



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 294 707 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 07 C 229/06
A 61 K 31/22

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

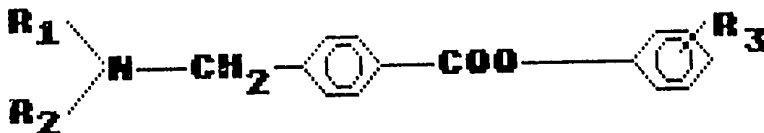
(21)	DD C 07 C / 341 131 6	(22)	30.05.90	(44)	10.10.91
(71)	VEB Berlin-Chemie, Glienicker Weg 125, O - 1199 Berlin, DE				
(72)	Wischnewski, Gerd, Dipl.-Chem.; Hesse, Kristin, Dr. rer. nat.; Lorch, Bernd, Dipl.-Chem.; Grupe, Renato, Prof. Dr. sc. nat.; Ziska, Thomas, Dipl.-Biochem.; Weiher, Bettina, Dipl.-Chem.; Göres, Erhard, Prof. Dr. med. habil.; Koßowicz, Joachim, Dipl.-Chem., DE				
(73)	VEB Berlin-Chemie, O - 1199 Berlin; Institut für pharmakologische Forschung, O - 1136 Berlin, DE				
(54)	Neue biologisch aktive ω -(Alkyl)-p-amino-methylbenzoesäure-phenylester				

(55) neue Pharmazeutika; Aminomethylbenzoesäureester; pharmakologische Wirkung; Herstellungsmöglichkeiten; Antiphlogistika; Analgetika; Antihistaminika; antitumoröse Wirkstoffe; Lipoxigenasehemmer; Antiallergika

(57) Die Erfindung betrifft neue Substanzen aus der Reihe der ω -Aminomethylbenzoesäureester (siehe Formel I), bei denen unerwartete biologische Wirkungen festgestellt wurden; die Substanzen sind in Modellversuchen wirksam gegen Entzündungen, Schmerzen und einem Tumormodell. Sie heben die Wirkung von Histamin auf und hemmen die Lipoxigenase, wobei bedeuten:

$R_1, R_2 = H$, Niedrigalkyl-, Aralkyl-; $R_3 =$ Alkyl- (C_1 bis C_7 ; geradkettig und verzweigt) sowie deren Salze mit R_4X wobei:

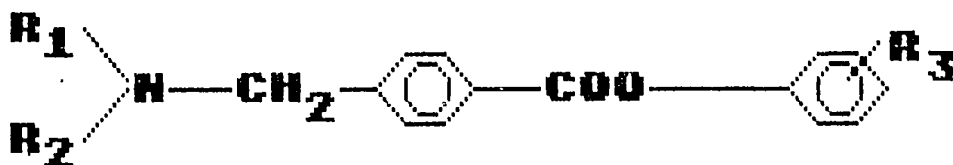
$R_4 = H$, Alkyl-, Aryl-, Aralkyl-; X = Halogen, Toluolsulfonyl- bedeuten. Formel I



Formel I

Patentanspruch:

1. Neue ω -(Alkyl)-p-aminomethylbenzoesäure-phenylester nach der allgemeinen Formel I,



wobei bedeuten:

$R_1, R_2 = H, \text{Niedrigalkyl-, Aralkyl-;}$

$R_3 = \text{Alkyl- (C}_1 \text{ bis C}_7 \text{; geradkettig und verzweigt)}$

sowie deren Salze mit R_4X , wobei:

$R_4 = H, \text{Alkyl-, Aryl-, Aralkyl-;}$

$X = \text{Halogen, Toluolsulfonyl-}$.

2. Mittel gegen Entzündungen, Schmerzen, Allergien und Hyperproliferationen, **dadurch gekennzeichnet**, daß es neben pharmazeutisch üblichen Trägern und Hilfsstoffen ω -(Alkyl)-p-aminomethylbenzoesäure-phenylester enthält.
3. Verfahren zur Herstellung von neuen Substanzen der allgemeinen Formel I, **dadurch gekennzeichnet**, daß nach Leuckart-Wallach aus p-Aminomethylbenzoesäure die N,N-Dimethyl-Verbindung gebildet wird, die mit Thionylchlorid in das Säurechlorid überführt wird, wonach der Ester durch Umsetzung mit tert.-Butylphenol und die quaternären Salze mit Alkylhalogeniden durch Umsetzung mit der freien Base in Nitromethan erhalten werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Diese Substanzen wurden bisher nicht beschrieben. Überraschend zeigen sie interessante pharmakologische Wirkungen. Entsprechend ihrer biologischen Aktivität in Modellversuchen, können sie als antiphlogistische, analgetische, antiproliferative, antiallergische und Mediator-antagonistische Pharmaka in der Human- bzw. Veterinärmedizin Anwendung finden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Für die Behandlung von Entzündungen und Schmerzzuständen wurden bisher vorwiegend Cyclooxygenaseinhibitoren bzw. phenolische Antioxydantien eingesetzt. Die bisher bekannt gewordenen Lipoxxygenasehemmer sind zwar antiphlogistisch, antiallergisch und antiproliferativ wirksam, jedoch ist ihr praktischer Einsatz wegen ihrer Nebenwirkungen stark eingeschränkt. Starke antiproliferativ wirksame Verbindungen (u. a. Krebs-Chemotherapeutika) besitzen ebenfalls erhebliche Nebenwirkungen, die ihren Einsatz einschränken.

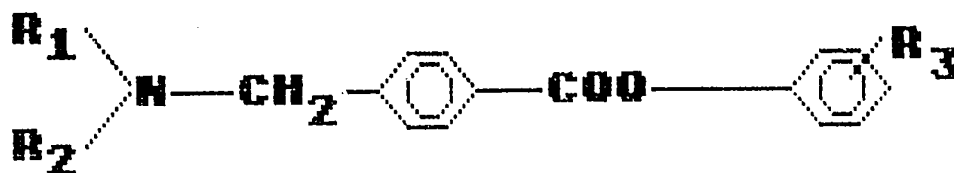
Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, neue Substanzen zur Behandlung von Entzündungen, Schmerzen, Allergien und Hyperproliferationen einzusetzen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe besteht in der Auffindung und Herstellung neuer, bisher unbekannter Substanzen, die zur Behandlung von Entzündungen, Schmerzzuständen, Hyperproliferationen und Allergien bei geringen Nebenwirkungen geeignet sind.

Überraschend wurde gefunden, daß Substanzen vorstehender Zusammensetzung (siehe Formel I) sehr gute therapeutische Wirkungen bei den genannten Indikationen besitzen und dabei weitgehend nebenwirkungsarm sind.



wobei bedeuten:

R_1, R_2 = H, Niedrigalkyl-, Aralkyl-;

R_3 = Alkyl- (C_1 bis C_7 ; geradkettig und verzweigt)

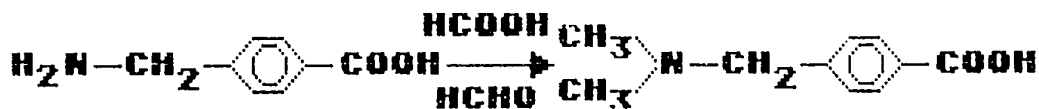
sowie deren Salze mit R_4X , wobei:

R_4 = H, Alkyl-, Aralkyl-;

X = Halogen, Toluolsulfonyl-.

Diese Verbindungen wurden bisher nicht beschrieben. Sie werden nach bekannten Verfahren hergestellt, wie z. B. in Houben-Weyl VI/3,53 und VIII,340,508 sowie XI/1,850 oder in Analogievorschriften nach Beilstein ausführlich dargestellt.

Erfindungsgemäß wird die p-Aminomethylbenzoesäure nach Leuckart-Wallach in die N,N-Dimethyl-Verbindung überführt,



wobei Temperaturen bis 140°C angewandt werden.

Diese N,N-Dimethylaminobenzoessäure wird mittels Thionylchlorid in das Säurechlorid überführt, das nach Umsetzung mit tert.-Butylphenol bei 160°C das N,N-Dimethylaminobenzoessäure-4'-tert.-butylphenylester-hydrochlorid ergibt.

Die Herstellung der quaternären Salze mit Alkylhalogeniden erfolgt durch Umsetzung mit der freien Base in Nitromethan.

Die so synthetisierten, bisher nicht beschriebenen Verbindungen wurden nach allgemein üblichen pharmakologischen Methoden auf ihre biologische Aktivität untersucht.

Dabei wurde überraschend eine gute antiphlogistische und analgetische Wirkung festgestellt. Ebenso zeigen Vertreter dieser neuen Substanzserie eine sehr gute Hemmung des Ehrlich-Ascites-Carcinoms. Im Modellversuch wird weiterhin die Histaminwirkung aufgehoben. Schließlich werden verschiedene Lipoxygenasen in vitro gehemmt.

In umfangreichen ergänzenden pharmakologischen Untersuchungen ergaben sich keine weiteren biologischen Aktivitäten (hier nicht im Detail aufgeführt); es konnte keine Wirkung auf das Nerven- oder auf das Herz-Kreislauf-System festgestellt werden. So wurden an speziellen ZNS-Tests u. a. durchgeführt: Verhaltenstest, orientierende Toxizität (LD), Elektrokrampf und Pentetrazolkrampf. Bei allen Versuchen und in einem orientierenden toxikologischen Test traten bei maximal applizierbaren Dosen keine Toxizität oder andere als die genannten biologischen Aktivitäten auf.

Damit zeigen die Verbindungen überraschenderweise ein neues Wirkungsspektrum, das durch besonders geringe Nebenwirkungen gekennzeichnet ist. Eine antiphlogistische und analgetische Wirkung bei gleichzeitigen anti-allergischen Wirkkomponenten läßt auf die Abwesenheit typischer Verträglichkeitsprobleme klassischer Antiphlogistika/Analgetika, wie z. B. Schleimhautreizungen und z. T. schweren pseudoallergischen Reaktionen, schließen. Damit sollten, im Gegensatz zu den bekannten Arzneimitteln, derartige Substanzen auch zur Behandlung von Entzündungen und Schmerzzuständen mit ausreichend starker Wirkung bei Allergikern bzw. für pseudoallergische Reaktionen disponierter Personen geeignet sein. Entsprechend den Ergebnissen der Modellversuche ist eine besonders gute Verträglichkeit zu erwarten. Dies wird durch die Abwesenheit allergener Reaktionen bei Meerschweinchen, denen nach einem Standardverfahren mehrmals eine 1%ige Substanzlösung injiziert wurde, weiter bekräftigt.

Bemerkenswert ist weiterhin die antihistaminische Wirkung gemeinsam mit der Lipoxygenasehemmung beim Fehlen von ZNS-Nebenwirkungen. Damit ist in der Praxis eine anti-allergische Wirkung ohne Beeinträchtigungen bzw. bei guter Verträglichkeit zu erwarten. Günstig ist die zusätzlich vorhandene Schmerzhemmung. Klassische Anti-allergika zeigen häufig ZNS-Nebenwirkungen; viele bisher bekannte Lipoxygenasehemmer haben wegen ihrer Toxizität keinen Eingang in die Therapie gefunden.

Die Hemmung des Tumorzustands liegt im Bereich klassischer Chemotherapeutika, ohne deren Allgemeintoxizität annähernd zu erreichen.

Ausführungsbispiele

Herstellungsbispiele

Die verwendeten chemischen Substanzen für die Untersuchungen werden nach bekannten Methoden hergestellt. Sie können zum Beispiel nach folgenden Verfahren erhalten werden:

Herstellung von 4-(N,N-Dimethylaminomethyl)-benzoesäure-4'-tert.-butylphenylester-hydrochlorid (Substanz A)

Zu 10 ml Ameisensäure werden unter Rühren bei 0 bis 5°C 15,1 g 4-Aminomethylbenzoesäure eingetragen. Anschließend werden 21 ml Formalinlösung zugefügt. Die klare, farblose Lösung wird langsam erwärmt, wobei es zur Kohlendioxidabspaltung kommt. Die Temperatur steigt auf 85°C von selbst an; dann wird noch 7 Stunden auf 140°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit Salzsäure kongosauer gemacht und im Vakuum zur Trockne eingedunstet. Man erhält 20–21,5 g weiße Kristalle (= 92–99%) vom Fp. 256–263°C. Ohne weitere Reinigung wird das Produkt mit der gleichen Menge Thionylchlorid 1 Stunde auf 60°C und 3 Stunden auf 75°C erwärmt. Nach Abziehen des überschüssigen Thionylchlorids erhält man in quantitativer Ausbeute 4-(N,N-Dimethylaminomethyl)-benzoylchlorid als gelblichweißen Feststoff, das ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet wird. Dazu werden 5,5 g dieses Produkts mit 3,9 g p-tert.-Butylphenol bei 160°C zur Reaktion gebracht und nach Abkühlen mit Ether gereinigt und dann aus Ethanol umkristallisiert. Es werden ca. 6 g 4-(N,N-Dimethylaminomethyl)-benzoesäure-4'-tert.-butylphenylester-hydrochlorid als weiße Kristalle vom Fp. 232–238°C erhalten.

Herstellung von quaternären Salzen des 4-(N,N-Dimethylaminomethyl)-benzoesäure-4'-tert.-butylphenylesters

Die freie Base wird aus dem obenstehend beschriebenen Hydrochlorid durch Fällen mit Natronlauge als weißer Feststoff erhalten.

Die Quaternisierung erfolgt nach bekannten Methoden, am günstigsten in Nitromethan, wobei praktisch quantitativ die gewünschten Produkte erhalten werden, die zur Reinigung aus einer Aceton/Ethanol-Lösung mit Wasser ausgefällt werden. Es wurden hergestellt:

4-(N,N-Dimethylaminomethyl)-benzoesäure-4'-tert.-butylphenylester-methobromid (Substanz B)
Fp. 230–232°C

4-(N,N-Dimethylaminomethyl)-benzoesäure-4'-tert.-butylphenylester-methojodid (Substanz C)
Fp. 218–220°C

und

4-(N,N-Dimethylaminomethyl)-benzoesäure-4'-tert.-butylphenylester-ethojodid (Substanz D)

Die Elementaranalysen dieser Produkte entsprachen den Erwartungswerten; DC-Untersuchungen ergaben keine Nebenprodukte.

IR- und NMR-Spektren bestätigten die Zusammensetzung der Verbindungen.

Methoden zur Testung der biologischen Aktivität

Kaolinödem der Rattenpfote

Es werden männliche oder weibliche Wistar-Ratten (von der Firma Falcke/Barby) im Gewicht zwischen 100 und 200 g verwendet. Den Tieren wird am Nachmittag vor dem Versuchstag das Futter entzogen, so daß sie ca. 16–18 Stunden nüchtern sind. Trinkwasser erhalten sie ad libitum.

Jede Versuchsgruppe umfaßt 10 Tiere. Die Kontrollgruppe erhält anstelle der Testsubstanz die entsprechende Menge Wasser peroral.

Nach subplantarer Injektion von 0,1 ml einer 10%igen wäßrigen Kaolinsuspension (Bolus alba DAB 7-DDR) in eine Rattenhinterpfote entsteht eine akute Entzündung, die nach ca. 7 Stunden ihr Maximum erreicht hat.

Die Testsubstanzen werden unmittelbar nach Auslösung der Entzündung peroral gegeben (1 ml/100 g KM).

Testsubstanzen, die nicht wasserlöslich sind, werden als wäßrige Suspensionen mit 2 Tropfen Tween 80 (Sorbimacrogolum oleinicum, DAB 7-DDR) pro 5 ml hergestellt.

Mit einem Plethysmometer wird vor Versuchsbeginn und 3 Stunden nach Auslösung der Entzündung das Volumen der Pfote bestimmt.

Aus der prozentualen Differenz des Pfootenvolumens je Tier wird die mittlere Differenz in der Gruppe mit Standardabweichung berechnet.

Essigsäure-Writhing

Pro Versuchsgruppe bzw. Kontrollgruppe werden 10 Tiere (männlich oder weiblich) eingesetzt. Die Tiere werden 15 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern gesetzt; sie erhalten Wasser ad libitum.

Die Gabe der Testsubstanzen erfolgt p. o. (0,4 ml/20 g KM). 20 Minuten nach Applikation wird die 0,8%ige Essigsäure i. p. (0,2 ml/20 g KM) injiziert, nach weiteren drei Minuten erfolgt die Zählung der Writhings (Bauchdeckenkrämpfe) über 12 Minuten.

Die Kontrollgruppe erhält Leitungswasser bzw. Lösungsvermittler anstelle der Testsubstanz. Die Durchschnittszahl der Bauchdeckenkrämpfe muß in der Kontrollgruppe mindestens 30 sein. Bei einer geringeren Anzahl sind die Mäuse für diesen Test nicht geeignet.

Die Anzahl der Writhings in der Kontrollgruppe wird als 100% Wirkung angenommen. Daraus ergibt sich für die Berechnung der Hemmung folgende Gleichung:

$$\% \text{Hemmung} = \frac{a \cdot 100}{b} - 100$$

a – Anzahl der Writhings der Versuchsgruppe

b – Anzahl der Writhings der Kontrollgruppe

Zur Berechnung der ED₅₀ wird die Dosis-Wirkungs-Kurve mit 3 bis 4 Dosen im linearen Bereich aufgenommen.

Solides Ehrlich-Ascites-Carcinom (EAC)

Pro Gruppe werden 10 weibliche ICR-Mäuse (18 bis 22 g; vom VEB Tierzuchtkombinat Schönwalde) mit 0,2 ml der EAC-Zellsuspension (6 Mio Zellen/ml) intracutan geimpft.

Vom nächsten Tag an werden die Substanzen täglich peroral verabreicht. Die Kontrollgruppe erhält die entsprechende Menge Wasser.

Am 8. Tag werden die Tiere getötet, zur Kontrolle das Körpergewicht bestimmt, und es wird das feste Geschwür aus der Bauchhaut herauspräpariert und sofort gewogen.

Angegeben wird die mittlere prozentuale Differenz des Tumorgewichts mit Standardabweichung im Verhältnis zu der Kontrollgruppe. Als innerer Standard wird eine Gruppe mitgeführt, die mit Cyclophosphamid behandelt wurde.

Histaminlyse in vitro

Der in Tyrode präparierte Meerschweinchendarm (Aufkaufiere, bunt, männlich, 250...350 g KM) wird 15 bis 30 Minuten im Organbad (Luft durchperlt, Belastung 1 g, Tyrode, pH 7,38 bis 7,42; 37°C) adaptiert.

Die durch Histamin ausgelösten Kontraktionen werden isotonisch über ein Meßwertgebersystem auf Laborschreiber übertragen. Es wird die Wirkung der Substanzen gegenüber der submaximalen Histaminkonzentration ($5 \cdot 10^{-7}$ mol/l Badkonzentration, Histamindihydrochlorid) ermittelt. Sobald sich ein Plateau der Histaminkontraktion herausgebildet hat, wird eine (weitere) Dosis der Testsubstanz (akkumulierend) dem Organbad hinzugegeben.

Für jede Wirkkonzentration wird die mittlere prozentuale Hemmung, bezogen auf die gleich 100% gesetzte submaximale Histaminkonzentration, berechnet.

Hemmung der Lipoxygenasen

Sowohl die Präparation der Erbsen- und der Retikulozytenlipoxygenase als auch die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgt entsprechend der Literaturvorschriften (R. GRUPE, T. ZISKA, A. RICHTER, B. BÖHME und E. GÖRES, Biomed. Biochim. Acta 47 [1988] 12, 955-963) in Anlehnung an Methoden von RAPOPORT und SCHEWE (T. SCHEWE, R. WIESNER, S. M. RAPOPORT, Methods Enzymol. 71 [1981] 430-441; D. REGDEL, T. SCHEWE, S. M. RAPOPORT, Biomed. Biochim. Acta 44 [1985] 1411-1428; H. KÜHN, T. SCHEWE, S. M. RAPOPORT, Biomed. Biochim. Acta 43 [1984] 358-361).

Die Enzyme werden durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung gewonnen. Ihre Aktivität gegenüber Linolsäure in wässriger Lösung wird mit einer Clark-Elektrode gemessen.

Ergebnisse der biologischen Tests**1. Kaolinödem**

Als Testsubstanz wurde Substanz C verwendet. Es werden die ED_{50} -Werte in mol/kg p.o. angegeben.

Testsubstanz	$1,6 \cdot 10^{-4}$ ($1,4 \cdot 10^{-5}$... $1,9 \cdot 10^{-3}$)
Diclofenac-Na	$1,7 \cdot 10^{-5}$ ($1,2 \cdot 10^{-4}$... $4,7 \cdot 10^{-6}$)
Piroxicam	$2,0 \cdot 10^{-5}$ ($3,9 \cdot 10^{-6}$... $9,7 \cdot 10^{-5}$)
Phenylbutazon	$2,9 \cdot 10^{-4}$ ($1,2 \cdot 10^{-4}$... $7,0 \cdot 10^{-4}$)

2. Essigsäure-Writhing

Als Testsubstanz wurde Substanz A und als Standard 2,3-Dimethyl-4-methylamino-1-phenyl-5-pyrazolon-N-methansulfonsäure verwendet. Es werden die ED_{50} -Werte in mol/kg p.o. angegeben.

Testsubstanz	$3,3 \cdot 10^{-4}$ ($3,2 \cdot 10^{-4}$... $3,5 \cdot 10^{-4}$)
Standard	$8,7 \cdot 10^{-5}$ ($2,7 \cdot 10^{-5}$... $2,9 \cdot 10^{-4}$)

3. Ehrlich-Ascites-Carcinom

Als Testsubstanz wurde Substanz A und als Standard Cyclophosphamid verwendet.

Substanz	Dosis in mol/kg p.o.	Wirkung in %-Hemmung
Testsubstanz	$1 \cdot 10^{-4}$	-77 ± 7
	$1 \cdot 10^{-5}$	-80 ± 7
	$1 \cdot 10^{-6}$	-73 ± 17
Standard	$1,5 \cdot 10^{-4}$	-70 ± 10

4. Histaminlyse

Die Wirkungen der Substanz C betragen:

Dosis in mol/l	Wirkung in %-Hemmung
$2 \cdot 10^{-4}$	100
$2 \cdot 10^{-5}$	100
$2 \cdot 10^{-6}$	30

5. Hemmung der Erbsen-Lipoxygenase

Als Testsubstanz 1 wurde Substanz B, als Testsubstanz 2 Substanz D und als Standard Propylgallat verwendet. Die Wirkungen werden als IC_{50} -Werte in mol/l angegeben.

Substanz 1	$2,3 \cdot 10^{-5}$ ($1,9 \cdot 10^{-5}$... $2,6 \cdot 10^{-5}$)
Substanz 2	$3,8 \cdot 10^{-5}$ ($2,5 \cdot 10^{-5}$... $5,7 \cdot 10^{-5}$)
Standard	$2,8 \cdot 10^{-5}$ ($2,2 \cdot 10^{-5}$... $3,6 \cdot 10^{-5}$)

6. Hemmung der Retikulozyten-Lipoxygenase

Als Testsubstanz wurde Substanz D und als Standard Phenidon verwendet. Die Wirkungen werden als IC_{50} -Werte in mol/l angegeben.

Testsubstanz	$1,6 \cdot 10^{-4}$ ($1,4 \cdot 10^{-4}$... $1,8 \cdot 10^{-4}$)
Standard	$1,3 \cdot 10^{-6}$ ($8,9 \cdot 10^{-7}$... $1,7 \cdot 10^{-6}$)