

Synthese, Struktur und biochemische Eigenschaften von 6-(Imidazol-2-thio)purin-Nucleosiden

Ulrich Hopf*, Georg Niebch** und Friedhelm Schneider**

(Der Schriftleitung zugegangen am 20. Dezember 1971)

Zusammenfassung:

1. Die Synthese folgender Nucleoside wird beschrieben: 6-(4-*t*-Butylimidazol-2-thio)purin-9-yl- β -D-ribofuranosid, β -D-ribopyranosid, β -D-desoxy-ribofuranosid, β -D-xylofuranosid, β -D-xylopyranosid, α -D-arabinofuranosid, α -D-arabinopyranosid, α -L-arabinofuranosid, α -L-arabinopyranosid, α -L-rhamnopyranosid, ferner der β -D-Ribofuranoside des 2-Amino-6-(4-*t*-butylimidazol-2-thio)purins, des 2-Amino-6-(4,5-dimethylimidazol-2-thio)purins, des 2-Amino-6-(4-phenylimidazol-2-thio)purins, des 2-Chlor-6-(4-*t*-butylimidazol-2-thio)purins, des 2-Chlor-6-(4,5-dimethylimidazol-2-thio)purins und des 2-Chlor-6-(4-phenylimidazol-2-thio)purins.

2. Konfiguration und Konformation der Nucleoside wurden durch NMR- und CD-Spektren z. T. auch massenspektroskopisch bestimmt.

3. Die Thioätherbindung der Nucleoside wird durch nucleophile Reagenzien unter relativ milden Bedingungen unter Bildung von 2-Mercaptoimidazolen und in 6-Stellung substituierten Purinderivaten gespalten.

4. Xanthin-Oxidase wird durch alle Thioäther ge-

hemmt. Die Inhibitorkonzentration für eine 50proz. Hemmung liegt zwischen 2 und 6×10^{-4} M. Die Hemmung beruht wahrscheinlich auf einer S-Purinylierung des Enzyms. 6-(4-*t*-Butylimidazol-2-thio)purin-9-yl- β -ribofuranosid wird durch Adenosin-Kinase phosphoryliert, alle anderen Nucleoside werden durch dieses Enzym nicht umgesetzt. Unter Einwirkung des Enzyms Purin-Nucleosid-Phosphorylase wird aus 6-(4-*t*-Butylimidazol-2-thio)purin und Ribose-1-phosphat das β -D-Ribofuranosid gebildet.

5. DNA-, RNA- und Proteinsynthese werden von den Nucleosiden in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst: Generell steht eine Uridineinbauhemmung im Vordergrund; 2-Chlor-6-(4-phenyl- und 4-*t*-butylimidazol-2-thio)purin-9-yl- β -D-ribofuranosid führen auch zu einer starken Hemmung des Thymin- und Leucineinbaus an Ascites-Zellen in vitro.

6. Das Wachstum von Ascites-Zellen in vivo wird durch die Verbindungen nicht signifikant verzögert, dagegen wird mit einigen Nucleosiden Wachstumshemmung von Ascites-Zellen in Monolayer-Kulturen beobachtet.

* Postanschrift: Dr. U. Hopf, Papierwerke Waldhof-Aschaffenburg, Pharma-Forschung, D-6800 Mannheim.

** Postanschrift: Prof. Dr. Fr. Schneider u. Dr. G. Niebch, Physiologisch-Chemisches Institut, Lehrstuhl II d. Univ., D-3550 Marburg/Lahn, Auf den Lahnbergen.

Enzyme:

Adenosin-Kinase, ATP:Adenosin-5'-Phosphotransferase (EC 2.7.1.20)

Purin-Nucleosid-Phosphorylase, Purin-Nucleosid:Orthophosphat-Ribosyltransferase (EC 2.4.2.1)

RNA-Nucleotidyltransferase, Nucleosidtriphosphat:RNA-Nucleotidyltransferase (=RNA-Polymerase)(EC 2.7.7.6)

Xanthin-Oxidase, Xanthin:Sauerstoff-Oxidoreduktase (EC 1.2.3.2).

*Synthesis, structure and biochemical properties of 6-(imidazole-2-thio)purine nucleosides***Summary:**

1) The synthesis of the following nucleosides is described: 6-(4-*t*-butylimidazole-2-thio)purin-9-yl- β -D-ribofuranoside, β -D-ribofuranoside, β -D-deoxyribofuranoside, β -D-xylofuranoside, β -D-xylopyranoside, α -D-arabinofuranoside, α -L-arabinopyranoside, α -L-rhamnopyranoside; in addition, the synthesis of the β -D-ribofuranosides of 2-amino-6-(4-*t*-butylimidazole-2-thio)purine, 2-amino-6-(4-phenylimidazole-2-thio)purine, 2-chloro-6-(4-*t*-butylimidazole-2-thio)purine, 2-chloro-6-(4,5-dimethylimidazole-2-thio)purine and 2-chloro-6-(4-phenylimidazole-2-thio)purine.

2) Configuration and conformation of the nucleosides were confirmed by NMR- and CD-spectra, in some cases with mass-spectra.

3) The thioether bond of the nucleosides is cleaved by nucleophilic agents under mild conditions forming 2-mercaptoimidazoles and purines substituted in position 6.

4) Xanthine oxidase is inhibited by all thioethers described. The concentration for a 50 percent inhibition is $2-6 \times 10^{-4}$ M. This inhibition is probably a consequence of the formation of an S-purinylenzyme. While 6-(4-*t*-butylimidazole-2-thio)purin-9-yl- β -D-ribofuranoside is phosphorylated by adenosine kinase, the other nucleosides were not substrates for the enzyme. 6-(4-*t*-Butylimidazole-2-thio)purin-9-yl- β -D-ribofuranoside is formed from the base and ribose 1-phosphate by the enzyme purine nucleoside phosphorylase.

5) DNA-, RNA- and protein synthesis are inhibited by the nucleosides in different degrees: 2-chloro-6-(4-phenyl- and 4-*t*-butylimidazole-2-thio)purine are the most potent inhibitors.

6) Proliferation of Ascites-tumour-cells *in vivo* was not significantly inhibited, but the growth of cells in monolayer culture was delayed.

Im Rahmen von Untersuchungen über cytostatisch wirksame Verbindungen aus der Klasse der Mannichbasen beobachteten Weitzel u. Mitarb.^[1], daß 2-Mercaptoimidazol und seine Derivate das Wachstum von Tumorzellen hemmen und eine spez. Senkung des [¹⁴C]Thymidin-Einbaus in Ascites-Zellen bewirken. Bei Prüfung der Frage, ob die thyreostatischen Wirkungen des 2-Mercaptoimidazols von den cytostatischen Aktivitäten getrennt werden können^[2], stießen wir auf die 6-(Imidazol-2-thio)purine^[3], die als Purinylthioäther der 2-Mercaptoimidazole oder Imidazolthioäther des 6-Mercaptopurins aufzufassen sind und das Wachstum von Ascites-Zellen hemmen, ohne die Schilddrüsenfunktion zu beeinträchtigen.

Nachdem erste Untersuchungen über die Riboside von 6-(Imidazol-2-thio)purinen gezeigt hatten^[4], daß durch Einführung von Zuckern die Löslichkeit der Verbindungen verbessert und ihre Effekte auf

einige untersuchte Stoffwechselfparameter im Vergleich zu den zuckerfreien Verbindungen variiert werden können, haben wir eine Reihe von Glykosiden mit verschiedenen Zuckern synthetisiert und ihre biochemischen Eigenschaften untersucht. Diese Versuche schienen uns auch deshalb sinnvoll, weil bekannt ist, daß bei Purinantagonisten die allgemeine Toxizität durch Ribosidierung vermindert werden kann^[5], weil ferner gezeigt wurde, daß die eigentlichen Wirkformen z. B. des 6-Mercaptopurins die Nucleoside und Nucleosidmonophosphate darstellen^[6] und weil bei einigen Cytostatika auf Nucleosidbasis die biologische Wirkung allein auf einen atypischen Zucker zurückzuführen ist^[4]. Die vorliegende Arbeit befaßt sich daher mit

1. der Synthese, Struktur und den chemischen Eigenschaften von 6-(4-*t*-Butylimidazol-2-thio)purin-Nucleosiden – wobei als Zuckerkomponenten die Furanoside bzw. Pyranoside von D-Ribose, D-Xylose, D-Arabinose, L-Arabinose, L-Rhamnose und 2-Desoxy-D-ribose gewählt wurden – sowie von 2-Amino- und 2-Chlor-6-(imidazol-2-thio)purin-9-yl-ribofuranosiden;

⁵ Montgomery, J. (1967) *Methods Cancer Res.* 3, chapter 9.

⁶ Roy-Burman, P. (1970) in *Recent Results in Cancer Research*, Bd. 25 (Analogues of Nucleic Acid Components) S. 16–21, Springer Verlag, Berlin.

¹ Weitzel, G., Schneider, F., Guglielmi, H., Sander, J., Durst, J. & Hirschmann, W. D. (1966) *diese Z.* 346, 208–223.

² Weitzel, G., Schneider, F., Guglielmi, H., Seif, F., Hirschmann, W. D. & Durst, J. (1967) *diese Z.* 348, 1277–1284.

³ Schneider, F., Niemers, E. & Warnecke, P. (1968) *diese Z.* 349, 1739–1744.

⁴ Hopf, U. & Schneider, F. (1971) *Arzneimittelforschung* 21, 294–296.

2. mit der Frage, ob diese Nucleoside von Enzymen des Purinstoffwechsels wie Purin-Nucleosid-Phosphorylase, Adenosin-Kinase und Xanthin-Oxidase als Substrate verwendet werden oder als Inhibitoren dieser Enzyme wirken;

3. Untersuchungen über die Wirkung dieser Verbindungen auf das Wachstum von Ascites-Zellen in Monolayerkulturen und in vivo, sowie den DNA-, RNA- und Proteinstoffwechsel von Ascites-Zellen in vitro.

Synthese und Struktur der 6-(Imidazol-2-thio)purin-Nucleoside

Die Synthese der in dieser Arbeit beschriebenen 6-(Imidazol-2-thio)purin-Nucleoside erfolgte durch Reaktion der 6-Chlorpurin-Nucleoside mit 2-Mercaptoimidazolen^[4]. Die benötigten 6-Chlorpurin-Nucleoside wurden nach dem Quecksilbersalz-Verfahren von Davoll und Lowy^[7] hergestellt, indem die 9-Chlormercuripurine mit geschützten Halogenzuckern umgesetzt werden. Die Pentopyranoside wurden in Form ihrer 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-bromide^[8], die Pentofuranoside als 2,3,5-Tri-*O*-benzoyl-1-chloride^[9] und die 2-Desoxy-D-ribose wurde als 3,5-Di-*O*-(*p*-chlorbenzoyl)-1-chlorid eingesetzt^[9]. Die Reinigung der geschützten Nucleoside erfolgte durch Chromatographie an neutralem Aluminiumoxid. Zur Abtrennung des nach aminolytischer Abspaltung der Acylgruppen von den geschützten Zuckern häufig als geringfügige Verunreinigung auftretenden Ammoniumchlorids bewährte sich Chromatographie an Aktivkohle. Für die Darstellung der 2-Amino-6-chlor-^[10] bzw. 2,6-Dichlorpurin-9-yl-ribofuranoside^[11] diente Guanosin als Ausgangsprodukt; dadurch umgeht man die relativ mühsame Anknüpfung des Zuckers an die Base und verkürzt die Gesamtsynthese erheblich.

Die in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal beschriebenen Verbindungen sind mit ihren Formeln und analytischen Daten in Tab. 1 zusammengefaßt.

⁷ Davoll, J. & Lowy, B. A. (1951) *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 1650–1655.

⁸ Bárczai-Martos, M. & Körösy, F. (1950) *Nature (London)* **165**, 369.

⁹ Recondo, E. F. & Rinderknecht, H. (1959) *Helv. Chim. Acta* **42**, 1171–1173.

¹⁰ Gerster, J. F., Jones, J. W. & Robins, R. K. (1963) *J. Org. Chem.* **28**, 945–948.

¹¹ Gerster, J. F. & Robins, R. K. (1966) *J. Org. Chem.* **31**, 3258–3262.

Die in der Tabelle angegebene Struktur der Verbindungen wurde außer durch Syntheseweg und analytische Daten durch folgende Kriterien bewiesen.

1. *Stellung des Zuckers*: Die Frage, ob die Zucker ausschließlich mit Position 9 des Purinringes reagiert haben, konnte mit Hilfe von NMR-Spektren eindeutig beantwortet werden. Bei allen Verbindungen wurden nie mehr als zwei Purinprotonensignale beobachtet; der Abstand der beiden Signale liegt in allen Fällen zwischen 0 und 7 Hz, was für 9-Nucleoside charakteristisch ist^[12].

2. *Konfiguration am anomeren C-Atom*: Im Falle der Pyranoside geben die NMR-Spektren auch eine exakte Auskunft über die Konfiguration am anomeren C-Atom. Die vicinalen Kopplungskonstanten der Protonen H-1' und H-2' für die Pyranoside (Tab. 2, Spalte 5) liegen im Bereich um 9 Hz; daraus ist der Schluß zu ziehen^[13], daß in allen Fällen eine trans-diaxiale Konfiguration vorliegt, d. h. β -Pyranoside, wie es auf Grund der Baker'schen Regel nach dem Syntheseweg auch zu erwarten ist. Für die Furanoside haben neuere Untersuchungen gezeigt, daß die Methode hier keine eindeutigen Aussagen erlaubt^[14]. Aus Tab. 2 ist zu ersehen, daß für das D-Xylofuranosid eine Kopplungskonstante von 1 Hz gefunden wird, die für eine β -Konfiguration spricht.

3. *Konformation der Zucker*: Aus den NMR-Daten (Tab. 2) ergeben sich in Übereinstimmung mit Literaturbefunden^[13] nach der Nomenklatur von Reeves^[15] für die Pyranoside folgende Konformationen:

β -D-Ribopyranosid C 1-Konformation

β -D-Xylopyranosid C 1-Konformation

α -L-Rhamnopyranosid C 1-Konformation

α -L-Arabinopyranosid C 1-Konformation

α -D-Arabinopyranosid I C-Konformation

Bemerkenswert ist, daß die acetylierten Halogenzucker nicht immer die gleiche Konformation wie

¹² Townsend, L. B., Robins, R. K., Loeppky, R. N. & Leonard, N. Y. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.* **86**, 5320–5325.

¹³ Hall, L. D. (1964) *Advan. Carbohydr. Chem.* **19**, 51; Martinez, A. P., Lee, W. W. & Goodman, L. (1969) *J. Org. Chem.* **34**, 92–97; Martinez, A. P. & Lee, W. W. (1969) *J. Org. Chem.* **34**, 416–421.

¹⁴ Lemieux, R. U. & Lineback, D. R. (1963) *Ann. Rev. Biochem.* **32**, 155–184.

¹⁵ Reeves, R. E. (1950) *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 1499–1506.

Tab. 1. Formeln und analytische Daten der 6-(Imidazol-2-thio)purin-Nucleoside.

Verbindung	R	Summenformel	Elementaranalyse		$[\alpha]_D^{20}$
			Ber.	Gef.	
	H (× HCl) (I)	C ₁₂ H ₁₅ ClN ₆ S (310,8)	N	27,0 26,9	—
	β-D-ribofuranosid (II)	C ₁₇ H ₂₂ N ₆ O ₄ S (406,5)	C	50,23 50,05	−20 ⁰
			H	5,46 5,75	(c=0,5; Äthanol)
			N	20,65 20,64	
			S	7,89 7,63	
	β-D-ribopyranosid (III)	C ₁₇ H ₂₂ N ₆ O ₄ S (406,5)	N	20,65 20,21	−21,2 ⁰
			S	7,89 7,68	(c=0,5; Äthanol)
	β-D-desoxyribofuranosid (IV)	C ₁₇ H ₂₂ N ₆ O ₃ S (390,5)	C	52,29 51,81	+14,1 ⁰
			H	5,68 5,76	(c=0,2; 25proz.
			N	21,12 20,81	Äthanol)
			S	8,12 8,06	
	β-D-xylofuranosid* (V)	C ₁₇ H ₂₂ N ₆ O ₄ S (406,5)	N	20,65 20,41	−92,5 ⁰
			S	7,89 7,85	(c=0,54; Äthanol)
	β-D-xylopyranosid (VI)	C ₁₇ H ₂₂ N ₆ O ₄ S (406,5)	N	20,65 20,91	−23,0 ⁰
			S	7,89 8,06	(c=1; Äthanol)
	α-D-arabinofuranosid* (VII)	C ₁₇ H ₂₂ N ₆ O ₄ S (406,5)	N	20,65 20,10	+80,0 ⁰
			S	7,89 7,67	(c=0,6; Äthanol)
	α-D-arabinopyranosid (VIII)	C ₁₇ H ₂₂ N ₆ O ₄ S (406,5)	C	50,23 50,11	−23,0 ⁰
			H	5,46 5,65	(c=1; Äthanol)
			N	20,65 20,35	
			S	7,89 7,74	
	α-L-arabinofuranosid* (IX)	C ₁₇ H ₂₂ N ₆ SO ₄ S (406,5)	N	20,65 20,11	−78,7 ⁰
			S	7,89 7,89	(c=0,5; Äthanol)
	α-L-arabinopyranosid (X)	C ₁₇ H ₂₂ N ₆ O ₄ S (406,5)	N	20,65 20,65	+18,0 ⁰
			S	7,89 7,88	(c=1; Äthanol)
	α-L-rhamnopyranosid (XI)	C ₁₈ H ₂₄ N ₆ O ₄ S (420,5)	C	51,42 50,92	−39,0 ⁰
			H	5,75 5,94	(c=0,5; Äthanol).
			N	19,98 18,88	
			S	7,62 7,74	

* Reinigung nach Methode II.

das Endprodukt besitzen. Für das Triacetylxylopyranosylbromid ist eine C 1-Konformation, für das Triacetyl-D-arabinopyranosylbromid eine 1 C-Konformation nachgewiesen^[16], beide liefern Glykoside gleicher Konformation. Für das Triacetyl-D-ribofuranosid ist eine 1 C-Konformation nachgewiesen, das entsprechende Nucleosid hat dagegen eine C 1-Konformation, d. h. es kann bei der

¹⁶ Horton, D. & Turner, W. N. (1965) *J. Org. Chem.* **30**, 3387–3394.

Knüpfung der glykosidischen Bindung eine Konformationsänderung eintreten.

Eine Konfigurationszuordnung für 2'-Desoxyribonucleoside in der Furanoseform ist auf Grund der NMR-Daten nicht möglich; die chemische Verschiebung von H_{1'} stimmt allerdings genau mit der von in der Literatur^[17] beschriebenen β-Desoxynucleosiden überein.

¹⁷ Robins, M. J. & Robins, R. K. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.* **87**, 4934–4940.

Verbindung	R	Summenformel	Elementaranalyse		$[\alpha]_D^{20}$
			Ber.	Gef.	
	-β-D-ribofuranosid × HCl (XII)	C ₁₇ H ₂₂ Cl ₂ N ₆ O ₄ S (477,4)	Cl 14,85 S 6,72	14,79 6,78	-25,6° (c=1; Methanol)
	-β-D-ribofuranosid × HCl (XIII)	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₆ O ₄ S (449,3)	Cl 15,80 S 7,14	15,60 7,31	-31,1° (c=1; Methanol)
	-β-D-ribofuranosid × HCl (XIV)	C ₁₉ H ₁₈ Cl ₂ N ₆ O ₄ S (497,4)	Cl 14,24 S 6,44	13,94 6,55	-25,0° (c=1; Methanol)
	-β-D-ribofuranosid × HCl (XV)	C ₁₉ H ₂₀ ClN ₇ O ₄ S (477,9)	Cl 7,43 N 20,50 S 6,71	7,61 20,51 6,85	-33,5° (c=0,2; Methanol)
	-β-D-ribofuranosid × HCl (XVI)	C ₁₇ H ₂₄ ClN ₇ O ₄ S (458,0)	Cl 7,74 N 21,40 S 7,00	7,65 21,60 6,77	-26,2° (c=1; Methanol)
	-β-D-ribofuranosid × HCl (XVII)	C ₁₅ H ₂₀ ClN ₇ O ₄ S (429,90)	Cl 8,26 N 22,82 S 7,47	7,72 22,84 7,38	-29,1° (c=1; Methanol)

Die β-Konfiguration des 2-Desoxyribofuranosids konnte jedoch durch das Massenspektrum der Verbindung bewiesen werden. Das unterschiedliche Fragmentierungsverhalten von α- und β-Nucleosiden in Hinblick auf die Formaldehydabspaltung ist die Grundlage dieser Methode^[18]. Aus Tab. 3 ist zu entnehmen, daß der (M⁺-30)-Peak größer ist als der Molekülpeak M⁺; das ist charakteristisch für β-Nucleoside, bei α-Nucleosiden sind die Verhältnisse umgekehrt^[18].

Aussagen über die Konfiguration von Nucleosiden

sind darüberhinaus aus dem Vorzeichen der Cottoneffekte möglich. So zeigen alle bisher untersuchten Verbindungen dieser Klasse bei etwa 260 nm einen negativen Cottoneffekt, wenn sie β-Konfiguration besitzen, bei α-Form einen positiven Cottoneffekt^[19].

¹⁸ Shaw, S. J., Desiderio, D. M., Tsuboyama, K. & McCloskey, J. A. (1970) *J. Amer. Chem. Soc.* **92**, 2510–2522.

¹⁹ Emerson, T. R., Swan, R. J. & Ulbricht, T. L. V. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**, 505–510.

Tab. 2. NMR-Spektren* von 6-(4-*t*-Butylimidazol-2-thio)purin-Nucleosiden in [²H₆]Dimethylsulfoxid. Alle Signale als δ -Werte in ppm bezogen auf Tetramethylsilan als innerer Standard.

Substanz	Purin		Imidazol	t-Butyl	Zucker	$J_{1',2'}, [\text{Hz}]$
	H-2	H-8	H-5	H	H-1'	
Verb. II (ribfur)	8,76	8,65	6,99	1,27	6,01	6
Verb. III (ribpyr)	8,70	8,63	6,93	1,25	5,75	9
Verb. IV (dribfur)	8,76	8,66	7,00	1,23	6,50	—
Verb. V (xylfur)	—	—	7,08	1,26	5,96	1
Verb. VI (xylpyr)	—	—	7,00	1,27	5,47	9
Verb. VII (D-arafur)	8,77	8,73	7,01	1,29	6,00	5
Verb. VIII (D-arapyr)	8,70	8,61	7,02	1,28	5,46	9
Verb. IX (L-arafur)	—	—	7,00	1,28	6,01	5
Verb. X (L-arapyr)	8,70	8,53	7,04	1,28	5,46	9
Verb. XI (L-rhapyr)	8,53	8,52	7,00	1,26	5,98	8

* Die Spektren wurden mit einem 60-MHz-Gerät der Fa. Varián aufgenommen.

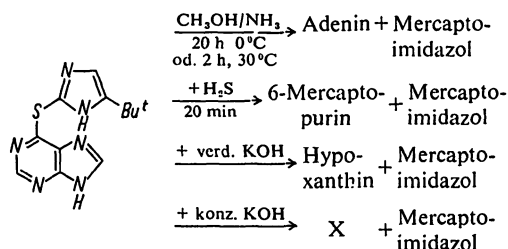
Tab. 3. Charakteristische Bruchstücke des Massenspektrums von Verb. IV.

Relative Intensität bezogen auf B + H = 100 %, M = gesamtes Molekül, B = freie Base. Die Bruchstücke in Spalte 1 sind als einfach positiv geladene Molekülfragmente zu verstehen.

Bruchstück	Masse	Relative Intensität [%]
a) H — C = O	29	110
b) C(CH ₃) ₃	57	62
c) Desoxyribose	117	57
d) 4- <i>t</i> -Butyl-2-mercapto-imidazol	115	38
e) Purin + 28	146	8
B	273	2
B + H	274	100
B + 2 H	275	115
M	390	0,3
H — OH	373	0,2
M — H ₂ O	372	0,2
M — 30	360	0,4

Chemische Eigenschaften

Sämtliche der in Tab. 1 aufgeführten Verbindungen besitzen mindestens eine Löslichkeit von 10⁻³ Mol/l, was für die Untersuchung ihrer biologischen Eigenschaften wichtig ist. Der pK-Wert des Imidazols der Thioäther liegt bei 4,5. Mit diazotierter Sulfanilsäure kuppeln alle Nucleoside (mit Ausnahme der 6-(4,5-Dimethylimidazol-2-thio)purin-Nucleoside) zu intensiv gelben Produkten in 4(5)-Stellung des Imidazolringes unter Bildung eines Mono-Azo-Farbstoffs. Die Thioäther-Bindung der Nucleoside erweist sich im Vergleich mit gewöhnlichen Thioäthern als verhältnismäßig labil. Eine Zusammenstellung der aminolytischen, thiolytischen und hydrolytischen Spaltungsreaktionen enthält das Schema.



Schema: Aminolytische, thiolytische und hydrolytische Thioätherspaltung von 6-(4-*t*-Butylimidazol-2-thio)purinen, X = nicht identifizierte Purinfragmente wie z. B. Diaminopyrimidine^[21].

Wie aus Tab. 4 ersichtlich ist, ergeben die bei 280 nm gefundenen Vorzeichen der Cottonneffekte die Konfigurationen, die auf Grund der Synthesen und NMR-Spektren zu erwarten sind. Quantitative Aussagen sind wegen der Schwäche der Signale nicht möglich^[20].

²⁰ Miles, D. W., Robins, R. K. & Eyring, H. (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **57**, 1138–1145.

²¹ Johnson, J. A. & Thomas, H. J. (1956) *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 3863.

Tab. 4. Cottoneffekte einiger 6-(Imidazol-2-thio)purin-Nucleoside in H₂O, $c=0,22-0,23$ mg/ml.

Substanz	Konfiguration	Vorzeichen des Cottoneffektes	
		bei ca. 220nm	bei ca. 280nm
Verb. II (D-Ribofuranosid)	β	—	—
Verb. V (D-Xylofuranosid)	β	—	—
Verb. VII (D-Arabinofuranosid)	α	+	+
Verb. IX (L-Arabinofuranosid)	α	+	—

Außer bei der Spaltung durch H₂S entsteht stets das 2-Mercaptoimidazol-Derivat, nicht das 6-Mercaptopurin. Diese nucleophilen Verdrängungsreaktionen verlaufen in Methanol und Äthanol schneller als in Wasser, zeigen also Ähnlichkeit mit der S_N2-Reaktion bei Aliphaten.

Für das chemische Verhalten der Verbindungen ist von Bedeutung, daß physiologische SH-Verbindungen wie Cystein oder Glutathion eine Spaltung der Thioätherbindung bewirken. Eine exakte Kinetik der Reaktion konnte nicht aufgenommen werden, da die chromatographische Prüfung der Reaktionsprodukte zeigte, daß die Reaktion nicht einheitlich verläuft. Aus der pH-Abhängigkeit der Reaktion (Tab. 5) ergibt sich aber, daß das Thiolatanion das reaktive Agens ist.

Tab. 5. Abnahme der SH-Konzentration bei der Thioätherspaltung durch Cystein in Abhängigkeit vom pH-Wert, Ausgangskonzentration an Thioäther und Cystein: 10⁻³M.

Abnahme an SH in 30 min (Ausgangskonz. 10 ⁻³ M)	Relat. Geschw.	pH-Wert
0,75 × 10 ⁻⁴ M	1,00	7,0
0,96 × 10 ⁻⁴ M	1,28	7,4
1,32 × 10 ⁻⁴ M	1,76	7,5
3,60 × 10 ⁻⁴ M	4,80	8,0

Als Spaltungsprodukte der Reaktion mit Cystein findet man stets 2-Mercaptoimidazol und höchstwahrscheinlich S-Purinylcystein. Versuche, S-Purinylcystein aus 6-Chlorpurin und Cystein in schwach alkalischem Medium herzustellen, führten zum N,S-Dipurinylcystein. Dagegen erhält man aus 6-Chlorpurin und Cystein in Natrium/fl. Ammoniak u. a. ein Reaktionsprodukt, welches das gleiche dünnschichtchromatographische und UV-spektroskopische Verhalten zeigt, wie eine aus 6-(Imidazol-2-thio)purin und Cystein erhaltene Komponente.

Material und Methoden

BESCHREIBUNG DER SYNTHESSEN

Allgemeine Vorschriften

6-Chlorpurin-Nucleoside: 10 g (0,026 Mol) 9-Chlormercuri-6-chlorpurin^[7] werden in 400 ml abs. Toluol oder Xylol unter Zusatz von 2 g Celite suspendiert; aus der Suspension werden unter Rühren ca. 50–80 ml Lösungsmittel abdestilliert, um Wasserreste zu entfernen. Man gibt 0,026–0,03 Mol geschütztes Zucker-1-halogenid in fester Form oder in etwas Toluol oder Xylol gelöst hinzu und erhitzt 1–2 h unter Rühren unter Rückfluß. Die heiße Lösung wird filtriert, der Rückstand mit 300 ml Chloroform gewaschen, das Hauptfiltrat eingedampft und der Rückstand in den 300 ml Chloroform gelöst. Die Chloroformlösung wird zweimal mit 100 ml 20proz. Kaliumjodidlösung und 100 ml 10proz. Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vak. eingedampft. Dabei entstanden entweder ein fester Schaum oder ein zähflüssiger Sirup, der sich im allgemeinen nicht kristallisieren ließ. Die Ausbeuten liegen bei 25–35% d.Th., bezogen auf 6-Chlorpurin. Reinigung der Produkte erfolgt durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxid (Methode I). Einzelheiten sind aus Tab. 6 zu entnehmen.

6-(Imidazol-2-thio)purin-Nucleoside: Äquimolare Mengen (0,003–0,03 Mol) am Zuckerrest geschütztes 6-Chlorpurin-Nucleosid und 2-Mercapto-4-*r*-butylimidazol werden in Isopropanol, Butanol oder Methanol 1–2 h unter Rückfluß gekocht, das Lösungsmittel im Vak. abgezogen, der Rückstand in Benzol oder Benzol/Chloroform 2:1 gelöst und an einer Aluminiumoxidsäule (Methode I) chromatographiert. Die Endprodukte waren in den meisten Fällen ölig oder schaumig.

Abspaltung der Zuckerschutzgruppen: Die am Zuckerrest geschützten Nucleoside werden in abs. Methanol gelöst, das bei 0°C mit Ammoniak gesättigt war, und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Wird eine Reaktionszeit von 15 h nicht überschritten, findet unter diesen Bedingungen keine Aminolyse der Thioätherbindung statt. Nach Filtration der Lösung wird

Tab. 6. Reaktionsbedingungen für Nucleosidsynthesen und Thioätherbildung.

N- T- thio)purin-9-yl-	Lösungsmittel (Reaktions- zeit [h])	Reinigung Methode I m/ Elutionsmittel	Zuckerkomponente	Eigenschaften chromatographisch rein Methode III und IV
N- β-tri- <i>O</i> -benzoyl-D-ribo- furanosid T-	Xylol (2)	200 CCl ₄ 300 Benzol 600 Essigester	2,3,5-Tri- <i>O</i> -benzoyl- D-ribofuranosyl- 1-chlorid	Sirup
	n-Butanol (1)	600 Essigester	—	fest, nicht kristallin
N- β-tri- <i>O</i> -acetyl-D-ribo- pyranosid T-	Toluol (0,66)	—	2,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl- D-ribopyranosyl-1- bromid ^[8]	Sirup
	Isopropanol (1)	300 Benzol 600 Essigester	—	fest schaumig
N- (3,5-di- <i>O</i> - <i>p</i> -chlorbenzoyl- 2-desoxyribofuranosid) T-	Toluol (2,5)	200 Benzol 200 Essigester* 700 Essigester** 100 Äthanol	3,5-Di- <i>O</i> - <i>p</i> -chlor- benzoyl-2-desoxy-D- ribofuranosyl-1- chlorid	beide Anomeren in fester nicht kristall. Form
	Isopropanol (1)	chromatographisch rein Methode III	—	fest schaumig
N- β-tri- <i>O</i> -benzoyl-D- xylofuranosid T-	Toluol (1,5)	150 CCl ₄ 150 Benzol 300 Essigester 300 Essigester + 20% Äthanol	2,3,5-Tri- <i>O</i> -benzoyl- D-xylofuranosyl-1- chlorid ^[9]	fest, nicht kristallin
	Isopropanol (1,75)	150 Benzol 600 Essigester 200 Methanol	—	Öl
N- β-tri- <i>O</i> -acetyl-D-xylo- pyranosid T-	Xylol (2)	Umkristallisation aus Äther/Ben- zol 10:1	2,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl- xylopyranosyl-1- bromid ^[8]	Kristalle Schmp. 172°C
	Isopropanol (1)	Umkristallisation aus Äther/ Benzol 10:1	—	Kristalle Schmp. 195°C
N- α-tri- <i>O</i> -benzoyl-D-ara- binofuranosid T-	Toluol (4)	500 Benzol 900 Essigester	2,3,5-Tri- <i>O</i> -benzoyl- D-arabinofuranosyl- 1-bromid ^[9]	fest, nicht kristallin
	Isopropanol (1)	600 Benzol 1200 Essigester	—	fest, nicht kristallin
N- α-tri- <i>O</i> -benzoyl-L-ara- binofuranosid T-	Toluol (2)	500 Benzol 800 Essigester	2,3,5-Tri- <i>O</i> -benzoyl- L-arabinofuranosyl- 1-bromid ^[9]	Öl
	Isopropanol (2)	300 Benzol 150 Äther 700 Essigester	—	Sirup

* 200 m/ Essigester (enthalten rechtsdrehendes Produkt).

** 700 m/ Essigester (enthalten linksdrehendes Produkt).

Fortsetzung von Tab. 6.

N- α-tri- <i>O</i> -acetyl-D-ara- binopyranosid T-}	Xylol (1)	Umkristallisation aus Äthanol	2,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl- D-arabinopyranosyl- 1-bromid	kristallin Schmp. 140°C
	Isopropanol (1)	500 Benzol 100 Chloroform 800 Essigester	—	fest, nicht kristallin
N- α-tri- <i>O</i> -acetyl-L-ara- binopyranosid T-}	Xylol (2)	300 Benzol 900 Essigester	2,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl- L-arabinopyranosyl- 1-bromid	fest, nicht kristallin
	Isopropanol (1)	500 Benzol 100 Chloroform 800 Essigester	—	fest, nicht kristallin
N- α-tri- <i>O</i> -acetyl-L-rhamno- pyranosid T-}	Xylol (1)	300 CCl ₄ 500 Benzol/ Essigester 2:7	2,3,4-Tri- <i>O</i> -acetyl- L-rhamnopyranosyl- 1-bromid	kristallin, 140°C
	n-Propanol (2)	670 Chloroform/ 100 Chloroform/ Essigester 5:4 800 Chloroform/ Essigester 1:6	—	fest, nicht kristallin

im Vak. auf ein kleines Volumen (3–5 ml) eingengt und in 200 ml Äther eingetropft. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und getrocknet. Falls sich Spuren von Ammoniumchlorid nachweisen lassen, wird an Aktivkohle chromatographiert. Die analytischen Daten der Endprodukte sind in Tab. 1 enthalten.

Allgemeine Synthesevorschrift für 2-Amino- bzw. 2-Chlor-6-(imidazol-2-thio)purin-9-yl-β-ribofuranoside

5mm 6-Chlorpurin-9-yl-ribosid und 5mm 2-Mercaptoimidazol werden in 50 ml Isopropanol 2 h unter Rückfluß gekocht. Danach wird am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft, in wenig Methanol gelöst und nach Behandlung mit Aktivkohle mit Äther gefällt. Das 2-Amino-6-(4-phenylimidazol-2-thio)purin-9-yl-β-D-ribofuranosid kann aus n-Butanol umkristallisiert werden.

Thiolytische Spaltung der 6-(Imidazol-2-thio)purin-Nucleoside

Die Kinetik der Spaltungsreaktion durch Cystein wurde an der Abnahme der SH-Gruppen mit Hilfe der Ellman-Reaktion^[22] verfolgt. Ein Inkubationsansatz enthielt: 1,5 ml/0,05M Phosphatpuffer, pH 7 bis 8, 0,5 ml Cysteinlösung (6,0 mg/10 ml Wasser), 0,5 ml Thioäther (15,3 mg/10 ml Wasser). Endkonzentration an Cystein 10⁻³M, Thioäther 10⁻³M, Temp: 37°C. In bestimmten

Abständen wurden 0,1 ml Inkubationsmischung entnommen und zu einer Mischung von 1,5 ml Phosphatpuffer (0,05M, pH 8) 1,35 ml Wasser und 0,02 ml Ellmann-Reagens gegeben; nach 2 min wurde gegen einen Standard bei 412 nm gemessen.

Chromatographische Verfahren zur Reinigung und Reinheitskontrolle der Produkte

Methode I: Zur Säulenchromatographie der Zwischenprodukte wurden etwa 6 g Substanzgemisch auf eine mit neutralem Aluminiumoxid (Woelm; Eschwege, Aktivitätsstufe I) beschickte 2,5 × 50 cm Säule gegeben. Die Elutionsbedingungen sind bei den einzelnen Verbindungen in Tab. 6 gesondert angegeben. Die Elution wurde mit einem Durchflußphotometer (Uvicord, LKB-Produkte, Stockholm) verfolgt.

Methode II: Präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel mit Fluoreszenzindicator ohne Bindemittel (Merck, Darmstadt) Schichtdicke 230 nm auf Glasplatten 20 × 20 cm. Zweimalige Vorentwicklung mit Methanol 2 cm vom Startfleck. Die Zonen wurden abgekratzt, mit abs. Methanol 1 h bei Zimmertemperatur extrahiert und zur Entfernung kolloidaler Kieselsäure durch kurze Kieselgelsäulen filtriert.

Methode III: Chromatographie auf Aluminiumfolie mit Kieselgelbeschichtung und Fluoreszenzindicator bei 254 nm. (Riedel-de Haen) Laufmittel: Benzol/Methanol 2:1 (IIIa) und n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 (IIIb).

²² Ellman, G. E. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70–77.

Methode IV: Chromatographie auf Cellulose-beschichteten Kunststoffolien mit Fluoreszenzindikator (CEL 300, UV 254, Macherey & Nagel, Düren) Laufmittel: dest. Wasser.

BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Methodik

Die Wirkung der 6-(Imidazol-2-thio)purin-Nucleoside auf die DNA-, RNA- und Proteinsynthese von intakten Ascites-Zellen wurde nach der l. c.^[23] beschriebenen Methode untersucht. In einer Endkonzentration von 10^{-3} M waren alle Verbindungen gelöst.

Untersuchungen an Ascites-Zellen in Monolayer-Kulturen wurden nach der l. c.^[24] beschriebenen Methode durchgeführt. Zur Methodik des Carcinolyse-testes s. l. c.^[25].

Enzymatische Untersuchungen

Adenosin-Kinase wurde nach l. c.^[26] aus Brauereihefe angereichert (spez. Aktivität 13,0 U/mg). Inkubationsansätze wie dort beschrieben. Die Umwandlung von Nucleosiden zu Nucleotiden wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt: a) auf Polyäthylenimin-impregnierter Cellulose, Laufmittel 0,4 M Lithiumchlorid; b) Cellulose auf Alu-Folie. Laufmittel: Isoamylalkohol/Ameisensäure/Wasser 3:2:1.

Xanthin-Oxidase: Präparat der Firma Boehringer Mannheim GmbH, spez. Aktivität 0,4 U/mg. Die zu testenden Verbindungen wurden in einer Konzentration von 10^{-4} M in Phosphatpuffer, pH 7,4, gelöst und zeitabhängig die UV-Spektren im Bereich von 400 bis 220 nm aufgenommen sowie Dünnschichtchromatogramme der Inkubationsansätze angefertigt. Die Hemmwirkung der Thioäther auf die Oxidation von Hypoxanthin wurde bei 293 nm in 3-ml-Ansätzen folgender Zusammensetzung geprüft: 0,05 M Phosphat, pH 7,4 sauerstoffgesättigt; 10^{-4} M Hypoxanthin, 10^{-4} M EDTA, 10^{-3} – 10^{-5} M Thioäther; gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,01 ml Enzymsuspension (10 mg/ml).

Purin-Nucleosid-Phosphorylase: Präparat der Firma Boehringer Mannheim GmbH, spez. Aktivität: 25 U/mg. Test: 5×10^{-4} M Nucleosid, 0,25 U Enzym wurden in 3 ml 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4, inkubiert und dünnschichtchromatographisch geprüft, ob unter Abspaltung von Ribose-1-phosphat freie Base entsteht. Die Synthese von Ribosid aus 6-(4-*r*-Butylimidazol-2-thio)purin und Ribose-1-phosphat wurde in

einem 3-ml-Testansatz folgender Zusammensetzung dünnschichtchromatographisch geprüft: $4,7 \times 10^{-4}$ M Base; $4,7 \times 10^{-4}$ M Ribose-1-phosphat, 0,25 U Enzym, 0,05 ml Phosphatpuffer, pH 7,4.

Mit Inosin als Substrat der Purin-Nucleosid-Phosphorylase wurde die Hemmwirkung der Thioäther-Nucleoside untersucht. Das freigesetzte Hypoxanthin wurde mit Xanthin-Oxidase bestimmt, wobei zu berücksichtigen ist, daß die Thioäther-Nucleoside die Xanthin-Oxidase hemmen. Die Testansätze enthielten 3 ml Lösung folgender Zusammensetzung: 0,05 M Phosphatpuffer, sauerstoffgesättigt, 10^{-4} M Inosin, 10^{-4} M EDTA, 10^{-5} – 10^{-3} M Thioäther, 0,4 U Xanthin-Oxidase und 0,04 U. Purin-Nucleosid-Phosphorylase.

Ergebnisse

DNA-, RNA- und Proteinsynthese

In Tab. 7 sind die Ergebnisse der Messungen der Einbauraten in Ascites-Zellen in vitro zusammengefaßt. Es sind nur die Werte nach 2stdg. Inkubation aufgenommen, die das Wesentliche erkennen lassen: am stärksten betroffen ist unter Einfluß der 6-(4-*r*-Butylimidazol-2-thio)purin-9-yl-glykoside der Uridin-Einbau, während der Thymidin- und Leucin-Einbau kaum beeinflusst werden. Signifi-

Tab. 7. [¹⁴C]Thymidin, -Uridin und -Leucin-Einbau in Ascites-Zellen nach 2stdg. Inkubation mit 10^{-3} M 6-(4-*r*-Butylimidazol-2-thio)purin-Nucleosiden.

Substanz (s. Tab. 1)	Einbau in % der Kontrolle		
	Thymidin	Uridin	Leucin
I	57	45	81
II	82	24	82
III	88	80	76
IV	93	36	86
V	80	60	70
VI	89	81	95
VII	80	68	74
VIII	87	71	80
XI	57	56	46
X	82	80	86
XI	98	68	75
XII	3	4	50
XIII	20	32	39
XIV	0	0	0
XV	90	53	85
XVI	102	99	106
XVII	90	56	96

²³ Weitzel, G., Schneider, F., Fretzdorff, A. M., Durst, J. & Hirschmann, W. D. (1967) *diese Z.* **348**, 433–442.

²⁴ Schachtschabel, D. O. (1969) *Exp. Cell. Res.* **57**, 19–28.

²⁵ Weitzel, G., Buddecke, E., Schneider, F. & Pfeil, H. (1961) *diese Z.* **325**, 65–90.

²⁶ Kornberg, A. & Pricer, W. E. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 481–495.

kante Einbauhemmungen bewirken außer der freien Base (I) das Ribofuranosid (II) und das Desoxyribosid (IV). Einführung eines Chlors in 2-Stellung des Purins des Ribofuranosids II führt zu einer erheblichen Steigerung der Hemmeffekte (XII), wobei zu bemerken ist, daß die freie Base – das 2-Chlor-6-(4-*t*-butylimidazol-2-thio)purin – bereits in einer Konzentration von $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ nach 30 min zu einer völligen Blockierung der Nucleinsäure- und Proteinsynthese führt^[27]. Man erkennt ferner, daß die Einführung einer Aminogruppe in 2-Stellung (XV, XVI, XVII) bedeutend weniger effektiv ist als die eines Chlors. In Hinblick auf die Substituenten am Imidazolrest zeigt sich für die in 2-Stellung des Purins mit Cl substituierten Derivate folgende Wirkungsabstufung: Phenyl (XIV) > *t*-Butyl (XII) > 4,5-Dimethyl (XIII).

Zellwachstum

Untersuchungen über den Einfluß der in Tab. 1 aufgeführten Verbindungen auf das Zellwachstum von Ascites-Zellen in Monolayer-Kulturen^[24] sowie im Carcinolysetest^[25] zeigten, daß das Wachstum des Mäuse-Ascites-Carcinoms durch eine Auswahl dieser Verbindungen (XII, XV, XVI, XVII) nicht signifikant beeinflußt wird, dagegen konnte an Zellen in Monolayer-Kulturen mit einigen Verbindungen Wachstumshemmungen beobachtet werden. So wurde mit Verbindung XII bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ nach 21 h Inkubation ein Abfall der Proteinmenge in der Kultur auf 70% des Ausgangswertes beobachtet (infolge Wachstumshemmung und Absterben der Zellen; die toten Zellen werden vor der Proteinbestimmung abgetrennt), während in der Kontrolle der Wert auf 280% anstieg. Mit Verbindung IV sank die Proteinkonzentration nach 25 h auf 75% des Ausgangswertes. Die gleichzeitig über längere Zeiträume gemessenen Einbauparameter bestätigten die Ergebnisse der Kurzzeitversuche in dem Sinne, daß der Uridin-Einbau in allen untersuchten Fällen am stärksten gesenkt wurde.

Enzymatische Untersuchungen

Adenosin-Kinase: Durch das Enzym Adenosin-Kinase wird nur das Ribosid (II) zum Nucleotid phosphoryliert. Alle übrigen Verbindungen werden nicht umgesetzt.

²⁷ Niebch, G. (1971) Dissertat. Univ. Tübingen.

Unsere Experimente mit Xanthin-Oxidase führten zu folgenden Ergebnissen: Keine der in Tab. 1 aufgeführten Verbindungen wird von der Xanthin-Oxidase als Substrat verwendet. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß auch die Basen von diesem Enzym nicht umgesetzt werden. Dagegen zeigte sich, daß alle geprüften Thioäther-Nucleoside die Xanthin-Oxidase mehr oder weniger stark hemmen. Die für eine 50proz. Hemmung erforderlichen Konzentrationen von Inhibitor sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Tab. 8. Konzentration von Thioäther-Nucleosiden für eine 50proz. Hemmung der Xanthin-Oxidase.

Inhibitor	Konzentration f. 50% Hemmung [Mol/l]	Inhibitor	Konzentration f. 50% Hemmung [Mol/l]
Verb. I	$2,1 \times 10^{-4}$	Verb. VII	$2,9 \times 10^{-4}$
Verb. II	$6,0 \times 10^{-4}$	Verb. VIII	$4,9 \times 10^{-4}$
Verb. III	$3,2 \times 10^{-4}$	Verb. IX	$4,8 \times 10^{-4}$
Verb. IV	$3,6 \times 10^{-4}$	Verb. X	$3,4 \times 10^{-4}$
Verb. V	$3,3 \times 10^{-4}$	Verb. XI	$3,4 \times 10^{-4}$
Verb. VI	$5,0 \times 10^{-4}$	Imurek ^[28]	$2,4 \times 10^{-4}$

Aus dem Dixon-Diagramm (nicht gezeigt) geht hervor, daß die gefundene Hemmung weder kompetitiv noch nicht-kompetitiv ist^[29]. Außerdem ist aus Tab. 8 zu entnehmen, daß der zuckerfreie Thioäther (I) am stärksten hemmt, bei den übrigen Verbindungen hemmt das Furanosid stets etwas stärker als das entsprechende Pyranosid. Im Hinblick auf den Mechanismus der Hemmung ist von Interesse, daß aus einem Differenzspektrum zu erkennen ist, daß während der Reaktion freies 4-*t*-Butyl-2-mercaptoimidazol entsteht und das Flavinspektrum verändert ist^[29].

Purin-Nucleosid-Phosphorylase aus Kalbsmilz katalysiert die Bildung des Ribosids aus 6-(4-*t*-Butylimidazol-2-thio)purin und Ribose-1-phosphat. Die Rückreaktion, d. h. die Bildung von freier Base und Ribose-1-phosphat aus dem Ribosid, konnte mit keiner der in Tab. 1 aufgeführten Verbindungen beobachtet werden; die Spaltung von Inosin wird durch keinen der untersuchten Thioäther gehemmt.

²⁸ Elion, G. B., Bieber, S., Hitchings, G. H. & Rundles, R. W. (1961) *Cancer Chemother. Rep.* 14, 93–98.

²⁹ Hopf, U. (1971) Dissertat. Univ. Tübingen.

Diskussion

Spaltung der Thioätherbindung in vivo

Die unter relativ milden Bedingungen verlaufende hydrolytische, aminolytische und thiololytische Spaltung der Thioäther legt die Frage nahe, ob in der Zelle eine solche Spaltung erfolgt und die biologischen Effekte auf die Spaltprodukte zurückzuführen sind. Von den möglichen Spaltungsreaktionen käme vor allem die Thiolyse in Frage. Alle bisher vorliegenden Untersuchungen sprechen jedoch gegen eine Freisetzung von 2-Mercaptoimidazolen. Die biologischen Effekte der 6-(Imidazol-2-thio)purin-Nucleoside sind also weder auf freigesetzte 2-Mercaptoimidazole noch auf die Bildung von 6-Mercaptopurinen zurückzuführen. Damit verhalten sich die hier untersuchten 6-(Imidazol-2-thio)purine anders als das von Elion u. a.^[28] beschriebene 6-(1-Methyl-4-nitroimidazol-5-thio)purin (Imurek), aus dem unter Einfluß von SH-Verbindungen 6-Mercaptopurine entstehen.

Wirkung der Nucleoside auf die DNA-, RNA- und Proteinsynthese

Die Einbauraten von [¹⁴C]Thymin, -Uridin und -Leucin in Ascites-Zellen unter Einwirkung der Nucleoside lassen erkennen, daß eine Hemmwirkung nur bei Nucleosiden mit physiologisch normalen Zuckern, d. h. Ribofuranosiden und Desoxyribofuranosiden, zu beobachten ist. Außerdem findet man, im Vergleich zu den freien Basen, eine leichte Verstärkung der Uridin-Einbauhemmung; die Spezifität der Effekte ist also gegenüber den freien Basen, die z. T. Thymin-, Uridin- und Leucin-Einbau in gleichem Maße erniedrigen, erhöht. Eine Ausnahme davon bilden die 2-Chlor-6-(imidazol-2-thio)purin-Nucleoside, die alle drei Parameter beeinflussen.

Da die DNA-abhängige RNA-Nucleotidyltransferase (Polymerase) aus Rattenleberzellkernen durch die Nucleoside nicht gehemmt wird^[29], bleibt die Frage nach dem Mechanismus der Uridin-Einbauhemmung zu stellen. Außer durch Hemmung der Polymerase kann die Einbauhemmung z. B. auch dadurch zustande kommen, daß die [¹⁴C]Uridinaufnahme aus dem Medium behindert wird und hauptsächlich zelleigenes Uridin für die RNA-Synthese verwendet wird. Dann spiegeln die erniedrigten Einbauraten keine echte Hemmung der RNA-Synthese wider, sondern Membraneffekte, was durch frühere Untersuchungen gestützt wird^[4].

Dabei wurde festgestellt, daß das Ribosid (II) in einer Konzentration von $8 \times 10^{-4} \text{M}$ die Permeation von [¹⁴C]Adenosin, -Desoxyadenosin, -Cytidin und -Uridin auf 50% der Kontrolle (ohne Inhibitor) senkt. Membraneffekte müssen daher auf jeden Fall zur Deutung der biochemischen Wirkungen der Verbindungen herangezogen werden.

Da der RNA-Umsatz etwa 50fach höher liegt als der Protein- und DNA-Umsatz, machen sich unter dem Einfluß von Membraneffekten Hemmungen des Uridin-Einbaus eher bemerkbar, als solche des Thymins und Leucins.

Durch Untersuchungen an Ascites-Zellen konnte ausgeschlossen werden, daß die Hemmung der Phosphorylierung von Adenosin, Desoxyadenosin und Uridin zu den entsprechenden Triphosphaten als möglicher intracellulärer Angriffspunkt der Verbindungen in Frage kommt^[4].

Wachstum und Vermehrung von Ascites-Zellen in Kultur und im Ascites-Carcinom der Maus wurden durch die Verbindungen uneinheitlich, meist jedoch nur mäßig beeinflusst. Überraschend war der Befund, daß Verb. XII, die in vitro zu einer vollständigen Hemmung des Einbaus von Thymin, Uridin und Leucin führt, nahezu keine Wirkung am Ascites-Carcinom der Maus zeigte, während die Zellproliferation in Monolayer-Kulturen vollständig gehemmt wurde. Die Versuche am Ascites-Carcinom der Maus wurden als Carcinolysetest und als Therapieversuche durchgeführt. Offenbar verhindert ein bisher nicht bekannter Mechanismus (rasche Ausscheidung oder Bindung an Ascites-Serumproteine), daß die für eine Wachstumshemmung erforderliche Konzentration im Tier erreicht wird.

Enzymatische Untersuchungen

Von *Adenosin-Kinase* aus Hefe ist bekannt, daß sie Purinnucleosid-Analoga wie 2,6-Diaminopurinytribosid, 2-Chlorpurinytribosid und 2,8-Dichlorpurinytribosid umsetzt^[26], das Enzym aus Tumorzellen verwertet auch 6-Methylmercaptapurinytribosid und Nucleoside mit atypischen Zuckern, wie Adenin-D-xylofuranosid und Adenin-D-arabinofuranosid als Substrate^[6]. Für das Hefeenzym sind keine Substrate oder Inhibitoren mit atypischen Zuckern bekannt. Aus unseren Versuchen geht hervor, daß der relativ große 4-*t*-Butylimidazol-Rest am Purinring vom Enzym toleriert wird (Verb. II), eine Veränderung am Zucker jedoch

nicht, da die Verbindungen III – XI nicht phosphoryliert werden.

Purin-Nucleosid-Phosphorylase aus Leber, Erythrozyten oder Ascites-Zellen verwertet außer den natürlichen Substraten auch atypische Purine wie z. B. 6-Methylmercaptapurin, 8-Azaguanin, 6-Mercaptopurin und 2,6-Diaminopurin^[30]. Als Zuckerkomponenten werden nur D-Ribofuranose-1-phosphat und D-2-Desoxyribofuranose-1-phosphat umgesetzt. Das Gleichgewicht der durch das Enzym katalysierten Reaktion liegt auf Seiten des Nucleosids. Das erklärt 1. daß aus dem Thioäther (I) und Ribose-1-phosphat das Ribosid (II) gebildet wird und 2. daß eine Spaltung von Verb. II zu Thioäther und Ribose-1-phosphat wegen der die Synthese begünstigenden Gleichgewichtslage dünn-schichtchromatographisch nicht nachgewiesen werden konnte.

Die relativ starke Hemmung der *Xanthin-Oxidase* durch alle geprüften Nucleoside ist von der Art des Zuckers praktisch unabhängig. Die Beobachtung, daß die Aktivität des Enzyms über einen breiten Konzentrationsbereich nahezu linear mit zunehmender Inhibitorkonzentration abnimmt, spricht dafür, daß die Thioäther unter Spaltung mit dem Protein eine kovalente Bindung eingehen und dadurch das Enzym irreversibel blockieren. Es ist bekannt, daß im aktiven Zentrum des Enzyms zwei

SH-Gruppen vorkommen, die in der durch Substrat reduzierten Form mit *p*-Chlormercuribenzoat und Jodacetamid unter Inaktivierung reagieren^[31]. Auch Purin-Analoga hemmen das Enzym. Unter Berücksichtigung dieser Befunde nehmen wir an, daß die Thioäther mit einer essentiellen SH-Gruppe des aktiven Zentrums unter thiolytischer Spaltung der Thioätherbindung und Freisetzung von 2-Mercaptoimidazol sowie Bildung der *S*-Purinyilverbindung des Enzyms reagieren.

Das Vorhandensein einer essentiellen SH-Gruppe im aktiven Zentrum genügt nicht für eine Hemmwirkung der Thioäther. Es muß eine Bindung des Inhibitors auf Grund der strukturellen Verwandtschaft mit dem Substrat möglich sein. Das ist bei der Xanthin-Oxidase der Fall: Im Hypoxanthin, Xanthin und dem Inhibitor ist der Purinring gemeinsames Strukturmerkmal. Der gebundene Inhibitor könnte dann eine essentielle SH-Gruppe des Enzyms in einer milden Purinylierungsreaktion blockieren.

Für ihre Mithilfe bei dieser Arbeit danken wir Herrn Prof. Dr. Schachtschabel (Marburg), Herrn Dr. Jung, Dr. Jackisch und Frau Dr. Fretzdorff, Tübingen. Die Arbeit wurde dankenswerterweise aus Mitteln des Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

³⁰ Tarr, H. L. A. (1967) *Methods Enzymol.* 12A, 113 – 118.

³¹ Bray, R. C. (1966) in *Flavins and Flavoproteins*, Proc. of a Sympos. held in Amsterdam 1965 (Slater, E.C. ed.) B.B.A. Library, Bd. 8, S. 117, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam.