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

(10) **DE 600 11 889 T2** 2005.07.14

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 173 413 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 11 889.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP00/03688**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 927 038.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/64863**
(86) PCT-Anmeldetag: **25.04.2000**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **02.11.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.01.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **30.06.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.07.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C07C 271/22**
A61P 43/00, A61K 31/325

(30) Unionspriorität:

300779	**27.04.1999**	**US**
388700	**02.09.1999**	**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:
Novartis AG, Basel, CH

(74) Vertreter:
Spott & Weinmiller, 80336 München

(72) Erfinder:
FRANCE, Dennis, Morris Plains, US; FÜRST, Peter, CH-4310 Rheinfelden, CH; ZIMMERMANN, Johann, D-79424 Auggen, DE; GARCIA-ECHEVERRIA, Carlos, CH-4052 Basel, CH; SCHOLZ, Dieter, A-1040 Wien, AT; FURET, Pascal, F-68800 Thann, FR; IMBACH, Patricia, CH-4303 Kaiseraugst, CH

(54) Bezeichnung: **2,4-DIAMINO-3-HYDROXYCARBOXYLSÄUREDERIVATE ALS PROTEASOME 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).

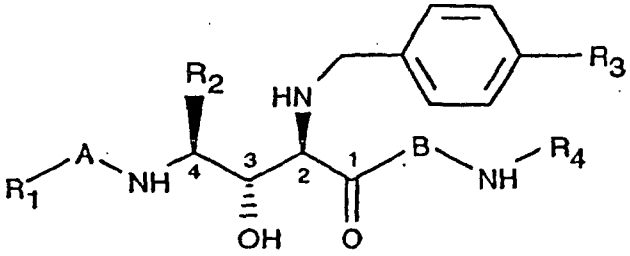
Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine neue Verwendung von 2,4-Diamino-3-hydroxycarbonsäuren der Formel I, worin die Symbole und Substituenten die im Folgenden angegebenen Bedeutungen haben, in freier Form oder in Form eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes oder Komplexes, wobei diese Verbindungsgruppe hierin kollektiv als die erfindungsgemäßen Verbindungen bezeichnet wird, bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung einer proliferativen Erkrankung, beispielsweise eines festen Tumors, auf neue 2,4-Diamino-3-hydroxycarbonsäuren und deren pharmazeutisch annehmbare Salze und auf eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine erfindungsgemäße Verbindung zusammen mit einem pharmazeutischen Träger enthält.

[0002] Proteine, die bestimmt sind für den Abbau durch den multikatalytischen Proteasomkomplex, sind bekannt für unter anderem Funktionen bei der Zellrykulssteuerung (wie der Cycline, p21 und p27) und bei Apoptose, wie p53 (M Rolfe, I M Chiu und M Pagano, The ubiquitin-mediated proteolytic pathway as therapeutic area, J Mol Med 75, 1997, Seiten 5 bis 17). Inhibitoren des Proteasoms eignen sich daher zur Behandlung proliferativer Erkrankungen, welche auf die Hemmung der Proteasomaktivität ansprechen. Als proliferative Erkrankungen lassen sich hier Erkrankungen erwähnen, wie Psoriasis, und insbesondere feste Tumore, wie Colontumor, Brusttumor, Lungentumor und Prostatatumor.

[0003] Die vorliegende Erfindung bezieht sich nun auf eine neue Verwendung von 2,4-Diamino-3-hydroxycarbonsäuren der Formel I



(I)

worin
A und B unabhängig für eine Bindung oder einen unsubstituierten oder substituierten Aminoacylrest stehen,
R_1 für Wasserstoff, eine Aminoschutzgruppe oder eine Gruppe der Formel R_5Y- steht, worin
R_5 für Wasserstoff oder eine unsubstituierte oder substituierte Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl-, Arylalkyl-, Heteroaryl-, Heteroarylalkyl-, Heterocyclyl- oder Heterocyclylalkylgruppe steht und Y für -CO- , -NH-CO- , -NH-CS- , $-SO_2-$, -O-CO- oder -O-CS- steht,
R_2 für die Seitenkette einer natürlichen Aminosäure, eine Alkyl-, Arylalkyl-, Heteroarylalkyl- oder Cycloalkylalkylgruppe oder für Trimethylsilylmethyl, 2-Thienylmethyl oder Styrylmethyl steht,
R_3 für Halogen, Alkyl, Alkoxy oder Hydroxyalkoxy steht und
R_4 für 2(R)-Hydroxyindan-1-(S)-yl , (S)-2-Hydroxy-1-phenylethyl oder 2-Hydroxybenzyl steht, das unsubstituiert oder in Stellung 4 substituiert ist durch Methoxy, worin die 2,4-Diamino-3-hydroxycarbonsäure vorliegt in freier Form oder in Form eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes hiervon, bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung einer proliferativen Erkrankung als Reaktion auf eine Hemmung des multikatalytischen Proteasomkomplexes.

[0004] Unsubstituiertes oder substituiertes Alkyl ist hierin vorzugsweise Alkyl mit 1 bis 5 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, wie Methyl, Ethyl, Isopropyl oder tert-Butyl, und insbesondere mit 1 oder 4 Kohlenstoffatomen. Der Substituent ist beispielsweise Phenoxy, Hydroxy oder ungeschütztes oder geschütztes Amino.

[0005] Unsubstituiertes oder substituiertes Arylalkyl ist beispielsweise Phenylalkyl mit zusammen 7 bis 10 Kohlenstoffatomen, wie Benzyl oder 2-Phenylethyl. Dieses ist unsubstituiert oder substituiert im Aryl- oder Alkylrest durch beispielsweise Hydroxy, wie in Benzyl-CH(OH)- oder Phenyl-$CH(CH_2OH)$-, durch Alkyl, Amino oder Alkylamino, oder ist beispielsweise Naphthylalkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen im Alkylenteil, insbesondere Naphthylmethyl.

[0006] Eine Aminoschutzgruppe ist vorzugsweise Benzyloxycarbonyl, Cycloalkylalkoxycarbonyl, insbesondere Cyclohexylmethoxycarbonyl, oder tert-Butoxycarbonyl. Unsubstituiertes oder substituiertes Heteroarylalkyl ist vorzugsweise Pyridylalkyl, insbesondere 2-Pyridylmethyl und 4-Pyridylmethyl.

[0007] Aryl, Heteroaryl und die Arylteile von Arylalkyl und Heteroarylalkyl können mono- oder polycyclisch sein, wie beispielsweise Pyridyl, Naphthyl oder Benzimidazolyl. Der Alkylenteil von Arylalkyl oder Heteroarylalkyl kann substituiert sein, beispielsweise durch Hydroxy.

[0008] Eine Heterocyclylgruppe und der Heterocyclylteil einer Heterocyclylalkylgruppe ist eine gesättigte Heterocyclylgruppe mit 1 oder mehr Heteroatomen, die ausgewählt sind aus Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel. Sie hat vorzugsweise 5 oder 6 Ringatome und vorzugsweise bis zu 3 Heteroatome.

[0009] Cycloalkylalkyl ist vorzugsweise Cyclohexylalkyl und enthält vorzugsweise 1 bis 4 Kohlenstoffatome im Alkylenteil.

[0010] Halogen ist Fluor, Chlor, Brom oder Iod, vorzugsweise Chlor oder Brom.

[0011] Alkyl und Alkoxy enthalten vorzugsweise 1 bis 4 Kohlenstoffatome, insbesondere 1 oder 2 Kohlenstoffatome, und sind vor allem Methyl oder Methoxy.

[0012] Hydroxyalkoxy ist vorzugsweise ω-Hydroxyalkoxy mit 2 bis 4 Kohlenstoffatomen, insbesondere 2-Hydroxyethoxy.

[0013] Ein Salz ist beispielsweise ein Säureadditionssalz, wie ein Hydrochlorid.

[0014] Die Verbindungen der Formel I haben mehrere Chiralitätszentren und können daher an einer Vielfalt an Stereoisomeren vorkommen. Zur Erfindung gehören daher alle Stereoisomeren und auch racemischen Gemische, sofern nichts anderes gesagt ist. Die Isomeren können aufgetrennt oder getrennt werden durch herkömmliche Techniken, wie Chromatographie. Wie der Formel I zu entnehmen ist, entspricht die Konfiguration am Kohlenstoffatom in Stellung 2 der Konfiguration R und in den Stellungen 3 und 4 der Konfiguration S.

[0015] R_1 ist vorzugsweise Wasserstoff, Pyridylalkoxycarbonyl, Naphthylalkoxycarbonyl, Naphthylalkylcarbonyl, Benzyl-CH(OH)-carbonyl, Phenoxymethylcarbonyl, Phenylalkylcarbonyl oder eine Aminoschutzgruppe, wie tert-Butoxycarbonyl, Cycloalkylalkoxycarbonyl, insbesondere Cyclohexylmethoxycarbonyl, oder Benzyloxycarbonyl, das unsubstituiert oder substituiert ist durch Alkyl oder Amino, wobei R_1 vorzugsweise steht für Naphthyhnethoxycarbonyl, Naphthylmethylcarbonyl, Pyridyhnethoxycarbonyl, Phenylpropionyl, Aminophenylpropionyl, tert-Butoxycarbonyl, Aminobenzyloxycarbonyl, Alkylbenzyloxycarbonyl, Dialkylbenzyloxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl, bevorzugter sogar für Benzyloxycarbonyl.

[0016] Steht A für einen unsubstituierten oder substituierten Aminoacylrest, dann ist dieser vorzugsweise ein unsubstituierter oder substituierter α-Aminoacylrest, wie Alanin, Leucin, Isoleucin, Asparagin, Valin, tert-Butylglycin, tert-Leucin oder Histidin. Hierbei handelt es sich vorzugsweise um einen geschützten oder ungeschützten Rest einer natürlichen α-Aminosäure, vorzugsweise um eine Aminosäure, die ein normaler Bestandteil von Proteinen ist, oder um tert-Leucin. Dieser Rest hat vorzugsweise die Konfiguration L. A ist insbesondere Glycin, L-Valin, L-tert-Leucin oder eine Bindung, bevorzugter L-tert-Leucin.

[0017] R_2 ist vorzugsweise die Seitenkette einer natürlichen Aminosäure, vorzugsweise einer α-Aminosäure, vorzugsweise einer Aminosäure, die ein normaler Bestandteil von Proteinen ist. Vorzugsweise ist dieser Rest Isopropyl, Aminocarbonylmethyl, Methyl, 1-Methylpropyl, Benzyl, 4-Hydroxybenzyl oder Isobutyl, vorzugsweise Benzyl.

[0018] Ist B ein unsubstituierter oder substituierter Aminoacylrest, dann ist dieser Rest vorzugsweise ein unsubstituierter oder substituierter α-Aminoacylrest, wie Phenylalanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Alanin oder Asparagin. Vorzugsweise handelt es sich dabei um den unsubstituierten oder substituierten Rest einer natürlichen α-Aminosäure, vorzugsweise einer Aminosäure, die ein normaler Bestandteil von Proteinen ist. α Aminosäuren mit einer zweiten Carboxylgruppe, beispielsweise Glutaminsäure, sind vorzugsweise mit einem C_1-C_3-Alkohol, insbesondere mit Methanol, verestert. Bevorzugt ist hierfür die Konfiguration L. B ist L-Valin, L-Glutaminsäuremethylester oder eine Bindung, bevorzugter sogar L-Valin.

[0019] R_3 ist vorzugsweise Halogen, Methyl oder Methoxy, insbesondere Methoxy.

[0020] R_4 ist vorzugsweise 2(R)-Hydroxyindan-1-(S)-yl oder 2-Hydroxybenzyl, das unsubstituiert oder wie oben definiert substituiert ist, insbesondere 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl.

[0021] Y ist vorzugsweise -CO- oder -O-CO-, insbesondere -O-CO-.

[0022] R_5 ist vorzugsweise eine unsubstituierte oder substituierte Alkyl-, Arylalkyl- oder Heteroarylalkylgruppe, insbesondere Alkyl, im Falle von unsubstituiertem oder substituiertem Heteroarylalkyl vorzugsweise Pyridylalkyl, insbesondere 2-Pyridylmethyl, im Falle von unsubstituiertem oder substituiertem Arylalkyl, vorzugsweise Benzyl-CH(OH)-, und im Fall von substituiertem Alkyl vorzugsweise Phenoxymethyl.

[0023] Über die erfindungsgemäßen Verbindungen wird in den Patentanmeldungen EP 0 615 969 A und JP 04-1047/94 A sowie den Patenten AU 672 867 A, EC 961 021 A und TW NI 74 341 A sowie US 5 538 997 A ausgeführt, dass diese Verbindungen gegen AIDS wirksam sind, da sie die Fähigkeit zur Hemmung der HIV Proteinase haben.

[0024] Erfindungsgemäß ist nun erkannt worden, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen überraschenderweise günstig wirken auf proliferative Erkrankungen, beispielsweise Psoriasis, und insbesondere auf feste Tumore, wie Colontumor, Brusttumor, Lungentumor und Prostatatumor.

[0025] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können nach Verfahren hergestellt werden, wie sie in den oben angegebenen Patenten und Patentanmeldungen beschrieben werden. Die in der folgenden Tabelle 1 aufgeführten Verbindungen lassen sich vor allem durch die im Folgenden beschriebenen Verfahren – unter Bezugnahme auf US 5 538 997 A – herstellen.

Abkürzungen

Bn	Benzyl
BOC	tert-Butoxycarbonyl
ES-MS	Elektronensprühmassenspektrometrie
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Me	Methyl
TFp	Trifluoressigsäure
tLeu	tert-Leucin
Val	Valin
Z	Benzyloxycarbonyl

Tabelle 1

(R_2 = Bn, R_3 = OMe, R_4 = 2-OH, 4-MeO-Bn)

Beispiel	A	B	R_1
1	L-tLeu	L-Val	Z
2	L-Val	O-Me-L-Glu	Z
3	L-tLeu	L-Val	BOC
4	L-tLeu	L-Val	Naphth-1-yl-methoxycarbonyl
5	L-tLeu	L-Val	Naphth-2-yl-methoxycarbonyl
6	L-tLeu	L-Val	4-Pyridylmethoxycarbonyl
7	Gly	L-Val	Z
8	L-Val	L-Val	Z
9	L-tLeu	L-tLeu	Z
10	L-tLeu	L-Val	Naphth-1-ylacetyl
11	L-tLeu	L-Val	3-Methylbenzyloxycarbonyl
12	L-tLeu	L-Val	3-(3-Aminophenyl)-propionyl
13	L-tLeu	L-Val	3-Aminobenzyloxycarbonyl
14	L-tLeu	L-Val	3,5-Dimethylbenzyl-oxycarbonyl
15	L-tLeu	L-Val	Cyclohexylmethoxycarbonyl

[0026] Die Herstellung der Verbindungen der Beispiele 1 bis 15 erfolgt nach dem allgemeinen Reaktionsschema von US 5 538 997 A für die Umwandlung von Verbindungen der Formel III in Verbindungen der Formel VII. Die Synthese der verschiedenen Baublöcke wird im oben erwähnten US Patent unter den Beispielen 1 bis 4, Spalten 6 bis 8, und unter Weitere Zwischenprodukte, Spalten 9 bis 11, beschrieben.

[0027] Die Reinheit der Verbindungen wird durch analytische HPLC mit Umkehrphase auf einer mit Nucleosil C18 gefüllten Säule (250 × 4 mm, 5 mm, 100 Å) verifiziert: System A: linearer Gradient während 7 min von MeCN/0,09% TFA und H_2O/0,1% TFA im Verhältnis von 1:49 bis 1:0 und während 3 min im Verhältnis von 1:0, Flussrate 2,0 ml/min, Detektion bei 215 nm; System B: linearer Gradient während 10 min von McCN/0,09% TFA und H_2O/0,1% TFA im Verhältnis von 1:49 bis 1:0, Flussrate 2,0 ml/min, Detektion bei 215 nm. System C: analytische HPLC mit Umkehrphase auf einer mit Nucleosil C_{18AB} gefüllten Säule (125 × 3 mm, 3 µm, 120 Å, linearer Gradient während 7 min von MeCN/0,09% TFA und H_2O/0,1 % TFA im Verhältnis von 1:49 bis 1:0, und während 3 min im Verhältnis von 1:0, Flussrate 1,15 ml/min, Detektion bei 215 nm.

Beispiel 1:

N-{4(S)-[(N-Benzyloxycarbonyl-tert-leucinoyl)amino]-3-(S)-hydroxy-2(R)-(4-methoxybenzylamino)5-phenyl}pentanoyl-L-valin-N-[(2-hydroxy-4-methoxy)benzyl]amid

[0028] Die Verbindung von Beispiel 1 entspricht der Verbindung von Beispiel 4 von US 5 538 997 A.

Beispiel 2:

4-[4-(2-Benzyloxycarbonylamino-3-methyl-butyrylamino)-3-hydroxy-2-(4-methoxy-benzylamino)-5-phenylpentanoylamino]-4-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-buttersäuremethylester

[0029] Die Herstellung der Titelverbindung erfolgt analog zu Beispiel 4 von US 5 538 997 A. Die Herstellung der Baublöcke erfolgt unter Verwendung von BOC-L-Glutaminsäure-γ-methylester-α-p-nitrophenylester anstelle von BOC-L-Valin-p-nitrophenylester in der Sufe C.c) und von BOC-L-Valin anstelle von BOC-L-tert-Leucin ind der Stufe B) unter Weitere Zwischenprodukte, ES-MS 856 [M + H^+].

Beispiel 3:

{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäure-tert-butylester

[0030] Die Verbindung von Beispiel 3 entspricht der Verbindung von Beispiel 11 von US 5 538 997 A.

Beispiel 4:

{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurenaphthalin-1-ylmethylester

[0031] Die Herstellung der Titelverbindung erfolgt analog zu Beispiel 4 von US 5 538 997 A unter Verwendung von Carbonsäurenaphthalin-1-ylmethylester-4-nitro-phenylester anstelle von N-(Benzyloxycarbonyloxy)-succinimid. Die Synthese des Carbonsäurenaphthalin-1-ylmethylester-4-nitro-phenylesters erfolgt ausgehend von 1-Naphthalinmethanol (Aldrich, Buchs, Schweiz) entsprechend einem im Stand der Technik bekannten Verfahren (P Furet et al, J Med Chem 1997, 40, Seiten 3551 bis 3556). ES-MS (Titelverbindung): 877,3 [M + H^+], 899,4 [M + Na^+]; HPLC (System A) Bildung eines einzelnen Peaks bei t_R = 7,30 min.

Beispiel 5:

{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurenaphthalin-2-ylmethylester

[0032] Die Herstellung der Titelverbindung erfolgt analog zu Beispiel 4 von US 5 538 997 A unter Verwendung von Carbonsäurenaphthalin-2-ylmethylester-4-nitro-phenylester anstelle von N-(Benzyloxycarbonyloxy)-succinimid. Die Synthese des Carbonsäurenaphthalin-2-ylmethylester-4-nitro-phenylesters erfolgt ausgehend von 2-Naphthalinmethanol (Aldrich, Buchs, Schweiz) entsprechend einem im Stand der Technik bekannten Verfahren (P Furet et al, J Med Chem 1997, 40, Seiten 3551 bis 3556). ES-MS (Titelverbindung): 877,3 [M + H^+], 899,4 [M + Na^+]; HPLC (System A) Bildung eines einzelnen Peaks bei t_R = 7,38 min.

Beispiel 6:

{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurepyridin-4-ylmethylester

[0033] Die Herstellung der Titelverbindung erfolgt analog zu Beispiel 4 von US 5 538 997 A unter Verwendung von Carbonsäure-4-nitro-phenylesterpyridin-4-ylmethylester anstelle von N-(Benzyloxycarbonyloxy)-succinimid. Die Synthese des Carbonsäure-4-nitro-phenylesterpyridin-4-ylmethylesters erfolgt ausgehend von 4-(Hydroxymethyl)pyridin (Fluka, Buchs, Schweiz) entsprechend einem im Stand der Technik bekannten Verfahren (P Furet et al, J Med Chem 1997, 40, Seiten 3551 bis 3556). ES-MS (Titelverbindung): 828,3 [M + H^+], 849,2 [M + Na^+]; HPLC (System B) Bildung eines einzelnen Peaks bei t_R = 6,80 min.

Beispiel 7:

{[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxybenzylamino)-propylcarbamoyl]-methyl}-carbaminsäurebenzylester

[0034] Die Herstellung der Titelverbindung erfolgt analog zu Beispiel 4 von US 5 538 997 A. Ein Baublock wird hergestellt unter Verwendung von Z-L-Glycin anstelle von BOC-L-tert-Leucin bei der Stufe B) unter Weitere

Zwischenprodukte. ES-MS: 771,0 [M + H^+]; HPLC (System B) Bildung eines einzelnen Peaks bei t_R = 9,45 min.

Beispiel 8:

{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-metho xy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2-methyl-propyl}-carbaminsäurebenzylester

[0035] Die Verbindung von Beispiel 8 entspricht der Verbindung von Beispiel 22 von US 5 538 997 A. ES-MS: 813,0 [M + H^+]; HPLC (System A) Bildung eines einzelnen Peaks bei t_R = 7,53 min.

Beispiel 9:

{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2,2-dimethyl-propylcarbamoyl]-3-(4-me thoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurebenzylester

[0036] Die Herstellung der Titelverbindung erfolgt analog zu Beispiel 4 von US 5 538 997 A. Ein Baublock wird hergestellt unter Verwendung von BOC-L-tert-Leucin-p-nitrophenylester anstelle von BOC-L-Valin-p-nitrophenylester bei der Stufe C.c) unter Weitere Zwischenprodukte. ES-MS (Titelverbindung): 841,0 [M + H^+]; HPLC (System A) Bildung eines einzelnen Peaks bei t_R = 7,22 min.

Beispiel 10:

4-[3,3-Dimethyl-2-(2-naphthalin-1-ylacetylamino)-butyrylamino]-3-hydroxy-2-(4-methoxy-benzylamino)-5-phe nyl-pentansäure-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propyl]-amid

[0037] Die Herstellung der Titelverbindung erfolgt analog zu Beispiel 4 von US 5 538 997 A, aber unter Verwendung von 1-Naphthylessigsäure (Fluka, Buchs, Schweiz) zur Einführung der endgültigen N-terminalen Gruppe R_1. Im Einzelnen wird hierzu 1-Naphthylessigsäure (1,1 Äquivalent) zuerst gekuppelt mit 2-(2-Pyridon-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborat (1,1 Äquivalent; Fluka) in Anwesenheit von Düsopropylethylamin (2,2 Äquivalent) und unter Verwendung von N,N-Dimethylacetamid als Lösemittel. ES-MS (Titelverbindung): 861,0 [M + H^+], 883,1 [M + Na^+]; HPLC (System A) Bildung eines einzelnen Peaks bei t_R = 7,17 min.

Beispiel 11:

{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl)-3-(4-metho xy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäure-3-methylbenzylester

[0038] Die Herstellung der Titelverbindung erfolgt analog zu Beispiel 4 von US 5 538 997 A unter Verwendung von Carbonsäure-3-methyl-benzylester-4-nitro-phenylester anstelle von N-(Benzyloxycarbonyloxy)-succinimid. Die Synthese des Carbonsäure-3-methyl-benzylester-4-nitro-phenylesters erfolgt ausgehend von 3-Methylbenzylalkohol (Aldrich, Buchs, Schweiz) entsprechend einem im Stand der Technik bekannten Verfahren (P Furet et al, J Med Chem 1997, 40, Seiten 3551 bis 3556). ES-MS (Titelverbindung): 841,0 [M + H^+], 843,0 [M + Na^+ J; HPLC (System A) Bildung eines einzelnen Peaks bei t_R = 7,17 min.

Beispiel 12:

4-{2-[3-(3-Amino-phenyl)-propionylamino)-3,3-dimethyl-butyrylamino}-3-hydroxy-2-(4-methoxy-benzylamino)-5-phenyl-pentansäure-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propyl]-amid,

[0039] Die Herstellung der Titelverbindung erfolgt analog zu Beispiel 4 von US 5 538 997 A, aber unter Verwendung von 3-(3-tert-Butoxycarbonylamino-phenyl)-propionsäure zur Einführung der endgültigen N-terminalen Gruppe R_1.

[0040] Die Synthese der 3-(3-tert-Butoxycarbonylamino-phenyl)-propionsäure erfolgt ausgehend von 3-(3-Aminophenyl)propionsäure (Trans World Chemicals, Inc., Rockville, USA) entsprechend einem im Stand der Technik bekannten Verfahren (P Furet et al, J Med Chem 1997, 40, Seiten 3551 bis 3556) und Einführung der N-Endgruppe unter analoger Befolgung des Beispiels 10. Die tert-Butoxycarbonylgruppe wird durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. ES-MS (Titelverbindung): 840,0 [M + H^+], 862,1 [M + Na^+]; HPLC (System A) Bildung eines einzelnen Peaks bei t_R = 5,74 min.

Beispiel 13:

{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-(1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-diemethyl-propyl}-carbaminsäure-3-aminobenzylester

[0041] Die Herstellung der Titelverbindung erfolgt analog zu Beispiel 4 von US 5 538 997 A unter Verwendung von Carbonsäure-3-tert-butoxycarbonylamino-benzylester-4-nitro-phenylester anstelle von N-(Benzyloxycarbonyloxy)succinimid. Die Synthese des Carbonsäure-3-tert-butoxycarbonylamino-benzylester-4-nitro-phenylesters erfolgt ausgehend von 3-Aminobenzylalkohol (Aldrich) entsprechend einem im Stand der Technik bekannten Verfahren (P Furet et al, J Med Chem 1997, 40, Seiten 3551 bis 3556). Die Entfernung der tert-Butoxycarbonylgruppe erfolgt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure. ES-MS (Titelverbindung): 842,0 [M + H^+], 864,0 [M + Na^+]; HPLC (System A) Bildung eines einzelnen Peaks bei t_R = 5,85 min.

Beispiel 14:

{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäure-3,5-dimethylbenzylester

[0042] Die Herstellung der Titelverbindung erfolgt analog zu Beispiel 4 von US 5 538 997 A, aber unter Verwendung von Carbonsäure-3,5-dimethyl-benzylester-4-nitro-phenylester anstelle von N-(Benzyloxycarbonyloxy)-succinimid. Die Synthese des Carbonsäure-3,5-dimethyl-benzylester-4-nitro-phenylesters erfolgt ausgehend von 3,5-Dimethylbenzylalkohol (Aldrich, Schweiz) entsprechend einem im Stand der Technik bekannten Verfahren (P Furet et al, J Med Chem 1997, 40, Seiten 3551 bis 3556). ES-MS (Titelverbindung): 855,0 [M + H^+], 877,0 [M + Na^+]; HPLC (System A) Bildung eines einzelnen Peaks bei t_R = 7,32 min.

Beispiel 15:

{(S)-1-[(15,2S,3R)-1-Benzyl-2-hydroxy-3-[(S)-1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methylpropylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}carbaminsäurecyclohexylmethylester

[0043] Die Herstellung der Titelverbindung erfolgt analog zu Beispiel 4 von US 5 538 997 A, aber unter Verwendung von Carbonsäure-3,5-dimethyl-benzylester-4-nitro-phenylester anstelle von N-(Benzyloxycarbonyloxy)-succinimid. Die Synthese des Carbonsäurecyclohexylmethylester-4-nitro-phenylesters (1,1 Äquivalent) erfolgt ausgehend von Cyclohexyhnethanol (Fluka, Buchs, Schweiz) entsprechend einem im Stand der Technik bekannten Verfahren (P Furet et al, J Med Chem 1997, 40, Seiten 3551 bis 3556). ES-MS (Titelverbindung): 833,0, t_R = 7,55 min (System C).

Beispiel 16:

Zusammensetzung für eine orale Verabreichung

[0044] Zur Herstellung von 20,0 g einer Lösung zur oralen Verabreichung wird von folgenden Bestandteilen ausgegangen (die Angabe % bezieht sich auf das Gewicht des jeweiligen Bestandteils, bezogen auf das Gesamtgewicht der Lösung):

Cremophor RH 40	9,6 g (48%)
Maisöl-mono-di-tri-glyceride	5,8 g (29%)
Propylenglycol	3,8 g (19%)
Verbindung der Formel I	0,8 g (4%)

[0045] Die Lösung wird bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur aufbewahrt.

[0046] Die Brauchbarkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Behandlung der oben erwähnten proliferativen Erkrankungen lasst sich beispielsweise durch die im Folgenden beschriebenen Testmethoden belegen.

Hemmung von 20S Proteasom

Die erfindungsgemäßen Verbindungen hemmen das 20S Proteasom.

[0047] Der multikatalytische Proteasomkomplex ist verantwortlich für die von ATP abhängige Proteolyse des Großteils der Zellproteine. Das 20S Proteasom enthält zwar den proteolytischen Kern, kann aber Proteine in-vivo nicht abbauen, sofern es nicht an beiden Enden seiner Struktur, welche selbst multiple ATPase Aktivitäten enthält, mit 19S Kappen komplexiert ist. Diese größere Struktur ist als das 26S Proteasom bekannt und baut Proteine rasch ab, die für den Abbau durch die Anbindung multipler Moleküle des 8,5 kDa Polypeptids Ubiquitin bestimmt sind. Für einen proteasomalen Abbau ausgerichtete Proteine haben Funktionen bei der Zellzykluskontrolle (beispielsweise Cycline, p21, p27) und der Apoptose (beispielsweise p53)(M Rolfe, I M Chiu und M Pagano, siehe oben). Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind daher hoch geeignet zur Behandlung von Erkrankungen, die auf eine Hemmung der Aktivität des 20S Proteasoms ansprechen, welches der Grund für die oben erwähnten proliferativen Erkrankungen ist.

[0048] Die Hemmung der Chymotrypsin ähnlichen Aktivität des 20S Proteasoms kann durch den folgenden Versuch gezeigt werden. Dieser beruht auf der Hydrolyse des fluorogenen Peptids Suc-LLVY-AMC (Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-amino-4-methylcumarin), welches ausschließlich an der Y-AMC Bindung durch das 20S Proteasom gespalten wird. Die Hydrolyse dieses Peptids ist begleitet von einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität (λ_{ex} 355 nm, λ_{em}, 460 nm) infolge einer Freisetzung der intern blockierten 2-Aminobenzoylfluoreszenz, welche eine Diffusion weg vom Hydrolyseprodukt Suc-LLVY begleitet.

[0049] Man vorinkubiert 2 µl einer 1 mM Lösung einer Versuchsverbindung in DMSO (Dimethylsulfoxid, 20 µm Endkonzentrat im Loch) während 60 min bei Raumtemperatur in schwarzen Mikrotiterplatten mit 96 Löchern zusammen mit einem Gemisch aus 1 µl gereinigtem humanen Plazenta-20S-proteasom (Diabetes Forschungsinstitut, Düsseldorf Deutschland, etwa 100 ng Proteasom, je nach der Proteasomzubereitung) und 47 µl Puffer-Ca (5 mM $CaCl_2$, 20 mM Tris/HCl (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid) vom pH 8,0) und zersetzt das Ganze unter Vermischung mit 0,3 µl einer 2,67 mM Lösung Suc-LLVY-AMC (Bachem, Schweiz) in DMSO (80 µM Endkonzentration im Loch) und 47 µl Puffer-Ca. Das erhaltene Gemisch wird 3 bis 24 h bei 37°C inkubiert. Gewünschtenfalls kann die Proteolyse des Substrats durch Zusatz von 50 µl Stopplösung (100 mM Monochloressigsäure, 130 mM NaOH, 100 mM Essigsäure, pH = 4,3) gestoppt werden. Die Fluoreszenz wird überwacht mit einem Mikrotiterplattenlesegerät der Bezeichnung Fluoroskan Ascent™.

[0050] Für jede Messreihe müssen zwei Kontrollversuche durchgeführt werden:

1.) 0% Wert:
Beim oben beschriebenen Versuch werden 2 µl DMSO anstelle von 2 µl einer 1 mM Lösung einer Versuchsverbindung in DMSO und 48 µl Puffer-Ca anstelle eines Gemisches aus 47 µl Puffer-Ca und 1 µl gereinigtes Proteasom verwendet.

2.) 100% Wert:
Beim oben beschriebenen Versuch werden 2 µl DMSO anstelle von 2 µl einer 1 mM Lösung einer Versuchsverbindung in DMSO verwendet.

Berechnung

$$\%\ \text{Restaktivität} = \frac{(\text{Wert mit der Verbindung} - 0\%\ \text{Wert})}{(100\%\ \text{Wert} - 0\%\ \text{Wert})} \cdot 100\%$$

[0051] Der IC_{50} Wert ist definiert als die Konzentration einer Verbindung, bei welcher die Restaktivität 50% beträgt. Beispiele für IC_{50} Werte, welche bei diesem Versuch für erfindungsgemäße Verbindungen bestimmt worden sind, sind der folgenden Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2

(R_2 = Bn, R_3 = OMe, R_4 = 2-OH, 4-MeO-Bn)

Beispiel	A	B	R_1	IC_{50} Wert [µM]
1	L-tLeu	L-Val	Z	0,9
2	L-Val	O-Me-L-Glu	Z	0,4
3	L-tLeu	L-Val	BOC	26
4	L-tLeu	L-Val	Naphth-1-ylmethoxycarbonyl	2

Beispiel	A	B	R_1	IC_{50} Wert [µM]
5	L-tLeu	L-Val	Naphth-2-ylmethoxycarbonyl	5,2
6	L-tLeu	L-Val	4-Pyridylmethoxycarbonyl	2,2
7	Gly	L-Val	Z	9
8	L-Val	L-Val	Z	3,3
10	L-tLeu	L-Val	Naphth-1-ylacetyl	0,1
11	L-tLeu	L-Val	3-Methylbenzyloxycarbonyl	0,5
12	L-tLeu	L-Val	3-(3-Aminophenyl)propionyl	0,6
13	L-tLeu	L-Val	3-Aminobenzyloxycarbonyl	0,6
14	L-tLeu	L-Val	3,5-Dimethylbenzyloxycarbonyl	1,1
15	L-tLeu	L-Val	Cyclohexylmethoxycarbonyl	1,0

[0052] Die antitumorale Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen kann auch in-vivo belegt werden.

In-Vivo Beurteilung der antitumoralen Wirkung in Nacktmäusen unter Verwendung humaner Tumor-Xenotransplantate

[0053] Weibliche oder männliche BALB/c nu/nu Mäuse (Tierfarm der Novartis, Sisseln, Schweiz, oder Bomholtgaard, Kopenhagen, Dänemark) mit subkutan transplantierten Humantumoren werden zur Beurteilung der Antitumorwirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen gegenüber Zelllinien verwendet, die von den folgenden vier Tumorarten stammen:Brusttumor: MCF-7, Lungentumor: NCI H596: Colontumor: HCT 116 und Prostatatumor: PC 3.

Materialien

[0054] Humanes Colonkarzinom HCT 116 (ATCC CCL 247), humanes squamöses Zelllungenkarzinom NCI H596 (ATCC HTB 178), Östrogen abhängiges Brustkarzinom MCF-7 (ATCC HTB 22) und die humane Prostatakrebs PC 3 Zelllinie werden bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA). Die Zellen werden bei 37°C in einer Atmosphäre aus 5% V/V CO_2 und 80% relativer Feuchtigkeit in den folgenden Medien kultiviert: NCI H596: RPMI 1640, 20% V/V FBS (fetales Rinderserum), 1% W/V Glutamin; HCT-116: McCoy 5A, 10% V/V FBS,1% W/V Glutamin; PC 3: RPMI 1640, 20% V/V FBS, 1% W/V Glutamin; MCF-7, RPMI 1640, 20% V/V FBS, 1% W/V Glutamin. Alle diese Zelllinien sind anhaftend und können freigesetzt werden durch Spülung mit einer ausgewogenen Salzlösung nach Hank und Behandlung mit 0,25% W/V Trypsin. Alle diese Zellen werden hergestellt als so genannte Masterzellstammkulturen (in Kulturmedien, die so ergänzt worden sind, dass die 20% V/V FBS und 7% V/V DMSO enthalten) und aufbewahrt bei –125°C (Dämpfe aus

flüssigem Stickstoff). Aus den Masterstammkulturen werden Arbeitszellkulturen der Zellen hergestellt durch Auftauen und Expandieren der Zellen während drei Passagen, welche dann auf Ampullen verteilt und eingefroren werden. Die Lebensfähigkeit (Ausschlussversuch von Trypanblau unter Verwendung von 0,5% W/V Trypanblau) beträgt vor dem Einfrieren über 90% für alle Zelllinien.

Bildung fester Tumore in Nacktmäusen

[0055] Die Mäuse werden unter kontrollierten Bedingungen (optimale hygienische Bedingungen [OHC]) unter freiem Zugang zu sterilem Futter und Wasser gehalten. Die Bildung von Tumoren erfolgt nach subkutaner Injektion von Zellen (ein Minimum von 2×10^6 Zellen in 100 µl PBS (mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) oder Medium) in Trägermäusen (4 bis 8 Mäuse pro Zelllinie). Es werden subkutane Injektionen in die jeweils linke Seite der Mäuse in der Mitte zwischen dem Schwanz und dem Kopf vorgenommen. Die erhaltenen Tumoren werden Reihenpassagen für ein Minimum aus drei aufeinander folgenden Transplantationen unterzogen, bevor die Behandlung begonnen wird. Die Tumore werden transplantiert, sobald sie ein Volumen von 800 bis 1.000 mm^3 erreicht haben.

Transplantation fester Tumoren in Nacktmäuse

[0056] Spendermäuse werden anästhesiert (Forene®, Abbott, Schweiz) und durch Entfernung der Köpfe getötet. Die Haut wird desinfiziert und der Tumor durch Herausschneiden entfernt. Die äußeren Ecken der Tumormasse werden mit einem Skalpell entfernt, und die erhaltene Masse wird in Stücke von etwa 3 bis 4 mm Höhe aufgeteilt. Es werden Abschnitte von 3 bis 4 mm^2 ausgeschnitten und in steriles 0,9%iges W/V NaCl gegeben. Tumorstücke, die nekrotisch sind, werden nicht verwendet.

[0057] Tumorfragmente werden den Empfängermäusen subkutan in die linke Seite implantiert. Die Empfängermäuse werden anästhesiert (Forene®, Abbott, Schweiz), und die Haut des gesamten Rückens und der Seiten der Mäuse wird desinfiziert. Die Haut wird 0,5 bis 1 cm oberhalb des Schwanzes angehoben und mit einem einzelnen Schnitt von 1 bis 1,5 cm versehen. In eine 13 Gauge Trokarnadel werden Tumorsektionen gedrückt. Die Trokarnadel wird in die Öffnung der Haut gedrückt und unter der Haut bis zu einem Punkt hineingeschoben, der in der Mitte zwischen dem Kopf und dem Schwanz liegt. Das Tumorfragment wird deponiert, indem die Nadel weiter verschoben wird. Sodann wird die Wunde mit 1 oder 2 Metallklammern verschlossen.

[0058] Im Fall von Östrogen abhängigen Brusttumoren werden in den gegenüber liegenden Seiten den Mäusen subkutan Östrogenpellets angeordnet (17β-Östradiol, 5 mg/Pellet, wodurch sich eine verzögerte Freisetzung während 60 Tagen ergibt, erhalten von der Innovative Research of America, Sarasota, USA). Man lässt die Tumoren so lange wachsen, bis sie eine Größe von 100 bis 150 mm^3 erreicht haben, bevor mit einer Behandlung begonnen wird. Die Tumoren werden dann gemessen und in Gruppen (normalerweise n = 6 bis 8) angeordnet, die ausgewogen sind entsprechend der mittleren Größe und dem mittleren Ausmaß der Tumorvolumina. Gruppen werden statistisch Behandlungsgruppen zugeordnet

Herstellung und Anwendung von Versuchsverbindungen

[0059] Vorratslösungen von jeweils 40 mg/ml der jeweiligen Verbindung werden in 100% DMSO gelöst und so lange bei Raumtemperatur gerührt, bis klare Lösungen erhalten worden sind. Vor jeder Verabreichung wird die Vorratslösung mit 10% Tween 80 (Fluka, Buchs, Schweiz) versetzt und dann auf 1:20 (V/V) mit sterilem 0,9% W/V NaCl oder Wasser verdünnt. Lösungen und Verdünnungen werden täglich vor einer Anwendung zubereitet. Die Anwendungen erfolgen an 7 Tagen einer Woche (p.o., i.p., s.c. oder i.v.). Die Anwendungsvolumina betragen p.o. 25 ml/kg, i.p. 25 ml/kg, s.c. 10 ml/kg, i.v. 10 ml/kg.

Messung der Tumorvolumina

[0060] Das Tumorwachstum wird einmal, zweimal oder dreimal pro Woche (in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumorlinie) überwacht und 24 h nach der letzten Behandlung durch Bestimmung der senkrechten Durchmesser gemessen. Hierzu werden Lehren verwendet, durch welche sich die Abstände in mm bestimmen lassen. Die Berechnung der Tumorvolumina erfolgt nach der Formel $L \times D^2 \times \pi/6$. Die Antitumoraktivität wird ausgedrück als T/C % (mittlere Zunahme der Tumorvolumina der behandelten Tiere dividiert durch die mittlere Zunahme der Tumorvolumina der Kontrolltiere multipliziert mit 100). Eine Tumorregression (%) entspricht dem kleinsten mittleren Tumorvolumen im Vergleich zum mittleren Tumorvolumen zu Beginn der Behadlung. Die Deltawerte (Δ) der Tumorvolumina zeigen einen Vergleich der Veränderung des Tumorvolumens während der Versuchsdauer (Volumen am letzten Tag der Behandlung minus Volumen am ersten Tag

der Behandlung). Alle Tiere, bei denen die Tumore eine Größe von über etwa 1.500 bis 2.000 mm^3 erreichen, werden getötet.

Weitere Messungen

[0061] Die Körpergewichte und Überlebensdaten werden ebenfalls gesammelt. Die Deltawerte (Δ) der Körpergewichte werden berechnet als Anzeichen für eine Verträglichkeit der Behandlung (Gewicht am letzten Tag der Behandlung minus Gewicht am ersten Tag der Behandlung). Statistisch signifikante Abnahmen an Körpergewicht oder Mortalitäten werden als Indikatoren für eine schlechte Verträglichkeit der Behandlung betrachtet. Ferner werden die Mäuse ein- oder zweimal täglich bezüglich ihres allgemeinen Gesundheitszustands beurteilt.

Statistische Analysen

[0062] Die Grundannäherung für statistische Analysen ist die Verwendung von Versuchen für multiple Vergleiche, um die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen Behandlungsgruppen und Unterschieden innerhalb einer Gruppe zu beurteilen und so zu bestimmen, ob eine Behandlung eine stabile Erkrankung oder Tumonegressionen induziert. Subkutane Tumorvolumina sind aber nicht immer normal verteilt, sodass Unterschiede in den subkutanen Tumorvolumina zwischen Behandlungsgruppen bestimmt werden unter Anwendung des nicht parametrischen Einweg-ANOVA-Versuchs nach Kruskal-Wallis über aufgereihte Daten und der statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen gemäß der Bestimmung unter Anwendung des Dunnett Versuchs. Es werden paarweise Vergleiche zwischen allen Gruppen unter Anwendung der Methode von Student-Newman-Keuls (SNK) dwchgeführt. Werden lediglich zwei Gruppen miteinander verglichen, dann wird der Rank Summenversuch herangezogen. Die Körpergewichte der Tiere sind normalerweise verteilt, und Veränderungen in den Körpergewichten innerhalb einer Gruppe werden durch gepaarte t-Versuche analysiert, während Unterschiede zwischen den Gruppen durch einen Einweg-ANOVA-Versuch und paarweise Vergleiche unter Anwendung des Tukey Versuchs analysiert werden. Für alle Versuche wird der Signifikanzspiegel festgelegt auf $p < 0,05$.

[0063] Ein anderer in-vivo Versuch zur Bestimmung der antitumoralen Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen ist der im Folgenden beschriebene Hohlfaserversuch.

Hohlfaserversuch: Beurteilung der Antitumorwirkung in Nacktmäusen

[0064] Bei diesem Versuch werden vier unterschiedliche Tumoren, die in Hohlfasern eingekapselt sind, subkutan und/oder intraperitoneal in Nacktmäuse implantiert (athymische weibliche gekreuzte Nacktmäuse (Ncr nu/nu)). Tiere werden dann mit einer Versuchsverbindung behandelt, die in einem geeigneten Träger formuliert ist, deren Kontrolltiere nur mit dem Träger behandelt werden. Am Ende des Versuchs werden die Fasern rückgewonnen, wobei die Anzahl an lebenden Zellen unter Verwendung eines metabolischen Versuchs gemessen wird (MTT, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid). Die Aktivität der Versuchsverbindung wird gemessen durch Vergleich des Wachstums der Zellen bei den Versuchstieren (T) mit dem Wachstum der Zellen bei den Kontrolltieren, die mit dem Träger allein behandelt worden sind (C), wobei diese Aktivität ausgedrückt wird als %T/C.

Materialien

[0065] Humane Colonkarzinome SW 620 und LS 174T und Brustkarzinome MDA-MB-435S werden erhalten von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA). Das Colonkarzinom MIP 101, welches hohe Mengen an pgp-1 exprimiert, ist ursprünglich etabliert worden aus einem Patienten am Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA. Alle Zelllinien lässt man entsprechend standardisierter Gewebekulturtechniken in RPMI 1640 wachsen, welches die folgenden Zusätze enthält: 5% FBS (fetales Rinderserum), 5 mg/ml Insulin, 5 mg/ml Transferrin, 5 ng/ml selenige Säure, 1 nM β-Estradiol, 1 nM Testosteron.

Versuchsausführung

[0066] 4 humane feste Tumorzelllinien werden in Hohlfasern aus PVDF (Polyvinylidenfluorid) mit einem Innendurchmesser von 1 mm (Biopore, Spectrum Medical, CA, USA) eingekapselt. Nach der Einkapselung und vor der Implantation in die Tiere wird für eine Anhaftung von Zellen auf der Innenseite der Fasern durch Inkubation im Gewebekulturmedium während 24 h gesorgt. Hierauf implantiert man in ein Tier intraperitoneal oder subkutan jeweils vier Hohlfasern. Bei der vorliegenden Versuchsanordnung werden 4 bis 6 Tiere pro Gruppe

verwendet, wobei der Versuch aus einem Minimum von drei Gruppen besteht:

1. Gruppe zur Zeit 0
2. Kontrollgruppe (Placebo)
3. Behandelte Gruppe (Versuchsverbindung).

[0067] Die Behandlung beginnt 24 h nach Implantation der Fasern. Die Behandlung der Tiere erfolgt einmal täglich an den Tagen 1, 3 und 5. Gleichzeitig mit dem Beginn der Behandlung tötet man die Tiere der Gruppe mit der Zeit 0, gewinnt deren Fasern und bestimmt die Anzahl an lebenden Zellen zu Beginn des Versuchs (T_0). Am 7. Tag nach der Implantation tötet man alle Tiere, gewinnt die Fasern dieser Tiere und bestimmt die Anzahl der lebenden Zellen der Kontrollgruppe (C_v) und der behandelten Gruppe (T_v). Sodann wird der Aktivitätswert %T/C gemäß der folgenden Formel berechnet:

$$\%T/C = (T_v - T_0)/(C_v -)T_0 \times 100\%$$

Einkapselung von Tumorzellen in Hohlfasern

[0068] Fasern werden auf die gewünschte Länge geschnitten und während wenigstens 72 h in 70%igem Ethanol getränkt. Sodann werden die Fasern und Instrumente für die Einkapselung sterilisiert. Das humane feste Tumorzelllinienwachstum wird in Gewebekultur trypsinisiert, in einer kleinen Menge an Gewebekulturmedium suspendiert und mit einer Spritze in die Fasern übertragen. Die Fasern werden dann hitzeversiegelt und 24 h bei 37°C in einer 5% CO_2 enthaltenden Atmosphäre inkubiert. Hierauf werden die Fasern subkutan und/oder intraperitoneal in Nacktmäuse implantiert.

Bestimmung lebender Zellen in Hohlfasern

[0069] Man gibt 1 g MTT zu 200 ml PBS (mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung), worauf das Ganze 20 min gerührt und dann filtriert (0,22 µm Filter) wird. Hierauf vermischt man 10 ml dieser Lösung mit 40 ml RPMI 1640 mit Zusätzen unter Bildung der Arbeitslösung von MTT. Sodann werden die Fasern während 30 min bei 37°C in 5 ml RPMI 1640 unter Stabilisierung in 5% CO_2 inkubiert. Anschließend gibt man in jedes Loch der Probenplatte 0,5 ml MTT Arbeitslösung. Sodann werden die Platten während 4 h bei 37°C in 5% CO_2 inkubiert. Hierauf wird das MTT aus jedem Loch der Probenplatte aspiriert. Sodann wird jedes Loch der Probenplatte mit 2 ml einer 2,5%igen wässrigen Lösung von Protaminsulfat versetzt. Die Platten werden dann 24 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wird das Protaminsulfat aus jedem Loch in der Probenplatte aspiriert. Dann wird jedes Loch der Probenplatte mit 2 ml Protaminsulfat versetzt und das Ganze während weiterer 2 bis 4 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wird jede Faser in ein Loch einer Platte mit 24 Löchern übertragen. Die Fasern werden so geschnitten, dass sie am Boden der Löcher liegen, und über Nacht getrocknet. Hierauf wird jedes Loch mit 250 µl DMSO versetzt. Die Platten werden dann während 4 h auf einen Rotationsschüttler gegeben, wobei sie zum Schutz des MTT vor Licht mit einem Deckel versehen sind. Anschließend überträgt man 150 µl einer jeden Probe in das geeignete Loch einer Lochplatte mit 96 Löchern. Sodann werden die Platten bei 540 nm unter Verwendung von DMSO als Blindloch abgelesen.

[0070] Wie aus der Literatur bekannt, zeigen Arzneimittel auf Basis von Peptiden charaktertstischerweise eine schlechte orale Bioverfügbarkeit. Dies ist eines der Haupthindernisse für die Entwicklung wirksamer Arzneimittel in dieser Peptidstrukturklasse. Demgegenüber zeigen die erfindungsgemäßen Verbindungen nun nach oraler Verabreichung eine hervorragende Bioverfügbarkeit, was beispielsweise durch den folgenden Versuch gezeigt werden kann.

[0071] Zur peroralen Verabreichung wird eine Lösung der zu prüfenden Verbindung (25 mg/ml) in einem geeigneten Lösemittel, wie Cremophor RH40® / Maisine® / Propylenglycol / Ethanol (38/32/15/15) hergestellt. Man lässt weibliche Balb/c Mäuse vor dem Beginn während 24 h fasten und gibt den Mäusen während des gesamten Versuchs Wasser ad libitum. Zu verschiedenen Zeiten nach Verabreichung des Wirkstoffs werden Blutproben erhalten durch Opfern von Tieren unter Anästhesie durch Aufschneiden der Vena jugularis und anschließende Entfernung des Kopfes. Die Proben werden in heparinisierten Röhrchen (typischerweise 0,4 bis 0,6 ml) gesammelt. Die Probenanalyse erfolgt durch Festphasenextraktion und HPLC. Die Wirkstoflkonzentration in den Proben wird berechnet durch lineare Regressionsanalyse der kleinsten Quadrate des Peakflächenverhältnisses (Inhibitor/interner Standard) von gespikten Blutstandards gegen die Konzentration. Aus den Daten der Konzentration gegen die Zeit wird der AUC-Wert (Fläche unter der Kurve) nach der Trapezregel berechnet.

[0072] Bei diesem Versuch zeigen die Verbindungen der US 5 538 997 B1 AUC-Werte von etwa 25 µM × h

bis etwa 160 µm × h bei einer Dosis von 125 mg/kg.

[0073] Dieser Versuch belegt somit, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen als Pharmazeutika verwendet werden können.

[0074] Die Erfindung bezieht sich insbesondere auf die Verwendung erfindungsgemäßer Verbindungen, worin
A und B unabhängig für eine Bindung oder einen Aminoacylrest stehen, der unsubstituiert oder substituiert ist durch Alkyl oder Alkoxycarbonylalkyl,
R_1 für Wasserstoff, eine Aminoschutzgruppe oder eine Gruppe der Formel R_5Y- steht, worin R_5 für Wasserstoff oder eine unsubstituierte oder substituierte Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl-, Arylalkyl-, Heteroaryl-, Heteroarylalkyl-, Heterocyclyl- oder Heterocyclylalkylgruppe steht und Y für -CO- , -NH-CO- , -NH-CS- , -SO_2- , -O-CO- oder -O-CS- steht,
R_2 für die Seitenkette einer natürlichen Aminosäure, eine Alkyl-, Arylalkyl-, Heteroarylalkyl- oder Cycloalkylalkylgruppe oder für Trimethylsilylmethyl, 2-Thienylmethyl oder Styrylmethyl steht,
R_3 für Halogen, Alkyl, Alkoxy oder Hydroxyalkoxy steht und
R_4 für 2(R)-Hydroxyindan-1-(S)-yl, (S)-2-Hydroxy-1-phenylethyl oder 2-Hydroxybenzyl steht, das unsubstituiert oder in Stellung 4 substituiert ist durch Methoxy.

[0075] Besonders bevorzugt betrifft die Erfindung die Verwendung erfindungsgemäßer Verbindungen, worin
A und B unabhängig für eine Bindung oder einen Aminoacylrest stehen, der unsubstituiert oder substituiert ist durch Alkyl oder Alkoxycarbonylalkyl,
R_1 für Wasserstoff, eine Aminoschutzgruppe oder eine Gruppe der Formel R_5Y- steht, worin R_5 für Wasserstoff oder eine unsubstituierte oder substituierte Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl-, Arylalkyl-, Heteroaryl-, Heteroarylalkyl-, Heterocyclyl- oder Heterocyclylalkylgruppe steht und Y für -CO- , -NH-CO- , -NH-CS- , -SO_2- , -O-CO- oder -O-CS- steht,
R_2 für Arylalkyl steht,
R_3 für Halogen, Alkyl, Alkoxy oder Hydroxyalkoxy steht und
R_4 für 2-Hydroxybenzyl steht, das unsubstituiert oder in Stellung 4 substituiert ist durch Methoxy.

[0076] Weiter betrifft die Erfindung vorzugsweise die Verwendung einer erfindungsgemäßen Verbindung, worin
A und B unabhängig für einen Aminoacylrest stehen, der unsubstituiert oder substituiert ist durch C_1-C_4-Alkyl oder C_1-C_4-Alkoxycarbonyl-C_1-C_4-alkyl,
R_1 für Wasserstoff oder eine Gruppe der Formel R_5Y- steht, worin R_5 für Wasserstoff, C_1-C_4-Alkyl, das unsubstituiert oder substituiert ist durch Phenoxy, Hydroxy oder Amino, für C_2-C_4-Alkenyl, C_2-C_4-Alkinyl, C_6-C_{10}-Aryl, C_7-C_{12}-Arylalkyl, das unsubstituiert oder substituiert ist durch Hydroxy, C_1-C_4-Alkyl, Amino oder C_1-C_4-Alkylamino, oder für Pyridyl- C_1-C_4-alkyl steht und Y für -O-CO- oder -CO- steht,
R_2 für C_7-C_{12}-Arylalkyl steht,
R_3 für Halogen, C_1-C_4-Alkyl, C_1-C_4-Alkoxy oder Hydroxy- C_1-C_4-alkoxy steht und
R_4 für 2-Hydroxybenzyl steht, das unsubstituiert oder in Stellung 4 substituiert ist durch Methoxy

[0077] Stärker bevorzugt betrifft die Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Verbindung, worin
A und B unabhängig für einen Aminoacylrest stehen, der unsubstituiert oder substituiert ist durch C_1-C_4-Alkyl oder C_1-C_4-Alkoxycarbonyl-C_1-C_4-alkyl,
R_1 für Wasserstoff oder eine Gruppe der Formel R_5Y- steht, worin R_5 für Wasserstoff, C_1-C_4-Alkyl, das unsubstituiert oder substituiert ist durch Phenoxy, Hydroxy oder Amino, für C_2-C_4-Alkenyl, C_2-C_4-Alkinyl, C_6-C_{10}-Aryl, C_7-C_{12}-Arylalkyl, das unsubstituiert oder substituiert ist durch Hydroxy, C_1-C_4-Alkyl, Amino oder C_1-C_4-Alkylamino, oder für Pyridyl- C_1-C_4-alkyl steht und Y für -O-CO- oder -CO- steht,
R_2 für C_7-C_{12}-Arylalkyl steht,
R_3 für C_1-C_4-Alkoxy steht und
R_4 für 2-Hydroxybenzyl steht, das in Stellung 4 substituiert ist durch Methoxy.

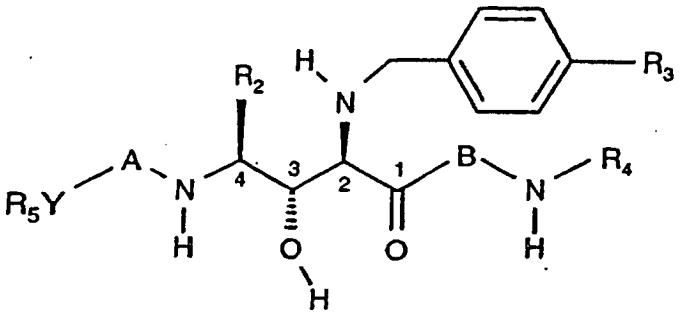
[0078] Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Warmblüter ein Mensch.

[0079] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung hemmt die therapeutisch wirksame Dosis eine Zellproliferation im Tumor.

[0080] Eine bevorzugte Untergruppe der erfindungsgemäßen Verbindungen sind die Verbindungen der Formel I gemäß obiger Definition, worin

R_4 für 2-Hydroxybenzyl oder vorzugsweise für 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl steht.

[0081] Die Erfindung bezieht sich insbesondere auf erfindungsgemäße Verbindungen der Formel I*



I*

worin
A und B unabhängig für eine Bindung oder einen unsubstituierten oder substituierten Aminoacylrest stehen,
R_2 für Arylalkyl steht,
R_3 für Halogen, Alkyl, Alkoxy oder Hydroxyalkoxy steht,
R_4 für 2-Hydroxybenzyl steht, das unsubstituiert oder in Stellung 4 substituiert ist durch Methoxy und
R_5 für Arylalkyl steht und
Y für -CO- steht, oder
R_5 für Alkyl steht, das substituiert ist durch Cycloalkyl, Naphthyl, Pyridyl oder Phenyl, worin Phenyl substituiert ist durch Alkyl oder Amino, und
Y für -O-CO- steht.

[0082] Bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der Formel I* sind diejenigen, worin
A und B unabhängig für L-tert-Leucin, L-Valin, L-Glutaminsäuremethylester oder Glycin stehen,
R_2 für Arylalkyl steht,
R_3 für Alkoxy steht,
R_4 für 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl steht und
R_5 für Arylalkyl steht und
Y für -CO- steht, oder
R_5 für Alkyl steht, das substituiert ist durch Cycloalkyl, Naphthyl, Pyridyl oder Phenyl, worin Phenyl substituiert ist durch Alkyl oder Amino, und
Y für -O-CO- steht.

[0083] Am meisten bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der Formel I* sind diejenigen, worin
A und B unabhängig für L-tert-Leucin, L-Valin, L-Glutaminsäuremethylester oder Glycin stehen,
R_2 für C_7-C_{12}-Arylalkyl steht,
R_3 für C_1-C_4-Alkoxy steht,
R_4 für 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl steht und
R_5 für C_7-C_{12}-Arylalkyl und
Y für -CO- steht, oder
R_5 für C_1-C_4-Alkyl steht, das substituiert ist durch C_5-C_7-Cycloalkyl, Naphthyl, Pyridyl oder Phenyl, worin Phenyl substituiert ist durch C_1-C_4-Alkyl oder Amino, und
Y für -O-CO- steht.

[0084] Eine andere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung einer der folgenden Verbindungen oder eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes einer dieser Verbindungen:
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxybenzylamino)-propylcarbamoyl]-2-methyl-propyl}-carbaminsäurebenzylester,
N-{4(S)-[(N-Benzyloxycarbonyl-tert-leucinoyl)amino]-3-(S)-hydroxy-2(R)-(4-methoxybenzylamino)-5-phenyl}pentanoyl-L-valin-N-[(2-hydroxy-4-methoxy)benzyl]amid oder
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxybenzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäure-tert-butylester.

[0085] Ferner bezieht sich die Erfindung auf eine Verbindung, die aus der Gruppe von Verbindungen ausgewählt ist, welche besteht aus
4-[4-(2-Benzyloxycarbonylamino-3-methyl-butyrylamino)-3-hydroxy-2-(4-methoxy-benzylamino)-5-phenylpentanoylamino]-4-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-buttersäuremethylester,

{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-metho xybenzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurenaphthalin-1-ylmethylester,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-metho xybenzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurenaphthalin-2-ylmethylester,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-metho xybenzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurepyridin-4-ylmethylester,
{[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy benzylamino)-propylcarbamoyl]-methyl}-carbaminsäurebenzylester, oder
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2,2-dimethyl-propylcarbamoyl]-3-(4-me thoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurebenzylester,
4-[3,3-Dimethyl-2-(2-naphthalin-1-ylacetylamino)-butyrylamino]-3-hydroxy-2-(4-methoxy-benzylamino)-5-phe nylpentansäure-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propyl]-amid,
{1-[
1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxyb enzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäure-3-methylbenzylester,
4-{2-[3-(3-Amino-phenyl)-propionylamino]-3,3-dimethyl-butyrylamino}-3-hydroxy-2-(4-methoxy-benzylamino)-5-phenyl-pentansäure-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propyl]-amid,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-metho xybenzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäure-3-aminobenzylester,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-metho xybenzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäure-3,5-dimethylbenzylester, oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz einer dieser Verbindungen.

[0086] Bei einer bevorzugteren Ausführungsform der Erfindung bezieht sich die Erfindung auf 4-[4-(2-Benzyloxycarbonylamino-3-methyl-butyrylamino)-3-hydroxy-2-(4-methoxy-benzylamino)-5-phenylpent anoylamino]-4-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-buttersäuremethylester oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz dieser Verbindung.

[0087] Weiter betrifft die Erfindung insbesondere eine Verbindung, die aus der Gruppe von Verbindungen ausgewählt ist, welche besteht aus
4-[4-(2-Benzyloxycarbonylamino-3-methyl-butyrylamino)-3-hydroxy-2-(4-methoxy-benzylamino)-5-phenylpent anoylamino]-4-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-buttersäuremethylester,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-metho xybenzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurenaphthalin-1-ylmethylester,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-metho xybenzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurenaphthalin-2-ylmethylester,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-metho xybenzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurepyridin-4-ylmethylester,
{[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy benzylamino)-propylcarbamoyl]-methyl}-carbaminsäurebenzylester,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2,2-dimethyl-propylcarbamoyl]-3-(4-me thoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurebenzylester, und
{1-[(1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-metho xybenzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurecyclohexylmethylester,
oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz einer solchen Verbindung zur Verwendung bei einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

[0088] Weiter betrifft die Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Verbindung zur Behandlung einer proliferativen Erkrankung. Ebenfalls bezieht sich die Erfindung auf die Verwendung einer erfindungsgemäßen Verbindung zur Hemmung des multikatalytischen Proteasomkomplexes bei Warmblütern, insbesondere bei Menschen.

[0089] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können mit herkömmlichen chemotherapeutisch annehmbaren Verdünnungsmitteln und Trägern vermischt und beispielsweise parenteral oder intravenös, vorzugsweise oral, in Formen, wie Lösungen, Tabletten oder Kapseln, verabreicht werden. Die Konzentrationen der Wirksubstanz können natürlich schwanken in Abhängigkeit von beispielsweise der jeweils verwendeten erfindungsgemäßen Verbindung, der gewünschten Behandlung und der Art der Form.

[0090] Solche Zusammensetzungen sind ebenfalls Teil der Erfindung. Die Erfindung bezieht sich daher auch auf eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine erfindungsgemäße Verbindung der Formel I* zusam-

men mit einem pharmazeutischen Träger enthält, insbesondere zur Behandlung einer proliferativen Erkrankung.

[0091] Stabile Zusammensetzungen für eine orale Verabreichung, die eine höhere Absorptionseffizienz und Wirkstoffbeladung bietet, können erhalten werden durch Formulierung eines erfindungsgemäßen Mittels mit einem Trägermedium, das eine hydrophile Phase, eine lipophile Phase und ein Tensid enthält. Vorzugsweise hat die Zusammensetzung die Form eines Mikroemulsionsvorkonzentrats oder Emulsionsvorkonzentrats, insbesondere der Art, welche für O/W (Öl-in-Wasser) Mikroemulsionen oder Emulsionen sorgt. Die Zusammensetzung kann jedoch auch in Form einer Mikroemulsion oder einer Emulsion vorliegen, welche zusätzlich eine wässrige Phase, vorzugsweise Wasser, enthält. Ein Mikroemulsionsvorkonzentrat ist eine Formulierung, die in einem wässrigen Medium, beispielsweise Wasser, oder in Magensäften, nach oraler Anwendung spontan eine Mikroemulsion bildet. Eine Mikroemulsion ist eine nicht opake oder im Wesentlichen nicht opake kolloidale Dispersion, die spontan oder im Wesentlichen spontan gebildet wird, sobald ihre Komponenten miteinander in Kontakt gebracht werden. Eine Mikroemulsion ist thermodynamisch stabil.

[0092] Ein Emulsionsvorkonzentrat ist eine Formulierung, die in einem wässrigen Medium, beispielsweise in Wasser, oder in den Magensäften, nach oraler Verabreichung spontan eine Emulsion bildet. Die gebildete Emulsion ist opak und thermodynamisch stabil.

[0093] Die lipophile Phase kann 10 bis 85 Gew.-% des Trägermediums ausmachen, das Tensid kann 5 bis 80 Gew.-% des Trägermediums betragen, die hydrophile Phase kann 10 bis 50 Gew.-% des Trägermediums umfassen.

[0094] Die erfindungsgemäße Verbindung ist vorzugsweise in einer Menge von etwa 1 bis 15 Gew.-% der Zusammensetzung, bevorzugter in einer Menge von etwa 2 bis 8 Gew.-%, vorhanden.

[0095] Die hydrophile Phase kann ausgewählt werden aus beispielsweise Transcutol® (C_2H_5-[O-$(CH_2)_2$]$_2$-OH), Glycofurol®,das auch als Tetrahydrofurfurylalkoholpolyethylenglycolether bekannt ist, und 1,2-Propylenglycol oder Gemischen hiervon, und ist vorzugsweise 1,2-Propylenglycol. Sie kann auch hydrophile Cokomponenten einschließen, beispielsweise C_1-C_5-Alkanole.

[0096] Bevorzugte Komponenten für die lipophile Phase sind mittelkettige Fettsäuretriglyceride, gemischte Mono-, Di- und Triglyceride und veresterte ethoxylierte Pflanzenöle. Geeignete mittelkettige Fettsäuretriglyceride sind solche, wie sie bekannt und im Handel erhältlich sind unter den Bezeichnungen Miglyol®, Captex®, Captex®, Neobee® und Mazol®, wobei Miglyol 812® am meisten bevorzugt ist. Die gemischten Mono-, Di- und Triglyceride umfassen vorzugsweise Gemische von C_{12}-C_{20}-Fettsäuremono-, -di- und -triglyceriden. Die Fettsäurekomponente der gemischten Mono-, Di- und Triglyceride können sowohl gesättigte als auch ungesättigte Fettsäurereste enthalten. Die umgeesterten ethoxylierten Pflanzenöle umfassen Umesterungsprodukte von beispielsweise Mandelöl, Palmöl oder vorzugsweise Maisöl, Sonnenblumenöl oder Safloröl und insbesondere Maisöl, mit Glycerin. Zusätzlich zu ihren Mono-, Di- und Triglycertdkomponenten können die Umesterungsprodukte allgemein auch geringere Mengen an freiem Glycerin enthalten. Vorzugsweise wird etwas Glycerin zuerst unter Bildung eines im Wesentlichen an Glycerin freien Produkts entfernt, wenn Weichgelatinekapseln hergestellt werden sollen.

[0097] Die Umesterungsprodukte aus Maisöl und Glycerin ergeben besonders geeignete gemischte Mono-, Di- und Triglyceride. Ein Beispiel für ein geeignetes gemischtes Glyceridprodukt ist das Umesterungsprodukt, das im Handel unter der Bezeichnung Maisine® verfügbar ist (erhältlich von Etablissements Gattefossé, F 69804 Saint-Priest, Cedex, Frankreich). Der Fettsäuregehalt von Maisine® beträgt typischerweise etwa 11 % Palmitinsäure, etwa 2,5% Stearinsäure, etwa 29% Ölsäure, etwa 56% Linolensäure und 1,5% sonstige Säuren.

[0098] Soll das erfindungsgemäße Mittel in Form einer Mikroemulsion oder Emulsion verabreicht werden, dann sind die gemischten Mono-, Di- und Triglyceride vorzugsweise klar und bleiben auch klar, während mehr als 20 Tagen bei einer Lagerung bei Temperaturen von 20°C bis 25°C. Auch eine Probe von genschten Mono-, Di- und Triglyceriden, die zuerst bei etwa zwischen 2°C und 8°C während 24 h im Kühlschrank und dann bei etwa Raumtemperatur während 1 h gehalten wurde, sollte klar sein. Ferner haben die Mono-, Di- und Triglyceride vorzugsweise auch einen niedrigen Gehalt an gesättigten Fettsäuren. Gemischte Mono-, Di- und Triglyceride, die diese Erfordernisse erfüllen, lassen sich gewinnen aus im Handel erhältlichen Produkten durch in der Technik bekannte Trenntechniken zur Entfernung der gesättigten Fettsäurekomponenten und Verbesserung des Gehalts an ungesättigter Fettsäurekomponente. Typischerweise beträgt die gesamte gesättigte Fett-

säurekomponente weniger als 15 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht der lipophilen Phase. Ein hierfür geeignetes Verfahren wird beispielsweise in WO 93 09 211 A1 beschrieben.

[0099] Die lipophile Phase kann alternativ geeignete umgeesterte ethoxylierte Pflanzenöle enthalten, wie sie beispielsweise erhalten werden durch Umsetzung verschiedener natürlicher Pflanzenöle mit Polyethylenglycolen, welche ein mittleres Molekulargewicht von 200 bis 800 haben, in Gegenwart eines geeigneten Katalysators. Die hierzu geeigneten Verfahren sind bekannt, und ein Beispiel hierfür wird in US 3 288 824 A beschrieben. Umgeestertes ethoxyliertes Maisöl ist besonders bevorzugt. Ein bevorzugtes umgeestertes ethoxyliertes Pflanzenöl ist Labrafil M 2125 CS®.

[0100] Beispiele für geeignete Tenside sind:

i) Reaktionsprodukte aus einem natürlichen oder hydrierten Ricinusöl und Ethylenoxid. Die Öle, welche unter der Bezeichnung Cremophor® erhältlich sind, sind speziell geeignet. Besonders geeignet sind Cremophor RH40® und Cremophor RH60®. Weiter geeignet sind auch Polyethylenglycolricinusöle, wie sie unter der Bezeichnung Cremophor EL® erhältlich sind. Ähnliche oder identische Produkte, die ebenfalls verwendet werden können, sind unter den Bezeichnungen Nikkol®, Mapeg®, Incrocas® und Tagat® erhältlich.

ii) Polyethylensorbitanfettsäureester, beispielsweise Ester, wie sie bekannt und im Handel unter der Bezeichnung Tween® erhältlich sind.

iii) Polyethylenfettsäureester, beispielsweise Polyoxyethylenfettsäureester, beispielsweise Polyoxyethylenstearinsäureester, wie sie bekannt und im Handel unter der Bezeichnung Myrj® erhältlich sind.

iv) Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Copolymere und -Blockcopolymere, wie sie beispielsweise bekannt und im Handel unter den Bezeichnungen Pluronic®, Emkalyx® und Poloxamer® erhältlich sind, wobei Pluronic F68® und Poloxamer 188® besonders bevorzugt sind.

v) Dioctylsulfosuccinat oder Di-[2-ethylhexyl]-succinat

vi) Phospholipide, insbesondere Lecithine.

vii) Propylenglycolmono- und -difettsäureester.

[0101] Das ausgewählte Tensid hat vorzugsweise einen HLB Wert (hydrophiles/lipophiles Gleichgewicht) von wenigstens etwa 10.

[0102] Vollständige physikalische Charakteristiken der hierin durch die Warenbezeichnungen beschriebenen Produkte sind beispielsweise erhältlich aus H P Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und Angrenzende Gebiete, Editio Cantor, D 88326 Aulendorf Deutschland, 3. überarbeitete und erweiterte Auflage (1989). Das relative Verhältnis aus den Komponenten der hydrophilen Phase, der lipophilen Phase und dem Tensid liegt vorzugsweise innerhalb des Bereichs einer Mikroemulsion auf einer standardisierten Dreiwegauftragung. Die so erhaltenen Zusammensetzungen sind Mikroemulsionsvorkonzentrate mit hoher Stabilität.

[0103] Wahlweise können die Komponenten auch so ausgewählt werden, dass sich ein Emulsionsvorkonzentrat ergibt. Die Emulsionsvorkonzentratzusammensetzungen zeigen ebenfalls gute Stabilitätscharakteristiken.

[0104] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können auch weitere Additive oder Ingredienzien enthalten, wie beispielsweise Antioxidantien. Sie verfügen insbesondere über vorteilhafte Eigenschaften bei einer oralen Verabreichung, beispielsweise was ihre Konsistenz und ihr hohes Ausmaß an Bioverfügbarkeit betrifft, wie sich in standardisierten Bioverfügbarkeitsversuchen zeigen lässt. Ferner werden auch pharmakokinetische Parameter, wie die Absorptions- und Blutspiegel, überraschenderweise besser vorhersagbar, wobei sich zudem Probleme bei der Verabreichung mit erratischer Absorption eliminieren oder abschwächen lassen. Ferner ist die pharmazeutische Zusammenensetzung wirksam mit Tensidmaterialien, beispielsweise Gallensalzen, wie sie im Gastrointestinaltrakt vorhanden sind.

[0105] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen für eine orale Anwendung sind vorzugsweise zu einer Einheitsdosierungsform kompoundiert, was beispielsweise durch Abfüllung in oral verabreichbare Kapselschalen erreicht werden kann. Die Kapselschalen können Schalen von Weich- oder Hartgelatinekapseln sein. Gewünschtenfalls können die pharmazeutischen Zusammensetzungen aber auch in Form einer Trinklösung vorliegen und Wasser oder irgendein anderes wässriges System enthalten, so dass sich Emulsionssysteme oder Mikroemulsionssysteme ergeben, die zum Trinken geeignet sind.

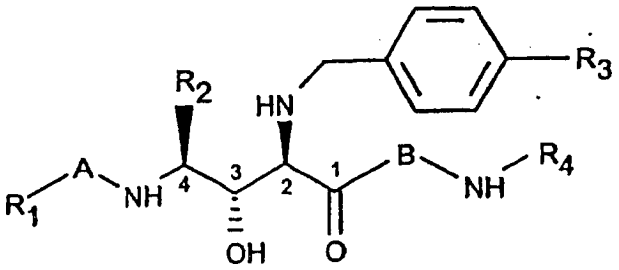
[0106] Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden in Dosierungen gut vertragen, wie sie für die erfindungsgemäßen Verwendungen und Verfahren erforderlich sind. In Abhängigkeit von der An, dem Alter, dem jeweiligen Zustand, der Verabreichungsart und dem besonderen klinischen Bild werden die erfindungsgemäßen Verbindungen beispielsweise in Tagesdosen von etwa 0,05 bis etwa 10 g, vorzugsweise etwa 0,1 bis etwa

5 g, beispielsweise etwa 0,15 bis 1,5 g, an einen Warmblüter mit einem Körpergewicht von etwa 70 kg verabreicht.

[0107] Die vorliegende Erfindung bezieht sich insbesondere auf die Verwendung von erfindungsgemäßen Verbindungen und insbesondere von Verbindungen der Formel I* bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung einer proliferativen Erkrankung, beispielsweise eines festen Tumors, und auf die Verwendung solcher Verbindungen zur Behandlung einer derartigen proliferativen Erkrankung.

Patentansprüche

1. Verwendung einer 2,4-Diamino-3-hydroxycarbonsäure der Formel I



worin
A und B unabhängig für eine Bindung oder einen unsubstituierten oder substituierten Aminoacylrest stehen,
R_1 für Wasserstoff, eine Aminoschutzgruppe oder eine Gruppe der Formel R_5Y- steht, worin R_5 für Wasserstoff oder eine unsubstituierte oder substituierte Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl-, Arylalkyl-, Heteroaryl-, Heteroarylalkyl-, Heterocyclyl- oder Heterocyclylalkylgruppe steht und Y für -CO- , -NH-CO- , -NH-CS- , $-SO_2$- , -O-CO- oder -O-CS- steht,
R_2 für die Seitenkette einer natürlichen Aminosäure, eine Alkyl-, Arylalkyl-, Heteroarylalkyl- oder Cycloalkylalkylgruppe oder für Trimethylsilylmethyl, 2-Thienylmethyl oder Styrylmethyl steht,
R_3 für Halogen, Alkyl, Alkoxy oder Hydroxyalkoxy steht und
R_4 für 2(R)-Hydroxyindan-1-(S)-yl , (S)-2-Hydroxy-1-phenylethyl oder 2-Hydroxybenzyl steht, das unsubstituiert oder in Stellung 4 substituiert ist durch Methoxy,
in freier Form oder in Form eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes oder Komplexes bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung einer proliferativen Erkrankung als Reaktion auf eine Hemmung des multikatalytischen Proteasomkomplexes.

2. Verwendung einer 2,4-diamino-3-hydroxycarbonsäure der Formel I nach Anspruch 1, worin
A und B unabhängig für eine Bindung oder einen Aminoacylrest stehen, der unsubstituiert oder substituiert ist durch Alkyl oder Alkoxycarbonylalkyl,
R_1 für Wasserstoff, eine Aminoschutzgruppe oder eine Gruppe der Formel R_5Y- steht, worin R_5 für Wasserstoff oder eine unsubstituierte oder substituierte Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl-, Arylalkyl-, Heteroaryl-, Heteroarylalkyl-, Heterocyclyl- oder Heterocyclylalkylgruppe steht und Y für -CO- , -NH-CO- , -NH-CS- , $-SO_2$- , -O-CO- oder -O-CS- steht,
R_2 für die Seitenkette einer natürlichen Aminosäure, eine Alkyl-, Arylalkyl-, Heteroarylalkyl- oder Cycloalkylalkylgruppe oder für Trimethylsilylmethyl, 2-Thienylmethyl oder Styrylmethyl steht,
R_3 für Halogen, Alkyl, Alkoxy oder Hydroxyalkoxy steht und
R_4 für 2(R)-Hydroxyindan-1-(S)-yl , (S)-2-Hydroxy-1-phenylethyl oder 2-Hydroxybenzyl steht, das unsubstituiert oder in Stellung 4 substituiert ist durch Methoxy.

3. Verwendung einer 2,4-Diamino-3-hydroxycarbonsäure der Formel I nach Anspruch 1, worin
A und B unabhängig für eine Bindung oder einen Aminoacylrest stehen, der unsubstituiert oder substituiert ist durch Alkyl oder Alkoxycarbonylalkyl,
R_1 für Wasserstoff, eine Aminoschutzgruppe oder eine Gruppe der Formel R_5Y- steht, worin R_5 für Wasserstoff oder eine unsubstituierte oder substituierte Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl-, Arylalkyl-, Heteroaryl-, Heteroarylalkyl-, Heterocyclyl- oder Heterocyclylalkylgruppe steht und Y für -CO- , -NH-CO- , -NH-CS- , $-SO_2$- , -O-CO- oder -O-CS- steht,
R_2 für Arylalkyl steht,
R_3 für Halogen, Alkyl, Alkoxy oder Hydroxyalkoxy steht und
R_4 für 2-Hydroxybenzyl steht, das unsubstituiert oder in Stellung 4 substituiert ist durch Methoxy.

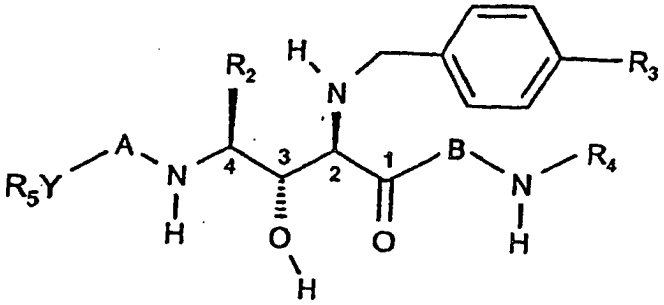
4. Verwendung einer 2,4-Diamino-3-hydroxycarbonsäure der Formel I nach Anspruch 1, worin

A und B unabhängig für einen Aminoacylrest stehen, der unsubstituiert oder substituiert ist durch C_1-C_4-Alkyl oder C_1-C_4-Alkoxycarbonyl-C_1-C_4-alkyl,
R_1 für Wasserstoff oder eine Gruppe der Formel R_5Y- steht, worin R_5 für Wasserstoff, C_1-C_4-Alkyl, das unsubstituiert oder substituiert ist durch Phenoxy, Hydroxy oder Amino, für C_2-C_4-Alkenyl, C_2-C_4-Alkinyl, C_6-C_{10}-Aryl, C_7-C_{12}-Arylalkyl, das unsubstituiert oder substituiert ist durch Hydroxy, C_1-C_4-Alkyl, Amino oder C_1-C_4 Alkylamino, oder für Pyridyl- C_1-C_4-alkyl steht und Y für -O-CO- oder -CO- steht,
R_2 für C_7-C_{124}-Arylalkyl steht,
R_3 für Halogen, C_1-C_4-Alkyl, C_1-C_4-Alkoxy oder Hydroxy- C_1-C_4-alkoxy steht und
R_4 für 2-Hydroxybenzyl steht, das unsubstituiert oder in Stellung 4 substituiert ist durch Methoxy.

5. Verwendung einer 2,4-Diamino-3-hydroxycarbonsäure der Formel I nach Anspruch 1 worin
A und B unabhängig für einen Aminoacylrest stehen, der unsubstituiert oder substituiert ist durch C_1-C_4-Alkyl oder C_1-C_4-Alkoxycarbonyl-C_1-C_4-alkyl,
R_1 für Wasserstoff oder eine Gruppe der Formel R_5Y- steht, worin R_5 für Wasserstoff, C_1-C_4-Alkyl, das unsubstituiert oder substituiert ist durch Phenoxy, Hydroxy oder Amino, für C_2-C_4-Alkenyl, C_2-C_4-Alkinyl, C_6-C_{10}-Aryl, C_7-C_{12}-Arylalkyl, das unsubstituiert oder substituiert ist durch Hydroxy, C_1-C_4-Alkyl, Amino oder C_1-C_4-Alkylamino, oder für Pyridyl- C_1-C_4-alkyl steht und Y für -O-CO- oder -CO- steht,
R_2 für C_7-C_{12}-Arylalkyl steht,
R_3 für C_1-C_4-Alkoxy steht und
R_4 für 2-Hydroxybenzyl steht, das in Stellung 4 substituiert ist durch Methoxy.

6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die proliferative Erkrankung eine Tumorerkrankung ist.

7. Verbindung der Formel I*



worin
A und B unabhängig für eine Bindung oder einen unsubstituierten oder substituierten Aminoacylrest stehen,
R_2 für Arylalkyl steht,
R_3 für Halogen, Alkyl, Alkoxy oder Hydroxyalkoxy steht,
R_4 für 2-Hydroxybenzyl steht, das unsubstituiert oder in Stellung 4 substituiert ist durch Methoxy und
R_5 für Arylalkyl steht und
Y für -CO- steht, oder
R_5 für Alkyl steht, das substituiert ist durch Cycloalkyl, Naphthyl, Pyridyl oder Phenyl, worin Phenyl substituiert ist durch Alkyl oder Amino, und
Y für -O-CO- steht, oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz hiervon.

8. Verbindung der Formel I* nach Anspruch 7, worin
A und B unabhängig für L-tert-Leucin, L-Valin, L-Glutaminsäuremethylester oder Glycin stehen,
R_2 für Arylalkyl steht,
R_3 für Alkoxy steht,
R_4 für 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl steht und
R_5 für Arylalkyl steht und
Y für -CO- steht, oder
R_5 für Alkyl steht, das substituiert ist durch Cycloalkyl, Naphtyl, Pyridyl oder Phenyl, worin Phenyl substituiert ist durch Alkyl oder Amino, und
Y für -O-CO- steht, oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz hiervon.

9. Verbindung der Formel I* nach Anspruch 7, worin
A und B unabhängig für L-tert-Leucin, L-Valin, L-Glutaminsäuremethylester oder Glycin stehen,

R_2 für C_7-C_{12}-Arylalkyl steht,
R_3 für C_1-C_4-Alkoxy steht,
R_4 für 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl steht und
R_5 für C_7-C_{12}-Arylalkyl und
Y für -CO- steht, oder
R_5 für C_1-C_4-Alkyl steht, das substituiert ist durch C_5-C_7-Cycloalkyl, Naphthyl, Pyridyl oder Phenyl, worin Phenyl substituiert ist durch C_1-C_4-Alkyl oder Amino, und
Y für -O-CO- steht,
oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz hiervon.

10. Verbindung der Formel I* nach Anspruch 7, ausgewählt aus der Gruppe von Verbindungen, die besteht aus
4-[4-(2-Benzyloxycarbonylamino-3-methyl-butyrylamino)-3-hydroxy-2-(4-methoxy-benzylamino)-5-phenylpentanoylamino]-4-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-buttersäuremethylester,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurenaphthalin-1-ylmethylester,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurenaphthalin-2-ylmethylester,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurepyridin-4-ylmethylester,
{[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxybenzylamino)-propylcarbamoyl]-methyl}-carbaminsäurebenzylester,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2,2-dimethyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurebenzylester,
und die pharmazeutisch annehmbaren Salze dieser Verbindungen.

11. Verbindung der Formel I* nach Anspruch 7, nämlich
4-[4-(2-Benzyloxycarbonylamino-3-methyl-butyrylamino)-3-hydroxy-2-(4-methoxy-benzylamino)-5-phenylpentanoylamino]-4-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-buttersäuremethylester
oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz dieser Verbindung.

12. Verbindung der Formel I* nach Anspruch 7, die ausgewählt ist aus der Gruppe von Verbindungen, die besteht aus
4-[3,3-Dimethyl-2-(2-naphthalin-1-ylacetylamino)-butyrylamino]-3-hydroxy-2-(4-methoxy-benzylamino)-5-phenyl-pentansäure[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propyl]-amid,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäure-3-methylbenzylester,
4-
{2-[3-(3-Amino-phenyl)-propionylamino]-3,3-dimethyl-butyrylamino}-3-hydroxy-2-(4-methoxybenzylamino)-5-phenyl-pentansäure-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propyl]-amid,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-diemethyl-propyl}-carbaminsäure-3-aminobenzylester,
{1-[1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäure-3,5-dimethylbenzylester,
{1-[(1-Benzyl-2-hydroxy-3-[1-(2-hydroxy-4-methoxy-benzylcarbamoyl)-2-methyl-propylcarbamoyl]-3-(4-methoxy-benzylamino)-propylcarbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl}-carbaminsäurecyclohexylmethylester,
und die pharmazeutisch annehmbaren Salze dieser Verbindungen.

13. Verbindung der Formel I* nach Anspruch 7 oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz einer solchen Verbindung zur Verwendung als Arzneimittel.

14. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend eine Verbindung der Formel I* nach Anspruch 7 oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz einer solchen Verbindung zusammen mit einem pharmazeutischen Träger.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen