



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 17 124 T2** 2005.05.12

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 952 148 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 17 124.5**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 302 282.1**

(96) Europäischer Anmeldetag: **25.03.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.10.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **12.05.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.05.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C07C 317/14**

C07C 311/19, C07C 311/29, C07C 311/42

(30) Unionspriorität:

81392 P 10.04.1998 US

(73) Patentinhaber:

Pfizer Products Inc., Groton, Conn., US

(74) Vertreter:

Lederer & Keller, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**Reiter, Lawrence Alan, Mystic, Connecticut 06355,
US**

(54) Bezeichnung: **Cyclobutyl-Aryloxysulfonylamin-Hydroxamsäurederivate**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Cyclobutylaryloxyarylsulfonylaminohydroxamsäurederivate und pharmazeutische Zusammensetzungen und Verfahren zur Behandlung.

[0002] Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind Inhibitoren von Zinkmetalloendopeptidasen, insbesondere jenen, die zu den Matrixmetalloproteinase- (auch MMP oder Matrixin genannt) und Reprolysin- (auch bekannt als Adamylsin)-Unterfamilien von Metzincinen gehören (Rawlings, et al., *Methods in Enzymology*, 248, 183–228 (1995) und Stocker, et al., *Protein Science*, 4, 823–840 (1995)).

[0003] Die MMP-Unterfamilie von Enzymen enthält gegenwärtig siebzehn Mitglieder (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). Die MMP sind für ihre Rolle beim Regulieren des Umsatzes (Turn-over) von extrazellulären Matrixproteinen gut bekannt und spielen als solche eine wichtige Rolle bei normalen physiologischen Vorgängen, wie Reproduktion, Entwicklung und Differentiation. Außerdem werden die MMP in vielen pathologischen Situationen, bei denen abnormaler Bindegewebsumsatz stattfindet, exprimiert. Beispielsweise wurde von MMP-13, einem Enzym mit starker Wirksamkeit beim Abbauen von Collagen Typ II (das Hauptcollagen in Knorpel), gezeigt, dass es in osteoarthritischem Knorpel überexprimiert wird (Mitchell, et al., *J. Clin. Invest.*, 97, 761 (1996)). Andere MMP (MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-12) werden auch in osteoarthritischem Knorpel überexprimiert und es wird erwartet, dass die Inhibierung von einigen oder allen von diesen MMP den beschleunigten Verlust an Knorpel, der für Gelenkserkrankungen, wie Osteoarthritis oder rheumatische Arthritis, typisch ist, verlangsamt oder blockiert.

[0004] Die Säugerreprolysine sind als ADAM (eine Disintegrin- und Metalloproteinase) bekannt (Wolfberg, et al., *J. Cell Biol.*, 131, 275–278 (1995)) und enthalten, zusätzlich zu der Metalloproteinase-artigen Domäne, eine Disintegrindomäne. Bis heute wurden dreiundzwanzig verschiedene ADAM identifiziert.

[0005] ADAM-17, auch bekannt als Tumor-Nekrosefaktor-alphaumwandelndes Enzym (TACE), ist das bestbekannte ADAM. ADAM-17 (TACE) ist verantwortlich für die Spaltung von zellgebundenem Tumor-Nekrosefaktor-alpha (TNF- α , auch bekannt als Cachectin). TNF- α ist bekanntlich in viele infektiöse und Autoimmunerkrankungen verwickelt (W. Friers, *FEBS Letters*, 285, 199 (1991)). Weiterhin wurde gezeigt, dass TNF- α der primäre Mediator der entzündlichen Reaktion, die bei Sepsis und septischem Schock beobachtet wird, darstellt (Spooner, et al., *Clinical Immunology and Immunopathology*, 62 Seite 11 (1992)). Es gibt zwei Formen von TNF- α , ein Membranprotein Typ II der relativen Molekülmasse 26 000 (26 kD), und eine lösliche 17 kD-Form, erzeugt aus dem zellgebundenen Protein durch spezifische proteolytische Spaltung. Die lösliche 17 kD-Form von TNF- α wird durch die Zelle freigesetzt und ist mit den verschlechternden Wirkungen von TNF- α verbunden. Diese Form von TNF- α ist auch in der Lage, an Stellen, die von der Synthesestelle entfernt sind, zu wirken. Somit verhindern Inhibitoren von TACE die Bildung von löslichem TNF- α und verhindern die verschlechternden Wirkungen des löslichen Faktors.

[0006] Ausgewählte erfindungsgemäße Verbindungen sind starke Inhibitoren von Aggrecanase, einem beim Knorpelaggrecanabbau wichtigen Enzym. Aggrecanase wird auch als ein ADAM angenommen. Der Verlust an Aggrecan aus der Knorpelmatrix ist ein wichtiger Faktor beim Fortschreiten von Gelenkserkrankungen, wie Osteoarthritis und rheumatische Arthritis, und es wird erwartet, dass Inhibierung von Aggrecanase den Verlust von Knorpel bei diesen Erkrankungen verlangsamt oder blockiert.

[0007] Andere ADAM, die in pathologischen Situationen Expression gezeigt haben, schließen ADAM TS-1 (Kuno, et al., *J. Biol. Chem.*, 272, 556–562 (1997)) und ADAM 10, 12 und 15 (Wu, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 235, 437–442 (1997)) ein. Mit wachsendem Wissen über die Expression physiologischer Substrate und Erkrankungen, die mit den ADAM verbunden sind, kann die ganze Bedeutung der Rolle der Inhibierung dieser Enzymklasse eingeschätzt werden.

[0008] Erkrankungen, worin die Inhibierung von MMP und/oder ADAM einen therapeutischen Vorteil bereitstellen, schließen ein: Arthritis (einschließlich Osteoarthritis und rheumatische Arthritis), entzündliche Darmerkrankung, Crohn-Krankheit, Emphysem, akutes Atemwegsdistresssyndrom, Asthma, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, Alzheimer-Demenz, Organtransplantationstoxizität, Kachexie, allergische Reaktionen, allergische Kontaktüberempfindlichkeit, Krebs (wie solider Tumorkrebs, einschließlich Darmkrebs, Brustkrebs, Lungenkrebs und Prostatakrebs und hämatopoietisches Malignin, einschließlich Leukämie und Lymphoma),

Gewebsgeschwürgbildung, Restenose, Zahnerkrankung, Epidermolysis bullosa, Osteoporose, Lockern künstlicher Gelenksimplantationen, Atherosklerose (einschließlich atherosklerotischen Plaquebruchs), Aortenaneurysma (einschließlich Bauchschlagaderaneurysma und Gehirnschlagaderaneurysma), dekompensierte Herzinsuffizienz, Herzmuskelinfarkt, Schlaganfall, Gehirnschämie, Kopftrauma, Rückenmarksverletzung, (akute und chronische) neuro-degenerative Beschwerden, Autoimmunitätsstörungen, Corea Huntington, Parkinson-Krankheit, Migräne, Depression, periphere Neuropathie, Schmerzen, amyloide Gehirngiopathie, nootropische oder Wahrnehmungssteigerung, amyotrophische Lateralsklerose, Multiple Sklerose, Augenangiogenese, Hornhautverletzung, Makulardegeneration, anormale Wundheilung, Verbrennungen, Diabetes, Tumoringvasion, Tumorwachstum, Tumormetastase, Hornhautvernarbung, Skleritis, AIDS, Blutvergiftung, septischen Schock und andere Erkrankungen, die durch Metalloproteinase- oder ADAM-Expression gekennzeichnet sind.

[0009] Diese Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Anwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen bei der Behandlung der vorstehenden Erkrankungen bei Säugern, insbesondere Menschen, und die dafür verwendbaren pharmazeutischen Zusammensetzungen.

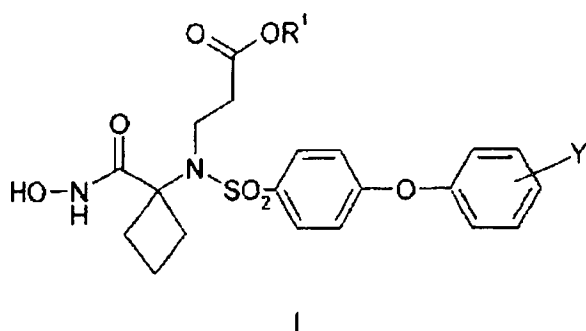
[0010] Verschiedene Kombinationen von MMP und ADAM werden bekanntlich in verschiedenen pathologischen Situationen exprimiert. Als solche Inhibitoren mit speziellen Selektivitäten für einzelne ADAM und/oder MMP können einzelne Erkrankungen bevorzugt sein. Beispielsweise ist rheumatische Arthritis eine Gelenkentzündungserkrankung, die sich durch zu hohe TNF-Spiegel und den Verlust an Gelenkmatrixbestandteilen auszeichnet. In diesem Fall kann eine Verbindung, die TACE und Aggrecanase sowie MMP, wie MMP-13, inhibiert, die bevorzugte Therapie sein. Im Gegensatz dazu können bei Gelenkserkrankung mit schwächerer Entzündung, wie Osteoarthritis, Verbindungen, die Matrix-abbauende MMP, wie MMP-13, inhibieren, jedoch nicht TACE, bevorzugt sein.

[0011] Die Erfinder haben gefunden, dass es möglich ist, Inhibitoren mit unterschiedlicher Metalloprotease-wirksamkeit zu entwickeln. Insbesondere sind die Erfinder beispielsweise in der Lage, Moleküle zu entwickeln, die selektiv Matrixmetalloprotease-13 (MMP-13) bevorzugt gegenüber MMP-1 inhibieren.

[0012] Matrixmetalloproteinaseinhibitoren sind in der Literatur gut bekannt. Insbesondere bezieht sich die PCT-Veröffentlichung WO 96/33172, veröffentlicht am 24. Oktober 1996, auf cyclische Arylsulfonylamino-Hydroxamsäuren, die als MMP-Inhibitoren verwendbar sind. US-Patent 5 672 615, PCT-Veröffentlichung WO 97/20824, PCT-Veröffentlichung WO 98/08825, PCT-Veröffentlichung WO 98/27069 und PCT-Veröffentlichung WO 98/34918, veröffentlicht am 13. August 1998, mit dem Titel „Arylsulfonyl Hydroxamic Acid Derivatives“, beziehen sich alle auf cyclische Hydroxamsäuren, die als MMP-Inhibitoren verwendbar sind. PCT-Veröffentlichungen WO 96/27583 und WO 98/07697, veröffentlicht am 7. März 1996 bzw. 26. Februar 1998, beziehen sich auf Arylsulfonyl-Hydroxamsäuren. Die PCT-Veröffentlichung WO 98/03516, veröffentlicht am 29. Januar 1998, bezieht sich auf Phosphinate mit MMP-Wirksamkeit. Die PCT-Veröffentlichung WO 98/34915, veröffentlicht am 13. August 1998, mit dem Titel „N-Hydroxy-b-Sulfonyl Propionamide Derivatives“, bezieht sich auf Propionylhydroxamide als verwendbare MMP-Inhibitoren. Die PCT-Veröffentlichung WO 98/33768, veröffentlicht am 6. August 1998, mit dem Titel „Arylsulfonylamino Hydroxamic Acid Derivatives“, bezieht sich auf N-unsubstituierte Arylsulfonylamino-Hydroxamsäuren. Die PCT-Veröffentlichung WO 98/30566, veröffentlicht am 16. Juli 1998, mit dem Titel „Cyclic Sulfone Derivatives“, bezieht sich auf cyclische Sulfonylhydroxamsäuren als MMP-Inhibitoren. Die provisorische US-Patentanmeldung 60/55208, eingereicht am 8. August 1997, bezieht sich auf Biarylhydroxamsäuren als MMP-Inhibitoren. Die provisorische US-Patentanmeldung Seriennummer 60/55207, eingereicht am 8. August 1997, mit dem Titel „Aryloxyarylsulfonylamino Hydroxamic Acid Derivatives“, bezieht sich auf Aryloxyarylsulfonylhydroxamsäuren als MMP-Inhibitoren. Die provisorische US-Patentanmeldung 60/62766, eingereicht am 24. Oktober 1997, mit dem Titel „The Use of MMP-13 Selective Inhibitors For The Treatment of Osteoarthritis and Other MMP Mediated Disorders“, bezieht sich auf die Verwendung von selektiven MMP-13-Inhibitoren, um Entzündung und andere Erkrankungen zu behandeln. Die provisorische US-Patentanmeldung Seriennummer 60/68261, eingereicht am 19. Dezember 1997, bezieht sich auf die Verwendung von MMP-Inhibitoren, um Angiogenese und andere Störungen zu behandeln. Jede der vorstehend angeführten Veröffentlichungen und Anmeldungen wird durch diesen Hinweis in ihrer Gesamtheit hierin einbezogen.

Kurzdarstellung der Erfindung

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Verbindung der Formel



oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz derselben, wobei

R¹ für Wasserstoff oder (C₁-C₆)Alkyl steht; und

Y ein Substituent an irgendeinem der Kohlenstoffatome des Phenylrings ist, der in der Lage ist, eine zusätzliche Bindung zu tragen, vorzugsweise von 1 bis 2 Substituenten (bevorzugter ein Substituent, besonders bevorzugt ein Substituent in der 4-Position) an dem Phenylring, unabhängig ausgewählt aus Wasserstoff, Fluor, Chlor, Trifluormethyl, (C₁-C₆)Alkoxy, Trifluormethoxy, Difluormethoxy und (C₁-C₆)Alkyl.

[0014] Der wie hierin verwendete Begriff „Alkyl“ schließt, sofern nicht anders ausgewiesen, gesättigte einwertige Kohlenwasserstoffreste mit geradkettigen, verzweigten oder cyclischen Einheiten oder Kombinationen davon ein.

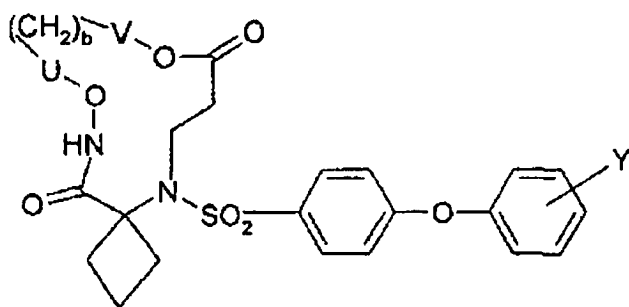
[0015] Der wie hierin verwendete Begriff „Alkoxy“ schließt O-Alkylgruppen ein, worin „Alkyl“ wie vorstehend definiert ist.

[0016] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die pharmazeutisch akzeptablen Säureadditionssalze der Verbindungen der Formel I. Die Säuren, die zum Herstellen der pharmazeutisch akzeptablen Säureadditionssalze der vorstehend erwähnten Basenverbindungen dieser Erfindung verwendet werden, sind jene, die nicht-toxische Säureadditionssalze bilden; d. h. Salze, die pharmakologisch akzeptable Anionen enthalten, wie die Hydrochlorid-, Hydrobromid-, Hydrojodid-, Nitrat-, Sulfat-, Bisulfat-, Phosphat-, sauren Phosphat-, Acetat-, Lactat-, Citrat-, sauren Citrat-, Tartrat-, Bitartrat-, Succinat-, Maleat-, Fumarat-, Gluconat-, Saccharat-, Benzoat-, Methansulfonat-, Ethansulfonat-, Benzolsulfonat-, p-Toluolsulfonat- und Pamoat- [d. h. 1,1'-Methylen-bis-(2-hydroxy-3-naphthoat)]-Salze.

[0017] Die Erfindung betrifft auch Basenadditionssalze der Formel I. Die chemischen Basen, die als Reagenzien zum Herstellen der pharmazeutisch akzeptablen Basensalze jener Verbindungen der Formel I verwendet werden können, die saurer Beschaffenheit sind, sind jene, die nicht-toxische Basensalze mit solchen Verbindungen bilden. Solche nicht-toxischen Basensalze schließen ein, sind jedoch nicht auf jene, abgeleitet von solchen pharmakologisch akzeptablen Kationen, wie Alkalimetallkationen (beispielsweise Kalium und Natrium), und Erdalkalimetallkationen (beispielsweise Calcium und Magnesium), Ammonium- oder in Wasser lösliche Aminadditionssalze, wie N-Methylglucamin-(Meglumin), und die Niederalkanolammonium- und anderen Basensalze von pharmazeutisch akzeptablen organischen Aminen, begrenzt.

[0018] Die Verbindungen der Formel I können chirale Zentren aufweisen und liegen deshalb in verschiedenen enantiomeren Formen vor. Diese Erfindung betrifft alle optischen Isomeren und Stereoisomeren der Verbindungen der Formel I und Gemische davon.

[0019] Diese Erfindung umfasst auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die dieselben enthalten und Verfahren zur Behandlung oder Prävention, umfassend Verabreichen von Prodrugs der Verbindungen der Formel I. Verbindungen der Formel I mit freien Amino-, Amido-, Hydroxy- oder Carbonsäuregruppen können in Prodrugs umgewandelt werden. Prodrugs schließen Verbindungen ein, worin ein Aminosäurerest oder eine Polypeptidkette von zwei oder mehreren (beispielsweise zwei, drei oder vier) Aminosäureresten, kovalent über Peptidbindungen an freie Amino-, Hydroxy- oder Carbonsäuregruppen der Verbindungen der Formel I gebunden sind. Die Aminosäurereste schließen die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren, die üblicherweise durch drei Buchstabensymbole aufgebaut sind, ein, und schließen auch 4-Hydroxyprolin, Hydroxylysin, Demosin, Isodemosin, 3-Methylhistidin, Norvalin, β-Alanin, γ-Aminobuttersäure, Citrullin, Homocystein, Homoserin, Ornithin und Methioninsulfon ein. Prodrugs schließen auch Verbindungen ein, worin Carbonate, Carbamate, Amide und Alkylester, die kovalent an die vorstehenden Substituenten der Formel I durch die Carbonylkohlenstoff-Prodrugeitenkette gebunden sind. Prodrugs schließen auch Verbindungen der Formel I ein, worin die Hydroxamsäure und die Carbonyleinheit, wenn zusammengenommen, eine Gruppe der Formel



bilden, worin Y wie in Formel I definiert ist und U und V unabhängig Carbonyl, Methylene, SO_2 oder SO_3 darstellen und b eine ganze Zahl von eins bis drei ist, worin jede Methylengruppe gegebenenfalls mit Hydroxy substituiert ist.

[0020] Bevorzugte Verbindungen der Formel I schließen jene ein, worin Y Wasserstoff, Fluor oder Chlor, vorzugsweise 4-Fluor oder 4-Chlor, darstellt.

[0021] Andere bevorzugte Verbindungen der Formel I schließen jene ein, worin R^1 Wasserstoff darstellt.

[0022] Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel I schließen die nachstehenden ein:
 3-[[4-(4-Fluorphenoxy)benzolsulfonyl]-(1-hydroxycarbamoylcyclobutyl)amino]propionsäureethylester und
 3-[[4-(4-Fluorphenoxy)benzolsulfonyl]-(1-hydroxycarbamoylcyclobutyl)amino]propionsäure.

[0023] Andere Verbindungen der Formel I schließen die nachstehenden ein:
 3-[(1-Hydroxycarbamoylcyclobutyl)-(4-phenoxybenzolsulfonyl)amino]propionsäure,
 3-[[4-(4-Chlorphenoxy)benzolsulfonyl]-(1-hydroxycarbamoylcyclobutyl)amino]propionsäure,
 3-[(1-Hydroxycarbamoylcyclobutyl)-(4-phenoxybenzolsulfonyl)amino]propionsäureethylester und
 3-[[4-(4-Chlorphenoxy)benzolsulfonyl]-(1-hydroxycarbamoylcyclobutyl)amino]propionsäureethylester.

[0024] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung für die Behandlung eines Zustands, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Arthritis (einschließlich Osteoarthritis und rheumatischer Arthritis), entzündlicher Darmerkrankung, Crohn-Krankheit, Emphysem, chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung, Alzheimer-Demenz, Organtransplantationstoxizität, Kachexie, allergischen Reaktionen, allergischer Kontaktüberempfindlichkeit, Krebs (wie solider Tumorkrebs), Gewebsgeschwürbildung, Restenose, Zahnerkrankung, Epidermolysis bullosa, Osteoporose, Lockern künstlicher Gelenkimplantationen, Atherosklerose (einschließlich atherosklerotischen Plaquebruchs), Aortenaneurysma (einschließlich Bauchschlagaderaneurysma und Gehirnschlagaderaneurysma), dekompensierter Herzinsuffizienz, Herzmuskelinfarkt, Schlaganfall, Gehirnschämie, Kopftrauma, Rückenmarksverletzung, (akuter und chronischer) neuro-degenerativer Beschwerden, Autoimmunstörungen, Corea Huntington, Parkinson-Krankheit, Migräne, Depression, peripherer Neuropathie, Schmerzen, amyloider Gehirnangiopathie, nootropischer oder Wahrnehmungssteigerung, amyotrophischer Lateralsklerose, Multipler Sklerose, Augenangiogenese, Hornhautverletzung, Makulardegeneration, anormaler Wundheilung, Verbrennungen, Diabetes, Tumorerkrankung, Tumorwachstum, Tumormetastase, Hornhautvernarbung, Skleritis, AIDS, Blutvergiftung, septischem Schock und anderen Erkrankungen, die durch Metalloproteinasewirksamkeit gekennzeichnet sind, und andere Erkrankungen, die durch Säugerreprolysinaktivität bei einem Säuger, einschließlich eines Menschen, gekennzeichnet sind, umfassend eine bei solchen Behandlungen wirksame Menge einer Verbindung der Formel I oder eines pharmazeutisch akzeptablen Salzes davon und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

[0025] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung für die Inhibierung von (a) Matrixmetalloproteinase oder anderen Metalloproteinase, die in Matrixabbau einbezogen sind, oder (b) einem Säugerreprolysin (wie Aggrecanase oder ADAM TS-1, -10, -12, -15 und -17, besonders bevorzugt ADAM-17) bei einem Säuger, einschließlich eines Menschen, umfassend eine wirksame Menge einer Verbindung der Formel I oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz derselben.

[0026] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung einer wirksamen Menge einer Verbindung der Formel I für die Zubereitung eines Medikaments zur Behandlung eines Zustands, der aus der Gruppe ausgewählt wird, bestehend aus Arthritis (einschließlich Osteoarthritis und rheumatischer Arthritis), entzündlicher Darmerkrankung, Crohn-Krankheit, Emphysem, chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung, Alzheimer-Demenz, Organtransplantationstoxizität, Kachexie, allergischen Reaktionen, allergischer Kontaktüberempfindlichkeit, Krebs, Gewebsgeschwürbildung, Restenose, Zahnerkrankung, Epidermolysis bullosa, Osteoporose,

Lockern künstlicher Gelenkimplantationen, Atherosklerose (einschließlich atherosklerotischen Plaquebruchs), Aortenaneurysma (einschließlich Bauchschlagaderaneurysma und Gehirnschlagaderaneurysma), dekompensierter Herzinsuffizienz, Herzmuskelinfarkt, Schlaganfall, Gehirnschämie, Kopftrauma, Rückenmarkverletzung, (akuter und chronischer) neuro-degenerativer Beschwerden, Autoimmunitätsstörungen, Corea Huntington, Parkinson-Krankheit, Migräne, Depression, peripherer Neuropathie, Schmerzen, amyloider Gehirnangiopathie, nootropischer oder Wahrnehmungssteigerung, amyotrophischer Lateralsklerose, Multipler Sklerose, Augenangiogenese, Hornhautverletzung, Makulardegeneration, anormaler Wundheilung, Verbrennungen, Diabetes, Tumorinvasion, Tumorwachstum, Tumormetastase, Hornhautvernarbung, Skleritis, AIDS, Blutvergiftung, septischem Schock und anderen Erkrankungen, die durch Metalloproteinase-Wirksamkeit gekennzeichnet sind, und andere Erkrankungen, die durch Säugerreprolysinaktivität bei einem Säuger, einschließlich eines Menschen, gekennzeichnet sind, umfassend Verabreichen einer beim Behandeln eines solchen Zustands wirksame Menge einer Verbindung der Formel I oder eines pharmazeutisch akzeptablen Salzes derselben an den Säuger.

[0027] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung einer wirksamen Menge einer Verbindung der Formel I für die Zubereitung eines Medikaments für die Inhibierung von (a) Matrixmetalloproteinasen oder anderen Metalloproteinasen, die in Matrixabbau einbezogen sind, oder (b) ein Säugerreprolysin (wie Aggrecanase oder ADAM TS-1, -10, -12, -15 und -17, vorzugsweise ADAM-17) bei einem Säuger, einschließlich eines Menschen, umfassend Verabreichen einer wirksamen Menge einer Verbindung der Formel I oder eines pharmazeutisch akzeptablen Salzes davon an den Säuger.

[0028] Diese Erfindung umfasst auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die Prodrugs der Verbindungen der Formel I enthalten. Diese Erfindung umfasst auch Verfahren zur Behandlung oder Prävention von Störungen, die durch Inhibierung von Matrixmetalloproteinasen behandelt oder verhindert werden können, oder die Inhibierung von Säugerreprolysin, umfassend Verabreichen von Prodrugs von Verbindungen der Formel I. Verbindungen der Formel I mit freien Amino-, Amido-, Hydroxy- oder Carboxylgruppen können in Prodrugs umgewandelt werden. Prodrugs schließen Verbindungen ein, worin ein Aminosäurerest oder eine Polypeptidkette von zwei oder mehreren (beispielsweise zwei, drei oder vier) Aminosäureresten, die kovalent durch Peptidbindungen an freie Amino-, Hydroxy- oder Carbonsäuregruppen der Verbindungen der Formel I gebunden sind. Die Aminosäurereste schließen die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren, die üblicherweise durch drei Buchstabensymbole aufgebaut sind, ein, und schließen auch 4-Hydroxyprolin, Hydroxylysin, Demosin, Isodemosin, 3-Methylhistidin, Norvalin, β -Alanin, γ -Aminobuttersäure, Citrullin, Homocystein, Homoserin, Ornithin und Methioninsulfon ein. Prodrugs schließen auch Verbindungen ein, worin Carbonate, Carbamate, Amide und Alkylester, die kovalent an die vorstehenden Substituenten der Formel I durch die Carbonylkohlenstoff-Produktseitenkette gebunden sind.

[0029] Der Durchschnittsfachmann wird einschätzen, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen beim Behandeln diverser Krankheitskomplexe verwendbar sind. Der Durchschnittsfachmann wird auch einschätzen, dass beim Anwenden der erfindungsgemäßen Verbindungen bei der Behandlung einer speziellen Krankheit die erfindungsgemäßen Verbindungen mit verschiedenen vorliegenden therapeutischen Mitteln kombiniert werden können, die für die Erkrankung verwendet werden.

[0030] Für die Behandlung von rheumatischer Arthritis können die erfindungsgemäßen Verbindungen mit Mitteln, wie TNF- α -Inhibitoren, wie monoklonalen anti-TNF-Antikörpern, und TNF-Rezeptor-Immunglobulinmolekülen (wie Enbrel[®]), Niederdosismethotrexat, Lefunimid, Hydroxychloroquin, d-Penicilamin, Auranofin oder parenterales oder orales Gold, kombiniert werden.

[0031] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch in Kombination mit vorliegenden therapeutischen Mitteln für die Behandlung von Osteoarthritis verwendet werden. Geeignete, in Kombination zu verwendende Mittel schließen nicht-steroidale Standard-Antientzündungsmittel (nachstehend NSAID), wie Piroxicam, Diclofenac, Propionsäuren, wie Naproxen, Flubiprofen, Fenoprofen, Ketoprofen und Ibuprofen, Fenamate, wie Mefenamsäure, Indomethacin, Sulindac, Apazon, Pyrazolone, wie Phenylbutazon, Salicylate, wie Aspirin, COX-2-Inhibitoren, wie Celecoxib und Rofecoxib, Analgetika und intraartikuläre Therapien, wie Corticosteroide, und Hyaluronsäuren, wie Hyalgan und Synvisc, ein.

[0032] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch in Kombination mit Antikrebsmitteln, wie Endostatatin und Angiostatin, oder cytotoxischen Arzneimitteln, wie Adriamycin, Daunomycin, Cisplatin, Etoposid, Taxol, Taxoter und Alkaloiden, wie Vincristin, und Antimetaboliten, wie Methotrexat, verwendet werden.

[0033] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch in Kombination mit kardiovaskulären Mitteln, wie

Calciumkanalblockern, Lipid senkenden Mitteln, wie Statinen, Fibraten, beta-Blockern, ACE-Inhibitoren, Angiotensin-2-Rezeptor-Antagonisten und Thrombozytenaggregationsinhibitoren, verwendet werden.

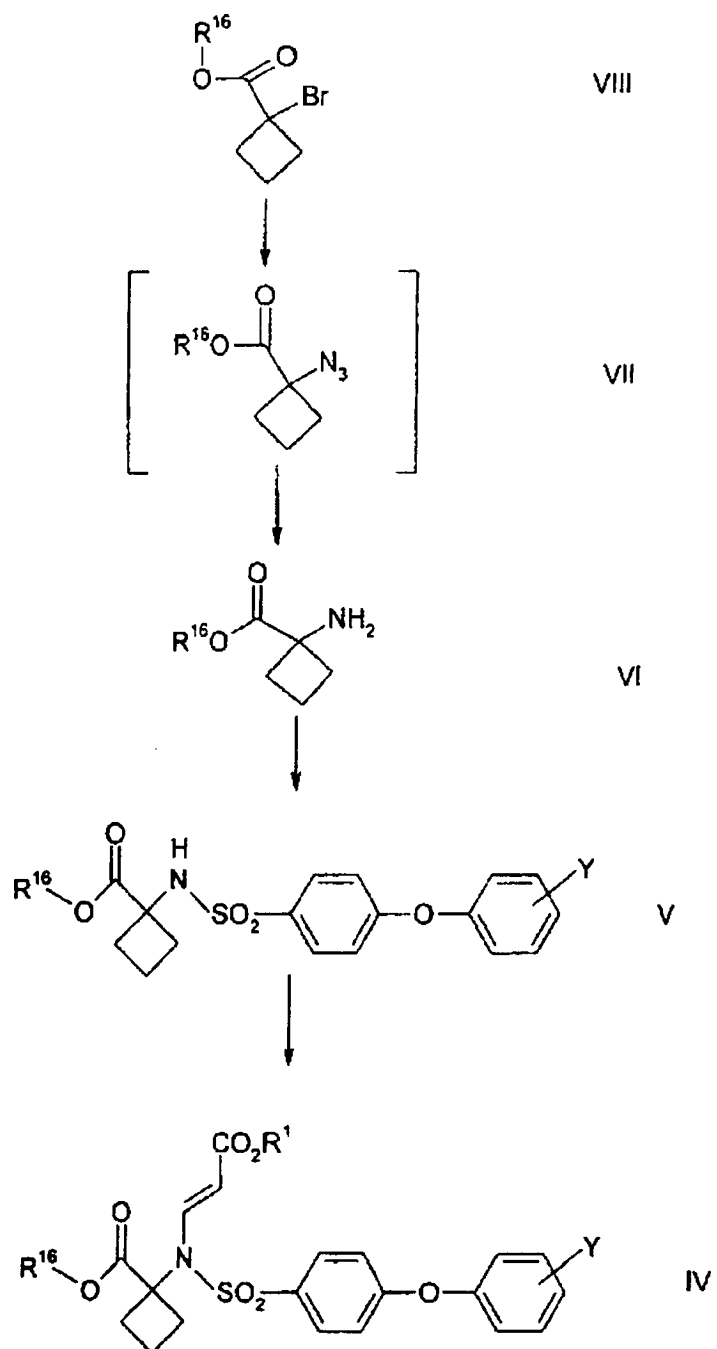
[0034] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch in Kombination mit ZNS-Mitteln, wie Antidepressiva (wie Sertralin), Anti-Parkinson-Arzneimitteln (wie Deprenyl, L-Dopa, Requip, Miratex, MAOB-Inhibitoren, wie Selegine und Rasagiline, comP-Inhibitoren, wie Tasmar, A-2-Inhibitoren, Dopamin-Wiederaufnahme-Inhibitoren, NMDA-Antagonisten, Nicotin-Agonisten, Dopamin-Agonisten und Inhibitoren von neuronaler Stickoxidsynthase) und Anti-Alzheimer-Arzneimitteln, wie Aricept, Tracrine, COX-2-Inhibitoren, Propentofyllin oder Metryfonat, verwendet werden.

[0035] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch in Kombination mit Osteoporosemitteln, wie Droloxifen oder Fosomax, und immunsenkenden Mitteln, wie FK-506 und Rapamycin, angewendet werden.

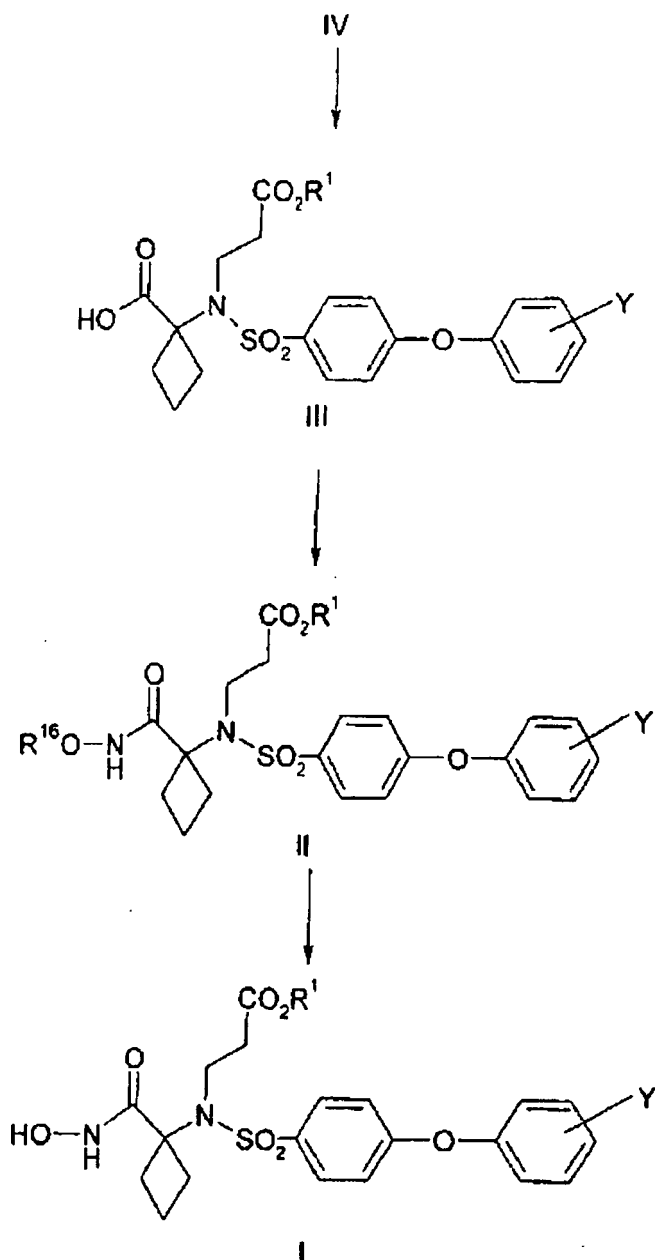
Beschreibung der Erfindung im Einzelnen

[0036] Die nachstehenden Reaktionsschemata erläutern die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen. Sofern nicht anders ausgewiesen, sind Y und R¹ in den Reaktionsschemata und der nachfolgenden Erörterung wie vorstehend definiert.

Schema 1



Schema 1 Fortsetzung



[0037] Schema 1 bezieht sich auf die Herstellung von Verbindungen der Formel I. Bezugnehmend auf Schema 1 wird die Verbindung der Formel I aus einer Verbindung der Formel II durch Entfernung der Hydroxylaminschutzgruppe von R^{16} , worin R^{16} Benzyl darstellt, hergestellt. Entfernung der Hydroxylaminschutzgruppe wird durch Hydrogenolyse der Benzylschutzgruppe unter Verwendung von katalytischem Palladium-auf-Bariumsulfat in einem polaren Lösungsmittel bei einer Temperatur von etwa 20°C bis etwa 25°C; d. h. Raumtemperatur, für einen Zeitraum von etwa 1 Stunde bis etwa 5 Stunden, vorzugsweise etwa 3 Stunden, ausgeführt.

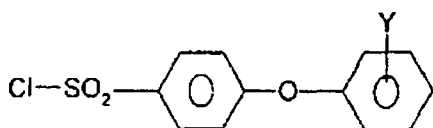
[0038] Die Verbindung der Formel II, worin R^{16} Benzyl darstellt, wird aus einer Verbindung der Formel III durch Aktivierung der Verbindung der Formel III, gefolgt von Reaktion mit Benzylhydroxylamin, hergestellt. Die Verbindung der Formel III wird durch Behandlung mit (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat in Gegenwart einer Base bei Raumtemperatur in einem polaren Lösungsmittel aktiviert. Die vorstehend erwähnte Reaktion wird für einen Zeitraum von etwa 15 Minuten bis etwa 4 Stunden, vorzugsweise etwa 1 Stunde, durchgeführt. Die von der Formel III abgeleitete, aktivierte Verbindung wird in situ zu der Verbindung der Formel II durch Reaktion mit Benzylhydroxylaminhydrochlorid umgewandelt. Die Reaktion mit Benzylhydroxylaminhydrochlorid wird für etwa 1 Stunde bis etwa 5 Tage, vorzugsweise etwa 16 Stunden, bei einer Temperatur von etwa 40°C bis etwa 80°C, vorzugsweise etwa 60°C, durchgeführt. Geeignete Basen schließen N-Methylmorpholin oder Diisopropylethylamin, vorzugsweise Diisopropylethylamin, ein. Geeignete Lösungsmittel schließen N,N-Dimethylformamid oder N-Methylpyrrolidin-2-on, vorzugsweise N,N-Dimethyl-

formamid, ein.

[0039] Die Verbindung der Formel III wird aus einer Verbindung der Formel IV, worin R^{16} Benzyl darstellt, durch Entfernung der Schutzgruppe von R^{16} und Reduktion der Seitenkettendoppelbindung durch Hydrogenolyse, unter Verwendung von Palladium-auf-Kohlenstoff, in einem Lösungsmittel, wie Methanol oder Ethanol, für einen Zeitraum von etwa 30 Minuten bis etwa 48 Stunden, vorzugsweise 16 Stunden, bei einer Temperatur von etwa 20°C bis etwa 25°C; d. h. Raumtemperatur, hergestellt.

[0040] Die Arylsulfonylaminoverbindung der Formel IV, worin R^{16} Benzyl darstellt, wird aus der entsprechenden Verbindung der Formel V durch Reaktion mit einer Verbindung der Formel $HC\equiv C-CO_2R^1$, worin R^1 (C_1-C_6)Alkyl darstellt, in Gegenwart einer Base, wie Kaliumcarbonat, Cäsiumcarbonat, Kaliumhexamethyldisilazid, Natriumhydrid oder Tetrabutylammoniumfluorid, vorzugsweise Cäsiumcarbonat, hergestellt. Die Reaktion wird in einem polaren Lösungsmittel, wie Dimethylformamid, N-Methylpyrrolidin-2-on oder t-Butanol, bei Raumtemperatur für einen Zeitraum zwischen etwa 2 Stunden bis etwa 48 Stunden, vorzugsweise etwa 18 Stunden, gerührt.

[0041] Die Verbindung der Formel V, worin R^{16} Benzyl darstellt, wird aus der entsprechenden Verbindung der Formel VI durch Reaktion mit einem reaktiven funktionellen Derivat einer Arylsulfonsäureverbindung der Formel



IX

in Gegenwart einer Base, wie Triethylamin, und einem polaren Lösungsmittel, wie Tetrahydrofuran, 1,2-Dimethoxyethan, Dimethylformamid, Dioxan, Wasser oder Acetonitril, vorzugsweise Dimethylformamid, hergestellt. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur für einen Zeitraum zwischen etwa 10 Minuten bis etwa 24 Stunden, vorzugsweise etwa 60 Minuten, gerührt.

[0042] Verbindungen der Formel VI können aus Verbindungen der Formel VIII durch Behandlung mit einem Metallazid, wie Natriumazid, in einem polaren Lösungsmittel, wie DMF, bei Raumtemperatur, gefolgt von Reduktion des so gebildeten Zwischenproduktazids der Formel VII, durch Hydrogenolyse über Palladium in einem alkoholischen Lösungsmittel, das mindestens ein Äquivalent einer Mineralsäure, wie Salzsäure, enthält, hergestellt werden. Die Gruppe R^{16} der Formel VI kann in andere Gruppen R^{16} durch Erhitzen der Verbindungen der Formel VI mit einem Überschuss des gewünschten Alkohols $R^{16}OH$ in Toluol in Gegenwart eines Äquivalents von p-Toluolsulfonsäure unter Rückfluss umgewandelt werden.

[0043] Verbindungen der Formel VIII und IX sind kommerziell erhältlich oder können durch dem Durchschnittsfachmann gut bekannte Verfahren hergestellt werden.

[0044] Pharmazeutisch akzeptable Salze der erfindungsgemäßen sauren Verbindungen sind Salze, die mit Basen gebildet werden, nämlich kationische Salze, wie Alkali- und Erdalkalimetallsalze, wie Natrium-, Lithium-, Kalium-, Calcium-, Magnesium- sowie Ammoniumsalze, wie Ammonium-, Trimethylammonium-, Diethylammonium- und Tris(hydroxymethyl)methylammoniumsalze.

[0045] In ähnlicher Weise werden Säureadditionssalze, wie von Mineralsäuren, organischen Carbon- und organischen Sulfonsäuren, wie Salzsäure, Methansulfonsäure, Maleinsäure, auch möglicherweise mit einer basischen Gruppe, wie Pyridyl, die einen Teil der Struktur ausmachen, bereitgestellt.

[0046] Die Verbindungen der Formel I, die basischer Beschaffenheit sind, können eine breite Vielzahl von verschiedenen Salzen mit verschiedenen anorganischen und organischen Säuren bilden. Obwohl solche Salze zur Verabreichung an Lebewesen pharmazeutisch akzeptabel sein müssen, ist es häufig in der Praxis erwünscht, anfänglich eine Verbindung der Formel I aus dem Reaktionsgemisch als ein pharmazeutisch nicht akzeptables Salz zu isolieren und dann einfach das Letztere zurück zu der freien Basenverbindung durch Behandlung mit einem alkalischen Reagenz umzuwandeln und anschließend die freie Base zu einem pharmazeutisch akzeptablen Säureadditionssalz umzuwandeln. Die Säureadditionssalze der erfindungsgemäßen Basenverbindungen werden leicht durch Behandeln der Basenverbindung mit einer im Wesentlichen äquivalenten Menge der ausgewählten Mineral- oder organischen Säure in einem wässrigen Lösungsmittelmedium oder

in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, wie Methanol oder Ethanol, hergestellt. Nach vorsichtiger Verdampfung des Lösungsmittels wird das gewünschte feste Salz erhalten.

[0047] Die Säuren, die verwendet werden können, um die pharmazeutisch akzeptablen Säureadditionssalze der erfindungsgemäßen Basenverbindungen herzustellen, sind jene, die nicht-toxische Säureadditionssalze bilden; d. h. Salze, die pharmakologisch akzeptable Anionen enthalten, wie die Hydrochlorid-, Hydrobromid-, Hydrojodid-, Nitrat-, Sulfat- oder Bisulfat-, Phosphat- oder sauren Phosphat-, Acetat-, Lactat-, Citrat- oder sauren Citrat-, Tartrat-, Bitartrat-, Succinat-, Maleat-, Fumarat-, Gluconat-, Saccharat-, Benzoat-, Methansulfonat- und Pamoat- [d. h. 1,1'-Methylen-bis-(2-hydroxy-3-naphthoat)]-Salze.

[0048] Jene Verbindungen der Formel I, die auch saurer Beschaffenheit sind, beispielsweise, worin R³ Wasserstoff darstellt, können Basensalze mit verschiedenen pharmakologisch akzeptablen Kationen bilden. Beispiele für solche Salze schließen die Alkalimetall- und Erdalkalimetallsalze und insbesondere die Natrium- und Kaliumsalze ein. Diese Salze werden alle durch herkömmliche Techniken hergestellt. Die chemischen Basen, die als Reagenzien zum Herstellen der pharmazeutisch akzeptablen Basensalze dieser Erfindung verwendet werden, sind jene, die nicht-toxische Basensalze mit den hierin beschriebenen sauren Verbindungen der Formel I bilden. Diese nicht-toxischen Basensalze schließen jene, abgeleitet von solchen pharmakologisch akzeptablen Kationen, wie Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium usw., ein. Diese Salze können leicht durch Behandeln der entsprechenden sauren Verbindungen mit einer wässrigen Lösung, die die gewünschten, pharmakologisch akzeptablen Kationen enthält, und dann Eindampfen der erhaltenen Lösung zur Trockne, vorzugsweise unter vermindertem Druck, hergestellt werden. Alternativ können sie auch durch Vermischen niederalkanolischer Lösungen der sauren Verbindungen und des gewünschten Alkalimetallalkoxids miteinander und dann Eindampfen der erhaltenen Lösung zur Trockne in der gleichen Weise wie vorstehend hergestellt werden. In jedem Fall werden vorzugsweise stöchiometrische Mengen an Reagenzien angewendet, um Vollständigkeit von Reaktion und maximale Produktausbeuten zu sichern.

[0049] Die Fähigkeit der Verbindungen der Formel I oder deren pharmazeutisch akzeptablen Salze (nachstehend auch als MMP-13 selektive erfindungsgemäße Verbindungen bezeichnet) zum Inhibieren von Matrixmetalloproteinasen, vorzugsweise 2, 9 oder 13, besonders bevorzugt MMP-13, und folglich das Aufzeigen ihrer Wirksamkeit zum Behandeln von Erkrankungen, die durch Matrixmetalloproteinaseinhibierung gekennzeichnet sind, wird durch die nachstehenden in vitro-Assaytests gezeigt.

Biologisches Assay

Inhibierung von Human Collagenase (MMP-1)

[0050] Humane rekombinante Collagenase wird mit Trypsin unter Verwendung des nachstehenden Verhältnisses aktiviert: 10 µg Trypsin pro 100 µg Collagenase. Das Trypsin und Collagenase werden bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert, dann wird ein fünffacher Überschuss (50 µg/10 µg Trypsin) Sojabohnentrypsininhibitor zugegeben.

[0051] 10 mM Stammlösungen Inhibitoren werden in Dimethylsulfoxid aufgefüllt und dann unter Verwendung des nachstehenden Schemas verdünnt:

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

[0052] Fünfundzwanzig Mikroliter von jeder Konzentration werden dann in dreifacher Ausführung zu geeigneten Vertiefungen einer 96-Vertiefungs-Mikrofluorplatte gegeben. Die Endkonzentration an Inhibitor wird eine 1 : 4-Verdünnung nach Zugabe von Enzym und Substrat sein. Positive Kontrollen (Enzym, kein Inhibitor) werden in Vertiefungen D1–D6 eingefüllt und Blindproben (kein Enzym, keine Inhibitoren) werden in Vertiefungen D7–D12 eingefüllt.

[0053] Collagenase wird auf 400 ng/ml verdünnt und 25 µl werden dann zu geeigneten Vertiefungen der Mikrofluorplatte gegeben. Die Endkonzentration an Collagenase in dem Assay ist 100 ng/ml.

[0054] Substrat (DNP-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(NMA)-NH₂) wird als ein 5 mM Stamm in Dimethylsulfoxid aufgefüllt und dann auf 20 mM in Assaypuffer verdünnt. Das Assay wird durch die Zugabe von 50 µl Substrat pro Vertiefung der Mikrofluorplatte gestartet, unter Gewinnung einer Endkonzentration von 10 µM.

[0055] Fluoreszenzablesungen (360 nM Anregung, 460 nm Emission) wurden zur Zeit 0 und dann bei 20-Minuten-Intervallen vorgenommen. Das Assay wird bei Raumtemperatur mit einer typischen Assayzeit von 3

Stunden durchgeführt.

[0056] Fluoreszenz gegen die Zeit wird dann für sowohl die Blind- als auch Collagenase-enthaltenden Proben aufgetragen (Daten aus dreifachen Bestimmungen werden gemittelt). Ein Zeitpunkt, der ein gutes Signal liefert (die Blindprobe) und der auf einem linearen Teil der Kurve vorliegt (gewöhnlich rund 120 Minuten), wird zum Bestimmen von IC_{50} -Werten ausgewählt. Die Zeit null wird als eine Blindprobe für jede Verbindung bei jeder Konzentration verwendet, und diese Werte werden von den 120-Minuten-Daten subtrahiert. Die Daten werden als Inhibitorkonzentration gegen % Kontrolle (Inhibitorfluoreszenz, geteilt durch Fluoreszenz von Collagenase allein $\times 100$) aufgetragen. IC_{50} werden aus der Konzentration von Inhibitor bestimmt, was ein Signal ergibt, das 50% der Kontrolle darstellt.

[0057] Wenn IC_{50} als $<0,03 \mu\text{M}$ mitgeteilt werden, dann werden die Inhibitoren bei Konzentrationen von $0,3 \mu\text{M}$, $0,03 \mu\text{M}$, $0,03 \mu\text{M}$ und $0,003 \mu\text{M}$ bestimmt.

Inhibierung von MMP-13

[0058] Humanes rekombinantes MMP-13 wird mit 2 mM APMA (p-Aminophenylquecksilberacetat) für 1,5 Stunden bei 37°C aktiviert und wird auf 400 mg/ml in Assaypuffer (50 mM Tris, pH 7,5, 200 mM Natriumchlorid, 5 mM Calciumchlorid, $20 \mu\text{M}$ Zinkchlorid, 0,02% Brij) verdünnt. Fünfundzwanzig Mikroliter von verdünntem Enzym werden pro Vertiefung einer 96-Vertiefungs-Mikrofluorplatte zugegeben. Das Enzym wird dann in einem 1 : 4-Verhältnis in dem Assay durch die Zugabe von Inhibitor und Substrat verdünnt, unter Gewinnung einer Endkonzentration in dem Assay von 100 mg/ml.

[0059] 10 mM Stammlösungen von Inhibitoren werden in Dimethylsulfoxid aufgefüllt und dann in Assaypuffer als pro dem Inhibitorverdünnungsschema zur Inhibierung von Humancollagenase (MMP-1) aufgefüllt: Fünfundzwanzig Mikroliter von jeder Konzentration werden in dreifacher Ausführung zu der Mikrofluorplatte gegeben. Die Endkonzentrationen in dem Assay sind $30 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $0,3 \mu\text{M}$ und $0,03 \mu\text{M}$.

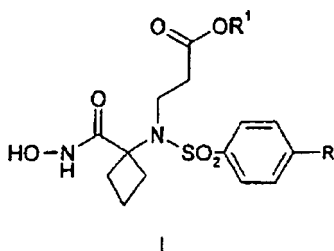
[0060] Substrat (Dnp-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(NMA)- NH_2) wird für die Inhibierung von Humancollagenase (MMP-1) hergestellt und 50 ml werden zu jeder Vertiefung gegeben, um eine Endkonzentration von $10 \mu\text{M}$ zu ergeben. Fluoreszenzablesungen (360 nM Anregung, 450 Emission) werden zur Zeit 0 und alle 5 Minuten für 1 Stunde vorgenommen.

[0061] Positive Kontrollen bestehen aus Enzym und Substrat ohne Inhibitor und Blindproben bestehen nur aus Substrat.

[0062] IC_{50} werden als pro Inhibierung Humancollagenase (MMP-1) bestimmt. Wenn IC_{50} als weniger als $0,03 \mu\text{M}$ mitgeteilt werden, dann werden Inhibitoren auf die Endkonzentrationen von $0,3 \mu\text{M}$, $0,03 \mu\text{M}$, $0,003 \mu\text{M}$ und $0,0003 \mu\text{M}$ bestimmt.

[0063] Die erfindungsgemäßen Verbindungen besitzen überraschenderweise selektive Wirksamkeit gegen Matrixmetalloproteinase-13 (Collagenase 3), verglichen mit Matrixmetalloproteinase-1 (Collagenase 1). Insbesondere können Verbindungen der Formel I 100-fach selektiver für Matrixmetalloproteinase-13 (Collagenase 3) sein als Matrixmetalloproteinase-1 (Collagenase 1) und haben IC_{50} -Werte von weniger als 10 nM gegen Matrixmetalloproteinase-13 (Collagenase 3). Tabelle 1 zeigt, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen unerwartete Selektivität für MMP-13-Inhibierung besitzen.

TABELLE 1



Beispiel	R ¹	R	MMP-1	MMP-13
			IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
1	H	4-Fluorphenoxy	90	0,6
1	Ethyl	4-Fluorphenoxy	18	0,6

Inhibierung von Gelatinase (MMP-2)

[0064] Humane rekombinante 72 kD Gelatinase (MMP-2 Gelatinase A) wird für 16–18 Stunden mit 1 mM p-Aminophenylquecksilberacetat (aus frisch hergestelltem 100 mM Stamm in 0,2 N NaOH) bei 4°C, mildem Schütteln, aktiviert.

[0065] 10 nM Dimethylsulfoxid-Stammlösungen von Inhibitoren werden seriell in Assaypuffer (50 mM TRIS, pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 20 µM ZnCl₂ und 0,02% BRIJ-35 (Volumen/Volumen)), unter Verwendung des nachstehenden Schemas, verdünnt:
10 mM → 120 µM → 12 µM → 1,2 µM → 0,12 µM

[0066] Weitere Verdünnungen werden, falls notwendig, gemäß diesem gleichen Schema ausgeführt. Ein Minimum an vier Inhibitorkonzentrationen für jede Verbindung wird in jedem Assay durchgeführt. 25 µl von jeder Konzentration werden dann zu dreifachen Vertiefungen einer schwarzen, U-förmigen 96-Vertiefungs-Mikrofluorplatte gegeben. Wenn das Endassayvolumen 100 µl ist, werden Endkonzentrationen an Inhibitor eine weitere 1 : 4-Verdünnung ergeben (d. h. 30 mM → 3 µM → 0,3 µM → 0,03 µM, usw.). Eine Blindprobe (kein Enzym, kein Inhibitor) und eine positive Enzymkontrolle (mit Enzym, ohne Inhibitor) werden ebenfalls in dreifacher Ausführung hergestellt.

[0067] Aktiviertes Enzym wird auf 100 ng/ml in Assaypuffer verdünnt. 25 µl pro Vertiefung werden zu geeigneten Vertiefungen der Mikroplatte gegeben. Die Enzymendkonzentration in dem Assay ist 25 ng/ml (0,34 nM).

[0068] Eine fünf mM Dimethylsulfoxidstammlösung von Substrat (Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂) wird in Assaypuffer auf 20 µM verdünnt. Das Assay wird durch Zugabe von 50 µl verdünntes Substrat gestartet, was eine Assayendkonzentration von 10 µM Substrat ergibt. Zum Zeitpunkt null wird sofort Ablesen der Fluoreszenz (320 Anregung, 390 Emission) vorgenommen und anschließende Ablesungen werden alle fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur mit einem PerSeptive Biosystems CytoFluor Multi-Well Plate Reader mit dem Ziel bei 90 Einheiten vorgenommen.

[0069] Der Mittelwert von Fluoreszenz des Enzyms und der Blindprobe werden gegen die Zeit aufgetragen. Ein früher Zeitpunkt auf dem linearen Teil der Kurve wird für IC₅₀-Bestimmungen ausgewählt. Der Null-Zeitpunkt für jede Verbindung an jeder Verdünnung wird von dem späteren Zeitpunkt subtrahiert und die Daten werden als Prozent Enzymkontrolle (Inhibitor Fluoreszenz, geteilt durch Fluoreszenz positive Enzymkontrolle × 100) exprimiert. Die Daten werden als Inhibitorkonzentration gegen Prozent Enzymkontrolle aufgetragen. IC₅₀ werden als die Konzentration an Inhibitor definiert, die ein Signal ergibt, das 50% der positiven Enzymkontrolle ist.

Inhibierung von Stromelysin-Wirksamkeit (MMP-3)

[0070] Humanes rekombinantes Stromelysin (MMP-3, Stromelysin-1) wird für 20–22 Stunden mit 2 mM p-Aminophenylquecksilberacetat (aus frisch hergestelltem 100 mM Stamm in 0,2 N NaOH) bei 37°C aktiviert.

[0071] 10 mM Dimethylsulfoxid-Stammlösungen von Inhibitoren werden seriell in Assaypuffer (50 mM TRIS, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ und 0,05% BRIJ-35 (Volumen/Volumen)), unter Verwendung des nachstehenden Schemas, verdünnt:
10 mM → 120 µM → 12 µM → 1,2 µM → 0,12 µM

[0072] Weitere Verdünnungen werden, falls erforderlich, gemäß diesem gleichen Schema ausgeführt. Ein Minimum an vier Inhibitorkonzentrationen für jede Verbindung wird in jedem Assay durchgeführt. 25 µl von jeder Konzentration werden dann zu dreifachen Vertiefungen einer schwarzen, U-förmigen 96-Vertiefungs-Mikrofluorplatte gegeben. Wenn das Endassayvolumen 100 µl ist, werden die Endkonzentrationen an Inhibitor das Ergebnis einer weiteren 1 : 4-Verdünnung sein (d. h. 30 mM → 3 µM → 0,3 µM → 0,03 µM, usw.). Eine Blindprobe (kein Enzym, kein Inhibitor) und eine positive Enzymkontrolle (mit Enzym, ohne Inhibitor) werden auch in drei-

facher Ausführung hergestellt.

[0073] Aktiviertes Enzym wird auf 200 ng/ml in Assaypuffer verdünnt. 25 µl pro Vertiefung werden zu geeigneten Vertiefungen der Mikroplatte gegeben. Die Enzymendkonzentration in dem Assay ist 50 ng/ml (0,875 nM).

[0074] Eine zehn mM Dimethylsulfoxidstammlösung von Substrat (Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH₂) wird in Assaypuffer auf 6 µM verdünnt. Das Assay wird durch Zugabe von 50 µl verdünntem Substrat gestartet, was eine Assayendkonzentration von 3 µM Substrat ergibt. Zur Zeit null wird sofort Ablesen der Fluoreszenz (320 Anregung, 390 Emission) vorgenommen und anschließend werden Ablesungen alle fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur mit einem PerSeptive Biosystems CytoFluor Multi-Well Plate Reader mit dem Zuwachs bei 90 Einheiten genommen.

[0075] Der Mittelwert von Fluoreszenz des Enzyms und der Blindprobe werden gegen die Zeit aufgetragen. Ein früher Zeitpunkt auf dem linearen Teil dieser Kurve wird für IC₅₀-Bestimmungen ausgewählt. Der Null-Zeitpunkt für jede Verbindung an jeder Verdünnung wird von dem späteren Zeitpunkt subtrahiert und die Daten dann als Prozent Enzymkontrolle (Inhibitor Fluoreszenz, geteilt durch Fluoreszenz positive Enzymkontrolle × 100) ausgedrückt. Die Daten werden als Inhibitorkonzentration gegen Prozent Enzymkontrolle aufgetragen. IC₅₀ werden als die Konzentration an Inhibitor definiert, die ein Signal ergeben, das 50% der positiven Enzymkontrolle ist.

[0076] Alternativ kann Inhibierung von Stromelysinwirksamkeit unter Verwendung von Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH₂ (3 µM), unter Bedingungen, die ähnlich wie bei der Inhibierung von Humancollagenase (MMP-1) sind, bestimmt werden.

[0077] Humanstromelysin wird für 20–24 Stunden bei 37°C mit 2 mM APMA (p-Aminophenylquecksilberacetat) aktiviert und wird verdünnt, unter Gewinnung einer Endkonzentration in dem Assay von 50 ng/ml. Inhibitoren werden wie für die Inhibierung von Humancollagenase (MMP-1) verdünnt, unter Gewinnung von Endkonzentrationen in dem Assay von 30 µM, 3 µM, 0,3 µM und 0,03 µM. Jede Konzentration wird dreifach ausgeführt.

[0078] Fluoreszenzablesungen (320 nm Anregung, 390 Emission) werden zum Zeitpunkt null und dann bei 15-Minuten-Intervallen für 3 Stunden genommen.

[0079] IC₅₀-Werte werden als pro Inhibierung von Humancollagenase (MMP-1) bestimmt. Wenn IC₅₀ als weniger als 0,03 µM berichtet werden, dann werden die Inhibitoren bei Endkonzentrationen von 0,03 µM, 0,003 µM, 0,0003 µM und 0,00003 µM bestimmt.

[0080] IC₅₀-Werte werden in der gleichen Weise wie für Collagenase bestimmt.

Inhibierung von TNF-Erzeugung

[0081] Die Fähigkeit der Verbindungen oder der pharmazeutisch akzeptablen Salze derselben zum Inhibieren der Erzeugung von TNF und folglich das Aufzeigen ihrer Wirksamkeit zum Behandeln von Erkrankungen, die die Erzeugung von TNF einbeziehen, wird durch das nachstehende in vitro-Assay gezeigt:

[0082] Humane, einkernige Zellen wurden aus anti-koaguliertem, humanem Blut, unter Verwendung einer Ein-Schritt-Ficoll-Hypaque-Trenntechnik, isoliert. (2) Die einkernigen Zellen wurden dreimal in Hanks-ausgleichener Salzlösung (HBSS) mit zweibindigen Kationen gewaschen und zu einer Dichte von 2 × 10⁶/ml in HBSS, enthaltend 1% BSA, resuspendiert. Verschiedene, unter Verwendung des Abbott Cell Dyn 3500 Analysators bestimmte Zählungen wiesen aus, dass Monozyten im Bereich von 17 bis 24% der Gesamtzellen in diesen Zubereitungen liegen.

[0083] 180 µl der Zellsuspension wurden zu Flachboden 96-Vertiefungs-Platten (Costar) aliquot gegeben. Zugaben von Verbindungen und LPS (100 ng/ml Endkonzentration) ergaben ein Endvolumen von 200 µl. Alle Bedingungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Nach einem Inkubationszeitraum von vier Stunden bei 37°C in einem befeuchteten CO₂-Inkubator wurden die Platten entfernt und zentrifugiert (10 Minuten bei ungefähr 250 × G) und die Überstände entfernt und auf TNFα, unter Verwendung des R & D ELISA Kits, bestimmt.

Inhibierung von löslicher TNF α -Erzeugung

[0084] Die Fähigkeit der Verbindungen oder der pharmazeutisch akzeptablen Salze derselben zum Inhibieren von cellulärer Freisetzung von TNF α und folglich Aufzeigen ihrer Wirksamkeit zum Behandeln von Erkrankungen, unter Einbezug der Disregulation von löslichem TNF α , wird durch das nachstehende in vitro-Assay gezeigt:

Verfahren für die Bewertung von rekombinanter TNF α -umwandelnder Enzym-Aktivität

Expression von rekombinanter TACE

[0085] Ein DNA-Fragment, das für die Signalsequenz, Preprodomain, Prodomain und katalytische Domain von TACE (Aminosäuren 1-473) codiert, kann durch Polymerasekettenreaktion, unter Verwendung einer Humanlungen-cDNA-Library als ein Templat, erweitert werden. Das erweiterte Fragment wird dann in pFastBac-Vektor geklont. Die DNA-Sequenz des Inserts wird für beide Stränge bestätigt. Ein Bacmid, hergestellt unter Verwendung von pFastBac in E. coli DH10Bac, wird in SF9-Insektenzellen transfiziert. Die Viruspartikel werden dann auf P1-, P2-, P3-Stufen erweitert. Der P3-Virus wird in sowohl SF9- als auch High Five Insektenzellen infiziert und bei 27°C für 48 Stunden wachsen lassen. Das Medium wird gesammelt und für Assays und weitere Reinigung verwendet.

Herstellung von fluoreszierendem, gequenchem Substrat

[0086] Ein peptidisches TNF α -Modellsubstrat (LY-LeucinAlaninGlutaminAlaninValinArgininSerinSerinLysin(CTMR)-Arginin (LY = Lucifer Yellow; CTMR = Carboxytetramethyl-Rhodamin)) wird hergestellt und die Konzentration durch Absorption bei 560 nm ($E_{560} 60\ 000\ \text{M}^{-1}\text{CM}^{-1}$) gemäß dem Verfahren von Geoghegan, KF, „Improved method for converting an unmodified peptide to an energy-transfer Substrate for a proteinase.“ Bioconjugate Chem. 7, 385–391 (1995) hergestellt. Dieses Peptid umfasst die Spaltungsstelle auf pro-TNF, welches in vivo durch TACE gespalten wird.

Expression von rekombinatem TACE

[0087] Ein DNA-Fragment, das für die Signalsequenz, Preprodomain, Prodomain und katalytische Domain von TACE (Aminosäuren 1-473) codiert, wird durch Polymerasekettenreaktion, unter Verwendung einer humanen Lungen-cDNA-Library als ein Templat, erweitert. Das erweiterte Fragment wird in pFastBac-Vektor geklont. Die DNA-Sequenz des Inserts wird für beide Stränge bestätigt. Ein unter Verwendung von pFastBac in E. coli DH10Bac hergestelltes Bacmid wird in SF9-Insektenzellen transfiziert. Die Viruspartikel werden auf P1-, P2-, P3-Stufen erweitert. Der P3-Virus wird in sowohl SF9- als auch High Five Insektenzellen infiziert und bei 27°C für 48 Stunden wachsen lassen. Das Medium wird gesammelt und für Assays und weitere Reinigung verwendet.

Enzymreaktion

[0088] Die Reaktion, ausgeführt in einer 96-Vertiefungs-Platte (Dynatech), umfasst 70 μl Pufferlösung (25 mM Hepes-HCl, pH 7,5, plus 20 μM ZnCl₂), 10 μM Fluoreszenz-gequenches Substrat, 10 μl einer DMSO-(5%)-Lösung von Testverbindung und einer Menge von r-TACE-Enzym, das 50% Spaltung in 60 Minuten in einem Gesamtvolumen von 100 μl verursachen wird. Die Spezifität der Enzymspaltung an der Amidbindung zwischen Alanin und Valin wird durch HPLC- und Massenspektrometrie verifiziert. Anfängliche Geschwindigkeiten der Spaltung werden durch Messen der Anstiegsgeschwindigkeit der Fluoreszenz bei 530 nm (Anregung bei 409 nm) innerhalb 30 Minuten verfolgt. Der Versuch wird wie nachstehend gesteuert: 1) für Hintergrundfluoreszenz von Substrat; 2) für Fluoreszenz von vollständig gespaltenem Substrat; 3) für Fluoreszenzquenchen oder Vergrößerung von Lösungen, die die Testverbindung enthalten.

[0089] Die Daten werden wie nachstehend analysiert. Die Geschwindigkeiten aus der Nicht-Test-Verbindung, enthaltend „Kontroll“reaktionen, wurden zum Einstellen des 100%-wertes gemittelt. Die Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart von Testverbindung wurde mit jener in Abwesenheit von Verbindung verglichen und als „Prozent Nicht-Test-Verbindung enthaltende Kontrolle“ tabellarisch angeführt. Die Ergebnisse werden als „% Kontrolle“ gegen den Logarithmus der Verbindungskonzentration oder einen halb-maximalen Punkt oder IC₅₀-Wert bestimmt.

[0090] Alle erfindungsgemäßen Verbindungen haben IC₅₀ von weniger als 1 μM , vorzugsweise weniger als

50 nM. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen sind mindestens 100-fach weniger stark gegen r-MMP-1 als in dem vorstehenden TACE-Assay.

Humanes Monozyten-Assay

[0091] Humane einkernige Zellen werden aus gerinnungsgehemmtem Humanblut, unter Verwendung einer Ein-Schritt-Ficoll-Hypaque-Trenntechnik, isoliert. (2) Die einkernigen Zellen werden drei Mal in Hanks ausgeglichener Salzlösung (HBSS) mit zweiwertigen Kationen gewaschen und zu einer Dichte von 2×10^6 /ml in HBSS, enthaltend 1% BSA, resuspendiert. Verschiedene Zählungen, bestimmt unter Verwendung des Abbott Cell Dyn 3500 Analysators, wiesen aus, dass Monozyten im Bereich von 17 bis 24% der Gesamtzellen in diesen Zubereitungen lagen.

[0092] 180 μ l der Zellsuspension wurden in Flachboden-96-Vertiefungs-Platten (Costar) in aliquoten Mengen eingefüllt. Zugaben von Verbindungen und LPS (100 ng/ml Endkonzentration) ergaben ein Endvolumen von 200 μ l. Alle Bedingungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Nach einer Inkubation für vier Stunden bei 37°C in einem befeuchteten CO₂-Inkubator wurden die Platten entfernt und zentrifugiert (10 Minuten bei ungefähr 250 \times G) und die Überstände entfernt und auf TNF α , unter Verwendung des R & D ELISA Kits, bestimmt.

Aggrecanase Assay

[0093] Primäre Schweine-Chondrozyten von künstlichem Gelenksknorpel werden durch aufeinanderfolgende Trypsin- und Collagenasedigestion, gefolgt von Collagenasedigestion, über Nacht isoliert und werden bei 2×10^5 Zellen pro Vertiefung in 48-Vertiefungs-Platten mit 5 μ Ci/ml ³⁵S (1000 Ci/mMol) Schwefel in Typ-I-Collagen-beschichteten Platten angeordnet. Die Zellen ließ man die Markierung in ihre Proteoglycanmatrix (ungefähr 1 Woche) bei 37°C, unter einer Atmosphäre von 5% CO₂, einbauen.

[0094] Die Nacht vor dem Start des Assays werden die Chondrozyteneinschichten zwei Mal in DMEM/1% PSF/G gewaschen und dann in frischem DMEM/1% FBS über Nacht inkubieren lassen.

[0095] Die Chondrozyten am nächsten Morgen werden ein Mal in DMEM/1% PSF/G gewaschen. Die Endwaschung wird auf den Platten in dem Inkubator, unter Erzeugung von Verdünnungen, absetzen lassen.

[0096] Medien und Verdünnungen können wie in der nachstehenden Tabelle beschrieben hergestellt werden.

Kontrollmedien	DMEM allein (Kontrollmedien)
IL-1-Medien	DMEM + IL-1 (5 ng/ml)
Arzneimittelerdünnungen	Erzeugung aller Verbindungsstämme bei 10 mM in DMSO. Erzeugung eines 100 μ M Stamms von jeder Verbindung in DMEM in 96-Vertiefungsplatte. Lagerung im Kühlschrank über Nacht. Am nächsten Tag Ausführen serieller Verdünnungen in DMEM mit IL-1 auf 5 μ M, 500 nM und 50 nM. Belüften der Endwaschung von Vertiefungen und Zugeben von 50 μ l Verbindung aus vorstehenden Verdünnungen auf 450 μ l von IL-1-Medien in geeigneten Vertiefungen der 48-Vertiefungsplatten. Endverbindungskonzentrationen gleich 500 nM, 50 nM und 5 nM. Alle Proben vollständig in dreifacher Ausführung mit Kontrolle und IL-1-Proben allein auf jeder Platte.

[0097] Die Platten werden markiert und nur die inneren 24 Vertiefungen der Platte werden verwendet. Auf einer der Platten werden verschiedene Spalten als IL-1 (kein Arzneistoff) und Kontrolle (kein IL-1, kein Arzneistoff) gekennzeichnet. Diese Kontrollspalten werden periodisch gezählt, um ³⁵S-Proteoglycanfreisetzung zu

verfolgen. Kontrolle und IL-1-Medien werden zu Vertiefungen (450 µl), gefolgt von Verbindung (50 µl), um das Assay zu starten, gegeben. Die Platten werden bei 37°C mit einer 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert.

[0098] Bei 40–50% Freisetzung (wenn CPM von IL-1-Medien 4–5-fache Kontrollmedien sind), wie bewertet durch Flüssig-Szintillationszählen (LSC) von Medienproben, wird das Assay beendet (9–12 Stunden). Die Medien werden von allen Vertiefungen entfernt und in Szintillationsröhrchen angeordnet. Das Szintillat wird zugegeben und radioaktiven Zählungen werden erhalten (LSC). Um Zellschichten zu solubilisieren, werden 500 µl Papain Digestionspuffer (0,2 M Tris, pH 7,0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT und 1 mg/ml Papain) zu jeder Vertiefung gegeben. Die Platten mit Digestionslösung werden bei 60°C über Nacht inkubiert. Die Zellschicht wird von den Platten am nächsten Tag entfernt und in Szintillationsröhrchen angeordnet. Das Szintillat wird dann zugesetzt und die Proben gezählt (LSC).

[0099] Der Prozentsatz freigesetzter Zählereignisse aus dem gesamt Vorliegenden in jeder Vertiefung wird bestimmt. Mittelwerte von dreifachen Ausführungen werden errechnet, wobei der Kontrollhintergrund von jeder Vertiefung subtrahiert wird. Der Prozentsatz an Verbindungsinhibierung wird auf IL-1-Proben als 0% Inhibierung (100% Gesamtzählungen) bezogen.

[0100] Zur Verabreichung an Menschen zur Inhibierung von Matrixmetalloproteinase-13 oder die Erzeugung von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) kann eine Vielzahl von herkömmlichen Wegen, einschließlich oral, parenteral und örtlich, angewendet werden. Im Allgemeinen wird der Wirkstoff oral oder parenteral bei Dosierungen zwischen etwa 0,1 und 25 mg/kg Körpergewicht an den zu behandelnden Patienten pro Tag, vorzugsweise etwa 0,3 bis 5 mg/kg, verabreicht. Jedoch wird eine gewisse Variation in der Dosierung notwendigerweise in Abhängigkeit von dem Zustand des zu behandelnden Patienten auftreten. Die für die Verabreichung verantwortliche Person wird in jedem Fall die für den jeweiligen Patienten geeignete Dosis bestimmen.

[0101] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können im Allgemeinen über eine breite Vielzahl von verschiedenen Dosierungsformen verabreicht werden, wobei die erfindungsgemäßen, therapeutisch wirksamen Verbindungen in solchen Dosierungsformen bei Konzentrationsspiegeln im Bereich von etwa 5,0% bis etwa 70 Gewichtsprozent vorliegen.

[0102] Zur oralen Verabreichung können Tabletten, die verschiedene Exzipienten, wie mikrokristalline Cellulose, Natriumcitrat, Calciumcarbonat, Dicalciumphosphat und Glycin, enthalten, zusammen mit verschiedenen Sprengmitteln, wie Stärke (und vorzugsweise Mais-, Kartoffel- oder Tapiokastärke), Alginsäure und bestimmten Komplexsilikaten, zusammen mit Granulierungsbindemitteln, wie Polyvinylpyrrolidon, Saccharose, Gelatine und Acacia, angewendet werden. Zusätzlich sind Gleitmittel, wie Magnesiumstearat, Natriumlaurylsulfat und Talkum, häufig für Tablettierungszwecke verwendbar. Feste Zusammensetzungen eines ähnlichen Typs können auch als Füllstoffe in Gelatine kapseln angewendet werden, wobei bevorzugte Materialien in diesem Zusammenhang auch Lactose oder Milchzucker sowie Polyethylenglycole mit hohem Molekulargewicht einschließen. Wenn wässrige Suspensionen und/oder Elixiere zur oralen Verabreichung erwünscht sind, kann der Wirkstoff mit verschiedenen Süßungs- oder Geschmacksmitteln, färbenden Stoffen oder Farbstoffen und, falls so gewünscht, emulgierenden oder suspendierenden Mitteln, sowie zusammen mit solchen Verdünnungsmitteln, wie Wasser, Ethanol, Propylenglycol, Glycerin und verschiedenen ähnlichen Kombinationen davon, kombiniert werden.

[0103] Zur parenteralen Verabreichung (intramuskuläre, intraperitoneale, subkutane und intravenöse Verwendung) wird gewöhnlich eine sterile, injizierbare Lösung des Wirkstoffs hergestellt. Lösungen einer therapeutischen Verbindung der vorliegenden Erfindung in entweder Sesam- oder Erdnussöl oder in wässrigem Propylenglycol können angewendet werden. Die wässrigen Lösungen sollten geeigneterweise eingestellt und gepuffert sein, vorzugsweise bei einem pH-Wert von größer als 8, falls erforderlich, und das flüssige Verdünnungsmittel zuerst isotonisch gemacht werden. Diese wässrigen Lösungen sind für intravenöse Injektionszwecke geeignet. Die öligen Lösungen sind für intraartikuläre, intramuskuläre und subkutane Injektionszwecke geeignet. Die Herstellung von allen diesen Lösungen unter sterilen Bedingungen wird leicht durch dem Fachmann gut bekannte pharmazeutische Standardtechniken ausgeführt.

[0104] Zur örtlichen okularen Verabreichung kann direkte Auftragung auf das befallene Auge in Form einer Formulierung, wie Augentropfen, Aerosol, Gele oder Salben, angewendet werden, oder kann in Collagen (wie Poly-2-hydroxyethylmethacrylat und Copolymere davon), oder ein hydrophiles Polymerschild, eingearbeitet werden. Die Materialien können auch als eine Kontaktlinsen- oder über ein lokales Reservoir oder als eine subkonjunktivale Formulierung angewendet werden.

[0105] Zur intraorbitalen Verabreichung wird gewöhnlich eine sterile injizierbare Lösung des Wirkbestandteils hergestellt. Lösungen einer erfindungsgemäßen therapeutischen Verbindung in einer wässrigen Lösung oder Suspension (Teilchengröße weniger als 10 Mikrometer) kann angewendet werden. Die wässrigen Lösungen sollten geeigneterweise eingestellt und gepuffert sein, vorzugsweise bei einem pH-Wert zwischen 5 und 8, falls erforderlich, und das flüssige Verdünnungsmittel zuerst isotonisch gemacht werden. Kleine Mengen Polymere können zur Erhöhung von Viskosität oder zur verzögerten Freisetzung (wie Cellulosepolymere, Dextran, Polyethylenglycol oder Alginsäure) zugesetzt werden. Diese Lösungen sind für intraorbitale Injektionszwecke geeignet. Die Zubereitung von allen diesen Lösungen unter sterilen Bedingungen wird durch pharmazeutische Standardtechniken, die dem Fachmann gut bekannt sind, ausgeführt. Im Fall von Tieren können die Verbindungen intraorbital bei Dosierungsspiegeln von etwa 0,1 bis 50 mg/kg/Tag, vorteilhafterweise 0,2 bis 10 mg/kg/Tag, gegeben in einer einzelnen Dosis oder bis zu 3 verteilten Dosen, verabreicht werden.

[0106] Die erfindungsgemäßen Wirkstoffe können auch in rektalen Zusammensetzungen, wie Suppositorien oder Retentionsklistieren, beispielsweise die herkömmlichen Suppositoriengrundlagen, wie Kakaobutter oder andere Glyceride, enthalten, formuliert werden.

[0107] Zur intranasalen Verabreichung oder Verabreichung durch Inhalation werden die erfindungsgemäßen Wirkstoffe geeigneterweise in Form einer Lösung oder Suspension aus einem Pumpsprühbehälter, der durch den Patienten gequetscht oder gepumpt wird, oder als eine Aerosolprühdarreichung aus einem unter Druck gesetzten Behälter oder Nebulisator, unter Verwendung eines geeigneten Treibmittels, beispielsweise Dichlordifluormethan, Trichlorfluormethan, Dichlortetrafluorethan, Kohlendioxid oder anderem geeigneten Gas, freigesetzt. Im Fall eines unter Druck gesetzten Aerosols kann die Dosierungseinheit durch Bereitstellen eines Ventils zum Freisetzen einer abgemessenen Menge bestimmt werden. Der unter Druck gesetzte Behälter oder Nebulisator kann eine Lösung oder Suspension des Wirkstoffs enthalten. Kapseln und Patronen (beispielsweise aus Gelatine hergestellt) zur Verwendung in einem Inhalator oder Insufflator können formuliert werden, die ein Pulvergemisch einer erfindungsgemäßen Verbindung und einer geeigneten Pulvergrundlage, wie Lactose oder Stärke, enthalten.

[0108] Die nachstehenden Beispiele erläutern die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen. Schmelzpunkte sind unkorrigiert. NMR-Daten werden in Parts per million (δ) angeführt und werden auf das Deuterium-Lock-Signal des Probenlösungsmittels (Deuteriodimethylsulfoxid, sofern nicht anders ausgewiesen) bezogen. Kommerzielle Reagenzien wurden ohne weitere Reinigung verwendet. THF bezieht sich auf Tetrahydrofuran.

[0109] DMF bezieht sich auf N,N-Dimethylformamid. Chromatographie bezieht sich auf Säulenchromatographie, ausgeführt unter Verwendung von 32–63 mm Kieselgel und ausschließlich unter Stickstoffdruck-(Flashchromatographie)-Bedingungen. Raum- oder Umgebungstemperatur bezieht sich auf 20 bis 25°C. Alle nicht-wässrigen Reaktionen wurden zweckmäßigerweise und zur Maximierung von Ausbeuten unter einer Stickstoffatmosphäre laufen lassen. Aufkonzentrierung unter vermindertem Druck bedeutet, dass ein Rotationsverdampfer angewendet wurde.

Beispiel 1

3-[[4-(4-FLUORPHENOXY)PHENYLSULFONYL]-1[(N-HYDROXYCARBAMOYL)CYCLOBUTYL]AMINO]PROPIONSÄURE

A) 1-Azidocyclobutan-1-carbonsäureethylester

[0110] Zu einem Kolben wurde 1-Bromcyclobutan-1-carbonsäureethylester (5,0 g, 25 mMol), Dimethylformamid (120 ml) und Natriumazid (2,43 g, 37,5 mMol) gegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 2 Tage wurde die Reaktion in Ether aufgenommen und mit Wasser gewaschen (3 × 150 ml). Die organische Schicht wurde entfernt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde durch Vakuumfiltration entfernt und das Lösungsmittel durch Rotationsverdampfer entfernt, unter Gewinnung einer farblosen Flüssigkeit, 3,69 g, Ausbeute 87%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1,29 (t, 3H), 2,00 (m, 2H), 2,25 (m, 2H), 2,55 (m, 2H), 4,22 (q, 2H); IR (unverdünnt) 2109 cm^{-1} .

B) 1-Aminocyclobutan-1-carbonsäureethylesterhydrochlorid

[0111] 1-Azidocyclobutan-1-carbonsäureethylester (15,98 g, 94 mMol) wurde über 5% Palladium-auf-Kohlen-

stoff (2 g) mit konzentrierter Salzsäure (8 ml) in Ethanol (250 ml) bei 40 psi Raumtemperatur hydriert. Nach etwa 3 Stunden wurde der Katalysator durch Vakuumfiltration entfernt und das Lösungsmittel durch Rotationsverdampfer entfernt, unter Gewinnung eines weißen Feststoffs, 16,52 g, Ausbeute 97%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1,34 (t, 3H), 2,15 (m, 1H), 2,30 (m, 1H), 2,70 (m, 2H), 2,80 (m, 2H), 4,30 (q, 2H), 9,05 (br s, 2H).

C) 1-Aminocyclobutan-1-carbonsäurebenzylestertosylat

[0112] Zu einem Kolben wurde 1-Aminocyclobutan-1-carbonsäureethylesterhydrochlorid (4,97 g, 29,6 mMol), p-Toluolsulfonsäure (6,27 g, 33 mMol), Benzylalkohol (83 ml) und Toluol (138 ml) gegeben. Die Reaktion wurde 2 Tage mit einer Dean-Stark-Falle unter Rückfluss erhitzt. Nach Kühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel durch Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Ether aufgenommen und in einem Kühlschrank über Nacht gelagert. Der erhaltene weiße Feststoff wurde gesammelt und getrocknet, 5,27 g, 93% Ausbeute.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1,90 (m, 2H), 2,30 (s, 3H), 2,40 (m, 2H), 2,55 (m, 2H), 5,10 (s, 2H), 7,05 (d, 2H), 7,25 (br s, 5H), 7,70 (d, 2H), 8,50 (br s, 2H); Chemisches Ionisationsmassenspektrum bei Atmosphärendruck: 206 ($\text{M}^+ + 1$).

D) 1-[4-(4-Fluorphenoxy)phenylsulfonylamino]cyclobutan-1-carbonsäurebenzylester

[0113] 1-Aminocyclobutan-1-carbonsäurebenzylestertosylat (27,60 g, 70 mMol) wurde in Methylenchlorid aufgenommen und mit einem Überschuss an gesättigter Natriumbicarbonatlösung gewaschen. Die organische Schicht wurde über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde durch Vakuumfiltration entfernt und das Lösungsmittel durch Rotationsverdampfer entfernt. Zu dem Rückstand wurde 4-(4-Fluorphenoxy)phenylsulfonylchlorid (20,10 g, 70 mMol), Triethylamin (8,48 g, 11,6 ml, 84 mMol) und Dimethylformamid (150 ml) gegeben und die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit Ether verdünnt und mit 1 N Salzsäure (3 \times 150 ml), Wasser (2 \times 200 ml) und gesättigter Salzlösung (1 \times 150 ml) gewaschen. Die organische Schicht wurde abgetrennt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde durch Vakuumfiltration entfernt und das Lösungsmittel wurde durch Rotationsverdampfer entfernt, unter Gewinnung eines hellbraunen Feststoffs, 24,45 g. Eine zweite Charge wurde durch sorgfältiges Waschen des Trockenmittels mit Methylenchlorid erhalten, unter Gewinnung nach Verdampfung von 4,2 g eines weißen Feststoffs, Gesamtausbeute 90%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1,95 (m, 2H), 2,45 (m, 2H), 5,00 (s, 2H), 6,95 (m, 2H), 7,00 (m, 2H), 7,05 (m, 2H), 7,25 (br s, 3H), 7,30 (m, 2H), 7,35 (m, 2H), 7,75 (d, 2H); Chemisches Ionisationsmassenspektrum bei Atmosphärendruck: 456 ($\text{M}^+ + 1$).

E) cis- und trans-1-{N-(2-Ethoxycarbonylethenyl)-N-[4-(4-fluorphenoxy)phenylsulfonyl]-amino}-cyclobutan-1-carbonsäurebenzylester

[0114] Zu einem Kolben wurde 1-[4-(4-Fluorphenoxy)phenylsulfonylamino]cyclobutan-1-carbonsäurebenzylester (10,0 g, 22 mMol), t-BuOH (75 ml), Cäsiumcarbonat (7,16 g, 22 mMol) und Propionsäureethylester (4,31 g, 44 mMol, 4,45 ml, $d = 0,968$) gegeben. Nach Rühren für etwa 1 Stunde änderte sich die Reaktion nach dunkelrot. Nach Rühren für 5 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit Toluol verdünnt und das Cäsiumcarbonat durch Vakuumfiltration abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Wasser und Salzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde durch Vakuumfiltration entfernt und das Lösungsmittel durch Rotationsverdampfer entfernt, unter Gewinnung eines ziegelroten Öls. Dieses wurde chromatographiert (50 mm Säule; 15% EtOAc : 85% Hexan), unter Gewinnung eines gelben Öls, 5,12 g, Ausbeute 42%. Eine zweite Portion wurde durch erneutes Chromatographieren der gemischten Fraktionen erhalten, unter Gewinnung eines gelben Öls, 2,72 g, Ausbeute 22% (Gesamtausbeute 64%).

[0115] Chemisches Ionisationsmassenspektrum bei Atmosphärendruck: 554 ($\text{M}^+ + 1$).

F) 1-{N-(2-Ethoxycarbonylethyl)-N-[4-(4-fluorphenoxy)-phenylsulfonyl]amino}cyclobutan-1-carbonsäure

[0116] Ein Gemisch von cis- und trans-1-{N-(2-Ethoxycarbonylethenyl)-N-[4-(4-fluorphenoxy)-phenylsulfonyl]amino}cyclobutan-1-carbonsäurebenzylester (11,57 g, 20,9 mMol) wurde über 10% Palladium-auf-Kohlenstoff in Ethanol (500 ml) für etwa 24 Stunden bei Raumtemperatur bei 40 psi hydriert. Der Katalysator wurde durch Vakuumfiltration entfernt und das Filtrat wie vorstehend über 10% Palladium-auf-Kohlenstoff (8 g) für etwa 2 Tage hydriert. Der Katalysator wurde durch Vakuumfiltration entfernt und das Lösungsmittel durch Rotationsverdampfer entfernt, unter Gewinnung eines dicken, gelben Öls, 4,48 g, Ausbeute 46%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1,24 (t, 3H), 1,80 (m, 1H), 2,10 (m, 1H), 2,45 (m, 2H), 2,60 (m, 2H), 2,75 (m, 2H), 3,55 (m, 2H), 4,12 (q, 2H), 7,00 (d, 2H), 7,10 (m, 4H), 7,80 (d, 2H); Chemisches Ionisationsmassenspektrum bei Atmosphärendruck: 456 ($\text{M}^+ + 1$); HPLC (C18 NovaPak, 30% bis 90% Acetonitril/Wasser-Gradient) 18,6 min.

G) 3-{1-[(N-Benzyloxycarbonyl)cyclobutyl]-4-(4-fluorphenoxy)phenylsulfonyl}amino}propionsäureethylester

[0117] Zu einem Kolben wurde 1-{N-(2-Ethoxycarbonyl)ethyl)-N-[4-(4-fluorphenoxy)phenylsulfonyl]amino}cyclobutan-1-carbonsäure (4,48 g, 9,6 mMol), BOP (4,64 g, 10,5 mMol), Diisopropylethylamin (1,37 g, 10,5 mMol = 1,8 ml bei $d = 0,742$) und DMF (50 ml) gegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur etwa 3 Stunden gerührt. Zu diesem Gemisch wurde Diisopropylethylamin (2,49 g, 19,2 mMol, 3,35 ml) und O-Benzylhydroxylaminhydrochlorid (1,98 g, 12,48 mMol) gegeben. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde die Reaktion in Ether aufgenommen und mit 1 N Salzsäure (3×150 ml), Wasser (3×100 ml) und Salzlösung (1×200 ml) gewaschen. Die organische Schicht wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Filtrat aufkonzentriert. Der Rückstand wurde chromatographiert (20% Essigsäureethylester : 80% Hexan), unter Gewinnung eines dicken, farblosen Öls, 4,82 g, Ausbeute 88%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1,23 (t, 3H), 1,60 (m, 1H), 1,80 (m, 1H), 2,20 (m, 2H), 2,55 (m, 4H), 3,45 (m, 2H), 4,08 (q, 2H), 4,97 (s, 2H), 7,00 (d, 2H), 7,10 (m, 4H), 7,25 (m, 3H), 7,35 (m, 2H), 7,75 (d, 2H), 9,70 (br s, 1H); Chemisches Ionisationsmassenspektrum bei Atmosphärendruck: 571 ($\text{M}^+ + 1$).

H) 3-[[4-(4-Fluorphenoxy)phenylsulfonyl]-1-[(N-hydroxycarbonyl)cyclobutyl]amino]propionsäureethylester

[0118] Der 3-{1-[(N-Benzyloxycarbonyl)cyclobutyl]-4-(4-fluorphenoxy)phenylsulfonyl}amino}propionsäureethylester (4,8 g, 8,4 mMol) wurde über 5%igem Palladium-auf-Bariumsulfat (2,5 g) in Ethanol/Essigsäureethylester (1 : 4) (70 ml) bei 40 psi bei Raumtemperatur für etwa 2,5 Stunden hydriert. Der Katalysator wurde durch Vakuumfiltration entfernt und das Lösungsmittel durch Rotationsverdampfer entfernt, unter Gewinnung eines weißen Schaums, 3,64 g, Ausbeute 90%.

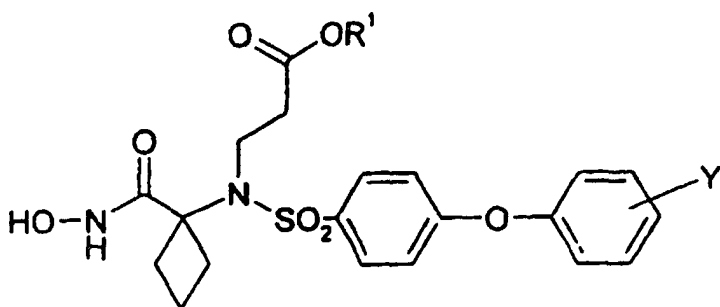
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1,14 (t, 3H), 1,65 (m, 2H), 2,40 (m, 4H), 2,65 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 4,00 (q, 2H), 7,05 (d, 2H), 7,20 (m, 2H), 7,25 (m, 2H), 7,75 (d, 2H), 8,90 (br s, 1H), 10,70 (br s, 1H); Chemisches Ionisationsmassenspektrum bei Atmosphärendruck: 481 ($\text{M}^+ + 1$).

I) 3-[[4-(4-Fluorphenoxy)phenylsulfonyl]-1-[(N-hydroxycarbonyl)cyclobutyl]amino]propionsäure

[0119] Zu einem Kolben wurde 3-[[4-(4-Fluorphenoxy)phenylsulfonyl]-1-[(N-hydroxycarbonyl)-cyclobutyl]amino]propionsäureethylester (3,64 g, 7,6 mMol), Ethanol (50 ml), Lithiumhydroxidhydrat (1,59 g, 38 mMol) gegeben. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel durch Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen und mit Wasser (2×200 ml) und 1 N Salzsäure (2×200 ml) gewaschen. Die organische Schicht wurde entfernt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde durch Vakuumfiltration entfernt und das Lösungsmittel durch Rotationsverdampfer entfernt, unter Gewinnung eines weißen Feststoffs, 3,37 g, Ausbeute 98%. Dieser wurde aus Hexan : Essigsäureethylester umkristallisiert, unter Gewinnung weißer Kristalle, 2,23 g, Ausbeute 65%, Fp. 168–169°C. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1,60 (m, 2H), 2,35 (m, 4H), 2,55 (m, 2H), 3,35 (m, 2H), 7,00 (d, 2H), 7,20 (m, 2H), 7,25 (m, 2H), 7,75 (d, 2H), 8,85 (s, 1H), 10,65 (s, 1H), 12,25 (s, 1H); Chemisches Ionisationsmassenspektrum bei Atmosphärendruck: 453 ($\text{M}^+ + 1$); HPLC (C18 NovaPak, 30% bis 90% Acetonitril/Wasser-Gradient) 9,9 min; Analyse berechnet: C, 53,09; H, 4,68; N, 6,19; gefunden: C, 53,40; H, 4,68; N, 6,20.

Patentansprüche

1. Verbindung der Formel



oder die pharmazeutisch akzeptablen Salze derselben,

wobei

R¹ für Wasserstoff oder (C₁-C₆)-Alkyl steht und

Y ein Substituent an irgendeinem der Kohlenstoffatome des Phenylrings ist, der in der Lage ist, eine zusätzliche Bindung zu tragen, unabhängig ausgewählt unter Fluor, Chlor, Trifluormethyl, (C₁-C₆)-Alkoxy, Trifluormethoxy, Difluormethoxy und (C₁-C₆)-Alkyl.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei Y für Wasserstoff, Fluor oder Chlor steht.

3. Verbindung nach Anspruch 1, wobei Y für 4-Fluor oder 4-Chlor steht.

4. Verbindung nach Anspruch 1, wobei R¹ für Wasserstoff steht.

5. Verbindung nach Anspruch 3, wobei R¹ für Wasserstoff steht.

6. Verbindung nach Anspruch 1, wobei die Verbindung aus der Gruppe ausgewählt wird bestehend aus:
3-[[4-(4-Fluorphenoxy)benzolsulfonyl](hydroxycarbamoylcyclobutyl)amino]-propionsäureethylester und
3-[[4-(4-Fluorphenoxy)benzolsulfonyl](hydroxycarbamoylcyclobutyl)amino]-propionsäure.

7. Pharmazeutische Zusammensetzung für die Behandlung eines Zustands, der aus der Gruppe ausgewählt wird bestehend aus Arthritis (einschließlich Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis) entzündlicher Darmerkrankung, Crohn'-Krankheit, Aufblähung, chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung, Alzheimer-Demenz, Organtransplantationstoxizität, Kachexie, allergischer Reaktionen, allergischer Kontaktüberempfindlichkeit, Krebs, Gewebevereiterung, Restenose, Zahnerkrankung, Epidermolysis bullosa, Osteoporose, Loslösen künstlicher Gelenkimplantationen, Atherosklerose (einschließlich arteriosklerotischer Plaqueruptur), Aortenaneurysma (einschließlich Bauchschlagaderaneurysma und Gehirnschlagaderaneurysma), dekompensierter Herzinsuffizienz, Herzmuskelinfarkt, Schlaganfall, Gehirnschämie, Kopftrauma, Rückenmarkverletzung, (akuter und chronischer) neurodegenerativer Beschwerden, Autoimmunitätsstörungen, Chorea Huntington, Parkinson-Krankheit, Migräne, Depression, peripherer Neuropathie, Schmerzen, amyloider Gehirnangiopathie, nootropischer oder Wahrnehmungssteigerung, amyotrophischer Lateralsklerose, multipler Sklerose, Augenangiogenese, Hornhautverletzung, Makuladegeneration, anormaler Wundheilung, Verbrennungen, Diabetes, Tumorinvasion, Tumorwachstum, Tumormetastase, Hornhautvernarbung, Skleritis, AIDS, Blutvergiftung und septischem Schock bei Säugern, einschließlich eines Menschen, umfassend eine Menge einer Verbindung nach Anspruch 1, die bei einer solchen Behandlung wirksam ist und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

8. Verwendung einer wirksamen Menge einer Verbindung nach Anspruch 1 für die Zubereitung eines Medikaments für die Behandlung eines Zustands, der aus der Gruppe ausgewählt wird bestehend aus Arthritis (einschließlich Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis) entzündlicher Darmerkrankung, Crohn'-Krankheit, Aufblähung, chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung, Alzheimer-Demenz, Organtransplantationstoxizität, Kachexie, allergischer Reaktionen, allergischer Kontaktüberempfindlichkeit, Krebs, Gewebevereiterung, Restenose, Zahnerkrankung, Epidermolysis bullosa, Osteoporose, Loslösen künstlicher Gelenkimplantationen, Atherosklerose (einschließlich arteriosklerotischer Plaqueruptur), Aortenaneurysma (einschließlich Bauchschlagaderaneurysma und Gehirnschlagaderaneurysma), dekompensierter Herzinsuffizienz, Herzmuskelinfarkt, Schlaganfall, Gehirnschämie, Kopftrauma, Rückenmarkverletzung, (akuter und chronischer) neurodegenerativer Beschwerden, Autoimmunitätsstörungen, Chorea Huntington, Parkinson-Krankheit, Migräne, Depression, peripherer Neuropathie, Schmerzen, amyloider Gehirnangiopathie, nootropischer oder Wahrnehmungssteigerung, amyotrophischer Lateralsklerose, multipler Sklerose, Augenangiogenese, Hornhautverletzung, Makuladegeneration, anormaler Wundheilung, Verbrennungen, Diabetes, Tumorinvasion, Tumorwachstum, Tumormetastase, Hornhautvernarbung, Skleritis, AIDS, Blutvergiftung und septischem Schock bei Säugern, einschließlich eines Menschen.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung für die Behandlung eines Zustands, der durch Hemmen von Matrixmetalloproteinasen bei einem Säuger, einschließlich einem Menschen, behandelt werden kann, umfassend eine Menge einer Verbindung nach Anspruch 1, die bei einer solchen Behandlung wirksam ist, und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

10. Pharmazeutische Zusammensetzung für die Behandlung eines Zustands, der durch Hemmen eines Säugerreprolysins bei einem Säuger, einschließlich einem Menschen behandelt werden kann, umfassend eine Menge einer Verbindung nach Anspruch 1, die bei einer solchen Behandlung wirksam ist, und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

11. Verwendung einer wirksamen Menge einer Verbindung nach Anspruch 1 für die Zubereitung eines Medikaments für das Hemmen von Matrixmetalloproteinasen bei einem Säuger, einschließlich eines Menschen.

12. Verwendung einer wirksamen Menge einer Verbindung nach Anspruch 1 für die Zubereitung eines Medikaments für das Hemmen eines Säugerprolysins bei einem Säuger, einschließlich eines Menschen.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen