

Hypertensiv wirksame 5-(β -Aminoethyl)aminoisoxazole: Synthese und Prüfung von Derivaten mit teilrigidierter C-5-Seitenkette bzw. ω -ständigem Heterocyclus

Gerd Dannhardt^{a)}*, Peter Dominiak^{b)} und Stefan Laufer^{a)}

^{a)} Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Georg-Voigt-Straße 14, D-6000 Frankfurt am Main 11

^{b)} Physiologisches Institut der Universität München, Pettenkoferstraße 12, D-8000 München 2

Eingegangen am 27. Juli 1989

Die Darstellung von Isoxazolen mit 1,2-Diaminoethanseitenkette an C-5 gelingt durch nucleophile Substitution von 5-Chlorisoxazolen. Die Einschränkung der konformativen Beweglichkeit wird erreicht durch Einbeziehung der 1,2-Diaminoethanfunktion in ein Piperazin-, Imidazolin- bzw. 1,2-Diaminocyclohexan-System. Daneben werden Verbindungen beschrieben, bei denen das ω -ständige N-Atom der Seitenkette Teil eines weiteren Heterocyclus ist. Die hypertensive Wirkung der genannten Isoxazolderivate wird am Modell der narkotisierten bzw. demedullierten Ratte gezeigt. Aus Struktur-Wirkungs-Betrachtungen folgt, daß die hypertensive Aktivität der Verbindungen 7 und 8 in erster Linie durch den ω -ständigen Heterocyclus bestimmt wird (Piperazin > Piperidin \approx Pyrrolidin > Morpholin). Jede Rigidisierung der 5-(β -Aminoethyl)amino-Seitenkette (Verbindungen 2 - 5) vermindert die hypertensive Wirkung im Vergleich zu entspr. Verbindungen mit uneingeschränkter konformativer Beweglichkeit.

5-(β -Aminoethyl)aminoisoxazoles with Hypertensive Activity: Synthesis and Screening of Derivatives with Partially, Rigid C-5 Side Chains and Heterocycles at the ω -Position, Respectively

Isoxazoles with a 1,2-diaminoethane side chain at C-5 are synthesized by nucleophilic substitution of 5-chloro derivatives. Using piperazine, imidazolidine and 1,2-diaminocyclohexane, resp., isoxazoles with partially rigid chains at C-5 are formed. The same procedure succeeds in the synthesis of isoxazoles having a heterocycle at the ω -position of the side chain. The hypertensive activity of all new compounds is shown for the pithed and the anaesthetized rat, resp. According to structure activity relationships the hypertensive activity of compounds 7 and 8, resp., is mainly determined by the heterocycle at the ω -position (piperazine > piperidine \approx pyrrolidine > morpholine). Derivatives 2 - 5 with partially rigid 5-(β -aminoethyl)amino side chains show less hypertensive activity than the corresponding compounds without restrictions.

Isoxazole mit einer ω -Aminopropyl- bzw. (β -Aminoethyl)amino-Seitenkette an C-5¹⁻³⁾ besitzen ausgeprägte hypertensive Wirkung ohne Einfluß auf die Herzfrequenz. Um den Einfluß der Beweglichkeit der Seitenkette auf die Aktivität untersuchen zu können, werden Derivate mit teilrigidierter 1,2-Diaminoethanfunktion an C-5 der Isoxazole aufgebaut.

Als Edukte dienen die entspr. 5-Chlorisoxazole **1**³⁾, die durch Piperazin, (\pm)-trans-1,2-Diaminocyclohexan bzw. Tetrahydroimidazol zu den Isoxazolen **2**, **3** und **4** substituiert werden. Im Falle des instabilen Tetrahydroimidazols wird ein Gemisch aus Tetrahydroimidazol, 1,2-Diaminoethan und 1,2-Bismethylen-di-tetrahydroimidazol eingesetzt⁴⁾; das als Nebenprodukt anfallende **5**³⁾ läßt sich sc von **4** trennen. Das Isoxazol **4** ist relativ instabil und muß unmittelbar vor dem Test gereinigt werden.

Als weitere strukturelle Variation wird die Einbeziehung des ω -ständigen N-Atoms in ein heterocyclisches System, unter Beibehaltung seiner basischen Eigenschaften, untersucht. Vergleichbare Isoxazole besitzen zentral muskelrelaxierende Wirkung, die durch die Struktur des verwendeten endständigen Heterocyclus bestimmt wird⁵⁾. Nach Umsetzung der 5-Chlorisoxazole **6**³⁾ mit freien Basen bzw. deren Lithiumsalzen erhält man die substituierten Isoxazolderivate **8/7**. Die zur Darstellung von **7** erforderlichen Amine sind aus 1-Anilino-2-chlorethan und Piperidin, Pyrrolidin, Morpholin bzw. Piperazin zugänglich⁶⁾. Erwartungsgemäß entstehen bei der Umsetzung mit N-(β -Aminoethyl)piperazinen durch nucleophilen Angriff des sek. Piperazin-N-Atoms an

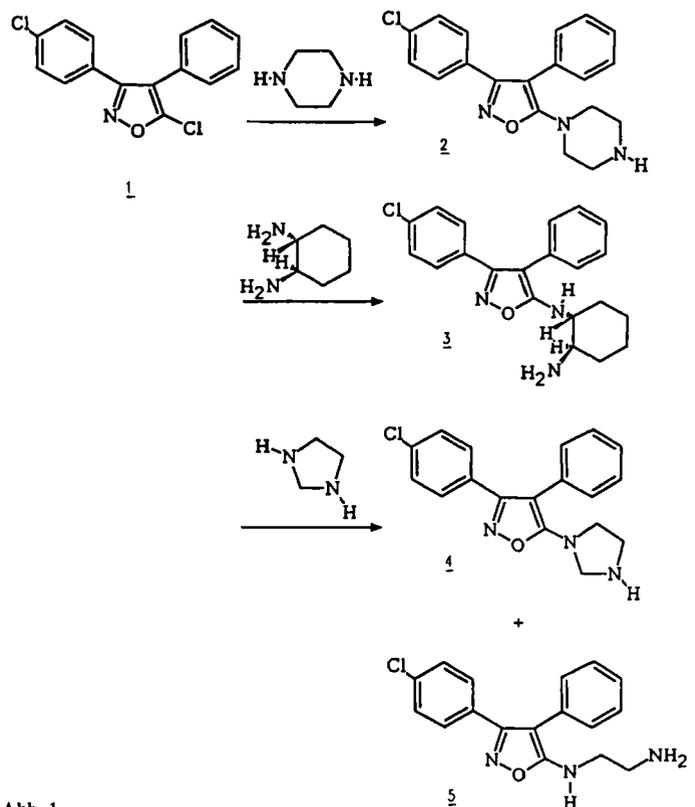


Abb. 1

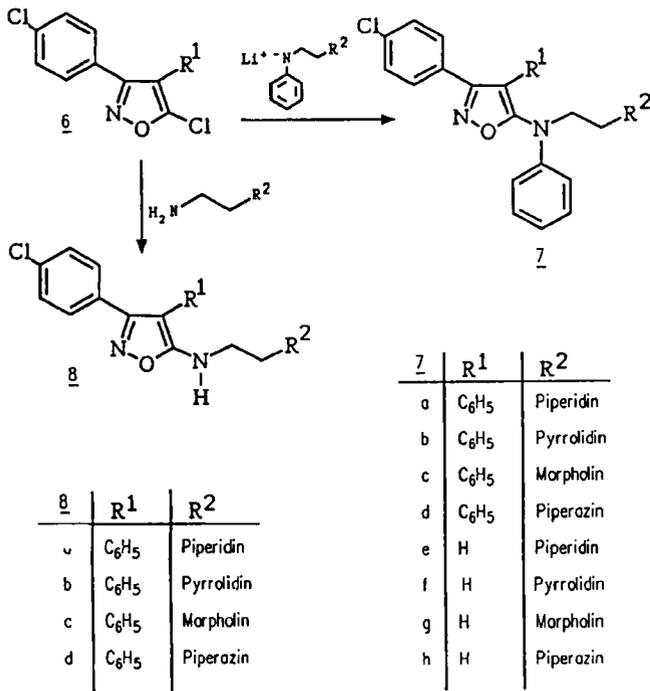


Abb. 2

6 auch Isoxazole mit ω -ständiger NH₂-Funktion und ω -ständigem Piperazinring; der Anteil dieser Nebenprodukte beträgt 10-30% der Gesamtausbeute. Da die Trennung von den angestrebten Verbindungen 7d, 8d an Kieselgel nur unzureichend gelingt, wird die SC an reversed phase-Material (RP-8) mit einem Methanol-Wasser-Stufengradienten durchgeführt (s. Exp. Teil).

Beispielhaft für diese Verbindungen wird das 90 MHz-¹H-NMR-Spektrum von 7g besprochen: Neben Aromatenprotonen zwischen 7.21 - 7.84 ppm findet man bei 5.28 ppm ein scharfes Singulett für das C-4-Proton des Isoxazols. Die Methylenprotonen der Seitenkette treten bei 3.98 ppm (CH₂N-Aryl) und 2.65 ppm (CH₂N-Morpholin) jeweils als Triplett in Resonanz. Multipletts für jeweils vier Protonen bei 3.55 - 3.76 ppm (CH₂OCH₂) und 2.40 - 2.56 ppm (CH₂NCH₂) belegen den Morpholinring. Alle übrigen Daten (s. Exp. Teil) sind mit den vorgeschlagenen Strukturen 7 und 8 in Übereinstimmung.

Testergebnisse und Struktur-Wirkungs-Betrachtungen

Die vorangehend beschriebenen Verbindungen werden auf kardiovaskuläre Wirkung an der narkotisierten und demedullierten Ratte ("pithed rat"⁷⁾) untersucht, um zwischen zentral bzw. peripher ausgelösten Kreislauffeffekten differenzieren zu können (zur Versuchsanordnung s. Exp. Teil).

Die Ergebnisse sind in den Tab. 1-5 zusammengefaßt, für die graphische Darstellung (Abb. 3-7) werden die Werte der demedullierten Ratte bei einer Dosis von 10⁻⁵ mol/kg herangezogen. Diese Werte sind für die Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Betrachtungen besser geeignet als die der narkotisierten Ratte, da die Effekte ausgeprägter sind (qualitativ aber immer mit denen der narkotisierten Ratte korrelieren), homogenere und bessere reproduzierbare Ergebnisse liefern (keine zentralen Einflüsse, weniger individuelle

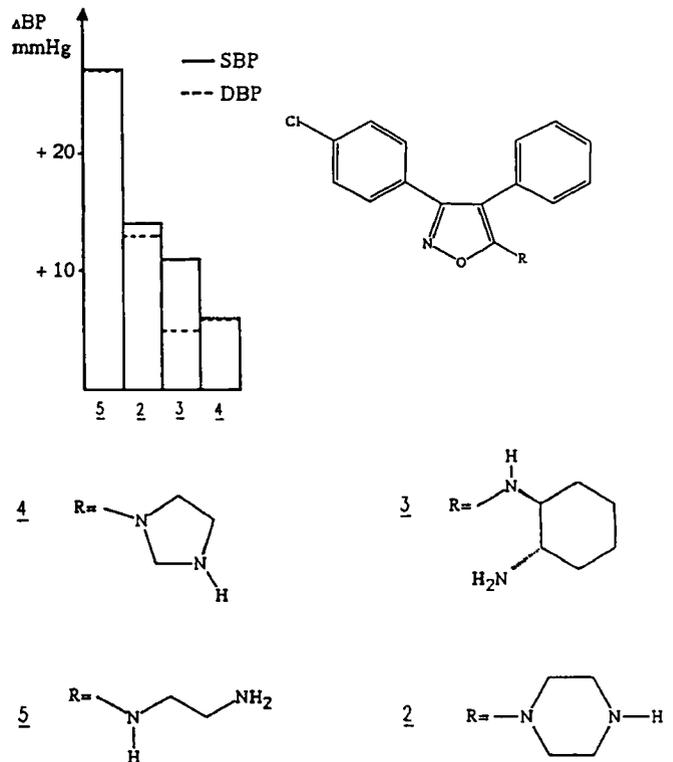
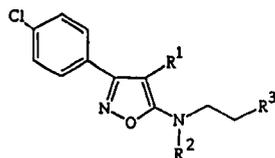
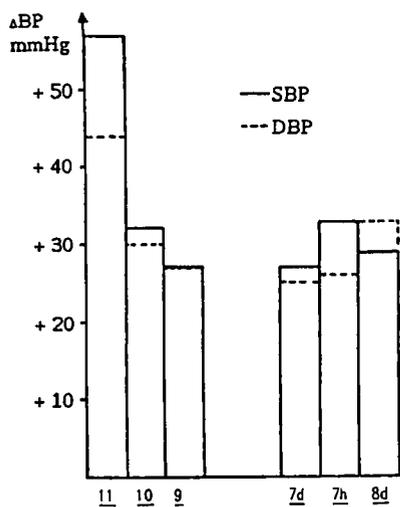


Abb. 3: Blutdruckänderungen nach 10⁻⁵ Mol/Kg, demedullierte Ratte
SBP = systolischer Blutdruck, DBP = diastolischer Blutdruck

Schwankungen) und konstantere Blutdruckkurven bei kontrollierter Beatmung der Versuchstiere resultieren. Die genannte Konzentration wurde gewählt, da hierfür alle Verbindungen vergleichend auswertbar sind.

Als Bezugsstoff wählen wir das Isoxazolderivat 5³⁾, da dieses eine konformativ völlig frei bewegliche Seitenkette besitzt. Vergleicht man in Abb. 3 die Erhöhung des systolischen bzw. diastolischen Blutdrucks von 5 mit der von 2, 3 und 4, so fällt auf, daß jede Einschränkung der Seitenkettenbeweglichkeit mit einem Verlust an hypertensiver Aktivität verbunden ist. Während die Unterschiede zwischen 2 und 3 bezüglich des systolischen Blutdrucks nur wenig ausgeprägt sind, beobachtet man für 4 einen signifikanten Wirkungsverlust, der sich mit der zunehmenden Einschränkung der konformativen Beweglichkeit - der Imidazolidinring ist weniger beweglich als der Piperazinring - erklären läßt. Ist die C₂-Einheit zwischen den beiden N-Atomen wie in 3 Teil eines Cyclohexanringes, so fällt die hypertensive Wirkung deutlich ab (Abb. 3).

Die Untersuchungsergebnisse an der demedullierten Ratte mit Verbindungen, bei denen die ω -ständige Aminofunktion Teil eines weiteren heterocyclischen Ringsystems ist, sind in den Abb. 4-6 zusammengefaßt. Vergleicht man die Blutdrucksteigerung bei 7d, 7h und 8d, die jeweils am Ende der Seitenkette einen Piperazinring tragen aber am Isoxazolring unterschiedlich substituiert sind, so fällt auf, daß der beobachtete Anstieg des Blutdrucks nahezu gleich groß ist, während sich entspr. substituierte Isoxazole mit freier ω -Aminofunktion (10, 11, 9) erheblich unterscheiden (Abb.



	R ¹	R ²	R ³
10	H	C ₆ H ₅	NH ₂
11	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	NH ₂
9	C ₆ H ₅	H	NH ₂
7h	H	C ₆ H ₅	Piperazin
7d	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	Piperazin
8d	C ₆ H ₅	H	Piperazin

Abb. 4: Blutdruckänderungen nach 10⁻⁵ Mol/Kg, demedullierte Ratte
SBP = systolischer Blutdruck, DBP = diastolischer Blutdruck

Tab. 1: Blutdruckänderungen an der narkotisierten Ratte

Mol/kg	10 ⁻⁶		3x10 ⁻⁶		10 ⁻⁵		2x10 ⁻⁵		10 ⁻⁴	
	SBP	DBP	SBP	DBP	SBP	DBP	SBP	DBP	SBP	DBP
2	2	2	11	9	22	12	10	8		
3	3	0	9	8	12	6	-20	-20		
4	1	1	3	2	14	7	20	10		
5	5	5	12	11	17	13	6	4		

SBP - systolischer Blutdruck

DBP - diastolischer Blutdruck

Werte ohne Vorzeichen stellen Blutdruckerhöhungen dar

4). Dies gilt auch für Isoxazole mit einem Piperidin-, Morpholin- bzw. Pyrrolidin-Ring am Ende der Seitenkette (Abb. 5): Verbindungen mit endständigem Piperazinring wirken am stärksten hypertensiv, Piperidin- bzw. Pyrrolidin-Derivate nehmen eine Mittelstellung ein, das Morpholin-Derivat 7c steigert den Blutdruck am wenigsten. Die hypertensive Wirkung dieser Derivate wird somit in erster Linie durch den ω-ständigen Heterocyclus der Seitenkette bestimmt und

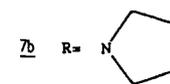
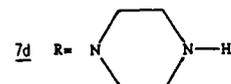
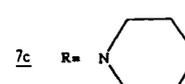
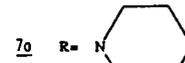
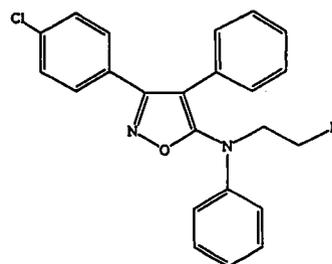
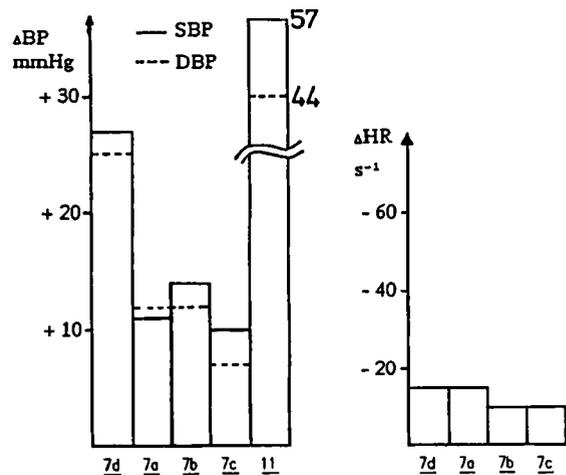


Abb. 5: Blutdruck- und Herzfrequenzänderungen nach 10⁻⁵ Mol/Kg demedullierte Ratte

Tab. 2: Blutdruckänderungen an der demedullierten Ratte

Tests substanz	10 ⁻⁶		3x10 ⁻⁶		10 ⁻⁵		2x10 ⁻⁵		10 ⁻⁴	
	SBP	DBP	SBP	DBP	SBP	DBP	SBP	DBP	SBP	DBP
2	6	5	11	12	14	13				
3	3	6	9	8	11	5				
4	1	2	0	0	6	6	13	12		
5	6	5	5	4	27	27	47	43		

SBP - systolischer Blutdruck

DBP - diastolischer Blutdruck

Werte ohne Vorzeichen stellen Blutdruckerhöhungen dar

nicht, wie bei den vorangehenden Verbindungen und weiteren von uns untersuchten Isoxazolderivaten gezeigt, durch das Substitutionsmuster des Isoxazolrings. Die bisher formulierte Abhängigkeit der Wirkung bei 5-Amino(hetero)alkylisoxazolen von den Substituenten an Position 3, 4 bzw. 5 ist auf diese Verbindungen nicht übertragbar. Erstmals findet man in dieser Reihe eine Absenkung der Herzfrequenz an der demedullierten Ratte mit unterschiedlicher Intensität (Abb. 6): Bei 7f wird die Herzfrequenz um 60 s⁻¹ abgesenkt bei gleichzeitigem leichten Anstieg des systolischen Blutdrucks um 15 mm Hg. Diese Beobachtung gilt

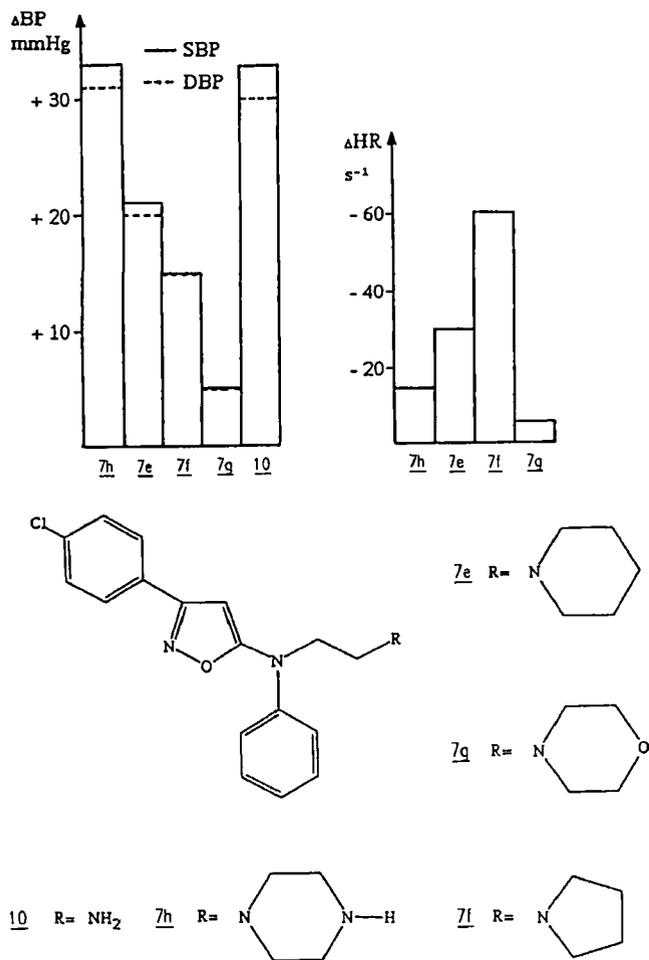


Abb. 6: Blutdruck- und Herzfrequenzänderungen nach 10^{-5} Mol/Kg demedullierte Ratte

SBP = systolischer Blutdruck, DBP = diastolischer Blutdruck

für alle Verbindungen dieser Reihe, jedoch mit unterschiedlicher Intensität (Abb. 5,6,7).

Alle bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, daß die hypertensiven Effekte dieser Isoxazolderivate einem anderen Wirkungsmechanismus folgen. Eine Überlagerung mehrerer Effekte ist ebenfalls denkbar, z.B. Blutdruckerhöhung einerseits und Herzfrequenzabsenkung andererseits. Die Untersuchungen an der narkotisierten Ratte liefern zu dieser Frage keine zusätzlichen Informationen, die Blutdruckeffekte sind im Vergleich zur demedulierten Ratte schwächer ausgeprägt, aber prinzipiell gleich gerichtet. Auf eine gesonderte graphische Darstellung wurde daher verzichtet. Die Herzfrequenzsenkung ist zumindest im Falle der demedulierten Ratte auf eine Eigenwirkung der Substanzen zurückzuführen, da eine zentrale Gegenregulation hier nicht möglich ist. Weitere Untersuchungen zur Klärung des Wirkmechanismus der durch die genannten Isoxazole induzierten Hypertension sind im Gange.

Dem Fonds der Chemischen Industrie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DA 175/3-1) danken wir herzlich für die großzügige Förderung unserer Untersuchungen.

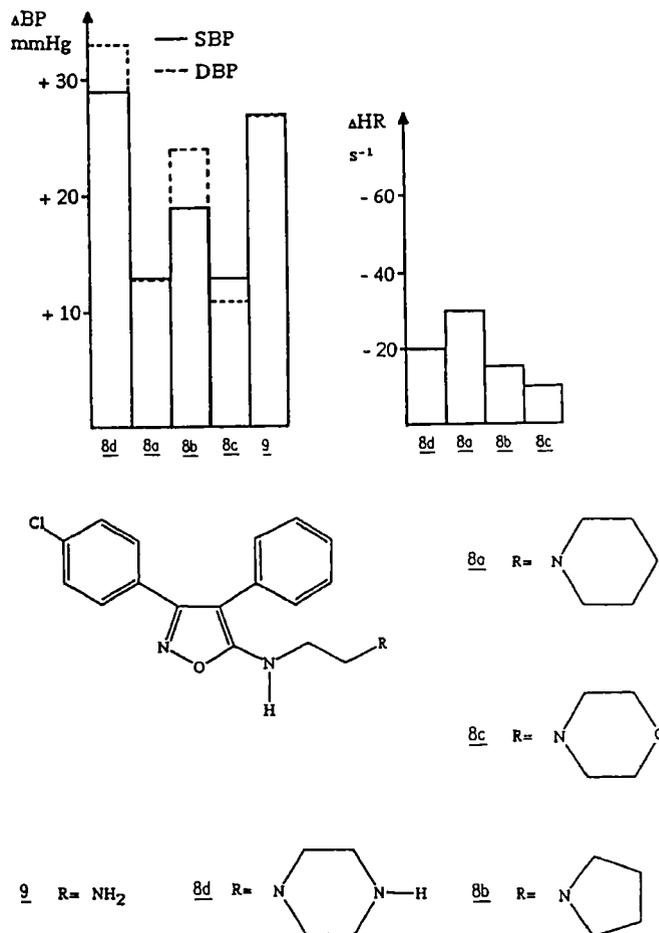


Abb. 7 Blutdruck- und Herzfrequenzänderungen nach 10^{-5} Mol/Kg demedullierte Ratte

SBP = systolischer Blutdruck, DBP = diastolischer Blutdruck

Tab. 3: Blutdruckänderungen an der narkotisierten Ratte

Tests substanz	10^{-6}		3×10^{-6}		10^{-5}		2×10^{-5}		10^{-4}	
	SBP	DBP	SBP	DBP	SBP	DBP	SBP	DBP	SBP	DBP
7a	2	0	1	2	3	2	5	2	L	
7b	0	0	5	3	6	3	8	4	L	
7c	1	0	3	1	13	8	10	5	L	
7d	12	6	7	5	14	5				
7e	5	2	3	1	10	5	15	9	L	
7f	1	1	2	0	-1	-2	11	12	L	
7g	2	0	1	0	0	-1	9	2	L	
7h	10	8	30	17	27	14	23	11	L	
8a	3	1	1	0	15	9	12	2	L	
8b	1	1	3	2	22	11	29	12	L	
8c	1	1	4	0	13	11	16	14	L	
8d	1	2	4	7	15	12	8	6	L	

SBP - systolischer Blutdruck

DBP - diastolischer Blutdruck

L Testung aus Löslichkeitsgründen nicht möglich

Werte ohne Vorzeichen stellen Blutdruckerhöhungen dar

Tab. 4: Blutdruckänderungen an der demedullierten Ratte

Mol/kg	10 ⁻⁶		3x10 ⁻⁶		10 ⁻⁵		2x10 ⁻⁵		10 ⁻⁴	
	SBP	DBP	SBP	DBP	SBP	DBP	SBP	DBP	SBP	DBP
7a	2	3	5	4	11	12	20	16	L	
7b	2	1	4	3	14	12	8	11	L	
7c	3	2	4	3	10	7	11	9	L	
7d	12	14	21	21	27	25				
7e	2	2	4	2	21	20	16	15	L	
7f	4	5	2	3	15	15	31	29	L	
7g	2	2	2	0	5	5	13	6	L	
7h	3	1	8	9	33	31	12	9	L	
8a	2	2	4	3	13	13	21	13	L	
8b	1	2	1	1	19	24	44	37	L	
8c	3	3	4	4	13	11	24	24	L	
8d	3	4	5	4	29	33	23	26	L	

SBP - systolischer Blutdruck

DBP - diastolischer Blutdruck

L Testung aus Löslichkeitsgründen nicht möglich

Werte ohne Vorzeichen stellen Blutdruckerhöhungen dar

Tab. 5: Herzfrequenzsenkungen (s⁻¹)

Mol/kg	10 ⁻⁶		3x10 ⁻⁶		10 ⁻⁵		2x10 ⁻⁵	
	D	N	D	N	D	N	D	N
7a	0	0	0	0	15	30	30	45
7b	0	0	10	8	10	30	20	30
7c	0	0	10	0	10	0	10	10
7d	0	15	0	15	15	30		
7e	0	10	20	30	30	50	25	55
7f	20	20	30	25	60	60	50	50
7g	0	0	0	0	0	10	30	30
7h	0	0	10	10	15	40	20	40
8a	0	0	10	20	30	40	40	80
8b	0	10	10	15	15	40	30	75
8c	0	0	10	0	10	10	20	40
8d	5	0	10	0	20	20	30	45

D demedullierte Ratte

N narkotisierte Ratte

Experimenteller Teil

Allg. Angaben s.⁸⁾.

5-Piperazino-3-(4-chlorphenyl)-4-phenylisoxazol (2)

290 mg (1 mmol) 5-Chlor-3-(4-chlorphenyl)-4-phenylisoxazol (1)³⁾ und 2 g wasserfreies Piperazin werden in 30 ml trockenem THF 15 h unter

Feuchtigkeitsausschluß rückfließend gekocht. Die noch warme Lösung wird von ausgefallenem Piperazinhydrochlorid abgesaugt und i. Vak. eingengt. Der ölige Rückstand wird mit H₂O angerieben; 2 fällt aus, Piperazin geht in Lösung. Man saugt scharf ab, wäscht mehrfach mit H₂O und kristallisiert aus Methanol/H₂O um. Ausb. 200 mg (60%), Schmp. 139-140°C. C₁₉H₁₈ClN₃O (339.8) Ber. C 67.2 H 5.34 N 12.37 Gef. C 67.0 H 5.30 N 12.31. IR: 3420 (NH), 1620 (C=N) cm⁻¹. ¹H-NMR: δ (ppm) = 1.6 (s, 1H austauschbar, NH); 2.75-2.97 (m, 4H, CH₂); 3.15-3.33 (m, 4H, CH₂); 7.12-7.42 (m, 9H, Arom.)

N¹-3-(4-Chlorphenyl)-4-phenylisoxazol-5-yl-1,2-diaminocyclohexan (3)

400 mg 1 (1.38 mmol) und 8 g trans-1,2-Diaminocyclohexan werden in 15 ml trockenem THF 30 h unter Feuchtigkeitsausschluß rückfließend erhitzt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels entfernt man den Überschuß an 1,2-Diaminocyclohexan durch Kugelrohrdestillation (50°C Luftbadtemp., Ölpumpenvacuum). Der verbleibende Rückstand wird sc an Kieselgel mit Methanol/wäßrigem NH₃ (25%) 99:1 gereinigt (R_f=0.35). Umkristallisation aus Methanol ergibt einen weißen, kristallinen Feststoff. Ausb. 350 mg (70%), Schmp. 168°C. C₂₁H₂₂ClN₃O (367.9) Ber. 68.6 H 6.03 N 11.42 Gef. C 68.4 H 6.21 N 11.30. IR: 3250, 3200 (NH₂, NH); 1620 (C=N) cm⁻¹. ¹H-NMR: δ (ppm) = 1.0-2.65 (m, 11H, Cyclohexyl, NH₂); 3.04-3.48 (m, 1H, CH); 4.88 (d, 1H, J = 9 Hz, austauschbar, NH); 7.11-7.52 (m, 9H, Arom.)

5-(Tetrahydroimidazo)-3-(4-chlorphenyl)-4-phenylisoxazol (4)

580 mg 1 (2 mmol) und 3 g Tetrahydroimidazol (Rohprodukt, synthetisiert nach Krässig³⁾) werden 24 h in 15 ml trockenem THF rückfließend gekocht. Man zieht das Lösungsmittel ab und isoliert aus dem öligen Rückstand 4 durch mehrfache SC an Kieselgel mit Methanol/wäßrigem NH₃ (25%) 99:1 (R_f=0.4). Bedingt durch die bekannte Instabilität von Tetrahydroimidazol³⁾ treten mehrere Nebenprodukte auf, die nur durch mehrfache SC abgetrennt werden können. 4 ist ebenfalls instabil und kann deshalb weder umkristallisiert noch längere Zeit in Lösung gehalten werden. Das nach SC anfallende Öl wird sofort tiefgefroren (-18°C) und unmittelbar vor der pharmakologischen Prüfung erneut chromatographiert, Ausb. 124 mg (19%). C₁₈H₁₆ClN₃O (325.8). IR: 1625 cm⁻¹ (C=N). ¹H-NMR: δ (ppm) = 2.91-3.49 (m, 4H, CH₂); 3.29 (s, 1H, austauschbar, NH); 4.16 (d, 2H, J = 10 Hz, N-CH₂-N); 7.1-7.45 (m, 9H, Arom.)

Die 2-Piperidin-, 2-Pyrrolidin-, 2-Morpholin und 2-Piperazinethylanilin-Seitenketten werden abweichend von Lit.⁶⁾ wie folgt dargestellt:

5 g (32 mmol) 2-Chlorethylanilin⁹⁾ werden mit dem fünffachen molaren Überschuß der entspr. Base ohne Lösungsmittel (bei Piperidin, Pyrrolidin, Morpholin) bzw. in trockenem 1,2-Dimethoxyethan (Piperazin) bis zum Verschwinden des Edukts (DC-Kontrolle, 2-5 h) bei 100-130°C gerührt, mit 1 g Na₂CO₃ versetzt und anschließend i. Vac. fraktioniert destilliert (10⁻² bar).

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der Verbindungen 7a-h

10 mmol 2-Piperidino-, 2-Pyrrolidino-, 2-Piperazino- oder 2-Morpholinoethylanilin werden in 10 ml trockenem THF vorgelegt. Bei -78°C (Aceton/Trockeneis) tropft man 9 mmol n-BuLi (2.3 molar in n-Hexan) zu, rührt 20 min bei dieser Temp. und anschließend noch 1 h bei 0°C. Man kühlt wieder auf -78°C, tropft 2 mmol 5-Chlor-3-(4-chlorphenyl)-4-phenylisoxazol (1) bei 7a-d bzw. 5-Chlor-3-(4-chlorphenyl)isoxazol¹⁰⁾ bei 7e-h in 10 ml trockenem THF zu und bringt unter Rühren über Nacht auf Raumtemp. Die braungefärbte Lösung wird mit 30 ml Ether und 20 ml H₂O versetzt und einige min intensiv gerührt. Man trennt die org. Phase ab, zieht das Lösungsmittel ab, nimmt in CH₂Cl₂ auf und trocknet über Na₂SO₄. Isolierung und Reinigung durch SC an Kieselgel. Eluens und R_f-Werte sind bei den einzelnen Verbindungen vermerkt.

3-(4-Chlorphenyl)-4-phenyl-5-(2-piperidinoethylanylino)isoxazol (7a)

SC (SiO₂; THF/wäßriges NH₃ (25%) 99:1, R_F=0.55).- Langsam kristallisierendes, farbloses Öl, Umkristallisation aus Petrolether (50-70°C) gibt einen weißen, pulverigen Feststoff, Ausb. 82%, Schmp. 109-110°C.- C₂₈H₂₈ClN₃O (458.0) Ber. C 73.4 H 6.16 N 9.17 Gef. C 73.1 H 6.37 N 9.00.- IR: 2960 (CH), 1620 (C=N) cm⁻¹.- ¹H-NMR: δ (ppm) = 1.31-1.71 (m, 6H, CH₂); 2.3-2.51 (m, 4H, CH₂); 2.61 (t, 2H, J = 8 Hz, CH₂-Piperidin); 3.93 (t, 2H, J = 8 Hz, CH₂-N-Ph); 6.81-7.2 (m, 10H, Arom.); 7.2-7.45 (m, 4H, Arom.)

3-(4-Chlorphenyl)-4-phenyl-5-(2-pyrrolidinoethylanylino)isoxazol (7b)

2xSC (SiO₂; Essigsäureethylester/Methanol/wäßriges NH₃ 85:15:0.1, R_F=0.45), langsam kristallisierendes Öl, Ausb. 78%, Schmp. 108°C (SC).- C₂₇H₂₆ClN₃O (444.0) Ber. C 73.0 H 5.90 N 9.46 Gef. C 72.6 H 5.63 N 9.22.- IR: 1620 cm⁻¹ (C=N).- ¹H-NMR: δ (ppm) = 1.65-1.88 (m, 4H, CH₂); 2.43-2.63 (m, 4H, CH₂); 2.73 (t, 2H, J = 8 Hz, CH₂-Pyrrolidin); 3.9 (t, 2H, J = 8 Hz, CH₂-N-Ph); 6.83-7.2 (m, 10H, Arom.); 7.2-7.45 (m, 4H, Arom.)

3-(4-Chlorphenyl)-5-(2-morpholinoethylanylino)-4-phenyl-isoxazol (7c)

2xSC (SiO₂; Essigsäureethylester, R_F=0.5), hellgelbes Öl, das an der Hochvacuumpumpe langsam (10 h) erstarrt, umkristallisiert aus Petrolether (50-70°C). Ausb. 88%, Schmp. 94°C.- C₂₇H₂₆ClN₃O₂ (460.0) Ber. C 70.5 H 5.70 N 9.14 Gef. C 70.8 H 5.94 N 9.07.- IR: 1610 cm⁻¹ (C=N).- ¹H-NMR: δ (ppm) = 2.35-2.54 (m, 4H, CH₂); 2.65 (t, 2H, J = 7 Hz, CH₂-Morpholin); 3.57-3.74 (m, 4H, CH₂); 3.92 (t, 2H, J = 7 Hz, CH₂-N-Ph); 6.78-7.18 (m, 10H, Arom.); 7.18-7.45 (m, 4H, Arom.)

3-(4-Chlorphenyl)-4-phenyl-5-(2-piperazinoethylanylino)isoxazol (7d)

SC 1: SiO₂; Essigsäureethylester; Nebenprodukt (R_F=0.35) wird eluiert. SC 2: SiO₂; Methanol/wäßriges NH₃ (25%) 99:1; Produkt 7d und Edukt 2-Piperazinoethylanylino werden eluiert (R_F=0.2-0.3), eine Trennung ist an Kieselgel nicht möglich. Das durch SC an Kieselgel vorgereinigte Gemisch wird einer dritten SC an reversed-phase Material unterzogen. Glassäule 200x15 mm, Füllung LiChroprep RP-8, Korngröße 40-63 μm (Merck 9362). Die Säule wird trocken gepackt und mit Methanol/H₂O/wäßrigem NH₃ (25%) 50:49.5:0.5 konditioniert. Das vorgereinigte Gemisch wird aus Methanol/H₂O 30:70 aufgetragen. Eluiert wird mit Stufengradienten beginnend mit Methanol/H₂O/wäßrigem NH₃ (25%) 50:49.5:0.5 (100 ml), dann 75:24.5:0.5 (100 ml) und zuletzt 99:0:1 (100 ml).

Bei einem Fraktionsvolumen von 15 ml ist eine vollständige Trennung möglich. Das Edukt 2-Piperazinoethylanylino wird zuerst eluiert (75:24.5:0.5), 7d fließt erst bei der nächsten Gradientenstufe von der Säule. Farbloses Öl, erstarrt nach einigen Tagen an der Hochvacuumpumpe. Umkristallisation aus Petrolether (50-70°C): feines, weißes Pulver. Ausb. 48%, Schmp. 164°C.- C₂₇H₂₇ClN₄O (459.0) Ber. C 70.7 H 5.93 N 12.21 Gef. C 70.3 H 5.58 N 11.92.- IR: 1600 cm⁻¹ (C=N).- ¹H-NMR: δ (ppm) = 2.12 (s, br., 1H, austauschbar, NH); 2.27-2.51 (m, 4H, CH₂); 2.63 (t, 2H, J = 7 Hz, CH₂-Piperazin); 2.72-2.91 (m, 4H, CH₂); 3.91 (t, 2H, J = 7 Hz, CH₂-N-Ph); 6.83-7.2 (m, 10H, Arom.), 7.2-7.49 (m, 4H, Arom.).- MS (70 eV): m/z = 458 (<1, M⁺), 291 (9), 256 (4), 254 (3), 226 (2), 137 (<1), 99 (100), 87 (14), 77 (6).

3-(4-Chlorphenyl)-5-(2-piperidinoethylanylino)isoxazol (7e)

Abweichend von der allgemeinen Synthesevorschrift wird nach dem Rühren über Nacht noch 1 h unter N₂ rückflußerhitzt. SC (SiO₂/Essigsäureethylester, R_F=0.5, starkes tailing). 7e fällt nach SC als hellgelber Feststoff an, der nach Umkristallisation aus Petrolether (50-70°C) fast weiß ist. Ausb. 86%, Schmp. 94°C.- C₂₇H₂₄ClN₃O (381.9) Ber. C 69.2 H 6.33 N 11.00 Gef. C 69.5 H 6.71 N 10.63.- IR: 1610 cm⁻¹ (C=N).- ¹H-NMR: δ (ppm) = 1.35-1.71 (m, 6H, CH₂), 2.32-2.53 (m, 4H, CH₂), 2.62 (t, 2H, J = 7

Hz, CH₂-Piperidin); 3.97 (t, 2H, J = 7 Hz, CH₂-N-Ph), 5.3 (s, 1H, CH); 7.2-7.48 (m, 7H, BB' und Arom.); 7.65 (AA', 2H, J = 11 Hz).

3-(4-Chlorphenyl)-5-(2-pyrrolidinoethylanylino)isoxazol (7f)

Abweichend von der allgemeinen Synthesevorschrift wird nach dem Rühren über Nacht noch 1 h unter N₂ rückflußerhitzt. SC (SiO₂/Essigsäureethylester, R_F=0.35). 7f fällt als hellgelbes Öl an, das nach Anreiben mit Ether erstarrt und aus Ether/Petrolether (50-70°C) umkristallisiert wird. Ausb. 80%, Schmp. 84-85°C.- C₂₁H₂₂ClN₃O (367.9) Ber. C 68.6 H 6.03 N 11.42 Gef. C 68.2 H 6.40 N 11.08.- IR: 1615 cm⁻¹ (C=N).- ¹H-NMR: δ (ppm) = 1.65-1.91 (m, 4H, CH₂); 2.42-2.68 (m, 4H, CH₂); 2.8 (t, 2H, J = 7 Hz, CH₂-Pyrrolidin); 4.0 (t, 2H, J = 7 Hz, CH₂-N-Ph); 5.31 (s, 1H, CH); 7.16-7.51 (m, 7H, BB' und Arom.); 7.68 (AA', 2H, J = 11 Hz).

3-(4-Chlorphenyl)-5-(2-morpholinoethylanylino)isoxazol (7g)

Abweichend von der allgemeinen Synthesevorschrift wird nach dem Rühren über Nacht 45 min unter N₂ rückflußerhitzt. SC (SiO₂/Essigsäureethylester, R_F=0.5). 7g fällt als fast weißer Feststoff an, der aus Ether/Petrolether (50-70°C) umkristallisiert wird. Ausb. 84%, Schmp. 85°C.- C₂₁H₂₂ClN₃O₂ (383.9) Ber. C 65.7 H 5.78 N 10.95 Gef. C 65.9 H 5.86 N 10.74.- IR: 1610 cm⁻¹ (C=N).- ¹H-NMR: δ (ppm) = 2.4-2.56 (m, 4H, CH₂); 2.66 (t, 2H, J = 7 Hz, CH₂-Morpholin); 3.55-3.76 (m, 4H, CH₂); 3.98 (t, 2H, J = 7 Hz, CH₂-N-Ph); 5.28 (s, 1H, CH); 7.21-7.51 (m, 7H, BB' und Arom.); 7.68 (AA', 2H, J = 11 Hz).

3-(4-Chlorphenyl)-5-(2-piperazinoethylanylino)isoxazol (7h)

Abweichend von der allgemeinen Synthesevorschrift wird nach dem Rühren über Nacht noch 1 h unter N₂ rückflußerhitzt. Vorreinigung durch SC an Kieselgel mit Methanol/wäßrigem NH₃ (25%) 99:1 (R_F=0.25), wobei 7h und überschüssiges Edukt (2-Piperazinoethylanylino) nicht getrennt werden können. Die Mischfraktionen werden durch SC an reversed-phase Material analog 7d getrennt. Als Eluenten werden folgende Stufengradienten verwendet: MeOH/H₂O/wäßriges NH₃ (25%) 50:49.5:0.5; Elution des Eductes; 75:24.5:0.5; Elution von 7h, aus Ether umkristallisiert, Ausb. 73%, Schmp. 104°C (Ether).- C₂₁H₂₃ClN₄O (382.9) Ber. C 65.9 H 6.05 N 14.63 Gef. C 65.7 H 6.19 N 14.52.- IR: 1615 cm⁻¹ (C=N).- ¹H-NMR: δ (ppm) = 1.46 (s, br., austauschbar, NH); 2.34-2.54 (m, 4H, CH₂); 2.66 (t, 2H, J = 7 Hz, CH₂-Piperazin); 2.77 (m, 4H, CH₂); 3.99 (t, 2H, J = 7 Hz, CH₂-N-Ph); 5.29 (s, 1H, CH); 7.17-7.52 (m, 7H, BB' und Arom.); 7.68 (AA', 2H, J = 11 Hz).- MS (70 eV): m/z = 382 (3, M⁺), 180 (4), 178 (3), 150 (4), 137 (5), 99 (100).

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der Verbindungen 8a-d

2 mmol 5-Chlor-3-(4-chlorphenyl)-4-phenylisoxazol (1) werden in 15 ml trockenem THF gelöst und mit 10 mmol

- 1-(2-Aminoethyl)piperidin (a)
- 1-(2-Aminoethyl)pyrrolidin (b)
- 1-(2-Aminoethyl)morpholin (c)
- 1-(2-Aminoethyl)piperazin (d)

unter Feuchtigkeitsausschluß und N₂ bis zum Verschwinden von 1 (DC-Kontrolle, 12-48 h) rückfließend gekocht. Die Reaktionszeit läßt sich durch den Einsatz von Dioxan als Lösungsmittel verkürzen (höherer Siedepunkt), es entstehen dann jedoch mehrere Nebenprodukte.

Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert und der Rückstand an Kieselgel gereinigt; Eluens und R_F-Werte sind bei den einzelnen Verbindungen vermerkt.

3-(4-Chlorphenyl)-4-phenyl-5-(2-piperidinoethylamino)isoxazol (8a)

SC (SiO₂/Essigsäureethylester, R_F=0.3).- 8a fällt als farbloses Öl an, das schnell kristallisiert und aus Methanol umkristallisiert wird. Ausb. 78%,

Schmp. 130°C.- $C_{22}H_{24}ClN_3O$ (381.9) Ber. C 69.2 H 6.33 N 11.00 Gef. C 69.0 H 6.23 N 10.81.- IR: 3370 (NH); 1635 (C=N) cm^{-1} .- 1H -NMR: δ (ppm) = 1.33-1.63 (m, 6H, CH_2); 2.29-2.5 (m, 4H, CH_2); 2.53 (t, 2H, J = 6 Hz, CH_2 -Piperidin); 3.44 (t, 2H, J = 6 Hz, CH_2 -N-Isox.); 5.68 (s, 1H, austauschbar, NH), 7.09-7.54 (m, 9H, Arom.)

3-(4-Chlorphenyl)-4-phenyl-5-(2-pyrrolidinoethylamino)isoxazol (8b)

SC (SiO_2 /Essigsäureethylester/Methanol/wäßriges NH_3 80:19.5:0.5). **8b** fällt als gelblicher Feststoff an, der aus Methanol umkristallisiert wird. Ausb. 81%, Schmp. 138°C.- $C_{21}H_{22}ClN_3O$ (367.9) Ber. C 68.6 H 6.03 N 11.42 Gef. C 68.9 H 6.25 N 11.25.- IR: 3390 (NH); 1630 (C=N) cm^{-1} .- 1H -NMR: δ (ppm) = 1.62-1.9 (m, 4H, CH_2); 2.41-2.66 (m, 4H, CH_2); 2.74 (t, 2H, J = 7 Hz, CH_2 -Pyrrolidin); 3.48 (q, 2H, J = 7 Hz, CH_2 -N-Isox.); 5.46 (t, 1H, J = 7 Hz, austauschbar, NH); 7.06-7.48 (m, 9H, Arom.).

3-(4-Chlorphenyl)-5-(2-morpholinoethylamino)-4-phenyl-isoxazol (8c)

SC (SiO_2 /Essigsäureethylester/Methanol 95:5, $R_f=0.5$), **8c** fällt als weißer Feststoff an, nach Umkristallisation aus Methanol große, farblose Kristalle. Ausb. 80%, Schmp. 146°C.- $C_{21}H_{22}ClN_3O_2$ (383.9) Ber. C 65.7 H 5.78 N 10.95 Gef. C 65.8 H 5.65 N 10.67.- IR: 3320 (NH); 1625 (C=N) cm^{-1} .- 1H -NMR: δ (ppm) = 2.35-2.54 (m, 4H, CH_2); 2.59 (t, 2H, J = 7 Hz, CH_2 -Morpholin); 3.46 (q, 2H, J = 7 Hz, CH_2 -N-Isox.); 3.56-3.75 (m, 4H, CH_2); 5.48 (t, 1H, J = 7 Hz, austauschbar, NH); 7.08-7.54 (m, 9H, Arom.).

3-(4-Chlorphenyl)-4-phenyl-5-(2-piperazinoethylamino)-isoxazol (8d)

Durch 2xSC (SiO_2 /Methanol/wäßriges NH_3 (25%) 99:1) wird **8d** ($R_f=0.25$) vom Nebenprodukt abgetrennt. **8d** fällt als farbloses Öl an, das nach Etherzusatz kristallisiert, Ausb. 30%. Bessere Ausbeuten werden erreicht, wenn man nach der allgemeinen Synthesvorschrift für die Verbindungen **7** vorgeht, jedoch n-BuLi nur im 0.2 molaren Verhältnis einsetzt und nach dem Rühren über Nacht noch 4 h rückflußerhitzt (Ausb. 65%), Schmp. 109°C.- $C_{21}H_{23}ClN_4O$ (382.9) Ber. C 65.9 H 6.05 N 14.63 Gef. C 66.2 H 6.41 N 14.50.- IR: 3360; 3310 (NH); 1630 (C=N) cm^{-1} .- 1H -NMR: δ (ppm) = 1.85 (s, 1H, br., austauschbar, NH); 2.27-2.45 (m, 4H, CH_2); 2.53 (t, 2H, J = 7 Hz, CH_2 -Piperazin); 2.65-2.9 (m, 4H, CH_2); 3.41 (q, 2H, J = 7 Hz, CH_2 -N-Isox.); 5.63 (t, 1H, J = 7 Hz, austauschbar, NH); 7.05-7.47 (m, 9H, Arom.).- MS (70 eV): m/z = 382 (28, M^+), 340 (7), 256 (5), 254 (5), 226 (6), 99 (100).

Pharmakologische Testmodelle

Allgemeine Angaben

Versuchstiere

Männliche Sprague-Dawley Ratten, 150-200 g (Stamm SIV 50, Fa. SA-VO, Dr. Ivanovas, Kiblegg/Allgäu), sie wurden mit Altromin Standard Diät (Fa. Altromin), Lage und Wasser ad libitum, ernährt.

Lösung der Testverbindungen

Die höchste Konzentration (2×10^{-5} Mol/ml) wurde im allgemeinen durch Lösen der Substanz (Hydrochlorid) in demineralisiertem Wasser oder der Base in der equimolaren Menge Salzsäure hergestellt. Die weiteren Konzentrationen (10^{-5} , 3×10^{-6} , 10^{-6}) wurden durch Verdünnen eines Aliquots der höchsten Konzentration mit Ringerlösung (DRF) erhalten. Einige Verbindungen gaben mit Ringerlösung gallertartige Ausfällungen, hier wurde demineralisiertes Wasser verwendet, ggf. war ein DMSO Zusatz von 3-10% notwendig. Ein Vorversuch zeigte, daß diese Menge DMSO keine Eigenwirkung auf die Meßparameter Blutdruck und Herzfrequenz hatte. Erst ab $\approx 20\%$ DMSO führte das Lösungsmittelgemisch zu Kreislaufreaktionen.

Häufig war es notwendig, die Lösungen vor jedem Versuch frisch herzustellen, da nach einiger Zeit, besonders bei den höheren Konzentrationen, Ausfällungen auftraten. Untersuchung dieser Niederschläge zeigte, daß es sich nicht um Zersetzungsprodukte handelt, sondern um die aus der übersättigten Lösung ausfallenden Testverbindungen. Dc wurde sichergestellt, daß die Testlösungen für die Dauer der Versuche stabil und frei von Zersetzungsprodukten sind. Das Lösungsmittelvolumen wurde so gewählt, daß die jeweilige Injektionsmenge (in μl) dem Körpergewicht der Ratte (in g) entsprach, d.h. ein Tier mit 200 g erhielt 200 μl der jeweiligen Konzentration. Hierzu muß die jeweilige Konzentrationsstufe, also z.B. 10^{-4} Mol, 10^{-5} Mol etc. in 1 ml Lösungsmittel gelöst sein.

Demedullierte Ratte ("pithed rat"⁷)

Die Versuchstiere wurden mit Ether narkotisiert und auf einem entsprechend der Körpertemp. angewärmten Operationstisch gelagert. Anschließend wurde die linke und rechte Arteria carotis communis und beide Vagusnerven freipräpariert, und das Tier wurde tracheotomiert. Medulla oblongata und Rückenmark wurden durch Einführen eines V2A Metallstabes (Durchmesser 1.5 mm) über die Orbita ins Rückenmark zerstört. Die Ratten wurden sofort nach Demedullieren künstlich beatmet. Beide Vagusnerven wurden durchtrennt und beide Carotiden ligiert. Für die Blutdruckmessung und -registrierung wurde ein PE-50 Katheter in die Arteria carotis implantiert, der mit heparinisierter Ringerlösung (DRF) gefüllt ist. Der Katheter wird mit einem Statham pressure transducer (P 23 Db) verbunden. Blutdruck und die mit einem Integrator berechnete Herzfrequenz wurde mit einem Gould-Brush-2600-Schreiber fortlaufend registriert. Nach Demedullieren wurde mindestens 30 min gewartet, um stabile Kreislaufverhältnisse zu erhalten, bevor mit dem eigentlichen Versuch begonnen wurde.

Für die Injektion der Testsubstanzen wurde den Tieren ein PE-10 Katheter in eine Vena femoralis implantiert, durch den die entspr. Lösung, beginnend mit der Konzentration 10^{-6} Mol/kg (dann 3×10^{-6} , 10^{-5} , 2×10^{-5} , 10^{-4}) langsam (über mindestens 2 min, bei starkem Blutdruckabfall noch langsamer) injiziert wurden. Nach jeder Injektion wurde der Katheter mit 150 μl Ringerlösung (DRF) gespült.

Zwischen den einzelnen Injektionen wurde gewartet, bis die jeweiligen Blutdruckausgangswerte wieder erreicht waren, mindestens jedoch 20 min und höchstens 45 min.

Narkotisierte Ratte

Die Tiere wurden mit 100 mg/kg Thiobutabarbital (Inaktin®, sehr langsam i.v. in eine Schwanzvene injiziert) narkotisiert und auf einem beheizbaren Operationstisch (37°C) gelagert. Die Ratten wurden anschließend tracheotomiert und bei Bedarf künstlich beatmet. Eine Arteria carotis wurde unter Schonung der sie begleitenden Nerven freipräpariert und ein PE-50 Katheter implantiert.

Messung und Registrierung von Herzfrequenz und Blutdruck sowie Injektion der Testsubstanzen erfolgten wie bei der demedullierten Ratte beschrieben.

Auswertung

Ausgewertet wurde in beiden Modellen die nach Injektion maximal erreichten Blutdruckänderungen und die zu diesem Zeitpunkt gemessene Herzfrequenzdifferenz, jeweils bezogen auf den Wert vor Injektion.

Für jede Verbindung wurden mindestens 6 Versuchstiere verwendet, bei gut wirksamen Verbindungen 8-10, wobei jeweils die Hälfte der Tiere narkotisiert, die anderen demedulliert wurde. Alle Blutdruck- und Herzfrequenzwerte sind Mittelwerte aus allen Tieren des jeweiligen Testmodells (pro Testsubstanz).

Blutdrucksteigerungen unter 5 mm Hg können unberücksichtigt bleiben, da solch geringe Effekte auch schon während der Injektion des Lösungsmittelgemisches vorübergehend auftreten können.

Wegen der relativ kleinen Zahl an Versuchstieren pro Substanz können diese Versuche nur als Screening angesehen werden. Für quantitativ genauere Dosis-Wirkungs-Kurven wären mehr Versuchstiere notwendig. Der von uns aufgezeigte Weg bietet jedoch die Möglichkeit, durch Prüfung möglichst vieler Substanzen umfassende Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erhalten.

Literatur

- 1 G. Dannhardt, A. Grobe, S. Gußmann, R. Obergrusberger und K. Zie-reis, *Arch. Pharm. (Weinheim)* 321, 163 (1988).
- 2 G. Dannhardt und S. Laufer, *Synthesis* 1989, 12.
- 3 G. Dannhardt, S. Laufer und I. Obergrusberger, *Synthesis* 1989, 275.
- 4 H. Krässig, *Makromol. Ch.* 17, 77, 105 (1955/56).
- 5 T. Tatee, S. Kurashige, A. Shiozawa, K. Narita, M. Takei, S. Ito, H. Miyazaki, H. Yamanaka, M. Mizugaki, T. Sakamoto und H. Fukuda, *Chem. Pharm. Bull.* 34, 1634 (1986).
- 6 A. Larizza und G. Brancaccio, *Gazz. Chim. Ital.* 89, 2402 (1959); *Janssen Pharmaceutica N.V., Neth. Appl.* 6, 507, 312 (10.12.1965), *C.A.* 64, 12705e (1966).
- 7 J.S. Gillespie und T.C. Muir, *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 30, 78 (1967).
- 8 G. Dannhardt, A. Grobe und R. Obergrusberger, *Arch. Pharm. (Weinheim)* 320, 582 (1987).
- 9 A.P. Sineokov, F.N. Gladysheva und U.S. Ethis, *Zh. Orig. Khim.* 4, 284 (1968); *C.A.* 68, 104644h (1968).
- 10 I. Obergrusberger, *Dissertation, Universität Regensburg*, 1989.

[Ph736]