

Ester der β -Carbolin-3-carbonsäure mit alizyklischen Alkoholen - Synthese und Affinität zu Benzodiazepinrezeptoren

Klaus H. Geldsetzer^{+) und Walter Schunack*}

Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin, Königin-Luise-Str. 2+4, D-1000 Berlin 33

Eingegangen am 16. Januar 1989

Es wurden Ester der β -Carbolin-3-carbonsäure mit alizyklischen Alkoholen dargestellt und deren Affinität zum Benzodiazepinrezeptor in Mäusehirn-Membranen bestimmt. Dabei wiesen die Substanzen **3d,f** und **4b** auffallend hohe Affinitäten (<70 nmol) auf. Für **3f** läßt sich dies auf den Benzodiazepin-Anteil im Molekül zurückführen. **4b** verhält sich im GABA-Shift wie Invers-Agonisten des Benzodiazepinrezeptors. Über weitere Struktur-Affinitätsbeziehungen wird berichtet.

Esters of β -Carboline-3-carboxylic Acid with Alicyclic Alcohols - Synthesis and Benzodiazepine Receptor Affinity

Esters of β -carboline-3-carboxylic acid with alicyclic substituents were prepared and tested with respect to their affinity for the benzodiazepine receptor in mouse brain membranes. Compounds **3d,f** and **4b** showed high affinities (<70 nmol). In the case of **3f** the benzodiazepine moiety may be responsible for the affinity. In the GABA-shift test **4b** behaves as invers agonists to the benzodiazepine receptor. Further structure-affinity relationships are reported.

Die Beobachtung, daß Ester der β -Carbolin-3-carbonsäure neben Benzodiazepinen, Pyrazolochinolin und Cyclopyrrolonen hohe Affinitäten zum zentralen Benzodiazepin(BZ)-Rezeptor aufweisen¹⁾, führte zur Darstellung zahlreicher Vertreter dieser Stoffklassen²⁻⁵⁾.

Im Rahmen von Struktur-Affinitätsbeziehungen an Derivaten der am Ringsystem unsubstituierten β -Carbolin-3-carbonsäure wurden in vorliegender Arbeit vorwiegend Ester mit alizyklischen Alkoholen dargestellt und auf ihre Affinität zum Benzodiazepinrezeptor untersucht.

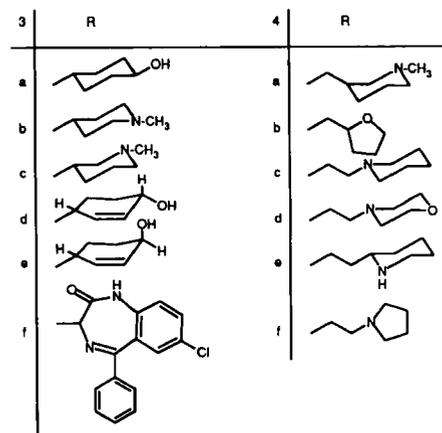
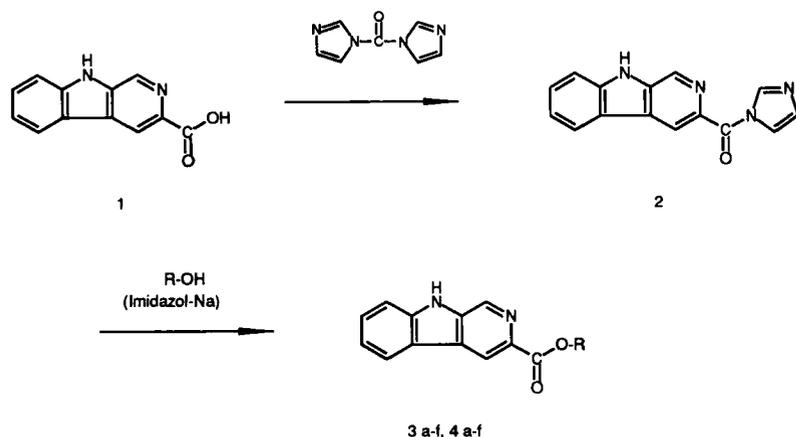
Als zentrale Ausgangsverbindung diente β -Carbolin-3-carbonsäure (**1**), die auf zwei kürzlich beschriebenen Wegen zugänglich ist: Die Darstellung erfolgt zum einen ausgehend von Tryptophan durch Ringschluß mit Formaldehyd, Veresterung mit Methanol, Oxidation mit Bleitetraacetat und anschließende Hydrolyse des Esters³⁾. Nach dem zweiten Verfahren erhält man das trizyklische β -Carbolin-Grundgerüst durch elektrophile Substitution von Indol mit 1,4-Bis-dimethylamino-3-ethoxycarbonyl-2-aza-butadien³⁾. Die Darstellung dieses hochreaktiven Synthesebausteins erfolgt ausgehend von Dimethylsulfat und Dimethylformamid. Das gebildete Formimidiumsäureester-methylsulfat wird mit Dimethylamin zu Tetramethylformamidinium-methylsulfat umgesetzt. Der Austausch des Anions gegen tert. Butylat sowie die nachfolgende Reaktion mit Glycineylester gibt das substituierte 2-Azabutadien⁶⁻⁹⁾.

β -Carbolin-3-carbonsäure reagiert mit 1,1'-Carbonyldiimidazol zum isolierbaren Imidazolylamid **2**, das mit nukleophilen primären und sekundären Alkoholen leicht zu den Estern **3a-f**, **4a-f**, **6** umgesetzt werden kann. Durch Zugabe katalytischer Mengen Imidazol-Natrium läuft die Veresterung aufgrund der stärkeren Nucleophilie des Alkohols bereits nach 2stdg. Rühren bei Raumtemp. mit 50-80proz. Ausbeute ab.

Im Gegensatz zu 2-(2-Hydroxyethyl)piperidin, das mit **2** wegen sterischer Hinderung ausschließlich zu **4e** reagiert, führt die Umsetzung mit 3-Hydroxymethylpiperidin zum entspr. Piperidylamid. Die Aminogruppe wurde daher durch Umsetzung mit Chlorameisensäurebenzylester analog¹⁰⁾ geschützt. Veresterung von **5** zu **6** und nachfolgende hydrogenolytische Abspaltung der Schutzgruppe mit Pd-Aktivkohle gibt **7** mit guter Ausbeute.

Pharmakologischer Teil

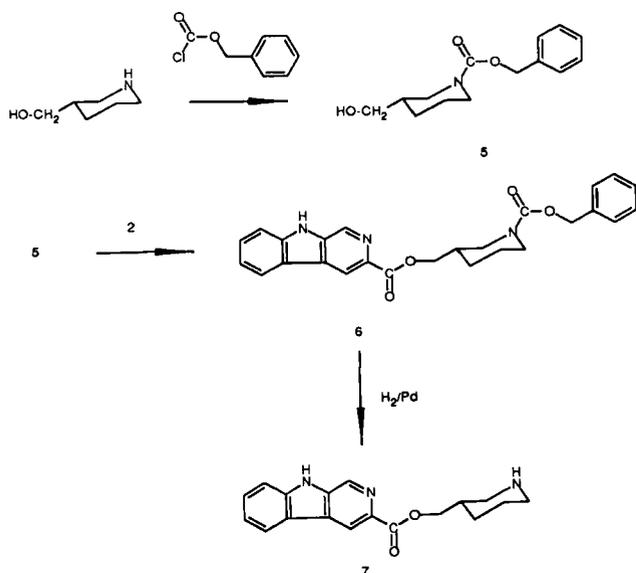
Die Ester wurden nach¹¹⁾ auf ihre Affinität zum Benzodiazepinrezeptor untersucht. IC₅₀-Werte geben die



^{+) Teilergebnisse der Dissertation K.H. Geldsetzer, Berlin 1988.}

Tab. 1: Analytische Daten und ^3H -Flunitrazepam-Bindung (IC_{50} [nmol])

Subst.	Schmp. °C	Summenformel (Mol-Masse)	Analyse		Ber.: Gef.: N	IC_{50} [nM] (n_H) ^a
			C	H		
2	250	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}$ (262.3)	68.7 68.6	3.84 3.78	21.4 21.1	150
3a	237	$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ (310.4)	69.7 69.9	5.85 5.85	9.03 9.30	985 (0.91)
3b	304	$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ (309.4)	69.9 69.6	6.19 6.20	13.6 13.6	730 (0.86)
3c	187	$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ (309.4)	69.9 69.8	6.19 6.17	13.6 13.6	1800 (1.07)
3d	224	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ (308.3)	70.1 69.8	5.23 5.02	9.09 9.19	65 (0.87)
3e	241	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ (308.3)	70.1 70.0	5.23 5.23	9.09 9.09	185 (0.89)
3f	228	$\text{C}_{27}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_3 \times 1/3\text{H}_2\text{O}$ (486.9)	66.6 66.4	3.66 3.50	11.5 11.8	25 (0.95)
4a	193	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ (323.4)	70.6 70.3	6.55 6.52	13.0 13.0	240 (1.02)
4b	185	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ (296.3)	68.9 68.9	5.44 5.40	9.45 9.55	13 (0.93)
4c	210	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ (323.4)	70.6 70.3	6.55 6.55	13.0 13.0	215 (0.93)
4d	228	$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ (325.4)	66.5 66.5	5.89 5.90	12.9 12.8	325 (0.98)
4e	203	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ (323.4)	70.6 70.8	6.55 6.58	13.0 13.1	270 (0.91)
4f	196	$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ (309.4)	69.9 69.5	6.19 6.04	13.6 13.4	195 (0.98)
6	137	$\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (461.5)	67.7 67.6	5.89 5.78	9.10 9.11	200 (0.68)
7	188	$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ (309.4)	69.9 69.8	6.19 6.07	13.6 13.8	330 (0.99)

^aHillkoeffizient

Konzentration an, bei der 50% des Radioliganden ^3H -Flunitrazepam vom BZ-Rezeptor verdrängt ist.

Die Ergebnisse (Tab. 1) zeigen, daß β -Carboline mit räumlich anspruchsvolleren Substituenten deutlich niedrigere Affinitäten aufweisen als solche mit kleinen Resten wie z.B. der Methyl- oder Ethylester¹²⁾. Die Ester der sekundären Alkohole Cyclohexandiol und Hydroxypiperidin 3a-c besitzen IC_{50} -Werte im mikromolaren Bereich. Befindet sich zwischen Estergruppe und alizyklischem System eine Methylene- oder Ethylenbrücke, so liegen die IC_{50} -Werte bei 200 nmol. Ein Heteroatom im Ring, substituiert oder

Tab. 2: GABA-Shift

Substanz	IC_{50} [nM]		Shift	n
	ohne GABA	mit GABA		
Diazepam	8.8	5.0	1.76	4
Oxazepam	20.4	17.6	1.16	4
Flumazenil	2.0	2.1	0.95	2
β -CCM ^a	2.3	3.1	0.74	4
3d	70	66	1.06	2
3f	27.5	22.8	1.21	2
4b	16.2	20.9	0.77	2

^a β -Carbolin-3-carbonsäuremethylester

Tab. 3: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von **2**, **3a**, **b**, **d**, **f**, **4a**, **b**, **d**, **e**, **5** und **6** (Lösungsmittel: $[\text{D}_6]\text{DMSO}$)

Substanz	δ (ppm)
2	12.32 (s; NH), 9.15 (s; 1H arom.), 9.08 (s; 1H arom.), 8.95 (s; 1m H-2), 8.49 (d; $J=7.9$ Hz, 1H arom.), 8.07 (s; 1m H-5), 7.75-7.20 (m; 3H arom.), 7.16 (s; 1m H-4)
3a	12.08 (s; NH), 8.98 (s; 1H arom.), 8.90 (s; 1H arom.), 8.41 (d; $J=7.9$ Hz, 1H arom.), 7.69-7.21 (m; 3H arom.), 4.99-4.90 (m; O-CH), 4.68 (d; $J=4.0$ Hz, OH), 3.63-3.56 (m; CH-OH), 2.08-1.31 (m; $2 \times (\text{CH}_2)_2$)
3b	12.09 (s; NH), 9.00 (s; 1H arom.), 8.93 (s; 1H arom.), 8.43 (d; $J=7.8$ Hz, 1H arom.), 7.70-7.20 (m; 3H arom.), 5.08-4.97 (m; O-CH), 2.60-1.80 (m; $2 \times (\text{CH}_2)_2$)
3d	12.11 (s; NH), 9.00 (s; 1H arom.), 8.93 (s; 1H arom.), 8.43 (d; $J=7.8$ Hz, 1H arom.), 7.70-7.19 (m; 3H arom.), 6.02-5.83 (m; CH=CH), 5.52-5.39 (m; O-CH), 5.02 (d; $J=5.4$ Hz, OH), 4.18-4.04 (m; CH-OH), 2.08-1.65 (m; $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)
3f	12.12 (s; NH), 11.24 (s; CO-NH), 9.09 (s; 1H arom.), 9.07 (s; 1H arom.), 8.49 (d; $J=7.9$ Hz, 1H arom.), 7.80-7.34 (m; 11H arom.), 6.14 (s; O-CH)
4a	12.12 (s; NH), 9.00 (s; 1H arom.), 8.94 (s; 1H arom.), 8.44 (d; $J=7.7$ Hz, 1H arom.), 7.71-7.21 (m; 3H arom.), 4.30-4.15 (m; O- CH_2), 2.85-2.62 (m; $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.17 (s; N- CH_3), 2.09-1.05 (m; CH- $(\text{CH}_2)_3$)
4b	12.12 (s; NH), 9.01 (s; 1H arom.), 8.93 (s; 1H arom.), 8.43 (d; $J=7.9$ Hz, 1H arom.), 7.71-7.20 (m; 3H arom.), 4.36-4.18 (m; CO-O- $\text{CH}_2\text{-CH}$), 3.87-3.66 (m; O- CH_2), 2.10-1.67 (m; $(\text{CH}_2)_2$)
4d	12.10 (s; NH), 9.00 (s; 1H arom.), 8.92 (s; 1H arom.), 8.41 (d; $J=7.9$ Hz, 1H arom.), 7.70-7.20 (m; 3H arom.), 4.46 (t; $J=4.7$ Hz, O- CH_2), 3.59 (t; $J=4.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$), 2.74 (t; $J=5.9$ Hz, CO-O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.53-2.49 (m; $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$)
4e	12.16 (s; NH), 9.00 (s; 1H arom.), 8.93 (s; 1H arom.), 8.42 (d; $J=7.9$ Hz, 1H arom.), 7.71-7.20 (m; 3H arom.), 4.42 (t; $J=6.8$ Hz, O- CH_2), 2.96-2.90 (m; CH), 2.62-2.48 (m; $\text{CH}_2\text{-N}$), 1.81-1.01 (m; $\text{CH}_2\text{-CH-}(\text{CH}_2)_3$)
5	7.39-7.29 (m; 5H arom.), 5.07 (s; O- CH_2), 4.57 (t; $J=5.1$ Hz, OH), 4.09-3.87 (m; N- $\text{CH}_2\text{-CH}$), 3.36-3.18 (m; N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 1.71-1.06 (m; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}$)
6	12.11 (s; NH), 9.00 (s; 1H arom.), 8.92 (s; 1H arom.), 8.39 (d; $J=7.4$ Hz, 1H arom.), 7.71-7.18 (m; 8H arom.), 4.31-4.20 (m; O- CH_2), 4.18-3.83 (m; N- $\text{CH}_2\text{-CH}$), 3.04-2.86 (m; N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.03-1.33 (m; CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$)
7	12.10 (s; NH), 9.01 (s; 1H arom.), 8.92 (s; 1H arom.), 8.43 (d; $J=7.9$ Hz, 1H arom.), 7.70-7.20 (m; 3H arom.), 4.25-4.12 (m; O- CH_2), 3.09-2.82 (m; N- $\text{CH}_2\text{-CH}$), 2.47-2.31 (m; N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.95-1.78 (m; CH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$)

unsubstituiert, hat keinen nennenswerten Einfluß auf die Rezeptor-Affinität (vergl. **4a**, **c-f**, **6**, **7**).

Auffallend sind die hohen Affinitäten von **3d,f** und **4b**. Im Gegensatz zu **3a** ist der Ring in **3d,e** nahezu planar, was eine bessere Anlagerung an den Rezeptor zu ermöglichen scheint. Zudem übt die Hydroxygruppe in 4-Stellung einen positiven Einfluß auf die Rezeptor-Affinität aus. Für das cis-Isomer **3d** wurde eine etwa um den Faktor 3 höhere Affinität gefunden als für das trans-Isomer **3e**. Alle für **3f** gefundenen Werte (IC_{50} , Hillkoeffizient, GABA-Shift) entsprachen denen von Oxazepam, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Bindung an den BZ-Rezeptor allein über den BZ-Rest von **3f** erfolgt. Der Alkoholrest von **4b** ist räumlich deutlich kleiner als die übrigen hier verwendeten Alkohole. Aufgrund der nahezu planaren Struktur des Tetrahydrofurans wird zudem die Rezeptorbindung wie bei den kurzkettigen Alkoholen offensichtlich nicht behindert.

Die Vergleichbarkeit von **4b** mit Estern kurzkettiger Alkohole wird bei der Betrachtung des GABA-Shifts bestätigt. **4b** weist in etwa den gleichen GABA-Shift wie der Methyl-ester auf (0.77 bzw. 0.74). Dies läßt auf ähnliche invers-agonistische Eigenschaften schließen. **3d** verhält sich mit einem Shift von 1.06 ähnlich wie der BZ-Rezeptor-Antagonist Flumazenil (0.96).

Dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für eine Sachbeihilfe, Herrn Prof. Dr. Walter E. Müller, Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, Mannheim, für die Bereitstellung der Geräte zur Bestimmung der ^3H -Flumazenil-Bindung.

Experimenteller Teil

Schmp. (unkorr.): Schmp.-Bestimmungsapparat Fa. Büchi 512 nach Dr. Tottoli.- Elementaranalysen: Perkin-Elmer-Elementaranalysator 240C.- $^1\text{H-NMR}$ -Spektren: Bruker WM 250.- Temp. in $^{\circ}\text{C}$.

Darstellung von **2**

30 mmol **1**, suspendiert in 20 ml absol. DMF, wurden unter schnellem Rühren und Feuchtigkeitsausschluß mit 60 mmol 1,1'-Carbonyldiimidazol versetzt und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Nach kurzzeitigem Entstehen einer klaren Lösung fiel **2** langsam aus. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit DMF und Ether gewaschen sowie i. Vak. bei 80° getrocknet (Ausb. 92%).

Allgemeine Veresterungsvorschrift

10 ml absol. DMF wurden mit 1.5 mmol Imidazol-Natrium versetzt, anschließend 15 mmol des entspr. Alkohols zugefügt, nach 10 min Rühren 2 mmol **2** zugesetzt und bei Raumtemp. 2 h unter Feuchtigkeitsausschluß weitergerührt. Das Reaktionsgemisch wurde i. Vak. eingengt, der Rückstand mit 100 ml H_2O versetzt, mit wenigen Tropfen Eisessig neutralisiert, die Fällung abgesaugt und aus Acetonitril umkristallisiert.

Entsprechend wurden **3a-f**, **4a-f** dargestellt und i. Vak. bei 80° getrocknet (Ausb. 50-80%).

1-Benzoyloxycarbonyl-3-hydroxymethyl-piperidin (**5**)

75 mmol 3-Hydroxymethyl-piperidin (frisch destilliert), gelöst in 18 ml 4N-NaOH, wurden in kleinen Portionen mit 80 mmol Chlorameisensäurebenzylester und weiteren 18 ml 4N-NaOH versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 h unter Eiskühlung und 2 h bei Raumtemp. gerührt.

Anschließend wurde mit 2N HCl angesäuert, mit 3 x 70 ml Ether ausgeschüttelt und die org. Phase mit 5proz. NaHCO₃-Lösung neutral gewaschen. Der Ether wurde abdestilliert und der Rückstand einer Vakuumdestillation unterzogen (Ausb. 66%).

β-Carbolin-3-carbonsäure-(1-benzoyloxycarbonyl-3-piperidinyl)methylester (6)

10 ml absol. Dimethylformamid wurden mit 135 mg Imidazol-Natrium und 3.74 g **5** versetzt, 10 min gerührt, 0.53 g **2** zugefügt und bei Raumtemp. unter Feuchtigkeitsausschluß weitergerührt, wobei schnell eine klare Lösung entstand. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC (Kieselgel 60 F₂₅₄, Butan-2-on) verfolgt. Nach vollständiger Umsetzung wurde Dimethylformamid i. Vak. abdestilliert, der Rückstand unter Rühren mit 100 ml Wasser versetzt, mit Eisessig neutralisiert sowie der Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen, aus Acetonitril kristallisiert und bei 100° i. Vak. getrocknet (Ausb. 50%).

β-Carbolin-3-carbonsäure-(3-piperidinyl)methylester (7)

1 mmol **6** wurde in 150 ml Isopropanol gelöst, mit 60 mg Pd/C 10% versetzt und 20 h hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde die Lösung auf 20 ml eingengt, unter Rühren mit 100 ml Ether versetzt, sowie der Niederschlag aus Acetonitril umkristallisiert und i. Vak. bei 80° getrocknet (Ausb. 65%).

Prüfung auf Rezeptor-Affinität

Die Prüfung auf Rezeptor-Affinität erfolgte nach dem in¹¹⁾ beschriebenen Verfahren.

Bestimmung des GABA-Shifts

Der GABA-Shift wurde in Abwandlung des oben angeführten Verfahrens der Bestimmung der Rezeptor-Affinität in zwei Parallelansätzen bestimmt. Dabei wurden die Konzentrationsstufen enger gewählt (4 Werte innerhalb einer Zehnerpotenz). Den Probenlösungen (³H-Flunitrazepamlösung und Leerwert) wurden in der ersten Reihe 1000 µl

Tris-HCl-Puffer mit 2x10⁻³ mol/l NaCl sowie in der zweiten Reihe 1000 µl Tris-HCl-Puffer mit 2x10⁻³ mol/l NaCl und 2x10⁻⁶ mol/l GABA zugesetzt. Anschließend wurde nach Zugabe von 900 µl Gewebehomogenat 30 min im Eisbad inkubiert und wie oben weiter verfahren. Der Quotient aus dem IC₅₀-Wert ohne und mit GABA-Zusatz bildet den GABA-Shift.

Literatur

- 1 W. Haefely, E. Kyburz, M. Gerecke und H. Möhler, *Adv. Drug Res.* 14, 165 (1985).
- 2 Schering AG (Erf. U. Eder, G. Neef, A. Huth, D. Rahtz, R. Schmichen, C. Braestrup, M.C. Nielsen, J.A. Christensen, M. Engelstoft und H. Schou) EP 0030254 (17.6.1981); *C.A.* 95, 115508a (1981).
- 3 K.-P. Lippke, W.G. Schunack, W. Wenning und W.E. Müller, *J. Med. Chem.* 26, 499 (1983).
- 4 M. Cain, R.W. Weber, F. Guzman, J.M. Cook, S.A. Barker, K.C. Rice, J.N. Crawley, S.M. Paul und P. Skolnick, *J. Med. Chem.* 25, 1081 (1982).
- 5 H. Biere, R. Russe und W. Seelen, *Liebigs Ann. Chem.* 1986, 1749.
- 6 W. Kantlehner, F. Wagner und H. Brederock, *Liebigs Ann. Chem.* 1980, 344.
- 7 H. Brederock, F. Effenberger und G. Simchen, *Chem. Ber.* 96, 1350 (1963).
- 8 H. Brederock, F. Effenberger und G. Simchen, *Chem. Ber.* 98, 1078 (1965).
- 9 H. Brederock, F. Effenberger und G. Simchen, *Dtsch. Bundes-Pat.* 1205548; *C.A.* 64, 9593d (1965).
- 10 G. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* 69, 1384 (1947).
- 11 K.-P. Lippke, W.E. Müller und W.G. Schunack, *J. Pharm. Sci.* 74, 676 (1985).
- 12 C. Braestrup und M. Nielsen, In: *Handbook of Psychopharmacol.*, Hrsg. L.L. Iversen, S.D. Iversen und S.H. Snyder, vol. 17, S.285, Plenum Verlag, New York 1983.

[Ph608]