



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 15 465 T2** 2006.08.03

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 313 697 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 15 465.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/26697**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 964 460.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/018324**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.08.2001**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **07.03.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.05.2003**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **30.11.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.08.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C07C 245/08** (2006.01)

A61K 31/655 (2006.01)

A61K 31/195 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

228683 P **29.08.2000** **US**

(73) Patentinhaber:

Nobex Corp., Research Triangle Park, N.C., US

(74) Vertreter:

Freischem und Kollegen, 50667 Köln

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**EKWURIBE, N., Nnochiri, Cary, US;
RIGGS-SAUTHIER, Jennifer, Raleigh, US**

(54) Bezeichnung: **IMMUNOREGULIERENDE VERBINDUNGEN, DEREN DERIVATE UND IHRE VERWENDUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Verwandte Anmeldung

[0001] Diese Anmeldung beansprucht die United States Provisional Application Nummer 60/228,683, eingereicht am 29. August 2000 zu nutzen, deren Offenbarung hierin in ihrer Gesamtheit als Referenz einbezogen wird.

Gebiet der Erfindung

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft immunregulierende Verbindungen und Verfahren, um damit Krankheiten zu behandeln.

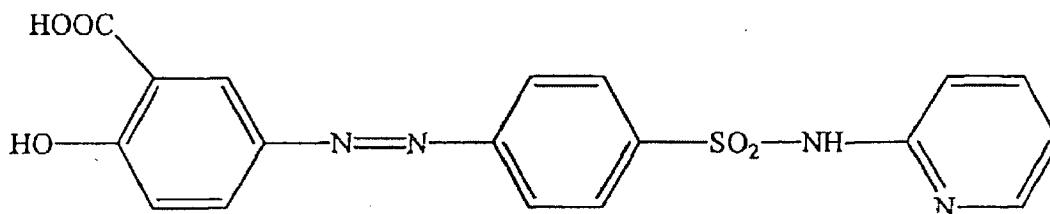
Hintergrund der Erfindung

[0003] Viele Menschen leiden an entzündlichen Darmerkrankungen (IBD). IBD ist ein allgemeiner Begriff, der verwendet wird um zwei entzündliche Erkrankungen, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, zu bezeichnen. Colitis ulcerosa ist eine chronische entzündliche Erkrankung unbekannter Ätiologie, welche verschiedene Teile des Gastrointestinal-(GI)-Traktes beeinträchtigt, insbesondere den unteren GI-Trakt, und noch spezieller das Kolon und/oder Rektum. Morbus Crohn ist eine ernste entzündliche Erkrankung des GI-Traktes. Sie herrscht im Dünndarm (Ileum) und dem Dickdarm (Kolon) vor. Verschiedene Medikationen werden verwendet, um entzündliche Darmerkrankungen zu behandeln.

[0004] Es ist bekannt Mesalamin, 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) zu verwenden, um Colitis ulcerosa zu behandeln. Während Mesalamin bei der Behandlung von Colitis ulcerosa wirksam sein kann, kann es absorbiert werden während es den GI-Trakt durchläuft. Diese Absorption kann die Menge Mesalamin nachteilig beeinflussen, welche den unteren GI-Trakt, insbesondere das Kolon und das Rektum, erreicht.

[0005] Verschiedene Mesalamin-Zubereitungen sind eingeführt worden bei einem Versuch Mesalamin zu schützen, während es den Darmkanal und den oberen GI-Trakt durchläuft. Eine dieser Zubereitungen ist eine Zubereitung mit verzögerter Freisetzung, welche auf einer pH-sensitiven Beschichtung beruht, welche das Mesalamin umgibt. Die Beschichtung gestattet, dass das Mesalamin den Darmkanal und den oberen GI-Trakt passiert, ohne dass es absorbiert wird, so dass das Mesalamin das Ziel (d. h. den unteren GI-Trakt, insbesondere das Kolon und/oder Rektum) intakt erreicht. In einer anderen Zubereitung umgeben Mesalamin-Mikrokügelchen einen Mesalamin-Kern. Diese Zubereitung setzt Mesalamin eher im gesamten GI-Trakt frei, als dass sie spezifisch auf das Kolon ausgerichtet ist. Es kann schwierig sein, die Bioverfügbarkeit der verschiedenen Mesalamin-Zubereitungen vorherzusagen, wenn sie an eine große Auswahl von Individuen verabreicht werden. Demzufolge kann es schwierig sein, die angemessene Dosierung für ein bestimmtes Individuum zu bestimmen.

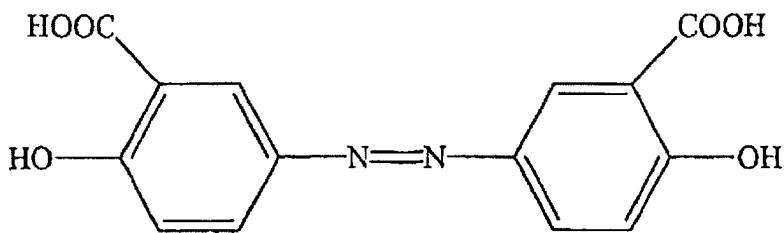
[0006] Es ist bekannt Sulfasalazin, welches die folgende Formel besitzt, zur Behandlung von Colitis ulcerosa zu verwenden.



[0007] Jedoch wird Sulfasalazin im Körper metabolisiert, so dass Mesalamin (5-Aminosalicylsäure (5-ASA)) und Sulfapyridin gebildet werden. Verschiedene Nebenwirkungen sind bei der Verwendung von Sulfasalazin beobachtet worden, einschließlich Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen und Kopfschmerzen, um nur einige zu nennen. Diese Nebenwirkungen werden gewöhnlich der Aktivität von Sulfapyridin im GI-Trakt, wie auch dem im System absorbierten, zugeschrieben.

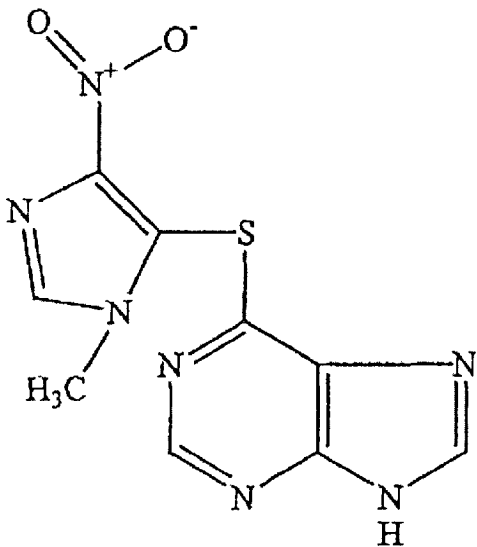
[0008] Das US-Patent Nr. 4 412 992 von Chan schlägt Mesalamin-Derivative vor. Im Gegensatz zu Sulfalazin kann der Zerfall dieser Verbindungen im Intestinaltrakt nicht zu unerwünschten metabolischen Produkte führen. Tatsächlich können die metabolischen Nicht-Mesalamin-Produkte unschädlich sein.

[0009] Olsalazin, welches die folgende Formel besitzt, ist zur Behandlung von Colitis ulcerosa verwendet worden.

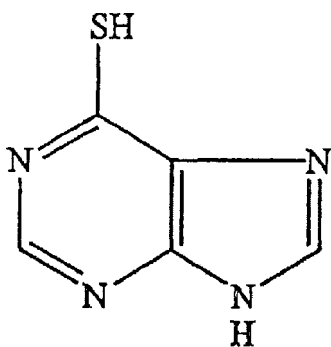


[0010] Zusätzlich dazu, dass es relativ teuer herzustellen ist, kann Olsalazin Nebenwirkungen, einschließlich Diarrhoe, haben.

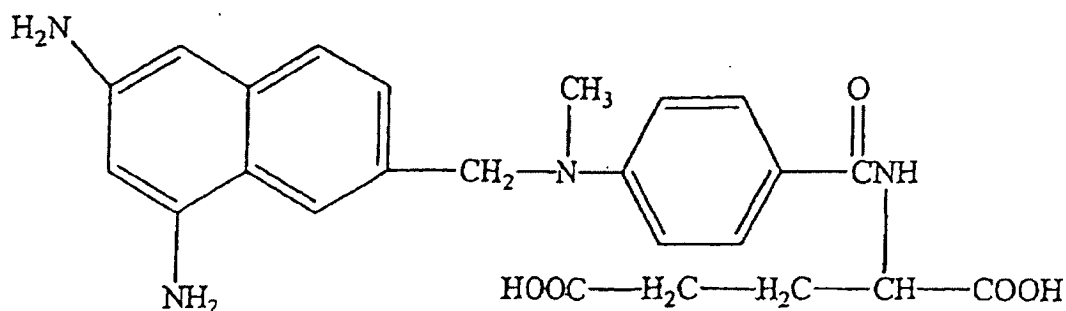
[0011] Es ist bekannt Azathioprin (6-(1-Methyl-4-nitroimidazol-5-ylthio)purin) bei der Behandlung von entzündlicher Darmerkrankung zu verwenden. Azathioprin hat die folgende chemische Struktur:



[0012] Es ist auch bekannt 6-Mercaptopurin, ein Metabolit von Azathioprin, zur Behandlung von entzündlicher Darmerkrankung zu verwenden. 6-Mercaptopurin hat die folgende chemische Struktur:



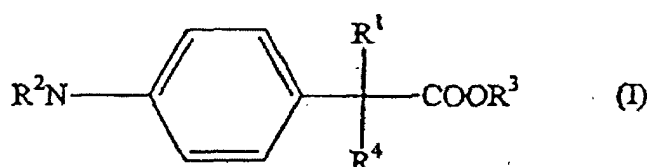
[0013] Methotrexat (L-4-amino-N¹⁰-methylpteroyl-glutaminsäure) ist auch zur Behandlung von entzündlicher Darmerkrankung verwendet worden. Methotrexat hat die folgende chemische Struktur:



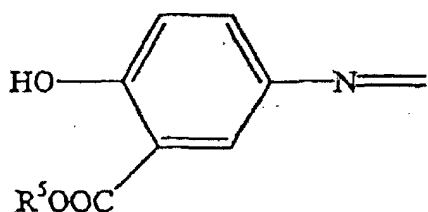
[0014] Das Polypeptid Cyclosporin, das traditionell Transplantationspatienten gegeben wurde, um Organabstoßung zu verhindern, ist auch zur Behandlung von entzündlicher Darmerkrankung verwendet worden. Die Verwendung von Cyclosporin zur Behandlung von IBD kann jedoch wegen der verschiedenen Nebenwirkungen begrenzt sein, die mit dieser Medikation verbunden sind. Diese Nebenwirkungen schließen Bluthochdruck, Nierenschäden, Tremor, Kopfschmerzen, Krämpfe, exzessiven Haarwuchs, extensives Wachstum des Zahnfleisches, Verwirrtheit, Koma und Gicht ein.

Zusammenfassung der Erfindung

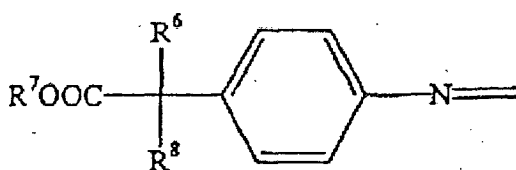
[0015] Gemäß erfindungsgemäßer Ausführungsbeispiele werden Verbindungen bereitgestellt, welche die folgende Formel besitzen:



worin R^1 , R^3 und R^4 unabhängig voneinander Wasserstoff oder C_1 - bis C_4 -Alkyl sind und R^2 ist:



worin R^5 ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff und C_1 - bis C_4 -Alkyl, oder



worin R^6 , R^7 und R^8 unabhängig voneinander Wasserstoff oder C_1 - bis C_4 -Alkyl sind, unter der Bedingung, dass wenn fünf der sechs Substituenten R^1 , R^3 , R^4 , R^6 , R^7 und R^8 Wasserstoff sind, der verbleibende Substituent C_1 - bis C_4 -Alkyl ist, und unter der weiteren Bedingung, dass wenn R^1 , R^3 , R^6 und R^7 jeweils Wasserstoff sind, R^4 und R^8 nicht beide C_2 -Alkyl sind, wie auch die pharmazeutisch verträglichen Salze solcher Verbindungen. Pharmazeutische Zusammensetzungen, welche Verbindungen gemäß erfindungsgemäßer Ausführungsbeispiele einschließen, werden auch bereitgestellt, wie auch Verfahren zur Behandlung von Entzündungszuständen mit solchen Verbindungen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0016] [Fig. 1](#) veranschaulicht Ausführungsbeispiele von Synthesewegen für erfindungsgemäße Verbindungen.

[0017] [Fig. 2](#) veranschaulicht Ausführungsbeispiele von Synthesewegen für erfindungsgemäße Verbindungen.

[0018] **Fig. 3** veranschaulicht die mittlere Reduktion von Kolon: Körpergewicht [% BW] unter Anwendung erfindungsgemäßer Ausführungsbeispiele (4-APAA/DNBS und Mischung/DNBS) im Vergleich mit Ergebnissen, die mittels des Standes der Technik (5-ASA/DNBS) erreicht werden, und Kontrolle (Vehikel/DNBS).

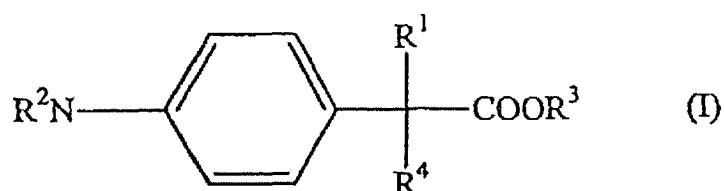
[0019] **Fig. 4** veranschaulicht DNBS-Colitis-Adhäsions-Werte, welche unter Anwendung erfindungsgemäßer Ausführungsbeispiele (4-APAA/DNBS und Mischung/DNBS) erreicht werden, im Vergleich zu Ergebnissen, welche mittels des Standes der Technik (5-ASA/DNBS) erreicht werden, und Kontrolle (Vehikel/DNBS und Vehikel/Sham).

Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsbeispiele

[0020] Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf hierin beschriebene bevorzugte Ausführungsbeispiele näher beschrieben. Es sollte jedoch begreiflich sein, dass diese Ausführungsbeispiele nur dem Zweck der Veranschaulichung der Erfindung dienen, und sollen nicht als Begrenzung des Geltungsbereichs der Erfindung verstanden werden, wie er durch die Ansprüche definiert wird.

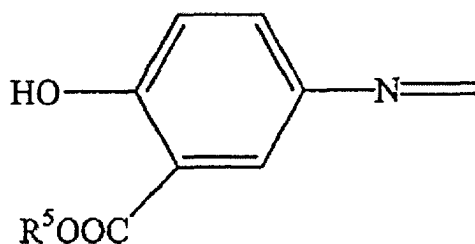
[0021] Wie hierin verwendet schließt der Begriff "entzündliche Darmerkrankung" Colitis ulcerosa und Morbus Crohn ein.

[0022] Gemäß erfindungsgemäßer Ausführungsbeispiele werden Verbindungen bereitgestellt, welche die folgende Formel besitzen:

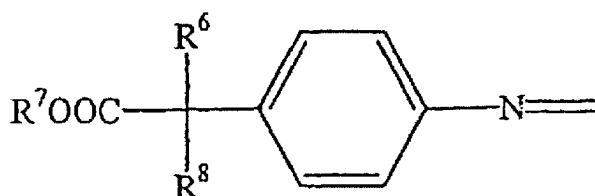


[0023] R^1 , R^3 und R^4 sind unabhängig voneinander Wasserstoff oder C_1 bis C_4 -Alkyl. Bevorzugt sind R^1 , R^3 und R^4 unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus H, CH_3 , CH_2CH_3 und $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. Stärker bevorzugt sind R^1 , R^3 und R^4 H oder CH_3 .

[0024] R^2 ist.



oder



[0025] R^5 ist ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff und C_1 - bis C_4 -Alkyl. Bevorzugt ist R^5 ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus H, CH_3 , CH_2CH_3 und $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. Stärker bevorzugt ist R^5 H oder CH_3 , und am stärksten bevorzugt ist R^5 H.

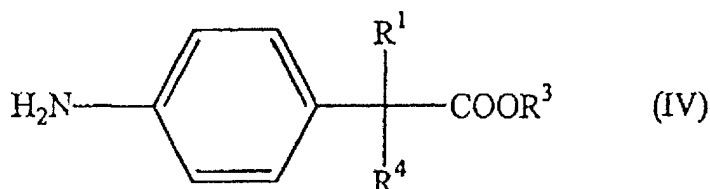
[0026] R^6 , R^7 und R^8 sind unabhängig voneinander Wasserstoff oder C_1 - bis C_4 -Alkyl. Bevorzugt sind R^6 , R^7 und R^8 unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus H, CH_3 , CH_2CH_3 und $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

Stärker bevorzugt sind R^6 , R^7 und R^8 unabhängig voneinander H oder CH_3 .

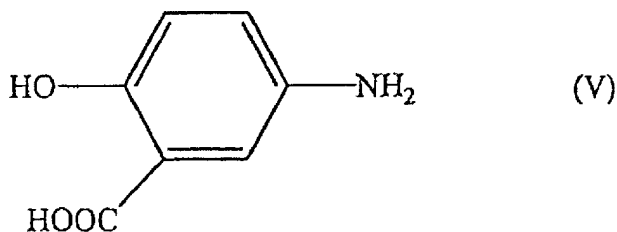
[0027] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können unter Verwendung bekannter Ausgangsmaterialien und Reagenzien hergestellt werden. Zum Beispiel sind Ausführungsbeispiele von Synthesewegen veranschaulicht, wie sie in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigt werden.

[0028] Erfindungsgemäße Verbindungen können eingesetzt werden zur Prophylaxe oder Behandlung verschiedener Krankheiten, insbesondere von Entzündungszuständen des GI-Traktes, einschließlich, aber nicht begrenzt auf Entzündungszustände des Mundes wie Mukositis, Infektionskrankheiten (z. B. virale, bakterielle und fungale Krankheiten) und Morbus Crohn; Entzündungszustände des Ösophagus wie Ösophagitis, aus chemischen Verletzungen resultierende Zustände (z. B. Ingestion von Lauge), gaströsophageale Reflux-Erkrankungen, Gallensäure-Reflux, Barrett-Ösophagus, Morbus Crohn und Ösophagealstriktur; Entzündungszustände des Magens wie Gastritis (z. B. *Helicobacter pylori*, saure/peptische Erkrankung und chronischatrophische Gastritis), Ulkuskrankheit, präkanzeröse Läsion des Magens, funktionelle Dyspepsie und Morbus Crohn; Entzündungszustände des Darms wie Zöliakie, Morbus Crohn, bakterielle Überwucherung, Ulkuskrankheit und Fissuren des Darms; Entzündungszustände des Kolon sowie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, infektiöse Colitis (z. B. pseudomembranöse Colitis wie *Clostridium difficile* Colitis, *Salmonella enteritis*, *Shigella*-Infektionen, *Yersiniose*, Kryptosporidiose, microsporidial Infektionen und Virusinfektionen), strahleninduzierte Colitis, Colitis beim immungeschwächten Wirt (z. B. Typhlitis), präkanzeröse Zustände des Kolon (z. B. Dysplasie, Entzündungszustände des Darms und Kolonpolypen), Proktitis, Entzündung im Zusammenhang mit Hämorrhoiden, Proctalgia fugax und rektale Fissuren; Leber-Gallenblasen- und/oder Gallen-Trakt-Zustände wie Cholangitis, primär-sklerosierende Cholangitis, primäre biliäre Zirrhose und Cholezystitis und intestinaler Abszess. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch zur Diagnose von Bestandteilen, Zuständen oder Krankheitszuständen in biologischen Systemen oder Untersuchungsmaterialien, wie auch für diagnostische Zwecke in nicht-physiologischen Systemen eingesetzt werden. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Verbindungen Anwendung finden bei der Prophylaxe oder Behandlung eines Zustands (von Zuständen) oder eines Krankheitszustands (von Krankheitszuständen) in pflanzlichen Systemen. Als Beispiel kann die aktive Komponente des Konjugats Insektizide, herbizide, fungizide und/oder pestizide Wirksamkeit besitzen, welche für die Anwendung in verschiedenen pflanzlichen Systemen zugänglich ist.

[0029] In einigen Ausführungsbeispielen können erfindungsgemäße Verbindungen im Intestinal-Trakt zerfallen, um das metabolische Produkt der Formel IV:

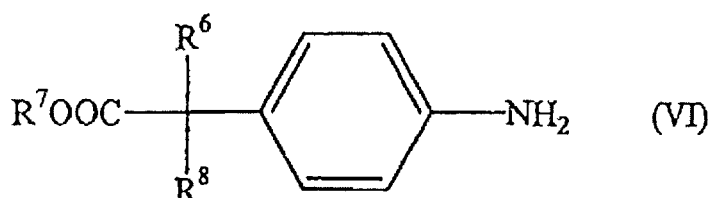


worin R^1 , R^3 und R^4 definiert sind, wie es oben unter Bezugnahme auf Formel I beschreiben ist, und das metabolische Produkt der Formel V zu bilden:



[0030] Das metabolische Produkt der Formel IV kann entzündungshemmende Aktivität und/oder immunregulierende Aktivität besitzen. Das metabolische Produkt der Formel V kann entzündungshemmende Aktivität besitzen, und kann genauer gesagt die Hemmung von Prostaglandinsynthetase I & II bereitstellen.

[0031] In anderen Ausführungsbeispielen können erfindungsgemäße Verbindungen im Intestinal-Trakt zerfallen, um das metabolische Produkt der Formel IV und das metabolische Produkt der Formel VI zu bilden:



worin R^6 , R^7 und R^8 sind, wie es oben unter Bezugnahme auf Formel I beschreiben ist. Das metabolische Produkt der Formel VI kann entzündungshemmende Aktivität und/oder immunregulierende Aktivität besitzen. Dementsprechend können erfindungsgemäße Verbindungen immunregulierende Aktivität besitzen. Erfindungsgemäße Verbindungen können auch die Hemmung von Prostaglandinsynthetase I und II bereitstellen. Erfindungsgemäße Verbindungen können bei der Behandlung verschiedener Krankheiten nützlich sein, insbesondere Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und dergleichen.

[0032] Beim therapeutischen Gebrauch zieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Behandlung eines tierischen Subjekts in Betracht, welches sich in einem intestinalen Zustand (Zuständen) oder Krankheitszustand (-zuständen) befindet oder latent anfällig dafür ist, und deshalb einer Behandlung bedarf, umfassend die Verabreichung einer wirksamen Menge einer erfindungsgemäßen Verbindung an ein solches Tier, welche bei diesem Zustand oder Krankheitszustand therapeutisch wirksam ist. Mittels der erfindungsgemäßen Verbindungen zu behandelnde Subjekte schließen sowohl menschliche als auch nicht-menschliche tierische Subjekte (z. B. Vogel, Hund, Katze, Kuh, Pferd) ein, und sind bevorzugt Säugetier-Subjekte, und am stärksten bevorzugt menschliche Subjekte.

[0033] In Abhängigkeit vom zu bekämpfenden spezifischen Zustand oder Krankheitszustand, können tierischen Subjekten erfindungsgemäße Verbindungen in jeder geeigneten therapeutisch wirksamen und sicheren Dosierung verabreicht werden, was man leicht mit dem Wissen des Standes der Technik und ohne unangemessenes Experimentieren bestimmt werden kann. Zum Beispiel können erfindungsgemäße Verbindungen verabreicht werden in einer Dosierung zwischen ungefähr 0,1 und 100 mg/kg, bevorzugt zwischen ungefähr 5 und 90 mg/kg, und stärker bevorzugt zwischen ungefähr 10 und 80 mg/kg.

[0034] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können selbst, wie auch in Form pharmazeutisch verträglicher Ester und anderer ihrer physiologisch funktionellen Derivate verabreicht werden.

[0035] Die vorliegende Erfindung zieht auch pharmazeutische Zubereitungen in Betracht, sowohl für veterinär- als auch humanmedizinische Verwendung, welche als aktiven pharmazeutischen Bestandteil eine oder mehr erfindungsgemäße Verbindung(en) umfassen. In solchen pharmazeutischen und Medikament-Zubereitungen wird der aktive pharmazeutische Bestandteil dafür bevorzugt zusammen mit einem oder mehr pharmazeutisch verträglichem beziehungsweise verträglichen Träger(n) und optional irgendwelchen anderen therapeutischen Bestandteilen eingesetzt. Der beziehungsweise die Träger muss beziehungsweise müssen in dem Sinn pharmazeutisch verträglich sein, dass sie mit den anderen Bestandteilen der Zubereitung kompatibel sind und bevorzugt nicht unangemessen schädlich für ihren Empfänger sind. Der aktive pharmazeutische Bestandteil wird in einer Menge bereitgestellt, die effektiv ist um den gewünschten pharmazeutischen Effekt zu erreichen, wie hierin oben beschrieben wird, und in einer Menge, die geeignet ist die gewünschte Tagesdosis zu erreichen.

[0036] Die Zubereitungen schließen jene ein, die für parenterale wie auch nicht-parenterale Verabreichung geeignet sind, und spezifische Verabreichungsmodalitäten schließen ein, sind aber nicht begrenzt auf, orale, rektale, bukkale, topische, nasale, ophthalmische, subkutane, intramuskuläre, intravenöse, transdermale, intrathekale, intraartikuläre, intraarterielle, subarachnoidale, bronchiale, lymphatische, vaginale und intrauterine Verabreichung. Zubereitungen zur oralen und parenteralen Verabreichung sind bevorzugt, wobei Zubereitungen, die zur oralen Verabreichung geeignet sind, am stärksten bevorzugt sind.

[0037] Wenn eine erfindungsgemäße Verbindung in einer Zusammensetzung eingesetzt wird, die eine flüssige Lösung umfasst, kann die Zubereitung vorteilhafterweise oral oder parenteral verabreicht werden. Wenn eine erfindungsgemäße Verbindung in einer flüssigen Suspensions-Zubereitung oder als Pulver in einer biokompatiblen Träger-Zubereitung angewendet wird, kann die Zubereitung bevorzugt oral, rektal oder bronchial verabreicht werden.

[0038] Wenn eine erfindungsgemäße Verbindung direkt in Form eines pulverisierten Feststoffs angewendet wird, kann die Verbindung vorteilhafterweise oral verabreicht werden. Alternativ kann sie bronchial verabreicht

werden, über die Vernebelung des Pulvers in einem Trägergas, um eine gasförmige Dispersion des Pulvers zu bilden, welches von dem Patienten aus einem Beatmungssystem eingeatmet wird, das einen geeigneten Vernebler umfasst.

[0039] Die eine erfindungsgemäße Verbindung umfassenden Zubereitungen können in geeigneter Weise als Einzeldosi-Form vorliegen und können mit jedem der im Stand der Technik der Pharmazie wohlbekannten Verfahren hergestellt werden. Solche Verfahren schließen allgemein den Schritt ein, bei dem eine erfindungsgemäße Verbindung mit einem Träger in Verbindung gebracht wird, welcher aus einem oder mehreren zusätzlichen Bestandteilen besteht. Typischerweise werden die Zubereitungen hergestellt durch gleichmäßiges und inniges in Verbindung Bringen einer erfindungsgemäßen Verbindung mit einem flüssigen Träger, einem fein zerteilten festen Träger oder beiden, und dann, falls erforderlich, Formen des Produkts zu einer Darreichungsform der gewünschten Zubereitung.

[0040] Erfindungsgemäße Zubereitungen, die zur oralen Verabreichung geeignet sind, können als diskrete Einheiten wie Kapseln, Oblatenkapseln, Tabletten oder Lutschtabletten dargeboten werden, wobei jede eine vorbestimmte Menge einer erfindungsgemäßen Verbindung als Pulver oder Granalien enthält; oder als Suspension in einem wässrigen Liquor oder einer nicht-wässrigen Flüssigkeit, wie einem Sirup, einem Elixier, einer Emulsion oder einer Arzneimittellösung.

[0041] Eine Tablette kann mittels Kompression oder Formpressen, optional mit einem oder mehr zusätzlichen Bestandteilen, hergestellt werden. Komprimierte Tabletten können mittels Kompression in einer geeigneten Maschine hergestellt werden, wobei die aktive Verbindung in freifließender Form, wie einem Pulver oder Granalien vorliegt, welche optional mit einem Bindemittel, Sprengmittel, Schmierstoff, inerten Verdünnungsmittel, Oberflächenaktivstoff oder Austragemittel gemischt ist. Formgepresste Tabletten, welche eine Mischung der pulverisierten aktiven Verbindung mit einem geeigneten Träger umfassen, können durch Formen in einer geeigneten Maschine hergestellt werden.

[0042] Ein Sirup kann durch Hinzufügen einer erfindungsgemäßen Verbindung zu einer konzentrierten wässrigen Lösung eines Zuckers, zum Beispiel Saccharose, hergestellt werden, zu welcher auch jeglicher zusätzlicher Bestandteil beziehungsweise jegliche zusätzliche Bestandteile hinzugefügt werden kann beziehungsweise können. Solcher zusätzlicher Bestandteil beziehungsweise solche zusätzlichen Bestandteile kann beziehungsweise können beispielsweise Geschmacksstoffe, geeignete Konservierungsstoffe, Mittel zur Verzögerung der Kristallisation des Zuckers, Mittel zur Erhöhung der Löslichkeit irgendeines anderen Bestandteils, wie einen Polyhydroxyalkohol, zum Beispiel Glycerin oder Sorbitol einschließen.

[0043] Zur parenteralen Verabreichung geeignete Zubereitungen umfassen geeigneter Weise eine sterile wässrige Formulierung einer erfindungsgemäßen Verbindung, welche bevorzugt isotonisch mit dem Blut des Empfängers ist (z. B. physiologische Kochsalzlösung). Solche Zubereitungen können Suspensiermittel und Verdickungsmittel oder andere mikropartikuläre Systeme einschließen, welche ausgelegt sind um die Verbindung zu Blutkomponenten oder einem oder mehr Organen zu steuern. Die Zubereitungen können als Einzeldosis- oder Multi-Dosis-Form vorliegen.

[0044] Nasenspray-Zubereitungen umfassen gereinigte wässrige Lösungen einer erfindungsgemäßen Verbindung mit Konservierungsstoffen und isotonischen Mitteln. Solche Zubereitungen sind bevorzugt auf einen pH und isotonischen Zustand eingestellt, der mit den Nasenschleimhaut-Membranen kompatibel ist.

[0045] Zubereitungen zur rektalen Verabreichung können als Zäpfchen mit einem geeigneten Träger wie Kaobutter, Hartfetten oder gehärteten Fettcarbonsäuren vorliegen.

[0046] Ophthalmische Zubereitungen werden durch ein ähnliches Verfahren wie Nasenspray hergestellt, außer dass der pH und die isotonischen Faktoren bevorzugt so eingestellt sind, dass sie denen des Auges entsprechen.

[0047] Topische Zubereitungen umfassen eine erfindungsgemäße Verbindung, die gelöst oder suspendiert ist in einem oder mehr Medien wie Mineralöl, Erdöl, Polyhydroxyalkoholen oder anderen Basen, die für topische pharmazeutische Zubereitungen verwendet werden.

[0048] Zusätzlich zu den oben genannten Bestandteilen können die Zubereitungen dieser Erfindung weiterhin einen zusätzlichen Bestandteil oder mehr zusätzliche Bestandteile enthalten, die ausgewählt sind aus Verdünnungsmitteln, Puffern, Geschmacksstoffen, Sprengmitteln, Oberflächenaktivstoffen, Verdickungsmitteln,

Schmiermitteln, Konservierungsmitteln (einschließlich Antioxidanzien) und dergleichen.

[0049] Dementsprechend können erfindungsgemäße Verbindungen zur Prophylaxe oder Behandlung verschiedener Krankheiten eingesetzt werden, insbesondere Krankheiten des GI-Traktes, einschließlich, aber nicht begrenzt auf entzündliche Darmkrankheiten.

[0050] Die vorliegende Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele beschrieben. Es sollte jedoch gewürdigt werden, dass diese Beispiele nur dem Zweck der Veranschaulichung von Aspekten der vorliegenden Erfindung dienen und nicht den Geltungsbereich der Erfindung begrenzen, wie er durch die Ansprüche definiert wird.

BEISPIELE

Beispiele 1 bis 4

Synthese von erfindungsgemäßen Verbindungen

[0051] Die Schmelzpunkte wurden mit einem "Laboratory Devices Mel-Temp II" Kapillar-Schmelzpunktgerät erhalten und sind unkorrigiert. ¹H-NMR-Spektren wurden mit einem "Varian Unity 600 MHz" Spektrometer erhalten. Die chemischen Verschiebungen (δ) werden angegeben als Teile je Million Teile (ppm) relativ zu dem internen Standard Tetramethylsilan. Ultraviolett- und Spektren im sichtbaren Bereich wurden mit einem "Beckman DU 640i" Spektrophotometer erhalten. Infrarotspektroskopie wurden mit einem "Nicolet Impact 410" erhalten und "Fast-Atom-Bombardment"- (FAB) Massenspektroskopiedaten wurden mittels M-Scan Inc erhalten. Alle Reagenzien wurden verwendet, wie sie von Aldrich Chemical Co. erhalten wurden.

Beispiele 1 und 2

Synthese von 5-[4-(1-Carboxy-ethyl)-phenylazo]-2-hydroxybenzoesäure

Beispiel 1

2-(4-Amino-phenyl)-propionsäure

[0052] Ein ofengetrockneter 500 ml-Dreihalskolben, ausgestattet mit einem Rühranker, wurde beschickt mit (R, S) 2-(4-Nitrophenyl)propionsäure (5,00 g, 25,6 mmol), absolutem Ethylalkohol (200 ml) und Palladium (10 Gew.-% auf Aktivkohle, 0,27 g, 2,56 mmol). Eine Wasserstoffumgebung wurde in den Kolben eingeführt und die Mischung wurde dann bei Raumtemperatur 6 Stunden lang gerührt. Die rohe Reaktionsmischung wurde durch Celite filtriert und der Ethylalkohol wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde unter Vakuum über Nacht getrocknet, wodurch ein schwachgelber Feststoff resultierte (70% Ausbeute, 2,98 g): Smp. 125–129°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 1,24 (3H, s), 1,26 (3H, s), 3,41 (1H, s), 3,43 (2H, s), 6,46 (2H, d, J = 7,6 Hz), 6,91 (2H, d, J = 7,6 Hz); IR (KBr) 2596, 2189, 1630, 1581, 1441, 1375, 1277, 1192, 1052, 876 cm⁻¹; FAB-MS (NBA) m/z 165 (M + H)⁺.

Beispiel 2

5-[4-(1-Carboxyethyl)-phenylazo]-2-hydroxybenzoesäure

[0053] Wie im obigen Verfahren hergestellt, wurde 2-(4-Amino-phenyl)-propionsäure (3,90 g, 23,6 mmol) gelöst in einer wässrigen HCl-Lösung (75 ml, 36,5–38,0% HCl in 8 ml H₂O) in einem 200 ml-Becherglas platziert und in einem Eisbad auf 0°C gekühlt. Sobald die Lösung bei 0°C stabilisiert war, wurde Natriumnitrit (1,79 g, 26,0 mmol) in Wasser (2 ml) tropfenweise hinzugefügt. Die Temperatur wurde bei 0–5°C gehalten und die resultierende Diazoniumsalzlösung wurde 15 min. lang gerührt.

[0054] Während die Diazoniumsalzlösung rührte, wurde ein 800 ml-Becherglas, ausgestattet mit einem Rühranker, Thermometer und pH-Sonde (Orion "Model 420A" mit Orion "Semimicro pH-Sonde") mit Salicylsäure-Natriumsalz, (11,3 g, 20,8 mmol), gelöst in Natriumhydroxid (4,25 g, 106 mmol) und H₂O (100 ml), beschickt. Unter Verwendung eines Eisbades wurde die Salicylsäurelösung auf 17°C gekühlt und die Diazoniumsalzlösung wurde langsam in 10 ml-Portionen hinzugegeben. Während der gesamten Zugabe wurde der pH durch die Zugabe von wässrigem Natriumhydroxid bei 13,2–13,3 gehalten und die Temperatur wurde durch die Zugabe von Eis zwischen 17–18°C gehalten. Nachdem die Zugabe abgeschlossen war, ließ man die resultie-

rende dunkelrote Lösung auf Raumtemperatur erwärmen und das Rühren wurde 90 min. lang fortgesetzt. Nach Ansäuern auf pH 3,5 mit konzentrierter HCl (~20 ml, 36,5–38%), fiel ein dunkelroter Feststoff aus und wurde mittels Vakuumfiltration gesammelt.

[0055] Das Rohprodukt (8,49 g, 27,0 mmol) wurde in H₂O (300 ml) suspendiert und bei 70°C 30 min. lang erhitzt, um überschüssige Salicylsäure zu entfernen. Die Suspension wurde auf 50°C gekühlt und ein Feststoff wurde durch Saugfiltration gesammelt. Der gesammelte Feststoff wurde dann mittels Flash-Chromatographie (SiO₂: Ethylacetat/Hexane, 1:1) gereinigt. Das Rohprodukt (2,50 g, 7,95 mmol) in DMF (~4,5 ml) wurde aufgebracht und gelbgefärbte Fraktionen wurden gesammelt, kombiniert und unter reduziertem Druck konzentriert. Nach dem Trocknen unter Vakuum wurde das gereinigte Produkt als orangefarbener Feststoff in 55% Ausbeute erhalten (1,38 g): Smp. 147°C, ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 1,38 (3H, s), 1,39 (3H, s), 3,76 (1H, s), 3,78 (1H, s), 7,11 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,46 (2H, d, J = 7,8 Hz), 7,80 (2H, d, J = 8,4 Hz), 8,03 (1H, d, J = 9,0 Hz), 8,30 (1H, s); IR (KBr) 2973, 1921, 1708, 1652, 1577, 1477, 1339, 1289, 1226, 1164, 1101, 1013, 857, 663 cm⁻¹; UV-Vis (MeOH) λ_{max} = 355 nm, ε = 23700 mol⁻¹cm⁻¹; FAB-MS (NBA) m/z 313 (M)⁻.

Beispiel 3

Synthese von 5-(4-Carboxymethyl-phenylazo)-2-hydroxybezoessäure [APAZA]

[0056] 4-Aminophenyllessigsäure (10,0 g, 66,2 mmol), gelöst in einer wässrigen HCl-Lösung (20 ml, 36,5–38,0% HCl in 200 ml H₂O) wurde in einem 500 ml-Becherglas platziert und in einem Eisbad auf 0°C gekühlt. Sobald die Lösung bei 0°C stabilisiert war, wurde Natriumnitrit (5,02 g, 72,8 mmol) in Wasser (50 ml) langsam in 5 ml-Portionen hinzugefügt. Die Temperatur wurde bei 0–5°C gehalten und die resultierende Diazoniumsalzlösung wurde 15 min. lang gerührt.

[0057] Während die Diazoniumsalzlösung rührte, wurde ein 2 l-Becherglas, ausgestattet mit einem Rühranker, Thermometer und pH-Sonde (Orion "Model 420A" mit Orion "Semimicro pH-Sonde") mit Salicylsäure-Natriumsalz (31,8 g, 198 mmol), gelöst in Natriumhydroxid (11,9 g, 230 mmol) und Wasser (200 ml) beschickt. Unter Verwendung eines Eisbades wurde die Salicylsäurelösung auf 17°C gekühlt und die Diazoniumsalzlösung wurde langsam in 25 ml-Portionen hinzugefügt. Während der gesamten Zugabe wurde der pH durch Hinzufügen von wässrigem Natriumhydroxid auf 13,2–13,3 gehalten, und die Temperatur wurde durch Zugabe von Eis zwischen 17–18°C gehalten. Nachdem die Zugabe abgeschlossen war, ließ man die resultierende dunkelrote Lösung auf Raumtemperatur erwärmen und das Rühren wurde zusätzliche 30 min. lang fortgesetzt. Nach Ansäuern auf pH 3 mit konzentrierter HCl (~50 ml, 36,5–38%) fiel ein brauner Feststoff aus und wurde mittels Vakuumfiltration gesammelt.

[0058] Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie (SiO₂: Ethylacetat/Hexane, 1:1) gereinigt. Auf eine Säule, gepackt 70–230 Mesh, 60 Å Kieselgel mit einem BET-Oberflächenbereich von ~500 m²/g und einem Porenvolumen von 0,75 cm³/g, wurde das Rohprodukt (11,5 g, 38,2 mmol) in DMF (~12 ml) aufgebracht. Fraktionen wurden gesammelt und basierend auf der Farbe kombiniert. Die erste Bande besaß eine gelbe Farbe und enthielt einen Überschuss Salicylsäure wie auch Spuren des gewünschten Produkts. Die zweite Bande war orangefarben und enthielt das gewünschte Produkt, und die dritte Bande war rot und enthielt unbekannte Verunreinigungen. Alle Fraktionen wurden kombiniert und unter reduziertem Druck konzentriert und unter Vakuum getrocknet.

[0059] Das gereinigte Produkt wurde als orangefarbener Feststoff in 28% Ausbeute (2,75 g) erhalten: Smp 204°C; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 3,67 (2H, s), 7,11 (1H, d, J = 9,0 Hz), 7,44 (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,79 (2H, d, J = 8,4 Hz), 8,02 (1H, d von d, J = 2,4 Hz, 9,0 Hz), 8,29 (1H, s); IR (KBr) 3098, 1696, 1614, 1458, 1345, 1195, 838 cm⁻¹; UV-Vis (Me-OH) λ_{max} = 350 nm, ε = 25700 mol⁻¹cm⁻¹; positive FAB-MS (NBA) m/z 301 (M + H)⁺, negative FAB-MS (NBA) m/z 299 (M)⁻.

Beispiel 4

Synthese von 4-(4-Carboxymethyl-phenylazo)-Phenyllessigsäure

[0060] 4-Aminophenyllessigsäure (3,75 g, 24,8 mmol) wurde in Wasser (75 ml) suspendiert und konzentrierte Salzsäure (8 ml) wurde hinzugegeben. Die Lösung wurde in einen Eisbad unter schnellem Rühren auf 0°C gekühlt. Natriumnitrit (1,80 g, 26,1 mmol) in Wasser (20 ml) wurde tropfenweise zu der 4-Aminophenyllessigsäurelösung unter schnellem Rühren hinzugegeben. Es wurde darauf geachtet, dass die Temperatur zu jeder Zeit zwischen 0–5°C gehalten wird, insbesondere während der NaNO₂-Zugabe. Die Reaktion wurde zusätzliche 20

min. lang gerührt. In der Zwischenzeit wurde Phenylelessigsäure (10,1 g, 74,4 mmol) in einer wässrigen NaOH-Lösung (4,50 g, 113 mmol NaOH in 100 ml H₂O) gelöst. Die Lösung wurde bei 17°C und pH 13,3 stark gerührt. Die Diazoniumsalzlösung wurde tropfenweise zu der Phenylelessigsäurelösung gegeben. Es ist äußerst wichtig während der gesamten Zeit die Temperatur der Phenylelessigsäurelösung zwischen 17–18°C und den pH zwischen 13,2–13,3 zu halten, insbesondere während der Zugabe des Diazoniumsalzes. Die Temperatur wurde durch die Zugabe von Eis reguliert und der pH wurde durch die Zugabe von 8 M NaOH reguliert. Nachdem die Zugabe abgeschlossen war, ließ man die Lösung auf Raumtemperatur erwärmen und rührte zusätzliche 30 min. lang. Die Reaktionsmischung wurde abgesaugt, um ungelöste Feststoffteilchen oder ungewollte Nebenprodukte zu entfernen. Das Filtrat wurde mit wässriger HCl (10 ml konz. HCl in 20 ml H₂O) angesäuert, was einen dunkelroten Niederschlag erzeugte. Der Niederschlag wurde mittels Saugfiltration gesammelt und mehrmals mit kaltem H₂O gewaschen, bis das Filtrat klar war. Der gesammelte Feststoff wurde über Nacht luftgetrocknet, wodurch die gewünschte Verbindung als roter Feststoff in 37 Ausbeute erhalten wurde: IR (KBr) 3030 (br), 1696, 1658, 1452, 1414, 1201, 850, 675 cm⁻¹ FABMS m/z 299 (M + H)⁺, 320 (M + Na); ¹H-NMR (DM-SO-d₆) δ 3,47 (s, 4H), 7,33 (4H, d, J = 8,1 Hz), 7,84 (4H, d, J = 8,4 Hz).

Beispiel 5

Metabolismus von APAZA nach oraler Gabe

[0061] Der Abbau von Apaza (5-(4-Carboxymethyl-phenylazo)-2-hydroxybenzoesäure), einer erfindungsge-
mäßigen Verbindung, und Sulfasalazin (als Kontrolle verwendet; kein Teil der vorliegenden Erfindung) und die
Erzeugung ihrer Metaboliten, als diese Verbindungen oral an Ratten dosiert wurden, wurde gemessen, um in
der Lage zu sein zu bestätigen, dass sowohl Apaza als auch Sulfasalazin bakterieller Azo-Reduktion unterlie-
gen und ihre Metaboliten, 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) und Sulfapyridin für Sulfasalazin, 5-Aminosalicylsäure
(5-ASA) und 4-Aminophenylelessigsäure (4-APAA) für Apaza, ergeben.

[0062] Dieses Experiment wurde durchgeführt, um zu bestätigen, dass eine Azo-Verbindung, Apaza, einem
bakteriellen Reduktionsprozess unterliegt und ihre Metaboliten im In-vivo-Metabolismus hervorbringt. Die
Quantifizierung ihrer Metaboliten wurde durchgeführt. Sulfasalazin, kein Teil der vorliegenden Erfindung, wur-
de als Kontrolle verwendet, weil bei ihr eine ähnliche Azo-Bindungsspaltung durch Bakterien eintritt, was in
5-Aminosalicylsäure und Sulfapyridin als ihre Metaboliten resultiert. Sowohl Apaza als auch Sulfasalazine wur-
den abgebaut und ihre Metaboliten wurden wie erwartet erzeugt.

[0063] Bei Urin wurden die Ausgangsverbindungen und ihre Metaboliten nur mit der Sammlung von Tag 1 de-
tektiert. Der Rest der Sammlungen zeigte keine Verbindungen. Beim Fäces waren bis zur Sammlung von Tag
2 Verbindungen detektierbar.

[0064] Ratten denen Apaza dosiert wurde (Ratte 1, 2 und 3) zeigten Apaza, 4-APAA, Actarit und acetyliertes
5-ASA im Urin. Ratten mit Sulfasalazin-Dosierung (Ratte 4, 5 und 6) zeigten Sulfasalazin, Sulfapyridin und ace-
tyliertes 5-ASA im Urin. Nur acetyliertes 5-ASA wurde im Fäces detektiert, unabhängig davon welche Verbin-
dungen gegeben wurden. 5-ASA wurde schnell in acetyliertes 5-ASA überführt.

[0065] Es ist interessant zu erwähnen, dass während mit Sulfasalazin dosierte Ratten ihre Metaboliten 5-ASA
(acetyliertes 5-ASA in diesem Fall) und Sulfapyridin im 1:1-Verhältnis erzeugten, Ratten mit Apaza-Dosierung
7 bis 10 mal mehr 4-APAA als acetyliertes 5-ASA erzeugten.

[0066] Es wird angenommen, dass die Hauptmenge des eingenommenen Sulfasalazins sich den Dünndarm
hinab zum Kolon bewegt und bakterieller Azo-Reduktion unterliegt, wodurch Sulfapyridin- und 5-ASA-Moleküle
freigesetzt werden. Die Ergebnisse aus dieser Studie bestätigen diese Annahme und zeigen, dass Apaza einer
ähnlichen Azo-Reduktion unterworfen wird.

[0067] Eine Gesamtzahl von 8 Ratten wurde für das Experiment verwendet und Methylcellulose wurde als
Vehikel verwendet. Die Dosierungsmenge war 100 mg/kg pro Ratte. Drei Ratten wurden mit Apaza dosiert und
die anderen drei Ratten wurden mit Sulfasalazin dosiert. Zwei Ratten wurden als Kontrolle verwendet und mit
Methylcellulose dosiert. Sowohl Urin als auch Fäces wurden über vier Tage gesammelt und mittels HPLC ana-
lysiert.

[0068] Urin wurde jeden Tag gesammelt und 300 µl Aliquot von jeder Probe wurden 10 Minuten lang bei 5000
g zentrifugiert. 80 µl des Überstandes wurden zur Analyse injiziert. Fäces wurde auch jeden Tag gesammelt
und mit einer 1:1-Mischung aus Wasser und Acetonitril homogenisiert. Diese Mischung wurde dann 20 Minuten

lang bei 5000 g zentrifugiert. 80 µl des Überstandes wurden zur Analyse injiziert.

[0069] Ein "Waters 2690 HPLC" wurde wie folgt zur Probenanalyse verwendet:

Mobile Phase, Programmierung: Gradient

Mobile Phase:

Flussrate:

Säule:

PDA-Einstellungen:

Laufzeit/Probe:

Gradient

A = Wasser + 0,1% TFA

B = Acetonitril + 0,1% TFA

1 ml/min.

Phenomenex Max RP, 80 Å, 4,6 mm × 250 mm

Gesammeltes Spektrum: 210–400 nm

Extrahiertes Chromatogramm: 280 und/oder andere
ungefähr 50 min.

Zeit	Fluss (ml/Minute)	% Mobile Phase A	% Mobile Phase B
-	1	100	0
40	1	50	50
43	1	5	95
44	1	95	5
50	1	95	5

[0070] 5-ASA wurde schnell in acetyliertes 5-ASA überführt. Die gleiche Menge acetyliertes 5-ASA wurde sowohl aus Apaza als auch Sulfasalazin in Urin erzeugt. Acetyliertes 5-ASA und Sulfapyridin wurden im 1:1-Verhältnis im Urin von mit Sulfasalazin dosierten Ratten produziert. Ungefähr 7 bis 10 mal mehr 4-APAA als acetyliertes 5-ASA wurde in dem Urin von mit Apaza dosierten Ratten produziert. Nur acetyliertes 5-ASA wurde aus Fäces detektiert, ungeachtet der dosierten Verbindung. Es wurde mehr acetyliertes 5-ASA in Fäces als in Urin detektiert.

Tag 1

Urin

		Dosiertes Apaza			
	Gesamtdo-	Apaza	4APAA	Actarit	Acety-
	sierung	(mg)	(mg)	(mg)	liertes
	(mg)				5ASA
					(mg)
Ratte 1	22,0	0,48	3,456	0,0717	0,299
Ratte 2	23,5	0,3546	3,177		0,422
Ratte 3	22,5	0,4707	4,674		0,298
		Dosiertes Sulfasalazin			
	Gesamtdo-	Sulfasalazin	Sulfapyri-		Acety-
	sierung	(mg)	din (mg)		liertes
	(mg)				5ASA
					(mg)
Ratte 4	21	0,00882		0,337	0,288
Ratte 5	22,5	0,01279		0,305	0,328
Ratte 6	21	0,01092		0,41	0,39

Stuhl

		Dosiertes Apaza	
	Gesamtdosierung	Acetyliertes	
	(mg)	5ASA (mg)	
Ratte 1	22	1,9254	
Ratte 2	23,5	1,9519	
Ratte 3	22,5	1,2437	
		Dosiertes Sulfasalazin	
	Gesamtdosierung	Acetyliertes	
	(mg)	5ASA (mg)	
Ratte 4	21	1,2158	
Ratte 5	22,5	1,3708	
Ratte 6	21	0,9033	

Tag 2 Stuhl	Dosiertes APAZA	
	Gesamtdosierung (mg)	Acetyliertes 5ASA (mg)
Ratte 1	22	0,2562
Ratte 2	23,5	0,7755
Ratte 3	22,5	0,1827
Dosiertes Sulfasalazin		
Ratte 4	21	0,2
Ratte 5	22,5	0,2584
Ratte 6	21	0,1458

Beispiel 6

Biologische Effekte von erfindungsgemäßen Verbindungen

[0071] Der Zweck dieser Untersuchung war es, die Effekte von vier verschiedenen aktiven pharmazeutischen Bestandteilen, die intrarektal (zweimal am Tag vier Tage lang) männlichen Lewis-Ratten verabreicht wurden, gefolgt von der intrarektalen Verabreichung von Dinitrobenzolsulfonsäure (DNBS), histologisch zu evaluieren und zu vergleichen. DNBS induzierte bei Ratten Colitis, gemäß einem etablierten experimentellen Modell (Richard et al., 2000; Bertran et al., 1996; Blau et al., 2000; Kimura et al., 1998; Hogaboam et al., 1996). SHAM- und DNBS-Gruppen dienten als negative beziehungsweise positive Kontrollen. Die Verteilung von Tieren auf jede Gruppe ist in Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1

GRUPPE	ANZAHL DER TIERE
SHAM	6
DNBS	5
5-ASA	6
4-APAA	6
Mischung aus 5-ASA und 4-APAA	4

Materialien und Methoden

[0072] Geschnittene Kolon-Proben von 27 männlichen Ratten wurden getestet, einschließlich Mikrotomieren und Hämatoxylin- und Eosin-Färbung. Die resultierenden 27 Schnitte (1 Querschnitt pro Schnitt) wurden mikroskopisch untersucht. Außer bei einer Ratte der SHAM-Gruppe und einer Ratte der DNBS-Gruppe, hatten alle Schnitte ihre Aufschrift überklebt, um das Blindablesen ("blind-reading") zu erleichtern. Läsionen wurden eingestuft auf einer Skala von 1–5 (1 = minimal; 2 = schwach; 3 = moderat; 4 = moderat-ernst; 5 = ernst).

Ergebnisse

[0073] Die histomorphologische Hauptveränderung, die beobachtet wurden bei Kolon-Sektionen aller mit DNBS behandelten Ratten (ungeachtet einer zusätzlichen Behandlung) war eine koagulativ-artige Nekrose auf der gesamten Länge, partiell bis zur gesamten Dicke. Nekrose wurde nicht bei den mit Kochsalzlösung/Methylcellulose behandelten Ratten (SHAM-Gruppe) beobachtet. In allen Fällen wurden nekrotische Bereiche charakterisiert durch einen dramatischen Verlust an zellulärem Detail und der Affinität gegenüber Färbung; in solchen Bereichen verblieben nur "schemenhafte" Konturen der Kolon-Architektur. Gelegentlich wurde ein segmentieller Zusammenbruch oder "Ausbrechen" einer Darmgewebeschicht offenkundig. Nekrotische Gewebe waren stark von gemischten Bakterien-Typen befallen. In Sektionen, die nicht vollständig nekrotisch waren, neigte das Muster der Nekrose dazu, laminar zu sein, wodurch gewöhnlich die Mukosa und Submukosa befallen wird, während Teile der Muskularis externa und/oder Aciventitia (Serosa und benachbartes Mesenterium) verschont werden. In diesen Sektionen teilte eine dichte Zone von karyorrhektischer Neutrophilie die nekrotischen inneren Schichten von den weniger betroffenen äußeren Schichten ab. Fibrinoid nekrotisierende Vasculitis von submukosalen Blutgefäßen wurde bei allen DNBS-behandelten Ratten beobachtet. Beobachtet wur-

den Vaskulitis, sowohl in nekrotischen als auch nicht-nekrotischen Regionen, häufig begleitet von Thrombose (fibrinöse, fibrinozelluläre und/oder bakterielle Thromben), und minimale bis moderate submukosale Hämorrhagie (mit oder ohne Fibrinakkumulation). Einige hämorrhagische Stellen enthielten pigmentbeladene Makrophagen (Siderophagen – nicht separat diagnostiziert). In allen Sektionen der DNBS-behandelten Ratten waren die Serosa und angrenzendes Gekröse ausgedehnt durch schwache bis moderat ernste fibrovaskuläre Proliferation (frühe Granulation auf Gewebe). Sektionen von zwei Ratten (#4 und #11, Mischung aus der 5-ASA- und 4-APAA-Gruppe), enthielten jeweils ein einzelnes, kurzes, scharf abgegrenztes Segment nicht-nekrotischer, nicht-ulzerierter Mukosa. Veränderungen innerhalb dieser vergleichsweise unbeeinträchtigten Mukosa-Segmente waren begrenzt auf minimale bis schwache epitheliale Krypten-Hyperplasie, minimale Krypten-Dilation und minimale neutrophile Infiltration.

[0074] Die Einstufung der Schwere der Kolon-Nekrose basierte auf dem Grad, zu dem das Gewebe in Mitteldensität gezogen wurde; jedoch wurde Stufe 5 (ernst) reserviert für Läsionen, in welchen Nekrose zu einem erheblichen Gewebeverlust führte. Weil die Nekrosemuster häufig von Sektion zu Sektion variierten, wurden die individuellen Darmschichten einzeln bewertet. Allgemein war die mittlere Einstufung der Schweregrade der Nekrose unter den vier Gruppen der DNBS-behandelten Ratten (Tabelle 2) vergleichbar. Die durchschnittliche Einstufung der Mukosa-Nekrose bei der Mischung aus 5-ASA- und 4-APAA-Gruppe war niedriger als die Einstufungen in den anderen Gruppen der DNBS-behandelten Ratten, aufgrund der verschonten Mukosa-Bereiche bei zwei Tieren aus der Mischung aus 5-ASA- und 4-APAA-Gruppe.

Tabelle 2: Mittlere Gewebe-Nekrose-Einstufungen

Gruppe	SHAM	DNBS	5 -ASA	4 -APAA	Mischung 5 -ASA & 4 -APAA
Nr. Tiere	(6)	(5)	(6)	(6)	(4)
Mukosa	0,00	4,20	4,50	4,33	3,50
Submukosa	0,00	4,20	4,17	4,00	4,25
Muskularis	0,00	3,60	3,5	3,17	3,00
Adventitia	0,00	1,40	1,67	1,67	1,50

Zusammenfassung

[0075] Die histomorphologische Hauptveränderung, die in den Kolon-Sektionen aller mit DNBS-behandelten Ratten beobachtet wurde (ungeachtet einer zusätzlichen Behandlung) war eine koagulatv-artige Nekrose auf der gesamten Länge, partiell bis zur gesamten Dicke. Damit verbundene Veränderungen schlossen massiven bakteriellen Befall des nekrotischen Gewebes, fibrinoid nekrotisierende Vaskulitis mit Thrombosen und Hämorrhagie und schwere neutrophile Infiltration ein. Nekrose wurde nicht bei den Kochsalzlösung-/Methylcellulose-behandelten Ratten (SHAM-Gruppe) beobachtet. Die Schwere (Ausmaß) der Nekrose war unter den vier Gruppen der DNBS-behandelten Ratten (DNBS, 5-ASA, 4-APAA und Mischung aus 5-ASA und 4-APAA) vergleichbar, außer dass einzelne Mukosa-Segmente bei 2/4 Ratten aus der Gruppe der Mischung aus 5-ASA- und 4-APAA-Gruppe relativ verschont blieben.

Beispiel 7

[0076] Entzündungshemmende Aktivität der Arzneimittelmischung Dinitrobenzolsulfonsäure-(DNBS)-Colitis wurde (keine Ether-Anästhesie) bei 4 Gruppen aus jeweils 6 Lewis-Ratten induziert. Eine DNBS-Gruppe wurde dosiert mit Vehikel (0,7% Methylcellulose), wie auch eine zusätzliche SHAM-Gruppe aus 6 Tieren, die einen Kochsalzlösung-Einlauf anstelle von DNBS erhielten. Intrarektale (ir) Dosierung wurde bei Tieren unter Bewusstsein b. i. d. 4 Tage lang durchgeführt. Die Arzneimittelbehandlungen waren wie folgt:

5-Aminosalicylsäure (5-ASA):	50 mg/kg
4-Aminophenyllessigsäure (4-APAA):	49,5 mg/kg (äquimolar zu 5-ASA)
Mischung: 5-ASA + 4-APAA:	50 mg/kg + 49,5 mg/kg

[0077] Die Arzneimittel wurden im oben genannten Vehikel suspendiert und in Arzneimittelgruppen verblindet ("staff blinded"). Die täglichen Gewichte und Diarrhoe-Bewertungen wurden aufgezeichnet. Am fünften Tag

nach der Reizung wurden die Ratten eingeschläfert, Laparotomien durchgeführt und auf Darmadhäsion und -verengungen bewertet; kolektomisiert und die Kolongewichte aufgezeichnet, Kolone longitudinal geöffnet und Entzündung/Vereiterung bewertet.

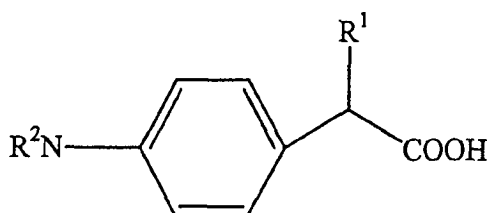
[0078] Die in den [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) veranschaulichten Ergebnisse zeigen, dass 5-ASA, 4-APAA und die Mischung ähnliche entzündungshemmende Aktivität entwickeln (~31% Reduktion von Kolon:Körpergewicht [% BW]). Die Schwere der Entzündung nähert sich einem Maximum. Es ist möglich, dass die Schwere mittels Reduktion der DNBS-Dosis eingestellt werden könnte, und eine kleine Untersuchung wurde durchgeführt, um diese Hypothese zu testen. Es ist möglich, dass es bei einem schwächeren Insult einen Beweis einer größeren Abgrenzung der Behandlungseffekte geben kann.

[0079] DNBS-Colitis wurde bei 6 Lewis-Ratten (3 mit 30 und 3 mit 15 mg/Ratte DNBS) induziert und man ließ sie sich 5 Tage lang ohne Behandlung entwickeln, um die Schwere der Entzündung einzustellen. Diarrhoe wurde an den Tagen 1–4 beobachtet und die Ratten wurden am Tag 5 eingeschläfert und das Kolon:Körpergewicht bestimmt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass 15 mg/Ratte DNBS schwächere aber inkonsistente Entzündung hervorruft, verglichen mit 30 mg. Das Ergebnis der 30 mg/kg DNBS war konsistent mit dem, das vorher beobachtet wurde.

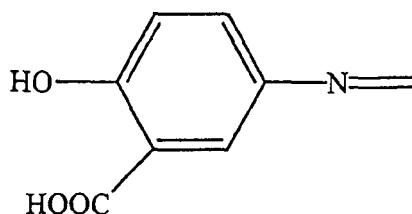
[0080] Das Vorangehende soll die vorliegende Erfindung veranschaulichen und ist nicht als deren Begrenzung zu verstehen. Die Erfindung wird durch die folgenden Ansprüche definiert, wobei Äquivalente der Ansprüche eingeschlossen sein sollen.

Patentansprüche

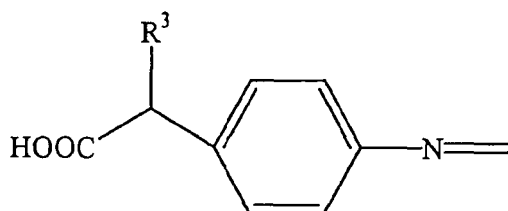
1. Verbindung der Formel:



worin R^1 ausgewählt ist aus H, CH_3 , CH_2CH_3 und $CH(CH_3)_2$ und R^2 ist



oder



worin R^3 ausgewählt ist aus H, CH_3 , CH_2CH_3 und $CH(CH_3)_2$, unter der Bedingung, dass wenn R^1 H ist, R^3 ausgewählt ist aus CH_3 , CH_2CH_3 und $CH(CH_3)_2$, und wenn R^3 H ist, R^1 ausgewählt ist aus CH_3 , CH_2CH_3 und $CH(CH_3)_2$, und unter der weiteren Bedingung, dass wenn R^1 CH_2CH_3 ist, R^3 ausgewählt ist aus H, CH_3 und $CH(CH_3)_2$, und wenn R^3 CH_2CH_3 ist, R^1 ausgewählt ist aus H, CH_3 und $CH(CH_3)_2$; oder eines ihrer pharmazeutisch verträglichen Salze.

2. Verbindung gemäß Anspruch 1, worin R^1 und R^3 unabhängig von einander ausgewählt sind aus H und CH_3 .

3. Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2, 5-(4-Carboxymethylphenylazo)-2-hydroxybenzoesäure oder eines ihrer pharmazeutisch verträglichen Salze.

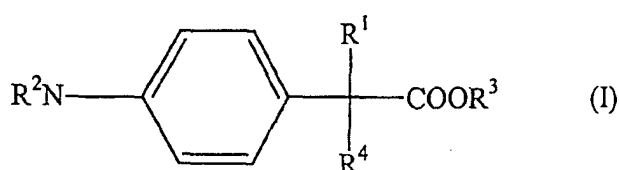
4. Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2, 5-[4-(1-Carboxyethyl)-phenylazo]-2-hydroxybenzoesäure oder eines ihrer pharmazeutisch verträglichen Salze.

5. Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2, 4-(4-Carboxymethylphenylazo)-phenylelessigsäure oder eines ihrer pharmazeutisch verträglichen Salze.

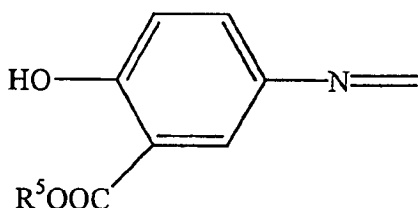
6. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von entzündlicher Darmerkrankung, umfassend eine zur Behandlung der genannten Krankheit wirksame Menge einer Verbindung gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, oder eines ihrer pharmazeutisch verträglichen Salze, in Beimengung mit einem festen oder flüssigen pharmazeutischen Verdünnungsmittel oder Träger.

7. Verwendung einer Verbindung gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5 bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von entzündlicher Darmerkrankung.

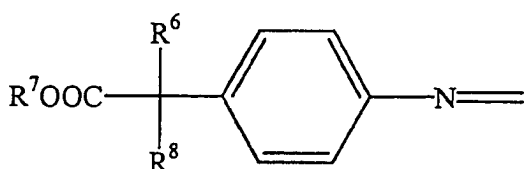
8. Verbindung gemäß Formel I:



worin R^1 , R^3 und R^4 unabhängig von einander Wasserstoff oder C_1 - bis C_4 -Alkyl sind und R^2 ist:



worin R^5 ausgewählt ist aus Wasserstoff und C_1 - bis C_4 -Alkyl oder



worin R^6 , R^7 und R^8 unabhängig von einander Wasserstoff oder C_1 - bis C_4 -Alkyl sind, unter der Bedingung, dass wenn fünf der sechs Substituenten R^1 , R^3 , R^4 , R^6 , R^7 und R^8 Wasserstoff sind, der verbleibende Substituent C_1 - bis C_4 -Alkyl ist, und unter der weiteren Bedingung, dass wenn R^1 , R^3 , R^6 , und R^7 jeweils Wasserstoff sind, R^4 und R^8 nicht beide C_2 -Alkyl sind; oder eines ihrer pharmazeutisch verträglichen Salze.

9. Verbindung gemäß Anspruch 8, worin R^1 , R^3 und R^4 unabhängig von einander ausgewählt sind aus H, CH_3 , CH_2CH_3 und $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

10. Verbindung gemäß Anspruch 8 oder 9, worin R^6 , R^7 und R^8 unabhängig von einander ausgewählt sind aus H, CH_3 , CH_2CH_3 und $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

11. Verbindung gemäß irgendeinem der Ansprüche 8 bis 10, worin R^5 ausgewählt ist aus H, CH_3 , CH_2CH_3 und $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung eines Entzündungszustandes des GI-Traktes, umfassend eine zur Behandlung des genannten Zustandes wirksame Menge einer Verbindung gemäß irgendeinem der Ansprüche 8 bis 11 oder deren pharmazeutisch verträglichen Salze, in Beimengung mit einem festen oder flüssigen pharmazeutischen Verdünnungsmittel oder Träger.

13. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 12, wobei der Entzündungszustand des GI-Traktes Colitis ulcerosa ist.

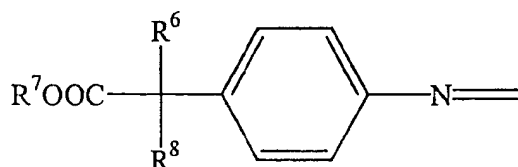
14. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 12, wobei der Entzündungszustand des GI-Traktes Morbus Crohn ist.

15. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Ansprüche 12 bis 14 zur oralen Verabreichung an ein Subjekt, das der genannten Behandlung bedarf.

16. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß irgendeinem der Ansprüche 12 bis 14 zur rektalen Verabreichung an ein Subjekt, das der genannten Behandlung bedarf.

17. Verwendung einer Verbindung gemäß irgendeinem der Ansprüche 8 bis 11 bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung eines Entzündungszustandes des GI-Traktes.

18. Verbindung gemäß Anspruch 8, worin R^2 ist:



worin R^6 , R^7 und R^8 unabhängig von einander Wasserstoff oder C_1 -to C_4 -Alkyl sind.

19. Verbindung gemäß Anspruch 18, worin R^7 Wasserstoff ist.

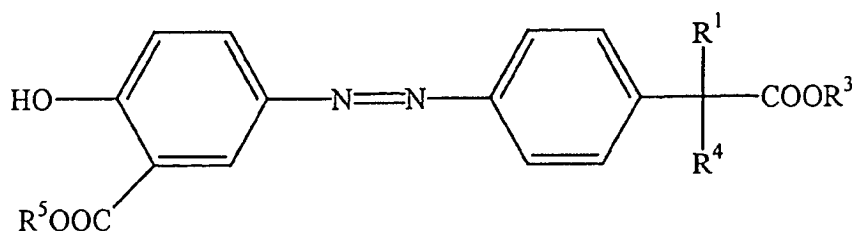
20. Verbindung gemäß Anspruch 18 oder 19, worin R^6 Wasserstoff ist und R^8 ausgewählt ist aus H, CH_3 , CH_2CH_3 und $CH(CH_3)_2$.

21. Verbindung gemäß irgendeinem der Ansprüche 18 bis 20, worin R^1 und R^6 Wasserstoff sind und R^4 und R^8 unabhängig von einander ausgewählt sind aus H, CH_3 , CH_2CH_3 und $CH(CH_3)_2$.

22. Verbindung gemäß irgendeinem der Ansprüche 18 bis 21, worin R^1 , R^3 und R^6 Wasserstoff sind und R^4 und R^8 unabhängig von einander ausgewählt sind aus H und CH_3 .

23. Verbindung gemäß irgendeinem der Ansprüche 18 bis 21, worin R^1 , R^3 , R_6 und R^7 Wasserstoff sind und R^4 und R^8 unabhängig von einander ausgewählt sind aus H, CH_3 , CH_2CH_3 und $CH(CH_3)_2$.

24. Verbindung gemäß Anspruch 8, welche die folgende Struktur besitzt:



worin R^1 , R^3 , R^4 und R^5 unabhängig von einander Wasserstoff oder C_1 - bis C_4 -Alkyl sind, oder eines ihrer pharmazeutisch verträglichen Salze.

25. Verbindung gemäß Anspruch 24, worin R^5 Wasserstoff ist.

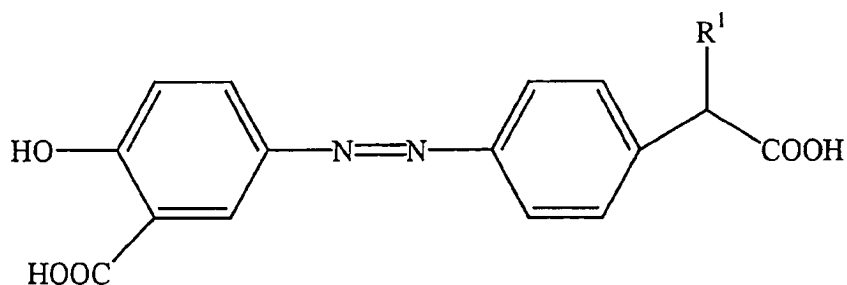
26. Verbindung gemäß Anspruch 24 oder 25, worin R^1 Wasserstoff ist und R^4 ausgewählt ist aus H, CH_3 , CH_2CH_3 und $CH(CH_3)_2$.

27. Verbindung gemäß irgendeinem der Ansprüche 24 bis 26, worin R^4 Wasserstoff ist und R^1 ausgewählt ist aus H und CH_3 .

28. Verbindung gemäß irgendeinem der Ansprüche 24 bis 27, worin R^3 Wasserstoff ist.

29. Verbindung gemäß irgendeinem der Ansprüche 24 bis 26 oder 28, worin R^1 , R^3 und R^5 Wasserstoff sind und R^4 ausgewählt ist aus H, CH_3 , CH_2CH_3 und $CH(CH_3)_2$.

30. Verbindung gemäß Anspruch 1, welche die folgende Struktur besitzt:



worin R^1 C_1 - bis C_4 -Alkyl ist; oder eines ihrer pharmazeutisch verträglichen Salze.

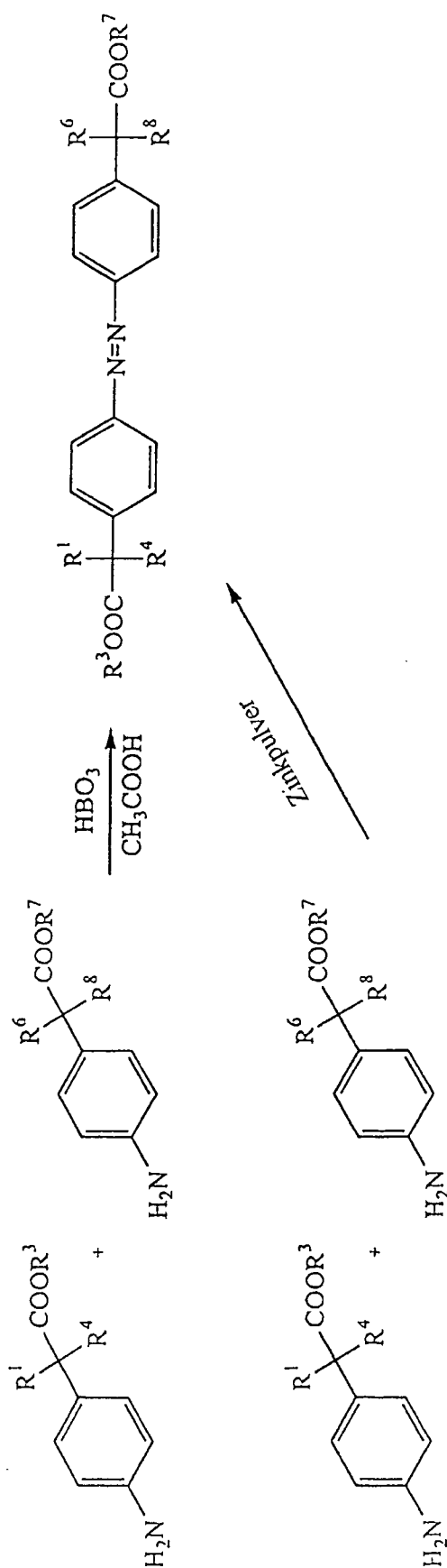
31. Verbindung gemäß Anspruch 30, worin R^1 C_1 - oder C_2 -Alkyl ist.

32. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung eines Entzündungszustandes des GI-Traktes, umfassend eine zur Behandlung des genannten Zustandes wirksame Menge einer Verbindung gemäß irgendeinem der Ansprüche 24 bis 31, oder deren pharmazeutisch verträglichen Salze, in Beimengung mit einem festen oder flüssigen pharmazeutischen Verdünnungsmittel oder Träger.

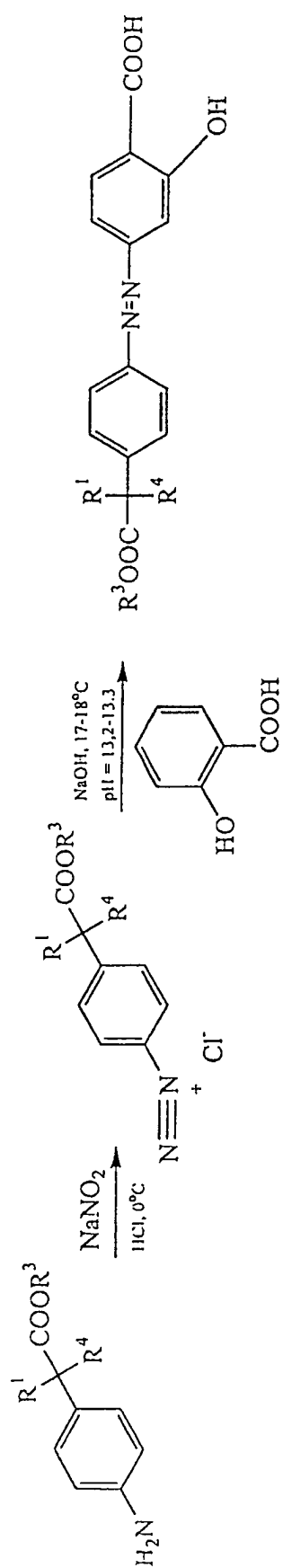
33. Verwendung einer Verbindung gemäß irgendeinem der Ansprüche 24 bis 31 bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Behandlung eines Entzündungszustandes des GI-Traktes.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

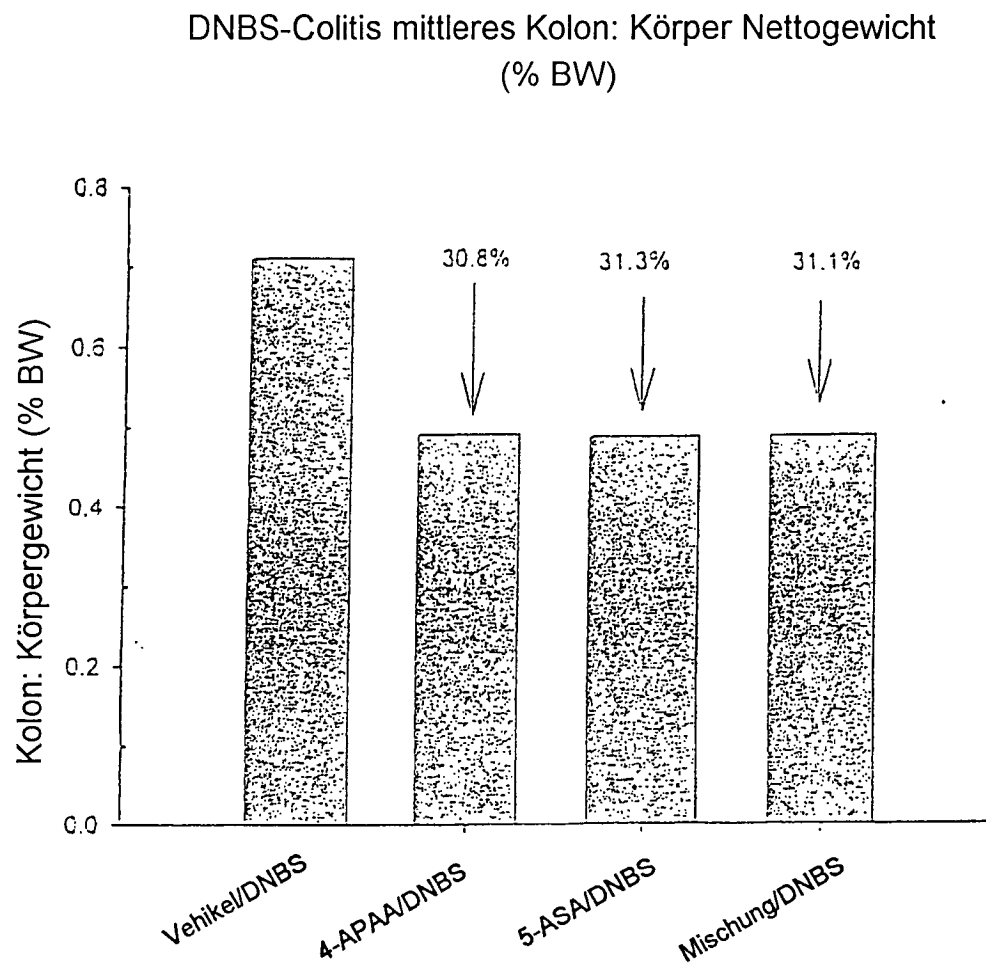
Anhängende Zeichnungen



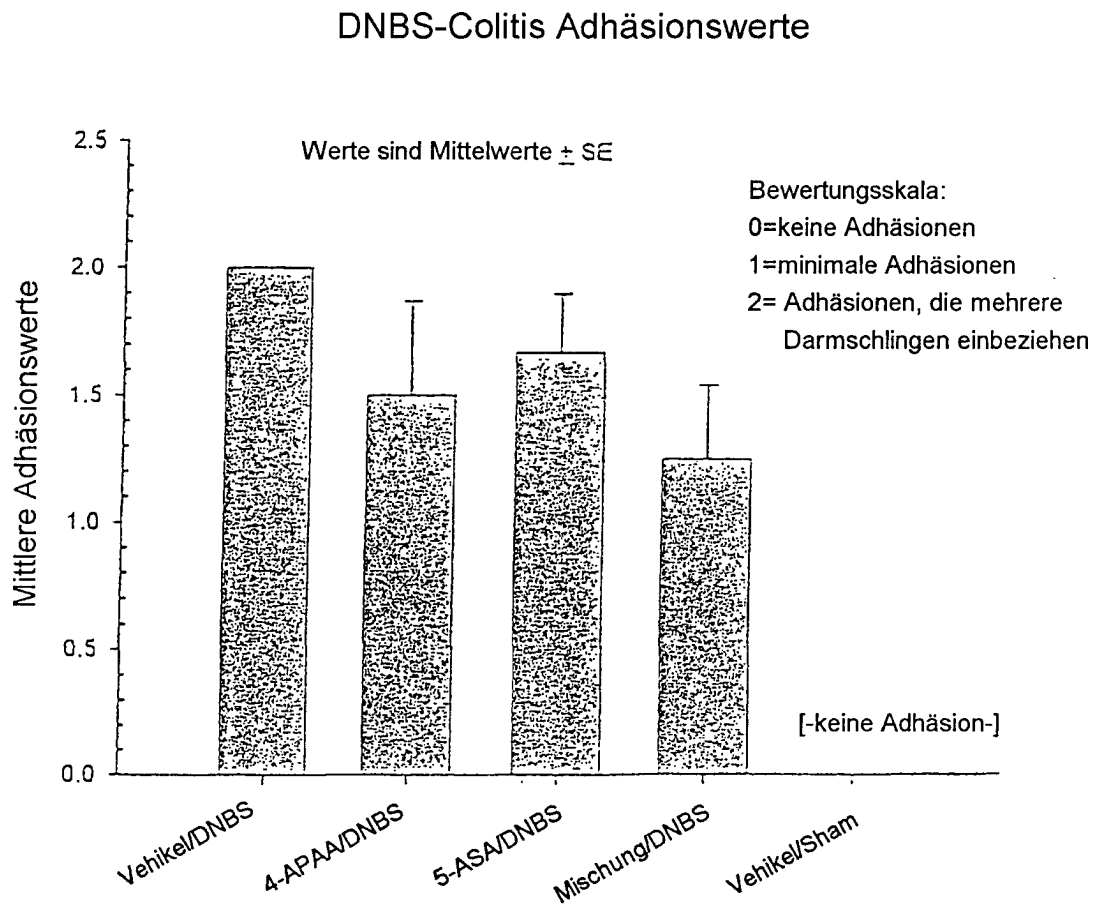
Figur 1



Figur 2



Figur 3



Figur 4