



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 601 06 036 T2 2006.03.02

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 299 350 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 601 06 036.9

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/SE01/01526

(96) Europäisches Aktenzeichen: 01 958 717.9

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 02/002511

(86) PCT-Anmeldetag: 03.07.2001

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 10.01.2002

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 09.04.2003

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 29.09.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 02.03.2006

(51) Int Cl.⁸: C07C 233/78 (2006.01)

C07D 295/04 (2006.01)

A61K 31/166 (2006.01)

A61K 31/167 (2006.01)

A61K 31/495 (2006.01)

A61K 31/5375 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0002531 05.07.2000 SE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Active Biotech AB, Lund, SE

(72) Erfinder:

BJÖRK, Anders, S-230 50 Bjärred, SE; HEDLUND, Gunnar, S-224 56 Lund, SE; LEANDERSON, Tomas, S-211 16 Malmö, SE

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: Substituierte Benzamide für die Immunstärkung, die Behandlung von Krebs, Infektionen und manisch-depressiven Erkrankungen

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 eingeleitet, 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**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft substituierte Benzamide, welche Verstärker des Transkriptionsfaktors AP (Aktivatorprotein)-1 sind, Zusammensetzungen, welche sie enthalten, und Verfahren für die klinische Behandlung von Krankheiten, die mit immunsuppressiven Zuständen in Zusammenhang stehen, und die Verwendung der Benzamide zur Herstellung eines Medikaments zur Stimulierung des Transkriptionsfaktors AP-1. Derartige Verbindungen sind besonders nützlich bei der Behandlung einer Vielfalt von Krankheiten, welche mit Immunsuppression und einer geringen Fähigkeit, IL (Interleukin)-2 herzustellen, in Zusammenhang stehen. Derartige Krankheiten schließen Krebs, Autoimmunkrankheit und Infektionskrankheit ein. Ganz besonders betrifft die vorliegende Erfindung Benzamidderivate, welche zur Behandlung von zum Beispiel festen Tumoren, rheumatoider Arthritis (RA) und AIDS geeignet sind. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind auch zur Behandlung von manisch-depressiver Erkrankung geeignet.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] AP-1 ist ein transkriptionell aktives Protein heterodimer, welches Mitglieder der Fos (z. B. c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) und der Jun (z. B. c-Jun, JunB, JunD) Proteinfamilie enthält. Die AP-1 Transkriptionsfaktoren werden durch z. B. Wachstumsfaktoren, Cytokine, T-Zellaktivatoren und Neurotransmitter stimuliert und wirken als Dimere, welche in vielen Promotoren, einschließlich Proteasen und Cytokinen, wie IL-2, an DNA binden. C-Jun und c-Fos knockout Mäuse sind erzeugt worden, welche embryonische Letalität, bzw. Osteopetrosis/Lymphopenie/Verhaltensauffälligkeiten zeigen (Johnson et al., 1992). Diese Ergebnisse bringen zur Geltung, dass die AP-1 Stelle in vielen verschiedenen Genen entscheidend ist, und sie weist auf die Regulation von Lymphozyten und Verhalten, die Regulation im Zentralnervensystem als zwei unterschiedliche biologische Hotspots hin. Daher sind Immunsuppression mit einer geringen Fähigkeit, IL-2 herzustellen und Verhaltensstörungen zwei sehr verschiedene medizinische Indikationsbereiche, bei welchen die AP-1 Aktivität suboptimal ist und bei welchen AP-1 Verstärker angewendet werden können.

[0003] In US Patent Nr. 3,177,252 werden einige substituierte Benzamidderivate einschließlich Metoclopramid (The Merck Index 12. Ausg., Eintrag 6226) als für die Behandlung von Erbrechen nützlich offenbart.

[0004] Die Verbindung Metoclopramid kann mit Depression in Zusammenhang gebracht werden und kann, auf Grund seiner zentralen, ebenso wie peripheren Dopamin-blockierenden Eigenschaften ein höchst unerwünschtes tardive Dyskinesie verursachen. Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung haben die Verbindung zwischen der Diaminoethylenbrücke und der Dopamin-D₂ Blockade gezeigt.

[0005] In GB 1,174,956 werden quaternäre Ammoniumsalze von N-substituierten Benzamidderivaten und ihre Wirkung zum Beschleunigen der automatischen Motivität des Verdauungstraktes offenbart.

[0006] In J. Org. Chem. USSR 22, 578 – 582 (1986) wird die Synthese von N-(3-Dimethylaminopropyl)-3-nitro-4-acetylaminobenzamid beschrieben.

[0007] In US Patent Nr. 4,568,685 wird von einigen N-[(1H-1,2,4-Triazol-1-yl)alkyl]arylamiden offenbart, dass sie Inhibitoren des Thromboxansynthetase-Enzyms sind.

[0008] In US Patent Nr. 4,568,687 wird von einigen N-[ω (1H-Imidazol-1-yl)alkyl]arylamiden offenbart, dass sie Inhibitoren des Thromboxansynthetase-Enzyms sind und auch bei der Behandlung von Bluthochdruck und Myokardischämie nützlich sind.

[0009] In Analytical Profiles of Drug Substances Bd. 4, K Florey, Herausgeber (Academic Press, New York, 1975) S. 333 – 383, ist Procainamid (The Merck Index 12. Ausg., Eintrag 7936) als ein Antiarrhythmikum beschrieben.

[0010] Wir haben nun ein neues Verfahren zur Stimulierung des Transkriptionsfaktors AP-1 entdeckt, welches substituierte Benzamide verwendet.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0011] Immunsuppression bei Krebs Autoimmunkrankheit und Infektionskrankheit Ansätze zur Behandlung

bösartiger Krankheit, die auf dem Immunsystem basieren, haben sich auf cytotische Effektorzellen, wie zum Beispiel cytotoxische T-Lymphozyten (CTL), und natürliche Killerzellen (NK) konzentriert. Es ist auch gezeigt worden, dass Tumor-tragende Mäuse unter Verwendung einer breiten Vielfalt von Ansätzen geheilt werden können, von denen einige die IL-2-vermittelte Verbesserung der CTL- und NK-Zellaktivität einbeziehen.

[0012] Allerdings steht der sichtbare Erfolg in Mäusen im Widerspruch zu der gegenwärtigen Situation in der Klinik, wobei nur eine Minderheit an Patienten bislang einen Vorteil aus den CTL- oder NK Zellen-basierenden Antitumoransätzen gezogen hat. Dies ist wahrscheinlich ein Ergebnis aus der Tumor-induzierten Immunsuppression (Whiteside, 1999; Kiessling et al., 1999). Eine der zu Grunde liegenden Ursachen der mit Tumor in Zusammenhang stehenden Immunsuppression der CTL und NK Zellaktivität, das Fehlen von intrazellulärer Signalübertragung als ein Ergebnis aus der Verringerung der Expression der TCR/CD3 zeta-Kette von T-Zellen, wird auch mit HIV Infektion, Lepra und rheumatoider Arthritis geteilt. Dieses Fehlen der Signalübertragung wird durch IL-2 Behandlung in vitro überrrannt. IL-2 ist ein zentrales Cytokin bei der Entwicklung funktioneller Immunantworten, und es ist deutlich gezeigt worden, dass die AP-1 Stelle des IL-2 Promoters für die optimale Aktivität (Sundstedt und Dohlsten, 1998) entscheidend ist. Unterschiedliche Benzamide würden daher eine alternative Behandlung zur Immunstimulierung und IL-2 Verbesserung bei immunsuppressiven Zuständen bei Krankheit darstellen. Zusätzlich führen einige Behandlungsstrategien, wie zum Beispiel bei der Behandlung von Krebs angewendete Zytostatika- und Strahlentherapie, zu einer unerwünschten Immunsuppression, ein induzierter Zustand, welcher durch das Verabreichen von erfindungsgemäßen Verbindungen ausgeglichen werden würde.

Manisch-depressive Erkrankung

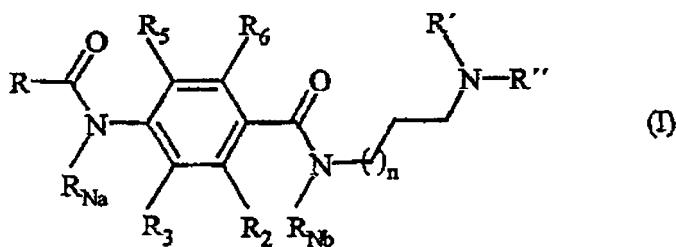
[0013] Lithium und Natriumvalproat (VPA) (The Merck Index 12. Ausg., Eintrag 10049) sind bei der Behandlung bipolarer Störungen (manisch-depressive Erkrankung) wirksam und können durch die Regulierung der Signalübertragungswege und der Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel c-Fos und c-Jun wirken, was wiederum zu Änderungen bei der Genexpression führt. Die Wirksamkeit über lange Zeit von Lithium und VPA bei bipolaren Störungen legt nahe, dass die Regulierung der Genexpression ein wichtiges Ziel für diese Arzneistoffe sein kann. Diese zwei strukturell höchst unähnlichen Stoffe, Lithium und VPA, erhöhen die DNA-Bindungsaktivität von AP-1 in Regionen von einem Nagergehirn ex vivo und in menschlichen Neuronenzellen in Kultur (Yuan et al., 1998; Chen et al., 1999). Beide Behandlungen erhöhen auch die Expression eines Reportergens, welches durch einen AP-1-enthaltenden Promotor gesteuert wird, und Mutationen an den AP-1 Stellen des Reportergenpromoters schwächen diese Effekte merklich ab. Beide Behandlungen erhöhen auch die Expression einiger endogener Proteine, wobei von diesen Genen bekannt ist, dass sie durch AP-1 reguliert werden. Diese Effekte legen nahe, dass die temporäre Regulierung der AP-1 vermittelten Genexpression in kritischen neuronalen Kreisläufen eine Rolle bei der therapeutischen Wirksamkeit über lange Zeit von Lithium und VPA spielen und heben hervor, dass auch anderen AP-1 Verstärker wie unterschiedliche Benzamide potentiell als Modulatoren von z. B. manisch-depressiver Erkrankung wirken könnten.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0014] Eine primäre Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, Benzamidverbindungen bereitzustellen, welche auf Grund ihres pharmakologischen Profils mit hoher Wirksamkeit in experimentellen Modellen und einem geringen Grad an Nebenwirkungen, als wertvoll bei der Behandlung von Krankheit, welche mit immunsuppressiven Zuständen in Zusammenhang gebracht werden, betrachtet werden, z. B. für die Stimulierung, die Verbesserung oder die Modulation der Immunantwort. In die Erfindung eingeschlossen ist auch die Verwendung der Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Stimulierung des Transkriptionsfaktors AP-1. In einer besonderen Ausführungsform stellt diese Erfindung die Herstellung eines Medikaments zur Stimulierung des Transkriptionsfaktors AP-1, ein Verfahren zur Behandlung von Krankheiten, bei denen die Krankheitspathologie durch das Stimulieren von AP-1 therapeutisch modifiziert werden kann, bereit. Beispiele für derartige Krankheiten sind Krebs, Autoimmunkrankheit und Infektionskrankheit. Ganz besonders betrifft die vorliegende Erfindung Benzamidderivate, welche zur Behandlung von zum Beispiel festen Tumoren, rheumatoider Arthritis (RA) und AIDS geeignet sind. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind auch zur Behandlung von manisch-depressiver Erkrankung geeignet.

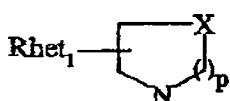
[0015] Der Begriff „Behandlung“, wie er hierin verwendet wird, schließt sowohl Prophylaxe als auch das Mildernd der Symptome der Krankheit ein.

[0016] Überraschenderweise ist nun herausgefunden worden, dass die Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



wobei

der Rest R aus Methyl, Ethyl, n-Propyl-, iso-Propyl, c-Propyl, n-Butyl, sec-Butyl, iso-Butyl, tert-Butyl, i-Butyl, n-Pentyl, sec-Pentyl, iso-Pentyl, tert-Pentyl, neo-Pentyl, c-Pentyl, c-Hexyl und c-Heptyl ausgewählt ist;
 die Reste R_{Na} und R_{Nb} gleich oder verschieden und aus Wasserstoff, Methyl und Ethyl ausgewählt sind;
 die Reste R₂, R₃, R₅ und R₆ unabhängig aus Wasserstoff, Methyl, Methoxy, Thiomethyl, Hydroxy, Fluor, Chlor, Brom, Trifluormethyl, Phenyl und Benzyl ausgewählt sind; n gleich 1, 2 oder 3 ist;
 die Reste R' und R'' gleich oder verschieden und aus Methyl, Ethyl, n-Propyl-, iso-Propyl, n-Butyl, sec-Butyl und iso-Butyl ausgewählt sind oder die Reste R' und R'' zusammen einen gesättigten heterocyclischen Ring mit 5 bis 7 Atomen der Formel



bilden,

wobei p gleich 1, 2, 3 ist;

X aus CHRhet₁, NRhet₁ und O ausgewählt ist, mit der Maßgabe, dass p gleich 2 oder 3 ist wenn X die Bedeutung NRhet₁ und O hat;

Rhet₁ aus Wasserstoff und C₁₋₅-Alkyl ausgewählt ist, welches gegebenenfalls mit OH, Halogen (F, Cl und Br), CN, COORhet₂, N(Rhet₂)₂ funktionalisiert ist, wobei Rhet₂ unabhängig aus H, C₁₋₄-Alkyl ausgewählt ist; mit der Maßgabe, dass, wenn die Reste R' und R'' Methyl sind, der Rest R nicht Methyl sein kann;

und pharmazeutisch verträgliche Salze, Hydrate und Solvate davon;

unerwarteterweise effektiv und spezifisch bei der Behandlung von Individuen sind, welche an Krebs, Autoimmunkrankheit, Infektionskrankheiten und manisch-depressiver Erkrankung leiden.

[0017] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Rest R ausgewählt aus Methyl, Ethyl, n-Propyl-, iso-Propyl,

die Reste R_{Na} und R_{Nb} sind Wasserstoff,

einer der Reste R₂, R₃, R₅ und R₆ ist ausgewählt aus Methyl, Methoxy, Thiomethyl, Hydroxy, Fluor, Chlor, Brom, Trifluormethyl, Phenyl,

die Reste R' und R'' sind ausgewählt aus Methyl, Ethyl, n-Propyl-, iso-Propyl, n-Butyl,

mit der Maßgabe, dass, wenn die Reste R' und R'' Methyl sind, der Rest R nicht Methyl sein kann;

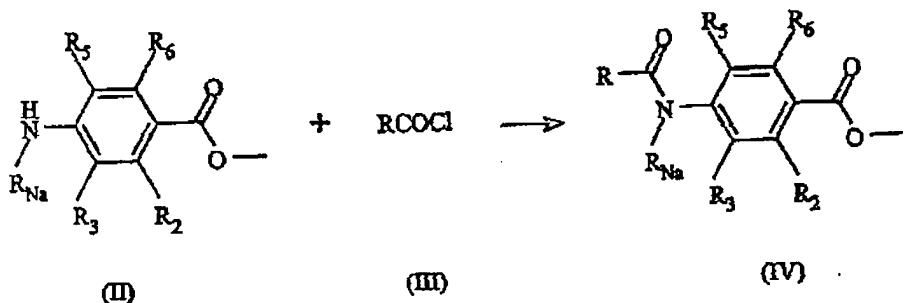
[0018] Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) wurden auf die AP-1 Erhöhung getestet. Die erfindungsgemäßen Verbindungen wurden in Assays zur Modulation der stimulierten Aktivität eines AP-1 getriebenen Reportergens in der Jurkat T-Zelllinie getestet. Die Aktivierung dieses Reportergens führt zur Luciferaseherstellung und die Mengen an hergestellter Luciferase laufen parallel zu dem Grad an AP-1 Aktivität. Ein hoher Spiegel an AP-1 Aktivität ist entscheidend für z. B. die hohe Herstellung von IL-2.

[0019] Alle erfindungsgemäßen Ausführungsformen, wie in den Ansprüchen offenbart wird, werden hier in der Beschreibung eingeschlossen.

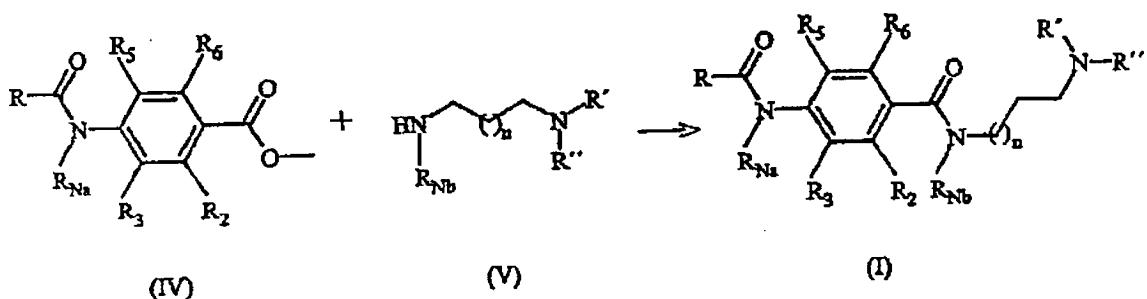
[0020] Die folgenden Experimente sollen die Erfindung ohne Einschränken deren Umfangs veranschaulichen.

[0021] Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können durch in der Literatur gut bekannte Verfahren hergestellt werden. Die allgemeine Lösungsherstellung wird in Schema 1 und 2 gezeigt.

Schema 1



Schema 2



[0022] Ein Benzamidderivat der allgemeinen Formel (I) kann durch herkömmliche Verfahren hergestellt werden und zum Beispiel, durch erstens die Umsetzung eines 4-Aminobenzoësäuremethylesters (II) mit einem Säurechlorid (III) oder -anhydrid in einem inerten Lösungsmittel, wie zum Beispiel Dichlormethan in Gegenwart von Triethylamin (Schema 1) hergestellt werden. Die so erhaltenen 4-Acylaminobenzoësäuremethylester (IV) und ein N,N-substituiertes Alkylendiamin (V) wird dann in einem Überschuss an V in Gegenwart einer katalytischen Menge Ammoniumchlorid kondensiert, um die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) (Schema 2) zu bilden. In einer anderen Ausführungsform wird der Methylester zuerst hydrolysiert und dann unter Verwendung herkömmlicher Verfahren, wie zum Beispiel Ethylchlorformiat, Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborat (TBTU), aktiviert. Die hierin verwendeten Ausgangsmaterialien sind im Handel erhältlich oder werden durch herkömmliche Verfahren, welche in Standardreferenzwerken gefunden werden können, wie zum Beispiel dem Compendium of Organic Synthetic Methods, Bd. I – VI (Wiley Interscience), welche Fachleuten gut bekannt sind, hergestellt.

[0023] Säureadditionssalze der Verbindungen der Formel (I) werden auf eine Standardweise in einem geeigneten Lösungsmittel und in einem Überschuss an Säure, wie zum Beispiel Chlorwasserstoff-, Bromwasserstoff-, Schwefel-, Malein- und Bernsteinsäure, hergestellt.

Beispiel 1

4-iso-Butyrylamino-2-methoxy-benzoësäuremethylester.

[0024] 1,81 g 4-Amino-2-methoxy-benzoësäuremethylester und 1,4 g Triethylamin wurden in 20 ml Dichlormethan gelöst. 1,23 g Isobutyrylchlorid in 5 ml Dichlormethan wurde tropfenweise bei 0 °C zugegeben. Man ließ das Umsetzungsgemisch Raumtemperatur erreichen und 3 Stunden lang rühren. Das Umsetzungsgemisch wurde mit Wasser gewaschen, getrocknet, und die Lösungsmittel wurden eingedampft, um 1,9 g des Titelprodukts zu erzielen.

1H NMR (CDCl₃): δ 1,22 (6H, d), 2,53 (1H, m), 3,83 (3H, s), 3,83 (3H, s), 6,85 (1H, d), 7,70 (1H, s), 7,75 (1H, d), 7,84 (1H, s).

Beispiel 2

N-[(3-Diethylamino)propyl]-4-isobutyrylamino-2-methoxy-benzamid.

[0025] 0,3 g 4-iso-Butyrylamino-2-methoxy-benzoësäuremethylester wurde in 3 ml N,N-Diethylpropylendiamin zusammen mit einer katalytischen Menge an Ammoniumchlorid gelöst. Das Umsetzungsgemisch wurde 3 Stunden lang unter Rückfluss erhitzt. Dichlormethan wurde zugegeben, und 4 Mal Waschen mit Wasser ent-

fernte den Überschuss an Diamin. Trocknen und Eindampfen der Lösungsmittel erzielte 0,15 g der Titelverbindung.

1H NMR (CDCl₃): δ 0,97 (6H, t), 1,20 (6H, d), 1,71 (2H, m), 2,48 (6H, m), 2,59 (1H, m), 2,46 (2H, q), 3,90 (3H, s), 6,80 (1H, d), 7,94 (1H, s), 8,03 (1H, d), 8,29 (1H, s).

Beispiel 3

N-[3-(Diethylamino)propyl]-4-iso-butyrylamino-3-hydroxy-benzamid

[0026] 4-iso-Butyrylamino-3-hydroxy-benzoësäure (0,089 g) und TBTU (0,128 g) in Chloroform (15 ml) wurde 2 Stunden lang gerührt. N,N-Diethylpropylendiamin (0,052 g) wurde zugegeben, und das Gemisch wurde 1 Stunde lang gerührt. Eindampfen des Lösungsmittels gab einen Rückstand, welcher auf einer Silicagelsäule zuerst mit Ethylacetat eluiert/gewaschen wurde und dann mit Ethylacetat-Methanol-Triethylamin (12 : 4 : 1) eluiert wurde, um 0,03 g des Titelprodukts zu erzielen.

1H NMR (CDCl₃): δ 1,14 (t, 6H) 1,25 (m, 6H) 2,01 (m, 2H) 2,61 (m, 1H) 2,98 (m, 2H) 3,04 (m, 2H) 3,44 (m, 2H) 7,35 (m, 1H) 7,80 (d, 1H) 7,92 (m, 1H) 8,21 (d, 1H) 8,36 (s, 1H).

Beispiel 4

4-(N-iso-Butyryl-N-methylamino)benzoësäure

[0027] 4-Methylamino-benzoësäuremethylester (0,41 g) wurde in Chloroform (20 ml) suspendiert. Isobutyrylchlorid (0,79 g) in Chloroform (10 ml) wurde 30 Minuten lang tropfenweise zugegeben und dann wurde Triethylamin (1 ml), gelöst in Chloroform (5 ml), tropfenweise zugegeben. Das Umsetzungsgemisch wurde 3 Stunden lang gerührt, und das Lösungsmittel wurde eingedampft. 1 M NaOH (wässr.) (40 ml) wurde zugegeben, und das Gemisch wurde über Nacht gerührt. Die Lösung wurde filtriert, um ungelöstes Material zu entfernen und dann mit 2 M HCl (wässr.) angesäuert. Filtration und Trocknen im Vakuum erzielte 0,48 g des Titelprodukts.

Beispiel 5

N-[3-(Diethylamino)propyl]-4-(N-iso-butyryl-N-methylamino)benzoësäure

[0028] Zu einer gerührten Lösung aus 4-(iso-Butyryl-N-methylamino)-benzoësäure (0,088 g) und Triethylamin (0,041 g) in Chloroform (4 ml) wurde eine Lösung aus Ethylchlorformiat (0,049 g) in Chloroform (1 ml) gegeben. Das Gemisch wurde unter einer N₂-Atmosphäre 1 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und dann auf 0 °C gekühlt. N,N-Diethylpropylendiamin (0,051 g) in Chloroform (1 ml) wurde zugegeben, und das Gemisch wurde über Nacht gerührt. Das Gemisch wurde mit 0,5 M NaOH (wässr.) und Wasser gewaschen. Trocknen und Eindampfen des Lösungsmittels gab einen Rückstand, welcher auf einer Silicagelsäule zuerst mit Ethylacetat eluiert/gewaschen wurde und dann mit Ethylacetat-Methanol-Triethylamin (12 : 4 : 1) eluiert wurde, um 0,098 g des Titelprodukts zu erzielen.

1H NMR (CDCl₃): δ 1,01 (t, 6H) 1,04 (t, 6H) 1,77 (m, 2H) 2,48 (m, 1H) 2,61 (m, 6H) 3,23 (s, 3H) 3,57 (m, 2H) 7,21 (m, 1H) 7,83 (m, 1H) 8,80 (s, 1H).

[0029] Beispiele 6 bis 12 wurden durch das in Beispiel 5 beschriebenen Verfahren hergestellt.

Beispiel 6

N-[3-(Diethylamino)propyl]-4-iso-butyrylamino-3-methoxy-benzoësäure

[0030] 1H NMR (CDCl₃): δ 1,07 (t, 6H) 1,25 (d, 6H) 1,80 (m, 2H) 2,55 (m, 1H) 2,64 (m, 6H) 3,56 (m, 2H) 3,94 (s, 3H) 7,27 (m, 1H) 7,55 (d, 1H) 7,91 (s, 1H) 8,43 (d, 1H) 8,70 (s, 1H).

Beispiel 7

N-[3-(Diethylamino)propyl]-4-(iso-butyryl-N-methylamino)-2-methoxy-benzoësäure

[0031] 1H NMR (CDCl₃): δ 1,04 (m, 12H) 1,80 (m, 2H) 2,56 (m, 7H) 3,24 (s, 3H) 6,75 (s, 1H) 6,88 (m, 1H) 7,99 (m, 1H) 8,17 (d, 1H).

Beispiel 8:

N-(3-Morpholinopropyl)-4-iso-butyrylamino-2-methoxy-benzamid

[0032] 1H NMR (CDCl₃): δ 1,24 (d, 6H) 1,86 (m, 2H) 2,52 (m, 7H) 3,51 (m, 2H) 3,75 (m, 4H) 3,97 (s, 3H) 6,71 (m, 1H) 7,37 (s, 1H) 7,94 (s, 1H) 8,09 (d, 1H).

Beispiel 9

N-[4-(Dimethylamino)butyl]-4-iso-butyrylamino-2-methoxy-benzamid

[0033] 1H NMR (CDCl₃): δ 1,25 (d, 6H) 1,65 (m, 4H) 2,37 (m, 6H) 2,52 (m, 3H) 3,45 (m, 2H) 3,97 (s, 3H) 6,73 (m, 1H) 7,43 (s, 1H) 7,88 (m, 1H) 7,92 (s, 1H) 8,09 (d, 1H).

Beispiel 10:

N-[3-(4-Methylpiperazino)propyl]-4-iso-butyrylamino-2-methoxy-benzamid

[0034] 1H NMR (CDCl₃): δ 1,25 (d, 6H) 1,83 (m, 3H) 2,35 (s, 3H) 2,52 (m, 3H) 2,60 (m, 7H) 3,49 (m, 2H) 3,96 (s, 3H) 6,71 (m, 1H) 7,37 (s, 1H) 7,94 (m, 2H) 8,08 (d, 1H).

Beispiel 11

N-[3-(Diethylamino)propyl]-4-iso-butyrylamino-3,5-dichlorbenzamid

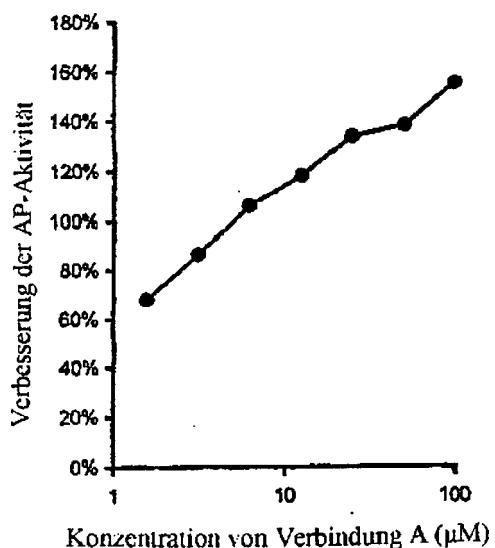
[0035] 1H NMR (CDCl₃): δ 1,10 (t, 6H) 1,29 (d, 6H) 1,82 (m, 2H) 2,69 (m, 7H) 3,55 (m, 2H) 7,03 (s, 1H) 7,82 (s, 2H) 9,22 (s, 1H).

Pharmakologische Verfahren

[0036] Zellen aus der Jurkat T-Zelllinie wurden mit einem AP-1-gesteuerten Luciferase-Reportergenkonstrukt (Parra et al., 1997) zusammen mit einem Selektionsgenvektor transfiziert. Ausgewählte Klone aus den so erhaltenen stabilen AP-1 Reportergentransfektanten wurden in den Assays zur AP-1 Transkriptionsfaktoraktivität verwendet. Diese transfizierten Jurkat-Zellen (Jurkat/AP-1rep) wurden in RPMI 1640, welches mit Glutamin, Hepes, Natriumpyruvat, Gentamicin, 10 % FCS und G418 ergänzt wurde, kultiviert. Um die unterschiedlichen Verbindungen in ihrer Kapazität, die AP-1 Aktivität zu erhöhen, zu beurteilen, wurden Jurkat/AP-1rep-Zellen 5,5 Std. lang bei der Temperatur von 37 °C mit Phorbolmyristacetat und Ionomycin in Abwesenheit und Gegenwart der Testverbindungen stimuliert. Die Platten mit 96 Vertiefungen, welche die Zellkulturen enthalten, wurden dann auf Eis gestellt, bis sie geerntet wurden. Die Überstände wurden entfernt, und die Zellen wurden lysiert. Die AP-1 Aktivität wurde als die durch das Luciferasesubstrat erzeugte Luminiszenz gemessen, welches in die Vertiefungen in Zusammenhang mit der Messung gegeben wurde.

[0037] Superantigen-reagierende Mäuse wurden mit Enterotoxin A aus Staphylococcus in Übereinstimmung mit Belfrage et al. behandelt (Belfrage et al. 1995, 1997a, 1997b). Plasma und Splenocyten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt, um die induzierte Aktivität der T-Zellen mit oder ohne Behandlung mit den erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zu beurteilen. Es wird gezeigt, dass T-Zellaktivität, gemessen als IL-2-Herstellung, cytotoxische T-Zellaktivität und eine Anergieinduktion (Belfrage et al. 1995, 1997a, 1997b), durch die Behandlung moduliert wurde.

[0038] Unter den bevorzugten Verbindungen ist N-[(3-Diethylamino)propyl]-4-isobutyrylamino-2-methoxybenzamid, hierin nachstehend Verbindung A genannt. Von Verbindung A wurde gezeigt, dass sie die Aktivität des AP-1-gesteuerten Reporters auf eine Dosis abhängige Weise bis hinunter zu μM Konzentrationen erhöht (**Abb. 1**).



[0039] Abb. 1: Prozentsatz der Erhöhung der Reportergenaktivität bei der Analyse, welche Jurkat-Zellen mit einem transfizierten AP-1-gesteuerten Luciferasereportergen benutzt.

[0040] Die Verbindungen der Formel (I) sind als Verstärker von AP-1 nützlich. Die vorliegende Erfindung stellt nützliche Zusammensetzungen und Formulierungen der Verbindungen, einschließlich Arzneimittel und Formulierungen der Verbindungen bereit.

[0041] Wirksame Mengen der Verbindungen der Formel (I) werden vorzugsweise einem Patienten, der einer derartigen Behandlung bedarf, auf gewöhnlichen Verabreichungswegen verabreicht und in gewöhnliche Arzneimittel, umfassend eine wirksame Menge des Wirkstoffs und einen geeigneten pharmazeutisch verträglichen Träger, formuliert. Derartige Zusammensetzungen können eine Vielfalt an Formen annehmen, z. B. Lösungen, Suspensionen, Emulsionen, Tabletten, Kapseln und Pulver, welche zur oralen Verabreichung hergestellt wurden, Aerosole zur Inhalation, sterile Lösungen zur parenteralen Verabreichung, Zäpfchen zur rectalen Verabreichung oder geeignete topische Formulierungen. Herkömmliche Verfahren zur Auswahl und Herstellung geeigneter pharmazeutischer Formulierungen werden zum Beispiel, in „Pharmaceuticals – The Science of Dosage Form Design“, M. B. Aulton, Churchill Livingstone, 1988, beschrieben. Für eine geeignete tägliche Dosis zur Verwendung bei der Behandlung von Krankheit, welche mit Immunsuppression in Zusammenhang gebracht wird, oder manisch-depressiver Erkrankung wird in Erwägung gezogen, dass sie zwischen 0,0005 mg/kg bis etwa 10 mg/kg Körpergewicht variiert, insbesondere zwischen 0,005 mg/kg bis 1 mg/kg Körpergewicht, abhängig von der spezifischen Störung, welche zu behandeln ist, dem Alter und Gewicht des spezifischen Patienten und der Reaktion des spezifischen Patienten auf die Medikation. Die exakte individuelle Dosierung, ebenso wie die tägliche Dosierung wird gemäß medizinischen Standardprinzipien durch die Anweisung eines Arztes bestimmt werden.

[0042] Verschiedene Zusatzstoffe werden, um die Stabilität zu steigern oder die Verabreichung des Arzneistoffes zu erleichtern, in Erwägung gezogen. Das Arzneimittel kann auch zusätzliche therapeutisch nützliche Stoffe, welche sich von der Verbindung der Formel (I) unterscheiden, enthalten.

[0043] Die Fähigkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen, die AP-1 Aktivität zu verbessern, wird durch ihre Fähigkeit, die Reportergenaktivität (siehe Abb. 1) zu verbessern, deutlich bewiesen. Es werden keine unannehmbaren toxisologischen Effekte, wie zum Beispiel tardive Dyskinesie, erwartet, wenn die erfindungsgemäßen Verbindungen in Übereinstimmung mit der Erfindung verabreicht werden.

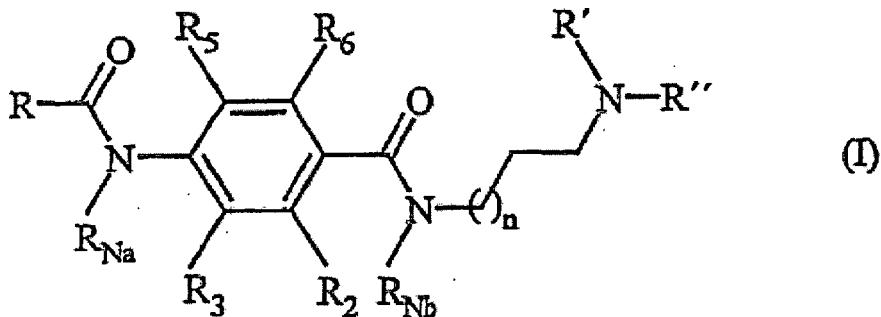
Referenzen

- Belfrage H, Dohlsten M, Hedlund G, Kalland T. 1995 Enhanced and prolonged efficacy of superantigen-induced cytotoxic T lymphocyte activity by interleukin-2 in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 1995 Aug; 41 (2): 87 – 94
- Belfrage H, Dohlsten M, Hedlund G, Kalland T. 1997a Prevention of superantigen-induced down-regulation of T-cell mediated cytotoxic activity by IL-2 in vivo. *Immunology* 1997 Feb; 90 (2): 183 – 8
- Belfrage H, Dohlsten M, Hedlund G, Kalland T. 1997b Prevention of superantigen-induced tolerance in vivo by interleukin-2 treatment. *Cancer Immunol Immunother* 1997 Apr; 44 (2): 77 – 82

- Chen G, Yuan PX, Jiang YM, Huang LD, Manji HK. Valproate robustly enhances AP-1 mediated gene expression. *Brain Res Mol Brain Res* 1999 Jan 22; 64 (1): 52 – 8
- Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V. Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* 1992 Nov 13; 71 (4): 577 – 86
- Kiessling R, Wasserman K, Horiguchi S, Kono K, Sjoberg J, Pisa P, Petersson M. Tumorinduced immune dysfunction. *Cancer Immunol Immunother* 1999 Oct; 48 (7): 353 – 62
- Parra E, Varga M, Hedlund G, Kalland T, Dohlsten M. Costimulation by B7-1 and LFA-3 targets distinct nuclear factors that bind to the interleukin-2 promoter: B7-1 negatively regulates LFA-3-induced NF-AT DNA binding. *Mol Cell Biol* 1997 Mar; 17 (3): 1314 – 23
- Sundstedt A, Dohlsten M. In vivo anergized CD4+ T cells have defective expression and function of the activating protein-1 transcription factor. *J Immunol* 1998 Dec 1; 161 (11): 5930 – 6
- Whiteside TL. Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy. *Cancer Immunol Immunother* 1999 Oct; 48 (7): 346 – 52
- Yuan PX, Chen G, Huang LD, Manji HK. Lithium stimulates gene expression through the AP-1 transcription factor pathway. *Brain Res Mol Brain Res* 1998 Jul 15; 58 (1 – 2): 225 – 30

Patentansprüche

1. Verwendung einer Verbindung der allgemeinen Formel (I)



wobei

der Rest R aus Methyl, Ethyl, n-Propyl, iso-Propyl, c-Propyl, n-Butyl, sec-Butyl, iso-Butyl, tert-Butyl, c-Butyl, n-Pentyl, sec-Pentyl, iso-Pentyl, tert-Pentyl, neo-Pentyl, c-Pentyl, c-Hexyl und c-Heptyl ausgewählt ist; die Reste R_{Na} und R_{Nb} gleich oder verschieden und aus Wasserstoff, Methyl und Ethyl ausgewählt sind; die Reste R₂, R₃, R₅ und R₆ unabhängig aus Wasserstoff, Methyl, Methoxy, Thiomethyl, Hydroxy, Fluor, Chlor, Brom, Trifluormethyl, Phenyl und Benzyl ausgewählt sind;

n gleich 1, 2 oder 3 ist;

die Reste R' und R'' gleich oder verschieden und aus Methyl, Ethyl, n-Propyl, iso-Propyl, n-Butyl, sec-Butyl und iso-Butyl ausgewählt sind oder die Reste R' und R'' zusammen einen gesättigten heterocyclischen Ring mit 5 bis 7 Atomen der Formel



bilden,

wobei p gleich 1, 2, 3 ist;

X aus CHRhet₁, NRhet₁ und O ausgewählt ist, mit der Maßgabe, dass p gleich 2 oder 3 ist, wenn X die Bedeutung NRhet₁ und O hat;

Rhet₁ aus Wasserstoff und C₁₋₅-Alkyl ausgewählt ist, welches gegebenenfalls mit OH, Halogen (F, Cl und Br), CN, COORhet₂, N(Rhet₂)₂ funktionalisiert ist, wobei Rhet₂ unabhängig aus H, C₁₋₄-Alkyl ausgewählt ist; und pharmazeutisch verträglicher Salze, Hydrate und Solvate davon zur Herstellung eines Medikaments zur Stimulierung des Transkriptionsfaktors AP (activator protein)-1.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1 der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zur Herstellung eines Medikaments zur Stimulierung, Verbesserung oder Modulation der Immunantwort.

3. Verwendung gemäß Anspruch 2 der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs und unerwünschter Immunsuppression, welche durch z.B. Zytostatika- und Strahlungstherapie ausgelöst wird.

4. Verwendung gemäß Anspruch 2 der Verbindung der allgemeinen Formel (I) zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Autoimmunkrankheit.

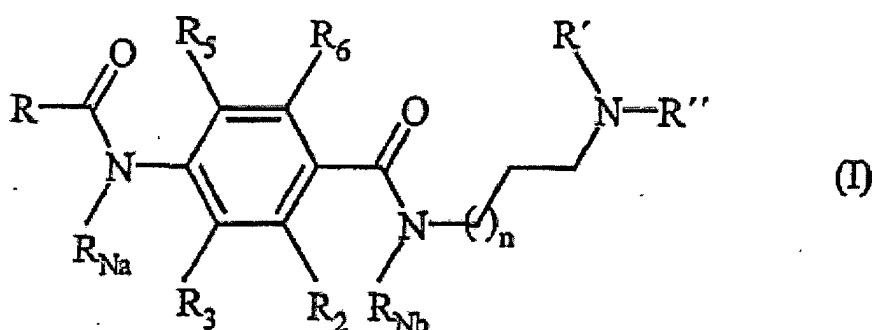
5. Verwendung gemäß Anspruch 2 der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Infektionskrankheit.

6. Verwendung gemäß Anspruch 1 der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von manisch-depressiver Erkrankung.

7. Verwendung gemäß Anspruch 1 von N-[(3-Diethylamino)propyl]-4-isobutyrylamino-2-methoxybenzimid.

8. Verwendung gemäß Anspruch 1 der Verbindung zur Herstellung eines Medikaments, welches in einer täglichen Dosierung zwischen 0,0005 mg/kg bis etwa 10 mg/kg Körpergewicht, insbesondere zwischen 0,005 bis 1 mg/kg Körpergewicht verabreicht werden soll.

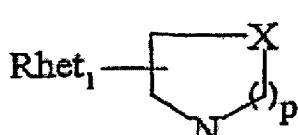
9. Zusammensetzung, umfassend als einen Wirkstoff Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



wobei

der Rest R aus Methyl, Ethyl, n-Propyl, iso-Propyl, c-Propyl, n-Butyl, sec-Butyl, iso-Butyl, tert-Butyl, c-Butyl, n-Pentyl, sec-Pentyl, iso-Pentyl, tert-Pentyl, neo-Pentyl, c-Pentyl, c-Hexyl und c-Heptyl ausgewählt ist;
die Reste R_{Na} und R_{Nb} gleich oder verschieden und aus Wasserstoff, Methyl und Ethyl ausgewählt sind;
die Reste R₂, R₃, R₅ und R₆ unabhängig aus Wasserstoff, Methyl, Methoxy, Thiomethyl, Hydroxy, Fluor, Chlor, Brom, Trifluormethyl, Phenyl und Benzyl ausgewählt sind;
n gleich 1, 2 oder 3 ist;

die Reste R' und R'' gleich oder verschieden und aus Methyl, Ethyl, n-Propyl, iso-Propyl, n-Butyl, sec-Butyl und iso-Butyl ausgewählt sind oder die Reste R' und R'' zusammen einen gesättigten heterocyclischen Ring mit 5 bis 7 Atomen der Formel



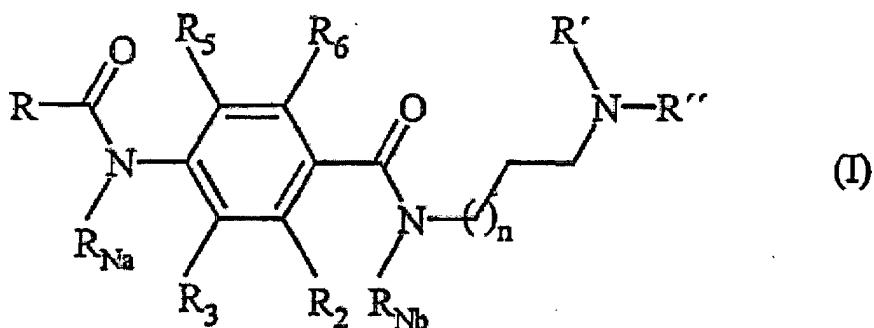
bilden,

wobei p gleich 1, 2, 3 ist;

X aus CHRhet₁, NRhet₁ und O ausgewählt ist, mit der Maßgabe, dass p gleich 2 oder 3 ist wenn X die Bedeutung NRhet₁ und O hat;

Rhet₁ aus Wasserstoff und C₁₋₅-Alkyl ausgewählt ist, welches gegebenenfalls mit OH, Halogen (F, Cl und Br), CN, COORhet₂, N(Rhet₂)₂ funktionalisiert ist, wobei Rhet₂ unabhängig aus H, C₁₋₄-Alkyl ausgewählt ist; pharmazeutisch verträgliche Salze, Hydrate und Solvate davon und einen pharmazeutisch wirksamen Träger.

10. Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



wobei

der Rest R aus Methyl, Ethyl, n-Propyl, iso-Propyl, c-Propyl, n-Butyl, sec-Butyl, iso-Butyl, tert-Butyl, c-Butyl, n-Pentyl, sec-Pentyl, iso-Pentyl, tert-Pentyl, neo-Pentyl, c-Pentyl, c-Hexyl und c-Heptyl ausgewählt ist;

die Reste R_{Na} und R_{Nb} gleich oder verschieden und aus Wasserstoff, Methyl und Ethyl ausgewählt sind;

die Reste R₂, R₃, R₅ und R₆ unabhängig aus Wasserstoff, Methyl, Methoxy, Thiomethyl, Hydroxy, Fluor, Chlor, Brom, Trifluormethyl, Phenyl und Benzyl ausgewählt sind;

n gleich 1, 2 oder 3 ist;

die Reste R' und R'' gleich oder verschieden und aus Methyl, Ethyl, n-Propyl, iso-Propyl, n-Butyl, sec-Butyl und iso-Butyl ausgewählt sind oder die Reste R' und R'' zusammen einen gesättigten heterocyclischen Ring mit 5 bis 7 Atomen der Formel



bilden,

wobei p gleich 1, 2, 3 ist;

X aus CHRhet₁, NRhet₁ und O ausgewählt ist, mit der Maßgabe, dass p gleich 2 oder 3 ist, wenn X die Bedeutung NRhet₁ und O hat;

Rhet₁ aus Wasserstoff und C₁₋₅-Alkyl ausgewählt ist, welches gegebenenfalls mit OH, Halogen (F, Cl und Br),

CN, COORhet₂, N(Rhet₂)₂ funktionalisiert ist, wobei Rhet₂ unabhängig aus H, C₁₋₄-Alkyl ausgewählt ist;

mit der Maßgabe, dass, wenn die Reste R' und R'' Methyl sind, der Rest R nicht Methyl sein kann; und pharmazeutisch verträgliche Salze, Hydrate und Solvate davon.

11. Verbindungen gemäß Anspruch 10, wobei

der Rest R aus Methyl, Ethyl, n-Propyl und iso-Propyl ausgewählt ist,

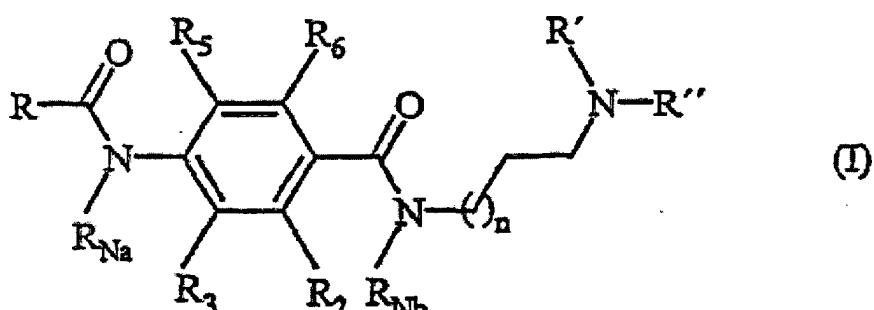
die Reste R_{Na} und R_{Nb} Wasserstoff sind,

einer der Reste von R₂, R₃, R₅ und R₆ aus Wasserstoff, Methyl, Methoxy, Thiomethyl, Hydroxy, Fluor, Chlor, Trifluormethyl und Phenyl ausgewählt ist,

mit der Maßgabe, dass, wenn die Reste R' und R'' Methyl sind, der Rest R nicht Methyl sein kann; und die Reste R' und R'' aus Methyl, Ethyl, n-Propyl und n-Butyl ausgewählt sind.

12. N-[(3-Diethylamino)propyl]-4-isobutyrylamino-2-methoxybenzamid gemäß den Ansprüchen 9 und 10.

13. Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



wobei

der Rest R aus Methyl, Ethyl, n-Propyl, iso-Propyl, c-Propyl, n-Butyl, sec-Butyl, iso-Butyl, tert-Butyl, c-Butyl, n-Pentyl, sec-Pentyl, iso-Pentyl, tert-Pentyl, neo-Pentyl, c-Pentyl, c-Hexyl und c-Heptyl ausgewählt ist;

die Reste R_{Na} und R_{Nb} gleich oder verschieden und aus Wasserstoff, Methyl und Ethyl ausgewählt sind;
 die Reste R_2 , R_3 , R_5 und R_6 unabhängig aus Wasserstoff, Methyl, Methoxy, Thiomethyl, Hydroxy, Fluor, Chlor, Brom, Trifluormethyl, Phenyl und Benzyl ausgewählt sind;
 n gleich 1, 2 oder 3 ist;
 die Reste R' und R'' gleich oder verschieden und aus Methyl, Ethyl, n-Propyl, iso-Propyl, n-Butyl, sec-Butyl und iso-Butyl ausgewählt sind oder die Reste R' und R'' zusammen einen gesättigten heterocyclischen Ring mit 5 bis 7 Atomen der Formel



bilden,
 wobei p gleich 1, 2, 3 ist;
 X aus $CHRhet_1$, $NRhet_1$ und O ausgewählt ist, mit der Maßgabe, dass p gleich 2 oder 3 ist, wenn X die Bedeutung $NRhet_1$ und O hat;
 $Rhet_1$ aus Wasserstoff und C_{1-5} -Alkyl ausgewählt ist, welches gegebenenfalls mit OH Halogen (F, Cl und Br), CN, $COORhet_2$, $N(Rhet_2)_2$ funktionalisiert ist, wobei $Rhet_2$ unabhängig aus H, C_{1-4} -Alkyl ausgewählt ist;
 mit der Maßgabe, dass, wenn die Reste R' und R'' Methyl sind, der Rest R nicht Methyl sein kann;
 und pharmazeutisch verträgliche Salze, Hydrate und Solvate davon zur therapeutischen Verwendung.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen