

Arch. Pharm. (Weinheim) 318, 161–167 (1985)

Nichtsteroidale Entzündungshemmer, 15. Mitt.¹⁾

Chirale Arylhydroxycarbonsäuren

Adriano Guarnieri^{*)}), Lucilla Varoli, Silvia Burnelli⁺⁺⁾

Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica dell'Università, via Belmeloro 6, I-40126 Bologna

Monique Sarret, Marinella Fantuz

Laboratorio Farmacologico „Alfa Ricerche“, via Ragazzi del 99, I-40133 Bologna

Kay Brune und René Lanz

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen–Nürnberg, Universitätsstraße 22, D-8520 Erlangen

Eingegangen am 19. Oktober 1983

Einige früher synthetisierte und antiphlogistisch wirksame chirale Biphenylcarbonsäuren wurden zu den *p*-Fluorbiphenyl- oder *p*-Cyclohexylphenyl-Analogen **4iF–4aC** modifiziert und pharmakologisch geprüft. Im Tierversuch wurde eine Abschwächung der antiphlogistischen Aktivität gefunden; bei den auch *in vitro* getesteten Fluorverbindungen konnte eine mögliche Hemmung der Phorbol ester-induzierten PGE₂-Freisetzung aus Mausperitonealmakrophagen nicht nachgewiesen werden.

Nonsteroidal Antiinflammatory Agents, XV: Chiral Aryl(hydroxy)carboxylic Acids

Alkyl/aryl(biphenyl)carboxylic acids were modified to the *p*-fluorobiphenyl and *p*-cyclohexylphenyl analogues **4iF–4aC**. These products were tested for antiinflammatory and analgesic activities and for acute toxicity. The fluorinated compounds were also screened *in vitro* for inhibition of prostaglandin (PGE₂) from mouse peritoneal macrophages stimulated by the phorbol ester TPA.

In vorangegangenen Mitt. aus dem Bereich der chiralen Alkylaryl-hydroxycarbonsäuren haben einige von uns über die entzündungshemmende Wirkung der (+)-3-Biphenyl-3-hydroxy-isocaproensäure (**4**, R = *i*-C₃H₇-, R' = C₆H₅-)²⁾ und besonders der (-)-3-*m*-Tolyl- und (±)-3-*m*-Anisyl-3-biphenyl-3-hydroxy-propionsäure (**4**, R = *m*-CH₃-C₆H₄- bzw. *m*-CH₃O-C₆H₄-; R' = C₆H₅-)³⁾ berichtet. Um die eigentliche Rolle der planaren Fläche der Biphenylgruppe bei der Entfaltung der Aktivität zu untersuchen, die durch hydrophobe Bindungen an die Cyclooxygenase, dem oft als Wirkort für

¹⁾ Als Poster vorgetragen auf dem 4. Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della S.C.I.-Palermo, 18.–22. Oktober 1983.

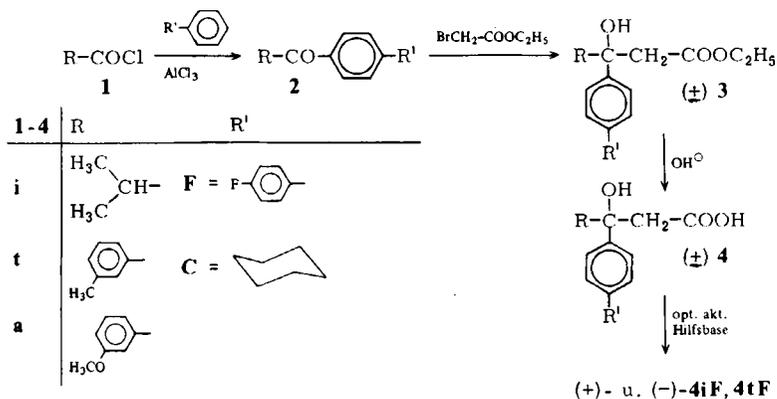
⁺⁺⁾ Herrn Prof. Teodoro Pozzo-Balbi zum 70. Geburtstag gewidmet.

nichtsteroidale Antiphlogistika vermuteten Enzym der Arachidonsäurekaskade^{4,5}, und/oder durch p-hydroxylierte Metabolite⁶) zustande kommen könnte, haben wir die Analogen **4iF**–**4aC** hergestellt und pharmakologisch vorgetestet, bei denen der Biphenylrest durch die 4-Fluorbiphenyl- bzw. 4-Cyclohexylphenyl-Gruppe ersetzt ist.

Wie das Reaktionsschema zeigt, wurden die Ketone **2** aus den Säurechloriden **1** und Biphenyl oder Cyclohexylbenzol nach *Friedel-Crafts* erhalten; dann wurden sie nach *Reformatsky* in die racem. Ethylester überführt, deren alkalische Hydrolyse die entsprechenden Säuren **4** lieferte. Schließlich folgte die Spaltung der racem. Säuren über die diastereomeren Salze mit optisch aktiven Hilfsbasen. Obwohl sie mit mehreren Lösungsmitteln versucht wurde, gelang sie nur im Fall des *i*-Propyl- und *m*-Tolyl-Fluorderivates. Die hergestellten Verbindungen und ihre physikalischen Eigenschaften sind in Tab. 1–3 angeführt.

Wie die Tab. 4 zeigt, wurden die Säuren **4** im Vergleich zu Indometacin an der Ratte auf ihre antiinflammatorische Wirkung im Carrageenin-induzierten Oedem, an der Maus auf ihre analgetische Aktivität im Writhing-Syndrom und auf akute Toxizität geprüft. Die Fluorsäuren wurden auch *in vitro* auf ihre Wirkung bezüglich der Freisetzung von Prostaglandin E₂ aus Mausperitonealmakrophagen, die mit dem Phorbolster 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) stimuliert wurden, getestet.

Reaktionsschema



Pharmakologische Ergebnisse und Struktur-Aktivitätsbeziehungen

Wie Tab. 4 zeigt, sind die geprüften Verbindungen weniger toxisch nach oraler als nach intraperitonealer Gabe; *i.p.* verabreicht wirken (+)-, (-)-**4tF** und (\pm)-**4tC** besonders toxisch mit bis zu 72 h verspäteter Mortalitätsinduktion. Dieser Unterschied wird auch im neurologischen und neurovegetativen Verhalten der Mäuse beobachtet, wenn die geprüften Substanzen oral und *i.p.* verabreicht wurden. Oral bewirkt die gleiche Dosis (500 mg/kg) aller geprüften Substanzen eine Verminderung der motorischen Aktivität, Asthenie, eine verminderte Reaktivität auf Schmerzreize und eine Verminderung des

Tab. 1: Ketone 2iF-2aC

Vbdg. Nr.	Ausb.: % d.Th.	Schmp.° (aus)	Rf-Werte Fließm.: T	IR (Nujol) (cm ⁻¹)		Summen- formel (Molm.)	Ber.: Gef.:	
				CO			C	H
2iF	98	69-71 (E)	0,61	1670		C ₁₆ H ₁₅ FO (242,3)	79,3 79,2	6,32 6,24
2tF	80	86-87 (E)	0,64	1640		C ₂₀ H ₁₅ FO (290,3)	82,7 83,0	5,21 5,21
2aF	66	78-80 (M)	0,45	1655		C ₂₀ H ₁₅ FO ₂ (306,3)	78,4 78,5	4,94 5,07
2iC	70	54-55 *(E/W)	0,40	1682		C ₁₆ H ₂₂ O (230,4)	83,4 83,6	9,63 9,67
2tC	81	*Öl	0,35	1658		C ₂₀ H ₂₂ O (278,4)	86,3 86,5	7,96 8,01
2aC	82	67-68 *(E/W)	0,22	1653		C ₂₀ H ₂₂ O ₂ (294,4)	81,6 81,4	7,53 7,33

Tab. 2: Chirale Hydroxyester (±)3iF-3aC

Vbdg. Nr.	Ausb.: % d.Th.	Schmp.° (aus)	Rf-Werte Fließm.: T/A 9 : 1 T	IR (Nujol) (cm ⁻¹)		Summen- formel (Molm.)	Ber.: Gef.:	
				OH	CO		C	H
3iF	95	71-73 (E)	0,28	3480	1690	C ₂₀ H ₂₃ FO ₃ (330,4)	72,7 72,9	7,02 7,18
3tF	90	84-86 (E)	0,34	3430	1708	C ₂₄ H ₂₃ FO ₃ (378,4)	76,2 76,3	6,12 5,99
3aF	75	69-71 *(E/W)	0,20	3435	1700	C ₂₄ H ₂₃ FO ₄ (394,4)	73,1 73,2	5,88 5,59
3iC	§58	88-89 *(E)	0,61	3499	1700	C ₂₀ H ₃₀ O ₃ (318,5)	75,7 76,0	9,49 9,82
3tC	§50	68-69 *(E)	0,67	3480	1708	C ₂₄ H ₃₀ O ₃ (366,5)	78,6 78,4	8,25 8,30
3aC	§50	69-70 *(E/W)	0,44	3438	1694	C ₂₄ H ₃₀ O ₄ (382,5)	75,4 75,4	7,90 8,03

E = Ethanol, M = Methanol, W = Wasser, T = Toluol, A = Aceton

Muskeltonus. Diese Effekte zeigen sich langfristig und dosisabhängig, aber weniger ausgeprägt auch bei (+)4iF. Als Entzündungshemmer erwiesen sich die Prüfsubstanzen als schwächer wirksam als die Biphenylleitverbindungen^{2,3}). Trotzdem besitzt das Isopropylfluoranalogue (+)4iF noch eine gute, mehr als 3 h lang dauernde Wirkung, während sein linksdrehender Antipode inaktiv ist. Die Racemate 4aC und 4iC hemmen das Oedem auch beträchtlich, aber kurzfristiger.

Die analgetische Wirkungsstärke fast aller Hydroxysäuren ist schwach; sie ist nennenswert bei den bezüglich der Entzündungshemmung aktiveren Isopropylanalogen (\pm)4iC und (+)4iF und beim inaktiven Antipoden (-)4iF. Bei fünf Fluorhydroxysäuren (+)-, (-)4iF, (+)-, (-)4tF und (\pm)4aF wurde *in vitro* ihre mögliche Hemmwirkung auf die mit dem Phorbolster TPA induzierte Freisetzung von Prostaglandin E₂ (PGE₂) aus Peritonealmakrophagen von Mäusen⁷) untersucht. Wie man aus Tab. 4 entnehmen kann, ist eine deutliche Hemmung der PGE₂-Freisetzung bei keiner der untersuchten Verbindungen gefunden worden. Bei hohen Konzentrationen (10^{-4} M, 10^{-5} M) wurde zwar

Tab. 3: Rac. und opt. aktive Hydroxysäuren 4iF-4aC

Vbdg. Nr.	$[\alpha]_D^{25}$	Schmp. ^o (aus)	Rf-Werte Fließm.: T/Es 9 : 1	IR (Nujol) (cm ⁻¹)		Summen- formel (Molm.)	Ber.: Gef.:		
				OH	CO		C	H	F
4iF	(\pm)	178-180 (B/Bn)	0,42	3505	1690	C ₁₈ H ₁₉ FO ₃ (302,3)	71,5 71,8	6,33 6,30	6,3 6,5
	+21,8 ²⁴	203-205 (B)	0,42	3505	1690	C ₁₈ H ₁₉ FO ₃ (302,3)	71,7	6,32	n.b.
	-22,0 ²⁵	198-200 (B)	0,42	3505	1690	C ₁₈ H ₁₉ FO ₃ (302,3)	71,5	6,23	n.b.
4tF	(\pm)	134-136 (B/Bn)	0,43	3482	1682	C ₂₂ H ₁₉ FO ₃ (350,4)	75,5 75,6	5,45 5,59	5,4 5,9
	+4,5 ²⁸	138-140 (B/Bn)	0,43	3482	1682	C ₂₂ H ₁₉ FO ₃ (350,4)	75,6	5,43	n.b.
	-2,2 ²⁸	134-136 (B/Bn)	0,43	3482	1682	C ₂₂ H ₁₉ FO ₃ (350,4)	75,5	5,65	n.b.
4aF	(\pm)	172-174 (E)	0,40	3495	1680	C ₂₂ H ₁₉ FO ₄ (366,4)	72,1 72,4	5,23 5,33	5,2 5,3
4iC	(\pm)	135-136 (T)	0,46	3508	1686	C ₁₈ H ₂₆ O ₃ (290,4)	74,4 74,7	9,02 9,29	
4tC	(\pm)	143-144 (T)	0,45	3498	1678	C ₂₂ H ₂₆ O ₃ (338,4)	78,1 78,4	7,74 7,94	
4aC	(\pm)	131-132 (T)	0,42	3518	1678	C ₂₂ H ₂₆ O ₄ (354,4)	75,5 75,3	7,39 7,52	

Es = Essigsäure, B = Benzol, Bn = Benzin, n. b. = nicht bestimmt

Tab. 4: Pharmakologische Daten der Hydroxysäuren **4iF-4aC** im Vergleich zu Indometacin

Vbdg.	Akute Toxizität DL ₅₀ = mg/kg;		Carrageenin-Oedem % Hemmung			Writhing-Syndrom % Hemmung	TPA-induzierte PGE ₂ - Freisetzung aus Maus- peritonealmakrophagen % Hemmung Konz. = 10 ⁻⁷ M
	p.o.	i.p.	10 mg/kg; i.p.				
			1h	3h	5h	10 mg/kg; s.c.	
(+) 4iF	>500	300	65	46	33	41	15,5
(-) 4iF	>500	300	0	0	0	38	5,5*
(+) 4tF	>500	150	25	14	13	26	7,7*
(-) 4tF	>500	100	16	25	21	15	0,0
(±) 4aF	>500	400	30	7	14	16	6,8*
(±) 4iC	>500	250	50	0	5	46	
(±) 4tC	>500	50	20	20	30	5	
(±) 4aC	>500	200	60	24	29	14	
Indometacin	20	15	§50	53	53	60	74,0

§ = 1 mg/kg * = nicht signifikant

eine verminderte PGE₂-Freisetzung beobachtet, die aber wahrscheinlich mehr auf die Toxizität der Verbindungen als auf eine eigentliche Hemmung der Prostaglandin-Produktion der Zellen zurückzuführen ist (Zellschädigung beobachtet). Die scheinbar mangelnde Übereinstimmung der Ergebnisse, die *in vivo* beim Carrageeninödem und *in vitro* bei der TPA-induzierten Freisetzung von Prostaglandin E₂ aus Peritonealmakrophagen von Mäusen erhalten wurde, könnte der Entstehung eines „aktiven“ Metaboliten zugeschrieben werden, der nur *in vivo* eine entzündungshemmende Wirkung entfaltet. Außerdem muß betont werden, daß die *in vivo* aktiven Substanzen eine gewisse entzündungshemmende Wirkung vorwiegend nach der ersten Stunde, die der Erzeugung der Entzündung folgt, aufweisen; eine Zeitspanne, in der die Wirkung der Prostaglandine nicht vorherrscht⁸⁾.

Aus den Befunden kann man als Schlußfolgerung ableiten, daß die durchgeführten Strukturmodifikationen die entzündungshemmende Aktivität vermindern und daher die ausgewählten Leitstrukturen^{2,3)} von diesem Standpunkt aus optimal sind.

Wir danken dem Ministero della P. I. für die Unterstützung der Arbeit.

Experimenteller Teil

a) Chemie

Schmp.: Electrothermal Mod. 1A-6304A (unkorr.). – *IR*: Perkin-Elmer 298. – *Optische Rotationen*: Polartronic I (Schmidt u. Hänsch), 5proz. Lösungen in THF. – Der Reaktionsverlauf und die Reinheit der Endprodukte wurden an Kieselgel 60 F 254-Fertigfolien (Merck) überprüft und die Rf-Werte auf 4-Fluorbiphenyl (F-Reihe) bzw. Cyclohexylbenzol (C-Reihe) bezogen. – *SC*: Kieselgel 60 (Merck). – *Elementaranalysen*: Mikroanalyt. Labor des Pharm. Instituts Universität Pisa.

Darstellung der Ketone 2iF–2aC

Allgemeine Arbeitsvorschrift: Zu einer Suspension von 35 mmol AlCl_3 in 40 ml CS_2 wird unter Rühren eine Lösung von 32 mmol 4-Fluorbiphenyl (oder Cyclohexylbenzol) und 32 mmol Säurechlorid **1**^{9a,b,c} bei Raumtemp. nach und nach zugetropft. Dann kocht man rückfließend bis zur Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle). CS_2 wird abdestilliert und der Rückstand auf 10proz. eiskalte Salzsäure gegeben. Man schüttelt die Mischung mit Ether aus und wäscht die Etherschicht mit Wasser und ges. NaHCO_3 -Lösung. Beim Abziehen der über Na_2SO_4 getrockneten Etherphase erhält man das rohe Keton, das unmittelbar oder nach SC mit Toluol (*) umkristallisiert wird.

Darstellung der racem. Ester 3iF–3aC

Es wurde die bereits³⁾ beschriebene Arbeitsvorschrift angewendet. Die Herstellung aller Cyclohexylester wurde mit nach¹⁰⁾ behandeltem Zinkstaub und Jod aktiviert, vor dem Umkristallisieren mußte das rohe Reaktionsprodukt sc mit Toluol (*) gereinigt werden. Der vom unveränderten Keton kaum trennbare Ester **3tC** wurde zur Säure verseift und diese durch alkalische Extraktion abgetrennt.

Darstellung der racem. Säuren 4iF–4aC und deren Spaltung

Die racem. Ethylester **3** wurden in Ethanol mit überschüssiger 2 N-NaOH nach der bereits beschriebenen Vorschrift³⁾ zur racem. Säure **4** mit fast theoretischer Ausbeute umgesetzt. Ebenso nach^{3,11)} wurden alle racem. Säuren mit äquimol. Menge von optisch aktiver Hilfsbase ((-)-Chinin, (+)-Cinchonin und (+)- α -Phenylethylamin) in verschiedenen organischen Lösungsmitteln versetzt. Die Racematspaltung erfolgte im Fall von **4iF** (aus einer Lösung von 7,34 g Hydroxysäure und 7,87 g (-)-Chinin in 200 ml Ethanol, die 2 d im Kühlschrank gehalten wurde) und von **4tF** (aus einer Lösung von 6,10 g Hydroxysäure und 5,29 g (-)-Cinchonin in 110 ml Ethanol, dann einige d im Kühlschrank). In beiden Fällen kristallisierte das diastereomere Salz der Hilfsbase mit dem rechtsdrehenden Antipoden der Säure.

b) Pharmakologie

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (IFFA CREDO), 150 bis 180 g, und männliche Swiss-Mäuse (NOSSAN), 18 bis 22 g, verwendet. Die Vergleichssubstanz Indometacin und die Prüfsubstanzen wurden in einem Vol. von 1 ml/100 g Körpergewicht in einer wäßrigen Lösung, mit 1 N-NaOH auf pH 7,5 gebracht, oral, intraperitoneal und subcutan verabreicht.

Akute Toxizität

Die akute Toxizität wurde nach Irwin¹²⁾ geprüft. Jeder Gruppe von 4 Mäusen wurden die einzelnen Prüfsubstanzen in Dosen von 500 mg/kg per os und von 500–250–125 und 62 mg/kg intraperitoneal verabreicht. Danach wurde die Symptomatik 6 h beobachtet; die Mortalität wurde innerhalb der ersten 4 h und 24, 48 und 72 h nach Substanzgabe registriert.

Antiphlogistische Wirkung

Nach Winter et al.¹³⁾ wurde das Oedem an Gruppen von 8 nüchternen Ratten durch subcutane Injektion in die rechte Hinterpfote von 0,1 ml 1proz. Carrageenin-Suspension (Viscarin Rex 179 Marine Colloids) in steriler physiologischer Lösung induziert. 1 h vorher wurden Indometacin und Prüfsubstanzen intraperitoneal verabfolgt. Vor und 1, 3 und 5 h nach Substanzgabe wurde die Oedembildung mit dem „Volume Differential Meter“ (Basile) gemessen. Die entzündungshemmende Wirkung wurde als prozentuale Verminderung des mittleren Oedemvol. der behandelten Tiere gegenüber dem der Kontrollgruppe berechnet.

Analgetische Wirkung

Nach Koster¹⁴⁾ wurden die Prüfsubstanzen an Gruppen von 8 nicht nüchternen Mäusen subcutan verabreicht; zur Writhing-Syndromauslösung erhielten dieselben nach 1 h 0,2 ml 3proz. Essigsäure intraperitoneal injiziert. 5 min später wurden die Streckungen für 5 min gezählt und deren prozentuale Abnahme dem Mittelwert der Kontrolltiere gegenüber berechnet.

Freisetzung von PGE₂ aus Peritonealmakrophagen von Mäusen

Unstimulierte Makrophagen wurden aus der Bauchhöhle von Mäusen gewonnen, und 2×10^6 Zellen/35-mm Petrischale wurden über Nacht in je 2 ml Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % hitzeinaktiviertem Neugeborenen-Kälberserum (Gibco, Karlsruhe, BRD) bei 37° in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ in Luft (Luftfeuchtigkeit 95 %) inkubiert. Dann wurden nicht festsitzende Zellen gewaschen und das Medium durch serumfreies DMEM ersetzt. Dieses enthielt entweder 0,5 % DMSO, oder das Lösungsmittel mit den Testsubstanzen in den Konz. 10^{-4} bis 10^{-7} M. Nach 1 h wurden entweder 10 µl DMSO (Lösungsmittelkontrolle) oder Lösungsmittel mit TPA als Stimulus (Endkonz. 10^{-7} M) zugegeben. 2 h später wurden die Kulturüberstände gesammelt. Der Gehalt an PGE₂ wurde mit einem spezifischen Radioimmunoassay bestimmt¹⁵⁾. Ferner wurde die Vitalität der Zellen kontrolliert¹⁵⁾. Ausgehend von den Mittelwerten der Lösungsmittelkontrollen (= 100 % Hemmung) und der mit TPA maximal stimulierten Proben (= 0 % Hemmung) wurde für die Testsubstanzen die prozentuale Hemmung der PGE₂-Freisetzung berechnet.

Literatur

- 1 P. De Maria, A. Fini, A. Guarnieri und L. Varoli, Arch. Pharm. (Weinheim) 317, 877 (1984).
- 2 A. Guarnieri, S. Burnelli, L. Varoli, A. M. Barbaro und M. Gaiardi, Farmaco Ed. Sci. 33, 992 (1978).
- 3 A. Guarnieri, S. Burnelli, L. Varoli, I. Busacchi, A. M. Barbaro, M. Gaiardi und G. L. Biagi, Arch. Pharm. (Weinheim) 314, 703 (1981).
- 4 R. A. Scherrer, C. V. Winder und F. W. Short, Nat. Med. Symp. Am. Chem. Soc., Div. Med. Chem., Abstr. 11a-11i (1964).
- 5 T. Y. Shen, Int. Symp. Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs Proc. 1964, 1320.
- 6 F. S. Chiccarelli, H. J. Eisner und G. E. Van Lear, Arzneim. Forsch. 30, 707 (1980).
- 7 K. Brune, H. Kälin, R. Schmidt und E. Hecker, Cancer Lett. 4, 333 (1978).
- 8 M. Di Rosa und D. A. Willoughby, J. Pharm. Pharmacol. 23, 297 (1971).
- 9 a) (Ii) H. C. Brown, J. Am. Chem. Soc. 60, 1325 (1938);
b) (It) J. Coops, W. ThNauta, M. J. E. Ernsting und A. C. Faber, Recl. Trav. Chim. Pays Bas 69, 1109 (1940);
c) (Ia) F. F. Blicke und O. J. Weinkauff, J. Am. Chem. Soc. 54, 1446 (1932).
- 10 M. S. Newman und F. J. Evans Jr., J. Am. Chem. Soc. 77, 946 (1955).
- 11 A. Guarnieri, S. Burnelli, G. Scapini, L. Varoli, I. Busacchi, B. Lumachi und G. Bossoni, Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther. 17, 509 (1982).
- 12 S. Irwin, Science 136, 123 (1962).
- 13 C. A. Winter, E. A. Risley und G. W. Nuss, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 544 (1962).
- 14 R. Koster, M. Anderson und J. De Beer, Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 18, 412 (1959).
- 15 K. Brune, M. Glatt, H. Kälin und B. A. Peskar, Nature (London) 274, 261 (1978).