

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C07C 59/90

A61K 31/19 C07C 59/84

C07C 59/88

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97196453.X

[43]公开日 1999年11月10日

[11]公开号 CN 1234791A

[22]申请日 97.5.12 [21]申请号 97196453.X

[30]优先权

[32]96.5.15 [33]US[31]08/645,029

[86]国际申请 PCT/US97/08608 97.5.12

[87]国际公布 WO97/43240 英 97.11.20

[85]进入国家阶段日期 99.1.15

[71]申请人 拜尔公司

地址 美国宾夕法尼亚州

[72]发明人 威廉·J·斯科特 玛格丽特·A·波普

戴维·S·哈索格

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

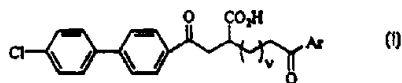
代理人 巫肖南

权利要求书 3 页 说明书 34 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 通过 2-(ω -芳酰基烷基)-4-二芳基-4-氧代丁酸抑制基质金属蛋白酶

[57]摘要

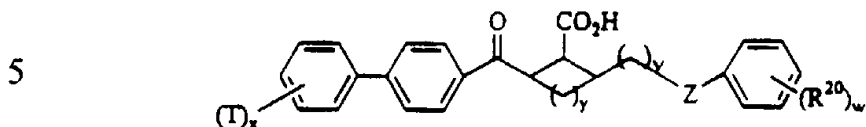
本发明提供了药物组合物和治疗某些疾病的方法,该方法包括给予一定量的有效抑制至少一种基质金属蛋白酶的本发明化合物或组合物,以达到所希望的效果。本发明的化合物具有通式(1),其中 v 是 1, 2, 3 或 4, Ar 表示取代的芳香部分。这些化合物用于抑制基质金属蛋白酶并因此消除 MMP's 导致的疾病,如骨关节炎,类风湿性关节炎,脓毒性关节炎,牙周疾病,角膜溃疡,蛋白尿,动脉瘤的主动脉疾病,营养不良表皮松解症,导致炎症反应的病症,由 MMP 活性介导的骨质减少,颞下颌骨关节疾病,或神经系统的脱髓鞘疾病;创伤型关节损伤引起的肿瘤转移或变性的软骨损失;由动脉粥样硬化破裂引起的冠状动脉血栓形成。本发明也提供了治疗这些疾病的药用组合物和方法。



ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 基质金属蛋白酶-抑制化合物, 具有通式:



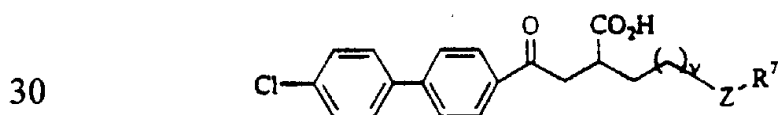
其中 v 是 1-4, y 是 0-2, x 是 0-2, w 是 0-3, z 选自 $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-C(O)-$, $-N(R^2)C(O)-$, $-OC(O)-$ 或 $-O-$, T 独立地选自: $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-I$, 1-6 个碳的烷基基; 6-10 个碳的芳基; 含 4-9 个碳和至少一个 N , O 或 S 杂原子的杂芳基; 其中的芳基部分含 6-10 个碳而烷基部分含 1-4 个碳的芳基烷基; 或其中的杂芳基部分包括 4-9 个碳和至少一个 N , O , 或 S 杂原子而烷基部分含 1-4 个碳的杂芳基-烷基; 1-6 个碳的烯基; 1-6 个碳的炔基; $-(CH_2)_pQ$, 其中的 p 是 0-4, Q 是选自 $-OR^4$, $-SR^4$, 和 $-N(R^2)_2$, 而各个 R^{20} 是独立 1-5 个碳的烷基, 1-5 个碳的烷氧基, 芳基氧基, 卤素, $-COOR^2$, $-CON(R^2)_2$, SOR^3 , SO_2R^3 或 COR^2 , 其中

R^2 表示 H , 1-6 碳烷基; 6-10 碳的芳基, 包含 4-9 碳和至少一个 N , O 或 S 杂原子的杂芳基, 其中芳基部分含有 6-10 个碳, 而烷基部分含有 1-4 碳的芳烷基; 或其中杂芳基部分包含 4-9 碳和至少一个 N , O , 或 S 杂原子, 而烷基部分含有 1-4 碳的杂芳基-烷基,

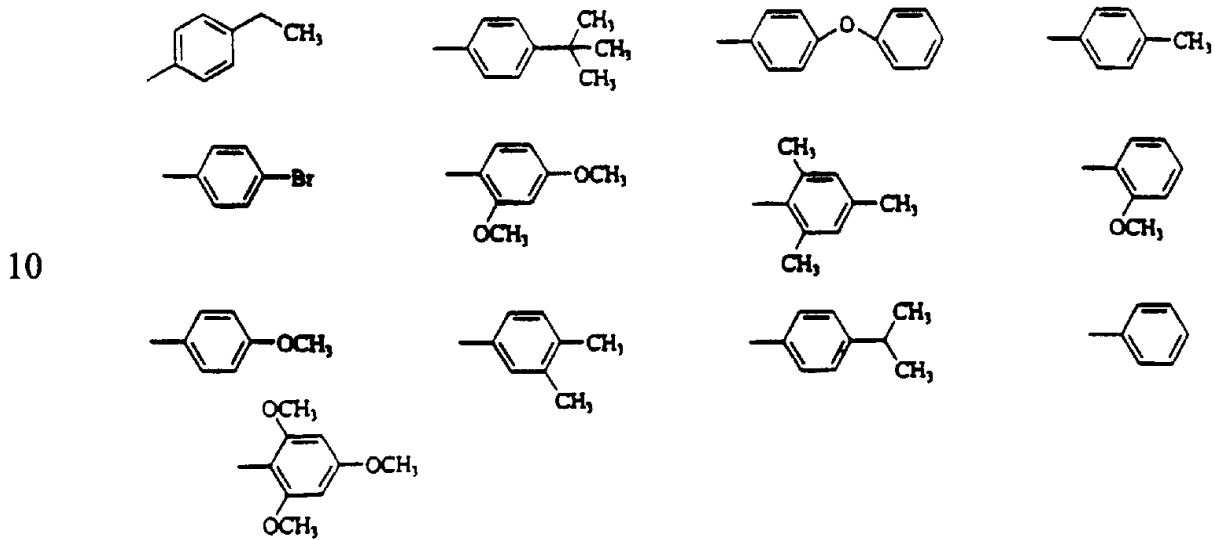
20 R^3 表示 1-4 碳烷基; 6-10 碳芳基; 含 4-9 个碳和至少一个 N , O 或 S 杂原子的杂芳基; 其中芳基部分含有 6-10 个碳, 而烷基部分含有 1-4 碳的芳烷基; 或其中杂芳基部分包含 4-9 碳和至少一个 N , O , 或 S 的杂原子, 而烷基部分含有 1-4 碳的杂芳基-烷基, 和

25 R^4 表示 H ; 1-6 碳烷基; 6-10 碳的芳基; 包含 4-9 碳和至少一个 N , O , 或 S 杂原子的杂芳基; 其中芳基部分含有 6-10 个碳, 而烷基部分含有 1-4 碳的芳烷基; 或其中杂芳基部分包含 4-9 碳和至少一个 N , O , 或 S 杂原子, 而烷基部分含有 1-4 碳的杂芳基-烷基。

2. 基质金属蛋白酶-抑制化合物, 具有通式:



其中 v 是 1-4, Z 选自 -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -C(O)-, -N(R²)C(O)-, -OC(O)- 或 -O-, 其中的 R² 是 H, 1-6 个碳的烷基; 6-10 个碳的芳基; 含 4-9 个碳和至少一个 N, O 或 S 杂原子的杂芳基; 其中的芳基部分含 6-10 个碳而烷基部分含 1-4 个碳的芳基烷基; 或其中的杂芳基部分包括 4-9 个碳和至少一个 N, O, 或 S 杂原子而烷基部分含 1-4 个碳的杂芳基-烷基; 而 R⁷ 选自



15 3. 抑制基质金属蛋白酶活性的方法, 包括提供有效的基质金属蛋白酶-抑制量的权利要求 1 的化合物。

4. 抑制基质金属蛋白酶活性的方法, 包括提供有效的基质金属蛋白酶-抑制量的权利要求 2 的化合物。

20 5. 具有基质金属蛋白酶抑制活性的药物组合物, 包括权利要求 1 的化合物和药用载体。

6. 具有基质金属蛋白酶抑制活性的药物组合物, 包括权利要求 2 的化合物和药用载体。

7. 治疗哺乳动物的方法, 包括对该哺乳动物给予基质金属蛋白酶抑制量的权利要求 1 的化合物, 其足以:

25 a)减轻骨关节炎, 类风湿性关节炎, 脓毒性关节炎, 牙周疾病, 角膜溃疡, 蛋白尿, 动脉瘤的主动脉疾病, 营养不良表皮松解疮, 导致炎症反应的病症, 由 MMP 活性介导的骨质减少, 颞下颌骨关节疾病, 或神经系统的脱髓鞘疾病;

b)创伤型关节损伤引起的肿瘤转移的阻滞或变性的软骨损失;

30 c)降低由动脉粥样硬化斑破裂引起的冠状动脉血栓形成; 或

d)用于生育控制。

8. 治疗哺乳动物的方法，包括对该哺乳动物给予基质金属蛋白酶抑制量的权利要求 1 的化合物，其足以：

5 a)减轻骨关节炎，类风湿性关节炎，脓毒性关节炎，牙周疾病，角膜溃疡，蛋白尿，动脉瘤的主动脉疾病，营养不良表皮松解疱，导致炎症反应的病症，由 MMP 活性介导的骨质减少，颞下颌骨关节疾病，或神经系统的脱髓鞘疾病；

b)创伤型关节损伤引起的肿瘤转移的阻滞或变性的软骨损失；

c)降低由动脉粥样硬化斑破裂引起的冠状动脉血栓形成；或

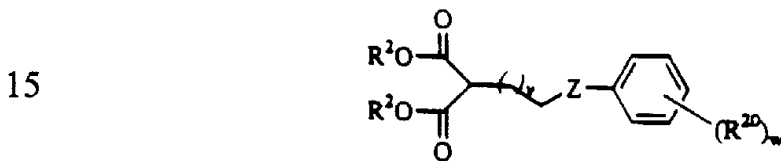
d)用于生育控制。

10 9. 权利要求 8 的方法，其中所说的哺乳动物是人。

10. 权利要求 8 的方法，其中所说的效应是缓解骨关节炎。

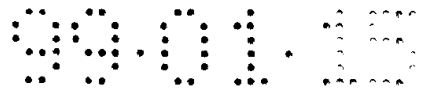
11. 权利要求 8 的方法，其中所说的效应是延滞肿瘤转移。

12. 下式的化合物



其中 v 是 1-4，w 是 0-3，Z 选自 -S-，-S(O)-，-S(O)₂-，-C(O)-，-N(R²)C(O)-，-OC(O)-或 -O-，而各个 R²⁰ 是独立的 1-5 个碳的烷基，1-5 个碳的烷氧基，芳基氧基，卤素，-COOR²，-CON(R²)₂，SOR³，SO₂R³ 或 COR²，其中 R² 表示 H，1-6 碳烷基；6-10 碳的芳基，包含 4-9 碳和至少一个 N，O 或 S 杂原子的杂芳基，其中芳基部分含有 6-10 个碳，而烷基部分含有 1-4 碳的芳烷基；或其中杂芳基部分包含 4-9 碳和至少一个 N，O，或 S 杂原子，而烷基部分含有 1-4 碳的杂芳基-烷基，和

25 R³ 表示 1-4 碳烷基；6-10 碳芳基；含 4-9 个碳和至少一个 N，O 或 S 杂原子的杂芳基；其中芳基部分含有 6-10 个碳，而烷基部分含有 1-4 碳的芳烷基；或其中杂芳基部分包含 4-9 碳和至少一个 N，O，或 S 杂原子，而烷基部分含有 1-4 碳的杂芳基-烷基。



说明书

通过 2-(ω -芳酰基烷基)-4-二芳基-4-氧代
丁酸抑制基质金属蛋白酶

5

发明背景

发明领域

本发明涉及酶抑制剂, 更具体地, 涉及用于抑制基质金属蛋白酶的 2-(ω -芳酰基烷基)-4-二芳基-4-氧代丁酸化合物。

10 相关技术

基质金属蛋白酶(也称为基质金属内切蛋白酶或 MMP)是一类锌内切蛋白酶, 包括, 但不限于, 间质胶原酶(也称为 MMP-1), 溶基质素(也称为粘蛋白酶, transin, 或 MMP-3), 明胶酶 A(也称为 72kDa-明胶酶或 MMP-2)和明胶酶 B(也称为 95kDa-明胶酶或 MMP-9)。这些 MMP 由多种细胞包括成纤维细胞和软骨细胞分泌, 与称为 TIMP(金属蛋白酶的天然蛋白酶抑制剂)的天然蛋白酶抑制剂一起。

所有这些 MMP 都可以破坏关节软骨或基膜的多种连接性组织成分。各个 MMP 以非活性酶原被分泌, 该酶原在其能够显示其蛋白水解活性之前, 必须在后续步骤中裂解。除了基质破坏作用之外, 这些 MMP 的某一些如 MMP-3 已经含有作为其它 MMP 如 MMP-1 和 MMP-9 的体内活化剂的意义 (Ito, A.; Nagase, H. Arch. Biochem. Biophys. 267, 211-6(1988); Ogata, Y. ; Enghild, J. J.; Nagase, H., 生物化学杂志, 267, 3581-4(1992))。因此, 一系列蛋白水解活性可以由过量的 MMP-3 引发。这意味着特定的 MMP-3 抑制剂将限制那些不直接由这类抑制剂抑制的其它 MMP 的活性。

也已经报道, MMP-3 可以裂解并因此使其它蛋白酶如弹性蛋白酶的内源性抑制剂失活(Winyard, P. G.; Zhang, Z.; Chidwich, K.; Blake, D. R.; Carrell, R. W.; Murphy, G. FEBS Lett. 279, 91-4(1991))。因此, MMP-3 抑制剂可以通过改变其内源性抑制剂水平而影响其它破坏性蛋白酶的活性。

许多疾病都被认为是由过量或不恰当的基质-破坏性金属蛋白酶活性, 或由 MMP 与 TIMP 的比例不平衡介导的。这些疾病包括: a)骨关节炎

(Woessner, J. F., Jr.; Selzer, M. G., 生物化学杂志, 259, 3633-8(1984)和 Phadke, K. J. Rheumatol. 10, 852-60(1983)), b)类风湿性关节炎(Mullins, D. E.; Rohrllich, S. T. Biochim. biophys. Acta 695, 117-214(1983), Woolley, D. E.; Crossley, M. J.; Evanson, M. J. ArthritisRheum. 20, 1231-9(1977), 和 5 Gravallese, E. M.; Darling, J. M.; Ladd, A. L.; Katz, J. N.; Glimcher, L. H. Arthritis Rheum. 34, 1076-84(1991), c)脓毒性关节炎(Williams, R. J., III; Smith, R. L.; Schurman, D. J. Arthritis Rheum. 33, 533-41(1990)), d)肿瘤转移 (Reich, R.; Thompson, E. W.; Iwamoto, Y.; Martin, G. R.; Deason, J. R; Fuller, G. C.; Miskin, R. Cancer Res. 48, 3307-12(1988)和 Matrisian, L. M.; 10 et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.. 83, 9413-7(1986)), e)牙周疾病(Overall, C. M.等, Peridontal Res. 22, 81-8(1987)), f)角膜溃疡(Burns, F. R.等, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 30, 1569-75(1989)), g)蛋白尿(Baricos, W. H.等, Biochem. J. 254, 609-12(1988)), h)动脉粥样硬化斑破裂引起的冠状血栓形成 (Davies, M. J.等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 8154-8(1991)), i)动脉瘤主 15 动脉疾病(Vine, N. 等, Clin. Sci. 81, 233-9(1991)), j)生育控制(Woessner, J. F., Jr.等, Steroids54, 491-9(1989)), k)营养不良表皮松解大疱(Kronberger, A. 等, J. Invest. Dermatol. 79, 208-11(1982)), 和 l)外伤型关节损伤引起的变性 性软骨损失, 引起发炎反应的病症, 由 MMP 活性介导的骨质减少, 颞下颌 关节疾病, 神经系统的脱髓鞘疾病, 等等(Chantry, A.等, J. Neurochem. 50, 20 688-94(1988)).

在关节疾病的情况下, 新治疗的需要尤其重要。骨关节炎(OA), 类风 湿性关节炎(AR)和脓毒性关节炎的主要伤残作用是关节软骨和其附近正常 关节功能的进行性损失。没有市面上的药物能够预防或减缓这一软骨损 失, 虽然非甾类消炎药(NSAID)能控制疼痛和肿胀。这些疾病的最终结果是 25 关节功能的彻底丧失, 这只能由关节置换手术治疗。MMP 抑制剂被预期能 停止或逆转软骨损失的过程避免或延缓外科干扰。

蛋白酶在转移的癌症的过程中在几个阶段是关键元素。在此方法中, 结构蛋白质在基膜中的蛋白水解降解引起在第一位点的肿瘤的扩散, 从该 位点离开并返回, 并在远离的第二位点发病。而且, 肿瘤诱导的血管生成 30 对于肿瘤生长是需要的, 并依赖于蛋白水解组织改造。各种类型的蛋白酶的 转染实验已经显示, 基质金属蛋白酶, 尤其是, 明胶酶 A 和 B(分别为

MMP-2 和 MMP-9)在这些过程中扮演重要的角色。这些领域的概况参见 Mullins, D. E 等, *Biochim. Biophys. Acta* 695, 177, 1983; , Ray, J. M. 等, *Eur. Respir. J.* 7, 2062, 1994; Birkedal-Hansen, H 等, *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 4, 197, 1993。

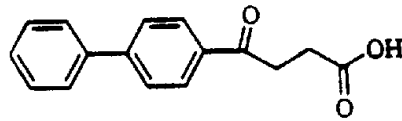
5 而且, 可以显示, 由天然基质金属蛋白酶抑制剂 TIMP-2(一种蛋白质)的胞外基质的降解抑制阻止癌症生长(De Clerck, Y. A 等, *癌症研究*, 52, 701-8(1991)), 并且, TIMP-2 在实验系统中抑制肿瘤-诱导的血管生成(Moses, M. A 等, *科学*, 248, 1408-10(1990))。综述参见 De Clerck, Y 等, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 732, 222, 1994。也已证明, 当腹膜内给药时, 合成的
10 基质金属蛋白酶抑制剂 batimastat 抑制人结肠肿瘤生长, 并在裸鼠体内在正位模型中传布(Wang, 等, *癌症研究*, 54, 4726, 1994)并延长带有人卵巢癌外移植物大鼠的存活(Davies, B 等, *癌症研究*, 53, 2087, 1993)。这些和相关化合物的应用已经在 WO-A-9321942A2(931111)中描述。

有几份专利和专利申请要求保护用于阻滞转移的癌症, 促进肿瘤退
15 化, 抑制癌细胞增生, 延缓或预防与骨关节炎相关的软骨损失, 或用于治疗上面指出的其它疾病的金属蛋白酶抑制剂(例如 Levy, et al., WO-A-9519965A1; Beckett, et al., WO-A-9519956A1; Beckett, et al., WO-A-9519957A1; Beckett, et al., WO-A-9519961A1; Brown, et al., WO-A-9321942A2; Crimmin, et al., WO-A-9421625A1; Dickens, et al., USP-
20 4599361; Hughs, et al., USP-5190937; Broadhurst, et al., EP-0574758A1; Broadhurst, et al., EP-026436; 和 Myers et al., EP-0520573A1)。这些专利的优选的化合物具有肽骨架, 在一端带有锌配位基(羟肟酸, 硫醇, 羧酸或次磷酸)和许多侧链, 以及在天然氨基酸发现的和更新的官能团。这类小肽常常不易吸收, 显示低的口服生物利用率。它们也进行快速蛋白水解代谢,
25 具有很短的半寿期。作为例子, batimastat, 在 Brown, et al., WO-A-9321942A2 中描述的化合物, 只能腹膜内给药。

某些 3-联苯酰基丙酸和 4-联芳基酰基丁酸在文献中被描述为消炎, 抗
血小板凝聚, 抗炎, 抗增生, 低脂血, 抗风湿, 止痛, 和血胆固醇过少的
药剂。这些例子没有一个是如要求的治疗效果的机理那样产生 MMP 抑制
30 的。某些相关化合物也在制备液晶时用作中间体。

具体地, Tomcufcik, et al., 美国专利 3784701 要求了某些取代的苯甲

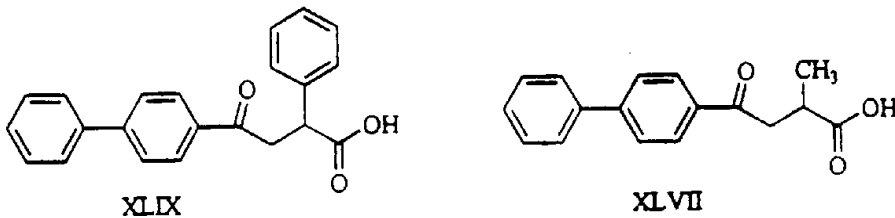
酰基丙酸治疗炎症和疼痛。这些化合物包括如下所示的 3-联苯酰基丙酸(即联苯丁酮酸)。



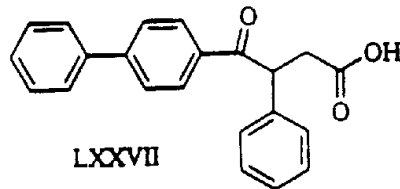
5

联苯丁酮酸

Child, et al., J. Pharm. Sci. 66, 466, 1977 描述了几种联苯丁酮酸类似物的构效关系。这些包括几种这样的化合物，其中联苯环体系被取代，或丙酸部分被苯基，卤素，羟基或甲基取代，或羧酸或羰基官能团被转化为各种衍生物。没有描述含有 4'-取代的联苯基和取代的丙酸部分结合在一个分子中的化合物。如下所示的苯基(化合物 XLIX 和 LXXVII)和甲基(化合物

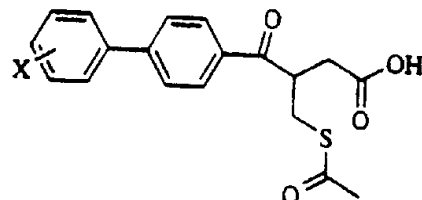


15



20

Kameo, et al., Chem. Pharm. Bull., 36, 2050, 1988 和 Tomizawa, et al., JP-62132825A2 描述了某些取代的 3-联苯酰基丙酸衍生物和其包括如下的类似物。描述了各种在丙酸部分带有其他取代基的化合物，但它们不含有联苯基残基。

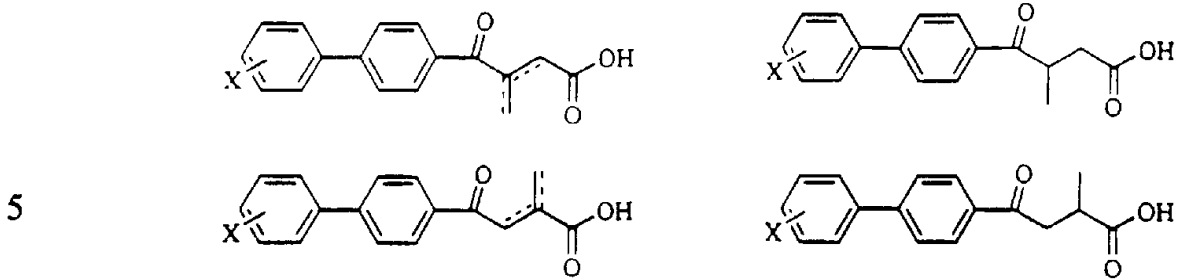


25

其中 X = H, 4'-Br, 4'-Cl, 4'-CH₃, 或 2'-Br。

Cousse, et al., Eur. J. Med. Chem., 22, 45, 1987 描述了如下甲基和亚甲基取代的 3-联苯酰基-丙酸和-丙烯酸。也描述了其中羰基被 CH₂OH 或 CH₂ 代替的相应化合物。

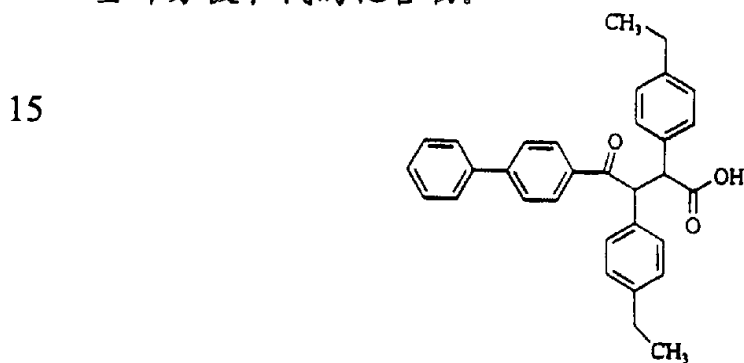
30



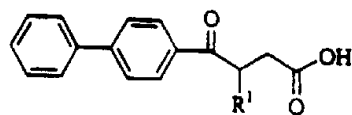
其中 X = H, Cl, Br, CH₃O, F, 或 NH₂。

10 Nichl, et al., 德国专利 1957750 也描述了某些上述亚甲基取代的联苯甲酰基丙酸。

EI-Hashash, et al., Revue Roum. Chim. 23, 1581, 1978 描述了从 β-芳酰基-丙烯酸环氧化物衍生的产物, 包括下列联苯基化合物。没有描述在联苯基部分被取代的化合物。

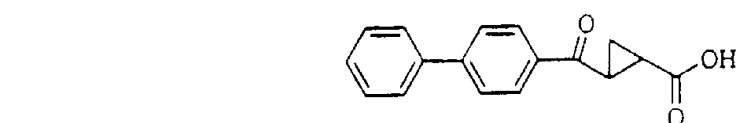


20 Kitamura, et al., JP-60209539 描述了某些包括如下用于生产液晶的中间体。在这些中间体中, 联苯基不被取代。



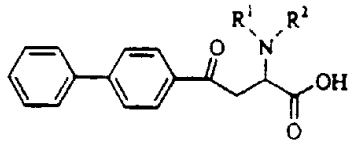
25 其中 R¹ 是 1-10 个碳原子的烷基。

Thyes, et al., 德国专利 2854475 用如下化合物作中间体。联苯基未被取代。



Sammour, et al., Egypt J. Chem. 15, 311, 1972 和 Couquelet, et al., Bull.

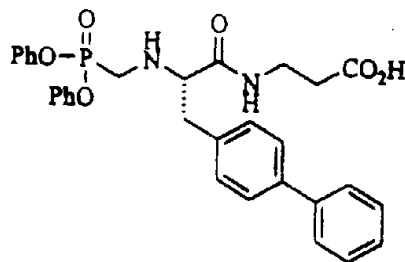
Soc. Chim. Fr. 9, 3196, 1971 描述了某些包括如下的二烷基氨基取代的联苯酰基丙酸。在所有的情况下，联苯基都没有被取代。



5

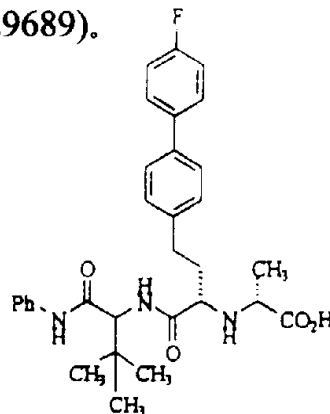
其中 $R^1, R^2 =$ 烷基, 苄基, H, 或与氮原子一起, 吗啉基。

其他已经公开了一系列的含联苯基的羧酸, 其例子示于如下, 它们抑制神经内肽酶(NEP24.11), 一种膜结合的锌金属蛋白酶(Stanton, et al., Bior. Med. Chem. Lett. 4, 539, 1994; Lombaert, et al., Bior. Med. Chem. Lett. 4, 2715, 1994; Lombaert, et al., Bior. Med. Chem. Lett. 5, 145, 1995; Lombaert, et al., Bior. Med. Chem. Lett. 5, 151, 1995)。



15

20 已经报道, 由如下所示的化合物举例说明的含有联苯基乙基甘氨酸的 N-羧基烷基衍生物是溶基质素-1(MMP-3), 72kDa 明胶酶(MMP-2)和胶原蛋白酶(Durette, et al. WO-9529689)。



25

30 相对于现有技术以肽为基础的化合物具有改进的生物利用率和生物学稳定性, 并可以最佳地用于抗特定的靶 MMP 的有效的 MMP 抑制剂将是需要的。这类化合物是本申请的主题。

有效的 MMP 抑制剂的开发将提供对于由于 MMP 活性存在, 或过量的 MMP 活性介导的疾病, 包括骨关节炎, 类风湿性关节炎, 脓毒性关节炎, 肿瘤转移, 牙周疾病, 角膜溃疡, 蛋白尿的治疗方法。几种 MMP 抑制剂已经在文献中描述, 包括硫醇(besant, et al., J. Med. Chem. 36, 4030, 1993), 异羟肟酸(Wahl, et al., Bioor. Med. Chem. Lett. 5, 349, 1995; Conway, et al., J. Exp. Med. 182, 449, 1995; Porter, et al., Bioor. Med. Chem. Lett. 4, 2741, 1994; Tomczuk, et al., Bioor. Med. Chem. Lett. 5, 343, 1995; Castelhana, et al., Bioor. Med. Chem. Lett. 5, 1415, 1995), 含磷酸(Bird, et al., J. Med. Chem. 37, 158, 1994; Morphy, et al., Bioor. Med. Chem. Lett. 4, 2747, 1994; Korylewicz, et al., J. Med. Chem. 33, 263, 1990)和羧酸(Chapman, et al., J. Med. Chem. 36, 4293; Brown, et al., J. Med. Chem. 37, 674, 1994; Morphy, et al., Bioor. Med. Chem. Lett. 4, 2747, 1994; Stack, et al., Arch. Biochem. Biophys. 287, 240, 1991; Ye. et al., J. Med. Chem. 37, 206, 1994; Grobelny, et al. Biochemistry 24, 6145, 1985; Mookhtiar, et al., Biochemistry 27, 4299, 1988)。然而, 这些抑制剂一般都含有肽骨架, 由于其低吸收而显示低的口服生物活性, 和由于快速蛋白水解显示短半衰期。因此, 需要改进的 MMP 抑制剂。

发明提要

本发明提供具有基质金属蛋白酶抑制活性的化合物。这些化合物可用于抑制基质金属蛋白酶, 因此, 抗由 MMP 引起的疾病。所以, 本发明也提供药物组合物和治疗这些病症的方法。

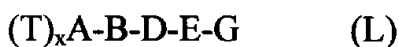
所述化合物涉及治疗哺乳动物的方法, 包括对哺乳动物给予基质金属蛋白酶抑制量的本发明的化合物, 其足以: (a)减轻骨关节炎, 类风湿性关节炎, 脓毒性关节炎, 牙周疾病, 角膜溃疡, 蛋白尿, 动脉瘤的主动脉疾病, 营养不良表皮松解疮, 导致炎症反应的病症, 由 MMP 活性介导的骨质减少, 颞下颌骨关节疾病, 或神经系统的脱髓鞘疾病;

- (b)创伤型关节损伤引起的肿瘤转移的阻滞或变性的软骨损失;
- (c)降低由动脉粥样硬化斑破裂引起的冠状动脉血栓形成; 或
- d)用于生育控制。

本发明化合物也用作在体外和体内体系中研究基质金属蛋白酶功能和机理的科研工具。由于其 MMP-抑制活性, 本发明化合物用于调节 MMP 作用,

从而使研究者能够观察研究中实验生物体系内降低的 MMP 活性的作用。

本发明涉及具有基质金属蛋白酶抑制活性和如下通式的化合物：



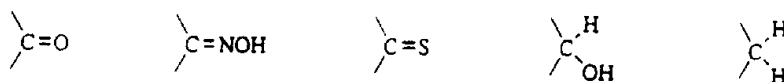
在上述通式(L)中，(T)_xA 表示取代或未取代的芳香 6-员环或含有 1-2 个 N, O, 或 S 原子的杂芳香 5-6 员环。T 表示一个或多个取代基，下标 x 表示这类取代基的数量，A 表示芳香或杂芳香环，指定为 A 环或 A 单元。当 N 被用于与 A 环中的 S 或 O 结合时，这些杂原子被至少一个碳原子分开。

取代基 T 独立地选自卤素；烷基；卤代烷基；烯基；炔基；-(CH₂)_pQ，其中 p 是 0 或 1-4 的整数；和-烯基-Q，其中烯基部分包含 2-4 个碳原子。

在后两个基团中 Q 选自芳基，杂芳基，-CN, -CHO, -NO₂, -CO₂R², -OCOR², -SOR³, -SO₂R³, -CON(R²)₂, -SO₂N(R²)₂, -COR², -N(R²)₂, -N(R²)₂COR², N(R²)₂CO₂R³, -NR²CON(R²)₂, -CHN₄, -OR⁴, -SR⁴, 烷基，芳基，杂芳基，芳烷基，或杂芳基-烷基组成的基团。R² 和 R³ 表示烷基，芳基，杂芳基，芳烷基，或杂芳基-烷基；而 R⁴ 表示 H, 烷基，芳基，芳烷基，杂芳基-烷基，烯基，炔基，卤代烷基，酰基，或亚烷氧基或由 H, 烷基，或苯基封端的聚亚烷氧基。在与 Q 连接的部分中或是 Q 部分的不饱和部位与任何 Q 的 N, O, 或 S 被至少一个碳原子分开。A 环可以是未取代的，或带有至多 2 个取代基 T。而且，下标 x 是 0, 1, 或 2。

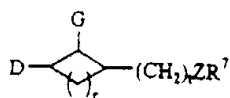
在通式(L)中，B 表示芳香 6-员环或含有 1-2 个 N, O, 或 S 原子的杂芳香 5-6 员环。称为 B 环或 B 单元。当 N 用于在 B 环中与 S 或 O 联合时，这些杂原子被至少一个碳原子分开。

在通式(L)中，D 表示



25

在通式(L)中，E 表示下式的部分

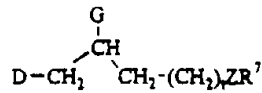


30

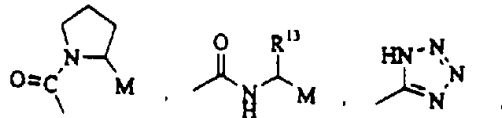
其中 r 是 0-2, t 是 0-4, z 代表-S-, -S(O)-, -S(O₂)-, -C(O)-, -N(R²)(CO)-, -

O(CO)-, 或-O-, 而 R^7 是任选取代的氨基, 酰胺, 尿素, 羧酸酯, 以及单-, 二-, 或三-环芳基, 其任选用选自 N, O 和 S 的杂原子取代。用于上述结构中的 D 和 G 表示通式(L)中的 D 和 G 单元, 而不是 E 单元的部分; 它们只是指明 D, E 和 G 基团是如何连接的。当 $r = 0$ 时, 上述结构采取如下形式:

5



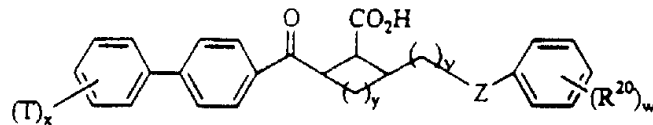
在通式(L)中, G 表示 $-PO_3H_2$, $-CN$, $-PO_3H_2$, $-M$



10

其中 M 表示 $-CO_2H$, $-CON(R^{11})_2$, 或 $-CO_2R^{12}$, R^{11} 表示 H 或 1-4 碳的烷基; R^{12} 表示 1-4 碳的烷基, R^{13} 表示 19 种非环状天然氨基酸的任何一种侧链。

某些优选的实施方法包括那些具有基质金属蛋白酶抑制活性并有下列通式的化合物

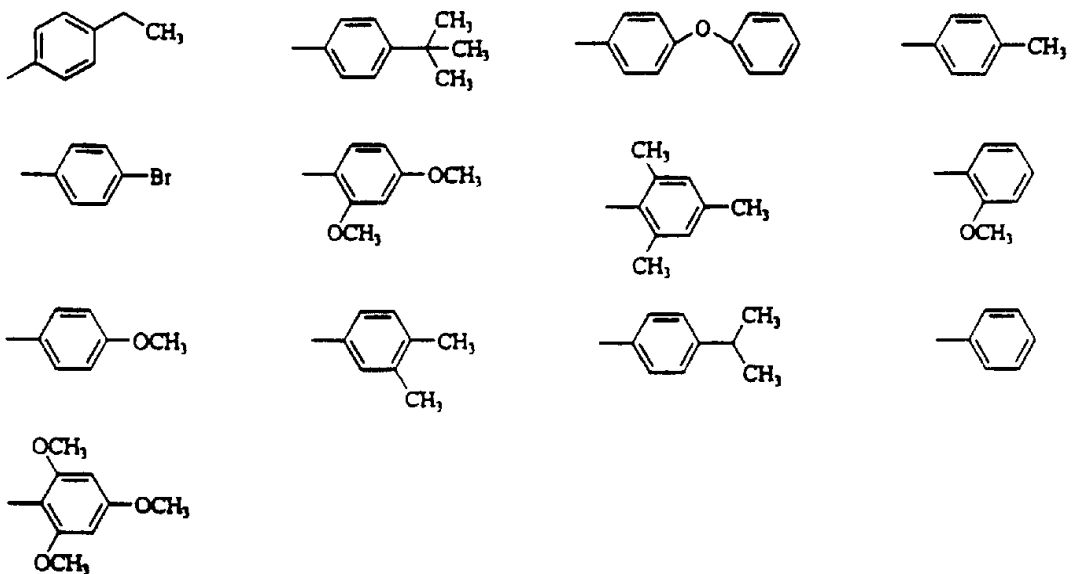


15

其中 v 是 1-4, w 是 0-3, y 是 0-2, z 选自 $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-C(O)-$, $-N(R^2)C(O)-$, $-OC(O)-$ 或 $-O-$, 而各个 R^{20} 是独立的 H, 烷基, 烷氧基, 芳基氧基, 卤素, $-COOR^2$, $-CON(R^2)_2$, SOR^3 , SO_2R^3 或 COR^2 , 其中的 R^2 和 R^3 如上定义。当 $y = 0$ 时, 所形成的结构是线型烷链; 当 $y = 1$ 时, 形成四员环(环丁基); 而当 $y = 2$ 时, 形成五员环(环戊基)。优选地, 苯环和 $(R^{20})_w$ 共

20

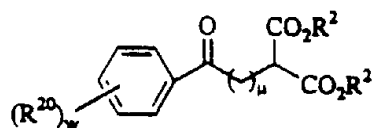
同(即 R^7)是下列之一:



25

30

本发明还涉及用于合成一些权利要求的抑制剂的某些中间体。这些中间体是具下列通式的化合物：



5

其中 μ 代表 $V + 1$ ，即 μ 是 1-5，而 R^2 如上定义并优选是烯丙基取代基。

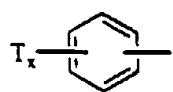
前面仅仅概述了本发明的某些方面，而不在任何意义上限制本发明。在本说明书中引用的所有专利和其他公开物都全文引作本文参考。

优选方案的说明

10 更具体地，本发明涉及具有基质金属蛋白酶抑制活性和如下通式的化合物：



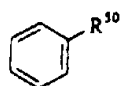
其中 $(T)_x\text{A}$ 表示选自如下的取代或未取代的芳香或杂芳香部分：



其中 R^1 表示 H 或 1-3 碳烷基。A 也可表示烷基、芳基、杂芳基、芳基烷基、烷氧基烷基、羟基炔基、杂芳基烷基、链烯基、炔基、卤代烷基、酰基、亚烷基氧基或聚亚烷基氧基，其每一个用 H、Et、烯丙基、烷基或苯基封端。

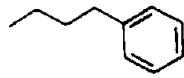
25

整个申请中，在显示的化学结构中，开放键指结构与其他基团连接的点。例如，

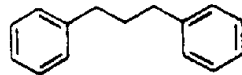


30

其中 R^{50} 是



5 的化合物是如下结构



在这些结构中，芳香环称为 A 环或 A 单元，各个 T 表示取代基，称为 T 基团或 T 单元。取代基 T 独立地选自卤素-F, -Cl, -Br, 和-I; 1-10 碳的烷基; 1-10 碳的卤代烷基; 2-10 碳的烯基; 2-10 碳的炔基; $-(CH_2)_pQ$ 其中 p 是 0 或 1-4 的整数; 和-烯基-Q 其中烯基部分包含 2-4 个碳原子。在后两个基团中 Q 选自 6-10 碳的芳基, 包含 4-9 碳和至少一个 N, O, 或 S 杂原子的杂芳基, -CN, -CHO, -NO₂, -CO₂R², -OCOR², -SOR³, -SO₂R³, -CON(R²)₂, -SO₂N(R²)₂, -COR², -N(R²)₂, -N(R²)₂COR², N(R²)₂CO₂R³, -N(R²)CON(R²)₂, -CHN₄, -OR⁴, 和-SR⁴ 组成的基团。基团 R², R³, 和 R⁴ 如下定义。

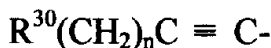
R² 表示 H, 1-6 碳烷基; 6-10 碳的芳基, 包含 4-9 碳和至少一个 N, O, 或 S 杂原子的杂芳基, 其中芳基部分含有 6-10 个碳, 而烷基部分含有 1-4 碳的芳烷基; 或其中杂芳基部分包含 4-9 碳和至少一个 N, O, 或 S 杂原子, 而烷基部分含有 1-4 碳的杂芳基-烷基。

R³ 表示 1-4 碳烷基; 6-10 碳芳基; 其中芳基部分含有 6-10 个碳, 而烷基部分含有 1-4 碳的芳烷基; 或其中杂芳基部分包含 4-9 碳和至少一个 N, O, 或 S 杂原子, 而烷基部分含有 1-4 碳的杂芳基-烷基。

R⁴ 表示 H; 1-12 碳烷基; 6-10 碳的芳基; 包含 4-9 碳和至少一个 N, O, 或 S 杂原子的杂芳基; 其中芳基部分含有 6-10 个碳, 而烷基部分含有 1-4 碳的芳烷基; 或其中杂芳基部分包含 4-9 碳和至少一个 N, O, 或 S 杂原子, 而烷基部分含有 1-4 碳的杂芳基-烷基; 2-12 碳烯基; 2-12 碳炔基; $-(C_qH_{2q}O)_rR^5$ 其中 q 是 1-3, r 是 1-3, R⁵ 是 H, 条件是 q 大于 1, 或 R⁵ 是 1-4 碳烷基, 或苯基; 其中 s 是 2-3, X 是卤素的 $-(CH_2)_sX$; 或 $-C(O)R^2$ 。

在与 Q 连接的部分中或是 Q 部分的不饱和部位与任何 Q 的 N, O, 或 S 被至少一个碳原子分开, 取代基的数量, 标为 x, 是 0, 1, 或 2。

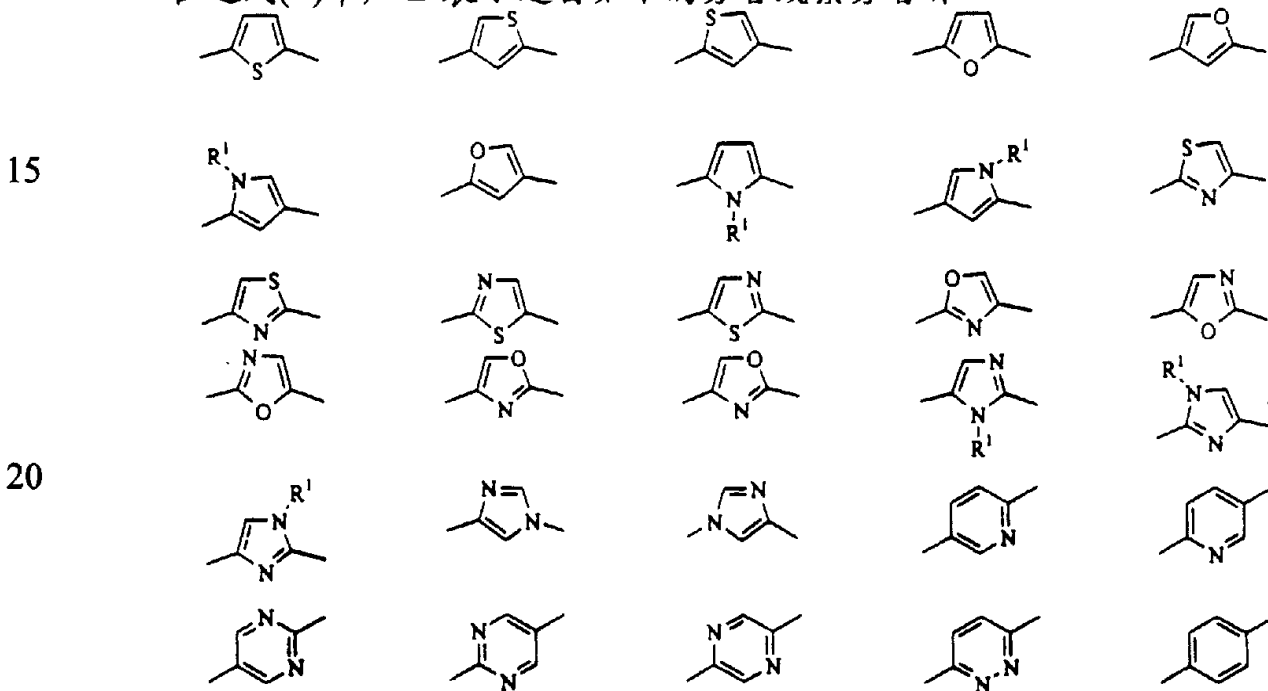
取代基 T 也可以含有如下通式部分的乙炔:



其中 n 是 1-4, R^{30} 选自: OH-, MeO-, N(n-Pr)₂-, CH₃CO₂-, CH₃CO₂OCO₂-, HO₂C-, CHO, Ph-, 3-HO-Ph-, 和 PhCHO-, 条件是当 R^{30} 是 Ph 或 3-HO-Ph- 时, n = 0.

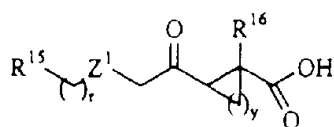
通式(L)的 B 环是取代或未取代的芳香或杂芳香环, 其中任何取代基都是不使分子与靶酶的活性位点不配或破坏 A 和 B 环相对构型的, 若那样的话将是有害的。这类基团可以是诸如低级烷基, 低级烷氧基, CN, NO₂, 卤素, 等等的部分, 但不限于这类基团。B 也可表示烷基、芳基、杂芳基、芳基烷基、杂芳基-烷基、链烯基、炔基、卤代烷基、酰基、亚烷基氧基或聚亚烷基氧基。

在通式(L)中, B 表示选自如下的芳香或杂芳香环:



其中 R^1 如上定义。这些环被称为 B 环或 B 单元。

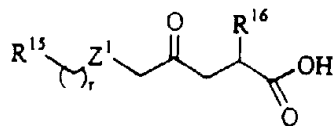
25 通式(L)的化合物包括其中(T)_x-A-B 的联合, 不采取上述形式之一, 而具有如下结构的化合物:



30 其中 r 是 0-6, 而 Z 可以是 (CH₂)_e-C₆H₄-(CH₂)_f 或 (CH₂)_g, e = 0-8, f = 0-5 和 g = 0-10, 且 y=0-2。当 y=1 时, 形成 4 元环(环丁基)基, 而当 y=2 时,

形成 5 元环(环戊基)基。

当 $y = 0$ 时, 上述结构式为:

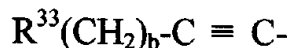


5

R^{15} 可以是具有 6-12 个碳原子, 优选 7-11 个碳原子的直链, 或环状烷基, 并非强制性地可以带有一个或多个在下面更详细讨论的药学上可接受的取代基。任何支化或取代优选在 R^{15} 基团与苯环的连接点相隔至少 3 个链原子的地方。

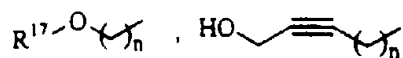
10 R^{15} 也可以是式 $R^{32}O(C_2H_4O)_h$ 的聚醚, 其中下标 “h” 是 1 或 2, 而基团 R^{32} 是 1-5 个碳原子, 优选 1-3 个碳原子的直链, 支链或环状烷基, 或苯基, 或苄基。 R^{32} 非强制性地可以带有一个或多个在下面更详细讨论的药学上可接受的取代基。任何支化或取代都在 R^{15} 基团与苯环的连接点相隔至少 3 个链原子的地方。

15 R^{15} 也可以是下式取代的炔基:



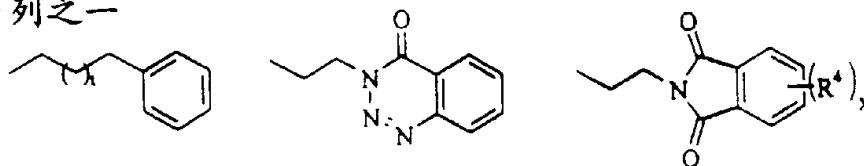
其中下标 “b” 是 1-10, 而基团 R^{33} 是 H-, HO-或 $R^{34}O-$, 优选 HO-基团。 R^{34} 可以是 1-3 个碳原子的烷基, 或苯基或苄基。 R^{33} 非强制性地可以带有一个或多个在下面更详细讨论的药学上可接受的取代基。

20 R^{15} 也可以是 -H, -Cl, -OMe 或



其中 n 是 0-4, R^{17} 是 C_2H_5 , 烯丙基或苄基。

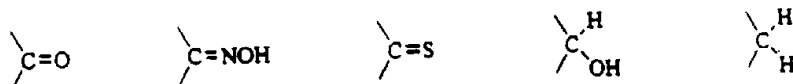
25 R^{16} 是下列之一



其中 x 是 0-4, t 是 0-2, R^4 是下列之一: 卤素, 1-6 碳烷基, OR, NR_2 , NO_2 (R = H 或 1-6 碳烷基)。

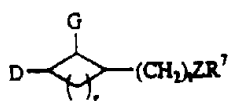
30

在通式(L)中, D 表示如下部分:



5

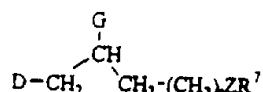
在通式(L)中, E表示下式的部分



10

其中 r 是 0-2, t 是 1-4, Z 是 -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -C(O)-, -N(R²)C(O)-, OC(O)-, 或 -O- 而 R⁷ 选自 1-12 个碳的烷基; 6-10 个碳的芳基; 含有 4-9 个碳和至少一个 N, O 或 S 杂原子的杂芳基; 其中的芳基部分含 6-12 个碳而烷基部分含 1-4 个碳的芳基烷基; 其中的芳基部分含 6-12 个碳和至少一个 N, O 或 S 杂原子而烷基部分含 1-4 个碳的杂芳烷基。用于上述结构中的 D 和 G 表示通式(L)中的 D 和 G 单元, 而不是 E 单元的部分; 它们只是指明 D, E 和 G 基团是如何连接的。当 r = 0 时, 上述结构采取如下形式:

15

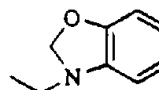
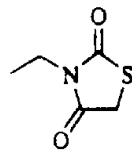
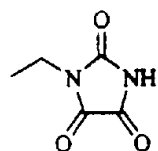
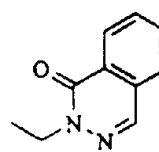
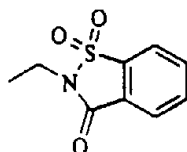
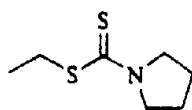
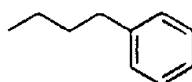
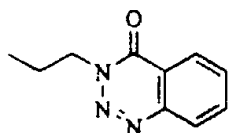
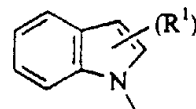
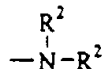
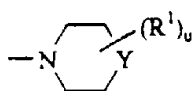
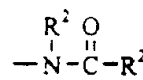
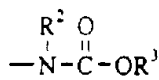
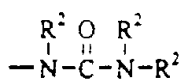
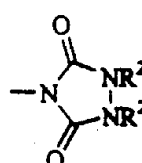
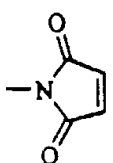
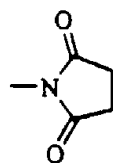
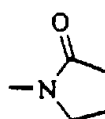
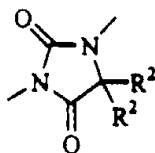
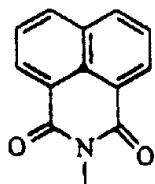
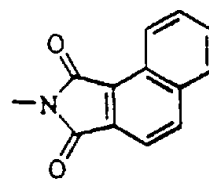
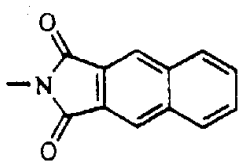
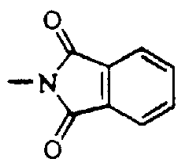


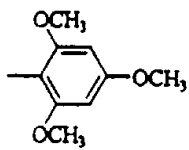
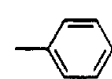
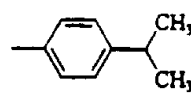
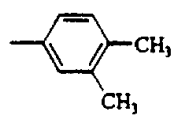
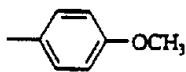
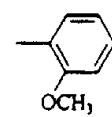
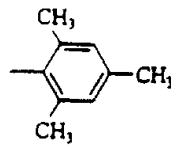
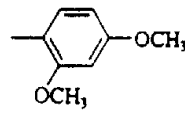
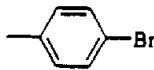
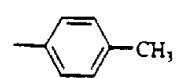
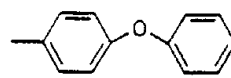
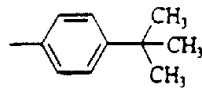
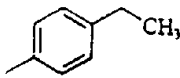
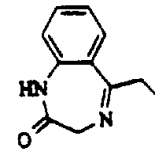
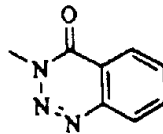
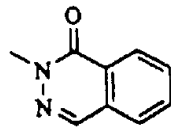
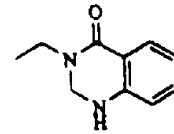
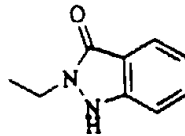
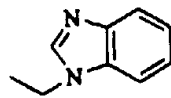
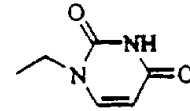
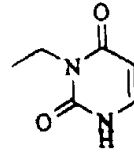
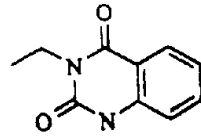
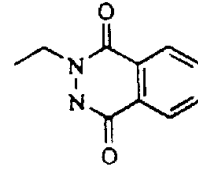
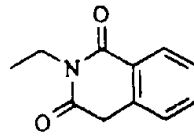
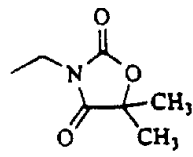
20

另外, 任何 T 基团或 R⁷ 的芳基或杂芳基部分可以非强制性地带有至多两个选自如下的取代基: -(CH₂)_yC(R¹¹)(R¹²)OH, -(CH₂)_yOR¹¹, -(CH₂)_ySR¹¹, -(CH₂)_ySR¹¹, -(CH₂)_yS(O)R¹¹, -(CH₂)_yS(O)₂R¹¹, -(CH₂)_ySO₂N(R¹¹)₂-, -(CH₂)_yN(R⁴)₂, -(CH₂)_yCOR¹², -OC(R¹¹)₂O-, 其中两个氧原子都连接在芳环上的, -(CH₂)_yCOR¹¹, -(CH₂)_yCON(R¹¹)₂, -(CH₂)_yCO₂R¹¹, -(CH₂)_yOCOR¹¹, 卤素, -CHO, -CF₃, -NO₂, -CN, 和 -R¹², 其中 y 是 0-4; R¹¹ 表示 H 或 1-4 碳烷基; R¹² 表示 1-4 碳烷基。

25

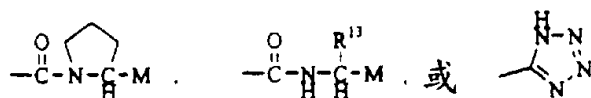
在具体的实施方案中, 优选取代的 R⁷ 基选自任一:





其中 μ 是 1-3 而 R^1 如上定义。

在通式(L)中, G 表示 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{M}$, 或



5

其中 M 表示 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^{11})_2$ 、或 $-\text{CO}_2\text{R}^{12}$, R^{11} 和 R^{12} 定义如上, R^{13} 表示 19 种非环状天然氨基酸的任何一种侧链。

落入该通式(L)范围的该化合物的药用盐也在本发明的范围内。

取代基 T 优选地为卤素, 或醚 OR^4 , 其中 R^4 优选地为 1-12 个碳的烷基或其中的芳基是 6-10 个碳的而烷基部分含 1-4 个碳的芳烷基。最优选地, T 是卤素, 而当 T 是 OR^4 , R^4 是 1-6 个碳的烷基, 或苄基。

定义 T 取代基数量的下标 x 优选地是 1 或 2, 最优选地是 1, 该取代基在 A 环的 4 位。

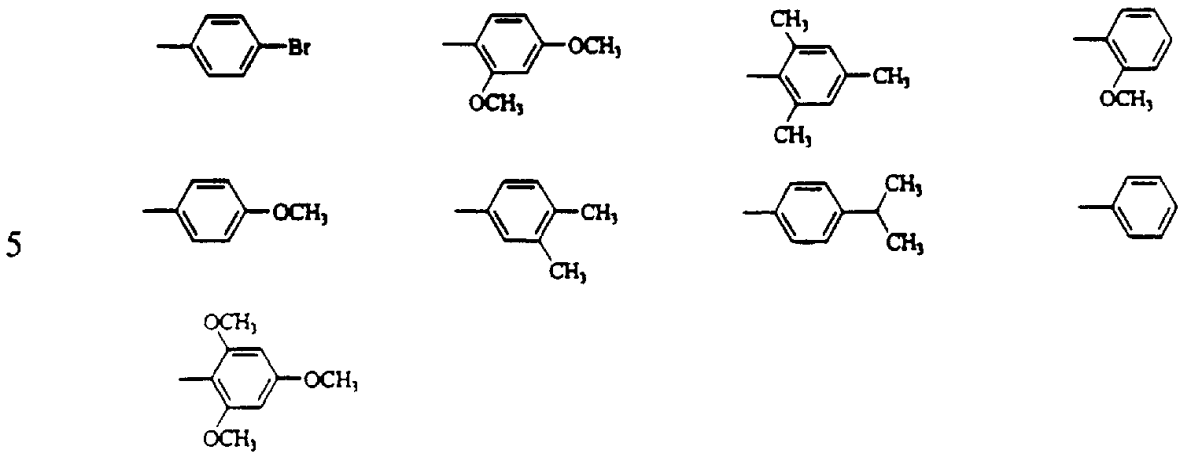
应该理解, 本文所用的术语“烷基”指直链, 支链, 环状, 和多环物。术语“卤代烷基”指部分或全卤代的烷基, 例如 $-(\text{CH}_2)_2\text{Cl}$, $-\text{CF}_3$ 和 $-\text{C}_6\text{F}_{13}$ 。

在这些方案之一中, 本发明涉及其中至少一个单元 A, B, T, 和 E 包含杂芳香环的通式(L)化合物。优选的含芳香环的化合物是其中杂芳基是 4-9 碳, 包括含有 O, S, 或 NR^1 (当环是 5-员时), 和 N (当所说的环是 6-员时) 的 5-6 员杂芳香环。特别优选的含杂芳香环的化合物是 A 和 B 单元至少之一包含噻吩环的化合物。当 A 单元是噻吩时, 它优选地在位置 2 与 B 单元连接, 并在位置 5 带有一个取代基 T。当 B 单元是噻吩时, 它优选地分别通过位置 2 和 5 与 D 和 A 单元连接。

在通式(L)中, A 和 B 环优选地分别是苯基和亚苯基, A 环优选地带至少一个取代基 T, 优选地位于与 A 环和 B 环相连的位置最远处, D 单元优选地是羰基, 优选地在该 E 单元中, r 是 0, t 是 1-5, z 是 $-\text{CO}-$, 而任选取代的 R^7 基是任一:

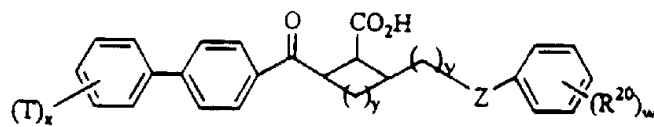


30

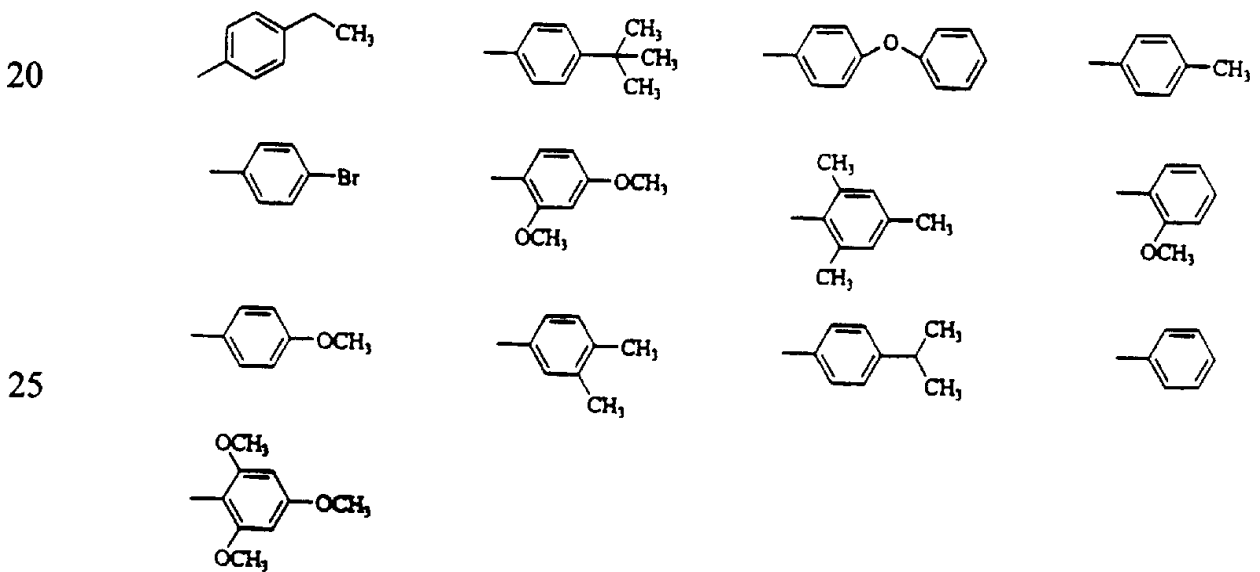


G 优选地为羧酸并连接到该 E 单元上的对 D 单元为 β 的碳原子上。

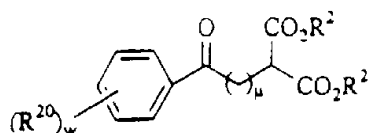
- 10 特别优选的实施方式包括那些具有基质金属蛋白酶抑制活性并有下列通式的化合物



- 15 其中 v 是 1-4, w 是 0-3, y 是 0-2, 而各个 R^{20} 是独立的 1-5 个碳的烷基, 1-5 个碳的烷氧基, 芳基氧基, 卤素, $-\text{COOR}^2$, $-\text{CON}(\text{R}^2)_2$, SOR^3 , SO_2R^3 或 COR^2 , 其中的 R^2 和 R^3 如上定义。优选地, 苯环和 $(\text{R}^{20})_w$ 共同(即 R^7)是下列之一:



- 30 本发明还涉及用于合成一些权利要求的抑制剂的某些中间体。这些中间体是具下列通式的化合物



其中 μ 代表 2-5，而 R^2 优选是烯丙基取代基(指定所有的具有下列结构)。

5 最优选的本发明的化合物在下面给出并命名：

- I) 4'-氯- γ -氧代- α -(4-氧代-4-苯基丁基)-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- II) 4'-氯- γ -氧代- α -(3-氧代-4-苯基丙基)-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- III) 4'-氯- γ -氧代- α -(5-氧代-4-苯基戊基)-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- IV) 4'-氯- γ -氧代- α -(6-氧代-4-苯基己基)-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- 10 V) 4'-氯- γ -氧代- α -(4-氧代-4-(2, 4, 6-三甲氧苯基)丁基)-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- VI) 4'-氯- γ -氧代- α -(4-氧代-4-(2, 4, 6-三甲氧苯基)丁基)-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- VII) 4'-氯- γ -氧代- α -(4-氧代-4-(4-苯氧苯基)丁基)-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- 15 VIII) 4'-氯- α -[4-(4-甲基苯基)-4-氧代丁基]- γ -氧代-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- IX) α -[4-(4-溴代苯基)-4-氧代丁基]-4'-氯代- γ -氧代-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- X) 4'-氯- α -[4-(4-甲氧苯基)-4-氧代丁基]- γ -氧代-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- XI) 4'-氯- α -[4-(3, 4-二甲基苯基)-4-氧代丁基]- γ -氧代-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- 20 XII) 4'-氯- α -[4-(2, 4-二甲氧苯基)-4-氧代丁基]- γ -氧代-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- XIII) 4'-氯- α -[4-[4-(1, 1-二甲基乙基)苯基]-4-氧代丁基]- γ -氧代-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- 25 XIV) 4'-氯- α -[4-(4-乙基苯基)-4-氧代丁基]- γ -氧代-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- XV) 4'-氯- α -[4-(4-(1-甲基乙基)苯基)-4-氧代丁基]- γ -氧代-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸,
- XVI) 4'-氯- α -[4-(2-甲氧苯基)-4-氧代丁基]- γ -氧代-[1, 1'-二苯基]-4-丁酸。

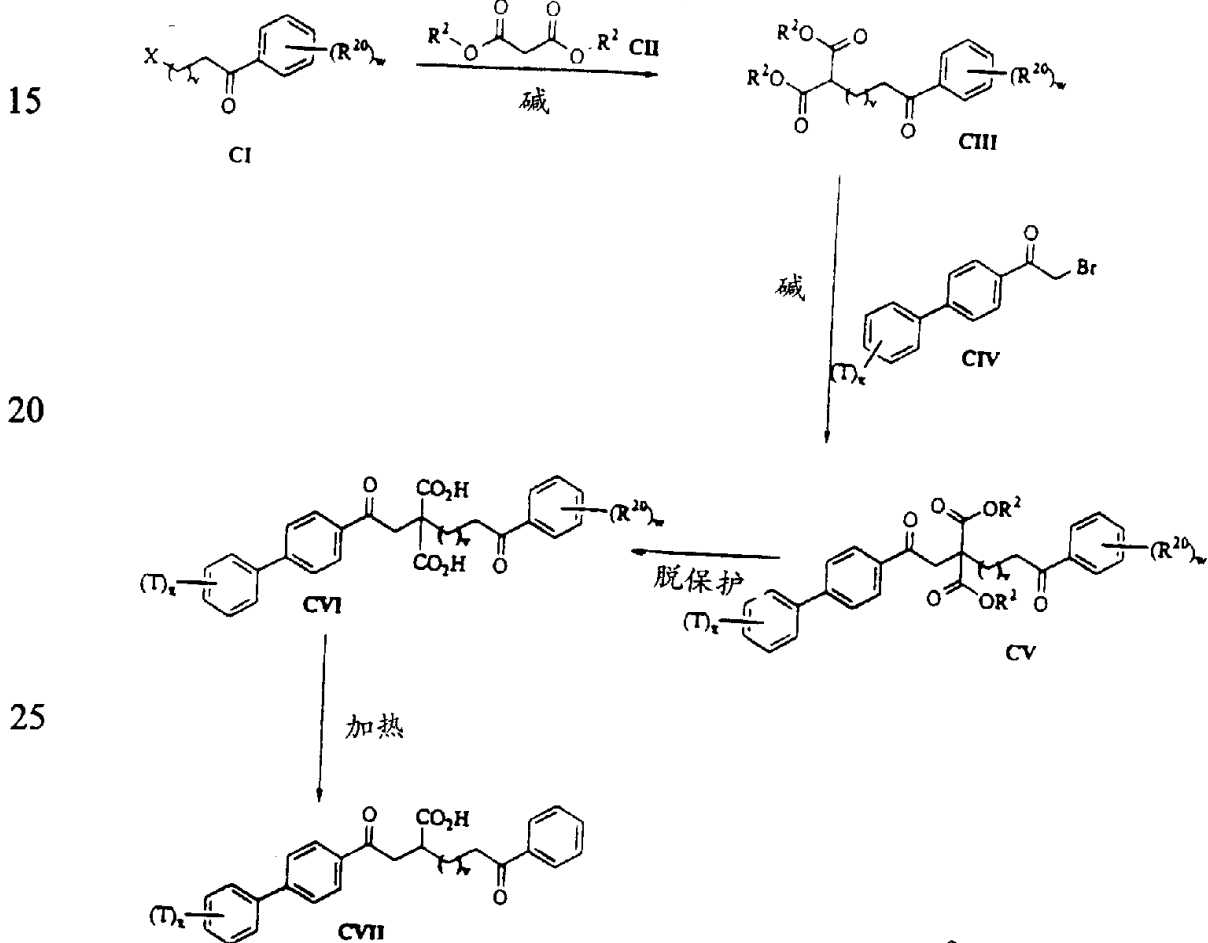
30 本专业熟练的技术人员将认识到，许多本发明化合物存在对映体或非对映体形式，而且在本领域知道，这类立体异构形式通常在生物体系中显示不同的活性。本发明包括对 MMP 具有抑制活性的所有可能的立体异构

体，与其立体异构设计无关，以及其中至少一个具有抑制活性的立体异构体的混合物。

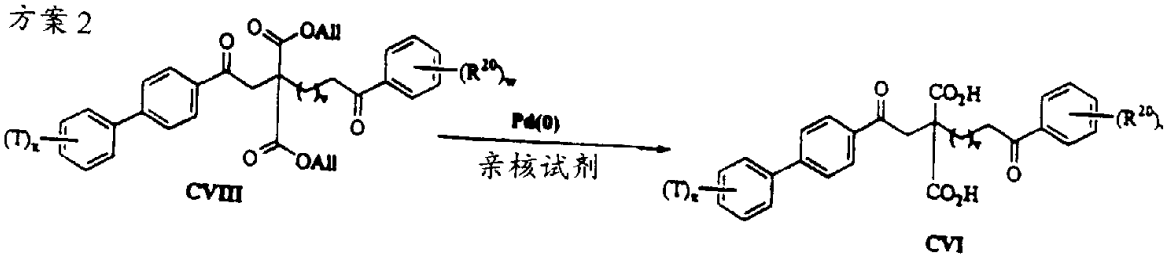
本发明的化合物可以通过用已知的化学反应和工艺制备。不过，下列一般制备方法用于帮助读者合成该抑制剂，在下面描述工作实施例的实验部分有更详细具体的实施例。

该化合物可如方案 1 所示制备。 ω -取代的烷基芳基酮 CI，其中 X 取代基代表离去基，和丙二酸酯 CII 在碱存在下得到相应的丙二酸酯，CIII。合适的离去基包括，但不限于，卤素，磷酸酯，和磺酸酯。合适的碱包括，但不限于，氢氧化物，醇盐，或氢化钠。用取代的溴代苯乙酮 CIV 在碱存在下处理取代的丙二酸酯 CIII 得到二取代的丙二酸酯，CV。脱去丙二酸酯，CV，的保护基即产生二酸 CVI，虽然在某些情况下，脱保护与对羧酸的脱羧酸作用同时进行，CVII。若需要，通过在诸如甲苯或 1,4-二噁烷的溶剂中加热实现脱羧酸化。

方案 1



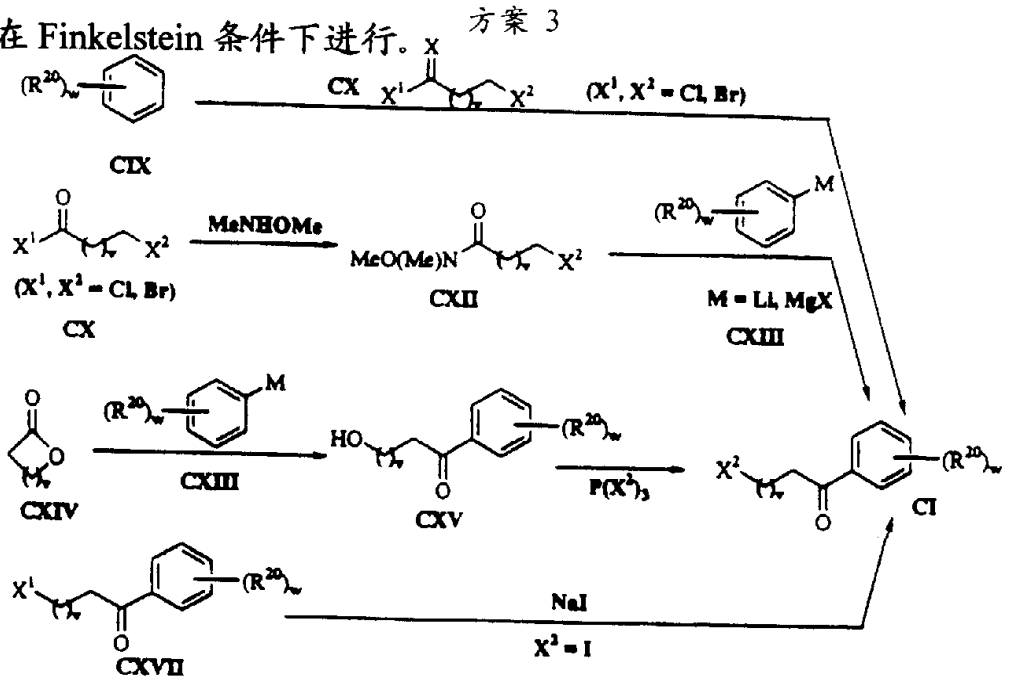
用于脱保护二酯 CV 的方法基于待除去的部分(R^2)。如，通过用钯催化剂在合适的亲核试剂，如胺，丙二酸酯阴离子，或氢化物源的存在下处理实现二(烯丙基酯)CVIII 的脱保护，如方案 2 所示。



5

许多取代的 ω -取代的烷基芳基酮 CI 可市购，通常是溴化物或氯化物。可用任何方法，包括方案 3 的那些，合成该酮。用卤代酸(CX)进行取代的芳基 CIX 的 Friedel-Crafts 酰基化直接得到所需的酮 CI。或者，卤代酸卤化物 CX 和 N, O-二甲基羟基胺反应产生相应的酰胺，其在与芳基 Grignard 试剂或芳基锂，CXIII，反应产生酮 CI。可用芳基亲核试剂 CXII 打开内酯形成羟基酮 CXV。羟基酮 CXV 和卤化源如 PX_3 或 SOCl_2 反应得到酮 CI。羟基酮 CXV 还可转化成相应的羧酸酯或磺酸酯。芳基酮的互变(CXVII 和 CI)可通过用合适的亲核试剂 X^2 置换离去基(X^1)而实现。最好，对于 $\text{X}^1 = \text{Br}, \text{Cl}$ ，此步在 Finkelstein 条件下进行。

10



20

25

本发明化合物的合适的药用盐包括与有机或无机碱形成的加成盐。从这类碱衍生的成盐离子可以是金属离子，例如，铝，碱金属离子，如钠或钾，碱土金属离子如钙或镁，或胺盐离子，其中许多是已知用于此目的。例子包括铵盐，芳基烷基胺如二苄基胺和 N, N-二苄基乙二胺，低级烷基胺如甲基胺，叔丁基胺，普鲁卡因，低级烷基哌啶如 N-乙基哌啶，环烷基胺如环己基胺或二环己基胺，1-金刚烷基胺， benzathine，或从氨基酸如精氨酸，赖氨酸等衍生的盐。生理上可接受的盐如钠盐或钾盐和氨基酸盐可以

30

如下所述在医药上应用，并且是优选的。

5 这些和其它不需要生理上可接受的盐在分离或纯化在下述目的中可接受的产物时是有用的。例如，在通常被称为“经典拆分”的方法中，可购买的对映体纯的胺如(+)-辛可宁在合适的溶剂中可以产生本发明化合物的单个对映体盐晶体，在溶液中留下相反的对映体。因为一个给定的本发明化合物的对映体在生理作用上比其对映体大得多，所以此活性异构体可以以晶体或液相被纯化。该盐通过化合物的酸形式与等当量的，在介质中提供碱性离子的碱反应而生产，其中该盐沉淀或在含水介质中，然后冻干。游离的酸形式可以从盐提供普通中和技术，例如，用硫酸氢钾，盐酸等等
10 获得。

本发明的化合物已经被发现抑制基质金属蛋白酶 MMP-3, MMP-9, 和 MMP-2，并较小程度地抑制 MMP-1，因此可以用于治疗或预防在背景部分列出的病症。由于没有在上面列出的其它 MMP 与上面列出的具有很高程度的同源性，尤其是在催化位点上，因此，可以认为本发明的化合物应该
15 也在不同程度上抑制这类其它 MMP。改变分子中联芳基部分上的取代基，以及所要求的化合物的丙酸或丁酸链的取代基，已经证明能影响所列出的 MMP 的相对抑制。因此，此一般类型的化合物可以通过选择特定的取代基而“调节”，从而使与特定病理状况有关的特定的 MMP 的抑制被加强，而使不包括的 MMP 少受影响。

20 治疗基质金属蛋白酶-介导的病症的方法可以在显示这类病症的哺乳动物，包括人身上实施。

本发明的抑制剂被期望用于兽医和人。因此，它们将被用于药物组合
25 物中，该药物组合物含有活性成分加一种或多种药学上可接受的载体，稀释剂，填充剂，粘合剂，和其它赋形剂，取决于给药方式和期望的剂量形式。

抑制剂的给药可以是本专业人员已知的任何合适的方式。合适的肠胃
30 外给药的例子包括静脉内，关节内，皮下和肌肉内途径。静脉内给药可以被用于获得药物的峰血浆浓度的急性调节。改进的半衰期和药物对关节腔的靶向瞄准可以通过将药物捕集在脂质体内而加强。通过将配位体掺入结合在滑液特异性大分子上的脂质体的外围，可以改善脂质体向关节腔靶向瞄准的选择性。另外，在有或没有药物胶囊化的情况下，肌肉内，关节内或皮

下贮存注射到可降解的微球，例如，包含聚(DL-丙交酯-co-乙交酯)的微球，可被用于获得药物缓释。对于剂量形式改善的便利，可以用 i.p.植入的贮器和间隔如从 Pharmacia 得到的 Percuseal 系统。改善的便利和患者的依从也可以通过用注射笔(例如 Novo Pin 或 Q-pen)或无针喷射注射器(例如从 Bioject 或 Becton Dickinson 得到的)实现。延缓的零-阶或其它精确的控制释放如脉动释放也可以根据需要，用可植入的泵，将药物通过套管输送到滑液空间而实现。其例子包括皮下植入从 ALZA 得到的渗透系，如 ALZET 渗透系。

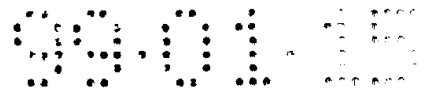
鼻腔输送可以通过将药物掺入生物粘性的颗粒载体($< 200 \mu m$)如包含纤维素，聚丙烯酸酯或 polycarbophil 的载体，与合适的吸收增强剂如磷脂或酰基肉碱结合而实现。可购买的系统包括 DanBiosys 和 Scios Nova 开发的那些。

与在本申请背景部分列出的各种肽化合物相反，本发明化合物的突出贡献是本发明化合物所表现的口服活性。某些化合物已经在各种动物模型中显示出高达 90-98 % 的生物利用率。口服输送可以通过将药物掺入片剂，包衣片剂，糖衣丸，硬或软胶囊，溶液，乳化液或悬浮液中而实现。口服输送也可以通过将药物掺入设计为将药物释放到消化蛋白酶活性很低的结肠中的肠衣胶囊内而实现。其例子包括分别从 ALZA 和 Scherer Drug Delivery Systems 得到的 OROS-CT/OsmetTM 和 PULSINCAPTM 系统。其它系统使用通过结肠特殊细菌偶氮还原酶降解的偶氮-交联聚合物，或 pH 敏感的，通过升高结肠内 pH 而活化的聚丙烯酸酯聚合物。上述系统可以与广泛的吸收增强剂联合使用。

直肠输送可以通过将药物掺入栓剂而实现。

本发明化合物可以通过加入本专业技术人员已知的各种治疗惰性的无机或有机载体，制成上述制剂。这些例子包括，但不限于，乳糖，玉米淀粉或其衍生物，滑石，植物油，蜡，脂肪，多醇如聚乙二醇，水，蔗糖，醇类，甘油等等。各种防腐剂，乳化剂，分散剂，调味剂，湿润剂，抗氧化剂，甜味剂，着色剂，稳定剂，盐，缓冲剂等等也根据需要被加入，帮助稳定制剂，或帮助增加活性成分的生物利用率，产生在口服剂型情况下可接受味道或气味的制剂。

所应用的药物组合物的量将取决于接受者和被治疗的病症。所需的量



不需要过度的实验，由本专业技术人员确定。另外，所需的量可以以测定必需被抑制而治疗病症的靶酶的量为基础进行计算。

5 本发明的基质金属蛋白酶抑制剂不仅可以用于治疗上面讨论的病症，而且可以用于金属蛋白酶的纯化，基质金属蛋白酶活性的试验。这类活性试验既可以用天然或合成的酶制剂体外进行，也可以用，例如，其中异常破坏性酶水平被自然发现(用基因突变或转基因动物)或通过施用外源性药剂或通过破坏关节稳定性的手术而诱导的动物模型体内进行。

下列实施例仅用于举例说明，而不在任何意义上限制本发明。

10

实施例

一般过程:

除非另外说明，所有的反应都在火焰-干燥或烘箱-干燥的玻璃仪器中，在氩气正压下，并在电磁搅拌下进行。敏感的液体和溶液通过注射器或导管转移，并通过橡胶隔膜导入反应器中。除非另外说明，减压浓缩用 Buchi 15 旋转蒸发器在约 15mmHg 下进行。球对球(bulb-to-bulb)浓缩用 Aldrich kugelrohr 仪进行，此时温度指烘箱温度。

原料:

商品级的试剂和溶剂不经进一步纯化而使用，只有四氢呋喃和 1, 2-二甲氧基乙烷(DME)用钾二次蒸馏、二乙醚用苯酮羧基钠蒸馏，二氯甲烷在 20 氩气中用氯化钙蒸馏。

色谱:

分析薄层色谱(TLC)在 Whatman®预涂的玻璃支载的硅胶 GHLF 250mm 板上进行。斑点的显色通过下列技术之一进行: (a)紫外光照, (b)暴露于碘蒸汽中, (c)将板浸入磷钼酸的 10 % 乙醇溶液, 然后加热, 和(d)将板浸入含有 25 0.5 % 浓硫酸的甲氧基苯甲醛的 3 % 乙醇溶液, 然后加热。

柱层析用 230-400 目 EM Science®硅胶进行。旋转色谱在 Harrison research chromatotron 上用预铸造的 SiO₂ 板 Alltech®进行。

仪器:

熔点(mp)用 Thomas-Hoover 熔点仪测定, 并且未经校正。

30 质子 (¹H) 核磁共振 (NMR) 谱用 General Electric GN-OMEGA 300(300MHz)光谱仪测量, 碳 13(¹³C)NMR 谱用 General Electric GN-OMEGA

300(75MHz)光谱仪测量。在下面实验中合成的大部分化合物通过 NMR 分析，并且在各种情况下，光谱与假设的结构一致。

5 质谱数据是用 kratos Concept 1-H 质谱仪、通过液-铯二级离子(LCIMS)、最新的快速原子撞击(FAB)的版本而得到的。在下面实验中合成的大部分化合物通过高分辨率质谱(HRMS)来分析，并在各种情况下，光谱与假设的结构一致。

一般解释:

对于多步工艺，相继的步骤用数字标明。

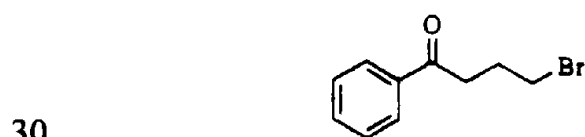
实施例 1-5 制备化合物 I-V

10 步骤 1. 丙二酸二烯丙酯: 向丙二酸(100g, 0.96mol)的烯丙醇(250ml)溶液中加入 H_2SO_4 (0.25ml)并 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 加热该混合物 12 小时。将所得溶液在减压下浓缩至约 100ml 并用己烷(500mL)稀释。用饱和的 K_2CO_3 溶液(250ml)和饱和的 NaCl 溶液(250ml)洗涤此溶液，干燥(Na_2SO_4)并减压浓缩。蒸馏所得的油得到丙二酸二烯丙酯(156g, 88 %), 无色油状物: bp $85\text{ }^\circ\text{C}$ (0.01mmHg); ^1H
 15 NMR
 ($CDCl_3$) δ 3.40 (s, 2H), 4.60 (m, 4H), 5.20 (m, 2H), 5.30 (m, 2H), 5.85 (m, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$)
 δ 41.2, 68.5 (2C), 118.5 (2C), 131.3 (2C), 165.9 (2C).

所得的化合物如下



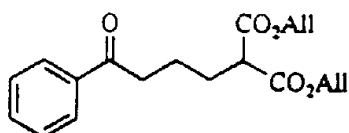
步骤 2. 4-溴丙基苯基(甲)酮: 向 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 下的 $AlCl_3$ (8.0g, 0.60mmol)在无水苯(100ml)中的淤浆中加入 4-溴代丁酰氯(5.8mL)。 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 下搅拌所得的混合物 2
 25 小时，此时， TLC 检测显示酰基氯已完全消耗。将该混合物温至室温，用冰水混合物(100ml)处理，并减压浓缩。该残留物在 $CHCl_3$ (150ml)和水(150ml)间分离。有机相用饱和的 NaCl 溶液(150ml)洗涤，干燥(Na_2SO_4)，并减压浓缩得到浅黄色油(0.5g, 92 %), 无需进一步纯化而使用。所得化合物如下:



步骤 3. 2-(4-苯基-4-氧代丁基)丙二酸二烯丙酯: 向 NaH(60 % 在矿物油中,

0.21g)在无水 THF(35ml)中的淤浆中加入丙二酸二烯丙酯(4.3g, 25mmol)。室温下搅拌所得的淤浆 30 分钟, 并加入 4-溴代苯乙酮(4.6g, 5.0mmol)。回流温度下加热此混合物 18 小时, 冷却至室温, 并用 1M H₃PO₄ 溶液(10ml)酸化。用 CH₂Cl₂(2 × 100mL)萃取所得的混合物。用 1M H₃PO₄ 溶液(100ml), 和饱和的 NaCl 溶液(50ml)连续洗涤该合并的有机相, 干燥(MgSO₄), 并减压浓缩(Kugelrohr, 80 °C, 4mmHg)得到粗制油, 其用旋转色谱(SiO₂, 梯度: 1 % EtoAc/己烷-25 % EtoAc/己烷)进一步纯化得到无色油状的含少量 4-溴代苯乙酮的所需的丙二酸酯(2.1g)。此所得的化合物(如下)在下一步中使用而无需进一步纯化。

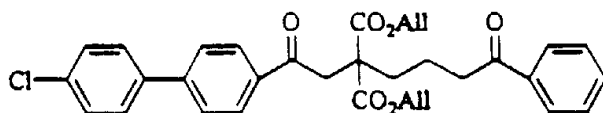
10



步骤 4. 2-(4-苯基-4-氧代丁基)-2-(2-(4-(4-氯代苯基)苯基)-2-氧代)乙基丙二酸二烯丙酯:

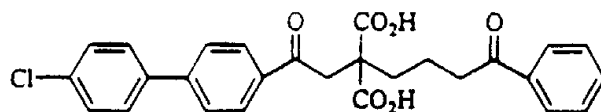
15 用己烷(2 × 5ml)洗涤 NaH(60 %, 在矿物油中, 0.88g, 2.2mmol), 并用 2-(4-苯基-4-氧代丁基)丙二酸二烯丙酯(0.74g)的 DME(5ml)溶液处理并室温下搅拌所得的混合物 30 分钟。将所得的淤浆用 1-(4-(4-氯代苯基)苯基)-2-溴代乙-1-酮(0.60g)和 NaI(0.30g)的 DME(1.5ml)溶液处理。室温下搅拌所得的混合物过夜, 并减压浓缩。残留物在 CH₂Cl₂(100ml)和水(100ml)间分离。干燥(MgSO₄)该有机相并减压浓缩得到棕油油, 用旋转色谱(SiO₂, 梯度: 1 % EtoAc/己烷-50 % EtoAc/己烷)纯化得到无色油状(0.72g, 64 %)的所需产物。所得的化合物如下:

25



步骤 5. 2-(4-苯基-4-氧代丁基)-2-(4-(4-氯代苯基)苯基)-2-氧代乙基)丙二酸: 向 2-(4-苯基-4-氧代丁基)-2-(2-(4-(4-氯代苯基)苯基)-2-氧代乙基)丙二酸二烯丙酯(0.70g)的 1, 4-二噁烷(12.5ml)溶液中加入 Pd(PPh₃)₄(0.028g)和吡咯烷(120μl), 并将所得的溶液于室温下搅拌一小时, 此时, TLC(10 % MeOH/CH₂Cl₂)显示起始反应物已完全消耗。减压浓缩所得的混合物。将残留物溶解于 EtoAc(25ml), 并先后用水(25ml)和 1M H₃PO₄(25ml)洗涤, 干燥

(MgSO₄), 并减压浓缩得到橙色固体(0.51g), 其重结晶(EtOAc/己烷)得到浅褐色固体(0.27g, 45%), 如下:



5

步骤 6. 2-(2-(4-(4-氯代苯基)苯基)-2-氧代乙基)-6-苯基-6-氧代己酸

回流温度下加热 2-(4-苯基-4-氧代丁基)-2-(2-(4-(4-氯代苯基)苯基)-2-氧代乙基)丙二酸(0.26g)的二噁烷(55ml)溶液, 并冷却至室温, 减压浓缩得到棕色油, 其重结晶(EtOAc/己烷)得到所需的浅黄色固态产物(0.11g, 44%):

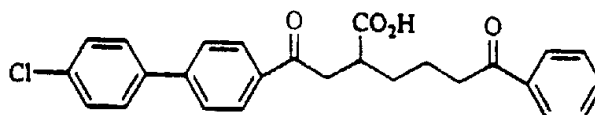
10

TLC (10% MeOH/CH₂Cl₂) R_f

0.56; ¹H NMR (DMSO) δ 1.64-1.71 (m, 4H), 2.88-2.90 (m, 1H), 3.05-3.10 (m, 2H), 3.16 (dd, J=4.0, 18.0 Hz, 1H), 3.44 (dd, J=9.6, 18.0 Hz, 1H), 7.50-7.66 (m, 5H), 7.78-7.86 (m, 4H), 7.98 (dm, J=7.0 Hz, 2H), 8.07 (d, J=8.5 Hz, 2H), 12.2 (br s, 1H); ¹³C NMR (DMSO) δ 21.9 (2C), 31.6, 38.2 (2C), 127.4 (2C), 129.2 (4C), 129.3 (2C), 129.6 (2C), 133.6, 133.8, 136.0, 137.2, 138.2, 143.7, 176.7, 198.5, 200.3; LRMS m/z (% 丰度) 435 (M⁺+H, 100), 437 (38).

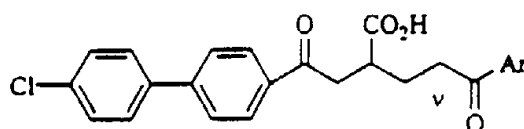
15

所得的化合物如下:



20

其它以类似方式合成的基本结构如下的实施例包括:



25

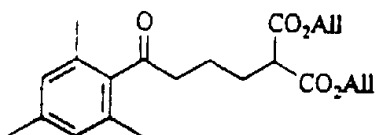
对比. #	Ar	v	TLC(R _f) ^a	羟基 ¹³ C NMR(δ)
II	C ₆ H ₅	1	0.43	177.2, 199.1, 200.5
III	C ₆ H ₅	3	0.54	176.7, 198.6, 200.5
IV	C ₆ H ₅	4	0.27 ^b	179.3, 197.8(2C)
V	2, 4, 6-(CH ₃ O) ₃ C ₆ H ₂	2	0.49	180.6, 197.9, 204.4

^aTLC 溶剂系统是 10 % MeOH/CH₂Cl₂, ^b5 % MeOH/CH₂Cl₂

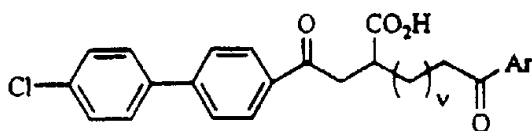
实施例 6 和 7 制备化合物 VI 和 VII

步骤 1. 2-(4-(2, 4, 6-三甲基苯基)-4-氧代丁基)丙二酸二烯丙酯:

向 NaH(60 %, 在矿物油中, 0.36g)和 NaI(0.55g)的无水 THF(37ml)淤浆中加入丙二酸二烯丙酯(3.2g, 18.5mmol)。在室温下搅拌所得的淤浆 30 分钟, 然后加入 4-溴-1-(2, 4, 6-三甲基苯基)-1-丁酮(1.0g, 3.7mmol)。在回流温度下加热该混合物 18 小时, 冷却至室温, 并用 1M H₃PO₄ 溶液(10ml)酸化。用 CH₂Cl₂(2 × 100ml)萃取所得的混合物。先后用 1M H₃PO₄ 溶液(100ml), 和饱和的 NaCl 溶液(50ml)洗涤合并的有机相, 干燥(MgSO₄), 并减压下浓缩(Kugelrohr, 80 °C, (4mmHg))得到粗制油, 其用旋转色谱(SiO₂, 梯度: 1 % EtoAc/己烷-5 % EtoAc/己烷)进一步纯化得到起始的溴化物(0.34g), 随后是所需的丙二酸酯(0.36g)。所得的化合物如下并无需如实施例 1 步骤 4 中所述进一步纯化而可用于下一步。



下列通式的实施例以类似的方法合成, 包括:

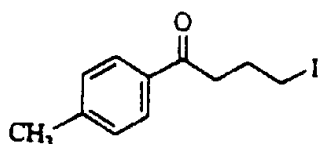


化合物	Ar	v	TLC(R _f) ^a	羟基 ¹³ C NMR(δ)
VI	2, 4, 6-(CH ₃) ₃ C ₆ H ₂	2	0.57 ^a	176.6, 198.5, 210.2
VII	4-(C ₆ H ₅ O)C ₆ H ₄	2	0.30 ^b	180.0, 197.7, 198.6

TLC 溶剂系统是: (a) 10 % MeOH/CH₂Cl₂; (b) 5 % MeOH/CH₂Cl₂

实施例 8-15 制备化合物 VIII-XV

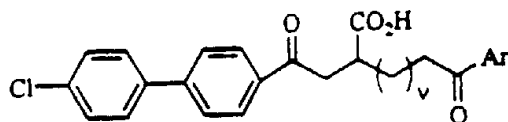
步骤 1: 4-碘-1-(4-甲基苯基)-1-丁酮: 在回流温度下加热 NaI(7.49g)和 4-氯-1-(4-甲基苯基)-1-丁酮(4.9g)在 2-丁酮中的混合物 18 小时, 冷却至室温, 并过滤除去固体。减压下浓缩滤液并在己烷(250ml)和水(250ml)间分离残留物。先后用饱和的 NaHSO₃ 溶液(100ml), 和饱和的 NaCl 溶液(100ml)洗涤有机相, 然后干燥(MgSO₄), 并减压下浓缩得到灰色固态的所需产物(3.2g, 44 %)。所得化合物如下:



并无需如实施例 1 步骤 3 所述的进一步纯化而可用于下一步。

以类似方式合成的下列通式的实施例包括:

5



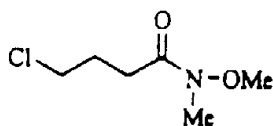
对比. #	Ar	v	TLC(R _f) ^a	羟基 ¹³ C NMR(δ)
VIII	4-(CH ₃)C ₆ H ₄	2	0.51	176.6, 198.5, 199.9
IX	4-BrC ₆ H ₄	2	0.41	179.9, 198.0, 198.9
X	4-(CH ₃ O)C ₆ H ₄	2	0.42	180.1, 197.8, 198.7
XI	3, 4-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃	2	0.43	180.2, 198.0, 200.0
XII	2, 4-(CH ₃ O) ₂ C ₆ H ₃	2	0.32	180.1, 198.0, 200.2
XIII	4-((CH ₃) ₃ C) ₃ C ₆ H ₄	2	0.43	180.1, 197.8, 199.7
XIV	4-(C ₂ H ₅) ₃ C ₆ H ₄	2	0.49	179.2, 197.8, 199.7
XV	4-((CH ₃) ₂ CH)C ₆ H ₄	2	0.40	180.1, 197.8, 199.7

^aTCL 溶剂系统是 10 % MeOH/CH₂Cl₂

实施例 16 制备化合物 XVI

10 步骤 1. N-甲基-N-甲氧基-4-氯代丁酰胺:

向 N, O-二甲基羟基胺盐酸盐(9.8g)的吡啶(250ml)溶液中加入 4-氯代丁酰氯(5.6ml)并在室温下搅拌所得的混合物 3 天。减压下浓缩所得的混合物,溶于 CH₂Cl₂,先后用饱和的 NaHCO₃ 溶液(100ml),水(100ml), 1M H₃PO₄ 溶液(100ml),和饱和的 NaCl 溶液(100ml)洗涤,干燥(MgSO₄),并浓缩。通过旋转色谱(SiO₂, 梯度: 1 % EtoAc/己烷-50 % EtoAc/己烷)纯化所得的橙色油得到所需的黄色油状物(如下)(2.7g, 32 %):



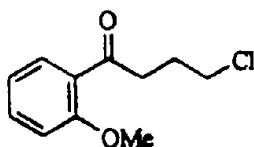
20 步骤 2. 4-氯-1-(2-甲氧苯基)-1-丁酮:

氩气下火焰干燥 Mg(2.3g)和碘(6 晶体)的混合物以得到红紫色光雾。冷却并加入 THF(10ml),接着加入 2-溴代苯甲醚(3ml)的 THF(20ml)溶液。当起

始反应平息后, 加入 2-溴代苯甲醚(8.3ml)的 THF(30ml)溶液并回流加热该混合物 2 小时, 并冷却至室温。

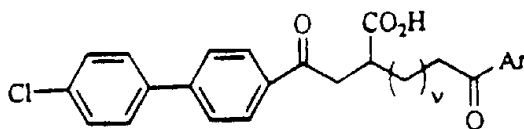
向 N-甲基-N-甲氧基-4-氯代丁酰胺(1.24g)在 0 °C 的 THF(75ml)中的混合物中加入 Grignard 试剂(约 1.44M, 6.25ml)并 0 °C 下搅拌该反应混合物 3 天。

- 5 室温下进一步反应 6 小时后, 通过加入饱和的 NH₄Cl 溶液(100ml)和水(100ml)骤冷, 而各相分离。用 CH₂Cl₂(2 × 100ml)萃取水相。用饱和的 NaCl 溶液(100ml)洗涤该合并的有机相, 干燥(MgSO₄)并减压下浓缩得到橙色油(1.24g)。用旋转色谱(SiO₂, 梯度: 2 % EtoAc/己烷-10 % EtoAc/己烷)纯化该粗制酮得到无色油状物(0.30g, 19 %)。其无需如实施例 8 步骤 1 所述的进一步纯化而可用于下一步。所得到的化合物如下:



以类似方式合成的下列通式的实施例包括:

15



对比 #	Ar	v	TLC(R _f) ^a	羟基 ¹³ C NMR(δ)
XVI	2-(CH ₃ O)C ₆ H ₄	2	0.34	176.8, 197.9, 202.5

TCL 溶剂系统是 10 % MeOH/CH₂Cl₂

20

实施例 17

本发明化合物的生物试验

MMP 抑制的 P218 熄灭荧光试验

- 25 P218 熄灭荧光试验(微荧光计剖面分析试验)是最初由 C.G. Knight 等, FEBS Letters, 296, 163-266(1992)所述的, 在小杯中对于相关底物和许多基质金属蛋白酶(MMP)试验的修改。该试验用本发明的各个实施例化合物和三种 MMP, MMP-3, MMP-9 和 MMP-2 进行, 适合于在 96-孔微滴板和 Hamilton AT[®]工作站中如下平行地分析。

★ P218 荧光团底物

P218 是在 N-端位置含有 4-乙酰基-7-香豆素(MCA)基团, 并在内部含有

3-(2, 4-二硝基苯基)-(L)-2, 3-二氨基丙酰基(DPA)基团的合成底物。这是由 Knight(1992)报道的, 用作基质金属蛋白酶底物的肽的修饰物。一旦 P218 肽裂解(在 Ala-Leu 键上推定的剪断位点), MCA 基团的荧光可以在荧光计上被检测, 在 328nm 激发, 在 393nm 发射。P218 目前由 BACHEM Bioscience, Inc. 为 Bayer Corp 独家生产。P218 具有如下结构:

H-MCA-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Leu-DPA-Ala-Arg-NH₂(MW 1332.2)

重组人 CHO 溶基质素(MMP-3):

重组人 CHO Pro-MMP-3: 人 CHO Pro-溶基质素-257(pro-MMP-3)如 T. J. Housley 等, 生物化学杂志, 268, 4481-4487(1993)所述的被表达和纯化。

10 Pro-MMP-3 的活化: Pro-MMP-3 以 1.72 μ M(100 μ g/mL)在由 pH 7.5 的 5mM Tris, 5mM 氯化钙, 25mM 氯化钠, 和 0.005 % Brij-35 组成的 MMP-3 活化缓冲液中用 TPCK(N-甲磺酰基-(L)-苯丙氨酸氯甲基酮)胰蛋白酶 (1:100w/w 对 pro-MMP)在 25 °C 温育 30 分钟而活化。反应通过加入大豆胰蛋白酶抑制剂(SBTI; 5:1 w/w 对胰蛋白酶浓度)而终止。此活化的原始记录导致 45kDa 活性 MMP-3 的形成, 还含有酶的 C-端部分。

制备人重组 Pro-明胶酶 A(MMP-2):

根据 R. Fridman 等, 生物化学杂志, 267, 15398-405, (1992)的方法, 用牛痘表达系统制备人重组 Pro-MMP-2: 人 Pro-明胶酶 A(Pro-MMP-2)。

20 Pro-MMP-2 的活化: 252mg/mL 的 Pro-MMP-2 在由 pH 7.5 的 25mM Tris, 5mM 氯化钙, 150mM 氯化钠, 和 0.005 % Brij-35 组成的 MMP-2 活化缓冲液中稀释 1:5 至最终浓度 50mg/mL。对氨基苯基汞乙酸盐(APMA)以 10mM(3.5mg/mL)在 0.05N 氢氧化钠中制备。以 1/20 反应体积加入 APMA 溶液, 使最终 APMA 浓度为 0.5mM, 将酶在 37 °C 温育 30 分钟。将活化的 MMP-2(15mL)对 2L MMP-2 活化缓冲液(渗透膜用由 MMP-2 活化缓冲液中 0.1 % BSA 组成的溶液预处理 1 分钟, 接着彻底水洗)。将酶在 Centricon 浓缩器(浓缩器也用由 MMP-2 活化缓冲液中 0.1 % BSA 组成的溶液预处理 1 分钟, 接着水洗, 然后用 MMP-2 活化缓冲液洗涤), 再稀释, 接着重复再浓缩两次。将酶用 MMP-2 活化缓冲液稀释至 7.5mL(原始体积的 0.5 倍)。

制备人重组 Pro-明胶酶 B(MMP-9):

30 用杆状病毒蛋白质表达体系将如 S. M. Wilhelm 等, 生物化学杂志, 264, 17213-17221(1989)所述的从 U937 cDNA 衍生的人重组 Pro-MMP-9: 人重组

Pro-明胶酶 B(Pro-MMP-9)表达为全-长形式。该前-酶用由 M. S. Hibbs 等, 生物化学杂志, 260, 2493-500(1984)所述的方法纯化。

Pro-MMP-9 的活化: 在由 pH 7.4 的 50mM Tris, 150mM 氯化钠, 10mM 氯化钙, 和 0.005 % Brij-35 组成的 MMP-9 活化缓冲液中的 Pro-MMP-9(20
5 μ g/mL)通过在 37 °C, 用 0.5mM 对氨基苯基汞乙酸盐(APMA)温育 3.5 小时而活化。该酶相对同样的缓冲液渗析。

仪器:

Hamilton Microlab AT Plus[®]: MMP-剖面分析试验用 Hamilton Microlab AT Plus[®]自动化进行。Hamilton 被编程为: (1)用抑制剂在 100 %
10 DMSO 中的 2.5mM 贮存溶液自动连续稀释至 11 潜在抑制剂; (2)将底物分配在 96-孔 Cytofluor 板中, 接种分配抑制剂; 和(3)往板中加入单个酶, 混合以启动反应。各个附加酶的后续板通过在底物加入的时刻启动程序而自动制备, 再与稀释的抑制剂混合, 通过加入酶启动反应。以这种方式, 所有的 MMP 试验都用相同的抑制剂稀释液进行。

15 Millipore Cytofluor II: 温育之后, 将板在 Cytofluor II 荧光读数计上读数, 该读数计在 340nm 激发, 在 395nm 发射, 放大装置在 80。

缓冲液:

微荧光计反应缓冲液(MRB): 用于微荧光计试验的试验化合物, 酶和 P218 底物的稀释液在由 pH 6.5 的 50mM 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)与 10mM
20 氯化钙, 150mM 氯化钠, 和 0.005 % Brij-35 和 1 % DMSO 组成的微荧光计反应缓冲液(MRB)中制造。

方法:

MMP 微荧光计剖面分析试验。该试验用最终 P218 浓度 6 μ M, 大约 0.5 至 0.8nM 活化的 MMP, 和可变的抑制剂浓度进行。Hamilton Microlab
25 AT Plus[®]被编程为在试验中, 从 2.5mM 贮存(100 % DMSO)连续稀释至 11 化合物, 至最终化合物浓度的 10-倍。开始, 仪器将各种量的微荧光计反应缓冲液(MRB)输送到 96-管架的 1mL Marsh 稀释管内。该仪器取 20 μ L 抑制剂(2.5mM), 并将其与 Marsh 架中 A 排的缓冲液混合, 产生 50 μ M 的抑制剂浓度。该抑制剂然后系统地稀释至 10, 5, 0.2, 0.05 和 0.01 μ M。在样品架的位置 1 上只含有用于试验中的“仅有酶”孔的 DMSO, 这导致在第
30 1 列, A 排至 H 排中没有抑制剂。仪器然后分配 107 μ L P218 至单个 96-孔

Cytofluor 微滴板中。将仪器再混合，并从 Marsh 架上的 A 排至 G 排装载 14.5μL 稀释的化合物到微滴板的相应的排中。(H 排表示“背景”排。往其中加入 39.5μL 微荧光计反应缓冲液代替药物或酶)。通过从 BSA-处理的试剂储罐中将 25μL 合适的酶(最终酶浓度的 5.86 倍)到各个孔中，排除 H 排，

5 “背景”排。(酶储罐用在含有 150mM 氯化钠的 pH 7.5 的 50mM Tris 中的 1 % BSA 在室温下预处理 1 小时，接着用水充分洗涤，并在室温下干燥)。

加入酶并混合后，将该板覆盖并在 37 °C 温育 25 分钟。附加的酶以相同的方式通过启动 Hamiton 程序而试验，将 P218 底物分配在微滴板中，接着再混合，并从相同的 Marsh 架上将药物分配到微滴板上。然后将第二种(或

10 第三种，等等)被试验的 MMP 从试剂架上分配到微滴板上，混合然后覆盖和温育。

在微荧光计试验中的 IC₅₀ 测定：在 Cytofluoro II 上产生的数据被从输出的“CSV”文件复制到户主的 Excel 展开页上。从各种 MMP((每个 MMP 一个 96-孔板)得到的数据被同时计算。各个药物浓度的抑制百分数通过比较

15 含有化合物的孔与在 1 列中“仅有酶”孔的水解量(水解 25 分钟时产生的荧光单元)而测定。减去背景，如下计算抑制百分数：

$$((\text{对照值}-\text{处理值})/\text{对照值}) \times 100$$

对于抑制剂浓度 5, 1, 0.5, 0.1, 0.02, 0.005 和 0.001 μ M，测定抑制百分数。抑制百分数对抑制剂浓度的对数的线性回归分析被用于获得 IC₅₀ 值。

20 某些本发明化合物的剖面分析试验数据

表 1

本发明的某些化合物的剖面检测数据

化合物	MMP-3 IC ₅₀ (nM)	MMP-9IC ₅₀ (nM)	MMP-2IC ₅₀ (nM)
I	65.0	65.7	9.97
II	96.0	127	9.60
III	61.1	52.4	7.52
IV	109	175	34.1
V	71.7	132	8.13
VI	39.6	1310	30.8
VII	367	65.7	131
VIII	69.1	108	19.0

IX	125	131	28.3
X	122	145	25.1
XI	104	105	48.3
XII	115	225	25.1
XIII	222	167	71.6
XIV	89	126	29.4
XV	130	133	35.7
XVI	48.2	152	26.2

本发明的其它方案考虑本文公开的本发明说明书或实施，对于本专业技术人员将是显而易见的。说明书和实施例认为只是举例性的，本发明真正的范围和精神在权利要求书中给出。

本文中的Ph是苯基，Me是甲基，THF是四氢呋喃，Bu是丁基，tBu是叔丁基，Et是乙基。