



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 34 309 T2 2007.07.05**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 079 819 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 34 309.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB99/01541**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 922 317.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/059568**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.05.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **25.11.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.03.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **06.12.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.07.2007**

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

A61K 31/16 (2006.01)

A61K 31/22 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 31/425 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9810464 **16.05.1998** **GB**

(73) Patentinhaber:

Vernalis (Oxford) Ltd., Winnersh, Berkshire, GB

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**HUNTER, British Biotech, Michael George,
Cowley, Oxford OX4 5LY, GB; BECKETT, British
Biotech, Raymond Paul, Cowley, Oxford OX4 5LY,
GB; CLEMENTS, British Biotech, John Martin,
Cowley, Oxford OX4 5LY, GB; WHITTAKER, British
Biotech, Mark, Cowley, Oxford OX4 5LY, GB;
SPAVOLD, Marie, Zoe, Cowley, Oxford OX4 5LY,
GB**

(54) Bezeichnung: **HYDROXAMSÄUREDERIVATE ALS ANTIBAKTERIELLE ARZNEIMITTEL**

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] Diese Erfindung betrifft die Verwendung von Hydroxamsäurederivaten als antibakterielle Mittel.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Im Allgemeinen werden bakterielle Pathogene entweder als Gram-positiv oder Gram-negativ klassifiziert. Viele antibakterielle Mittel (einschließlich Antibiotika) sind gegen die eine oder die andere Gram-Klasse von Pathogenen spezifisch. Antibakterielle Mittel, die sowohl gegen Gram-positive als auch gegen Gram-negative Pathogene wirksam sind, werden daher im Allgemeinen als solche mit Breitspektrumaktivität angesehen.

[0003] Viele Klassen von antibakteriellen Mitteln sind bekannt, einschließlich der Penicilline und Cephalosporine, Tetracycline, Sulfonamide, Monobactame, Fluorochinolone und Chinolone, Aminoglycoside, Glycopeptide, Macrolide, Polymyxine, Lincosamide, Trimethoprim und Chloramphenicol. Die grundlegenden Mechanismen der Wirkung dieser antibakteriellen Klassen variieren.

[0004] Die Resistenz von Bakterien gegen viele bekannte antibakterielle Mittel ist ein wachsendes Problem. Folglich gibt es auf diesem Fachgebiet ein fortgesetztes Bedürfnis nach alternativen antibakteriellen Mitteln, insbesondere derjenigen, die Wirkmechanismen haben, die sich von den bekannten Klassen grundlegend unterscheiden.

[0005] Unter den Gram-positiven Pathogenen, wie Staphylococci, Streptococci, Mycobacterien und Enterococci, sind resistente Stämme aufgetaucht, was es besonders schwierig macht, sie auszulöschen. Beispiele solcher Stämme sind Methicillin resistenter Staphylococcus aureus (MRSA), Methicillin resistente, Coagulase negative Staphylococci (MRCNS), Penicillin resistenter Streptococcus pneumoniae und mehrfach resistenter Enterococcus faecium.

[0006] Pathogene Bakterien sind oft gegenüber den Aminoglycosid-, β -Lactam-(Penicillin- und Cephalosporin-) und Chloramphenicol-Typen der Antibiotika resistent. Diese Resistenz geht mit der enzymatischen Inaktivierung des Antibiotikums durch Hydrolyse oder durch Bildung von inaktiven Derivaten einher. Die β -Lactam-(Penicillin und Cephalosporin)-Familie der Antibiotika ist durch die Gegenwart einer β -Lactamringstruktur gekennzeichnet. Eine Resistenz gegenüber dieser Familie von Antibiotika in klinischen Isolaten wird am häufigsten durch die Erzeugung eines "Penicillinase" (R-Lactamase)-Enzyms durch das resistente Bakterium verursacht, das den β -Lactamring hydrolysiert, wodurch seine antibakterielle Aktivität zerstört wird.

[0007] Kürzlich gab es ein Auftauchen von Vancomycin-resistenten Stämmen von Enterococci (Woodford N., 1998, Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience, Journal of Medical Microbiology, 47(10):849-62). Vancomycin-resistente Enterococci sind besonders gefährlich, da sie häufige Ursachen von Krankenhaus-basierten Infektionen sind und gegenüber den meisten Antibiotika inhärent resistent sind. Vancomycin wirkt durch die Bindung an die terminalen D-Ala-D-Ala-Reste des Zellwandpeptidoglycan-Vorläufers. Eine hochgradige Beständigkeit gegenüber Vancomycin ist als VanA bekannt und wird durch Gene verursacht, die sich an einem übertragbaren Element befinden, dass die terminalen Reste zu D-Ala-D-lac verändert, wodurch die Affinität für Vancomycin reduziert wird.

[0008] Im Hinblick auf das schnelle Auftauchen von gegen mehrere Arzneimittel resistenten Bakterien ist die Entwicklung von antibakteriellen Mitteln mit neuen Wirkungsweisen, die gegen die wachsende Anzahl an resistenten Bakterien wirksam sind, insbesondere gegen Vancomycin-resistente Enterococci und R-Lactam-Antibiotika-resistente Bakterien, wie Methicillin-resistente Staphylococcus aureus, von größter Wichtigkeit.

Kurze Beschreibung der Erfindung

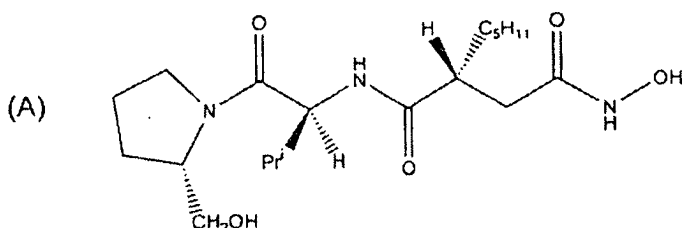
[0009] Diese Erfindung basiert auf dem Befund, dass bestimmte Hydroxamsäurederivate antibakterielle Aktivität besitzen, und macht eine neue Klasse an antibakteriellen Mitteln zugänglich. Die Erfinder haben herausgefunden, dass die Verbindungen, mit denen sich diese Erfindung befasst, antibakteriell in Bezug auf eine Auswahl von Gram-positiven und Gram-negativen Organismen sind.

[0010] Obwohl es von Interesse sein kann, den Wirkmechanismus der erfindungsgemäßen Verbindungen herauszufinden, ist es ihre Fähigkeit, Bakterienwachstum zu hemmen, die sie nützlich macht. Es wird jedoch derzeit angenommen, dass ihre antibakterielle Aktivität zumindest teilweise durch die intrazelluläre Hemmung des

bakteriellen Polypeptiddeformylase (PDF)-Enzyms verursacht wird.

[0011] Bakterielle Polypeptiddeformylasen (PDF) (EC 3.5.1.31) sind eine konservierte Familie von Metalloenzymen (Übersicht: Meinel T., Lazennec C., Villoing S., Blanquet S., 1997, Journal of Molecular Biology 267, 749-761), die für die Lebensfähigkeit von Bakterien essentiell sind, wobei es ihre Funktion ist, die Formylgruppe vom N-terminalen Methioninrest der durch Ribosom synthetisierten Proteine in Eubakterien zu entfernen. Mazel et al. (EMBO J. 13(4):914-923, 1994) haben kürzlich eine E. coli PDF geklont und charakterisiert. Da PDF für das Wachstum von Bakterien essentiell ist und es keinen eukaryotischen Gegenpart zu PDF gibt, haben Mazel et al. (ebenda), Rajagopla et al. (J. Am. Chem. Soc. 119:12418-12419, 1997) und Becker et al. (J. Biol. Chem. 273(19): 11413-11416, 1998) jeweils vorgeschlagen, dass PDF ein ausgezeichnetes antibakterielles Ziel ist.

[0012] Das natürliche Antibiotikum Actinonin (siehe z.B. J.C.S. Perkin 2, 1975, 819) ist ein Hydroxamsäurederivat der Struktur (A):

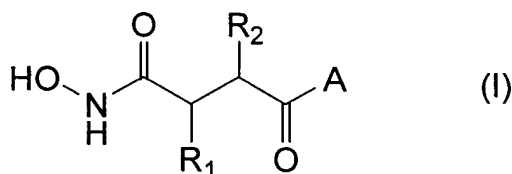


[0013] Zusätzlich wurde von verschiedenen Strukturanaloga von Actinonin auch gezeigt, dass sie antibakterielle Aktivität besitzen (siehe z.B. Devlin et al., Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1 (9):830-841, 1975; Broughton et al., Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1 (9):857-860, 1975).

[0014] Hydroxamsäurederivate sind auch auf dem Gebiet der Hemmung von Matrixmetalloproteinasen (MMP) bekannt. Viele Beispiele der Klasse wurden synthetisiert und über ihre MMP-hemmenden Eigenschaften berichtet. Von einer kleineren Anzahl wurde berichtet, dass sie in Tiermodellen von durch MMPs mediierten Krankheiten, z.B. von verschiedenen Krebsarten und rheumatoider Arthritis, wirksam sind. Für Überblicke über die Patentliteratur zu Hydroxamat MMP-Hemmstoffen siehe z.B. Beckett, Exp. Opin. Ther. Patents (1996) 6, 1305-1315, und Beckett & Whittaker, Exp. Opin. Ther. Patents (1998), 8(3), 259-282, und die darin zitierten Dokumente.

Beschreibung der Erfindung

[0015] Erfindungsgemäß wird die Verwendung einer Verbindung der Formel (I) oder eines pharmazeutisch oder veterinärmedizinisch annehmbaren Salzes davon für die Herstellung eines Medikaments zur Hemmung des Bakterienwachstums bereitgestellt:



worin

R_1 C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_6 -Alkyl substituiert durch ein oder mehrere Halogenatome, Amino, Hydroxy oder C_1 - C_6 -Alkoxy darstellt;

R_2 eine Gruppe R_{10} -(X)_n-(ALK)_m darstellt, worin

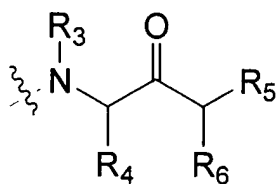
R_{10} Wasserstoff oder eine C_1 - C_6 -Alkyl-, C_2 - C_6 -Alkenyl-, C_2 - C_6 -Alkynyl-, Cycloalkyl-, Aryl- oder Heterocyclylgruppe darstellt, von denen jede unsubstituiert oder mit (C_1 - C_6)-Alkyl, (C_1 - C_6)-Alkoxy, Hydroxy, Mercapto, (C_1 - C_6)-Alkylthio, Amino, Halogen (einschließlich Fluor, Chlor, Brom und Iod), Trifluormethyl, Cyano, Nitro, -COOH, -CONH₂, -COOR^A, -NHCOR^A, -CONHR^A, -NHR^A, -NR^AR^B oder -CONR^AR^B substituiert sein kann, worin R^A und R^B unabhängig voneinander eine (C_1 - C_6)-Alkylgruppe sind, und

ALK ein geradkettiges oder verzweigtes zweiwertiges C_1 - C_6 -Alkyl-, C_2 - C_6 -Alkenyl- oder C_2 - C_6 -Alkynylradikal darstellt, und durch eine oder mehrere nicht nebeneinander liegende -NH-, -O- oder -S-Bindungen unterbrochen sein kann,

X -NH-, -O- oder -S- darstellt, und

m und n unabhängig voneinander 0 oder 1 darstellen; und

A (i) eine Gruppe der Formel (IA) oder (ID) darstellt



(IA)



(ID)

worin:

R_3 Wasserstoff oder C_1 - C_6 -Alkyl darstellt und R_4 die Seitenkette einer natürlichen oder nicht natürlichen α -Aminosäure darstellt und

R_5 und R_6 unabhängig voneinander Wasserstoff oder eine optional substituierte C_1 - C_8 -Alkyl-, Cycloalkyl-, Aryl-, Aryl(C_1 - C_6 -Alkyl)-, heterozyklische oder heterozyklische(C_1 - C_6)-Alkylgruppe darstellen, oder worin R_5 und R_6 , wenn sie mit dem Stickstoffatom zusammengekommen werden, an welches sie gebunden sind, einen optional substituierten gesättigten heterozyklischen Ring von 3 bis 8 Atomen bilden, welcher optional mit einem carbozyklischen oder zweiten heterozyklischen Ring anneliert ist.

[0016] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform können die verschiedenen erfindungsgemäßen Aspekte gegen Vancomycin-, Chinolon- und " β -Lactam"-resistente Bakterien und die Infektionen, die sie verursachen, angewandt werden.

[0017] Basierend auf der Hypothese, dass die Verbindungen (I) durch die Hemmung von intrazellulärer PDF wirken, kann der wirksamste antibakterielle Effekt durch Verwendung von Verbindungen, die effizient durch die Bakterienzellwand gehen, erzielt werden. Daher sind Verbindungen, die als Hemmstoffe von PDF in vitro hoch aktiv sind und die Bakterienzellen penetrieren, zur erfindungsgemäßen Verwendung bevorzugt. Es muss angenommen werden, dass die antibakterielle Wirksamkeit der Verbindungen, die potente Hemmstoffe des PDF-Enzyms in vitro sind, aber schlecht die Zellen penetrieren, durch ihre Verwendung in der Form eines Prodrugs, d.h. eines strukturell modifizierten Analogons, das z.B. durch Enzymwirkung in das Elternmolekül der Formel (I) umgewandelt wird, nachdem es durch die Bakterienzellwand gegangen ist, verbessert werden kann.

[0018] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff " $(C_1$ - C_6)-Alkyl" eine gerad- oder verzweigt-kettige Alkyleinheit mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, einschließlich z.B. Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl, sek-Butyl, t-Butyl, n-Pentyl und n-Hexyl.

[0019] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff "zweiwertiges (C_1 - C_6)-Alkylradikal" eine gesättigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen und zwei ungesättigten Valenzen.

[0020] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff " $(C_2$ - C_6)-Alkenyl" eine gerad- oder verzweigt-kettige Alkyleinheit mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen mit zumindest einer Doppelbindung von entweder E- oder Z-Stereochemie, wo zutreffend. Der Begriff schließt z.B. Vinyl, Allyl, 1- und 2-Butenyl und 2-Methyl-2-propenyl ein.

[0021] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff "zweiwertiges (C_2 - C_6)-Alkenylradikal" eine Kohlenwasserstoffkette mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen, zumindest einer Doppelbindung und zwei ungesättigten Valenzen.

[0022] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff " C_2 - C_6 -Alkynyl" auf geradkettige oder verzweigt-kettige Kohlenwasserstoffgruppen mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen und zusätzlich einer Dreifachbindung. Dieser Begriff würde z.B. Ethinyl, 1-Propinyl, 1- und 2-Butinyl, 2-Methyl-2-propinyl, 2-Pentinyl, 3-Pentinyl, 4-Pentinyl, 2-Hexinyl, 3-Hexinyl, 4-Hexinyl und 5-Hexinyl einschließen.

[0023] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff "zweiwertiges (C_2 - C_6)-Alkynylradikal" eine Kohlenwasserstoffkette mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen, zumindest einer Dreifachbindung und zwei ungesättigten Valenzen.

[0024] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff "Cycloalkyl" eine gesättigte alicyclische Einheit mit 3 bis 8 Kohlenstoffatomen und schließt z.B. Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl und Cyclooctyl ein.

[0025] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff "Cycloalkenyl" eine ungesättigte alicyclische Einheit von 3

bis 8 Kohlenstoffatomen und schließt z.B. Cyclopropenyl, Cyclobutenyl, Cyclopentenyl, Cyclohexenyl, Cycloheptenyl und Cyclooctenyl ein. In dem Fall von Cycloalkenylringen mit 5 bis 8 Kohlenstoffatomen kann der Ring mehr als eine Doppelbindung enthalten.

[0026] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "Aryl" auf eine mono-, bi- oder tricyclische carbocyclische aromatische Gruppe, und auf Gruppen, bestehend aus zwei kovalent gebundenen monocyclischen carbocyclischen aromatischen Gruppen. Illustrativ für solche Gruppen sind Phenyl, Biphenyl und Naphthyl.

[0027] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "Heteroaryl" auf einen 5- oder 6-gliedrigen aromatischen ring, enthaltend ein oder mehrere Heteroatome, und optional anneliert mit einem Benzyl- oder Pyridylring; und auf Gruppen, bestehend aus zwei kovalent gebundenen 5- oder 6-gliedrigen aromatischen Ringen, wobei jeder ein oder mehrere Heteroatome enthält; und auf Gruppen, bestehend aus einer monocyclischen carbocyclischen aromatischen Gruppe, kovalent gebunden an einen 5- oder 6-gliedrigen aromatischen Ring, enthaltend ein oder mehrere Heteroatome. Illustrativ für solche Gruppen sind Thienyl, Furyl, Pyrrolyl, Imidazolyl, Benzimidazolyl, Thiazolyl, Pyrazolyl, Isoxazolyl, Isothiazolyl, Triazolyl, Thiadiazolyl, Oxadiazolyl, Pyridinyl, Pyridazinyl, Pyrimidinyl, Pyrazinyl, Triazinyl, 4-([1,2,3]-Thiadiazol-4-yl)phenyl und 5-Isoxazol-3-ylthienyl.

[0028] Wie hierin verwendet, schließt der unqualifizierte Begriff "Heterocycl" oder "heterocyclisch" das oben definierte "Heteroaryl" ein und bedeutet insbesondere einen 5- bis 7-gliedrigen aromatischen oder nicht-aromatischen heterocyclischen Ring, enthaltend ein oder mehrere Heteroatome, ausgewählt aus S, N und O, und optional anneliert mit einem Benzolring, einschließlich z.B. Pyrrolyl-, Furyl-, Thienyl-, Piperidinyl-, Imidazolyl-, Oxazolyl-, Thiazolyl-, Thiadiazolyl-, Pyrazolyl-, Pyridinyl-, Pyrrolidinyl-, Pyrimidinyl-, Morpholinyl-, Piperazinyl-, Indolyl-, Benzimidazolyl-, Maleimido-, Succinimido-, Phthalimido- und 1,3-Dioxo-1,3-dihydro-isoindol-2-yl-Gruppen.

[0029] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff "Acy" eine Gruppe $R_{20}C(O)-$, worin R_{20} (C_1-C_6)-Alkyl, (C_2-C_6)-Alkenyl, (C_3-C_7)-Cycloalkyl, Phenyl, Heterocycl, Phenyl- (C_1-C_6) -alkyl, Heterocycl- (C_1-C_6) -alkyl, (C_3-C_7)-Cycloalkyl- (C_1-C_6) -alkyl, Phenyl- (C_2-C_6) -alkenyl, Heterocycl- (C_2-C_6) -alkenyl, (C_3-C_7)-Cycloalkyl- (C_2-C_6) -alkenyl ist, wobei jede der R_{20} -Gruppen substituiert sein kann.

[0030] Außer in dem Kontext, in dem er vorkommt, anders beschrieben, bedeutet der Begriff "substituiert", wie hier für jede Einheit angewandt, mit bis zu 4 Substituenten substituiert, wobei jeder unabhängig (C_1-C_6)-Alkyl, Benzyl, (C_1-C_6)-Alkoxy, Phenoxy, Hydroxy, Mercapto, (C_1-C_6)-Alkylthio, Amino, Halogen (einschließlich Fluor, Chlor, Brom und Iod), Trifluormethyl, Nitro, $-COOH$, $-CONH_2$, $-COR^A$, $-COOR^A$, $-NHCOR^A$, $-CONHR^A$, $-NHR^A$, $-NR^AR^B$ oder $-CONR^AR^B$ sein kann, worin R^A und R^B unabhängig eine (C_1-C_6)-Alkylgruppe sind. In dem Fall, wo "substituiert" Benzyl bedeutet, kann der Phenylring davon selbst mit jedem der vorangehenden, ausgenommen Benzyl, substituiert sein.

[0031] Wie hierin verwendet, bedeuten die Begriffe "Seitenkette einer natürlichen α -Aminosäure" und "Seitenkette einer nicht-natürlichen α -Aminosäure" die Gruppe R^x in Bezug auf eine natürliche oder nicht-natürliche Aminosäure der Formel $NH_2-CH(R^x)-COOH$.

[0032] Beispiele von Seitenketten von natürlichen α -Aminosäuren schließen diejenigen von Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Cystin, Glutaminsäure, Histidin, 5-Hydroxylysin, 4-Hydroxyprolin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin, Valin, α -Amino adipinsäure, α -Amino-n-buttersäure, 3,4-Dihydroxyphenylalanin, Homoserin, α -Methylserin, Ornithin, Pipecolinsäure und Thyroxin ein.

[0033] In natürlichen α -Aminosäureseitenketten, die funktionelle Substituenten enthalten, z.B. Amino-, Carboxyl-, Hydroxy-, Mercapto-, Guanidyl-, Imidazolyl- oder Indolylgruppen, wie bei Arginin, Lysin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Tryptophan, Histidin, Serin, Threonin, Tyrosin und Cystein, können solche funktionalen Substituenten optional geschützt sein.

[0034] Ebenso können in den Seitenketten von nicht-natürlichen α -Aminosäuren, die funktionellen Substituenten enthalten, z.B. Amino-, Carboxyl-, Hydroxy-, Mercapto-, Guanidyl-, Imidazolyl- oder Indolylgruppen, solche funktionellen Substituenten optional geschützt sein.

[0035] Der Begriff "geschützt", wenn in Bezug auf einen funktionellen Substituenten in einer Seitenkette von einer natürlichen oder nicht-natürlichen α -Aminosäure verwendet, bedeutet ein Derivat solch eines Substituenten, das im Wesentlichen nicht-funktionell ist. Das häufig verwendete Handbuch von T. W. Greene und P. G.

Wuts "Protective Groups in Organic Synthesis", 2. Auflage, Wiley, New York, 1991 gibt einen Überblick über das Thema. Zum Beispiel können Carboxylgruppen verestert sein (z.B. als ein C₁-C₆-Alkylester), Aminogruppen können zu Amiden (z.B. als NHCOC₁-C₆-Alkylamid) oder Carbamaten (z.B. als NHC(=O)OC₁-C₆-Alkyl oder NHC(=O)OCH₂Ph-Carbamat) umgewandelt sein, Hydroxylgruppen können zu Ethern (z.B. einem OC₁-C₆-Alkyl- oder einem O(C₁-C₆-Alkyl)phenylether) oder Estern (z.B. einem OC(=O)C₁-C₆-Alkylester) umgewandelt sein, und Thiolgruppen können zu Thioethern (z.B. einem tert-Butyl- oder Benzylthioether) oder Thioestern (z.B. einem SC(=O)C₁-C₆-Alkylthioester) umgewandelt sein.

[0036] Salze der erfindungsgemäßen Verbindungen schließen physiologisch annehmbare Säureadditionssalze, z.B. Hydrochloride, Hydrobromide, Sulfate, Methansulfonate, p-Toluolsulfonate, Phosphate, Acetate, Citrate, Succinate, Lactate, Tartrate, Fumarate und Maleate ein. Salze können auch mit Basen gebildet werden, z.B. Natrium-, Kalium-, Magnesium und Calciumsalze.

[0037] Aufgrund des Vorhandenseins von asymmetrischen Kohlenstoffatomen gibt es mehrere tatsächliche oder potentielle chirale Zentren in den erfindungsgemäßen Verbindungen. Das Vorhandensein von mehreren asymmetrischen Kohlenstoffatomen führt zu einer Anzahl von Diastereomeren mit R- oder S-Stereochemie an jedem chiralen Zentrum. Die Erfindung schließt alle solchen Diastereomere und Mischungen davon ein. Derzeit ist die bevorzugte Stereokonfiguration des die R₂-Gruppe tragenden Kohlenstoffatoms R; die des die R₄-Gruppe tragenden Kohlenstoffatoms (wenn asymmetrisch) ist S und die des die R₁-Gruppe tragenden Kohlenstoffatoms (wenn asymmetrisch) ist R.

[0038] In den Verbindungen zur erfindungsgemäßen Verwendung und in den neuen erfindungsgemäßen Verbindungen:

R₁ kann z.B. Hydroxy, Methoxy, Methyl oder Trifluormethyl sein. Wasserstoff ist derzeit bevorzugt.

[0039] R₂ kann z.B. sein:

optional substituiertes C₁-C₆-Alkyl, C₃-C₆-Alkenyl, C₃-C₆-Alkynyl oder Cycloalkyl;

Phenyl(C₁-C₆-alkyl)-, Phenyl(C₃-C₆-alkenyl)- oder Phenyl(C₃-C₆-alkynyl)-, optional substituiert am Phenylring;

Cycloalkyl(C₁-C₆-alkyl)-, Cycloalkyl(C₃-C₆-alkenyl)- oder Cycloalkyl(C₃-C₆-alkynyl)-, optional substituiert am Cycloalkylring;

Heterocyclyl(C₁-C₆-alkyl)-, Heterocyclyl(C₃-C₆-alkenyl)- oder Heterocyclyl(C₃-C₆-alkynyl)-, optional substituiert am Heterocyclring; oder

CH₃(CH₂)_pO(CH₂)_q- oder CH₃(CH₂)_pS(CH₂)_q-, worin p 0, 1, 2 oder 3 ist und q 1, 2 oder 3 ist.

[0040] Spezielle Beispiele von R²-Gruppen schließen ein:

Methyl, Ethyl, n- und Isopropyl, n- und Isobutyl, n-Pentyl, Isopentyl-3-methyl-buty-1-yl, n-Hexyl, n-Heptyl, n-Octyl, Methylsulfanylethyl, Ethylsulfanylmethyl, 2-Methoxyethyl, 2-Ethoxyethyl, 2-Ethoxymethyl, 3-Hydroxypropyl, Allyl, 3-Phenylprop-3-en-1-yl, Prop-2-yn-1-yl, 3-Phenylprop-2-yn-1-yl, 3-(2-Chlorphenyl)prop-2-yn-1-yl, But-2-yn-1-yl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cyclopentylmethyl, Cyclopentylethyl, Cyclopentylpropyl, Cyclohexylmethyl, Cyclohexylethyl, Cyclohexylpropyl, Furan-2-ylmethyl, Furan-3-methyl, Tetrahydrofuran-2-ylmethyl, Tetrahydrofuran-2-ylmethyl, Piperidinylmethyl, Phenylpropyl, 4-Chlorphenylpropyl, 4-Methylphenylpropyl, 4-Methoxyphenylpropyl, Benzyl, 4-Chlorbenzyl, 4-Methylbenzyl und 4-Methoxybenzyl.

[0041] Derzeit bevorzugte Gruppen an R₂ sind n-Propyl, n-Butyl, n-Pentyl, Benzyl und Cyclopentylmethyl.

[0042] R₃ kann z.B. Wasserstoff oder Methyl sein, wobei Wasserstoff derzeit bevorzugt ist.

[0043] R₄ kann z.B. sein:

die kennzeichnende Gruppe einer natürlichen α-Aminosäure, z.B. Isopropyl, Benzyl oder 4-Hydroxyphenylmethyl, in denen jede funktionelle Gruppe geschützt, jede Aminogruppe acyliert und jede vorhandene Carboxylgruppe amidiert sein kann; oder

eine Gruppe -[Alk]_nR₉, worin Alk eine (C₁-C₆)-Alkyl- oder (C₂-C₆)-Alkenylengruppe ist, die optional durch ein(e) oder mehrere -O- oder -S-Atome oder -N(R₁₂)-Gruppen [worin R₁₂ ein Wasserstoffatom oder eine (C₁-C₆)-Alkylgruppe ist] unterbrochen ist, n 0 oder 1 ist, und R₉ Wasserstoff oder eine optional substituierte Phenyl-, Aryl-, Heterocyclyl-Cycloalkyl- oder Cycloalkenylgruppe oder (nur wenn n 1 ist) R₉ zusätzlich Hydroxy, Mercapto, (C₁-C₆)-Alkylthio, Amino, Halogen, Trifluormethyl, Nitro, -COOH, -CONH₂, -COOR^A, -NHCOR^A, -CONHR^A, -NHR^A, -NR^AR^B oder -CONR^AR^B sein kann, worin R^A und R^B unabhängig eine C₁-C₆-Alkylgruppe sind; oder

eine Benzylgruppe, die am Phenylring durch eine Gruppe der Formel -OCH₂COR₈ substituiert ist, worin R₈ Hydroxyl, Amino, (C₁-C₆)-Alkoxy, Phenyl-(C₁-C₆)-alkoxy, C₁-C₆-Alkylamino, Di((C₁-C₆)-alkyl)amino, Phe-

nyl-(C₁-C₆)-alkylamino ist, oder

eine heterocyclische (C₁-C₆-Alkyl)-Gruppe, die am heretocyclischen Ring entweder unsubstituiert oder mit Halogen, Nitro, Carboxy, C₁-C₆-Alkoxy, Cyano, C₁-C₆-Alkanoyl, Trifluormethyl-C₁-C₆-alkyl, Hydroxy, Formyl, Amino, C₁-C₆-Alkylamino, Di-(C₁-C₆-Alkyl)amino, Mercapto, (C₁-C₆)-Alkylthio, Hydroxy(C₁-C₆-alkyl), Mercapto(C₁-C₆-alkyl) oder C₁-C₆-Alkylphenylmethyl mono- oder disubstituiert ist; oder

eine Gruppe -CR_aR_bR_c, in welcher:

jedes von R_a, R_b and R_c unabhängig Wasserstoff, (C₁-C₆)-Alkyl, (C₂-C₆)-Alkenyl, (C₂-C₆)-Alkynyl, Phenyl-(C₁-C₆)-alkyl, (C₃-C₈)-Cycloalkyl ist; oder

R_c Wasserstoff ist und R_a und R_b unabhängig Phenyl oder Heteroaryl, wie beispielsweise Pyridyl sind; oder

R_c Wasserstoff, (C₁-C₆)-Alkyl, (C₂-C₆)-Alkenyl, (C₂-C₆)-Alkynyl, Phenyl-(C₁-C₆)-alkyl oder (C₃-C₈)-Cycloalkyl ist, und R_a und R_b zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an welches sie gebunden sind, einen 3- bis 8-gliedrigen Cycloalkyl- oder einen 5- bis 6-gliedrigen heterocyclischen Ring bilden; oder

R_a, R_b und R_c zusammen mit den Kohlenstoffatom, an welches sie gebunden sind, einen tricyclischen Ring (zum Beispiel Adamantyl) bilden; oder

R_a und R_b jeweils unabhängig (C₁-C₆)-Alkyl, (C₂-C₆)-Alkenyl, (C₂-C₆)-Alkynyl, Phenyl-(C₁-C₆)-alkyl oder eine Gruppe, wie sie unten für R_c definiert ist, außer Wasserstoff sind, oder R_a und R_b zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an welches sie gebunden sind, einen Cycloalkyl- oder heterocyclischen Ring bilden, und R_c Wasserstoff, -OH, -SH, Halogen, -CN, -CO₂H, (C₁-C₄)-Perfluoralkyl, -CH₂OH, -CO₂(C₁-C₆)-Alkyl, -O(C₁-C₆)-Alkyl, -O(C₂-C₆)-Alkenyl, -S(C₁-C₆)-Alkyl, -SO(C₁-C₆)-Alkyl, -SO₂(C₁-C₆)-Alkyl, -S(C₂-C₆)-Alkenyl, -SO(C₂-C₆)-Alkenyl, -SO₂(C₂-C₆)-Alkenyl oder eine Gruppe -Q-W ist, worin Q eine Bindung oder -O-, -S-, -SO- oder -SO₂- darstellt, und W eine Phenyl-, Phenylalkyl-, (C₃-C₈)-Cycloalkyl-, (C₃-C₈)-Cycloalkylalkyl-, (C₄-C₈)-Cycloalkenyl-, (C₄-C₈)-Cycloalkenylalkyl-, Heteroaryl- oder Heteroarylalkylgruppe darstellt, welche optional durch einen oder mehrere Substituten substituiert sein kann, die unabhängig ausgewählt sind aus Hydroxyl, Halogen, -CN, -CO₂H, -CO₂(C₁-C₆)-Alkyl, -CONH₂, -CONH(C₁-C₆)-Alkyl, -CONH((C₁-C₆)-Alkyl)₂, -CHO, -CH₂OH, (C₁-C₄)-Perfluoralkyl, -O(C₁-C₆)-Alkyl, -S(C₁-C₆)-Alkyl, -SO(C₁-C₆)-Alkyl, -SO₂(C₁-C₆)-Alkyl, -NO₂, -NH₂, -NH(C₁-C₆)-Alkyl, -N((C₁-C₆)-Alkyl)₂, -NHCO(C₁-C₆)-Alkyl, (C₁-C₆)-Alkyl, (C₂-C₆)-Alkenyl, (C₂-C₆)-Alkynyl, (C₃-C₈)-Cycloalkyl, (C₄-C₈)-Cycloalkenyl, Phenyl oder Benzyl.

[0044] Beispiele von besonderen R₄-Gruppen schließen Methyl, Ethyl, Isopropyl, Benzyl, 4-Chlorbenzyl, 4-Hydroxybenzyl, Phenyl, Cyclohexyl, Cyclohexylmethyl, Pyridin-3-ylmethyl, tert-Butoxymethyl, Naphthylmethyl, Isobutyl, sec-Butyl, tert-Butyl, 1-Benzylthio-1-methylethyl, 1-Methylthio-1-methylethyl, 1-Mercapto-1-methylethyl, 1-Methoxy-1-methylethyl, 1-Hydroxy-1-methylethyl, 1-Fluor-1-methylethyl, 4,4-Dimethyl-prop-1-en-4-yl, 4,4-Dimethyl-prop-4-yl-hydroxymethyl, 2-Hydroxyethyl, 2-Carboxyethyl, 2-Methylcarbamoylethyl, 2-Carbamoylethyl und 4-Aminobutyl ein. Derzeit bevorzugte R₄-Gruppen schließen tert-Butyl, Isobutyl, Benzyl und Methyl ein.

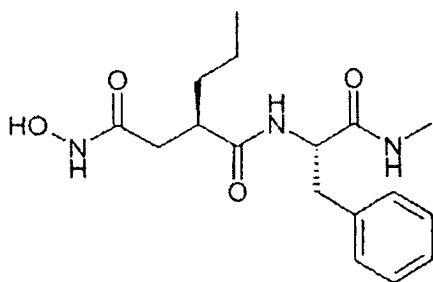
[0045] R₅ und R₆ können unabhängig z.B. Wasserstoff, Methyl, Ethyl, tert-Butyl, n-Heptyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Phenyl, 2-Ethoxycarbonyleth-2-yl, Pyrid-2-yl, 1,1,3,3-Tetramethylbutyl, Benzyl, 2,6-Dimethyl-4-tert-butylphenyl, Diphenylmethyl, 4-Chlorphenyl-phenylmethyl, 2-Fluorphenyl-phenylmethyl, 1-(4-Fluorphenyl)-1-phenyl-1-aminomethyl, 1,1-Diphenylprop-3-yl, 3-Phenyl-thiazolyl oder 2-Hydroxyethyl sein; oder R₅ und R₆ können, wenn sie mit dem Stickstoffatom zusammengenommen werden, an welches sie gebunden sind, einen gesättigten 5- bis 8-gliedrigen monocyclischen N-heterocyclischen Ring bilden, der über das N-Atom angebunden ist und der optional -N(R₁₁)- enthält, worin R₁₁ Wasserstoff oder C₁-C₆-Alkyl, Benzyl, Acyl oder eine Aminoschutzgruppe, O, S, SO oder SO₂ als Ringmitglied ist, und/oder der optional an einem oder mehreren C-Atomen durch Hydroxy, C₁-C₆-Alkyl, Hydroxy(C₁-C₆-alkyl)-, C₁-C₆-Alkoxy, Oxo, ketalisiertes Oxo, Amino, Mono(C₁-C₆-alkyl)amino, Di(C₁-C₆-alkyl)amino, Carboxy, C₁-C₆-Alkoxy-carbonyl, Hydroxymethyl, C₁-C₆-Alkoxy-methyl, Carbamoyl, Mono(C₁-C₆-alkyl)carbamoyl, Di(C₁-C₆-alkyl)carbamoyl oder Hydroxylamino substituiert ist.

[0046] Beispiele solcher Ringe sind substituiertes oder unsubstituiertes 1-Pyrrolidinyl, Piperidin-1-yl, 1-Piperazinyl, Hexahydro-1-pyridazinyl, Morpholin-4-yl, Tetrahydro-1,4-thiazin-4-yl, Tetrahydro-1,4-thiazin-4-yl-1-oxid, Tetrahydro-1,4-thiazin-4-yl-1,1-dioxid, Hexahydroazipino oder Octahydroazocino. Substituierte Beispiele der Vorstehenden sind 2-(Methylcarbamoyl)-1-pyrrolidinyl, 2-(Hydroxymethyl)-1-pyrrolidinyl, 4-Hydroxypiperidino, 2-(Methylcarbamoyl)piperidino, 4-Hydroxyiminopiperidino, 4-Methoxypiperidino, 4-Methylpiperidin-1-yl, 4-Benzylpiperidin-1-yl, 4-ACetyl-piperidin-1-yl, 4-Methyl-1-piperazinyl, 4-Phenyl-1-piperazinyl, 1,4-Dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl, Hexahydro-3-(methylcarbamoyl)-2-pyridazinyl und Hexahydro-1-(benzylloxycarbonyl)-2-pyridazinyl, Decahydroisochinolin-2-yl und 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-2-yl.

[0047] Wenn A eine Gruppe der Formel (IA) ist, ist es derzeit bevorzugt, dass R₅ Methyl oder Wasserstoff und R₆ Methyl ist.

- [0048]** Spezielle Beispiele von Verbindungen mit PDF-hemmender und antibakterieller Aktivität gemäß der Erfindung schließen diejenigen der Beispiele herein ein.
- [0049]** Verbindungen zur erfindungsgemäßen Verwendung können durch in der Literatur für die Herstellung von Hydroxamat-MMP-Inhibitoren beschriebene Verfahren hergestellt werden, z.B. den Patentveröffentlichungen betreffend solche Verbindungen, zitiert in Beckett, Exp. Opin. Ther. Patents (1996) 6,1305-1315, und Beckett & Whittaker, Exp. Opin. Ther. Patents (1998), 8(3), 259-282.
- [0050]** Die Zusammensetzungen, mit denen sich die Erfindung befasst, können zur Verabreichung über jede Route, die mit den pharmakokinetischen Eigenschaften des Wirkstoffs/der Wirkstoffe konsistent ist, hergestellt werden.
- [0051]** Oral verabreichbare Zusammensetzungen können in der Form von Tabletten, Kapseln, Pulver, Granulaten, Pastillen, Flüssig- oder Gelpräparaten, wie als orale, topische oder sterile parenterale Lösungen oder Suspensionen vorliegen. Tabletten und Kapseln zur oralen Verabreichung können in Einheitsdosis-Präsentationsform vorliegen und herkömmliche Exzipienten, wie Bindemittel, z.B. Sirup, Akazin, Gelatine, Sorbit, Tragacanth oder Polyvinylpyrrolidon; Füllstoffe, z.B. Lactose, Zucker, Maisstärke, Calciumphosphat, Sorbit oder Glycin; Tablettengleitmittel, z.B. Magnesiumstearat, Talk, Polyethylenglykol oder Silika; Auflösungsmittel, z.B. Kartoffelstärke oder akzeptable Feuchthaltemittel, wie Natriumlaurylsulfat enthalten. Die Tabletten können gemäß den in der normalen pharmazeutischen Praxis gut bekannten Verfahren beschichtet werden. Orale flüssige Präparate können in der Form von z.B. wässrigen oder öligen Suspensionen, Lösungen, Emulsionen, Sirupen oder Elixieren vorliegen, oder können als Trockenprodukt zur Rekonstitution mit Wasser oder einem anderen geeigneten Vehikel vor Gebrauch angeboten werden. Solche flüssigen Präparate können herkömmliche Additive, wie Suspendiermittel, z.B. Sorbit, Sirup, Methylcellulose, Glucosesirup, Gelatine, hydrierte essbare Fette; Emulgiermittel, z.B. Lecithin, Sorbitanmonooleat; oder Akazin; nicht-wässrige Vehikel (welche essbare Öle einschließen können), z.B. Mandelöl, fraktioniertes Kokosöl, ölige Ester wie Glycerin, Propylenglykol oder Ethylalkohol; Konservierungsmittel, z.B. Methyl- oder Propyl-p-hydroxybenzoat oder Sorbinsäure, und falls gewünscht, herkömmliche Aroma- oder Färbemittel enthalten.
- [0052]** Zur topischen Verabreichung auf die Haut kann/können der Wirkstoff/die Wirkstoffe in eine Creme, Lotion oder Salbe aufbereitet werden. Creme- oder Salbenformulierungen, die für den Arzneistoff verwendet werden können, sind in dem Fachgebiet gut bekannte herkömmliche Formulierungen, z.B. wie in Standardtextbüchern der Pharmazie, wie der britischen Pharmacopoeia, beschrieben.
- [0053]** Der Wirkstoff/die Wirkstoffe kann/können auch parenteral in einem sterilen Medium verabreicht werden. Abhängig vom verwendeten Vehikel und der Konzentration kann der Arzneistoff entweder in dem Vehikel suspendiert oder gelöst sein. Vorteilhafterweise können Hilfsstoffe, wie Lokalanästhetika, Konservierungsmittel und Puffermittel in dem Vehikel gelöst sein.
- [0054]** Sichere und wirksame Dosen für verschiedene Klassen von Patienten und für unterschiedliche Krankheitszustände werden durch klinische Versuche, wie auf dem Fachgebiet verlangt, bestimmt. Es wird verstanden werden, dass das spezifische Dosisniveau für jeden bestimmten Patienten von einer Vielzahl an Faktoren, einschließlich der Aktivität der spezifischen eingesetzten Verbindung, dem Alter, dem Körpergewicht, der allgemeinen Gesundheit, dem Geschlecht, der Diät, der Verabreichungszeit, dem Verabreichungsweg, der Ausscheidungsrate, der Arzneistoffkombination und der Schwere der bestimmten, der Therapie zugrundeliegenden Krankheit abhängt.
- [0055]** Die folgenden Beispiele sind von erfindungsgemäßen Verbindungen der obigen Formel (I) mit PDF-hemmender Aktivität und antibakterieller Aktivität.
- [0056]** ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden unter Verwendung eines Bruker AC 250E-Spektrometers bei 250,1 bzw. 62,9 MHz aufgezeichnet. Elementarmikroanalysen wurden durch MEDAC Ltd. Department of Chemistry, Brunel University, Uxbridge, Middlesex UB8 3PH durchgeführt. L-tert-Leucin-N-methylamid wurde gemäß eingeführten Literaturverfahren hergestellt.

Illustratives Herstellungsbeispiel A

N¹-(1S-Methylcarbamoyl-2-phenyl-ethyl)-N⁴-hydroxy-2R-propyl-succinamid

[0057] Die Titelverbindung wurde durch das in WO 92/13831 (Beispiel 1) beschriebene Verfahren hergestellt, wobei 4-Methylvalerylchlorid durch Valerylchlorid ersetzt wurde.

Smp.: = 191-193°C. ¹H-NMR δ (CD₃OD, partieller D-Austausch); 8,12 (0,5H, d, J = 8,1 Hz), 7,96-7,87 (5H, m), 4,55-4,40 (1H, m), 3,11 (1H, dd, J = 6,4, 13,7 Hz), 2,89 (1H, dd, J = 8,9, 13,7 Hz), 2,65, 2,63 (3H, 2s), 2,60-2,50 (1H, m), 2,20 (1H, dd, J = 8,0, 14,6 Hz), 2,06 (1H, dd, J = 6,7, 14,6 Hz), 1,48-1,00 (4H, m) und 0,78 (3H, t, J = 7,1 Hz).

¹³C-NMR δ (CD₃OD); 177,0, 174,0, 170,8, 138,8, 130,3, 129,4, 127,7, 56,3, 44,4, 38,7, 36,4, 35,6, 26,3 21,3 und 14,3. IR (KBr, ν_{max} cm⁻¹): 3292, 2957, 1637, 1560 und 1541. Gefunden: C 60,18, H 7,45, N 12,52 %; C₁₇H₂₅N₃O₄·2H₂O erfordert C 60,23, H 7,55, N 12,39 %

Beispiele

[0058] Durch in der Literatur beschriebene Verfahren analog den für das obige illustrative präparative Beispiel A verwendeten, wurden die folgenden Verbindungen der obigen Formel (I), worin A eine Gruppe der Formel (IA) ist, hergestellt:

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
OH	Isobutyl	H	tert-Butyl	H	2,6-Dimethyl-4-tert-butyl-phenyl
OH	Isobutyl	H	tert-Butyl	H	Diphenylmethyl
OH	Isobutyl	H	tert-Butyl	H	4-Chlorphenyl-phenylmethyl
OH	Isobutyl	H	tert-Butyl	H	1,1-Diphenylprop-3-yl
OH	Isobutyl	H	tert-Butyl	H	3-Phenylthiazolyl
OH	Isobutyl	H	tert-Butyl	H	1-(4-Fluorphenyl)-1-phenyl-1-aminomethyl
OH	Isobutyl	H	tert-Butyl	H	2-Fluorphenyl-phenylmethyl

Biologisches Beispiel A

i) Klonen des Escherichia coli-PDF-Gens

[0059] Das E. coli-PDF-Gen wurde in pET24a(+) geklont (bezeichnet als pET24-PDF) und wurde verwendet, um BL21 DE3-Zellen von Novagen Inc. (Madison, Wisconsin) zu transformieren. Klone wurden bei 37°C auf YT-Agarplatten (8 g/l Typton, 5 g/l Hefeextrakt, NaCl 5 g/l, Agar 15 g/l), ergänzt mit 30 µg/l Kanamycin, ausgewählt.

ii) Expression von PDF

[0060] Eine 20 ml-Übernachtkultur von BL 21 DE3-Zellen, die pET24-PDF beherbergten, wurde verwendet, um 500 ml 2 × YT-Nährlösung (16 g/l Typton, 10 g/l Hefeextrakt, NaCl 5 g/l), enthaltend 30 µg/ml Kanamycin, in einem 2 Liter Kolben mit Baffle zu infizieren und bei 37°C unter Schütteln auf einen OD₆₀₀ von 0,6 wachsen gelassen. Die Kultur wurde dann durch Einstellen des Mediums auf 1,0 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Man ließ die Induktion für weitere 3 Stunden bei 37°C fortschreiten, die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und das Zellpellet mit 250 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und das Pellet bei -70°C gelagert.

iii) Herstellung der löslichen Proteinfraction

[0061] Die Zellen aus einer 1 Liter-Expression wurden in 2 × 25 ml eiskalter Phosphat-gepufferter Salzlösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Eis unter Verwendung eines MSE-Soniprep 150, ausgestattet mit einem mittleren Schallkopf und bei einer Amplitude von 20 bis 25 µm in 6 × 20 Sekunden-Pulsen mit Ultraschall behandelt. Die resultierende Suspension wurde dann durch Zentrifugation bei 20.000 × g 15 Minuten geklärt. Der Überstand wurde dann zur weiteren Reinigung des Enzyms verwendet.

iv) PDF-Reinigung

[0062] E. coli-Lysat aus einer 1 Liter-Kultur in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) wurde auf 2 M Ammoniumsulfat eingestellt. Eine 15 ml-Phenylsepharose-Säule wurde mit PBS/2 M Ammoniumsulfat bei 4°C äquilibriert. Das Lysat wurde auf die Säule geladen und mit Äquilibrierungspuffer gewaschen. Die Säule wurde durch Reduktion der Ammoniumsulfatkonzentration von 2 M auf 0 M über 10 Säulenvolumen eluiert. 5 ml-Fractionen wurden gesammelt und durch SDS-PAGE analysiert. Die die Hauptmenge der 20 kDa-PDF enthaltenden Fractionen wurden vereinigt. Die vereinigten Fractionen wurden unter Verwendung einer 3 kDa-Cut-off-Membran auf ein Volumen von 5 ml konzentriert. Die Fraction wurde dann auf eine Superdex 75 (Größenausschluss-Chromatographie)-Säule, äquilibriert in PBS, geladen. Der konzentrierte PDF-Vorrat wurde bei 1 ml/min bei 4°C eluiert, und 5 ml-Fractionen wurden gesammelt und durch SDS-PAGE analysiert. Die reinsten Fractionen wurden vereinigt und bei -70°C gelagert.

v) PDF-in vitro-Assay

[0063] Der Assay wurde auf einer einzelnen Platte mit 96 Vertiefungen in einem Endvolumen von 100 µl, enthaltend:

- 20 µl PDF (4 µg/ml)
- 20 µl 100 mM Hepes, pH 7,0 + 1 M KCl + 0,05 % Brij
- 10 µl serielle Verdünnung der Testverbindung in 20 % DMSO
- 50 µl Formyl-Met-Ala-Ser (8 mM)

durchgeführt.

[0064] Der Assay wurde bei 37°C 30 Minuten inkubiert. Die freie Aminogruppe des deformylierten (Met-Ala-Ser)-Produkts wurde unter Verwendung von Fluorescamin mittels der folgenden Zugaben detektiert:

- 50 µl 0,2 M Borat, pH 9,5
- 50 µl Fluorescamin (150 µg/ml in trockenem Dioxan)

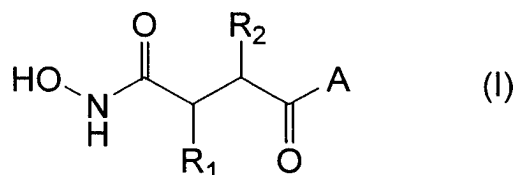
[0065] Die Fluoreszenz wurde auf einem SLT-Fluostar-Plattenleser unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Emissionswellenlänge von 485 nm quantifiziert. Die Standardkontrollreaktionen sind eine Reaktion ohne Hemmstoff, die den Wert der Null-Hemmung liefert, und eine Reaktion ohne Enzym und ohne Hemmstoff, die den Wert der 100 % Hemmung liefert. Die Daten wurden durch Umwandlung der Fluoreszenzeinheiten auf % Hemmung analysiert, und die Hemmstoffkonzentration gegen die % Hemmung aufgetragen. Die Daten wurden an eine sigmoide Funktion: $y = A + ((B - A)/(1 + ((C/x)^D)))$ gefittet, worin A die Null-Hemmung, B die 100 % Hemmung und C den IC₅₀, D die Steigung darstellt. Der IC₅₀ entspricht der Konzentration des Hemmstoffs (nM), die benötigt wird, um die Enzymaktivität um 50 % zu reduzieren.

[0066] Von den Testverbindungen wurde gefunden, dass sie bakterielles PDF in vitro hemmen.

[0067] Die minimalen hemmenden Konzentrationen (MIC) der Testverbindungen gegen E. coli-Stamm DH5 α (Genotyp; F- ϕ 80d/acZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r_k^- , m_k^+)phoA supE44 λ^- thi-1 gyrA96 relA1), erhalten von GibcoBRL Life Technologies, wurden wie folgt bestimmt. Stammlösungen der Testverbindung wurden durch Lösung jeder Verbindung in Dimethylsulfoxid mit 10 mM hergestellt. Für die Bestimmung der minimalen hemmenden Konzentration wurden 2-fache Serienverdünnungen in 2xYT-Nährlösung (Typton 16 g/l, Hefeextrakt 10 g/l, Natriumchlorid 5 g/l, erhalten von BIO 101 Inc., 1070 Joshua Way, Vista, CA92083, USA) hergestellt, um 0,05 ml Verbindung enthaltendes Medium pro Vertiefung zu ergeben. Impfmateriale wurden aus über Nacht in 2xYT-Nährlösung bei 37°C gezogenen Kulturen hergestellt. Die Zelldichten wurden auf eine Extinktion bei 660 nm (A660) = 0,1 eingestellt; die auf die optische Dichte standardisierten Präparate wurden 1:1000 in 2xYT-Nährlösung verdünnt; und jede Vertiefung mit 0,05 ml der verdünnten Bakterien beimpft. Die Mikrotiterplatten wurden bei 37°C 18 Stunden in einem befeuchteten Inkubator inkubiert. Die Testverbindungen hatten MICs von 200 μ M oder weniger gegen die Testorganismen.

Patentansprüche

1. Verwendung einer Verbindung der Formel (I) oder eines pharmazeutisch oder veterinärmedizinisch annehmbaren Salzes davon zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung des Bakterienwachstums:



worin

R_1 C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_6 -Alkyl substituiert durch ein oder mehrere Halogenatome, Amino, Hydroxy oder C_1 - C_6 -Alkoxy darstellt;

R_2 eine Gruppe R_{10} -(X) $_n$ -(ALK) $_m$ darstellt, worin

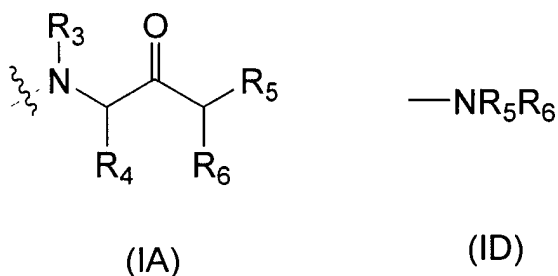
R_{10} Wasserstoff oder eine C_1 - C_6 -Alkyl-, C_2 - C_6 -Alkenyl-, C_2 - C_6 -Alkynyl-, Cycloalkyl-, Aryl- oder Heterocyclylgruppe darstellt, von denen jede unsubstituiert oder mit (C_1 - C_6)-Alkyl, (C_1 - C_6)-Alkoxy, Hydroxy, Mercapto, (C_1 - C_6)-Alkylthio, Amino, Halogen (einschließlich Fluor, Chlor, Brom und Iod), Trifluormethyl, Cyano, Nitro, -COOH, -CONH $_2$, -COOR A , -NHCOR A , -CONHR A , -NHR A , -NR A R B oder -CONR A R B substituiert sein kann, worin R A und R B unabhängig voneinander eine (C_1 - C_6)-Alkylgruppe sind, und

ALK ein geradkettiges oder verzweigtes zweiwertiges C_1 - C_6 -Alkylen-, C_2 - C_6 -Alkenylen- oder C_2 - C_6 -Alkinylenradikal darstellt, und durch eine oder mehrere nicht nebeneinander liegende -NH-, -O- oder -S-Bindungen unterbrochen sein kann,

X -NH-, -O- oder -S- darstellt, und

m und n unabhängig voneinander 0 oder 1 darstellen; und

A (i) eine Gruppe der Formel (IA) oder (ID) darstellt



worin:

R_3 Wasserstoff oder C_1 - C_6 -Alkyl darstellt und R_4 die Seitenkette einer natürlichen oder nicht natürlichen alpha-Aminosäure darstellt und

R_5 und R_6 unabhängig voneinander Wasserstoff oder eine optional substituierte C_1 - C_8 -Alkyl-, Cycloalkyl-, Aryl-, Aryl(C_1 - C_6 -Alkyl)-, heterozyklische oder heterozyklische(C_1 - C_6)-Alkylgruppe darstellen, oder worin R_5 und R_6 , wenn sie mit dem Stickstoffatom zusammengefasst werden, an welches sie gebunden sind, einen optional substituierten gesättigten heterozyklischen Ring von 3 bis 8 Atomen bilden, welcher optional mit einem carbozyklischen oder zweiten heterozyklischen Ring anneliert ist.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, worin R_1 C_1 - C_6 -Alkyl darstellt; R_3 Wasserstoff oder C_1 - C_6 -Alkyl darstellt;

R₄ die Seitenkette einer natürlichen oder nicht natürlichen alpha-Aminosäure darstellt; R₅ und R₆ unabhängig voneinander Wasserstoff, C₁-C₆-Alkyl oder Cycloalkyl darstellen oder worin R₅ und R₆, wenn sie mit dem Stickstoffatom zusammengenommen werden, an welches sie gebunden sind, einen optional substituierten gesättigten heterozyklischen Ring von 3 bis 8 Atomen bilden; und R₇ Wasserstoff oder eine Acylgruppe darstellt.

3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, worin R₁ Methyl ist.

4. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, worin R₂ ist:

C₁-C₆-Alkyl, C₃-C₆-Alkenyl oder C₃-C₆-Alkyl;

Phenyl(C₁-C₆-Alkyl)-, Phenyl(C₃-C₆-Alkenyl)- oder Phenyl(C₃-C₆-Alkyl)-, optional substituiert am Phenylring; Cycloalkyl(C₁-C₆-Alkyl)-, Cycloalkyl(C₃-C₆-Alkenyl)- oder Cycloalkyl(C₃-C₆-Alkyl)-, optional substituiert am Cycloalkylring; Heterocyclyl(C₁-C₆-Alkyl)-, Heterocyclyl(C₃-C₆-Alkenyl)- oder Heterocyclyl(C₃-C₆-Alkyl)-, optional substituiert am Heterocyclring.

5. Verwendung gemäß Anspruch 3, worin R₂ Methyl, Ethyl, n-Propyl, n-Butyl, n-Pentyl, n-Hexyl, 2-Methoxyethyl, Prop-2-yn-1-yl, 3-Phenylprop-2-yn-1-yl, 3-(2-Chlorphenyl)prop-2-yn-1-yl, But-2-yn-1-yl, Cyclopentylmethyl, Cyclopentylethyl, Cyclopentylpropyl, Phenylpropyl, 4-Chlorphenylpropyl, 4-Methylphenylpropyl oder 4-Methoxyphenylpropyl darstellt.

6. Verwendung gemäß Anspruch 3, worin R₂ n-Butyl, Benzyl oder Cyclopentylmethyl ist.

7. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, worin R₃ Wasserstoff oder Methyl ist.

8. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, worin R₄ darstellt:

eine Gruppe -[Alk]_nR₉, worin Alk eine (C₁-C₆)-Alkyl- oder (C₂-C₆)-Alkenylgruppe ist, die optional durch ein(e) oder mehrere -O- oder -S-Atome oder -N(R₁₂)-Gruppen [worin R₁₂ ein Wasserstoffatom oder eine (C₁-C₆)-Alkylgruppe ist] unterbrochen ist, n 0 oder 1 ist, und R₉ eine optional substituierte Cycloalkyl- oder Cycloalkenylgruppe ist; oder

eine Benzylgruppe, die am Phenylring durch eine Gruppe der Formel -OCH₂COR₈ substituiert ist, worin R₈ Hydroxyl, Amino, (C₁-C₆)-Alkoxy, Phenyl(C₁-C₆)-Alkoxy, C₁-C₆-Alkylamino, Di(C₁-C₆-Alkyl)amino, (Phenyl(C₁-C₆-alkyl))amino ist, oder

eine heterozyklische(C₁-C₆-Alkyl)gruppe, die am heretozyklischen Ring entweder unsubstituiert oder mit Halogen, Nitro, Carboxy, C₁-C₆-Alkoxy, Cyano, C₁-C₆-Alkanoyl, Trifluormethyl, C₁-C₆-Alkyl, Hydroxy, Formyl, Amino, C₁-C₆-Alkylamino, Di-(C₁-C₆-Alkyl)amino, Mercapto, C₁-C₆-Alkylthio, Hydroxy(C₁-C₆-Alkyl), Mercapto(C₁-C₆-Alkyl) oder C₁-C₆-Alkylphenylmethyl mono- oder disubstituiert ist; oder

eine Gruppe -CR_aR_bR_c, in welcher:

jedes von R_a, R_b and R_c unabhängig Wasserstoff, (C₁-C₆)-Alkyl, (C₂-C₆)-Alkenyl, (C₂-C₆)-Alkyl, Phenyl(C₁-C₆)-Alkyl, C₃-C₈-Cycloalkyl ist; oder

R_c Wasserstoff ist und R_a und R_b unabhängig Phenyl oder Heteroaryl wie beispielsweise Pyridyl sind; oder

R_c Wasserstoff, C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkyl, Phenyl(C₁-C₆-Alkyl) oder C₃-C₈-Cycloalkyl ist, und R_a und R_b zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an welches sie gebunden sind, einen 3- bis 8-gliedrigen Cycloalkyl- oder einen 5- bis 6-gliedrigen heterozyklischen Ring bilden; oder

R_a, R_b und R_c zusammen mit den Kohlenstoffatom, an welches sie gebunden sind, einen trizyklischen Ring (zum Beispiel Adamantyl) bilden; oder

R_a und R_b unabhängig C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkyl, Phenyl(C₁-C₆-Alkyl) oder eine Gruppe, wie sie unten für R_c definiert ist, außer Wasserstoff sind, oder R_a und R_b zusammen mit dem Kohlenstoffatom, an welches sie gebunden sind, einen Cycloalkyl- oder heterozyklischen Ring bilden, und R_c Wasserstoff, -OH, -SH, Halogen, -CN, -CO₂H, C₁-C₄-Perfluoralkyl, -CH₂OH, -CO₂(C₁-C₆-Alkyl), -O(C₁-C₆-Alkyl), -O(C₂-C₆-Alkenyl), -S(C₁-C₆-Alkyl), -SO(C₁-C₆-Alkyl), -SO₂(C₁-C₆-Alkyl), -S(C₂-C₆-Alkenyl), -SO(C₂-C₆-Alkenyl), -SO₂(C₂-C₆-Alkenyl) oder eine Gruppe -Q-W ist, worin Q eine Bindung oder -O-, -S-, -SO- oder -SO₂- darstellt und W eine Phenyl-, Phenylalkyl-, C₃-C₈-Cycloalkyl-, C₃-C₈-Cycloalkylalkyl-, C₄-C₈-Cycloalkenyl-, C₄-C₈-Cycloalkenylalkyl-, Heteroaryl- oder Heteroarylalkylgruppe darstellt, welche optional durch einen oder mehrere Substituenten substituiert sein kann, die unabhängig ausgewählt sind aus Hydroxyl, Halogen, -CN, -CO₂H, -CO₂(C₁-C₆-Alkyl), -CONH₂, -CONH(C₁-C₆-Alkyl), -CONH(C₁-C₆-Alkyl)₂, -CHO, -CH₂OH, C₁-C₄-Perfluoralkyl, -O(C₁-C₆-Alkyl), -S(C₁-C₆-Alkyl), -SO(C₁-C₆-Alkyl), -SO₂(C₁-C₆-Alkyl), -NO₂, -NH₂, -NH(C₁-C₆-Alkyl), -N(C₁-C₆-Alkyl)₂, -NHCO(C₁-C₆-Alkyl), C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkyl, C₃-C₈-Cycloalkyl, C₄-C₈-Cycloalkenyl, Phenyl oder Benzyl.

9. Verwendung gemäß Anspruch 8, worin R₄ Phenyl, tert-Butyl, iso-Butyl, Benzyl, Cyclohexylmethyl, Pyridin-3-ylmethyl, tert-Butoxymethyl, tert-Butyl, 1-Benzylthio-1-methylethyl, 1-Methylthio-1-methylethyl oder

1-Mercaptop-1-methylethyl ist.

10. Verwendung gemäß Anspruch 8, worin R_4 tert-Butyl ist.

11. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei R_5 und R_6 unabhängig Wasserstoff, Methyl, Ethyl oder Cyclohexyl sind.

12. Verwendung gemäß Anspruch 10, worin R_5 und R_6 , wenn sie mit dem Stickstoffatom zusammengekommen werden, an welches sie gebunden sind, einen gesättigten 5- bis 8-gliedrigen monozyklischen N-heterozyklischen Ring bilden, welcher über das N-Atom verbunden ist und welcher optional NR_{11} enthält, wobei R_{11} Wasserstoff, C_1 - C_6 -Alkyl, Benzyl, Acyl oder eine Amino-Schutzgruppe, O, S, SO oder SO_2 als Ringmitglied enthält, und/oder der optional an einem oder mehreren C-Atomen durch Hydroxy, C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_6 -Alkoxy, Oxo, ketalisiertem Oxo, Amino, Mono(C_1 - C_6 -Alkyl)amino, Di(C_1 - C_6 -Alkyl)-amino, Carboxy, C_1 - C_6 -Alkoxy-carbonyl, Hydroxymethyl, C_1 - C_6 -Alkoxy-methyl, Carbamoyl, Mono(C_1 - C_6 -Alkyl)-carbamoyl, Di(C_1 - C_6 -Alkyl)carbamoyl oder Hydroxyimino substituiert ist.

13. Verwendung gemäß Anspruch 10, worin R_5 und R_6 , wenn sie mit dem Stickstoffatom zusammengekommen werden, an welches sie gebunden sind, einen substituierten oder unsubstituierten 1-Pyrrolidinyl-, Piperidin-1-yl-, 1-Piperazinyl-, Hexahydro-1-pyridazinyl-, Morpholin-4-yl-, Tetrahydro-1,4-thiazin-4-yl-, Tetrahydro-1,4-thiazin-4-yl-1-oxid-, Tetrahydro-1,4-thiazin-4-yl-1,1-dioxid-, Hexahydroazipino- oder Octahydroazocinoring bilden.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen