

Entwicklung nichtsteroidaler Antiandrogene: 4-Nitro-3-trifluormethyldiphenylamine

Alfred W. Humm* und Martin R. Schneider

Sonderforschungsbereich 234, Institut für Pharmazie, Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie II, Universität Regensburg, Universitätsstraße 31, D-8400 Regensburg

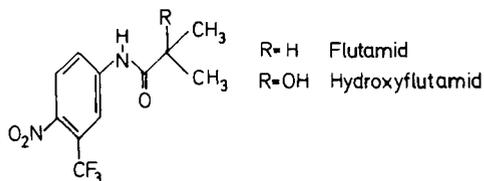
Eingegangen am 22. Februar 1989

Bei der Suche nach neuen nichtsteroidalen Antiandrogenern wurde eine Reihe von 4-nitro-3-trifluormethyl-substituierten Diphenylaminen synthetisiert und pharmakologisch auf Affinität zu Steroidhormonrezeptoren und auf antiandrogene Wirkung untersucht. Diese Verbindungen sind zugänglich durch Umsetzen von 4-Nitro-3-trifluormethylphenylsulfocyanamid-Natriumsalz (4) mit den entspr. aromatischen Aminen zu N-(4-Nitro-3-trifluormethylphenylsulfonyl)-N'-phenylguanidinen, die in einer nachfolgenden *Smiles*-Umlagerung und gleichzeitiger Hydrolyse die gewünschten Diphenylamine geben. 2-Hydroxy-4'-nitro-3'-trifluormethyldiphenylamin (13) besitzt mit einer relativen Bindungsaffinität (RBA) zum Androgenrezeptor (AR) von 6.5% des Testosterons eine höhere Affinität als Hydroxyflutamid (RBA = 4.5). Verschiebung der Hydroxygruppe in 3- oder 4-Position führt ebenso wie N-Methylierung zu einem Abfall der AR-Affinität. Verbindungen mit AR-Affinität wurden auf antiandrogene Wirkung getestet. 13 zeigte die beste antiandrogene Wirkung, war jedoch schwächer wirksam als das bekannte Antiandrogen Flutamid.

Development of Nonsteroidal Antiandrogens: 4-Nitro-3-trifluoro-methyldiphenylamines

For the development of new nonsteroidal antiandrogens a series of 4-nitro-3-trifluoromethyldiphenylamines was synthesized and compounds were tested for their affinities to steroid hormone receptors and for antiandrogenic activities. These compounds were synthesized by reacting 4-nitro-3-trifluoromethylphenylsulfocyanamide-sodium (4) with the corresponding aromatic amines to give the N-(4-nitro-3-trifluoromethylphenylsulfonyl)-N'-phenylguanidines. The crude products were then converted to the desired diphenylamines by *Smiles* rearrangement and hydrolysis. 2-Hydroxy-4'-nitro-3'-trifluoromethyldiphenylamine (13), which shows a relative binding affinity (RBA) to the androgen receptor (AR) of 6.5% of that of testosterone, exerts a higher affinity than hydroxyflutamide (RBA = 4.5). Shift of the hydroxyfunction to position 3 or 4 as well as N-methylation caused a decrease in AR-affinity. Compounds exerting AR-affinity were tested for antiandrogenic activity. Compound 13 showed the best antiandrogenic effect, though less than the well-known antiandrogen flutamide.

Die Therapie des menschlichen Prostatacarcinoms erfolgt durch androgendeprivierende Maßnahmen wie Kastration, Applikation von LHRH-Analoga, Östrogenen oder Antiandrogenern. Aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antiandrogene ist vor allem Flutamid (Flu) zu nennen. Flu selbst hat nur sehr geringe Affinität (RBA = 0.1) zum Androgenrezeptor (AR); erst sein wirksamer Metabolit Hydroxyflutamid (OH-Flu) besitzt eine Affinität von 4.5% des Testosteronwertes zum AR¹. Da die AR-Affinität im Vergleich zum natürlichen Liganden Testosteron gering ist und Flu zudem unerwünschte Nebenwirkungen zeigt, die möglicherweise auf der hohen Dosierung beruhen, erscheint es uns erfolgversprechend, neue nichtsteroidale Strukturen auf ihre Eignung als Antiandrogene zu untersuchen.



Durch strukturelle Veränderungen des nichtsteroidalen Antiandrogens Flu, bzw. OH-Flu, haben wir versucht, zu neuen nichtsteroidalen Antiandrogenern zu gelangen. Der Ersatz des α -Hydroxyisobuttersäurerestes gegen einen

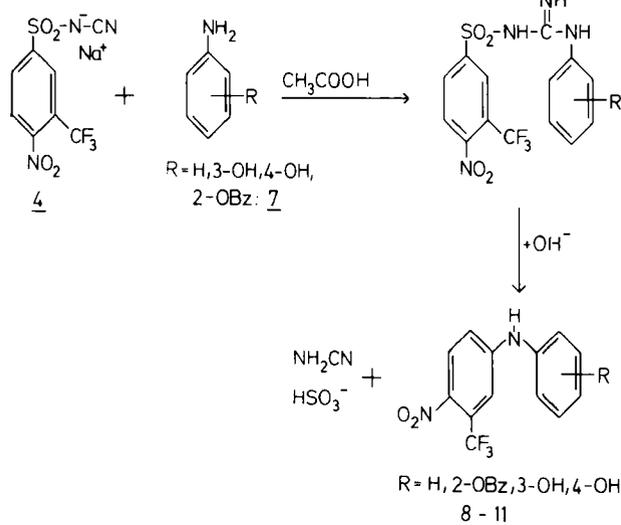
2-Hydroxybenzoesäurerest bei OH-Flu bewirkt einen starken Abfall der AR-Affinität gegenüber OH-Flu. Nachdem die 4-Nitro-3-trifluormethyl-Substitution in der Reihe der Flu-Analoga und Benzanilide die besten Ergebnisse erzielt¹, wurden weitere Strukturvariationen mit diesem Substitutionsmuster durchgeführt.

Dazu haben wir Diphenylamine synthetisiert, bei denen einer der Aromaten eine 4-Nitro-3-trifluormethylsubstitution aufweist; der zweite Ring trägt die für eine AR-Affinität ebenfalls essentielle OH-Gruppe. Der Einfluß der Position der OH-Gruppe und der N-Methylierung wurde untersucht. Die synthetisierten Diphenylamine wurden auf Affinität zu Steroidhormon-Rezeptoren und auf antiandrogene Wirkung getestet.

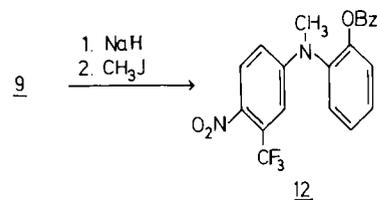
Chemie

4-Nitrodiphenylamin läßt sich u.a. durch *Smiles*-Umlagerung und gleichzeitige Hydrolyse aus N-(4-Nitrophenylsulfonyl)-N'-phenylguanidin gewinnen, das aus 4-Nitrophenylsulfocyanamid-Natriumsalz und Anilin zugänglich ist². Auf diesem Wege wurden auch die in dieser Arbeit beschriebenen 4-Nitro-3-trifluormethyldiphenylamine 8-11 gewonnen, nämlich durch Umsetzung von 4-Nitro-3-trifluormethylphenylsulfocyanamid-Natriumsalz (4) mit den entspr. aromatischen Aminen und anschließende Umlagerung und Zersetzung der als Zwischenprodukt auftretenden, aber nicht

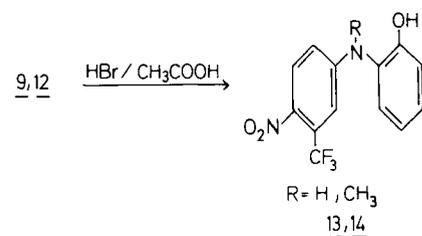
isolierten N-(4-Nitro-3-trifluormethylphenylsulfonyl)-N'-phenyl-guanidine.



Diese Synthese lieferte mit 2-Hydroxyanilin sehr schlechte Ausbeuten. Die Verwendung von 2-Methoxyanilin ergab zwar das Diphenylamin, die folgende Etherspaltung mit BBr_3 oder mit siedender Mischung aus HBr (48%) und Eisessig 1:1 führte jedoch zur Zersetzung der Substanzen. Erst die Verwendung von 2-Benzyloxyanilin erwies sich als vorteilhaft.

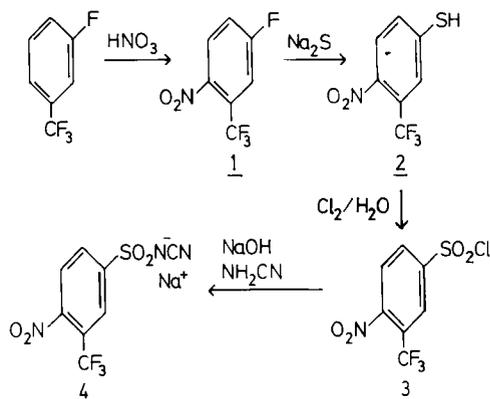


Die N-Methylierung war durch Bildung des Anions von **9** mittels NaH und dessen Umsetzung mit CH_3I in nahezu quantitativer Ausbeute möglich.

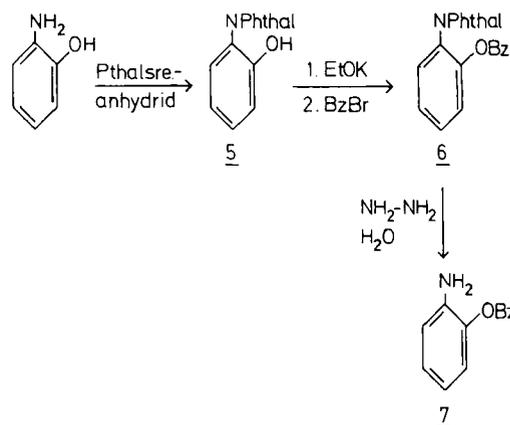


Die resultierenden 2-Benzyloxy-4'-nitro-3'-trifluormethyl-diphenylamine **9** und **12** konnten durch eine Etherspaltung mittels 48proz. HBr / Eisessig (1:1) bei 60°C in die gewünschten OH-Verbindungen **13** und **14** überführt werden.

Die Synthese von 4-Nitro-3-trifluormethylphenylsulfo-cyanamid-Natriumsalz (**4**) erfolgte durch Nitrierung von 3-Trifluormethylfluorbenzol zum 4-Nitro-3-trifluormethylfluor-



benzol (**1**)³, nucleophile Substitution des Fluoratoms gegen eine SH-Gruppe zum 4-Nitro-3-trifluormethylthiophenol (**2**)⁴, Oxidation zum 4-Nitro-3-trifluormethylphenylsulfochlorid (**3**) mittels Cl_2 in 90proz. Essigsäure⁴ und Bildung des 4-Nitro-3-trifluormethylphenylsulfo-cyanamid-Natriumsalzes (**4**) mit Cyanamid in 2M NaOH ².



2-Benzyloxyanilin (**7**) ließ sich durch Bildung des N-(2-Hydroxyphenyl)phthalimides (**5**) aus 2-Hydroxyanilin und Phthalimid⁵, Veretherung der freibleibenden OH-Gruppe mit Benzylbromid zum N-(2-Benzyloxyphenyl)phthalimid (**6**) und anschließende Hydrazinolyse von **6** gewinnen⁶.

Die Reinheit der zur Testung eingesetzten Verbindungen **8**, **10**, **11**, **13** und **14** wurde mittels HPLC und on-line Detektion im UV-Bereich 220-370 nm überprüft; die Identität durch IR- und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, Elementaranalyse und Massenspektroskopie bestätigt.

Biologische Prüfung

Einen Überblick über die zu erwartenden endokrinen Eigenschaften einer Substanz verschafft die in vitro-Bestimmung der Affinitäten zu den Sexualhormonrezeptoren. Dazu wurden die relativen Bindungsaffinitäten (RBA) der Verbindungen **8**, **10**, **11**, **13** und **14** zum Androgenrezeptor (AR), Estrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR) bestimmt.

Voraussetzung für die antiandrogene Wirkung einer Substanz ist eine Affinität zum AR. Zur Bestimmung der

AR-Affinität wurde Kalbsuteruscytosol mit [³H]-Mibolone inkubiert. Die Konzentrationen, die 50% des gebundenen Radioliganden vom Rezeptor verdrängen, wurden für Testosteron [T], dem definitionsgemäß der RBA-Wert = 100 zugeordnet wird, und die zu testenden Inhibitoren [I] graphisch ermittelt. Daraus wird der RBA-Wert des Inhibitors berechnet:

$$\text{RBA} = [\text{T}] / [\text{I}] \times 100$$

Die Affinitäten zum ER und PR wurden analog bestimmt.

Tab. 1: RBA-Werte von Flu, OH-Flu, 8, 10, 11, 13 und 14 zum Androgenrezeptor (AR), Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR).

Nr.	AR	ER	PR
Flu	0.1	–	–
OH-Flu	4.5	–	–
8	< 0.01	< 0.01	0.2
13	6.5	< 0.01	0.6
10	1.6	< 0.01	0.2
11	0.2	< 0.01	0.1
14	1.1	< 0.01	0.2

Der Vergleich der RBA-Werte von Flu und OH-Flu zeigt, daß eine OH-Gruppe für eine AR-Affinität essentiell ist. Dies erwies sich auch in der Klasse der 4-Nitro-3-trifluormethyl-diphenylamine als zutreffend, da die nicht OH-substituierte Verbindung 8 keine Affinität zum AR (RBA < 0.01) zeigt. Das Diphenylamin 13 mit der besten strukturellen Übereinstimmung mit OH-Flu (2-OH-Substitution) besitzt mit einem RBA-Wert von 6.5% des Testosterons sogar eine höhere AR-Affinität als OH-Flu. Die AR-Affinität fällt in der Reihe der 2-OH-, 3-OH-, 4-OH-Substitution stark ab. Durch N-Methylierung von 13 sinkt die AR-Affinität [14] ebenfalls ab.

Das IR-Spektrum für das 2-OH-substituierte Diphenylamin 13 zeigt für die OH- und NH-Valenzschwingung lediglich eine breite Bande im Bereich von 3600 - 3200 cm⁻¹. Die 3-OH-substituierte Verbindung 10 weist jedoch getrennte scharfe Signale für OH- und NH-Schwingung bei 3530 bzw. 3300 cm⁻¹ auf. Es ist daher anzunehmen, daß analog zu Hydroxyflutamid⁷⁾ bei 13 eine intramolekulare H-Brücke vorliegt, die zur Fixierung der Raumstruktur beiträgt und die Bindung an den AR begünstigt.

Eine ER-Affinität konnte für keine der Verbindungen nachgewiesen werden; alle Verbindungen zeigten jedoch geringe PR-Affinität.

Aufgrund der relativ hohen AR-Affinität ist vor allem bei 13 die Voraussetzung für eine antiandrogene Wirkung gegeben. Deshalb wurden die Verbindungen an der juvenilen, Testosteronpropionat (TP)-substituierten Ratte vergleichend mit dem Antiandrogen Flu auf antiandrogene Wirkung getestet. Ermittelt wurde dabei die prozentuale Hemmung der Gewichte der Samenblasen (SB) und Prostatas (Pr) gegenüber der ausschließlich mit TP therapierten Standardgruppe (Standard).

Tab. 2: Antiandrogene Wirkung von Flu, 10, 11, 13 und 14 auf die Gewichte von Samenblasen (SB) und Prostatas (Pr) an der juvenilen, TP-substituierten Ratte.

Gruppe	Dosis ^{a)} (mg/die)	rel. Organgewicht (mg/100g Körpergew.)		Hemmung (%)	
		SB	Pr	SB	Pr
Standard	–	12.2 ± 1.7	58.5 ± 2.9	–	–
Flu	5	5.4 ± 0.7	28.2 ± 6.0	56 ^a	52 ^a
10	5	11.5 ± 0.6	56.6 ± 6.9	6	3
11	5	11.5 ± 1.7	67.6 ± 8.8	6	0
13	5	10.1 ± 0.7	50.6 ± 0.6	17 ^a	14 ^b
14	5	12.5 ± 2.4	68.7 ± 6.0	0	0

* : Alle Tiere erhielten zusätzlich 50 µg TP täglich.

^a : p < 0.01, ^b : p < 0.05

Während Flu in dieser Versuchsanordnung in der 5 mg-Dosierung eine ca. 50proz. Reduktion der Organgewichte gegenüber dem Standard bewirkt, ist die antiandrogene Wirkung der getesteten Diphenylamine 10, 11, 13 und 14 schwächer oder fehlt vollständig. Die Wirkung sinkt mit dem Abfall der Affinität zum AR stark ab. Trotz der gegenüber OH-Flu höheren AR-Affinität ist 13 ein schwächeres Antiandrogen als OH-Flu. Als mögliche Ursache für diese Tatsache kommen u.a. partiell agonistische Effekte in Frage, diese konnten jedoch in einem Test auf androgene Wirkung an der kastrierten, juvenilen Ratte nicht bestätigt werden. Um Speziesunterschiede in der Wirkung nicht zu übersehen, haben wir 13 auch an der Maus auf antiandrogene Wirkung getestet.

Tab. 3: Antiandrogene Wirkung von Flutamid (Flu) und 13 auf die Samenblasen (SB)-Gewichte

a.) an der kastrierten, TP-substituierten Maus

Gruppe	Dosis ^{a)} (mg/die)	rel. SB-Gew. (mg/100g)	Hemmung (%)
Standard	–	145.9 ± 29.4	–
Flu	2	32.1 ± 2.4	78 ^a
13	2	64.3 ± 12.0	56 ^a

* : alle Tiere wurden zusätzlich täglich mit 300 µg TP behandelt, ^a : p < 0.01

b.) an der intakten Maus

Gruppe	Dosis (mg/die)	rel. SB-Gew. (mg/100g)	Hemmung (%)	T-Spiegel (ng/ml)
Kontrolle	–	95.2 ± 21.4	–	4.1
Flu	2	69.0 ± 16.5	28 ^b	> 10.0
13	2	89.8 ± 28.1	6	4.1

^b : p < 0.05

Flu führt an der kastrierten, TP-substituierten Maus zu einer 78proz. Hemmung der SB-Gewichte. 13 zeigt ebenfalls eine starke antiandrogene Wirkung. Jedoch ist mit einer Hemmung der SB-Gewichte um 56% gegenüber der Standardgruppe die antiandrogene Wirkung auch bei der Maus schwächer ausgeprägt als bei Flu.

Am intakten Tier zeigt Flu lediglich schwache Effekte, was auf die gleichzeitige starke Erhöhung der Testosteronspiegel infolge der Flu-Gabe zurückzuführen ist⁸). Das Diphenylamin **13** ist auch am intakten Tier schwächer wirksam als Flu, obwohl es keine Erhöhung der Testosteronspiegel hervorruft.

Die vorliegenden Daten zeigen, daß auch in der Klasse der Diphenylamine Substanzen mit zum Teil hoher AR-Affinität erhalten werden können. Hinsichtlich Struktur-Wirkungs-Beziehungen ergeben sich ähnliche Ableitungen wie bei Flu und analogen Benzaniliden. Die bei **13** gute AR-Affinität schlägt sich allerdings aus bisher nicht bekannten Gründen nicht in einer überzeugenden antiandrogenen Effektivität nieder.

Die Autoren danken Herrn Prof. Dr. H. Schönenberger für wertvolle Diskussionen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 234) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Chemikalien: Fa. Janssen, Fa. Aldrich, Fa. Merck.- Schmp.: Büchi 510 Apparat (unkorrigiert).- IR-Spektren: Beckman Acculab 7.- UV-Spektroskopie: Kontron Uvikon 810, Schichtdicke 10 mm, in Methanol.- ¹H-NMR Spektren: Varian EM 360 A (60 MHz).- HPLC: LKB 2150 Pumpe; LKB 2140 Spektraldetektor, Wavescan 2140-202: 220-370 nm; Säule: Lichrosorb RP 18, 10 µm; Fließmittel: Methanol-Wasser-Mischungen.- Elementaranalysen: Mikroanalyt. Labor, Universität Regensburg.- Massenspektren: Varian MAT CH 5; Versuchstiere: Fa. Ivanovas, Kiflégg.

Synthesevorschriften

4-Nitro-3-trifluormethylfluorbenzol (1)

Zu 10.5 g 65proz. HNO₃ und 33.6 g konz. H₂SO₄ werden 16.4 g (0.1 mol) 3-Fluorbenzotrifluorid derart zugegeben, daß die Temp. bei 30 - 35°C bleibt. Nach Beendigung des Zutropfens wird für 15 min auf 60°C erhitzt. Die untere Phase wird abgetrennt und verworfen. Die org. Phase wird mit 2proz. Na₂CO₃-Lösung und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Abziehen des Lösungsmittels wird destilliert.- Blaßgelbe Flüssigkeit, Ausb. 72%, Sdp.₁₀ 82°C (Lit. Sdp. 188 - 189°C³).- C₇H₃F₄NO₂ (209.1).- ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 6.92 - 7.28 (m; 2 H arom.), 7.64 (dd; J = 58 Hz, 1 H, arom.).

4-Nitro-3-trifluormethylthiophenol (2)

2.09 g (10.0 mmol) **1** werden in 25 ml Ethanol zum Sieden erhitzt. Zur siedenden Lösung tropft man innerhalb von 10 min eine heiße Lösung von 1.75 g (7.2 mmol) Na₂S-9 H₂O und 0.23 g (7.3 mmol) Schwefel in 10 ml Ethanol. Danach werden innerhalb 20 min 10 ml molare ethanolische NaOH zugegeben. Nach dem Abkühlen gießt man auf Eiswasser, filtriert und säuert das Filtrat mit 10proz. HCl an. Das ausgefallene Produkt wird in Ether aufgenommen, die Etherphase über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt, wobei **2** kristallisiert. Rosafarbene Kristalle, Ausb. 45%, Schmp. 45 - 47°C.- C₇H₄F₃NO₂S (224.1).- IR (KBr): 2570 (SH).- ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 3.87 (s; SH), 7.40 - 7.60 (m; 2 H, arom.), 7.80 (d; J = 9 Hz, 1 H, arom.).

4-Nitro-3-trifluormethylphenylsulfonchlorid (3)

2.24 g (0.01 mol) **2** werden in 20 ml 90proz. Essigsäure suspendiert und auf 10°C gekühlt. In die Suspension leitet man Cl₂ ein bis zum Abklingen

der Wärmetönung. Die resultierende Lösung wird in Eiswasser gegossen und das Produkt mit Ether extrahiert. Die Etherphase wird neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt, wobei **3** kristallin anfällt. Das Produkt wird ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt. Ausb. 89%, Schmp. 56 - 58°C.- C₇H₃ClF₃NO₂S (289.5).- ¹H-NMR (60 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.10 (d; J = 8 Hz, 1 H arom.), 8.43 - 8.57 (m; 2 H arom.).

4-Nitro-3-trifluormethylphenylsulfocyanamid-Natriumsalz (4)

1.45 g (5.0 mmol) **3** werden in 10 ml Dioxan gelöst. Dazu wird eine Lösung von 0.21 g (5.0 mmol) Cyanamid in 5 ml 2M NaOH getropft, anschließend wird noch 10 min gerührt. Das Produkt wird mit 3 x 20 ml Essigester extrahiert, der Essigesterextrakt mit 1 x 20 ml Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel abgezogen, wobei **4** kristallin anfällt. Gelbliche Kristalle, Ausb. 71%, Schmp. 280°C (Zers.).- C₈H₃F₃NaO₄S (317.1).- IR (KBr): 2100 (CN).

N-(2-Hydroxyphenyl)-phthalimid (5)

10.9 g (0.1 mol) 2-Hydroxyanilin und 29.6 g (0.2 mol) Phthalsäureanhydrid werden in 250 ml Eisessig 1 h rückfließend erhitzt, anschließend mit 250 ml Wasser verdünnt und nochmals zum Sieden erhitzt. Beim Erkalten kristallisiert **5** aus. Farblose Kristalle, Ausb. 93%, Schmp. 223 - 224°C, (entspr.Lit.⁵).- C₁₄H₉NO₃ (239.2).- IR (KBr): 3370 (OH).- ¹H-NMR (60 MHz, d₆-Aceton): δ (ppm) = 6.97 - 7.40 (m; 4 H, arom.), 7.88 (s; 4 H, arom.).

N-(2-Benzoyloxyphenyl)-phthalimid (6)

23.9 g (0.1 mol) **5** werden zu einer Lösung von 3.9 g (0.1 mol) Kalium in 250 ml 99proz. Ethanol gegeben. Unter kräftigem Rühren werden 25.6 g (0.15 mol) Benzylbromid tropfenweise zugegeben, und die Mischung wird 1 h auf 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen gießt man auf Eis und extrahiert **6** mit Dichlormethan. Nach dem Waschen des Extraktes mit 10proz. NaOH und Wasser trocknet man über Na₂SO₄ und engt ein. Der Rückstand wird mit Petrolether 40/60°C gerührt, wobei **6** kristallisiert. Farblose Kristalle, Ausb. 51%, Schmp. 147 - 148°C (entspr.Lit.⁶).- C₂₁H₁₅NO₃ (329.4).- ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.07 (s; 2 H, -OCH₂-), 6.88 - 7.35 (m; 9 H, arom.), 7.57 - 7.98 (m; 4 H, arom.).

2-Benzoyloxyanilin (7)

9.9 g (0.03 mol) **6** werden in 100 ml Ethanol suspendiert und nach Zugabe von 1.5 ml Hydrazinhydrat 1 h rückfließend erhitzt. Nach Abkühlen werden 300 ml Ether zugegeben, der dabei entstehende Niederschlag wird abfiltriert. Das Filtrat wird eingengt und der Rückstand in 100 ml 10proz. HCl zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen wird ein Überschuß von konz. NaOH zugegeben, worauf sich ein Öl absondert. Dieses wird in Ether aufgenommen, die Lösung mit Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ wird eingengt, wobei **7** kristallisiert. Bräunliche Kristalle, Ausb. 55%, Schmp. 37 - 39°C (entspr.Lit.⁶).- C₁₃H₁₃NO (199.3).- IR (KBr): 3470; 3380 (NH₂).- ¹H-NMR (60 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.70 (s; NH₂), 5.03 (s; 2 H, -OCH₂-), 6.62 - 6.87 (m; 4 H, arom.), 7.30 (s; 5H, arom.).

Diphenylaminsynthese

1.0 g (3.1 mmol) **4** wird in 5 ml Eisessig gelöst und die Lösung auf 100°C erhitzt. Hierzu werden 3.1 mmol des entspr. aromatischen Amins, gelöst in 5 ml Eisessig, getropft und noch 15 min bei 100°C gehalten. Das Lösungsmittel wird i.Vak. abgezogen, der Rückstand in 10 ml Dioxan gelöst und zu 20 ml siedender 10proz. NaOH getropft. Man hält noch 10 min am Sieden. Nach Abkühlen gießt man auf Wasser und extrahiert das Produkt mit Essigester. Der Essigesterextrakt wird neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird über Kieselgel 60 mit Dichlormethan / Ethanol (19:1) chromatographiert.

4-Nitro-3-trifluormethyldiphenylamin (8)

Orangerotes Pulver, Ausb. 56%, Schmp. 149 - 150°C.- $C_{13}H_9F_3N_2O_3$ (282.2).- Ber. C 55.3 H 3.22 N 9.9 Gef. C 55.3 H 3.42 N 9.7.- IR (KBr): 3300 (NH).- UV(Methanol): λ max (log ϵ) = 379(4.23).- 1H -NMR (60 MHz, d_6 -Aceton): δ (ppm) = 7.30 - 7.52 (m; 7 H, arom.), 8.18 (d; J = 9 Hz, 1 H, arom.).- MS(70 eV): m/z = 282 (M^+).

2-Benzyloxy-4'-nitro-3'-trifluormethyldiphenylamin (9)

Orangefarbenes Öl, Ausb. 44%. - $C_{20}H_{15}F_3N_2O_3$ (388.3).- IR (Film): 3400 (NH).- UV(Methanol): λ max (log ϵ) = 379(4.26).- 1H -NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 5.10 (s; $-OCH_2-$), 6.58 (s; NH), 6.97 - 7.33 (m; 11 H arom.), 7.93 (d; J = 9 Hz, 1 H, arom.).

3-Hydroxy-4'-nitro-3'-trifluormethyldiphenylamin (10)

Orangerotes Pulver, Ausb. 47%, Schmp. 138 - 140°C.- $C_{13}H_9F_3N_2O_3$ (298.2).- Ber. C 52.4 H 3.05 N 9.4 Gef. C 52.3 H 3.33 N 9.1.- IR (KBr): 3530 (OH); 3330 (NH).- UV(Methanol): λ max (log ϵ) = 379(4.24).- 1H -NMR (d_6 -Aceton): δ (ppm) = 6.50 - 7.33 (m; 6 H arom.), 8.00 (d, J = 9 Hz, 1 H arom.).- MS(70 eV): m/z = 298 (M^+).

4-Hydroxy-4'-nitro-3'-trifluormethyldiphenylamin (11)

Orangerotes Pulver, Ausb. 42%, Schmp. 137 - 139°C.- $C_{13}H_9F_3N_2O_3$ (298.2).- Ber. C 52.4 H 3.05 N 9.4 Gef. C 52.1 H 3.20 N 9.3.- IR (KBr): 3600 - 3200 (OH), 3350 (NH).- UV(Methanol): λ max (log ϵ) = 379(4.22).- 1H -NMR (60 MHz, d_6 -Aceton): δ (ppm) = 6.83 - 7.23 (m; 6 H, arom.), 8.00 (d, J = 9 Hz, 1 H, arom.).- MS(70 eV): m/z = 298 (M^+).

2-Benzyloxy-N-methyl-4'-nitro-3'-trifluormethyldiphenylamin (12)

120 mg NaH in Paraffin (80%), entspr. 4.0 mmol, werden in 10 ml trockenem Dimethylacetamid (DMA) suspendiert. Dazu werden 2.0 mmol des zu methylierenden Diphenylamins **9**, gelöst in 10 ml N,N-Dimethylacetamid, getropft. Man läßt 30 min bei Raumtemp. rühren, tropft anschließend 0.71 g (5.0 mmol) CH_3I zu und rührt weitere 30 min. Zur Hydrolyse werden 100 ml Wasser zugefügt, und das Produkt wird mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird das Lösungsmittel abgezogen. Gelbes Öl, Ausb. 96%. - $C_{21}H_{17}F_3N_2O_3$ (402.4).- UV(Methanol): λ max (log ϵ) = 379(4.32).- 1H -NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.23 (s; $-NCH_3$), 4.90 (s; $-OCH_2-$), 6.37 (dd; J = 9/2 Hz, 1 H, arom.), 6.70 (d; J = 2 Hz, 1 H, arom.), 6.70 - 7.18 (m; 9 H, arom.), 7.78 (d; J = 9 Hz, 1 H, arom.).

Spaltung der Benzylether

2.0 mmol der zu spaltenden Benzyloxyverbindung **9** bzw. **12** werden in 20 ml Eisessig gelöst und 20 ml 48proz. HBr zugefügt. Die Lösung wird 1 h bei 60°C gerührt. Nach Abkühlen werden 100 ml Wasser zugegeben, und das Produkt wird mit Essigester ausgeschüttelt. Der Essigesterextrakt wird über Na_2SO_4 getrocknet und i.Vak. eingengt. Der Rückstand wird mit Dichlormethan / Ethanol (19:1) über Kieselgel 60 chromatographiert.

2-Hydroxy-4'-nitro-3'-trifluormethyldiphenylamin (13)

Rotes Pulver, Ausb. 72%, Schmp. 139 - 140°C.- $C_{13}H_9F_3N_2O_3$ (298.2).- Ber. C 52.4 H 3.05 N 9.4 Gef. C 52.6 H 3.29 N 9.1.- IR (KBr): 3600 - 3200 (OH, NH).- UV(Methanol): λ max (log ϵ) = 379(4.32).- 1H -NMR (60 MHz, d_6 -Aceton): δ (ppm) = 6.72 - 7.35 (m; 6 H, arom.), 8.05 (d; J = 9 Hz, 1 H, arom.).- MS(70 eV): m/z = 298 (M^+).

2-Hydroxy-N-methyl-4'-nitro-3'-trifluormethyldiphenylamin (14)

Gelbe Kristalle, Ausb. 90%, Schmp. 123 - 125°C.- $C_{14}H_{11}F_3N_2O_3$ (312.3).- Ber. C 53.8 H 3.56 N 8.9 Gef. C 53.9 H 3.50 N 8.7.- IR (KBr):

3550 - 3200 (OH).- UV(Methanol): λ max (log ϵ) = 379(4.32).- 1H -NMR (60 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.38 (s; 3 H, $-CH_3$), 5.67 (s; OH), 6.63 (dd; J = 9/2 Hz, 1 H, arom.), 6.90 - 7.43 (m; 5 H, arom.), 7.87 (d; J = 9 Hz, 1 H, arom.).- MS: m/z = 312 (M^+).

Affinität zu Steroidhormonrezeptoren

Die RBA - Werte werden nach beschriebenen Methoden bestimmt⁹⁾. Als Rezeptorquelle dient Kalbsuteruscytosol. Radioliganden: [3H]-Mibolerone (AR), [3H]-Estradiol (ER) und [3H]-R5020 (PR). Die Menge an gebundenem Radioligand wird durch die DCC (dextran-coated charcoal)-Methode bestimmt. Als Standard (RBA = 100) dienen Testosteron (AR), Estradiol (ER) und Progesteron (PR).

Antiandrogene Wirkung an der juvenilen Ratte

Juvenile Ratten, 24 Tage alt, 6 - 7 Tiere / Gruppe werden verwendet. Die Tiere der Standardgruppe erhalten täglich 50 μ g TP / Tier. Alle übrigen Gruppen erhalten täglich zusätzlich die angegebene Menge Testsubstanz in 0.1 ml Olivenöl p.A.. (Therapiedauer 7 Tage, subcutane Injektion). Zu Ende des Versuches (8. Tag) werden die Tiere getötet und Samenblasen (SB) und Prostatae (Pr) entnommen. Die Prostatae werden nach Entfernung anhängenden Gewebes naß gewogen. Die Samenblasen werden in Bouin'scher Lösung fixiert und nach Entfernung der Koagulationsdrüse und anhängenden Gewebes 12 h bei 100°C getrocknet und dann gewogen. Die Mittelwerte der Organgewichte aller Gruppen werden bestimmt, die prozentuale Hemmung in den Therapiegruppen gegenüber der Standardgruppe wird ermittelt.

Antiandrogene Wirkung an der Maus

Die Bestimmung der antiandrogenen Wirkung an der Maus erfolgt analog dem Versuch an der Ratte, aber in einem 10-Tage-Versuch. Zur Bestimmung der antiandrogenen Wirkung werden lediglich die relativen Samenblasengewichte (SB-Gewicht / Körpergewicht · 100) ausgewertet.

a) Zur Bestimmung an der kastrierten Maus wird die antiandrogene Wirkung in Prozent der Standardgruppe (Kastration + 300 μ g TP pro Tier und Tag) errechnet. Die Kastration erfolgt einen Tag vor Therapiebeginn.

b) Bei den intakten Tieren wird die prozentuale Hemmung gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe bestimmt. Die Mäuse werden unter Ethernarkose durch Herzpunktion getötet. Das Blut einer jeden Gruppe (ca. 1 ml/Tier) wird gepoolt und durch 20 μ l Liquemin 25000^R ungerinnbar gemacht; das daraus gewonnene Plasma dient der Bestimmung (2 Bestimmungen je Gruppe) der Testosteronspiegel mittels Radioimmunoassay (^{125}J -Testosteron-Radioimmunoassay, DRG International).

Literatur

- 1 A.W. Humm und M.R. Schneider, Arch. Pharm. (Weinheim) 321, 419 (1988).
- 2 H.J. Backer und S.K. Wadman, Rec. Trav. Chim. Pays Bas 68, 595 (1949).
- 3 G.C. Finger und F.H. Reed, J. Am. Chem. Soc. 66, 1972 (1944).
- 4 Merck & Co., Inc., Rahway, N.J. (Erf. H.H. Mrozik), Ger. Offen. 2,218,778 (P 22 18 778.6), 9. Nov. 1972; C.A. 78, 43042t (1973).
- 5 G. Wanag und A. Veinbergs, Chem. Ber. 75B, 1558 (1942).
- 6 M. Artico und W.C.J. Ross, Biochem. Pharmac. 19, 893 (1968).
- 7 A.T. Glenn, L.R. Hughes, J.J. Morris und P.J. Taylor, Third SCI-RSC Medical Chemistry Symposium, S. 345, The Royal Society of Chemistry, Burlington House, London 1985.
- 8 B. Marchetti und F. Labrie, J. Steroid Biochem. 29, 691 (1988).
- 9 M.R. Schneider, E. von Angerer, W. Höhn und F. Sinowatz, Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 23, 1005 (1987). [Ph628]