

Literatur

- 1 A. G. Bell, *Am. J. Sci.* 20, 305 (1880).
- 2 A. G. Bell, *Philos. Mag.* 11, 510 (1881), zit. nach⁸⁾.
- 3 J. Tyndall, *Proc. R. Soc. London* 31, 307 (1881).
- 4 W. C. Roentgen, *Philos. Mag.* 11, 308 (1881), zit. nach⁸⁾.
- 5 Y.-H. Pao, (Ed.), *Optoacoustic Spectroscopy and Detection*, Academic Press, New York 1977.
- 6 A. Rosencwaig, *Photo-acoustics and Photo-acoustic-spectroscopy*, Wiley, New York, 1980.
- 7 H. D. Breuer und H. Jacob, *Ann. Univ. Sarav. Math. Naturwiss. Fak.*, Heft 15, 45 (1980).
- 8 H.-H. Perkampus, *Naturwissenschaften* 69, 162 (1982).

[Ph 856]

Arch. Pharm. (Weinheim) 318, 40–48 (1985)

Thiophen als Strukturelement physiologisch aktiver Substanzen, 11. Mitt.¹⁾**Substituierte Thieno[2,3-*d*]imidazole als potentiell antivirale Wirkstoffe**

Dieter Binder*, Christian R. Noe, Hermann Kollmann

Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Wien, Getreidemarkt 9,
A-1060 Wien

und Brigitte Rosenwirth

Sandoz Forschungsinstitut, Brunnerstraße 59, A-1235 Wien

Eingegangen am 19. September 1983.

Eine neue Thieno[2,3-*d*]imidazol-Synthese wird beschrieben, wobei in der Schlüsselsequenz ein Nitrothiophenderivat mit Dinatriumcyanamid umgesetzt und das resultierende Natriumsalz nach einer katalytischen Hydrierung ringgeschlossen wird. Eine nach diesem Verfahren hergestellte Verbindung **1**, deren Substitutionsmuster einem gegen Rhino- und andere Picornaviren hochwirksamen Benzolanalogon, dem Enviroxime (**B**), entspricht, zeigt eine geringere antivirale Aktivität als dieses.

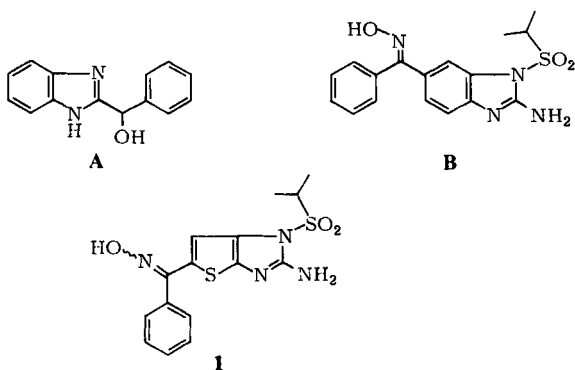
Thiophene as a Structural Element of Physiologically Active Compounds, XI: Substituted Thieno[2,3-*d*]imidazoles as Potentially Antiviral Compounds

A novel synthesis of thieno[2,3-*d*]imidazole is described. In the key reaction sequence a nitrothiophene derivative is reacted with disodium cyanamide. The resulting sodium salt is subjected to ring closure after a catalytic hydrogenation step. Compound **1**, prepared by this procedure, has a

substitution pattern equal to that of the benzene analogue enviroxime (**B**), which is highly active against picorna virus and rhino virus in particular. However, the thienoimidazole **1** was found to be less active against these viruses than the benzimidazole.

Die antivirale Wirkung von Benzimidazolen ist seit 1952 bekannt²⁾; die Struktur-Aktivitätsbeziehungen einer großen Zahl von Benzimidazolderivaten wurden seitdem extensiv untersucht^{3,4)}. 2-(α -Hydroxybenzyl)benzimidazol (HBB) (**A**), eine der bestuntersuchten antiviralen Substanzen, hemmt selektiv die Vermehrung bestimmter Vertreter der Picornavirus-Gruppe, indem es mit der Replikation der viralen Nukleinsäure interferiert^{5,6)}. Die Empfindlichkeit verschiedener Viren der Picorna-Gruppe gegen **A** variiert sehr stark, insbesondere wird die Mehrzahl der klinisch bedeutenden Rhinoviren durch **A** nicht oder nur marginal gehemmt⁷⁻⁹⁾. [2-Amino-1-(isopropylsulfonyl)-6-benzimidazolyl]phenylmethanon-Oxim (Enviroxime) (**B**) ist ein hochwirksamer Inhibitor der Rhinovirus-Vermehrung in Zell- und Organkulturen^{10,11)}. Es zeichnet sich durch ein breites Wirkspektrum aus: Alle bisher untersuchten Rhinovirus-Serotypen und Enteroviren (Polio, Echo und Coxsackie) werden effektiv gehemmt¹²⁾.

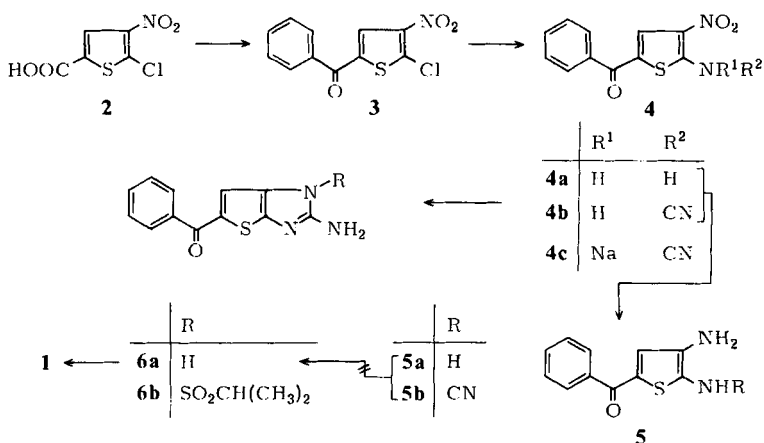
Diese interessante biologische Aktivität veranlaßte uns, die Synthese des Thiophen-analogons **1** des Enviroximes (**B**) auszuführen und seine antivirale Aktivität zu untersuchen. Es konnte in den bisherigen Mitt. gezeigt werden, daß der Austausch Benzol gegen Thiophen sehr häufig nicht durch einfache Übertragung analoger Syntheseschritte gelingt, sondern daß die Entwicklung neuer Syntheseverfahren erforderlich ist. Dies gilt in besonderem Maße, wenn man aus ökonomischen Gründen einen vergleichbaren synthetischen Aufwand für den thiophenhaltigen Wirkstoff anstrebt.



Schema 1

Wir haben in einer früheren Mitt.¹³⁾ über die Synthese des Thiophenanalogs des Benzimidazol-Analgeticums Entonitazen berichtet, wozu eine neue Synthese von Thieno[2,3-*d*]imidazolen durch Curtiusabbau von *o*-Aminothiophencarbonsäureaziden entwickelt worden war. Obwohl nun in der gewünschten Zielverbindung **1** dasselbe Stammsystem vorlag, wurde ein anderes Synthesekonzept erarbeitet, welches in der Schlüsselstufe einen nucleophilen Substitutionsschritt vorsieht (vgl. ^{13,14)}). Der limitierende Faktor bei der Synthese eines Thienoimidazols ist nämlich die Instabilität der bei der

Synthese intermediär auftretenden Thiophendiamine. Während bei der Synthese über den *Curtiusabbau* elektronenabziehende Substituenten an der Aminogruppe zur Stabilisierung der Zwischenprodukte eingesetzt worden waren, ließ bei der Synthese von **1** über einen nucleophilen Austausch die bereits im Edukt **3** vorliegende elektronenabziehende Benzoylgruppe eine größere Stabilität der intermediär auftretenden Amine erwarten¹⁵⁾.



Schema 2

Die Ausgangsverbindung **3** ließ sich in ausgezeichneter Ausbeute aus der Carbonsäure **2** durch *Friedel-Crafts*-Reaktion des Säurechlorides herstellen. Der nucleophile Austausch des Chloratoms gegen die Aminogruppe erfolgte durch Erhitzen in einem Gemisch von Methanol und gesättigter wäßriger Ammoniaklösung. Das erhaltene Monoamin **4a** wurde in einer *Parr*-Hydrierapparatur mit W-2-Raney-Nickel hydriert, wobei mit einem großen Katalysatorüberschuß gearbeitet werden mußte. Das Diamin **5a** war wider Erwarten sehr unbeständig und konnte nicht in reiner Form isoliert werden. Versuche, das Rohprodukt von **5a** bzw. sein Hydrochlorid mit Bromcyan umzusetzen, führten zur Zersetzung des Reaktionsgemisches.

Aufgrund dieser Ergebnisse erschien die Einführung einer Cyanaminogruppe ein vielversprechender Ausweg zu sein, einerseits wegen der stabilisierenden Wirkung der elektronenabziehenden Cyangruppe, andererseits, weil sämtliche für das Ringsystem erforderliche Atome in einem Schritt eingeführt werden konnten. Tatsächlich gelang der Umsatz von **3** mit Dinatriumcyanamid recht gut. Die durch Ansäuern des Reaktionsgemisches erhaltene Verbindung **4b** wurde zu **5b** hydriert, welches aber offensichtlich ebenso wie **5a** recht instabil war und sich unter Ammoniakentwicklung zersetzte. Beim nucleophilen Austausch mit Dinatriumcyanid war das Natriumsalz **4c** in kristalliner Form aus dem Reaktionsgemisch angefallen. Dieses wurde beim nächsten Versuch in die katalytische Hydrierung eingesetzt. Tatsächlich konnte nach dem Ansäuern des Hydrierungsgemisches **6a** in guter Ausbeute isoliert werden, sodaß sich auf diese Weise eine sehr einfache und effiziente neue Synthese für 2-Aminothieno[2,3-*d*]imidazole ergab. Durch

Umsatz des Natriumsalzes von **6a** mit Isopropansulfonsäurechlorid konnte **6b** erhalten werden. Die hellgelbe Farbe von **6b**, sowie ein UV-Maximum bei 380 nm bestätigten die Annahme einer Substitution in Position 1, da nur in diesem Fall eine energetisch günstige mesomere Grenzformel mit einer negativen Ladung am Carbonylsauerstoff und einer positiven Ladung am exocyclischen Stickstoff geschrieben werden kann. Durch Rückfluß-erhitzen von **6b** mit Hydroxylamin in Methanol wurde schließlich **1** als Gemisch der (*E*)/(*Z*)-Diastereomere erhalten.

Diskussion der Ergebnisse der Untersuchungen zur antiviralen Aktivität

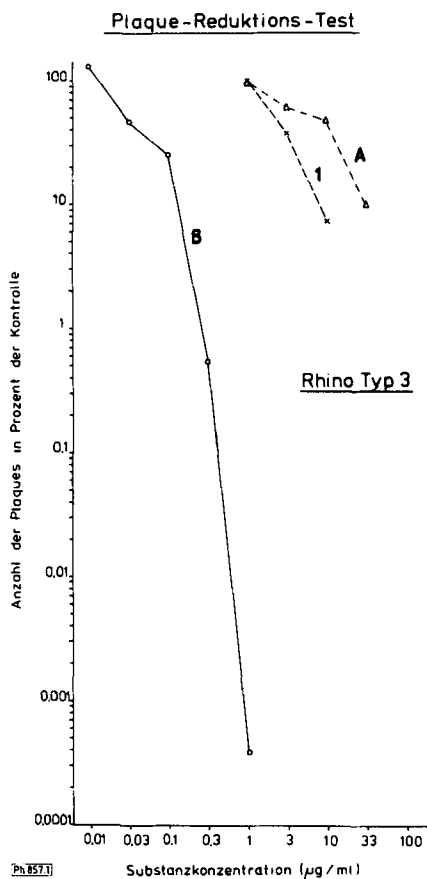
Das Thiophenanalogon **1** der gegen Picornaviren wirksamen Substanz **B** besitzt eine deutlich geringere antivirale Aktivität als diese (Tab. 1).

Tab. 1: Antivirale Wirksamkeit von **1**

Viren	MHK (µg/ml)			Virus Rating		
	HBB A	Enviroxime B	Thienoimidazol I	HBB A	Enviroxime B	Thienoimidazol I
Rhino Typ 2	100	0,1	10	0,3	1,4	0,4
Rhino Typ 3	33	0,03	10–3	0,8	2,5	0,4
Rhino Typ 14	10–3	0,1	10–3	1,8	2,2	0,4
Rhino Typ 16	33	0,03	10–3	0,8	2,9	0,4
Rhino Typ 33	100	0,03	10–3	0,4	2,5	0,3
Rhino Typ 37	33	0,03	10–3	0,6	2,3	0,3
Rhino Typ 48	33	0,1	10–3	0,8	2,1	0,3
Rhino Typ 50	100	0,3	3	0,1	2,1	1,2
Rhino Typ 55	>100	0,1	33	0	1,6	0,1
Polio Typ 2	10	0,3	> 33	1,5	1,8	0
Coxsackie B3	3	0,1	10–3	1,7	1,9	0,3
Echo Typ 9	10	0,3	3	1,7	2,8	1,3
EMC	>100	>10	> 33	0,5	0	0
MTK (µg/ml)	100	10–3	33			

Es ist – ebenso wie **B** – gleichermaßen aktiv gegen alle untersuchten Rhinovirus-Serotypen, die MHK-Werte liegen jedoch um einen Faktor 100 über denen des Enviroximes. Dem HBB **A** ist unsere Verbindung bezüglich der Hemmung bestimmter Rhinovirus-Serotypen vergleichbar (Abb. 1).

Encephalomyocarditis-Virus (EMC) wird durch keine der untersuchten Substanzen gehemmt. Dieses Virus ist ein Picornavirus, gehört jedoch zu der von den Rhino- und Enteroviren klar abgegrenzten Gruppe der Cardioviren. Die Zelltoxizität von **1** ist höher als die des HBB (**A**), jedoch niedriger als die des Enviroximes (**B**). Die Ergebnisse zeigen, daß im vorliegenden Fall ein Ersatz des Benzolrings durch ein Thiophen die antivirale Aktivität der Verbindung beeinträchtigt.



Experimenteller Teil

Allgemeine Angaben vgl. ¹⁶⁾

(5-Chlor-4-nitro-2-thienyl)-phenylmethanon (3)

122,3 g (0,599 mol) **2**¹⁷⁾ wurden in 1,25 l absol. Benzol mit 147 g (0,707 mol) Phosphorpentachlorid auf 50° erwärmt. Es wurde auf etwa 20° abgekühlt und 172 g (1,296 mol) wasserfreies Aluminiumchlorid portionsweise so zugegeben, daß die Temp. 50° nicht erreichte. Es wurde 1 h unter Rückfluß erhitzt, abgekühlt, auf ein Gemisch von 325 ml konz. Salzsäure und 3,5 kg Eis gegossen. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt, beide Phasen über Hyflo filtriert, die organische über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Aus Ethanol blieben 143,4 g (91 % d. Th.) farblose Nadeln zurück. Schmp.: 119–120° (zers.). ¹H-NMR: δ (ppm) = 8,07 (s, 1H Thiophen), 7,55–7,9 ppm (m, 5H Phenyl). C₁₁H₆NO₃SCl (267,5) Ber.: C 49,4 H 2,26 N 5,2; Gef.: C 49,4 H 2,35 N 5,3.

(5-Amino-4-nitro-2-thienyl)-phenylmethanon (4a)

In einem fest verschlossenen 500 ml Rotavaporkolben mit Magnetrührer wurden 38 ml konz. Ammoniaklösung, 270 ml Methanol und 14 g (52,3 mmol) **3** vorgelegt und die Suspension bei 60° Ölbadtemp. 4,25 h erhitzt. Dann wurde das Reaktionsgemisch 15 h auf 0° gekühlt, kalt abgesaugt, mit viel Ether nachgewaschen und bei 100° i. Vak. getrocknet. 9,36 g hellgelbe Kristalle. Sie wurden in 250 ml Dioxan aufgeköcht. Es wurde heiß von einem verbleibenden Rückstand filtriert, das Filtrat auf 130 ml eingeengt und nach dem Erkalten das Reaktionsprodukt mit 400 ml Ether ausgefällt. Nach 15 h bei 0° wurde abgesaugt und mit Ether nachgewaschen. Nach Trocknung bei 100° i. Vak. wurden, 8,36 g (64 % d. Th.) hellgelbe Nadeln erhalten und aus Acetonitril umkristallisiert. Schmp.: 230–232° (Zers.). ¹H-NMR: δ (ppm) = 9,3 (s, breit, 2H, -NH₂, aust. mit D₂O), 7,6–8,0 (m, 6H arom.). C₁₁H₈N₂O₃S (248,26) Ber.: C 53,2 H 3,25 N 11,3; Gef.: C 53,2 H 3,27 N 11,3.

(4,5-Diamino-2-thienyl)-phenylmethanon (5a)

3,9 g (15,7 mmol) **4a** wurden in 120 ml Dioxan unter Erwärmen gelöst, mit wenig Aktivkohle versetzt und heiß in eine 500 ml Schüttelente gesaugt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemp. (RT) wurden 30 g W2-Raney-Nickel zugegeben und in eine Parr-Mitteldruckhydrierapparatur bis zur Aufnahme von 0,0471 mol H₂ hydriert (Dauer 3 h). Das Hydriergemisch wurde über Hyflo vom Katalysator abfiltriert, mit viel Dioxan nachgewaschen und i. Vak. bei einer Badtemp. von ca. 30° eingedampft. Es wurden 3,08 g (90 % d. Th.) eines dunkelroten Öls erhalten, das sehr stark zur Zersetzung neigte und selbst unter N₂ im Tiefkühlschrank nur kurzfristig aufbewahrt werden konnte.

N-(5-Benzoyl-3-nitro-2-thienyl)-cyanamid (4b)

Eine Lösung von 2,36 g (56 mmol) Cyanamid in 20 ml Natronlauge aus 4,48 g (112 mmol) NaOH wurde mit 60 ml Methanol verdünnt. Sodann wurden 10 g (37,4 mmol) **3** portionsweise zugegeben, wobei sich das Gemisch auf 34° erwärmte und kurzfristig eine nahezu klare rote Lösung auftrat, aus der ein orangeroter Niederschlag fiel. Nach 15 min Rühren bei RT wurde abgesaugt, das Natriumsalz mit Dichlormethan gut gewaschen und trocken gesaugt. Der Rückstand wurde in 40 ml Wasser suspendiert und mit 7 ml konz. Salzsäure angesäuert, gut durchgerührt, die freie Verbindung **4b** abgesaugt und mit Wasser bzw. Dichlormethan digeriert. Die Mutterlauge des Natriumsalzes von **4b** wurde mit 2N-HCl bis zu einem pH von ca. 2 angesäuert, wobei noch ein Niederschlag von **4b** ausfiel, der gewaschen wurde. Die erhaltenen kristallinen Fraktionen wurden vereinigt und bei 60° i. Vak. getrocknet. Ausb.: 6,93 g (67,9 % d. Th.). Schmp.: 165° (Zers.). ¹H-NMR: δ (ppm) = 7,4–8,0 (m, 6H arom.), 6,05 (s, 1H, -NH-CN, aust. mit D₂O). IR (KBr): 3400 und 3200 (-NH), 2240 cm⁻¹ (CN).

N-(3-Amino-5-benzoyl-2-thienyl)-cyanamid (5b)

In eine Lösung von 2 g (7,3 mmol) **4b** in 60 ml Methanol/Dioxan 1:1 wurde eine Spatelspitze Aktivkohle eingerührt, in eine 500 ml Schüttelente gesaugt, mit ca. 20 g W2-Raney-Nickel versetzt und in einer Parr-Mitteldruckhydrierapparatur bis zur berechneten H₂-Aufnahme von 22 mmol hydriert (Dauer ca. 3 h). Dann wurde über Hyflo filtriert, mit Dioxan nachgewaschen und bei 30° i. Vak. eingedampft. 1,5 g (84 % d. Th.) dunkelrotes Öl, welches laut DC (Benzol/Ethanol/Triethylamin 6:1:1) nicht ganz einheitlich war und sich beim Stehen unter Ammoniakentwicklung zersetzte.

N-(5-Benzoyl-3-nitro-2-thienyl)-cyanamid-Natriumsalz (4c)

In eine Lösung von 37 g (417 mmol) Dinatriumcyanamid in 650 ml Methanol wurden portionsweise 74,5 g (278 mmol) **3** eingetragen, wobei die Temp. bei ca. 40° gehalten wurde. Nach beendeter Zugabe

erfolgte 45 min Nachrühren bei RT. Dann wurde das Natriumsalz mit wenig Wasser gewaschen und mehrmals mit Dichlormethan digeriert. Nach Trocknen i. Vak. bei 60° blieben 56,2 g (68 % d. Th.) intensiv gelbe Kristalle zurück. Schmp.: > 360°.

(2-Amino-1H-thieno[2,3-d]imidazol-5-yl)-phenylmethanon (6a)

7,75 g (26,3 mmol) **4c** wurden in 320 ml Methanol unter gelindem Erwärmen gelöst, mit Aktivkohle versetzt und warm in eine Schüttelente filtriert. Nach dem Abkühlen wurden ca. 60 g W2-Raney-Nickel zugegeben und in einer Parr-Mitteldruckhydrierapparatur bis zur Aufnahme von 79 mmol H₂ hydriert. Das Gemisch wurde über Hyflo filtriert, das Filtrat mit 200 ml Wasser und 6,56 ml konz. Salzsäure versetzt und das Methanol i. Vak. abdestilliert. Die wäßrige Phase wurde mit Dichlormethan ausgeschüttelt, beide Phasen über Hyflo filtriert und die organische mit Dichlormethan extrahiert. Die wäßrige Phase wurde unter Rühren mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert, wobei ein gelber Niederschlag ausfiel, welcher unter Zusatz von einigen Millilitern Dichlormethan zur besseren Koagulation 1/2 h nachgerührt wurde. Dann wurde filtriert, mit Wasser und Dichlormethan gewaschen und bei 100° i. Vak. getrocknet. Ausb.: 4,25 g (74 % d. Th.) hellgelbe Nadeln. Schmp.: 273–276° (Zers.). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) = 7,5–8,0 (m, 5H Phenyl), 7,35 (s, 1H Thiophen), 6,7 (s, 1H, -NH-, aust. mit D₂O), 3,5 (s, breit, 2H, -NH₂, aust. mit D₂O). Für die Analyse wurde aus Ethylacetat umkristallisiert. C₁₂H₉N₃OS (243,29) Ber.: C 59,2 H 3,73 N 17,3; Gef.: C 58,9 H 3,72 N 16,8.

[2-Amino-1-[(1-methylethyl)sulfonyl]-1H-thieno[2,3-d]imidazol-5-yl]-phenylmethanon (6b)

In eine Suspension von 34,7 g (142,6 mmol) **6a** in 270 ml absol. Dimethoxyethan wurden unter Stickstoff 3,56 g (145 mmol) Natriumhydrid eingetragen. Nach 1 h Rückflußerhitzen wurde auf 30° abgekühlt und 16,95 ml (151 mmol) Isopropylsulfonylchlorid in 52 ml absol. Dimethoxyethan so zufließen gelassen, daß die Temp. 40° nicht überstieg. Nach weiteren 4 h Rückflußkochen wurde das Dimethoxyethan i. Vak. abgedampft, der dunkelbraune Rückstand (66,3 g) in ca. 900 ml Dichlormethan gelöst, mit 0,5 N-HCl, Wasser, 0,1 N-HCl und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet, abfiltriert, zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 1250 ml Ethanol aufgeköcht, die Lösung mit Aktivkohle versetzt und heiß filtriert. Nach 15 h wurde der Niederschlag abgesaugt und bei 100° i. Vak. getrocknet (Ausb.: 14,98 g). Die Mutterlauge wurde auf 200 ml eingengt und die ausgefallenen Kristalle erneut gesammelt (4,1 g). Schließlich wurde das restliche Ethanol abgedampft, der Rückstand mit 50 ml Ether digeriert, der Niederschlag aus Ethanol umkristallisiert, wobei weitere 2,5 g reines **6b** isoliert werden konnten. Gesamtausb.: 21,5 g (43 % d. Th.) gelbe Nadeln. Schmp.: 209–211,5°. ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) = 7,4–8,0 (m, 8H arom., 2H, -NH₂, aust. mit D₂O), 3,7–4,3 (m, 1H, -CH-), 1,35 (d, 6H, -2CH₃). UV (EtOH): λ max. (ε) = 210 (10 043), 258,5 (8 730), 380 nm (18 660). Für die Analyse wurde aus Acetonitril umkristallisiert. C₁₅H₁₅N₃O₃S₂ Ber.: C 51,6 H 4,33 N 12,0; Gef.: C 51,5 H 4,30 N 11,9.

[2-Amino-1-[(1-methylethyl)sulfonyl]-1H-thieno[2,3-d]imidazol-5-yl]-phenylmethanonoxim (E/Z-Diastereomergemisch) (1)

14,9 g (42,6 mmol) **6b** und 8,89 g (128 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid wurden in 700 ml absol. Methanol unter Stickstoff 24 h rückflußerhitzt. Dann wurde auf 175 ml eingengt. Zu der noch heißen Lösung wurden unter heftigem Rühren 207 ml Wasser, 207 ml pH 7-Pufferlösung und 207 ml pH 7-Pufferlösung/Wasser 1:1 zugegeben, wobei bei der Zugabe des Puffer/Wassergemisches ein feiner gelbbrauner Niederschlag ausfiel. Die Lösung wurde auf Raumtemp. abkühlen gelassen und 17 h nachgerührt, wobei das Präzipitat zu größeren Teilchen koagulierte. Es wurde mit wenig Wasser gewaschen und bei 100° i. Vak. getrocknet. Ausb.: 6,8 g (43,8 % d. Th.); farblose Kristalle. Schmp.:

170–172° (Zers.). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ (ppm) = 12,1 (s, breit, 0,82 H, -OH, aust. mit D_2O), 11,1 (s, breit, 0,18 H, -OH, aust. mit D_2O), 7,5 (m, 5H Phenyl), 7,0 (s, breit, 2H, -NH₂, aust. mit D_2O), 6,9 (s, 0,82 H Thiophen), 6,5 (s, 0,18 H Thiophen), 3,5–4,1 (m, 1H, -CH(CH₃)₂), 1,33 (d, 6H, -CH(CH₃)₂). $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$ (364,45) Ber.: C 49,4 H 4,43 N 15,4; Gef.: C 49,5 H 4,35 N 15,1.

Biologische Untersuchungen: Material und Methoden

Zellen: HeLa Ohio Zellen wurden als Ein-Zell-Schichten in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM)¹⁸⁾ mit 5 % fötalem Kälberserum (FCS) bei 37° in einer 5 % CO_2 in Luft-Atmosphäre kultiviert. Zellsuspensionen wurden durch Behandlung konfluenter Zellkulturen mit Trypsin-Versen¹⁹⁾ hergestellt; die von der Oberfläche abgelösten Zellen wurden in der gewünschten Dichte in MEM mit 15 % FCS suspendiert. Die GMK-Zelllinie ist eine von primären Affennierenzellen abgeleitete, kontinuierliche Zelllinie, und stammt von H. Lennartz, Hamburg. Sie wurde in gleicher Weise wie HeLa Ohio Zellen kultiviert.

Viren: Alle Rhinoviren wurden von der American Type Culture Collection erhalten. Polio Typ 2, Coxsackie B3 und Echo Typ 9 stammen ursprünglich von A. B. Sabin und wurden von H. J. Eggers, Köln, zur Verfügung gestellt. Encephalomyocarditis-Virus war von M. Scriba, Wien. Echovirus Typ 9 wurde in GMK Zellen gezüchtet²⁰⁾, die übrigen Viren in HeLa Ohio Zellen. Zur Vermehrung von Rhinoviren enthielten alle Medien zusätzlich 30 mmol MgCl_2 .

Substanzen: Enviroxime (**B**) wurde freundlicherweise von E. Lilly, Indianapolis, zur Verfügung gestellt. Thieno[2,3-d]imidazol und **B** wurden in DMSO gelöst, in MEM verdünnt und mittels Ultraschall gut suspendiert. Beide Substanzen waren erst ab 10 $\mu\text{g/ml}$ klar löslich. 2-(α -D-Hydroxybenzyl)benzimidazol-HCl (HBB) (**A**) wurde direkt in MEM gelöst.

Virus-Hemm-Test (Tab. 1): In Mikrotiterplatten mit flachem Boden wurden serielle Dreifach-Verdünnungen der Substanzlösung in MEM hergestellt. Gleiche Vol. Virusverdünnung in MEM und Zellsuspension in MEM mit 15 % FCS wurden zugesetzt. Die Zellkonzentration wurde so gewählt, daß sich nach 1–2 d ein konfluenter Zellrasen bildet. Die Virusverdünnungen wurden so eingestellt, daß ohne hemmende Substanz nach 3–4 d ein vollständiger zytopathischer Effekt auftritt. Als Kontrollen wurden Zellen allein (Zellkontrolle), Zellen mit Virus (Viruskontrolle) und Zellen mit Substanz in verschiedenen Konz. (Toxizitätskontrolle) mitgeführt. Als minimale Hemmkonzentration (MHK) wurde die Substanzkonzentration bezeichnet, in deren Gegenwart der zytopathische Effekt noch deutlich geringer als der der Viruskontrolle war. Die minimale toxische Konzentration (MTK) war die Substanzkonzentration, bei der noch eine geringere Zelldichte als in der Zellkontrolle beobachtet wurde. Das „Virus Rating“ wurde nach Sidwell²¹⁾ aus MHK, MTK und aus dem Grad der Hemmung des zytopathischen Effekts berechnet.

Plaque-Reduktions-Test (Abb. 1): Konfluente Ein-Zell-Schichten wurden mit seriellen Zehnfach-Verdünnungen von Viruslysaten infiziert. Nach 1 h Adsorption bei RT wurden die Zellen überschichtet mit einer Mischung aus gleichen T. 1,2 % Agarose und doppelt konz. Medium nach Dulbecco²²⁾, welches die zu testende Substanz in verschiedenen Konz. enthielt. Nach 3–4 d wurden die Zellen mit Neutralrot gefärbt, die Plaques im Zellrasen gezählt, und die Plaquezahl relativ zur Viruskontrolle berechnet.

Literatur

10. Mitt.: D. Binder, C. R. Noe und B. C. Prager, Arch. Pharm. (Weinheim) 314, 751 (1981).
- I. Tamm, K. Folkers und F. L. Horsfall Jr., Yale J. Biol. Med. 24, 559 (1952).

- 3 I. Tamm und P. B. Sehgal, *Adv. Virus Res.* 22, 187 (1978).
- 4 H. J. Eggers in *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 61, Chapter 9, p. 374, P. E. Came und L. A. Caliguiri, Eds., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1982.
- 5 H. J. Eggers und I. Tamm, *Virology* 18, 426 (1962).
- 6 H. J. Eggers und I. Tamm, *Nature (London)* 197, 1327 (1963).
- 7 H. J. Eggers und I. Tamm, *J. Exp. Med.* 113, 657 (1961).
- 8 H. J. Eggers und I. Tamm, *Virology* 13, 545 (1961).
- 9 J. M. Gwaltney Jr., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 129, 665 (1968).
- 10 J. H. Wikel, C. J. Paget, D. C. DeLong, J. D. Nelson, C. Y. E. Wu, J. W. Paschal, A. Dinner, R. J. Tempelton, M. O. Chaney, N. D. Jones und J. W. Chamberlin, *J. Med. Chem.* 23, 368 (1980).
- 11 D. C. DeLong und S. E. Reed, *J. Infect. Dis.* 141, 87 (1980).
- 12 D. C. DeLong, J. D. Nelson, C. Y. E. Wu, B. Warren, J. H. Wikel, J. W. Chamberlin, D. Montgomery und C. J. Paget in *Abstracts of the Annual Meeting, Am. Soc. Microbiol.* p. 234, Baltimore, Md., 1978.
- 13 D. Binder, C. R. Noe und F. Hillebrand, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 312, 845 (1979).
- 14 D. R. Hoff und L. H. Peterson, *S. African* 6800, 904, 12. Aug. 1969; *C. A.* 72, 100 702k (1970).
- 15 D. Binder, F. Hillebrand und C. R. Noe, *J. Chem. Res. (S)* 1979, 96.
- 16 D. Binder, C. R. Noe und W. Bilek, *Arch. Pharm. (Weinheim)* 313, 883 (1980).
- 17 C. D. Hurd, K. L. Kreuz, *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2967 (1952).
- 18 H. Eagle, *Science* 130, 432 (1959).
- 19 J. L. Melnick in *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Diseases*, Am. Publ. Health Assoc., New York 1956.
- 20 B. Rosenwirth und H. J. Eggers, *Virology* 123, 102 (1982).
- 21 R. W. Sidwell in *Chemotherapy of Infectious Disease*, Chapter 3, p. 31, H. H. Gadebusch Ed., CRC Press, Cleveland, Ohio, 1976.
- 22 R. Bablanian, H. J. Eggers und I. Tamm, *Virology* 26, 100 (1965).

[Ph 857]

Arch. Pharm. (Weinheim) 318, 48–59 (1985)

Thiophen als Strukturelement physiologisch aktiver Substanzen, 12. Mitt.¹⁾

Thiophenanaloga antiviraler Chalkone

Dieter Binder*, Christian R. Noe, Wolfgang Holzer

Institut für Organische Chemie der Technischen Universität, Getreidemarkt 9, A-1060 Wien

und Brigitte Rosenwirth

Sandoz Forschungsinstitut, Brunnerstraße 59, A-1235 Wien

Eingegangen am 19. September 1983

0365-6233/85/0101-0048 \$ 02.50/0

© VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1985