

Nucleoside und Nucleotide als mögliche Therapeutika

Von T. Y. Shen^[*]

In diesem Aufsatz werden Fortschritte bei Untersuchungen von Nucleosid-Derivaten als antivirale und immunsuppressive Substanzen besprochen. Einige 5'-substituierte 5'-Desoxy-nucleoside erwiesen sich als permeable und nicht inkorporierbare Antimetaboliten von 5'-Nucleotiden. N⁶-Isopentenyl-adenosin und Analoga zeigten vielversprechende immunsuppressive Wirkungen. Da Oligonucleotide bekanntlich die Bildung von Antikörpern stimulieren, arbeiteten wir eine bequeme Synthese für diese Verbindungen unter Verwendung geschützter phosphorylierter Zwischenprodukte aus. Für biologische und physikalische Untersuchungen wurden mehrere Tetradesoxy-ribonucleotide (dApdApd-ApdX) dargestellt. Nucleotid-Derivate lassen sich möglicherweise bei manchen immunologischen Störungen als Heilmittel verwenden.

1. Einführung

Im folgenden werden neuere Untersuchungen von Nucleosiden und Nucleotiden auf dem Gebiet der Chemotherapie und Immunologie zusammengefaßt. Es ist die Absicht dieses Aufsatzes, einige Ziele biomedizinischer Forschung herauszustellen und die therapeutischen Möglichkeiten zu erörtern, die Nucleoside und Nucleotide bieten könnten^[1]. Die eingehende chemische und biologische Untersuchung von Nucleosiden und einigen Nucleotid-Analoga wurde in den letzten fünfzehn Jahren hauptsächlich durch deren Antitumor- und antibiotische Eigenschaften angeregt. Oft können die cytotoxischen oder bakteriziden Wirkungen dieser Antimetaboliten auf die Hemmung von Enzymsystemen bei der Biosynthese von Nucleinsäuren, z.B. der Nucleotid-Reduktasen, -Kinasen und -Polymerasen, oder auf die Bildung fehlerhafter Nucleinsäuren durch Inkorporation dieser falschen Bausteine zurückgeführt werden^[2]. Nucleosid-Antibiotika wie Puromycin, Blastocidin und Gugerotin hemmen die Proteinsynthese durch Kettenabbruch oder durch Störung der normalen Funktionen der Peptid-Synthetase oder der Ribosomen^[3]. Da diese aber für die Biosynthese von Proteinen und Nucleinsäuren in normalen Zellen unentbehrlich sind, wird der therapeutische Wert von Nucleosid-Antimetaboliten häufig durch ihre potentielle Toxizität verringert.

Ein besserer therapeutischer Index ist bei Verwendung der Nucleosid-Analoga zur Viruschemotherapie^[4]

oder bei Stoffwechselkrankheiten besonders dringend erwünscht. Um nützlich zu sein, darf eine derartige Verbindung praktisch nicht in normale Zellen eingebaut werden (das bedeutet das Fehlen mutagener Effekte) und muß einen hohen Grad an selektiver Toxizität besitzen.

2. Inhibitoren von DNA-Viren

2.1. 2'-Desoxyribo- und Arabinonucleosid-Analoga

Die Möglichkeit der klinischen Anwendung eines Nucleosids als Antivirusmittel mit angemessenem therapeutischem Index wurde erstmals an einem bekannten Thymidin-Analogen, 5-Jod-2'-desoxyuridin (1) (Idoxuridin), bei der Behandlung einer Augeninfektion (Herpes keratitis) gezeigt^[5]. Daß sich diese Verbindung offenbar ohne Risiko verwenden läßt, beruht auf der physiologisch einzigartigen Erscheinung, daß Augeninfektionen lokal ablaufen und in-vitro-Systemen nicht unähnlich sind. Seitdem erwiesen sich Inhibitoren der DNA-Synthese oder Thymidin-Antimetaboliten wie Trifluorthymidin (2)^[6], Cytosin-arabinosid (Cytarabin) (3)^[7] und sein 5-Fluor-Analogen (4)^[8] als ähnlich wirksam. Auch ein Homologes des Thymidins, 5-Äthyl-2'-desoxyuridin (5a), zeigte bei einigen Untersuchungen^[8a] Antiherpes-Wirkung.

Wir beschäftigten uns mit einem anderen Analogon, 5-Methylamino-2'-desoxyuridin (MADU) (5)^[9]. Wie schon Visser et al. gefunden hatten, ist es als Thymidin-

[*] Dr. T. Y. Shen
Merck Sharp and Dohme Research Laboratories
Rahway, New Jersey 07065 (USA)

[1] Nach Vorträgen beim Symposium on Recent Advances in Nucleoside Chemistry. 156. American Chemical Society Meeting, Atlantic City, New Jersey, 11. Sept. 1968, und bei der Gordon Conference on Carbohydrate Chemistry, New Hampshire, Juni 1969.

[2] J. A. Montgomery, Progr. Drug Res. 8, 431 (1965).

[3] R. E. Monro u. K. A. Marcker, J. Molecular Biol. 25, 347 (1967); M. Yukioka u. S. Morisawa, J. Biochemistry (Japan) 66, 241 (1969).

[4] Zusammenfassung s.: Antiviral Substances. Ann. New York Acad. Sci. 130, (1965); W. H. Prusoff, Pharmacol. Rev. 19, 209 (1967).

[5] H. E. Kaufman, E. L. Martola u. C. Dohlman, Arch. Ophthalmol. 68, 235 (1962).

[6] H. E. Kaufman u. C. Heidelberger, Science (Washington) 145, 585 (1964); R. A. Hyndiuk u. H. E. Kaufman, Invest. Ophthalmol. 5, 424 (1966).

[7] D. A. Buthala, Proc. Soc. exp. Med. 69, 115 (1964).

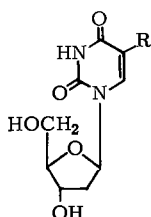
[8] R. Duschinsky, T. Gabriel, M. Hoffner, J. Berger, E. Tittsworth, E. Grunberg, J. H. Burchenal u. J. J. Fox, J. med. Chem. 9, 566 (1966); T. Y. Shen u. W. V. Ruyle, US-Pat. 3 328 388, und unveröffentlichte Ergebnisse.

[8a] K. K. Gauri, G. Malorny u. W. Schiff, Chemotherapy 14, 129 (1969), und dort zitierte Literatur.

[9] T. Y. Shen, J. F. McPherson u. B. O. Linn, J. med. Chem. 9, 366 (1966).

Antagonist in bakteriellen Systemen nur schwach aktiv^[10], wirkt überraschenderweise aber in Zellkulturen und Kaninchenaugen-Systemen gegen Herpes simplex so stark wie Idoxuridin (1)^[11]. Wie selektiv die Toxizität gegenüber Herpes-Viren ist, wird auch dadurch unterstrichen, daß MADU das Wachstum anderer DNA- und RNA-Viren nicht beeinträchtigt. Es ist angenommen worden, daß phosphorylierte MADU-Derivate die Verwendung von Thymidin-5'-triphosphat für die DNA-Synthese blockieren. Die Selektivität von MADU beruht demnach auf einer erhöhten Phosphorylierungsfähigkeit der infizierten Zellen^[12]. Leider enttäuschte die Wirkung von MADU gegen systemische Herpes-Infektionen.

Der Aktivität von Nucleosiden in vivo sind oft durch ihre ungünstige Verteilung oder ihre ungünstigen Stoffwechseleigenschaften Grenzen gesetzt^[13]. So ist in vivo die immunsuppressive Wirkung von 5'-Adamantoyl-cytarabin (6) stärker und hält länger an als die des zugrundeliegenden Nucleosids (3)^[14]. Als Erklärung wurden selektive Verteilung, erschwerte Hydrolyse und Resistenz gegen enzymatischen Abbau vorgeschlagen. Aus diesem Beispiel könnte man schließen, daß sich auch bei anderen Nucleosid-Analoga der potentielle Anwendungsbereich erweitern ließe, wenn man sie als in vivo spaltbare Derivate verwendete. Diese Technik ist bei anderen Arzneimitteln gut untersucht.

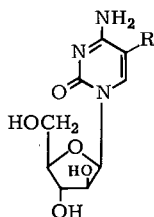


(1), R = J (Idoxuridin)

(2), R = CF₃

(5), R = NHCH₃

(5a), R = C₂H₅

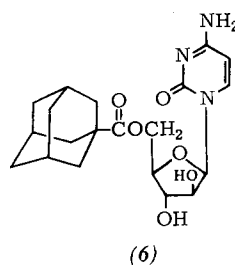


(3), R = H (Cytarabin)

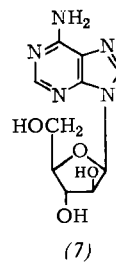
(4), R = F

Vor kurzem wurde ein Purin-Nucleosid, Adenin-arabinsid (7)^[15], als in vitro und in vivo wirksames Breitbandmittel gegen DNA-Viren beschrieben^[16]. Wahrscheinlich ist es dem Idoxuridin bei der Behandlung von Herpes keratitis überlegen; seine Brauchbarkeit bei systemischen Virusinfektionen muß noch überprüft werden. Auch im Hinblick auf die kürzlich bewiesene Beteiligung von Herpes-Viren bei infektiöser

Mononucleose, Burkitts Lymphom^[17] und cervicalen Carcinomen^[18] wäre eine sichere und stärker wirksame Verbindung äußerst wünschenswert.



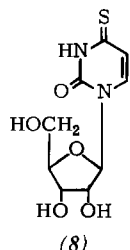
(6)



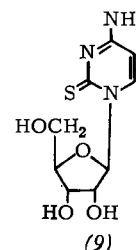
(7)

2.2. Suche nach neuen Strukturen

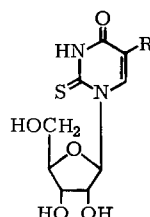
Die mögliche Rolle der löslichen RNA als Regulator des Nucleinsäurestoffwechsels ist oft diskutiert worden^[19]. Besonders interessiert die Bedeutung seltener oder anomaler Nucleotide in der tRNA. Uns fiel bei unseren Untersuchungen über Pyrimidin-Nucleoside als neue Antimetaboliten auf, daß einige Thiopyrimidin-Nucleoside, z.B. 4-Thiouridin (8)^[20], 2-Thiocytidin (9) sowie 5-substituierte Derivate (10)^[21] und (11)^[22] auch in der tRNA vorkommen können. Es sind auch Änderungen beim Einbau von ³⁵S in die tRNA nach Phageninfektion beobachtet worden^[23].



(8)



(9)



(10), R = CH₂NHCH₃

(11), R = CH₂CO₂CH₃

2-Thiocytosin-arabinsid (12), das wir durch Ringöffnung eines Cyclonucleosids synthetisierten^[24],

[10] D. W. Visser, S. Kabat u. M. Lieb, Biochim. biophysica Acta 76, 463 (1963); S. Kabat u. D. W. Visser, ibid. 80, 680 (1964).

[11] M. M. Nemes u. M. R. Hilleman, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 119, 515 (1965).

[12] R. W. Burg u. M. M. Nemes, Federat. Meetings Abstract (1970).

[13] K. Gerzon u. D. Kau, J. med. Chem. 10, 189 (1967).

[14] G. D. Gray, M. M. Mickelson u. J. A. Crim, Biochem. Pharmacol. 18, 2163 (1969).

[15] W. W. Lee, A. Benitez, L. Goodman u. B. R. Baker, J. Amer. chem. Soc. 82, 2648 (1960).

[16] F. M. Schabel, Chemotherapy 13, 321 (1968).

[17] G. Henle, W. Henle u. V. Diehl, Proc. nat. Acad. Sci. USA 59, 94 (1968); L. N. Chessim, P. R. Glade, J. A. Kasel, H. L. Moses, R. B. Heberman u. Y. Hirschaut, Ann. intern. Med. 69, 333 (1968).

[18] W. E. Rawls, W. A. F. Tompkins, M. E. Figueroa u. J. L. Melnick, Science (Washington) 161, 1256 (1968).

[19] M. J. Robins, R. H. Hall u. R. Thedford, Biochemistry 6, 1837 (1967).

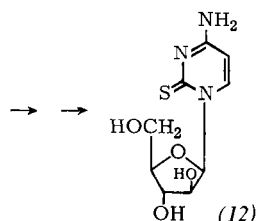
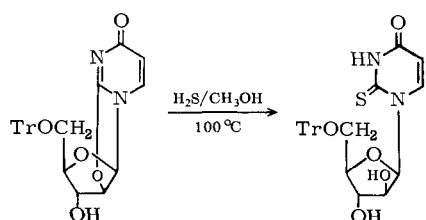
[20] M. N. Lipsett, J. biol. Chemistry 240, 3975 (1965).

[21] J. Carbon, H. David u. M. H. Studier, Science (Washington) 161, 1146 (1968).

[22] L. Baczynsky, K. Biemann u. R. H. Hall, Science (Washington) 159, 1481 (1968); L. Baczynsky, K. Biemann, M. H. Fleysher u. R. H. Hall, Canad. J. Biochem. 47, 1202 (1969).

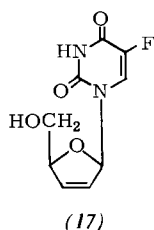
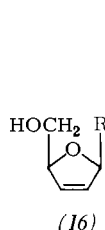
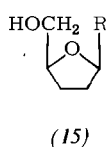
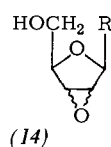
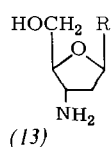
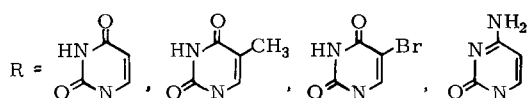
[23] S. B. Weiss, Wen Tah Shu, J. W. Foft u. N. H. Scherberg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 61, 114 (1968).

[24] W. V. Ruyle u. T. Y. Shen, J. med. Chem. 10, 331 (1967).



hatte leider keine nennenswerten antiviralen Eigenschaften.

Zur Zeit scheint es, daß vornehmlich Pyrimidin-Analoga mit 2'-Desoxy-D-ribose- und D-Arabinose-Gruppen gegen DNA-Viren wirksam sind. Mehrere Verbindungen, in denen eine Pyrimidin-Base wie Uracil, Thymin, 5-Bromuracil und Cytosin mit einer modifizierten Pentofuranose wie 3-Amino-2,3-didesoxy-ribose (13), 2,3-Anhydridoribose (14), 2,3-Didesoxy-ribose (15) oder dem 2,2-Didehydro-Analogon (16) und einigen Hexopyranosen verknüpft ist, sind inaktiv [25]. Kürzlich stellte sich heraus, daß das 2',3'-Didehydro-Analogon des 5-Fluoruridins ein Antitumor-Agens ist [26]; Informationen über seine antivirale Aktivität stehen noch aus.



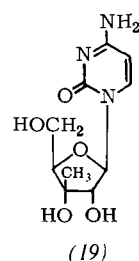
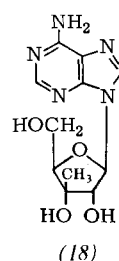
Vor kurzem sind Nucleoside mit verzweigten Ketten synthetisiert worden, z.B. 2'-C-Methyl- und 3'-C-Methylhomologe des Adenosins und Cytidins [27, 28].

[25] Unveröffentlichte Ergebnisse aus unserem Laboratorium.
[26] T. A. Khwaja u. C. Heidelberger, J. med. Chem. 10, 1066 (1967).

[27] E. Walton, S. R. Jenkins, R. F. Nutt, M. Zimmerman u. F. W. Holly, J. Amer. chem. Soc. 88, 4524 (1966).

[28] E. Walton, F. W. Holly, S. R. Jenkins, R. F. Nutt u. M. M. Nemes, J. med. Chem. 12, 306 (1969).

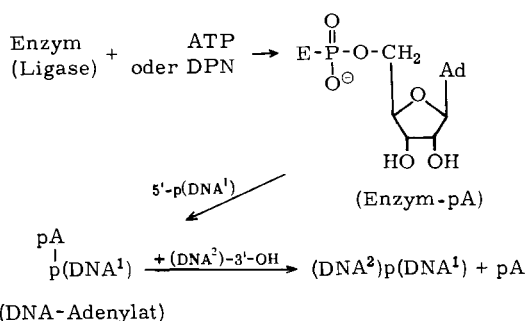
Sowohl 3'-C-Methyladenosin (18) als auch 3'-C-Methylcytidin (19) sind sehr viel weniger toxisch gegenüber Zellkulturen als 3'-Desoxy-adenosin (Cordycepin) [29]. Die Verbindungen (18) und (19) zeigten jedoch in Dosen von 1–2 mg bei Mäusen eine interessante Aktivität gegen Vaccinia-Infektion und waren dem Standardmittel Marboran überlegen. Die entsprechenden 2'-C-Methyl-derivate waren sehr viel weniger aktiv [28].



3. Suche nach Inhibitoren von RNA-Viren

3.1. Zur Struktur der RNA-Polymerase

Auf der Suche nach Mitteln gegen RNA-Viren befaßten wir uns zunächst mit der außergewöhnlichen Synthese viraler RNA, an der eine einsträngige RNA-Matrize, ein doppelsträngiges replikatives Zwischenprodukt und eine virusspezifische Polymerase beteiligt sind. Über die komplizierte virale Replikation gibt es viele Spekulationen und viele Hypothesen [30]. Möglicherweise können neue reversible und irreversible Inhibitoren, die sich von Nucleosiden ableiten, zusätzlich zu ihrer therapeutischen Aufgabe auch als Sonden für das aktive Zentrum der Polymerase dienen und dabei helfen, ihre Wirkungsweise aufzuklären. Noch nicht abgeschlossene Untersuchungen an der RNA-Polymerase deuten darauf hin, daß das eintretende Nucleosidtriphosphat möglicherweise zuerst mit dem aktiven Zentrum derart in Wechselwirkung tritt, daß ein reaktives Nucleosid-5'-phosphoryl-Enzym-Zwischenprodukt gebildet wird, welches dann an der Kupplung mit der 3'-Hydroxygruppe des wachsenden Polymeren beteiligt ist. Eine ähnliche Aneinanderfolge der Reaktionsschritte beobachtet man bei Reaktionen, die von der Polynucleotid-Ligase [31] kataly-



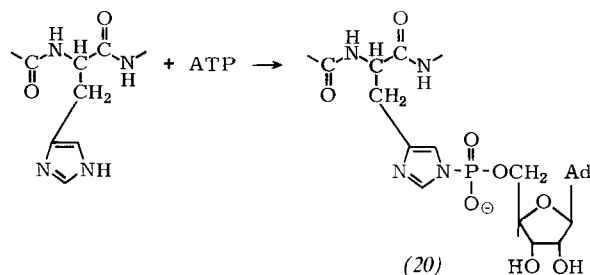
[29] H. T. Shigeura, unveröffentlichte Beobachtungen.

[30] Nature (London) 219, 675 (1968).

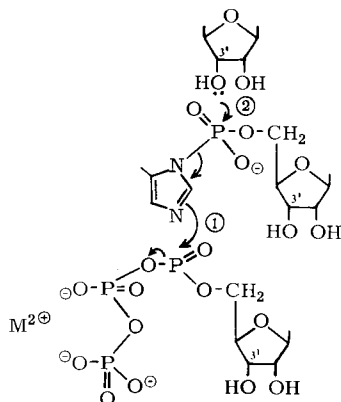
[31] Z. W. Hall u. I. R. Lehman, J. biol. Chemistry 244, 43 (1969).

siert werden. Die Aktivität dieses Enzyms wird durch Virusinfektion erheblich verändert; es könnte sich ebenfalls als Angriffspunkt für Chemotherapeutika erweisen [32].

Das aktive Zentrum der RNA-Polymerase enthält einen Histidylrest [33], welcher für die Kettenverlängerung notwendig ist. Ähnlich wie im aktiven Zentrum der Nucleosid-Diphosphokinase [34] könnte der Histidylrest mit dem Nucleosidtriphosphat ein Phosphorylimidazol-Zwischenprodukt (20) bilden.



Eine synchrone Aktivierung (Schritt 1) und Übertragung (Schritt 2) könnte man sich etwa wie in Schema 1 vorstellen.



Schema 1.

3.2. Modelle des Enzym-Zwischenprodukts

Als Modell des aktiven Zwischenprodukts haben wir die kristalline Verbindung (21) synthetisiert [35]. Wir vermuten, daß der Phosphorylrest an N-3 gebunden ist, weil im allgemeinen beim vergleichbaren Histidin N-3- stabiler als N-1-Phosphorylderivate sind [36].

Im Gegensatz zu vielen Adenylsäurederivaten, welche ähnliche ORD-Spektren wie 5'-AMP mit einem negativen Cottoneffekt bei 277 nm haben, gab die Verbindung (21) ein anomales ORD-Spektrum mit einem positiven Cottoneffekt nahe 270 nm. Ob diese Umkehrung des Cottoneffekts auf eine Konformationsänderung deutet, die auf der intramolekularen Wechselwirkung zwischen der Imidazolgruppe und dem Adeninchromophor basiert, ist noch unbekannt. Es

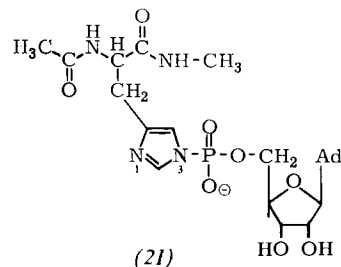
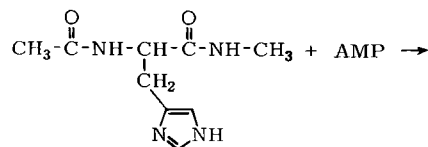
[32] J. Sambrook u. A. J. Shatkin, J. Virology 4, 719 (1969).

[33] A. Ishihama u. J. Hurwitz, J. biol. Chemistry 244, 6680 (1969).

[34] P. L. Pedersen, J. biol. Chemistry 243, 4305 (1968).

[35] K. H. Boswell u. T. Y. Shen, unveröffentlicht.

[36] D. E. Hultquist, Biochim. biophysica Acta 153, 329 (1968).

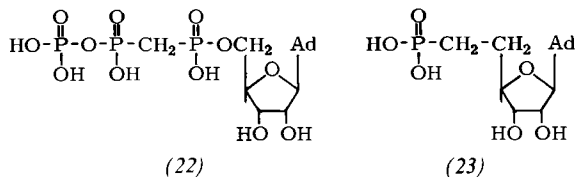


wäre interessant, die physikochemischen Eigenschaften von (21) mit denen des aktiven Zwischenprodukts der Polymerase zu vergleichen. Eine ähnliche Umkehrung des Cottoneffekts tritt bei den 5'-Adenylderivaten des Imidazols, Pyrazols und 2-Hydroxypyridins auf [35].

Es wird noch untersucht, ob diese Analoga des aktiven Zwischenprodukts die Wirkung des Enzyms beeinträchtigen können. Bei der normalen Polymerisation wird angenommen, daß der Bildung des aktiven Zwischenprodukts (Imidazol-pA) die Übertragung des pA auf die wachsende Kette des Polynucleotids folgt. Dies erforderte eine Konformationsänderung des aktiven Zentrums, die z.B. durch Eliminierung der geladenen Pyrophosphatgruppe bewirkt werden könnte, oder eine Translokation des aktiven Zwischenprodukts selbst. Man könnte sich vorstellen, daß diese Analoga möglicherweise in den Übertragungsschritt eingreifen. Klassische Antimetaboliten des Substrats ATP mit ihren geladenen triphosphat-ähnlichen Seitenketten werden wahrscheinlich nur den Aktivierungsschritt und die Bildung des aktiven Zwischenprodukts stören.

3.3. 5'-Substituierte Nucleosidanaloga als Nucleotidäquivalente

Die am besten bekannten klassischen Antimetaboliten der Nucleotide sind ihre Methylphosphonat-Iso-steren, z.B. die Verbindungen (22) [37] und (23) [38]. In beiden Fällen ist eine Sauerstoffbrücke durch eine unter physiologischen Bedingungen nicht abspaltbare Methylengruppe ersetzt.



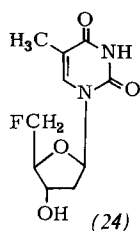
Diese Analoga können Substrate oder Inhibitoren sein [37], je nachdem, welches Sauerstoffatom durch die Methylengruppe ersetzt ist. Die Anwendbarkeit der Analoga ist jedoch offensichtlich durch ihre

[37] T. C. Meyers, K. Nakamura u. A. B. Danielsaheh, J. org. Chemistry 30, 1517 (1965).

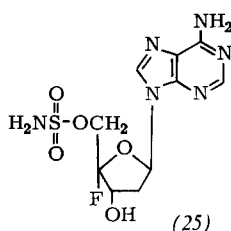
[38] G. H. Jones u. J. G. Moffat, J. Amer. chem. Soc. 90, 5337 (1968).

schlechten Permeabilitätseigenschaften eingeschränkt. Um diese Barriere zu umgehen, untersuchten wir Nucleosidderivate, die in 5'-Stellung eine polare organische Gruppe tragen, welche die Rolle der Triphosphat-Mg²⁺-Seitenkette des Polymerasesubstrats spielen könnte [39]. Diese 5'-substituierten Nucleoside können wahrscheinlich leicht in die Zellen eindringen. Darüber hinaus sind diese Verbindungen aus anderen Gründen für uns attraktiv: sie können erstens mit ihrer substituierten 5'-Hydroxygruppe absolut nicht inkorporiert werden und erfüllen damit eine unserer oben erläuterten Sicherheitsbedingungen. Zweitens sollte – anders als bei den meisten anderen Nucleosid-Antimetaboliten – die Inhibitorwirkung eines 5'-substituierten Nucleosids nicht von seiner enzymatischen Umwandlung in das Nucleotid abhängen; die Entwicklung einer Resistenz ist deshalb auch weniger zu befürchten [40].

Weiterhin sollten 5'-substituierte Adenosin-Derivate gegenüber katabolischen Enzymen wie Adenosin-Desaminase und Purin-nucleosid-Phosphorylase resistenter sein, wie kürzlich für das 5'-Desoxy-5'-methylthioadenosin gezeigt wurde [41]. Die zu Beginn unserer Untersuchungen unbekannte Möglichkeit, 5'-substituierte Nucleoside als Kinase- und Polymerase-Inhibitoren zu benutzen, ergab sich inzwischen durch die Entdeckung, daß 5'-Desoxy-5'-fluorthymidin (24) als kompetitiver Inhibitor nicht des Thymidins gegenüber seiner Kinase, sondern der Thymidylsäure gegenüber der Thymidylat-Kinase wirkt [42]. Ein anderes Beispiel für 5'-substituierte Nucleosid-Analoga ist das natürlich vorkommende Antibiotikum Nucleocidin (25) [43], dessen Struktur kürzlich aufgeklärt wurde.



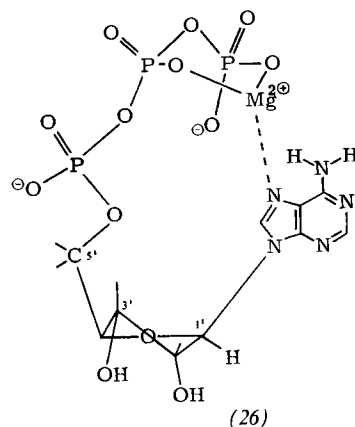
(24)



(25)

Unser Versuch zur Konzeption eines organischen Äquivalents des 5'-Triphosphat-Mg²⁺-Komplexes wurde durch die Unkenntnis über die Konfiguration eines Nucleotides wie des ATP-Mg²⁺-Komplexes erschwert. Im allgemeinen wird eine cyclische, durch β - und γ -Phosphatgruppe sowie Mg²⁺ gebildete Chelatstruktur angenommen; die mögliche Einbeziehung eines Stickstoffatoms aus dem Ring in die Koordination muß noch sichergestellt werden. Vor kurzem wurden aufgrund von Röntgenstrukturanalysen ähnlicher Verbindungen Gruppierungen wie in (26) vorgeschlagen, bei denen N7 anstelle der 6-Aminogruppe

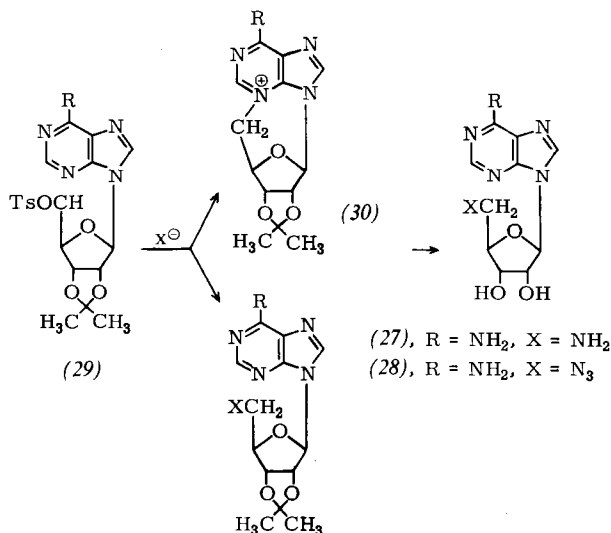
beteiligt ist [44]. Über die dreidimensionale Struktur des ATP, das in Form seines hydratisierten Dinatrium-Salzes mit zur Purinbase zurückgefalteter Phosphatkette vorliegt, wurde von einer anderen Arbeitsgruppe berichtet [45].



(26)

3.4. Derivate von 5'-Amino-5'-desoxy-nucleosiden

Unser ursprünglicher Plan war, bei Nucleosid-Derivaten mit cyclischer Struktur oder Chelatstruktur in 5'-Stellung zu prüfen, ob sie sich zur Nachahmung der Triphosphat-Seitenkette eignen. 5'-Amino-5'-desoxy- und 5'-Azido-5'-desoxy-Derivate des Adenosins (27) bzw. (28) [46] sollten bei dieser Synthese als Zwischenprodukte fungieren. Diese Wahl erwies sich als besonders glücklich, da beide Substanzen per se antivirale Aktivität zeigten. So wirkten sie gegen Parainfluenza III in Zellkulturen schon in Konzentrationen von 8–30 $\mu\text{g/ml}$. Der therapeutische Index betrug 16–128 in Abhängigkeit von der Schwere der Infektion [47].



(27), R = NH₂, X = NH₂
(28), R = NH₂, X = N₃

R = CH₃S, OHC-NH, (Cl, NH₂, SH)
X = N₃, NH₂, CH₃NH, (CH₃)₂N, CH₃-C(O)S, -N=C=NH,
-S-C \equiv N

[39] T. Y. Shen, Abstracts of Papers, 154. Amer. Chem. Soc. Meeting, Sept. 1967, Chicago, Ill., S. 29.

[40] B. R. Baker u. P. M. Tanna, J. pharmac. Sci. 54, 1774 (1965).

[41] A. E. Pegg u. H. G. Williams-Ashman, Biochem. J. 115, 241 (1969).

[42] P. Langen u. G. Kowolik, Europ. J. Biochem. 6, 344 (1968).

[43] G. O. Morton, J. E. Lancaster, G. E. Van Lear, W. Fulmor u. W. E. Meyer, J. Amer. chem. Soc. 91, 1535 (1969).

[44] M. Sundaralingam, Biopolymers 7, 821 (1969).

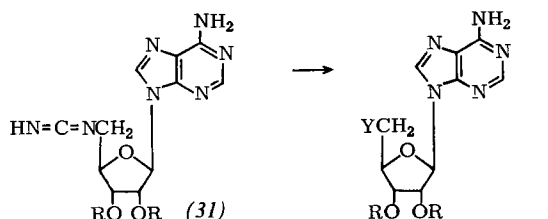
[45] O. Kennard, N. W. Isaacs, J. C. Coppola, A. J. Kirby, S. Warren, W. D. S. Motherwell, D. G. Watson, D. L. Wampler, D. H. Chenery, A. C. Larson, K. A. Kerr u. L. R. DiSanseverino, Nature (London) 225, 333 (1970).

[46] W. Jahn, Chem. Ber. 98, 1705 (1965).

[47] M. M. Nemes, unveröffentlichte Beobachtungen.

Ermotigt durch diese Ergebnisse synthetisierten wir durch ähnliche nucleophile Verdrängungsreaktionen mehrere einfache Derivate des vielseitigen 5'-Tosylates (29). Um die Bildung des Cyclonucleosides (30) zu unterdrücken, gingen wir in einigen Fällen vom N⁶-Formyl- und vom 6-Methylthio-Derivat aus.

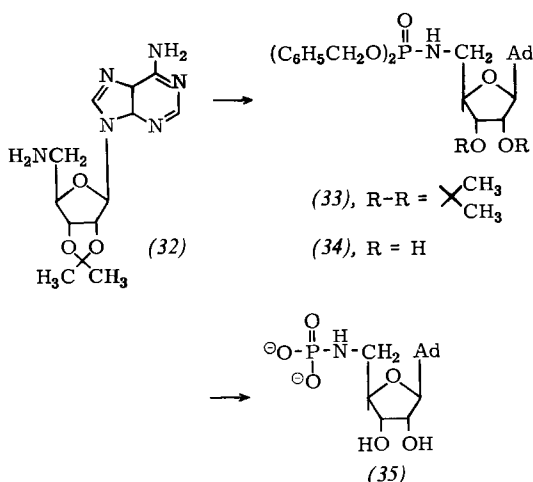
Einige Guanidin- und Harnstoff-Derivate ließen sich ohne Schwierigkeiten aus der Carbodiimidvorstufe (31) herstellen.



R = H oder R-R = Isopropyliden

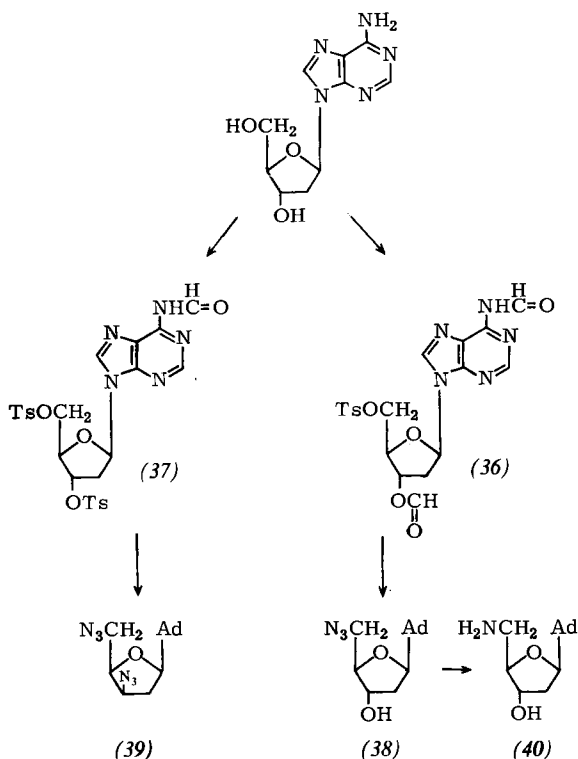
Y = NH-CO-NH₂, NH-C(NH)-NH₂, NH-CS-NH₂,
NH-C(NH)-NHC₄H₉

Das geschützte 5'-Amino-5'-desoxy-adenosin (32) wurde mit Dibenzylphosphit und N-Chlorsuccinimid in Methylenchlorid zum Phosphoramidat (33) phosphoryliert. Durch Entfernung der Isopropyliden-gruppe mit verdünnter Ameisensäure erhielten wir das Derivat (34). Seine Hydrogenolyse in Gegenwart von Natriumhydroxid lieferte ein Produkt, von dem wir annahmen, es sei das gewünschte „5'-Aza-AMP“ (35). Für die Cyclisierung zum 3',5'-Cyclo-Derivat war es aber zu instabil. Eine ähnliche Beobachtung über die Stabilität von (35) wurde kürzlich mitgeteilt [48].



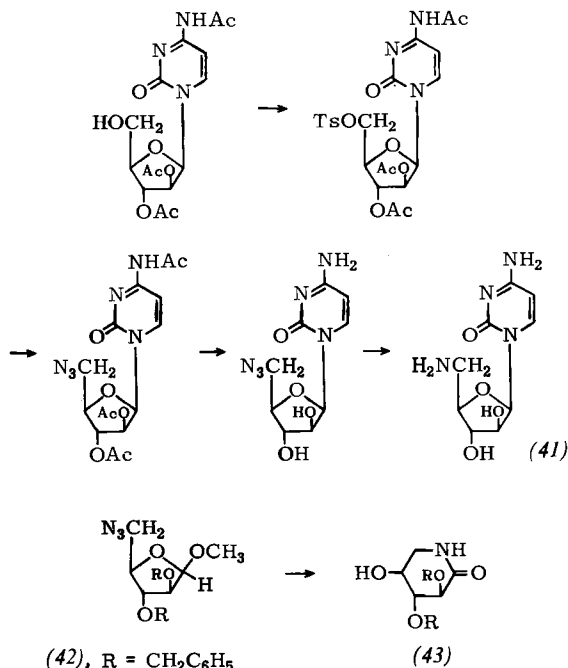
In der 2'-Desoxyribonucleosid-Reihe wurde 2'-Desoxyadenosin, ein bekannter Antimetabolit, zu einer Mischung des Mono- und Ditosylats sulfoniert. Die Behandlung der Formyllderivate (36) bzw. (37) mit Natriumazid lieferte die Azidoderivate (38) bzw. (39). (38) wurde zu 5'-Amino-2',5'-didesoxyadenosin (40) reduziert [49].

[48] B. Jastorff u. H. Hettler, *Tetrahedron Letters* 1969, 2543.
[49] Eine unabhängige Synthese dieser Verbindung wurde kürzlich mitgeteilt: M. G. Stout, M. J. Robins, R. K. Olsen u. R. K. Robins, *J. med. Chem.* 12, 658 (1969).



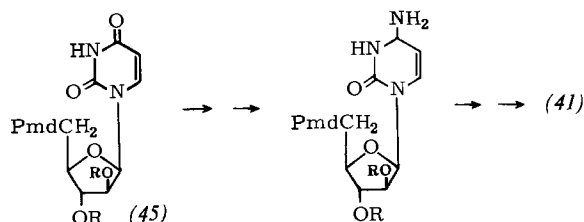
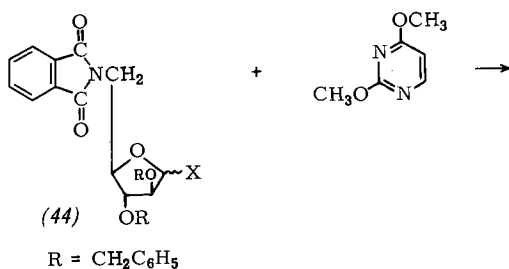
3.5. 5'-Substituierte Arabinosyl-Nucleoside

Die Bedeutung der Arabinosyl-Nucleoside für die Therapie ist schon durch Cytosin-, Adenin- und 6-Methylthiopurin-arabinsid gezeigt worden. Cytosin-arabinsid ließ sich leicht in sein 5'-Amino-Analogon (41) umwandeln.



Um die Möglichkeiten zur Untersuchung 5'-substituierter Arabinosyl-Nucleoside zu erweitern, synthetisierten wir zuerst das Methyl-5'-azidoarabino-furanosid (42) als potentiell Zwischenprodukt. Die milde saure Hydrolyse ergab unerwarteterweise eine neue kristalline Verbindung, die sich als Piperidin (43) erwies [50].

[50] W. V. Ruyle, unveröffentlichte Beobachtungen.

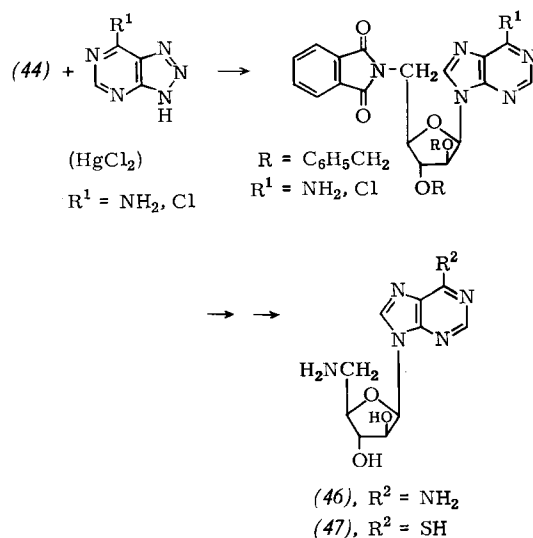


Das durch eine 5'-Phthalimidogruppe geschützte Arabinosylhalogenid (44) konnte jedoch leicht aus dem Arabinosyl-*p*-nitrobenzoat dargestellt und in die übliche Hilbert-Johnson-Reaktion eingesetzt werden.

Aus dem α -Chlorid wurde das β -Nucleosid (45) als Hauptprodukt erhalten. Die Stereospezifität dieser Reaktion erinnert an unsere früheren Erfahrungen mit 2,3,5-Tri-*O*-benzylarabinosylhalogeniden bei der Synthese von Cytosin-arabinosid^[51]. Die 4-Ketogruppe in (45) ließ sich über das Methylthio-Zwischenprodukt in eine Aminogruppe umwandeln; beim Entfernen der Schutzgruppe bildet sich (41).

Aus dem Arabinosylhalogenid (44) erhielt man durch Kondensation mit Adenin ein Zwischenprodukt, das zum 5'-Amino-5'-desoxy-adenin-arabinosid (46) gespalten wurde. Das 6-Mercaptopurin-Analogon (47) entstand in schlechter Ausbeute aus der geschützten 6-Chlorpurin-Vorstufe und Thioharnstoff. In diesem Fall war die Entfernung der Schutzgruppen durch die Bildung von Disulfid und anderen Zersetzungsprodukten erschwert.

Die β -Konfiguration dieser Purin-arabinoside wurde durch die Ähnlichkeit ihrer ORD-Spektren mit dem



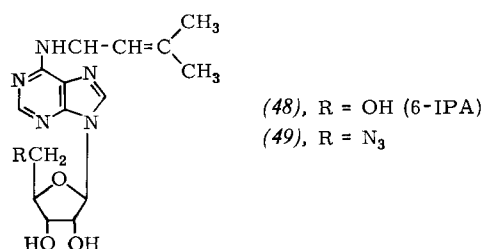
[51] T. Y. Shen, H. M. Lewis u. W. V. Ruyle, J. org. Chemistry 30, 835 (1965).

ORD-Spektrum des Adenosins sichergestellt. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, daß die Konfiguration der 2'-Hydroxygruppe das ORD-Spektrum dieser Nucleoside nicht wesentlich beeinflusst.

3.6. Biologische Eigenschaften 5'-substituierter Nucleoside

Die neuen Analoga zeigen in Konzentrationen von 1 mmol/l mäßige bis gute Cytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen^[29]. Die 5'-Azido-5'-desoxy-Derivate sowohl von Adenosin als auch von 6-Methylthiopurin-ribosid sind bei dieser Konzentration stark toxisch. Einige Analoga, z. B. 5'-Amino-, 5'-Azido-, 5'-Ureido- und 5'-Äthoxycarbonyl-Derivate des Adenosins, inhibieren in Konzentrationen von 0.9 mmol/l die Umwandlung des Adenosins in seine phosphorylierten Derivate in Asciteszellen zu ca. 60%^[29], eine signifikante antivirale Aktivität wurde aber nicht entdeckt. Daß diese Verbindungen die Verwertung von Adenosin hemmen, erinnert an die oben erwähnte Inhibition der Verwertung von Thymidin durch 5'-Desoxy-5'-fluor-thymidin (24).

Als Teil unserer systematischen Studien synthetisierten wir auch das 5'-Azido-Derivat (49) des N⁶-Isopentenyladenosins (48) (6-IPA)^[52]. Dieses Derivat ist wieder ein nichtinkorporierbarer Antimetabolit. Ähnlich wie 6-IPA inhibierte es in Konzentrationen von 1 mmol/l dennoch HeLa-Zellen fast zu 100%; bei niedrigeren Konzentrationen war seine Wirksamkeit etwas geringer.



4. Immunologische Effekte von Nucleosiden und Nucleotiden

4.1. Immunosuppressive Nucleoside

Unser Interesse an 6-IPA-Analoga beruhte weiterhin auf ihrer möglichen Anwendung als Immunosuppressoren. Nucleosid-Antimetaboliten wie 6-Mercaptopurin, Imuran und Cytarabin (3) sind bereits klinisch zur Behandlung immunologischer Störungen angewendet worden, während 6-Mercaptopurin-arabinosid (50), 6-Methylthiopurin-ribosid (51) und sein Perjodat-Oxidationsprodukt im Laboratorium geprüft wurden^[53]. Unter Verwendung der Hämagglutinin-

[52] K. Biemann, S. Tsunakawa, K. Sonnenbichler, H. Feldmann, D. Dütting u. H. G. Zachau, Angew. Chem. 78, 600 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 590 (1966).

[53] J. P. Bell, M. L. Faures, G. A. LePage u. A. P. Kimball, Cancer Res. 28, 782 (1968).

Reaktion auf Schaf-Erythrocyten als Modell für die humorale Antikörper-Produktion und der Reaktion eines Empfängers auf ein Transplantat als repräsentative zellkatalysierte Immunreaktion läßt sich die Wirkungsweise dieser Immunsuppressoren nach und nach besser verstehen [53]. Es ist lehrreich, sich daran zu erinnern, daß diese Inhibitoren der DNA-Synthese die Proliferation sensibilisierter Lymphocyten und die zell-vermittelte Immunität sehr wirksam unterdrücken, aber die auferlegte biochemische Blockierung wird leicht überwunden. Die humorale Antikörper-Reaktion wird im allgemeinen durch diese Verbindungen nicht inhibiert [54].

4.2. Eigenschaften von Cytokinin-Derivaten

Kinetin-riboside (52), 6-IPA und andere Cytokinin-Derivate bilden eine neue Gruppe von Immunsuppressoren. Als Primäreffekt von 6-IPA wird die Störung der RNA- und Protein-Synthese angenommen [55]. Kürzlich wurde beobachtet, daß es in Abhängigkeit von der Konzentration und von den Stadien des Zellzyklus eine biphasische Wirkung auf die Transformation und die Mitose menschlicher Lymphocyten hat, die mit Phytohämagglutinin behandelt waren. Die biphasische Reaktion erinnert an die Stimulierung der Antikörper-Produktion oder an die Hemmwirkung, die ein anderer Inhibitor der RNA-Synthese, 6-MP, in einigen in-vivo-Systemen zeigt [56].

6-IPA und die Cytokinine üben auch einen indirekten Einfluß auf einige durch Nucleinsäuren vermittelte humorale Immunreaktionen aus. An der Primärreaktion beteiligen sich mindestens zwei Arten von Zellen – Makrophagen und Lymphocyten [57, 58]. Bei manchen löslichen Antigenen wird eine 4S-RNA oder ein RNA-Protein-Komplex durch Makrophagen nach der Phagocytose des Antigens freigesetzt. Dieses RNA-enhaltende Material, das derzeit untersucht wird, ist möglicherweise an der Sensibilisierung von Lymphocyten beteiligt [59]. Gleichzeitig wurde gezeigt, daß Nucleinsäure-Bruchstücke oder Oligonucleotide sowohl die Phagocytose von Antigenen durch Makrophagen als auch die Produktion von Antikörpern durch sensibilisierte Lymphocyten stimulierten (Abb. 1) [60]. Aus noch unbekannten Gründen wird der antikörper-stimulierende Effekt durch 6-IPA, Kinetin-ribosid (52) und andere Analoga inhibiert [61].

Cytokinine sind im allgemeinen alkylierte Purinderivate [62]; kürzlich wurde aber auch ein Pyrimidin-

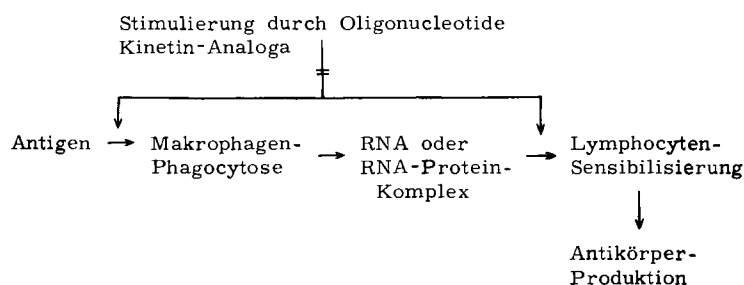
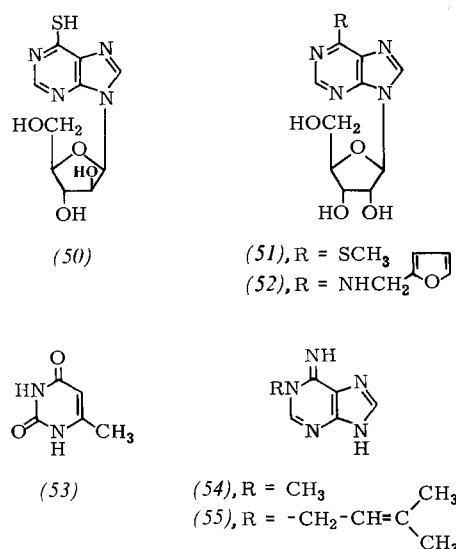


Abb. 1. Wirkung von Kinetin-Analoga auf die Antikörper-Produktion.

cytokinin, 6-Methyluracil (Pseudothymin) (53), beschrieben [63]. Es wäre interessant, die immunsuppressive Aktivität der Pseudothymin-Nucleoside miteinander zu vergleichen [64].

Ein weiteres alkyliertes Purin, 1-Methyladenin (54), das bei Seesternen als starker Meiose-Induktor wirkt, stimuliert in Konzentrationen von 0.02 µg/ml die Ovulation [65]. Das 1-Äthylanalogon ist viel weniger aktiv. Wir konnten zeigen, daß 1-Isopentenyladenin (55), ein Zwischenprodukt der Synthese von N⁶-Isopentenyladenin, in Konzentrationen von 1 mmol/l die Inkorporation von Thymidin in HeLa-Zellen inhibiert, aber in Konzentrationen von 10 µg/ml die Inkorporation von Thymidin und Uridin in durch Phytohämagglutinin stimulierte Rattenmilzzellen erhöht [66].

6-IPA (48) und sein 2-Methylthio-Derivat kommen in der tRNA vor, wo sie Positionen direkt neben bestimmten Anticodon-Regionen einnehmen [67, 68]. Die spezielle Lage dieser Basen und die Wirksamkeit hydrophober N⁶-Seitenketten legen nahe, daß die



[54] R. H. Gisler u. J. P. Bell, *Biochem. Pharmacol.* **18**, 2115, 2123 (1969).

[55] R. C. Gallo, J. Whang-Peng u. S. Perry, *Science (Washington)* **165**, 400 (1969).

[56] E. Gabrielson u. R. A. Good, *Adv. Immunology* **6**, 148 (1967).

[57] M. Fishman u. F. L. Adler, *J. exp. Med.* **117**, 595 (1963).

[58] M. Fishman, *Annu. Rev. Microbiol.* **23**, 199 (1969).

[59] A. A. Gottlieb, V. R. Glisin u. P. Doty, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **57**, 1849 (1967); A. A. Gottlieb u. D. S. Straus, *J. biol. Chemistry* **244**, 3324 (1969).

[60] W. Braun u. W. Firschein, *Bacteriol. Rev.* **31**, 83 (1967).

[61] O. J. Plešcia u. W. Braun: *Nucleic Acids in Immunology*. Springer-Verlag, Wien-New York 1968, S. 347.

[62] J. P. Helgeson, *Science (Washington)* **161**, 974 (1968).

[63] B. I. Pozsar u. Gy. Matolcsy, *Life Sciences* **7**, 699 (1968).

[64] M. W. Winkley u. R. K. Robins, *J. org. Chemistry* **33**, 2822 (1968).

[65] H. Kanatani, H. Sirai, K. Nakanishi u. T. Kurokawa, *Nature (London)* **221**, 273 (1969).

[66] H. T. Shigeura u. T. L. Feldbush, unveröffentlichte Beobachtungen.

[67] W. J. Burrows, D. J. Armstrong, F. Skoog, J. M. Hecht, J. T. A. Boyle, N. J. Leonard u. J. Occolowitz, *Science (Washington)* **161**, 691 (1968).

[68] D. J. Armstrong, W. J. Burrows, F. Skoog, K. L. Roy u. D. Söll, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **63**, 834 (1969).

Cytokine in der tRNA bei der Codon-Anticodon-Wechselwirkung eine Rolle spielen, möglicherweise durch eine festere Bindung der N⁶-Substituenten an das Ribosom. Ob der regulatorische Effekt exogener Cytokine durch die Inkorporation in die tRNA per se durch einen indirekten Einfluß auf den Pool cyto-kinin-haltiger tRNA-Spezies erreicht wird, muß noch geklärt werden. Die asymmetrischen N⁶-Alkyl-Seitenketten einiger Cytokine liegen bevorzugt in der (S)-Konfiguration vor [69].

Die Wirkungen dieser Nucleosid-Analoga auf Säugetierzellen sind in letzter Zeit mehrfach untersucht worden. So verhalten sich manche N⁶-alkylierten Adenosine gegenüber Leukämiezellen und gegenüber normalen Lymphocyten verschieden stark toxisch [70 bis 72]. Es wäre interessant zu prüfen, ob derartige Effekte auch bei immunologischen Störungen auftreten.

5. Oligonucleotide

5.1. Adjuvantien-Wirkung von Oligonucleotiden

Wir haben uns ebenfalls mit der Beobachtung befaßt, daß durch Oligonucleotide die Resistenz eines Wirtes gegenüber Infektionen erhöht wird [60]. In den ursprünglichen immunologischen Experimenten zeigte sich ein antikörper-stimulierender Effekt des unfractionierten Gemisches von DNA-Abbauprodukten; die optimale Größe der Oligomeren lag schätzungsweise zwischen dem Tri- und dem Hexanucleotid. Wir versuchten, die für die Wirkung verantwortlichen Strukturmerkmale der Oligomeren herauszuarbeiten und, wenn möglich, weitere Klarheit in die Wirkungsweise dieser Stimulierung zu bringen. So interessierten vor allem Basensequenz, Ladungsverteilung, Konformation, Art des „Rückgrates“ und Stabilität gegenüber Abbau durch Nucleasen. Die Aufnahme von Oligonucleotiden in die Zelle und das Zentrum der Wirkung – ob an Membranen oder im Cytoplasma – erforderte ebenfalls eine Klarstellung (Abb. 2).

1. Erhöhung der Phagocytose-Aktivität
2. Verkürzung der Induktionsperiode bei der Antikörper-Produktion
3. Erhöhung der Desoxynucleotid-Kinase-Aktivität (dCMP, dGMP)
4. Schutz gegen bakterielle Infektionen in vivo

Aktive Strukturen: Oligonucleotide (n = 3–6)

Poly C, Poly A (Poly C + Poly I)

Abb. 2. Immunstimulierende Wirkung von Oligonucleotiden.

[69] K. Koshimizu, A. Kobayashi, T. Fukita u. T. Mitsui, *Phytochemistry* 1, 1989 (1968).

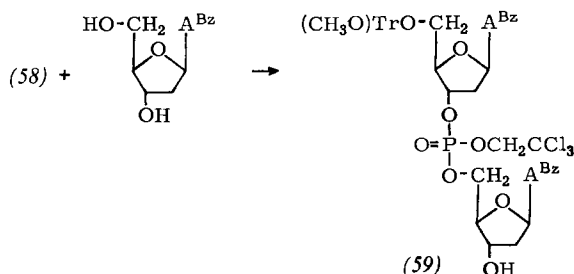
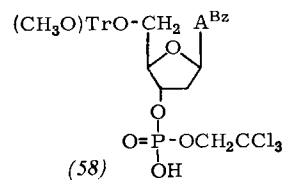
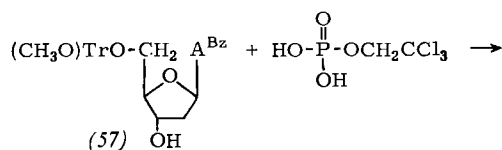
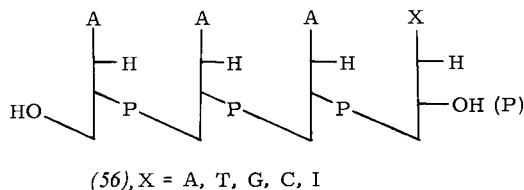
[70] N. J. Leonard, S. M. Hecht, F. Skoog u. R. Y. Schmitz, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 59, 15 (1968).

[71] M. H. Fleysher, M. T. Hakala, A. Bloch u. R. H. Hall, *J. med. Chem.* 11, 717 (1968).

[72] M. H. Fleysher, A. Bloch, M. T. Hakala u. C. A. Nichol, *Abstracts of Papers*, 156. Amer. Chem. Soc. Meetings, Sept. 1968, Atlantic City, N.J. *Medi* 25.

5.2. Synthese von Oligo(2'-desoxynucleotiden)

Zunächst synthetisierten wir eine Gruppe von Tetra-desoxynucleotiden der allgemeinen Formel dApd-ApdApdX (56) mit dX = dA, dG, dI, T und dC nach einer modifizierten Methode, in der die Vorzüge mehrerer bekannter Methoden kombiniert sind [73, 73a, 74]. N⁶-Benzoyl-5'-O-monomethoxytrityl-2'-desoxy-adenosin (57) diente als Ausgangsmaterial. Mit Trichloräthylphosphat und Mesitylensulfonylchlorid in Pyridin wurde es in das 3'-phosphorylierte Derivat (58) überführt. Durch Kondensation mit der 5'-Hydroxygruppe des N⁶-Benzoyl-2'-desoxy-adenosins (ebenfalls in Pyridin in Gegenwart von Triisopropylbenzolsulfonylchlorid) entstand das Dinucleotid (59). Durch Wiederholung von 3'-Phosphorylierung und 5'-Kondensation erhielten wir das Trinucleotid (60), welches seinerseits mit N⁶-Benzoyl-desoxyadenosin, N²-Dimethylaminomethyl-desoxyguanosin, N⁴-p-Methoxybenzoyl-desoxycytidin, 2'-Desoxyinosin oder Thymidin kondensiert wurde. Das Arbeiten mit geschützten Zwischenprodukten erlaubte es uns, ohne zu große Schwierigkeiten säulenchromatographisch an Kieselgel 10–20 mg Produkt zu erhalten. Die Schutzgruppen im Tetranucleotid (61) wurden nacheinander durch Behandlung mit Zink/Kupfer, verdünntem Ammoniak und wäßriger Essigsäure entfernt. Die Verwendung der Trichloräthylgruppe zum Schutz der



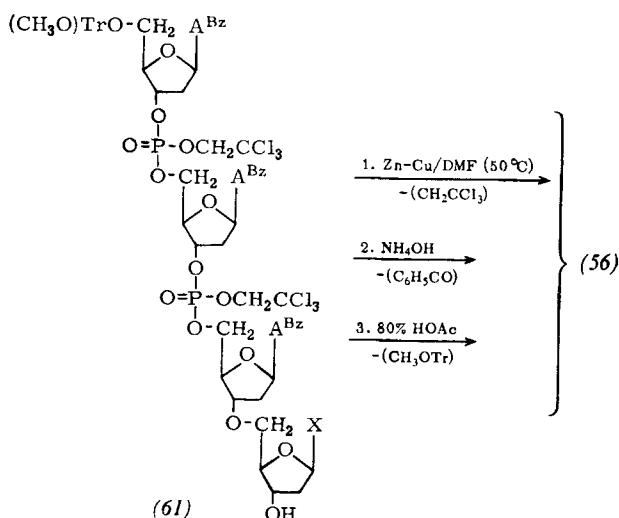
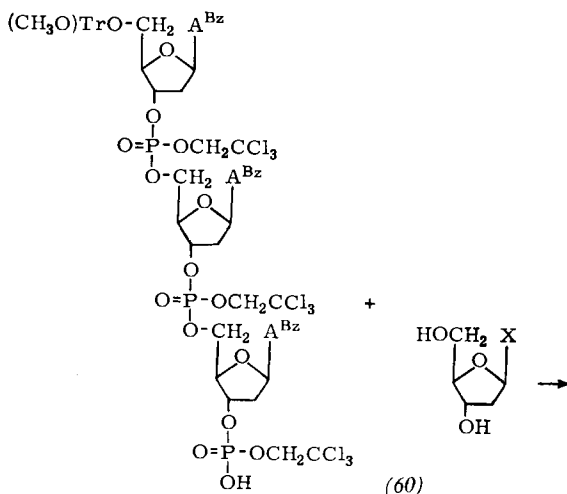
[73] H. G. Khorana et al., *J. Amer. chem. Soc.* 89, 2148, 2185, 2195 (1967).

[73a] F. Eckstein u. I. Rizk, *Chem. Ber.* 102, 2362 (1969).

[74] R. L. Letsinger u. K. K. Ogilvie, *J. Amer. chem. Soc.* 89, 4801 (1967).

Phosphatgruppe gestattet weitere Abänderungen der Struktur. Der Anwendungsbereich dieser Synthese wurde kürzlich auf Oligoribonucleotide ausgedehnt, bei denen die 2'-Tetrahydropyranylgruppe benutzt wurde, um die 2'-Hydroxygruppe zu blockieren [75].

Wir versuchen derzeit, unsere Oligodesoxyribonucleotide in cyclische (circular) Analoga umzuwandeln, um ihre Resistenz gegenüber Nucleasen und ihre Aufnahme in Zellen zu erhöhen; dabei interessieren besonders die physikochemischen Eigenschaften dieser Verbindungen.



5.3. Mögliche Anwendungen von Oligonucleotiden

Eine weitere mögliche Anwendung von Nucleotid-Derivaten liegt auf dem Gebiet der Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus Erythematoses (LE) und anderer chronischer degenerativer Störungen. Bei diesen Krankheiten bilden sich antinucleare Antikörper, welche gegen Nucleinsäuren und Nucleoproteine gerichtet sind. In Patienten mit LE wurde eine Vielzahl von Antikörpern gegen native DNA, einzelsträngige DNA und sogar doppelsträngige RNA gefunden [76, 77]. Diese Antikörper bilden mit Nuclein-

säuren Antigen-Antikörper-Komplexe, die zu Entzündungen entlang der Basalmembran der Nieren-glomeruli führen, wobei die Glomeruli geschädigt werden. Wenn man die Bildung pathogener Antigen-Antikörper-Komplexe zu verhindern trachtet, sollte man sich erinnern, daß die Bindung von Antigen und Antikörper der Enzym-Substrat-Wechselwirkung ähnelt. Es ist bekannt, daß die Wechselwirkung zwischen Polysacchariden und ihren Antikörpern durch chemische Analoga der Determinanten, z.B. Oligosaccharide, gehemmt werden kann [78]. In ähnlicher Weise ließ sich vor einigen Jahren eine partielle Inhibierung von LE-Seren durch Tetra- oder Pentanucleotide zeigen [79]. Wenn man die Bindung zwischen Antigen und Antikörper besser kennt, ist es durchaus denkbar, daß sich Oligonucleotid-Derivate finden lassen, die nicht nur eine höhere Affinität besitzen, sondern auch zur Kreuz-Reaktion mit vielen LE-Seren fähig sind. Die Bildung löslicher Antigen-Antikörper-Komplexe zwischen Oligonucleotid-Analoga und Anti-DNA-Antikörpern würde vermutlich die immunologischen Schädigungen verringern und wahrscheinlich die Induktion der Toleranz erleichtern (Abb. 3) [80].

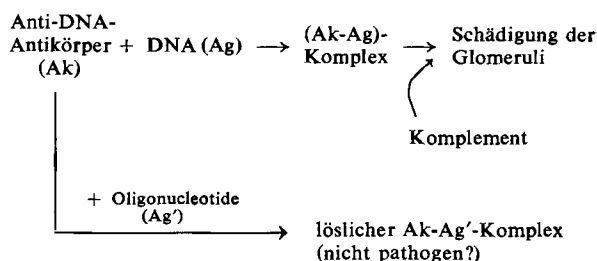


Abb. 3. Pathogenese bei systemischem Lupus Erythematoses (LE).

Das Konzept der Benutzung von Oligonucleotid-Derivaten oder sehr vereinfachten „Strukturäquivalenten“ als Stellvertreter oder als Konkurrenten biologisch aktiver Polynucleotide sollte auch auf andere wichtige medizinische Probleme anzuwenden sein, z. B. die Interferon-Induktion, die Inhibierung der viralen RNA-Polymerase, die Inhibierung spezifischer tRNA und den Episomen-Transfer. In jedem Fall könnte man annehmen, daß die Wechselwirkung der Nucleinsäure mit einem Proteinmolekül oder einem Receptor nur eine Region oder wenige Regionen der Oligonucleotide einbezieht und daß die Spezifität durch die Basensequenz und die Sekundärstruktur dieser Regionen bestimmt ist.

Die Gangbarkeit dieses Weges zeigte sich an der Sequenz von Q β - und R17-Phagen-RNA. Die Basensequenz des Q β -Phagen wurde sowohl vom 3'-[81, 82]

[75] T. Neilson, Chem. Commun. 1969, 1139.

[76] D. Koffler, R. I. Carr, V. Angello, T. Fiezi u. H. G. Kunkel, Science (Washington) 166, 1649 (1969).

[77] P. H. Schur u. M. Monroe, Proc. nat. Acad. Sci. USA 63, 1108 (1969).

[78] E. A. Kabat: Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry. Holt, Rinehart and Winston, New York 1968.

[79] L. Levine u. B. D. Stollar, Progr. Allergy 12, 161 (1968).

[80] A. R. Boyns u. J. Hardwicke, Immunology 15, 263 (1968).

[81] U. Rensing u. J. T. August, Nature (London) 224, 853 (1969).

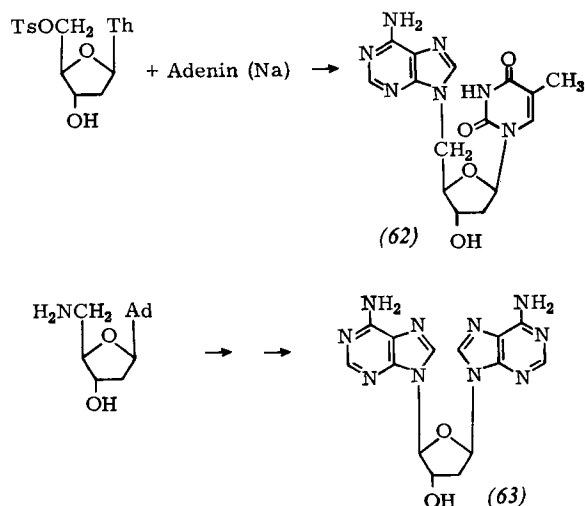
[82] H. L. Weith u. P. T. Gilham, Science (Washington) 166, 1004 (1969).

als auch vom 5'-Ende^[83] her bestimmt; dabei ließen sich vom 5'-Ende her nicht weniger als 175 Nucleotide mit wohldefinierter schleifenähnlicher Sekundärstruktur aufklären^[83]. Die Identifizierung einer spezifischen Bindungsregion sollte uns in die Lage versetzen, chemische Verbindungen zu entwerfen, die entweder um die Proteinbindungsstelle konkurrieren oder die mit der Oligonucleotidregion selbst durch Intercalation, Basenpaarung oder andere Arten von Wasserstoffbrücken in Wechselwirkung treten.

6. Neue Nucleosid-Derivate

6.1. „Doppelköpfige“ Nucleoside

Zur Untersuchung von Nucleosid-Analoga, die möglicherweise bei der Wechselwirkung mit Nucleinsäuren gewisse Basensequenzen bevorzugen, haben wir die oben beschriebenen vielseitigen 5'-O-Tosyl- und 5'-Amino-5'-desoxy-Derivate von Nucleosiden zur Synthese solcher Ribonucleoside und 2'-Desoxyribonucleoside benutzt, die eine zweite Purin- oder Pyrimidin-Gruppe am 5'-Kohlenstoffatom tragen^[84,85].



[83] M. A. Billeter, J. E. Dahlberg, H. M. Goodman, J. Hindley u. C. Weissmann, *Nature* (London) 224, 1083, 1055 (1969).

[84] R. Fecher, K. H. Boswell, J. Wittick u. T. Y. Shen, *J. Amer. chem. Soc.* 92, 1400 (1970).

[85] K. H. Boswell u. T. Y. Shen, unveröffentlicht.

Es ist zu hoffen, daß bei geeigneter Auswahl und Anordnung dieser beiden Basen die eine zu einer Watson-Crick-Paarung und die andere zur Intercalation zwischen den beiden nächsten benachbarten Nucleotiden in einem Polynucleotid führt. Die Spezifität dieser Wechselwirkungen wird die Grundlage für die selektive Bindung von drei Nucleotiden durch eine doppelköpfige Einheit sein. Das Nucleosid (63) zeigt, vermutlich aufgrund der intramolekularen Wechselwirkung zwischen den beiden Basen, ein ungewöhnliches CD-Spektrum^[84]. Diese Verbindungen sind nützliche Modelle zum Studium von Basen-Basen-Wechselwirkungen. Der ausgeprägte Cottoneffekt könnte ebenfalls zur Verfolgung der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen diesen Verbindungen und Polynucleotiden dienen.

7. Schlußbetrachtung

Der medizinischen Anwendung von Nucleotid-Derivaten ist in der Vergangenheit nicht viel Aufmerksamkeit geschenkt worden, zum Teil wegen der schwierigen chemischen Synthese, zum Teil wegen der schlechten Absorptions- und Zellpermeabilitätseigenschaften. Fortschritte bei der Synthese und bei der Isolierung haben die Oligomeren jetzt jedoch für medizinisch-chemische Untersuchungen zugänglich gemacht. Durch neue Entdeckungen wie die Anwendung doppelsträngiger Polynucleotide als Interferon-Induktoren in der viralen Chemotherapie^[86,87] wurde das traditionelle Konzept ausschließlich monomerer Arzneimittel erweitert. Die wachsende Erkenntnis über Membran-Receptor-Zentren und Membran-Enzyme wie ATPase bei der Regulation des Zellgeschehens weist ebenfalls auf neue extrazelluläre Angriffspunkte für die Wirkung von Arzneimitteln hin. Die Strukturaufklärung der Nucleinsäuren und das Verständnis ihrer Wechselwirkungen mit Proteinrezeptoren lassen weitere Fortschritte in der Anwendung von Nucleosiden und Nucleotid-Derivaten als neue Therapeutica erwarten.

Eingegangen am 20. April 1970 [A 779]
Übersetzt von Dr. Fritz Eckstein, Göttingen

[86] G. P. Lampson, A. A. Tytell, A. K. Field, M. M. Nemes u. M. R. Hilleman, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 58, 782 (1967).

[87] J. H. Park u. S. Baron, *Science* (Washington) 162, 811 (1968).