

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. Februar 2005 (24.02.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/016860 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07C 39/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT2004/000279

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. August 2004 (09.08.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
A 1285/2003 14. August 2003 (14.08.2003) AT

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **SZEKERES, Thomas** [AT/AT]; Gugitzgasse
8/41, A-1190 Wien (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HANDLER, Norbert**
[AT/AT]; Gumpendorferstrasse 51/16, A-1060 Wien (AT).
JÄGER, Walter [AT/AT]; Sumer Siedlung 27, A-3021
Pressbaum (AT). **MURIAS, Arkadiusz, Marek** [AT/AT];
Garnisongasse 14-16, A-1090 Wien (AT). **ERKER,**
Thomas [AT/AT]; Heinrich Collin Strasse 29-31/14,
A-1140 Wien (AT).

(74) Anwälte: **BEER, Manfred** usw.; Lindengasse 8, A-1070
Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

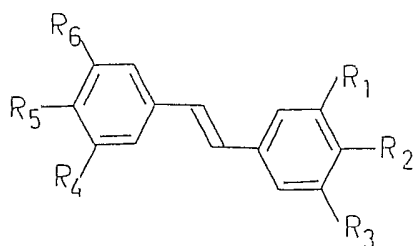
Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: STILBENE DERIVATIVES AND THEIR USE IN MEDICAMENTS

(54) Bezeichnung: STILBEN-DERIVATE UND DEREN VERWENDUNG IN ARZNEIMITTELEN



(I)

(57) Abstract: The invention relates to stilbene derivatives of general
formula (I), in which at least four of the substituents R₁ to R₆ do not rep-
resent hydrogen. The substituents are effective radical captors, anti-tu-
mour active ingredients and selective cyclooxygenase-2 inhibitors.

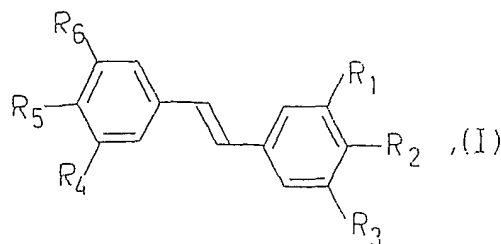
(57) Zusammenfassung: Beschrieben werden Stilbenderivate der all-
gemeinen Formel (I); In dieser haben wenigstens vier der Substituenten
R₁ bis R₆ eine andere Bedeutung als Wasserstoff. Die Substituenten sind
wirksame Radikalfänger, Antitumorstoffe und selektive Cyclooxy-

genase-2-Inhibitoren.

WO 2005/016860 A2

Stilben-Derivate und deren Verwendung in Arzneimitteln

Die Erfindung betrifft Stilben-Derivate der allgemeinen Formel I



worin R_1 bis R_6 , die gleich oder verschieden sind, Wasserstoff-, OH-, -OD oder -OR₇ bedeuten, worin R_7 eine C₁ bis C₃-Alkylgruppe oder eine C₂ bis C₄-Carboxylgruppe ist, mit der Maßgabe, daß wenigstens vier (4) der Substituenten R_1 bis R_6 eine andere Bedeutung als Wasserstoff haben.

Die Erfindung betrifft weiters Arzneimittel, die wenigstens eine der Verbindungen der allgemeinen Formel I enthalten.

Überdies erstreckt sich die Erfindung auf die Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formel I zum Herstellen von Arzneimitteln.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind pharmazeutisch wertvolle Wirkstoffe, da sie als Radikalfänger, als Antitumorsubstanzen und/oder als selektive Cyclooxygenase 2-Inhibitoren (COX 2) wirken.

In Betracht gezogen sind im Vorliegenden 3,3',4,4',5,5'-Hexahydroxystilbene und deren Ether und Ester, wobei als Ether insbesondere die Methyl-, Ethyl-, und Propyl-Ether und als Ester insbesondere solche der Ameisensäure und der Essigsäure in Betracht gezogen sind.

Weiters in Betracht gezogen sind im Rahmen der Erfindung deuterierte 3,3',4,4',5,5'-Hexahydroxystilbene, in deren -OH-Gruppen statt Wasserstoff Deuterium enthalten ist, also statt der OH-Gruppen OD-Gruppen vorliegen.

Besonders in Betracht gezogen sind im Rahmen der Erfindung 3,3',4,4',5,5'-Hexahydroxystilben und 3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxystilben. Diese Verbindungen haben sich als Wirkstoffe mit vorteilhaften Eigenschaften als Radikalfänger und Antitumorsubstanz sowie als hochselektive Cyclooxygenase 2-Hemmer erwiesen.

Allgemeiner gesprochen sind im Vorliegenden folgende Verbindungen in Betracht gezogen:

E- und Z-Formen von: 3,3',4,4',5,5'-Hexahydroxystilben, aber auch 3,3',4,5,5'-Pentahydroxystilben, 3,3',4,4',5-Pentahydroxystilben, 3,4,4',5,5'-Pentahydroxystilben,

3,4,4',5-Tetrahydroxystilben, 3,3',5,5'-Tetrahydroxystilben, 3,3',4',5-Tetrahydroxystilben und Ether (Methoxy, Ethoxy, Propoxy,) und Ester (Formiat, Acetat,) dieser Verbindungen; dies sind zum Beispiel Tetra-, Hexa- und Pentamethoxy-Stilbenderivate der oben erwähnten Strukturen, gemischte Hydroxy- und Methoxy-Stilbenderivate, aber auch deuterierte (D anstatt H) Analoga der erwähnten Strukturen als hoch selektive COX 2 Inhibitoren mit signifikant niedrigerer Hemmwirkung auf COX 1 als auf COX 2.

Arzneimittel, welche die oben genannten Stilben-Derivate der Formel I enthalten, sind für die Prävention und die Behandlung verschiedener Erkrankungen einschließlich Tumorerkrankungen, wobei es auf die Eigenschaften von Wirkstoffen als Radikalfänger ankommt, und für alle Zustandsbilder und Erkrankungen, die durch die Verwendung von Cyclooxygenase 2-Hemmern behandelt werden können, geeignet.

Hintergrund der Erfindung:

Viele natürlich vorkommende Substanzen, wie Flavonoide oder Phenole können das Entstehen einer Reihe von Krankheiten verhindern oder bei der Behandlung verschiedener Erkrankungen, wie zum Beispiel Tumorerkrankungen oder Herz- Kreislauf-Erkrankungen, wirkungsvoll eingesetzt werden. Diese Substanzen können in verschiedenen Pflanzenextrakten, Gewürzmischungen oder Pflanzen, wie Beeren, Trauben, Erdnüssen, oder auch in Wein gefunden werden und wurden beispielsweise bereits in der Indischen oder Chinesischen Medizin eingesetzt.

Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilben) ist die am Genauesten untersuchte polyphenolische Substanz. Sie wird von Weintrauben gebildet und ist im Wein zu finden. Resveratrol hemmt wirksam das Wachstum von Tumorzellen und wird für das so genannte „französische Paradoxon“ (die Tatsache, dass die Wahrscheinlichkeit an koronarer Herzkrankheit zu erkranken, verglichen mit allen anderen Europäischen Staaten in Frankreich um 40% reduziert ist), verantwortlich gemacht. Eine Reihe zellulärer Wirkungen, wie die Hemmung der Cyclooxygenase (COX)-Aktivität (Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto JM, Dannenberg AJ. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. J Biol Chem. 1998 Aug 21;273(34):21875-82.), Hemmung der Ribonukleotid Reduktase Aktivität (Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, Guittet O. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. FEBS Lett. 1998 Jan 16;421(3):277-9.) oder Induktion von NFkappaB (Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. Br J Pharmacol. 1999 Feb;126(3):673-80.) wurden für Resveratrol beschrieben. Eine selektive

Hemmung der Cyclooxygenase 2 (COX 2) konnte für Resveratrol nicht gezeigt werden. Dies ist auch nicht der Fall; Resveratrol hemmt beide Isoenzyme (COX 1 und COX 2) mit vergleichbarer Wirksamkeit.

Verschiedene Analoga von Resveratrol werden in der WO 01/21165 A1 als Antitumorsubstanzen genannt. Nicht geoffenbart in der WO 01/21165 A1 ist die Substanz, die Synthese und Verwendung von 3,5,4,4',5,5'-Hexahydroxy-, Hexamethoxy- und verwandter Analoga des Resveratrol. Die Hexahydroxy-Verbindung war allerdings unerwartet ein sehr wirksamer Inhibitor des Wachstums von humanen Tumorzellen. Außerdem hat diese Substanz, aber auch die Hexamethoxy-Verbindung, eine selektive Hemmung für COX 2 gezeigt.

Für andere Resveratrol-Analoga beschreiben Ghai et al. (Ghai et al. WO 01/21165 A1, Lu J, Ho CH, Ghai G, Chen KY. Resveratrol analog, 3,4,4',5-tetrahydroxystilbene, differentially induces pro-apoptotic p53/Bax gene expression and inhibits the growth of transformed cells but not their normal counterparts. *Carcinogenesis*. 2001 Feb;22(2):321-8.) Antitumor-Aktivität, allerdings wird die selektive Hemmung der COX 2 nicht erwähnt.

Zwei Isoenzyme der Cyclooxygenase wurden während der letzten Jahre identifiziert. COX 2 ist die induzierbare Form, die auch gehemmt werden muß, um Entzündungen, Schmerzen etc. zu hemmen. Die Hemmung von COX 1 wird teilweise für die Nebenwirkungen von sogenannten nicht-steroidalen entzündungshemmenden Medikamenten (NSAIDs), wie zum Beispiel Aspirin, verantwortlich gemacht. Deshalb wurden selektive Inhibitoren der COX 2 entwickelt. Dadurch können die Nebenwirkungen der NSAIDs (hauptsächlich gastrointestinale Probleme) minimiert und die Effektivität der Medikamente verbessert werden. Bis jetzt wurden einige wenige hoch selektive Inhibitoren der COX 2 beschrieben. Einige der Medikamente sind zugelassen. Die Indikationen für die Verwendung von COX 2 Inhibitoren sind weiter unten aufgezählt. Sie umfassen inzwischen eine Reihe von Zustandsbildern und Erkrankungen.

Hoch selektive COX 2-Inhibitoren können beispielsweise für die Behandlung folgender Zustandsbilder und Erkrankungen verwendet werden:

- Antitumor Wirkung

- Behandlung und Prävention von Malignomen

- Induktion von Apoptose (programmiertem Zelltod)

- Hemmung von NFkappaB

- Verwendung in der Kombination mit Strahlentherapie

- Verwendung in der Kombination mit anderen Substanzen in der Chemotherapie

- Reduktion der Invasivität und des metastatischen Potentials von Tumoren

- Fiebersenkende (antipyretische) Wirkung

Hemmung der Gebärmutterkontraktion
Entzündungshemmung
Behandlung von Asthma
Behandlung von Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis
Verbessernde Wirkung auf Knochen Reparatur
Prävention und Behandlung von Bindegewebserkrankungen und Knochenerkrankungen einschließlich Osteoporose
Antiöstrogene Effekte (Behandlung zur Tumorprävention und Behandlung von menopausalen und post-menopausalen Beschwerden)
Behandlung von Glaukom
Schmerzreduktion
Reduktion von Ödemen
Antiangiogenetische Wirkung d.h. Wirkung auf Angiogenese (Hemmung der Gefäßbildung)
Hemmung der Plättchenaggregation
Wirkung auf NO Synthase
Prävention von Herz- Kreislauferkrankungen (Blutgefäßerkrankungen)
Prävention und Behandlung von Herzinfarkt
Prävention und Behandlung von Diabetes und Diabetes Komplikationen
Prävention der ischämisch proliferativen Retinopathie
Prävention von Reperfusionsschäden
Antivirale Aktivität
Antibakterielle Aktivität
Antimykotische Aktivität
Behandlung gegen sonstige Erreger wie: Malariabehandlung
Behandlung von Sichelzellanämie
Behandlung verschiedener Hauterkrankungen (auch lokale topische Verwendung) wie z.B: Psoriasis
Behandlung der Aktinischen Keratose
Prävention und Behandlung der Helicobacter Pylori Gastritis
Prävention und Behandlung von M. Parkinson
Behandlung der Amytopen Lateralsklerose
Behandlung von Multipler Sklerose
Behandlung von M. Alzheimer

Nachstehend werden Beispiele für das Herstellen von Verbindungen der allgemeinen Formel I wiedergegeben, wobei für die Synthese von Methoxystilbenen. die Horner-Emmons-Wadsworth-Reaktion angewendet wurde.

Beispiel 1:

3,3',5-Trimethoxystilben. In einem trockenen Reaktionskolben wurde 10 mmol (2.58 g) Diethyl- (4-methoxybenzyl)phosphonat unter Argon auf 0° C gekühlt. Dann wurden 10 mL trockenes DMF, 20 mmol (1.12 g) Natriummethoxid und 10 mmol (1.661 g) 3,5-Dimethoxybenzaldehyd zugefügt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur eine Stunde lang gerührt und dann unter Argon 1,5 Stunden lang auf 100°C erhitzt. Dann wurde die Lösung in ein Becherglas mit 250 mL Eiswasser übergeführt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und aus Ethanol (70%) umkristallisiert.

Ausbeute: 1.59 g (59%).

Beispiel 2:

3,4,4',5-Tetramethoxystilben wurde aus: 10 mmol (2.58 g) Diethyl-(4-methoxybenzyl)-phosphonat, 20 mmol (1.12 g) Natriummethoxid und 10 mmol (1.962 g) 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd auf die oben beschriebene Weise synthetisiert.

Ausbeute: 1.65 g (55%);

Fp = 157° C.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.44 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.98 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 6.91-6.83 (m, 3H), 6.71 (s, 2H), 3.90 (s, 6H), 3.86 (s, 3H), 3.82 (s, 3H). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 159.2, 153.3, 137.7, 133.3, 129.9, 127.6, 127.5, 126.4, 114.1, 103.2, 60.9, 56.0, 55.2.

MS *m/z* 300 (M⁺, 100 %).

Anal (C₁₈H₂₀O₄) C, H.

Beispiel 3:

3,3',5,5'- Tetramethoxystilben wurde wie in Beispiel 1 beschrieben synthetisiert aus: 10 mmol (2.88 g) Diethyl-(3,5-dimethoxybenzyl)phosphonat, 20 mmol (1.12 g) Natriummethoxid und 10 mmol (1.661 g) 3,5-Dimethoxybenzaldehyd.

Ausbeute: 1.56 g (52%).

Beispiel 4:

3,3',4',5-Tetramethoxystilben wurde wie in Beispiel 1 beschrieben synthetisiert aus: 10 mmol (2.48 g) Diethyl-(3,5-dimethoxybenzyl)phosphonat, 20 mmol (1.12 g) Natriummethoxid und 10 mmol (1.661 g) 3,4-Dimethoxybenzaldehyd.

Ausbeute: 1.65 g (55%).

Beispiel 5:

3,3',4,5,5'-Pentamethoxystilben wurde wie in Beispiel 1 beschrieben synthetisiert aus: 10 mmol (2.48 g) Diethyl-(3,5-dimethoxybenzyl)phosphonat, 20 mmol (1.12 g) Natriummethoxid und 10 mmol (1.962 g) 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd.

Ausbeute: 1.94 g (59%).

Beispiel 6:

3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxystilben wurde wie in Beispiel 1 beschrieben synthetisiert aus: 10 mmol (3.18 g) Diethyl-(3,4,5-trimethoxybenzyl)phosphonat, 20 mmol (1.12 g) Natriummethoxid und 10 mmol (1.962 g) 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd.

Ausbeute: 1.76 g (49%);

Fp = 215° C.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 6.94 (s, 2H), 6.74 (s, 4H), 3.92 (s, 12H), 3.87 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ 153.3, 137.8, 132.8, 128.0, 103.3, 60.9, 56.0. MS m/z 360 (M^+ , 100%). Anal. ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$) C, H.

Beispiel 7:

3,4,4',5-Tetrahydroxystilben: In einem trockenen Reaktionskolben wurde 2.5 mmol (0.750 g) 3,4,4',5-Tetramethoxystilben in unter Argon in Methylenchlorid gelöst und auf – 30 °C abgekühlt. Dann wurde tropfenweise 15 mmol (15 mL 1 M-Lösung in Methylenchlorid) Bortribromid-Lösung zugegeben. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 24 Stunden lange gerührt. Die Reaktion wurde durch langsame Zugabe von gesättigter NaHCO_3 Lösung gestoppt. Danach wurde die Lösung für weitere 30 Minuten gerührt und Methylenchlorid wurde abgedampft; die wässrige Phase wurde mit 2N HCl angesäuert. Nach Zugabe von EtOAc wurde das Gemisch extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde durch Vakuum entfernt. Die Kristalle wurden aus EtOH/Wasser oder reinem Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 0.335 g (55%);

Fp = 240° C.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, d_6 -DMSO): δ 8.78 (s, 4H), 7.35 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.76-6.72 (m, 4H), 6.47 (s, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, d_6 -DMSO): δ 156.7, 146.1, 132.9, 128.5, 128.2, 127.4, 125.9, 125.1, 115.5, 105.2.

MS m/z 244 (M^+ , 100 %).

Anal. (C₁₄H₁₂O₄) C, H.

Beispiel 8:

3,3',5,5'-Tetrahydroxystilben wurde aus 2.5 mmol (0.750 g) 3,3',5,5'-Tetramethoxystilben wie in Beispiel 7 beschrieben synthetisiert.

Ausbeute: 0.366 g (60%);

Fp > 320° C.

¹H-NMR (200 MHz, d₆-DMSO): δ 9.24 (s, 4H), 6.84 (s, 2H), 6.41 (d, J = 2.0 Hz, 4H), 6.16 (t, J = 1.9 Hz, 2H). ¹³C-NMR (50 MHz, d₆-DMSO): δ 158.5, 138.7, 128.4, 128.4, 104.6, 102.2.

MS *m/z* 244 (M⁺, 100%).

Anal. (C₁₄H₁₂O₄) C, H.

Beispiel 9:

3,3',4',5-Tetrahydroxystilben wurde aus 2.5 Mmol (0.750 g) 3,3',4',5-Tetramethoxystilben wie in Beispiel 7 beschrieben, synthetisiert.

Ausbeute: 0.311 g (51%);

Fp = 236° C.

¹H-NMR (200 MHz, d₆-DMSO): δ 8.70 (s, 4H), 6.97 (s, 1H), 6.87- 6.63 (m, 4H), 6.40 (d, 1.9 Hz, 2H), 6.20-6.19 (m, 1H). ¹³C-NMR (50 MHz, d₆-DMSO): δ 158.0, 144.9, 144.8, 138.9, 128.6, 127.8, 125.4, 118.3, 115.3, 112.7, 104.1, 101.6.

MS *m/z* 244 (M⁺, 100%).

Anal. (C₁₄H₁₂O₄) C, H.

Beispiel 10:

3,3',4,5,5'-Pentahydroxystilben wurde aus 2.5 mmol (0.825 g) 3,3',4,5,5'-Pentamethoxystilben wie in Beispiel 7 beschrieben, synthetisiert.

Ausbeute: 0.370 g (57%);

Fp = 252° C.

¹H-NMR (200 MHz, d₆-acetone): δ 8.00 (s, 5H), 6.89 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 6.76 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 6.64 (s, 2H), 6.51 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 6.28-6.25 (m, 1H). ¹³C-NMR (50 MHz, d₆-acetone): δ 160.2, 147.4, 141.4, 134.7, 130.5, 130.3, 127.7, 107.3, 106.3, 103.3.

MS *m/z* 260 (M⁺, 100%).

Anal (C₁₄H₁₂O₅).

Beispiel 11:

3,3',4,4',5,5'-Hexahydroxystilben wurde aus 2.5 mmol (0.900 g) 3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxystilben wie in Beispiel 1 beschrieben, synthetisiert.

Ausbeute: 0.31 g (45%);

Fp = 270° C.

¹H-NMR (200 MHz, d₆-DMSO): δ 8.66 (s, 6H), 6.57 (s, 2H), 6.44 (s, 4H). ¹³C-NMR (50 MHz, d₆-DMSO): δ 146.1, 132.9, 128.1, 125.8, 105.2.

MS *m/z* 276 (M⁺, 100%).

Anal. (C₁₄H₁₂O₆) C, H.

Literatur: Chemische Daten von Methoxystilbenen: J. Med. Chem. 45 (1), 1999, p 2671-2686

Die pharmazeutische Wirksamkeit von erfindungsgemäßen Verbindungen wurde untersucht:

1. Bestimmungsreihe:

Zell-Kultur:

Die humane Promyelozytenleukämiezelllinie HL-60 wurde von der ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) gekauft. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% Hitze inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) (GIBCO, Grand Island Biological Co., Grand Island, NY, USA) und mit 1 % Penizillin/Streptomycin in angefeuchteter Atmosphäre bei 5% CO₂ gezüchtet.

Die Zellzahlen wurden mittels eines Mikrozellcounters CC-108 (Sysmex, Kobe, Japan) bestimmt. Für die Versuche wurden Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet.

Wachstumshemmungsassay:

Logarithmisch wachsende HL-60 Zellen wurden in einer Dichte von 0.1x10⁶ Zellen/ml in Gewebekulturflaschen angesetzt und mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Stilben-Derivate inkubiert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mittels des Mikrozellcounters gezählt. Die Viabilität der Zellen wurde mittels Trypanblau Färbung bestimmt. Als Resultate wurden als Anzahl viabler Zellen berechnet.

COX (humaner) Inhibitor Screening Assay:

Es wurde ein Immunoassay der Firma IBL Produkte, Hamburg, Deutschland für die Bestimmung der COX 1 und COX 2 Aktivitäten verwendet. Der Assay bestimmt quantitativ die Prostaglandine F, E und D sowie Thromboxan B artige Prostaglandine, die durch die Cyclooxygenase Reaktion gebildet werden. COX 1 und COX 2 wurden als so- genannte IC₅₀, 50 % Enzym Hemmung, d.h. die Substanzkonzentration, welche 50 % des gemessenen Isoenzymes hemmt, angegeben.

Tabelle 1:

Hemmende Wirkung von Stilbenen und von Resveratrol auf COX 1 und COX 2 Aktivität:

Stoff	IC ₅₀ (μM)		COX 2/ COX 1
	COX 1	COX 2	Verhältnis
3,3',4,5,5'-Pentamethoxystilben	10	0,6	0,06
3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxystilben	10	0,5	0,05
3,4,4',5-Tetrahydroxystilben	5	0,01	0,002
3,3',5,5'-Tetrahydroxystilben	0,01	< 0,001	< 0,1
3,3',4',5-Tetrahydroxystilben	5	0,005	0,001
3,3',4',5,5'-Pentahydroxystilben	0,01	0,005	0,5
3,3',4,4',5,5'-Hexahydroxystilben	0,5	0,001	0,002
3,4',5-Trihydroxystilben (Resveratrol)	0,5	0,5	1

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich ist, sind nur die erfindungsgemäßen Verbindungen, nicht aber Resveratrol selbst COX 2 selektiv (d.h. sie zeigen eine wesentlich effektivere Wirkung auf COX 2 als auf COX 1).

Tabelle 2:

Hemmende Wirkung erfindungsgemäßer Verbindungen auf das Wachstum von HL-60 humane Promyelocyten Leukämie-Zellen:

Stoff	IC ₅₀ (μM)
3,3',4,5,5'-Pentamethoxystilben	25
3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxystilben	>100
3,4,4',5-Tetrahydroxystilben	9
3,3',5,5'-Tetrahydroxystilben	12,5
3,3',4',5-Tetrahydroxystilben	9
3,3',4',5,5'-Pentahydroxystilben	10
3,3',4,4',5,5'-Hexahydroxystilben	4
3,4',5-Trihydroxystilbene (Resveratrol)	12

Bestimmungsreihe:

Chemikalien

3, 4, 5, 3', 4', 5'- Hexahydroxystilben wurde gemäß Beispiel 11 synthetisiert und verwendet. Resveratrol stammt von Sigma-Aldrich GmbH, Vienna, Austria. Beide Substanzen wurden in DMSO verdünnt.

Zell Kultur

Die humane Promyelozytenleukämiezelllinie HL-60 wurde von der ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) gekauft. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% Hitze inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) (GIBCO, Grand Island Biological Co., Grand Island, NY, USA) und mit 1 % Penizillin/Streptomycin in angefeuchteter Atmosphäre bei 5% CO₂ gezüchtet.

Die Zellzahlen wurden mittels eines Mikrozellcounters CC-108 (Sysmex, Kobe, Japan) bestimmt. Für die Versuche wurden Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet.

Wachstumshemmungsassay

Logarithmisch wachsende HL-60 Zellen wurden in einer Dichte von 0.1×10^6 Zellen/ml in Gewebekulturflaschen angesetzt und mit verschiedenen Konzentrationen der Resveratrol Analoga inkubiert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mittels des Mikrozellcounters gezählt. Die Viabilität der Zellen wurde mittels Trypanblau Färbung bestimmt. Als Resultate wurden als Anzahl viabler Zellen berechnet.

Analyse der intrazellulären dNTP (Deoxynukleosidtriphosphat) Pools mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Analyse der intrazellulären dNTP Konzentrationen erfolgte nach der Methode von Garrett und Santi (Garrett C, Santi DV. A rapid and sensitive high pressure liquid chromatography assay for deoxyribonucleoside triphosphates in cell extracts. Anal Biochem. 1979 Nov 1;99(2):268-73.)

Höchst Propidium Jodid Doppelfärbung

HL-60 Zellen (0.1×10^6 /ml) wurden in 25 cm² Flaschen gesät und 24 Stunden lange mit Hexahydroxystilben bzw. Resveratrol inkubiert. Dann wurden die Zellen mit Hoechst 33258 (HO, Sigma, St. Louis, MO, USA) und Propidium Iodid (PI, Sigma, St. Louis, MO, USA) (5 µg/ml und 2 µg/ml) eine Stunde lange behandelt. Danach wurden die Zellen mittels eines Fluoreszenz Mikroskops fotografiert und die Zellen wurden morphologisch in früh apoptotisch, spät apoptotisch und nekrotische Zellen unterteilt.

Bestimmung der Zell Zyklus Verteilung

HL-60 Zellen wurden in der Gegenwart von Hexahydroxystilben inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gewaschen, zentrifugiert und in Alkohol fixiert. Danach mit Propidium Iodid gefärbt und mittels FACS Analyse untersucht. Danach wurde die Zell Zyklus Phasen Verteilung berechnet.

In unbehandelten Zellen waren 41.9% in G0-G1, 43.8% in S und 14.3% in G2-M Phase des Zell Zyklus.

Ergebnisse der 2. Bestimmungsreihe:

In der folgenden Beschreibung wird auf die Fig. 1 bis 5 Bezug genommen. Diese zeigen: Legende zu den Abbildungen

Fig. 1: Zytotoxische Wirkungen von Resveratrol und Hexahydroxystilben in humanen HL-60 Leukämie Zellen

Fig. 2: Wirkung von Vitamin C und Hexahydroxystilben auf das Wachstum von HL-60 Zellen

Fig. 3: Wirkung von Hexahydroxystilben auf intrazelluläre dNTP Spiegel von HL-60 Zellen.

Fig. 4: Apoptose Induktion durch Resveratrol und Hexahydroxystilben in HL-60 Zellen

Fig. 5: Zell Zyklus Phasen Verteilung von HL-60 Zellen nach Behandlung mit Hexahydroxystilben

Wachstumshemmungsassay

Die wachstumshemmende Wirkung von Resveratrol bzw. Hexahydroxystilben („M8“) auf HL-60 Zellen ist in Fig. 1 dargestellt. Nach 72 Stunden Inkubation hat Resveratrol eine IC₅₀ (50 % Hemmung des Zellwachstums) von 12 µM bewirkt, während Hexahydroxystilben die Zellen mit einem IC₅₀ Wert von 6,25 µM an ihrem Wachstum gehemmt hat.

Durch Zugabe von 50 bzw. 100 µM Vitamin C konnte das wachstumshemmende Potential der beiden Substanzen, wie in Fig. 2 dargestellt, noch weiter verstärkt werden. Für Hexahydroxystilben („M8“) z.B. auf einen IC₅₀ Wert von 2 µM. Vitamin C selbst hat in den verwendeten Konzentrationen keine Wirkung auf das Zellwachstum gezeigt.

Analyse der intrazellulären dNTP (Deoxynucleosidtriphosphat) Pools

Untersucht wurde die Wirkung von Hexahydroxystilben („M8“) auf die intrazellulären dNTP Konzentrationen in HL-60 Zellen. Die Untersuchung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden mit 6,25, 12,5 und 25 µM Hexahydroxystilben inkubiert und dann wurden die dNTP Pools bestimmt. Die dCTP Pools erhöhten sich auf 110, 137 und 199 % der Kontroll- Werte, während die dTTP Pools auf 84, 72 und 27 % der Ausgangswerte sanken. Die dATP Konzentrationen sanken bei Behandlung mit 12,5 und 25 µM Hexahydroxystilben

auf 27 und 41 % der Ausgangswerte. Besonders eindrucksvoll war die Depletion der dATP Pools, im Falle von HT-29 humanen Kolon Tumor Zellen, dort sanken die dATP Werte bereits nach Behandlung mit 4 μ M der Substanz auf durchschnittlich 1,5 % der Ausgangswerte. Es gibt kaum eine antivirale bzw. in der Antitumorbehandlung eingesetzte Substanz, welche solche eindrucksvollen Wirkungen zeigt. Durch diese eindrucksvolle Inbalance der dNTP Pools, welche Prekursoren der DNA Synthese sind, kann auch die Wirkung der Substanz erklärt werden. Die Ergebnisse des Experimentes mit HL-60 Zellen sind in Fig. 3 dargestellt.

Induktion von Apoptose durch Resveratrol bzw. Hexahydroxystilben

Es ist bekannt, daß Resveratrol in verschiedenen Tumorzellen Apoptose induziert. Wir haben die apoptotische Wirkung von Resveratrol mit der von Hexahydroxystilben („M8“) verglichen. HL-60 Leukämie Zellen wurden 24 Stunden lange mit verschiedenen Konzentrationen von Resveratrol bzw. Hexahydroxystilben („M8“) behandelt; dann wurde die Anzahl von apoptotischen Zellen mittels Höchst/Propidium Jodid Doppelfärbung bestimmt. Die Resultate sind in Fig. 4 dargestellt. Hexahydroxystilben („M8“) hat, wie aus der Abbildung ersichtlich bei signifikant niedrigeren Konzentration als Resveratrol in diesen Zellen Apoptose induziert. Behandlung mit 6.25 μ M Hexahydroxystilben („M8“) führte zum Beispiel in 68.5% der Zellen zur Induktion von Apoptose.

Wirkung von Hexahydroxystilben auf die Zell Zyklus Verteilung von HL-60 Leukämie Zellen

Wie aus Fig. 5 ersichtlich, hat Hexahydroxystilben („M8“) signifikanten Einfluß auf die Zell Zyklus Verteilung von HL-60 Zellen. Behandlung mit Hexahydroxystilben hat die Zellen in S Phase arretiert und so eine Hemmung des Zellwachstums bewirkt. Es kam in der Folge nach Inkubation mit Hexahydroxystilben zu einer Depletion von Zellen in G2-M Phase des Zell Zyklus.

In der folgenden Tabelle 3 sind die Wirksamkeiten von Resveratrol und ausgewählter erfindungsgemäßer Verbindungen wiedergegeben:

Wachstumstrennung (72h) von Stilben--Derivaten in HL-60 und klonogenen Testreihen (7d) in Prostata-Krebs-Zelllinien:

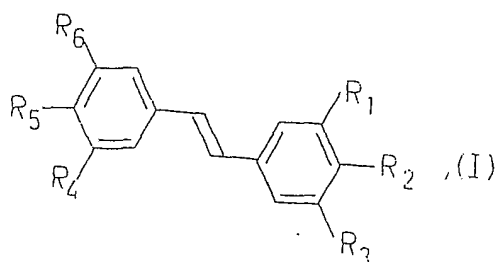
Verbindung	Kode	HL-60	PC-3	LNCaP*	DU-145
Resveratrol		12 µM	16 µM	5 µM	10 µM
3,5,3',5'-tetramethoxy	M1	über 100 µM	35 µM	21 µM	25 µM
3,4,5,3'5'-pentamethoxy	M2	25 µM	21 µM	über 100 µM	68 µM
3,4,5,3',4',5'-hexamethoxy	M3	über 100 µM	5,5 µM	37 µM	12,5 µM
3,4,5,4'-tetramethoxy	M4	20 µM	3 µM	0,4 µM	0,4 µM
3,5,4'-trimethoxy	M5	5 µM	3 µM	6,25 µM	6 µM
3,4,3',5'-tetramethoxy	M5A	25 µM	35 µM	6,25 µM	30 µM
3,5,3',5'-tetrahydroxy	M6	12,5 µM	16 µM	84 µM	17 µM
3,4,5,3'5'-pentahydroxy	M7	10 µM	5 µM	7,5 µM	23 µM
3,4,5,3',4',5'-hexahydroxy	M8	4 µM	2,5 µM	3,4 µM	25 µM
3,4,5,4'-tetrahydroxy	M9	9 µM	8 µM	9,5 µM	30 µM
3,4,3',5'-tetrahydroxy	M10	9 µM	18 µM	33 µM	58 µM

* LNCaP-Zellen sind zu 5- α -dihydrotestosterone responsiv.

** jeweils " -Stilben"

Zusammenfassend kann ein Ausführungsbeispiel der Erfindung wie folgt dargestellt werden:

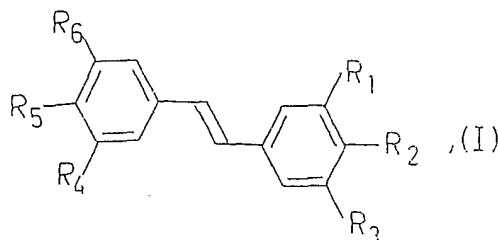
Beschrieben werden Stilbenderivate der allgemeinen Formel 1



In dieser haben wenigstens vier der Substituenten R_1 bis R_6 eine andere Bedeutung als Wasserstoff. Die Substituenten sind wirksame Radikalfänger, Antitumorwirkstoffe und selektive Cyclooxygenase-2-Inhibitoren.

Patentansprüche:

1. Verbindung der allgemeinen Formel I



worin R_1 bis R_6 , die gleich oder verschieden sind, Wasserstoff-, OH-, -OD oder -OR₇ bedeuten, worin R_7 eine C₁ bis C₃-Alkylgruppe oder eine C₂ bis C₄-Carboxylgruppe ist, mit der Maßgabe, daß wenigstens vier (4) der Substituenten R_1 bis R_6 eine andere Bedeutung als Wasserstoff haben.

2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R_7 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Methoxy, Ethoxy und Propoxy.

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß R_7 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Formiat und Acetat.

4. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß fünf (5) der Substituenten R_1 bis R_6 eine andere Bedeutung als Wasserstoff haben.

5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sechs (6) der Substituenten R_1 bis R_6 eine andere Bedeutung als Wasserstoff haben.

6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin R_1 , R_2 , R_3 und R_5 eine andere Bedeutung als Wasserstoff haben.

7. Verbindung nach Anspruch 6, nämlich 3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxystilben.

8. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin R_1 , R_3 , R_4 und R_6 eine andere Bedeutung als Wasserstoff haben.

9. Verbindung nach Anspruch 8, nämlich 3,3',5,5'-Tetrahydroxystilben.

10. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin R_1 , R_3 , R_4 und R_5 eine andere Bedeutung als Wasserstoff haben.

11. Verbindung nach Anspruch 10, nämlich 3,3',4',5-Tetrahydroxystilben.

12. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin R_1 , R_2 , R_3 , R_4 und R_5 eine andere Bedeutung als Wasserstoff haben.

13. Verbindung nach Anspruch 12, nämlich 3,3',4,4',5-Pentahydroxystilben.
14. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin R₁, R₂, R₃, R₄ und R₆ eine andere Bedeutung als Wasserstoff haben.
15. Verbindung nach Anspruch 14, nämlich 3,3',4,5,5'-Pentahydroxystilben.
16. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin R₁, R₂, R₃, R₅ und R₆ eine andere Bedeutung als Wasserstoff haben.
17. Verbindung nach Anspruch 16, nämlich 3,4,4',5,5'-Pentahydroxystilben.
18. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin R₁, R₃, R₄, R₅ und R₆ eine andere Bedeutung als Wasserstoff haben.
19. Verbindung nach Anspruch 18, nämlich 3,3',4',5,5'-Pentahydroxystilben.
20. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß R₁ bis R₆ eine andere Bedeutung als Wasserstoff haben.
21. Verbindung nach Anspruch 20, nämlich 3,3',4,4',5,5'-Hexahydroxystilben.
22. Verbindung nach Anspruch 20, nämlich 3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxystilben.
23. Arzneimittel, enthaltend wenigstens eine der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 22.
24. Arzneimittel, enthaltend wenigstens eine der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 22 als Radikalfänger.
25. Arzneimittel nach Anspruch 24, enthaltend 3,3',4,4',5,5'-Hexahydroxystilben und/oder 3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxystilben.
26. Arzneimittel mit Antitumorwirkung, enthaltend wenigstens eine Verbindung der Ansprüche 1 bis 22.
27. Arzneimittel nach Anspruch 26, enthaltend 3,3',4,4',5,5'-Hexahydroxystilben und/oder 3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxystilben.
28. Arzneimittel enthaltend wenigstens eine der Verbindungen der Ansprüche 1 bis 22 als selektiven Cyclooxygenase 2-Hemmstoff.
29. Arzneimittel nach Anspruch 28, enthaltend 3,3',4,4',5,5'-Hexahydroxystilben und/oder 3,3',4,4',5,5'-Hexamethoxystilben.
30. Verwendung wenigstens einer Verbindung der Ansprüche 1 bis 22 zum Herstellen von Arzneimitteln mit Radikalfänger-, Antitumor- und Cyclooxygenase 2-Hemm-Wirkung.

Fig. 1

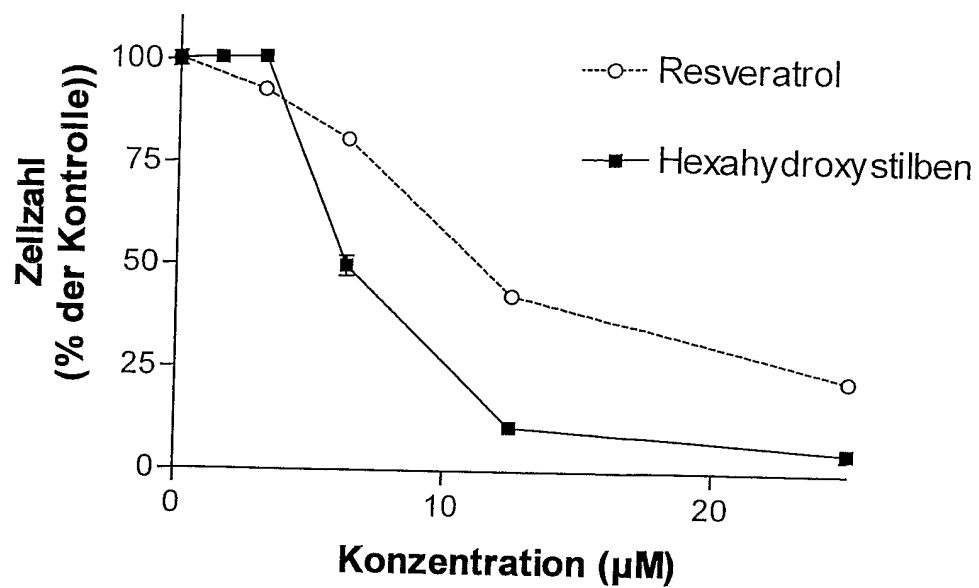


Fig. 2

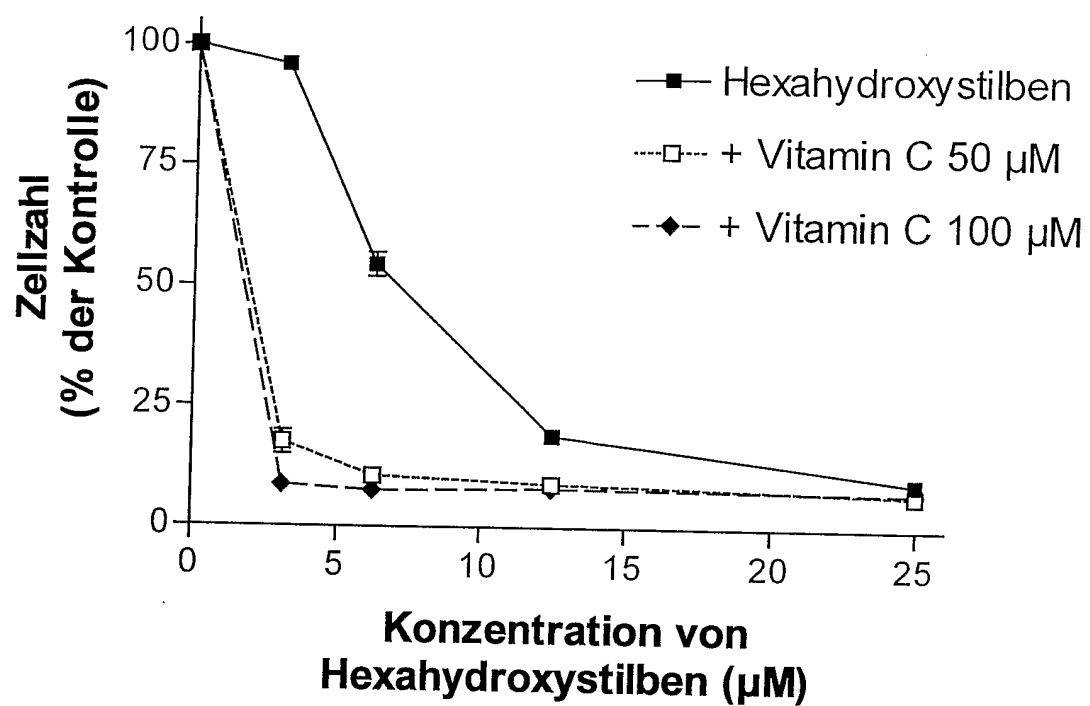


Fig. 3

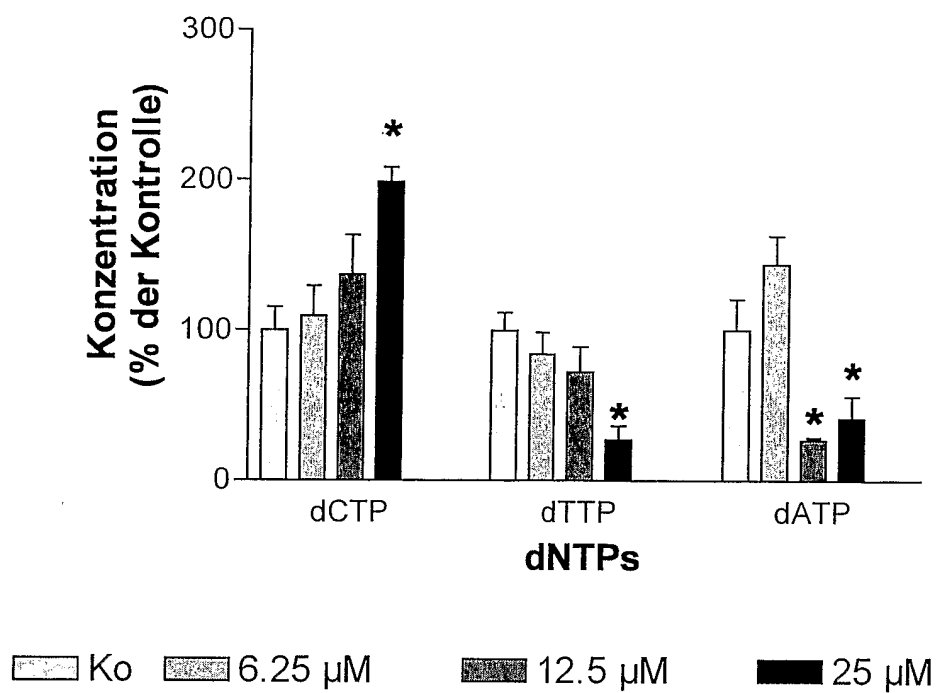


Fig. 4

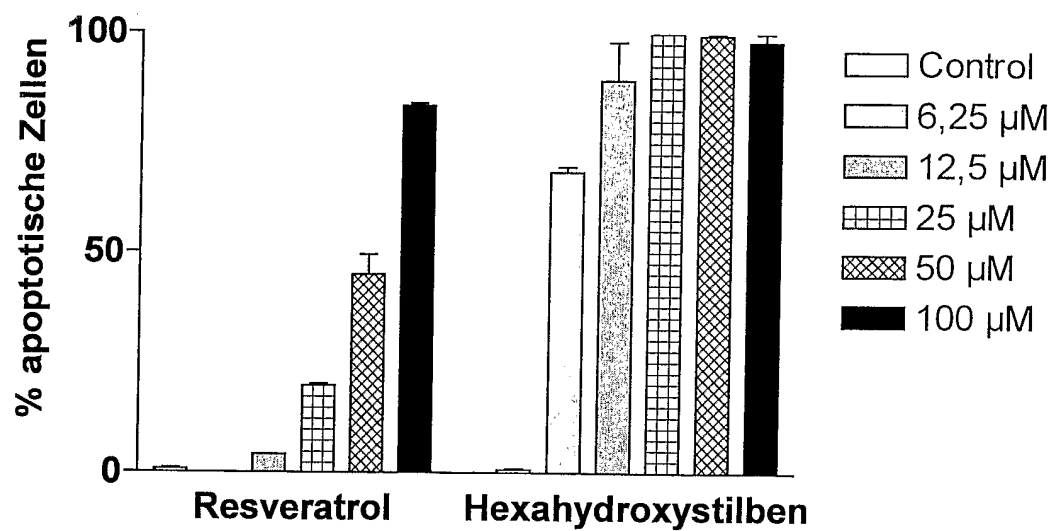


Fig. 5

