



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(21) Broj prijave:



HR P20000648A A2

HR P20000648A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: C 07 D 309/14
C 07 D 405/12
A 61 K 31/35

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 03.10.2000.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 31.12.2000.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/IB99/00505

Datum podnošenja međunarodne prijave 24.03.1999.

(87) Broj međunarodne objave: WO 99/52889

Datum međunarodne objave 21.10.1999.

(31) Broj prve prijave: 60/081,364; (32) Datum podnošenja prve prijave: 10.04.1998.; (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(71) Podnositelj prijave:

Pfizer Products Inc., Eastern Point Road, Groton, CT, US

(72) Izumitelj:

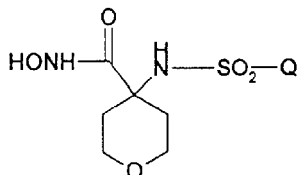
Lawrence Alan Reiter, 32 West Mystic Avenue, Mystic, 06355 CT, US

(74) Punomoćnik:

Silvije HRASTE, ZAGREB, HR

(54) Naziv izuma: HIDROKSAMIDI (4-SULFONILAMINO)-TETRAHIDROPIRAN-4-KARBOKSILNE KISELINE

(57) Sažetak: Spoj formule (I), gdje je Q kao što je definirano, koji se koristi za tretman stanja koja se biraju iz grupe koju čine artritis (uključujući osteoartritis i reumatoidni artritis), inflamatorna bolest utrobe, Crohn-ova bolest, emfizem, kronična opstruktivna bolest pluća, Alzheimer-ova bolest, toksičnost uslijed transplantacije organa, kaheksija, alergijske reakcije, alergijska hipersenzitivnost na dodir, karcinom, ulceracija tkiva, restenoza, periodontalne bolesti, epidermoliza buloza, osteoporoza, odbacivanje implantanata umjetnog zgloba, ateroskleroza (uključujući raskidanje aterosklerotičnog plaka), aneurizma aorte (uključujući aneurizmu abdominalne aorte i aneurizmu moždane aorte), kongestivna srčana mana, infarkt miokarda, moždani udar, cerebralna ishemija, traume glave, povrede leđne moždine, neurodegenerativni poremećaji (akutni i kronični), autoimuni poremećaji, Huntington-ova bolest, Parkinson-ova bolest, migrena, depresija, periferna neuropatija, bolovi, cerebralna amiloidna angiopatija, poboljšanje spoznaje, amiotrofna lateralna skleroza, multipla skleroza, okularna angiogeneza, povrede rožnjače, makularna degeneracija, abnormalno zarastanje rana, opekotine, dijabetes, početak tumora, rast tumora, metastaza tumora, ubodi rožnjače, skleritis, AIDS, sepsa i septički šok. Pored toga, spojevi ovog izuma mogu se koristiti u kombiniranoj terapiji sa standardnim nesteroidnim anti-inflamatornim lijekovima (NSAID) i analgeticima, i u kombinaciji sa citotoksičnim lijekovima, kao što su adriamycin, daunomycin, cis-platina, etoposide, taxol, taxotere i drugim alkaloidima, kao što su vincristine, za liječenje karcinoma.



HR P20000648A A2

Područje izuma

Ovaj izum se odnosi na derivate hidroksamida (4-sulfonilamino)-tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline, na farmaceutске preparate i na postupke liječenja.

Spojevi ovog izuma su inhibitori cink metaloendopeptidaza, naročito onih koje pripadaju matričnoj metaloproteinazi (koje se zovu još MMP ili matriksini) i reprotizinu (poznatom i kao adamilzin), podfamilijama metcincina (Rawlings i suradnici: "*Methods in Enzymology*", 248, 183-228, (1995.); i Stocker i suradnici: "*Protein Science*", 4, 823-840, (1995.)).

Podfamilija enzima MMP, danas sadrži sedamnaest članova (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-18, MMP-19, MMP-20). Ovi MMP-i su najbolje poznati zbog njihove uloge u reguliranju prijenosa vanstaničnih matričnih proteina i kao takvi igraju značajnu ulogu u normalnim fiziološkim procesima, kao što su reprodukcija, razvoj i diferencijacija. Pored toga, MMP-i se iskazuju u mnogim patološkim situacijama koje su u vezi s abnormalnostima vezivnog tkiva. Na primjer, MMP-13 je enzim sa potencijalom aktivnosti za razgradnju kolagena tipa II (glavni kolagen u hrskavici), za koga je demonstrirano da je prenatlažen u osteoartritičnim hrskavicama (Mitchell i suradnici: "*J. Clin. Invest.*", 97, 761, (1996.)). U osteoartritičnoj hrskavici prenatlaženi su također i drugi MMP-i (MMP2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-12), pa se očekuje da će inhibicija nekog ili svih ovih MMP-a usporiti ili blokirati gubitak hrskavice, tipičan za bolesti zglobova, kao što su osteoarthritis ili reumatoidni arthritis.

Reprotizini sisavaca, poznati kao ADAM-i (engl.: *A Desintegrin And Metalloproteinase*) (Wolfberg i suradnici: "*J. Cell Biol.*", 131, 275-278, (1995.)), sadrže dezintegrinsku domenu pored domene nalik metaloproteinazi. Do danas su identificirana 23 različita ADAM-a.

ADAM-17, također poznat kao enzim za konverziju faktora alfa nekroze tumora (TACE), najbolje je poznat ADAM. ADAM-17 (TACE) je odgovoran za odvajanje faktora-alfa nekroze tumora od stanice (TNF- α , poznatog također kao kahektin). Uloga TNF- α prepoznata je kod mnogih infekcija i autoimunih bolesti (W. Friers: "*FEBS Letters*", 285, 199, (1991.)). Nadalje, pokazano je da je TNF- α primarni medijator inflamatornog odgovora koji se zapaža kod sepse i septičkog šoka (Spooner i suradnici: "*Clinical Immunology and Immunopathology*", 62, 11, (1992.)). Postoje dva oblika TNF- α , tip II, membranski protein relativne molarne mase 26.000 (26 kD), i rastvorni oblik od 17 kD, koji se generira specijalnim proteolitičkim odvajanjem iz proteina vezanog za stanicu. Ovaj rastvorni oblik od 17 kD TNF- α oslobađa stanicu i povezan je sa štetnim efektima TNF- α . Ovaj oblik TNF- α je također u stanju da djeluje na mjestima koja su udaljena od mjesta sinteze. Dakle, inhibitori TACE sprječavaju stvaranje rastvornog TNF- α i sprječavaju štetne efekte ovog rastvornog faktora.

Izbor spojeva ovog izuma su potencijalni inhibitori agrekanaze, enzima koji je važan pri degradaciji agrekana hrskavice. Također se smatra da je i agrekanaza ADAM. Gubitak agrekana iz matrice hrskavice je značajan faktor u napredovanju bolesti zglobova, kao što su osteoarthritis i reumatoidni arthritis, pa se očekuje da inhibicija agrekanaze uspori ili blokira gubitak hrskavice kod ovih bolesti.

Drugi ADAM-i koji su pokazali ispoljavanje u patološkim situacijama su ADAM TS-1 (Kuno i suradnici: "*J. Biol. Chem.*", 272, 556-562, (1997.)), te ADAM-i 10, 12 i 15 (Wu i suradnici: "*Biochem. Biophys. Res. Comm.*", 235, 437-442, (1997.)). Kako raste znanje u vezi ispoljavanja fizioloških substrata i povezivanje ADAM-a sa bolešću, raste cjelokupni značaj uloge inhibicije ove klase enzima.

Bolesti kod kojih inhibicija MMP-a i ADAM-a daje terapijsko poboljšanje su: arthritis (uključujući osteoarthritis i reumatoidni arthritis), inflamatorno oboljenje utrobe, Crohn-ova bolest, emfizem, sindrom akutnog respiratornog bola, astmatične kronične opstruktivne plućne bolesti, Alzheimer-ova bolest, toksičnost uslijed transplantacije organa, kaheksija, alergijske reakcije, alergijska hipersenzitivnost na dodir, karcinom, ulceracija tkiva, restenoza, periodontalne bolesti, epidermoliza buloza, osteoporoza, odbacivanje implantanata umjetnog zgloba, ateroskleroza (uključujući raskidanje aterosklerotičnog plaka), aneurizma aorte (uključujući aneurizmu abdominalne aorte i aneurizmu moždane aorte), kongestivna srčana mana, infarkt miokarda, moždani udar, cerebralna ishemija, traume glave, povrede leđne moždine, neurodegenerativni poremećaji (akutni i kronični), autoimuni poremećaji, Huntington-ova bolest, Parkinson-ova bolest, migrena, depresija, periferna neuropatija, bolovi, cerebralna amiloidna angiopatija, poboljšanje spoznaje, amiotrofna lateralna skleroza, multipla skleroza, okularna angiogeneza, povrede rožnjače, makularna degeneracija, abnormalno zarastanje rana, opekotine, dijabetes, početak tumora, rast tumora, metastaza tumora, ubodi rožnjače, skleritis, AIDS, sepsa, septički šok i druge bolesti koje karakterizira ispoljavanje metaloproteinaze ili ADAM.

Ovaj izum se također odnosi i na postupak korištenja spojeva ovog izuma za tretman gornjih bolesti kod sisavaca,

naročito humanih bića, i na farmaceutske preparate koji su za to upotrebljivi.

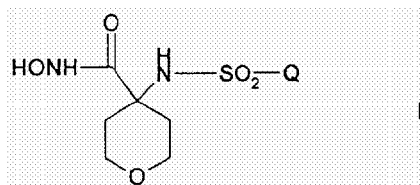
Poznato je da se različite kombinacije MMP-a i ADAM-a ispoljavaju u različitim patološkim situacijama. Stoga su za pojedine bolesti poželjni inhibitori sa specifičnom selektivnošću za pojedinačne ADAM-e i MMP-e. Na primjer, reumatoidni artritis je bolest upale zglobova koju karakterizira povišen nivo TNF i gubitak konstituenata matrice zgloba. U ovom slučaju, spoj koji inhibira TACE i agrekanazu, a isto tako i MMP-e, kao što je MMP-13, može biti poželjan za terapiju. Nasuprot, kod manjih upalnih bolesti zgloba, kao što je osteoartritis, mogu biti poželjni spojevi koji inhibiraju degradaciju matričnih MMP-a, kao što je MMP-13, ali ne i TACE.

Sadašnji izumitelji su također otkrili da je moguće dizajnirati inhibitore sa različitom aktivnošću prema metaloproteinazama. Specifično, na primjer izumitelji su bili u stanju dizajnirati molekule koje selektivno inhibiraju prvenstveno matričnu metaloproteinazu-13 (MMP-13), u odnosu na MMP-1.

U literaturi su dobro poznati inhibitori metaloproteinaze i repolizina. Preciznije, PCT patentna prijava objavljena kao WO 96/33172, od 24. listopada 1996., odnosi se na ciklične arilsulfonilamino hidroksamske kiseline, koje su korisni inhibitori MMP. US patent 5.672.615, PCT patentna prijava objavljena kao WO 97/20824, PCT patentna prijava objavljena kao WO 98/08825, PCT patentna prijava objavljena kao WO 98/27069 i PCT patentna prijava objavljena kao WO 98/34918 od 13. kolovoza 1998. pod naslovom "Derivati arilsulfonil hidroksamske kiseline", svi se odnose na ciklične hidroksamske kiseline koje su korisni inhibitori MMP. PCT patentne prijave objavljene kao WO 96/27583 i WO 98/07697, od 7. ožujka 1996. i 26. veljače 1998., respektivno, odnose se na arilsulfonil hidroksamske kiseline. PCT patentna prijava objavljena kao WO 98/03516, od 29. siječnja 1998., odnosi se na fosfinate sa aktivnošću prema MMP. PCT patentna prijava objavljena kao 98/34915, od 13. kolovoza 1998., pod naslovom "Derivati N-hidroksi-b-sulfonil-propionamida", odnosi se na propionilhidroksamide, kao korisne inhibitore MMP. PCT patentna prijava objavljena kao WO 98/33768, od 6. kolovoza 1998., pod naslovom "Derivati arilsulfonilamino hidroksamske kiseline", odnosi se na N-nesupstituirane arilsulfonilamino hidroksamske kiseline. PCT patentna prijava objavljena kao WO 98/30566, od 16. srpnja 1998., pod naslovom "Derivati cikličnog sulfona", odnosi se na hidroksamske kiseline cikličnog sulfona, kao inhibitore MMP. US privremena patentna prijava 60/55208, podnesena 8. kolovoza 1997., odnosi se na biaril hidroksamske kiseline kao inhibitore MMP. US privremena patentna prijava 60/55207, podnesena 8. kolovoza 1997., pod naslovom "Derivati ariloksiarilsulfonilamino hidroksamske kiseline", odnosi se na ariloksiarilsulfonil hidroksamske kiseline kao inhibitore MMP. US privremena patentna prijava 60/62766, podnesena 24. listopada 1997., pod naslovom "Upotreba selektivnih inhibitora MMP-13 za tretman osteoartritisa i drugih poremećaja posredovanih sa MMP", odnosi se na upotrebu selektivnih inhibitora MMP-13 za tretiranje inflamacijskih i drugih poremećaja. US privremena patentna prijava 60/68261, podnesena 19. prosinca 1997., odnosi se na upotrebu inhibitora MMP za tretiranje angiogeneze i drugih poremećaja. Svaka od gore citiranih objava i prijava ovdje je u cjelini unijeta kao referenca.

Kratki opis izuma

Ovaj izum se odnosi na spoj formule



ili njegove farmaceutske prihvatljive soli, gdje

Q je (C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril(C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril(C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroaril(C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroaril(C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkoksi(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkoksi(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkoksi(C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkoksi(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkoksi(C₆-C₁₀)aril ili (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkoksi(C₂-C₉)heteroaril;

pri čemu je svaki (C₆-C₁₀)aril ili (C₂-C₉)heteroaril ostatak u spomenutim (C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril(C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril(C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroaril(C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroaril(C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkoksi(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkoksi(C₂-C₉)heteroaril,

(C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroaril(C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroaril(C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkoksi(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkoksi(C₆-C₁₀)aril ili (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkoksi(C₂-C₉)heteroaril opciono supstituiran na bilo kome atomu ugljika u prstenu koji je u stanju formirati dodatnu vezu sa jednim ili više supstituenata po prstenu, koji se nezavisno biraju između fluoro, kloro, bromo, (C₁-C₆)alkil, (C₁-C₆)alkoksi, perfluoro(C₁-C₃)alkil, perfluoro(C₁-C₃)alkoksi i (C₆-C₁₀)ariloksi,

ili njegova farmaceutski prihvatljiva sol.

Ukoliko se drugačije ne naglasi, nazivom "alkil" ovdje su obuhvaćeni zasićeni monovalentni ugljikovodični radikali koji imaju ravan, razgranat ili cikličan ostatak, ili njihove kombinacije.

Nazivom "alkoksi" ovdje su obuhvaćene O-alkil grupe, gdje je "alkil" definiran gore.

Ukoliko se drugačije ne naglasi, nazivom "aril" ovdje je obuhvaćen organski radikal koji se izvodi iz aromatičnog ugljikovodika uklanjanjem jednog vodika, kao što su fenil ili naftil, opciono supstituiran sa 1 do 3 supstituenta koji se biraju iz grupe koju čine fluoro, kloro, bromo, perfluoro (C₁-C₆)alkil (uključujući trifluorometil), (C₁-C₆)alkoksi, (C₆-C₁₀)ariloksi, perfluoro (C₁-C₃)alkoksi (uključujući trifluorometoksi i difluorometoksi) i (C₁-C₆)alkil.

Ukoliko se drugačije ne naglasi, nazivom "heteroaril" ovdje je obuhvaćen organski radikal koji se izvodi iz aromatičnog heterocikličnog spoja uklanjanjem jednog vodika, kao što su piridil, furil, pirolil, tienil, izotiazolil, imidazolil, benzimidazolil, tetrazolil, pirazinil, pirimidil, kinolil, izokinolil, benzofuril, izobenzofuril, benzotienil, pirazolil, indolil, izoindolil, purinil, karbazolil, izoksazolil, tiazolil, oksazolil, benzotiazolil ili benzoksazolil, opciono supstituiran sa 1 do 2 supstituenta koji se biraju iz grupe koju čine fluoro, kloro, trifluorometil, (C₁-C₆)alkoksi, (C₆-C₁₀)ariloksi, trifluorometoksi, difluorometoksi i (C₁-C₆)alkil. Poželjni heteroarili su piridil, furil, tienil, izotiazolil, pirazinil, pirimidil, pirazolil, izoksazolil, tiazolil ili oksazolil. Najpoželjniji su piridil, furil ili tienil.

Poželjni spojevi formule (I) su oni u kojima je Q opciono supstituiran sa (C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril (C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroaril(C₂-C₉) heteroaril, (C₆-C₁₀)aril (C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroaril(C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkoksi (C₆-C₁₀)aril ili (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkoksi(C₆-C₁₀)aril.

Ostali poželjni spojevi formule (I) su oni u kojima je Q opciono supstituiran sa (C₆-C₁₀)ariloksi(C₆-C₁₀)aril.

Specifično, poželjni spojevi formule (I) su slijedeći:

- 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid;
- 4-[4-(4-klorofenoksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid;
- 4-[4-(fenoksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid;
- 4-[4-(4-piridiloksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid;
- 4-[4-(4-fluorofenil)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid;
- 4-[4-(4-fluorofenilmetoksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid;
- 4-[4-(fenilmetoksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid; i
- 4-[4-(4-fluorofeniletoksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid.

Ovaj izum odnosi se također na farmaceutski preparat za tretman stanja koje se bira iz grupe koju čine artritis (uključujući osteoartritis i reumatoidni artritis), inflamatorno oboljenje utrobe, Crohn-ova bolest, emfizem, kronična opstruktivna plućna bolest, Alzheimer-ova bolest, toksičnost uslijed transplantacije organa, kaheksija, alergijske reakcije, alergijska hipersenzitivnost na dodir, karcinom (kao što je karcinom sa čvrstim tumorom, uključujući karcinom debelog crijeva, karcinom dojke, karcinom pluća i prostate, karcinomozni i hematopoietični maligniteti, uključujući leukemije i limfome), ulceracija tkiva, restenoza, periodontalne bolesti, epidermoliza buloza, osteoporoza, odbacivanje implantanata umjetnog zgloba, ateroskleroza (uključujući raskidanje aterosklerotičnog plaka), aneurizma aorte (uključujući aneurizmu abdominalne aorte i aneurizmu moždane aorte), kongestivna srčana mana, infarkt miokarda, moždani udar, cerebralna ishemija, traume glave, povrede ledne moždine, neurodegenerativni poremećaji (akutni i kronični), autoimuni poremećaji, Huntington-ova bolest, Parkinson-ova bolest, migrena, depresija, periferna neuropatija, bolovi, cerebralna amiloidna angiopatija, poboljšanje spoznaje, amiotrofna lateralna skleroza, multipla skleroza, okularna angiogeneza, povrede rožnjače, makularna degeneracija, abnormalno zarastanje rana, opekotine, dijabetes, početak tumora, rast tumora, metastaza tumora, ubodi rožnjače, skleritis, AIDS, sepsa, septički šok i druge bolesti koje karakterizira aktivnost metaloproteinaze i druge bolesti sisavaca koje karakterizira aktivnost replolizina kod sisavaca, uključujući i humana bića, koji u takvim tretmanima sadrži efikasnu količinu spoja formule (I) ili njegove

farmaceutski prihvatljive soli i farmaceutski prihvatljiv nosač.

Ovaj izum se također odnosi na farmaceutski preparat za inhibiciju (a) matričnih metaloproteinaza ili drugih metaloproteinaza koje su uključene u degradaciju matrice, ili (b) reprolizina kod sisavaca (kao što je agrekanaza ili ADAM-i TS-1, 10, 12, 15 i 17, najpoželjnije ADAM-17), uključujući i humana bića, koji sadrži efikasnu količinu spoja formule (I) ili njegove farmaceutski prihvatljive soli.

Ovaj izum se također odnosi i na postupak tretiranja stanja koje se bira iz grupe koju čine artritis (uključujući osteoartritis i reumatoidni artritis), inflamatorno oboljenje utrobe, Crohn-ova bolest, emfizem, kronična opstruktivna bolest pluća, Alzheimer-ova bolest, toksičnost uslijed transplantacije organa, kaheksija, alergijske reakcije, alergijska hipersenzitivnost na dodir, karcinom, ulceracija tkiva, restenoza, periodontalne bolesti, epidermoliza buloza, osteoporoza, odbacivanje implantanata umjetnog zgloba, ateroskleroza (uključujući raskidanje aterosklerotičnog plaka), aneurizma aorte (uključujući aneurizmu abdominalne aorte i aneurizmu moždane aorte), kongestivna srčana mana, infarkt miokarda, moždani udar, cerebralna ishemija, traume glave, povrede leđne moždine, neurodegenerativni poremećaji (akutni i kronični), autoimuni poremećaji, Huntington-ova bolest, Parkinson-ova bolest, migrena, depresija, periferna neuropatija, bolovi, cerebralna amiloidna angiopatija, poboljšanje spoznaje, amiotrofna lateralna skleroza, multipla skleroza, okularna angiogeneza, povrede rožnjače, makularna degeneracija, abnormalno zarastanje rana, opekotine, dijabetes, početak tumora, rast tumora, metastaza tumora, ubodi rožnjače, skleritis, AIDS, sepsa, septički šok i druge bolesti koje karakterizira aktivnost metaloproteinaze i druge bolesti koje aktivnost reprolizina kod sisavaca, uključujući i humana bića, a koji se sastoji u davanju spomenutom sisavcu količine spoja formule (I) ili njegove farmaceutski prihvatljive soli, koja je efikasna u tretiranju takvog stanja.

Ovaj izum se također odnosi na postupak inhibicije (a) matričnih metaloproteinaza ili drugih metaloproteinaza koje su uključene u razgradnju matrice, ili (b) reprolizina kod sisavaca (kao što je agrekanaza ili ADAM-i TS-1, 10, 12, 15 i 17, najpoželjnije ADAM-17), uključujući i humana bića, koji se sastoji u davanju spomenutom sisavcu efikasne količine spoja formule (I) ili njegove farmaceutski prihvatljive soli.

Ovim izumom obuhvaćeni su također i farmaceutski preparati koji sadrže prolijekove spojava formule (I). Ovaj izum također obuhvaća postupke tretiranja ili prevenciju poremećaja kod kojih se tretman ili prevencija mogu obaviti inhibicijom ateričnih metaloproteinaza ili inhibicijom reprolizina sisavaca, koji se sastoje u davanju prolijekova spojava formule (I). Spojevi formule (I), budući da imaju slobodne amino, amido, hidroksi ili karboksilne grupe, mogu se konvertirati u prolijekove. Prolijekovi obuhvaćaju spojeve u kojima je ostatak amino kiseline, ili peptidnog lanca dva ili više (npr. dva, tri ili četiri) ostataka amino kiseline, kovalentno spojen preko peptidnih veza za slobodne grupe amino, hidroksi ili karboksilne kiseline spojeva formule (I). Ostaci amino kiselina obuhvaćaju 20 amino kiselina koje se nalaze u prirodi, koje se obično označavaju sa tri slova simbola, a obuhvaćaju također i 4-hidroksiprolin, hidroksilizin, demozin, izodemozin, 3-metilhistidin, norvalin, beta-alanin, gama-aminobuternu kiselinu, citrulin, homocistein, homoserin, omitin i metioninsulfon. Prolijekovi također obuhvaćaju i spojeve u kojima su karbonati, karbamati, amidi i alkilestri kovalentno vezani za gornje supstituentne formule (I), preko bočnog ugljik-ugljik lanca prolijeka.

Onaj tko je uobičajeno verziran u stanju tehnike podrazumijeva da su spojevi ovog izuma korisni za tretiranje mnoštva različitih bolesti. Onaj tko je uobičajeno verziran u stanju tehnike također podrazumijeva da kada se koriste spojevi ovog izuma u tretmanu specifične bolesti, da se spoj ovog izuma može kombinirati sa različitim, već postojećim terapijskim sredstvima koja se koriste za tu bolest.

Za tretman reumatoidnog artritisa, spojevi ovog izuma se mogu kombinirati sa sredstvima kao što su inhibitori TNF- α , kao što su anti-TNF monoklonska antitijela i molekule TNF receptora imunoglobulina (kao što je Enbrel[®]), niska doza methotrexate-a, lefunimide-a, hidroksiklorokina, d-penicilamina, auranofin-a, ili parenteralnog ili oralnog zlata.

Spojevi ovog izuma također se mogu koristiti u kombinaciji sa već postojećim terapijskim sredstvima za tretiranje osteoartritisa. Prikladna sredstva koja se mogu koristiti u kombinaciji su standardna nesteroidna i anti-inflamatorna sredstva (u nastavku teksta: NSAID), kao što su piroxicam, diclofenac, propionske kiseline, kao što su naproxen, flubiprofen, fenoprofen, ketoprofen i ibuprofen, pa fenamati, kao što su mefenaminska kiselina, indomethacin, sulindac, apazone, pirazoloni kao što je phenilbutazone, salicilati kao što je aspirin, COX-2 inhibitori kao što su celecoxib i rofecoxib, analgetici i intra-artikularne terapije, kao što su kortikosteroidi i hijaluronske kiseline, kao što su hyalgan i synvisc.

Spojevi ovog izuma također se mogu koristiti u kombinaciji sa sredstvima protiv karcinoma, kao što su endostatin i angiostatin, ili citotoksičnim lijekovima, kao što su adriamycin, daunomycin, cis-platina, etoposide, taxol, taxotere, i alkaloidi, kao što je vincristine i antimetaboliti kao što je methotrexate.

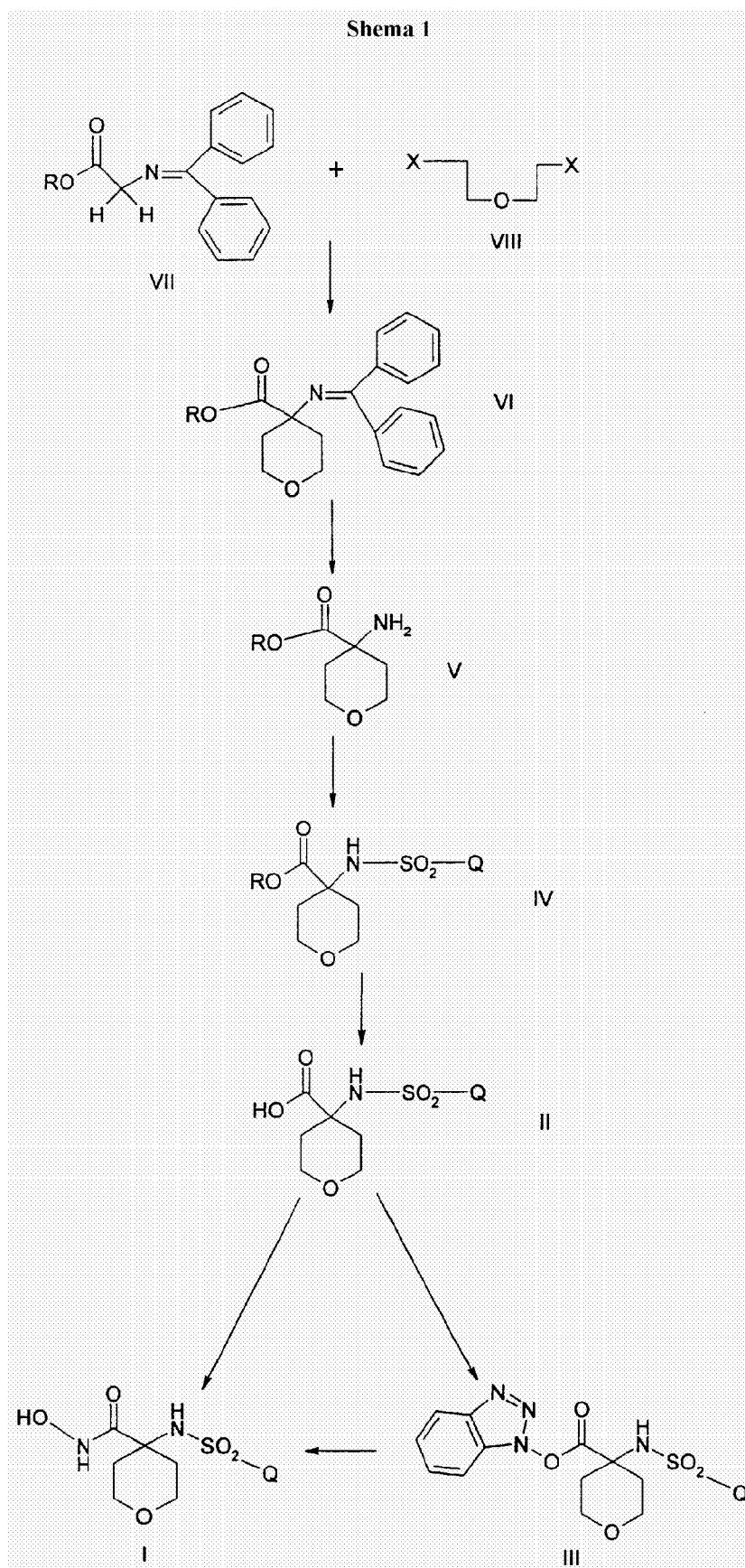
Spojevi ovog izuma također se mogu koristiti u kombinaciji sa kardiovaskularnim sredstvima, kao što su blokatori

kalcijevih kanala, sredstva za snižavanje lipida kao to su statini, fibrati, beta-blokatori, Ace inhibitori, antagonisti receptora Angiotenzin-2 i inhibitori agregacije trombocita.

- 5 Spojevi ovog izuma također se mogu koristiti u kombinaciji sa sredstvima za CNS, kao što su antidepresanti (kao što je sertraline), lijekovi protiv Parkinson-ove bolesti (kao što je deprenyl, L-dopa, requip, miratex, inhibitori MAOB kao što su selegine i rasagiline, inhibitori comP kao što je Tasmar, inhibitori A-2, inhibitori resorpcije dopamina, antagonisti NMDA, agonisti nikotina, agonisti dopamina i inhibitori sintaze neuronskog oksida dušika) i lijekovi protiv Alzheimer-ove bolesti kao što je Aricept, tacrine, inhibitori COX-2, propentofylline ili metryfonate.
- 10 Spojevi ovog izuma također se mogu koristiti u kombinaciji sa sredstvima za osteoporozu, kao što su droloxifene ili fosomax, i sredstvima za imunosupresiju kao što su FK-506 i rapamycin.

Detaljni opis izuma

- 15 Reakcijska shema koja slijedi ilustrira dobivanje spojeva ovog izuma. Ukoliko se drugačije ne naglasi, Q u reakcijskoj shemi i diskusiji koja slijedi je kao što je definirano gore.



Shema 1 se odnosi na dobivanje spojeva formule (I).

5 Pozivajući se na shemu 1, spoj formule (I) se dobiva iz karboksilne kiseline formule (II) tretmanom sa

1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimidom i 1-hidroksibenzotriazolom, u polarnom otapalu, kao što je N,N-dimetilformamid, nakon čega slijedi dodavanje hidroksilamina u reakcijsku smjesu, po isteku vremena između oko 15 minuta i oko 1 sata, poželjno oko 30 minuta. Poželjno je da se hidroksilamin generira *in situ* iz njegove soli, kao što je hidroksilamin hidroklorid, u prisustvu baze, kao što je trietilamin.

Alternativno, spoj formule (I) se može dobiti iz spoja formule (II) reakcijom sa zaštićenim terc-butil, benzil, alil ili 2-trimetilsililetil eterom. Uklanjanja zaštitne hidroksi grupe se obavlja hidrogenolizom za zaštitnu benzil grupu (5 % paladija na barij-sulfatu, kao poželjan katalizator) ili, za zaštitnu grupu terc-butil, tretmanom sa jakim kiselinom, kao što je trifluorooctena kiselina. Zaštitna alil grupa se može ukloniti tretmanom sa tributilkositar-hidridom i octenom kiselinom u prisustvu katalizatora bis(trifenilfosfin)paladij(II)klorida, a 2-trimetilsililetileter se može ukloniti reakcijom sa jakim kiselinom, kao što je trifluorooctena kiselina, ili reakcijom sa izvorom fluorida, kao što je bor-trifluorid eterat.

Reakcija II sa hidroksilaminom, solju hidroksilamina, zaštićenim derivatom hidroksilamina, ili solju zaštićenog derivata hidroksilamina, može se također obaviti u prisustvu (benzotriazol-1-iloksi)tris(dimetilamino)-fosfonij heksafluorofosfata i baze, kao što je trietilamin, u inertnom otapalu, kao što je metilenklorid. Reakcijska smjesa se miješa na temperaturi između oko 0 °C i oko 50 °C, poželjno na sobnoj temperaturi, između oko 1 sata i oko 3 dana, poželjno oko 1 dan.

Druga procedura za konvertiranje spoja formule (II) u spoj formule (I) je reagiranjem spoja formule (II) sa O-benzilhidroksilamin hidrokloridom u prisustvu (benzotriazol-1-iloksi)tris(dimetilamino)fosfonij heksafluorofosfata i trietilamina, koristeći metilenklorid kao otapalo. Naknadno uklanjanje O-benzil zaštitne grupe, dajući spoj formule (I), obavlja se zatim hidrogenolizom pod tlakom vodika od 3 bara i na sobnoj temperaturi, koristeći 5 % paladija na barij-sulfatu kao katalizator. Poželjno otapalo je metanol. Vrijeme reakcije može varirati od oko 1 sata do oko 2 dana (poželjno je 8 sati).

Poželjna procedura konvertiranja spoja formule (II) u spoj formule (I), je da 16 sati reagira spoj formule (II) sa oksalilkloridom u metilenkloridu, u prisustvu katalitičke količine DMF. Nastali klorid kiseline reagira na 0 °C sa N,O-bis(trimetilsilil)hidroksilaminom, nastalim reagiranjem hidroksilamin hidroklorida sa klorometilsilanom u piridinu, između 0 °C i sobne temperature. Produkt formule (I) dobiva se poslije nekoliko sati reagiranja na 0 °C do sobne temperature, poslije čega slijedi obrada vodenom kiselinom, kojom se ukloni cjelokupan trimetilsilil ostatak.

U nekim slučajevima, poželjno je da se spoj formule (I) dobije reakcijom hidroksilamina, soli hidroksilamina, zaštićenog derivata hidroksilamina ili soli zaštićenog derivata hidroksilamina sa aktiviranim esterom formule (III). Ova reakcija se obavlja u inertnom otapalu, kao što je N,N-dimetilformamid, na temperaturi koja se kreće od oko sobne temperature do oko 80 °C, poželjno oko 60 °C, u vremenu od oko 1 sata do oko 2 dana. Ukoliko se koristi zaštićeni derivat hidroksilamina ili sol zaštićenog derivata hidroksilamina, uklanjanje zaštitne grupe se obavlja kao što je gore opisano. Derivat aktiviranog estera formule (III) se dobiva tretmanom spoja formule (II) sa (benzotriazol-1-iloksi) tris(dimetilamino)-fosfonij heksafluorofosfatom i bazom, kao što je trietilamin, u inertnom otapalu, kao što je metilenklorid. Reakcijska smjesa se miješa na temperaturi između oko 0 °C i oko 50 °C, poželjno na sobnoj temperaturi, između oko 1 sata i 3 dana, poželjno oko 1 dan.

Intermedijerni spoj formule (II) se dobiva saponifikacijom spoja formule (IV). Reakcija se obavlja u otapalu kao što je vodeni etanol, sa viškom metalnog hidroksida, kao što je natrij-hidroksid ili litij-hidroksid, na temperaturi od oko 20 °C do oko 100 °C (tj. između sobne temperature i temperature refluksa otapala), poželjno na oko 80 °C. Reakcijska smjesa se normalno miješa na sobnoj temperaturi između 30 minuta i oko 1 tjedna, poželjno oko 16 sati.

Spoj formule (IV) se dobiva reagiranjem spoja formule (V) sa reaktivnim funkcionalnim derivatom sulfonske kiseline (QSO₂OH), kao što je sulfonilklorid (QSO₂Cl), u prisustvu baze. Prikladne baze su natrij-hidroksid, trietilamin ili diizopropiletilamin, poželjno trietilamin. Prikladna otapala su dimetilformamid (DMF), metilenklorid, tetrahidrofuran, dioksan, voda, acetonitril, poželjno DMF. Reakcijska smjesa se miješa na temperaturi između oko 0 °C i oko 50 °C, poželjno od oko 20° do oko 25 °C (tj. sobna temperatura), između oko 10 minuta i oko 2 dana, poželjno oko 1 dan.

Spoj formule (V) se dobiva hidrolizom spoja formule (IV). Specifično, spoj formule (VI) se tretira vodenom kiselinom, poželjno u prisustvu nemiješljivog organskog otapala, kao što su etileter, diizopropileter ili metilenklorid. Prikladne kiseline su klorovodična i sumporna. Reakcijska smjesa se miješa na temperaturi između oko 0 °C i oko 50 °C, poželjno na oko 20 °C do oko 25 °C (tj. na sobnoj temperaturi), između oko 10 minuta i oko 2 dana, poželjno oko 1 dan.

Spoj formule (VI) se dobiva reakcijom derivata amino kiseline formule (VII) sa spojem formule (VIII), u prisustvu baze i otapala, pri čemu X je Cl, Br, I, tozilat ili mezilat. Prikladne baze su etilen glikol, natrij hidrid, litij-diizopropilamid ili natrij-heksametilidisilazid. Prikladna otapala su dimetileter, dimetilformamid, tetrahidrofuran ili dimetilsulfoksid. Reakcijska smjesa se miješa na temperaturi između oko -20 °C i oko 25 °C, poželjno od oko 0 °C do 20 °C (tj. sobna temperatura), između oko 10 minuta i oko 2 dana, poželjno oko 1 dan.

Spojevi formule (VII) i (VIII) se mogu dobiti postupcima koji su dobro poznati onima koji su verzirani u stanje tehnike. Primjeri takvih spojeva su metilglicin benzofenonimin i etilglicinbenzofenonimin.

- 5 Farmaceutski prihvatljive soli kiselih spojeva ovog izuma su soli nastale sa bazama, zapravo kationima soli, kao što su soli alkalnih i zemnoalkalnih metala, kao što su natrij, litij, kalij, kalcij, magnezij, a isto tako amonijeve soli, kao što su amonijeve, trimetilamonijeve, dietilamonijeve i tris(hidroksimetil)-metilamonijeve soli.

- 10 Slično, kisele adicijske soli, mineralnih kiselina, organskih karboksilnih kiselina i organskih sulfonskih kiselina, npr. klorovodične kiseline, metansulfonske kiseline, maleinske kiseline, također su moguće, pod uvjetom da je bazna grupa kao što je piridil, konstitutivni dio strukture.

- 15 Sposobnost spojeva formule (I) ili njihovih farmaceutski prihvatljivih soli (u nastavku teksta: spojevi ovog izuma) da inhibiraju metaloproteinaze ili reprotizin sisavaca, pa slijedom toga demonstriraju njihovu efikasnost u tretiranju bolesti koje karakterizira metaloproteinaza ili proizvodnja faktora nekroze tumora, pokazana je *in vitro* testovima koji slijede.

Biološko ispitivanje

Inhibicija humane kolagenaze (MMP-1)

- 20 Humana rekombinantna kolagenaza se aktivira sa tripsinom. Optimizira se količina tripsina za svaku partiju kolagenaze-1, ali tipična reakcija koristi slijedeći odnos: 5 µg tripsina na 100 µg kolagenaze. Tripsin i kolagenaza se inkubiraju 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim se doda peterostruki višak (50 mg/10 mg tripsina) inhibitora tripsina iz soje.

- 25 Pripreme se matične otopine (10 mM) inhibitora u dimetilsulfoksidu, pa se zatim razblaže koristeći slijedeću shemu:

$$10 \text{ mM} \rightarrow 120 \text{ } \mu\text{M} \rightarrow 12 \text{ } \mu\text{M} \rightarrow 1,2 \text{ } \mu\text{M} \rightarrow 0,12 \text{ } \mu\text{M}$$

- 30 Zatim se u triplikatu doda 25 µl svake koncentracije u odgovarajuće udubljenje mikroflore ploče sa 96 udubljenja. Konačnu koncentraciju inhibitora određuje razblaženje 1:4 poslije dodavanja enzima i supstrata. U udubljenja D7-D12 se stave pozitivni kontrolni uzorci (enzim, bez inhibitora), a u udubljenja D1-D6 negativni kontrolni uzorci (bez enzima, bez inhibitora).

- 35 Kolagenaza-1 se razblaži na 240 ng/ml, pa se onda po 25 µl doda u odgovarajuća udubljenja mikroflore ploče. Konačna koncentracija kolagenaze u testu je 60 ng/ml.

- 40 Substrat (DNP-Pro-Cha-Gly-Cis(Me)-His-Ala-Lys(NMA)-NH₂) se napravi kao 5 mM matična otopina u dimetilsulfoksidu, pa se zatim razblaži na 20 µM u puferu za ispitivanje. Ispitivanje počinje dodavanjem 50 ml substrata po udubljenju mikroflore ploče, dajući konačnu koncentraciju od 10 mM.

Fluorescencija se očitava (360 nm ekscitacija, 460 nm emisija) u vremenu 0, pa zatim u intervalima od 20 minuta. Ispitivanje se obavlja na sobnoj temperaturi, u tipičnom trajanju od 3 sata.

- 45 Zatim se predstavi ovisnost fluorescencija-vrijeme i za slijepu probu i za kolagenazu koja sadrži uzorke (prosječni podatak iz određivanja u triplikatu). Za određivanje vrijednosti IC₅₀ bira se točka na skali vremena koja daje dobar signal (najmanje peterostruko iznad slijepe probe) i na linearnom dijelu krivulje (obično oko 20 minuta). Za svaki spoj, pri svakoj koncentraciji, nulto vrijeme se koristi kao slijepa proba, pa se ove vrijednosti oduzmu od podataka u 120. minuti. Podaci se predstave kao ovisnost koncentracije inhibitora prema % kontrolnog uzorka (fluorescencija inhibitora podijeljena sa fluorescencijom same kolagenaze × 100). Vrijednosti IC₅₀ se određuju iz koncentracije inhibitora koja daje signal koji iznosi 50 % od kontrolnog.

Dobivene IC₅₀ su manje od 3 mM, pa su inhibitori testirani pri koncentracijama 0,3 mM, 0,03 mM i 0,003 mM.

- 55 Inhibicija želatinaze (MMP-2)

Humana rekombinantna želatinaza od 72kD (MMP-2, želatinaza A) aktivira se 16-18 sati sa 1 mM p-aminofenil-merkuri-acetatom (iz sveže pripremljene 100 mM matične otopine u 0,02 M NaOH), na 4 °C, uz blago mućkanje.

- 60 Matične otopine inhibitora, 10 mM u dimetilsulfoksidu, serijski se razblažuju u puferu za ispitivanje (50 mM Tris, pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 20 µM ZnCl₂ i 0,02 vol./vol. % BRIJ-35), u skladu sa slijedećom shemom:

10 mM → 120 μM → 12 μM → 1,2 μM → 0,12 μM

Ukoliko je potrebno, daljnje razblaživanje slijedi ovu istu shemu. U svakom testu uzete su najmanje četiri koncentracije inhibitora za svaki spoj. Doda se 25 μl svake od koncentracija u tri udubljenja crne mikrofluorne ploče sa 96 udubljenja U-profila. Pošto je konačni volumen u testu 100 μl, konačne koncentracije inhibitora su rezultat daljeg razblaživanja u odnosu 1:4 (tj. 30 μM → 3 μM → 0,3 μM → 0,03 μM, itd.). Slijepa proba (bez enzima, bez inhibitora) i pozitivni kontrolni uzorak (sa enzimom, bez inhibitora) se također pripreme u triplicatu.

Aktivirani enzim se razblaži do 100 ng/ml u puferu za ispitivanje. Doda se 25 μl u svako odgovarajuće udubljenje u mikroploči. Konačna koncentracija enzima u testu je 25 ng/ml (0,34 nM).

Matična otopina supstrata 5 mM (Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂) u dimetilsulfoksidu razblaži se u puferu za ispitivanje do 20 μM. Ispitivanje počinje dodavanjem 50 μl razblaženog supstrata, dajući konačnu koncentraciju supstrata u testu od 10 μM. Fluorescencija (320 ekscitacija, 390 emisija) u vremenu nula odmah se očitava, a naknadna čitanja se obavljaju nakon svakih 25 minuta, na sobnoj temperaturi, na instrumentu PerSeptive Biosystems CytoFluor Multi-Well Plate Reader, sa pojačanjem od 90 jedinica.

Prosječne vrijednosti fluorescencije za enzim i slijepu probu predstave se kao ovisnosti u vremenu. Za određivanja IC₅₀ uzimaju se točke u početnim vremenima, sa linearnog dijela krivulje. Točka u nultom vremenu za svaki spoj i svako razblaženje, oduzima se od točke u kasnijem vremenu, pa se zatim podaci iskažu kao postotak enzima za kontrolni uzorak (fluorescencija inhibitora podijeljena sa fluorescencijom pozitivnog kontrolnog uzorka za enzim × 100). Podaci se predstave kao koncentracija inhibitora prema postotku kontrolnog uzorka enzima. Vrijednosti IC₅₀ se definiraju koncentracijom inhibitora koja daje signal koji je 50 % od pozitivnog kontrolnog uzorka za enzim.

Inhibicija aktivnosti stromelizina (MMP-3)

Humani rekombinantni stromelizin (MMP-3, stromelizin-1) aktivira se 20-22 sata sa 2 mM p-aminofenil-merkuri-acetatom (iz sveže pripremljene matične otopine 100 mM u 0,2 M NaOH), na 37 °C.

Matične otopine inhibitora, 10 mM u dimetilsulfoksidu, serijski se razblažuju u puferu za ispitivanje (50 mM Tris, pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 20 μM ZnCl₂ i 0,02 vol./vol. % BRIJ-35), u skladu sa slijedećom shemom:

10 mM → 120 μM → 12 μM → 1,2 μM → 0,12 μM

Ukoliko je potrebno, daljnje razblaživanje slijedi ovu istu shemu. U svakom testu upotrijebljene su najmanje četiri koncentracije inhibitora za svaki spoj. Zatim se 25 μl svake koncentracije doda u tri udubljenja crne mikroploče sa 96 udubljenja U-profila. Pošto je ukupni ispitivani volumen 100 μl, konačne koncentracije inhibitora su rezultat daljeg razblaživanja u odnosu 1:4 (tj. 30 μM → 3 μM → 0,3 μM → 0,03 μM, itd.). Slijepa proba (bez enzima, bez inhibitora) i pozitivni kontrolni uzorak enzima (sa enzimom, bez inhibitora) pripremaju se također u triplicatu.

Aktivirani enzim se razblaži do 200 ng/ml u ispitivanom puferu. Doda se 25 μl po udubljenju u svako odgovarajuće udubljenje mikroploče. Konačna koncentracija enzima u testu je 50 ng/ml (0,875 nM).

Matična otopina supstrata, 10 mM (Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH₂) u dimetilsulfoksidu, razblaži se u puferu za ispitivanje do 6 μM. Ispitivanje počinje dodavanjem 50 μl razblaženog supstrata što daje konačnu koncentraciju u testu od 3 μM supstrata. Odmah se očitava fluorescencija (320 ekscitacija, 390 emisija), a naknadna čitanja se uzimaju nakon svakih 15 minuta, na sobnoj temperaturi, na instrumentu PerSeptive Biosystems CytoFluor Multi-Well Plate Reader sa pojačanjem od 90 jedinica.

Prosječna vrijednost fluorescencije enzima i slijepe probe se prikazuju kao ovisnosti u vremenu. Za određivanja IC₅₀ biraju se točke u početnim vremenima, na linearnom dijelu ove krivulje. Točka u nultom vremenu za svaki spoj i za svako razblaženje se oduzme od točke u posljednjem vremenu, pa se podaci zatim iskažu kao postotak kontrolnog uzorka enzima (fluorescencija inhibitora podijeljena sa fluorescencijom pozitivnog kontrolnog uzorka enzima × 100). Podaci se daju kao koncentracija inhibitora prema postotku enzima u kontrolnom uzorku. IC₅₀ se definira koncentracijom inhibitora koja daje signal koji je 50 % od pozitivnog kontrolnog uzorka enzima.

Inhibicija MMP-13

Humani rekombinantni MMP-13 se aktivira sa 2mM APMA (p-aminofenil merkuri-acetatom) 2 sata na 37 °C, pa se

razblaži do 240 nG/ml u puferu za ispitivanje (50 mM Tris, pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 20 mM ZnCl₂ i 0,02 vol./vol. % BRIJ-35), Doda se 25 µl razblaženog enzima po udubljenju mikrofluorne ploče sa 96 udubljenja. U testu se enzim razblaži u odnosu 1:4 dodavanjem inhibitora i supstrata, dajući konačnu koncentraciju u testu od 60 ng/ml.

- 5 Matična otopina inhibitora (10 mM) se pripremi u dimetilsulfoksidu, pa se zatim razblaži u puferu za ispitivanje, po shemi razblaženja inhibitora za inhibiciju humane kolagenaze-1 (MMP-1). Doda se 25 µl svake koncentracije u triplikatu na mikrofluornu ploču. Konačne koncentracije u testu su 30 mM, 3 mM, 0,3 mM i 0,03 mM.

- 10 Supstrat (Dnp-Pro-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(NMA)-NH₂) se pripremi kao za inhibiciju humane kolagenaze (MMP-1), pa se 50 µl doda u svako udubljenje, dajući konačnu koncentraciju u testu od 10 µM. Čitanja fluorescencije (360 nm ekscitacija, 450 nm emisija) uzimaju se u vremenu 0, pa poslije svakih 5 minuta, u toku 1 sata.

Pozitivni kontrolni i negativni kontrolni uzorci se uzmu u triplikatu, kao što je opisano u MMP-1 testu.

- 15 IC₅₀ se određuju kao i za inhibiciju humane kolagenaze (MMP-1). Ukoliko se pokaže da su vrijednosti za IC₅₀ manje od 0,03 mM, inhibitori se tada testiraju sa konačnim koncentracijama 0,3 mM, 0,03 mM, 0,003 mM i 0,0003 mM.

Inhibicija stvaranja TNF

- 20 Sposobnost ovih spojeva ili njihovih farmaceutski prihvatljivih soli da inhibiraju stvaranje TNF, čime će se demonstrirati njihova efikasnost za tretiranje bolesti kod kojih dolazi do stvaranja TNF, pokazana je slijedećim *in vitro* testom.

- 25 Humane mononuklearne stanice se izoliraju iz anti-koagulirane humane krvi, koristeći tehniku separacije u jednom koraku Ficoll-hypaque. (2) Mononuklearne stanice se tri puta operu u uravnoteženoj slanoj otopini po Hanks-u (HBSS) sa dvovalentnim kationima, pa se resuspendiraju do sadržaja od 2×10^6 /ml u HBSS, koji sadrži 1 % BSA. Odrede se razlike u brojanjima koristeći instrument Abbott Cell Dyn 3500 analyzer, koje su pokazale sa su se monociti kretali od 17 do 24 % od ukupnog broja stanica u ovim preparatima.

- 30 Alikvoti od 180 µl suspenzije stanica se dodaju u udubljenja sa ravnim dnom ploče sa 96 udubljenja (Costar). Dodaci spojeva i LPS (100 ng/ml konačna koncentracija) daju krajnji volumen od 200 µl. Sve se obavi u triplikatu. Poslije 1 sata inkubacije na 37 °C u vlažnom inkubatoru sa CO₂, ploče se izvade, pa se centrifugiraju (10 minuta pri približno 250 × g), odvoji se gornji bistar sloj, pa se ispita na TNF-α koristeći komplet R&D ELISA.

- 35 Inhibicija stvaranja rastvornog TNF-α

Sposobnost ovih spojeva ili njihovih farmaceutski prihvatljivih soli da inhibiraju oslobađanje TNF-α u stanicama i tako demonstriraju njihovu efikasnost za tretiranje bolesti kod kojih dolazi do deregulacije rastvornog TNF-α, pokazana je u slijedećem *in vitro* testu.

40

Postupak vrednovanja aktivnosti rekombinantnog konvertirajućeg enzima TNF-α

Ekspresija rekombinantnog TACE

- 45 Fragment DNA kodiran za signal sekvencije, preprodomenu, prodomenu i katalitičku domenu TACE (amino kiseline 1-473), može se pojačati lančanom reakcijom polimeraze, korištenjem biblioteke cDNA iz humanih pluća kao šablona. Pojačani fragment se zatim klonira na vector pFastBac. Potvrdi se sekvencija DNA u insertu, za oba konca. Pripremi se bacmid, koristeći pFastBac u E.coli DH10Bac, pa se transficira u stanice insekta Sf9. Čestice virusa se zatim pojačavaju do stadija P1, P2 i P3. Virusom P3 se inficiraju i Sf9 i High Five stanice insekta, pa se ostave da rastu 48 sati na 27 °C.
- 50 Sakupi se medij i koristi za testiranje i dalje pročišćavanje.

Dobivanje supstrata prekinutog fluorescencijom

- 55 Model peptidnog TNF-α supstrata (LZ-LeucinAlaninGlutaminAlaninValinArginin-Serin-Serin-Lizin(CTMR)-arginin (LY=Lucifer žuto; CTMR=karboksitetrametil-Rodamin) dobiven je u koncentraciji koja je ocijenjena na osnovu apsorpcije na 560 nm (E₅₆₉ 60,000 M⁻¹CM⁻¹) u skladu sa metodom koju je dao K.F. Geoghegan: "Poboljšana metoda konvertiranja nemodificiranog peptida u supstrat za prijenos energije za proteinazu", Bioconjugate Chem. 7, 385-391, (1995.). Ovaj peptid zahvaća mjesto odvajanja na pro-TNF, koje se odvaja *in vivo* pomoću TACE.

- 60 Ekspresija rekombinantnog TACE

Fragment DNA kodiran za signal sekvencije, preprodome, prodome i katalitičke domene TACE (amino kiseline 1-473), može se pojačati lančanom reakcijom polimeraze, korištenjem biblioteke cDNA iz humanih pluća kao šablona. Pojačani fragment se zatim klonira na vector pFastBac. Potvrdi se sekvencija DNA u insertu, za obje kraja. Pripremi se bacmid, koristeći pFastBac u E.coli DH10Bac, pa se transficira u stanice insekta Sf9. Čestice virusa se zatim pojačavaju do stadija P1, P2 i P3. Virusom P3 se inficiraju Sf9 i High Five stanice insekta, pa se ostave da rastu 48 sati na 27 °C. Sakupi se medij i koristi za testiranje i daljnje pročišćavanje.

Enzimska reakcija

Reakcija, koja se obavlja u ploči sa 96 udubljenja (Dynatech), sastoji se od 70 µl otopine pufera (26 mM HEPES-HCl, pH 7,5, plus 20 µM ZnCl₂), 10 µl 100 µM supstrata prekinutog fluorescencijom, 10 µl DMSO (5 %) otopine test spoja i količine r-TACE enzima koji će prouzrokovati 50 % odvajanja za 60 minuta, u ukupnom volumenu od 100 µl. Specifičnost enzimskog odvajanja na amidnoj vezi između alanina i valina, provjerava se sa HPLC i masenom spektrometrijom. Početne brzine odvajanja se prate mjerenjem brzine porasta fluorescencije na 530 nm (ekscitacija na 409 nm) tokom 30 minuta. Eksperiment se kontrolira kao što slijedi: 1) na osnovnu fluorescenciju supstrata; 2) na fluorescenciju potpuno odvojenog supstrata; 3) na prekidanje ili porast fluorescencije iz otopine koji sadrži spoj koji se testira.

Podaci se analiziraju kao što slijedi. Utvrde se prosječne brzine za spoj koji se ne testira, koje predstavljaju "kontrolne" reakcije, sa vrijednošću 100 %. Usporedi se brzina reakcije u prisustvu testiranog spoja i u odsustvu spoja, i prikaže u tablici kao postotak netestiranog spoja koga sadrži kontrolni uzorak. Rezultati se predstavljaju kao "% kontrolnog uzorka" prema logaritmu koncentracije, pa se odredi polovina maksimalne točke ili vrijednost IC₅₀.

Svi spojevi ovog izuma imaju IC₅₀ manje od 1 µM, poželjno manje od 50 nM. Najpoželjniji spojevi ovog izuma su najmanje 100-struko manje potentni prema r-MMP-1, nego prema gornjem TACE testu.

Test humanih monocita

Izoliraju se humane mononuklearne stanice iz anti-koagulirane humane krvi koristeći tehniku separacije u jednom koraku Ficoll-hypaque (2). Mononuklearne stanice se tri puta isperu uravnoteženom slanom otopinom po Hanks-u (HBBS) sa divalentnim kationima, pa se resuspendiraju do sadržaja 2×10^6 /ml u HBBS koji sadrži 1 % BSA. Odrede se razlike u brojanjima koristeći instrument Abbott Cell Dyn 3500 analyzer, koje su pokazale da se sadržaj monocita kretao od 17 do 24 % od ukupnog broja stanica u ovim preparatima.

Alikvoti od 180 µl suspenzije stanica se dodaju u udubljenja sa ravnim dnom ploče sa 96 udubljenja (Costar). Dodaci spojeva i LPS (100 ng/ml konačna koncentracija) daju krajnji volumen od 200 µl. Sve se obavi u triplicatu. Poslije 1 sata inkubacije na 37 °C u vlažnom inkubatoru sa CO₂, ploče se izvađaju, pa se centrifugiraju (10 minuta, pri približno 250×g), pa se gornji bistar sloj odvoji i ispita na TNF-α koristeći komplet R&D ELISA.

Test agrekanaze

Primarni svinjski hondrociti dobiveni iz hrskavice zgloba, izolirani su uzastopnom digestijom sa tripsinom i kolagenazom, koje slijedi digestija kolagenaze preko noći, pa se prenesu su na ploču sa 2×10^5 stanica po udubljenju, u 48 udubljenja ploče, sa 5 µCi/ml ³⁵S (1.000 Ci/mmol) sumpora u pločama prevučenicima sa kolagenom tipa I. Stanice se ostave da se ugradi marker u njihove proteoglikanske matrice (približno 1 tjedan) na 37 °C, u atmosferi 5 % CO₂.

Noć prije početka testa, monoslojevi hondrocita se operu dva puta sa DMEM/1 % PSF/G, a zatim ostave da se preko noći inkubiraju u svežem DMEM/1 %PSF/G.

Slijedećeg jutra hondrociti se operu jedanput sa DMEM/1 %FBS. Konačno ispiranje se ostavi na pločama u inkubatoru, dok se obave razblaživanja.

Medij i razblaživanja se prave kao što je opisano u slijedećoj tablici.

Kontrolni medij	sam DMEM (kontrolni medij)
IL-1- medij	DMEM + IL-1 (5 ng/ml)

Razblaženja lijeka	Pripreme se matične otopine 10 mM u DMSO. Pripremi se 100 μM matična otopina svakog spoja u DMEM na ploči sa 96 udubljenja. Čuva se u hladnjaku preko noći. Idućeg dana obavi se serija razblaživanja u DMEM sa IL-1 do 5 μM, 500 nM i 50 nM. Posljednje ispiranje se usisa iz udubljenja i doda 50 μl spoja gornjih razblaženja do 450 μl medija IL-1 u odgovarajućem udubljenju ploče sa 48 udubljenja. Konačne koncentracije spoja su 500 nM, 50 nM i 5 nM. Svi uzorci su kompletirani u triplicatu sa kontrolnim i samo IL-1 uzorcima na svakoj ploči.
--------------------	---

Ploče su obilježene, a koristi se sadržaj iz samo 24 udubljenja po upotrijebljenoj ploči. Na jednoj od ploča, nekoliko kolona je označeno sa: IL-1 (bez lijeka) i kontrola (bez IL-1, bez lijeka). Ove kontrolne kolone su povremeno brojane na monitoru na oslobađanje 35S-proteoglikana. U udubljenja se dodaju kontrolni i IL-1 mediji (450 μ l), a zatim spoj (50 μ l), kako bi se inicirao test. Ploče su inkubirane na 37 °C, u atmosferi 5 % CO₂.

Pri 40-50 % oslobađanju (kada je broj impulsa u minuti u IL-1-mediju 4-5 puta veći nego u kontrolnom mediju), što se utvrdi pomoću tekućeg scintilacijskog brojanja (LCS) uzoraka u mediju, završi se test (9-12 sati). Iz svih udubljenja uklone se mediji, pa stave u scintilacijske cijevi. Doda se scintilat, pa se obavi radioaktivno brojanje (LSC). Da bi se rastvorili slojevi stanica, u svako udubljenje se doda 500 μ l pufera za digestiju sa papainom (0,2 M Tris, pH 7,0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, i 1 mg/ml papaina). Ploče sa otopinom za digestiju se preko noći inkubiraju na 60 °C. Idućeg dana, sloj stanica koji je odvojen sa ploča stavi se u scintilacijske cijevi. Zatim se doda scintilat i broje uzorci (LSC).

Odredi se broj impulsa za oslobođeni postotak od ukupnog postotka u svakom udubljenju. Od srednje vrijednosti triplicata oduzme se osnovni broj impulsa za kontrolni uzorak, za svako udubljenje. Postotak inhibicije spoja je zasnovan na uzorcima IL-1 kao 0 % inhibicije (100 % ukupnih impulsa).

Za davanje sisavcima, uključujući i humana bića, za inhibiciju matričnih metaloproteinaza ili stvaranje faktora nekroze tumora (TMF), može se koristiti niz konvencionalnih načina, uključujući oralni, parenteralni i površinski. Obično, aktivni spoj se daje oralno ili parenteralno, sa dozama između oko 0,1 do 25 mg/kg tjelesne težine subjekta koji se tretira, na dan, poželjno od oko 0,3 do 5 mg/kg. Međutim, izvjesne varijacije u doziranju neophodno se mogu dogoditi zbog stanja subjekta koji se tretira. Osoba koja je odgovorna za doziranje u svakom će slučaju odrediti odgovarajuću dozu za svakog pojedinog subjekta.

Spojevi ovog izuma se mogu davati u vrlo različitim oblicima doziranja, a obično su terapijski efikasni spojevi ovog izuma prisutni u takvom obliku za doziranje koji omogućava nivo koncentracija koji se kreće od oko 5 mas. % do oko 70 mas. %.

Za oralno davanje, tablete koje sadrže različite dodatke, kao što su mikrokristalna celuloza, natrij-citrat, kalcij-karbonat, dikalcij-fosfat i glicin, mogu se koristiti zajedno sa različitim dezintegrantima kao što su škrob (poželjno škrob iz kukuruza, krumpira ili tapioke), alginska kiselina i neki kompleksni silikati, zajedno sa vezivima za granulaciju, kao što je polivinilpirolidon, saharoza, želatina i akacija. Pored toga, za potrebe tabletiranja vrlo su korisna sredstva za podmazivanje, kao što su natrij-stearat, natrij-laurilsulfat i talk. Čvrsti preparati slične vrste mogu se koristiti također kao punioci u želatinskim kapsulama, a prikladni materijali u vezi sa tim su također laktoza ili mliječni šećer, kao i polietilen glikoli visoke molarne mase. Ukoliko se za oralno davanje žele vodene suspenzije i/ili eliksiri, aktivni sastojak se može kombinirati sa različitim sredstvima za zaslađivanje ili aromatiziranje, supstancama za bojenje ili bojama, i ukoliko se želi, sredstvima za emulgiranje i/ili suspendiranje, zajedno sa razblaživačima, kao što su voda, etanol, propilenglikol, glicerol i razne slične njihove kombinacije. U slučaju životinja, pogodno je da se sadrže u životinjskoj hrani ili vodi za piće, u koncentraciji 5 - 5.000 ppm, poželjno 25 do 500 ppm.

Za parenteralno davanje (intramuskularnu, intraperitonealnu, potkožnu i intravenoznu upotrebu) obično se priprema sterilna otopina aktivnog sastojka za injekcije. Mogu se koristiti otopine terapijskog spoja iz ovog izuma bilo u sezamovom ili kikirikijevom ulju ili u vodenom propilenglikolu. Vodene otopine trebaju biti prikladno podešene i puferirane, poželjno na pH iznad 8, ukoliko je potrebno, a tekući razblaživač treba biti izotoničan. Ove vodene otopine su prikladne za intravenozne injekcije. Uodne otopine su prikladne za intraartikularne, intramuskularne i potkožne injekcije. Dobivanje svih ovih otopina, pod sterilnim uvjetima, lako se ostvaruje standardnim farmaceutskim tehnikama, koje su dobro poznate verziranim u stanje tehnike. U slučaju životinja, spojevi se mogu davati intramuskularno ili potkožno sa nivoom doziranja oko 0,1 do 50 mg/kg, prikladno 0,2 do 10 mg/kg, u obliku pojedinačne doze ili podijeljeno u do tri doze.

Za površinsko očno davanje, direktnom primjenom na povrijeđeno oko, mogu se koristiti u obliku formulacija kapi za

oči, aerosola, gela ili masti, ili se može ugraditi u kolagen (kao što je poli-2-hidroksietilmetakrilat i njegovi kopolimeri) ili u omot hidrofilnog polimera. Ovi materijali se mogu također upotrijebiti kao kontaktne leće ili preko lokalnog depoa, ili kao subkonjunktivne formulacije.

5 Za intraorbitalno davanje obično se priprema sterilna otopina aktivnog sastojka za injektiranje. Mogu se koristiti otopine terapijskih spojeva iz ovog izuma u vodenoj otopini ili suspenziji (veličina čestica manja od 10 μm). Vodene otopine trebaju biti prikladno podešene i puferirane, poželjno na pH između 5 i 8, ukoliko je neophodno, a tekuće otapalo mora prethodno biti izotonično. Mogu se dodavati male količine polimera da povećaju viskoznost ili za

10 prikladne za intraorbitalne injekcije. Dobivanje ovih otopina pod sterilnim uvjetima lako se obavlja standardnim farmaceutskim tehnikama, što je dobro poznato verziranim u stanje tehnike. U slučaju životinja, spojevi se mogu davati intraorbitalno sa nivoom doziranja od oko 0,1 do 50 mg/kg/dan, prikladno 0,2 do 10 mg/kg/dan, davanjem u jednoj dozi ili podijeljeno na do tri doze.

15 Aktivni spojevi iz ovog izuma također se mogu formulirati u rektalne preparate, kao što su supozitorije ili retencijski klistiri, npr. tako što sadrže konvencionalne osnove za supozitorije, kao što su kakaov putar ili drugi gliceridi.

Za intranazalno davanje ili davanje inhalacijom, prikladno je da se aktivni spojevi iz ovog izuma daju u obliku otopine ili suspenzije iz bočice sa sprejom i pumpicom koju pacijent pritiskuje ili pumpa, ili kao aerosol sprej iz bočice pod

20 tlakom, ili raspršivača, uz upotrebu prikladnog propelanta, npr. diklorodifluorometana, triklorofluorometana, diklorotetrafluoroetana, ugljičnog dioksida ili drugog prikladnog plina. U slučaju aerosola pod tlakom, jedinična doza se može odrediti pomoću ventila koji oslobađa odmjerenu količinu. Bočica pod tlakom ili nebulizator, može sadržavati otopinu ili suspenziju aktivnog spoja. Kapsule i patrone (napravljene, na primjer od želatine) za upotrebu u inhalatorima ili insuflatorima, mogu se formulirati tako da sadrže mješavinu praha spoja ovog izuma i prikladne praškaste baze, kao

25 što je laktoza ili škrob.

Ovaj izum je ilustriran sa Preparatima i Primjerima koji slijede, ali nije ograničen njihovim detaljima.

Primjer 1

30

4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensulfonilamino]-tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline hidroksiamid

(A) 4-[N-(difenilmetilen)amino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline etil ester

35 Suspenziji natrij hidrida (6,56 g, 0,164 mol) u etilen glikol dimetil eteru (150 ml) na 0 °C dodaje se u kapima, kroz lijevak za kapanje, N-(difenilmetilen)glicin etil ester (20,60 g, 73,98 mmol) u etilen glikol dimetil eteru (50 ml). Zatim se u obrocima od 10 ml tokom približno 5 minuta dodaje etilen glikol dimetil eterska otopina 2-bromoetiletera (23,21 g, 90 mmol) u etilen glikol dimetil eteru (50 ml). Ukloni se ledena kupka, pa se reakcija 16 sati miješa na sobnoj temperaturi. Smjesa se razblaži dietil eterom i razblaži vodom. Vodeni sloj se ekstrahira dietil eterom. Sjedinjeni

40 organski ekstrakti se operu zasićenom otopinom NaCl, osuše iznad magnezij sulfata i koncentriraju, dajući mutno žuto ulje (28,692 g). Kromatografija na silikagelu, uz eluiranje prvo sa 4 l 5 % etil acetat/heksanom, a zatim sa 4 l 10 % etilecat/heksanom, daje 4-[N-(difenilmetilen)amino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline etil ester, u obliku bistrog žutog ulja (16,114 g, 64 %).

45 ^1H NMR (CDCl_3) δ 7,58 (d, 2H); 7,36 (m, 4H); 7,28 (t, 2H); 7,08 (m, 2H); 3,99 (m, 2H); 3,70 (m, 2H); 3,66 (q, 2H); 2,10 (m, 2H); 1,99 (m, 2H); 1,08 (t, 3H).
MS atmosferski tlak, kemijska ionizacija, maseni spektar 338 ($\text{M}^+ + 1$).

(B) 4-aminotetrahidropiran-4-karboksilne kiseline etil ester

50

Otopini 4-[N-(difenilmetilen)amino]tetrahidropropan-4-karboksilne kiseline etil estera (16,0 g, 0,047 mol) u dietiletru (120 ml), doda se 1M vodena otopina HCl (100 ml). Smjesa se 16 sati snažno miješa na sobnoj temperaturi. Razdvoje se slojevi, a vodeni sloj se opere dietil eterom. Vodeni sloj se opere do pH 10 sa razblaženom vodenom otopinom amonij hidroksida i ekstrahira diklorometanom. Organski ekstrakt se osuši iznad natrij sulfata, pa se koncentrira, dajući

55 4-aminotetrahidropropan-4-karboksilne kiseline etil ester (7,128 g, 71,7 %), u obliku ulja.

^1H NMR (CDCl_3) δ 4,15 (q, 2H); 3,62 (m, 2H); 2,07 (m, 2H); 1,60 (s, 2H); 1,44 (m, 2H); 1,24 (t, 3H).
 ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 176,48, 63,70, 61,09, 54,78 35,05, 14,15.
MS atmosferski tlak kemijska ionizacija maseni spektar: 210 ($\text{M}^+ + 1$).

60

(C) 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline etil ester

Otopini 4-aminotetrahidropiran-4-karboksilne kiseline etil estera (7,00 g, 0,0404 mol) u N,N-dimetilformamidu (40 ml), doda se trietilamin (5,94 g, 0,043 mol). U obrocima se dodaje čvrst 4-(4-fluorofenoksi)benzensulfonil klorid (12,165 g, 0,0424 mol). Dobivena smjesa se 16 sati miješa na sobnoj temperaturi, pa se onda većina otapala ukloni isparavanjem pod vakuumom. Ostatak se raspodijeli između zasićene otopine natrij bikarbonata i diklorometana. Vodeni sloj se ekstrahira diklorometanom. Sjedinjeni organski slojevi se operu zasićenom otopinom NaCl i osuše iznad natrij sulfata. Isparavanje otapala pod vakuumom daje sirovi 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline etil ester kao ulje boje jantara (21,05 g). Fleš kromatografija na silikagelu, uz eluiranje sa 25 % etil acetat/heksanom, a zatim 50 % etil acetat/heksanom, daje 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline etil ester kao bjeličastu kristalnu supstancu (12,15 g, 71, T. toplj. 116-117 °C).

¹H NMR (CDCl₃) δ 7,79 (d, 2H); 7,09 (t, 3H); 7,02 (m, 2H); 6,97 (d, 2H); 5,10 (s, 1H); 4,01 (q, 2H); 3,60 (m, 4H); 2,08 (m, 2H); 1,84 (bd, 2H); 1,23 (t, 3H).

MS atmosferski tlak kemijska ionizacija maseni spektar: 424 (M⁺+1).

(D) 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina

Postupak A Otopina 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline etil estera (12,1 g, 0,0286 mol) u tetrahidrofuranu (190 ml) tretira se sa 3M vodenom otopinom NaOH (95 ml, 0,286 mol) i 4 dana miješa na sobnoj temperaturi. Otapalo se ispari pod vakuumom, a ostatak raspodijeli između vode i dietil etera. Vodeni sloj se opere dietil eterom, zakiseli do pH = 1 sa 3M vodenom otopinom HCl i ekstrahira diklorometanom. Poslije ispiranja vodom, organski ekstrakt se osuši iznad natrij sulfata i koncentrira, dajući 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilnu kiselinu (11,241 g, 99 %), kao žućkastu čvrstu pjenu.

Postupak B Otopina 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline etil estera (34,19 g, 0,807 mmol) u etanolu (330 ml) tretira se sa 3M vodenom otopinom NaOH (330 ml, 0,990 mol), pa se preko noći zagrijava pod refluksom. Otapalo se ispari pod vakuumom, a ostatak raspodijeli između vode i dietil etera. Vodeni sloj se opere dietil eterom, zakiseli do pH = 1 sa 3M vodenom otopinom HCl i ekstrahira etil acetatom. Poslije ispiranja vodom, organski ekstrakt se osuši iznad natrij sulfata i koncentrira, dajući 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilnu kiselinu (31,26 g, 98 %), u obliku bijele kristalne supstance.

¹H NMR (CDCl₃) δ 7,73 (d, 2H); 7,03 (t, 2H); 6,96 (m, 2H); 6,91 (m, 2H); 3,56 (m, 2H); 3,43 (bm, 3H); 2,01 (m, 2H); 1,80 (bd, 2H).

MS atmosferski tlak kemijska ionizacija maseni spektar: 394 (M⁺-1)(-ion).

(E) 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline N-benziloksiamid

Dodaju se redom diizopropiletilamin (3,89 g, 0,030 mol) i (benzotriazol-1-iloksi) tris-(dimetilamino)-fosfonij heksafluorofosfat (13,27 g, 0,030 mol) otopini 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline (11,22 g, 0,028 mol) u bezvodnom N,N-dimetilformamidu (140 ml). Dobivena otopina se 16 sati miješa na sobnoj temperaturi. Zatim se doda još diizopropiletilamina (4,0 ml, 0,051 mol) i O-benzil hidroksilamin hidroklorid (5,46 g, 0,034 mol), pa se nastala smjesa 18 sati miješa na 60 °C. Poslije koncentriranja pod vakuumom, ostatak se tretira sa 0,5 M vodenom otopinom HCl, pa ekstrahira etil acetatom. Organski ekstrakt se opere zasićenom vodenom otopinom natrij bikarbonata, vodom i zasićenom otopinom NaCl. Otopina se osuši iznad magnezij sulfata, filtrira i koncentrira na četvrtinu prvobitnog volumena. Dodavanjem jednako volumena heksana istaloži se 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline N-benziloksiamid (11,595 g, 81,6 %), u obliku bijele kristalne supstance (T. toplj. 175-176 °C).

¹H NMR (CDCl₃) δ 7,76 (d, 2H); 7,35 (m, 5H); 7,05 (t, 2H); 6,96 (m, 4H); 5,38 (bs, 1H); 4,86 (s, 2H); 3,57 (m, 2H); 3,44 (m, 2H); 2,01 (m, 2H); 1,77 (bd, 2H); 1,54 (bs, 1H).

MS atmosferski tlak kemijska ionizacija 501 (M⁺1).

(F) 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline hidroksiamid

Postupak A Otopina 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline N-benziloksiamida (11,28 g, 0,0225 mol) u etil acetatu (600 ml) tretira se sa 5 % paladijem na barij sulfatu (5,0 g), pa se 18 sati hidrogenira u mućkalici firme ParrTM na tlaku 3 bara. Poslije filtriranja kroz najlon (veličina pora 0,45 mm) da bi se uklonio katalizator, filter se ispere metanolom. Sjedinjeni

filtrat i tekućina od ispiranja se ispare, a ostatak otopi u vrućem metanolu. Hlađenje daje sirovi 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline hidroksiamid (5,941 g, 64 %, T. toplj. 176-177 °C) u obliku bijele kristalne supstance. Matična tekućina se ispari, a ostatak kristalizira iz 50 % metanol/diklorometana, dajući još 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline hidroksiamida (0,660 g, T. toplj. 184-185 °C) u obliku bijelih iglica. Ponovo se matična tekućina ispari, a ostatak kristalizira iz metanol/diklorometana, dajući još produkta (1,861 g, T. toplj. 176-177 °C). Rekristalizacija prve partije iz metanol/diklorometana daje analitički čist 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensufonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilne kiseline hidroksiamid (3,091 g, T. toplj. 184-185 °C).

Postupak B Miješanoj suspenziji karboksilne kiseline (33,25 g, 0,0841 mol) u suhom metilenkloridu (300 ml), na sobnoj temperaturi, doda se oksalil klorid (11,83 g, 0,0932 mol, 1,1 ekv.) i DMF (0,13 ml). Opaža se barbotiranje. Ova suspenzija, koja lagano postaje žućkasta otopina, miješa se preko noći na sobnoj temperaturi. U međuvremenu, tretira se otopina hidroksilamin hidroklorida (7,65 g, 0,110 mol, 1,3 ekv.) u suhom piridinu (51,4 ml, 0,635 mol, 7,5 ekv.), na 0 °C, sa klorotrimetilsilanom, što izazove stvaranje bijelog taloga. Ova suspenzija se preko noći miješa na sobnoj temperaturi. Oba balona se ohlade na 0 °C, pa se otopina klorida kiseline doda suspenziji sililiranog hidroksilamina. Nastala smjesa se 1 sat miješa na 0 °C i 2 sata na sobnoj temperaturi. Doda se 1.000 ml vodene 2M HCl, pa se 1 sat miješa na sobnoj temperaturi. Slojevi se razdvoje, a vodeni sloj se ekstrahira tri puta etil acetatom (500 ml). Sjedinjeni organski slojevi se operu vodom i zasićenom otopinom NaCl, pa osuše iznad magnezij sulfata, filtriraju, a volumen filtrata svede na 300 ml, kada se istaloži velika količina kristalne supstance. Ova smjesa se preko noći drži u hladnjaku. Čvrsta supstanca se sakupi vakuum filtriranjem, opere hladnim 1:1 etil acetat/heksanom i osuši pod visokim vakuumom, dajući 30,311 g željene hidroksamske kiseline (87,8 %) u obliku bijele kristalne supstance (T. toplj. 189-190 °C).

¹H NMR (CDCl₃) δ 10,35 (bs, 1H); 8,68 (bs, 1H); 7,78 (bs, 1H); 7,74 (d, 2H); 7,26 (t, 2H); 7,16 (m, 2H); 7,04 (d, 2H); 3,40 (m, 2H); 3,31 (m, 2H); 1,78 (m, 4H).

¹³C NMR (DMSO) δ 169,65, 160,66, 137,50, 129,239, 122,34, 122,25, 117,75, 117,44, 117,24, 62,94, 58,45, 33,34.

MS atmosferski tlak kemijska ionizacija maseni spektar: 409 (M⁺-1)(-ion).

Preparat A

4-(4-fluorofenoksi)benzensulfonilklorid

U kapima se dodaje klorosulfonska kiselina (26 ml, 0,392 mol) ledom ohlađenom 4-fluorofenoksibenzenu (36,9 g, 0,196 mol), uz mehaničko miješanje. Po završetku dodavanja, smjesa se 4 sata miješa na sobnoj temperaturi. Smjesa se zatim presipa u ledenu vodu. Produkt 4-(4-fluorofenoksi)benzen-sulfonilklorid (18,6 g, 33 %) sakupi se filtriranjem i osuši na zraku.

Preparat B

natrij-4-(3-metilbutoksi)benzensulfonat

Otopina 4-hidroksibenzensulfonske kiseline (10,0 g, 43,1 mmol) i NaOH (3,3 g, 83 mmol) u vodi (40 ml) miješaju se sa otopinom 1-jodo-3-metilbutana (11,3 ml, 86,4 mmol) u izopropanolu (60 ml), pa se nastala smjesa 2 dana zagrijava pod refluksom. Izopropanol se ukloni isparavanjem pod vakuumom. Spoj iz naslova, 10,0 g (87 %), se sakupi filtriranjem i opere izopropanolom.

Preparat C

4-(3-metilbutoksi)benzensulfonilklorid

Smjesa natrij-4-(3-metilbutoksi)benzensulfonata (2,5 g, 9,4 mmol), tionilklorida (10 ml) i 5 kapi N,N-dimetilformamida zagrijava se 5 sati pod refluksom. Poslije hlađenja, ispari se višak tionilklorida, a ostatak se otopi u etil acetatu. Otopina se ohladi u ledenoj kupki, pa se doda voda. Organska faza se odvoji i opere vodom i zasićenom otopinom NaCl. Poslije sušenja iznad natrij sulfata otapalo se ispari, dajući spoj iz naslova u obliku ulja, 2,34 g (95 %).

Preparat D

natrij-4-(2-ciklopentiletoksi)benzensulfonat

Otopina 4-hidroksibenzensulfonske kiseline (6,5 g, 28,2 mmol) i NaOH (2,2 g, 55 mmol) pomiješa se sa otopinom 2-(bromometil)ciklopentana (15,0 g, 84,7 mmol) u izopropanolu (40 ml), pa se nastala smjesa 2 dana zagrijava pod refluksom. Ukloni se izopropanol isparavanjem pod vakuumom. Spoj iz naslova, 4,7 g (57 %), se sakupi filtriranjem i opere izopropanolom.

Preparat E

4-(3-metilbutoкси)benzensulfonilklorid

Smjesa natrij-4-(2-ciklopentiletoksi)-benzensulfonata (2,5 g, 8,6 mmol), tionilklorida (15 ml) i nekoliko kapi N,N-dimetilformamida zagrijava se 5 sati pod refluksom. Poslije hlađenja ispari se višak tionilklorida, a ostatak se otopi u etil acetatu. Otopina se ohladi u ledenoj kupki, pa se doda voda. Odvoji se organska faza i opere vodom i zasićenom otopinom NaCl. Poslije sušenja iznad natrij sulfata ispari se otapalo, dajući spoj iz naslova u obliku ulja, 2,24 g (90 %).

Preparat F

4-fluorobifenilsulfonilklorid

U kapima se dodaje klorosulfonska kiselina (8,7 ml, 0,13 mol) 4-fluorobifenilu (10,2 g, 59 mmol), u ledenoj kupki, uz miješanje. Nastavi se miješanje još 30 minuta uz hlađenje ledom, a zatim se reakcijska smjesa presipa u led. Nastali bijeli talog se sakupi filtriranjem i otopi u kloroformu. Kloroformska otopina se opere vodom i zasićenom otopinom NaCl, osuši iznad magnezij sulfata i koncentrira, dajući bijelu supstancu. Željeni produkt, 4-fluorobifenilsulfonilklorid (4,3 g, 27 %) se odvoji od 4-fluorobifenilsulfonske kiseline (neželjeni sporedni produkt), kristalizacijom navedene iz etil acetata, pa kristalizacijom preostalog materijala iz heksana.

Preparat G

natrij-4-(4-fluorobenziloksi)benzensulfonat

Otopini 4-hidroksibenzensulfonske kiseline (5,13 g, 22,1 mmol) u 1M vodenoj otopini NaOH (23 ml), doda se otopina 4-fluorobenzilbromida (3,3 ml, 26,5 mmol) u etanolu (20 ml). Nastala smjesa se 2 dana zagrijava pod refluksom. Poslije hlađenja i stajanja istaloži se bijela supstanca. Istaloženi produkt, natrij-4-(4-fluorobenziloksi)benzensulfonat, 4,95 g (74 %), sakupi se filtriranjem i opere etil acetatom i dietil eterom.

Preparat H

4-(4-fluorobenziloksi)benzensulfonilklorid

Suspenciji natrij-4-(4-fluorobenziloksi)benzensulfonata (0,5 g, 1,64 mmol) u metilenkloridu (5 ml), doda se fosfor pentaklorid (275 mg, 1,31 mmol). Nastala smjesa se 7 sati zagrijava pod refluksom. Poslije hlađenja u ledenoj kupki i zaustavljanja sa vodom (15 ml), smjesa se ekstrahira etil acetatom. Organska faza se opere zasićenom otopinom NaCl, osuši iznad natrij sulfata i koncentrira, dajući 4-(4-fluorobenziloksi) benzensulfonilklorid, u obliku bijele supstance (130 mg, 26 %).

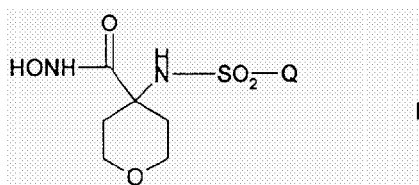
Preparat I

4-(4-klorofenoksi)benzensulfonilklorid

U kapima se dodaje klorosulfonska kiselina (9,7 ml, 0,147 mol) 4-klorofenoksibenzenu (12,6 ml, 73,4 mmol), na sobnoj temperaturi, uz miješanje. Kada se završi dodavanje, smjesa se 1 sat miješa na sobnoj temperaturi, a zatim presipa u smjesu leda i vode. Talog se sakupi filtriranjem, osuši na zraku i rekristalira iz petrolej etera i etil acetata, dajući 4-(4-klorofenoksi)benzensulfonil klorid (7,43 g, 33 %).

PATENTNI ZAHTJEVI

1. Spoj formule



ili njegove farmaceutske prihvatljive soli, **naznačen time**, što

- 5 Q je (C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril(C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril(C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroaril(C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroaril(C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkoksi(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkoksi(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkoksi(C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkoksi(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkoksi(C₆-C₁₀)aril ili (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkoksi(C₂-C₉)heteroaril;

15 pri čemu je svaki (C₆-C₁₀)aril ili (C₂-C₉)heteroaril ostatak u spomenutim (C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril(C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril(C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroaril(C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroaril(C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkoksi(C₁-C₆)alkil, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkoksi(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkoksi(C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkoksi(C₁-C₆)alkil, (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkoksi(C₆-C₁₀)aril ili (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkoksi(C₂-C₉)heteroaril opciono supstituiran na bilo kome atomu ugljika u prstenu koji je u stanju formirati dodatnu vezu sa jednim ili više supstituenata po prstenu, koji se nezavisno biraju između fluoro, kloro, bromo, (C₁-C₆)alkil, (C₁-C₆)alkoksi, perfluoro(C₁-C₃)alkil, perfluoro(C₁-C₃)alkoksi i (C₆-C₁₀)ariloksi,

25 ili njegova farmaceutske prihvatljiva sol.

2. Spoj prema zahtjevu 1, **naznačeno time**, što Q je opciono supstituiran sa (C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)ariloksi(C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroaril(C₂-C₉)heteroaril, (C₆-C₁₀)aril(C₂-C₉)heteroaril, (C₂-C₉)heteroaril(C₆-C₁₀)aril, (C₂-C₉)heteroariloksi(C₆-C₁₀)aril, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₆)alkoksi(C₆-C₁₀)aril ili (C₂-C₉)heteroaril(C₁-C₆)alkoksi(C₆-C₁₀)aril.
3. Spoj prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što Q je opciono supstituiran sa (C₆-C₁₀)ariloksi(C₆-C₁₀)aril.
4. Spoj prema zahtjevu 3, **naznačen time**, što je (C₆-C₁₀)ariloksi prsten spomenute grupe (C₆-C₁₀)ariloksi(C₆-C₁₀)aril, opciono mono-supstituiran u 4. položaju prstena.
5. Spoj prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što se bira iz grupe koju čine:
 - 35 4-[4-(4-fluorofenoksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid;
 - 4-[4-(4-klorofenoksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid;
 - 4-[4-(fenoksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid;
 - 4-[4-(4-piridiloksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid;
 - 4-[4-(4-fluorofenil)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid;
 - 40 4-[4-(4-fluorofenilmetoksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid;
 - 4-[4-(fenilmetoksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid; i
 - 4-[4-(4-fluorofeniletoksi)benzensulfonilamino]tetrahidropiran-4-karboksilna kiselina hidroksiamid.
6. Farmaceutski preparat za tretman stanja koja se biraju iz grupe koju čine artritis (uključujući osteoartritis i reumatoidni artritis), inflamatorna bolest utrobe, Crohn-ova bolest, emfizem, kronična opstruktivna bolest pluća, Alzheimer-ova bolest, toksičnost uslijed transplantacije organa, kaheksija, alergijske reakcije, alergijska hipersenzitivnost na dodir, karcinom, ulceracija tkiva, restenoza, periodontalne bolesti, epidermoliza buloza, osteoporoza, odbacivanje implantanata umjetnog zgloba, ateroskleroza (uključujući raskidanje aterosklerotičnog plaka), aneurizma aorte (uključujući aneurizmu abdominalne aorte i aneurizmu moždane aorte), kongestivna srčana mana, infarkt miokarda, moždani udar, cerebralna ishemija, traume glave, povrede leđne moždine, neurodegenerativni poremećaji (akutni i kronični), autoimuni poremećaji, Huntington-ova bolest, Parkinson-ova bolest, migrena, depresija, periferna neuropatija, bolovi, cerebralna amiloidna angiopatija, poboljšanje spoznaje, amiotrofna lateralna skleroza, multipla skleroza, okularna angiogeneza, povrede rožnjače, makularna degeneracija, abnormalno zarastanje rana, opekotine, dijabetes, početak tumora, rast tumora, metastaza tumora, ubodi rožnjače, skleritis, AIDS, sepsa i septički šok kod sisavaca, uključujući i humana bića, **naznačen time**, što sadrži količinu spoja iz zahtjeva 1 koja je efikasna u tom tretmanu, i farmaceutske prihvatljiv nosač.
7. Postupak tretiranja stanja koja se bira iz grupe koju čine artritis (uključujući osteoartritis i reumatoidni artritis),

inflamatorna bolest utrobe, Crohn-ova bolest, emfizem, kronična opstruktivna bolest pluća, Alzheimer-ova bolest, toksičnost uslijed transplantacije organa, kaheksija, alergijske reakcije, alergijska hipersenzitivnost na dodir, karcinom, ulceracija tkiva, restenoza, periodontalne bolesti, epidermoliza buloza, osteoporoza, odbacivanje implantanata umjetnog zgloba, ateroskleroza (uključujući raskidanje aterosklerotičnog plaka), aneurizma aorte (uključujući aneurizmu abdominalne aorte i aneurizmu moždane aorte), kongestivna srčana mana, infarkt miokarda, moždani udar, cerebralna ishemija, traume glave, povrede leđne moždine, neurodegenerativni poremećaji (akutni i kronični), autoimuni poremećaji, Huntington-ova bolest, Parkinson-ova bolest, migrena, depresija, periferna neuropatija, bolovi, cerebralna amiloidna angiopatija, poboljšanje spoznaje, amiotrofna lateralna skleroza, multipla skleroza, okularna angiogeneza, ubodi rožnjače, makularna degeneracija, abnormalno zarastanje rana, opekotine, dijabetes, početak tumora, rast tumora, metastaza tumora, ubodi rožnjače, skleritis, AIDS, sepsa i septički šok kod sisavaca, uključujući i humana bića, **naznačen time**, što se spomenutom sisavcu daje količina spoja prema zahtjevu 1 koja je efikasna u tretmanu takvog stanja.

8. Farmaceutski preparat za tretman stanja koja se mogu tretirati inhibicijom matričnih metaloproteinaza kod sisavaca, uključujući i humana bića, **naznačen time**, što sadrži količinu spoja prema zahtjevu 1 koja je efikasna u takvom tretmanu, i farmaceutski prihvatljiv nosač.
9. Farmaceutski preparat za tretman stanja koja se mogu tretirati inhibicijom reprotizina kod sisavaca, uključujući i humana bića, **naznačen time**, što sadrži količinu spoja prema zahtjevu 1 koja je efikasna u takvom tretmanu, i farmaceutski prihvatljiv nosač.
10. Postupak inhibicije matrične metaloproteinaze kod sisavaca, uključujući i humana bića, **naznačen time**, što se spomenutom sisavcu daje efikasna količina spoja prema zahtjevu 1.
11. Postupak inhibicije reprotizina kod sisavaca, uključujući i humana bića, **naznačen time**, što se spomenutom sisavcu daje efikasna količina spoja prema zahtjevu 1.

SAŽETAK

Spoj formule (I), gdje je Q kao što je definirano, koji se koristi za tretman stanja koja se biraju iz grupe koju čine artritis (uključujući osteoartritis i reumatoidni artritis), inflamatorna bolest utrobe, Crohn-ova bolest, emfizem, kronična opstruktivna bolest pluća, Alzheimer-ova bolest, toksičnost uslijed transplantacije organa, kaheksija, alergijske reakcije, alergijska hipersenzitivnost na dodir, karcinom, ulceracija tkiva, restenoza, periodontalne bolesti, epidermoliza buloza, osteoporoza, odbacivanje implantanata umjetnog zgloba, ateroskleroza (uključujući raskidanje aterosklerotičnog plaka), aneurizma aorte (uključujući aneurizmu abdominalne aorte i aneurizmu moždane aorte), kongestivna srčana mana, infarkt miokarda, moždani udar, cerebralna ishemija, traume glave, povrede leđne moždine, neurodegenerativni poremećaji (akutni i kronični), autoimuni poremećaji, Huntington-ova bolest, Parkinson-ova bolest, migrena, depresija, periferna neuropatija, bolovi, cerebralna amiloidna angiopatija, poboljšanje spoznaje, amiotrofna lateralna skleroza, multipla skleroza, okularna angiogeneza, povrede rožnjače, makularna degeneracija, abnormalno zarastanje rana, opekotine, dijabetes, početak tumora, rast tumora, metastaza tumora, ubodi rožnjače, skleritis, AIDS, sepsa i septički šok. Pored toga, spojevi ovog izuma mogu se koristiti u kombiniranoj terapiji sa standardnim nesteroidnim anti-inflamatornim lijekovima (NSAID) i analgeticima, i u kombinaciji sa citotoksičnim lijekovima, kao što su adriamycin, daunomycin, cis-platina, etoposide, taxol, taxotere i drugim alkaloidima, kao što su vincristine, za liječenje karcinoma.

