



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 20 554 T2** 2004.01.08

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 030 842 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 20 554.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB97/03132**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 912 351.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/025693**

(86) PCT-Anmeldetag: **13.11.1997**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **27.05.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.08.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **02.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.01.2004**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C07D 213/75**  
**A61K 31/44**

(73) Patentinhaber:  
**British Biotech Pharmaceuticals Ltd., Cowley,  
Oxford, GB**

(74) Vertreter:  
**HOFFMANN · EITLE, 81925 München**

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

(72) Erfinder:  
**BECKETT, Paul, Raymond, Watlington Road,  
Oxford OX4 5LY, GB; WHITTAKER, Mark,  
Watlington Road, Oxford OX4 5LY, GB; MILLER,  
Andrew, Watlington Road, Oxford OX4 5LY, GB;  
MARTIN, Mitchell, Fionna, Watlington Road,  
Oxford OX4 5LY, GB**

(54) Bezeichnung: **METALLOPROTEINASE INHIBITOREN**

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).

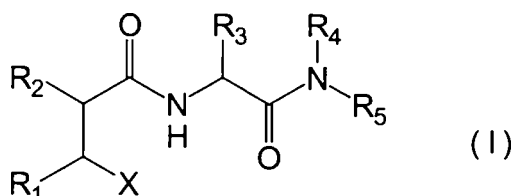
Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft N<sup>1</sup>-[2,2-Dimethyl-IS-(pyridin-2-yl-carbamoyl)-propyl]-N<sup>4</sup>-hydroxy-2R-isobutyl-3S-methoxy-succinamid und seine pharmazeutisch annehmbaren Salze, Hydrate und Solvate.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG:**

[0002] WO95/19956 (British Biotech Pharmaceuticals Ltd.) beschreibt und beansprucht eine Klasse von Verbindungen, die Matrix-Metalloproteinase (MMP)-Inhibitoren und Inhibitoren der Freisetzung von Tumornekrosefaktor (TNFα) aus Zellen sind. Insbesondere beansprucht die Anmeldung Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



worin:

X eine -CO<sub>2</sub>H- oder -CONHOH-Gruppe ist;

R<sub>1</sub> ist Wasserstoff, (C<sub>1-6</sub>)-Alkyl; (C<sub>2-6</sub>)-Alkenyl; Phenyl; substituiertes Phenyl; Phenyl-(C<sub>1-6</sub>)-alkyl; substituiertes Phenyl-(C<sub>1-6</sub>)-alkyl; Heterocyclyl; substituiertes Heterocyclyl; Heterocyclyl-(C<sub>1-6</sub>)-alkyl; substituiertes Heterocyclyl-(C<sub>1-6</sub>)-alkyl; eine Gruppe BSO<sub>n</sub>A-, worin n 0, 1 oder 2 ist und B Wasserstoff oder (C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, Phenyl, substituiertes Phenyl, Heterocyclyl, (C<sub>1-6</sub>)-Acyl, Phenacyl oder eine substituierte Phenacylgruppe ist, und A darstellt: (C<sub>1-6</sub>)-Alkyl; Amino; geschütztes Amino; OH; SH; (C<sub>1-6</sub>)-Alkoxy; (C<sub>1-6</sub>)-Alkylamino, Di-(C<sub>1-6</sub>)-alkylamino; (C<sub>1-6</sub>)-Alkylthio, Aryl-(C<sub>1-6</sub>)-alkyl; Amino-(C<sub>1-6</sub>)-alkyl; Hydroxy-(C<sub>1-6</sub>)-alkyl, Mercapto-(C<sub>1-6</sub>)-alkyl oder Carboxy-(C<sub>1-6</sub>)-alkyl, worin die Amino-, Hydroxyoder Carboxylgruppe gegebenenfalls geschützt oder die Carboxylgruppe amidiert ist; Niederalkyl, substituiert durch Carbamoyl, Mono(niederalkyl)carbamoyl, Di(niederalkyl)carbamoyl, Di(niederalkyl)amino oder Carboxyniederalkanoylamino;

R<sub>2</sub> ist eine (C<sub>1-6</sub>)-Alkyl-, (C<sub>2-6</sub>)-Alkenyl-, (C<sub>2-6</sub>)-Alkyl-, Phenyl(C<sub>1-6</sub>)-alkyl-, Heteroaryl-(C<sub>1-6</sub>)-alkyl-, Cycloalkyl-(C<sub>1-6</sub>)-alkyl- oder Cycloalkenyl-(C<sub>1-6</sub>)-alkyl-Gruppe, wovon jede gegebenenfalls durch einen oder mehrere Substituenten, ausgewählt aus (C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, -O(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, -S(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, Halogen und Cyano (-CN) substituiert sein kann;

R<sub>3</sub> die kennzeichnende Gruppe einer natürlichen oder nicht-natürlichen α-Aminosäure ist, worin jede funktionelle Gruppe geschützt sein kann;

R<sub>4</sub> Phenyl oder ein 5- oder 6-gliedriger Heteroarylring ist, worin jedes Stickstoffatom als ein N-Oxid oxidiert sein kann, das/der gegebenenfalls mit einem Benzolring oder einem 5-, 6- oder 7-gliedrigen heterocyclischen Ring kondensiert sein kann und worin jeder der Ringe gegebenenfalls substituiert sein kann durch:

(a) einen oder mehrere Substituenten, unabhängig ausgewählt aus Hydroxy, Halogen, -CN, -CO<sub>2</sub>H, -CO<sub>2</sub>(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, -(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl-CO<sub>2</sub>(C<sub>1-6</sub>)alkyl, -CONH<sub>2</sub>, -CONH(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, -CON((C<sub>1-6</sub>)-Alkyl)<sub>2</sub>, -CHO, -CH<sub>2</sub>OH, -(C<sub>1-4</sub>)-Perfluoralkyl, -O(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, -S(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, -SO(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, -SO<sub>2</sub>(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, -NO<sub>2</sub>, -NH(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, -N((C<sub>1-6</sub>)-Alkyl)<sub>2</sub> und -NHCO(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, oder

(b) eine Gruppe, ausgewählt aus (C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, (C<sub>2-6</sub>)-Alkenyl, (C<sub>2-6</sub>)-Alkyl-, (C<sub>3-8</sub>)-Cycloalkyl, (C<sub>4-8</sub>)-Cycloalkenyl, Phenyl, Benzyl, Heteroaryl oder Heteroarylmethyl, wovon jede Gruppe gegebenenfalls mit einem oder mehreren Substituenten substituiert sein kann, ausgewählt aus Halogen, Hydroxy, Amino, Carboxy, (C<sub>1-4</sub>)-Perfluoralkyl, (C<sub>1-6</sub>)-Alkyl, -O(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl oder -S(C<sub>1-6</sub>)-Alkyl;

R<sub>5</sub> Wasserstoff oder eine (C<sub>1-6</sub>)-Alkylgruppe ist;

oder ein Salz, Hydrat oder Solvat davon.

[0003] WO97/03966 offenbart weitere Verbindungen der zuerst in obiger WO95/19956 offenbarten Klasse.

**KURZE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG:**

[0004] N<sup>1</sup>-[2,2-Dimethyl-IS-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-propyl]-N<sup>4</sup>-hydroxy-2R-isobutyl-3S-methoxy-succinamid ist ein Mitglied der in WO95/19956 generisch offenbarten und beanspruchten Klasse, aber weder ist dieses noch seine Eigenschaften ansonsten spezifiziert.

[0005] WO95/19956 besagt, dass in der offenbarten Klasse von Verbindungen der aromatische oder Heteroaryl R<sub>4</sub>-Substituent im allgemeinen die unerwartete und gewünschte Wirkung einer ansteigenden Aktivität gegen Stromelysin, bezogen auf bekannte Verbindungen mit ansonsten ähnlicher Struktur aber mit unterschiedlichem (üblicherweise Methyl) R<sub>4</sub>-Substituenten, der in solchen Verbindungen vorhanden ist, besitzt,

während die Aktivität gegen Kollagenase und Gelatinase aufrecht erhalten wird. Als ein Mitglied dieser Klasse besitzt die nun ausgewählte Verbindung N<sup>1</sup>-[2,2-Dimethyl-IS-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-propyl]-N<sup>4</sup>-hydroxy-2R-isobutyl-3S-methoxy-succinamid diese Eigenschaften.

[0006] Es ist jedoch bekannt, dass eine Nebenwirkung mancher MMP-Inhibitoren die Induktion von Skelettmuskulaturschmerz (manchmal auch als "Tendinitis" bezeichnet) in den Gelenken, z. B. der Schulter, mancher Tiere und Patienten nach hoher und/oder anhaltender Dosierung ist. Obwohl angenommen wird, dass diese Wirkung bei Beendigung der Dosierung im wesentlichen reversibel ist, ist sie nichtsdestotrotz unerwünscht. Der Mechanismus, durch den dieser Schmerz entsteht, ist zur Zeit nicht verstanden, und es war bisher nicht möglich, die Eigenschaft der Verbindung, Schmerz zu erzeugen, mit bestimmten strukturellen Eigenschaften oder Enzyminhibierungsprofilen des Enzyms zu korrelieren. Entsprechend kann zur Zeit nicht vorhergesagt werden, ob ein gegebener MMP-Inhibitor diese Nebenwirkung zeigen wird, und die Grösse der Wirkung, falls vorhanden, und muss deshalb empirisch untersucht werden.

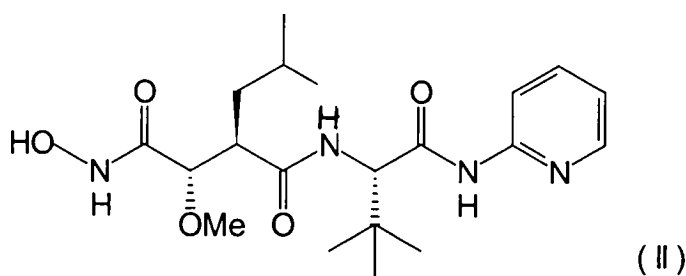
[0007] Es wurde nun gefunden, dass das ausgewählte N<sup>1</sup>-[2,2-Dimethyl-IS-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-propyl]-N<sup>4</sup>-hydroxy-2R-isobutyl-3S-methoxy-succinamid eine allgemeine Tendenz zum Induzieren der Skelettmuskulaturschmerz-Nebenwirkung zeigt. In diesem Zusammenhang unterscheidet es sich von den strukturell nahestehenden Analoga, z. B. N<sup>1</sup>-[2,2-Dimethyl-IS-(pyridin-3-ylcarbamoyl)-propyl]-N<sup>4</sup>-hydroxy-2R-isobutyl-3S-hydroxy-succinamid, die mehr dazu neigen, diese Nebenwirkung zu induzieren.

[0008] WO95/19956 sagt auch, dass die offenbarte Klasse an Arylamid-MMP-Inhibitoren Verbindungen einschliesst, die oral bioverfügbar sind. Nicht alle Verbindungen, die durch die Offenbarung von WO95/19956 eingeschlossen werden, sind oral zu einem nützlichen Grad eingeschlossen, wie z. B. durch die Peakhöhe der MMP-inhibitorischen Aktivität oder das Niveau der Aktivität über die Zeit ("Fläche unter der Kurve"), die dem Arzneimittel im Blut von Tieren, denen dieses Arzneimittel oral verabreicht wurde, zuordenbar ist. Es wurde gefunden, dass die gemäss der vorliegenden Erfindung ausgewählte Verbindung N<sup>1</sup>-[2,2-Dimethyl-IS-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-propyl]-N<sup>4</sup>-hydroxy-2R-isobutyl-3S-methoxy-succinamid in Menschen und anderen Säugern oral bioverfügbar ist.

[0009] Diese Kombination aus oraler Bioverfügbarkeit und verminderter Neigung zu tendinitischen Nebenwirkungen impliziert, dass die erfindungsgemässe Verbindung ein relativ grosses therapeutisches Fenster zur Behandlung von Krankheiten, die eine mittlere oder langzeitige systemische Verabreichung eines MMP-Inhibitors benötigen, ermöglichen sollte. Die Verbindung ist deshalb zur Behandlung von z. B. rheumatoider Arthritis, Krebs, Multipler Sklerose (MS), Guillan-Barré-Syndrom (GBS) und Psoriasis indiziert.

#### AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG:

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt deshalb N<sup>1</sup>-[2,2-Dimethyl-IS-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-propyl]-N<sup>4</sup>-hydroxy-2R-isobutyl-3S-methoxy-succinamid der Formel (II) bereit:



und seine pharmazeutisch annehmbaren Salze, Hydrate und Solvate.

[0011] Die erfindungsgemässe Verbindung besitzt drei asymmetrische Kohlenstoffatome, deren stereochemische Konfiguration wie im Namen der Verbindung und in Formel (II) gezeigt spezifiziert ist. Jedoch ist zu beachten, dass die Erfindung Mischungen der Enantiomere der Verbindung (II) einschliesst, vorausgesetzt, das spezifizierte Enantiomer überwiegt. Vorzugsweise sollten solche enantiomere Mischungen aus 90 Gew.% oder mehr des spezifizierten Enantiomers bestehen.

[0012] Die Erfindung schliesst auch pharmazeutische Zusammensetzungen, umfassend N<sup>1</sup>-[2,2-Dimethyl-IS-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-propyl]-N<sup>4</sup>-hydroxy-2R-isobutyl-3S-methoxy-succinamid oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz, Hydrat oder Solvat davon, zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger bereit. Bevorzugte Zusammensetzungen der Erfindung sind diejenigen, die zur oralen Verabreichung angepasst sind.

[0013] Die Erfindung schliesst ferner die Verwendung von N<sup>1</sup>-[2,2-Dimethyl-1S-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-propyl]-N<sup>4</sup>-hydroxy-2R-isobutyl-3S-methoxysuccinamid oder eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes, Hydrats oder Solvats davon zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von rheumatoider Arthritis, Krebs, Multipler Sklerose (MS), Guillan-Barre-Syndrom (GBS) oder Psoriasis in Säugern.

gern, einschliesslich Menschen, bereit.

[0014] Salze der erfindungsgemässen Verbindung schliessen physiologisch annehmbare Säureadditionssalze, z. B. das Hydrochlorid, Hydrobromid, Sulfat, Methansulfonat, p-Toluolsulfonat, Phosphat, Acetat, Citrat, Succinat, Lactat, Tartrat, Fumarat und Maleat ein. Salze können auch mit Basen, z. B. Natrium-, Kalium-, Magnesium- und Calciumsalzen, gebildet werden.

[0015] Die ausgewählte erfindungsgemässe Verbindung kann durch den im Beispiel beschriebenen Weg hergestellt werden und kann zur Verabreichung durch jeden Weg, der mit seinen pharmakokinetischen Eigenschaften übereinstimmt, dargeboten werden. Oral verabreichbare Zusammensetzungen können in Form von Tabletten, Kapseln, Pulvern, Granalien, Lutschtabletten, flüssigen oder gelartigen Zubereitungen, wie oralen, topischen oder sterilen parenteralen Lösungen oder Suspensionen, sein. Tabletten und Kapseln zur oralen Verabreichung können in Form von Einheitsdosisdarreichungen sein und können übliche Exzipienten enthalten, wie Bindemittel; Füllstoffe; Tablettengleitmittel; Tablettensprengmittel oder annehmbare Benetzungsmittel. Tabletten können gemäss in der normalen pharmazeutischen Praxis wohlbekannten Verfahren umhüllt werden. Orale flüssige Zubereitungen können in Form von z. B. wässrigen oder öligen Suspensionen, Lösungen, Emulsionen, Sirupen oder Elixieren sein oder können als trockenes Produkt für die Rekonstitution mit Wasser oder anderen geeigneten Vehikeln vor der Verwendung vorliegen. Solche flüssigen Zubereitungen können übliche Zusatzstoffe enthalten, wie Suspensionsmittel; Emulgatoren; nicht-wässrige Vehikel (die essbare Öle einschliessen können); Konservierungsmittel; und, falls gewünscht, übliche Geschmacks- oder Farbstoffe.

[0016] Der Wirkstoff kann auch parenteral in einem sterilen Medium verabreicht werden. Abhängig vom Vehikel und der verwendeten Konzentration kann die Arznei im Vehikel entweder suspendiert oder gelöst vorliegen. Adjuvanzen, wie Lokalanästhetika, Konservierungsmittel und Puffer, können im Vehikel gelöst sein.

[0017] Die Dosis der erfindungsgemässen Verbindung für eine bestimmte klinische Indikation durch einen vorgegebenen Verabreichungsweg wird durch klinische Tests in Übereinstimmung mit dem Standardverfahren zur Bewilligung des Zulassungsverfahrens durch die relevanten Behörden bestimmbar sein. Im allgemeinen wird zur Zeit erwartet, dass die Verbindung Menschen oral in Dosierungseinheiten von 5 bis 100 mg, zweimal oder dreimal täglich verabreicht werden wird.

[0018] Die folgenden Beispiele beschreiben die Herstellung der erfindungsgemässen Verbindung. Die Ausgangsmaterialien 2R-(2,2-Dimethyl-5-oxo-[1,3]dioxolan-4S-yl)-4-methylpentansäure und L-tert-Leucin-N-(2-pyridyl)amid wurden wie in WO95/19961 beschrieben hergestellt.

[0019] Die folgenden Abkürzungen wurden im Beispiel verwendet:

DMF: N,N-Dimethylformamid

EDC: N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid

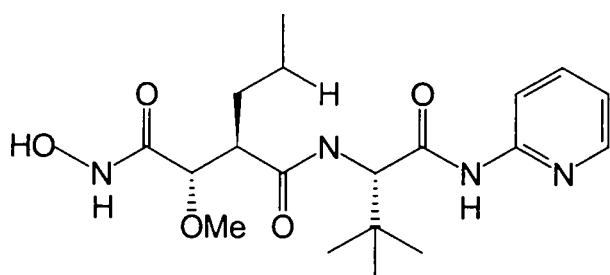
HOBt: 1-Hydroxybenzotriazol

NMM N-Methylmorpholin

THF: Tetrahydrofuran

#### BEISPIEL 1

N<sup>1</sup>-[2,2-Dimethyl-1S-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-propyl]-N4-hydroxy-2R-isobutyl-3S-methoxy-succinamid:



Schritt A:

2S-Hydroxy-3R-isobutyl-bernsteinsäuredimethylester:

[0020] 2R-(2,2-Dimethyl-5-oxo-[1,3]dioxolan-4S-yl)-4-methylpentansäure (75,0 g, 0,326 mol) wurde in Methanol (500 ml) gelöst und auf 0°C gekühlt, und die resultierende Mischung wurde mit Chlorwasserstoffgas gesättigt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur erwärmen gelassen und über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in Dichlormethan gelöst, und nacheinander mit gesättigtem Natriumhydrogencarbonat und Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck zur Trockene verdampft, zum Erhalt der Titelverbindung als gelbes Öl (53 g, 75%). <sup>1</sup>H-NMR, δ (CDCl<sub>3</sub>): 4,10 (1H, d, J = 4,0 Hz), 3,60 (3H, s), 3,50 (3H, s), 3,18 (br s), 2,78 (1H, m), 1,61–1,40 (2H, m), 1,28 (1H, m) und 0,76–0,73 (6H, m).

## Schritt B:

## 2R-Isobutyl-3S-methoxy-bernsteinsäuredimethylester:

[0021] 2S-Hydroxy-3R-isobutyl-bernsteinsäuredimethylester (23,9 g, 110 mmol) wurde in DMF (200 ml) gelöst und destilliertes Iodmethan (8,2 mol, 132 mmol) wurde zugegeben, gefolgt von Silber(I)oxid (27,95 g, 121 mmol). Die Reaktionsmischung wurde 7 Stunden bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatografie (Kieselgel, Dichlormethan als Eluent) gereinigt, zum Erhalt der Titelverbindung als viskoses gelbes Öl (19,16 g, 75%).  $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 3,83 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz), 3,71 (3H, s), 3,62 (3H, s), 3,30 (3H, s), 2,85 (1H, m), 1,65–1,39 (2H, m), 1,10 (1H, m) und 0,83–0,81 (6H, m).

## Schritt C:

## 2R-Isobutyl-3S-methoxy-bernsteinsäure-Dilithiumsalz:

[0022] Lithiumhydroxid (1,76 g, 42,0 mmol) wurde zu einer Lösung von 2R-Isobutyl-3S-methoxy-bernsteinsäuredimethylester (4,70 g, 20,0 mmol) in Methanol (30 ml) und Wasser (30 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 2 Stunden gerührt, dann wurden die Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt zum Erhalt der Titelverbindung als gelben Feststoff (4,40 g, quant.).  $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 3,52 (1H, d,  $J = 5,1$  Hz), 3,27 (3H, s), 2,65 (1H, m), 1,56–1,53 (2H, m), 1,31 (1H, m) und 0,82–0,78 (6H, m).

## Schritt D:

## 2R-Isobutyl-3S-methoxy-bernsteinsäure-4-methylester:

[0023] 2R-Isobutyl-3S-methoxy-bernsteinsäure-Dilithiumsalz (25,14 g, 116 mmol) wurde in trockenem THF (150 ml) gelöst und die Lösung auf 0°C gekühlt. Trifluoressigsäureanhydrid (30 ml) wurde zugegeben und die Mischung bei 0°C weitere 4 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand in wasserfreiem Methanol (200 ml) bei 0°C gelöst und die Lösung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt zum Erhalt der Titelverbindung als gelbes Öl (54,3 g, einschliesslich 2 Äquivalenten Lithiumtrifluoracetat), das ohne weitere Reinigung in Schritt E verwendet wurde.  $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7,71 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz), 3,65 (3H, s), 3,24 (3H, s), 2,72 (1H, m), 1,56–1,42 (2H, m), 1,06 (1H, m) und 0,81–0,79 (6H, m).

## Schritt E:

## 3R-[2,2-Dimethyl-IS-(pyridylcarbamoyl)-propylcarbamoyl]-2S-methoxy-5-methyl-hexansäuremethylester:

[0024] Das Produkt aus Schritt D (25,06 g, äquivalent zu 53,7 mmol 2R-Isobutyl-3S-methoxy-bernsteinsäure-4-methylester) wurde in DMF (200 ml) gelöst und die Lösung wurde während der Addition von HOBt (8,70 g, 53,7 mmol), gefolgt von EDC (12,35 g, 64,4 mmol) auf 0°C gekühlt. Die Mischung wurde gerührt und über 2 Stunden auf Raumtemperatur erwärmen gelassen. Die Lösung des so gebildeten aktiven Esters wurde auf 0°C gekühlt, L-tert-Leucin-N-(2-pyridyl)amid (11,11 g, 53,7 mmol) wurde zugegeben und die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in Ethylacetat gelöst. Die Lösung wurde nacheinander mit 1 M Natriumcarbonatlösung und Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und zur Trockene eingedunstet. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatografie (Kieselgel, 0 bis 5% Methanol in Dichlormethan) gereinigt, zum Erhalt der Titelverbindung als weissen Feststoff (13,41 g, 61%).  $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 9,61 (1H, s), 8,47 (1H, m), 8,24 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz), 7,74 (1H, m), 7,07 (1H, m), 6,97 (1H, d,  $J = 8,9$  Hz), 4,64 (1H, d,  $J = 8,9$  Hz), 4,01 (1H, d,  $J = 7,6$  Hz), 3,76 (3H, s), 3,41 (3H, s), 2,75 (1H, m), 1,79 (1H, m), 1,51 (1H, m), 1,11 (1H, m), 1,02 (9H, s), 0,84 (3H, d,  $J = 6,3$  Hz) und 0,82 (3H, d,  $J = 6,3$  Hz).

## Schritt F:

## 3R-[2,2-Dimethyl-IS-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-propylcarbamoyl]-2S-methoxy-5-methyl-hexansäure-Lithiumsalz:

[0025] 3R-[2,2-Dimethyl-IS-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-propylcarbamoyl]-2S-methoxy-5-methyl-hexansäuremethylester (13,4 g, 32,9 mmol) wurde in einer Mischung von THF (265 ml) und Wasser (65 ml) gelöst, und Lithiumhydroxidmonohydrat (1,396 g, 33,3 mmol) wurde zugegeben. Die Lösung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

peratur gerührt, dann unter reduziertem Druck verdampft, zum Erhalt eines gelben Öls, das durch azeotrope Destillation mit Aceton weiter getrocknet wurde. Das Produkt (13,4 g, enthaltend Restlösungsmittel) wurde sofort ohne weitere Reinigung verwendet.  $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$  3,5 : 1-Mischung an Diastereoisomeren): 8,31 (1H, m), 7,99 (1H, d,  $J = 8,3$  Hz), 7,66 (1H, m), 7,00 (1H, m), 4,49 (0,23 H, s; Nebendiastereoisomer), 4,37 (0,77, s, Hauptdiastereoisomer), 3,68 (0,23H, d,  $J = 7,6$  Hz, Nebendiastereoisomer), 3,52 (0,77 H, d,  $J = 7,6$  Hz, Hauptdiastereoisomer), 3,21 (0,69 H, s, Nebendiastereoisomer), 3,20 (2,31 H, s, Hauptdiastereoisomer), 2,64 (1H, m), 1,53 (2H, br m), 1,18 (1H, m), 1,01 (9H, s), 0,85 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz) und 0,81 (3H, d,  $J = 6,3$  Hz).

## Schritt G:

$\text{N}^4$ -Benzyloxy- $\text{N}^1$ -[2,2-Dimethyl-IS-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-propyl]-2R-isobutyl-3S-methoxysuccinamid:

[0026] Das Produkt aus Schritt F (13,4 g, ca. 33 mmol) wurde in trockenem THF (250 ml) gelöst und unter Argon auf  $-10^\circ\text{C}$  unter Rühren gekühlt. Ethylchlorformiat (3,47 ml, 36 mmol) wurde zugetropft, gefolgt von NMM (1,8 ml, 16,5 mmol). Die Mischung wurde 30 Minuten gerührt, bevor O-Benzylhydroxylamin (6 g, 49 mmol) in DMF (10 ml) zugetropft wurde. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur erwärmen gelassen und über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand zwischen Ethylacetat und Kochsalzlösung geteilt. Die organische Schicht wurde mit 1 M Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und verdampft. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatografie (Kieselgel, 5% Methanol in Dichlormethan) gereinigt. Das gewünschte Produkt enthaltende Fraktionen wurden gesammelt und verdampft. Das Produkt wurde mit Diethylether zur Entfernung von leicht gefärbter Verunreinigung verrieben. Ausbeute: 9,44 g (58%,  $> 10$  : 1-Mischung an Diastereoisomeren).  $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$  Hauptdiastereoisomer), 10,26 (1H, s), 9,93 (1H, s), 8,32 (1H, m), 8,23 (1H, d,  $J = 8,2$  Hz), 7,63 (1H, m), 7,25 (5H, m), 7,12 (1H, d,  $J = 9,2$  Hz), 7,02 (1H, m), 4,94 (1H, d,  $J = 10,8$  Hz), 4,76 (2H, d,  $J = 3,8$  Hz), 3,88 (1H, d,  $J = 5,5$  Hz), 3,32 (3H, s), 2,91 (1H, m), 1,72 (1H, m), 1,55 (1H, m), 1,35 (1H, m), 1,02 (9H, s), 0,89 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz) und 0,85 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz).

## Schritt H:

$\text{N}^1$ -[2,2-Dimethyl-IS-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-propyl]- $\text{N}^4$ -hydroxy-2R-isobutyl-3S-methoxy-succinamid:

[0027]  $\text{N}^4$ -Benzyloxy- $\text{N}^1$ -[2,2-dimethyl-IS-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-propyl]-2R-isobutyl-3S-methoxy-succinamid wurde in einer Mischung aus Methanol (75 ml) und Ethanol (75 ml) gelöst und unter eine Argonatmosphäre gegeben. 10% Palladium-auf-Kohle (Charcoal) wurden zugegeben und Wasserstoffgas wurde über 2 Stunden durch die Lösung geblubbert, wonach DSC-Analyse ergab, dass das gesamte Ausgangsmaterial verbraucht wurde. Das System wurde mit Argon gespült und der Katalysator durch Filtration entfernt. Die Lösungsmittel wurden unter reduziertem Druck entfernt zum Erhalt der Titelverbindung als weissen Feststoff (8,8 g, quant., 12 : 1-Mischung an Diastereoisomeren). Schmelzpunkt: 164 bis  $164^\circ\text{C}$ .  $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ): 10,67 (1H, s), 10,13 (1H, s), 8,90 (1H, s), 8,15 (1H, m), 7,89 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz), 7,81 (1H, d,  $J = 8,8$  Hz), 7,60 (1H, m), 6,93 (1H, m), 4,53 (0,12H, d,  $J = 9,4$  Hz), 4,43 (0,88H, d,  $J = 8,8$  Hz), 3,74 (0,12H, d,  $J = 10,0$  Hz), 3,32 (0,88H, d,  $J = 9,8$  Hz), 2,9B (0,3H, s), 2,96 (2,64H, s), 2,78 (1H, m), 1,23 (2H, m), 0,84 (10H, s und m), 0,65 (3H, d,  $J = 6,4$  Hz) und 0,56 (3H, d,  $J = 6,3$  Hz).  $^{13}\text{C-NMR}$ ,  $\delta$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 172,6, 170,0, 166,0, 151,5, 147,9, 136,0, 119,5, 113,6, 61,2, 60,6, 56,7, 46,2, 37,0, 34,0, 26,5, 25,2, 23,7 und 21,7. IR;  $\nu_{\text{max}}$  (KBr), 3255, 2957, 1700, 1645, 1524, 1467, 1435, 1370, 1301, 1213 und  $1152\text{ cm}^{-1}$ . Gefunden C 58,40, H 7,92, N 13,61%;  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 0,2\text{H}_2\text{O}$  erfordert C 58,29, H 7,92, N 13,60%

## BIOLOGISCHES BEISPIEL A

[0028] Die Wirksamkeit der erfindungsgemässen Verbindung als Inhibitor interstitieller Kollagenase wurde durch das Verfahren von Cawston und Barret (Anal. Biochem. 9, 340–345, 1979) bestimmt, wobei eine 1 mM-Lösung der untersuchten Verbindung oder eine Verdünnung davon 16 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  mit Kollagen und Kollagenase (gepuffert mit 25 mM Hepes, pH 7,5, enthaltend 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,05% Brij 35 und 0,02%  $\text{NaN}_3$ ) inkubiert wurde. Das Kollagen war acetyliertes  $^{14}\text{C}$ -Kollagen, hergestellt durch das Verfahren von Cawston und Murphy (Methods in Enzymology, 80, 711, 1981), hiermit durch Referenz mit eingeschlossen. Die Proben wurden zum Sedimentieren von unverdaulichem Kollagen zentrifugiert und ein Aliquot des radioaktiven Überstandes für einen Assay auf einem Szintillationszähler als ein Mass der Hydrolyse entfernt. Die Kollagenaseaktivität in Anwesenheit von 1 mM der Testverbindung oder einer Verdünnung davon wurde mit der Aktivität einer an Inhibitor freien Kontrolle verglichen und das Resultat nachstehend als das der Inhibitorkonzentration, die 50% Inhibierung der Kollagenaseaktivität bewirkt ( $\text{IC}_{50}$ ) angeführt.

[0029] Die Wirksamkeit der erfindungsgemässen Verbindung als Inhibitor von Stromelysin-1 wurde durch das

Verfahren von Cawston et al. (Biochem. J., 195, 159–165, 1981) bestimmt, wobei eine 1 mM-Lösung der untersuchten Verbindung oder eine Verdünnung davon bei 37°C 16 Stunden mit Stromelysin und  $^{14}\text{C}$ -acetyliertem Kasein inkubiert wurde (gepuffert mit 25 mM Hepes, pH 7,5, enthaltend 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,05% Brij 35 und 0,02%  $\text{NaN}_3$ ). Bei dem Kasein handelte es sich um  $^{14}\text{C}$ -acetyliertes Kasein, welches durch das Verfahren von Cawston et al. (ibid.) hergestellt wurde. Die Stromelysinaktivität in Anwesenheit von 1 mM der Testverbindung oder einer Verdünnung davon wurde mit der Aktivität einer an Inhibitor freien Kontrolle verglichen und das Resultat nachstehend als InhibitorKonzentration, die 50% Inhibierung der Stromelysinaktivität bewirkt ( $\text{IC}_{50}$ ), angeführt.

[0030] Die Wirksamkeit der erfindungsgemässen Verbindung als Inhibitor von 72 kDa Gelatinase wurde durch ein Verfahren, das auf dem Verfahren von Sellers et al., Biochem. J., 171, 493–496 (1979), basiert, bestimmt. 72 kDa Gelatinase, die aus RPMI-7951-Zellen gewonnen wurde, wurde durch Gelatine-Agarose-Chromatografie gereinigt. Das Enzym wurde durch Inkubation mit Aminophenyl-Quecksilberacetat inkubiert und etwa 0,05 Einheiten wurden mit 50  $\mu\text{g}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-radiomarkierter Gelatine in einem entsprechenden Puffer 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden 50  $\mu\text{g}$  Rinderserumalbumin zusammen mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 16%) zugegeben, um die Reaktion zu beenden und um nicht-abgebautes Substrat auszufällen. Die Reaktionsröhrchen wurden 15 Minuten auf Eis gegeben, bevor sie 15 Minuten bei 10.000 G zentrifugiert wurden, um das ausgefällte Substrat zu sedimentieren. Ein 200  $\mu\text{l}$ -Aliquot des Reaktionsüberstandes wurde entfernt und die Radioaktivität durch Flüssig-Szintillationszählung bestimmt. Die Wirkung der Inhibitoren wurde mit einer Dosisantwortkurve bestimmt. Die  $\text{IC}_{50}$  (die benötigte InhibitorKonzentration, um 50% Abfall der Enzymaktivität zu bewirken) wurde durch Anpassen einer Kurve an die Daten und Berechnen der benötigten InhibitorKonzentration, um 50% Inhibierung des Enzyms zu bewirken, ermittelt. Für jede  $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung wurde der Einfluss von mindestens 8 Konzentrationen des Inhibitors auf die Gelatinaseaktivität bestimmt. Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und verdünnt.

[0031] Die Ergebnisse der obigen Untersuchungen mit der erfindungsgemässen Verbindung waren wie folgt:

| Enzym                                     | $\text{IC}_{50}$ (nM) |
|-------------------------------------------|-----------------------|
| Kollagenase 72 kDa Gelatinase Stromelysin | 10 70 30              |

#### BIOLOGISCHES BEISPIEL B

[0032] Die zeitabhängige Konzentration der erfindungsgemässen Verbindung im Blut von Labortieren nach Verabreichung der Testverbindungen wurde gemessen. Die Verbindung wurde an 6 männliche Ratten (300 g) pro Behandlungsgruppe über eine Magensonde verabreicht. Blutproben wurden durch Schwanzvenenpunktur bei 0,5, 1,0, 2,0, 6,0 und 24 Stunden nach Verabreichung entnommen. 0,4 ml Blut wurden in 4,5 ml-Röhrchen, enthaltend 0,1 ml saure Citratdextrose (ACD) als Antikoagulans gegeben. Zur Extraktion wurden 3 ml Methanol zugegeben und das präzipitierte Blut durch Zentrifugation (30 Minuten bei 3.000 U/min) pelletiert. Ein 2 ml-Aliquot des Überstands wurde entfernt und durch Lyophilisierung konzentriert. Das Extrakt wurde wieder in 200  $\mu\text{l}$  DMSO gelöst und ein 0  $\mu\text{l}$ -Aliquot auf kollagenaseinhibitorische Aktivität untersucht. Die inhibitorische Aktivität in den Extrakten wurde unter Verwendung des im biologischen Beispiel A oben beschriebenen Kollagenaseassay bestimmt und die Konzentration an Inhibitor (d. h. Arzneimittel plus aktive Metaboliten) durch Vergleich mit Standardkurven bestimmt. Die Ergebnisse sind als Peakkonzentration in ng/ml als Fläche unter der Kurve (AUC) in ng/ml  $\times$  Stunden über 0,5 bis 24 Stunden und als AUC als  $\text{IC}_{50} \times$  Stunden ausgedrückt.

| Ergebnisse:       |                  |                                  |
|-------------------|------------------|----------------------------------|
| Peakkonzentration | AUC (0,5-24 h)   | AUC (0,5-24 h)                   |
| ng/ml             | ng/ml $\times$ h | n $\text{IC}_{50}$ 's $\times$ h |
| 212               | 2.966            | 674                              |

[0033] Die erfindungsgemässe Verbindung wurde auch durch orale Verabreichung an Krallenaffen und gesunde menschliche Freiwillige untersucht und signifikante Inhibitoraktivitätsspiegel wurden im Blut dieser Subjekte nach Verabreichung festgestellt.

#### BIOLOGISCHES BEISPIEL C

[0034] Die erfindungsgemässe Verbindung wurde in zwei Tierkrebsmodellen untersucht und die Aktivität bestimmt.

## B16 Maus-Melanommodell:

[0035] In diesem Modell werden C57/BL6J-Mäuse mit  $10^5$  B16-Maus-Melanomzellen subkutan inokuliert. Die Tumore werden 18 Tage wachsen gelassen und das Tumorgewicht durch Raster (Caliper)-Messungen und die folgende Formel berechnet:  $\text{Gewicht (mg)} = \text{Länge (mm)} \times \text{Breite (mm)} : 4$ . Eine Gruppe an Mäusen ( $n = 19$ ) erhielt die Verbindung über eine auf der entgegengesetzten Flanke zum B16-Tumor subkutan implantierte miniosmotische Pumpe verabreicht. Die Pumpe wurde am Tag vor der Tumorinokulation implantiert und die Verbindung wurde in einer Dosis von 360 µg/Tag verabreicht. Eine Kontrollgruppe ( $n = 17$ ) erhielt das entsprechende Volumen an Träger aus identisch implantierten Pumpen.

[0036] Das mittlere Gewicht der Kontrolltumore am Tag **18** betrug  $1.145 \pm 97$  mg. Das Gewicht der mit Verbindung behandelten Tumore betrug  $774 \pm 50$  mg. Diese Reduktion (**32%** für die Testverbindung) war signifikant ( $p < 0,005$ ). Auswertungen der Proben am Ende der Studie wiesen darauf hin, dass der Plasmaspiegel der Testverbindung **26,8**  $\pm 3,2$  ng/ml betrug.

## MDA-435-Brustkarzinommodell:

[0037] In diesem Modell wurden Tiere mit MDA-435-Zellen ( $10^6$  Zellen/Maus) inokuliert, die Tumore **4** Tage wachsen gelassen und dann wurden die Tiere über das Tumorgewicht in drei Behandlungsgruppen ( $n = 15$  pro Gruppe) randomisiert. Minipumpen, die entweder Vehikel oder Testverbindung zu 15 mg/ml oder 60 mg/ml enthielten (Verabreichung von 180 bzw. 720 µg/Maus/ Tag), wurden am Tag **5** chirurgisch implantiert. Die Pumpen wurden am Tag **19** ersetzt und die Studie endete am Tag **32**. Es gab eine dosisabhängige Inhibierung des Tumorstwachstums mit 19% Inhibierung bei 180 µg/Maus/Tag und 33% bei 720 µg/Maus/Tag. Die Inhibierung bei höherer Dosis war statistisch signifikant ( $p < 0,005$ ). Auswertungen der Proben am Ende der Studie deuten darauf hin, dass die Plasmaspiegel **99**  $\pm 6$  ng/ml bzw. 136  $\pm 42$  ng/ml für die Niedrigdosis- bzw. Hochdosisgruppen betrugen.

## BIOLOGISCHES BEISPIEL D

[0038] Die erfindungsgemässe Verbindung wurde auf ihre Neigung, beobachtbare Anzeichen an Tendinitis in Ratten zu induzieren, untersucht. Die tendinitische Wirkung in Ratten durch die erfindungsgemässe Verbindung (Verbindung A) wurde mit der eines nahen strukturellen Isomers, nämlich N<sup>1</sup>-[2,2-Dimethyl-1S-(pyridin-3-ylcarbonyl)-propyl]-N<sup>4</sup>-hydroxy-2R-isobutyl-3S-hydroxy-succinamid (Verbindung B) untersucht.

[0039] Es wurden männliche Lewis-Ratten verwendet. In jeder Studie wurden bis zu 30 Ratten gewogen und auf Körpergewicht zur Gruppenbestimmung randomisiert,  $n = 6$ /Gruppe. In jeder Studie wurde eine entsprechende Vehikelgruppe verwendet, um sie mit jeder Behandlungsgruppe zu vergleichen.

[0040] Verbindung A wurde als Mesylatsalz formuliert, während Verbindung B als freie Base formuliert wurde. Für Verbindung A bei 15 mg/ml war das Vehikel **50%** DMSO, 37% 0,1 M Methansulfonsäure, 13% steriles Wasser; und bei 30 mg/ml war das Vehikel **50%** DMSO, 37% 0,2 M Methansulfonsäure, 13% steriles Wasser. Für Verbindung B bei 15 mg/ml war das Vehikel **50%** DMSO/ Wasser.

[0041] Alzet (Marke) osmotische Minipumpen (2ML2, **14** Tage, 5 µl/std. von Iza Corp., Palo Alto, CA 94303) wurden leer und gefüllt gewogen, um das genaue Füllvolumen zu bestimmen. Vor der Implantierung wurden gefüllte Pumpen in einen Inkubator bei 37°C gegeben. Alle Ratten wurden mit Halothan anästhetisiert. Sobald sie anästhetisiert waren, wurde der Nacken rasiert und desinfiziert. Ein longitudinaler Hautschnitt von ca. 2 cm wurde an der präparierten Stelle durchgeführt und eine subkutane Tasche wurde unter der Haut unter Verwendung einer hämostatischen Pinzette gemacht. Minipumpen wurden eingeführt, mit dem Pumpenausgang von der Wunde weggerichtet. Die Schnittwunde wurde mit Nähten geschlossen und die Fläche um die Wunde erneut desinfiziert. Sofort nach der Operation erhielten alle Ratten Anal-getika (Temgesic – Marke – Reckitt and Colman) zu 0,1 mg/kg s. c. in die Flanke. nach dem Erholen von den Anästhetika wurden die Tiere wieder in die Käfige zurückgebracht, die trockenes Bettzeug enthielten, um sicherzustellen, dass die Wunde vor dem Heilen staubfrei blieb. Am Tag nach der Operation wurden alle Ratten auf Standardbettzeug zurückgebracht und in Gruppen von 3 gehalten, um genauere Beobachtung von Anzeichen an Tendinitis zu erlauben.

[0042] Nach Implantierung der Minipumpen wurden die Ratten gewogen und auf möglichen Beginn an Tendinitis beobachtet. Beginn und Schwere der Tendinitis wurden mit einem auf Beobachtung basierenden Bewertungssystem (siehe unten) gemessen. Die Ratten wurden täglich 16 Stunden beobachtet. Mittlere Bewertungen  $> 2$  wurden als signifikant eingeschätzt. Das verwendete Bewertungssystem war wie folgt:



|                           |   |
|---------------------------|---|
| Ruhephase:                |   |
| Normal                    | 0 |
| Ausruhen auf einer Pfote  | 1 |
| Ausruhen auf keiner Pfote | 2 |

|                                                   |   |
|---------------------------------------------------|---|
| Wenn zur Bewegung stimuliert, zeigten die Tieren: |   |
| Normale Bewegung                                  | 0 |
| Abneigung gegen Bewegung                          | 1 |
| Moderate Abneigung gegen Bewegung                 | 2 |
| Starke Abneigung gegen Bewegung                   | 3 |

|                                               |   |
|-----------------------------------------------|---|
| Gangart:                                      |   |
| Normal                                        | 0 |
| Vermeidung der Verwendung einer Hinterpfote   | 1 |
| Vermeidung der Verwendung beider Hinterpfoten | 2 |

[0043] Die Ergebnisse ergaben, dass die mit Verbindung A (sowohl bei 15 mg/ml als auch 30 mg/ml) und mit lediglich Vehikel dosierten Ratten keine signifikanten Anzeichen von Tendinitis zeigten, wohingegen die mit Verbindung B dosierten signifikante Anzeichen vom Tag 8 ab zeigten (mittlere Bewertungen von > 2 am Tag 8 stiegen auf etwa 6 an den Tagen 15 und 16 an).

[0044] Es bestätigte sich, dass mit Verbindungen A und B in den obigen Untersuchungen dosierte Ratten Plasmaaussetzungen durch die Verbindungen aus den Minipumpen erhielten. Blutproben wurden an den Tagen 3 und 10 nach Minipumpenimplantierung aus mit Halothan leicht anästhetisierten Ratten über die Schwanzvenen erhalten. Blutproben (0,5 ml) wurden in 3,0 ml enthaltende Röhrchen gegeben, um freie und gebundene Verbindung zu extra-Nieren. Die Blutkonzentration der Verbindung A oder Verbindung B wurde durch einen fluorimetrischen Assay unter Verwendung des Cumarinpeptidsubstrats Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> (Mca = (7-Methoxycumarin-4-yl)acetyl, Dpa = N-3-(2,4-Dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropyl) (siehe Knight et al., FEBS Lett. 1992, 296, 263–266) bestimmt. Entweder am Tag 16 oder 17 nach Implantierung wurden die Studien beendet, die Ratten mit Halothan terminal anästhetisiert und Blutproben (0,5 ml) durch Herzpunktion genommen und die Blutkonzentration der Verbindung A oder Verbindung B bestimmt.

#### BIOLOGISCHES BEISPIEL E

[0045] Die Wirkung der erfindungsgemässen Verbindung wurde in einem GBS-Tiermodell bestimmt.

[0046] Experimentelle Autoimmunneuritis (EAN) ist eine von T-Zellen vermittelte Autoimmunstörung des peripheren Nervensystems. Das Modell zeigt viele pathologische Zeichen von GBS mit Symptomen von Ataxie, Schwäche und Paralyse. EAN kann ausgelöst werden, wenn Tiere mit Myelin von peripheren Nerven oder mit Proteinkomponenten des Myelins, wie Protein 0, in Adjuvantien injiziert werden. EAN-Läsionen treten in den Spinalwurzeln und peripheren Nerven auf und sind durch perivaskuläre mononukleare Zellinfiltration, Demyelinierung der Axonen und Nervenleitungsdefizit gekennzeichnet. TNF $\alpha$  wurde in die Pathologie von GBS und EAN impliziert: TNF $\alpha$ -Spiegel sind im Blut von GBS-Patienten erhöht und Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper vermindern die Erkrankungsschwere in EAN (Hartung HP, Annals of Neurology 1993, 33: 563–567).

[0047] Die erfindungsgemässe Verbindung wurde in einem EAN-Rattenmodell untersucht, wo Krankheits-symptome durch Injektion von peripherem Nervenmyelin in Adjuvans ausgelöst wurde.

[0048] Die Verbindung wurde durch chirurgisch implantierte Minipumpen zu 15 oder 30 mg/ml mit einer Rate von 5  $\mu$ l/h (siehe biologisches Beispiel D) verabreicht, was 7 bzw. 14 mg/kg/Tag bereitstellt. Behandlung mit der Verbindung während des Experiments von Tag 1 bis 15 reduziert die Entwicklung klinischer Symptome auf eine dosisabhängige Weise signifikant. Die Verbindung reduziert auch klinische Symptome auf eine dosisabhängige Weise im EAN-Modell, wenn sie therapeutisch an den Tagen 8 bis 15 zu 15 oder 30 mg/ml bei einer Rate von 10  $\mu$ l/h therapeutisch gegeben werden, was 14 bzw. 28 mg/kg/Tag bereitstellt.

#### BIOLOGISCHES BEISPIEL F

[0049] Die Aktivität der erfindungsgemässen Verbindung in einem experimentellen MS-Modell:

##### Verfahren:

[0050] Das hypersensible MS-Modell vom verzögerten Typ, beschrieben durch Matyszak und Perry wurde verwendet (M. K. Matyszak & V. H. Perry, 1995, Demyelination in the central nervous system following a de-

layed type hypersensitivity response to bacillus Calmette-Guerin, Neuroscience 64: 967–977). Männliche Lewis-Ratten wurden anästhetisiert und eine Injektion einer 1 µl phosphatgepufferten Kochsalzlösung, enthaltend 105 wärmezerstörte Calmette-Guerin-Bacillen (BCG)-Organismen in das Striatum der linken Hemisphäre verabreicht. BCG wurde stereotaxial über eine 27G-Spritze mit 10 µl Kapazität injiziert. Die Injektionskoordinaten waren: bregma + 1,2 mm, lateral + 3,0 mm und Tiefe 4,5 mm. Nach 4 Wochen wurden 200 µl einer Lösung, enthaltend 10<sup>7</sup> wärmeabgetöteter BCG-Organismen in vollständigem Freund's Adjuvans intradermal in die unteren Gliedmassen injiziert. Nach weiteren 15 Tagen erhielten die Ratten eine intravenöse Injektion von 2750 U Meerrettichperoxidase (HRP) vom Typ II. 30 Minuten später wurden die Ratten mit Pentobarbitalnatrium tief anästhetisiert und mit 100 ml 0,9% (G/V) NaCl, enthaltend 5.000 U/l Heparin, gefolgt von 200 ml p-Formaldehydlysine-periodat fixativ (PLP), enthaltend 2% para-Formaldehyd und 0,05% Glutaraldehyd, transkardial perfundiert. Die Gehirne wurden entfernt, für weitere 4 Stunden in PLP postfixiert und durch Eintauchen in 30% Sucrose bei 4°C über Nacht kältegeschützt, bevor sie in Tissue-Tek O.C.T. (Miles Inc., Elkhart, USA) eingebettet und mit flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Koronale freiflotierende 50 µm dicke Sektionen wurden zur HRP-Lokalisation durch das Hanker-Yates-Verfahren ausgeschnitten (V. H. Perry et al., 1992).

[0051] Dieses Verfahren erzeugt eine verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion an der stereotaxischen Injektionsstelle von BCG, gekennzeichnet durch lokalen Zusammenbruch der Bluthirnschranke wie durch Anfärben für die extravaskuläre Gegenwart von HRP indiziert; Infiltration von Lymphozyten, wie durch Anfärben mit dem Antikörper OX-22, spezifisch auf die Hochmolekulargewichtsform des Leukozyten gemeinsamen Antigens, indiziert, Aktivieren der Leukozyten, wie durch Anfärben mit dem Antikörper OX-6, spezifisch auf Klasse II Haupthistokompatibilitätsantigen, indiziert; und Myelinzusammenbruch, wie durch Anfärben mit einem Antikörper auf myelinbasiertes Protein indiziert. Diese Eigenschaften sind alle Kennzeichen der aktiven Läsionen oder Flecken, die im zentralen Nervensystem von Patienten mit MS gefunden werden. Lymphozyten wurden durch Zählen der OX-22 positiven Zellen im Gebiet, wo das Färben am intensivsten war, bestimmt. Die Anzahl der Zellen in einem einzelnen Gesichtsfeld wurde aufgezeichnet und als Zellen/mm<sup>2</sup> ausgedrückt. Die Fläche der MGC Klasse II-Expression, Bluthirnschrankenleck und Demyelinierung wurden unter computergestützter Bildanalyse berechnet und die Daten in mm<sup>2</sup> ausgedrückt.

[0052] Die Wirkungen der erfindungsgemässen Verbindung wurden durch Behandlung von Ratten mit 20 mg/kg bei täglicher zweifacher oraler Gabe 5 Tage nach der zweiten Injektion von BCG bis zum Tag 15 bestimmt. Die erfindungsgemässe Verbindung wurde in einem phosphatgepufferten Kochsalzvehikel, enthaltend 0,01% Tween 80, formuliert. Kontrolltiere erhielten lediglich das Vehikel.

[0053] Die Flächen des Bluthirnschrankenlecks, MHC Klasse II-Expression, Demyelinierung und Anzahl an T-Zellen in Tieren, behandelt mit der erfindungsgemässen Verbindung, wurden mit den vehikelbehandelten Kontrollen unter Verwendung von Student's T-Test verglichen.

### Ergebnisse

[0054] In vehikelbehandelten Tieren war die DTH-Antwort durch den Zusammenbruch der Bluthirnschranke, Infiltration von Lymphozyten, MHC Klasse II-Expression und Demyelinierung gekennzeichnet. In mit der erfindungsgemässen Verbindung behandelten Tieren zeigten sich signifikante Abnahmen im Gebiet des Bluthirnschrankenlecks ( $p < 0,05$ ) und in der Zahl an infiltrierenden T-Zellen ( $p < 0,0001$ ). Abnahmen im Gebiet der Demyelinierung und MHC Klasse II-Expression wurden beobachtet, aber erreichten keine statistische Signifikanz.

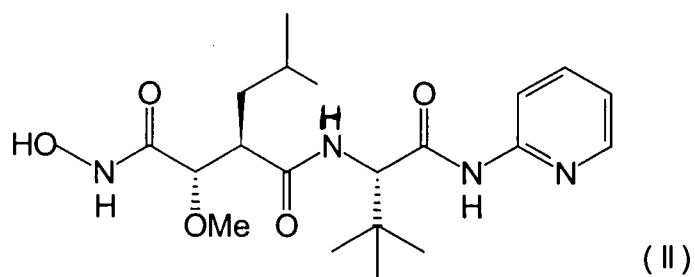
[0055] Die Wirkung der erfindungsgemässen Verbindung im DTH-Modell von MS:

|                          | Vehikel      | Verbindung   |
|--------------------------|--------------|--------------|
| Bluthirnschrankenleck    | 6,325± 1,953 | 2,042± 0,487 |
| T-Zell-Infiltration      | 851,1 ±66,5  | 341,2 ±21,9  |
| MHC Klasse II-Expression | 1,763± 0,370 | 1,318± 0,300 |
| Demyelinierung           | 0,960± 0,329 | 0,758± 0,227 |

Die Werte sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts.

### Patentansprüche

1. N<sup>1</sup>-[2,2-Dimethyl-1S-(pyridin-2-ylcarbamoyl)-propyl]-N4-hydroxy-2Risobutyl-3S-methoxy-succinamid der Formel (II):



oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz, Hydrat oder Solvat davon.

2. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung gemäss Anspruch 1 zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger.

3. Zusammensetzung gemäss Anspruch 2, die zur oralen Verabreichung angepasst ist.

4. Verwendung einer Verbindung gemäss Anspruch 1 bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von rheumatoider Arthritis, Krebs, Multiple Sklerose, Guillan-Barre-Syndrom oder Psoriasis in Säugern, einschliesslich Menschen.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen