



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149271 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 2563/84

(51) Int.Cl.⁴: C 07 D 471/04

(22) Indleveringsdag: 24 maj 1984

(41) Alm. tilgængelig: 28 nov 1984

(44) Fremlagt: 14 apr 1986

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 27 maj 1983 DK 2402/83

(71) Ansøger: *SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT; Berlin, DE.

(72) Opfinder: Claus Thyco *Braestrup; DK, Erling *Petersen; DK, Tage *Honore; DK, Leif Helth *Jensen; DK,
Dieter *Seidelmann; DE.

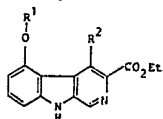
(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree

(54) Beta-carbolin-3-carboxylsyrederivater

(57) Sammendrag:

2563-84

β -carbolin-3-carboxylsyrederivater med den almene formel



hvor

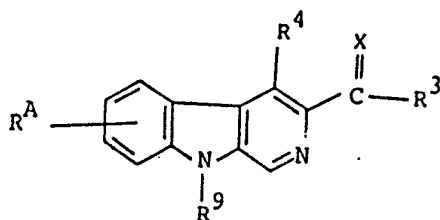
R¹ betegner methyl, ethyl, n-propyl eller iso-propyl, og
R² betegner hydrogen, methyl, ethyl, n-propyl eller iso-propyl, forudsat at R¹ ikke betegner methyl, når R² betegner hydrogen.

Forbindelserne er nyttige i psykofarmaceutiske præparater, idet de er benzodiazepinantagonister.

DK 149271 B

Opfindelsen angår hidtil ukendte β -carbolin-3-carboxylsyrederivater, hvilke forbindelser er nyttige i psychopharmaceutiske præparater, idet de er benzodiazepinantagonister.

I EP patentpublikation nr. 30 254 omtales forbindelser med den almene formel:



hvor

X betegner oxygen, svovl eller NR^{10} , hvor R^{10} betegner hydrogen eller en lavere alkyl- eller cycloalkylgruppe;

R^3 betegner (a) en alkoxy-, aryloxy- eller aralkoxygruppe, der hver især eventuelt er substitueret med ét eller flere halogenatomer, (F, Cl, Br, I), f.eks. 1-3 halogenatomer, hydroxygrupper, CF_3 -grupper eller alkoxygrupper eller med en amino-, dialkylamino- eller alkoxycarbonylgruppe; eller (b) $\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, hvor R^{11} og R^{12} er ens eller forskellige og hver betegner (i) hydrogen, (ii) hydroxy, (iii) alkyl, (iv) aryl, (v) aralkyl eller (vi) cycloalkyl, hvor de sidste fire (iii-vi) eventuelt er substitueret med en hydroxy-, carboxamid-, alkoxycarbonyl-, carboxy- eller monosaccharidgruppe eller en heterocyklisk gruppe, eller (vii) amino eventuelt substitueret med alkyl, aryl, aralkyl eller cycloalkyl; eller hvor R^{11} og R^{12} sammen med det naboliggende nitrogenatom danner en 5-, 6- eller 7-leddet heterocyklisk ring, der eventuelt kan være substitueret, under forudsætning af, at R^{11} og R^{12} ikke begge kan være en hydroxygruppe; eller hvor X og R^3 tilsammen betegner et enkelt nitrogenatom;

R^4 betegner hydrogen, en alkyl-, cycloalkyl-, aralkyl-, phenyl- eller en alkoxyphenylgruppe indeholdende op til 10 carbonatomer,

R^A betegner F, Cl, Br, I, NO_2 , $\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, NHCOR^{13} , CN, COOR^{13} , OR^{13} , SCH_3 eller $\text{SO}_2\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, hvor R^{13} og R^{14} hver betegner et hydrogenatom eller en alkylgruppe indeholdende op til 6 carbonatomer og eventuelt substitueret med en hydroxy-
 5 gruppe eller et halogenatom (F, Cl, Br, I), og hvor R^{11} og R^{12} har den ovenfor nævnte betydning, og hvor der kan være 1-4 identiske eller forskellige R^A 'er;

R^9 betegner hydrogen, eller en alkyl- eller alkoxy-carbonylgruppe,
 10 hvor de to sidstnævnte hver indeholder op til 8 carbonatomer;

forudsat dog:-

at R^{11} og R^{12} ikke begge kan betegne et hydrogenatom, når X betegner et oxygenatom, og R^4 , R^A og R^9 hver betegner et
 15 hydrogenatom,

at én af substituenterne R^{11} og R^{12} ikke kan betegne et hydrogenatom, når den anden substituent betegner en amino-
 gruppe, og når X betegner et oxygenatom, og R^4 , R^A og R^9
 20 hver betegner et hydrogenatom, og

at R^4 , R^A og R^9 ikke hver kan betegne et hydrogenatom, når X betegner et oxygenatom, og R^3 betegner OCH_3 .

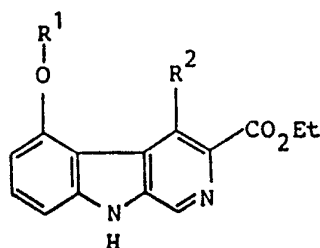
25 Den klasse af forbindelser, som angives med den ovenfor nævnte almene formel, omtales som værende i stand til at fortrænge flunitrazepam fra benzodiazepinreceptorer, og i modsætning til benzodiazepin, chlordiacepoxid og diazepam at hæmme aggression uden at bevirke forringet motorisk koordination, hvilket betyder, at
 30 forbindelser med den ovennævnte almene formel er egnede til brug som ikke-sedative antikonvulsionsmidler, antiaggressionsmidler og angstdæmpende midler eller til beskyttelse mod stress. De kan derfor anvendes til behandling af følgende indikationer:

Angst og anspændthed med eller uden depressioner, uro og
 35 forstyrrelse hidrørende fra stresspåvirkninger eller for meget stimulering såvel som patologisk aggressivitet.

Det har nu overraskende vist sig, at en lille gruppe af forbindelser, der tilhører den ovennævnte klasse, men som ikke er specifikt omtalt i ovennævnte publikation, er stærke benzodia-

zepin-antagonister målt ved deres mangel på benzodiazepinlignende farmakologiske virkninger på trods af deres høje affinitet overfor benzodiazepinreceptorer samt deres evne til at undertrykke benzodiazepinens virkninger. Disse egenskaber gør forbindelserne ifølge
 5 den foreliggende opfindelse yderst nyttige til f.eks. at styre og modvirke de farmakologiske virkninger hidrørende fra behandling med benzodiazepiner og andre forbindelser, som virker gennem deres affinitet overfor benzodiazepinreceptorerne.

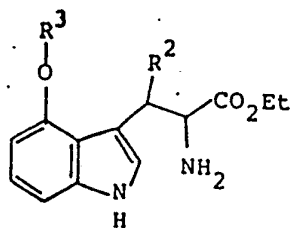
Forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse er β -carbolin-3-carboxylsyrederivater med den almene formel
 10



hvor

R^1 betegner methyl, ethyl, n-propyl eller iso-propyl, og
 R^2 betegner hydrogen, methyl, ethyl, n-propyl eller
 20 iso-propyl, forudsat at R^1 ikke betegner methyl, når R^2 betegner hydrogen.

Forbindelserne ifølge opfindelsen kan fremstilles ved, at et indolderivat med den almene formel



30 hvor

R^2 betegner hydrogen, methyl, ethyl, n-propyl eller iso-propyl og
 R^3 betegner hydrogen, methyl, ethyl, n-propyl eller iso-propyl, forudsat at R^3 ikke betegner methyl, når R^2
 35 betegner hydrogen,

cykliseres med glyoxylsyre eller formaldehyd, hvorefter det således opnåede 1,2,3,4-tetrahydrocarbolinderivat dehydrogeneres, og hvis R^3 betegner hydrogen foretheres hydroxygruppen ved omsætning

med en forbindelse med den almene formel R^1X , hvor R^1 betegner methyl, ethyl, n-propyl eller iso-propyl, og X betegner et halogenatom.

5 Forbindelserne ifølge opfindelsen kan anvendes til formulering af farmaceutiske præparater, f.eks. til oral og parenteral indgivelse i pattedyr inklusiv mennesker, i overensstemmelse med galenisk farmacis traditionelle metoder.

10 Traditionelle tilsætningsmidler er sådanne farmaceutisk acceptable organiske eller uorganiske bærersubstanser, der er egnede til parenteral eller enteral tilførsel, og som ikke på skadelig måde reagerer med de aktive forbindelser.

I almindelighed dispenseres forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse i enhedsdosisform omfattende fra 0,05 til 100 mg i en farmaceutisk acceptabel bærer pr. enhedsdosis.

15 Dosis af forbindelserne ifølge den foreliggende opfindelse er 0,1-300 mg/dag, fortrinsvis 1-30 mg/dag, når det indgives i patienter, f.eks. mennesker, som et lægemiddel.

20 Det er velkendt (Squires, R. F. og Braestrup, C., Nature (London) 266 (1977), 734) at specifikke steder i centralnervesystemet hos hvirveldyr udviser en specifik stor affinitet for binding af 1,4- og 1,5-benzodiazepiner. Disse steder kaldes benzodiazepinreceptorer.

25 De farmakologiske egenskaber af forbindelserne ifølge opfindelsen er blevet undersøgt ved at bestemme deres evne til at fortrænge radioaktivt mærket flunitrazepam fra sådanne benzodiazepinreceptorer samt deres evne til at antagonisere pentazolinducerede kramper.

Fortrængningsaktiviteten af forbindelserne ifølge opfindelsen er blevet bestemt ved at bestemme IC_{50} -værdien og ED_{50} -værdien.

30 IC_{50} -værdien repræsenterer den koncentration, hvorved der sker en fortrængning af 50% af den specifikke binding af 3H -flunitrazepam (1,0 nM, $0^{\circ}C$) i prøver omfattende et samlet volumen på 0,55 ml af en suspension af hjernemembran, f.eks. fra rotter.

Fortrængningsprøven udføres på følgende måde:

35 0,50 ml af en suspension af ubehandlet rotteforhjerne i 25 mM KH_2PO_4 , pH = 7,1 (5-10 mg væv/prøve) inkuberes i 40-60 minutter ved $0^{\circ}C$ sammen med 3H -diazepam (specifik aktivitet 14,4 Ci/mmol, 1,9 nM) eller 3H -flunitrazepam (specifik aktivitet 87 Ci/mmol, 1,0 nM). Efter inkubering filtreres suspensionen gennem "Whatman GF/C" glasfiberfiltre, filterresten vaskes to gange med kold buffer-

opløsning, og radioaktiviteten måles ved scintillationstælling.

Forsøget gentages, idet der forud for tilsætningen af det radioaktivt mærkede benzodiazepin tilsættes en given mængde eller overskud af den forbindelse, hvis fortrængningsevne ønskes bestemt. På basis af de opnåede måleresultater kan IC_{50} -værdien beregnes.

ED_{50} -værdien repræsenterer den dosis (mg/kg) af en prøvesubstans, hvorved den specifikke binding af flunitrazepam til benzodiazepinreceptorer i en levende hjerne reduceres til 50% af kontrolværdien. Et sådant in vivo forsøg udføres på følgende måde:

Grupper af mus injiceres med prøvesubstansen ved forskellige doser og sædvanligvis subcutant. 15 minutter senere gives 3H -flunitrazepam intravenøst til musene, og efter yderligere 20 minutter dræbes musene og deres forhjernemembraner fjernes, og radioaktiviteten i forhjernemembranerne måles ved scintillationstælling. ED_{50} -værdien bestemmes ud fra dosis-responskurver.

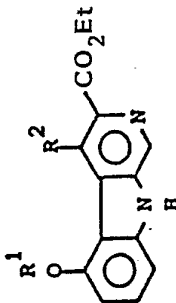
Antagonisme af pentazolinducerede kramper er blevet undersøgt.

Undersøgelsen blev udført i overensstemmelse med kendte forsøgsmodeller indenfor farmakologi, som f.eks. beskrevet i R.A.Turner, Screening Methods in Pharmacology, Academic Press, N.Y. og London 1965, især p.164 ff. eller Woodbury, P.M., Perry, I.K. og Schmidt, R.P. Antiepileptic Drugs, Raven Press, N.Y. 1972.

Hæmning af motorisk koordination i mus blev også undersøgt 30 minutter efter subkutan indgivelse i overensstemmelse med en metode beskrevet i litteraturen (Buus Lassen et al., Acta Pharmacol. et Toxicol., 1971, 39, 1-16).

Forsøgsresultater opnået ved at afprøve nogle af forbindelserne ifølge opfindelsen vil fremgå af den efterfølgende tabel 1.

Tabel 1

Testforbindelser 	Hæmning af ³ H-flunitrazepam binding		Antagonisme af pentazol-inducerede kramper ED ₅₀ i.p. mg/kg	Ataxia (mang- lende motorisk koordination)
	in vitro IC ₅₀ ng/ml	in vivo ED ₅₀ mg/kg		
R ¹				
R ²				
(CH ₃) ₂ CH	0,6	0,3	>100	>100
CH ₃	1,4	3,0	>100	>100
(CH ₃) ₂ CH	0,4	6,4	>100	>100
Diazepam ("Stesolid" ®) *	3	1,5	3	3
Lorazepam ("Temesta" ®) *	1	0,2	0,1	0,3

* Indgivet som kommercielle injektionspræparater.

Det fremgår af resultaterne ovenfor, at forbindelserne ifølge opfindelsen meget effektivt fortrænger ^3H -flunitrazepam fra benzodiazepinreceptorerne, skønt de overhovedet ikke modvirker pentazol-inducerede kramper og ikke udviser ataxia-egenskaber, hvilket betyder, at de f.eks. ikke udviser benzodiazepiners normale

5 antikonvulsive, angstdæpende og beroligende virkninger, hvorfor de er antagonist overfor disse benzodiazepiner. (A.S.Lippa, P.A.Nash og E.N.Greenblatt i "Anxiolytics", S.Fielding og H.Lal, Futura Publishing Co., Inc., New York 1979).

Sammenlignet med de ovenfor omtalte, kendte β -carbolinforbindelser har forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen en betydeligt større aktivitet, for såvidt angår hæmningen af bindingen ^3H -flunitrazepam. Dette kan illustreres ved at sammenligne ED_{50} -værdien for den kendte forbindelse 5-methoxy- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester med samme værdi for den nært beslægtede hidtil ukendte forbindelse

10 5-isopropoxy-4-methyl- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester. Medens førstnævnte således har en ED_{50} -værdi på 37 mg/kg, er den for sidstnævnte forbindelse 0,3 mg/kg, d.v.s. at sidstnævnte forbindelse har en affinitet over for benzodiazepinreceptorer, der er over 100

15 gange så stor som for den kendte nærtbeslægtede forbindelse.

De overraskende egenskaber ved forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen er imidlertid ikke alene, at de har denne stærkt øgede affinitet over for benzodiazepinreceptorer, men at de ikke modvirker pentazolinducerede kramper og ikke udviser ataxia-egenskaber. Forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen har således ikke benzodiazepinernes normale antikonvulsive, angstdæpende og beroligende

20 virkninger.

Dette kombineret med deres ovenfor omtalte kraftige affinitet over for benzodiazepinreceptorer bevirker, at de er stærke benzodiazepinantagonister.

25

Den uventede biologiske virkning af forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen ligger således i, at de er kraftige benzodiazepin-antagonister, medens de beslægtede kendte forbindelser er benzodiazepinagonister.

Antagonismevirkningen af forbindelserne ifølge opfindelsen illustreres yderligere ved afprøvning af virkningen af en af disse forbindelser, nemlig 5-isopropoxy-4-methyl- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester, overfor benzodiazepinvirkning i de to in vivo afprøvnings i ovennævnte tabel, nemlig pentazol-inducerede kramper

30

35

og ataxia.

Antagonisme af benzodiazepinvirkning på pentazol-inducerede krampeanfald i NMRI mus (20-25 g).

- 5 5 mg/kg diazepam, indgivet intraperitonealt 30 minutter før pentazol, hæmmede fuldstændig de krampeanfald, der induceredes med en supramaximal dosis pentazol (150 mg/kg, indgivet subkutant).

De foreliggende forbindelsers evne til at modvirke virkningen af benzodiazepin på pentazol-inducerede krampeanfald er blevet undersøgt ved at bestemme ED_{50} -værdien. ED_{50} -værdien angiver den koncentration af testforbindelsen, ved hvilken kloniske krampeanfald observeredes i 50% af dyrene behandlet med 5 mg/kg diazepam 30 minutter før indgivelse af pentazol og testforbindelsen 15 minutter før indgivelse af pentazol. Forsøget blev udført på følgende måde:

- 15 Mindst 4 grupper af mus (10 mus i hver gruppe) injiceredes intraperitonealt med 5 mg/kg diazepam. 15 minutter senere blev hver gruppe af mus injiceret intraperitonealt med forskellige doser af testforbindelsen og efter yderligere 15 minutter modtog musene 150 mg/kg pentazol, indgivet subkutant. Kloniske krampeanfald i løbet af de næste 30 minutter noteredes. Ud fra de opnåede resultater beregnedes ED_{50} -værdien.

I dette forsøg var ED_{50} -værdien for 5-isopropoxy-4-methyl- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester 0,7 mg/kg.

- 25 Antagonisme af benzodiazepinvirkning i manglende motorisk koordination.

NMRI mus (20-25 g) anbragtes på en horisontal træstang (diameter 4,3 cm), som roterede med en hastighed på 6 min^{-1} , 8 cm over bordet. En intraperitoneal injektion af 2 mg/kg lorazepam 30 min før testen inducerede ataxia i alle dyr, defineret som over 3 fald fra staven i løbet af 2 min. De foreliggende forbindelsers evne til at modvirke virkningen af benzodiazepin i motorisk koordination er blevet bestemt ved at bestemme ED_{50} -værdien. ED_{50} -værdien repræsenterer den koncentration ved hvilken ataxia observeredes i 50% af dyrene behandlet med testforbindelsen 15 minutter efter en intraperitoneal injektion af 2 mg/kg lorazepam. Testen blev udført på følgende måde:

35 Mindst 3 grupper af mus (8 mus i hver gruppe) injiceredes intraperitonealt med 2 mg/kg lorazepam. 15 minutter senere injice-

redes hver gruppe af mus med forskellige doser af testforbindelserne, og efter yderligere 15 minutter udførtes prøven for ataxia. Ud fra de opnåede resultater beregnedes ED_{50} -værdien.

5 Ved denne test var ED_{50} -værdien for 5-isopropoxy-4-methyl- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester 1,0 mg/kg.

Fremstillingen af forbindelserne ifølge opfindelsen vil nu blive beskrevet i yderligere detaljer under henvisning til de efterfølgende eksempler.

10 Eksempel 1

5-Isopropoxy-4-methyl- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester

A. 5-Isopropoxy-3-ethoxycarbonyl-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-1-carboxylsyre

15 Til en omrørt opløsning af 27,25 g 2-amino-3(4-isopropoxyindol-3-yl)butansyreethylester i 70 ml ethylacetat tilsattes 9,99 g glyoxylsyrehydrat opløst i 70 ml vand. pH-Værdien af blandingen indstilles til 4 (10% K_2CO_3 -opløsning), og blandingen omrørtes yderligere ved stuetemperatur i 6 timer. Det gule præcipitat opsamledes ved
20 filtrering, vaskedes med ethylacetat og tørredes.

Den organiske fase fra filtratet opsamledes, tørredes derefter (Na_2SO_4) og inddampedes.

Det opnåede råmateriale, 28,6 g (sm.p. 126-130°C sønderdeling), anvendtes uden yderligere rensning.

25

B. 5-Isopropoxy-4-methyl- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester

20,3 g 5-isopropoxy-3-ethoxycarbonyl-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-1-carboxylsyre tilbagesvales i 450 ml xylen i 3,5 timer. Blandingens inddampes til frembringelse af en gul olie, som
30 opløstes i 250 ml DMSO. Til opløsningen tilsattes 3,6 g svovl, og blandingen omrørtes ved 140°C i en totalperiode på 1,5 timer.

Opløsningsmidlet afdampes, og resten oprensedes på SiO_2 med hexan - acetone 1+1.

Udbyttet var 8,47 g 5-isopropoxy-4-methyl- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester (sm.p. 170-172°C).
35

På lignende måde fremstilledes følgende forbindelser ud fra forskellige tryptophanderivater.

4-Ethyl-5-methoxy- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester, sm.p. 166-167°C.

5-Isopropoxy- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester, sm.p. 209°C.

Eksempel 2

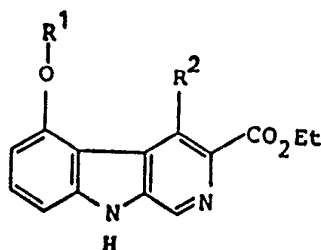
5 5-Isopropoxy-4-methyl- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester

0,5 g 5-hydroxy-4-methyl- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester tilbagesvales i 50 ml ethanol med 0,25 g 2-brompropan og 0,5 g K_2CO_3 i 4 timer under N_2 -atmosfære. Blandingen filtreres og indampes. Den opnåede rest oprenses på SiO_2 med dichlor-
10 methan - ethanol 1000 + 25.

Udbyttet var 0,243 g 5-isopropoxy-4-methyl- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester (sm.p. 170-172°C).

P a t e n t k r a v .

1. β -carbolin-3-carboxylsyrederivater k e n d e t e g n e t
ved, at de har den almene formel:



hvor R^1 betegner methyl, ethyl, n-propyl eller iso-propyl, og R^2
betegner hydrogen, methyl, ethyl, n-propyl eller iso-propyl,
forudsat at R^1 ikke betegner methyl, når R^2 betegner hydrogen.

15 2. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den
er 5-isopropoxy-4-methyl- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester.

3. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den
20 er 4-ethyl-5-methoxy- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester.

4. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den
er 5-isopropoxy- β -carbolin-3-carboxylsyreethylester.

Fremdragne publikationer:

EP 30254 A1.