Synthese heterocyclischer Immunmodulatoren, 1. Mitt.:

Alkylderivate von 1,2,4-Dithiazolidin-3,5-diyliden-bis(*o*-benzochinonmethid): Synthese und Prüfung auf immunmodulierende Wirkung*)

Detlef Briel [a], Siegfried Leistner [a] und Karl Drößler [b]

Bereich Chemie biologisch aktiver Verbindungen[a] und Bereich Immunbiologie und Tierphysiologie[b] der Sektion Biowissenschaften der Universität Leipzig, Brüderstr. 34, O-7010 Leipzig

Eingegangen am 25. Oktober 1990

Die Reaktion des 1,2,4-Dithiazolidin-3,5-diyliden-bis(*o*-benzochinonmethids) **3** mit Alkylhalogeniden bzw. substituierten Benzyl- oder Phenacylhalogeniden führt zu den 1,2,4-Dithiazol-3-yliden-chinonmethiden **4a-4l**. Die ms-Fragmentierung von **4a**, **4c** und **4f** wird diskutiert. Die Prüfung von **4a-c**, **4e** und **4g** auf immunmodulierende Wirkung wird beschrieben; einige dieser Verbindungen zeigen immunstimulierende Effekte.

Synthesis of Heterocyclic Immunomodulators, I: Alkyl Derivatives of 1,2,4-Dithiazolidine-3,5-diylidene-bis(*o*-benzoquinonemethids): Synthesis and Test for Immuno-modulating Activity

Reactions of 1,2,4-dithiazolidine-3,5-diylidene-bis(*o*-benzoquinone-methid) **3** with alkyl and substituted benzyl or phenacyl halides yield 1,2,4-dithiazol-3-ylidene-quinone-methides **4a-4l**. Mass spectral fragmentations of **4a**, **4c**, and **4f** are discussed. Tests for immunomodulating properties of **4a-c**, **4e**, and **4g** are described. Some of these compounds show immuno-stimulatory activity.

Das aus Salicylsäurethioamid (**1**) durch Oxidation mit Brom bequem erhältliche bis-(2-hydroxyphenyl)-substituierte 1,2,4-Dithiazolium-Salz **2** wird durch schwache Basen schnell zu dem Dithiazolidin-Derivat **3** deprotoniert, dessen Ring-C-Atome Bestandteil zweier *o*-Benzochinonmethid-Molekülstrukturen sind[1]. Dieses Bis-*o*-chinonmethid-Derivat **3** unterliegt bei der Einwirkung nucleophiler Reaktionspartner verschiedenen Ringtransformationsreaktionen, die Zugang zu Derivaten verschiedener Heterosysteme ermöglichen[2,3]. Ein begrenzender Faktor der elektrophilen Potenz von **3** ist deren Acidität, wodurch z.B. bei der Umsetzung mit methylenaktiven Verbindungen im basischen Milieu eine vergleichsweise deutlich verminderte Reaktivität zu registrieren ist[2].

An diese Erkenntnisse anknüpfend, sollten aus **3** solche (resonanzstabilisierte) Chinonmethid-Derivate dargestellt werden, die kein acides H-Atom im Molekül aufweisen. Als Weg bot sich die Herstellung von Alkyl-Derivaten von **3** an. Die im System DMF/K_2CO_3 bzw. DMF/Triethylamin durchgeführten Umsetzungen von **3** mit Alkylhalogeniden bzw. substituierten Benzyl- oder Phenacylhalogeniden verliefen einheitlich. Die Alkyl-Derivate wurden als dunkelviolette Kristalle in Ausbeuten von 53-96% erhalten. Als Konstitution der erhaltenen Alkyl-Derivate von Verbindung **3**, die jeweils auch eine *vinyloge Lactam-Struktur* aufweist, standen sowohl eine *N*-Alkyl- als auch eine *O*-Alkyl-Struktur zur Diskussion. Die Struktur wurde am Beispiel der durch Methylierung von **3** mit Methyliodid gewonnenen Verbindung zugeordnet: Das ^{1}H-NMR-Spektrum weist ein einer OCH_3-Gruppe zuzuordnendes Singulett bei 4.12 ppm auf. Weiter wurden durch energische alkalische Hydrolyse 2-Methoxybenzoesäure und Salicylsäureamid gebildet. Salicylsäure-*N*-methylamid war dc nicht nachweisbar. Auch durch diese Befunde wird das Methylierungs-Derivat von **3** eindeutig als *O*-Methyl-Derivat **4a** ausgewiesen.

Die Verbindungen **4a-4i** weisen in ethanolischer Lösung gleichartige 4-Banden-UV/vis-Spektren mit einem längstwelligen Maximum zwischen 498 und 502 nm auf, was auf die Gleichartigkeit des chromophoren Systems dieser Verbindungen schließen läßt und somit die *O*-Alkyl-Struktur sichert. Die bei der unsubstituierten Verbindung **3** vorhandene starke Solvatochromie (Rotverschiebung um 57 nm bei Übergang von Cyclohexan zu Ethanol) ist z.B. bei **4a** deutlich weniger ausgeprägt: sie beträgt nur 8 nm.

Die Chinonmethide **4** sind neben **3** die ersten Vertreter von Benzochinonmethiden, bei denen die Methylengruppe zugleich Bestandteil eines 1,2,4-Dithiazol-Ringes ist. Dagegen sind vergleichbar substituierte 1,2-Dithiole schon in breiterem Umfang synthetisiert worden[4-6]. Über Folgereaktionen der Verbindungen **4** wird berichtet.

Die Massenspektren von **4a,c** und **f** belegen, daß sowohl die Stabilität der Molekülionen als auch das Fragmentierungsverhalten dieser Alkylderivate stark vom jeweiligen Substituenten R geprägt wird. Bei **4a** ist M^+ bei m/z = 301 Basispeak. Als intensivste Fragmentierung erfolgt eine SH-Abspaltung zu m/z = 268 (61%). Zusätzlich wird das 2-Cyanopheno-Kation (m/z = 118; 46%) gebildet. Bei **4c** und **4f** dominieren Abbaureaktionen am Substituenten. Bei **4c** ist das intensivste Fragment das Tropyliumion, bei **4f** das Benzoylkation (m/z = 91 bzw. 105). Bei diesen Verbindungen tritt außerdem das korrespondierende Chinonmethid-Kation bei m/z = 287 mit 4 bzw. 18% rel.Int. auf. Wie *Böhme* und *Ahrens*[7,8] in den MS von 5-Phenyl-4*H*-1,2,4-dithiazolen beobachteten wir Abspaltungen von zwei Schwefelatomen aus M^+. Schließlich sind noch die Fragmente $(M^+,-2S-H)^+$ aus **3a,f** und die Bildung des $O{=}C_6H_4{=}C{=}S$-Radikalkations (m/z = 136; aus **4c**: 11%, aus **4f**: 3%) zu erwähnen.

*) Teil eines Postervortrages, 100-Jahrfeier Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft, Berlin; Arch. Pharm. (Weinheim) *323*, 734 (1990).

 ©VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim, 1991 0365-6233/91/1212-0959 $ 3.50 + .25/0

Tabelle 1: Darstellung immunregulatorischer Effekte

Bezeichnung	SI-Werte der DTH-Reaktion 24 h	48 h	Ak-Titer-Differenz
4a	110	110	- 1,0
4b	115	85	+ 1,8
4c	130	140	+ 0,5
4e	130	150	- 1,5
4g	125	120	- 1,0
Isoprinosin	135	135	- 0,5

Prüfung auf immunmodulierende Eigenschaften

Auf immunmodulierende Effekte wurde an Albinomeerschweinchen geprüft[9] (Tab. 1). Die Verbindungen **4b**, **4c** und **4e** haben Einfluß auf die durch DNFB-Sensibilisierung induzierten Immunprozesse. **4c** und **4e** steigern die DTH-Reaktion um 30 bis 50% und liegen damit im Wirkungsbereich von Isoprinosin; **4b** hingegen fördert die Synthese der TNP-spezifischen humoralen Antikörper. Daß die Steigerung einzelner Parameter, z.B. von Manifestationen einer zellvermittelten immunologischen Reaktivität, auch zu Lasten anderer gehen kann, ist allgemein bekannt[10] und in der Regel vom eingesetzten Testmodell abhängig.

Nach jüngsten Befunden[11] zeigen im Vergleich zu den Verbindungen des Typs **4** artverwandte 1,2-Dithiol-Derivate ebenfalls immunstimulierende Eigenschaften.

Experimenteller Teil

1. Synthese

Verbindungen **4a-4d**; *Allgemeine Vorschrift*

1.0 g (3.5 mmol) **3** werden mit 10 ml DMF, 1.5 g (13 mmol) K_2CO_3 und jeweils 7 mmol Alkylierungsmittel 2 h bei Raumtemp. geschüttelt, dann wird der Niederschlag mit wenig CH_3OH gewaschen.

6-[5-(2-Methoxyphenyl)-1,2,4-dithiazol-3-yliden]-2,4-cyclohexadien-1-on (**4a**)

Nach obiger Vorschrift mit 0.5 ml CH_3I. Der Ansatz wird jedoch in 20 ml H_2O eingerührt; dunkelviolette Kristalle, Schmp. 220°C (Essigsäure), Ausb. 0.95 g (89%).- $C_{15}H_{11}NO_2S_2$ (301.4).- MS (70 eV): m/z (%) = 301 (100), 268 (61), 237 (9), 236 (9), 222 (21), 135 (29), 119 (26), 118 (46), 108 (44), 77 (18).- ^{1}H-NMR (D_6-DMSO): δ (ppm) = 4.12 (s; 3H), 6.79-7.83 (m; 4H), 8.35-8.77 (m; 4H).

6-[5-(2-Ethoxyphenyl)-1,2,4-dithiazol-3-yliden]-2,4-cyclohexadien-1-on (**4b**)

Analog **4a**, jedoch mit 1.5 ml C_2H_5I; Violette Kristalle, Schmp. 187-188°C (wenig C_2H_5OH bei -12°C), Ausb. 0.86 g (78%).- $C_{16}H_{13}NO_2S_2$ (315.4).

6-[5-(2-Benzyloxyphenyl)-1,2,4-dithiazol-3-yliden]-2,4-cyclohexadien-1-on (**4c**)

Nach allgemeiner Vorschrift mit 0.8 ml Benzylbromid; dunkelviolette Kristalle, Schmp. 244-249°C (Essigsäure), Ausb. 1.26 g (96%).- $C_{21}H_{15}NO_2S_2$ (377.5).- MS: 377 (2), 313 (1), 287 (4), 136 (11), 108 (23), 91 (100), 77 (5).

6-[-[2-(4-Fluorbenzyloxy)phenyl]-1,2,4-dithiazol-3-yliden]-2,4-cyclohexadien-1-on (**4d**)

Nach allgemeiner Vorschrift mit 0.9 ml 4-Fluorbenzylchlorid; dunkelviolette Kristalle, Schmp. 258-261°C (Essigsäure), Ausb. 1.2 g (86%).- $C_{21}H_{14}FNO_2S_2$ (395.5).

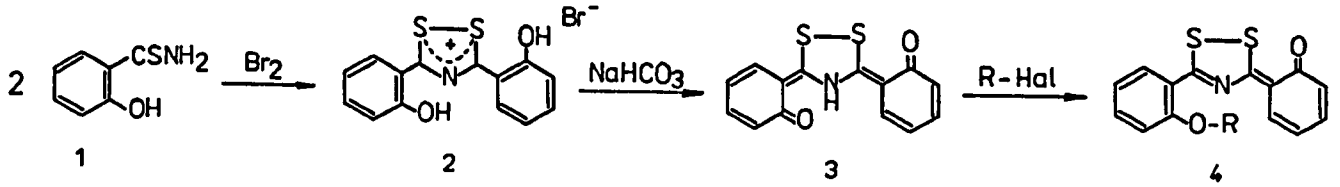
Tabelle 2: Spektroskopische Daten

Verbindung	UV/VIS[a]: λ_{max} (nm) (lg ε)				IR (KBr) (cm^{-1}) CO-Substituent R	-Chinonmethid
4a	273 (4,08)	313 (4,07)	350 (4,11)	502 (3.98)[b]	-	1615
4b	278 (4,14)	316 (4,14)	352 (4,17)	500 (4,07)	-	1610
4c	275 (4,03)	315 (4,03)	350 (4,08)	498 (3,97)	-	1610
4d	275 (3,99)	315 (3,97)	350 (4,04)	498 (3,91)	-	1610
4e	274 (4,15)	317 (4,13)	349 (4,17)	500 (3.99)	1760	1610
4f	276 (4,17)	317 (4,11)	349 (4,12)	500 (3,98)	1695	1605
4g	261 (4,47)	318 (4,14)	352 (4,14)	500 (3,87)	1700	1615
4h	278 (4,20)	317 (4,14)	349 (4,14)	500 (3,97)	1705[c]	1610
4i	276 (4,24)	314 (4,07)	350 (4,03)	500 (3,61)	1700	1610

a) in Etanol.

b) in Cyclohexan (wegen Schwerlösligkeit nur λmax bestimmt): 306, 341, 490.

c) CN-Bande: 2240 $cm\text{-}2^{-1}$.



1 2 3 4

Verbindungen **4e-4i**; *Allgemeine Vorschrift*

1.0 g (3.5 mmol) **3** werden in 10 ml DMF und 1 ml (7.2 mmol) Triethylamin gelöst und mit 7 mmol des Alkylierungsmittels über Nacht geschüttelt. Der Niederschlag wird mit wenig CH_3OH gewaschen.

6-[5-[2-(Methoxycarbonylmethyl)-phenyl]-1,2,4-dithiazol-3-yliden]-2,4-cyclohexadien-1-on (**4e**)

Nach allgemeiner Vorschrift mit 0.74 ml Bromessigsäuremethylester; dunkelviolette Kristalle, Schmp. 212-215°C (Essigsäure/H_2O), Ausb. 0.85 g (67%).- $C_{17}H_{13}NO_4S_2$ (359.4).

6-[5-(2-Phenacyloxyphenyl)-1,2,4-dithiazol-3-yliden]-2,4-cyclohexadien-1-on (**4f**)

Nach allgemeiner Vorschrift mit 1.4 g Phenacylbromid; dunkelviolette Kristalle, Schmp. 158-165°C (Essigsäure), Ausb. 1.25 g (89%).- $C_{22}H_{15}NO_3S_2$ (405.5).- MS: 405 (0.1), 340 (1), 287 (18), 223 (6), 195 (5), 136 (3), 121 (18), 105 (100), 77 (52).

6-[5-[2-(4-Bromphenacyloxy)-phenyl]-1,2,4-dithiazol-3-yliden]-2,4-cyclohexadien-1-on (**4g**)

Nach allgemeiner Vorschrift mit 2.0 g 4-Bromphenacylbromid; dunkelviolette Kristalle, Schmp. 226-228°C (Essigsäure), Ausb. 1.4 g (83%).- $C_{22}H_{14}BrNO_3S_2$ (484.4).

6-[5-[2-(4-Cyanphenacyloxy)-phenyl]-1,2,4-dithiazol-3-yliden]-2,4-cyclohexadien-1-on (**4h**)

Nach allgemeiner Vorschrift mit 1.6 g 4-Cyanphenacylbromid; dunkelviolette Kristalle, Schmp. 205-208°C (Essigsäure), Ausb. 0.8 g (53%).- $C_{23}H_{14}N_2O_3S_2$ (430.5).

6-[5-[2-(3-Nitrophenacyloxy)-phenyl]-1,2,4-dithiazol-3-yliden]-2,4-cyclohexadien-1-on (**4i**)

Nach allgemeiner Vorschrift mit 1.8 g 3-Nitrophenacylbromid; dunkelviolette Kristalle, Schmp. 178-183°C (Essigsäure), Ausb. 1.1 g (63%).- $C_{22}H_{14}N_2O_5S_2$ (450.5).

Hydrolyse von **4a**

0.1 g (0.33 mmol) **4a** werden mit 10 ml Pyridin und 0.19 g (3.3 mmol) gepulvertem KOH 1 h rückfließend erhitzt und anschließend bis zur Trokkene eingeengt. Der Rückstand wird in 1 ml DMF aufgenommen und dc getrennt (PSC-Fertigplatte, Kieselgel 50 F_{254}, Schichtdicke 2 mm, Merck, Darmstadt; Toluol/Essigsäure = 10:1). Durch Vergleich mit authentischen Verbindungen wurden Salicylamid, Salicylsäure und 2-Methoxybenzoesäure nachgewiesen. 2-Methoxybenzoesäure wurde isoliert und durch Vergleich der Schmp. und IR-Spektren charakterisiert.

2. Immunpharmakologische Untersuchungen

Beeinflussung einer Hautreaktion vom verzögerten Typ

300 g schwere Albinomeerschweinchen wurden durch epikutane Gabe von 0.05 ml einer 1 proz. DNFB-Lösung (Lösungsmittel: Aceton und Olivenöl, 4:1) sensibilisiert und 7 Tage später durch Aufbringen von je 0.02 ml 0.5-, 0.1-, 0.05- und 0.01 proz. DNFB-Lösung auf die vorher enthaarten Flanken getestet. Das Ergebnis wurde nach 24 und 48 h abgelesen. Es ergab sich aus der Intensität und Anzahl der positiven Reaktionen, der Stimulationsindex aus dem Vergleich von Test- und Kontrollgruppe:RRe

4a	$R = CH_3$
4b	C_2H_5
4c	$CH_2C_6H_5$
4d	$CH_2C_6H_4$-4-F
4e	CH_2COOCH_3
4f	$CH_2COC_6H_5$
4g	$CH_2COC_6H_4$-4-Br
4h	$CH_2COC_6H_4$-4-CN
4i	$CH_2COC_6H_4$-3-NO_2

$$\text{Stimulationsindex (SI)} = \frac{\text{Reaktionsstärke (Testgruppe)}}{\text{Reaktionsstärke (Kontrollgruppe)}} \cdot 100$$

Ein durchschnittlicher SI-Wert von 120 - das entspricht einer Steigerung gegenüber der Kontrolle um mindestens 20% - gilt für uns als unterste Grenze für den Nachweis einer Stimulierung. Die Behandlung mit den o.g. Verbindungen erfolgte an den Tagen +1 bis +5 durch eine tägliche orale Gabe eines mikronisierten Gemisches von 1 x 10^{-5} mol des jeweiligen **4**/kg Körpermasse und der vierfachen Menge Lactose AB-DDR. Die Kontrolltiere erhielten nur Lactose, eine weitere Kontrollgruppe 10 mg/kg Körpermasse Isoprinosin.

Einfluß auf die Synthese TNP-spezifischer Antikörper

Die vorhergehend beschriebene Form der Sensibilisierung löst beim Meerschweinchen auch die Bildung humoraler Antikörper mit Trinitrophenol (TNP)-Spezifität aus. Ihr Nachweis erfolgte mit Hilfe der passiven Hämagglutination; die Kopplung der TNP-Gruppen an die Schaferythrozyten nach einer von *Rittenberg* und *Pratt*[9] beschriebenen Methode. Zu einer Lösung von 20 mg TNP in 7 ml Kakodylatpuffer (pH 6.9; 0.15 M) wurde 1 ml eines Schaferythrozytensediments tropfenweise zugegeben und nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemp. 4 x mit 0.2 M Kochsalzlösung gewaschen.

Zur Ermittlung eines Modulierungseffektes wurde die Differenz der Mittelwerte von Test- und Kontrollgruppen herangezogen.

Literatur

1 S. Leistner, G. Wagner und M. Ackermann, Z. Chem. *17*, 223 (1977).
2 D. Briel, S. Leistner und G. Wagner, Synthesis *1985*, 535 und *1986*, 147.
3 D. Briel, S. Leistner und G. Wagner, Pharmazie *41*, 283 (1986).
4 E.G. Frandsen, Acta Chem. Scand. *B31*, 262 (1977).
5 D. Barillier, C. Gy, P. Ricoult und J. Vialle, Bull. Soc. Chim. Fr. *1973*, 277.
6 J. Faust, B. Bartho und R. Mayer, Z. Chem. *15*, 395 (1975).
7 H. Böhme und K.H. Ahrens, Arch. Pharm. (Weinheim) *307*, 828 (1974).
8 H. Böhme und K.H. Ahrens, Tetrahedron Lett. *1971*, 149.
9 M.B. Rittenberg und K.J. Pratt, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *132*, 575 (1969); C.A. *72*, 64786e (1970).
10 A. Szenberg und N.L. Warner, Br.med.Bull. *1967*, 23.
11 I. Yamamoto, A. Matsubara, K. Tomitani, O. Mizuno und H. Tanada, Jap. Pat. 01 319 477; C.A. *113*, 17889w (1990). [Ph870]