



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 603 16 688 T2 2008.07.17

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 529 044 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 603 16 688.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US03/24232

(96) Europäisches Aktenzeichen: 03 811 651.3

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2004/054498

(86) PCT-Anmeldetag: 01.08.2003

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 01.07.2004

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 11.05.2005

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 03.10.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 17.07.2008

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C07D 403/06 (2006.01)

C07D 405/12 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

C07D 409/12 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

401074 P 02.08.2002 US

411128 P 16.09.2002 US

450063 P 24.02.2003 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR

(73) Patentinhaber:

Nereus Pharmaceuticals, Inc., San Diego, Calif.,  
US

(74) Vertreter:

Maiwald Patentanwaltsgesellschaft mbH, 80335  
München

(72) Erfinder:

HAYASHI, Yoshio, Ritto-shi, Shiga 520-3031, JP;  
GRODBERG, Jennifer, Carlsbad, CA 92009, US;  
PALLADINO, Michael, Olivenhain, CA 92024, US

(54) Bezeichnung: DEHYDROPHENYLAHISTINE UND ANALOGE DAVON SOWIE EIN VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON DEHYDROPHENYLAHISTINEN UND ANALOGEN DAVON

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 eingelebt, 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**

## Hintergrund der Erfindung

## Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen und Methoden zur synthetischen Herstellung auf den Gebieten der Chemie und Medizin. Im Speziellen bezieht sich die Erfindung auf Verbindungen und Verfahren zur Herstellung von Verbindungen, die nützlich für die Behandlung von Krebs und die Behandlung von Pilzinfektionen sind.

## Kurze Beschreibung des Standes der Technik

**[0002]** Es wird angenommen, dass der Prozess der eukaryotischen Zellzyklusregulation durch einen einzigen, universellen zellulären Mechanismus kontrolliert wird. Siehe z. B. Hartwell, L.H. et al., *Science* (1989), 246: 629–34. Es ist auch bekannt, dass eine Anomalie im Kontrollmechanismus des Zellzyklus zu Krebs oder Erkrankung des Immunsystems führen kann. Dementsprechend ist ebenfalls bekannt, dass antitumorale Agenzien und Immunsuppressoren unter den Substanzen sein können, die den Zellzyklus regulieren. Daher werden neue Methoden für die Produktion von eukaryotischen Zellzyklusinhibitoren als antitumorale und immunverstärkende Verbindungen gebraucht und diese können ebenfalls nützlich sein in der Behandlung von humanen Krebserkrankungen als Chemotherapeutika und antitumorale Agenzien. Siehe z. B. Roberge, M., et al., *Cancer Res.* (1994), 54, 6115–21.

**[0003]** Pilze und speziell pathogene Pilze und zugehörige Infektionen stellen ein wachsendes Problem in der Klinik dar. Die existierenden Antipilzmittel sind giftig und von beschränkter Wirksamkeit, dazu kommt die Entstehung und/oder Entdeckung von Stämmen pathogener Pilze, die resistent sind gegen Medikamente, die gegenwärtig verfügbar sind bzw. zur Zeit entwickelt werden. Zu den für den Menschen pathogenen Pilze gehören u. a. beispielsweise *Candida* spp., einschließlich *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei* und *C. galbrata*; *Aspergillus* spp., einschließlich *A. fumigatus* und *A. flavus*; *Cryptococcus neoformans*; *Blastomycetes* spp., einschließlich *Blastomyces dermatitidis*; *Pneumocystis carinii*; *Coccidioides immitis*; *Basidiobolus ranarum*; *Conidiobolus* spp.; *Histoplasma capsulatum*; *Rhizopus* spp., einschließlich *R. oryzae* und *R. microsporus*; *Cunninghamella* spp.; *Rhizomucor* spp. *Paracoccidioides brasiliensis*; *Pseudallescheria boydii*; *Rhinosporidium seeberi*; und *Sporothrix schenckii* (Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E. 1992 *Medical Mycology*, Lea and Febiger, Malvern, PA).

**[0004]** Kürzlich wurde berichtet, dass die Tryprostatine A und B (welches Diketopiperazine bestehend aus Prolin und isoprenylierten Tryptophanresten sind), und fünf weitere strukturell ähnliche Diketopiperazine den Zellzyklus in der M-Phase inhibierten, siehe Cui, C. et al., 1996 *J Antibiotics* 49: 527–33; Cui, C. et al. 1996 *J Antibiotics* 49: 534–40, und dass diese Verbindungen auch den Mikrotubuli-Aufbau beeinflussen, siehe Usui, T., et al., 1998 *Biochem J* 333: 543–48; Kondon, M. et al., 1998 *J Antibiotics* 51: 801–04. Weiterhin wurde gezeigt, dass natürliche und synthetische Verbindungen die Mitose inhibieren können und dadurch den eukaryotischen Zellzyklus, indem sie an die Colchicin-Bindungsstelle (CLC-site) des Tubulins, welches ein Makromolekül bestehend aus zwei 50 kDa Untereinheiten (αβ und αβ-Tubulin) und Hauptbestandteil von Mikrotubuli ist. Siehe z. B. Iwasaki, S., 1993 *Med Res Rev* 13: 183–198; Hamel, E. 1996 *Med Res Rev* 16: 207–31; Weissenberg, R.C. et al., 1969 *Biochemistry* 7: 4466–79. Es wird angenommen, dass Mikrotubuli an mehreren essentiellen zellulären Funktionen beteiligt sind, wie etwa dem axonalen Transport, der Zellmotilität und der Festlegung der Zellmorphologie. Inhibitoren der Mikrotubuli-Funktion können deswegen breite biologische Aktivität aufweisen und können anwendbar für medizinische und agrochemische Zwecke sein. Ebenso ist es denkbar, dass sich Colchicin (CLC)-site Liganden wie CLC, Steganacin, siehe Kupchan, S.M. et al., 1973 *J Am Chem Soc* 95: 1335–36, Podophyllotoxin, siehe Sackett, D.L., 1993 *Pharmacol Ther* 59: 163–228, und Combretastatine, siehe Pettit, G.R., et al., 1995 *J Med Chem* 38: 166–67, sich als wertvolle Inhibitoren des eukaryotischen Zellzyklus herausstellen, und deswegen nützlich als chemotherapeutische Agenzien sein könnten.

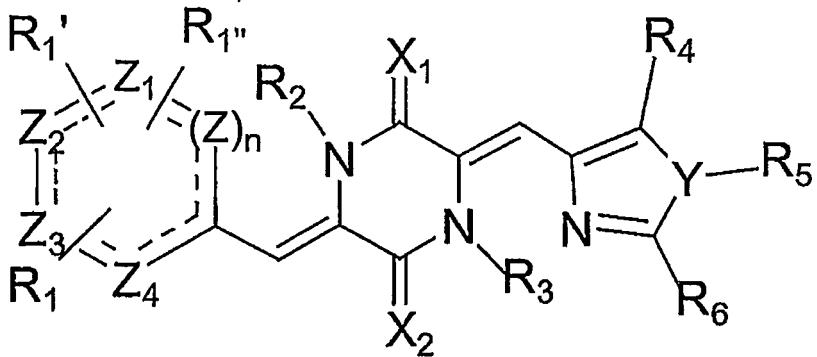
**[0005]** Obwohl Diketopiperazin-Typ-Metabolite aus verschiedenen Pilzen als Mycotoxine, siehe Horak R.M., et al., 1981 *JCS Chem Comm* 1265–67; Ali M., et al., 1898 *Toxicology Letters* 48: 235–41, oder als sekundäre Metaboliten, siehe Smedsgaard J., et al., 1996 *J Microbiol Meth* 25: 5–17 isoliert wurden, ist wenig über die spezifische Struktur der Diketopiperazin-Typ-Metabolite oder ihre Derivate und ihre Antitumor-Aktivität speziell in vivo bekannt. Diese Verbindungen wurden nicht nur als Mycotoxine isoliert, die chemische Synthese eines Diketopiperazin-Typ-Metaboliten, Phenylahistin, wurde beschrieben in Hayashi et al., in *J. Org. Chem.* (2000) 65, Seite 8402. Im Stand der Technik wurde ein Derivat eines Diketopiperazin-Typ-Metaboliten, Dehydrophe-

nylahistin, durch enzymatische Dehydrogenierung des Ausgangsstoffes Phenylahistin hergestellt. Im Hinblick auf die steigende Inzidenz von Krebs, existiert ein besonderer Bedarf an einer chemischen Herstellung einer Klasse von im Wesentlichen aufgereinigten Diketopiperazin-Typ-Metabolitderivaten, die inhibierende Aktivität auf die Proliferation von tierischem Zellen ausüben sowie hohe Antitumor-Aktivität und Selektivität aufweisen. Es gibt deswegen ein besonderes Bedürfnis nach einer effizienten Methode zur synthetischen Herstellung von weitgehend aufgereinigten und strukturell und biologisch charakterisierten Diketopiperazin-Typ-Metabolitderivaten.

**[0006]** Auch beschreibt die PCT-Publikation WO/0153290 (26. Juli 2001) eine nicht-synthetische Methode zur Produktion von Dehydrophenylahistin durch Kontaktieren von Phenylahistin oder einem bestimmten Phenylahistin-Analog mit einer Dehydrogenase gewonnen aus *Streptomyces albulus*.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0007]** Verbindungen und Methoden für die synthetische Herstellung von Verbindungen sind offenbart für eine Klasse von Verbindungen mit der Struktur der Formel (I):



(I)

**[0008]** Die offenbarten Verbindungen haben die Struktur der Formel (I), worin:

R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>6</sub> jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>-Alkyl, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>-Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen, Hydroxy, Carboxy, -CO-O-R<sub>7</sub>, Cyano, Alkylthio, halogeniertem Alkyl einschließlich polyhalogeniertem Alkyl, halogeniertem Carbonyl und Carbonyl -CCO-R<sub>7</sub>, worin R<sub>7</sub> ausgewählt ist aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen;

R<sub>1</sub>' und R<sub>1</sub>'' jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen, Hydroxy, Carboxy, -CO-O-R<sub>7</sub>, Cyano, Alkylthio, halogeniertem Alkyl einschließlich polyhalogeniertem Alkyl, halogeniertem Carbonyl und Carbonyl -CCO-R<sub>7</sub>, worin R<sub>7</sub> ausgewählt ist aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen;

R<sub>1</sub>' und R<sub>1</sub>'' entweder kovalent miteinander verbunden sind, um einen Ring zu bilden, oder nicht kovalent miteinander verbunden sind;

R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>5</sub> jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> Alkenyl-, Acyl-, Cycloalkyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino- und Nitrogruppen, Sulfonyl und substituierten Sulfonylgruppen;

X<sub>1</sub> und X<sub>2</sub> getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Sauerstoffatom, einem Stickstoffatom und einem Schwefelatom, jeweils entweder unsubstituiert oder mit einer wie oben definierten R<sub>5</sub>-Gruppe substituiert;

Y ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Stickstoffatom, einem mit R<sub>5</sub> substituierten Stickstoffatom, einem Sauerstoffatom, einem Schwefelatom, einem oxidierten Schwefelatom, einer Methylengruppe und einer substituierten Methylengruppe;

n eine ganze Zahl ist, die entweder Null, Eins oder Zwei ist;

Z, einzelne n, falls es nicht Null ist, und Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> und Z<sub>4</sub> jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus einem Kohlenstoffatom, einem Schwefelatom, einem Stickstoffatom oder einem Sauerstoffatom; und die gestrichelten Bindungen entweder Einfach- oder Doppelbindungen sein können; wobei das Verfahren umfasst:

Reagieren eines Diacyldiketopiperazins mit einem ersten Aldehyd, um ein Zwischenprodukt herzustellen; und Reagieren des Zwischenprodukts mit einem zweiten Aldehyd, um die Verbindung herzustellen, wobei das erste Aldehyd und das zweite Aldehyd ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Oxazolcarboxaldehyd, Imidazolcarboxaldehyd, einem Benzaldehyd, Imidazolcarboxaldehyd-Derivaten und Benzaldehyd-Derivaten, wodurch die Verbindung gebildet wird.

**[0009]** Die offenbarten Verbindungen haben die Struktur nach Formel (I) worin:

R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>6</sub> jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigtem C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>-Alkyl, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>-Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen, Hydroxy, Carboxy, -CO-O-R<sub>7</sub>, Cyano, Alkylthio, halogeniertem Alkyl einschließlich polyhalogeniertem Alkyl, halogeniertem Carbonyl und Carbonyl -CCO-R<sub>7</sub>, worin R<sub>7</sub> ausgewählt ist aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen;

R<sub>1</sub>' und R<sub>1</sub>" jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen, Hydroxy, Carboxy, -CO-O-R<sub>7</sub>, Cyano, Alkylthio, halogeniertem Alkyl einschließlich polyhalogeniertem Alkyl, halogeniertem Carbonyl und Carbonyl -CCO-R<sub>7</sub>, worin R<sub>7</sub> ausgewählt ist aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und saturierten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen;

R<sub>1</sub>' und R<sub>1</sub>" entweder kovalent miteinander verbunden sind, um einen Ring zu bilden, oder nicht kovalent miteinander verbunden sind;

R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>5</sub> jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> Alkenyl-, Acyl-, Cycloalkyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino- und Nitrogruppen, Sulfonyl und substituierten Sulfonylgruppen;

X<sub>1</sub> und X<sub>2</sub> getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Sauerstoffatom, einem Stickstoffatom und einem Schwefelatom, jeweils entweder unsubstituiert oder mit einer wie oben definierten R<sub>5</sub>-Gruppe substituiert;

Y ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Stickstoffatom, einem mit R<sub>5</sub> substituierten Stickstoffatom, einem Sauerstoffatom, einem Schwefelatom, einem oxidierten Schwefelatom, einer Methylengruppe und einer substituierten Methylengruppe;

n eine ganze Zahl ist, die entweder Null, Eins oder Zwei ist;

Z, für jedes einzelne n, falls es nicht Null ist, und Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> und Z<sub>4</sub> jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus einem Kohlenstoffatom, einem Schwefelatom, einem Stickstoffatom oder einem Sauerstoffatom; und die gestrichelten Bindungen entweder Einfach- oder Doppelbindungen sein können.

**[0010]** In bevorzugten Ausführungsformen der Verbindung und des Verfahrens ist das Imidazolcarboxaldehyd ein 5-(1,1-dimethyl-2-ethyl)imidazol-4-carboxaldehyd und das Benzaldehyd umfasst eine einzelne Methoxygruppe. Zusätzliche bevorzugte Ausführungsformen der hierin beschriebenen Verbindungen beinhalten Verbindungen, die eine t-Butyl-Gruppe, eine Dimethoxy-Gruppe, eine Chlor-Gruppe, und eine Methylthiophen-Gruppe haben und Verfahren, um solche Verbindungen herzustellen, als auch Verbindungen wie sie beschrieben sind in den Tabellen 2, 3 und 4 als auch Verfahren, um solche Verbindungen herzustellen.

**[0011]** Ebenso offenbart sind Verfahren und Materialien für die Behandlung von neoplastischem Gewebe bzw. zur Prävention von Krebs oder Infektion durch pathogene Pilze. Diese Verfahren und Materialien sind besonders geeignet für die Behandlung von Säugetieren, insbesondere dem Menschen, wobei dem Probanden

Dehydrophenylahistin oder sein Analog verabreicht wird. Das Verfahren umfasst, dem Probanden eine antitumorale oder antifungale wirksame Menge von Dehydrophenylahistin oder seinem Analog zu verabreichen.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0012] Die beigefügten Zeichnungen sind Bestandteil der Beschreibung und sollen lediglich bestimmte bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung veranschaulichen. Zusammen mit dem Rest der Beschreibung sollen sie dazu dienen, dem Fachmann bestimmte bevorzugte Methoden zur Herstellung bestimmter erfindungsgemäßer Verbindungen zu erklären. In den Abbildungen enthalten:

[0013] [Abb. 1](#) zeigt ein Reaktionsschema für die Herstellung von Dehydrophenylahistinen durch Reagieren eines Diacyldiketopiperazins 1 mit einem Imidazolcarboxaldehyd 2 was eine Zwischenverbindung 3 ergibt, welche reagiert wird mit einem Benzaldehyd 4 zur Herstellung eines Dehydrophenylahistins.

[0014] [Abb. 2](#) zeigt ein HPLC-Profil von synthetischem Roh-Dehydrophenylahistin.

[0015] [Abb. 3](#) zeigt ein Reaktionsschema zur Herstellung von Dehydrophenylahistinen durch Reagieren eines Diacyldiketopiperazin 1 mit einem Benzaldehyd 4 was ein Zwischenprodukt 17 ergibt, welches reagiert wird mit einem Imidazolcarboxaldehyd 15 zur Herstellung eines Dehydrophenylahistins.

[0016] [Abb. 4](#) zeigt ein HPLC-Profil von synthetischem Roh-tBu-Dehydrophenylahistin hergestellt durch Weg A und Weg B.

[0017] [Abb. 5](#) zeigt zwei Modifikationsstrategien für DehydroPLH für wirksame zytotoxische Aktivität.

[0018] [Abb. 6](#) zeigt die mutmaßliche aktive Konformation am Phenylrest von DehydroPLH.

[0019] [Abb. 7](#) zeigt den Cytochrom P450-Metabolismus von Phenylahistin.

[0020] [Abb. 8](#) zeigt die Z-E-Isomerisierung von tBu-DehydroPLH.

[0021] [Abb. 9](#) zeigt die Synthese des Pro-Pharmakons von Acyl-E-tBu-DehydroPLH und eine schematische Abbildung desselben.

[0022] [Abb. 10](#) zeigt den Temperaturgradienten von 3-Z-Benzyliden-6-[5"-(1,1-dimethylallyl)-1H-imidazol-4"-Z-ylmethylene]-piperazin-2,5-dion.

[0023] [Abb. 11](#) zeigt den Temperaturgradienten von 3-Z-Benzyliden-6-(5"-tert-butyl-1H-imidazol-4"-Z-ylmethylene)-piperazin-2,5-dion.

[0024] [Abb. 12](#) zeigt den Effekt von KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin im Vergleich zu Colchicin und Taxol auf die Permeabilität einer HuVEC-Monolayer gegenüber FITC-Dextran.

[0025] [Abb. 13](#) zeigt den Effekt von KPU-2 allein und in Kombination mit CPT-11 auf das geschätzte Tumorgewicht im HT-29 Xenograft-Modell für humanen Dickdarmkrebs.

[0026] [Abb. 14](#) zeigt den Effekt von KPU-2 allein und in Kombination mit CPT-11 auf das Gewicht von Tumoren operativ entfernt bei der Autopsie individueller Mäuse im HT-29 Xenograft-Modell für humanen Dickdarmkrebs.

[0027] [Abb. 15](#) zeigt den Effekt von KPU-2 allein und in Kombination mit CPT-11 auf das geschätzte Tumorgewicht im HT-29 Xenograft-Modell für humanen Dickdarmkrebs.

[0028] [Abb. 16](#) zeigt den Effekt von KPU-2 allein und in Kombination mit CPT-11 auf das Gewicht von Tumoren operativ entfernt bei der Autopsie individueller Mäuse im HT-29 Xenograft-Modell für humanen Dickdarmkrebs.

[0029] [Abb. 17](#) zeigt den Effekt von: A. KPU-2, B. KPU-35 und C. t-Butylphenylahistin allein und in Kombination mit CPT-11 auf das geschätzte Tumorgewicht im HT-29 Xenograft-Modell für humanen Dickdarmkrebs.

[0030] [Abb. 18](#) zeigt den Effekt von: A. KPU-2, B. KPU-35 und C. t-Butylphenylahistin allcin und in Kombination mit CPT-11 auf das Gewicht von Tumoren operativ entfernt bei der Autopsie individueller Mäuse im HT-29 Xenograft-Modell für humanen Dickdarmkrebs.

[0031] [Abb. 19](#) zeigt den Effekt von KPU-2 allein und in Kombination mit CPT-11 auf das Tumorwachstum im HT-29 Xenograft-Modell für humanen Dickdarmkrebs: Vergleich von drei Studien.

[0032] [Abb. 20](#) zeigt den Effekt von KPU-2 allein und in Kombination mit CPT-11 auf finale Tumorgewichte im HT-29 Xenograft-Modell für humanen Dickdarmkrebs: Vergleich von drei Studien.

[0033] [Abb. 21](#) zeigt den Effekt von KPU-2 allein oder in Kombination mit Taxoter auf das geschätzte Tumorgewicht in einem DU-145 Xenograft-Modell für humanen Prostatakrebs.

[0034] [Abb. 22](#) zeigt den Effekt von A. KPU-2, B. KPU-35 und C. t-Butylphenylahistin allein und in Kombination mit Taxoter auf das geschätzte Tumorgewicht basierend auf Beobachtungen während der in vivo-Phase des DU-145 Xenograft-Modells für humanen Prostatakrebs.

[0035] [Abb. 23](#) zeigt den Effekt von KPU-2 allein und in Kombination mit Taxoter auf das Gewicht individuell operativ entfernter Tumoren bei der Autopsie im DU-145 Xenograft-Modell für humanen Prostatakrebs.

[0036] [Abb. 24](#) zeigt den Effekt von KPU-35 allein und in Kombination mit Taxoter auf das Gewicht individuell operativ entfernter Tumoren bei der Autopsie im DU-145 Xenograft-Modell für humanen Prostatakrebs.

[0037] [Abb. 25](#) zeigt den Effekt von A. KPU-2, B. KPU-35 und C. t-Butylphenylahistin allein und in Kombination mit Taxoter in einem MCF-7 Xenograft-Modell für humanen Brustkrebs.

[0038] [Abb. 26](#) zeigt den Effekt von KPU-2 allein und in Kombination mit Taxoter auf das geschätzte Tumorgewicht in einem A549 Xenograft-Modell für humanen Lungenkrebs.

[0039] [Abb. 27](#) zeigt den Effekt von KPU-2 allein und in Kombination mit Taxoter auf das Gewicht operativ entfernter Tumoren bei der Autopsie im A549 Xenograft-Modell für humanen Lungentumor.

[0040] [Abb. 28](#) zeigt den Effekt von KPU-2 allein und in Kombination mit Paclitaxel auf das geschätzte Tumorwachstum in einem MDA-231 murinen Brust-Fettpolster Implantat-Modell für humanen Brustkrebs.

[0041] [Abb. 29](#) zeigt den Effekt von A. KPU-2, B. KPU-35 und C. t-Butylphenylahistin allein und in Kombination mit Paclitaxel in einem Maus-Melanom B16 F10-Modell für metastatische Tumoren. In bestimmten Abbildungen sind Verbindungen mit einer alternativen Bezeichnung versehen. Eine komplette Liste dieser alternativen Bezeichnungen findet sich im Folgenden:

Alternative Bezeichnung	Ursprüngliche Bezeichnung
NPI-2350	(-)-phenylahistin
NPI-2352	KPU-01
NPI-2353	KPU-03
NPI-2354	KPU-04
NPI-2355	KPU-05
NPI-2356	KPU-06
NPI-2357	KPU-07
NPI-2358	KPU-08
NPI-2359	KPU-09
NPI-2360	KPU-10
NPI-2362	KPU-11
NPI-2363	KPU-12
NPI-2364	KPU-13
NPI-2365	KPU-14

NPI-2366	KPU-15
NPI-2367	KPU-16
NPI-2368	KPU-17
NPI-2369	KPU-18
NPI-2370	KPU-19
NPI-2371	KPU-21
NPI-2372	KPU-22
NPI-2373	KPU-23
NPI-2374	KPU-24
NPI-2375	KPU-25
NPI-2376	KPU-28
NPI-2377	KPU-26
NPI-2378	KPU-27
NPI-2379	KPU-29
NPI-2380	KPU-20
NPI-2381	KPU-30
NPI-2382	KPU-31
NPI-2383	KPU-32
NPI-2384	KPU-33
NPI-2385	KPU-34
NPI-2386	KPU-35
NPI-2387	KPU-36
NPI-2388	KPU-37
NPI-2389	KPU-38
NPI-2390	KPU-39
NPI-2391	KPU-40
NPI-2392	KPU-41
NPI-2393	KPU-42
NPI-2394	KPU-43
NPI-2395	KPU-44
NPI-2396	KPU-45
NPI-2397	KPU-46
NPI-2398	KPU-47
NPI-2399	KPU-48
NPI-2400	KPU-49
NPI-2401	KPU-50
NPI-2402	KPU-51
NPI-2403	KPU-52
NPI-2404	KPU-53
NPI-2405	KPU-54
NPI-2406	KPU-55
NPI-2407	KPU-56
NPI-2408	KPU-57
NPI-2409	KPU-58
NPI-2410	KPU-59
NPI-2411	KPU-60

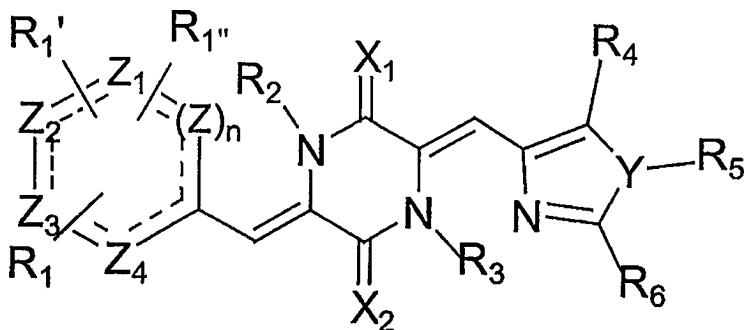
NPI-2412	KPU-61
NPI-2413	KPU-62
NPI-2414	KPU-63
NPI-2415	KPU-64
NPI-2416	KPU-65
NPI-2417	KPU-66
NPI-2418	KPU-67
NPI-2419	KPU-68
NPI-2420	KPU-69
NPI-2421	KPU-70
NPI-2422	KPU-71
NPI-2423	KPU-72
NPI-2424	KPU-73
NPI-2425	KPU-74
NPI-2426	KPU-75
NPI-2427	KPU-76
NPI-2428	KPU-77
NPI-2429	KPU-79
NPI-2430	KPU-80
NPI-2431	KPU-81
NPI-2432	KPU-82
NPI-2433	KPU-83
NPI-2434	KPU-84
NPI-2435	KPU-86
NPI-2436	KPU-87
NPI-2437	KPU-88
NPI-2438	KPU-89
NPI-2439	KPU-90
NPI-2440	KPU-91
NPI-2441	KPU-92
NPI-2442	KPU-80
NPI-2455	KPU-94
NPI-2456	KPU-95
NPI-2457	KPU-96
NPI-2458	KPU-97
NPI-2459	KPU-98
NPI-2460	t-Butyl-phenylahistin

## Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

**[0042]** Die Offenbarung stellt Verfahren für die künstliche Herstellung von Verbindungen einschließlich neuer Verbindungen und einschließlich Dehydrophenylahistin und Dehydrophenylahistin-Analogen bereit, ebenso werden bereitgestellt Verfahren für die Herstellung pharmazeutisch akzeptabler Zellzyklusinhibitoren, antitumoraler Agenzien und antifungaler Agenzien mit einer verhältnismäßig hohen Ausbeute, wobei besagte Verbindungen und/oder ihre Derivate zu den aktiven Inhaltsstoffen dieser Zellzyklusinhibitoren, antitumoralen Agenzien und antifungalen Agenzien zählen. Andere Gegenstände umfassen das Bereitstellen neuer Verbindungen, die durch gegenwärtig gebräuchliche, nicht-synthetische Methoden nicht erhältlich sind. Ein weiterer Gegenstand ist das Bereitstellen eines Verfahrens zur Behandlung von Krebs, insbesondere humaner Krebs-

formen, umfassend den Schritt des Verabreichens einer wirksamen Tumorwachstum-inhibierenden Menge einer der Klasse von neuen Anti-Tumorverbindungen. Diese Erfindung stellt auch ein Verfahren für die Prävention oder Behandlung eines pathogenen Pilzes in einem Probanden bereit, wobei dem Probanden eine wirksame antifungale Menge einer Klasse von neuen antifungalen Verbindungen verabreicht wird, z. B. Verabreichen von Dehydrophenylahistin oder seinem Analog in einer Menge und in einer Weise, die den beabsichtigten antifungalen Effekt gewährleistet. In der hier offenbarten bevorzugten Ausführungsform der Verbindungen und der Methoden, solche Verbindungen herzustellen und einzusetzen, aber nicht notwendigerweise in allen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, werden diese Zielsetzungen erfüllt.

**[0043]** Ebenfalls offenbart werden Verbindungen und Methoden zur Herstellung solcher Verbindungen, wobei die Verbindungen durch Formel (I) dargestellt werden:



(I)

worin:

R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>6</sub> jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigtem C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkyl, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen, Hydroxy, Carboxy, -CO-O-R<sub>7</sub>, Cyano, Alkylthio, halogeniertem Alkyl einschließlich polyhalogeniertem Alkyl, halogeniertem Carbonyl und Carbonyl -CCO-R<sub>7</sub>, worin R<sub>7</sub> ausgewählt ist aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen;

R<sub>1</sub>' und R<sub>1</sub>'' jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen, Hydroxy, Carboxy, -CO-O-R<sub>7</sub>, Cyano, Alkylthio, halogeniertem Alkyl einschließlich polyhalogeniertem Alkyl, halogeniertem Carbonyl und Carbonyl -CCO-R<sub>7</sub>, worin R<sub>7</sub> ausgewählt ist aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und saturierten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen;

R<sub>1</sub>' und R<sub>1</sub>'' entweder kovalent miteinander verbunden sind, um einen Ring zu bilden, oder nicht kovalent miteinander verbunden sind;

R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>5</sub> jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> Alkenyl-, Acyl-, Cycloalkyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino- und Nitrogruppen, Sulfonyl und substituierten Sulfonylgruppen;

X<sub>1</sub> und X<sub>2</sub> getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Sauerstoffatom, einem Stickstoffatom und einem Schwefelatom, jeweils entweder unsubstituiert oder mit einer wie oben definierten R<sub>5</sub>-Gruppe substituiert;

Y ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Stickstoffatom, einem mit R<sub>5</sub> substituierten Stickstoffatom, einem Sauerstoffatom, einem Schwefelatom, einem oxidierten Schwefelatom, einer Methylengruppe und einer substituierten Methylengruppe;

n eine ganze Zahl ist, die entweder Null, Eins oder Zwei ist;

Z, für jedes einzelne n, falls es nicht Null ist, und Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> und Z<sub>4</sub> jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus einem Kohlenstoffatom, einem Schwefelatom, einem Stickstoffatom oder einem Sauerstoffatom; und

die gestrichelten Bindungen entweder Einfach- oder Doppelbindungen sein können.

**[0044]** Das Verfahren umfasst eine Prozedur zur Herstellung von Verbindungen der Formel (I) durch die Schritte:

Reagieren eines Diacyldiketopiperazin mit einem ersten Aldehyd, um ein Zwischenprodukt herzustellen; und Reagieren des Zwischenprodukts mit einem zweiten Aldehyd, um die Verbindung herzustellen, wobei das erste Aldehyd und das zweite Aldehyd ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Oxazolcarboxaldehyd, Imidazolcarboxaldehyd, einem Benzaldehyd, Imidazolcarboxaldehyd-Derivaten und Benzaldehyd-Derivaten, wodurch die Verbindung nach Formel (I) gebildet wird, worin

$R_1$ ,  $R_4$  und  $R_6$  jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten  $C_1$ - $C_{24}$  Alkyl-, ungesättigten  $C_1$ - $C_{24}$  Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl-, und substituierten Phenylgruppen, Hydroxy, Carboxy, -CO-O- $R_7$ , Cyano, Alkylthio, halogeniertem Alkyl einschließlich polyhalogeniertem Alkyl, halogeniertem Carbonyl und Carbonyl -CCO- $R_7$ , worin  $R_7$  ausgewählt ist aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten  $C_1$ - $C_{24}$  Alkyl-, ungesättigten  $C_1$ - $C_{24}$  Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen;

$R_1'$  und  $R_1''$  jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten  $C_1$ - $C_{24}$  Alkyl-, ungesättigten  $C_1$ - $C_{24}$  Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen, Hydroxy, Carboxy, -CO-O- $R_7$ , Cyano, Alkylthio, halogeniertem Alkyl einschließlich polyhalogeniertem Alkyl, halogeniertem Carbonyl und Carbonyl -CCO- $R_7$ , worin  $R_7$  ausgewählt ist aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten  $C_1$ - $C_{24}$  Alkyl-, ungesättigten  $C_1$ - $C_{24}$  Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen;

$R_1'$  und  $R_1''$  entweder kovalent miteinander verbunden sind, um einen Ring zu bilden, oder nicht kovalent miteinander verbunden sind;

$R_2$ ,  $R_3$  und  $R_5$  jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten  $C_1$ - $C_{12}$  Alkyl-, ungesättigten  $C_1$ - $C_{12}$  Alkenyl-, Acyl-, Cycloalkyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino- und Nitrogruppen, Sulfonyl und substituierten Sulfonylgruppen;

$X_1$  und  $X_2$  getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Sauerstoffatom, einem Stickstoffatom und einem Schwefelatom, und

$Y$  ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Stickstoffatom, einem mit  $R_5$  substituierten Stickstoffatom, einem Sauerstoffatom, einem Schwefelatom, einem oxidierten Schwefelatom, einer Methylengruppe und einer substituierten Methylengruppe;

$Z$ , für jedes einzelne  $n$ , falls es nicht Null ist, und  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  und  $Z_4$  jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus einem Kohlenstoffatom, einem Schwefelatom, einem Stickstoffatom oder einem Sauerstoffatom; und die gestrichelten Bindungen entweder Einfach- oder Doppelbindungen sein können.

**[0045]** Ebenso bereitgestellt werden pharmazeutisch akzeptable Salze und Pro-Pharmakon-Ester der Verbindung gemäß der Formeln (I) und (II), weiterhin werden Verfahren zur Synthese solcher Verbindungen durch die hierin offenbarten Verfahren bereitgestellt.

**[0046]** Der Begriff "Pro-Pharmakon-Ester", insbesondere wenn er sich auf Pro-Pharmakon-Ester der Verbindung gemäß Formel (I) bezieht, die durch die hier offenbarten Methoden hergestellt wurde, verweist auf ein chemisches Derivat der Verbindung, das in vivo, z. B. durch Hydrolyse im Blut oder im Gewebe rasch umgewandelt wird und so die Verbindung ergibt. Der Begriff "Pro-Pharmakon-Ester" bezeichnet Derivate der hierin offenbarten Verbindungen, gebildet durch die Addition jeglicher der vielen Ester-bildenden Gruppen, die unter physiologischen Bedingungen hydrolysiert werden. Beispiele für Pro-Pharmakon-Ester-Gruppen umfassen Pivoxymethyl, Acetoxymethyl, Phthalidyl, Indanyl und Methoxymethyl, wie auch andere solcher, in dem Gebiet bekannten Gruppen, umfassend eine (5-R-2-oxo-1,3-Dioxolen-4-yl)methyl-Gruppe. Andere Beispiele für Pro-Pharmakon-Ester-Gruppen befinden sich in z. B. T. Higuchi und V. Stella, in "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society (1975); und "Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application", herausgegeben von E.B. Roche, Pergamon Press: New York, 14-21 (1987) (Beispiele für Ester verwendbar als Pro-Pharmaka für Verbindungen, die Carboxylgruppen enthalten).

**[0047]** Der Begriff "Pro-Pharmakon-Ester" wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auch auf ein chemisches

Derivat der Verbindung, das in vivo beispielsweise durch Hydrolyse im Blut, rasch umgewandelt wird und so die Verbindung ergibt. Der Begriff "Pro-Pharmakon-Ester" bezieht sich auf Derivate der hierin offenbarten Verbindungen, gebildet durch die Addition jeglicher der mehreren Ester-bildenden Gruppen, die unter physiologischen Bedingungen hydrolysiert werden. Beispiele für Pro-Pharmakon-Ester-Gruppen umfassen Pivoyloxy-methyl, Acetoxymethyl, Phthalidyl, Indanyl und Methoxymethyl, wie auch andere solcher, in dem Gebiet bekannten Gruppen umfassend eine (5-R-2-oxo-1,3-Dioxolen-4-yl)methyl-Gruppe. Andere Beispiele für Pro-Pharmakon-Ester-Gruppen befinden sich in z. B. T. Higuchi und V. Stella, in "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society (1975); und "Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application", herausgegeben von E.B. Roche, Pergamon Press: New York, 14–21 (1987) (Beispiele für Ester verwendbar als Pro-Pharmaka für Verbindungen, die Carboxylgruppen enthalten).

**[0048]** Der Begriff "pharmazeutisch akzeptables Salz", insbesondere wenn bezogen auf ein pharmazeutisch akzeptables Salz einer Verbindung nach Formel (I) synthetisiert durch die hier offenbarten Methoden, bezieht sich auf jegliches pharmazeutisch akzeptables Salz einer Verbindung und bezieht sich bevorzugt auf ein Säureadditionssalz der Verbindung. Bevorzugte Beispiele für pharmazeutisch akzeptable Salze sind die Alkalimetallsalze (Natrium oder Kalium), die Erdalkalimetallsalze (Kalzium oder Magnesium), oder Ammoniumsalze abgeleitet von Ammoniak oder von pharmazeutisch akzeptablen organischen Amine, z. B. C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> Alkylamin, Cyclohexylamin, Triethanolamin, Ethylendiamin oder Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan. Im Hinblick auf Verbindungen, die nach dem Verfahren hergestellt wurden und basische Amine darstellen, sind die bevorzugten Beispiele von pharmazeutisch akzeptablen Salzen Säureadditionssalze von pharmazeutisch akzeptablen inorganischen oder organischen Säuren, z. B. Halogenwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure oder aliphatische oder aromatische Carbonsäure oder Sulfonsäure, z. B. Essig-, Succin-, Milch-, Äpfel-, Wein-, Zitronen-, Ascorbin-, Nikotin-, Methansulfon-, p-Toluensulfon- oder Naphthalensulfonsäure.

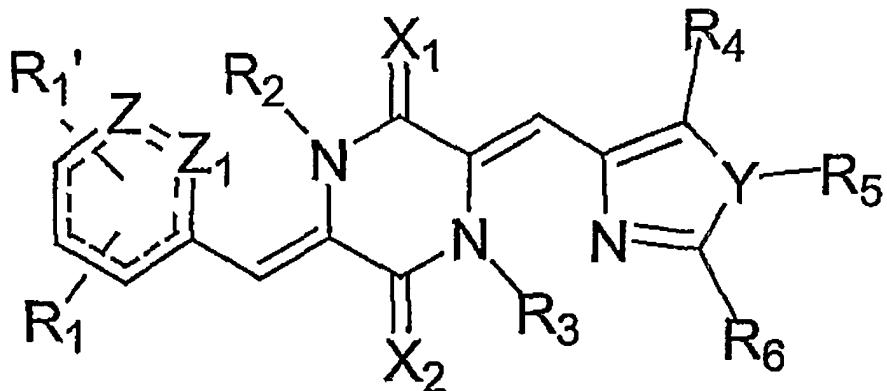
**[0049]** Der Begriff "pharmazeutisch akzeptables Salz", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auch auf jegliches pharmazeutisch akzeptables Salz einer Verbindung und bezieht sich bevorzugt auf ein Säureadditionssalz einer Verbindung. Bevorzugte Beispiele von pharmazeutisch akzeptablen Salzen sind die Alkalimetallsalze (Natrium oder Kalium), die Erdalkalimetallsalze (Kalzium oder Magnesium), oder Ammoniumsalze von Ammoniak abgeleitet oder von pharmazeutisch akzeptablen organischen Aminen, z. B. C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> Alkylamin, Cyclohexylamin, Triethanolamin, Ethylendiamin oder Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan. Im Hinblick auf Verbindungen, die basische Amine darstellen, sind die bevorzugten Beispiele pharmazeutisch akzeptabler Salze Säureadditionssalze von pharmazeutisch akzeptablen inorganischen oder organischen Säuren, z. B. Halogenwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure oder aliphatische oder aromatische Carbonsäure oder Sulfonsäure, z. B. Essig-, Succin-, Milch-, Äpfel-, Wein-, Zitronen-, Ascorbin-, Nikotin-, Methansulfon-, p-Toluensulfon- oder Naphthalensulfonsäure.

**[0050]** Bevorzugte pharmazeutische Zusammensetzungen, die hierin offenbart werden, umfassen pharmazeutisch akzeptable Salze und Pro-Pharmakon-Ester der Verbindung nach Formel (I) hergestellt durch die hierin offenbarten Verfahren. Folglich, wenn die Herstellung der pharmazeutischen Zubereitung eine innige Vermischung der pharmazeutischen Trägerstoffe und der aktiven Inhaltsstoffe in ihrer Salzform umfasst, dann werden bevorzugt pharmazeutische Trägerstoffe verwendet, die nicht basisch sind, d. h. entweder saure oder neutrale Trägerstoffe.

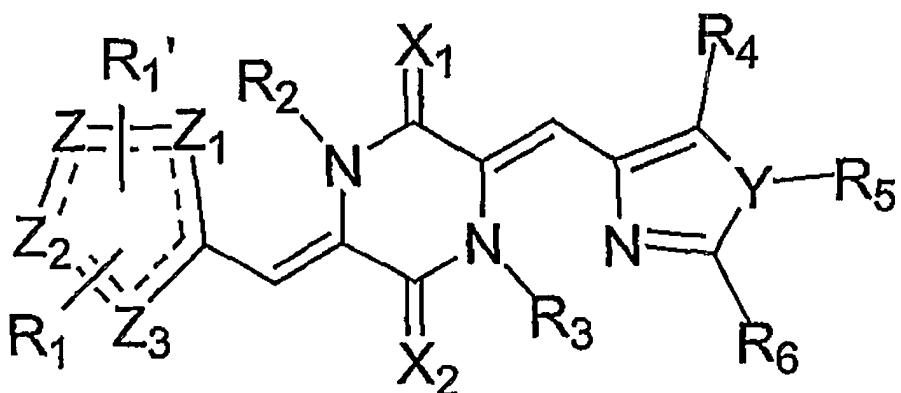
**[0051]** Bei bevorzugten Ausführungsformen der Verfahren der hierin offenbarten Verbindungen kann es zur Bildung einer relativ starren planaren Pseudo-Dreiringstruktur kommen. Um eine solche relativ starre, planare Pseudo-Dreiringstruktur zu stabilisieren, kann vorzugsweise Wasserstoff als R<sub>3</sub> ausgewählt werden.

**[0052]** In anderen bevorzugten Ausführungsformen der hierin offenbarten Verbindungen und Verfahren ist n Null oder Eins, besonders bevorzugt Eins, und Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> und Z<sub>4</sub> sind jeweils getrennt voneinander ausgewählt aus einem Sauerstoffatom, einem Stickstoffatom, und einem Kohlenstoffatom, besonders bevorzugt ist wenigstens eins von Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> und Z<sub>4</sub> ein Kohlenstoffatom, und am meisten bevorzugt sind wenigstens zwei von Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> und Z<sub>4</sub> ein Kohlenstoffatom. Alle Zs können gleichzeitig Kohlenstoffatome sein.

**[0053]** Andere bevorzugte Ausführungsformen der Verfahren und Zusammensetzungen, die hierin offenbart werden, umfassen Verbindungen, die die Struktur der folgenden Formeln (Ia) und (Ib) haben:



(Ia)



(Ib)

worin die variablen Gruppen hierin bereits definiert wurden bzw. werden.

**[0054]** Der Begriff "Halogenatom", wie er hierin verwendet wird, bezeichnet jegliches der radiostabilen Atome der 7. Hauptgruppe des Periodensystems der Elemente, d. h. Fluor, Chlor, Brom, oder Iod, wobei Fluor und Chlor bevorzugt sind.

**[0055]** Der Begriff "Alkyl", wie er hierin verwendet wird, bezeichnet jegliche unverzweigte oder verzweigte, substituierte oder unsubstituierte, gesättigte Kohlenwasserstoffe, wobei C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> als unverzweigte, gesättigte, unsubstituierte Kohlenwasserstoffe bevorzugt sind, und wobei Methyl, Ethyl, Isobutyl und tert-Butyl am meisten bevorzugt sind. Unter den substituierten, gesättigten Kohlenwasserstoffen werden C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Mono- und Di- und Perhalogen-substituierte, gesättigte Kohlenwasserstoffe und Amino-substituierte Kohlenwasserstoffe bevorzugt, wobei Perfluormethyl, Perchlormethyl, Perfluor-tert-butyl und Perchlor-tert-butyl besonders bevorzugt werden. Der Begriff "substituiert" wird in seiner üblichen Bedeutung verwendet, wie beispielsweise in einer Anzahl aktueller Patente aus dem Gebiet. Siehe z. B. US-Patent Nrn. 6,583,143; 6,509,331; 6,506,787; 6,500,825; 5,922,683; 5,886,210; 5,874,443 und 6,350,759. Im Speziellen ist die Definition von substituiert so umfassend wie die in US-Patent Nr. 6,583,143, welche den Begriff substituiert für Gruppen wie Alkyl, Aryl, Aryl-alkyl, Heteroaryl, Heteroarylalkyl, Heterozyklisch und Heterozyklisch-alkyl definiert, worin wenigstens ein Wasserstoffatom durch einen Substituenten ersetzt ist. Der Begriff "substituiert" ist ebenfalls so umfassend wie die Definition angegeben in US-Patent Nr. 6,509,331, welches den Begriff "substituiertes Alkyl" so definiert, dass er eine Alkylgruppe, bevorzugt mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, mit 1 bis 5 Substituenten, und bevorzugt mit 1 bis 3 Substituenten bezeichnet, die Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkoxy-, substituiertes Alkoxy-, Zykloalkyl-, substituiertes Zykloalkyl-, Zykloalkenyl-, substituiertes Zykloalkenyl-, Acyl-, Acyl-

amino-, Acyloxy-, Amino-, substituiertes Amino-, Aminoacyl-, Aminoacloxy-; Oxyacylamino-, Cyano-, Halogen-, Hydroxyl-, Carboxyl-, Carboxylalkyl-, Keto-, Thioketo-, Thiol-, Thioalkoxy-, substituiertes Thioalkoxy-, Aryl-, Aryloxy-, Heteroaryl-, Heteroaryloxy-, Heterozyklen-, Heterozyklooxy-, Hydroxyamino-, Alkoxyamino-, Nitro-, -SO-Alkyl-; -SO-substituiertes Alkyl-, -SO-Aryl-, -SO-Heteroaryl-, -SO<sub>2</sub>-Alkyl-, -SO<sub>2</sub>-substituiertes Alkyl-, -SO<sub>2</sub>-Aryl und -SO<sub>2</sub>-Heteroaryl-Gruppen. Die anderen oben angeführten Patente liefern ebenfalls Standarddefinitionen für den Begriff "substituiert", die vom Fachmann wohl verstanden werden. Der Begriff "Zykloalkyl" beschreibt jeglichen nicht-aromatischen Kohlenwasserstoffring, bevorzugt fünf bis zwölf Atome umfassend. Der Begriff "Acyl" bezieht sich auf Alkyl- oder Aryl-Gruppen, die abgeleitet sind von einer Oxosäure, bevorzugt mit einer Acetylgruppe.

**[0056]** Der Begriff "Alkenyl" wie er hierin verwendet wird, bezeichnet einen verzweigten oder unverzweigten, substituierten oder unsubstituierten ungesättigten Kohlenwasserstoff umfassend vielfach ungesättigte Kohlenwasserstoffe, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-unverzweigte, einfach ungesättigte und zweifach ungesättigte, unsubstituierte Kohlenwasserstoffe, und besonders bevorzugt einfach ungesättigte, Di-Halogen-substituierte Kohlenwasserstoffe. An den R<sub>1</sub>- und R<sub>4</sub>-Positionen einer Verbindung mit Struktur (I) ist eine z-Isoprenyl-Einheit besonders bevorzugt. Der Begriff "Zykloalkenyl" bezieht sich auf jeglichen nicht-aromatischen Kohlenwasserstoffring, wobei der Ring bevorzugt fünf bis zwölf Atome umfasst.

**[0057]** Die Begriffe "Aryl", "substituiertes Aryl", "Heteroaryl" und "substituiertes Heteroaryl" wie sie hierin verwendet werden, beziehen sich auf aromatische Kohlenwasserstoffringe, der Ring umfasst bevorzugt fünf, sechs oder sieben Atome, und am meisten bevorzugt sechs Atome. "Heteroaryl" und "substituiertes Heteroaryl" beziehen sich auf aromatische Kohlenwasserstoffringe, in denen wenigstens ein Heteroatom, z. B. ein Sauerstoff, Schwefel, oder Stickstoffatom sich neben wenigstens einem Kohlenstoffatom im Ring befindet.

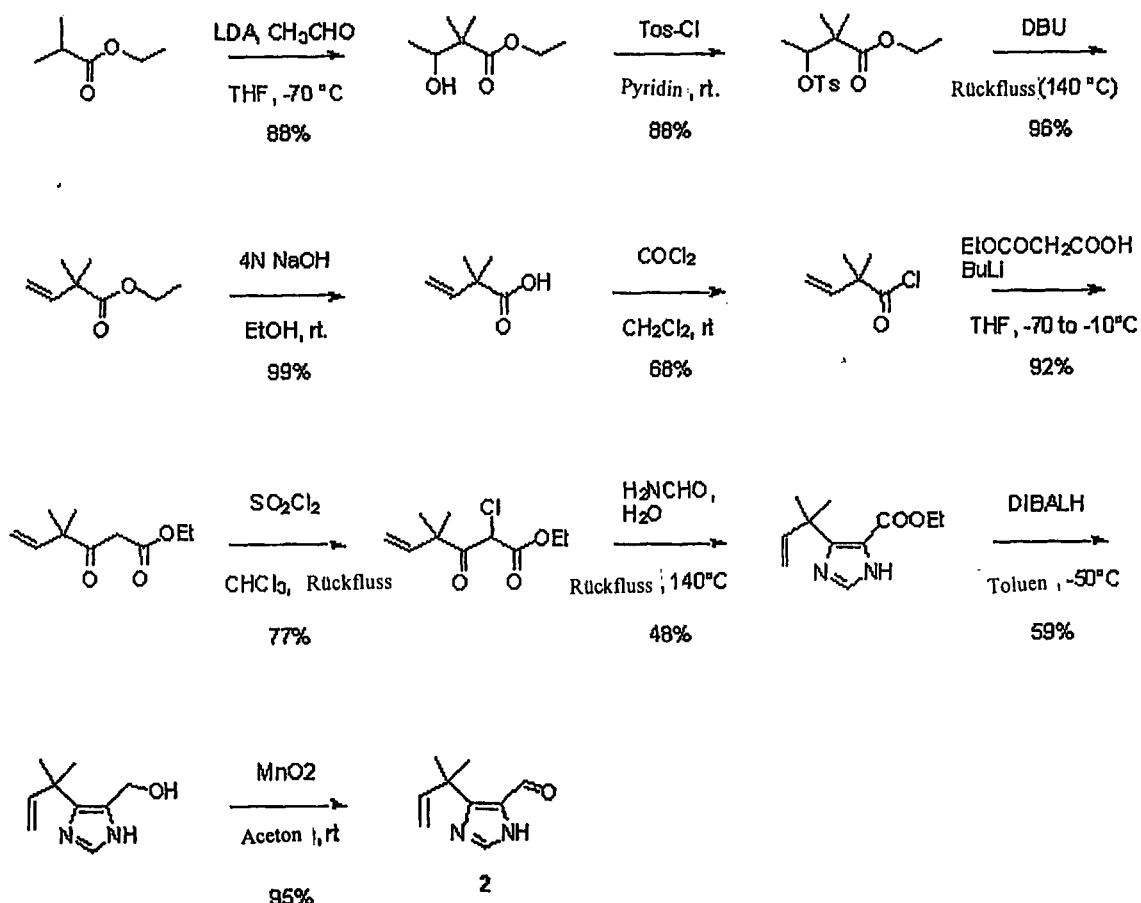
**[0058]** Der Begriff "Alkoxy" bezieht sich auf jeglichen unverzweigten oder verzweigten, substituierten oder unsubstituierten, gesättigten oder ungesättigten Ether, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> unverzweigten, gesättigten, unsubstituierten Ether, besonders bevorzugt Methoxy, und ebenfalls bevorzugt Dimethyl, Diethyl, Methyl-isobutyl und Methyl-tert-butyl-ether.

**[0059]** Der Begriff "Zykloalkoxy" bezieht sich auf jeglichen nicht aromatischen Kohlenwasserstoffring, wobei der Ring bevorzugt fünf bis zwölf Atome umfasst.

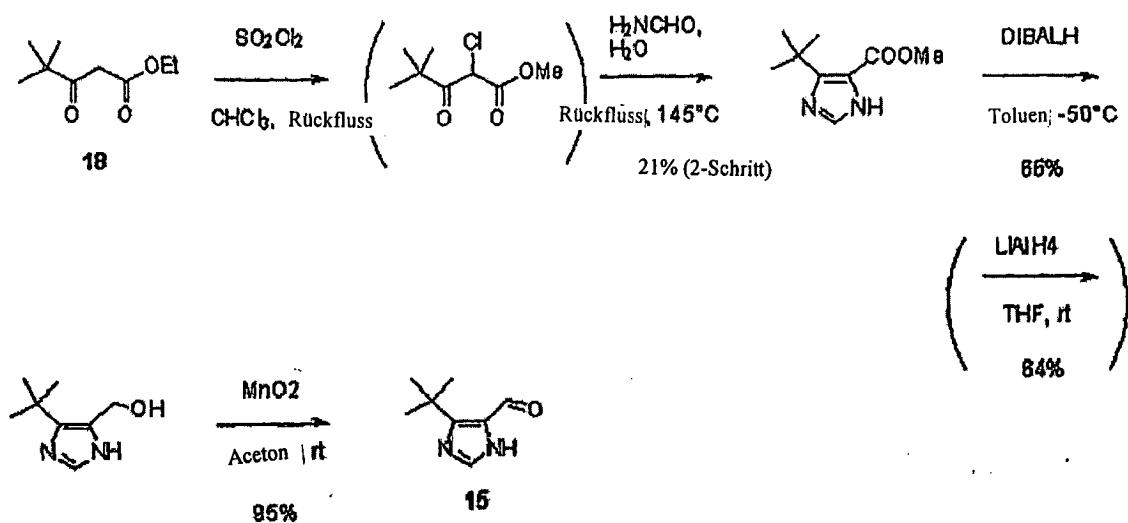
**[0060]** Die Begriffe "gereinigt", "wesentlich gereinigt" und "isoliert" beziehen sich darauf, dass die Verbindung frei ist von verschiedenen anderen Verbindungen mit denen die Verbindung in ihrem natürlichen Zustand normalerweise assoziiert ist, so dass in einer gegebenen Probe die erfundungsgemäße Verbindung wenigstens 0,5%, 1%, 5%, 10%, oder 20% und am meisten bevorzugt wenigstens 50% oder 75% des Gewichtes ausmacht.

**[0061]** Die Verbindung nach Formel (I) kann ausgehend von im Gebiet bekannten und erhältlichen Reagenzien chemisch synthetisiert bzw. hergestellt werden. Modifikationen von Diacyldiketopiperazin (Diacetyldiketopiperazin) wurden beispielsweise in Loughlin et al., 2000 Bioorg Med Chem Lett 10: 91 oder in Brocchini et al. in WO 95/21832 beschrieben. Das Diacyldiketopiperazin (Diacetyldiketopiperazin) kann beispielsweise durch Diacetylierung von kostengünstigem 2,5-piperazindion (TCI Cat. No. G0100, 25 g) mit Natriumacetat und Natriumanhydrid hergestellt werden. Die Diacetylstruktur des aktivierte Diketopiperazins kann mit anderen Acylgruppen ersetzt werden, umfassend Carbamate wie Boc(t-butoxycarbonyl), Z(benzoyloxycarbonyl).

**[0062]** Das Imidazolcarboxaldehyd kann z. B. entsprechend der Prozedur offenbart in Hayashi et al. 2000 J. Organic Chem 65: 8402 und wie unten dargestellt, hergestellt werden:



[0063] Ein anderes Beispiel für ein Imidazolcarboxaldehyd-Derivat ist ein Imidazol-4-carboxaldehyd 15-Derivat, das ausgehend beispielsweise von einem kommerziell erhältlichem Beta-ketoester 18 (TCI Cat. No. P1031, 25 mL) auf dem folgenden Weg hergestellt werden kann:



[0064] Das hierin offenbarte synthetische Verfahren kann bevorzugt in der Gegenwart von Cesiumcarbonat, als Base in DMF vorliegend und in deoxygenierter Atmosphäre durchgeführt werden. Die inerte Atmosphäre verhindert die voraussichtliche Oxidation des aktivierten  $\alpha$ -Kohlenstoffatomen des Diketopiperazinrings während der Behandlung mit Cesiumcarbonat (siehe unten) wie beispielsweise beschrieben in Watanabe et al. 18th International Congress of Heterocyclic Chemistry in Yokohama, Japan (30. Juli 2001), Abstract, Seite 225.



Luftoxidation von aktivierten Carbonylverbindungen mit Cesiumsalzen

**[0065]** Andere Ausführungsformen des synthetischen Verfahrens beinhalten Modifikationen der Verbindungen, die bei der Herstellung von Verbindungen repräsentiert durch die Formel (I) benutzt werden oder anderweitig beteiligt sind. Solche Derivate umfassen Modifikationen des Phenylrings, die Einführung anderer aromatischer Ringsysteme, die Positionierung des aromatischen Ringes, Änderungen des Imidazolringsystems und/oder weitere Modifikationen an der 5-Position des Imidazolringes. Beispiele für solche Modifikationen werden beispielsweise in Beispiel 4 diskutiert. Das Ergebnis solcher Modifikationen umfasst einen erhöhten Stickstoffanteil des Phenylringes und/oder der Verbindung, was zu einer erhöhten Löslichkeit der Verbindung führen kann. Andere Modifikationen können Derivate von bekannten Tubulininhibitoren umfassen und dadurch die Aktivität der Tubulininhibitoren nachahmen. Andere Modifikationen können die Synthese des  $\beta$ -Ketoester vereinfachen, der bei der Produktion des im hier offenbarten Verfahren verwendeten Imidazolcarboxaldehyds verwendet wird.

#### Pharmazeutische Zusammensetzungen

**[0066]** Die vorliegende Erfindung umfasst ebenfalls die hierin offenbarten Verbindungen, ggf. und bevorzugt hergestellt durch die hierin offenbarten Verfahren, in pharmazeutischer Zusammensetzungen umfassend einen pharmazeutisch akzeptablen Träger zubereitet für Lagerung und anschließende Verabreichung, welche eine pharmazeutisch wirksame Menge des oben offenbarten Produktes in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Verdünnungsmittel aufweisen. Akzeptable Träger oder Verdünnungsmittel für therapeutische Zwecke sind im pharmazeutischen Gebiet wohl bekannt und sind beschrieben, z. B. in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (Hrsg. A.R. Gennaro, 1985). Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Farbstoffe und selbst Geschmacksstoffe können in der pharmazeutischen Zusammensetzung bereitgestellt werden enthalten sein Natriumbenzoat, Ascorbinsäure und p-Hydroxybenzoësäureester können z. B. als Konservierungsstoffe zugesetzt werden. Zusätzlich können Antioxidanzien und Suspensionsmittel eingesetzt werden.

**[0067]** Die Zusammensetzungen aus Dehydrophenylahistin oder Dehydrophenylahistin-Analogen können als Tabletten, Kapseln oder Elixiere für orale Verabreichung; Zäpfchen für rektale Verabreichung; sterile Lösungen, Suspensionen für Verabreichung durch Injektion; Pflaster für transdermale Verabreichung und subdermale Depots u. Ä. formuliert und verwendet werden. Injektionslösungen ("injectables") können in konventioneller Form präpariert werden, entweder als flüssige Lösung oder Suspension, in fester Form geeignet zum Lösen oder Suspendieren in flüssige Form vor der Injektion oder Infusion, oder als Emulsionen. Geeignete Trägerstoffe sind z. B. Wasser, Salzlösungen, Dextrose, Mannitol, Laktose, Lecithin, Albumin, Natriumglutamat, Cysteinhochchlorid, humanes Serumalbumin u. Ä. Zusätzlich kann die injizierbare pharmazeutische Zusammensetzung ggf. geringe Menge nicht giftiger Hilfsstoffe wie Benetzungsmittel, pH-Pufferagenzien u. Ä. enthalten. Gegebenenfalls können auch Präparate, die die Absorption verstärken (z. B. Liposomen) verwendet werden.

**[0068]** Pharmazeutische Formulierungen für die parenterale Verabreichung umfassen wässrige Lösungen der aktiven Verbindungen in wasserlöslicher Form. Zusätzlich können Suspensionen der aktiven Verbindungen als geeignete ölige Injektionssuspensionen präpariert werden. Geeignete lipophile Lösungsmittel oder Vehikel umfassen fettige Öle wie Sesamöl oder andere organische Öle wie Soja-, Grapefruit- oder Mandelöle, oder synthetische Fettsäureester, wie Ethyloleat oder Triglyceride oder Liposomen. Wässrige Injektionssuspensionen können Substanzen enthalten, die die Viskosität der Suspension erhöhen, wie Natriumcarboxymethylcellulose, Sorbitol oder Dextran. Optional kann die Suspension auch geeignete Stabilisatoren oder Agenzien, die die Löslichkeit der Verbindungen erhöhen und so die Präparation von hoch konzentrierten Lösungen erlauben, enthalten.

**[0069]** Pharmazeutische Präparationen für die orale Verwendung können erhalten werden durch Kombinieren der aktiven Verbindungen mit einem festen Trägerstoff, optionales Zermahlen des resultierenden Gemisches und Weiterverarbeitung der Mischung von Körnchen nach Zugabe von geeigneten Hilfsstoffen, wenn gewünscht, um Tabletten oder Dragée-Kerne zu gewinnen. Geeignete Trägerstoffe sind, im Speziellen, Füllstoffe wie Zucker, umfassend Laktose, Sukrose, Mannitol oder Sorbitol; Cellulose-Präparationen wie z. B. Maisstärke, Weizenstärke, Reisstärke, Kartoffelstärke, Gelatin, Gummi-Tragacanth, Methylcellulose, Hydroxypropyl-

methylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose und/oder Polyvinylpyrrolidon (PVP). Gegebenenfalls können Aufschlussmittel wie vernetztes Polyvinylpyrrolidon, Agar oder Alginsäure oder ein Salz davon wie Natriumalginat zugesetzt werden. Dragéekerne werden mit geeigneten Beschichtungen versehen. Zu diesem Zweck werden konzentrierte Zuckerlösungen verwendet, die optional auch Gummi Arabicum, Talk, Polyvinylpyrrolidon, Carbopolgel, Polyethylenglycol und/oder Titaniumdioxid, Lacklösungen, und geeignete organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelmischungen enthalten können. Farbstoffe oder Pigmente können zu den Tabletten- oder Dragée-Beschichtungen zur Identifikation oder zur Charakterisierung unterschiedlicher Kombinationen von Mengen der aktiven Verbindungen zugegeben werden. Zu diesem Zweck werden konzentrierte Zuckerlösungen verwendet, die optional auch Gumarabic Gummi Arabicum, Talk, Polyvinylpyrrolidon, Carbopolgel, Polyethylenglycol und/oder Titaniumdioxid, Lacklösungen, und geeignete organische Lösungsmittel oder Lösungsmittellösungen enthalten können. Farbstoffe oder Pigmente können zu den Tabletten- oder Dragée-Beschichtungen zur Identifikation oder zur Charakterisierung unterschiedlicher Kombinationen von Mengen der aktiven Verbindungen zugegeben werden. Solche Formulierungen können hergestellt werden, indem Verfahren, die im Gebiet bekannt sind, verwendet werden (siehe z. B. U.S.-Patent Nrn. 5,733,888 (injizierbare Zusammensetzungen); 5,726,181 (schwer wasserlösliche Zusammensetzungen); 5,707,641 (therapeutisch aktive Proteine oder Peptide); 5,667,809 (lipophile Agenzien); 5,576,012 (solubilisieren von polymeren Agenzien); 5,707,615 (antivirale Formulierungen); 5,683,676 (partikuläre Medikamente); 5,654,286 (topische Formulierungen); 5,688,529 (orale Suspensionen); 5,445,829 (Formulierungen für verlängerte Freisetzung); 5,653,987 (flüssige Formulierungen); 5,641,515 (Formulierungen für kontrollierte Freisetzung) und 5,601,845 (spheroide Formulierungen).

**[0070]** Weiterhin werden hierin verschiedene pharmazeutische Zusammensetzungen offenbart, die im Gebiet der Pharmazie bekannt sind für ihre Verwendung umfassend intraokulare, intranasale und intraaurikulare Zuführung. Pharmazeutische Zubereitungen umfassen wässrige ophthalmische Lösungen der aktiven Verbindung in wasserlöslicher Form, wie etwa Augentropfen oder in Gellan Gummi (Shedden et al., 2001 Clin Ther 23(3): 440–50) oder Hydrogele (Mayer et al., 1996 (Ophthalmologica 210: 101–3); ophthalmische Salben; ophthalmische Suspensionen, wie etwa Mikropartikel, Arzneimittel-enthaltende kleine Polymerpartikel, die in einem flüssigen Trägermedium suspendiert werden (Joshi, A., 1994 J Ocul Pharmacol 10: 29–45), fettlösliche Zubereitungen (Alm et al. 1989 Prog Clin Biol Res 312: 447–58), und Mikrosphären (Mordini, 1999 Toxicol Sci 52: 101–6); und Okulare Einsätze. Solche geeigneten pharmazeutischen Zubereitungen sind meistens und bevorzugt so formuliert, dass sie steril, isotonisch und gepuffert sind aus Gründen der Stabilität und des Komforts. Pharmazeutische Zusammensetzungen können ebenso Tropfen und Sprays beinhalten, die häufig derart hergestellt werden, um damit sie in vielerlei Hinsicht die nasale Sekretion simulieren und so die normale Ziliarkaktivität aufrechterhalten. Wie in Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing, 18. Ausgabe) offenbart wird und wie dem Fachmann wohl bekannt ist, sind geeignete Zubereitungen meistens und bevorzugt isotonisch, leicht gepuffert, um einen pH von 5,5 bis 6,5 aufrechtzuerhalten und umfassen meistens bevorzugt antimikrobiale Konservierungsstoffe und geeignete Stabilisatoren für Arzneimittel. Pharmazeutische Zubereitungen für intraaurikulare Zuführung umfassen Suspensionen und Salben für die topische Applikation im Ohr. Gebräuchliche Lösungsmittel für solche auralen Zubereitungen umfassen Glycerin und Wasser.

**[0071]** Bei einer Verwendung als Zellzyklusinhibitor, einer Tumorwachstum-inhibierenden oder Pilzwachstum-inhibierenden Verbindung kann die Verbindung nach Formel (I) entweder oral oder über nicht-orale Zuführungswege verabreicht werden. Bei einer oralen Verabreichung kann sie als Kapsel, Tablette, Granulat, Spray, Syrup oder in einer ähnlichen Form verabreicht werden. Bei einer nicht-oralen Verabreichung kann sie als wässrige Lösung, als ölige Zubereitung o. Ä. oder als Tropffusion, Zäpfchen, Salbe, Balsam o. Ä verabreicht werden, wenn die Verabreichung via Injektion oder Infusion, subkutan, intraperitoneal, intravenös, intramuskulär o. Ä. erfolgt. Ebenso kann sie topisch, rektal oder vaginal verabreicht werden, wie vom Fachmann für angemessen befunden, um die Verbindung in optimalen Kontakt mit dem Tumor zu bringen, und so das Tumorwachstum zu hemmen. Eine lokale Verabreichung am Ort des Tumors wird ebenso in Erwägung gezogen, entweder vor oder nach einer Tumorresektion, ebenso wie eine Zubereitung für eine kontrollierte Freisetzung, eine Zubereitung für ein Depot und die Zuführung über eine Infusionspumpe.

#### Verfahren zur Verabreichung

**[0072]** Die vorliegende Erfindung umfasst ebenso Verfahren zur Herstellung und zur Verabreichung der offensichtlichen chemischen Verbindungen und der offensichtlichen pharmazeutischen Zusammensetzungen. Solche offensichtlichen Verfahren umfassen u. a. (a) Verabreichung durch orale Zuführungswege, welche Verabreichung umfasst Verabreichung in Form von Kapsel, Tablette, Körnchen, Spray, Syrup oder andere solcher Formen; (b) Verabreichung durch nonorale Zuführungswege, welche Verabreichung umfasst Verabreichung als eine wässrige Suspension, eine ölige Zubereitung o. Ä. oder als eine Tropffinfusion, Zäpfchen, Salbe, Balsam o. Ä.; Ver-

abreichung via Injektion oder Infusion, subkutan, intraperitoneal, intravenös, intramuskulär, intradermal o. Ä.; ebenso wie (c) topische Verabreichung, (d) rektale Verabreichung, oder (e) vaginale Verabreichung, wie vom Fachmann als angemessen befunden, um die Verbindung in Kontakt mit lebendem Gewebe zu bringen; und (f) Verabreichung via einer Zubereitung für kontrollierte Freisetzung, einer Depotzubereitung und einer Zuführung über eine Infusionspumpe. Als weitere Beispiele für solche Arten der Verabreichung und als weitere Offenbarung solcher Verabreichungsarten werden hier verschiedene Verfahren für die Verabreichung der offebarten chemischen Verbindungen und pharmazeutischen Verbindungen umfassend Verabreichungsarten der intraokularen, intranasalen und intraaurikularen Zuführungswege offenbart.

**[0073]** Die pharmazeutisch wirksame Menge von Dehydrophenylahistin oder Dehydrophenylahistinanalog-Zusammensetzungen, die als Dosis benötigt wird, wird von der Art der Verabreichung, der Art der zu behandelnden Tieres, einschließlich des Menschen, und den physischen Eigenschaften des speziellen in Be tracht kommenden Tieres abhängen. Die Dosis kann abgestimmt werden, um den erwünschten Effekt zu erzielen, diese wird jedoch von Faktoren abhängen, die dem medizinischen Fachmann bekannt sind, wie z. B. Gewicht, Ernährung, gleichzeitige Medikation und ähnlichen Faktoren.

**[0074]** Bei der Ausführung des Verfahrens können die Produkte oder Zusammensetzungen allein oder in Kombination miteinander oder in Kombination mit anderen therapeutischen oder diagnostischen Agenzien verwendet werden. Wie beispielsweise hierin offenbart sind die offebarten Verbindungen wirksam in der Krebsbehandlung, wenn sie in Kombination mit anderen Wirkstoffen ("actives"), speziell anderen Chemotherapeutika, z. B. Biologika ("biologics") und den spezifischen Chemotherapeutika CPT-11, Taxotene (Docetaxel) und Paclitaxel verwendet werden. Die hierin offebarten Verbindungen sind ebenso wirksam in der Krebsbehandlung, wenn sie in Kombination mit anderen Wirkstoffen ("actives") umfassend antivaskulare Agenzien, anti-Angiogenese Agenzien wie z. B. Erbitux (Imclone/Bristol-Myers) und Iressa (AstraZeneca), anderen VEGF-Inhibitoren und Biologika ("biologics"), im Speziellen wenigstens ein Anti-VEGF-Antikörper, speziell monoklonalen Antikörper gegen den VEGF-Rezeptor, umfassend DC101, einen monoklonalen Antikörper aus der Ratte, der den Maus-VEGF-Rezeptor 2 (flk-1) bindet, verwendet werden. Solche Kombinationen können in vivo, üblicherweise in einem Säuger, bevorzugt in einem Menschen, oder in vitro verwendet werden. Bei ihrem Einsatz in vivo können die offebarten Verbindungen, allein oder in Kombination mit anderen Therapeutika oder anderen biologischen Produkten dem Säugetier auf vielfältige Weise verabreicht werden, einschließlich parenteral, intravenös, via Infusion oder Injektion, subkutan, intramuskulär, kolonikal ("colonically"), rektal, vaginal, nasal oder intraperitoneal, unter Verwendung einer Vielzahl von Dosierungsarten. Solche Verfahren können auch angewandt werden, um die chemische Aktivität in vivo zu testen.

**[0075]** Wie für den Fachmann leicht ersichtlich, wird die nützliche zu verabreichende in vivo Dosierung und die jeweilige Art der Verabreichung vom Alter, dem Gewicht und der Spezies des behandelten Säugers sowie von der jeweiligen eingesetzten Verbindung und der spezifischen Verwendung dieser eingesetzten Verbindungen abhängen. Die Bestimmung der wirksamen Dosierungsmengen, das sind die Dosierungsmengen, die notwendig sind, um das gewünschte Ergebnis zu erzielen, kann vom Fachmann durch die Verwendung von pharmakologischen Routinemethoden erreicht werden. Typischerweise beginnt die Anwendung von Produkten im humanklinischen Bereich mit einem niedrigen Dosierungslevel, dieses Dosierungslevel wird dann gesteigert, bis der gewünschte Effekt erzielt wird. Alternativ dazu können akzeptable in vitro-Studien unter Verwendung etablierter pharmakologischer Verfahren durchgeführt werden, um nützliche Dosierungen und Wege der Verabreichung für die mit den vorliegenden Verfahren identifizierten Verbindungen zu etablieren.

**[0076]** In nicht-humanen Tierversuchen wird bei der Anwendung eines potentiellen Produktes mit einer höheren Dosis begonnen, die dann abgesenkt wird, bis der gewünschte Effekt nicht mehr erzielt wird oder nachteilige Nebenwirkungen verschwinden. Die Dosis kann sich, abhängig von den erwünschten Effekten und der therapeutischen Indikation, über einen breiten Bereich erstrecken. Typischerweise können Dosierungen zwischen etwa 10 Mikrogram/kg und 100 mg/kg Körpergewicht, bevorzugt zwischen etwa 100 Mikrogram/kg und 10 mg/kg Körpergewicht liegen. Alternative Dosierungen können berechnet werden basierend auf der (Körper-)Oberfläche des Patienten, wie dem Fachmann bekannt. Die Verabreichung kann oral an jedem dritten Tag, jedem zweiten Tag, täglich, zweimal täglich oder dreimal täglich erfolgen.

**[0077]** Die exakte Zusammensetzung, Art der Verabreichung und Dosierung kann durch den jeweiligen Arzt im Hinblick auf den Zustand des Patienten bestimmt werden. Siehe z. B. Fingl et al. in The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1975. Es sollte erwähnt werden, dass der behandelnde Arzt weiß, wie und wann die Verabreichung aufgrund von Toxizität oder Dysfunktion von Organen angepasst, unterbrochen oder abgebrochen werden sollte.

**[0078]** Umgekehrt wüsste der behandelnde Arzt ebenso, dass er die Behandlung durch Gabe höherer Mengen anpassen muss, wenn das klinische Ansprechen nicht adäquat ist (Toxizität ausgenommen). Die Größenordnung der verabreichten Dosis bei der Bewältigung der jeweiligen Krankheit (disorder of interest) wird dabei von der Schwere der zu behandelnden Krankheit und der Art der Verabreichung abhängen. Die Schwere der Erkrankung kann jedenfalls teilweise z. B. durch übliche prognostische Beurteilungsmethoden abgeschätzt werden. Weiterhin variiert die Dosis und eventuell auch die Dosisfrequenz in Abhängigkeit vom Alter, Körpergewicht und Ansprechen des individuellen Patienten. Ein Programm vergleichbar zu dem oben Diskutierten kann ebenfalls in der Veterinärmedizin verwendet werden.

**[0079]** Abhängig von der spezifischen Krankheit, die behandelt wird, können solche Agenzien zubereitet und systemisch oder lokal verabreicht werden. Eine Vielzahl von Methoden für die Zubereitung und Verabreichung kann in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. Ausgabe, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990) gefunden werden. Geeignete Arten der Verabreichung können umfassen oral, rektal, transdermal, vaginal, transmukosal, oder intestinale Verabreichung; parenterale Zuführung, umfassend intramuskulär, subkutan, intramedullare Injektionen, und ebenso intrathekal, direkt intraventikular, intravenös, via Infusion, intraperitoneal, intranasal oder als intraokulare Injektionen.

**[0080]** Für Injektionen oder Infusionen können die Agenzien in wässrigen Lösungen zubereitet werden, z. B. in physiologisch kompatiblen Puffer wie Hank's Solution, Ringer's Solution oder physiologischem Kochsalzpfiffer. Für solche transmukosalen Verabreichungen werden Penetriermittel, geeignet für die jeweils zu durchdringende Barriere bei der Zubereitung verwendet. Solche Penetriermittel sind generell im Stand der Technik bekannt. Die Verwendung von pharmazeutisch akzeptablen Trägern für die Zubereitung der hier offenbarten Verbindungen für die Ausführung der Erfindung in Dosierungen geeignet für die systemische Verabreichung ist im Rahmen der Erfindung. Bei der passenden Auswahl eines Trägers und geeigneter Herstellung können die hierin offenbarten Zusammensetzungen, insbesondere diejenigen, die als Lösungen zubereitet werden, parenteral verabreicht werden, etwa durch intravenöse Injektion oder Infusion. Unter Verwendung von im Gebiet bekannten pharmazeutisch akzeptablen Trägern können die Verbindungen leicht zu Dosierungen verarbeitet werden, die für die orale Verabreichung geeignet sind. Solche Träger ermöglichen die Zubereitung der Verbindung als Tabletten, Pillen, Kapseln, Flüssigkeiten, Gels, Syrups, Breie, Suspensionen und Ähnliches für die orale Aufnahme durch den zu behandelnden Patienten.

**[0081]** Agenzien, die intrazellulär verabreicht werden sollen, können durch Techniken, die dem durchschnittlichen Fachmann bekannt sind, verabreicht werden. Zum Beispiel können solche Agenzien in Liposomen ver kapselt werden und dann wie oben beschrieben verabreicht werden. Alle Moleküle in einer wässrigen Lösung, die zum Zeitpunkt der Liposomenbildung vorhanden sind, werden in das wässrige Innere aufgenommen. Der liposomale Inhalt wird sowohl vor der externen ummittelbaren Umgebung („micro-environment“) geschützt als auch effizient in das Zytosol überführt, da die Liposomen mit der Zellmembran fusionieren. Außerdem können kleine organische Moleküle aufgrund ihrer Hydrophobizität direkt intrazellulär verabreicht werden.

**[0082]** Die Bestimmung der wirksamen Mengen, speziell im Licht der bereitgestellten, detaillierten Offenbarungen, liegt durchaus im Vermögen des Fachmanns. Zusätzlich zu den aktiven Verbindungen können diese pharmazeutischen Verbindungen geeignete pharmazeutisch akzeptable Trägerstoffe, umfassend Arzneimittelträger und Hilfsstoffe enthalten, die die Verarbeitung der aktiven Verbindungen zu Zubereitungen die pharmazeutische genutzt werden können, ermöglichen. Die zubereiteten Zusammensetzungen für die orale Verabreichung können die Form von Tabletten, Dragees, Kapseln oder Lösungen haben. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können auf bekannte Weise hergestellt werden, zum Beispiel durch konventionelle Misch-, Lösungs-, Granulier-, Dragee-Herstellungs-, Schweb-, Emulsions-, Einkapselungs-, Einkapselungs- oder Lyophilisierverfahren.

**[0083]** Die Wirksamkeit und Toxizität der hierin offenbarten Verbindungen kann durch bekannte Verfahren ermittelt werden. So kann z. B. die Toxikologie einer bestimmten Verbindung oder einer Untergruppe von Verbindungen, die etwa bestimmte chemische Komponenten gemeinsam haben, durch Feststellung der in vitro-Toxizität gegenüber einer Zelllinie, wie etwa einer Säugerzelllinie und bevorzugt einer humanen Zelllinie, festgestellt werden. Die Ergebnisse solcher Studien sind oft geeignet, um Voraussagen bezüglich der Toxizität in Tieren zu machen, wie etwa in Säugetieren, oder spezieller, in Menschen. Alternativ dazu kann die Toxizität bestimmter Verbindungen in einem Tiermodell, z. B. in Mäusen, Ratten, Kaninchen oder Affen unter Zuhilfenahme bekannter Verfahren bestimmt werden. Die Wirksamkeit einer bestimmten Verbindung kann durch verschiedene, im Gebiet anerkannte Verfahren nachgewiesen werden, wie z. B. durch in vitro-Verfahren, Tiermodelle oder klinische Studien am Menschen. Im Gebiet anerkannte in vitro-Modelle existieren für nahezu jeden klinischen Befund, umfassend die Befunde, die durch die hierin offenbarten Verbindungen gelindert werden,

umfassend Krebs, kardiovaskuläre Krankheiten und verschiedene Pilzinfektionen. Ebenso können akzeptable Tiermodelle verwendet werden, um die Wirksamkeit von Chemikalien für die Behandlung solcher Erkrankungen nachzuweisen. Bei der Wahl eines solchen Modells, um die Wirksamkeit zu bestimmen, kann der Fachmann sich am Stand der Technik orientieren, um ein geeignetes Modell, eine geeignete Dosis, eine geeignete Verabreichungsform und ein Behandlungsschema zu wählen. Selbstverständlich können auch klinische Versuche am Menschen verwendet werden, um die Wirksamkeit solcher Verbindungen im Menschen zu bestimmen.

**[0084]** Bei einer Verwendung als Antikrebsagens oder als Krebswachstums-inhibierende Verbindung können die hierin offebarten Verbindungen entweder oral oder durch nicht-orale Wege verabreicht werden. Bei einer oralen Verabreichung können sie als Kapsel, Tablette, Körnchen, Spray, Syrup oder in einer ähnlichen solchen Form verabreicht werden. Bei einer nicht-oralen Verabreichung können sie als wässrige Lösung, als ölige Zubereitung oder Ähnliches oder als Tropfinfusion, Zäpfchen, Salbe, Balsam oder Ähnliches, bei Verabreichung via Injektion oder Infusion, subkutan, intraperitoneal, intravenös, intramuskulär, intradermal oder ähnlich verabreicht werden. Ebenso können sie topisch, rektal oder vaginal verabreicht werden, wie vom Fachmann für geeignet erachtet, um die Verbindung in optimalen Kontakt mit einem Tumor zu bringen, um so das Tumorzwachstum zu inhibieren. Eine lokale Verabreichung am Ort des Tumors oder einer anderen Krankheit wird ebenso in Betracht gezogen, entweder bevor oder nach einer Tumorresektion oder als Bestandteil einer im Gebiet anerkannten Behandlung einer Krankheit. Zubereitungen, die eine kontrollierte Freisetzung, Depot-Zubereitungen und Zuführung über eine Infusionspumpe werden ebenfalls in Betracht gezogen.

**[0085]** Bei einer Verwendung als Antikrebsagens oder als Antitumoragens kann [die Verbindung] oral oder nicht-oral verabreicht werden, wobei dem menschlichen Patienten eine Menge von etwa 0,0007 mg/Tag bis zu etwa 7.000 mg/Tag aktiven Inhaltsstoffes und bevorzugt etwa 0,07 mg/Tag bis zu etwa 70 mg/Tag des aktiven Inhaltsstoffes, bevorzugt einmal am Tag oder weniger bevorzugt über zwei- bis etwa zehnmal pro Tag verabreicht werden. Alternativ dazu und ebenfalls bevorzugt kann die Verbindung in den angegebenen Mengen, bevorzugt kontinuierlich verabreicht werden, z. B. durch einen intravenösen Tropf. Demnach wäre die bevorzugte tägliche Dosis des aktiven Antitumorinhaltstoffes für einen Patienten, der 70 kg wiegt, etwa 0,0007 mg/kg/Tag bis zu 35 mg/kg/Tag umfassend 1,0 mg/kg/Tag und 0,5 mg/kg/Tag und besonders bevorzugt von 0,007 mg/kg/Tag bis zu 0,050 mg/kg/Tag, einschließlich 0,035 mg/kg/Tag. Gleichwohl ist dem Fachmann bekannt, dass in bestimmten Situationen eine Verabreichung der Antitumorverbindung in Mengen, die die oben genannten bevorzugten Dosisbereiche überschreiten, oder sogar weit überschreiten, nötig sind, um bestimmte fortgeschrittene oder lethale Tumoren wirksam und aggressiv zu behandeln.

**[0086]** Bei einer Verwendung als antifungales Agens ist die bevorzugte Menge des Dehydrophenylahistins oder seines Analogs, die wirksam bei der Behandlung oder Prävention eines bestimmten Pilzpathogens ist, abhängig von den Eigenschaften des Pilzes und dem Ausmaß der Infektion, und kann durch klinische Standardverfahren bestimmt werden. In vitro- oder in vivo-Assays können optional eingesetzt werden, um die optimalen Dosierungsbereiche zu identifizieren. Wirksame Dosierungen können aus Dosis-Wirkungskurven, abgeleitet aus in vitro-Analysen, oder bevorzugt Tiermodellen, extrapoliert werden. Der präzise Dosierungsgrad sollte durch den behandelten Arzt oder einen anderen Gesundheitsversorger bestimmt werden und wird von bekannten Faktoren abhängen, umfassend die Art der Verabreichung, und das Alter, Körpergewicht, Geschlecht und die generelle Gesundheit des Individuums; die Art, Schwere und das klinische Stadium der Infektion; sowie die Verwendung (oder nicht) von begleitenden Therapien.

**[0087]** Die wirksame Dosis von Dehydrophenylahistin oder seinem Analog wird typischerweise im Bereich von etwa 0,01 bis zu etwa 50 mg/kg, bevorzugt etwa 0,1 bis zu etwa 10 mg/kg des Körpergewicht eines Säugers pro Tag sein, verabreicht in einer einzelnen oder in mehreren Dosen. Generell kann die Verbindung Patienten, die eine solche Behandlung benötigen, in einem täglichen Dosisbereich von etwa 1 bis zu etwa 2000 mg pro Patienten verabreicht werden.

**[0088]** Um die Dosierung, umfassend die hierin offebarten Verbindungen als Tumorzwachstum-inhibierende Verbindung zuzubereiten, können bekannte oberflächenwirksame Stoffe, Trägersubstanzen, Glättungsagenzien, Suspensionsagenzien und pharmazeutisch akzeptable filmbildende Substanzen und Beschichtungshilfsstoffe und Ähnliches verwendet werden. Bevorzugt können Alkohole, Ester, sulfatierte aliphatische Alkohole und Ähnliches als oberflächenwirksame Stoffe verwendet werden; Sukrose, Glukose, Laktose, Stärke, kristallisierte Cellulose, Mannitol, leichtes wasserfreies Silikat, Magnesiumaluminat, Magnesiummethasilikataluminat, synthetisches Aluminiumsilikat, Kalziumcarbonat, saures Natriumcarbonat, Kalziumhydrogenphosphat, Kalziumcarboxymethylcellulose und Ähnliches als Trägerstoffe; Magnesiumstearat, Talk, gehärtetes Öl und Ähnliches als Glättungsagenzien; Kokosnussöl, Olivenöl, Sesamöl, Erdnussöl, Soja können als Suspensions-

agenzien oder Gleitmittel verwendet werden; Celluloseacetatphthalat als ein Derivat eines Kohlenhydrates wie Cellulose oder Zucker, oder ein Methylacetat-methacrylatcopolymer als ein Derivat von Polyvinyl können verwendet werden als Suspensionsagenzien; und Weichmacher wie Esterphthalate und Ähnliche können verwendet werden als Suspensionsagenzien. Zusätzlich zu den vorher genannten bevorzugten Inhaltsstoffen können Süßungs-, Duft-, Farb- und Konservierungsstoffe und Ähnliches zur verabreichten Zubereitung der Verbindung dazu gegeben werden, speziell wenn die Verbindung oral verabreicht wird.

**[0089]** Die Zusammensetzungen, die hierin als pharmazeutische Zusammensetzungen offenbart sind, können auch einen pharmazeutisch akzeptablen Trägerstoff umfassen. Solche Zusammensetzungen können für die Lagerung und nachfolgende Verabreichung präpariert werden. Akzeptable Trägerstoffe oder Verdünnungsmittel für die therapeutische Anwendung sind im pharmazeutischen Gebiet wohl bekannt und beschrieben, z. B. in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro, Hrsg. 1985). Solche Zusammensetzungen können beispielsweise zubereitet und verwendet werden als Tabletten, Kapseln oder Lösungen für die orale Verabreichung; Zäpfchen für rektale oder vaginale Verabreichung, sterile Lösungen oder Suspensionen für Verabreichung durch Injektion. Injizierbare Zusammensetzungen können in konventioneller Form, entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen, in fester Form geeignet zur Herstellung von Lösungen oder Suspensionen vor der Injektion oder Infusion, oder als Emulsionen hergestellt werden. Geeignete Trägerstoffe beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf isotonische Kochsalzlösung, Dextrose, Mannitol, Laktose, Leцитin, Albumin, Natriumglutamat, Cysteinhydrochlorid und Ähnliche. Zusätzlich, kann die injizierbare pharmazeutische Zusammensetzungen ggf. ebenfalls geringe Menge nicht toxischer Hilfsstoffe enthalten, wie z. B. Benetzungsmittel, pH-Pufferagenzien und Ähnliche. Wenn gewünscht, können Zubereitungen, die die Absorption verstärken (z. B. Liposomen) verwendet werden.

**[0090]** Die pharmazeutisch wirksame Menge der Zubereitung, die für eine Dosis benötigt wird, wird von der Art der Verabreichung, der Art des zu behandelnden Tieres, und den physischen Eigenschaften des in Betracht kommenden spezifischen Tieres abhängen. Die Dosis kann justiert werden, um einen gewünschten Effekt zu erzielen, sie wird jedoch von Faktoren wie Gewicht, Ernährung, begleitender Medikation und anderen Faktoren, die vom medizinischen Fachmann als solche erkannt werden, abhängen.

**[0091]** Die oben beschriebenen Verbindungen oder Zusammensetzungen können allein oder in Kombination miteinander oder in Kombination mit anderen therapeutischen oder diagnostischen Agenzien verwendet werden. Im Speziellen können die offenbarten Verbindungen allein oder in Verbindung mit anderen Chemotherapeutika oder Biologika, einschließlich Antikörper für die Behandlung von Krebs, oder in Kombination mit anderen Antiinfektiva für die Behandlung von Pilzinfektionen eingesetzt werden. Die Verbindungen oder Zusammensetzungen können in vivo oder in vitro verwendet werden. Geeignete Dosierungen und die geeignetste Art der Verabreichung werden variieren, abhängig vom Alter, dem Gewicht und der Art des zu behandelnden Tieres und von den einzelnen jeweils eingesetzten Verbindungen, und der speziellen Verwendung, für welche diese Verbindung bzw. Verbindungen eingesetzt werden. Die Stärke der Dosierung bei der Handhabung einer bestimmten Fehlstörung wird variieren mit der Schwere des Leidens, das zu behandeln ist, und dem Weg der Verabreichung und abhängig von den Erkrankungen und deren Ernsthaftigkeit können die Verbindungen systemisch oder lokal zubereitet und verabreicht werden. Eine Vielzahl von Techniken für die Zubereitung und Verabreichung kann in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th. ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990) gefunden werden.

**[0092]** Um die Verbindungen nach Formel (I), bevorzugt synthetisch hergestellt entsprechend der hierin offenbarten Verfahren, als einen Zellzyklusinhibitor, eine Tumorwachstum-inhibierende, oder als eine antifungale Verbindung zuzubereiten, können oberflächenwirksame Stoffe, Trägerstoffe, Glättungsagenzien, Suspensionsagenzien und pharmazeutisch akzeptable filmbildende Substanzen und Beschichtungshilfsstoffe und Ähnliche verwendet werden. Bevorzugt können Alkohole, Ester, sulfatierte aliphatische Alkohole und Ähnliche als oberflächenwirksame Stoffe verwendet werden; Sukrose, Glukose, Laktose, Stärke, kristalline Cellulose, Mannitol, leichtes wasserfreies Silikat, Magnesiumaluminat, Magnesiummethasilikataluminat, synthetisches Aluminiumsilikat, Kalziumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Kalziumhydrogenphosphat, Kalziumcarboxymethylcellulose und Ähnliche können als Trägerstoffe verwendet werden; Magnesiumstearat, Talk, gehärtetes Öl und Ähnliche können als Glättungagenzien verwendet werden; Kokosnussöl, Olivenöl, Sesamöl, Erdnussöl und Soja(öl) können als Suspensionsagenzien oder Gleitmittel verwendet werden; Celluloseacetatphthalat als Derivat eines Kohlenhydrates wie Cellulose oder Zucker, oder Methylacetat-methacrylatcopolymer als Derivat von Polyvinyl können als Suspensionsagenzien verwendet werden; und Weichmacher wie Esterphthalate und Ähnliche können als Suspensionsagenzien verwendet werden. Zusätzlich zu den vorhergehenden bevorzugten Inhaltsstoffen können Süßungsstoffe, Duftstoffe, Farbstoffe und Konservierungsstoff und Ähnliches zu der zu verabreichenden Darreichungsform der nach dem Verfahren hergestellten Verbindung zugegeben werden,

speziell wenn die Verbindung oral verabreicht wird.

**[0093]** Die Zellzyklusinhibitoren, die antitumorale Agenzien und die antifungale Agenzien, die durch das Verfahren hergestellt werden können, können einem menschlichen Patienten oral oder nicht-oral in einer Menge von etwa 0,001 mg/kg/Tag bis zu etwa 10.000 mg/kg/Tag des aktiven Inhaltsstoffs, und besonders bevorzugt etwa 0,1 mg/kg/Tag bis zu etwa 100 mg/kg/Tag des aktiven Inhaltsstoffe, bevorzugt einmal alle drei Tage auf einer zyklischen Basis, einmal jeden zweiten Tag, einmal pro Tag, zweimal pro Tag, oder weniger bevorzugt mehr als zweimal bis etwa zehnmal pro Tag verabreicht werden. Alternativ und ebenso bevorzugt kann die durch das Verfahren hergestellte Verbindung bevorzugt in den genannten Mengen kontinuierlich verabreicht werden, z. B. durch einen intravenösen Tropf. Dementsprechend, wäre die bevorzugte täglich Dosis des aktiven antitumorale Inhaltsstoffes für einen Patienten von 70 Kilogramm etwa 0,07 mg/Tag bis etwa 700 Gramm/Tag und besonders bevorzugt 7 mg/Tag bis etwa 7 Gramm/Tag. Nichtsdestotrotz, und wie auch für den Fachmann einleuchtend, kann es in bestimmten Situationen notwendig sein, die im Verfahren hergestellte antitumorale Verbindung in Mengen, die den oben genannten bevorzugten Dosierungsbereich überschreiten, oder sogar weit überschreiten, zu verabreichen, um wirksam und aggressiv bestimmte fortgeschrittene oder lethale Tumoren zu behandeln.

**[0094]** Im Falle der Verwendung des durch die Verfahren hergestellten Zellzyklusinhibitors als biochemisches Testreagenz inhibiert die durch die Verfahren hergestellte Verbindung die Progression des Zellzyklus, wenn sie in einem organischen Lösungsmittel oder in einem wässrigen organischen Lösungsmittel gelöst wird und dann direkt in einem der verschiedenen Zellkultursysteme angewandt wird. Nützliche organische Lösungsmittel umfassen z. B. Methanol, Methylsulfoxid und Ähnliche. Die Zubereitung kann beispielsweise ein pulverförmiger, granulärer oder ein fester Inhibitor sein, oder ein flüssiger Inhibitor hergestellt unter Verwendung eines organischen Lösungsmittels oder eines wässrigen organischen Lösungsmittels. Während die bevorzugte Konzentration der nach dem Verfahren hergestellten Verbindung zur Verwendung als Zellzyklusinhibitor generell im Bereich von etwa 1 bis etwa 100 µg/ml liegt, variiert die am meisten geeignete Menge in Abhängigkeit von der Art des verwendeten Zellkultursystems und des Verwendungszwecks, wie dem Fachmann bekannt ist. Zudem kann es für den Fachmann notwendig erscheinen oder bevorzugt sein, für bestimmte Verwendungen eine Menge außerhalb des vorher genannten Bereichs zu verwenden.

**[0095]** Von einer pharmazeutischen Perspektive aus stellen bestimmte Ausführungsformen Verfahren für die Prävention oder Behandlung von Pilzinfektionen und/oder pathogenen Pilzen in einem Patienten bereit, wobei dem Patienten eine Zusammensetzung enthaltend ein Dehydrophenylahistin oder sein Analog verabreicht wird, beispielsweise ein Dehydrophenahistin oder sein Analog in einer Menge und in einer Weise, die den beabsichtigten Effekt herbeiführt.

**[0096]** Andere Ausführungsformen umfassen die Behandlung oder Prävention einer Infektion eines Patienten durch einen pathogenen Pilz, wie beispielsweise solche oben angeführten, oder solche, auf die unten Bezug genommen wird.

**[0097]** Eine weitere Ausführungsform bezieht sich auf die Behandlung oder die Prävention der Infektion eines Patienten durch einen pathogenen Pilz, der resistent gegen eines oder mehrere antifungale Agenzien ist, speziell ein Agens außer Dehydrophenylahistin oder seinem Analog, umfassend z. B. Amphotericin B oder Analoga oder Derivate davon (einschließlich 14(s)-Hydroxyamphotericin B-methylester, das Hydrazid von Amphotericin B mit 1-amino-4-methylpiperazin und anderen Derivaten) oder andere Polyenmakrolid-Antibiotika, einschließlich z. B. Nystatin, Kandicidin, Pimaricin und Natamycin; Flucytosin; Griseofulvin; Echinokandine oder Aureobasidine, einschließlich natürlich vorkommender und semisynthetischer Analoge; Dihydrobenzo[a]naphthacenchinone; Nukleosidpeptid-Antipilzmittel einschließlich die Polyoxine und Nikkomycine; Allylamine wie etwa Naftifin und andere Squalenepoxidase-Inhibitoren; und Azole, Imidazole und Triazole wie etwa z. B. Clotrimazol, Miconazol, Ketoconazol, Econazol, Butoconazol, Oxiconazol, Terconazol, Itraconazol oder Fluconazol und Ähnliche. Zusätzliche konventionelle antifungale Agenzien und neue Agenzien in der Entwicklung finden sich in z. B. Turner und Rodriguez, 1996 Current Pharmaceutical Design, 2: 209–224. Eine weitere Ausführungsform umfasst die Behandlung oder Prävention einer Infektion einer Patienten mit einem pathogenen Pilz in Fällen, in denen der Patient allergisch oder auf andere Weise intolerant gegenüber einem oder mehreren antifungalen Agenzien ist oder auf diese nicht anspricht oder in welchem die Verwendung von anderen antifungalen Agenzien aus anderen Gründen kontraindiziert ist. Diese anderen antifungale Agenzien umfassen unter anderem solche antifungale Agenzien, wie sie oben und an anderen Stellen hierin offenbart werden.

**[0098]** In den vorangegangenen Verfahren für die Behandlung oder Prävention wird dem Patienten ein Dehydrophenylahistin oder sein Analog in einer wirksamen antifungale Menge verabreicht.

**[0099]** Andere Ausführungsformen betreffen die Behandlung oder Prävention einer Infektion durch einen pathogenen Pilz in einem Patienten durch Verabreichung von Dehydrophenylahistin oder seinem Analog in Verbindung mit der Verabreichung von einem oder mehreren antifungalen Agenzien, einschließlich z. B. jegliches der vorher genannten Agenzien oder Typen von Agenzien (z. B. in Kombination mit der Behandlung mit Amphotericin B, bevorzugt in einer Lipid- oder Liposomenzubereitung; einem Azol oder Triazol z. B. Fluconazol; einem Aureobasidin; Dihydrobeno[a]naphacenchinon; oder einem Echinokardin) ebenso wie mit einem anderen Dehydrophenylahistin oder seinem Analog.

**[0100]** Das Dehydrophenylahistin oder sein Analog kann vor, nach oder gleichzeitig mit dem anderen antifungalen Agens verabreicht werden. In bestimmten Ausführungsformen kann diese Kombinationstherapie die Verwendung von verringerten Mengen einer der beiden antifungalen Komponenten relativ zu der Menge bei alleiniger Verwendung ermöglichen.

**[0101]** Wiederum andere Ausführungsformen betreffen die Verabreichung eines Dehydrophenylahistins oder seines Analogs zur Behandlung oder Prävention einer Infektion eines Patienten mit einem pathogenen Pilz, wobei der Patient immunsupprimiert ist oder über ein geschwächtes Immunsystem verfügt, z. B. als Resultat einer genetischen Fehlstörung, einer Erkrankung wie Diabetes oder HIV oder einer anderen Infektion, einer Chemotherapie oder Bestrahlungsbehandlung bei Krebs oder anderen Krankheiten, einer Arzneimittel- oder anderweitig induzierten Immunsuppression in Verbindung mit Gewebe- oder Organtransplantationen oder der Behandlung einer Autoimmunerkrankung. Wenn der Patient mit einem immunsuppressiven Agens behandelt wird oder behandelt werden wird, z. B. in Verbindung mit einer Gewebe- oder Organtransplantation, kann ein Dehydrophenylahistin oder sein Analog zusammen mit dem/den immunsuppressiven Agens/Agenzien verabreicht werden, um eine Infektion mit einem pathogenen Pilz zu behandeln oder dieser vorzubeugen.

**[0102]** Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft die Behandlung oder die Prävention einer Infektion mit einem pathogenen Pilz in einem Patienten, der mit HIV infiziert ist oder in Verdacht steht, mit HIV infiziert zu sein, durch die Verabreichung eines antifungalen Dehydrophenylahistins oder seines Analogs in Verbindung mit der Verabreichung von einem oder mehreren anti-HIV-Therapeutika (einschließlich z. B. HIV-Proteaseinhibitoren, reverse Transkriptaseinhibitoren oder antivirale Agenzien). Das Dehydrophenylahistin oder sein Analog können vor, nach oder gleichzeitig mit dem/den anti-HIV-Agens/Agenzien verabreicht werden.

**[0103]** Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung ist die Behandlung oder Prävention von Infektionen durch einen pathogenen Pilz in einem Patienten durch Verabreichung von einem antifungalen Dehydrophenylahistin oder seinem Analog in Verbindung mit der Verabreichung von einem oder mehreren anderen antibiotischen Verbindungen, speziell einem oder mehreren antibakteriellen Agenzien, bevorzugt in einer Menge und im Rahmen eines Heilprogramms, das für die Behandlung oder Vorbeugung von bakteriellen Infektionen wirksam ist. Wiederum kann das Dehydrophenylahistin oder sein Analog vor, nach oder gleichzeitig mit dem/den anderen Agens/Agenzien verabreicht werden.

**[0104]** Pathogene Pilzinfektionen, die mit den offensichtlichen Verfahren behandelt oder denen vorgebeugt werden kann, umfassen u. a. Aspergillose, einschließlich invasive pulmonare Aspergillose; Blastomycose, einschließlich profunde oder rasch fortschreitende Infektionen und Blastomycose im zentralen Nervensystem; Kandidiase, einschließlich retrograde Kandidiase des Harnwegs, z. B. in Patienten mit Nierensteinen, Harnwegsverschluss, Nierentransplantationen oder schlecht kontrollierter Diabetes mellitus; Coccidioidomycose, einschließlich chronische Erkrankungen, die nicht gut auf andere Chemotherapie ansprechen; Cryptococcosis; Histoplasmosis; Mucormycose, einschließlich z. B. kraniofaciale Mucormycose und pulmonare Mucormycose; Paracoccidioidomycose; und Sporotrichose. Es sollte erwähnt werden, dass die Verabreichung einer Zusammensetzung umfassend eine antifungale Menge eines oder mehrerer Dehydrophenylahistine oder ihrer Analoga insbesondere für die Behandlung oder die Prävention einer Infektion mit einem pathogenen Pilz in einem Säugetier geeignet ist, wenn der Pilz resistent gegenüber einer oder mehreren antifungaler Therapien ist, oder wo die Verwendung einer oder mehrerer antifungaler Therapien kontraindiziert ist, z. B. wie oben erläutert.

**[0105]** Antifungale pharmazeutische Zusammensetzungen, die wenigstens ein antifungales Dehydrophenylahistin oder sein Analog enthalten, werden ebenso für die Ausübung der offensichtlichen Verfahren bereitgestellt. Solche pharmazeutischen Zusammensetzungen können zusammen mit einer geeigneten Packungsbeilage abgepackt werden, die inter alia Anweisungen und Informationen betreffend ihre antifungale Verwendung enthalten können. Ebenso werden pharmazeutische Zusammensetzungen bereitgestellt, die ein oder mehrere Dehydrophenylahistine oder ihre Analoga zusammen mit einem zweiten antifungalen Agens enthalten.

## Verfahren für die Behandlung von Pilzinfektionen

**[0106]** Bestimmte hierin offenbare Ausführungsformen betreffen Verfahren für die Behandlung oder Prävention einer pathogenen Pilzinfektion, einschließlich z. B. Aspergillose einschließlich invasive pulmonare Aspergillose; Blastomycose, einschließlich profunde oder rasch fortschreitende Infektionen und Blastomycose im zentralen Nervensystem; Kandidiase, einschließlich retrograde Kandidiase des Harnwegs, z. B. in Patienten mit Nierensteinen, Harnwegsverschluss, Nierentransplantationen oder schlecht kontrollierter Diabetes mellitus; Coccidioidomycose einschließlich chronische Erkrankungen, die nicht gut auf andere Chemotherapie ansprechen; Cryptococcose; Histoplasmosis; Mucormycose einschließlich z. B. kraniofaciale Mucormycose und pulmonare Mucormycose; Paracoccidioidomycose; und Sporotrichose. Die Verfahren können die Verabreichung wenigstens eines antifungalen Dehydrophenylahistins oder seines Analogs, wie oben beschrieben, umfassen, so dass in einem humanen Patienten die fungale Infektion behandelt oder ihr vorgebeugt wird. In bestimmten Ausführungsformen kann das Dehydrophenylahistin oder sein Analog in Verbindung mit der Verabreichung von einem oder mehreren Nicht-Dehydrophenylahistin oder seinen analogen antifungalen Agenzien wie z. B. Amphotericin B oder einem Imidazol oder einem Triazolagenz wie oben beschrieben, verabreicht werden.

**[0107]** Die pathogene Pilzinfektion kann topisch sein, z. B. verursacht durch, neben anderen Organismen, Spezies von *Candida*, *Trichophyton*, *Microsporum* oder *Epidermophyton* oder sie kann mucosal sein, z. B. verursacht durch *Candida albicans* (z. B. Soormycose und vaginale Kandidiase). Die Infektion kann systemisch sein, z. B. verursacht durch *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma* oder *Blastomyces* spp. Die Infektion kann auch eumycotische Mycetoma, Chromoblastomycose, cryptococcale Meningitis oder Phycomycose umfassen.

**[0108]** Weitere Ausführungsformen betreffen Verfahren für die Behandlung oder Prävention einer pathogenen Pilzinfektion ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *Candida* spp. einschließlich *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei* und *C. galbrata*; *Aspergillus* spp. einschließlich *A. fumigatus* und *A. flavus*; *Cryptococcus neoformans*; *Blastomyces* spp. einschließlich *Blastomyces dermatitidis*, *Pneumocystis caninii*, *Coccidioides immitis*; *Basidiobolus ranarum*; *Conidiobolus* spp.; *Histoplasma capsulatum*; *Rhizopus* spp. einschließlich *R. oryzae* und *R. microsporus*; *Cunninghamella* spp.; *Rhizomucor* spp.; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Pseudallescheria boydii*; *Rhinosporidium seeberi*; und *Sporothrix schenckii*. Wiederum kann das Verfahren die Verabreichung eines nicht-immunosuppressiven antifungalen Dehydrophenylahistins oder seines Analogs an einen geeigneten Patienten beinhalten, so dass die Pilzinfektion behandelt oder ihr vorgebeugt wird, ohne dass ein unpassender immunsuppressiver Effekt induziert wird.

**[0109]** Weitere Ausführungsformen betreffen Verfahren für die Behandlung oder Prävention einer pathogenen Pilzinfektion, welche resistent gegenüber anderen antifungalen Therapien ist, einschließlich pathogene Pilzinfektionen, die resistent gegenüber einem oder mehreren antifungalen Agenzien, wie sie bereits hierin beschrieben wurden, wie z. B. Amphotericin B, Flucytosin, eines der Imidazole oder Triazole (einschließlich z. B. Fluconazol, Ketoconazol, Itraconazol und die anderen vorher genannten Beispiele) sind. Diese Verfahren können umfassen, dem Patienten eine oder mehrere antifungale Dehydrophenylahistin oder seine Analoga in einer Menge und in einem Dosierungsregime zu verabreichen, die eine Behandlung oder Prävention einer Pilzinfektion mit Resistenz gegenüber anderen antifungalen Therapien in einem Patienten ermöglicht.

**[0110]** Weitere Ausführungsformen betreffen Verfahren für die Behandlung oder Prävention einer pathogenen Pilzinfektion in einem Patienten, der allergisch gegenüber, intolerant gegenüber oder nicht-ansprechend gegenüber anderen antifungalen Therapie ist, oder in dem die Verwendung anderer antifungaler Agenzien anderweitig kontraindiziert ist, umfassend eines oder mehrere andere antifungale Agenzien, die anderweitig hierin genannt werden, wie z. B. Amphotericin B, Flucytosin, eines der Imidazole oder Triazole (einschließlich z. B. Fluconazol, Ketoconazol, Itraconazol und die anderen vorher genannten Beispiele). Die Verfahren können die Verabreichung von einem oder mehrerer antifungaler Dehydrophenylahistin oder ihrer Analoga eines Patienten beinhalten, in einer Menge, durch die eine Pilzinfektion behandelt oder ihr vorgebeugt wird.

## Abgepacktes Dehydrophenylahistin oder seine Analoga

**[0111]** Bestimmte Ausführungsformen betreffen abgepackte Dehydrophenylahistin oder seine Analoga, bevorzugt abgepacktes, nicht-immunosuppressive antifungales Dehydrophenylahistin oder seine Analoga, wobei beabsichtigt ist, dass dieser Begriff wenigstens ein Dehydrophenylahistin oder sein Analog wie oben beschrieben abgepackt mit Instruktionen zur Verabreichen des Dehydrophenylahistins oder seines Analogs/Analoga als ein antifungales Agens, das keinen unpassenden immunsuppressive Effekte in einem menschlichen

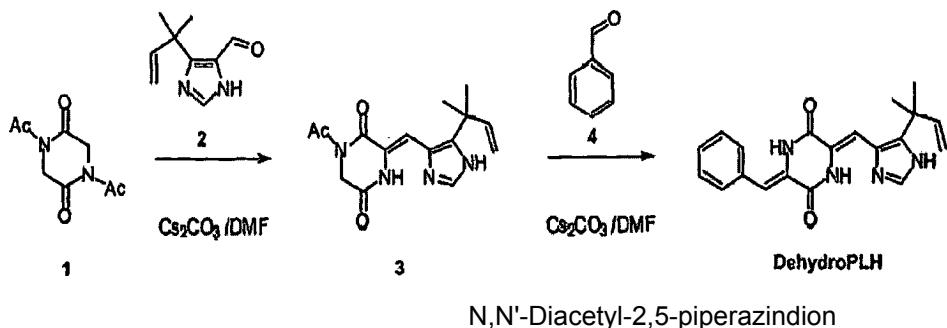
Patienten auslöst, umfasst. In einigen Ausführungsformen ist das nicht-immunosuppressive, antifungale Dehydrophenylahistin oder sein Analog ein Mitglied von bevorzugten Untergruppen („preferred subsets“) der oben beschriebenen Verbindungen. Das Dehydrophenylahistin oder sein Analog kann allein mit der Beschreibung verpackt werden oder kann mit einem anderen Dehydrophenylahistin oder seinem Analog verpackt werden, mit Rapamycin oder einem anderen Inhaltsstoff oder Additiv, z. B. einem oder mehreren der Inhaltsstoffe der pharmazeutischen Zusammensetzungen verpackt werden. Die Packung kann einen oder mehrere Behälter gefüllt mit einem oder mehreren der Inhaltsstoffe der pharmazeutischen Zusammensetzung enthalten. Dem Behälter bzw. den Behältern kann ggf. ein Hinweis in der Form wie er von einer staatlichen Behörde vorgeschrieben ist beigelegt sein, der die Herstellung, Verwendung oder Vermarktung von pharmazeutischen oder biologischen Produkten vorschreibt, welcher Hinweis die Zulassung durch die Behörde für solche Herstellung, Verwendung oder Vermarktung für die humane Verabreichung angibt.

**[0112]** Die folgenden nicht limitierenden Beispiele sollen die bevorzugten Verfahren unter Verwendung bestimmter bevorzugter Ausführungsformen beschreiben. Abwandlungen in Abweichungen von den Einzelheiten der einzelnen verwendeten Verfahren und der erhaltenen präzisen chemischen Zusammensetzungen sind dem Fachmann zweifellos bekannt.

#### BEISPIEL 1

##### A. Synthese von Dehydrophenylahistin

**[0113]** Dehydrophenylahistin wurde durch Kondensation gemäß des folgenden Grundreaktionsschemas, wie in [Fig. 1](#) gezeigt, synthetisiert:



**[0114]** 25,0 g global 2,5-Piperazindion 1 [2,5-Piperazindion (Aldrich G640-6), 25,0 g, 0,218 mol] in 100 ml Essigsäureanhydrid ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) wurde gemischt mit Natriumacetat ( $\text{NaOAc}$ ) (17,96 g, 0,0218 mol). Das Gemisch wurde auf 110°C für 8 h unter einer Ar-Atmosphäre unter Verwendung eines doppelt gewendeten Dampfkondensators erhitzt. Nachdem das  $\text{Ac}_2\text{O}$  durch Evaporation entfernt wurde, wurde der Rückstand in  $\text{AcOEt}$  gelöst und jeweils dreimal mit 10% Zitronensäure, 10%  $\text{NaHCO}_3$  und gesättigter  $\text{NaCl}$  gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und in *vacuo* konzentriert. Der Rückstand wurde mit Ether trituriert, um einen Feststoff zu bilden. Dieser Feststoff wurde aus  $\text{EtOAc}$  über Ether-Hexan rekristallisiert und erbrachte 26,4 g (61%) des N,N'-Diacetal-2,5-piperazindion 1.

##### 1-Acetyl-3-[(Z)-1-[5-(1,1-Dimethyl-2-propenyl)-1H-4-imidazolyl]methylidene]-2,5-piperazindion 2

**[0115]** Zu einer Lösung von 5-(1,1-Dimethyl-2-propenyl)imidazol-4-carbaldehyd (100 mg, 0,609 mmol) in DMF (2 ml) wurde Verbindung 1 (241 mg, 1,22 mmol) zugegeben und die Lösung wurde wiederholt kurzzeitig evakuiert, um Sauerstoff zu entfernen und mit Ar gespült, gefolgt von der Addition von  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (198 mg, 0,609 mmol) und der Evakuierungs-Spülprozess wurde nochmals wiederholt. Das resultierende Gemisch wurde für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel durch Evaporation entfernt wurde, wurde der Rückstand in einem Gemisch von  $\text{EtOAc}$  und 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  gelöst und die organische Phase wieder mit 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und dreimal mit gesättigter  $\text{NaCl}$  gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und in *vacuo* konzentriert. Das daraus resultierende Öl wurde durch Säulenchromatographie auf Silikabasis unter Verwendung von  $\text{CHCl}_3$ - $\text{MeOH}$  (100:0 bis 50:1) als Eluant aufgereinigt und ergab 60 mg (33%) eines blassgelben Feststoffes 2.

##### Dehydrophenylahistin

**[0116]** Zu einer Lösung von 2 (30 mg, 0,099 mmol) in DMF (0,8 ml) wurde Benzaldehyd (51  $\mu\text{l}$ , 0,496 mmol, 5 eq) gegeben und die Lösung wurde wiederholt kurzzeitig evakuiert, um Sauerstoff zu entfernen und mit Ar

gespült, gefolgt von der Addition von  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (53 mg, 0,149 mmol, 1,5 eq) und der Evakuierungs-Spülprozess wurde nochmals wiederholt. Das resultierende Gemisch wurde für 2,5 h bei 80°C erhitzt. (Die Temperatur muss langsam erhöht werden. Schnelles Erhitzen erhöht die Produktion des E-Isomers an der Benzyliden-Einheit). Nachdem das Lösungsmittel durch Evaporation entfernt wurde, wurde der Rückstand in EtOAc gelöst und mit Wasser zweimal gewaschen und dreimal mit saturierter NaCl gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und in *vacuo* konzentriert. Bei Dünnschichtchromatographie (TLC) unter Verwendung von  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (10:1) kann ein Fleck mit hellgrün-gelber Lumineszenz bei 365 nm UV beobachtet werden. Laut HPLC-Analyse war die Reinheit dieses Rohproduktes größer als 75%. Der resultierende Rückstand wurde in 90% MeOH aq gelöst und auf eine Umkehrphasen-HPLC-Säule (YMC-Pack, ODS-AM, 20 × 250 mm) aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 70 bis 74% MeOH in Wasser über 16 min bei einer Flussrate von 12 ml/min eluiert, und die gewünschte Fraktion wurde gesammelt und durch Evaporation konzentriert, was 19,7 mg (60%) eines gelbfarbenen Dehydrophenylahistins ergab. Das HPLC-Profil des synthetischen Roh-Dehydrophenylahistins ist in [Abb. 2](#) dargestellt.

**[0117]** Bei der Aufreinigung von Dehydrophenylahistin, wie in [Abb. 4](#) gezeigt, entsprach einer der prominentesten Peaks der gewünschten Z-Form der Dehydrophenylahistin-Verbindung. Die Bildung eines E-Isomers wurde als unbedeutende Komponente vermerkt (etwa 10%), welche bei einem polareren Peak als das Z-Isomer eluierte. Andere unbedeutende Peaks, die reduzierten Z- und E-Verbindungen, in denen der Dimethylallyl-Teil des Dehydrophenylahistins reduziert war, wurde ebenso beobachtet. Die Bildung dieser reduzierten Verbindungen geschah aufgrund des Aldehyds 2 mit reduzierten Unreinheiten, welche während der Reduktion mit DIBAL-H erzeugt und in den nachfolgenden Prozessen nicht abgetrennt wurden.

**[0118]** Diese Nebenbestandteile können durch präparative HPLC-Aufreinigung entfernt werden, was Dehydrophenylahistin mit der Z-Konfiguration am Benzylidene-Teil mit einer 60%-igen Ausbeute (20% Ausbeute in zwei Schritten) mit mehr als 95% Reinheit hervorbringt. Verbindungen mit E-Konfiguration an der Imidazol-Seite des Diketopiperazin-Rings wurden im HPLC-Diagramm nicht beobachtet, was nahelegt, dass die erste Reaktion von Verbindung 1 bis 3 in [Abb. 1](#) Z-selektiv ist.

## B. Chemische Eigenschaften

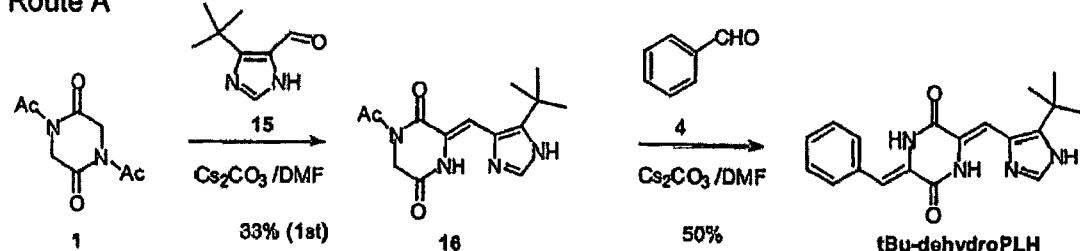
**[0119]** Die oben beschriebene Dehydrophenylahistin-Verbindung ist ein blassgelber Feststoff. Die Struktur wurde durch Standard-NMR-Analyse bestätigt.

### BEISPIEL 2

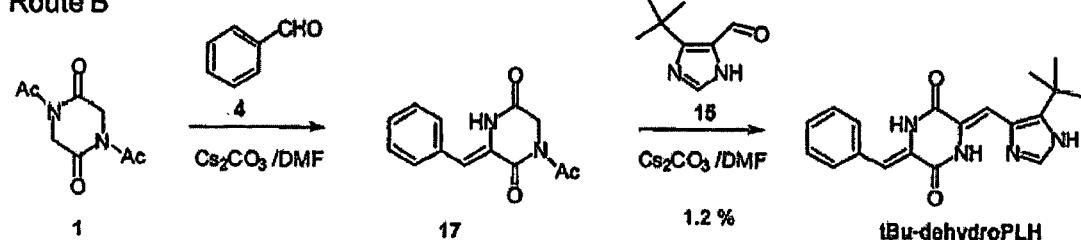
#### Synthese und physikalische Charakterisierung von tBu-Dehydrophenylahistin-Derivaten

**[0120]** Strukturelle Derivate von Dehydrophenylahistin wurde gemäß dem folgenden Reaktionsschema synthetisiert, um tBu-Dehydrophenylahistin herzustellen. Die Synthese durch Route A (siehe [Abb. 1](#)) ist in gewisser Hinsicht ähnlich der Synthese von Dehydrophenylahistin synthetisiert wie in Beispiel 1.

#### Route A



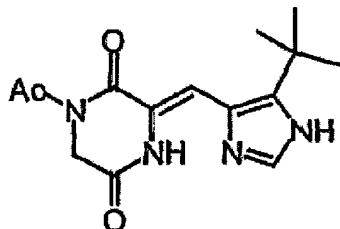
#### Route B



## Route A:

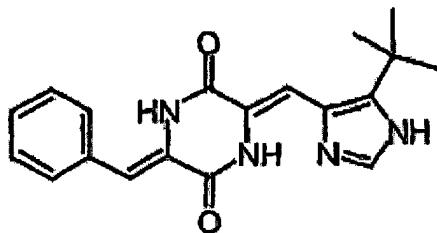
[0121] N,N'-Diacetyl-2,5-piperazindion 1 wurde wie in Beispiel 1 hergestellt.

1) 1-Acetyl-3-*{(Z)-1-[5-tert-butyl-1H-4-imidazolyl]methyliden}*]-2,5-piperazindion (16)



[0122] Zu einer Lösung von 5-tert-butylimidazol-4-carbaldehyd 15 (3,02 g, 19,8 mmol) in DMF (30 ml) Verbindung 1 (5,89 g, 29,72 mmol) gegeben und die Lösung wurde wiederholt kurzzeitig evakuiert, um den Sauerstoff zu entfernen und mit Ar gespült, gefolgt von der Zugabe von  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (9,7 g, 29,72 mmol) und der EvakuierungsSpülprozess wurde erneut wiederholt. Das resultierende Gemisch wurde für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem der Lösungsmittel durch Evaporation entfernt wurde, wurde der Rückstand in einem Gemisch von EtOAc und 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  gelöst und die organische Phase mit 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und anschließend dreimal mit gesättigter NaCl gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und in vacuo konzentriert. Das Restöl wurde durch Säulenchromatographie auf Silikabasis gereinigt unter Verwendung von  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (100:0 bis 50:1) als Eluant und erbrachte 1,90 g (33%) eines blassgelben Feststoffes 16.  $^1\text{H}$  NMR (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) δ 12,14 (d, br-s, 1H), 9,22 (br-s, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,18, (s, 1H), 4,47 (s, 2H), 2,65 (s, 3H), 1,47 (s, 9H).

2) t-Bu-Dehydrophenylahistin



[0123] Zu einer Lösung von 1-Acetyl-3-*{(Z)-1-[5-tert-butyl-1H-4-imidazolyl]methyliden}*]-2,5-piperazindion (16) (11 mg, 0,038 mmol) in DMF (1,0 ml) wurde Benzaldehyd (19 μL, 0,19 mmol, 5 eq) gegeben und die Lösung wurde wiederholt kurzzeitig evakuiert, um Sauerstoff zu entfernen und mit Ar gespült, gefolgt von der Zugabe von  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (43 mg, 0,132 mmol, 3,5 eq) und der Evakuierungs-Spülprozess wurde nochmals wiederholt. Das resultierende Gemisch wurde für 2,5 h bei 80°C erhitzt. Nachdem das Lösungsmittel durch Evaporation entfernt wurde, wurde der Rückstand im EtOAc gelöst, zweimal mit Wasser und dreimal mit saturierter NaCl gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und in vacuo konzentriert. Der resultierende Rückstand wurde in 90% MeOH aq gelöst und auf eine Umkehrphase HPLC-Säule (YMC-Pack, ODS-AM, 20 × 250 mm) aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 70 bis 74% MeOH in Wasser über 16 min bei einer Flussrate von 12 ml/min eluiert und die gewünschte Fraktion wurde gesammelt und durch Evaporation konzentriert, was 6,4 mg (50%) eines gelbfarbenen tert-butyl-Dehydrophenylahistins ergab.  $^1\text{H}$  NMR (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) δ 12,34 (br-s, 1H), 9,18 (br-s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,31–7,49 (m, 5H), 7,01 (s, 2H), 1,46 (s, 9H).

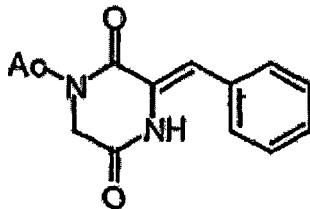
[0124] Die Dehydrophenylahistin-Reaktion zur Herstellung von tBu-Dehydrophenylahistin ist identisch zu Beispiel 1.

[0125] Die Gesamtausbeute des gewonnenen tBu-Dehydrophenylahistins war 16,5%.

## Route B:

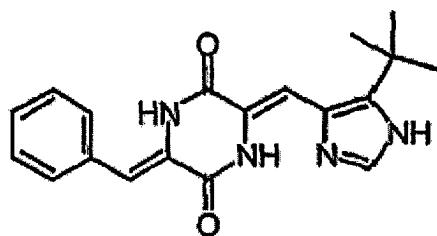
[0126] N,N'-Diacetyl-2,5-piperazindion 1 wurde wie in Beispiel 1 hergestellt.

## 1) 1-Acetyl-3-[(Z)-benzyliden]-2,5-piperazindion (17)



**[0127]** Zu einer Lösung von Benzaldehyd 4 (0,54 g, 5,05 mmol) in DMF (5 ml) wurde Verbindung 1 (2,0 g, 10,1 mmol) zugegeben und die Lösung wurde wiederholt für kurze Zeit evakuiert, um Sauerstoff zu entfernen und mit Ar gespült, gefolgt von der Addition von  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (1,65 g, 5,05 mmol) und der Evakuierungs-Spülprozess wurde erneut wiederholt. Das resultierende Gemisch wurde für 3,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel durch Evaporation entfernt wurde, wurde der Rückstand in einem Gemisch von EtOAc und 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  gelöst und die organische Phase wurde mit 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und anschließend dreimal mit saturierter NaCl gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und in vacuo konzentriert. Der Restfeststoff wurde aus MeOH-Ether rekristallisiert, wobei ein cremefarbener Feststoff von 17 gewonnen wurde; Ausbeute 1,95 g (79%).

## 2) t-Bu-Dehydrophenylahistin



**[0128]** Zu einer Lösung von 1-Acetyl-3-[(Z)-Benzyliden]-2,5-Piperazindion (17) (48 mg, 0,197 mmol) in DMF (1,0 ml) wurde 5-tert-butylimidazol-4-carboxaldehyd 15 (30 mg, 0,197 mmol) gegeben und die Lösung wurde wiederholt kurzzeitig evakuiert, um Sauerstoff zu entfernen und mit Ar gespült, gefolgt von der Addition von  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (96 mg, 0,296 mmol) und der Evakuierungs-Spülprozess wurde erneut wiederholt. Das resultierende Gemisch wurde für 14 h bei 80°C erhitzt. Nachdem das Lösungsmittel durch Evaporation entfernt wurde, wurde der Rückstand in EtOAc gelöst, zweimal mit Wasser und dreimal mit saturierter NaCl gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und in vacuo konzentriert. Der resultierende Rückstand wurde in 90% MeOH aq gelöst und auf eine Umkehrphase-HPLC-Säule (YMC-Pack, ODS-AM, 20 × 250 mm) aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 70 bis 74% MeOH in Wasser über 16 min bei einer Flussrate von 12 ml/min eluiert, und die gewünschte Fraktion wurde gesammelt und durch Evaporation konzentriert, was 0,8 mg (1,2%) eines gelbfarbigen tert-butyl-Dehydrophenylahistins ergab.

**[0129]** Die Gesamtausbeute des gewonnenen tBu-Dehydrophenylahistins war 0,9%.

**[0130]** Das HPLC-Profil des synthetischen Roh-tBu-Dehydrophenylahistins von Route A und von Route B ist in [Abb. 4](#) dargestellt.

**[0131]** Zwei weitere tBu-Dehydrophenylahistin-Derivate wurden gemäß des Verfahrens von Route A synthetisiert. Bei der Synthese der zusätzlichen tBu-Dehydrophenylahistin-Derivate wurden Modifikationen der Benzaldehyd-Verbindung 4 vorgenommen.

**[0132]** [Abb. 4](#) zeigt die Ähnlichkeiten der HPLC-Profile (Säule: YMC-Pack ODS-AM (20 × 250 mm); Gradient: 65% bis 75% in einem Methanol-Wasser-System für 20 min, anschließend 10 min in einem 100%-Methanol-System; Flussrate: 12 ml/min; O.D. 230 nm) des synthetisierten Dehydrophenylahistins aus Beispiel 1 ([Abb. 2](#)) und der oben beispielhaft erläuterten tBu-Dehydrophenylahistin-Verbindung hergestellt durch Route A.

**[0133]** Die Reihenfolge des Einfügens von Aldehyden ist relevant für die Ausbeute und ist deswegen ein Gesichtspunkt bei der Synthese. Als Kontrolle bzw. Modell wurde ein Analog von Dehydrophenylahistin synthetisiert, worin die Dimethylallylgruppe zu einer tert-butyl-Gruppe geändert wurde, die über eine gleichartige sterische Hinderung an der 5-Position des Imidazol-Rings verfügte.

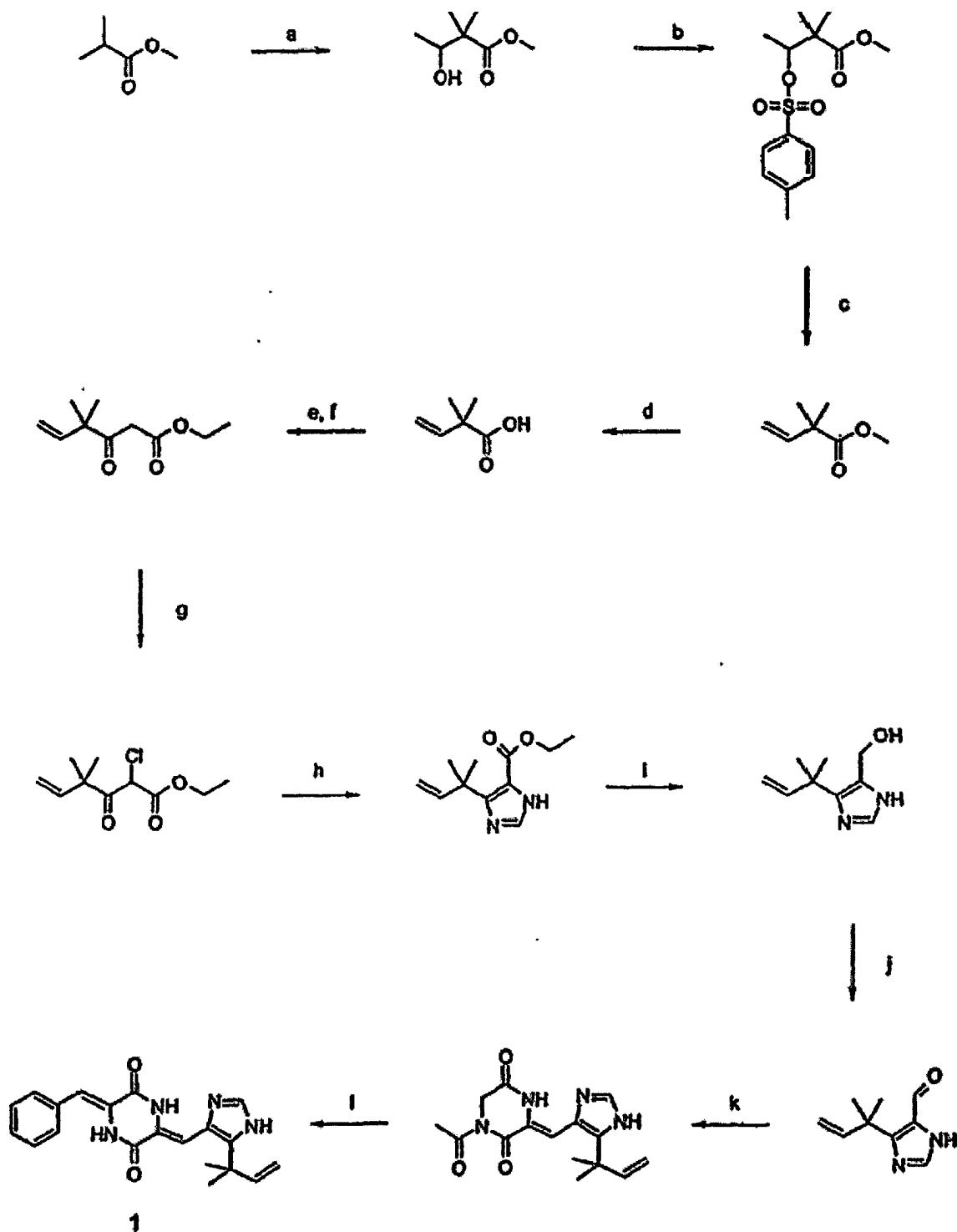
**[0134]** Diese Synthese dieses "tert-butyl(tBu)-Dehydrophenylahistin" unter Verwendung der "Route A" war wie oben gezeigt. Insbesondere die Abfolge des Einfügens der Aldehyde folgte exakt der Dehydrophenylahistin-Synthese, und führte zu einer Gesamtausbeute von 16,5% tBu-Dehydrophenylahistin. Diese Ausbeute war ähnlich wie die von Dehydrophenylahistin (20%). Bei der Verwendung von "Route B", wo die Reihenfolge des Einfügens der Aldehyde entgegengesetzt zu der von Route "A" der Dehydrophenylahistin-Synthese, wurde nur eine sehr geringe Menge („trace amount“) des gewünschten tBu-DehydroPLH mit einer Gesamtausbeute von 0,9% erhalten, obwohl das Einfügen des ersten Benzaldehyds 4 eine Ausbeute von 76% der Intermediärverbindung 17 ergab. Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass es schwierig sein kann, die hochgradig voluminösen Imidazol-4-carboxaldehyde 15 mit einer Austauschgruppe mit einem quartären Kohlenstoff an der benachbarten 5-Position des Imidazol-Rings in die Intermediärverbindung 17 einzufügen, was nahe legt, dass die Reihenfolge des Einfügens der Aldehyde ein wichtiger Gesichtspunkt für die Erlangung einer hohen Ausbeute von Dehydrophenylahistin oder einem Analogon von Dehydrophenylahistin bei der Verwendung der hier offenbarten Synthese darstellt.

**[0135]** Bei der HPLC-Analyse der Roh-Endprodukte, wie in [Abb. 4](#) gezeigt, wurde in der finalen Roh-Probe von Route A (links) ein sehr hoher Gehalt von tBu-Dehydrophenylahistin und eine geringe Menge von Nebenprodukt-Bildungen beobachtet. Allerdings wurden in der Probe, die durch Route B (rechts) erhalten wurde, eine relativ geringere Menge des gewünschten tBu-Dehydrophenylahistins und mehrere andere Nebenprodukte beobachtet.

## BEISPIEL 3

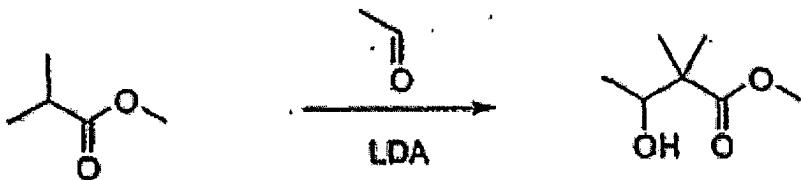
Alternative Synthese von Dehydrophenylahistin und Analogen im größeren Maßstab

Synthese von 3-Z-Benzyliden-6-[5"-(1,1-dimethylallyl)-1H-imidazol-4"-Z-ylmethylen]piperazin-2,5-dion [Dehydrophenylahistin] (1)



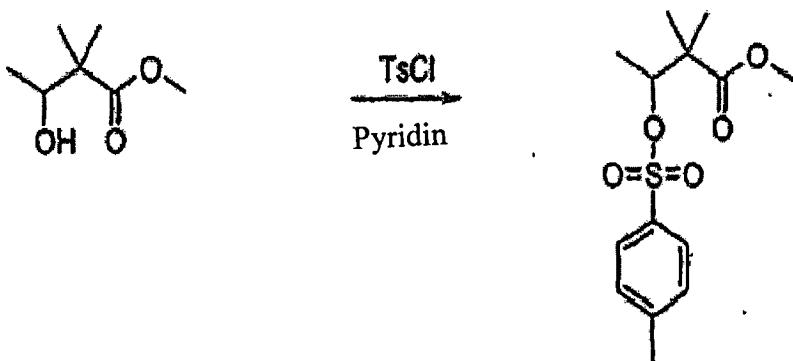
Reagenzien: a) LDA,  $\text{CH}_3\text{CHO}$ ; b) Tos-Cl, Pyridin; c) DBU; d) NaOH; e)  $\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$ ; f)  $\text{KOOCC}_2\text{H}_5\text{COOEt}$ , BuLi; g)  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ; h)  $\text{H}_2\text{NCHO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ; i)  $\text{LiAlH}_4$ ; j)  $\text{MnO}_2$ ; k) 1,4-Diacetyl-piperazin-2,5-dion,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ; l) Benzaldehyd,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$

## 3-Hydroxy-2,2-dimethyl-buttersäure-methylester



**[0136]** Eine LDA-Lösung in Heptan/THF/Ethylbenzen (2 M, 196 ml, 0,39 mol) wurde unter Argon zu einer Methylisobutyrat-Lösung (45 ml, 0,39 mol) in THF (270 ml) bei  $-60^{\circ}$  und das resultierende Gemisch wurde für 30 min gerührt. Eine auf  $-60^{\circ}$  vorgekühlte Acetaldehyd-Lösung (27 ml, 0,48 mol) in THF (45 ml) wurde langsam zugegeben und die resultierende Lösung wurde für weitere 30 min gerührt. Gesättigtes Ammoniumchlorid (50 ml) wurde zugegeben und der Lösung wurde ermöglicht, Raumtemperatur anzunehmen. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat extrahiert und die Extrakte mit HCl (2 M), Natriumbicarbonat und Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, gefiltert und dann evapiert und ergab ein klares Öl (52,6 g). Die Destillation bei 76–82°/30 mmHg ergab reinen 3-Hydroxy-2,2-dimethylbuttersäuremethylester (42,3 g, 74%). (Burk et al., J. Am. Chem. Soc., 117: 4423–4424 (1995).  
 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,15 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3H); 1,17 (s, 6H); 2,66 (d,  $J = 6,2$  Hz, 1H, -OH); 3,71 (s, 3H, -OMe); 3,87 (app quintet,  $J = 6,4$  Hz, 1H, H3).

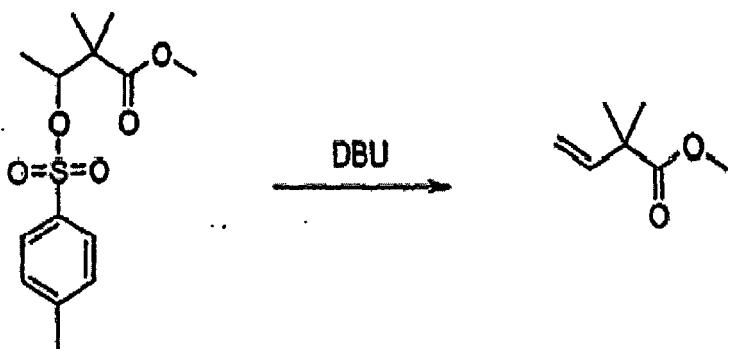
## 2,2-Dimethyl-3-(toluol-4-sulfonyloxy)-buttersäure-methylester



**[0137]** Zu einer gekühlten ( $0^{\circ}$ ) Lösung von 3-Hydroxy-2,2-dimethylbuttersäure-methylester (52,0 g, 0,36 mol) in Pyridin (100 ml) wurde schrittweise p-Toluolsulfonylchlorid (69,0 g, 0,36 mol) gegeben. Das Gemisch konnte Raumtemperatur annehmen und wurde für 60 h gerührt. Die Reaktion wurde erneut mit Eis gekühlt und durch Zugabe von HCl (2 M) angesäuert. Die resultierende Lösung wurde mit Ethylacetat extrahiert und die Extrakte wurden mit HCl, dann Kochsalzlösung, gewaschen, getrocknet und evapiert, und ergaben ein Öl, welches, nachdem es stehengelassen wurde, ein weißes Präzipitat bildete. Dieses Gemisch wurde in der minimalen Menge von Ethylacetat gelöst und Petrolether wurde dann zugegeben, um ein weißes Präzipitat hervorzubringen, welches gesammelt und mit weiterem Petrolether gewaschen wurde. Das Filtrat wurde partiell evapiert und ein zweiter Kristallanschluss wurde gesammelt und zu dem ersten gegeben, um 2,2-Dimethyl-3-(toluol-4-sulfonyloxy)buttersäure-methylester (81,2 g, 76%) zu erhalten.  
 $^1\text{H}$  NMR (400 NMz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,12 (s, 3H); 1,13 (s, 3H); 1,24 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H); 2,45 (s, 3H, -PhMe) 3,58 (s, 3H, -OMe); 4,94 (quartet,  $J = 6,4$  Hz, 1H, H3), 7,33 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 7,78 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H).

**[0138]** Die Evaporation des Endfiltrats ergab zusätzlich Roh-2,2-Dimethyl-3-(toluol-4-sulfonyloxy)buttersäure-methylester (19,0 g, 18%).

## 2,2-Dimethyl-but-3-en-säure-methylester



**[0139]** Eine Lösung von 2,2-Dimethyl-3-(toluol-4-sulfonyloxy)-buttersäure-methylester (18,06 g, 0,06 mol) in DBU (15 ml) wurde für 3,5 h auf 140–160° erhitzt. Das Gemisch konnte anschließend auf Raumtemperatur abkühlen und wurde dann mit Ether verdünnt. Das Gemisch wurde mit HCl (1 M), Natriumbicarbonat und anschließend Kochsalzlösung gewaschen. Die Etherphase wurde getrocknet und partiell evaporiert, um eine konzentrierte Lösung von 2,2-Dimethyl-but-3-en-säure-methylester (10 g) zu ergeben. (Savu und Katzenellenbogen, J. Org. Chem., 46: 239–250 (1981)). Eine weitere Evaporation wurde durch die Flüssigkeitseigenschaften des Produkts (Siedepunkt 102°) verhindert. (Tsaconas et al., Aust. J. Chem., 53: 435–437 (2000)).  
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,31 (s, 6H); 3,68 (s, 3H); 5,06 (d, J = 17,1 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5,11 (d, J = 10,7 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 6,03 (dd, J = 17,1, 10,7 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>).

## 2,2-Dimethyl-but-3-en-säure



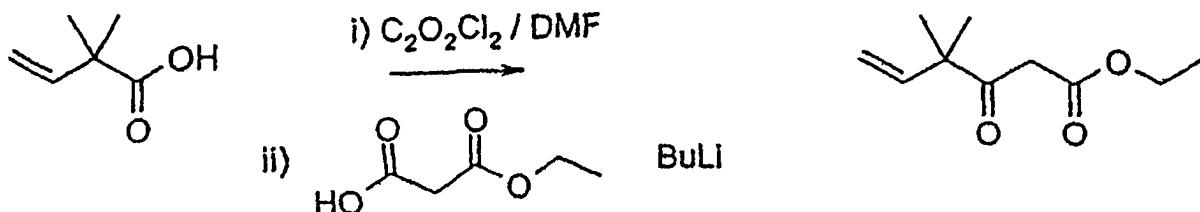
**[0140]** Die oben genannte Etherlösung von 2,2-Dimethyl-but-3-en-Säure-Methylester (10 g) wurde mit Ethanol (25 ml) verdünnt und nach Zugabe von Natriumhydroxid (4 M, 22 ml) wurde das Gemisch über Nacht gerührt. Die Lösung wurde partiell evaporiert, um Ethanol zu entfernen und das resultierenden Gemisch wurde zu HCl (1 M, 100 ml) gegeben. Das Produkt wurde mit Ethylacetat extrahiert und die Extrakte wurden getrocknet und evaporiert, um 2,2-Dimethyl-but-3-en-säure (6,01 g, 88% 2 Stufen) zu ergeben. (Hayashi et al., J. Org. Chem., 65: 8402–8405 (2000)).  
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,33 (s, 6H); 5,11 (d, J = 10,8 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5,15 (d, J = 17,2 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 6,05 (dd, J = 17,2, 10,8 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>).

**[0141]** Monoethylhydrogenmalonat (Wierenga und Skulnick, „Aliphatic and Aromatic β-keto Esters from Monoethyl Malonate: Ethyl 2-Butyrylacetate,” Organic Syntheses Collective Volume 7, 213).



**[0142]** Ethylkaliummalonat (25,0 g, 0,15 mol) wurde in Wasser (15,6 ml) suspendiert und in einem Eisbad gekühlt. Konzentrierte HCl (12,5 ml) wurde tropfenweise über 30 min. dazugegeben und das Gemisch anschließend für weitere 10 min. gerührt. Das Präzipitat wurde gefiltert und zwei Mal mit Ether gewaschen. Das Filtrat wurde getrennt und die wässrige Phase wurde mit Ether extrahiert. Die kombinierten Ether-Lösungen wurden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und evaporiert, um, als ein Öl, Monoethylhydrogenmalonat (19,2 g, 99%) zu erhalten, welches vor der Verwendung über Nacht (oder für 1 h bei 50°/1 mm) vakuumgetrocknet wurde.

## 4,4-Dimethyl-3-oxo-hex-5-en-säure-ethylester

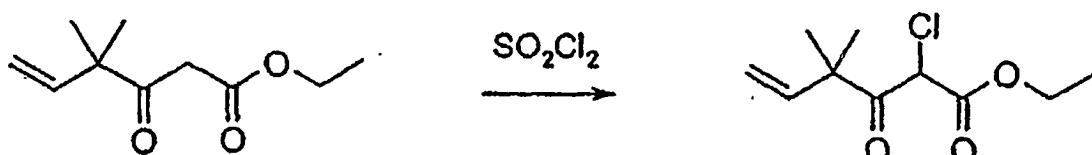


**[0143]** Oxalylchlorid (3,83 ml, 43,9 mmol) wurde tropfenweise zu einer gekühlten (0°) Lösung von 2,2-Dimethyl-but-3-en-Säure (5,0 g, 43,9 mmol) und DMF (1 Tropfen) in wasserfreiem Dichlormethan (25 ml) gegeben. Das Gemisch wurde für 1 h bei 0°, anschließend für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Eine fraktionierende Destillation (121°/760 mmHg) ergab 2,2-Dimethyl-but-3-en-chlorid (4,1 g, 71%).

**[0144]** Monoethylhydrogenmalonat (7,2 g, 0,05 mol) und Bipyridyl (wenige Milligramm) wurden in THF (90 ml) gelöst und das System wurde mit Stickstoff gespült. Die Lösung wurde auf -70° gekühlt und BuLi (2,5 M in Hexanen, 37 ml, 0,09 mol) wurde zugegeben. Nach der Zugabe von nur ~10 ml BuLi wurde die Lösung rosa und zusätzliches THF (15 ml) wurde benötigt, um magnetisches Rühren zu ermöglichen. Das Kühlbad wurde entfernt und das restliche BuLi zugegeben und es wurde zugelassen, dass die Temperatur -10° erreichte, woraufhin die Lösung farblos wurde. Das Gemisch wurde erneut auf -60° gekühlt und eine Lösung von 2,2-Dimethyl-but-3-en-chlorid (4,1 g, 0,03 mol) in THF (12 ml) wurde tropfenweise zugegeben. Nachdem die Zugabe abgeschlossen war, wurde zugelassen, dass das Gemisch 0° erreichte und dann anschließend für 3 h gerührt wurde, dann wurde sie zu einer 1:1-Mischung von Ether/1M HCl (260 ml) bei 0° gegeben und für weitere 1,5 h gerührt. Die organische Phase wurde entfernt, mit HCl (1 M), Natriumbicarbonatlösung und Kochsalzlösung gewaschen, dann getrocknet und evaporiert, um 4,4-Dimethyl-3-oxo-hex-5-en-säure-ethylester (5,6 g, 98%) zu ergeben. (Hayashi et al., J. Org. Chem., 65: 8402–8405 (2000). Die Destillation mit einem Kugelrohrrofen (160°/1 mmHg) ergab reines Material.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,26 (s, 6H); 1,27 (t, J = 6,9 Hz, 3H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,51 (s, 2H); 4,18 (q, J = 6,9 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 5,20 (d, J = 17,7 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5,21 (d, J = 9,6 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5,89 (dd, J = 17,7, 9,6 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>).

## 2-Chlor-4,4-dimethyl-3-oxo-hex-5-en-säure-ethylester



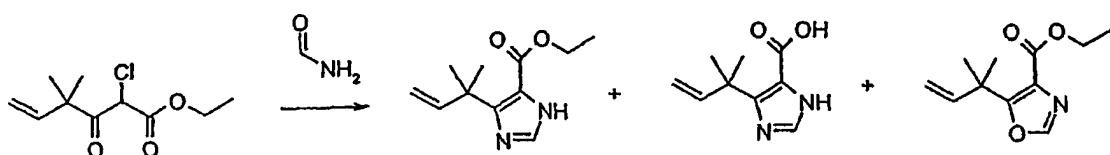
**[0145]** Sulfurylchlorid (0,84 ml, 10,4 mmol) wurde zu einer gekühlten (0°) Lösung von 4,4-Dimethyl-3-oxo-hex-5-en-säure-ethylester (1,83 g, 9,93 mmol) in Chloroform (7 ml) gegeben. Das resultierende Gemisch konnte Raumtemperatur annehmen und wurde für 30 min. gerührt, wonach es unter Rückfluss für 2 h erhitzt wurde. Nachdem das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde es mit Chloroform verdünnt, dann mit Natriumbicarbonat, Wasser und anschließend Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet und evaporiert um, als braunes Öl, 2-Chlor-4,4-dimethyl-3-oxo-hex-5-en-säure-ethylester (2,01 g, 93%) zu ergeben. (Hayashi et al., J. Org. Chem., 65: 8402–8405 (2000)).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,28 (t, J = 7,0 Hz, 3H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,33 (s, 3H); 1,34 (s, 3H); 4,24 (q, J = 7,0 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 5,19 (s, 1H); 5,28 (d, J = 16,9 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5,29 (d, J = 10,9 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5,96 (dd, J = 16,9, 10,9 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>).

LC/MS t<sub>R</sub> = 8,45 (219,3 [M(Cl)<sup>37</sup>] + H)<sup>+</sup> min.

**[0146]** Dieses Material wurde ohne weitere Aufreinigung reagiert.

## 5-(1,1-Dimethyl-allyl)-3H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester



**[0147]** Eine Suspension aus 2-Chlor-4,4-dimethyl-3-oxo-hex-5-en-säure-ethylester (19,4 g, 0,09 mol) und Wasser (1,94 ml, 0,11 mol) in Formamid (36,8 ml) wurde kurz geschüttelt und dann in 15 Röhrchen à 18 ml aufgeteilt. Die Röhrchen wurden versiegelt und für 5 h bei 150° erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der Inhalt der Röhrchen vereinigt und vollständig mit Chloroform extrahiert. Die Extrakte wurden getrocknet und evaporiert, um eine konzentrierte Formamidlösung (14,7 g) zu ergeben. Diese wurde auf eine Silica-Säule (7 cm Durchmesser, 11 cm Höhe), gepackt in 1% MeOH/1% Et<sub>3</sub>N in Chloroform, aufgetragen. Die Elution von der Säule mit 2 L dieses Gemischs, gefolgt von 2 L 2% MeOH/1% Et<sub>3</sub>N in Chloroform, ergab in den frühen Fraktionen eine Verbindung, von der angenommen wurde, dass es sich um 5-(1,1-Dimethyl-allyl)-oxazol-4-carbonsäure-ethylester (1,23 g, 7%) handelt.

HPLC (214 nm) t<sub>R</sub> = 8,68 (50,4%) min.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,40 (t, J = 7,2 Hz, 3H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,54 (s, 6H); 4,38 (t, J = 7,2 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 5,03 (d, J = 17,4 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5,02 (d, J = 10,4 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 6,26 (dd, J = 17,4, 10,4 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 7,83 (s, 1H).

LCMS t<sub>R</sub> = 8,00 (210,1 [M + H]<sup>+</sup>, 361,1 [2M + H]<sup>+</sup>) min.

**[0148]** Aus später gesammelten Fraktionen wurde das erwünschte 5-(1,1-Dimethyl-allyl)-3H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (3,13 g, 17%) gewonnen. (Hayashi et al., J. Org. Chem., 65: 8402–8405 (2000)).

HPLC (214 nm) t<sub>R</sub> = 5,52 (96,0%) min.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,38 (t, J = 7,0 Hz, 3H); 1,57 (s, 6H); 4,35 (q, J = 7,0 Hz, 2H); 5,04–5,14 (m, 2H, -CH=CH<sub>2</sub>); 6,28 (dd, J = 18,0, 10,4 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 7,52 (s, 1H).

LC/MS t<sub>R</sub> = 5,30 (209,1 [M + H]<sup>+</sup>, 417,2 [2M + H]<sup>+</sup>) min.

**[0149]** Zusätzlicher 5-(1,1-Dimethyl-allyl)-3H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester wurde ebenso von der Säule gewonnen (3,59 g, 19%), welcher zwar von niedrigerer Reinheit war, aber immer noch ausreichend für weitere Reaktion.

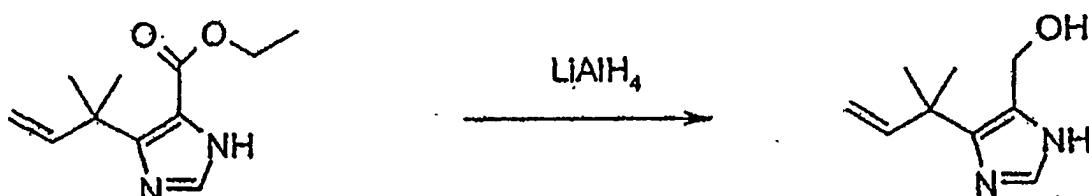
**[0150]** Ein weiteres Nebenprodukt aus einer ähnlichen Reaktion (kleinerer Maßstab), das durch weitere Elution der Säule mit 5% MeOH/1% Et<sub>3</sub>N in Chloroform isoliert wurde, war eine Verbindung, von der angenommen wurde, dass es sich um 5-(1,1-Dimethyl-allyl)-3H-imidazol-4-carbonsäure (0,27 g, 9%) handelte.

HPLC (245 nm) t<sub>R</sub> = 5,14 (68,9%) min.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1,45 (s, 6H); 4,97 (d, J = 10,6 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5,01 (d, J = 17,7 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 6,28 (dd, J = 17,7, 10,6 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 7,68 (s, 1H).

LCMS t<sub>R</sub> = 4,72 (181,0 [M + H]<sup>+</sup>, 361,1 [2M + H]<sup>+</sup>) min.

#### [5-(1,1-Dimethyl-allyl)-3H-imidazol-4-yl]-Methanol



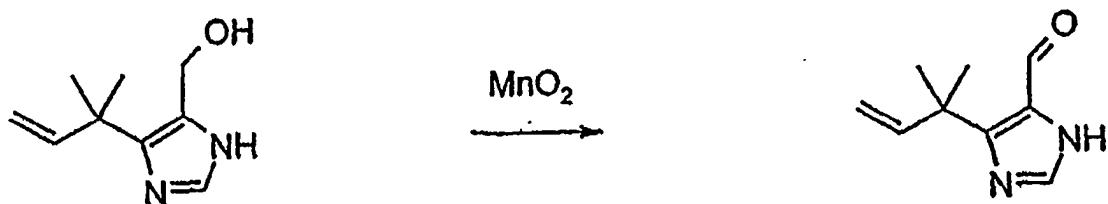
**[0151]** Eine Lösung von 5-(1,1-Dimethyl-allyl)-3H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (3,13 g, 15,0 mmol) in THF (60 ml) wurde tropfenweise zu einer Suspension von Lithiumaluminiumhydrid (95% Suspension, 1,00 g, 25,0 mmol) in THF (40 ml) gegeben und das Gemisch wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Wasser wurde zugegeben, bis die Gasentwicklung aufhörte, das Gemisch wurde für 10 min. gerührt und dann durch einen gesinterten Trichter gefiltert. Das Präzipitat wurde mit THF und dann mit Methanol gewaschen, die Filtrate und Waschungen wurden vereint, evaporiert und dann gefriergetrocknet, um [5-(1,1-Dimethyl-allyl)-3H-imidazol-4-yl]-methanol (2,56 g, 102%) zu ergeben. Verbleibendes Wasser wurde vor einer weiteren Reaktion durch Azeotropierung mit Chloroform entfernt. (Siehe Hayashi et al., J. Org. Chem., 65: 8402–8405 (2000)).

HPLC (240 nm) t<sub>R</sub> = 3,94 (56,8%) min.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1,43 (s, 6H); 4,57 (s, 2H); 5,01 (d, J = 10,5 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5,03 (d, J = 17,7 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 6,10 (dd, J = 17,7, 10,5 Hz, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>); 7,46 (s, 1H).

LC/MS t<sub>R</sub> = 3,77 (167,3 [M + H]<sup>+</sup>) min.

## 5-(1,1-Dimethyl-allyl)-3H-imidazol-4-carbaldehyd



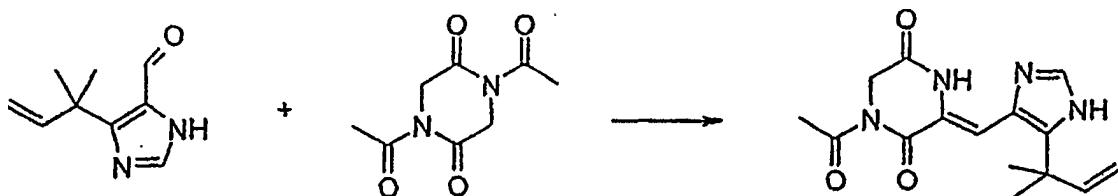
[0152] Mangandioxid (20 g, 0,23 mol) wurde zu einer Lösung von [5-(1,1-Dimethyl-allyl)-3H-imidazol-4-yl]-Methanol (2,56 g, 0,02 mol) in Aceton (300 ml) gegeben und das resultierende Gemisch wurde für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde durch Filterpapier gefiltert und der Rückstand mit Aceton gewaschen. Das Filtrat und die Waschungen wurden vereinigt und evaporiert, um 5-(1,1-Dimethyl-allyl)-3H-imidazol-4-carbaldehyd (1,82 g, 51%) zu ergeben. (Hayashi et al., J. Org. Chem., 65: 8402-8405 (2000)).

HPLC (240 nm)  $t_R$  = 4,08 (91,5%) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,56 (s, 6H); 5,16 (d,  $J$  = 10,6 Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,19 (d,  $J$  = 17,3 Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,22 (dd,  $J$  = 17,3, 10,6 Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 7,75 (s, 1H), 10,02 (s, 1H,  $\text{HCO}$ ).

LC/MS  $t_R$  = 3,75 (165,2  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ) min.

## 1-Acetyl-3-[5'-(1,1-dimethyl-allyl)-1H-imidazol-4'-ylmethylene]piperazin-2,5-dion



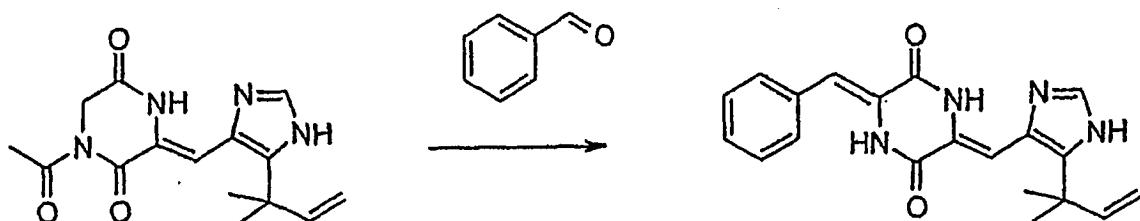
[0153] Zu einer Lösung von 5-(1,1-Dimethyl-allyl)-3H-imidazol-4-carbaldehyd (1,78 g, 0,01 mol) in DMF (35 ml) wurde 1,4-Diacetyl-piperazin-2,5-dion (8,59 g, 0,04 mol) gegeben und die Mischung wurde evakuiert und anschließend mit Argon gespült. Der Evakuierungs-Spül-Prozess wurde zwei weitere Male wiederholt und dann wurde Caesiumcarbonat (3,53 g, 0,01 mol) zugesetzt. Der Evakuierungs-Spül-Prozess wurde weitere drei Male wiederholt, anschließend wurde das resultierende Gemisch für 5 h auf 45° erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde partiell evaporiert (Erwärmen bei hohem Vakuum), bis nur noch ein kleines Volumen vorhanden war, und die resultierende Lösung wurde tropfenweise zu Eiswasser (50 ml) gegeben. Das gelbe Präzipitat wurde gesammelt, mit Wasser gewaschen und dann gefriergetrocknet, um 1-Acetyl-3-[5'-(1,1-dimethyl-allyl)-1H-imidazol-4'-ylmethylene]piperazin-2,5-dion (1,18 g, 36%) zu ergeben. (Hayashi, Personal Communication (2001)).

HPLC (214 nm)  $t_R$  = 6,01 (72,6%) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,53 (s, 6H); 2,64 (s, 3H); 4,47 (s, 2H); 5,19 (d,  $J$  = 17,3 Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,23 (d,  $J$  = 10,7 Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,06 (dd,  $J$  = 17,3, 10,7 Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 7,16 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 9,47 (bs, 1H); 12,11 (bs, 1H) [~2% 1,4-Diacetyl-piperazin-2,5-dion Verunreinigung beobachtet  $\delta$  2,59 (s, 6H); 4,60 (s, 4H).]

LC/MS  $t_R$  = 6,65 (303,3  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 605,5  $[2\text{M} + \text{H}]^+$ ) min. (n.b. anderes System wurde verwendet)

## 3-Z-Benzyliden-6-[5'-(1,1-dimethylallyl)-1H-imidazol-4'-ylmethylene]-piperazin-2,5-dion



[0154] Zu einer Lösung von 1-Acetyl-3-[5'-(1,1-dimethyl-allyl)-1H-imidazol-4'-ylmethylene]piperazin-2,5-dion (2,91 g, 9,62 mmol) in DMF (70 ml) wurde Benzaldehyd (4,89 ml, 48,1 mmol) gegeben und die Lösung wurde evakuiert und anschließend mit Argon gespült. Der Evakuierungs-Spül-Prozess wurde zwei Male wiederholt, dann wurde Caesiumcarbonat (4,70 g, 14,4 mmol) zugegeben. Der Evakuierungs-Spül-Prozess wurde weitere

drei Male wiederholt, dann wurde das resultierende Gemisch gemäß eines Temperaturgradienten wie unten gezeigt erhitzt.

**[0155]** Nach einer Gesamtzeit von 5 h wurde die Abkühlung der Reaktion auf Raumtemperatur ermöglicht und das Gemisch wurde zu eiskaltem Wasser (500 ml) gegeben. Das Präzipitat wurde gesammelt, mit Wasser (300 ml) gewaschen und dann gefriergetrocknet, um einen gelben Feststoff (2,80 g) zu ergeben. Dieses Material wurde in Chloroform (250 ml) gelöst, durch Filterpapier gefiltert und evaporiert, um das verbleibende Wasser zu azeotropieren. Das resultierende gelbe Präzipitat (2,70 g, HPLC (214 nm)  $t_R = 7,26$  (93,6%) min.) wurde partiell in Chloroform (20 ml) gelöst, die Suspension wurde für 5 min mit Ultraschall behandelt, anschließend wurde der Feststoff gesammelt und luftgetrocknet, um 3-Z-Benzyliden-6-[5"-(1,1-dimethylallyl)-1H-imidazol-4"-Z-ylmethylen]-piperazin-2,5-dion (1,82 g, 54%) zu ergeben (Hayashi, Personal Communication (2001)), m.p. 239–240° (dec.).

HPLC (214 nm)  $t_R = 6,80$  (1,92) min, 7,33 (95,01%)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,53 (s, 6H); 5,18 (d,  $J = 17,6$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,21 (d,  $J = 11,0$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,06 (dd,  $J = 17,6$ , 11,0 Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,99 (s, 1H,  $-\text{C}-\text{C}=\text{CH}$ ), 7,00 (s, 1H,  $-\text{C}-\text{C}=\text{CH}$ ); 7,30–7,50 (m, 5  $\times$  ArH); 7,60 (s, H<sup>2"</sup>); 8,07 (bs, NH); 9,31 (bs, NH); 12,30 (bs, NH).

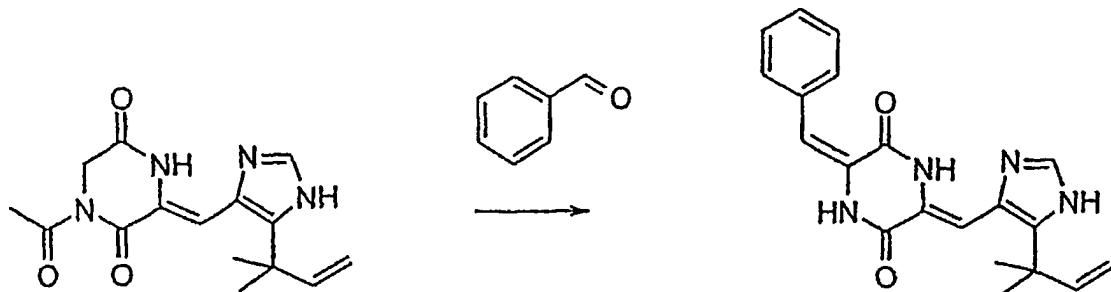
LC/MS  $t_R = 6,22$  (349,3 [M + H]<sup>+</sup>, E-Isomer), 6,73 (349,5 [M + H]<sup>+</sup>, 697,4 [2M + H]<sup>+</sup>, Z-Isomer) min.

ESMS m/z 349,5 [M + H]<sup>+</sup>, 390,3 [M +  $\text{CH}_4\text{CN}$ ]<sup>+</sup>

**[0156]** Die Evaporation der Chloroform-Lösung ergab zusätzliches 3-Z-Benzyliden-6-[5"-(1,1-dimethylallyl)-1H-imidazol-4"-Z-ylmethylen]-piperazin-2,5-dion (0,76 g, 29%).

HPLC (214 nm)  $t_R = 7,29$  (84,5%) min.

3-E-Benzyliden-6-[5"-(1,1-dimethylallyl)-1H-imidazol-4"-Z-ylmethylen]-piperazin-2,5-dion



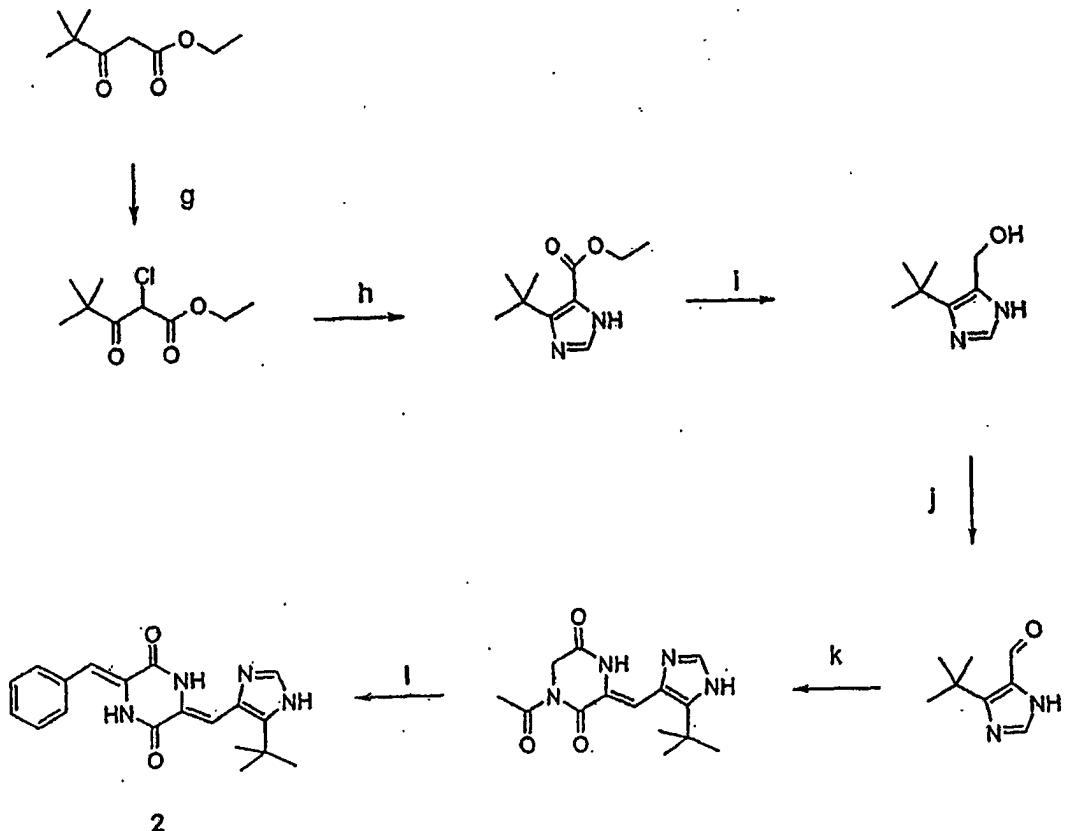
**[0157]** Die präparative HPLC-Aufreinigung einer Roh-Probe des wie oben synthetisierten Materials ergab das geometrische Isomer 3-E-Benzyliden-6-[5"-(1,1-dimethylallyl)-1H-imidazol-4"-Z-ylmethylen]-piperazin-2,5-dion (1,7 mg).

HPLC (214 nm)  $t_R = 6,75$  (87,79%) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,52 (s, 6H); 5,19 (d,  $J = 20,8$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 5,22 (d,  $J = 14,0$  Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,05 (dd,  $J = 18,0$ , 10,4 Hz, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ); 6,33 (s, 1H,  $-\text{C}-\text{C}=\text{CH}$ ), 6,90–7,65 (m, 7H).

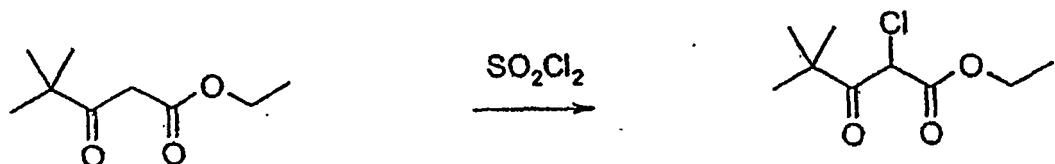
ESMS m/z 349,5 [M + H]<sup>+</sup>, 390,4 [M +  $\text{CH}_4\text{CN}$ ]<sup>+</sup>

## Synthese von 3-Z-Benzyliden-6-(5"-tert-butyl-1H-imidazol-4"-Z-ylmethylen)-piperazin-2,5-dion (2)



Reagentien: g)  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ ; h)  $\text{H}_2\text{NCHO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ; i)  $\text{LiAlH}_4$ ; j)  $\text{MnO}_2$ ; k) 1,4-Diacetyl-piperazin-2,5-dion,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ; l) Benzaldehyd,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$

## 2-Chlor-4,4-dimethyl-3-oxo-pentansäure-Ethylester



**[0158]** Sulfurylchlorid (14,0 ml, 0,17 mol) wurde zu einer gekühlten ( $0^\circ$ ) Lösung von Ethylpivaloylacetat (27,17 g, 0,16 ml) in Chloroform (100 ml) gegeben. Das resultierende Gemisch konnte Raumtemperatur annehmen und wurde für 30 min gerührt, wonach es unter Rückfluss für 2,5 h erhitzt wurde. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit Chloroform verdünnt und dann mit Natriumbicarbonat, Wasser und Kochsalzlösung gewaschen.

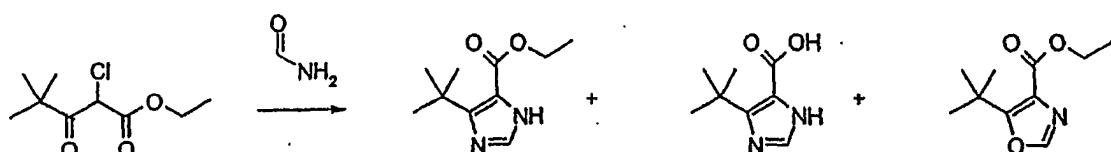
**[0159]** Die organische Phase wurde getrocknet und evaporiert, um, als ein klares Öl, 2-Chlor-4,4-dimethyl-3-oxo-pentansäure-ethylester (33,1 g, 102%) zu erhalten. (Durant et al., "Aminoalkylimidazoles and Process for their Production." Patent No. GB 1341375 (Großbritannien, 1973)).

HPLC (214 nm)  $t_R = 8,80$  (92,9%) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,27 (s, 9H); 1,29 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H); 4,27 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H); 5,22 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13,8, 26,3, 45,1, 54,5, 62,9, 165,1, 203,6.

## 5-tert-Butyl-3H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester



**[0160]** Eine Lösung aus 2-Chlor-4,4-dimethyl-3-oxo-pentansäure-ethylester (25,0 g, 0,12 mol) in Formamid (47,5 ml) und Wasser (2,5 ml) wurde geschüttelt und dann in 15 Röhrchen 8 ml aufgeteilt. Alle Röhrchen wurden versiegelt und dann für 3,5 h auf 150° erhitzt. Die Röhrchen konnten anschließend Raumtemperatur annehmen, dann wurde Wasser (20 ml) zugegeben und das Gemisch wurde vollständig mit Chloroform extrahiert. Das Chloroform wurde entfernt, um eine konzentrierte Formamid-Lösung (22,2 g) zu ergeben, welche auf eine Silica „flash“-Säule (6 cm Durchmesser, 12 cm Höhe) gepackt in 1% MeOH/1% Et<sub>3</sub>N in Chloroform aufgetragen wurde. Die Elution der Säule mit 2,5 L dieses Gemisches gefolgt von 1 L von 2% MeOH/1% Et<sub>3</sub>N in Chloroform ergab, in den frühen Fraktionen, ein Produkt, von dem angenommen wurde, dass es sich um 5-tert-Butyl-oxazol-4-carbonsäure-ethylester (6,3 g, 26%) handelte.

HPLC (214 nm) t<sub>R</sub> = 8,77 min.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,41 (t, J = 7,2 Hz, 3H); 1,43 (s, 9H); 4,40 (q, J = 7,2 Hz, 2H); 7,81 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 14,1, 28,8, 32,5, 61,3, 136,9, 149,9, 156,4, 158,3.

ESMS m/z 198,3 [M + H]<sup>+</sup>, 239,3 [M + CH<sub>4</sub>CN]<sup>+</sup>.

LC/MS t<sub>R</sub> = 7,97 (198,1 [M + H]<sup>+</sup>) min.

**[0161]** Aus späteren Fraktionen wurde 5-tert-Butyl-3H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (6,20 g, 26%) gewonnen. (Durant et al., "Aminoalkylimidazoles and Process for their Production." Patent No. GB 1341375 (Großbritannien, 1973)).

HPLC (214 nm) t<sub>R</sub> = 5,41 (93,7%) min.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,38 (t, J = 7,0 Hz, 3H); 1,47 (s, 9H); 4,36 (q, J = 7,2 Hz, 2H); 7,54 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13,7, 28,8, 32,0, 59,8, 124,2, 133,3, 149,2, 162,6.

ESMS m/z 197,3 [M + H]<sup>+</sup>, 238,3 [M + CH<sub>4</sub>CN]<sup>+</sup>.

**[0162]** Die weitere Elution der Säule mit 1 L von 5% MeOH/1% Et<sub>3</sub>N ergab eine Verbindung, von der angenommen wurde, dass es sich um 5-tert-Butyl-3H-imidazol-4-carbonsäure (0,50 g, 2%) handelt.

HPLC (245 nm) t<sub>R</sub> = 4,68 (83,1%) min.

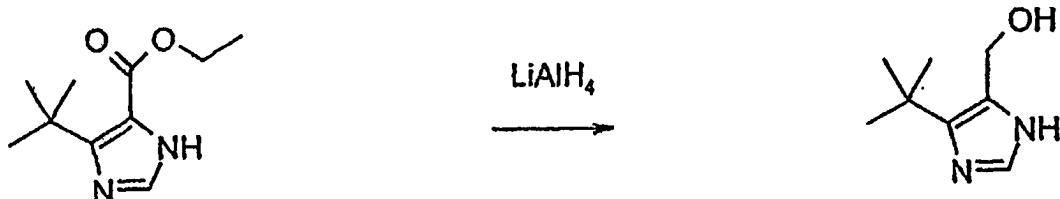
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1,36 (s, 9H); 7,69 (s, 1H).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,37 (s, 9H); 7,74 (s, 1H).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>SO) δ 1,28 (s, 9H); 7,68 (s, 1H).

ESMS m/z 169,2 [M + H]<sup>+</sup>, 210,4 [M + CH<sub>4</sub>CN]<sup>+</sup>.

(5-tert-Butyl-3H-imidazol-4-yl)-methanol



**[0163]** Eine Lösung von 5-tert-Butyl-3H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester (3,30 g, 16,8 mmol) in THF (60 ml) wurde tropfenweise zu einer Suspension von Lithiumaluminiumhydrid (95% Suspension, 0,89 g, 22,2 mmol) in THF (40 ml) gegeben und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 3 h gerührt. Wasser wurde hinzugegeben, bis die Bildung von Gas endete, das Gemisch wurde für 10 min gerührt und dann durch einen gesinterten Trichter gefiltert. Das Präzipitat wurde mit THF und dann mit Methanol gewaschen und das Filtrat und die Wäschen kombiniert und evaporiert. Der Rückstand wurde über Nacht gefriergetrocknet, um als weißen Feststoff (5-tert-Butyl-3H-imidazol-4-yl)-methanol (2,71 g, 105%) zu erhalten. (Durant et al., "Aminoalkylimidazoles and Process for their Production." Patent No. GB 1341375 (Großbritannien, 1973)).

HPLC (240 nm) t<sub>R</sub> = 3,70 (67,4%) min.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1,36 (s, 9H); 4,62 (s, 2H); 7,43 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 31,1, 33,0, 57,9, 131,4, 133,9, 140,8.

LC/MS t<sub>R</sub> = 3,41 (155,2 [M + H]<sup>+</sup>) min.

**[0164]** Dieses Material wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

## 5-tert-Butyl-3H-imidazol-4-carbaldehyd



**[0165]** Mangandioxid (30 g, 0,35 mol) wurde zu einer heterogenen Lösung von (5-tert-butyl-3H-imidazol-4-yl)-methanol (4,97 g, 0,03 mol) in Aceton (700 ml) gegeben und das resultierende Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 4 h gerührt. Das Gemisch wurde durch ein Celite-Kissen ("pad of Celite") gefiltert und das Kissen wurde mit Aceton gewaschen. Das Filtrat und die Waschungen wurden vereinigt und evaporiert. Der Rückstand wurde mit Ether trituriert, um als farblosen Feststoff 5-tert-butyl-3H-imidazol-4-carbaldehyd (2,50 g, 51%) zu erhalten. (Hayashi, personal communication (2000)).

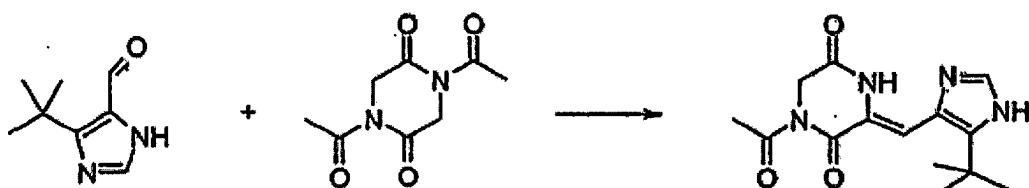
HPLC (240 nm)  $t_R$  = 3,71 (89,3%) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,48 (s, 9H); 7,67 (s, 1H); 10,06 (s, 1H)

LC/MS  $t_R$  = 3,38 (153,2  $[\text{M} + \text{H}]^+$  min.

**[0166]** Die Evaporation des Filtrates der Trituration ergab zusätzliches 5-tert-Butyl-3H-imidazol-4-carbaldehyd (1,88 g, 38%).

## 1-Acetyl-3-(5'-tert-butyl-1H-imidazol-4'-Z-ylmethylen)-piperazin-2,5-dion



**[0167]** Zu einer Lösung von 5-tert-butyl-3H-imidazol-4-carbaldehyd (2,50 g, 164,4 mmol) in DMF (50 ml) wurde 1,4-Diacetyl-piperazin-2,5-dion (6,50 g, 32,8 mmol) gegeben und die Lösung wurde evakuiert und anschließend mit Argon gespült. Der Evakuierungs-Spülprozess wurde zwei weitere Male wiederholt, anschließend wurde Cäsiumcarbonat (5,35 g, 16,4 mmol) zugegeben. Der Evakuierungs-Spülprozess wurde weitere drei Male wiederholt, anschließend wurde das resultierende Gemisch für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde partiell evaporiert (Hitze und Hochvakuum), bis nur ein kleines Volumen übrig blieb und die resultierende Lösung wurde tropfenweise zu Wasser (100 ml) gegeben. Das gelbe Präzipitat wurde gesammelt, anschließend gefriergetrocknet, um 1-Acetyl-3-(5'-tert-butyl-1H-imidazol-4'-Z-ylmethylen)-piperazin-2,5-dion (2,24 g, 47%). (Hayashi, personal communication (2000)) zu erhalten.

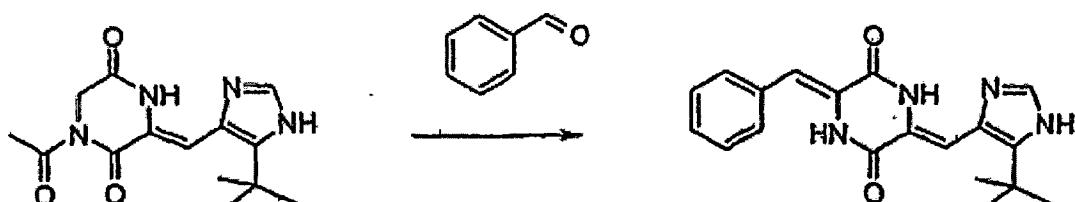
HPLC (214 nm)  $t_R$  = 5,54 (94,4%) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,47 (s, 9H); 2,65 (s, 3H), 4,47 (s, 2H); 7,19 (s, 1H); 7,57 (s, 1H), 9,26 (s, 1H), 12,14 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  27,3; 30,8; 32,1; 46,5; 110,0; 123,2; 131,4; 133,2; 141,7; 160,7; 162,8; 173,0.

LC/MS  $t_R$  = 5,16 (291,2  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 581,6  $[\text{2M} + \text{H}]^+$  min.

## 3-Z-Benzyliden-6-(5"-tert-butyl-1H-imidazol-4"-Z-ylmethylen)-piperazin-2,5-dion



**[0168]** Zu einer Lösung von 1-Acetyl-3-(5'-tert-butyl-1H-imidazol-4'-Z-ylmethylen)-piperazin-2,5-dion (2,43 g, 8,37 mmol) in DMF (55 ml) wurde Benzaldehyd (4,26 ml, 41,9 mmol) gegeben und die Lösung wurde evakuiert und anschließend mit Stickstoff gespült. Der Evakuierungs-Spülprozess wurde zwei weitere Male wiederholt, anschließend wurde Cäsiumcarbonat (4,09 g, 12,6 mmol) zugegeben. Der Evakuierungs-Spülprozess wurde drei weitere Male wiederholt, anschließend wurde das resultierende Gemisch gemäß eines Temperaturgradi-

enten wie unter gezeigt erhitzt. Nach einer Gesamtzeit von 5 h konnte die Reaktion Raumtemperatur annehmen und das Gemisch wurde zu eiskaltem Wasser (400 ml) gegeben. Das Präzipitat wurde gesammelt, mit Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet, um einen gelben Feststoff (2,57 g, HPLC (214 nm)  $t_R = 6,83$  (83,1%) min) zu ergeben. Das Material wurde in Chloroform (100 ml) gelöst und evaporiert, um verbleibendes Wasser zu azeotropieren, wobei ein braunes Öl entstand. Dieses wurde in Chloroform (20 ml) gelöst und in Eis gekühlt. Nach 90 min wurde das gelbe Präzipitat gesammelt und luftgetrocknet, um 3-Z-Benzyliden-6-(5"-tert-butyl-1H-imidazol-4"-Z-ylmethylene)-piperazin-2,5-dion (1,59 g, 56%) zu ergeben. (Hayashi, personal communication (2000)).

HPLC (214 nm)  $t_R = 6,38$  (2,1%), 6,80 (95,2) min.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1,46 (s, 9H); 7,01 (s, 1H, -C-C=CH); 7,03 (s, 1H, -C-C=CH); 7,30–7,50 (m, 5H, Ar); 7,60 (s, 1H); 8,09 (bs, NH); 9,51 (bs, NH); 12,40 (bs, NH).

LC/MS  $t_R = 5,84$  (337,4  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , E-Isomer, 6,25 (337,4  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 673,4  $[2\text{M} + \text{H}]^+$ , Z-Isomer) min.

ESMS m/z 337,3  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 378,1  $[\text{M} + \text{CH}_4\text{CN}]^+$ .

**[0169]** Die Evaporation der Chloroformlösung ergab zusätzliches 3-Z-Benzyliden-6-(5"-tert-butyl-1H-imidazol-4"-Z-ylmethylene)-piperazin-2,5-dion (0,82 g, 29%). HPLC (214 nm)  $t_R = 6,82$  (70,6%) min.

#### Allgemeine experimentelle Bedingungen ("General experimental")

**[0170]** Natriumbicarbonat bezieht sich auf eine 5%-ige Lösung.

**[0171]** Sofern nicht anderweitig angegeben, wurden organische Lösungsmittel über Natriumsulfat getrocknet.

#### Analytische Bedingungen

##### NMR-Bedingungen

**[0172]**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz)-Analyse wurde in einer Varian Inova Unity 400 MHz NMR-Maschine durchgeführt. Der Probenlauf erfolgte in deuteriertem Chloroform, das 0,1% TMS (soweit nicht anderweitig spezifiziert) enthielt. Chemische Verschiebungen (chemical "shifts") (ppm) beziehen sich relativ auf TMS (0,00 ppm) oder  $\text{CH}_3\text{OH}$  bei 3,30 ppm für Probenlauf in  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Die Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) ausgedrückt.

##### Analytische HPLC-Bedingungen

##### System 6-Bedingungen

**[0173]** RP-HPLC wurde auf einer Rainin Microsorb-MV C18 (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ) 50  $\times$  4,6 mm-Säule durchgeführt.

Puffer A:	0,1% wässriger TFA
Puffer B:	0,1% TFA in 90% wässriger MeCN
Gradient:	0–100% Puffer B über 11 min
Flussrate:	1,5 ml/min

##### LCMS-Bedingungen

**[0174]** LCMS wurden auf einem Perkin-Elmer Sciex API-100-Instrument durchgeführt.

##### LC-Bedingungen:

##### Umkehrphasen-HPLC-Analyse ("reverse phase HPLC")

Säule:	Monitor 5 $\mu\text{m}$ C18 50 $\times$ 4,6 mm
Lösungsmittel A:	0,1% TFA in Wasser
Lösungsmittel B:	0,085% TFA in 90% wässriger MeCN
Gradient:	0–100% B über 11,0 min
Flussrate:	1,5 ml/min
Wellenlänge:	214 nm

## MS-Bedingungen:

Ionenquelle:	Ionenspray ("ionspray")
Detektion:	Ionenzählung ("ion counting")
Flussrate zum Massenspektrometer:	300 µl/min nach Abspaltung ("split") von der Säule (1,5 ml/min)

## ESMS-Bedingungen

[0175] ESMS wurde auf einem Perkin Elmer/Sciex-API III LC/MS/MS unter Verwendung eines Elektrospray-Einsatzes ("electrospray inlet") durchgeführt.

Lösungsmittel:	0,1% AcOH in 60% wässriger MeCN
Flussrate:	25 µl/min
Ionenspray:	5000 V
Messblende ("orifice plate"):	55 V
Erfassungszeit:	2,30 min
Abtastbereich:	100–1000 amu/z
Größe der Abtastschritte:	0,2 amu/z

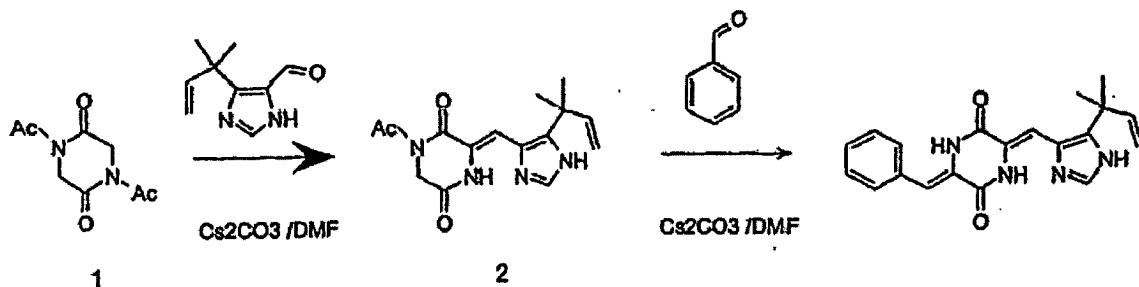
## Präparative RP-HPLC-Aufreinigungsbedingungen

[0176] Umkehrphasen-HPLC-Aufreinigung wurde unter Verwendung von Nebula mit der Waters Xterra-MS-Säule (19 × 50 mm, 5 µm, C18) durchgeführt unter Verwendung der folgenden Bedingungen:

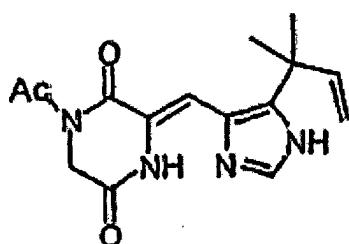
Lösungsmittel A:	0,1% wässriger TFA
Lösungsmittel B:	0,1% TFA in 90% wässriger MeCN
Gradient:	5–95% B über 4 min
Flussrate:	20 ml/min
Wellenlänge:	214 nm

[0177] Abkürzungen sind wie folgt: br s: breites Singlet; BuLi: n-Butyllithium; d: Doublet; DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en; ESMS: Elektrospray Massenspektrometrie; HCl: Salzsäure; HPLC: Hochleistungsflüssigchromatographie; LCMS: Flüssigchromatographiemassenspektrometrie; LD: Lithiumdiisopropylamid; M<sup>+</sup>: molekulares Ion; m: Multiplet; MeCN: Acetonitril; M: Massenspektrometrie; MW: Molekulargewicht; NMR: Kernspinresonanz; q: Quartet; s: Singlet; Triplet; t<sub>R</sub>: Retentionszeit; TFA: Trifluoressigsäure; THF: Tetrahydrofuran

## Detaillierte Prozedur für die Synthese von Dehydrophenylahistin



1-Acetyl-3-[(Z)-1-[5-(1,1-dimethyl-2-propenyl)-1H-4-imidazolyl]methyliden]-2,5-piperazindion (2)



**[0178]** Zu einer Lösung von 5-(1,1-Dimethyl-2-propenyl)imidazol-4-carboxaldehyd (100 mg, 0,609 mmol) in DMF (2 ml) wurde Verbindung 1 (241 mg, 1,22 mmol) gegeben und die Lösung wurde wiederholt für kurze Zeit evakuiert, um Sauerstoff zu entfernen und mit Ar gespült, gefolgt von der Addition von  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (198 mg, 0,609 mmol) und der Evakuierungs-Spülprozess wurde nochmals wiederholt. Das Entfernen von Sauerstoff ist bevorzugt, weil angenommen wird, dass eine solche Entfernung die Oxidation des Alpha-Kohlenstoffs an der Position 6 des Diketopiperazin-Rings verhindert. Das resultierende Gemisch wurde für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel durch Evaporation entfernt wurde, wurde der Rückstand in einem Gemisch von EtOAc und 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  gelöst und die organische Phase wurde einmal mit 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und dreimal mit saturierter NaCl gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  getrocknet und in vacuo konzentriert. Das Restöl wurde über Säulenchromatographie auf Silikabasis aufgereinigt unter Verwendung von  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (100:0 bis 50:1) als Eluant, um 60 mg (33%) des blassgelben Feststoffes 2 zu ergeben.

#### Dehydrophenylahistin

**[0179]** Zu einer Lösung von 2 (30 mg, 0,099 mmol) in DMF (0,8 ml) wurde Benzaldehyd (51  $\mu\text{l}$ , 0,496 mmol, 5 eq) gegeben und die Lösung wurde wiederholt für kurze Zeit evakuiert, um Sauerstoff zu entfernen und mit Ar gespült, gefolgt von der Addition von  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (53 mg, 0,149 mmol), 1,5 eq) und der Evakuierungs-Spülprozess wurde nochmals wiederholt. Das resultierende Gemisch wurde für 2,5 h bei 80°C erhitzt. (Die Temperatur muss langsam erhöht werden. Schnelles Erhitzen erhöht die Produktion des E-Isomers an der Benzyliden-Einheit). Nachdem das Lösungsmittel durch Evaporation entfernt wurde, wurde der Rückstand in EtOAc gelöst, zweimal mit Wasser und dreimal mit saturierter NaCl gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und in vacuo konzentriert. Bei Dünnschicht-Chromatographie (TLC) unter Verwendung von  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (10:1) kann ein Fleck mit hellgrün-gelber Lumineszenz bei 365 nm UV beobachtet werden. Die Reinheit dieses Rohprodukts war größer als 75% nach HPLC-Analyse. Der resultierende Rückstand wurde in 90% MeOH aq gelöst und auf eine Umkehrphase-HPLC-Säule (YMC-Pack, ODS-AM, 20  $\times$  250 mm) aufgetragen und unter Verwendung eines linearen Gradienten von 70 bis 74% MeOH in Wasser über 16 min bei einer Flussrate von 12 ml/min eluiert und die gewünschte Fraktion wurde gesammelt und durch Evaporation konzentriert, um 19,7 mg (60%) des gelb-farbigen Dehydrophenylahistins zu ergeben, obwohl die Ausbeute nicht für jeden Schritt optimiert ist.

#### BEISPIEL 4

##### Biologische Eigenschaften von Dehydrophenylahistin und Dehydrophenylahistin-Analoga

###### A. Biologische Evaluation

**[0180]** Die biologischen Eigenschaften von synthetisiertem tBu-dehydrophenylahistin und Dehydrophenylahistin wurden sowohl in HT29 humanen Dickdarmzellen, als auch in PC-3 Prostata-Adenokarzinomzellen evaluiert.

**[0181]** HT-29 (ATCC HTB-38) aus einem humanen kolorektalen Adenokarzinom wurden in McCoy's complete medium (McCoy's 5A-Medium mit L-Glutamin und 25 mM HEPES ergänzt mit 10% FBS, 1 mM Na-Pyruvat, 1X NEAA, 2 mM L-Glutamin und Pen/Strep bei 100 IU/ml bzw. 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gehalten. PC-3 (ATCC CRL 1435) aus einem humanen Prostata-Adenokarzinom wurden in F12K complete medium (F12K-Medium ergänzt mit 10% FBS; 2 mM Glutamin; 1% HEPES; und Pen/Strep mit 100 IU/ml bzw. 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gehalten. Die Zelllinien wurden bei 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  in einem 95% befeuchteten Inkubator kultiviert.

**[0182]** Für Tumor-Zytotoxizitäts-Versuche wurden HT-29- oder PC-3-Zellen bei 5000 Zellen/Vertiefung in 90  $\mu\text{l}$  Komplettmedium in eine schwarzwandige Corning 3904 Zellkulturplatte mit transparentem Boden ("clear-bottom") ausgesät, und die Platte wurde über Nacht inkubiert, um den Zellen die Etablierung und den Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase zu ermöglichen. 20 mM Stamm-Lösungen von Dehydrophenylahistin und tBu-dehydrophenylahistin wurden in 100% DMSO präpariert und bei -20°C gelagert. 10X konzentrierte serielle Verdünnungen der beiden Verbindungen für Endkonzentrationen zwischen  $20 \times 10^{-5}$  bis  $10^{-10}$  M wurden in geeigneten Zellkulturen präpariert. Zehn  $\mu\text{l}$  Volumen einer 10X seriellen Verdünnung wurden zu den Test-Vertiefungen als Triplikate gegeben und die Platten wurden für 48 Stunden zurück in den Inkubator gebracht. Die Endkonzentration von DMSO in allen Proben betrug 0,25%.

**[0183]** Nach 48 Stunden Einwirkungszeit des Inhaltsstoffs wurden 1001 einer 0,2 mg/ml Resazurin-Lösung, (bezogen von Sigma-Aldrich Chemical Co.) in  $\text{Mg}^{2+}$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem PBS zu jeder Vertiefung gegeben und die Platten wurden für 3–4 Stunden in den Inkubator zurückgebracht. Anschließend wurden die Platten entnommen und die Resazurin-Fluoreszenz wurde unter Verwendung von 530 nm Anregungs- und 590 nm Emissi-

ons-Filtern in einem Fusion-Fluorimeter (Packard Instruments) gemessen. Der Resazurin-Farbstoff ohne Zellen wurde verwendet, um den Leerwert zu bestimmen, der von allen Daten der experimentellen Vertiefungen („wells“) subtrahiert wurde. Die Daten wurden unter Verwendung der Prism-Software (GraphPad Software) analysiert. Die Daten wurden auf Durchschnittswerte von Vertiefungen („wells“), in denen Zellen nur mit Medium behandelt wurden (100% Zellwachstum) normalisiert und EC<sub>50</sub>-Werte wurden unter Verwendung eines an eine sigmoidale Standard-Dosis-Wirkungskurve angepassten Algorithmus ausgewertet.

**[0184]** Wie in Tabelle 1 unten gezeigt, weist tBu-Dehydrophenylahistin eine etwa 4-mal größere zytotoxische Aktivität im Vergleich mit Dehydrophenylahistin auf.

Tabelle 1: Zytotoxische Effekt von Dehydrophenylahistin und Derivat

		Dehydrophenylahistin	tBu-dehydrophenylahistin
		EC <sub>50</sub> (nM)	
Zelle		ΔPLH	tBu-ΔPLH
HT29		48	13
PC-3		5.4	1.0

#### B. Struktur- und Aktivitätsstudie von Dehydrophenylahistinderivaten

**[0185]** Die zytotoxischen Effekte von Phenylahistin, Dehydrophenylahistin und verschiedenen Derivaten von Dehydrophenylahistin wurden in P388 murinen Leukämiezellen, HT-29 humanen Dickdarmzellen und PC-3 Prostata-Adenokarzinomzellen untersucht.

**[0186]** Wie oben beschrieben, wurden HT-29 humane kolorektale Adenokarzinomzellen in McCoy's complete medium (McCoy's 5A-Medium mit L-Glutamin und 25 mM HEPES, ergänzt mit 10% FBS, 1 mM Na-Pyruvat, 1XNEAA, 2 mM L-Glutamin und Pen/Strep mit 100 IU/ml bzw. 100 µg/ml) gehalten. PC-3 aus humanen Prostata-Adenkarzinom wurde in F12K complete Medium (F12K-Medium ergänzt mit 10% FBS; 2 mM Glutamin; 1% HEPES; und Pen/Strep mit 100 IU/ml bzw. 100 µg/ml) gehalten. Die Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in einem 95% befeuchteten Inkubator gehalten.

**[0187]** Für Tumor-Zytotoxizitäts-Versuche wurden HT-29- oder PC-3-Zellen bei 5000 Zellen/Vertiefung in 90 µl Komplettmedium in eine schwarzwandige Corning 3904 Zellkulturplatte mit transparentem Boden ("clear-bottom") ausgesät, und die Platte wurde über Nacht inkubiert, um den Zellen die Etablierung und den Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase zu ermöglichen. 20 mM Stammlösungen von Dehydrophenylahistin und tBu-Dehydrophenylahistin wurden in 100% DMSO präpariert und bei -20°C gelagert. 10X-konzentrierte serielle Verdünnungen der beiden Verbindungen für Endkonzentrationen im Bereich zwischen 20 × 10<sup>-5</sup> M bis 20 × 10<sup>-10</sup> M wurden in geeignetem Kulturmedium präpariert. Zehn µl Volumen der 10X-seriellen Verdünnungen wurden in Triplikaten zu den Testvertiefungen gegeben und die Platten wurden für 48 Stunden in den Inkubator verbracht. Zurückverbracht. Die Endkonzentration von DMSO. betrug 0,25% in allen Proben.

**[0188]** Nach 48 Stunden Einwirkungszeit des Inhaltsstoffs wurden 10 µl einer 0,2 mg/ml Resazurin-Lösung (von Sigma-Aldrich Chemical Co.) in Mg<sup>2+</sup>-, Ca<sup>2+</sup>-freiem PBS zu jeder Vertiefung zugegeben und die Platten wurden für 3–4 Stunden in den Inkubator zurückverbracht. Die Platten wurden entnommen und die Resazurin-Fluoreszenz wurde unter Verwendung von 530 nm Anregungs- und 590 nm Emissions-Filtern in einem Fusion-Fluorimeter (Packard Instruments) gemessen. Der Resazurin-Farbstoff ohne Zellen wurde verwendet, um den Leerwert zu bestimmen, der von allen Daten der experimentellen Vertiefungen subtrahiert wurde. Die Daten wurden unter Verwendung der Prism-Software (GraphPad Software) analysiert. Die Daten wurden auf den Durchschnitt der Zellen, die nur mit Medium behandelt wurden (100% Zellwachstum) normalisiert und EC<sub>50</sub>-Werte wurden unter Verwendung eines an eine Standard-sigmoidale Dosis-Wirkungskurve angepassten

Algorithmus bestimmt.

**[0189]** EC<sub>50</sub>- und IC<sub>50</sub>-Werte von Phenylahistin, Dehydrophenylahistin und Dehydrophenylahistin-Derivaten sind in der unten stehenden Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2. SAR-Studie von Phenylahistin oder Dehydrophenylahistin und von Dehydrophenylahistin-Derivaten

Verbindungen	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)		IC <sub>50</sub> (nM)
		HT-29	PC-3	P-388
(-)-Phenylahistin		1600	n.t.	833 ± 153 (n=5)
KPU-1 tPLH		48	4.7	36 ± 12.8 (n=5)
KPU-2 tBu-tPLH		13	1	31.8 ± 5.0 (n=5)
KPU-6 tBu-tPLH-p-OMe		>2000	n.t.	9333 ± 5457 (n=3)

KPU-8 tBu-tPLH-o-OMe		89		315 ± 137 (n=4)
KPU-9 tBu-tPLH-M-OMe		31		20.8 ± 68 (n=4)
Colchicin	—			208 ± 68 (n=4)

**[0190]** Modifikationen des Phenylrings haben einen signifikanten Effekt auf zytotoxische Aktivitäten. Im Vergleich mit der Aktivität von tBu-Dehydrophenylahistin (#6) zeigt die Methoxygruppe an der Metaposition

(KPU-9) die höchste Aktivität mit einem  $IC_{50}$  von  $20,8 \pm 3,3$  nM in P388-Zellen verglichen mit den anderen Derivaten. Das KPU-9-Derivat zeigte auch Zytotoxizität in HT-29-Zellen ( $EC_{50}$  31 nM). Dehydrophenylahistin, tBu-Dehydrophenylahistin (KPU-2) and das KPU-9-Derivat zeigten allesamt Zytotoxizität in P388-Zellen.

C. Struktur- und Aktivitätsstudie von zusätzlichen Dehydrophenylahistin-Derivaten

**[0191]** Die zytotoxischen Effekte von Phenylahistin, Dehydrophenylahistin und verschiedenen zusätzlichen Derivaten von Dehydrophenylahistin wurden in HT-29 humanen Darmzellen und PC-3 Prostata-Adenokarzinomzellen mit der oben beschriebenen Methodologie untersucht.

Tabelle 3. SAR-Studie von Phenylahistin, Dehydrophenylahistin und von zusätzlichen Dehydrophenylahistin-Derivaten

Verbindungen	Struktur	SALT FORM	M.W.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT-29	PC-3
(-)-Phenylahistin		-	350.41	1600	n.t.
KPU-1 tPLH		-	348.40	48	4.7

Verbindungen	Struktur	SALT FORM	M.W.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-2 tBu- $\beta$ PLH		-	336.39	13	1
KPU-6 tBu- $\beta$ PLH-p-OMe		-	366.41	>2000	n.t.
KPU-8 tBu- $\beta$ PLH-o-OMe		-	366.41	89	
KPU-9 tBu- $\beta$ PLH-m-OMe		-	366.41	31	
KPU-14 tBu- $\beta$ PLH-2,3-diOMe		TFA	396.44 510.46 (+TFA)	610	96%
KPU-12 tBu- $\beta$ PLH-2,4-diOMe		-	396.44	4980	
KPU-10 tBu- $\beta$ PLH-2,5-diOMe		-	396.44	1350	

Verbindungen	Struktur	SALT FORM	M.W.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-15 tBu- <i>i</i> PLH-2,6-diOMe		TFA	396.44 510.46 (+TFA)	4430	96%
KPU-13 tBu- <i>i</i> PLH-3,4-diOMe		-	396.44	2130	
KPU-16 tBu- <i>i</i> PLH-3,5-diOMe		-	396.44	42	82%
KPU-11 tBu- <i>i</i> PLH-3,4,5-triOMe		-	426.47	> 20 μM	
KPU-17 tBu- <i>i</i> PLH-2,3,4-triOMe		TFA	426.47 540.49 (+TFA)	4060	94%
KPU-18 tBu- <i>i</i> PLH-o-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)	42	100%
KPU-19 tBu- <i>i</i> PLH-m-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)	20	98%

Verbindungen	Struktur	SALT FORM	M.W.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-20 tBu-IP LH-p-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)	545	
KPU-21 tBu-IP LH-2Cl-5-NO <sub>2</sub>		TFA	415.83 529.85 (+TFA)	51	100%
KPU-22 tBu-IP LH-3,4-Methylen-dioxy		TFA	380.40 494.42 (+TFA)	82	95%
KPU-23 tBu-IP LH-2-OH-3-OMe (o-Vanillin)		TFA	382.41 496.44 (+TFA)	5870	86%
KPU-24 tBu-IP LH- zyklisch-3-MeO		TFA	364.40 487.42 (+TFA)	7040	100%
KPU-25 tBu-IP LH-4-pyridyl		TFA	337.38 565.42 (+2TFA)	544	96%
KPU-28 tBu-IP LH-2-pyridyl		TFA	337.38 565.42 (+2TFA)	> 20 μM	99%

Verbindungen	Struktur	SALT FORM	M.W.	EC <sub>50</sub> (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-26 tBu- <i>i</i> PLH-2-furyl		TFA	326.35 440.37 (+TFA)	600	88%
KPU-27 tBu- <i>i</i> PLH-5-Me-2-thienyl		TFA	356.44 470.47 (+TFA)	80	97%
KPU-29 tBu- <i>i</i> PLH-3-Me-2-thienyl		TFA	356.44 470.47 (+TFA)	44	81%

## BEISPIEL 5

## Andere Dehydrophenylahistin-Analoga

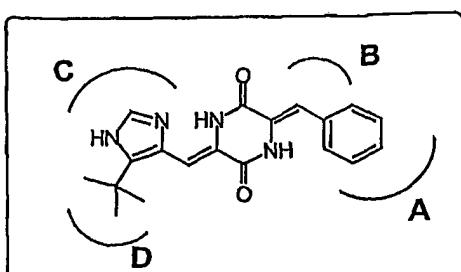
## A. Modifikationen für die Synthese von Dehydrophenylahistin-Derivaten

**[0192]** Andere Derivate von Dehydrophenylahistin werden synthetisiert unter Verwendung der vorher genannten Techniken allein oder in Verbindung mit anderen wohl bekannten Techniken der organischen Synthese.

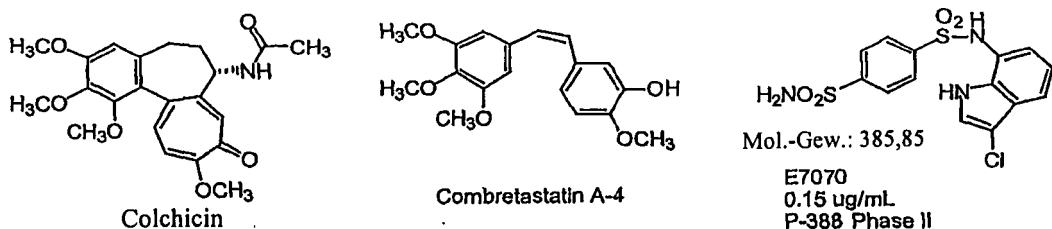
**[0193]** Die Modifikationen des Diacyldiketopiperazins und des ersten und zweiten Aldehyds, die an der Synthese beteiligt sind variieren in Abhängigkeit des zu produzierenden erwünschten Derivats. Es werden Derivate synthetisiert, die:

- A) den Phenylring modifizieren und/oder andere aromatische Ringsysteme einfügen,
- B) die Position des aromatischen Rings ändern,
- C) das aromatische Imidazol-Ringsystem ändern, und/oder
- D) die 5-Position im Imidazol-Ring modifizieren.

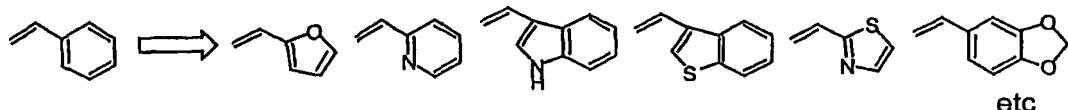
**[0194]** Die Abbildung unten stellt Bereiche der Dehydrophenylahistin-Verbindung dar, die modifiziert wurden, um Derivate von Dehydrophenylahistin herzustellen. Nicht-limitierende Beispiele solcher von Modifikationen werden offenbart und würden vom Fachmann auf der Basis dieser Offenbarung verstanden werden.



A 1) Modifikation des Phenylrings basierend auf der Struktur bekannter anti-Tubulin-Verbindungen  
Alkyl, Halogen, Akoxy, Acetyl, Sulfonamid, Amino, Hydroxyl, Nitro, etc.



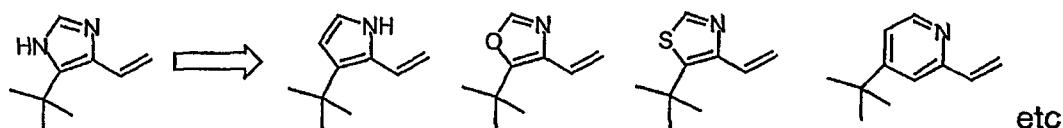
2) Einführung eines anderen aromatischen Ringsystems



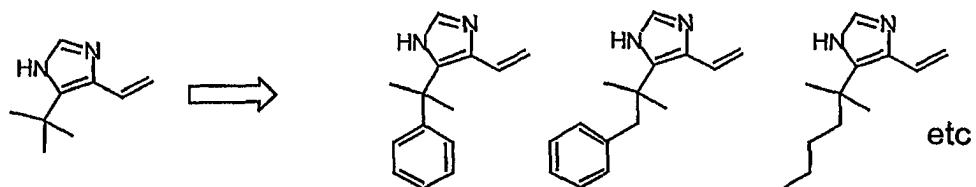
B Position des aromatischen Ringes



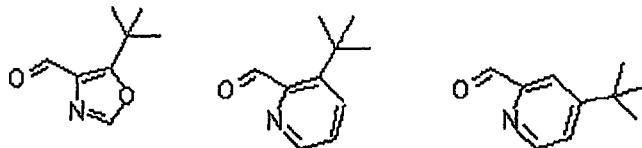
C Wechsel zu einem anderen Ringsystem



D Weitere Modifikationen der 5-Position im Imidazol-Ring



**[0195]** Die obigen Modifikationen der Dehydrophenylahistin-Verbindung erweiternd, können Derivate der Verbindung die folgenden Substitutionen am Phenylring beinhalten (A): -CF<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (-SO<sub>2</sub>NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>), -SO<sub>3</sub>H, -CONH<sub>2</sub> (-CONR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>), -COOH, etc. Andere Ringsysteme (C) können auch die folgenden umfassen:



B. Beispiele für synthetisierte Dehydrophenylahistin-Derivate

**[0196]** Zusätzliche Beispiele für synthetisierte Dehydrophenylahistin-Derivate sind in Tabelle 4 offenbart.

Tabelle 4. Zusätzliche synthetisierte Derivate von Dehydrophenylahistin

Verbindungen	Struktur	SALT FORM	M.W.
KPU-20 tBu- $\beta$ PLH-p-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)
KPU-30 tBu- $\beta$ PLH-2,3-methylendioxy		TFA	380.40 494.42 (+TFA)
KPU-31 tBu- $\beta$ PLH-3-pyridyl		2TFA	337.38 565.42 (+2TFA)
KPU-32 tBu- $\beta$ PLH-o-Me		TFA	350.41 464.44 (+TFA)
KPU-33 tBu- $\beta$ PLH-3-Me-2-pyridyl		2TFA	351.40 579.45 (+2TFA)
KPU-34 tBu- $\beta$ PLH-4-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)
KPU-35 tBu- $\beta$ PLH-m-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)

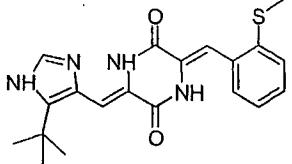
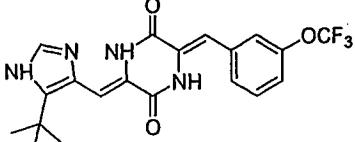
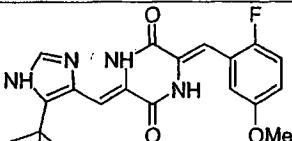
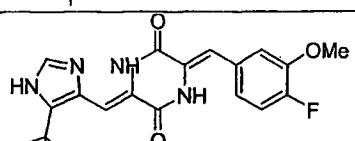
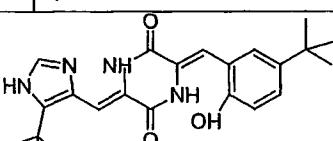
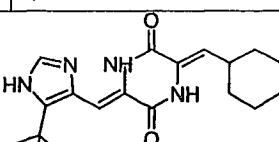
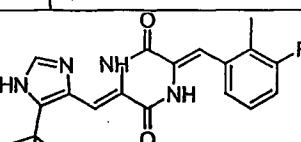
Verbindungen	Struktur	SALT FORM	M.W.
KPU-36 tBu-iPLH-5-Me-4-im		2TFA	356.42 584.47 (+2TFA)
KPU-37 tBu-iPLH-o-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)
KPU-38 tBu-iPLH-m-Me		TFA	350.41 464.44 (+TFA)
KPU-39 tBu-iPLH-p-Me		TFA	350.41 464.44 (+TFA)
KPU-40 tBu-iPLH-p-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-41 tBu-iPLH-m-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-42 tBu-iPLH-3-thienyl		TFA	342.42 456.44 (+TFA)

Verbindungen	Struktur	SALT FORM	M.W.
KPU-43 tBu- <i>i</i> PLH-p-CN		TFA	361.40 475.42 (+TFA)
KPU-44 tBu- <i>i</i> PLH-m-EtO		TFA	380.44 494.46 (+TFA)
KPU-45 tBu- <i>i</i> PLH-2,4,6-TriOMe		TFA	426.47 540.49 (+TFA)
KPU-46 tBu- <i>i</i> PLH-o-NO <sub>2</sub>		TFA	381.39 495.41 (+TFA)
KPU-47 tBu- <i>i</i> PLH-m-NO <sub>2</sub>		TFA	381.39 495.41 (+TFA)
KPU-48 tBu- <i>i</i> PLH-p-NO <sub>2</sub>		TFA	381.39 495.41 (+TFA)
KPU-49 tBu- <i>i</i> PLH-m-CN		TFA	361.40 475.42 (+TFA)

Verbindungen	Struktur	SALT FORM	M.W.
LPU-50 tBu-IPHL-o-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-51 tBu-IPHL-m-OH		TFA	352.39 466.41 (+TFA)
KPU-52 tBu-IPHL-2-NO2-5-Cl		TFA	415.83 529.85 (+TFA)
KPU-53 tBu-IPHL-o-OH		TFA	352.39 466.41 (+TFA)
KPU-54 tBu-IPHL-2-OH-5-OMe		TFA	382.41 496.44 (+TFA)
KPU-55 tBu-IPHL-3-furanyl		TFA	326.35 440.37 (+TFA)
KPU-56 tBu-IPHL-2-OH-5-Br		TFA	431.28 545.31 (+TFA)

Verbindungen	Struktur	SALT FORM	M.W.
KPU-57 tBu- <i>i</i> PLH-2-OH-4-OMe		TFA	382.41 496.44 (+TFA)
KPU-58 tBu- <i>i</i> PLH-2-OH-4-OMe		TFA	382.41 496.44 (+TFA)
KPU-59 tBu- <i>i</i> PLH-2-OH-5-Cl		TFA	386.83 (+TFA) 500.86
KPU-60 tBu- <i>i</i> PLH-5-Me-2-furanyl		TFA	340.38 454.40 (+TFA)
KPU-61 tBu- <i>i</i> PLH-5-Cl-2-thionyl		TFA	376.86 490.88 (+TFA)
KPU-62 tBu- <i>i</i> PLH-2-thionyl		TFA	342.42 458.44 (+TFA)
KPU-63 tBu- <i>i</i> PLH-N-Me-2-pyrrrol		TFA	339.39 453.42 (+TFA)

Verbindungen	Struktur	SALT FORM	M.W.
KPU-64 tBu- <i>i</i> PLH-3,5-diCl		TFA	405.27
KPU-65 tBu- <i>i</i> PLH- <i>m</i> -CF <sub>3</sub>		TFA	404.39
KPU-66 tBu- <i>i</i> PLH-1-Naphthalen		TFA	386.44
KPU-67 tBu- <i>i</i> PLH-2-Naphthalen		TFA	386.44
KPU-68 tBu- <i>i</i> PLH-2,3-diCl		TFA	405.27
KPU-69 tBu- <i>i</i> PLH- <i>m</i> -Vinyl		TFA	362.42
KPU-77 tBu- <i>i</i> PLH-2-F-5-I		TFA	480.28

Verbindungen	Struktur	SALT FORM	M.W.
KPU-79 TBU-IP LH-2-(Methylthio)		TFA	368.45
KPU-80 TBU-IP LH-m-OCF <sub>3</sub>		TFA	420.38
KPU-81 TBU-IP LH-2-F-5-OMe		TFA	384.38
KPU-82 TBU-IP LH-4-F-3-OMe		TFA	384.38
KPU-83 TBU-IP LH-2-OH-5-tBu		TFA	408.39
KPU-84 TBU-IP LH-cyclohexan		TFA	341.39
KPU-86 TBU-IP LH-2-Me-3-F		TFA	368.39

Verbindungen	Struktur	SALT FORM	M.W.
KPU-87 TBU- <i>i</i> PLH-2-F-5-Me		TFA	368.39
KPU-88 TBU- <i>i</i> PLH-2-Cl-6-F		TFA	388.83
KPU-89 TBU- <i>i</i> PLH-2,5-di-F		TFA	372.38
KPU-90 TBU- <i>i</i> PLH-2,3-di-Me		TFA	364.38
KPU-91 TBU- <i>i</i> PLH-2,6-di-Me		TFA	364.38
KPU-92 TBU- <i>i</i> PLH-2-NO2-3-OMe		TFA	411.39
KPU-93 TBU- <i>i</i> PLH-2,5-diMe		TFA	364.38

Verbindungen	Struktur	SALT FORM	M.W.
KPU-94 TBU- <i>i</i> PLH-2-NH <sub>2</sub> -3-OMe		TFA	381.399
KPU-96 TBU- <i>i</i> PLH-2-NH <sub>2</sub>		TFA	351.41
KPU-97 TBU- <i>i</i> PLH-m-NH <sub>2</sub>		TFA	351.41

### C. Evaluierung der Dehydrophenylahistin-Derivate

**[0197]** Die Evaluierung der oben beschriebenen Derivate wird entsprechend der in Beispiel 3 beschriebenen Verfahren vorgenommen. Die zusätzliche Beurteilung der Derivate wird auf spezifische Aktivitäten wie beispielsweise die Bestimmung des inhibierenden Effekts auf die Zellproliferation und Effekte auf spezifische zellulären Mechanismen (z. B. Microtubuli-Funktion), Effekte auf die Zellzyklus-Progression, die Evaluierung der in vitro-Antitumoraktivität gegenüber Krebszelllinien, etc. erweitert. Einige dieser Evaluierungsverfahren und ihre Protokolle sind der Beschreibung weiter unten zu entnehmen.

#### 1) Der Zellproliferation-inhibierende Effekt von Dehydrophenylahistin und seinen Analogen

**[0198]** In jede Vertiefung einer 96-Vertiefungs-Mikrotiterplatte werden 100 µl A-549-Zellen abgeleitet von humanem Lungenkrebs, präpariert in einem Kulturmedium zu 10<sup>5</sup> Zellen/ml, das Kulturmedium erhalten durch Addition von 10% fötalem Rinderserum zu EMEM-Kulturmedium (Nissui Seiyaku Co., Ltd.), einen antitumoralen Effekt gegen A-549-Zellen abgeleitet von humanem Lungenkrebs habend, gegeben. Die Derivate, nach den oben genannten Beispielen erhalten, gelöst in Methanol, werden zu den Vertiefungen der obersten Reihe gegeben, und die Proben werden durch die halblogarithmische Verdünnungsmethode verdünnt und zugegeben, wonach die Platte bei 37° in Kohlenstoff-Dioxid-Gasinkubator für 48 Stunden inkubiert wird. Jeweils 10 µl MTT-Reagens (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrabromid) (1 mg/ml-PBS) werden zugegeben, gefolgt von einer Inkubation in einem Kohlenstoff-Dioxid-Gasbinkubator für 6 Stunden bei 37°C. Das Kulturmedium wird dann verworfen und die von den Zellen produzierten Kristalle werden in 100 µl/Vertiefung Dimethylsulfoxid gelöst. Die Absorption von Licht der Wellenlänge 595 nm wird dann mit einem Mikroplatten-Lesegerät („microplate reader“) gemessen. Durch den Vergleich der Lichtabsorption der unbehandelten Zellen mit der von Zellen, die mit einer Probe mit einer bekannten Konzentration behandelt wurden, wird die Probenkonzentration, die die Zellproliferation um 50% inhibiert (IC<sub>50</sub>) berechnet.

#### 2) Zellzyklus-inhibierende Aktivität von Dehydrophenylahistin und seinen Analogen

**[0199]** Die Zelllinie A431 ist von humanem Lungenkrebs(gewebe) abgeleitet. Das EMEM-Kulturmedium, das 10% fötales Rinderserum und 1% MEM nicht-essentielle Aminosäure-Lösung (SIGMA M2025) enthält, wird verwendet, um A431-Zellen in einem Inkubator bei 37°C mit 5% Kohlendioxidgas und Wasserdampf zu inkubieren. Die durch die oben beschriebenen Verfahren gewonnenen gereinigten Proben von Dehydrophenylahistin werden zu den Zellen während der logarithmischen Wachstumsphase gegeben und die Progression des Zellzyklus wird durch Durchflusszytometrie und mikroskopische Beobachtungen analysiert.

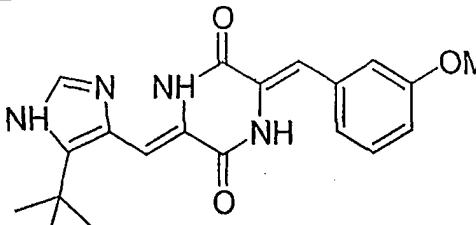
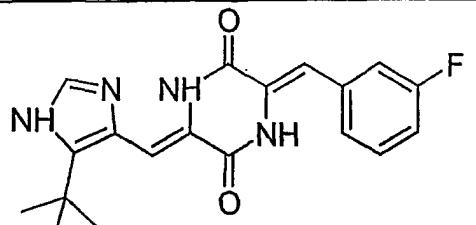
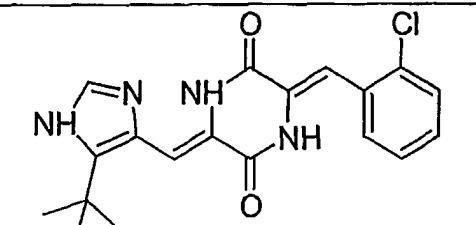
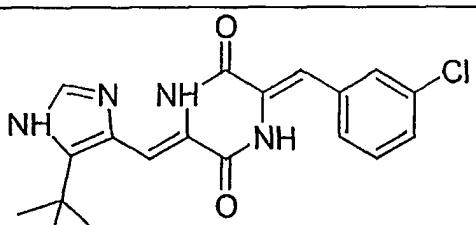
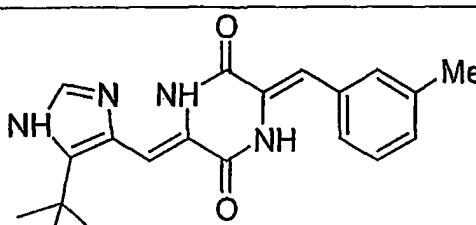
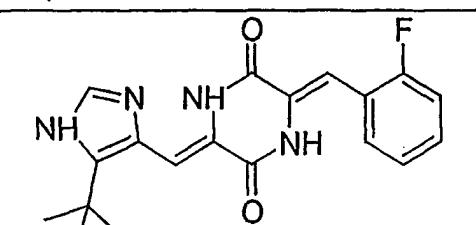
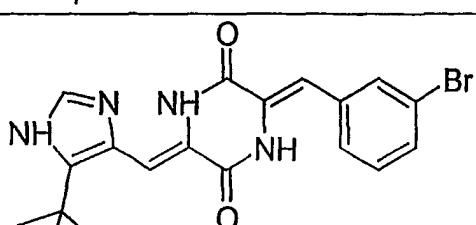
## BEISPIEL 6

Struktur-Aktivität-Verhältnis von synthetisierten Dehydrophenylahistin-Derivaten (DehydroPLH)

1) Überblick über die Derivat-Synthese

**[0200]** Viele, aber nicht alle der Derivate von DehydroPLH, die hierin offenbart wurden, umfassen eine, zwei oder drei Modifikationen am Phenylring ([Abb. 5](#) unten). Die Derivate wurden durch die oben beschriebenen Verfahren synthetisiert. Wie in Tabelle 5 gezeigt wird, zeigen einige Verbindungen eine wirksamere zytotoxische Aktivität als DehydroPLH und tBu-dehydroPLH. Die wirksamste Verbindung war KPU-90, die einen EC50-Wert von 3 nM aufwies. Dieser Wert war 16 Mal bzw. 4 Mal höher als der von DehydroPLH bzw. tBu-dehydroPLH. Diese Derivate haben Mono-Substitutionen an der o- oder m-Position des Phenylrings mit Halogenatomen wie etwa Fluor- und Chlor-Atomen oder der Methyl-, Vinyl- oder Methoxy-Gruppe. Derivate mit Substitutionen zu Heteroaryl-Strukturen wie etwa Naphthalen-, Thiophen- und Furan-Ringen lösten ebenso eine wirksame Aktivität aus. KPU-35, -42, -69, -80 und -81 zeigten ebenfalls eine höhere Aktivität als tBu-dehydroPLH.

Tabelle 5. Synthetische wirksame DehydroPLH-Derivate

Verbindungen	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-9		31
KPU-35		10
KPU-18		42
KPU-19		20
KPU-38		45
KPU-37		21
KPU-41		31

Verbindungen	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-29		44
KPU-16		42
KPU-32		42
KPU-42		54
KPU-46		44
KPU-44		43
tBu-PLH (KPU-2)		13

Verbindungen	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-69		16
KPU-80		13
KPU-81		19
KPU-90		3
DehydroPLH (KPU-1)		48

## 2) Einfügen von Methoxy-Gruppen in den Phenylring

**[0201]** Kolchizin erkennt die gleiche Bindungsstelle im  $\beta$ -Tubulin wie PLH. Kolchizin hat vier charakteristische Methoxy-Gruppen in seinen A- und B-Ringen. Eine Reihe von Substitutionen mit einer einzelnen oder mehreren Methoxy-Gruppen wurde durchgeführt und die Ergebnisse bezüglich der zytotoxischen Aktivität werden in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6. Effekt der Substitution von Methoxy-Gruppen auf die Proliferation von HT-29-Zellen

Verbindungen	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
DehydroPLH (KPU-1)		48

Verbindungen	Struktur	EC50 (nM)
tBuPLH (KPU-2)		13
KPU-8		89
KPU-9		31
KPU-6		6730
KPU-10		1350
KPU-12		4980
KPU-13		2130

Verbindungen	Struktur	EC50 (nM)
KPU-14		610
KPU-15		4430
KPU-16		42
KPU-24		7040

**[0202]** Die Resultate demonstrieren, dass Substitutionen an der m- oder o-Position die zytotoxische Aktivität gegenüber HT-29-Zellen verstärken. KPU-9 und -16 zeigten eine hohe Aktivität. Die Methoxy-Derivate mit Dreifach-Substitution (KPU-11, -17 und -45) zeigten ebenfalls Aktivität. Die Struktur von KPU-24 wurde durch MASS-Analyse bestimmt.

### 3) Modifikation mit Elektronen-entziehenden Gruppen

**[0203]** Um die Studien der Struktur-Aktivität-Beziehung des Phenylrings zu erweitern, wurde eine Reihe von verschiedenen funktionellen Gruppen eingefügt, welche sowohl Elektronen-entziehende als auch -spendende Gruppen umfassen. Das Ergebnis hinsichtlich der Zytotoxizität gegenüber HT-29-Zellen ist in den Tabellen 7 bzw. 8 gezeigt.

**[0204]** Die Substitution an der o- oder m-Position erhöhte wirksam die Aktivität. Diese Ergebnisse stimmten gut überein mit denen der Methoxy-Gruppe.

Tabelle 7. Effekt der Elektronen-entziehenden Gruppe auf die Proliferation von HT-29-Zellen

Verbindung	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-18		42
KPU-19		20
KPU-20		545
KPU-21		51
KPU-52		110
KPU-37		21
KPU-35		10

Verbindung	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-34		466
KPU-50		38
KPU-41		31
KPU-40		623
KPU-46		44
KPU-47		40
KPU-48		> 20 µM

Verbindung	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-49		28
KPU-43		> 20 μM

Tabelle 8. Effekt der Elektronen-spendenden Gruppe auf die Proliferation von HT-29-Zellen

Verbindung	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-8		89
KPU-9		31
KPU-6		6730
KPU-44		43

Verbindung	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-30		477
KPU-22		82
KPU-32		42
KPU-38		45
KPU-39		460
KPU-53		> 20 µM
KPU-51		617

Verbindung	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-23		5870
KPU-58		>20 nM
KPU-54		> 20 μM
KPU-57		> 20 μM

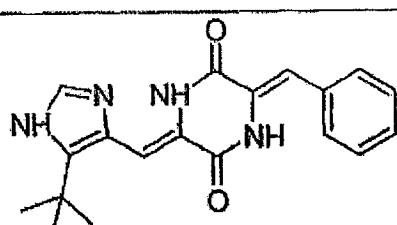
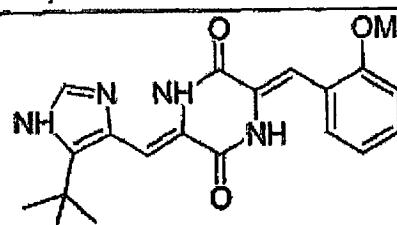
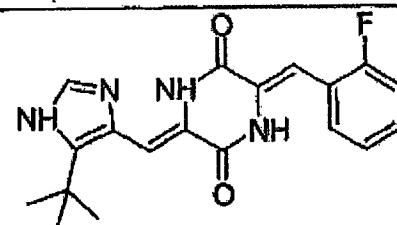
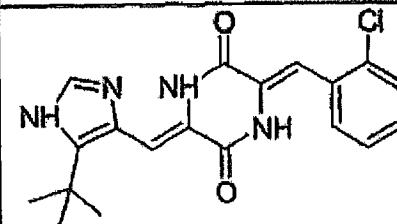
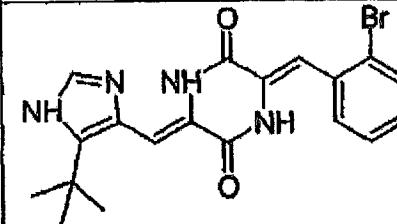
**[0205]** Die vorliegende Offenbarung ist nicht durch eine bestimmte wissenschaftliche Theorie gebunden oder limitiert. Nichtsdestotrotz wird gewürdigt, dass Fachleute die hierin gezeigten Ergebnisse so interpretieren können, dass eine relativ kleine funktionelle Gruppe, die weniger die sterische Hinderung beeinflusst, bevorzugt werden könnte, um eine stärkere Aktivität auslösen zu können und dass etwas größere Gruppen wie die Ethoxygruppe (verglichen mit der Methoxygruppe) oder das Brom-Atom (verglichen mit dem Cl-Atom) die sterische Hinderung beeinflussen können und sich beispielsweise unvorteilhaft bei der Interaktion mit, der Tubulin-Bindungsstelle auswirken können. Ferner, weil die elektrischen Eigenschaften dieser Substituenten nicht die Aktivität beeinflussen, wird dadurch nahegelegt, dass diese relativ kleinen Substituenten nicht direkt mit der Bindungsstelle im β-Tubulin interagieren, sondern die für die Bindung geeignete Konformation von DehydroPLH eineingen. Oder, als eine weitere mögliche Hypothese, kann die hydrophobe Eigenschaft ein wichtigerer Faktor an der Bindungsstelle für die o- oder m-Position im β-Tubulin sein, da das Einfügen einer hydrophilen Hydroxylgruppe, die als Wasserstoff-Donor eine Wasserstoffbrücke ausbilden kann, zu einer drastisch verminderter Aktivität führt.

**[0206]** Wie in Tabelle 9 gezeigt, kann der Effekt der Substituenten an der o-Position auf die zytotoxische Aktivität geordnet sein wie auch im Fall der m-Position, wie in Tabelle 10 gezeigt. Die Verbindungen mit wirksamen funktionellen Gruppen, die eine höhere Aktivität als tBu-DehydroPLH haben, können ebenso weiter modifiziert werden. Und da die Migration der Stereochemie von Z nach E unter sichtbarer Lichteinstrahlung beobachtet werden konnte, können Substituenten, die die Elektronendichte in den konjugierten Doppelbindungen vermindern, zu einer Reduktion der Z zu E-Migration durch das Licht beitragen, was zu physico-chemisch stabileren Strukturen führt. Die Temperatur kann diese Migration ebenfalls beeinflussen.

**[0207]** Die Modifizierung an zwei Stellen des Rings kann für die Entwicklung von wirksamen aber auch biologisch stabilen Verbindungen bevorzugt sein. Der Phenylring von Phenylahistin wird durch Cytochrom P-450 oxidiert. Doppelmodifikationen, die die Elektronendichte des Phenylrings reduzieren, können daher wirksam die P-450-Oxidation vermeiden. Daher kann die Kombination einer kleinen Elektronen-entziehenden Gruppe wie etwa das Fluor-Atom mit einem Element, das diese Aktivität verstärken kann, wie etwa -OMe, -Me, -Cl, -F

und Br, zu wirksameren und biologisch stabileren Arzneimittelverbindungen führen.

Tabelle 9. Zusammenfassung der Modifikation an der o-Position

Verbindung	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-2		48
KPU-8		89
KPU-37		21
KPU-18		42
KPU-50		38

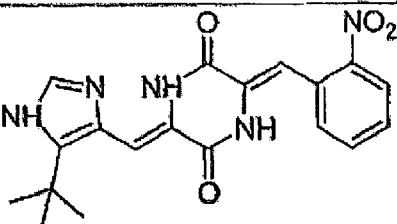
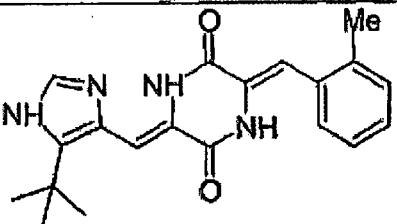
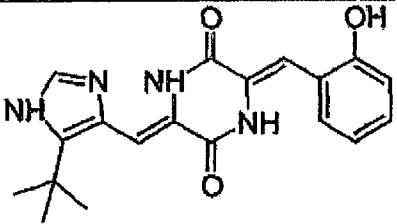
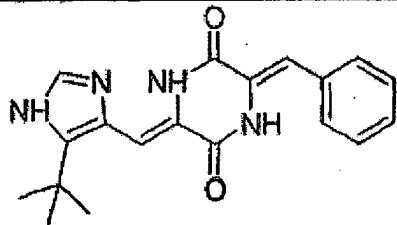
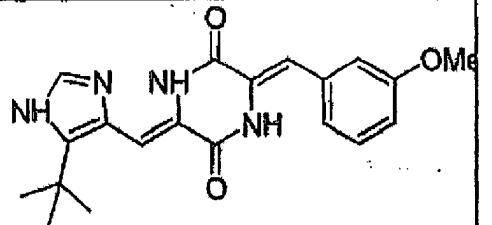
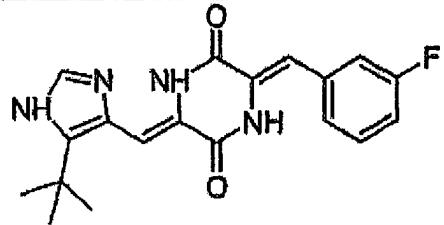
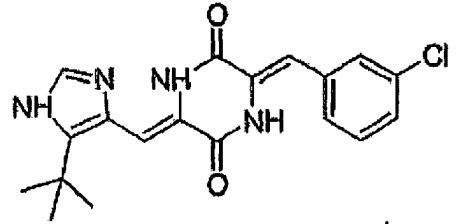
Verbindung	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-46		44
KPU-32		42
KPU-53		> 20 μM

Tabelle 10. Zusammenfassung der Modifikation an der m-Position

Verbindung	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-2		48
KPU-9		31
KPU-35		10
KPU-19		20

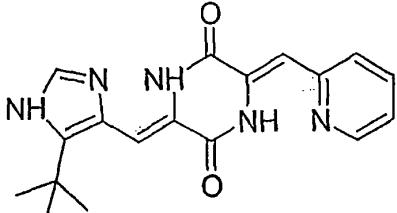
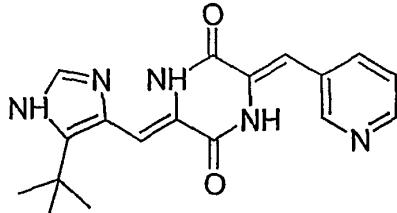
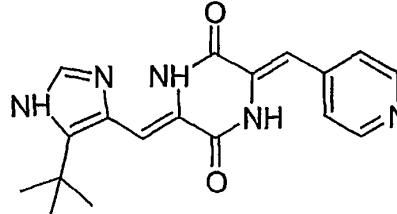
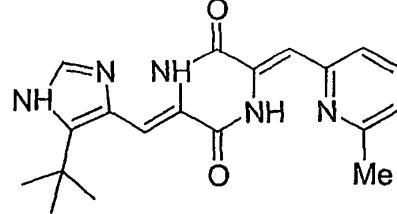
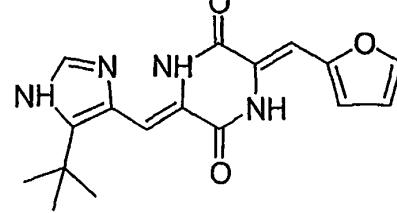
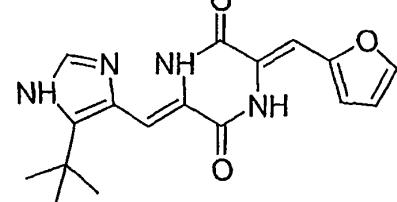
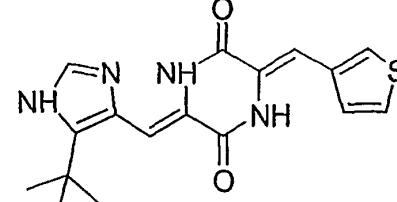
Verbindung	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-41		31
KPU-47		40
KPU-38		45
KPU-51		617
KPU-49		28
KPU-44		43

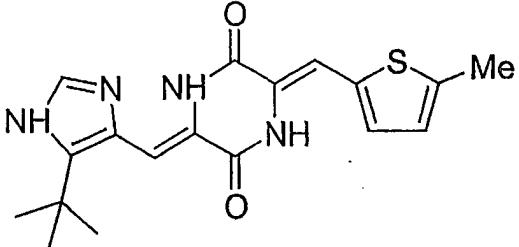
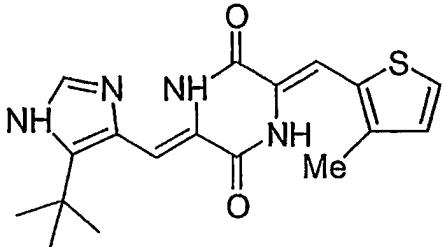
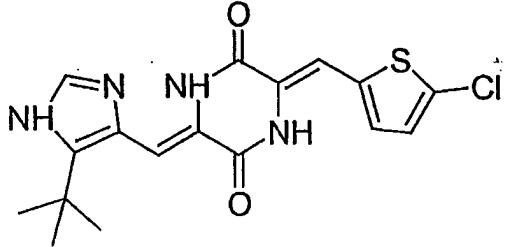
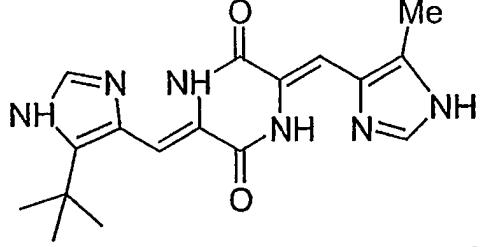
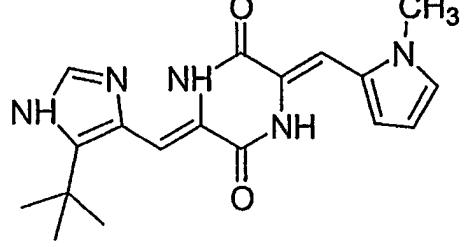
## 4) Substitution des Phenylrings zu Aryl-Heterozyklen

**[0208]** Der Phenylring kann auch durch Heteroarylgruppen ersetzt werden. Das Resultat einer solchen Ersetzung bezüglich der zytotoxischen Aktivität wird in Tabelle 11 gezeigt. Da die Aryl-Stickstoff-Atome („arylic nitrogen atoms“) eine Wasserstoffbrücke mit einer NH-Gruppe des Diketopiperazin-Rings formen können und die Konformation des Moleküls zwischen Pyridin und Diketopiperazin-Ringen auf eine uniplanaren Struktur beschränken können, wäre es vonnöten, dass die aktive Konformation von DehydroPLH einen gewissen Grad

eines dihedralen Winkels, gebildet durch die sterische Abstoßung zwischen dem Amid-Wasserstoff-Atom des Diketopiperazin-Rings und des o-Wasserstoff-Atoms des Phenylrings ([Abb. 6](#)) aufweist.

Tabelle 11. Effekt des Austausches mit einem Heteroarylring auf die Proliferation von HT-29-Zellen

Verbindungen	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-28		>20 nM
KPU-31		96
KPU-25		544
KPU-33		>20 nM
KPU-26		600
KPU-60		71
KPU-42		54

Verbindung	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
KPU-27		80
KPU-29		44
KPU-61		184
KPU-36		2790
KPU-63		105

**[0209]** Das Ersetzen des Phenylrings mit einem kleineren Furan- oder Thiophen-Ring, zum Beispiel KPU-29 oder -42, führte zu Aktivität. Der Phenylring kann zu einer anderen aromatischen Struktur verändert werden unter Beibehaltung der wirksamen Aktivität.

##### 5) Metabolismus von Phenylahistin

**[0210]** In einer kürzlich erschienen Studie wurde ( $\pm$ )-Phenylahistin mit hepatischen Mikrosomen der Ratte oder humanen hepatischen P450s behandelt. Im Falle des humanen Systems wurden wenigstens sieben Metabolite detektiert, und zwei von ihnen, d. h. P1 und P3, waren Haupt-Metabolite, die zusammen mehr als 60% der gewonnenen Metabolite ausmachten.

**[0211]** Da in tBu-DehydroPLH keine exo-Olefin-Struktur vorhanden ist, weisen die vorliegenden synthetisierten Derivate keine Oxidation wie P1 und P4 auf. Allerdings werden Oxidationen wie P3 und P5 während des hepatischen Metabolismus gebildet. Verschiedene Derivate, die einen solchen Metabolismus verhindern, sind wirksam, um eine P450-Oxidation am Phenylring zu vermeiden. Der Imidazol-Ring kann ebenso modifiziert

werden, um unvorteilhafte Oxidation zu vermeiden.

#### 6) Physiko-chemische Stabilität von DehydroPLH

**[0212]** Die physiko-chemische Stabilität ist eines der unvorteilhaften Probleme von DehydroPLH. Bei Phenylahistin ist dieses Problem nicht vorhanden, da es dort keine zusätzliche Olefinstruktur im Benzylteil gibt. Allerdings kann im DehydroPLH der Benzyliden-Rest leicht aktiviert werden, vermutlich durch sichtbares Licht, und die Z zu E-Migration tritt häufig auf aufgrund der Existenz einer längeren Konjugation der Doppelbindung. Diese Migration trat sogar unter normaler Raumbeleuchtung auf. In den Zytotoxizitäts-Experimenten migrieren einige der Verbindungen zur E-Form während der Inkubation, obwohl diese Migration im Falle von DehydroPLH wahrscheinlich ein Gleichgewicht bei einem 1:1-Verhältnis erreicht. Diese Migration kann kontrolliert werden. Die Z- zu E-Migration ist auch bei Combretastatin A4, einem ähnlichen Typ von Tubulin-Inhibitor, bekannt, und einige Studien zur Lösung dieses Problems liegen vor.

#### 7) Propharmakon-Synthese

**[0213]** Die E-Form kann auch als Propharmakon von DehydroPLH oder einem oder mehreren seiner Analoge verwendet werden, einschließlich die hier beschriebenen Analoge. Eine der unerwünschten Eigenschaften von anti-Tubulin-Pharmaka ist deren niedrige Selektivität zwischen Tumor- und intaktem Gewebe, obwohl diese Wirkstoffe zu den molekularen Ziel-Therapien gehören („molecular target therapies“). Dies verursacht unerwünschte Nebeneffekte. Wenn die Verbindungen hingegen selektiv nur im Tumor-Gewebe wirken, können negative Nebeneffekte der anti-Mikrotubuli-Pharmaka reduziert werden. Da DehydroPLH (Z-Form) aus dem E-Isomer durch sichtbare Lichteinstrahlung produziert werden kann, wird die E-Form verabreicht, und Lichtbestrahlung wird nur an der Stelle des Tumors durchgeführt, so dass nur der Tumor durch die photoproduzierte Z-Form geschädigt wird und die nachteiligen Effekte im intakten Gewebe reduziert werden.

**[0214]** Die E-Form kann durch Addition einer raumeinnehmenden aber biologisch abbaubaren Acylgruppe chemisch geschützt werden, wobei diese als Propharmaka in den Diketopiperazin-Ring eingefügt wird. Diese Acylgruppe kann durch körpereigene Proteasen gespalten werden. Daher wird die acetylierte E-Verbindung vor der Verabreichung beibehalten, dann nach der Verabreichung wird sie zur richtigen („real“) E-Form umgewandelt, welche durch die lokale Lichteinstrahlung zur bioaktiven Z-Form migrieren kann.

**[0215]** Das Synthese-Schema dieser Acyl-E-Form von tBu-DehydroPLH ist in [Abb. 9](#) zusammengefasst.

#### BEISPIEL 7

##### Pharmazeutische Zubereitungen der synthetisierten Dehydrophenylahistine

1) Zubereitungen für intravenöse Verabreichung, durch Tropfenfusion, Injektion, Infusion oder Ähnliches

**[0216]** Zu Röhrchen, die 5 g pulverförmige Glukose enthalten, werden jeweils 10 mg einer Verbindung, die nach dem Verfahren synthetisiert wurde, aseptisch zugegeben und die Röhrchen werden anschließend versiegelt. Nachdem die Röhrchen mit Stickstoff, Helium oder einem anderen inerten Gas gefüllt wurden, werden sie an einem kühlen, dunklen Platz gelagert. Vor der Verwendung wird der Inhalt in Ethanol gelöst und zu 100 ml einer 0,85% physiologischen Salzlösung in Wasser gegeben. Die resultierende Lösung wird intravenös, durch Tropfinfusion oder via subkutaner oder intraperitonealer Injektion, zwischen etwa 10 ml/Tag bis etwa 1000 ml/Tag, wie vom Fachmann für angemessen erachtet, verabreicht als ein Verfahren, um das Wachstum eines krebsartigen Tumors in einem Menschen, der diagnostiziert wurde, einen solchen Tumor zu haben, zu inhibieren.

2) Zubereitungen, die oral oder ähnlich verabreicht werden

**[0217]** Aus einem Gemisch, erhalten durch das gründliche Vermischen von 1 g einer Verbindung, synthetisiert nach dem Verfahren, 98 g Lactose und 1 g Hydroxypropyl-Cellulose werden durch eine beliebige konventionelle Methode Körnchen ausgeformt. Die Körnchen werden gründlich getrocknet und gesiebt, um eine Körnchenpräparation geeignet für das Abpacken in Flaschen oder durch Hitzeversiegelung zu erhalten. Die resultierende Körnchenpräparation wird oral in einer Dosis von etwa 100 ml/Tag bis etwa 1000 ml/Tag verabreicht, abhängig von den Symptomen, wie vom Fachmann für die Behandlung von krebsartigen Tumoren im Menschen für angemessen erachtet wird.

## 3) Zubereitungen für die topische Verabreichung

**[0218]** Die Verabreichung einer wirksamen Menge der Verbindung kann auch topisch durchgeführt werden durch die Verabreichung der Verbindung(en) direkt auf das betroffene Areal der Haut des Individuums. Zu diesem Zweck liegt die angewendete Verbindung in Form einer Zubereitung umfassend einen pharmakologisch akzeptablen topischen Träger wie etwa ein Gel, eine Salbe, eine Lotion oder eine Creme vor, welche umfassen, ohne Limitation, Trägerstoffe wie Wasser, Glycerol, Alkohol, Propylenglykol, Fettalkohole, Triglyceride, Fettsäureester oder Mineralöle. Andere topische Träger umfassen flüssiges Petroleum, Isopropylpalmitat, Polyethyenglykol, Ethanol (95%), Polyoxyethylenmonolaurat (5%) in Wasser oder Natriumdodezylsulfat (5%) in Wasser. Andere Stoffe wie Antioxidantien, Hurnektanzien („hurnectants“), Viskositätsstabilisatoren und ähnliche Agenzien können wenn nötig zugesetzt werden. Perkutane Durchdringungsverstärker („Penetration enhancers“) wie etwa Azon, können ebenso einbezogen werden. Zusätzlich, in bestimmten Fällen, wird erwartet, dass die Verbindung als Bestandteil von Hilfsmitteln angewendet wird, die auf, in oder unter die Haut platziert werden können. Solche Hilfsmittel umfassen Pflaster, Implantate und Injektionen, die die Verbindung, entweder durch passive oder aktive Freisetzungsmechanismen in die Haut entlassen.

## BEISPIEL 8

## In vitro Pharmakologie von KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin

**[0219]** Die mit KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin durchgeführten in vitro-Wirksamkeitsstudien umfassen: A) eine repräsentative Gruppe ("panel") von sechs Tumorzelllinien, B) Studien in Tumorzellen, die gegen eine Vielzahl von Arzneimitteln resistent sind ("multidrug-resistant tumor cells") und C) Studien, um den Wirkungsmechanismus zu bestimmen.

A). Studien von KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin in einer repräsentativen Gruppe von sechs Tumorzelllinien

**[0220]** Die folgenden Zelllinien (Bezugsquelle in Klammern) wurden verwendet: HT29 (humaner Dickdarmtumor; ATCC; HTB-38), PC3 (humaner Prostata-tumor; ATCC; CRL-1435), MDA-MB-231 (humaner Brusttumor; ATCC; HTB-26), NCI-H292 (humaner nicht-kleinzylliger Lungentumor; ATCC; CRL-1848), OVCAR-3 (humaner Ovar-tumor; ATCC; HTB-161), B16-F10 (murines Melanom; ATCC; CRL-6475) und CCD-27sk (normale humane Fibroblasten; ATCC; CRL-1475). Die Zellen wurden bei subkonfluenter Dichte in ihrem jeweiligen Kulturmedium gehalten.

**[0221]** Zytotoxizitätsversuche wurden wie oben in Beispiel 4 beschrieben durchgeführt, unter Verwendung der Resazurin-Fluoreszenz als Indikator für die Vitalität der Zellen.

**[0222]** Die offenbarten Verbindungen sind wirksame Agenzien in einer Vielzahl von verschiedenen und klar voneinander abgegrenzten Zelllinien. Im Speziellen waren beispielsweise KPU-2 und KPU-35 am wirksamsten in der HT-29 Tumorzelllinie sowohl bezüglich Wirksamkeit (aktiv im niedrigen nanomolaren Bereich) als auch des Wirkungsgrads (am stärksten ansprechend bezüglich des maximalen zytotoxischen Effekts); t-Butylphenylahistin zeigte seine größte Wirksamkeit gegenüber der PC-3-Tumorzelllinie, obwohl der größte Wirkungsgrad gegenüber der HT-29-Zelllinie auftrat; KPU-2 und KPU-35 waren generell 10-40-fach wirksamer als t-Butylphenylahistin, wobei der Wirkungsgrad für alle drei Verbindungen in den verschiedenen Tumorzelllinien ähnlich war; die HT-29-, PC-3-, MDA-MB-231- und NCI-H292-Zelllinien sprachen alle vergleichbar auf die NP1-Verbindungen an, wobei B16-F10 weniger empfindlich zu sein schienen. t-Butylphenylahistin offenbarte eine deutliche Differenz zwischen normalen Fibroblasten und den Tumorzelllinien, mit einem Verhältnis, das sich zwischen > 20 -> 100 erstreckte, mit Ausnahme der OVCAR-3-Zelllinie.

Tabelle 12 Aktivität von KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin bei der Durchmusterung einer repräsentativen Gruppe von Tumoren ("tumor panel screen")

Zelllinie	KPU-2			KPU-35			t-Butylphenylahistin		
	Mittelw.	s	n	Mittelw.	s	n	Mittelw.	s	n
HT-29 Dickdarm									
IC50 nM%	9,8	2,4	4	8,2	2,0	4	420	473	3
Zytotoxizität	82,5	5,3	4	81,3	4,0	4	88	0,2	3
PC-3-Prostata									
IC50 nM	13,4	0,7	4	13,2	2,5	4	174	-	2
% Zytotoxizität	60,3	2,1	4	56,8	1,0	4	59,5	-	2
MDA-MB-231 Brust									
IC50 nM	13,8	1,9	4	9,7	4,2	4	387	-	2
% Zytotoxizität	56,7	7,2	4	59,3	5,6	4	65,5	-	2
NCI-H292 Lunge									
IC50 nM	17,5	1,1	4	15,9	1,1	4	384	194	3
% Zytotoxizität	70,5	2,9	4	68,5	2,9	4	65	5	3
OVCAR-3-Ovar									
IC50 nM	> 20.000	-	4	> 20.000	-	4	> 20.000	-	2
% Zytotoxizität	45,8	3,0	4	39	2,2	4	37	-	2
B16-F10 Melanom									
IC50 nM	37,1	26,3	4	32,3	19,9	4	736	650	3
% Zytotoxizität	71,8	2,5	4	72,0	2,2	4	74	2	3
CCD-27sk Fibroblasten									
IC50 nM	9,2	2,9	4	7,4	2,6	4	> 20.000	-	2
% Zytotoxizität	64,3	2,4	4	60,8	1,9	4	45	-	2

## B). Studien in Arzneimittel-resistenten Zelllinien

**[0223]** Eine der großen Herausforderungen bei der Verwendung von chemotherapeutischen Agenzien in der klinischen Onkologie ist die Entwicklung von Resistzenzen der Tumorzellen gegenüber dem Effekt des Arzneimittels. Es gibt verschiedene Mechanismen für die Entwicklung von Resistenz, jeder wird dabei verschiedene Effekte hinsichtlich der chemotherapeutischen Arzneimittel haben. Diese Mechanismen umfassen erhöhte Expression von ATP-abhängigen Effluxpumpen wie etwa das P-Glykoprotein, kodiert durch MDR1 oder das "multidrug"-Resistenz-assoziierte Protein 1 kodiert durch MRP1. Die reduzierte Aufnahme von Arzneimitteln, Änderungen bezüglich des Angriffspunktes des Arzneimittels ("the drug's target"), verstärkte Reparatur von Arzneimittel-induzierten DNA-Schädigungen, Änderungen im Apoptose-Signalweg und die Aktivierung von Zytochrom P450-Enzymen sind andere Beispiele für Mechanismen, durch die Krebszellen resistent gegenüber Antikrebs-Arzneimitteln werden. Die ausgesuchten Verbindungen wurden in drei verschiedenen Zelllinien untersucht, die zwei verschiedene Mechanismen der Resistenz abbilden; die Überexpression eines P-Glykoproteins und veränderte Topoisomerase II-Aktivität.

1) Das humane Gebärmuttersarkom Tumorzelllinien-Paar: MES-SA (Taxol-sensitiv) und MES-SA DX (Taxol-resistant).

**[0224]** Diese Zelllinie exprimiert erhöhte Mengen mdr-1 mRNA und P-Glykoprotein (ein Extrudierpumpenmechanismus). Die Vorbehandlung mit Cyclosporin-A (CsA) blockiert das P-Glykoprotein und setzt die Aktivität in der resistenten Zelllinie für solche Komponenten, für die die Resistenz auf erhöhtem P-Glykoprotein beruht, wieder ein.

**[0225]** Wie in Tabelle 13 zu sehen ist, verfügen KP-2 und KPU-35 über die gleiche Wirksamkeit in der resis-

tenten Zelllinie als auch in der sensitiven Zelllinie und die Wirksamkeit von t-Butylphenylahistin war nur leicht reduziert. Die Cyclosporin A (CsA)-Vorbehandlung änderte nicht die Wirksamkeit der gewählten Verbindungen. Im Gegensatz war Taxol in der MES-SA DX-resistenten Zelllinie nahezu inaktiv, wohingegen diese Verbindung in der sensitiven Zelllinie sehr wirksam war. CsA-Behandlung stellte die Sensitivität der MES-SA DX-Zelllinie gegenüber Taxol wieder her. Die MES-SA DX-Zelllinie zeigte ebenso eine reduzierte Suszeptibilität gegenüber Etoposid (60-fach), Doxorubizin (34-fach) und Mitoxantrone (20-fach).

**[0226]** Diese Daten weisen daraufhin, dass die Effekte von KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin nicht suszeptibel gegenüber dem Taxol-bezogenen Resistenzmechanismus (P-Glykoprotein) in dieser Zelllinie sind, und dass eine Kreuzresistenz mit Taxol bei diesen ausgewählten Verbindungen in diesem Modell nicht vor kommt.

Tabelle 13 Aktivität von KPU-2, KPU-35, t-Butylphenylahistin und Taxol in MES-SA Taxol-sensitiven und MES-SA DX Taxol-resistenten humanen Gebärmuttersarkom-Tumorzelllinien

Verbindung Studie	MES-SA-sensitiv			MES-SA DX-resistant			
	Kein CsA	CsA Vorbehandlung		Kein CsA		CsA Vorbehandlung	
	IC50 nM	IC50 nM	Verhältnis Kein CsA	IC50 nM	Verhältnis MES-SA	IC50 nM	Verhältnis Kein CsA
<b>KPU-2</b>							
Studie I	8,5	-	-	10,5	1,2	-	-
Studie II	19,4	27,4	1,4	21,7	1,1	37,8	1,74
<b>KPU-35</b>							
Studie I	6,6	-		5,2	0,8	-	-
Studie III	3,9	2,0	0,5	2,5	0,6	6,7	2,7
<b>t-Butylphenylahistin</b>							
Studie I	144	-	-	825	5,7	-	-
Studie III	122	162	1,3	694	4,3	622	0,9
<b>Taxol</b>							
Studie I	4,4	-	-	> 20.000	> 455	-	-
Studie II	13,3	7,6	0,6	>> 100	>> 8	40	<< 0,25
Studie III	7,3	2,8	0,4	> 24.000	> 3000	2,0	<< 0,001

2) Das humane akute promyelozytische Leukämie Zelllinienpaar: HL-60 (Mitoxantrone-sensitiv) und HL-60/MX-2 (Mitoxantrone-resistant)

**[0227]** Die Arzneimittelresistenzeigenschaften dieser Zelllinie werden als atypisch angesehen, weil eine veränderte katalytische Aktivität von Topoisomerase II ohne Überexpression des P-Glykoproteins vorliegt.

**[0228]** Wie aus Tabelle 14 entnommen werden kann, zeigen die Ergebnisse, dass die Wirksamkeit der ausgesuchten neuen Verbindungen sehr ähnlich in den sensitiven und resistenten HL-60 Zelllinien ist. Im Gegensatz sinkt der Wirkungsgrad von Mitoxantrone in der resistenten HL-60/MX-2-Zelllinie um einen Faktor von 24-fach.

**[0229]** Demnach sind KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin nicht suszeptibel gegenüber dem gleichen Resistenzmechanismus wie Mitoxantrone in dieser Zelllinie und es gibt keine Kreuzresistenz in diesem Modell von Mitoxantrone zu diesen ausgewählten neuen Verbindungen.

Tabelle 14. Aktivität von KPU-2, KPU-35, t-Butylphenylahistin und Mitoxantrone in dem HL-60 humanen akute promyelozytische Leukämie Tumor-sensitiv und -resistente Zelllinienpaar:

Verbindung	HL-60-sensitiv	HL-60-resistant	
	IC50 nM	IC50 nM	Verhältnis zu sensitiv
KPU-2	6,4	8,17	1,28
KPU-35	9,2	7,3	0,79
t-Butylphenylahistin	255	175	0,69
Mitoxantrone	202	4870	24,1

3). Humanes Brustkarzinom Zelllinienpaar: MCF-7 (Taxol-sensitiv) und MCF-7/ADR (Taxol-resistant)

**[0230]** Diese Studie betrifft KPU-2 im Vergleich mit Taxol. KPU-2 zeigte ähnliche Wirksamkeit in den sensiti-ven und resistenten Mitgliedern dieses Zelllinienpaars. Im Gegensatz dazu war Taxol nahezu inaktiv in der re-sistenten Zelllinie, wohingegen in der sensiti-ven Zelllinie eine Wirksamkeit im geringen nanomolaren Bereich vorhanden war (Tabelle 15).

**[0231]** Diese Studie bestätigt in einer anderen humanen Tumorzelllinie, dass die Taxol-Resistenz sich nicht auf KPU-2 überträgt.

Tabelle 15. Aktivität von KPU-2 und Taxol im MCF-7 humanen Brustkarzinom-sensitiven und -resistenten Zell-linienpaar

Verbindung	MCF-7-sensitiv	MCF-7/ADR-resistant	
	IC50 nM	IC50 nM	Verhältnis zu sensitiv
KPU-2	39,6	27,4	0,69
Taxol	2,6	>> 100	>> 38

### C) Studien des Wirkmechanismus

#### 1). Wirkung auf Mikrotubulin-Funktion

**[0232]** Humane Nabelschnurendothelzellen (HuVEC von Cambrex) wurden in dieser Studie verwendet, um KPU-2 und t-Butylphenylahistin vergleichend mit Colchicin und Taxol hinsichtlich ihres Effektes auf Tubulin durch Anfärbung von  $\alpha$ -Tubulin zu beurteilen.

**[0233]** Die dreißigminütige Einwirkung von KPU-2, t-Butylphenylahistin oder Colchicin (alle 2  $\mu$ M) induzierte Mikrotubulin-Depolymerisation, gekennzeichnet durch das Fehlen einer intakten Mikrotubulinstruktur, im Ge-gensatz zu der, die in der DMSO-Kontrolle beobachtet werden konnte, und die Bildung von Bläschen an der Zellmembran ("membrane blebbing") (ein klarer Hinweis auf Apoptose) in den HuVEC-Zellen, wohingegen Ta-xol unter diesen Bedingungen keine Mikrotubuli-Depolymerisation induzierte. Colchicin ist ein bekanntes Mi-krotubulin-depolymerisierendes Agens, während Taxol ein Tubulin-stabilisierendes Agens ist. Ähnliche Ergeb-nisse wurden erzielt, wenn CCD-27sk-Zellen KPU-2 oder Colchicin ausgesetzt waren.

#### 2). Induktion von Apoptose

**[0234]** Apoptose und seine Dysregulation spielen eine wichtige Rolle in der Onkologie; die selektive Induktion des programmierten Zelltod-Zyklus in Tumorzellen ist das Ziel vieler Programme der chemotherapeutischen Wirkstoffforschung und -entdeckung. Die Induktion von Apoptose kann durch verschiedene Verfahren demonstriert werden umfassend die charakteristische Bläschenbildung der Membran, DNA-Fragmentierung, Hy-perphosphorylierung des antiapoptotischen Faktors Bcl-2, Aktivierung des Caspase-Kaskade und Spaltung der Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP).

**[0235]** Die charakteristischen Anzeichen des apoptotischen Zelltods umfassen die Bläschenbildung der Zell-membran, die Auflösung des Zellkerns, das Schrumpfen und die Kondensierung der Zelle und schlussendlich der Zelltod, ders sehr verschieden vom nekrotischen Zelltod ist. In humanen Prostatatumorzellen induzierte

KPU-2 die typischen morphologischen Veränderungen, die mit den frühen Phasen der Apoptose assoziiert sind. Ein ähnliches Ergebnis war ebenso nach der Behandlung von HuVEC-Zellen mit KPU-2 zu erkennen.

### 3). DNA-Fragmentierung

**[0236]** Ein Charakteristikum einer späten Phase der Apoptose ist die Spaltung internukleosomaler DNA, das in einem distinkten "Leiter"-Muster ("ladder pattern") resultiert, das durch Gelelektrophorese visualisiert werden kann. Dieser Ansatz wurde gewählt, um den Effekt von KPU-2 auf das sogenannte "DNA-laddering" in Jurkat-Zellen (humane T-Zell-Leukämienlinie) im Vergleich mit Halimid und Dehydrophenylahistin (KPU-1) zu untersuchen. KPU-2 induzierte "DNA-laddering" bei einer Konzentration von 1 nM, während Halimid und KPU-1 bedeutend weniger wirksam waren.

### 4). Aktivierung der Caspase-Kaskade

**[0237]** Verschiedene Enzyme in der Caspase-Kaskade werden während der Apoptose aktiviert, umfassend Caspase-3, -8 und -9. Die Aktivität von Caspase-3 in Jurkat-Zellen wurde nach Behandlung mit KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin gemessen.

**[0238]** Die Ergebnisse zeigen, dass Caspase-3 in einer Dosis-abhängigen Art und Weise durch Behandlung mit allen drei Komponenten ähnlich wie bei Halimid aktiviert wurde. Die Caspase-3-Aktivierung erfolgte in einem Konzentrationsbereich, der ähnlich war zu den IC50s der Zytotoxizität in der Jurkat-Zelllinie (Tabelle 16).

Tabelle 16 Zytotoxizität von KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin in Jurkat-Zellen

NPI-Verbindung	Zytotoxizität	
	Wirksamkeit IC50 nM	Wirkungsgrad % Zelltod
KPU-2	11	94
KPU-35	5	93
t-Butylphenylahistin	165	93
Mitoxantron	41	99

### 5). Spaltung von Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) in Jurkat-Zellen

**[0239]** Um die Fähigkeit dieser Verbindungen, Apoptose in Jurkat-Zellen zu induzieren, zu beurteilen, wurde die Spaltung von Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) überprüft. PARP ist ein 116 kDa nukleares Protein, das eines der wichtigsten intrazellulären Ziele („Targets“) von Caspase-3 ist. Die Spaltung von PARP generiert ein stabiles 89 kDa-Produkt und dieser Prozess kann leicht durch sogenanntes "western blotting" beobachtet werden. Die Spaltung von PARP durch Caspase-3 ist eines der Kennzeichen der Apoptose und als solches dient es als exzellerter Marker für diesen Prozess. KPU-2 (100 nM) induzierte die Spaltung von PARP in Jurkat-Zellen 10 Stunden nach der Einwirkung der Verbindung auf die Zellen. KPU-2 schien dabei aktiver zu sein als Halimid oder KPU-1.

### 6). Verstärkte vaskuläre Permeabilität in HuVEC-Zellen

**[0240]** Es wurde gezeigt, dass Verbindungen, die die Mikrotubuline depolymerisieren (z. B. Combretastatin A-4-Phosphat, ZD6126) den vaskulären Kollaps von Tumoren *in vivo* induzieren. Dem vaskulären Kollaps geht eine rapide Induktion der vaskulären Zellpermeabilität, zunächst gegenüber Elektrolyten und kurz darauf gegenüber großen Molekülen, voran. Die erhöhte Permeabilität von HuVEC-Zellen gegenüber Fluoreszenz-markiertem Dextran wird in diesem Experiment als stellvertretend für den vaskulären Kollaps verwendet.

**[0241]** KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin induzierten schnell (innerhalb 1 Stunde) eine signifikante Permeabilität der HuVEC-Monolayer in einem Ausmaß vergleichbar mit der Permeabilität induziert durch Colchicin. Das Mikrotubulin-stabilisierende Agens Taxol war in diesem Experiment inaktiv ([Abb. 12](#)).

### 7). Profil innerhalb eines breit angelegten Kinase-Durchmusterungsexperiment ("kinase screen")

**[0242]** KPU-2 wurde zuerst bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M in einer repräsentativen Gruppe ("panel") von 60 verschiedenen Kinasen überprüft ("screened"); die ATP-Konzentration war 10  $\mu$ M. In dem primären

"screen" wurden vier Kinasen mehr als 50% inhibiert und die im sekundären "screening" bestimmten IC50's sind in Tabelle 17 dargestellt. Alle diese IC50-Werte sind im niedrigen mikromolaren Bereich, was darauf hinweist, dass die Inhibition dieser Kinasen nicht in Verbindung steht mit den niedrigen nanomolaren Aktivitäten, die bei der Tumorzell-Zytotoxizität beobachtet wurden.

Tabelle 17. Aktivität von KPU-2 gegenüber ausgewählten Kinasen

Kinase	IC50 (µM)
CDK1/Zyklin B (Human)	10,1
c-RAF (Human)	8,9
JNK3 (Ratte)	6,8
Lyn (Maus)	11,1

### BEISPIEL 9

#### In vivo Pharmakologie

**[0243]** Vorläufige Studien in der Maus mit KPU-2 wurden unter Verwendung der MX-1- (Brust) und HT-29 (Dickdarm)-Xenograftmodelle und dem P-388 murinen Leukämie-Tumormodell durchgeführt. Andere Tumormodelle ausgewählt auf der Basis der Aktivität im in vivo "tumor panel" waren die DU-145 (Prostata), MCF-7- (Brust) und die A549 (Lunge)-Zelllinien. Der humane Pankreastumor (MiaPaCa-2) wurde ebenso einbezogen. Die neuen Verbindungen wurden als Monotherapie und in Kombination mit klinisch verwendeten chemotherapeutischen Agenzien untersucht. Die Dosen der ausgewählten neuen Verbindungen wurden durch den akuten Verträglichkeitstest (maximal tolerierte Dosis, MTD) bestimmt und wurden, wenn nötig, ggf. in der jeweiligen Studie angepasst. Die Dosen der klinisch verwendeten chemotherapeutischen Agenzien wurden auf der Basis vorheriger Studien ausgewählt.

**[0244]** KPU-2 war die erste Verbindung, die in diesen fünf Tumormodellen untersucht wurde. Nach den ersten Resultaten von dieser Studie wurde alle drei Verbindungen im HT-29 humanen Dickdarmtumor-, dem DU-145 humanen Prostata- und dem MCF-7 humanen Brusttumor Xenograft-Modell miteinander verglichen.

**[0245]** Sämtliche oben beschrieben Modelle verwenden die subkutane Xenograft-Implantationstechnik und unterliegen möglicherweise selektiven Effekten einer Verbindung auf die subkutane Vaskulatur, die eine verstärkte oder scheinbare antitumorale Aktivität erzeugen. Um diese Möglichkeit zu umgehen, wurden zwei weitere Tumormodelle in die Untersuchung aufgenommen. Eines von diesen ist die Beobachtung von Lungenmetastasen nach der intravenösen Injektion von B16-F10-Melanomzellen aus der Maus. Das andere Modell ist die Implantation von humanen MDA-231-Brusttumorzellen in das Fettpolster der Brustdrüse der Maus. Obwohl das letztere Modell ein Xenograft-Modell ist, spielt hier die subkutane Vaskulatur keine Rolle.

#### Methoden

##### 1). Xenograft-Modelle

**[0246]** Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um (Ausnahmen für individuelle Studien werden angegeben): weibliche Nacktmäuse (nu/nu) zwischen 5 und 6 Wochen alt (~20 g, Harlan); Gruppengröße war 9–10 Mäuse pro Gruppe, solange nicht anders angegeben.

**[0247]** Verwendete Zelllinien für die Tumorimplantation waren: HT-29 humaner Dickdarmtumor; MCF-7 humaner Brusttumor; A549 humaner nicht-kleinzelliger Lungenkarzinom; MiaPaCa-2 humaner Pankreastumor; DU-145 humaner Prostatakarzinom.

**[0248]** Ausgewählte neue Verbindungen wurden als Monotherapie via der intraperitonealen (i.p.) Route in den für die individuellen Studien angegebenen Dosen verabreicht; für die Kombinationsstudien wurde das ausgewählte Referenzchemotherapieagens 15–30 min vor der Verbindung injiziert.

**[0249]** In dieser Studie verwendete Vehikel waren: 12,5% DMSO, 5% Cremaphor und 82,5% Erdnussöl für die ausgewählten neuen Verbindungen; (1:3) Polysorbat 80:13% Ethanol für Taxotere; (1:1) Cremaphor:Ethanol für Paclitaxel; für CPT-11 enthielt jeder mL der Lösung 20 mg Irinotecanhydrochlorid, 45 mg Sorbitol NF-Pulver

und 0,9 mg Milchsäure, wobei der pH mit NaOH oder HCl auf 7,4 eingestellt wurde. Salzlösungen werden verwendet, um die verwendeten Injektionskonzentrationen der Referenzverbindungen zu erreichen.

Das HT-29 humane Dickdarmtumormodell

**[0250]** Den Tieren wurden subkutan (s.c.) Fragmente von HT-29-Tumoren, gewonnen aus s.c. wachsenden Tumoren in Nacktmäusen als Wirt, mittels eines Trokar implantiert. Wenn die Tumogröße 5 mm × 5 mm (etwa 10–17 Tage) erreichte, wurden die Tiere in Behandlungs- und Kontrollgruppen aufgeteilt. Die Mäuse wurden zweimal wöchentlich gewogen und die Tumormessungen wurden beginnend am ersten Tag zweimal wöchentlich unter Verwendung eines Messschiebers durchgeführt. Die Tumormessungen wurden unter Verwendung der Formel  $(W^2 \times L)/2$  in das geschätzte mg Tumorgewicht umgerechnet. Wenn das geschätzte Tumorgewicht in der Kontrollgruppe im Durchschnitt 1000 mg erreichte, wurden die Mäuse gewogen, geopfert und der Tumor wurde entfernt. Die Tumoren wurden gewogen und das mittlere Tumorgewicht pro Gruppe wurde errechnet und die Inhibition des Tumorwachstums (TGI) wurde für jede Gruppe bestimmt (100% minus die Veränderung des Mittelwertes des Gewichts des behandelten Tumors/die Veränderung im Mittelwert des Kontroll-Tumorgewichts × 100).

**[0251]** In diesem Modell, solange nicht für die jeweilige Studie anderweitig vermerkt, wurden die ausgesuchten neuen Verbindungen jeden dritten Tag für 15 Tage intraperitoneal injiziert [1, 4, 8, 11 und 15 (q3dx5)]; CPT-11 wurde intraperitoneal an den Tagen 1, 8 und 15 (qwx3) verabreicht.

Das MCF-7 humane Brusstumormodell

**[0252]** Weibliche Nacktmäuse (~20 g) wurden 24 h vor der s.c. Implantierung von MCF-7 Tumorfragmenten (gewonnen aus s.c. Tumoren in Nacktmäusen als Wirten) s.c. mit 21-Tages Freisetzung-Pellets von Östrogen (0,25 mg) implantiert. Die Studie lief dann wie für das HT-29-Modell beschrieben ab, unter Verwendung von Taxoter als Standard-Chemotherapieagens. In diesem Modell, solange nicht für die jeweilige Studie anderweitig vermerkt, wurden die ausgesuchten neuen Verbindungen täglich an den Tagen 1–5 intraperitoneal injiziert (qdx5); Taxoter wurde intravenös an den Tagen 1, 3 und 5 (qodx3) verabreicht.

Das A549 humane Lungentumormodell

**[0253]** Den Tieren wurden s.c. Fragmente von A549-Tumoren, gewonnen aus s.c. wachsenden Tumoren in Nacktmäusen als Wirt, mittels eines Trokar implantiert. Wenn die Tumogröße 5 mm × 5 mm (etwa 10–17 Tage) erreichte, wurden die Tiere in Behandlungs- und Kontrollgruppen aufgeteilt. Die Studie lief dann wie für das HT-29-Modell beschrieben ab, unter Verwendung von Taxoter und CPT-11 als Standard-Chemotherapieagenten. In diesem Modell, solange nicht für die jeweilige Studie anderweitig vermerkt, wurden die getesteten Verbindungen in Kombination mit CPT-11 gemäß eines q3dx5-Dosierungsschema oder gemäß eines qdx5-Dosierungsschemas für die Kombination mit Taxoter via der intraperitonealen Route verabreicht; CPT-11 wurde gemäß eines qwx3-Zeitplans via der intraperitonealen Route verabreicht; Taxoter wurde intravenös gemäß des qodx3-Dosierungsschemas verabreicht.

Das MiaPaCa-2 humane Pankreatumormodell

**[0254]** Den Tieren wurden s.c. Fragmente von MiaPaCa-2-Tumoren, gewonnen aus s.c. wachsenden Tumoren in Nacktmäuse als Wirt, mittels eines Trokar implantiert. Wenn die Tumogröße 5 mm × 5 mm (etwa 10–17 Tage) erreichte, wurden die Tiere in Behandlungs- und Kontrollgruppen aufgeteilt. Der Rest der Studie lief dann wie für das HT-29-Modell beschrieben ab, unter Verwendung von Gemcitabin als Standard-Chemotherapieagens. In diesem Modell, solange nicht für die jeweilige Studie anderweitig vermerkt, wurden die Testverbindungen jeden dritten Tag an den Tagen 1, 4, 7, 10 und 15 (q3dx5) via der intraperitonealen Route verabreicht; Gemcitabin wurde an den Tagen 1, 4, 7 und 10 (q3dx4) via der intraperitonealen Route verabreicht.

Das DU-145 humane Prostatatumormodell

**[0255]** Männlichen Mäusen wurden s.c. Fragmente von DU-145-Tumoren, gewonnen aus s.c. wachsenden Tumoren in männlichen Nacktmäusen als Wirt, mittels eines Trokar implantiert. Wenn die Tumogröße 5 mm × 5 mm (etwa 13–17 Tage) erreichte, wurden die Tiere in Behandlungs- und Kontrollgruppen aufgeteilt. Der Rest der Studie lief dann wie für das HT-29-Modell beschrieben ab, unter Verwendung von Taxoter als Standard-Chemotherapieagens. In diesem Modell, solange nicht für die jeweilige Studie anderweitig vermerkt, wurden die Testverbindungen via der intraperitonealen Route an den Tagen 1, 3, 5, 8 und 11 (q3dx5) verabreicht;

Taxoter wurde an den Tagen 1, 3 und 5 (q2dx3) intravenös verabreicht.

2). Tumormodelle mit nicht-subkutaner Implantation

**[0256]** Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um: weibliche Nacktmäuse (nu/nu) (MDA-231 Studie) oder B6D2F1-Mäuse (B16-F10-Studien), die zwischen 5 und 6 Wochen alt waren (~20 g, Harlan); soweit nicht anderweitig beschrieben, war die Gruppengröße 10 Mäuse pro Gruppe.

**[0257]** Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um: MDA-MB-231 humaner Brusstumor und B16-F10 murine Melanomazellen.

**[0258]** Die NPI-Verbindungen wurden als Monotherapie via der intraperitonealen Route in den für die jeweilige Studie angegebenen Dosen verabreicht; in den Kombinationsstudien wurden die ausgewählten Referenz-Chemotherapeutika-Agenzien 15–30 min vor der NPI-Verbindung injiziert.

MDA-231 humaner Brusstumor

**[0259]** Weiblichen Nacktmäusen wurden  $2 \times 10^6$  MDA-231-Zellen, gewonnen aus in vitro-Zellkultur in das Brustdrüsen-Fettpolster injiziert. Wenn die Tumorgröße 5 mm × 5 mm erreicht hatte (etwa 14–28 Tage), wurden die Tiere in Behandlungs- und Kontrollgruppen aufgeteilt. Die Studie lief dann wie für das HT-29-Modell beschrieben ab, unter Verwendung von Paclitaxel als dem Standard-Chemotherapieagens.

**[0260]** In diesem Modell, solange nicht für die jeweilige Studie anderweitig vermerkt, wurden die Testverbindungen via der intraperitonealen Route an den Tagen 1, 4, 8, 11 und 15 (q3dx5) verabreicht; Paclitaxel wurde via der interperitonealen Route an den Tagen 1–5 (qdx5) verabreicht.

Das B16-F10 murine Melanoma-Metastasenmodell

**[0261]** Die Mäuse erhielten B16-F10-Zellen (präpariert aus einer in vitro-Zellkultur von B16-F10-Zellen) über die iv-Route am Tag 0. Am Tag 1 wurden die Mäuse in Behandlungs- und Kontrollgruppen randomisiert und die Behandlung begann. Beginnend am Tag 1 wurden die Mäuse zweimal wöchentlich gewogen. Alle Mäusen wurden am Tag 16 geopfert, die Lungen wurden entfernt, gewogen und die Kolonien an der Oberfläche gezählt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert der Kolonienanzahl der behandelten Mäuse/Mittelwert der Kolonienanzahl der Kontrollmäuse (T/C) × 100% ausgedrückt. Die sogenannte "metastasis growth inhibition" (MGI) erhält man durch Subtraktion dieser Zahl von 100%. Als Chemotherapiestandardagens wurde in dieser Studie Paclitaxel verwendet.

**[0262]** In diesem Modell, solange nicht für die jeweilige Studie anderweitig vermerkt, wurden die Testverbindungen via der intraperitonealen Route an Tagen 1–5 (qdx5) verabreicht; Paclitaxel wurde an Tagen 1–5 (qdx5) intravenös verabreicht.

**[0263]** Wenn zweckdienlich ( $n \geq 3$ ), werden die Resultate als Mittelwerte ± Standardabweichung ("SEM") dargestellt. Sofern nicht anderweitig angegeben, erfolgte die statistische Analyse von Studien mit mehreren Gruppen unter Verwendung von ANOVA mit dem Neuman-Keulspost hoc-Test durchgeführt. Ein einseitiger t-Test wurde ebenso verwendet, basierend auf der Hypothese, dass die Verbindung oder das Arzneimittel oder die Kombination der beiden, Tumorwachstum reduzieren würde.

Ergebnisse

Studien im HT-29-Human Dickdarmtumor-Xenograft-Modell

1. In vivo-Evaluierung von KPU-2 +/- CPT-11 im HT-29 humanen Dickdarmtumor-Xenograft-Modell

**[0264]** Diese Studie untersuchte die Veränderungen in der Dosierungsstärke und dem Dosierungsprogramm für KPU-2 allein und in Kombination mit dem relevanten Chemotherapeutikum CPT-11 im HT-29-Modell.

**[0265]** KPU-2 wurde täglich in Dosen von 7,5 mg/kg ip für fünf Tage (qdx5) verabreicht, 3,75 mg/kg ip bid für fünf Tage, 7,5 mg/kg ip jeden zweiten Tag für 10 Tage (qodx5) und 7,5 mg/kg ip jeden dritten Tag für 15 Tage (q3dx5). Die Kombination von CPT-11 mit NPI-2358 bei einer Dosis von 7,5 mg/kg ip q3dx5 resultierte in einem signifikant größeren Effekt als der der jeweiligen Verbindung allein, dieser hielt für die Dauer der Studie an

([Abb. 13](#)). Diese Beobachtungen während der in vivo-Phase der Studie wurden durch die Mittelwerte der finalen Tumorgewichte der Gruppe bei der Autopsie bestätigt, wobei nur die Kombinationsgruppe ein statistisch signifikant niedrigeres Tumorgewicht aufwies als die Kontrollgruppen. Zusätzlich war der Unterschied zwischen den Mittelwerten der Tumorgewichte der Kombinationstherapie- und der CPT-11-Monotherapie-Gruppen statistisch signifikant ([Abb. 14](#)). Bei der Untersuchung der individuellen, finalen Tumorgewichte bei der Autopsie ist der größere Effekt der Co-Therapie offensichtlich ([Abb. 14](#)). Die Tumorwachstumsinhibition ("TGI") der Co-Therapie war 78% im Vergleich zu 38,9% bei CPT-11 allein. Die Tumorwachstumsinhibition ("TGI") der kombinierten Therapiegruppe übertrifft das NCI-Kriterium von 58% für ein positives Resultat.

## 2. Untersuchung von KPU-2 +/- Standard-Chemotherapie in fünf humanen Tumor-Xenograft-Modellen

**[0266]** Diese Studie besteht aus fünf verschiedenen Bereichen, jeder mit seinem eigenen Protokoll, Zeitintervall, Dosierungsprogramm und Referenz-Verbindung. Jeder Bereich wird bei der Darstellung im Lichte des jeweiligen Tumor-Modells betrachtet.

**[0267]** Das Ziel des HT-29-Bereichs der Studie war, eine etwas höhere Dosis von KPU-2 (10 mg/kg ip q3dx5) verglichen mit der Dosis in der oben beschriebenen Studie, in der eine deutliche Synergie zwischen KPU-2 (7,5 mg/kg ip q3dx5) und CPT-11 (100 mg/kg ip qwx3) beobachtet wurde, nun im HT-29 humanen Dickdarmtumor-Xenograft-Modell zu untersuchen.

**[0268]** Wie aus [Abb. 15](#) entnommen werden kann, resultiert die Kombination von KPU-2 und CPT-11 in diesem Modell in einer deutlichen Synergie bei der Inhibition des Tumorwachstums, wobei das Tumorwachstum in der Kombinations-Therapie-Gruppe bis zum Behandlungstag 29 fast völlig inhibiert wird. Die kombinierte Therapie behielt ihre Wirkungskraft und das geschätzte Tumorwachstum für diese Gruppe war signifikant niedriger als das für jede der Monotherapie-Gruppen. Dementsprechend inhibierte die Verabreichung von KPU-2 und CPT-11 das Tumorwachstum und ist damit eine wirksame Antitumorbehandlung.

**[0269]** Die Beobachtungen im in vivo-Teil dieser Studie (geschätztes Tumorwachstum, [Abb. 15](#)) werden durch die Messungen der Gewichte der bei der Autopsie herausgeschnittenen Tumore ([Abb. 16](#)) gestützt. Die Tumorgewichte der Kombinationsgruppe waren signifikant geringer als die der Kontrollen ( $p < 0,01$ ) wie auch die Tumorgewichte für CPT-11 allein ( $p < 0,05$ ).

**[0270]** Wenn man die individuellen finalen Tumorgewichte betrachtet, ([Abb. 16](#)), dann war die Tumorgröße in der Kombinationsgruppe generell kleiner als die der Kontrollgruppen oder der Gruppen mit anderer Behandlung. Die Tumorwachstumsinhibition ("TGI") der Kombinationsgruppe war 65,8%, was unter Zugrundelegen des NCI-Kriteriums auf einen positiven Effekt hindeutet, während die Monotherapie nicht das NCI-Kriterium eines  $TGI > 58\%$  erreichte.

## 3. Studie der Aktivität von KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin in der HT-29 humanen Dickdarmtumor-Xenograft-Studie

**[0271]** Die Resultate dieser Studie sind in [Abb. 17](#) und Tabelle 18 dargestellt. Die Kombinationstherapiegruppen zeigten allesamt eine deutliche Synergie zwischen den neuen Verbindungen und CPT-11. Die individuellen Tumorgewichte zeigen die Wirksamkeit der Co-Therapie-Behandlung ([Abb. 18](#)). In jedem Fall übertraf die Tumorwachstumsinhibition ("TGI") das NCI-Kriterium für einen positiven Effekt, während die Tumorwachstumsinhibition ("TGI") der CPT-11-Monotherapie dieses Niveau nicht erreichte.

**Tabelle 18.** Zusammenfassung der Studien, die im HT-29 humanen Kolontumor-Modell durchgeführt wurden

Beschreibung der Studie		NPI-Verbindung		Chemotherapeutikum		Kombination		Anmerkungen	
Nummer	Endpunkt	Nummer, mg/kg ip	Resultat TGI%	Name Dosis	Resultat TGI%	Resultat TGI%	Über NCI-Kriterium (TGI $\geq$ 58%)	Kombination	Synergie
2164	TGI	KPU-2 7,5 qdx5 7,5 q3dx5	Kein Effekt Kein Effekt	CPT-11 100 ip qwx3	39*	78 **,#			
2288	TGI	KPU-2 10→7,5 q3dx5	Kein Effekt	CPT-11 100 ip qwx3	36,5*	65,8 **		Kombination	Synergie Siehe Text
2139	TGI	KPU-2 7,5 q3dx5	Kein Effekt	CPT-11 100 ip qwx3	32,7	80,7 **,#		Kombination	Synergie
2139	TGI	KPU-35 10→7,5 q3dx5	Kein Effekt	CPT-11 100 ip qwx3	32,7	83,3 **,##		Kombination	Synergie 1+Day 13 1+Day 27
2139	TGI	t-Butyl- phenylahistin 30 q3dx5	Kein Effekt	CPT-11 100 ip qwx3	32,7	77,7 *,#		Kombination	Synergie

\* p<0,05 vs Kontrolle; \*\* p<0,01 vs Kontrolle; # p<0,05 vs CPT-11 allein; ## p<0,01 vs CPT-11 allein;

+= Anzahl der Todesfälle

4. Zusammenfassung der Effekte von KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin in Kombination mit CPT-11 im HT-29 humanen Dickdarmtumor-Xenograft-Modell

**[0272]** In Kombination mit CPT-11 verstärkt KPU-2 den Effekt von CPT-11, dem Standard-Chemotherapeutikum, auf ein Niveau, dass das NCI-Kriterium eines TGI  $\geq$  58% für einen positiven Effekt weit überschreitet. Die

in den drei Studien generierten Resultate sind sowohl für die Beobachtungen während der in vivo-Phase ([Abb. 19](#)) als auch für die Gewichte der bei der Autopsie entfernten Tumoren ([Abb. 20](#)) durchaus vergleichbar.

#### Studien im DU-145 humanen Prostatatumor-Xenograft-Modell

**[0273]** Zwei Studien wurden mit diesem Modell durchgeführt: die erste Studie beinhaltete KPU-2 allein und in Kombination mit Taxotere; in der zweiten Studie wurden vergleichend KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin allein und in Kombination mit Taxotere eingesetzt.

##### 1. Effekt von KPU-2 in Kombination mit Taxotere im DU-145 humanen Prostatatumor-Xenograft-Modell

**[0274]** Wie aus den Daten, die während der in vivo-Phase dieser Studie ([Abb. 21](#)) erhoben wurden, gefolgt werden kann, war die kombinierte Therapie von KPU-2 und Taxotere die wirksamste Behandlung in DU-145 humanen Prostatatumor. Der Effekt der Behandlung war am stärksten ausgeprägt am Beginn der Studie und schien sich bei Vorlauf der Studie zu vermindern. In den Behandlungstagen 20–27 bewirkte die Kombinationstherapie einen sichtbaren TGI, der das NCI-Kriterium ( $TGI \geq 58\%$ ) überschritt, und das geschätzte Tumorge wicht bei der Kombinationstherapie war signifikant geringer als bei der Monotherapie.

##### 2. Aktivität von KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin allein oder in Kombination mit Taxotere im DU-145 humanen Prostata-Xenograft-Modell

**[0275]** Basierend auf den Daten erhalten mit KPU-2 in Kombination mit Taxotere in der oben beschriebenen Studie wurde eine zweite Studie initiiert, in der die Verwendung von KPU-2 mit KPU-35 und t-Butylphenylahistin sowohl allein als auch in Kombination mit Taxotere verglichen werden sollte.

**[0276]** Die Beobachtungen, die während der in vivo-Phase dieser Studie gemacht wurden, weisen darauf hin, dass die Kombination von entweder KPU-2 oder KPU-35 mit Taxotere zu einer stärkeren Reduktion des Tumorwachstums führt, als Taxotere alleine ([Abb. 22](#)). Die Kombination von KPU-35 und Taxotere führte zu einer fast vollkommenen Hemmung des Tumorwachstums.

**[0277]** Die Gewichte der bei der Autopsie entfernten Tumore bestätigten die in der in vivo-Phase der Studie gemachten Beobachtungen. Die Kombination von jeweils KPU-2 ([Abb. 23](#)) oder KPU-35 ([Abb. 24](#)) mit Taxotere war signifikant wirksamer hinsichtlich der Hemmung des Tumorwachstums als Taxotere allein. Im Falle von KPU-35 zeigten drei von zehn Mäusen Anzeichen für ein Schrumpfen der Tumore. Die Indices der Tumorwachstumsinhibition deuten auf eine merkliche Inhibition des Tumorwachstums bei KPU-2 (Gruppen-Mittelwert = 74,1%) und eine fast totale Hemmung bei KPU-35 (Gruppen-Mittelwert = 92,5%) hin. Taxotere allein erreichte nicht das etablierte NCI-Kriterium für einen positiven Effekt ( $TGI \geq 58\%$ ).

#### 5. Studien im MCF-7 humanen Brusttumor-Xenograft-Modell

**[0278]** Diese Studie verglich die Effekte von KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin im MCF-7 humanen Brusttumor-Xenograft-Modell. Die Dosierungen der Verbindungen wurden an den Tagen 1, 2, 3, 4 und 7 verabreicht; Taxotere wurde an den Tagen 1, 3 und 7 verabreicht.

**[0279]** Die ausgewählten neuen Verbindungen weisen früh beginnende und statistisch signifikante Effekte auf, wenn sie in diesem Modell in Kombination mit Taxotere eingesetzt werden, was offenbar zu einer fast vollständigen Inhibition des zu erwartenden Tumorwachstums führt ([Abb. 25](#)). Von den drei Verbindungen schien KPU-2 die wirksamste zu sein, wobei t-Butylphenylahistin ebenfalls eine signifikante Potenzierung des Taxotere-Effektes zeigte.

#### 6. Studien im A549 humanen nicht-kleinzeligen Lungentumor-Xenograft-Modell

**[0280]** Die Beobachtungen während der in vivo-Phase dieser Studie ([Abb. 26](#)) zeigten an, dass die Kombination von KPU-2 (7,5 mg/kg ip, qdx5) mit Taxotere im Vergleich zur Kontroll- oder der Monotherapiegruppe zu einer ausgeprägten Inhibition des Tumorwachstums führte. Dies wurde durch die Gewichte der bei der Autopsie entfernten Tumore bestätigt, da hier der Mittelwert der Co-Therapie-Gruppe signifikant niedriger war als der von Taxotere allein oder der Kontrollgruppe ([Abb. 27](#)). Die Tumorgewichte aus der Co-Therapie-Gruppe bilden einen "cluster" geringer Tumorgewichte, was auf die Konsistenz dieses Effekts hindeutet.

**[0281]** Bei der Berechnung des Tumorwachstumsindex wies die Co-Therapie-Gruppe im Vergleich zur Kon-

trollgruppe einen TGI von 74,4% aus, was das NCI-Kriterium für einen positiven Effekt (TGI  $\geq$  58%) weit überschreitet. Taxoter allein hatte einen TGI von 26,1%.

#### 7. Studien im MDA-231 humanen Brusttumor orthotopischen Xenograft-Modell

**[0282]** Dieses Modell umfasst das Einbringen von humanem Tumorgewebe in das Fettpolster der Brustdrüse der Maus, welches ein Surrogat der natürlichen Umgebung darstellt. Auf diese Art wird die Möglichkeit eines positiven Effektes aufgrund spezifischer Auswirkungen auf die subkutane vaskuläre Schicht vermieden. Diese Studie verglich den Effekt von KPU-2 (7,5 mg/kg ip, q3dx5) allein und in Kombination mit Paclitaxel (16 mg/kg ip, qdx5).

**[0283]** Drei Wochen nach Beginn der Studie trat in der Kombinationstherapiegruppe eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums auf, ein hoch signifikanter Effekt. Dieser Effekt schien ausgeprägter zu sein als der von Taxoter allein ([Abb. 28](#)).

#### 8. Studien im murinen Melanom B16-F10 metastatischen Tumormodell

**[0284]** Diese Studie untersuchte den Effekt von KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin allein oder in Kombination mit Paclitaxel auf die Anzahl von Metastasen, die 16 Tage nach einer intravenösen Injektion der Maus mit B16-F10 Melanomzellen auf der Oberfläche der Lunge erschienen. Dieses Modell ist kein Xenograft-Modell; nichtsdestotrotz beinhaltet es keinen hohen Grad von Vaskularisierung in die Tumormasse.

**[0285]** In diesem Modell war die wirksamste Behandlung KPU-2 allein ([Abb. 29](#)) mit einer mittleren Anzahl von Metastasen, die etwa 10% niedriger war als die bei Paclitaxel (MGIs von 41,6% bzw. 35,0%). Auch wenn diese Studie selbst nicht nachweist, dass die Kombinationstherapie wirksamer als die Monotherapie ist, so zeigt sie dass KPU-2, KPU-35 und t-Butylphenylahistin am wirksamsten in hoch vaskularisierten Tumoren sind.

#### BEISPIEL 10

##### Untersuchungsmethoden für die Aktivität gegenüber pathogenen Pilze

**[0286]** Der Vergleich der Aktivität von Dehydrophenylahistin oder seinem Analog relativ zu bekannten antifungalen Verbindungen wie oben beschrieben, gegenüber einem pathogenen Pilz, zur Bestimmung des AF/IS-Wertes von Dehydrophenylahistin oder seinem Analog wird direkt gegenüber dem fungalen Organismus gemessen, z. B. durch die Adaptation des NCCLS-Brühe-Makroverdünnungs-Verfahrens beschrieben in Diagn Micro and Infect Diseases 21: 129–133 (1995) auf einer Mikrotiterplatte. Die antifungale Aktivität kann ebenso in Tiermodellen für fungale Infektion bestimmt werden. Man kann hierfür beispielsweise das Steroid-behandelte Mausmodell für pulmonare Mucormycose verwenden (Goldaill, L.Z. & Sugar, A.M. 1994 J Antimicrob Chemother 33: 369–372). Veranschaulichend dargestellt gibt man in solcher Studien einer Anzahl von Tieren kein Dehydrophenylahistin oder sein Analog, verschiedene Dosen von Dehydrophenylahistin oder seinem Analog (und/oder Kombinationen mit einem oder mehreren anderen antifungalen Agenzien), bzw. eine Positivkontrolle (z. B. Amphotericin B) beginnend vor, gleichzeitig mit oder nachfolgend einer Infektion mit dem Pilz. Die Tiere können einmal alle 24 Stunden mit der ausgesuchten Dosis von Dehydrophenylahistin oder seinem Analog, der Positivkontrolle oder nur den Vehikel behandelt werden. Die Behandlung wird dann für eine vorher festgesetzte Anzahl von Tagen fortgeführt, z. B. für bis zu zehn Tagen. Die Tiere werden nach der Behandlungsperiode für einige Zeit weiter beobachtet, z. B. für eine Gesamtzeit von drei Wochen, wobei die Mortalität täglich bestimmt wird. Bei den Modellen kann es sich um systemische, pulmonare, vaginale und andere Infektionsmodelle mit oder ohne andere Behandlungen (z. B. Behandlung mit Steroiden) handeln, die geeignet sind, eine humane Testperson, die infektionsanfällig ist, nachzuahmen.

**[0287]** Als weitere Veranschaulichung ein Verfahren für die Bestimmung des therapeutischen Wirkungsgrades in vivo ( $ED_{50}$ , z. B. ausgedrückt in mg-Dehydrophenylahistin oder seinem Analog/kg Subjekt) ist ein Nagetier-Modellsystem. Eine Maus wird z. B. mit einem fungalen Pathogen infiziert, wie etwa durch intravenöse Infektion mit etwa der 10-fachen 50% lethalen Dosis des Pathogens ( $10^6$  C. albicans Zellen/Maus). Unmittelbar nach der fungalen Infektion werden der Maus vorher festgelegte Dosierungsvolumina von Dehydrophenylahistin-Verbindungen gegeben. Der  $ED_{50}$  wird nach dem Verfahren von Van der Waerden (Arch Exp Pathol Pharmacol 195: 389–412, 1940) aus der Überlebensrate, die 20 Tage post-Infektion verzeichnet wird, errechnet. Generell sterben unbehandelte Kontrolltiere 7 bis 13 Tage post-Infektion.

**[0288]** In einer weiteren veranschaulichenden Ausführungsform werden C. albicans Wisconsin (C43) und C.

tropicalis (C112) auf Sabouraud Dextrose-Agar-(SDA-)Schrägen für 48 h bei 28°C kultiviert, dann in Salzlösung suspendiert und auf 46% Transmission bei 550 nm in einem Spektralphotometer eingestellt. Das Inokulum wird weiter mit einem Hemazytometer auf etwa 1 oder  $5 \times 10^7$  CFU/ml eingestellt, was durch Zählung (der Kolonien) der Platten bestätigt wird. CF-1-Mäuse werden durch Injektion von 1 oder  $5 \times 10^6$  CFU in die Schwanzvene infiziert. Antifungale Agenzien in Ethanol:Wasser (10:90) werden 4 h post-Infektion und nachfolgend für 3 oder 4 weitere Tage einmal täglich intravenös oder subkutan verabreicht. Überleben wird täglich überprüft. Die ED<sub>50</sub> kann als die Dosis definiert werden, die das Überleben von 50% der Mäuse ermöglicht.

## BEISPIEL 11

### Evaluierung der antimikotischen Aktivität

**[0289]** Benzimidazole und Griseofulvin sind Antitubulinagenzien, die geeignet sind, fungale Mikrotubuline zu binden. Einmal gebunden interferieren diese Verbindungen in sensitiven Organismen mit der Zellteilung und dem intrazellulären Transport, was in Zelltod resultiert. Kommerziell werden Benzimidazole als fungizidale Agenzien in der Veterinärmedizin und bei der Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten eingesetzt. Eine große Bandbreite von Pilzspezies, umfassend *Botrytis cinerea*, *Beauveria bassiana*, *Helminthosporium solani*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Aspergillus* sind suszeptibel gegenüber diesen Molekülen. Bedenken hinsichtlich der Giftigkeit und der erhöhten Resistenz gegenüber Arzneimittel haben jedoch ihre Verwendung negativ beeinflusst. Griseofulvin wird in der Klinik verwendet, um Flechtengrind-Infektionen („Ringworm-infections“) der Haut, Haare und Nagel verursacht durch *Trichophyton* sp., *Microsporum* sp., und *Epidermophyton floccosum* zu behandeln. Sein antifungales Spektrum ist jedoch auf diese Klasse von fungalen Organismen begrenzt. Ebenso ist die Genotoxizität ein signifikanter Nebeneffekt. Die alternative Erstbehandlung mit Terbinafin ist kostenintensiver. Ebenso wurde kürzlich eine klinische Resistenz in *Trichophyton rubrum* (der Haupterreger für alle Dermatophyten-Infektionen) beobachtet.

**[0290]** Bei *Candida albicans* ist die Mikrotubulin/Mikrofilament-Bildung beeinträchtigt, wenn die Zellen den Mikrotubulin-Inhibitoren Nocodazol und Chloroprophan ausgesetzt werden. Diese Resultate sprechen zusätzlich für die Erforschung von Zytoskelett-Inhibitoren als wirksame antimykotische Agenzien. Dementsprechend wurde die antimykotische Aktivität mehrerer hierin offenerbarter Verbindungen untersucht.

**[0291]** Insbesondere wurden die offenen Verbindungen gegenüber kommerziell erhältlichen Mikrotubulin-Inhibitoren und auch anerkannten antifungalen Agenzien evaluiert. Die in dieser Studie verwendeten Testverbindungen und Kontrollen: (–)-Phenylahistin, KPU-1, KPU-2, KPU-11 und KPU-17, KPU-35, t-Butylphenylahistin, Colchicin (kommerzieller Mikrotubulin-Inhibitor getestet in 3 *Candida*-Isolaten), Benomyl (kommerzieller Mikrotubulin-Inhibitor getestet in 3 *Candida*-Isolaten), Griseofulvin (kommerzieller Mikrotubulin-Inhibitor und Antibiotika-Kontrolle für Untersuchungen in 6 Dermatophyt-Isolaten), Amphotericin B (Antibiotika-Kontrolle für die Untersuchung in 3 *Candida*-Isolaten), Itraconazol (Antibiotika-Kontrolle für Untersuchungen in 2 *Aspergillus*-Isolaten).

**[0292]** Die Mikroorganismen, in denen diese Verbindungen getestet wurden, umfassten: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*. Zwei Isolate von jeder Spezies wurden untersucht mit der Ausnahme von *Candida glabrata* (ein Isolat).

**[0293]** Die Tests für antifungale Suszeptibilität wurden entsprechend der Verfahren beschrieben im National Committee for Clinical Laboratory Standards, M38-A "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Test of Conidium-Forming Filamentous Fungi; Approved Standard" ausgeführt. Dies umfasst eine Inokulum-Größe von  $0,4-5 \times 10^4$  in RPMI-1640 mit Glutamin und ohne Bicarbonat mit einer Inkubation bei 30 oder 35°C für 48 h zu testen. Die minimale inhibitorische Konzentration ("MIC") wurde als die niedrigste Konzentration, die zu einer 80%-igen Reduktion in der Trübe verglichen mit einem Röhrchen ohne Zusatz von Arzneimitteln führte, definiert. Die Arzneimittel-Konzentrationen der zu erforschenden Verbindungen betrugen 0,03–16 µg/ml und 0,015–8 µg/ml im Falle von Itraconazol und Griseofulvin.

**[0294]** Die minimale inhibitorische Konzentration (MIC), bei der die Verbindung das Wachstum des Zielmikroorganismus verhinderte, wurde entsprechend einer modifizierten Version des NCCLS-Protokolls bestimmt. Die minimalen inhibitorischen Konzentrationen (MIC) wurden im ersten 24-Stunden-Intervall, in dem das Wachstum im Röhrchen der Arzneimittel-freien Kontrolle bestimmt werden konnte, bestimmt. Die definierte MIC war die niedrigste Konzentration, die eine 80%-ige Reduktion der Trübe verglichen mit der Wachstumskontrolle aufwies. Die minimale lethale Konzentration ("MLC") wurde durch Plattieren von 0,1 µl der MIC-Kon-

zentration und jeder Konzentration über der MIC bestimmt. Die erste Konzentration, die dabei fünf oder weniger Kolonien mit Pilzwachstum zeigte, was eine 99,95%-ige Tötung repräsentiert, wurde als MLC bezeichnet. Wenn eine MIC erhalten wurde, wurde die minimale fungizidale Konzentration ("MFC") bestimmt, um die fungistatische/fungizidale Natur der Verbindung abzuschätzen. Diese Prozedur umfasst das Verdünnen von mit Arzneimitteln behandelten Zellproben (entnommen aus Test-Vertiefungen, die die Verbindung an und über der MIC enthalten) auf Konzentrationen der Verbindungen, die signifikant unter der inhibitorischen Konzentration liegen und das Deponieren auf Agarplatten. Die Verbindung wird als fungistatisch angesehen, wenn die Zellen das Wachstum wieder aufnehmen und als fungizidal, wenn kein Wachstum mehr möglich ist, weil die Verbindung die Organismen getötet hatte.

**[0295]** Die hierin offenbarten Verbindungen waren gegenüber zwei *Trichophyton*-Spezies wirksam. *T. rubrum* ist das prinzipielle verursachende Agens für humane dermatophytische Infektionen und wäre der Schlüsselorganismus, auf den die Entwicklung eines klinischen Agens abzielen musste.

**[0296]** Die Verbindungen KPU-2, KPU-11 und KPU-17, KPU-35 & t-Butylphenylahistin waren in ihrer Wirksamkeit gleichwertig oder in einigen Fällen wirksamer als Griseofulvin, ein pharmazeutisches Standard-Agens gegenwärtig eingesetzt für die Behandlung von dermatophytischen Infektionen.

**[0297]** Die Verbindungen (–)-Phenylahistin und KPU-1 waren signifikant weniger wirksam als die anderen Verbindungen bei einem Test in gegenüber *T. rubrum* und schwächer aber eher vergleichbar mit den anderen, wenn sie gegenüber dem sensitiven *T. mentagrophytes*-Isolat getestet wurden.

**[0298]** In den Fällen, in denen ein MFC bestimmt werden konnte, zeigte die Resultate an, dass diese Verbindungen fungistatischer Natur sind (siehe Tabellen 19 und 20).

Tabelle 19. Antifungale Aktivität von Dehydrophenylahistin und Analoge davon

Verbindung	MICs und MFCs, ?g/ml						A. fumigatus-Isolat #1	A. fumigatus-Isolat #2
	C. albicans 90028	C. albicans 10231	C. glabrata	MIC	MFC	MIC	MFC	
(-)Phenylahistin	>70	**	70*	-	>70	-	>16	-
KPU-1	>68*	-	>68	-	>68	-	>16	-
KPU-2	>32	-	>32	-	>32	-	>16	-
KPU-11 und KPU-17	>32	-	>32	-	>32	-	>16	-
KPU-35	>32	-	>32	-	>32	-	0,06	>16
t-Butylphenylahistin	>32	-	>32	-	>32	-	<0,03	0,125
Amphotericin B	0,5	0,5	0,5	1	1	-	<0,03	0,125
Griseofulvin	-	-	-	-	-	-	0,5	-
Itraconazol	-	-	-	-	-	1	-	-
Colchicin	>128	-	>128	-	>128	-	-	-
Benomyl	64	>512	64	>512	64	>512	-	-

Tabelle 20. Antifungale Aktivität von Dehydrophenylahistine und Analoga davon

Verbindung	<i>T. rubrum</i> -Isolat #1				<i>T. mentagrophytes</i> -Isolat #1				<i>T. mentagrophytes</i> -Isolat #2				<i>E. floccosum</i> -Isolat #1				<i>E. floccosum</i> -Isolat #2			
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC		
NP12350	>16	-	0,16	>16	16	>16	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-		
NP12352	>16	-	0,25	>16	4	>16	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-		
NP12358	>16	-	<0,03	0,125	2	>16	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-		
NP12362	0,06	>16	<0,03	<0,03	1	>16	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-		
NP12386	<0,03	0,125	<0,03	0,06	1	>16	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-		
NP12460	<0,03	0,125	<0,03	<0,03	4	>16	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-	>16	-		
Amphotericin B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Griseofulvin	0,5	-	<0,015	-	1	-	2	-	2	-	2	-	2	-	4	-	4	-		
Itraconazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Colchicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Benomyl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

[0299] Die hierin beschriebenen Beispiele sind einzig und allein dargelegt, um dem Verständnis der Erfindung zu dienen. Folglich wird der Fachmann zu würdigen wissen, dass die offensichtlichen Verfahren und Verbindungen weitere Derivate von Dehydrophenylahistinen umfassen und bereitstellen können.

[0300] Der Fachmann würde es jederzeit zu würdigen wissen, dass die vorliegende Erfindung gut geeignet

ist, um die genannten Ziele und Vorteile zu erreichen, als auch solche, die sich als inharent verstehen. Die hierin beschriebenen Verfahren und Prozeduren sind repräsentativ für die bevorzugten Ausführungsformen und sind rein exemplarisch. Jegliche Veränderungen hierin und andere Verwendungen sind dem Fachmann einleuchtend und werden vom Geist der Erfindung umfasst.

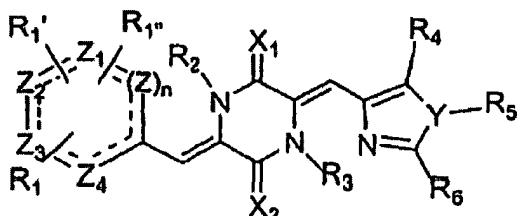
**[0301]** Es ist für den Fachmann nahe liegend, dass verschiedene Ersetzungen und Modifikationen innerhalb der hierin offenbarten Beispiele gemacht werden können, ohne sich vom Umfang und Geist der Erfindung zu entfernen.

**[0302]** Wie oben erwähnt, zeigen die in der Beschreibung erwähnten Patente und Publikationen das Niveau der Fachleute an, die diese Erfindung betrifft.

**[0303]** Die hierin illustrativ beschriebene Erfindung kann angemessen in der Abwesenheit jegliches Elementes oder Elemente, jeglicher Einschränkung oder Einschränkungen die nicht spezifisch hierin offenbart werden, durchgeführt werden. Die Begriffe und Ausdrücke, die verwendet wurden, werden als beschreibende Begriffe verwendet und nicht als einschränkende, und es ist nicht beabsichtigt, durch die Verwendung solcher Begriffe und Ausdrücke den Ausschluss von Äquivalenten der hier gezeigten und beschriebenen Merkmale oder Teilen davon anzuseigen. Es ist anerkannt, dass verschiedene Modifikationen möglich sind innerhalb des Geltungsbereichs der Erfindung. Es sollte daher selbstverständlich sein, dass obwohl die vorliegende Erfindung durch bevorzugte Ausführungsformen und optionale Merkmale spezifisch offenbart wurde, der Fachmann sich auf Modifikationen und Variationen der hierin offenbarten Konzepte verlegen kann und dass solche Modifikationen und Variationen als in dem Geltungsbereich der Erfindung fallend anzusehen sind. Der Geltungsbereich der Erfindung ist einzig und allein durch die folgenden Ansprüche definiert.

## Patentansprüche

## 1. Verfahren zur synthetischen Herstellung einer Verbindung mit der Struktur der Formel (I):



worin

R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>6</sub> jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen, Hydroxy, Carboxy, -CO-O-R<sub>7</sub>, Cyano, Alkylthio, halogeniertem Alkyl einschließlich polyhalogeniertem Alkyl, halogeniertem Carbonyl und Carbonyl -CCO-R<sub>7</sub>, worin R<sub>7</sub> ausgewählt ist aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen;

$R_1$  und  $R_1''$  jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten  $C_{1-C_{24}}$  Alkyl-, ungesättigten  $C_{1-C_{24}}$  Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen, Hydroxy, Carboxy,  $-CO-O-R_7$ , Cyano, Alkylthio, halogeniertem Alkyl einschließlich polyhalogeniertem Alkyl, halogeniertem Carbonyl und Carbonyl  $-CCO-R_7$ , worin  $R_7$  ausgewählt ist aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und saturierten  $C_{1-C_{24}}$  Alkyl-, ungesättigten  $C_{1-C_{24}}$  Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen;

$R_1'$  und  $R_1''$  entweder kovalent miteinander verbunden sind, um einen Ring zu bilden, oder nicht kovalent miteinander verbunden sind:

$R_2$ ,  $R_3$  und  $R_5$  jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten  $C_1$ - $C_{12}$  Alkyl-, ungesättigten  $C_1$ - $C_{12}$  Alkenyl-, Acyl-, Cycloalkyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino- und Nitrogruppen, Sulfonyl und substituierten Sulfonylgruppen;

$X_1$  und  $X_2$  getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Sauerstoffatom, einem Stickstoffatom und einem Schwefelatom, jeweils entweder unsubstituiert oder mit einer wie oben definierten  $R_5$ -Gruppe substituiert;

Y ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Stickstoffatom, einem mit R<sub>5</sub> substituierten Stickstoffatom, einem Sauerstoffatom, einem Schwefelatom, einem oxidierten Schwefelatom, einer Methylengruppe und einer substituierten Methylengruppe;

n eine ganze Zahl ist, die entweder Null, Eins oder Zwei ist;

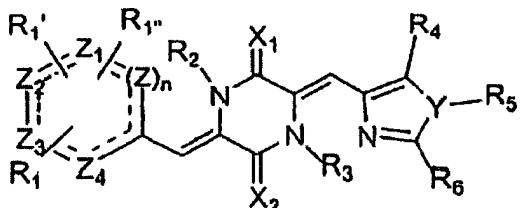
Z, für jedes einzelne n, falls es nicht Null ist, und  $Z_1, Z_2, Z_3$  und  $Z_4$  jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus einem Kohlenstoffatom, einem Schwefelatom, einem Stickstoffatom oder einem Sauerstoffatom; und die gestrichelten Bindungen entweder Einfach- oder Doppelbindungen sein können; wobei das Verfahren umfasst:

Reagieren eines Diacyldiketopiperazins mit einem ersten Aldehyd, um ein Zwischenprodukt herzustellen; und Reagieren des Zwischenprodukts mit einem zweiten Aldehyd, um die Verbindung herzustellen, wobei das erste Aldehyd und das zweite Aldehyd ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Oxazolcarboxaldehyd, Imidazolcarboxaldehyd, einem Benzaldehyd, Imidazolcarboxaldehyd-Derivaten und Benzaldehyd-Derivaten, wodurch die Verbindung gebildet wird.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das erste Aldehyd ein Imidazolcarbaldehyd oder ein Benzaldehyd ist.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das zweite Aldehyd ein Benzaldehyd oder Imidazolcarboxaldehyd ist.

#### 4. Verbindung mit der Struktur der Formel (I):



worin

R<sub>1</sub> und R<sub>6</sub> jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen, Hydroxy, Carboxy, -CO-O-R<sub>7</sub>, Cyano, Alkylthio, halogeniertem Alkyl einschließlich polyhalogeniertem Alkyl, halogeniertem Carbonyl und Carbonyl -CCO-R<sub>7</sub>, worin R<sub>7</sub> ausgewählt ist aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkyl-, ungesättigten C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen:

R<sub>1</sub> eine tertiäre Butylgruppe ist:

$R_1'$  und  $R_1''$  jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten  $C_{1-24}$  Alkyl-, ungesättigten  $C_{1-24}$  Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen, Hydroxy, Carboxy,  $-CO-O-R_7$ , Cyano, Alkylthio, halogeniertem Alkyl einschließlich polyhalogeniertem Alkyl, halogeniertem Carbonyl und Carbonyl  $-CCO-R_7$ , worin  $R_7$  ausgewählt ist aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten  $C_{1-24}$  Alkyl-, ungesättigten  $C_{1-24}$  Alkenyl-, Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino-, Nitro-, Azido-, Phenyl- und substituierten Phenylgruppen;

$R_1'$  und  $R_1''$  entweder kovalent miteinander verbunden sind, um einen Ring zu bilden, oder nicht kovalent miteinander verbunden sind;

$R_2$ ,  $R_3$  und  $R_5$  jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einem Halogenatom und gesättigten  $C_1$ - $C_{12}$  Alkyl-, ungesättigten  $C_1$ - $C_{12}$  Alkenyl-, Acyl-, Cycloalkyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Aryl-, substituierten Aryl-, Heteroaryl-, substituierten Heteroaryl-, Amino-, substituierten Amino- und Nitrogruppen, Sulfonyl und substituierten Sulfonylgruppen;

$X_1$  und  $X_2$  getrennt voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Sauerstoffatom, einem Stickstoffatom und einem Schwefelatom, jeweils entweder unsubstituiert oder mit einer wie oben definierten

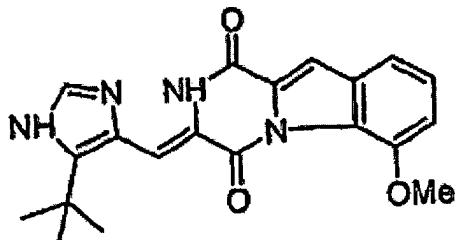
$R_5$ -Gruppe substituiert;

Y ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Stickstoffatom, einem mit  $R_5$  substituierten Stickstoffatom, einem Sauerstoffatom, einem Schwefelatom, einem oxidierten Schwefelatom, einer Methylengruppe und einer substituierten Methylengruppe;

n eine ganze Zahl ist, die entweder Null, Eins oder Zwei ist;

Z, für jedes einzelne n, falls es nicht Null ist, und  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  und  $Z_4$  jeweils getrennt voneinander ausgewählt sind aus einem Kohlenstoffatom, einem Schwefelatom, einem Stickstoffatom oder einem Sauerstoffatom; und die gestrichelten Bindungen entweder Einfach- oder Doppelbindungen sein können.

5. Verbindung mit der Struktur



6. Verfahren oder Verbindung gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 4, worin  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_5$  und  $R_6$  jeweils ein Wasserstoffatom ist.

7. Verfahren oder Verbindung gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 4, worin  $X_1$  und  $X_2$  jeweils ein Sauerstoffatom ist.

8. Verfahren oder Verbindung gemäß Anspruch 1, worin  $R_4$  ein gesättigtes  $C_1$ - $C_{12}$  Alkyl ist.

9. Verfahren oder Verbindung gemäß Anspruch 8, worin das gesättigte  $C_1$ - $C_{12}$  Alkyl eine tertiäre Butylgruppe ist.

10. Verfahren oder Verbindung gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 4, worin  $R_1$  ein substituiertes Phenyl umfasst.

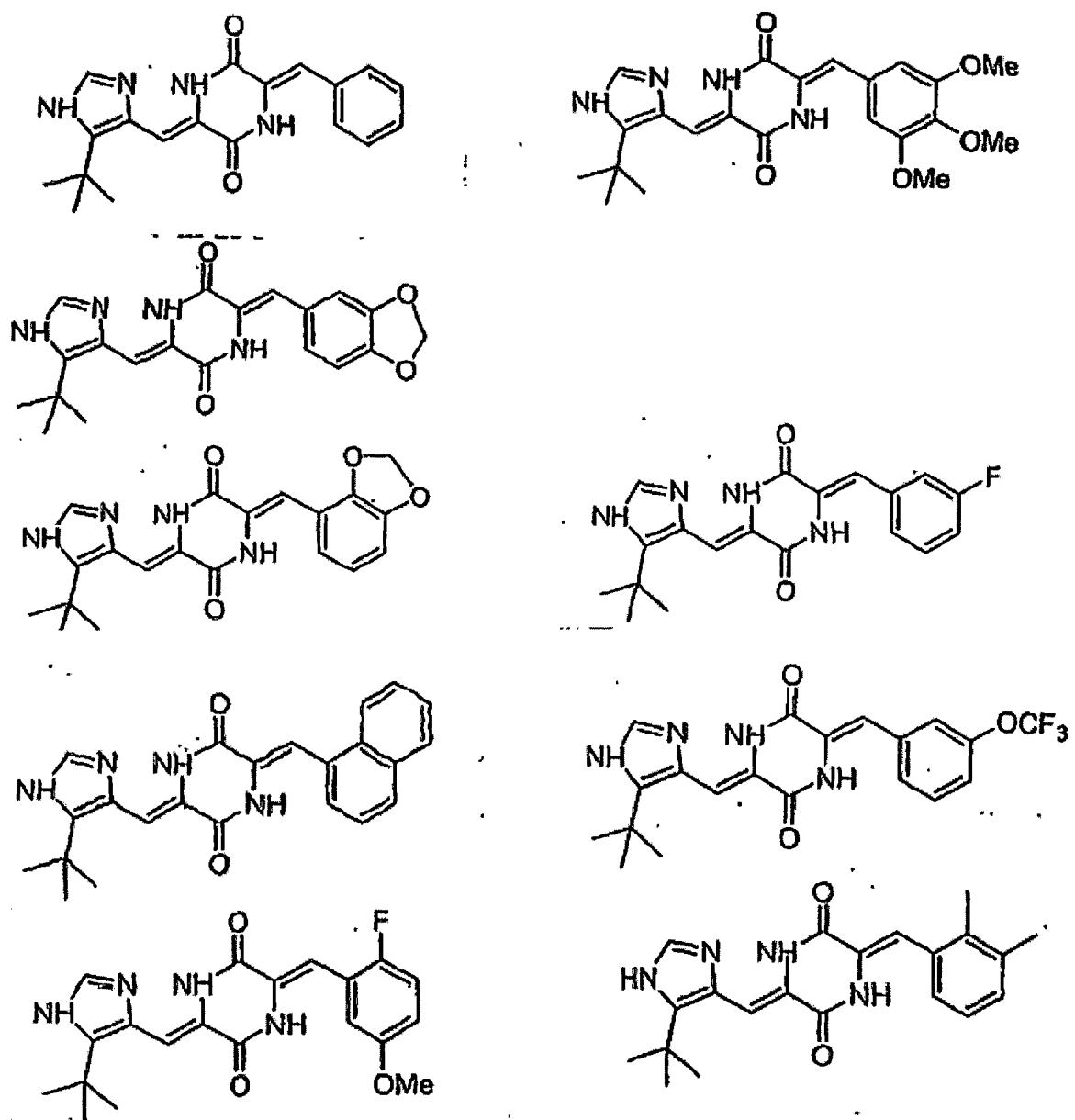
11. Verfahren oder Verbindung gemäß Anspruch 10, worin die substituierte Phenylgruppe Methoxybenzol ist.

12. Verfahren oder Verbindung gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 4, worin n gleich Null oder Eins ist.

13. Verfahren oder Verbindung gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 4, worin n Eins ist.

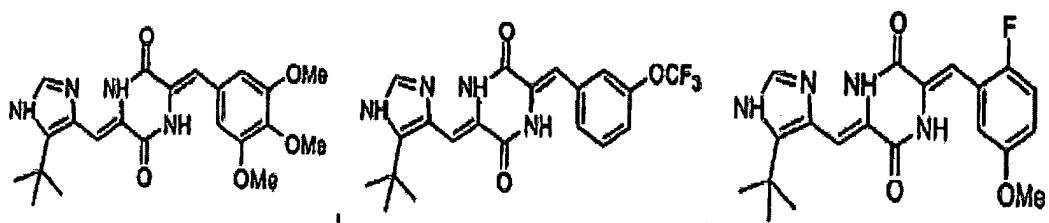
14. Verfahren oder Verbindung gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 4, worin n Eins ist und  $Z$ ,  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  und  $Z_4$  jeweils ein Kohlenstoffatom ist.

15. Verfahren oder Verbindung gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 4, worin die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

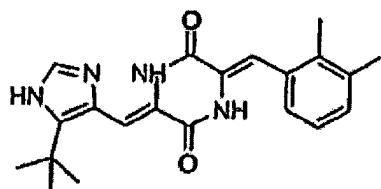


16. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend die Verbindung gemäß Anspruch 4 oder Anspruch 5 und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

17. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 16, worin die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:



und



18. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 16, wobei die Verbindung eine cytotoxische Aktivität aufweist.

19. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 16, wobei die Verbindung ein Zellzyklus-Inhibitor ist.

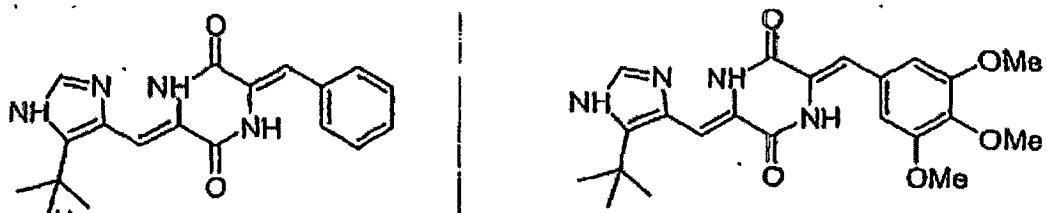
20. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 16 zur Behandlung oder Prävention einer Pilzinfektion.

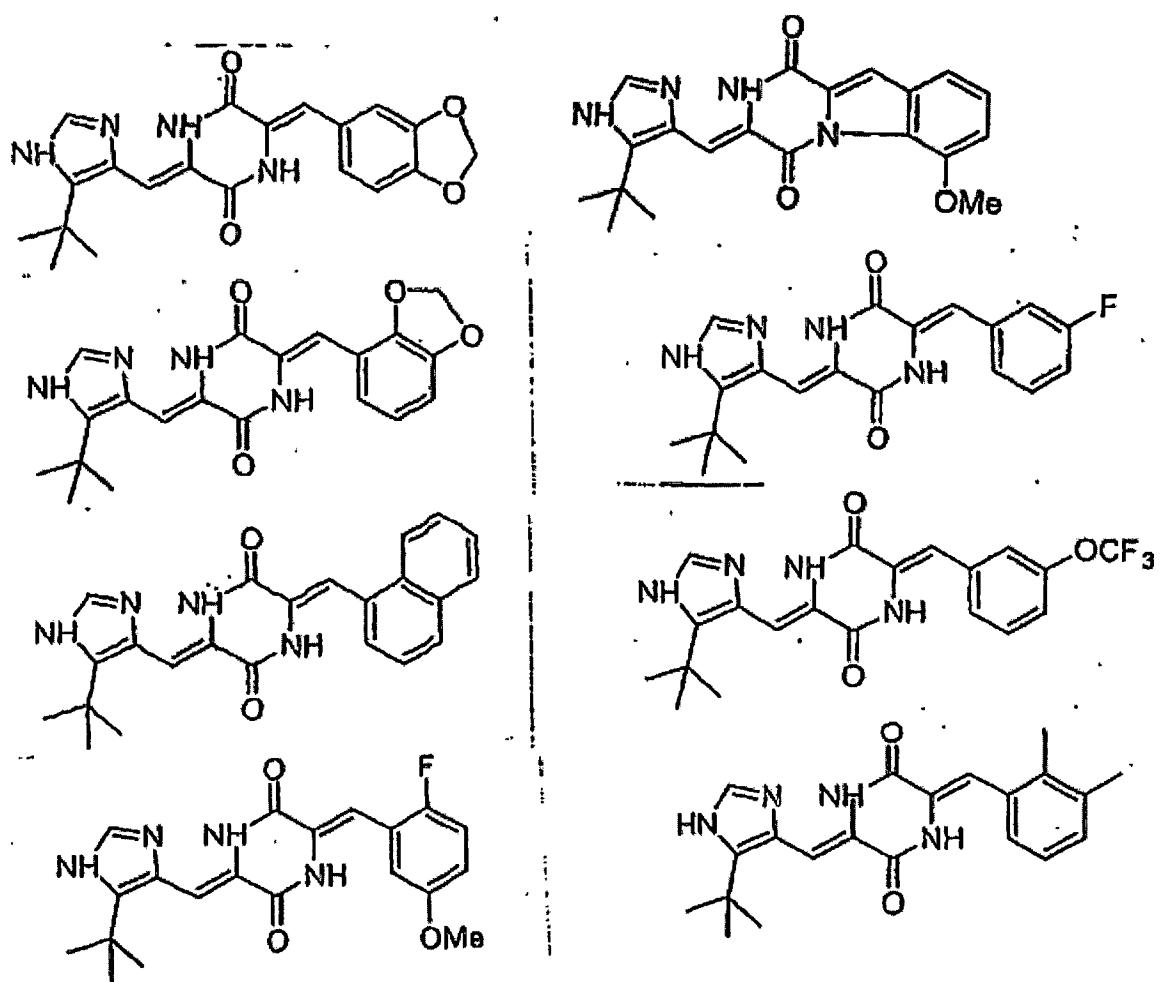
21. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 16 zur Behandlung oder Prävention eines Tumors.

22. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 4 oder 5 bei der Herstellung eines Medikaments für die Behandlung und/oder Prävention von mindestens einer Pilzinfektion in einem Säuger, der mindestens eine Pilzinfektion in sich trägt.

23. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 4 oder 5 bei der Herstellung eines Medikaments für die Behandlung und/oder Prävention von Krebs in einem Säuger, der von Krebs befallen ist.

24. Verwendung gemäß Anspruch 22 oder 23, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:





25. Verbindung gemäß Anspruch 4 oder 5 zur Verwendung als Medikament.

Es folgen 29 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

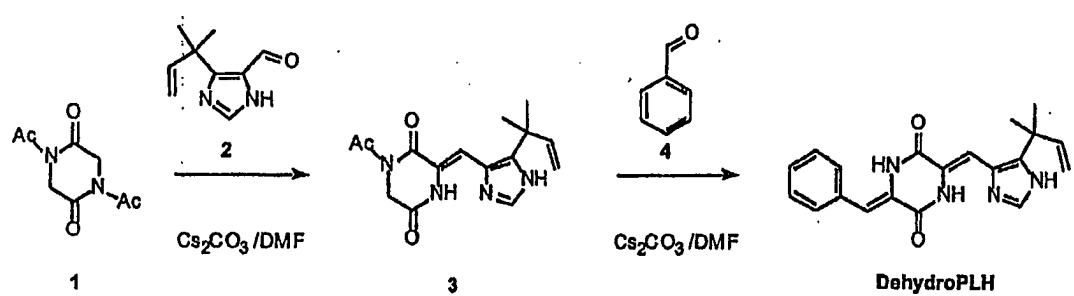
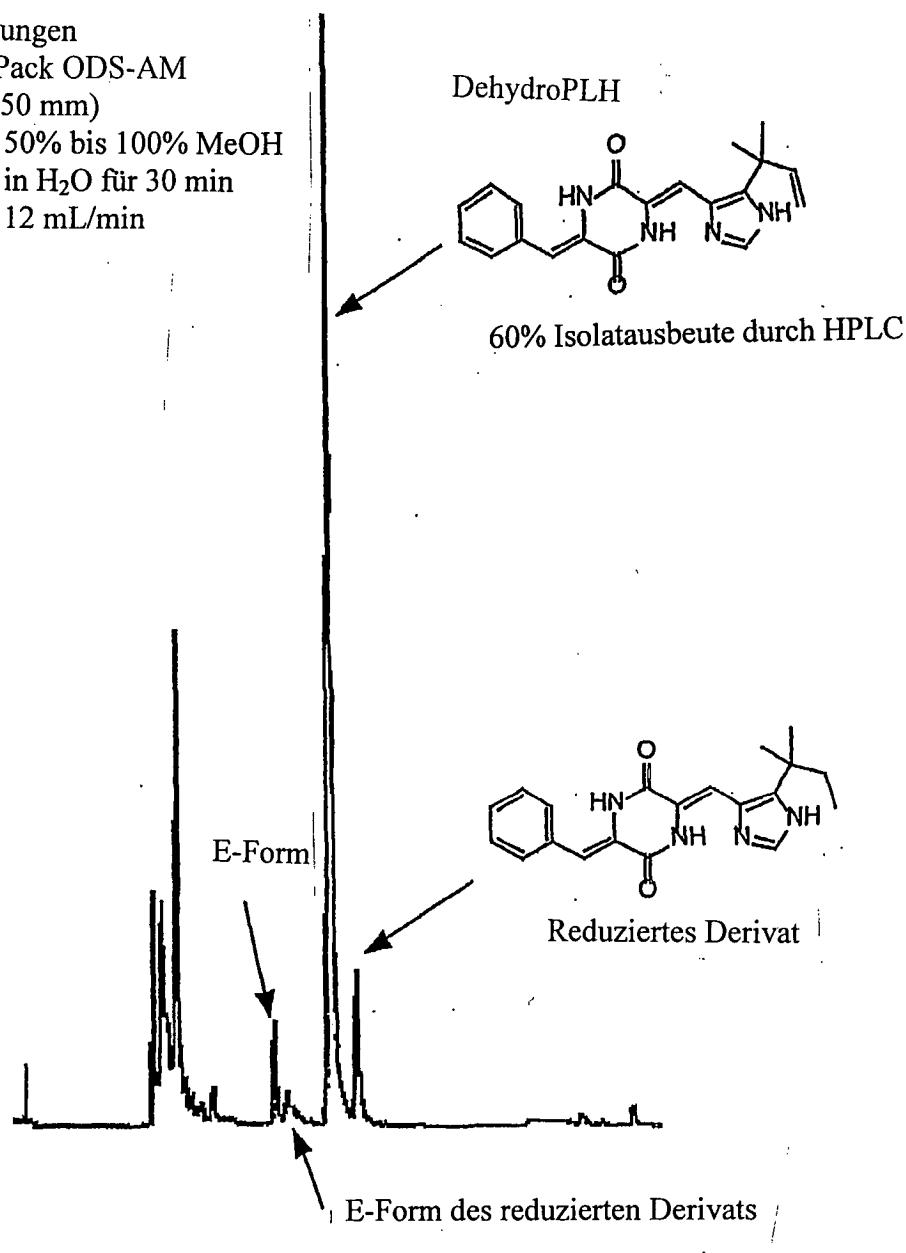


Abbildung 1

HPLC-Bedingungen  
Säule: YMC-Pack ODS-AM  
(20 x 250 mm)  
Gradient: 50% bis 100% MeOH  
in H<sub>2</sub>O für 30 min  
Flussrate: 12 mL/min  
O.D.: 230 nm



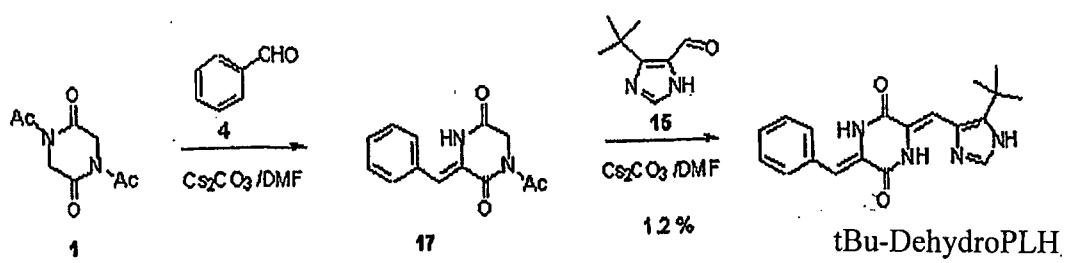


Abbildung 3

HPLC-Bedingungen  
Säule: YMC-Pack ODS-AM (20 x 250 mm)  
Gradient: 50% bis 100% MeOH in H<sub>2</sub>O für 30 min  
Flussrate: 12 mL/min  
O.D.: 230 nm

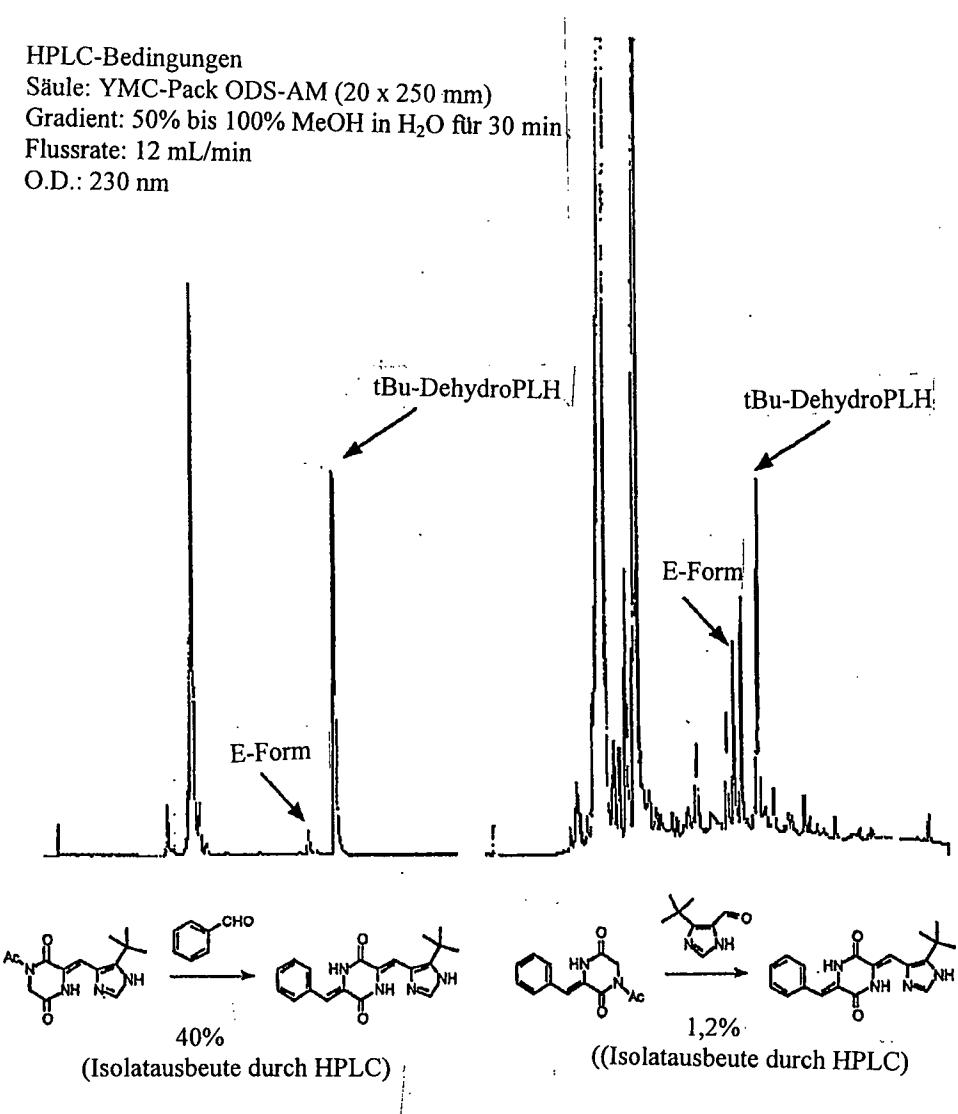


Abbildung 4

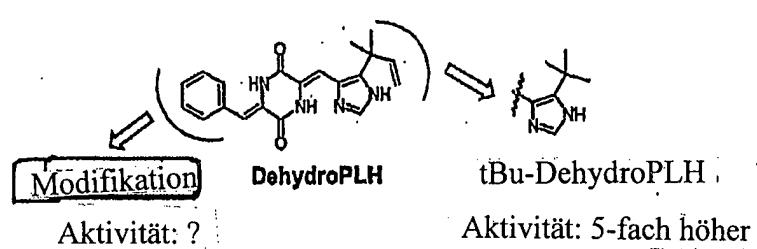


Abbildung 5 |

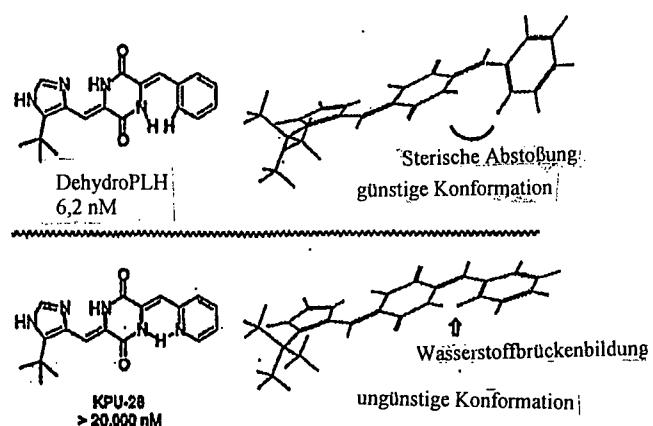


Abbildung 6

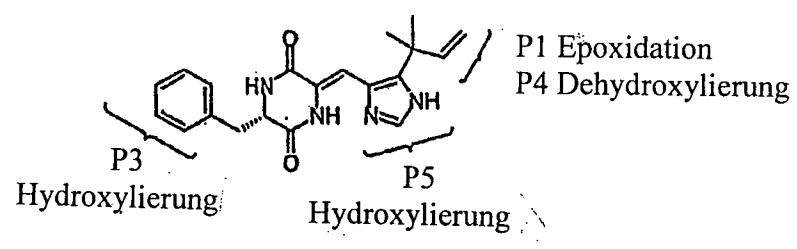


Abbildung 7

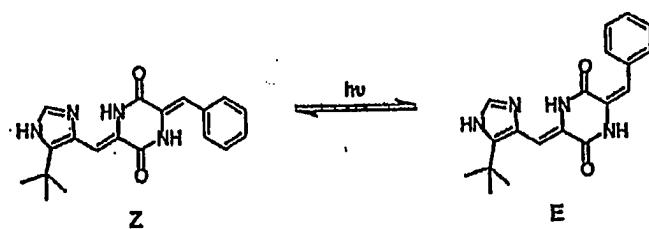


Abbildung 8

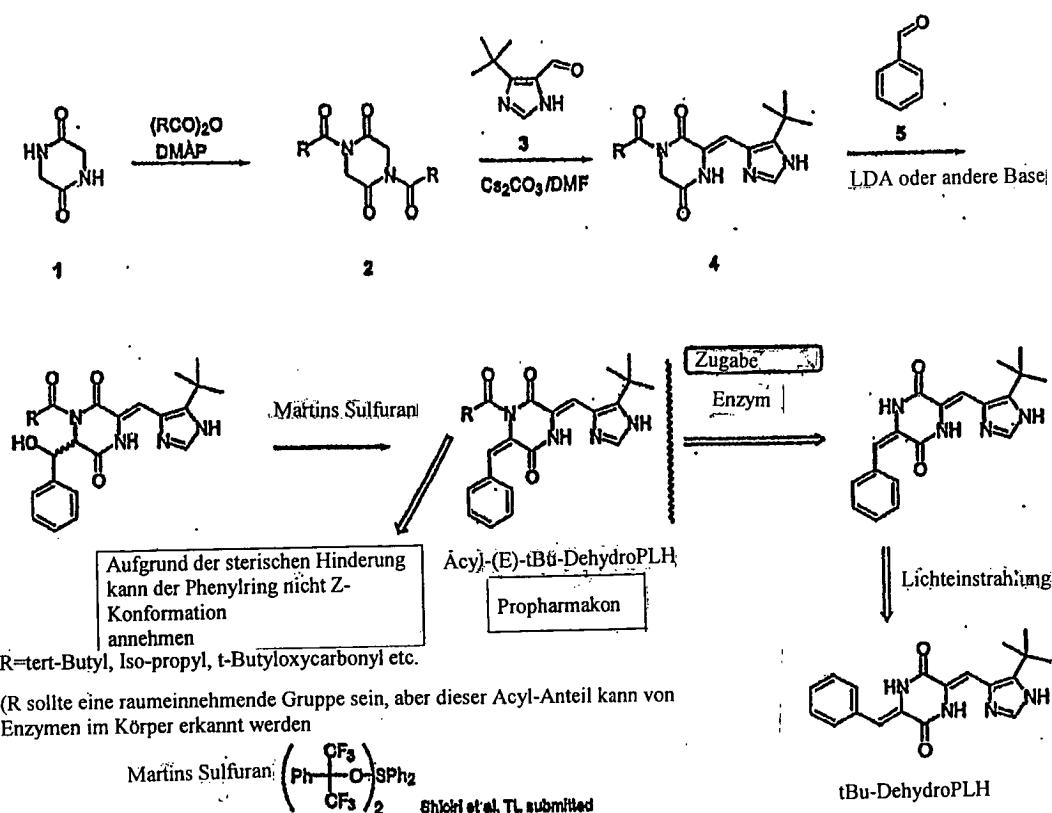


Abbildung 9

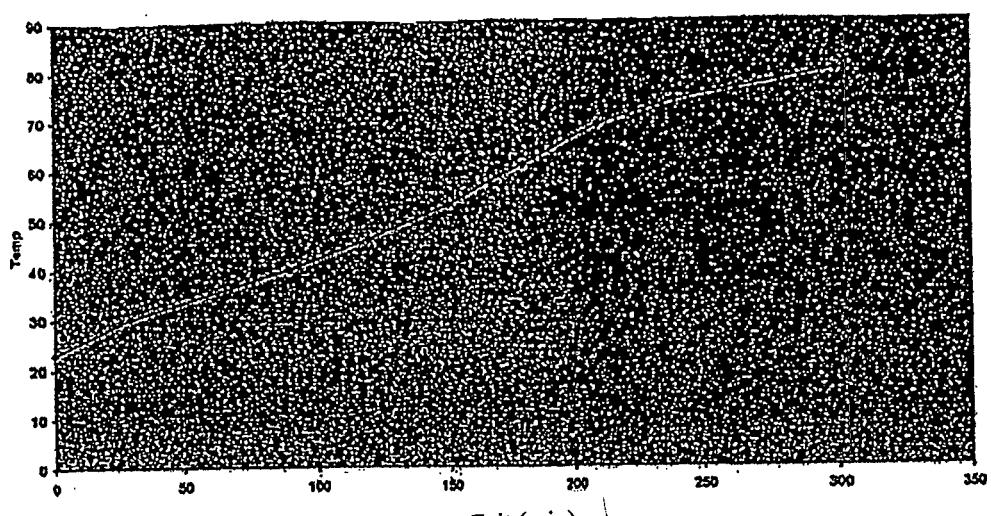


Abbildung 10

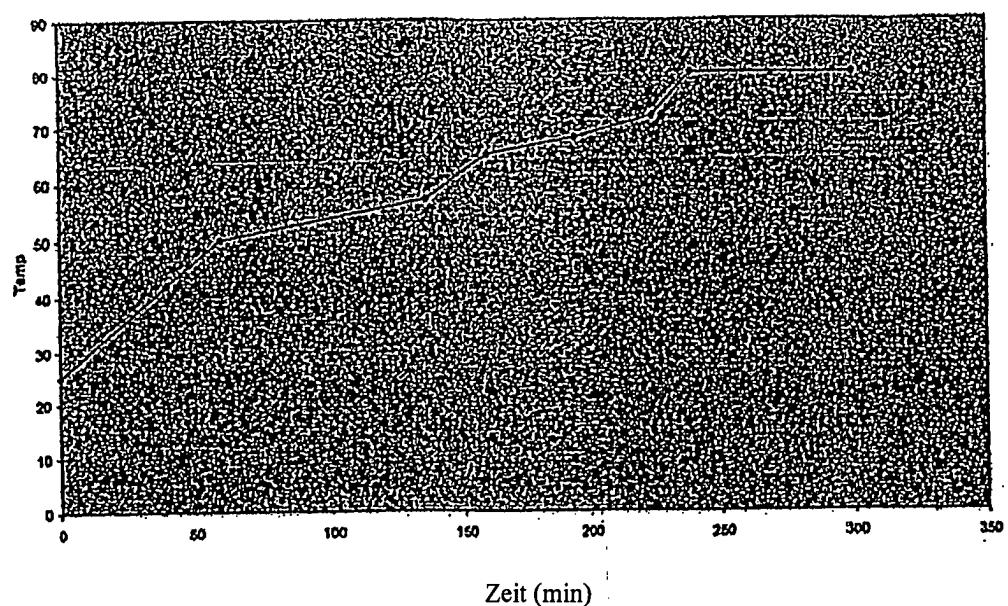


Abbildung 11

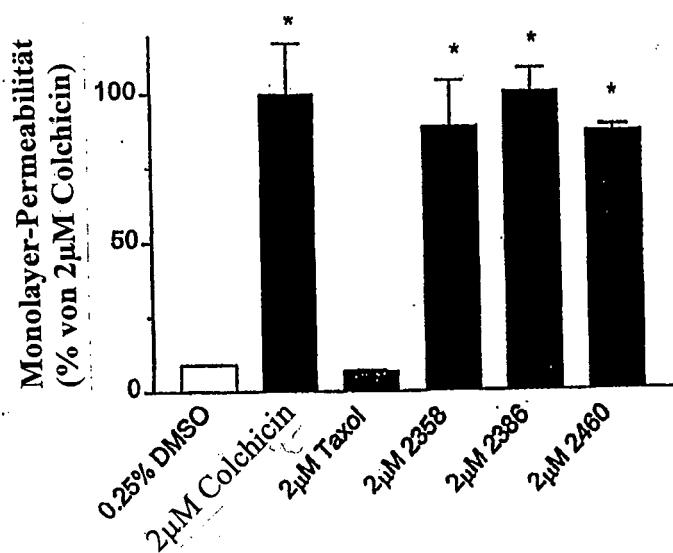


Abbildung 12

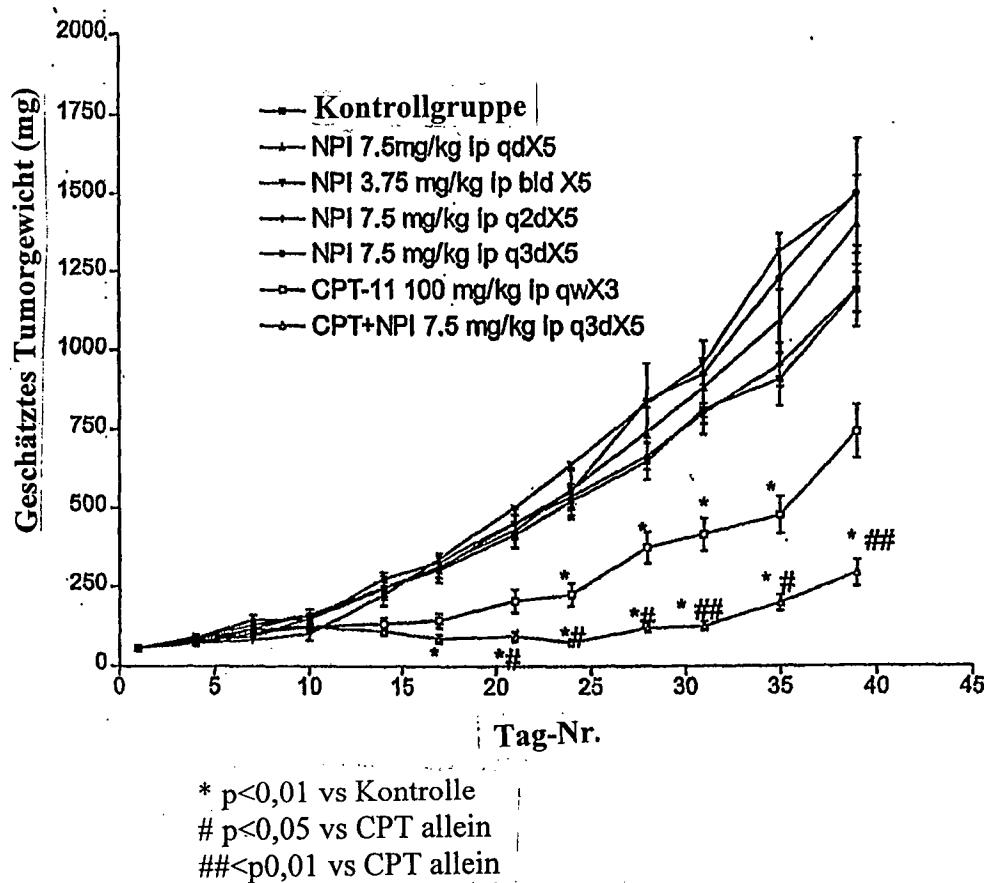


Abbildung 13

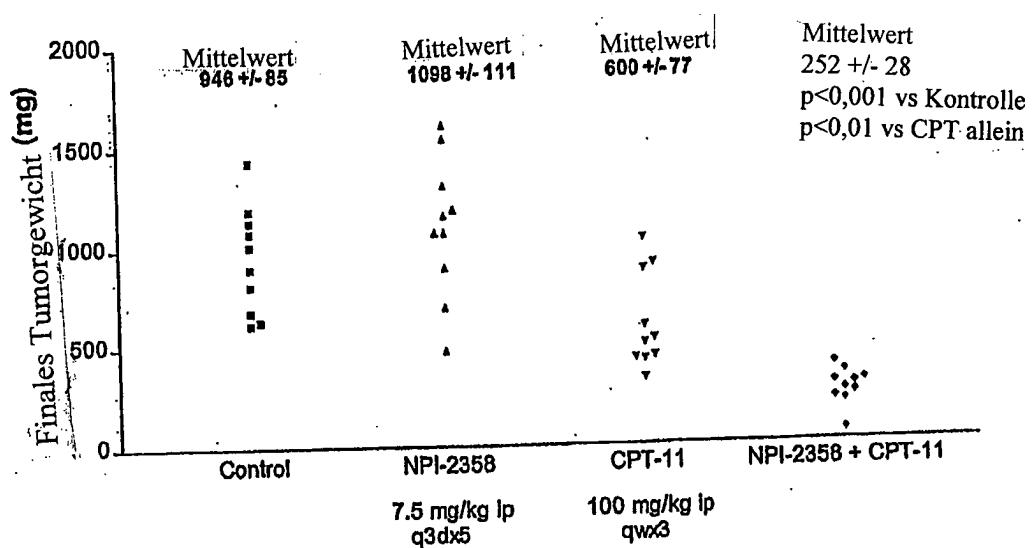


Abbildung 14

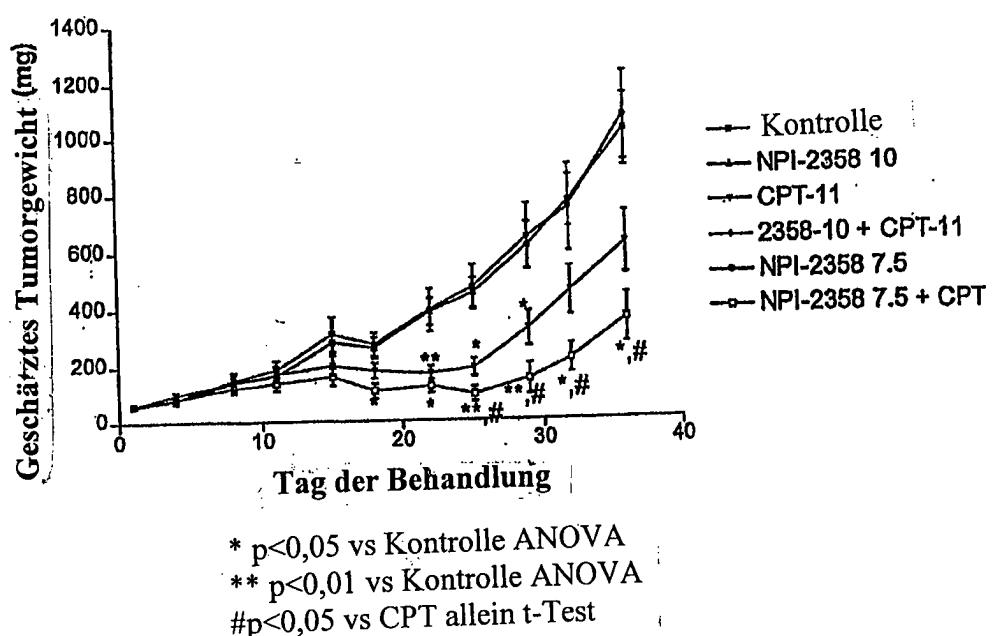


Abbildung 15

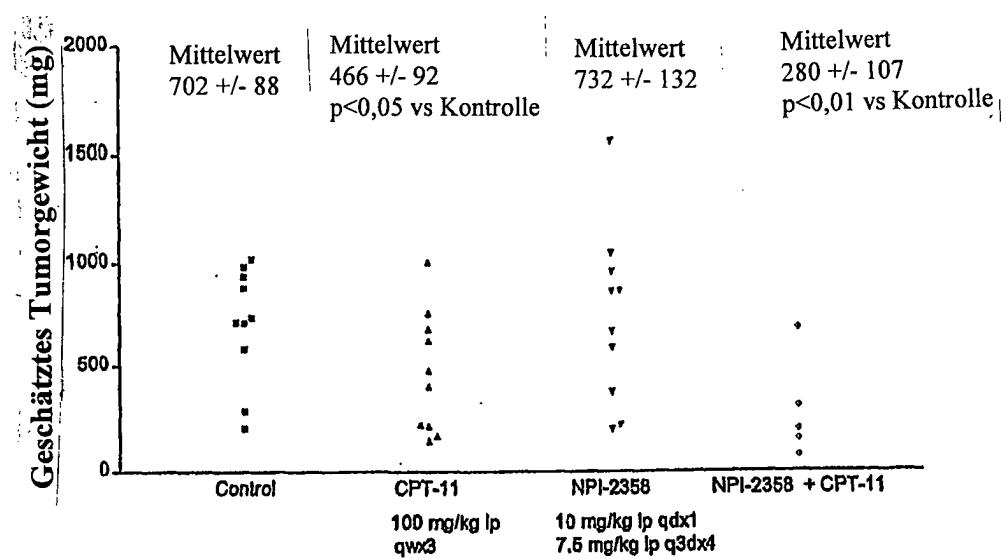


Abbildung 16

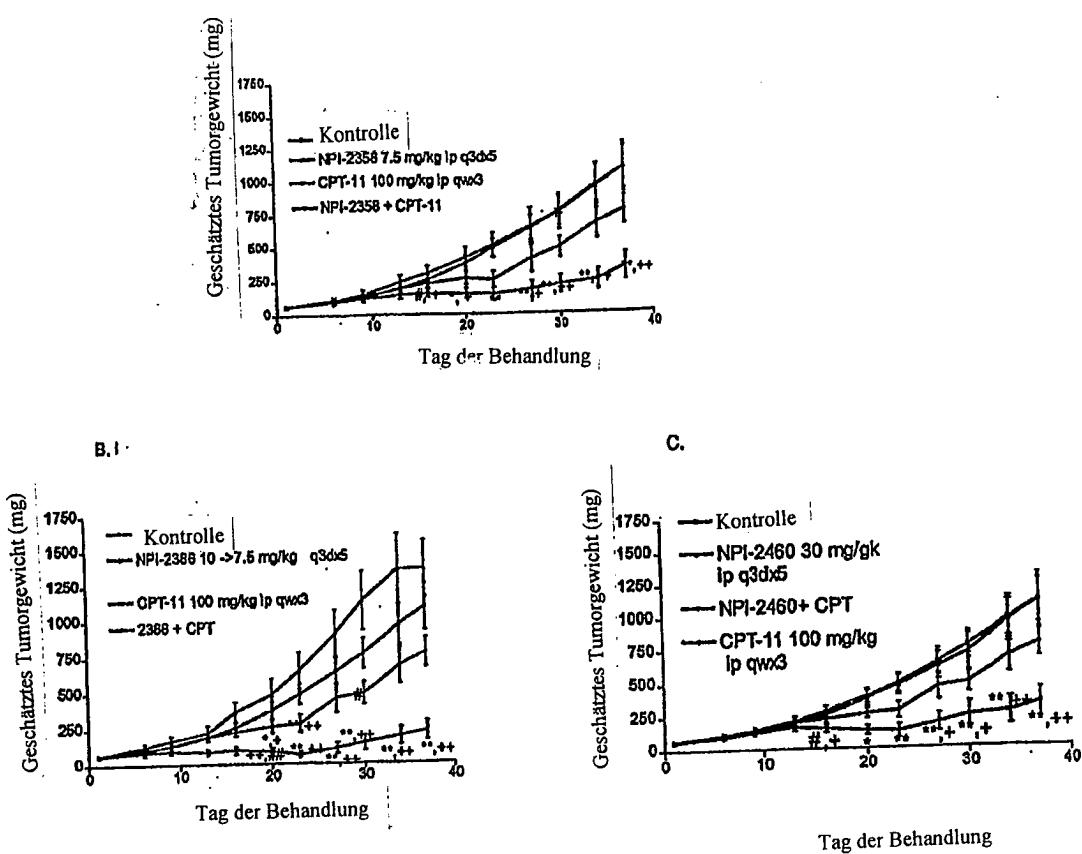


Abbildung 17

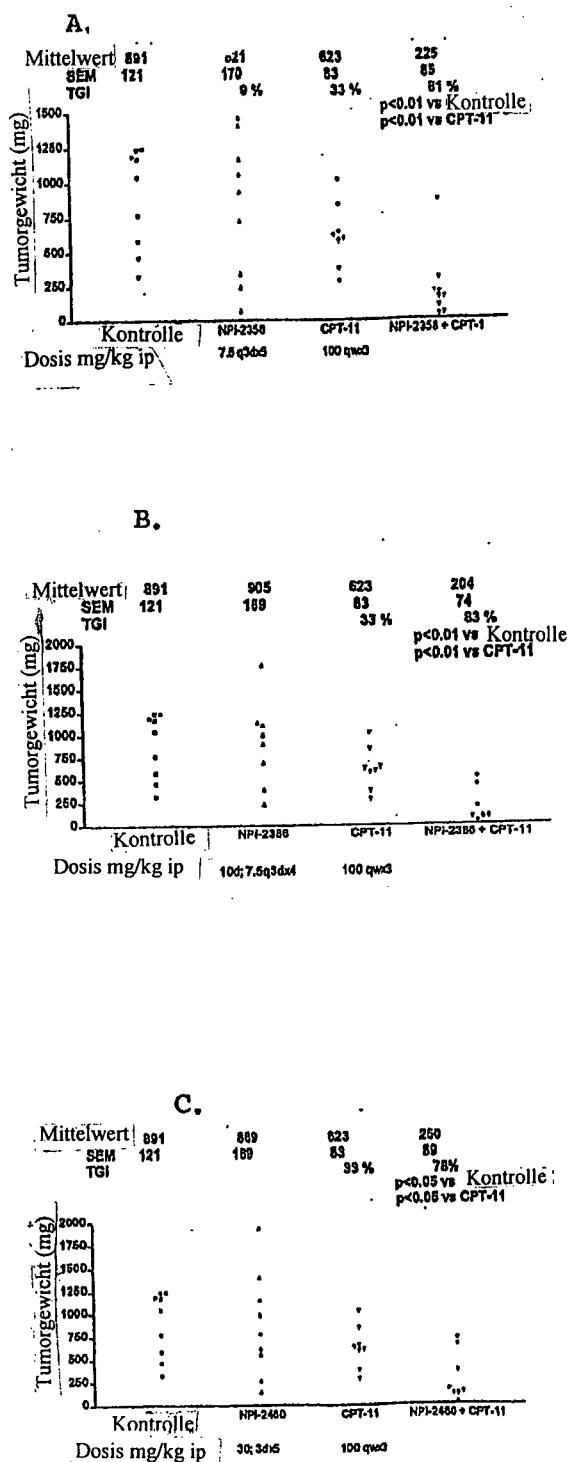
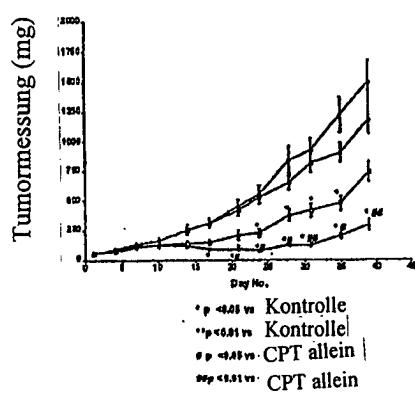
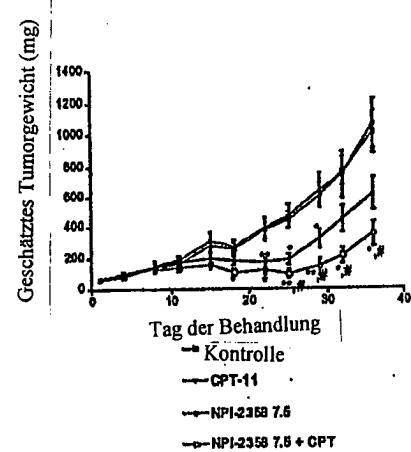


Abbildung 18

Studie 2164



Studie 2288



Studie 2139

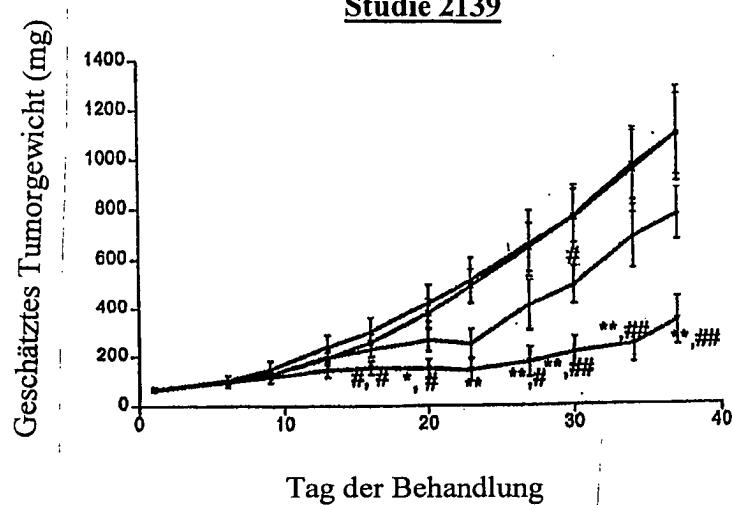


Abbildung 19

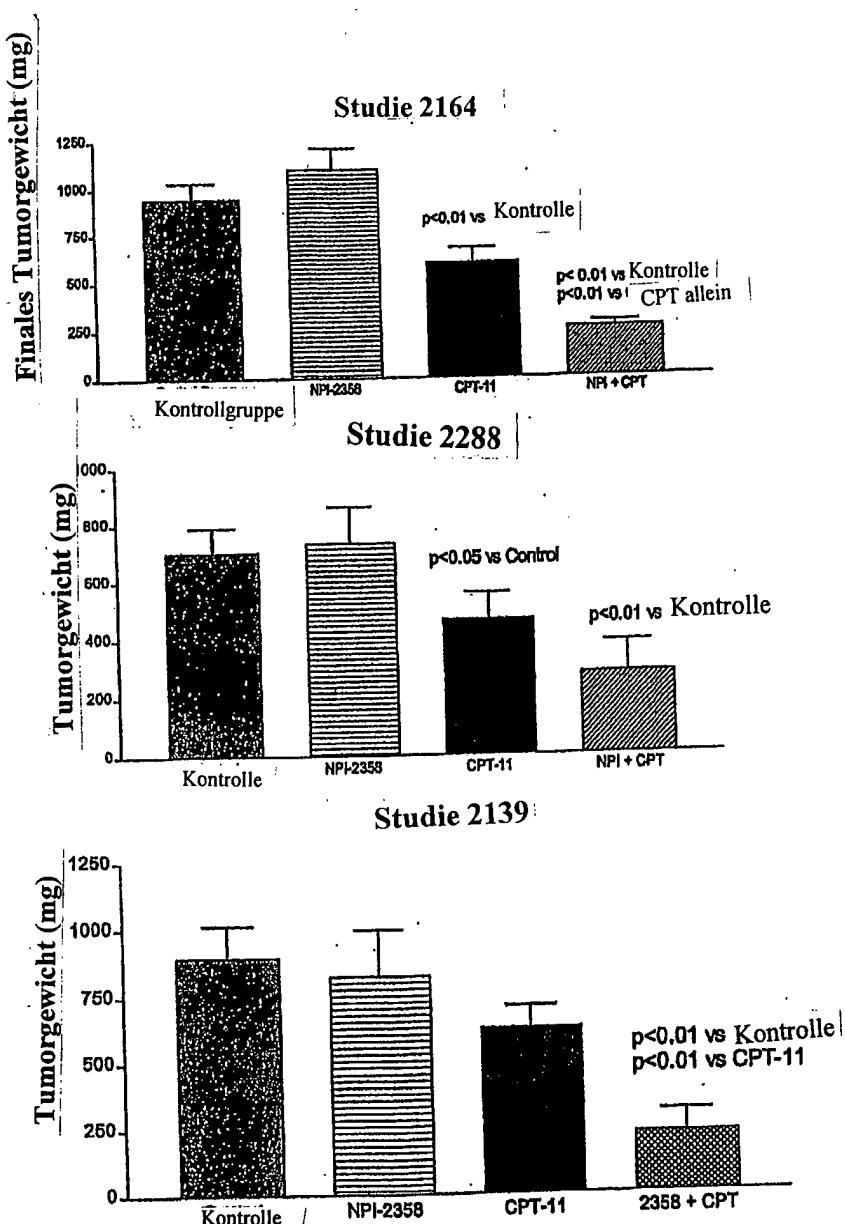


Abbildung 20

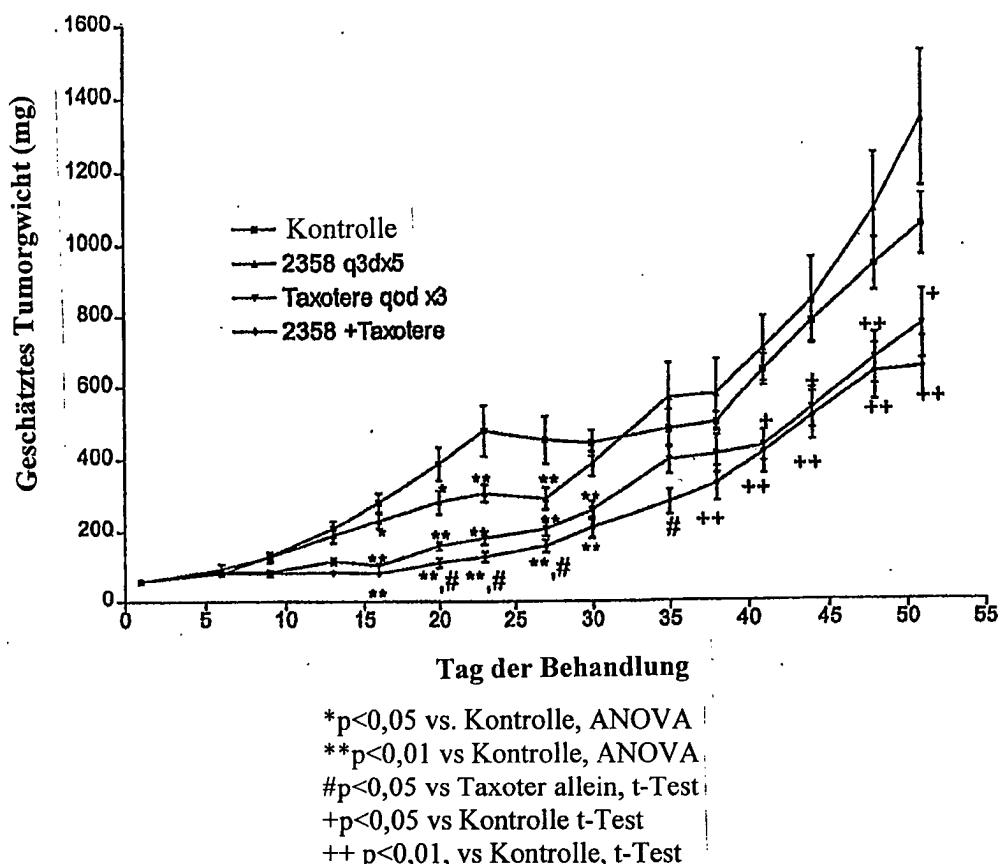


Abbildung 21

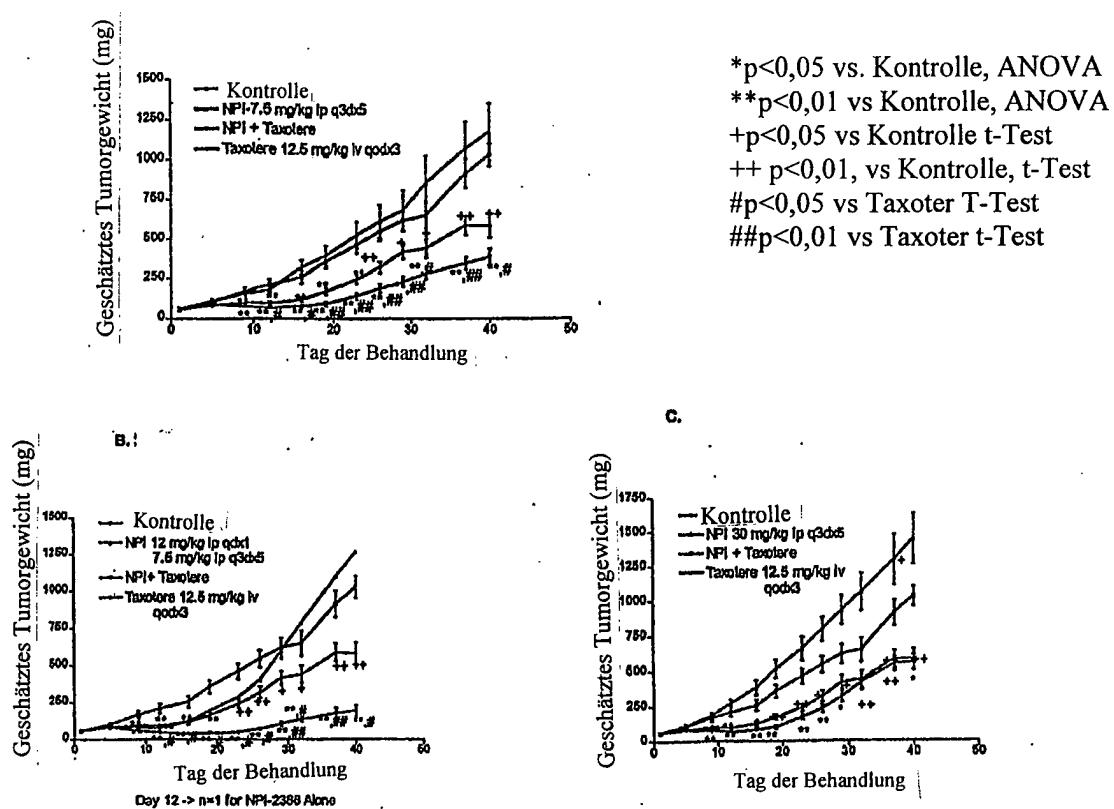


Abbildung 22

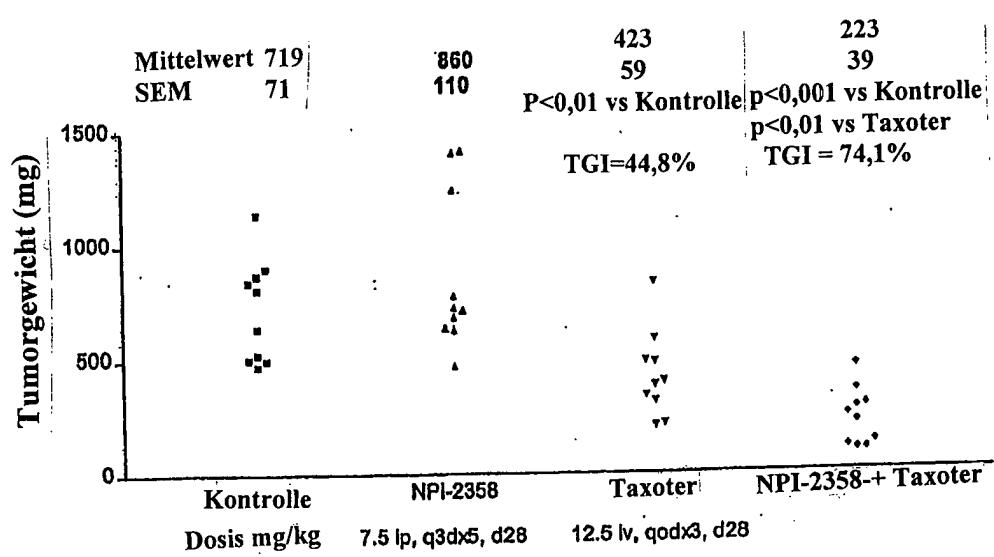


Abbildung 23

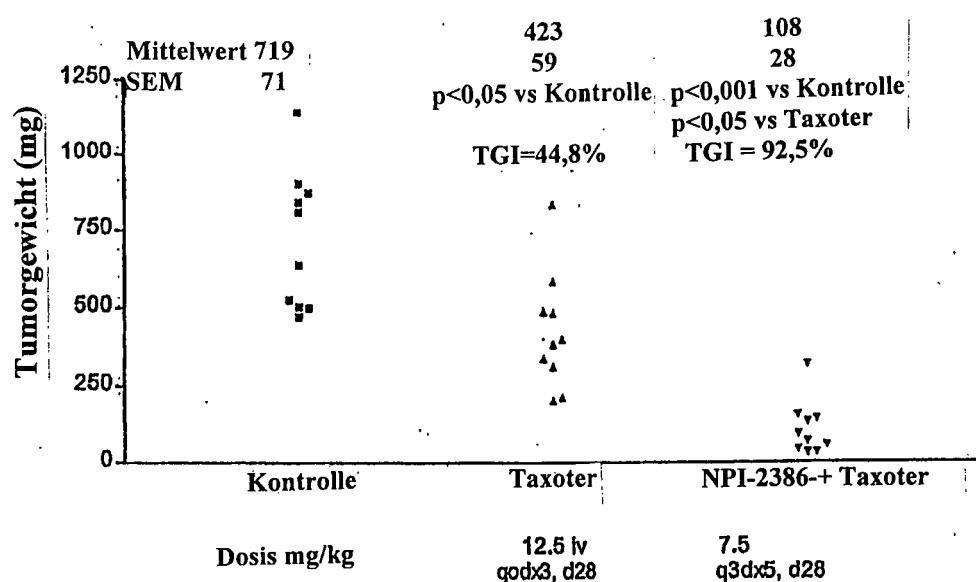


Abbildung 24

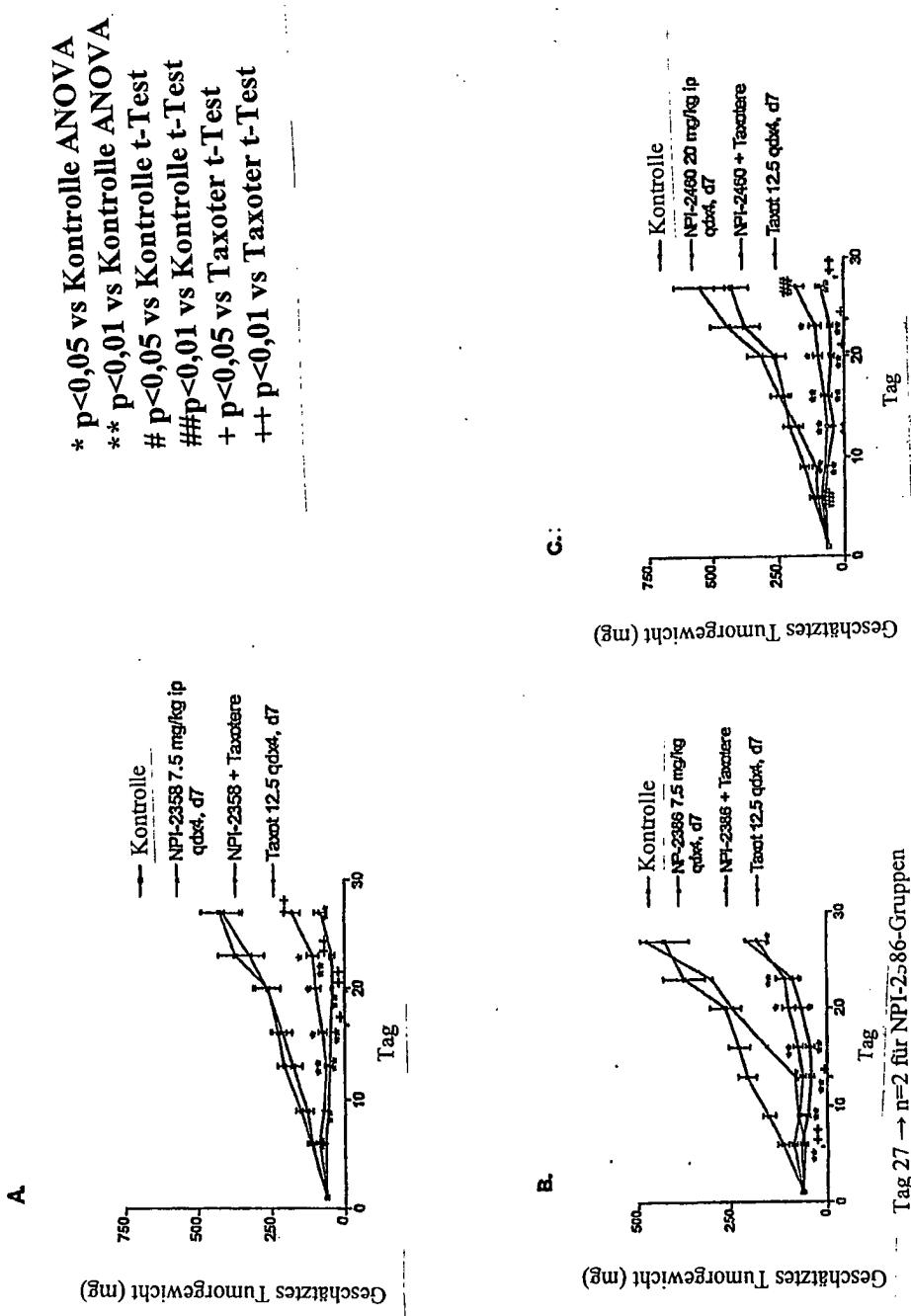


Abbildung 25

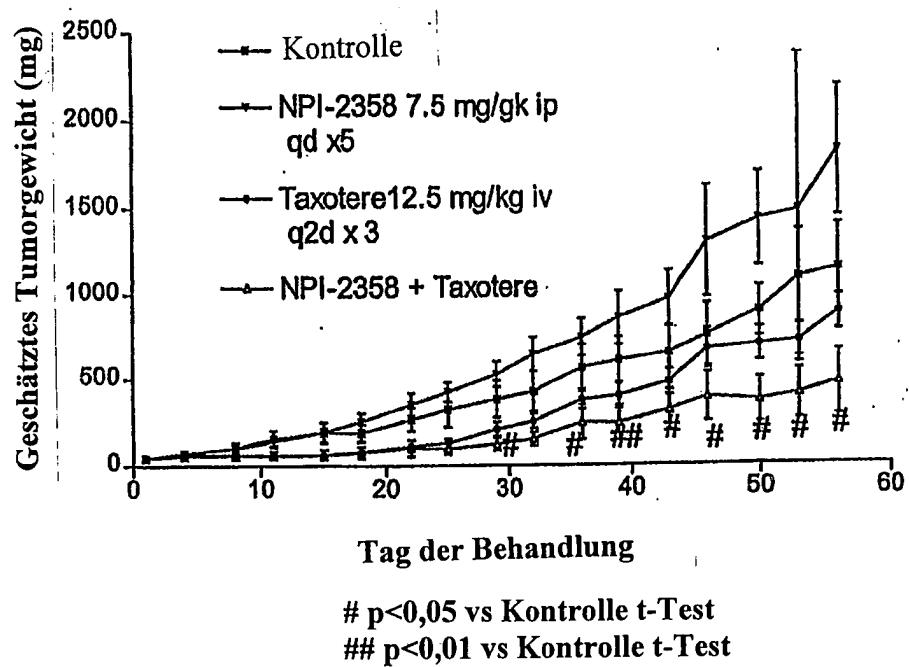


Abbildung 26

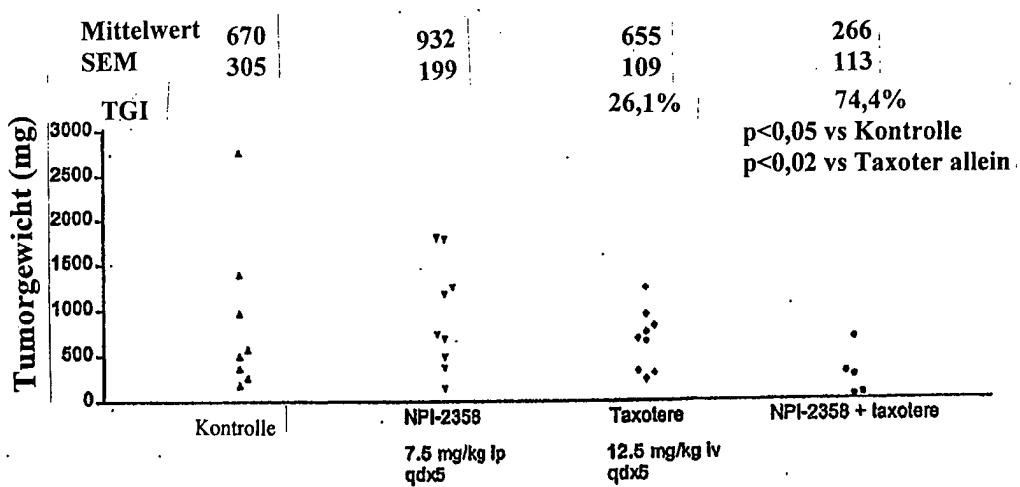


Abbildung 27

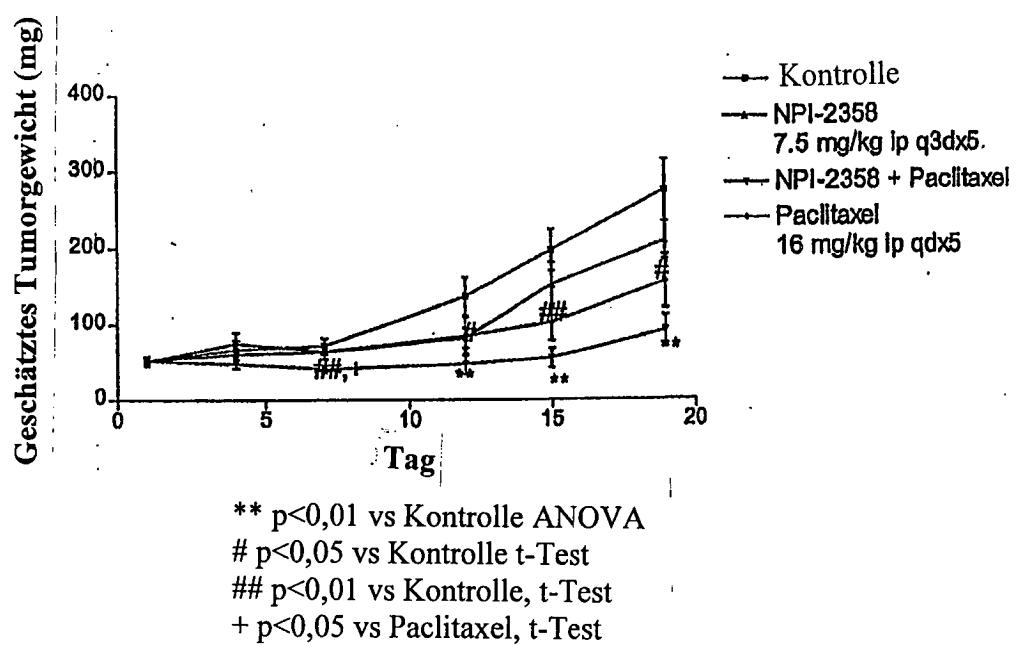


Abbildung 28

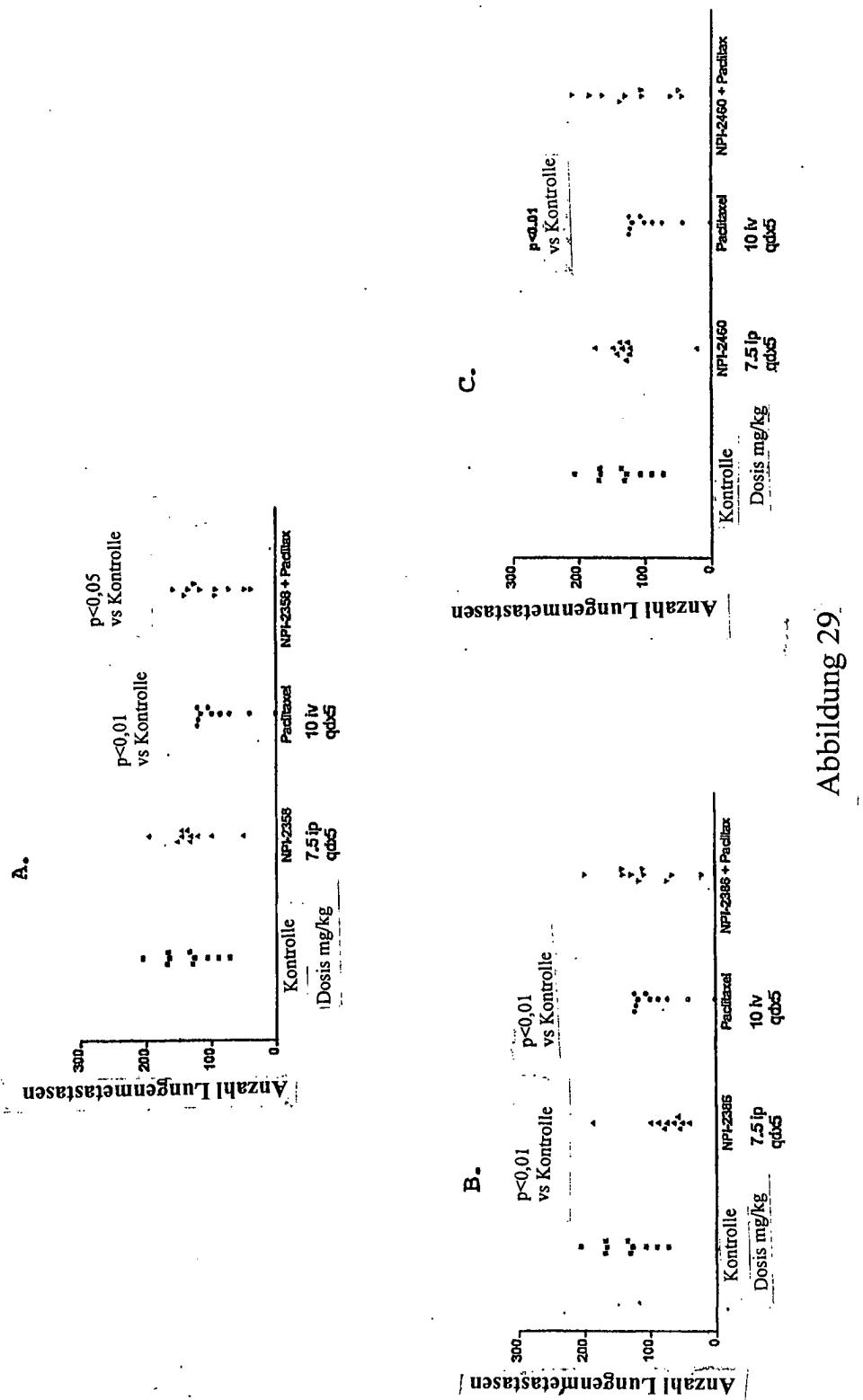


Abbildung 29