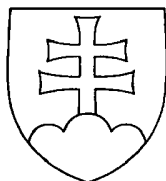


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 30.09.97
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 9620572.9, 9706667.4
(32) Dátum priority: 02.10.96, 02.04.97
(33) Krajina priority: GB, GB
(40) Dátum zverejnenia: 06.08.99
(86) Číslo PCT: PCT/EP97/05376, 30.09.97

(21) Číslo dokumentu:

430-99

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶ :

**C 07C 259/06,
A 61K 31/16**

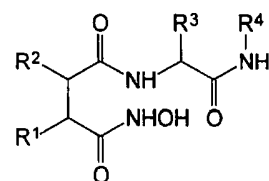
(71) Prihlasovateľ: NOVARTIS AG, Basel, CH;

(72) Pôvodca vynálezu: Kottirsch Georg, Freiburg, DE;
Neumann Ulf, Rheinfelden, CH;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Deriváty hydroxámovej kyseliny, spôsob ich prípravy a ich použitie**

(57) Anotácia:

Opisujú sa deriváty hydroxámovej kyseliny, napríklad vzorca (I), ktoré sú vhodné ako liečivá, napríklad na potláčanie uvoľňovania TNF a liečbu autoimúnnych a zápalových ochorení, napríklad sklerózy multiplex a reumatoidnej artritídy. Opisuje sa tiež spôsob prípravy zlúčenín a farmaceutické prostriedky obsahujúce tieto zlúčeniny.



(I)

Deriváty hydroxámovej kyseliny, spôsob ich prípravy a ich použitie

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka nových derivátov hydroxámovej kyseliny, ktoré sú vhodné ako liečivá, napríklad pri inhibícii matricových metaloproteináz, ako je kolagenáza, a pri inhibícii vylučovania TNF, najmä pri liečbe ochorení alebo stavov sprostredkovaných nadmernou produkciou alebo nadmernou citlivosťou na TNF α .

Doterajší stav techniky

Nádorový nekrotický faktor (TNF) je cytokín, ktorý sa pôvodne produkuje ako 28 kD prekursor viazaný na membránu. Potom sa štiepi enzýmom (TNF konvertáza) a uvoľňuje sa ako rozpustná aktívna forma 17 kD. Rozpustný TNF existuje najmenej v dvoch formách, TNF α a TNF β , z ktorých je TNF α klinicky významnejší. Predpokladá sa, že TNF α sprostredkuje zápal a iné stavy spojené so septickým šokom alebo akútnou infekciou. Predpokladá sa, že dlhý čas trvajúca nadmerná stimulácia TNF α zohráva úlohu pri autoimúnnych a chronických zápalových stavoch, ako je artritída, skleróza multiplex a podobne.

Ukázalo sa, že určité inhibítory matricových metaloproteináz z triedy hydroxámových kyselín, najmä (7-N-hydroxy)diamidy kyseliny 3-imino-4-oxoheptán-1,7-diovej (ktoré sú prípadne ďalej 1-N, 2-, 5- a 6-substituované), sú schopné sprostredkovať produkciu TNF α pravdepodobne pomocou inhibície TNF konvertázy. Známi predstavitelia tejto triedy zlúčenín sú zhrnutí a opísaní napríklad vo WO 94/10990.

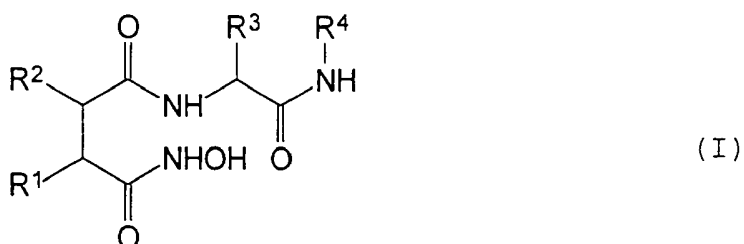
Teraz sa prekvapujúco zistilo, že nová trieda derivátov hydroxámovej kyseliny („nové zlúčeniny“) sú účinnými potláčateľmi TNF α a majú výhodné farmaceutické vlastnosti, najmä preto, že sú orálne biologicky využiteľné.

Podstata vynálezu

Novými zlúčeninami podľa predkladaného vynálezu sú (7-N-hydroxy)diamidy kyseliny 3-imino-4-oxo-6-(oxymetyl)heptán-1,7-diovej. Vhodne je 6-oxymetylovým substituentom vo vzorci II nižšie napríklad hydroxymetylová skupina alebo mono- alebo polyalkoxymetylová skupina. Nové zlúčeniny môžu byť ďalej substituované v polohách 1-N, 2- a 5-, čo je známe z doterajšieho stavu techniky, napríklad ako sa to opisuje vo WO 94/10990, alebo ako sa opisuje ďalej. Nové zlúčeniny môžu byť napríklad 1-N substituované metylovou skupinou, pyridylovou skupinou alebo substituentom vzorca X-Y- alebo X'-Y-, ako sa opisuje nižšie, napríklad (1-N-morfolinokarbonylalkyl-7-N-hydroxy)diamid kyseliny 3-imino-4-oxo-6-(oxymetyl)heptán-1,7-diovej, a môže sa vyskytovať vo voľnej forme alebo vo forme farmaceuticky prijateľnej soli.

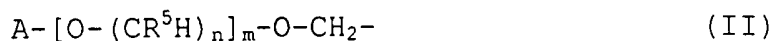
Zvlášť výhodnou triedou nových zlúčenín sú (7-N-hydroxy)-diamidy kyseliny 3-imino-4-oxo-5-aryl-6-(oxymetyl)heptán-1,7-diovej. 5-Arylový substituent môže byť taký, ako sa opisuje ďalej, napríklad ak 5-arylový substituent je prípadne substituovaná fenylová skupina, zvyčajne substituovaná v polohe 4, substituentom je hydroxylová skupina, alkylová skupina obsahujúca 1 až 6 atómov uhlíka, alkoxy skupina obsahujúca 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupina, atóm halogénu alebo kyanoskupina. Nové zlúčeniny substituované v polohe 5 arylovou skupinou sa môžu vyskytovať vo voľnej forme alebo vo forme farmaceuticky prijateľnej soli.

Výhodne majú nové zlúčeniny všeobecný vzorec I



kde

R^1 je substituent vzorca II



kde n je 1, 2, 3 alebo 4, výhodne 2;

m je 0, 1, 2 alebo 3;

každá skupina R^5 je nezávisle atóm vodíka; alkylová skupina obsahujúca 1 až 10 atómov uhlíka, ktorá je prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou, alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupinou, alkylaminoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, merkaptoskupinou, alkylmerkaptoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka alebo chránenou hydroxylovou skupinou, chránenou aminoskupinou alebo chránenou merkaptoskupinou; alkenylová skupina obsahujúca 2 až 6 atómov uhlíka; arylová skupina obsahujúca 6 až 14 atómov uhlíka, ktorá je prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou, alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupinou, alkylaminoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, atómom halogénu alebo kyanoskupinou; alebo arylalkylová skupina obsahujúca v arylovej časti 6 až 14 atómov uhlíka a v alkylovej časti 1 až 6 atómov uhlíka; výhodne atóm vodíka, fenylová skupina alebo alkylová skupina obsahujúca 1 až 5 atómov uhlíka;

A je atóm vodíka, alkylová skupina obsahujúca 1 až 10 atómov uhlíka, arylová skupina obsahujúca 6 až 14 atómov uhlíka, arylalkylová skupina obsahujúca v arylovej časti 6 až 14 atómov uhlíka a v alkylovej časti 1 až 6 atómov uhlíka, arylkarbonylová skupina obsahujúca v arylovej časti 6 až 14 atómov uhlíka alebo alkylkarbonylová skupina obsahujúca v alkylovej časti 1 až 10 atómov uhlíka; výhodne atóm vodíka, alkylová skupina obsahujúca 1 až 6 atómov uhlíka (napríklad metylová skupina alebo cyklohexylová skupina), fenylová skupina alebo benzylová skupina;

R^2 je alkylová skupina obsahujúca 2 až 12 atómov uhlíka, alkenylová skupina obsahujúca 3 až 12 atómov uhlíka, cykloalkylová

skupina obsahujúca 3 až 7 atómov uhlíka prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou, alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupinou alebo alkylaminoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, arylová skupina obsahujúca 5 až 14 atómov uhlíka alebo arylalkylová skupina obsahujúca v arylovej časti 5 až 14 atómov uhlíka a v alkylovej časti 1 až 6 atómov uhlíka, kde arylové skupiny sú prípadne substituované hydroxylovou skupinou, alkylovou skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupinou, atómom halogénu alebo kyanoskupinou; výhodne fenylová skupina, 4-metylfenylová skupina, 4-metoxifyenylová skupina, cyklohexylová skupina alebo izobutylová skupina.

R^3 je alkylová skupina obsahujúca 1 až 10 atómov uhlíka, ktorá je prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou alebo alkoxyamino skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, alkylaminoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, merkaptoskupinou, alkylmerkaptoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka alebo chránenou hydroxylovou skupinou, chránenou aminoskupinou alebo chránenou merkaptoskupinou; napríklad terc-butylová skupina alebo cyklohexylmetylová skupina; arylová skupina obsahujúca 6 až 14 atómov uhlíka prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou, aryloxyskupinou obsahujúcou 6 až 14 atómov uhlíka alebo alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupinou, alkylaminoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, atómom halogénu alebo kyanoskupinou, napríklad benzylová skupina, *p*-metoxybenzylová skupina, *p*-benzyloxybenzylová skupina); alebo indolylmetylová skupina, napríklad 2-indolylmetylová skupina; výhodne benzylová skupina alebo terc-butylová skupina;

R^4 je metylová skupina, pyridylová skupina alebo substituent vzorca X-Y-, kde X je morfolinoskupina, pyridylová skupina alebo arylová skupina, výhodne morfolinoskupina a Y je alkylénová skupina obsahujúca 1 až 12 atómov uhlíka, v ktorej sú až štyri metylénové jednotky prípadne nahradené skupinou -CO-, skupinou -NH-, skupinou -SO₂- alebo skupinou -O-; napríklad metylová skupina, 2-pyridylová skupina, morfolinokarbonylmetylová

skupina, 5-(morfolino)pentyllová skupina alebo 5-(morfolinokarbonyl)pentyllová skupina.

„Alkylová skupina“ je lineárna, cyklická alebo rozvetvená alkylová skupina; a

„Arylová skupina“ je jednoväzbový aromatický zvyšok obsahujúci jeden alebo dva aromatické kruhy, napríklad fenylová skupina, benzylová skupina alebo tolylová skupina, a medzi tieto skupiny patrí heteroarylová skupina obsahujúca jeden alebo viacero heteroatómov, napríklad atóm dusíka, atóm kyslíka alebo atóm síry.

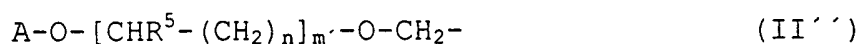
Atóm halogénu alebo halo, ak sa neuvádza inak, je atóm fluóru, atóm chlóru, atóm brómu alebo atóm jódu.

Zvyčajne je R^1 substituent všeobecného vzorca II'



kde A, n a m sú definované vyššie.

V alternatívnom uskutočnení je R^1 substituent všeobecného vzorca II''



kde A, n a R^5 sú definované vyššie a m' je 0, 1 alebo 2.

Ak vo vzorci I je substituent vzorca X-Y-, je to výhodne substituent vzorca X'-Y-, kde X' je morfolinoskupina a Y je definované vyššie.

Vo zvláštnom uskutočnení poskytuje predkladaný vynález nové zlúčeniny všeobecného vzorca I, kde nezávisle:

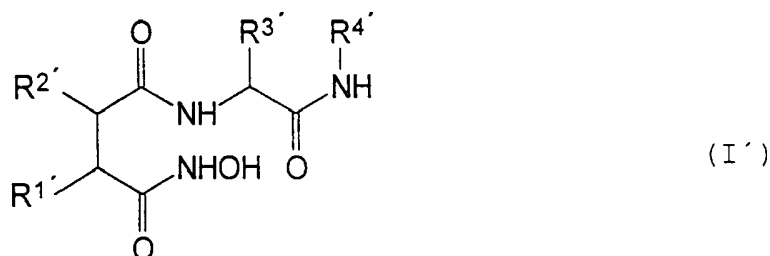
n vo vzorci II je 3 alebo 4; alebo

R^5 vo vzorci II nie je atóm vodíka; alebo

R^2 je alkylová skupina obsahujúca 7 až 12 atómov uhlíka, alkenylová skupina obsahujúca 3 až 12 atómov uhlíka, cykloalkylová

skupina obsahujúca 3 až 7 atómov uhlíka, ktorá je prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou, alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupinou alebo alylaminoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka; arylová skupina obsahujúca 5 až 14 atómov uhlíka alebo arylalkylová skupina obsahujúca v arylovej časti 5 až 14 atómov uhlíka a v alkylovej časti 1 až 6 atómov uhlíka, kde arylové skupiny sú prípadne substituované hydroxylovou skupinou, alkylovou skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupinou, atómom halogénu alebo kyanoskupinou; výhodne fenylová skupina, 4-metylfenylová skupina, 4-metoxifyenylová skupina alebo cyklohexylová skupina; alebo akákoľvek arylová skupina je heteroarylová skupina obsahujúca jeden alebo viacero heteroatómov, napríklad atóm dusíka, atóm kyslíka alebo atóm síry.

V ďalšom zvláštnom uskutočnení predkladaný vynález poskytuje nové zlúčeniny všeobecného vzorca I'



kde R^{1'} je substituent všeobecného vzorca II''''



kde

n' je celé číslo jedna alebo dva, výhodne dva;

m' je celé číslo nula, jedna, dva alebo tri;

A' je atóm vodíka, arylová skupina obsahujúca 6 až 14 atómov uhlíka, alkylová skupina obsahujúca 1 až 10 atómov uhlíka, arylkarbonylová skupina obsahujúca v arylovej časti 6 až 14

atómov uhlíka alebo alkylkarbonylová skupina obsahujúca v alkylovej časti 1 až 10 atómov uhlíka, výhodne alkylová skupina obsahujúca 1 až 6 atómov uhlíka, napríklad metylová skupina alebo cyklohexylová skupina;

R^2 je alkylová skupina obsahujúca 2 až 6 atómov uhlíka, výhodne izobutylová skupina;

R^3 je alkylová skupina obsahujúca 1 až 10 atómov uhlíka, ktorá je prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou alebo alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, napríklad *tert*-butylová skupina alebo cyklohexylmetylová skupina; arylová skupina obsahujúca 6 až 14 atómov uhlíka prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou, aryloxyskupinou obsahujúcou 6 až 14 atómov uhlíka alebo alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, napríklad benzylová skupina, *p*-metoxybenzylová skupina, *p*-benzyloxybenzylová skupina; alebo indolylmetylová skupina, napríklad 2-indolylmetylová skupina; výhodne benzylová skupina alebo *tert*-butylová skupina.

R^4 je metylová skupina, pyridylová skupina alebo substituent vzorca X-Y-, kde X je morfolinoskupina, pyridylová skupina alebo arylová skupina, výhodne morfolinoskupina, a Y je alkylénová skupina obsahujúca 1 až 12 atómov uhlíka, v ktorej až štyri metylénové jednotky sú prípadne nahradené skupinou -CO-, skupinou -NH-, skupinou -SO₂- alebo skupinou -O-; napríklad metylová skupina, 2-pyridylová skupina, morfolinokarbonylmetylová skupina, 5-(morfolino)pentyllová skupina alebo 5-(morfolinokarbonyl)pentyllová skupina.

Výhodné nové zlúčeniny, kde R^2 je arylová skupina, sú zlúčeniny, kde R^1 má vzorec II', ako je definované vyššie a R^2 je fenylová skupina, 4-metylfenylová skupina alebo 4-metoxyfenylová skupina.

Zvlášť výhodnou skupinu zlúčenín všeobecného vzorca I sú zlúčeniny, kde

(i) R^1 má vzorec II' alebo II'' (výhodne vzorec II') a A vo

vzorci II je atóm vodíka; alkylová skupina obsahujúca 1 až 6 atómov uhlíka, napríklad metylová skupina alebo cyklohexylová skupina, napríklad tak, že R^1 vo vzorci I je napríklad hydroxymetylová skupina, cyklohexyloxyetoxymetylová skupina, metoxyetoxymetylová skupina alebo hydroxyetyloxymetylová skupina; alebo arylkarbonylová skupina obsahujúca v arylovej časti 6 až 14 atómov uhlíka, napríklad benzoylová skupina, napríklad tak, že R^1 vo vzorci I je napríklad benzoyloxymetylová skupina, benzoyloxyetoxymetylová skupina alebo benzoyloxyetoxymetylová skupina;

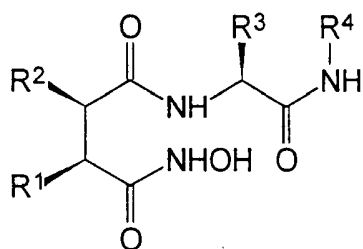
(ii) R^2 vo vzorci I je cyklohexylová skupina, fenylová skupina, 4-metylfenylová skupina, 4-metoxyfenylová skupina alebo izobutylová skupina;

(iii) R^3 vo vzorci I je benzylová skupina alebo *terc*-butylová skupina; a

(iv) R^4 vo vzorci I je metylová skupina alebo morfolínokarbonylalkylová skupina obsahujúca v alkylovej časti 1 až 6 atómov uhlíka.

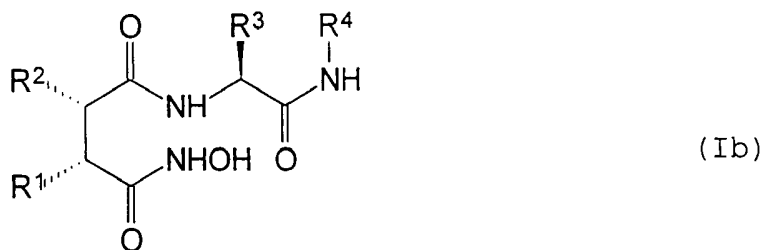
Nové zlúčeniny môžu existovať vo voľnej forme alebo vo forme soli a formy solí sú súčasťou predkladaného vynálezu. Napríklad určité nové zlúčeniny môžu existovať ako fyziologicky prijateľné kyslé adičné soli alebo bázické adičné soli, napríklad hydrochloridy, oxaláty alebo fumaráty.

Konfigurácia nových zlúčenín je výhodne taká, ako je uvedené vo vzorci Ia:



(Ia)

alebo vo vzorci Ib:

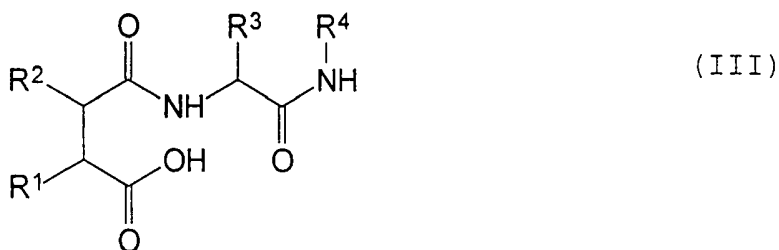


výhodnejšie taká, ako je uvedené vo vzorci Ia.

Predkladany vynález teda zahŕňa nové zlúčeniny, ktoré sú vo forme zmesi enantiomérov, napríklad racemické zmesi, napriek tomu je výhodné, ak sú v čistej alebo značne čistej enantiomérskej forme, napríklad vo forme, kedy obsah jedného izoméru novej zlúčeniny je najmenej 90 %, výhodne najmenej 95 % a najmä 98 %, t. j. obsahuje menej než 10 %, výhodne menej než 5 % a najmä menej než 2 % iného izoméru novej zlúčeniny.

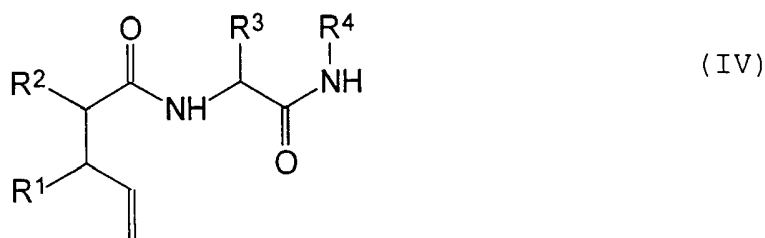
V ďalšom aspekte predkladany vynález poskytuje nové spôsoby prípravy zlúčenín všeobecného vzorca I alebo medziproduktu vzorca III, IV alebo V nižšie, ktoré zahŕňajú:

a) na prípravu zlúčeniny všeobecného vzorca I, ako je definované vyššie, reakciu zlúčeniny všeobecného vzorca III



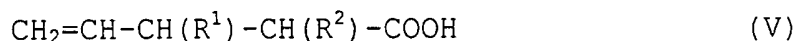
kde R^1 , R^2 , R^3 a R^4 sú definované vyššie, s hydroxylamínom (prípadne vo forme soli alebo v O-substituovanej forme, napríklad hydrochloridu hydroxylamínu), čím sa získa zlúčenina všeobecného vzorca I a prípadne, ak je to vhodné, odstránenie ochrannej skupiny z produktu alebo oddelenie požadovaného diastereoizoméru;

b) na prípravu zlúčeniny všeobecného vzorca III, ako je definované vyššie, oxidáciu olefinickej väzby zlúčeniny všeobecného vzorca IV



kde R^1 , R^2 , R^3 a R^4 sú definované vyššie, napríklad použitím oxidačného katalyzátora, ako je hydrát chloridu rutenitého, čím sa získa kyselina všeobecného vzorca III a prípadne, ak je to vhodné, oddelenie požadovaného diastereoizoméru;

c) na prípravu zlúčeniny všeobecného vzorca IV, reakciu karboxylovej kyseliny všeobecného vzorca V



kde R^1 a R^2 sú definované vyššie, s amidom aminokyseliny všeobecného vzorca VI



kde R^3 a R^4 sú definované vyššie, čím sa získa amid všeobecného vzorca IV a prípadne, ak je to vhodné, oddelenie požadovaného diastereoizoméru; a

d) na prípravu zlúčeniny všeobecného vzorca V, reakciu alkoholu všeobecného vzorca II^{IV}



kde A'' je rovnaké, ako sa definovalo pre A vo vzorci II okrem toho, že ak A je atóm vodíka, A'' je O-ochranná skupina (napríklad skupina schopná tvoriť ľahko odstrániteľnú éterovú skupinu, napríklad benzylová skupina) a kde R^5 , n a m sú definované pre vzorec II vyššie, s dihalogenovaným alkánom (*trans*), napríklad s

1,4-dibrómbut-2-énom, čím sa získa substituovaný R^1 -halogénalkán, napríklad $R^1\text{-CH=CH-CH}_2\text{-W}$ (*trans*), kde W je atóm halogénu, napríklad atóm brómu, ktorý potom reaguje s karboxylovou kyselinou zodpovedajúcej R^2 , t. j. $R^2\text{-CH}_2\text{-COOH}$, čím vznikne ester, ktorý potom prešmykuje, napríklad v prítomnosti organickej bázy, ako je lítiumdiizopropylamid, čím sa získa zlúčenina vzorca V.

Ak je to nevyhnutné na zachovanie integrity medziproduktov a koncového produktu, je možné prípadne do vyššie uvedených postupov zaradiť kroky chránenia a odstránenia ochranných skupín.

Predkladaný vynález ďalej zahŕňa aj nové medziprodukty všeobecného vzorca III a IV, ktoré sú definované vyššie.

Ako je uvedené v príkladoch testov nižšie, nové zlúčeniny sú silnými inhibítormi uvoľnenia $\text{TNF}\alpha$, sú orálne aktívne a nie sú v účinných dávkach cytotoxické. Nové zlúčeniny inhibujú aj kolagenázu a stromelyzín pri koncentráciách 0,3 až 10 nM. Nové testované zlúčeniny sa ďalej vyznačujú orálnou aktivitou *in vivo* pri dávkach nižších než 10 mg/kg pri LPS vyvolanom uvoľnení $\text{TNF}\alpha$ u potkanov a ukazuje sa, že sú pri týchto dávkach dobre znášateľné. Nové zlúčeniny teda majú nasledovné farmaceutické využitie:

Nové zlúčeniny sú vhodné na profylaxiu a liečbu ochorení alebo patologických stavov sprostredkovaných TNF, najmä $\text{TNF}\alpha$, napríklad zápalových stavov, autoimúnnych ochorení, závažných infekcií a odmietnutia transplantátu orgánu alebo tkanivá, napríklad na liečbu príjemcov transplantátov srdca, pľúc, srdca a pľúc zároveň, pečene, obličiek, slinivky brušnej, kože alebo rohovky a na prevenciu ochorení štep-hostiteľ, ktoré nasledujú po transplantácii kostnej drene.

Nové zlúčeniny sú zvlášť vhodné na liečbu, prevenciu alebo zlepšenie autoimúnnych ochorení a zápalových stavov s etiológiou zahŕňajúcou autoimúnnu zložku, ako je artritída (napríklad reumatoidná artritída, chronická postupujúca artritída a

deformujúca artritída). Špecifickými autoimúnnymi ochoreniami, pri ktorých sa môžu využiť nové zlúčeniny, sú autoimúnné hematologické poruchy (vrátane napríklad hemolytickej anémie, aplastickej anémie, anémie červených krviniek a idiopatickej trombocytopénie), systémový lupus erythematosus, polychondritída, skleroderma, Wegenerova granulomatóza, dermatomyozitída, chronická aktívna hepatitída, ťažká myasténia, psoriáza, Steven-Johnsonov syndróm, idiopatický malabsorpčný syndróm, autoimúnné zápalové črevné ochorenia (napríklad vredový zápal tračníka a Crohnova choroba), endokrinná oftalmopatia, Graveova choroba, sarkoidózy, skleróza multiplex, primárna biliárna cirhóza, juvenilná cukrovka (diabetes mellitus typu I), zápal cievnatky (prednej a zadnej), keratokonjunktivitída suchá a keratokonjunktivitída vernálna, intersticiálna fibróza pľúc, psoriatická artritída a glomerulonefritída (s nekrotickým syndrómom a bez neho, napríklad vrátane idiopatického nefrotického syndrómu alebo nefropatie s minimálnou zmenou).

Nové zlúčeniny sú vhodné aj na liečbu, prevenciu alebo zlepšenie astmy, bronchitídy, pneumokoniózy, rozdutia pľúc a ďalších obštrukčných alebo zápalových ochorení dýchacích ciest.

Nové zlúčeniny sú vhodné aj na liečbu nežiaducich akútnych a hyperakútnych zápalových reakcií, ktoré sú sprostredkované TNF, najmä $\text{TNF}\alpha$, napríklad akútnych infekcií, napríklad septického šoku (napríklad endotoxického šoku a syndrómu dýchacieho stresu dospelých), meningitídy, zápalu pľúc; a závažných popálenín; a na liečbu kachexie alebo syndrómu spôsobujúceho úbytok spojeného s chorobným uvoľňovaním TNF, nasledujúcim po infekcii, rakovine alebo dysfunkcii orgánov, najmä kachexia spojená s AIDS, napríklad spojená s HIV infekciou alebo nasledujúca po nej.

Okrem inhibície uvoľnenia TNF, najmä $\text{TNF}\alpha$ pomocou potlačenia TNF konvertázy, sú nové zlúčeniny aj inhibítormi matricových metaloproteináz, napríklad kolagenázy, stromelyzínu a želatinázy a preto sú vhodné na indikácie, ktoré sú známe pre

inhibitory kolagenázy alebo iných matricových metaloproteináz, napríklad na liečbu rôznych chorobných stavov kože, kostí a spojivových tkanív, napríklad reumatoidnej artritídy, psoriázy, psoriatickej artritídy, osteoporózy, osteoartritídy, periodontitídy, zápalu ďasna a zvrhovatení rohovky; na liečbu kardiovaskulárnych ochorení, napríklad aterosklerózy a koronárnej angioplastiky; na prevenciu metastázovania nádorových buniek a invázie a fibrózy nádorov, napríklad pri liečbe rakoviny; a na prevenciu neurodegeneratívnych porúch, napríklad Alzheimerovej choroby.

Pri vyššie uvedených indikáciách sa bude vhodná dávka samozrejme meniť v závislosti napríklad od použitej novej zlúčeniny, od liečeného pacienta, spôsobu podávania a povahe a závažnosti liečeného ochorenia. Vo všeobecnosti sa však u zvierat dosiahli uspokojivé výsledky pri dennej dávke 1 až 10 mg/kg/deň pri perorálnom podávaní. U väčších cicavcov, napríklad u človeka, sa denná dávka pohybuje medzi 50 až 750 mg novej zlúčeniny podávanej orálne, naraz alebo vhodnejšie v rozdelených dávkach, dvakrát až štyrikrát denne.

Nové zlúčeniny sa môžu podávať akýmkoľvek bežným spôsobom, napríklad orálne, napríklad vo forme roztokov na pitie, tabliet alebo toboliek, alebo parenterálne, napríklad vo forme roztokov alebo suspenzií na injekčné podávanie. Bežne sú na systémové podávanie vhodné orálne dávkovacie formy, hoci pri niektorých indikáciách sa môžu nové zlúčeniny podávať aj miestne alebo dermálne, napríklad vo forme kožného krému alebo gélu alebo podobných prostriedkov alebo, na aplikáciu do oka, vo forme očného krému, gélu alebo očných kvapiek; alebo sa môžu napríklad pri liečbe astmy podávať inhalačne. Vhodná jednotlivá dávkovacia forma na orálne podávanie obsahuje napríklad 25 až 250 mg novej zlúčeniny na dávku.

V súlade s tým, čo sa už uviedlo, predkladaný vynález poskytuje aj ďalšiu sériu uskutočnení:

A. Spôsob inhibície produkcie rozpustného TNF, najmä TNF α ,

alebo potlačenie zápalu u pacienta (t. j. u cicavcov, najmä u človeka) v prípade, že takúto liečbu potrebuje, pričom tento spôsob zahŕňa podávanie účinného množstva novej zlúčeniny uvedenému pacientovi alebo spôsob liečby akéhokoľvek vyššie uvedeného stavu, najmä spôsob liečby zápalových alebo autoimúnnych ochorení alebo stavov, napríklad sklerózy multiplex alebo reumatoidnej artritídy alebo úľavy od jedného alebo viacerých symptómov vyššie uvedených stavov.

B. Novú zlúčeninu na použitie ako liečivo napríklad na použitie ako imunosupresívum alebo protizápalové činidlo alebo na použitie pri prevencii, zlepšení alebo liečbe akéhokoľvek ochorenia alebo stavu, ktorý je opísaný vyššie, napríklad autoimúnneho alebo zápalového ochorenia alebo stavu.

C. Farmaceutický prostriedok obsahujúci novú zlúčeninu v spojení s farmaceuticky prijateľným riedidlom alebo nosičom, napríklad na použitie ako imunosupresívum alebo protizápalové činidlo alebo na použitie pri prevencii, zlepšení alebo liečbe akéhokoľvek ochorenia alebo stavu opísaného vyššie, napríklad autoimúnneho alebo zápalového ochorenia alebo stavu.

D. Použitie novej zlúčeniny pri príprave liečiva na použitie ako imunosupresívum alebo protizápalové činidlo alebo na použitie pri prevencii, zlepšení alebo liečbe akéhokoľvek ochorenia alebo stavu, ktorý je opísaný vyššie, napríklad autoimúnneho alebo zápalového ochorenia alebo stavu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Príprava {1-[S-fenylalanín-1-metylamid]-4-[N-hydroxyl]}diamidu kyseliny R-2-izobutyl-S-3-(2,5,8-trioxanonyl)jantárovej (zlúčenina vzorca I, kde R¹ je 2,5,8-trioxanonylová skupina, R² je izobutylová skupina, R³ je benzylová skupina a R⁴ je metylová skupina)

a. Roztok 50,00 g *trans*-1,4-dibróm-2-buténu (CAS reg. č. 821-06-7), 30,89 g monometyléteri dietylénglykolu (CAS reg. č. 111-77-3), 7,94 g tetrabutylamóniumhydrogénsulfátu (CAS reg. č. 32503-27-8) a 113,70 ml 50 % vodného roztoku hydroxidu sodného v 200 ml dichlórmétánu sa mieša počas 16 hodín pri teplote miestnosti. Reakčná zmes sa zriedi vodou a éterom, organická vrstva sa oddelí a olefinický produkt sa prečistí pomocou chromatografie.

b. Roztok 27,11 g *trans*-olefinového produktu z kroku a a 17,6 ml DBU (1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-énu, CAS reg. č. 6674-22-2) v 200 ml dichlórmétánu reaguje s 12,44 g kyseliny izokaprónovej. Po 1 hodine sa pridá bezvodý uhličitan sodný. Zmes sa mieša cez noc. Organická vrstva sa oddelí a ester sa prečistí pomocou chromatografie.

c. Roztok LDA (lítiumdiizopropylamidu) v 400 ml tetrahydrofuránu sa pripraví pri teplote - 70° C z 22,65 ml diizopropylamínu a 99,89 ml 1,6N butyllítia v hexáne. Pri tej istej teplote sa pridá 43,90 g roztoku produktu z kroku b v 100 ml tetrahydrofuránu. Po 30 minútach sa pridá 20,22 ml chlórtrimetylsilánu. Teplota sa nechá vystúpiť najskôr na teplotu miestnosti a potom sa zmes varí cez noc. Zmes sa zriedi éterom. Z organickej vrstvy sa získa 35,12 g surovej kyseliny, ktorá sa potom prečistí pomocou chromatografie, čím sa získa 30,70 g čistej karboxylovej kyseliny.

d. Roztok 10,50 g produktu z kroku c, 8,60 g 1-metylmidu-*L*-fenylalanínu (výhodne pripraveného napríklad reakciou komerčne dostupného *N*-karbobenzoxy-*L*-fenylalanínu s metylamínom použitím štandardných podmienok na získanie metylmidu a hydrogenáciou v prítomnosti paládia, pri ktorej sa odstráni ochranná skupina z aminoskupiny) a 4,89 g 4-metylaminopyridínu v 120 ml dichlórmétánu reaguje so 7,68 g EDCI (hydrochlorid 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylkarbodiimidu, CAS reg. č. 25952-53-8) a 7,61 ml trietylaminu cez noc. Pridá sa éter a organická vrstva sa vysuší a odparí. Surový produkt, zmes dvoch izomérov, sa prečistí chromatografiou na silikagéli,

pričom sa rozdelia izoméry, ktoré majú rôznu polaritu.

e. Energicky miešaný roztok 5,30 g menej polárneho produktu z kroku d v 150 ml tetrachlórmétanu, 150 ml acetonitrilu a 20 ml vody reaguje s 0,49 g hydrátu chloridu rutenitého a 15,16 g perhydrátu sodného. Po 2 hodinách sa pridá éter a pH sa upraví na 4. Organická vrstva sa oddelí, vysuší a odparí. Zvyšok sa prečistí pomocou chromatografie na silikagéli.

f. Roztok 5 g produktu z kroku e, 2,00 g hydroxybenzotriazolu a 2,51 g EDCI v 20 ml N,N-dimetylformamidu reaguje počas 2,5 hodiny. Potom sa pridá 1,90 g hydrochloridu hydroxylamínu a 4,61 ml N-metylmorfolínu a zmes sa mieša cez noc. Rozpúšťadlo sa odparí pri zníženom tlaku pri teplote 50° C. Zvyšok sa prečistí pomocou HPLC na RP18-silikagéli, čím sa získa čistá hydroxámová kyselina vo forme bieleho kryštallického prášku. teplota topenia 195-197° C; optická otáčavosť: $[\alpha]_D^{20} = -8,5^\circ$, $c = 0,175$ v metanole).

Príklady 2 až 17

Zlúčeniny zodpovedajúce príkladom 2 až 17 v tabuľke I sa pripravujú analogicky ako je opísané v príklade 1. Produkt z kroku c v príklade 1 reaguje s vhodnými derivátmi amidu aminokyseliny, ako je opísané v kroku d príkladu 1. Podľa spôsobov opísaných v krokoch e a f príkladu 1 sa pripravujú čisté hydroxámové kyseliny.

Príklady 18 až 32

Miesto monometyléteru dietylenglykolu sa pri reakcii s trans-1,4-dibróm-2-buténom, ako je opísané v kroku a príkladu 1, použije cyklohexylglykol. Podľa postupov, ktoré sú opísané v krokoch b až f príkladu 1 sa získajú čisté hydroxámové kyseliny, ktoré sú uvedené v príkladoch 18 až 32 tabuľky I.

Príklady 33 a 34

Miesto monometyléteru glykolu sa pri reakcii s *trans*-1,4-dibróm-2-buténom, ako je opísané v kroku a príkladu 1, použije monobenzylglykol alebo (2-benzyl)glykolmonobenzyléter. Podľa rovnakého postupu, ako je opísané v krokoch b až f príkladu 1 sa získajú hydroxámové kyseliny vzorca I, ktoré majú v R¹ hydroxylové skupiny chránené benzylovou skupinou. Po hydrogenácii v prítomnosti katalytického množstva paládia na sírane bárnatom sa odstráni benzylová skupina a po HPLC prečistení na R18-silikagéli sa pripraví zodpovedajúca zlúčenina vzorca I (vid' tabuľka I).

Príklady 35 až 59

Miesto monometyléteru dietylenglykolu sa pri reakcii s *trans*-1,4-dibróm-2-buténom, ako je opísané v kroku a príkladu 1, použije benzylalkohol. Podľa rovnakého postupu, ako je opísané v krokoch b až f príkladu 1 s vhodnými východiskovými látkami, množstvami a podobne, sa získajú hydroxámové kyseliny vzorca I, obsahujúce v R¹ benzyloxymetylovú skupinu. Pomocou hydrogenácie v prítomnosti katalytického množstva paládia na sírane bárnatom sa odstráni benzylová skupina a po prečistení pomocou HPLC na RP18-silikagéli sa získajú čisté produkty 35 až 59 uvedené v tabuľke I.

Tabuľka I

Pr. ¹	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	benzyl	metyl
2	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	benzyl	2-(morfolino)etyl
3	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	benzyl	5-(<i>p</i> -tozylamino)pentyl
4	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	benzyl	2-(morfolinokarbonyl)-etyl
5	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	benzyl	2-(<i>p</i> -tozylamino)etyl
6	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	benzyl	1- <i>S</i> -(metylkarbamoyl)-etyl
7	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	terc-butyl	metyl
8	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	terc-butyl	morfolinokarbonylmetyl
9	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	terc-butyl	2-(morfolinokarbonyl)-etyl
10	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	terc-butyl	5-(morfolinokarbonyl)-pentyl
11	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	terc-butyl	2-pyridyl
12	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	<i>p</i> -metoxybenzyl	metyl
13	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	1- <i>R</i> -terc-butyl-	metyl

Pr. ¹	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
			oxyetyl	
14	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	1-R-benzyloxyetyl	metyl
15	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	p-benzyloxybenzyl	metyl
16	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	metyl-3-indolyl	metyl
17	CH ₃ (OCH ₂ CH ₂) ₂ OCH ₂	izobutyl	1-R-hydroxyetyl	metyl
18	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	benzyl	metyl
19	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	benzyl	2-pyridyl
20	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	benzyl	3,6-dioxa-8-oxo-9-imino-11-morfolinoundecyl
21	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	benzyl	5-(morfolino)pentyl
22	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	benzyl	4-(morfolino)butyl
23	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	benzyl	3,6-dioxa-8-oxo-8-morfolinoktyl
24	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	terc-butyl	metyl
25	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	terc-butyl	6-imino-8-fenylloktyl
26	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	terc-butyl	5-(2-amino)pentyl
27	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	terc-butyl	6-imino-7-oxo-10-metylundecyl
28	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	terc-butyl	morfolinokarbonylmetyl
29 ²	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	terc-butyl	2-pyridyl
30	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	p-metoxibenzyll	metyl
31	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	metyl-3-indolyl	metyl
32	c-hexyl-OCH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	1-R-terc-butyl-oxyetyl	metyl
33	HO-CH ₂ CH ₂ OCH ₂	izobutyl	terc-butyl	metyl
34	HO-CH(benzyl)CH ₂ OCH ₂	izobutyl	terc-butyl	
35	HO-CH ₂	izobutyl	benzyl	metyl
36	HO-CH ₂	izobutyl	terc-butyl	metyl
37	HO-CH ₂	izobutyl	terc-butyl	6-imino-7-oxo-10-metylundecyl
38	HO-CH ₂	izobutyl	terc-butyl	6-imino-8-fenylloktyl
39	HO-CH ₂	izobutyl	terc-butyl	5-(morfolinokarbonyl)-pentyl
40	HO-CH ₂	izobutyl	terc-butyl	morfolinokarbonylmetyl
41	HO-CH ₂	izobutyl	terc-butyl	2-(morfolinokarbonyl)-etyl
42	HO-CH ₂	n-propyl	terc-butyl	metyl
43	HO-CH ₂	izopropyl	terc-butyl	metyl
44	HO-CH ₂	cyklopropyl	terc-butyl	metyl
45	HO-CH ₂	3-metylbutyl	terc-butyl	metyl
46	HO-CH ₂	cyklopentyl	terc-butyl	metyl
47	HO-CH ₂	cyklohexyl	terc-butyl	metyl
48	HO-CH ₂	cyklopentyl-metyl	terc-butyl	metyl
49	HO-CH ₂	cyklohexyl-metyl	terc-butyl	metyl
50	HO-CH ₂	2-metoxyeetyl	terc-butyl	metyl
51	HO-CH ₂	fenyl	terc-butyl	metyl
52	HO-CH ₂	benzyl	terc-butyl	metyl
53	HO-CH ₂	4-fenylfenyl	terc-butyl	metyl
54	HO-CH ₂	2-fenyleetyl	terc-butyl	metyl
55	HO-CH ₂	2-naftyl	terc-butyl	metyl
56	HO-CH ₂	3-metylfenyl	terc-butyl	metyl
57	HO-CH ₂	4-metylfenyl	terc-butyl	metyl
58	HO-CH ₂	4-metoxifenyl	terc-butyl	metyl
59	HO-CH ₂	4-fluórfenyl	terc-butyl	metyl

Poznámky k tabulke I:

Z je benzyloxykarbonylová skupina;

c-hexyl je cyklohexylová skupina;

1 znamená, že všetky štruktúry majú stereochemiu vzorca Ia, ak sa neuvádza inak

2 znamená zmes diastereomérov všeobecného vzorca Ia a Ib 1/1.

Všetky zlúčeniny sú charakterizované hmotnostnou spektroskopiou a protónovou NMR spektroskopiou. Tabuľka II zhŕňa analytické údaje z príkladov 1 až 59.

Tabuľka II

Pr.	ms: [M-H] ⁺	r.t. (A/B)	m.p.	[α] _D ²⁰
1	482		195-197	- 8,5
2	581,4	4,00 (10/90)		
3	707,1		171-172	- 3,2
4	609,1	2,98 (15/85)	159-161	- 1,7
5	665,2	3,35 (30/70)	211-220	+ 3,6
6	553,4	1,83 (20/80)	197-199	- 10
7	448,3		173-174	- 11,7
8	561,3	2,33 (15/85)		
9	575,3	2,33 (15/85)	176-177	- 8,7
10	617,4	4,44 (15/85)	158-160	- 4,6
11	511,2	2,87 (25/75)	197-200	+ 2,8
12	512,1		171-172	+ 1,9
13	511,2		170-171	+ 24,2
14	496,2		141-145	+ 2,8
15	588,2	3,63 (30/70)	197-199	- 5,6
16	521,1	3,26 (20/80)	174-176	- 15,8
17	436,2	1,34 (25/75)	115-125	+ 6,8
18	506		207	- 7,5
19	569	10,69 (30/70)	163-166	
20	750,4	2,07 (30/70)		
21	647,4	2,51 (30/70)	167-170	- 3,3
22	633,3	2,27 (30/70)		
23	707,3	2,62 (30/70)	161-163	- 3,5
24	472,2		187-188	- 9,0
25	647,3	3,12 (30/70)		
26	677,2	6,54 (40/60)	152-155	- 7,6

Pr.	ms: [M-H] ⁺	r.t. (A/B)	m.p.	[α] _D ²⁰
27	641,3	5,77 (35/65)		
28	585,1			
29	535,2	3,48 + 3,68 (40/60)	185	- 3,5
30	536,2	3,38 (30/70)	195-200	- 8,9
31	545,2	3,56 (30/70)	160	- 16,5
32	516,2	5,61 (30/70)	150-170	+ 26,2
33	390,2	1,73 (20/80)	185-186	- 2,8
34	478,2 [M-H] ⁻	5,78 (25/75)	120	- 13,1
35	380,2		173-175	- 2,5
36	346,1	2,31 (10/90)	152-155	+ 2,3
37	515,5	1,92 (30/70)	190-192	+ 2,0
38	521,5	1,44 (30/70)	173-177	
39	514,4	1,68 (20/80)		+ 45,8
40	459	2,93 (20/80)	204-206	- 23
41	473,3	1,62 (15/85)		- 3,4
42	332,0	--	144-146	
43	332	--	149-154	
44		1,18 (10/90)	137-141	+ 12,8
45			142-145	- 11,8
46	358,1	1,65 (20/80)	183-187	- 9,4
47	372,2	1,54 (20/80)	128-130	+ 2,0
48	372,1	--	149-153	+ 7,1
49	386,1	4,02 (20/80)	142-144	+ 4,9
50	348,1	2,56 (10/90)	--	
51	366,0	2,70 (10/90)	152-155	+ 20,9
52	380,1	1,92 (20/80)	130-137	+ 26,0
53	440,1 [M-H] ⁻	2,99 (30/70)	182-184	+ 38,7
54	392 [M-H] ⁻	2,73 (20/80)	126-130	+ 3,2
55	414,0 [M-H] ⁻	3,14 (20/80)	170-172	- 1,7
56	380,0	2,24 (20/80)	152-153	
57	378,1 [M-H] ⁻	2,13 (20/80)	146-147	+ 41,4
58	394,2 [M-H] ⁻		128-135	+ 47
59	382,1 [M-H] ⁻		149-153	+ 40,0

Poznámky k tabuľke II:

ms je hmotnostná spektroskopia;

[M-H]⁺, ak sa neuvádza inak, je [M-H]⁺;

r.t. je retenčný čas v minútach, HPLC kolóna C18;

A = % rozpúšťadla A: acetonitril (100 %);

B = % rozpúšťadla B: voda (88 %) + acetonitril (9,8 %) + 10 % vodný Me_4NOH (2 %) + 85 % vodná H_3PO_4 (0,2 %);

m.p. je teplota topenia v ° C;

$[\alpha]_D^{20}$ je merná optická otáčavosť pri teplote 20° C v metanole

Príklad testovania 1: Inhibícia uvoľňovania TNF

Mononukleárne bunky sa pripravujú z periférnej krvi zdravých dobrovoľníkov, pričom sa použije ficoll-hypaque hustotný gradient podľa spôsobu opísaného v Hansell a kol., J. Imm. Methods 145, 105 (1991) a koncentrácia 10^5 buniek/jamka v RPMI 1640 plus 10 % FCS. Bunky sa inkubujú so sériovými zriedeniami testovaných zlúčenín počas 30 minút pri teplote 37°C pred pridaním IFN γ (100 U/ml) a LPS (5 $\mu\text{g/ml}$) a potom sa ďalej inkubujú počas 3 hodín. Inkubácia sa ukončí odstredením pri 1400 otáčkach za minútu počas 10 minút. TNF α v supernatante sa meria použitím komerčného ELISA testu (Innotest hTNF α , dostupný od Innogenetics N. V., Zwijnaarde, Belgicko). Nové zlúčeniny sa testujú pri koncentrácii 0 až 10 μM . Testované zlúčeniny všeobecného vzorca I, najmä Ia, potláčajú pri tomto teste uvoľňovanie TNF pri IC_{50} 50 nM až 5 μM .

Príklad testovania 2: Cytotoxicita

Cytotoxicita sa určí na THP1 bunkách (5×10^4 buniek/jamka), ktoré sa inkubujú v prítomnosti IFN γ (100 U/ml) a LPS (5 $\mu\text{g/ml}$) a v prítomnosti alebo v neprítomnosti testovanej zlúčeniny počas 24 hodín pri teplote 37° C. Percentuálny obsah živých a mŕtvych buniek sa určí pomocou kolorimetrického merania (MTT), ktorým sa merajú enzýmy mitochondriálnej dehydrogenázy v živých bunkách, ako sa opisuje v Mosman, J. Imm. Methods 65, 55 (1983). Testované nové zlúčeniny sa vyznačujú nižšou než 50 % cytotoxicitou pri koncentrácii 10 μM , čo naznačuje, že nové zlúčeniny nie sú cytotoxické pri koncentrácii, ktorá je dostatočná na potla-

čenie TNF.

Príklad testovania 3: Inhibícia kolagenázy

Inhibícia kolagenázy sa určí použitím aktívnej kolagenázy s tiopeptidovým MMP-substrátom opísaným v Stein a Izquierdo-Martin, Arch. Biochem. Biophys. 308, 274-277 (1994). Testované zlúčeniny sa inkubujú s kolagenázou pred pridaním substrátu pri pH 6,5, teplote 25° C v 2-morfolínetánsulfónovej kyseline (50 mM) pufru s 10 mM chloridu vápenatého. Absorbancia sa zaznamenáva pri vlnovej dĺžke 405 nm v pravidelných intervaloch počas 40 minút. Inhibičná aktivita testovaných zlúčenín sa určí ako funkcia aktivity kolagenázy v kontrolných vzorkách v prítomnosti a neprítomnosti testovanej zlúčeniny. Nové zlúčeniny sa vyznačujú výraznou inhibičnou aktivitou kolagenázy závislou od dávky pri nízkych nM koncentráciách, napríklad nižších než 10 nM.

Príklad testovania 4: Orálna biologická využiteľnosť

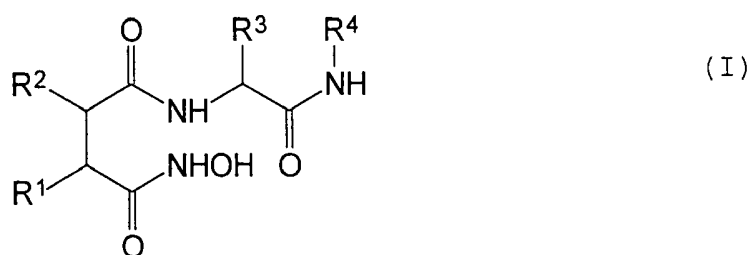
Test z predošlého príkladu sa štandardizuje meraním aktivity pri meniacich sa známych koncentráciách určitej testovanej zlúčeniny a meraním koncentrácie testovanej zlúčeniny v plazme po orálnom podávaní. Testované zlúčeniny sa podávajú orálne potkanom pri vedomí v dávke 10 mg/kg. Vzorky krvi sa odoberú z odrezaného konca chvosta po 30, 60, 120 a 240 minútach po orálnom podaní. Plazma sa extrahuje kyselinou trichlóroctovou. Extrakt sa testuje v uvedenom kolagenázovom inhibičnom teste, čím sa získa odhad koncentrácie liečiva prítomného v plazme. Nové zlúčeniny sa vyznačujú dobrou orálnou biologickou využiteľnosťou pri koncentrácii v plazme 300 až 5000 nM po 30 minútach a 50 až 500 nM po 240 minútach. Teda farmaceuticky účinná hladina v plazme (ako sa uvádza v príkladoch testovania 1 a 3) sa dá ľahko dosiahnuť po orálnom podaní primeranej dávky, napríklad 10 mg/kg. Dosiahnutá hladina v plazme je ďalej hlboko pod cytotoxickou hladinou a potkany sa pri tejto dávke nevyznačovali žiadnymi nepriaznivými účinkami.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. (7-N-Hydroxy)diamid kyseliny 3-imino-4-oxo-6-(oxymetyl)heptán-1,7-diovej vo voľnej forme alebo vo forme farmaceuticky prijateľnej soli.

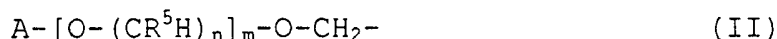
2. Zlúčenina podľa nároku 1, ktorou je (7-N-hydroxy)diamid kyseliny 3-imino-4-oxo-5-aryl-6-(oxymetyl)heptán-1,7-diovej vo voľnej forme alebo vo forme farmaceuticky prijateľnej soli.

3. Zlúčenina podľa nároku 1 všeobecného vzorca I



kde

R^1 je substituent vzorca II



kde n je 1, 2, 3 alebo 4;

m je 0, 1, 2 alebo 3;

každá skupina R^5 je nezávisle atóm vodíka; alkylová skupina obsahujúca 1 až 10 atómov uhlíka, ktorá je prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou, alkoxyskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupinou, alkylaminoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, merkaptoskupinou, alkylmerkaptoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka alebo chránenou hydroxylovou skupinou, chránenou aminoskupinou alebo chránenou merkaptoskupinou; alkenylová skupina obsahujúca 2 až 6

atómov uhlíka; arylová skupina obsahujúca 6 až 14 atómov uhlíka, ktorá je prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou, alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupinou, alkylaminoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, atómom halogénu alebo kyanoskupinou; alebo arylalkylová skupina obsahujúca v arylovej časti 6 až 14 atómov uhlíka a v alkylovej časti 1 až 6 atómov uhlíka;

A je atóm vodíka, alkylová skupina obsahujúca 1 až 10 atómov uhlíka, arylová skupina obsahujúca 6 až 14 atómov uhlíka, arylalkylová skupina obsahujúca v arylovej časti 6 až 14 atómov uhlíka a v alkylovej časti 1 až 6 atómov uhlíka, arylkarbonylová skupina obsahujúca v arylovej časti 6 až 14 atómov uhlíka alebo alkylkarbonylová skupina obsahujúca v alkylovej časti 1 až 10 atómov uhlíka;

R^2 je alkylová skupina obsahujúca 2 až 12 atómov uhlíka, alkenylová skupina obsahujúca 3 až 12 atómov uhlíka, cykloalkylová skupina obsahujúca 3 až 7 atómov uhlíka prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou, alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupinou alebo alkylaminoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, arylová skupina obsahujúca 5 až 14 atómov uhlíka alebo arylalkylová skupina obsahujúca v arylovej časti 5 až 14 atómov uhlíka a v alkylovej časti 1 až 6 atómov uhlíka, kde arylové skupiny sú prípadne substituované hydroxylovou skupinou, alkylovou skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupinou, atómom halogénu alebo kyanoskupinou;

R^3 je alkylová skupina obsahujúca 1 až 10 atómov uhlíka, ktorá je prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou alebo alkoxyamino skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, alkylaminoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, merkaptoskupinou, alkylmerkaptoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka alebo chránenou hydroxylovou skupinou, chránenou aminoskupinou alebo chránenou merkaptoskupinou; arylová skupina obsahujúca 6 až 14 atómov uhlíka prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou, aryloxy skupinou obsahujúcou 6 až 14 atómov uhlíka alebo alkoxy skupinou

obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupinou, alkylaminoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, atómom halogénu alebo kyanoskupinou, alebo indolylmetylová skupina;

R^4 je metylová skupina, pyridylová skupina alebo substituent vzorca X-Y-, kde X je morfolinoskupina, pyridylová skupina alebo arylová skupina, a Y je alkylénová skupina obsahujúca 1 až 12 atómov uhlíka, v ktorej sú až štyri metylénové jednotky prípadne nahradené skupinou -CO-, skupinou -NH-, skupinou -SO₂- alebo skupinou -O-;

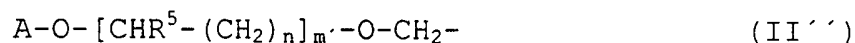
vo voľnej forme alebo vo forme farmaceuticky prijateľnej soli.

4. Zlúčenina podľa nároku 3, kde R^1 je substituent vzorca II'



kde A, n a m sú definované v nároku 3.

5. Zlúčenina podľa nároku 3, kde R^1 je substituent vzorca II''



kde A, n a R^5 sú definované v nároku 3 a m' je 0, 1 alebo 2.

6. Zlúčenina podľa nároku 3, 4 alebo 5 pod podmienkou, že ak m vo vzorci II alebo II' alebo m' vo vzorci II'' je nula, potom R^4 vo vzorci I je substituent vzorca X-Y-.

7. Zlúčenina všeobecného vzorca I podľa nároku 3, kde nezávisle:

n vo vzorci II je 3 alebo 4; alebo

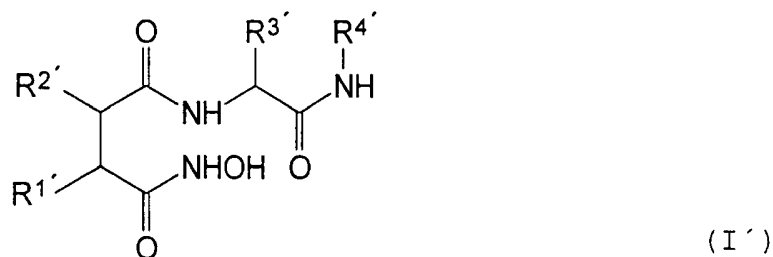
R^5 vo vzorci II nie je atóm vodíka; alebo

R^2 je alkylová skupina obsahujúca 7 až 12 atómov uhlíka, alkenylová skupina obsahujúca 3 až 12 atómov uhlíka, cyklolalkylová skupina obsahujúca 3 až 7 atómov uhlíka prípadne substituo-

vaná hydroxylovou skupinou, alkoxy skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupinou alebo alylaminoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, arylová skupina obsahujúca 5 až 14 atómov uhlíka alebo arylalkylová skupina obsahujúca v arylovej časti 5 až 14 atómov uhlíka a v alkylovej časti 1 až 6 atómov uhlíka, kde arylové skupiny sú prípadne substituované hydroxylovou skupinou, alkylovou skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, alkoxylovou skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, aminoskupinou, atómom halogénu alebo kyanoskupinou;

R^3 je alkylová skupina obsahujúca 1 až 10 atómov uhlíka, prípadne substituovaná aminoskupinou, alkylaminoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, merkaptoskupinou, alkylmerkaptoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka alebo chránenou hydroxylovou skupinou, chránenou aminoskupinou alebo chránenou merkaptoskupinou; arylová skupina obsahujúca 6 až 14 atómov uhlíka substituovaná aminoskupinou, alkylaminoskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, atómom halogénu alebo kyanoskupinou; alebo akákoľvek jej arylová skupina je heteroarylová skupina obsahujúca jeden alebo viacero heteroatómov, napríklad atóm dusíka, atóm kyslíka alebo atóm síry.

8. Zlúčenina podľa nároku 3 všeobecného vzorca I'



kde

$R^{1'}$ je substituent všeobecného vzorca II''''



taký, že

n' je celé číslo jedna alebo dva, výhodne dva;

m' je celé číslo nula, jedna, dva alebo tri;

A' je atóm vodíka, arylová skupina obsahujúca 6 až 14 atómov uhlíka, alkylová skupina obsahujúca 1 až 10 atómov uhlíka, arylkarbonylová skupina obsahujúca v arylovej časti 6 až 14 atómov uhlíka alebo alkylkarbonylová skupina obsahujúca v alkylovej časti 1 až 10 atómov uhlíka;

R^2' je alkylová skupina obsahujúca 2 až 6 atómov uhlíka;

R^3' je alkylová skupina obsahujúca 1 až 10 atómov uhlíka prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou alebo alkoxylovou skupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka, arylová skupina obsahujúca 6 až 14 atómov uhlíka prípadne substituovaná hydroxylovou skupinou, aryloxyskupinou obsahujúcou 6 až 14 atómov uhlíka alebo alkoxyskupinou obsahujúcou 1 až 6 atómov uhlíka alebo indolylmetylová skupina;

R_4' je metylová skupina, pyridylová skupina alebo substituent vzorca $X-Y-$, kde X je morfolinoskupina, pyridylová skupina alebo arylová skupina, a Y je alkylénová skupina obsahujúca 1 až 12 atómov uhlíka, kde až štyri metylénové jednotky sú prípadne nahradené skupinou $-CO-$, skupinou $-NH-$, skupinou $-SO_2-$ alebo skupinou $-O-$;

vo voľnej forme alebo vo forme farmaceuticky prijateľnej soli.

9. Zlúčenina podľa ktoréhokoľvek z nárokov 3 až 7, kde:

(i) R^1 vo vzorci II' alebo II'' a A vo vzorci II je atóm vodíka, alkylová skupina obsahujúca 1 až 6 atómov uhlíka alebo arylkarbonylová skupina obsahujúca v arylovej časti 6 až 14 atómov uhlíka;

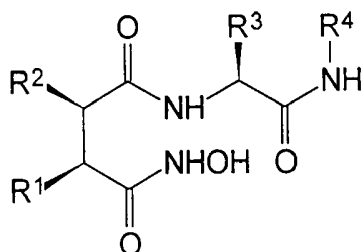
(ii) R^2 vo vzorci I je cyklohexylová skupina, fenylová skupina, 4-metylfenylová skupina, 4-metoxyfenylová skupina alebo izobuty-

lová skupina;

(iii) R^3 vo vzorci I je benzylová skupina alebo *terc*-butylová skupina; a

(iv) R^4 vo vzorci I je metylová skupina alebo morfolínokarbonylalkylová skupina obsahujúca v alkylovej časti 1 až 6 atómov uhlíka.

10. Zlúčenina podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 9, kde konfigurácia zodpovedá vzorcu Ia



(Ia)

11. Zlúčenina podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 10 vybraná zo zlúčenín uvedených v príkladoch 1 až 59.

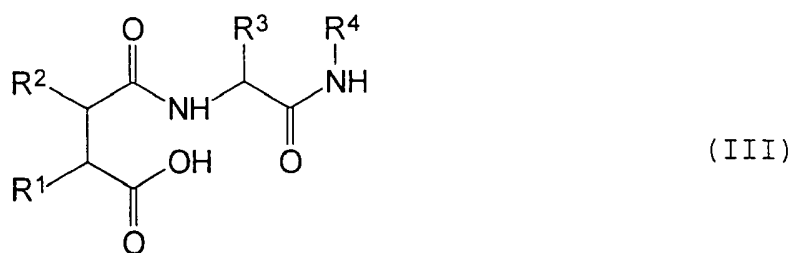
12. Zlúčenina podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11 na použitie ako liečivo.

13. Spôsob liečby zápalového alebo autoimúnneho ochorenia alebo stavu, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa podávanie účinného množstva zlúčeniny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11 pacientovi v prípade, že takúto liečbu potrebuje.

14. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje zlúčeninu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11.

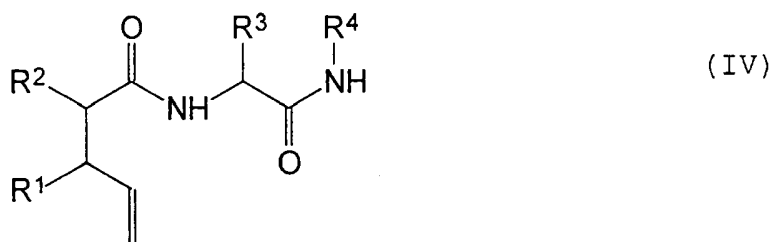
15. Použitie zlúčeniny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11 pri príprave liečiva na liečbu autoimúnneho alebo zápalového ochorenia alebo stavu.

16. Zlúčenina všeobecného vzorca III



kde R^1 , R^2 , R^3 a R^4 sú definované v nároku 3.

17. Zlúčenina všeobecného vzorca IV



kde R^1 , R^2 , R^3 a R^4 sú definované v nároku 3.

18. Spôsob prípravy zlúčeniny podľa ktoréhokolvek z nárokov 1 až 11, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa krok reakcie zlúčeniny všeobecného vzorca III podľa nároku 16 s hydroxylamínom, prípadne vo forme soli alebo v O-chránenej forme, a ak je to vhodné, odstránenie ochranných skupín z takto získaného produktu.