

GERHARD ETZOLD und PETER LANGEN

Pyrimidin-nucleoside der 2-Desoxy-D-glucose

Aus dem Institut für Biochemie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Berlin-Buch

(Eingegangen am 30. Dezember 1964)

Die Kondensation von 2-Desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl-D-glucopyranosylbromid (I) mit Monoquecksilberverbindungen des Thymins, 5-Fluor-, 5-Brom-, 5-Joduracils und Uracils (IIa–e) in Dimethylformamid liefert nach basen- oder protonenkatalysierter Entacetylierung die entsprechenden 1-[2-Desoxy- α , β -D-glucopyranosyl]-pyrimidin-Derivate (α , β -IVa–e). Die α - bzw. β -Anomeren wurden entweder isoliert oder angereichert. Die Untersuchung der Hemmwirkung dieser Nucleoside und ihrer Pyrimidin-Basen auf die Spaltung von Desoxyuridin durch Extrakte aus Ascites-Tumorzellen ergab, daß in allen Fällen die β -Anomeren wirksamer sind als die α -Anomeren und die freien Basen.

In dem von W. W. ZORBACH und G. J. DURR¹⁾ nach der Hilbert-Johnson-Methode erhaltenen 1-[2-Desoxy-D-*arabino*-hexapyranosyl]-thymine (1-[2-Desoxy-D-glucopyranosyl]-thymine) hatten wir eine Substanz gefunden, die als kompetitiver Hemmstoff einer „Uridin-Desoxyuridin“-Phosphorylase²⁾ aus Ascites-Tumorzellen wirkte³⁾. Dieser Befund veranlaßte uns, die Darstellung dieser Verbindung und analoger Pyrimidin-desoxyglucoside nach dem kürzeren Quecksilberverfahren⁴⁾ zu versuchen. Zum anderen erschien uns die Isolierung und biochemische Testung des bisher unbekannten *anomeren* Thymine-desoxyglucosids von Interesse, dessen gleichzeitige Entstehung mit großer Wahrscheinlichkeit zu erwarten war. Die Kondensation von *O*-acylierten 2-Desoxy-D-glucosylhalogeniden mit Schwermetallsalzen von Heterocyclen war bis dahin⁵⁾ nur in der Purinreihe, und zwar beim Theophyllin⁶⁾ und Adenin⁷⁾ beschrieben worden. Die beiden einzigen Pyrimidinabkömmlinge, 1-[2-Desoxy-D-glucopyranosyl]-thymine¹⁾ und -uracil⁸⁾, wurden nach dem Hilbert-Johnson-Verfahren gewonnen.

¹⁾ J. org. Chemistry **27**, 1474 [1962].

²⁾ Dieses Enzym bewirkt die Aufspaltung der 2-Desoxy- β -D-ribofuranoside von Uracil, Thymin und 5-Halogen-uracilen in freie Base und Pentose-1-phosphat, ist also nicht spezifisch für Uracil-nucleoside.

³⁾ P. LANGEN und G. ETZOLD, Biochem. Z. **339**, 190 [1963].

⁴⁾ Eine eingehende Beschreibung beider Verfahren findet sich bei J. J. FOX und I. WEMPEN, Advances Carbohydrate Chem. **14**, 328 [1959].

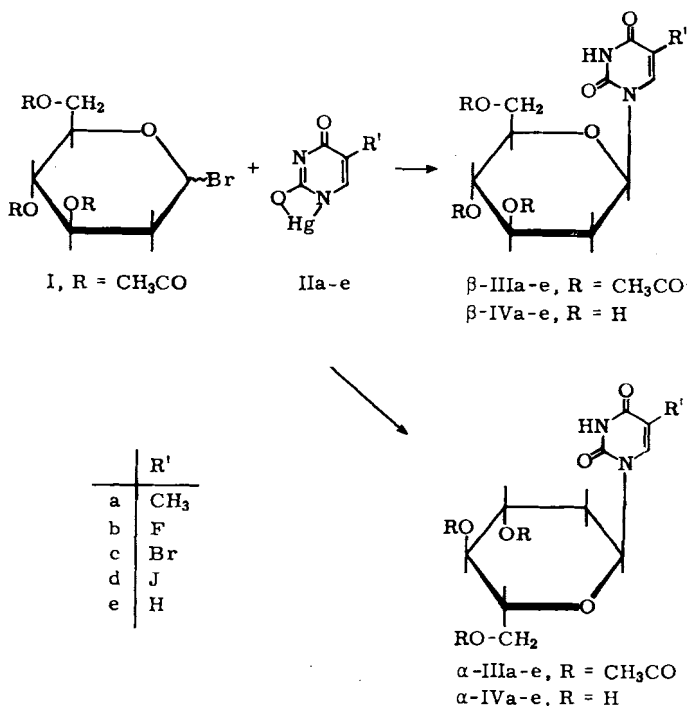
⁵⁾ Inzwischen ist uns zur Kenntnis gelangt, daß kürzlich auch von einem anderen Arbeitskreis nach dem von uns gewählten Verfahren ein 1-[2-Desoxy-D-glucosyl]-thymine (in 8-proz. Ausbeute) erhalten wurde. Allerdings sind für diese Verbindung keine physikalischen Daten angegeben. Die Aufarbeitung läßt auf das Vorliegen eines Anomerengemisches schließen. J. J. K. NOVÁK und F. ŠORM, Tschech. Pat. 107594 v. 15. 6. 1963, C. A. **60**, 5627 [1964].

⁶⁾ P. A. LEVENE und F. CORTESE, J. biol. Chemistry **92**, 53 [1931]; J. DAVOLL und B. LYTCHGOE, J. chem. Soc. [London] **1949**, 2526.

⁷⁾ J. J. K. NOVÁK und F. ŠORM, Collect. czechoslov. chem. Commun. **27**, 902 [1962].

⁸⁾ I. GOODMAN und J. P. HOWARD, Abstr. Amer. chem. Soc., 115. Meeting, Div. biol. Chemistry, San Francisco 1949, 24c; J. J. FOX, L. F. CAVALIERI und N. CHANG, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4315 [1953].

Versuche, Quecksilbersalze des Thymins mit 2-Desoxy-3.4.6-tris-*O*-[*p*-nitro-benzoyl]- α -D-*arabino*-hexapyranosylbromid in Toluol umzusetzen, waren kürzlich bereits ohne Erfolg unternommen worden¹⁾. Gleichmaßen fanden wir beim Erwärmen von Monoquecksilberthymin IIa⁹⁾ mit dem entsprechenden, aus 3.4.6-Tri-*O*-acetyl-D-glucal mit Bromwasserstoff in Lösung erhaltenen 2-Desoxy-3.4.6-tri-*O*-acetyl-D-glucopyranosylbromid (I) in aromatischen Kohlenwasserstoffen nach kurzer Zeit lediglich eine intensive Zersetzung der Zuckerkomponente. Vereinigt man dagegen die Reaktionspartner I und IIa in wasserfreiem Dimethylformamid als Verdünnungsmittel, so setzt in exothermer Reaktion sofort die erwünschte Kondensation ein.



Das aus einem Anomerengemisch bestehende 1-[2-Desoxy-3.4.6-tri-*O*-acetyl-D-glucopyranosyl]-thymin (α,β -IIIa) wurde wegen seiner geringen Kristallisationsneigung ohne Reinigung nach ZEMPLÉN mit Natriummethylat katalytisch entacetyliert. Aus dem resultierenden Rohprodukt, in dem dünnschichtchromatographisch ca. 10 Substanzen nachweisbar sind, läßt sich durch Verteilungschromatographie an Hyflo Super-Cel bei geeigneter Laufmittelszusammensetzung das aus α - und β -Form bestehende 1-[2-Desoxy-D-glucopyranosyl]-thymin (α,β -IVa) fast analysenrein abtrennen. Bezogen auf Monoquecksilberthymin beträgt die Ausbeute 30%. Aus der spezifischen Drehung der getrennten Anomeren errechnet sich für das Gemisch ein Verhältnis von

⁹⁾ Die hier gewählte Formulierung der Monoquecksilberpyrimidin-Derivate entspricht der gebräuchlichen Schreibweise, schließt aber eine andere Struktur nicht aus.

67% α - zu 33% β -Form. Das Überwiegen der α -Form stimmt mit der Feststellung von M. HOFFER¹⁰⁾ überein, daß sich bei der Thymidin-Synthese in stark polaren Verdünnungsmitteln bevorzugt α -Thymidin bildet.

Eine vollständige Trennung von α - und β -IVa war weder an Hyflo Super-Cel- oder Cellulose-Säulen noch durch Papier- oder Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G mit verschiedenen Laufmitteln (auf Butanol- oder Essigesterbasis) zu erzielen. Dagegen gelang durch mehrfaches Umkristallisieren aus absolutem Äthanol die Isolierung des reinen β -IVa ($[\alpha]_D^{20}$: +4.0°), das mit dem nach ZORBACH und DURR¹⁾ gewonnenen Produkt identisch ist. Zur Reindarstellung der stärker rechts drehenden α -Form ($[\alpha]_D^{20}$: +89.6°) wurde die bei der Verteilungschromatographie an Hyflo Super-Cel beobachtete Anreicherung von α -IVa in den ersten Fraktionen wiederholt ausgenutzt und erst dann umkristallisiert. Beide Verbindungen besitzen im neutralen und alkalischen pH-Bereich gleiche UV-Absorptionsspektren, so daß eine verschiedenartige Ringsubstitution ausgeschlossen werden kann.

Die von uns getroffene Konfigurationszuordnung entspricht den HUDSONSchen Isorotationsregeln, obwohl bei deren Anwendung auf Nucleoside Zurückhaltung geboten erscheint, wie die zunehmende Zahl von Abweichungen bei Pyrimidin-glykosiden der 2-Desoxy-D-ribofuranose^{10,11)} und D-Ribofuranose¹²⁾ beweist.

Ob, wie kürzlich berichtet¹³⁾, auch die nach dem Hilbert-Johnson-Verfahren gewonnenen Anomerenpaare des 1-D-Ribo- und 1-D-Xylopyranosylthymins zu diesen Ausnahmen gehören, ist nicht ganz sicher, wenn man die von anderer Seite¹²⁾ geäußerten Bedenken gegen die Beweisführung bei der Konfigurationszuordnung berücksichtigt.

Untersuchungen von R. U. LEMIEUX und Mitarbb.¹⁴⁾ zufolge sollen jedoch die spezifischen Drehungen von 2-Desoxy-gluco- und 2-Desoxy-ribofuranosiden den HUDSONSchen Isorotationsregeln gehorchen. Ein wesentlicher Hinweis für die Konfiguration der beiden Thymin-desoxyglucoside dürfte aber der Befund sein, daß — wie weiter unten gezeigt wird — die weniger rechtsdrehende Form (β -IVa) im Fermenttest bedeutend aktiver als α -IVa ist. Erfahrungsgemäß sind Nucleoside mit gesicherter β -Konfiguration entweder allein oder zumindest stärker biochemisch wirksam als die entsprechenden α -Formen.

Beispielsweise hemmt α -Thymidin „Uridin-Desoxyuridin“-Phosphorylase aus Ascites-Tumorzellen nicht und wird durch dieses Ferment, wie auch durch Coli-Nucleosidase¹⁰⁾, im Gegensatz zu β -Thymidin nicht abgebaut¹⁵⁾. Die glykosidische Bindung des 1- β -D-Ribofuranosyl-thymins wird durch Pyrimidin-nucleosid-Phosphorylase enthaltenden Extrakt aus *Bacillus subtilis* 16 gespalten, während das α -Anomere nicht angegriffen wird¹²⁾.

Im Borsäurespray von M. PÖHM und R. WEISER¹⁶⁾ zur papierchromatographischen Identifizierung von 2-Desoxyzuckern (Graufärbung) fanden wir überraschenderweise

¹⁰⁾ Chem. Ber. **93**, 2777 [1960].

¹¹⁾ M. HOFFER, R. DUSCHINSKY, J. J. FOX und N. C. YUNG, J. Amer. chem. Soc. **81**, 4112 [1959]; J. J. FOX, N. C. YUNG, I. WEMPEN und M. HOFFER, ebenda **83**, 4066 [1961]; R. BROSSMER und E. RÖHM, Angew. Chem. **76**, 50 [1964]; Angew. Chem. internat. Edit. **3**, 66 [1964].

¹²⁾ J. FARKAŠ, L. KAPLAN und J. J. FOX, J. org. Chemistry **29**, 1469 [1964].

¹³⁾ T. NAITO und T. KAWAKAMI, Chem. pharmac. Bull. [Tokyo] **10**, 627 [1962].

¹⁴⁾ Vgl. R. U. LEMIEUX und M. HOFFER, Canad. J. Chem. **39**, 110 [1961].

¹⁵⁾ Eigene Versuche. Wir danken der Firma HOFFMANN-LA ROCHE INC., Nutley, für die freundliche Überlassung von α -Thymidin.

¹⁶⁾ Naturwissenschaften **24**, 582 [1956].

ein empfindliches und spezifisches Nachweisreagens für die α -Form der hier beschriebenen Nucleoside der 2-Desoxy-D-glucopyranose. Noch Mengen unter 0.1 μ g geben sich auf Filterpapier nach Besprühen und Erwärmen (105°, 5 Min.) durch eine deutliche, an der Luft wieder verblassende Rotfärbung zu erkennen. β -IVa sowie α - und β -Thymin geben keine Reaktion.

Wie Monoquecksilberthymin konnten wir auch die Monoquecksilber-Derivate des 5-Fluor-, 5-Brom- und 5-Jod-uracils sowie des Uracils selbst unter den gleichen Bedingungen glatt mit I zu den entsprechenden Nucleosiden (IIIb–e bzw. IVb–e) kondensieren. Diese Verbindungen waren von besonderem Interesse, da erfahrungsgemäß die 5-Halogen-uracil-Derivate ähnliche biochemische Eigenschaften wie die analogen Thymin- oder Uracilverbindungen aufweisen und zum anderen das Uracil-desoxyglucosid als Ausgangsprodukt für die Markierung mit radioaktivem Halogen in Frage kommt.

Monoquecksilber-5-brom-uracil (IIc) und das inzwischen auch von anderer Seite^{17,18)} beschriebene Monoquecksilber-5-jod-uracil (II d) wurden quantitativ aus äquimolaren Mengen Quecksilber(II)-acetat und dem 5-Halogen-uracil gewonnen. Entgegen den bisherigen Erfahrungen¹⁹⁾ ist in gleicher Weise – wie auch mit Millons-Reagens²⁰⁾ – aus Uracil ein stöchiometrisches Monoquecksilberuracil (IIe) erhältlich.

Die acetylgeschützten Nucleoside α,β -IIIb–e wurden ebenfalls ohne vorherige Isolierung und Reinigung nach ZEMPLÉN entacyliert. Im Fall des 5-Fluor-Derivats (α,β -IIIb) bildet sich dabei jedoch neben α,β -IVb ein zweites Produkt, das trotz etwas geringerer Wanderungsgeschwindigkeit auf der Säule nicht völlig abgetrennt werden konnte. UV-Absorption und chromatographisches Verhalten sprechen gegen eine tiefgreifende Veränderung des Gesamtmoleküls. Führt man die Entacylierung von α,β -IIIb dagegen in methanolischer Salzsäure durch, so entsteht nur das 5-Fluor-1-[2-desoxy- α,β -D-glucopyranosyl]-uracil (α,β -IVb) mit den erwarteten Analysenwerten.

Analog lassen sich auch IVa, c–e durch Protonenkatalyse entacylieren, wobei allerdings bei der 5-Brom- und 5-Jodverbindung bereits die Spaltung der Glykosidbindung nachweisbar ist. Diese Zunahme der Hydrolysenempfindlichkeit gegenüber Säuren mit steigendem Molekulargewicht des 5-substituierten Halogens stimmt mit dem Verhalten der isologen Pyrimidin-desoxyribofuranoside überein²¹⁾.

Aus den Anomerengemischen wurden die stärker rechts drehenden α -Formen (α -IVb–e) durch wiederholte Säulenfraktionierung und Umkristallisation isoliert. Die β -Anomeren wurden mit Ausnahme von β -IVa nicht in reiner Form gewonnen, sondern zur biochemischen Testung nur mehr oder weniger stark angereichert.

Abgesehen von IVe, das gegenüber polaren Lösungsmitteln eine extreme Solvationsneigung aufweist, verhalten sich auf dem Papierchromatogramm die Wanderungsstrecken der Pyrimidin-Basen zu denen ihrer Desoxyglucoside streng proportional (s. Versuchsteil).

¹⁷⁾ G. AMIARD und V. TORELLI, Franz. Pat. 1 336 866 v. 6. 9. 1963, C. A. **60**, 3082 [1964].

¹⁸⁾ M. PRYSTAŠ und F. ŠORMA, Collect. czechoslov. chem. Commun. **29**, 121 [1964].

¹⁹⁾ Vgl. I. c. 4), S. 335.

²⁰⁾ I. BAYER, E. POSGAY und P. MAJLÁT, Pharmaz. Zentralhalle Deutschland **101**, 476 [1962].

²¹⁾ A. WACKER und L. TRÄGER, Z. Naturforsch. **18b**, 13 [1963].

BIOCHEMISCHE HEMMVERSUCHE

Das nach ZORBACH und DURR¹⁾ hergestellte 1-[2-Desoxy-D-glucopyranosyl]-thymine, das mit β -IVa identisch ist, hemmt kompetitiv die Aufspaltung von Pyrimidin-nucleosiden durch das Ferment „Uridin-Desoxyuridin“-Phosphorylase^{2,3)}. 1- β -D-Glucopyranosyl-thymine ist dagegen völlig unwirksam. Nachdem uns auf Grund der im vorhergehenden Teil beschriebenen Synthesen die reinen bzw. angereicherten α - und β -Formen der 2-Desoxy-D-glucopyranoside des Thymins (IVa), 5-Fluor-uracils (IVb), 5-Brom-uracils (IVc), 5-Jod-uracils (IVd) und Uracils (IVe) zur Verfügung standen, haben wir untersucht, inwieweit sich die beiden Anomeren jedes einzelnen Nucleosids und die verschiedenen Pyrimidin-nucleoside untereinander in ihrer Hemmwirkung unterscheiden. Die Nucleoside wurden außerdem mit den in ihnen enthaltenen Pyrimidin-Basen verglichen, die ebenfalls hemmen (Thymine = 5-Brom-uracil = 5-Jod-uracil > 5-Fluor-uracil > Uracil). Dabei wurden folgende Gesetzmäßigkeiten gefunden:

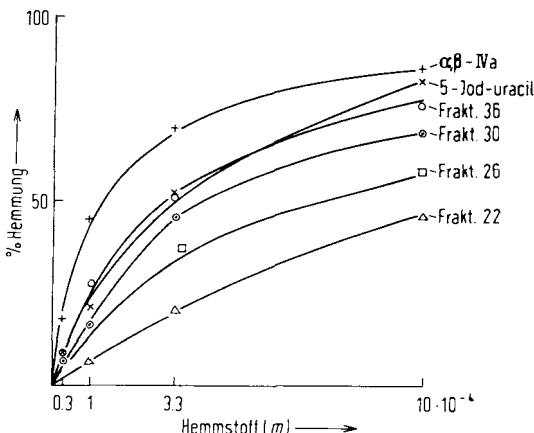
1) Das α -Anomere ist in jedem Falle weniger wirksam als das β -Anomere, aber nicht unwirksam. Das geht aus der Tab. hervor, in der die Wirksamkeit für alle untersuchten Verbindungen an Hand der für eine 50-proz. Hemmung benötigten Hemmstoffkonzentration wiedergegeben ist. Aus der Abbild. ist ersichtlich, wie sich bei der Verteilungschromatographie von α , β -IVd an Hyflo Super-Cel mit zunehmender Fraktionszahl, d. h. zunehmender Anreicherung der β -Form, die Hemmwirkung verstärkt.

Hemmwirkung der Pyrimidin-desoxyglucoside auf die Aufspaltung von Desoxyuridin durch „Uridin-Desoxyuridin“-Phosphorylase aus Ascites-Tumorzellen.

Ansatz: 0.1 ccm $5 \cdot 10^{-3} m$ Desoxyuridin, 0.2 ccm Puffergemisch pH 7.4 (0.2 m Arsenatpuffer und 0.5 m Trispuffer 2:3 gemischt), 0.1 ccm Hemmstoff-Lösung, 0.1 ccm Enzym-Lösung. Inkubationszeit 4 Std. Bei den α -Formen und β -IVa handelt es sich um die reinen Anomeren, bei β -IVb—e um angereicherte Produkte und damit um Näherungswerte

| Hemmstoff | Konz. für 50-proz. Hemmung in $1 \cdot 10^{-4} m$ | Relation der Wirksamkeiten | |
|----------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | | freie Base β -Form | freie Base α -Form |
| Thymine | 3.6 | | |
| α -IVa | 5.3 | 7.2 | 0.7 |
| β -IVa | 0.5 | | |
| 5-Fluor-uracil | 6 | | |
| α -IVb | 18 | 0.8 | 0.3 |
| β -IVb | 8 | | |
| 5-Brom-uracil | 3.3 | | |
| α -IVc | 4.5 | 2.5 | 0.7 |
| β -IVc | 1.3 | | |
| 5-Jod-uracil | 3.2 | | |
| α -IVd | 11 | 1.1 | 0.3 |
| β -IVd | 3.0 | | |
| Uracil | 18 | | |
| α -IVe | 2.5 | 14.4 | 7.2 |
| β -IVe | 1.3 | | |

2) Bei der Überführung der Pyrimidin-Basen in die Nucleoside tritt in den meisten Fällen bei der β -Form eine — z. T. starke — Wirkungssteigerung, bei der α -Form eine Wirkungsschwächung ein. Eine Ausnahme bildet IVe, bei dem auch die α -Form



Hemmwirkung verschiedener Fraktionen einer Verteilungsschromatographie von α, β -IVd an Hyflo Super-Cel. Im Vergleich dazu 5-Jod-uracil und α, β -IVa

wesentlich wirksamer als die freie Base ist. Bei IVb scheint auch die Bildung der β -Form zu einer Wirkungsschwächung zu führen. Wegen eines sehr hohen Anteils α -IVb im Anomerengemisch war es jedoch in diesem Fall nicht möglich, die α -Form in hinreichendem Maße abzutrennen, wie aus Schmelzpunkt und spezifischer Drehung erkennbar ist. Wir möchten daher doch annehmen, daß das reine β -IVb ebenfalls besser als die freie Base hemmt.

Die biochemischen Eigenschaften der 1-[2-Desoxy-D-glucopyranosyl]-pyrimidin-Derivate sind in mehrfacher Hinsicht ungewöhnlich. Zunächst ist die Hemmwirkung durch Nucleoside mit Pyranose-Struktur überhaupt eine Ausnahme. Weiter sind bisher von Nucleosiden mit α -Konfiguration keine Hemmeffekte bekannt. Unerwartet ist schließlich auch die erhebliche Verstärkung der Hemmwirksamkeit, die Uracil durch Überführung in ein α -Glucosid erfährt (Tab.). Nach allem nehmen die dargestellten 1-[2-Desoxy-D-glucopyranosyl]-pyrimidin-Derivate offenbar eine Sonderstellung im Rahmen der bisher bekannten Antimetabolite ein.

β -IVa zeigt den höchsten bisher erzielten Hemmeffekt. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß die gereinigten β -Formen der anderen Verbindungen eine ähnliche oder höhere Wirksamkeit haben. Für praktische Zwecke kann man aber auch direkt das bei der Kondensation anfallende Gemisch von 67% α - und 33% β -Form ohne Auftrennung in die beiden Anomeren anwenden. In Versuchen an Katzen konnte nach vorläufigen Ergebnissen durch Anwendung dieses Gemisches bei der i. p.-Applikation von 5-Jod-desoxyuridin (im Verhältnis α, β -IVa: 5-Jod-desoxyuridin = 2:1) eine fünf-fache Steigerung des Einbaus von Joduracil in die Darm-DNS erhalten werden. Offenbar hemmt das Thymin-desoxyglucosid-Gemisch auch im Organismus die „Uridin-Desoxyuridin“-Phosphorylase, die normalerweise 5-Jod-desoxyuridin so schnell aufspaltet, daß es nur in geringem Umfang für den Einbau in die DNS zur Verfügung steht.

Herrn Prof. Dr. K. LOHMANN danken wir sehr für die ständige Förderung unserer Arbeit und für wertvolle Ratschläge.

Die Analysen wurden von Frau F. KNOBLOCH, Leiterin der Zentralstelle für Mikroelementaranalyse des Forschungszentrums Berlin-Buch, angefertigt.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Alle Schmelzpunkte wurden mit dem Mikro-Schmelzpunktsapparat nach Boëtius bestimmt. Die spezifischen Drehungen wurden in Wasser gemessen.

Lösungsmittel zur Chromatographie: Essigsäureäthylester/Isopropylalkohol/Wasser 4 : 1 : 2 (Gemisch A), 8 : 1 : 4 (Gemisch B).

Verteilungschromatographie an Hyflo Super-Cel-Säulen: 80 g gereinigtes Hyflo Super-Cel²²⁾ werden mit 32 ccm der unteren Phase des jeweiligen Lösungsmittelgemisches gut gemischt und in eine Säule von 2.5 cm Durchmesser und mindestens 50 cm Länge gleichmäßig eingestampft. Analog wird die in unterer Phase gelöste Substanz an der doppelten Trägermenge adsorbiert und aufgetragen. Eluiert wird mit der oberen Phase unter leichtem Überdruck (Aquariumpumpe), wobei zweckmäßig Fraktionen von 10 ccm aufgefangen und durch UV-Absorptionsmessung bei $\lambda = 260$ nm auf ihren Nucleosid-Gehalt geprüft werden. Die ersten Fraktionen der Rohgemische enthalten regelmäßig braune und UV-absorbierende Nebenprodukte, die aber von den folgenden Pyrimidin-desoxyglucosiden stets durch optisch leere Fraktionen getrennt sind.

1-[2-Desoxy- α,β -D-glucopyranosyl]-thymine (α,β -IVa): In eine Lösung von 5.4 g (20 mMol) 3.4.6-Tri-O-acetyl-D-glucal²³⁾ in 20 ccm absol. Benzol wird unter Eiskühlung 1 Stde. trockener Bromwasserstoff eingeleitet und anschließend das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen. Der Sirup wird 3 mal in je 15 ccm absol. Benzol gelöst, jeweils i. Vak. wieder eingeengt und schließlich in 10 ccm absol. Benzol aufgenommen.

Eine Suspension von 2.27 g (7.0 mMol) Monoquecksilberthymine¹⁰⁾ in 20 ccm Dimethylformamid und 7 ccm Toluol wird durch Abdestillieren des Toluols bei Normaldruck unter Rühren azeotrop getrocknet. Nach dem Erkalten gibt man bei Raumtemperatur unter Rühren die oben erhaltene Benzol-Lösung des 2-Desoxy-3.4.6-tri-O-acetyl-D-glucopyranosylbromids (I) auf einmal zu, wobei unter Selbsterwärmung rasch eine klare Lösung entsteht²⁴⁾. Nach 3 stdg. Rühren unter Feuchtigkeitsausschluß setzt man 40 ccm Chloroform zu und schüttelt mit 70 ccm 15-proz. Kaliumjodid-Lösung aus. Die mit Na₂SO₄ getrocknete organische Phase wird i. Vak. zum Sirup eingeengt, aus dem durch dreifaches Auskochen mit je 25 ccm getrocknetem Cyclohexan überschüss. Triacetyl-D-glucal extrahiert wird. Das nach Abziehen der Cyclohexanreste hinterbleibende bräunliche Öl wird zur Entacetylierung in 20 ccm absol. Methanol mit 1 n NaOCH₃ bis zum Umschlag von Phenolphthalein versetzt und unter Rückfluß erhitzt. Durch Zutropfen von weiterem Methylat wird der pH-Wert aufrechterhalten, bis er trotz weiteren Siedens für mindestens 10 Min. konstant bleibt (insgesamt 30 Min.). Nach Verdünnen mit 20 ccm Wasser gibt man bis zur neutralen Reaktion Ionenaustauscher KPS 200 (H⁺-Form) zu und engt das Filtrat i. Vak. ein. Der ölige Rückstand wird mit unterer Phase von Laufmittel A auf 10 ccm aufgefüllt, an 20 g Hyflo Super-Cel adsorbiert und mit oberer Phase säulenchromatographisch gereinigt. Die vereinigten Nucleosid-Fractionen (ca. Nr. 25–70) dampft man i. Vak. ein, durchmischt 2 mal mit je 5 ccm absol. Isopropylalkohol,

²²⁾ Produkt der Johns-Manville Corporation. Zur Reinigung vgl. H. M. KISSMAN, C. PIDACKS und B. R. BAKER, J. Amer. chem. Soc. **77**, 18 [1955], i. c.¹⁹⁾.

²³⁾ F. B. CRAMER, J. Franklin Inst. **253**, 277 [1952].

²⁴⁾ Bei portions- oder tropfenweiser Zugabe des Halogenzuckers sowie bei tieferen Temperaturen bleibt ein großer Teil ungelöst, und die Ausbeute ist bedeutend niedriger.

engt jeweils wieder ein und löst den Sirup in einigen ccm heißem Isopropylalkohol. Beim Eindunsten an der Luft bei Raumtemperatur hinterbleiben 580 mg (30.5%) α,β -Gemisch, das mit Isopropylalkohol/Essigester (1:2) nahezu verlustlos aufgenommen werden kann. Schmp. unscharf bei 165°²⁵⁾. $[\alpha]_D^{25}$: +61.8° ($c = 1.74$).

β -Form (β -IVa): Aus dem Anomerengemisch durch 4–5fache Umkristallisation aus absol. Äthanol. Schmp. 232–233° (Lit.¹⁾: 231.5–232.5°). Misch-Schmp. mit authent. Material ohne Depression. $[\alpha]_D^{25}$: +4.0° ($c = 0.691$). UV: In H₂O: λ_{\max} 266 nm, λ_{\min} 236 nm, $\epsilon_{260} = 8900$; in n_{10} NaOH: λ_{\max} 266 nm, λ_{\min} 245 nm. Mit Borsäurespray nach PÖHM und WEISER¹⁶⁾ erfolgt keine Reaktion.

α -Form (α -IVa): Die erste Hälfte der bei der Säulenchromatographie anfallenden Thymin-desoxyglucosid-Fractionen (ca. Nr. 25–45) wird wie oben bis zum Sirup aufgearbeitet, mit einigen ccm unterer Phase von Laufmittel B aufgenommen und erneut an Hyflo Super-Cel chromatographiert. Davon ergibt das erste Drittel des Nucleosid-Eluats nach analoger Aufbereitung und einmaliger Umkristallisation aus Isopropylalkohol 23 mg α -IVa. Bei weiterer Umkristallisation bleiben die physikalischen Daten unverändert. Schmp. 182–183° (bei 179° erweichend). $[\alpha]_D^{25}$: +89.6° ($c = 1.63$). UV-Maxima und -Minima wie β -IVa. $\epsilon_{260} = 9100$ (H₂O).

| | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------|---------|--------|---------|
| C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₆ (272.3) | Ber. | C 48.53 | H 5.92 | N 10.29 |
| | Gef. (β) | C 48.50 | H 5.88 | N 10.36 |
| | Gef. (α) | C 48.51 | H 6.20 | |

5-Fluor-1-[2-desoxy- α,β -D-glucopyranosyl]-uracil (α,β -IVb): Wie unter α,β -IVa beschrieben, werden 5.4 g Triacetyl-D-glucal mit Bromwasserstoff behandelt und mit 2.3 g (7.0 mMol) azeotrop getrocknetem Monoquecksilber-5-fluor-uracil²⁶⁾ in Dimethylformamid kondensiert. Das nach der Cyclohexanextraktion anfallende rohe Triacetyl-nucleosid-Gemisch α,β -IIIb wird durch 20stdg. Stehenlassen mit 40 ccm methanol. 1 n HCl bei Raumtemperatur entacyliert und nach der Neutralisation mit NaOH i. Vak. eingedampft. Der halbkristalline Rückstand wird mit unterer Phase von Laufmittel B auf 10 ccm aufgefüllt und säulenchromatographisch gereinigt. — Die vereinigten α,β -IVb-Fractionen (meist Nr. 40–95) ergeben nach der Weiterbehandlung wie unter α,β -IVa einen sirupösen oder festen amorphen Rückstand, der in wenig warmem Isopropylalkohol gelöst und bis zur Niederschlagsbildung mit Essigester versetzt wird. Ausb. 450 mg (23%). Schmp. unscharf um 180°. $[\alpha]_D^{25}$: +79° ($c = 1$).

α -Form (α -IVb): Nach 2–3facher Umkristallisation des Anomerengemisches aus Isopropylalkohol resultieren derbe, farblose Kristalle vom Schmp. 186–186.5°. Ab ca. 190° bilden sich in der Schmelze wieder Kristalle, die bei 220–230° zerfließen. $[\alpha]_D^{25}$: +99.4° ($c = 0.5$). UV: In H₂O: λ_{\max} 267 nm, λ_{\min} 235 nm, $\epsilon_{260} = 8000$; in n_{10} NaOH: λ_{\max} 267 nm, λ_{\min} 248 nm. Bei einer wiederholten Säulenfraktionierung des Anomerengemisches, analog der Gewinnung von α -IVa, erhält man ein identisches Produkt.

| | | | | | | | | |
|------------------------------------------------------------------------|------|---------|--------|---------|------|---------|--------|--------|
| C ₁₀ H ₁₃ FN ₂ O ₆ (276.2) | Ber. | C 43.48 | H 4.75 | N 10.14 | Gef. | C 43.68 | H 4.74 | N 9.85 |
|------------------------------------------------------------------------|------|---------|--------|---------|------|---------|--------|--------|

Monoquecksilber-5-brom-uracil (IIc): Zu einer warmen Lösung von 6.37 g (20 mMol) Quecksilber(II)-acetat in 120 ccm Methanol fügt man unter Rühren 3.82 g (20 mMol) 5-Brom-uracil in 180 ccm heißem Wasser, läßt erkalten und rührt noch ca. 12 Std. Der abgetrennte Niederschlag wird durch wiederholte azeotrope Destillation mit Toluol unter Rühren von Wasser- und Methanolresten befreit und bei 70° getrocknet. Ausb. 7.62 g (98%).

| | | | | |
|-----------------------------------------------------------|------|--------|------|------------------------|
| C ₄ HBrHgN ₂ O ₂ (389.6) | Ber. | N 7.12 | Gef. | N 6.67 (nach KJELDAHL) |
|-----------------------------------------------------------|------|--------|------|------------------------|

²⁵⁾ Der Misch-Schmp. der anomeren Thymin-desoxyglucoside zeigt eine Depression von ca. 15°.

²⁶⁾ N. C. YUNG, J. H. BURCHENAL, R. FECHER, R. DUSCHINSKY und J. J. FOX, J. Amer. chem. Soc. **83**, 4060 [1961].

5-Brom-1-[2-desoxy- α - β -D-glucopyranosyl]-uracil (α , β -IVc): Analog der Darstellung von α , β -IVa wird eine bromwasserstoff-gesätt. Lösung von 5.4 g *Triacetyl-D-glucal* mit 2.72 g (7.0 mMol) *IIC* umgesetzt und das acetylierte Rohkondensat α , β -IIIc mit *Natriummethylat* umgeestert. — Ähnlich wie bei α , β -IVb kann die Entacetylierung auch durch 4-tägiges Stehenlassen mit 2-proz. methanol. *HCl* bei Raumtemperatur erfolgen, wobei die Ausb. jedoch etwas niedriger ist. — Nach säulenchromatographischer Reinigung mit Laufmittel B wird von den vereinigten Nucleosid-Fractionen (Nr. 22–64) das Lösungsmittel i. Vak. abgetrieben und der Rückstand mehrmals mit etwas absol. Äthanol versetzt und eingengt. Aus Isopropylalkohol scheiden sich beim Anreiben und nach Essigesterzusatz 695 mg (30%) ab. Schmp. 167–177° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: +39.2° (c = 1.57).

α -Form (α -IVc): Das erste Drittel der oben eluierten Nucleosid-Fractionen (22–38) wird eingengt, mit Laufmittel B erneut an einer Säule fraktioniert und die erste Hälfte davon analog aufgearbeitet. Ausb. 55 mg. Schmp. aus Methanol 189.5–190.5°. $[\alpha]_D^{20}$: +46.5° (c = 0.99). UV: In H_2O : λ_{max} 276 nm, λ_{min} 242 nm, ϵ_{260} = 4800; in n_{10} NaOH: λ_{max} 277 nm, λ_{min} 250 nm.

$C_{10}H_{13}BrN_2O_6$ (337.1) Ber. C 35.62 H 3.89 N 8.31 Gef. C 35.75 H 4.03 N 8.15

Monoquecksilber-5-jod-uracil (II d): Entsprechend *IIC* erhält man aus 4.76 g (20 mMol) 5-Jod-uracil in 100 ccm heißem Wasser 8.6 g *II d* (99%). Bei 280° partiell schmelzend, darüber langsame Zers. (Lit. 17); Schmp. 280°).

$C_4HHgJN_2O_2$ (436.6) Ber. N 6.42 Gef. N 6.26 (nach KJELDAHL)

5-Jod-1-[2-desoxy- α - β -D-glucopyranosyl]-uracil (α , β -IVd): Wie unter α , β -IVa beschrieben, werden 5.4 g *Triacetyl-D-glucal* mit *Bromwasserstoff* behandelt und mit 3.06 g (7.0 mMol) *II d* kondensiert. Nach der Entacetylierung der rohen *Triacetyl-nucleoside* α , β -III d mit *Natriummethylat* wird mit Laufmittel B analog säulenchromatographisch gereinigt. Die Nucleosid-Fractionen (ca. Nr. 15–50) werden i. Vak. zum Sirup eingedampft. Nach Zugabe von wenig Wasser scheidet sich rasch das kristalline *Trihydrat von* α , β -IVd (ca. 500 mg) ab, das aus Wasser umkristallisiert und i. Vak. über P_2O_5 bei Raumtemperatur getrocknet wird.

$C_{10}H_{13}JN_2O_6 \cdot 3H_2O$ (438.3) Ber. N 6.39 Gef. N 6.30

Ein wasserfreies Produkt erhält man daraus durch 2–3stdg. Erhitzen auf 100° über P_2O_5 bei 1 Torr. $[\alpha]_D^{20}$: +20° (c = 1.2).

α -Form (α -IVd): Das Anomerengemisch wird 4–6 mal aus Wasser umkristallisiert und dann dehydratisiert. Die Substanz erweicht um 125° und schmilzt bei 167–170° unter Zers. $[\alpha]_D^{20}$: +39.9° (c = 1). UV: In H_2O : λ_{max} 286 nm, λ_{min} 246 nm, ϵ_{260} = 3500; in n_{10} NaOH: λ_{max} 286 nm, λ_{min} 250 nm.

$C_{10}H_{13}JN_2O_6$ (384.1) Ber. C 31.27 H 3.41 N 7.30 Gef. C 31.05 H 3.61 N 7.52

Monoquecksilberuracil (II e): Wie unter *IIC* ausgeführt, ergeben 6.37 g *Quecksilber(II)-acetat* und 2.24 g (20 mMol) *Uracil* in 70 ccm heißem Wasser 5.9 g (95%) *II e*.

$C_4H_2HgN_2O_2$ (310.7) Ber. N 9.01 Gef. N 8.25 (nach KJELDAHL)

1-[2-Desoxy- α - β -D-glucopyranosyl]-uracil (α , β -IVe): 2.18 g (7.0 mMol) *II e* werden, wie unter α , β -IVa beschrieben, mit einer bromwasserstoff-gesätt. Lösung von 5.4 g *Triacetyl-D-glucal* umgesetzt. Das *Triacetyl-nucleosid* α , β -III e wird mit *Natriummethylat* entacyliert und mit Laufmittel A chromatographiert. Man engt die Nucleosid-Fractionen i. Vak. ein, nimmt den Rückstand mit Essigester/Äther (1:1) auf und vervollständigt den Niederschlag in der Suspension durch Ätherzugabe. Die leicht hygroskopische, amorphe Substanz erweicht nach dem Trocknen (P_2O_5 , 65°, 1 Torr) um 80° und schmilzt gegen 90° unscharf. $[\alpha]_D^{20}$: +75.3° (c = 0.69).

α -Form (α -IVe): Wie bei α -IVa wird die erste Hälfte der Nucleosid-Fractionen von α , β -IVe vereinigt und eingeeengt, mit Laufmittel B erneut über eine Säule gegeben und die erste Hälfte des nucleosidhaltigen Eluats i. Vak. eingedampft. Man löst den Rückstand in Methanol, fällt mit Äther und trocknet die amorphe Substanz wie oben. Schmp. $85-87^{\circ}$ ²⁷⁾. $[\alpha]_D^{25}$: $+85.5^{\circ}$ ($c = 0.585$). UV: In H_2O : λ_{\max} 260 nm ($\epsilon = 9900$), λ_{\min} 230 nm; in $n/_{10}$ NaOH: λ_{\max} 260 nm ($\epsilon = 8300$), λ_{\min} 242 nm.

$C_{10}H_{14}N_2O_6$ (258.2) Ber. C 46.51 H 5.46 N 10.85 Gef. C 46.58 H 5.88 N 10.84

Papierchromatographie: Absteigend auf Papier Schleicher & Schüll 2043 b, Lösungsmittel-gemisch A (obere Phase), Substanzmenge je $3 \cdot 10^{-7}$ Mol, Nachweis durch UV-Absorption.

Relative Wanderungsstrecken: Uracil/Thymin/5-Fluor-/5-Brom-/5-Jod-uracil = 0.73 : 1.0 : 1.07 : 1.3 : 1.33; α , β -IVe/ α , β -IVa/ α , β -IVb/ α , β -IVc/ α , β -IVd = 0.62 : 1.0 : 1.08 : 1.3 : 1.35.

Zur biochemischen Testung: Die Hemmwirkung der Pyrimidin-desoxyglucoside auf die „Uridin-Desoxyuridin“-Phosphorylase aus Ascites-Tumorzellen wurde nach der an anderer Stelle³⁾ beschriebenen Methodik getestet. Es wurden folgende angereicherte β -Formen verwendet:

β -IVb: Nach der Säulenchromatographie von α , β -IVb wird die zweite Hälfte der Nucleosid-Fractionen eingeeengt und mit Laufmittel B erneut über eine Säule geschickt. Von den Eluatn wird wiederum die zweite Hälfte eingedampft und das Öl in wenig heißem n-Butanol gelöst. Es kristallisieren langsam ca. 10 mg aus. Schmp. $165-175^{\circ}$. $[\alpha]_D^{25}$: $+60.6^{\circ}$ ($c = 0.616$).

β -IVc: Aus den letzten 10 Nucleosid-Fractionen, die bei der Chromatographie von α , β -IVc anfallen, ließen sich 27 mg farblose Kristalle isolieren, die sich bei 175° partiell zersetzen und bei $214-216^{\circ}$ schmelzen.

β -IVd: Eine der letzten Nucleosid-Fractionen (Nr. 36) der α , β -IVd-Säule wurde an der Luft eingedunstet, wobei sich farblose Nadeln abschieden, die sich über 180° langsam zersetzen.

β -IVe: Entsprechend der Gewinnung von α -IVe wurde die zweite Hälfte der α , β -IVe-Fractionen erneut chromatographiert und davon wiederum die zweite Hälfte analog aufgearbeitet. Das gefällte Produkt ist hygroskopisch. $[\alpha]_D^{25}$: $+55.7^{\circ}$ ($c = 0.485$, aus der Extinktion unter Annahme von $\epsilon_{260} = 9900$ berechnet). [595/64]

²⁷⁾ Das in der Literatur⁸⁾ beschriebene 1-[2-Desoxy-D-glucopyranosyl]-uracil schmilzt bei $169-170^{\circ}$ bzw. $168-169^{\circ}$ und dürfte das β -Anomere sein.