

PETER LANGEN

Antimetabolite des Nucleinsäure-Stoffwechsels

Antimetabolite des Nucleinsäure-Stoffwechsels

Biochemische Grundlagen der Wirkung

Dr. habil. PETER LANGEN

Wissenschaftlicher Abteilungsleiter im Institut für Biochemie
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch

Mit 40 Abbildungen im Text, einer Farbtafel und vielen Formelbildern

Vorwort und Zusammenfassung in deutscher und englischer Sprache



AKADEMIE-VERLAG · BERLIN

1968

Erschienen im Akademie-Verlag GmbH, 108 Berlin, Leipziger Straße 3—4

Copyright 1968 by Akademie-Verlag GmbH

Lizenznummer: 202 · 100/497/68

Gesamtherstellung: VEB Druckhaus „Maxim Gorki“, 74 Altenburg

Bestellnummer: 5672 · ES 17 E/18 G 1

Vorwort

Die systematische Entwicklung neuer biologisch aktiver Verbindungen, d. h. ihre Synthese, die biochemische Analyse ihrer Wirkungsweise, sowie die pharmakologische und schließlich die klinische Untersuchung vereint Wissenschaftler wie Chemiker, Biochemiker, Genetiker, Mikrobiologen und Mediziner zur interdisziplinären Zusammenarbeit. Keiner dieser Wissenschaftler kann dabei heute noch die vielfältigen Details auf den verschiedenen Wissensgebieten kennen, für alle ist es aber wichtig, die großen Zusammenhänge zu überblicken. Im vorliegenden Buch sollen diese Zusammenhänge für eine Gruppe von Verbindungen behandelt werden, die in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen haben — die Antimetabolite des Nucleinsäure-Stoffwechsels. Prinzipien und Probleme der Wirkung von Antimetaboliten sollen hier in einer Art dargestellt werden, welche die Wissenschaftler verschiedener Disziplinen mit den Besonderheiten und Vorzügen dieser Verbindungsgruppe vertraut macht. Dazu gehört vor allem die reizvolle Möglichkeit, bei der Neuentwicklung von biologisch aktiven Verbindungen die molekulare Struktur verschiedenster Zellinhaltsstoffe zum Ausgangspunkt für die Synthese von spezifischen Hemmstoffen zu machen, die in voraussehbarer Weise in bestimmte Biosynthesen eingreifen. Damit entfällt hier weitgehend das intellektuell unbefriedigende, rein empirische Ausprobieren einer Verbindung auf ihre biologische Aktivität hin (wobei die Erfolgchancen nicht besser — und häufig auch nicht verdienter — als in einer Lotterie sind). Ganz frei von Empirie ist allerdings auch die Antimetabolit-Forschung nicht, da sich nicht mit absoluter Sicherheit voraussagen läßt, ob und welche Modifikationen in der molekularen Struktur einen Metaboliten zu einer wirksamen oder völlig inerten Verbindung werden lassen. In diesem Zusammenhang ist von HITCHINGS der treffende Ausdruck „rational empiricism“ geprägt worden.

Eine erfolgversprechende experimentelle Arbeit auf dem Gebiet der Antimetabolit-Forschung setzt nicht nur eine gute Einsicht in die Vorgänge des Intermediär-Stoffwechsels voraus, sondern erfordert auch eine genaue Kenntnis der bewährten Metabolit-Modifikationen und ihrer Angriffspunkte auf molekularer Ebene. Die Antimetabolit-Forschung ist daher ein besonders gutes Beispiel für die enge Verbindung zwischen Grundlagen-Forschung und Zweck-Forschung. So hat die rasche Entwicklung der Molekularbiologie und ihrer Methoden in den letzten 15 Jahren die Forschung über Antimetabolite des Nucleinsäure-Stoffwechsels in großem Umfang gefördert. Sie hat dazu beigetragen, viele Wirkungsmechanismen im Detail aufzuklären und darüber hinaus sicher auch die Entwicklung neuer Verbindungen stimuliert. Umgekehrt haben Antimetabolite wie z. B. 5-Brom-2'-

desoxyuridin und 5-Fluoruracil nicht unbeträchtlich zur Aufstellung und Bestätigung bestimmter Theorien der Molekularbiologie beigetragen (Mutations-Mechanismen auf molekularer Ebene, Messenger-RNS-Konzept). Das schnelle Fortschreiten der Forschung über Antimetabolite ist besonders daran zu erkennen, daß die in diesem Buch besprochenen Verbindungen in den Büchern über Antimetabolite von WOOLLEY (1952) und MARTIN (1951) — wenn überhaupt — nur andeutungsweise behandelt sind. Auf diese beiden Bücher sei jedoch schon hier hingewiesen für diejenigen Leser, die sich über die Anfänge der Antimetabolit-Forschung (die weniger Antimetabolite des Nucleinsäure-Stoffwechsels als vielmehr Aminosäure- und Vitamin-Analoga betraf) orientieren wollen.

Fast die gesamte Forschung über Antimetabolite ist dem Ziel gewidmet, zur Verbesserung der Chemotherapie des Krebses beizutragen. Da bisher keine auswertbaren qualitativen Unterschiede im biochemischen Verhalten zwischen Krebs- und Normalzelle bekannt sind, lassen sich auch heute noch keine Antimetabolite gewinnen, die absolut selektiv nur auf die Krebszelle einwirken. Mir scheinen jedoch die Antimetabolite des Nucleinsäure-Stoffwechsels diejenige Verbindungsgruppe zu sein, mit der sich auch auf Grund der heutigen Kenntnisse gezielt eine möglichst optimale partielle Selektivität anstreben läßt. Auf dieses Problem wird in dem der Chemotherapie des Krebses gewidmeten Kapitel 6 genauer eingegangen. Darüber hinaus ist das der Antimetabolit-Wirkung innewohnende Prinzip der Hemmwirkung von Naturstoff-ähnlichen Verbindungen auf Reaktionen, an denen der simulierte Naturstoff beteiligt ist, auch für die Zukunft von besonderer Bedeutung. Es stellt vielleicht die einzige Möglichkeit dar, in rationeller Weise biochemische Unterschiede zwischen der Krebs- und Normalzelle — sobald sie bekannt werden — für die Chemotherapie praktisch auszunutzen.

In diesem Buch sind vor allem die Antimetabolite des Nucleinsäure-Stoffwechsels im engeren Sinne, d. h. Analoga von Purinen und Pyrimidinen und ihrer Nucleoside behandelt worden. Darüber hinaus wird — wenn auch nicht so ausführlich — auch auf die Folsäure- und Glutamin-Antagonisten eingegangen, da sie stark in den Nucleinsäure-Stoffwechsel eingreifen und wesentliche Characteristica zum Antimetabolit-Begriff beitragen. Ich bitte um Verständnis, wenn nicht alle Verbindungen und Gebiete mit gleicher Intensität abgehandelt sind. So haben sicher Probleme, die meinem unmittelbaren Arbeitsgebiet nahe liegen oder vom molekularbiologischen Standpunkt aus besonders interessant sind, eine sehr ausführliche Behandlung erfahren. Der erste und größere Teil des Buches ist der zusammenfassenden Darstellung verschiedener gemeinsamer Eigenschaften der behandelten Verbindungen, wie Wirkungsweise, Resistenz-Probleme, Abbau usw. gewidmet. Der zweite spezielle Teil enthält kurze zusammenfassende Beschreibungen der einzelnen Verbindungen zusammen mit ihren Struktur-Formeln. Soweit über bestimmte Eigenschaften im allgemeinen Teil ausführlicher berichtet wurde, wird im speziellen Teil darauf zurückverwiesen. Darüber hinaus werden im zweiten speziellen Teil zusätzliche Literatur-Angaben über biologische Wirkungen der Verbindungen gemacht. Mit Hilfe des für den zweiten Teil nach Verbindungen gegliederten Inhaltsverzeichnisses ist es so leicht möglich, sich über

spezielle Eigenschaften jeder aufgeführten Verbindung schnell zu orientieren und gleichzeitig einen Eindruck über ähnliche Eigenschaften anderer Verbindungen zu gewinnen. Die Literatur ist etwa bis Anfang 1967 erfaßt.

Das vorliegende Buch hat seinen Zweck erfüllt, wenn es dazu beiträgt der Antimetabolit-Forschung neue Anhänger zu gewinnen, indem es Chemiker zu sinnvollen Modifikationen an Naturstoff-Molekülen anregt (und sie vielleicht vor sinnlosen bewahrt), Biologen beim Studium der resultierenden neuen wie auch bereits bekannter Analoga unterstützt und dem Arzt die Grundlagen der Wirkung von ihm benutzter Antimetabolite nahebringt.

P. LANGEN, August 1967

Foreword

The systematic development of new biologically active compounds, i.e. their synthesis and biochemical analysis of their action, as well as pertinent pharmacological and clinical studies have been uniting for inter-discipline co-operation chemists, biochemists, workers in genetics, microbiologists, and physicians. Today, no scientist is any longer capable of controlling the multifarious details of all the above fields, but it is of utmost importance to all to understand what the major implications are. These implications are to be covered in this book for a group of compounds which has increasingly gained importance in recent years, namely the antimetabolites of nucleic acid metabolism. The principles and problems related to the effect of these antimetabolites are presented with the view of making scientists of different disciplines acquainted with the peculiarities and advantages of this group of compounds. This implies, in the first place, the tempting opportunity to take the molecular structure of various cell constituents as the basis to synthesise specific inhibitors that interfere in a predictable way with certain biosyntheses in the preparation of new biologically active compounds. Such approach would widely eliminate the merely empirical and intellectually unsatisfactory testing of a given compound for its biological activity where the chance of success is often not better and not more deserved than it would be in a lottery. However, not even antimetabolite research will be entirely cleared from empirism, since it is impossible to predict with absolute safety whether and which modifications of the molecular structure will convert a metabolite to an effective or completely inert compound. Hitchings has devised in this connection the suitable term of „rational empirism“.

Promising experimentation in the field of antimetabolite research requires not only profound knowledge of the processes of intermediate metabolism, but also precise understanding of the time-tested metabolite modifications and their points of attack at the molecular level. Antimetabolite research is, therefore, a highly suitable model for the close combination of basic with applied research. The research work on antimetabolites of the nucleic acid metabolism has been greatly promoted by the rapid development of molecular biology and its methods, in the past 15 years. Molecular biology has helped to clarify the details of numerous modes of action, and it certainly has also stimulated the development of new compounds. On the other hand, have antimetabolites, such as 5-bromo-2'-deoxyuridine and 5-fluorouracil, played an efficient role in postulating and confirming certain theories of molecular biology (mechanisms of mutation on molecular level, messenger RNA concept). The rapid progress made in antimetabolite research

is conclusively illustrated by the fact that the compounds discussed in this book were indicated only or not found at all in the books on antimetabolites published by Woolley (1952) and Martin (1951). These books, however, are recommended to all who seek orientation on the early stages of antimetabolite research (which dealt with amino acid and vitamin analogues rather than with antimetabolites of the nucleic acid metabolism).

Antimetabolite research is almost entirely devoted to the goal of improving the chemotherapy of cancer. Since no exploitable qualitative differences are so far known between the biochemical behaviour of the cancer cell and that of the normal cell, no antimetabolites can be prepared as yet which act selectively only on the cancer cell. After all, it is the author's view that the antimetabolites of the nucleic acid metabolism seem to constitute the group of compounds by means of which, on the basis of latest knowledge, a most optimum partial selectivity might be achievable. This problem is treated more in detail in Chapter 6 on the chemotherapy of cancer. In addition, particular importance also to future developments may be claimed for the principle inherent in antimetabolite effect, namely the inhibitory effect of compounds similar to natural substances on reactions in which the simulated natural substance participates. This principle might possibly provide the only chance to practically and rationally utilise for chemotherapy the biological differences between the cancer cell and the normal cell, as soon as they become known.

This book covers mainly the antimetabolites of the nucleic acid metabolism in a somewhat limited sense, i. e. the analogues of purines and pyrimidines and their nucleosides. Less detailed coverage is given to the folic acid and glutamine antagonists which strongly interfere with the nucleic acid metabolism and provide essential characteristics to the definition of antimetabolites. The reader is kindly requested to understand that not every compound and field is treated with equal intensity. Problems very close to the author's special subject and those of particular interest from the molecular-biological point of view are certainly treated in greater detail. The first and major part of the book includes a summarising presentation of various properties common to the compounds described, such as mode of action, problems of resistance, and degradation. In the second more specialised part brief summarising descriptions are given of the various compounds together with their structure formulae. Properties reported in detail in the general part will be referred to in the special part which will include also additional literature references as to works on biological effects of the compounds. Easy orientation on the properties of each of the enlisted compounds as well as on similar properties of other compounds is facilitated by the table of contents of the second part which is subdivided by compounds. The references include the literature published up to early 1967.

It is the established purpose of this book to win new enthusiasts for antimetabolite research by inspiring chemists to undertake sensible modifications of natural compounds (and beware of senseless efforts), by assisting biologists in the study of resulting new as well as of known analogues, and by making the physician more familiar with the fundamentals underlying the action of therapeutically used antimetabolites.

P. LANGEN, August, 1967

Inhalt

Vorwort	5
Foreword	9
Inhalt	11
I. Allgemeiner Teil	15
1. Allgemeine Bemerkungen über die Eigenschaften von Antimetaboliten	17
1.1. Definition, Historie und Abgrenzung von anderen Cytostatica	17
1.2. Über die strukturelle Ähnlichkeit von Antimetabolit und Metabolit	20
1.3. Letale Synthese	22
2. Wirkungsweise	26
2.1. Hemmung von Enzym-Reaktionen	26
2.1.1. Blockierung des katalytisch aktiven Zentrums von Enzymen	28
2.1.1.1. Kinetische Grundlagen der Bindung von Substraten und Inhibitoren an das katalytisch aktive Zentrum	28
2.1.1.2. Antimetabolite als substratanaloge Enzym-Inhibitoren.	33
2.1.2. Reaktion von Antimetaboliten mit dem regulativen Zentrum der Enzyme	40
2.1.2.1. Das Prinzip der Rückkopplungsregulierung von Enzym-Reaktionen	40
2.1.2.2. Antimetabolite als Rückkopplungs-Inhibitoren	43
2.2. Einbau in die Nucleinsäuren	46
2.2.1. Der Einbau von Antimetaboliten in die DNS und seine Folgen	46
2.2.1.1. 5-Bromuracil und 5-Joduracil (Mutationsauslösung S. 54, Strahlensensibilisierung S. 56)	49
2.2.1.2. 5-Trifluormethyluracil.	66
2.2.1.3. 6-Azathymin	66
2.2.1.4. 5-Azaacytosin	66
2.2.1.5. Cytosin-arabinosid	67
2.2.1.6. 2-Aminopurin	67
2.2.1.7. 6-Thioguanin	68

2.2.2.	Der Einbau von Antimetaboliten in die RNS und seine Folgen	69
2.2.2.1.	5-Fluoruracil	69
2.2.2.2.	8-Azaguanin	77
2.2.2.3.	2-Thiouracil	79
2.2.2.4.	Tubercidin (7-Deazaadenosin)	80
2.2.2.5.	5-Azacytosin	80
2.2.2.6.	6-Azacytosin	80
2.2.2.7.	5-Chloruracil	80
2.2.2.8.	5-Bromuracil und 5-Bromcytosin	81
2.2.2.9.	Arabinosyl-Nucleoside	81
2.2.2.10.	3'-Desoxyadenosin	82
3.	Biochemische Ursachen der erworbenen Resistenz	83
3.1.	Ausfall der letalen Synthese	87
3.2.	Veränderung der Affinität zwischen Enzym und Antimetabolit	92
3.3.	Kompensatorisch erhöhte Enzym-Bildung	93
3.4.	Verzögerte Penetration von Antimetaboliten in die Zelle	96
3.5.	Erhöhter Abbau von Antimetaboliten	97
4.	Der Abbau der Antimetabolite	98
4.1.	Desaminierungen bei Purinen	98
4.2.	Abbau von Hypoxanthin, Xanthin und ihrer Analoga	100
4.3.	Desaminierungen bei Pyrimidinen	101
4.4.	Abbau von Thymin, Uracil und 5-halogenierten Uracilen	102
4.5.	Nucleosid-Spaltung	104
4.6.	Abbau der Folsäure-Antagonisten	105
4.7.	Abbau von Azaserin	106
5.	Biochemische Probleme bei der Anwendung von Antimetaboliten des Nucleinsäure-Stoffwechsels zur Chemotherapie des Krebses	107
II.	Spezieller Teil	121
1.	Unnatürliche Pyrimidin-Derivate	123
1.1.	5-Fluoruracil, -ribosid und -2'-desoxyribosid	123
1.2.	5-Fluor-2'-desoxycytidin	125
1.3.	5-Fluororotat	125
1.4.	5-Trifluormethyl-2'-desoxyuridin	126
1.5.	5-Brom-2'-desoxyuridin, 5-Jod-2'-desoxyuridin	126
1.6.	5-Chlor-2'-desoxyuridin	128
1.7.	5-Aminouracil, -ribosid und -2'-desoxyribosid	128
1.8.	5-Methylamino-2'-desoxyuridin	129
1.9.	5-Nitrouracil, -2'-desoxyribosid	129

1.10.	5-Hydroxyuracil, -ribosid	129
1.11.	5-Mercaptouracil	130
1.12.	5-Äthyluracil-,2'-desoxyribosid	130
1.13.	5-Allyl-2'-desoxyuridin	130
1.14.	Uracil-6-sulfonsäure	131
1.15.	6-Aminothymin	131
1.16.	N-Methyluridin	131
1.17.	4-N-Hydroxy-2'-desoxycytidin	132
1.18.	2-Thiouracil	132
1.19.	Pyrimidin-2-one, -2'-desoxyriboside	132
1.20.	6-Azauracil, -ribosid	133
1.21.	5-Azauracil	134
1.22.	6-Azacytidin	134
1.23.	5-Azacytidin	135
1.24.	6-Azathymine, -2'-desoxyribosid.	136
1.25.	5-Azaorotat	136
2.	Unnatürliche Purin-Derivate	137
2.1.	6-Mercaptopurin	137
2.2.	6-Thioguanin	139
2.3.	6-Chlorpurin	140
2.4.	6-Methylpurin	140
2.5.	6-N-Hydroxylaminopurin	141
2.6.	2-Fluoradenin	141
2.7.	2-Aminopurin	141
2.8.	2,6-Diaminopurin.	141
2.9.	Pyrazolo [3,4-d]pyrimidine	142
2.10.	Tubercidin (7-Deazaadenosin)	143
2.11.	8-Azaguanin	144
2.12.	3-Isoadenosin (3- β -D-Ribofuranosyladenin)	145
2.13.	Adenosin-5'-sulfato-pyrophosphat	145
2.14.	Adenosin- und Guanosin-5'-[methyldiphosphonyl] phosphat	146
3.	Purin- und Pyrimidin-Nucleoside mit unnatürlicher Zuckerkomponente	147
3.1.	Arabinosyl-Nucleoside	147
3.2.	Xylosyl-Nucleoside	148
3.3.	3'-Desoxyadenosin	149
3.4.	4'-Thioadenosin	150
3.5.	Homoribose-Nucleoside	150
3.6.	2'-Desoxyglucopyranosyl-thymine, 2'-Desoxyxylo- pyranosyl-thymine	150
3.7.	Psicofuranin (Angustmycin C)	151
3.8.	Decoyinin (Angustmycin A)	152
3.9.	Puromycin	153

4.	Folsäure-Antagonisten (Aminopterin, Amethopterin)	154
5.	Glutamin-Antagonisten (Azaserin und 6-Diazo-5-oxo-L-Norleucin (DON))	157
6.	Sonstige Verbindungen	158
6.1.	N-substituierte Biuret-Derivate.	158
6.2.	Antagonisten des Carbamoylaspartats	158
6.3.	Hadacidin	158
III.	Anhang	159
1.	Schemata der Biosynthese der Purin- und Pyrimidin-Nucleotide.	161
2.	Enzym-Nummern entsprechend der Enzym-Nomenklatur der International Union of Biochemistry (I. U. B.)	167
IV.	Zusammenfassung — Summary.	169
	Literaturverzeichnis	187
	Ergänzungen und Nachtrag neuer Befunde	217

1. Allgemeine Bemerkungen über die Eigenschaften von Antimetaboliten

1.1. Definition, Historie und Abgrenzung von anderen Cytostatica

Die biochemische Dynamik einer Zelle bedingt den dauernden Umsatz bestimmter, als Metabolite bezeichneter Verbindungen in enzymatisch katalysierten Reaktionen. Dabei gehen diese Metabolite mit den für sie zuständigen Enzymen fortlaufend reversible Bindungen ein. Antimetabolite sind, wie der Name besagt, in ihrer Wirkung gegen die Metabolite gerichtet. Sie sind ihnen in der Struktur so ähnlich, daß sie ihren Platz am Enzym besetzen können, ohne aber ihre biochemische Funktion zu erfüllen. Daher wird die enzymatische Reaktion entweder blockiert oder verläuft normal, weil nicht der Metabolit, sondern der Antimetabolit umgesetzt wird.

In der Möglichkeit, durch geringe Abwandlung der molekularen Struktur eines Metaboliten einen Hemmstoff zu erhalten, der selektiv und in voraussehbarer Weise nur in bestimmte biochemische Reaktionsketten eingreift, liegt der große Vorteil der Antimetabolite gegenüber anderen Pharmaka.

Antimetabolite des Nucleinsäure-Stoffwechsels werden im allgemeinen durch Abwandlung an den Purin- oder Pyrimidin-Basen, in letzter Zeit aber auch häufig durch Abwandlung der Zuckerkomponente von Nucleosiden gewonnen. Im weiteren Sinne gehören auch die Folsäure- und Glutamin-Antagonisten zu den Antimetaboliten des Nucleinsäure-Stoffwechsels, da eine Hauptfunktion der Folsäure in ihrem Beitrag zur Purin- und Thymin-Synthese liegt und Glutamin bei der Purin- und Pyrimidin-Synthese eine große Rolle spielt.

Eine Hemmung der Nucleinsäure-Synthese wirkt sich in erster Linie auf Zellen mit einer hohen Mitose-Rate aus. Antimetabolite des Nucleinsäure-Stoffwechsels hemmen daher die Zellteilung und stellen somit Cytostatica dar. Beim Menschen und beim Tier werden infolgedessen vorwiegend solche Gewebe von der Wirkung der Antimetabolite betroffen, deren physiologische Funktion mit einer ständigen Regeneration verbunden ist, wie z. B. das Knochenmark und verschiedene Epithelien, vor allem das Darmepithel. Da auf Grund quantitativer, im allgemeinen noch unbekannter Unterschiede zwischen Krebszellen und sich schnell teilenden Normalzellen häufig eine partielle Selektivität der Wirkung gegen Krebsgewebe zustande kommt, wirken viele Antimetabolite cancerostatisch und werden in der Klinik zur Chemotherapie des Krebses angewandt.¹ Auf die Bedeutung der Antimetabolite für die Chemotherapie des Krebses wird im Kapitel 5 noch genauer eingegangen. Auch gegenwärtig erfolgt die Entwicklung neuer Antimetabolite meist unter dem Gesichtspunkt der Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten auf diesem Gebiet.

Viele Antimetabolite wurden aufgrund genauer Kenntnisse des Nucleinsäure-Stoffwechsels entwickelt, bei anderen wurde der Wirkungsmechanismus erst aufgeklärt, nachdem ihre cytostatische Wirksamkeit schon lange feststand. Das gilt besonders für Antibiotika, die auf Antimetabolit-Grundlage wirksam werden.

Obwohl die der Antimetabolit-Wirkung zugrunde liegenden Gesetze in der Enzymologie längst bekannt waren — die Malonat-Hemmung der Succinat-Dehydrogenase wurde von QUASTEL und WOOLDRIDGE bereits 1928 entdeckt [890] — wurden sie lange Zeit nicht auf die Wirksamkeit von Pharmaka bezogen. So wurde, wie WOOLLEY berichtet [1063], vielfach nicht verstanden, warum durch Abwandlung von natürlich vorkommenden Verbindungen nicht nur unwirksame, sondern sogar toxische Produkte entstehen. Die entscheidenden Schlußfolgerungen wurden 1940 von WOODS gezogen [1062], als er fand, daß bei Bakterien die Wirkung des Sulfanilamids durch p-Aminobenzoesäure kompensiert werden kann. WOODS erklärte das damit, daß die p-Aminobenzoesäure, ein damals ebenso wie die Folsäure völlig unbekannter Metabolit, durch das strukturell ähnliche Sulfonamid von den für sie zuständigen Enzymen verdrängt würde. WOODS Befunde und ihre Interpretation sowie im gleichen Jahr von FILDES entwickelte Vorstellungen [313] eröffneten die eigentliche Antimetabolit-Forschung. Es wurden in sehr rascher Folge eine große Zahl von Naturstoff-ähnlichen Verbindungen synthetisiert, deren biologische Wirksamkeit die Theorie von WOODS glänzend bestätigte. Die Mehrzahl waren „Antivitamine“, die das Wachstum von Wuchsstoff-abhängigen Bakterien hemmen oder beim Tier Vitamin-Mangelerscheinungen verursachen. Eine Übersicht über diese Periode der Antimetabolit-Forschung ist 1951 von MARTIN [689] und 1952 von WOOLLEY gegeben worden [1063].

Zu den ersten Antimetaboliten des Nucleinsäure-Stoffwechsels gehörten nach der Isolierung und Charakterisierung der Folsäure die Folsäure-Antagonisten [303; 896], die noch heute in der Praxis eine große Rolle spielen. Parallel dazu erfolgte die im großen Stil durchgeführte Synthese und Untersuchung von abgewandelten Purinen und Pyrimidinen, vor allem durch HITCHINGS, ELION und Mitarbeiter, die 1948 zu dem biologisch wirksamen 2,6-Diaminopurin führte [136; 468] und 1951 mit der Entdeckung des 6-Mercaptopurins und seiner cancerostatischen Eigenschaften [200; 279; 714] von einem bedeutenden Erfolg gekrönt war. Unabhängig davon wurde im 8-Azaguanin der erste Antimetabolit gefunden, der in die Nucleinsäuren eingebaut werden kann. Der in dieser Zeit beginnende rasche Fortschritt der Molekularbiologie (und damit der Nucleinsäure-Biochemie) führte zur Erkenntnis weiterer Angriffspunkte und Wirkungsmöglichkeiten für Antimetabolite. Als Meilensteine in der Entwicklung seien hier die Entdeckung des Einbaus von 5-Bromuracil in die DNS durch WEYGAND, WACKER und DELLWEG [1049], die

¹ Die Ausdrücke „Cytostaticum“ und „Cancerostaticum“ werden im allgemeinen synonym verwandt. In diesem Buch werden mit dem Ausdruck „Cancerostaticum“ nur solche Verbindungen bezeichnet, die in ihrer cytostatischen Aktivität eine partielle Selektivität für Krebsgewebe aufweisen.

Einführung des 6-Azauracils im Jahre 1956 durch die Arbeitskreise von WELCH in den USA und ŠORM in der ČSSR sowie die Entwicklung der 5-Fluoruracil-Verbindungen durch HEIDELBERGER 1957 genannt. Alle diese Verbindungen sind durch abgewandelte Basen gekennzeichnet, jedoch hat in den letzten Jahren auch eine Gruppe von Nucleosiden mit natürlichen Basen und abgewandelter Zuckerkomponente großes Interesse gefunden: die Arabino-Nucleoside (auch Spongo-Nucleoside genannt nach dem Vorkommen von Thymin-arabinosid = Spongothymidin in einem Schwamm). Hier hat vor allem das Cytosin-arabinosid erhebliche Wirksamkeit gezeigt und wird bereits in der Praxis zur lokalen Bekämpfung bestimmter Virus-Erkrankungen eingesetzt.

Zur weiteren Charakterisierung und Verdeutlichung des Antimetabolit-Begriffs erscheint es als angezeigt, hier auch kurz auf den Wirkungsmechanismus einiger anderer Gruppen von Cytostatica oder Cancerostatica einzugehen und ihn von dem der Antimetabolite abzugrenzen. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die alkylierenden Agenzien, verschiedene Antibiotika und die Steroid-Hormone zu erwähnen.

Die Antibiotika sind als Gruppe im Gegensatz zu den Antimetaboliten oder alkylierenden Agenzien nicht durch ihren Wirkungsmechanismus, sondern die Art ihrer Entdeckung gekennzeichnet. Soweit sie am Protein- und Nucleinsäure-Stoffwechsel angreifen, [324; 741; 769] können sie ihrem Wirkungsmechanismus nach entweder zu den alkylierenden Agenzien (wie das Mitomycin [649; 804; 1040]) oder zu den Antimetaboliten gehören und sind daher in die vorliegenden Ausführungen eingeschlossen, wie z. B. Azaserin und 6-Diazo-5-oxo-L-Norleucin, das 3'-Desoxyadenosin, das Puromycin, das Psicofuranosin, das Tubercidin und das Hadacidin. Eine dritte Gruppe bildet Komplexe mit makromolekularen zelleigenen Verbindungen (z. B. Actinomycin [357; 827], Streptomycin [114] und Phleomycin [301]).

Die alkylierenden Agenzien führen Alkyl-Gruppen in zelleigene Verbindungen ein und stören dadurch deren physiologische Funktion. Wegen ihrer großen Reaktivität können die alkylierenden Agenzien mit zahlreichen Verbindungen in der Zelle reagieren, und erst in der letzten Zeit wurde bewiesen, daß die Reaktion mit den Nucleinsäuren für ihre biologische Wirkung verantwortlich ist [128; 129; 130; 617; 619; 620; 650]. Dadurch entstehen z. B. Vernetzungen innerhalb der DNS-Helix, die die Replication verhindern. Die Wirkung ist also einer Strahlenschädigung ähnlich (wenn auch die chemischen Prozesse im einzelnen unterschiedlich sind) und diese Verbindungen haben deshalb nicht zu Unrecht den Namen „Radiomimetica“ bekommen.

Die durch Alkylierung, Strahlenwirkung oder Komplex-Bildung mit Antibiotika veränderten Nucleinsäuren sind nicht mehr zur Erfüllung einer normalen Matritzen-Funktion fähig. Darüber hinaus können sie in in-vitro Ansätzen diejenigen Enzymzentren blockieren, an denen normalerweise die Nucleinsäuren zur Ausübung ihrer Templat-Funktion angelagert werden [301; 397; 434; 1085; 1086]. Dadurch vermögen sie die enzymatischen Synthesen auch in Gegenwart der normalen Nucleinsäuren zu hemmen, und es bildet sich dabei zu diesen häufig ein

kompetitives Verhältnis aus [301]. In Analogie zu den Antimetaboliten könnte man hier von „Antimatrizen“ sprechen. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, daß eine derartige — im in-vitro Ansatz künstlich hervorrufbare — Konkurrenz von Matrize und „Antimatrize“ auch in der Zelle stattfindet. Eine Anwendung von „Antimatrizen“ zur gezielten Beeinflussung bestimmter Enzyme, wie sie durch Antimetabolite erreicht wird, ist sicher vor allem davon abhängig, ob es gelingt, Verbindungen mit einem derartigen Charakter in größerem Ausmaß in die Zelle hineinzubringen.

Der Wirkungsmechanismus der letzten Gruppe von potentiellen Cancerostatica, der Steroid-Hormone, liegt nach neueren Untersuchungen in der Aktivierung von Genorten, die die Bildung bestimmter Enzyme zur Folge hat [997; 1056]. Dazu müssen DNS-Moleküle (oder bestimmte Abschnitte eines Moleküls) als Matrizen zur „Ablese“ durch die RNS-Polymerase wirksam werden. In welcher Weise die Hormone das bewirken (z. B. durch Einlagerung in die DNS-Helix auf Grund der „hydrophobic bonds“) und wie ihre organspezifische Wirkung zustande kommt (z. B. durch bestimmte Rezeptoren), wird zur Zeit intensiv untersucht.

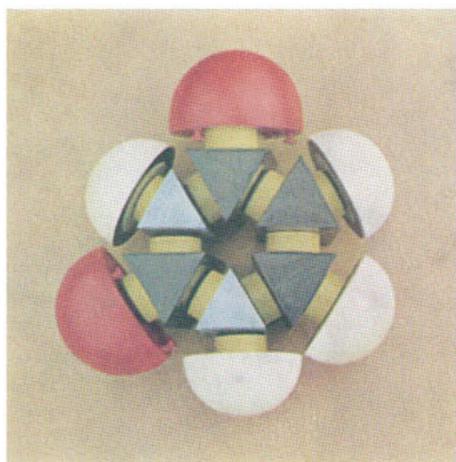
Es sei noch erwähnt, daß auch zwei andere cancerostatisch wirksame Verbindungs-Klassen, die keiner der bereits erwähnten großen Gruppen zuzuordnen sind, mit dem Nucleinsäure-Stoffwechsel interferieren. So hemmen die Vinca-Alkaloide die DNS- und RNS-Synthese [570; 666; 837; 1011]. Phthalanilide schieben sich als coplanare Heterooligobasen zwischen die Purin- und Pyrimidin-Basen der DNS-Helix und bewirken so Hemmungen der Nucleinsäure-Synthese [826].

Es kann also festgestellt werden, daß alle wesentlichen heute bekannten cancerostatischen Verbindungen über eine Beeinflussung der Nucleinsäuren und ihres Stoffwechsels wirksam werden. Dieser Tatsache sollte bei Versuchen zur Entwicklung neuer Cancerostatica Rechnung getragen werden.

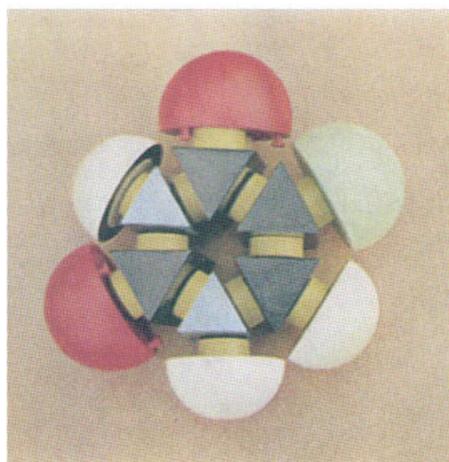
1.2. Über die strukturelle Ähnlichkeit von Antimetabolit und Metabolit

Da Enzym und Metabolit zueinander passen müssen wie Schlüssel und Schloß (E. FISCHER), sind den Variationsmöglichkeiten zur Abwandlung eines Metaboliten in einen Antimetaboliten bestimmte Grenzen gesetzt. Werden sie überschritten, geht die Affinität zum Enzym verloren und der Stoff ist völlig inert. Ausmaß und Art der möglichen Abänderungen sind dabei von Enzym zu Enzym verschieden, weil hier die unterschiedliche Spezifität der Enzyme zum Ausdruck kommt. So gibt es Enzyme, die gleiche Substrate umsetzen, aber völlig unterschiedlich auf den gleichen Hemmstoff reagieren. Bei der Entwicklung neuer Antimetabolite wird es im allgemeinen günstig sein, die Abänderungen zunächst so gering wie möglich zu halten.

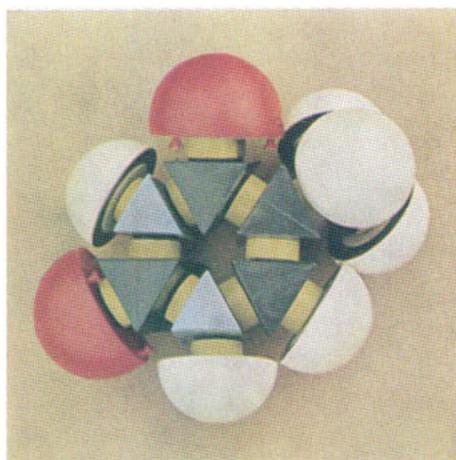
Im chemischen Sinne ist die Affinität eines Substrates zu seinem Enzym von bestimmten reaktiven Gruppen, die die Bindung zum Enzym eingehen, sowie von sterischen Bedingungen abhängig. Häufig sind diese Voraussetzungen für eine



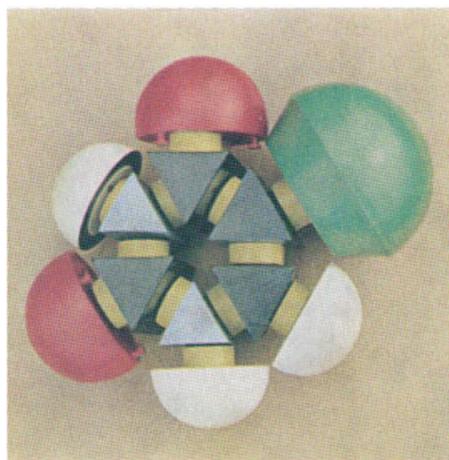
a)



b)



c)



d)

Abb. 1. Modelle von a) Uracil, b) 5-Fluoruracil, c) Thymin und d) 5-Bromuracil, die unterschiedliche Größe der Substituenten am C-5 des Uracils zeigend.

Die van der Waalschen Radien dieser Substituenten sind: H = 1,20 Å, F = 1,35 Å, CH₃ = 2,00 Å; Br = 1,95 Å; die Radien der entsprechenden Substituenten der hier nicht gezeigten Verbindungen 5-Chloruracil, 5-Joduracil und 5-Trifluormethyluracil sind: Cl = 1,81 Å, J = 2,16 Å und CF₃ = 2,44 Å.

Affinität bei dem Versuch erkannt worden, aus einem Metaboliten durch Abwandlung einen Antimetaboliten zu erhalten. Ein in diesem Zusammenhang klassisch gewordenes Beispiel für die Bedeutung bestimmter raumerfüllender Gruppen sind die 5-halogenierten Uracile. In Abb. 1 sind die Radien der Halogen-Substituenten im Vergleich zu denen der natürlichen Substituenten wiedergegeben. Wie ersichtlich, ist die Größe des Radius vom Fluor der des Wasserstoff, vom Jod oder Brom dagegen der der Methyl-Gruppe ähnlich. Biochemisch verhalten sich daher 5-Fluoruracil wie Uracil und 5-Jod- und 5-Bromuracil wie Thymin. Auch der Radius der Trifluormethyl-Gruppe ist dem der Methyl-Gruppe ähnlich und 5-Trifluormethyluracil wird daher in die DNS eingebaut. Der Radius des Chlor liegt zwischen dem des Brom oder Jod und dem des Fluor. 5-Chloruracil kann daher von der Zelle sowohl als Uracil wie auch als Thymin „empfunden“ werden. Die Größe des Substituenten am C-5 hat hier also einen ganz entscheidenden Einfluß auf das Stoffwechselschicksal der Verbindung und entscheidet unter anderem darüber, ob sie in die DNS oder die RNS eingebaut wird.

Die strukturellen Abwandlungsmöglichkeiten am Molekül eines Metaboliten zur Gewinnung eines Antimetaboliten sind natürlich sehr groß, auch wenn der Tatsache Rechnung getragen wird, daß hierbei ein bestimmtes Maß nicht überschritten werden darf. Das gilt besonders für die Antimetabolite des Nucleinsäure-Stoffwechsels im engeren Sinne, d. h. die von den natürlichen Purinen und Pyrimidinen und ihren Nucleosiden abgeleiteten Derivate. Hier gibt es zahlreiche im Sinne der Antimetabolit-Gewinnung „vernünftige“ Variationen. Zu den bewährten Veränderungen gehören: bei den Pyrimidinen die Einführung verschiedener Substituenten (z. B. Halogene, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHOH}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{Äthyl}$) am C-Atom 5 von Uracil und Cytosin, Austausch einer OH-Gruppe gegen eine SH-Gruppe (2-Thiouracil), Austausch eines Ring-C-Atoms gegen ein N-Atom (5-Aza- oder 6-Azauracil- oder -cytosin-Verbindungen). Bei den Purinen Austausch von OH-Gruppen gegen SH-Gruppen (6-Thioguanin, 6-Mercaptopurin) oder die NH_2 -Gruppe (2,6-Diaminopurin), Einführung von Halogenen am C-Atom 2 oder 6 (2-Fluoradenin, 6-Chloropurin), Austausch eines Ring-C-Atoms gegen ein N-Atom (8-Azaganin) oder umgekehrt Austausch eines Ring-N-Atoms gegen ein C-Atom (7-Deazaadenosin = Tubercidin), Vertauschen der Plätze eines C- und N-Atoms im Ringsystem (Pyrazolo [3.4-d]pyrimidine).

Weniger zahlreich sind offenbar die Möglichkeiten, durch Veränderung des Zuckeranteils von Nucleosiden Antimetabolite zu erhalten. Offenbar stellen die Enzyme des Nucleinsäure-Stoffwechsels bei der Kohlehydrat-Komponente viel höhere Ansprüche an die Bewahrung einer natürlichen Struktur als bei den Basen. Zu den erfolgreichen Abänderungen am Zuckeranteil von Nucleosiden gehören insbesondere die Umkehr des Hydroxyls am C-2' (Arabinosyl-Nucleoside) oder C-3' (Xylosyl-Nucleoside) und die Umwandlung der Hydroxy-Gruppe am C-3' in eine Desoxy-Gruppe (3'-Desoxyadenosin = Cordycepin). In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß sich allein aus der Kombination einer Base mit einem Zucker theoretisch je 4 isomere Nucleoside für die D-Form und die L-Form ableiten lassen (α -, β -Form, Furanosyl-, Pyranosyl-Form). Es haben sich in der

Vergangenheit aus der Erfahrung heraus Regeln ergeben, nach denen sich die Wahrscheinlichkeit für die Antimetabolit-Wirkung dieser isomeren Nucleoside im gewissen Umfang voraussagen läßt. Dabei treten aber immer wieder Ausnahmen auf. So konnte bis vor kurzem angenommen werden, daß α -Nucleoside ohne jede Wirkung sind, da alle im Nucleinsäure-Stoffwechsel auftretenden bzw. als Antimetabolite wirksamen Nucleoside der β -Konfiguration zugehörten. Dann wurden jedoch Ausnahmen gefunden: α -Cytidin-2'- oder 3'-phosphat wurde in Hefe-RNS nachgewiesen und hemmt die Ribonuclease [348] und α -2'-Desoxythioguanosin kann enzymatisch gespalten werden [634] und möglicher Weise sogar in die DNS eingebaut werden [633]. α -2'-Desoxyglucosyl-thymin und α -2'-Desoxyxylosyl-thymin hemmen die Uridin-Desoxyuridin-Phosphorylase, wenn auch in geringerem Ausmaß als die β -Formen [295]. α -Uridin-5'-diphosphat hemmt oder fördert (je nach Konzentration) die Bildung von Polyuridylsäure aus Uridin-5'-diphosphat durch die Polynucleotid-Phosphorylase [749]. Ebenso konnte die früher gültige Annahme, daß pyranoide Nucleoside biochemisch unwirksam sind, nicht mehr aufrecht erhalten werden. Bei den eben genannten Hemmstoffen der Uridin-Desoxyuridin-Phosphorylase ist eine pyranoid Struktur der Zuckerkomponente sogar Voraussetzung für die Wirksamkeit und eine Reihe von Antibiotika, die wie das Puromycin in die Protein-Synthese eingreifen, enthält pyranoid Nucleoside [324].

1.3. Letale Synthese

Mit Ausnahme der Folsäure- und Glutamin-Antagonisten müssen alle Antimetabolite, die mit der Synthese der Nucleinsäuren interferieren, von der Zelle erst in die eigentliche Wirkform — die Nucleotide — übergeführt werden. Die Ursache hierfür liegt darin, daß die deNovo-Synthese der Purin- und Pyrimidin-Verbindungen in der Zelle ausschließlich (Purine) oder vorwiegend (Pyrimidine) über phosphorylierte Zwischenstufen verläuft. Daher erreichen die Antimetabolite auch nur in der Nucleotid-Form diejenige Substrat-Ähnlichkeit, die Voraussetzung für die Wirkung ist. Es ist jedoch nicht möglich, die Nucleotide selbst zu verabreichen, da sie nicht intakt in die Zelle gelangen, sondern beim Penetrations-Prozeß dephosphoryliert werden [842; 843; 622]. Es müssen daher geeignete, nicht phosphorylierte Vorstufen, also die freien Basen oder die Nucleoside, appliziert werden, aus denen die Zelle dann die aktiven Nucleotide selbst herstellt. Dieser Vorgang wird nach einem von PETERS geprägten Begriff für die Überführung von Fluor-essigsäure in das eigentlich wirksame Fluorcitrat [778] als „letale Synthese“ bezeichnet. Das Ausmaß der letalen Synthese entscheidet weitgehend über die cytostatische Wirksamkeit einer Verbindung gegen eine bestimmte Zellart, wie in Abb. 2 am Beispiel der Hemmbarkeit des Wachstums verschiedener Transplantationstumoren durch Cytosin-arabinosid gezeigt wird. Hier besteht eine klare Abhängigkeit zwischen der Nucleotidbildung und der Verlängerung der Überlebenszeit der die verschiedenen Tumoren tragenden Mäuse.