

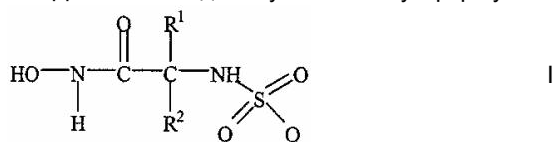
Даний винахід стосується похідних арилсульфоніламіногідроксамових кислот, які є інгібіторами матричних металопротеїназ або продукування фактору некрозу пухлини (TNF), а також які використовуються в лікуванні станів, вибраних з групи, яка складається з артритів, раку, утворення виразок тканини, рестенозу, захворювань періодонту, бульозного епідермолізу, склеритів та інших захворювань, що характеризуються активністю матричних металопротеїназ, ВІЛ, сепсису, септичного шоку та інших захворювань, які включають продукування TNF. Крім того, сполуки, представлені винаходом, можуть бути застосовані в комбінованій терапії із стандартними нестероїдними протизапальними засобами (далі в тексті NSAID'S) та анальгетиками для лікування артритів та в комбінації з цитотоксичними засобами, такими як адриаміцин, дауноміцин, цис-платина, етопозид, таксол, таксофер та алкалоїдами, такими як вінкрістин, у лікуванні раку.

Цей винахід також стосується способів використання цих сполук в лікуванні інших захворювань в ссавців, особливо людей, та до фармацевтичних композицій, придатних для цього використання.

Існує велика кількість ферментів, які призводять до розриву структури білків, та які структурно подібні до металопротеаз. Металопротеїнази, що мають руйнівну матрицю, такого типу як желатиназа, стромелізин та колагеназа, беруть участь в розкладі матриці тканини (наприклад, колапс колагену) та зумовлюють багато патологічних станів, які характеризуються аномальним метаболізмом з'єднувальної тканини та матриці базальної мембрани, таких як артрит (наприклад, остеоартрит та ревматоїдний артрит), утворення виразки тканини (наприклад, рогівкова, епідермальна та шлункові виразки), аномальне загоєння рани, захворювання періодонту, кісткові захворювання (наприклад, хвороба Педжета та остеопороз), метастази пухлини або інвазії, а також ВІЛ-інфекція (J. Leuk. Biol., 52 (2): 244-248, 1992).

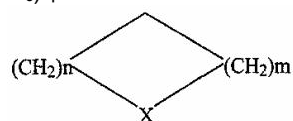
Фактор некрозу пухлини, як визнають, зумовлює ряд інфекційних та аутоімунних захворювань (W. Fiers, FEBS Letters, 1991, 285, 199). Крім того, доведено, що TNF - головний медіатор запальної реакції, що спостерігається при сепсисі та септичному шоку (CE. Spooner та інші, Клінічна Імунологія та Імунопатологія, 1992, 62 S11).

Даний винахід стосується сполук формули



або їх фармацевтично прийнятних солей, де

R^1 та R^2 - кожний незалежно вибраний з (C_1 - C_6)алкілу, трифторметилу, трифторметил(C_1 - C_6)алкілу, (C_1 - C_6)алкіл(дифторметилу), (C_1 - C_3)алкіл(дифторметилу)-(C_1 - C_3)алкілу, (C_6 - C_{10})арилу, (C_2 - C_9)гетероарилу, (C_6 - C_{10})арил(C_1 - C_6)алкілу, (C_2 - C_9)гетероарил(C_1 - C_6)алкілу або R^1 та R^2 взяті разом, можуть утворювати (C_3 - C_6)циклоалкіл або бензо-конденсоване (C_3 - C_6)циклоалکیلне кільце або групу формули



де n та m незалежно дорівнюють 1 або 2 та X - CF_2 , S , O або NR^3 , де R^3 являє собою водень, (C_1 - C_6)алкіл, (C_6 - C_{10})арил, (C_2 - C_9)гетероарил, (C_6 - C_{10})арил (C_1 - C_6)алкіл, (C_2 - C_9)гетероарил(C_1 - C_6)алкіл, (C_1 - C_6)алкілсульфоніл, (C_6 - C_{10})арилсульфоніл або ацил; та

Q являє собою (C_1 - C_6)алкіл, (C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арилокси(C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арил(C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арил(C_6 - C_{10})арил(C_6 - C_{10})алкіл, (C_6 - C_{10})арил(C_2 - C_9)гетероарил, (C_6 - C_{10})арилокси(C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил(C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил(C_6 - C_{10})арил, (C_1 - C_6)алкіл(C_6 - C_{10})арил, (C_1 - C_6)алкокси(C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арил(C_1 - C_6)алкокси(C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арил(C_1 - C_6)алкокси(C_1 - C_6)алкіл, (C_2 - C_9)гетероарилокси(C_6 - C_{10})арил, (C_1 - C_6)алкіл(C_2 - C_9)гетероарил, (C_1 - C_6)алкокси(C_2 - C_9)гетероарил, (C_6 - C_{10})арил(C_1 - C_6)алкокси(C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарилокси(C_2 - C_9)гетероарил, (C_6 - C_{10})арилокси(C_1 - C_6)алкіл, (C_1 - C_6)алкіл(C_6 - C_{10})арилокси(C_6 - C_{10})арил, (C_1 - C_6)алкіл(C_2 - C_9)гетероарилокси(C_6 - C_{10})арил, (C_1 - C_6)алкокси(C_6 - C_{10})арилокси(C_6 - C_{10})арил, (C_1 - C_6)алкокси(C_2 - C_9)гетероарилокси(C_6 - C_{10})арил або (C_1 - C_6)алкокси(C_6 - C_{10})арилокси(C_2 - C_9)гетероарил, де кожна група арилу необов'язково заміщена фтором, хлором, бромом, (C_1 - C_6)алкілом, (C_1 - C_6)алкокси або перфтор(C_1 - C_3)алкілом.

Термін 'алкіл', що застосований тут, якщо не вказано інакше, означає, одновалентні вуглеводневі радикали, що мають прямі, розгалужені або циклічні залишки або їх комбінації.

Термін 'алкокси', що застосований тут, означає О-алکیلні групи, де 'алкіл' визначений вище.

Термін 'арил', що застосований тут, якщо не вказано інакше, означає органічний радикал, що походить від ароматичного вуглеводню відщепленням одного водню, такого як феніл або нафтил, необов'язково заміщеного від 1 до 3 замісниками, вибраних з групи, яка складається з фтору, хлору, трифторметилу, (C_1 - C_6)алкокси, (C_6 - C_{10})арилокси, трифторметокси, дифторметокси та (C_1 - C_6)алкілу.

Термін 'гетероарил', що застосований тут, якщо не вказано інакше, означає органічний радикал, що походить від ароматичної гетероциклічної сполуки відщепленням одного водню, такої як піридил, фурил, піроїл, тієніл, ізотіазоліл, імідазоліл, бензімідазоліл, тетразоліл, піразиніл, піримідил, хіноліл, ізохіноліл, бензофурил, ізобензофурил, бензотієніл, піразоліл, індоліл, ізоіндоліл, пуринил, карбазоліл, ізоксазоліл, тіазоліл, оксазоліл, бензтіазоліл або бензоксазоліл, необов'язково заміщених від 1 до 2 замісниками, вибраними з групи, яка складається з фтору, хлору, трифторметилу, (C_1 - C_6)алкокси, (C_6 - C_{10})арилокси, трифторметокси, дифторметокси та (C_1 - C_6)алкілу/

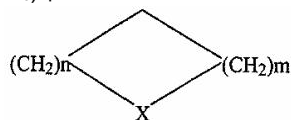
Термін 'ацил', що застосований тут, якщо не вказано інакше, означає вуглеводень загальної формули RCO , де R - алкіл, алкокси, арил, арилалкіл або арилалкілокси, та терміни 'алкіл' або 'арил' як визначені вище.

Термін 'ацилокси', що застосований тут, означає О-ацильні групи, де 'ацил' визначений вище.

Сполука формули I може мати хіральні центри і тому існує в різноманітних енантімерних формах. Цей

винахід стосується усіх оптичних ізомерів та стереоізомерних сполук формули I та їх сумішей.

Переважні сполуки формули I являють собою сполуки, в яких R^1 та R^2 , взяті разом, утворюють (C_3 - C_6)циклоалкіл або бензо-конденсоване (C_3 - C_6)циклоалкільне кільце або групу формули



де n та m незалежно 1 або 2, та X - CF_2 , S, O або NR^3 , де R^3 водень, (C_1 - C_6)алкіл, (C_6 - C_{10})арил, (C_2 - C_9)гетероарил, (C_6 - C_{10})арил(C_1 - C_6)алкіл, (C_2 - C_9)гетероарил(C_1 - C_6)алкіл, (C_1 - C_6)алкілсульфоніл, (C_6 - C_{10})арилсульфоніл або ацил.

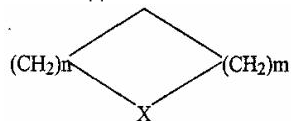
Іншими переважними сполуками формули I є ті, де R^1 та R^2 взяті разом, утворюють (C_3 - C_6)циклоалкіл або бензо-конденсоване (C_3 - C_6)циклоалкільне кільце.

Іншими переважними сполуками формули I є ті, де Q - (C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арил(C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арилокси(C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арилокси(C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил(C_2 - C_9)гетероарил, (C_6 - C_{10})арил(C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил(C_6 - C_{10})арил або (C_2 - C_9)гетероарилокси(C_6 - C_{10})арил.

Іншими переважними сполуками формули I є ті, де Q - (C_6 - C_{10})арилокси(C_6 - C_{10})арил.

Іншими переважними сполуками формули I є ті, де R^1 та R^2 - кожен незалежно (C_6 - C_{10})алкіл.

Більш переважними сполуками формули I є ті, де R^1 та R^2 , взяті разом, утворюють (C_3 - C_6)циклоалкіл або конденсоване з бензолним ядром (C_3 - C_6)циклоалкільне кільце або групу формули



де n та m незалежно 1 або 2, та X - CF_2 , S, O або NR^3 , де R^3 водень, (C_1 - C_6)алкіл, (C_6 - C_{10})арил, (C_2 - C_9)гетероарил, (C_6 - C_{10})арил(C_1 - C_6)алкіл, (C_2 - C_9)гетероарил(C_1 - C_6)алкіл, (C_1 - C_6)алкілсульфоніл, (C_6 - C_{10})арилокси(C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арилокси(C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил(C_2 - C_9)гетероарил, (C_6 - C_{10})арилокси(C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил(C_6 - C_{10})арил або (C_2 - C_9)гетероарилокси(C_6 - C_{10})арил.

Більш переважними сполуками формули I є ті, де R^1 та R^2 , взяті разом, утворюють (C_3 - C_6)циклоалкіл або конденсоване з бензолним ядром (C_3 - C_6)циклоалкільне кільце; та Q - (C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арил(C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арилокси(C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арилокси(C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил(C_2 - C_9)гетероарил, (C_6 - C_{10})арил(C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил(C_6 - C_{10})арил або (C_2 - C_9)гетероарилокси(C_6 - C_{10})арил.

Більш переважними сполуками формули I є ті, де R^1 та R^2 - кожен незалежно являє собою (C_1 - C_6)алкіл; та Q - (C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арил(C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арилокси(C_6 - C_{10})арил, (C_6 - C_{10})арилокси(C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил(C_2 - C_9)гетероарил, (C_6 - C_{10})арил(C_2 - C_9)гетероарил, (C_2 - C_9)гетероарил(C_6 - C_{10})арил або (C_2 - C_9)гетероарилокси(C_6 - C_{10})арил.

Більш переважними сполуками формули I є ті, де R^1 та R^2 - кожен незалежно являє собою (C_1 - C_6)алкіл; та Q - (C_6 - C_{10})арилокси(C_6 - C_{10})арил.

Особливо переважними сполуками формули I є наступні:

гідроксиамід 3-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфоніламіно]азетидин-3-карбонової кислоти;
гідроксиамід 4-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфоніламіно]піперидин-4-карбонової кислоти;
гідроксиамід 1-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфоніламіно]циклопропан-1-карбонової кислоти;
гідроксиамід 1-[4-(4-хлорфенокси)бензолсульфоніламіно]циклопропан-1-карбонової кислоти;
гідроксиамід 1-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфоніламіно]циклобутан-1-карбонової кислоти;
гідроксиамід 1-[4-(4-хлорфенокси)бензолсульфоніламіно]циклобутан-1-карбонової кислоти;
гідроксиамід 1-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфоніламіно]циклопентан-1-карбонової кислоти;
гідроксиамід 1-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфоніламіно]циклогексан-1-карбонової кислоти;
2-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфоніламіно]-N-гідрокси-2-метилпропіонамід;
2-[4-(4-хлорфенокси)бензолсульфоніламіно]-N-гідрокси-2-метилпропіонамід;
N-гідрокси-2-метил-2-(5-піридин-2-ілтіофен-2-сульфоніламіно)пропіонамід;
гідроксиамід 1-(5-піридин-2-ілтіофен-2-сульфоніламіно)циклопентан-1-карбонової кислоти;
гідроксиамід 1-(4'-фторбіфеніл-4-сульфоніламіно)циклопропан-1-карбонової кислоти;
гідроксиамід 1-(4'-фторбіфеніл-4-сульфоніламіно)циклобутан-1-карбонової кислоти;
гідроксиамід 1-(4'-фторбіфеніл-4-сульфоніламіно)циклопентан-1-карбонової кислоти;
гідроксиамід 2-(4-метоксибензолсульфоніламіно)індан-2-карбонової кислоти; та
гідроксиамід 2-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфоніламіно]-індан-2-карбонової кислоти.

Даний винахід також стосується фармацевтичної композиції для (а) лікування станів, вибраних з групи, яка складається з артриту, раку, синергії з цитотоксичними антираковими агентами, утворення виразки тканин, деградаційних плям, рестенозу, захворювань періодонту, бульозного епідермолізу, склеритів, в комбінації з стандартними NSAID'S та анальгезуючими засобами та інших захворювань, що характеризуються активністю матричних металопротеїназ, ВІЛ, сепсису, септичного шоку та інших захворювань, що характеризуються утворенням фактору некрозу пухлини (TNF) або (б) інгібування матричних металопротеїназ або утворення фактору некрозу пухлини (TNF) у ссавців, включаючи людину, яка містить кількість сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі, ефективну при такому лікуванні, та фармацевтично прийнятний носій.

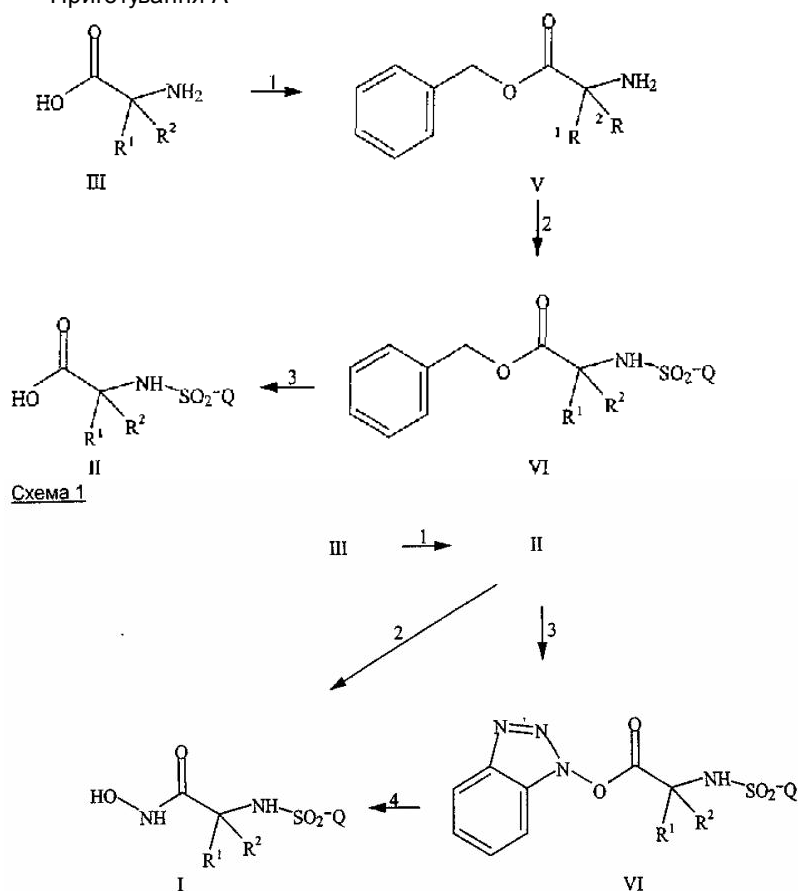
Даний винахід також стосується способу інгібування (а) матричних металопротеїназ або (б) продукування фактору некрозу пухлини (TNF) у ссавців, включаючи людину, який полягає в призначенні вказаному ссавцю ефективної кількості сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі.

Даний винахід також стосується способу лікування станів, вибраних з групи, яка складається з артриту, раку, утворення виразки тканини, макулярної деградації, рестенозу, захворювань періодонту, бульозного

епідермолізу, склеритів, сполуки формули I можуть бути застосовані в комбінації з стандартними NSAID'S та анальгезуючими засобами та в комбінації з цитотоксичними антираковими агентами, та інших хвороб, що характеризуються активністю матричних металопротеїназ, ВІЛ, сепсису, септичного шоку та інших хвороб, що беруть участь в утворенні фактору некрозу пухлини (TNF) в ссавців, включаючи людину, який полягає в призначенні вказаному ссавцю кількості сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі, ефективною при лікуванні таких станів.

Наступні схеми реакцій пояснюють одержання сполук даного винаходу. Якщо не вказано інакше, R^1 , R^2 та Q в схемах реакцій та в наступному обговоренні, є такими як визначено вище.

Приготування A



В реакції 1 Приготування A, амінокислота формули III реагує з бензиловим спиртом та кислотою формули HX, де X переважно 4-толуолсульфонат, в інертному розчиннику, типу бензолу або толуолу (толуол переважніше) для одержання відповідної солі ефіру бензилової кислоти формули V, реакція зазвичай виконується в інтервалі часу між приблизно 1 годиною до приблизно 24 годин, при температурі кипіння застосованого розчинника. Вода, яка утворюється під час процесу реакції, зазвичай збирається в пастці Діна-Старка.

В реакції 2 Приготування A, сполука формули V перетворюється до відповідної сполуки формули VI, взаємодією V з реакційноздатною функціональною похідною сульфенової кислоти (QSO_2OH), типу сульфонілхлориду (QSO_2Cl), в присутності основи, типу гідроксиду натрію або триетиламіну, та розчинника, типу метиленхлориду, тетрагідрофурану, діоксану, води або ацетонітрилу, переважно суміші діоксану та води. Реакційну суміш перемішували при температурі між приблизно $0^\circ C$ до приблизно $50^\circ C$, переважно при кімнатній температурі, в інтервалі часу між приблизно 10 хвилин до приблизно 2 днів, переважно приблизно 60 хвилин.

В реакції 3 Приготування A, проміжні сполуки формули VI - гідрогенолізують, для одержання проміжних сполук формули II. Реакцію проводять в розчиннику, типу етанолу, в атмосфері азоту (переважно при тиску 3 атмосфери) з використанням каталізатору такого як 10% паладій-на-активованому вуглі. Реакційну суміш зазвичай перемішують при кімнатній температурі в інтервалі часу між приблизно 30 хвилин до приблизно 24 годин, переважно приблизно 1,5 години.

В реакції 1 з Схеми 1, амінокислотну сполуку формули III перетворюють у відповідну сполуку формули II взаємодією III з реакційноздатною функціональною похідною сульфенової кислоти формули QSO_2OH , де Q є такою, як зазначено вище, такою як сульфонілхлорид (QSO_2Cl), в присутності основи, такого як гідроксиду натрію або триетиламіну, та полярного розчинника такого як тетрагідрофуран, діоксан, вода або ацетонітрil, переважно в суміші діоксану та води. Реакційну суміш перемішували при температурі між приблизно $0^\circ C$ до приблизно $50^\circ C$, переважно при кімнатній температурі, в інтервалі часу між 10 хвилинами до приблизно 2 днів, переважно приблизно 60 хвилин.

В реакції 2 з Схеми 1, карбонову кислоту формули II перетворюють до гідроксамової кислоти формули I, обробкою II за допомогою 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодіміду та 1-гідроксибензотриазолу в полярному розчиннику, такому як N,N-диметилформамід, з наступним додаванням гідроксиламіну до реакційної суміші в інтервалі часу між приблизно 15 хвилин до приблизно 1 години, переважно приблизно 30 хвилин. Гідроксиламін переважно утворюється *in situ* з солі, такої як хлорідат гідроксиламіну, в присутності основи, типу триетиламіну. Альтернативно, замість гідроксиламіну або солі гідроксиламіну

можуть бути застосовані захищена похідна гідроксиламіну або її сіль, в яких гідроксильна група захищена трет-бутилом, бензилом, алілом або 2-триметилсілілетиловим ефіром. Видалення гідроксил-захисної групи проводять шляхом гідрогенолізу для бензил-захисної групи (5% паладій-на-сульфаті барію є переважним каталізатором) або обробкою сильною кислотою, такою як трифтороцтова кислота, для трет-бутильної захисної групи. Алільна захисна група може бути видалена обробкою трибутилтінідридом та оцтовою кислотою в присутності каталітичної кількості біс(трифенілфосфін)паладій (II) хлориду. 2-Триметилсілілетиловий ефір може бути видалений обробкою сильною кислотою такою як трифтороцтова кислота або взаємодією з джерелом фтору, таким як ефірат трифтористого бору. Реакція сполуки II з гідроксиламіном, сіллю гідроксиламіну, захищеною похідною гідроксиламіну або сіллю захищеної похідної гідроксиламіну може також бути проведена в присутності (бензтриазол-1-ілокси)трис(диметиламіно)фосфонійгексафторфосфату та основи, такої як триетиламін, в інертному розчиннику, такому як метиленхлорид. Реакційна суміш перемішується при температурі між приблизно 0°C до приблизно 50°C, переважно при кімнатній температурі, в інтервалі часу між приблизно 1 година до приблизно 3 днів, переважно приблизно 1 день. Переважним процесом для перетворення сполуки II в сполуку I є взаємодія II з О-бензилгідроксиламін-гідрохлоридом в присутності гексафторфосфату (бензтриазол-1-ілокси)трис(диметиламіно)фосфонію та триетиламіну з використанням метиленхлориду як розчинника. Наступне видалення захисної групи О-бензилу для утворення сполуки формули I проводять шляхом гідрогенолізу під тиском 3 атмосфери при кімнатній температурі, використовуючи як каталізатор 5% паладій-на-сульфаті барію. Переважним розчинником є метанол. Час реакції може мінятися від приблизно 1 години до приблизно 5 годин (3,5 годин переважно).

В певних випадках переважно одержувати сполуки формули I реакцією гідроксиламіну, солі гідроксиламіну, захищеної похідної гідроксиламіну або солі захищеної похідної гідроксиламіну з активним ефіром формули IV, як показано в реакції 3 схеми 1. Реакцію проводять в інертному розчиннику, такому як N,N-диметилформамід при температурі в межах від приблизно кімнатної температури до приблизно 80°C, переважно приблизно 60°C в інтервалі часу приблизно 1 година до приблизно 2 днів. Якщо використовується захищена похідна гідроксиламіну або солі захищеної похідної гідроксиламіну, видалення захисної групи виконують як описано вище. Активну ефірну похідну формули IV одержують обробкою сполуки формули II з (бензтриазол-1-ілокси)трис(диметиламіно)фосфоній гексофторфосфатом та основою, такою як триетиламін, в інертному розчиннику, такому як хлористий метилен (Реакція 4, схема 1). Реакційну суміш перемішують при температурі між приблизно 0°C до приблизно 50°C, переважно при кімнатній температурі, в інтервалі часу між приблизно 1 година до приблизно 3 днів, переважно приблизно 1 день.

Фармацевтично прийнятні солі кислих сполук винаходу це солі, які утворені основами, а саме, катіонні солі, такі як солі лужних та лужноземельних металів, таких як натрій, літій, калій, кальцій, магній, а також амонійні солі, такі як солі амонію, триметиламонію, диметиламонію, та сіль трис(гідроксиметил)метиламонію.

Аналогічно солі приєднання кислот, таких як мінеральні кислоти, органічні карбонові та органічні сульфонові кислоти, наприклад соляна кислота, метансульфонова кислота, малеїнова кислота, також можуть містити основні групи, такі як піридил, що складають частину структури.

Здатність сполук формули I або їх фармацевтично прийнятних солей (в подальшому також згаданих як сполуки даного винаходу) інгібувати матричні металопротеїнази або утворення фактору некрозу пухлини (TNF) та, відповідно, проявляти їх ефективність для лікування захворювань, що характеризуються матричними металопротеїназами або утворенням фактору некрозу пухлини, підтверджується наступними виконаними *in vitro* тестами.

Біологічні тести

Інгібування Людської Колагенази (MMP-1)

Людську рекомбінантну колагеназу активували трипсином, використовуючи наступне співвідношення: 10мкг трипсину в 100мкг колагенази. Трипсин та колагеназу культивували при кімнатній температурі на протязі 10 хвилин, потім додавали п'ятикратний надлишок сполуки (50мкг/10мкг трипсині) інгібітора трипсину сої.

Готували 10мМ вихідних розчинів інгібіторів в диметилсульфоксиді та потім розбавляли, використовуючи наступну схему:

10мМ→120мкМ→12мкМ→1,2мкМ→0,12мкМ

Двадцять п'ять мікролітрів кожної концентрації вносили у відповідні лунки 96-лункової мікрофторованої кювети в трьох серіях. Після додавання ензиму та субстрату кінцева концентрація інгібітора буде 1:4 розведення. Позитивні контрольні тести (ензим, без інгібітору) здійснювали в лунках D1-D6 та тести порівняння (без ензиму, без інгібітору) проводили в лунках D7-D12.

Колагеназу розбавляли до 400нг/мл і потім додавали 25мкл до відповідних лунок мікрофторної кювети. Кінцева концентрація колагенази в випробуванні - 100нг/мл.

Субстрат (DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(NMA)-NH₂) одержували як 5мМ напівпродукт в диметилсульфоксиді та потім розбавляли до 20мкМ в буфері випробування. Тест починали додаванням 50мкл субстрату в лунку мікрофторної кювети, до кінцевої концентрації 10мкМ.

Флуоресцентні дані (360нм збудження, 460нм випромінювання) були отримані на початку відліку часу і потім з 20-хвилинними інтервалами. Випробування проводили при кімнатній температурі з типовим часом випробування 3 години.

Графік флуоресценції від часу будували як для порівняльного зразка так і для зразків, що містили колагеназу (дані трикратно вимірювань усереднювали). Точку часу, яка забезпечує хороший сигнал (порівняльна) та точку, що знаходиться на лінійній частині кривої (зазвичай біля 120 хвилин), вибирали так, щоб визначити значення IC₅₀. Нульовий час використовували як порівняльний для кожної сполуки при кожній концентрації, та ці значення віднімали від 120 хвилинних даних. Результати будували як залежність концентрації інгібітору від % контролю (флуоресценція інгібітору поділена на флуоресценцію самої колагенази x 100). IC₅₀ визначали з концентрації інгібітору, яка дає сигнал, який є 50% від контролю.

Якщо було встановлено, що IC₅₀<0,03мкМ, то інгібітори випробовували на концентраціях 0,3мкМ, 0,03мкМ, 0,03мкМ та 0,003мкМ.

Інгібування Желатинази (MMP-2)

Інгібування активності желатинази випробували з використанням Dnp-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(NMA)-NH₂ субстрату (10мкМ) при таких же умовах, як інгібування людської колагенази (MMP-1).

72кД желатинази активували за допомогою 1мМ АРМА (р-амінофенілацетату ртуті) на протязі 15 годин при 4°C та розбавляли, щоб одержати кінцеву концентрацію в випробуванні 100мг/мл. Інгібітори розбавляли як для інгібування людської колагенази (MMP-1) щоб забезпечити кінцеві концентрації в випробуванні 30мкМ, 3мкМ, 0,3мкМ та 0,03мкМ. Кожна концентрація виконана в трьох серіях.

Флуоресцентні дані (360нм збудження, 460нм випромінювання) беруться на початку відліку часу та потім через 20 хвилинні інтервали на протязі 4 годин.

IC₅₀ визначають як для інгібування людської колагенази (MMP-1). Якщо встановлено, що IC₅₀ є меншим, ніж 0,03мкМ, то інгібітори випробовуються в кінцевих концентраціях 0,3мкМ, 0,03мкМ, 0,003мкМ та 0,003мкМ.

Інгібування активності Стромелізіну (MMP-3)

Інгібування активності стромелізіну засноване на модифікованому спектрофотометричному тесті, описаному Weingarten та Feder (Weingarten, H. and Feder, J., Spectrophotometric Assay for Vertebrate Collagenase, Anal. Biochem. 147. 437-440 (1985)). Гідроліз тіапетолідсубстрату [Ac-Pro-Leu-Gly-SCH [CH₂ CH(CH₃)₂]CO-Leu-Gly-OC₂H₅] дає фрагмент меркаптану, який може бути перевірений в присутності реактиву Ellman's.

Людський рекомбінантний простромелізін активують трипсином з використанням співвідношення 1мкл 10мг/мл напівпродукту трипсину на 26мг стромелізіну. Трипсин та стромелізін культивують при 37°C на протязі 15 хвилин, з наступним культивуванням з 10мкл 10мг/мл інгібітору трипсину сої на протязі 10 хвилин при 37°C для пригнічення активності трипсину.

Випробування проводять при загальному об'ємі 250мкл випробувального буферу (200мМ хлориду натрію, 50мМ MES та 10мМ хлориду кальцію, pH 6,0) в мікролітрових пластинах з 96 лунками. Активованій стромелізіну розбавляють в буфері випробування до 25мкг/мл. Реактив Елмана (3-карбокси-4-нітрофенілдисульфід) готують як вихідний продукт 1М в диметилформаміді та розводять до 5мМ в буфері випробування з 50мкл виходу в кінцевій концентрації 1мМ.

10мМ базові розчини інгібіторів одержують в диметилсульфоксиді і розбавляють послідовно в буфері випробування таким чином, щоб додавання 50мкл до відповідних лунок приводить до кінцевих концентрацій 3мкМ, 0,3мкМ, 0,003мкМ, та 0,0003мкМ. Всі стадії зроблені тричі.

300мМ вихідного розчину пептидного субстрату в диметилсульфоксиді розбавляють до 15мМ в випробувальному буфері та випробування починають додаванням 50мкл до кожної лунки, щоб забезпечити кінцеву концентрацію субстрату 3мМ. Порівняльні лунки містять субстрат пептиду та реактив Елмана без ензиму. Утворення продукту було перевірено при 405нм за допомогою Molecular Devices UVmax plate reader.

IC₅₀ значення були визначені тим же самим способом, що і для колагенази.

Інгібування MMP-13

Людський рекомбінантний MMP-13 активують 2мМ АРМА (р-амінофеніл ацетат ртуті) на протязі 1,5 годин, при 37°C та розбавляють до 400мг/мл в випробувальному буфері (Трис 50мМ, pH 7,5, 200мМ хлориду натрію, 5мМ хлориду кальцію, 20мМ хлориду цинку, 0,02% brj). Двадцять п'ять мікролітрів розбавленого ензиму додають в кожну лунку 96-лункової мікрофторованої кювети. Ензим потім розбавляють у співвідношенні 1:4 в випробуванні додаванням інгібітора та субстрату, щоб забезпечити кінцеву концентрацію в випробуванні 100мг/мл.

Вихідні розчини 10мМ інгібіторів одержують в диметилсульфоксиді та потім розбавляють в буфері випробування відповідно до схеми розбавлень інгібітора при інгібуванні людської колагенази (MMP-1): Двадцять п'ять мікролітрів кожної концентрації додають у трьох серіях до мікрофторованої кювети. Кінцеві концентрації в випробуванні - 30мкМ, 3мкМ, 0,3мкМ та 0,03мкМ.

Субстрат (Dnp-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(NMA)-NH₂) готують як інгібітор людської колагенази (MMP-1) та 50мкл додають до кожної лунки, щоб забезпечити кінцеву концентрацію у випробуванні 10мкМ. Флуоресцентні дані (360нм збудження; 460нм випромінювання) взяті на початку відліку часу та через кожні 5 хвилин на протязі 1 години.

Позитивні контрольні лунки містять ензим та субстрат без інгібітору та порівняльні лунки містять лише субстрат.

IC₅₀ визначають як для інгібування людської колагенази (MMP-1). Якщо встановлено, що IC₅₀ є меншим ніж 0,03мкМ, то інгібітори випробовують при кінцевих концентраціях 0,3мкМ, 0,03мкМ, 0,003мкМ та 0,0003мкМ.

Інгібування TNF Продуктів

Здатність сполук або їх фармацевтично прийнятних солей інгібувати утворення TNF та, відповідно, проявляти їх ефективність при лікуванні захворювань, що зумовлюються утворенням TNF, ілюструється наступними випробуваннями *in vitro*.

Людські мононуклеофільні клітини були виділені з анти-коагульованої людської крові, використовуючи одностадійну Ficoll-huраque методику розділення. (2) Мононуклеофільні клітини тричі промивали, три рази в збалансованому солевому розчині Хенкса (HBSS) з двовалентними катіонами та повторно суспендували до щільності 2x10⁶/мл в HBSS, що містить 1% BSA. Диференційні індекси, визначені з використанням Abbott Cell Dyn 3500 аналізатора, показали, що моноцити містяться в кількості від 17 до 24% від загальної кількості клітин в цих приготуваннях.

Аліквота 180мкл суспензії клітин була вміщена на дно 96-лункової кювети (Costar). Додаванням сполук та LPS (100нг/мл кінцева концентрація) доводили кінцевий об'єм до 200мкл. Всі стадії виконували тричі. Після 4-х годинної інкубації при 37°C в зволоженому CO₂ інкубаторі, кювети видаляли та піддавали центрифугуванню (10 хвилин при приблизно 250хg), надосадову рідину видаляли та випробували на TNF, використовуючи R&D ELISA набір.

Для призначення ссавцям, включаючи людей, для інгібування матричних металопротеїназ або утворення фактору некрозу пухлини (TNF), можуть бути застосовані різні способи, включаючи пероральний, парентеральний та місцевий. Взагалі, активна сполука буде призначатися перорально або парентерально в

дозах між приблизно 0,1 та 25мг/кг ваги тіла пацієнтів на добу, переважно від приблизно від 0,3 до 5мг/кг. Однак, деякі варіації в дозуваннях обов'язково відбудуться в залежності від станів пацієнтів. Людина відповідальна за призначення, в будь-якому випадку, визначить відповідну дозу для пацієнта.

Сполуки даного винаходу можуть призначатися в широкій різновидності дозованих форм, загалом терапевтично ефективні сполуки цього винаходу присутні в таких дозованих формах в концентраціях, що лежать в межах від приблизно 5,0ваг.% до приблизно 70ваг.%.

Для перорального прийому, таблетки, що містять різноманітні ексципієнти, типу мікрокристалічної целюлози, лимоннокислого натрію, вуглекислого кальцію, дикальційфосфату та гліцину, можуть використовуватися разом з різноманітними дезінтеграторами, такими як крохмаль (переважно кукурудзяний, картопляний або крохмаль тапіоки), альгінова кислота та деякі комплексні силікати, разом з гранулюючим зв'язуючим типу полівінілпірролідону, цукрози, желатину та акації. Додатково, змашувальні агенти, такі як стеарат магнію, натрій лаурилсульфат та тальк, часто дуже корисні для цілей таблетування. Тверді композиції подібного типу можуть також бути використані як наповнювачі в желатинових капсулах; переважними матеріалами для цього є лактоза або молочний цукор, а також високомолекулярні поліетиленгліколи. Коли для перорального прийому бажані водні суспензії та/або еліксири, активний інгредієнт може бути поєднаний з різноманітними підсолоджувачами або засобами, що надають смак, забарвлюючими агентами або барвниками та, якщо бажано, емульгаторами та/або суспензуючими агентами, а також разом з такими розчинниками, як вода, етанол, пропіленгліколь, гліцерин та різні подібні розчинники або їх комбінації. У випадку тварин, вони переважно містяться в кормі або питній воді в концентрації 5-5000м.ч, переважно від 25 до 5000м.ч.

Для парентерального призначення (внутрішньом'язове, внутрішньочеревне, підшкірне та внутрішньовенне використання) зазвичай готують стерильний розчин активного інгредієнту для ін'єкцій. Розчини терапевтичних сполук даного винаходу можуть застосовуватися або в кунжутному або арахісовому маслі або в водному пропіленгліколі. Водні розчини повинні відповідно регулюватися та буферизуватися, переважно з рН більшим, ніж 8, якщо необхідно, та рідкий розчинник спочатку роблять ізотонічним. Ці водні розчини придатні для внутрішньовенних ін'єкцій. Масляні розчини придатні для внутрішньоротового, внутрішньом'язового та підшкірного ін'єкційного застосування. Приготування всіх цих розчинів в стерильних умовах легко виконується стандартними фармацевтичними методами, відомими фахівцю в даній галузі. У випадку тварин сполуки можуть бути призначені внутрішньом'язово або підшкірно у дозах приблизно від 0,1 до 50мг/кг/день, переважно від 0,2 до 10мг/кг/день, введених в одиничній дозі або розділених на 3 дози.

Даний винахід ілюструється наступними прикладами, але не обмежується ними.

Приготування А

4-(4-фторфенокси)бензолсульфонілхлорид

Хлорсульфонова кислота (26мл, 0,392моля) додавали по краплям до охолодженого льодом 4-фторфеноксибензолу (36,9 грамів, 0,196моля) при механічному перемішуванні. Коли додавання було закінчене, суміш перемішували при кімнатній температурі на протязі 4 годин. Суміш виливали в крижану воду. Продукт, 4-(4-фторфенокси)бензолсульфонілхлорид (18,6 грамів, 33%) був зібраний фільтрацією та висушений на повітрі.

Приготування В

4-(3-метилбутокси)бензолсульфонат натрію

Розчин 4-гідроксибензолсульфонові кислоти (10,0 грамів, 43,1ммоля) та гідроксиду натрію (3,3 грама, 83ммоля) у воді (40мл) змішували з розчином 1-йодо-3-метилбутану (11,3мл, 86,4ммоля) в ізопропанолі (60мл) та одержану суміш кип'ятили на протязі 2 днів. Ізопропанол був видалений випаровуванням під вакуумом. Названа у заголовку сполука, 10,0 грамів (87%) була зібрана фільтрацією та промита ізопропанолом.

Приготування С

4-(3-метилбутокси)бензолсульфонілхлорид

Суміш 4-(3-метилбутокси)бензолсульфонілхлориду натрію (2,5 грама, 9,4ммоля), тіонилхлориду (10мл), та 5 крапель N,N-диметилформаміду кип'ятили на протязі 5 годин. Після охолодження, надлишок тіонилхлориду випарювали, та залишок екстрагували етилацетатом. Розчин охолоджували в бані з льодом та додавали воду. Органічну фазу відокремлювали та промивали водою та насиченим розчином хлориду натрію. Після сушки сульфатом натрію, розчинник випарювали з одержанням названої сполуки у вигляді масла, 2,34 грама (95%).

Приготування D

4-(2-циклопентилетокси)бензолсульфонат натрію

Розчин 4-гідроксибензолсульфонові кислоти (6,5 грамів, 28,2ммоля) та гідроксиду натрію (2,2 грама, 66ммоля) у воді (16мл) змішували з розчином 2-(брометил)циклопентаном (15,0 грамів, 84,7ммоля) в ізопропанолі (40мл) та одержану суміш кип'ятили на протязі 2 днів. Ізопропанол був видалений випаровуванням під вакуумом. Названа у заголовку сполука 4,7 грама (57%) була зібрана фільтрацією та промита ізопропанолом.

Приготування Е

4-(3-Метилбутокси)бензолсульфонілхлорид

Суміш 4-(2-циклопентилетокси)бензолсульфонату натрію (2,5 грама, 8,6ммоля), тіонилхлориду (15мл) та декілька крапель N,N-диметилформаміду кип'ятили на протязі 5 годин. Після охолодження надлишок тіонилхлориду випарювали та залишок екстрагували в етилацетаті. Розчин охолоджували в бані з льодом та була додавали воду. Органічну фазу відокремлювали промивали водою та насиченим розчином хлориду натрію. Після висушування над сульфатом натрію, розчинник випарювали, одержуючи названу у заголовку сполуку у вигляді масла, 2,24 грама (90%).

Приготування F

4'-фторбіфенилсульфонілхлорид

Хлорсульфову кислоту (8,7мл, 0,13моля) додавали по краплям до 4-фторбіфенілу (10,2 грамів, 69ммоля) при перемішуванні в бані з льодом. Перемішування продовжували при охолодженні на протязі 0,5 годин та потім реакційну суміш виливали на лід. Одержаний білий осад був зібраний фільтрацією та

розчинений в хлороформі. Хлороформний розчин промивали водою та насиченим розчином хлориду натрію, висушували над сульфатом магнію та концентрували з одержати білої твердої речовини. Цільовий продукт, 4'-фторбіфенілсульфонілхлорид (4,3 грама, 27%), відокремлювали від 4'-фторбіфенілсульфонові кислоти (небажаного побічного продукту) кристалізацією останнього з етилацетату та кристалізацією залишку з гексану.

Приготування G

4-(4-фторбензилокси)бензолсульфонат натрію

До розчину 4-гідроксибензолсульфонові кислоти додають (5,13 грамів, 22,1ммоль) в 1N водному розчині гідроксиду натрію (23мл) додавали розчин 4-фторбензилброміду (3,3мл, 26,5ммоль) в етанолі (20мл). Одержану суміш кип'ятили на протязі 2 днів. При стоянні при постійному охолодженні осаджувалась біла тверда речовина. Осаджений продукт, 4-(4-фторбензилокси)бензолсульфонат натрію, 4,95 грама (74%) був зібраний фільтрацією та промитий етилацетатом та діетиловим ефіром.

Приготування H

4-(фторбензилокси)бензолсульфонілхлорид

До суспензії 4-(4-фторбензилокси)бензолсульфонату натрію (0,5 грамів, 1,64ммоль) в метиленхлориді (5мл) додавали п'ятихлористий фосфор (275мг, 1,31ммоль). Одержану суміш кип'ятили на протязі 7 годин. Після охолодження в бані з льодом та заливання водою (15мл) суміш екстрагували етилацетатом. Органічну фазу промивали насиченим розчином хлориду натрію, висушували над сульфатом натрію та концентрували з одержанням 4-(4-фторбензилокси)бензолсульфонілхлориду у вигляді твердої речовини білого кольору (130мг, 26%).

Приготування I

4-(4-хлорфенокси)бензолсульфонілхлорид

Хлорсульфонову кислоту (9,7мл, 0,147ммоль) додавали по краплям до 4-хлорфеноксибензолу (12,6мл, 73,4ммоль) при кімнатній температурі при перемішуванні. Коли додавання було закінчене, суміш перемішували при кімнатній температурі на протязі 1 години та потім виливали у льодяну воду. Тверду речовину було зібрано фільтрацією, висушено на повітрі та перекристалізовано з петролейного ефіру та етилацетату з одержанням 4-(4-хлорфенокси)бензолсульфонілхлориду (7,43 грамів, 33%).

Приклад 1

1-(4-метоксибензолсульфоніламіно)циклопентан-1-карбонової кислоти гідроксиамід

(А) До розчину 1-аміноциклопентан-1-карбонової кислоти (6,0 грамів, 46,5ммоль) та триетиламіну (14мл, 100ммоль) в діоксані (90мл) та воді (90мл) додавали 4-метоксибензолсульфонілхлорид (10,6 грамів, 51,3ммоль). Одержану суміш перемішували при кімнатній температурі на протязі 4 годин, підкислювали розчином 1N водним розчином соляної кислоти та двічі екстрагували етилацетатом. Об'єднані етилацетатні екстракти промивали розчином хлориду натрію, висушували над сульфатом магнію та концентрували, одержуючи тверду рудувато-коричневу речовину, яку потім розтирали з хлороформом з одержанням 1-(4-метоксибензолсульфоніламіно)циклопентан-1-карбонової кислоти у вигляді білої твердої речовини, 5,42 грамів (39%).

(В) До розчину 1-(4-метоксибензолсульфоніламіно)циклопентан-1-карбонової кислоти (4,65 грама, 15,2ммоль) та триетиламіну (2,6мл, 17,9ммоль) в метиленхлориді (120мл) додавали (бензотриазол-1-ілокси)трис(диметиламіно)фосфонійгексафторфосфат (7,4 грамів, 16,3ммоль). Одержану суміш перемішували при кімнатній температурі на протязі 2,5 днів. Розчинник випарювали та залишок екстрагували в етилацетаті. Розчин послідовно промивали 0,5N водним розчином соляної кислоти, водою та насиченим розчином хлоридом натрію. Після сушки над сульфатом магнію, розчинник випарювали з одержанням бензотриазол-1-ілового ефіру 1-(4-метоксибензолсульфоніламіно)циклопентанкарбонової кислоти у вигляді жовтої твердої речовини. Одержану речовину розчиняли в N,N-диметилформаміді (120мл) і до одержаного розчину додавали діізопропілетиламін (5,3мл, 30ммоль) та гідрохлорид О-бензилгідроксиламіну (3,2 грама, 20ммоль). Суміш нагрівали в масляній бані до 50°C на протязі 20 годин. Розчинник випарювали та додавали етилацетат. Суміш була фільтрували, збираючи білу тверду речовину. Фільтрат промивали послідовно 0,5N водним розчином соляної кислоти, водним насиченим розчином бікарбонату натрію та насиченим розчином хлориду натрію. Після випарювання розчинника одержували тверду речовину, яку поєднували з речовиною, одержаною фільтруванням, и розтирали з етилацетатом з одержанням бензілоксиаміду 1-(4-метоксибензолсульфоніламіно)-циклопентан-1-карбонової кислоти у вигляді білої твердої речовини, 2,82 грама (47%).

(С) Розчин бензілоксиаміду 1-(4-метоксибензолсульфоніламіно)циклопентан-1-карбонової кислоти (1,50 грам, 3,71ммоль) в метанолі (200мл) обробляли 5% паладієм-на-сульфаті барію (0,75 грамів) та гідрували при тиску 3 атмосфери на протязі 3,5 годин в Рагг шейкері. Каталізатор видаляли пропусканням крізь 0,45мкм нейлоновий фільтр і фільтрат концентрували з одержанням гідроксиаміду 1-(4-метоксибензолсульфоніламіно)-циклопентан-1-карбонової кислоти у вигляді білої твердої речовини, 1,13 грам (97%). МС: 313 (М-1).

Названі в заголовках сполуки прикладів 2-8 були одержані методом, аналогічним описаному в прикладі 1, використовуючи вказані реактиви.

Приклад 2

1-(4-метоксибензолсульфоніламіно)циклогексан-1-карбонової кислоти гідроксиамід.

1-Аміноциклогексан-1-карбонова кислота; 4-метоксибензолсульфонілхлорид. МС:327 (М-1).

Приклад 3

1-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфоніламіно]циклопентан-1-карбонової кислоти гідроксиамід

1-аміноциклопентан-1-карбонова кислота; 4-(4-фторфенокси)бензолсульфонілхлорид. МС: 393 (М-1).

Аналіз, розраховано для C₁₈H₁₉FN₂O₅S.0,25H₂O: С 54,19, Н 4,93, N 7,02. Одержано: С 54,20, Н 5,13, N 7,08.

Приклад 4

1-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфоніламіно]циклогексан-1-карбонової кислоти гідроксиамід

1-аміноциклогексан-1-карбонова кислота; 4-(4-фторфенокси)бензолсульфонілхлорид.

Перекристалізований з хлороформу, температура плавлення: 174°C; МС: 407 (М-1).

Приклад 5

1-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфоніламіно]циклопропан-1-карбонової кислоти гідроксиамід.

1-аміноциклопропан-1-карбонова кислота; 4-(4-фторфенокси)бензолсульфонілхлорид; температура плавлення: 184°C; МС 365 (M-1); Аналіз, розраховано для $C_{16}H_{15}FN_2O_5S$: С 52,45, Н 4,13, N 7,65. Одержано: С 52,20, Н 4,34, N 7,44.

Приклад 6

1-(4'-фторбіфеніл-4-сульфоніламіно)циклопентан-1-карбонової кислоти гідроксиамід

1-аміноциклопентан-1-карбонова кислота; 4'-фторбіфенілсульфонілхлорид. Перекристалізований з хлороформу. Температура плавлення 159°C; МС: 377 (M-1).

Приклад 7

1-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфоніламіно]циклобутан-1-карбонової кислоти гідроксиамід

1-аміноциклобутан-1-карбонова кислота; 4-(фторфенокси)бензолсульфонілхлорид. МС: 379 (M-1).

Приклад 8

1-[4-(4-фторбензилокси)бензолсульфоніламіно]циклопропанкарбонової кислоти гідроксиамід.

1-аміноциклопропан-1-карбонова кислота; 4-(4-фторбензилокси)бензолсульфонілхлорид. МС: 379 (M-1).

Приклад 9

N-гідрокси-2-(4-метоксибензолсульфоніламіно)-2-метилпропіонамід

(А) Розчин гідрохлориду бензилового ефіру 2-аміно-2-метилпропіонової кислоти (12,0 грамів, 52,2ммоль) та 4-метоксибензолсульфонілхлориду (11,9 грамів, 57,6ммоль) в диоксані (100мл) та воді (100мл) був охолоджений у бані з льодом. Потім додавали триетиламін (18,2мл, 0,13ммоль). Баню з льодом прибирали, та реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі на протязі 2 днів. Розчинники видаляли під вакуумом і залишок екстрагували етилацетатом та водою. Водний шар відокремлювали та екстрагували двічі етилацетатом. Поєднані органічні шари промивали водним насиченим розчином бікарбонату натрію, 1N водним розчином соляної кислоти, та насиченим розчином хлориду натрію. Після сушки над сульфатом натрію розчинник випарювали з одержанням жовтого масла (19,3 грамів), частину якого (10 грамів) хроматографували на силікагелі з 3:7 етилацетат/гексан в якості елюенту, потім перекристалізували з етилацетат/гексаном з одержанням бензилового ефіру 2-(4-метоксибензолсульфоніламіно)-2-метилпропіонової кислоти у вигляді білої твердої речовини, 6,59 грамів (67%).

(В) Розчин бензилового ефіру 2-(4-метоксибензолсульфоніламіно)-2-метилпропіонової кислоти (1,5 грама, 4,13ммоль) в етанолі (80мл) обробляли 10% паладієм-на-вуглі (0,17 грамів) та гідрували при тиску 3 атмосфери на протязі 1,5 години в Рагг шейкері. Каталізатор був видалений пропусканням крізь 0,45мм нейлоновий фільтр та фільтрат був сконцентрований з одержанням 2-(4-метоксибензолсульфоніламіно)-2-метилпропіонової кислоти у вигляді білої твердої речовини, 1,09 грамів (96%).

(С) Розчин 2-(4-метоксибензолсульфоніламіно)-2-метилпропіонової кислоти (1,08 грама, 3,95ммоль) в метиленхлориді (120мл) охолоджували в бані з льодом. Потім послідовно додавали триетиламін (2,2мл, 16,8ммоль), (бензотриазол-1-ілокси)трис(диметиламіно)фосфонію гексафторфосфат (2,6 грама, 5,88ммоль) та О-бензилгідроксиламінігідрохлорид (0,95 грамів, 5,95ммоль). Одержану суміш перемішували при кімнатній температурі на протязі 16 годин. Розчинник випарювали та залишок екстрагували етилацетатом. Розчин промивали послідовно 1N водним розчином соляної кислоти, водним насиченим розчином бікарбонату натрію, водою та насиченим розчином хлориду натрію. Після сушки над сульфатом натрію, розчинник випарювали з одержанням масла, з якого цільовий продукт, N-бензилокси-2-(4-метоксибензолсульфоніламіно)-2-метилпропіонамід (1,41 грама, 95%), у вигляді білої твердої речовини, було одержано хроматографією на силікагелі з 1:2 етилацетат/гексаном, як елюенту.

(D) Розчин N-бензилокси-2-(4-метоксибензолсульфоніламіно)-2-метилпропіонаміду (1,40 грама, 3,70ммоль) в метанолі (80мл) обробляли 6% паладієм-на-сульфаті барію (0,75 грамів) та гідрували при тиску 3 атмосфери на протязі 1,5 годин в Рагг шейкері. Каталізатор видаляли пропусканням крізь 0,45мм нейлоновий фільтр і фільтрат концентрували з одержанням N-гідрокси-2-(4-метоксибензолсульфоніламіно)-2-метилпропіонаміду у вигляді білої твердої речовини, 1,06 грамів (100%). Температура плавлення: 122-125°C МС: 289 (M+1); Аналіз, розраховано для $C_{11}H_{16}N_2O_5S$: С 45,82; Н 5,59; N 9,72; Одержано: С 45,88; Н 5,60; N 9,69.

Вказані в заголовках сполуки прикладів 10-12 були одержані методом, аналогічним описаному в прикладі 9 використовуючи вказані реактиви.

Приклад 10

2-[4-(4-фторфенокси)бензолсульфоніламіно]-N-гідрокси-2-метилпропіонамід

Гідрохлорид бензилового ефіру 2-аміно-2-метилпропіонової кислоти; 4-(4-фторфенокси)бензолсульфонілхлорид. Температура плавлення: 133-134°C. МС: 369 (M+1). Аналіз, розраховано для $C_{16}H_{17}FN_2O_5S$: С 52,17; Н 4,65; N 7,60; Одержано: С 52,21; Н 4,83; N 7,80.

Приклад 11

N-гідрокси-2-метил-2-[4-(3-метилбутокси)бензолсульфоніламіно]пропіонамід

Гідрохлорид бензилового ефіру 2-аміно-2-метилпропіонової кислоти; 4-(3-метилбутокси)бензолсульфонілхлорид. Перекристалізований з етилацетат/гексану. Температура плавлення 126,5-128°C МС: 343 (M-1). Аналіз, розраховано для $C_{15}H_{24}N_2O_5S$: С 52,31; Н 7,02; N 8,13; Одержано: С 52,30; Н 7,07; N 8,16.

Приклад 12

2-[4-(2-циклопентилетокси)бензолсульфоніламіно]-N-гідрокси-2-метилпропіонамід

Гідрохлорид бензилового ефіру 2-аміно-2-метилпропіонової кислоти; 4-(2-циклопентилетокси)бензолсульфонілхлорид. Перекристалізований з етилацетат/гексану. Температура плавлення 125-127°C МС: 369 (M-1). Аналіз, розраховано для $C_{17}H_{26}N_2O_5S$: С 55,12, Н 7,07, N 7,56. Одержано: С 55,46, Н 7,09, N 7,38.

Приклад 13

N-гідрокси-2-метил-2-(5-піридин-2-ілтіфен-2-сульфоніламіно)пропіонамід

(А) До розчину 2-аміно-2-метилпропіонової кислоти (2,0 грама, 19,4ммоль) в 1N водному розчині гідроксиду натрію (45мл) та диоксані (45мл) додавали 5-піридин-2-ілтіфен-2-сульфонілхлорид (8,41 грамів,

32,4ммоля). Одержану суміш перемішували при кімнатній температурі на протязі 16 годин. Додатково додавали 1N водний розчин гідроксиду натрію (45мл) до реакційної суміші, яку потім екстрагували діетиловим ефіром. Органічні екстракти були відкинуті. Водний шар був підкислений 1N розчином соляної кислоти та екстрагований етилацетатом. Етилацетатні фракції промивали насиченим розчином хлориду натрію, висушували над сульфатом магнію та концентрували з одержанням 2-метил-2-(5-піридин-2-ілтіофен-2-сульфоніламіно)пропіонової кислоти у вигляді твердої речовини білого кольору (2,18 грама, 34%).

(В) До розчину 2-метил-2-(5-піридин-2-ілтіофен-2-сульфоніламіно)пропіонової кислоти (1,60 грама, 4,91ммоля) в метиленхлориді (160мл) додавали триетиламін (2,3мл, 16,5ммоля), гексофторфосфат(бензотриазол-1-ілокси)трис(диметиламіно)фосфонію (2,4 грама, 5,41ммоля) та гідрохлорид О-(2-триметилсілілєтил)гідроксиламіну (0,92 грамів, 5,41ммоля). Одержану суміш перемішували при кімнатній температурі на протязі 16 годин. Розчинник випарювали та залишок екстрагували етилацетатом. Розчин промивали водою, насиченим водним розчином бікарбонату натрію та насиченим розчином хлориду натрію. Після сушки над сульфатом магнію розчинник випарювали з одержанням білої піни, з якої цільовий продукт, 2-метил-2-(5-піридин-2-ілтіофен-2-сульфоніламіно)-N-(2-триметилсіланілетокси)-пропіонамід (220мг, 10%) у вигляді білої твердої речовини виділяли хроматографією на силікагелі з 3:2 етилацетат/гексаном, як елюенту.

(С) 2-метил-2-(5-піридин-2-ілтіофен-2-сульфоніламіно)-N-(2-триметилсіланілетокси)пропіонамід (80мг, 0,18ммоля) розчиняли в трифтороцтовій кислоті та одержаний розчин перемішували при кімнатній температурі на протязі 16 годин. Трифтороцтову кислоту випарювали під вакуумом, залишок гасили метанолом, одержуючи N-гідрокси-2-метил-2-(5-піридин-2-ілтіофен-2-сульфоніламіно)пропіонамід у вигляді жовтого масла (60мг, 97%), яке кристалізували з етанолу. Температура плавлення 165-166°C. МС: 342 (M+1).

Названі у заголовку сполуки прикладів 14-16 одержували методом, аналогічним цьому, що описаний в прикладі 13 з використанням вказаних реактивів.

Приклад 14

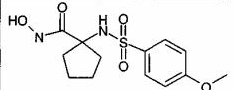
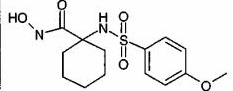
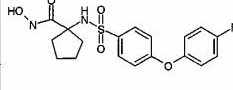
Гідроксиамід 1-(5-піридин-2-ілтіофен-2-сульфоніламіно)циклопентан-1-карбонової кислоти
1-Аміноциклопентан-1-карбонова кислота; 5-піридин-2-ілтіофен-2-сульфонілхлорид. МС: 368 (M+1).

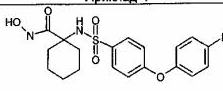
Приклад 15

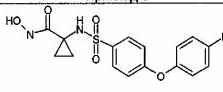
Гідроксиамід 1-[4-(4-хлорфенокси)бензолсульфоніламіно]циклопропан-1-карбонової кислоти
1-Аміноциклопропан-1-карбонова кислота; 4-(4-хлорфенокси)бензолсульфонілхлорид. МС:381 (M-1).

РЕЗУЛЬТАТИ БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

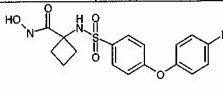
Інгібування MMP

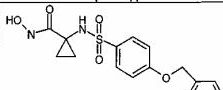
Сполука	MMP Інформація	
<div>Приклад 1</div> 	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	900,0000
	G2948A MMP-13	50,0000
	G5108A MMP-12	
	G2945A MMP-2	
	G2946A MMP-3	
	G2947A MMP-9	
	G5418A MMP-14	
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	
<div>Приклад 2</div> 	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	690,0000
	G2948A MMP-13	49,0000
	G5108A MMP-12	
	G2945A MMP-2	
	G2946A MMP-3	
	G2947A MMP-9	
	G5418A MMP-14	
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	
<div>Приклад 3</div> 	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	65,0000
	G2948A MMP-13	0,9000
	G5108A MMP-12	
	G2945A MMP-2	1,4500
	G2946A MMP-3	
	G2947A MMP-9	2,9000
	G5418A MMP-14	
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	1,0000
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	

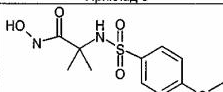
<div> <div>Приклад 4</div>  </div>	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	333,3333
	G2948A MMP-13	0,9667
	G5108A MMP-12	
	G2945A MMP-2	0,7500
	G2946A MMP-3	
	G2947A MMP-9	
	G5418A MMP-14	
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	

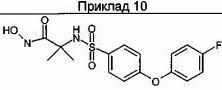
<div> <div>Приклад 5</div>  </div>	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	496,6667
	G2948A MMP-13	0,9333
	G5108A MMP-12	
	G2945A MMP-2	0,7500
	G2946A MMP-3	53,0000
	G2947A MMP-9	18,0000
	G5418A MMP-14	
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	

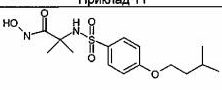
<div> <div>Приклад 6</div>  </div>	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	400,0000
	G2948A MMP-13	2,1000
	G5108A MMP-12	
	G2945A MMP-2	1,6000
	G2946A MMP-3	107,5000
	G2947A MMP-9	160,0000
	G5418A MMP-14	
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	

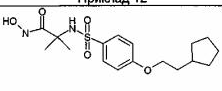
<div> <div>Приклад 7</div>  </div>	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	280,0000
	G2948A MMP-13	0,5333
	G5108A MMP-12	
	G2945A MMP-2	0,3500
	G2946A MMP-3	2,0000
	G2947A MMP-9	6,2000
	G5418A MMP-14	
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	

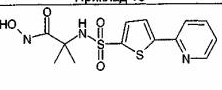
<div> <div>Приклад 8</div>  </div>	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	9650,0000
	G2948A MMP-13	70,0000
	G5108A MMP-12	
	G2945A MMP-2	18,0000
	G2946A MMP-3	1900,0000
	G2947A MMP-9	1400,0000
	G5418A MMP-14	
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	

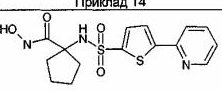
<div> <div>Приклад 9</div>  </div>	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	1100,0000
	G2948A MMP-13	17,0000
	G5108A MMP-12	
	G2945A MMP-2	110,0000
	G2946A MMP-3	620,0000
	G2947A MMP-9	220,0000
	G5418A MMP-14	
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	

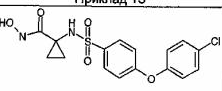
Приклад 10	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	1186,6667
	G2948A MMP-13	0,9000
	G5108A MMP-12	0,6129
	G2945A MMP-2	0,3000
	G2946A MMP-3	16,3333
	G2947A MMP-9	8,6667
	G5418A MMP-14	10,3360
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	

Приклад 11	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	9500,0000
	G2948A MMP-13	13,5000
	G5108A MMP-12	
	G2945A MMP-2	10,7500
	G2946A MMP-3	65,0000
	G2947A MMP-9	185,0000
	G5418A MMP-14	
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	4,7500
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	

Приклад 12	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	4300,0000
	G2948A MMP-13	6,7500
	G5108A MMP-12	
	G2945A MMP-2	7,3000
	G2946A MMP-3	30,0000
	G2947A MMP-9	47,0000
	G5418A MMP-14	
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	10,4000
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	

Приклад 13	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	1850,0000
	G2948A MMP-13	38,0000
	G5108A MMP-12	
	G2945A MMP-2	4,7000
	G2946A MMP-3	850,0000
	G2947A MMP-9	1200,0000
	G5418A MMP-14	
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	

Приклад 14	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	950,0000
	G2948A MMP-13	21,5000
	G5108A MMP-12	
	G2945A MMP-2	10,0000
	G2946A MMP-3	330,0000
	G2947A MMP-9	380,0000
	G5418A MMP-14	
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	

Приклад 15	Протокол	IC ₅₀ (нМ)
	G2557A MMP-1	850,0000
	G2948A MMP-13	0,8500
	G5108A MMP-12	
	G2945A MMP-2	0,3700
	G2946A MMP-3	33,0000
	G2947A MMP-9	7,0000
	G5418A MMP-14	
	G5021A Агреканаз	
	G5197A Агреканаз	
	G5019A MMP-8 IC ₅₀	
	Протокол	K _i (нМ)
	G5019A MMP-8 K _i	