



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 31 577 T2 2007.08.23

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 265 606 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 31 577.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US00/22285

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 959 232.0

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/012186

(86) PCT-Anmeldetag: 14.08.2000

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 22.02.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 18.12.2002

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 25.10.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 23.08.2007

(51) Int Cl.⁸: **A61K 31/40 (2006.01)**

A61K 31/4025 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

C07D 401/06 (2006.01)

C07D 401/08 (2006.01)

C07D 401/10 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

C07D 207/16 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 405/12 (2006.01)

C07D 405/14 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

148845 P 13.08.1999 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

BIOGEN IDEC MA INC., Cambridge, Mass., US

(72) Erfinder:

LEE, Wen-Cherng, Lexington, MA 02421, US;

SCOTT, Daniel, Weston, MA 02493, US;

CORNEBISE, Mark, Watertown, MA 02472, US;

PETTER, Russell, Stow, MA 01775, US

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: **HEMMER DER ZELLADHÄSION**

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

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

Beschreibung**HINTERGRUND**

[0001] Zelladhäsion ist ein Vorgang, durch den sich den Zellen miteinander verbinden, sich in Richtung auf einen spezifischen Zielort bewegen oder innerhalb der extrazellulären Matrix lokalisieren. Als solche begründet Zelladhäsion einen der fundamentalen Mechanismen, welche die Grundlage für zahlreiche biologische Phänomene bilden. Zum Beispiel ist Zelladhäsion für die Adhäsion von hämopoetischen Zellen an endotheliale Zellen und für die anschließende Bewegung jener hämopoetischen Zellen aus den Blutgefäßen heraus und zu dem Ort der Verletzung verantwortlich. Als solche spielt Zelladhäsion eine Rolle bei Krankheitsbildern wie etwa Entzündung und Immunreaktionen bei Säugern.

[0002] Untersuchungen der molekularen Basis für Zelladhäsion haben offen gelegt, dass verschiedene Makromoleküle auf der Zelloberfläche – zusammengenommen bekannt als Zelladhäsionsmoleküle oder -rezeptoren – Zelle-Zelle- und Zelle-Matrix-Wechselwirkungen vermitteln. Zum Beispiel sind Proteine der Superfamilie, die „Integrine“ genannt wird, Schlüsselmediatoren bei adhäsiven Wechselwirkungen zwischen hämopoetischen Zellen und ihrer Mikro-Umgebung (M. E. Hemler, „VLA Proteins in the Integrin Family: Structures, Functions, and Their Role on Leukocytes.“, Ann. Rev. Immunol., 8, S. 365 (1990)). Integrine sind nicht-kovalente heterodimere Komplexe, die aus zwei Untereinheiten bestehen, die α und β genannt werden. Es gibt mindestens 12 verschiedene α -Untereinheiten ($\alpha 1-\alpha 6$, α -L, α -M, α -X, α -IIB, α -V und α -E) und mindestens 9 unterschiedliche β -Untereinheiten ($\beta 1-\beta 9$). Basierend auf dem Typ der Komponenten seiner α - und β -Untereinheit wird jedes Integrinmolekül in eine Unterfamilie eingeordnet.

[0003] $\alpha 4\beta 1$ -Integrin, auch bekannt als sehr spätes Antigen-4 („very late antigen-4“) („VLA-4“), CD49d/CD29, ist ein Rezeptor auf der Zelloberfläche von Leukocyten, der an einer großen Vielzahl adhäsiver sowohl Zelle-Zelle- als auch Zelle-Matrix-Wechselwirkungen teilnimmt (M. E. Hemler, Ann. Rev. Immunol., 8, S. 365 (1990)). Er dient als Rezeptor für das durch Cytokin induzierbare Endothelzellen-Oberflächenprotein, das Gefäßzellen-Adhäsionmolekül-1 („vascular cell adhesion molecule-1“) („VCAM-1“) ebenso wie für das extrazelluläre Matrixprotein Fibronektin („FN“) (Ruegg et al., J. Cell Biol., 177, S. 179 (1991); Wayner et al., J. Cell Biol., 105, S. 1873 (1987); Kramer et al., J. Biol. Chem., 264, S. 4684 (1989); Gehlsen et al., Science, 24, S. 1228 (1988)). Es ist gezeigt worden, dass monoklonale Antikörper („MAK“) gegen VLA-4 VLA-4-abhängige adhäsive Wechselwirkungen sowohl in vitro als auch in vivo hemmen (Ferguson et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88, S. 8072 (1991); Ferguson et al., J. Immunol., 150, S. 1172 (1993)). Ergebnisse von in vivo-Experimenten legen nahe, dass diese Hemmung von VLA-4-abhängiger Zelladhäsion mehreren Entzündungs- und Autoimmun-Krankheitsbildern vorbeugen oder sie hemmen kann (R. L. Lobb et al., „The Pathophysiologic Role of $\alpha 4$ Integrins In Vivo“, J. Clin. Invest., 94, S. 1722-28 (1994)).

[0004] Trotz dieser Fortschritte bleibt ein Bedarf an kleinen, spezifischen Hemmern von VLA-4-abhängiger Zelladhäsion. Idealerweise können solche Hemmer oral verabreicht werden. Solche Verbindungen würden nützliche Mittel zur Behandlung, Vorbeugung oder Unterdrückung von verschiedenen Krankheitsbildern, die durch Zelladhäsion und das Binden an VLA-4 vermittelt werden, zur Verfügung stellen.

ZUSAMMENFASSUNG

[0005] Die vorliegende Erfindung betrifft neue nicht-peptidische Verbindungen, die spezifisch das Binden von Liganden an VLA-4 hemmen. Diese Verbindungen sind nützlich zur Hemmung, Vorbeugung und Unterdrückung von durch VLA-4 vermittelter Zelladhäsion und von Krankheitsbildern, die mit jener Adhäsion verbundenen sind, wie etwa Entzündung und Immunreaktionen. Die Verbindungen dieser Erfindung können alleine oder in Kombination mit anderen therapeutischen oder prophylaktischen Mitteln verwendet werden, um Zelladhäsion zu hemmen, ihr vorzubeugen oder sie zu unterdrücken. Die Erfindung stellt auch Arzneimittel, umfassend die Verbindungen dieser Erfindung, zur Verfügung. Die Verbindungen und Zusammensetzungen der Erfindung können zur Hemmung von Zelladhäsion verwendet werden.

[0006] Die neuen Verbindungen und Zusammensetzungen der Erfindung werden vorteilhafterweise verwendet, um Entzündungs- und Immunstörungen zu behandeln. Die Beschreibung stellt auch Verfahren zum Herstellen der Verbindungen dieser Erfindung und von Zwischenstufen dafür zur Verfügung.

[0007] Diese Erfindung betrifft Zelladhäsionshemmer der Formel (I):

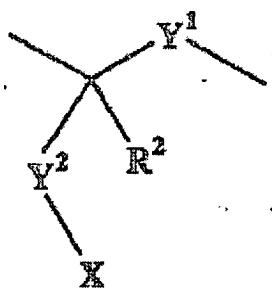
$R^3-L-L'-R^1$

(I)

wobei

R¹ gegebenenfalls substituiertes Pyrrolidinyl-SO₂-phenyl ist, wobei der fakultative Substituent Alkyl oder Halogen ist;

L' der Formel (iv) entspricht



wobei Y¹ für -NH-CO- steht, R² für H steht, Y² eine Bindung ist und X für COOH steht;

L der Formel (v) entspricht

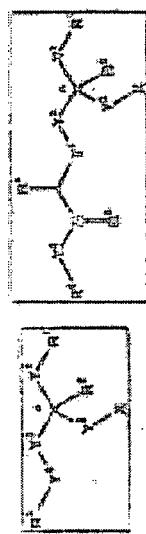


wobei Y³ für -(CH₂)₀₋₅- steht und Y⁴ für -CO-NH- steht; und

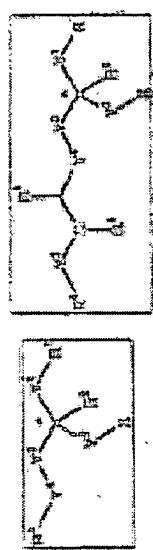
R³ der Formel R⁴-Y⁵-N(R⁵)-CH(R⁶)- entspricht, wobei R⁶ die Seitenkette von Leucin oder Isoleucin ist; R⁵ für Wasserstoff oder Methyl steht; Y⁵ für C(=O)- steht und R⁴ für o-Methylphenylureidophenyl-CH₂ steht; oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon.

[0008] In einer Ausführungsform weisen die Verbindungen der Erfindung eine IC₅₀ von 5 nM oder weniger, von 2 nM oder weniger, von 1 nM oder weniger oder von 0,5 nM oder weniger auf. IC₅₀-Werte können durch Bindungstests, wie sie nachstehend beschrieben sind, bestimmt werden oder durch andere bekannte konventionelle Verfahren. In einer Ausführungsform weisen die Verbindungen der Erfindung einen Prozentanteil, der an die Mn-aktivierte Form von VLA-4-Molekülen gebunden ist, von 50% oder höher, von 75% oder höher, von 90% oder höher oder von 95% oder höher auf. In einer Ausführungsform weisen die Verbindungen der Erfindung einen Prozentanteil, der an die Ca/Mg-aktivierte Form von VLA-4-Molekülen gebunden ist, von 50% oder höher, von 75% oder höher, von 90% oder höher oder von 95% oder höher auf. Der Prozentanteil, der an die VLA-4-Moleküle gebunden ist, kann durch biologische Tests, wie sie nachstehend beschrieben sind, bestimmt werden.

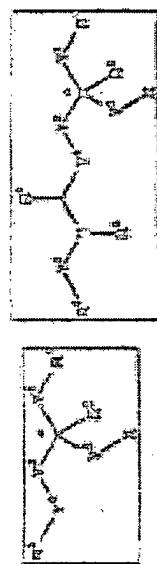
[0009] Nachstehend dargelegt sind einige Beispiele einer Verbindung dieser Erfindung. Zur Erleichterung stellen das Stickstoffatom und das Kohlenstoffatom in der Spalte „N(R⁵)-CH(R⁶)“ die α-Stickstoff- und die α-Kohlenstoffatome der Aminosäure, wie angegeben, dar. Zum Beispiel gibt ein Eintrag „Leu“ an, dass R⁵ für H steht und R⁶ für Isobutyl steht.



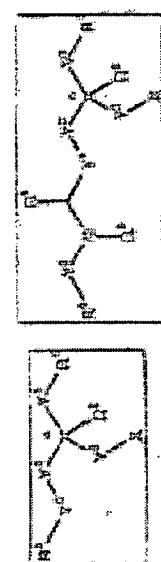
Verbindung Nr.	R ³ /R ⁴	Y ⁵	N(R ⁵)- CH(R ⁶)	Y ⁴	Y ³	Y ²	Y ¹	R ²	R ¹	X	Konfig.
5192	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
5283	oMePUPCH ₂	-C(O)-	Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
6714	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
7234	oMePUPCH ₂	-C(O)-	Leu	-NH-	(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
7662	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
7796	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ OH	S
8221	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S



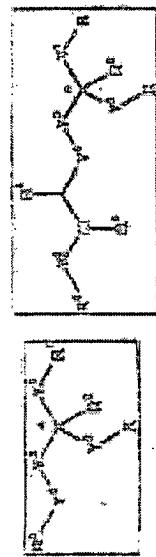
Verbindung Nr.	R ³ /R ⁴	Y ⁵	N(R ⁵)- CH(R ⁶)	Y ⁴	Y ³	Y ²	Y ¹	R ²	R ¹	X	Konfig.
8341	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8342	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	R
8343	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	R
8348	oMePUPCH ₂	-C(O)-	D-N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	R
8367	oMePUPCH ₂	-C(O)-	D-N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8368	oMePUPCH ₂	-C(O)-	D-N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
8469	oMePUPCH ₂	-C(O)-	Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S



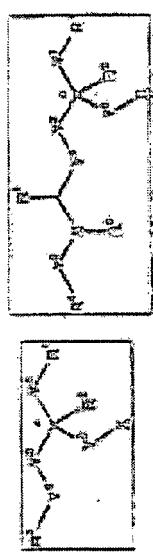
Verbindung Nr.	R ³ /R ⁴	Y ⁵	N(R ⁵)- CH(R ⁶)	Y ⁴	Y ³	Y ²	Y ¹	R ²	R ¹	X	Konfig.
8491	oMePUPCH ₂	-C(O)-	Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHCO-	H		CO ₂ H	S
8494	oMePUPCH ₂	-C(O)-	D-N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHCO-	H		CO ₂ H	R
8555	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHCO-	H		CO ₂ H	S
8558	oMePUPCH ₂	-C(O)-	Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHCO-	H		CO ₂ H	S
8559	oMePUPCH ₂	-C(O)-	Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHCO-	H		CO ₂ H	S
8685	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHCO-	H		CO ₂ H	S
8689	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHCO-	H		CO ₂ H	S



Verbindung Nr.	R ³ /R ⁴	Y5	N(R ⁵)- CH(R ⁶)	Y4	Y3	Y2	Y1	R ₂	R1	X	Konfig.
8690	oMePUPCH ₂	-C(O)- N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H			CO ₂ H	S
8723	oMePUPCH ₂	-C(O)- N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H			CO ₂ H	S
8746	oMePUPCH ₂	-C(O)- N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H			CO ₂ H	S
8749	oMePUPCH ₂	-C(O)- N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H			CO ₂ H	S
8758	oMePUPCH ₂	-C(O)- N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H			CO ₂ H	S
8796	oMePUPCH ₂	-C(O)- N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H			CO ₂ H	S
8797	oMePUPCH ₂	-C(O)- N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H			CO ₂ H	S



Verbindung Nr.	R ³ /R ⁴	Y ⁵	N(R ⁵)- CH(R ⁶)	Y ⁴	Y ³	Y ²	Y ¹	R ²	R ¹	X	Konfig.
8809	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
9120	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
9169	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
9171	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
9182	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
9227	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
9264	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S



Verbindung Nr.	R^3/R^4	Y^5	$N(R^5)-$ $CH(R^6)$	Y^4	Y^3	Y^2	Y^1	R^2	R^1	X	Konfig.
9315	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S
9418	oMePUPCH ₂	-C(O)-	N-Me-Leu	-C(O)NH-	-(CH ₂) ₂ -	-	-NHC(O)-	H		CO ₂ H	S

[0010] Ein oder mehrere der Hemmer, die vorstehend beschrieben sind, oder ein Salz davon können zur Herstellung eines Medikaments zum Behandeln der vorstehend erwähnten Störungen verwendet werden.

[0011] Eine weitere Ausführungsform dieser Erfindung betrifft eine Zusammensetzung, umfassend einen

pharmazeutischen Träger und eine wirksame Menge einer Verbindung der Formel (I), supra.

[0012] Eine Verbindung der Formel (I), supra, kann bei einem Verfahren des Hemmens der VLA-4-abhängigen Zelladhäsion verwendet werden, wobei sie an einen Patienten, der dessen bedarf, in einer wirksamen Menge zu verabreichen ist.

[0013] Das Vermögen der Verbindungen dieser Erfindung, den Wirkungen von VLA-4 entgegen zu wirken, macht sie nützlich zum Vorbeugen, Behandeln oder Rückgängigmachen der Symptome, Störungen oder Erkrankungen, welche durch das Binden von VLA-4 an seine Liganden induziert wird. So werden diese Antagonisten Zelladhäsionsprozesse einschließlich Zellaktivierung, -migration, -proliferation und -differentiation hemmen. Sie können daher bei Verfahren zur Behandlung, Vorbeugung, Linderung oder Unterdrückung von Erkrankungen oder Störungen, die über den VLA-4-Weg vermittelt werden, verwendet werden. Solche Erkrankungen und Störungen schließen zum Beispiel Asthma, Multiple Sklerose, allergische Rhinitis, allergische Konjunktivitis, entzündliches Lungenleiden, rheumatoide Arthritis, eitrige Arthritis, Typ-I-Diabetes, Organtransplantatabstoßung, entzündliche Darmerkrankung und andere ein.

[0014] Verbindungen der Erfindung enthalten ein oder mehrere asymmetrische Zentren und können so als Racemate und racemische Gemische, als einzelne Enantiomere, als diastereomere Gemische und einzelne Diastereomere vorkommen. Die vorliegende Erfindung ist dazu gedacht, alle solche isomeren Formen der Verbindungen der Erfindung zu umfassen.

[0015] Die beanspruchte Erfindung ist auch darauf ausgelegt, pharmazeutisch verträgliche Salze der Formel I einzuschließen. Der Begriff „pharmazeutisch verträgliche Salze“ bezieht sich auf Salze, die aus pharmazeutisch verträglichen, nicht-toxischen Basen oder Säuren einschließlich anorganischen oder organischen Basen und anorganischen oder organischen Säuren hergestellt werden. Salze, die aus anorganischen Basen abgeleitet sind, schließen Aluminium-, Ammonium-, Calcium-, Kupfer-, Eisen(III)-, Eisen(II)-, Lithium-, Magnesium-, Mangan(III)-, Mangan(II)-, Kalium-, Natrium-, Zinksalze und dergleichen ein. Besonders bevorzugt sind die Ammonium-, Calcium-, Magnesium-, Kalium- und Natriumsalze.

[0016] Salze, die aus pharmazeutisch verträglichen, organischen, nicht-toxischen Basen abgeleitet sind, schließen Salze von primären, sekundären und tertiären Aminen, substituierten Aminen einschließlich natürlich vorkommenden substituierten Aminen, cyclischen Aminen und basischen Ionenaustauscherharzen wie etwa Arginin, Betain, Koffein, Cholin, N,N'-Dibenzylethylendiamin, Diethylamin, 2-Diethylaminoethanol, 2-Dimethylaminoethanol, Ethanolamin, Ethylendiamin, N-Ethylmorpholin, N-Ethylpiperidin, Glucamin, Glucosamin, Histidin, Hydrabamin, Isopropylamin, Lysin, Methylglucamin, Morpholin, Piperazin, Piperidin, Polyaminharzen, Procain, Purinen, Theobromin, Triethylamin, Trimethylamin, Tripropylamin, Tromethamin und dergleichen ein.

[0017] Wenn die Verbindung der vorliegenden Erfindung basisch ist, können Salze aus pharmazeutisch verträglichen, nicht-toxischen Säuren einschließlich anorganischen und organischen Säuren hergestellt werden. Solche Säuren schließen Essig-, Benzolsulfon-, Benzoe-, Kampfersulfon-, Zitronen-, Ethansulfon-, Fumar-, Glucon-, Glutamin-, Bromwasserstoff-, Salz-, Isethion-, Milch-, Malein-, Äpfel-, Mandel-, Methansulfon-, Schleim-, Salpeter-, Pamoin-, Pantothen-, Phosphor-, Bernstein-, Schwefel-, Wein-, p-Toluolsulfonsäure und dergleichen ein. Besonders bevorzugt sind Zitronen-, Bromwasserstoff-, Salz-, Malein-, Phosphor-, Schwefel- und Weinsäure.

[0018] Wie er hier verwendet wird, bezieht sich der Begriff „Alkyl“, allein oder in Kombination, auf einen unverzweigten oder verzweigten Alkylrest, der 1 bis 10, bevorzugt 1 bis 6 und stärker bevorzugt 1 bis 4 Kohlenstoffatome enthält. Beispiele für solche Reste schließen Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl, sek-Butyl, tert-Butyl, Pentyl, Isoamyl, Hexyl, Decyl und dergleichen ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0019] Der Begriff „Halogen“ bedeutet Fluor, Chlor, Brom und Iod.

[0020] Wie er in dieser gesamten Anmeldung verwendet wird, bezieht sich der Begriff „Patient“ auf Säuger einschließlich Menschen. Und der Begriff „Zelle“ bezieht sich auf Säuerzellen einschließlich menschlichen Zellen.

[0021] Im Hinblick auf die vorstehenden Definitionen können andere chemische Begriffe, die in dieser gesamten Anmeldung verwendet werden, von Fachleuten leicht verstanden werden. Die Begriffe können allein oder in jeglicher Kombination davon verwendet werden. Die bevorzugten und stärker bevorzugten Kettenlängen der Reste gelten für alle solche Kombinationen.

[0022] Andere Merkmale oder Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der nachstehenden detaillierten Beschreibung einiger Ausführungsformen und auch aus den anhängenden Ansprüchen ersichtlich sein.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0023] Die Verbindungen dieser Erfindung können unter Verwendung eines jeglichen konventionellen Verfahrens, von denen einige hier beispielhaft aufgeführt sind, synthetisiert werden. Bevorzugt werden diese Verbindungen chemisch aus ohne weiteres verfügbaren Ausgangsmaterialien wie etwa α -Aminosäuren und ihren funktionellen Äquivalenten synthetisiert. Modulare und konvergente Verfahren zur Synthese dieser Verbindungen werden auch bevorzugt. Auf einem konvergenten Weg werden zum Beispiel große Teile des Endprodukts in den letzten Schritten der Synthese zusammengebracht und nicht durch inkrementales Hinzufügen von kleinen Stücken an eine wachsenden Molekülkette.

[0024] Die Verbindungen der Erfindung, $R^3-L-L'-R^1$, gemäß einer Ausführungsform, können dargestellt werden als $R^3-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1-R^1$. Diese Verbindung kann als ein Dipeptidderivat angesehen werden: mit R^1 als ein Aminosäurerest oder einem Derivat davon; Y^1 als eine Amidbrücke oder ein Derivat davon zwischen den zwei Resten; X als einem Carboxylat oder ein Derivat davon; C als das α -Kohlenstoffatom des zweiten Rests und $R^3-Y^4-Y^3-$ als die Seitenkette des zweiten Rests.

[0025] In dem allgemeinen Verfahren, das nachstehend veranschaulicht ist, wird die Verbindung $R^3-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1-R^1$ hergestellt, indem zunächst eine geeignet geschützte Einheit $Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ mit einem geeignet geschützten R^3 gekoppelt wird. Y^3 und X sind vorstehend definiert worden. Y^4 , Y^1 und R^3 sind Vorstufen von Y^4 , Y^1 beziehungsweise R^3 .

[0026] Die Verbindungen der Formel $Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ sind kommerziell verfügbar oder können gemäß Verfahren, die Durchschnittsfachleuten bekannt sind, hergestellt werden. Zum Beispiel ist, wenn Y^1 für eine Aminogruppe steht; X für Carboxylat steht und Y^4-Y^3- für $NH_2-(CH_2)_3-$ steht, die Verbindung $Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ Ornithin. Als ein anderes Beispiel ist, wenn Y^1 für eine Aminogruppe steht; X für Carboxylat steht und Y^4-Y^3- für $4-NH_2-Cyclohexyl-CH_2-$ steht, die Verbindung $Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ 4-Aminophenylalanin, verfügbar durch Reduktion von kommerziell verfügbarem 4-Nitrophenylalanin. Die weitere Reduktion der Phenyleinheit führt zu einer Verbindung, in der Y^1 für eine Aminogruppe steht; X für Carboxylat steht und Y^4-Y^3- für $4-NH_2-Cyclohexyl-CH_2-$ oder $4-Aminocyclohexylalanin$ steht, kommerziell verfügbar als ein Gemisch von cis- und trans-Isomeren. Wie vorstehend erwähnt, sind geeignete Schutzgruppen erforderlich, um bestimmte Funktionalitäten daran zu hindern, unerwünschte Reaktionen zu durchlaufen. Um Ornithin als ein Beispiel zu verwenden: Y^1 und X sind Funktionalitäten, die nicht bei der ersten Kopplungsreaktion beteiligt sind, und sollten mit üblichen Aminoschutzgruppen wie etwa mit Carbamaten (z.B. t-Butylcarbamat (BOC) und Benzylcarbamat (CBZ)) und üblichen Carboxylschutzgruppen wie etwa substituierten Estern (z.B. Ethylester und Methoxymethylester) geschützt werden. Für geeignete Schutzgruppen siehe T. W. Greene, Protecting Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, New York, 1981, und Literaturstellen, die darin zitiert werden.

[0027] Die Verbindung R^3 kann durch die Formel $Z^3-L^b-Z^4-T$ oder $R^4-Y^5-N(R^5)-CH(R^6)-T'$ dargestellt werden. Ein jedes von T und T' steht für eine Funktionalität, die sich mit Y^4 verbindet, um Y^4 zu bilden. Zum Beispiel kann das gewünschte Y^4 , wenn es eine Amidbrücke ist, gebildet werden, indem eine Aminogruppe (Y^4) mit einer Carboxylgruppe (T oder T') in Anwesenheit eines gewöhnlichen Kopplungsreagens wie etwa Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) oder O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) umgesetzt wird. Als ein anderes Beispiel kann das gewünschte Y^4 , wenn es ein Arylether ist, gebildet werden, indem ein Phenol mit einem Alkohol in Anwesenheit von Diethylazodicarboxylat (DEAD) und Triphenylphosphin umgesetzt wird.

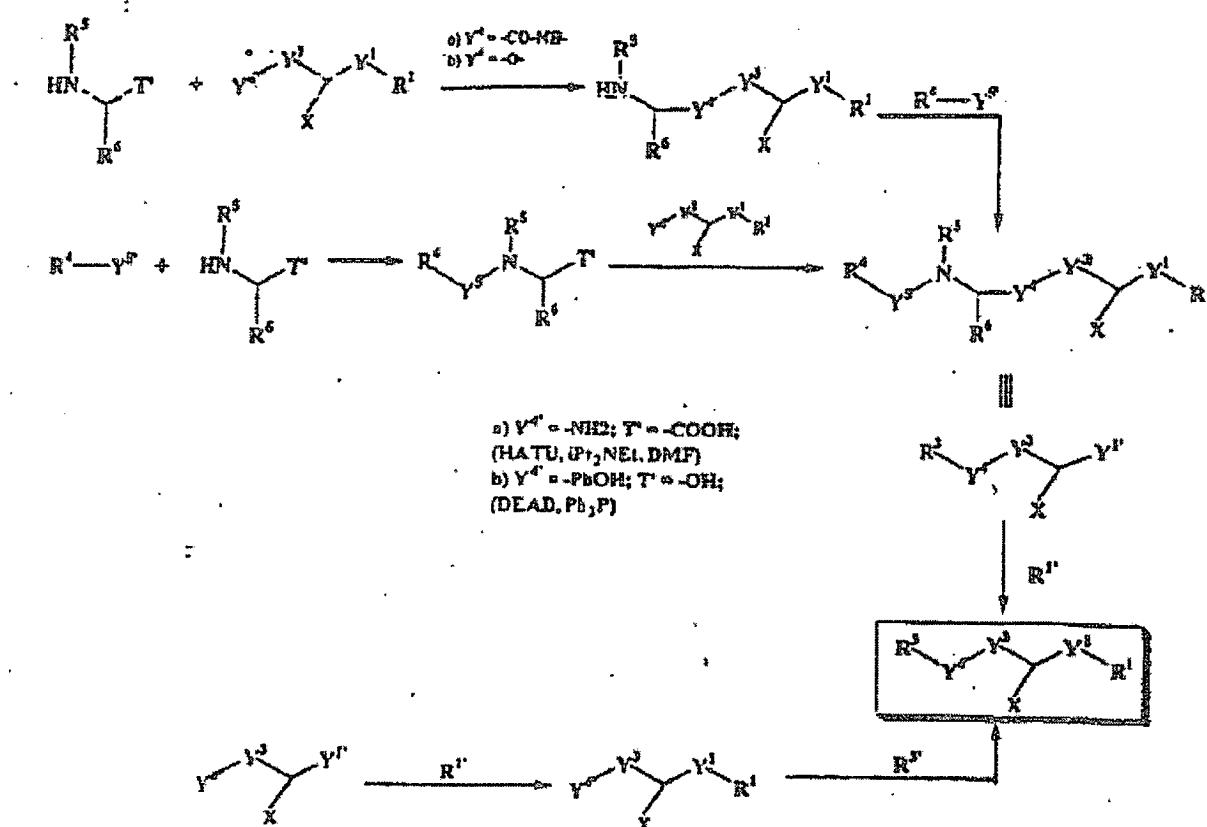
[0028] Wenn R^3 der Formel $Z^3-L^b-Z^4-T$ entspricht, ist die Verbindung kommerziell verfügbar oder kann gemäß Verfahren, die Durchschnittsfachleuten bekannt sind, hergestellt werden. Zum Beispiel steht, wenn Z^3 für 2-Methylphenyl steht; Z^4 für Phenylmethyl steht; L^b für $-NH-CO-NH-$ steht und T für $-COOH$ steht, R^3 für o-Methylphenylureidophenylessigsäure und kann erhalten werden, indem 4-Aminophenyllessigsäure mit 2-Methylphenylisocyanat umgesetzt wird. Als ein anderes Beispiel steht, wenn Z^3 für 3-Indol steht; Z^4 für Phenylmethyl steht; L^b für $-CO-NH-$ steht und T für $-COOH$ steht, R^3 für 3-Indolcarboxamidophenylessigsäure und kann erhalten werden, indem 4-Aminophenyllessigsäure mit Indol-3-carbonylchlorid umgesetzt wird.

[0029] Wenn R^3 der Formel $R^4-Y^5-N(R^5)-CH(R^6)-T'$ entspricht, kann $Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ an $NH(R^5)-CH(R^6)-T'$ koppeln, um die Zwischenstufe $NH(R^5)-CH(R^6)-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ zu bilden, vor weiterem Koppeln an R^4-Y^5 , um $R^4-Y^5-N(R^5)-CH(R^6)-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ zu bilden. Y^5 steht für eine Funktionalität, die, nachdem sie weitere Kopp-

lungsreaktionen durchlaufen hat, die Funktionalität Y^5 ergibt. Man beachte, dass die Verbindung $NH(R^5)-CH(R^6)-T'$ ein Amiosäurederivat sein kann, das kommerziell verfügbar ist und unter Verwendung konventioneller Verfahren von einem Durchschnittsfachmann hergestellt werden kann. Zum Beispiel ist, wenn T' für Carboxyl steht; R^6 für Isobutyl steht und R^5 für Methyl steht, die Verbindung $NH(R^5)-CH(R^6)-T' N$ -Methylleucin. R^4-Y^5 können durch gewöhnlich verwendete synthetische Verfahren an $NH(R^5)-CH(R^6)-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ gekoppelt werden. Zum Beispiel ist, wenn Y^5 für Carboxyl steht, das resultierende Y^5 eine Amidbrücke und kann unter Verwendung gewöhnlicher Peptidsynthesereagenzien, wie vorstehend erwähnt, hergestellt werden. Als ein anderes Beispiel ist, wenn Y^5 für ein Halogen oder Sulfonat steht, das resultierende Y^5 ein sekundäres oder tertiäres Amin, das aus einer Alkylierung des Ausgangs-Amins resultiert. Alternativ kann, um die Verbindung $R^4-Y^5-NH(R^5)-CH(R^6)-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ zu bilden, $NH(R^5)-CH(R^6)-T'$ zuerst an R^4-Y^5 koppeln, um die Zwischenstufe $R^4-Y^5-N(R^5)-CH(R^6)-T'$ zu bilden, vor weiterem Koppeln an $Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$. Das nachstehende Beispiel 1 stellt eine detaillierte Vorgehensweise zur Verfügung, wobei R^3 der Formel $R^4-Y^5-N(R^5)-CH(R^6)$ entspricht.

[0030] Alternativ kann R^3 , wenn es der Formel $Z^3-L^b-Z^4-T$ entspricht, mit $Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ reagieren, um $Z^3-L^b-Z^4-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ zu bilden. Siehe Beispiel 2.

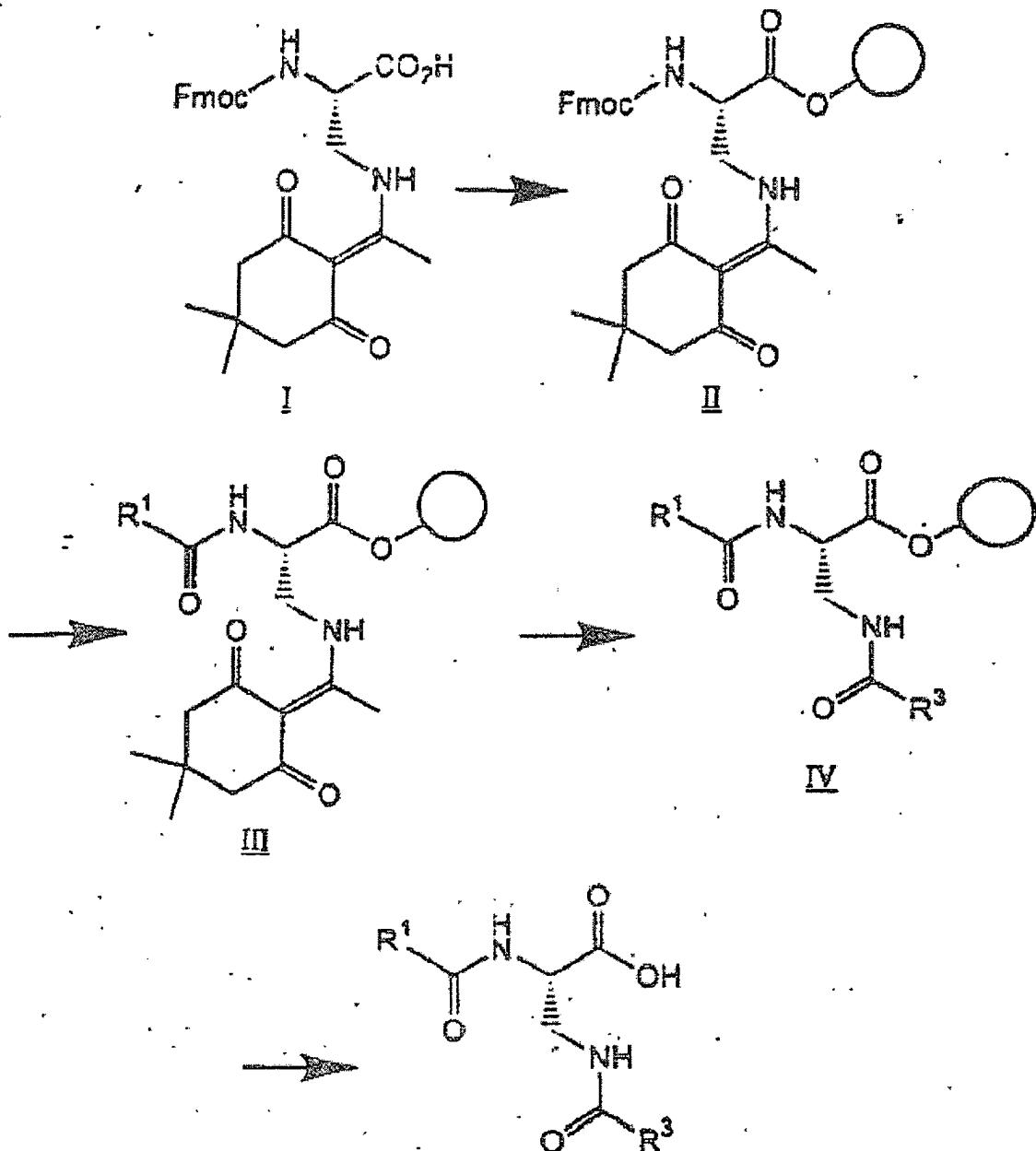
[0031] Das Endprodukt $R^3-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ kann dann durch Umsetzen entweder von $R^4-Y^5-N(R^5)-CH(R^6)-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ oder von $Z^3-L^b-Z^4-Y^4-Y^3-CH(X)-Y^1$ mit R^1 (dem Vorläufer von R^1) gebildet werden. Die Einheit Y^1 kann in einer ähnlichen Art und Weise wie Y^4 gebildet werden.



[0032] Ein Zelladhäsionshemmer der Erfindung kann durch konventionelle Verfahren wie etwa Chromatographie oder Kristallisation gereinigt werden.

[0033] Nachstehend dargelegt sind fünf allgemeine Verfahren zum Herstellen einer Verbindung dieser Erfindung.

Allgemeines Verfahren A – Festphasen-Herstellung von Diaminopropionatderivaten:



[0034] Orthogonal Fmoc/Dde-geschütztes Wang-Harz (II): S-N- α -Fmoc-N- β -Dde-Diaminopropionsäure, I (4,95 g, 10,1 mmol), wurde durch Umsetzung mit 2,6-Dichlorbenzoylchlorid (1,45 ml, 10,1 mmol) und trockenem Pyridin (1,35 ml) in 40 ml trockenem DMF an Wang-Harz (7,88 g, 0,64 mmol/g, 100–200 Mesh) gebunden. Das Gemisch wurde 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz wurde durch Filtration isoliert und wurde dreimal jeweils mit DMF und Dichlormethan gewaschen. Das Harz wurde durch 2-stündige Umsetzung mit Dichlorbenzoylchlorid und Pyridin (jeweils 2 ml) übedeckt, gefolgt von Waschen wie vorstehend. Das resultierende Harz enthielt 0,64 mmol/g Fmoc, wie durch Piperidinbehandlung und Messung der A_{290} bestimmt.

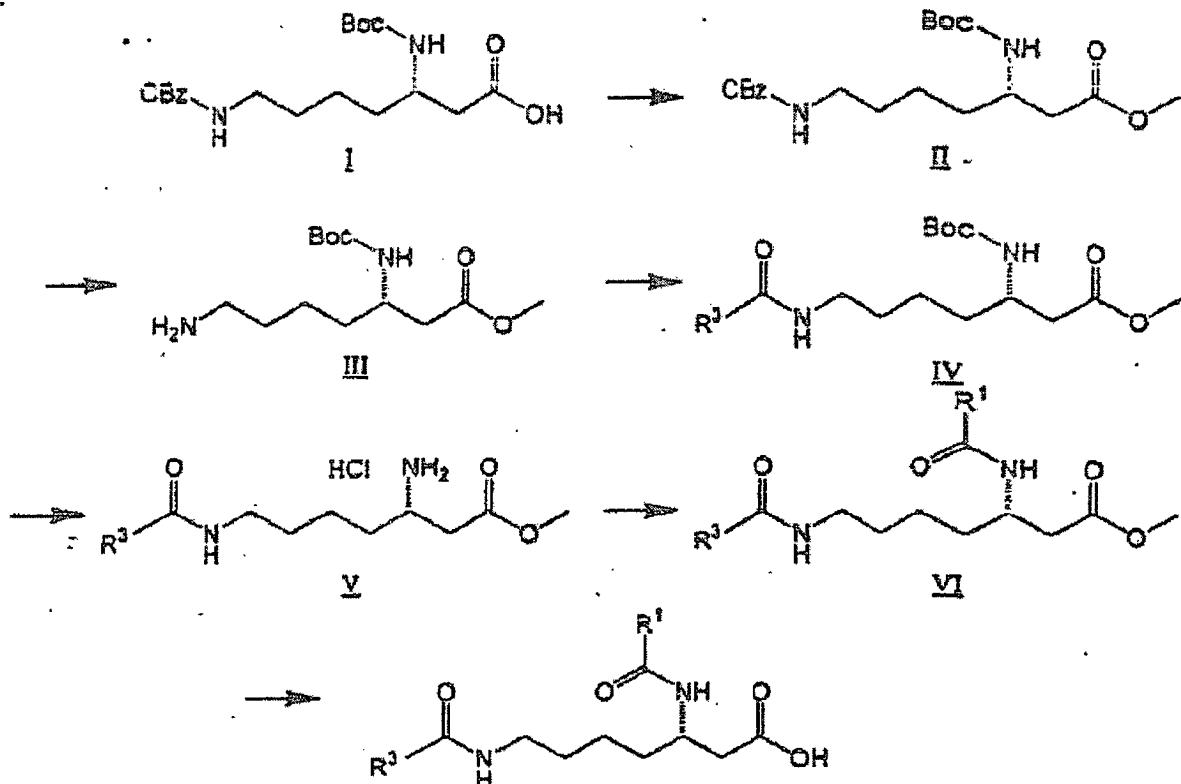
[0035] Schutzgruppenentfernung und Acylierung von N- α : Das Diaminopropionatharz, II, wurde mit 20% Piperidin in DMF 15 Minuten behandelt, wonach es filtriert und mit DMF und Dichlormethan gewaschen wurde. Das Harz mit entfernter Schutzgruppe wurde sogleich durch Behandlung mit R^1CO_2H (2 Äquivalente), HATU (2 Äquivalente) und Diisopropylethylamin (4 Äquivalente) acyliert. Die Umsetzungen wurden 2 h geschüttelt, und die Acylierung wurde wiederholt. Die Vervollständigung der Acylierung wurde durch einen negativen Kaiser-Test bestimmt. Das Harz wurde filtriert und mit DMF und Dichlormethan gewaschen. Wenn R^1CO_2H eine Fmoc-geschützte Aminosäure ist, werden die Schutzgruppenentfernung und Acylierung, wie vorstehend beschrieben, wiederholt.

[0036] Schutzgruppenentfernung und Acylierung von N- β : Das acyierte Diaminopropionatharz, III, wurde mit

2% Hydrazin in DMF 1 h behandelt, wonach es filtriert und mit DMF und Dichlormethan gewaschen wurde. Das Harz mit entfernter Schutzgruppe wurde sogleich durch Behandlung mit R^3CO_2H (2 Äquivalente), HATU (2 Äquivalente) und Diisopropylethylamin (4 Äquivalente) acyliert. Die Umsetzungen wurden 2 h geschüttelt, und die Acylierung wurde wiederholt. Das Harz wurde filtriert und mit DMF und Dichlormethan gewaschen.

[0037] Abspaltung des Endprodukts von dem Harz: Das Diacyldiaminopropionatharz, IV, wurde mit 95% TFA/5% Wasser 1 h behandelt. Das Lösungsmittel wurde durch Filtration entfernt, und das Harz wurde mit zwei kleinen Portionen TFA gewaschen. Die vereinigten TFA-Lösungen wurden unter Vakuum aufkonzentriert, und der resultierende Rückstand wurde durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt, was reine Diacyldiaminopropionatderivate ergab.

Allgemeines Verfahren B – Herstellung von β -Lysinderivaten:



[0038] Omega-N-Cbz-beta-N-BOC-beta-homolysinmethylester (II): Omega-N-Cbz-beta-N-BOC-beta-homolysin, I, wurde in N,N-Dimethylformamid gelöst. Zu dieser Lösung wurde Natriumbicarbonat (10 Äquivalente) und dann Jodmethan (6 Äquivalente) unter Rühren zugegeben. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch zwischen Wasser und Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, dann über Natriumsulfat getrocknet. Filtrieren und Verdampfung des Lösungsmittels wurden gefolgt von Kieselgelchromatographie (Hexan/Ethylacetat), um den Ester II zu gewinnen.

[0039] Beta-N-BOC-beta-homolysinmethylester (III): Das N-Cbz-carbamat II wurde in Methanol gelöst. Zu diesem wurde 10% Palladium auf Kohlenstoff gegeben. Das Gemisch wurde mit Stickstoff gespült, dann wurde Wasserstoff (50 psi) zugegeben. Nach Rühren über Nacht wurde der Katalysator unter Verwendung eines Whatman PTFE-Filters entfernt, und die Lösung wurde aufkonzentriert, um rohes Amin III zu gewinnen.

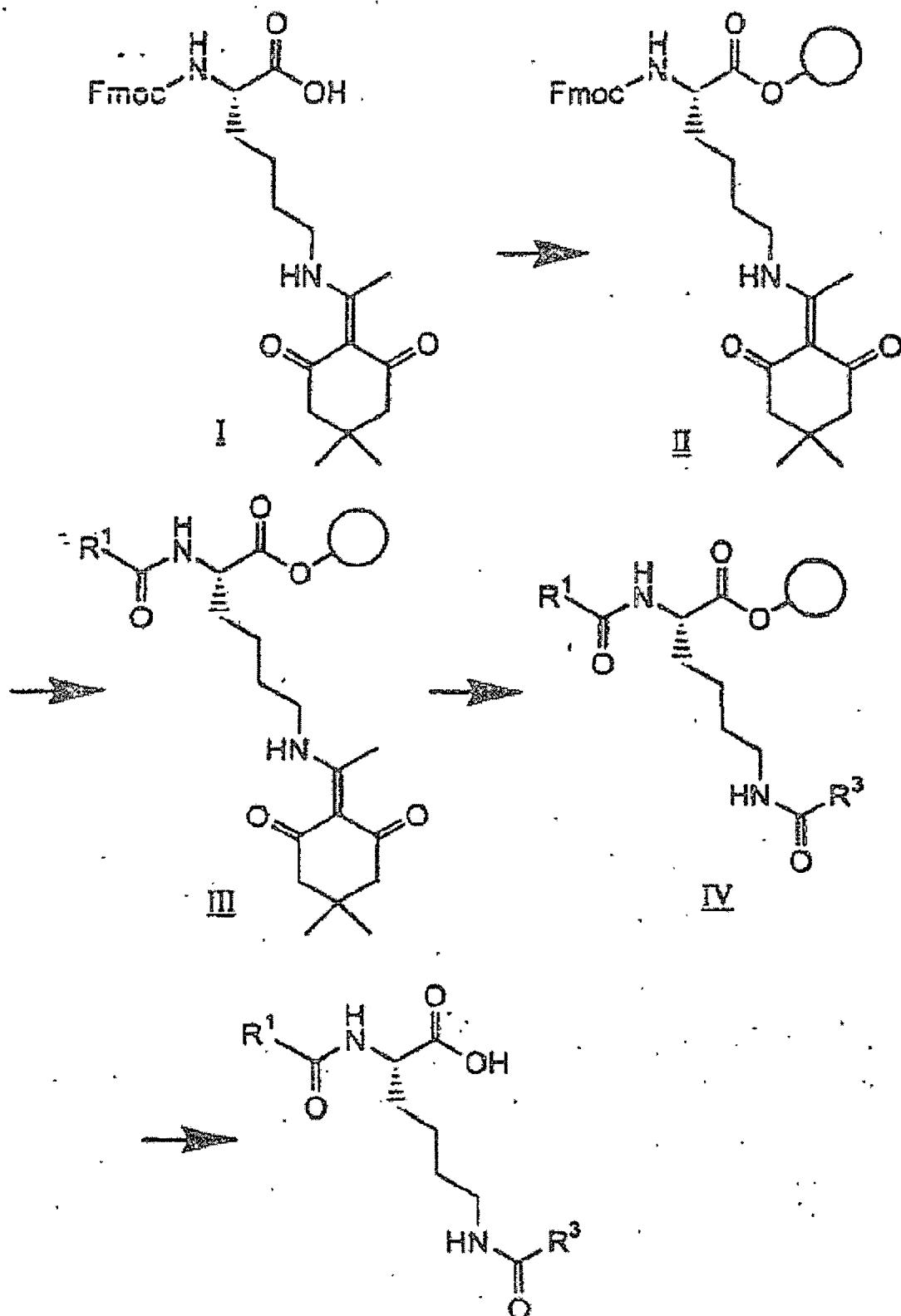
[0040] N-omega-Acylierung: Das Amin III (111 mg), 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU, 1,1 Äquivalente) und R^1CO_2H (1,1 Äquivalente) wurden in N,N-Dimethylformamid gelöst. Zu dieser Lösung wurde N,N-Diisopropylethylamin (2,5 Äquivalente) zugegeben. Nach Rühren über Nacht wurde die Umsetzung mit 5% wässriger Zitronensäurelösung quenched, dann mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Stoffe wurden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, dann über Natriumsulfat getrocknet. Filtration und Entfernung des Lösungsmittels durch Rotationsverdampfung ergaben rohes Amid IV, das ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

[0041] N-beta-Schutzgruppenentfernung und Acylierung: Rohes N-BOC-carbamat IV wurde mit gesättigter

Salzsäure in Ethylacetat behandelt, die durch 30-minütiges Durchperlen von Chlorwasserstoffgas durch kalte (Null Grad) Ethylacetatlösung hergestellt wurde. Die Umsetzung wurde eine Stunde gerührt, dann zur Trockene aufkonzentriert, um rohes Amin V zu gewinnen, das ohne weitere Reinigung verwendet wurde. Das rohe Amin V wurde in N,N-Dimethylformamid zusammen mit R^3CO_2H (1 Äquivalent) und HBTU (1,1 Äquivalente) gelöst. Unter Rühren wurde N,N-Diisopropylethylamin (7,5 Äquivalente) zugegeben. Nach Rühren über Nacht wurde die Umsetzung zwischen 5% wässriger Zitronensäure und Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, dann über Natriumsulfat getrocknet. Filtration des Trocknungsmittels und Verdampfung des Lösungsmittels ergaben rohes Amin VI, das ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

[0042] Endgültige Schutzgruppenentfernung: Der Methylester VI wurde in 1:1 Tetrahydrofuran und Methanol gelöst. Unter Rühren wurde wässriges Lithiumhydroxid (2 N) zugegeben. Nach einer Stunde Rühren wurde das Reaktionsgemisch zur Trockene aufkonzentriert. Der Rückstand wurde zwischen 1 N wässriger Salzsäure und Ethylacetat ausgeschüttelt, und die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Trocknen über Natriumsulfat, Filtrieren und Verdampfen ergab rohe Säure. Die Reinigung durch präparative Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ergab reine Säure.

Allgemeines Verfahren C – Festphasen-Herstellung von Lysinderivaten:

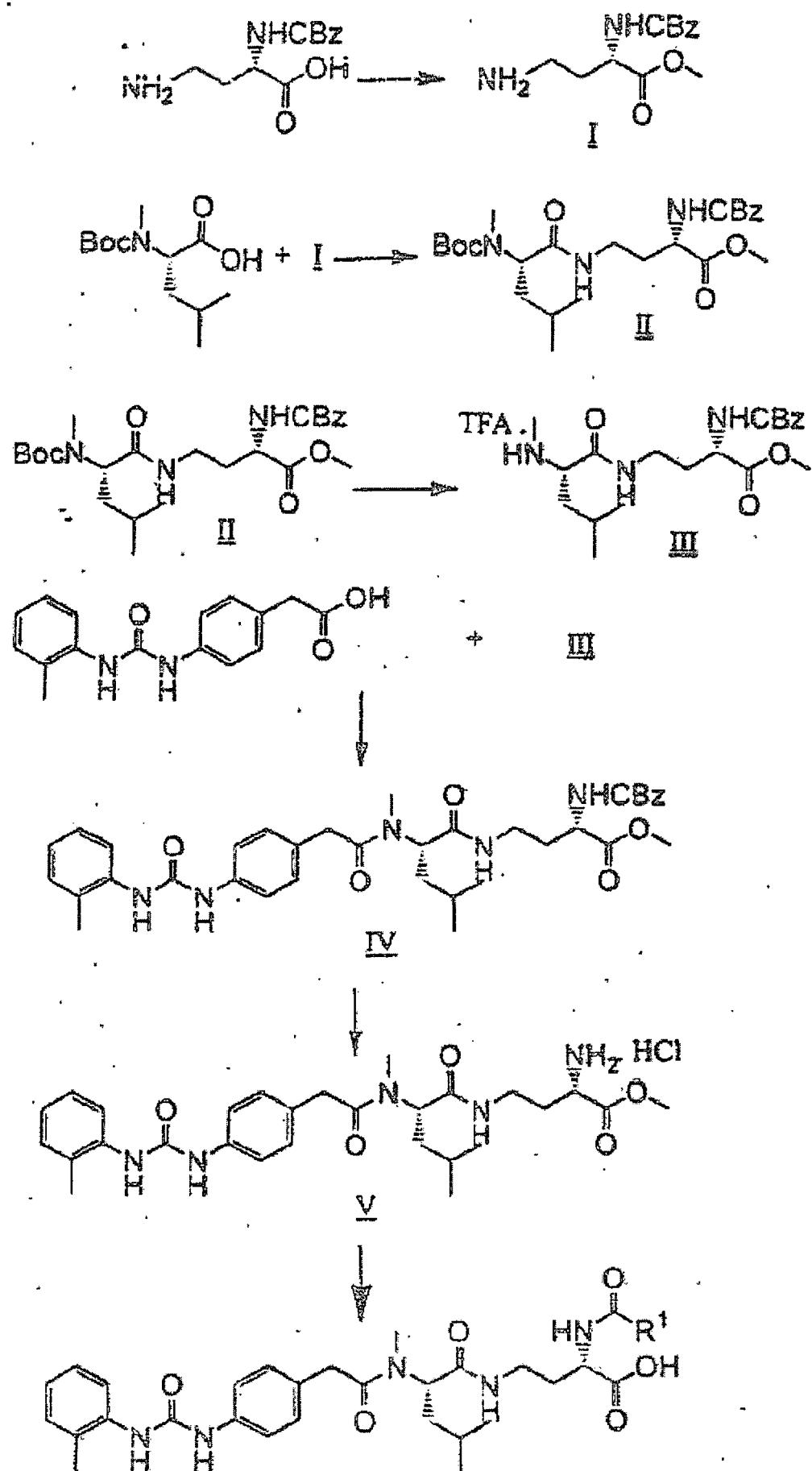


[0043] Fmoc/Dde-Lysin-Wang-Harz (II): N- α -Fmoc-N- β -Dde-Lysin, I (5,0 g, 9,39 mmol), wurde durch Umsetzung mit 2,6-Dichlorbenzoylchlorid (1,33 ml, 10,1 mmol) und trockenem Pyridin (1,27 ml) in 50 ml trockenem DMF an Wang-Harz (7,34 g, 0,64 mmol/g, 100–200 Mesh) gebunden. Das Gemisch wurde 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz wurde durch Filtration isoliert und wurde dreimal jeweils mit DMF und Dichlormethan gewaschen. Das Harz wurde durch 2-stündige Umsetzung mit Dichlorbenzoylchlorid und Pyridin (je- weils 2 ml) überdeckt, gefolgt von Waschen wie vorstehend. Das resultierende Harz enthielt 0,56 mmol/g Fmoc, wie durch Piperidinbehandlung und Messung der A_{290} bestimmt.

[0044] Schutzgruppenentfernung und Acylierung von N- α : Das Diaminopropionatharz, II, wurde mit 20% Piperidin in DMF 15 Minuten behandelt, wonach es filtriert und mit DMF und Dichlormethan gewaschen wurde. Das Harz mit entfernter Schutzgruppe wurde sogleich durch Behandlung mit R^1CO_2H (2 Äquivalente), HATU (2 Äquivalente) und Diisopropylethylamin (4 Äquivalente) acyliert. Die Umsetzungen wurden 2 h geschüttelt, und die Acylierung wurde wiederholt. Die Vervollständigung der Acylierung wurde durch einen negativen Kaiser-Test bestimmt. Das Harz wurde filtriert und mit DMF und Dichlormethan gewaschen. Wenn R^1CO_2H eine Fmoc-geschützte Aminosäure ist, werden die Schutzgruppenentfernung und Acylierung, wie vorstehend beschrieben, wiederholt.

[0045] Schutzgruppenentfernung und Acylierung von N- ϵ : Das acylierte Lysinharz, III, wurde mit 2% Hydrazin in DMF 1 h behandelt, wonach es filtriert und mit DMF und Dichlormethan gewaschen wurde. Das Harz mit entfernter Schutzgruppe wurde sogleich durch Behandlung mit R^3CO_2H (2 Äquivalente), HATU (2 Äquivalente) und Diisopropylethylamin (4 Äquivalente) acyliert. Die Umsetzungen wurden 2 h geschüttelt filtriert, und die Acylierung wurde wiederholt. Das Harz wurde filtriert und mit DMF und Dichlormethan gewaschen.

[0046] Abspaltung des Endprodukts von dem Harz: Das Diacyllysinharz, IV, wurde mit 95% TFA/5% Wasser 1 h behandelt. Das Lösungsmittel wurde durch Filtration entfernt, und das Harz wurde mit zwei kleinen Portionen TFA gewaschen. Die vereinigten TFA-Lösungen wurden unter Vakuum aufkonzentriert, und der resultierende Rückstand wurde durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt, was reine Diacyllysinderivate ergab.

Allgemeines Verfahren D: Herstellung von oMePUPA-N-MeLeu- α,γ -diaminobuttersäurederivaten:

[0047] N- α -CBZ-2,4-Diaminobuttersäuremethylesterhydrochlorid (I): In einem 500-ml-RB-Kolben wurden 8,4 g (33,3 mmol) N- α -CBZ-2,4-Diaminobuttersäure in 200 ml Methanol unter Rühren suspendiert. Dies wurde auf 0°C gekühlt (Eisbad), und dann wurden 14,6 ml (200 mmol) SOCl_2 tropfenweise über 15 Minuten zugegeben, um eine farblose Lösung zu ergeben. Diese Lösung ließ man sich auf RT erwärmen und es wurde über Nacht gerührt. Die Lösung wurde aufkonzentriert, in MeOH wieder gelöst und zweimal aufkonzentriert, dann in CH_2Cl_2 gelöst, aufkonzentriert und 16 Stunden unter Hochvakuum gesetzt, um Verbindung I als einen leicht gelben Schaum zu ergeben, der eine Masse von 10,33 g (34,2 mmol, 103%) aufwies. M/z = 267,1 (M + H $^+$).

[0048] BOC-N-methylleucinyl-(N- α -CBZ)-GABA-methylester (II): In einem 500-ml-RB-Kolben wurden 10,33 g (33,3 mmol) I (Molgewicht = 302) in 100 ml trockenem Dimethylformamid (DMF) unter Rühren gelöst, um eine farblose Lösung zu ergeben. Zu dieser wurden 17,4 ml (100 mmol) Diisopropylethylamin (DIEA) zugegeben, dann 7,96 g (32,5 mmol) BOC-N-Me-leucin und schließlich 14,83 g (39,0 mmol) O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU), um eine gelbe Lösung zu ergeben. Diese wurde über Nacht gerührt, wonach die HPLC kein Ausgangsmaterial zeigte. Die Lösung wurde mit Ethylacetat (EtOAc, 500 ml) verdünnt und mit 1 N HCl (zweimal), 1 N NaOH (zweimal) und Salzlösung (einmal) gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem MgSO_4 getrocknet, filtriert und zu einem roten Öl aufkonzentriert. Die Chromatographie mit 2:1 Hexanen/EtOAc über Kieselgel gab 12,56 g (25,5 mmol, 78%) II (R_f = 0,46 mit 1:1 Hex/EtOAc über Kieselgel) als einen gelben Sirup (HPLC, > 99%). M/z = 494,3 (MH).

[0049] H-N-Methylleucinyl-(N- α -CBZ)-GABA-methylestertrifluoracetatsalz (III): In einem 50-ml-RB-Kolben wurden 0,50 g (1,01 mmol) II (Molgewicht = 493) in 10 ml CH_2Cl_2 unter Rühren gelöst, um eine farblose Lösung zu ergeben. Zu dieser wurden 2 ml (26 mmol, großer Überschuss) Trifluoressigsäure zugegeben, und die resultierende Lösung wurde vier Stunden gerührt, wonach die HPLC kein Ausgangsmaterial zeigte. Die Lösung wurde aufkonzentriert, wieder in CH_2Cl_2 gelöst und aufkonzentriert (zweimal), dann über Nacht unter Hochvakuum gesetzt, um 0,52 g (~ quantitativ) III als ein sehr blassgelbes Öl zu ergeben. M/z = 394,4 (M + H $^+$). Material zur weiteren Durchführung verwendet.

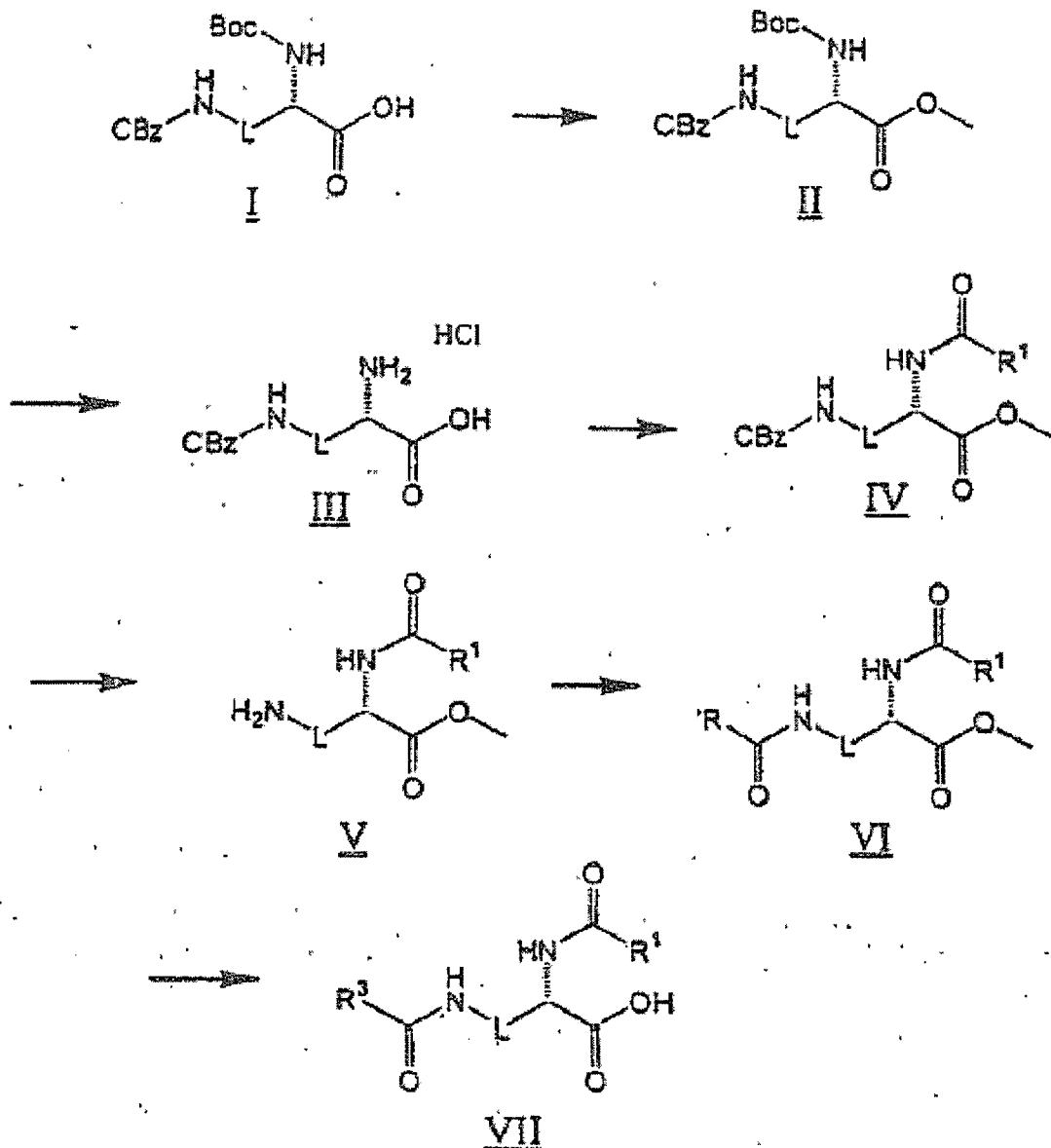
[0050] oMePUPA-N-methylleucinyl-(N- α -CBZ)-GABA-methylester (IV): In einem 10-ml-Fläschchen wurden 0,52 g (1,01 mmol) III (Molgewicht = 507) in 5 ml DMF unter Rühren gelöst, um eine blassgelbe Lösung zu ergeben. Zu dieser wurden 525 μ l (3,0 mmol) DIEA zugegeben, dann 284 mg (1,0 mmol) oMePUPA in Form der freien Säure (Ricerca; MW = 284) und schließlich 0,42 g (1,1 mmol) HATU, um eine gelbe Lösung zu ergeben. Diese wurde über Nacht gerührt, wonach die HPLC kein verbleibendes Ausgangsmaterial zeigte. Die Lösung wurde mit EtOAc (75 ml) verdünnt und mit 1 N HCl (dreimal), 1 N NaOH (dreimal) und Salzlösung (einmal) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Filtrat zu einem gelben Öl/Feststoff-Gemisch aufkonzentriert. Die Chromatographie mit 1:2 Acetonitril/ CH_2Cl_2 über Kieselgel ergab 0,49 g (0,74 mmol, 74%) VI (R_f = 0,56 mit 1:1 Acetonitril/ CH_2Cl_2 über Kieselgel) als einen leuchtendweißen, schaumigen Feststoff (HPLC, > 99%). M/z = 660,1 (M + H $^+$).

[0051] oMePUPA-N-methylleucinyl-(N- α -H)-GABA-methylesterhydrochlorid (V): In einem 85-ml-Hochdruckgefäß wurden 400 mg (0,61 mmol) IV (Molgewicht = 659) in 10 ml MeOH unter Rühren gelöst, um eine farblose Lösung zu ergeben. Das Gefäß wurde mit Stickstoff gespült, und ~50 mg (katalytisch) 10% Palladium auf Kohlenstoff wurden zugegeben. Die Seiten des Gefäßes wurden mit zusätzlichem MeOH gewaschen und das Gefäß mit einem Hydrierungsaufsatzt verschlossen. Das Gefäß wurde mit 60 psi H $_2$ beschickt und das Gemisch über Nacht gerührt, wonach das Gefäß auf Umgebungsatmosphäre entgast wurde. Das Gemisch wurde durch Celite 545 filtriert, die Filter-Einlage mit zusätzlichem (10 ml) MeOH gewaschen und das Filtrat aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in der Minimalmenge (2 ml) MeOH gelöst und in eiskalte 1,0 M HCl in Diethylether getropft, um einen weißen Niederschlag zu ergeben. Der Feststoff wurde in dem HCl/Ether 20 Minuten verrieben, dann filtriert, der Feststoff mit Ether gewaschen und eine Stunde luftgetrocknet. Der weiße Feststoff wurde dann mit einem Spatel zu einem Pulver zerstoßen, mit zusätzlichem Ether gewaschen und über Nacht luftgetrocknet, um 336 mg (0,50 mmol, 98%) V als ein weißes Pulver (HPLC, > 99%) zu ergeben. ESMS m/z = 526,6 (M + H $^+$).

[0052] Acylierung und endgültige Hydrolyse: Rohes Amin V wurde in N,N-Dimethylformamid zusammen mit $\text{R}^3\text{CO}_2\text{H}$ (1 Äquivalent) und HBTU (1,1 Äquivalente) gelöst. Unter Rühren wurde N,N-Diisopropylethylamin (4 Äquivalente) zugegeben. Nach Rühren über Nacht wurde die Umsetzung zwischen 5% wässriger Zitronensäure und Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, dann über Natriumsulfat getrocknet. Die Filtration des Trocknungsmittels und Verdampfung des Lösungsmittels ergab rohes Amid, das durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt werden konnte. Der Methylester wurde in 1:1 Tetrahydrofuran und Methanol gelöst. Unter Rühren wurde wässriges Lithiumhydroxid (2 N) zugegeben. Nach einer Stunde Rühren wurde das Reaktionsgemisch zur Trockene aufkonzentriert. Der Rück-

stand wurde zwischen 1 N wässriger Salzsäure und Ethylacetat ausgeschüttelt, und die organische Phase wurde mit gesättigtem Natriumchlorid gewaschen. Trocknen über Natriumsulfat, Filtrieren und Verdampfen ergaben rohe Säure. Die Reinigung durch präparative Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ergab reines Produkt.

Allgemeines Verfahren E – Lösungs-Phasen-Synthese aus Diaminosäuren:



[0053] Das orthogonal N-alpha-BOC/CBZ-geschützte Diamin, I, wurde zu dem Methylester II durch Umsetzung mit Methyljodid (5 Äquivalente) und Kaliumcarbonat (5 Äquivalente) in Aceton bei Raumtemperatur über 16 Stunden umgewandelt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser verdünnt und mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit Wasser, gesättigtem Natriumbicarbonat und Salzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Produkt wurde durch Kieselgel in Ethylacetat und Hexan eluiert.

[0054] N-alpha-Schutzgruppenentfernung und Acylierung: Das vollkommen geschützte Diamin, II, wurde in 3 N HCl in EtOAc gelöst und wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde unter verminderter Druck aufkonzentriert. Der resultierende Feststoff wurde in Diethylether suspendiert, durch Filtration isoliert, mit Ether gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Das Hydrochlorid, III, das auf diese Weise isoliert wurde, wurde mit HATU (1,25 Äquivalente), Diisopropylethylamin (4 Äquivalente) und R¹CO₂H (1,25 Äquivalente) in trockenem DMF behandelt und wurde unter Stickstoff 16 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 5% Zitronensäure verdünnt und wurde mit EtOAC extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit Wasser, gesättigtem Natriumbicarbonat und Salzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Die Lösung wurde unter verminderter Druck aufkonzentriert, und der Rückstand wurde durch Elution durch Kieselgel in EtOAc und Hexan gereinigt, was rohes Produkt, IV, zur Verfügung stellte.

[0055] Entfernung der distalen Stickstoff-Schutzgruppe und Acylierung: Die CBZ-geschützte Zwischenstufe, IV, wurde in Methanol gelöst und wurde entgast. 10% Pd auf aktiviertem Kohlenstoff wurden zugegeben, und das Gemisch wurde unter 60 psi Wasserstoff 3 bis 16 h gerührt. Die Umsetzung wurde filtriert und aufkonzentriert. Das resultierende freie Amin wurde sogleich durch Umsetzen mit HATU (1,25 Äquivalente), Diisopropylethylamin (4 Äquivalente) und R^3CO_2H (1,25 Äquivalente) in trockenem DMF 16 h unter Röhren unter Stickstoff acyliert. Das Reaktionsgemisch wurde mit 5% Zitronensäure verdünnt und wurde mit EtOAC extrahiert. Die organischen Stoffe wurden mit Wasser, gesättigtem Natriumbicarbonat und Salzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Produkt, IV, wurde durch Elution durch Kieselgel in Ethylacetat und Hexan gereinigt.

[0056] Hydrolyse zu dem Endprodukt: Der Methylester IV wurde in 1:1 Tetrahydrofuran und Methanol gelöst. Unter Röhren wurde wässriges Lithiumhydroxid (2 N) zugegeben. Nach einer Stunde Röhren wurde das Reaktionsgemisch zur Trockene aufkonzentriert. Der Rückstand wurde zwischen 1 N wässriger Salzsäure und Ethylacetat ausgeschüttelt, und die organische Phase wurde mit gesättigtem Natriumchlorid gewaschen. Trocknen über Natriumsulfat, Filtern und Verdampfen ergab rohe Säure. Die Reinigung durch präparative Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ergab reine Säure VII.

[0057] Die Verbindungen dieser Erfindung können auch durch Anhängen angemessener Funktionalitäten modifiziert werden, um die selektiven biologischen Eigenschaften zu verbessern. Solche Modifikationen sind im Fachgebiet bekannt und schließen jene ein, welche die biologische Penetration in ein gegebenes biologisches System (z.B. Blut, lymphatisches System, Zentralnervensystem) steigern, die orale Verfügbarkeit steigern, die Löslichkeit steigern, um eine Verabreichung durch Injektion zu erlauben, den Metabolismus ändern und die Geschwindigkeit der Ausscheidung verändern.

[0058] Beispiele dieser Modifikationen sind Veresterungen mit Polyethylenglykolen.

[0059] Einmal synthetisiert, können die Wirkungen und VLA-Spezifitäten der Verbindungen gemäß dieser Erfindung unter Verwendung von in vitro- und in vivo-Tests bestimmt werden.

[0060] Zum Beispiel kann die hemmende Wirkung dieser Verbindungen auf die Zelladhäsion durch Bestimmen der Konzentration des Hemmers, welche erforderlich ist, um das Binden von VLA-4 exprimierenden Zellen an mit Fibronektin oder CS-1 beschichtete Platten zu blockieren, gemessen werden. In diesem Test werden Mikrotiterplatten-Vertiefungen entweder mit Fibronektin (welches die CS-1-Sequenz enthält) oder mit CS-1 beschichtet. Wenn CS-1 verwendet wird, muss es an ein Trägerprotein wie etwa Rinderserumalbumin konjugiert sein, um an die Vertiefungen zu binden. Sind die Vertiefungen beschichtet, werden variierende Konzentrationen der Testverbindung zusammen mit angemessen markierten, VLA-4 exprimierenden Zellen zugegeben. Alternativ kann man die Testverbindung zuerst zugeben und mit den beschichteten Vertiefungen inkubieren lassen, vor der Zugabe der Zellen. Man lässt die Zellen in den Vertiefungen mindestens 30 Minuten inkubieren. Im Anschluss an die Inkubation werden die Vertiefungen geleert und gewaschen. Die Hemmung des Bindens wird durch Quantifizieren der Fluoreszenz oder der Radioaktivität, die an die Platte gebunden sind, für jede der verschiedenen Konzentrationen der Testverbindung ebenso wie für die Kontrollen, die keine Testverbindung enthalten, gemessen.

[0061] VLA-4 exprimierende Zellen, die bei diesem Test benutzt werden können, schließen Ramos-Zellen, Jurkat-Zellen, A375-Melanom-Zellen ebenso ein wie menschliche periphere Blutzellen (PBLs). Die Zellen, die bei diesem Test verwendet werden, können fluoreszenz- oder radioaktiv markiert sein.

[0062] Ein direkter Bindungstest kann auch eingesetzt werden, um die hemmende Wirkung der Verbindungen dieser Erfindung zu quantifizieren. Bei diesem Test wird ein VCAM-IgG-Fusionsprotein, das die ersten beiden Immunglobulindomänen von VCAM (D1D2) gebunden über die Gelenkregion eines IgG1-Moleküls („VCAM 2D-IgG“) enthält, an ein Markerenzym wie etwa alkalische Phosphatase („AP“) konjugiert. Die Synthese dieser VCAM-IgG-Fusion wird in der PCT-Veröffentlichung WO 90/13300 beschrieben, deren Offenbarung hier durch Bezugnahme eingeschlossen ist. Die Konjugation dieser Fusion an ein Markerenzym wird durch quervernetzende Verfahren erreicht, die im Fachgebiet wohlbekannt sind.

[0063] Das VCAM-IgG-Enzym-Konjugat wird dann in die Vertiefungen einer Filtrationsplatte mit mehreren Vertiefungen, wie etwa der, welche in dem Millipore Multiscreen Test System (Millipore Corp, Bedford, MA) enthalten ist, platziert. Variierende Konzentrationen der hemmenden Testverbindung werden dann zu den Vertiefungen zugegeben, gefolgt von der Zugabe von VLA-4 exprimierenden Zellen. Die Zellen, die Verbindung und das VCAM-IgG-Enzym-Konjugat werden, zusammengemischt und bei Raumtemperatur inkubieren gelassen.

[0064] Im Anschluss an die Inkubation werden die Vertiefungen mittels Vakuum trockengelegt, wobei die Zellen und jegliches gebundene VCAM übrig blieben. Die Quantifizierung des gebundenen VCAM wird durch Zugeben eines angemessenen kolorimetrischen Substrats für das Enzym, das an VCAM-IgG konjugiert ist, und Bestimmen der Menge des Reaktionsprodukts bestimmt. Ein verringertes Reaktionsprodukt zeigt eine gesteigerte hemmende Wirkung auf die Bindung an.

[0065] Um die VLA-4 hemmende Spezifität der Verbindungen dieser Erfindung abzuschätzen, werden Tests für andere Hauptgruppen von Integrinen, d.h. für $\beta 2$ und $\beta 3$ ebenso wie für andere $\beta 1$ -Integrine wie etwa für VLA-5, VLA-6 und $\alpha 4\beta 7$ durchgeführt. Diese Tests können ähnlich sein wie die Adhäsions-Hemmungs- und Direktbindungstests, die vorstehend beschrieben sind, wobei die angemessene Integrin exprimierende Zelle und der entsprechende Ligand ersetzt werden. Zum Beispiel exprimieren polymorphekernige Zellen (PMNs) $\beta 2$ -Integrine auf ihrer Oberfläche und binden an ICAM. $\beta 3$ -Integrine sind an der Aggregation der Blutplättchen beteiligt, und die Hemmung kann in einem Standard-Blutplättchen-Aggregations-Test gemessen werden. VLA-5 bindet spezifisch an Arg-Gly-Asp-Sequenzen, während VLA-6 an Laminin bindet. $\alpha 4\beta 7$ ist ein kürzlich entdecktes Homologes von VLA-4, das auch an Fibronektin und VCAM bindet. Die Spezifität mit Bezug auf $\alpha 4\beta 7$ wird in einem Bindungstest bestimmt, der das vorstehend beschriebene VCAM-IgG-Enzymmarker-Konjugat und eine Zelllinie, die $\alpha 4\beta 7$, aber nicht VLA-4 exprimiert, wie etwa RPMI-8866-Zellen, benutzt.

[0066] Sind die VLA-4-spezifischen Hemmer identifiziert, können sie in in vivo-Tests weiter charakterisiert werden. Ein solcher Test testet die Hemmung der Kontakthypersensitivität bei einem Tier, wie es durch P. L. Chisholm et al., „Monoclonal Antibodies to the Integrin $\alpha 4$ Subunit Inhibit the Murine Contact Hypersensitivity Response“, Eur. J. Immunol., 23, S. 682–688 (1993) und in „Current Protocols in Immunology“, J. E. Coligan et al., Hrsg., John Wiley & Sons, New York, 1, S. 4.2.1–4.2.5 (1991) beschrieben wurde, dessen Offenbarungen hier durch Bezugnahme eingeschlossen sind. In diesem Test wird die Haut des Tiers durch Einwirkung eines Reizmittels wie etwa Dinitrofluorbenzol sensibilisiert, gefolgt von leichter physikalischer Reizung wie etwa leichtem Kratzen der Haut mit einer scharfen Schneide. Im Anschluss an eine Erholungszeit werden die Tiere wiederum sensibilisiert, wobei derselben Vorgehensweise gefolgt wird. Einige Tage nach der Sensibilisierung wird ein Ohr des Tiers dem chemischen Reizmittel ausgesetzt, während das andere Ohr mit einer nicht reizenden Kontrolllösung behandelt wird. Kurz nach dem Behandeln der Ohren werden den Tieren verschiedene Dosen des VLA-4-Hemmers durch subkutane Injektion gegeben. Die in vivo-Hemmung von mit Zelladhäsion verbundener Entzündung wird durch Messen der Ohrenschwellungs-Antwort des Tiers bei dem behandelten gegen das unbehandelte Ohr beurteilt. Das Anschwellen wird unter Verwendung von Tastzirkeln oder einem anderen geeigneten Instrument, um die Dicke des Ohrs zu messen, gemessen. Auf diese Art und Weise lassen sich jene Hemmer dieser Erfindung identifizieren, die am besten zum Hemmen einer Entzündung geeignet sind.

[0067] Ein anderer in vivo-Test, der eingesetzt werden kann, um die Hemmer dieser Erfindung zu testen, ist der Schaf-Asthma-Test. Dieser Test wird im Wesentlichen durchgeführt, wie es in W. M. Abraham et al., „ α -Integrins Mediate Antigen-induced Late Bronchial Responses and Prolonged Airway Hyperresponsiveness in Sheep“, J. Clin. Invest., 93, S. 776–87 (1994) beschrieben ist, dessen Offenbarung hier durch Bezugnahme eingeschlossen ist. Dieser Test misst die Hemmung von durch Ascaris-Antigen induzierten Spätphasen-Atemwegs-Antworten und Atemwegs-Überansprechbarkeit bei asthmatischen Schafen.

[0068] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können auch in der Form von pharmazeutisch verträglichen Salzen, die von anorganischen oder organischen Säuren und Basen abgeleitet sind, verwendet werden. Unter solchen Säuresalzen eingeschlossen sind die folgenden: Acetat, Adipat, Alginat, Aspartat, Benzoat, Benzolsulfonat, Bisulfat, Butyrat, Citrat, Kampferat, Kampfersulfonat, Cyclopentanpropionat, Digluconat, Dodecylsulfat, Ethansulfonat, Fumarat, Glucoheptanoat, Glycerophosphat, Hemisulfat, Heptanoat, Hexanoat, Hydrochlorid, Hydrobromid, Hydrojodid, 2-Hydroxyethansulfonat, Lactat, Maleat, Methansulfonat, 2-Naphthalsulfonat, Nicotinat, Oxalat, Pamoat, Pectinat, Persulfat, 3-Phenylpropionat, Pikrat, Pivalat, Propionat, Succinat, Tartrat, Thiocyanat, Tosylat und Undecanoat. Basensalze schließen Ammoniumsalze, Alkalimetallsalze wie etwa Natrium- und Kaliumsalze, Erdalkalimetallsalze, wie etwa Calcium- und Magnesiumsalze, Salze mit organischen Basen wie etwa Dicyclohexylaminsalze, N-Methyl-D-glucamin und Salze mit Aminosäuren wie etwa Arginin, Lysin und so weiter ein. Auch die basischen stickstoffhaltigen Gruppen können mit solchen Mitteln wie Niederalkylhalogeniden wie etwa Methyl-, Ethyl-, Propyl- und Butylchloriden, -bromiden und -jodiden; Dialkylsulfaten wie etwa Dimethyl-, Diethyl-, Dibutyl und Diamylsulfaten, langketten Halogeniden wie etwa Decyl-, Lauryl-, Myristyl- und Stearylchloriden, -bromiden und -jodiden, Aralkylhalogeniden wie etwa Benzyl- und Phenethylbromiden und anderen quaternisiert werden. In Wasser oder Öl lösliche oder dispergierbare Produkte werden dadurch erhalten.

[0069] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können in Arzneimitteln formuliert sein, die oral, parenteral, durch Spray-Inhalation, topisch, rektal, nasal, buccal, vaginal oder über ein implantiertes Reservoir verabreicht werden können. Der Begriff „parenteral“, wie er hier verwendet wird, schließt subkutane, intravenöse, intramuskuläre, intraartikuläre, intrasynoviale, intrasternale, intrathekale, intrahepatische, intraläsionale und intracraniale Injektions- oder Infusionsverfahren ein.

[0070] Die Arzneimittel dieser Erfindung umfassen eine der Verbindungen der vorliegenden Erfindung oder pharmazeutisch verträgliche Derivate davon zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger. Der Begriff „Träger“, wie er hier verwendet wird, schließt verträgliche Hilfsstoffe und Vehikel ein. Pharmazeutisch verträgliche Träger, die bei den Arzneimitteln dieser Erfindung eingesetzt werden können, schließen Ionaustauscher, Aluminiumoxid, Aluminumstearat, Lecithin, Serumproteine wie etwa menschliches Serumalbumin, Puffersubstanzen wie etwa Phosphate, Glycin, Sorbinsäure, Kaliumsorbit, partielle Glyceridgemische von gesättigten Pflanzenfettsäuren, Wasser, Salze oder Elektrolyte wie etwa Protaminsulfat, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumhydrogenphosphat, Natriumchlorid, Zinksalze, kolloidales Siliziumoxid, Magnesiumtrisilikat, Polyvinylpyrrolidon, Cellulose-basierte Substanzen, Polyethylenglykol, Natriumcarboxymethylcellulose, Polyacrylate, Wachse, Polyethylen-Polyoxypropylen-Blockpolymere, Polyethylenglykol und Wollfett ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0071] Gemäß dieser Erfindung können die Arzneimittel in der Form eines sterilen injizierbaren Präparats, zum Beispiel einer sterilen injizierbaren wässrigen oder ölhaltigen Suspension vorliegen. Diese Suspension kann gemäß Verfahren, die im Fachgebiet bekannt sind, unter Verwendung geeigneter Dispergierungs- oder Netzmittel und Suspendierungsmittel formuliert sein. Das sterile injizierbare Präparat kann auch eine sterile injizierbare Lösung oder Suspension in einem nicht-toxischen parenteral verträglichen Verordnungs- oder Lösungsmittel sein, zum Beispiel als eine Lösung in 1,3-Butandiol. Unter den verträglichen Vehikeln und Lösungsmitteln, die eingesetzt werden können, befinden sich Wasser, Ringer-Lösung und isotonische Natriumchloridlösung. Außerdem werden konventionell sterile Fettöle als ein Lösungsmittel oder Suspendierungsmedium eingesetzt. Zu diesem Zweck kann jegliches milde Fettöl eingesetzt werden, einschließlich synthetischer Mono- oder Diglyceride. Fettsäuren wie etwa Ölsäure und ihre Glyceridderivate sind nützlich bei der Herstellung von Injektionsmitteln, wie es auch natürliche pharmazeutisch verträgliche Öle sind, wie etwa Olivenöl oder Rhizinusöl, besonders in ihren polyoxyethylierten Versionen. Diese Öl-Lösungen oder -Suspensionen können auch ein langkettiges Alkohol-Verdünnungs- oder -Dispergierungsmittel enthalten, wie etwa Ph. Helv. oder einen ähnlichen Alkohol.

[0072] Die Arzneimittel dieser Erfindung können in jeglicher oral verträglichen Dosierungsform oral verabreicht werden, einschließlich Kapseln, Tabletten, wässriger Suspensionen oder Lösungen, aber nicht darauf beschränkt.

[0073] Im Falle von Tabletten zur oralen Verwendung schließen Träger, die gewöhnlich verwendet werden, Lactose und Maisstärke ein. Gleitmittel wie etwa Magnesiumstearat werden auch typischerweise zugegeben. Zur oralen Verabreichung in einer Kapsel-Form schließen nützliche Verdünnungsmittel Lactose und getrocknete Maisstärke ein. Wenn wässrige Suspensionen zur oralen Verwendung erforderlich sind, wird der wirksame Bestandteil mit Emulgierungs- und Suspendierungsmitteln kombiniert. Falls gewünscht können auch bestimmte Süßungs-, Aromatisierungs- oder Färbemittel zugegeben werden.

[0074] Alternativ können die Arzneimittel dieser Erfindung in der Form von Suppositorien zur rektalen Verabreichung verabreicht werden. Diese können durch Mischen des Mittels mit einem geeigneten, nicht-reizenden Exzipienten, der bei Raumtemperatur fest, aber flüssig bei Rektaltemperatur ist und daher im Rektum schmelzen wird, um den Arzneistoff freizusetzen, hergestellt werden. Solche Materialien schließen Kakaobutter, Bienenwachs und Polyethylenglykole ein.

[0075] Die Arzneimittel dieser Erfindung können auch topisch verabreicht werden, insbesondere wenn der Zielort der Behandlung Regionen oder Organe einschließt, die ohne weiteres durch eine topische Anwendung zugänglich sind, einschließlich Störungen des Auges, der Haut oder des unteren Darmtrakts. Geeignete topische Formulierungen werden ohne weiteres für jede(s) dieser Regionen oder Organe hergestellt.

[0076] Eine topische Anwendung für den unteren Darmtrakt kann in einer rektalen Suppositorien-Formulierung (siehe vorstehend) oder in einer geeigneten Einlauf-Formulierung verwirklicht werden. Topisch-transdermale Pflaster können auch verwendet werden.

[0077] Für topische Anwendungen können die Arzneimittel in einer geeigneten Salbe formuliert werden, wel-

che die wirksame Komponente in einem oder mehreren Trägern suspendiert oder gelöst enthält. Träger für die topische Verabreichung der Verbindungen dieser Erfindung schließen eine Mineralöl-, flüssige Vaseline-, weiße Vaseline-, Propylenglykol-, Polyoxyethylen-, Polyoxypropylen-Verbindung, emulgierendes Wachs und Wasser ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Alternativ können die Arzneimittel in einer geeigneten Lotion oder Creme formuliert sein, welche die wirksamen Komponenten in einem oder mehreren pharmazeutisch verträglichen Trägern suspendiert oder gelöst enthält. Geeignete Träger schließen Mineralöl, Sorbitanmonostearat, Polysorbat 60, Cetylesterwachs, Cetearylalkohol, 2-Octyldodecanol, Benzylalkohol und Wasser ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0078] Zur ophthalmischen Verwendung können die Arzneimittel als mikronisierte Suspensionen in isotonischer, pH-eingestellter, steriler Salzlösung oder bevorzugt als Lösungen in isotonischer, pH-eingestellter, steriler Salzlösung, entweder mit der ohne ein Konservierungsmittel wie etwa Benzylalkoniumchlorid, formuliert sein. Alternativ können die Arzneimittel zur ophthalmischen Verwendung in einer Salbe wie etwa Vaseline formuliert sein.

[0079] Die Arzneimittel dieser Erfindung können auch durch ein nasales Aerosol oder durch Inhalation unter Verwendung eines Zerstäubers, Trockenpulverinhalators oder eines Inhalators mit festgelegter Dosierung verabreicht werden. Solche Zusammensetzungen werden gemäß Verfahren, die im Fachgebiet der pharmazeutischen Formulierung wohlbekannt sind, hergestellt und können als Lösungen in Salzlösung hergestellt werden, wobei Benzylalkohol oder andere geeignete Konservierungsmittel, die Absorption fördernde Mittel, um die Bioverfügbarkeit zu erhöhen, Fluorkohlenstoffe und/oder andere konventionelle löslich machende oder Dispergierungsmittel eingesetzt werden.

[0080] Die Menge des wirksamen Inhaltsstoffs, der mit den Trägermaterialien kombiniert werden kann, um eine Einzeldosierungsform herzustellen, wird in Abhängigkeit von dem behandelten Patienten und der speziellen Art der Verabreichung variieren. Es sollte jedoch selbstverständlich sein, dass ein spezifisches Dosierungs- und Behandlungsschema für einen speziellen Patienten von einer Vielzahl von Faktoren abhängen wird, einschließlich der Wirkung der spezifischen Verbindung, die eingesetzt wird, des Alters, des Körpergewichts, des allgemeinen Gesundheitszustands, des Geschlechts, der Ernährung, des Zeitpunkts der Verabreichung, der Geschwindigkeit der Ausscheidung, der Arzneistoffkombination und des Urteils des behandelnden Arztes und der Schwere der speziellen Störung, die behandelt wird. Die Menge des wirksamen Inhaltsstoffs kann auch von dem therapeutischen oder prophylaktischen Mittel, falls vorhanden, abhängen, mit welchem zusammen der Inhaltsstoff verabreicht wird.

[0081] Wie vorstehend erwähnt, befindet sich eine wirksame Menge eines Arzneimittels, das eine wirksame Menge einer Verbindung dieser Erfindung enthält, auch innerhalb des Umfangs dieser Erfindung. Eine wirksame Menge ist definiert als die Menge, die erforderlich ist, um eine therapeutische Wirkung bei dem behandelten Patienten zu erzielen, und wird von einer Vielzahl von Faktoren abhängen, wie etwa von der Art des Hemmers, der Größe des Patienten, dem Ziel der Behandlung, der Art des Krankheitsbildes, das zu behandeln ist, dem spezifischen verwendeten Arzneimittel, das verwendet wird, und von dem Urteil des behandelnden Arztes. Zur Unterrichtung siehe Freireich et al., Cancer Chemother. Rep. (1966), 50, 219 und Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, New York, 1970, 537. Dosierungsniveaus der wirksamen Inhaltsverbindung zwischen etwa 0,001 und etwa 100 mg/kg Körpergewicht pro Tag, bevorzugt zwischen etwa 0,1 und etwa 10 mg/kg Körpergewicht pro Tag sind nützlich.

[0082] Die Zusammensetzungen, die eine Verbindung dieser Erfindung enthalten, können auch ein zusätzliches Mittel umfassen, das ausgewählt ist aus Kortikosteroiden, Bronchodilatoren, Antiasthmatika (Mastzellenstabilisatoren), entzündungshemmenden Mitteln, Antirheumatika, Immunsuppressiva, Antimetaboliten, Immunmodulatoren, antipsoriatischen und antidiabetischen Mitteln. Spezifische Verbindungen innerhalb jeder dieser Klassen können aus jeglichen von jenen ausgewählt werden, die unter den entsprechenden Gruppenüberschriften in „Comprehensive Medicinal Chemistry“, Pergamon Press, Oxford, England, S. 970–986 (1990) aufgelistet sind, dessen Offenbarung hier durch Bezugnahme eingeschlossen ist. Auch innerhalb dieser Gruppe eingeschlossen sind Verbindungen wie etwa Theophyllin, Sulfasalazin und Aminosalicylate (entzündungshemmende Mittel); Cyclosporin, FK-506 und Rapamycin (Immunsuppressiva); Cyclophosphamid und Methotrexat (Antimetabolite) und Interferone (Immunmodulatoren).

[0083] Die Zusammensetzungen der Erfindung können in Verfahren zum Vorbeugen, Hemmen oder Unterdrücken von mit Zelladhäsion verbundener Entzündung und von mit Zelladhäsion verbundenen Immun- oder Autoimmunantworten verwendet werden. Mit VLA-4 verbundene Zelladhäsion spielt eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl von Entzündungs-, Immun- und Autoimmunstörungen. So kann die Hemmung der Zelladhäsion

durch die Verbindungen dieser Erfindung bei Verfahren des Behandelns oder Vorbeugens von Entzündungs-, Immun- und Autoimmunstörungen benutzt werden. Bevorzugt sind die Störungen, die zu behandeln sind, ausgewählt aus Asthma, Arthritis, Psoriasis, Transplantatabstoßung, Multipler Sklerose, Diabetes und entzündlicher Darmstörung.

[0084] Diese Verfahren können die Verbindungen dieser Erfindung in einer Monotherapie oder in Kombination mit einem entzündungshemmenden oder immunsuppressiven Mittel einsetzen. Solche Kombinationstherapien schließen die Verabreichung der Mittel in einer einzeldosierten Form oder in mehrfachdosierten Formen, die zum selben Zeitpunkt oder zu verschiedenen Zeitpunkten verabreicht werden, ein.

[0085] Damit diese Erfindung vollständiger verstanden werden kann, werden die nachstehenden Beispiele dargelegt. Diese Beispiele sind nur zum Zweck der Veranschaulichung und sind nicht so auszulegen, als begrenzen sie den Umfang der Erfindung in irgendeiner Weise.

Zwischenstufe 1:

[0086] 4-(2-Methylphenylaminocarbonylamino)phenylessigsäure (oMePUPA-OH): Zu einer Suspension von p-Aminophenylessigsäure (56,8 g, 376 mmol) in DMF (150 ml) wurde o-Tolylisocyanat (50 g, 376 mmol) tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h röhren gelassen und wurde unter Röhren in EtOAc (1,75 l) gegossen. Der Niederschlag wurde gesammelt und mit EtOAc (400 ml) und MeCN (400 ml) gewaschen, um oMePUPA (80 g, 75%) zur Verfügung zu stellen. ESMS m/z (M + H⁺) 285,1.

Zwischenstufe 2:

[0087] oMePUPA-Leu-OH: oMePUPA-OH (0,78 g) wurde mit Leucinmethylesterhydrochlorid (0,50 g, 1,0 Äquivalent) und Diisopropylethylamin (1,9 ml, 4 Äquivalente) in 10 ml trockenem DMF kombiniert. Die Umsetzung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt, wonach sie mit 50 ml EtOAc verdünnt wurde, was mit 5% Zitronensäure, Wasser, gesättigtem Natriumbicarbonat und Salzlösung gewaschen wurde. Die resultierende organische Lösung wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und aufkonzentriert, um 1,13 g eines weißen Feststoffs zu gewinnen. Dieses Produkt wurde in 10 ml THF gelöst, 5 ml 2 N LiOH wurde zugegeben, und die Umsetzung wurde 16 h gerührt. Das THF wurde unter verminderter Druck entfernt, und die Lösung wurde mit 40 ml Wasser verdünnt und mit EtOAc gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 1 N HCl angesäuert und wurde mit EtOAc extrahiert. Die organischen Extrakte wurden mit verdünnter HCl und Salzlösung gewaschen, wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter verminderter Druck aufkonzentriert, wobei sie 0,77 g eines weißen Feststoffs ergaben. ESMS m/z (M + H⁺) 398,5.

Zwischenstufe 3:

[0088] N-(3,5-Dichlorbenzolsulfonyl)prolinmethylester: Zu einer Lösung von 24,8 g (0,15 mol) L-Prolinmethylesterhydrochlorid in 500 ml CH₂Cl₂ wurden 70 ml (0,5 mol) Triethylamin unter Röhren zugegeben, um in Mengen weißen Niederschlag zu ergeben. Das Gemisch wurde filtriert und das Filtrat unter Röhren auf 0°C (Eisbad) gekühlt. Zu der gekühlten Lösung wurde eine Lösung von 36,8 g (0,15 mol) 3,5-Dichlorbenzolsulfonylchlorid in 70 ml CH₂Cl₂ tropfenweise schnell über fünf Minuten zugegeben. Der Zugabetrichter wurde mit zusätzlichen 30 ml CH₂Cl₂ gespült, und man ließ das wolkige gelbe Gemisch sich unter Röhren über Nacht auf Raumtemperatur erwärmen. Das Gemisch wurde 2-mal mit 400 ml 1 N HCl, 2-mal mit 400 ml 1 N NaOH, dann mit Salzlösung gewaschen, dann getrocknet (MgSO₄), filtriert und zu einem gelben Öl aufkonzentriert, das beim Stehen kristallisierte. Das Material wurde dreimal aus Ethylacetat/Hexanen rekristallisiert, um 39,3 g (0,116 mol, 77%) N-(3,5-Dichlorbenzolsulfonyl)prolinmethylester (Molgewicht = 338) als weiße Nadeln zu ergeben (Dünnschichtchromatographie über Kieselgel mit 2:1 Hexanen/Ethylacetat, R_f = 0,51). m/z = 339,3 (M + H⁺).

[0089] N-(3,5-Dichlorbenzolsulfonyl)prolin: Zu einer Lösung von 39,3 g (0,116 mol) des vorstehenden Methylesters in 250 ml Methanol wurden 115 ml (0,23 mol) eines frisch hergestelltes 2 M wässrigen LiOH unter Röhren zugegeben, um eine farblose Lösung zu ergeben. Diese wurde drei Stunden gerührt, wonach HPLC kein Ausgangsmaterial zeigte. Die Lösung wurde um 50% im Vakuum vermindert und zwischen 1 N HCl und CH₂Cl₂ (jeweils ~200 ml) ausgeschüttelt. Die Phasen wurden getrennt, und die wässrige Phase wurde wieder mit CH₂Cl₂ gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, getrocknet (MgSO₄) und zu einem weißen schaumigen Feststoff aufkonzentriert. Dieser wurde zweimal aus Ethylacetat/Hexanen rekristallisiert, um 33,8 g (0,104 mol, 90%) der in der Überschrift genannten Verbindung als farblose, breite, flache Nadeln zu ergeben. m/z = 325,2 (M + H⁺).

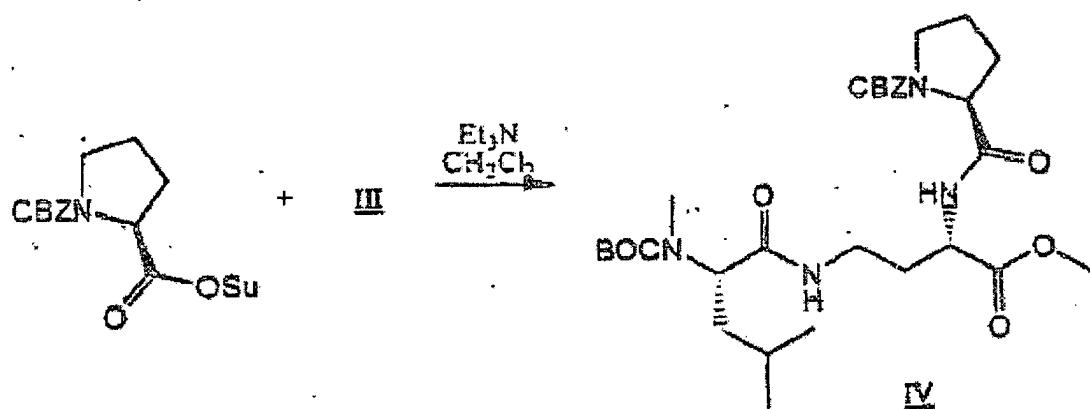
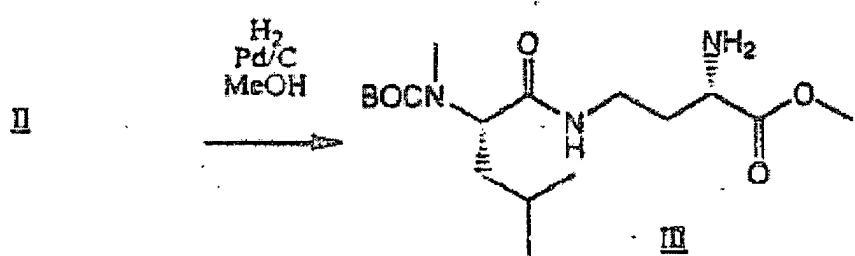
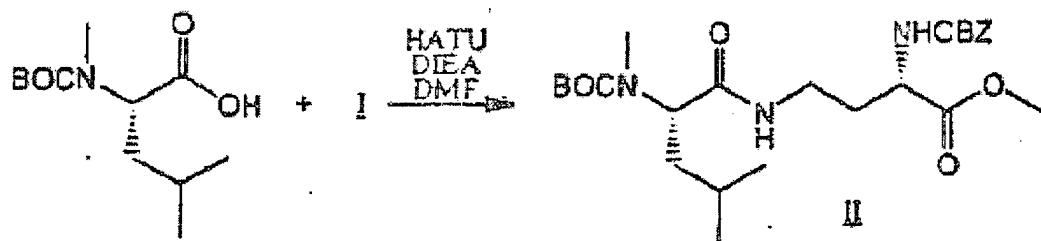
Zwischenstufe 4:

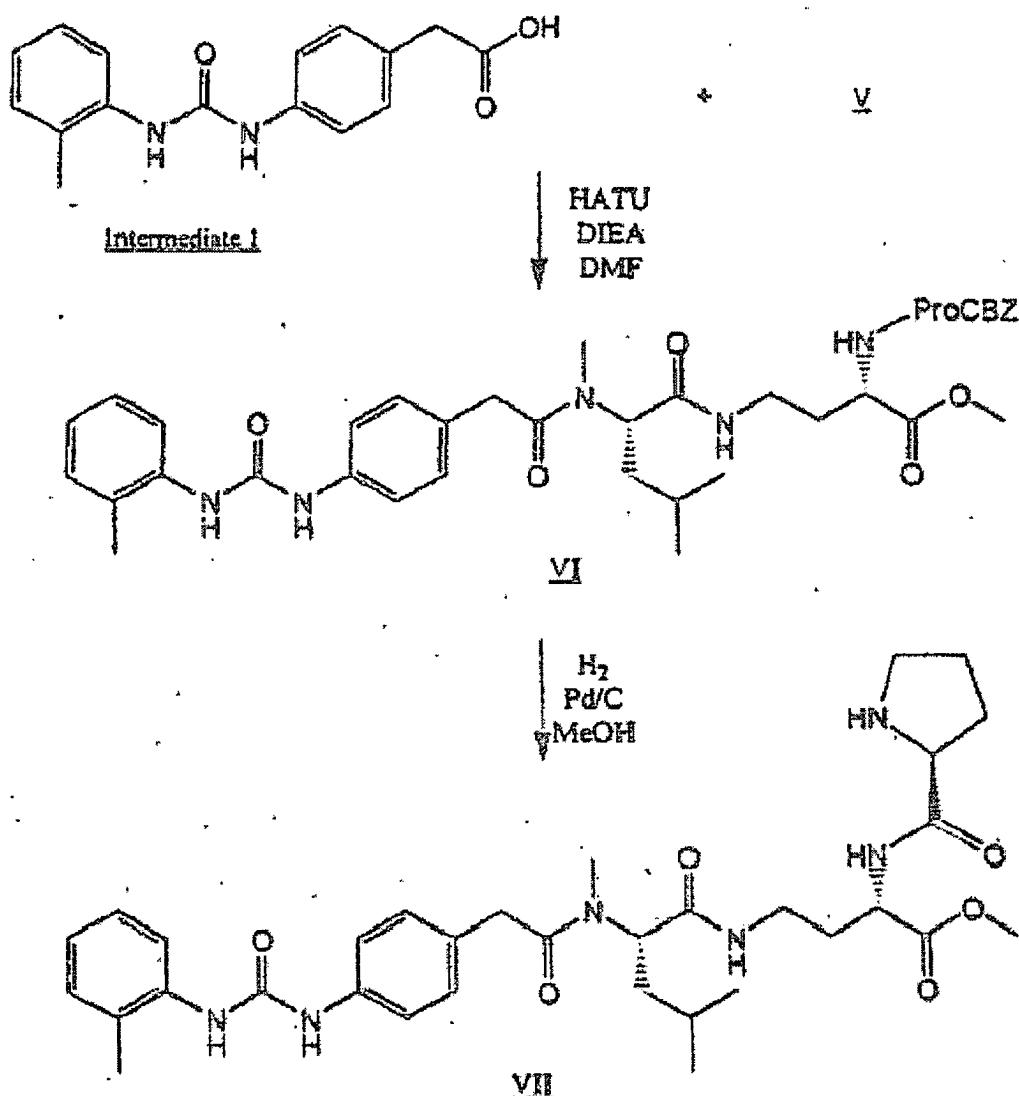
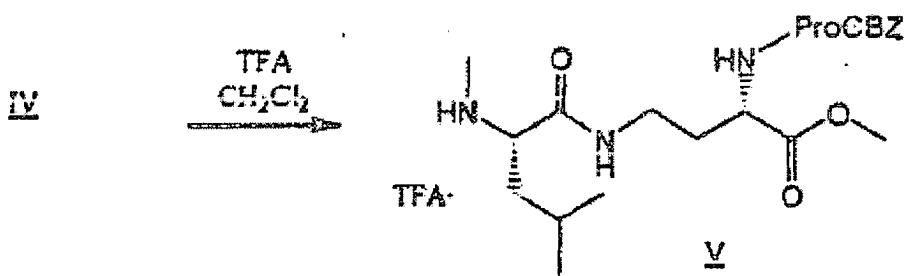
[0090] N-(Benzolsulfonyl)prolinmethylester: Zu einer Lösung von 25 g (0,15 mol) L-Prolinmethylesterhydrochlorid in 500 ml CH_2Cl_2 wurden 70 ml (0,5 mol) Triethylamin unter Rühren zugegeben, um in Mengen weißen Niederschlag zu ergeben. Dieses Gemisch wurde filtriert und das Filtrat unter Rühren auf 0°C (Eisbad) gekühlt. Zu der gekühlten Lösung wurde eine Lösung von 20 ml (0,15 mol) Benzolsulfonylchlorid in 50 ml CH_2Cl_2 tropfenweise über fünfzehn Minuten zugegeben. Der Zugabetrichter wurde mit zusätzlichen 25 ml CH_2Cl_2 gespült, und man ließ das wolkige farblose Gemisch sich unter Rühren über Nacht auf Raumtemperatur erwärmen. Die Lösung wurde 2-mal mit 400 ml 1 N HCl, 2-mal mit 400 ml 1 N NaOH, 1-mal mit Salzlösung gewaschen, dann getrocknet (MgSO_4), filtriert und zu einem blassen gelben Feststoff aukonzentriert. Dieses Material wurde dreimal aus Ethylacetat/Hexanen rekristallisiert, um 38,2 g (0,142 mol, 95%) N-(Benzolsulfonyl)prolinmethylester (Molgewicht = 269) als breite weiße Nadeln zu ergeben (Dünnschichtchromatographie mit 2:1 Hexanen/Ethylacetat, $R_f = 0,35$). $m/z = 270,2$ ($M + \text{H}^+$).

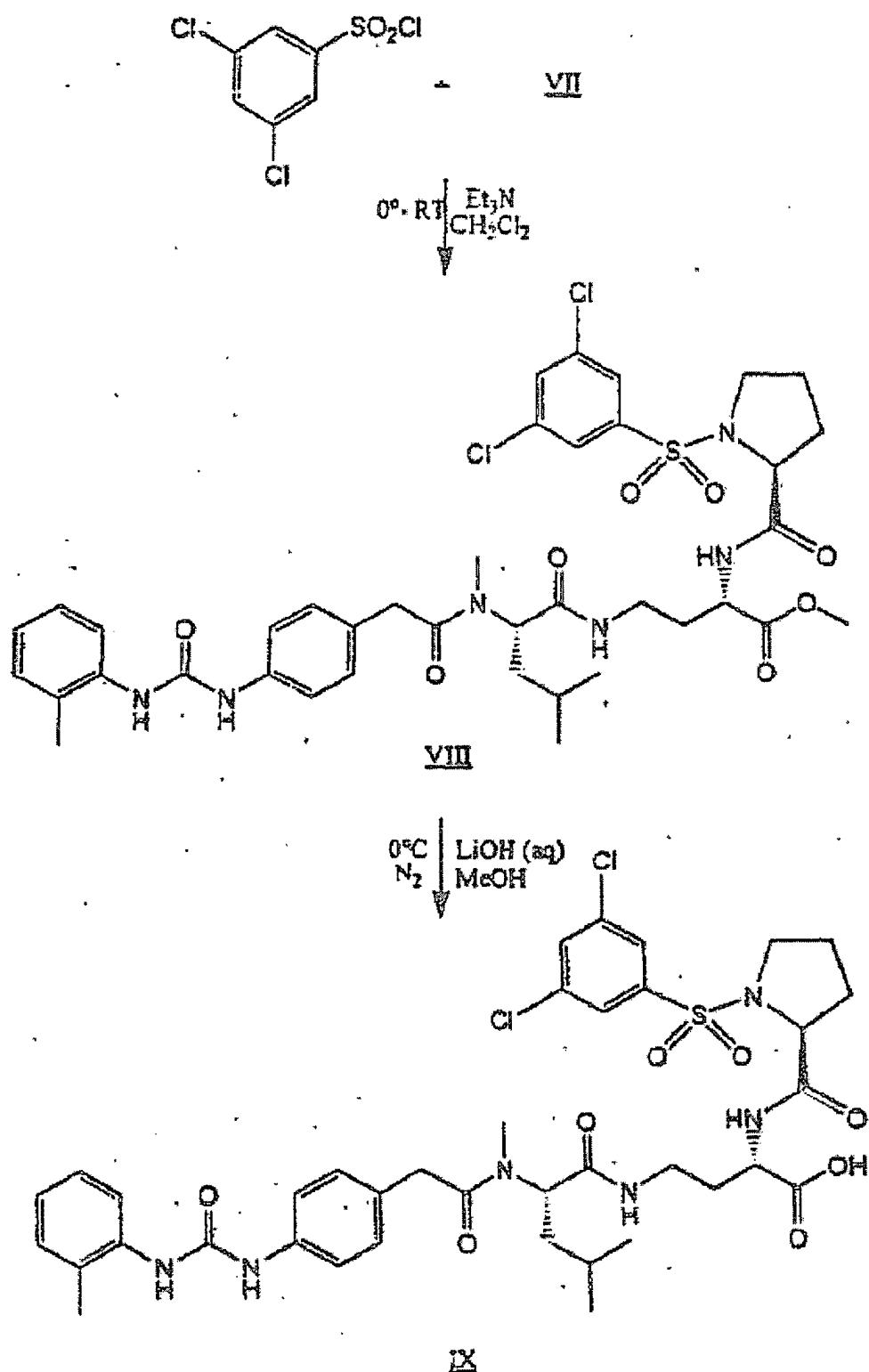
[0091] N-(Benzolsulfonyl)prolin: Zu einer Lösung von 38,2 g (0,142 mol) des vorstehenden Methylesters in 500 ml Methanol wurden 140 ml (0,28 mol) eines frisch hergestelltes 2 M wässrigen LiOH unter Rühren zugegeben, um eine farblose Lösung zu ergeben. Diese wurde über Nacht gerührt, wonach HPLC kein Ausgangsmaterial zeigte. Die Lösung wurde um 50% im Vakuum vermindert und zwischen 1 N HCl und CH_2Cl_2 (jeweils ~200 ml) ausgeschüttelt. Die Phasen wurden getrennt, und die wässrige Phase wurde wieder mit CH_2Cl_2 gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, getrocknet (MgSO_4) und zu einem weißen Feststoff aukonzentriert. Dieser wurde zweimal aus Ethylacetat/Hexanen rekristallisiert, um 34,7 g (0,136 mol, 96%) der in der Überschrift genannten Verbindung als feine weiße Nadeln zu ergeben. $m/z = 256,2$ ($M + \text{H}^+$).

Beispiel 1

Synthese von Verbindung IX







[0092] Methylester-Hydrochlorid I: In einem 500-ml-Rundkolben wurden 8,4 g (33,3 mmol) 2-N-CBZ-L-2,4-Diaminobutyrsäure in 200 ml Methanol (MeOH) unter Rühren suspendiert. Dieses wurde auf 0 Grad C (Eisbad) gekühlt, und dann wurden 14,6 ml (200 mmol) SOCl_2 tropfenweise über 15 Minuten zugegeben, um eine farblose Lösung zu ergeben. Man ließ die Lösung sich auf Raumtemperatur erwärmen und über Nacht röhren, wobei ein Protonen-NMR-Spektrum eines Aliquots anzeigte, dass die Umsetzung abgeschlossen war. Die Lösung wurde aufkonzentriert, wieder in MeOH gelöst und 2-mal aufkonzentriert, dann in CH_2Cl_2 , konz., gelöst und 16 Stunden unter Hochvakuum gesetzt, um Verbindung I als einen leicht gelben Schaum zu ergeben, der eine Masse von 10,33 g (34,2 mmol, 103%) aufwies. MS m/z 267 ($\text{M} + \text{H}^+$).

[0093] tert-Butoxycarbonylmethylester II: In einem 500-ml-Rundkolben wurden 10,33 g (33,3 mmol) I in trockenem Dimethylformamid (DMF) unter Rühren gelöst, um eine farblose Lösung zu ergeben. Zu dieser wurden

17,4 ml (100 mmol) Diisopropylethylamin (DIEA) gegeben, dann 7,96 g (32,5 mmol) BOC-N-Methyl-Leucin und schließlich 14,83 g (39,0 mmol) O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU), um eine gelbe Lösung zu ergeben. Diese wurde über Nacht gerührt, wonach HPLC kein Ausgangsmaterial zeigte. Die Lösung wurde mit Ethylacetat (EtOAc, 500 ml) verdünnt und mit 1 N HCl (2-mal), 1 N NaOH (2-mal) und Salzlösung (1-mal) gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und zu einem roten Öl aufkonzentriert. Die Chromatographie mit 2:1 Hexanen/EtOAc über Kieselgel ergab 12,56 g (25,5 mmol, 78%) II als einen gelben Sirup (HPLC, > 99%). MS: m/z = 393 ($M - BOC$)⁺, 494 ($M + H^+$).

[0094] Aminoester III: In einem 280-ml-Hochdruck-Gefäß wurden 11,38 g (23,08 mmol) II in 75 ml MeOH unter Rühren gelöst, um eine orange Lösung zu ergeben. Das Gefäß wurde mit Stickstoff gespült, und ~200 mg (katalytisch) 10% Palladium auf Kohlenstoff wurden zugegeben. Die Seiten des Gefäßes wurden mit zusätzlichem MeOH gewaschen und das Gefäß mit einem Hydrierungsaufsatz verschlossen. Das Gemisch wurde unter Rühren über Nacht unter 60 psi H_2 gesetzt, wonach HPLC kein Ausgangsmaterial zeigte. Das Gemisch wurde durch Celite 545 filtriert, die Filter-Einlage mit zusätzlichem MeOH gewaschen und das Filtrat zu einem farblosen Öl aufkonzentriert, das eine Masse von 8,29 g (~ quantitativ) aufwies. Material zur weiteren Durchführung verwendet. MS: m/z = 360 ($M + H^+$).

[0095] Benzylcarbamatemylester IV: In einem 500-ml-Rundkolben wurden 8,29 g (23,08 mmol) III in 100 ml CH_2Cl_2 unter Rühren gelöst, um eine farblose Lösung zu ergeben. Zu dieser wurden 7,0 ml (50 mmol) Triethylamin (Et_3N) zugegeben, dann 7,96 g (23,0 mmol) CBZ-Prolinhydroxysuccinimidester (CBZ-Pro-Osu), um eine farblose Lösung zu ergeben. Diese wurde über Nacht gerührt, wonach HPLC kein Ausgangsmaterial zeigte. Die Lösung wurde mit zusätzlichem CH_2Cl_2 verdünnt, mit 1 N HCl (2-mal), 1 N NaOH (2-mal) gewaschen und die organische Phase über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Filtrat zu einem farblosen Öl aufkonzentriert. Die Chromatographie mit 3:1 EtOAc/Hexanen über Kieselgel ergab 12,22 g (20,7 mmol, 90%) IV als ein schaumiges, farbloses Glas (HPLC, > 99%). MS: m/z 490 ($M - BOC$)⁺, 591 ($M + H^+$).

[0096] Amintrifluoracetatsalz V: In einem 500-ml-Rundkolben wurden 11,80 g (20,0 mmol) IV in 120 ml CH_2Cl_2 unter Rühren gelöst, um eine farblose Lösung zu ergeben. Zu dieser wurden 20 ml (260 mmol, großer Überschuss) Trifluoressigsäure (TFA) gegeben, und die resultierende Lösung wurde vier Stunden gerührt, wonach HPLC kein Ausgangsmaterial zeigte. Die Lösung wurde aufkonzentriert, in CH_2Cl_2 wieder gelöst und aukonzentriert (2-mal), dann unter Hochvakuum gesetzt, um 12,1 g (~ quantitativ) V als ein blasses gelbes Öl zu geben. Material zur weiteren Durchführung verwendet. MS: m/z 491 ($M + H^+$).

[0097] Diarylharnstoffmethylester VI: In einem 500-ml-Rundkolben wurden 12,1 g (20,0 mmol) V in 100 ml DMF unter Rühren gelöst, um eine blasse gelbe Lösung zu ergeben. Zu dieser wurden 17,4 ml (100 mmol) DIEA gegeben, dann 5,68 g (20,0 mmol) Zwischenstufe 1 (oMePUPA-OH) und schließlich 9,12 g (24 mmol) HATU, um eine gelbe Lösung zu ergeben. Diese wurde über Nacht gerührt, wonach HPLC kein Ausgangsmaterial zeigte. Die Lösung wurde mit EtOAc (500 ml) verdünnt und mit 1 N HCl (2-mal), 1 N NaOH (2-mal) und Salzlösung (1-mal) gewaschen. Die organische Phase wurde mit $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und zu einem gelben Öl/Feststoff-Gemisch aufkonzentriert. Die Chromatographie mit 2:1 Acetonitril/ CH_2Cl_2 über Kieselgel ergab 11,35 g (15,0 mmol, 75%) VI als einen leicht gelben, schaumigen Feststoff (HPLC, > 99%). MS: m/z 757 ($M + H^+$), 779 ($M + Na^+$).

[0098] Aminomethylester VII: In einem 280-ml-Hochdruck-Gefäß wurden 8,0 g (10,6 mmol) VI in 50 ml MeOH unter Rühren gelöst, um eine leicht gelbe Lösung zu ergeben. Das Gefäß wurde mit Stickstoff gespült, und ~200 mg (katalytisch) 10% Pd/C wurden zugegeben. Die Seiten des Gefäßes wurden mit zusätzlichem MeOH gewaschen und das Gefäß mit einem Hydrierungsaufsatz verschlossen. Das Gemisch wurde unter Rühren über Nacht unter 60 psi H_2 gesetzt, wonach HPLC kein Ausgangsmaterial zeigte. Das Gemisch wurde durch Celite 545 filtriert, die Filter-Einlage mit zusätzlichem MeOH gewaschen und das Filtrat aufkonzentriert, um 6,6 g VII (~ quantitativ) als einen weißen Feststoff zu geben. Material zur weiteren Durchführung verwendet. MS: m/z = 623 ($M + H^+$).

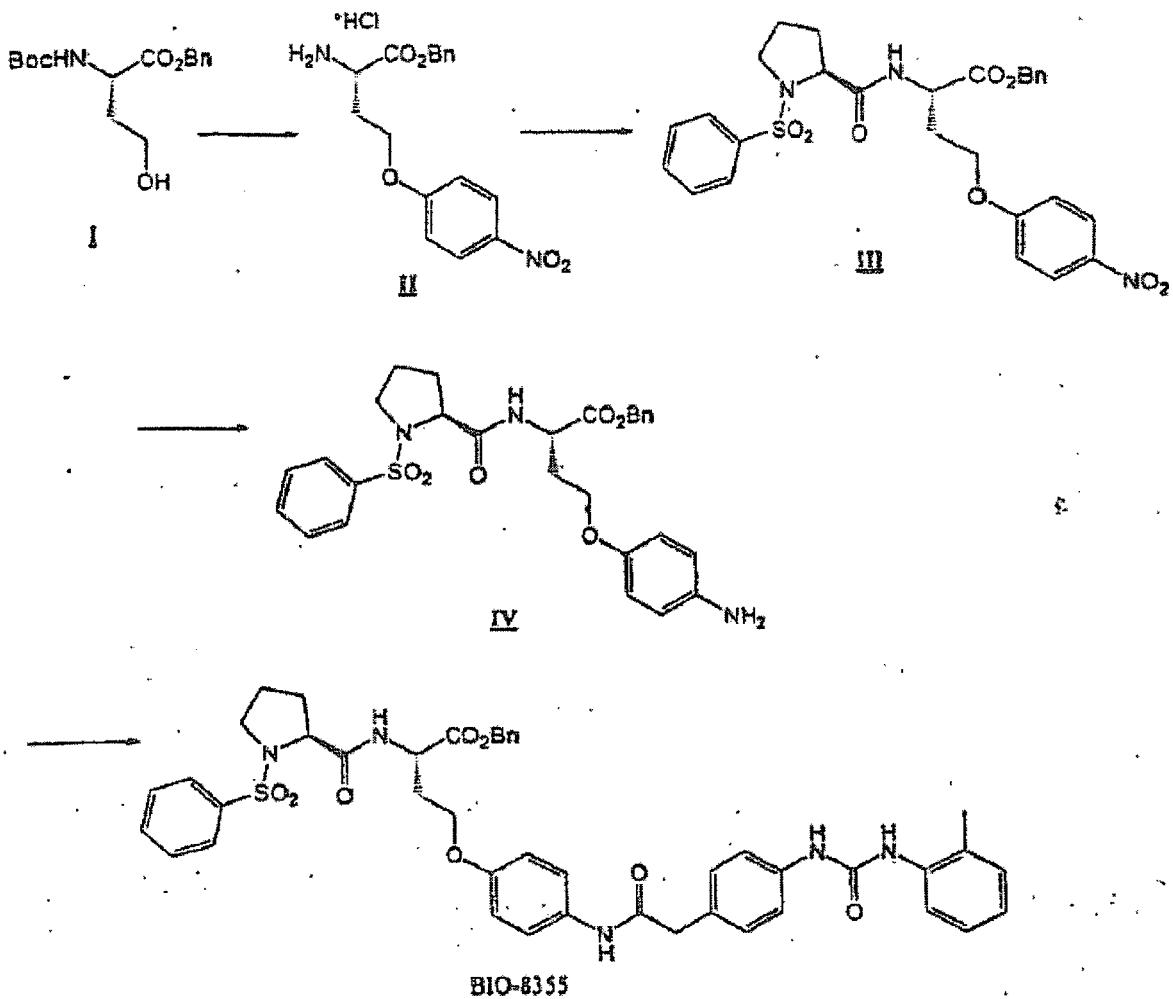
[0099] Sulfonamidmethylester VIII: In einem 500-ml-Rundkolben wurden 6,6 g (10,6 mmol) VII in 100 ml trockenem CH_2Cl_2 unter Rühren gelöst, um eine farblose Lösung zu ergeben. Diese wurde auf 0 Grad C (Eisbad) gekühlt, und 4,2 ml (30 mmol) Et_3N wurden zugegeben, gefolgt von einer Lösung von 3,68 g (15 mmol) 3,5-Dichlorbenzolsulfonylchlorid in 25 ml trockenem CH_2Cl_2 , das tropfenweise über 10 Minuten zugegeben wurde. Man ließ die resultierende Lösung sich auf Raumtemperatur erwärmen und 2 Stunden rühren, wonach HPLC kein Ausgangsmaterial zeigte. Die Lösung wurde mit zusätzlichem CH_2Cl_2 verdünnt und mit 1 N HCl (2-mal) und 1 N NaOH (2-mal) gewaschen, darin über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Filtrat zu einem gel-

ben Feststoff aufkonzentriert. Die Chromatographie mit 2:1 CH_2Cl_2 /Acetonitril über Kieselgel ergab 6,68 g (8,0 mmol, 75%) VIII als einen weißen Feststoff (HPLC, > 99%). MS: m/z 832/833 ($\text{M} + \text{H}^+$).

[0100] Carbonsäure IX: In einem 500-ml-Rundkolben wurden 6,26 g (7,53 mmol) VIII in 150 ml MeOH unter Röhren gelöst, um eine farblose Lösung zu ergeben. Diese wurde auf 0 Grad C (Eisbad) gekühlt, und Stickstoff wurde 30 Minuten durch die rührende Lösung gepert. Dazu wurden 19 ml (38 mmol) einer frisch hergestellten 2 M LiOH-Lösung tropfenweise über 10 Minuten zugegeben, wonach die Lösung bei 0 Grad C unter Stickstoff gerührt wurde, während der Fortgang der Umsetzung kleinschrittig durch HPLC überwacht wurde. Nach drei Stunden zeigte HPLC kein übrig gebliebenes Ausgangsmaterial. Die Lösung wurde unter minimalem Erhitzen aukonzentriert (Volumen vermindert um ~50%) und langsam, in Portionen, in eiskalte 1 N HCl gegossen, um in Mengen einen brillant-weißen Niederschlag zu ergeben. Der Feststoff wurde über Filtration isoliert, mit kaltem destillierten Wasser gewaschen und über Nacht luftgetrocknet. Der resultierende feine, weiße Feststoff wurde in ein Glasgefäß überführt und 72 Stunden unter Hochvakuum gesetzt. Die Endmasse betrug 6,02 g (7,36 mmol, 98%) IX als ein weißes Pulver (HPLC > 98%). MS: m/z 818/819 (M + H)⁺, 841 (M + Na⁺).

Beispiel 2:

Synthese von Verbindung XVI



[0101] Homoserin-4-nitrophenyletherbenzylester: Zu einer Lösung von N-BOC-Homoserinbenzylester I (1,2 g, 3,89 mmol), 4-Nitrophenol (485 mg, 4,08 mmol) und Triphenylphosphin (1,2 g, 4,66 mmol) in THF (10 ml) wurde Diethylazodicarboxylat (DEAD) (0,74 ml, 4,66 mmol) tropfenweise zugegeben, und die Umsetzung wurde bei Raumtemperatur 12 bis 24 h gerührt. Nach Abschluss, wie durch Flüssigkeitschromatographie beurteilt, wurden die Lösungsmittel entfernt, um einen viskosen Sirup zu gewinnen. 4 N HCl in Dioxan (10 ml) wurde rasch zugegeben, und die Lösung wurde bei Raumtemperatur 3 bis 6 h, oder bis durch Flüssigkeitschromatographie als abgeschlossen beurteilt, gerührt. Die Umsetzung wurde zu $\frac{1}{4}$ des Volumens aufkonzentriert, und das Produkt wurde aus Ethylacetat präzipitiert, um das Hydrochloridsalz II (96% rein, Flüssigkeitschromatographie) als einen weißen Feststoff zu gewinnen (867 mg, 2,36 mmol, 61%). ESMS: (M – Cl) = 331.

[0102] Zu einer Lösung von Zwischenstufe 4 (117 mg, 0,46 mmol) in DMF (3 ml) wurde DIEA (0,27 mg, 0,48 mmol) zugegeben, nacheinander gefolgt von dem Hydrochloridsalz II (160 mg, 0,48 mmol) und HATU (239 mg, 0,63 mmol). Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 2 bis 4 h gerührt, bis durch Flüssigkeitsschomatographie als abgeschlossen beurteilt. Die Umsetzung wurde mit Ethylacetat (30 ml) verdünnt und mit 5% Bicarbonat (10 ml), Wasser (10 ml), Zitronensäure (10 ml), Salzlösung (2-mal 10 ml) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet, um das rohe Produkt III als einen bräunlichen Schaum (213 mg, 0,37 mmol, 82%) zu gewinnen, der direkt verwendet wurde. ESMS: $(M + H) = 568$.

[0103] Das vorstehende Material wurde in Ethylacetat (15 ml) gelöst, 10% Pd/C (200 mg) wurden zugegeben, und die Umsetzung wurde einer Hydrogenolyse bei 50 psi 4 bis 6 h, oder bis durch Flüssigkeitsschomatographie als abgeschlossen beurteilt, unterworfen. Filtration durch Celite und Aufkonzentrierung lieferte das rohe Anilin IV (144 mg, 0,32 mmol, 87%) als einen bräunlichen Schaum, der direkt verwendet wurde. ESMS: $(M + H) = 448$.

[0104] Das vorstehend erhaltene Anilin (74 mg, 0,17 mmol) wurde in DMF (3 ml) gelöst, und oMePUPA (52 mg, 0,18 mmol) wurde zugegeben, gefolgt von DIEA (0,08 ml, 0,43 mmol) und HATU (69 mg, 0,18 mmol), und die Umsetzung wurde bei Raumtemperatur 3 bis 4 h gerührt, bis durch Flüssigkeitsschomatographie als vollständig beurteilt. Reinigung durch HPLC lieferte Bio-8355 (39 mg, 0,054 mmol, 30%) als einen weißen Feststoff. ESMS: $(M + H) = 714$, $(M - H) = 712$.

[0105] Die Verbindungen dieser Erfindung, wurden, wie in den nachstehenden Tabellen gezeigt, gemäß dem Verfahren, das vorstehend beschrieben ist, hergestellt.

Verbindungen, die gemäß dem allgemeinen Verfahren A hergestellt wurden, schließen ein:

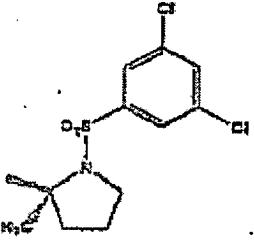
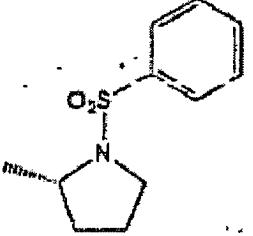
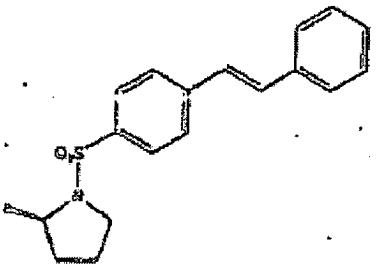
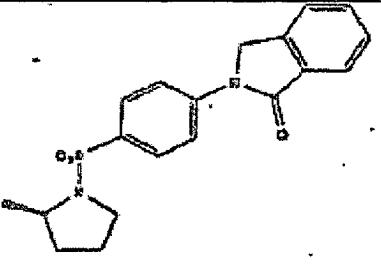
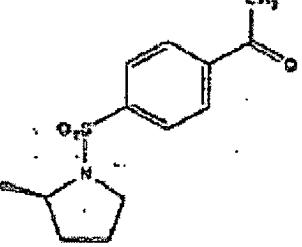
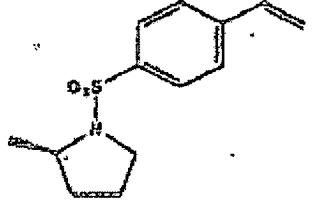
Verbindung	R3	R1	ESMS m/z
6714	oMePUPA-N-MeLeu		804,4 ($M + H^+$)

Verbindungen, die gemäß dem allgemeinen Verfahren C hergestellt wurden, schließen ein:

Verbindung	R3	R1	ESMS m/z
7234	oMePUPA-Leu		831,1 ($M + H^+$)

Verbindungen, die gemäß dem allgemeinen Verfahren D hergestellt wurden, schließen ein:

Verbindung	R1	ESMS m/z
7092		875,8 (M+H ⁺)
7181		833,1 (M+H ⁺)
7398		832,1 (M+H ⁺)
7662		750,1 (M+H ⁺)

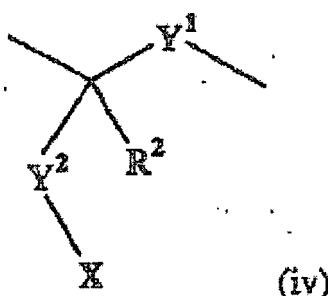
8221		832,9 ($M+H^+$)
8341		750,0 ($M+H^+$)
9120		852,2 ($M+H^+$)
9169		881,4 ($M+H^+$)
9171		791,3 ($M+H^+$)
9182		755,5 ($M+H^+$)

9264		764,2 ($M+H^+$)
------	--	-------------------

Patentansprüche1. Verbindung der Formel $R^3-L-L'-R^1$

wobei

R^1 gegebenenfalls substituiertes Pyrrolidinyl- SO_2 -phenyl ist, wobei der fakultative Substituent Alkyl oder Halogen ist;
 L' der Formel (iv) entspricht



wobei Y^1 für $-\text{NH}-\text{CO}-$ steht, R^2 für H steht, Y^2 eine Bindung ist und X für COOH steht;
 L der Formel (v) entspricht



wobei Y^3 für $-(\text{CH}_2)_{0-5}-$ steht und Y^4 für $-\text{CO}-\text{NH}-$ steht; und
 R^3 der Formel $R^4-Y^5-\text{N}(R^5)-\text{CH}(R^6)-$ entspricht, wobei R^6 die Seitenkette von Leucin oder Isoleucin ist; R^5 für Wasserstoff oder Methyl steht; Y^5 für $\text{C}(=\text{O})-$ steht und
 R^4 für o-Methylphenyl-ureido-phenyl- CH_2 steht;
oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R^5 für H steht.3. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R^5 für Methyl steht.

4. Verbindung nach Anspruch 1, wobei Phenyl substituiert ist.

5. Verbindung nach Anspruch 1, wobei Phenyl unsubstituiert ist.

6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Verbindung Folgende ist

5192,

2S- $\{[1-(3,5-\text{Dichlorbenzolsulfonyl})-\text{pyrrolidin}-2\text{S}-\text{carbonyl}]-\text{amino}\}-4-[4-\text{methyl}-2\text{S}-\{\text{methyl}-\{2-[4-(3-\text{o-tolylureido})-\text{o}-\text{phenyl}]-\text{acetyl}\}-\text{amino}\}-\text{pentanoylamino}\]-\text{buttersäure}$,

5283,

2S- $\{[1-(3,5-\text{Dichlorbenzolsulfonyl})-\text{pyrrolidin}-2\text{S}-\text{carbonyl}]-\text{amino}\}-3-[4-\text{methyl}-2\text{S}-\{2-[4-(3-\text{o-tolylureido})-\text{phenyl}]-\text{acetyl}\}-\text{amino}\}-\text{pentanoylamino}\]-\text{propionsäure}$,

6714,

2S- $\{[1-(3,5-\text{Dichlorbenzolsulfonyl})-\text{pyrrolidin}-2\text{S}-\text{carbonyl}]-\text{amino}\}-3-[4-\text{methyl}-2\text{S}-\{\text{methyl}-\{2-[4-(3-\text{o-tolylureido})-\text{o}-\text{phenyl}]-\text{acetyl}\}-\text{amino}\}-\text{pentanoylamino}\]-\text{propionsäure}$,

7234,

2S-{[1-(3,5-Dichlorbenzolsulfonyl)-pyrrolidin-2S-carbonyl]-amino}-6-[4-methyl-2S-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino]-pentanoylamino]-hexansäure,
 7662,
 2S-[(1-Benzolsulfonylpyrrolidin-2S-carbonyl)-amino]-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure,
 8221,
 2S-{[1-(3,5-Dichlorbenzolsulfonyl)-2-methylpyrrolidin-2S-carbonyl]-amino}-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure,
 8341,
 2S-[(1-Benzolsulfonylpyrrolidin-2R-carbonyl)-amino]-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure,
 8342, 2R-[(1-Benzolsulfonylpyrrolidin-2S-carbonyl)-amino]-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure,
 8343,
 2R-[(1-Benzolsulfonylpyrrolidin-2R-carbonyl)-amino]-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure,
 8367,
 2S-[(1-Benzolsulfonylpyrrolidin-2R-carbonyl)-amino]-4-[4-methyl-2R-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure,
 8368,
 2S-[(1-Benzolsulfonylpyrrolidin-2R-carbonyl)-amino]-4-[4-methyl-2R-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure,
 8469,
 2S-{[1-(3,5-Dichlorbenzolsulfonyl)-pyrrolidin-2S-carbonyl]-amino}-4-(4-methyl-2S-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure,
 8491,
 2S-[(1-Benzolsulfonyl-2-methylpyrrolidin-2S-carbonyl)-amino]-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure, oder
 9264,
 2S-[2-(1-Benzolsulfonylpyrrolidin-2S-yl)-acetyl-amino]-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure.

7. Verbindung nach Anspruch 6, wobei die Verbindung 5192, 2S-{[1-(3,5-Dichlorbenzolsulfonyl)-pyrrolidin-2S-carbonyl]-amino}-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure ist.

8. Verbindung, die Folgende darstellt
 8685,
 2S-[(1-Benzolsulfonyl-4R-benzyloxycarbonylaminopyrrolidin-2S-carbonyl)-amino]-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure,
 8689,
 2S-[(4R-Amino-1-benzolsulfonylpyrrolidin-2S-carbonyl)-amino]-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure,
 8690, 2S-{{4R,
 (6-Aminohexanoylamino)-1-benzolsulfonylpyrrolidin-2S-carbonyl]-amino}-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure,
 8749,
 2S-{{4S-(6-Aminohexanoylamino)-1-benzolsulfonylpyrrolidin-2S-carbonyl]-amino}-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure-20K PEG-SPA-Konjugat,
 8758,
 2S-{{4S-Amino-1-benzolsulfonylpyrrolidin-2S-carbonyl)-amino}-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure-20K PEG-SPA-Konjugat,
 8796,
 2S-{{1-Benzolsulfonyl-4R-[2-(4-hydroxyphenyl)-acetyl-amino]-pyrrolidin-2S-carbonyl}-amino}-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure,
 8797,
 2S-{{1-Benzolsulfonyl-4R-[3-(4-hydroxyphenyl)-propionyl-amino]-pyrrolidin-2S-carbonyl}-amino}-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure,
 8809,
 2S-[(4R-Amino-1-benzolsulfonylpyrrolidin-2S-carbonyl)-amino]-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure.

phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure-20K PEG-SPA-Konjugat,
9120,
4-[4-Methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-2S-[[1-(4-(E)styrylbenzolsulfonyl)-pyrrolidin-2S-carbonyl]-buttersäure,
9169,
4-[4-Methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-2S-{{1-[4-(1-oxo-1,3-dihydroisoindol-2-yl)-benzolsulfonyl]-pyrrolidin-2S-carbonyl}-amino}-buttersäure,
9171,
2S-{{1-(4-Acetylbenzolsulfonyl)-pyrrolidin-2S-carbonyl}-amino}-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure,
9182,
4-[4-Methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino-pentanoylamino]-2S-{{1-(4-vinylbenzolsulfonyl)-pyrrolidin-2S-carbonyl}-amino}-buttersäure,
9227,
2S-{{(4R-(6-Amino)-hexanoylamino)-1-benzolsulfonylpyrrolidin-2S-carbonyl}-amino}-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure-30K PEG-SPA-Konjugat,
9315,
2S-{{(4R-(6-Amino)hexanoylamino)-1-benzolsulfonylpyrrolidin-2S-carbonyl}-amino}-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure-50K PEG-SPA-Konjugat,
9418,
2S-{{(4R-(6-Amino)-hexanoylamino)-1-benzolsulfonylpyrrolidin-2S-carbonyl}-amino}-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure-20K PEG-SPA-Konjugat,
8723,
2S-{{(4S-(6-Aminohexanoylamino)-1-benzolsulfonylpyrrolidin-2S-carbonyl}-amino}-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure, oder
8746,
2S-[(4S-Amino-1-benzolsulfonylpyrrolidin-2S-carbonyl)-amino]-4-[4-methyl-2S-(methyl-{2-[4-(3-o-tolylureido)-phenyl]-acetyl}-amino)-pentanoylamino]-buttersäure.

9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Verbindung mit einem Polyethylenglycol modifiziert ist.

10. Zusammensetzung umfassend einen pharmazeutischen Träger und eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen