

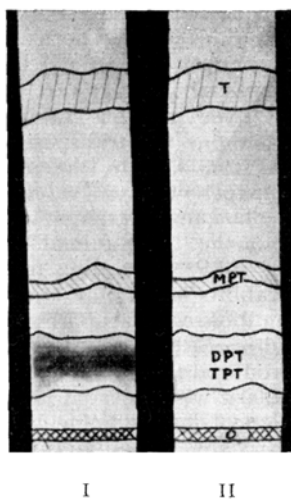
were subsequently kept in contact with a Ferrania X-Rays Film to demonstrate the presence of  $P^{32}$ (I).

Analysis and specific radioactivity of  $ATP^{32}$

Constituents	per cent
Hydrolysable phosphate (as P) . . .	7.65
Total phosphate (as P) . . . . .	11.30
Inorganic phosphate (as P) . . . . .	0.70
ATP . . . . .	96.20
ADP . . . . .	2.40
AMP . . . . .	1.40
Material counted	Activity counts per min per micromole
ATP before hydrol. . . . .	345
Labile P . . . . .	280
Stable P . . . . .	60

P was determined according to FISKE and SUBBAROW<sup>1</sup>. Labile phosphate was hydrolysed in N HCl for 11 min at 100°. ATP, ADP, and AMP have been determined enzymatically according to KALCKAR<sup>2</sup>.  $P^{32}$  was measured by means of a thin-mica window tube.

The Figure shows a typical radiochromatogram obtained from the liver of a rat killed 60 min after injection of  $ATP^{32}$  and thiamine. The greatest amount of  $P^{32}$  is localized in the spots corresponding to TPT and DPT,



I Radiochromatogram and (II) chromatogram obtained from the liver of a rat killed 60 min after injection of  $ATP^{32}$  and thiamine. TPT = triphosphothiamine; DPT = diphosphothiamine; MPT = monophosphothiamine; T = thiamine; O = Origin.

while no appreciable amount of  $P^{32}$  is detectable in the spot corresponding to MPT. This suggests that  $P^{32}$  is mainly localized in the two terminal phosphates of the phosphoric esters of thiamine.

A. ROSSI-FANELLI, N. SILIPRANDI, P. FASELLA,  
D. SILIPRANDI, and M. SALVETTI

*Institutes of Biochemistry and General Chemistry  
University of Rome, August 18, 1953.*

<sup>1</sup> C. H. FISKE and Y. SUBBAROW, *J. Biol. Chem.* **66**, 375 (1925).

<sup>2</sup> H. M. KALCKAR, *J. Biol. Chem.* **167**, 445 (1947).

### Riassunto

Gli autori hanno preparato  $ATP^{32}$  dai muscoli di coniglio trattato preventivamente con fosfato di sodio radioattivo. Iniettando per via endovenosa l' $ATP^{32}$  e tiamina a ratti albinì è stato possibile mettere in evidenza, impiegando la tecnica cromatografica su carta, la formazione nel fegato di questi animali di  $DP^{32}T$  e  $TP^{32}T$ . Questi risultati dimostrano che nell'animale vivente ha luogo una diretta trasposizione di gruppi fosforici dall' $ATP$  alla tiamina.

### Die Wirkung von Demecolceinamiden an Zellen *in vitro*

Das von SANTAVY<sup>1</sup> aus den verschiedenen Organen der Herbstzeitlose (*Colchicum autumnale*) isolierte Demecolcin (Substanz F = Desacetyl-N-methylcolchicin<sup>2</sup>) wurde in unseren pharmazeutischen Laboratorien mit verschiedenen Aminen zu den den Colchiceinamiden entsprechenden Demecolceinamiden umgesetzt<sup>3</sup>. Diese haben wir auf ihre Wirkung auf Zellen *in vitro* geprüft.

*Prüfung an Hühnergefäßfibroblasten:* Die Substanzen wurden in Tyrode gelöst den Kulturen 24 h nach der letzten Teilung während 8 h überschichtet. Für diese Versuche wurden 616 Kulturen verwendet.

Die Demecolceinamide führen wie Demecolcin<sup>4</sup> an Fibroblasten *in vitro* zu einem typischen colchicinartigen Effekt. Keiner der untersuchten Stoffe ist wirksamer als Colchicin. Das freie Amid ist weniger wirksam als das Mono-methyl- und das Mono-äthyl-amid, die die Wirksamkeit des Colchicins besitzen. Mit zunehmender Kettenlänge nimmt die colchicinartige Wirkung ab. Die disubstituierten Amide sind etwas weniger wirksam. LETTRÉ<sup>5</sup>, der die entsprechenden Colchiceinamide an Fibroblasten prüfte, fand für das N-methyl-, N-äthyl- und N-dimethylderivat die stärkste Wirksamkeit, während N-propyl- und N-butyl-derivate einen Wirkungsabfall zeigten. Die von LETTRÉ mit der Colchiceinamidreihe und von uns mit der Demecolceinamidreihe gewonnenen Resultate zeigen in dieser Beziehung eine gute Übereinstimmung. Die mehrfach stärkere Wirksamkeit der Amide, die LETTRÉ bei der vergleichenden Prüfung von Colchicin und den Methyl- und Äthylcolchiceinamiden fand, konnten wir weder für Colchicein-monomethylamid noch für Demecolcein-monomethylamid nachweisen. Eine wesentliche Steigerung der Wirksamkeit an Fibroblasten tritt durch Einführung des Aminrestes in den Ring C des Colchicins bzw. Demecolcins nicht auf.

*Prüfung an Leukozyten in vitro:* 4 h nach Ansetzen der Leukozytenkulturen wurden die in Tyrode gelösten Substanzen während 12 h überschichtet<sup>6</sup>. Die Auswanderungsareale wurden planimetrisch ausgemessen und mit den Kontrollen verglichen. Die in Tabelle I angegebenen Werte sind Durchschnittszahlen aus 530 Einzelkulturen.

<sup>1</sup> F. ŠANTAVY, D. LANG und B. MALINSKY, *Arch. int. Pharmacodyn.* **34**, 257 (1950).

<sup>2</sup> F. ŠANTAVY, R. WINKLER und T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* **36**, 1319 (1953). – A. UFFER, O. SCHINDLER, F. ŠANTAVY und T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* **37**, 18 (1954).

<sup>3</sup> A. UFFER, *Exper.* **10**, 76 (1954).

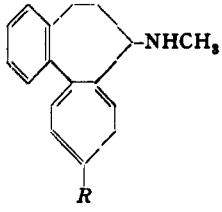
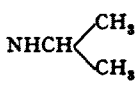
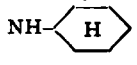





<sup>4</sup> B. SCHÄR, P. LOUSTALOT und F. GROSS, *Klin. Wo.* **32**, 49 (1954).

<sup>5</sup> H. LETTRÉ, *Angew. Chemie* **63**, 421 (1952).

<sup>6</sup> R. MEIER und B. SCHÄR, *Exper.* **7**, 308 (1951).

Tabelle I

Die Wirkung von Demecolceinamiden auf Fibroblasten und Leukozyten *in vitro*

Präparat	Chemische Bezeichnung	Fibroblasten: colchicinartige Wirkung bis und mit	Leukozytenauswanderung	
			% Hemmung bei 10 <sup>-4</sup>	<sup>1/2</sup> Förderung bei 10 <sup>-4</sup>
				
	R =			
14377. . . . .	NH <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup>	20	
13153. . . . .	NHCH <sub>3</sub>	10 <sup>-8</sup>	0	
14697. . . . .	NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	10 <sup>-8</sup>	15	
14080. . . . .		10 <sup>-7</sup>	20	
14081. . . . .	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	10 <sup>-7</sup>	20	
13485. . . . .	NHCH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup>	0	
13486. . . . .	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-8</sup>	35	
13540. . . . .	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-4</sup>	40	
14063. . . . .		10 <sup>-6</sup>	15	
13286. . . . .		10 <sup>-7</sup>		25
14698. . . . .		10 <sup>-6</sup>	0	
14844. . . . .		10 <sup>-7</sup>	10	
14054. . . . .		10 <sup>-7</sup>	30	
14055. . . . .		10 <sup>-7</sup>	40	
Demecolcin . . . . .	OCH <sub>3</sub>	10 <sup>-8</sup>	30	
Colchicin . . . . .		10 <sup>-8</sup>	25	

Für die Leukozyten *in vitro* sind die Amide des Demecolceins und des Colchiceins etwas weniger hemmend wirksam als Demecolcin und Colchicin. Die Wirksamkeit dieser Substanzgruppen auf die Leukozytenwanderung *in vitro* ist jedoch wesentlich geringer als ihre Wirksamkeit auf die Zellteilung. Nur ein Vertreter der Reihe zeigt eigenartigerweise eine Förderung der Leukozytenauswanderung.

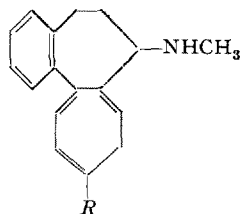
**Bakteriostatische und bakterizide Wirksamkeit *in vitro*:** Es schien von Interesse, die Wirkung dieser Colchicin-derivate an anderen Objekten daraufhin zu prüfen, ob eine Qualitätsänderung der Wirkung in der Hinsicht auftritt, dass Zellen, die im allgemeinen unempfindlich gegen Colchicin sind, beeinflusst werden. Die zur Bestimmung wirksamer Konzentrationen an Bakterien benutzte Versuchsanordnung ist früher im einzelnen beschrieben worden<sup>1</sup>. Die Konzentrationen für bakteriostatische und bakterizide Wirkung beziehen sich auf eine Einwirkungsdauer von 24 h. Als Nährlösung wurde

Glukosebouillon verwendet. Die testierten Bakterien waren *Staphylococcus aureus* (grampositiv) und *Escherichia coli* (gramnegativ). Die Resultate sind in der Tabelle II zusammengefasst.

Interessant ist die deutliche antibakterielle Wirkung des Präparats 13540, besonders die hohe bakteriostatische Wirksamkeit gegenüber *Staphylococcus aureus* und gegenüber anderen grampositiven Keimen wie *Streptococcus faecalis* (Enterococci), *Bacillus megatherium* (Sporenbildner) usw. Die Derivate 13485 und 13486 sowie 14063 zeigen ebenfalls eine gewisse antibakterielle Wirksamkeit gegenüber *Staphylococcus aureus*. Die antibakterielle Wirksamkeit tritt also bei Derivaten mit längerer Seitenkette am Ring C in Erscheinung. Dies scheint in Analogie zu der antibakteriellen Wirksamkeit von langkettig substituierten quaternären Ammoniumsalzen zu stehen. Interessant aber vor allem ist der Befund, dass mit zunehmender Länge der Seitenkette die colchicinartige Wirkung an Fibroblasten abnimmt, während die hemmende Wirkung auf die Bakterienzelle zunimmt. Diese beiden Aktivitäten scheinen sich somit

<sup>1</sup> L. NEIPP, Schweiz. Z. Path. Bakt. 9, 66 (1946).

Tabelle II



Präparat	Chemische Bezeichnung	Bakteriostatische Wirkung		Bakterizide Wirkung	
		<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>E. coli</i>
13153 . . . . .	$R = \text{NHCH}_3$	Spur	> 1,0	> 1,0	> 1,0
14697 . . . . .	$\text{NHC}_2\text{H}_5$	> 1,0	> 1,0	> 1,0	> 1,0
14080 . . . . .	$\text{NHCH} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	> 1,0	> 1,0	> 1,0	> 1,0
14081 . . . . .	$\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	> 1,0	> 1,0	> 1,0	> 1,0
13485 . . . . .	$\text{NHCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$	1,0–(0,5)	> 1,0	> 1,0	> 1,0
13486 . . . . .	$\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	1,0–(0,5)	> 1,0	1,0–(0,5)	> 1,0
13540 . . . . .	$\text{NH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	0,01–0,005	0,5–0,1	0,1–0,05	> 1,0
14063 . . . . .	$\text{NH} \begin{matrix} \text{H} \\ \text{H} \end{matrix}$	0,1	> 1,0	0,5	> 1,0
13286 . . . . .	$\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	> 1,0	> 1,0	> 1,0	> 1,0
14698 . . . . .	$\text{N} \begin{matrix} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}$	> 1,0	> 1,0	> 1,0	> 1,0
14844 . . . . .	$\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 \end{matrix}$	> 1,0	> 1,0	> 1,0	> 1,0
14055 . . . . .	$\text{N} \begin{matrix} \text{C}_6\text{H}_{11} \end{matrix}$	Spur	> 1,0	Spur	> 1,0
Demecolcin . . . . .	$\text{OCH}_3$	> 1,0	> 1,0	> 1,0	> 1,0
Colchicin . . . . .		> 1,0	> 1,0	> 1,0	> 1,0

hinsichtlich einer bestimmten Eigenschaft reziprok zu verhalten und eine gewisse Spezifität der hervorgebrachten Wirkungs- bzw. Konstitutionsänderung zu zeigen.

R. MEIER, B. SCHÄR und L. NEIPP

Aus den Biologischen Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, den 22. Oktober 1953.

#### Summary

A series of demecolceinamids was examined *in vitro* on chicken fibroblasts, leucocytes, and different bacteria. It was found that with increasing length of the side chain on ring C the antimitotic activity is decreasing while the antibacterial effect is increasing.

### Demecolceinamide

Aus den Knollen<sup>1</sup>, Blüten<sup>2</sup>, Blättern<sup>3</sup> und Samen<sup>4</sup> der Herbstzeitlose isolierte zuerst SANTAVY die Substanz F, deren Konstitution in den Arbeiten von ŠANTAVY,

<sup>1</sup> F. ŠANTAVY, Chem. Listy 42, 177 (1948); Chem. Abstr. 44, 9518 (1950); Pharm. Acta helv. 25, 248 (1950); Zbl. Chem. 1952, 3844.

<sup>2</sup> F. ŠANTAVY, Coll. Trav. Chim. Tchécoslov. 15, 552 (1950); Chem. Abstr. 46, 126 (1952).

<sup>3</sup> F. ŠANTAVY, J. LIPOVA und E. COUFALIK, Československa farmacie 1, 239 (1952); Chem. Abstr. 46, 10545 (1952).

<sup>4</sup> F. ŠANTAVY und M. TALAS, Chem. Listy 47, 232 (1953).

WINKLER und REICHSTEIN<sup>1</sup> sowie von UFFER, SCHINDLER, ŠANTAVY und REICHSTEIN<sup>2</sup> aufgeklärt wurde. Es handelt sich darnach um das Desacetyl-N-methylcolchicin, dem der Name Demecolcin gegeben wurde. Dem Verseifungsprodukt kommt daher in Analogie zum Colchicin die Bezeichnung Demecolcein zu. Wir setzten das Demecolcin mit Aminen um und erhielten dabei die Demecolceinamide<sup>3</sup>, denen als Mitose-Inhibitoren einige Bedeutung zukommt. Wir geben hier die physikalischen Eigenschaften der von uns hergestellten und in unsern pharmakologischen Laboratorien geprüften Verbindungen bekannt.

A. UFFER

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, den 23. Oktober 1953.

#### Summary

The physical data of a number of Demecolceinamides are described.

<sup>1</sup> F. ŠANTAVY, R. WINKLER und T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 36, 1319 (1953).

<sup>2</sup> A. UFFER, O. SCHINDLER, F. ŠANTAVY und T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 37, 18 (1954).

<sup>3</sup> Über Colchicineamide siehe: S. ZEISEL, Mh. Chem. 9, 1 (1888). – H. LETTRÉ, Angew. Chem. 55, 265 (1942). – H. LETTRÉ und F. FERNHOLZ, Z. physiol. Chem. 278, 175 (1943). – H. LETTRÉ, Angew. Chem. 63, 421 (1952). – F. ŠANTAVY, Chem. Listy 46, 280 (1952). – A. UFFER, Helv. chim. Acta 35, 2135 (1952). – P. BELLET und P. REGNIER, Soc. Chem. 20, 756 (1953). – J. L. HARTWELL, M. V. NADKARNI und J. LEITER, Amer. chem. Soc. 74, 3180 (1952). – R. M. HOROWITZ und G. E. ULLYOT, Amer. chem. Soc. 74, 587 (1952).