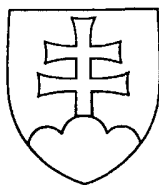


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: **1092-2003**
(22) Dátum podania prihlášky: **13. 3. 2002**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **5. 12. 2011**
Vestník ÚPV SR č.: **12/2011**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **0100902-6**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **15. 3. 2001**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **SE**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 5. 2004**
Vestník ÚPV SR č.: **5/2004**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **9. 11. 2011**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/SE02/00478**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/074751**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(11) Číslo dokumentu:

287834

(13) Druh dokumentu: **B6**

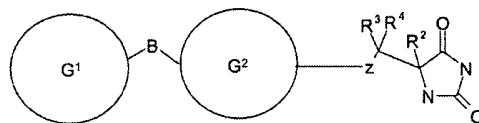
(51) Int. Cl. (2011.01):

C07D 233/00
C07D 403/00
A61K 31/00
A61P 35/00
A61P 11/00
A61P 19/00
A61P 1/00
A61P 13/00
A61P 15/00
A61P 17/00
A61P 25/00
A61P 27/00
A61P 29/00
A61P 37/00
A61P 7/00
A61P 9/00

- (73) Majiteľ: **ASTRAZENECA AB, Södertälje, SE;**
(72) Pôvodca: **Eriksson Anders, Lund, SE;**
Lepistö Matti, Lund, SE;
Lundkvist Michael, Lund, SE;
Munck af Rosenschöld Magnus, Lund, SE;
Zlatoidsky Pavol, Lund, SE;
(74) Zástupca: **Žovicová Viera, Mgr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Metaloproteinázové inhibítory**

- (57) Anotácia:
Zlúčeniny vzorca (II), kde Z je $\text{SO}_2(\text{N}^6)$ a atóm S skupiny Z je naviazaný na kruh G^2 , užitočné ako metaloproteinázové inhibítory, najmä ako inhibítory MMP12.



(II)

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka zlučenin užitočných pri inhibícii metaloproteináz a najmä farmaceutických kompozícií, ktoré ich obsahujú.

Doterajší stav techniky

Zlúčeniny podľa tohto vynálezu sú inhibítormi jedného alebo viacerých enzýmov - metaloproteináz. Metaloproteinázy sú nadrodinou proteináz (enzýmov), ktorých počet v nedávnych rokoch dramaticky vzrástol. Na základe štruktúrnych a funkčných aspektov boli tieto enzýmy klasifikované do rodín a podrodín, ako je opísané v publikácii N. M. Hooper (1994) FEBS Letters 354:1-6. Medzi príklady metaloproteináz patria matrixové metaloproteinázy (MMP) ako kolagenázy (MMP1, MMP8, MMP13), želatinázy (MMP2, MMP9), stromelyzíny (MMP3, MMP10, MMP11), matrilýzin (MMP7), metaloelastáza (MMP12), enamelyzín (MMP19), MT-MMP (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17); reprolyzín alebo adamalyzín, alebo rodina MDC, ktorá zahŕňa sekretázy shedázy ako TNF konvertujúce enzýmy (ADAM10 a TACE); astacínová rodina, ktorá zahŕňa enzýmy ako prokolagén spracúvajúcu proteinázu (PCP); a ďalšie metaloproteinázy ako agrekanáza, endotelín konvertujúca enzýmová rodina a angiotenzín konvertujúca enzýmová rodina.

Predpokladá sa, že metaloproteinázy sú dôležité v rade fyziologických chorobných procesov, ktoré zahŕňajú prestavbu tkaniva, napríklad embryonálny vývin, tvorba kostí a maternicová prestavba počas menštruácie. Toto je založené na schopnosti metaloproteináz štiepiť široký rad matrixových substrátov, ako je kolagén, proteoglykán a fibrinonektín. Predpokladá sa tiež, že metaloproteinázy sú dôležité v spracovaní alebo sekrécii biologicky významných bunkových mediátorov, ako je nádorový nekrotický faktor (TNF); a posttranslačnom proteolytickom spracovaní alebo ubúdání biologicky významných membránových proteínov, ako je napríklad nízkoafinitný IgE receptor CD23 (úplnejší zoznam pozrite v práci N. M. Hooper *et al.*, (1997) Biochem J. 321:265-279).

Metaloproteinázy sa spájajú s mnohými chorobami alebo stavmi. Inhibícia aktivity jednej alebo viacerých metaloproteináz môže byť napríklad priaznivá pri týchto chorobách alebo stavoch: rôzne zápalové a alergické choroby ako napríklad zápal kĺbov (najmä reumatoidná artritída, osteoartritída a dna), zápal gastrointestinálneho traktu (najmä zápalová črevná choroba, ulcerózna kolitída a gastritída), zápal kože (najmä psoriáza, ekzém, dermatitída); v nádorových metastázach alebo invázii; pri chorobe spojennej s nekontrolovanou degradáciou extracelulárneho matrixu, napríklad osteoartritíde; pri resorpčnej chorobe kostí (napríklad osteoporóza a Pagetova choroba); pri chorobách spojených s aberantnou angiogenezou; zrýchlená prestavba kolagénu spojená s diabetes, periodontálna choroba (napríklad gingivitída), ulcerácia rohovky, ulcerácia kože, pooperačné stavy (napríklad črevná anastomóza) a hojenie kožných rán; demyelináčne choroby centrálnej a periférnej nervovej sústavy (napríklad roztrúsená skleróza); Alzheimerova choroba; prestavba extracelulárneho matrixu pozorovaná pri kardiovaskulárnych chorobách, napríklad restenóza a ateroskleróza; astma; rinitída; a chronické obštrukčné pľúcne choroby (COPD).

MMP12, známa aj ako makrofágová elastáza alebo metaloelastáza, bola najprv klonovaná v myši (Shapiro *et al* [1992, Journal of Biological Chemistry 267: 4664]) a u človeka tou istou skupinou v roku 1995. MMP-12 sa preferenčne exprimuje v aktivovaných makrofágoch a bolo ukázané, že sa vylučuje z alveolárnych makrofágov z fajčiarov [Shapiro *et al*, 1993, Journal of Biological Chemistry, 268: 23824] ako aj v peňových bunkách v aterosklerotických léziách [Matsumoto *et al*, 1998, Am J Pathol 153: 109]. Myšiaci model COPD je založený na expozícii myši cigaretovému dymu na šesť mesiacov, dve cigarety denne šesť dní v týždni. Pri štandardných myšiach sa po tomto pôsobení vyvinul emfyzém. Keď sa v tomto modeli testovali MMP12 knock-out myši, nevyvinul sa u nich žiadny signifikantný emfyzém, čo intenzívne indikuje, že MMP-12 je kľúčovým enzýmom v patogenéze COPD. Rola MMP ako MMP12 v COPD (emfyzém a bronchitída) je diskutovaná v práci Anderson a Shinagawa, 1999, Current Opinion in Anti-inflammatory and Immunomodulatory Investigational Drugs 1(1): 29-38. Nedávno sa zistilo, že fajčenie zvyšuje infiltráciu makrofágov a expresiu od makrofágov odvodennej MMP-12 v plakoch ľudskej karotídy; Kangavari [Matetzky S, Fishbein MC *et al.*, Circulation 102:(18), 36-39 Suppl. S, Oct 31, 2000].

MMP13, alebo kolagenáza 3, bola najprv klonovaná z knižnice cDNA odvodennej z nádoru prsníka [J. M. P. Freije *et al.* (1994) Journal of Biological Chemistry 269 (24): 16766 - 16773]. PCR-RNA analýza RNA zo širokého radu tkanív indikovala, že expresia MMP13 je spojená s karcinómami prsníka, keďže sa nenašla v prsníkových fibroadenómoch, normálnej alebo odpočívajúcej mliečnej žľazy, placenty, pečeni, vaječníkoch, maternici, prostate ani príušnici ani v bunkových líniiach rakoviny prsníka (T47-D, MCF-7 a ZR75-1). Po tomto zistení sa MMP13 zistila v transformovaných epidermálnych keratinocytoch [N. Johansson *et al.*, (1997) Cell Growth Differ. 8 (2): 243 - 250], karcinómoch šupinatých buniek [N. Johansson *et al.*, (1997) Am. J. Pathol. 151 (2): 499 - 508] a epidermálnych nádoroch [K. Airola *et al.*, (1997) J. Invest. Dermatol. 109 (2): 225 - 231]. Tieto výsledky naznačujú, že MMP13 sa vylučuje transformovanými epitelovými bun-

kami a môže byť zapojená do degradácie extracelulárneho matrixu a interakcie bunka - matrix spojennej s metastázami, najmä ako sa pozoruje pri invazívnych léziách rakoviny prsníka a malígnom raste epitelu v karcinogénnej koži.

Nedávno publikované údaje implikujú, že MMP13 má úlohu pri premene iných spojovacích tkanív. Napríklad v súlade so substrátovou špecifickosťou MMP13 a preferenciou pre degradovanie kolagénu typu II [P. G. Mitchell *et al.*, (1996) *J. Clin. Invest.* **97** (3): 761 - 768; V. Knauper *et al.*, (1996) *The Biochemical Journal* **271**: 1544 - 1550] bola postavená hypotéza, že MMP13 má úlohu počas primárnej osifikácie a skeletálnej prestavby [M. Stahle-Backdahl *et al.*, (1997) *Lab. Invest.* **76** (5): 717 - 728; N. Johansson *et al.*, (1997) *Dev. Dyn.* **208** (3): 387 - 397], pri deštruktívnych kĺbových chorobách, ako je reumatoidná artritída a osteoartritída [D. Wernicke *et al.*, (1996) *J. Rheumatol.* **23**: 590 - 595; P. G. Mitchell *et al.*, (1996) *J. Clin. Invest.* **97** (3): 761 - 768; O. Lindy *et al.*, (1997) *Arthritis Rheum* **40** (8): 1391 - 1399]; a počas aseptického uvoľňovania bedrových náhrad [S. Imai *et al.*, (1998) *J. Bone Joint Surg. Br.* **80** (4): 701 - 710]. MMP13 bola tiež implikovaná v chronickej periodontitíde dospelých, keďže bola lokalizovaná do epitelu chronicky zapálenej sliznice ľudského gingiválneho tkaniva [V. J. Uitto *et al.*, (1998) *Am. J. Pathol.* **152** (6): 1489 - 1499] a pri premene kolagénneho matrixu pri chronických ranách [M. Vaalamo *et al.*, (1997) *J. Invest. Dermatol.* **109** (1): 96 - 101].

MMP9 (želatináza B; 92 kDa kolagenáza typu IV; 92 kDa želatináza) je vylučovaný proteín, ktorý bol najprv purifikovaný, potom klonovaný a sekvencovaný v roku 1989 [S. M. Wilhelm *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* **264** (29): 17213 - 17221; publikované erratum v *J. Biol. Chem.* (1990) **265** (36): 22570]. Nedávny prehľadný článok o MMP9 poskytuje výborný zdroj podrobných informácií a referencií o tomto type proteázy: T. H. Vu a Z. Werb (1998) (In: *Matrix Metalloproteinases*, 1998, redigoval W. C. Parks a R. P. Mecham, s. 115 - 148, Academic Press, ISBN 0-12-545090-7). Nasledujúce body čerpal z tohto prehľadného článku T. H. Vu a Z. Werb (1998).

Expresia MMP9 je normálne obmedzená na niekoľko bunkových typov vrátane trofoblastov, osteoklastov, neutrofilov a makrofágov. Jej expresia však môže byť indukovaná v týchto istých bunkách a v iných bunkových typoch niekoľkými mediátormi vrátane expozície buniek rastovým faktorom alebo cytokínom. Sú to tie isté mediátory, ktoré sú často implikované pri iniciovaní zápalovej reakcie. Rovnako ako pri iných vylučovaných MMP aj MMP9 sa uvoľňuje ako neaktívny proenzým, ktorý sa následne štiepi za vzniku enzymaticky aktívneho enzýmu. Proteázy potrebné na túto aktiváciu *in vivo* nie sú známe. Rovnováha aktívnej MMP9 oproti neaktívnemu enzýmu je ďalej regulovaná *in vivo* interakciou s TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases - 1), prírodne sa vyskytujúcim proteínom. TIMP-1 sa viaže na C-koncový región MMP9 čo vedie k inhibícii katalytickej domény MMP9. Rovnováha indukovanej expresie ProMMP9, štiepenie proenzýmu na aktívnu MMP9 a prítomnosť TIMP-1 sa kombinujú, aby určili množstvo katalyticky aktívnej MMP9, ktoré je prítomné na lokálnom mieste. Proteolyticky aktívna MMP9 atakuje substráty, ktoré zahŕňajú želatínu, elastín a natívne kolagény typu IV a typu V; nemá žiadnu aktivitu proti natívnemu kolagénu typu I, proteoglykánom alebo laminínom.

Rastie počet údajov implikujúcich roly pre MMP9 v rôznych fyziologických a patologických procesoch. Medzi fyziologické roly patrí invázia embryonálnych trofoblastov cez maternicový epitel v raných štádiách embryonálnej implantácie; určitá úloha v raste a vývoji kostí; a migrácii zápalových buniek z vaskulatúry do tkanív.

Uvoľňovanie MMP-9, merané pomocou enzymatického imunologického testu, bolo signifikantne zvýšené v tekutinách a v AM supernatantoch z neliečených astmatikov v porovnaní s inou populáciou [Am. J. Resp. Cell & Mol. Biol., Nov 1997, **17** (5): 583 - 591]. Zvýšená expresia MMP9 bola pozorovaná aj pri iných patologických stavoch, čím sa implikuje MMP9 v chorobných procesoch ako COPD, artritída, nádorové metastázy, Alzheimerova choroba, roztrúsená skleróza a praskanie plaku pri ateroskleróze vedúce k akútnym koronárnym stavom, napríklad infarktu myokardu.

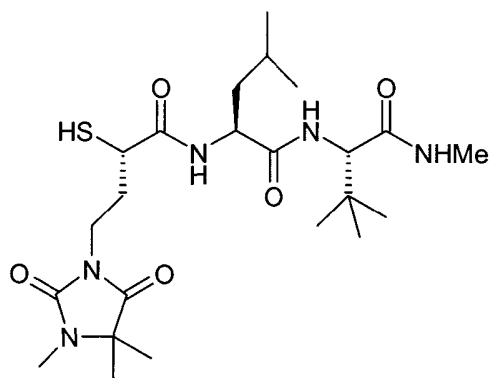
MMP-8 (kolagenáza-2, neutrofilová kolagenáza) je 53 kD enzým matrixovej metaloproteinázovej rodiny, ktorý sa preferenčne exprimuje v neutrofiloch. Neskoršie štúdie indikujú, že MMP-8 sa exprimuje aj v iných bunkách, napríklad v osteoartritických chondrocytoch [Shlopov *et al.*, 1997, *Arthritis Rheum*, **40**: 2065]. MMP produkované neutrofilmi môžu spôsobovať premenu tkaniva a teda blokovanie MMP-8 by malo mať pozitívny účinok pri fibrotických chorobách napríklad pľúc a pri degradatívnych chorobách, ako je pľúcny emfyzém. Zistilo sa tiež, že MMP-8 je regulovaná nahor pri osteoartritíde, čo indikuje, že blokovanie MMP-8 môže byť pri tejto chorobe tiež prospešné.

MMP-3 (stromelyzín-1) je 53 kD enzým matrixovej metaloproteinázovej rodiny. Aktivita MMP-3 bola demonštrovaná vo fibroblastoch izolovaných zo zapálených d'asién [Uitto V. J. *et al.*, 1981, *J. Periodontal Res.*, **16**: 417 - 424] a enzýmové hladiny boli korelované so závažnosťou ochorenia d'asién [Overall C. M. *et al.*, 1987, *J. Periodontal Res.*, **22**: 81 - 88]. MMP-3 je produkovaná aj bazálnymi keratinocyty v rade chronických vredov [Saarialho-Kere U. K. *et al.*, 1994, *J. Clin. Invest.*, **94**: 79 - 88]. mRNA a proteín MMP-3 boli zistené v bazálnych keratinocytoch susediacich ale distálnych od okraja rany v tom, čo pravdepodobne predstavuje proliferujúcu epidermu. MMP-3 môže teda brániť epiderme v hojení. Niekoľkí výskumníci ukázali

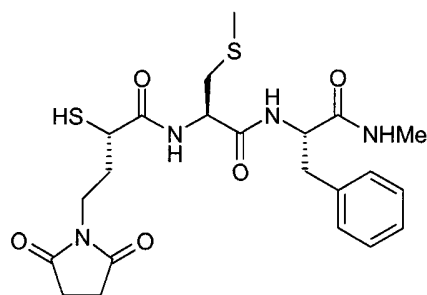
5 konzistentné zvýšenie MMP-3 v synoviálnych tekutinách z reumatických a osteoartritických pacientov v porovnaní s kontrolami [Walakovits L. A. *et al*, 1992, *Arthritis Rheum.*, 35: 35 - 42; Zafarullah M. *et al*, 1993, *J. Rheumatol.*, 20: 693 - 697]. Tieto štúdie poskytli základ pre presvedčenie, že inhibítor MMP-3 bude liečiť choroby zahŕňajúce narušenie extracelulárneho matrixu vedúce k zápalu v dôsledku lymfocytickej infiltrácie alebo strate štruktúrnej integrity potrebnej pre funkciu orgánu.

Je známych niekoľko inhibítorov metaloproteináz (pozrite napríklad prehľadný článok o inhibítoroch MMP autorov Beckett R. P. a Whittaker M., 1998, *Exp. Opin. Ther. Patents*, 8 (3): 259 - 282]. Rôzne triedy zlúčenín môžu mať rôzne stupne potencie a selektivity pre inhibíciu rôznych metaloproteináz.

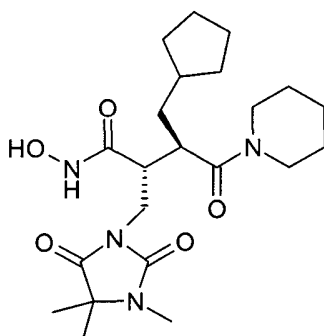
10 Whittaker M. *et al* (1999, *Chemical Reviews* 99 (9): 2735 - 2776] uvádzajú prehľad širokého radu známych zlúčenín - inhibítorov MMP. Uvádzajú, že účinný inhibítor MMP vyžaduje skupinu viažucu zinok alebo ZBG (zinc binding group; funkčná skupina schopná chelácie zinočnatého iónu aktívneho miesta), aspoň jednu funkčnú skupinu, ktorá poskytuje interakciu vodíkovej väzby s enzýmovým hlavným reťazcom, a jeden alebo viacero bočných reťazcov, ktoré podliehajú účinným van der Waalovým interakciám s enzýmovými vedľajšími aktívnymi miestami. Skupiny viažuce zinok v známych inhibítoroch MMP zahŕňajú karboxylové skupiny, hydroxámové skupiny, sulfhydryl alebo merkaptó atď. Napríklad Whittaker M. *et al* diskutujú nasledujúce inhibítory MMP:



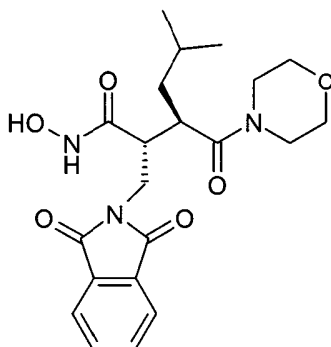
20 Uvedená zlúčenina vstúpila do klinického vývoja. Má merkaptoacylovú skupinu viažucu zinok, trimetylhydantoinyletylovú skupinu v polohe P1 a leuciny-*tert*-butylglycinylový hlavný reťazec.



25 Uvedená zlúčenina má merkaptoacylovú skupinu viažucu zinok a imidovú skupinu v polohe P1.



Uvedená zlúčenina bola vyvinutá na liečbu artritídy. Má nepeptidickú sukcinylhydroxamátovú skupinu viažucu zinok a trimetylhdyantoinyletylovú skupinu v polohe P1.

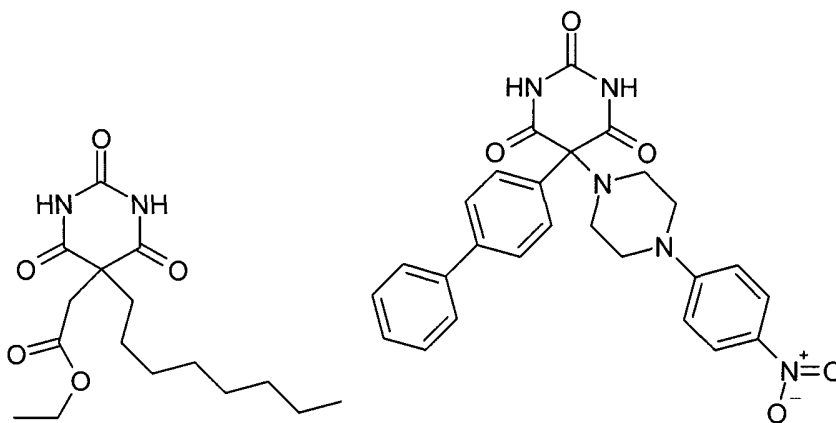


5

Uvedená skupina je ftalimidoderivát, ktorý inhibuje kolagenázy. Má nepeptidickú sukcinylhydroxamátovú skupinu viažucu zinok a cyklickú imidovú skupinu v polohe P1.

Whittaker M. *et al* diskutujú aj iné inhibítory majúce P1 cyklickú imidoskupinu a rôzne skupiny viažuce zinok (sukcinylhydroxamátovú, karboxylovú, tiolovú, fosforečnanovú skupinu).

10

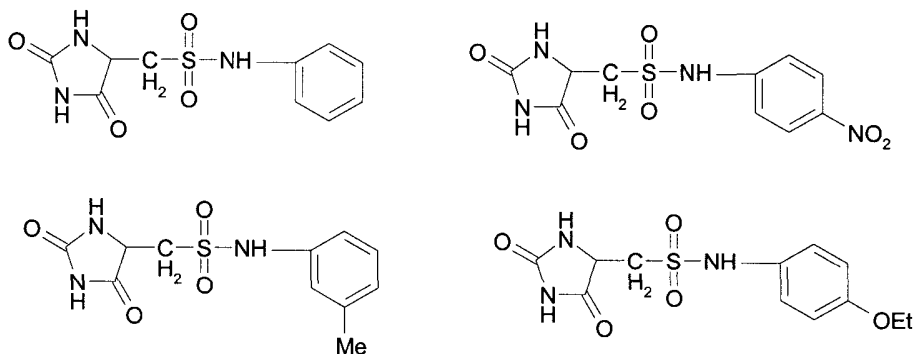


Zdá sa, že uvedené zlúčeniny sú dobrými inhibítormi MMP8 a MMP9 (patentové prihlášky PCT WO9858925, WO9858915). Majú pyrimidín-2,3,4-triónovú skupinu viažucu zinok.

15

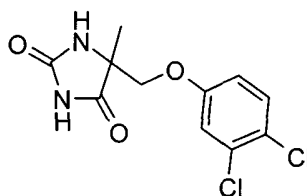
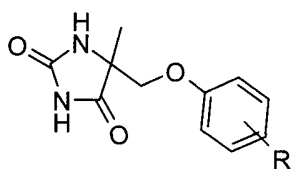
Nasledujúce zlúčeniny nie sú známe ako inhibítory MMP:

Lora-Tamayo, M *et al* (1968, An. Quim 64 (6): 591 - 606) opisujú syntézu nasledujúcich zlúčenín ako potenciálnych protirakovinových prostriedkov:



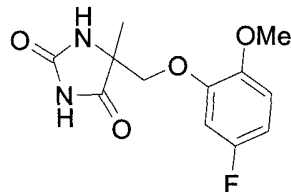
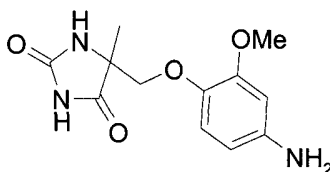
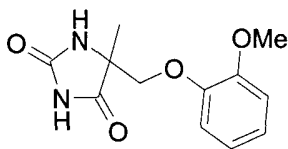
20

České patenty číslo 151744 (19731119) a 152617 (1974022) opisujú syntézu a antikonvulzívnu aktivitu nasledujúcich zlúčenín:



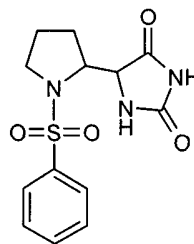
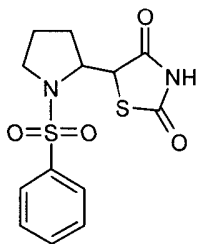
R = 4-NO₂, 4-OMe, 2-NO₂

Patent USA číslo 3529019 (19700915) opisuje nasledujúce zlúčeniny používané ako intermediáty:



5

Patentová prihláška PCT číslo WO 00/09103 opisuje zlúčeniny užitočné na liečbu poruchy zraku vrátane nasledujúcich (zlúčeniny 81 a 83, tabuľka A, strana 47):



10

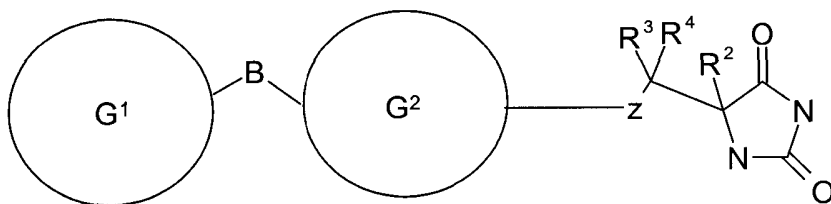
Podstata vynálezu

Objavili sme novú triedu zlúčenín, ktoré sú inhibítormi metaloproteináz a sú osobitne zaujímavé pri inhibícii MMP, ako je MMP-12. Zlúčeniny sú inhibítormi metaloproteináz a majú skupinu viažucu kovy, ktorá sa nenachádza pri známych inhibítoroch metaloproteináz. Konkrétne sme objavili zlúčeniny, ktoré sú potentnými inhibítormi MMP12 a majú vhodné profily aktivity. Zlúčeniny podľa tohto vynálezu majú priaznivú potenciu, selektivitu a/alebo farmakokinetické vlastnosti.

Metaloproteinázový inhibítor je zlúčenina, ktorá inhibuje aktivitu metaloproteinázového enzýmu (napríklad MMP). Ako neobmedzujúci príklad môže inhibítor vykazovať IC₅₀ *in vitro* v rozmedzí 0,1 - 10 000 nanomólov, výhodne 0,1 - 1 000 nanomólov.

Skupina viažuca kovy je funkčná skupina schopná viazať kovový ión z aktívneho miesta enzýmu. Napríklad skupinou viažucou kovy bude skupina viažuca zinok v inhibítoroch MMP viažuca zinočnatý ión z aktívneho miesta. Skupina viažuca kovy vzorca k je na báze päťčlennej kruhovej štruktúry a výhodne ide o hydantoínovú skupinu, s najväčšou výhodou 5-substituovaný 1-H,3-H-imidazolidín-2,4-diól.

Vynález poskytuje zlúčeniny vzorca (II)



(II),

30

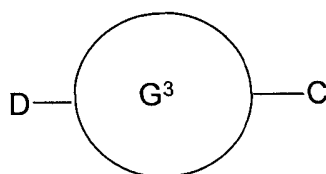
kde

každé z G^1 a G^2 je monocyklická kruhová štruktúra zahŕňajúca po až 7 atómov v kruhu nezávisle vybraná spomedzi nasledujúcich: cykloalkyl, aryl, heterocykloalkyl alebo heteroaryl, pričom každá kruhová štruktúra je nezávisle voliteľne substituovaná jedným alebo dvoma substituentmi nezávisle vybranými spomedzi nasledujúcich: halogén, hydroxy, haloalkoxy, amino, N-alkylamino, N,N-dialkylamino, kyano, nitro, alkyl, alkoxy, alkylsulfón, haloalkylsulfón, alkylkarbamát, alkylamid, kde akýkoľvek alkylový radikál v rámci akéhokoľvek substituentu môže byť sám voliteľne substituovaný jednou alebo viacerými skupinami vybranými spomedzi nasledujúcich: halogén, hydroxy, amino, N-alkylamino, N,N-dialkylamino, kyano, nitro, alkoxy, haloalkoxy;

Z je $SO_2N(R^6)$;

B je vybrané spomedzi nasledujúcich: priama väzba, O, (C_{1-6}) alkyl, (C_{1-6}) heteroalkyl;

R^2 je vybrané spomedzi nasledujúcich: H, (C_{1-6}) alkyl, haloalkyl, hydroxyalkyl, alkoxyalkyl, aminoalkyl, (N-alkylamino)alkyl, (N,N-dialkylamino)alkyl, amidoalkyl, tioalkyl, alebo R^2 je skupina vzorca (III)



(III),

C a D sú nezávisle vybrané spomedzi nasledujúcich: priama väzba, H, (C_1-C_6) alkyl, (C_1-C_6) haloalkyl, alebo (C_1-C_6) heteroalkyl obsahujúci jeden alebo dva heteroatómy vybrané spomedzi N, O alebo S tak, že keď sú prítomné dva heteroatómy, sú oddelené aspoň dvoma atómami uhlíka;

G^3 je monocyklická kruhová štruktúra zahŕňajúca do 7 atómov v kruhu nezávisle vybraná z nasledujúcich: cykloalkyl, aryl, heterocykloalkyl alebo heteroaryl, voliteľne substituovaný jedným alebo dvoma substituentmi nezávisle vybranými spomedzi nasledujúcich: halogén, hydroxy, amino, N-alkylamino, N,N-dialkylamino, kyano, nitro, alkyl, alkoxy, alkyl sulfón, haloalkylsulfón, alebo alkyl substituovaný jednou alebo viacerými skupinami vybranými spomedzi nasledujúcich: halogén, hydroxy, amino, N-alkylamino, N,N-dialkylamino, kyano, nitro, alkoxy, haloalkoxy.

Voliteľne je R^2 substituované nasledujúcimi: halogén, haloalkyl, hydroxy, alkoxy, haloalkoxy, amino, aminoalkyl, N-alkylamino, N,N-dialkylamino, (N-alkylamino)alkyl, (N,N-dialkylamino)alkyl, alkylsulfón, aminosulfón, N-alkylaminosulfón, N,N-dialkylaminosulfón, amido, N-alkylamido, N,N-dialkylamido, kyano, sulfonamino, alkyl-sulfonamino, amidino, N-aminosulfónamidino, guanidino, N-kyanoguanidino, tioguanidino, 2-nitroguanidino, 2-nitroetén-1,1-diamino, karboxy, alkylkarboxy;

R^3 a R^4 sú nezávisle vybrané spomedzi nasledujúcich: H alebo (C_{1-3}) alkyl;

R^6 je vybrané spomedzi nasledujúcich: H, (C_{1-3}) alkylamino, alebo R^6 je (C_{1-3}) alkyl voliteľne substituovaný arylom, heteroarylom, heterocykloalkylom.

Voliteľne môžu byť R^2 a R^3 spojené, čím sa vytvorí kruh obsahujúci do 7 atómov v kruhu, alebo môžu R^2 a R^4 tvoriť kruh obsahujúci do 7 atómov v kruhu, alebo R^2 a R^6 môžu byť spojené, čím sa vytvorí kruh obsahujúci do 7 atómov v kruhu; alebo R^3 a R^4 môžu byť spojené, čím sa vytvorí kruh obsahujúci do 7 atómov v kruhu, alebo R^3 a R^6 môžu byť spojené, čím sa vytvorí kruh obsahujúci do 7 atómov v kruhu, alebo R^4 a R^6 môžu byť spojené, čím sa vytvorí kruh obsahujúci do 7 atómov v kruhu.

Akákoľvek uvedená heteroalkylová skupina je heteroatómom substituovaný alkyl obsahujúci jednu alebo viacero heteroskupín nezávisle vybraných spomedzi N, O, S, SO, SO_2 , (pričom heteroskupinou je heteroatóm alebo skupina atómov).

Akákoľvek uvedená heterocykloalkylová alebo heteroarylová skupina obsahuje jednu alebo viacero heteroskupín vybraných spomedzi N, O, S, SO, SO_2 .

Akákoľvek spomínané alkylové, alkenylové alebo alkinylové skupiny môžu byť lineárne alebo rozvetvené; ak nie je uvedené inak, akákoľvek spomínaná alkylová skupina je výhodne (C_{1-7}) alkyl a s najväčšou výhodou (C_{1-6}) alkyl.

Výhodné zlúčeniny vzorca (II) sú tie, kde platí jedno alebo viacero z nasledujúcich:

Z je $SO_2N(R^6)$ a atóm S skupiny Z je naviazaný na kruh G^2 ;

B je priama väzba alebo O;

R^2 nie je voliteľne substituovaný, alebo R^2 je vybrané spomedzi nasledujúcich: H, (C_{1-6}) alkyl, aryl- (C_{1-6}) alkyl alebo heteroaryl- (C_{1-6}) alkyl voliteľne substituovaný nasledujúcimi: halogén, haloalkyl, hydroxy, alkoxy, haloalkoxy, amino, aminoalkyl, N-alkylamino, N,N-dialkylamino, (N-alkylamino)alkyl, (N,N-dialkylamino)alkyl, alkylsulfón, aminosulfón, N-alkylaminosulfón, N,N-dialkylaminosulfón, amido, N-alkylamido, N,N-dialkylamido, kyano, sulfonamino, alkylsulfonamino, amidino, N-aminosulfónamidino, guanidino, N-kyanoguanidino, tioguanidino, 2-nitroguanidino, 2-nitroetén-1,1-diamino, karboxy, alkylkarboxy;

R^3 aj R^4 sú H;

R^6 je H, benzyl alebo metylénpyridín;

G^1 a G^2 sú vybrané spomedzi arylu alebo heteroarylu;

R^3 a R^4 tvoria 5- alebo 6-členný kruh (výhodne 5-členný kruh) alebo R^3 a R^6 tvoria 5- alebo 6-členný kruh (výhodne 5-členný kruh) alebo R^4 a R^6 tvoria 5- alebo 6-členný kruh (výhodne 5-členný kruh); výhodne R^3 a R^6 tvoria 5- alebo 6-členný kruh, s najväčšou výhodou 5-členný kruh;

R^2 a R^3 tvoria 5-členný kruh ring alebo R^2 a R^6 tvoria 5-členný kruh.

Osobitne výhodné zlúčeniny vzorca (II) sú tie, kde Z je $SO_2N(R^6)$ a atóm S skupiny Z je naviazaný na kruh G^2 .

Konkrétnou zlúčeninou podľa vynálezu je: 5-(1-[[4-(4-kyanofenoxy)fenyl]sulfonyl]pyrolidin-2-yl)-5-metylimidazolidín-2,4-dión.

Bude zrejme, že konkrétne substituenty a počet substituentov v zlúčeninách podľa vynálezu je vybraný tak, aby sa predišlo stericky nežiaducim kombináciám.

Každá zlúčenina uvedená ako príklad predstavuje konkrétny a nezávislý aspekt vynálezu.

Kde v zlúčeninách podľa vynálezu existujú opticky aktívne centrá, uvádzame všetky jednotlivé opticky aktívne formy a ich kombinácie ako jednotlivé konkrétne uskutočnenia vynálezu ako aj ich zodpovedajúce racemáty. Racemáty možno rozdeliť na jednotlivé opticky aktívne formy pomocou známych postupov (Advanced Organic Chemistry: 3. vydanie: autor J. March, s. 104-107) vrátane napríklad tvorby diastereomérnych derivátov s vhodnými opticky aktívnymi pomocnými látkami s nasledujúcou separáciou a potom odštiepením pomocných látok.

Bude zrejme, že zlúčeniny podľa vynálezu môžu obsahovať jeden alebo viacero asymetricky substituovaných atómov uhlíka. Prítomnosť jedného alebo viacerých týchto asymetrických centier (chirálnych centier) v zlúčenine vzorca (II) môže viesť k vzniku stereoizomérov a v každom prípade vynález treba chápať tak, že pokrýva všetky také stereoizoméry vrátane enantiomérov a diastereomérov a zmesi vrátane ich racemických zmesí.

Kde v zlúčeninách podľa vynálezu existujú tautoméry, uvádzame všetky jednotlivé tautoméne formy a ich kombinácie ako jednotlivé konkrétne uskutočnenia vynálezu.

Ako bolo naznačené, zlúčeniny podľa vynálezu sú inhibítory metaloproteináz, najmä sú inhibítormi MMP12. Každá z uvedených indikácií pre zlúčeniny vzorca (II) predstavuje nezávislé a konkrétne uskutočnenie vynálezu.

Isté zlúčeniny podľa vynálezu sú osobitne vhodné ako inhibítory MMP13 a/alebo MMP9, a/alebo MMP8, a/alebo MMP3.

Zlúčeniny podľa vynálezu majú priaznivý profil selektivity. Hoci nechceme byť viazaní teoretickými úvahami, predpokladá sa, že zlúčeniny podľa vynálezu majú selektívnu inhibíciu pre ktorúkoľvek z uvedených indikácií v porovnaní s akoukoľvek inhibičnou aktivitou proti MMP1; ako neobmedzujúci príklad môžu mať 100 - 1 000-násobnú selektivitu oproti akejkoľvek inhibičnej aktivite proti MMP1.

Zlúčeniny podľa vynálezu možno poskytovať aj ako farmaceuticky prijateľné soli. Medzi tieto patria kyselínové adičné soli ako hydrochlorid, hydrobromid, citrát a maleát a soli tvorené s kyselinou fosforečnou a sírovou. Podľa ďalšieho aspektu sú vhodnými soľami bážické soli, napríklad soli alkalických kovov, napríklad sodné alebo draselné, soli alkalických zemín, napríklad vápenaté alebo horečnaté, alebo soli s organickými amínmi, napríklad trietylamin.

Aby sa dala používať zlúčenina - metaloproteinázový inhibítor podľa vynálezu (zlúčenina vzorca (II)) alebo jej farmaceuticky prijateľná soľ na terapeutickú liečbu (vrátane profylaktickej liečby) cicavcov vrátane ľudí, bežne sa formuluje podľa štandardnej farmaceutickej praxe ako farmaceutická kompozícia.

Preto v rámci ďalšieho aspektu predložený vynález poskytuje farmaceutickú kompozíciu, ktorá obsahuje zlúčeninu podľa vynálezu (zlúčeninu vzorca (II)) alebo jej farmaceuticky prijateľnú soľ a farmaceuticky prijateľný nosič.

Farmaceutické kompozície podľa tohto vynálezu možno podávať štandardným spôsobom pre chorobu alebo stav, ktorý sa má liečiť, napríklad orálnym, lokálnym, parenterálnym, bukálnym, nazálnym, vaginálnym alebo rektálnym podaním alebo inhaláciou. Na tieto účely môžu byť zlúčeniny podľa vynálezu formulované spôsobmi známymi v danej oblasti techniky vo forme napríklad tabliet, kapsúl, vodných alebo olejových roztokov, suspenzií, emulzií, krémov, mastí, gélov, nazálnych sprejov, supozitórií, jemne mletých práškov alebo aerosólov na inhaláciu a na parenterálne použitie (vrátane intravenózneho, intramuskulárneho alebo infúziou) vo forme sterilných vodných alebo olejových roztokov alebo suspenzií, alebo sterilných emulzií.

Popri zlúčeninách podľa predloženého vynálezu môže farmaceutická kompozícia podľa tohto vynálezu obsahovať alebo byť podávaná spolu (súčasne alebo postupne) s jedným alebo viacerými farmaceutickými prostriedkami hodnotnými pri liečbe jednej alebo viacerých uvedených chorôb alebo stavov.

Farmaceutické kompozície podľa tohto vynálezu sa budú bežne podávať ľuďom tak, aby sa získala denná dávka 0,5 až 75 mg/kg telesnej hmotnosti (a výhodne 0,5 až 30 mg/kg telesnej hmotnosti). Túto dennú dávku možno podať v rozdelených dávkach podľa potreby, pričom presné množstvo podanej zlúčeniny a cesta po-

dania bude závisieť od hmotnosti, veku a pohlavia liečeného pacienta a od konkrétnej liečenej choroby alebo stavu podľa zásad známych v danej oblasti.

Jednotkové liekové formy budú spravidla obsahovať približne 1 mg až 500 mg zlúčeniny podľa tohto vynálezu.

5 Preto v rámci ďalšieho aspektu poskytujeme zlúčeninu vzorca (II) alebo jej farmaceuticky prijateľnú soľ na použitie pri spôsobe terapeutickú liečby ľudského alebo zvieracieho tela alebo na použitie ako terapeutický prostriedok. Uvádzame použitie pri liečbe choroby alebo stavu sprostredkovaného jedným alebo viacerými metaloproteinázovými enzýmami. Konkrétne uvádzame použitie pri liečbe choroby alebo stavu sprostredkovaného MMP12 a/alebo MMP13, a/alebo MMP9, a/alebo MMP8, a/alebo MMP3; najmä použitie pri liečbe choroby alebo stavu sprostredkovaného MMP12 alebo MMP9; s najväčšou výhodou použitie pri liečbe choroby alebo stavu sprostredkovaného MMP12.

10 Uvádzame najmä zlúčeninu vzorca (II) alebo jej farmaceuticky prijateľnú soľ na použitie pri spôsobe terapeutickú liečby ľudského alebo zvieracieho tela alebo na použitie ako terapeutický prostriedok (napríklad použitie pri liečbe choroby alebo stavu sprostredkovaného MMP12 a/alebo MMP13, a/alebo MMP9, a/alebo MMP8, a/alebo MMP3; najmä MMP12 alebo MMP9; s najväčšou výhodou MMP12).

15 Uvádzame tiež použitie zlúčeniny vzorca (II) alebo jej farmaceuticky prijateľnej soli pri príprave liečiva na použitie pri liečbe choroby alebo stavu sprostredkovaného jedným alebo viacerými metaloproteinázovými enzýmami.

20 Uvádzame tiež použitie zlúčeniny vzorca (II) (alebo jej farmaceuticky prijateľnej soli) pri príprave liečiva na použitie pri liečbe choroby alebo stavu sprostredkovaného jedným alebo viacerými metaloproteinázovými enzýmami.

25 Metaloproteinázou sprostredkované choroby alebo stavy zahŕňajú astmu, rinitídu, chronické obštrukčné pľúcne choroby (COPD), artritídu (napríklad reumatickú artritídu a osteoartritídu), aterosklerózu a restenózu, rakovinu, inváziu a metastázy, choroby zahŕňajúce deštrukciu tkaniva, uvoľňovanie náhrad bedrového kĺbu, periodontálnu chorobu, fibrotickú chorobu, infarkt a srdcovú chorobu, pečeneňovú a obličkovú fibrózu, endometriózu, choroby súvisiace s oslabením extracelulárneho matrixu, srdcové zlyhanie, aortálne aneurizmy, choroby súvisiace s CNS ako Alzheimerova choroba a roztrúsená skleróza, hematologické poruchy.

Príprava zlúčenín podľa vynálezu

30 Podľa ďalšieho aspektu predložený vynález poskytuje postup na prípravu zlúčeniny vzorca (II) alebo jej farmaceuticky prijateľnej soli, ako je opísané v bodoch (a) až (c). Bude zrejmé, že mnohé z relevantných výhodiskových látok sú komerčne alebo inak dostupné, alebo ich možno syntetizovať známymi metódami, alebo ich možno nájsť vo vedeckej literatúre.

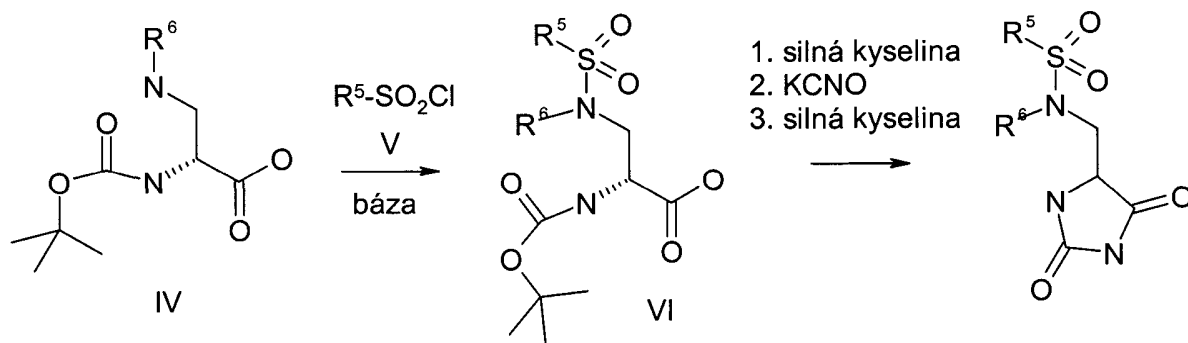
35 (a) Zlúčeniny vzorca (II), R^2 je H, R^3 je H, R^4 je H a G^1 -B- G^2 a R^6 majú význam podľa vzorca (II), možno pripraviť podľa schémy 1.

Keď R^6 je H, derivát kyseliny N^1 -BOC-D-diaminopropánovej vzorca (IV) sa nechá reagovať s vhodným sulfonylchloridom vzorca (V) v bázičkom prostredí za vzniku sulfónamidov vzorca (VI). Odstránenie chrániacej skupiny v kyslom prostredí, reakcia s kyanátom draselným na zodpovedajúcu močovinu a nakoniec cyklizácia v kyslom prostredí dáva zlúčeniny vzorca (I).

40 Keď R^6 je alkyl, napríklad metyl, etyl, propyl, izopropyl a n-butyl, kyselina N^2 -alkyl- N^1 -BOC-D-diaminopropiónová vzorca (IV) sa pripraví podľa práce Andruszkiewics, R.: *Pol. J. Chem.*, **62**, 257, (1988).

Keď R^6 je voliteľne substituovaný benzyl, metylbenzyl, metylpyridyl, metyl heteroaryl, N^2 -substituovaná aminokyselina vzorca (IV) sa pripraví podľa *Helv. Chim. Acta*, **46**, 327, (1963).

45 Schéma 1 (kde R^5 znamená G^1 -B- G^2):



Reakcia IV - VI sa výhodne uskutočňuje vo vhodnom rozpúšťadle voliteľne za prítomnosti bázy v priebehu 1 až 24 h pri teplote prostredia až po teplotu refluxu. Výhodne sa používajú rozpúšťadlá ako pyridín, dimetylformamid, tetrahydrofurán, acetonitril alebo dichlórmetán s bázami ako trietylamin, N-metylmorfolín, pyridín alebo uhličitany alkalickej kovov pri teplote prostredia v priebehu 2 - 16 h reakčného času alebo do skončenia reakcie podľa chromatografických alebo spektroskopických metód. Reakcie sulfonylchloridov vzorca (V) s rôznymi sekundárnymi amínmi sú opísané v literatúre a variácie podmienok budú zrejmé odborníkom v danej oblasti. Rad zlúčenín vzorca (V) je komerčne dostupných, alebo ich syntéza je opísaná v literatúre. Konkrétne deriváty vzorca (VI) môžu pripraviť odborníci v danej oblasti podľa známych postupov.

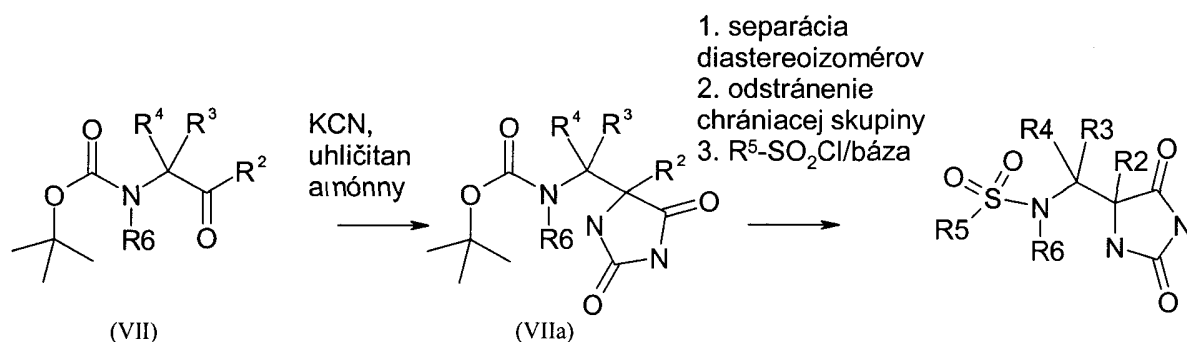
(b) Zlúčeniny vzorca (II), kde R^6 je H, a R^2 , R^3 , R^4 a G^1 -B- G^2 majú význam podľa vzorca (II), možno pripraviť podľa schémy 1.

Zlúčeniny, kde R^2 je H, R^3 je H a R^4 je alkyl alebo aryl, možno pripraviť vychádzajúc zo zodpovedajúcich BOC N-chránených α -aminoaldehydov vzorca (VII) pripravených podľa práce *Fehrentz, J. A., Castro, B.*; *Synthesis*, 676, (1983).

Zlúčeniny, kde R^2 je alkyl alebo aryl, R^3 je H a R^4 je alkyl alebo aryl, možno pripraviť vychádzajúc zo zodpovedajúceho BOC N-chráneného α -aminoketónu vzorca (VII), ako je uvedené v schéme 2. BOC N-chránené α -aminoketóny sa pripravujú podľa práce *Nahm, S., Weinreb, S. M.*; *Tetrahedron Lett.* **22**, 3815, (1981), voliteľne keď R^6 nie je H, podľa zdroja *Shuman, Robert T.*, US 4448717 A 19840515.

Niektoré zlúčeniny pripravené postupom zobrazeným v schéme 2 sú opísané v príklade 3.

Schéma 2 (kde R^5 znamená G^1 -B- G^2 -):



Zlúčeniny vzorca (VII) sa nechajú reagovať s alkalickej kyanidom a uhličitanom amónnym (*Streckerova reakcia*) za vzniku zodpovedajúcich hydantoinov vzorca (VIIa). Diastereoizoméry možno voliteľne rozdeliť po ktoromkoľvek z troch ostávajúcich syntetických krokov: karbamáty vzorca (VIIa) a sulfonamidy vzorca (II) chromatografiou na silikagéli, po odstránení chrániacej skupiny aminointermediátu kryštalizáciou. Aminové intermediáty sa voliteľne používajú na priamu syntézu so sulfonylchloridmi vzorca (V), ako je opísané pri sulfonylácii pod uvedeným bodom (a), v základnom prostredí za vzniku zlúčenín vzorca (II).

Reakcia VII až VIIa sa výhodne uskutočňuje v uzavretej oceľovej nádobe vo vodnom alkoholickom rozpúšťadle pri 90 - 130 °C v priebehu 3 - 16 hodín, alebo kým sa nedosiahne koniec reakcie na základe určenia chromatografickými alebo spektroskopickými metódami. Pôsobenie 1 - 4-násobným nadbytkom kyanidových solí, výhodne 1 - 2 ekvivalentmi, a 2 - 6-násobným nadbytkom uhličitanu amónneho, výhodne 4 - 6 ekvivalentmi dáva hydantoiny vzorca (VIIa). Odstránenie chrániacej skupiny a sulfonylácia podľa schémy 1 potom dáva zlúčeniny vzorca (II).

Aminoaldehydy alebo ketóny vzorca (VII) a ich chránené deriváty sú komerčne dostupné a existujú aj ďalšie spôsoby prípravy α -aminoaldehydov a ketónov vzorca (VII). Konkrétne deriváty vzorca (VIIa) môžu pripraviť odborníci v danej oblasti podľa známych postupov.

Zlúčeniny podľa vynálezu možno hodnotiť napríklad v nasledujúcich testoch:

Testy s izolovaným enzýmom

Rodina matrixových metaloproteináz zahŕňajúca napríklad MMP12, MMP13.

Rekombinantnú ľudskú MMP12 katalytickú doménu možno exprimovať a vyčistiť podľa publikácie *Parker A. A. et al.*, (2000), *Protein Expression and Purification*, **20**: 152. Vyčistený enzým možno použiť na monitoring aktivity inhibítorov nasledovne: MMP12 (konečná koncentrácia 50 ng/ml) sa inkubuje 30 minút pri laboratórnej teplote v testovacom tlmivom roztoku (0,1 M Tris-HCl, pH 7,3 obsahujúca 0,1 M NaCl, 20 mM CaCl_2 , 0,040 mM ZnCl_2 a 0,05 % (hmotnosť/objem) prípravku Brij 35) použitím syntetického substrátu Mac-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH₂ za prítomnosti alebo neprítomnosti inhibítorov. Aktivita sa určí meraním fluorescence pri λ_{ex} 328 nm a λ_{em} 393 nm. Percentuálna inhibícia sa určí nasledovne: % inhi-

bície sa rovná $[\text{fluorescencia}_{\text{plus inhibitor}} - \text{fluorescencia}_{\text{pozadie}}] \text{ delené } [\text{fluorescencia}_{\text{minus inhibitor}} - \text{fluorescencia}_{\text{pozadie}}]$.

Rekombinantnú ľudskú proMMP13 možno exprimovať a vyčistiť podľa publikácie Knauper *et al.* [V. Knauper *et al.*, (1996) *The Biochemical Journal* **271**: 1544 - 1550 (1996)]. Vyčistený enzým možno použiť na monitoring aktivity inhibitorov nasledovne: vyčistená proMMP13 sa aktivuje pomocou 1 mM kyseliny aminofenylortutnatej (APMA) 20 hodín pri 21 °C; aktivovaná MMP13 (11,25 ng na jeden test) sa inkubuje 4 - 5 hodín pri 35 °C v testovacom tlmivom roztoku (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 obsahujúca 0,1 M NaCl, 20 mM CaCl₂, 0,02 mM ZnCl₂ a 0,05 % (hmotnosť/objem) prípravku Brij 35) použitím syntetického substrátu 7-metoxykumarin-4-yl)acetyl.Pro.Leu.Gly.Leu.N-3-(2,4-dinitrofenyl)-L-2,3-diaminopropionyl.Ala.Arg.NH₂ za prítomnosti alebo neprítomnosti inhibitorov. Aktivita sa určí meraním fluorescence pri λ_{ex} 328 nm a λ_{em} 393 nm. Percentuálna inhibícia sa určí nasledovne: % inhibície sa rovná $[\text{fluorescencia}_{\text{plus inhibitor}} - \text{fluorescencia}_{\text{pozadie}}] \text{ delené } [\text{fluorescencia}_{\text{minus inhibitor}} - \text{fluorescencia}_{\text{pozadie}}]$.

Podobný protokol možno použiť pre iné exprimované a vyčistené proMMP použitím substrátov a tlmivých roztokov optimálnych pre konkrétnu MMP, napríklad podľa publikácie C. Graham Knight *et al.*, (1992) *FEBS Lett.* **296** (3): 263 - 266.

Adamalýzinová rodina zahŕňajúca napríklad TNF konvertázu

Schopnosť zlúčenín inhibovať proTNF α konvertázu možno vyhodnotiť použitím testu s čiastočne vyčisteným, izolovaným enzýmom, ktorý sa získal z membrán THP-1 podľa opisu v práci K. M. Mohler *et al.*, (1994) *Nature* **370**: 218 - 220. Aktivita vyčisteného enzýmu a jeho inhibícia sa určí inkubovaním čiastočne vyčisteného enzýmu za prítomnosti alebo neprítomnosti testovaných zlúčenín použitím substrátu 4',5'-dimetoxyluoresceinyl Ser.Pro.Leu.Alu.Gln.Alu.Val.Arg.Ser.Ser.Ser.Arg.Cys(4-(3-sukcinimid-1-yl)-fluoresceín)-NH₂ v testovacom tlmivom roztoku (50 mM Tris HCl, pH 7,4 obsahujúca 0,1 % (hmotnosť/objem) prípravku Triton X-100 a 2 mM CaCl₂) pri 26 °C v priebehu 18 hodín. Množstvo inhibície sa určí rovnako ako pri MMP13 s výnimkou toho, že sa použili λ_{ex} 490 nm a λ_{em} 530 nm. Substrát sa syntetizoval nasledovne. Peptidická časť substrátu sa zostavila na Fmoc-NH-Rink-MBHA-polystyrénovej živici buď manuálne, alebo na automatizovanom syntetizátore peptidov štandardnými metódami zahŕňajúcimi použitie Fmoc-amino-kyselín a O-benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetrametylróniumhexafluórfosfátu (HBTU) ako spájacieho činidla s najmenej 4- alebo 5-násobným nadbytkom Fmoc-aminokyseliny a HBTU. Ser¹ a Pro² boli syntetizované dvojnásobne. Použila sa nasledujúca stratégia ochrany bočných reťazcov; Ser¹(But), Gln⁵(Trityl), Arg^{8,12}(Pmc or Pbf), Ser^{9,10,11}(Trityl), Cys¹³(Trityl). Po zostavení sa N-koncová chrániaca skupina Fmoc odstránila pôsobením DMF na Fmoc-peptidylovú živicu. Amino-peptidylová živica takto získaná sa acylovala spracovaním počas 1,5 - 2 hod. pri 70 °C 1,5 - 2 ekvivalentmi kyseliny 4',5'-dimetoxyluoresceín-4(5)-karboxylovej [Khanna & Ullman, (1980) *Anal Biochem.* **108**:156-161), ktorá bola predaktivovaná diizopropylkarbodiimidom a 1-hydroxybenzotriazolom v DMF]. Dimetoxyluoresceinyl-peptid sa potom súčasne zbavil chrániacich skupín a odštípil zo živice pôsobením kyseliny trifluóroctovej obsahujúcej po 5 % vody a trietylsilánu. Dimetoxyluoresceinyl-peptid sa izoloval odparením, rozotrením s dietyléterom a filtráciou. Izolovaný peptid sa nechal reagovať so 4-(N-maleimido)fluoresceínom v DMF obsahujúcom diizopropyletylamín, produkt sa vyčistil pomocou RP-HPLC a nakoniec sa izoloval lyofilizáciou z vodnej kyseliny octovej. Produkt bol charakterizovaný pomocou MALDI-TOF MS a aminokyselinovou analýzou.

Prírodné substráty

Aktivita zlúčenín podľa vynálezu ako inhibitorov agregácie degradácie sa dá hodnotiť pomocou metód napríklad založených na publikáciách E. C. Arner *et al.*, (1998) *Osteoarthritis and Cartilage* **6**:214-228; (1999) *Journal of Biological Chemistry*, **274** (10), 6594-6601 a tam opísaných protilátkach. Potenciu zlúčenín v pôsobení ako inhibitorov proti kolagenázam možno určiť podľa publikácie T. Cawston a A. Barrett (1979) *Anal. Biochem.* **99**:340-345.

Inhibícia metaloproteinázovej aktivity v aktivite na bunkovej/tkanivovej báze

Test ako prostriedku na inhibíciu membránových shedáz ako TNF konvertáza

Schopnosť zlúčenín podľa tohto vynálezu inhibovať bunkové spracovanie produkcie TNF α možno vyhodnotiť v bunkách THP-1 pomocou ELISA na určenie uvoľneného TNF podľa publikácie K. M. Mohler *et al.*, (1994) *Nature* **370**: 218 - 220. Podobne možno testovať spracovanie alebo uvoľňovanie iných membránových molekúl, napríklad tých, ktoré sú opísané v N. M. Hooper *et al.*, (1997) *Biochem. J.* **321**: 265 - 279, použitím vhodných bunkových línií a s vhodnými protilátkami na detekciu uvoľneného proteínu.

Test prostriedku na inhibíciu invázie na bunkovej báze

Schopnosť zlúčeniny podľa tohto vynálezu inhibovať migráciu buniek v inváznom teste možno určiť podľa publikácie A. Albini *et al.*, (1987) *Cancer Research* **47**: 3239 - 3245.

Test ako prostriedku na inhibíciu aktivity TNF shedázy v celej krvi

- Schopnosť zlúčenín podľa tohto vynálezu inhibovať produkciu TNF α sa hodnotí v teste celej ľudskej krvi, kde sa používa LPS na stimulovanie uvoľňovania TNF α . Heparinizovaná (10 jednotiek/ml) ľudská krv získaná od dobrovoľníkov sa zriedi 1 : 5 médiom (RPMI1640 + bikarbonát, penicilín, streptomycín a glutamín) a inkubuje sa (160 μ l) s 20 μ l testovanej zlúčeniny (trojmo) v DMSO alebo vhodnom vehikule počas 30 min. pri 37 °C vo zvlhčovacom (5 % CO₂/95 % vzduch) inkubátore pred pridaním 20 μ l LPS (*E. coli* 0111:B4; konečná koncentrácia 10 μ g/ml). Každý test zahŕňa kontroly zriedenej krvi inkubovanej s médiom samotným (6 jamiek/platnička) alebo známym inhibítorom TNF α ako štandardom. Platničky sa potom inkubujú 6 hodín pri 37 °C (zvlhčovaný inkubátor), centrifugujú (2 000 ot./min. počas 10 min.; 4 °C), plazma sa oddelila (50 - 100 μ l) a uloží sa v 96-jamkových platničkách pri -70 °C pred následnou analýzou na koncentráciu TNF α pomocou ELISA.

Test prostriedku na inhibíciu degradácie chrupavky *in vitro*

- Schopnosť zlúčenín podľa tohto vynálezu inhibovať degradáciu agrekánových alebo kolagénových zložiek chrupavky možno hodnotiť v podstate podľa práce K. M. Bottomley *et al.*, (1997) *Biochem J.* 323: 483 - 488.

Farmakodynamický test

- Aby sa vyhodnotili vlastnosti klírensu a biologickej dostupnosti zlúčenín podľa tohto vynálezu, použije sa *ex vivo* farmakodynamický test, ktorý využíva uvedené testy so syntetickým substrátom alebo alternatívne HPLC alebo hmotnostnú spektrometrickú analýzu. Toto je generický test, ktorý možno použiť na odhad rýchlosti klírensu zlúčenín v celom rade druhov. Zvieratá (napr. potkany, kozmáče) sa nadávajú iv alebo po rozpuštením prípravkom zlúčeniny (napríklad 20 % hmotnosť/objem DMSO, 60 % hmotnosť/objem PEG400) a v následných časových bodoch (napr. 5, 15, 30, 60, 120, 240, 480, 720, 1 220 min.) sa z vhodnej cievy odoberú vzorky krvi do 10 U heparínu. Po centrifugovaní sa získajú frakcie plazmy a plazmové proteíny sa vyzrážajú acetonitrilom (80 % hmotnosť/objem konečnej koncentrácie). Po 30 minútach pri -20 °C sa plazmové proteíny sedimentujú centrifugovaním a frakcia supernatantu sa odparí dosucha použitím prístroja Savant speed vac. Sediment sa rekonšituuje v testovacom tlmivom roztoku a následne sa analyzuje na obsah zlúčeniny použitím testu so syntetickým substrátom. Pre hodnotenú zlúčeninu sa zostrojí krivka závislosti odozvy od koncentrácie. Sériové zriedenia rekonštituovaných plazmových extraktov sa hodnotia na aktivitu a množstvo zlúčeniny prítomnej v pôvodnej vzorke plazmy sa vypočíta pomocou krivky závislosti odozvy od koncentrácie berúc do úvahy celkový faktor zriedenia plazmy.

Hodnotenie *in vivo*

- Test ako anti-TNF prostriedku

- Schopnosť zlúčenín podľa tohto vynálezu ako *ex vivo* inhibítorov TNF α sa hodnotí na potkanoch. Skupiny samcov potkanov Wistar Alderley Park (AP) (180 - 210 g) sa nadávajú zlúčeninou (6 potkanov) alebo vehikulom liečiva (10 potkanov) vhodnou cestou - napr. perorálne (p.o.), intraperitoneálne (i.p.), subkutánne (s.c.). O deväťdesiat minút neskôr sa potkany usmrtna pomocou stúpajúcej koncentrácie CO₂ a nechajú sa vykrvácať cez posteriornú vena cavae do 5 jednotiek sodného heparínu na ml krvi. Vzorky krvi sa okamžite umiestnia na ľad a centrifugujú sa pri 2 000 ot./min. počas 10 min. pri 4 °C a oddelené plazmy sa zmrazia pri -20 °C na následný test ich účinku na produkciu TNF α LPS-stimulovanou ľudskou krvou. Vzorky potkanej plazmy sa rozmrazia a 175 μ l každej vzorky sa pridá do stanoveného formátového vzoru v 96U jamkovej platničke. Do každej jamky sa potom pridá 50 μ l heparinizovanej ľudskej krvi, pomieša sa a platnička sa inkubuje 30 min. pri 37 °C (zvlhčovaný inkubátor). Do jamiek sa pridá LPS (25 μ l; konečná koncentrácia 10 μ g/ml) a inkubácia pokračuje ďalších 5,5-hodiny. Kontrolné jamky sa inkubujú s 25 μ l média samotného. Platničky sa potom centrifugujú 10 min. pri 2 000 ot./min. a 200 μ l supernatantov sa preniesie do 96-jamkovej platničky a zmrazí pri -20 °C na následnú analýzu koncentrácie TNF pomocou ELISA.

Dátová analýza špeciálnym softvérom počíta pre každú zlúčeninu/dávku:

$$\text{Percento inhibície TNF}\alpha = \frac{\text{stredná TNF}\alpha \text{ (kontroly)} - \text{stredná TNF}\alpha \text{ (ošetrené)}}{\text{stredná TNF}\alpha \text{ (kontroly)}} \times 100$$

Test ako antiartritického prostriedku

- Aktivita zlúčeniny ako antiartritika sa testuje v kolagénom indukovanej artritíde (CIA) vo význame podľa publikácie D. E. Trentham *et al.*, (1977) *J. Exp. Med.* 146: 857. V tomto modeli v kyseline rozpustný natívny kolagén typu II spôsobuje polyartritídu pri potkanoch pri podávaní vo Freundovom nekompletnom adjuvans. Podobné podmienky možno použiť na indukovanie artritídy u myší a primátov.

Test ako protirakovinového prostriedku

Aktivitu zlúčeniny ako protirakovinového prostriedku možno hodnotiť podľa publikácie I. J. Fidler (1978) *Methods in Cancer Research* **15**: 399 - 439 použitím napríklad bunkovej línie B16 (opísaná v práci B. Hibner *et al.*, Abstract 283 s. 75, 10th NCI-EORTC Symposium, Amsterdam 16 - 19. júna 1998).

5

Test ako antiemfyzematického prostriedku

Aktivitu zlúčeniny ako antiemfyzematického prostriedku možno hodnotiť podľa publikácie Hautamaki *et al.* (1997) *Science*, **277**: 2002.

Vynález bude teraz ilustrovaný, ale nie obmedzený, nasledujúcimi príkladmi.

10

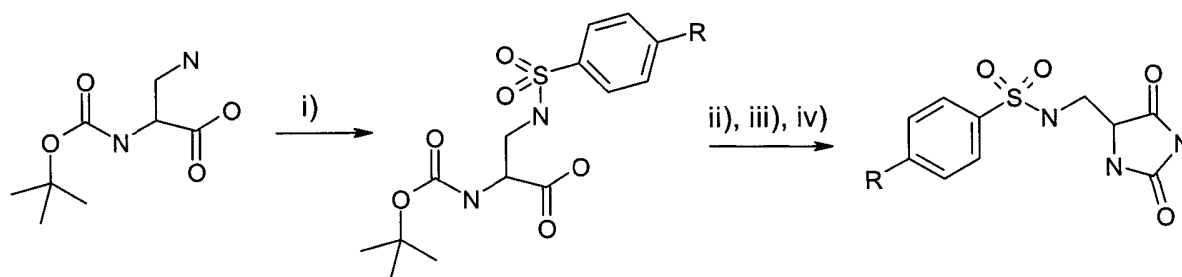
Príklady uskutočnenia vynálezu

Všeobecné analytické metódy: ¹H-NMR spektrá sa zaznamenali buď na prístroji Varian ^{Unity}Inova 400 MHz, alebo na prístroji Varian *Mercury-VX* 300 MHz. Ako interná referencia sa použil centrálny pík chloroformu-*d* (δ_H 7,27 ppm), dimetylsulfoxidu-*d*₆ (δ_H 2,50 ppm) alebo metanolu-*d*₄ (δ_H 3,31 ppm). Hmotnostné spektrá s nízkym rozlíšením sa získali na systéme Agilent 1100 LC-MS vybavenom ionizačnou komorou APCI.

15

Príklad 1

20 *N*-{[(4*S*)-2,5-Dioxoimidazolidinyl]metyl}-4-(4-fluórfoxy)benzénsulfónamid a *N*-{[(4*S*)-2,5-dioxoimidazolidinyl]metyl}[1,1'-bifeny]-4-sulfónamid



25 i) C₆H₄SO₂Cl; ii) HCl/dioxán; iii) KCNO; iv) vodná HCl, 100 °C

R = 4-fluórfoxy alebo R = fenyl

Do miešaného roztoku kyseliny *N*-alfa-BOC-(*S*)-diaminopropiónovej (100 mg, 0,5 mmol) v 2,5 ml vody obsahujúceho 0,04 g (0,55 mmol) uhličitanu sodného sa pridal roztok sulfonylchloridu (0,5 mmol) v 2,5 ml dioxánu. Roztok sa miešal cez noc pri laboratórnej teplote, rozdelil sa medzi etylacetát (10 ml) a cca 20 % kyselinu citrónovú (10 ml), vodná fáza sa trikrát extrahovala etylacetátom, organický extrakt sa premyl roztokom NaCl, vysušil, odparil a k zvyšku sa pridala 4 N HCl v dioxáne. Zmes sa miešala 20 min., odparila sa a vysušila za zníženého tlaku v priebehu 4 hodín pri 40 °C. Zvyšok sa potom neutralizoval 3 ml vodného roztoku uhličitanu sodného (0,08 g, 0,85 mmol), pridalo sa 0,9 g (1,1 mmol) kyanátu sodného a zmes sa miešala 4 hodiny pri 100 °C. Pridal sa 1 ml koncentrovanej HCl, zmes sa miešala 1 hodinu pri rovnakej teplote a potom sa nechala stáť pri laboratórnej teplote cez noc. Kryštály sa odfiltrovali, premyli destilovanou vodou a vysušili za zníženého tlaku (v prípade potreby sa rekryštalizovali z vodného etanolu).

30

35

N-{[(4*S*)-2,5-dioxoimidazolidinyl]metyl}-4-(4-fluórfoxy)benzénsulfónamid

MS: *m/z* = 380,1

40

N-{[(4*S*)-2,5-dioxoimidazolidinyl]metyl}[1,1'-bifeny]-4-sulfónamid

MS: *m/z* = 346,1

¹H NMR: (DMSO): 3,00 m (1,5 H), 3,10 m (0,6 H), (CH₂), 4,10 m (1 H, CH), 7,5 m (3 H), 7,70 d (2 H), 7,4 s (4 H).

45 Príklad 2

Prípravili sa zlúčeniny vzorca (II), kde R² je H, R³ je H, R⁴ je H, R⁶ je H, (C₁₋₄)alkyl, metylbenzyl alebo metylpyridyl, a G¹-B-G² sa mení.

Syntézy sa uskutočnili paralelne na 20-jamkovej platničke v manuálnom režime.

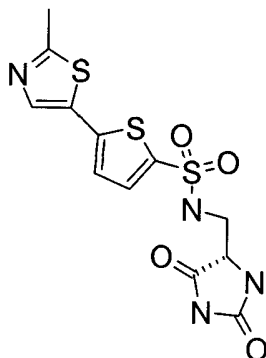
Aminokyselina (20 μmol) sa rozpustila v 5 ml vody obsahujúcej 6,36 mg (60 μmol) uhličitanu sodného.

50

Do každej jamky sa napipetovalo 0,5 ml roztoku a po ňom 0,5 ml dioxánového roztoku obsahujúceho 20 μmol zodpovedajúceho sulfonylchloridu. Reakčná zmes sa pretrepávala 18 hodín pri laboratórnej teplote,

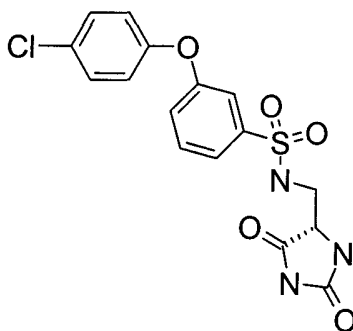
zriedila sa 2 ml metanolu a do každej jamky sa pridalo 20 mg prípravku Lewatite S100 (kyslá forma) na 5 min. Všetky reakčné zmesi sa prefiltrovali, odparili za zníženého tlaku a k zvyšku sa pridal 1 ml 4 N HCl v dioxáne na 30 min., odparil sa za zníženého tlaku, pridalo sa 0,5 ml 0,5 M vodného roztoku kyanátu draselného a zmes sa zahrieva na 100 °C v priebehu 3 hod. Do každej jamky sa po ochladení na laboratórnu teplotu pridalo 10 mg prípravku Lewatite S100 (kyslá forma) a po ňom 2 ml metanolu, zmes sa odparila za zníženého tlaku a pridala sa kyselina trifluóroctová pri 80 °C na 2 hodiny. Po odparení sa zvyšok vyčistil flash chromatografiou na oxide kremičitom použitím gradientu metanolu v etylacetáte (až do 10 % MeOH). Čistota a molekulová hmotnosť sa monitorovala pomocou HPLC-MS. Výťažky: 0,5 - 1 mg na každú jamku.

- 10 (2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)amid kyseliny 5-(2-metyltiazol-5-yl)tiofén-2-sulfónovej



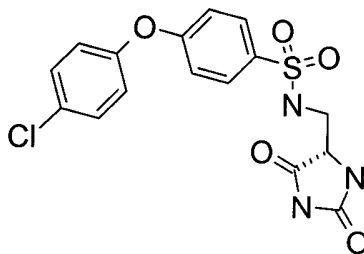
LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 373,4$ (m/z)

- 15 3-(4-Chlórfenoxy)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-benzénsulfónamid



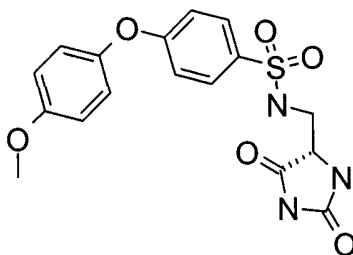
LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 396,8$ (m/z)

- 20 4-(4-Chlórfenoxy)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)benzénsulfónamid



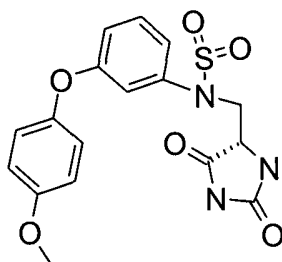
LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 396,8$ (m/z)

N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-(4-metoxyfenoxy)benzénsulfónamid



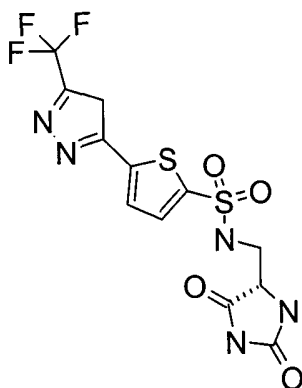
LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 392,6$ (m/z)

5 *N*-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-3-(4-metoxyfenoxy)benzénsulfónamid



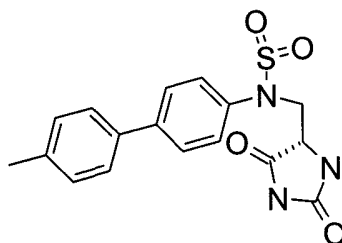
LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 392,6$ (m/z)

10 (2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)amid kyseliny 5-(5-trifluórmetyl-2*H*-pyrazol-3-yl)tiofén-2-sulfónovej



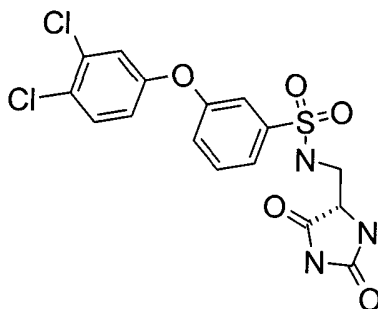
LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 410,4$ (m/z)

15 *N*-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-*p*-tolylloxybenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 376,4$ (m/z)

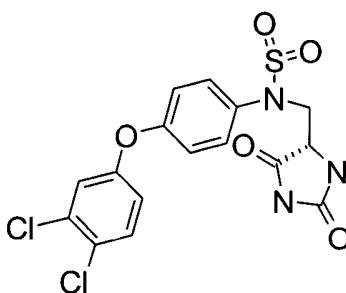
3-(3,4-Dichlórfenoxy)-*N*-(dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 430,6$ (m/z)

5

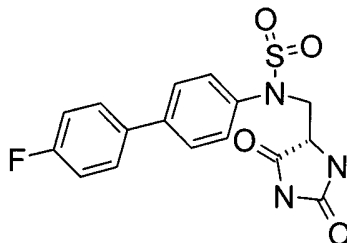
4-(3,4-Dichlórfenoxy)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 430,6$ (m/z)

10

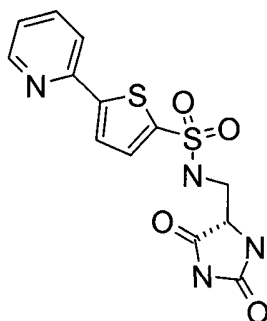
(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)amid kyseliny 4'-fluórbifeny-4-sulfónovej



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 364,4$ (m/z)

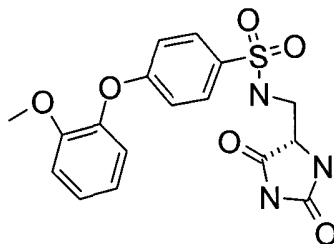
15

(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)amid kyseliny 5-pyridin-2-yltiofén-2-sulfónovej



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 353,4$ (m/z)

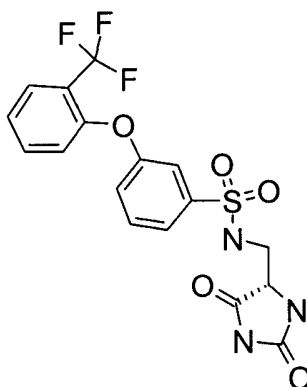
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-(2-metoxifenoxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 392,5$ (m/z)

5

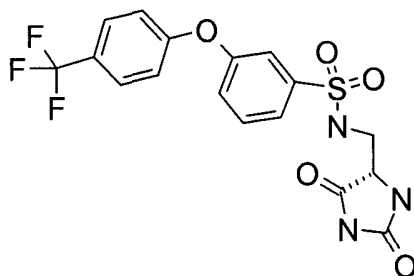
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-3-(2-trifluórmetylfenoxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 430,4$ (m/z)

10

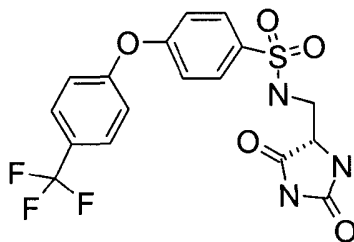
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-3-(4-trifluórmetylfenoxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 430,4$ (m/z)

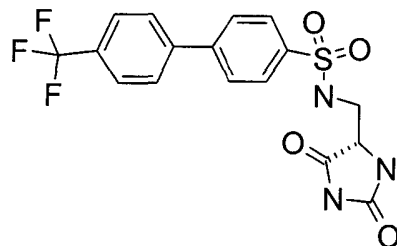
15

N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-(4-trifluórmetylfenoxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 430,4$ (m/z)

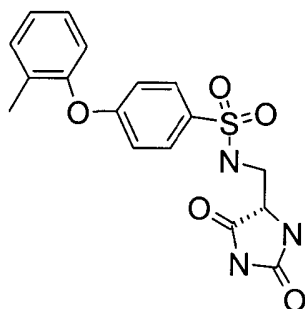
(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)amid kyseliny 4'-trifluórmetylbifenyl-4-sulfónovej



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 414,4$ (m/z)

5

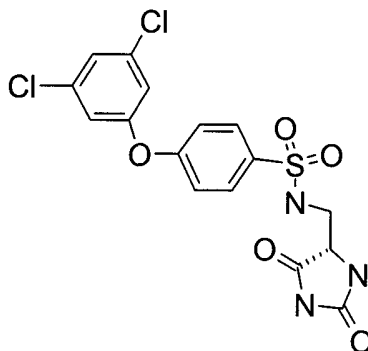
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-*o*-tolylxybenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 376,4$ (m/z)

10

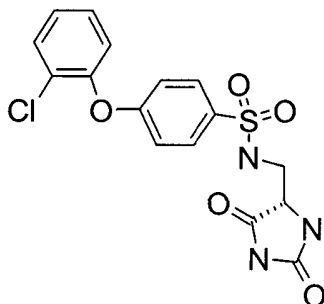
4-(3,5-Dichlórfenoxy)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 431,3$ (m/z)

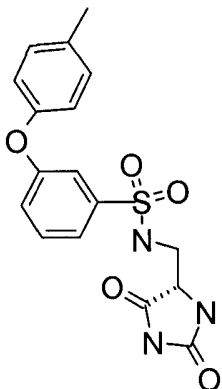
15

4-(2-Chlórfenoxy)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 396,8$ (m/z)

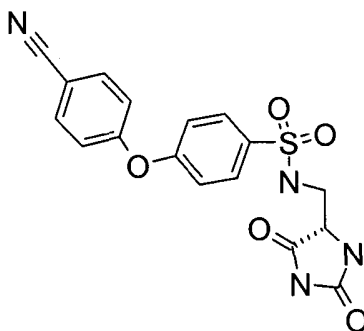
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-3-*p*-tolylloxybenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 376,4$ (m/z)

5

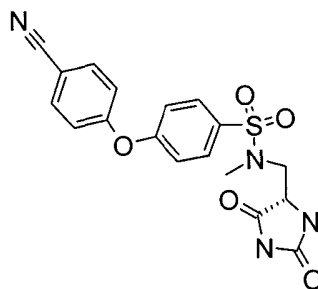
4-(4-Kyanofenoxi)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 387,4$ (m/z)

10

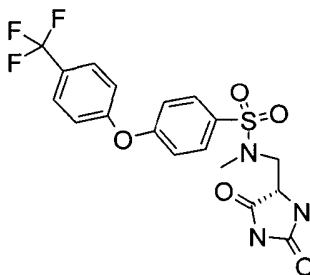
4-(4-Kyanofenoxi)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-metylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 401,4$ (m/z)

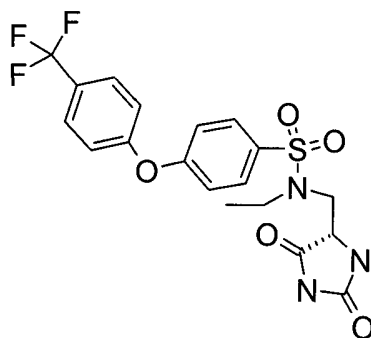
15

N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-metyl-4-(4-trifluórmetilfenoxi)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 444,4$ (m/z)

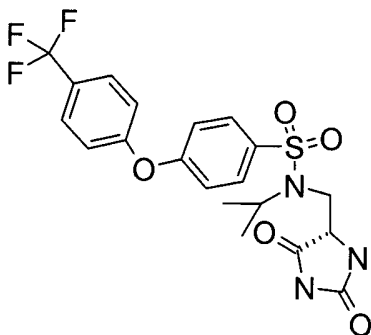
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-etyl-4-(4-trifluórmetylfenoxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 458,4$ (m/z)

5

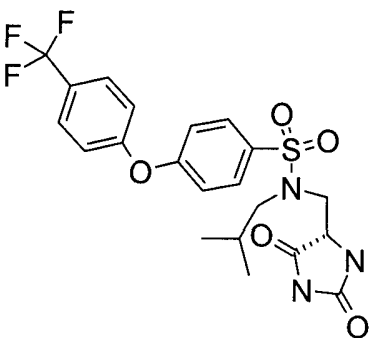
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-izopropyl-4-(4-trifluórmetylfenoxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 472,4$ (m/z)

10

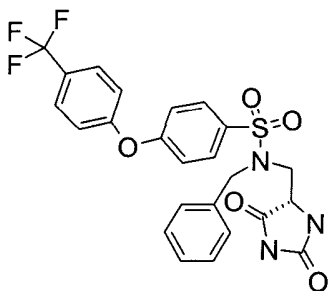
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-izobutyl-4-(4-trifluórmetylfenoxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 486,5$ (m/z)

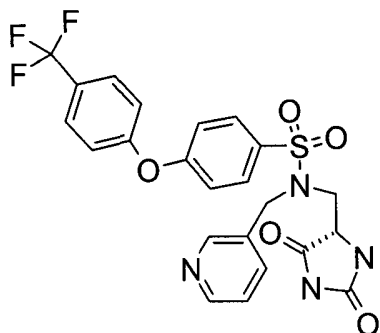
15

N-Benzyl-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-(4-trifluórmetylfenoxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 520,5$ (m/z)

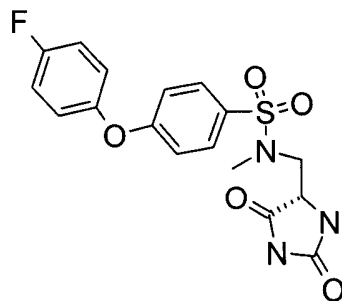
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-pyridin-3-ylmetyl-4-(4-trifluórmetylfenoxy)benzén



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 521,5$ (m/z)

5

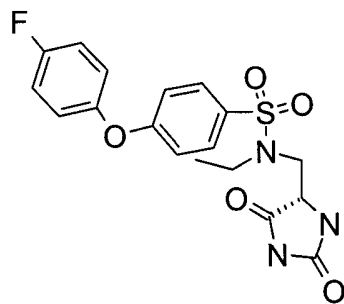
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-(4-fluórfenoxy)-*N*-metylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 394,4$ (m/z)

10

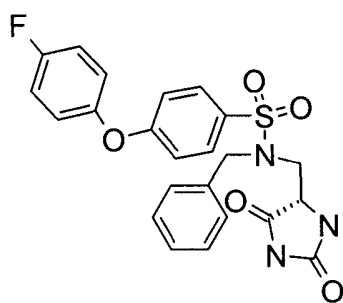
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-etyl-4-(4-fluórfenoxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 408,4$ (m/z)

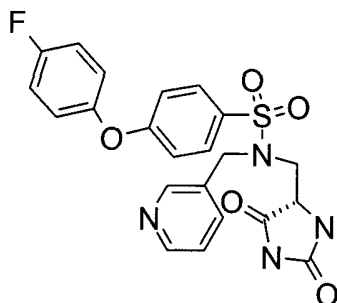
15

N-Benzyl-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-(4-fluórfenoxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 470,5$ (m/z)

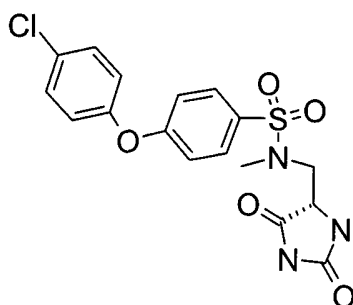
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-(4-fluórfenoxi)-*N*-pyridin-3-ylmetylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 471,5$ (m/z)

5

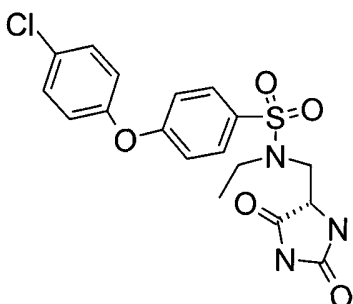
4-(4-Chlórphenoxi)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-metylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 410,5$ (m/z)

10

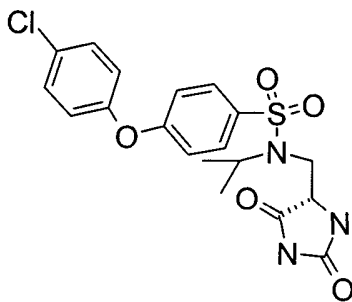
4-(4-Chlórphenoxi)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-etylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 424,88$ (m/z)

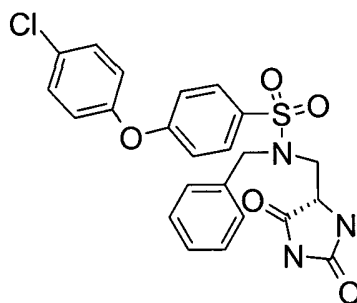
15

4-(4-Chlórphenoxi)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-izopropylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 424,88$ (m/z)

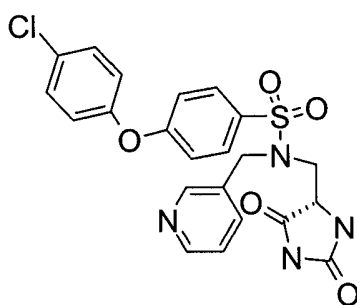
N-Benzyl-4-(4-chlórfenoxy)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 486,9$ (m/z)

5

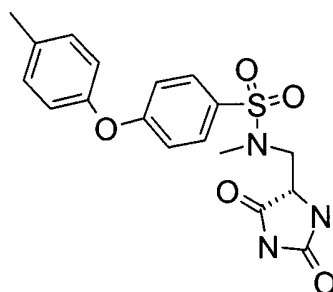
4-(4-Chlórfenoxy)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-pyridin-3-ylmetylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 487,9$ (m/z)

10

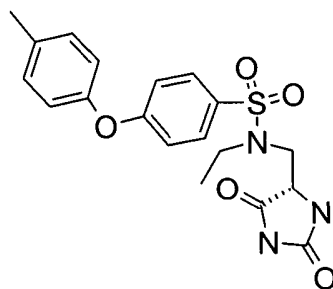
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-metyl-4-*p*-tolylloxybenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 390,4$ (m/z)

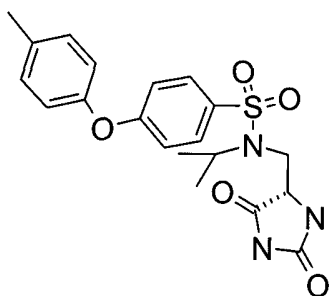
15

N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-etyl-4-*p*-tolylloxybenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 404,5$ (m/z)

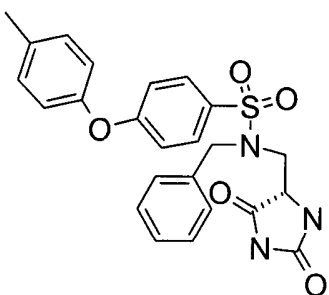
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-izopropyl-4-*p*-tolylloxybenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 418,5$ (m/z)

5

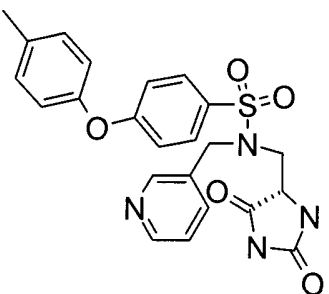
N-Benzyl-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-*p*-tolylloxybenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 466,5$ (m/z)

10

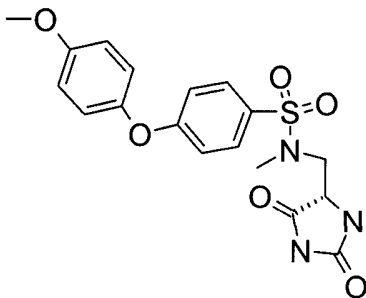
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-pyridin-3-ylmetyl-4-*p*-tolylloxybenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 467,5$ (m/z)

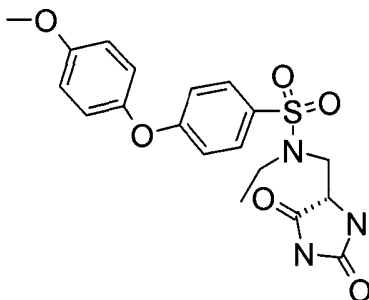
15

N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-(4-metoxifenoxy)-*N*-metylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 406,5$ (m/z)

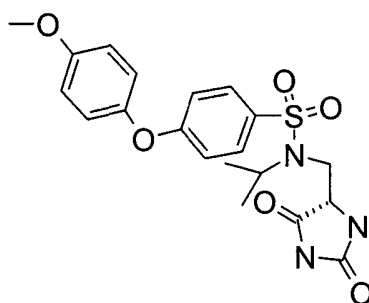
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-etyl-4-(4-metoxifenoxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 420,5$ (m/z)

5

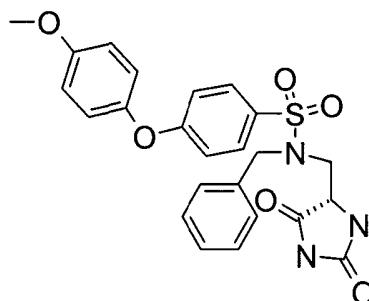
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-izopropyl-4-(4-metoxifenoxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 433,5$ (m/z)

10

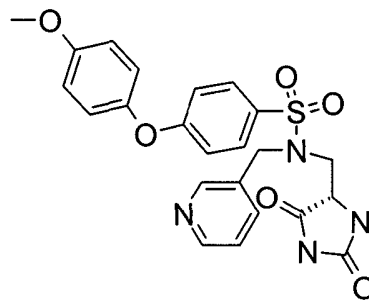
N-Benzyl-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-(4-metoxifenoxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 482,5$ (m/z)

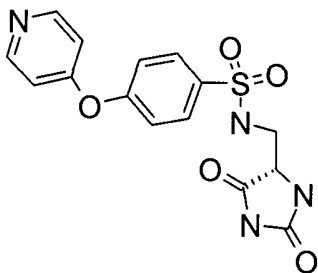
15

N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-(4-metoxifenoxy)-*N*-pyridin-3-ylmetylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 483,5$ (m/z)

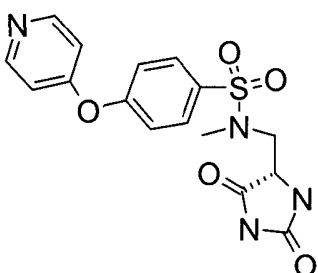
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmethyl)-4-(pyridin-4-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 363,5$ (m/z)

5

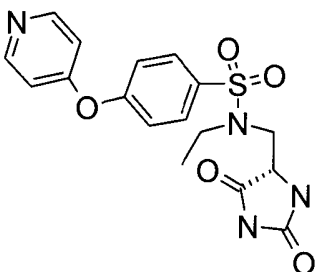
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmethyl)-*N*-metyl-4-(pyridin-4-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 377,4$ (m/z)

10

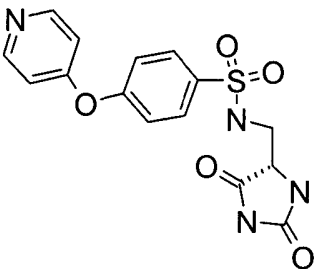
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmethyl)-*N*-etyl-4-(pyridin-4-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 363,4$ (m/z)

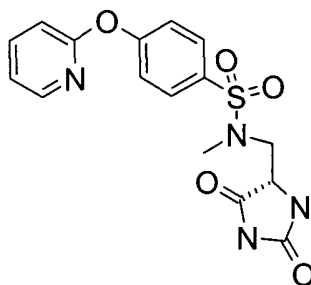
15

N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmethyl)-4-(pyridin-4-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 363,5$ (m/z)

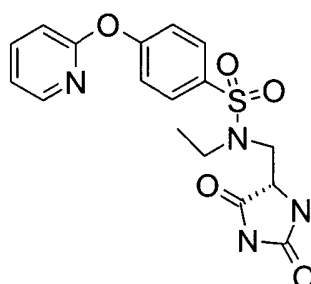
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-(pyridin-2-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 376,4$ (m/z)

5

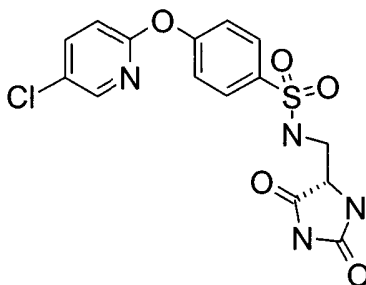
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-etyl-4-(pyridin-2-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 391,4$ (m/z)

10

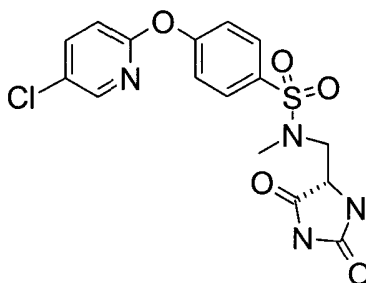
4-(5-Chlórpyridin-2-yloxy)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 397,8$ (m/z)

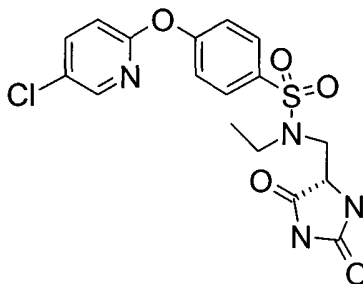
15

4-(5-Chlórpyridin-2-yloxy)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-metylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 410,8$ (m/z)

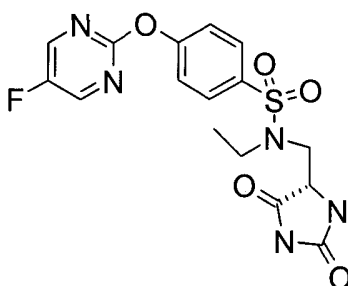
4-(5-Chlórpyridin-2-yloxy)-*N*-(2,5-dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-etylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 425,8$ (m/z)

5

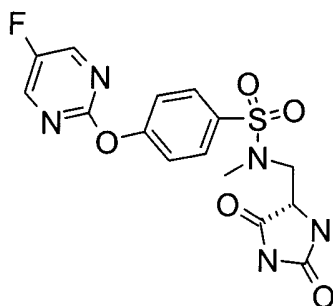
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-*N*-etyl-4-(5-fluórpyrimidin-2-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 409,8$ (m/z)

10

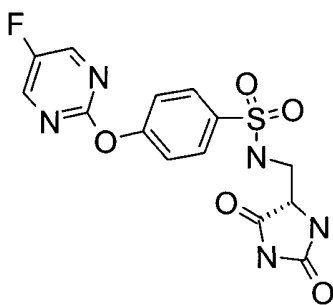
N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-(5-fluórpyrimidin-2-yloxy)-*N*-metylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 396,4$ (m/z)

15

N-(2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylmetyl)-4-(5-fluórpyrimidin-2-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI) $M^+ + H^+ = 382,4$ (m/z)

Príklad 3

Zlúčeniny sa pripravili podľa schémy 2 podľa uvedeného opisu.

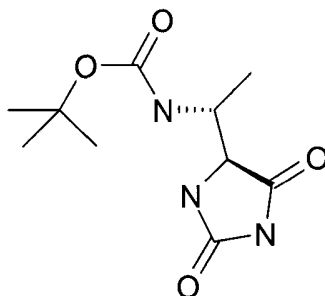
(a) Príprava východiskových látok (aldehydov alebo ketónov)

- 5 Aldehydy sa pripravili podľa postupu opísaného v práci *Fehrentz J. A. a Castro B.*, *Synthesis*, 676, (1983). Ketóny sa pripravili podľa postupu opísaného v práci *Nahm S. a Weinreb S. M.*: *Tetrahedron Lett.* **22**, 3815, (1981).

(b) Príprava hydantoínových intermediátov

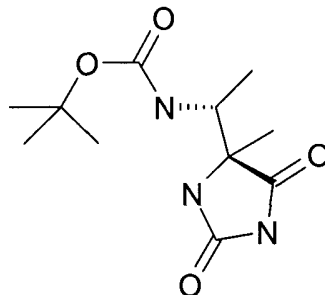
- 10 Aldehyd alebo ketón (5 mmol) sa rozpustil v 50 % vodnom etanole (10 ml), pridalo sa 0,55 g (10 mmol) kyanidu sodného a 2,7 g (25 mmol) uhličitanu amónneho a zmes sa zahrieva v zatavenej ampule na 80 °C počas 6 hodín. Zmes sa ochladila, pH sa upravilo na 4 a rozpúšťadlá sa odparili za zníženého tlaku. Zvyšok sa rozdelil medzi vodu (10 ml) a etylacetát, vodná fáza sa 3-krát extrahovala etylacetátom, odparila sa a diastereoizoméry sa rozdelili chromatografiou na silikagéli (gradient TBME - metanol 0 - 10 % MeOH).
- 15 Pripravili sa nasledujúce hydantoíny:

tert-Butylester kyseliny R-1-(2,5-dioxoimidazolidin-4-S-yl)etylkarbamidovej



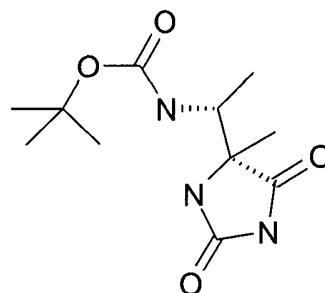
- 20 LC-MS (APCI): ($M^+ + H^+ = 244,4$), ($M^+ - 56$ (izobutylén) 188,6), $M^+ - BOC = 144,4$ (hlavný pík)
H-NMR ($CDCl_3$, ppm): 1,23 d (3 H), 1,45 s (9,1 H), 0,36 m (1,1 H), 5,30 bs (1,1 H), 10,1 bs (1,3 H)

Kyselina R-1-(4-metyl-2,5-dioxoimidazolin-4-S-yl)etylkarbamidová



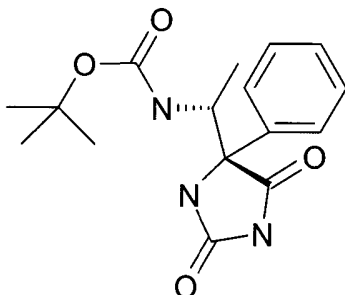
- 25 LC-MS (APCI): ($M^+ + H^+ = 258,3$), ($M^+ - 56$ (- izobutylén) 202,3), $M^+ - BOC = 158,3$ (hlavný pík)
H-NMR ($CDCl_3$, ppm): 1,22 d (3 H), 1,44 s (9,2 H), 1,58 s (3,1 H), 3,95 m (0,9 H), 5,5 bs (1,5 H), 7,9 bs (0,8 H)

- 30 *tert*-Butylester kyseliny R-1-(4-metyl-2,5-dioxoimidazolin-4-R-yl)etylkarbamidovej



LC-MS (APCI): ($M^+ + H^+ = 258,3$), ($M^+ - 56$ (- izobutylén) 202,3), $M^+ - BOC = 158,3$ (hlavný pík)
 H-NMR ($CDCl_3$, ppm): 1,29 d (3 H), 1,54 s (9,1 H), 1,50 s (2,95 H), 0,25 m (1,1 H), 5,5 bs (1,8 H), 7,9 bs (0,6 H)

5 *terc*-Butylester kyseliny R-1-(2,5-dioxo-4-fenylimidazolidin-4-S-yl)-etylkarbamidovej



LC-MS (APCI): ($M^+ + H^+ = 320,3$), ($M^+ - 56$ (- izobutylén) 264,3), $M^+ - BOC = 230,3$ (hlavný pík)
 H-NMR ($CDCl_3$, ppm): 1,31 d (3 H), 1,35 s (9,2 H), 0,65 m (0,9 H), 0,6 d (0,94 H), 7,25 m (3,2 H), 7,60 d (2,05 H)

terc-butyl (2S)-2-[(4R)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl]pyrrolidine-1-carboxylate

LC-MS: $M^+ + H^+ = 170,0$ ($M^+ - BOC$)

NMR: ($CDCl_3$, ppm): 1,26 s (9 H), 1,7 - 1,9 m (3,37 H), 2,1 - 2,2 m (0,84 H), 3,35 - 3,44 m (1,82 H), 4,1 bs (1,1 H),

terc-butyl (2S)-2-[(4S)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl]pyrrolidin-1-karboxylát

LC-MS: $M^+ + H^+ = 170,0$ ($M^+ - BOC$)

H-NMR: ($CDCl_3$, ppm): 1,27 s (9 H), 1,65 - 2,0 m (široký), (4,47 H), 3,55 m (1,15 H), 3,62 m (0,55 H), 4,4 m (0,87 H)

terc-butyl (2R)-2-[(4S)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl]pyrrolidin-1-karboxylát

LC-MS: $M^+ + H^+ = 170,0$ ($M^+ - BOC$)

H-NMR: ($CDCl_3$, ppm): 1,47 s (9 H), 1,7 - 2,2 m (široký) 4,30 H, 3,6 m (1,12 H), 3,8 m (0,78 H), 3,6 m (1,1 H).

terc-butyl (2R)-2-[(4R)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl]pyrrolidin-1-karboxylát

LC-MS: $M^+ + H^+ = 170,0$ ($M^+ - BOC$)

H-NMR: ($CDCl_3$, ppm): 1,47 s (9 H), 1,7 - 2,2 m (široký) 4,30 H, 3,6 m (1,12 H), 3,8 m (0,78 H), 3,6 m (1,1 H).

terc-butyl (2R)-2-[(4S)-4-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl]pyrrolidin-1-karboxylát

LC-MS: $M^+ + H^+ = 183,1$ ($M^+ - BOC$)

H-NMR: ($CDCl_3$, ppm): 1,4 s (9 H), 1,50 s (3,2 H), 1,65 - 2,1 m (široký) 4,20 H, 3,4 m (1,1 H), 3,5 bs (0,78 H, 4,4 m (0,94 H).

Odstránenie chrániacej skupiny z hydantoínov chránených BOC sa uskutočnilo 40 % kyselinou trifluór-
 octovou v dichlórmetáne a konečná zlúčenina 5-(1-aminoetyl)-5-alkylimidazolidín-2,4-dión trifluóracetát sa
 vyzrážal éterom po odparení dosucha.

R-5-(S-1-aminoetyl)imidazolidín-2,4-dión trifluóracetát

LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 144,2$ (m/z)

R-5-(1-aminoetyl)-5-S-metylimidazolidín-2,4-dión trifluóracetát

LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 158,2$ (m/z)

R-5-(1-aminoetyl)-5-R-metylimidazolidín-2,4-dión trifluóracetát

LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 158,2$ (m/z)

R-5-(1-aminoetyl)-5-S-fenylimidazolidín-2,4-dión trifluóracetát

LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 220,3$ (m/z)

(5R)-5-[(2S)-pyrolidin-2-yl]imidazolidín-2,4-dión trifluóracetát
LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 169,1$ (m/z)

5 (5R)-5-[(2R)-pyrolidin-2-yl]imidazolidín-2,4-dión
LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 169,1$ (m/z)

(5R)-5-[(2S)-pyrolidin-2-yl]imidazolidín-2,4-dión
LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 169,1$ (m/z)

10 (5S)-5-[(2S)-pyrolidin-2-yl]imidazolidín-2,4-dión
LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 169,1$ (m/z)

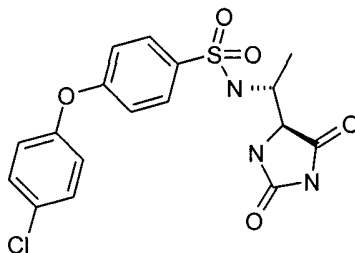
(5S)-5-metyl-5-[(2R)-pyrolidin-2-yl]imidazolidín-2,4-dión
LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 183,21$ (m/z)

15 (c) Príprava hydantoínov vzorca (II)

Syntézy sa uskutočnili paralelne na 20-jamkových platničkách v manuálnom režime.

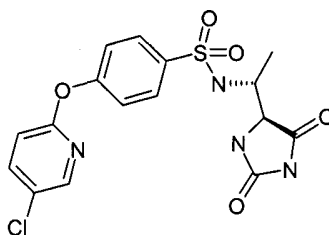
Do každej jamky sa dalo cca 7,5 μ mol príslušného sulfonylchloridu v 0,5 ml dichlórmetánu a cca 15 - 20 μ mol 5-(1-aminoetyl)-5-alkylimidazolidín-2,4-dión trifluóracetátu v 0,5 ml dichlórmetánu (v prípade potreby sa kvôli úplnému rozpusteniu pridalo malé množstvo DMF) a pridalo sa 10 mg dietylaminometylpolystyrénovej živice. Zmes sa pretrepávala cez noc, prefiltrovala sa cez 200 mg silikagélu, premyla sa 3 - 5 ml etylacetátu a čistota sa monitorovala pomocou LC-MS. Roztoky sa odparili dosucha, čím sa získali všetky očakávané zlúčeniny v dostatočnej čistote.

25 4-R-(4-Chlórfenoxy-N-(1-(2,5-dioxoimidazolidin-4-S-yl)etyl)benzénsulfónamid



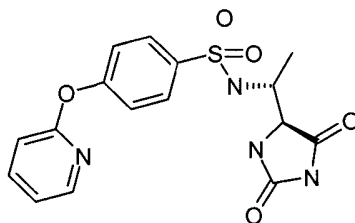
LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 411,1$ (m/z)

30 4-R-(5-Chlóropyridin-2-oxy)-N-(1-(2,5-dioxoimidazolidin-4-S-yl)etyl)benzénsulfónamid



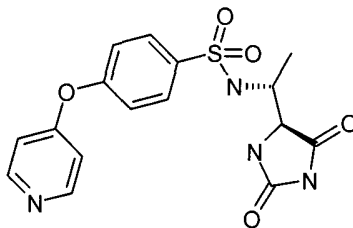
LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 412,1$ (m/z)

35 R-N-(1-(2,5-Dioxoimidazolidin-S-4-yl)etyl)-4-(pyridin-2-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + 2 H^+ = 378,9$ (m/z)

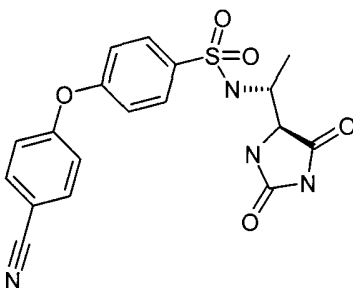
R-N-(1-(2,5-Dioxoimidazolidin-S-4-yl)ethyl)-4-(pyridin-4-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + 2 H^+ = 378,9$ (m/z)

5

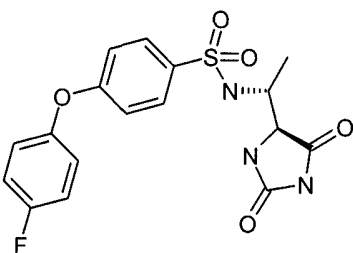
4-R-(4-Kyanofenoxi-N-(1-(2,5-dioxoimidazolin-4-S-yl)ethyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 401,5$ (m/z)

10

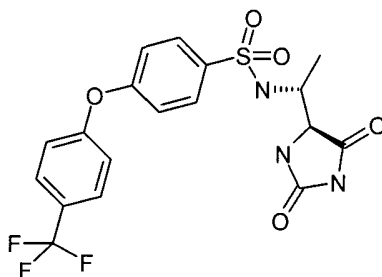
4-R-(4-Fluórfenoxi-N-(1-(2,5-dioxoimidazolin-4-S-yl)ethyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 394,3$ (m/z)

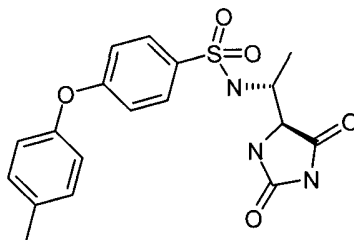
15

4-R-(4-Trifluórmetylfenoxi-N-(1-(2,5-dioxoimidazolin-4-S-yl)ethyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 444,4$ (m/z)

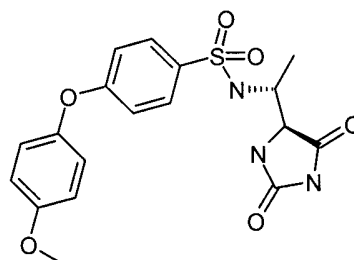
4-R-(4-Metylfoxy-N-(1-(2,5-dioxoimidazolin-4-S-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 389,43$ (m/z)

5

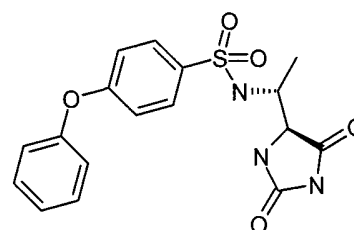
4-R-(4-Metoxifenoxy-N-(1-(2,5-dioxoimidazolin-4-S-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 406,4$ (m/z)

10

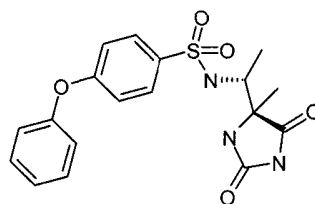
4-R-(4-Fenoxy-N-(1-(2,5-dioxoimidazolin-4-S-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + 2 H^+ = 376,2$ (m/z)

15

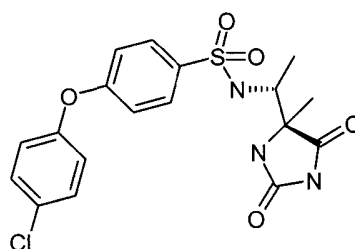
R-N-(1-(4-Metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-S-yl)etyl-4-fenoxybenzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 390,4$ (m/z)

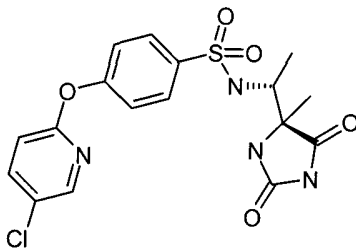
20

4-(4-Chlórfenoxy-N-(1-(4-S-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 423,4$ (m/z)

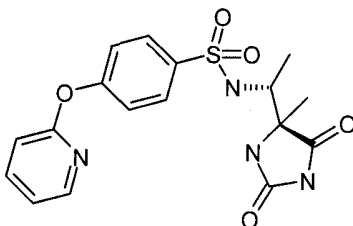
4-(5-Chlórpyridyl-2-oxy)-N-(1-(4-S-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 424,4$ (m/z)

5

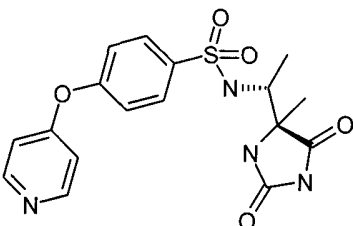
N-(1-(4-S-Metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etyl)-4-(pyridin-2-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + 2H^+ = 392,4$ (m/z)

10

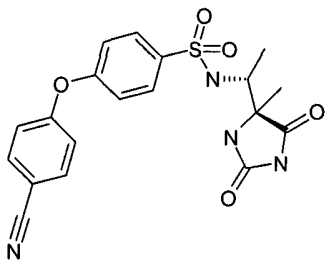
N-(1-(4-S-Metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etyl)-4-(pyridin-2-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + 2H^+ = 392,4$ (m/z)

15

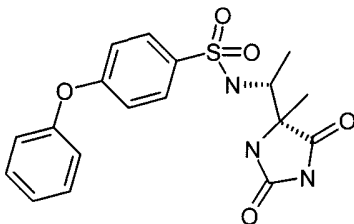
4-(4-Kyanofenoxi)-N-(1-(4-S-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + 2H^+ = 415,4$ (m/z)

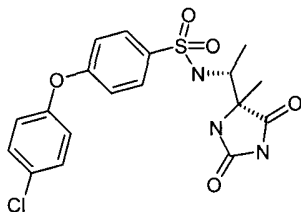
20

R-N-(1-(4-Metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etyl)-4-fenoxi-benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 390,4$ (m/z)

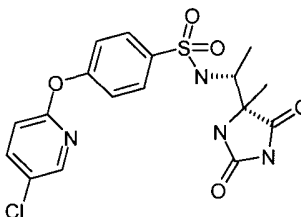
4-(4-Chlórfenoxý-N-(1-(4-R-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 423,4$ (m/z)

5

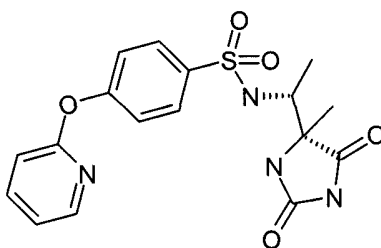
4-(5-Chlórpýridyl-2-oxy)-N-(1-(4-R-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 424,4$ (m/z)

10

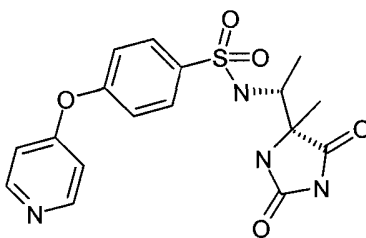
N-(1-(4-R-Metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etyl)-4-(pyridin-2-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + 2H^+ = 392,4$ (m/z)

15

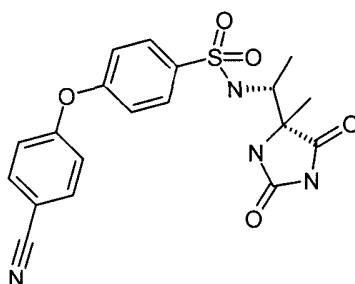
N-(1-(4-R-Metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etyl)-4-(pyridin-2-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + 2H^+ = 392,4$ (m/z)

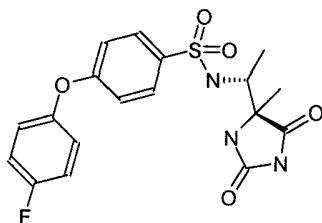
20

4-(4-Kyanofenoxý-N-(1-(4-R-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 415,4$ (m/z)

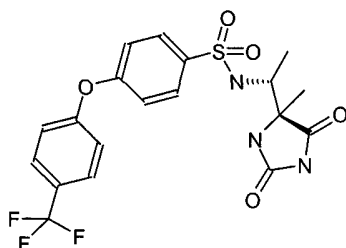
4-(4-Fluórfenoxi-N-(1-(4-S-metyl-2,5-dioximidazolidin-4-R-yl)etylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 407,4$ (m/z)

5

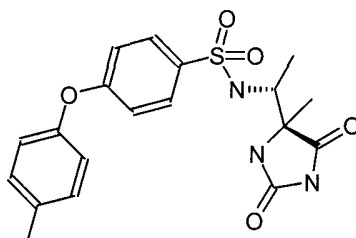
4-(4-Trifluórmetylfenoxi-N-(1-(4-R-metyl-2,5-dioximidazolidin-4-S-yl)etylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 458,4$ (m/z)

10

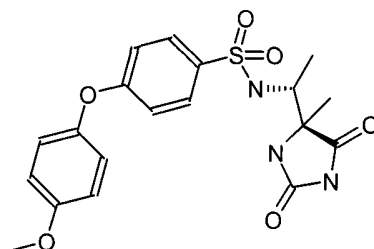
4-(4-Metylfenoxi-N-(1-(4-R-metyl-2,5-dioximidazolidin-4-S-yl)etylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 404,5$ (m/z)

15

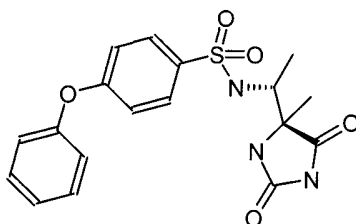
4-(4-Metoxifenoxi-N-(1-(4-R-metyl-2,5-dioximidazolidin-4-S-yl)etylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 420,5$ (m/z)

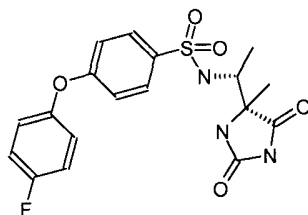
20

4-(4-Fenoxi-N-(1-(4-R-metyl-2,5-dioximidazolidin-4-S-yl)etylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 390,5$ (m/z)

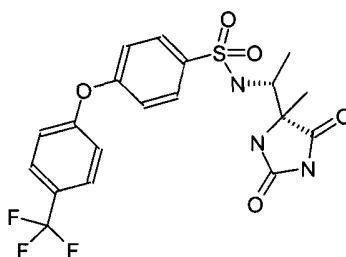
4-(4-Fluórfenoxo-N-(1-(4-R-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 407,4$ (m/z)

5

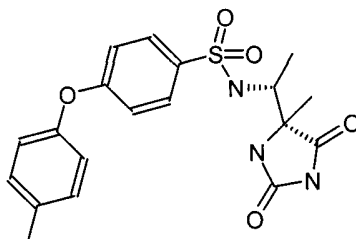
4-(4-Trifluórmetylfenoxo-N-(1-(4-R-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 458,4$ (m/z)

10

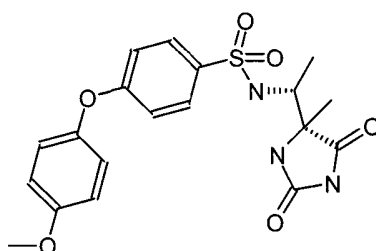
4-(4-Metylfenoxo-N-(1-(4-R-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 404,5$ (m/z)

15

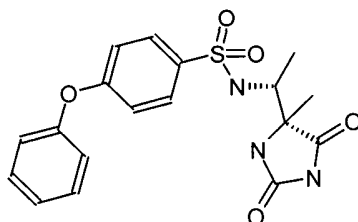
4-(4-Metoxýfenoxo-N-(1-(4-R-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 420,5$ (m/z)

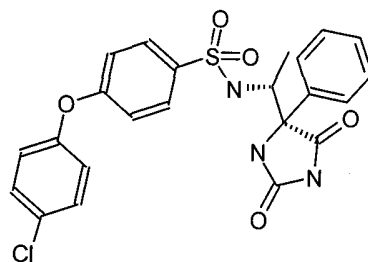
20

4-(4-Fenoxo-N-(1-(4-R-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-R-yl)etylbenzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 390,5$ (m/z)

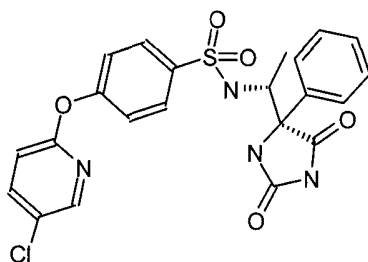
4-(4-Chlórfenoxý)-N-(1-((2,5-dioxo-4-S-fenylimidazolidin-4-R-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 486,8$ (m/z)

5

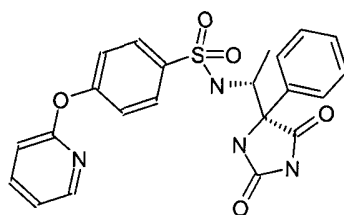
4-(5-Chlórpýridín-2-yloxy)-N-(1-((2,5-dioxo-4-S-fenylimidazolidin-4-R-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 487,8$ (m/z)

10

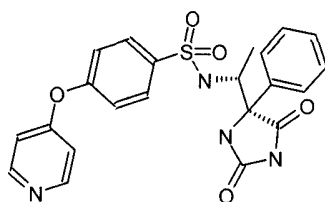
N-(1-S-(2,5-Dioxo-4-fenylimidazolidin-4-R-yl)etyl-4-(pyridin-2-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + 2H^+ = 454,6$ (m/z)

15

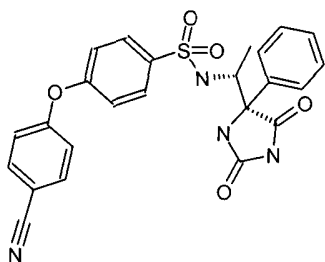
N-(1-S-(2,5-Dioxo-4-fenylimidazolidin-4-R-yl)etyl-4-(pyridin-4-yloxy)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + 2H^+ = 454,6$ (m/z)

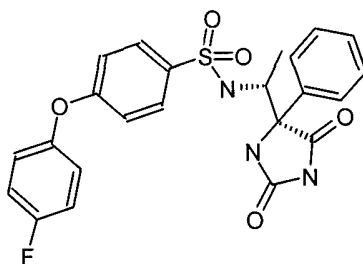
20

4-(4-Kyanofenoxý)-N-(1-((2,5-dioxo-4-S-fenylimidazolidin-4-R-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 477,6$ (m/z)

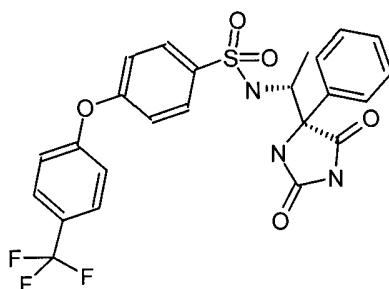
4-(4-Fluórfenoxi)-N-(1-((2,5-dioxo-4-S-fenylimidazolidin-4-R-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 470,5$ (m/z)

5

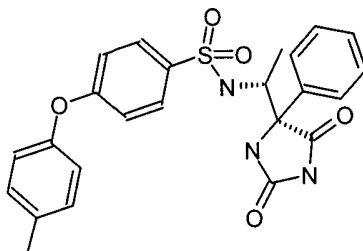
4-(4-Trifluórmetilfenoxi)-N-(1-((2,5-dioxo-4-S-fenylimidazolidin-4-R-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 519,1$ (m/z)

10

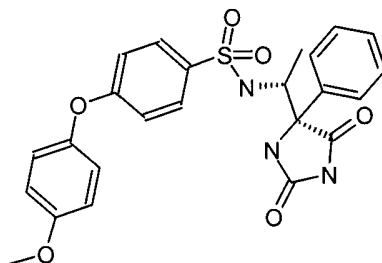
4-(4-Metilfenoxi)-N-(1-((2,5-dioxo-4-S-fenylimidazolidin-4-R-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 466,4$ (m/z)

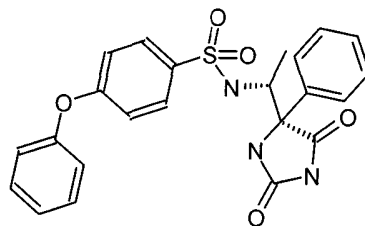
15

4-(4-Metoxifenoxi)-N-(1-((2,5-dioxo-4-S-fenylimidazolidin-4-R-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 482,4$ (m/z)

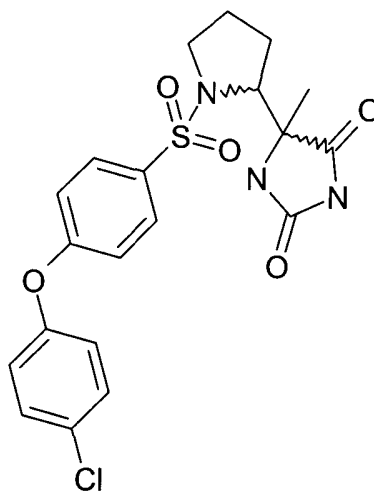
4-(4-Fenoxi)-N-(1-((2,5-dioxo-4-S-fenylimidazolidin-4-R-yl)etyl)benzénsulfónamid



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 452,5$ (m/z)

5

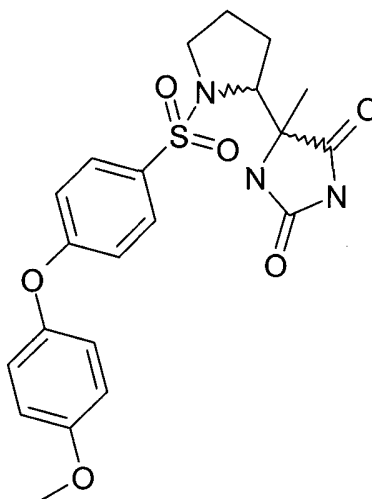
5-(1-{[4-(4-Chlórfenoxi)fenyl]sulfonyl}pyrolidin-2-yl)-5-metylimidazolidín-2,4-dión



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 450,5$ (m/z)

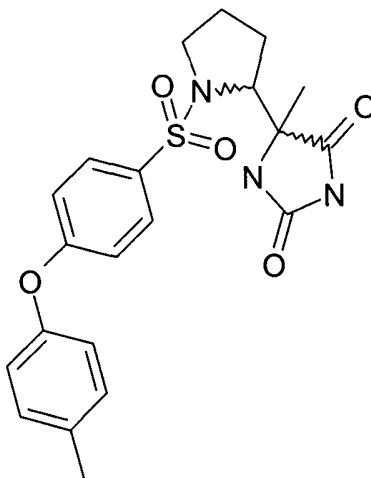
10

5-(1-{[4-(4-Metoxifenoxy)fenyl]sulfonyl}pyrolidin-2-yl)-5-metylimidazolidín-2,4-dión



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 446,2$ (m/z)

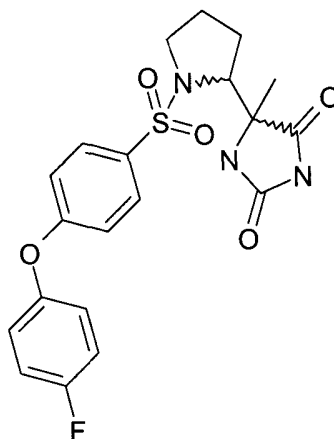
5-(1-{[4-(4-Metylfenoxy)fenyl]sulfonyl}pyrolidin-2-yl)-5-metylimidazolidín-2,4-dión



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 430,1$ (m/z)

5

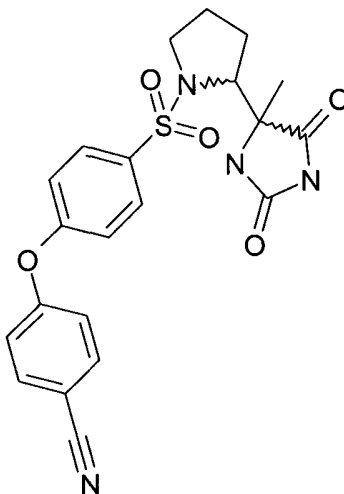
5-(1-{[4-(4-Fluórfenoxy)fenyl]sulfonyl}pyrolidin-2-yl)-5-metylimidazolidín-2,4-dión



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 434,1$ (m/z)

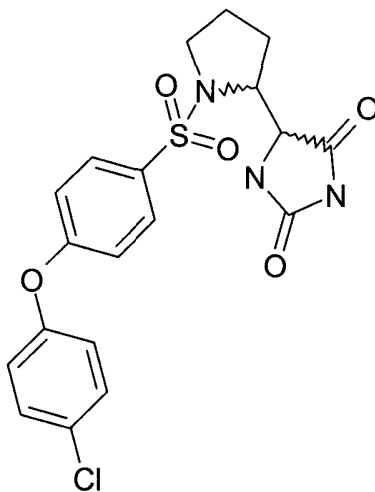
10

(1-{[4-(4-Kyanofenoxy)fenyl]sulfonyl}pyrolidin-2-yl)-5-metylimidazolidín-2,4-dión



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 441,1$ (m/z)

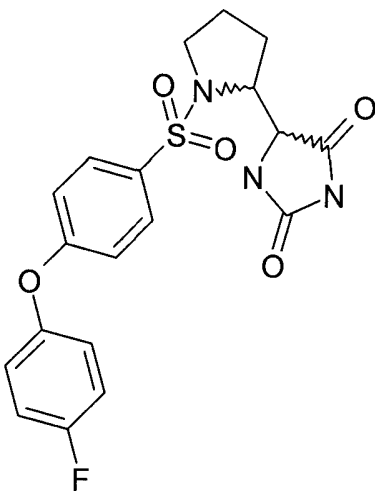
5-(1-{[4-(4-Chlórfenoxy)fenyl]sulfonyl}pyrolidin-2-yl)imidazolidín-2,4-dión



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 436,1$ (m/z)

5

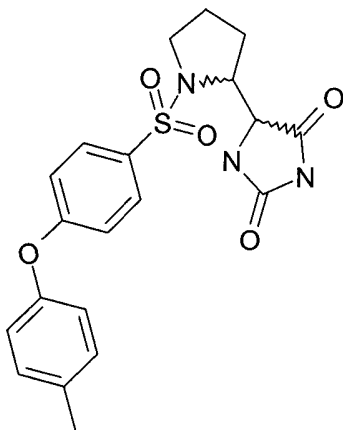
5-(1-{[4-(4-Fluórfenoxy)fenyl]sulfonyl}pyrolidin-2-yl)imidazolidín-2,4-dión



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 420,1$ (m/z)

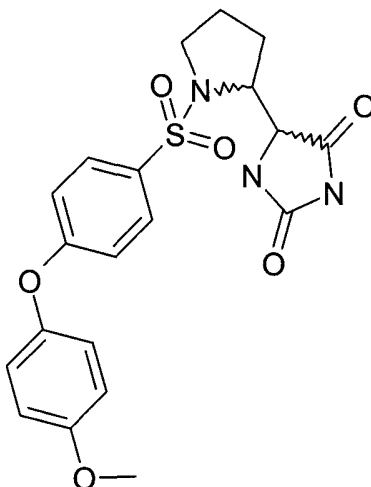
10

5-(1-{[4-(4-Metylfeoxy)fenyl]sulfonyl}pyrolidin-2-yl)imidazolidín-2,4-dión



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 416,1$ (m/z)

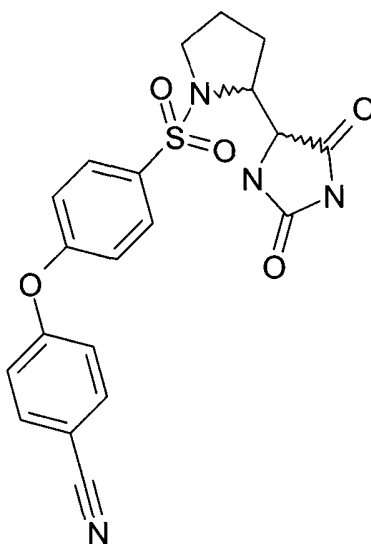
5-(1-{[4-(4-Metoxyfenoxy)fenyl]sulfonyl}pyrolidin-2-yl)imidazolidín-2,4-dión



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 432,1$ (m/z)

5

5-(1-{[4-(4-Kyanofenoxy)fenyl]sulfonyl}pyrolidin-2-yl)imidazolidín-2,4-dión



LC-MS (APCI): $M^+ + H^+ = 427,1$ (m/z)

10

Príklad 4 (Referenčné zlúčeniny)

[(4*R*)-2,5-Dioxoimidazolidinyl]metánsulfonylchlorid, [(4*S*)-2,5-dioxoimidazolidinyl]metánsulfonylchlorid alebo [(*R*)-2,5-dioxoimidazolidinyl]metánsulfonylchlorid sa nechal reagovať s príslušným primárnym alebo sekundárnym amínom za vzniku uvedených zlúčenín. Všetky použité amíny sú komerčne dostupné.

15

Sulfonylchlorid (0,060 mmol), amín (0,060 mmol), trietylamín (0,0084 ml, 0,060 mmol) v suchom tetrahydrofuráne (0,70 ml) sa miešali pri laboratórnej teplote cez noc. Pridal sa polystyrénmetylizokyanát (0,025 g, 0,030 mmol) a zmes sa miešala cez noc. Biela suspenzia sa prefiltrovala a tuhá fáza sa premyla tetrahydrofuránom (2 x 1 ml). Filtráty sa odparili, biela tuhá látka sa suspendovala vo vode (5 ml), oddelila sa na filtri, premyla sa vodou (2 x 1 ml), voda sa odsala a látka sa vysušila vo vákuu pri 45 °C cez noc, čím sa získali titelné zlúčeniny.

20

Východiskové látky boli pripravené nasledovne:

5-Metyl-5-[[fenylmetyl]tio]metyl}imidazolidín-2,4-dión

Oceľová nádoba sa naplnila etanolom a vodou (315 ml/135 ml).

25

Pridalo sa 31,7 g (0,175 mol) benzyltioacetónu, 22,9 g (0,351 mol) kyanidu draselného a 84,5 g (0,879 mol) uhličitanu amónneho. Uzavretá reakčná nádoba sa udržiavala v olejovom kúpeli (teplota kúpeľa 90 °C) pod intenzívnym miešaním 3 h.

Reakčná nádoba sa ochladila zmesou ľadu a vody (0,5 h), žltkastá suspenzia sa odparila dosucha a tuhý zvyšok sa rozdelil medzi 400 ml vody a 700 ml etylacetátu a vrstvy sa oddelili. Vodná fáza sa extrahovala etylacetátom (300 ml). Spojené organické fázy sa premyli nasýteným roztokom NaCl (150 ml), vysušili sa (Na_2SO_4), prefiltrovali a odparili dosucha. Ak produkt nekryštalizoval, do oleja sa pridalo 300 ml dichlórmetánu. Odparením sa získal produkt ako žltkastý prášok, 43,8 g (90 %).

LC-MS (APCI) m/z 251,1 (MH^+).

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 10,74 (1 H, s); 8,00 (1 H, s); 7,35 - 7,20 (5 H, m); 3,76 (2 H, s); 2,72, 2,62 (po 1 H, ABq, $J = 14,0$ Hz); 1,29 (3 H, s).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 177,30, 156,38, 138,11, 128,74, 128,24, 126,77, 62,93, 37,96, 36,39, 23,15.

(5*S*)-5-Metyl-5-[[([fenylmetyl]tio)metyl]imidazolidín-2,4-dión

Titulná zlúčenina sa pripravila chirálnou separáciou racemického materiálu použitím 250 mm x 50 mm kolóny na systéme Dynamic Axial Compression Preparative HPLC. Použitou stacionárnou fázou bol CHIRALPAK AD, eluent = metanol, prietok = 89 ml/min., teplota = laboratórna, UV = 220 nm, koncentrácia vzorky = 150 mg/ml, injekčný objem = 20 ml.

Retenčný čas pre titulnú zlúčeninu = 6 min.

Analýza chirálnej čistoty sa uskutočnila pomocou 250 mm x 4,6 mm kolóny CHIRALPAK-AD od firmy Daicel, prietok = 0,5 ml/min., eluent = etanol, UV = 220 nm, teplota = laboratórna.

Retenčný čas pre titulnú zlúčeninu = 9,27 min.

Čistota odhadovaná na > 99 % ee.

LC-MS (APCI) m/z 251,1 (MH^+).

$[\alpha]_D = -30,3^\circ$ ($c = 0,01$ g/ml, MeOH, $t = 20^\circ\text{C}$).

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 10,74 (1 H, s); 8,00 (1 H, s); 7,35 - 7,20 (5 H, m); 3,76 (2 H, s); 2,72, 2,62 (po 1 H, ABq, $J = 14,0$ Hz); 1,29 (3 H, s).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 177,30, 156,28, 138,11, 128,74, 128,24, 126,77, 62,93, 37,96, 36,39, 23,15.

(5*R*)-5-Metyl-5-[[([fenylmetyl]tio)metyl]imidazolidín-2,4-dión

Titulná zlúčenina sa pripravila chirálnou separáciou racemického materiálu použitím 250 mm x 50 mm kolóny na systéme Dynamic Axial Compression Preparative HPLC. Použitou stacionárnou fázou bol CHIRALPAK AD, eluent = metanol, prietok = 89 ml/min., teplota = laboratórna, UV = 220 nm, koncentrácia vzorky = 150 mg/ml, injekčný objem = 20 ml.

Retenčný čas pre titulnú zlúčeninu = 10 min.

Analýza chirálnej čistoty sa uskutočnila pomocou 250 mm x 4,6 mm kolóny CHIRALPAK-AD od firmy Daicel, prietok = 0,5 ml/min., eluent = etanol, UV = 220 nm, teplota = laboratórna.

Retenčný čas pre titulnú zlúčeninu = 17,81 min.

Chirálna čistota odhadovaná na > 99 % ee.

LC-MS (APCI) m/z 251,0 (MH^+).

$[\alpha]_D = +30,3^\circ$ ($c = 0,01$ g/ml, MeOH, $t = 20^\circ\text{C}$).

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 10,74 (1 H, s); 8,00 (1 H, s); 7,35 - 7,20 (5 H, m); 3,76 (2 H, s); 2,72, 2,62 (po 1 H, ABq, $J = 14,0$ Hz); 1,29 (3 H, s).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 177,31, 156,30, 138,11, 128,74, 128,25, 126,77, 62,94, 37,97, 36,40, 23,16.

[(4*S*)-4-Metyl-2,5-dioximidazolidín-4-yl]metánsulfonylchlorid

(5*S*)-5-Metyl-5-[[([fenylmetyl]tio)metyl]imidazolidín-2,4-dión (42,6 g; 0,17 mol) sa rozpustil v zmesi AcOH (450 ml) a H_2O (50 ml). Zmes sa ponorila do kúpeľa ľadu s vodou, cez roztok sa prebublával Cl_2 (g) a prietok plynu sa nastavil tak, aby sa teplota udržala pod $+15^\circ\text{C}$. Po 25 min. roztok nadobudol žltozelenú farbu a odobrala sa vzorka na LC/MS a HPLC analýzu. Tá ukázala, že východisková látka sa spotrebovala. Žltý priehľadný roztok sa miešal 30 min. a vytvoril sa kalný roztok až suspenzia.

Rozpúšťadlo sa odparilo na rotačnej odparke použitím vodného kúpeľa s teplotou udržiavanou na $+37^\circ\text{C}$. Žltkastá tuhá látka sa suspendovala v toluéne (400 ml) a rozpúšťadlo sa odstránilo na tej istej rotačnej odparke. To sa opakovalo ešte raz.

Surový produkt sa potom suspendoval v izohexáne (400 ml) a zahrial sa na $+40^\circ\text{C}$ s miešaním. Suspenzia sa nechala vychladnúť na laboratórnu teplotu, nerozpustný produkt sa oddelil filtráciou, premyl sa izohexánom (6 x 100 ml) a vysušil za zníženého tlaku pri $+50^\circ\text{C}$ cez noc. Takto sa získal produkt ako žltkastý prášok.

Získalo sa 36,9 g (95 %) titulnej zlúčeniny.

Čistota podľa HPLC = 99 %, NMR túto čistotu potvrdilo.

$[\alpha]_D = -12,4^\circ$ ($c = 0,01$ g/ml, THF, $t = 20^\circ\text{C}$).

^1H NMR ($\text{THF}-d_8$) δ 9,91 (1 H, bs); 7,57 (1 H, s); 4,53, 4,44 (po 1 H, ABq, $J = 14,6$ Hz); 1,52 (s, 3 H, CH_3).

^{13}C NMR ($\text{THF}-d_8$) δ 174,96; 155,86; 70,96; 61,04; 23,66.

[(4*R*)-4-Metyl-2,5-dioximidazolidin-4-yl]metánsulfonylchlorid

Podľa postupu opísaného pre [(4*S*)-4-metyl-2,5-dioximidazolidin-4-yl]metánsulfonylchlorid.

Vychádzalo sa z (5*R*)-5-metyl-5-[[[fenylmetyl]tio]metyl]imidazolidín-2,4-diónu (10,0 g, 40 mmol).

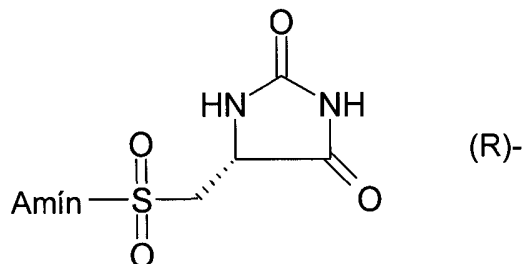
Získalo sa 8,78 g (96 %) titulnej zlúčeniny.

Čistota podľa NMR > 98 %.

$[\alpha]_D = +12,8^\circ$ ($c = 0,01$ g/ml, THF, $t = 20^\circ\text{C}$).

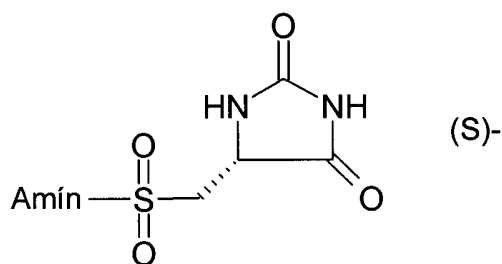
^1H NMR (THF- d_8): δ 9,91 (1 H, brs); 7,57 (1 H, s); 4,53, 4,44 (po 1 H, ABq, $J = 14,6$ Hz); 1,52 (s, 3 H, CH_3).

^{13}C NMR (THF- d_8): δ 174,96; 155,84; 70,97; 61,04; 23,66.

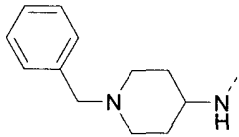
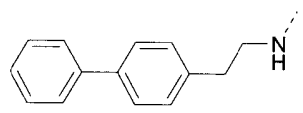
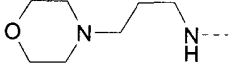
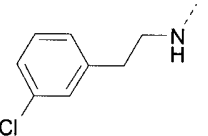
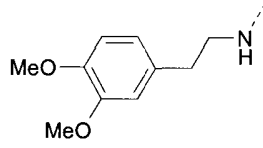
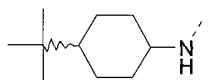
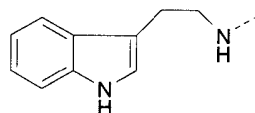
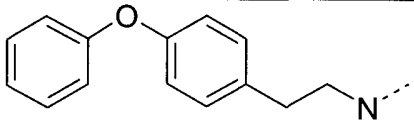
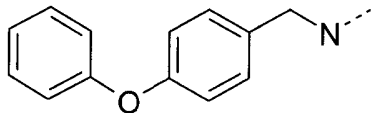


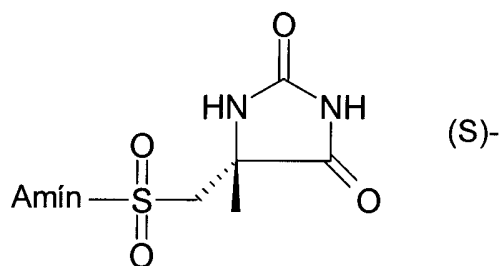
Uvedená tabuľka uvádza aminové skupiny pre každú zlúčeninu uvedenej štruktúry.

MW 366 m/z 367 (M+1)	MW 373,43 m/z 374 (M+1)
MW 320 m/z 321 (M+1)	MW 331,78 m/z 332 (M+1)
MW 357,39 m/z 358 (M+1)	MW 331,44 m/z 332 (M+1)
MW 336,37 m/z 337 (M+1)	

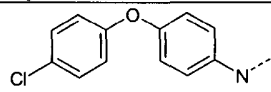
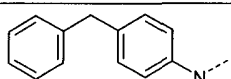


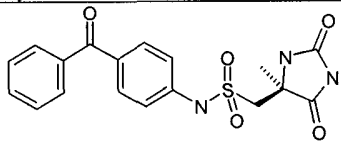
Uvedená tabuľka uvádza aminové skupiny pre každú zlúčeninu uvedenej štruktúry.

 MW 366 m/z 367 (M+1)	 MW 373,43 m/z 374 (M+1)
 MW 320 m/z 321 (M+1)	 MW 331,78 m/z 332 (M+1)
 MW 357,39 m/z 358 (M+1)	 MW 331,44 m/z 332 (M+1)
 MW 336,37 m/z 337 (M+1)	 MW 403,46 m/z 404 (M+1)
 MW 389,43 m/z 390 (M+1)	



Uvedená tabuľka uvádza aminové skupiny pre každú zlúčeninu uvedenej štruktúry.

Hydantoin	Analýza ⁽¹⁾
	MW 375,41 m/z 410 (MH ⁺)
	m/z 374 (MH ⁺) MW 373,43

Hydantoín	Analýza ⁽¹⁾
	m/z 388 (MH ⁺) MW 387,42

N-[4-(4-Chlórfenoxy)fenyl]-*C*-((4*S*)-4-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)metánsulfónamid
LC-MS (APCI) m/z 410 (MH⁺).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 10,75 (1 H, s); 9,89 (1 H, s); 8,04 (1 H, s); 7,45 - 7,39 (2 H, m); 7,25 - 7,19 (2 H, m);
5 7,06 - 6,97 (4 H, m); 3,54 (1 H z ABq, *J* = 14,1 Hz); 1,31 (3 H, s).

N-(4-Benzylfenyl)-*C*-((4*S*)-4-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)metánsulfónamid
LC-MS (APCI) m/z 374 (MH⁺).

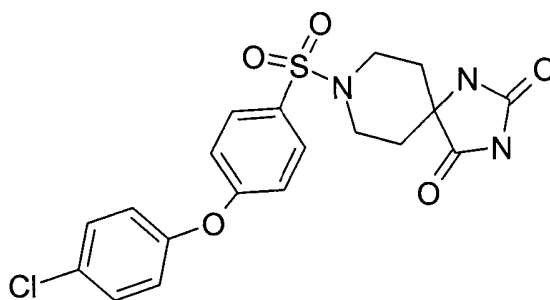
¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 10,74 (1 H, s); 9,82 (1 H, s); 8,01 (1 H, s); 7,33 - 7,05 (9 H, m); 3,49, 3,36 (po 1 H,
10 ABq, *J* = 16,2 Hz); 1,28 (3 H, s).

N-(4-Benzoylfenyl)-*C*-((4*S*)-4-metyl-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)metánsulfónamid
LC-MS (APCI) m/z 388 (MH⁺).

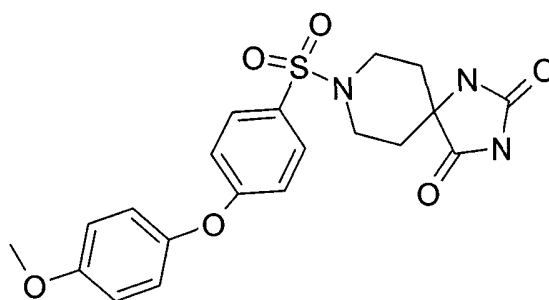
¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 10,81 (1 H, s); 10,58 (1 H, s); 8,08 (1 H, s); 7,76 - 7,62 (5 H, m); 7,60 - 7,52 (2 H,
15 m); 7,33 - 7,27 (2 H, m); 3,68, 3,52 (po 1 H, ABq, *J* = 14,7 Hz); 1,33 (3 H, s).

Příklad 5

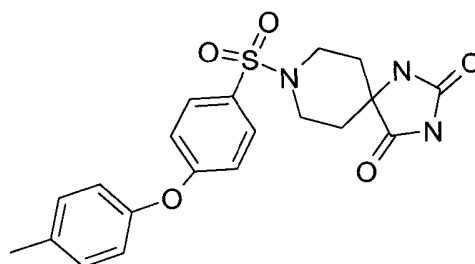
Pripravený z komerčně dostupného *N*-Boc-4-piperidónu metodami opísanými v príklade 3.



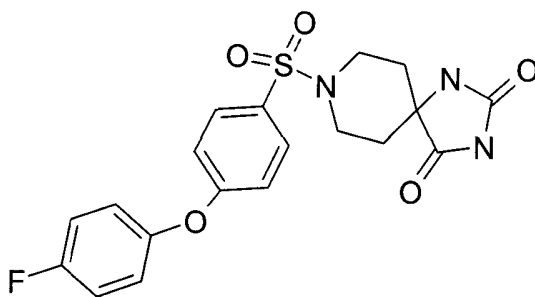
m/z 437 (MH⁺) MW 435,89



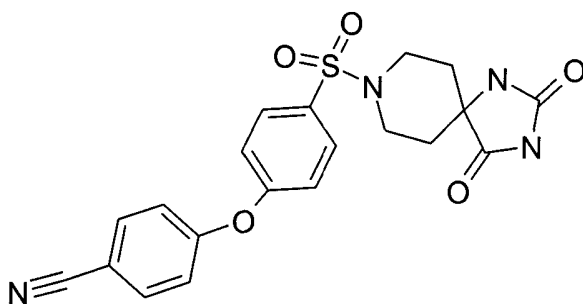
m/z 432 (MH⁺) MW 431,47



m/z 416 (MH⁺) MW 415,47



m/z 420 (MH⁺) MW 419,43



m/z 427 (MH⁺) MW 426,45

PATENTOVÉ NÁROKY

1. 5-(1-{[4-(4-Kyanofenoxy)fenyl]sulfonyl}pyrrolidin-2-yl)-5-metylimidazolidín-2,4-dión a jej farmaceuticky prijateľné soli.

2. Farmaceutická kompozícia, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje 5-(1-{[4-(4-kyanofenoxy)fenyl]sulfonyl}pyrrolidin-2-yl)-5-metylimidazolidín-2,4-dión alebo jej farmaceuticky prijateľnú soľ spolu s farmaceuticky prijateľným nosičom.

Koniec dokumentu