
N(3)–C(4)–C(5)	113.1(2)	111.99(15)	112.30(14)
C(6)–C(5)–F(5)	120.6(4)	120.40(16)	120.80(15)
C(6)–C(5)–C(4)	122.7(3)	123.31(15)	123.06(14)
F(5)–C(5)–C(4)	[a])	116.30(15)	116.13(14)
C(5)–C(6)–N(1)	120.3(3)	120.29(16)	119.93(15)
O(4′)–C(1′)–N(1)	[a])	108.16(13)	109.32(12)
O(4′)–C(1′)–C(2′)	107.5(3)	108.48(13)	108.75(12)
N(1)–C(1′)–C(2′)	[a])	114.55(14)	112.97(12)
O(2′)–C(2′)–C(3′)	115.4(2)	105.15(13)	105.43(12)
O(2′)–C(2′)–C(1′)	109.3(3)	111.45(14)	109.93(12)
C(3′)–C(2′)–C(1′)	101.7(3)	102.81(13)	103.33(12)
C(2′)–O(2′)–C(10)	[a])	108.29(13)	107.98(11)
O(3′)–C(3′)–C(4′)	108.4(2)	108.94(14)	110.63(14)
O(3′)–C(3′)–C(2′)	110.6(2)	101.81(13)	102.57(12)
C(4′)–C(3′)–C(2′)	102.3(3)	106.61(14)	105.91(12)
C(3′)–O(3′)–C(10)	[a])	105.51(13)	105.59(12)
O(4′)–C(4′)–C(5′)	109.6(2)	111.85(14)	110.30(13)
O(4′)–C(4′)–C(3′)	106.2(2)	104.68(13)	105.92(12)
C(1′)–O(4′)–C(4′)	[a])	111.61(12)	111.49(11)
O(5′)–C(5′)–C(4′)	110.2(3)	109.82(15)	108.79(14)
O(3′)–C(10)–O(2′)	[a])	104.90(12)	104.65(11)

[a]) Not reported.

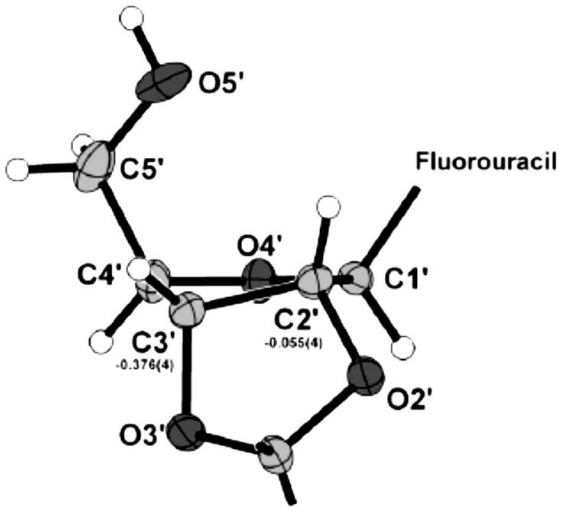
Aus einer vergleichenden Analyse der vorliegenden Daten ging hervor, dass die strukturellen Parameter beider Ketal-Derivate identisch waren, sich allerdings partiell von denen des Stamm-Nukleosids unterschieden. So war beispielsweise der in der +ac-Region liegende Torsionswinkel χ(C(2)-N(1)-C(1‘)-O(4‘)) der N-glykosidischen Bindung des 5-Fluorouridins (Verbindung **2**) im Fall der Verbindungen **5** und **6** ins Antiperiplanare (+ac) verzerrt. Des Weiteren ist die Faltung der Zuckereinheit leicht verändert. Während das Stamm-Nukleosid eine C(2‘) endo-($^{2'}E$)-Konformation einnimmt, zeigten die Ketal-Derivate **5** und **6** eine C(3‘) exo-($_{3'}$E)-Konformation (s. Abbildung 3) mit einem pseudorotatorischen Phasenwinkel *P* von 204,06° für

Synthesis and Crystal Structures of O-2',3'-Cyclic Cyclopentanone and Cyclohexanone Ketals of the Cytostatic 5-Fluorouridine

Verbindung **5** und 204,27° für Verbindung **6**, sowie eine pseudorotatorische Amplitude τ_m von 24,3°, bzw. 21,5°. Verglichen mit der Amplitude der Verbindung **2** (P = 166,3°, τ_m = 34.5°) bestand somit eine Reduktion um 10-13° infolge der Ketalisierung.



5



6

Abbildung 5: Zucker Puckering der Verbindung **5** und **6**.

Nucleolipids of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers

Edith Malecki, Vanessa Ottenhaus, Emma Werz, Christine Knies, Malayko Montilla-Martinez, Helmut Rosemeyer

Chemistry & Biodiversity **2014**, 11 (2), 217-232.

DOI: 10.1002/cbdv.201300127

Nucleolipids of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Umwandlung des Nukleosid-Cancerostatikums 5-Fluorouridin in ein *N*(3)-farnesyliertes Nukleoterpen über die Methode der direkten Alkylierung mittels Farnesylbromid, einem Derivat des Farnesols (s. Abbildung 1). Bei Farnesol handelt es sich um einen natürlichen Sesquiterpenalkohol, der als Schlüssel-Intermediat bei der *de novo* Synthese von Cholesterol in den Zellen höherer Organismen eine zentrale Rolle spielt [61].

Abbildung 1: Strukturen von Farnesol (links) und Farnesylbromid (rechts).

Ein weiterer Kernpunkt dieser Arbeit war die Darstellung von *O*-2‘,3‘-Lipid-Derivaten des 5-Fluorouridins mit verschiedenen Kettenlängen (Nukleolipide), durch Ketalisierung mit Aceton, Heptan-4-on, Nonadecan-10-on und Hentriacontan-16-on (s. Abbildung 2). Die Umsetzung mit den beiden zuletzt genannten Ketonen hatte zum Ziel, dem Bauprinzip der Phospholipide (= Grundbausteine biologischer Membranen) nachempfundene Derivate des 5-Fluorouridins zu synthetisieren.

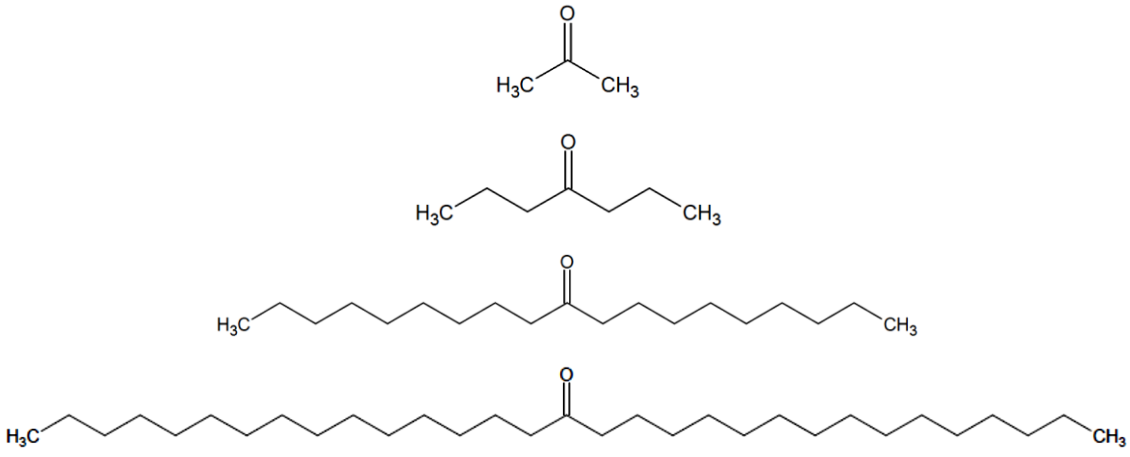


Abbildung 2: Umgesetzte Ketone, Aceton, Heptan-4-on, Nonadecan-10-on und Hentriacontan-16-on (von oben nach unten).

Terpene, die man ebenfalls als Isoprenoide oder Terpenoide bezeichnet, stellen eine vielfältige Klasse natürlicher Verbindungen dar. Sie kommen in allen Organismen vor, in

größter Vielfältigkeit jedoch in Pflanzen. Vorhanden sind hier mehr als 35.000 natürliche Terpenoide [62].

Den Terpenoiden liegt allen eine besondere Struktur zugrunde. Diese resultiert aus einer periodischen Verzweigung von Isopren-Einheiten (Isopentyl-Einheiten), bei denen es sich typischerweise um C_5-Körper handelt (s. Abbildung 3) [62].

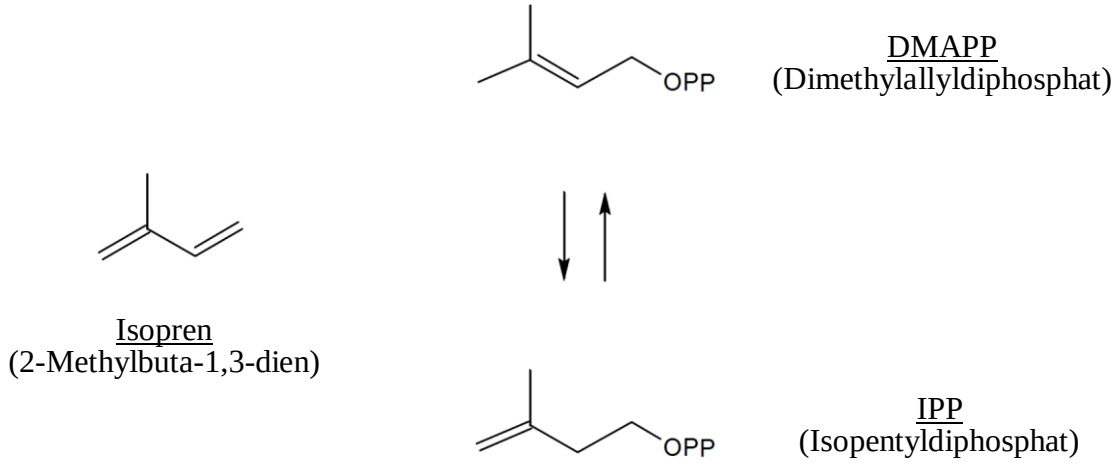


ABB 3: Struktur des Isoprens (2-Methylbuta-1,3-dien) und seines biogenetischen Äquivalentes DMAPP (Dimethylallyldiphosphat), ein Regioisomer des IPP (Isopentyl-diphosphat). IPP und DMAPP stehen im Gleichgewicht.

Anhand der Anzahl an vorkommenden C_5-Isopreneinheiten in einem Terpen findet eine Einteilung der Terpene in Gruppen statt. Die Basis-Einheit stellt dabei ein C_{10}-Körper dar, der entsprechend aus 2 C_5-Körpern (2 Isopreneinheiten) besteht. Dieser Grundstruktur entsprechende Terpene werden als Monoterpene bezeichnet. Je nachdem wie viele C_5-Bausteine zu einem Monoterpen hinzu addiert werden, spricht man von Sesqui- (lat.: sesqui [eineinhalb]), Di-, Tri- oder Tetraterpenen. Innerhalb der Gruppen findet im Weiteren eine Unterteilung in Subklassen statt, wobei man sich dabei an der Struktur des C-Skelettes orientiert (azyklisch ↔ zyklisch → bi-, tri-, tetra-, pentazyklisch). Die C_5-Bausteine werden im Normalfall regulär miteinander verknüpft. Dies bedeutet, es findet eine Bindungsknüpfung zwischen dem endständigen C4-Atom einer Isopren-Einheit und dem C1-Atom einer weiteren Einheit statt. In diesem Fall spricht man von einer Kopf-Schwanz-Verknüpfung. Daneben gibt es weitere Varianten

Nucleolipids of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers

der Verknüpfung. Bei der Kopf-Kopf-Addition kommt es zur Kondensation der jeweiligen C4-Atome beider Isopren-Einheiten (s. Abbildung 4). Weitere Reaktionsmöglichkeiten stellen die C4→C2- und C4→C3-Verknüpfung dar. Die Kondensationsreaktionen laufen im Falle der Terpene unter der Beteiligung von Phosphat ab, anders als bei einer klassischen Kondensation, wie beispielsweise einer Aldol- ober Claisen-Kondensation [62, 63, 64].

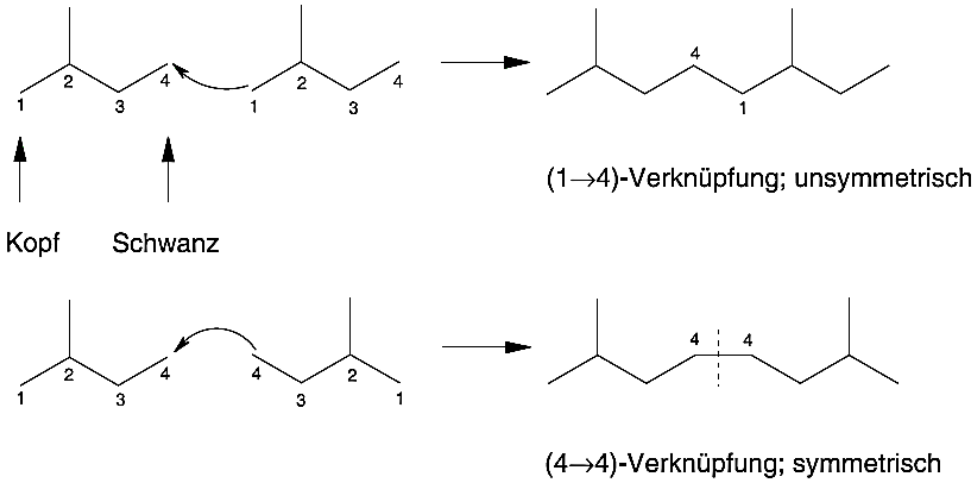


Abbildung 4: Die Kopf-Schwanz- (1→4) und die Kopf-Kopf-Verknüpfung (4→4) stellen zwei häufige Möglichkeiten zur Verknüpfung von Isopren-Molekülen dar [62].

Isopren ist eine bisher in der Natur nicht nachgewiesene Verbindung. Bei dem C_5-Grundbaustein der Isoprenoide handelt es sich daher um ein biogenetisches Äquivalent des Isoprens, welches als Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) bezeichnet wird. DMAPP stellt das Regioisomer des Isopentyldiphosphates (IPP) dar. Die Biosynthese des IPP erfolgt durch decarboxylierende Eliminierung aus Mevalonsäure [65]. IPP ist Baustein aller natürlichen Terpene und wird daher auch als das „aktive Isopren“ bezeichnet. Es steht im Gleichgewicht mit DMAPP [64].

Die C_5-Isopreneinheit kann auf zwei verschiedenen Wegen biosynthetisiert werden (s. Abbildung 5). In tierischen Zellen stammen alle Isoprenoide von der Mevalonsäure ab [66]. Diese entsteht aus der Kondensation dreier Moleküle Acetyl-SCoA unter nachfolgender Decarboxylierung. Man spricht in diesem Fall von einer Isopren-Biosynthese über den Acetat-Mevalonat-Weg. Der Acetat-Mevalonat-Weg ist im Zytosol lokalisiert. Daneben existiert in Plastiden ein alternativer Nicht-Mevalonat-Weg, der mit

Nucleolipids of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers

Pyruvat und Glyceraldehyd-3-Phosphat startet und über 1-Desoxy-D-Xylulose (DOX) und 2-Methylerythritolphosphat (MEP) ebenfalls zu IPP führt. Dieser, als DXP-MEP- oder DXP/MEP-Weg bezeichnete Isopren-Biosyntheseweg, ist in allen Photosynthese betreibenden Organismen zu finden, sowie in Bakterien und Cyanobakterien und Diatomeen (Kieselalgen), jedoch nicht in Tieren und Menschen. Über den DXP/MEP-Weg findet die Synthese des Isopren-Precursors, der Mono-, Di- und Tetraterpene statt. Nur die Sesqui- und Triterpene werden hier über den Acetat-Mevalonat-Weg angeliefert. Die beiden Biosynthesewege unterliegen keiner strikten Trennung. Man weiß heute, dass ein Austausch von Terpenvorstufen stattfindet [62, 66].

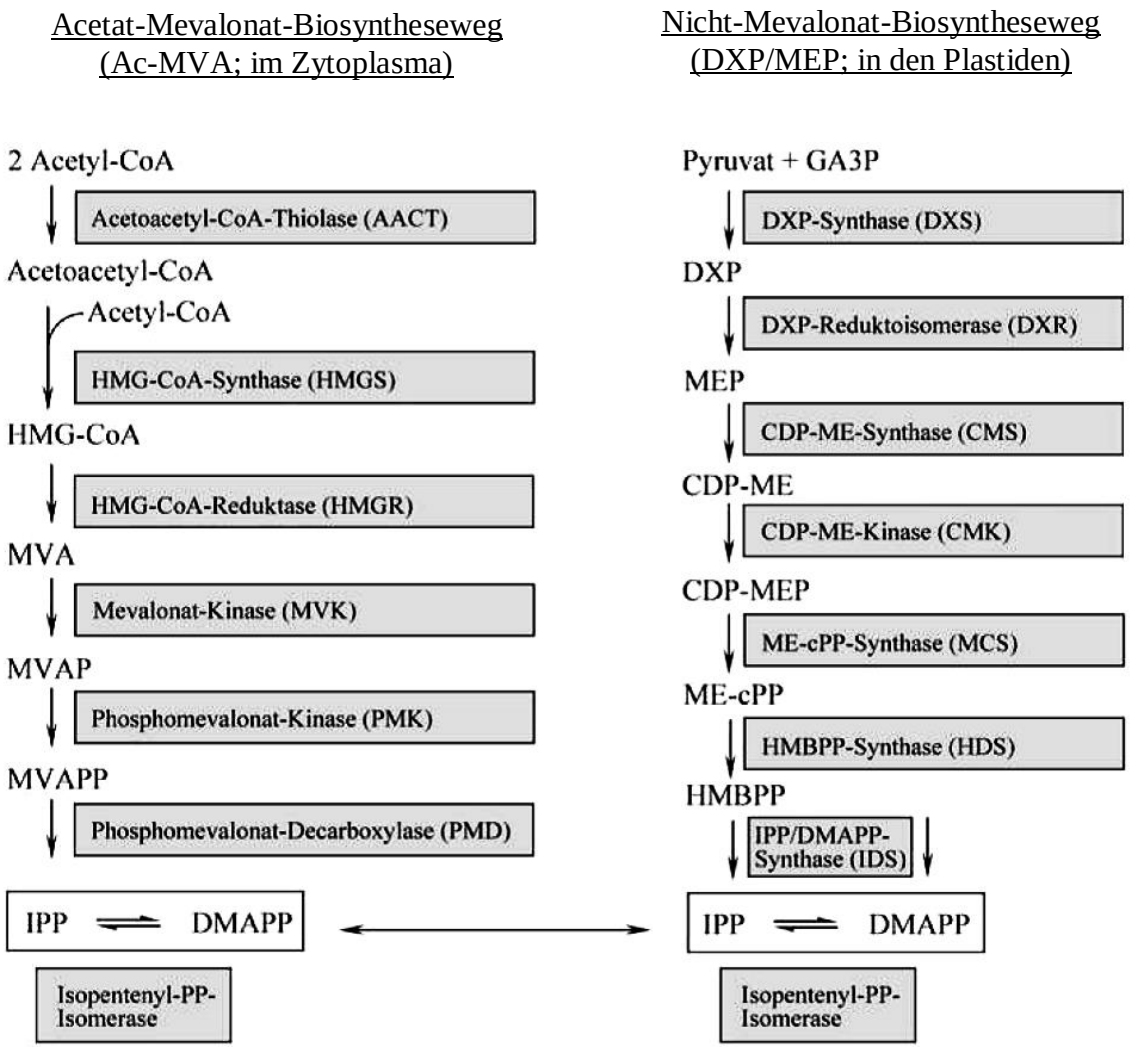


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Acetat-Mevalonat- und alternativen Nicht-Mevalonat-Biosyntheseweges von Isoprenen [62].

Nucleolipids of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers

Isoprenoide sind an essentiellen biophysiologischen Zellprozessen beteiligt [66]. Sie spielen eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation, Apoptose, Differenzierung und Lipid-Biosynthese [67].

Im Syntheseweg der Isoprenoide treten u.a. Farnesyl-PP und Geranylgeraniol-PP (→ aktivierte Form des Farnesols und Geranylgeraniols, PP = Diphosphat) auf. Beide sind an der Biosynthese des Cholesterols, der Sterole und weiterer Cholesterol-Derivate beteiligt, vor allem aber sind sie essentiell für die Prenylierung von Proteinen [67].

Bei der Prenylierung handelt es sich um eine Lipid-Modifikation [68]. Dabei wird durch das Anbringen von Isoprenyl-Lipiden ein hydrophober Teil an Proteinen kreiert [69]. Die Addition des Isoprenyl-Restes erfolgt an Cystein-Reste, die am oder in der Nähe des C-Terminus eines Proteins liegen und resultiert in der Bildung von Thioetherbrücken [68]. Dieser Prozess wird enzymatisch katalysiert und stellt eine Art von post-translationaler Modifikation dar, welche essentiell für die Reifung und Entwicklung von Proteinen ist. Nur infolge einer Protein-Prenylierung können Protein-Protein-Interaktionen und Protein-Membran-Assoziationen stattfinden [70]. Unter den post-translationalen Modifikationen stellt die Farnesylierung von Proteinen die am häufigsten vorkommende Form dar, welche zudem (vermutlich) in allen eukaryotischen Zellen vertreten ist [69].

Im Rahmen von zellulären Aktivitäten, wie Proliferation und Apoptose, spielt die Isoprenyl-Lipid-Modifikation von Proteinen in menschlichen Zellen und Hefen eine wichtige Rolle [69]. Prenylierte Proteine sind zudem an vielen zellulären Lebensprozessen, wie der Signaltransduktion oder dem intrazellulären Trafficking, beteiligt [68]. Bekannt sind eine Reihe isoprenylierter Proteine menschlicher Zellen [71]. Dazu gehören u.a. kleine GTPasen, wie Ras, Rac, Rho und Rab, denen eine zentrale Rolle bei der Zellsignaltransduktion, dem Versikel-Trafficking und der Zellzyklusabfolge zukommt [69]. Der Grund, warum einige Proteine nicht Substrate für die Isoprenylierung sind, ist nicht gänzlich geklärt. Man vermutet jedoch, dass die Sequenz des carboxylterminalen Tetrapeptides entscheidend ist [71].

Die Protein-Prenylierung findet unter Vermittlung dreier Enzyme statt, deren Bezeichnung sich vom jeweiligen Lipid-Substrat ableitet. Bei der FTase (Protein-Farnesyl-transferase) und GGTase-I (Protein-Geranylgeraniol-transferase Typ I) handelt es sich um CAAX-Prenyltransferasen. Die FTase erkennt eine spezifische Aminosäure-

abfolge am C-Terminus von Proteinen, die als CAAX-Box (C = Cystein, A = Aminosäure (aliphatisch), X = Serin, Methionin, Alanin oder Glycin) bezeichnet wird und transferiert an die Thiol-Gruppe des Cysteins in dieser Reihe von Aminosäuren eine Farnesyl-Einheit. Beim Vorhandensein eines Leucins im C-Terminus (CAAL) findet die Übertragung einer Geranylgeranyl-Einheit durch GGTase-I statt. Die GGTase-II (Protein-Geranylgeranyl-transferase Typ II) beschränkt sich auf das Übertragen von Geranylgeranyl-Einheiten auf Mitglieder der Rab-Familie, die sich durch das Vorhandensein von zwei C-terminalen Cysteinen (Cys-Cys, Cys-X-Cys, X = Aminosäure) auszeichnet. Rab-Proteine dienen der Regulation des interzellulären Versikel-Traffickings [68, 69, 72].

Seit einiger Zeit stellen Enzyme, welche an der Protein-Prenylierung beteiligt sind, neue Wirkstoff-Targets dar [69, 70]. So konnten Inhibitoren der FTase als Antikrebs-Chemotherapeutika entwickelt werden. Die Aktivität dieser beruht dabei auf einer Blockierung des Protein-Farnesylierungschrittes [69, 72]. Abweichungen im Gencode isoprenylierter Proteine oder Enzyme der Protein-Isoprenylierung, führen zu einer Reihe von Erkrankung, u. a. zur Tumorgenese [70].

Farnesol, ursprünglich entdeckt als Quorum Sensing-Molekül des pathogenen Pilzes *Candia albicans*, besitzt eine signifikante Antiumor-Aktivität [61]. Diese Wirkung zeigt sich in Form eines antiproliferativen Effekts und der Eigenschaft, Apoptose zu induzieren. In einigen Tiermodellen konnte zudem ein inhibitorischer Effekt auf die Carcinogenese beobachtet. Sowohl die chemopräventive Eigenschaft als auch die Anti-Tumor-Wirkung des Farnesols konnten *in vivo* gezeigt werden. Zudem richtet sich die Wirkung des Farnesols verstärkt auf Tumorzellen. Diese reagieren sensitiver auf eine Farnesol-induzierte Wachstumsinhibierung als unveränderte Zellen [67].

Farnesol entsteht in tierischen Zellen aus Farnesyldiphosphat unter Vermittlung einer Farnesyldiphosphat-spezifischen Pyrophosphatase [66]. Verschiedene biochemische und zelluläre Prozesse stehen im Zusammenhang mit einer Farnesol-induzierten Wachstumsinhibition und Apoptose in Tumorzellen [67]. So beruht der antiproliferative Effekt des Farnesols u.a. auf der Inhibierung der Phosphatidylcholin-Synthase und folglich des Cholinphosphotransferase-Schrittes [61]. Bei der Phosphatidylcholin-

Synthase handelt sich um ein Rate-limitierendes Enzym der Phosphatidylcholin-Biosynthese [67]. Phosphatidylcholin stellt ungefähr 50% des zellulären Gesamtgehalts an Phospholipid dar und ist das häufigste in eukaryotischen Zellenmembranen vorkommende Lipid [61].

Des Weiteren löst ein intrazellulärer Anstieg von Farnesol die Degradierung der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA)-Reduktase aus, eines zentralen Enzyms des Mevalonat-Biosynthesewegs, das speziell in Tumorzellen überexprimiert wird. Die Degradierung tritt dabei als Folge einer durch Farnesol vermittelten Hochregulierung der Aktivität der nicht-lyosomalen Cystein-Protease auf [67, 73]. Eine reduzierte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität führt zu einer verminderten Syntheserate von Cholesterol und Intermediaten des MVA-Weg (Farnesyl- oder Geranylgeranyl-diphosphat), welche essentiell für die Prenylierung von Proto-Oncogenen sind [74]. Zudem bewirkt Farnesol eine Effizienzminderung in der mRNA-Translation der HMG-CoA-Reduktase [73].

Die antiproliferative Wirkung des Farnesol betrifft die G_1-Phase des (Tumor-) Zellzyklus. Diese beschreibt das Intervall zwischen der Mitose (M-Phase) und DNA-Replikation (S-Phase) [73]. Die Induzierung von Apoptose durch Farnesol beruht auf einer Unterdrückung der Expression anti-apoptotischer Proteine und einer Aktivierung der Caspase-Aktivität [73]. Caspasen stellen eine Klasse von Cystein-Asparaginsäure-Proteasen dar, deren Spaltung das Auslösen eines apoptotischen Signals in Form proteolytischer Kaskaden zur Folge hat [61].

Neben den beschriebenen molekularen Mechanismen gibt es eine Reihe weitere Effekte, die durch Farnesol induziert werden. Viele dieser Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Als fortführende und vertiefende Literatur hierzu wird [67] empfohlen.

Aufgrund der signifikanten und selektiven anti-proliferativen Wirkung auf Tumorzellen und der Eigenschaft, Apoptose in diesen auszulösen, ist Farnesol ein neuer interessanter Wirkstoffkandidat, mit Wirkung auf mehreren Ebenen des Zellgeschehens. Farnesol ist daher sowohl im Rahmen unserer Arbeit zur Verbesserung bekannter Chemotherapeutika mit pharmakokinetischen Mängeln (insbesondere 5-Fluorouridin, -uracil) mittels Lipophilisierung, als auch im Rahmen unseres Studiums zur Interaktion von

Nucleolipids of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers

Nukleolipiden, bzw. Lipo-Oligonukleotiden mit Lipidmembranen, ein besonderes Lipophilisierungs-Tool.

Neben der Darstellung der zu Beginn genannten Nukleolipide, spielte die Charakterisierung der Lipophilie dieser Verbindungen eine zentrale Rolle. Diese wurde durch Berechnung der log *P*-Werte und Bestimmung der Retentionszeiten mittels *RP18*-HPLC erfasst. Im Fall des *N*(3)-farnesylierten 5-Fluorouridin-Derivats fand zusätzlich eine Überprüfung der Säurestabilität statt.

Im Rahmen der Untersuchungen bezüglich der Inkorporationseigenschaften von Lipo-Oligonukleotiden in künstliche Lipidmembranen wurden einige der synthetisierten 5-Fluorouridin-Lipidderivate in Phosphoramiditbausteine überführt und für die Synthese von terminal lipophilisierten Oligonukleotiden mit einem Cyanin-3- oder Cyanin-5-Fluoreszenzfarbstoff in der 5‘-(n-1)-Position verwendet. Die Interaktion der synthetisierten Lipo-Oligonukleotide mit künstlichen Doppellipidmembranen wurde mittels konfokaler Fluoreszenzmikrospie studiert.

Es sei erwähnenswert, dass die synthetisierten Nukleinsäurebausteine Kettenterminatoren darstellen, da diese, wenn terminal eingebaut, die Nukleinsäurekette vor einem 5‘-exo-nukleolytischen Abbau schützen.

Vorüberlegungen führten zu der Annahme, dass sich für die Synthese eines *N*(3)-basenalkylierten Derivats des 5-Fluorouridins ein Schutz der glykosidischen Hydroxylfunktionen, aufgrund möglicher Mehrfachalkylierung des Moleküls, als vorteilhaft oder gar notwendig erweisen würde.

Aufgrund dessen fand zunächst, durch Umsetzung mit Aceton in Gegenwart von polymergebundener p-Toluolsulfonsäure als Katalysator, die Synthese eines *O*-2‘,3‘-isopropyliden Derivates des 5-Fluorouridins (s. Abbildung 6 Verbindung **2a**) statt. Die Reaktion lieferte das Produkt in quantitativer Ausbeute. Im Weiteren erfolgte der Schutz der 5‘-OH-Position mittels Umsetzung mit 4,4‘-Dimethoxytriphenylmethylchlorid. Während der Reaktion erwies sich die Isopropyliden-Schutzgruppe als sehr labil. Diese Labilität trat ebenfalls im Falle der Alkylierung eines nur Isopropyliden-5-Fluorouridin-Derivats mit Farnesylbromid (K_2CO_3, DMF) auf. Um diese Problematik zu umgehen, wurde eine direkte Alkylierung des 5-Fluorouridins durchgeführt. Das gewünschte

Produkt (Verbindung **8**) konnte auf diese Weise allerdings nur in unzureichender Ausbeute erhalten werden. Eine nach der Farnesylierung erfolgende Einführung einer *O*-2‘,3‘-Isopropylidenschutzgruppe führt zwar zum gewünschten Intermediat für die Phosphoramiditsynthese (Verbindung **9**), allerdings war auch hier die Ausbeute nicht zufriedenstellend.

Die *O*-2‘,3‘-Isopropylidenschutzgruppe zeigte sich ebenfalls während der Phosphitylierung der 5‘-OH-Position der Verbindung **9** mit (Chloro)(2-Cyanoethoxy) (diisopropylamino)-Phosphin als labil und wurde daher durch ein 5-Fluoro-2‘,3‘-*O*-(1-Propylbutyliden)uridin (Verbindung **2b**) ersetzt, ein bekanntes *O*-2‘,3‘-Derivat des 5-Fluorouridins [53]. Dieses Ketal-Derivat zeigt mit einer Halbwertszeit von 130 Minuten eine wesentlich höhere Stabilität gegenüber Säure als das respektive Isopropyliden-Derivat mit nur 1 Minute unter denselben Hydrolyse-Bedingungen (1*N* wässriger HCl und MeCN (1:1 (v/v), Details siehe Exp. Teil).

Die Alkylierung von Verbindung **2b** mit Farnesylbromid (K_2CO_3, DMF, Raumtemperatur) ergab nach chromatographischer Aufreinigung das *O*-2‘,3‘-geschützte Nukleoterpen **5** in 51% Ausbeute. Eine anschließende 5‘-*O*-Phosphitylierung dieses Derivates mit (Chloro)(2-Cyanoethoxy)(diisopropylamino)-Phosphin lieferte das 5‘-*O*-(2-Cyanoethyl)-phosphoramidit **6** in 60 % Ausbeute.

Nucleolipids of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers

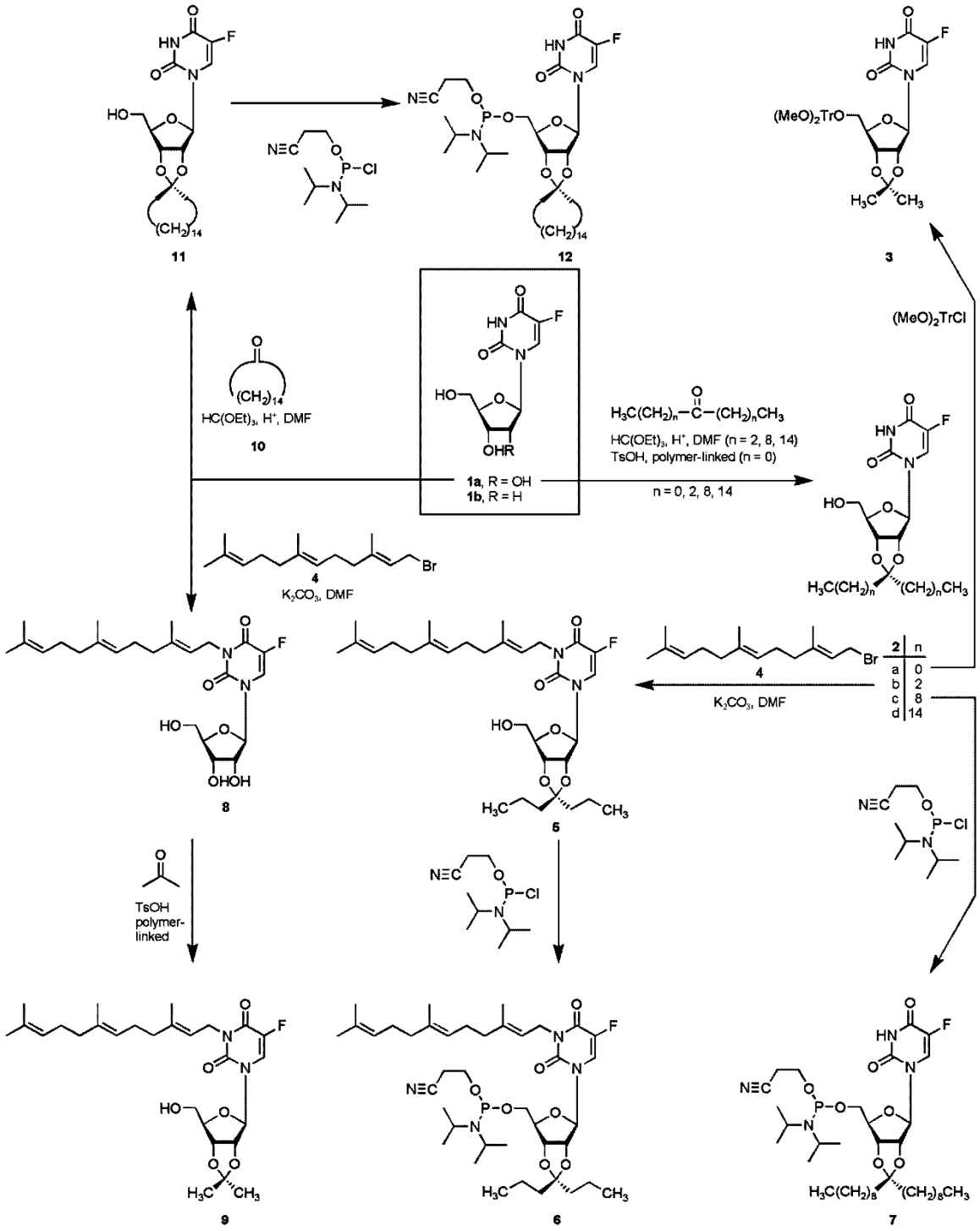


Abbildung 6: Synthetisierte Lipid-Derivate des 5-Fluorourdins und ihre DNA-Synthese-Bausteine.

Nucleolipids of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers

Die Ketalisierung des 5-Fluorouridins mit Nonadecan-10-on erfolgte nach [53], die Umsetzung mit Hentriacontan-16-on, einem Bestandteil pflanzlicher Epicuticularwachse [75], nach [76] und ergab die Verbindungen **2c** und **2d** in guter Ausbeute.

In parallelen Arbeiten zur Synthese und Charakterisierung von Farnesyl-Derivaten des 2‘-Desoxyinosins und Thymidins [41] zeigte sich, dass es unter sauren Bedingungen (ESI MS, Ionisierung mit 2% Ameisensäure), infolge einer Schwanz-Schwanz-Verknüpfung, ähnlich wie es typisch für Isopren-Einheiten ist, zur Formation von Dimeren kommt. Diese Beobachtung konnte im Fall des *N*(3)-farnesylierten 5-Fluorouridins (Verbindung **8**) nicht gemacht werden. Eine theoretisch mögliche Verbindung **13** (s. Abbildung 7) oder ähnliche Strukturen traten unter keinen Bedingungen im ESI-Massenspektrometer auf. Es fand des Weiteren keine Bildung von stabilen hochmolekularen Aggregaten des farnesylierten 5-Fluorouridins statt, wie es mittel Gelpermeationschromatographie im Falle von *N*(1)-farnesyliertem 2‘-Desoxyinosin detektiert werden konnte.

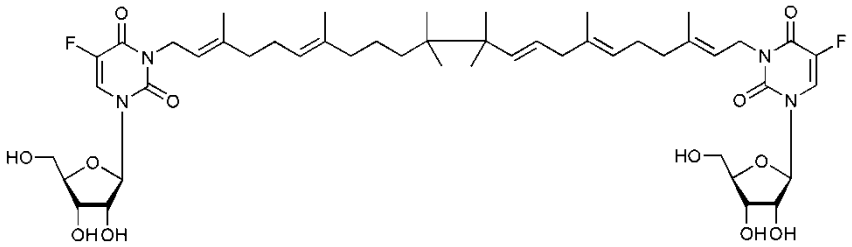


Abbildung 7: Dimer aus zwei *N*(3)-farnesylierten 5-Fluorouridin-Derivaten.

Die Einschätzung der synthetisierten 5-Fluorouridin-Derivate hinsichtlich ihrer Lipophilie erfolgte sowohl auf theoretischen, als auch auf experimentellem Weg. Ein erster Eindruck über den Einfluss der eingeführten Modifikationen auf die Lipophilie wurde über die Ermittlung der Retentionszeiten gewonnen, welche durch einen Vergleich der chromatographischen Mobilität in einer *RP18*-HPLC erfasst wurden. Ergänzend dazu fand eine Berechnung der log*P*-Werte statt. Tabelle 1 stellt die Ergebnisse zusammenfassend dar.

Nucleolipids of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers

Tabelle 1: Berechnete log*P*-Werte und *RP-18* Retentionszeiten der hydrophoben 5-Fluorouridin-Derivate.

Verbindung	Berechneter log*P*	*RP-18* HPLC t_R [min]
1a (5-Fluorouridin)	− 1.34 ± 0.46	1
2a	+ 0.50 ± 0.56	unstabil
8	+ 6.26 ± 0.62	27
9	+ 7.56 ± 0.67	24
2c	+ 9.00 ± 0.56	> 600
5	+ 9.68 ± 0.67	87

Die Phosphoramidit-Bausteine **6** und **7** (s. Abbildung 6) wurden jeweils zusammen mit einem Cyanin-3-Phosphoramidit für die Synthese[2] lipophiler Oligonukleotide mit der folgenden Sequenz verwendet:

5‘-d[(**5**)-(Cy3)-TAG GTC AAT ACT] (**14**)
5’-d[(**2c**)-(Cy3)-TAG GTC AAT ACT] (**15**)

Die Charakterisierung[1] der synthetisierten Lipo-Oligomere erfolgte durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Hier zeigte sich in der massenspektrometrischen Analyse des synthetisierten Lipo-Oligomers mit eingebautem *N*(3)-Farnesyl-5-Fluorouridin (Verbindung **14**) eine Abweichung. Das tatsächliche Molekulargewicht dieses Oligonukleotids war geringer und deutete darauf hin, dass es sich bei dem eingebauten lipohilen Rest nicht um ein *N*(3)-farnesyliertes 5-Fluorouridin handeln konnte, sondern um *N*(3)-geranyliertes 5-Fluorouridin handeln musste, also eine Verbindung, bei der eine Einheit in der Isopren-Seitenkette weniger auftritt. Dieser Verlust konnte bisher nicht geklärt werden und trat nur im Fall des farnesylieten 5-Fluorouridin-Bausteins auf, nicht bei farnesyliertem Thymidin- oder *N*(1)-farnesyliertem Inosin. Folglich kann daraus der Schluss gezogen werden, dass der Fluor-Substituent der heterozyklischen Einheit einen weit reichenden elektronischen Einfluss auf die Farnesyl-Seitenkette ausüben muss.

[2] Die Synthese der Oligonukleotide und ihre massenspektrometische Analyse wurden durch die Firma *Eurogentec* S.A. (Liège Sience Park, Belgien) durchgeführt.

Nucleolipids of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers

In ersten, der Orientierung dienenden, Experimenten wurden die Lipo-Oligonukleotide **14** und **15** in künstliche Lipid Bilayers aus POPE/POPC (8:2, w/w) in n-Decan (10 mg/ml), eingelagert (s. Abbildung 8) (Exp. Details hierzu siehe Exp. Teil der Veröffentlichung und [77]).

Aus Abbildung 8 geht hervor, dass beide Lipo-Oligonukeotide insertiert wurden. In weiteren Experimenten zeigte das Oligomer **15** mit eingebautem doppelkettigen Lipid-5-Fluorouridin eine effizientere Einlagerung, welche gleichzeitig auch die stabilere der beiden Einlagerungen darstellte, da hier nach 7facher Perfusion der Lipidmembran keine signifikante Abnahme in der Fluoreszenzintensität der Lipidmembran zu verzeichnen war. Im Gegensatz dazu konnte das Oligomer **14**, mit farnesyliertem 5-Fluorouridin, bereits nach 2facher Perfusion zu einem großen Teil aus der Lipidmembran entfernt werden. Eine effiziente und stabile Einlagerung des Lipo-Oligonukleotids ist somit besonders durch den Einbau eines doppelkettigen 5-Fluorouridin gegeben (s. Abbildung 9).

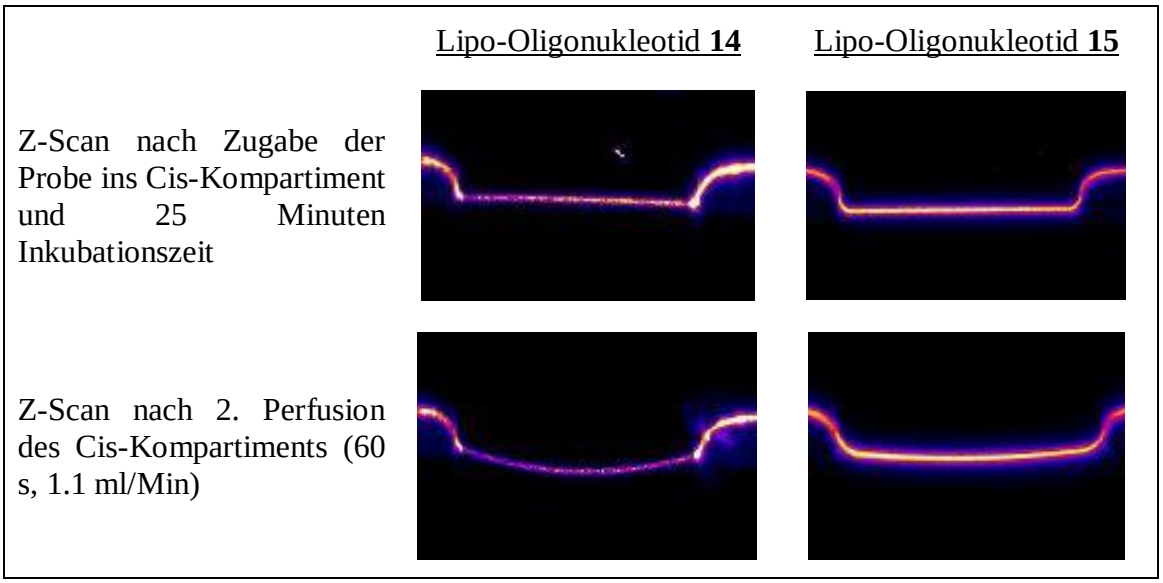


Abbildung 8: Einlagerung der Lipo-Oligonukleotide **14** und **15** und Situation nach zweifacher Perfusion des Cis-Kompartiments (Ausschnitte aus dem chronologischen Protokoll des Einlagerungsexperimentes).

Nucleolipids of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers

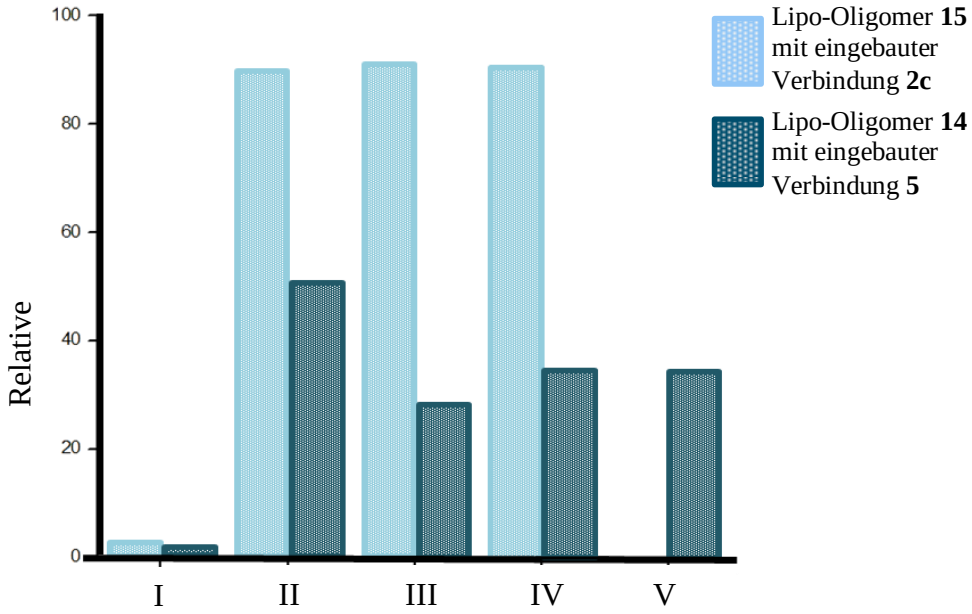


Abbildung 9: Relative Helligkeit der Lipidmembran als Funktion der Perfusionsanzahl nach Einlagerung der Lipo-Oligonukleotide **14** und **15**, I): leere Lipidmembran, II): Nach Zugabe, III) Nach 1. Perfusion, IV): Nach 2. Perfusion, V): Nach 3. Perfusion.

Anhand von Diffusionszeiten sollte die Bildung von hochmolekularen Aggregaten der Lipo-Oligonukleotide **14** und **15** außerhalb der Membran überprüft werden. Hierfür war zunächst die Ermittlung der freien Diffusionszeiten notwendig, welche über "Einzelmolekül"-Detektion in einem konfokalen Volumen von 1 fl erfolgte. Die Messung der Diffusionszeit in Gegenwart einer Lipidmembran umfasste eine umfangreiche Datenaufnahme, die aus der Aufnahme der Situation einer stabilen leeren Lipidmembran bestand sowie der Situation nach Zugabe der Oligonukleotid-Probe (mit Inkubationszeit) und nach mehrfacher Perfusion. Dabei erforderten Fluktuationen der Lipidmembran, dass jede Messung an 5 Punkten, die sich an und in Nähe der Lipidmembran befanden, durchgeführt werden musste (Details siehe Veröffentlichung). Tabelle 2 stellt eine Zusammenfassung der Messergebnisse dar. Dieser ist zu entnehmen, dass das Lipo-Oligomer **15**, mit doppelkettigen 5-Fluorouridin-Derivat, eine signifikant kürzere freie Diffusionszeit aufweist, als das Lipo-Oligomer **14**, mit eingebautem farnesyliertem 5-Fluorouridin-Derivat. Diese Beobachtung ließ auf die Bildung hochmolekularer Aggregate im Fall von Oligomer **15** schließen.

Nucleolipids of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers

Tabelle 2: Gemessenen Diffusionszeiten [µs] der Lipo-Oligonukleotide **14** und **15** ohne und in Präsenz einer Lipidmembran.

Probe	Freie Diffusionszeit [µs]
15	279.67 ± 141.08
14	390.39 ± 249.05
	Diffusionszeiten in Gegenwart einer Lipidmembran [µs]
15	33547 ± 16751, nach 1. Perfusion
15	12866 ± 1364, nach 2. Perfusion
14	75952 ± 8201, nach 1. Perfusion
14	53868 ± 11623, nach 2. Perfusion
14	19891 ± 3266, nach 3. Perfusion

Der Befund, dass das Lipo-Oligomer **15** effizienter eingebaut wird als das Lipo-Oligomer **14**, konnte durch die Messung der Diffusionszeit in Gegenwart einer Lipidmembran bestätigt werden. Hier zeigte dieses eine signifikant höhere Diffusionszeit im Vergleich zu Oligomer **14**.

Um ein exakteres Bild über das Einlagerungsverhalten und die Einlagerungsqualität von Oligonukleotiden mit 5‘-terminal eingebauten Nukleolipiden zu erhalten, ist es erforderlich, entsprechende Messungen in Zukunft mit weiteren ähnlichen und anderen Lipo-Oligonukleotiden zu wiederholen. Eine Serie von synthetisierten Lipo-Oligonukleotiden steht hierfür bereits zur Verfügung. Die Ergebnisse werden nach abgeschlossenen Untersuchungen veröffentlicht.

Mitsunobu Reactions of 5-Fluorouridine with the Terpenols *Phytol* and *Nerol*: DNA Building Blocks for a Biomimetic Lipophilisation of Nucleic Acids

Edith Malecki, Christine Knies, Emma Werz, Helmut Rosemeyer

Chemistry & Biodiversity **2013**, 10 (12), 2209-2220.

DOI: 10.1002/cbdv.201300107

Mitsunobu Reactions of 5-Fluorouridine with the Terpenols *Phytol* and *Nerol*: DNA Building Blocks for a Biomimetic Lipophilisation of Nucleic Acids

Zytotoxische Nukleoside sind Analoga physiologischer Pyrimidin- und Purin-Nukleoside. In der Zelle unterliegen sie metabolischen Prozessen und werden in biophysiologisch aktive Formen überführt. Dabei erfordert die Generierung des zytotoxischen Effektes die Phosphorylierung der Moleküle [78].

Nukleosid-Analoga sind S-Phase spezifisch. Sie treten an die Stelle natürlicher Nukleinsäuren und dienen als Bausteine für die DNA- und RNA-Synthese. Zudem stellen sie Substrate zellulärer Schlüssel-Enzyme dar und fungieren als Inhibitoren diverser Enzyme der Nukleinsäure-Synthese sowie des Reparaturmechanismus und Metabolismus [78].

In der Regel handelt es sich bei Nukleosid-Analoga um Verbindungen mit hydrophilen Moleküleigenschaften. Aufgrund dieser Tatsache vermögen sie nur unzureichend biologische Membranen zu überwinden, ohne dass an diesem Prozess spezielle Nukleosid-Transporter-Proteine beteiligt sind [78].

Besonders im Rahmen von therapeutischen Maßnahmen stellt die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ein großes Problem dar. So erweist sich die Behandlung von Gehirntumoren als sehr kompliziert und stark limitiert in möglichen Maßnahmen.

Bei Gehirntumoren handelt es sich um Neoplasmen des zentralen Nervensystems. Es gibt mehr als 100 verschiedene Typen. Unter ihnen stellt das Glioblastoma multiforma den aggressivsten Tumor des zentralen Nervensystems dar. Erforderliche Behandlungsmaßnamen sind, zusätzlich nach einem chirurgischen Eingriff, die Radio- und Chemotherapie. Obwohl eine Reihe von Chemotherapeutika zur Tumorbehandlung existiert, so eignet sich kaum eines von diesen für die Behandlung von Gehirntumoren. Das einzige Blut-Hirn-Schranke passierende Chemotherapeutikum ist ein lange bekanntes Alkylierungs-Agens namens Temozolomid [79].

Die Blut-Hirn-Schranke dient, in ihrer Funktion als physiologische Barriere, dem kontrollierten Eintritt von im Blut zirkulierenden Substanzen ins Gehirn. Sie ist das Resultat einer besonderen zellulären Architektur der kapillaren Endothelzellen und aufgrund vorhandener Tight junctions impermeabel für nahezu alle Moleküle [80].

Die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke wird durch eine spezifische Transport-Maschinerie bestimmt. Der Transport über die Blut-Hirn-Schranke stellt einen hoch selektiven Prozess dar, der (1) physikalisch über die Tight junctions und (2)

physiologisch über eine Vielzahl von Zell-Transport-Systemen und Enzymen kontrolliert wird. Es gibt 5 Klassen des Transportes über die Blut-Hirn-Schranke:

- Passive Diffusion
- Parazelluläres Trafficking
- Aktiver Carrier-vermittelter Transport
- Rezeptor-vermittelte Endocytose/Transcytose
- Adsorptive Endocytose

Kleine hydrophile Verbindungen passieren die Blut-Hirn-Schranke über den Weg des parazellulären Trafficking. Die Möglichkeit zur passiven Diffusion hängt in erster Linie von den physikochemischen Eigenschaften, insbesondere der Lipophilie, einer Verbindung ab. Neben der Lipophilität sind das Molekulargewicht, der pK_a-Wert, die Anzahl an H-Brücken und biologische Faktoren weitere Parameter, die darüber entscheiden, ob und auf welchem Weg ein Molekül die Blut-Hirn-Schranke zu passieren vermag [80].

Bei toxischen Substanzen handelt es sich hauptsächlich um lipophile Verbindungen. Diese vermögen die Blut-Hirn-Schranke über passive Diffusion zu überwinden. Viele Antitumor-Chemotherapeutika dringen ebenfalls über den transzellularen Weg ein. Pyrimidin- und Purin-Nukleosid Antimetaboliten werden über ein spezifisches Nukleosid-Transporter-System (CNTs, ENTs → Details siehe Einleitung) transportiert. So wird der Transport der Purin-Nukleosid Antimetabolite Cytarabin und Gemcitabin durch den Nukleosid-Transporter ENT 1 vermittelt. Des Weiteren ist ein Transport der zytostatisch aktiven Purin-Nukleosid Analoga Fludarabin und Cladribin mittels Nukleosid-Transporter bekannt [80].

Die fluorierte Form der Nukleobase Uracil, das 5-Fluorouracil, gehört zu den ältesten Antimetaboliten zur Behandlung von soliden Tumoren und ist seit mehr als 45 Jahren im klinischen Gebrauch [79].

Der Einsatz des 5-Fluorouracils ist aufgrund seines mangelhaften pharmakokinetischen Profils problematisch (Details siehe Einleitung). So muss die Administration über eine kontinuierliche Infusion erfolgen, da 5-Fluorouracil eine sehr kurze Halbwertszeit

ausweist und bereits nach 3 Stunden nicht mehr im Plasma detektierbar ist. Um die pharmakokinetischen Mängel zu vermeiden, sowie um die ebenfalls vorhandene schlechte Bioverfügbarkeit und hohe Toxizität zu überwinden, bevorzugt man den Einsatz von oralen Prodrug-Formen des 5-Fluorouracils. Bekannte orale Prodrugs des 5-Fluorouracils sind *Tegafur*, *Carmofur*, *Doxifluridin* und *Capecitabin*. Sie zeichnen sich gegenüber dem 5-Flurouracil durch eine erhöhte Tumorselektivität, Effizienz, sowie insgesamt erhöhte Sicherheit für den Patienten aus [79].

Unter ihnen gilt *Capecitabin* (*N*4-pentyloxycarbonyl-5-deoxy-5-fluorocytidine, Xeloda®) als ein besonders vielversprechend lipophiles Prodrug des 5-Fluorouracils, da es stark tumorselektiv wirkt.

Capecitabin wird im Darm resorbiert. Die biophysiologische Aktivierung zum zytotoxischen 5-Fluorouracil erfolgt über mehrere enzymatische Schritte und findet zum größten Teil im Tumorgewebe selbst statt, da die dafür zuständigen Enzyme in Tumoren in höherer Konzentration als in gesunden Geweben vorkommen. Dies gilt besonders für die Thymidinphosphorylase, die den intrazellulären Intermediaten 5‘-Desoxy-5-fluoro-uridin (5‘-DFU, Doxifluridin) des Capecitabins zu 5-Fluorouracil umwandelt. Folglich reichert sich 5-Fluorouracil im Tumorgewebe in höheren Konzentrationen an [7, 79]. Capecitabin ist zur Behandlung von metastasierendem Dickdarmkrebs und Brustkrebs zugelassen [21].

Trotz positiver Resultate versagen bewährte Chemotherapeutikum bei der Behandlung von Gehirntumoren, da sie aufgrund mangelnder Lipophilie nicht in ausreichendem Maße ins Hirnparenchym zu penetrieren vermögen [80]. Dies gilt auch für *Capecitabin* [79]. Ein Bedarf an neuen, insbesondere lipophilen Prodrugs des 5-Fluorouracils ist besonders im Hinblick auf die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke demnach vorhanden.

Diese Veröffentlichung beschreibt die Synthese biomimetischer lipophiler Derivate des Cancerostatikums 5-Fluorouridin, ihre Umwandlung in 5‘-*O*-(2-cynoethyl)-Phosphoramidite sowie des Weiteren den Einsatz der Bausteine in der Oligonukleotidsynthese und die Einlagerung dieser in künstliche Lipidmembran.

Mitsunobu Reactions of 5-Fluorouridine with the Terpenols *Phytol* and *Nerol*: DNA Building Blocks for a Biomimetic Lipophilisation of Nucleic Acids

Die biomimetische Lipophilisierung des 5-Fluorouridins erfolgte über die Einführung der Terpenalkohle Nerol oder Phytol in *N*(3)-Position des Nukleosides durch eine *Mitsunobu*-Reaktion.

Das acyclische Diterpen Phytol stellt die Partialstruktur der Tocopherole sowie des Vitamins K_1 dar [81]. Des Weiteren dient es, über eine Esterbindung geknüpft, der Lipophilisierung und Verankerung von Chlorophyllmolekülen in biologischen Membranen [82].

Nerol wurde im Rahmen dieser Arbeit als das kürzere Gegenstück zu Phytol gewählt. Es handelt sich dabei um einen acyclischer Monoterpen-Alkohol und das Hydrierungsprodukt des Nerals, eines Bestandteil des Citrals. Citral kommt in den ätherischen Ölen der Früchte vieler *Citrus*-Arten vor. So besteht Lemongras zu 70-80 % aus Citral [83].

Die Idee zur Synthese eines lipophilen Prodrugs des 5-Fluorouridin, bzw. 5-Fluorouracils, durch die Einführung einer Phytyl-Komponente, begründet sich im biophysiologischen Vorteil des Phytols. Phytol kann als ein natürlicher verzweigtkettiger Fettalkohol vom Organismus abgebaut werden.

Als Bestandteil des Chlorophylls wird Phytol (3, 7, 11, 15-Tetramethylhexadec-2-en-1-ol) durch den Verzehr von grünem Gemüse mit der täglichen Nahrung aufgenommen [84]. Im Gegensatz zu Wiederkäuern, bei denen Phytol im Verdauungstrakt durch Darmbakterien freigesetzt und hauptsächlich in Milch und Milcherzeugnissen akkumuliert, findet beim Menschen eine Absorption von freiem Phytol über den Dünndarm statt, mit anschließender Biokonversion. Durch zweifache Oxidation wird Phytol zunächst zu Phytansäure (3, 7, 11, 15-Tetramethylhexadecan-säure) metabolisiert. Die Phytansäure erfordert im Weiteren einen Abbau, da hohe Konzentrationen dieser Fettsäure zelltoxisch wirken. Der Abbau der Phytansäure erfolgt dabei zunächst über die α-Oxidation, da die in ß-Stellung stehende Methylen-Gruppe in 3-Position eine ß-Oxidation verhindert. Die α-Oxidation nimmt ihren Anfang in den Peroxisomen der menschlichen Leber und führt zur Bildung von Pristansäure (2, 6, 10, 14-Tetramethylpentadecansäure), welche ein Kohlenstoffatom kürzer ist als die Phytansäure. Die Pristansäure fließt dann im Weiteren zwecks Endoxidation als Substrat in die mitochondriale ß-Oxidation ein [85, 86].

Mitsunobu Reactions of 5-Fluorouridine with the Terpenols *Phytol* and *Nerol*: DNA Building Blocks for a Biomimetic Lipophilisation of Nucleic Acids

Die *Mitsunobu*-Reaktion dient der Umsetzung primärerer und sekundäre Alkohole mit Nukleophilen. Die treibende Kraft der Reaktion ist dabei ein Reduktions-Oxidation-System, bestehend aus einem Trialkyl- oder Triarylphosphin und einem Dialkylazodicarboxylat. Vor allem in der Organischen und Medizinischen Chemie spielt die *Mitsunobu*-Reaktion heute eine wichtige Rolle, da sie stereospezifisch unter milden Bedingungen abläuft. Durch Variationsreichtum erlaubt die *Mitsunobu*-Reaktion eine Vielzahl verschiedener Umsetzungen. Häufig stellt sie eine Schlüsselreaktion bei der Synthese natürlicher Produkt dar [87].

Mittels der *Mitsunobu*-Reaktion ist es möglich, eine Reihe verschiedener Verbindungen zu synthetisieren. So stellen diverse Amine, Azide, Cyanide, Ester, Ether, Thiocyanide, Thioester und Thioether typische Syntheseprodukte dar. Die *Mitsunobu*-Reaktion besteht in der Kondensation einer aziden Verbindung mit einem primären oder sekundären Alkohol in Gegenwart von Triphenylphosphin (PPh_3) oder einem anderen passenden Phosphin und Diethylazodicarboxylat (DEAD) oder Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) und führt zur Ausbildung von C-O-, C-S-, C-N- und C-C-Bindungen [87].

Neben primären und sekundären Alkoholen sind tertiäre Alkohole ebenfalls relevante Edukte dieser Reaktion. Diese treten allerdings als weniger reaktive Komponenten auf. Geeignete Nukleophile sind vornehmlich relativ azide Verbindungen mit OH-, SH- oder NH-Gruppe, die einen pK_a von ≤ 15, vorzugsweise ≤ 11, aufweisen. Hierzu gehören beispielsweise carbocyclische Säuren, Phenole, Imide, Purin- und Pyrimidin Basen, sowie andere Heterozyklen. Die klassischen Lösungsmittel der *Mitsunobu*-Reaktion sind Tetrahydrofuran (THF) und Toluol. Verwendbar sind des Weiteren Benzen, Dimethylformamid, Diethylether, Acetonitril, Dichlormethan und 1,4-Dioxan. Die besten Ergebnisse werden bei Temperaturen zwischen 0° und 25° C und mit den Lösungsmitteln THF und Toluol erzielt. Neben PPh_3 stellt Tributylphosphin (Bu_3P) eine für die *Mitsubobu*-Reaktion passende P^{III}-Quelle dar. Nicht umgesetztes PPh_3 und oxidiertes PPh_3 sind anfallende Nebenprodukte, die aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit in der Regel chromatographisch vom Syntheseprodukt separiert werden können. Das PPh_3-DEAD/DIAD-System wird für die Umsetzung mit Nukleophilen verwendet, welche einen pK_a-Wert von < 11 aufweisen. Nukleophile mit einem pKa-Wert von > 11

Mitsunobu Reactions of 5-Fluorouridine with the Terpenols *Phytol* and *Nerol*: DNA Building Blocks for a Biomimetic Lipophilisation of Nucleic Acids

erfordern den Einsatz von Bu_3P- oder Me_3P-Systemen mit ADDP[3], DHTD[4] oder TMAD[5] [87].

Die Basen-Alkylierung von Nukleosiden mit Alkoholen mittels einer *Mitsunobu*-Reaktion erfordert das Vorhandensein bestimmter Reaktionsbedingungen. Eine Vorausetzung für den Einsatz dieser Reaktion bezieht sich auf den pK_{BH+}-Wert der Base des Nukleosides. Dieser muss zwischen 0 und 14 liegen, damit die Reaktion erfolgreich stattfinden kann [88]. Mit einem pK_{BH+}-Wert von 8.0 ± 0.1, bzw. 9.4 ± 0.1 sind sowohl das 5-Fluorouracil als auch das Uracil kompatibel für eine *Mitsunobu*-Alkylierung.
Um die Generierung von mehrfach alkylierten Nebenprodukten zu unterbinden, ist es notwendig Nukleoside vor der Umsetzung ausreichend an den Hydroxylfunktionen zu schützten. Des Weiteren führt die *Mitsunobu*-Reaktion bei Nukleosiden mit vollständig geschützter glykosidischer Einheit zur Bildung von hauptsächlich basenalkylierten Produkten [87].
Folglich wurde 5-Fluorouridin (s. Abbildung 1 Verbindung **1**) durch eine Reaktion mit Heptan-4-on in Gegenwart von Ameisensäuretriethylester und 4 M HCl in Dioxan zunächst an der 2‘,3‘- Position geschützt (Verbindung **2**). Im Weiteren erfolgte die Einführung eines 4-Monomethoxy-triphenyl-Restes zwecks Blockierung der 5‘-OH-Position (Verbindung **3**).
Das synthetisierte Intermediat wurde dann für die Reaktion mit Nerol oder Phytol im Zuge der *Mitsunobu*-Reaktion mit PPh_3, DEAD, THF bei 0° C umgesetzt.
Die Reaktionsprodukte **4a** und **4b** wurden im Folgenden mit 4%iger Dichloressigsäure in Dichlormethan (Raumtemperatur, 10 Minuten) detrityliert. Die erhaltenen Verbindungen **5a** und **5b** wurden im Weiteren in die reaktiven Phosphoramiditbausteine **6a** und **6b** überführt.

[3] 1,1‘-(Azodicarbonyl)dipiperidin
[4] 1,6-Dimethyl-1,5,7-hexahydro-1,4,6,7-tetrazocin-2,5-dion
[5] *N,N,N‘,N‘*-Tetramethylazodicarboxamid

Mitsunobu Reactions of 5-Fluorouridine with the Terpenols *Phytol* and *Nerol*: DNA Building Blocks for a Biomimetic Lipophilisation of Nucleic Acids

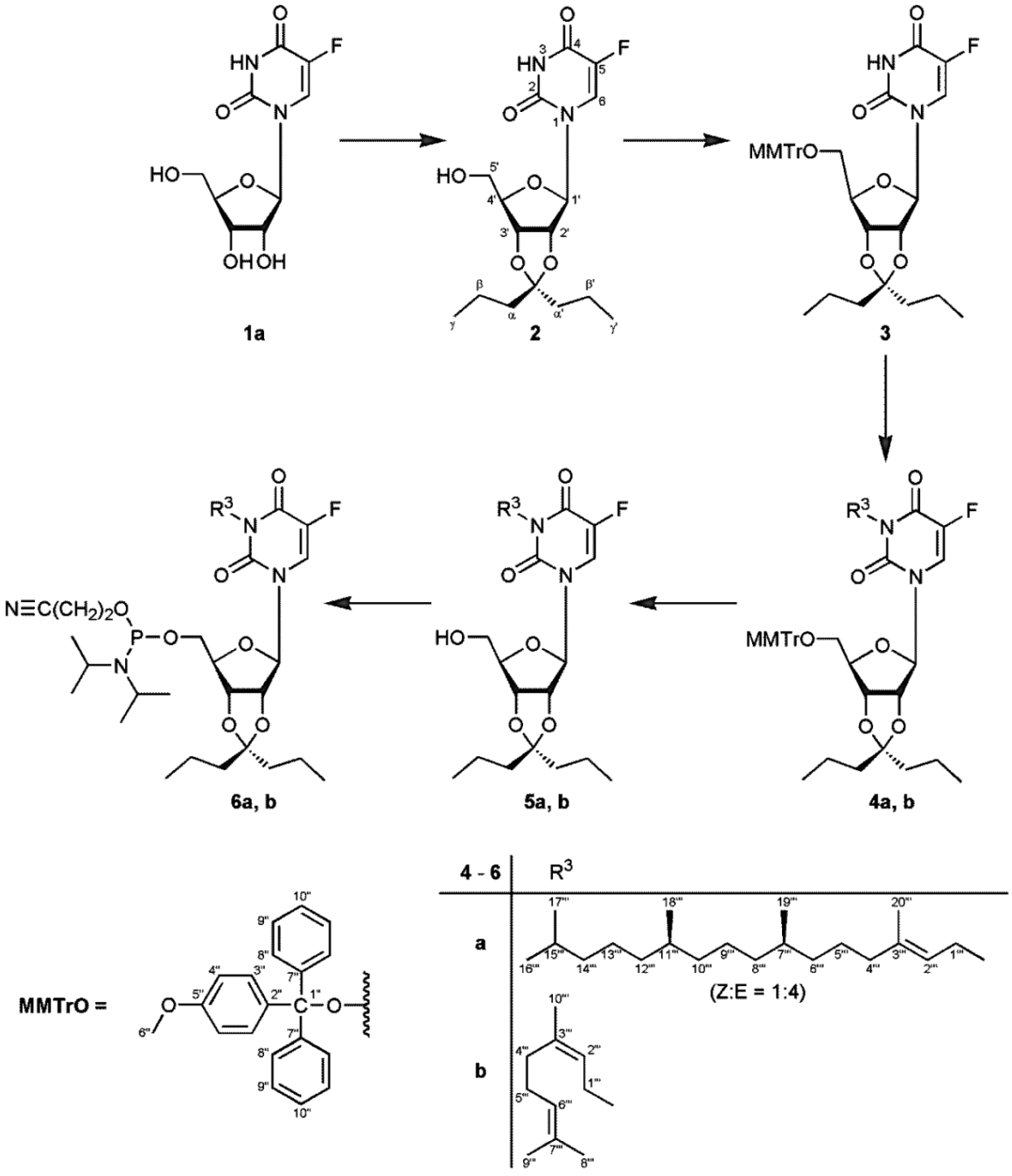


Abbildung 1: Per *Mitsunobu*-Reaktion synthetisierte 5-Fluorouridin-Derivate.

Verbindung **5a** und **5b** stellen, dem berechneten log *P*-Wert (s. Tabelle 1) nach, hoch lipophile Derivate des 5-Fluorouridins dar.

Mitsunobu Reactions of 5-Fluorouridine with the Terpenols *Phytol* and *Nerol*: DNA Building Blocks for a Biomimetic Lipophilisation of Nucleic Acids

Tabelle 2: Berechneter log *P*-Wert des 5-Fluorouridins und der Derivate **5a** und **5b.**

Verbindung	**Berechneter log *P*-Wert**
1 (5-Fluorouridin)	-1.34 ± 0.46
5a	+12.5 ± 0.63
5b	+7.65 ± 0.65

Während der Durchführung einer *Mitsunobu*-Reaktion an Nukleobasen ist neben der gewünschten Einführung eines Alkyl-Restes in *N*(3)-Position eine unerwünschte Alkylierung der O(2)- und O(4)-Atome des Heterozyklus möglich.
Um diesen Sachverhalt zu überprüfen wurden ^{13}C-Spektren der möglichen Alkylierungsprodukte simuliert, wobei relevante Signale aus diesen Spektren mit den entsprechenden Signalen aus den gemessenen ^{13}C-Spektren der Alkylierungsprodukte abgeglichen wurden. Auf der Grundlage aus diesem Vergleich resultierender Daten, konnte eine *O*-Alkylierung ausgeschlossen werden.

Das Phosphoramidite **6a** wurde für die Synthese folgender Olignukleotide mit **5a** als Baustein verwendet:

5‘-d(**5a**-Cy5-TAG GTC AAT ACT)-3‘
5’-d(**5a**-TAG GTC AAT ACT)-3’
3’-d(ATC CAG TTA TGA)-5’

Es wurde im Folgenden das Einlagerungsverhalten des Cyanin5-markierte Oligomer **8** in künstliche Doppellipidmembranen studiert. Insbesondere fand eine Betrachtung der Einlagerungsstabilität und -geschwindigkeit statt.
Ferner wurde durch den Einsatz des Interkalationsfarbstoffes SYBR Green eine Duplexbildung zwischen dem Lipo-Oligonukleotid **9** und dem komplementären Olinukeleotid-Strang **10** an der Grenzfläche zwischen der Lipidmembran und der wässrigen Phase studiert. Die Resultate dieser Untersuchung werden in naher Zukunft veröffentlicht.

Synthesis of Thymidine-, Uridine, and 5-Methyluridine Nucleolipids: Tools for a Tuned Lipophilization of Oligonucleotides

Emma Werz, Rebecca Viere, Gina Gaßmann, Sergei Korneev, Edith Malecki, Helmut Rosemeyer

Helvetica Chimica Acta **2013**, 96 (5), 872-888.

DOI: 10.1002/hlca.201200573

Synthesis of Thymidine-, Uridine- and 5-Methyluridine Nucleolipids: Tools for a Tuned Lipophilization of Oligonucleotides

In zuvor beschriebenen Arbeiten – im Rahmen der Entwicklung einer neuen Art von Biosensortechnologie – wurden verschiedene Lipo-Oligonukleotide und die Einlagerung dieser in künstliche Doppel-Lipidmembran vorgestellt [41, 89]. Es konnte gezeigt werden, dass ein Gleichgewicht zwischen Lipidmembran-gebundenen DNA-Duplexen und im Lösungsmittel frei diffundierenden Oligonukleotiden besteht [89]. Der Zustand dieses Gleichgewichtes wird vom Grad der Lipophilität der hydrophoben Kopfgruppe des Lipo-Oligonukleotids und einer aus der Kettenlänge resultierenden Hydrophilie der Oligonukleotid-Einheit beeinflusst. Eine Beziehung dieser Art wurde bereits früher erkannt und als *amphiphilic ratio* definiert [53]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass DNA-Dodecamere am effizientesten in künstliche Lipidmembranen eingelagert werden, wenn der terminale Teil des Lipo-Oligonukleotids aus einem langen doppelkettigen Lipid besteht [89, 90]. Ein einfaches Auswaschen von Lipidmembran-immobilisierten Dodecameren hingegen konnte durch das Einführen von kurzen einfachen Lipiden, wie Geranyl- und Farnesyl-Einheiten, am 5'-terminalen Nukleotid-Rest des Lipo-Oliginukleotids, erreicht werden [41]. Die Erkenntnis, dass das Auftreten von hoch lipophilen Nukleolipid-Resten innerhalb einer kurzen DNA-Sequenz die Bildung von hochmolekularen Aggregaten fördert und somit einer Einlagerung der Lipo-Oligonukleotide in die Lipidmembran entgegenwirkt, war das ausschlaggebende Argument für eine Fortführung von Studien dieser Art.

Um die Möglichkeit zu schaffen, das Gleichgewicht gezielt beeinflussen zu können, wurde eine Serie von amphiphilen Nukleolipiden und entsprechenden Phosphoramiditbausteinen für die automatische DNA-Festphasensynthese, dargestellt. Bei den synthetisierten Verbindungen handelte es sich um lipophile Derivate des Uridins und des 5'-Methyluridins, die sich durch das Vorhandensein eines symmetrischen *O*-2',3'-Ketals mit variierender Alkylkettenlänge sowie teilweise durch eine zusätzliche Hydrophobisierung in Form einer *N*(3)-Farnesylierung der Pyrimidinbase, auszeichneten (s. Abbildung 1). Im Rahmen der Untersuchungen wurde des Weiteren eine Hydrophobisierung des 2'-Desoxythymidins (s. Abbildung 5), durch Einführung eines Cetyl-Restes in die *N*(3)-Position der heterocyclischen Base über eine direkte Alkylierung sowie per *Mitsunobu*-Reaktion, durchgeführt.

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Phosphoramidite eignen sich nicht nur zur Herstellung von lipophilisierten Oligonukleotiden, sondern zeichnen sich durch weitere

nützliche Eigenschaften aus. Sie können zum einen als Terminatoren der Nucleinsäure-Synthese eingesetzt werden und eröffnen des Weiteren die Möglichkeit, Nukleinsäureketten vor einem enzymatischen 5‘-exonukleolytischen Abbau zu schützen, wenn sie am 5‘-Terminus eingebaut werden. In naher Zukunft sollen die synthetisierten Phosphoramidite zunächst zur Herstellung lipophilisierter Oligonukleotide verwendet werden und dem Studium der oben beschriebenen Problematik dienen.

Zusätzlich soll das Verhalten der synthetisierten Lipo-Oligonukleotide in Bezug auf ihre Einlagerung in künstliche Lipidmembranen untersucht werden, mit dem Ziel unsere DNA-Biosensortechnologie [91] zu optimieren. Es ist sowohl nützlich, als auch notwendig eine passende Auswahl von lipophilen Kopfgruppen, bzw. Nukleolipiden für die Synthese von Lipo-Oligonukleotiden mit unterschiedlichen Kettenlängen und Einsatzgebieten zu besitzen. So spielt beispielsweise die lipophile Komponente beim *in vivo* Transport von lipophilisierter siRNA eine entscheidende Rolle [92]. Der für gewöhnlich hier zur Lipophilisierung verwendete Cholesteryl-Rest weist eine starke Bindungsaffinität zu Biomembranen auf und erschwert prinzipiell somit eine effektive Transfektion. Ein Bedarf an alternativen Komponenten zur Lipophilisierung ist demnach (vor allem im biologischen Forschungsbereich) vorhanden. Dies bezüglich stellen die hier beschriebenen Nukleolipide, bzw. entsprechenden Phosphoramidit-Bausteine (s. Abbildung 1 und 5) mögliche Alternativen dar.

Synthesis of Thymidine-, Uridine- and 5-Methyluridine Nucleolipids: Tools for a Tuned Lipophilization of Oligonucleotides

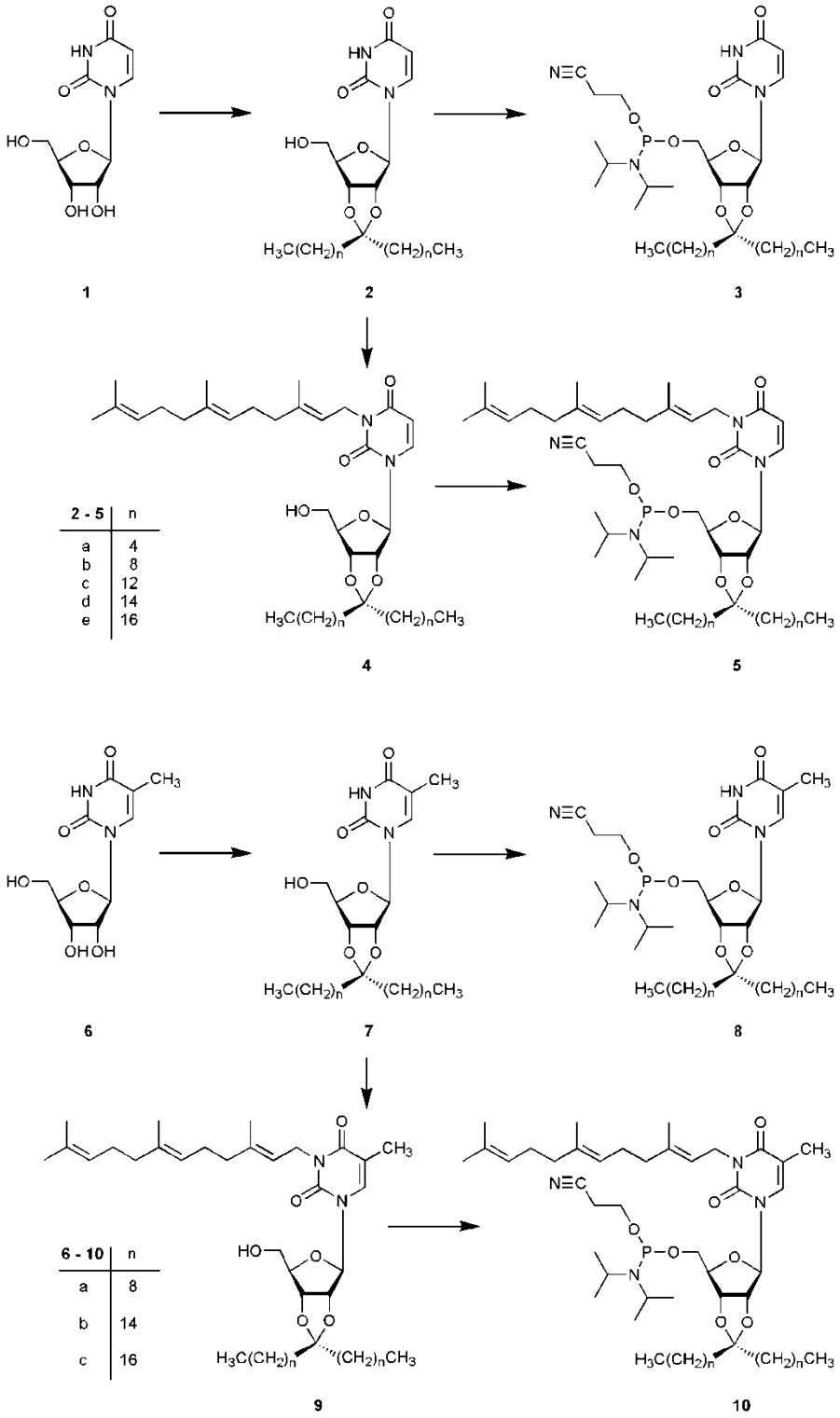


Abbildung 6: Hydrophobisierung von Uridin (**1**) und Methyluridin (**6**) und Umwandlung in die entsprechenden Phosphoramiditbausteine. Durch eine Reaktion mit symmetrischen langkettigen Ketonen im sauren Medium (DMF) wurden die *O*-2‘,3‘-Katale **2a-e** und **7a-c** synthetisiert (Details siehe Synthesevorschriften [53, 93] und experimenteller Teil). Teilweise erfolgte eine direkte Umwandlung der Derivate in Phosphoramiditbausteine (**3a-e**, **8a-c**), ansonsten nach erfolgter *N*(3)-Farnesylierung (**5a-e**, **10a-c**).

Synthesis of Thymidine-, Uridine- and 5-Methyluridine Nucleolipids: Tools for a Tuned Lipophilization of Oligonucleotides

Um den Einfluss der eingeführten aliphatischen Gruppe auf den lipophilen Charakter der synthetisierten *O*-2‘,3‘-Ketale des Uridins und Methyluridins beschrieben zu können, wurden die R_f-Werte (TLC) der Verbindungen als Funktion der Kohlenstoffkettenlänge der Lipidkette dargestellt (s. Abbildung 2).

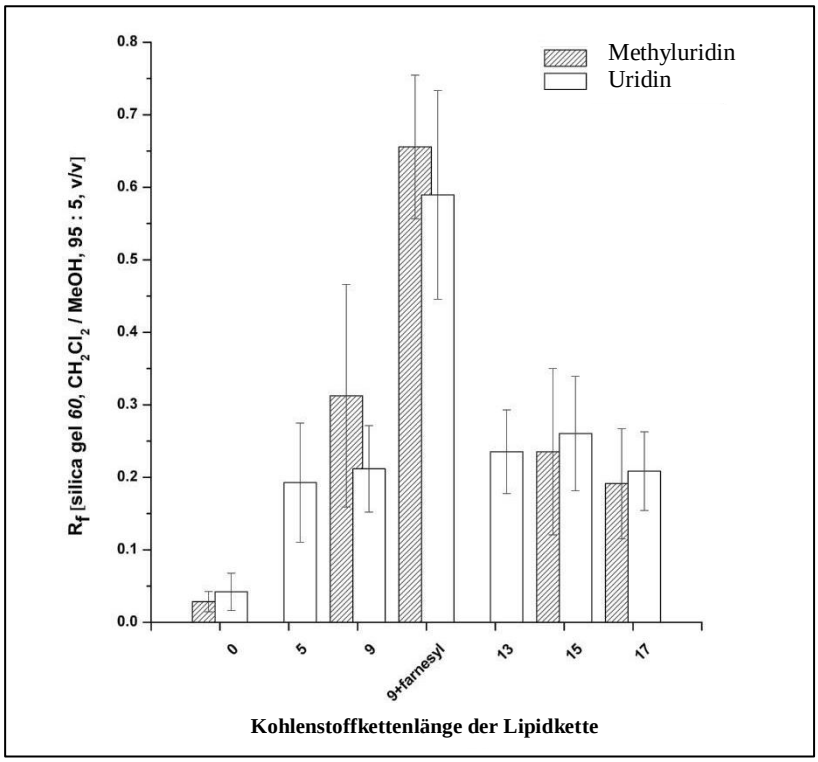


Abbildung 7: Darstellung der experimentell ermittelten R_f-Werte der *O*-2’,3’-Ketale (**2a-e**, **7a-c**) als Funktion der Kohlenstoffkettenlänge der eingeführten Lipidkette.

Aus Abbildung 2 geht hervor, dass die Lipophilie der synthetisierten Ketale offenbar nicht stark von der Alkykettenlänge abhängt. Allerdings trägt ein zusätzlich eingeführter *all-trans*-Farnesyl-Rest zur Erhöhung der Lipophilie des Nukleolipides bei. Diese Beobachtung wurde bereits im Rahmen einer Arbeit zur Synthese von zyklischen *O*-2‘,3‘-Ketalderivaten des 5-Fluorouridins gemacht [53].

Eine umfangreiche Analyse der NMR-spektroskopischen Daten zeigte im ^{13}C NMR-Spektrum eine chemischen Verschiebung ($\Delta\partial$) für die 1a‘‘- und 1b‘‘-Ketalkohlenstoffsignale der Derivate (Definition siehe Exp. Teil). Abbildung 3 stellt diese chemische Verschiebungen als Funktion der Länge der Kohlenstoffatomkette dar.

Synthesis of Thymidine-, Uridine- and 5-Methyluridine Nucleolipids: Tools for a Tuned Lipophilization of Oligonucleotides

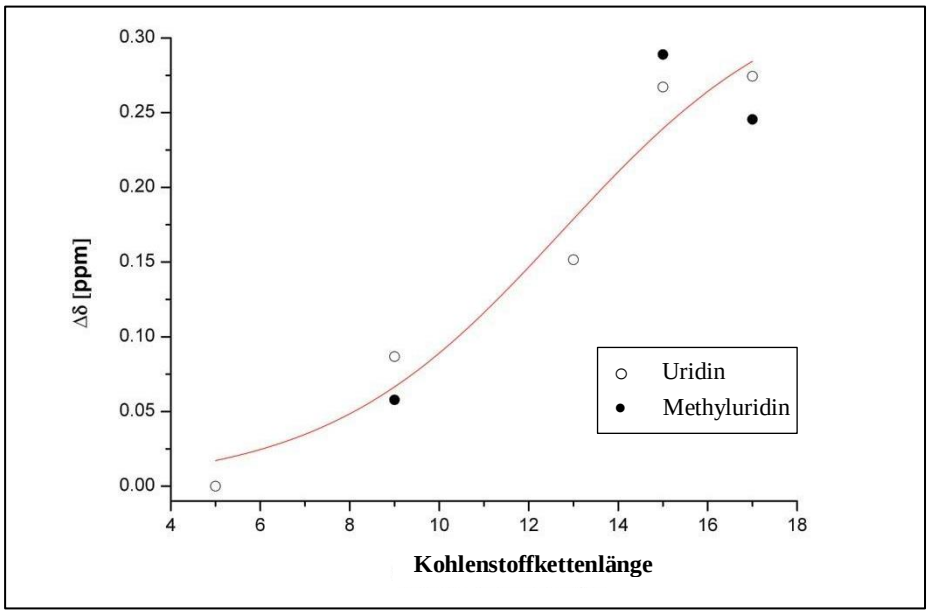


Abbildung 8: Δδ-Werte der ^{13}C-NMR Signale. Dargestellt sind die C-1'' der *O*-2',3'-Ketale (**2a-e**, **7a-c**) als Funktion der Kohlenstoffkettenlänge.

Aus Abbildung 3 wird ersichtlich, dass der Unterschied in der chemischen Verschiebung der Acetal-Kohlenstoffatome des pseudo-stereogenen Zentrums mit zunehmender Alkylkettenlänge zunimmt. Anhand des Charakters der chemischen Verschiebung der C-1a''- und C1b''-Signale (s. ^{13}C-NMR-Daten im exp. Teil der Veröffentlichung) im jeweiligen *O*-2',3'-Ketal (**2a-e**, **6a-c**), wird erkennbar, dass der Anstieg des Δ∂-Wertes allein aus einer Hochfeldverschiebung des jeweiligen C-1b''-Signals (C_{exo}) resultiert und dass das jeweilige C-1a''-Signal (C_{endo}) keiner chemischen Verschiebungsänderung unterliegt. Es ist anzunehmen, dass eine derartige Hochfeldverschiebung durch eine sterischen Interaktion zwischen benachbarten Wasserstoffatomen der 1a''- und 1b''-Kohlestoffatome zustande kommt (s. Abbildung 4).

Synthesis of Thymidine-, Uridine- and 5-Methyluridine Nucleolipids: Tools for a Tuned Lipophilization of Oligonucleotides

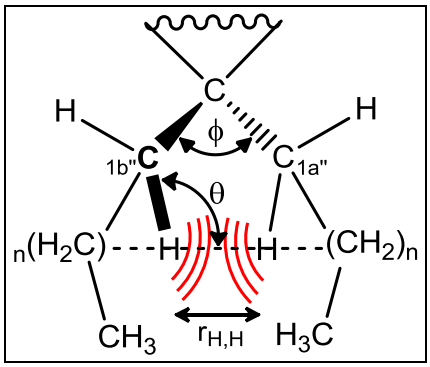


Abbildung 9: *O*-2',3'-Ketal-Ketten und sterischer Zusammenstoß derer H-C(1a'')- und H-C(1b'')-Atome.

Sterische Interaktionen, die aus einer Berührung der *Van der Waals* Radii von räumlich nahe liegenden Wasserstoffatomen resultieren, führen zu einer erhöhten Abschirmung der Kohlenstoffatome an den entsprechenden Wasserstoffatomen [94]. Dies hat wiederum Auswirkungen auf die C-H-Bindung. Es kommt hier zu einer Ladungsverschiebung in Richtung des Kohlenstoffatoms und infolgedessen zu einer Ausweitung des Kohlenstoffbindungsorbitals, was schließlich zur Entstehung eines paramagnetischen Schildes σ^{para} nach der *Karplus*-Pople Gleichung [95] führt. Dies wiederum bringt eine Verringerung des 1a'' – C_{acetal} – C-1b'' – Bindungswinkels (ϕ) mit sich. Mit zunehmender Alkylkettenlänge fällt dieser Effekt stärker aus, da mit einer größeren Anzahl an Kohlenstoffen auch mehr Wasserstoffatome innerhalb der jeweiligen Alkylketten auftreten und folglich vermehrt *van der Waals* Interaktionen zwischen den Alkylketten stattfinden. Eine Verlängerung der Alkylkette führte somit durch zusätzlich auftretende *van der Waals* Interaktionen zu einer Annäherung beider Kohlenstoffketten mit den im ^{13}C-NMR-Spektren sichtbaren Folgen. In einem dazu passenden Modell formuliert *Grant* die Abhängigkeit der sterischen Verschiebung σ_{st} von der Proton-Proton Abstoßungskraft [$F_{HH}(r_{HH})$] [96]. Die Proton-Proton Abstoßungskraft wird hier als Funktion der Proton-Proton Distanz und des Winkels Θ zwischen der H-H Achse und der involvierten C-H Bindung definiert:

$$\sigma_{st} = \text{const.}\ F_{HH}(r_{HH}) \cos \Theta$$

Synthesis of Thymidine-, Uridine- and 5-Methyluridine Nucleolipids: Tools for a Tuned Lipophilization of Oligonucleotides

Neben der Synthese von hydrophoben Derivaten des Uridins und Methyluridins lag ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Hydrophobisierung des 2‘-Desoxythymidins. Ziel der Synthesen hier war die Einführung von unverzweigten Alkylketten in die *N*(3)-Position der heterozyklischen Base (s. Abbildung 5).

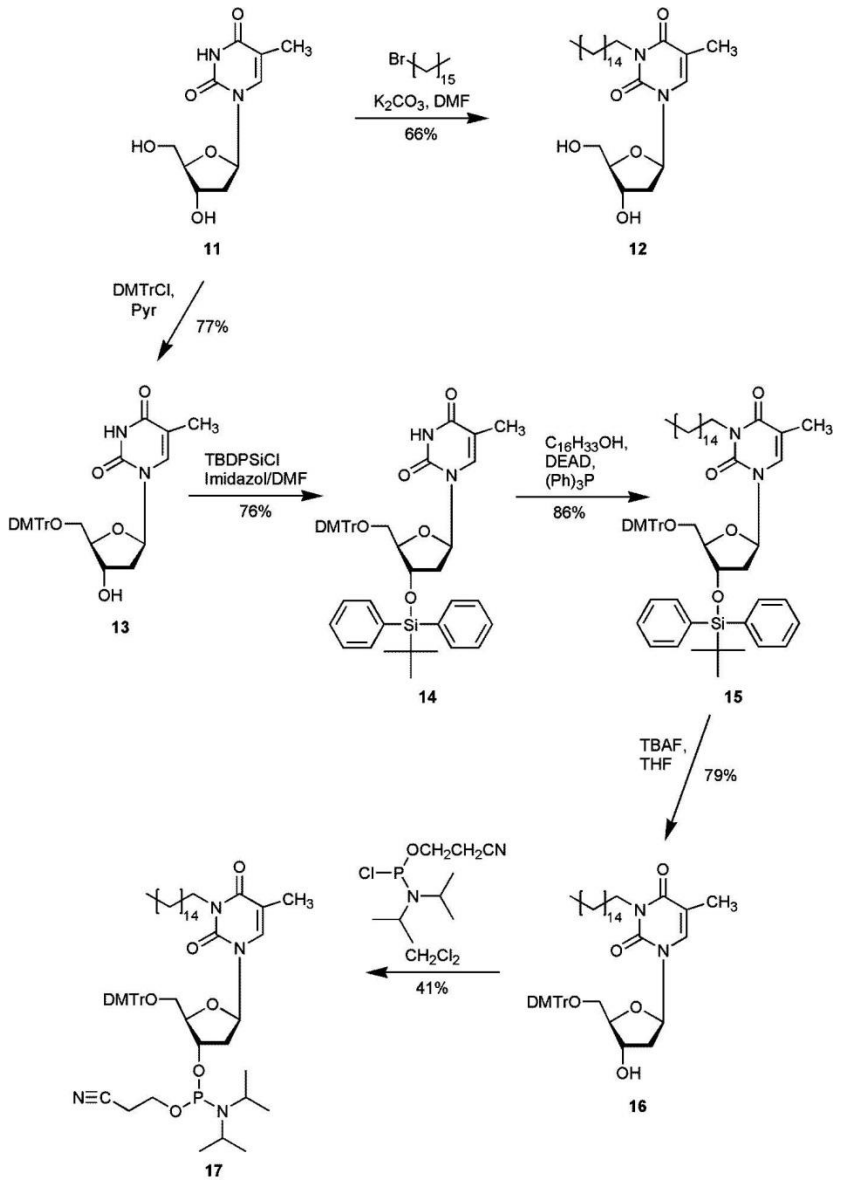


Abbildung 5: Synthetisierte Derivate des 2‘-Desoxythymidins.

Hierzu wurde über eine direkte Alkylierung des Nukleosids mit Cetylbromid (1-Bromohexadecan) unter Standardreaktionsbedingungen (K_2CO_3, DMF, RT) zunächst ein

Cetyl-Rest eingeführt. Eine mögliche *O*-Alkylierung an der Nukleobase konnte ausgeschlossen werden.

Ferner wurde eine *N*(3)-Alkylierung mit Hexadecan-1-ol per *Mitsunobu*-Reaktion [87, 97] durchgeführt. Im Rahmen einer anderen Arbeit [98] konnte gezeigt werden, dass die *Mitsunobu*-Reaktion keine stereoselektive Methode zur Alkylierung darstellt. Somit war die vorherige Einführung von Hydroxylschutzgruppen von essentieller Bedeutung, um Nebenreaktionen zu vermeiden. Aufgrund dieser Tatsache wurde das 2‘-Desoxythymidin zunächst an der 5‘-OH-Position durch das Einführen einer DMTr-Schutzgruppe (Verbindung **13**) und in der Folge durch das Einführen einer *tert*-Butyl-diphenylsilyl-Gruppe in die 3‘-OH-Position (Verbindung **14**) geschützt.

Interessanterweise kam es zur Bildung eines stabilen Addukts, bestehend aus der *N*(3)-Cetyl-alkylierten Verbindung **13** und einem Äquivalent Cetylalkohl, wenn die *Mitsunobu*-Reaktion am nur 5‘-geschützten 2‘-Desoxythymidin-Derivat durchgeführt wurde. Das Vorhandensein eines Cetylalkoholmoleküls konnte aus dem ^{1}H-NMR Spektrum der Verbindung abgeleitet werden. Hier zeigten sich zwei Sätze von Methylengruppen und eine zusätzliche Hydroxylfunktion neben jener in 3‘-Position. Ein zur Überprüfung des Molekulargewichtes der Verbindung aufgenommenes ESI-Massenspektrum zeigte unter den zur Ionisierung gewählten Bedingungen keine Auffälligkeiten. Hier wurde ein für die Verbindung korrektes Molekulargewicht von 713.5 Da detektiert. Sowohl eine mehrfach durchgeführte Chromatographie der Verbindung, als auch eine intensive Trocknung im Hochvakuum bei 40° C führte nicht zur Dissoziation des Adduktes.

Ferner wurde die *Mitsunobu*-Alkylierung am voll geschützten 2‘-Desoxythymidin unter Einhaltung verschiedener Reaktionsbedingungen studiert. Das beste Ergebnis wurde erreicht, indem alle Reagenzien (DIAD, PPh_3, THF) bei Raumtemperatur zusammengeführt und über Nacht gerührt wurden. Verbindung **15** konnte auf diese Weise nach erfolgter Aufreinigung mit einer Ausbeute von 50 % synthetisiert werden. Die Durchführung der *Mitsunobu*-Reaktion unter diesen Bedingungen führte nicht zur oben beschriebenen Adduktbildung.

Die Desilylierung von Verbindung **15** fand durch eine Reaktion mit TBA^+F^- statt. Eine anschließende Phosphitylierung der entschützten Verbindung gab die Verbindung **17**, einen Festphasen-Oligonukleotidsynthesebaustein.

Nucleoterpenes of Thymidine and 2'-Deoxyinsoine: Synthons for a Biomimetic Lipophilization of Oligonucleotides

Karl Köstler, Emma Werz, Edith Malecki, Malayko Montilla-Martinez, Helmut Rosemeyer

Chemistry & Biodiversity **2013**, 10 (1), 39-61.

DOI: 10.1002/cbdv.201100338

Nucleoterpenes of Thymidine and 2'-Deoxyinosine: Synthons for a Biomimetic Lipophilization of Oligonucleotides

Der Begriff "Gen Silencing" bezeichnet die Unterdrückung, bzw. Unterbrechung der Expression von Genen auf transkriptionaler oder translationaler Ebene des DNA-Zellstoffwechsels. Gen Silencing stellt prinzipiell einen Vorgang zur Regulation der Aktivität von Genen dar. Da die Regulation auf zwei Ebenen des DNA-Zellstoffwechsels erfolgen kann, unterscheidet man zwischen dem transkriptionellen und post-transkriptionellen Gen Silencing. Findet die Genregulation durch eine Hemmung der Übertragung genetischer Information von der DNA auf die mRNA statt, so spricht man vom transkriptionellen Gen Silencing. Hervorgerufen durch epigenetische Veränderungen aufgrund von z.B. DNA-Methylierung (Hypermethylierung im Promotorbereich) oder Histonmodifikation (Änderungen in der Chromationstruktur), wird hier eine Anbindung der Transkriptionsmechanismen verhindert und somit die Proteinbiosynthese unterbunden. Das post-translationale Gen Silencing umfasst hingegen alle Mechanismen zur Stilllegung von Genen, die nach der Transkription genetischer Informationen von der DNA auf die mRNA erfolgen. Hier spielt vor allem der Prozess der RNA-Interferenz (RNAi) eine besondere Rolle. Beteiligt an dieser Art des regulatorischen Prozesses sind spezielle RNA-Moleküleinheiten, die siRNA und miRNA, welche aus der entsprechenden double-stranded RNA (dsRNA) durch ein spezielles Enzym namens *Dicer* herausgeschnitten werden. Prinzipiell erfolgt beim posttranskriptionellen Gene Silencing die Ausschaltung von Genen durch einen intensiven Abbau der mRNA eines ganz bestimmten Gens. Steht infolgedessen eine bestimmte mRNA nicht mehr der ribosomalen Translation zur Verfügung, so entfällt folglich die Bildung des aus der Übersetzung dieser resultierenden Genproduktes [99, 100].

Zum ersten Mal wurde das Gen Silencing, infolge einer durch dsRNA induzierten RNAi, im Jahre 1998 durch *Andrew Fire* und *Craig Mellow*, im Rahmen der Arbeiten zur Genomaufklärung des *Caenorhabitis elegans* (Fadenwurm aus der Gruppe der Rhabditiden), beschrieben. Durch Adaption dieser neuen Technologie entwickelte sich nach kurzer Zeit eine Methode der RNAi, mit welcher mittels siRNA Gene von Säugern *in vitro* ausgeschaltet werden konnten [101].

Mit der Entdeckung des Gen Silencing durch kleine Nukleinsäuren (siRNA) entstand ein neuer gentherapeutischer Ansatz [102, 103], der eine Reihe von Anwendungsmöglichkeit versprach, u.a. in der antiviralen Therapie zur Bekämpfung von HIV-1 [101]. In diesem

Nucleoterpenes of Thymidine and 2'-Deoxyinosine: Synthons for a Biomimetic Lipophilization of Oligonucleotides

Zusammenhang entstand auch eine neue Klasse besonderer Oligonukleotide, die sogenannten Antagomire [102]. Bei Antagomiren handelt es sich um RNAi-Konstrukte, die das Ausschalten spezifischer miRNA ermöglichen. Diese modellierten einsträngigen RNA-Analoga bestehen aus 2'-*O*-Methyl-ß-D-ribonucleosid-Bausteinen und tragen an beiden Termini verschiedene Phosphorothioat-Internukleotide sowie eine Cholesteryl-Einheit am 5'-Ende. Diese chemisch eingeführten Modifikationen dienen zum einen der Erhöhung der Stabilität und zu anderen dem Transport in die Zelle. Das "Targeting" erfolgt im Falle der Antagomire über das Prinzip der Watson-Crick Basenpaarung, was diesen sowohl flexible als auch spezifische Eigenschaften verleiht. Es konnte gezeigt werden, dass Antagomire zum spezifischen Ausschalten von endogener miRNA in Mäusen fähig sind [102].

Da die miRNA bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine zentrale Rolle spielt, u.a. auch in Rahmen von Tumorerkrankungen, ist es naheliegend, dass Antagomire eine Anwendung bei der Behandlung diverser Krankheiten finden könnten [102]. Sie stellen somit eine neue therapeutische Maßnahme im Bereich der Gentherapie dar.

Obwohl in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die zelluläre Aufnahme von einer Vielzahl an Molekülen (u.a. RNA, siRNA, Nukleosid-Derivate) durch eine Konjugation mit Cholersterol, einem Bestandteil von biologischen Membranen, begünstigt wird [104, 105, 106], gibt es Veröffentlichungen, die dies wiederlegen. Das Vorhandensein von bereits einer Cholersteryl-Einheit kann beispielsweise die Synthese und Aufreinigung eines Oligomeres erschweren [107]. Des Weiteren wurde eine, im Zusammenhang mit der Einführung eines Cholesteryl-Restes stehende verminderte Zellpermeabilität, beobachtet [108].

Es ist daher wichtig, nach alternativen Komponenten zur Hydrophobisierung von Oligomeren zu suchen, die idealerweise eine graduelle Lipophilisierung ermöglichen und die einen Rahmen für das Studium der Interaktionen zwischen Oligomeren und Zellmembranen schaffen.

Zu diesem Zweck wurde eine Serie von basenalkylierten 2'-Deoxyinosin und 2'-Deoxythymidine 2-Cyanoethylphosphoramiditbausteinen synthetisiert (s. Abbildung 1

Nucleoterpenes of Thymidine and 2'-Deoxyinosine: Synthons for a Biomimetic Lipophilization of Oligonucleotides

Verbindung **5a**, **5b**, **11a**, **11b**). Diese wurden anschließend für die Synthese von 5'-lipophilisierten Oligonukleotiden verwendet.

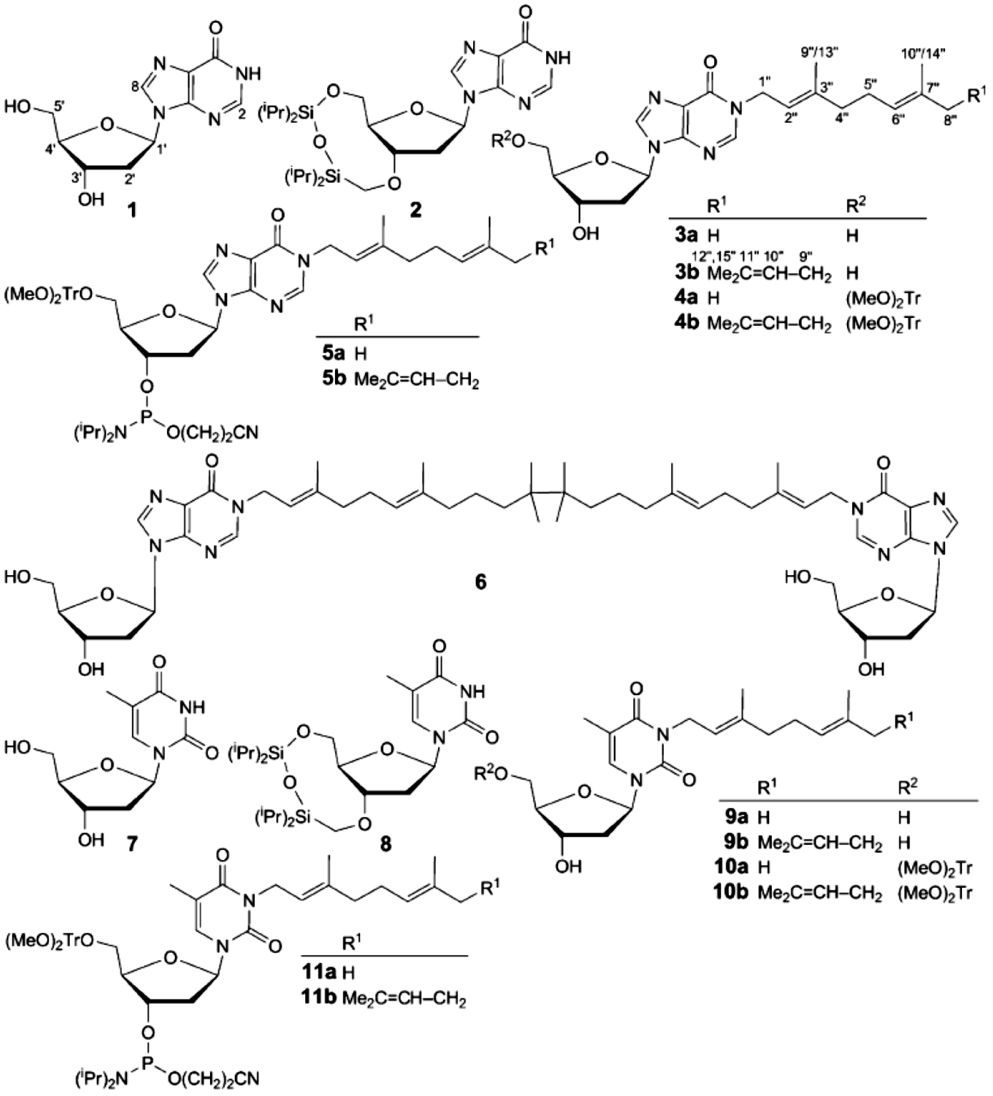


Abbildung 1: Synthetisierte Lipid-Derivate des 2'-Desoxyinosins und Thymidins.

Ein entscheidender Vorteil dieser DNA-Synthesebausteine ist die Möglichkeit des flexiblen Einbaus in die wachsende Nukleinsäurekette, während einer konventionellen DNA-Festphasensynthese. Dies ermöglicht eine gesteuerte Hydrophobisierung an ausgewählten Stellen des Oligomeren (s. Abbildung 2).

Nucleoterpenes of Thymidine and 2'-Deoxyinosine: Synthons for a Biomimetic Lipophilization of Oligonucleotides

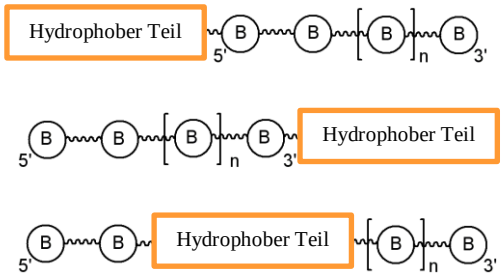


Abbildung 2: Verschiedene Positionen von Nukleolipiden innerhalb einer Nukleinsäurekette.

Da es sich bei den synthetisierten DNA-Synthesebausteine um reine *tools* für die Hydrophobisierung von Oligomeren handeln sollte, wurde die lipophile Seitenkette in den Teil der heterocyclischen Base eingeführt, der an der Watson-Crick Basenpaarung beteiligt ist. Einige der synthetisierten Verbindungen stellen Besonderheiten dar, da es sich bei ihnen um erstmalig synthetisch hergestellte Nukleoterpene handelte. Nach unserem Verständnis handelt es sich bei Nukleoterpenen um Hybridmoleküle, die aus einem Nukleosid (in diesem Fall Thymidin bzw. 2'Desoxyinosin) und einem Terpen bestehen. Das heute einzige bekannte natürlich vorkommende Nukleoterpen ist ein Merotepen namens Avinosol (s. Abbildung 3). Es handelt sich dabei um ein alkyliertes 2'-Desoxyinosin-Derivat mit einem Benzen-1,4-diol- und Sesquiterpen-Rest. Diese Verbindung konnte zum ersten Mal im Jahre 2006 aus einem Schwamm namens *Dysidea sp.*, beheimatet in der Nähe von Papua New Guinea, isoliert werden. Avinosol ist von biomedizinischem Interesse, da es antiangiogene und antimetastatische Eigenschaften aufweist [109].

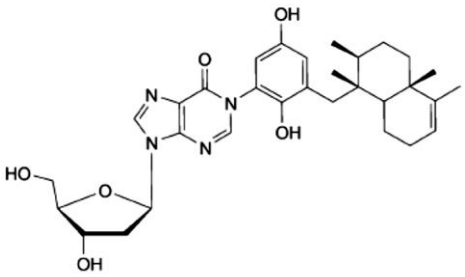
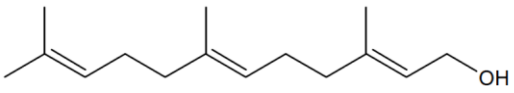


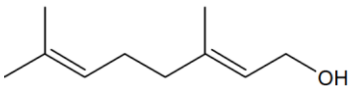
Abbildung 3: Struktur von Avinosol [109].

Die zur Lipophilisierung der Nukleoside eingeführten Komponenten (Geranyl- und Farnesyl-Einheit) stellten eine Besonderheit dar, da es sich bei diesen um Einheiten mit

biomimetischer Funktion handelt. Die Geranyl- und Farnesylseitenkette leiten sich von zwei wichtigen Naturstoffen, dem Farnesol und Geraniol ab (s. Abbildung 4).



Farnesol



Geraniol

Abbildung 4: Strukturen der Terpenalkohole Farnesol und Geraniol.

Geraniol und Farnesol gehören zur großen Familie der Terpenoide (auch Isoprenoide genannt) und sind Stoffe des sekundären Pflanzenstoffwechsels. Charakteristisch für beide Verbindungen ist das sich wiederholende Auftreten der Isopreneinheit (siehe Abbildung 5).

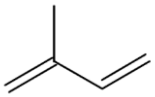


Abbildung 5: Struktur des Isoprens.

Viele Terpene bieten eine Reihe von Anwendungsmöglichkeiten für den Menschen, sind in wichtige biochemische Prozesse involviert und stellen Intermediate in der Biosynthese wichtiger Substanzen und weiterer Substanzklassen dar. So dient Geraniol als Precursor für alle weiteren Monoterpene und findet aufgrund seines rosenartigen Duftes Verwendung in der Parfümindustrie. Bei einer ganzen Reihe von Terpenen handelt es sich aufgrund ihres Duftes oder ihrer Farbe um Signalstoffe lebender Organismen [65]. Andere Terpene, wie beispielsweise das Taxol, finden Anwendung als Cytostatika [83]. Die Liste an Beispielen für die natürlichen Funktionen und Anwendungen der Terpene ist lang.

Das Farnesol spielt eine entscheidende Rolle im Prozess der Proteinprenylierung. Man versteht unter diesem Begriff eine Fixierung von Proteinen in Zellmembranen durch das Anbringen eines Isoprenyllipides, bzw. Farnesylisoprenyl-Restes [72, 110]. Bei diesem auch als Proteinfarnesylierung bezeichneten Prozess, handelt es sich um eine posttranslational eingeführte Modifikation an Proteinen, die wahrscheinlich bei allen

eukaryotischen Zellen zu finden ist [69]. Während des Prozesses der Proteinfarnesylierung erfolgt die Anknüpfung von Farnesyl-Resten über kovalente Addition an, dem *C*-Terminus nahe, Cystein-Reste der Proteine unter Ausbildung von Thioether-Brücken. Als Katalysator für diesen Prozess fungiert ein spezielles Enzym, die Farnesyltransferase (FTase) [68]. Dieser Prozess ist entscheidend für ein funktionierendes Zellgeschehen, da Proteine, die im Allgemeinen aufgrund ihres molekularen Charakters hydrophile Eigenschaften besitzen, lipidlöslich werden und folglich erst mit Lipiddoppelmembranen assoziieren können [111].

Die besondere Funktion der Farnesyl-Reste im biochemischen Geschehen der Zelle prädisponierte diese für die Lipophilisierung von Oligomeren im Rahmen der hier vorgestellten Studien. Da die Geranyl-Einheit die Vorstufe der Farnesyl-Einheit darstellt und im Prinzip das kürzere Pendant zu dieser ist, wurde das Einführen einer solchen zum Zweck der Lipophiliserung von Oligomeren ebenfalls realisiert. So war ein vergleichendes Studium der Eigenschaften bezüglich der Interaktion der synthetisierten Lipo-Oligomere mit künstlichen Lipidmembranen möglich.

Die Einführung der Seitenkette in die jeweilige Position der heterocyclischen Base der Nukleoside erfolgte über eine basen-katalysierte Alkylierung mit der terminal bromierten Form des jeweiligen Terpens. Um unter den gewählten Reaktionsbedingungen eine mögliche *O*-Alkylierung der Hydroxylfunktionen der Zuckereinheit und mögliche Nebenreaktionen an der Base [87, 97] zu vermeiden, wurde zunächst ein 1,1,3,3-Tetraisopropylsiloxan-Derivat des jeweiligen Nukleosides dargesetllt. Diese sogenannte *Markiewiez* Silyl-Klammer [112] diente einem simultanen Schutz der 3'- und 5'-OH-Gruppe der Zuckereinheit beider 2'-Desoxynukleoside. Der große Vorteil dieser Gruppe ist die recht einfache Einführung und Abspaltung unter milden Bedingungen mittels Bu_4NF.

Der Syntheseverlauf zeigte allerdings, dass eine *Markiewiez* Silyl-Klammer als Schutzeinheit keine ideale Wahl im Rahmen dieser Reaktion darstellte. Nach erfolgter Deprotonierung und Alkylierung sind jeweils mehrere Reaktionsprodukte durch TLC zu detektierbar gewesen. Ein möglicher Grund dafür könnte in einem Verlust oder einem

Wandern der Schutzgruppe während der Alkylierung gewesen sein. Ebenfalls möglich wäre eine Silylbrücken-Bildung zwischen zwei silanisierten Nukleosid-Derivaten gewesen.
Eine direkte Alkylierung mit Geranyl- und Farnesylbromid am jeweiligen ungeschützten Nukleosid führte zu den gewünschten Produkten, ohne starke Nebenproduktbildung. Der Einsatz von K_2CO_3 als Deprotonierungsreagenz und DMF als Lösungsmittel lieferte, nach einer Reaktionszeit von 24 h bei Raumtemperatur für 2'-Desoxyinosin und 48 h bei 40° C für Thymidin, die gewünschten Produkte in akzeptablen Ausbeuten (50 – 75%).

Ein Vergleich der lipophilen Thymidin-Derivate bezüglich ihrer Retentionszeiten, gemessen an einer *RP-18* HPLC-Anlage, zeigte eine deutliche Zunahme der Retention mit dem Einführen der Geranyl-, bzw. Farnesyl-Einheit. So verdoppelte, bzw. verdreifachte sich diese nahezu mit eingeführter Isopreneinheit, im Vergleich zur der des unmodifizierten Thymidins.
Die Analyse der Geranyl- und Farnesyl-Derivate des 2'-Desoxyinosins und Thymidins mittels ESI-Massenspektroskopie ließ auf eine Dimerbildung schließen. Wahrscheinlich durch die im Massenspektrometer vorhandene Ionisierungsbedingungen (2% wässrige Ameisensäure) hervorgerufen, trat die Dimerbildung verstärkt bei den 2'-Desoxyinosin-Nukleoterpenen auf. Hingegen zeichnete sich im Falle der Thymidin-Nukleoterpene eine stärkere Tendenz zur Ausbildung von Dimeren bei den Farnesyl-Derivaten (Verbindung **9b**) ab. Eine Interaktion zwischen den Nukleoterpenen ist aufgrund der Art der Seitenkette nicht ungewöhnlich und lässt auf einen biomimentischen Charakter schließen. Abbildung 6 stellt einen von uns erstellten Vorschlag für den Mechanismus der Dimerbildung dar. Dieser beschreibt eine end-to-end-Dimersierung von zwei farnesylierten Nukleosiden unter Ausbildung einer C-C-Verknüpfung. Möglich ist allerdings ebenfalls die Entstehung anderer Produkten, welche z.B. aus einer non-end-to-end-Dimerisierung resultieren könnten.

Nucleoterpenes of Thymidine and 2'-Deoxyinosine: Synthons for a Biomimetic Lipophilization of Oligonucleotides

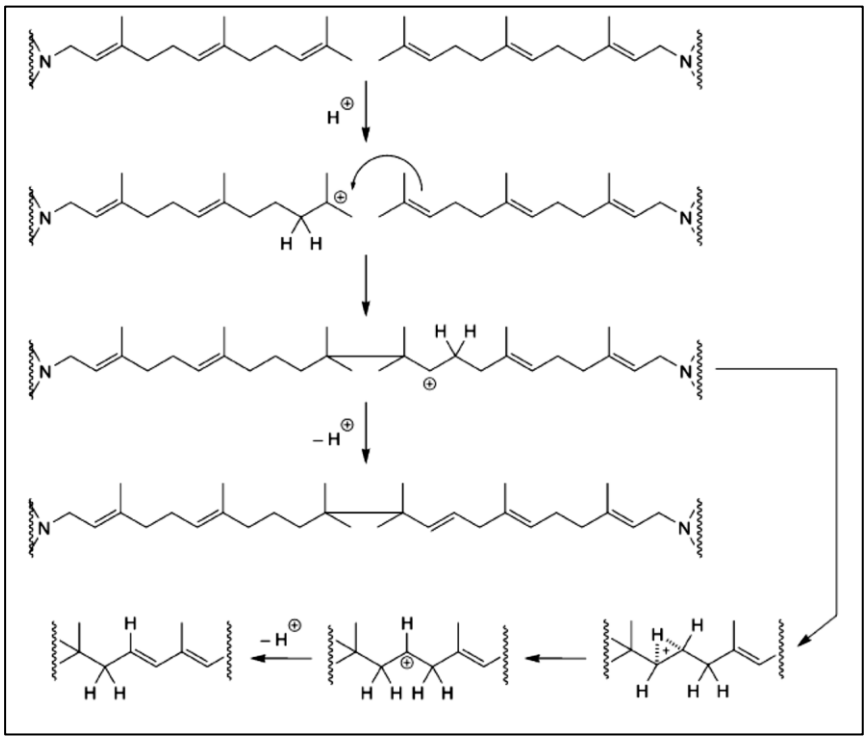


Abbildung 6: Vorgeschlagener Mechanismus der Dimerbildung.

Mittels GPC-Messungen sollte das genaue Molekulargewicht der Verbindung **3b** bestimmt werden. Im Elutionsprofil zeigte sich neben dem Signal für die passende molekulare Masse (errechnet: 456.6 g/mol, ermittelt: 484 g/mol) ein weiteres deutliches Signal, welches auf das Vorhandensein eines hochmolekularen Aggregates hinwies. Das durch Lichtstreumessungen ermittelte Molekulargewicht dieser Überstruktur betrug 1,571,000 g/mol. Es war somit 3440mal höher als das Molekulargewicht der monomeren Verbindung. Dies ließ vermuten, dass es zur Entstehung von Aggregaten in Form von höchstwahrscheinlich inversen Micellen oder Liposomen gekommen sein muss.

Die synthetisierten Phosphoramidite **5b**, **11a** und **11b** (s. Abbildung 7) wurden für sie Synthese einer Serie von lipophilen Oligionukleotiden (s. Tabelle 1) verwendet.

Nucleoterpenes of Thymidine and 2'-Deoxyinosine: Synthons for a Biomimetic Lipophilization of Oligonucleotides

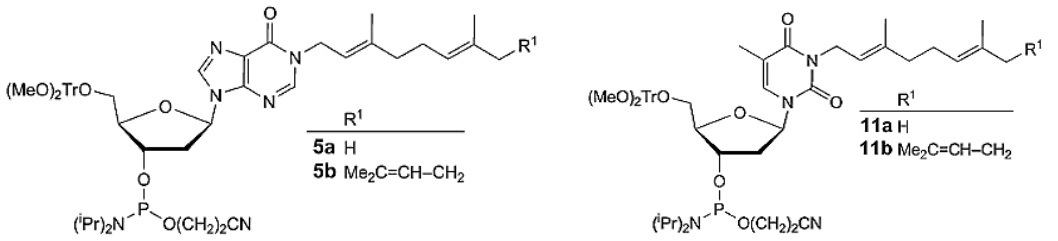


Abbildung 7: Synthetisierte Phosphoramidite.

Tabelle 3: Sequenzen und MALDI-TOF Daten der synthetisierten Oligonukleotide.

Oligonucleotide (sequence, formula No, abbreviation)			$[M+H]^+$ (calc.)	$[M+H]^+$ (found)
5′-d(**3b**-Cy3-TAG GTC AAT ACT)-3′	**18**	**KK1**	4671.6	4671.1
5′-d(**9b**-Cy3-TAG GTC AAT, ACT)-3′	**19**	**EW1**	4660.6	4659.5
5′-d(**9a**-Cy3-TAG GTC AAT, ACT)-3′	**20**	**EW2**	4592.5	4590.5
5′-d(**9b**-TAG GTC AAT, ACT)-3′	**21**	**EW3**	4153.0	4152.3
5′-d(**9b**-ATC CAG TTA TGA)-3′	**22**	**EW4**	4153.0	4152.0
5′-d(Cy5-AGT ATT GAC CTA)-3′	**23**	**EW5**	4178.1	4178.4

Um die Detektion ausgewählter Oligonukleotide (Verbindung **18** – **20**) im Bilayer zu ermöglichen, wurde zusätzlich zum eingebauten Nukleoterpen ein Indocarbocyanin-Chromophor (Cy3) in die 5'-(*n* -1) Position der wachsenden Oligonukleotidkette eingeführt (s. Abbildung 8).

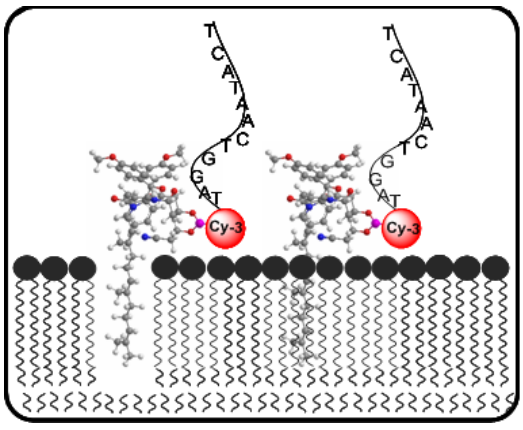


Abbildung 8: Schematische Darstellung eingelagerter Lipo-Oligonukleotide mit Cyaninfarbstoff.

Der Fokus bei den durchgeführten Einlagerungsexperimenten lag auf Stabilitäts-untersuchungen der Lipo-Oligonukleotide mit enthaltenen Nukleoterpen (Oligonukleotid

Nucleoterpenes of Thymidine and 2'-Deoxyinosine: Synthons for a Biomimetic Lipophilization of Oligonucleotides

18 – **20**) bezüglich ihrer Einlagerung in künstliche Lipidmembranen, bestehend aus 1-Palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphethanolamine (POPE) und 1-Palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) in n-Decan (Details siehe Exp. Teil der Veröffentlichung).

Alle Lipo-Oligonukleotide ließen sich in eine künstliche Lipidmembran insertieren. Allerdings zeigten die Einlagerungen dabei unterschiedliche Beständigkeit gegenüber Perfusionen. So konnte zwar eine gute Einlagerung beim *N*(3)-Geranyl-Thymidin enthaltenden Oligonukleotid beobachtet werden, allerdings zeigte sich hier, dass bereits nach einer Perfusion ca. 50% der Oligomere entfernt werden konnten. Es handelte sich folglich um keine stabile Einlagerung. Im Vergleich dazu zeigten die Oligonukleotide mit einem farnesylierten Baustein am 5'-Ende eine signifikant stabilere Einlagerung bezüglich Perfusion (s. Abbildung 9). Ersichtlich wurde, dass Oligomere mit farnesyliertem Baustein sich prinzipiell besser in künstliche Lipidmembranen einlagern lassen.

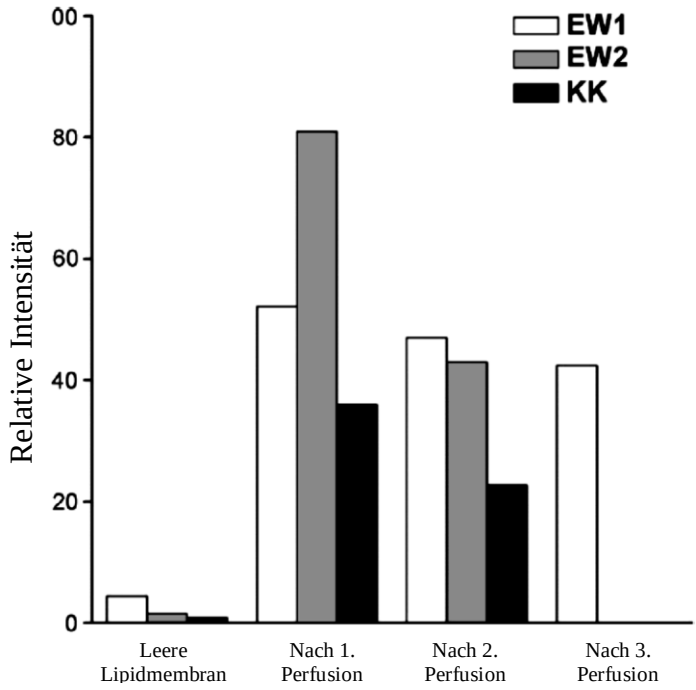


Abbildung 9: Relative Leuchtintensität der Lipidmembran nach Einlagerung der Lipo-Oligomere als Funktion der Perfusionsanzahl.

Nucleoterpenes of Thymidine and 2'-Deoxyinosine: Synthons for a Biomimetic Lipophilization of Oligonucleotides

Synthetisiert wurden des Weiteren die Oligonukleotide **21** und **22** mit jeweils einem Thymidinterpen am 5'-Ende und das Oligonukleotid **23** mit Cy5 als Fluorophor. Für das Oligonukleotid **23** wurde eine zu Oligonukleotid **21** komplementäre Stranganordnung ausgewählt, die allerdings nicht komplementär zu der von Oligonukleotid **22** gewesen ist (s. Tabelle 1). Überprüft werden sollte, ob eine Duplexformation zwischen den Bilayer-immobilisierten Lipo-Oligonukleotiden **21** und **22** und dem Oligomer **23** stattfindet. Durch Integration des Cy5-Chromophors in Oligomer **23** ist die Erkennung eines gebildeten Duplexes mittels Fluoreszenzmikroskopie möglich gewesen. Den Erwartungen entsprechend fand eine Duplexbildung zwischen Oligomer **21** und **23** statt, aber keine Duplexbildung zwischen Oligomer **22** und **23** (s. Abbildung 10).

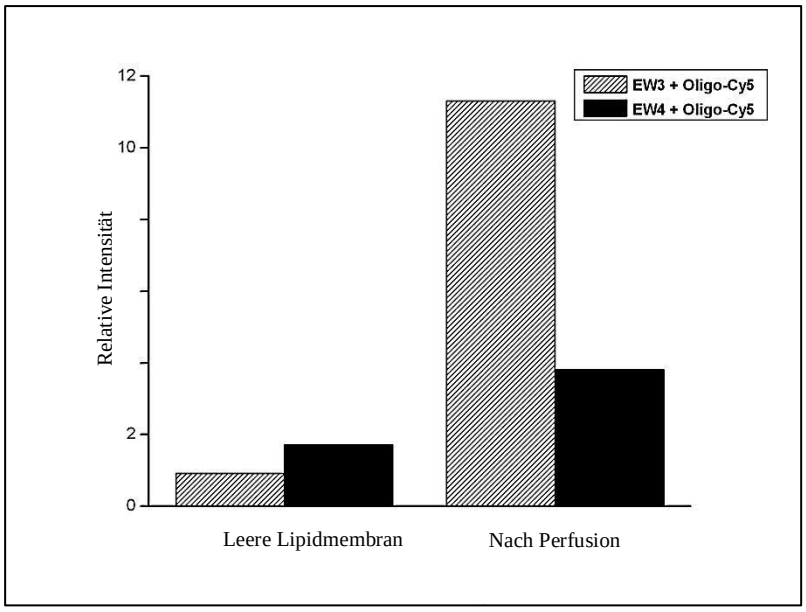


Abbildung 10: Relative Leuchtintensität der Lipidmembran nach Einlagerung der Lipo-Oligomere.

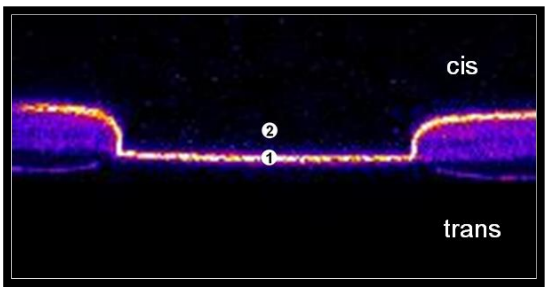
Des Weiteren wurden für das Oligomer **23** die freie Diffusionszeit und die Diffusionszeit des gebildeten Duplexes, bestehend aus Oligomer **21** und **23**, jeweils in Gegenwart und in Abwesenheit einer künstlichen Lipidmembran, bestimmt. In beiden Fällen konnte eine schnelle freie Diffusionszeit ermittelt werden (s. Tabelle 2). Eine beim Duplex **21•23** auftretende breite Verteilung der Diffusionszeit ließ allerdings auf die Bildung von Aggregaten diverser Größen schließen. In Gegenwart einer stabilen Lipidmembran wurde zudem ein Anstieg der Diffusionszeit um den Faktor 10 festgestellt, was darauf

Nucleoterpenes of Thymidine and 2'-Deoxyinosine: Synthons for a Biomimetic Lipophilization of Oligonucleotides

schließen ließ, dass es zur Ausbildung von Molekülaggregaten gekommen sein muss, welche dann partiell mit der Lipidmembran in Interaktion getreten sind.

Tabelle 2: Diffusionszeiten [τ_D (ms)] von **21**·**23** in Abwesenheit und Gegenwart einer künstlichen Lipidmembran. Messpunkte: 1, Lipidmembran; 2, Lösungsmittelumgebung in unmittelbarer Nähe zur Lipidmembran.

	Position	τ_D (ms)
23	Diffusion (in Lösung ohne Lipidmembran)	0.24 ± 0.1
21 · 23		0.12 ± 0.1
21 · 23	1	26.6 ± 2.0
21 · 23	2	2.39 ± 0.3



Synthesis of 5-Fluorouridine Nucleolipid Derivatives and Their Cytostatic/Cytotoxic Activities on Human HT-29 Human Carcinoma Cells

Edith Malecki, Anisa Farhat, Gabriel A. Bonaterra, Doris Röthlein, Martin Wolf, Jürgen Schmitt, Ralf Kinscherf, Helmut Rosemeyer

Chemistry & Biodiversity **2013**, 10 (12), 2235-2246.

DOI: 10.1002/cbdv.201300219

Synthesis of 5-Fluorouridine Nucleolipid Derivatives and Their cytostatic/cytotoxic Activities on Human HT-29 Colon Carcinoma Cells

Das colorectale Karzinom gehört zu den sechs häufigsten bösartigen Tumoren der westlichen Welt [113]. Die Lebenserwartungszeit beträgt fünf Jahre, wobei die relative Überlebensrate nur zwischen 44% und 60% in Großbritannien und Nordamerika liegt [113, 114]. Ursache dieses klinischen Problems ist die Tatsache, dass Tumorzellen ausstreuen und in die Leber, sowie andere Bereiche metastasieren. Diese Metastasierung stellt den Hauptgrund für den Tod durch Darmkrebs dar [115]. Für gewöhnlich erfolgt die chemotherapeutische Behandlung eines Colonkarzinoms mit dem Zytostatikum 5-Fluorouracil (s. Abbildung 1 Struktur 1), welches den am häufigsten verwendeten Wirkstoffen im Rahmen einer Darmkrebstherapie darstellt und zur Standardbehandlung der post-operativen Stufe III gehört [116].

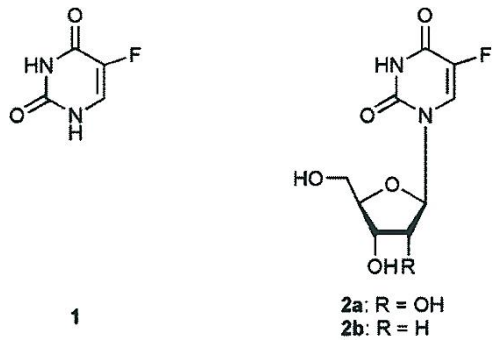


Abbildung 1: Struktur des Zytostatikums 5-Fluorouracil (**1**) und dessen Derivate 5-Fluorouridin (**2a**) und 5-Fluoro-2‘-Desoxyuridin (**2b**).

5-Fluorouracil, sowie dessen ß-*D*-Ribo- und 2‘-Desoxy-ß-*D*-ribonukleoside (s. Abbildung 1 Struktur **2a** und **2b**) weisen Antitumoraktivität gegenüber verschiedenen Arten von Karzinomen auf. Hierzu gehören Karzinome der Blase, der Brust und des gastrointestinalen Traktes [117, 118]. Zudem konnten positive Ergebnisse bei der topischen Behandlung premaligner Keratose der Haut, sowie Basalzellkarzinomen erlangt werden [119, 120]. Der intrathekale Einsatz des 5-Flurouracil-Derivates 5-Fluoro-2‘-desoxyuridin (s. Abbildung 1 Struktur **2b**) zur Behandlung meningealer Streuung bösartiger Hirntumore zeigte, dass dieses Nukleosid-Analogon eine hervorragende Antitumoraktivität bei nur minimaler Neurotoxizität besitzt [121].

Die zytotoxische Wirkung des 5-Fluorouracils beruht auf drei biochemischen Mechanismen (Details siehe Einleitung oder [122]). Problematisch ist eine bei vielen Patienten auftretende tumor-spezifische Resistenz gegenüber 5-Fluorouracil [123]. Das

Synthesis of 5-Fluorouridine Nucleolipid Derivatives and Their cytostatic/cytotoxic Activities on Human HT-29 Colon Carcinoma Cells

Muster und Ausmaß der Zellzerstörung durch Chemotherapeutika, so auch durch Fluoropyrimidine, in menschlichen Krebszellen hängt zudem vermutlich ebenfalls davon ab, welche untergeordneten apoptoseindizierenden Wirkstoff-Target-Interaktionen ausgelöst werden [124].

Es existieren verschiedene Ansätze, um den therapeutischen Nutzen des 5-Fluorouracils zu erhöhen. Einer davon befasst sich mit der Variationen der Wirkstoffdarreichungsform und beschreibt die Möglichkeit der Darreichung per Bolusinfusion oder durch kontinuierliche Infusion über einen längeren Zeitraum [125]. Daneben befasst sich ein weiterer Ansatz mit der Modifikation der molekularen Struktur zum Zwecke einer erhöhten therapeutischen Effizienz. Beide Ansätze verfolgen das Ziel, durch eine erhöhte Wirkstoffdiffusionsrate den therapeutischen Effekt des 5-Fluorouracils zu steigern. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls die bei vielen Chemotherapeutika vorhandene unzureichende Penetration durch Zellmembranen zu nennen sowie die fehlende Eigenschaft dieser, die stark hydrophobe Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Eine Möglichkeit, diese Problematik zu lösen, stellt die Einführung lipophiler Gruppen an das Wirkstoffmolekül dar, um Hydrophobizität zu generieren und infolge dessen die pharmakologischen Eigenschaften zu verbessern [51, 126]. In Anbetracht dessen spielt bei der Modifikation niedermolekularer Wirkstoffe die Erfüllung von ‘Lipinski’s Rule of Five‘ [28, 127] eine wichtige Rolle. ‘Lipinski’s Rule of Five‘ beschreibt die molekularen Eigenschaften, welche bedeutsam für die Pharmakokinetik eines Wirkstoffes im menschlichen Körper sind und befasst sich im Besonderen mit dessen Absorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung. Die postulierten Regeln stellen eine Richtlinie in der Entwicklung neuer Wirkstoffe dar, welche sich von pharmakologisch aktiven Leitstrukturen ableiten und dienen hier der Optimierung der Precursor in Bezug auf eine Erhöhung ihrer Aktivität und Selektivität. Ein Aspekt der ‘Lipinski’s Rule of Five‘ betrifft den Verteilungskoeffizienten (log *P* zwischen n-Octanol und Wasser) von Wirkstoffen und besagt, dass dieser idealerweise in einem Bereich zwischen -0,4 und +5,5 liegen sollte.

Wir haben unter Berücksichtigung dessen eine Serie von Nukleolipid-Derivaten des canzerostatisch aktiven 5-Fluorouracil-Derivates 5-Fluorouridin synthetisiert, welche sich durch das Vorhandensein lipophiler Einheiten in *N*(3)- und *O*-2‘,3‘-Position (s. Abbildung 2 Verbindung **3a**-**7a** und **3b**) auszeichnen [53, 90, 128]. Im Weiteren haben

Synthesis of 5-Fluorouridine Nucleolipid Derivatives and Their cytostatic/cytotoxic Activities on Human HT-29 Colon Carcinoma Cells

wir nahezu alle Derivate mit einem lipophilen Coumarin-haltigen Fluorophor (ATTO-425) versehen, welcher über seine *N*(9)-Butanoatform in die 5‘-OH-Positon des jeweiligen 5-Fluorouridin-Nukleolipides eingeführt worden ist. Das getestete Derivat **7a** leitete sich von einem bereits beschriebenen unfarnesylierten Precursor ab [41]. Zudem wurde aus Gründen des Vergleichs ein *O*-2‘,3‘-Nonadecyliden Derivat des Uridins dargestellt [91, 129].

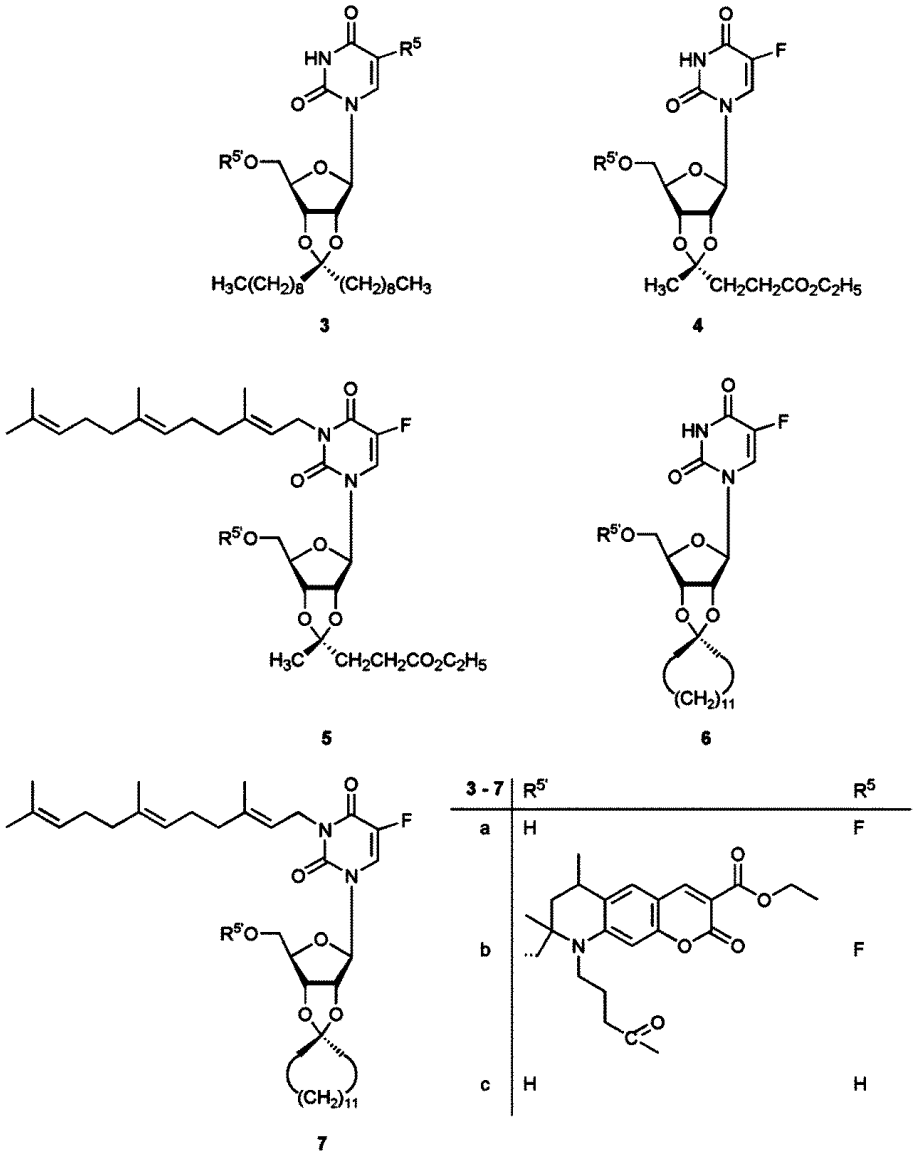


Abbildung 2: Strukturen der synthetisierten 5-Fluorouridin-Derivate (**3a**-**7a**), ohne F (**3c**) und ATTO-425-Konjugate (**3b**-**7b**).

Synthesis of 5-Fluorouridine Nucleolipid Derivatives and Their cytostatic/cytotoxic Activities on Human HT-29 Colon Carcinoma Cells

In einer anschließenden *in vitro* Studie wurden die synthetisierten Nukleolipid-Derivate auf eine canzerostatische, bzw. zytotoxische Wirkung hin untersucht. Bei der im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten Reporter-Zelllinie handelte es sich um eine menschliche Colonkarzinom-Zelllinie mit der Bezeichnung HT-29, die ursprünglich aus dem Primärtumor einer 44 Jahre alten kaukasischen Frau mit Adenokarzinom des Dickdarms isoliert worden ist. Die menschliche HT-29-Karzinomzellinie ist durch intensiven Einsatz im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen sehr gut charakterisiert [130, 131, 132]. Ihre Anwendung ermöglicht eine einfache Bestimmung von Wachstumsparametern durch Ermittlung der Viabilität/Apoptose sowie der Zellzahl und des Proteingehaltes, die in Form von Funktionen der Kultivierungs-, bzw. Behandlungszeit betrachtet werden [130, 131].

Die Farnesylierung der Verbindungen **6a** und **7a** erfolgte auf dieselbe Art und Weise, wie sie bereits für die Synthese der Verbindung **5a** aus **4a** beschrieben wurde [90, 41, 128]. Alle weiteren testrelevanten Verbindungen lagen bereits vor.
Die Konjugation der Verbindung **3a**-**7a** mit dem lipophilen Fluorophor ATTO-425, einem Cumarin-Derivat, wurde mittels *Steglich-Veresterung* [133] (DCC, Dimethylamionpyridin) realisiert. Die Aufreinigung der dargestellten Produkte fand über Säulenchromatographie statt. Ihre anschließende Analyse erfolgte durch Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie sowie ESI-Massenspektroskopie.

Die Antitumoraktivität der synthetisierten 5-Fluorouridin-Derivate gegenüber menschlichen HT-29-Colonkarzinomzellen wurde vergleichend zu der des 5-Fluorouracils und 5-Fluorouridins überprüft. Betrachtet wurde der Effekt aller Testverbindungen auf die Viabilität der HT-29-Zellen nach einer Behandlungszeit von 24 h (s. Abbildung 3).

Synthesis of 5-Fluorouridine Nucleolipid Derivatives and Their cytostatic/cytotoxic Activities on Human HT-29 Colon Carcinoma Cells

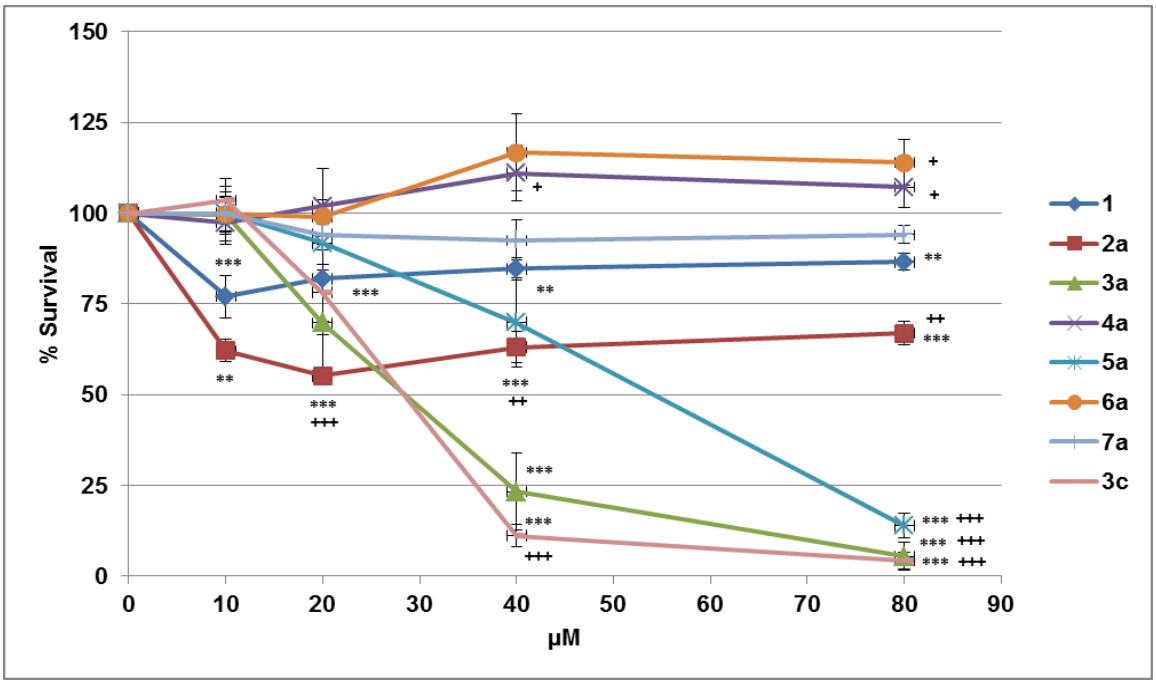


Abbildung 3: Viabilität/Überlebensrate menschlicher HT-29-Colonkarzinomzellen nach 24 h Inkubation mit 5-Fluorouracil (**1**) [positive Kontrolle], 5-Fluorouridin (**2a**), und den Derivaten **3a**, **4a**, **5a**, **6a**, **7a** oder **3c**. Werte sind angegeben in % Überleben der Kontrolle (Inkubation mit Medium allein; = 100 % Überleben), Durchschnitt ± SEM; p, Signifikanz vs. [negative] Kontrolle (Medium allein; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 und Signifikanz vs. 5-Fluoruracil (positive Kontrolle) +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001.

Im Vergleich zur (negativen) Kontrolle bewirkte 5-Fluorouracil eine Erniedrigung in der Zell-Viabilität um 14-23% bei einer eingesetzten Konzentrationen von 10µM, 20µM, 40µM und 80µM. Unter selbigen Bedingungen betrug die Senkung in der Viabilität menschlicher HT-29-Colonkarzinomzellen durch 5-Fluorouridin hingegen 33-45% im Vergleich zur (negativ) Kontrolle. Verbindung **3a** zeigte mit 77% und 95% bei 40 µmolarer und 80µmolarer Konzentration eine signifikante Erniedrigung ($p < 0.001$) der Viabilität. Derivat **3c** löschte hingegen signifikant ($p < 0.001$) mit 89-96% bei einer Konzentration von 40 µM und 80 µM nahezu alle menschlichen HT-29-Colonkarzinom-zellen aus. Im Weiteren zeigten sich die Derivate **3a** und **3c** nach 24-stündiger Inkubationszeit bei 40 µmolarer und 80 µmolarer Konzentration effektiver als 5-Fluorouracil, da beide Derivate signifikant die Viabilität von HT-29-Zellen um 63-72%, bzw. 75% im Vergleich zu 5-Fluorouracil (positive Kontrolle) senkten. Im Falle der Derivate **4a** und **6a** konnte keine signifikant beeinträchtigende Wirkung auf die Überlebensrate von HT-29-Zellen, im Vergleich zur (Negativ-) Kontrolle, beobachtet

Synthesis of 5-Fluorouridine Nucleolipid Derivatives and Their cytostatic/cytotoxic Activities on Human HT-29 Colon Carcinoma Cells

werden. Diese Verbindungen förderten sogar bei 40 µmolarer und 80 µmolarer Konzentration das Krebszellenwachstum im Vergleich zu 5-Fluorouracil (positive Kontrolle). Des Weiteren verursachte Verbindung **5a** eine signifikante Senkung der Überlebensrate um 30% und 80% bei 40 µM und 80 µM im Vergleich zur (negativen) Kontrolle. Das Derivat **7a** zeigte hingegen keinen signifikanten Effekt auf die Überlebensrate menschlicher HT-29-Colonkarzinomzellen nach 24 h Inkubationszeit mit einer Konzentration von 10 µM, 20 µM, 40 µM und 80 µM.

Die in Abbildung 2 zu sehenden Verbindungen **3b**-**7b** stellen die 5'-*O*-gelabelten ATTO-425-Derivate der Verbindungen **3a**-**7a** dar. Abbildung 4 zeigt das Ergebnis (Überlebensrate von HT-29-Zellen) nach 24 h Inkubationszeit mit den ATTO-425-Konjugaten unter Verwendung verschiedener Konzentrationen (10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM).

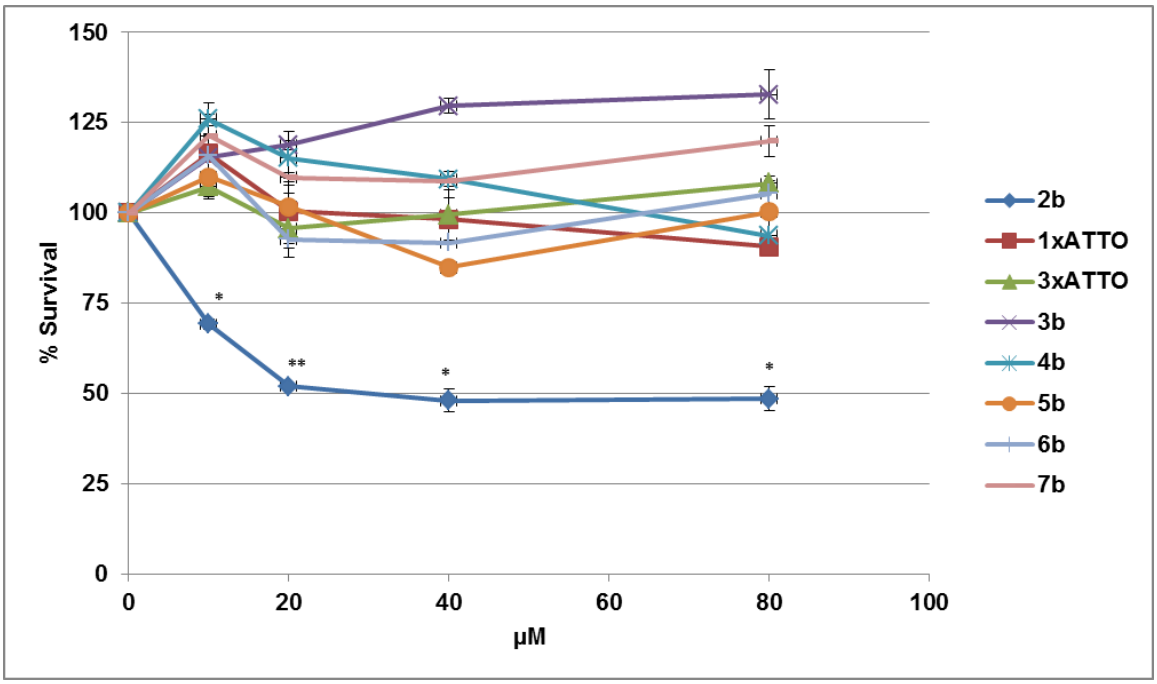


Abbildung 4: Viabilität/Überleben der menschlichen Colonkarzinom-Zelllinie HT-29 nach 24 h Inkubation mit ATTO-425-Konjugaten des 5-Fluorouridins (**2b**), den Derivative **3b**, **4b**, **5b**, **6b**, **7b** und ATTO-425. Werte beziehen sich %-Überleben der Kontrolle (ohne Behandlung/Medium allein; = 100 % Überleben), Durchschnitt ± SEM; p, Signifikanz vs. Kontrolle ohne Behandlung, *p<0.05, **p<0.01***p<0.001. N=4 unabhängige Experimente, Gebrauch von 4-6 Wells pro Behandlung und Experiment.

Synthesis of 5-Fluorouridine Nucleolipid Derivatives and Their cytostatic/cytotoxic Activities on Human HT-29 Colon Carcinoma Cells

Auffällig war, dass die Derivate **3a**, **3c** und **5a** nach einer Konjugation mit ATTO-425 ihre inhibitorische Aktivität das Wachstum von HT-29-Zellen zu hemmen, verloren. Das 5‘-*O*-gelabelte ATTO-425-Derivate des 5-Fluorouridins zeigte hingegen eine signifikante Erniedrigung der Überlebensrate um 31-52% nach 24-stündiger Inkubationszeit bei einer eingesetzten Konzentrationen von 10 µM, 20 µM, 40 µM und 80 µM.

Alle 5‘-*O*-gelabelten ATTO-425- Derivate wurden von HT-29-Zellen inkorporiert und akkumulierten homogen im Zytoplasma der Zellen, umgingen allerdings dabei den Zellkern (s. Abbildung 5). Eine derartige intrazelluläre Lokalisation fand in allen Fällen statt, wobei das ATTO-425-konjuguerte 5-Fluorouridin hier eine Ausnahme darstellte, da dieses im Vergleich zu den anderen Verbindungen eine granulierte Verteilung im Zytoplasma zeigt.

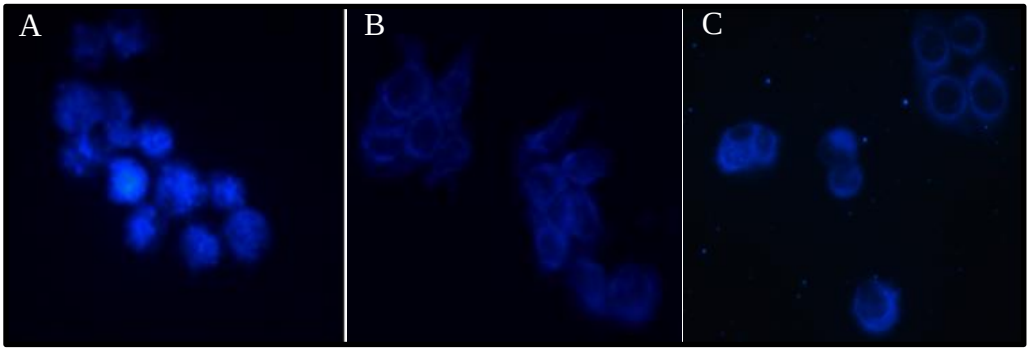


Abbildung 5: Exemplarische Bilder für die intrazelluläre Lokalisation des 5-Fluorouridin-ATTO-425-Konjugates und einiger ATTO-425-Konjugate der 5-Fluorouridin-Derivate in menschlichen HT-29 Adenokarzinomzellen. A) 5-Fluorouridin, B) Derivat **4b**, C) Derivat **5b** nach 24 h Behandlungszeit. Vergrößerung x200.

Wir konnten im Rahmen dieser Untersuchung darstellen, dass die synthetisierten 5-Fluorouridin-Derivate durch menschliche HT-29-Colonkarzinomzellen inkorporiert werden und zeigen, dass diese eine effektivere Inhibierung bezüglich der Überlebensrate menschlicher HT-29-Zellen besitzen als die klinischen Wirkstoffe 5-Fluorouracil und 5-Fluorouridin.

Synthesis of 5-Fluorouridine Nucleolipid Derivatives and Their cytostatic/cytotoxic Activities on Human HT-29 Colon Carcinoma Cells

Fluoropyrimidine sind Antimetabolit-Wirkstoffe, die eine weite Verwendung in der Tumortherapie finden. Die Effekte von Fluoropyrimidinen, wie beispielsweise des 5-Fluorouridins, sind das Resultat einer komplexen Kombination verschiedener molekularer Interaktionen zwischen dem Fluoropyrimidin, dessen Metaboliten, sowie der Plasma und/oder Kernmembran. Dies fördert oder erschwert ihre Verfügbarkeit und somit auch Effektivität. Eine Antitumortherapie hängt von der Effizienz des eingesetzten therapeutischen Wirkstoffes ab. Diese wird wiederum durch die spezifische Verteilung dessen von der peripheren Blutzirkulation hin zum Tumor bedingt [134]. Die daraus resultierende Konsequenz ist, dass nur ein geringer Teil der verabreichten Dosis in den Tumor gelangt, während der Rest des Wirkstoffes unerwünschte Nebenwirkungen verursacht [134]. 5-Fluorouracil wird überwiegend intravenös injiziert. Rund 80% des Wirkstoffs werden dabei in der Leber metabolisiert [135]. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass es beim Einsatz von 5-Fluorouracil und verwandter Wirkstoffe zur Entwicklung von Wirkstoffresistenzen durch den Tumor kommt. Aufgrund einer Wirkstoffresistenz kann es zu Veränderungen im Wirkstofftransport kommen. Folglich besteht die Notwendigkeit, die therapeutische Effizienz des 5-Fluorouracils zu erhöhen. Dies zu erreichen, ist durch eine veränderte Administrationsart oder Modifikation der molekularen Struktur gegeben.

Wir haben diese 5-Fluorouridin-Derivate in Übereinstimmung mit therapeutischen Strategien synthetisiert und konnten in unserer Studie mit menschlichen HT-29-Colonkarzinomzellen beobachten, dass die Derivate **3a** und **5a**, sowie das Uridin-Nukleolipid **3c**, von Karzinomzellen internalisiert werden und eine hohe *in vitro* Aktivität besitzen, die Überlebensrate signifikant zu inhibieren. Ihre Effektivität geht dabei über die des 5-Fluorouracils und 5-Fluorouridins deutlich hinaus.

Die Internalisierung kationischer zellpenetrierender Wirkstoffe ist abhängig von Wechselwirkungen mit der lipophilen Zelloberfläche, wobei es zu einem direkten Eintritt in die Zelle durch Diffusion oder Endozytose kommen kann. In unserer Untersuchung bestätigten wir die intrazelluläre Aufnahme der 5-Fluorouridin-Derivate durch die Bestimmung der zytoplasmatischen Lokalisation entsprechender ATTO-425-gelabelter Derivate (**3b**-**7b**) und stellten fest, dass diese Verbindungen nicht weiter, d.h. nicht bis in den Zellkern, gelangen, dem eigentlichen intrazellulären Ziel. Dies könnte eine plausible Erklärung für den beobachteten Verlust der zytotoxischen Aktivität, infolge des 5‘-*O*-

Fluoreszenzfarbstofflabelings, darstellen. Daneben sei eine weitere Erklärung denkbar, in welcher dieses Ergebnis das Resultat der Blockierung der 5‘-OH-Position des Nukleolipides, infolge der kovalenten Anbindung des ATTO-425-Fluoreszenzfarbstoffes, ist. Auf diese Weise wurde die intrazelluläre Phosphorylierung zum entsprechenden (aktiven) Triphosphat unterbunden.

Prinzipiell ist eine intrazelluläre Phosphorylierung der Nukleolipide **3a**-**7a** unter enzymatischer Vermittlung möglich und folglich auch deren Einbau in eine wachsende Nukleinsäurekette. Diese Derivate besitzen demzufolge Terminatoreigenschaften in Bezug auf die Verlängerung von Nukleinsäureketten, da der terminale Einbau eines *O*-2‘,3‘-blockierten Nukleotids eine weitere enzymatische Verlängerung der wachsenden Nukleinsäurekette verhindert und zur Initiierung von Apoptose führt.

Der Transport eines Wirkstoffes in den Zellkern lebender Zellen hinein erfordert die Überwindung von zwei Hindernissen. Zunächst muss eine zelluläre Internalisierung durch direkte Translokation auf energieanhängigem Wege oder mittels Endozytose erfolgen, wobei eine “Flucht“ vor Endosomen essentiell für die Translokation zu verschiedenen Zellkompartimenten ist. Im Weiteren muss zudem der Weg über die Kernhülle in den Zellkern hinein überwunden werden [136]. Bekannt ist, dass die zelluläre Internalisierung kationischer zellpenetrierender Peptide (CPPs) von lipophilen Wechselwirkungen mit der Zelloberfläche abhängig ist und zum Eintritt durch Diffusion oder mittels Endozytose führt [136]. Die nach 24h aktiven 5-Fluorourdin-Deriavte **3a** und **5a** weisen mehr lipophile Einheiten auf, als die Derivate **4a** und **6a**. Daher mag die Zytotoxizität der beiden ersteren Verbindungen mit der Erhöhung der lipophilen Eigenschaft zusammenhängen.

5-Fluorouracil und 5-Fluorouridin haben in unseren Untersuchungen einen zytotoxischen Effekt mit charakteristischem Inhibierungsverlauf gezeigt, wie er bereits durch andere Autoren beschrieben worden ist [137, 138, 139]. In diesem Zusammenhang konnte im Falle der Derivate **3a** und **3c** eine interessante Beobachtung gemacht werden. Hier wechselte der zytostatische Effekt der Verbindung **3a** zu einem zytotoxischen Effekt der Verbindung **3c**, infolge des Verlustes des Fluoratoms. Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass Derivat **3c** ein anderes oder komplementäres intrazelluläres Target besitzt oder gar nach einem eigenen, bzw. anderen Wirkmechanismus funktionieren muss, welcher zum jetzigen Zeitpunkt nicht bis ins Detail dargestellt werden kann.

Synthesis of 5-Fluorouridine Nucleolipid Derivatives and Their cytostatic/cytotoxic Activities on Human HT-29 Colon Carcinoma Cells

Weitere Untersuchungen sind auch in Bezug auf den molekularen Mechanismus der anderen aktiven Derivate erforderlich. Zur Erforschung dessen sind weitere Tests angesetzt. Hierzu gehören die Betrachtung des zytostatischen/zytotoxischen Effekts auf menschliche HT-29-Colonkarzinomzellen nach längeren Behandlungszeiten, sowie die Untersuchung der Wirkung unserer 5-Flurorouridin-Derivate auf weitere Krebszelllinien.

Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter and Adult Stem Cells

Katharina Raasch, Edith Malecki, Maria Siemann, Malayko Montilla Martinez, Jürgen Heinisch, Janine Müller, Lidia Bakota, Christian Kaltschmidt, Barbara Kaltschmidt, Helmut Rosemeyer, Roland Brandt

submitted for *Nature – Chemical Biology*

Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter and Adult Stem Cells

Ein biologisches Angriffsziel von *small molecules* sind spezifische intrazelluläre Signalwege. Diese Eigenschaft macht sie zu nützlichen Werkzeugen für die Manipulation des Zellschicksals und ist insbesondere im Rahmen der Behandlung von neurodegenerativen Krankheiten, denen ein massiver Verlust an ausdifferenzierten und postmitotischen Neuronen zugrunde liegt, interessant. Die Induktion neuronaler Differenzierung bei endogenen Progenitoren oder implantierten Stammzellen durch *small molecules* könnte eine Möglichkeit darstellen, ausdifferenzierte Neuronen zu schaffen, welche verlorene Zellen im Gehirn zu ersetzten vermögen [140, 141, 142, 143, 144]. *Small molecules* weisen zudem ein besonderes therapeutisches Potential auf, da sie neuronale Differenzierung fördern. Dies ist in Bezug auf neurodegenerative Krankheiten, wie der Alzheimer Krankheit, interessant, da speziell in diesen Fällen die De-differenzierung von Neuronen ein pathologisches Element darzustellen scheint [145]. Man vermutet ferner, dass verschiedene Tumore durch das Vorhandensein einer geringen Anzahl von dedifferenzierten Krebszellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften aufrechterhalten werden [146]. In diesem Fall könnte eine Behandlung, die eine Zelldifferenzierung begünstigt, effektiv zur Reduktion dieser Krebszellen führen und folglich zur Unterbindung ihrer selbstregenerierenden Fähigkeit beitragen.

Diese Zusammenfassung befasst sich mit einer Studie, in welcher wir Nukleosid-Analoga (NSA) als eine Klasse von *small molecules* zur Induktion neuronaler Differenzierung identifizierten. Durch unsere ermittelten Daten sind wir zu dem Schluss gelangt, dass Nukleosid-Analoga eine attraktive Gruppe von *small molecules* darstellen aufgrund bestehender konzeptioneller Parallelen zwischen der Regulation epigentischer Stadien während der Krebs- und Zelldifferenzierung [146].

In der Medizin stellen Nukleosid-Analoga chemotherapeutische Wirkstoffen dar, die der Tumorbehandlung dienen. Durch Interaktion mit verschiedenen intrazellulären Targets treten Nukleosid-Analoga in erster Linie als Antimetabolite auf, sie können zudem aber auch auf verschiedene Signalwege einwirken, sowie epigenetische Mechanismen beeinflussen [147, 148, 149]. Die zelluläre Aufnahme von Verbindungen dieser Substanzklasse erfolgt effektiv über Nukleosid-Transporter, bei denen es sich um integrale Membrantransportsysteme handelt, die dem Fluss von Nukleosiden und

Nukleobasen über die Zellmembran dienen [150]. Nukleosid-Analoga sind Prodrugs und erfordern eine intrazelluläre Phosphorylierung, um aktiv zu werden und sich anzureichern [151].

In unserer Veröffentlichung beschreiben wir ein neues phänotypisches Assay, mittels dem 38 strukturähnliche Nukleosid-Analoga (s. Tabelle 1 im Anhang der Zusammenfassung) auf die Eigenschaft hin untersucht wurden, neuronale Differenzierung bei humanen embryonalen Stammzell-ähnlichen Zellkulturen auszulösen. Als Reporterzellsystem für das systematische Screening nach aktiven Verbindungen diente ein lentiviral transduziertes NT2-Zell-System. Der Nachweis aktiver Verbindungen erfolgte über Live-Cell-Fluorescence-Imaging, sowie fluorimetrische Detektion.
Unter den getesteten Nukleosid-Analoga löste eine Reihe von Verbindungen eine neuronale Differenzierung aus. Diese zeigte sich in Form eines zellmorphologischen Wechsels sowie in der Expression neuronaler Markerproteine und der Aktivierung des Promotors der neuronalen CaMKII (= Serin-/Threonin-spezifische Proteinkinase). Als hoch aktive Verbindungen erwiesen sich Nukleosid-Analoga mit Halogen-substituierter Pyrimidin-Nukleobase und einem unmodifizierten oder 2‘-*O*-Methyl-substituierten 2-Desoxy-ß-D-Ribofuranosyl-Rest als glykosidische Einheit. Zudem zeigte sich das Purin-Nukleosid 2-Chloro-2‘-desoxyadenosine (Cladribin), welches der Behandlung von Leukämie und Multipler Sklerose [152, 153, 154] dient, als ebenso aktiv und induzierte des Weiteren bei humanen adulten Stammzellen der Neuralleiste eine neuronale Differenzierung.

Die Ntera-2/D1- oder NT-2-Linie ist eine humane testikuläre embryonale Karzinomzelllinie mit pluripotenter Eigenschaft, die klonal aus dem Teratokarzinom Tera-2, einem Hodenkarzinom, gewonnen wurde [155]. NT-2-Zellen sind embryonalen Stammzellen ähnlich und weisen *in vitro* die Eigenschaft auf, infolge einer Behandlung mit Vitamin A-Säure, zu Zellen mit typischen Charakteristika fötaler humaner CNS-Neuronen zu differenzieren (NT2N-Zellen oder hNT-Neurone) [156]. In klinischen Phase I- und II-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Transplantation von

Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter and Adult Stem Cells

NT2-N-Zellen bei Hirnschlagpatienten möglich ist [157]. Einen wesentlichen Nachteil stellt allerdings die stark proliferative Eigenschaft der Precursor-Zellen dar, welche das Resultat ihres canzerogenen Ursprungs ist.

Vitamin A-Säure wird im Allgemeinen für die Differenzierung embryonaler Stammzellen verwendet [158]. Neben dieser Eigenschaft gehören die Aufrechterhaltung des ausdifferenzierten Status adulter Neuronen, sowie die Beteiligung an der Regeneration von Nerven, zu weiteren wichtigen Funktionen der Vitamin A-Säure [159]. Eine durch Vitamin A-Säure-vermittelte Differenzierung erfordert eine 5-wöchige kontinuierliche Behandlung der Zellkultur mit einem systematischen Einsatz von Mitoseinhibitoren [160, 161]. Infolge des neuronalen Differenzierungsprozesses wird als eines der ersten Markerproteine das Neurofilament M (NF-M) gebildet, das bereits nach einem Behandlungszeitraum von 3 Tagen nachweisbar ist. Nach einem Behandlungszeitraum von 1-2 Wochen treten dann zellmorphologische Veränderungen ein, die sich in der Annahme einer Neuronen-typischen Zellmorphologie äußern und der Ausbildung von langen NF-M-haltigen Zellfortsätzen (s. Abbildung 1).

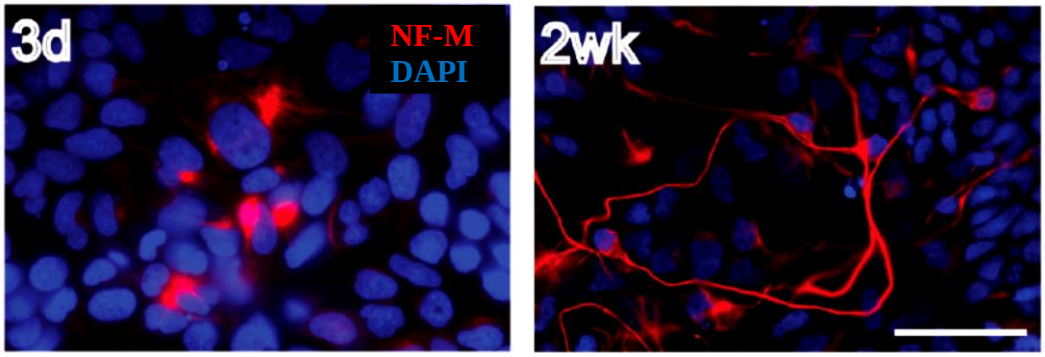


Abbildung 1: Induzierte NF-M-Immunreaktion und morphologische Differenzierung durch Vitamin A-Säure. Färbung gegen *O*-glykosyliertes NF-M (rot) und DNA (DAPI, blau) nach 3 Tagen und 2 Wochen langer Vitamin A-Säure-Behandlung. Maßstab, 50 µm.

Zur Bestimmung des Potentials der 38 strukturähnlichen Nukleosid-Analoga, neuronale Differenzierung zu induzieren, wie es infolge einer Vitamin A-Säure-Anwendung der Fall ist, fand eine Behandlung von NT-2-Zellen mit den entsprechenden Verbindungen statt. Die Wirkung der Nukleosid-Analoga wurde über einen Zeitraum von 2 Woche untersucht. Dabei erfolgte die Beurteilung des Effektes anhand eines morphologischen

Wandels sowie über den Nachweis der Expression des Markerproteins NF-M durch immunocytochemische Analyse.

Die getesteten Nukelosid-Analoga, unter denen sich ebenfalls synthetisch modifizierte Verbindungen befanden, zeichneten sich durch das Vorhandsein verschiedener Seitengruppen aus. Diese befanden sich jeweils an verschiedenen Positionen des Moleküls, so dass aufgrund der molekularen Eigenschaften bestimmbar werden sollte, welche Typen von Nukleosid-Analoga effektive Auslöser neuronaler Differenzierung darstellen. Unter den getesteten 38 Nukleosid-Analoga befanden sich 13 Verbindungen, die eine neuronale Differenzierung in verschiedenen Ausmaßen auslösten (s. in Tabelle 2 im Anhang der Zusammenfassung farblich abgesetzte NSA). Davon zeigten 6 Nukleosid-Analoga eine sehr effiziente Wirkung in einem ersten Screening (s. in Tabelle 2 im Anhang der Zusammenfassung rot markierte Verbindungen) und induzierten hier eindeutig die Expression von NF-M, sowie die Ausbildung langer NF-M-haltiger Fortsätze (s. Abbildung 2).

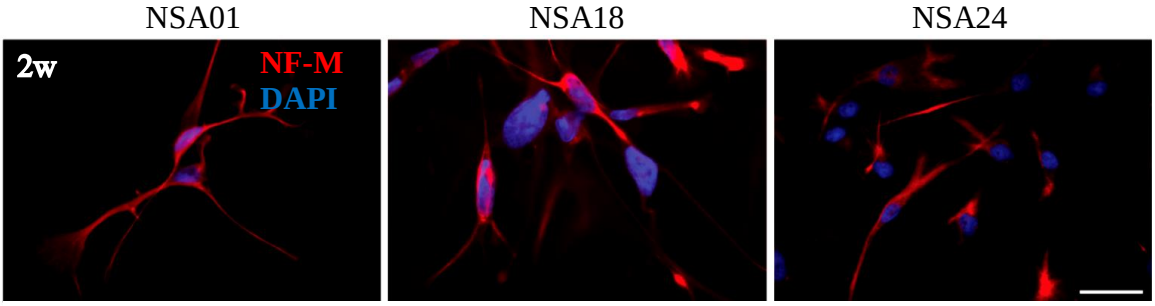


Abbildung 2: Exemplarische immunofluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen den Effekt aktiver Nukleosid-Analoga in Form einer induzierten NF-M-Immunreaktion und morphologischen Differenzierung. Die Färbung der Zellen gegen *O*-glykosyliertes NF-M (rot) und DNA (DAPI, blau) erfolgte nach 2-wöchiger Inkubation mit dem entsprechenden Nukleosid-Analogon. Maßstab 50, µm.

Eine Analyse der Struktur-Funktionsbeziehung machte deutlich, dass die aktivsten Nukleosid-Analoga einen Halogensubstituenten an der Nukleobase (Purin- oder Pyrimidinbase) tragen (s. Abbildung 3 oben). Die Natur des Substituenten scheint allerdings nicht ausschlaggebend für die Induktion neuronaler Differenzierung zu sein. Ferner besitzen diese Verbindungen eine unmodifizierte 2-Desoxy-ß-D-Ribofuranosyl- oder ß-D-Ribofuranose-Einheit als glykosidischen Rest. Des Weiteren wiesen die Daten

Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter and Adult Stem Cells

darauf hin, dass die neuronale Differenzierung durch synthetisch modifizierte Nukleosid-Analoga von der Spezifität und Position der eingeführten Modifikation abhängig zu sein scheint. So zeigten beispielsweise zyklische *O*-2‘,3‘-Ketal-Derivate des 5-Fluorouridins [29, 53] (s. Tabelle 2 NSA 23, 29, 30, 31, 32) keinerlei Aktivität, Verbindung NSA 18, mit einem *O*-2’-Methylrest, hingegen schon.

Weitere wichtige Ergebnisse der Studie waren zum einen die Feststellung, dass die getesteten halogenierten 2‘-Desoxy-Nukleosid-Analoga eine schnelle neuronale Differenzierung auslösen und zum anderen, dass 2-Chloro-2‘-desoxyadenosine (Cladribin) zudem eine neuronale Differenzierung bei humanen adulten Stammzellen der Neuralleiste induziert.

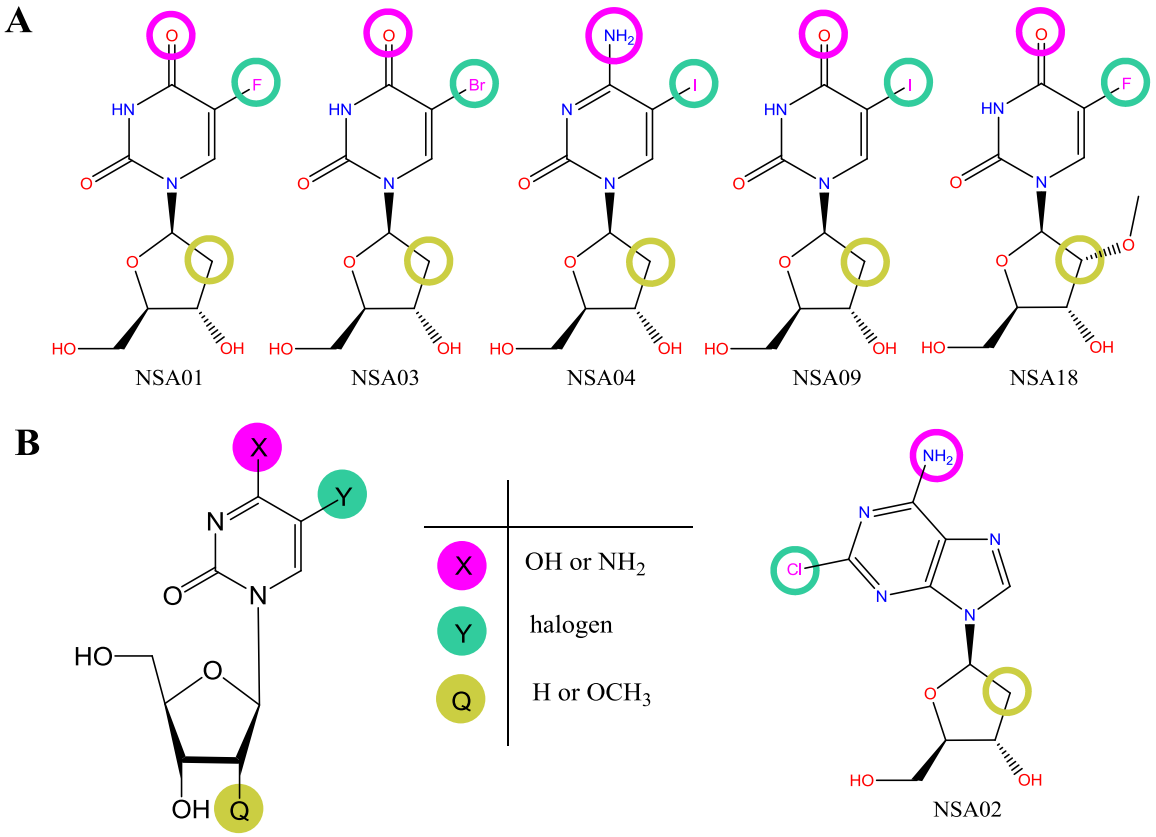


Abbildung 3: Strukturelle Merkmale hoch aktiver Nukleosid-Analoga zur Induktion neuronaler Differenzierung**. A**. Schematische Darstellung der Nukleosid-Analoga mit höchster Aktivität. **B**. Strukturelle Gemeinsamkeiten der getesteten Pyrimidin-Nukleoside dieser Studie.

Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter and Adult Stem Cells

Die verwendete genetisch modifizierte NT-2-Zellinie (Details siehe Veröffentlichung) ermöglichte eine vergleichende Betrachtung der Effektivität der aktiven Nukleosid-Analoga neuronale Differenzierung auszulösen und eine quantitative Einschätzung ihrer Aktivität.

Wie oben beschrieben, wurde zunächst die Induktion neuronaler Differenzierung anhand des morphologischen Wechsels hin zu einer neuronentypischen Zelle, sowie der Expression von NF-M, einem sehr frühen Markerprotein der neuronalen Differenzierung, bestimmt. Die Besonderheit der Reporterzelllinie stellte ihre Eigenschaft dar, auf eine positive Nukleosid-Analoga-Behandlung mit der Expression von eGFP (= enhanced green fluorescent protein) als Konsequenz der Aktivierung des CaMKII-Promotors zu reagieren. Dieser wird üblicherweise erst an einem späteren Punkt des Differenzierungsprogramms aktiviert, ungefähr zur Zeit des Eintritts der Induktion der Mikrotubuli-assoziierten Proteine MAP2- und Tau-Expression, bei welchen es sich um Bestandteile von Neuronen handelt.

Die eGFP-Expression wurde quantitativ nach einem Inkubationszeitraum von 2 Wochen mit den 8 aktivsten Verbindungen (s. Tabelle 2 rot und rosa unterlegte NSA) erfasst. Im Falle einer Behandlung mit Vitamin A-Säure ist ein solch kurzer Zeitraum nicht ausreichend, um eine signifikante eGFP-Fluoreszenz auszulösen. Im Vergleich dazu lösten unter den getesteten Nukleosid-Analoga die Verbindungen 01, 02, 03, 04 und 09 eine erhöhte Fluoreszenz (s. Abbildung 4 A, B) aus, welche auch nach einem längeren Behandlungszeitraum vorhanden war (s. Abbildung 4 C).

Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter and Adult Stem Cells

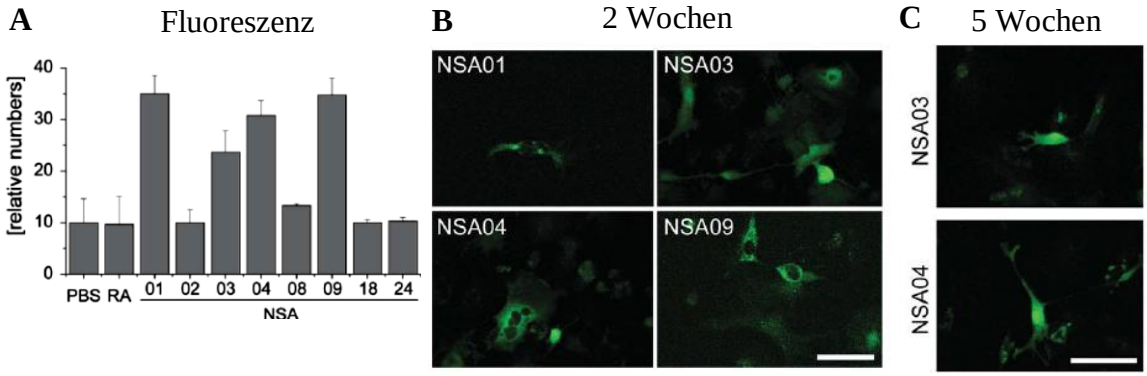


Abbildung 4: Live-Cell-Imaging und fluorimetrische Analyse der Reporterzellen nach Behandlung mit verschiedenen Nukleosid-Analoga. **A**. Fluorimetrische Detektion nach 2-wöchiger Kultivierung **B, C.** Live-Cell-Imaging von Reporter-Neuronen nach einem Behandlungszeitraum von 2 Wochen **B.** und 5 Wochen **C.** mit ausgewählten Nukleosid-Analoga. Maßstab, 100 µm.

Um zu überprüfen, ob die Nukleosid-Analoga 01, 02, 03, 04 und 09 zusätzlich die Expression weiterer später auftretender neuronaler Markerproteine induzieren, fand eine Immunofluoreszenzfärbung gegen MAP2 statt. Es konnte festgestellt werden, dass bereits nach zwei Wochen auch MAP2-poitive Zellen mit entsprechender Neuronen-typischer Morphologie präsent waren (s. Abbildung 5).

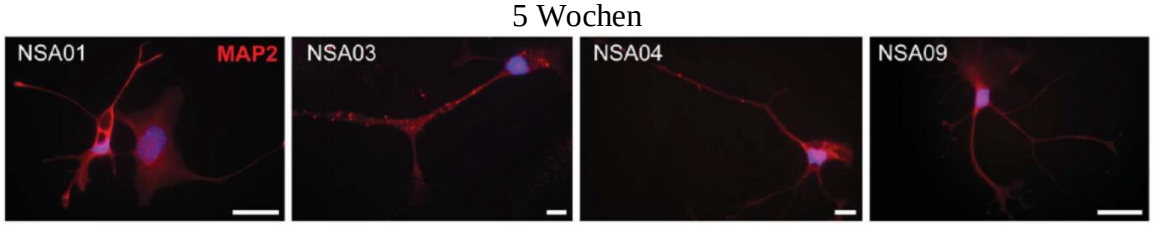


Abbildung 5: Durch Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesene Co-Expression von eGFP und MAP2 nach einer Inkubationszeit von 5 Wochen mit NSA 01, 03, 04 und 09. Maßstab, 50 µm.

Zur Beantwortung der Frage, ob es sich infolge des kurzen Differenzierungszeitraums nur um eine vorübergehende Expression neuronaler Markerproteine handelte, erfolgte eine Differenzierung der Zellen für 2 Wochen mit anschließender 2-wöchiger Kultivierung in Abwesenheit der Nukleosid-Analoga. Mittels Live-Cell-Imaging konnte beobachtet werden, dass eine 2-wöchige frequentive Behandlung mit den Nukleosid-Analoga 01, 03, 04 und 09 eine bleibende Differenzierung bei NT2-Zellen auslöst.

Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter and Adult Stem Cells

Die strukturchemische Gemeinsamkeit dieser Nukleosid-Analoga besteht im Vorhandensein einer halogensubstituierten Pyrimidinbase und einer unmodifizierten 2-Desoxy-ß-D-Ribofuranosyl-Einheit als glykosidischen Rest.

Um das Potential der 8 aktivsten Nukleosid-Analoga (s. Tabelle 2 rot und rosa markierte NSA), neuronale Differenzierung auszulösen, in einem breiteren Rahmen zu untersuchten, wurde ihre Wirkung zusätzlich auf adulte Stammzellen untersucht. Verwendet wurde hier eine Neuralleisten-abstammende Stammzellkultur aus dem respiratorischen Epithel der adulten humanen unteren Nasenmuschel (ITSCs = inferior turbinate stem cells) [162]. ITSCs sind glialen Ursprungs und besitzen die Fähigkeit, sich zu Zellen mit neuro-ectodermalem und -mesodermalem Phenotyp zu differenzieren.
Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass unter den getesteten Verbindungen 2-Chloro-2‘-desoxyadenosin (Cladribin) (s. Tabelle 2 NSA 02) eine Differenzierung auslöst (s. Abbildung 6). Diese weitere Beobachtung lässt nahelegen, dass Nukleosid-Analoga in verschiedenen Stammzell-Modellsystemen aktiv sein können. Cladribin, das einzige getestete Nukleosid-Analogon mit einem Purinheterozyklus, ist ein synthetischer Antitumorwirkstoff, welcher im Weiteren eine immunsuppressive Eigenschaft aufweist und als Wirkstoff zur Behandlung von Multipler Sklerose erforscht wird. Als Adenosin-Analogon fungiert es bei Stammzellen möglicherweise als Adenylatcylase-Inhibitor und verursacht folglich dadurch einen Anstieg in der cAMP-Konzentration, welcher zur Induktion neuronaler Differenzierung führen kann [163].

Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter and Adult Stem Cells

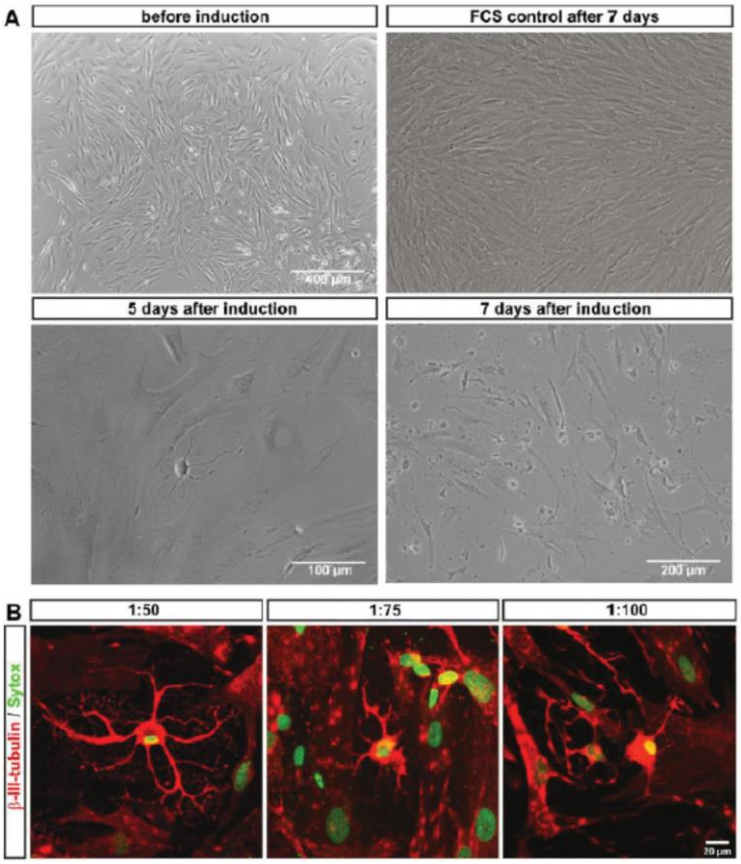


Abbildung 6: Nachgewiesene Induktion neuronaler Differenzierung bei adulten Stammzellen der Neuralleiste durch Cladribin (NSA 02).

Unserer Studie zufolge nach könnten Nukelosid-Analoga eine potentielle Verbindungsklasse von *small molecules* darstellen, welche sich als Tools für den Einsatz in Zell-Ersatz-Therapien eignen.

Nukleosid-Analoga als *small molecules* zur Induktion neuronaler Differenzierung stellen zudem die Lösung eines weiteren Problems dar. Eine neuronale Differenzierung kann durch besondere Kultivierungsbedingungen hervorgerufen werden, wie beispielsweise einem Stammzellwachstum in Aggregatkultur [164]. So fördert auch im Falle von NT2-Zellen das Wachstum in Aggregatkultur eine neuronale Differenzierung [165]. Im Weiteren ist es möglich, durch Induktion von metabolischer Oxidation neuronale Differenzierung auszulösen [166]. Die Manipulation der Zellkulturbedingungen ist allerdings mit dem Nachteil verbunden, dass es infolge dessen zur Entstehung von Heterogenität in einer Zellpopulation kommt [167]. Im Vergleich dazu erscheint eine Induktion neuronaler Differenzierung durch *small molecules* vorteilhaft, da auf diesem

Weg gezielt Signaltransduktionsmechanismen beeinflusst werden. Dies führt dementsprechend zu einer effizienteren und selektiveren Induktion neuronaler Differenzierung.

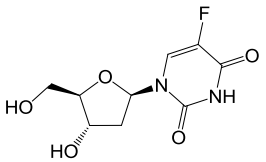
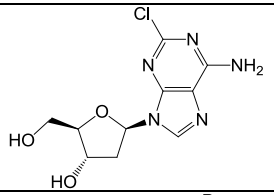
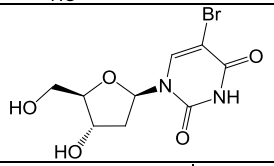
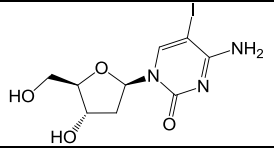
Small molecules sind in der Lage, neuronale Differenzierung auf verschiedenen Wegen zu induzieren. Bekannt ist, dass für 4,6-disubstituierte Pyrrolopyrimidine [168], 5-Imino-1,2,4-thiazole [169] und Indolylmaleimide [170] GSK3ß (= Glykogen Synthase Kinase 3, Serin-/Threonin-Proteinkinase) das Target darstellt. Mitglieder dieser Substanzklassen bewirken eine GSK3ß-Inhibierung und rufen infolge dessen eine neuronale Stammzellendifferenzierung aus. Dieser Effekt konnte in verschiedenen experimentellen Modellen gezeigt werden. Weitere *small molecules*, die eine neuronale Differenzierung auslösen, allerdings auf Grundlage anderer Mechanismen, sind Phenazopyridin [171] und Isoxazol, wovon letzteres eine neuronale Differenzierung in adulten neuronalen Stammzellen über den Ca^{2+}-Ionen-Einfluss auslöst, der zu einer Derepression neuronaler Gene führt [172]. Daneben sind einige Vertreter aus der Gruppe der Nukleosid-Analog bekannt, die ebenfalls neuronale Differenzierung auszulösen vermögen. Hierzu gehören beispielsweise Abacavir [173], 5-Aza-2‘-desoxycytidin [174] und Cyclopentenylcytosin [175]. Eine systematische Studie zur Analyse der Struktur-Funktionsbeziehungen von Nukleosid-Analoga wurde in Bezug auf ihre Eigenschaft, eine neuronale Differenzierung auszulösen, nicht durchgeführt.

Wir haben in Anbetracht dessen und der Beobachtung, dass das lipophile 2‘-*O*-Methyl-Derivat des 5-Fluorouridins (s. Tabelle 1 NSA 18) sowie das sehr hydrophobe Cladribin (s. Tabelle 1 NSA 02) zu den aktivsten Verbindungen bezüglich morphologischer Differenzierung und NF-M-Immunreaktivität gehörten, verschiedene hydrophobe Nukleosid-Analoga synthetisiert und getestet und basierend auf ihrer Aktivität, neuronale Differenzierung auszulösen, in Kategorien eingeordnet (s. Tabelle 2).

Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation
using Human Reporter Cells and adult Human Neural Crest-derived Stem Cells

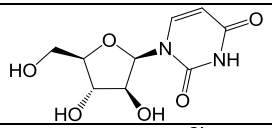
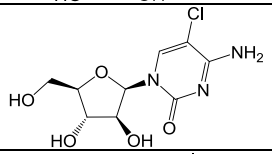
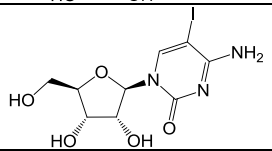
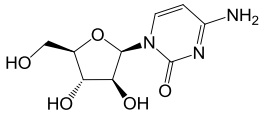
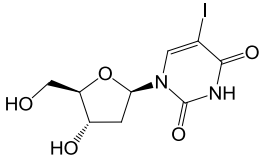
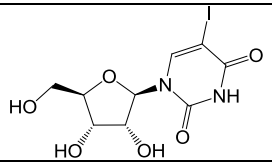
Anhang

Tabelle 1: Strukturen und Merkmale der getesteten Nukleosid-Analoga (NSAs). Löslichkeitsangaben beziehen sich auf Herstellung einer 5 mM-Stammlösung. Bestimmung der Toxizität durch visuelle Inspektion der Zellkulturen nach Behandlung mit 50 µmolarer Lösungen der entsprechenden Verbindungen für 1, 2 und 3 Wochen. Löslichkeit und Toxizität wurden mit sehr hoch (++), hoch (+), gering (0) oder nicht vorhanden (-) beurteilt.

Substance code	Structure	Systematic name	Relative molecular weight	Solubility in PBS (alternative solvent)	Toxicity	Biological activity
NSA01		5-fluoro-1-((2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	246.19	+	++	inhibits DNA synthesis by blocking thymidylic acid synthetase, antineoplastic activity
NSA02		(2R,3S,5R)-5-(6-amino-2-chloro-9H-purin-9-yl)-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol	285.70	+	++	(cladribine) strong antileukemic and immunosuppresive activity
NSA03		5-bromo-1-((2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	307.10	++	+	incorporated into cell DNA at the S phase, growth inhibition
NSA04		4-amino-1-((2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yl)-5-iodopyrimidin-2(1H)-one	353.11	++	+	

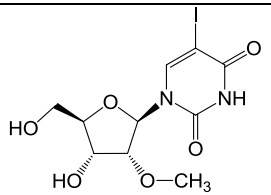
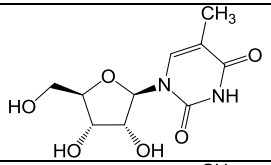
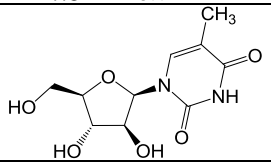
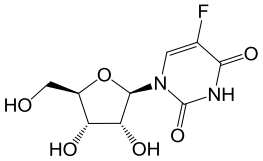
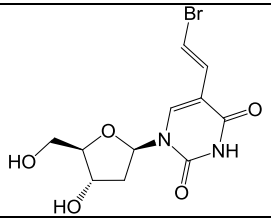
Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter Cells and adult Human Neural Crest-derived Stem Cells

Anhang

NSA05		1-((2R,3S,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydro-furan-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	244.20	++	-	(AraU)
NSA06		4-amino-5-chloro-1-((2R,3S,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrimidin-2(1H)-one	277.16	++	-	
NSA07		4-amino-1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-2-yl)-5-iodopyrimidin-2(1H)-one	369.12	+	-	
NSA08		4-amino-1-((2R,3S,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yl)pyrimidin-2(1H)-one	243.22	+	++	(araC) inhibitor of DNA synthesis, antineoplastic and antiviral activity
NSA09		1-((2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-5-iodopyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	354.10	**O**	+	inhibitor of thymidine kinase and thymidylate synthetase, antiviral activity
NSA10		1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yl)-5-iodopyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	370.10	+	-	

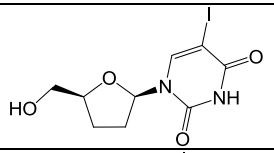
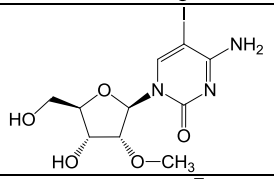
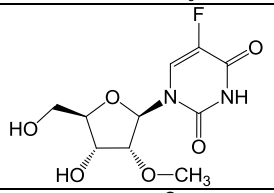
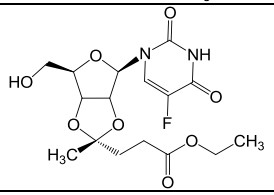
Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation
using Human Reporter Cells and adult Human Neural Crest-derived Stem Cells

Anhang

NSA11		1-((2R,3R,4R,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-3-methoxy-tetrahydrofuran-2-yl)-5-iodopyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	384.12	++	-	
NSA12		1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yl)-5-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	258.23	++	-	ribothymidine
NSA13		1-((2R,3S,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydro-furan-2-yl)-5-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	258.23	++	-	antiviral activity
NSA14		1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yl)-5-fluoropyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	262.19	++	++	5-fluoro-uridine anticancer and cytotoxic activity
NSA15		5-((E)-2-bromovinyl)-1-((2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	333.10	++	-	(brivudine) antiviral activity

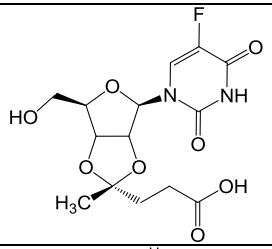
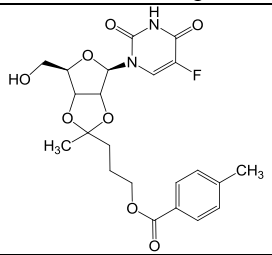
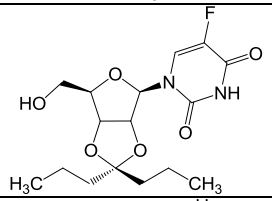
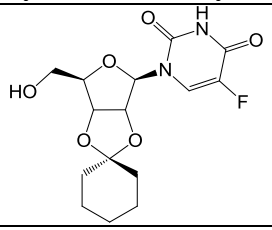
Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter Cells and adult Human Neural Crest-derived Stem Cells

Anhang

NSA16		1-((2R,5S)-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yl)-5-iodopyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	338.10	+	-	
NSA17		4-amino-1-((2R,3R,4R,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-3-methoxytetrahydrofuran-2-yl)-5-iodopyrimidin-2(1H)-one	383.14	++	-	
NSA18		5-fluoro-1-((2R,3R,4R,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-3-methoxytetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	276.22	+	-	
NSA19		ethyl 3-((2R,4R,6R)-4-(5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-6-(hydroxymethyl)-2-methyltetrahydrofuro[3,4-*d*]-[1,3]dioxol-2-yl)propanoate	388.35	++	-	

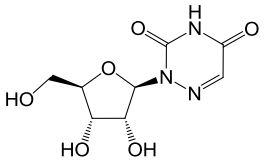
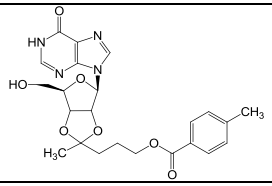
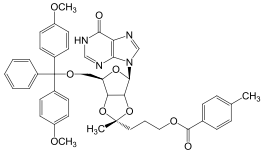
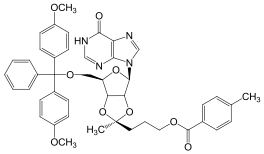
Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter Cells and adult Human Neural Crest-derived Stem Cells

Anhang

NSA20		3-((2R,4R,6R)-4-(5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-6-(hydroxymethyl)-2-methyltetrahydrofuro[3,4-*d*]-[1,3]dioxol-2-yl)propanoic acid	360.29	- (methanol)	-	
NSA21		3-((4R,6R)-4-(5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-6-(hydroxymethyl)-2-methyltetrahydrofuro[3,4-*d*]-[1,3]dioxol-2-yl)propyl 4-methylbenzoate (diastereoisomeric mixture)	464.44	- (chloroform:methanol=2:1)	+	
NSA22		5-fluoro-1-((4R,6R)-6-(hydroxymethyl)-2,2-dipropyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	358.36	- (DMF:PBS=2:1)	-	
NSA23		5-fluoro-1-((4'R,6'R)-4'-(hydroxymethyl)tetrahydrospiro[cyclohexane-1,2'-furo[3,4-*d*]-[1,3]dioxol]-6'-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	342.32	- (DMF:PBS=2:1)	-	

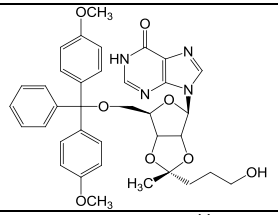
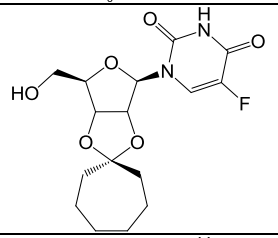
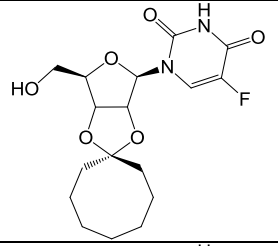
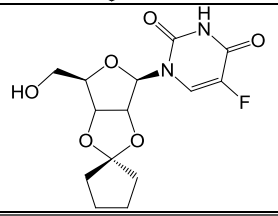
Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation
using Human Reporter Cells and adult Human Neural Crest-derived Stem Cells

Anhang

NSA24		2-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yl)-1,2,4-triazine-3,5(2H,4H)-dione	245.19	++	-	6-azauridine antiviral and anticancer activity
NSA25		3-((4R,6R)-4-(hydroxymethyl)-2-methyl-6-(6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)tetrahydrofuro[3,4-*d*]-[1,3]dioxol-2-yl)propyl 4-methylbenzoate	470.51	- (DMF:PBS=1:1)	-	
NSA26		3-((2R,4R,6R)-4-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-2-methyl-6-(6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-2-yl)propyl 4-methylbenzoate (R diastereoisomer)	772.84	- (chloroform:methanol=1:1)	-	
NSA27		3-((2S,4R,6R)-4-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-2-methyl-6-(6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)tetrahydrofuro-[3,4-*d*][1,3]dioxol-2-yl)propyl 4-methylbenzoate (S diastereoisomer)	772.84	- (acetonitril)	-	

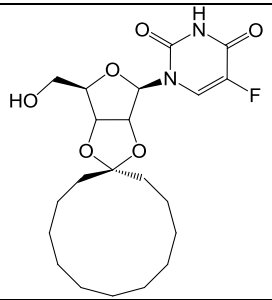
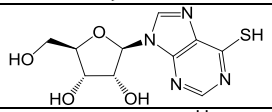
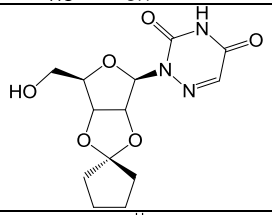
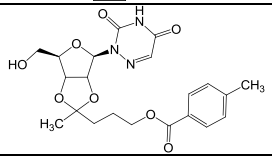
Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter Cells and adult Human Neural Crest-derived Stem Cells

Anhang

NSA28		9-((2R,4R,6R)-6-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-2-(3-hydroxypropyl)-2-methyltetrahydrofuro[3,4-*d*]-[1,3]dioxol-4-yl)-1H-purin-6(9H)-one	654.71	- (DMF:PBS=3:1)	++	
NSA29		5-fluoro-1-((4'R,6'R)-4'-(hydroxymethyl)tetrahydrospiro[cycloheptane-1,2'-furo[3,4-*d*]-[1,3]dioxol]-6'-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	356.35	- (DMF:PBS=1:1)	-	
NSA30		5-fluoro-1-((4'R,6'R)-4'-(hydroxymethyl)tetrahydrospiro[cyclooctane-1,2'-furo[3,4-*d*]-[1,3]dioxol]-6'-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	370.37	- (DMF:PBS=2:1)	-	
NSA31		5-fluoro-1-((4'R,6'R)-4'-(hydroxymethyl)tetrahydrospiro[cyclopentane-1,2'-furo[3,4-*d*]-[1,3]dioxol]-6'-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	328.29	- (DMF:PBS=1:1)	-	

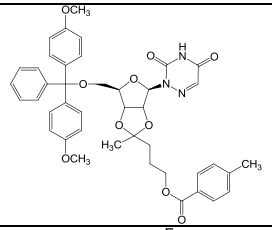
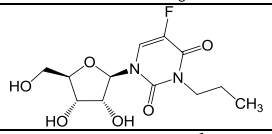
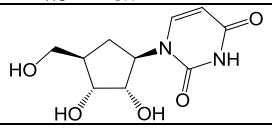
Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter Cells and adult Human Neural Crest-derived Stem Cells

Anhang

NSA32		5-fluoro-1-((4'R,6'R)-4'-(hydroxymethyl)tetrahydrospiro[cyclododecane-1,2'-furo[3,4-*d*]-[1,3]dioxol]-6'-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	426.48	- (DMF:PBS=3:1)	++	
NSA33		(2R,3S,4R,5R)-2-(hydroxymethyl)-5-(6-mercapto-9H-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3,4-diol	284.29	- (DMF:PBS=1:1)	++	
NSA34		2-((4'R,6'R)-4'-(hydroxymethyl)tetrahydrospiro-[cyclopentane-1,2'-furo[3,4-d][1,3]dioxol]-6'-yl)-1,2,4-triazine-3,5(2H,4H)-dione	311.29	- (DMF:PBS=1:1)	-	
NSA35		3-((4R,6R)-4-(3,5-dioxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-2(3H)-yl)-6-(hydroxymethyl)-2-methyltetrahydrofuro[3,4-d]-[1,3]dioxol-2-yl)propyl 4-methylbenzoate	447.44	- (chloroform:methanol=2:1)	-	

Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation
using Human Reporter Cells and adult Human Neural Crest-derived Stem Cells

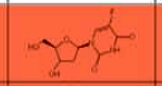
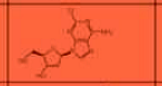
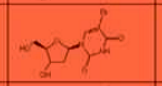
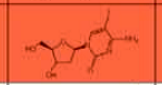
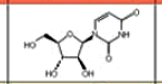
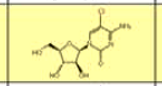
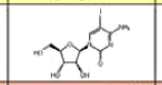
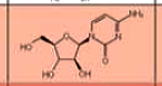
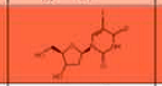
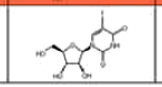
Anhang

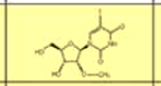
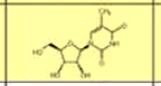
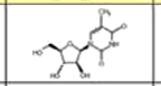
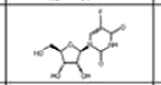
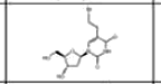
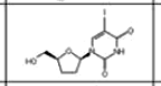
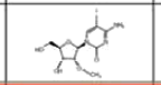
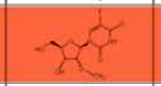
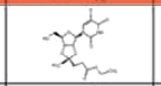
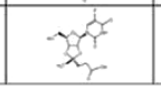
NSA36		3-((4R,6R)-4-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-6-(3,5-dioxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-2(3H)-yl)-2-methyltetrahydrofuro[3,4-*d*]-[1,3]dioxol-2-yl)propyl 4-methylbenzoate	749.81	- (DMF:PBS=2:1)	++	
NSA37		1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yl)-5-fluoro-3-propylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	304.27	- (DMF:PBS=1:1)	-	
NSA38		1-((1R,2S,3R,4R)-2,3-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)-cyclopentyl)-pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione	242.1	+	-	O-4‘-carbauridine

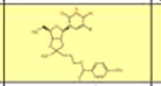
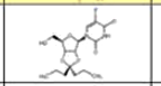
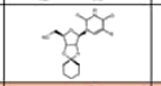
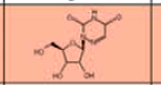
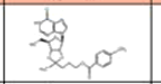
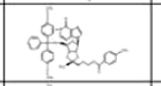
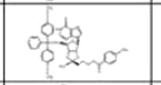
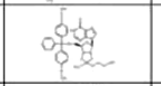
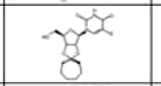
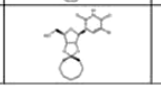
Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation
using Human Reporter Cells and adult Human Neural Crest-derived Stem Cells

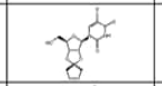
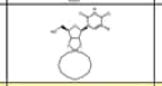
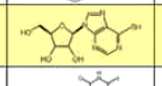
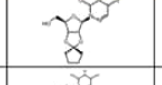
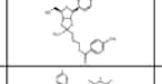
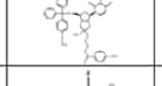
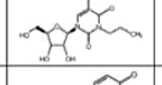
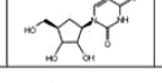
Anhang

Tabelle 2: Nukleosid-Analoga (NSA), die in erstem Screening getestet wurden. Überprüft wurde die Eigenschaft morphologische Differenzierung auszulösen sowie die Induktion einer NF-M-Immunreaktion. Hoch aktive Nukleosid-Analoga sind rot, weniger aktive rosa unterlegt. Effekt auf morphologische Differenzierung und NF-M-Immunreaktion (nach 1 und 2 Wochen) wurden eingestuft: (++) = sehr positiv, (+) = positiv, (o) = gering und (-) = keine Effekt im Vergleich zur Kontrolle (PBS).

Substance	Structure	Morphological differentiation [1]	NF-M immuno-reactivity [2]
NSA01		++	++
NSA02		++	++
NSA03		++	++
NSA04		++	++
NSA05		-	-
NSA06		o	+
NSA07		-	-
NSA08		+	+
NSA09		++	++
NSA10		-	-

Substance	Structure	Morphological differentiation [1]	NF-M immuno-reactivity [2]
NSA11		o	+
NSA12		o	+
NSA13		-	-
NSA14		-	-
NSA15		-	-
NSA16		-	-
NSA17		o	-
NSA18		++	++
NSA19		-	-
NSA20		-	-

Substance	Structure	Morphological differentiation [1]	NF-M immuno-reactivity [2]
NSA21		o	+
NSA22		-	-
NSA23		-	-
NSA24		+	++
NSA25		-	-
NSA26		-	-
NSA27		-	-
NSA28		-	-
NSA29		-	-
NSA30		-	-

Substance	Structure	Morphological differentiation [1]	NF-M immuno-reactivity [2]
NSA31		-	-
NSA32		-	-
NSA33		o	+
NSA34		-	-
NSA35		-	-
NSA36		-	-
NSA37		-	-
NSA38		-	-

Immobilization of 5-Fluorouridine on Chitosan

Edith Malecki, Rebecca Viere, Helmut Rosemeyer

Chemistry & Biodiversity **2013**, 10 (10), 1828-1841.

DOI: 10.1002/cbdv.201300025

Immobilization of 5-Fluororuridine on Chitosan

Drug Delivery Systems dienen der vorhersehbaren und systematischen Freisetzung von Wirkstoffen in eine spezifische Umgebung und bieten viele Vorzüge. Ihr Einsatz trägt zur Optimierung der Wirkstoffwirkung bei, generiert eine Minimierung von Nebenwirkungen und führt zu einer verlängerten Wirkdauer von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen durch eine retardierte Abgabe. Kontrollierte Formen der Wirkstoffdosierung erhöhen die Sicherheit, Effizienz und Zuverlässigkeit einer medikamentösen Therapie, indem sie eine Regulation der Freisetzungsrate von Wirkstoffen ermöglichen und die Häufigkeit der Wirkstoffeinnahme reduzieren. Dies ist mit einem erhöhten Komfort für den Patienten verbunden. Konventionelle Formen der Medikamentendarreichung führen zu unsteten Wirkstoffkonzentrationen im Serum, wobei die höchste Menge des Wirkstoffs direkt nach der Administration freigesetzt wird. Einem daraus resultierenden schnellen Anstieg des Wirkstofflevels im Organismus folgt ein rapider Abfall der Wirkstoffkonzentration. Diese Situation ist besonders bei Wirkstoffen problematisch, deren Wirkung stark mit der Plasmakonzentration korreliert. Scharfe Fluktuationen in der Wirkstoffkonzentration verursachen in diesen Fällen häufig unerwünschte Nebenwirkungen (s. Abbildung 1) [176].

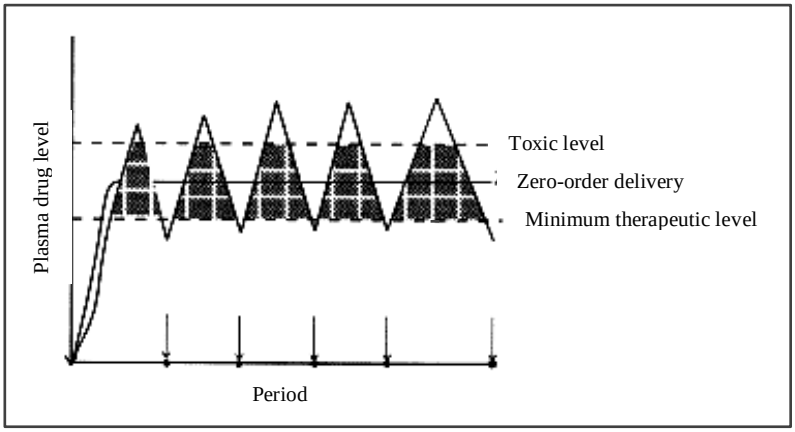


Abbildung 1: Kontrollierte Abgabe und sofortige Freisetzung eines Wirkstoffes [176].

Einen möglichen Lösungsansatz für diese Problematik bietet der Einsatz von Wirkstoffen in Kombination mit biodegradierbaren Materialien. In Frage kommt hierfür eine ganze Reihe von biodegradierbaren Polymeren als Träger dieser Pharmaka, deren Zusammensetzung sowohl auf synthetischer Basis, als auch auf natürlicher Basis, beruht. Von Polymeren absorbierte oder umhüllte Wirkstoffe werden retardiert abgegeben, an

Immobilization of 5-Fluororuridine on Chitosan

Polymere kovalent gebundene oder in einer polymeren Matrix dispergierte Wirkstoffe können durch den Abbau des Materials freigesetzt werden. Möglich ist zudem eine auf Diffusion beruhende Freisetzung aus gelartigen Materialien [176].
Die besonderen Eigenschaften des Chitosans machen dieses Biopolymer zu einem idealen Trägermaterial für Formulierungen zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung. Chitosan ist nicht-toxisch, bioresorbierbar und besitzt gelbildende Eigenschaften bei niedrigen pH-Werten. Zudem schützt Chitosan vor einer auf Medikamenteneinnahme beruhenden Irritation des Magens, oder lindert diese, da es als Antazidum wirkt und vorbeugende Eigenschaften gegen Magengeschwüre aufweist [176].

Diese Publikation ist aufgrund ihrer Thematik in der Darstellung ihres Inhaltes praxisorientiert aufgebaut.

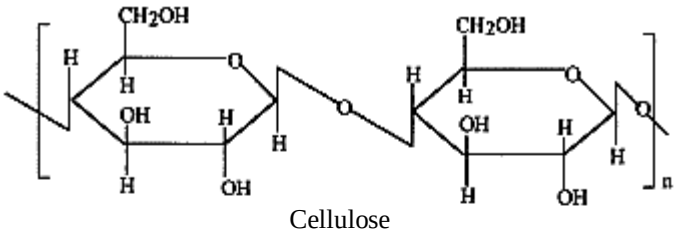
Der erste Teil der Veröffentlichung beschreibt die Immobilisierung eines *O*-2‘,3‘-funktionalisierten Lävulinsäure-Derivates des Cancerostatikums 5-Fluorouridin und dessen *N*(3)-farnesylierter, gegen HT29-Zellen cancerostatisch aktiveren (Lipid-)Form [177], an wasserlösliche Chitosane verschiedener Molekulargewichte, sowie das Fluoreszenzfarbstoff-Labeling der synthetisierten Nukleosid-Chitosan-Konjugate zwecks biologischer und onkologischer Studien. Im Mittelpunkt der Arbeit standen vor allem die Entwicklung von allgemeinen Kupplungsvorschriften für die Immobilisierung von 5-Fluorouridin an verschiedene Chitosane, sowie die Analyse der synthetisierten 5-Fluorouridin-Chitosan-Konjugate bezüglich der Ligandenkonzentration. Ziel war es ein Wirkstoffsystem auf Polymerbasis zu schaffen, welches sich durch eine starke Antitumoraktivität auszeichnet und durch welches die schweren Nebenwirkungen und das mangelhafte pharmakokinetische Profil des 5-Fluorouridins negiert werden können. Derartig funktionalisierte Chitosane besitzen das Potential als biomedizinische Materialen für eine retardierte Freisetzung des 5-Fluorouridins zu fungieren.
Bereits beschrieben sind 5-Fluorouracil-konjugierte Chitosan- und Chitosamino-Oligosaccharide. Diese Konjugate zeigten *in vivo* einen wachstumsinhibierenden Effekt auf Tumorzellen (Met-A Fibrosarcoma, MH-134Y Hepatoma), wobei die starke Antitumoraktivität nicht von einer akuten Toxizität begleitet wurde, welche ebenfalls bei

hohen Dosierungen entfiel. Beide Konjugate sind heute klinisch zugelassene makromolekulare Prodrugs des 5-Fluorouracils [178].

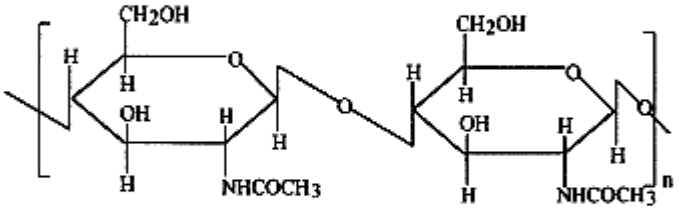
Im zweiten Teil dieser Veröffentlichung geht es um die Präparation von Chitosanfolien aus verschiedenen Chitosanen und deren Charakterisierung u.a. durch Diffusions- und Abbauexperimente sowie um deren Beladung mit einem *O*-2‘,3‘-Lävulinsäure-Derivate des 5-Fluorouridins. Wirkstoffbeladene Chitosanfolien sind im Hinblick auf eine topische Anwendung bei (Tumor-) Erkrankungen der Haut interessant, vor allem jedoch unter dem Gesichtspunkt einer permeationskontrollierten transdermalen Wirkstoff-freisetzung.
Ein auf Chitosanmembranen basierendes transdermales Drug Delivery System zur Freisetzung von Propranololhydrochlorid, einem Betablockers u.a. zur Behandlung von Bluthochdruck, konnte bereits erfolgreich synthetisiert werden und ist beschrieben. Die Freisetzung des Wirkstoffes durch dieses System erfolgte zuverlässig und führte zu reproduzierbaren Ergebnissen [176].

Chitosan ist ein interessantes und vielseitig einsetzbares Biopolymer. Es stellt ein lineares, stickstoffhaltiges Polysaccharid natürlichen Ursprungs dar, welches aus ß(1→4) verknüpften 2-Acetamido-2-desoxy-ß-D- und 2-Amino-2-desoxy-ß-D-glucopyranose-Einheiten besteht [178, 179] und durch partielle Deacetylierung infolge einer alkalischen Behandlung von Chitin, einem in der Natur weit verbreiteten Stoff [178], synthetisiert werden kann [180, 181]. Prinzipiell handelt es sich bei Chitosan um das *N*-deacetylierte Material des Chitins. Chitin, bestehend aus der ß(1→4)-verknüpften monomeren Einheit 2-Acetamido-2-desoxy-ß-D-glucopyranose, ist ein Mucopolysaccharid und fungiert in der Natur, wie beispielsweise Cellulose, als ein strukturelles Polysaccharid [176]. Es bildet das Strukturelement des Exoskelets der Crustaceae (Krebs, Schrimps, etc.) und ist im Weiteren als natürlicher Bestandteil in Insekten und einigen Pilzen vorhanden [178, 179]. Abbildung 2 stellt die strukturellen Details des Chitins und Chitosans sowie der Cellulose dar.

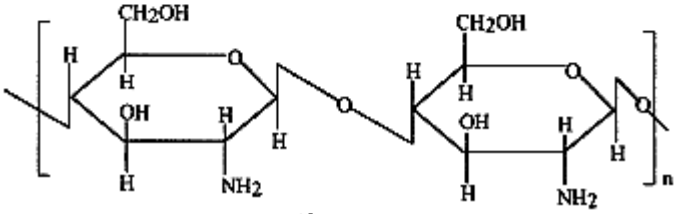
Immobilization of 5-Fluororuridine on Chitosan



Cellulose



Chitin



Chitosan

Abbildung 2: Struktur von Chitosan, Chitin und Cellulose [176].

Die meisten Polymere stellen synthetische Materialen dar und sind aufgrund dessen stärker in ihrer Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit eingeschränkt als natürliche polymere Strukturen. Insbesondere Chitosan und Chitin eignen sich für eine Anwendung als funktionelle Materialen, da beide natürlichen Polymere herausragende Eigenschaften im Bereich der Biokompatibilität und -degradierbarkeit aufweisen, sowie adsorptive Eigenschaften, bei gleichzeitig nicht vorhandener Toxizität [176].

Unzählige Veröffentlichungen befassen sich mit Chitosan und dessen Einsatz auf verschiedenen Gebieten. Insbesondere im Bereich der Agrarkultur, Industrie und Medizin stellt es sich aufgrund vieler besonderer Qualitäten und Vorzüge als einzigartiges Biomaterial dar. Zu den Eigenschaften des Chitosans gehören eine immunstimulierende, antikoagulative, antibakterielle und fungizide Wirkung sowie eine wundheilungsfördernde Disposition [178]. Es findet Verwendung als Ingrediens in der Lebensmittelindustrie, dient in der Kosmetikindustrie als Feuchtigkeitsfaktor und spielt

Immobilization of 5-Fluororuridine on Chitosan

als pharmazeutischer Zusatz in der Biomedizin eine wichtige Rolle [181]. Die Liste an Beispielen für den Gebrauch des Chitosans ließe sich unendlich fortsetzten.
Die funktionellen Eigenschaften sowie die biologische Aktivität des Chitosans sind stark abhängig vom Grad der Polymerisation und der Rest-*N*-Acetylierung sowie dem Vorhandensein von positiven Ladungen, der Ladungsverteilung und -dichte, aber auch von der Natur chemischener Modifikationen [178, 182].
Beim enzymatischen Abbau von Chitosan entstehende Oligomere stehen unter Verdacht Wundheilungsprozesse zu begünstigen [176]. Derivate des Chitosans können durch lysosomale Enzyme abgebaut werden, was diese besonders interessant als Träger von Wirkstoffen erscheinen lässt [176]. Aufgrund struktureller Ähnlichkeit mit Glycosaminoglycan kommt Chitosan das Potential zu, als Basismaterial für künstlichen Hautersatz zu fungieren. So zeigte Chitosan in einem Komplex mit Gelatine adhäsive Eigenschaften an subkutanes Fettgewebe [176]. Es ist sowohl mit gesunder, als auch kranker menschlicher Haut biokompatibel und verursacht keine Irritationen oder allergischen Effekte [178].
Die antibakterielle Eigenschaft des Chitosans gegenüber diversen Gruppen von Mikroorganismen ist abhängig vom Molekulargewicht und Deacetylierungsgrad und konnte bisher aufgrund der eingeschränkten Löslichkeit des Chitosans nur in sauren Medien gezeigt werden, in denen die Aminogruppen des Polymers in protonierter Form vorliegen. Es wurde bisher nicht eindeutig geklärt, ob das Vorhandensein von ungeladenen Aminogruppen zum selben Effekt führt [181]. Man vermutet, dass eine Bindung der kationischen Gruppen des Chitosans an die anionischen Gruppen der Mikroorganismen zur Inhibition des Wachstums führt. Chitosan hemmt bereits ab einer Konzentration von < 0.025 % das Wachstum von *E. coli*. Es ist im Weiteren aktiv gegen einige Gattungen von Schimmelpilzen (Fusarium, Alternaria) sowie gegen eine parasitäre Gattung von Pilzen aus der Familie der Schwarzpilze (Helminthosporium) [176].

Aufgrund der Aminogruppen handelte es sich bei Chitosan um ein basisches Polysaccharid. Die Anwesenheit dieser reaktiven primären Amino-Gruppen verleiht dem Polymer spezielle Eigenschaften. So bildet Chitosan Polyoxylate und mit gegensätzlich geladenen Polymeren Polyelektrolytkomplexe, zudem Filme und Chelatkomplexe. Dabei werden die verschiedenen Eigenschaften durch das Molekulargewicht und den Grad der

Deacetylierung des Biopolymeres bestimmt. Auch die chemische Reaktivität des Chitosans wird durch das Vorhandensein der Aminogruppen bestimmt. So unterliegt es für Amine typischen Reaktionen, wie *N*-Acylierung und Schiff-Reaktionen [176, 179].
Die Löslichkeit des Chitosans ist auf saure wässrige Medien mit einem pH-Wert vom < 6,5 beschränkt, hängt jedoch stark von Parametern wie dem Deacetylierungsgrad und der Anzahl an protonierten Amino-Gruppen ab. In alkalischen oder neutralen Medien ist Chitosan nicht löslich [179]. Beim Lösen werden die Amino-Gruppen der Glucosamin-Einheiten protoniert und das gelöste Polysaccharid liegt positiv geladen vor – Chitosan verhält sich somit in Lösung wie eine Polykation [180, 182]. Aus der polymeren kationischen Struktur resultiert zudem die Gel- und Film-bildende Eigenschaft dieses Biopolymeres [180].

Für die Immobilisierung von 5-Fluorouridin an Chitosan und Chitosanfolien ist zunächst eine chemische Funktionalisierung der monomeren Verbindung erforderlich gewesen. Diese bestand in der Einführung eines *O*-2‘,3‘-Ketal-Linker durch Überführung des 5-Fluorouridins in ein *O*-2‘,3‘-Ethyllävulinat (s. Abbildung 3, Verbindung **2a**) [53, 128]. Das *O*-2‘,3‘-Ethyllävulinat wurde im weiteren Verlauf entweder direkt zum kupplungsaktiven Säure-Derivat (Verbindung **2b)** verseift oder zunächst weiter durch Alkylierung mit Farmesylbromid in *N*(3)-Position farnesyliert (Verbindung **2c)**, welches anschließend zur kupplungsaktiven Verbindung (**2d)** verseift wurde. Die kupplungsaktiven Derivate des 5-Fluorouridins sowie deren Vorstufen sind in Abbildung 3 dargestellt.

Immobilization of 5-Fluororuridine on Chitosan

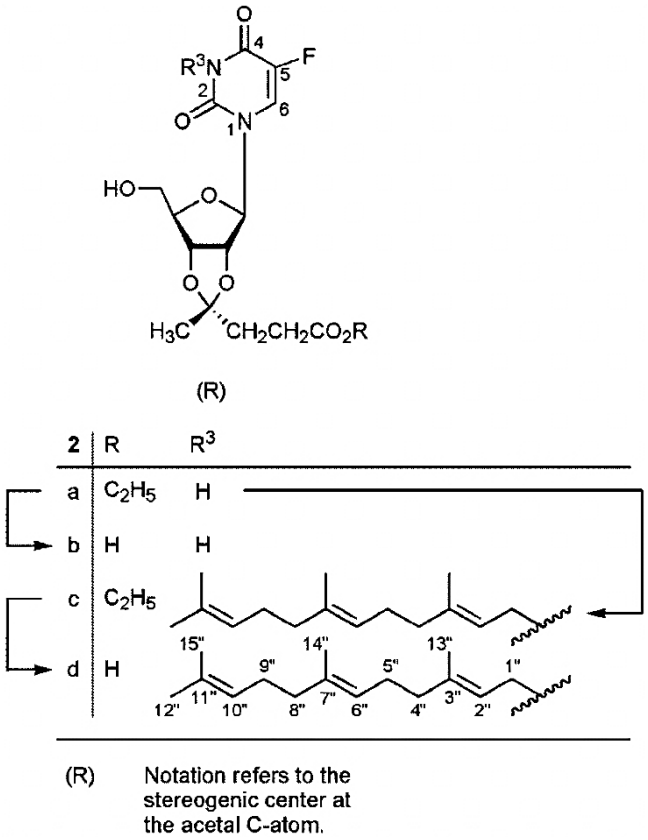


Abbildung 3: Synthetisierte Derivate des 5-Fluorouridins.

Die funktionalisierten 5-Fluorouridin-Derivate **2b** und **2d** wurden in einer Reihe von Experimenten an Chitosane verschiedener Herkunft und Molekulargewichte über eine Amidbindung immobilisiert. Eine Besonderheit unter den gewählten Chitosanen stellt das wasserlösliche Chitosan-Oligomer mit einem Molekulargewicht von 1.1 kDa dar, bei welchem es sich um wasserlösliches Material handelte.

In ersten Experimenten zur Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen wurde Verbindung **2b** (s. Abbildung 3; in Abbildung 4 Verbindung **3a**) an ein Chitosan mit einem Molekulargewicht von 12.0 kDa und einem Deacetylierungsgrad von 0.75 bei verschiedenen pH-Werten (wässrige HAc-Lösung mit pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5) über eine Carbodiimid (EDC)-vermittelte Kupplung immobilisiert (s. Abbildung 4). Das gewonnene Material (s. Abbildung 3 Verbindung **6**) musste mittels intensiver Dialyse aufgereinigt und für eine anschließende Analyse lyophilisiert werden.

Immobilization of 5-Fluororuridine on Chitosan

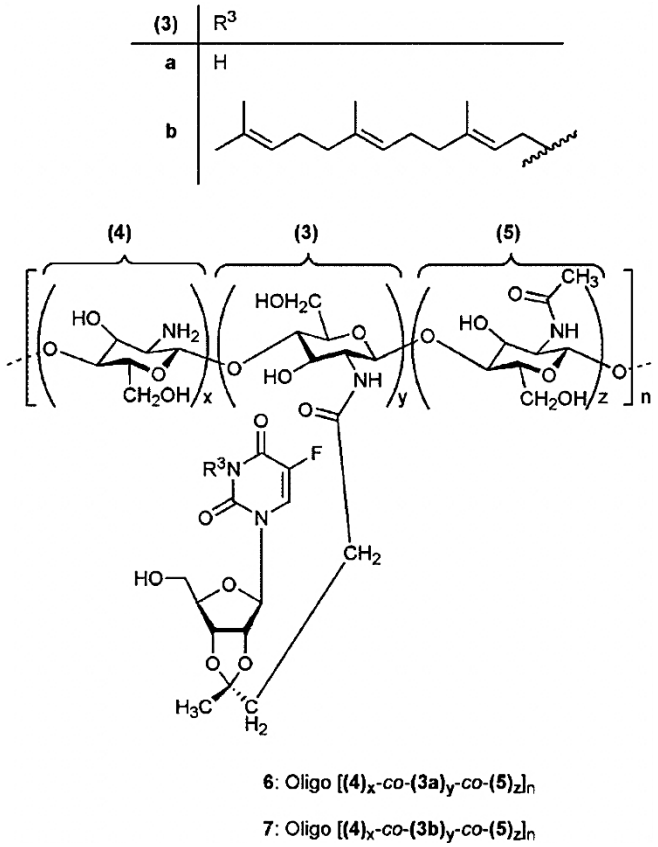


Abbildung 4: Synthetisierte 5-Fluorouridin-Chitosan-Konjugate.

Die Menge an immobilisiertem 5-Fluorouridin (Ligandenkonzentration) wurde für jede Probe mittels UV-Spektroskopie bestimmt. Notwendig war hierfür eine vorherige Hydrolyse des Materials in 6 N HCl. Die hierfür benötigte Reaktionszeit betrug 1 h bei 100° C [183]. In Tabelle 1 sind die Reaktionsbedingungen der durchgeführten Kupplungen sowie die ermittelten Ligandenkonzentrationen aufgeführt.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, verlief eine Kupplung der Verbindung **2b** an ein nicht-wasserlösliches Chitosan mit einem Molekulargewicht von 12 kDa nur in einem pH-Wertbereich von 4 bis 5. Bei einem pH-Wert von 3.5 und 5.5 war hingegen die Kupplung nicht bzw. nur eingeschränkt möglich. Eine denkbare Erklärung dafür ist die Protonierung der NH_2-Gruppen bei niedrigen pH-Werten, so dass diese für eine Reaktion nicht mehr zur Verfügung standen. Die Durchführung der Kupplungsreaktion bei einem pH-Wert von 5.5 führte hingegen wahrscheinlich zu einer Deprotonierung der Verbindung **2b**, so dass diese folglich in Form eines unreaktiven Carboxylates an der Reaktion nicht mehr teilnehmen konnte.

Immobilization of 5-Fluororuridine on Chitosan

Tabelle 1: Reaktionsbedingungen und Ligandenkonzentrationen der synthetisierten 5-Fluoro-uridin-Chitosan-Konjugate.

Chitosan M_n [kDa]	pH (aq. HAc)	Ligand(en) (5-Fluorouridin-Derivat, ATTO dye)	Ligandenkonzentration [mg 5-Fluorouridin-Derivat/g modifiziertes Chitosan]	Beladungsgrad[6]
1.1	5.0	**2b**	443.5	4
1.1	5.0	**2b** + ATTO-488	212.1	8
1.1	5.0	**2d**	383.0; 1412.4[1])	6; 2
1.1	5.0	**2d** + ATTO-488	606.7[1])	3
12.0	5.5	**2b**	0	-
12.0	5.0	**2b**	86,8	25
12.0	4.5	**2b**	85.7	25
12.0	4.0	**2b**	141.6	15
12.0	3.5	**2b**	7.3	290

Aufgrund der Empfindlichkeit des Materials fand die Immobilisierung der Verbindung **2b** an oligomeres Chitosan mit einem Molekulargewicht von 1.1 kDa nur bei einem pH-Wert von 5.0 statt. Auch im Fall dieser synthetisierten Konjugate erfolgte die Bestimmung der Ligandenkonzentration über UV-Spektroskopie. Da es sich bei dem synthetisierten **2b**-Konjugat um ein wasserlösliches Produkt handelte, entfiel hier die vorherige Hydrolyse des Materials. Die Ligandenkonzentration wurde stattdessen über den Extinktionskoeffizienten der Verbindung **2a** (ε_{267}, 12.400 $M^{-1}cm^{-1}$) ermittelt und betrug 443.5 mg Ligand/g modifiziertes Chitosan (s. Tabelle 1). Zusätzlich wurde mittels ^{1}H-DOSY-NMR-Spektroskopie die Immobilisierung des Derivates **2b** an oligomeres Chitosan überprüft und bewiesen.

Ferner erfolgte die Kupplung der Säure **2d** an oligomeres Chitosan, welche *in situ* aus dem farnesylierten 5-Fluorouridin-Derivat **2c** dargestellt wurde. Die Reaktions-bedingungen der Kupplung entsprachen den oben beschriebenen, allerdings wurde in

[6] Gibt die Häufigkeit der Aminogruppen-Beladung an: Jede 4., jede 8., usw. Aminogruppe trägt einen Liganden.

Immobilization of 5-Fluororuridine on Chitosan

einem zweiten Ansatz aufgrund der mangelnden Löslichkeit von Verbindung **2d** ein Lösungsmittelgemisch aus aq. HAc (pH 5.0) und p-Dioxan (1:1, v/v) verwendet. Das unter Normalbedingungen synthetisierte Produkt **7** (s. Abbildung 4) erwies sich mit einer Ligandenkonzentration von 383 mg Ligand/g modifiziertes Chitosan (s. Tabelle 1) als wasserlöslich. Die Kupplung im Lösungsmittelgemisch mit p-Dioxan führt hingegen zu einer signifikant höheren Beladung mit dem Liganden (1.412 mg Ligand/g modifiziertes Chitosan) und einem Material, das nicht mehr wasserlöslich gewesen ist.

Im Rahmen von geplanten biologischen Tests erfolgte die Darstellung von Fluoreszenzfarbstoff-gelabelten Chitosan-5-Fluorouridin-Konjugaten (s. Abbildung 5). Immobilisiert wurde jeweils die Verbindung **2b** oder **2d (**in Abbildung 5 Verbindung **3a** und **3b**) an oligomeres Chitosan und zusätzlich der wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoff ATTO-488 in seiner *N*(9)-Butanoat-Form. Die Reaktion erfolgte in Form einer sequenziellen Kupplung, welche ebenfalls durch EDC vermittelt wurde (Verlauf und Details der sequentiellen Kupplung siehe Veröffentlichung). Diese sequentielle Kupplungsstrategie sollte eine Beladung des niedermolekularen Polymers entweder nur mit dem sperrigen Fluorophor oder nur mit dem Ligand verhindern.

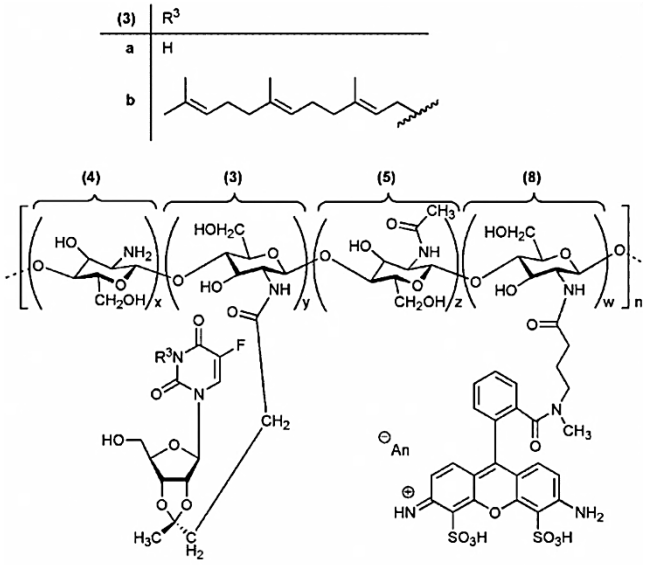


Abbildung 5: Synthetisierte 5-Fluorouridin-Chitosan-Konjugate, gelabelt mit ATTO-488.

.

Immobilization of 5-Fluororuridine on Chitosan

Nach erfolgter Dialyse (s. Abbildung 6) und Lyophilisation (s. Abbildung 7) wurden die wasserlöslichen Konjugate **9** und **10** erhalten, deren Ligandenkonzentrationen ebenfalls mittels UV-Spektroskopie über den Extinktionskoeffizienten der Verbindung **2c** (ε_{268}, 11.250 $M^{-1}cm^{-1}$) ermittelt wurde (s. Tabelle 1 Eintrag 2 und 4). Zu beobachten war, dass die gleichzeitige Immobilisierung des Fluorophors eine deutliche Verringerung der Konzentration des Liganden zu Folge hatte.

Abbildung 6: Synthetisiertes Konjugat **9** nach erfolgter Dialyse.

Abbildung 7: Synthetisiertes Konjugat **9** nach Lyophilisation.

Chitosanfolien können aus leicht sauren Lösungen hochmolekularer Chitosane hergestellt werden [184]. Die Herstellung von reißfesten und flexiblen Folien erfolgte aus Chitosanen verschiedener Molekulargewichte (14.0 kDa, 34.0 kDa, 82.0 kDa und 20-200 kDa). Hierfür wurden diese jeweils in verschiedenen Gemischvarianten, bestehend aus Wasser, Essigsäure oder Ameisensäure und Methanol oder p-Dioxan, gelöst und anschließend zum Abdampfen der Lösungsmittel in Petri-Schalen aus Glas (Ø 90 mm) überführt. Eine abschließende Nachbehandlung in Form einer Neutralisation mit wässriger NaOH-Lösung und extensivem Waschen mit Wasser führte in den meisten Fällen zu einem verwendbaren Material. Tabelle 2 fasst die Reaktionsbedingungen und Ergebnisse erfolgreicher Ansätze zusammen.

Immobilization of 5-Fluororuridine on Chitosan

Tabelle 2: Gewählte Reaktionsbedingungen für die Herstellung von Chitosanfolien.

Eintrag	M_n [kDa]/ Menge [mg]	H_2O [ml]	HAc [ml]	HCOOH [ml]	MeOH [ml]	v/v/v Lösungs-mittel-verhältnis	PEG 200 [ml]	PEG 6.000 [g]	Beschaffenheit der Folie
E	14.0/100	8	1	-	1	8:1:1	-	-	flexibel, reißfest
J	82.0/500	40	5	-	5	8:1:1	-	-	glatte Oberfläche
K	82.0/500	40	5	-	5	8:1:1	5	-	flexibel, reißfest
P[1)]	20-200/400	24	-	8	8	6:2:2	-	-	flexibel, reißfest
Q[2)]	20-200/400	24	-	8	8	6:2:2	-	-	flexibel, reißfest
T	20-200/400	24	-	8	8	6:2:2	-	0.3	trüb, reißfest

[1)] Die Mischung wurde in eine Petrischale überführt → Dicke der Chitosanfolie ≈ 1.0 mm.
[2)] Die Mischung wurde auf zwei Petrischalen verteilt → Dicke der Chitosanfolie ≈ 0.5 mm.

Rasterelektronmikroskopische Aufnahmen der Chitosanfolienoberflächen zeigten, dass reißfeste und stabile Chitosanfolien (s. Abbildung 8) eine ebene und dichte Oberfläche besitzen.

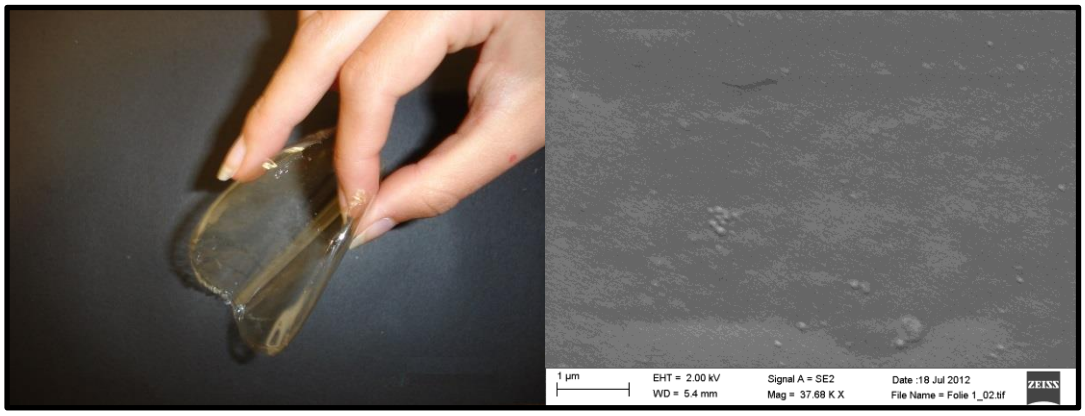


Abbildung 8: Chitosanfolie, hergestellt aus Material mit breiter Molekulargewichtsverteilung (20-200 kDa) und rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche der gezeigten Chitosanfolie.

Fand hingegen eine Zugabe von Polyethylenglykol (PEG 6.000) als Additiv während des Herstellungsprozesses statt (Details siehe Exp. Teil der Veröffentlichung), so waren die hergestellten Chitosanfolien weiterhin flexibel und mechanisch stabil, zeigten allerdings im Rasterelektronenmikroskop eine raue und poröse Oberfläche (s. Abbildung 9).

Immobilization of 5-Fluororuridine on Chitosan

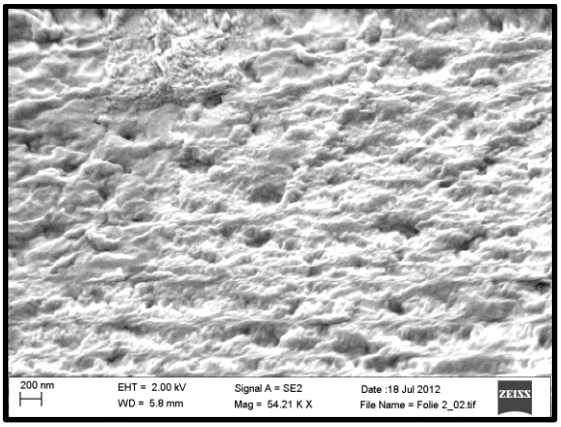


Abbildung 9: Rasterelektronischenmikroskopische Aufnahme einer Chitosanfolie, die mit Zugabe von PEG 6.000 hergestellt wurde.

Aufgrund dieser Beobachtung wurden die Chitosanfolien aus den Experimenten J, K, Q und F auf vorhandene Permeabilität hin untersucht. Beobachtet wurde das Diffusionsverhalten des wasserlöslichen Farbstoffs Rhodamin B (Absorptionsmaximum 550nm) durch die ausgewählten Folien in einer Franz-Diffusionszelle (s. Abbildung 10).

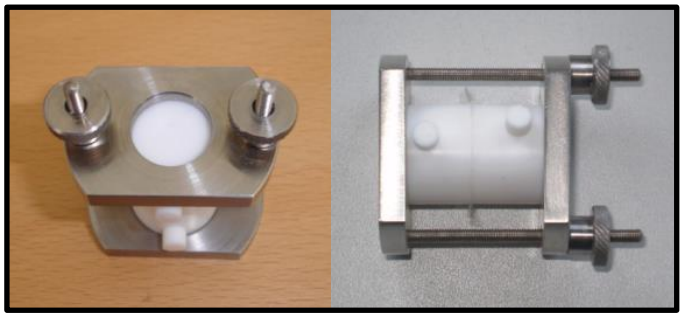


Abbildung 10: Franz-Diffusionszelle mit zwei Kammern aus Teflon à 1,5 ml Fassungsvolumen.

Die jeweilige Folie wurde zwischen beiden Kompartimenten der Franz-Diffusionszelle fixiert. Nach Füllung des linken Kompartiments (Donor-Zelle) mit wässriger Rhodamin B-Lösung und Füllung des rechten Kompartiments (Akzeptorzelle) mit purem Wasser erfolgte alle 4 Minuten eine Probenentnahme aus der Akzeptorzelle und Aufnahme eines Vis-Spektrums, so dass eine zunehmende Absorption aufgezeichnet werden konnte (s. Abbildung 11).

Immobilization of 5-Fluororuridine on Chitosan

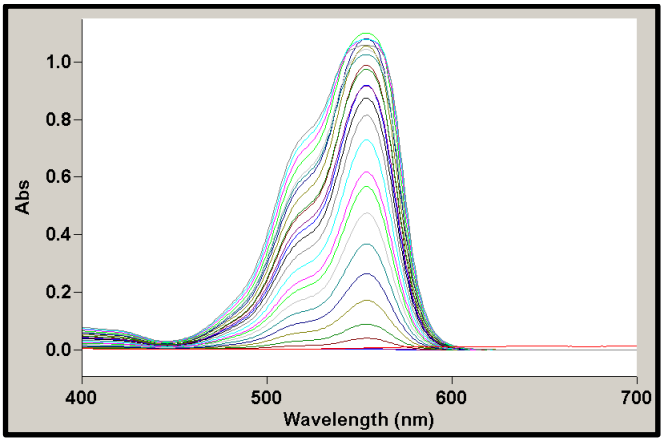


Abbildung 11: Vis-Spektren der entnommenen Proben aus der Akzeptorzelle. Verwendet wurde Chitosanfolie aus dem Experiment J (s. Tabelle 2).

Die Darstellung des Absorptionsmaximums von Rhodamin B als Funktion der Zeit zeigte in jedem Experiment ein logistisches Wachstum (s. Abbildung 12). Die Dauer der lag-Phase steht im Zusammenhang mit der Dicke der jeweiligen Folie und ist bei allen Produkten identisch gewesen.

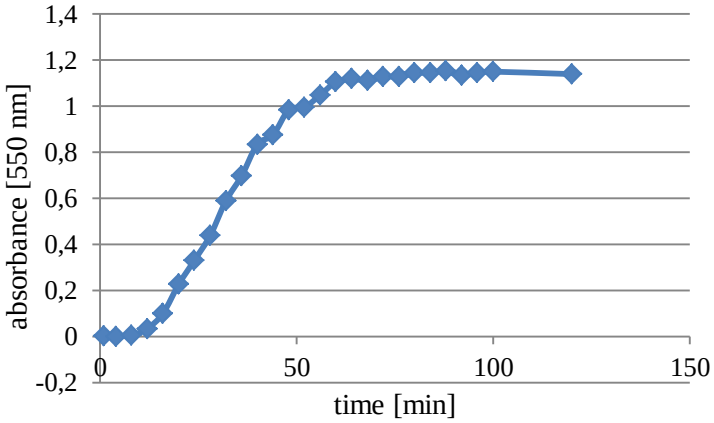


Abbildung 12: Absorptionsmaximum von Rhodamin B bei 550 nm dargestellt als Funktion der Zeit.

Aus den ermittelten Kurven wurde die Diffusionsrate von Rhodamin B durch die jeweilige Folie bestimmt. Die berechneten Werte sind in Tabelle 3 aufgeführt. Interessanterweise ist zu beobachten gewesen, dass eine Zugabe von PEG während der Folienherstellung die Diffusionsrate des Farbstoffes erhöhte. Dieses Ergebnis war kongruent mit rasterelektronmikroskopischen Aufnahmen, welche eine poröse Struktur

Immobilization of 5-Fluororuridine on Chitosan

bei Folien zeigten, die mit PEG als Additiv hergestellt wurden (für Beispiel siehe Abbildung 9).

Tabelle 3: Diffusionsraten von Rhodamin B durch verschiedene Chitosanfolien. Bei der Herstellung von Chitosanfolien in den Experimenten K and T wurde PEG als Additiv verwendet.

Chitosanfolie aus Experiment	Diffusionsrate [ΔA_{550}/min]
J	0.0266
K	0.0346
Q	0.0457
T	0.0530

Die Immobilisierung der Säure **2b** an Chitosanfolien erfolgte nach demselben Prinzip wie es im Falle der löslichen Chitosane beschrieben wurde. Für die Kupplung wurden in Wasser gequollene Chitosanfolien aus den Experimenten P (10x10x1 mm Stück) und Q (10x10x0,5 mm Stück) verwendet. Tabelle 4 stellt eine Zusammenfassung der verschiedenen Reaktionsbedingungen für die Immobilisierung von **2b** dar.

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen für die Kupplung von Verbindung **2b** an Chitosanfolien.

Chitosanfolie	Verwendet Menge **2b** [mmol]	pH-Wert	Zeit [Tage]	Ligandenkonzentration [mg Ligand/g modifizierte Chitosanfolie]
P	0.4	5.0	1	44.5
Q	0.4	4.0	2	94.8
Q	0.2	4.0	4	69.6
Q	0.2	5.0	4	96.3

Die Konzentration des Liganden wurde, nach erfolgter Hydrolyse des Produktes, ebenfalls über UV/Vis-Spektroskopie bestimmt (Details siehe Exp. Teil der Veröffentlichung). Es zeigte sich, dass im Falle der Immobilisierung der Säure **2b** an Chitosanfolien eine maximale Beladung von 96,3 mg Ligand/g modifizierte Chitosanfolie, nach einer Reaktionszeit von 4 Tagen bei einem pH-Wert von 5.0, erreicht werden konnte.

Immobilization of 5-Fluororuridine on Chitosan

Alle Kupplungsreaktionen wurden im sauren Medium durchgeführt. Um optimale Reaktionsbedingungen generieren zu können, war die Überprüfung der Säurestabilität des *O*-2‘,3‘-Ketal-Linkers des 5-Fluorouridin notwendig. Hierfür erfolgte die Ermittlung der Halbwertszeit von Verbindung **2a**, welche durch Hydrolyse (Inkubation in 1 N aq. HCl/MeCN-Lösung (1:1, v/v) mit anschließender Neutralisation durch Zugabe von Et_3N) und anschließender Analyse der Probe mittels *RP-18* HPLC, erfolgte (Details siehe Exp. Teil der Veröffentlichung). Das erstellte Elutionsprofil (s. Abbildung 13) zeigte eine ansteigende Konzentration an 5-Fluorouridin (Signalintegral bei 1 Min) und einen zunehmenden Abbau von Verbindung **2a** (Signalintegral um 2,5 Min), bzw. des *O*-2‘,3‘-Ketals. Eine Degradierung zur Nukleobase 5-Fluorouracil (Signalintegral < 1 Min) konnte hingegen nicht beobachtet werden.

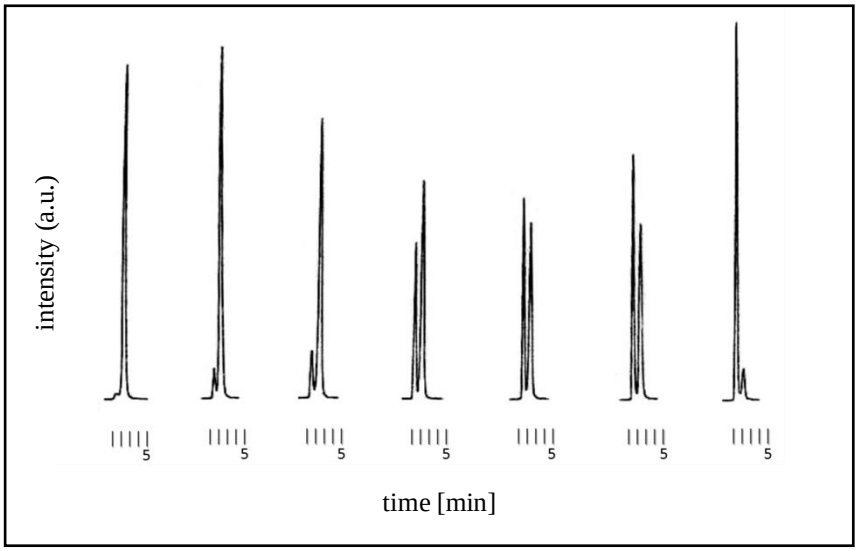


Abbildung 13: *RP-18* HPLC-Profil der Hydrolysereaktion von Verbindung **2a** in aq. HCl/MeCN 1:1 (v/v). Für Details siehe Exper. Teil.

Die Halbwertszeit für Verbindung **2a** wurde aus einer graphischen Darstellung der 5-Fluorouridin-Signalintegrale gegen die Zeit der Hydrolyse (s. Abbildung 14) ermittelt und betrug ca. 300 Minuten.

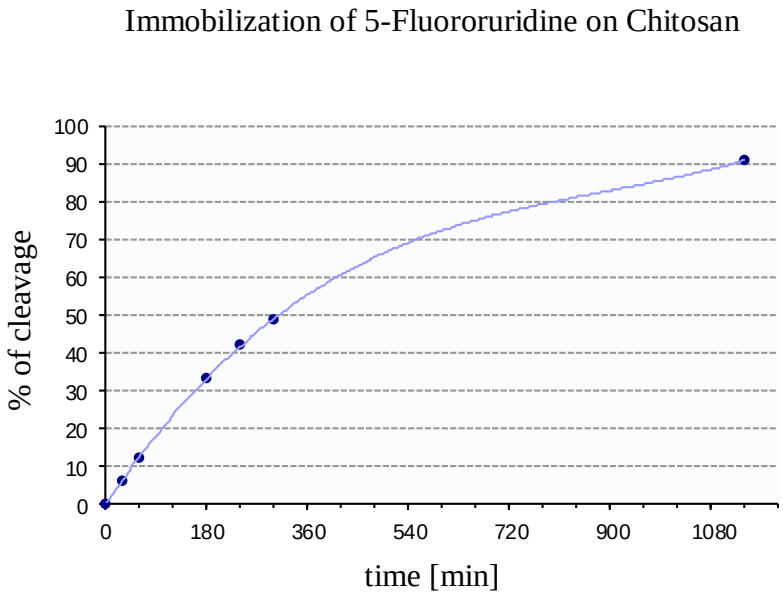


Abbildung 14: *RP-18* HPLC-Analyse der prozentualen Spaltung des Ketals der Verbindung **2a** in aq. HCl/MeCN 1:1 (v/v) als Funktion der Zeit.

Enzymatische Abbauexperimente mit Chitosanase aus *Streptomyces sp. 174* sollten zeigen, dass es sich sowohl bei den hergestellten Folien, als auch bei den modifizierten Folien, die ja wieder re-acylierte Verbindungen darstellen, weiterhin um Chitosane handelte. Der enzymatische Abbau erfolgte in einer Franz-Diffusionszelle, deren Kompartimente durch eine Dialysemembran (MWCO 1.000 Da) separiert wurden. Das linke Kompartiment wurde mit Wasser, einem Stück unmodifizierter Chitosanfolie (4x4x1 mm) und der Enzymlösung (5 µl, 30 U/mg) befüllt, das rechte Kompartiment enthielt nur Wasser. Die Franz-Diffusionszelle wurde für mehrere Tage bei 37° C aufbewahrt, wobei der Inhalt der linken Kammer in regelmäßigen Abständen auf das Vorhandensein der Chitosanfolie hin überprüft wurde. Nach einem Zeitraum von etwa zwei Tagen konnte die unmodifizierte Chitosanfolie nicht mehr vorgefunden werden.
Der Abbau von 5-Fluorouridin-beladener Chitosanfolie (Folie Q, siehe Tabelle 4 vierter Eintrag) durch Chitosanase aus *Streptomyces sp. 174* wurde ebenfalls in einer Franz-Diffusionszelle beobachtet und wurde über 10 Tage durch UV/Vis-Spektroskopie verfolgt. Hierfür wurde der Inhalt der Akzeptorzelle regelmäßig auf eine zunehmende Absorption (Absorptionsmaximum lag bei 268 nm) im UV-Spektrometer hin überprüft. Abbildung 15 stellt den Verlauf des enzymatisch-katalysierten Abbaus der modifizierten Chitosanfolie Q graphisch dar.

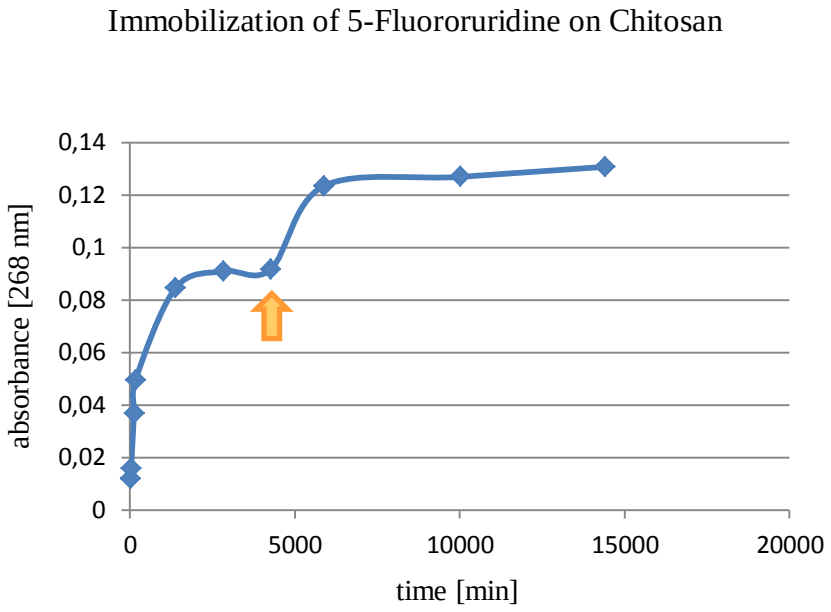


Abbildung 15: Chitosanase-katalysierte Degradierung eines 5-Fluorouridin-Chitosanfolie-Kojugates (Folie Q). Dargestellt sind die Absorptionsmaxima (bei 268 nm) des Akzeptorzelleninhaltes der Franz-Diffusionszelle als Funktion der Zeit. Der Pfeil markiert die Zugabe einer zweiten Portion Enzymlösung.

Aus dem Kurvenverlauf geht hervor, dass nach vier Tagen keine weitere Zunahme in der Absorption zu verzeichnen gewesen ist. Grund dafür ist entweder ein Verlust der Aktivität des Enzyms durch längere Reaktion bei 37° C gewesen oder eine einsetzende Produktinhibition. Eine erneute Zugabe frischer Enzymlösung führte zu einem weiteren Abbau der modifizierten Chitosanfolie. Ein Ende der Abbaureaktion durch Chitosanase konnte nach 240 Stunden verzeichnet werden.

Colloid bonded Medical Compounds (Patent)

Edith Malecki, Helmut Rosemeyer

Europäische Patentanmeldung EP 12186555.4; 28.09.2012

Colloid bonded Medical Compounds (Patent)

Im Folgenden wird ein zentraler Aspekt unseres Patentes „Colloid-bonded Medical Compounds“ beschrieben.

Angelehnt an das Prinzip der Oligo-Nukleotid-Synthese (DNA-Festphasen-Synthese) haben wir eine Methode entwickelt und zum Patent angemeldet, mit welcher pharmakologisch aktive Wirkstoffe, bevorzugt nukleosidischer Struktur, an Hydroxyethylstärke (HES) immobilisiert werden können.
Der wichtigste Schritt der chemischen Oligo-Nukleotid-Synthese ist die Kupplung von Nukleosid-Einheiten. In diesem Zusammenhang hat sich die Kupplung über den Phosphoramidit-Weg als eine besonders effiziente Methode erwiesen und findet daher heutzutage breite Anwendung. Im Regelfall liegt das zu kuppelnde Nukleosid als reaktiver Phosphoramidit-Baustein vor, der mit Diisopropylamin-Abgangsgruppe und Cyanoethyl-Schutzgruppe sowie 4,4‘-Dimethoxytriphenylmethyl als P-O-, bzw. 5‘-OH-Schutzgruppe versehen ist [185].
Die Phosphoramidit-Methode bedient sich der Fest-Phasen-Methode, in welcher das wachsende Oligo-Nukleotid kovalent an eine (CPG) *C*ontrolled-*P*ore-*G*las-Matrix in einer Säule verankert ist und von entsprechenden Reagenzien durchströmt wird [185].
Charakteristisch für die Festphasen-Synthese ist ein Zyklus (s. Abbildung 1) aus 4 aufeinander folgenden Synthese-Schritten [186]:

- Detritylierung
- Kupplung
- Capping
- Oxidation

Die Kupplung eines (nukleosidischen) Wirkstoffs an HES erfolgt über eine reaktive Phosphoramidit-Gruppe an der Zuckereinheit eines nukleosidischen Bausteins, oder im Falle eines Wirkstoffes mit anderer Molekülstruktur, über eine entsprechend funktionalisierte OH-Gruppe und führt zur Ausbildung eines Phosphorsäure-Diesters als Bindeglied zwischen dem Polymer und Wirkstoffmolekül. Die entstandene Phosphodiesterbrücke sollte biochemisch unter enzymatischer Katalyse, vermittelt durch Enzyme der Phosphodiesterase-Superfamilie [187, 188], hydrolysierbar sein.

Colloid bonded Medical Compounds (Patent)

Im Rahmen unserer Entwicklung eines neuen Konzeptes zur Immobilisierung zunächst nur nukleosidischer Wirkstoffe an HES waren der Schritt der Kupplung über das Phosphoramidit-Derivat und die Oxidation des vorläufigen Kupplungsproduktes zum stabilen Produkt die primären Ziele.

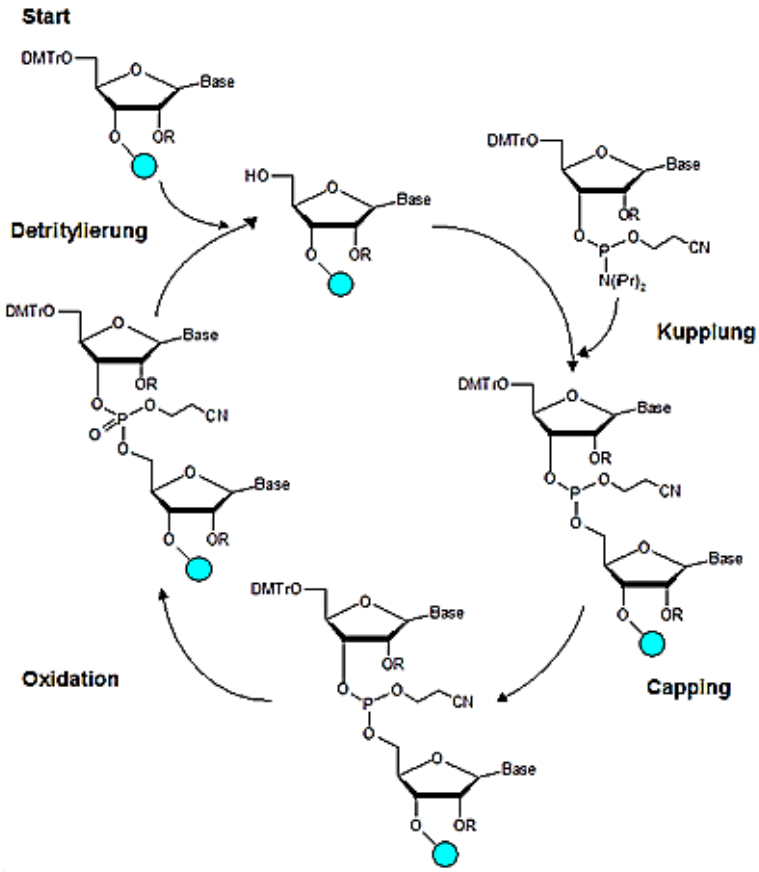


Abbildung 10: Die chemische DNA-Synthese verläuft, im Gegensatz zur biologischen, von 3‘- nach 5‘-Richtung. Start: Der vollständig geschützte Baustein wird mit seinem 3‘-Ende an CPG-Material (hier türkisfarbene Kugel) oder an ein Polymer (z.B. Polystyrol) gebunden. Detritylierung: Saure Abspaltung (z.B. mit Trichloressigsäure in Dichlormethan) der Tritylschutzgruppe und Generierung der freien 5‘-OH-Funktion. Kupplung: Reaktion zwischen aktivierter 3‘-Phosphoramiditfunktion der zu kuppelnden Base und mit freigesetzter 5’-OH-Gruppe des fixierten Bausteins. Die Reaktion erfordert einen Aktivator (z.B. Tetrazol oder Tetrazol-Derivate). Capping: Blockierung und dadurch Deaktivierung freier 5‘-OH-Gruppen nicht umgesetzter Phosphoramidite durch Acetylierung. Oxidation: Oxidation des entstandenen Phosphittriesters zum Phosphattriester mittels wässriger Jodlösung. Einsatz eines nicht-wässrigen Oxidationsmittels ist ebenfalls möglich. Nach Syntheseende: In einem Schritt erfolgende Abspaltung des Oligonukleotids von der festen Phase mit konz. Ammoniaklösung oder wasserfreier Alternative und Abspaltung vorhandener Basen-Schutzgruppen sowie Aufreinigung mittels einer geeigneten Methode [186].

Colloid bonded Medical Compounds (Patent)

Die heutigen Methoden der Oligonukleotid-Synthese gehen vor allem auf die Arbeiten von *Khorana, Letsinger* und *Caruthers* zurück. Über 30 Jahre wurden 3 Methoden für die DNA-Synthese entwickelt [189]:

- Phosphat-Diester-Methode
- Phosphat-Triester-Methode
- Phosphit-Triester-Methode

Ein Vorteil der Oligonukleotid-Synthesechemie ist ihre Flexibilität, da die einzelnen Syntheseschritte auf jedes Oligonukleotid individuell abgestimmt werden können [186]. Dies gilt insbesondere für die verschiedenen Reagenzien wie Aktivatoren und Oxidationsmittel der Reaktion, aber auch für die Schutzgruppen und deren Reagenzien zur Abspaltung. In unserem Fall wies diese Reaktion im Hinblick auf die an HES zu immobilisierenden Wirkstoffe noch einen weiteren Vorteil auf, da hier prinzipiell alle pharmazeutisch relevanten Wirkstoffe eingesetzt werden können, die in einen Phosphoramidit-Baustein überführbar sind. Die Flexibilität des Oligonukleotid-Synthese-Prinzips haben wir uns zu Nutze gemacht und verschiedene Wege der Synthese (Reaktor, One-Pot-Reaction) sowie Aktivatoren und Oxidationsmittel getestet, um die Phosphoramidit-Kupplungsreaktion an HES zu optimieren und zu studieren.
Die Aktivierung des Phosphoramidits durch typische Aktivatoren der Phosphoramidit-Kupplungsreaktion beinhaltet die nukleophile Katalyse und Bildung eines reaktiven Addukts. Die Phosphoramidit-Kupplungsreaktion (Phosphitylierung) selbst besteht in der nukleophilen Substitution der Amin-Einheit eines nukleosidischen Phosphoramidits durch die 5‘-OH-Funktion eines am Festkörper gebundenen Nukleosids [185], oder aber, wie in unserem Fall, durch eine OH-Funktion einer stringent getrockneten Hydroxyethylstärke. Diese Reaktion erfordert einen passenden Säure/Base-Aktivator, der zur bestmöglichen Kupplungs-Effizienz führt. Davon steht der chemischen Oligo-Nukleotid-Synthese eine ganze Reihe zur Verfügung. Nennenswerte Beispiele sind hier 1H-Tetrazol, 2,4-Dinitrophenol, 2-Bromo-4,5-Dicyanoimidazol, verschiedene Carbonsäuren, 4,5-Dicyanoimidazol, 5-Phenyltetrazol und Arylsulfonyl-Tetrazol [185]. Ein wichtiger Aktivator ist 1H-Tetrazol, ein als Säure reagierendes sekundäres Amin und Aktivator des HX-Typs [185, 199]. Erstmalig durch *Cartuhers* et al. verwendet [185],

zeigte sich 1H-Tetrazol (neben SMI) auch im Rahmen der Aktivierung eines nukleosidischen Phosphoramidits zur Kupplung an HES als sehr effizient. Während der Phosphitylierung spielt 1H-Tetrazol, wie prinzipiell alle Aktivatoren der Phosphoramidit-Kupplung, eine doppelte Rolle. Zum einen reagiert es als Säure und protoniert das Stickstoffatom der Amin-Abgangsgruppe, zum anderen reagiert es als Nukleophil und ersetzt die Isopropylamin-Einheit des protonierten Amidits, so dass infolge dessen ein hoch reaktives Tetrazolid-Intermediat generiert wird. Dieses durchläuft im Folgenden einen nukleophilen Angriff durch die 5‘-OH Gruppe des geschützten Nukleosid, was zum Phosphit-Produkt führt [185]. In unserem Fall erfolgt der nukleophile Angriff durch eine OH-Funktion der HES. Die besondere synthetische Herausforderung, im Rahmen der Immobilisierung eines nukleosidischen Wirkstoffs an HES über die Phosphoramidit-Methode, bestand in der Auswahl eines effizienten Aktivators, der als Säure zur Protonierung des Phosphoramidits funktioniert und gleichzeitig als Base, welche die Rolle eines guten Nukleophils (→ schnelle Umwandlung zum aktiven Intermediat) und einer guten Abgangsgruppe für die Bildung des Phosphit-Triesters übernehmen konnte. Ausschlaggebend für die Effizienz und Tauglichkeit eines Aktivators für unsere Reaktion war im Weiteren die Generierung von Nebenprodukte. Ein für die Phosphoramidit-Kupplung an HES geeigneter Aktivator muss das Kriterium einer ausreichend starken Säure erfüllen, um das Phosphoramidit aktivieren zu können, gleichzeitig muss der pK_a -Wert hoch genug sein, damit es nicht zur Entfernung der DMT-Schutzgruppe (5‘-OH-Schutzgruppe) am nukleosidischen Phosphoramidit-Baustein und folglich zur Generierung von Nebenprodukten kommt. Der pK_a des Aktivators spielt folglich bei der delikaten Balance zwischen gewollter Aktivierung und ungewollter De-Tritylierung des Phosphoramidits eine entscheidende Rolle [199].

Eine weitere synthetische Schwierigkeit der Phosphoramidit-Kupplungsreaktion an HES ist der Oxidierungsschritt, der in der Umwandlung des reaktiven Phosphors der Oxidationsstufe +III zu einem Phosphor mit Oxidationsstufe +IV besteht. Der zwingend erforderliche Schritt der Oxidation des Phosphit-Triester-Intermediates zu einem Phosphat-Triester besitzt ein hohes Risiko, da es dabei u.U. zur ungewollten Oxidation der Anhydroglucose-Einheiten der HES kommen kann. Somit sind sowohl die Wahl eines geeigneten Oxidationsmittels (Konzentration und Art), als auch der Oxidationszeitraums, von Bedeutung. In Bezug auf den Oxidationszeitraum besteht auf

Colloid bonded Medical Compounds (Patent)

der anderen Seite ebenfalls die Gefahr der unvollständigen Oxidation und Generierung eines H-Phosphonat-Derivates bei zu kurzen Reaktionszeiten oder bei Verwendung zu schwacher Oxidationsmittel.

Polysaccharide besitzen eine Reihe von Vorteilen in Bezug auf ihre Verwendung als kolloidaktives Trägermaterial von Wirkstoffen. Neben dem Vorhandensein funktioneller Gruppen, welche die Einführung von Modifikationen und eine Funktionalisierung der Moleküle ermöglichen, weisen diese eine hohe Biotolerierbarkeit und –abbaubarkeit sowie proteinabweisende Eigenschaften und Interaktionsmöglichkeiten mit spezifischen Zuckereinheiten als Rezeptoren auf. Stärke ist ein häufig vorkommendes natürliches Polysaccharid. Sie besteht aus einer Mischung zweier Polymere, bei denen es sich zum einen um Amylose, ein gradkettiges Polyglucan mit α-1,4-glykosidischen Bindungen handelt, zum anderen aus Amylopektin, eine durch zusätzliche α-1,6-Bindungen verzweigte Variante der Amylose [200].
Native Stärke ist schlecht wasserlöslich und weist stark die Tendenz auf zu „verkleistern“. Die Ursache hierfür liegt in inter- und intramolekularen Wechselwirkungen, die zwischen den einzelnen Glukoseeinheiten der Amylopektin-Moleküle herrschen [201].
Ein biomedizinisch relevantes Derivat der Stärke ist die bereits oben genannte wasserlösliche Hydroxyethylstärke (HES) (s. Abbildung 2), die als Trägermaterial im Rahmen unserer Phosphoramidit-Kupplung diente. HES ist ein semi-synthetisches Polysaccharid, das durch Reaktion von Stärke mit Ethylenoxid im alkalischen Medium gewonnen wird [200].

Colloid bonded Medical Compounds (Patent)

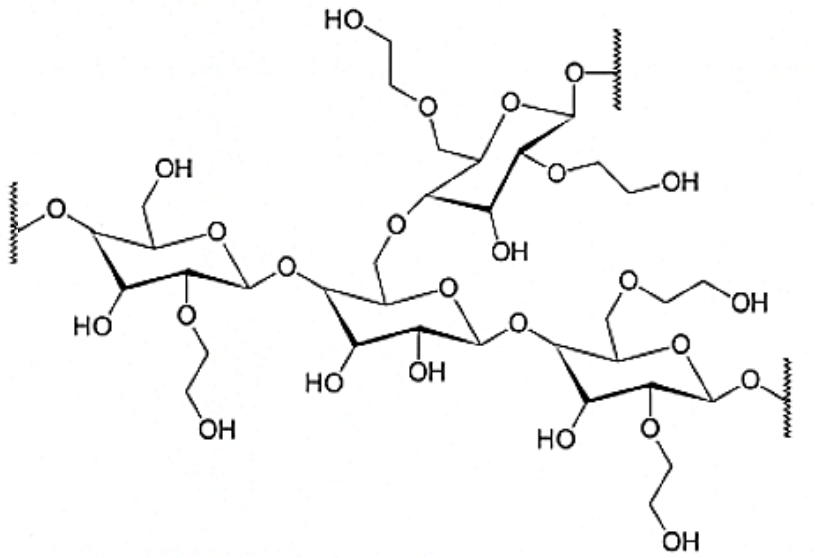


Abbildung 11: Struktur von HES. Monomere Anhydroglukose-Einheiten liegen zum größten Teil α(1→4)-verknüpft vor, α(1→6)-Verknüpfungen treten seltener auf, OH-Gruppen der C2-Gruppen sind überwiegend hydroxyethyliert, zusätzliche Hydroxyethylierung in C3- und C6-Position sind ebenfalls in geringem Umfang möglich.

Die Einführung von Hydroxyethylgruppen am Stärkemolekül stellt dabei eine Modifikation zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit dar. Die vorhandenen hydroxylierten Ethylengruppen wirken dabei als Störstellen und unterbinden die bestehenden Wechselwirkungen im Stärkemolekül [201]. HES ist eine hochpolymere Glukoseverbindung, welche aus Amylopektin-reicher und somit hochverzweigte Stärke, wie Wachsmaisstärke oder Kartoffelstärke, gewonnen wird [200, 202]. Grund dafür ist die hohe Strukturähnlichkeit des Amylopektins mit Glykogen, dem menschlichen verzweigten Glukosespeicherpolymer. Man vermutet, dass diese Strukturähnlichkeit für die mangelnde immunogene Aktivität der HES verantwortlich ist, welche eine ihrer besonderen Eigenschaften darstellt [200]. HES gehört, wie Dextran und Gelatine, zu den künstlichen kolloidalen Plasmaersatzstoffen und wird zur Therapie und Prophylaxe einer Hypovolämie bei Blut- und Plasmaverlusten verwendet. In diesem Zusammenhang findet es Einsatz im Rahmen von Operationen, Verletzungen und chirurgischen Eingriffen [202].

Neben der bereits genannten Erhöhung der Wasserlöslichkeit, verleiht das Vorhandensein von Hydroxyethylengruppen im Stärkemolekül dieser zusätzliche positive Eigenschaften. Hinzu kommt nicht nur eine erhöhte Stabilität in Lösung, sondern auch eine Erhöhung der *in vivo* Halbwertszeit. Native Stärke unterliegt einer

Colloid bonded Medical Compounds (Patent)

schnellen Degradierung durch im Serum vorliegende α-Amylase und besitzt daher eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten. Durch Hydroxyethylierung der Stärke wird die enzymatische Biodegradierung behindert [200], zudem wird dem Abbau von HES durch Phagozytose entgegengewirkt [201]. Dies führt insgesamt zu einer längeren Verweildauer im Blut [201]. Die Hydrolyse von HES erfolgt in unterschiedlichem Ausmaß, wobei die Geschwindigkeit des enzymatischen Abbaus durch den Substitutionsgrad und das C2/C6-Hydroxyethylierungsverhältnis einer HES beeinflusst wird. Dies hat folglich ebenfalls eine Auswirkung auf die Dauer des Verdünnungseffektes. Der Abbau eines HES-Moleküls geht langsamer von statten, je höher der Substitutionsgrad und das C2/C6-Verhältnis sind [202].

Zu den Hauptcharakteristika einer HES gehören das Molekulargewicht (M_w), die Molekulare Substitution (MS), welche das Verhältnis zwischen den hydroxyethylierten Molekülen und unmodifizierten Glucosemolekülen angibt und das C2/C6-Verhältnis, durch welches das (Hydroxyethylen-Einheiten-)Substitutionsmuster an den Kohlenstoffatomen der Anhydroglucose-Untereinheit beschrieben wird. Je nach Ausführung unterscheiden sich verschiedene HES in ihrer Pharmakologie (Halbwertszeiten, Dauer des Volumeneffektes, Posologie, Nebenwirkungen). Die Ausscheidung von HES erfolgt über den renalen Weg nach vorheriger Hydrolyse in kleinere Fragmente durch α-Amylase. Andere Exkretionswege sind unbedeutend [203].

HES ist nicht nur ein besonderes Polymer mit hervorragender Eignung als Plasmaersatzmaterial, sondern wird des Weiteren aufgrund seiner positiven Eigenschaften (Wasserlöslichkeit, kaum Hypersensitivität auszulösend, molekulare Masse und Biodegradierbarkeit und somit physikochemischen Eigenschaften können „zugeschnitten“ werden), als potentieller Ersatz für Polyethylenglycol (PEG) diskutiert [200, 204].

PEG wird häufig zur Stabilisierung von Nanopartikeln und Liposomen verwendet [200] sowie für die Herstellung von Protein-Konjugaten [204]. Das Ziel der „PEGylierung“ ist die Umgehung der Erkennung durch Abwehrsysteme des Organismus. Ein großer Nachteil dieser Methode stellt dabei die Förderung der Aufnahme durch phagozytisch-aktive Zellen dar. Die Partikel gelangen hier in die Lysosomen und werden aufgrund der fehlenden Biodegradierbarkeit sowie gegebenen Hydrophile des PEGs, zum Problem. Die daraus resultierende fehlende Eigenschaft des PEGs, die lysosomale Membran zu

Colloid bonded Medical Compounds (Patent)

passieren, führt zur Akkumulation der „PEGylierten“ Partikel und Beeinflussung lysosomaler Enzyme. Aufgrund dieser Problematik wird nach einem adäquaten Ersatz zu PEG gesucht und HES stellt aufgrund seiner molekularen sowie physikochemischen Eigenschaften einen potentiellen Ersatz dar [200].

Wir haben eine neue Art der Wirkstoffimmobilisierung an HES entwickelt und zum Patent angemeldet. Im Zentrum dieser steht die Bildung von Phosphodiesterbrücken. Angelehnt an das Prinzip der chemischen DNA/RNA-Synthese erfolgt die Immobilisierung nach der Phosphoramidit-Methode. Die Anwendung dieses Prinzips ist insbesondere für pharmazeutisch relevante Nukleoside geeignet. Eine Immobilisierung von Pharmaka anderen Strukturtyps ist ebenfalls möglich, wenn diese in ein Phosphoramidit-Synthon zu überführen sind. Besonders interessante Targets der „HESylierung“ stellen Wirkstoff dar, die eine unzureichende Pharmakokinetik bezüglich ihrer Bioverfügbarkeit und/oder Plasmahalbwertszeit aufweisen. In diesem Zusammenhang machen die besonderen Eigenschaften der HES diese zu einem idealen Wirkstoff-Carrier und Edukt für unsere Reaktion. Unser Ziel ist es, auf diesem Wege die Erhöhung der *in vivo*-Halbwertszeit von Wirkstoffen zu bewirken. Man wünscht sich insbesondere bei cancerostatischen Wirkstoffen eine längere Verweildauer im Blut, da ein Transport des Wirkstoffs zum Tumor erfolgen muss [205]. Aber auch für hoch lipophile oder lipophilisierte (nukleosidische) Wirkstoffe, von denen man sich aufgrund der Applikationsform wasserlösliche Eigenschaften wünscht, ist diese Methode bedeutsam. Des Weiteren finden lipophilisierte Polysaccaride, aufgrund ihrer amphiphilen Natur, weite und interessante Anwendungsmöglichkeiten als Rheologiemodifikatoren, Emulsionsstabilisatoren, Oberflächenmodifizierer für Liposomen und Nanopartikel sowie (wie bereits erwähnt) als Trägermaterial für den Wirkstofftransport [200].

Literaturverzeichnis

[1] Die Welt, http://www.welt.de/109281692, abgerufen am 15.10.2012

[2] Galmarini C. M., Mackey J.R., Dumontet C. *Lancet Oncol.* **2002**, 3, 415-424.

[3] Nuhn P. *Naturstoffchemie*, 4. Auflage, **2006**, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, Kap. 8, S. 465-522.

[4] Gossauer A. *Struktur und Reaktivität der Biomoleküle*, **2006**, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, Kap. 10, S. 514-549.

[5] Karlson P., Doenecke D., Koolmann J., Fuchs G., Gerok W. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, 15. Auflage, **2005**, Thieme Verlag, Stuttgart, Kap. 5, S. 95-118.

[6] Parker W. B. *Chemical Reviews* **2009**, 109 (7), 2880-2893.

[7] Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz M., Roth H. J. *Medizinische Chemie: Targets, Arzneistoffe, Chemische Biologie*, 2. Auflage, **2010**, Deutscher Apotheker Verlag, Kaptiel 12, S. 461-516.

[8] Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz M., Roth H. J. *Medizinische Chemie: Targets, Arzneistoffe, Chemische Biologie*, 2. Auflage, **2010**, Deutscher Apotheker Verlag, Kaptiel 13, S. 519-598.

[9] Banerjee A., Johnston J. S., Swaan P. W. *Carrier-Mediated Mechanisms for Cellular Drug Transport* in *Cellular Drug Delivery: Principles and Practice* (Eds. D. Robert Lu, Svein Øie), **2004**, Humana Press, Totowa, New Jersey, Part II, p.107-128.

[10] Mader M. M., Henry J. R. in *Comprehensive Medicinal Chemistry* (Ed. Taylor J. B., Triggler D. B.), **2007**, Elsevier Ltd. Oxford, Vol. 7, p. 55-78.

[11] Hoff P. M., Cassidy J., Schmoll H-J. *The Oncologist* **2001**, 6 (4), 3-11.

[12] Köhne C. H., Peters G. J. *Oncology* **2000**, 14 (9), 13-18.

[13] Sampath D., Ashutosh Rao V., Plunkett W. *Oncogene* **2003**, 22, 9063-9074.

[14] Avendano C., Menéndez J. C. *Medicinal Chemistry of Anticancer* Drugs 1st Edition, **2008**, Elsevier, Oxford, Chapter 2, p. 9-52.

[15] Hiller S. A., Zhuk R.A., Lidak M. Y., Zidermane A. A., Br. Pat. 1, 168,391, 1969; sowie: http://85.254.195.114/eng/izgudrojumi/ftorafurs.asp (Inventions of Latvia).

[16] Lamont E. B., Schilsky R. L. *Clin Cancer Res* **1999**, 5, 2289-2296.

[17] Gielen W. in *Neue Arzneimittel Band 15 (2000-2003)*, Hrsg. Fricke U., Klaus W. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **2006**, S. 444-454.

[18] Aktories K., Unger C. in *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (Hrg. Aktories K., Förstermann U., Hofmann F. B., Starke K.), 10. Auflage, **2009**, Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München, Kap. 37, S. 929-984.

[19] Mutschler E. Geisslinger G., Kroemer H. K., Ruth P., Schäfer-Korting M. *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Aufl., **2008**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Kap. B12, S. 907-950.

[20] Van Kuilenburg A. B. P., Haasjes, J., Richel D. J., et al. *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 4705-4712.

[21] Diasio R.B. *Journal of Clinical Oncology*, **2002**, 20 (4), 894-896.

[22] Song Y.-Y., Schmidt-Stein F., Bauer S., Schmucki P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 4230-4232.

[23] Majeti N. V., Kumar R. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2000**, 3 (2), 234-258.

[24] Peng L., Mendelsohn A. D., LaTempa T., Yoriya S., Grimes C.A., Desai T.A. *Nano Lett.* **2009**, 9 (5), 1932-1936.

[25] Han C.-M., Lee E.-J., Kim H.-E., Koh Y.-H., Jang J.-H. *Thin Solid Films* **2011**, 519 (22), 8074-8078.

[26] Leeson P. *Nature* **2012**, 481, 455-456.

[27] Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J. *Adv. Drug Del. Rev.* **2001**, 46, 3-26.

[28] Ghose A. K., Vellarkad N., Viswanadhan V.N., Wendoloski J. J. *J. Comb. Chem.* **1999**, 1 (1), 55-68.

[29] Malecki, E., Ye F., Reuter H., Rosemeyer H. *Hel. Chim. Acta* **2009**, 92, 1923-1932.

[30] Ohloff G., Becker J., Schulte-Elte K. H. *Helv. Chim. Acta* **1967**, 50, 705-708.

[31] Felix D., Schreiber J., Ohloff G., Eschenmoser A. *Helv. Chim. Acta* **1971**, 54, 2896-2912.

[32] Ohloff G. *'Düfte – Signale der Gefühlswelt'*, **2004**, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich.

[33] Kennedy J. C., Pottier R. H., Pross D. C. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1990**, 6, 143-148.

[34] Pass H. I. *J Natl. Cancer Inst.* **1993**, 85 (6), 443-456.

[35] Messmann H., Knüchel R., Endlicher E., Hauser T., R., Szeimies R. M., Kullmann F., Bäumler W., Schölmerich J. *Dtsch. med. Wschr.* **1998**, 123 (17), 515-521.

[36] Stummer W., Pichlmeier U., Meinel T., Wiestler O. D., Zanella F., Reulen H.-J. *Lancet Oncol.* **2006**, 7 (5), 392-401.

[37] Sapov A.A., Khamidova T.V., Bugaeva L. I., Morozov S. *Pharm. Chem. J.* **2000**, 34 (1), 1-7.

[38] Orzeszko A., Kaminski B., Orzeszko G., Starosciak B. J. *II Farmaco* **2000**, 55, 619-623.

[39] Tsuzuki N., Hama T., Kawada M., Hasui A., Konishi R., Shiwa S., Ochi Y., Futaki S., Kitaga K. *J. Pharm. Sci.* **1994**, 83, 481-484.

[40] Buchbauer G., Esterer S., Cermak C. *Die Pharmazie* **1983**, 38 (3), 151-169.

[41] Köstler K., Werz E., Malecki E., Montilla-Martinez M., Rosemeyer H. *Chem. Biodiv.* **2013**, 10, 39-61.

[42] Malecki E., Viere R., Rosemeyer H. *Chem. Biodiv.* **2013**, 10, 1828-1841.

[43] Rosemeyer H., Dissertation, Universität Paderborn, **1980**.

[44] Rosemeyer H., Seela F. C*arbohydr. Res.* **1978**, 62, 155-169.

[45] Seela F., Ott J., Rosemeyer H. *Z. Naturforsch.***1979**, 34c, 350-358.

[46] Ott J., Dissertation, Universität Paderborn, **1983**.

[47] Ott J., Seela F. *Bioorg. Chem.* **1981**, 10, 82-89.

[48 Köstler K., Rosemeyer H. *Molecules* **2009**, 14, 4326-4336.

[49] Van Meerloo J., Kaspers G., Cloos J. *Methods Mol. Biol.* **2011**, 731, 237-245.

[50] Pongsavee M. *J. Occup. Med. Toxicol.***2009**, 4, 27.

[51] Rosemeyer H. *Chem. Biodiversity.* **2005**, 2 (8), 977-1063.

[52] Rosemeyer H., Stürenberg E.-M., Herdewijn P. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, 26 (8-9), 995-999.

[53] Malecki E., Rosemeyer H. *Helv. Chim. Acta* **2010**, 93, 1500-1512.

[54] Albert A. *Selective Toxicity – The physico-chemical basis of therapy*, 7th Edition, **1985**, Chapman and Hall, London, New York, p. 101.

[55] Hiller S. A., Zhuk R. A., Lidak M. Yu., Zidermane A. A., Br. Pat.1,168,391, **1969**; Online: http://85.254.195.114/eng/izgudrojumi/ftorafurs.asp (Inventions of Latvia).

[56] Manning S.J., Cohen A. M., Townsend L. B. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1978**, 15, 723-726.

[57] Blokhina N., Vozny E., Garin A. *Cancer* **1972**, 30, 390-392.

[58] Valdivieso M., Bodey G., Gottlieb J., Freireich E. *Cancer Res.***1976**, 36, 1821-1824.

[59] Saunders P. P., Chao L.-Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, 11, 451-454.

[60] Mizuno Y. *The Organic Chemistry of Nucleic Acids*, **1986**, Elsevier Sience Publishers, Amsterdam, p. 71.

[61] Scheper M. A., Shirtliff M. E., Meiller T.F., Peters B. M., Jabra-Rizk M. A. *Neoplasia* **2008**, 10 (9), 954-963.

[62] Hänsel R., Sticher O. (Hrsg.) *Pharmakognosie – Phytopharmazie*, 9. Auflage, **2010**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Kap. 23.1, S.738-743.

[63] Hänsel R., Sticher O. (Hrsg.) *Pharmakognosie – Phytopharmazie*, 9. Auflage, **2010**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Kap. 25.2, S. 948-960.

[64] Hänsel R., Sticher O. (Hrsg.) *Pharmakognosie – Phytopharmazie*, 9. Auflage, **2010**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Kap. 1.3, S. 8-18.

[65] Gossauer A. *Struktur und Reaktivität der Biomoleküle*, **2006**, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, Kap. 3.19, S. 124-133.

[66] Hemmerlin A., Bach T. J. *Plant Physiol* **2000**, 123, 1257-1268.

[67] Joo J. H., Jetten A. M. *Cancer Lett.* **2010**, 287 (2), 123-135.

[68] Casey P. J., Seabra M. C. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271 (10), 5289-5292.

[69] Eastman R. T., Buckner F. S., Yokoyama K., Gelb M. H., Voorhis W.C. *J. Lipid Res.* **2006**, 47, 33-240.

[70] Novelli G., D'Apice M. R. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2012**, 35 (5), 917-926.

[71] Maltese W.A. *FASEB J.* **1990**, 4 (15), 3319-3328.

[72] Basso A. D., Kirschmeier P., Bishop R. *J. Lipid Res.* **2006**, 47, 15-31.

[73] Mo H., Elson C. in *Nutritional Oncology* 2nd Edition (Eds. Heber G., Blackburn G. L., Go V. L.W., Milner J.), **2006**, Academic Press, Burlington, Chapter 38, pp. 629-644.

[74] Ong T. P., Heidor R., De Conit A., Dagli M. L. Z. *Carcinogenesis* **2006**, 27 (6), 1194-1203.

[75] Rhee Y., Hlousek-Radojcic A., Ponsamuel J., Liu D., Post-Beittenmiller D., *Plat Physiol*. **1998**, 116, 901-911.

[76] Moreau L., Camplo M., Wathier M., Taib N., Laguerre M., Bestel I., Grinstaff M.W., Barthelemy P. *J. Amer. Chem. Soc*. **2008**, 130, 14454-14455.

[77] Honigmann A. *Dissertation*, Universität Osnabrück, **2010**.

[78] Szafraniec S.I., Stachnik K.J., Skierski J.S. *Acta Polonica Pharmaceutica – Drug Research* **2004**, 61 (3), 223- 232.

[79] Im J., Biswas G., Kim W., Kim K.-T., Chung S.-K. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, 32 (3), 873-879.

[80] Omidi Y., Barar J. *BioImpacts* **2012**, 2 (1), 5-22.

[81] Hänsel R., Sticher O. (Hrsg.) *Pharmakognosie – Phytopharmazie*, 9. Auflage, **2010**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Kap. 23.5, S. 807-817.

[82] Heldt H.-W. *Pflanzenbiochemie*, 3. Auflage, **2003**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Kap. 2, S. 47-70.

[83] Nuhn P. *Naturstoffchemie*, 4. Auflage, **2006**, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, Kap. 4.2, S. 194-225.

[84] Mize C.E., Avigan J., Baxter J.H., Fales H.M., Steinberg D. *J. Lip.Res.* **1966**, 7, 692-697.

[85] Gloerich J., van den Brink D.M., Ruiter J.P.N., van Vlies N., Vaz F.M., Wanders R.J.A., Ferdinandusse S. *J. Lipid Res.* **2007**, 48, 77-85.

[86] Verhoeven N.M., Roe D.S., Kok R.M., Wanders R.J.A., Jakobs C., Roe C.R. *J. Lipid Res.***1998**, 39, 66-74.

[87] Swamy K.C.K., Kumar N.N.B., Balaraman E., Kumar K. V. P. P. *Chem. Rev*. **2009**, 109 (6), 2551-2651.

[88] Tsunoda T., Kaku H., Ito S. TCIMAIL, number 123. [Online]: http://www.tcichemicals.com/en/us/supportdownload/tcimail/backnumber/article/123drE.pdf

[89] Werz E., Korneev S., Montilla-Martinez M., Wagner R., Hemmler R., Walter C., Eisfeld J., Gall K., Rosemeyer H. *Chemistry & Biodiversity*, **2012**, 9, 272-281.

[90] Malecki E., Ottenhaus V., Werz E., Knies C., Montilla-Martinez M., Rosemeyer H. *Chem. Biodiv.* **2014**, 11, 217-232.

[91] Rosemeyer H, Malecki E., Korneev S., Werz E., Gall K. *European Patent Application* **2012**. EP12186576.0, priority date: September 28.

[92] (a) Wolfrum C., Shi S., Jayaprakash K.N., Jayaraman M., Wang G., Pandey R.K., Rjeev K.G., Nakayama T., Charrise K., Ndungo E.M., Zimmermann T., Koteliansky V., Manoharan M., Stoffel M. *Nature Biotechnology* **2007**, 25, 1149-1157.

(b) Anaya M., Kwak M., Musser A.J., Müllen K., Herrmann A. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 12852-12859.

[93] Moreau L., Camplo M., Wathier M., Taib N., Laguerre M., Bestel I., Grinstaff M.W., Barthélémy P. *J. Amer. Chem. Soc*. **2008**, 130, 14454-14455.

[94] Breitmaier E., Voelter W. ^{13}C-NMR Spectroscopy – Monographs in Modern Chemistry, Vol. 5, 1978, Verlag Chemie, Weinheim, New York, pp. 72-74.

[95] Karplus M., Pople J.A. *J. Chem. Phys*. **1963**, 38, 2803-2807.

[96] Grant D.M., Cheney B.V. *J. Amer. Chem. Soc*. **1967**, 89, 5315-5318.

[97] (a) Brossette T., Klein E., Creminon C., Grassi J., Mioskowski C., Lebeau L. *Tetrahedron* **2001**, 57, 8129-8143.

(b) Himmelsbach F., Schulz B.S., Trichtinger T., Charubala R., Pfleiderer W. *Tetrahedron* **1984**, 40, 59-72.

(c) Quezada E., Viña D., Delogu G., Borges F., Santana L., Uriarte E. *Helv. Chim. Acta* **2010**, 93 (2), 309-313.

(d) Ludek O.R., Meier C. *Synlett* **2005**, 3145-3147.

(e) Ludek O.R., Meier C. *Synlett* **2006**, 324-326.

[98] Korneev S., Rosemeyer H. *Helv. Chim. Acta* **2013**, 96 (2), 201-216.

[99] Filipowicz W., Jaskiewicz L., Kolb F.A., Pillai R.S. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, 15 (3), 331-341.

[100] Kaczmarek, Oliver *Dissertation*, Humbold-Universität zu Berlin, **2008**.

[101] McManus M.T., Sharp P.A. *Nature Rev. Genet.* **2002**, 3, 737-747.

[102] Krützfeld J., Rajewsky N., Braich R., Rajeev K.G., Tusch T., Manoharan M., Stoffel M. *Nature* **2005**, 438, 685-689.

[103] Czech M.P. *The New England Journal of Medicine* **2006**, 354, 1194-1195.

[104] Manoharan M. *Antisene & Nucleic Acid Drug Development* **2002**, 12, 103-128.

[105] Soutschek, J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P. Harborth J., John M., Kesavan V., Lavine G., Pandey R.K., Racie T., Rajeev K.G., Röhl I., Toudjarska I., Wang G., Wunschko S., Bumcrot D., Koteliansky V., Limmer S., Manoharan M., Vornlocher H.-P. *Nature* **2004**, 432, 173-178.

[106] Lorenz C., Hadwiger P., John M., Vornlocher H.-P., Unverzagt C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14 (19), 4975-4977.

[107] Glen Research Corporation, [Online]: http://www.glenresearch.com/GlenReports/GR20-19.html

[108] Manoharan M., Inamati G., Kathleen L., Tivel K.L., Conklin B., Ross B.S., Cook P.D. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, 16, 1141-1143.

[109] Diaz-Marrero A.R., Austin P., Van Soest R., Matainaho T., Roskelley C.D., Roberge M., Andersen R.J. *Org. Lett.* **2006**, 8, 3749-3752.

[110] Roskoski R. Jr. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 303 (1), 1-7.

[111] Heldt H.-W. Pflanzenbiochemie, 3. Auflage, **2003**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Kap. 17, S. 432-444.

[112] Markiewicz W.T., Wiewiórowski, M. *Nucl. Acids Res.* **1978**, 1 (1), 185-190.

[113] Rim, S.H., Seeff L., Ahmed F., King J.B., Coughlin S.S. *Cancer* **2009**, 115, 1967-1976.

[114] Coleman M.P., Quaresma M., Berrino F., Lutz J.M., De Angelis R., Capocaccia, R., Baili P., Rachet B., Gatta G., Hakulinen T., Micheli A., Sant M., Weir H.K., Elwood J.M., Tsukuma H., Koifman S., GA E.S., Francisci S., Santaquilani M., Verdecchia A., Strom H.H., Young J.L. *Lancet Oncol.* **2008**, 9, 730-756.

[115] Ho S.B., Yan P.S., Dahiya R., Neuschwander-Tetri B.A., Basbaum C.K.I.M. *J. Cell Physiol.* **1994**, 160, 213-226.

[116] Carrato A. *Gastrointest. Cancer Res.* **2008**, 2 (4), 42-46.

[117] Furuse H., Hirano Y., Harada M. Ming L.H., Aoki T., Kurita Y., Mugiya S., Ushiyama T., Ozono S. *Anticancer Res.* **2009**, 29 (4), 1001-1008.

[118] García M.A., Carrasco E., Aguilera M., Alvarez P., Rivas C., Campos J.M., Prados J.C., Calleja M.A., Esteban M., Marchal J.A., Aránega A. *PLoS One* **2011**, 6 (8):e23887. DOI: 10.1371/journal.pone.0023887. Epub 2011 Aug 24.

[119] Albert A. *Chapman and Hall*, 7th Edition, **1985**, London, New York, pp. 60, 125-126.

[120] Heidelberger C., Griesbach L. Cruz O., Schnitzer R., Gruenberg F. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1958**, 97, 470-475.

[121] Yamada M., Nakagawa H., Fukushima M., Shimizu K., Hayakama T., Ikenaka *J. Neurooncol.* **1998**, 37, 115-121.

[122] Marin-Vicente C., Lyutvinskiy Y., Romans Fuertes P., Zubarev R.A., Visa N., *J. Proteome Res.* **2013**, Mar 21. [DOI: 10.1021/pr400052p].

[123] Nita M.E., Nagawa H., Tominaga O., Tsuno N., Fujii S., Sasaki S., Fu C.G., Takenoue T., Tsuruo T., Muto T. *Br. J. Cancer* **1998**, 78 (8), 986-992.

[124] Lowe S.W., Ruley H.E., Jacks T., Housman D.E. *Cel.* **1993**, 74, 957-967.

[125] Peters G.J. *Oxford Textbook of Oncology* **1995**, 524-552.

[126] (a) Lu D.R., Øie S. (Eds.) *Principles and Practice* **2004**, Humana Press, Totowa, New Jersey.

(b) Dasgupta P., Mukherjee R. *Brit. J. Pharmacol.* **2000**, 129 (1), 101-109.

(c) Torres F., Martin D., Torrelo G., Casado V., Fernandez O., Tenllado D., Vazquez L., Moran-Valero M.I., Reglero G. *Current Nutrition & Food Science* **2011**, 7, 160-169.

[127] Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. *Adv. Drug Del. Rev.* **1997**, 23, 3-25.

[128] Rosemeyer H., Malecki E. *European Patent Application* **2012**, EP 12 186 564.6, priority date: September 28.

[129] Werz E., Viere R., Gaßmann G., Korneev S., Malecki E., Rosemeyer H. *Hel. Chim. Acta* **2013**, 96, 872-888.

[130] Calabro-Jones P.M., Byfield J.E., Ward J.F., Sharp T.R. *Cancer Res.* **1982**, 42 (11), 4413-4420.

[131] Tang X.Y., Zhu Y.Q., Tao W.H., Wei B., Lin X.L. *Postgrad. Med. J.* **2007**, 83 (979), 338-343.

[132] Bonaterra G.A., Kelber O., Weiser D., Kinscherf R. *Phytomedicine* **2013**, Mar 25. pii: S0944-7113(13)00083-4. doi: 10.1016/j.phymed.2013.02.011. [Epub ahead of print].

[133] Neises B., Steglich W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, 17, 522-524.

[134] Mader R.M., Kalipciyan M., Ohana P., Hochberg A., Steger G.G. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2011**, 49 (1), 69-70.

[135] Diasio R.B., Harris B.E. *Pharmacokinet.* **1989**, 16 (4), 215-237.

[136] Noor F., Kinscherf R., Bonaterra G.A., Walczak S., Wölfl S., Metzler-Nolte N. *Chembiochem.* **2009**, 10 (3), 493-502.

[137] Eda H., Fujimoto K., Watanabe S., Ura M., Hino A., Tanaka Y., Wada K., Ishitsuka, H. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1993**, 32 (5), 333-338.

[138] Weinreich J., Schott S., Königsrainer I., Zieker D., Königsrainer A., Schott H. *Invest. New Drugs* **2011**, 29 (6), 1294-1302.

[139] Weinreich J., Schott T.C., Königsrainer I., Küper M., Königsrainer A., Schott H. *Anticancer Res.* **2012**, 32 (10), 4299-4305.

[140] Li W., Jiang K., Ding S. *Stem Cells* **2012**, 30, 61-68.

[141] Ding S., Schultz P.G. *Nature Biotechnol*. **2004**, 22, 833-840.

[142] Emre, N., Coleman R., Ding, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 252-258.

[143] Chen, S., Hilcove S., Ding, S. *Mol. Biosyst.* **2006**, 2, 18-24.

[144] Efe, J. A., Ding, S. *Phil. Trans. R. Soc.* **2011**, B 366, 2208-2221.

[145] Arendt, T. *Mol. Neurobiol*. **2012**, 46, 125-135.

[146] Suva, M.L., Riggi N., Bernstein B.E. *Science* **2013**, 339, 1567-1570.

[147] Bloch A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1975**, 255, 576-596.

[148] Zhenchuk A., Lotfi K., Juliusson G., Albertioni F. *Biochem. Pharmacol.*, **2009**, 78, 1351-1359.

[149] Cihak A., Vesley J., Skoda J. *Adv. Enzyme Regul.* **1985**, 24, 335-354.

[150] Rose J.B., Coe I.R. *Physiology (Bethesda*) **2008**, 23, 41-48.

[151] Diab R., Degobert G., Hamoudeh M., Dumontet C., Fessi H. *Expert. Opin. Drug Deliv*. **2007**, 4, 513-531.

[152] Carson, D. A.,Wasson D.B., Beutler E. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1984**, 81, 2232-2236.

[153] Piro L. D., Carrera C.J., Beutler E., Carson D.A. *Blood* **1988**, 72, 1069-1073.

[154] Giovannori, G., Comi G., Cook S., Rammohan K., Rieckmann P., Soelberg Sörensen P., Vermersch P., Chang P., Hamlett A., Musch B.,Greenberg S.J. *N. Engl. J. Med.* **2010**, 362, 416-426.

[155] Andrews P.W. *Dev. Biol.* **1984**, 103, 285-293.

[156] Pleasure S.J., Lee V.M. *J. Neurosci. Res.* **1993**, 35, 585-602.

[157] Hara K., Yasuhara T., Maki M., Matsukawa N., Masuda T. Yu S.J., Ali M., Yu G., Xu L., Kim S.U., et al. *Prog. Neurobiol.* **2008**, 318-334.

[158] Glaser T., Brustle O. *Trends Neurosci.* **2005**, 28, 397-400.

[159] Maden M. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, 8, 755-765.

[160] Pleasure S.J., Page C., Lee V.M. *J. Neurosci.* **1992**, 12, 1802-1815.

[161] Piontek J., Chen C.C., Kempf M., Brandt R. *J. Neurochem.* **1999**, 73, 139-146.

[162] Hauser S., Widera D., Qunneis F., Muller J., Zander C., Greiner J., Strauss C., Luningschror P., Heimann P., Schwarze H., et al. *Stem Cells Dev.* **2012**, 21, 742-756.

[163] Bang, Y.J., Pirnia F., Fang W.G., Kang W.K., Sartor O., Whitesell L., Ha M.J., Tsokos M., Sheahan M.D., Nguyen P., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 5330-5334.

[164] Fluri D.A., Tonge P.D., Song H., Baptista R.P., Shakiba N., Shukla S., Clarke G., Nagy A., Zandstra P.W. *Nat. Methods* **2012**, 9, 509-516.

[165] Podrygajlo G., Tegenge M.A., Gierse A., Paquet-Durand F., Tan S., Bicker G., Stern M. *Cell Tissue Res.* **2009**, 336, 439-452.

[166] Yanes O., Clark J., Wong M.D., Patti G.J., Sanchez-Ruiz A., Benton H.P., Trauger S.A., Desponts C., Ding S., Siuzdak G. *Nat.Chem. Biol.* **2010**, 6, 411-417.

[167] Bauwens C.L., Peerani R., Niebruegge S., Woodhouse K.A., Kumacheva E., Husain M., Zandstra P.W. *Stem Cells* **2008**, 26, 2300-2310.

[168] Ding S., Wu T.Y., Brinker A., Peters E.C., Hur W., Gray N-S., Schultz P.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 7632-7637.

[169] Palomo, V., Perez D.I., Perez C., Morales-Garcia J.A., Soteras I., Alonso-Gil S., Encinas A., Castro A., Campillo N.E., Perez-Castillo A., et al. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 1645-1661.

[170] Schmole A.C., Brennfuhrer A., Karapetyan G., Jaster R., Pews-Davtyan A., Hubner R., Ortinau S., Beller M., Rolfs A., Frech M.J. *Bioorg. Med Chem.* **2010**, 18, 6785-6795.

[171] Suter D.M., Preynat-Seauve O., Tirefort D., Feki A., Krause K.H. *J. Cell Mol. Med.* **2009**, 13, 3517- 3527.

[172] Schneider J.W., Gao Z., Li S., Farooqi M., Tang T.S., Bezprozvanny I., Frantz D.E., Hsieh J. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 408-410.

[173] Rossi, A., Russo G., Puca A., La Montagna R., Caputo M., Mattioli E., Lopez M., Giordano A., Pentimalli F. *Int. J. Cancer* **2009**, 125, 235-243.

[174] Bartolucci, S., Estenoz M., Longo A., Santoro B., Momparler R.L., Rossi M., Augusti-Tocco G. *Cell Differ. Dev.* **1989**, 27, 47-55.

[175] Bierau, J., van Gennip A.H., Helleman J., van Kuilenburg A.B. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, 62, 1099-1105.

[176] Ravi Kumar M.N.V. *React. Funct. Polym* **2000**, 46, 1-27.

[177] Malecki E., Farhat A., Bonaterra G.A., Röthlein D., Wolf M., Schmitt J., Kinscherf R., Rosemeyer H. submitted to *ChemBioChem*.**2013.**

[178] Dodane V., Vilivalam V.D. *PSTT* **1998**, 1, 246-253.

[179] Bansal V, Sharma P.K., Sharma N., Pal O.P., Malviya R. *Adv. Biol. Res.* **2011**, 5 (1), 28-37.

[180] Illum L. *Pharm. Res.* **1998**, 15, 1326-1331.

[181] Qin C., Li H., Xiao Q., Liu Y., Zhu J., Du Y. *Carbohydr. Polym*. **2006**, 63, 367-374.

[182] Chirkov S.N. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2002**, 38 (1), 1-8.

[183] Wada T., Chirachanchai S., Izawa N., Inaki Y., Takemoto K. *J. Bioactive and Comp. Polymers* **1994**, 9 (4), 429-447.

[184] Ott J. Diplomarbeit, Universität Paderborn, **1978**.

[185] Russell M.A., Laws A.P., Atherton J.H., Page M.I. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 3270-3275.

[186] a) BioSpring GmbH: www.biospring.de/html/ger/oligos2_1.html.

b) BioSpring GmbH: www.biospring.de/html/ger/oligos2_3.html.

[187] Bender A.T., Beavo J.A. *Pharmacol. Rev.* **2006**, 58, 488-520.

[188] Liu S., Mansour M.N., Dillman K.S., Perez J.R., Danley D.E., Aeed P.A., Simsons S.P., LeMotte P.K., Menniti F.S. *PNAS* **2008**, 105 (36), 13309-13314.

[189] Caruther M.H. *Science* **1985**, 230, 281-285.

[199] Hogrefe R. *A short history of oligonucleotide synthesis* **2006**, Trilink Bio Technologies: www.trilinkbiotech.com/tech/tech_articles/short_history_oligonucleotides.pdf.

[200] Besheer A., Hause G., Kressler J., Mäder K. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 359-367.

[201] Lesch A. *Doktorarbeit*, Universität Frankfurt am Main, **2003**.

[202] Treib J., Haaß A., Pindur G., Wenzel E., Schimrigk K. *Dt. Ärztebl.* **1997**, 94 (Heft 37), 2326-2330.

[203] Jungheinrich C., Scharpf R., Wargenau M., Bepperling F., Baron J.-F. *Anesth. Analg.* **2002**, 95, 544-551.

[204] Besheer A., Hertel T.C., Kressler J., Mäder K., Pietzsch M. *Methods Mol. Biol.* **2011**, 751, 17-27.

[205] Rooseboom M., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E. *Pharmacol. Rev.* **2004**, 56, 53-102.

Originalartikel

O-2',3'-Ketal-Nucleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity, and Acidic Stability

Edith Malecki and Helmut Rosemeyer

Helvetica Chimica Acta **2010**, 93 (8), 1500-1512.

DOI: 10.1002/hlca.201000121

Synthesis and Crystal Structures of *O*-2',3'-Cyclic Cyclopentanone and Cyclohexanone Ketals of the Cytostatic 5-Fluorouridine

Edith Malecki, Fei Ye, Hans Reuter, Helmut Rosemeyer

Helvetica Chimica Acta **2009**, 92 (10), 1923-1932.

DOI: 10.1002/hlca.200900115

Nucleolipids of the Cancerostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Adherence to Oligonucleotides, and Incorporation into Artificial Lipid Bilayers

Edith Malecki, Vanessa Ottenhaus, Emma Werz, Christine Knies, Malayko Montilla-Martinez, Helmut Rosemeyer

Chemistry & Biodiversity **2014**, 11 (2), 217-232.

DOI: 10.1002/cbdv.201300127

Mitsunobu Reactions of 5-Fluorouridine with the Terpenols *Phytol* and *Nerol*: DNA Building Blocks for a Biomimetic Lipophilisation of Nucleic Acids

Edith Malecki, Christine Knies, Emma Werz, Helmut Rosemeyer

Chemistry & Biodiversity **2013**, 10 (12), 2209-2220.

DOI: 10.1002/cbdv.201300107

Synthesis of Thymidine-, Uridine, and 5-Methyluridine Nucleolipids: Tools for a Tuned Lipophilization of Oligonucleotides

Emma Werz, Rebecca Viere, Gina Gaßmann, Sergei Korneev, Edith Malecki, Helmut Rosemeyer

Helvetica Chimica Acta **2013**, 96 (5), 872-888.

DOI: 10.1002/hlca.201200573

Nucleoterpenes of Thymidine and 2'-Deoxyinsoine: Synthons for a Biomimetic Lipophilization of Oligonucleotides

Karl Köstler, Emma Werz, Edith Malecki, Malayko Montilla-Martinez, Helmut Rosemeyer

Chemistry & Biodiversity **2013**, 10 (1), 39-61.

DOI: 10.1002/cbdv.201100338

Synthesis of 5-Fluorouridine Nucleolipid Derivatives and Their Cytostatic/Cytotoxic Activities on Human HT-29 Human Carcinoma Cells

Edith Malecki, Anisa Farhat, Gabriel A. Bonaterra, Doris Röthlein, Martin Wolf, Jürgen Schmitt, Ralf Kinscherf, Helmut Rosemeyer

Chemistry & Biodiversity **2013**, 10 (12), 2235-2246.

DOI: 10.1002/cbdv.201300219

Identification of Nucleoside Analogues as Inducers of Neuronal Differentiation using Human Reporter and Adult Stem Cells

Katharina Raasch, Edith Malecki, Maria Siemann, Malayko Montilla Martinez, Jürgen Heinisch, Janine Müller, Lidia Bakota, Christian Kaltschmidt, Barbara Kaltschmidt, Helmut Rosemeyer, Roland Brandt

submitted for *Nature – Chemical Biology*

Identification of nucleoside analogues as inducers of neuronal differentiation using human reporter and adult stem cells

Katharina Raasch[1], Edith Malecki[2], Maria Siemann[1], Malayko Montilla Martinez[1], Jürgen Heinisch[3], xx (Kaltschmidt Lab), Lidia Bakota[1], Christian Kaltschmidt[4], Barbara Kaltschmidt[4], Helmut Rosemeyer[2], Roland Brandt[1*]

[1]Department of Neurobiology, University of Osnabrück, Germany;
[2]Institute of Chemistry of New Materials, University of Osnabrück, Germany;
[3]Department of Genetics, University of Osnabrück, Germany;
[4]Department of Molecular Neurobiology, University of Bielefeld, Germany.

INTRODUCTION

Small molecules targeting specific signaling pathways are powerful tools to manipulate cell fate and could help to treat a variety of impairments including cancer and neurodegenerative diseases. Growing evidence suggests that various tumors may be maintained by a small number of de-differentiated cancer cells with stem cell-like features (Suva et al., 2013). Treatments with small molecules, which favor differentiation, could thus be effective to reduce the number of cancer cells with self-renewal capacity. De-differentiation of neurons appears also to be a common pathological element of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (Arendt, 2012). Small molecules that promote neuronal differentiation and thereby maintain the features of postmitotic neurons may thus have therapeutic potential. Finally, induction of neuronal differentiation of endogenous progenitors or implanted stem cells by small molecules could be of use to generate terminally differentiated neurons that compensate for the lost cells in the brain (Li et al., 2012; Ding and Schultz, 2004; Emre et al., 2007; Chen et al., 2006; Efe and Ding, 2011).

In this respect, nucleoside analogues (NSAs) represent an interesting class of compounds. They were among the first chemotherapeutic agents to be introduced for the medical treatment of cancer and have been shown to behave as anti-metabolites, interact with different intracellular targets, affect several signaling pathways and trigger

epigenetic mechanisms (Bloch, 1975; Cihak et al., 1985; Zhenchuk et al., 2009). NSAs have the advantage that they effectively enter cells via nucleoside transporters, which mediate and facilitate the flux of nucleosides and nucleobases across cellular membranes (Rose and Coe, 2008). Within the cells they become activated by phosphorylation and are subsequently trapped and enriched (Diab et al., 2007). We were reasoning that NSAs could also be an attractive group of small molecules useful for manipulation of neuronal cell fate due to the conceptual parallels between regulation of epigenetic states during cancer and cell differentiation (Suva et al., 2013).

In this study we describe a novel phenotypic assay and tested a panel of 38 structurally related NSAs with variations of their side groups for their activity to induce neuronal differentiation of human embryonic stem (ES) cell-like cultures. As a reporter for systematic screening of potentially active compounds by live cell fluorescence imaging and fluorimetric detection we used NT2 cells transduced with a lentivirus derivative. Sustained transgene expression was demonstrated in terminally differentiated NT2N neurons that were cultured for more than 2 months *in vitro*. We show that NSAs induce neuronal differentiation as evidenced by morphological changes, expression of neuronal marker proteins and activation of the neuronal CaMKII-promoter. The chemical structures of NSAs with highest activity are characterized by a halogen substituent at their pyrimidine nucleobase and an unmodified or 2'-O-methyl substituted 2-deoxy-ß-D-ribofuranosyl residue as glyconic moiety. 2-Chloro-2'-deoxyadenosine (cladribine), a purine nucleoside with similar structural features and in use to treat leukemia and multiple sclerosis (Carson et al. 1984; L. Piro et al., 1988; Giovannori et al., 2010), was similarly active and induced also neuronal differentiation of adult human neural crest-derived stem cells.

RESULTS

Nucleoside analogues induce neuronal differentiation of human embryonic stem cell-like cultures

The Ntera-2/D1 (further on called NT2) line is a pluripotent human testicular embryonic carcinoma cell line, which has been clonally derived from the teratocarcinom Tera-2, a human testicular cancer (Andrews, 1984). NT2 cells resemble

embryonic stem (ES) cells and differentiate *in vitro* during treatment with retinoic acid (RA) to yield cells with characteristics of terminally differentiated, fetal human CNS neurons (NT2N cells or hNT neurons) (Pleasure and Lee, 1993). RA-mediated differentiation of NT2 cultures requires 5 weeks of continuous treatment followed by selective replatement and treatment with mitotic inhibitors and occurs in a sequential fashion (Piontek et al., 1999; Pleasure et al., 1992). As one of the first protein marker for neuronal differentiation, cells start to synthesize neurofilament M (NF-M) that becomes detectable already three days after RA treatment in some cells (Fig. 1C). After two weeks of treatment many cells also exhibited morphological differentiation as evidenced by a complex neuron-like morphology with the development of long processes, which were filled with NFs (Fig. 1C).

To investigate the potential of nucleoside analogues (NSAs) for the induction of neuronal differentiation in a manner that is similar to RA, we treated NT2 cells with 38 different structurally related NSAs and analyzed the effect on morphological differentiation and expression of NF-M by immunocytochemistry. The NSAs carried various side groups in order to identify molecular features that guide their effectiveness as inducers of neuronal differentiation. We found that 13 NSAs induced neuronal differentiation to different extents, with six of them being most efficient in the first round of screening (Fig. 1A). These active NSAs led to a pronounced upregulation of NF-M after 1 week and the formation of long NF-containing processes after 2 weeks (Fig. 1D).

Analysis of the structure-activity relationship (SAR) of the different NSAs revealed that all active compounds carry a halogen substituent at their nucleobase, which can be either a pyrimidine or a purine heterocycle (Fig. 1B). The nature of the halogen substituent seems not to be important. All active compounds also possess an unmodified 2-deoxy-*ß*-D-ribofuranosyl or ß-*D*-ribofuranose residue as glyconic moiety.

The data indicate that synthetic NSAs induce the differentiation of ES-like human cells to a neuronal phenotype in a manner that depends on the modification at specific positions.

A novel reporter cell line allows fluorescence-based detection of neuronal differentiation in living neurons

Immunocytochemical methods provide an effective tool to determine neuronal differentiation on a cellular level. However, the method is time consuming, work intensive and expression levels of neuronal marker proteins cannot be easily quantified. To develop an assay, which allows detection of neuronal differentiation more directly and which can also be applied for high throughput screening (HTS), we prepared an NT2-derived cell line that expresses eGFP under the control of the neuron-specific promoter for alpha-calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), which becomes expressed postnatally in forebrain neurons (Burgin et al., 1990; Dittgen et al., 2004). We employed a recently developed vector shuttle system for fast cloning in yeast (Bakota et al., 2012) to construct a lentiviral derivative that encodes both a constitutively expressed puromycin resistence gene under the control of the SV40 promoter for selection of transduced cells and CaMKII-driven eGFP expression to transduce the cells (Fig. 2A).

NT2 cells that were transduced with the virus displayed resistence against puromycin and could be selected by continuous presence of 1 µg/ml puromycin in the medium (Fig. 2B). As expected, CaMKII-driven expression of eGFP occurred much later in differentiation than expression of earlier neuronal markers such as NF-M and was detected only in fully differentiated and purified NT2-N cells together with fetal tau protein as a marker for development of polarity (Kempf et al., 1996)(Fig. 2C). In agreement with the Western blot data, eGFP expression could be detected fluorimetrically in NT2-N cells but not in NT2 cells (Fig. 2D). Live cell imaging confirmed expression of eGFP in single cells with neuronal morphology (Fig. 2E). The CaMKII-promoter remained constitutively active in the neurons as indicated by a constant fluorescence even after 10 weeks in culture. To confirm that eGFP expressing cells represent neurons, double immunofluorescence staining was performed. The stainings indicated that eGFP-positive neurons also expressed the neuronal marker proteins MAP2b and NF-M (Fig. 2F).

The data demonstrate that NT2 cells that have been transduced with a lentivirus that guides expression of eGFP under the control of the CaMKII-promoter constitute a useful reporter cell line to systematically analyze the effect of small molecules on neuronal differentiation. The system provides a quantitative readout for fluorimetric

detection and allows analysis by live cell imaging. Sustained transgene expression was demonstrated in terminally differentiated NT2N neurons that were cultured for more than 2 months *in vitro*.

Halogenated 2'deoxy nucleoside analogues induce fast neuronal differentiation

The use of the reporter cell line allows direct comparison of the effectiveness of the active NSAs on neuronal differentiation in a quantitative manner. Our first screening was based on induction of morphological differentiation and expression of NF-M as a very *early* marker for neuronal differentiation. Our reporter cells respond with eGFP expression as a consequence of activation of the CaMKII-promoter, which becomes active much later during the differentiation program (in a time range similar to the induction of MAP2b and tau expression).

We tested the 8 NSAs, which were most active during our first screening by immunocytochemistry (see Fig. 1A) and quantitated eGFP expression after 2 weeks. At this short time of treatment, RA was not active to induce significant eGFP fluorescence compared to the negative control (Fig. 3A). In contrast, NSA01, 02, 03, 04, and 09 showed increased fluorescence, both in fluorimeter readout (Fig 3A) and during live cell imaging (Fig. 3B). Fluorescence remained present also after longer treatment with the drugs (Fig. 3C).

To confirm that NSA01, 02, 03, 04, and 09 induce also expression of other late neuronal markers, immunofluorescence staining against MAP2b was performed. Indeed, many MAP2b-positive cells with evident neuronal morphology were present already after 2 weeks in culture that had been treated with the respective NSAs (Fig. 3D). To determine whether the short treatment with the four NSAs induced only a transient expression of neuronal markers or caused terminal differentiation similar to long term treatment with RA, cells were differentiated for 2 weeks with the respective NSAs and culture was continued for 2 weeks in the absence of the drugs. Live cell imaging confirmed the presence of neuronal eGFP expression indicating that a two week pulse with NSA01, 03, 04, and 09 causes permanent differentiation of NT2 cells.

The chemical structures of the NSAs with fastest activity had in common that they carried a halogen substituent at their pyrimidine nucleobase and possessed an unmodified 2-deoxy-ß-D-ribofuranosyl residue as glyconic moiety.

2-Chloro-2'-deoxyadenosine (Cladribine, NSA02) induces neuronal differentiation of adult human neural crest-derived stem cells

To determine whether any of the NSAs that were active to induce neuronal differentiation in NT2 cells also induced differentiation of adult human stem cells, we tested the 8 NSAs, which were most active during our first screening by immunocytochemistry (see Fig. 1B). We used a neural crest-derived stem cell population within the respiratory epithelium of human adult inferior turbinate (inferior turbinate stem cells (ITSCs)) (Hauser et al., 2012). ITSCs are of glial origin and able to differentiate into cells with neuro-ectodermal and mesodermal phenotype.

We observed that → Kaltschmidt lab

The data show activity of 2-chloro-2'-deoxyadenosine (NSA02) to induce neuronal differentiation of adult human neural crest-derived stem cells, indicating that NSAs are active in different stem cell models and suggesting that NSA-based small molecules might be useful for potential cell-replacement therapy and treatment of neurodegenerative diseases.

DISCUSSION

To functionally characterize compounds with respect to their activity to induce neuronal differentiation we have established a novel reporter cell line based on genetically modified human NT2 cells. NT2 cells exhibit similar properties as ES cells or very early neuroepithelial progenitors and can be induced to become postmitotic, polar and terminally differentiated central nervous system neurons (Piontek et al., 1999; Pleasure and Lee, 1993). Phase I and II clinical trials have shown the feasibility of transplantation of neuronally differentiated NT2 cells (hNT neurons) in stroke patients (Hara et al., 2008), demonstrating their potential for cell replacement therapy. We engineered the

cells to express a fluorescent marker under control of the CaMKII-promoter, which is known to drive postnatal expression in mouse forebrain neurons. We demonstrated that retinoic acid (RA) and some NSAs induced persistent neuronal differentiation as evidenced by eGFP synthesis and MAP2b immunoreactivity. Single differentiated neurons could be followed by live cell imaging and sustained transgene expression was demonstrated in terminally differentiated NT2N neurons that were cultured for more than 2 months *in vitro*. In addition to their use as reporter for compounds with differentiating activity, the cells could be valuable to efficiently purify differentiated neurons by fluorescence-activated cell sorting in order to follow their fate in real time during transplantation studies.

It is known since long time that RA is involved in the induction of neuronal differentiation, maintenance of the differentiated state of adult neurons and nerve regeneration (Maden, 2007). As a small molecule it is commonly used in embryonic stem cell differentiation, where RA-treated cells give rise to a defined and developmentally restricted neuronal lineage (Glaser and Brustle, 2005). In addition to RA, also different culture conditions have been shown to promote neuronal differentiation. This includes growing stem cells or ES-like cell lines such as NT2 cells in aggregate cultures (Fluri et al., 2012; Podrygajlo et al., 2009) or induction of metabolic oxidation (Yanes et al., 2010). However, the teratogenic potential of RA and other retinoid pharmaceuticals limits its use as therapeutic drug, and manipulation of the culture condition produces large heterogeneity in the cell population (Bauwens et al., 2008). Treatment with small molecules that directly target signal transduction mechanisms has the potential to be more efficient and selective.

GSK3β has previusly been identified as a major target for small molecules including 4,6-disubstituted pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (Ding et al., 2003), 5-imino-1,2,4-thiadiazoles (Palomo et al., 2012) and indolylmaleimides (Schmole et al., 2010). All of these small molecules appear to inhibit GSK3β and induce neural stem cell differentiation in various experimental models. Several other small molecules have been shown to affect neuronal differentiation most likely by acting through other mechanisms. Examples are phenazopyridine that induces neuronal differentiation (Suter et al., 2009) and isoxazole small molecules, which trigger neuronal differentiation in adult neural stem cells via Ca^{2+} influx that leads to de-repression of neuronal genes (Schneider et al., 2008). Occasionally also compounds which belong to the group of nucleoside analogues (NSAs) such as

Abacavir (Rossi et al., 2009), 5-Aza-2'-deoxycytidine (Bartolucci et al., 1989), and cyclopentenyl cytosine (Bierau et al., 2001) have been reported to induce neuronal differentiation. However a systematic study of the structure-function relation of NSAs with respect to their effect on neuronal differentiation had not been undertaken so far.

Here, we tested 38 structurally related NSAs, which carried various side groups in order to identify molecular features that guide their effectiveness as inducers of neuronal differentiation. The main intension for the synthesis and testing of various highly hydrophobic NSA derivatives was the finding that the lipophilic 2'-O-methyl derivative of 5-fluorourdine (NSA18) as well as the highly hydrophobic cladribine (NSA02) belong to the most active compounds with respect to morphological differentiation as well as NF-M immunoreactivity. The compounds tested can be divided into four categories: compounds NSA01, 02, 03, 04, 09 and 18 (category 1) exhibited the highest differentiating activity, while NSA08 and 24 (category 2) showed less pronounced activity. Other compounds possess only slight (category 3) or no activity (category 4). Inspection of the chemical structures discloses that the most active nucleosides (category 1) have in common that they carry a halogen substituent at their pyrimidine or purine nucleobase. The nature of the halogen substituent seems to be not important. Moreover, these compounds possess an unmodified 2-deoxy-*ß*-D-ribofuranosyl residue as glyconic moiety or, in case of NSA18, a ß-*D*-ribofuranose moiety with a 2'-O-methyl substituent, which renders the nucleoside hydrophobic. Nucleosides with a less pronounced (category 2) cell differentiating activity carried an unmodified 2-deoxy-*ß*-D-ribofuranosyl residue. Only slightly active (category 3) or non-active (category 4) are those compounds which carry sterically high demanding groups at their O-2',3' position; these substances are highly hydrophobic and possess additionally terminator properties after incorporation into a growing nucleic acid chain. The same is true for a O-2',3'-didesoxynucleoside such as NSA16 or for the O-4'-carbanucleoside NSA38.

We showed that one of the compounds with highest activity (2-Chloro-2'-desoxyadenosine; 2CDA) did also induce differentiation of adult human neural crest-derived stem cells. Retinoic acid was not active in this system → Kaltschmidt lab. 2-Chloro-2'-desoxyadenosine (2CDA; cladribine) is a synthetic anti-cancer agent that also suppresses the immune system and is under investigation for the treatment of multiple scleorsis. It was the only NSA with a purine heterocycle. Chemically, 2CDA mimics adenosine and might act as adenylatcylase inhibitor in stem cells thereby increasing the

concentration of cAMP, which has previously been shown to induce neuronal differentiation (Bang et al., 1994). However, at the current state it is unclear, which signal transduction mechanisms are targeted by the active NSAs. We hope that our data on the structure and function relationship will help to identify cellular targets and provide the basis to rationally design additional compounds with increased activity and low toxicity for cell replacement therapy and treatment of neurodegenerative diseases.

METHODS

Nucleoside analogues (NSAs) . Compounds 01, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, and 37 were purchased from *Berry & Associates* Inc. (Ann Arbor, MI 48106 USA). NSA24, 33, and 38 were purchased from *Sigma Aldrich* (Deisenhofen, Germany). Compounds NSA19, 20, 21, 22, 23, 29, 30, 31, and 32 were synthesized according to Malecki and Rosemeyer (Malecki and Rosemeyer, 2009; Malecki and Rosemeyer, 2010; Malecki et al., 2013). NSAs 25, 26, 27, and 28 were prepared according to Köstler and Rosemeyer (Köstler and Rosemeyer, 2009). Compounds 34, 35, and 36 were prepared from 6-azauridine according to the method of Malecki and Rosemeyer (Malecki and Rosemeyer, 2010; Malecki and Rosemeyer, unpublished results). Cladribine (NSA02) was prepared by Dr. *N. Ramzaeva* in the laboratory of one of us (H.R.) according to Kazimierczuk et al. (Kazimierczuk et al., 1984; Seela et al., 1998). All NSAs were dissolved as 5 mM stock solution in PBS or alternative solvent as indicated in Table S1 and used at a final concentration of 50 µM. As a negative control, the same volume of PBS was added to the cultures. As a positive control, retinoic acid (RA) was used at a final concentration of 10 µM.

Construction and preparation of lentiviral vectors

Construction of lentiviral vectors employed a recently described shuttle system (Bakota et al., 2012). To introduce the puromycin resistance gene under the control of the SV40 promoter, the respective sequence was first excised from E[beta]P (obtained from Addgene, Cambridge, USA, and described in (Fuerer and Nusse, 2010)) as a SalI restriction fragment and subcloned into pUK1921 (Heinisch, 1993) to yield pJJH1403. From there, the cassette was amplified by PCR using the oligonucleotide pair

11.349/11.348 (sequences: 5'-AGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAgctagcTGTGTGTCAGTTAGGGTGTGG-3' and 5'-AATCTTTCACAAATTTTGTAATCCAGAGGTTGATTATCGATCGACTGGCATGGGGTCGTGCG-3', respectively. Underlined sequences indicate those complementary to the pJJH1403 template, small letters define a newly introduced SalI restriction site and the remaining sequences are homologous to the target vector pJJH1308). The PCR product was co-transformed into the yeast strain DHD5 with plasmid pJJH1308, which was partially digested with EcoRI for linearization between the eGFP coding sequence and the WPRE element (the strain and the recipient plasmid are described in Bakota et al., 2012). Yeast transformants were selected for uracil prototrophy and plasmids were isolated, amplified in *E. coli* and verified by restriction analyses. A clone carrying pJJH1407 was used for large-scale DNA preparation and viral packaging and concentration was performed as described earlier (Bakota et al., 2012).

NT2/NT2-N cell culture

NT2 cells were essentially cultured and differentiated as previously described (Piontek et al., 1999) in serum-DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 5% horse serum, 100U/ml penicillin, and 100 µg/ml strepromycin) at 37°C and 10 %CO_2. For differentiation, NT2 cells were grown in 75-cm^2 tissue culture flasks in serum-DMEM with 10 µM retinoic acid for a total of 5 weeks. To purifiy NT2-N neurons, cells were enzymatically removed with trypsin/EDTA and replated on a collagen-coated 15-cm tissue culture dish. After 2 days, neurons were selectively washed off and replated onto a fresh collagen-coated 10-cm dish and treated with a mixture of cytostatics for a total of two weeks. The resulting purified neurons were replated on collagen-coated glass-bottom culture dishes for live cell imaging or used for the preparation of cell lysates.

For generation of Puro/eGFP-indicator lines 5×10^4 NT2 cells were plated in a 4-well dish and infected with lentivirus L22-eGFP-Puromycin on the next day. The culture was successively expanded and at 10 days post infection, transduced cells were selected by inclusion of 1µ/ml puromycin in the culture medium.

For the test of the different NSAs, Puro/eGFP-NT2 cells were cultured on 10-cm TC-culture dishes in 6 ml serum-DMEM containing 1 µg/ml puromycin and the respective NSA or control, and medium was exchanged twice per week.

Culture of adult human neural crest-derived stem cells

→ Kaltschmidt lab

Fluorometric analysis

For fluorometric analysis, cells were enzymatically removed from a 10-cm cell culture dish and washed once with PBS. Same number of cells were plated in triplicate in a total volume of 200 µl serum-DMEM on opaque F-bottom TC-96-well plates (Cellstar no.781965, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). Detection was performed after 24h on a FLUOstar OPTIMA fluorometer (bmg labtech, Ortenberg, Germany) at excitation/emission wavelengths of 485nm/520nm. Fluorescence was expressed compared to controls (medium only).

Live cell imaging

Undifferentiated or differentiated Puro/eGFP-indicator lines were plated on 35-mm poylysine- and collagen-coated glass-bottom culture dishes (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) in 1.5 ml serum-DMEM containing 1 µg/ml puromycin and the respective NSA or control. Medium was exchanged twice per week. Imaging was performed on a Nikon laser scanning microscope (Nikon Eclipse TE2000-U inverted), equipped with a C1 confocal laser scanning unit and EZ-C1 software. Cells were visualized using a 488 nm argon laser line and 510-540 nm band-pass emission filter. Microscope objectives used were an oil-immersion Nikon Plan Fluor 60× (NA 1.4) objective. The microscope was enclosed in an incubation chamber maintained at 37°C and 5% CO_2 (Solent Scientific Limited, Sagensworth, UK).

Other methods

For immunocytochemistry NT2 or NT2N cells were fixed for 10 min with 4% (w/v) formaldehyde in PBS containing 4% (w/v) sucrose, incubated for 20 min with 0.1 M glycine in PBS, and permeabilized for 5 min with 0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS. Staining was as described earlier (Kempf et al., 1996) using monoclonal anti-O-glycosylated NF-M (mouse NL6; (Ludemann et al., 2005)) and anti-MAP2 (mouse AP20; Millipore) antibodies. As secondary antibody Cy3-conjugated donkey anti-mouse (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) was used. For visualization of nuclei, 5 µg/ml 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was included in the secondary antibody incubation. Fluorescence microscopy was performed using an oil-immersion 60× (NA 1.4) objective lens on a fluorescence microscope (Eclipse TE2000-U; Nikon) equipped with a digital camera (COOL-1300; Vosskühler).
Preparation of cell lysates and immunoblot analysis was performed as described previously (Leschik et al., 2007) using monoclonal anti-tau (mouse Tau-5; BD PharMingen) and anti-actin (mouse JLA20; Calbiochem) antibodies and polyclonal anti-GFP (rabbit; Invitrogen). As secondary antibodies, peroxidase-conjugated anti-mouse and anti-rabbit antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) were used.

MTT assays were performed essentially as described previously (Piontek et al., 1999) with 1×10^4 NT2 cells or Puro/eGFP-indicator cells per well. Puromycin was added on the next day and incubation continued for another 24 hrs. before addition of MTT.

Potential toxicity of the NSAs on NT2 cells was analyzed by visual inspection of living cultures after 1, 2 and 3 weeks. Conditions were considered to be toxic, when cell density was decreased compared to freshly plated cultures.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Xu Xu for help with developing the fluorometric analysis; Frederik Sündermann, Giray Korkmaz and Marta Swierczek with initial experiments on the effect of synthetic nucleoside analogues; Angelika Hilderink and Vanessa Herkenhoff for technical assistence. The work was supported by the Interdisciplinary Graduate College "Cell and Tissue Differentiation from an Integrative Perspective" at the University of

Osnabrück. E.M. and H.R. gratefully acknowledge financial support by the BBraun AG (Melsungen, Germany).

REFERENCES

Andrews, P.W. 1984. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol* 103:285-293.

Arendt, T. 2012. Cell cycle activation and aneuploid neurons in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 46:125-135.

Bakota, L., R. Brandt, and J.J. Heinisch. 2012. Triple mammalian/yeast/bacterial shuttle vectors for single and combined Lentivirus- and Sindbis virus-mediated infections of neurons. *Mol Genet Genomics* 287:313-324.

Bang, Y.J., F. Pirnia, W.G. Fang, W.K. Kang, O. Sartor, L. Whitesell, M.J. Ha, M. Tsokos, M.D. Sheahan, P. Nguyen, *et al.* 1994. Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5330-5334.

Bartolucci, S., M. Estenoz, A. Longo, B. Santoro, R.L. Momparler, M. Rossi, and G. Augusti-Tocco. 1989. 5-Aza-2'-deoxycytidine as inducer of differentiation and growth inhibition in mouse neuroblastoma cells. *Cell Differ Dev* 27:47-55.

Bauwens, C.L., R. Peerani, S. Niebruegge, K.A. Woodhouse, E. Kumacheva, M. Husain, and P.W. Zandstra. 2008. Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories. *Stem Cells* 26:2300-2310.

Bierau, J., A.H. van Gennip, J. Helleman, and A.B. van Kuilenburg. 2001. The cytostatic- and differentiation-inducing effects of cyclopentenyl cytosine on neuroblastoma cell lines. *Biochem Pharmacol* 62:1099-1105.

Bloch, A. 1975. The structure of nucleosides in relation to their biological and and biochemical activity: a summary. *Ann N Y Acad Sci* 255:576-596.

Burgin, K.E., M.N. Waxham, S. Rickling, S.A. Westgate, W.C. Mobley, and P.T. Kelly. 1990. In situ hybridization histochemistry of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J Neurosci* 10:1788-1798.

Carson, D. A., D. B. Wasson, and E. Beutler. 1984. Antileukemic and immunosuppressive activity of 2-chloro-2'-deoxyadenosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2232-2236.

Cihak, A., J. Vesely, and J. Skoda. 1985. Azapyrimidine nucleosides: metabolism and inhibitory mechanisms. *Adv Enzyme Regul* 24:335-354.

Chen, S., S. Hilcove, and S. Ding. 2006. Exploring stem cell biology with small molecules. *Mol. Biosyst.* 2: 18-24.

Diab, R., G. Degobert, M. Hamoudeh, C. Dumontet, and H. Fessi. 2007. Nucleoside analogue delivery systems in cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 4:513-531.

S. Ding and P. G. Schultz. 2004. A role for chemistry in stem cell biology. *Nature Biotechnol*. 22: 833-840.

Ding, S., T.Y. Wu, A. Brinker, E.C. Peters, W. Hur, N.S. Gray, and P.G. Schultz. 2003. Synthetic small molecules that control stem cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7632-7637.

Dittgen, T., A. Nimmerjahn, S. Komai, P. Licznerski, J. Waters, T.W. Margrie, F. Helmchen, W. Denk, M. Brecht, and P. Osten. 2004. Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:18206-18211.

Efe, J. A., and Ding, S. 2011. The evolving biology of small molecules: controlling cell fate and identity. *Phil. Trans. R. Soc. B* 366: 2208-2221.

Emre, N., R. Coleman, and S. Ding. 2007. A chemical approach to stem cell biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11: 252-258.

Fluri, D.A., P.D. Tonge, H. Song, R.P. Baptista, N. Shakiba, S. Shukla, G. Clarke, A. Nagy, and P.W. Zandstra. 2012. Derivation, expansion and differentiation of induced pluripotent stem cells in continuous suspension cultures. *Nat Methods* 9:509-516.

Fuerer, C., and R. Nusse. 2010. Lentiviral vectors to probe and manipulate the Wnt signaling pathway. *PLoS One* 5:e9370.

Giovannori, G., G. Comi, S. Cook, K. Rammohan, P. Rieckmann, P. Soelberg Sörensen, P. Vermersch, P. Chang, A. HamlettB. Musch, S. J. Greenberg. 2010, A Placebo-Controlled Trial of Oral Cladribine for Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 362: 416-426.

Glaser, T., and O. Brustle. 2005. Retinoic acid induction of ES-cell-derived neurons: the radial glia connection. *Trends Neurosci* 28:397-400.

Hara, K., T. Yasuhara, M. Maki, N. Matsukawa, T. Masuda, S.J. Yu, M. Ali, G. Yu, L. Xu, S.U. Kim, *et al.* 2008. Neural progenitor NT2N cell lines from teratocarcinoma for transplantation therapy in stroke. *Prog Neurobiol* 85:318-334.

Hauser, S., D. Widera, F. Qunneis, J. Muller, C. Zander, J. Greiner, C. Strauss, P. Luningschror, P. Heimann, H. Schwarze, *et al.* 2012. Isolation of novel multipotent neural crest-derived stem cells from adult human inferior turbinate. *Stem Cells Dev* 21:742-756.

Heinisch, J.J. 1993. PFK2, ISP42, ERG2 and RAD14 are located on the right arm of chromosome XIII. *Yeast* 9:1103-1105.

Kazimierczuk, Z., H. B. Cottam, G. R. Revankar, and R. K. Robins. 1984. Synthesis of 2'-Deoxytubercidin, 2'-Deoxyadenosine, and Related 2'-Deoxynucleosides via a Novel Direct Stereospecific Sodium-Salt Glycosylation Procedure. J. Am. Chem. Soc. 106: 6379-6382.

Kempf, M., A. Clement, A. Faissner, G. Lee, and R. Brandt. 1996. Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J Neurosci* 16:5583-5592.

Köstler K. and H. Rosemeyer. 2009. Towards the Synthesis of Inosine Building Blocks for the Preparation of Oligonucleotides with Hydrophobic Alkyl Chains Between the Nucleotide Units. *Molecules* 14: 4326-4336.

Leschik, J., A. Welzel, C. Weissmann, A. Eckert, and R. Brandt. 2007. Inverse and distinct modulation of tau-dependent neurodegeneration by presenilin 1 and amyloid-beta in cultured cortical neurons: evidence that tau phosphorylation is the limiting factor in amyloid-beta-induced cell death. *J Neurochem* 101:1303-1315.

Li, W., K. Jiang, and S. Ding. 2012. Concise review: A chemical approach to control cell fate and function. *Stem Cells* 30:61-68.

Ludemann, N., A. Clement, V.H. Hans, J. Leschik, C. Behl, and R. Brandt. 2005. O-glycosylation of the tail domain of neurofilament protein M in human neurons and in spinal cord tissue of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Biol Chem* 280:31648-31658.

Maden, M. 2007. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 8:755-765.

Malecki, E., F. Ye, H. Reuter, and H. Rosemeyer. 2009. Synthesis and Crystal Structures of *O*-2',3'-Cyclic Cyclopentanone and Cyclohexanone Ketals of the Cytostatic 5-Fluorouridine. *Helv. Chim. Acta* 92: 1923-1932.

Malecki, E.and H. Rosemeyer. 2010. *O*-2',3'-Ketal Nucleolipids of the Cytostatic 5-Fluorouridine: Synthesis, Lipophilicity, and Acidic Stability. *Helv. Chim. Acta* 93: 1500-1512.

Malecki, E., Viere, R., and Rosemeyer, H. 2013. Immobilization of 5-Fluorouridine to Chitosan, Edith Malecki, *Chemistry & Biodiversity*, **2013**, accepted for publication, DOI: 10.1002/cbdv.201300025.

Palomo, V., D.I. Perez, C. Perez, J.A. Morales-Garcia, I. Soteras, S. Alonso-Gil, A. Encinas, A. Castro, N.E. Campillo, A. Perez-Castillo, *et al.* 2012. 5-Imino-1,2,4-thiadiazoles: first small molecules as substrate competitive inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *J Med Chem.* 55:1645-1661.

Piontek, J., C.C. Chen, M. Kempf, and R. Brandt. 1999. Neurotrophins differentially regulate the survival and morphological complexity of human CNS model neurons. *J Neurochem.* 73:139-146.

Piro L. D., C. J. Carrera, E. Beutler, and D. A. Carson. 1988. 2-Chlorodeoxyadenosine: An Effective New Agent for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 72: 1069-1073.

Pleasure, S.J., and V.M. Lee. 1993. NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J Neurosci Res* 35:585-602.

Pleasure, S.J., C. Page, and V.M. Lee. 1992. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci* 12:1802-1815.

Podrygajlo, G., M.A. Tegenge, A. Gierse, F. Paquet-Durand, S. Tan, G. Bicker, and M. Stern. 2009. Cellular phenotypes of human model neurons (NT2) after differentiation in aggregate culture. *Cell Tissue Res* 336:439-452.

Rose, J.B., and I.R. Coe. 2008. Physiology of nucleoside transporters: back to the future. *Physiology (Bethesda)* 23:41-48.

Rossi, A., G. Russo, A. Puca, R. La Montagna, M. Caputo, E. Mattioli, M. Lopez, A. Giordano, and F. Pentimalli. 2009. The antiretroviral nucleoside analogue Abacavir reduces cell growth and promotes differentiation of human medulloblastoma cells. *Int J Cancer* 125:235-243.

Schmole, A.C., A. Brennfuhrer, G. Karapetyan, R. Jaster, A. Pews-Davtyan, R. Hubner, S. Ortinau, M. Beller, A. Rolfs, and M.J. Frech. 2010. Novel indolylmaleimide acts as GSK-3beta inhibitor in human neural progenitor cells. *Bioorg Med Chem* 18:6785-6795.

Schneider, J.W., Z. Gao, S. Li, M. Farooqi, T.S. Tang, I. Bezprozvanny, D.E. Frantz, and J. Hsieh. 2008. Small-molecule activation of neuronal cell fate. *Nat Chem Biol* 4:408-410.

Seela, F., Ramzaeva, N., and Rosemeyer, H. 1998. PURINES. *Houben-Weyl, Methods of Organic Synthesis*, **1998**, *Vol. E9b*, 304-550.

Suter, D.M., O. Preynat-Seauve, D. Tirefort, A. Feki, and K.H. Krause. 2009. Phenazopyridine induces and synchronizes neuronal differentiation of embryonic stem cells. *J Cell Mol Med* 13:3517-3527.

Suva, M.L., N. Riggi, and B.E. Bernstein. 2013. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science* 339:1567-1570.

Yanes, O., J. Clark, D.M. Wong, G.J. Patti, A. Sanchez-Ruiz, H.P. Benton, S.A. Trauger, C. Desponts, S. Ding, and G. Siuzdak. 2010. Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat Chem Biol* 6:411-417.

Zhenchuk, A., K. Lotfi, G. Juliusson, and F. Albertioni. 2009. Mechanisms of anti-cancer action and pharmacology of clofarabine. *Biochem Pharmacol* 78:1351-1359.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Nucleoside analogues induce neuronal differentiation in a human ES-like cell line (NT2 cells).

A. Summary list showing the nucleoside analogues (NSAs) that have been tested in a first round of screening for their activity to induce morphological differentiation and expression of NF-M. Highly active NSAs according to both criteria are shown with dark red, less active NSAs with light red overlay. Inactive or only slightly active NSAs are indicated white and yellow, respectively. NF-M immunoreactivity and morphological differentiation were determined after 1 and 2 weeks, respectively, by visual inspection of fluorescence micrographs and rated as highly positive (++), positive (+), slight (0) or no (-) effect compared to the carrier control (PBS). **B**. Schematic representation of the structure of the different NSAs. Positions where active NSAs are modified are indicated. **C**. Induction of NF-M immunoreactivity and morphological differentiation by retinoic acid (RA). Staining was performed against O-glycosylated NF-M (red) and DNA (DAPI, blue), 3 days and 2 weeks following treatment with RA. Scale bar, 50 µm. **D**. Immunofluorescence micrographs showing examples of the effect of NSAs on induction of NF-M immunoreactivity and morphological differentiation. Cells were stained 2 weeks after treatment with the respective NLAs against O-glycosylated NF-M (red) and DNA (DAPI, blue). Scale bar, 50 µm.

Figure 2: Development and validation of a human reporter cell line for fluorescence-based detection of neuronal differentiation.

A. Schematic representation of the vector used to construct a lentiviral derivative by fast cloning in yeast. Sequence, which will be packed in viral particles is located between the LTR5' and LTR3' and encodes both a constitutively expressed puromycin resistence gene under the control of the SV40 promoter for selection of transduced cells and CaMKII-driven eGFP expression. **B**. Survival of wildtype and Puro/eGFP transduced NT2 cells in the presence of puromycin. Transduced cells exhibit markedly increased survival between 0.5 and 10 µg/ml puromycin compared to control cells as judged by formazan production in a MTT assay. **C**. Expression of eGFP and marker proteins during RA-induced differentiation of the Puro/eGFP reporter cell line. Expression of eGFP is detected late during differentiation together with tau, a marker protein for development of neuronal polarity. 50 µg (eGFP, tau) or 5 µg (actin) of total protein from NT2 cells after treatment with RA for 1, 2, 3, 4 and 5 weeks (w) as well as purified NT2N neurons were separated by 10% (tau, actin) and 15% (eGFP) SDS-PAGE, blotted and detected for the presence of the respective proteins. Molecular weight markers (m.w.) are indicated at right. **D**. Fluorometric analysis of developmentally regulated eGFP expression. 3.6×10^4 NTs or purified NT2N cells were plated in triplicate and subjected to fluorescence detection. Mean±SEM are shown. **E**. Live cell imaging of NT2N reporter neurons. Differentiated and purified Puro/eGFP transduced neurons were plated on glass-bottom culture dishes and subjected to fluorescence microscopy after 1-10 weeks as indicated. Scale bar, 100 µm. **F**. Immunofluorescence micrographs showing co-expression of eGFP with the neuronal marker proteins NF-M and MAP2 in individual neurons. Scale bar, 20 µm.

Figure 3: Live cell imaging and fluorometric analysis of reporter cells after treatment with different nucleoside analogues for short incubation times.

A. Fluorometric analysis of the effect of selected NSAs on induction of eGFP expression. Cells were treated for 2 weeks with the respective NSA or controls and $7\text{-}9\times10^3$ cells per condition were plated in triplicate and subjected to fluorescence detection. Mean±SEM are shown. **B, C**. Live cell imaging of reporter neurons that have been treated for 2 weeks (B) or 5 weeks (C) with selected NSAs. Scale bar, 100 µm. **D**.

Immunofluorescence micrographs showing co-expression of eGFP and MAP2 after 5 weeks of treatment with the NSA as indicated. Scale bar, 50 µm.

Figure 4: Induction of neuronal differentiation of adult human neural crest-derived stem cells.

→ Kaltschmidt lab

Figure 5: Structural features of NSAs highest activity to promote neuronal differentiation.

A. Schematic representation of the NSAs with highest activity. **B.** Common structural features of the pyrimidin nucleosides that have been analyzed in this study.

Supplementary Material:

Table S1: Solubility and toxicity of NSAs.

Figure 1

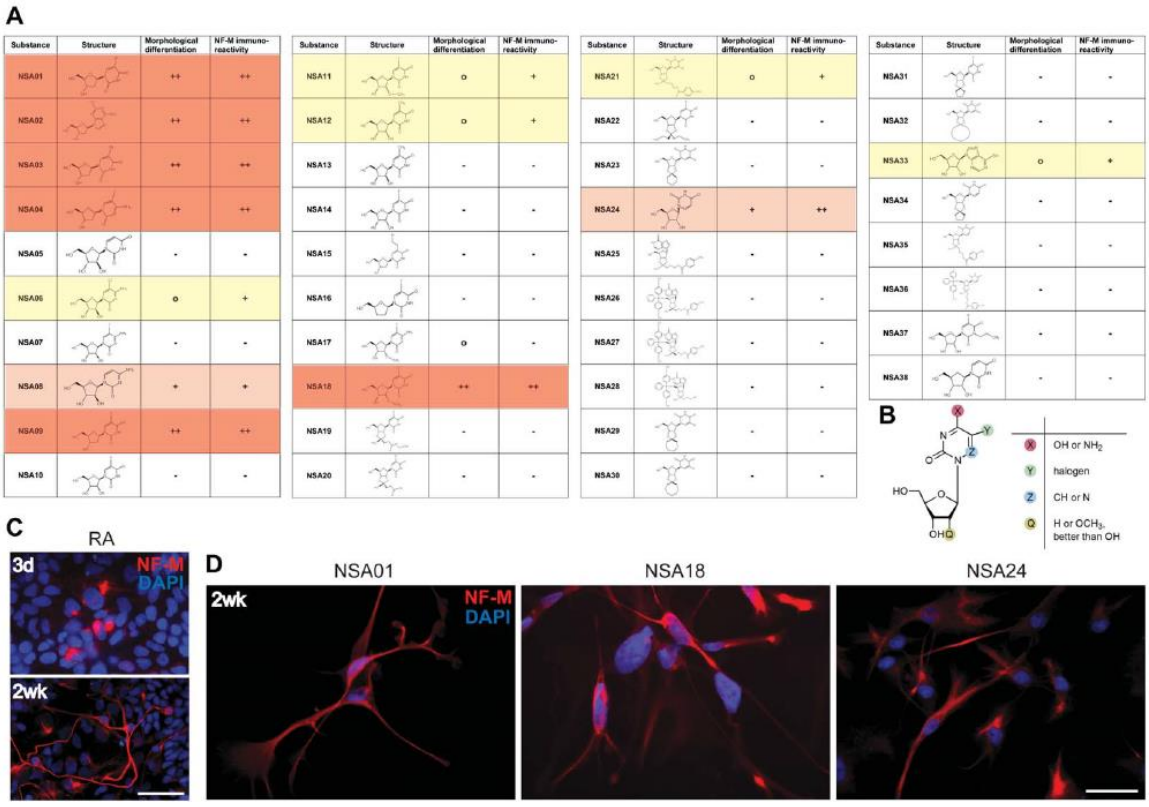

A
Substance
Structure
Morphological differentiation
NF-M immuno-reactivity
NSA01
NSA02
NSA03
NSA04
NSA05
NSA06
NSA07
NSA08
NSA09
NSA10
NSA11
NSA12
NSA13
NSA14
NSA15
NSA16
NSA17
NSA18
NSA19
NSA20
NSA21
NSA22
NSA23
NSA24
NSA25
NSA26
NSA27
NSA28
NSA29
NSA30
NSA31
NSA32
NSA33
NSA34
NSA35
NSA36
NSA37
NSA38
B
X
Y
Z
Q
OH or NH2
halogen
CH or N
H or OCH3, better than OH
C
RA
3d
NF-M
DAPI
2wk
D
NSA01
NSA18
NSA24
2wk
NF-M
DAPI

Figure 2

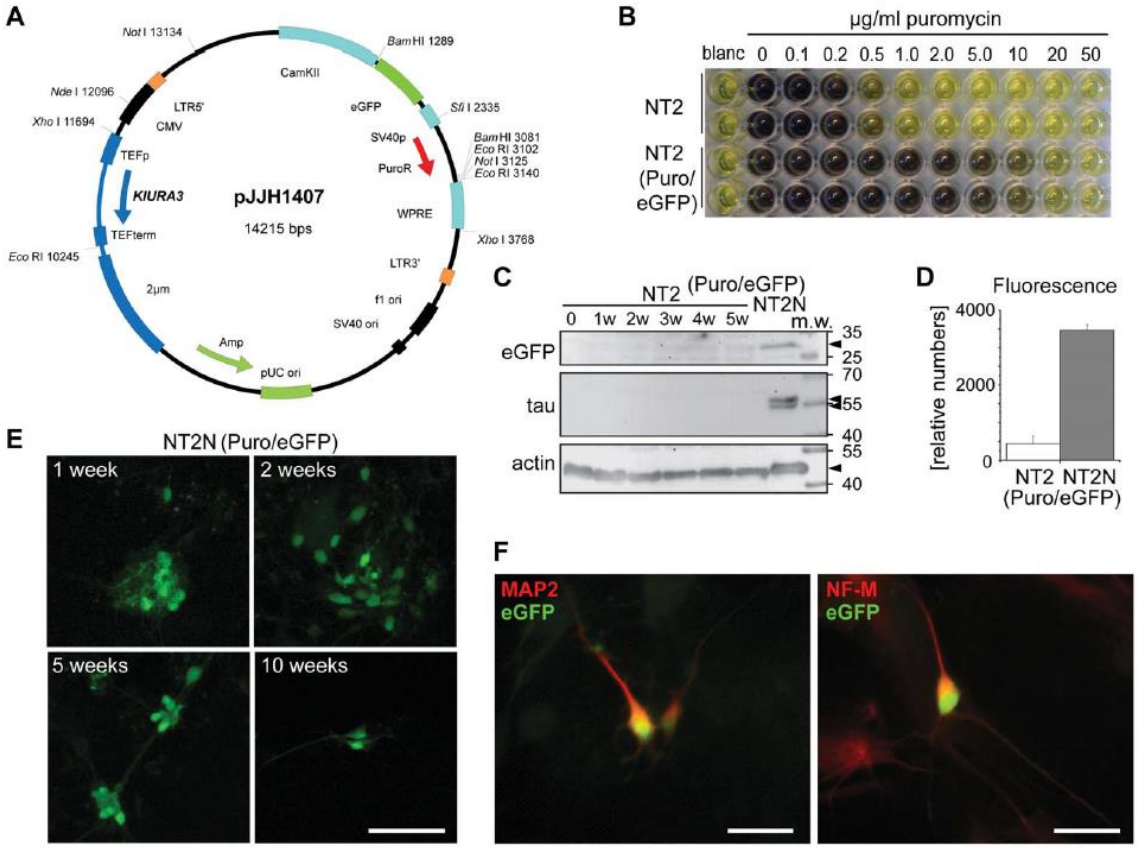

A
Not I 13134
Bam HI 1289
CamKII
Nde I 12096
LTR5'
eGFP
Sfi I 2335
Xho I 11694
CMV
SV40p
Bam HI 3081
Eco RI 3102
Not I 3125
Eco RI 3140
TEFp
PuroR
KIURA3
pJJH1407
14215 bps
WPRE
TEFterm
Xho I 3768
Eco RI 10245
LTR3'
2µm
f1 ori
SV40 ori
Amp
pUC ori
B
µg/ml puromycin
blanc 0 0.1 0.2 0.5 1.0 2.0 5.0 10 20 50
NT2
NT2 (Puro/ eGFP)
C
NT2 (Puro/eGFP)
NT2N
0 1w 2w 3w 4w 5w
m.w.
eGFP
tau
actin
35
25
70
55
40
55
40
D
Fluorescence
[relative numbers]
4000
2000
0
NT2 NT2N (Puro/eGFP)
E
NT2N (Puro/eGFP)
1 week
2 weeks
5 weeks
10 weeks
F
MAP2 eGFP
NF-M eGFP

Figure 3

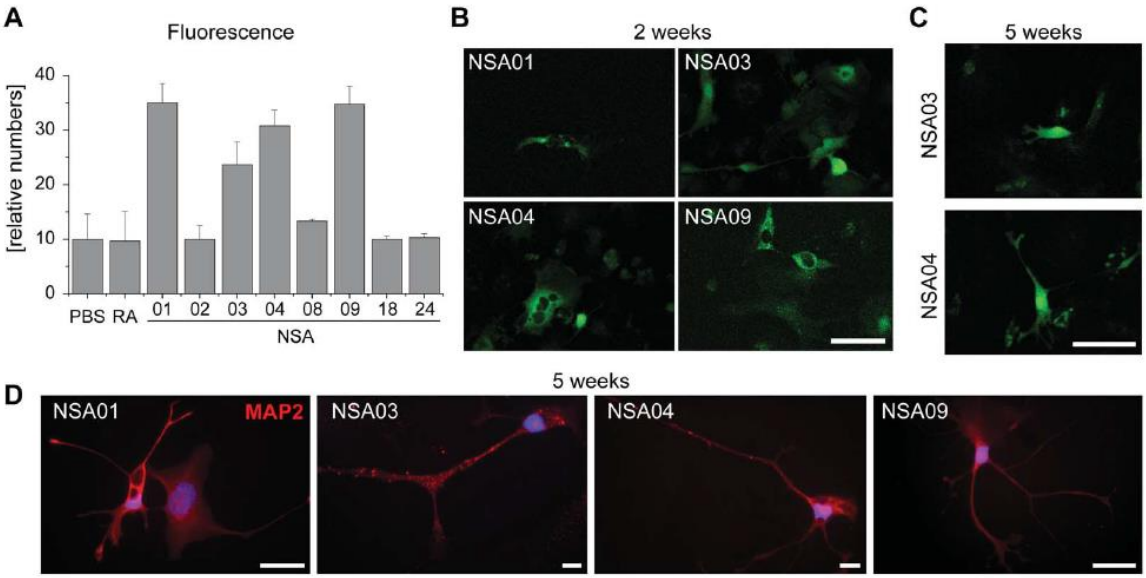

A
Fluorescence
[relative numbers]
40
30
20
10
0
PBS RA 01 02 03 04 08 09 18 24
NSA
B
2 weeks
NSA01
NSA03
NSA04
NSA09
C
5 weeks
NSA03
NSA04
D
5 weeks
NSA01
MAP2
NSA03
NSA04
NSA09

Figure 4

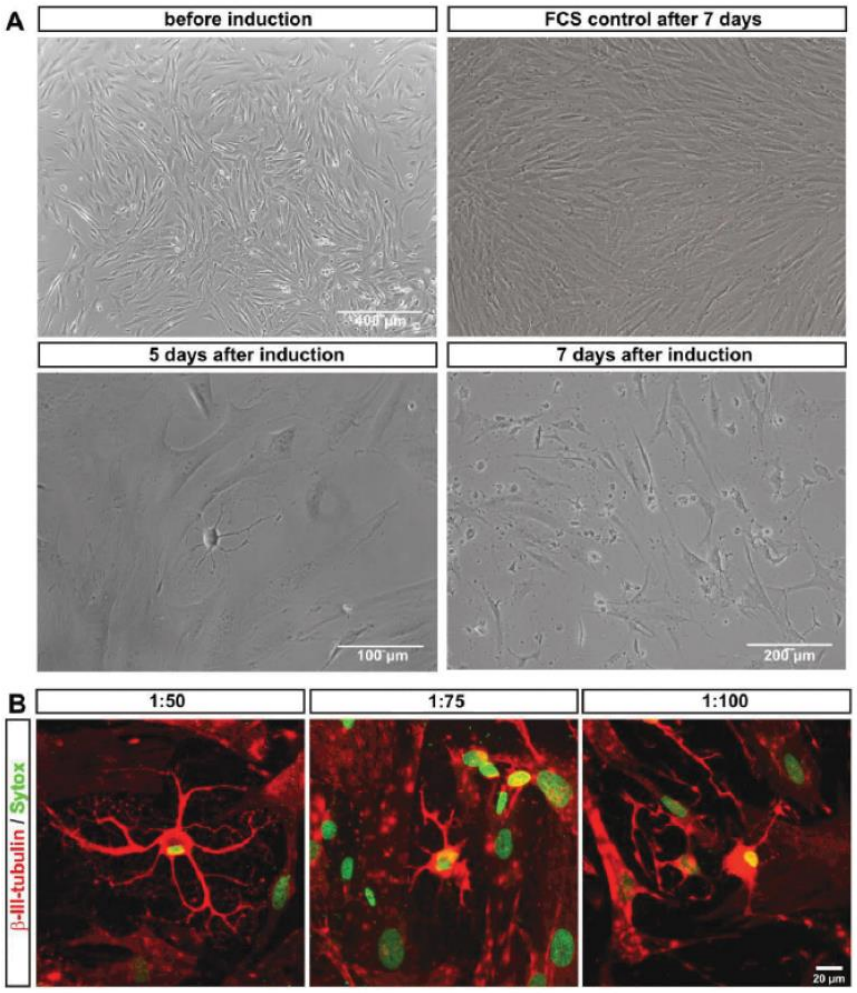
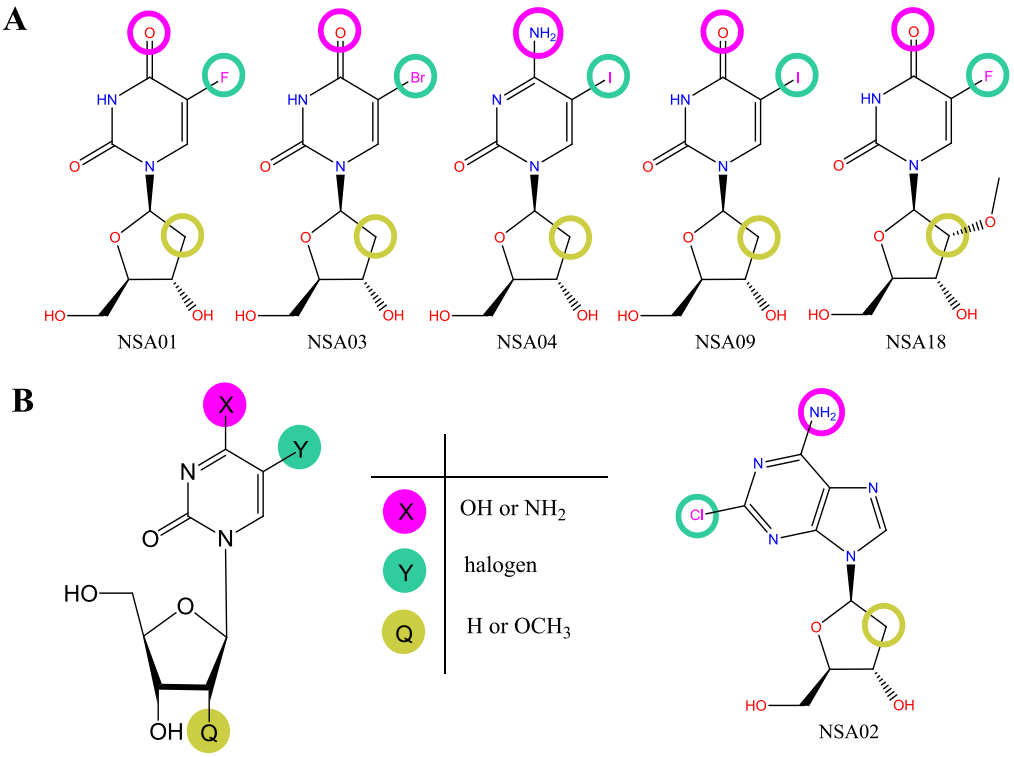

A
before induction
FCS control after 7 days
400 µm
5 days after induction
7 days after induction
100 µm
200 µm
B
1:50
1:75
1:100
β-III-tubulin / Sytox
20 µm

Figure 5


A
NSA01
NSA03
NSA04
NSA09
NSA18
B
X
Y
Q
OH or NH2
halogen
H or OCH3
NSA02

Immobilization of 5-Fluorouridine on Chitosan

Edith Malecki, Rebecca Viere, Helmut Rosemeyer

Chemistry & Biodiversity **2013**, 10 (10), 1828-1841.

DOI: 10.1002/cbdv.201300025

Patente

Datei anhang_malecki