

Fakultät für Biowissenschaften der Universität Leipzig¹, Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Germany²

Maskierte Mercaptoalkylpyrimidinone: Synthese und Prüfung auf immunstimulierende Wirkung

D. BRIEL¹, K. DRÖßLER¹, A. RYBAK¹, M. HOLZER², B. DOBNER²

Eingegangen am 5. Dezember 2003, angenommen am 5. August 2004

Priv.-Doz. Dr. Detlef Briel, Institut für Pharmazie, Brüderstr. 34, D-04103 Leipzig

Pharmazie 60: 415–417 (2005)

Aus 3-Hydroxyalkyl-pyrimidinen **1** werden durch Umsetzung mit Phosphoroxychlorid und Thioglycolsäure bzw. Thioharnstoff Pyrimidin-3-ylalkylthioessigsäuren **3** bzw. Pyrimidin-3-ylalkylthiuroniumsalze **5** synthetisiert. Einige der Pyrimidine **3** und **5** zeigen signifikante immunmodulierende Effekte.

Protected mercaptoalkylpyrimidinones: synthesis and test for immunostimulating activity

3-Hydroxyalkyl-pyrimidine **1** reacts with phosphoroxychloride and thioglycolic acid or thiourea to yield pyrimidin-3-ylalkylthioacetic acids **3** or pyrimidin-3-ylalkylthiuroniumsalts **5** respectively. Some of the pyrimidines **3** and **5** showed immunomodulatory activity.

1. Einleitung

Das zur Immunstimulation im Verlauf maligner Erkrankungen eingesetzte Levamisol (Mutschler 2001; Roth 2000; Aksoy et al. 2002; Kaytas 2002) wird im wässrigen Medium in ein mercaptoethylsubstituiertes Imidazolidinon umgewandelt. Dieses Hydrolyseprodukt hat wahrscheinlich einen Anteil an der Beeinflussung der zellulären Immunantwort (Roth 2000). Mit dem Ziel, andere mercaptoethylsubstituierte Stickstoff-Heterocyclen mit verwertbarer immunologischer Aktivität zu finden, führten wir Untersuchungen mit funktionalisierten Pyrimidinonen durch. Über die hierbei erhaltenen Verbindungen und deren Prüfung auf immunmodulierende Wirkung wurde in einer vorangehenden Mitteilung berichtet (Briel et al. 2003).

2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

In Fortführung dieser Untersuchungen sollten, ausgehend von den leicht zugänglichen Pyrimidinonen **1**, Derivate synthetisiert werden, welche eine substituierte Schwefelfunktion in der Seitenkette besitzen, so dass diese Verbindungen vor einer unerwünschten Oxidation unter Bildung von Disulfiden (Briel et al. 2003) geschützt sind. Unsere Zielverbindungen waren Thioglykolsäure- und Isothiuronium-Derivate der Pyrimidine. Während Thioglykolsäureether anderer Heterocyclen als immunologisch aktive Verbindungen beschrieben wurden (Khaliullin et al. 2001), können aus Isothiuroniumsalzen hydrolytisch Thiole gebildet werden.

Durch Umsetzung von **1** mit POCl₃ wurden die Chlor-ethylpyrimidine **2** mit guten Ausbeuten erhalten. Die Ein-

Schema

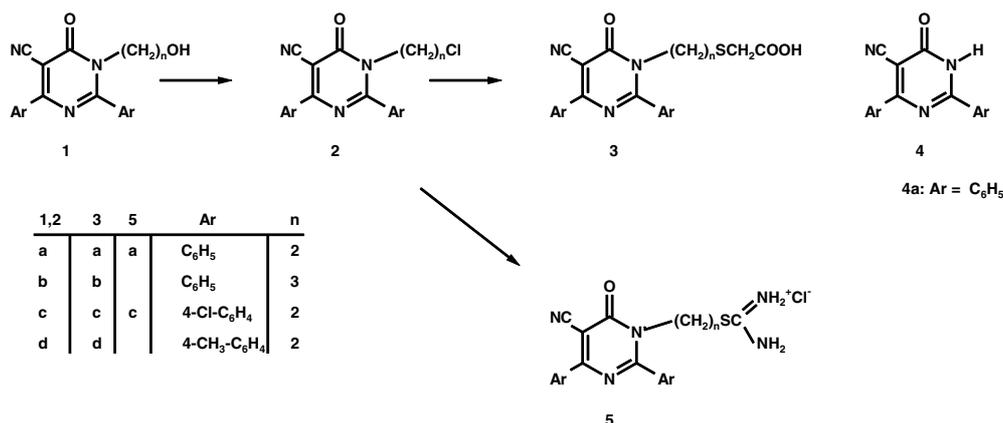


Tabelle: Beeinflussung der humoralen und zellulären Immunreaktion durch die Thioethersäuren 3 und die Isothiuroniumsalze 5

Verbindung	Humorale Immunreaktion ^a		Zelluläre Immunreaktion ^b	
	AK-Titer	AK-Titer-Differenz	24 h Reaktion	48 h Reaktion
3a	1,0 (± 0,4)	-0,1	6,3 (± 0,6)	5,1 (± 1,2)
3b	1,1 (± 0,8)	0,0	7,8 (± 0,5)	4,7 (± 1,6)
3c	1,5 (± 0,5)	+0,4	4,5 (± 0,6)	3,0 (± 1,2)
3d	1,5 (± 1,2)	+0,4	6,4 (± 1,3)	4,0 (± 1,4)
5a	2,7 (± 0,5)	+1,6	2,4 (± 1,5)	2,1 (± 0,7)
5c	1,7 (± 0,5)	+0,6	7,9 (± 2,2)	5,5 (± 1,2)
Kontrolle	1,1 (± 0,4)		7,8 (± 0,6)	5,5 (± 0,4)

^a Serumantikörperkonzentration (AK-Titer) und Differenz gegenüber einer Kontrollgruppe (AK-Titer-Differenz) 14 Tage nach primärer epikutaner Applikation von DNFB

^b Hautreaktionen nach epikutaner Applikation einer DNFB (Dinitrofluorbenzol)-Lösung (0,5–0,01%) am Meerschwein. Perorale Applikation der Testverbindung (Dosis 1×10^{-5} mol/kg) Kontrolle: Lactose

wirkung von überschüssiger Thioglykolsäure mit Triethylamin als Hilfsbase in DMSO auf **2** lieferte die Thioethersäuren **3**. Die Ausbeuten liegen hierbei zwischen 88% (für **3b**) und 41% (für **3a**).

In der Mutterlauge der Ansätze dc nachgewiesenes Nebenprodukt trat bei der Umsetzung von **2a** in größerer Menge auf und wurde isoliert. Es handelt sich um das Pyrimidin **4a**. Über den Mechanismus dieser Seitenkettenabspaltung konnten keine Erkenntnisse gewonnen werden. Da **4a** auch thermolytisch durch Erhitzen von **3a** auf 200 °C erhalten werden kann, könnte eine Parallele zu von Spitzner und Mitarbeitern an *N*-Alkylpyrimidiniumsalzen beobachteten Seitenkettenabspaltungen bestehen (Spitzner et al. 1987).

Durch Umsetzung der Chloralkylpyrimidine **2a, c** mit Thioharnstoff wurden die Isothiuroniumsalze **5a, c** erhalten.

Die Prüfung der Verbindungen auf immunstimulierende Eigenschaften wurde mit den Screeningmodellen: Takatsy-Test zum Nachweis Trinitrophenol-spezifischer Antikörper (humorale Immunantwort) und Kontaktüberempfindlichkeit vom verzögerten Typ (Effektor-T-Lymphozytenaktivität) (zelluläre Immunantwort) (Holzer 1992; Briel et al. 2003) durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass das Isothiuroniumsalz **5a** die humorale Immunreaktion signifikant stimuliert. Dagegen haben **5a** und **3c** auf die zelluläre Immunantwort einen supprimierenden Effekt. Bemerkenswert ist das Fehlen einer signifikanten Wirkung bei **5c**.

3. Experimenteller Teil

3.1. Allgemeine Angaben und Geräte

Schmelzpunkte (unkorrigiert): Heitzschmikroskop nach Boetius. IR-Spektren: IR-Spektrophotometer 16PC FT-IR Perkin-Elmer. UV/Vis-Spektren: Shimadzu UV160A. Massenspektren: Hewlett Packard 5989A (70 eV). Die Ergebnisse der Elementaranalysen lagen innerhalb der üblichen Fehlergrenzen.

3.2. 2,6-Diaryl-3,4-dihydro-3-chloralkyl-4-oxo-pyrimidin-5-carbonitrile **2a–d**

1a–d (Holzer et al. 1994) (3 mmol) werden in 5 ml POCl₃ 20 min rückfließend erhitzt. Man lässt erkalten und gießt unter Rühren in Eiswasser ein. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Na₂CO₃-Lösung (5%) und anschließend mit Wasser gewaschen.

3.2.1. 2,6-Diphenyl-3,4-dihydro-3-(2-chlorethyl)-4-oxo-pyrimidin-5-carbonitril (**2a**)

Ausbeute: 0,95 g (94%). farblose Kristalle vom Schmp. 203–206 °C (CH₃OH). IR (KBr, cm⁻¹): 2240 (C≡N), 1670 (C=O). UV/Vis (C₂H₅OH, nm): λ_{max} (log ε) = 245 (4,24), 289 (4,18), 326 (3,96). C₁₉H₁₄N₃OCl (335,8)

3.2.2. 2,6-Diphenyl-3,4-dihydro-3-(3-chlorpropyl)-4-oxo-pyrimidin-5-carbonitril (**2b**)

Ausbeute: 0,95 g (90%). farblose Kristalle vom Schmp. 110–111 °C (n-C₃H₇OH). IR (KBr, cm⁻¹): 2240 (C≡N), 1680 (C=O). UV/Vis (C₂H₅OH, nm): λ_{max} (log ε) = 244 (4,23), 287 (4,16), 326 (3,95). C₂₀H₁₆N₃OCl (349,8)

3.2.3. 2,6-Bis(4-chlorphenyl)-3,4-dihydro-3-(2-chlorethyl)-4-oxopyrimidin-5-carbonitril (**2c**)

Ausbeute: 1,18 g (97%). hellgelbe Kristalle vom Schmp. 194–195 °C (n-C₃H₇OH). IR (KBr, cm⁻¹): 2240 (C≡N), 1690 (C=O). UV/Vis (C₂H₅OH, nm): λ_{max} (log ε) = 249,5 (4,25), 298 (4,33), 334 (4,06). C₁₉H₁₂N₃OCl₃ (404,7)

3.2.4. 2,6-Bis(4-methylphenyl)-3,4-dihydro-3-(2-chlorethyl)-4-oxopyrimidin-5-carbonitril (**2d**)

Ausbeute: 1,02 g (93%). farblose Kristalle vom Schmp. 206–210 °C (CH₃OH). IR (KBr, cm⁻¹): 2240 (C≡N), 1680 (C=O). UV/Vis (C₂H₅OH, nm): λ_{max} (log ε) = 248 (4,21), 307 (4,31), 340 (4,02). C₂₁H₁₈N₃OCl (363,8)

3.3. [(2,6-Diaryl-3,4-dihydro-5-cyan-4-oxo-pyrimidin-3-yl)alkylthio]essigsäuren **3a–d**

2a–d (1,5 mmol) werden mit 20 ml abs. CH₃SOCH₃, 8 mmol HSCH₂COOH und 14 mmol (C₂H₅)₃N 8 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 15 ml H₂O versetzt und mit Salzsäure neutralisiert. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

3.3.1. [2-(2,6-Diphenyl-3,4-dihydro-5-cyan-4-oxo-pyrimidin-3-yl)ethylthio]essigsäure (**3a**)

Die nach Absaugen von **3a** zurückbleibende Mutterlauge wird durch präparative DC getrennt (Merck, PLC Platten 20 × 20 cm, Silicagel 60 F254, 2 mm)(Dioxan/Toluol = 1 : 4). Hierbei wird weiteres **3a** und **4** erhalten.

3a: Ausbeute: 0,24 g (41%).

Farblose Kristalle vom Schmp. 178–182 °C (CH₃OH/H₂O = 9 : 1). IR (KBr, cm⁻¹): 3300 (OH), 2240 (C≡N), 1740 (C=O), 1700 (C=O). UV/Vis (C₂H₅OH, nm): λ_{max} (log ε) = 251 (4,18), 311 (4,28). MS (E.-I.) m/z (rel. Int. %): 391 (M⁺, 10), 273 (100). C₂₁H₁₇N₃O₃ (391,4)

3.3.2. [3-(2,6-Diphenyl-3,4-dihydro-5-cyan-4-oxo-pyrimidin-3-yl)propylthio]essigsäure (**3b**)

Ausbeute: 0,54 g (88%). Farblose Kristalle vom Schmp. 151–153 °C (CH₃OH/H₂O = 9 : 1). IR (KBr, cm⁻¹): 3350 (OH), 2240 (C≡N), 1720 (C=O), 1640 (C=O). UV/Vis (C₂H₅OH, nm): λ_{max} (log ε) = 249 (4,23), 311 (4,33). MS (E.-I.) m/z (rel. Int. %): 405 (M⁺, 22), 273 (100). C₂₂H₁₉N₃O₃ (405,5)

3.3.3. [2-[2,6-Bis(4-chlorphenyl)-3,4-dihydro-5-cyan-4-oxo-pyrimidin-3-yl]ethylthio]essigsäure (**3c**)

Ausbeute: 0,43 g (62%). Hellgraue Kristalle vom Schmp. 165–168 °C (CH₃OH/H₂O = 9 : 1). IR (KBr, cm⁻¹): 3450 (OH), 2230 (C≡N), 1715 (C=O), 1650 (C=O). UV/Vis (C₂H₅OH, nm): λ_{max} (log ε) = 254 (4,18), 306 (4,21). C₂₁H₁₅N₃O₃Cl₂ (460,3)

3.3.4. [2-[2,6-Bis(4-methylphenyl)-3,4-dihydro-5-cyan-4-oxo-pyrimidin-3-yl]ethylthio]essigsäure (**3d**)

Ausbeute: 0,47 g (75%). Farblose Kristalle vom Schmp. 183–185 °C (CH₃OH/H₂O = 9 : 1). IR (KBr, cm⁻¹): 3340 (OH), 2220 (C≡N), 1740 (C=O), 1705 (C=O). UV/Vis (C₂H₅OH, nm): λ_{max} (log ε) = 258 (4,33), 309 (4,34). C₂₃H₂₁N₃O₃ (419,5)

3.4. 2,6-Diphenyl-3,4-dihydro-4-oxo-pyrimidin-5-carbonitril **4a**

A) Herstellung siehe 3.3.1. Ausbeute: 0,09 g (22%).

B) 0,02g **3a** werden 3 min auf 200 °C erhitzt. Anschließend wird aus CH₃OCH₂CH₂OH umkristallisiert. Ausbeute: 0,008 g (57%). Farblose Kristalle vom Schmp. 348–356 °C (CH₃OCH₂CH₂OH). Schmidt (1965): Schmp. 350–356 °C. IR (KBr, cm⁻¹): 3220, 3160, 3090 (NH), 2240 (C≡N), 1655 (C=O). UV/Vis (C₂H₅OH, nm): λ_{max} (log ε) = 256 (4,06), 290 (3,80), 335 (3,73). MS (E.-I.) m/z (rel. Int. %): 273 (M⁺, 90), 170 (M⁺-C₆H₅CN, 100), 104 (C₆H₅CNH⁺, 100). C₁₇H₁₁N₃O (273,2)

3.5. *S*-[2-(2,6-Diaryl-3,4-dihydro-5-cyan-4-oxo-pyrimidin-3-yl)ethyl]thiuronium-hydrochloride (**5a, c**)

2a, c (2 mmol) werden mit Thioharnstoff (6 mmol) in 10 ml CH₃OCH₂CH₂OH 90 min rückfließend erhitzt. Nach dem Erkalten werden 20 ml abs. (CH₃CH₂)₂O zugegeben. Der Niederschlag wird abgesaugt.

3.5.1. *S*-[2-(2,6-Diphenyl-3,4-dihydro-5-cyan-4-oxo-pyrimidin-3-yl)ethyl]thiuronium-hydrochlorid (**5a**)

Ausbeute: 0,44 g (53 %). farblose Kristalle, 210–220 °C Zersetzung unter Nadelbildung, Schmp. 310 °C (CH₃NO₂/CH₃CH₂OCH₂CH₃). IR (KBr, cm⁻¹): 3400, 3000 (NH₂), 2245 (C≡N), 1660 (C=O). UV/Vis (C₂H₅OH, nm): λ_{max} (log ε) = 244 (4,29), 291 (4,21), 328 (3,94). MS (E.-I.) m/z (rel. Int. %): 375 (M⁺-HCl, 10). C₂₀H₁₈N₅SOCl (411,9)

3.5.2. *S*-[2-[2,6-Bis(4-chlorphenyl)-3,4-dihydro-5-cyan-4-oxo-pyrimidin-3-yl]ethyl]thiuronium-hydrochlorid (**5c**)

Ausbeute: 0,29 g (30 %). farblose Kristalle, 215–220 °C Zersetzung unter Nadelbildung, Schmp. 306–309 °C (CH₃NO₂/CH₃CH₂OCH₂CH₃). IR (KBr, cm⁻¹): 3450, 3010 (NH₂), 2240 (C≡N), 1660 (C=O). UV/Vis (C₂H₅OH, nm): λ_{max} (log ε) = 248 (4,31), 299 (4,32), 332 (4,07). C₂₀H₁₆N₅SOCl₃ (480,8)

Literatur

Aksoy H, Baltaci S, Turkolmez K, Seckinger I, Beduk Y (2001) Combined interferon alpha with levamisole in patients with metastatic renal cell carcinoma. Intern Urol Nephrol 33: 457–459. ref.: CA (2002) 137: 293329m.

Briel D, Holzer M, Leistner S, Dröbber K, Dobner B (2003) Synthese von Sulfanylalkylpyrimidin-Derivaten mit potenziell immunmodulierender Wirkung. Pharmazie 58: 759–760 und dort zit. Lit.

Briel D, Leistner S, Dröbber K (1991) Alkylderivate von 1,2,4-Dithiazolidin-3,5-diylden-bis-(o-benzochinonmethid): Synthese und Prüfung auf immunmodulierende Wirkung. Arch Pharm 324: 959–961.

Holzer M (1992) Diplomarbeit, Leipzig.

Holzer M, Dobner B, Briel D (1994) Synthese von N-substituierten Oxo- und Thioxopyrimidinen aus 1,2,4-Dithiazoliumsalzen. Liebigs Ann Chem: 895–900.

Kaytas M (2002) Levamisole treatment enhances protective antibody response to hepatitis B vaccination in hemodialysis patients. Artificial Organs 2002: 492–496. ref.: CA (2002) 137: 103450y.

Khaliullin FA, Alekhin EK, Klen EE, Ryabchinskaya LA, Kataev VA, Bogdanova AS (2001) Synthesis and immunotropic activity of (benzimidazolyl-2-thio)acetic acid derivatives. Pharm Chem J 35: 11–14, ref.: CA (2001) 135: 257196r.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M (2001) Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wiss. Verl. Ges. mbH, 8. Aufl., Stuttgart, S. 930.

Roth HJ, Fenner H (2000) Arzneistoffe – Struktur, Bioreaktivität, wirkungsbezogene Eigenschaften. Dt. Apotheker Verlag, 3. Aufl., Stuttgart, S. 612.

Schmidt RR (1965) Neue Synthese von Pyrimidinderivaten. Chem Ber 98: 346–351.

Spitzner R, Lesinski M, Richter M, Schroth W (1987) Nukleophile Substitutionen und Eliminierungen von Aminofunktionen via Pyrimidiniumsalze. Mh Chem 118: 485–502.