(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 19 922 T2** 2004.09.02

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 017 667 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 19 922.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IT98/00252**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 946 706.3**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/015494**
(86) PCT-Anmeldetag: **22.09.1998**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **01.04.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.07.2000**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **19.11.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.09.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C07C 215/48**
C07C 215/52, C07C 217/60, C07C 225/20, A61K 31/135

(30) Unionspriorität:
RM970568 22.09.1997 IT

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A., Rom/Roma, IT

(74) Vertreter:
HOFFMANN · EITLE, 81925 München

(72) Erfinder:
FANTO, Nicola, I-00142 Roma, IT; MORETTI, Piero, Gian, I-00174 Roma, IT; FORESTA, Piero, I-00040 Pomezia, IT

(54) Bezeichnung: **2-Amino-6-methyl-7-acetyl-tetralin und pharmazeutische Zusammensetzungen zur Vorbeugung und therapeutischen Behandlung von entzündlichen und/oder Autoimmunkrankheiten**

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

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

Beschreibung

[0001] Die hierin beschriebene Erfindung betrifft Derivate von 2-Aminotetralinen und deren pharmakologisch akzeptablen Salze, ein Verfahren zu deren Herstellung, pharmazeutische Zusammensetzungen, die für die prophylaktische und therapeutische Behandlung eines septischen Schocks und für die Behandlung von Entzündungs- und/oder Autoimmunpathologien geeignet sind, die nachfolgend besser definiert werden, worin die ätiopathogene Rolle der Entzündungszytokine gut etabliert ist.

[0002] 6,7-Substituierte-2-Aminotetraline, die bei der Behandlung des septischen Schocks aktiv sind, sind gut bekannt.

[0003] EP-A-0 730 861, das hierin für Referenzzwecke eingefügt ist, beschreibt eine Klasse solcher 6,7-substituierter-2-Aminotetraline und insbesondere die Verbindung (R,S)-2-Amino-6-fluor-7-methoxytetralin (nachfolgend mit ST 626 bezeichnet).

[0004] Die Entzündungs- und/oder Autoimmunpathologien, die mit den Zusammensetzungen dieser Erfindung, die hierin beschrieben werden, behandelt werden sollen, sind z. B. rheumatoide Arthritis, Pancreatitis, entzündliche Darmerkrankungen, systemischer Lupus erythematosus, Glomerulonephritis und Encephalomyelitis.

[0005] Nachfolgend wird nur auf den septischen Schock Bezug genommen, wobei zu verstehen ist, dass die anderen Pathologien durch die Entzündungszytokine ebenfalls entsprechend dieser Erfindung wirksam behandelt werden können.

[0006] Septischer Schock ist ein extrem schweres klinisches Syndrom, das als Ergebnis von Infektionen auftreten kann, die hauptsächlich durch Gram-negative oder Gram-positive Bakterien, durch Protozoa oder Viren verursacht sind und durch Leukozytose, Fieber, Tachycardie, Hypotonie und Nieren-, Atem-, Herz- und hepatitische Insuffizienz kennzeichnet ist.

[0007] Es ist jedoch zu betonen, dass die Ernsthaftigkeit des septischen Schocks unabhängig von der Art des Mikroorganismus ist, der für das Syndrom verantwortlich ist (Parrillo J. E., Pathogenetic mechanisms of septic shock. New Engl. J. Med., 328: 1471–1477, 1993), hängt aber mit dem Ausmaß der einzelnen Entzündungsantwort auf das Antigen zusammen, das für den toxischen Anfall verantwortlich ist.

[0008] Trotz der signifikanten Verbesserung der antibiotischen Therapie und bei den Interventionsprotokollen bei intensiven Pflegeeinheiten in den letzten Jahren verbleibt der Schock als eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität bei Krankenhauspatienten. Es wird geschätzt, dass er in den USA für ungefähr 100.000 Todesfälle pro Jahr verantwortlich ist (Glauser M. P., Zanetti G., Baumgartner, J. D., Cohen J., Septic shock: pathogenesis. Lancet, 338: 732–736, 1991).

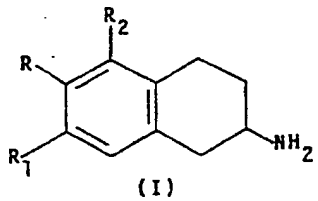
[0009] Das entscheidendste und charakteristische Merkmal des septischen Schocks ist die Körperreaktion für Produkte, die von Lysis oder von dem mikrobiellen Metabolismus stammen.

[0010] Die erste dieser Substanzen, die identifiziert und bei der experimentellen Forschung am häufigsten verwendete wurde, ist Lipopolysaccharid (LPS); ein Bestandteil der Wand eines Gram-negativen Bakteriums, der chemisch aus einem Polysaccharidanteil, das entsprechend der bakteriellen Spezies variiert, und einem Lipidanteil (Lipid A) besteht, das konstant ist und in dem Blut der septikämischen Subjekten in Form von Micellen vorhanden ist. Bei Verabreichung an Tieren ist LPS in der Lage, alle Cardiozirkulations- und neurologischen Symptome, die mit dem Schock zusammenhängen, zu reproduzieren (Olson, N. C., Salzer W. L., McCall C. E., Biochemical, physiological and clinical aspects of endotoxaemia. Molec. Aspects Med., 10: 511–629, 1988). Es ist daher als hauptsächlicher Beweggrund in der Zufallskette identifizierbar, was zum Triggern der klinischen Symptome über die Aktivierung der intrinsischen und extrinsischen Wege der koagulativen Kaskade und der Sekretion von Zytokinen hauptsächlich von Makrophagen-Monozyten-Ursprungs, wie beispielsweise TNF, IL-1 und INF-γ führt (Bone R. C., A. critical evaluation of new agents for the treatment of sepsis. J. Am. Med. Ass., 266: 1686–1691, 1991).

[0011] Die zunehmende Wichtigkeit dieses Syndroms hat in den letzten Jahren zugenommen, die Ernstheit und die inadäquaten therapeutischen Mittel, die gegenwärtig verfügbar sind, machen die schnelle Entdeckung von therapeutischen Mitteln, die den Verlauf der Krankheit wirksam bekämpfen können, sehr wünschenswert.

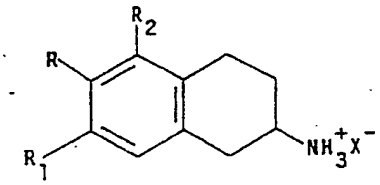
[0012] Es wurde nun festgestellt, dass ein neues 6,7-substituiertes-2-Aminotetralin eine starke Aktivität bei der Verhinderung und therapeutischen Behandlung der oben erwähnten Pathologien entfaltet.

[0013] Die 2-Aminotetralinderivate der Erfindung können als freie Basen mit der allgemeinen Formel (I):



(I)

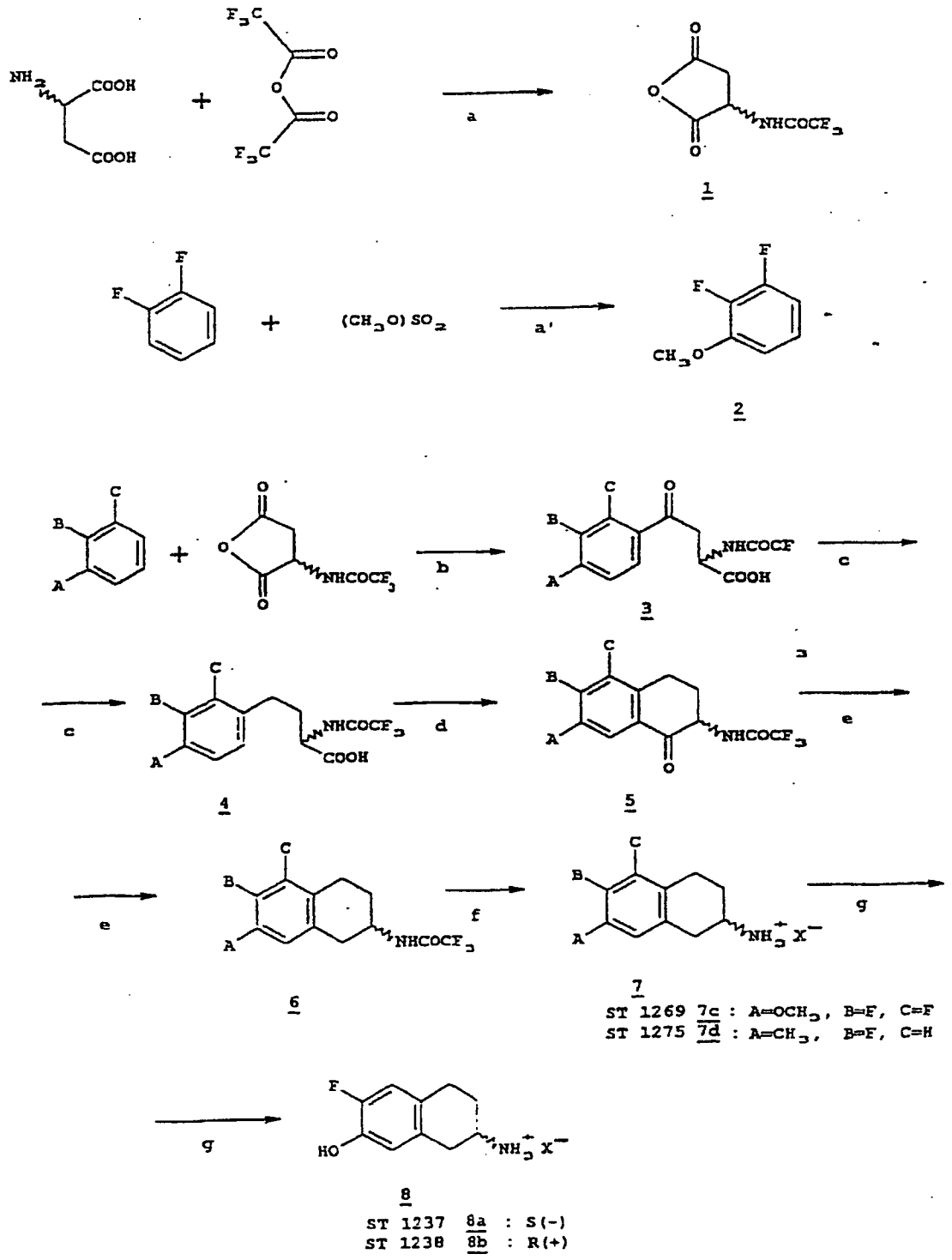
und als pharmakologisch akzeptable Salze mit der allgemeinen Formel (II) auftreten:



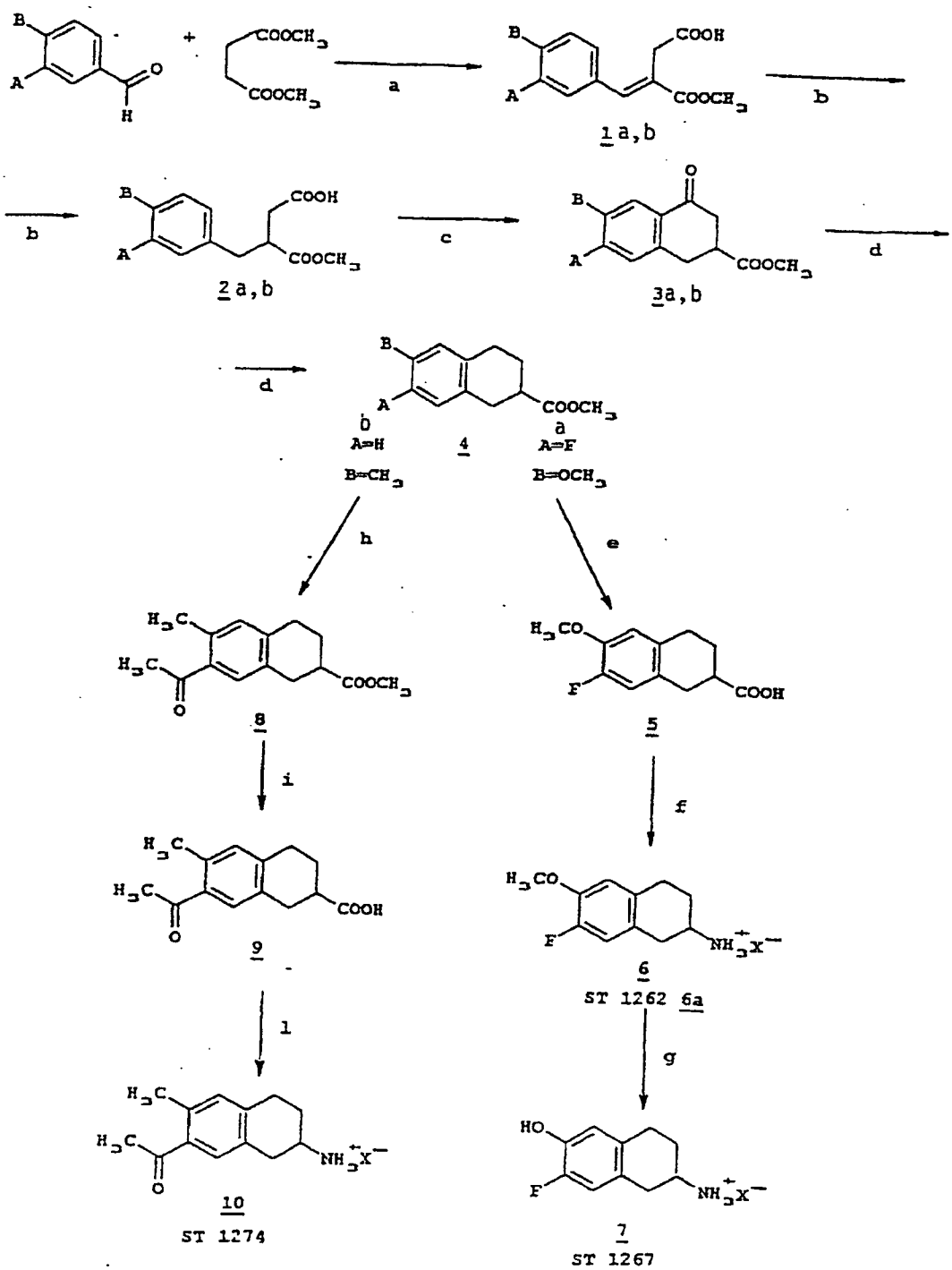
(II)

worin bedeuten:
R Methyl, R_1 Acetyl und X^- das monovalente Anion einer pharmakologisch akzeptablen Säure.
[0014] Mit pharmakologisch akzeptablen Salzen der Verbindungen der Formel (II) sind irgendwelche Salze mit einer Säure gemeint, die keine unerwünschten toxischen oder Nebenwirkungen ergeben. Solche Säuren sind dem Pharmakologen und dem Experten der Pharmazie und pharmazeutischen Technologie gut bekannt.
[0015] Beispiele solcher Salze – obwohl diese nicht exklusiv sind -sind Chlorid, Bromid, Orotat, saures Aspartat, saures Citrat, saures Phosphat, Fumarat und saures Fumarat, Lactat, Maleat und saures Maleat, saures Oxalat, saures Sulfat, Glucosephosphat, Tartrat und saures Tartrat.
[0016] Von der FDA anerkannte Salze, die in Int. J. of Pharm. 33 (1986), 201–217 aufgelistet sind, sind hierin zu Referenzzwecken eingefügt.
[0017] Das bevorzugte Beispiel der spezifischen Verbindung gemäß dieser Erfindung ist: (R,S)-7-Acetyl-2-amino-6-methyltetralin-Hydrochlorid (ST 1274).
[0018] Das Verfahren zur Herstellung der Verbindung gemäß dieser Erfindung, die hierin als freie Base oder als pharmakologisch akzeptable Salze beschrieben ist, wird in den folgenden Reaktionsschemata angegeben:

Reaktionsschema 1



Reaktionsschema 2



[0019] Unter Bezugnahme auf die obigen Reaktionsschemata erläutern die folgenden Beispiele, worin X = Cl^-, die Erfindung, ohne diese exklusiv darauf zu beschränken.

[0020] Beispiele 1 bis 6 sind Referenzbeispiele außerhalb des Umfangs dieser Erfindung.

Beispiel 1 (Schema 1)

Herstellung von S(–)-2-Amino-6-fluor-7-hydroxytetralin-Hydrochlorid (ST 1237) 8a

a) Herstellung von S(–)-Trifluoracetyl-asparaginanhydrid 1a

[0021] L-Asparaginsäure (100 g; 0,75 mol) wurde in Trifluoressigsäure (300 ml) suspendiert, die resultierende Suspension unter Rühren gehalten und auf –20°C in einem Eis/Salzbad gekühlt. Trifluoressigsäureanhydrid (300 ml; 2,16 mol) wurde langsam unter Rühren zugegeben. Am Ende der Zugabe wurde die resultierende

Mischung vorsichtig über Nacht bei 45°C unter Rückfluss gehalten.

[0022] Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung in einem Exsikkator zur Trockne gebracht und der feste Rest dreimal mit Hexan unter Rühren gewaschen, wobei jedesmal das Hexan durch Dekantieren entfernt wurde; der Rest wurde erneut vollständig zur Trockene gebracht. Schließlich wurde der Rest unter Rühren mit Hexan-Ethylether trituriert, die resultierende Mischung filtriert und der Rest unter Vakuum getrocknet. 150 g der Verbindung 1a wurde erhalten (Ausbeute 95%).

Schmelzpunkt: 140–142°C

$[\alpha]D$ = –40,7 (c = 1% Methylalkohol)

^{1}H-NMR(DMSO d_6), Varian 300 MHz, δ (ppm): 2,85–3,3 (2H, m, C<u>H</u>$_2$); 4,95–5,1 (1H, m, C<u>H</u>NH); 9,6–9,8 (1H, bd, CHN<u>H</u>COCF$_3$).

b) Herstellung von S(+)-4-(3-Fluor-4-methoxyphenyl)-4-oxo-2-(N-trifluoracetyl)-aminobutansäure 3a

[0023] S(–)-Trifluoracetyl-asparaginsäureanhydrid (150 g; 0,712 mol) wurde in 2-Fluoranisol (300 ml; 2,67 mol) suspendiert, die resultierende Mischung kräftig gerührt, und dann wurde wasserfreies Aluminiumchlorid (240 g; 1,57 mol) langsam in kleinen Portionen zugegeben. Nach Vollendung der Zugabe wurde die Mischung unter heftigem Rühren 24 h bei 40–45°C gehalten.

[0024] Wasserfreies CH_2Cl_2 und weiterhin 60 g $AlCl_3$ wurden zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 48 h unter Rühren gehalten.

[0025] Der feste Rest wurde mit 1 l CH_2Cl_2 durch Mahlen unter Rühren behandelt. Methylenchlorid, das überschüssiges Fluoranisol enthielt, wurde abgetrennt. Der feste Rest wurde abfiltriert und portionsweise zu 2 l 6 M HCl gegeben, das unter heftigem Rühren gehalten wurde. Nach Vollendung der Zugabe wurde die Mischung 30 min gerührt. Die saure Phase wurde dann wiederholt mit Ethylether extrahiert. Die kombinierten Etherphasen wurden mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und dann zur Trockne gebracht. Ein roher Feststoffrest wurde erhalten, der durch 1 : 1 AcOEt/Hexan kristallisiert wurde. 188 g der Verbindung 3a wurde erhalten (Ausbeute 78%).

Schmelzpunkt: 113–115°C

$[\alpha]D$ = + 27,5 (c = 1% Methylalkohol)

^{1}H-NMR(CD_3OD), Varian 300 MHz, δ (ppm): 3,6 (2H, m, C<u>H</u>$_2$NH); 3,96 (3H, S, PhOC<u>H</u>$_3$); 4,88–5,01 (1H, m, CH_2C<u>H</u>NH);
7,18–7,22 (1H, t, Ar); 7,7–7,8 (1H, dd, Ar); 7,82–7,9 (1H, bd, Ar).

c) Herstellung von S(+)-4-(3-Fluor-4-methoxyphenyl)-2-(N-trifluoracetyl)aminobutansäure 4a

[0026] Die Verbindung 3a (100 g; 0,297 mol) wurde in Trifluoressigsäure (500 ml) aufgelöst. Die resultierende Lösung wurde auf 0°C gekühlt und Triethylsilan (300 ml; 1,89 mol) wurde langsam zugegeben. Nach Vollendung der Zugabe wurde die Mischung langsam zum Siedepunkt gebracht und bei der Siedetemperatur 4 h gehalten.

[0027] Die Mischung wurde dann zur vollständigen Trocknung in einen Exsik kator gebracht; der Rest wurde zweimal mit Ethylether gewaschen, wobei die Mischung jedesmal zur Trockne gebracht wurde, um die Trifluoressigsäure vollständig zu eliminieren. Der somit erhaltene ölige Rest wurde in einem Eis/Salzbad auf –20°C gekühlt und dann unter Rühren mit einer gesättigten $NaHCO_3$-Lösung behandelt, deren pH mit 4 N NaOH auf 10 eingestellt worden war.

[0028] Die schließliche alkalische Phase wurde vorsichtig mit 6 N HCl bei 0°C auf pH 3 angesäuert. Ein Präzipitat wurde erhalten, das wiederholt mit CH_2Cl_2 extrahiert wurde. Die kombinierten organischen Extrakte wurden in einer kleinen Menge Wasser gewaschen, über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockne gebracht. Der ölige Rest wurde in einer kleinen Menge Ethylacetat aufgelöst und mit Hexan unter Rühren ausgefällt. Die Mischung wurde über Nacht unter Rühren gehalten, filtriert und der Rest getrocknet. 72 g der Verbindung 4a wurden erhalten (Ausbeute 75%).

Schmelzpunkt: 113–115°C

$[\alpha]D$ = + 11,3 (c = 1% Methylalkohol) Analyse: entsprechend Standard

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ (ppm):
2,0–2,18 (1H, m, C<u>H</u>HCHNH); 2,22–2,36 (1H, m, CH<u>H</u>CHNH);
2,6–2,7 (2H, t, PhC<u>H</u>$_2$CH$_2$); 3,84 (3H, S, PhOC<u>H</u>$_3$);
4,6–4,7 (1H, m, CH_2C<u>H</u>NH); 6,78 (1H, bd, CHN<u>H</u>COCF$_3$); 6,8–6,92 (2H, m, Ar).

d) Herstellung von S(–)-2-(N-Trifluoracetyl)amino-6-fluor-7-methoxy-1-tetralon 5a

[0029] Die Verbindung 4a (70 g; 0,217 mol) wurde in wasserfreiem Methylenchlorid (1400 ml) aufgelöst. Die resultierende Mischung wurde auf 0°C in einem Eisbad gekühlt und dann wurde Phopshorpentachlorid (70 g;

0,336 mol) langsam zugegeben. Am Ende der Zugabe wurde die Mischung bei 0°C unter Rühren etwa 2 h gehalten und dann auf –20°C gekühlt. Aluminiumchlorid (56 g; 0,42 mol) wurde in kleinen Portionen zu der Mischung gegeben.

[0030] Nach der Zugabe wurde die Mischung 2 h bei Raumtemperatur gehalten und dann vorsichtig auf den Siedepunkt erwärmt und für etwa 6 h bei der Siedetemperatur gehalten.

[0031] Die Mischung wurde dann auf 0°C gekühlt und zerstoßenes Eis (etwa 300 ml) wurde portionsweise unter Rühren zum Zerstören der überschüssigen Reaktionsmittel zugegeben. Die Mischung wurde dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockne gebracht. Ein gelber Feststoff wurde erhalten, der in einem kleinen Volumen Ethylacetat aufgelöst wurde, und wurde dann mit Hexan ausgefällt. 40 g der Verbindung 5a wurden erhalten (Ausbeute 60%).

Schmelzpunkt: 184–185°C

$[\alpha]D$ = –55,4 (c = 1% Methylalkohol)

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, (ppm):

1,83–2,2 (1H, m, C<u>H</u>HCHNH); 2,8–2,88 (1H, m, CH<u>H</u>CHNH);

2,9–3,0 (1H, m, C<u>H</u>HCH_2); 3,15–2,26 (1H, m, CH<u>H</u>CH_2);

3,92 (3H, S, PhOC<u>H</u>$_3$); 4,53–4,62 (1H, m, CH_2C<u>H</u>NHOOOF_3);

6,88 (1H, d, Ar); 7,57 (1H, d, Ar); 7,43 (1H, bs, CHN<u>H</u>COCF_3).

e) Herstellung von S(–)-2-(N-Trifluoracetyl)amino-6-fluor-7-methoxytetralin 6a

[0032] Die Verbindung 5a (40 g; 0,131 mol) wurde in Boretherattrifluorid (340 ml) bei 0°C suspendiert. Triethylsilan (90 ml; 0,567 mol) wurde zu der Suspension bei 0°C gegeben und die Suspension wurde 4 Tage bei Raumtemperatur unter Rühren gehalten. Am Ende der Reaktion wurde eine gesättigte $NaHCO_3$-Lösung (pH 8–9) zu der Reaktionsmischung gegeben und die wässrige Phase viermal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und zur Trockne gebracht.

[0033] Die somit erhaltene rohe Verbindung wurde von Isopropylether rekristallisiert. 30 g der Verbindung 6a wurden erhalten (Ausbeute 78%).

Schmelzpunkt: 45–47°C

$[\alpha]D$ = – 80 (c = 1% Methylalkohol)

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ (ppm):

1,78–1,9 (1H, m, C<u>H</u>HCNNH); 2,0–2,15 (1H, m, CH<u>H</u>CHNH);

2,6–2,72 (1H, dd, PhC<u>H</u>HCHNH);

2,73–2,9 (2H, m, PhCH<u>H</u>CHNH, PhC<u>H</u>HCH_2);

3,03–3,15 (1H, dd, PhCH<u>H</u>CH_2); 4,2–4,35 (1H, m, C<u>H</u>NH);

6,38 (1H, bd, CHN<u>H</u>COCF_3); 6,6 (1H, d, Ar); 6,8 (1H, d, Ar).

f) Herstellung von S(–)-2-Amino-6-fluor-7-methoxytetralin-Hydrochlorid 7a

[0034] Die Verbindung 6a (30 g; 0,13 mol) wurde in Methanol (225 ml) und Wasser (225 ml) mit K_2CO_3 (54 g; 0,39 mol) aufgelöst.

[0035] Die resultierende Lösung wurde 3 h unter Rühren unter Rückfluss gehalten.

[0036] Methanol wurde unter Vakuum entfernt und weitere 100 ml Wasser wurden zu der Lösung gegeben.

[0037] Die wässrige Phase wurde wiederholt mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und zur Trockne gebracht. Der somit erhaltene ölige Feststoff wurde in Ethylether, der mit HCl angesäuert war (15%ige Lösung in Ethanol) aufgelöst und das feste Präzipitat abfiltriert und in Methanol erneut aufgelöst, mit Aktivkohle entfernt, filtriert, im Vakuum konzentriert und schließlich mit n-Propanol kristallisiert.

[0038] Die Kristallisierung wurde zweimal wiederholt, unter Erhalt von 12,6 g der Verbindung 7 (Ausbeute 53%).

Schmelzpunkt: 263–265°C

$[\alpha]D$ = –52, 5 (c = 1% H_2O)

^{1}H-NMR($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ (ppm):

1,6–1,8 (1H, m, C<u>H</u>HCHN+); 2,0–2,15 (1H, m, CH<u>H</u>CHN+);

2,6–2,75 (3H, m, PhC<u>H</u>HCHN+, PhC<u>H$_2$</u>CH_2);

2,95–3,05 (1H, DD, PhCH<u>H</u>CHN+); 3,45–3,55 (1H, m, C<u>H</u>N+);

6,7–6,7 (2H, m, Ar).

g) Herstellung von S(–)-2-Amino-6-fluor-7-hydroxytetralin-Hydrochlorid (ST 1237) 8a

[0039] Eine Lösung aus S(–)-2-Amino-6-fluor-7-methoxytetralin-Hydrochlorid 7a (3 g; 0,13 mol) in 20 ml Bromwasserstoffsäure (47%ige wässrige Lösung) wurde bei Rückflusstemperatur über Nacht gehalten. Am Ende des Rückflusses wurde die Lösung konzentriert und unter Vakuum zur Trockne gebracht. Der somit erhaltene Rest wurde wiederholt unter Rühren mit Aceton gewaschen und abfiltriert, in einer 1 : 1-Wasser/Methanol-Mischung erneut aufgelöst und durch eine Säule mit 60 ml Amberlyst A 21-Harz eluiert, das in der basischen Form aktiviert war.
[0040] Das Eluat wurde mit 2 N Salzsäure angesäuert und dann zur Trockne unter Vakuum konzentriert, der somit erhaltene Rest wurde mit Aceton gewaschen, abfiltriert und erneut in 1 : 1 Wasser/Methanol aufgelöst und durch eine Säule mit 60 ml Amberlyst A 21-Harz, das in der sauren Form aktiviert war, eluiert.
[0041] Das Eluat wurde mit Aktivkohle entfernt, durch Celite filtriert und zu einem kleinen Volumen konzentriert. Aceton wurde zugegeben, unter Erhalt eines Präzipitates, das abfiltriert und im Ofen unter Vakuum getrocknet wurde.
[0042] 2,2 g der Verbindung 8a wurden erhalten (Ausbeute 78%).
Schmelzpunkt: 259–261°C
$[\alpha]D$ = –55,4 (c = 1% H_2O)
^{1}H-NMR(D_2O), Varian 300 MHz, δ (ppm):
1,6–1,8 (1H, m, $CH_2C\underline{H}HCHN+$); 2,0–2,1 (1H, m, $CH_2CH\underline{H}CHN+$);
2,5–2,7 (3H, m, $PhC\underline{H}_2CH_2$), $PhC\underline{H}HN^+$); 2,85–3,0 (1H, m, $PhCH\underline{H}N^+$);
3,4–3,55 (1H, m, $C\underline{H}N+$); 6,55–6,8 (2H, 2d, AR).

Beispiel 2 (Schema 1)

Herstellung von R(+)-2-Amino-6-fluor-7-hydroxytetralin-Hydrochlorid (ST 1238) 8b

a) Herstellung von R(+)-Trifluoracetylasparaginsäure 1b

[0043] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(–)-Trifluor-acetylasparagrinsäure 1a angewandt wurde, wobei D(–)Asparaginsäure als Ausgangsprodukt verwendet wurde (Ausbeute 86%).
Schmelzpunkt: 142–144°C
$[\alpha]D$ = +40,0 (c = 1% Methylalkohol)
^{1}H-NMR: entsprechend dem, das mit Produkt 1a erhalten wurde, und mit diesem übereinstimmend.

b) Herstellung von R(–)-4-(3-Fluor-4-methoxyphenyl)-4-oxo-2-(N-trifluoracetyl)aminobutansäure 3b

[0044] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(+)-4-(3-Fluor-4-methoxyphenyl)-4-Oxo-2-(N-trifluoracetyl)aminobutansäure 3a angewandt wurde, wobei das Anhydrid 1b als Ausgangsmaterial verwendet wurde (Ausbeute 57s).
Schmelzpunkt: 86–88°C
$[\alpha]D$ = –28,0 (c = 1% Methylalkohol)
^{1}H-NMR: entsprechend dem, das mit Produkt 3a erhalten wurde, und mit diesem übereinstimmend.

c) Herstellung von R(–)-4-(3-Fluor-4-methoxyphenyl)-2-(N-trifluoracetyl)aminobutansäure 4b

[0045] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(+)-4-(3-Fluor-4-methoxyphenyl)-2-(N-trifluoracetyl)-aminobutansäure 4a angewandt wurde, wobei die Säure 3b als Ausgangsmaterial verwendet wurde (Ausbeute 65%).
Schmelzpunkt: 110–112°C
$[\alpha]D$ = –11,2 (c = 1% Methylalkohol)
^{1}H-NMR: entsprechend dem, das mit Produkt 4a erhalten wurde, und mit diesem übereinstimmend.

d) Herstellung von R(+)-2-(N-Trifluoracetyl)amino-6-fluor-7-methoxy-1-tetralonsäure 5b

[0046] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(–)-2-(N-Trifluoracetyl)-amino-6-fluor-7-methoxy-l-tetralonsäure 5a verwendet wurde, wobei das Anhydrid 4b als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde (Ausbeute 84%).
Schmelzpunkt: 185–186°C
$[\alpha]D$ = +66,0 (c = 1% Methylalkohol)
^{1}H-NMR: entsprechend dem, das mit Produkt 5a erhalten wurde, und mit diesem übereinstimmend.

e) Herstellung von R(+)-2-(N-Trifluoracetyl)-amino-6-fluor-7-methoxytetralinsäure 6b

[0047] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(–)-2-(N-Trifluoracetyl)-amino-6-fluor-7-methoxytetralin-säure 6a angewandt wurde, wobei das Tetralon 5b als Ausgangsmaterial verwendet wurde (Ausbeute 47%).
Schmelzpunkt: 145–147°C
$[\alpha]D$ = +92,0 (c = 1% Methylalkohol)
^{1}H-NMR: entsprechend dem, das mit Produkt 6a erhalten wurde, und mit diesem übereinstimmend.

f) Herstellung von R(+)-2-Amino-6-fluor-7-methoxytetralin-Hydrochlorid 7b

[0048] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(–)-2-Amino-6-fluor-7-methoxytetralin-Hydrochlorid 7a angewandt wurde, wobei das Tetralin 6b als Ausgangsmaterial verwendet wurde (Ausbeute 64%).
Schmelzpunkt: 260–262°C
$[\alpha]D$ = + 48,5 (c = 1% H_2O)
^{1}H-NMR: entsprechend dem, das mit Produkt 7a erhalten wurde, und mit diesem übereinstimmend.

g) Herstellung von R+)-2-Amino-5-fluor-7-hydroxytetralin-Hydrochlorid (ST 1238) 8b

[0049] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(–)-2-Amino-5-fluor-7-hydroxytetralin-Hydrochlorid (ST 1237) 8a angewandt wurde, wobei das Tetralinhydrochlorid 7b als Ausgangsmaterial verwendet wurde (Ausbeute 78%).
Schmelzpunkt: 260–262°C
$[\alpha]D$ = +55,0 (c = 1% H_2O)
^{1}H-NMR (D_2O), Varian 300 MHz, δ (ppm):
1,6–1,8 (1H, m, $CH_2C\underline{H}HCHN$+); 2,0–2,1 (1H, m, $CH_2CH\underline{H}CHN$+); 2,5–2,7 (3H, m, $PhC\underline{H}_2CH_2$)$PhC\underline{H}HCHN$+); 2,85–3,0 (1H, m, $PhCH\underline{H}CHN$); 3,4–3,55 (1H, m, $C\underline{H}N$+); 6,55–6,8 (2H, 2d, Ar).

Beispiel 3 (Schema 1)

Herstellung von (R,S)-2-Amino-5,6-difluor-7-methoxytetralin-Hydrochlorid (ST 1269) 7c

a) Herstellung von (R,S)-Trifluoracetyl-asparaginsäureanhydrid 1c

[0050] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(–)-Trifluoracetylasparaginsäure 1a angewandt wurde, wobei D,L-Asparaginsäure als Ausgangsprodukt verwendet wurde (Ausbeute 96%).
Schmelzpunkt: 133–134°C
^{1}HNMR: entsprechend dem, das mit Produkt 1a erhalten wurde, und mit diesem übereinstimmend.

a') Herstellung von 2,3-Difluoranisol 2

[0051] 20 g (0,154 mol) 2,3-Difluorphenol wurden durch Schütteln des Produktes bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 6,24 g NaOH in 60 ml Wasser zum vollständigen Auflösen verseift.
[0052] Zu der auf etwa 10°C gekühlten Lösung wurden 14,4 ml Dimethylsulfat langsam zugegeben; die Lösung wurde dann auf Rückflusstemperatur erwärmt und 24 h unter Rückfluss gehalten.
[0053] Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur gebracht und mit Methylenchlorid extrahiert; die organische Phase wurde mit Wasser, N Schwefelsäure und erneut mit Wasser gewaschen bis ein neutraler pH erhalten wurde.
[0054] Die Lösung wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat dehydratisiert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt, unter Erhalt von 21 g einer Verbindung a' als rötliches Öl, das durch NMR analysiert und wie es war verwendet wurde.
(Ausbeute 94% des Ausgangsmaterials).
^{1}H-NMR (D_2O) Varian 300 MHz δ (ppm): 3,9 (3H, S, $PhOC\underline{H}_3$); 6,6–7,2 (3H, m, aromatisch).

b) Herstellung von (R,S)-4-(2,3-Difluor-4-methoxyphenyl)-4-oxo-2(N-trifluoracetyl)aminobutansäure 3c

[0055] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für (S(+)-4-(3-Fluor-4-methoxyphenyl)-4-oxo-2(N-trifluoracetyl)-aminobutansäure 3a verwendet wurde, wobei das Anhydrid 1c und 2,3-Difluoranisol als Ausgangsprodukte und 2 und 72 h als Reaktionszeit anstelle von 48 h verwendet wurden (Ausbeute

23%).
^{1}H-NMR (D_2O) Varian 300 MHz δ (ppm): 3,9 (3H, S, PhOC$\underline{H}_3$); 6,6–7,2 (3H, m, aromatisch).

c) Herstellung von (R,S)-4-(2,3-Difluor-4-methoxyphenyl)-2-(N-trifluoracetyl)aminobutansäure 4c

[0056] Die Herstellung ist ähnlich zu der, wie sie für S(+)-4-(3-Fluor-4-methoxyphenyl)-2-(N-trifluoracetyl)aminobutansäure 4a verwendet wurde, wobei die Säure 3c als Ausgangsprodukt verwendet wurde (Ausbeute 76%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ (ppm):
2,0–2,2 (1H, m, C$\underline{H}$HCHN+); 2,2–2,4 (1H, m, CH$\underline{H}$CHCN); 2,6–2,8 (2H, t, PhC$\underline{H}_2$CH$_2$); 3,86 (3H, S, PhOC$\underline{H}_3$);
4,6–4,72 (1H, bq, CH$_2$C$\underline{H}$NH); 6,6–6,7 (1H, bt, Ar); 6,75–6,88 (2H, m, Ar, CHN$\underline{H}$COCF$_3$).

d) Herstellung von (R,S)-2-(N-Trifluoracetyl)amino-5,6-difluor-7-methoxy-1-tetralon 5c

[0057] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(–)-(N-Trifluoracetyl)amino-6-fluor-7-methoxy-1-tetralon 5a verwendet wurde, wobei die Säure 4c als Ausgangsprodukt verwendet und 3 h bei Rückfluss nach Zugabe von Aluminiumchlorid anstelle von 6h als Reaktionszeit eingesetzt wurde (Ausbeute (26%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ (ppm):
1,85–2,0 (1H, m, C$\underline{H}$HCHN+); 2,84–3,07 (2H, m, CH$\underline{H}$NH, PhC$\underline{H}$HCH$_2$);
3,13–3,24 (1H, m, PhCH$\underline{H}$CH$_2$); 3,93 (1H, S, PhOC$\underline{H}_3$);
4,55–4,65 (1H, m, CH$_2$C$\underline{H}$NH); 7,38–7,42 (1H, dd, Ar);
7,43–(1H, bs, CHN$\underline{H}$COCF$_3$).

e) Herstellung von (R,S)-2-(N-Trifluoracetyl)amino-5,6-difluor-7-methoxytetralin 6c

[0058] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(–)-(N-Trifluoracetyl)amino-6-fluor-7-methoxytetralin 6a (Beispiel 1) verwendet wurde, wobei Tetralon 5c als Ausgangsprodukt und 7 Tage anstelle von 4 als Reaktionszeit eingesetzt wurden (Ausbeute 46%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ (ppm):
1,75–1,9 (1H, m, CH$\underline{H}$CHN+); 2,04–2,16 (2H, m, CH$\underline{H}$CHNH);
2,6–2,9 (3H, m, PhC$\underline{H}_2$CHNH, PhC$\underline{H}$HCH$_2$);
3,05–3,15 (1H, dd, PhCH$\underline{H}$CH$_2$); 3,84 (3H, s, PhOCH$_3$);
4,2–4,33 (1H, m, C$\underline{H}$NHCOCF$_3$); 6,22 (1H, bs, CHN$\underline{H}$COCF$_3$);
6,9–6,94 (1H, bd, Ar).

f) Herstellung von (R,S)-2-Amino-5,6-difluor-7-methoxy-1-tetralin-Hydrochlorid ST (1269) 7c

[0059] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(–)-2-Amino-6-fluor-7-methoxytetralin-Hydrochlorid 7a eingesetzt wurde, wobei Tetralin 6c als Ausgangsprodukt und Isopropanol als Kristallisationslösungsmittel verwendet wurden. (Ausbeute 62%).
Schmelzpunkt: zersetzt sich bei 210°C
^{1}H-NMR (D_2O), Varian 300 MHz, δ (ppm):
1,6–1,8 (1H, m, CH$_2$C$\underline{H}$HCHN+); 2,0–2,2 (1H, m, CH$_2$CH$\underline{H}$CHN+); 2,5–2,9 (3H, m, PhC$\underline{H}$HCHN+, PhC$\underline{H}_2$CH$_2$);
2,9–3,1 (1H, m, PhCHC$\underline{H}$N+); 3,4–3,6 (1H, m, C$\underline{H}$N+); 6,5–6,6 (1H, d, Ar).

Beispiel 4 (Schema 1)

Herstellung von (R,S)-2-Amino-6-fluor-7-methyltetralin-Hydrochlorid (ST 1275) 7d

a) Herstellung von (R,S)-Trifluoracetylasparaginsäureanhydrid 1c (siehe Beispiel 3)

b) Herstellung von (R,S)-4-(3-Fluor-4-methyl-phenyl)-4-oxo-2-(N-trifluoracetyl)aminobutansäure 3d

[0060] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(+)-4-(3-Fluor-4-methoxyphenyl)-4-oxo-2-(N-trifluoracetyl)-aminobutansäure 3a verwendet wurde, wobei Fluortoluol als Ausgangsprodukt und 72 h anstelle von 48 h als Reaktionszeit eingesetzt wurden (Ausbeute 36%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) Varian 300 MHz, δ (ppm): 2,15 (3H, d, PhC$\underline{H}_3$); 3,35–3,42 (1H, dd, C$\underline{H}$HCHNH); 3,5–3,6 (1H, dd, CH$\underline{H}$CHNH);
4,68–4,76 (1H, m, CH$_2$C$\underline{H}$NH); 6,85–6,95 (1H, t, Ar);
7,55–7,65 (2H, m, Ar); 8,0–8,1 (1H, bd, CHN$\underline{H}$COCF$_3$).

c) Herstellung von (R,S)-4-(3-Fluor-4-methyl-phenyl)-2-(N-trifluoracetyl)aminobutansäure 4d

[0061] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(+)-4-(3-Fluor-4-methoxyphenyl)-2-(N-trifluoracetyl)amino-butansäure 4a verwendet wurde, wobei die Säure 3d als Ausgangsprodukt verwendet wurde (Ausbeute 52%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) Varian 200 MHz, δ (ppm): 2,15 (3H, d, PhC$\underline{H}_3$); 2,0–2,4 (2H, dd, C$\underline{H}_2$CHNH); 2,5–2,7 (2H, t, PhCH_2CH_2);
4,5–4,7 (1H, bq, CH_2C$\underline{H}$NH); 6,6–6,7 (1H, m, Ar); 6,75–6,95 (2H, m, Ar); 7,35–7,5 (1H, bd, CHN$\underline{H}$COCF_3).

d) Herstellung von (R,S)-2-(N-Trifluoracetyl)amino-6-fluor-7-methyl-1-tetralon 5d

[0062] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(–)-2-(N-Trifluoracetyl)amino-6-fluor-7-methoxy-1-tetralon 5a eingesetzt wurde, wobei die Säure 4d als Ausgangsprodukt und 1 h bei Rückfluss anstelle von 2 h bei Raumtemperatur und nach Zugabge des Aluminiumchlorids 6 h bei Rückfluss als Reaktionszeit eingesetzt wurden (Ausbeute 80%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) Varian 300 MHz, δ (ppm):
1,83–2,0 (1H, d, C$\underline{H}$HCHNH); 2,3-(3H, d, PhC$\underline{H}_3$);
2,8–2,9 (1H, m, CH$\underline{H}$CHNH); 2,92–3,03 (1H, m, C$\underline{H}$HCH_2);
3,13–3,25 (1H, m, CH$\underline{H}$CH_2); 4,53–4,62 (1H, m, CH_2C$\underline{H}$NHOOOF_3);
7,2 (1H, d, Ar); 7,6 (1H, d, Ar); 7,95 (1H, bs, CHN$\underline{H}$COCF_3).

e) Herstellung von (R,S)-2-(N-Trifluoracetyl)amino-6-fluor-7-methyltetralin 6d

[0063] Die Herstellung ist analog zu der, die für S(–)-2-(N-Trifluoracetyl)amino-6-fluor-7-methoxytetralin 6a eingesetzt wurde, wobei Tetralon 5d als Ausgangsprodukt verwendet wurde (Ausbeute 60%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) Varian 300 MHz, δ (ppm):
1,75–1,9 (1H, m, C$\underline{H}$HCHNH); 2,0–2,15 (1H, m, CH$\underline{H}$CHNH);
2,2 (3H, s, PhC$\underline{H}_3$); 2,6–2,7 (1H, dd, PhC$\underline{H}$HCHNH);
2,7–2,9 (2H, m, PhCH$\underline{H}$CHNH, PhC$\underline{H}$HCH_2);
3,03–3,15 (1H, dd, PhCH$\underline{H}$CH_2); 4,25–4,35 (1H, m, C$\underline{H}$NH);
6,2 (1H, b, s, N$\underline{H}$COCF_3); 6,7 (1H, d, Ar); 6,9 (1H, d, Ar).

f) Herstellung von (R,S)-2-Amino-6-fluor-7-methyltetralin-Hydrochlorid (ST 1275) 7d

[0064] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für S(–)-2-Amino-6-fluor-7-methoxytetralin-Hydrochlorid 7a verwendet wurde, wobei Tetralin 6d als Ausgangsprodukt verwendet wurde (Ausbeute 67%).
Schmelzpunkt: zersetzt sich bei 230°C
^{1}H-NMR (CD_3OD) Varian 300 MHz, δ (ppm):
1,7–1,9 (1H, m, CH_2C$\underline{H}$HCHN+); 2,15–2,25 (1H, m, CH_2CH$\underline{H}$CHN+);
2,19 (3H, S, PhC$\underline{H}_3$); 2,7–2,9 (3H, m, PhC$\underline{H}$NH+, PhCH_2CH_2);
3,05–3,6 (1H, m, PhCH$\underline{H}$CHN+); 3,45–3,6 (1H, m, C$\underline{H}$NH_3+);
6,75–6,8 (1H, d, Ar); 6,95–7,0 (1H, d, Ar).

Beispiel 5 (Schema 2)

Herstellung von (R,S)-2-Amino-6-methoxy-7-fluortetralin-Hydrochlorid (ST 1262) 6a

a) Herstellung von 4-(6-Methoxy-7-fluorphenyl)-3-carbomethoxy-3-butansäure 1a

[0065] 9,4 g (0,061 mol) 3-Fluor-p-anisaldehyd und 10 g (0,068 mol) Dimethylsuccinat wurden in 15 ml wasserfreiem Methanol aufgelöst. Die somit erhaltene Lösung wurde tropfenweise bei Raumtemperatur zu einer zuvor hergestellten Lösung aus 1,66 g (0,073 mol) Natriummethoxid gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 3 h in einer Stickstoffatmosphäre unter Rückfluss gehalten, dann gekühlt und auf das halbe Volumen unter Vakuum konzentriert.
[0066] Die erhaltene Lösung wurde mit 2 N HCl angesäuert, in einem Eisbad gekühlt und dann mit Wasser verdünnt, bis die Ausfällung des Produktes auftrat. Das Präzipitat wurde abfiltriert und in einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung aufgelöst. Die wässrige Lösung wurde wiederholt mit Ethylether geschüttelt und mit 2 N HCl erneut angesäuert und in einem Eisbad gekühlt.
[0067] Das Produkt wurde wiederholt von der wässrigen Lösung mit wasserfreiem Natriumsulfat extrahiert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt, unter Erhalt eines festen Produkts, das mit einer Ethylace-

tat/n-Hexan-Mischung kristallisiert wurde, zur Trockne gebracht, unter Erhalt von 5,5 g der Säure 1a (Ausbeute 33%).
Schmelzpunkt: 141–144°C
^{1}H-NMR ($CDCl_3$); Varian 300 MHz, δ (ppm): 3,55 (2H, s, C<u>H</u>$_2$COOH);
3,83 (3H, s, COOC<u>H</u>$_3$); 3,9 (3H, s, PhOC<u>H</u>$_3$); 6,95–7,2 (3H, m, Ar); 7,8 (1H, s, C<u>H</u>=C).

b) Herstellung von (R,S)-4-(6-Methoxy-7-fluorphenyl)-3-carbomethoxybutansäure 2a

[0068] 2 g (0,0075 mol) 4-(6-Methoxy-7-fluorphenyl)-3-carbomethoxy-3-butansäure wurden in 80 ml Ethylacetat aufgelöst und dann in einer Parr-Anlage mit 200 mg Palladium auf Kohle bei 5,5 psi Wasserstoffdruck für 1,5 h hydriert. Die Lösung wurde durch Celite filtriert und der Katalysator und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt, unter Erhalt von 1,9 g eines Öls, das spontan kristallisierte (Ausbeute 93%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$), Varian 200 MHz, δ (ppm)
2,3–2,45 (1H, m, C<u>H</u>COOCH$_3$); 2,5–2,75 (2H, m, C<u>H</u>$_2$OOOH);
2,8–3,1 (2H, m, PhC<u>H</u>$_2$); 3,6 (3H, s, COOC<u>H</u>$_3$); 3,8 (3H, s, PhOC<u>H</u>$_3$); 6,75-6,9 (3H, m, Ar).

c) Herstellung von (R,S)-6-Methoxy-7-fluor-4-oxo-1,2,3,4-tetra-hydro-2-naphthoesäure-ethylester 3a

[0069] 5,6 g (0,021 mol) (R,S)-4-(6-Methoxy-7-fluorphenyl)-3-carbomethoxybutansäure 2a wurden in 100 ml wasserfreiem Methylenchlorid aufgelöst; 5 g (0,024 mol) Phosphorpentachlorid wurde zugegeben und die Temperatur 95 min bei 0°C gehalten. Die Temperatur wurde auf –10°C gebracht und 3,6 g (0,027 mol) Aluminiumchlorid wurden zu der Lösung gegeben; die Temperatur konnte sich in 40 min auf 20°C erhöhen und dann wurde die Lösung für 1 h auf Rückflusstemperatur erwärmt.
[0070] Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt; 100 ml kaltes Wasser wurden zu der Suspension gegeben, die dreimal mit 150 ml Ethylacetat extrahiert wurde; die organische Lösung wurde über wasserfreiem Natriumsulfat dehydratisiert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt, unter Erhalt von 4,3 g eines festen Produktes (Ausbeute 81%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$), Varian 200 MHz, δ (ppm)
2,3–2,45 (1H, m, C<u>H</u>COOCH$_3$); 2,5–2,75 (2H, m, C<u>H</u>$_2$COOH);
2,8–3,1 (2H, m, PhC<u>H</u>$_2$); 3,6 (3H, s, COOC<u>H</u>$_3$; 3,8 (3H, s, PhOC<u>H</u>$_3$); 6,75–6,9 (3H, m, Ar)

d) Herstellung von (R,S)-6-Methoxy-7-fluor-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoesäuremethylester 4a

[0071] 6 g (0,024 mol) des (R,S)-6-Methoxy-7-fluor-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoesäuremethylesters 3a wurden in 100 ml einer Mischung aus wasserfreiem Methanol und 50 ml Eisessig aufgelöst; die Lösung wurde in eine Parr-Anlage mit 800 mg Palladium über Kohle bei 50 psi Wasserstoffdruck für 4 h gegeben.
[0072] Der Katalysator wurde durch Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, unter Erhalt von 5,5 g eines festen Produktes (Ausbeute 98%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ (ppm):
1,75–1,9 (1H, m, C<u>H</u>HCHCOOCH$_3$);
2,1–2,22 (1H, m, CH<u>H</u>CHCOOCH$_3$);
2,6–2,8 (3H, m, PhC<u>H</u>$_2$CHOOOCH$_3$, CHCOOCH$_3$);
2,9 (2H, d, PhC<u>H</u>$_2$CH$_2$); 3,7 (3H, s, COOC<u>H</u>$_3$); 3,83 (3H, s, PhOC<u>H</u>$_3$); 6,62 (1H, d, Ar) ; 6, 78 (1H, d, Ar) .

e) Herstellung von (R,S)-6-Methoxy-7-fluor-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoesäure 5a

[0073] 5,2 g (0,022 mol) (R,S)-6-Methoxy-7-fluor-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoesäure 4a wurden in einer Lösung aus 2,2 g Kaliumcarbonat in 50 ml 50%ige wässrige Methanollösung suspendiert; die resultierende Lösung wurde 1 h unter Rückfluss gehalten.
[0074] Der Methanol wurde im Vakuum entfernt und die Lösung mit 150 ml Wasser verdünnt und mit Ethylether gewaschen; die wässrige Lösung wurde mit 12 N HCl angesäuert.
[0075] Das erhaltene Präzipitat wurde abfiltriert und getrocknet, unter Erhalt von 9,8 g des Produktes (Ausbeute 97%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ (ppm):
1,8–1,95 (1H, m, CH<u>H</u>CHCOOCH$_3$);
2,1–2,25 (1H, m, CH<u>H</u>CHCOOCH$_3$);
2,65–2,85 (3H, m, PhC<u>H</u>$_2$CHOOOCH$_3$, C<u>H</u>COOCH$_3$);
2,95 (2H, d, PhC<u>H</u>$_2$CH$_2$); 3,82 (3H, s, PhOC<u>H</u>$_3$);
6,6 (1H, d, Ar); 6,8 (1H, d, Ar).

f) Herstellung von (R,S)-2-Amino-6-methoxy-7-fluortetralin-Hydrochlorid (ST 1262) 6a

[0076] 4,11 g (0,018 mol) (R,S)-6-Methoxy-7-fluor-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoesäure 5a wurden in 9 ml Thionylchlorid unter Stickstoffatmosphäre aufgelöst und die Lösung auf 60°C für 4 h erwärmt; Toluol wurde dann zugegeben und die Lösung wiederholt im Vakuum extrahiert.
[0077] Ein grünes Öl wurde erhalten, das in 12 ml wasserfreiem Aceton aufgelöst wurde, und tropfenweise zu einer Lösung aus 1,75 g (0,024 mol) Natriumazid in 12 ml Wasser gegeben, wobei die Reaktionsmischung auf 0°C gekühlt wurde.
[0078] Die Mischung konnte unter Rühren 30 min reagieren, wobei die Temperatur sich auf 20°C erhöhen konnte. Die Mischung wurde erneut auf 0–5°C gekühlt und 150 ml Wasser wurden zugegeben.
[0079] Das erhaltene Präzipitat wurde im Vakuum zur Trockne gebracht, unter Erhalt von 3,9 g Säureazid.
[0080] Das erhaltene Produkt wurde in 12 ml Toluol aufgelöst und 30 min auf 100°C erwärmt; das Lösungsmittel wurde entfernt, unter Erhalt eines dichten Öls, zu dem 10 ml wasserfreier Benzylalkohol gegeben wurde, woraufhin die Lösung erneut bei 100°C für 6 h erwärmt wurde.
[0081] Die Lösung wurde über Nacht auf 5°C gekühlt; das erhaltene Präzipitat wurde dann abfiltriert und zur Trockne gebracht, unter Erhalt von 4,7 g Carbobenzoxyderivat.
[0082] Das Produkt wurde in 350 ml wasserfreiem Ethanol gegeben und durch leichtes Erwärmen aufgelöst und mit etwa 2 ml konz. HCl angesäuert; 500 mg Palladium über Kohle wurden zugegeben und die erhaltene Mischung in eine Parr-Anlage gegeben und 5 h bei 50 psi Waserstoffdruck hydriert.
[0083] Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und wiederholt mit erwärmtem Methanol gewaschen; das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der erhaltene Feststoff mit einer Ethanol/Ethylether-Mischung (Ausbeute 58%) kristallisiert.
Schmelzpunkt: zersetzt sich bei 230°C
^{1}H-NMR ($DMSOd_6$), Varian 300 MHz, δ (ppm):
1,6–1,8 (1H, m, C<u>H</u>HCHN+); 2,0–2,2 (1H, m, CH<u>H</u>CHN+);
2,6–3,0 (4H, m, PhC<u>H_2</u>CH_2, PhC<u>H_2</u>CHN+); 3,8 (3H, s, OC<u>H_3</u>);
6,8–7,0 (2H, 2d, Ar)

Beispiel 6 (Schema 2)

g) Herstellung von (R,S)-2-Amino-6-hydroxy-7-fluortetralin-Hydrochlorid (ST 1267) 7

[0084] 0,6 g (0,0026 mol) (R,S)-2-Amino-6-methoxy-7-fluortetralin-Hydrochlorid 6a wurden in 8 ml 47%ige Bromwasserstoffsäure in Wasser suspendiert und dann über Nacht bei 130°C erwärmt.
[0085] Wasser wurde durch Verdampfen im Vakuum entfernt; der somit erhaltene erhaltene dunkle Feststoff, aufgelöst in 50%iger wässriger Methanollösung, wurde durch eine Säule aus 20 ml A-21-Harz eluiert, das in einer basischen Form aktiviert war.
[0086] Die eluierte Lösung wurde mit 3N Salzsäure auf pH 2 angesäuert, im Vakuum konzentriert und durch eine Säule aus 20 ml A-21-Harz eluiert, das in der Hydrochloridform aktiviert war. Das Lösungsmittel wurde vollständig im Vakuum entfernt.
[0087] Der erhaltene Feststoff wurde mit Aceton behandelt, abfiltriert und von Methanol durch Zugabe von Ethylether kristallisiert; 350 ml Produkt wurden erhalten (Ausbeute 62%).
Schmelzpunkt: zersetzt sich bei etwa 200°C.
^{1}H-NMR, (CD_3OD), Varian 300 MHz, δ (ppm):
1,7–1,9 (1H, m, C<u>H</u>HCHN+); 2,1–2,3 (1H, m, CH<u>H</u>CHN+);
2,7–3,1 (4H, m, PhC<u>H_2</u>CH_2; PhC<u>H_2</u>CHN+); 3,4–3,6 (1H, m, C<u>H</u>N+);
6,6–6,85 (2H, 2d, Ar).

Beispiel 7 (Schema 2)

Herstellung von (R,S)-2-Amino-6-methyl-7-acetyltetralin-Hydrochlorid (ST 1274) 10

a) Herstellung von 4-(6-Methylphenyl)-3-carbomethoxy-3-butansäure 1b

[0088] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für 4-(6-Methoxy-7-fluorphenyl)-3-carbomethoxy-3-butansäure 1a verwendet wurde, wobei p-Tolualdehyd als Ausgangsprodukt, 3 h als Reaktionszeit bei Rückfluss und eine Cyclohexan/Ethylacetat-Mischung als Kristallisationslösungsmittel verwendet wurden (Ausbeute 27%).
^{1}H-NMR($CDCl_3$); Varian 200 MHz, δ (ppm): 2,35 (3H, s, PhC<u>H_3</u>); 3,58 (2H, s, C<u>H_2</u>OOOH); 3,83 (3H, s, COOC<u>H_3</u>); 7,15–7,3 (4H, m, Ar); 7,87 (1H, s, C<u>H</u>=C).

b) Herstellung von 4-(6-Methylphenyl)-3-carbomethoxy-3-butansäure 2b

[0089] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für 4-(6-Methoxy-7-fluorphenyl)-3-carbomethoxy-3-butansäure 2a verwendet wurde, wobei die Säure 1b als Ausgangsprodukt und 2,5 h als Hydrierungszeit eingesetzt wurden (Ausbeute 94%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$), Varian 200 MHz, δ (ppm): 2,23 (1H, s, PhC$\underline{H}_3$);
2,28–2,45 (1H, m, C$\underline{H}$COOCH_3); 2,55–2,75 (2H, m, C$\underline{H}_2$OOOH);
2,9–3,1 (2H, m, PhC$\underline{H}_2$); 3, 62 (3H, s, COOC$\underline{H}_3$); 6,9–7, 1 (4H, m, Ar).

c) Herstellung von (R,S)-6-Methyl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoesäuremethylester 3b

[0090] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für (R,S)-6-Methoxy-7-fluor-4-oxo-1,2,3,9-tetrahydro-2-naphthoesäuremethylester 3a verwendet wurde, wobei die Säure 2b als Ausgangsprodukt eingesetzt wurde (Ausbeute 94%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$), Varian 200 MHz, δ (ppm): 2,35 (3H, s, PhC$\underline{H}_3$); 2,7–2,9 (2H, m, PhC$\underline{H}_2$); 3,1–3,2 (3H, m, PhCOCH_2, C$\underline{H}$COOCH_3);
3,7 (3H, s, COOCH_3); 7,1–7,35 (2H, m, Ar); 7,8 (1H, s, Ar).

d) Herstellung von (R,S)-6-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoesäuremethylester 4b

[0091] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für (R,S)-6-Methoxy-7-fluor-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoesäuremethylester 4a verwendet wurde, wobei Methylester 3b als Ausgangsprodukt eingesetzt wurde (Ausbeute 94%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$), Varian 200 MHz), δ (ppm):
1,7–1,95 (1H, m, C$\underline{H}$HCHCOCCl_3); 2,1–2,3 (1H, m, CH$\underline{H}$CHCOOCH_3); 2,3 (3H, s, PhC$\underline{H}_3$);
2,6–2,85 (3H, m, PhC$\underline{H}_2$CHCOOCH_3, C$\underline{H}$COOCH_3);
2,9–3, 0 (2H, d, PhC$\underline{H}_2$CH_2);
3,72 (3H, s, COOC$\underline{H}_3$); 6,85–7,1 (3H, m, Ar).

h) Herstellung von (R,S)-6-Methyl-7-acetyl-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoesäuremethylester 8

[0092] 3,8 g (0,0186 mol) (R,S)-6-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoesäuremethylester 4b wurden in 30 ml Methylenchlorid aufgelöst; 5,2 g Aluminiumchlorid wurden zu der Lösung, die unter einer Stickstoffatmosphäre auf 5°C gekühlt war, gegeben und 1,6 ml Acetylchlorid wurden tropfenweise bei der gleichen Temperatur unter Rühren zugegeben.
[0093] Die Reaktionsmischung konnte bei Raumtemperatur 1,5 h reagieren, woraufhin die Mischung durch sehr langsame Zugabe von 100 ml kaltem Wasser unter Rühren gekühlt wurde. Die Lösung wurde wiederholt mit 100 ml (Gesamtvolumen) Methylenchlorid extrahiert und wiederholt mit kaltem Wasser gewaschen.
[0094] Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat wasserfrei gemacht und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, unter Erhalt eines dunklen Feststoffes, der getrocknet wurde, unter Erhalt von 3,8 eines Rohproduktes, das durch Silikagel-Säulenchromatographie (50 ml) gereinigt wurde, wobei n-Hexan/Ethylacetat 8 : 2 als Lösungsmittel verwendet wurde. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, unter Erhalt von 1,8 g des Produktes (Ausbeute 40%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ (ppm):
1,78–2,0 (1H, m, C$\underline{H}$HCHCOCOOCH_3);
2,1–2,3 (1H, m, CH$\underline{H}$CHCOOCH_3); 2,45 (3H, s, COC$\underline{H}_3$);
2,55 (3H, s, PhC$\underline{H}_3$);
2,65–2,85 (3H, m, PhC$\underline{H}_2$CHOOOCH_3, C$\underline{H}$COOCH_3);
2,95 (2H, d, PhCH_2CH_2); 6, 95 (1H, s, Ar); 7,45 (1H, s, Ar).

i) Herstellung von (R,S)-6-Methyl-7-acetyl-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoesäure 9

[0095] Die Herstellung ist grundsätzlich ähnlich zu der, wie sie für (R,S)-6-Methoxy-7-fluor-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoesäure 5 verwendet wurde, wobei Methylester 8 als Ausgangsprodukt, 1,5 h bei Rückflusstemperatur als Reaktionszeit und n-Hexan/Ethylacetat als Kristallisationsmischung eingesetzt wurden (Ausbeute 82%).
^{1}H-NMR ($CDCl_3$), Varian 300 MHz, δ (ppm):
2,78–2,92 (1H, m, C$\underline{H}$HCHCOOH); 2,1–2,25 (1H, m, CH$\underline{H}$CHCOOH);
2,4 (3H, s, COC$\underline{H}_3$); 2,5 (3H, s, PhC$\underline{H}_3$);
2,7–2,9 (3H, m, PhC$\underline{H}_2$CHOOOH, C$\underline{H}$COOH);

2,9–3,0 (2H, d, PhC$\underline{H}_2$CH_2); 6,9 (1H, s, Ar); 7,4 (1H, s, Ar).

I) Herstellung von (R,S)-2-Amino-6-methyl-7-acetyltetralin-Hydrochlorid (ST 1274) 10

[0096] 6,5 g (0,028 mol) (R,S)-6-Methyl-7-acetyl-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthoesäure 9 wurden in 40 ml wasserfreiem Aceton suspendiert; 4,3 ml (0,0307 mol) Triethylamin wurden langsam tropfenweise zu der Suspension gegeben. Die Lösungstemperatur wurde auf –5°C gebracht und 2,95 ml (0,0307 mol) Ethylchlorformiat, das in 4 ml Aceton aufgelöst war, wurden langsam tropfenweise zugegeben.
[0097] 3,65 g (0,056 mol) Natriumazid, das in 80 ml Wasser aufgelöst war, wurden tropfenweise zur Lösung gegeben, wobei die Temperatur bei 0°C gehalten wurde; die erhaltene Mischung wurde 1 h unter Rühren bei 0°C gehalten, unter Erhalt eines Präzipitates. Nach Zugabe von weiteren 8 ml kaltem Wasser wurde die Lösung mit 100 ml Toluol extrahiert und die organische Lösung mit wasserfreiem Natriumsulfat dehydratisiert.
[0098] Die Lösung wurde zu 30 ml Toluol, das auf 100°C erwärmt war, gegeben und für weitere 1,5 h bei 100°C gehalten.
[0099] Das Lösungsmittel wurde durch Verdampfung unter Vakuum entfernt, unter Erhalt von 4,9 g eines dichten leicht gefärbten Öls, das in 50 ml 8 N HCl suspendiert war und auf 100°C unter Rühren für 1,5 h erwärmt wurde.
[0100] Das Lösungsmittel wurde durch Verdampfung unter Vakuum entfernt; 100 ml Wasser wurden dann zugegeben und die Suspension unter Rühren mit 4N Natriumcarbonat unter Kühlen in einem Eisbad auf pH 10 gebracht.
[0101] Die wässrige Lösung wurde in kleinere Mengen verteilt und mit 120 ml Ethylether extrahiert. Die organische Phase wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat dehydratisiert und gasförmige Salzsäure in die somit erhaltene Etherlösung geblubbert.
[0102] Das so erhaltene Präzipitat wurde unter Vakuum abfiltriert und an Luft getrocknet, unter Erhalt von 2,3 g eines leicht gefärbten Feststoffes, der mit einer Mischung aus Ethylacetat/Methanol kristallisiert wurde. Der Feststoff wurde in dem Ofen zur Trockne gebracht, unter Erhalt von 2 g eines farblosen kristallinen Produktes (Ausbeute 30%). Schmelzpunkt: 195–197°C unter Zersetzung.
^{1}H-NMR, (CD_3OD); Varian 300 MHz, δ (ppm):
1,75–1,85 (1H, m, C$\underline{H}$HCHN+); 2,15–2,3 (1H, m, CH$\underline{H}$CHN+);
2,42 (3H, s, C$\underline{H}_3$CO); 2,53 (3H, s, C$\underline{H}_3$Ph);
2,8–3,0 (4H, m, PhC$\underline{H}_2$CHN+), PhC$\underline{H}_2$CH_2); 3,5–3,65 (1H, m, C$\underline{H}$N+);
7,05 (1H, s, Ar); 7,6 (1H, s, Ar).
[0103] Die am meisten angewandte methodologische Annäherung für die Zwecke der Ermittlung der möglichen Schutzwirkung einer Substanz bei einem septischen Schock bei vorklinischen Versuchen ist die Anwendung von experimentellen Modellen der Vergiftung mit einer toxischen Substanz (Exo- oder Endotoxin), die direkt in das Labortier injiziert oder in massiven Mengen durch Infizieren der Zellen freigesetzt wird, mit denen das Tier geimpft ist.
[0104] Die Beschreibung der folgenden pharmakologischen Tests zeigen die Ergebnisse, die mit der Verbindung gemäß dieser Erfindung erhalten wurde, im Vergleich mit den Referenzverbindungen (R,S)-2-Amino-6-fluor-7-methoxytetralin-Hydrochlorid (ST 626) und denen der Beispiele 1–6.
[0105] Wie oben erwähnt, ist die Verbindung ST626 eine bereits bekannte Verbindung, die den Verbindungen dieser Erfindung strukturell ähnlich ist und eine ähnliche pharmakologische Aktivität aufweist.
[0106] Diese Ergebnisse demonstrieren die verhindernde und therapeutische Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindung und geben ebenfalls Anzeichen bezüglich des möglichen Mechanismus der Wirkung, die für das vorteilhafte pharmakologische Profil der Referenzverbindung St1239 verantwortlich ist, nämlich eine drastische Verminderung der Entzündungszytokingehalte (TNF, IL-1β, IL-6 und IFN-γ) im Blut.
[0107] Auswirkung der Wirkung von ST 1238, ST 1274 und ST 1275 in Mäusemodellen des septischen Schocks
[0108] Männliche Balb/C-Mäuse (C. River) mit einem Alter von ungefähr 6 Wochen wurden verwendet (10 Tiere pro experimentelle Gruppe).
[0109] Die Tiere, die in Käfigen bei 22 ± 2°C und 50 ± 15% relativer Feuchtigkeit mit 12 h Licht (7 Uhr bis 19 Uhr) und 12 h Dunkelheit (19 Uhr bis 7 Uhr) hausten, hatten unbeschränkten Zugang zu Nahrungsmittel und Trinkwasser.
[0110] Die verwendeten Substanzen waren: LPS (Escherichia coli Serotyp = 26 : B6), Charge Nr. 73570 (Difco), LPS (Salmonella typhosa) Charge Nr. 81H4018 (Sigma); SEB (Staphylococcus aureus), Charge Nr. 144H4024 (Sigma) und D-Galactosamin, Charge Nr. 031EE002485 (Merck).
[0111] Die untersuchten Verbindungen waren ST1238, ST1274 und ST1275.
[0112] Der pH der Verbindungslösung wurde, falls erforderlich, mit 0,1 N NaOH (wobei die Lösung kalt und unter Rühren erhalten wurde) korrigiert, unter Erhalt von Werten mit einem pH von nicht weniger als 5,5. Lethalität, die durch S. typhosa LPS induziert war

[0113] Die Tiere wurden intraperitoneal (i.p.) mit S. typhosa LPS behandelt. Vor der Verwendung wurde das Endotoxin zunächst in steriler Saline aufgelöst und dann in einem Volumen von 200 µl bei der Dosis von 27,0 mg/kg, was etwa LD_{80} entspricht, injiziert wird.
[0114] Die untersuchten Verbindungen wurden intravenös (i.v.) in einem Volumen von 200 µl steriler Saline bei der Dosis, die ungefähr 1/10 LD_{50} entspricht, 30 min vor und erneut 5 min nach der endotoxinen Aussetzung (LPS) verabreicht.

Durch E. coli LPS in Mäusen, die mit D-Glatactosamin sensibilisiert sind, induzierte Lethalität

[0115] Die Tiere wurden mit D-Galactosamin (1000 mg/kg, i.p.) sensibilisiert und gleichzeitig mit E. coli LPS (0,30 mg/kg, i.p.) mit einem Gesamtvolumen von 200 µl behandelt.
[0116] Die Dosis des verwendeten LPS entsprach ungefähr 1/10 LD50 bei den mit D-Galactosamin sensibilisierten Tieren.
[0117] Die untersuchten Verbindungen wurden intravenös (i.v.) in einem Volumen von 200 µl steriler Saline bei der Dosis, die ungefähr 1/10 LD_{50} entsprach, 30 min vor und 5 min nach oder 5 und 30 min nach dem Aussetzen mit LPS verabreicht.

Durch SEB (Staphylococcus aureus) bei Mäusen, die mit D-Galactosamin sensibilisiert waren, induzierte Lethalität.

[0118] Die Tiere wurden mit D-Galactosamin (1000 bis 1500 mg/kg, i.p.) sensibilisiert und gleichzeitig mit dem Enterotoxin SEB (3 mg/kg, i.p.) in einem Gesamtvolumen von 200 µl behandelt. Die verwendete SEB-Dosis entsprach ungefähr LD80 und wurde in einem Vorexperiment ausgedrückt.
[0119] Die untersuchten Verbindungen wurden intravenös (i.v.) in einem Volumen von 200 µl steriler Saline bei der Dosis, die ungefähr 1/10 LD50 entspricht, 30 min vor und 5 min nach oder 5 min und 30 min nach dem Aussetzen mit SEB verabreicht.
[0120] Die Überlebensrate wurde täglich für 10 Tage bei allen Experimenten überprüft, wobei der Tag festgestellt wurde, wenn ein Tier starb.
[0121] Die statistische Signifikanz der Schutzwirkung wurde im einseitigen Fisher-Exakttest ausgewertet.

Ergebnisse

Durch S. typhosa LPS induzierte Lethalität

[0122] Bei diesem experimentellen Modell des endotoxischen Schocks mit S. typhosa LPS vermindern die Verbindungen ST1274 und ST1275 signifikant die Lethalität, wenn sie vor und nach der Aussetzung verabreicht werden ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) (Tabelle 1).

Tab. 1 – Wirkung der 5T1274 und ST1275 i.v.-Verabreichung auf die Lethalität, die bei Mäusen durch die Injektion von S. typhosa LPS induziert wird. Vor-/Nach-Ausssetzungsbehandlungsplan (–30 und +5 min).

Behandlung (Dosis)	Todesfälle/ insgesamt	Erhöhung der Überlebensrate[a] (%)	P[b]
LPS Kontrolle	14/20	-	-
ST 626 (6 mg/kg,i.v.)	6/20	+40	<0,05
LPS Kontrolle	18/20	-	-
ST 1274 (5,5 mg/kg,i.v.)	10/20	+40	<0,01
LPS Kontrolle	10/10	-	-
ST 1275 (4 mg/kg, i.v.)	6/10	+40	<0,05

[a] Prozentsatz der Erhöhung der Überlebensrate bei den behandelten Tieren im Vergleich zur LPS Kontrolle.
[b] Statistische Signifikanz, ausgewertet durch den einseitigen Fisher-Exakttest.

Lethalität, induziert durch E. coli LPS in Mäusen, die mit D-Galactosamin sensibilisiert sind

[0123] Die Verbindung ST1238 reduziert signifikant die Lethalität bei beiden temporären Behandlungsproto-

kollen ($p < 0,001$ und $p < 0,01$) (Tabellen 2 und 3), während die Verbindungen ST1274 und ST1275 eine nicht signifikante Erhöhung des Prozentsatzes bei der Überlebensrate (20%) nur bei dem Vor- und Nach-Aussetzungsverabreichungsprotokol ergibt (Tabelle 2).

Tab.2: Wirkung der ST1238, ST1279 und ST1275 i.v.-Verabreichung auf die Lethalität, die durch Injektion von E. coli LPS bei Mäusen, die mit D-Galactosamin sensibilisiert sind, induziert wird. Vor-/Nach-Aussetzungsbehandlungsplan (–30 und +5 min).

Behandlung (Dosis)	Todesfälle/ insgesamt	Erhöhung der Überlebensrate[a] (%)	P[b]
LPS+D-GalN Kontrolle	25/29	-	-
ST 626 (6 mg/kg, i.v.)	21/28	+11	ns
LPS+D-GalN Kontrolle	17/20	-	-
ST 1238 (18 mg/kg, i.v.)	5/20	+60	<0,001
LPS+D-GalN Kontrolle	7/10	-	-
ST 1274 (5,5 mg/kg, i.v.)	5/10	+20	ns
LPS+D-GalN Kontrolle	7/10	-	-
ST 1275 (4 mg/kg, i.v.)	5/10	+20	ns

[a] Prozentsatz der Erhöhung der Überlebensrate bei den behandelten Tieren im Vergleich zur LPS Kontrolle.
[b] Statistische Signifikanz, ausgewertet durch den einseitigen Fisher-Exakttest.

Tabelle 3% Wirkung der ST1238 i.v.-Verabreichung auf die durch Injektion von E. coli LPS bei Mäusen, die mit D-Galactosamin sensibilisiert waren, induzierte Lethalität. Behandlungsplan nur für die nachfolgende Behandluna (+5 und +30 min).

Behandlung (Dosis)	Todesfälle/ insgesamt	Erhöhung der Überlebensrate[a] (%)	P[b]
LPS+D-GalN Kontrolle	16/20	-	-
ST 1238 (18 mg/kg, i.v.)	7/19	+44	<0,01

[a] Prozentsatz der Erhöhung der Überlebensrate bei den behandelten Tieren im Vergleich zur LPS Kontrolle.
[b] Statistische Signifikanz, ausgewertet durch den einseitigen Fisher-Exakttest.

Lethalität, die durch SEB (Staphylococcus aureus) in mit D-Galactosamin sensibilisierten Mäusen induziert ist.

[0124] Mit diesem experimentellen Modell reduzieren alle Verbindungen die Lethalität im Vergleich zu den Kontrollen (70–90%), wenn sie 30 min vor und 5 min nach der Aussetzung verabreicht werden (Tabelle 4). ST1238 hält noch eine extrem signifikante Schutzwirkung bei dem Behandlungsplan nur nach der Aussetzung ($p < 0,001$) aufrecht (Tabelle 5).

Tab. 4: Wirkung der ST1238, ST1274 und ST1275 i.v.-Verabreichung auf die Lethalität, die durch Injektion von LPS von SEB-Enterotoxin in Mäusen, die mit D-Galactosamin sensibilisiert sind, induziert ist. Vor- und Nachaussetzungsbehandlungsplan (–30 und +5 min).

Behandlung (Dosis)	Todesfälle/ insgesamt	Erhöhung der Überlebensrate[a] (%)	P[b]
SEB+D-GalN Kontrolle	15/20	-	-
ST 1238 (18 mg/kg, i.v.)	1/20	+70	<0,001
SEB+D-GalN Kontrolle	9/10	-	-
ST 1274 (5,5 mg/kg, i.v.)	0/10	+90	<0,001
SEB+D-GalN Kontrolle	9/10	-	-
ST 1275 (4 mg/kg, i.v.)	1/10	+80	<0,01

[a] Prozentsatz der Erhöhung der Überlebensrate bei den behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrolle.
[b] Statistische Signifikanz, ausgewertet durch den einseitigen Fisher-Exakttest.

Tab.: 5: Wirkung der ST1238 i.v. Verabreichung auf die Lethalität, die durch Injektion von LPS von SEB Enterotoxin in Mäusen, die mit D-Galactosamin sensibilisiert sind, induziert wird. Behandlungsplan nur mit der Nachaussetzung (+5 und +30 min).

Behandlung (Dosis)	Todesfälle/ insgesamt	Erhöhung der Überlebensrate[a] (%)	P[b]
SEB+D-GalN Kontrolle	18/20	-	-
ST 1238 (18 mg/kg, i.v.)	4/20	+70	<0,001

[a] Prozentsatz der Erhöhung der Überlebensrate bei den behandelten Tieren im Vergleich zur LPS Kontrolle.
[b] Statistische Signifikanz, ausgewertet durch den einseitigen Fisher-Exakttest.

Auswertung der Wirkung von ST1238 auf Serum-TNF (Tumor-Necrosefaktor)-Gehalte, die durch LPS in Rattenblutkultur induziert sind.

[0125] Kulturen der gesamten Blutzellen, die durch LPS stimuliert sind, wurden als experimentelles Modell verwendet. Dieses Modell minimiert zwar mit gewissen Beschränkungen die physiophathologischen Aspekte von Endotoxämie eines Syndroms, bei dem Gram-negative Bakterien Lipopolysaccharid in dem Blutstrom freisetzen, das somit mit den Immunsystemzellen in Kontakt gelangt.
[0126] Tatsächlich wurde dieses Modell vor kurzem für die Auswertung von potenziellen Inhibitoren der Freisetzung von TNF und IL-1 angewandt (GC Rice et al., Shock, 4: 254–266, 1994. AJH Gearing et al., Nature, 370: 555–557, 1994. K. Tschaikowsky, Biochim. Biophys. Acta 1222 113–121, 1994. A Haziot et al., J. Immunol. 152: 5868–5876, 1994).
[0127] Männliche Wistar-Ratten (C. River) mit einem Gewicht von etwa 175–200 g wurden verwendet.
[0128] Die Tiere, die in Käfigen bei 22 ± 2°C und 50 ± 15% relativer Feuchtigkeit mit 12 h Licht (7 bis 19 Uhr) hausten, hatten uneingeschränkten Zugang zu Nahrungsmittel und Trinkwasser.
[0129] Die untersuchte Verbindung war ST1238.
[0130] Das verwendete Endotoxin war: LPS von Salmonella typhosa-Charge 81H4018 (Sigma).

Behandlung von Blutproben

[0131] Heparinisierte Blutproben, 0,450 ml/Ampullen, wurden von Wistar-Ratten entnommen, die durch Köpfung getötet waren.
[0132] Volumen von 0,025 ml (Lösung 20 ×) der Testverbindungen (Endkonzentration 0,050 mM), die in steriler Saline aufgelöst waren, wurden zu den Ampullen mit den Blutproben gegeben.

[0133] 0,025 ml (Sol 20 ×) Salmonella typhosa LPS (Endkonzentration in LPS gleich 1 µg/ml) wurden zu den Proben gegeben, die 1 h bei 37°C in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 5% CO_2 inkubiert waren.
[0134] Die Proben wurden unter den gleichen Bedingungen 4 h inkubiert und dann 5 min bei 10.000 U/min zentrifugiert, und der Überstand wurde bei –80°C für den TNF-Assay gelagert.
[0135] Die biologische TNF-Aktivität wurde in RPMI-Medium mit 1% FCS bestimmt .

Biologischer TNF-Assay

[0136] Für den TNF-Assay wurden Serienverdünnungen der Proben (50 µl) mit TNF direkt in Primaria 96-Well-Mikrotiter-Platten gegeben; Actinomycin-D-mannit (50 µl) bei einer Endkonzentration von 4 µg/ml, hergestellt in RPMI-Medium, versetzt mit 1% FCS, wurde zu den Wells gegeben. Dieser Inhibitor erhöht die Zellsensibilität für TNF.
[0137] 100 µl einer Suspension (standardisiert bei 4×10^5 Zellen/ml) L929 (Mäuse Fibrosarcoma, sensitiv für die toxische Wirkung von TNF) wurden in jede Well gegeben. Angemessene Kontrollen, d. h. die Actinomycin-D-Kontrolle (Zellen + Actinomycin-D, aber ohne TNF) und die Zellkontrolle (Zellen + Kulturmedium alleine) wurden ebenfalls hergestellt.
[0138] Nach weiterer Inkubation für 18 bei 37°C mit 5% CO_2 wurden die Zellen mit einer frisch hergestellten Lösung 1 mg/ml XTT (Natrium-3'-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-meth-oxy-6-nitro)benzolsulfonsäure-hydrat) und 125 µM PMS (Phenazinmethosulfat) entsprechend dem unten beschriebenen Verfahren gefärbt.
[0139] XTT wird in RPMI-Medium bei 60°C aufgelöst (1 mg/ml).
[0140] 100 mM PMS-Mutterlösung (stabil für etwa 20 Tage bei +4°C im Dunklen) wird durch Auflösen von PMS in PB5 mit anschließender kurzer Ultraschallwellen-Behandlung hergestellt, um so das PMS vollständig aufzulösen. Die 100 mM PMS-Lösung wird dann 1 : 800 in XTT verdünnt, unter Erhalt einer Endkonzentration von 125 µM in PMS und 1 mg/ml in XTT. Die Färbemischung muss vor der Verwendung filtriert werden.
[0141] Zellen wurden durch Zugabe von 50 µl/Well der XTT-PMS-Färbelösung gefärbt unter Erhalt eines Endvolumens von 250 µl/Well mit Endkonzentrationen von 0,2 mg/ml in XTT und 25 µM in PMS. Eine Blindprobe wurde ebenfalls in Wells mit 200 µl Kulturmedium + 50 µl XTT-PMS-Lösung hergestellt.
[0142] Die Mikrotiterplatten werden 2–2,5 h bei 37°C mit 5% CO_2 inkubiert (gesamte Inkubationszeit = etwa 20 h).
[0143] Die Absorbanzwerte einer jeden Probe wurden mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Lesewellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen (das Mikrotiterplatten-Lesegerät wurde programmiert, um den Wert von dem Probenwert abzuziehen, der für die Blindprobe erhalten wurde).
[0144] Der TNF-Titer wurde entsprechend dem folgenden Verfahren berechnet.
[0145] Gemäß Definition ist eine Einheit einer biologischen Aktivität durch den semimaximalen Wert (= 50%) der Actinomycin-D-Absorbanz gegeben.
[0146] Probenverdünnungen ergeben eine Absorbanzwertkurve, deren linearer Bereich durch die Gleichung $y = ax + b$ beschrieben wird.
[0147] Nach Einfügen der a- und b-Werte (erhalten von der linearen Regressionsanalyse durch den Computer) und nach Substituieren des semimaximalen Absorbanzwertes (entsprechend einer biologischen Einheit) der Actinomycin-D-Kontrolle für y wird die Gleichung für x gelöst, was den reziproken Wert der Probenverdünnungen darstellt. Der erhaltene Wert gibt den TNF-Titer in U/ml.
[0148] Die Daten wurden statistisch unter Verwendung des zweiseitigen Student-t-Test analysiert.

Ergebnisse

[0149] Die erhaltenen Ergebnisse (Tabelle 6) zeigen, dass die Verbindung ST1238 die TNF-Produktion durch Rattenblutkulturen, die mit LPS stimu- liert sind, reduziert (39%).

Tab. 6: Wirkung von ST1238 auf die TNF-Produktion, die in Rattenblutkulturen (n = 5) induziert wird, die mit S. typhosa LPS (1 µg (ml) stimuliert sind. Die Verbindungen wurden bei einer Konzentration von 50 µm getestet. Die experimentellen Bedingungen sind solche wie in Materialien und Methoden beschrieben.

Behandlung	TNF (mittlere %-Werte	Standard-Abweichung	p*
LPS Kontrolle	100	0	-
LPS+ST 1238	61	25	<0,01

* Statistische Signifikanz, ausgewertet durch den zweiseitigen Student-t-Test.

Auswirkung der Wirkung von ST 1238 auf Serum TNF-Gehalte in zwei Mäuse-Schock-Modellen.

[0150] Männliche BALB/c-Mäuse (C. River) mit einem Alter von ungefähr 6 Wochen wurden verwendet (10 Tiere pro experimentelle Gruppe).
[0151] Die Tiere, die in Käfigen bei 22 ± 2°C und 50 ± 15% relativer Feuchtigkeit mit 12 h Licht (7 bis 19 Uhr) und 12 h Dunkelheit (19 bis 7 Uhr) hausten, hatten uneingeschränkten Zugang zu Nahrungsmittel und Trinkwasser.
[0152] Die untersuchte Verbindung war ST 1238.
[0153] Die verwendeten Substanzen waren: LPS (von E. coli Serotyp = 26 : B6, Charge 73570 JB (Difco), SEB (Staphylococcus aureus), Charge 144H4024 (Sigma), D-Galctosamin, Charge 031EE002485 (Merck).

Lethalität, die durch E. coli LPS in Mäusen induziert wird, die mit D-Galactosamin sensibilisiert sind

[0154] Die experimentellen Bedingungen waren exakt die gleichen wie sie oben beschrieben sind.

Lethalität, induziert durch SEB (Staphylococcus aureus) in Mäusen, die mit D-Galactosamin sensibilisiert sind.

[0155] Die experimentiellen Bedingungen waren exakt die gleichen wie oben beschrieben.

Blutproben

[0156] Bei beiden experimentellen Methoden wurden Proben 90 min nach der Aussetzung gezogen (Peak Serum TNF-Gehalt).
[0157] Mit Ether anästhesierte Mäuse wurden durch retro-orbitale Sinuspunktur zum Bluten gebracht.
[0158] Blutproben wurden bei Raumtemperatur 2 h inkubiert und somit erhaltenes Serum 20 min bei 3000 U/min zentrifugiert und bei –80°C für den TNF-Assay gelagert.

Biologischer TNF-Assay

[0159] Die biologische TNF-Aktivität wurde in RPMI-Medium mit 1% FCS bestimmt.
[0160] 50 µl/Well Serienverdünnungen von Proben mit TNF wurden direkt zu Primaria-Mikrotiterplatten gegeben. Die experimentellen Bedingungen waren die gleichen wie oben beschrieben.
[0161] Die Daten wurden statistisch unter Verwendung eines einseitigen Student-t-Tests analysiert.

Ergebnisse

Lethalität, induziert durch E. coli LPS in Mäusen, die mit D-Galactosamin sensibilisiert sind.

[0162] Die bei diesem experimentellen Modell erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7 angegeben. Die Verbindung ST 1238 reduziert signifikant die TNF-Gehalte, die durch E. coli LPS induziert sind, mit beiden Behandlungsplänen (Vor-/Nach- und nur Nach-Aussetzung; $p < 0,008$ bzw. $p < 0,0001$).

Tab.: 7 Wirkung der ST 1238, 18 mg/kig, i.v.-Verabreichung auf die TNF-Produktion durch Injektion von E. coli LPS in Mäusen, die mit D-Galactosamin sensibilisiert sind.
Vor- und Nach-Aussetzungsbehandlungsplan (–30 und +5 min) und Behandlungsplan nur für die Nachaussetzung (+5 und +30 min).

	-30/+5 min Plan			+5/+30 min Plan		
	TNF /(U/ml)			TNF (U/ml		
Behandlung	Mittel-wert	S.D.	P	Mittel-wert	S.D.	P
LPS Kontrolle*	154,2	41,0	-			
ST 626 (6 mg/kg, i.v.)	35,0	10,0	<0,01			
LPS + D-GalN Kontrolle	13,6	4,7	-	18,1	1,8	-
ST 1238	0,4	0,2	0,008	2,2	0,6	0,0001

* Experiment durchgeführt mit Salmonella typhosa LPS.

[0163] Lethalität, die durch Enterotoxin SEB in Mäusen, die mit D-Galactosamin sensibilisiert sind, induziert wird.
[0164] Die mit diesem experimentellen Modell der TNF-Produktion, die durch LPS von SEB Enterotoxin in Tieren induziert wird, die mit D-Galactosamin sensibilisiert sind, erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Verbindung ST 1238 signifikant die TNF-Produktion sowohl mit dem Vor-/Nachaussetzungs-Plan ($p < 0,0001$) als auch mit dem Nachaussetzungsplan ($p < 0,0002$) reduziert.

Tab. 8: Wirkung der ST 1238, 18 mg/kg, i.v.-Verabreichung auf die TNF-Produktion, induziert durch LPS von SEB Enterotoxin bei Mäusen, die mit D-Galactosamin sensibilisiert sind.
Vor- und Nachaussetzung (–30 und +5 min) und nur Nachaussetzungsbehandlungsplan (+5 und +30 min).

	-30/+5 min Plan			+5/+30 min Plan		
	TNF /(U/ml)			TNF (U/ml		
Behandlung	Mittel-wert	S.D.	P	Mittel-wert	S.D.	P
SEB + D-GalN Kontrolle	240,9	49,4	-	240,9	49,4	-
ST 1238	6,2	3,0	0,0001	27,0	3,9	0,0002

[0165] Auswertung der Wirkung von ST 1238 auf Serum Interleukin-1 beta (IL-1β), Interleukin-6 (IL-6) und Interferon-gamma (IFN-γ), induziert durch Enterotoxin-SEB in Mäusen.
[0166] Männliche BALB/c-Mäuse (C. River) mit einem Alter von ungefähr 6 Wochen wurden verwendet (10 Tiere pro experimentelle Gruppe).
[0167] Die Tiere, die in Käfigen bei 22 ± 2°C und 50 ± 15% relativer Feuchtigkeit mit 12 h Licht (7 bis 19 Uhr) und 12 h Dunkelheit (19 bis 7 Uhr) hausten, hatten uneingeschränkten Zugang zu Nahrungsmittel und Trinkwasser. Die untersuchte Verbindung war ST1238.
[0168] Die verwendeten Substanzen waren LPS von SEB (Staphylococcus aureus), Charge 144H4024 (Sigma) und D-Galactosamin, Charge 031EE002485 (Merck).
[0169] Die Lethalität wurde durch S. aureus SEB in Mäusen, die mit D-Galactosamin sensibilisiert waren, induziert.
[0170] Die experimentellen Bedingungen waren exakt die gleichen wie oben beschrieben.

Blutproben

[0171] Die Blutproben wurden 2 h nach der Aussetzung bei IL-6; 4 h nach der Aussetzung bei IL-1β und 6 h Nachaussetzung bei IFN-g gezogen.
[0172] Durch Ether anästhetisierte Mäuse wurden durch retro-orbitale Sinuspunktur zum Bluten gebracht. Die Blutproben wurden bei Raumtemperatur 2 h inkubiert und das somit erhaltene Serum 20 min bei 3000 U/min zentrifugiert und bei –80°C bis zum Assay gelagert.

Biologische Tests

[0173] Biologische Tests wurden entsprechend den Vorgängen durchgeführt, die beiden jeweiligen verwendeten Assay-Kits angegeben sind
– Maus IL-1β Immunoassay (MLB00. R&D Systeme)
– Maus IL-6 EIA Kit (8-6706, durch septive Diagnostik)
– Maus IFN-γ EIA Kit (8-6716, durch septive Diagnostik).

[0174] Die Daten wurden statistisch unter Verwendung des einseitigen Student-t-Tests analysiert.

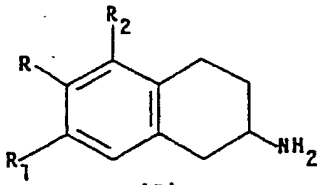
Ergebnisse

[0175] Die Verbindung ST 1238 reduziert sifnifikant die Produktion der untersuchten Entzündungszytokine ($p < 0{,}001$ für IL-1β; 0,0001 für IL-6; 0,01 für IFN-γ); die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 9 angegeben.
[0176] Tab. 9: Wirkung der ST 1238, 19 mg/kg, i.v. Verabreichung auf Serumgehalte von IL-1β, IL-6 und IFN-γ beim Intoxikationsmodell mit LPS von S. aureus SEB in Mäusen, die mit D-Galactosamin sensibilisiert sind; Vor- und Nachbehandlungsplan (–30 und +5 min).

	IL-1ß (pg/ml)			IL-6 (pg/ml)			IFN-γ (pg/ml)		
Behandlung	Mittel-wert	S.D.	P	Mittel-wert	S.D.	P	Mittel-wert	S.D.	P
SEB + D-Galactosamin Kontrolle	18	4	-	3493	558	-	40	3	-
ST 1238	0,9	0,5	0,001	599	163	0,0001	25	4	0,01

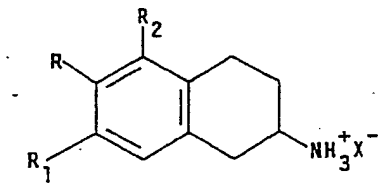
Patentansprüche

1. 2-Aminotetralin mit der Formel (I)



(I)

oder dessen pharmakologisch akzeptablen Salze mit Formel (II)



(II)

worin bedeuten:

R Methyl;
R_1 Acetyl;
R_2 Wasserstoff;
und X^- das monovalente Anion einer pharmakologisch akzeptablen Säure.

2. Verbindung nach Anspruch 1, worin das monovalente Anion einer pharmakologisch akzeptablen Säure ausgewählt ist aus Chlorid, Bromid, Orotat, saurem Aspartat, saurem Citrat, saurem Phosphat, Fumarat und saurem Fumarat, Lactat, Maleat und saurem Maleat, saurem Oxalat, saurem Sulfat, Glucosephosphat, Tartrat und saurem Tartrat.

3. Verwendung der Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Medikamentes zur Verhinderung und therapeutischen Behandlung von Entzündungs- und/oder Autoimmunerkrankungen, die durch Entzündungszytokine induziert sind.

4. Verwendung nach Anspruch 3, worin die Pathologien ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus rheumatoider Arthritis, Pankreatitis, entzündlichen Darmerkrankungen, systemischem Lupus erythematosus, Glomerulonephritis und Encephalomyelitis.

5. Verwendung nach Anspruch 3, worin die Pathologie septischer Schock ist.

6. Oral oder parenteral verabreichbare pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 als aktiver Bestandteil und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger und/oder Verdünnungsmittel.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen