



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 36 093 T2** 2008.05.15

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 158 971 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 36 093.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/03663**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 907 283.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/050026**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.02.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **31.08.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.12.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **22.08.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.05.2008**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 31/165** (2006.01)

C07C 233/65 (2006.01)

C07C 233/11 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

135511 P	23.02.1999	US
386601	31.08.1999	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:

icagen, Inc., Research Triangle Park, N.C., US

(72) Erfinder:

**MCNAUGHTON-SMITH, Grant Andrew, Morrisville,
NC 27560, US; RIGDON, Gregory Cooksey,
Durham, NC 27704, US; STOCKER, Jonathan
Walter, Durham, NC 27707, US**

(74) Vertreter:

Koepe & Partner Patentanwälte, 80538 München

(54) Bezeichnung: **ANTAGONISTEN DES GARDOS-KANALS**

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 vorliegende Anmeldung nimmt die Priorität der US Provisional Application mit dem amtlichen Aktenzeichen Nr. 60/135,511, eingereicht am 24. März 1999, in Anspruch.

Bereich der Erfindung

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft organische Verbindungen, die spezifische, potente bzw. wirksame und sichere Inhibitoren des durch Ca^{2+} -aktivierten Kalium-Kanals (Gardos-Kanals) von Erythrozyten sind. Noch spezieller betrifft die Erfindung Fluorsubstituierte Inhibitoren auf Triarylmethan-Basis, die eine bemerkenswert verstärkte Beständigkeit gegenüber einem Abbau in in vitro-Medien im biologischen Bereich zeigen und die längere in vivo Halbwertszeiten zeigen, bezogen auf ihre nicht-fluorierten Homologe.

Hintergrund der Erfindung

[0003] Die Sichelzell-Krankheit wurde in West-Afrika für einige Jahrhunderte erkannt. Sichelzell-Anämie und die Existenz von Sichel-Hämoglobin (Hb S) war die erste genetische Krankheit, die auf dem molekularen Niveau verstanden wurde. Sie wird heute erkannt als morphologisches und klinisches Ergebnis einer Substitution von Glycin nach Valin an der Position Nr. 6 der Beta-Globin-Kette (Ingram, Nature 178: 792–794 (1956)). Der Ursprung der Aminosäure-Änderung und des Krankheitszustands ist die Folge einer einzigen Nukleotid-Substitution (Marotta et al., J. Biol. Chem. 252: 5040–5053 (1977)).

[0004] Die Hauptursache von Krankhaftigkeit und Sterblichkeit von Patienten, die an der Sichelzell-Krankheit leiden, ist ein Gefäß-Verschluss, der durch die Sichelzellen hervorgerufen wird, was wiederholte Episoden von Schmerz sowohl in akuter als auch chronischer Form hervorruft und auch im Verlauf der Zeit eine laufende Organ-Schädigung hervorruft. Es wurde vor langem erkannt und akzeptiert, dass die Deformation und Verformung von Sichelzell-Erythrozyten bei vollständiger Deoxygenierung durch eine Polymerisation und intrazelluläre Gelierung von Sichelzell-Hämoglobin hervorgerufen wird, also Hämoglobin S (Hb S). Dieses Phänomen wird gut besprochen und diskutiert in Eaton et al., Blood 70:1245 (1987).

[0005] Die intrazelluläre Gelierung und Polymerisation von Hb S kann zu jeder beliebigen Zeit während der Reise eines Erythrozyten durch das Gefäßsystem auftreten. So können Erythrozyten in Patienten mit der Sichelzell-Krankheit, die kein polymerisiertes Hämoglobin S enthalten, durch die Mikrozirkulation hindurchtreten und zu den Lungen ohne Sichel-Bildung zurückkehren, können jedoch in den Venen Sicheln bilden oder können in Kapillargefäßen Sicheln bilden.

[0006] Die Wahrscheinlichkeit jedes dieser Ereignisse wird bestimmt durch die Verzögerungszeit für eine intrazelluläre Gelierung relativ zu der passenden Kapillar-Durchgangszeit (Eaton et al., Blood 47: 621 (1976)). Die Verzögerungszeit ist ihrerseits abhängig vom Oxygenierungszustand des Hämoglobins, wobei eine Deoxygenierung die Verzögerungszeit verkürzt. Wenn es thermodynamisch unmöglich ist, dass eine intrazelluläre Gelierung stattfindet, oder wenn die Verweilzeit bei venösen Sauerstoff-Drücken nicht länger als etwa 15 Sekunden ist, tritt eine Sichelbildung der Zelle nicht auf. Wenn die Verweilzeit zwischen etwa 1 und 15 Sekunden liegt, wird die rote Zelle in den Venen wahrscheinlich eine Sichel bilden. Wenn die Verweilzeit weniger als etwa 1 Sekunde ist, bilden rote Zellen Sicheln innerhalb der Kapillar-Gefäße.

[0007] Bei roten Zellen, die innerhalb der Kapillar-Gefäße Sicheln bilden, ist eine Zahl von Folge-Ereignissen möglich. Diese liegen zwischen dem Fehlen eines Effekts auf die Durchgangszeit über einen vorübergehenden Verschluss des Kapillar-Gefäßes bis zu einer mehr permanenten Blockade, die letztlich zu einer Ischämie oder einem Infarkt der umgebenden Zellen und zu einer anschließenden Zerstörung der roten Zelle führen kann.

[0008] Normale Erythrozyten bestehen aus etwa 70% Wasser. Wasser durchtritt eine normale Erythrozyten-Membran in Millisekunden. Ein Verlust von Zellwasser ruft einen exponentiellen Anstieg der Zytoplasma-Viskosität hervor, sobald die mittlere Zell-Hämoglobin-Konzentration (mean cell hemoglobin concentration; MCHC) über etwa 32 g/dl ansteigt. Da die Zytoplasma-Viskosität eine Hauptdeterminate der Erythrozyten-Verformbarkeit und der Sichelbildung eines Erythrozyten ist, hat die Dehydratisierung des Erythrozyten wesentliche rheologische und pathologische Folgen. Eine Regulierung der Erythrozyten-Dehydratation wurde als wichtiger therapeutischer Ansatz zum Behandeln der Sichelzell-Krankheit erkannt. Da Zellwasser irgendeiner osmotischen Änderung der intrazellulären Ionen-Konzentration folgt, ist die Aufrechterhaltung der Kalium-Konzentration einer roten Zelle von besonderer Wichtigkeit (Stuart et al., Brit. J. Haematol. 69: 1–4 (1988)).

[0009] Viele Ansätze zur therapeutischen Behandlung dehydratisierter Sichelzellen (und damit einer Senkung der Polymerisation von Hämoglobin S durch Senken der Osmolalität von Plasma) wurden versucht, jedoch mit beschränktem Erfolg, einschließlich der folgenden Ansätze: Intravenöse Infusion von destilliertem Wasser (Gye et al., *Am. J. Med. Sci.* 266: 267–277 (1973)); Verabreichung des anti-diuretischen Hormons Vasopressin zusammen mit einer hohen Flüssigkeitsaufnahme und Salz-Beschränkung (Rosa et al., *M. Eng. J. Med.* 303: 1138–1143 (1980)); (Charache et al., *Blood* 58: 892–896 (1981)); die Verwendung von Monensin zur Erhöhung des Kationengehalts der Sichelzelle (Clark et al., *J. Clin. Invest.* 70: 1074–1080 (1982)); (Fahim et al., *Life Sciences* 29: 1959–1966 (1981)); eine intravenöse Verabreichung von Cetiedilcitrat (Benjamin et al., *Blood* 67: 1442–1447 (1986)); (Berkowitz et al., *Am. J. Hematol.* 17: 217–223 (1981)); (Stuart et al., *J. Clin. Pathol.* 40: 1182–1186 (1987)); und die Verwendung von Oxpentifyllin (Stuart et al., a. a. O.).

[0010] Ein weiterer Ansatz in Richtung auf eine therapeutische Behandlung dehydratisierter Sichelzellen schließt eine Änderung des Kalium-Flusses eines Erythrozyten durch Ansprechen eines Calcium-abhängigen Kalium-Kanals ein (Ishi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (21): 11651–11656 (1997)). Dieser durch Calcium aktivierte Kalium-Kanal wird auch als der Gardos-Kanal bezeichnet (Brugnara et al., *J. Clin. Invest.* 92: 520–526 (1993)). Kürzlich wurde gezeigt, dass ein klonierter humaner, durch Calcium aktivierter Kalium-Kanal mit mittlerer Leitfähigkeit, hK1 im Wesentlichen ähnlich dem Gardos-Kanal in Bezug sowohl auf seine biophysikalischen als auch auf seine pharmakologischen Eigenschaften ist (Ishi, a. a. O.).

[0011] Verfahren, die verwendet wurden, um den Gardos-Kanal zu inhibieren, schließen die Verabreichung von Imidazol, Nitroimidazol und Thiazol umfassenden antimikotischen Mitteln wie beispielsweise Clotrimazol an Erythrozyten ein (US-Patent Nr. 5,273,992; Brugnara et al.). Es wurde gezeigt, dass Clotrimazol, ein Imidazol enthaltendes antimikotisches Mittel, ein spezieller potenter Inhibitor des Gardos-Kanals normaler Erythrozyten und Sichel-Erythrozyten ist und eine von Ca^{2+} -abhängige Dehydratisierung von Sichelzellen sowohl in vitro als auch in vivo verhindert (Brugnara, a. a. O.; De Franceschi et al., *J. Clin. Invest.* 93: 1670–1676 (1994)). Wenn es mit einer Verbindung kombiniert wird, die die Oxykonformation von Hb S stabilisiert, induziert Clotrimazol eine additive Reduktion der Verstopfungsrate eines Mikroporen-Filters und kann die Bildung irreversible Sichel bildender Zellen abschwächen (Stuart et al., *J. Haematol.* 86: 820–823 (1994)). Andere Verbindungen, die eine Heteroaryl-Einheit mit Ähnlichkeit zu Imidazol enthalten und von denen angenommen wird, dass sie nützlich sind bei einer Dehydratation von Sichelzell-Erythrozyten über eine Inhibierung des Gardos-Kanals, schließen Miconazol, Econazol, Butoconazol, Oxiconazol und Sulconazol ein. Obwohl gezeigt wurde, dass diese Verbindungen wirksam bei einer Reduzierung der Dehydratation von Sichelzellen sind, wurde gezeigt, dass andere Imidazol-Verbindungen nicht dazu fähig sind, den Gardos-Kanal zu inhibieren und einen Verlust von Kalium zu verhindern.

[0012] Die Druckschrift WO 97/34589 offenbart eine Klasse chemischer Verbindungen, die als wirksame Arzneimittel bei der Behandlung von Sichelzell-Krankheit und von Krankheiten beschrieben werden, die durch eine unerwünschte oder anormale Zell-Proliferation gekennzeichnet sind. Die aktiven Verbindungen sind substituierte Triarylmethan-Verbindungen oder Analoge davon, bei denen eine oder mehrere der Aryl-Gruppen ersetzt ist/sind durch eine Heteroaryl-Gruppe, Cycloalkyl-Gruppe oder Heterocycloalkyl-Gruppe, und/oder bei der/denen das tertiäre Kohlenstoff-Atom ersetzt ist durch ein davon verschiedenes Atom wie beispielsweise Si, Ge, N oder P. Es wurde berichtet, dass die Verbindungen eine Zell-Proliferation bei Säugern inhibieren, den Gardos-Kanal von Erythrozyten inhibieren, eine Dehydratation von Sichelzell-Erythrozyten verringern und/oder das Auftreten von Sichelzell-Bildung oder Deformation von Erythrozyten verzögern.

[0013] Da die Sichelzell-Anämie eine chronische Krankheit ist, zeigen Mittel, die zu ihrer Behandlung vorgesehen sind, idealerweise bestimmte charakteristische Eigenschaften, die weniger essentiell bei Arzneimitteln zur Behandlung heilbarer Krankheiten (z. B. Pilz-Infektionen) sind. Ein klinisch nützlicher Inhibitor für den Gardos-Kanal zeigt eine extrem niedrige Toxizität über einen längeren Zeitraum der Verabreichung, weist eine exzellente Bioverfügbarkeit auf, ist hochspezifisch für den Gardos-Kanal und ist potent bzw. wirksam in seinen Wechselwirkungen mit diesem Kanal.

[0014] Obwohl Clotrimazol und bestimmte verwandte Verbindungen – wie gezeigt wurde – den Gardos-Kanal inhibieren und einen Verlust von Kalium verhindern, sind diese Verbindungen weniger als ideale klinische Mittel für die Behandlung der Sichelzell-Anämie. Von primärer Bedeutung ist die Tatsache, dass gezeigt wurde, dass eine längere Verabreichung von Imidazol-Antimykotika zu Hepatotoxizität führt (siehe beispielsweise Rodriguez et al., *Toxicology* 6: 83–92 (1995); Findor et al., *Medicina* 58: 277–281 (1998); und Rodriguez et al., *J. Biochem. Toxicol.* 11: 127–131 (1996)). Die Neigung in Richtung auf Toxizität eines Mittels muss gewichtet werden mit anderen charakteristischen Eigenschaften wie beispielsweise seiner Bioverfügbarkeit, seine Selektivität für ein Target und seine Potenz bzw. Wirksamkeit.

[0015] Derzeit bekannte Inhibitoren des Gardos-Kanals haben kurze in vivo-Halbwertszeiten und niedrige Bioverfügbarkeiten. Diese Mängel sind von besonderer Bedeutung in Verbindung mit diesen Arzneimitteln, da sie regelmäßig über einen signifikanten Abschnitt der Lebenszeit einer Person verabreicht werden müssen. Mit derartigen Arzneimitteln ist die Einhaltung des Dosierungs-Plans durch den Patienten entscheidend, und je einfacher der Plan ist, desto wahrscheinlicher hält ein Patient diesen Plan ein. Die Inhibitoren des Gardos-Kanals, die geringe Bioverfügbarkeiten aufweisen, müssen häufig verabreicht werden, was das Risiko ausgelassener Dosierungen und – in der Folge – von Arzneimittel-Konzentrationen im Plasma erhöht, die inadäquat zum Verhindern der Dehydratation von Erythrozyten sind. Zusätzlich zu häufigem Dosieren müssen Mittel, die niedrige Bioverfügbarkeiten aufweisen, allgemein in höheren Dosierungen als analoge Mittel mit besserer Bioverfügbarkeit verabreicht werden. Bei höheren Dosierungen werden unerwünschte Nebenwirkungen und Toxizität ein sehr reales Problem.

[0016] Bartoli et al., *Arzneim. Forsch./Drug Res.*, 42, 6, 832–835 (1992) offenbaren die Synthese und vergleichbare in vitro-Aktivitäten von Difluor-Derivaten von Triphenylmethanimidazol-Verbindungen und anderen verwandten Verbindungen gegen eine Anzahl von Pilzen.

[0017] Zusätzlich zu ihrer niedrigen Bioverfügbarkeit haben bekannte Inhibitoren des Gardos-Kanals wie beispielsweise Clotrimazol auch eine relativ niedrige Potenz bzw. Wirksamkeit in ihrer Wechselwirkung mit dem Gardos-Kanal. Die niedrige Wirksamkeit der Verbindungen wird verschlimmert durch ihre niedrige Bioverfügbarkeit und ihre schnelle systemische Clearance bzw. ihr schnelles Verschwinden aus dem Organismus. Ein weiterer Nachteil vieler bekannter Inhibitoren des Gardos-Kanals ist die nichtspezifische Natur ihrer Wechselwirkungen mit durch Calcium aktivierten Kalium-Kanälen: Diese Mittel treten bereitwillig in Wechselwirkung mit durch Calcium aktivierten Kalium-Kanälen, die von dem Gardos-Kanal verschieden sind. Zusammengenommen erfordern die niedrige Wirksamkeit, die geringe Spezifität und die schlechte Bioverfügbarkeit bekannter Inhibitoren des Gardos-Kanals ein höheres und häufigeres Dosieren, wodurch sie das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen und von Toxizität erhöhen.

[0018] Im Hinblick auf die oben beschriebenen Nachteile bekannter Inhibitoren des Gardos-Kanals wird ein erheblicher Fortschritt bei der Behandlung von Sichelzellanämie von der Entdeckung von Inhibitoren des Gardos-Kanals erwartet, die Imidazol als Struktur-Komponente nicht enthalten, merklich bioverfügbar sind, langsam metabolisiert und abgeschieden werden und sowohl wirksam als auch spezifisch in ihren Wechselwirkungen mit dem Gardos-Kanal sind. Ganz überraschend stellt die vorliegende Erfindung Inhibitoren des Gardos-Kanals bereit, die diese charakteristischen Eigenschaften aufweisen.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0019] **Fig. 1** ist eine Auftragung (Plot) der mittleren Plasma-Konzentration gegen die Zeit für die Verbindungen 1 (i. v. (◆), oral (▲)), 3 (i. v. (*), oral (●)) und 18 (i. v. (■), oral (X)). Die Dosierungen waren i. v. (1 mg/kg) und oral (10 mg/kg).

Zusammenfassung der Erfindung

[0020] Ein Reduzieren der Dehydratation von Sichel-Erythrozyten über eine Blockade des Gardos-Kanals ist ein wirksamer therapeutischer Ansatz in Richtung auf die Behandlung und/oder Vorbeugung der Sichelzellanämie. Verbindungen, die in der Lage sind, den Gardos-Kanal zu inhibieren, als Mittel zum Verringern der Dehydratation von Sichelzellen sind in hohem Maße erwünscht und sind ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Obwohl von nachweislicher Wirksamkeit, sind Inhibitoren des Gardos-Kanals auf Imidazol-Basis, die bis heute erforscht wurden, benachteiligt durch einige Nachteile einschließlich eines gut dokumentierten Potentials für Hepatotoxizität. Diese Toxizität wird verschlimmert durch die geringe Wirksamkeit der Inhibitoren, nichtspezifische Wechselwirkungen mit durch Calcium aktivierten Kalium-Kanälen, die von dem Gardos-Kanal verschieden sind, und schlechten Bioverfügbarkeiten, und jede dieser Eigenschaften motiviert die Verabreichung höherer Dosierungen des Inhibitors sowie häufigere Verabreichungen.

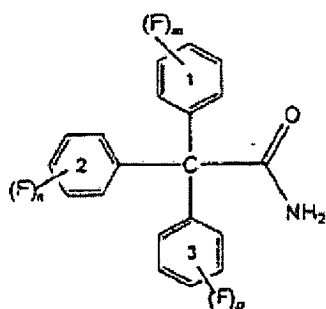
[0021] Im Gegensatz zu diesen bekannten Mitteln zeigt ein pharmazeutisch nützlicher Inhibitor des Gardos-Kanals der zweiten Generation eine längere Stabilität in einem biologischen Milieu sowie Wirksamkeit und Selektivität für den Gardos-Kanal. Ein ideales Mittel wird nach einer zweistündigen Inkubation in einem biologischen Milieu (z. B. in einer Mikrosomen-Zubereitung) zu weniger als 60% abgebaut und hat einen IC_{50} -Wert in Richtung auf den Gardos-Kanal von nicht mehr als 30 nM. Darüber hinaus sind diese Mittel wenigstens 100 Mal selektiver für den Gardos-Kanal als für andere Kalium-Kanäle, wie beispielsweise I_{Ks} .

[0022] Es wurde nun gefunden, dass Inhibitoren für den Gardos-Kanal auf Triphenylacetamid-Basis, in denen eine oder mehrere Phenyl-Gruppen mit einem oder mehreren Fluor-Atomen oder Fluor-enthaltenden Einheiten substituiert ist/sind, in vivo-Halbwertszeiten und in-vitro-Stabilitäten im Metabolismus aufweisen, die in überraschendem Umfang erhöht sind, relativ sowohl zu Clotrimazol als auch zu analogen nicht fluorierten Triphenylacetamiden. Beispielsweise ist Clotrimazol (19) nach zweistündigem Inkubieren in einer Leber-Mikrosomen-Zubereitung zu 94,2% abgebaut, und ein nicht fluoriertes Triphenylmethylacetamid (20) ist nach 2 Stunden zu 87% abgebaut. In bemerkenswertem Gegensatz dazu sind die beispielhaften difluorierten Verbindungen gemäß der Erfindung 3 und 5 nach einer ähnlichen Inkubationszeit nur zu 24% bzw. 29% abgebaut.

[0023] Obwohl Untersuchungen fluorierter Triphenylimidazol-Antimykotika gezeigt haben, dass diese fluorierten Mittel weniger schnell metabolisiert werden als ihre chlorierten Analoge, waren diese Mittel auch weniger pharmakologisch aktiv als Analoge chlorierte Derivate (siehe Conte et al., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 42: 854–858 (1992); und Bartoli et al., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 42: 832–835 (1992)).

[0024] Überraschenderweise jedoch wird genau der gegensätzliche Trend für die Verbindungen gemäß der Erfindung beobachtet: Die fluorierten Verbindungen sind nicht nur wirksamere, sondern auch selektivere Inhibitoren des Gardos-Kanals als Clotrimazol. Beispielsweise sind die Verbindungen 3 und 5 etwa acht- und zehnmal wirksamer als Clotrimazol gegenüber dem Gardos-Kanal. Darüber hinaus sind die Verbindungen 3 und 5 etwa sechzehn- bis siebzehnmals selektiver für den Gardos-Kanal, im Vergleich zu anderen Kalium-Ionen-Kanälen (z. B. I_{Ks}) als Clotrimazol.

[0025] Damit stellt in einem ersten Aspekt die vorliegende Erfindung eine Verbindung mit einer Struktur gemäß Formel (I) bereit:



(I)

worin

m, n und p unabhängig voneinander gewählt sind aus 0 und 1 und wenigstens einer der Indices m, n und p 1 ist; wenn m, n und p alle 1 sind, sind die Fluor-Substituenten an Ring 1 und an Ring 2 in einer Position angeordnet, die unabhängig gewählt ist aus ortho-Stellung zu dem Acetamid-Substituenten, in meta-Stellung zu dem Acetamid-Substituenten und para-Stellung zu dem Acetamid-Substituenten, und der Substituent an Ring 3 ist in einer Position angeordnet, die gewählt ist aus ortho-Position zu dem Acet-Substituenten und para-Position zu dem Acetamid-Substituenten; und

wenn p 0 ist und m 1 ist und n 1 ist, ist der Fluor-Substituent am Ring 1 in para-Position zu dem Acetamid-Substituenten, und der Substituent am Ring 2 ist in einer Position angeordnet, die gewählt ist aus ortho-Position zu dem Acetamid-Substituenten und para-Position zu dem Acetamid-Substituenten.

[0026] In einem zweiten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zubereitung bereit, die eine Verbindung gemäß Formel (I) in Mischung mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst. Eine derartige Zubereitung kann in Verfahren gemäß der Erfindung verabreicht werden.

[0027] Das Steuern von Krankheiten (z. B. der Sichelzell-Krankheit) über sich ändernde zelluläre Ionen-Flüsse von Zellen, die durch eine Krankheit befallen sind, ist ein wirksamer therapeutischer Ansatz. Darüber hinaus verspricht ein Basis-Verständnis der Rolle zellulärer Ionen-Flüsse sowohl in Krankheits-Prozessen als auch in der normalen Physiologie die Bereitstellung neuer therapeutischer Modalitäten, Dosierungspläne und Mittel. Verbindungen, die zelluläre Ionen-Ströme verändern, insbesondere diejenigen, die einen Kalium-Strom inhibieren, sind in hohem Maße erwünscht sowohl als Arzneimittel als auch als Sonden zum Aufklären der grundlegenden Mechanismen, die diesen Ionen-Strömen zugrunde liegen. In ähnlicher Weise sind Verfahren, die von diesen Verbindungen in der Grundlagen-Forschung und in therapeutischen Anmeldungen Gebrauch machen, wertvolle Werkzeuge im Arsenal sowohl des Forschers als auch des Klinikers. Daher sind solche Verbindungen und Verfahren ebenfalls ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

[0028] Damit stellt in einem dritten Aspekt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Inhibieren des Kalium-Stroms einer Zelle bereit. Das Verfahren umfasst ein In-Kontakt-Bringen einer Zelle mit einer Menge einer Verbindung gemäß Formel (I), die wirksam zum Inhibieren des Kalium-Stroms ist.

[0029] Ein wichtiger therapeutischer Weg zur Behandlung der Sichelzell-Krankheit ist ein Verhindern oder Verlangsamen der Dehydratation von Erythrozyten durch Manipulieren der zellulären Ionen-Ströme von Erythrozyten. So stellt in einem weiteren Aspekt die Erfindung ein Verfahren zum Reduzieren der Erythrozyten-Dehydratation bereit. Das Verfahren umfasst ein In-Kontakt-Bringen eines Erythrozyten mit einer Menge einer Verbindung gemäß Formel (I), die wirksam zum Reduzieren der Erythrozyten-Dehydratation ist.

[0030] In einem fünften Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Vorbeugung der Sichelzell-Krankheit bereit. Das Verfahren umfasst ein Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge einer Verbindung, die eine Struktur gemäß Formel (I) aufweist, an ein Subjekt, das unter der Sichelzell-Krankheit leidet.

[0031] Die Verbindungen gemäß der Erfindung stellen eine neue Klasse von Inhibitoren des durch Calcium aktivierten Kalium-Stroms bereit, die eine ausgezeichnete Beständigkeit gegenüber metabolischem Abbau und sowohl Selektivität als auch Wirksamkeit gegenüber dem Gardos-Kanal zeigen, die erhöht sind, relativ zu ihren nicht-fluorierten Analogen. So stellt in einem sechsten Aspekt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Verstärkung der Beständigkeit eines Calcium-Kanal-Inhibitors gegen Abbau in einem biologischen Medium bereit, der eine Triphenylmethyl-Einheit umfasst.

[0032] Diese und andere Gegenstände und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der detaillierten Beschreibung und den Beispielen, die folgen, offenbar.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung und der bevorzugten Ausführungsformen

Abkürzungen und Definitionen

[0033] „MCHC“ ist die mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration (mean corpuscular hemoglobin concentration).

[0034] „SAD-1“ ist ein transgenes Maus-Model der Sichelzell-Krankheit, wie es beschrieben wurde durch Trudel et al., EMBO J., 10(11): 3157–3165 (1991).

[0035] Der Begriff „biologisches Medium“, wie er in der vorliegenden Beschreibung und in den Patentansprüchen verwendet wird, bezieht sich sowohl auf biologische „in vitro-“ als auch „i -vivo-“Milieus. Beispiele von biologischen in vitro Medien schließen eine Zellkultur, eine Gewebekultur, Homogenate, Plasma und Blut ein. In vivo-Anwendungen werden allgemein durchgeführt in Säugern, vorzugsweise in Menschen.

[0036] Der Begriff „Fluoralkyl“ bezieht sich auf eine Unterklasse von „substituiertem Alkyl“, was Alkyl-Gruppen oder substituierte Alkyl-Gruppen einschließt, die entweder partiell fluoriert oder perfluoriert sind. Die Fluor-Substitution kann die einzige Substitution der Alkyl-Einheit sein, oder sie kann in im Wesentlichen jeder beliebigen Kombination mit irgendeinem anderen Substituenten oder irgendeiner anderen Gruppe von Substituenten vorliegen.

Einführung

[0037] Wie oben diskutiert, ist die Blockade der Sichelzell-Dehydratation über eine Inhibierung des Gardos-Kanals ein wirksamer therapeutischer Ansatz für die Behandlung von der und/oder die Vorbeugung gegen die Sichelzell-Krankheit. In vitro-Untersuchungen haben gezeigt, dass Clotrimazol, ein Imidazol-Gruppe enthaltendes antimykotisches Mittel, Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Strom und eine Zell-Dehydratation in Sichelzell-Erythrozyten blockiert (Brugnara et al., J. Clin. Invest. 92: 520–526 (1993)). Untersuchungen in einem transgenen Maus-Model für die Sichelzell-Krankheit, SAD-1-Maus (Trudel et al., EMBO J. 10 (11): 3157–3165 (1991)) zeigen, dass eine orale Verabreichung von Clotrimazol zu einer Inhibierung des Gardos-Kanals roter Zellen, zu einem erhöhten K^+ -Gehalt roter Zellen, einer verringerten mittleren korpuskulären Hämoglobin-Konzentration (MCHC) und zu einer abgesenkten Zell-Dichte führt (De Franceschi et al., J. Clin. Invest. 93: 1670–1676 (1994)). Darüber hinaus induziert eine Therapie mit oral verabreichtem Clotrimazol eine Inhibierung des Gardos-Kanals und verringert die Erythrozyten-Dehydratation in Patienten mit Sichelzell-Krankheit (Brugnara et al., J. Clin. Invest. 97: 1227–1234 (1996)). Andere antimykotische Mittel, die den Gardos-Kanal in vitro inhibie-

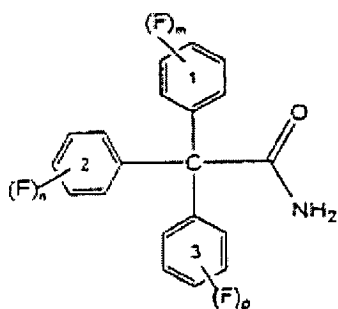
ren, schließen Miconazol, Econazol, Butoconazol, Oxiconazol und Sulconazol ein (US-Patent Nr. 5,273,992; Brugnara et al.). Alle diese Verbindungen enthalten einen Imidazol-artigen Ring, d. h. einen Heteroaryl-Ring, der zwei oder mehr Stickstoffe enthält.

[0038] Obwohl sie von nachweisbarer Wirksamkeit sind, sind Inhibitoren des Gardos-Kanals auf Imidazol-Basis, die bis heute erforscht wurden, durch einige Nachteile benachteiligt, die ein gut dokumentiertes Potential für Hepatotoxizität einschließen. Diese Toxizität wird verschlimmert durch die geringe Wirksamkeit der Inhibitoren, nicht spezifische Wechselwirkungen mit Kalium-Kanälen, die von dem Gardos-Kanal verschieden sind, und geringe Bioverfügbarkeiten; jeder dieser Nachteile motiviert die Verabreichung höherer Dosierungen der Inhibitoren und eine häufigere Verabreichung.

[0039] Zur Bereitstellung überlegener pharmazeutischer Mittel, die zur Inhibierung des Gardos-Kanals befähigt sind, müssen drei pharmakologische Kriterien erfüllt sein. Zum Einen müssen die Verbindungen in einem biologischen Milieu stabil sein, so dass wenigstens 40% der Verbindung nach zwei Stunden in diesem Milieu intakt bleiben. Weiter müssen die Verbindungen wirksame Inhibitoren des Gardos-Kanals sein, die einen IC_{50} -Wert gegenüber diesem Kanal von weniger als oder gleich 30 nM aufweisen. Zusätzlich zu ihrer Wirksamkeit gegenüber dem Gardos-Kanal müssen die Verbindungen auch selektiv in ihrer Wechselwirkung mit diesem Kanal sein. Die Verbindungen müssen eine Selektivität, gemessen durch das IC_{50} -Verhältnis ($I_{KS}/Gardos$) von größer als oder gleich 80 haben.

Verbindungen

[0040] In einem ersten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Verbindung mit einer Struktur gemäß Formel (I) bereit:



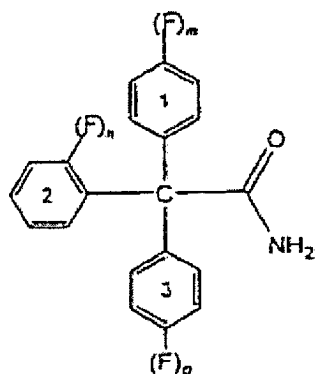
(I)

worin

m, n und p unabhängig voneinander gewählt sind aus 0 und 1 und wenigstens einer der Indices m, n und p 1 ist; wenn m, n und p alle 1 sind, sind die Fluor-Substituenten an Ring 1 und an Ring 2 in einer Position angeordnet, die unabhängig gewählt ist aus ortho-Stellung zu dem Acetamid-Substituenten, in meta-Stellung zu dem Acetamid-Substituenten und in para-Stellung zu dem Acetamid-Substituenten, und der Substituent an Ring 3 ist in einer Position angeordnet, die gewählt ist aus ortho-Position zu dem Acetamid-Substituenten und para-Position zu dem Acetamid-Substituenten; und

wenn p 0 ist und m 1 ist und n 1 ist, ist der Fluor-Substituent am Ring 1 in para-Position zu dem Acetamid-Substituenten, und der Substituent am Ring 2 ist in einer Position angeordnet, die gewählt ist aus ortho-Position zu dem Acetamid-Substituenten und para-Position zu dem Acetamid-Substituenten.

[0041] In einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform haben die Verbindungen gemäß der Erfindung eine Struktur gemäß der Formel (II):

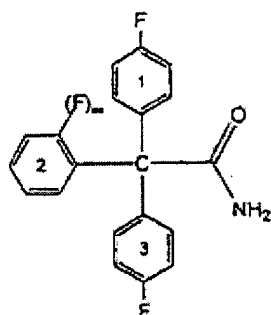


(II)

worin m, n und p unabhängig voneinander gewählt sind aus 0 und 1, und wenigstens einer der Indices m, n und p 1 ist.

[0042] Verbindungen gemäß dieser Struktur sind in Tabelle 1 gezeigt und schließen die Verbindungen 1 bis 5 ein.

[0043] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform haben die Verbindungen gemäß der Erfindung eine Struktur gemäß Formel (III):



(III)

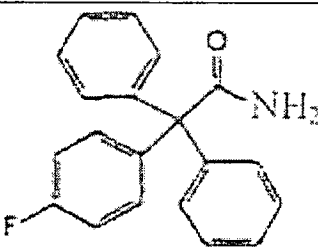
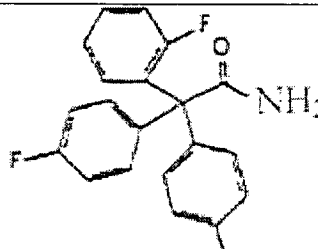
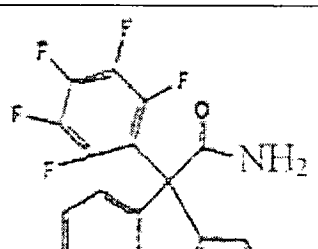
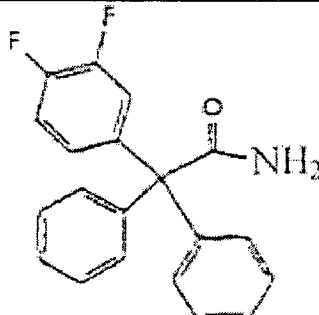
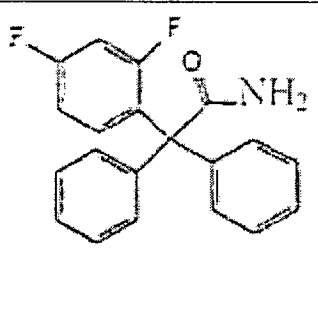
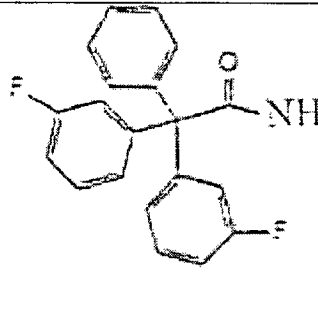
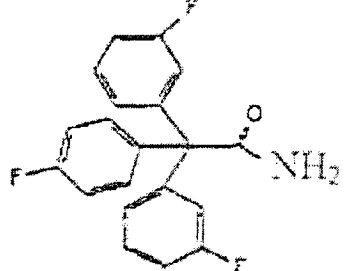
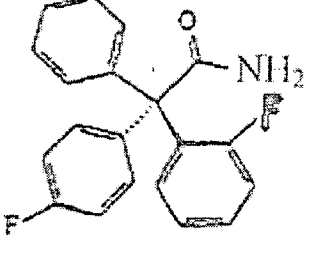
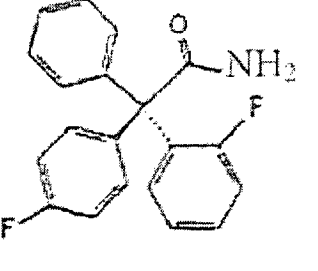
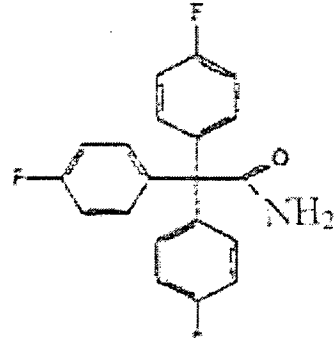
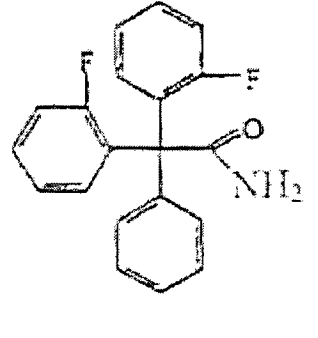
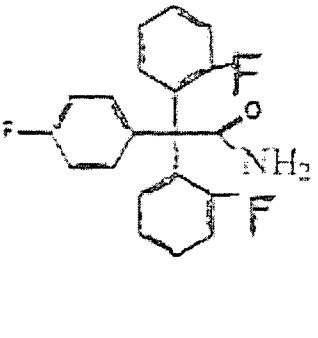
worin m entweder 0 oder 1 ist.

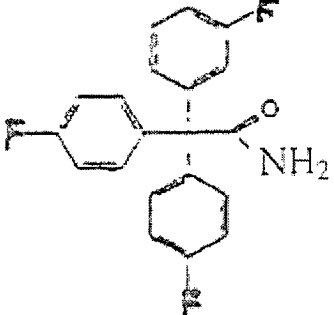
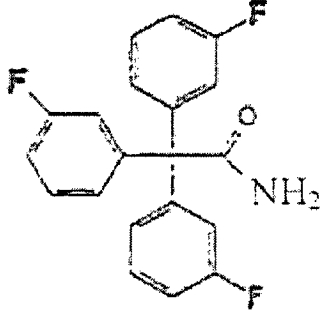
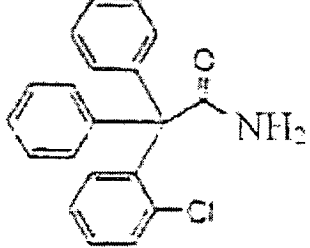
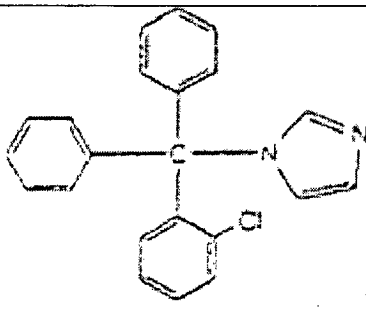
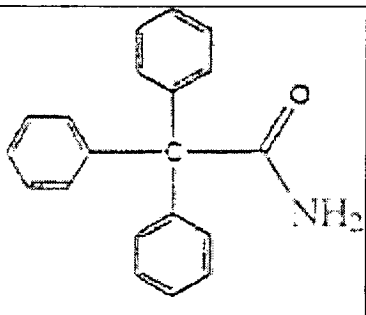
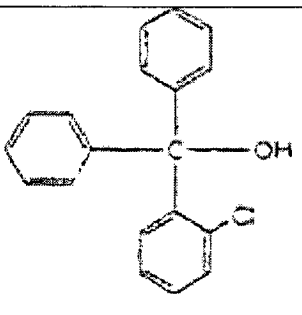
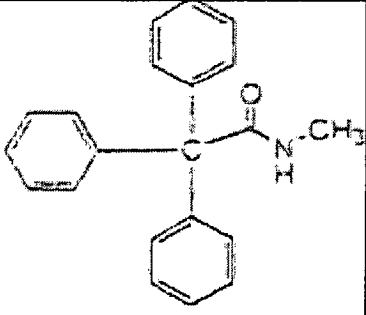
[0044] Verbindungen gemäß Formel (III) sind in Tabelle 1 gezeigt und schließen die Verbindungen 3 und 5 ein.

[0045] Verbindungen, die strukturell den Verbindungen gemäß der Erfindung nahe verwandt sind, sind ebenfalls in Tabelle 1 gezeigt. Die Verbindungen, die den Verbindungen gemäß der Erfindung strukturell verwandt sind, dienen als „Basis-Linie“ zur Beurteilung der Vorteile und unerwarteten Eigenschaften und Vorzüge der fluorierten Verbindungen gemäß der Erfindung.

Tabelle 1

1	2	3

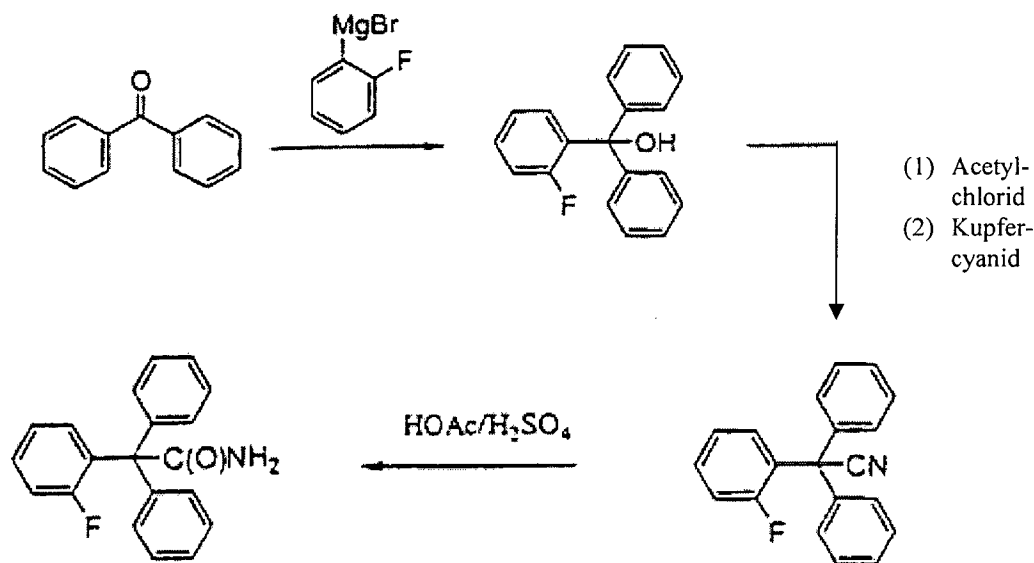
		
4	5	6
		
7	8	9
		
10	11	12
		
13	14	15

		
16	17	18
		
19	20	21
		
22		

Synthese der Verbindungen

[0046] Die Verbindungen der Erfindung können hergestellt werden durch Verfahrensweisen, die Standard im technischen Bereich der organischen Synthese sind. Passende Ausgangsmaterialien und Reagenzien können im Handel erworben werden, oder sie können hergestellt werden durch Standard-Verfahrensweisen der organischen Chemie. Bevorzugte Verfahrensweisen sind in den speziellen Beispielen veranschaulicht. Ein beispielhafter Syntheseweg ist in Schema 1 bereitgestellt.

Schema 1



[0047] In Schema 1 läuft die Synthese eines Fluor-substituierten Triphenylacetamids von dem entsprechenden Fluor-substituierten Triphenylmethanol, das hergestellt wird aus einem Fluor-substituierten Benzophenon und einem Reagenz, das eine Phenyl-Einheit oder eine Fluor-substituierte Phenyl-Einheit dem Benzophenon-Keton zufügt. Das Fluor-substituierte Triphenylmethanol wird anschließend in das entsprechende Fluor-substituierte Triphenylacetonitril umgewandelt, indem man den Alkohol mit Acetylchlorid und anschließend mit Kupfercyanid in Kontakt bringt. Das Acetamid kann gebildet werden durch Umsetzen der Nitril-Zwischenstufe mit einer Mischung aus Schwefelsäure und Eisessig. Andere Synthesewege, die zu der Fluor-substituierten Triphenylmethan-Spezies führen, insbesondere zu Acetamiden, liegen innerhalb der Kenntnisse eines durchschnittlichen Fachmanns in diesem technischen Bereich.

Stabilität der Verbindungen

[0048] Damit die Verbindungen als pharmazeutisch nützliche Inhibitoren des Gardos-Kanals wirken können, müssen Kandidaten solcher Verbindungen sowohl eine annehmbare Bioverfügbarkeit als auch eine annehmbare Stabilität in vivo zeigen. Verbindungen werden in der Weise beurteilt, dass sie einen ausreichenden Grad an Stabilität aufweisen, wenn wenigstens 40% einer Anfangsmenge der Verbindung im Anschluss an eine zweistündige Inkubation in einem biologischen Medium (z. B. in einer Mikrosomen-Zubereitung) intakt bleiben. Dieser Grad an Stabilität ist besonders wichtig zum Behandeln eines chronischen Syndroms wie beispielsweise zur Behandlung von Sichelzell-Anämie. Subjekte bzw. Personen, die einer Behandlung von Sichelzell-Anämie unterworfen werden, müssen regelmäßig dosismäßig mit dem Anti-Sichel-Mittel (z. B. dem Inhibitor für den Gardos-Kanal) über die Zeitdauer ihres Lebens versorgt werden. Neben anderen Problemen präsentiert ein derartiger lebenslanger Dosierungsplan ein ernsthaftes Risiko, dass ein Patient unterschiedlich gut den vorgesehen Plan erfüllt. Wenn der Titer der Medikation im System des Patienten als Ergebnis einer schlechten Erfüllung des Plans sinkt, erhöht dies das Risiko des Auftretens eines Sichelzell-Ereignisses und der gleichzeitigen Schmerzen sowie physischer und physiologischer Schädigung. Verbindungen, die erhöhte in vivo Verweilzeiten und eine erhöhte Bioverfügbarkeit aufweisen, erlauben einen vereinfachten Dosierungsplan (d. h. weniger Dosierungen pro Tag und/oder geringere Medikation). Darüber hinaus bringt ein Reduzieren der Menge an verabreichter Verbindung das Versprechen einer Reduzierung der Nebenwirkungen mit sich, die aus der Medikation und/oder ihren Metaboliten resultieren. Damit ist es in hohem Maße erwünscht, Inhibitoren des Gardos-Kanals bereitzustellen, die gute Bioverfügbarkeiten und erhöhte Stabilitäten in vivo aufweisen.

[0049] Die Stabilität der Verbindungen in verschiedenen biologischen Milieus kann durch in diesem technischen Gebiet bekannte Verfahrensweisen getestet werden. In einer Ausführungsform wird die Stabilität der Verbindungen getestet in einer in vitro-Zubereitung. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die in vitro-Zubereitung eine Leber-Mikrosomen-Zubereitung. Die Ergebnisse derartiger in vitro-Tests bzw. -Assays liefern Daten, die relevant für die in vivo-Stabilität der Verbindungen gemäß der Erfindung sind. Andere in vitro-Tests, die zum Testen der Stabilität der Verbindungen gemäß der Erfindung nützlich sind, sind in diesem technischen Bereich bekannt.

[0050] Zusätzlich zu in vitro-Verfahrensweisen können in-vivo-Verfahrensweisen wie beispielsweise pharma-

kokinetische Untersuchungen in einem Bereich von Tier-Modellen durchgeführt werden. Eine oder mehrere Verbindung(en) gemäß der Erfindung kann/können an ein Tier, vorzugsweise eine Ratte, in verschiedenen Dosierungen und/oder auf verschiedenen Wegen verabreicht werden (z. B. i. v., i. p., p. o.). Blut-, Urin- und/oder Fäzes-Proben können an in Reihe liegenden Zeitpunkten gewonnen werden, und die Proben können auf das Vorhandensein und/oder die Konzentration der Verbindung(en) gemäß der Erfindung und/oder von Metaboliten der Verbindung(en) getestet werden.

[0051] Irgendeine geeignete Mengengröße kann verwendet werden, um Daten von verschiedenen Verbindungen zu vergleichen. Beispielhafte Mengengrößen schließen Halbwertszeit, Bioverfügbarkeit, die Menge an Verbindung, die nach einer vorbestimmten Zeitdauer intakt bleibt, und dergleichen ein. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Menge an Verbindung, die nach einer vorbestimmten Zeitdauer intakt bleibt, verwendet. Der Ausdruck „intakt“, wie er in der vorliegenden Beschreibung und in den Patentansprüchen verwendet wird, bezieht sich auf eine Verbindung, die nicht zu einer Spezies metabolisiert oder in anderer Weise abgebaut wurde, die von der ursprünglichen Verbindung verschieden ist.

[0052] In einer bevorzugten Ausführungsform liegt die vorbestimmte Zeitdauer im Bereich von etwa 2 Stunden bis etwa 72 Stunden, noch mehr bevorzugt im Bereich von etwa 4 bis etwa 24 Stunden. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform liegt die Menge an intakter Verbindung, die nach einer vorbestimmten Zeitdauer von 2 Stunden zurückbleibt, bei wenigstens 40% der Anfangs-Probe, vorzugsweise bei wenigstens 50% und noch mehr bevorzugt bei wenigstens 70%.

[0053] Jede beliebige Verfahrensweise, die den Nachweis und – vorzugsweise – die quantitative Bestimmung der Verbindung(en) und/oder Metaboliten erlaubt, ist geeignet zur Verwendung beim Testen der Verbindungen gemäß der Erfindung. Diese Verfahrensweisen schließen ein: spektrometrische Verfahrensweisen (z. B. NMR (z. B. ^{19}F -NMR), MS, IR, UV/vis), chromatographische Verfahrensweisen (z. B. LC, GC, HPLC) und Hybrid-Verfahren, die sowohl von spektrometrischen als auch chromatographischen Verfahrensweisen Gebrauch machen (z. B. GC/MS, LC/MS, LC/MS/MS). Weiter können die Verfahrensweisen Gebrauch machen von nachweisbaren Markierungen wie beispielsweise die Verbindungen gemäß der Erfindung, die mit Radioisotopen (z. B. ^3H , ^{15}N , ^{14}C) oder fluoresszenten Markierungen (z. B. Fluorescein, Rhodamin) markiert sind. Andere Verfahrensweisen zum Testen der Existenz kleiner organischer Moleküle in-vivo, insbesondere solche Verfahrensweisen, die mit bioaktiven Molekülen zusammenhängen, sind Fachleuten mit technischem Sachverstand in diesem Gebiet offensichtlich.

Verbindungsaktivität

[0054] Um pharmazeutisch nützliche Gardos-Kanal-Inhibitoren zu entwickeln, müssen Kandidaten-Verbindungen eine annehmbare Aktivität gegenüber einem Ziel-Kanal demonstrieren. Verbindungen werden als ausreichend wirksam angesehen, wenn sie einen IC_{50} -Wert gegenüber dem Gardos-Kanal von nicht mehr als 30 nM aufweisen.

[0055] Wie oben im Zusammenhang mit der Stabilität der Verbindung diskutiert wurde, ist dieser Wert der Aktivität besonders wichtig zum Behandeln eines chronischen Syndroms wie beispielsweise der Sichelzellanämie. Die verschiedenen Probleme hinsichtlich der Zeitplan-Einhaltung von Patienten und der Nebeneffekte werden gut berücksichtigt bei Inhibitoren des Gardos-Kanals, die eine Potenz gegenüber dem Gardos-Kanal von 30 nM aufweisen.

[0056] Die Aktivität der Verbindungen gemäß der Erfindung gegenüber Ionen-Kanälen, wie beispielsweise gegenüber dem Gardos-Kanal, kann unter Anwendung von in diesem technischen Gebiet bekannten Verfahrensweisen getestet werden. Siehe beispielsweise „Brugnara et al., J. Biol. Chem. 268(12): 8760–8768 (1993)“. Unter Anwendung der Verfahrensweisen, die in dieser Druckschrift beschrieben sind, können sowohl die prozentuale Inhibierung des Gardos-Kanals als auch der IC_{50} -Wert der Verbindungen gemäß der Erfindung getestet werden.

[0057] In einem beispielhaften Test (bzw. Assay) kann die Inhibierung eines Erythrozyten-Gardos-Kanals durch Test-Verbindungen unter Verwendung menschlicher roter Blutzellen getestet werden. Der Grad an Inhibierung kann gemessen werden unter Verwendung eines nachweisbaren Materials wie beispielsweise ^{86}Rb . In einem beispielhaften Assay bzw. Test unter Verwendung von ^{86}Rb kann eine Gardos-Kanal-Inhibierung getestet werden, indem man rote Blutzellen mit ^{86}Rb und einer Test-Verbindung in Kontakt bringt und die Menge ^{86}Rb misst, die von den Zellen aufgenommen werden. Zahlreiche Variationen dieses Assays sind Fachleuten mit technischem Sachverstand in diesem Bereich offensichtlich.

[0058] Die Wirksamkeit der Verbindungen gemäß der Erfindung kann getestet werden unter Verwendung von Erythrozyten mittels eines Verfahrens wie desjenigen, das offenbart wurde durch „Brugnara et al., J. Clin. Invest., 92: 520–526 (1993)“. Kurz beschrieben, werden Erythrozyten mit einer Test-Verbindung und einem ^{86}Rb enthaltenden Medium in Kontakt gebracht. Die anfängliche Rate von ^{86}Rb -Transport kann berechnet werden von einem Parameter wie beispielsweise der linearen geringsten Fehlerquadrat-Steigung der ^{86}Rb -Aufnahme durch die Zelle(n). Inhibitor-Konstanten können berechnet werden nach Standard-Verfahren unter Verwendung der Computer-unterstützten Anpassung nicht linearer Kurven.

[0059] Andere Verfahrensweisen zum Testen der Aktivität von Ionen-Kanälen und der Aktivität von Mitteln, die die Ionen-Kanäle beeinflussen, sind in diesem technischen Gebiet bekannt. Die Auswahl passender Test-Verfahren liegt völlig innerhalb des Vermögens von Fachleuten mit technischem Sachverstand in diesem Bereich; siehe beispielsweise „B. Hille, Ionic Channels of Excitable Membranes, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1992)“.

[0060] Die Ergebnisse von Gardos-Kanal- und Erythrozyten-Inhibierungstests unter Verwendung von Verbindungen gemäß der Erfindung und anderen nahen verwandten Verbindungen sind in der nachfolgenden Tabelle 2 angegeben. Die Verbindungsnummern in Tabelle 2 nehmen einen Quer-Verweis zu den Verbindungs-Strukturen, die in Tabelle 1 gezeigt sind.

Tabelle 2

Verbindung Nr.	IC ₅₀ - Wirksamkeit gegenüber Gardos (nM)	geschätzte IC ₅₀ -Wirksamkeit gegen I _{Ks} (nM)	% intakt nach 2 h	Selektivität (I _{Ks} gegen Gardos)
1	9	2.000	64	220
2	15	N.D.	80	N.D.
3	12	1.500	76	130
4	13	N.D.	80	N.D.
5	10	1.400	71	140
6	37	N.D.	N.D.	N.D.
7	14	1.200	15	90
8	34	5.700	39	170
9	30	3.200	3	110
10	12	1.300	59	110
11	5	1.300	78	260
12	5	1.800	44	360
13	14	1.100	53	80
14	30	N.D.	46	N.D.
15	15	N.D.	53	N.D.
16	17	1.900	57	110
17	13	4.000	18	310
18	10	7.300	6	730
19 (Clotrimazol)	100	820	4	8
20	50	1.100	13	22
21	500	2.600	35	5
22	100	2.600	8	26

N. D. = nicht bestimmt

Selektivität der Verbindungen

[0061] Damit Verbindungen als pharmazeutisch nützliche Gardos-Kanal-Inhibitoren wirken können, müssen

Kandidaten-Verbindungen eine annehmbare Selektivität gegenüber dem Ziel-Kanal zeigen. Verbindungen mit einer Selektivität gegenüber dem Gardos-Kanal, gemessen durch das Verhältnis IC_{50} einer Verbindung gegenüber I_{Ks} gegen ihren IC_{50} -Wert gegen den Gardos-Kanal, von wenigstens 80 werden als ausreichend selektiv angesehen. Ein Aufzeichnen des I_{Ks} -Stroms wurde unter Verwendung der Vollzellen-Patch-Klammer-Verfahrensweise an Meerschweinchen-Myozyten, wie es beschrieben wurde in „Turgeon et al., Circulation Research 75: 879–886 (1994)“, durchgeführt.

[0062] Die Selektivität einer speziellen Verbindung gegenüber dem Gardos-Kanal relativ zu derjenigen gegenüber einem anderen Kalium-Ionen-Kanal wird in einfacher und bequemer Weise bestimmt als ein Verhältnis von zwei mit dem Binden einer Verbindung in Beziehung stehenden Größen (z. B. dem IC_{50} -Wert). In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Selektivität bestimmt unter Verwendung der Aktivitäten, die wie oben diskutiert bestimmt wurden, jedoch sind andere Verfahrensweisen zum Testen der Aktivität von Ionen-Kanälen und der Aktivität von Mitteln, die die Ionen-Kanäle beeinflussen, in diesem technischen Bereich bekannt. Die Auswahl von passenden Test-Methoden liegt vollständig im Vermögen von Fachleuten mit technischem Sachverstand in diesem Bereich; siehe beispielsweise B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1992).

[0063] Die Ergebnisse von Selektivitäts-Bestimmungen für die Verbindungen gemäß der Erfindung und andere nahe verwandte Verbindungen sind in Tabelle 2 angegeben. Die Selektivität der Verbindungen für den Gardos-Kanal wurde bestimmt relativ zu I_{Ks} , einem beispielhaften Kalium-Ionen-Kanal. Die Verbindungszahlen in Tabelle 2 nehmen einen Quer-Verweis auf die Verbindungsstrukturen, die in Tabelle 1 gezeigt sind.

[0064] Wie aus den oben gezeigten Ergebnissen ersichtlich ist, zeigen die Verbindungen gemäß der Erfindung eine bemerkenswerte Selektivität für den Gardos-Kanal gegenüber anderen Kalium-Ionen-Kanälen (z. B. dem I_{Ks}). Darüber hinaus sind die Verbindungen gemäß der Erfindung potente Inhibitoren des Gardos-Kanals. Weiter sind die in vivo-Halbwertszeiten dieser Verbindungen bemerkenswert erhöht im Vergleich zu nichtfluorierten Verbindungen wie beispielsweise Clotrimazol.

[0065] In einer Ausführungsform sind die Verbindungen gemäß der Erfindung potente, selektive und stabile Inhibitoren des Kalium-Stroms, wie beispielsweise desjenigen, wie er durch den Gardos-Kanal vermittelt wird.

[0066] Die Verbindungen gemäß der Erfindung sind vorzugsweise stabil in einem biologischen Medium wie beispielsweise in einer in vitro-Mikrosomen-Enzym-Zubereitung, wobei wenigstens 40% der intakten Verbindung nach 2 Stunden Inkubierung in dem biologischen Milieu zurückbleiben, vorzugsweise mehr als 50% und noch mehr bevorzugt mehr als 70%.

[0067] Obwohl es nicht erwünscht ist, an irgendeine spezielle Theorie der Vorgehensweise gebunden zu sein, geht man derzeit davon aus, dass bestimmte strukturelle Merkmale der Verbindungen gemäß der Erfindung (d. h. das Ersetzen von Wasserstoff durch Fluor) derzeit die Stabilität, Selektivität und Wirksamkeit dieser Verbindungen implizieren. So umfassen in einer bevorzugten Ausführungsform die Inhibitoren gemäß der Erfindung eine Aryl-Einheit, worin wenigstens ein Wasserstoff-Atom der Aryl-Einheit ersetzt wird durch einen Rest, der ein Fluor-Atom umfasst. In dieser Ausführungsform schließt die Erfindung fluoriierte Derivate von Verbindungen ein, die einen Kalium-Ionen-Strom inhibieren, insbesondere solche, die eine Inhibitor-Aktivität gegenüber dem Gardos-Kanal aufweisen (z. B. antimikotische Mittel wie beispielsweise Miconazol, Econazol, Butoconazol, Oxiconazol und Sulconazol). Andere Mittel, die eine Inhibitor-Aktivität gegenüber einem Kalium-Ionen-Kanal aufweisen und insbesondere eine Inhibitor-Aktivität gegenüber dem Gardos-Kanal aufweisen und wenigstens eine Aryl-Einheit aufweisen, die wenigstens ein Fluor-Atom trägt, sind innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung.

[0068] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Aryl-Einheit eine Phenyl-Gruppe. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Aryl-Einheit ein Bestandteil einer Triphenylmethyl-Gruppe.

[0069] Die Verbindung(en) gemäß der Erfindung kann/können per se oder in Form einer pharmazeutischen Zubereitung verabreicht werden, in der die aktive(n) Verbindung(en) in Mischung mit einem oder mehreren pharmazeutisch annehmbaren Trägern, Hilfsstoffen oder Verdünnungsmitteln vorliegen. So stellt zusätzlich zu Verbindungen, die zelluläre Ionen-Ströme beeinflussen (z. B. eine inhibierende Aktivität gegenüber dem Gardos-Kanal), die vorliegende Erfindung auch pharmazeutische Zubereitungen bereit, die die Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten.

[0070] In einem zweiten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Formulierung bereit, die eine Verbindung gemäß der Erfindung nach Formel (I) in Mischung mit einem pharmazeutisch annehmbaren Hilfsmittel umfasst. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Verbindungen diejenigen gemäß Formel (II) und noch mehr bevorzugt diejenigen gemäß Formel (III).

[0071] Die in der vorliegenden Beschreibung beschriebenen Verbindungen oder pharmazeutisch annehmbare Additionssalze oder Hydrate dieser Verbindungen können so formuliert sein, dass sie an einen Patienten unter Anwendung einer großen Vielzahl von Wegen oder Verabreichungsweisen abgegeben werden. Geeignete Wege der Verabreichung schließen ein: Inhalieren, transdermale Verabreichung, orale Verabreichung, Okulare Verabreichung, rektale Verabreichung, transmucosale Verabreichung, intestinale Verabreichung und parenterale Verabreichung, einschließlich intramuskulärer, subkutaner und intravenöser Injektionen.

[0072] Die in der vorliegenden Beschreibung beschriebenen Verbindungen oder pharmazeutisch annehmbare Salze und/oder Hydrate dieser Verbindungen können einzeln oder in Kombination mit anderen Verbindungen gemäß der Erfindung und/oder in Cocktails, die mit anderen therapeutischen Mitteln kombiniert sind verabreicht werden. Die Wahl von therapeutischen Mitteln, die mit den Verbindungen gemäß der Erfindung gemeinsam verabreicht werden können, hängt zum Teil von dem zu behandelnden Krankheitszustand ab.

[0073] Beispielsweise können die Verbindungen gemäß der Erfindung dann, wenn sie an Patienten verabreicht werden, die unter der Sichelzell-Krankheit leiden, in Cocktails verabreicht werden, die Mittel enthalten, die zum Behandeln der Schmerzen, einer Infektion und anderer Symptome und Nebenwirkungen verwendet werden, wie sie üblicherweise mit der Sichelzell-Krankheit assoziiert sind. Solche Mittel schließen ein z. B. Analgetika (Schmerzmittel), Antibiotika usw.. Die Verbindungen können auch in Cocktails verabreicht werden, die andere Mittel enthalten, wie sie verbreitet zur Behandlung der Sichelzell-Krankheit verwendet werden, einschließlich Butyrat und Butyrat-Derivate (Perrine et al., N. Engl. J. Med. 328 (2): 81–86 (1993)), Hydroxy-Harnstoff (Charache et al., N. Engl. J. Med. 323 (20): 1317–1322 (1995)), Erythropoietin (Goldberg et al., N. Engl. J. Med. 323 (6): 366–372 (1990)) und in der Ernährung vorkommende Salze wie beispielsweise Magnesium (De Franceschi et al., Blood 88 (648a): 2580 (1996)).

[0074] Pharmazeutische Zubereitungen zur Verwendung in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung können formuliert werden in herkömmlicher Weise unter Verwendung eines oder mehrerer physiologisch annehmbarer Träger(s), umfassend Trägerstoffe und Hilfsstoffe, die ein Verarbeiten der aktiven Verbindungen in Zubereitungen erleichtern, die pharmazeutisch verwendet werden können. Eine passende Formulierung ist abhängig von dem gewählten Verabreichungsweg.

[0075] Zur Injektion können Mittel gemäß der Erfindung in wässrigen Lösungen formuliert werden, vorzugsweise in physiologisch verträglichen Puffer wie beispielsweise Hanks's Lösung, Ringer's Lösung oder physiologische Kochsalz-Lösung. In einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform umfasst die Formulierung Wasser und einen Alkohol und/oder ein Glycol. Andere nützliche Komponenten dieser Formulierung schließen beispielsweise ein oberflächenaktives Mittel (Tensid), Emulgator(en) und Materialien wie beispielsweise ethoxylierte Öle ein. Eine beispielhafte Formulierung umfasst eine Verbindung gemäß der Erfindung, Polyethylenglycol 400, Ethanol und Wasser in einem Verhältnis 1:1:1. Eine andere beispielhafte Formulierung umfasst eine Verbindung gemäß der Erfindung, Wasser, Polyethylenglycol 400 und Cremophor-EL.

[0076] Für eine transmucosale Verabreichung (z. B. buccal, rektal, nasal, ocular usw.) werden Penetrationsmittel, die passend für die Barriere sind, die überwunden werden muss, in der Formulierung verwendet. Solche Penetrationsmittel sind allgemein in diesem technischen Bereich bekannt.

[0077] Für eine orale Verabreichung können die Verbindungen gemäß der Erfindung in einfacher Weise durch Kombinieren der aktiven Verbindung(en) mit pharmazeutisch annehmbaren Trägern formuliert werden, wie sie in diesem technischen Bereich wohlbekannt sind. Solche Träger machen es möglich, dass die Verbindungen gemäß der Erfindung als Tabletten, Pillen, Dragees, Kapseln, Flüssigkeiten, Gele, Sirupe, Aufschlammungen, Suspensionen und dergleichen für eine orale Aufnahme durch einen zu behandelnden Patienten formuliert werden können. Pharmazeutische Zubereitungen zur oralen Verwendung können kombiniert werden mit einem festen Hilfsmittel, gegebenenfalls Mahlen der resultierenden Mischung und Verarbeiten der Mischung von Granulaten nach Zusatz geeigneter Hilfsstoffe, sofern dies erwünscht ist, unter Erhalt von Tabletten oder Dragee-Kernen. Geeignete Träger sind insbesondere Füllstoffe wie beispielsweise Zucker einschließlich Laktose, Sucrose, Mannitol oder Sorbitol; Cellulose-Zubereitungen wie beispielsweise Maisstärke, Weizenstärke, Reis-

stärke, Kartoffelstärke, Gelatine, Tragacanth-Gummi, Methylcellulose, Hydroxypropylmethyl-Cellulose, Natriumcarboxymethylcellulose und/oder Polyvinylpyrrolidon (PVP). Sofern erwünscht, können desintegrierende Mittel zugesetzt werden, wie beispielsweise das vernetzte Polyvinylpyrrolidon, Agar oder Alginsäure oder ein Salz davon, wie beispielsweise Natriumalginat.

[0078] Dragee-Kerne werden mit geeigneten Überzügen versehen. Für diesen Zweck können konzentrierte Zucker-Lösungen, die gegebenenfalls Gummiarabicum, Talkum, Polyvinylpyrrolidon, Carbopol-Gel, Polyethylenglycol und/oder Titandioxid enthalten können, Lack-Lösungen und geeignete organische Lösungsmittel oder Lösungsmittel-Mischungen verwendet werden. Farbstoffe oder Pigmente können den Tabletten oder Dragee-Überzügen zur Identifizierung oder zum Charakterisieren verschiedener Kombinationen von Dosen der aktiven Verbindung zugesetzt werden.

[0079] Pharmazeutische Zubereitungen, die oral verwendet werden können, schließen aus Gelatine hergestellte Push-Fit-Kapseln sowie weiche, versiegelte Kapseln ein, die aus Gelatine und einem Weichmacher wie beispielsweise Glycerin oder Sorbitol hergestellt sind. Die Push-Fit-Kapseln können die aktiven Komponenten in Mischung mit einem Füllstoff wie beispielsweise Laktose, Bindemitteln wie beispielsweise Stärken und/oder Gleitmitteln wie beispielsweise Talkum oder Magnesiumstearat und gegebenenfalls Stabilisatoren enthalten. In Weichkapseln können die aktiven Verbindungen in geeigneten Flüssigkeiten gelöst oder suspendiert sein, wie beispielsweise Fettölen, flüssigem Paraffin oder flüssigen Polyethylenglycolen. Zusätzlich können Stabilisatoren zugesetzt sein. Alle Formulierungen für eine orale Verabreichung sollten in Dosierungen vorliegen, die für eine derartige Verabreichung geeignet sind.

[0080] Für eine buccale Verabreichung können die Zubereitungen die Form von Tabletten oder Pastillen annehmen, die in herkömmlicher Weise formuliert sind.

[0081] Für eine Verabreichung durch Inhalation werden die Verbindungen zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung in passender Weise in Form einer Aerosol-Spray-Präsentation von unter Druck stehenden Packungen oder einem Vernebler abgegeben, und zwar unter Verwendung eines geeigneten Treibmittels wie beispielsweise Dichlordifluormethan, Trichlorfluormethan, Dichlortetrafluorethan, Kohlendioxid oder einem anderen geeigneten Gas. Im Fall eines unter Druck gesetzten Aerosols kann die Dosis-Einheit bestimmt werden durch Vorsehen eines Ventils zur Abgabe einer abgemessenen Menge. Kapseln und Kartuschen beispielsweise aus Gelatine zur Verwendung in einem Inhalator oder Einbläser können so formuliert werden, dass sie eine Pulver-Mischung der Verbindung und eine geeignete Pulver-Basis wie beispielsweise Laktose oder Stärke enthalten.

[0082] Die Verbindungen können für eine parenterale Verabreichung durch Injektion formuliert werden, z. B. durch Bolus-Injektion oder kontinuierliche Infusion. Formulierungen für eine Injektion können präsentiert werden in Einheits-Dosis-Form, z. B. in Ampullen oder in mehreren Dosen enthaltenden Behältern, unter Zusatz eines Konservierungsmittels. Die Zubereitungen können solche Formen wie Suspensionen, Lösungen oder Emulsionen in öligen oder wässrigen Vehikeln annehmen und können formulierungsbedingte Mittel wie beispielsweise suspendierende und stabilisierende Mittel enthalten, und/oder es können dispergierende Mittel zugesetzt sein, wie beispielsweise vernetztes Polyvinylpyrrolidon, Agar oder Alginsäure oder ein Salz davon wie beispielsweise Natriumalginat.

[0083] Pharmazeutische Formulierungen für eine parenterale Verabreichung schließen wässrige Lösungen der aktiven Verbindungen in wasserlöslicher Form ein, wie beispielsweise diejenigen, die oben für eine intravenöse Verabreichung beschrieben wurden. Zusätzlich können Suspensionen der aktiven Verbindungen hergestellt werden als passende ölige Injektions-Suspensionen. Geeignete lipophile Lösungsmittel oder Vehikel schließen Fettöle wie beispielsweise Sesamöl oder synthetische Fettsäureester wie beispielsweise Ethyloleat oder Triglyceride oder Liposome ein. Wässrige Injektions-Suspensionen können Substanzen enthalten, die die Viskosität der Suspension erhöhen, wie beispielsweise Natriumcarboxymethylcellulose, Sorbitol oder Dextran. Gegebenenfalls kann die Suspension auch geeignete Stabilisatoren oder Mittel enthalten, die die Löslichkeit der Verbindungen erhöhen, so dass dies die Herstellung hoch konzentrierter Lösungen ermöglicht.

[0084] Alternativ dazu kann der aktive Wirkstoff in Pulverform zur Konstitution mit einem geeigneten Vehikel vorliegen, z. B. steriles, Pyrogen-freies Wasser, bevor er verwendet wird.

[0085] Die Verbindungen können auch in rektalen Zubereitungen wie beispielsweise Suppositorien oder Retentions-Einläufe formuliert sein, die z. B. herkömmliche Zäpfchen-Basismaterialien wie beispielsweise Kakaobutter oder andere Glyceride enthalten.

[0086] Über die vorstehend beschriebenen Formulierungen hinaus können die Verbindungen auch als Depot-Zubereitung formuliert werden. Solche langwirkenden Formulierungen können verabreicht werden durch Implantation oder transkutane Abgabe (z. B. subkutan oder intramuskulär), intramuskuläre Injektion oder ein transdermales Pflaster. So können z. B. die Verbindungen formuliert werden mit geeigneten Polymeren oder hydrophoben Materialien (z. B. als Emulsion in einem annehmbaren Öl) oder mit Ionen-Austausch-Harzen oder als wenig lösliche Derivate, beispielsweise in Form eines wenig löslichen Salzes.

[0087] Die pharmazeutischen Zubereitungen können auch geeignete Festphasen- oder Gelphasen-Träger oder Hilfsstoffe umfassen. Beispiele solcher Träger oder Hilfsstoffe schließen Calciumcarbonat, Calciumphosphat, verschiedene Zucker, Stärken, Cellulose-Derivate, Gelatine und Polymere wie beispielsweise Polyethylenglycole ein.

Effektive Dosierungen

[0088] Pharmazeutische Zubereitungen, die zur Verwendung mit der vorliegenden Erfindung geeignet sind, schließen Zubereitungen ein, in denen der aktive Wirkstoff in einer therapeutisch wirksamen Menge enthalten ist, d. h. in einer Menge, die wirksam dafür ist, ihre beabsichtigten Zwecke zu erreichen. Die tatsächliche Menge, die wirksam für eine besondere Anwendung ist, hängt unter anderem von dem zu behandelnden Krankheitszustand ab. Beispielsweise enthalten dann, wenn sie in Verfahren zur Verringerung des Sichelzell-Dehydratation und/oder Verzögerung des Auftretens von Erythrozyten-Sicheln oder einer in situ-Verdrehung verabreicht werden, solche Zubereitungen eine Menge an aktivem Wirkstoff, die wirksam dafür ist, dieses Ergebnis zu erreichen. Die Bestimmung einer wirksamen Menge liegt vollständig im Rahmen der Fähigkeiten von Fachleuten in diesem technischen Bereich, insbesondere im Licht der in der vorliegenden Beschreibung zu findenden detaillierten Offenbarung.

[0089] Für irgendeine in der vorliegenden Beschreibung beschriebene Verbindung kann die therapeutisch wirksame Menge anfänglich von Zellkultur-Assays bestimmt werden. Ziel-Plasma-Konzentrationen sind diejenigen Konzentrationen an aktiver/aktiven Verbindung/Verbindungen, die in der Lage sind, eine Inhibierung des Gardos-Kanals zu induzieren. In bevorzugten Ausführungsformen ist die Gardos-Kanal-Aktivität wenigstens zu 25% inhibiert. Ziel-Plasma-Konzentrationen an aktiver/aktiven Verbindung/Verbindungen, die in der Lage sind, eine wenigstens etwa 50%ige, 75%ige oder sogar 90%ige oder höhere Inhibierung des Gardos-Kanal-Kalium-Flusses zu induzieren, sind derzeit bevorzugt. Die Prozentwerte einer Inhibierung des Gardos-Kanals in dem Patienten können überwacht werden, um die Angemessenheit der erreichten Plasma-Arzneimittel-Konzentration zu bewerten, und die Dosierung kann nach oben oder nach unten angepasst werden, um die gewünschte Prozentzahl einer Inhibierung zu erreichen.

[0090] Wie in diesem technischen Bereich wohlbekannt ist, können therapeutisch wirksame Mengen zur Verwendung in Menschen auch aus Tier-Modellen bestimmt werden. Beispielsweise kann eine Dosis für Menschen formuliert werden, um eine umlaufende Konzentration zu erreichen, von der man gefunden hat, dass sie wirksam bei Tieren ist. Ein besonders nützliches Tier-Modell für die Sichelzell-Krankheit ist das SAD-1-Maus-Modell (Trudel et al., EMBO J. 11: 3157–3165 (1991)). Die Dosierung in Menschen kann angepasst werden durch Überwachen der Gardos-Kanal-Inhibierung und Anpassung der Dosis nach oben oder nach unten, wie dies oben beschrieben wurde.

[0091] Eine therapeutisch wirksame Dosis kann auch aus Human-Daten bestimmt werden für Verbindungen, von denen bekannt ist, dass sie ähnliche pharmakologische Aktivität zeigen, wie beispielsweise Clotrimazol und andere antimikotische Mittel (siehe z. B. Brugnara et al., JPET 273: 266–272 (1995); Benzaquen et al., Nature Medicine 1: 534–540 (1995); Brugnara et al., J. Clin. Invest. 97(5): 1227–1234 (1996)). Die angewendete Dosis kann angepasst werden auf der Basis der relativen Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit der verabreichten Verbindung, verglichen mit Clotrimazol.

[0092] Ein Anpassen der Dosis zum Erreichen einer maximalen Wirksamkeit im Menschen auf der Basis der oben beschriebenen Verfahrensweisen und andere Verfahrensweisen, wie sie in diesem technischen Bereich wohlbekannt sind, liegt vollständig innerhalb des Vermögens eines mit üblichem Sachverstand in diesem technischen Bereich ausgestatteten Fachmanns.

[0093] Im Fall einer lokalen Verabreichung ist die systemische zirkulierende bzw. umlaufende Konzentration einer verabreichten Verbindung nicht von besonderer Wichtigkeit. In solchen Beispielen wird die Verbindung so verabreicht, dass man eine Konzentration im lokalen Bereich erreicht, die wirksam dazu ist, das beabsichtigte Ergebnis zu erzielen.

[0094] Zur Verwendung bei der Prophylaxe und/oder Behandlung der Sichelzell-Krankheit, einschließlich sowohl chronischer Sichelzell-Episoden als auch einer akuten Sichelzell-Krise wird davon ausgegangen, dass eine Umlauf-Konzentration einer verabreichten Verbindung von etwa 0,001 μM bis 20 μM wirksam ist, wobei der Bereich von 0,01 μM bis 5 μM bevorzugt ist.

[0095] Patientendosen für eine orale Verabreichung der in der vorliegenden Beschreibung beschriebenen Verbindungen, die der bevorzugte Weg der Verabreichung zur Prophylaxe und zur Behandlung chronischer Sichelzell-Episoden ist, liegen typischerweise im Bereich von etwa 1 mg/Tag bis etwa 10.000 mg/Tag, noch typischer im Bereich von etwa 10 mg/Tag bis etwa 1.000 mg/Tag und am meisten typisch im Bereich von etwa 50 mg/Tag bis etwa 500 mg/Tag. Angegeben in Bezug auf das Körpergewicht eines Patienten liegen typische Dosierungen im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 150 mg/kg/Tag und noch mehr typisch im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 15 mg/kg/Tag und am meisten typisch im Bereich von etwa 1 bis etwa 10 mg/kg/Tag.

[0096] Für andere Verabreichungswege kann die Dosismenge und das Dosisintervall individuell angepasst werden und können so Plasma-Konzentrationen der verabreichten Verbindung zur Verfügung gestellt werden, die wirksam für die besondere klinische Indikation sind, die gerade behandelt wird. Beispielsweise kann dann, wenn akute Sichelzell-Krisen der am meisten vornehmlich klinische Bereich der Manifestation ist, in einer Ausführungsform eine Verbindung gemäß der Erfindung in relativ hohen Konzentrationen mehrere Male pro Tag verabreicht werden.

[0097] Alternativ dazu kann es dann, wenn der Patient nur periodische Sichelzell-Krisen auf weniger häufiger, periodischer oder unregelmäßiger Basis zeigt, in einer Ausführungsform noch mehr wünschenswert sein, eine Verbindung gemäß der Erfindung bei minimalen wirksamen Konzentrationen zu verabreichen und einen Verabreichungsplan mit weniger häufigen Verabreichungen anzuwenden. Dies liefert einen therapeutischen Plan, der in Übereinstimmung mit der Schwere der Sichelzell-Krankheit der besonderen Person ist.

[0098] Unter Anwendung der in der vorliegenden Beschreibung gegebenen Lehren kann ein effektiver prophylaktischer oder therapeutischer Behandlungsplan aufgestellt werden, der keine wesentliche Toxizität hervorruft und noch vollständig wirksam zur Behandlung der klinischen Symptome ist, die von dem speziellen Patienten gezeigt werden. Dieses Aufstellen eines Plans sollte die sorgfältige Wahl einer aktiven Verbindung durch In-Betracht-Ziehen von Faktoren wie beispielsweise Wirksamkeit der Verbindung, relative Bioverfügbarkeit, Körpergewicht des Patienten, Vorhandensein und Schwere nachteiliger Nebenwirkungen, bevorzugter Weg der Verabreichung und Toxizitätsprofil des ausgewählten Mittels einschließen.

Toxizität der Verbindungen

[0099] Das Verhältnis zwischen Toxizität und therapeutischer Wirkung für eine spezielle Verbindung ist ihr therapeutischer Index und kann ausgedrückt werden als Verhältnis zwischen dem Wert LD_{50} (der Menge an Verbindung, die bei 50% einer Population letal ist) und dem Wert ED_{50} (der Menge an Verbindung, die in 50% der Population wirksam ist). Verbindungen, die hohe Werte des therapeutischen Index zeigen, sind bevorzugt. Therapeutische Index-Daten, die aus Zellkultur-Assays und/oder Tierstudien erhalten werden, können dazu verwendet werden, einen Bereich von Dosierungen zur Verwendung im Menschen zu formulieren. Die Dosierung solcher Verbindungen liegt vorzugsweise innerhalb eines Bereichs von Plasma-Konzentrationen, die den ED_{50} -Wert bei wenig oder keiner Toxizität einschließen. Die Dosierung kann innerhalb dieses Bereichs in Abhängigkeit der angewendeten Dosierungsform und des angewendeten Verabreichungsweges schwanken. Siehe z. B. Fingt et al., In: "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Kapitel 1, Seite 1 (1975). Die exakte Formulierung, der exakte Verabreichungsweg und die exakte Dosierung können von dem einzelnen Arzt im Hinblick auf den Zustand des Patienten und das spezielle Verfahren, in dem die Verbindung verwendet wird, gewählt werden.

Verfahrensweisen

[0100] Zusätzlich zu den Verbindungen und pharmazeutischen Formulierungen, wie sie im Einzelnen oben diskutiert wurden, stellt die vorliegende Verbindung eine Anzahl von Verfahrensweisen bereit, in denen die Verbindungen gemäß der Erfindung Anwendung finden. Die Verfahrensweisen reichen von solchen, die in einem Labor-Setting verwendet werden können, um die grundlegenden Mechanismen beispielsweise der Pharmakokinetik, der Arzneimittel-Aktivität, des Ursprungs der Krankheit und deren Fortschritt usw. auszuprobieren.

[0101] Damit stellt in einem dritten Aspekt die Erfindung ein Verfahren zum Inhibieren des Kalium-Flusses einer Zelle bereit. Das Verfahren umfasst ein In-Kontakt-Bringen einer Zelle mit einer wirksamen Menge einer

Verbindung, die eine Struktur gemäß der Formel (I) aufweist. In einer bevorzugten Ausführungsform haben die Verbindungen eine Struktur gemäß der obigen Formel (II) und noch mehr bevorzugt eine Struktur gemäß der obigen Formel (III).

[0102] Dieser Aspekt der Erfindung hat einen großen Anwendungsbereich, jedoch ist er bevorzugt als eine Modalität zum Studieren der grundlegenden Mechanismen, auf denen der Kalium-Fluss beruht, und des Mechanismus der Aktivität von Mitteln, die diesen Fluss modulieren. Weiter können die Verbindungen gemäß der Erfindung verwendet werden als Werkzeuge zum Entdecken neuer Mittel, die den Kalium-Fluss steuern. Beispielsweise können die Verbindungen gemäß der Erfindung verwendet werden in Assays wie beispielsweise kompetitiven Assays zum Testen der Wirksamkeit von denkbaren Inhibitoren des Kalium-Flusses. Diese Verfahrensweisen gemäß der Erfindung können sowohl in vitro als auch in vivo durchgeführt werden. Assays bzw. Tests gemäß der vorliegenden Erfindung können beispielsweise durchgeführt werden durch Modifizieren von in diesem technischen Bereich anerkannten Verfahren, um es zu ermöglichen, dass die Verbindungen gemäß der Erfindung in solchen Verfahren eingebaut werden können. Solche Modifikationen liegen bestens innerhalb des Wissens von in diesem technischen Bereich erfahrenen Fachleuten.

[0103] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird dieses Verfahren therapeutisch zum Behandeln oder Vorbeugen eines Zustands angewendet, der positiv beeinflusst werden kann, indem man den Kalium-Fluss moduliert. In einer derzeit bevorzugten Ausführungsform ist der Zustand die Sichelzell-Krankheit.

[0104] In einem vierten Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zum Reduzieren der Erythrozyten-Dehydratation bereit. Dieses Verfahren umfasst ein In-Kontakt-Bringen eines Erythrozyten mit einer wirksamen Menge einer Verbindung, die eine Struktur gemäß der obigen Formel (I) hat. In einer bevorzugten Ausführungsform haben die Verbindungen eine Struktur gemäß der obigen Formel (II) und noch mehr bevorzugt eine Struktur gemäß der obigen Formel (III).

[0105] Dieser Aspekt der Erfindung kann angewendet werden für einen Bereich von Zwecken, der beispielsweise das Studieren des Mechanismus der Erythrozyten-Dehydratation, ein Untersuchen von Verbindungen, die eine Erythrozyten-Dehydratation inhibieren oder umkehren und das Behandeln oder Vorbeugen von Zuständen, die mit einer Erythrozyten-Dehydratation assoziiert sind, einschließt.

[0106] In einem fünften Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zum Behandeln oder Vorbeugen der Sichelzell-Krankheit bereit. Das Verfahren umfasst ein Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge einer Verbindung an ein Subjekt, das unter Sichelzell-Krankheit leidet, wobei die Verbindung eine Struktur gemäß der obigen Formel (I) hat. In einer bevorzugten Ausführungsform haben die Verbindungen eine Struktur gemäß der obigen Formel (II) und noch mehr bevorzugt eine Struktur gemäß der obigen Formel (III).

[0107] Dieser Aspekt der Erfindung kann angewendet werden zum Vorbeugen des Anspringens akuter Sichelzell-Ereignisse oder zur Verbesserung der Wirkungen dieser Ereignisse. Weiter kann das Verfahren verwendet werden zum Behandeln und/oder Vorbeugen einer chronischen Sichelzell-Krankheit. Das Verfahren kann Gebrauch machen von den Verbindungen gemäß der Erfindung per se oder – vorzugsweise – von den pharmazeutischen Formulierungen gemäß der Erfindung. Die relevanten Verabreichungswege, die Wahl der Dosierungs-Konzentrationen und die Häufigkeit des Dosierens wurden oben diskutiert.

[0108] In einem sechsten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Verstärken der Beständigkeit gegen Abbau in einem biologischen Medium eines Kalium-Kanal-Inhibitors bereit, der eine Phenyl-Einheit umfasst. Das Verfahren umfasst das Ersetzen eines Restes, der eine Phenyl-Gruppe umfasst, anstelle eines Wasserstoff-Atoms an dem Phenyl-Rest des Inhibitors.

[0109] Das Verfahren kann in der Praxis durchgeführt werden unter Verwendung von Kalium-Kanal-Inhibitoren, die einen großen Bereich von Strukturen aufweisen. Die einzige Beschränkung der Struktur des Inhibitors ist, dass ein Phenyl-Ring als Komponente der Struktur des Inhibitors zugegen sein muss. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Phenyl-Ring eine Komponente eines Triphenylmethyl-Restes. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der Abbau auf weniger als 60% des Wertes der Verbindung reduziert, die abgebaut wird, nachdem sie für 2 Stunden mit einem biologischen Medium in Kontakt erbracht wurde.

[0110] Das substitutionsmäßige Ersetzen des Fluor-Restes anstelle des Wasserstoffs kann bewirkt werden durch Verfahren, die in der vorliegenden Anmeldung offenbart werden, oder durch andere Verfahren, wie sie Standard in der organischen Chemie sind. Ein großer Bereich von Verbindungen, die die erforderliche Substi-

tution aufweisen, kann aus Fluoraryl-Verbindungen zusammengebaut werden, die in einfacher Weise von kommerziellen Händlern wie beispielsweise der Firma Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) erhältlich sind. Darüber hinaus existieren zahlreiche Standard-Wege der Synthese für ein leichtes Aufbauen einer Verbindung, die als Ausgangsmaterial für Verbindungen geeignet sind, wie sie in Übereinstimmung mit dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung synthetisiert werden.

[0111] Beim Wählen von Ziel-Verbindungen zum Umwandeln von Fluor-Derivaten versteht ein Fachmann mit üblichem Sachverstand in diesem Bereich, dass es wünschenswert ist, mit Aryl-Resten enthaltenden Verbindungen zu beginnen, die eine bekannte Aktivität gegenüber dem Gardos-Kanal haben. Viele in diesem technischen Bereich anerkannte Mittel mit antimykotischen Eigenschaften haben eine belegbare Gardos-Kanal-Aktivität. So würde ein Fachmann mit Sachverstand in diesem technischen Bereich Mittel wählen, die die antimykotische Aktivität aufweisen, oder Analoge zu diesen Verbindungen, um fluoriierte Analoge davon herzustellen. Ein Testen der neuen Mittel auf Wirksamkeit und Beständigkeit gegen biologischen Abbau kann routinemäßig von einem Fachmann in diesem technischen Bereich unter Anwendung der Verfahren bewirkt werden, die in der vorliegenden Erfindung zur Verfügung gestellt werden, zusätzlich zu solchen Verfahren, wie sie in diesem technischen Bereich bekannt sind. Darüber hinaus kann ein sachverständiger Fachmann durch routinemäßiges Experimentieren unter Anwendung dieser Verfahrensweisen schnell einen oder mehrere Aryl-Rest(e) enthaltende Moleküle hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber dem Gardos-Kanal testen. Fluor-Derivate vielversprechender Ziel-Moleküle können dann hergestellt und getestet werden, wie dies oben diskutiert wurde.

Optimierte pharmazeutische Eigenschaften

a) Metabolische Beständigkeit

[0112] Die vorliegenden Inhibitoren des Gardos-Kanals auf Triphenylacetamid-Basis, in denen eine oder mehrere der Phenyl-Gruppen mit einem oder mehreren Fluor-Atom(en) oder Fluor enthaltenden Einheiten substituiert sind, haben überraschenderweise eine hohe metabolische Stabilität im Vergleich zu bekannten Inhibitoren wie beispielsweise Clotrimazol. Beispielsweise wird Clotrimazol 19 zu 94,2% abgebaut nach Inkubieren für 2 Stunden in einer Leber-Mikrosomen-Zubereitung. Im Gegensatz dazu werden beispielhafte fluoriierte Verbindungen gemäß der Erfindung wie beispielsweise die Verbindungen 3 und 5 nur zu 24% bzw. 29% nach einer ähnlichen Inkubierung abgebaut. Diese fluoriierten Triphenylacetamide sind auch merklich stabiler als ihre nichtfluorierten Analoge. Beispielsweise wird die Verbindung 20 zu 87% nach einer ähnlichen Inkubierung abgebaut.

[0113] Obwohl ein allgemeiner Trend in Richtung auf eine verstärkte Stabilität bei Fluor-Substitution beobachtet wird, trifft dies nicht auf alle fluoriierten Derivate zu. Beispielsweise wurde ein Triphenylacetamid, das an zwei der Phenyl-Ringe in der 3-Position und in der 3'-Position substituiert ist (Verbindung 9) nach 2 Stunden in einer Mikrosomen-Zubereitung zu 97% abgebaut. Damit erhöhte in diesem Beispiel eine Fluor-Substitution offensichtlich den Wert des Abbaus relativ sowohl zu Clotrimazol als auch zu dem nicht-fluorierten Triphenylacetamid.

[0114] In ähnlicher Weise werden auch analoge Verbindungen, die zwei Fluor-Substituenten an einem Ring tragen, schnell abgebaut. Beispielsweise wurden nach 2 Stunden in einer Mikrosomen-Zubereitung Derivate, die in der 2- und 4-Position substituiert sind (Verbindung 8) und in der 3- und 4-Position substituiert sind (Verbindung 7) zu 61% bzw. 85% abgebaut. Weiter wurden auch bestimmte Verbindungen, die an jedem der drei Phenyl-Ringe monosubstituiert sind, schnell abgebaut. Beispielsweise wurde ein Derivat, das in der 3-Position, der 3'-Position und der 3"-Position substituiert ist (Verbindung 17), zu 82% nach 2 Stunden in einer Mikrosomen-Zubereitung abgebaut. Im Hinblick auf die obigen Ergebnisse wurde gefunden, dass nur ausgewählte Substitutions-Muster fluoriierten Triphenylacetamiden das nötige Maß an Stabilität verleihen. Eine ähnliche Schwankung der Wirksamkeit einer Verbindung und Selektivität mit einem bestimmten Substitutions-Muster wird auch beobachtet.

b) Wirksamkeit

[0115] Ein unerwartetes Ergebnis des Einsetzens von Fluor anstelle von Wasserstoff in den Phenyl-Ringen ist eine bemerkenswert erhöhte Wirksamkeit der Verbindungen gemäß der Erfindung für den Gardos-Kanal relativ zu Clotrimazol und zu nicht-fluorierten Triphenylacetamiden. Beispielsweise hat ein nicht-fluoriertes Triphenylacetamid (Verbindung 20) einen IC_{50} -Wert von 50 nM gegenüber dem Gardos-Kanal. Im Gegensatz dazu hat ein analoges mono-fluoriertes Triphenylacetamid (Verbindung 2) einen IC_{50} -Wert von 15 nM, was für eine

330%ige Verbesserung der Wirksamkeit steht.

[0116] Obwohl ein allgemeiner Trend in Richtung auf eine verbesserte Wirksamkeit bei den fluorierten Triphenylacetamid-Derivaten beobachtet wird, scheinen bestimmte Substitutions-Muster die Wirksamkeit relativ zu der unsubstituierten Stamm-Verbindung verstärkt zu verbessern. Ein besonderer Aspekt dieses allgemeinen Trends ist, dass Derivate, in denen mehr als ein Ring substituiert ist, allgemein wirksamer sind als solche, in denen nur ein Ring substituiert ist. Beispielsweise hat Verbindung 8 zwei Fluor-Substituenten in einem einzelnen Ring in der 2- und der 4-Position und weist einen IC_{50} -Wert von 34 nM auf. Im Gegensatz dazu hat Verbindung 12 einen Fluor-Substituenten an einem Ring an einer 2-Position, einen Fluor-Substituenten an einem anderen Ring in der 4'-Position und weist einen IC_{50} -Wert von 5 nM auf. Dies spiegelt eine Verbesserung der Wirksamkeit der Verbindung 12 gegenüber der Verbindung 8 von fast 700% wider. Darüber hinaus hat Verbindung 12 eine Wirksamkeit, die 1.000% größer ist als diejenige der nicht-fluorierten Stammverbindung 20. Dies stellt eine Erhöhung der Potenz gegenüber Clotrimazol von 2.000% dar.

[0117] Trotz des Trends in Richtung auf eine Erhöhung der Wirksamkeit ist der Grad der Verbesserung in der Wirksamkeit einer Verbindung a priori nicht voraussagbar aus der Zahl der Substituenten pro Ring. Beispielsweise hat Verbindung 9 einen Fluor-Substituenten an einem Ring in einer 3-Position und hat einen Fluor-Substituenten an einem anderen Ring in einer 3'-Position und hat einen IC_{50} -Wert von 30 nM. Eine ähnliche Verbindung 11, die einen Fluor-Substituenten an einem Ring in einer 2-Position und einen Fluor-Substituenten an einem anderen Ring in der 4'-Position aufweist, hat einen IC_{50} -Wert von 5 nM, was eine Erhöhung der Wirksamkeit der Verbindung 11 gegenüber Verbindung 9 von 600% bedeutet.

[0118] Wie oben diskutiert, wurde gefunden, dass die Wirksamkeit von fluorierten Triphenylacetamiden gegenüber dem Gardos-Kanal manipuliert werden kann durch eine geschickte Wahl sowohl der Zahl der Fluor-Substituenten als auch ihre Anordnung an den Phenyl-Ringen dieser Verbindungen. Überraschenderweise werden ähnliche Wirkungen beobachtet für die Selektivität gegenüber dem Gardos-Kanal bei diesen Verbindungen.

c) Selektivität

[0119] Zusätzlich zu Wirksamkeit und Bioverfügbarkeit muss ein pharmazeutisches Mittel zur Behandlung von Sichelzell-Anämie durch Inhibieren des Ionen-Flusses selektiv für den Ionen-Kanal sein, der ihr Target ist. Eine Wechselwirkung des Mittels mit Kanälen, die von dem Target verschieden sind, ruft mit Wahrscheinlichkeit unerwünschte und potentiell gefährliche Nebenwirkungen hervor. Beispielsweise ist bekannt, dass Clotrimazol und einige seiner Analogen mit der langsamen Komponente des verzögerten Gleichgewichtes für den Kalium-Strom in Myozyten (I_{Ks}) Wechselwirken. Eine Blockade dieses Stroms ist verknüpft mit einem plötzlichen Tod aufgrund ventrikulärer Fibrillierung (Turgeon et al., Circulation Research 75: 879–886 (1994)). Daher zeigen sich wahrscheinlich Verbindungen, die eine Selektivität für den Gardos-Kanal gegenüber I_{Ks} zeigen, als sicherere und wirksamere pharmazeutische Mittel.

[0120] Noch ein anderes unerwartetes Ergebnis einer Fluorierung eines oder mehrerer der Ringe der Gardos-Kanal-Inhibitoren ist eine erhöhte Selektivität dieser Verbindungen für den Gardos-Kanal relativ zu anderen Kalium-Kanälen. Einige der Fluor-substituierten Triphenylacetamide gemäß der Erfindung zeigen eine dramatisch verbesserte Selektivität gegenüber dem Gardos-Kanal im Vergleich zu I_{Ks} , und zwar relativ sowohl zu Clotrimazol als auch zu dem nicht-fluorierten Stamm-Triphenylacetamid. Beispielsweise sind Verbindungen 3 und 5 etwa 16-fach bzw. 18-fach mehr selektiv gegenüber dem Gardos-Kanal im Vergleich zu I_{Ks} als Clotrimazol. Weiter sind diese Verbindungen beide etwa 6-fach mehr selektiv gegenüber dem Gardos-Kanal als die unsubstituierte Stamm-Triphenylacetamid-Verbindung 20.

[0121] Es wurde nun gefunden, dass Fluor-substituierte Triphenylmethan-Derivate, insbesondere Fluor-substituierte Stickstoff-haltige Verbindungen wie beispielsweise Triphenylacetamide wirksam den Gardos-Kanal von Erythrozyten inhibieren. Darüber hinaus zeigen die Fluor-substituierten Verbindungen eine Beständigkeit gegen Abbau in einem biologischen Medium, die in überraschendem Umfang erhöht ist relativ zu den entsprechenden Verbindungen, die nicht mit Fluor substituiert sind.

[0122] Die Verbindungen, Zubereitungen und Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung werden weiter durch die Beispiele veranschaulicht, die nun folgen.

Beispiele

[0123] Beispiel 1 veranschaulicht Verfahrensweisen für die Synthese und Charakterisierung der Verbindungen gemäß der Erfindung. Die Verbindungen gemäß der Erfindung wurden in im Wesentlichen reiner Form und in guten Ausbeuten unter Anwendung der Verfahrensweisen isoliert, die detailliert in diesem Beispiel beschrieben sind.

[0124] Beispiel 2 veranschaulicht den Test der Verbindungen gemäß der Erfindung auf ihre Beständigkeit gegenüber Abbau in einem biologischen Medium. In diesem Beispiel bilden menschliche Leber-Mikrosomen das biologische Medium. Die Verbindungen gemäß der Erfindung – so wurde gefunden – zeigen eine bemerkenswerte Beständigkeit gegenüber Abbau durch die Mikrosomen-Zubereitung, relativ zu nicht-fluorierten Triphenylmethyl- Verbindungen.

[0125] Beispiel 3 beschreibt eine pharmakokinetische Untersuchung der Verbindungen gemäß der Erfindung in der Ratte. Die fluorierten Verbindungen gemäß der Erfindung – so wurde gefunden – zeigen eine in vivo-Halbwertszeit, die relativ zu nicht-fluorierten Derivaten erhöht war.

[0126] Beispiel 4 beschreibt einen Bio-Assay zum Messen der Inhibierung des Kalium-Kanals (Gardos-Kanals) durch die Verbindungen gemäß der Erfindung.

Beispiel 1

[0127] Dieses Beispiel veranschaulicht Verfahrensweisen zur Synthese und Charakterisierung von Verbindungen gemäß der Erfindung. Die Verbindungen gemäß der Erfindung wurden in im Wesentlichen reiner Form und in guten Ausbeuten unter Anwendung der Verfahrensweisen isoliert, die im Detail nachfolgend angegeben sind. Das Beispiel stellt Verfahrensweisen von generellem Umfang bereit, die zum Synthetisieren von Verbindungen gemäß der Erfindung verwendet werden können, die von den Verbindungen, die speziell angegeben wurden, verschieden sind.

1.1 Materialien und Verfahrensweisen

[0128] Reagenzien wurden so wie erhalten verwendet, so lange nichts anderes angegeben ist. Das Verfahren von Franco et al., J. Chem. Soc. Perkins Trans. II, 443 (1988), wurde zur Herstellung nicht-kommerzieller Fluorphenyllithium-Reagenzien und Fluorbenzophenonen verwendet. Alle gegenüber Feuchtigkeit empfindlichen Reaktionen wurden unter Stickstoff-Atmosphäre unter Verwendung ofengetrockneter Glas-Waren durchgeführt. Die Reaktionen wurden mittels TLC (Dünnschicht-Chromatographie) auf Silica-Gel 60 F₂₅₄ bei Nachweis durch Verkohlen mit dem Hanessian-Farbstoff überwacht (Khadem et al., Anal. Chem., 1958, 30 (1965)). Säulen-Chromatographie wurde durchgeführt unter Verwendung von Silica-Gel von der Firma Selecto (32-63 μ m). Schmelzpunkte wurden bestimmt an einer Elektrothermal-Einheit IA9000 und sind unkorrigiert. ¹H(300 MHz)- und ¹⁹F-(282 MHz)-Spektren wurden aufgenommen auf einer NMR-Maschine der Firma Varian (Gemini 2000) bei Raumtemperatur in CDCl₃. Tetramethylsilan wurde als interne Referenz verwendet. Eine chirale Trennung von Verbindung 1 wurde durchgeführt mittels Chiral Technologien unter Verwendung einer CHI-RA-CEL®-OD-R-Säule und Acetonitril/Wasser als Eluens.

1.2 Herstellung von Verbindung 1

[0129] Verbindung 1 wurde hergestellt in 28%iger Ausbeute in vier Schritten aus im Handel erhältlichen Vorstufen

1.2a Synthese von (2-Fluorphenyl)-(4-fluorphenyl)-phenylmethanol

[0130] Phenylmagnesiumbromid (1,83 ml, 5,5 mMol) wurde tropfenweise einer gerührten Lösung von 2,4'-Difluorbenzophenon (1,09 g, 5,0 mMol) in t-Butylmethylether (12 ml) bei Raumtemperatur ("RT", ca. 25°C) zugesetzt. Nachdem die Zugabe abgeschlossen war, wurde die Reaktionsmischung unter Rückfluss 3 h lang erhitzt. Die Lösung wurde auf RT abgekühlt und wurde in eiskalte 1,0 M HCl (aq) (20 ml) gegossen. Die organischen Komponenten wurden mit EtOAc (3 × 10 ml) extrahiert und getrocknet (Na₂SO₄). Ein Konzentrieren unter verringertem Druck ergab das gewünschte Produkt (2-Fluorphenyl)-(4-fluorphenyl) phenylmethanol) als blassbraunes Öl, das in der nächsten Reaktion ohne irgendeine weitere Reinigung verwendet wurde.

1.2b Synthese von (2-Fluorphenyl)-(4-fluorphenyl)-phenylacetonitril

[0131] (2-Fuoorphenyl)-(4-fluorphenyl)-phenylmethanol (1,47 g, 5,0 mMol) wurde einer 20%igen Lösung von Acetylchlorid in Dichlormethan (10 ml) bei RT zugesetzt. Die resultierende Lösung wurde 12 h lang gerührt, wonach das Lösungsmittel durch Verdampfung entfernt wurde. Toluol (2 × 20 ml) wurde dem Rückstand zugesetzt, und dieses verdampft; daraus ergab sich rohes 2-Fuoorphenyl-(4-fluorphenyl)-phenylchlormethan, das ohne Reinigung im nächsten Schritt verwendet wurde.

[0132] Kupfercyanid (0,50 g, 5,5 mMol) wurde dem Rückstand zugesetzt, und die resultierende Mischung wurde 2,5 h lang auf 130°C erhitzt. Sobald sich die Reaktionsmischung auf etwa 110°C abgekühlt hatte, wurde Toluol (30 ml) zugesetzt und die Mischung wurde kräftig 10 min lang gerührt. Die Mischung wurde filtriert, und das Lösungsmittel wurde unter verringertem Druck entfernt. Heißes Hexan (30 ml) wurde dem rohen Material zugesetzt, und die Mischung wurde kräftig für die Zeit von 30 min gerührt. Eine Filtration und ein Waschen mit noch mehr Hexan ergaben das gewünschte Cyano-Produkt in Form eines weißen Feststoffes, der ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

1.2c Synthese von (2-Fluorphenyl)-(4-fluorphenyl)-phenylacetamid (1)

[0133] Eine Lösung aus konzentrierter Schwefelsäure (10 ml) und Eisessig (10 ml) wurde rohem (2-Fluorphenyl)-(4-fluorphenyl)-phenylacetonitril (1,48 g, 5,0 mMol) bei RT zugesetzt.

[0134] Die resultierende orangefarbene Lösung wurde gerührt und für die Zeit von 3 h auf 130°C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C abgekühlt und wurde durch tropfenweisem Zusatz von Ammoniumhydroxid neutralisiert. Wasser wurde zugegeben (30 ml) und die organischen Komponenten wurden mit Chloroform (3 × 30 ml) extrahiert. Die organischen Fraktionen wurde zusammengegeben und nachfolgend mit Wasser (2 × 10 ml) und Kochsalzlösung (20 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet (Na_2SO_4) und unter verringertem Druck konzentriert. Hexan (30 ml) wurde dem resultierenden hellbraunen Öl zugesetzt und so eine Fällung initiiert. Das Präzipitat wurde gemahlen und anschließend mit heißem Hexan (30 ml) gewaschen. Ein Kristallisieren aus Hexan/Dichlormethan ergab das gewünschte Produkt (2-Fuoorphenyl)-(4-fluorphenyl)-phenylacetamid in Form eines weißen kristallinen Feststoffes (0,45 g, 1,4 mMol, 28%, 4 Schritte).

1.3 Herstellung von Verbindung 3

[0135] Verbindung 3 wurde in drei Schritten aus im Handel erhältlichen Vorstufen in 58%iger Ausbeute hergestellt.

1.3a Synthese von Bis(4-fluorphenyl)-phenylmethanol

[0136] Phenylmagnesiumbromid (100 ml, 0,1 Mol) wurde tropfenweise einer gerührten Lösung von 4,4'-Difluorbenzophenon (20 g, 0,092 Mol) in t-Butylmethylether (150 ml) bei RT zugegeben. Nachdem die Zugabe abgeschlossen war, wurde die Reaktionsmischung am Rückfluss 3 h lang erhitzt. Die Lösung wurde auf RT abgekühlt und wurde in eiskalte wässrige 1,0 M HCl (100ml) gegossen. Die organischen Komponenten wurden mit EtOAc (2 × 50 ml) extrahiert und getrocknet (Na_2SO_4). Ein Konzentrieren unter verringertem Druck ergab Bis(4-fluorphenyl)-phenylmethanol als blassgelbes Öl. Nach dem Trocknen im Vakuum für 2 h wurde das rohe Material in der nächsten Reaktion ohne irgendwelche weitere Reinigung verwendet.

1.3b Synthese von Bis(4-fluorphenyl)-phenylacetonitril

[0137] Bis(4-fluorphenyl)-phenylmethanol (0,092 Mol) wurde zu einer 20%igen Lösung von Acetylchlorid in Dichlormethan (50 ml) bei RT gegeben. Die resultierende purpurfarbene Lösung wurde für die Zeit von 12 h gerührt, wonach das Lösungsmittel durch Verdampfung entfernt wurde. Toluol (100 ml) wurde dem Rückstand zugesetzt, und dies wurde dann verdampft, was rohes Bis(4-fluorphenyl)-phenylchlormethan ergab, das in dem folgenden Schritt ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

[0138] Kupfercyanid (8,24 g, 0,11 Mol) wurde dem rohen Rückstand zugesetzt, und die Mischung wurde auf 140°C für 3 h erhitzt. Die Reaktion wurde auf 100°C abgekühlt, und Toluol (100 ml) wurde zugesetzt. Die resultierende Mischung wurde kräftig für 10 min gerührt, auf RT abgekühlt, durch ein kurzes Pad aus Siliciumoxid filtriert, und das Lösungsmittel wurde unter verringertem Druck entfernt, und dies ergab einen braunen Feststoff. Heißes Hexan (100 ml) wurde dem pulverförmigen Rohmaterial zugesetzt, und die Mischung wurde kräftig 4 h lang gerührt. Ein Filtrieren und Waschen mit weiterem Hexan ergab das gewünschte Bis(4-fluorphe-

nyl-)phenylacetonitril in Form eines weißen Feststoffs (18,9 g, 67%).

1.3c Synthese von Bis(4-fluorphenyl-)phenylacetamid (3)

[0139] Eine Lösung aus konzentrierter Schwefelsäure (50 ml) und Eisessig (50 ml) wurde zu Bis(4-fluorphenyl-)phenylacetonitril (18,9 g, 0,06 Mol) bei RT gegeben. Die resultierende orangefarbene Lösung wurde gerührt und für 3 h auf 130°C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C abgekühlt, in Eisessig (150 ml) gegossen und mit Ammoniumhydroxid neutralisiert. Die organischen Komponenten wurden mit Chloroform (3 × 100 ml) extrahiert, zusammengegeben und mit Kochsalzlösung (2 × 50 ml) gewaschen. Die organischen Komponenten wurden getrocknet (Na_2SO_4) und unter verringertem Druck konzentriert, und dies ergab einen gelb-orangefarbenen Feststoff. Der Feststoff wurde mit heißem Hexan (100 ml) für die Zeit von 30 min gerührt und dann filtriert. Ein Kristallisieren aus Dichlormethan/Hexan ergab Bis(4-fluorphenyl-)phenylacetamid (3) in Form eines weißen kristallinen Feststoffs (16,9 g, 0,052 Mol, 87%).

1.4 Herstellung von Verbindung 5

[0140] Verbindung 5 wurde in 66%iger Ausbeute in vier Schritten aus im Handel erhältlichen Vorstufen hergestellt.

1.4a Synthese von Bis(4-fluorphenyl-)2-fluorphenylmethanol

[0141] p-Fluorphenylmagnesiumbromid (124 ml, 0,12 Mol) wurde tropfenweise einer gerührten Lösung von 2,4'-Difluorbenzophenon (24,5 g, 0,11 Mol) in t-Butylmethylether (100 ml) bei RT zugesetzt. Nachdem die Zugabe vollständig abgeschlossen war, wurde die Reaktionsmischung am Rückfluss für die Zeit von 3 h erhitzt. Die Lösung wurde dann auf Raumtemperatur abgekühlt und in eiskalte 1,0 M HCl (aq) (100 ml) gegossen. Die organischen Komponenten wurden mit EtOAc (3 × 70 ml) extrahiert und getrocknet (Na_2SO_4). Ein Konzentrieren unter verringertem Druck ergab das gewünschte Produkt Bis (4-Fluorphenyl-)2-fluorphenylmethanol als blassgelbes Öl, das im nächsten Reaktionsschritt ohne irgendwelche weitere Reinigung verwendet wurde.

1.4b Synthese von Bis(4-fluorphenyl-)2-fluorphenylacetonitril

[0142] Eine 20%ige Lösung von Acetylchlorid in Dichlormethan (60 ml) wurde dem rohen Bis(4-fluorphenyl-)2-fluorphenylmethanol bei RT zugesetzt. Die resultierende Lösung wurde für die Zeit von 12 h gerührt, wonach das Lösungsmittel durch Verdampfen entfernt wurde. Toluol (100 ml) wurde dem Rückstand zugesetzt und wurde dann verdampft, was rohes Bis(4-fluorphenyl-)2-fluorphenylchloromethan ergab, das im nächsten Schritt ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

[0143] Kupfercyanid (12 g, 0,13 Mol) wurde dem Rohmaterial zugesetzt, und die resultierende Mischung wurde für die Zeit von 3 h auf 160°C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf etwa 100°C abgekühlt, Toluol (100 ml) wurde zugesetzt und die Mischung wurde kräftig für die Zeit von 10 min gerührt. Die Mischung wurde abgekühlt, durch einen kurzen Siliciumoxid-Stopfen filtriert und unter verringertem Druck konzentriert. Heißes Hexan (100 ml) wurde dem Rohmaterial zugesetzt und die Mischung wurde kräftig für die Zeit von 30 min gerührt. Ein Filtrieren und Waschen mit noch mehr Hexan ergab das gewünschte Bis(4-fluorphenyl-)2-fluorphenylacetonitril in Form eines weißen Feststoffs (25,3 g, 70 %)

1.4c Synthese von Bis(4-fluorphenyl-)2-fluorphenylacetamid (5)

[0144] Eine Lösung von konzentrierter Schwefelsäure (10 ml) und Eisessig (10 ml) wurde zu Bis(4-fluorphenyl-)2-fluorphenylacetonitril (5,0 g, 0,015 Mol) bei RT zugegeben. Die resultierende orangefarbene Lösung wurde gerührt und auf 130°C für die Zeit von 2 h erhitzt. Die Reaktion wurde auf 0°C abgekühlt und wurde in Eis gegossen (50 g). Die resultierende Mischung wurde durch tropfenweise Zugabe von Ammoniumhydroxid neutralisiert. CH_2Cl_2 (100 ml) wurde zugesetzt und die organischen Komponenten wurden mit weiteren CH_2Cl_2 (3 × 30 ml) extrahiert. Die kombinierten organischen Fraktionen wurden aufeinander folgend mit Wasser (2 × 10 ml) und Kochsalzlösung (20 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet (Na_2SO_4) und unter verringertem Druck konzentriert und ergab einen gelborangefarbenen Feststoff. Der Feststoff wurde pulverisiert und wurde wiederholt mit heißem Hexan (50 ml) gewaschen, bis keine Färbung in dem Filtrat nachweisbar war. Ein Kristallisieren aus Hexan/Dichlormethan ergab das gewünschte Produkt Bis(4-fluorphenyl-)2-fluorphenylacetamid 5 in Form eines weißen kristallinen Feststoffs (4,98 g, 0,0145 Mol, 94%).

1.5 Herstellung von Verbindung 16

[0145] Verbindung 16 wurde in 11%iger Ausbeute in vier Schritten aus im Handel erhältlichen Vorstufen hergestellt.

1.5a Synthese von Bis(4-fluorphenyl)-3-fluorphenylmethanol

[0146] n-Butyllithium (4 ml, 10 mMol) wurde tropfenweise zu einer gerührten Lösung von Brom-3-fluorbenzol (1,75 g, 10 mMol) in THF (25 ml) bei -78°C gegeben. Nach 20 min wurde 4,4'-Benzophenon (1,96 g, 9 mMol) zugesetzt. Man ließ die Reaktionsmischung auf 0°C über einen Zeitraum von 30 min erwärmen. Gesättigte NH_4Cl (aq) (30 ml) wurde zugesetzt und das Rühren wurde für 30 min fortgesetzt. EtOAc (20 ml) wurde zugesetzt und die organischen Komponenten wurden abgetrennt, mit Kochsalz-Lösung (20 ml) gewaschen, getrocknet (Na_2SO_4) und unter verringertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (100% Hexan bis 100% CH_2Cl_2) und ergab so Bis(4-fluorphenyl)-3-fluorphenylmethanol (2,81 g, 92%).

1.5b Synthese von Bis(4-fluorphenyl)-3-fluorphenylacetonitril

[0147] Bis(4-fluorphenyl)-3-fluorphenylmethanol (999 mg, 3,18 mMol) wurde zu einer 20%igen Lösung von Acetylchlorid in Dichlormethan (10 ml) bei RT gegeben. Die resultierende purpurfarbene Lösung wurde 12 h lang gerührt, wonach das Lösungsmittel durch Verdampfen entfernt wurde. Toluol (20 ml) wurde dem Rückstand zugesetzt und dann verdampft, was rohes Bis(4-fluorphenyl)-3-fluorphenylchloromethan ergab, welches im nächsten Schritt ohne Reinigung verwendet wurde.

[0148] Kupfercyanid (344 mg, 3,82 mMol) wurde dem Rohmaterial zugesetzt und die resultierende Mischung wurde auf 140°C für die Zeit von 3 h erwärmt. Die Reaktionsmischung wurde auf etwa 110°C abgekühlt, Toluol (50 ml) wurde zugesetzt und die Mischung wurde kräftig für die Zeit von 10 min gerührt. Die Mischung wurde auf RT abgekühlt, durch ein kurzes Pad aus Siliciumoxid filtriert, und das Lösungsmittel wurde unter verringertem Druck entfernt, was einen beigefarbenen Feststoff ergab. Heißes Hexan (100 ml) wurde dem pulverförmigen Rohmaterial zugesetzt und die Mischung wurde kräftig für 1 h lang gerührt. Ein Filtrieren und Waschen mit weiterem Hexan ergab Bis(4-fluorphenyl)-3-fluorphenylacetonitril in Form eines weißen Feststoffs, der ohne weitere Reinigung eingesetzt wurde.

1.5c Synthese von Bis(4-fluorphenyl)-3-fluorphenylacetamid (16)

[0149] Eine Lösung aus konzentrierter Schwefelsäure (10 ml) und Eisessig (10 ml) wurde zu Bis(4-fluorphenyl)-3-fluorphenylacetonitril (3,18 mMol) bei RT gegeben. Die resultierende orangefarbene Lösung wurde gerührt und für die Zeit von 3 h auf 130°C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C abgekühlt, und in Eiswasser (50 ml) gegossen und mit Ammoniumhydroxid neutralisiert. Die organischen Komponenten wurden mit Chloroform (3×50 ml) extrahiert. Die organischen Fraktionen wurden in Kombination mit Kochsalzlösung (2×20 ml) gewaschen, getrocknet (Na_2SO_4) und unter verringertem Druck konzentriert, was einen gelb-orangefarbenen Feststoff ergab. Der Feststoff wurde mit heißem Hexan (50 ml) 30 min lang gerührt und filtriert. Ein Kristallisieren aus Dichlormethan/Hexan ergab das gewünschte Produkt Bis(4-fluorphenyl)-3-fluorphenylacetamid 16 in Form eines weißen, kristallinen Feststoffs (147 mg, 0,43 mMol, 11%, 4 Schritte).

1,6 Charakterisieren der Verbindungen durch ^1H - und ^{19}F NMR-Spektroskopie und Schmelzpunkt

[0150] Die Verbindungen gemäß der Erfindung wurden charakterisiert durch eine Kombination aus ^1H - und ^{19}F NMR-Spektroskopie, und es wurden auch die Schmelzpunkte (Smp.) der Verbindungen bestimmt.

- 1: ^1H -NMR Γ (CHCl_3): 7,39–7,26 (8H, m), 7,15–6,90 (5H, m), 5,83 (1H, brs), 5,72 (1H, brs); ^{19}F -NMR Γ (CHCl_3): $-103,4$ (1F, s), $-115,8$ (1F, s) Smp.: 180 – 181°C .
- 2: ^1H -NMR Γ (CHCl_3): 7,37–7,28 (6H, m), 7,15–7,05 (2H, m), 6,93 (1H, dt, $J = 8$ und 2 Hz), 5,90 (1H, brs), 5,68 (1H, brs); ^{19}F -NMR Γ (CHCl_3): $-103,4$ (1F, m); Smp.: 210°C .
- 3: ^1H -NMR Γ (CHCl_3): 7,37–7,20 (9H, m), 7,04–6,91 (4H, m), 5,81 (1H, brs), 5,71 (1H, brs); ^{19}F -NMR Γ (CHCl_3): $-115,7$ (2F, s); Smp.: 180 – 181°C .
- 4: ^1H -NMR Γ (CHCl_3): 7,37–7,24 (12H, m), 6,97 (2H, t, $J = 8,5$ Hz), 5,83 (1H, brs), 5,75 (1H, brs); ^{19}F -NMR Γ (CHCl_3): $-116,2$ (1F, s); Smp.: 193 – 194°C .
- 5: ^1H -NMR Γ (CHCl_3): 7,41–7,34 (1H, m), 7,29–7,23 (4H, m), 7,16 (1H, ddd, $J = 18,1$, $8,1$ und $1,2$ Hz), 7,15 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 7,05–6,97 (4H, m), 6,93–6,87 (1H, dt, $J = 8,0$ und $1,4$ Hz), 5,90 (1H, brs), 5,74 (1H, brs); ^{19}F -NMR Γ (CHCl_3): $-103,3$ (1F, s), $-115,5$ (2F, s); Smp.: 168 – 169°C .

6: $^1\text{H-NMR}$ Γ (CHCl_3): 7,64–7,54 (4H, m), 7,40–7,34 (6H, m), 5,70 (2H, brs); $^{19}\text{F-NMR}$ Γ (CHCl_3): 137,3 (2F, d, $J = 19,2$ Hz), –155,8 (1F, t, $J = 21,4$ Hz), –161,9 (2F, dd, $J=21,4$ und 17,1 Hz).
 7: $^1\text{H-NMR}$ Γ (CHCl_3): 7,37–7,31 (6H, m), 7,28–7,20 (5H, m), 7,12–7,04 (2H, m), 5,90 (1H, brs), 5,74 (1H, brs); $^{19}\text{F-NMR}$ Γ (CHCl_3): –137,8 bis –137,9 (1F, m), –140,3 bis –140,4 (1F, m); Smp.: 174–175°C.
 8: $^1\text{H-NMR}$ Γ (CHCl_3): 7,37–7,28 (10H, m), 6,95–6,83 (2H, m), 6,81–6,75 (1H, m), 5,92 (1H, brs), 5,80 (H, brs); $^{19}\text{F-NMR}$ Γ (CHCl_3): –99,1 (1F, dd, $J = 19,2$ und 8,5 Hz), –111,6 (1F, m); Smp.: 187–188°C.
 9: $^1\text{H-NMR}$ Γ (CHCl_3): 7,38–7,22 (7H, m), 7,09–6,96 (6H, m), 5,83 (1H, brs), 5,77 (1H, brs); $^{19}\text{F-NMR}$ Γ (CHCl_3): –112,6 (2F, dd, $J = 17,1$ und 6,4 Hz); Smp.: 195–196°C.
 13: $^1\text{H-NMR}$ Γ (CHCl_3): 7,26–7,19 (6H, dd, $J = 9,0$ und 5,4 Hz), 7,20–7,01 (6H, t, $J = 8,7$ Hz), 5,83 (1H, brs), 5,69 (1H, brs); $^{19}\text{F-NMR}$ Γ (CHCl_3): –115,3 (3F, s); Smp.: 180–181°C.
 14: $^1\text{H-NMR}$ Γ (CHCl_3): 7,39–7,27 (9H, m), 7,17–7,03 (4H, m), 5,90 (1H, brs), 5,85 (1H, brs); $^{19}\text{F-NMR}$ Γ (CHCl_3): –102,9 (2F, s); Smp.: 166–167°C.
 15: $^1\text{H-NMR}$ Γ (CHCl_3): 7,41–7,34 (2H, m), 7,29–7,23 (4H, m), 7,17–7,05 (4H, m), 6,99 (2H, t, $J = 8,7$ Hz), 5,78 (2H, brs); $^{19}\text{F-NMR}$ Γ (CHCl_3): –103,0 (2F, s), –115,9 (1F, m); Smp.: 187–188°C.
 16: $^1\text{H-NMR}$ Γ (CHCl_3): 7,34–7,20 (6H, m), 7,06–6,97 (6H, m), 5,90 (1H, brs), 5,71 (1H, brs); $^{19}\text{F-NMR}$ Γ (CHCl_3): –112,2 (1 F, dd, $J = 17,1$ und 7,4 Hz), –115,5 bis –115,2 (2F, m); Smp.: 165–166°C.
 17: $^1\text{H-NMR}$ Γ (CHCl_3): 7,35–7,21 (3H, m), 7,06–6,97 (9H, m), 7,17–7,05 (4H, m), 5,96 (1H, brs), 5,76 (1H, brs); $^{19}\text{F-NMR}$ Γ (CHCl_3): –112,2 (3F, dd, $J = 17,1$ und 8,5 Hz); Smp.: 186–188°C.

Beispiel 2

[0151] Dieses Beispiel veranschaulicht den Test der Verbindungen gemäß der Erfindung auf ihre Beständigkeit gegenüber Abbau in einem biologischen Medium. In diesem Beispiel bilden menschliche Leber-Mikrosomen das biologische Medium. Die Verbindungen gemäß der Erfindung – so wurde gefunden – zeigen eine bemerkenswerte Beständigkeit gegenüber Abbau durch die Mikrosomen-Zubereitung, verglichen mit nicht-fluorierten Triphenylmethyl-Verbindungen.

2.1 Materialien und Verfahren

[0152] Siebzehn fluorierte Triarylmethan-Verbindungen, Clotrimazol und eine chlorierte Triarylmethan-Verbindung 18 wurden auf metabolische Stabilität in vitro in einer Reaktionsmischung aus menschlichen Leber-Mikrosomen getestet. Die Reaktionsmischung enthielt 1,0 mg/ml menschliche Leber-Mikrosomen-Protein, 100 mM Kaliumphosphat (pH 7,4), 10 mM MgCl_2 und ein NADPH-erzeugendes System. Die Verbindungen wurden getestet bei einer Konzentration von 5 μM bei 37°C, und die Menge an intakter Verbindung, die in der Mischung nach 2 Stunden zurückblieb, wurde berechnet als Prozentmenge der ursprünglichen Dosis, die übrig blieb.

2.2 Ergebnisse

[0153] Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass die fluorierten Verbindungen gemäß der Erfindung eine erhöhte Beständigkeit gegenüber Abbau in einem biologischen Milieu haben, verglichen mit analogen nicht-fluorierten Verbindungen. Die Ergebnisse sind in der obigen Tabelle 2 angegeben.

Beispiel 3

[0154] Dieses Beispiel veranschaulicht eine pharmakokinetische Untersuchung der Verbindungen gemäß der Erfindung in der Ratte. Die fluorierten Verbindungen gemäß der Erfindung – so wurde gefunden – zeigen eine in vivo Halbwertszeit, die erhöht war in Beziehung zu den nicht-fluorierten Derivaten.

3.1 Materialien und Verfahrensweisen

[0155] Pharmakokinetische Studien wurden durchgeführt in Ratten, um das Untersuchungsergebnis, dass eine ausgewählte Fluor-Substitution der Phenyl-Ringe die metabolische Stabilität in vitro erhöht, auf eine in vivo-Studie auszudehnen. Verbindung 1, Verbindung 3 und Verbindung 18 wurden an Gruppen von drei bis fünf männlichen Sprague-Dawley-Ratten in Dosen von 1 mg/kg i. v. und 10 mg/kg p. o. verabreicht und so der $T_{1/2}$ -Wert und die orale Bioverfügbarkeit bestimmt. Blutproben wurden zu 9 Zeitpunkten vor dem Dosieren bis zu 24 h nach dem Dosieren p. o. und zu 11 Zeitpunkten vor dem Dosieren bis 24 h nach dem Dosieren i. v. abgenommen. Proben wurden hergestellt und auf die Plasma-Konzentration der Verbindung analysiert, und zwar unter Verwendung von LC-MS/MS.

3.2 Ergebnisse

[0156] Wie aus den in vitro Metabolismus-Daten vorausgesagt wurde, hatte Verbindung 18 eine sehr schlechte orale Bioverfügbarkeit, wobei nur sehr niedrige Konzentrationen (31 bis 65 ng/ml) im Plasma erschienen, und zwar zwischen 0,25 und 1 h nach dem Dosieren, und es zeigte sich keine nachweisbare Konzentration in der Probe 2 Stunden nach dem Dosieren. Bei Dosieren über die i. v.-Route war die Elimination aus dem Blutstrom sehr schnell. Da die Plasma-Konzentrationen in Proben nach dem oralen Dosieren so niedrig waren, konnte die prozentuale Bioverfügbarkeit für Verbindung 18 nicht berechnet werden.

[0157] In bemerkenswertem Gegensatz zu den mit Verbindung 18 erhaltenen Ergebnissen hatte Verbindung 1 eine viel bessere orale Bioverfügbarkeit (35%), und die orale Bioverfügbarkeit für Verbindung 3 wurde zu 100% berechnet.

[0158] Die Ergebnisse dieses pharmakokinetischen Experiments sind graphisch in [Fig. 1](#) gezeigt.

Beispiel 4

[0159] Beispiel 4 beschreibt ein Bio-Assay zum Messen der Inhibierung eines Calcium-aktivierten Kalium-Kanals, des Gardos-Kanals, in roten Blutzellen durch die Verbindungen gemäß der Erfindung.

4.1 Materialien und Verfahrensweisen

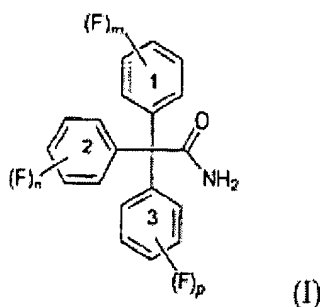
[0160] Heparinisiertes Gesamtblut wurde drei Mal mit modifiziertem Flux-Puffer (Modified Flux Buffer; MFB: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Tris, 0,1 mM EGTA, pH = 7,4) gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden dann 3 h lang mit ^{86}Rb (5 $\mu\text{Ci/ml}$) inkubiert. Nach dieser Inkubationsperiode wurden die RBCs drei Mal mit kaltem MFB gewaschen. Gewaschene, mit ^{86}Rb beladene RBCs wurden dann mit einer Test-Verbindung gemäß der Erfindung für die Zeit von 10 min inkubiert. Der ^{86}Rb -Fluss wurde dann initiiert durch die Zugabe von 20 $\mu\text{l/ml}$ einer MFB-Lösung, die enthaltend 10 mM CaCl_2 und 100 μM A23187, ein Calcium-Ionophor enthielt. Dies führte zu einer End-Konzentration von 200 μM CaCl_2 und 2 μM A23187 in dem Inkubations-Medium. Die Zellen wurden für 10 min inkubiert, zentrifugiert und der Überstand wurde entfernt. Die Proben wurden in einem Wallace-Microbeta-Liquid-Scintillations-Counter mittel Cerenkov-Emission gezählt. Der Gesamt RBC- ^{86}Rb -Gehalt wurde bestimmt durch Lysieren der RBCs mit Wasser und anschließendem Fällern des Proteins unter Verwendung einer Mischung aus Ethanol und Chloroform im Verhältnis 50:50. Nach einem 20-minütigen Mikro-Zentrifugen-Zentrifugieren wurden die wässrige und die organische Schicht voneinander getrennt, und die wässrige Schicht wurde entfernt und gezählt. Der Fluss wird ausgedrückt als Prozentwert des anfänglichen Zell-Gehalts an ^{86}Rb .

Ergebnisse

[0161] Der oben beschriebene Bio-Assay zeigte, dass die Verbindungen gemäß der Erfindung exzellente Inhibitoren des Gardos-Kanals sind. Die zahlenmäßigen Ergebnisse für die Inhibierungs-Untersuchungen sind in der obigen Tabelle 2 gezeigt.

Patentansprüche

1. Verbindung mit der Struktur

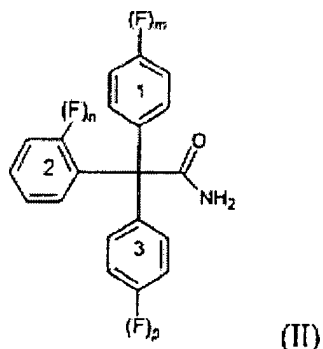


worin

m, n und p unabhängig voneinander gewählt sind aus 0 und 1 und wenigstens einer der Indices m, n und p 1 ist; dann, wenn m, n und p alle 1 sind, die Fluor-Substituenten am Ring 1 und am Ring 2 in einer Position ange-

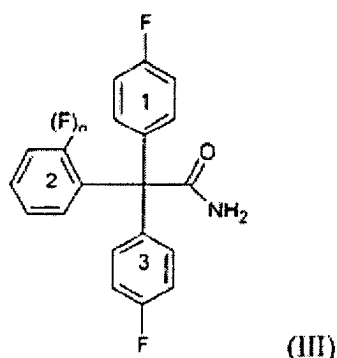
ordnet sind, die unabhängig gewählt ist aus ortho zu dem Acetamid-Substituenten, meta zu dem Acetamid-Substituenten und para zu dem Acetamid-Substituenten, und der Substituent am Ring 3 in einer Position ist, die gewählt ist aus ortho zu dem Acetamid-Substituenten und para zu dem Acetamid-Substituenten; und dann, wenn p 0 ist und m 1 ist und n 1 ist, der Fluor-Substituent am Ring 1 para zu dem Acetamid-Substituenten steht und der Substituent am Ring 2 in einer Position angeordnet ist, die gewählt ist aus ortho zu dem Acetamid-Substituenten und para zu dem Acetamid-Substituenten.

2. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Struktur



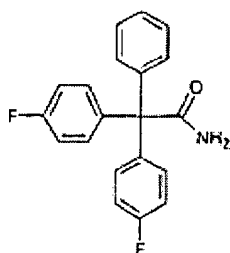
worin m, n und p unabhängig gewählt sind aus 0 und 1 und wenigstens einer der Indices m, n und p 1 ist.

3. Verbindung nach Anspruch 2 mit der Struktur

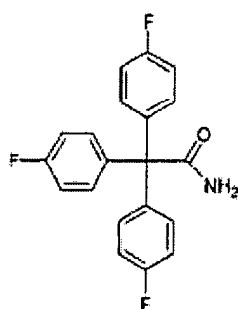


worin n entweder 0 oder 1 ist.

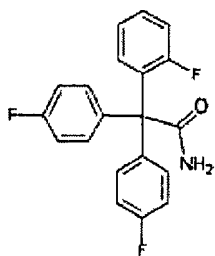
4. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Struktur



5. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Struktur



6. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Struktur



7. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 in Form eines Hydrats.

8. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Verwendung als pharmazeutische Substanz.

9. Verbindung nach Anspruch 8 für die Behandlung von Sichelzell-Anämie.

10. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 in Mischung mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger.

11. Pharmazeutisches Produkt, umfassend eine Kombination einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 mit einem weiteren therapeutischen Mittel.

12. Produkt nach Anspruch 11, worin das weitere therapeutische Mittel zur Behandlung eines Symptoms oder eines Nebeneffekts ist, das/der mit der Sichelzell-Krankheit in Verbindung steht.

13. Produkt nach Anspruch 11, worin das weitere therapeutische Mittel zur Behandlung der Sichelzell-Krankheit ist, z. B. Butyrat, Butyrat-Derivate, Hydroxyharnstoff, Erythropoietin oder ein Ernährungs-Salz ist, beispielsweise ein Magnesiumsalz.

14. Verfahren zum Inhibieren des Kalium-Flusses einer Zelle in-vitro, wobei das Verfahren ein In-Kontakt-Bringen der Zelle mit einer wirksamen Menge einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder mit einer pharmazeutischen Zusammen-setzung nach Anspruch 10 umfasst.

15. Verfahren nach Anspruch 14, worin die Zelle ein Erythrozyt ist.

16. Verfahren zum Reduzieren der Erythrozyten-Dehydratation in-vitro, wobei das Verfahren ein In-Kontakt-Bringen des Erythrozyten mit einer Menge einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, die wirksam zum Reduzieren der Dehydratation ist, oder mit einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 10 umfasst.

17. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung eines Medikaments zum Inhibieren des Kalium-Flusses einer Zelle.

18. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung eines Medikaments zum Reduzieren von Erythrozyten-Dehydratation.

19. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung eines Medikaments zum Behandeln oder Vorbeugen eines Sichelzell-Krankheits-Ereignisses.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 19, worin das Medikament eine Kombination umfasst, wie sie in einem der Ansprüche 11, 12 oder 13 definiert ist.

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 19, worin das Medikament zur Verabreichung in Kombinations-Therapie mit einem zweiten Medikament ist, das ein anderes therapeutisches Mittel umfasst.

22. Verwendung nach Anspruch 21, worin das weitere therapeutische Mittel ein wie in Anspruch 12 oder Anspruch 13 definiertes Mittel ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

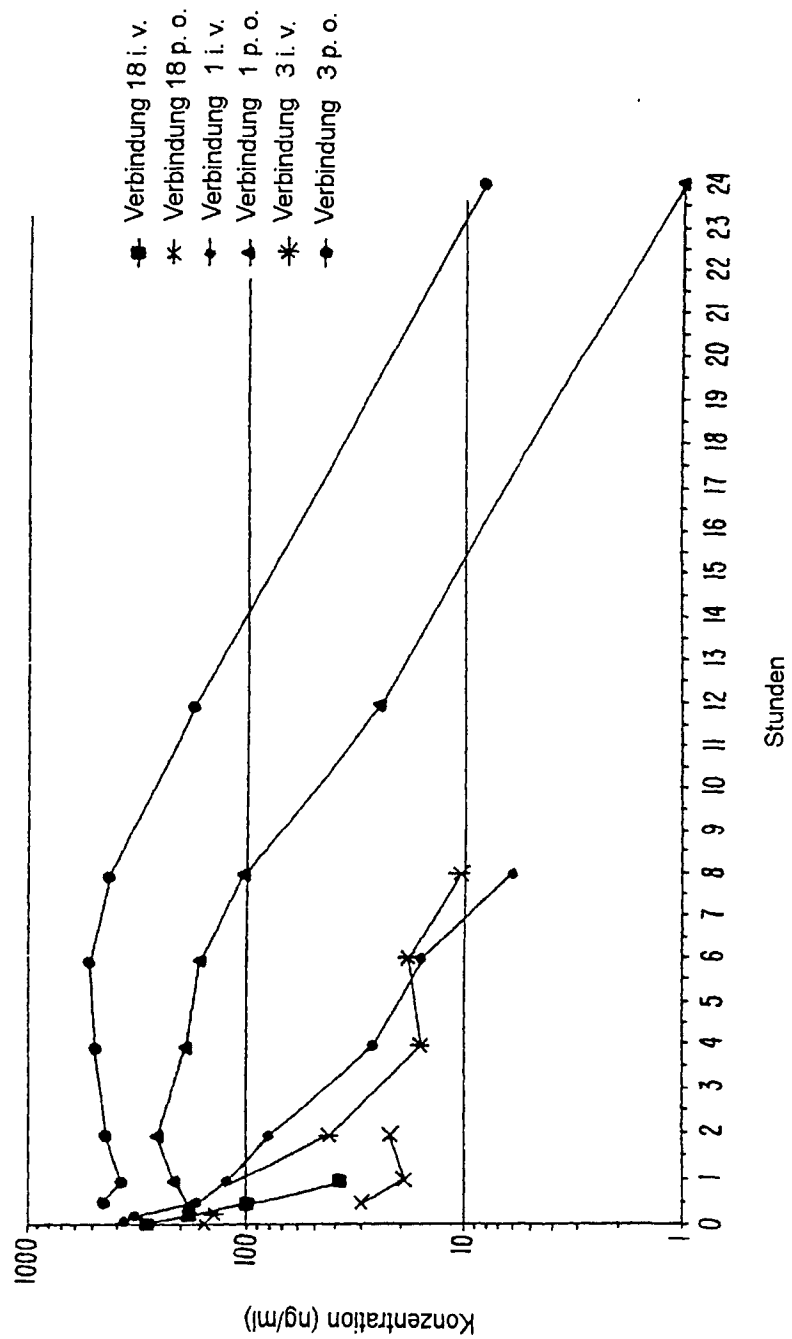


FIG. 1.