

2,4-Dinitro-3-(2-indolyl)-glutarsäurediäthylester (11)

Eine Lösung von 0,58 g Indol-2-aldehyd (4 mmol) und 2 g Nitroessigsäureäthylester (15 mmol) in 5 ml Äthanol, der 8 Tropfen Butylamin zugesetzt werden, wird kurze Zeit auf dem Wasserbad bis zur Dunkelrotfärbung erhitzt. Die nach Einengen der Lösung auskristallisierende Substanz wird aus Äthanol umkristallisiert. Ausb.: 0,6 g (38,2 % d. Th.), Schmp.: 128–130°. Schwach rosa gefärbte Kristalle, schwer löslich in Chloroform, löslich in Aceton. $C_{17}H_{19}N_3O_8$ (393,35) Ber.: C 51,91 H 4,87 N 10,68; Gef.: C 52,22 H 4,65 N 10,71. IR: ν_{CO} : 1750, 1730 cm^{-1} ; ν_{NO_2} 1565 cm^{-1} . NMR δ (ppm): 0,8–1,4 und 3,9–4,6 (m, $-C_2H_5$), 4,97–5,36 (m, Ind-CH) 6,17–6,44 (m, CH- NO_2).

Anschrift: Prof. Dr. E. Röder, An der Immenburg 4, 5300 Bonn-Endenich

[Ph 802]

Arch. Pharm. (Weinheim) 310, 979–987 (1977)

Klaus Rehse, Thomas Lang⁺ und Norbert Rietbrock

Gerinnungsphysiologische Aktivität von 2-Aryl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-benzocyclohepten-1,3-dionen

Aus dem Institut für Pharmazie und dem Institut für Klinische Pharmakologie der Freien Universität Berlin
(Eingegangen am 18. Januar 1977)

14 Titelverbindungen wurden synthetisiert. Neun zeigten nach einmaliger oraler Applikation bei Ratten blutgerinnungshemmende Eigenschaften. Fünf verringerten die Gerinnungsfähigkeit des Blutes (Quick-Zeit) auf weniger als 25 % der Norm. Bei **4i** (340 mg/kg) wurde dieses Niveau nach 5 h erreicht und 50 h lang aufrechterhalten. Die maximale Verlängerung der Quick-Zeit wurde hier nach 24 h beobachtet.

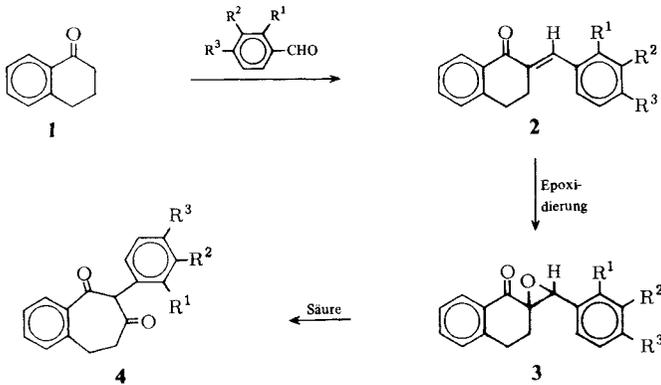
Anticoagulant Activity of 2-Aryl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-benzocycloheptene-1,3-diones

14 Title compounds have been synthesized. Nine of them showed anticoagulant activity in rats after oral administration of a single dose. Five compounds lowered the coagulability (Quick-time) to less than 25 % of normal. With **4i** (340 mg/kg) this level was reached after 5 h and maintained for 50 h. Maximum prolongation of the one stage prothrombin time (Quick) occurred 24 h after administration.

+ Auszug aus der Dissertation T. Lang, Berlin 1976.

Neben den Derivaten des 4-Hydroxycumarins gehören die 2-Aryl-1,3-indandione zu den am besten untersuchten indirekten Antikoagulantien. Im Gegensatz zu den erstgenannten werden sie heute in der Humanmedizin jedoch nicht eingesetzt, weil sie teilweise recht erhebliche Nebenwirkungen wie Hautnekrosen, Agranulocytosen, Leukopenie und allergische Reaktionen zeigen. Es erschien uns daher von Interesse zu prüfen, ob die bisher pharmakologisch noch nicht untersuchten homologen 2-Aryl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-benzocyclohepten-1,3-dione ebenfalls blutgerinnungshemmende Aktivitäten aufweisen. Gegebenenfalls wäre dann festzustellen, ob hier günstigere pharmakologische Profile als bei den 1,3-Indandionen gegeben bzw. zu erwarten sind.

Nach im Prinzip bekannten Methoden wurden daher 14 Substanzen der gewünschten Verbindungsklasse synthetisiert. Die Auswahl der Substituenten erfolgte in lokaler Anlehnung an das *Topliss-Modell*¹⁾. Die Titelverbindungen sind mit Ausnahme von **4a** in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.



2,3,4	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n
R ¹	H	H	H	H	Cl	H	H	H	H	H	F	H	H	H
R ²	H	H	H	OCH ₃	H	Cl	H	Cl	NO ₂	NO ₂	H	F	H	H
R ³	H	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	Cl	Cl	Cl	H	H	H	F	Br

Abb. 1: Syntheschema für 2-Aryl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-benzocycloheptendione

1 J. G. Topliss, J. Med. Chem. 15, 1006 (1972).

Im einzelnen wurde (s. Abb. 1) analog der Methode von *Rapson* und *Shuttleworth*²⁾ α -Tetralon mit den entsprechenden Aldehyden zu **2 a–n** umgesetzt. In Abweichung von der Literaturvorschrift mußte zur Darstellung von **2i** und **2j** 8proz. Kalilauge verwendet werden. Der Syntheserfolg wird insbesondere NMR-spektroskopisch durch das Singulett des jeweiligen olefinischen Protons bei 7,80–7,90 ppm gesichert. Die Epoxidierung wurde in Anlehnung an *Cromwell* und *Bambury*³⁾ durchgeführt. Lediglich bei **3i** und **3j** führte dies nicht zum Erfolg, so daß in diesen Fällen mit Trifluorperessigsäure umgesetzt werden mußte⁴⁾.

Die gelungene Epoxidierung wird wieder kernresonanzspektroskopisch durch ein Singulett zwischen 4,25 (**3g**) und 4,55 (**3j**) angezeigt.

Die Umlagerung zu **4 a–n** wurde schließlich analog *Buchanan* und *Jhaveri*⁵⁾ durchgeführt. Das Vorliegen der Diketoform von **4 a–n** läßt sich am Auftreten zweier Carbonylbanden im IR-Spektrum (1725–1710 bzw. 1690–1675 cm^{-1}) erkennen. Ferner ist ein scharfes Singulett zwischen 5,60 und 6,30 ppm für das Proton in 2-Stellung charakteristisch.

Tabelle 1: Gerinnungsphysiologische Aktivitäten von **4a–4n** (Quick-Zeit)

Substanz 4	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n
Dosis [mg/kg]	430	430	430	430	430	430	340	340	340	430	340	340	340	340
Prothrombinspiegel < 25 %	^t Anfang [h]	–	–	–	–	–	–	27	20	5	–	–	–	30
	^t Ende [h]	–	–	–	–	–	65	85	55	–	–	–	40	50
Δt_{max} [sec.]	–	–	–	–	3	2	18	13	70	–	7	7	8	12
Zeitpunkt nach Applikation [h]	–	–	–	–	24	48	48	75	24	–	24	48	36	48

Die mit **4 a–n** erhaltenen Testergebnisse (Quick-Zeit) sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Man erkennt zunächst, daß die unsubstituierte Modellverbindung **4a** ebenso unwirksam ist wie die Substanzen **4 b–d**, die Substituenten mit + I und/oder + M-Effekt tragen. Aktivität wird ausschließlich bei der Anwesenheit von Substituenten mit – I und/oder – M-Effekt gefunden. Dabei erscheint die p-Substitution gegenüber o- und m-Substitution begünstigt wie ein Vergleich von **4 g** mit **4 e** bzw. **4 f** zeigt. Die gleiche Tendenz – allerdings weniger ausgeprägt – findet man auch bei **4 k–m**. Die

2 W. S. Rapson und R. G. Shuttleworth, J. Chem. Soc. 1940, 636.

3 N. H. Cromwell, R. E. Bambury und R. P. Barkley, J. Am. Chem. Soc. 81, 4294 (1959).

4 W. D. Emmons und A. S. Pagano, J. Am. Chem. Soc. 77, 89 (1955).

5 G. L. Buchanan und D. B. Jhaveri, J. Org. Chem. 26, 4295 (1961).

Wirkung von **4 g** ist etwa um den Faktor 5 geringer als die des vergleichbaren 2-Chlorphenyl-1,3-indandions (Indalitan[®]). Völlig überraschend war die Inaktivität von **4 j**. Ist neben der p-Position noch gleichzeitig die m-Stellung geeignet substituiert, so läßt sich entweder eine deutliche Wirkungsverlängerung (**4 h**) oder auch eine massive Wirkungsverstärkung (**4 i**) erzielen. Bei **4 i** wird der Dosisbereich des Indalitan[®] erreicht. Ferner fällt hier auf, daß ein „therapeutischer Bereich“ (Prothrombinspiegel < 25 %) bereits etwa 5 Stunden nach oraler Applikation erreicht wird, was sich mit dem Wirkungsmechanismus eines „indirekten“ Antikoagulans kaum noch vereinbaren läßt. Möglicherweise werden hier noch zusätzliche direkte Effekte auf die Blutgerinnung sichtbar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Wirkprofile der Benzocycloheptendione **4** in Abhängigkeit von der Art der Substitution untereinander stark differieren und sich mithin auch Unterschiede zur Vergleichssubstanz Indalitan[®] abzeichnen.

Dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für die finanzielle Unterstützung unserer Untersuchungen, der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazie für die Anfertigung der Spektren und die Durchführung der Elementaranalysen.

Experimenteller Teil

a) Chemischer Teil

Schmp.: Schmelzpunktapparat nach Linström, nicht korr.

IR: Perkin-Elmer-Spectrophotometer 237 bzw. 421;

NMR: Varian A 60 A; Angaben nach der δ -Skala, *MS*: CH 7 Varian MAT, 70 eV. *Elementar-*

analysen: Elementaranalysator Perkin-Elmer 240.

2-Aryliden-1-tetralon (**2**)

Die Synthese von **2** erfolgte analog ²⁾. Die erhaltenen Daten sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Analytische und spektroskopische Daten von **2**

2	Ausbeute [%]	Schmp. ^o	Mol.-Masse [ms]	Ber. Analysen Gef.	IR (KBr) [cm ⁻¹]	NMR (CDCl ₃) δ [ppm]
a	85	105 ²⁾	234		1665	7,85 (s)
b	75	98	248	C 87,06 H 6,50 C 86,90 H 6,45	1650	7,85 (s)
c	80	116	264	C 81,79 H 6,10 C 81,59 H 6,18	1670	7,85 (s)
d	45	120	294	C 77,53 H 6,16 C 77,35 H 6,20	1655	7,85 (s)

Tabelle 2: Fortsetzung

2	Ausbeute [%]	Schmp. ^o	Mol.-Masse [ms]	Analysen Ber. Gef.	IR (KBr) [cm ⁻¹]	NMR (CDCl ₃) δ [ppm]
e	55	121	268	C 75,98 H 4,88 C 75,69 H 4,95	1670	7,90 (s)
f	65	115	268	C 75,98 H 4,88 C 75,93 H 4,90	1670	7,85 (s)
g	95	137 ³⁾	268		1670	7,75 (s)
h	80	155	303	C 67,35 H 3,99 C 67,34 H 4,01	1670	7,75 (s)
i	60	168	313	C 65,08 H 3,86 C 65,33 H 4,00	1665	7,85 (s)
j	70	143 ³⁾	279		1665	7,85 (s)
k	40	61	252	C 80,93 H 5,19 C 80,97 H 5,21	1670	7,80 (s)
l	50	110	252	C 80,93 H 5,19 C 80,71 H 5,21	1665	7,80 (s)
m	60	116	252	C 80,93 H 5,19 C 80,82 H 5,30	1670	7,80 (s)
n	85	157	312	C 65,19 H 4,18 C 65,17 H 4,26	1670	7,85 (s)

2'-Aryl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalin-2-spiro-2'-oxiran-1-on (3)

Die Synthese von 3 erfolgte analog ³⁾ bzw. ⁴⁾ (3 i, j). Die erhaltenen Daten sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Analytische und spektroskopische Daten von 3

3	Ausbeute [%]	Schmp. ^o	Mol.-Masse [ms]	Analysen Ber. Gef.	IR (KBr) [cm ⁻¹]	NMR (CDCl ₃) δ [ppm]
a	75	108 ³⁾	250		1695	4,40 (s)
b	70	125	264	C 81,79 H 6,10 C 81,99 H 6,07	1685	4,30 (s)
c	75	104	280	C 77,13 H 5,75 C 77,03 H 5,84	1680	4,40 (s)

Tabelle 3: Fortsetzung

3	Ausbeute [%]	Schmp. ^o	Mol.-Masse [ms]	Ber. Analysen Gef.	IR (KBr) [cm ⁻¹]	NMR (CDCl ₃) δ [ppm]
d	80	158	310	C 73,53 H 5,85 C 73,38 H 5,88	1680	4,30 (s)
e	55	114	284	C 71,71 H 4,60 C 71,46 H 4,66	1680	4,45 (s)
f	60	98	284	C 71,71 H 4,60 C 71,52 H 4,60	1680	4,35 (s)
g	90	136 ³⁾	284		1690	4,25 (s)
h	85	142	318	C 63,97 H 3,79 C 63,78 H 3,80	1690	4,45 (s)
i	50	148	329	C 61,91 H 3,67 C 61,80 H 3,83	1690	4,50 (s)
j	70	152 ³⁾	295		1690	4,55 (s)
k	50	126	268	C 76,11 H 4,88 C 76,23 H 4,90	1690	4,45 (s)
l	55	85	268	C 76,11 H 4,88 C 76,19 H 4,91	1690	4,40 (s)
m	70	92	268	C 76,11 H 4,88 C 75,91 H 4,90	1690	4,35 (s)
n	90	132	328	C 62,03 H 3,98 C 61,97 H 4,07	1685	4,40 (s)

2-Aryl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-benzocyclohepten-1,3-dion (**4**)

Die Synthese von **4** erfolgte analog ⁵⁾. Die erhaltenen Daten sind in Tab. 4 zusammengestellt.

b) Tierexperimenteller Teil

Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 150–200 g schwere männliche Albinoratten vom Typ Sprague-Dawley verwendet. Die Tiere erhielten Altromin-Standarddiät für Ratten und Mäuse sowie Wasser ad lib.

Tabelle 4: Analytische und spektroskopische Daten von 4

4	Ausbeute [%]	Schmp. °	Mol.-Masse [ms]	Analysen Ber. Gef.	IR (KBr) [cm ⁻¹]	NMR (CDCl ₃) δ [ppm]
a	80	87 ⁵⁾	250		1720 1685	5,60 (s)
b	75	103	264	C 81,79 H 6,10 C 81,58 H 6,01	1715 1670	6,10 (s)
c	75	130	280	C 77,13 H 5,75 C 77,04 H 5,83	1725 1685	5,90 (s)
d	75	148	310	C 73,53 H 5,85 C 73,42 H 5,85	1725 1690	6,05 (s)
e	30	118	284	C 71,71 H 4,60 C 71,53 H 4,62	1720 1670	6,30 (s)
f	75	133	284	C 71,71 H 4,60 C 71,59 H 4,61	1720 1680	5,85 (s)
g	80	138	284	C 71,71 H 4,60 C 71,74 H 4,61	1710 1690	5,85 (s)
h	80	175	318	C 63,97 H 3,79 C 63,69 H 3,79	1715 1685	5,80 (s)
i	60	170	329	C 61,92 H 3,67 C 61,70 H 3,70	1715 1670	6,00 (s)
j	55	177	295	C 69,15 H 4,44 C 68,88 H 4,34	1725 1675	6,70 (s)
k	65	96	268	C 76,11 H 4,88 C 75,88 H 4,96	1725 1680	6,00 (s)
l	70	102	268	C 76,11 H 4,88 C 76,01 H 4,97	1715 1685	5,70 (s)
m	75	119	268	C 76,11 H 4,88 C 75,92 H 4,88	1715 1680	5,70 (s)
n	80	230	328	C 62,03 H 3,98 C 61,83 H 3,99	1720 1675	5,70 (s)

Applikation der Substanzen

Die zu testenden Substanzen wurden im Achatmörser fein zerrieben, bevor von ihnen eine Suspension hergestellt wurde, die nach weitgehender Homogenisierung mittels Ultraschall den Tieren appliziert wurde. Als Vehikel wurde eine 1 proz. Methylcelluloselösung verwendet, der als Lösungsvermittler 1 proz. Tween 80[®] zugesetzt wurde. Auf eine intraperitoneale Applikation wurde verzichtet, da eine unterschiedliche Resorption bei der i. p. Gabe von Suspensionen nicht ausgeschlossen werden kann⁶⁾. Den Tieren wurde 1 ml Suspension oral mit Hilfe einer Schlundsonde appliziert, wobei die Tiere durch Entzug der Altromin-Standarddiät 12 h vorher nüchtern gestellt wurden. Von jeder Suspension wurden einmalig je 1 ml an 3 Ratten gegeben.

Blutentnahme und Plasmagewinnung

In eine Spritze mit Maßeinteilung (Ablesegenauigkeit 1/20 ml) wurden 0.1 ml einer Mischung aus gleichen Teilen 0.1 M Natriumcitratlösung und physiologischer Kochsalzlösung aufgezogen. Mit der so vorbereiteten Spritze wurde dem jeweiligen Tier dann mittels Herzpunktion ad 0,5 ml Blut entnommen. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden Blut und Citrat-Kochsalzlösung sorgfältig unter Vermeidung von Schaumbildung miteinander vermischt. Durch die Technik der Herzpunktion konnte ein und demselben Tier bis zu dreimal am Tag und an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen Blut entnommen werden. Die Blutentnahme erfolgte in bestimmten, vorher festgelegten Zeitabständen nach Applikation der Substanzen.

Das entcalcifizierte Blut wurde in Plastikzentrifugengläser überführt und anschließend in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 2 min bei 15 000 U/min zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abpipettiert und zur Messung verwendet.

Quick-Wertbestimmung (= TPZ-Bestimmung)

Da sich herausstellte, daß die einzelnen Ratten im unbehandelten Zustand unterschiedliche Quick-Werte aufwiesen (bis zu 4 s Unterschied, abhängig vom jeweils gelieferten Tiermaterial), wurde für jede in dem Test verwendete Ratte ihre „individuelle“ Quick-Zeit bestimmt (= Ausgangswert). Zur Kontrolle wurden mehrere Ratten in unbehandeltem Zustand an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen zweimal pro Tag punktiert und ihr Quick-Wert bestimmt. Der „individuelle“ Quick-Wert blieb dabei konstant.

Für die TPZ-Bestimmung wurde das Koagulometer CU 500 der Fa. Biodynamics verwendet. Als Reagens wurde Calcium-Thromboplastin der Behring-Werke AG benutzt, dessen nach Vorschrift hergestellte Lösung bei 37° inkubiert wurde.

Die Küvette des Koagulometers wurde mit 0,2 ml der auf 37° vorgewärmten Calcium-Thromboplastinlösung beschickt und in den Strahlengang des Gerätes gebracht. Nach Nullstellung des elektronischen Zählwerkes wurden 0,1 ml des ebenfalls auf 37° vorgewärmten Plasmas zu der Calcium-Thromboplastinlösung in der Küvette gegeben, wodurch das Zählwerk automatisch gestartet wurde. Die vom Zählwerk angezeigte Zeit (Genauigkeit 0.1 s) wurde notiert und die Messung wiederholt.

Eine gegenüber der Norm verlängerte TPZ bedeutet eine Verminderung der mit diesem Test erfaßten Gerinnungsfaktoren. Verdünnt man Normalplasma, so wird die TPZ des verdünnten Plasmas gegenüber der des Normalplasmas verlängert. Alle Methoden zur Bestimmung von Ge-

6 J. Wagenknecht, Dissertation, FU Berlin 1976.

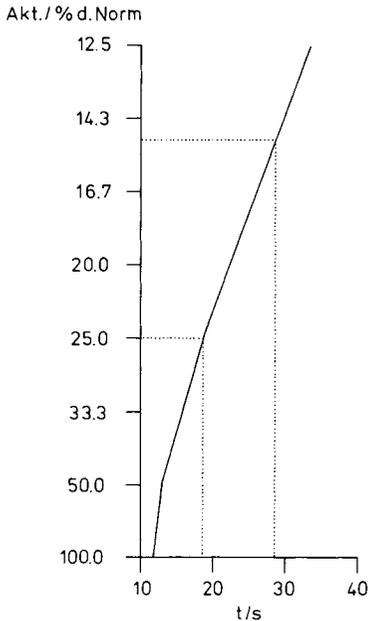


Abb. 2: Bezugscurve für den Prothrombinspiegel

rinnungsfaktoren beruhen darauf, daß die Zeit gemessen wird, zu der ein nachweisbares Gerinnsel auftritt. Diese Zeit, die sogenannte Gerinnungszeit, hängt nicht nur von der Temperatur und den Gerinnungsfaktoren, sondern auch von den verwendeten Reagenzien ab. Daher sind die gemessenen Gerinnungszeiten auf Sollwerte zu beziehen, die von Labor zu Labor neu bestimmt werden müssen. Daher wird die Plasmakonzentration der Gerinnungsfaktoren in Proz. der Norm angegeben, indem man von einem Normalplasma eine Verdünnungsreihe herstellt, die dazugehörigen Zeiten mißt, aus beiden eine Bezugscurve erstellt und die TPZ des fraglichen Plasmas auf diese Curve bezieht. Trägt man auf der Abzisse eines Koordinatensystems die Zeiten der einzelnen Verdünnungen auf, auf der Ordinate die Reziprokwerte der dazugehörigen Prozentwerte (Normalplasma = 100 proz.), so erhält man als Bezugscurve eine Gerade, mit deren Hilfe sich über die ermittelten Zeiten der untersuchten Plasmen die zugehörigen Plasmakonzentrationen in Prozent der Norm angeben lassen. In dieser Form wird im allgemeinen der Gerinnungsstatus eines unter Antikoagulantienbehandlung stehenden Patienten bei Überprüfung mittels der TPZ angegeben. Er erfährt die Faktoren VII, X, V, II und I.

Die Bedeutung dieses Testes liegt darin, daß er der beste Indikator für die Kontrolle der Therapie mit Vit-K-antagonistischen Antikoagulantien ist.

Mit Hilfe des Plasmas von 6 unbehandelten Ratten wurde eine derartige Bezugscurve erstellt. Die zu den einzelnen TPZ-Werten der Tab. 1 gehörenden Prozentwerte der Norm wurden über diese Bezugscurve ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen.