

Aus dem Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der  
Viruskrankheiten der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Gerhard Jahn

**Das neue AZT-PFA-Duplex-Virostatikum N3:  
Synthese, in vitro Aktivität und Stabilität**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnheilkunde der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

**Timm Cornelius Schott**

aus Tübingen

2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. K. Hamprecht

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Kandolf

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	4
1 Herpes-simplex-Virus.....	6
1.1.1 Eigenschaften des Herpes-simplex-Virus.....	6
1.1.1.1 Taxonomie und Morphologie.....	6
1.1.1.2 Genomaufbau und Replikation.....	6
1.1.2 Epidemiologie.....	8
1.1.3 Klinik.....	8
1.2 Antivirale Wirkstoffe.....	11
1.2.1 Nukleosidanaloga als antivirale Prodrugs.....	11
1.2.2 Acyclische Nukleosidanaloga.....	15
1.2.3 Acyclische Nukleosidphosphonate und deren Prodrugs.....	19
1.2.4 Nicht-nukleosidische Virostatika.....	20
1.3 Kombinationstherapie mit Virostatika.....	21
1.4 Antivirale Duplex-Wirkstoffe.....	22
1.4.1 Combined prodrugs.....	23
1.4.2 AZT-PFA-Ester.....	24
1.4.3 AZT-PFA-Konjugate.....	25
1.4.4 AZT-PFA-Duplex-Virostatika.....	26
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	28
2 Material.....	30
2.1 Material für die virologischen Untersuchungen.....	30
2.1.1 Vero-Zellen.....	30
2.1.2 Herpes-simplex Virusstämme.....	30
2.1.3 Virostatika.....	31
2.1.3.1 Aciclovir (Zovirax® u.a.).....	31
2.1.3.2 AZT-PFA-Duplex-Virostatika.....	31
2.1.4 Lösungen für die Zellkultur.....	32
2.1.5 Reagenzien.....	33
2.1.6 Verbrauchsmaterial.....	34
2.1.7 Geräte.....	35
2.2 Blutproben und Lösungen für die Blutausstriche.....	36

3	Methoden.....	37
3.1	Methoden der chemischen Synthese .....	37
3.1.1	Kondensation von PFA an 3´-Azido-3´-desoxythymidyl- (5´→2)-3-O-octadecyl-sn-glycerin (5) .....	37
3.1.1.1	Chromatographische Reinigung des Kondensations- gemisches .....	37
3.1.2	Hydrolytische Spaltung des Ethylesters im Kondensations- produkt 7 (N4) und Isolierung des AZT-PFA-Duplex- Virostatikums 8 (N3sn) .....	39
3.2	Virologische Arbeitsmethoden.....	40
3.2.1	Kultivierung von Vero-Zellen.....	40
3.2.2	Gewinnung von HSV-Lysaten durch Gefriertauanalyse.....	41
3.2.3	Zellzählung .....	41
3.2.4	Screening-Plaquereduktionstest (SPRA) .....	42
3.2.5	Plaquereduktionstest (PRA) zur Bestimmung der 50 % igen inhibitorischen Virostatikakonzentration – IC <sub>50</sub> Bestimmung mittels Probit-Analyse .....	44
3.2.6	Färbemethoden .....	45
3.2.6.1	Färbung mit Kristallviolett.....	45
3.2.6.2	HSV gD-Peroxidasetest .....	45
3.2.7	Mikroskopische Auswertung .....	46
3.2.8	Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte nach der zeitabhängigen Inkubation der Virostatika in humanem Blutserum bzw. EDTA-Humanblut....	46
3.2.8.1	Gewinnung des Humanserums und Inkubation mit N3 und N4 .....	47
3.2.8.2	Gewinnung des EDTA-Humanbluts und Inkubation mit N3, N4 und ACV.....	47
3.3	Anfertigung und Auswertung der Blutausstriche.....	48
3.3.1	Herstellung der Proben.....	48
3.3.2	Aufbringen der Blutpräparate.....	48
3.3.3	Giemsa-Färbung der Blutausstriche .....	48
3.4	Herstellung der Proben für die Messung des freien Hämoglobins mit dem Dade Dimensions RxL-Analysegerät.....	49

4	Ergebnisse.....	50
4.1	Synthese des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums.....	50
4.1.1	Synthese von 3'-Azido-3'-desoxythymidyl- (5'→2)-3-O-octadecyl-sn-glycerin (5) aus L-Batylalkohol .....	50
4.1.2	Synthese des Duplex-Virostatikums 8 (N3sn) durch Kondensation von 5 mit (Ethoxycarbonyl)phosphorigsäuredichlorid (6)....	54
4.1.2.1	Kondensationsreaktion.....	55
4.1.2.2	Säulenchromatographische Reinigung des Kondensationsansatzes .....	55
4.1.2.3	Hydrolytische Entfernung des Ethylesters aus 7 (N4) und Isolierung von 8 (N3sn) .....	58
4.1.3	Die optische Aktivität der Syntheseprodukte.....	59
4.2	Virologische Untersuchungen.....	61
4.2.1	Ergebnisse der Färbemethoden .....	61
4.2.2	Ermittlung der N3 und ACV-Konzentrationen, die die Virus- plaquebildung zu 50 % hemmt (IC <sub>50</sub> -Werte) durch den SPRA-und PRA Test .....	65
4.2.2.1	Ergebnisse des SPRA-Test.....	65
4.2.2.2	Ergebnisse des PRA-Tests .....	68
4.2.3	Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte von N3rac und N4 unter Verwendung des ACV-resistenten Viruslysates HSV-K182res nach unterschiedlicher Inkubationsdauer im Humanserum .....	69
4.2.4	Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte von N3rac, N3sn, N4 und ACV unter Verwendung des ACV-resistenten Viruslysates HSV-K182res nach unterschiedlicher Inkubationsdauer im EDTA-Humanblut....	71
4.3	Orientierende Untersuchungen zur Einwirkung von N3 auf die Blutbestandteile von EDTA-Humanblut.....	74
5	Diskussion .....	78
6	Zusammenfassung .....	84
7	Literaturverzeichnis.....	86
8	Danksagung.....	92
9	Lebenslauf .....	94

Abkürzungsverzeichnis	
[α]	Gemessener Drehwert bei 20°C und der Wellenlänge 589,3 nm
3TC	4-Amino-1-(2-hydroxymethyl-1,3-oxathiolan-5-yl)-1H-pyrimidin-2-on (Lamivudin)
ACV	9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanin (Aciclovir)
ACVres	Aciclovir-resistent
ACVsens	Aciclovir-sensitiv
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AZT	3'-Azido-2'-desoxythymidin (Zidovudin)
CMV	Cytomegalovirus
CPE	Cytopathischer Effekt
EBV	Epstein-Barr-Virus
FCS	Fötale Kälberserum
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HFF	Humane Vorhautfibroblasten (human foreskin fibroblasts)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes-simplex-Virus
IC <sub>50</sub>	Inhibitorische Dosis 50 %
Kb	Kilobase
MEM	Minimum essential medium
MG	Molgewicht

## Abkürzungsverzeichnis

---

N3rac	3'-Azido-3'-desoxythymidyl- (5'→2)-3-O-octadecyl-rac-glyceryl- 1-O-phosphonoameisensäure
N3sn	3'-Azido-3'-desoxythymidyl- (5'→2)-3-O-octadecyl-sn-glyceryl- 1-O-phosphonoameisensäure
N4	3'-Azido-3'-desoxythymidyl- (5'→2)-3-O-octadecyl-sn-glyceryl- 1-O-phosphonoameisensäure- ethylester
NCI	National Cancer Institut, USA
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PFA	Phosphonoameisensäure (Foscarnet)
PFU	Plaque forming unit
PRA	Plaquereduktionstest (Plaque Reduction Assay)
rac	Racemisch
P/S	Penicillin/Streptomycin
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
sn	stereospecific numbering system
TCID <sub>50</sub>	Tissue culture infectious dose 50 %
TK	Thymidinkinase

## **1 Herpes-simplex-Virus**

### **1.1.1 Eigenschaften des Herpes-simplex-Virus**

#### **1.1.1.1 Taxonomie und Morphologie**

Das Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1), auch als humanes Herpesvirus 1 (HHV1) bezeichnet, gehört zu der Alphaherpesvirinae-Subfamilie der Familie der Herpesviridae. Diese humanpathogenen Viren, zu denen auch das Herpes-simplex-Virus 2 (HSV-2) und das Varicella-Zoster-Virus (VZV) gehört, zeichnen sich sowohl durch eine kurze Replikationszeit in vielen verschiedenen Zelllinien als auch durch eine schnelle Ausbreitung der Infektion über Zell-zu-Zell-Kontakte aus.

Reife HSV-Virionen haben einen Durchmesser von 150 - 200 nm. Sie besitzen ein DNA-beinhaltenes ca. 25 - 30 nm großes Core, welches von einem aus 162 Kapsomeren gebildeten ikosaedrischen Kapsid umgeben ist. Dieses Nukleokapsid (ca. 105 nm) wird wiederum von einem herpesvirustypischen Tegument (oder Matrixraum) umgeben. Die äußerste Hülle (envelope) besteht aus einer zellulären Lipid-Doppelmembran, in die 12 unterschiedliche für den Infektionsvorgang erforderliche virale Glykoproteine verankert sind. Diese werden nach außen in Form von kurzen „Spikes“ exponiert.

Die Virionen sind empfindlich gegenüber organischen Lösungsmitteln, Hitze und niedrigem pH. Wegen ihrer geringen Stabilität bei -20°C sollten sie bei -80°C gelagert werden.

#### **1.1.1.2 Genomaufbau und Replikation**

Das HSV besitzt ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom aus 152 kb, das aus einem langen, 126 kb umfassenden ( $U_L$  = unique long) und einem kurzen, 26 kb umfassenden ( $U_S$  = unique short) Segment besteht, das von wiederholten, invertierten und jeweils zueinander homologen Sequenzen begrenzt wird. Die sich wiederholenden Sequenzen werden je nach ihrer

Lage im Genom als terminal repeat (TR<sub>L</sub> bzw. TR<sub>S</sub>) oder internal repeat (IR) bezeichnet. Durch die freie Invertierbarkeit der U<sub>L</sub>- und U<sub>S</sub>-Einheiten können durch intramolekulare Rekombination vier äquimolare Genomisomere entstehen.



**Figur 1.** Genomaufbau von HSV-1. Die Genomregionen, die aus Sequenzwiederholungen bestehen, sind als Kästen repräsentiert. Sie befinden sich an den Genomenden (TR = terminal repeat) und innerhalb des Genoms (IR = internal repeat). Die einmalig vorkommenden Genomabschnitte (U<sub>L</sub> bzw. U<sub>S</sub>) werden durch Striche dargestellt.

Die Herpes-simplex-Viren heften sich mit dem gC Protein an Heparinsulfat auf der Zellmembran und penetrieren durch Fusion von Plasmamembran und Virushülle in die Zelle. Der Transport des Kapsids zum Kern erfolgt durch Mikrotubuli, wo dann die virale DNA freigesetzt wird und die Transkription der HSV-Gene beginnt. Diese verläuft kaskadenartig in drei zeitlich aufeinanderfolgenden Abschnitten (immediate early -IE; early -E; late -L). Die immediate early-Proteine werden direkt nach Eintritt des Virus in die Wirtszelle unabhängig von viralen Funktionen gebildet. Sie regulieren wiederum die Promotoren der early-Proteine, deren Produkte an der Genomreplikation beteiligt sind. Zu ihnen gehören zahlreiche Enzyme wie z.B. Polymerase UL30 + UL42, Ribonukleotidreduktase UL39 + UL40, Thymidinkinase UL23 (TK) u.a. Letzterer kommt eine Schlüsselstellung für die selektive Wirkungsweise der meisten momentan zur Therapie von Herpes-simplex-Infektionen eingesetzten Virostatika zu. Funktionelle immediate early und early-Genprodukte aktivieren die Promotoren der late Proteine. Diese sind überwiegend an der Synthese der viralen Strukturproteine, die dem Aufbau des Virions dienen, beteiligt.

### 1.1.2 Epidemiologie

HSV-Infektionen sind weltweit verbreitet und zeigen keine jahreszeitlichen Schwankungen (Whitley et al., 2001). Die Infektion mit HSV-1 erfolgt oft schon im frühen Kindesalter durch Kontakt mit virushaltigem Bläscheninhalt oder Sekreten der Mundhöhle und führt zu einer Durchseuchungsrate bei Erwachsenen von 70 – 80 % (Miller et al., 1998). Die Infektion mit HSV-2 erfolgt normalerweise im Erwachsenenalter durch sexuellen Kontakt. Ungefähr 50 Millionen Personen in den Vereinigten Staaten haben eine genitale HSV-Infektion und ca. 500.000 – 700.000 Fälle symptomatischer genitaler Primärinfektionen kommen jährlich neu hinzu (Beauman 2005).

### 1.1.3 Klinik

HSV-1 ist normalerweise mit oralen, HSV-2 dagegen mit genitalen Infektionen assoziiert. Bei der Primärinfektion dringt das Virus über die Schleimhaut in den Wirtsorganismus ein. Bei gesunden und immunkompetenten Personen verläuft die Primärinfektion in 99 % der Fälle inapparent. Bei ca. 1 % der Infizierten kommt es zu Erkrankungen, die sich vorwiegend am Eintrittsort, meist mit typischen Herpesbläschen manifestieren, wie z.B. der äußerst schmerzhaften oralen Gingivostomatitis herpetica. Eine lebensbedrohliche und oft schwerste zerebrale Schäden zurücklassende Erkrankung ist der Herpes neonatorum. Ursächlich hierfür ist eine Infektion des immunologisch noch unreifen Neugeborenen mit HSV. Besonders gefährdet sind Frühgeborene. Infektionsquelle ist in 85 – 90 % der Fälle eine primäre oder rekurrende Herpes genitalis Infektion der Mutter, die sich auf den gesamten Geburtskanal ausbreiten kann. Um eine Übertragung der Erreger auf das Kind während der Geburt zu vermeiden, sollte eine sectio durchgeführt werden. In 10 – 15 % der Fälle ist eine postnatale HSV-Übertragung auf das Neugeborene von einer oralen Infektion der Mutter oder anderer Kontaktpersonen ursächlich.

Schwerwiegende, durch HSV-induzierte Komplikationen können auch nach Knochenmarks- oder Stammzelltransplantationen auftreten. Bei den

immunsupprimierten Patienten kann es zu disseminierten mukokutanen Läsionen im oberen Respirationstrakt (Oropharynx und Luftröhre) kommen, aber auch Endorganmanifestationen wie z.B. Ösophagitis, Pneumonien oder Hepatitis spielen eine wichtige Rolle. (Morfin et al., 2004)

Eine Übersicht der mit HSV assoziierten Erkrankungen ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1.** Erkrankungen durch das Herpes-simplex-Virus (nach Wutzler 2002).

Erkrankung	vorherrschender Virustyp	Primärinfektion (P)/ Rezidiv (R)
<b>Mukokutaner Herpes simplex</b>		
<b>bei immunkompetenten Patienten:</b>		
Gingivostomatitis herpetica	HSV-1	P
Keratoconjunctivitis herpetica	HSV-1	P
Herpes simplex labialis bzw. facialis	HSV-1	P/R
Eczema herpeticatum	HSV-1	P
Herpes genitalis	HSV-2, HSV-1 <sup>1</sup>	P/R
<b>Herpes simplex des Zentralnervensystems:</b>		
Herpesenzephalitis bei Kindern und Erwachsenen	HSV-1	P
Herpesenzephalitis bei Neugeborenen	HSV-2	P
Neurologische Komplikationen bei Herpes genitalis	HSV-2	P
Cauda-radiculitis herpetica		
Myelitis herpetica		
Meningitis herpetica		
<b>Disseminierte Herpes simplex bei Immunsupprimierten:</b>		
Viszeraler Herpes (Pneumonie, Ösophagitis, Hepatitis)	HSV-1, HSV-2	P/R



## 1.2 Antivirale Wirkstoffe

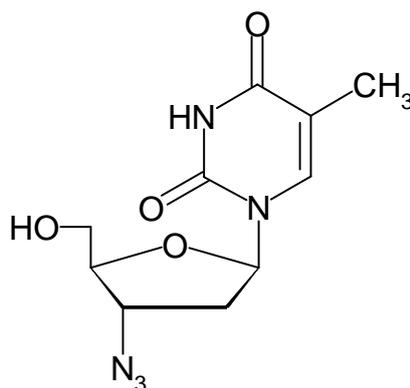
### 1.2.1 Nukleosidanaloga als antivirale Prodrugs

Seit Beginn der antiviralen Chemotherapie der virusbedingten Erkrankungen nehmen Nukleosidanaloga eine Schlüsselfunktion ein.

Die Entdeckung von Nukleosidanaloga als Virostatika wurde durch die Chemotherapie von Tumoren initiiert, bei der Nukleosidanaloga als sehr effektive Zytostatika appliziert werden. Das Tumorwachstum, das durch eine unkontrollierte Zellvermehrung ausgelöst wird, ist nur dann möglich, wenn die DNA-Replikation in der Tumorzelle ungehindert fortschreiten kann, indem die vier natürlichen Nukleosidtriphosphate schrittweise an das 3'-Ende der wachsenden DNA-Kette template-gesteuert ankondensiert werden. Nukleosidanaloga, die auf der molekularen Ebene des komplexen Replikationsmechanismus mit den natürlichen Nukleotiden an unterschiedlichen Stellen konkurrieren (Bindung an Substratbindungsstelle), können dabei die Reaktionsabläufe stark behindern oder sogar völlig blockieren, so dass auf der zellulären Ebene das Zellwachstum stoppt. Diese Nukleosidanaloga wirken dann als Zytostatika.

Da auf der molekularen Ebene bei einer Virusvermehrung analoge Mechanismen die Multiplikation des Virusgenoms bewerkstelligen, kann mit sehr unterschiedlichen Nukleosidanaloga, die die virale DNA/RNA-Synthese blockieren, die Virusvermehrung gestoppt werden, so dass sich solche Nukleosidanaloga als Virostatika eignen.

Die zur antiviralen Therapie verwendeten Nukleosidanaloga sind in der Regel therapeutisch unwirksame, sogenannte „Prodrugs“. Als Beispiel für ein antivirales Nukleosidanalogen ist in Figur 2 die Strukturformel des klassischen Virostatikums 3'-Azido-3'-desoxythymidin (Zidovudin, AZT) aufgeführt.



**Figur 2.** Strukturformel von 3'-Azido-3'-desoxythymidin (Zidovudin, AZT)

Das Nucleosidanalogue AZT (Sethi 1991) unterscheidet sich von Thymidin, dem natürlichen Nucleosid, darin, dass die 3'-Hydroxylgruppe des Thymidins durch eine Azidogruppe ( $N_3$ ) ersetzt ist. Nach der Zellaufnahme der Nucleosidanaloga wird zunächst ihre freie 5'-Hydroxylgruppe mit Hilfe von Kinasen phosphoryliert. In diesem ersten entscheidenden Phosphorylierungsschritt, der bei Herpesviren durch ein virales Genprodukt (HSV: Thymidinkinase UL23, CMV: UL97 Serin-Threoninphosphotransferase) katalysiert wird, resultiert ein Nucleosidmonophosphatanalogue, das anschließend noch über die Diphosphatstufe zum eigentlichen wirksamen Nucleosidtriphosphatanalogue durch zelluläre Enzyme anabolisiert werden muss.

Die Nucleosidanaloga können vor allem durch zwei Mechanismen die Virusvermehrung effektiv blockieren. Einerseits kommt nämlich die Multiplikation des Virusgenoms zum Erliegen, wenn die „reverse Transkriptase“ (RNA-abhängige DNA-Polymerase) kompetitiv durch die Nucleotidanaloga gehemmt wird. Andererseits stoppt die Neusynthese der Nucleinsäuren, wenn in das 3'-Ende der wachsenden Nucleinsäurekette ein Nucleotidanalogue eingebaut wird, das selbst keine freie 3'-Hydroxylgruppe aufweist. Aufgrund der dann fehlenden Ankergruppe am 3'-Terminus der wachsenden Nucleinsäurekette kann im anschließenden

Kondensationsschritt kein weiterer Nukleinsäurebaustein zur 3'→5'-Kettenverlängerung angehängt werden, was einen Kettenabbruch induziert. Da Nukleosidanaloga von allen Zellen aufgenommen werden können, ist ihre Wirkung weitgehend zellunspezifisch. Die Aufnahme des Wirkstoffs in nicht infizierte Zellen, die im Verlauf einer Chemotherapie unvermeidbar ist, kann somit auch das Wachstum dieser Zellen mehr oder weniger stark beeinträchtigen. Die Folgen dieses ungewollten Eingriffs in den Replikationsmechanismus gesunder, nicht infizierter Zellen, können unter anderem die Ursache für unangenehme Nebenwirkungen im Verlauf einer Chemotherapie mit Virostatika sein. Alle Wege, die einen selektiven Transport der Wirkstoffe zum Zielort ermöglichen, können somit zu einer, für den Patienten besseren Verträglichkeit der Chemotherapie beitragen. Beispiel: Myelosuppression durch Ganciclovir.

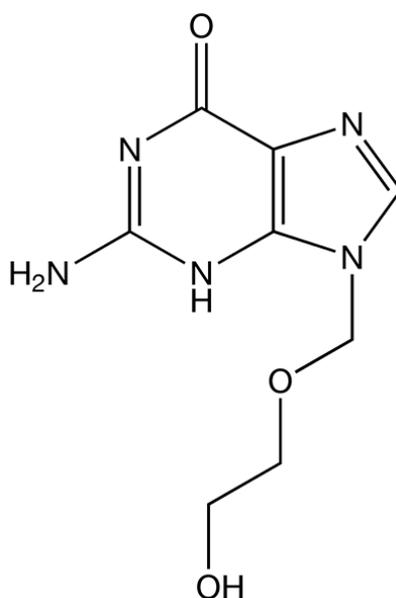
Ein zusätzliches, weitgehend ungelöstes Problem, das vor allem bei einer Langzeittherapie mit nur einem einzigen antiviralen Arzneimittel (Monotherapie) regelmäßig auftritt, ist die sich potenziell entwickelnde Resistenz gegen das applizierte Virostatikum. Die Ursachen für die Resistenzbildung, durch die die antivirale Wirkung eines Medikaments im Laufe der Therapie verloren geht, sind mannigfaltig. Vor allem zwei Mechanismen sind für auftretende Resistenzen bei der Applikation von Nukleosidanaloga verantwortlich. Einerseits können z.B. bei Herpes-simplex-Viren die Enzyme, denen die Anabolisierung der Nukleoside zu den Nukleosidmonophosphaten obliegt (bspw. virale UL23-Kinasen), mutationsbedingt inaktiviert oder nicht mehr als funktionsfähiges Protein gebildet werden. Die Folge ist, dass die erforderliche Menge an wirksamen Nukleosidtriphosphatanaloga in der Zelle fehlt, so dass die antivirale Therapie erfolglos verläuft.

Neben der Resistenz, die auf der Inaktivierung oder dem Mangel an funktionell aktiven viral codierenden Kinasen beruht, kommt ein weiterer Resistenzmechanismus dadurch zustande, dass das am 3'-Ende eingebaute Nukleosidanaloga aus dem sich neu bildenden Nukleinsäurestrang im Zuge einer Phosphorylierung entfernt wird (Meyer et

al., 1998; Boyer et al., 2001). Wenn das als Elongationsinhibitor wirkende Nukleosidanalogen abgespalten wird, kann die Replikation der Nukleinsäure mit den vier natürlichen Nukleosidtriphosphaten wieder problemlos fortgeführt werden. Die Nukleosidanaloga bleiben zwar immer noch potentielle Virostatika, können die Virusmultiplikation aber nicht mehr aufhalten. Sie haben ihre antivirale Wirkung verloren, da sie als Inhibitor der DNA-Elongation nicht mehr funktionieren.

### 1.2.2 Acyclische Nucleosidanaloga

Antivirale Nucleosidanaloga, in denen der Zuckeranteil gegen einen acyclischen Rest getauscht ist, bilden die Gruppe der acyclischen Nucleosidanaloga (Balfour 1999) oder (Choo et al., 2007). Ein typisches Virostatikum dieser Gruppe ist das 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanin (Aciclovir, ACV), ein Analogon des natürlichen 2'-Desoxyguanins (siehe Figur 3).



**Figur 3.** Strukturformel des acyclischen Nucleosidanalogs Aciclovir (ACV)

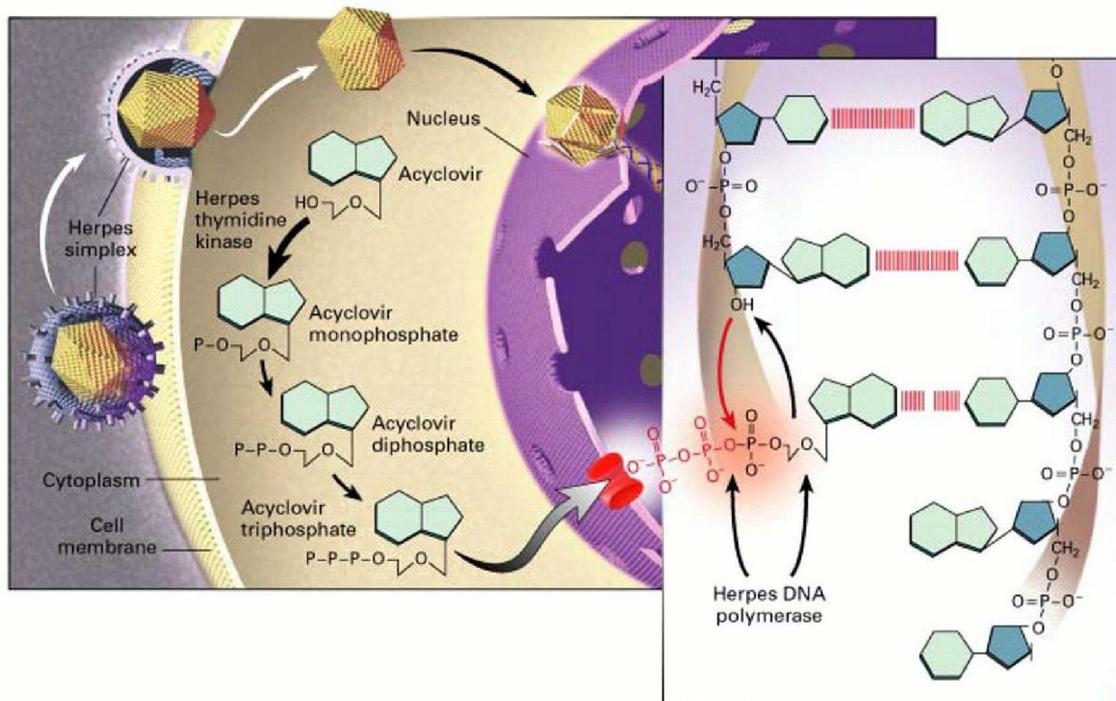
ACV wurde im Jahre 1974 von Howard Schaffer und Lilia Beauchamp bei Wellcome synthetisiert. Die antivirale Wirkung kann *in vitro* nachgewiesen werden (Elion et al., 1977; Schaeffer et al., 1978).

Der Wirkstoff wurde 1981 als Medikament zugelassen und hat im klinischen Alltag sowohl zur Prävention als auch zur Therapie von Herpesvirus-erkrankungen noch eine weite Verbreitung (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2.** Antivirales Wirkungsspektrum der Virostatika 3'-Azido-3'-desoxythymidin (AZT), Phosphonoameisensäure (PFA) und 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanin (ACV)

<b>Virus</b>	<b>AZT</b>	<b>PFA</b>	<b>ACV</b>	<b>Krankheitsbild</b>
<b>Herpesviren:</b>				
HSV-1		+	+	Gingivostomatitis herpetica
HSV-2		+	+	Genitaler Herpes
VZV		+	+	Windpocken, Gürtelrose
EBV		+	+	Infektiöse Mononukleose
CMV		+	(+)	Cytomegalie, kongenitale/postnatale Infektion
HHV-6				Roseola infantum (Dreitagefieber)
HHV-7				Roseola, Pityriasis rosea
HHV-8		+		Kaposi Sarkom, B-Zelllymphome
<b>Hepatitisviren:</b>				
Hepatitis B	+			
<b>Retroviren:</b>				
	+			

In Zellen, die mit dem Herpes-simplex-, Varicella-Zoster-, Epstein-Barr oder Cytomegalovirus infiziert sind, wird die Hydroxylgruppe des acyclischen Restes mit Hilfe der virusprogrammierten Enzyme bis zur Triphosphatgruppe anabolisiert (Figur 4).



**Figur 4.** Anabolisierung von ACV zum Aciclovirtriphosphat (Figur aus Balfour 1999).

Das acyclische Nucleosidtriphosphatanalogon kann dann die Replikation der viralen Nucleinsäure mit den Mechanismen stoppen, die bei den Nucleosidanaloga beschrieben sind.

Jedoch bereits ein Jahr nach der Zulassung wurden die ersten Fälle klinischer ACV-Resistenz beobachtet (Burns et al., 1982; Crumacker et al., 1982; Sibrack et al., 1982).

In vitro kann das Virus (z.B. das in dieser Arbeit verwendete Herpes-simplex-Virus) mittels Virusisolierung oder PCR nachgewiesen werden. Dabei treten nach Infektion geeigneter Zielzellen virusspezifische zelldegenerative cytopathische Effekte (CPEs) auf. Über die Suszeptibilität eines Viruslysates gegenüber geeigneter Virostatika ist es so möglich, die Reduktion der CPEs zu dokumentieren und anhand empirischer Grenzkonzentrationen Schlussfolgerungen zu ziehen, ob sich ein Isolat resistent oder sensitiv gegenüber dem eingesetzten Virostatikum verhält. Darauf basieren phänotypische Testsysteme wie z.B. der

Plaquereduktionstest (PRA), mit dessen Hilfe auch die Chemotherapeutikasuszeptibilität eines vorliegenden HSV-Isolates beurteilt werden kann.

Über den Schwellenwert der Resistenz bei ACV gegenüber HSV-Isolaten lassen sich in der Literatur verschiedene Angaben finden. So spricht Safrin ab einem Schwellenwert von 2 µg/ml ACV was 8,9 µM entspricht, von ACV-Resistenz, wohingegen Morfin schon ab 6,5 µM ACV von einer Resistenz ausgeht (Safrin et al., 1994; Morfin et al., 2000). Christophers geht bereits ab einem Wert von 3 µM ACV von einer HSV-Resistenz gegenüber ACV aus (Christophers et al., 1998).

Gilbert hingegen wählt eine objektivere Methode (Gilbert et al., 2002): Er vergleicht die IC<sub>50</sub>-Werte des prätherapeutischen und des darauffolgenden sequentiellen Isolates und geht bei einem 3 - 5 fachen Anstieg von einer Resistenz aus.

Die ACV-Resistenz gegenüber HSV beruht auf einem oder mehreren der folgenden Mechanismen (Morfin et al., 2003; Arduino et al., 2006):

1. kompletter Verlust der viralen TK-Aktivität (TK-deficient virus) (Vorkommen: bei 95 % der beobachteten ACV-resistenten Virusisolate (Hill et al., 1991).
2. reduzierte Produktion der viralen TK (TK low producer virus).
3. virales TK Protein mit veränderter Substratspezifität. (TK-altered virus. Das Enzym ist in der Lage, Thymidin zu phosphorylieren, nicht aber ACV).
4. virale DNA-Polymerase mit veränderter Substratspezifität (DNA pol altered).

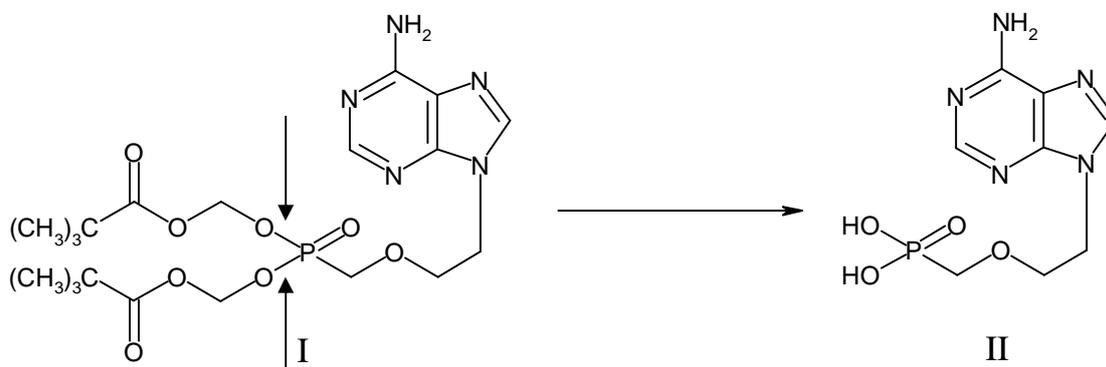
Der am häufigsten genannte Resistenzmechanismus ist die Mutation oder das vollständige Fehlen des TK Proteins, was die ACV-Phosphorylierung verhindert (Erllich et al., 1989; Whitley et al., 2001). Die meisten Fälle von ACV-Resistenz treten bei immunsuprimierten Patienten auf. Je länger die ACV-Therapie andauert, desto höher ist das Risiko, dass sich Stämme bilden, die gegen bekannte antivirale Medikamente resistent sind (Englund

et al., 1990; Christophers et al., 1998; Morfin et al., 2000; Morfin et al., 2003; Danve-Szatanek et al., 2004).

### 1.2.3 Acyclische Nukleosidphosphonate und deren Prodrugs

Für die antivirale Therapie von Viren, die gegen Nukleosidanaloga resistent sind, weil der erste viruskodierte enzymatische Phosphorylierungsschritt, mit dem das Nukleosid in ein Nukleosidmonophosphatanalogon überführt werden muss, mutationsbedingt nicht mehr erfolgen kann, bieten sich acyclische Nukleosidphosphonate als Alternative an (De Clercq 2003; De Clercq 2007). Stellvertretend für die Gruppe der acyclischen Nukleosidphosphonate ist in Figur 5 die Struktur des 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenin (Adefovir) (II) wiedergegeben.

Der gegen eine enzymatische Hydrolyse stabile Phosphonatrest, bei dem das Phosphoratom mit einem Kohlenstoff und nicht mit Sauerstoff verbunden ist, imitiert eine Monophosphatgruppe. Von Viren, dessen Kinasen diese „Imitation“ als „echten“ Phosphatrest akzeptieren, wird die „Imitation“ in zwei Phosphorylierungsschritten zum Triphosphatanalogon anabolisiert. Die acyclischen Nukleosidtriphosphate können dann wie „echte“ Nukleosidtriphosphate als kompetitive Hemmstoffe oder als Kettenabbrécher die Neusynthese der viralen Nukleinsäure und damit indirekt die Virusvermehrung stoppen.



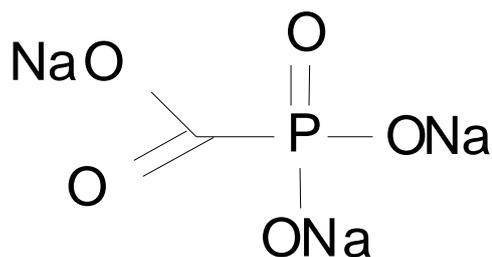
**Figur 5.** Strukturformel des acyclischen Nukleosidphosphonat Prodrugs Bis-(pivaloyloxymethyl)ester I (Adefovir dipivoxil), das enzymatisch zum

acyclischen Aciclovir-Nukleosidphosphonat II (Adefovir) metabolisiert wird (Esterspaltung durch Pfeil angezeigt).

Dem Vorteil, den ein Phosphonatrest für die antivirale Wirkung bei Kinasmangel bietet, steht der Nachteil entgegen, dass Nukleosidmonophosphonate aufgrund der negativen Ladung des Phosphonatrestes im Vergleich zu Nukleosiden wesentlich polarer sind, wodurch ihre Zellaufnahme erheblich erschwert ist. Die Membranpassage lässt sich dadurch erleichtern, dass die Phosphonatgruppe mit unterschiedlichen Resten verestert wird. Die beiden sauren Hydroxylgruppen des Phosphonatrestes sind mit einem (Pivaloyloxymethyl)rest zweimal verestert, so dass bei der Verseifung (Esterspaltung) die P-C-O-Bindung erhalten bleibt, wohingegen die P-O-C-Bindung gespalten wird. Hierbei resultieren Derivate der acyclischen Nukleosidphosphonate (siehe Figur 5) wie beispielsweise das Adefovir dipivoxil der Bis(pivaloyloxymethyl)ester des Adefovir (I) (De Clercq et al., 2006; De Clercq 2007; Choo et al., 2007). Nach der Zellaufnahme muss das Derivat durch Abspaltung der Estergruppe zunächst zum Adefovir metabolisiert werden, damit es anschließend zum antiviralen Triphosphat anabolisiert werden kann.

### 1.2.4 Nicht-nukleosidische Virostatika

Das Trinatriumsalz der Phosphonoameisensäure (Foscarnet, PFA) ist der klassische Vertreter aus der Gruppe der nicht-nukleosidischen Virostatika. PFA, dessen Struktur in Figur 6 aufgeführt ist, hemmt verschiedene DNA- und RNA-Polymerasen einschließlich der HIV reversen Transkriptase, so dass es als antiviraler Wirkstoff mit einer „Breitbandwirkung“ zur Therapie (siehe Tabelle 2) verschiedener viraler Infektionen eingesetzt werden kann (Balfour 1999).



**Figur 6.** Strukturformel des nicht-nukleosidischen virostatischen Trinatriumsalzes der Phosphonoameisensäure (Foscarnet, PFA)

Der Wirkmechanismus beruht darauf, dass PFA mit der Polymerase an der Stelle in Wechselwirkung tritt, an der sich im Zuge der Polymerasereaktion Pyrophosphat bildet, mit dem PFA um die Bindung an der Polymerase konkurriert. Hierdurch wird bei der Ankondensation der Nukleosidtriphosphate die Freisetzung von Pyrophosphat behindert, so dass die Nukleinsäuresynthese gehemmt wird (Crumpacker 1992).

Als Alternative zu der Mehrzahl der für die Therapie zugelassenen Virostatika, die als Kettenabbrecher und/oder als Hemmstoffe bei der Polymerasereaktion wirken, wurden erst in jüngster Zeit vielversprechende neue Wirkstoffe gefunden, die andere Targets der komplexen Virusvermehrung blockieren und somit neue Möglichkeiten zur Verhinderung der Virusmultiplikation eröffnen können (Pauwels 2006), auf die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden soll.

### 1.3 Kombinationstherapie mit Virostatika

Trotz beachtlicher Fortschritte bei der antiviralen Therapie besteht nach wie vor Bedarf an effektiven Virostatika, so dass die Suche nach neuen Virostatika intensiv betrieben wird (Rosowsky et al., 1990; Simons et al., 2005). Das Auffinden neuer geeigneter Virostatika ist äußerst mühsam, da von einer riesigen Zahl mehr oder weniger in vitro gut wirksamer antiviraler Substanzen nur ein verschwindend geringer Anteil die hohen Anforderungen

für eine Entwicklung bis zum Arzneimittel erfüllen kann. Beispielsweise wurden von dem klassischen Anti-HIV Virostatikum 3'-Azido-2'-desoxythymidin (AZT) (siehe Figur 2) bis zum Jahr 2000 annähernd 200 neue Derivate synthetisiert (Parang et al., 2000), mit den Zielen einer effektiveren Zellaufnahme, verminderter Toxizität, Erhöhung der Halbwertszeit im Plasma, Steigerung der Lipophilie, verbesserter Verteilung im Liquor und Überwindung von AZT-Resistenz. Doch keine dieser AZT-Derivate konnte AZT in der antiviralen Therapie ersetzen.

Eine aussichtsreiche, aber noch weitgehend ungenutzte Alternative zur Suche nach neuen antiviralen Einzelsubstanzen ist die antivirale Kombinationstherapie mit erprobten Virostatika. Die Kombinationstherapie kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Bei der sogenannten hochaktiven antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion (HAART) werden verschiedene Virostatika gleichzeitig appliziert. Mit dieser Art Kombinationstherapie werden Therapieerfolge erzielt, die mit einer Monotherapie bisher nicht erreichbar sind.

Eine andere Möglichkeit der Kombinationstherapie besteht darin, dass verschiedene Virostatika in einer Pille zu einem Kombinationspräparat formuliert werden. Mit solchen Präparaten wird zwar die Therapiepraxis für den Patient erheblich vereinfacht, was dadurch auch zu einer Zunahme der compliance führt. Das Wirkprofil der Einzelsubstanzen dieser Mischung jedoch bleibt unverändert. Beispiele für die derzeitigen antiviralen Kombinationspräparate sind Combivir<sup>TM</sup>, das aus einem Gemisch von AZT und 3TC besteht. Truvada<sup>TM</sup>, das Emtricitabin neben Tenofoviridisoproxil enthält und Atripla<sup>TM</sup>, in dem die drei Wirkstoffe Emtricitabin, Tenofoviridisoproxil und Efavirenz als Gemisch enthalten sind (De Clercq 2007).

### 1.4 Antivirale Duplex-Wirkstoffe

Eine neue Alternative der Kombinationstherapie besteht darin, dass zwei bewährte Virostatika chemisch zu einem neuen Molekül gekuppelt werden.

Hierbei wird ein sogenanntes Duplex-Virostatikum erhalten, das nach der Applikation in verschiedene antivirale Metabolite mit unterschiedlichen Wirkmechanismen gespalten werden kann, die eine additive oder synergistische antivirale Wirkung auslösen können. Zur Darstellung von Duplex-Virostatika sind Virostatika prinzipiell dann geeignet, wenn deren Synthese mit einem vertretbaren Aufwand möglich ist. Von Vorteil ist auch, wenn die antivirale Wirkung der beiden Einzelsubstanzen additiv oder sogar synergistisch ist und durch die Struktur des neuen Moleküls noch zusätzliche Mechanismen den therapeutischen Effekt optimieren. Für die zu erwartende Toxizität eines Duplex-Wirkstoffs sollten sich die zu kuppelnden Einzelsubstanzen in ihrer jeweiligen Toxizität erheblich unterscheiden. Unter diesen Gesichtspunkten bieten sich das Nukleosidanalogen AZT und die nicht-nukleosidische Phosphonoameisensäure (PFA) als Basisvirostatika für die Synthese eines Duplex-Virostatikums an.

Die unterschiedlichen Mechanismen, mit denen AZT und PFA antiviral wirken, sind vermutlich der Grund dafür, dass Gemische aus AZT (AZT-triphosphat) + PFA, in denen das Verhältnis AZT zu PFA variiert wird, die *in vitro* Replikation von HIV und CMV additiv oder synergistisch hemmen (Eriksson et al., 1989; Koshida et al., 1989). Dabei zeigt sich bei der CMV-Replikation, dass erst bei einer hohen Konzentration von PFA ein additiver Hemmeffekt auftritt, wenn gleichzeitig AZT in der Mischung enthalten ist (Snoeck et al., 1992).

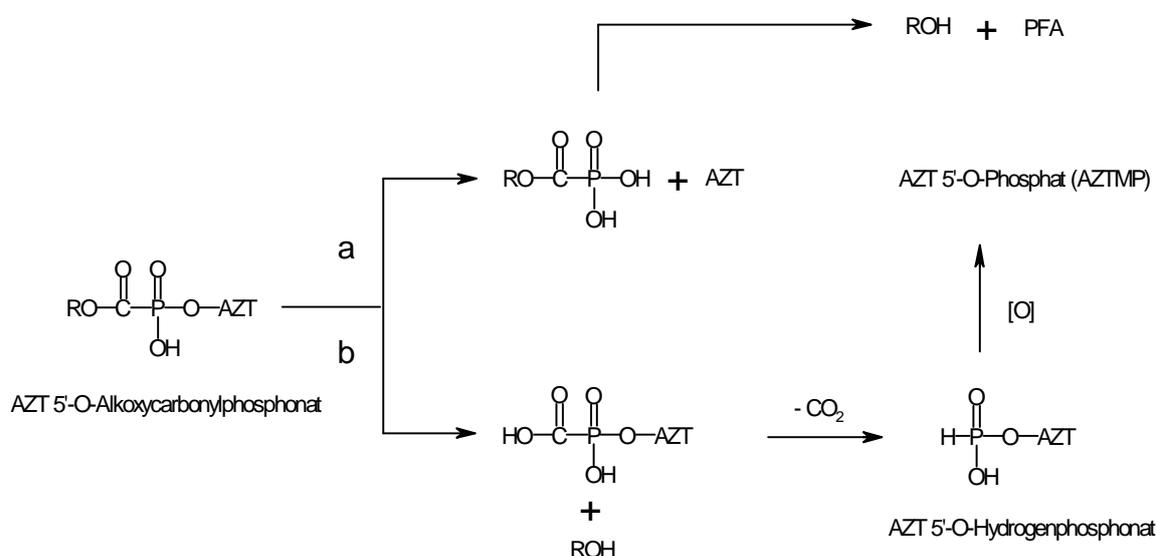
### **1.4.1 Combined prodrugs**

Die antiviralen Aktivitäten auf der Basis der kombinierten Anwendung von Nukleosidanaloga + PFA versuchte man erstmals 1988 durch die Synthese eines sogenannten „combined prodrug“ zu nutzen. Hierzu wurden an die 5´- bzw. 3´-Hydroxylgruppen verschiedener Nukleoside und antiviraler Nukleosidanaloga unterschiedliche Ester der Phosphonoameisensäure chemisch kondensiert (Griengl et al., 1988). Die so erhaltenen „combined prodrugs“ zeigten *in vitro* nicht die erhoffte bessere antivirale Wirkung. Der Misserfolg wurde mit den zu großen Unterschieden begründet, in denen sich

die relativ geringe antivirale Wirkung von PFA im Vergleich zu der sehr hohen Aktivität des gekoppelten antiviralen AZT unterscheidet. Da bei einer zu erwartenden enzymatischen Hydrolyse eines solchen „combined prodrug“ die Virostatika PFA und die Nukleosidanaloga im molaren Verhältnis von höchstens 1:1 gebildet werden, dominiert beispielsweise die Aktivität von AZT und überdeckt hierbei eventuelle Effekte, die von PFA ausgelöst werden.

### 1.4.2 AZT-PFA-Ester

1990 wurden Phosphonoameisensäureester an die 5'-Hydroxylgruppe von AZT gekoppelt (Rosowsky et al., 1990). Die Struktur der resultierenden AZT-PFA-Ester ist der der „combined prodrugs“ analog. Beim enzymatischen Metabolismus der AZT-PFA-Ester können, falls der Mechanismus der Figur 7, Weg a zustande kommt, die Virostatika PFA, AZT und AZT-5'-monophosphat (AZTMP) als Hauptmetabolite auftreten, die zumindest für Retroviren eine additive antivirale Wirkung erwarten lassen. Nach der hydrolytischen Entfernung von AZT verbleibt ein PFA-Ester, der anschließend in seine Alkoholkomponente und PFA gespalten wird. Als Alternative (Figur 7, Weg b) kann zuerst die Alkoholkomponente abgespalten werden, wobei AZT-PFA verbleibt. Das Dimere kann unter Decarboxylierung und Zerstörung von PFA zu AZT-5'-O-hydrogenphosphonat abgebaut werden, das anschließend oxidativ zu AZT-5'-O-monophosphat (AZTMP) weiter reagieren kann. Für den Fall, dass die P-C Bindung gespalten wird, wird ebenfalls AZT-5'-O-hydrogenphosphonat unter Zerstörung von PFA freigesetzt.



**Figur 7.** Möglicher Metabolismus eines AZT-PFA-Esters oder Konjugats, bei dem AZT, AZTMP und PFA als antivirale Metabolite entstehen können.

Der in vitro Test zeigte, dass die HIV-1 Replikation durch die AZT-PFA-Ester deutlich schlechter gehemmt wurde, als durch AZT, wobei AZT allerdings eine höhere Toxizität aufwies. Eine neue Gruppe von AZT-PFA-Estern (Meier et al., 1998) führte ebenfalls nicht zur Optimierung der antiviralen Wirkung von AZT.

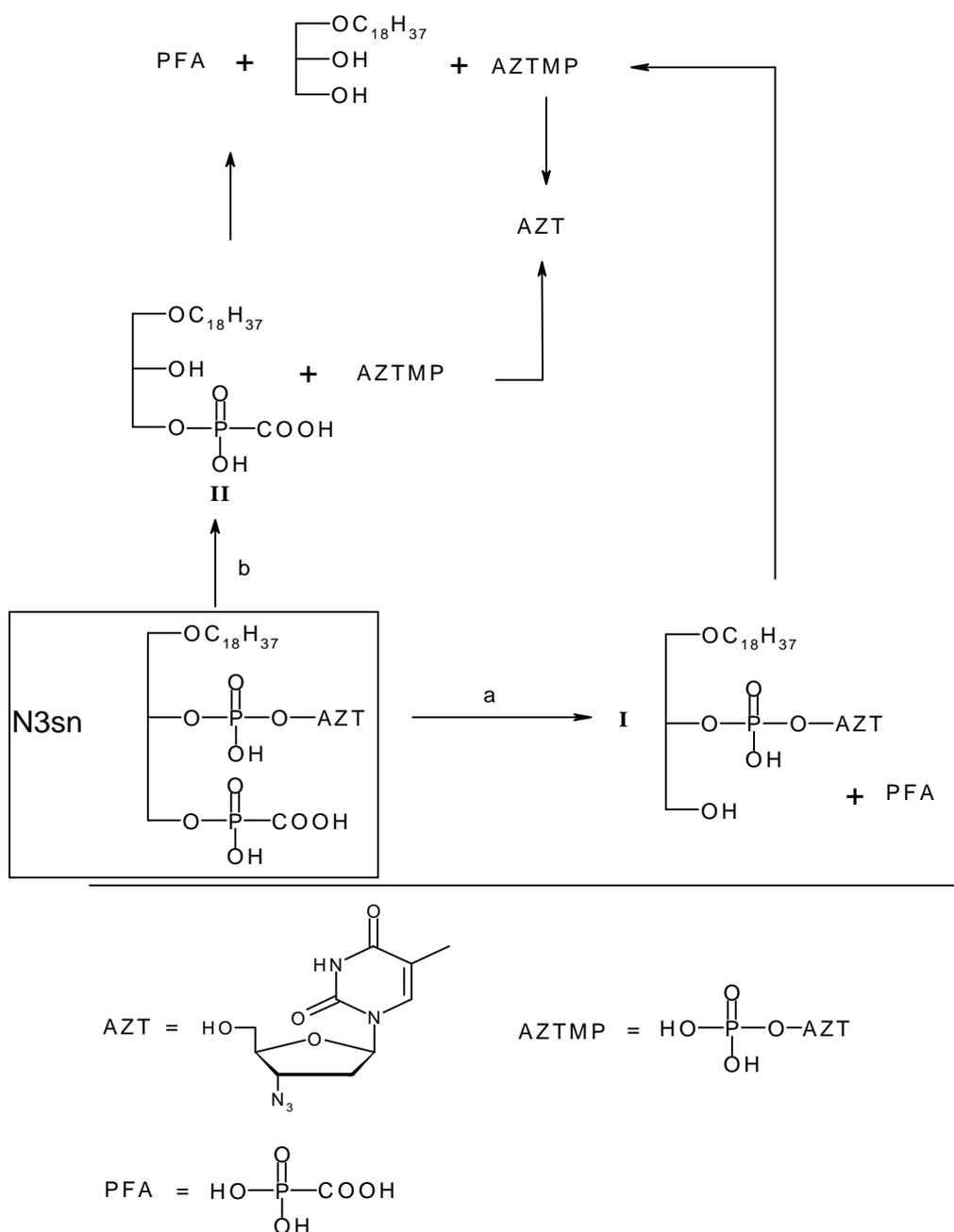
### 1.4.3 AZT-PFA-Konjugate

Verschiedene AZT-PFA-Konjugate (Rosowsky et al., 1997) weisen dagegen eine verbesserte antivirale Wirkung auf. Im Unterschied zu den früheren AZT-PFA-Estern, unterscheiden sich die neuen Phosphonoameisensäureester durch einen langen Kohlenwasserstoffrest. Die Struktur der Konjugate hat allerdings auch wiederum den grundsätzlichen Nachteil, dass bei der Metabolisierung des Moleküls der gekoppelte PFA-Anteil teilweise durch Decarboxylierung zerstört werden kann (siehe Figur 7). Hierdurch haben auch diese Konjugate eine ungünstige Voraussetzung für die Verbesserung der antiviralen Wirkung, da

die hohe antivirale Aktivität von AZT in einer äquimolaren Mischung aus AZT und PFA den geringen antiviralen Effekt von PFA überlagert. Überraschenderweise zeigt der in vitro Test, dass die virostatistische Aktivität der Konjugate bei einer AZT-Resistenz einerseits deutlich über der von AZT oder PFA liegt. Andererseits übertreffen die Konjugate bei PFA-resistenten Mutanten die Aktivität von PFA um den Faktor 1000 (Rosowsky et al., 1997). Die Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass der langkettige Kohlenwasserstoffrest entscheidend zur Optimierung der antiviralen Wirkung eines AZT-PFA-Konjugats beiträgt.

#### **1.4.4 AZT-PFA-Duplex-Virostatika**

Das von der Gruppe Schott synthetisierte AZT-PFA-Duplex-Virostatikum in dem AZT und PFA an einem Glyceryllipid gebunden sind und im folgenden mit N3 abgekürzt wird, ist das erste Duplex-Virostatikum aus dem bei einer Metabolisierung AZT und PFA ohne die teilweise Zersetzung von PFA freigesetzt werden können. In Figur 8 wird die Struktur des Duplex-Virostatikums und ein hypothetischer Metabolismus vorgeschlagen, der sowohl extra- als auch intrazellulär ablaufen könnte. Die verschiedenen Möglichkeiten, nach denen das Duplex-Virostatikum vermutlich abgebaut werden kann, führen einerseits zu den polaren Virostatika AZT und PFA, andererseits zu den lipophilen Octadecylglycerin-Prodrugs von AZT und PFA, die vermutlich die Zellmembran passieren können.



**Figur 8.** Strukturformel und hypothetischer Metabolismus des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums (N3sn). Auf Weg a bildet sich zunächst PFA und Octadecylglyceryl-AZT (I), das dann zu Octadecylglycerin und AZT monophosphat (AZTMP) und letzteres weiter zu AZT metabolisiert werden kann. Bei der alternativen Abspaltung (Weg b) von AZTMP, das weiter zu AZT dephosphoryliert wird, verbleibt Octadecylglyceryl-PFA (II), aus dem in einem nächsten Schritt Octadecylglycerin und PFA entstehen kann.

Wird PFA hydrolytisch entfernt (Weg a), verbleibt ein lipophiles Prodrug von AZT-Monophosphat (I). Bei der enzymatischen Spaltung von AZT aus dem Duplex-Virostatikum (Weg b) verbleibt ein lipophiles Prodrug von PFA (II). Die auftretenden Prodrugs, die vermutlich von den Zellen aufgenommen werden, können dann in einer Folgereaktion nochmals AZT und PFA intrazellulär freisetzen. Das PFA-Prodrug II entspricht dem bereits beschriebenen 1-Octadecyl-sn-glycero-3-phosphonoformiat (Hammond et al., 2001), das in vitro gegen HIV-Wildtyp und resistente HIV-1 Zelllinien die virostatischen Effekte von PFA deutlich übertrifft. Die hohe virostatische Wirkung des PFA-Prodrugs beruht vermutlich darauf, dass dieses lipophile PFA-Derivat von den infizierten Zellen wesentlich leichter aufgenommen werden kann als das polare PFA. Bei der intrazellulären Hydrolyse wird PFA aus dem Prodrug freigesetzt, so dass über die bessere Zellaufnahme ein deutlich höherer PFA-Spiegel intrazellulär erreichbar ist als mit dem nicht derivatisierten PFA. Im in vitro Test zeigt das AZT-PFA-Duplex-Virostatikum N3 eine höhere Aktivität sowohl gegen HIV (unveröffentlichte Daten des NCI), als auch verschiedene resistente Herpes-1 und humane CMV, sowie gegen HCMV-Patienten Isolate (Hamprecht et al., 2007). Erste in vivo Tests mit MCMV infizierten Mäusen bestätigten die hohe antivirale Wirkung des Duplex-Virostatikum (Capone et. al, 2007).

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Arbeit verfolgt als erstes Ziel, die mehrstufige chemische Synthese des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums, die bisher nur für 1 - 2 g Mengen ausgearbeitet ist, so zu optimieren, dass 10 - 20 g Ansätze praktikabel durchgeführt und damit die für in vivo Tests benötigten Mengen an Virostatikum synthetisiert werden können. Hierbei muss für die anstehende chromatographische Reinigung von 10 - 20 g Ansätzen ein neuer Weg gefunden werden. Außerdem soll der Syntheseweg so modifiziert werden, dass das Duplex-Virostatikum, das bisher ein racemisches

Glycerinlipidgerüst (N3rac) aufweist, auch mit einem optisch aktiven Glycerinrest (N3sn) zugänglich wird.

Nach dem erfolgreichen Abschluss der Synthesearbeiten soll als zweites Ziel zunächst die antivirale Aktivität des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums in vitro auf der Basis der  $IC_{50}$ -Werte vergleichend mit ACV getestet werden. Hierzu werden Vero-Zellen mit 3 ACV-sensitiven und 3 ACV-resistenten HSV-Viruslysaten infiziert, um dann mit Hilfe des SPRA-Test die  $IC_{50}$ -Werte der zu testenden Virostatika erst semiquantitativ und anschließend mit dem PRA-Test samt PROBIT-Transformation quantitativ zu bestimmen. Diese Testergebnisse zeigen dann, ob der Duplexwirkstoffs mit einem optisch aktiven Glycerinlipidgerüst (N3sn) die antivirale Wirkung eines entsprechenden racemischen Derivats übertrifft.

Nach der Ermittlung der virostatischen Wirkung ist geplant, die Stabilität des Duplex-Virostatikums im Serum und danach im Vergleich zu der von ACV im EDTA-Humanblut zu untersuchen. Die Stabilität kann indirekt über die zeitabhängige antivirale Aktivität (Änderung der  $IC_{50}$ -Werte) der im EDTA-Humanblut gelösten Virostatika bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung liefern wertvolle Informationen für eine mögliche Formulierung und Anwendung des Duplex-Virostatikums im Hinblick auf eine Weiterentwicklung zum therapeutisch anwendbaren Arzneimittel.

Abschließend sind als drittes und letztes Ziel der Arbeit orientierende Untersuchungen vorgesehen, die Aussagen über die Einwirkung des Duplex-Virostatikums auf die verschiedenen Blutbestandteile ermöglichen. Diese Untersuchungen liefern Hinweise, ob der amphiphile Charakter des Duplex-Virostatikums als „Seife“ wirken und dann verschiedene Blutbestandteile zerstören könnte, wodurch eine eventuelle Toxizität des Duplex-Wirkstoffs bei einer i.v.-Applikation verursacht werden könnte.

## 2 Material

### 2.1 Material für die virologischen Untersuchungen

#### 2.1.1 Vero-Zellen

Vero-Zellen stellen eine permanente, etablierte Zelllinie dar, die aus dem Nierenparenchym von grünen afrikanischen Meerkatzen (African Green Monkey) gewonnen wird. Sie bilden wie die humanen Vorhautfibroblasten (human foreskin fibroblasts, HFF) einen konfluenten Monolayer. Die für die Versuche verwendeten Zelllinien werden regelmäßig auf Mycoplasmen getestet, wobei der Mycoplasmentest (MycoAlert, Mycoplasma Detection Kit, Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien) stets negativ war.

#### 2.1.2 Herpes-simplex Virusstämme

Als ACV-sensitiver Referenzstamm wird der Laborstamm KOS (HSV-1) verwendet (freundlicherweise von Prof. Matz, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt), den Kendall O. Smith 1964 aus einer Lippenläsion isolierte (Smith 1964).

Dieser Stamm wurde über 3 Wochen am Institut für Medizinische Virologie, Tübingen einer 13 µM hohen ACV-Konzentration ausgesetzt, um eine Punktmutation im TK-Gen zu erhalten (Lensch 2006). Daraus resultiert der hoch ACV-resistente KOS-M Stamm (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3.** Verwendete Viruslysate. Das fettgedruckte „G“ zeigt die Nukleotidposition (Kodon) (nt) der Addition (add.) in das HSV-1 TK Gen. Diese Mutationen sind durch „Marker transfer analyse“ bestätigt.

<b>HSV-1 Virusstämme</b>		
Wildtyp	Mit UL23 Mutation	Mit ACV-Resistenz assoziierte Mutation
KOS sens	KOS-M res	add. <b>G</b> nt <b>430 (144)</b>
HSV-K161 sens	HSV-K143 res	add. <b>G</b> nt <b>548 (183)</b>
HSV-L177 sens	HSV-L182 res	add. <b>G</b> nt <b>430 (144)</b>

Die sequentiellen Isolate von HSV-K und HSV-L Stämmen wurden von den erwachsenen Stammzelltransplantationsempfängern K und L am Institut für Medizinische Virologie, Tübingen isoliert. Die sensitiven Wildtypen sind jeweils die Virusisolate vor Therapiebeginn (HSV-K161 sens und HSV-K177 sens (siehe Tabelle 3)). Die ACV-resistenten HSV-K und HSV-L-Stämme (HSV-K143res und HSV-L182res) sind Virusisolate von den Patienten K und L unter dem klinischen Verdacht der ACV-Resistenz.

### **2.1.3 Virostatika**

#### **2.1.3.1 Aciclovir (Zovirax® u.a.)**

Aciclovir wurde käuflich von der Firma GlaxoSmithKline erworben. Eine Durchstechflasche enthält 274,4 mg Aciclovir-Natrium als Trockensubstanz zur i.v.-Infusion. Dies entspricht 250 mg Aciclovir (MG = 225,2). In 11,1 ml PBS gelöst, entspricht dies einer 100 mM-Lösung. Davon wird eine 10 mM Stammlösung hergestellt (mit PBS), diese zu je 1,2 - 1,5 ml aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### **2.1.3.2 AZT-PFA-Duplex-Virostatika**

Die AZT-PFA-Duplex-Virostatika N3rac, N3sn und N4 wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schott am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen synthetisiert. Das Molgewicht für N3rac und N3sn beträgt 780,3, für N4 887,3. Daraus werden mit PBS 2 und 20 mM-Stammlösungen hergestellt, diese zu 1,2 - 1,5 ml aliquotiert und bei -80°C gelagert.



Phosphatgepufferte Saline (PBS)	Gibco, Karlsruhe
Trypanblau 0,4 % (wird vor Gebrauch sterilfiltriert)	Sigma-Aldrich, München
Trypsin / EDTA (1x)	PAA, Cölbe

### 2.1.5 Reagenzien

Bezeichnung	Firma
(Ethoxycarbonyl)phosphorigsäure-dichlorid	Nach Literaturangaben synthetisiert (Vaghefi et al., 1986).
3'-Azido-3'-desoxythymidyl-(5'→2)-3-O-octadecyl-sn-glycerin ( <b>5</b> )	Im Arbeitskreis Schott, Organische Chemie, Tübingen synthetisiert.
3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC)	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumhydroxid 25 %	Merck, Darmstadt
Anti-HSV gD	US Biological, Vertrieb über Biomol, Hamburg
Anti-Maus IgG POD	Protos ImmunoResearch, Vertrieb über Sanbio, Beutelsbach
Chloroform	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Na-Acetat-Puffer (0,1 M)	Sigma-Aldrich, München
Natriumcarbonat p.a.	Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Trimethylphosphat	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid, 30 %	Merck, Darmstadt

### 2.1.6 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Firma
Combitips plus 5 ml long Biopur	Eppendorf, Hamburg
Falcon tubes 15 ml; 50 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg
Kationenaustauscher Lewatit	Lanxess, Leverkusen
Kieselgelplatte (F254)	Merck, Darmstadt
Multiwellplatte, 24-well	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Pipettenspitzen mit Filter 0,5 - 1000 µl	Starlab, Aschaffenburg
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
LiChroprep® RP-18 (40 - 63 µm)	Merck, Darmstadt
S-Monovette® Hämatologie mit Kalium-EDTA und Serum mit Gerinnungsaktivator, 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Luer-Spritzen 5 ml - 50 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter 0,22 µm	Sartorius, Göttingen
Zellkulturschale 25, 80, 175 cm <sup>2</sup>	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	Costar, Cambridge, MA, USA

### 2.1.7 Geräte

Bezeichnung	Firma
Analysenwaage 770	Kern, Balingen-Frommern
Brutschrank Inkubator C200	Labotect, Göttingen
Dade Dimensions RxL (im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen)	Dade Behring, Marburg
Dispenser Multipipette ® plus	Eppendorf, Hamburg
Easypet ® Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg
Haemacytometer „Neubauer improved“	Hecht-Assistent, Sondheim
Heizbares Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph Instruments, Schwabach
Mikroskop Axiolab; Axiovert 200 mit Kamera ExWave (Sony, Berlin) und Software Axio Vision	Zeiss, Oberkochen
Pipetten Reference® (variabel) 0,5 - 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Schüttelgerät Reax Top	Heidolph Instruments, Schwabach
Sicherheitsarbeitsbank Lamin Air	Heraeus, Hanau
Zentrifugen Eppendorf 5804R mit Rotor A4-44; 5415D	Eppendorf, Hamburg
Taumler Rocky 3D	Multimed Wicker, Kirchheim/Teck

## 2.2 Blutproben und Lösungen für die Blutausstriche

Bezeichnung	Firma
EDTA-Humanblut	Spenderin K.G., Universitätsklinikum Tübingen
Humanserum	Spender T.S., Universitätsklinikum Tübingen
Giemsa-Stammlösung: Diese wird 1:20 mit Pufferlösung zur Giemsa-Gebrauchlösung verdünnt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pufferlösung: 1 Puffer-Tablette pH 7,2 wird in 1 l Aqua dest. aufgelöst. Haltbarkeit 8 Wochen	Merck, Darmstadt

### 3 Methoden

#### 3.1 Methoden der chemischen Synthese

##### 3.1.1 Kondensation von PFA an 3'-Azido-3'-desoxythymidylyl-(5'→2)-3-O-octadecyl-sn-glycerin (5)

Zu 75 ml Trimethylphosphat, die in einem 250 ml Einhalskolben mit Rührfisch und Magnetrührer bei RT gerührt werden, gibt man schnell 25 ml (Ethoxycarbonyl)phosphorigsäuredichlorid (**6**) und verschließt den Kolben mit einem Schliffhahn. Sobald die Flüssigkeiten durchmischt sind, werden über einen Pulvertrichter 25 g (37 mmol) 3'-Azido-3'-desoxythymidylyl-(5'→2)-3-O-octadecyl-sn-glycerin (**5**) schnell zugegeben. Der Ansatz wird verschlossen, mit einer Membranvakuumpumpe kurz evakuiert und weiter bei RT gerührt. Die anfängliche Suspension geht im Verlauf der Reaktion in eine trübe Lösung über. Das sich bildende HCl-Gas, das sich sowohl teilweise in der Reaktionslösung löst, als auch im Gasraum ansammelt, wird von Zeit zu Zeit aus dem Kolben mit der Membranpumpe im Vakuum abgesaugt.

Nach ca. 16 h lässt man die braune Reaktionslösung langsam zu ca. 225 ml gesättigter Natriumcarbonatlösung fließen, die in einem 2 l Erlenmeyerkolben unter Eisbadkühlung gerührt wird. Hierbei schäumt die Lösung stark auf. Nach erfolgter Zugabe sollte der pH-Wert des Reaktionsansatzes zwischen 6,5 und 7 liegen und wird, falls erforderlich, entsprechend eingestellt, so dass er keinesfalls längere Zeit oberhalb von pH 7 ist. Am Ende der Neutralisation werden insgesamt ca. 370 ml einer hellbraunen Reaktionslösung erhalten, aus der das gewünschte Reaktionsprodukt **7 (N4)** säulenchromatographisch wie folgt isoliert wird.

##### 3.1.1.1 Chromatographische Reinigung des Kondensationsgemisches

Zur Fraktionierung des Reaktionsgemisches wird der Ansatz aus 3.1.1 halbiert und bei RT in zwei Läufen an einer selbst gepackten LiChroprep RP-18 (40 - 63 µm) Glassäule (25 cm x 5 cm) chromatographiert. Pro Lauf

werden jeweils ca. 185 ml der Reaktionslösung auf die mit Wasser äquilibrierte Säule gepumpt (siehe Figur 8). Nach dem Auftragen wird die Säule bei schwachem Überdruck zunächst mit ca. 100 ml 50 % igem wässrigen Methanol eluiert. Dann folgt ein linear steigender Wasser/Methanol Gradient, der 600 ml 50 % iges Methanol im Mischgefäß und 600 ml 80 % iges Methanol im Vorratsgefäß enthält. Nach dem Gradienten wird die Elution der Säule mit 1 l 80 % igem Methanol fortgesetzt. Danach wird die Säule zur Entfernung der noch verbliebenen Verunreinigung mit 100 % Methanol eluiert, mit Wasser äquilibriert und so anschließend für den zweiten Lauf verwendet.

Mit Beginn des Wasser/Methanol Gradienten wird das Eluat mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen zu ca. 10 ml gesammelt. Die Absorption jeder 5. Fraktion wird nach vorheriger Verdünnung mit 50 % igem Methanol in einem UV-Spektralphotometer bei 260 nm bestimmt. Die graphische Auftragung der gemessenen UV-Werte gegen das Elutionsvolumen führt zu dem in Figur 11 abgebildeten Elutionsprofil. Fraktionen von Peak I und Peak II werden vereinigt, im Vakuum auf ca. 30 ml konzentriert und dann lyophilisiert. Nach zwei Läufen ergibt das Lyophilisat von Peak I 20,0 g (61 %), von Peak II 6,1 g (24 %) eines weißen Pulvers. Das Lyophilisat von Peak I wird als Ethylester des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums **7 (N4)** identifiziert und wandert auf der Kieselgelplatte im Laufmittel Chloroform/Methanol/25 % iges Ammoniumhydroxyd (20/10/3; v/v/v) als einheitlicher Fleck mit einem  $R_f$ -Wert von 0,55. Die Identifizierung von **7 (N4)** und **8 (N3sn)** auf der Dünnschichtplatte erfolgt unter der UV-Lampe bei 254 nm. Die Duplex-Virostatika bilden durch Fluoreszenzlöschung schwarze Flecken auf der hell leuchtenden Platte. Das Lyophilisat von Peak II enthält als Hauptprodukt das nicht umgesetzte Edukt 3'-Azido-3'-desoxythymidylyl-(5'→2)-3-O-octadecyl-sn-glycerin (**5**), das im gleichen System einen  $R_f$ -Wert von 0,75 aufweist. Daneben sind geringe Verunreinigungen als schwache Nebenflecken auf der Dünnschichtplatte erkennbar.

Die aus der Summenformel von **7 (N4)** berechnete Masse für  $C_{34}H_{60}H_5O_{13}P_2$   $[M-H]^{-1}$ : 808,36574 wird durch den gemessenen Wert von 808,36580

eindeutig bestätigt. Aus den gefundenen Werten der Elementaranalyse folgt, dass das Lyophilisat von **(7, N4)** als Dinatriumsalz mit 2 x H<sub>2</sub>O vorliegt, da der aus der Summenformel berechnete prozentuale Anteil von C,H,N mit den gefundenen Werten sehr gut übereinstimmt:

$C_{34}H_{59}N_5O_{13}P_2Na_2 \times 2H_2O$  MW 887,36

Berechnet C 46,00 H 7,10 N 7,89

Gefunden C 46,22 H 7,05 N 7,62

### 3.1.2 Hydrolytische Spaltung des Ethylesters im Kondensationsprodukt **7 (N4)** und Isolierung des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums **8 (N3sn)**

9,0 g (10 mmol) 3'-Azido-3'-desoxythymidyl-(5'→2)-3-O-octadecyl-sn-glyceryl-1-O-phosphonoameisensäureethylester **(7, N4)** werden unter Rühren in 135 ml 1 N Natronlauge gelöst und dann 20 min bei RT weitergerührt. Dann wird die Reaktion durch portionsweise Zugabe eines Kationenaustauschers in der H<sup>+</sup>-Form (schwach sauer) auf pH 8,5 eingestellt, wobei der pH-Wert bei Zugabe des Kationenaustauschers nur sehr langsam sinkt, so dass die pH-Einstellung 10 - 20 min benötigt. Der Austauscher wird auf einer Glasfritte abgesaugt und mit dest. Wasser nachgewaschen. Filtrat und Waschlösung werden am Rotationsverdampfer auf ca. 30 ml konzentriert. Das Konzentrat wird lyophilisiert und ergibt 9 g (9,79 mmol) des Trinatriumsalzes der 3'-Azido-3'-desoxythymidyl-(5'→2)-3-O-octadecyl-sn-glyceryl-1-O-phosphonoameisensäure x 4H<sub>2</sub>O **(8, N3sn)** als weißes Pulver in einer Ausbeute von 98 %, das auf der Kieselgelplatte im Laufmittel Chloroform/Methanol/25 % iges Ammoniumhydroxyd (20/10/3; v/v/v) einen R<sub>f</sub>-Wert von 0,14 aufweist;

Die aus der Summenformel von **8 (N3sn)** berechnete Masse für  $C_{32}H_{54}N_5O_{13}P_2 [M-H]^{-1}$ : 780,33533 wird durch den gemessenen Wert von 780,33606 eindeutig bestätigt. Aus den gefundenen Werten der Elementaranalyse folgt, dass das Lyophilisat von **8 (N3sn)** als Trinatriumsalz mit 4x H<sub>2</sub>O vorliegt, da der aus der Summenformel berechnete prozentuale Anteil von C,H mit den gefundenen Werten sehr gut

übereinstimmt. Der etwas zu niedrige Stickstoffwert beruht darauf, dass die Azido-Gruppe des AZT-Restes in der Analyse unvollständig in  $N_2$  übergeht.

$C_{32}H_{54}N_5O_{13}P_2Na_3 \times 4 H_2O$  MW: 916,89

Berechnet C 41,88 H 6,76 N 7,63

Gefunden C 42,02 H 6,63 N 6,56

### 3.2 Virologische Arbeitsmethoden

#### 3.2.1 Kultivierung von Vero-Zellen

Bei  $-80^\circ\text{C}$  im Einfriermedium konservierte Vero-Zellen werden bei Handwärme aufgetaut, dann sofort in 10 ml Wachstumsmedium (MEM-5 % FCS) aufgenommen und abzentrifugiert ( $260 \times g$ ; 5 min). Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 6 ml Wachstumsmedium resuspendiert und auf eine  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturschale gegeben. Nach Inkubation der Zellen im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ -Begasung (Standardkulturbedingungen) erfolgt bei Erreichen einer nahezu vollständigen Konfluenz des Zellrasens die Passagierung der Zellkultur. Dazu wird das verbrauchte Medium dekantiert und der Zellrasen mit 4 ml PBS gewaschen. Nach 5 min Inkubation mit 2 ml Trypsinlösung im Brutschrank werden die Zellen unter leichtem Klopfen vollständig abgelöst und in 7 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation ( $260 \times g$ ; 5 min) wird der Überstand wiederum verworfen, das Zellpellet in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:2 bis 1:4 in neue Zellkulturschalen ( $80 \text{ cm}^2$ ) passagiert, die auf ein Endvolumen von 15 ml mit Wachstumsmedium aufgefüllt werden. Die neue Zellpassage wird wie beschrieben kultiviert. Sobald die Zellen erneut eine weitgehende Konfluenz erreicht haben, werden sie wieder passagiert, je nach Bedarf auch in weitere Zellkulturschalen (z.B.  $175 \text{ cm}^2$ ) ausgesät oder für die Virostatika-Testung in Multiwellplatten überführt.

### 3.2.2 Gewinnung von HSV-Lysaten durch Gefriertauanalyse

Primäre Virusisolate stammzelltransplantierter Patienten wurden im Diagnostischen Labor der Virologischen Abteilung der Tübinger Universitätsklinik aus eingesandten Untersuchungsmaterialien isoliert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  konserviert. Das Viruslysat wird bei RT aufgetaut und in eine  $175\text{ cm}^2$  Zellkulturflasche mit einem nahezu konfluenten Vero-Zellrasen gegeben. Es folgt die Inkubation unter Standardkulturbedingungen bis die Zellen zu 80 - 100 % durchinfiziert sind. Dann kann die Gefriertauanalyse erfolgen. Dazu wird die Zellkulturflasche mit den durchinfizierten Vero-Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 30 min eingefroren und anschließend bei leicht geöffnetem Deckel aufgetaut (RT, 20 min). Dieser Vorgang wird einmal wiederholt. Die Zellen werden mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein 50 ml Falcon tube pipettiert. Anschließend erfolgt die Abzentrifugation bei  $1600 \times g$  für 5 min, Aliquotierung (0,7 bis 1 ml) und Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3 Zellzählung

Nachdem der konfluente Zellrasen, wie in 3.2.1 beschrieben, durch Trypsinierung abgelöst worden ist und sich die Zellen nach der Zentrifugation ( $260 \times g$ ; 5 min) als Pellet am Boden des Falcon-Röhrchens befinden, wird der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert.  $20\ \mu\text{l}$  der resuspendierten Zellen werden 1:2 mit Trypanblau zu einer Zellsuspension verdünnt.

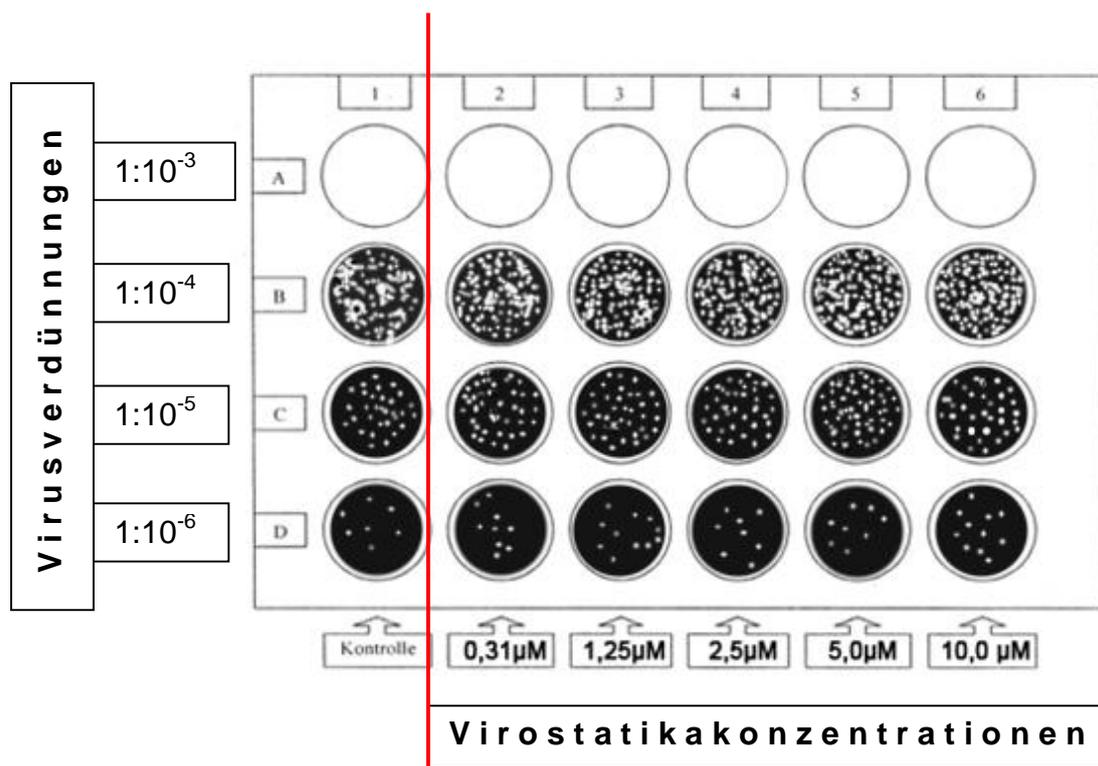
Eine Neubauer'sche Zählkammer improved wird wie folgt vorbereitet: Anfeuchten der Außenstege der Zählkammer, Deckglas (plangeschliffen) mit sanftem Druck von vorn auf die Zählkammer aufschieben. Sichtbarwerden der Interferenz-Linien (Newton'schen Ringe) zwischen Deckglas und Außenstege zeigt, dass die erforderliche Tiefe von 0,1 mm gewährleistet ist. Es werden  $10\ \mu\text{l}$  der Zellsuspension in die Zählkammer eingefüllt. Jedes der neun Großquadrate der Neubauer'schen Zählkammer hat eine Fläche von  $1\ \text{mm}^2$ . Dies ergibt bei einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von  $0,1\ \text{mm}^3$ . Der Mittelwert der ausgezählten Zellen der randständigen vier Großquadrate

wird mit dem Kammerfaktor  $10^4$  sowie dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension (hier: 2) multipliziert. Dies ergibt die Zellzahl pro ml.

### 3.2.4 Screening-Plaquereduktionstest (SPRA)

1. Eine Multiwellplatte (24 wells) wird mit  $1 \times 10^5$  Vero-Zellen in 500  $\mu$ l Wachstumsmedium pro well präpariert. Nachdem die Platte für 20 h im Brutschrank belassen worden ist, sind die Zellen am Plattenboden angewachsen.
2. Vorbereitung der Virostatika-Konzentrationen: Die eingefrorenen Virostatikastammlösungen werden bei RT aufgetaut. Dann erfolgt eine Verdünnung der Stammlösung in Methylzellulose-Overlay-Medium. Die  $\mu$ M-Endkonzentrationen für die N3 und ACV-Verdünnungsreihen betragen: 0,31; 1,25; 2,5, 5,0; 10.
3. Die zu testenden Viruslysate werden bei RT aufgetaut und logarithmisch von  $1:10^{-3}$  -  $1:10^{-6}$  im Wachstumsmedium verdünnt.
4. Der Überstand der oberen waagerechten Reihen A1 - A6 der Multiwellplatte (siehe Figur 9) wird abgenommen und 250  $\mu$ l/well der ersten Virusverdünnung ( $1:10^{-3}$ ) aufgebracht. Anschließend wird der Überstand der Reihen B1 - B6 abgenommen und die Zellen mit 250  $\mu$ l/well der zweitniedrigsten Konzentration ( $1:10^{-4}$ ) infiziert. Mit den übrigen Reihen (C1 - 6 und D1 - 6) und Virusverdünnungen ( $1:10^{-5}$  und  $1:10^{-6}$ ) wird analog verfahren. Die Platte wird für 90 min zur Virusfixierung in den Brutschrank gestellt.
5. Nach der Inkubation wird der Überstand der senkrechten Reihen A1 bis D1 (Kontrolle) abgenommen und je well 1 ml Methylzellulose-Overlay-Medium als Kontrolle dazugegeben (siehe Figur 9). Nach Abnahme des Überstandes der senkrechten Reihen A2 bis D2 wird je well 1 ml der niedrigsten unter 2. hergestellten Virostatikakonzentration dazugegeben. Die verbleibenden Reihen (A3-D3 – A6-D6) und Virostatikakonzentrationen (siehe 2.) werden analog verarbeitet.

6. Nach mind. 48 h, höchstens 72 h Inkubationszeit im Brutschrank (abhängig von der Größe der Plaques), werden die Zellen nach der unter 3.2.6.1 beschriebenen Kristallviolett-färbung gefärbt und fixiert. Die Ergebnisse der Kristallviolett-färbung werden mit dem unter 3.2.6.2 beschriebenen HSV-gD-Antikörper Bestätigungstest exemplarisch überprüft und bestätigt.



**Figur 9.** Skizze zur Durchführung des Screening-Plaquereduktionstest (SPRA). An der linken Ordinate sind die Werte der dekadischen Virusverdünnungen angegeben. Die Reihe links des roten Balkens ist die Kontrollgruppe, rechts davon die verschiedenen Virostatikakonzentrationen (siehe 3.2.4); hier beispielhaft für ACV gegen ein resistentes Viruslysate angegeben. Schematisch ist die jeweils unterschiedliche Plaquesformation dargestellt. Auswertbar sind nur die Wells, die einzeln unterscheidbare Plaques enthalten (hier Reihen C und D).

### 3.2.5 Plaquereduktionstest (PRA) zur Bestimmung der 50 % igen inhibitorischen Virostatikakonzentration – IC<sub>50</sub> Bestimmung mittels Probit-Analyse

1. Eine 24-well Multiwellplatte wird wie in 3.2.4 unter 1. beschrieben vorbereitet
2. Vorbereitung der Virostatika-Konzentrationen: Da durch den vorhergegangenen SPRA-Test die IC<sub>50</sub>-Werte des zu testenden Viruslysates bereits näherungsweise bestimmt wurden, werden die nun verwendeten Virostatikakonzentrationen diesem Ergebnis angepasst. Hierzu verdünnt man die Virostatika-Stammlösung mit Methylzellulose-Overlay-Medium. Die µM-Endkonzentrationen für die N3 Verdünnungsreihen betragen entweder 0,31; 0,63; 1,25; 2,5; 5,0 oder für die Virusstämme KOS und HSV-K143res 0,63; 1,25; 2,5; 5,0; 10. Die µM-Endkonzentrationen für die ACV Verdünnungsreihen betragen entweder 0,31; 0,63; 1,25; 2,5; 5,0 für die durch den SPRA-Test als sensitiv ermittelten Virusstämme oder 3,1; 6,25; 12,5; 25; 50 für die durch den SPRA-Test als resistent ermittelten Virusstämme.
3. Zur optimalen Auswertbarkeit des PRA-Testes werden in dieser Arbeit die Viruskonzentration auf Basis der im SPRA ermittelten PFU-Zahlen in der Kontrollreihe so berechnet, dass in der Kontrolle (Reihe A1 - D1) circa 40 PFUs/well gebildet werden. Beispiel: Bei einer Viruskonzentration von  $1:10^{-5}$  bilden sich beim SPRA-Test in der Kontrollreihe 58 Plaques (siehe Figur 9, well C1). Dann errechnet sich daraus für den PRA-Test eine Konzentration von:  $10^{-5}/58 \times 40 = 6,9 \times 10^{-4}$ .

Die zu testenden Viruslysate werden bei RT aufgetaut und im Wachstumsmedium verdünnt. Der Überstand wird abgenommen und 250 µl/well der Virusverdünnung aufgebracht. Die Platte wird für 90 min zur Virusfixierung in den Brutschrank gestellt.

Die weitere Aufarbeitung erfolgt in Analogie zu den Schritten 5. und 6. des in 3.2.4 beschriebenen SPRA-Tests.

4. Nach der mikroskopischen Auswertung (siehe 3.2.7) erfolgt dann die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte mit dem PROBIT-Verfahren. Dabei wird durch Bestimmung der Plaquereduktion in Abhängigkeit von der Virostatikakonzentration die genaue mittlere inhibitorische Virostatikakonzentration, welche die Plaquebildung um 50 % hemmt ( $IC_{50}$ ), berechnet. Die PROBIT-Auswertung wird mit Hilfe des SPSS-Programms (SPSS-Software, Version 15.0, München) durchgeführt. Die lineare Regression nach dem PROBIT-Modell ist ein übliches Verfahren zur statistischen Auswertung von Plaquereduktionstests (Jordan 1972).

### **3.2.6 Färbemethoden**

#### **3.2.6.1 Färbung mit Kristallviolett**

Der Überstand wird von der Multiwellplatte abgenommen. Pro well werden 200  $\mu$ l einer 0,1 % Kristallviolettlösung dazugegeben. Nach 30 min Stehen bei RT und anschließendem zweimaligem Waschen mit je 500  $\mu$ l PBS pro well wird die Platte mit geöffnetem Deckel mind. 1 h im Brutschrank getrocknet. Danach erfolgt die mikroskopische Auswertung (siehe 3.2.7).

#### **3.2.6.2 HSV gD-Peroxidasetest**

1. Permeabilisierung und Fixierung der Zellen:  
Medium von der Multiwellplatte abnehmen und 200  $\mu$ l/well Methanol (-20°C) zur Fixierung des Zellmonolayers hinzugeben, 15 min bei 4°C inkubieren, Methanol abdekandieren und 2 mal mit PBS (500  $\mu$ l/well) waschen.
2. Inkubation mit primärem Antikörper (HSV gD):  
Der Antikörper HSV gD wird 1:1,5 mit Glycerol verdünnt, zu je 30  $\mu$ l aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Vor Gebrauch wird ein Aliquot bei RT aufgetaut und 1:1333,33 mit PBS + 5 % FCS verdünnt.

Pro well werden 200 µl anti-HSV gD dazugegeben, die Platte wird anschließend 45 - 60 min im Brutschrank inkubiert und 2 mal mit PBS (500 µl/well) gewaschen.

3. Inkubation mit Sekundärantikörper:

Der IgD-POD Antikörper wird 1:5000 mit PBS + 5 % FCS verdünnt.

Pro well werden 200 µl des anti-Maus IgG-POD Antikörpers dazugegeben, die Platte wird anschließend 45 - 60 min im Brutschrank inkubiert und 2 mal mit PBS (500 µl/well) gewaschen.

4. Indikatorreaktion:

Die AEC-Stammlösung wird 1:20 mit 0,1 M Na-Acetat-Puffer verdünnt und das Substrat mit einem 0,22 µM Filter filtriert. Direkt vor Gebrauch des Substrats wird das Suspensionsgemisch mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1000, 4°C) versetzt, gevortext und vom Gemisch je 200 µl/well auf die Zellen gegeben. Die Platte 15 min im Brutschrank inkubieren und anschließend die Farbreaktion durch zweimaliges Waschen mit PBS (500 µl/well) stoppen.

5. Zur Lagerung 500 µl PBS in jedes well geben.

### 3.2.7 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Multiwellplatten erfolgt mikroskopisch bei 25-facher Vergrößerung. Bei der unspezifischen Kristallviolettffärbung werden die Plaques, die als helle Areale vor einem violetten Hintergrund auftreten, quantitativ erfasst. Bei der spezifischen Immunperoxidase-Färbung werden braunrot gefärbte Vero-Zellen positiv und damit HSV-infiziert gewertet.

### 3.2.8 Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte nach der zeitabhängigen Inkubation der Virostatika in humanem Blutserum bzw. EDTA-Humanblut

Sowohl die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte nach unterschiedlicher Inkubationsdauer in Humanserum von N3rac und N4 an dem Viruslysat HSV-L182res als auch die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte von N3rac, N3sn, N4 und ACV an dem Viruslysat HSV-L182res nach unterschiedlicher

Inkubationsdauer in EDTA-Humanblut erfolgt mit Hilfe des in 3.2.5 beschriebenen PRA-Tests. Lediglich die in 3.2.5. unter 2. beschriebene Herstellung der Virustatikakonzentrationen unterscheidet sich und wird im Folgenden erläutert.

### **3.2.8.1 Gewinnung des Humanserums und Inkubation mit N3 und N4**

Von einem gesunden, HSV-IgG positiven Spender werden ca. 25 ml Blut durch Venenpunktion in Serum-Röhrchen abgenommen. Unmittelbar nach der Entnahme erfolgt die Zentrifugation bei 1600 x g für 5 min. Der Serumüberstand wird abpipettiert und zu je 250 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Als Kontrollen werden 250 µl PBS bzw. 250 µl MEM mit P/S dazugegeben. Als Probe werden 250 µl einer 2 mM N3 bzw. N4 Stammlösung hinzugegeben. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei 37°C für 0 h, 24 h oder 130 h (siehe Tabelle 7). Nach Ende der Inkubationszeit werden Serumverdünnungsreihen mit Methylzellulose-Overlay-Medium in folgenden µM-Konzentrationen hergestellt: für N3 0,31, 0,62; 1,25; 2,5; 5,0 und für N4 1,25; 2,5; 5,0; 10; 20.

### **3.2.8.2 Gewinnung des EDTA-Humanbluts und Inkubation mit N3, N4 und ACV**

EDTA-Humanblut (ca. 43 ml) wird von einer gesunden, HSV-IgG negativen Spenderin durch Venenpunktion gewonnen. Unmittelbar nach der Entnahme wird das Blut gut gemischt und zu je 2,25 ml für N3-Verdünnungsreihen und die PBS-Kontrollen und zu je 2 ml für ACV Verdünnungsreihen in 15 ml Falcon tubes aliquotiert. Dazu werden 250 µl einer 20 mM N3 bzw. N4-Stammlösung bzw. 500 µl einer 10 mM ACV-Stammlösung gegeben. Diese kommen umgehend auf einen Taumler (Geschwindigkeit 1 - 2), der sich im Brutraum bei 37°C befindet. Die Inkubationszeiten in h betragen 0, 0,5, 1, 12, 24, 48, 72, 96 (siehe Tabelle 8). Kurz vor Testbeginn werden die Proben zentrifugiert (260 x g, 5 min), der Überstand in kleine 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und für wenige Sekunden bei 1600x g erneut

zentrifugiert. Aus der 2 mM-Lösung erfolgt die Herstellung einer Plasmaverdünnungsreihe aus dem inkubierten EDTA-Humanblutansatz in Methylzellulose-Overlay-Medium mit folgenden  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen: für N3 und N4 0,31, 0,62; 1,25; 2,5; 5,0 und für ACV 2,5; 5,0; 10; 20; 40.

### **3.3 Anfertigung und Auswertung der Blutausrichhe**

#### **3.3.1 Herstellung der Proben**

Das EDTA-Humanblut (ca. 9 ml) wird unmittelbar nach der Entnahme gut gemischt und zu je 1 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Zu den Aliquots wird von einer 2 mM Stammlösung soviel N3sn dazugegeben, dass folgende mikromolaren N3sn Konzentrationen erhalten werden: 5, 10, 20, 40, 80 und 800. Zur Kontrolle werden EDTA-Humanblut und eine Probe mit 50  $\mu\text{l}$  PBS/1 ml EDTA-Humanblut verwendet.

#### **3.3.2 Aufbringen der Blutpräparate**

Nach einer Inkubationszeit von 5 min, 30 min, 1 h, 7 h, 24 h und 48 h im Brutschrank werden von jeder Probe 3 - 5  $\mu\text{l}$  ca. 1 cm vom Rand der Schmalseite des Objektträgers entfernt auf den Objektträger aufgetragen. Ein zweiter Objektträger wird im 20 - 45° Winkel mit der Schmalseite an den Blutstropfen herangeführt, so dass dieser sich gleichmäßig an der Objektträgerkante ausbreitet. Das Blut wird zügig und gleichmäßig in Längsrichtung des Objektträgers ausgestrichen und an der Luft für mind. 30 min getrocknet. Von jeder Probe werden 2 Ausstriche angefertigt.

#### **3.3.3 Giemsa-Färbung der Blutausrichhe**

Die luftgetrockneten Blutausrichhe werden für mind. 3 min mit Methanol fixiert. Das Methanol wird abgekippt und die Blutausrichhe für 30 min mit Giemsa Gebrauchslösung bedeckt (ca. 2 ml/ Objektträger). Anschließend erfolgt eine Spülung mit Aqua dest.. Nachdem die Präparate an der Luft getrocknet sind, erfolgt die lichtmikroskopische Auswertung bei 100x Vergrößerung mit Ölimmersion.

Die Färbungen erfolgten am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Tübingen.

### **3.4 Herstellung der Proben für die Messung des freien Hämoglobins mit dem Dade Dimensions RxL-Analysegerät**

Das Vorgehen ist wie unter 3.3.1 beschrieben. Es werden Proben in folgenden N3sn  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen hergestellt: 5, 80, 800. Zur Kontrolle werden EDTA-Humanblut und eine Probe mit 50  $\mu\text{l}$  PBS/1ml EDTA-Humanblut verwendet. Nach 5 minütiger Inkubation im Brutschrank werden die Proben bei 260x g für 5 min zentrifugiert und das Plasma in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Die 800  $\mu\text{M}$  N3sn Probe wird 1 : 3 mit Aqua dest. verdünnt und in das Analysegerät gegeben. Die verbleibenden Proben werden unverdünnt dazugegeben. Die Messungen erfolgen nach der spektralphotometrischen Oxyhämoglobinbestimmung bei drei verschiedenen Messwellenlängen und Einsatz unterschiedlicher Korrekturverfahren zur Elimination von Störfaktoren, z.B. erhöhtes Bilirubin oder erhöhte Triglyceride (Thomas 2005) am Dade Dimensions RxL-Analysegerät im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen (Dr. Dr. Besenthal).

## 4 Ergebnisse

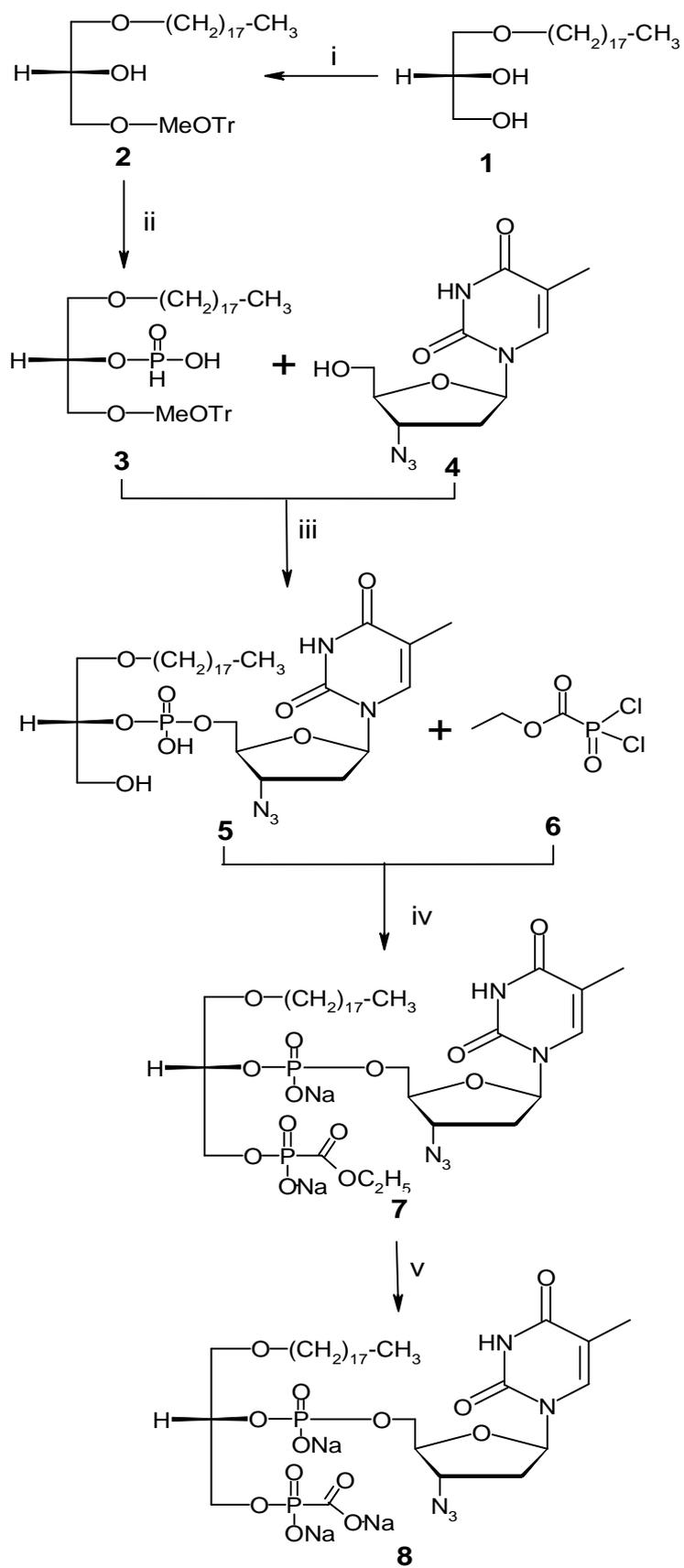
### 4.1 Synthese des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums

Die Synthese des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums **8** (N3sn) erfolgte nach einem von der Arbeitsgruppe Schott am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen erstellten Konzept, das allerdings nur für Substanzmengen im unteren Grammbereich ausgearbeitet war. Außerdem wurden bei der bisherigen Synthese des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums die beiden Virostatika AZT und PFA an ein racemisches Glycerinlipidgerüst gekuppelt. Das Syntheseziel der vorliegenden Arbeit, größere Substanzmengen des Duplex-Virostatikums herzustellen, deren AZT und PFA Reste an einem optisch aktiven Glycerinlipidgerüst verankert sind, war nicht durch „up-scalen“ des bisherigen Synthesekonzeptes erreichbar. Der Syntheseweg musste daher an einigen Synthesestufen geändert werden, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird.

Die ersten Stufen der Synthese zur Darstellung des Wirkstoffs sind experimentell sehr anspruchsvoll und wurden in Kooperation mit der Organischen Chemie durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit werden nur die beiden letzten Schritte der Synthese durchgeführt. Diese beinhalten die Kopplung von PFA an das AZT-Glyceryllipid, die chromatographische Reinigung des veresterten Duplex-Virostatikums (N4), die Spaltung der Estergruppe und die Isolierung des Duplex-Virostatikums (N3sn).

#### 4.1.1 Synthese von 3'-Azido-3'-desoxythymidylyl-(5'→2)-3-O-octadecyl-sn-glycerin (**5**) aus L-Batylalkohol

Als Ausgangsmaterial für die bisherige chemische Synthese von N3rac wurde das racemische Octadecylglycerin (Bathylalkohol) verwendet, aus dem in einer mehrstufigen Synthese N3rac mit einem racemischen Glycerinlipidgerüst als Trinatriumsalz erhalten werden kann (siehe Figur 10).



Figur 10.

**Figur 10.** Syntheseweg zur Darstellung des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums (**8, N3sn**) aus 3-O-Octadecyl-sn-glycerin (**1**). Die Reaktionsschritte sind: i = 1. Reaktionsschritt 4-Monomethoxytritylchlorid in Pyridin, 2. Reaktionsschritt präparative Säulenchromatographie an Kieselgel zur Reinigung von **2**. ii = 1. Reaktionsschritt Salicylchlorophosphit in Pyridin/Dioxan, 2. Reaktionsschritt präparative Säulenchromatographie an Kieselgel zur Reinigung von **3**. iii = 1. Reaktionsschritt Pivalinsäurechlorid in Pyridin, 2. Reaktionsschritt Jod in Tetrahydrofuran/Wasser, 3. Reaktionsschritt 80 % Essigsäure, RT, 4. Reaktionsschritt präparative Säulenchromatographie an Kieselgel zur Reinigung von **5**. iv = 1. Reaktionsschritt Rühren in Trimethylphosphat, 2. Reaktionsschritt Neutralisation mit Natriumcarbonat, 3. Reaktionsschritt präparative Säulenchromatographie an LiChroprep RP-18 zur Reinigung von **7** (N4), 4. Reaktionsschritt Lyophilisation. v = 1. Reaktionsschritt 1N Natronlauge, 2. Reaktionsschritt pH-Einstellung mit Kationenaustauscher (H<sup>+</sup>-Form) auf pH 8,5, 3. Reaktionsschritt Lyophilisation von **8, N3sn**.

Aufgrund des chiralen C2-Kohlenstoffatoms im Glycerinteil des Wirkstoffs wird für die Darstellung des Duplex-Virostatikums mit einem optisch aktiven Glycerinlipidgerüst das enantiomerenreine 3-O-Octadecyl-sn-glycerin (**1**) (L-Batylalkohol) als Ausgangsmaterial verwendet, das entweder aus D-Mannit synthetisiert wird (Hirth et al., 1982) oder auch käuflich erworben werden kann.

Im ersten Syntheseschritt wird die primäre Hydroxylgruppe in Position 1 des 3-O-Octadecyl-sn-glycerins mit einem 4-Monomethoxytritylrest verethert und somit mit einer wieder abspaltbaren Schutzgruppe versehen. Die sogenannte Tritylierung wird in wasserfreiem Pyridin durchgeführt, da bei der Reaktion HCl freigesetzt wird und die Base Pyridin die Salzsäure als Pyridiumhydrochlorid binden kann. Aus dem anfallenden Reaktionsgemisch wird das gewünschte Reaktionsprodukt 1-O-4-Monomethoxytrityl-3-O-octadecyl-sn-glycerin (**2**) an einer Kieselgelsäule chromatographisch isoliert. Im nächsten Schritt wird **2** mit Salicylchlorophosphit an der noch freien sekundären Hydroxylgruppe in Position 2 mit einem Phosphonatrest versehen, wobei 1-O-4-Monomethoxytrityl-3-O-octadecyl-sn-glycerin-2-O-hydrogenphosphonat (**3**) erhalten wird. Bei dieser Umsetzung wird das frei werdende HCl von Pyridin gebunden. Außerdem ist bei dieser Reaktion besonders darauf zu achten, dass unter Ausschluss von Feuchtigkeit gearbeitet wird, da Salicylchlorophosphit sofort mit Wasser reagieren würde und dann für die eigentliche Umsetzung verloren ginge. Das gewünschte Reaktionsprodukt **3** wird säulenchromatographisch an einer Kieselgelsäule gereinigt. Zur Fraktionierung des Reaktionsansatzes wird ein Chloroform/Methanol-Gradient mit steigendem Methanolanteil verwendet. Anschließend wird an **3** über die Hydrogenphosphonatgruppe das käuflich zu erwerbende Virostatikum AZT (**4**) mit seiner freien 5'-Hydroxylgruppe kondensiert. Die Kondensation erfolgt wiederum unter vollständigem Wasserausschluss nach der sogenannten Phosphonatmethode mit Hilfe von Pivaloylchlorid. Unmittelbar nach dem Kupplungsschritt wird die Phosphonatbrücke, die den Glycerinteil mit AZT verbindet, mit Hilfe von Jod zur Phosphodiesterbrücke oxidiert. Das Reaktionsgemisch wird

säulenchromatographisch im Chloroform/Methanol-Gradienten an Kieselgel fraktioniert. Aus dem isolierten Kondensationsprodukt wird durch die Behandlung mit Essigsäure die 4-Monomethoxytritylschutzgruppe abgespalten, so dass das Kondensat dann eine freie, primäre Hydroxylgruppe für die Kupplung des zweiten Wirkstoffs PFA aufweist. Die bis hierher beschriebenen Syntheseschritte wurden in der Arbeitsgruppe Schott durchgeführt. Das resultierende 3'-Azido-3'-desoxythymidylyl-(5'→2)-3-O-octadecyl-sn-glycerin (**5**) ist ein amphiphiles Glyceryl-Prodrug des Azidothymidin-5'-monophosphats (AZTMP), aus dem das gewünschte AZT-PFA-Duplex-Virostatikum erhalten wird, indem an dessen freie Hydroxylgruppe in Position 1 des Glycerinrestes, die Phosphonoameisensäure (PFA) gekuppelt wird. Diese Kupplung und die sich anschließenden Synthesearbeiten werden im Folgenden ausführlicher beschrieben, da sie die wesentlichen Beiträge der vorliegenden Arbeit zur Synthese des Duplex-Virostatikums sind.

#### **4.1.2 Synthese des Duplex-Virostatikums 8 (N3sn) durch Kondensation von 5 mit (Ethoxycarbonyl)phosphorigsäuredichlorid (6)**

Die Einführung des Phosphonoameisensäureesters erfolgt in zwei Schritten nach dem von der Arbeitsgruppe Schott entwickelten Konzept. Da diese Arbeitsvorschrift nur für Mengen bis zu ca. 2 g ausgearbeitet ist, wurden in Vorversuchen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, zunächst die Bedingungen wie beispielsweise Menge und Art der Lösungsmittel, Reaktionszeit und Reaktionstemperatur ermittelt, damit Ansätze bis zu ca. 20 g praktikabel durchgeführt werden können. Basierend auf den Ergebnissen dieser Vorarbeiten wurde der folgende Syntheseweg ausgearbeitet.

Im ersten Schritt wird aus dem Prodrug **5** durch Umsetzung mit (Ethoxycarbonyl)phosphorigsäuredichlorid (**6**), das nach Literaturangaben (Vaghefi et al., 1986) synthetisiert wird, der Phosphonoameisensäureester (**7**), N4 des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums synthetisiert. Nach der

chromatographischen Reinigung, die in präparativen Mengen möglich ist, wird **7**, N4 analysenrein im 10 - 20 g Maßstab mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 61 % erhalten. Im zweiten Schritt wird die Estergruppe durch alkalische Hydrolyse entfernt und das resultierende Duplex-Virostatikum **8** (N3sn) ohne weitere Reinigung durch Lyophilisation als Pulver erhalten.

#### 4.1.2.1 Kondensationsreaktion

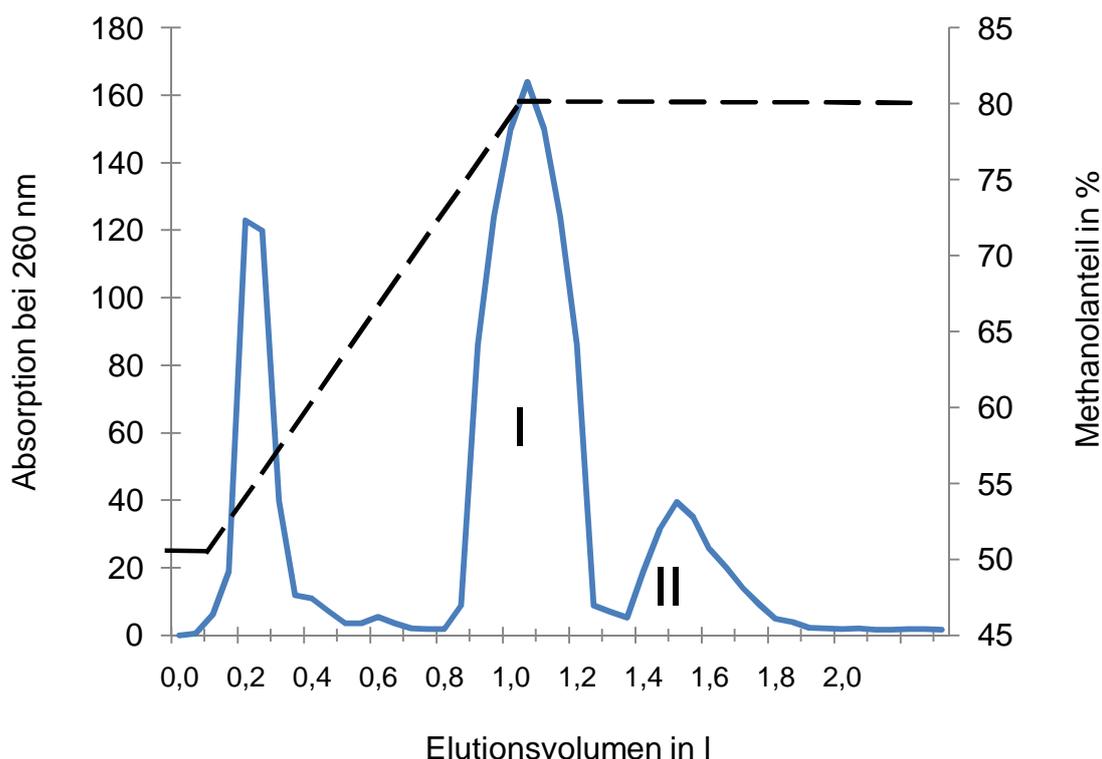
Bei der Umsetzung von **5** mit **6** in Trimethylphosphat entsteht unter Freisetzung von HCl der 3'-Azido-3'-desoxythymidylyl-(5'→2)-3-O-octadecyl-sn-glycerol-1-O-phosphonoameisensäureethylester **7**, N4. Das sich im Verlauf der Reaktion bildende HCl wird von Zeit zu Zeit durch Anlegen von Vakuum aus dem Reaktionsansatz mehrmals abgesaugt. Hierdurch wird die Ausbeute an dem gewünschten Kondensationsprodukt erhöht. Die Reaktion kann bei RT durchgeführt werden, da **7** (N4) gegen HCl bei RT verhältnismäßig stabil ist. Das Fortschreiten der Reaktion zeigt sich daran, dass die anfängliche Suspension nach und nach in eine Lösung übergeht. Am Ende der Kondensation wird das gesamte Reaktionsgemisch durch schnelles Eingießen in eine Natriumcarbonatlösung auf einen pH-Wert zwischen 6 und 7 gebracht. Ein alkalischer pH-Wert der Lösung sollte vermieden werden, da die Ethylestergruppe im Alkalischen hydrolysiert.

#### 4.1.2.2 Säulenchromatographische Reinigung des Kondensationsansatzes

Die Isolierung von **7** (N4) aus dem Reaktionsgemisch gelang bisher säulenchromatographisch in Mengen von 1 - 2 g aus Reaktionsvolumina von 20 ml problemlos an einer reversed-phase-Säule im salzgepufferten Wasser/Methanol-Gradienten und erforderte etwa einen Arbeitstag. Die chromatographische Aufarbeitung eines 400 ml Reaktionsansatzes, der bei der präparativen Synthese anfällt, würde dann ca. 2 - 3 Wochen benötigen, so dass ein neuer Weg zur präparativen Chromatographie entwickelt

werden musste. Da das zu isolierende, wasserlösliche Produkt an Kieselgel adsorbiert bleibt und vom Natriumchlorid (bildet sich bei der Neutralisation der Reaktionslösung), dem schwer flüchtigen Trimethylphosphat sowie den unerwünschten Nebenprodukten befreit werden muss, scheidet die Chromatographie an einer Kieselgelsäule von vornherein aus. Mehrere Versuche, das Gemisch am Anionenaustauscher unter Verwendung von flüchtigen wässrigen Salzgradienten zu trennen, verliefen unbefriedigend. Einerseits konnten Nebenprodukte nur unvollständig von **7** (N4) entfernt werden, andererseits waren Elutionsvolumina von einigen Litern zu konzentrieren und beispielsweise von dem im Elutionsgradienten verwendeten schwer flüchtigen Ammoniumacetatpuffer nur durch langwieriges, wiederholtes Lyophilisieren zu befreien. Es mussten somit zahlreiche unbefriedigende säulenchromatographische Trennversuche unternommen werden, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, bis schließlich ein Weg gefunden war, mit dem die Isolierung von **7** (N4) aus 300 - 400 ml Reaktionsvolumina mit einem vertretbaren Aufwand möglich ist, der im Folgenden beschrieben wird.

Die präparative säulenchromatographische Trennung gelingt mit Hilfe von LiChroprep RP-18 (40 - 63  $\mu\text{M}$ ) in einem zweistufigen Wasser/Methanol-Gradienten, in dem der Methanolanteil gesteigert wird. Das reversed-phase Trennmateriale ist grobkörnig und kann in einer großen Säule problemlos mit einer Mitteldruckpumpe eluiert werden. Die Reaktionslösung wird auf die mit Wasser äquilibrierte Säule aufgepumpt und dann zuerst mit 50 % igem Methanol eluiert. Hierbei werden vor allem das zur Reaktion verwendete Lösungsmittel Trimethylphosphat und das entstandene NaCl eluiert, während das gewünschte Reaktionsprodukt sowie das Edukt und die Nebenprodukte auf der Säule adsorbiert bleiben. Der Elutionsverlauf wird spektralphotometrisch bei 260 nm verfolgt und führt zu dem Elutionsprofil der Figur 11. Bei Steigerung des Methanolanteils verlassen zuerst unbekannte Nebenprodukte die Säule, gefolgt von Peak I, der chromatographisch reines **7** (N4) enthält. Nicht umgesetztes **5** wird in Peak II eluiert und kann erneut zur Reaktion verwendet werden.



**Figur 11.** Elutionsprofil der säulenchromatographischen Trennung des Reaktionsgemisches aus der Umsetzung von **5** mit **6** an einer LiChroprep RP-18 Säule (20 cm x 5 cm). Die Elution erfolgt mit einem zweistufigen Methanol/Wasser-Gradienten. Das Lyophilisat von Peak I enthält 3'-Azido-3'-desoxythymidyl-(5'→2)-3-O-octadecyl-sn-glycerol-1-O-phosphonoameisensäureethylester (**7**) (N4) in chromatographisch reiner Form. Im Lyophilisat von Peak II sind als Hauptprodukt das nicht umgesetzte Edukt 3'-Azido-3'-desoxythymidyl-(5'→2)-3-O-octadecyl-sn-glycerin **5** enthalten, sowie verschiedene geringfügige Verunreinigungen.

Die produktenthaltenden Fraktionen werden vereinigt, konzentriert und anschließend lyophilisiert, wobei das Duplex-Virostatikum **7** (N4) als weißes Pulver erhalten wird. Die Isolierung von **7** (N4) aus dem großen Elutionsvolumen ist unproblematisch, da der hohe Methanolanteil am Rotationsverdampfer schnell abgezogen werden kann. Da zur Elution kein Salzpuffer verwendet wird, kann das Eluat auf wenige ml Wasser konzentriert werden, die in kurzer Zeit durch Lyophilisation entfernbar sind.

Nach dem Lyophilisieren fällt **7** (N4) in analysenreiner Form als weißes lagerungsfähiges Pulver aus.

### **4.1.2.3 Hydrolytische Entfernung des Ethylesters aus **7** (N4) und Isolierung von **8** (N3sn)**

Bei Bedarf kann **7** (N4) problemlos in das aktive AZT-PFA-Duplex-Virostatikum **8**, N3sn überführt werden, indem der Ester durch Zugabe von 1 N NaOH bei RT gespalten wird. Nach der hydrolytischen Entfernung des Ethylrestes wird der stark alkalische Reaktionsansatz mit einem Kationenaustauscher auf pH 8,5 gebracht, vom Austauscher abgesaugt, konzentriert und anschließend lyophilisiert, wobei das AZT-PFA-Duplex-Virostatikum **8** (N3sn) als weißes Pulver analysenrein in über 97 % Ausbeute erhalten wird. Die Entfernung des Esters führt dazu, dass **8** (N3sn) in der Dünnschichtchromatographie auf der Kieselgelplatte deutlich langsamer wandert als **7** (N4), so dass auf diesem Weg die quantitative Esterspaltung einfach und zuverlässig überprüft werden kann. Eine säulenchromatographische Reinigung von **8** (N3sn) empfiehlt sich nicht, da N3 im Vergleich zu **7** (N4) hydrolyseempfindlich ist und bereits in leicht saurem bis neutralem Medium decarboxylieren kann und dadurch inaktiv wird. Aus diesem Grund sollte **7** (N4) in einer möglichst hohen Reinheit für die Esterspaltung eingesetzt werden, damit eine Reinigung von **8** (N3sn) nicht erforderlich wird.

Struktur und Reinheit der Syntheseprodukte wird mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ( $R_f$ -Werte), der  $^1\text{H}$ ,  $\text{C}^{13}$  und  $^{31}\text{P}$ -NMP, Massenspektroskopie, Elementaranalyse und den Drehwerten ( $[\alpha]$ ) überprüft und bestätigt. Von diesen experimentellen Messdaten, die am Institut für Organische Chemie erstellt wurden, sind im Rahmen dieser Arbeit nur die  $R_f$ -Werte, die Daten der Massenspektroskopie und die Ergebnisse der Elementaranalyse aufgeführt.

### 4.1.3 Die optische Aktivität der Syntheseprodukte

Nachdem das ausgearbeitete Synthesekonzept die Darstellung des analysenreinen N3sn in präparativen Mengen ermöglicht, stellt sich die Frage, ob im Syntheseprodukt das optisch aktive Glycerinlipidgerüst nachweisbar ist. Die optische Aktivität einer Substanz wird bekanntlich in einem gemessenen Drehwert dokumentiert, der mit Hilfe eines Polarimeters in der vorliegenden Arbeit bei 20°C und der Wellenlänge 589,3 nm (D-Linie für monochromatisches Natriumlicht) von der Arbeitsgruppe Schott bestimmt wird. Da zur Synthese von **8** (N3sn) der enantiomerenreine optisch aktive **1** (L-Batylalkohol) als Ausgangsmaterial verwendet wird, ist zu erwarten, dass die anschliessenden Syntheseprodukte ebenfalls optisch aktiv sind.

Aus den gemessenen Drehwerten folgt, dass bei der Derivatisierung des enantiomerenreinen Glycerinlipidgerüsts die optische Aktivität erhalten bleibt. Inwieweit sich die Einführung des AZT-Restes in das Glycerinlipidgerüst auf die optische Aktivität auswirkt, kann aus dem gemessenen Drehwert des Kondensationsproduktes **5** nicht eindeutig ermittelt werden. Der sehr hohe Drehwert von AZT mit  $[\alpha] = + 47,0$  ( $c = 1,0$ ,  $H_2O$ ) überlagert den geringen Wert des optisch aktiven Glycerinlipidgerüsts, der außerdem nicht in Wasser gemessen werden kann, da **3** in Wasser schwer löslich ist. Nach der Kondensation von AZT an **3** hat das Kondensat **5** einen Drehwert von  $[\alpha] = + 5,0$  ( $c = 1,3$ ,  $H_2O$ ), der praktisch dem Wert von  $[\alpha] = + 5,58$  ( $c = 1,04$ ,  $H_2O$ ) entspricht, den das Kondensat auch dann aufweist, wenn AZT nicht an ein optisch aktives, sondern an ein entsprechendes racemisches Glycerinlipidgerüst gekoppelt wird. Bei der Umsetzung von **5** mit **6** zum Phosphonoameisensäureethylester (**7**) (N4) beträgt  $[\alpha] = - 1,89^\circ$  ( $c = 1,03$ ,  $H_2O$ ), wenn der eingesetzte Reaktionspartner **5** ein optisch aktives Glycerinlipidgerüst aufweist. Ist das Glycerinlipidgerüst von **5** racemisch, dann weist das resultierende Kondensat **7** (N4) einen positiven Drehwert von  $[\alpha] = + 7,3^\circ$  ( $c = 1,00$ ,  $H_2O$ ) auf. Nach der hydrolytischen Entfernung des Ethylrestes bei der **7** (N4) in **8** (N3sn) überführt wird, ändert sich der Drehwert praktisch nicht, wobei  $[\alpha] = - 2,03^\circ$

( $c = 1,09$ ,  $H_2O$ ) beträgt, wenn das Glycerinlipidgerüst von **8** (N3sn) optisch aktiv ist.

## 4.2 Virologische Untersuchungen

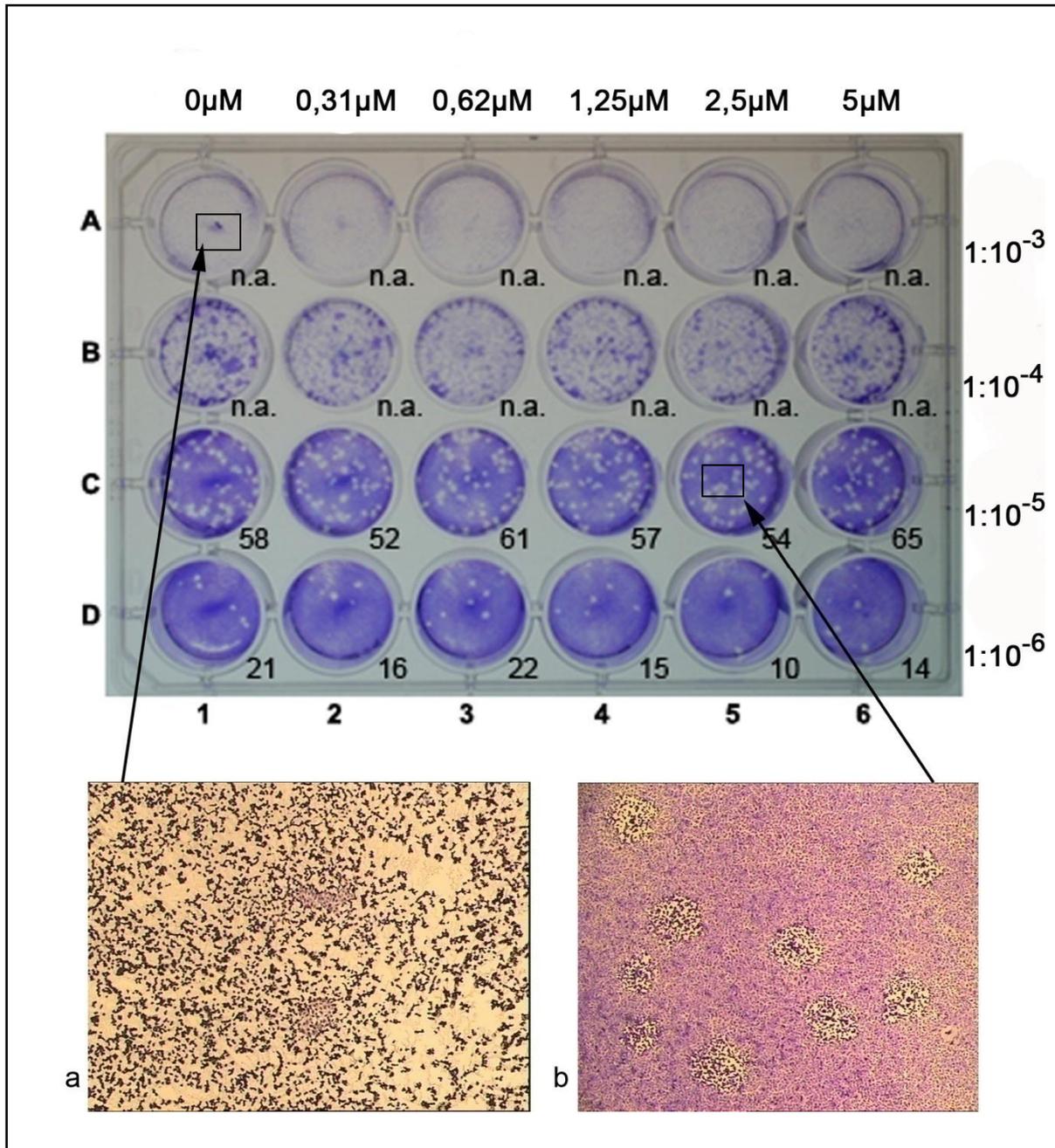
Nach dem erfolgreichen Abschluss der Synthesearbeiten steht das AZT-PFA-Duplex-Virostatikum (N3) sowohl mit einem enantiomerenreinen (N3sn) als auch aus früheren Synthesen mit einem racemischen N3rac Glycerinlipidgerüst für die geplanten virologischen Untersuchungen zur Verfügung. Ein durch die Konfiguration des Glycerinlipidrestes bedingter Einfluss auf die antivirale Wirkung von N3 kann mit Hilfe der zu ermittelnden virostatischen Aktivität abgeklärt werden. Außerdem können mit dem in der veresterten Form ebenfalls verfügbaren Wirkstoff N4 Hinweise zum Mechanismus der antiviralen Wirkung erhalten werden.

Als Maßstab für die virostatische in vitro Wirkung dient der  $IC_{50}$ -Wert. Dieser Wert gibt die Virostatikakonzentration an, bei der die Plaquezahl pro well im Vergleich zu der Kontrolle zu 50 % reduziert ist und wird durch den SPRA-Test orientierend und anschließend durch den PRA-Test samt PROBIT-Analyse genau berechnet.

### 4.2.1 Ergebnisse der Färbemethoden

Zur Fixierung und Färbung der Multiwellplatten, sowohl beim SPRA als auch beim PRA-Test wird die unspezifische, histochemische Methode der Kristallviolettffärbung verwendet (siehe Figur 12 und Figur 13, A1 - A4). Dabei handelt es sich um einen Anilinfarbstoff, mit dem innerhalb kurzer Zeit der CPE fixiert und angefärbt, sowie die Anzahl der Plaques bestimmbar wird (siehe Figur 12). Beim SPRA-Test sind die Reihen auswertbar, die in der Viruskontrolle 20 - 100 voneinander abgrenzbare Plaques enthalten. Als nicht auswertbar (n.a.) werden wells bezeichnet, die, aufgrund der durch konfluente Plaques bedingten teilweisen oder totalen Zelllyse, keine Differenzierung der aneinandergrenzenden Plaques mehr zulassen (siehe Figur 12, Bild a). Wells, die weniger als 20 Plaques enthalten, bleiben unberücksichtigt, da die statistische Auswertung an Genauigkeit verliert. Da beim PRA-Test, auf Basis des vorausgegangenen SPRA-Tests, eine vorherige Berechnung der einzusetzenden Virusverdünnung erfolgte (siehe 3.2.5. unter 3.), um die gewünschte Plaquezahl von circa 40 PFUs pro well

in der Kontrollreihe zu erhalten, sind alle wells für die Auswertung verwendbar.



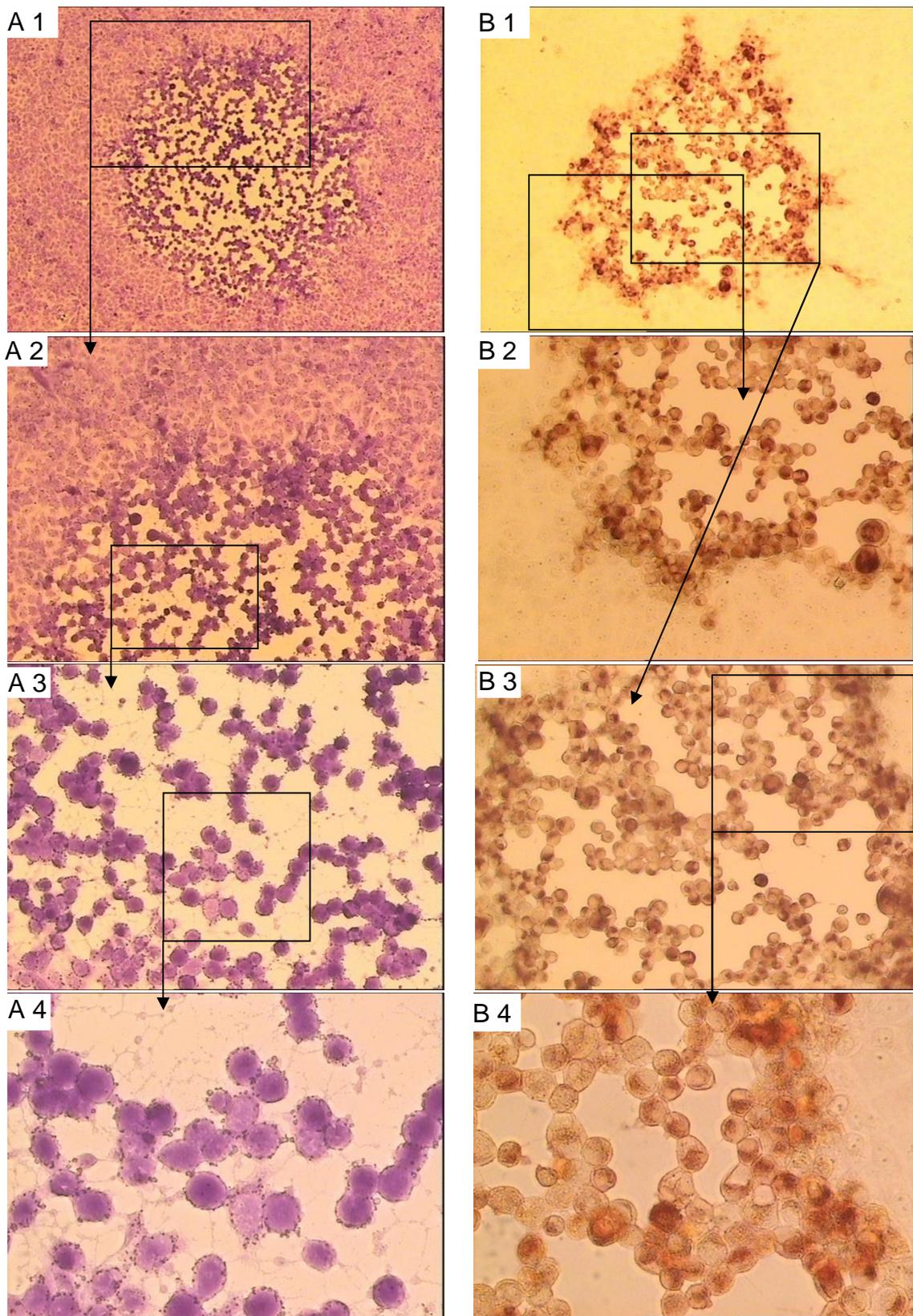
**Figur 12.**

Beispiel einer ACV-Screeningplatte nach Färbung mit Kristallviolett. In der oberen Abszisse sind die ACV-Konzentrationen aufgeführt. An der rechten Ordinate sind die Werte der dekadischen Virusverdünnungen des Viruslysates HSV-L182res angegeben. n.a. = nicht auswertbar aufgrund der

konfluenten Plaques bzw. kompletten Zellyse wie die Vergrößerung (25x) des wells A1 (Figur 12, Bildausschnitt a) beispielhaft zeigt. Die Zahlen neben den einzelnen wells geben die unter dem Lichtmikroskop ausgezählten Plaques an, wie das well C5 (Bildausschnitt b) beispielhaft zeigt. Die Zuordnung der wells erfolgt über die linke Ordinate A - D und die untere Abszisse 1 - 6.

Die Ergebnisse der Kristallviolett färbung werden exemplarisch mit Hilfe der HSV gD Antigen Färbung bestätigt (siehe Figur 13, Bild B1 - B4). Hierbei handelt es sich um eine Färbemethode, mit der der Nachweis des HSV gD Antigens bei Vorliegen einer viralen HSV Infektion der Vero-Gewebemikrokultur erbracht werden kann. Ein HSV spezifischer Primärantikörper detektiert das HSV gD Protein infizierter HFF- oder Verozellen. Ein sekundärer mit Meerrettich-Peroxidase konjugierter Antikörper (Kaninchen-anti-Maus-Antikörper) ist gegen den primären Antikörper gerichtet und bindet an diesen. Die Meerrettich-Peroxidase reduziert mit Hilfe des dreiwertigen Eisens im Porphyrinring (Elektronenlieferant) unter Zugabe des lichtempfindlichen Indikators AEC  $H_2O_2$  zu  $H_2O$ , wobei AEC oxidiert wird. Bei der Oxidation fällt AEC als unlöslicher Azamethinfarbstoff aus, was zu einer Braunrotfärbung der Kerne infizierter Zellen führt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass mit beiden Färbemethoden identische Ergebnisse erzielbar sind (siehe Figur 13). Aus Gründen der praktikableren Durchführbarkeit wurde die Kristallviolett färbung bevorzugt.



**Figur 13.** Vero Zellen, die mit dem Viruslysat HSV-L182res infiziert und nach der Methode der Kristallviolett-färbung (A1-A4) und der HSVgD-

Immunperoxidasefärbung (B1-B4) in der Vergrößerung 50x, 100x, 200x, 400x bzw. 100x, 200x, 400x abgebildet sind.

### **4.2.2 Ermittlung der N3 und ACV-Konzentrationen, die die Virusplaquebildung zu 50 % hemmt (IC<sub>50</sub>-Werte) durch den SPRA- und PRA Test**

Zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte des neuen Duplex-Virostatikums werden Vero-Zellen mit sechs unterschiedliche HSV-1 Virusstämmen infiziert, von denen drei ACV sensitiv (KOS, HSV-K161, HSV-L177) und drei ACV resistent (KOS-M, HSV-K143, HSV-L182) sind (siehe Tabelle 3). Nach Zugabe des zu testenden Virostatikums zu den infizierten Vero-Zellen zeigt eine Verminderung der Plaquezahl in Abhängigkeit der Virostatikakonzentration die virostatische Aktivität an. Als Vergleich für die antivirale Wirkung von N3 werden die IC<sub>50</sub>-Werte von ACV zugrunde gelegt, die zunächst orientierend nach dem SPRA-Test ermittelt werden.

#### **4.2.2.1 Ergebnisse des SPRA-Test**

Nach der Anfärbung der Multiwellplatte und Auszählung der Plaques lässt sich die Virostatikakonzentration optisch ermitteln, bei der die Plaquezahl im Vergleich zur Kontrolle um die Hälfte reduziert ist. Liegt die Zahl der Hälfte der Plaques zwischen zwei Virostatikakonzentrationen, was bei den hier untersuchten Platten der Fall ist, so kann nur eine semiquantitative Angabe zu IC<sub>50</sub>-Bereichen erfolgen. Kommt es bei keiner der verwendeten Virostatikakonzentrationen zu einer Reduktion der Plaquezahl im Vergleich zur Kontrollreihe, wie dies anhand von Figur 12 beispielhaft gezeigt wird, so verhält sich das untersuchte Viruslysat resistent gegenüber dem eingesetzten Virostatikum. Die Ergebnisse des SPRA-Tests sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

**Tabelle 4.** Mit dem SPRA-Test ermittelte IC<sub>50</sub>-Bereiche der Virostatika ACV und N3rac gegen 3 verschiedene ACV sensitive (sens) und 3 ACV resistente (res) HSV-Viruslysate.

Viruslysat	Virostatikum	Bereich der IC <sub>50</sub> -Werte in µM
HSV-K161sens	ACV	0,31<IC <sub>50</sub> <1,25
	N3	1,25<IC <sub>50</sub> <2,5
HSV-K143res	ACV	IC <sub>50</sub> >10
	N3	2,5<IC <sub>50</sub> <5,0
HSV-L177sens	ACV	0,31<IC <sub>50</sub> <1,25
	N3	1,25<IC <sub>50</sub> <2,5
HSV-L182res	ACV	IC <sub>50</sub> >10
	N3	1,25<IC <sub>50</sub> <2,5
KOSsens	ACV	2,5<IC <sub>50</sub> <5,0
	N3	2,5<IC <sub>50</sub> <5,0
KOS-Mres	ACV	IC <sub>50</sub> >10
	N3	2,5<IC <sub>50</sub> <5,0

Bei allen 6 untersuchten HSV-Isolaten kann unter Einwirkung von N3rac eine deutliche Verminderung der Plaquezahl beobachtet werden, so dass N3rac auch auf die ACV-resistenten Stämme eine hohe antivirale Wirkung ausübt. Unter dem Einfluss von ACV zeigen ACV-sensitive Viruslysate vergleichbare Ergebnisse wie N3rac, wohingegen bei den ACV resistenten Viruslysaten auch beim Einsatz von 10 µM ACV erwartungsgemäß keinerlei Verringerung der Plaquezahl erfolgt (siehe Figur 12).

Da es sich bei dem SPRA-Test um ein Screening-Verfahren handelt, werden im Folgenden die exakten IC<sub>50</sub>-Werte mit dem als „Gold-Standard“

anerkannten PRA-Tests mit anschließender PROBIT-Transformation berechnet.

Der SPRA-Tests wird auch dazu verwendet, die Virusverdünnung so zu berechnen, dass sich im anschließenden PRA-Test in der Kontrollreihe (A1 - D4) circa 40 Plaques pro well bilden, eine für die Auswertung optimale Plaquezahl. In die Berechnung eingezogen werden die Kontrollreihen (A1 - A4), in denen zwischen 20 und 100 Plaques gebildet werden. Dann erfolgt die im experimentellen Teil ausgeführte Berechnung. Die beim PRA-Test verwendeten Virusverdünnungen, die sich aus TCID<sub>50</sub>-Bestimmungen in Verozellkulturen der einzelnen Virusstämme ableiten, sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Meistenteils wurde mit 100x TCID<sub>50</sub>/ml inokuliert, um eine statistisch auswertbare Zahl von HSV-Plaques zu erzielen.

**Tabelle 5.** Errechnete Virusverdünnungen der verwendeten Virusstämme.

Viruslysats	Verdünnung
HSV-K161sens	1: 6 x 10 <sup>-4</sup>
HSV-K143res	1: 5 x 10 <sup>-4</sup>
HSV-L177sens	1: 4 x 10 <sup>-4</sup>
HSV-L182res	1: 10 <sup>-5</sup>
KOSsens	1: 8 x 10 <sup>-5</sup>
KOSMres	1: 10 <sup>-6</sup>

#### 4.2.2.2 Ergebnisse des PRA-Tests

Die berechneten IC<sub>50</sub>-Werte von N3rac und ACV gegenüber den sechs untersuchten HSV-1 Virusstämmen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tabelle 6.** Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte in µM (3-fach Bestimmung) der Virostatika N3rac und ACV gegen 3 verschiedene ACV sensitive (sens) und 3 ACV resistente (res) HSV-Viruslysate.

Viruslysat	Virostatikum	IC <sub>50</sub> µM			Mittel-Wert	SD
		1	2	3		
HSV-K161sens	ACV	0,66	0,45	0,63	<b>0,58</b>	0,11
	N3	1,59	3,44	1,80	<b>2,27</b>	1,01
HSV-K143res	ACV	66,11	82,05	77,05	<b>75,07</b>	8,15
	N3	4,64	5,63	3,50	<b>4,59</b>	1,07
HSV-L177sens	ACV	0,19	0,41	0,35	<b>0,32</b>	0,11
	N3	1,87	2,09	1,79	<b>1,92</b>	0,15
HSV-L182res <sup>a</sup>	ACV	9,97	9,17	9,38	<b>9,51</b>	0,41
	N3	1,15	2,03	2,44	<b>1,87</b>	0,66
KOSsens	ACV	2,69	1,60	4,85	<b>3,04</b>	1,65
	N3	4,77	3,17	4,13	<b>4,02</b>	0,81
KOS-Mres	ACV	30,45	30,23	32,94	<b>31,20</b>	1,51
	N3	4,38	2,52	3,28	<b>3,39</b>	0,93

<sup>a</sup> wurde in den folgenden Tests (siehe Tabelle 7 und 8) verwendet.

N3rac zeigt sowohl bei den ACV sensitiven als auch ACV resistenten Viruslysaten eine deutliche virostatistische Wirkung die zwischen 1,87 µM und 5,49 µM liegt. Dagegen zeigt ACV erwartungsgemäß nur bei den ACV

sensitiven Viruslysaten eine hohe antivirale Wirkung, die sich in  $IC_{50}$ -Werten zwischen 0,32  $\mu$ M und 3,04  $\mu$ M ausdrückt. Bei den ACV resistenten Viruslysaten werden dagegen  $IC_{50}$ -Werte im Bereich von 9,51  $\mu$ M und 75,07  $\mu$ M ermittelt. Bei den ACV sensitiven Viruslysaten sind die  $IC_{50}$ -Werte von ACV und N3rac entweder annähernd gleich, beispielsweise bei KOSsens (3,04  $\mu$ M für ACV, 4,02 für N3rac) oder nur um den Faktor 5 für ACV erniedrigt.

Bei den ACV resistenten Viruslysaten unterscheidet sich die virostatistische Wirkung von N3rac deutlich von der ACV-Aktivität. Beim HSV-K143res übertraf N3rac die Wirkung von ACV um den Faktor 14, beim HSV-L182res um den Faktor 5 und beim KOS-res wirkt N3rac 8-fach besser. Den unterschiedlichen  $IC_{50}$ -Werten ist eindeutig zu entnehmen, dass N3rac bei ACV-Resistenz eine Alternative zur ACV-Therapie bieten kann, falls die in vitro Aktivität auch in vivo auftritt.

### **4.2.3 Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte von N3rac und N4 unter Verwendung des ACV-resistenten Viruslysates HSV-K182res nach unterschiedlicher Inkubationsdauer im Humanserum**

Der Einfluss, den die Blutbestandteile auf die antivirale Wirkung der Duplex-Virostatika N3rac und N4 ausüben, wird mit Hilfe der  $IC_{50}$ -Werte untersucht, die diese Wirkstoffe gegenüber dem Viruslysate HSV-L182res aufweisen. Zunächst werden in einem orientierenden Versuch N3rac und N4 mit Humanserum unterschiedlich lange inkubiert. Anschließend werden die  $IC_{50}$ -Werte der inkubierten Virostatika bestimmt. Eine Änderung der  $IC_{50}$ -Werte im Vergleich zu den nicht mit Humanserum inkubierten Wirkstoffen gibt indirekt Auskunft darüber, ob die Bestandteile des Serums eine Aktivierung oder Deaktivierung des Virostatikums bewirken.

**Tabelle 7.** IC<sub>50</sub>-Werte der Duplex-Virostatika N3rac und N4 gegen das Viruslysat HSV-L182res nach unterschiedlicher Inkubationsdauer mit anti-HSV-IgG<sup>+</sup> Humanserum bei 37°C. Die verwendeten Virostatika-Konzentrationen in µM für N3rac betragen 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0, für N4 1,25; 2,5; 5,0; 10; 20. Die Kontrolle, das HSV-Antikörper enthaltende Serum reduziert nach 24 h bei Verdünnung mit MEM 20 % der Plaques.

Inkubation in h	Virostatikum	IC <sub>50</sub> in µM			MW	SD
		1	2	3		
0	N3rac	1,70	1,81	1,95	<b>1,69</b>	0,12
	N4	18,85	17,15	17,95	<b>18,05</b>	0,75
24	N3rac	1,86	1,96	1,82	<b>1,88</b>	0,07
	N4	15,56	17,81	14,94	<b>16,10</b>	1,23
130	N3sn	1,10	1,25	1,02	<b>1,12</b>	0,12
	N4	7,10	6,34.	8,59	<b>7,48</b>	0,53

Die Ergebnisse, die in Tabelle 7 zusammengefasst sind, zeigen, dass sich die virostatistische Wirkung von N3rac (IC<sub>50</sub> = 1,12 µM - 1,88 µM) im Verlauf von 130 h praktisch nicht ändert, so dass N3rac im Humanserum bei 37°C äußerst stabil ist. Dagegen nimmt die geringe antivirale Wirkung von N4 von IC<sub>50</sub> = 16,10 µM mit zunehmender Inkubationsdauer auf IC<sub>50</sub> = 7,48 µM zu. Es ist nicht auszuschließen, dass die anti-HSV-IgG<sup>+</sup>-Restkonzentration des verwendeten Humanserums das HSV-Lysat neutralisieren könnte und dadurch ein vermeintlicher antiviraler Effekt von N4 vorgetäuscht wird. Für diese Annahme spricht, dass das Humanserum bei abnehmender Verdünnung mit MEM die Plaquezahl beim PRA-Test von 49 (Kontrolle) über 42,5 (bei der Verdünnung von Serum zu MEM von 1:8) auf 33 Plaques (bei der Verdünnung von Serum zu MEM von 1:2) reduziert. Dieser Neutralisationseffekt könnte auch bei N3rac eine durch Metabolismus bedingte Abnahme der antiviralen Aktivität ausgleichen, mit der Folge, dass

keine Änderung der IC<sub>50</sub>-Werte im Verlauf der Inkubation mit Humanserum beobachtet werden, obwohl eine leichte Deaktivierung stattfindet. Um eventuelle HSV-IgG-induzierte Neutralisationseffekte von vornherein auszuschließen, wird in den folgenden Versuchen HSV-seronegatives Humanblut verwendet.

**4.2.4 Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte von N3rac, N3sn, N4 und ACV unter Verwendung des ACV-resistenten Viruslysates HSV-K182res nach unterschiedlicher Inkubationsdauer im EDTA-Humanblut**

Die Auswertung auf die virostatistische Wirkung der Virostatika nach der Inkubation mit HSV-seronegativem EDTA-Humanblut wird im Verlauf von 96 h bei 37°C wiederum über die IC<sub>50</sub>-Werte ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8.** IC<sub>50</sub>-Werte der Duplex-Virostatika N3rac, N3sn, N4 im Vergleich zu den IC<sub>50</sub>-Werten von ACV am Viruslysat HSV-L182res nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit EDTA-Humanblut bei 37°C.

Inkubation in h	Virostatikum	IC <sub>50</sub> in µM			MW	SD
		1	2	3		
0	N3sn	2,40	2,81	2,59	<b>2,60</b>	0,17
	PBS	k.E.	k.E.	k.E.		
0,5	N3rac	1,90	1,56	1,82	<b>1,76</b>	0,15
	N4	2,21	1,81	1,94	<b>1,99</b>	0,21
1	N3sn	0,62	0,53	0,55	<b>0,57</b>	0,04
	N4	5,45	3,33	4,27	<b>4,35</b>	0,87
	ACV	27,62	29,20	28,74	<b>28,52</b>	0,67
	PBS	k.E.	k.E.	k.E.		

<b>12</b>	<b>N3rac</b>	3,15	3,50	4,79	<b>3,81</b>	0,86
	<b>N4</b>	k.E.	k.E.	k.E.		
	<b>PBS</b>	k.E.	k.E.	k.E.		
<b>24</b>	<b>N3rac</b>	1,82	1,42	1,36	<b>1,53</b>	0,25
	<b>N3sn</b>	0,87	1,08	1,40	<b>1,11</b>	0,27
	<b>N4</b>	k.E.	k.E.	k.E.		
	<b>ACV</b>	10,85	9,74	10,58	<b>10,39</b>	0,47
	<b>PBS</b>	k.E.	k.E.	k.E.		
<b>48</b>	<b>N3rac</b>	1,87	2,62	1,44	<b>1,98</b>	0,60
	<b>N3sn</b>	0,94	0,71	0,91	<b>0,85</b>	0,10
	<b>N4</b>	k.E.	k.E.	k.E.		
	<b>ACV</b>	39,42	37,40	47,15	<b>41,32</b>	4,20
	<b>PBS</b>	k.E.	k.E.	k.E.		
<b>72</b>	<b>N3rac</b>	2,52	1,48	1,87	<b>1,96</b>	0,53
	<b>N4</b>	k.E.	k.E.	k.E.		
	<b>PBS</b>	k.E.	k.E.	k.E.		
<b>96</b>	<b>N3rac</b>	2,80	2,70	2,20	<b>2,57</b>	0,26
	<b>N4</b>	k.E.	k.E.	k.E.		
	<b>PBS</b>	k.E.	k.E.	k.E.		

k.E. = kein Effekt

Im Verlauf einer einstündigen Inkubation mit EDTA Humanblut ändert sich der IC<sub>50</sub>-Wert für N3rac (1,76 µM) praktisch nicht, während sich die antivirale Wirkung von ACV (9,51 µM) gegen den ACV-resistenten HSV-Stamm L182res (siehe Tabelle 8) um etwa den Faktor 3 auf den IC<sub>50</sub>-Wert von

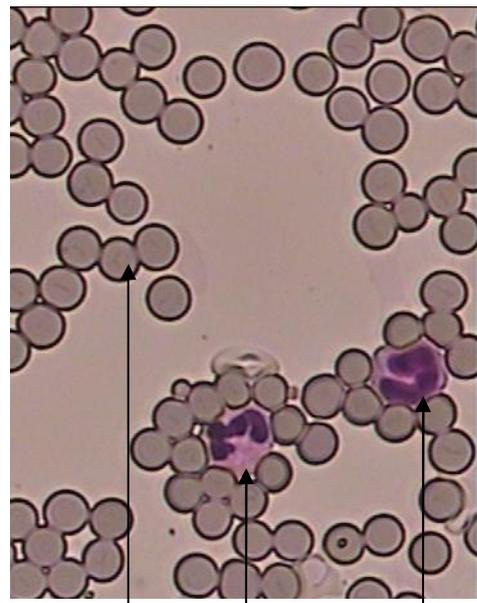
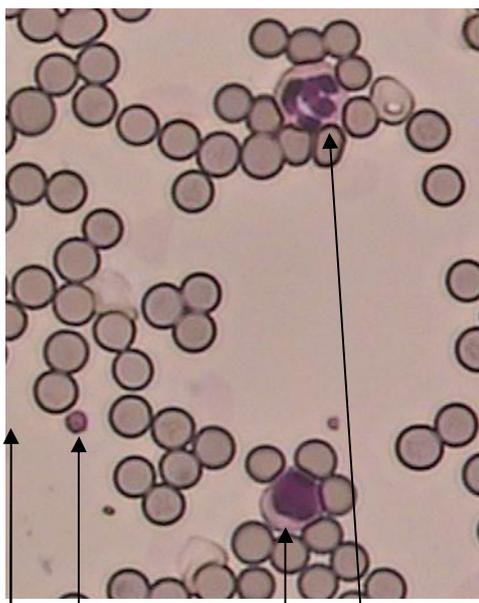
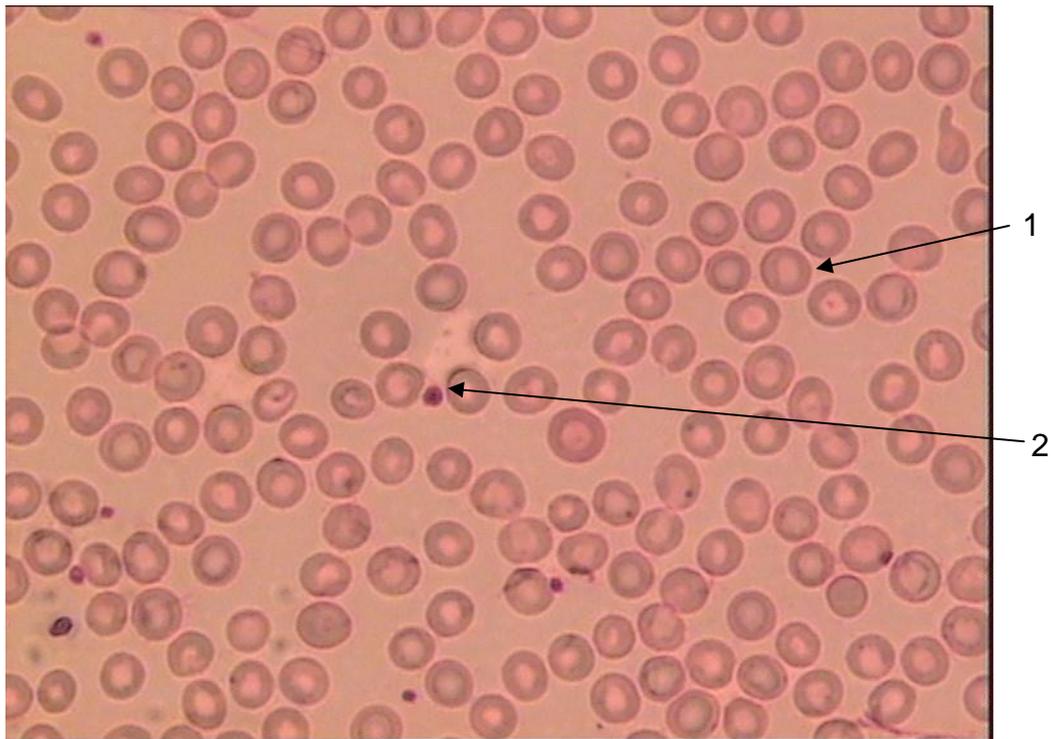
28,52  $\mu\text{M}$  vermindert. Dagegen zeigt N3sn, dass im Gegensatz zu N3rac kein racemisches sondern ein enantiomerenreines Glycerinlipidgerüst aufweist, während der einstündigen Inkubation eine Zunahme der antiviralen Wirkung, da der anfängliche  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 2,60  $\mu\text{M}$  um den Faktor 5 auf den Wert von 0,57  $\mu\text{M}$  fällt.

Bemerkenswert ist die antivirale Wirkung von N4, dem AZT-PFA-Duplex-Virostatikum dessen Phosphonoameisensäurester im Gegensatz zu N3 verestert ist. Nach einer halbstündigen Inkubation mit EDTA Humanblut zeigt N4 etwa die gleiche virostatistische Wirkung wie N3rac. Nach 1h sinkt die Wirkung etwa um den Faktor 2 auf  $\text{IC}_{50} = 4,35 \mu\text{M}$  und spätestens nach 12 h ist die Aktivität von N4 vollständig verloren, während N3rac lediglich eine Wirkungsverminderung auf  $\text{IC}_{50} = 3,81 \mu\text{M}$  erfährt. Nach 24 h Inkubation zeigen N3rac und N3sn in etwa die gleiche antivirale Wirkung, wobei N3rac nach der Abnahme des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes im Verlauf der 12 stündigen Inkubation nach 24 h eine deutlich Verbesserung erfährt, da der  $\text{IC}_{50}$ -Wert mit 1,53  $\mu\text{M}$  wieder dem Wert von 1,76  $\mu\text{M}$  zu Beginn der Inkubation entspricht.

Eine deutliche Verbesserung wird auch bei der virostatistischen Wirkung von ACV beobachtet, da der  $\text{IC}_{50}$ -Wert nach 24 h mit 10,39  $\mu\text{M}$  etwa um die Hälfte vermindert ist, gegenüber dem Wert von 28,52  $\mu\text{M}$ , der nach 1 stündiger Inkubation ermittelt wird. Nach 48 h ist die ACV-Aktivität allerdings um Faktor 4 verschlechtert und liegt bei  $\text{IC}_{50} = 41,32 \mu\text{M}$ . Nach einer Inkubationszeit von 96 h zeigt N3rac immer noch einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 2,57  $\mu\text{M}$ , so dass unter der Einwirkung von EDTA-Humanblut die antivirale Wirkung von N3 gegen den ACV-resistenten HSV-Stamm L182res in diesem Zeitraum weitgehend unverändert erhalten bleibt.

### **4.3 Orientierende Untersuchungen zur Einwirkung von N3 auf die Blutbestandteile von EDTA-Humanblut**

Nachdem sich gezeigt hat, dass die antivirale Wirkung des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums N3rac und N3sn während einer 96 stündigen Inkubation mit EDTA-Humanblut erhalten bleibt, wurde der Einfluss der Virostatika auf die Blutbestandteile ermittelt. Bei Zugabe von N3sn in Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  - 800  $\mu\text{M}$  sind keine Schäden an den Erythrozyten im Verlauf einer 7 stündigen Inkubation bei 37 °C im mikroskopischen Bild des Blutausstriches nachweisbar (Figur 14). Nach der Anfärbung der Blutausstriche konnten außerdem keine schädigenden Einflüsse von N3sn auf die Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten oder Thrombozyten festgestellt werden.



1. Erythrozyt

2. Thrombozyt

3. Lymphozyt

4. Neutrophiler Granulozyt

5. Monozyt

**Figur 14.** Ausschnitt aus einem Blutaussstrich (Mensch, Giemsa-Färbung, 663x).

Die Bestimmung des freien Hämoglobins ist eine wichtige Messgröße zur Beurteilung der Hämolyse, z.B. bei Arzneimittelintoxikation (Thomas 2005). Optisch sichtbar wird eine Hämolyse ab einer Konzentration des freien Hämoglobins von etwa 300 mg/l (Guder et al., 1999). Zur Bestätigung der Ergebnisse des Blutausstriches und der Betrachtung des Plasmas, wird daher mit dem Dimensions-RxL-Analysegerät das freie Hämoglobin im Plasma bestimmt.

**Tabelle 9.** Die Konzentrationen des freien Hämoglobins im EDTA-Plasma in Abhängigkeit der N3sn-Endkonzentration.

Kontrolle	N3sn- Endkonzentration	Freies Hämoglobin in mg/dl
Plasma		39,06
Plasma/PBS		37,38
	5 µM	38,45
	80 µM	32,81
	800 µM	683,04

Es zeigt sich im Vergleich zu den Kontrollen keine Veränderung des freien Hämoglobins, wenn die N3sn Konzentration im Bereich von 5 - 80 µM liegt. Dagegen tritt bei der Probe mit der N3sn-Konzentration von 800 µM eine deutliche Rotfärbung des Plasmas auf (siehe Figur 15). Dieser Befund korrespondiert mit dem gemessenen Wert von 683,04 mg/dl (siehe Tabelle 9).



**Figur 15.** Durch Hämolyse rot gefärbtes EDTA-Plasma nach der Einwirkung von 800  $\mu\text{M}$  N3sn.

## 5 Diskussion

Die Entwicklung einer in vitro wirksamen, vielversprechenden Substanz zu einem für die Therapie zugelassenen Arzneimittel scheidet häufig schon daran, dass die chemische Synthese im technischen Maßstab nicht praktikabel ist (Pauwels 2006). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebenen Synthesen zeigen, dass die Darstellung des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums, ausgehend vom leicht zugänglichen L-Batylalkohol (3-O-Octadecyl-sn-glycerin) zwar aufwendig, aber die Synthese im größeren technischen Maßstab problemlos möglich ist. Zudem sind die Ausbeuten, in denen die Syntheseprodukte erhalten werden, hoch. So verläuft beispielsweise der letzte Kondensationsschritt, bei dem das AZT-PFA-Duplex-Virostatikum als Ethylester (N4) erhalten wird, mit durchschnittlich 61 % Ausbeute. Bei der säulenchromatographischen Reinigung des Reaktionsgemisches wird das nicht umgesetzte Edukt in einer so reinen Form zurückgewonnen, dass es nochmals zur Kondensation verwendet werden kann. Hierdurch steigt die Gesamtausbeute des letzten Kondensationsschrittes auf ca. 80 %. Bei der Entfernung des Ethylrestes und der anschließenden Aufarbeitung wird das gewünschte N3 in einer Ausbeute von 97 % erhalten.

Bei der in vitro Bestimmung der virostatistischen Wirkung von N3 wird in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf die antiherpesvirale Aktivität gelegt. Hierbei zeigt sich, dass die DNA-Replikation sowohl des HSV-Laborstamms KOS als auch des ACV resistenten KOS-M-Stamms durch N3 blockiert wird. Außerdem wird die Virusreplikation sowohl von ACV sensitiven als auch ACV resistenten Virusisolaten, die von stammzelltransplantierten Patienten isoliert wurden, durch N3 gehemmt. Diese antiherpesvirale Wirkung ist sicherlich maßgeblich auf die PFA-Komponente des Duplex-Virostatikums zurückzuführen. Ein Einbau von PFA in den Duplex-Wirkstoff hat zur Folge, dass die antivirale Wirkung bspw. beim Laborstamm KOS bereits bei  $IC_{50} = 3 \mu M$  liegt, während der  $IC_{50}$ -Wert

von freiem PFA mit 125  $\mu\text{M}$  um den Faktor 42 höher ist (Lensch 2006). Der antivirale Effekt von AZT, der zweiten Wirkstoffkomponente von N3, kommt vermutlich erst bei HIV-Modellen deutlicher zum Tragen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die antivirale Aktivität des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums *in vitro* nicht wesentlich von der Konfiguration des Glycerinlipidgerüsts abhängt. Die virostatistische Wirkung des neu synthetisierten Isomers (N3sn), dessen Glycerinlipidgerüst optisch aktiv ist, liegt nur geringfügig über der Wirkung der bisher synthetisierten isomeren Verbindung (N3rac), die ein racemisches, optisch inaktives Glycerinlipidgerüst aufweist. Im Hinblick auf eine technische Synthese des AZT-PFA-Duplex-Virostatikums rechtfertigt die nur geringfügige Verbesserung der antiviralen Aktivität von N3sn im Vergleich zu N3rac nicht den wesentlich höheren Aufwand der Synthese des enantiomerenreinen Derivats (N3sn). Man kann daher postulieren, dass das Glycerinlipidgerüst nicht direkt am antiviralen Mechanismus des Duplex-Virostatikums beteiligt ist, sondern vermutlich zur besseren Zellaufnahme der gebundenen Virostatika AZT und PFA beiträgt. Inwieweit die Konfiguration des Glycerinlipidgerüsts die Toxizität des Duplex-Virostatikums beeinflusst, lässt sich auf der Basis der  $\text{IC}_{50}$ -Werte nicht ermitteln. Zur Bestimmung der allgemeinen Toxizität sind *in vivo* Studien erforderlich, die für die Zukunft geplant sind.

Zu den verwendeten Testverfahren ist Folgendes anzumerken: Um die Suszeptibilität von Herpes-simplex-Viren gegenüber antiviralen Wirkstoffen zu testen, wird nach wie vor der PRA-Test als „Gold-Standard“ angesehen (Leahy et al., 1996; Safrin et al., 1996; Standing-Cox et al., 1996; Tebas et al., 1998). Ein enger Bezug zwischen den *in vitro* Testergebnissen und dem klinischen Erscheinungsbild ist hierbei gewährleistet (Safrin et al., 1994). Von vielen Autoren wird der hohe Aufwand des PRA-Testes als nachteilig angegeben. Bis Ergebnisse vorliegen, vergehen zwischen 7 und 10 Tagen, was die Möglichkeit, die Testergebnisse in die Therapieentscheidung *ad hoc*

mit einzubringen, limitiert. (Safrin et al., 1994; Leahy et al., 1996; Tebas et al., 1998).

Da bei dem beschriebenen SPRA-Test die Virustiterbestimmung entfällt, kann hier bereits 2 - 3 Tage früher eine orientierende Aussage getroffen werden, in welchem Bereich die  $IC_{50}$ -Konzentration des getesteten Viruslysates liegen und ob sich das Isolat sensitiv oder resistent gegenüber dem eingesetzten Wirkstoff verhält. Nur diese Aussage jedoch ist klinisch relevant.

In dieser Arbeit wird der SPRA-Test verwendet, um den Virustiter zu ermitteln und die  $IC_{50}$ -Werte näherungsweise zu bestimmen. Da hierbei nur ein Wert (gegenüber 4 Werten beim PRA-Test) ermittelt wird, ist diese Methode nur ein Screening-Verfahren. Auf der Basis der Werte des SPRA-Tests können aber die  $IC_{50}$ -Werte mit Hilfe des PRA-Tests und der PROBIT-Transformation im Bedarfsfall exakt ermittelt werden und lassen sich direkt für die Planung von in vivo Studien verwenden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, neben der Ermittlung der antiherpesviralen Wirkung von N3sn, auch die Untersuchung des Einflusses der Blutbestandteile auf die virostatistische Wirkung und damit indirekt auch auf die Stabilität der Virostatika in Serum und Blut.

Bei der Inkubation der AZT-PFA-Duplex-Virostatika mit EDTA-Humanblut treten im Verlauf des untersuchten Inkubationszeitraums von 96 h zwar leichte Schwankungen bei den gefundenen  $IC_{50}$ -Werten auf, die hohe antivirale Aktivität bleibt dabei aber über den gesamten Zeitraum praktisch unverändert erhalten. Beim ACV, das als Vergleichswirkstoff mit getestet wird, ist die virostatistische Wirkung nach etwa 48 h bereits deutlich vermindert. Die beobachteten deutlichen Veränderungen der  $IC_{50}$ -Werte im Verlauf der Inkubationsdauer können nicht messtechnisch bedingt sein. Es ist eher denkbar, dass ein Teil des ACV, wie dies Perottet beschreibt, im Zeitraum von 1 h an korpuskuläre Blutbestandteile adsorbiert bzw. von den Erythrozyten aufgenommen und dann beim Abzentrifugieren entfernt wird (Perottet et al., 2007). Hierdurch wird die Virostatikakonzentration vermindert mit der Folge, dass der antivirale Effekt abnimmt. Mit

fortschreitender Inkubationsdauer werden die Erythrozyten nach und nach zerstört und der Wirkstoff wird dabei wieder weitgehend unverändert freigegeben, so dass er beim Abzentrifugieren nicht verloren geht. Hierdurch kann die antivirale Wirkung wieder einen vergleichbaren Wert wie im EDTA-humanblutfreien Medium erreichen ( $IC_{50} = 9,51$  siehe Tabelle 11, Seite 68). Eine mögliche Erklärung für die Reduktion der ACV-Wirkung nach 48 h könnte eine enzymatische Inaktivierung von ACV sein.

Die Daten lassen den Schluss zu, dass die AZT-PFA-Duplex-Virostatika N3rac und N3sn durch die Anwesenheit von Humanblut nicht merklich in ihrer antiviralen Wirkung beeinflusst werden. Dies stellt neben der sehr guten Lagerbeständigkeit einen weiteren Vorteil der neuen Virostatika gegenüber ACV dar.

Überraschend ist, dass N4, in dem der PFA-Rest als Phosphonameisensäureethylester vorliegt und das in der bisherigen in vitro Testung keine antivirale Wirkung gezeigt hat, nach kurzer Inkubation (0,5 h) mit EDTA-Humanblut antiviral wirkt, wobei die Aktivität mit fortschreitender Inkubationsdauer (12 h) wieder vollständig verloren geht. Eine Klärung dieses unerwarteten Befundes wäre nur mit einer detaillierten Untersuchung des Metabolismus von N4 möglich. Der folgende Vorschlag zum Mechanismus, mit dem der Wechsel der antiviralen Wirkung von N4 unter dem Einfluss von EDTA-Humanblut erklärt werden könnte, ist daher eine Arbeitshypothese.

Da es bei zunehmender Inkubation von Serum und Plasma in vitro bei 37°C zu einer Verringerung des CO<sub>2</sub>-Inhalts kommt, wird der physiologische pH-Wert von Serum und Plasma in vitro schwach alkalisch (Kalie 2006). Es ist denkbar, dass N4 in leicht alkalischem Milieu teilweise durch alkalische Esterspaltung hydrolytisch in N3 überführt wird, so dass eine vermeintliche antivirale Wirkung von N4 auftritt. Da bei der Esterspaltung Alkali verbraucht wird, sinkt der pH wieder, wodurch die Spaltung von N3 zu N4 gestoppt wird. Der Verlust der virostatischen Aktivität könnte vermutlich darauf beruhen, dass nur N4 aufgrund seines Ameisensäureethylesters spezifisch Enzyme aktiviert, die im Humanblut vorhanden sind, die den

Ameisensäurethylester von N4 unter Zerstörung von PFA hydrolytisch entfernen, wodurch die antivirale Wirkung verloren geht. Im Gegensatz zu N4 wird von N3sn, das keine Estergruppe aufweist, dieser Metabolismus nicht aktiviert.

Die Hypothese, dass nur der Phosphonoameisensäureester einen Metabolismus zur Spaltung der P-C-Bindung und damit zur Zerstörung der Foscarnetfunktion aktiviert, während das Salz der Phosphonoameisensäure die enzymatische Spaltung der P-C-Bindung nicht auslöst, könnte auch erklären, dass die Mehrzahl der in der Literatur synthetisierten AZT-PFA-Ester nicht die erhoffte antivirale Wirkung gezeigt haben. Im Falle, dass der hypothetische Mechanismus zutrifft, könnte N4 nicht als Prodrug von N3sn verwendet werden.

Nachdem im Verlauf einer 96 stündigen Inkubation mit Humanblut das Virostatikum N3 nicht nachweisbar deaktiviert wird, stellt sich die Frage, ob stattdessen eventuell durch das Virostatikum Schäden an Blutbestandteilen verursacht werden. Im Blutausschlag sind im Zeitraum von 96 h keinerlei Schädigungen der korpuskulären Blutbestandteile (Erythrozyten, Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten oder Thrombozyten) feststellbar.

Auch die Analyse des freien Hämoglobins im Plasma, was eine sehr sensitive Messgröße zur Beurteilung des Ausmaßes der Hämolyse ist (Thomas 2005), liefert keine pathologischen Werte. Die gemessenen Werte, sowohl für die Kontrollen als auch für die Proben bis einschließlich 80  $\mu\text{M}$  N3sn, liegen mit Werten zwischen 32,81 - 39,06 mg/dl zwar etwas über dem Normalbereich (<10,00 mg/dl). Zu berücksichtigen ist aber, dass im EDTA-Plasma, das analog der vorhergegangenen Versuche auch für diesen Test gewählt wurde, das freie Hämoglobin etwa 20fach höher ist als im Heparinplasma (Lammers et al., 1987). Auch könnte es bei der Blutabnahme bei der gesunden Patientin bereits zu einer leichten Hämolyse gekommen sein. Der Wert für die 800  $\mu\text{M}$  N3sn-Probe liegt mit 683,04 mg/dl weit über dem Normwert, wenn man aber bedenkt, dass die Zelltoxizität ( $\text{CC}_{50}$ ) von N3 auf HFF-Zellen bei ca. 75  $\mu\text{M}$  und die  $\text{IC}_{50}$ -Werte bei den hier untersuchten HSV-Isolaten zwischen 1,87 und 5,49  $\mu\text{M}$  liegt, spielt diese

hohe N3-Konzentration für den potentiellen in vivo Einsatz keine Rolle. Die Bestandteile des Humanblutes verhalten sich gegenüber dem neuen AZT-PFA-Duplex-Virostatikum einerseits inert, so dass der Wirkstoff im Blut weder aktiviert noch deaktiviert wird. Andererseits werden die Blutbestandteile durch den Wirkstoff nicht geschädigt. Hierdurch erfüllt das Virostatikum wesentliche Voraussetzungen für geplante in vivo Tests, bei der i.v.- Applikationen vorgesehen sind.

## 6 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit werden Verbesserungen der mehrstufigen Synthese des neuentwickelten AZT-PFA-Duplex-Virostatikums (N3) aufgezeigt. Durch die Optimierung kann die Verknüpfung der beiden Virostatika 3'-Azido-3'-desoxythymidin (AZT) und Phosphonoameisensäure (PFA), die vorher nur in 1 - 2 g Ansätzen möglich war, jetzt im 10 - 20 g Maßstab praktikabel durchgeführt werden, so dass die Synthese auch für technische Maßstäbe geeignet ist. Außerdem gelang die Kupplung über ein enantiomerenreines Glycerinlipidgerüst (N3sn), die bisher nur über eine racemische Glycerinlipidbrücke (N3rac) möglich war.

Im zweiten Teil der Arbeit wird eine vergleichende Untersuchung der antiviralen Wirkung von ACV und N3 gegen HSV1-Virusstämmen von Patienten nach Stammzelltransplantation durchgeführt. Hierzu werden Monolayer von Vero-Zellkulturen mit 3 ACV sensitiven (KOS, HSV-K161, HSV-L177) und 3 ACV resistenten (KOS-M, HSV-K143, HSV-L182) HSV-1 Viruslysaten infiziert.

Anhand der  $IC_{50}$ -Werte, die mit dem SPRA-Test semiquantitativ und anschließend mit dem PRA-Test und der PROBIT-Transformation quantitativ bestimmt werden, wird ermittelt, dass sich N3 und ACV bei ACV-sensitiven Viruslysaten in ihrer antiviralen Aktivität entsprechen. Dagegen zeigt sich an den HSV-Viruslysaten, die im Verlauf der ACV-Therapie eine mutationsbedingte Resistenz entwickelt haben, zwar der Verlust der antiviralen Wirkung von ACV, aber keinerlei Verminderung der antiviralen Aktivität von N3. Die antivirale Wirkung von N3 wird hierbei nicht wesentlich durch die Konfiguration des Glyceringerüsts beeinflusst. Hervorzuheben ist, dass die antivirale Aktivität von N3 selbst nach der 130 stündigen Inkubation bei 37°C im Humanserum praktisch nicht abnimmt, da die  $IC_{50}$ -Werte bei Vero-Zellen, die mit dem ACV resistenten Viruslysat HSV-L-182res infiziert wurden, sind in diesem Zeitraum unverändert.

Bei der Inkubation mit EDTA-Humanblut zeigt N3, im Verlauf von 96 h, abgesehen von zwei leichten Schwankungen im Bereich von 1 h (Steigerung) und von 12 h (Abschwächung), praktisch keine Änderungen in den  $IC_{50}$ -Werten. Dagegen fällt die antivirale Aktivität von ACV von anfänglich  $IC_{50} = 28,52 \mu\text{M}$  auf  $IC_{50} = 41,52 \mu\text{M}$ . Der Befund zeigt, dass die Stabilität des Duplex-Virostatikums im EDTA-Humanblut nicht nur unerwartet hoch ist, sondern auch die von ACV übertrifft.

Im Falle der Veresterung des Phosphonoameisensäurerestes mit Ethanol, wobei das Duplex-Virostatikum N4 erhalten wird, tritt zwar innerhalb 1 h eine mit N3 vergleichbare virostatistische Wirkung auf, die aber bereits nach 12 h nicht mehr nachweisbar ist. Für die antivirale Wirkung der Duplex-Virostatika ist somit das Vorhandensein eines freien Phosphonoameisensäurerestes eine grundsätzliche Voraussetzung.

Im dritten und letzten Teil der Arbeit wird anhand des Blutausriches und mit Hilfe der Bestimmung des freien Hämoglobins durch das Dade Dimensions RxL-Analysegerät gezeigt, dass N3 keine nachweisbaren Schäden an den Blutbestandteilen verursacht. Da weder die antivirale Wirkung von N3 bei Zugabe von Humanblut verändert noch die Blutbestandteile geschädigt werden, sollte eine i.v.- Applikation der neuen AZT-PFA-Duplex-Virostatika bei geplanten in vivo Testungen problemlos erfolgen können.

## 7 Literaturverzeichnis

- Arduino, P. G. and Porter, S. R. (2006).** Oral and perioral herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection: review of its management. *Oral Dis* 12: 254-270.
- Balfour, H. H., Jr. (1999).** Antiviral drugs. *N Engl J Med* 340: 1255-1268.
- Beauman, J. G. (2005).** Genital herpes: a review. *Am Fam Physician* 72: 1527-1534.
- Boyer, P. L., Sarafianos, S. G., Arnold, E. and Hughes, S. H. (2001).** Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* 75: 4832-4842.
- Burns, W. H., Saral, R., Santos, G. W., Laskin, O. L., Lietman, P. S., McLaren, C. and Barry, D. W. (1982).** Isolation and characterisation of resistant Herpes simplex virus after acyclovir therapy. *Lancet* 1: 421-423.
- Capone, J., Schott, H., Wing, B., Zimmerman, P., Hamprecht, K., Jahn, G. and Cook, C.H (2007).** Novel antiviral compound shows in-vivo efficacy against Cytomegalovirus. 11th International CMV & Betaherpes Virus Workshop, Toulouse, France, 13. - 17. Mai 2007.
- Choo, H., Beadle, J. R., Chong, Y., Trahan, J. and Hostetler, K. Y. (2007).** Synthesis of the 5-phosphono-pent-2-en-1-yl nucleosides: a new class of antiviral acyclic nucleoside phosphonates. *Bioorg Med Chem* 15: 1771-1779.
- Christophers, J., Clayton, J., Craske, J., Ward, R., Collins, P., Trowbridge, M. and Darby, G. (1998).** Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 868-872.
- Crumpacker, C. S. (1992).** Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *Am J Med* 92: 3S-7S.
- Crumpacker, C. S., Schnipper, L. E., Marlowe, S. I., Kowalsky, P. N., Hershey, B. J. and Levin, M. J. (1982).** Resistance to antiviral drugs of herpes simplex virus isolated from a patient treated with acyclovir. *N Engl J Med* 306: 343-346.
- Danve-Szatanek, C., Aymard, M., Thouvenot, D., Morfin, F., Agius, G., Bertin, I., Billaudel, S., Chanzy, B., Coste-Burel, M., Finkielsztejn, L., Fleury, H., Hadou, T., Henquell, C., Lafeuille, H., Lafon, M. E., Le Faou, A., Legrand, M. C., Maille, L., Mengelle, C., Morand, P.,**

- Morinet, F., Nicand, E., Omar, S., Picard, B., Pozzetto, B., Puel, J., Raoult, D., Scieux, C., Segondy, M., Seigneurin, J. M., Teyssou, R. and Zandotti, C. (2004).** Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up. *J Clin Microbiol* 42: 242-249.
- De Clercq, E. (2003).** Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clin Microbiol Rev* 16: 569-596.
- De Clercq, E. (2007).** Acyclic nucleoside phosphonates: past, present and future. Bridging chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, adeno-, herpes-, and poxvirus infections: the phosphonate bridge. *Biochem Pharmacol* 73: 911-922.
- De Clercq, E. and Field, H. J. (2006).** Antiviral prodrugs - the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *Br J Pharmacol* 147: 1-11.
- Elion, G. B., Furman, P. A., Fyfe, J. A., de Miranda, P., Beauchamp, L. and Schaeffer, H. J. (1977).** Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5716-5720.
- Englund, J. A., Zimmerman, M. E., Swierkosz, E. M., Goodman, J. L., Scholl, D. R. and Balfour, H. H., Jr. (1990).** Herpes simplex virus resistant to acyclovir. A study in a tertiary care center. *Ann Intern Med* 112: 416-422.
- Eriksson, B. F. and Schinazi, R. F. (1989).** Combinations of 3'-azido-3'-deoxythymidine (zidovudine) and phosphonoformate (foscarnet) against human immunodeficiency virus type 1 and cytomegalovirus replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 663-669.
- Erlich, K. S., Mills, J., Chatis, P., Mertz, G. J., Busch, D. F., Follansbee, S. E., Grant, R. M. and Crumpacker, C. S. (1989).** Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 320: 293-296.
- Gilbert, C., Bestman-Smith, J. and Boivin, G. (2002).** Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist Updat* 5: 88-114.
- Griengl, H., Hayden, W., Penn, G., De Clercq, E. and Rosenwirth, B. (1988).** Phosphonoformate and phosphonoacetate derivatives of 5-substituted 2'-deoxyuridines: synthesis and antiviral activity. *J Med Chem* 31: 1831-1839.

- Guder, W., Fonseca-Wollheim, F., Heil, W. and al., e. (1999).** Die hämolytische, ikterische und lipämische Probe. Empfehlung zur Erkennung und Vermeidung klinisch relevanter Störungen. *DG Klinische Chemie* 30: 167-177.
- Hammond, J. L., Koontz, D. L., Bazmi, H. Z., Beadle, J. R., Hostetler, S. E., Kini, G. D., Aldern, K. A., Richman, D. D., Hostetler, K. Y. and Mellors, J. W. (2001).** Alkylglycerol prodrugs of phosphonoformate are potent in vitro inhibitors of nucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 and select for resistance mutations that suppress zidovudine resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1621-1628.
- Hamprecht, K., Mikeler, E., Schott, T. C., Lensch, N. B., Kleymann, G., Jahn, G. and Schott, H. (2007).** A new duplex antiviral agent linking foscarnet (FOS) with zidovudine (AZT) acts as a potent replication inhibitor of drug-resistant strains of herpes simplex virus and human cytomegalovirus. Zur Publikation eingereicht.
- Hill, E. L., Hunter, G. A. and Ellis, M. N. (1991).** In vitro and in vivo characterization of herpes simplex virus clinical isolates recovered from patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2322-2328.
- Hirth, G. and Barner, R. (1982).** Synthese von Glycerylätherphosphatiden 1. Mitteilung Herstellung von 1-O-Octadecyl-2-O-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholin1 (Platelet Activating Factor), des Enantiomeren sowie einiger analoger Verbindungen. *Helvetica Chimica Acta* 65: 1059-1084.
- Jordan, G. W. (1972).** Basis for the probit analysis of an interferon plaque reduction assay. *J Gen Virol* 14: 49-61.
- Kalie, L. (2006).** Einfluss des Serum-Komplementsystems auf die Permeabilität von Liposomenmembranen. Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften, Albrecht-Ludwigs-Universität zu Freiburg.
- Koshida, R., Vrang, L., Gilljam, G., Harmenberg, J., Oberg, B. and Wahren, B. (1989).** Inhibition of human immunodeficiency virus in vitro by combinations of 3'-azido-3'-deoxythymidine and foscarnet. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 778-780.
- Lammers, M. and Gressner, A. M. (1987).** Immunonephelometric quantification of free haemoglobin. *J Clin Chem Clin Biochem* 25: 363-367.
- Leahy, B. J., Christiansen, K. J. and Collins, P. (1996).** A blinded comparison of two methods of viral susceptibility testing: plaque reduction assay versus microplate in situ ELISA. *J Virol Methods* 56: 85-90.

- Lensch, B. N. (2006).** Phänotypische und genotypische Charakterisierung der Virostatika-Suszeptibilität von Herpes Simplex Virusisolaten nach Stammzelltransplantation. Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten der Universität Tübingen
- Logan, H. L., Lutgendorf, S., Hartwig, A., Lilly, J. and Berberich, S. L. (1998).** Immune, stress, and mood markers related to recurrent oral herpes outbreaks. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 86: 48-54.
- Meier, C., Aubertin, A. M., de Monte, M., Faraj, A., Sommadossi, J. P., Perigaud, C., Imbach, J. L. and Gosselin, G. (1998).** Synthesis and antiviral evaluation of SATE-foscarnet prodrugs and new foscarnet-AZT conjugates. *Antivir Chem Chemother* 9: 41-52.
- Messner, H. A. (1984).** Human stem cells in culture. *Clin Haematol* 13: 393-404.
- Meyer, P. R., Matsuura, S. E., So, A. G. and Scott, W. A. (1998).** Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13471-13476.
- Miller, C. S., Danaher, R. J. and Jacob, R. J. (1998).** Molecular aspects of herpes simplex virus I latency, reactivation, and recurrence. *Crit Rev Oral Biol Med* 9: 541-562.
- Morfin, F., Bilger, K., Boucher, A., Thiebaut, A., Najjioullah, F., Bleyzac, N., Raus, N., Bosshard, S., Aymard, M., Michallet, M. and Thouvenot, D. (2004).** HSV excretion after bone marrow transplantation: a 4-year survey. *J Clin Virol* 30: 341-345.
- Morfin, F. and Thouvenot, D. (2003).** Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol* 26: 29-37.
- Morfin, F., Thouvenot, D., Aymard, M. and Souillet, G. (2000).** Reactivation of acyclovir-resistant thymidine kinase-deficient herpes simplex virus harbouring single base insertion within a 7 Gs homopolymer repeat of the thymidine kinase gene. *J Med Virol* 62: 247-250.
- Parang, K., Wiebe, L. I. and Knaus, E. E. (2000).** Novel approaches for designing 5'-O-ester prodrugs of 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine (AZT). *Curr Med Chem* 7: 995-1039.
- Pauwels, R. (2006).** Aspects of successful drug discovery and development. *Antiviral Res* 71: 77-89.

- Perrottet, N., Beguin, A., Meylan, P., Pascual, M., Manuel, O., Buclin, T., Biollaz, J. and Decosterd, L. A. (2007).** Determination of aciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography-spectrofluorimetric detection and stability studies in blood samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 852: 420-429.
- Rosowsky, A., Fu, H., Pai, N., Mellors, J., Richman, D. D. and Hostetler, K. Y. (1997).** Synthesis and in vitro activity of long-chain 5'-O-[(alkoxycarbonyl)phosphinyl]-3'-azido-3'-deoxythymidines against wild-type and AZT- and foscarnet-resistant strains of HIV-1. *J Med Chem* 40: 2482-2490.
- Rosowsky, A., Saha, J., Fazely, F., Koch, J. and Ruprecht, R. M. (1990).** Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by phosphonoformate esters of 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 288-294.
- Safrin, S., Elbeik, T., Phan, L., Robinson, D., Rush, J., Elbaggari, A. and Mills, J. (1994).** Correlation between response to acyclovir and foscarnet therapy and in vitro susceptibility result for isolates of herpes simplex virus from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1246-1250.
- Safrin, S., Palacios, E. and Leahy, B. J. (1996).** Comparative evaluation of microplate enzyme-linked immunosorbent assay versus plaque reduction assay for antiviral susceptibility testing of herpes simplex virus isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 1017-1019.
- Schaeffer, H. J., Beauchamp, L., de Miranda, P., Elion, G. B., Bauer, D. J. and Collins, P. (1978).** 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature* 272: 583-585.
- Sethi, M., L. (1991).** Zidovudine. *Analytical Profiles of Drug Substances*. Harcourt Brace Jovanovich, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. 20: 729-765.
- Sibrack, C. D., Gutman, L. T., Wilfert, C. M., McLaren, C., St Clair, M. H., Keller, P. M. and Barry, D. W. (1982).** Pathogenicity of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 from an immunodeficient child. *J Infect Dis* 146: 673-682.
- Siegel, M. A. (2002).** Diagnosis and management of recurrent herpes simplex infections. *J Am Dent Assoc* 133: 1245-1249.
- Simons, C., Wu, Q. and Htar, T. T. (2005).** Recent advances in antiviral nucleoside and nucleotide therapeutics. *Curr Top Med Chem* 5: 1191-1203.

- Smith, K. O. (1964).** Relationship between the Envelope and the Infectivity of Herpes Simplex Virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 115: 814-816.
- Snoeck, R., Andrei, G., Schols, D., Balzarini, J. and De Clercq, E. (1992).** Activity of different antiviral drug combinations against human cytomegalovirus replication in vitro. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11: 1144-1155.
- Standing-Cox, R., Bacon, T. H. and Howard, B. A. (1996).** Comparison of a DNA probe assay with the plaque reduction assay for measuring the sensitivity of herpes simplex virus and varicella-zoster virus to penciclovir and acyclovir. *J Virol Methods* 56: 3-11.
- Tebas, P., Scholl, D., Jollick, J., McHarg, K., Arens, M. and Olivo, P. D. (1998).** A rapid assay to screen for drug-resistant herpes simplex virus. *J Infect Dis* 177: 217-220.
- Thomas, L. (2005).** Labor und Diagnose - Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnose. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main.
- Vaghefi, M. M., McKernan, P. A. and Robins, R. K. (1986).** Synthesis and antiviral activity of certain nucleoside 5'-phosphonoformate derivatives. *J Med Chem* 29: 1389-1393.
- Whitley, R. J. and Roizman, B. (2001).** Herpes simplex virus infections. *Lancet* 357: 1513-1518.
- Wutzler, P. (2002).** Herpesviren: Herpes-simplex-Virus Typ 1 und 2, Varicella-Zoster-Virus. *Medizinische Virologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 373-378.

## 8 Danksagung

---

Die Arbeit wurde im Rahmen eines interdisziplinären Forschungsprojekts durchgeführt, das die Professoren Dr. med. Dr. rer. nat. Klaus Hamprecht, Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie, Universitätsklinikum Tübingen und Dr. rer. nat. Herbert Schott, Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen, konzipiert haben. Für die Überlassung des Promotionsthemas sowie die hilfreiche, sehr gute wissenschaftliche Betreuung möchte ich den beiden Projektleitern danken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Klaus Hamprecht, der mir nicht nur die Virologie näher gebracht, sondern auch viele konstruktive Anregungen in einer schnellen, unkonventionellen Kommunikation vermittelt hat.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Jahn bin ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Medizinische Virologie dankbar.

Vor allem möchte ich Frau Elfriede Mikeler danken, die mir mit ihrer großen Erfahrung bei der Vermittlung der experimentellen virologischen Arbeitsmethoden sehr behilflich war.

Desweiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie dafür, dass ich in einer sehr freundlichen Arbeitsatmosphäre meine Tätigkeit ausführen konnte.

Für die Hilfe bei der Befundung der Blutausstriche möchte ich mich bei Dr. Matthias Marschal und Dr. Thomas Hierl, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Tübingen, herzlich bedanken, des weiteren

für die Auswertung der Blutproben bei Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. Ingo Besenthal, Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen.

Für die Erstellung der technischen Daten im Zusammenhang mit der chemischen Synthese danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Organische Chemie der Universität Tübingen.

## 9 Lebenslauf

### TIMM CORNELIUS SCHOTT

---

- Geburtstag: 19.06.1980
- Geburtsort: Tübingen
- Familie: Vater: Uni.-Prof. Dr. rer. nat. Herbert Schott  
Mutter: Dipl.-Volkswirtin Monika Schott  
Schwester: Dr. med. Sarah J. Schott
- Staatsangehörigkeit: deutsch

### SCHULISCHE AUSBILDUNG IN TÜBINGEN

---

24.06.1999 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

1990 - 1999 Uhlandgymnasium

1986 - 1990 Grundschule auf der Wanne

Sprachenfolge während der schulischen Ausbildung: Latein, Englisch,  
Französisch

### STUDIUM DER ZAHNMEDIZIN AN DER UNIVERSITÄT HAMBURG

WS 2001/2002 - WS 2006/2007

---

21.12.2006 Erlangung der Approbation

14.12.2006 Staatsexamen

23.03.2004 Erlangung der Zahnärztlichen Vorprüfung

07.10.2002 Erlangung der Naturwissenschaftlichen Vorprüfung für  
Zahnärzte

### WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN

---

Experimentelle Doktorarbeit

01.2007 - 12.2007 Das neue AZT-PFA-Duplex-Virostatikum N3:  
Synthese, in vitro Aktivität und Stabilität am Institut für Medizinische  
Virologie des Universitätsklinikums Tübingen

03.2007 - 04.2007 Experimentelle Arbeiten im Rahmen einer Wirkstoffsynthese am Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen

### Publikation

Hamprecht, K., Mikeler, E., **Schott, T.C.**, Lensch, N.B., Kleymann, G., Jahn, G. and Schott, H. (2008). A new duplex antiviral agent linking foscarnet (FOS) with zidovudine (AZT) acts as a potent replication inhibitor of drug-resistant strains of herpes simplex virus and human cytomegalovirus. Zur Publikation eingereicht

### BERUFLICHE AUSBILDUNG

---

Seit 01.2008 Assistenz Zahnarzt am Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung für Kieferorthopädie, Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med.dent. G. Göz

02.2007 - 09.2007 Assistenz Zahnarzt in der Gemeinschaftspraxis Drs. Dirlewanger und Partner, Nagold

09.2000 - 10.2001 Ausbildung zum Zahntechniker im Dentallabor Rothmund, Holzgerlingen und Kurz, Dußlingen; Besuch der Berufsschule „Im Hoppenlau“, Stuttgart

07. - 08.2000 Praktika in den Zahntechniklaboratorien Flemming, Berlin und Kurz, Dußlingen

07.1999 - 06.2000 Zivildienst am Institut für Medizinische Virologie des Universitätsklinikums Tübingen