



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 27 008 T2** 2006.03.16

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 070 048 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 27 008.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/07722**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 916 516.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/051569**

(86) PCT-Anmeldetag: **08.04.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **14.10.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.01.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **31.08.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.03.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C07C 255/33** (2006.01)

C07C 217/56 (2006.01)

C07C 217/32 (2006.01)

C07C 255/55 (2006.01)

C07C 217/90 (2006.01)

C07C 311/06 (2006.01)

C07D 209/48 (2006.01)

A61K 31/195 (2006.01)

A61K 31/275 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61K 31/135 (2006.01)

A61K 31/215 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

81093 P **08.04.1998** **US**

(73) Patentinhaber:

SmithKline Beecham Corp., Philadelphia, Pa., US;
NPS Pharmaceuticals, Inc., Salt Lake City, Utah,
US

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITL, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

BHATNAGAR, Kumar, Pradip, Exton, US;
BURGESS, Lorraine, Joelle, Phoenixville, US;
CALLAHAN, Francis, James, Philadelphia, US;
CALVO, Rolando, Raul, Royersford, US; DEL MAR,
G., Eric, Salt Lake City, US; LAGO, Amparo, Maria,
Audubon, US; NGUYEN, The, Thomas,
Collegeville, US

(54) Bezeichnung: **VERBINDUNGEN MIT KALZILYTISCHER WIRKUNG**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue calcilytische Verbindungen, diese Verbindungen enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen und ihre Verwendung als Calciumrezeptorantagonisten.

[0002] In Säugetieren steht extrazelluläres Ca^{2+} unter strikter homöostatischer Kontrolle und reguliert verschiedene Prozesse, wie die Blutgerinnung, Nerven- und Muskeleerregungsfähigkeit und angemessene Knochenbildung. Extrazelluläres Ca^{2+} hemmt die Sekretion von Parathormon ("PTH") aus Nebenschilddrüsenzellen, hemmt die Knochenresorption durch Osteoklasten und stimuliert die Sekretion von Calcitonin aus C-Zellen. Calciumrezeptorproteine ermöglichen es bestimmten spezialisierten Zellen, auf Veränderungen in der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu reagieren.

[0003] PTH ist der endokrine Hauptfaktor, der die Ca^{2+} -Homöostase im Blut und extrazellulären Flüssigkeiten reguliert. PTH erhöht durch Wirkung auf Knochen und Nierenzellen den Ca^{2+} -Spiegel im Blut. Diese Zunahme von extrazellulären Ca^{2+} wirkt dann als ein negatives Rückkopplungssignal, das die PTH-Sekretion herabdrückt. Die reziproke Beziehung zwischen extrazellulärem Ca^{2+} und der PTH-Sekretion bildet einen wichtigen Mechanismus, der die Ca^{2+} -Homöostase des Körpers aufrechterhält.

[0004] Extrazelluläres Ca^{2+} wirkt direkt auf Nebenschilddrüsenzellen zur Regulation der PTH-Sekretion. Die Existenz von Nebenschilddrüsenzell-Oberflächenprotein, das Veränderungen von extrazellulärem Ca^{2+} detektiert, wurde bestätigt. Siehe Brown et al., Nature 366:574, 1993. In Nebenschilddrüsenzellen wirkt dieses Protein, der Calciumrezeptor, als ein Rezeptor für extrazelluläres Ca^{2+} , detektiert Veränderungen in der Ionenkonzentration von extrazellulärem Ca^{2+} und leitet eine funktionelle zelluläre Reaktion, die PTH-Sekretion, ein.

[0005] Extrazelluläres Ca^{2+} beeinflusst verschiedene Zellfunktionen (Übersicht in Nemeth et al., Cell Calcium 11:319, 1990). Zum Beispiel spielt extrazelluläres Ca^{2+} eine Rolle in parafollikulären Zellen (C-Zellen) und Nebenschilddrüsenzellen. Siehe Nemeth, Cell Calcium 11:323, 1990. Die Rolle von extrazellulärem Ca^{2+} auf Knochenosteoklasten wurde ebenfalls untersucht. Siehe Zaidi, Bioscience Reports 10:493, 1990.

[0006] Es ist bekannt, daß verschiedene Verbindungen die Wirkungen von extrazellulärem Ca^{2+} auf ein Calciumrezeptormolekül nachahmen. Calcilytische Mittel sind Verbindungen, die die Calciumrezeptoraktivität hemmen können und dadurch eine Verringerung einer oder mehrerer der Calciumrezeptoraktivitäten verursachen, die durch extrazelluläres Ca^{2+} hervorgerufen werden. WO 97/37967 beschreibt calcilytische Verbindungen, die Verwendung von calcilytischen Verbindungen zur Hemmung von Calciumrezeptoraktivität und/oder zum Erreichen einer vorteilhaften Wirkung in einem Patienten und Techniken, die zum Erhalt zusätzlicher calcilytischer Verbindungen verwendet werden können. Calcilytische Mittel sind nützlich als Leitmoleküle im Auffinden, in der Entwicklung, im Design, in der Modifikation und/oder Konstruktion von nützlichen Calciummodulatoren, die aktiv an Ca^{2+} -Rezeptoren sind. Solche calcilytischen Mittel sind nützlich in der Behandlung verschiedener Krankheitszustände, die durch abnormale Spiegel einer oder mehrerer Komponenten gekennzeichnet sind, zum Beispiel Polypeptide wie Hormone, Enzyme oder Wachstumsfaktoren, deren Expression und/oder Sekretion durch Aktivität an einem oder mehreren Ca^{2+} -Rezeptoren reguliert oder beeinflusst wird. Zielkrankheiten oder -störungen für calcilytische Verbindungen schließen Krankheiten ein, die abnormale Knochen- und Mineralienhomöostase involvieren.

[0007] Eine abnormale Calciumhomöostase ist durch eine oder mehrere der folgenden Aktivitäten gekennzeichnet: eine abnormale Zunahme oder Abnahme von Serumcalcium; eine abnormale Zunahme oder Abnahme der Harnausscheidung von Calcium; eine abnormale Zunahme oder Abnahme von Knochencalciumspiegeln (zum Beispiel gemäß Bewertung durch Messungen der Knochenmineraliendichte); eine abnormale Absorption von Calcium aus der Ernährung; eine abnormale Zunahme oder Abnahme der Erzeugung und/oder Freisetzung von Boten, die Serumcalciumspiegel beeinflussen, wie z.B. PTH und Calcitonin; und eine abnormale Veränderung der Reaktion, die durch Boten hervorgerufen wird, die Serumcalciumspiegel beeinflussen.

[0008] Daher bieten Calciumrezeptorantagonisten einen besonderen Ansatz in Richtung auf die Pharmakotherapie von Krankheiten, die mit abnormaler Knochen- oder Mineralienhomöostase assoziiert sind, wie zum Beispiel Hypoparathyroidismus, Osteosarkom, parodontale Krankheit, Bruchheilung, Osteoarthritis, rheumatoide Arthritis, Paget-Krankheit, humorale Hypercalcämie, die mit Malignität und Bruchheilung assoziiert ist, und Osteoporose.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Die vorliegende Erfindung umfaßt neue Calciumrezeptorantagonistverbindungen und ihre Verwendung als Calciumrezeptorantagonisten in der Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten, die mit abnormaler Knochen- oder Mineralienhomöostase verbunden sind, einschließlich (aber nicht beschränkt auf) Hypoparathyroidismus, Osteosarkom, parodontale Krankheit, Bruchheilung, Osteoarthritis, rheumatoide Arthritis, Paget-Krankheit, humorale Hypercalcämie, die mit Malignität und Bruchheilung verbunden ist, und Osteoporose.

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt ferner die Verwendung einer Verbindung der Erfindung in der Herstellung eines Medikaments bereit, um Calciumrezeptoren in einem Tier, einschließlich Menschen, entgegenzuwirken, welches das Verabreichen einer wirksamen Menge einer Verbindung der Erfindung an ein Tier, das dessen bedarf, umfaßt.

[0011] Die vorliegende Erfindung stellt ferner die Verwendung einer Verbindung der Erfindung in der Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung von Serumnebenschilddrüsen spiegeln in einem Tier, einschließlich Menschen, bereit, welches das Verabreichen einer wirksamen Menge einer Verbindung der Erfindung an ein bedürftiges Tier umfaßt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0012] Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind aus (R)-N-[2-Hydroxy-3-(2-cyano-4-(2-carboethoxyethyl)phenoxy)propyl]-1,1-dimethyl-2-(2-naphthyl)ethylamin, (R)-N-[2-Hydroxy-3-(2-cyano-4-(2-carboxyethyl)phenoxy)propyl]-1,1-dimethyl-2-(2-naphthyl)ethylamin, und pharmazeutisch akzeptablen Salzen und Komplexen davon ausgewählt.

[0013] Pharmazeutisch akzeptable Salze sind nicht-toxische Salze in den Mengen und Konzentrationen, in denen sie verabreicht werden.

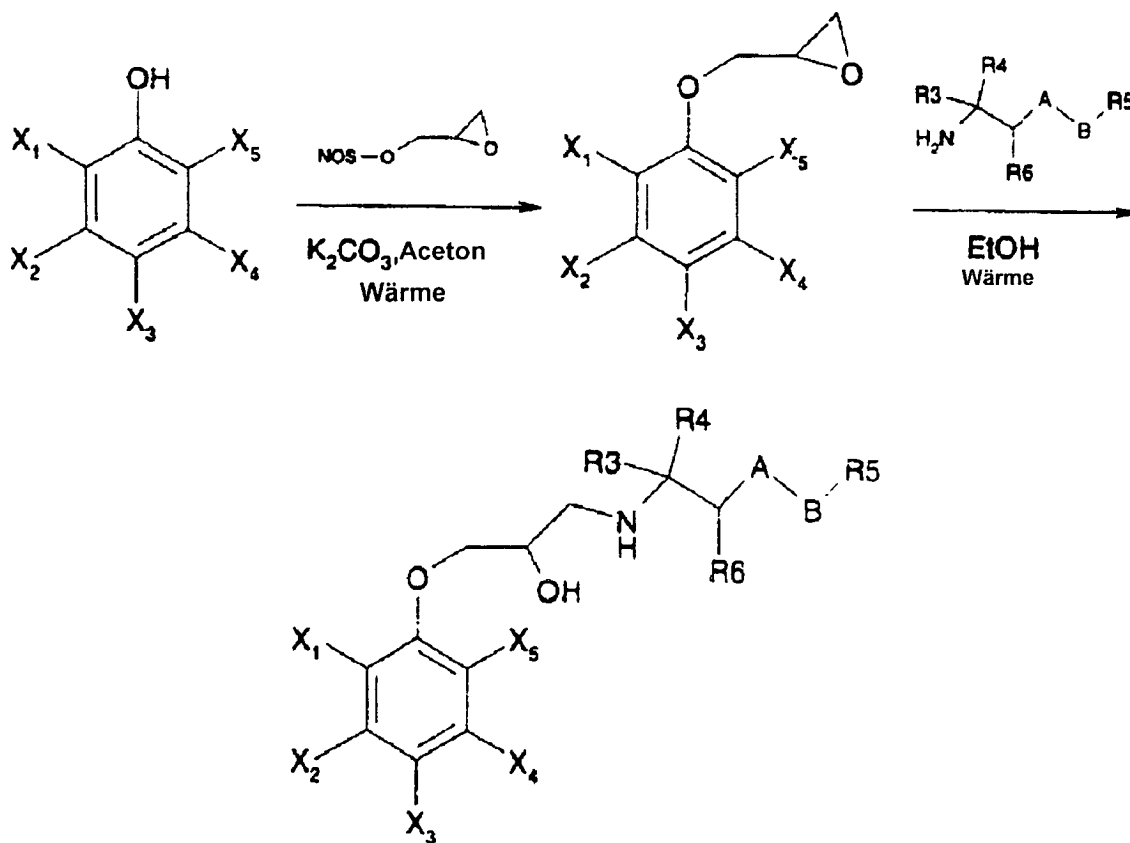
[0014] Pharmazeutisch akzeptable Salze schließen Säureadditionssalze ein, wie diejenigen, die Sulfat, Hydrochlorid, Fumarat, Maleat, Phosphat, Sulfamat, Acetat, Citrat, Lactat, Tartrat, Methansulfonat, Ethansulfonat, Benzolsulfonat, p-Toluolsulfonat, Cyclohexylsulfamat und Chinat enthalten. Ein bevorzugtes Salz ist ein Hydrochlorid. Pharmazeutisch akzeptable Salze können aus Säuren wie Chlorwasserstoffsäure, Maleinsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Sulfaminsäure, Essigsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Weinsäure, Malonsäure, Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Cyclohexylsulfaminsäure, Fumarsäure und Chinasäure erhalten werden.

[0015] Pharmazeutisch akzeptable Salze schließen auch basische Additionssalze ein, wie diejenigen, die Benzathin, Chlorprocain, Cholin, Diethanolamin, Ethylendiamin, Meglumin, Procain, Aluminium, Calcium, Lithium, Magnesium, Kalium, Natrium, Ammonium, Alkylamin und Zink enthalten, wenn saure funktionelle Gruppen wie Carbonsäure oder Phenol vorhanden sind.

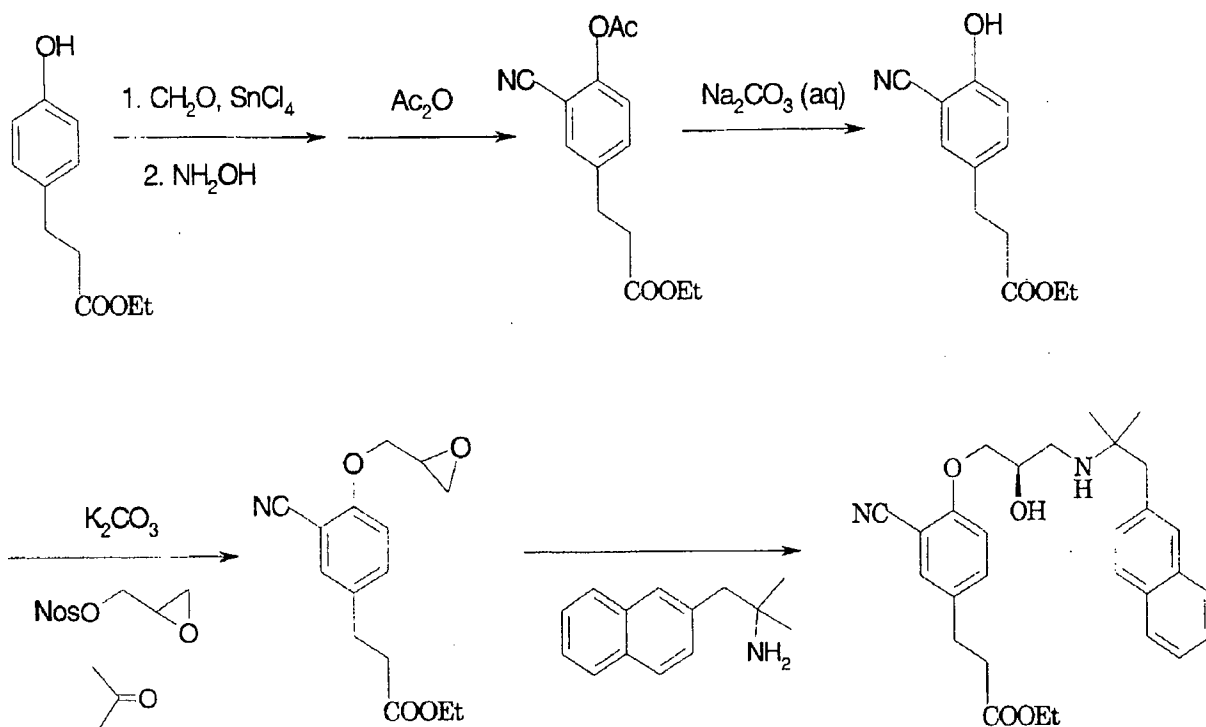
[0016] Die vorliegende Erfindung stellt Verbindungen bereit, die unter Verwendung von Standardtechniken hergestellt werden können. Eine Gesamtstrategie zur Herstellung hier beschriebener, bevorzugter Verbindungen kann wie in diesem Abschnitt beschrieben durchgeführt werden. Die nachfolgenden Beispiele veranschaulichen die Synthese spezifischer Verbindungen. Unter Verwendung der hier beschriebenen Protokolle als ein Modell kann ein Durchschnittsfachmann leicht andere Verbindungen der vorliegenden Erfindung herstellen.

[0017] Alle Reagentien und Lösungsmittel wurden von gewerblichen Lieferanten erhalten. Ausgangsstoffe (z.B. Amine und Epoxide) wurde unter Verwendung von Standardtechniken und -verfahren synthetisiert.

Schema 1



Schema 2



Allgemeine Herstellung

[0018] Ein allgemeines Verfahren, das zur Synthese vieler der Verbindungen verwendet wird, kann wie in Schema 1 beschrieben durchgeführt werden: eine Lösung aus Arylalkohol in Aceton wurde mit einer geeigneten Base wie K_2CO_3 behandelt und für 15 min erwärmt. R-Glycidylsilylat wurde hinzugegeben und die Reak-

tion über Nacht fortgesetzt, um den entsprechenden Glycidylether zu ergeben. Im Falle eines Alkylalkohols (z.B. ist Y_3 C₁₋₄-Alkylen-O) wurde eine stärkere Base, z.B. NaH in DMF, verwendet. Dieses Verfahren kann auch für Arylalkohole verwendet werden. Eine Lösung aus dem substituierten Glycidylether und überschüssigem Amin (typischerweise 1,1-Dimethyl-2-(4-methoxyphenyl)ethylamin) in absolutem Ethanol, Acetonitril, THF oder jedem anderen ähnlichen Lösungsmittel in Gegenwart eines geeigneten Katalysators, wie zum Beispiel LiClO₄, wird über Nacht im Rückfluß gerührt. Das Produkt wird durch Chromatographie in der normalen Phase gereinigt. Hydrochloridsalze werden durch Behandlung der entsprechenden freien Base mit HCl entweder in der Gasphase oder in einer 4M Dioxanlösung oder durch jedes andere standardmäßige Verfahren hergestellt.

[0019] Schema 2 umreißt die allgemeine Synthese von (R)-N-[2-Hydroxy-3-(2-cyano-4-(2-carboethoxyethyl)phenoxy)propyl]-1,1-dimethyl-2-(2-naphthyl)ethylamin. Die Synthese der verbleibenden Verbindungen der Erfindung wird durch Verfahren erreicht, die analog zu den obigen und zu denjenigen sind, die im experimentellen Abschnitt beschrieben werden.

[0020] Zur Verwendung einer Verbindung der Erfindung oder eines pharmazeutisch akzeptablen Salzes davon zur Behandlung von Menschen und anderen Säugetieren wird sie normalerweise gemäß pharmazeutischer Standardpraxis als pharmazeutische Zusammensetzung formuliert.

[0021] Die calcilytischen Verbindungen können auf verschiedenen Wegen verabreicht werden, die die intravenöse, intraperitoneale, subkutane, intramuskuläre, orale, topische (transdermale) oder transmukosale Verabreichung einschließen. Zur systemischen Verabreichung ist die orale Verabreichung bevorzugt. Zur oralen Verabreichung können die Verbindungen zum Beispiel zu herkömmlichen oralen Arzneiformen formuliert werden, wie z.B. Kapseln, Tabletten und flüssige Zubereitungen, wie Sirupe, Elixiere und konzentrierte Tropfen.

[0022] Alternativ kann eine Injektion (parenterale Verabreichung) verwendet werden, z.B. intramuskulär, intravenös, intraperitoneal und subkutan. Zur Injektion werden die Verbindungen der Erfindung in flüssiger Lösung formuliert, bevorzugt in physiologisch kompatiblen Puffern oder Lösungen, wie Kochsalzlösung, Hank-Lösung oder Ringer-Lösung. Zusätzlich können die Verbindungen in fester Form formuliert und unmittelbar vor der Verwendung erneut gelöst oder suspendiert werden. Lyophilisierte Formen können auch erzeugt werden.

[0023] Die systemische Verabreichung kann ebenfalls durch transmukosale oder transdermale Mittel erfolgen. Zur transmukosalen oder transdermalen Verabreichung werden für die zu durchdringende Barriere angemessene Durchdringungsmittel in der Formulierung verwendet. Solche Durchdringungsmittel sind allgemein fachbekannt und schließen zum Beispiel zur transmukosalen Verabreichung Gallensalze und Fusidinsäurederivate ein. Zusätzlich können Detergentien zur Erleichterung der Permeation verwendet werden. Die transmukosale Verabreichung kann zum Beispiel durch Nasensprays, rektale Suppositorien oder vaginale Suppositorien erfolgen.

[0024] Zur topischen Verabreichung können die Verbindungen der Erfindung zu Heilsalben, Salben, Gelen oder Cremes formuliert werden, wie es allgemein fachbekannt ist.

[0025] Die Menge der verschiedenen zu verabreichenden calcilytischen Verbindungen kann durch Standardverfahren unter Berücksichtigung von Faktoren wie dem IC₅₀-Wert der Verbindung, dem EC₅₀-Wert, der biologischen Halbwertszeit der Verbindung, dem Alter, der Größe und dem Gewicht des Patienten und der mit dem Patienten verbundenen Krankheit oder Störung bestimmt werden. Die Bedeutung dieser und anderer zu berücksichtigender Faktoren sind den Durchschnittsfachleuten bekannt.

[0026] Die verabreichten Mengen hängen auch von den Verabreichungswegen und dem Grad der oralen Bioverfügbarkeit ab. Zum Beispiel müssen für Verbindungen mit geringer oraler Bioverfügbarkeit relativ höhere Dosen verabreicht werden.

[0027] Bevorzugt ist die Zusammensetzung in Einheitsarzneiform. Zur oralen Anwendung kann zum Beispiel eine Tablette oder Kapsel verabreicht werden, zur nasalen Anwendung kann eine Dosieraerosoldosis verabreicht werden, zur transdermalen Anwendung kann eine topische Formulierung oder ein Pflaster verabreicht werden, und zur transmukosalen Übertragung kann ein bukkales Pflaster verabreicht werden. In jedem Fall ist die Dosierung derart, daß der Patient eine einzelne Dosis verabreichen kann.

[0028] Jede Dosierungseinheit zur oralen Verabreichung enthält in geeigneter Weise 0,01 bis 500 mg/kg und

bevorzugt 0,1 bis 50 mg/kg einer Verbindung der Erfindung oder eines pharmazeutisch akzeptablen Salzes davon, berechnet als freie Base. Die tägliche Dosierung für die parenteralen, nasalen, oralen Inhalations-, transmukosalen oder transdermalen Wege enthält in geeigneter Weise 0,01 bis 100 mg/kg einer Verbindung der Erfindung. Eine topische Formulierung enthält in geeigneter Weise 0,01 bis 5,0 % einer Verbindung der Erfindung. Der aktive Bestandteil kann zum Beispiel 1- bis 6-mal pro Tag verabreicht werden, bevorzugt einmal, in ausreichender Menge, um die gewünschte Aktivität zu zeigen, wie es einem Fachmann leicht ersichtlich sein wird.

[0029] Wie hier verwendet schließt die "Behandlung" einer Krankheit die Prävention, Verzögerung und Prophylaxe der Krankheit ein, aber ist nicht darauf beschränkt.

[0030] Krankheiten und Störungen, die auf der Basis von betroffenen Zellen behandelt oder präventiv behandelt werden könnten, schließen knochen- und mineralienbezogene Krankheiten oder Störungen ein; Hypoparathyroidismus; diejenigen des zentralen Nervensystems, wie Lähmungen, Schlaganfall, Schädeltraume, Rückenmarksverletzung, Hypoxie-induzierte Nervenzellschädigung, wie sie beim Herzstillstand oder neonatalen Streß auftreten, Epilepsie, neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer-Krankheit, Huntington-Krankheit und Parkinson-Krankheit, Demenz, Muskelspannung, Depression, Angst, Panikstörung, obsessive Zwangsstörung, posttraumatische Streßstörung, Schizophrenie, neuroleptisches bösartiges Syndrom und Tourette-Syndrom; Krankheiten, die eine übermäßige Wasserreabsorption durch die Niere beinhalten, wie zum Beispiel das Syndrom der unangemessenen ADH-Sekretion (SIADH), Zirrhose, Stauungs Herzinsuffizienz und Nephrose; Hypertonie; Prävention und/oder Verringerung der Nierentoxizität aus kationischen Antibiotika (z.B. Aminoglycosid-Antibiotika); Darmmotilitätsstörungen wie Diarrhoe und Refluxdarm; GI-Geschwürkrankheiten; GI-Krankheiten mit übermäßiger Calciumabsorption wie Sarkoidose; Autoimmunkrankheiten und Organtransplantatabstoßung; Schuppenzellkarzinom und Pankreatitis.

[0031] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die vorliegenden Verbindungen zur Erhöhung von Serumparathormon("PTH")-Spiegeln verwendet. Die Erhöhung von Serum-PTH-Spiegeln kann hilfreich bei der Behandlung von Krankheiten wie Hypoparathyroidismus, Osteosarkom, parodontaler Krankheit, Bruch, Osteoarthritis, rheumatoider Arthritis, Paget-Krankheit, humoraler Hypercalcämie, Malignität und Osteoporose sein.

[0032] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung eines Patienten, das das Verabreichen einer ausreichenden Menge einer vorliegenden Verbindung zur Erhöhung des Serum-PTH-Spiegels an den Patienten umfaßt. Bevorzugt wird das Verfahren durch Verabreichen einer Menge der Verbindung durchgeführt, die wirksam ist, um eine Zunahme der Dauer und/oder Höhe des Serum-PTH-Spiegels zu verursachen, die ausreichend für einen therapeutischen Effekt ist.

[0033] In verschiedenen Ausführungsformen verursacht die an einen Patienten verabreichte Verbindung eine Zunahme von Serum-PTH mit einer Dauer von bis zu einer Stunde, von ca. 1 bis ca. 24 Stunden, von ca. 1 bis ca. 12 Stunden, von ca. 1 bis ca. 6 Stunden, von ca. 1 bis ca. 5 Stunden, von ca. 1 bis ca. 4 Stunden, von ca. 2 bis ca. 5 Stunden, von ca. 2 bis ca. 4 Stunden oder von ca. 3 bis ca. 6 Stunden.

[0034] In einer alternativen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung verursacht die an einen Patienten verabreichte Verbindung eine Zunahme von Serum-PTH mit einer Dauer von mehr als ca. 24 Stunden, vorausgesetzt sie wird mit einem Antiresorptionsmittel koverabreicht.

[0035] In zusätzlichen unterschiedlichen Ausführungsformen verursacht die an einen Patienten verabreichte Verbindung eine Zunahme von Serum-PTH von bis zu 2-mal, 2- bis 5-mal, 5- bis 10-mal und wenigstens 10-mal mehr als der Serum-PTH-Spitzenwert im Patienten. Der Spitzenserumspiegel wird in bezug auf einen Patienten gemessen, der keine Behandlung erfährt.

[0036] Zusammensetzungen der Verbindungen der Erfindung und ihrer pharmazeutisch akzeptablen Salze, die wirksam sind, wenn sie oral verabreicht werden, können als Sirupe, Tabletten, Kapseln und Lutschtabletten formuliert werden. Eine Sirupformulierung wird allgemein aus einer Suspension oder Lösung der Verbindung oder des Salzes in einem flüssigen Träger, zum Beispiel Ethanol, Erdnußöl, Olivenöl, Glycerin oder Wasser, mit einem Geschmacks- oder Farbstoff bestehen. Wenn die Zusammensetzung in Form einer Tablette ist, kann jeder pharmazeutische Träger verwendet werden, der routinemäßig zur Herstellung fester Formulierungen verwendet wird. Beispiele für solche Träger schließen Magnesiumstearat, Kaolin, Talkum, Gelatine, Gummi arabicum, Stearinsäure, Stärke, Lactose und Saccharose ein. Wenn die Zusammensetzung in Form einer Kapsel ist, ist jede routinemäßige Verkapselung geeignet, zum Beispiel unter Verwendung der zuvor genannten Träger

in einer Hartgelatine-Kapselhülle. Wenn die Zusammensetzung in Form einer Weichgelatine-Kapselhülle ist, kann jeder pharmazeutische Träger erwogen werden, der routinemäßig zur Herstellung von Dispersionen oder Suspensionen verwendet wird, zum Beispiel wäßrige Gummen, Cellulosen, Silicate oder Öle, und in einer Weichgelatine-Kapselhülle aufgenommen wird.

[0037] Typische parenterale Zusammensetzungen bestehen aus einer Lösung oder Suspension einer Verbindung oder eines Salzes in einem sterilen wäßrigen oder nicht-wäßrigen Träger, der gegebenenfalls ein parenteral akzeptables Öl enthält, zum Beispiel Polyethylenglykol, Polyvinylpyrrolidon, Lecithin, Erdnußöl oder Sesamöl.

[0038] Typische Zusammensetzungen zur Inhalation sind in Form einer Lösung, Suspension oder Emulsion, die als trockenes Pulver oder in Form eines Aerosols unter Verwendung eines herkömmlichen Treibmittels wie Dichlordifluormethan oder Trichlorfluormethan verabreicht werden kann.

[0039] Eine typische Suppositorienformulierung umfaßt eine Verbindung der Erfindung oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz davon, das wirksam ist, wenn es auf diese Weise verabreicht wird, mit einem Bindemittel und/oder Schmiermittel, zum Beispiel polymeren Glykolen, Gelatinen, Kakaobutter oder anderen niedrigschmelzenden pflanzlichen Wachsen oder Fetten oder ihren synthetischen Analoga.

[0040] Typische dermale und transdermale Formulierungen umfassen einen herkömmlichen wäßrigen oder nicht-wäßrigen Träger, zum Beispiel eine Creme, Salbengrundlage, Lotion oder Paste oder sind in Form eines medizinischen Heilpflasters, eines medizinischen Pflasters oder einer medizinischen Membran.

[0041] Bevorzugt ist die Zusammensetzung in Einheitsarzneiform, zum Beispiel eine Tablette, Kapsel oder ein Dosieraerosol, so daß der Patient eine einzelne Dosis verabreichen kann.

[0042] Keine inakzeptablen toxikologischen Wirkungen werden erwartet, wenn die erfindungsgemäßen Verbindungen in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung verabreicht werden.

[0043] Die biologische Aktivität der Verbindungen der Erfindung wird durch die folgenden Untersuchungen gezeigt:

(I) Calciumrezeptor-Inhibitorassay

[0044] Die calcilytische Aktivität wurde durch Bestimmung des IC_{50} -Wertes der Testverbindung zur Blockierung der Zunahmen von intrazellulärem Ca^{2+} gemessen, die durch extrazelluläres Ca^{2+} in HEK 293 4.0-7-Zellen hervorgerufen werden, die stabil den humanen Calciumrezeptor exprimieren. HEK 293 4.0-7-Zellen wurden wie von Rogers et al. beschrieben konstruiert, J. Bone Miner. Res. 10, Suppl. I: S483, 1995 (hier durch Verweis eingeführt). Intrazelluläre Ca^{2+} -Zunahmen wurden durch Erhöhen von extrazellulärem Ca^{2+} von 1 auf 1,75 mM hervorgerufen. Intrazelluläres Ca^{2+} wurde unter Verwendung von Fluo-3, einem Fluoreszenzcalciumindikator, gemessen.

[0045] Das Verfahren war wie folgt:

1. Zellen wurden in einem T-150-Kolben in Selektionsmedium (DMEM, ergänzt mit 10 % fötalem Rinderserum und 200 µg/ml Hygromycin B) unter 5 % CO_2 :95 % Luft bei 37°C gehalten und bis 90 % Konfluenz kultiviert.
 2. Das Medium wurde abdekantiert, und die Zelleinzelschicht wurde zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), die auf 37°C gehalten wurde, gewaschen. Nach der zweiten Spülung wurden 6 ml 0,02 % EDTA in PBS hinzugegeben, und es wurde für 4 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch vorsichtiges Schütteln dispergiert.
 3. Zellen aus 2 oder 3 Kolben wurden vereinigt und pelletisiert (100 × g). Das Zellpellet wurde in 10–15 ml SPF-PCB+ resuspendiert und erneut durch Zentrifugieren pelletisiert. Dieser Waschvorgang erfolgte zweimal.
- Sulfat- und phosphatfreier Nebenschilddrüsenzellpuffer (SPF-PCB) enthält 20 mM Na-Hepes, pH 7,4, 126 mM NaCl, 5 mM KCl und 1 mM $MgCl_2$. SPF-PCB wurde hergestellt und bei 4°C gelagert. Am Tag der Verwendung wurde SPF-PCB mit 1 mg/ml D-Glucose und 1 mM $CaCl_2$ ergänzt und dann in zwei Fraktionen aufgeteilt. Zu einer Fraktion wurden Rinderserumalbumin (BSA; Fraktion V, ICN) mit 5 mg/ml gegeben (SPF-PCB+). Dieser Puffer wurde zum Waschen, Beladen und Aufrechterhalten der Zellen verwendet. Die BSA-freie Fraktion wurde zur Verdünnung der Zellen in der Küvette für Messungen der Fluoreszenz verwendet.

4. Das Pellet wurde in 10 ml SPF-PCB+, das 2,2 µM Fluo-3 (Molecular Probes) enthielt, resuspendiert und bei Raumtemperatur für 35 Minuten inkubiert.
5. Nach dem Inkubationszeitraum wurden die Zellen durch Zentrifugieren pelletisiert. Das resultierende Pellet wurde mit SPF-PCB+ gewaschen. Nach diesem Waschen wurden die Zellen in SPF-PCB+ mit einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml resuspendiert.
6. Zur Aufzeichnung von Fluoreszenzsignalen wurden 300 µl Zellsuspension in 1,2 ml SPF-Puffer, der 1 mM CaCl_2 und 1 mg/ml D-Glucose enthielt, verdünnt. Die Messungen der Fluoreszenz wurden bei 37°C unter konstantem Rühren unter Verwendung eines Spektrofluorimeters durchgeführt. Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden bei 485 bzw. 535 nm gemessen. Zur Kalibrierung der Fluoreszenzsignale wurde Digitonin (5 mg/ml in Ethanol) hinzugegeben, um F_{max} zu erhalten, und das scheinbare F_{min} wurde durch Zugabe von Tris-EGTA (2,5 M Tris-Base, 0,3 M EGTA) bestimmt. Die Konzentration von intrazellulärem Calcium wurde unter Verwendung der folgenden Gleichung berechnet: Intrazelluläres Calcium = $(F - F_{\text{min}} / F_{\text{max}}) \times K_d$; mit $K_d = 400$ nM.
7. Zur Bestimmung der potentiellen calcilytischen Aktivität von Testverbindungen wurden Zellen mit Testverbindung (oder Träger als Kontrolle) für 90 Sekunden inkubiert, bevor die Konzentration von extrazellulärem Ca^{2+} von 1 auf 2 mM erhöht wurde. Calcilytische Verbindungen wurden durch ihre Fähigkeit zur Blockierung der Erhöhungen der Konzentration von intrazellulärem Ca^{2+} , die durch extrazelluläres Ca^{2+} hervorgerufen wurden, in einer konzentrationsabhängigen Weise detektiert.

[0046] Allgemein sind diejenigen Verbindungen mit niedrigeren IC_{50} -Werten im Calciumrezeptor-Inhibitorassay die bevorzugteren Verbindungen. Verbindungen mit einem IC_{50} -Wert von mehr als 50 µM wurden als inaktiv betrachtet. Bevorzugte Verbindungen sind diejenigen mit einem IC_{50} -Wert von 10 µM oder weniger, besonders bevorzugte Verbindungen haben einen IC_{50} -Wert von 1 µM, und die am meisten bevorzugten Verbindungen haben einen IC_{50} -Wert von 0,1 µM oder darunter.

(II) Calciumrezeptorbindungsassay

[0047] HEK 293 4.0-7-Zellen, die stabil mit dem humanen Nebenschilddrüsen-Calciumrezeptor ("HuPCaR") transfiziert waren, wurden in T180-Gewebekulturkolben versiegelt. Plasmamembran wird durch Polytron-Homogenisierung oder Glasrütteln in Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 3 mM MgCl_2) in Gegenwart eines Proteaseinhibitor-Cocktails erhalten, der 1 µM Leupeptin, 0,04 µM Pepstatin und 1 mM PMSF enthält. Aufgeteilte Membran wurde schockgefroren und bei -80°C gelagert. ^3H -markierte Verbindung wurde auf eine radiospezifische Aktivität von 44 Ci/mmol radiomarkiert und aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff für die radiochemische Stabilität gelagert.

[0048] Eine typische Reaktionsmischung enthält 2 nM ^3H -Verbindung ((R,R)-N-4'-Methoxy-t-3-3'-methyl-1'-ethylphenyl-1-(1-naphthyl)ethylamin) oder ^3H -Verbindung (R)-N-[2-Hydroxy-3-(3-chlor-2-cyanophenoxy)propyl]-1,1-dimethyl-2-(4-methoxyphenyl)ethylamin, 4-10 µg Membran in Homogenisierungspuffer, der 0,1 % Gelatine und 10 % EtOH enthält, in einem Reaktionsvolumen von 0,5 ml. Die Inkubation wird in 12×75 Polyethylenröhrchen in einem Eis-Wasser-Bad durchgeführt. Zu jedem Röhrchen werden 25 µl Testprobe in 100 % EtOH gegeben, gefolgt von 400 µl kaltem Inkubationspuffer und 25 µl 40 nM ^3H -Verbindung in 100 % EtOH auf eine Endkonzentration von 2 nM. Die Bindungsreaktion wird durch Zugabe von 50 µl von 80-200 µg/ml HEK 293 4.0-7-Membran, verdünnt in Inkubationspuffer, gestartet, und man läßt bei 4°C für 30 min inkubieren. Der Waschpuffer ist 50 mM Tris-HCl, das 0,1 % PEI enthält. Die nicht-spezifische Bindung wird durch Zugabe eines 100-fachen Überschusses von unmarkiertem homologem Liganden bestimmt und beträgt allgemein 20 % der Gesamtbindung. Die Bindungsreaktion wird durch schnelle Filtration auf mit 1 % PEI vorbehandelten GF/C-Filtern unter Verwendung eines Brandel Harvestor beendet. Die Filter werden in Szintillationsflüssigkeit gegeben und die Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung bewertet.

[0049] Die folgenden Beispiele sind illustrativ, aber nicht beschränkend für die Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung.

Beispiel 1

Herstellung von (R)-N-[2-Hydroxy-3-(2-cyano-4-(carboethoxyethyl)phenoxy)propyl]-1,1-dimethyl-2-(2-naphthyl)ethylamin

(a) Ethyl-3-(3-cyano-4-hydroxyphenyl)propionat

[0050] Zu 25,2 g (0,13 mmol) Ethyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat in 300 ml trockenem Toluol wurden unter Ar-

gon 12,4 ml (0,052 mol) Tri-n-butylamin gegeben, gefolgt von 1,5 ml (0,013 mol) Zinn(IV)-chlorid. Nach Rühren für 10 min wurden 8,6 g Paraformaldehyd hinzugegeben, und die Reaktion wurde unter Argon für 18 h refluxiert. Die Reaktion wurde abgekühlt und zu einem dunklen Öl aufkonzentriert, das der Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel unter Elution mit 90:10 Hexan:Ethylacetat (V/V) unterworfen wurde. Es wurden 5,3 g Produkt (18,6 %) erhalten. Weitere Elution mit 70:30 Hexan:Ethylacetat (V/V) lieferte 12 g Ausgangsmaterial.

[0051] Zu einer Lösung aus 10 g (0,045 mol) des obigen Aldehyds in 200 ml absolutem Ethanol wurden 6,1 g (0,06 mol) Triethylamin gegeben, gefolgt von 3,48 g (0,05 mol) Hydroxylaminhydrochlorid. Die Reaktion wurde unter Argon für 18 h im Rückfluß gerührt. Die Reaktion wurde aufkonzentriert. Das verbleibende Öl wurde in Ethylacetat gelöst und mit 1N HCl gewaschen. Die Ethylacetatphase wurde getrocknet, filtriert und zu einem Öl aufkonzentriert, das mit 100 ml Essigsäureanhydrid behandelt und unter Argon für 30 min refluxiert wurde. Die Reaktion wurde aufkonzentriert. Das resultierende Öl wurde in Ethylacetat gelöst und mit Wasser gewaschen. Die Ethylacetatschicht wurde getrocknet, filtriert und zu einem Öl aufkonzentriert, das in 200 ml Ethanol gelöst und mit einer Lösung aus 9,54 g Natriumcarbonat (0,09 mol) in 50 ml Wasser behandelt wurde. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 5 h wurde die Mischung mit 3N HCl auf pH 5 neutralisiert und aufkonzentriert. Die resultierende Mischung wurde mit Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatlösung wurde getrocknet, filtriert und zu einem Öl aufkonzentriert, das sich beim Stehen verfestigte: 9,5 g (97 %).

(b) Ethyl-3-(3-cyano-4-(R)-glycidyoxyphenyl)propionat

[0052] Eine Lösung aus 7,7 g (0,035 mol) Ethyl-3-(3-cyano-4-hydroxyphenyl)propionat und 9,1 g (0,035 mol) 2-(R)-Glycidyl-3-nitrobenzolsulfonat in 100 ml trockenem Aceton wurde mit 7,6 g (0,055 mol) Kaliumcarbonat behandelt und unter Argon für 18 h refluxiert. Die Reaktion wurde abgekühlt und filtriert. Das Filtrat wurde aufkonzentriert und durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel unter Elution mit 70:30 Hexan:Ethylacetat gereinigt, um 6 g (62 %) des Epoxids zu liefern.

(c) (R)-N-[2-Hydroxy-3-(2-cyano-4-(2-carboethoxyethyl)phenoxy)propyl]-1,1-dimethyl-2-(2-naphthyl)ethylamin

[0053] Eine Lösung aus 2,69 g (0,0098 mol) des Epoxids und 1,95 g des Amins (0,098 mol) wurde in 75 ml Ethanol unter Argon für 18 h refluxiert. Die Reaktion wurde aufkonzentriert, und der Rückstand wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel unter Elution mit 95:5 Methylenchlorid: Methanol (V:V) gereinigt, um 4,0 g des gewünschten Produkts (86 %) zu liefern.

Beispiel 2

Herstellung von (R)-N-[2-Hydroxy-3-(2-cyano-4-(2-carboxyethyl)phenoxy)propyl]-1,1-dimethyl-2-(2-naphthyl)ethylamin-Natriumsalz

[0054] Zu einer gerührten Lösung aus 100 mg des Ethylesters (0,21 mmol) in 5 ml Ethanol wurde 1 ml 1N Natriumhydroxid (1 mmol) gegeben. Die Mischung wurde für 4 h gerührt und dann aufkonzentriert, mit 0,5 ml Wasser verdünnt und der pH mit 3N Salzsäure auf ca. 4 eingestellt. Die Mischung wurde abdekantiert und das verbleibende Gummi mit 2 ml 1N Chlorwasserstoffsäure in Methanol behandelt und aufkonzentriert. Der Rückstand wurde dann 4-mal aus Ethanol aufkonzentriert. Der resultierende Feststoff wurde mit Ether verrieben, filtriert und unter Vakuum getrocknet, um 60 mg eines weißen Pulvers (64 %) zu ergeben. ES-MS, m/z 446,7 (M+H).

Beispiel 3

Inhalationsmittelformulierung

[0055] Eine Verbindung der Erfindung (1 mg bis 100 mg) wird aus einem Dosierinhalator aerosolisiert, um die gewünschte Menge von Wirkstoff pro Verwendung abzugeben.

Beispiel 4

Tabletten/Bestandteile	pro Tablette
1. Aktiver Bestandteil (Verbindung der Erfindung)	40 mg
2. Maisstärke	20 mg
3. Alginsäure	20 mg
4. Natriumalginat	20 mg
5. Mg-Stearat	13 mg

Verfahren zur Tablettenformulierung

[0056] Die Bestandteile 1, 2, 3 und 4 werden in einem geeigneten Mischer/Mixgerät vermischt. Ausreichend Wasser wird portionsweise zur Mischung unter vorsichtigem Vermischen nach jeder Zugabe gegeben, bis die Masse eine Konsistenz besitzt, die ihre Umwandlung zu nassen Granalien erlaubt. Die feuchte Masse wird zu Granalien durch Hindurchleiten durch einen oszillierenden Granulator unter Verwendung eines Siebs Nr. 8 mesh (2,38 mm) umgewandelt. Die nassen Granalien werden dann in einem Ofen bei 140°F (60°C) bis zur Trockene getrocknet. Die trockenen Granalien werden mit Bestandteil Nr. 5 geschmiert, und die geschmierten Granalien werden auf einer geeigneten Tablettenpresse verpreßt.

Beispiel 5

Parenterale Formulierung

[0057] Eine pharmazeutische Zusammensetzung zur parenteralen Verabreichung wird durch Auflösen einer angemessenen Menge einer Verbindung der Erfindung in Polyethylenglykol unter Erwärmen hergestellt. Diese Lösung wird dann mit Wasser für Injektionen verdünnt (auf 100 ml). Die Lösung wird dann durch Filtration durch ein 0,22 µm Membranfilter steril gemacht und in sterilen Behältern versiegelt.

Patentansprüche

1. Verbindung, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus:
(R)-N-[2-Hydroxy-3-(2-cyano-4-(2-carboethoxyethyl)phenoxy)propyl]-1,1-dimethyl-2-(2-naphthyl)ethylamin;
(R)-N-[2-Hydroxy-3-(2-cyano-4-(2-carboxyethyl)phenoxy)propyl]-1,1-dimethyl-2-(2-naphthyl)ethylamin und pharmazeutisch akzeptablen Salzen und Komplexen davon besteht.
2. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Verwendung in der Behandlung einer Krankheit oder Störung, die durch eine abnormale Knochen- oder Mineralienhomöostase gekennzeichnet ist, welche eine Verbindung gemäß Anspruch 1 und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfaßt.
3. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 1 in der Herstellung eines Medikaments zum Entgegenwirken eines Calciumrezeptors.
4. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 1 in der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Krankheit oder Störung, die durch eine abnormale Knochen- oder Mineralienhomöostase gekennzeichnet ist.
5. Verwendung gemäß Anspruch 4, worin die Knochen- oder Mineralienkrankheit oder -störung aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Osteosarkom, parodontaler Krankheit, Bruchheilung, Osteoarthritis, rheumatoider Arthritis, Paget-Krankheit, humoraler Hypercalcämie, Malignität und Osteoporose besteht.
6. Verwendung gemäß Anspruch 5, worin die Knochen- oder Mineralienkrankheit oder -störung Osteoporose ist.
7. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 1 in der Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung von Serumnebenschilddrüsen spiegeln.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen