

$C_{17}H_{15}NO_3S_2$ (345,4)

Ber.: C 59,09; H 4,38; N 4,06; S 18,59.

Gef.: C 58,96; H 4,37; N 3,59; S 18,74.

3-Benzolsulfonyl-4,5-diphenyl-Δ4-1,3-oxazolin-2-thion (13e)

Aus 1,99 g (10 m Mol) N-Benzolsulfonyl-isothiocyanat und 3,34 g (10 m Mol) 2,2,2-Trimethoxy-4,5-diphenyl-2,2-dihydro-1,3,2-dioxaphospholen analog 13c. Schmp. 190° (aus Essigester/Ligroin). Ausb. 2,55 (65 % d. Th.)

$C_{21}H_{15}NO_3S_2$ (393,5)

Ber.: C 64,09; H 3,85; N 3,56; S 16,29.

Gef.: C 63,74; H 3,94; N 3,80; S 15,45.

3-p-Toluolsulfonyl-4,5-diphenyl-Δ4-1,3-oxazolin-2-thion (13f)

Aus 2,13 g (10 m Mol) N-p-Toluolsulfonyl-isothiocyanat und 3,34 g (10 m Mol) 2,2,2-Trimethoxy-4,5-diphenyl-2,2-dihydro-1,3,2-dioxaphospholen analog 13c. Schmp. 199° (aus Acetonitril). Ausb. 2,71 g (66 % d. Th.)

$C_{22}H_{17}NO_3S_2$ (408,4)

Ber.: C 64,77; H 4,20; N 3,43; S 15,64.

Gef.: C 64,80; H 4,58; N 3,84; S 15,44.

Anschrift: Prof. Dr. Richard Neidlein, 69 Heidelberg, Im Neuenheimer Feld, Tiergartenstr. Bau 364

[Ph 325]

D. Werner und H. Hoffmann

Puryl-6-ammonium- und -imonium-Derivate und ihre Substratfähigkeit für Xanthinoxidase

Aus dem Institut für Zellforschung am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (Eingegangen am 6. Juni 1973)

N-Dimethyl-β-amino-äthanol, Chinuclidin-3-ol und N-Methylpiperidin lassen sich mit 6-Chlorpurin (1) zu den quartären Ammoniumsalzen 2, 3 bzw. 4 und Pyridin, 3-Hydroxy-pyridin, 3-Amino-pyridin, Nicotinamid und 1-(2- bzw. 3-Pyridyl)-2-(3- bzw. 4-pyridyl)-äthylen zu den Imoniumsalzen 5, 6, 7, 8, 14 bzw. 15 umsetzen.

4-Hydroxy- und 4-Aminopyridin ergeben die tertiären Amine 9 bzw. 10 und 3- und 4-Picolylamin sowie 2-Pyridyl-β-äthylamin reagieren mit 1 zu den sekundären Aminen 11, 12 bzw. 13.

Die quartären Ammoniumsalze 2, 3 bzw. 4 sind im Gegensatz zu den dargestellten quartären Imoniumderivaten 5, 6, 7, 8, 14 bzw. 15 und den sekundären Aminen 11, 12 bzw. 13 keine Substrate für Xanthinoxidase.

Puryl-6-ammonium- and -imonium-Derivatives as Substrates for Xanthine Oxidase

N-Dimethyl-β-amino-ethanol, chinuclidine-3-ol and N-methylpiperidine react with 6-chloropurine (1) to yield the ammonium salts 2, 3 and 4. With pyridine, 3-hydroxy-pyridine, 3-amino-pyri-

dine, nicotinic acid amide and 1-(2-or 3-pyridyl)-2-(3- or 4-pyridyl)-ethylene as reactants one obtains the imonium salts 5, 6, 7, 8, 14 and 15.

6-Chloro-purine reacts with 4-hydroxy- and 4-amino-pyridine to form the tertiary amines 9 and 10 and with 3- and 4-picolyamine and 2-pyridyl- β -ethylamine to the secondary amines 11, 12 and 13.

In contrast to the imonium salts 5, 6, 7, 8, 14 and 15 the quarternary ammonium salts cannot serve as substrates for xanthine oxidase. The secondary amines 11, 12 and 13 serve as substrates as expected.

Unsere Untersuchungen über den enzymatischen Abbau cytotoxischer Puryl-6-Derivate haben ergeben, daß letztere Substrate für Xanthinoxidase sind¹⁾²⁾³⁾. Eine Ausnahme hiervon bildet das Puryl-6-trimethyl-ammonium-chlorid⁴⁾, das zwar an Zellen in der Gewebekultur cytotoxische Eigenschaften zeigt, jedoch kein Substrat für Xanthinoxidase ist. Zur Klärung der Frage, ob Purinderivate dieses Typs grundsätzlich nicht als Substrate für dieses Enzym dienen können, haben wir die Darstellung einer Reihe ähnlicher Verbindungen versucht.

Ammoniumderivate

Puryl-6-trimethyl-ammonium-chlorid ist durch einfache Umsetzung von Trimethylamin mit 6-Chlorpurin (1) zugänglich⁴⁾. Das Äthyl-Homologe ist dagegen aus sterischen Gründen nicht darstellbar. Wir versuchten deshalb, ob 6-Chlorpurin noch solche tertiären Amine zu alkylieren vermag, deren Raumerfüllung zwischen Trimethyl- und Triäthylamin liegen.

Zunächst konnten wir durch Umsetzen von 1 mit N-Dimethyl- β -amino-äthanol in n-Butanol das erwartete Puryl-6-N-dimethyl- β -äthanolium-chlorid 2 erhalten. Ebenso reagierten Chinuclidin-3-ol zum Puryl-6-chinuclidin-3-olium-chlorid 3 und N-Methylpiperidin zum Puryl-6-N-methyl-piperidinium-chlorid 4. Die Quaternisierung von Dimethylanilin war dagegen aus den dargelegten sterischen Gründen nicht mehr möglich.

Imoniumderivate

Pyridin reagiert mit 2,6,8-Tri-chlor-purin je nach Bedingungen zu 6-Pyridinium-2,8-dichlor-purin-betain bzw. zu 6,8-Dipyridinium-2-chlor-purin-betain-chlorid⁵⁾. Ausschließlich an 6-substituierten Derivaten interessiert, erhielten wir durch Umsatz von 1 mit Pyridin Puryl-6-pyridinium-chlorid 5. Da 5 eine Wirkung an Zellen in der Ge-

1 D. Werner und N.K. Kapoor, *Naturwissenschaften* 53, 308 (1966).

2 D. Werner und N.K. Kapoor, *Naturwissenschaften* 53, 407 (1966).

3 H. Lettré, N.K. Kapoor und D. Werner, *J. biochem. Pharmacol.* 16, 1747 (1967).

4 J.P. Horwitz und V.K. Vaitkevicius, *Experientia* 17, 552 (1961).

5 H. Brederick, O. Christmann, D. Grandums und W. Koser, *Angew. Chem.* 72, 708 (1960).

webekultur zeigte, wurde dieses Imoniumsalz und ähnliche Derivate in die Untersuchungen mit einbezogen.

3-Substituierte Pyridinderivate ($R = -OH, -NH_2$) verhalten sich bei der Umsetzung mit **1** ebenso wie Pyridin selbst. So wird mit 3-Hydroxy-pyridin das Puryl-6-(3-hydroxy-pyridinium)-chlorid (**6**), mit 3-Aminopyridin das Puryl-6-(3-amino-pyridinium)-chlorid (**7**) und mit Nicotinsäureamid das Puryl-6-(3-carboxamido-pyridinium)-chlorid (**8**) gebildet.

4-Substituierte Pyridinderivate ($R = -OH, -NH_2$) zeigen bei der Umsetzung mit **1** dagegen eine Besonderheit: Die Produkte sind halogenfrei und haben keine Salzstruktur. Aufgrund des IR-Spektrums konnte zwischen den beiden möglichen Strukturen (Betain **16a** bzw. Pyridon **16b**-Struktur) unterschieden werden. Die Verbindung **9** zeigt eine für konjugierte Carbonylgruppen typische (geschulterte) Bande bei $\nu = 1640 \text{ cm}^{-1}$ während diese Bande bei Verbindung **6** fehlt. Im festen Zustand liegen die beiden Verbindungen **9** bzw. **10** demnach in Form der tertiären Amine **16b** vor. Beide Verbindungen sind jedoch Substrate für Xanthinoxidase (vergl. unten). Da alle bisher untersuchten Puryl-6-Derivate von tertiären Aminen keine Substrate waren¹⁾ ist anzunehmen, daß in wässriger Lösung ein Gleichgewicht zwischen den beiden möglichen Formen **16a** bzw. **16b** vorliegt.

3- und 4-Picolylamin reagieren mit **1** unter Alkylierung der primären Aminogruppen zum Puryl-6-(3-picolylamin) (**11**) und zum Puryl-6-(4-picolylamin) (**12**). Eine Reaktion am Pyridin-Stickstoff findet nicht statt.

2-Alkylsubstituierte Pyridine können aus sterischen Gründen nicht mehr mit **1** reagieren. So wird beim Umsatz mit 2,4,6-Trimethyl-pyridin bzw. Chinolin kein Reaktionsprodukt erhalten. 2-Pyridyl- β -äthylamin wird an der primären Aminogruppe der Seitenkette zum Puryl-6-(2-pyridyl- β -äthylamin) (**13**) alkyliert.

Die Möglichkeit der Bildung von 3- und 4-purylsubstituierten Pyridinen und die Unmöglichkeit der Reaktion von 2-alkylsubstituierten Pyridinen mit **1** konnte ferner durch Umsatz von **1** mit 1-Pyridyl-2-pyridyl-äthylen demonstriert werden. Das 1-(2-Pyridyl)-2-(3-pyridyl)-äthylen reagiert nur mit einem Mol **1** zum Puryl-6-[1-(2-pyridyl)-2-(3-pyridinium)-äthylen]-chlorid (**14**), das 1-(3-Pyridyl)-2-(4-pyridyl)-äthylen hingegen kann mit zwei Mol **1** zum Bis-puryl-6-[1-(3-pyridinium)-2-(4-pyridinium)-äthylen]-dichlorid (**15**) umgesetzt werden.

Substratfähigkeit für Xanthinoxidase

Die Substratfähigkeit der dargestellten Substanzen gegenüber Xanthinoxidase wurde spektrophotometrisch nach der Methode von Kalckar⁶⁾ bestimmt. Die spektralen Änderungen, die sich bei der enzymatischen Oxidation der Substrate ergeben, sind in der Tabelle zusammengefaßt.

6 H. Kalckar, J. biol. Chemistry 167, 429 (1947).

Spektrale Änderungen bei der Inkubation der dargestellten Verbindungen mit Xanthinoxidase

Substanz	UV _{max.} pH 7,4	-ΔE	+ΔE
2	250	—	—
3	266	—	—
4	266	—	—
5	272/320	—	265/310
6	308	280	250/330
7	265/300/366	300	260/340
8	325/277	340	309/265
9	308	309	270
10	275/320	310	275
11	267	267	305
12	264	265	305
13	268	268	306
14	262/303	305	265
15	369/560	361	274

Die quartären Ammoniumsalze 2, 3 bzw. 4 sind demnach keine Substrate für Xanthinoxidase. Dagegen sind die Imoniumsalze 5, 6, 7, 8, 14 bzw. 15 sowie die beiden Derivate mit besonderer Struktur 9 bzw. 10 Substrate. Die sekundären Amine 11, 12 bzw. 13 sind wie erwartet¹⁾ ebenfalls Substrate für dieses Enzym.

Biologische Wirkung

Die dargestellten Substanzen wurden in der Gewebekultur hinsichtlich ihrer Wirkung auf verschiedene Zellstämme (Hühnerfibroblasten, HeLa, Hep II) nach früher beschriebenen Methoden⁷⁾ untersucht. Neben 13 zeigten insbesondere die Imoniumsalze 5, 14 bzw. 15 eine dosisabhängige, wachstumshemmende und cytotoxische Wirkung sowohl bei normalem als auch bei Tumorgewebe, während die dargestellten Ammoniumsalze keine Wirkung zeigten.

Neben morphologischen Veränderungen wie aufgelockertes Cytoplasma, Reduzierung der Plasmaausläufer, Granulierung des Cytoplasmas in der Umgebung der Kerne, Kernödem, vergrößerte Nukleolen, findet man bei 5, 14 bzw. 15 arretierte Metaphasen, die vergleichbar mit den durch Colchicin hervorgerufenen C-Mitosen sind. Letzteres ist insofern von Interesse als in der Purinreihe bisher keine Mitosegifte bekannt waren.

Die Ergebnisse bestätigen ferner die Annahme, daß ein Zusammenhang zwischen cytotoxischer Wirksamkeit von Puryl-6-Derivaten und der Substratfähigkeit gegen-

7 H. Lettré, *Angew. Chem.* 53, 363 (1940).

über Xanthinoxidase besteht⁸⁾. Einzige bekannte Ausnahme hiervon bleibt demnach Puryl-6-trimethyl-ammonium-chlorid.

Diese Arbeit wurde finanziell durch die Karl und Maria Biesinger-Stiftung unterstützt.

Beschreibung der Versuche

R_f Werte und Absorptionsmessungen

R_f-Werte wurden durch aufsteigende PC auf Schleicher & Schüll Papier 2043 b bestimmt. Fließmittel war n-Propanol/Wasser 75 : 25.

Absorptionsmessungen wurden mit einem Beckman DK 2-Spektrophotometer ausgeführt.

Xanthinoxidase-Test

Der Test wurde spektrophotometrisch in 1 cm Quarzküvetten bei Raumtemperatur durchgeführt. Xanthinoxidase war ein Produkt der Firma Boehringer/Mannheim. Die Vergleichsküvette enthielt 2 ml m/15 Natrium-Kalium-Phosphatpuffer vom pH 7,4, 0,3 ml bidestilliertes Wasser und 0,1 ml Enzymlösung (100 /μg Protein).

Die Versuchsküvette enthielt anstelle von Wasser 12 /μg Substrat in 0,3 ml bidestilliertem Wasser.

Darstellung der quartären Ammoniumsalze 2, 3 bzw. 4

0,0065 Mol I wurden jeweils mit 0,01 Mol der entsprechenden Base (tertiäres Amin) in 20 ml n-Butanol unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion (3–4 Std.) wurde das Lösungsmittel i.Vak. abgezogen. Der feste Rückstand wurde mehrmals umkristallisiert.

Puryl-6-N-dimethyl-β-amino-äthanolium-chlorid (2)

Umkristallisiert aus Äthanol/Aceton. Ausbeute: 59 %. Schmp. unter 310°. R_f 0,5, UV_{max} bei pH 7,4 250 nm.

C₉H₁₄N₅Cl (243,7) Ber.: C 44,36; H 5,83; N 29,16; Cl 14,59. Gef.: C 44,40; H 5,98; N 29,25; Cl 14,58.

Puryl-6-chinuclidin-3-olium-chlorid (3)

Umkristallisiert aus Äthanol. Ausbeute: 84 %. Schmp.: 185°. R_f 0,6. UV_{max} bei pH 7,4 266 nm.

C₁₂H₁₆N₅OCl (281,8) Ber.: C 51,15; H 5,72; N 24,86; Cl 12,58. Gef.: C 51,00; H 6,12; N 24,60; Cl 12,61.

Puryl-6-N-methyl-piperidinium-chlorid (4)

Umkristallisiert aus Äthanol/Aceton. Ausbeute: 54 %. Schmp.: 220°. R_f 0,6. UV_{max} bei pH 7,4 266 nm.

8 D. Werner, in: „Aktuelle Probleme aus dem Gebiet der Cancerologie II“, Herausgeber Lettré, Wagner, Springer-Verlag, Heidelberg 1968, S. 235,

$C_{11}H_{16}N_5Cl$ (253,7) Ber.: C 51,07; H 6,36; N 27,46; Cl 15,11. Gef.: C 50,90; H 6,23; N 27,39; Cl 15,41.

Darstellung der Imoniumverbindungen 5, 6, 7, 8, 14 bzw. 15 bzw. der tertiären Amine 9 bzw. 10
0,0065 Mol 1 und 0,01 Mol der entsprechenden Base wurden in n-Butanol 3 Std. unter Rückfluß gekocht. In Abständen von 30 Min. wurde vom ausgefallenen kristallinen Produkt abfiltriert und die gesammelten Niederschläge auf dem Filter mit Aceton gewaschen. Unter Zusatz von Aktivkohle wurde mehrmals umkristallisiert, bzw. umgefällt.

Puryl-6-pyridinium-chlorid (5)

Umkristallisiert aus Äthanol. Ausbeute: 86 %. Kein Schmp. unter 310°. R_f 0,55. UV_{max} . bei pH 7,4 272/320 nm.

$C_{10}H_8N_5Cl$ (234,7) Ber.: C 51,40; H 3,45; N 29,98; Cl 15,17. Gef.: C 51,49; H 3,48; N 29,48; Cl 15,56.

Puryl-6-(3-hydroxy-pyridinium)-chlorid (6)

Umkristallisiert aus Wasser/Aceton. Ausbeute: 98 %. Schmp. unter Zersetzung bei 253°. R_f 0,46. UV_{max} . pH 7,4 bei 308 nm.

$C_{10}H_8N_5OCl$ (249,7) Ber.: C 48,10; H 3,23; N 28,06; Cl 14,22. Gef.: C 48,45; H 3,42; N 28,13; Cl 14,02.

Puryl-6-(3-amino-pyridinium)-chlorid (7)

Die Umsetzung wurde in diesem Fall in Äthanol vorgenommen. Umkristallisiert aus Wasser/Aceton. Ausbeute: 38 %. Schmp.: 267°. R_f 0,50. UV_{max} . bei pH 7,4 265/300/366 nm.

$C_{10}H_9N_6Cl$ (248,7) Ber.: C 48,29; H 3,64; N 33,81; Cl 14,26. Gef.: C 48,37; H 3,79; N 33,48; Cl 14,23.

Puryl-6-(3-carboxamido-pyridinium)-chlorid (8)

Umkristallisiert aus Wasser/Aceton. Ausbeute: 80 %. Schmp.: 270°. R_f 0,33. UV_{max} . bei pH 7,4 325/277 nm.

$C_{11}H_9N_6Cl$ (276,7) Ber.: C 47,75; H 3,28; N 30,37; Cl 12,81. Gef.: C 47,46; H 3,31; N 29,98; Cl 12,74.

N-(Puryl-6)-pyridon-4 bzw. Puryl-6-(4-hydroxy-pyridinium)-betain (9)

Umkristallisiert aus Wasser. Ausbeute: 43 %. Schmp.: 312°. R_f 0,72. UV_{max} . bei pH 7,4 308 nm.

$C_{10}H_7N_5O$ (213,2) Ber.: C 56,33; H 3,31; N 32,86. Gef.: C 56,36; H 3,51; N 32,84.

N-(Puryl-6)-pyridimin-4 bzw. Puryl-6-(4-amino-pyridinium)-betain (10)

0,013 Mol 1 wurde mit 0,015 Mol 4-Amino-pyridin und 100 ml Äthanol im Einschlußrohr 3 Std. auf 85° erhitzt. Beim Abkühlen schieden sich Kristalle ab, die unter Zusatz von Aktivkohle umkristallisiert wurden. Schmp.: 305–310°. R_f 0,42. UV_{max} . bei pH 7,4 275/320 nm.

$C_{10}H_8N_6$ (212,2) Ber.: C 56,60; H 3,80; N 39,60. Gef.: C 56,35; H 4,00; N 39,76.

Puryl-6-[1-(2-pyridyl)-2-(3-pyridinium)-äthylen]-chlorid (14)

0,013 Mol 1 und 0,0065 Mol 1-(2-pyridyl)-2-(3-pyridyl)-äthylen wurden in 20 ml n-Butanol 4 Std. unter Rückfluß gekocht. Das ausgefallene feinkristalline Produkt wurde in Abständen von 30 Min. abfiltriert und mit Äther gewaschen. Umgefällt wurde aus Äthanol/Äther. Ausbeute: 55 %. Schmp.: 225°. R_f 0,57. UV_{max} bei pH 7,4 262/303 nm.

$C_{17}H_{15}N_6Cl$ (338,8) Ber.: C 60,27; H 4,46; N 24,81; Cl 10,46. Gef.: C 60,10; H 4,19; N 25,14; Cl 10,20.

Bispuryl-6-[1-(3-pyridinium)-2-(4-pyridinium)-äthylen]-dichlorid (15)

Es gilt die gleiche Vorschrift wie für das Produkt oben. Entsprechend wurde als Amin das 1-(3-Pyridyl)-2-(4-pyridyl)-äthylen eingesetzt. Es entsteht ein tiefrotes Produkt, das schwer zu reinigen ist. Kleine Mengen wurden durch Einengen einer Lösung in n-Butanol für die Analyse und zu Testzwecken gereinigt. Ausbeute (roh): 79 %. Schmp.: 200° (Zers.). R_f 0,50. UV_{max} bei pH 7,4 369 bzw. 560 nm.

$C_{22}H_{18}N_{10}Cl_2$ (493,3) Ber.: C 53,56; H 3,68; N 28,39; Cl 14,37. Gef.: C 53,30; H 4,03; N 28,18; Cl 13,16.

Puryl-6-picolyl-amine (11 bzw. 12)

0,013 Mol 1 wurden zusammen mit 0,026 Mol 3- bzw. 4-Picolylamin in 100 ml Äthanol bei 0° im Einschlußrohr eingeschmolzen. Die Mischung wurde 3 Wochen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die ausgefallenen Kristalle wurden nach Abkühlen auf 0° abfiltriert und aus Wasser umkristallisiert.

Puryl-6-(3-picolylamin) (11)

Ausbeute: 42 %. Schmp.: 250°. R_f 0,86. UV_{max} bei pH 7,4 267 nm.

$C_{11}H_{10}N_6$ (226,2) Ber.: C 58,39; H 4,45; N 37,16. Gef.: C 58,58; H 4,61; N 36,63.

Puryl-6-(4-picolylamin) (12)

Ausbeute: 43 %. Schmp.: 265°. R_f 0,80. UV_{max} bei pH 7,4 264 nm.

$C_{11}H_{10}N_6$ (226,2) Ber.: C 58,39; H 4,45; N 37,16. Gef.: C 58,75; H 4,47; N 37,29.

Puryl-6-(2-pyridyl- β -äthylamin) (13)

0,0065 Mol 1 und 0,013 Mol 2-Pyridyl- β -äthylamin wurden zusammen mit 20 ml n-Butanol 30 Min. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Beim Abkühlen schieden sich Kristalle ab, die abgesaugt und aus Wasser umkristallisiert wurden. Ausbeute: 74 %. Schmp.: 235°. R_f 0,84. UV_{max} bei pH 7,4 268 nm.

$C_{12}H_{12}N_6$ (240,3) Ber.: C 59,98; H 5,04; N 34,98. Gef.: C 59,96; H 5,21; N 35,05.