Synthese und biochemische Eigenschaften von heterocyclischen Thioäthern des 2-Chlor-6-mercaptapurins

Synthesis and Biochemical Properties of Heterocyclic Thioethers of 2-Chloro-6-mercaptapurine

G. NIEBCH und FR. SCHNEIDER *

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Marburg

(Z. Naturforsch. 27 b, 675—682 [1972]; eingegangen am 21. Februar 1972)

The synthesis of the following thioethers of 2-chloro-6-mercaptapurine is described: 2-chloro-6-[4-phenyl-imidazole-2-thio]purine; 2-chloro-6-[4-guanidopropyl-imidazole-2-thio]purine; 2-chloro-6-[4-t.butyl-thiazole-2-thio]purine; 2-chloro-6-[4-phenyl-thiazole-2-thio]purine; 2-chloro-6-[4-methyl-thiazole-2-thio]purine; 2-chloro-6-[4-carbomethoxymethyl-thiazole-2-thio]purine; 2-chloro-6-[4-carboxamido-5-amino-thiazole-2-thio]purine; 2-chloro-6-[5-phenyl-thiadiazole (1,3,4)-2-thio]purine; 2-chloro-6-[5-t.butyl-thiadiazole (1,3,4)-2-thio]purine; 2-chloro-6-[tetrazole-5-thio]purine. The thioether bond of these compounds is cleaved by nucleophilic agents especially by mercaptanes under mild conditions. The compounds are not metabolized by ascites cells and preferentially bound to the cell surface. They are inhibitors of DNA-, RNA-, and proteinsynthesis and of proliferation of Ascites cells in a different degree; the ascites carcinoma of mice was not influenced. A possible mechanism of action of their metabolic effects is discussed.

Wie unsere Untersuchungen über die biochemischen Eigenschaften von 6-[Imidazol-2-thio]purinen und ihrer Nucleoside gezeigt haben¹⁻³, werden die cytostatischen Effekte dieser Verbindungen, ihre Wechselwirkung mit Enzymen des Nucleosidstoffwechsels sowie ihre Wirkung auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese von Ascites-Zellen entscheidend von ihrer chemischen Struktur bestimmt. So bewirken vor allem die Einführung von Chlor in 2-Stellung des Purinringes, die Substitution des Imidazols in 4- oder 5-Stellung mit lipophilen Resten sowie die Variation der Zuckerkomponente erhebliche Abwandlungen ihres Verhaltens gegenüber intakten Zellen und isolierten Enzymen.

In Fortsetzung dieser Untersuchungen berichten wir in der vorliegenden Arbeit über

1. die Synthese und Eigenschaften von heterocyclischen Thioäthern des 2-Chlor-6-mercaptapurins, die anstelle von Imidazol einen Thiazol-, 1,3,4-Thiadiazol- oder Tetrazolrest enthalten;
2. den Einfluß dieser Thioäther auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese von Ehrlich-Ascites-Zellen in vitro;
3. ihre cytostatischen Wirkungen am Ascites-Carcinom der Maus und in Monolayer-Kulturen von Ascites-Zellen;
4. ihre Metabolisierung durch diese Zellen.

Synthese und Eigenschaften der Thioäther

Die Struktur der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen heterocyclischen Thioäther ist aus nachstehenden Formeln ersichtlich.

R, R₁, R₂: siehe Tab. 1.

In Tab. 1 sind die dargestellten Thioäther mit Formeln, analytischen Daten, Synthesebedingungen und Ausbeuten zusammengestellt. Die Synthese der Verbindungen erfolgte in allen Fällen durch Reaktion des 2,6-Dichlorpurins mit äquimolaren Mengen der entsprechenden Mercaptoheterocyklen. Auf diesem Weg konnten mit 1-Phenyl-5-mercapto-tetrazol, 5-Mercapto-triazolen (1.2.4) und 5-Mercapto-oxadiazolen (1.2.4) keine Thioäther erhalten werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden 4-t.-Butyl-2-mer-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. FR. SCHNEIDER, Physiolog.-chem. Institut, Lehrstuhl II, D-3550 Marburg/Lahn, Auf den Lahnbergen.

* Postanschrift: Professor Dr. FR. SCHNEIDER, Physiologisch-chemisches Institut, Lehrstuhl II, D-3550 Marburg/Lahn, Auf den Lahnbergen.

Thioäther	Formel (MG)	Analysen		Schmelz- punkt [°C]	Synthese- bedingungen	Isolierung	Ausb. [%] d. Th.
		Ber.	Gef.				
2-Chlor-6-[4-phenylimidazol-2-thio]purin × HCl	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ N ₆ S (365,26)	Cl 19,43 S 8,80	19,63 8,86	>260	n-Propanol 1 h Rückfluß	Krist. aus n-Propanol	78
2-Chlor-6-[4-guanidopropyl-imidazol-2-thio]purin × 2 HCl	C ₁₂ H ₁₆ Cl ₃ N ₉ S (424,77)	Cl 25,10 S 7,55	24,87 7,70	193 (Zers.)	Methanol 3 h Rückfluß; Purin in 50% Überschuß	Krist. aus Methanol/ Äther	75
2-Chlor-6-[4-phenylthiazol-2-thio]purin	C ₁₄ H ₉ ClN ₅ S ₂ (345,84)	C 48,70 H 2,33 Cl 10,25 N 20,25 S 18,54	48,35 2,33 10,29 20,31 18,24	240	n-Propanol 1 h Rückfluß	Krist. aus n-Propanol	58
2-Chlor-6-[4-t.butyl-thiazol-2-thio]purin	C ₁₂ H ₁₂ ClN ₅ S ₂ (325,86)	Cl 10,90 N 21,50 S 19,70	10,74 21,10 20,13	197—198	n-Propanol 1 h Rückfluß	Krist. aus Methanol	70
2-Chlor-6-[4-methyl-thiazol-2-thio]purin	C ₉ H ₆ ClN ₅ S ₂ (283,78)	C 38,16 H 2,13	38,08 2,34	209—211	Äthanol 1 h Rückfluß	Krist. aus Äthanol	77
2-Chlor-6-[4-carbäthoxy-methyl-thiazol-2-thio]purin	C ₁₂ H ₁₀ ClN ₅ O ₂ S ₂ (355,84)	C 40,60 H 2,84 Cl 9,97 N 19,70	40,45 2,99 9,97 19,24	185—187	Äthanol 2 h Rückfluß	Krist. aus Äthanol	73
2-Chlor-6-[4-carboxamido-5-amino-thiazol-2-thio]purin	C ₉ H ₆ N ₇ ClO ₂ S ₂ (327,79)	Cl 10,83 N 29,93 S 19,59	10,67 30,09 19,56	>250	DMF 2 h, 80°	Krist. aus DMF	92
2-Chlor-6-[5-phenylthia-diazol (1.3.4)-2-thio]purin	C ₁₃ H ₇ ClN ₆ S ₂ (346,83)	Cl 10,21 S 18,48	10,37 18,24	217—217	Isopropanol 1 h Rückfluß + aequimol. Triäthylamin	Fällung mit Wasser	87
2-Chlor-6-[5-t.butylthia-diazol (1.3.4)-2-thio]purin	C ₁₁ H ₁₁ ClN ₆ S ₂ (326,85)	C 40,50 H 3,39 Cl 15,86 N 25,77 S 19,61	39,91 3,41 10,85 25,45 19,65	157—159	Isopropanol 1 h Rückfluß + aequimol. Triäthylamin	Fällung mit Wasser	76
2-Chlor-6-(tetrazol-5-thio)purin	C ₆ H ₃ ClN ₈ S (254,68)	C 28,32 H 1,19 Cl 13,91 S 12,59	28,33 1,42 13,89 12,53	>260	Isopropanol 2 h Rückfluß	Krist. aus Isopropanol	70

Tab. 1. Formeln, analytische Daten, Synthesbedingungen und Ausbeuten der heterocyclischen Thioäther des 2-Chlor-6-mercapto-purins.

capto-triazol (1.2.4) und 5-t.-Butyl-2-mercapto-thia-diazol (1.3.4) zum ersten Mal beschrieben.

Der Thioäther des Tetrazols ist von allen beschriebenen Verbindungen am besten löslich. Die Löslichkeit der Thioäther des Imidazols ist sehr viel besser als die der Thioäther des Thiazols und Thiadiazols; sie hängt zusätzlich ab vom Substituenten am Imidazol, Thiazol und Thiadiazol und nimmt zu in der Reihenfolge Phenyl-, Dimethyl-, t.-Butyl-, Methyl.

Wie aus unseren früheren Untersuchungen hervorgeht³, werden 6-[Imidazol-2-thio]purine unter milden Bedingungen durch nucleophile Agenzien an der Thioätherbindung gespalten. Unter biochemischen Gesichtspunkten sind SH-Verbindungen die interessantesten Nucleophile. Es wurde daher die Stabilität der dargestellten Thioäther gegenüber Benzylmercaptan und Glutathion untersucht. Dabei

zeigte sich, daß durch Benzylmercaptan im pH-Bereich von 8—9 alle Thioäther innerhalb 30 min zu etwa 50% gespalten werden, wobei als Reaktionsprodukte 2-Chlor-6-benzyl-thiopurin und der jeweilige Mercaptoheterocyclus dünn-schichtchromatographisch identifiziert wurden. Ohne Benzylmercaptan sind die Thioäther unter den gleichen Bedingungen stabil. Bei pH 7 findet keine Spaltung statt, da bei diesem pH-Wert die Konzentration an Thiolatanion, des eigentlichen nucleophilen Agens, zu gering ist. Dasselbe Ergebnis erhält man mit Glutathion. So wird z. B. das 2-Chlor-6-[4-t.-butyl-imidazol-2-thio]purin bei pH 9,2 innerhalb von 2 Stdn. vollständig gespalten unter Bildung von 4-t.-Butyl-2-mercapto-imidazol und einer Komponente, die höchstwahrscheinlich in Analogie zur Reaktion mit Benzylmercaptan das S-[2-Chlor-purinyl-6-]-glutathion

darstellt; die Verbindung gibt eine positive Ninhydrinreaktion, aber keine Pauly-Reaktion und besitzt aromatische Eigenschaften.

Beschreibung der Synthesen

2,6-Dichlorpurin⁴, 4-t.-Butyl-2-mercaptoimidazol⁵, 4,5-Dimethyl-2-mercaptoimidazol⁶, 4-Phenyl-2-mercaptoimidazol⁷, 4-Guanidopropyl-2-mercaptoimidazol·HCl⁸, 4-Methyl-2-mercapto-thiazol⁹, 4-Phenyl-2-mercapto-thiazol¹⁰, 2-Mercapto-4-carboxamido-3-amino-thiazol¹¹, 5-Phenyl-2-mercapto-thiadiazol(1.3.4)¹², 5-Mercaptotetrazol¹³, 2-Chlor-6-[4-t.-butylimidazol-2-thio]purin·HCl¹⁴, 2-Chlor-6-[2-¹⁴C-4-t.-butylimidazol-2-thio]purin¹⁵, Imuran, Präparat der Firma Wellcome, Thio-guanin, Präparat von Serva.

4-t.-Butyl-2-mercaptothiazol

18 g Brompinacolon⁵ (0,1 M) werden mit 11 g Ammoniumdithiocarbaminat¹⁶ (0,1 M) in 150 ml abs. Äthanol 1 h bei 80 °C gehalten. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wird vom Ammoniumbromid abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Den Rückstand verreibt man mehrfach intensiv mit Methylenchlorid und filtriert. Die Methylenchlorid-Phase wird auf ca. 50 ml eingeeengt, zum Sieden erhitzt und mit heißem Petroläther (60–95°) bis zur bleibenden Trübung versetzt. Kristallisation im Eisschrank, Absaugen und Befreien vom Lösungsmittel im Vacuum liefert 9,5 g (55%) glänzender Blättchen mit Schmp. 169–171 °C.

C₇H₁₁NS₂ (173,30)

Ber. N 8,08 S 37,00,
Gef. N 8,21 S 37,00.

¹H-NMR (D₆-DMSO): τ = 8,75 (s, 9 H = t-Butyl), 3,52 (s, 1 H = H-5), –3,5 (schwaches, breites Signal: NH).

Nach den NMR-Daten liegt die Verbindung in DMSO in der Thionform vor.

4-Carbäthoxymethyl-2-mercaptothiazol

5,5 g Ammoniumdithiocarbaminat¹⁶ (50 mM) werden mit 8,25 g γ-Chloracetessigester (50 mM) in 100 ml abs. Äthanol gerührt. Sofort nach Zugabe verschwindet unter exothermer Reaktion die gelbe Farbe des Dithiocarbaminats, und es scheidet sich Ammonchlorid ab. Zur Aufarbeitung erhitzt man das Reaktionsgemisch zum Sieden und saugt heiß ab. Das Filtrat bringt man am Rotationsverdampfer zur Trockene, nimmt den Rückstand in Methylenchlorid auf und wäscht die Lösung zweimal mit Wasser. Nach Klären über ein doppeltes Faltenfilter trocknet man azeotrop durch Abziehen des Methylenchlorids am Rotationsverdampfer und kristallisiert aus wenig Methylenchlorid.

Ausbeute: 7,05 g (69,5%) weiße, faserige Nadeln. Schmp.: 140–141 °C.

C₇H₉NO₂S₂ (203,29)

Ber. N 6,90 S 31,60,
Gef. N 6,94 S 31,55.

Die Substanz gibt auf Kieselgel-DC-Platten nach einiger Einwirkzeit eine schwache rot-violette Pauly-Reaktion. Auf Chromatogrammen mit frischer 1-proz. NaNO₂-Lösung in 1 N HCl besprüht, gibt sie eine schwachgrüne Färbung.

Die Estergruppierung ist erstaunlich stabil: nach 48 h in ammoniakalischem Äthanol (bei 0 °C gesättigt) im verschlossenen Kolben und bei Zimmertemperatur ist noch keine Ammonolyse eingetreten.

5-t.-Butyl-2-mercaptothiadiazol(1.3.4)

13,3 g Thiopivalinsäurehydrazid¹² (0,1 M), gelöst in 400 ml Äthanol, werden mit 5,6 g KOH (in 20 ml Wasser) und 8,85 g Schwefelkohlenstoff (0,116 M) 3 h am Rückfluß gekocht.

Anschließend gießt man in ein Gemisch aus 200 ml Äthanol, 50 ml halbc. HCl und Eis. Am Rotationsverdampfer befreit man die Mischung vom Äthanol, wobei Kristallisation eintritt. Absaugen und Trocknen über CaCl₂ liefert 15,3 (88%) weiße, glänzende fettige Schuppen.

Schmp.: 120–121 °C (roh).

Nach Umkristallisation aus siedendem Äthanol-Wasser mit Aktivkohle erhöht sich der Schmp. auf 121–122 °C.

C₆H₁₀N₂S₂ (174,29)

Ber. N 16,07 S 36,79,
Gef. N 15,97 S 36,26.

5-t.-Butyl-3-mercaptotriazol(1.2.4)

1. Pivaloylthiosemicarbazid

Eine Suspension von 11,3 g Thiosemicarbazid (124 mM) in 100 ml abs. Pyridin wird auf –5 °C gekühlt und unter Rühren langsam bei Temperaturen < 0 °C mit 15 g dest. Pivaloylchlorid (124 mM) versetzt. Anschließend rührt man noch 12 h bei Zimmertemperatur und zieht am Rotationsverdampfer das Pyridin ab. Restliches Pyridin entfernt man durch Versetzen des Rückstandes mit Wasser und erneutes Abziehen. Der feste, weiße Rückstand wird aus siedendem Äthanol-Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 17,1 g (78,6%) weiße glänzende Schuppen. Schmp.: 209–210 °C (Zers.).

2. 5-t.-Butyl-2-mercaptotriazol(1.2.4)

8,75 g Pivaloylthiosemicarbazid (50 mM) werden zu einer Lösung von 3,8 g Na (165 mM) in 100 ml abs. Äthanol gegeben und unter Feuchtigkeitsausschluß 12 h am Rückfluß gekocht. Am Rotationsverdampfer bringt man zur Trockene, nimmt den halbkristallinen gelblichen Rückstand in Wasser auf, entfärbt mit Aktivkohle und säuert mit 10-proz. Essigsäure an. Spontan oder nach Kratzen tritt Kristallisation in feinen, weißen, langen Nadeln ein. Absaugen und Trocknen über CaCl₂ liefert 6,1 g (77,5%) Endprodukt.

Schmp.: 195–197 °C.

$C_6H_{11}N_3S$ (157,24)

Ber. C 45,80 H 7,05 N 26,79,

Gef. C 45,45 H 7,32 N 26,82.

1H -NMR (D_6 -DMSO): $\tau = 8,74$ (s, t-Butyl), $-3,2$ (sehr schwaches, breites Signal: NH).

Nach den NMR-Daten liegt die Verbindung in DMSO in der Thionform vor.

Synthese der Thioäther

Die Synthesebedingungen für die Reaktion des 2,6-Dichlorpurins mit den Mercaptoheterocyclen sowie die Isolierungsmethoden der Endprodukte sind in Tab. 1 angegeben. Beim 1,3,4-Thiadiazol erwies sich ein Zusatz von Triäthylamin als notwendig, um den bei der Reaktion entstehenden Chlorwasserstoff zu binden. Im allgemeinen wurden Ansätze von 10 mM durchgeführt.

Die dünnschichtchromatographische Reinheitsprüfung der Thioäther erfolgte auf Kieselgelplatten (SIF-Riedel) in Butanol–Eisessig–Wasser (4 : 1 : 1), Chloroform–Eisessig (9 + 1) und Propanol– NH_3 –Wasser (6 : 3 : 1). Die Aufnahme der 1H -NMR-Spektren erfolgte mit einem 60-MHz-Varian-Gerät*.

Spaltung der Thioäther durch SH-Verbindungen

Inkubationsansätze mit Benzylmercaptan hatten folgende Zusammensetzung:

Für Imidazol- und Tetrazol-Thioäther: 10^{-5} Mol Thioäther in 1 ml M/15-Phosphatpuffer pH 7,5; 10^{-5} Mol Benzylmercaptan in 0,5 ml Dimethylformamid (DMF); der pH-Wert der Mischung liegt zwischen 8 und 9; für Thiazol- und Thiadiazol-thioäther: 10^{-5} Mol Thioäther in einer Mischung aus 0,5 ml DMF, 10^{-5} Mol Benzylmercaptan in 0,5 ml DMF, 0,5 ml M/15 Phosphatpuffer pH 6,5. Der pH-Wert der Mischung lag zwischen 8 und 9. Es wurde 30 min bei 30° inkubiert und auf Kieselgelplatten (Riedel SIF) in Chloroform–Eisessig (9 : 1) und Butanol–Eisessig–Wasser (4 : 1 : 1) chromatographiert. Lokalisation der Substanzen unter kurzwelligem UV-Licht, außerdem bei Imidazol-thioäthern durch P a u l y -Reagenz¹⁷, bei den übrigen Thioäthern durch Jodanfärbung (beständige Gelbfärbung). Eine Probe der Referenzsubstanz 2-Chlor-6-benzylthiopurin wurde durch Reaktion von äquimolaren Mengen 2,6-Dichlorpurin, Triäthylamin und Benzylmercaptan in DMF hergestellt. Reaktionsbedingungen: 2 Stdn., 110 °C.

Inkubationsansätze mit Glutathion

$5,8 \cdot 10^{-6}$ Mol Thioäther und $1,6 \cdot 10^{-5}$ Mol Glutathion in 3 ml 0,2 M Boratpuffer pH 9,2. Nach 2 Stdn. bei Zimmertemperatur wurde auf Dünnschichtplatten (s. o.) in Propanol/Ammoniak/Wasser (6 : 3 : 1) chromatographiert. Lokalisation der Substanzen unter kurzwelligem UV-Licht sowie durch P a u l y -Reagenz und Ninhydrin.

* Für die Aufnahme der Spektren danken wir Herrn Dr. KESSLER, Chemisches Institut, Tübingen.

Biochemische Untersuchungen

Methodik

Der Einfluß der beschriebenen Thioäther auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese von Ascites-Zellen in vitro wurde nach der in l. c.¹⁸ beschriebenen Methode untersucht. Außer den Verbindungen der Tab. 1 wurden zum Vergleich auch Thioguanin und Imuran geprüft. Das Prinzip der Methode ist folgendes: man inkubiert die Zellen 40, 70 und 100 min mit den Substanzen vor und läßt sie anschließend – immer noch in deren Gegenwart – weitere 20 min ^{14}C -Thymidin, -Uridin und -Leucin einbauen. Die gesamte Inkubationsdauer der Zellen mit den Substanzen beträgt also 60, 90 und 120 min. Wie frühere Untersuchungen zeigten, ist der Einbau der markierten Vorstufen in den 20 min linear.

Experimente an Ascites-Zellen in Monolayer-Kulturen wurden nach der in l. c.¹⁹ beschriebenen Methodik durchgeführt. Zur Methode der Therapieversuche siehe l. c.¹⁸.

Im Carcinolysetest wird die Angehrate von Ascites-Zellen in der Maus nach vorhergehender Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen bestimmt; weitere Einzelheiten hierzu s. l. c.²⁰.

Untersuchungen zur Frage intrazellulärer Veränderungen der Thioäther in Ehrlich-Ascites-Zellen

a) Ganzzellinkubation

Die untersuchten Verbindungen wurden in Konzentrationen von 10^{-3} M mit 5-proz. Ehrlich-Ascites-Zellsuspensionen (v/v) in H a n k s -Medium²¹ 60 min bei 37° inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml 4 N $HClO_4$, Abzentrifugieren vom Protein und Neutralisieren des Überstandes mit halbconc. KOH, erfolgte Auswertung durch Dünnschichtchromatographie: auf Cellulose (CEF-Riedel) in 5-proz. $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ /Isoamylalkohol (1 : 1), und auf Kieselgel (SIF-Riedel) in wassergesättigtem Butanol und Propanol/Ammoniak/Wasser (6 : 3 : 1).

b) 100 000 g-Überstand des Ascites-Zellhomogenats

Das Homogenat wurde durch 10 sec Ultraschallbehandlung einer 5-proz. Ascites-Zellsuspension in M/15 Na-Phosphat-Puffer (pH 7,5 und 0 °C) erhalten.

Die untersuchten Verbindungen wurden in 10^{-3} M Konzentration mit dem 100 000 g-Überstand inkubiert. Die Auswertung erfolgte wie bei den Ganzzellinkubationen.

Aufnahme und Verteilung von 2-Chlor-6-[^{14}C -4-t-butyl-imidazol-2-thio]purin in Ascites-Zellen wurden geprüft, indem 2 ml einer 5-proz. (v/v) Ascites-Zellsuspension in H a n k s -Medium²¹ 30 bzw. 60 min bei 37° in silikonisierten Zentrifugenröhrchen mit etwa 0,2 nCi Thioäther entsprechend einer Konzentration von $4,6 \cdot 10^{-4}$ M inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand im Meßkolben auf 5 ml aufgefüllt und die Zellen mit 2 ml isotonischer

Kochsalzlösung bzw. 2 ml einer $5 \cdot 10^{-4}$ M „kalten“ Thioätherlösung gewaschen und abzentrifugiert. Die Waschflüssigkeiten werden in 5 ml Meßkolben aufgefüllt und die Zellen mit 2 ml 5-proz. Trichloressigsäure (TCA) bei 0° aufgeschlossen, zentrifugiert und die Überstände in Meßkolben aufgefüllt. Die Niederschläge werden dreimal mit 3 ml eiskalter 5-proz. TCA auf Millipore-Filter abgesaugt. 0,5 ml der erhaltenen Lösungen werden in 15 ml Dioxan-Szintillator und die Filter nach Trocknen bei 60°C in Toluol-Szintillator 3-mal 20 min gezählt.

Ergebnisse

DNS-, RNS- und Proteinsynthese

Die Ergebnisse der Messungen der Einbauraten von ^{14}C -Thymin, -Uridin- und -Leucin in Ascites-Zellen *in vitro* unter Einfluß der Thioäther sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Die Tabelle enthält die Werte nach 1-, 1,5- und 2-stdg. Inkubation und läßt erkennen, daß zwischen den verschiedenen Thioäthern erhebliche Wirkungsunterschiede bestehen, wobei die Tetrazol- und Guanido-propylimidazol-Thioäther praktisch ohne Effekt sind. Die Thioäther des Thiazols und Thiadiazols sind z. T. so schwer löslich, daß die Konzentrationen der gesättigten Lösungen noch unter 10^{-4} M lagen. Trotz dieser niedrigen Konzentrationen werden aber signifikante Hemmeffekte gefunden. Thioguanin ist in der vorliegenden Versuchsanordnung völlig ohne Effekt, während Imuran etwa dieselben Werte ergibt wie das 2-Chlor-6-[4-phenylimidazol-2-thio]purin. Nach

diesen Ergebnissen sind Imidazol-thioäther des 2-Chlor-6-mercaptapurins als Hemmstoffe der DNS-, RNS- und Proteinsynthese den übrigen heterocyclischen Thioäthern eindeutig überlegen; ihre bessere Löslichkeit gewährt auch eine Untersuchung über einen größeren Konzentrationsbereich.

Zellwachstum und Zellvermehrung *in vitro* und *in vivo*

Die Wirkung einer Auswahl der beschriebenen Thioäther auf Zellwachstum und Zellvermehrung wurde am Ascites-Carcinom der Maus und an Ascites-Zellen in Monolayer-Kulturen geprüft. Die Ergebnisse der Therapieversuche und des Carcinolyse-tests sind in Tab. 3 und 4 zusammengefaßt.

Wie die Zahl der überlebenden Tiere erkennen läßt, sind die Substanzen allgemein toxisch, so daß höhere Dosierung nicht möglich war. Mit Ausnahme des Guanidopropylderivates werden keine signifikanten Hemmungen des Tumorstwachstums beobachtet. Dieser Befund überrascht deshalb, weil die Substanz bei den Einbauversuchen keine Hemmung von DNS-, RNS- oder Proteinsynthese bewirkte. Im Carcinolyseversuch wurden dieselben Ergebnisse erhalten, wie aus Tab. 4 hervorgeht.

Während die Verbindungen das Wachstum von Ascites-Zellen *in vivo* nicht signifikant beeinflussen, wurde z. B. mit 2-Chlor-6-[4-t-butylimidazol-2-thio]purin eine erhebliche Wachstumshemmung an Ascites-Zellen in Monolayer-Kulturen beobachtet; so wurden bei den angegebenen Konzentrationen nach

Thioäther	Konzentration [M]	^{14}C -Thymin-Einbau			^{14}C -Uridin-Einbau			^{14}C -Leucin-Einbau		
		60'	90'	120'	60'	90'	120'	60'	90'	120'
2-Chlor-6-[4-phenylimidazol-2-thio]purin $\times$ HCl	10^{-4}	52	55	55	18	18	18	25	18	12
	$< 10^{-3}$	12	8	4	3	2	0	8	4	2
2-Chlor-6-[4-guanido-propyl-imidazol-2-thio]purin $\times$ HCl	10^{-3}	100	100	100	99	94	92	89	80	81
2-Chlor-6-[4-methyl-thiazol-2-thio]purin	10^{-4}	76	22	4	62	46	39	40	24	18
2-Chlor-6-[4-t-butyl-thiazol-2-thio]purin	10^{-4}	94	95	80	60	56	40	63	50	20
2-Chlor-6-[4-phenyl-thiazol-2-thio]purin	$< 10^{-4}$	88	88	78	76	65	54	83	72	70
2-Chlor-6-[4-carbäthoxymethyl-thiazol-2-thio]purin	$< 10^{-4}$	92	84	60	75	72	75	70	55	43
2-Chlor-6-[4-carboxamido-5-amino-thiazol-2-thio]purin	$< 10^{-4}$	84	93	98	82	80	80	96	92	84
2-Chlor-6-[5-t-butyl-thiadiazol(1.3.4)-2-thio]purin	10^{-4}	97	85	63	71	48	37	66	50	31
2-Chlor-6-[5-phenyl-thiadiazol(1.3.4)-2-thio]purin	$< 10^{-4}$	82	81	81	58	50	39	48	36	30
2-Chlor-6-[tetrazol-5-thio]purin	10^{-3}	96	98	91	104	103	103	95	95	100
Thio-guanin	10^{-3}	94	82	80	93	92	92	99	89	80
Imuran	10^{-3}	37	10	0	57	34	34	14	10	8

Tab. 2. Wirkung der Thioäther auf den Einbau von ^{14}C -Thymin, -Uridin und -Leucin in Asciteszellen *in vitro* nach 60, 90 und 120 Minuten-Inkubation. Angaben in Prozent der Kontrolle.

Thioäther	Dosis pro Tier und Tag i.p. [mg]	Ascitesmenge in % d. Kontrolle am 11. Versuchstag	Überlebende Tiere von je 11
2-Chlor-6-[4-t.butyl-imidazol-2-thio]purin × HCl	1,5 3,0	87 (63)	7 2
2-Chlor-6-[4-guanidopropyl-imidazol-2-thio]purin × 2 HCl	3,0	57	7
2-Chlor-6-[4-phenyl-thiazol-2-thio]purin	5,0	90	5
2-Chlor-6-[4-t.butyl-thiazol-2-thio]purin	1,5	83	8
2-Chlor-6-[5-t.butyl-thiadiazol(1.3.4)-2-thio]purin	1,5	77	8

Tab. 3. Wirkung der Thioäther auf das Wachstum des Ascites-Carcinoms der Maus in vivo. Therapieversuch.

Thioäther	Ascites- menge am 13. Versuchs- tag in % der Kontrolle
2-Chlor-6-[4-t.butylimidazol-2-thio]purin × HCl	90
2-Chlor-6-[4-t.butyl-thiazol-2-thio]purin	102
2-Chlor-6-[5-t.butyl-thiadiazol(1.3.4)-2-thio] purin	90
Thioguanin	102
Thioguanosin	100

Tab. 4. Ergebnisse des Carcinolysetests.

21 Stdn. folgende Proteinmengen gefunden: Kontrolle 257% (des Ausgangswertes = 100%), bei 10^{-5} M Thioäther 256%, bei 10^{-4} M 136% und bei $5 \cdot 10^{-4}$ M 19%. (Die Werte können unter den Ausgangswert von 100% sinken, wenn die Zellen absterben; bei der Proteinbestimmung werden tote Zellen nicht miterfaßt.)

Zur Frage der enzymatischen Umwandlung der Thioäther in der Zelle

Eine mögliche intracelluläre enzymatische Umwandlung wurde bei folgenden Thioäthern sowohl an intakten Zellen als auch mit 100 000 g Überstand homogenisierter Zellen mit und ohne Glucosezusatz

geprüft: 2-Chlor-6-[4-t.butyl-imidazol-2-thio]purin; 2-Chlor-6-[4-t.butyl-thiazol-2-thio]purin; 2-Chlor-6-[5-t.butyl-thiadiazol(1.3.4)-2-thio]purin; 2-Chlor-6-[tetrazol-5-thio]purin; zum Vergleich wurden außerdem Guanosin, Adenosin und Inosin in derselben Versuchsanordnung untersucht. Alle geprüften Thioäther sowie Guanosin wurden unter keiner der geprüften Bedingungen verändert. Adenosin wurde dagegen fast vollständig umgesetzt: neben viel Inosin fand sich wenig Hypoxanthin. Inosin wurde in geringem Umfang zu Hypoxanthin gespalten. In glucosereiem Medium wurde Adenosin vollständig abgebaut — Inosin und Hypoxanthin entstanden unter diesen Bedingungen in gleicher Menge — und Inosin wurde vermehrt zu Hypoxanthin verstoffwechselt. Die Adenosin- und Inosinverwertung durch Ascites-Zellen wird durch die untersuchten Thioäther ebenfalls nicht beeinflusst. Dieselben Ergebnisse wurden mit Zellhomogenaten erhalten.

Permeation und Verteilung der Thioäther

Untersuchungen zu dieser Frage wurden mit 2-Chlor-[2- 14 C-4-t.butylimidazol-2-thio]purin durchgeführt. Die Verteilung der Radioaktivität auf die verschiedenen Fraktionen (s. Methoden) ist aus der nachstehenden Tabelle 5 ersichtlich.

	Waschprozedur			
	1 × 0,9% NaCl 2 min	1 × „kalter“ Thioäther 2 min	2 × 0,9% NaCl je 2 min	1 × 0,9% NaCl 20 min
Inkubationsmed.	77,1	74,9	77,3	78,3
Waschlösung	14,3	17,5	15,4; 2,6	18,9
TCA lösliche Fraktion	7,7	6,9	3,6	1,8
TCA unlösliche Fraktion	0,9	0,7	1,1	1,0

Tab. 5. Verteilung der Radioaktivität in % der Gesamtaktivität auf verschiedene Fraktionen nach 60-Minuten-Inkubation von Asciteszellen mit 2-Chlor-6-[2- 14 C-4-t.butylimidazol-2-thio]purin.

Wie man aus den Werten erkennt, werden etwa 25% des Thioäthers an die Zellen gebunden. Hier- von läßt sich abhängig von der Art und Dauer der Waschprozedur ein Anteil von 15–19% der Gesamt- aktivität durch vorsichtiges Waschen der Zellen wie- der entfernen, vollständiges Entfernen ist nicht mög- lich. Mit steigender Waschintensität sinkt die Radio- aktivität der TCA-löslichen Zellfraktion. Der Mar- kierungsgrad der TCA-unlöslichen Fraktion ändert sich durch das Waschen der Zellen nicht. Außerdem findet man bei einer Inkubation von 30 und 60 min dieselbe Verteilung der Radioaktivität in den ein- zelnen Fraktionen. Die säurelösliche Fraktion nach 2-stdg. Inkubation mit 2-Chlor-6-[2-¹⁴C-4-t.-butyl- imidazol-2-thio]purin wurde in einem gesonderten Versuch nach Lyophilisieren dünn-schichtchromato- graphisch auf Metabolisierungsprodukte geprüft; auch bei diesem Experiment ließ sich nur der un- veränderte Thioäther nachweisen.

Diskussion

Die vorliegende Arbeit führt unsere früheren Untersuchungen^{1–3} über Struktur und Wirkung von 6-[Imidazol-2-thio]purinen und ihrer Nucleoside weiter. Während bisher der Einfluß von Substituen- ten am Imidazolrest und Purinring sowie bei den Nucleosiden zusätzlich der Einfluß verschiedener Zuckerkomponenten auf die biochemischen Eigen- schaften untersucht wurden, ist bei den in dieser Arbeit beschriebenen Thioäthern der Imidazolrest gegen andere Heterocyclen ausgetauscht. Während die Einführung eines Thiazol- und Thiadiazolrestes die Löslichkeit der Verbindungen und damit die Voraussetzung für Untersuchungen in wäßrigen Sys- temen verschlechtert, bringt das Tetrazol eine Er- höhung der Löslichkeit mit gleichzeitigem Wirkungs- verlust; das hydrophile Guanidopropylimidazol hat denselben Effekt. Offensichtlich hat die Wirkung der Verbindungen auf Zellen etwas mit ihrer Lipoid- löslichkeit zu tun. Das kommt besonders deutlich bei den Einbauversuchen zum Ausdruck, bei denen Tetrazol- und Guanidopropyl-imidazol-Thioäther auch in einer Konzentration von 10^{-3} M keine Ein- bauhemmungen bewirken.

Auf das Wachstum des Ascites-Carcinoms der Maus waren die geprüften Thioäther ohne Einfluß im Therapieversuch (tägliche Applikation) als auch im Carcinolysetest (Angehrate des Ascites-Tumors

nach einmaliger Einwirkung auf die Zellen). Die all- gemeine Toxizität der Verbindungen ist offensichtlich erheblich, da im Therapieversuch in keinem Fall alle Tiere die Versuchszeit von 11 Tagen überlebten. Auch im Carcinolysetest erwiesen sich die Verbin- dungen als wirkungslos. Dieser Befund steht in ge- wissem Widerspruch zu den Ergebnissen der Ver- suche mit Monolayer-Kulturen von Ascites-Zellen, bei denen sich zeigte, daß 2-Chlor-6-[4-t.-butylimi- dazol-2-thio]purin in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ M eine Abtötung der Zellen bewirkt. Einer intensiven Prüfung der Thioäther im Tierversuch steht die schlechte Löslichkeit im Wege.

Bei den Experimenten zum Metabolismus der Thioäther haben vor allem zwei Fragen im Vorder- grund gestanden. Einmal sollte geprüft werden, ob eine intracelluläre thiolytische Spaltung der Thio- äther unter Bildung von 2-Mercaptopurinderivaten und des Mercaptoheterocyclus eintritt, und zum zweiten war es interessant zu wissen, ob aus den Thioäthern die Riboside gebildet werden und dar- aus eventuell die Ribotide, die dann die eigentliche Wirkform darstellen könnten, wie es z. B. vom 6-Mercaptopurin bekannt ist²². Mit den hier ange- wandten Methoden ließ sich jedoch weder eine Spal- tung der Thioätherbindung noch die Bildung eines Ribosids in Ascites-Zellen nachweisen; ob und wie die Verbindungen im Ganztier verstoffwechselt wer- den, ist damit natürlich nicht beantwortet.

Am Beispiel des 2-Chlor-6-[2-¹⁴C-4-t.-butylimi- dazol-2-thio]purins sollte die Frage der Zellgängig- keit und intracellulären Verteilung der hier unter- suchten Thioäther geprüft werden. Dabei zeigte sich, daß der markierte Thioäther von der Zelle in einer Form gebunden wird, die einen raschen Austausch mit „kaltem“ Thioäther nicht zuläßt. Bei der Be- urteilung des Befundes, daß sowohl in der TCA-lös- lichen als auch TCA-unlöslichen Fraktion Aktivität auftritt, darf nicht übersehen werden, daß die ge- fundene Verteilung auch erst beim Zellaufschluß eingetreten sein kann. Die Thioäther lagern sich jedenfalls leicht an Membranen und lipophilen Strukturen an, eine Beobachtung, die bereits durch die Tatsache angedeutet wurde, daß Einführung lipophiler Reste die Wechselwirkung mit Zellen ver- stärkt.

Primärer Angriffspunkt von 2-Chlor-6-[4-t.-butyl- imidazol-2-thio]purin und der übrigen wirksamen Thioäther ist höchstwahrscheinlich die Zellmembran. Mit der Bindung an die Membran und einer dadurch

hervorgerufenen Permeationshemmung von ^{14}C -Thymin, -Uridin und -Leucin kann die Senkung des Einbaus der markierten Vorstufen in DNS, RNS und Protein erklärt werden. Erst bei längerdauernder Einwirkung führt eine solche Permeationshemmung zur irreversiblen Schädigung der Zellen. Insgesamt kann man sagen, daß der Austausch von Imidazol gegen andere Heterocyklen keine Vorteile

erbringt und die 6-[Imidazol-2-thio]purine und ihre Nucleoside die interessanteste Gruppe aus dieser Klasse von Verbindungen darstellt.

Wir danken dem Fonds der Chemischen Industrie für die Unterstützung der Arbeit. Ferner danken wir Herrn Dr. R. JACKISCH und Herrn Dr. A. JUNG, beide Physiolog.-chemisches Institut, Tübingen, und Herrn Professor Dr. D. SCHACHTSCHABEL, Physiolog.-chemisches Institut II, Marburg.

- ¹ FR. SCHNEIDER, E. NIEMERS u. P. WARNECKE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **349**, 1739 [1968].
- ² U. HOPF u. FR. SCHNEIDER, Arzneimittel-Forsch. **21**, 294 [1971].
- ³ U. HOPF, G. NIEBCH u. FR. SCHNEIDER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **353**, [1972], im Druck.
- ⁴ J. A. MONTGOMERY u. L. B. HOLUM, J. Amer. chem. Soc. **80**, 404 [1958].
- ⁵ M. JACKMAN, M. KLENK, B. FISHBURN, B. F. TULLAR u. S. ARCHER, *ibid.* **70**, 2884 [1948].
- ⁶ E. OCHIAI u. S. IKUMA, Chem. Ber. **69**, 1147 [1936].
- ⁷ P. M. KOTSCHERGIN u. M. N. SCHTSCHUKINA, J. allg. Chem. [UdSSR] **25**, 2182 [1955].
- ⁸ S. AKABORI u. T. KANEKO, Bull. chem. Soc. Japan **11**, 208 [1936].
- ⁹ E. R. BUCHMAN, A. O. REIMS u. H. SARGENT, J. org. Chemistry **6**, 764 [1941].
- ¹⁰ G. MIOLATI, Gazz. chim. ital. **23**, 579 [1893].
- ¹¹ A. H. COOK, J. HEILBRON u. E. SMITH, J. chem. Soc. **1949**, 1440.
- ¹² K. A. JENSEN u. C. PEDERSEN, Acta chem. scand. **15**, 1102 [1961].
- ¹³ D. ZINSER, Dissertation, Tübingen 1967.
- ¹⁴ E. NIEMERS, Dissertation, Tübingen 1968, sowie l. c. ¹.
- ¹⁵ G. NIEBCH, Dissertation, Tübingen 1971.
- ¹⁶ M. FREUND u. G. BACHRACH, Liebigs Ann. Chem. **285**, 201 [1895].
- ¹⁷ H. PAULY, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **42**, 508 [1904].
- ¹⁸ G. WEITZEL, FR. SCHNEIDER, A. M. FRETZDORFF, J. DURST u. W. D. HIRSCHMANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **348**, 433 [1967].
- ¹⁹ D. O. SCHACHTSCHABEL, F. ZILLIKEN, M. SAITO u. G. E. FOLEY, Exp. Cell Res. **57**, 19 [1969].
- ²⁰ G. WEITZEL, E. BUDDECKE, FR. SCHNEIDER u. H. PFEIL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **325**, 65 [1961].
- ²¹ J. PAUL, in: „Cell and Tissue Culture“, Verlag Livingstone, Edinburg 1965.
- ²² P. ROY-BURMAN, Recent Results in Cancer Research-Analogues of Nucleic Acid Components, Springer-Verlag, New York 1970.