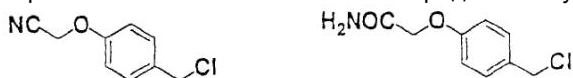


Даний винахід передбачає нові сполуки, корисні у виробництві біологічно активних сполук, а також способи для їх отримання. Більш конкретно, даний винахід передбачає нові арилалкілдіалкіламіни, які можуть бути використані при отриманні фармацевтичних продуктів.

Матричні металопротеїнази (ММП) являють собою групу ферментів, які беруть участь в патологічному руйнуванні з'єднувальної тканини і базальних мембран [Woessner, J.F., Jr. FASEB J. 1991, 5, 2145; Birkedal-Hansen, H.; Moore, W.G.I.; Bodden, M.K.; Windsor, L.J.; Birkedal-Kansen, B.; DeCarlo, A.; Engler, J.A. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1993, 4, 197; Cawston, T.E. Pharmacol. Ther. 1996, 70, 163; Powell, W.C.; Matrisian, L.M. Cur. Top. Microbiol. i Immunol. 1996, 213, 1]. Ці цинковмісні сидопептидази включають декілька підгруп ферментів, включаючи колагенази, стромелізини і желатинази. Серед цих класів желатинази, як показано, с ММП, що найбільш тісно беруть участь в зростанні і поширенні пухлин, в той час як колагенази пов'язують з патогенезом остеоартриту [Howell, D.S.; Pelletier, J.-P. In Arthritis i Allied Conditions: McCarthy, D.J.; Koopman, W.J., Eds.; Lea i Febiger: Philadelphia. 1993; 12th Edition Vol. 2, pp. 1723; Dean, D.D. Sem. Arthritis Rheum. 1991, 20, 2; Crawford, H.C; Matrisian, L.M. Invasion Metast. 1994-95, 14, 234; Ray, J.M.; Stetler-Stevenson, W.G. Exp. Opin. Invest. Drugs. 1996, 5, 323].

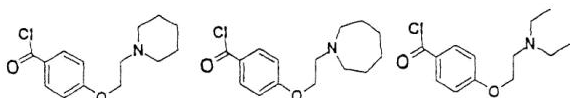
Використання гормонзамісної терапії для попередження втрати кісткової тканини у жінок в період після менопаузи добре відоме. Нормальний протокол лікування включає введення естрогенів з використанням таких препаратів, що включають естрон, естріол, етинілестрадіол, або кон'юговані естрогени, виділені з природних джерел (наприклад, кон'юговані естрогени Premarin® від Wyeth-Ayerst). Для деяких пацієнтів терапія може бути протипоказана через проліферативні впливи вільних естрогенів (естрогенів, присутніх поза поєднанням з прогестинами) на тканину матки. Ця проліферація зв'язується з підвищеним ризиком ендометриту і/або раку слизової оболонки матки. Впливи вільних естрогенів на тканині грудей є менш вивченими, але являють собою предмет деякого турботи. Необхідність в естрогенах, які можуть підтримувати щадячий вплив відносно кісткової тканини, при цьому мінімізуючи всі проліферативні впливи на матку і груди, є очевидною. Певні нестероїдні антиестрогени, підтримують масу кісток, як показано на моделях пацієнтів з видаленими яєчниками, а також при клінічних випробуваннях на людях. Тамоксифен (торгова марка Novadex® цитрат тамоксифену від Zeneca Pharmaceuticals, Wilmington, Delaware), наприклад, є корисним паліативом при лікуванні раку грудей і, як продемонстровано, виявляє вплив, подібний агоністу естрогену, на кісткову тканину у людей. Однак він також є частковим агоністом в матці, і це дає причину для деякої турботи. Raloxifene, антиестроген на основі бензотіофена, як показано, стимулює зростання матки у пацієнтів, з видаленими яєчниками в меншій мірі, ніж Тамоксифен, при цьому зберігаючи здатність зберігати кісткову тканину. Відповідний огляд по тканино-селективним естрогенам можна побачити в статті ["Tissue-Selective Actions Of Estrogen Analogs", Bone Vol.17, No.4, October 1995. 181S-190S].

Даний винахід передбачає нові проміжні сполуки, які можуть бути використані при отриманні фармацевтичних сполук для антиестрогенних і ММП-інгібуючих застосувань. Використання 4-карбамоїлметоксиметокси-бензилхлоридних сполук формул:

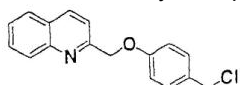


розкрито в NL 6402393: 1964; i Chem. Abstr. 1965, 62. 7698.

Використання 4-(2-діалкіламіноетокси)бензоїлхлоридних сполук структури:



розкрито в Sharpe C. J. et.al. J. Med. Chem. 1972, 15, 523 and Jones, C D. et.al. J. Med. Chem. 1984, 27, 1057. Подібно цьому, використання 4-(2-хінолінілметокси)бензилхлориду

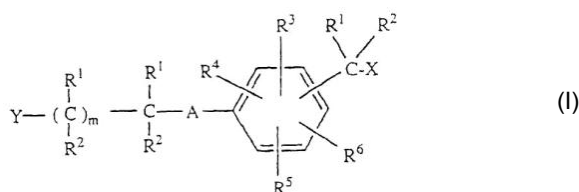


розкрито Huang, F-C. et.al. J. Med. Chem. 1990, 33, 1194.

Даний винахід передбачає нові сполуки, а також способи їх отримання, які можуть бути використані при отриманні фармацевтично активних сполук. Сполуки по даному винаходу можуть, зокрема, бути використані як проміжні сполуки при отриманні фармацевтичних сполук, такі як низькомолекулярні, що не містять пептидів інгібітори матричних металопротеїназ (наприклад, желатиназ, стромелізинів і колагеназ), і ФНП-перетворюючий фермент (TACE, що перетворює фермент фактору некрозу пухлини), які є корисними для використання при лікуванні захворювань, в яких ці ферменти задіяні, таких як артрит, метастази пухлин, покриття виразками тканин, патологічне загоєння ран, захворювання періодонтальної тканини, захворювання кісткової тканини, протеїнурія, захворювання аневіризми аорти, дегенеративні втрати хрящової тканини після травматичного пошкодження суглобів, захворювання нервової системи, пов'язане з процесом демієлінізації, і ВІЛ-інфекція. Крім того, сполуки по даному винаходу можуть бути використані для отримання сполук, які поведуться подібно агоністам естрогенів шляхом пониження рівня холестерину і запобігання втратам кісткової тканини.

Отже, вказані сполуки корисні для лікування багатьох захворювань, пов'язаних з недостатністю, включаючи остеопороз, гіпертрофію простати, безпліддя, раку грудей, внутриматочну гіперплазію і рак, серцево-судинні захворювання, контрацепцію, хворобу Альцгеймера і меланому.

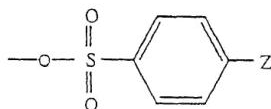
Даний винахід включає нові сполуки формули (I):



де:

R₁ і R₂ незалежно вибирають з H; C₁-C₁₂ алкілу, переважно C₁-C₆алкілу, або C₁-C₆перфторованого алкілу, переважно -CF₃;

X є відщеплюваною групою, такою як галоген, -O-SO₂-CH₃, -O-SO₂-CH₃, або залишком структури:



Z вибирають з -NO₂, галогену, -CH або -CF₃;

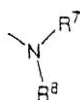
A вибирають з -O- або -S-, -SO- або -SO₂;

m є цілим числом від 0 до 3, переважно 1;

R₃, R₄, R₅ і R₆ незалежно вибирають з H, галогену, -NO₂, алкілу (переважно C₁-C₁₂алкілу, більш переважно C₁-C₆алкілу), алкокси (переважно C₁-C₁₂алкокси, більш переважно C₁-C₆алкокси), C₁-C₆перфторованого алкілу (переважно -CF₃), OH або їх C₁-C₄ складного ефіру або алкілових простих ефірів, CN, -O-R¹, -O-Ar, -S-R¹, -S-Ar, -SO-R¹, -SO-Ar, -SO₂-R¹, -SO₂-Ar, -CO-R¹, -CO-Ar, -CO₂-R¹ або -CO²-Ar;

Y вибирають з:

а) залишку:



де R₇ і R₈ незалежно вибрані з групи H, C₁-C₆алкілу або фенілу.

b) п'ятичленного насиченого, ненасиченого або частково ненасиченого гетероциклу, що включає до двох гетероатомів, вибраних з групи, що складається з -O-, -NH-, -N(C₁-C₄алкілу)-, -N= і -S(O)_n-, де n є цілим числом від 0 до 2, необов'язково заміщених 1-3 заступниками, незалежно, вибраними з групи, що складається з водню, гідроксилу, галогену, C₁-C₄алкілу, тригалогенметилу, C₁-C₄алкокси, тригалогенметокси, C₁-C₄ацилокси, C₁-C₄алкілтію, C₁-C₄алкілсульфінату, C₁-C₄алкілсульфонату, гідрокси(C₁-C₄)алкілу, фенілу, необов'язково заміщеного 1-3 (C₁-C₄) алкілом, -CO₂H, -CN, -CONHR¹, -NH₂, C₁-C₄ алкіламіно, C₁-C₄діалкіламіно, -NHSO₂R¹, -NHCOR¹, -NO₂;

c) шестичленного насиченого, ненасиченого або частково ненасиченого гетероциклу, що включає аж до двох гетероатомів, вибраних з групи, що складається з -O-, -NH-, -N(C₁-C₄алкіл)-, -N= і -S(O)_n-, де n є цілим числом від 0 до 2, необов'язково заміщених 1-3 заступниками, незалежно вибраними з групи, що складається з водню, гідроксилу, галогену, C₁-C₄алкілу, тригалогенметилу, C₁-C₄алкокси, тригалогенметокси, C₁-C₄ацилокси, C₁-C₄алкілтію, C₁-C₄алкілсульфінату, C₁-C₄алкілсульфонату, гідрокси(C₁-C₄)алкілу, фенілу, необов'язково заміщеного 1-3 (C₁-C₄) алкілом, -CO₂H, -CN, -CONHR¹, -NH₂, C₁-C₄алкіламіно, C₁-C₄діалкіламіно, -NHSO₂R¹, -NHCOR¹, -NO₂;

d) семичленного насиченого, ненасиченого або частково ненасиченого гетероциклу, що включає аж до двох гетероатомів, вибраних з групи, що складається з -O-, -NH-, -N(C₁-C₄алкілу)-, -N= і -S(O)_n-, де n є цілим числом від 0 до 2, необов'язково заміщених 1-3 заступниками, незалежно вибраними з групи, що складається з водню, гідроксилу, галогену, C₁-C₄алкілу, тригалогенметилу, C₁-C₄алкокси, тригалогенметокси, C₁-C₄ацилокси, C₁-C₄алкілтію, C₁-C₄алкілсульфінату, C₁-C₄алкілсульфонату, гідрокси(C₁-C₄)алкілу, фенілу, необов'язково заміщеного 1-3 (C₁-C₄) алкілом, -CO₂H, -CN, -CONHR¹, -NH₂, C₁-C₄алкіламіно, C₁-C₄діалкіламіно, -NHSO₂R¹, -NHCOR¹, -NO₂; або

e) біциклічного гетероциклу, що містить від 6 до 12 атомів вуглецю, або з внутрішнім містковим зв'язком, або конденсованого, і що включає аж до двох гетероатомів, вибраних з групи, що складається з -O-, -NH-, -N(C₁-C₄алкілу)- і -S(O)_n-, де n є цілим числом від 0 до 2, необов'язково заміщених 1-3 заступниками, незалежно вибраними з групи, що складається з водню, гідроксилу, галогену, C₁-C₄алкілу, тригалогенметилу, C₁-C₄алкокси, тригалогенметокси, C₁-C₄ацилокси, C₁-C₄алкілтію, C₁-C₄алкілсульфінату, C₁-C₄алкілсульфонату, гідрокси(C₁-C₄)алкілу, фенілу, необов'язково заміщеного 1-3 (C₁-C₄) алкілом, -CO₂H, -CN, -CONHR¹, -NH₂, C₁-C₄алкіламіно, C₁-C₄діалкіламіно, -NHSO₂R¹, -NHCOR¹, -NO₂;

і їх фармацевтично прийнятні солі.

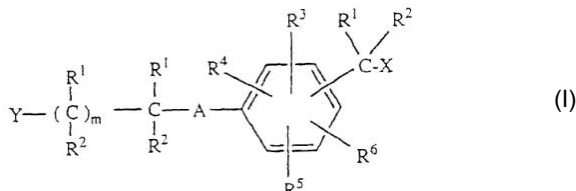
У найбільш загальному описі вище і в інших місцях даного опису, в кожному випадку, коли вони будуть згадуватися, мається на увазі, що R¹ і R² вибирають незалежно з групи перерахованих заступників. Будь-який R¹, перерахований в будь-якій структурі даного опису, не повинен обов'язково являти собою такий же заступник, як і інший R¹, або будь-який R² не повинен обов'язково бути таким же заступником, як і будь-який інший R², навіть якщо більше одного R¹ або R² знаходяться в одній і тій же структурі.

У описі вище символ "Ar" означає моноциклічні або поліциклічні арильні або гетероарильні групи, які можуть бути необов'язково заміщені одним або декількома заступниками, вибраними з галогену, C₁-C₆алкілу або -CF₃. Приклади переважних арильних груп включають антраценільні і фенантринільні групи, а також більш переважні фенільні, куменільні, мезитильні, толільні, ксилільні і нафталінільні групи. Приклади переважних гетероарильних груп включають індолізінільні, індозолільні, пуринільні, хінозінільні, ізохінолінільні, хінолінільні, фталозинільні, нафтиридиновільні, хіноксалінільні, хіназолінільні, цинолінільні і птеридинільні групи, і тому подібне, а також більш переважні пиридільні, піразинільні, піримідинільні,

піридинильні і індолильні групи.

Даний винахід включає прийнятні сольові форми, утворені при реакції приєднання або з неорганічними, або з органічними кислотами. Можуть бути використані неорганічні кислоти, такі як хлористоводнева кислота, бромистоводнева кислота, йодистоводнева кислота, сірчана кислота, фосфорна кислота, азотна кислота, а також органічні кислоти, такі як оцтова кислота, пропіонова кислота, лимонна кислота, малеїнова кислота, яблучна кислота, винна кислота, фталева кислота, янтарна кислота, метансульфонова кислота, толуолсульфонова кислота, нафталінсульфонова кислота, камфорсульфонова кислота, бензолсульфонова кислота. Відомо, що сполуки, що мають основний азот, можуть бути комплексно пов'язаними з багатьма різними кислотами (як з протонними, так і з апротонними), і звичайно є переважним вводити сполуку за даним винаходом у формі її адитивної солі кислоти. Крім того, даний винахід включає четвертинні амонійні солі сполук по даному винаходу, які можуть бути отримані шляхом взаємодії бічного ланцюга нуклеофільних амінів з відповідним реакційноспроможним алкілюючим агентом, таким як алкілгалогенід або бензилгалогенід.

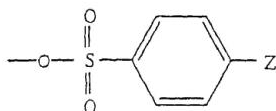
Переважними сполуками по даному винаходу є сполуки формули (I):



де:

R^1 і R^2 незалежно вибрані з H; C_1 - C_{12} алкіла, переважно C_1 - C_6 алкіла, або C_1 - C_6 перфторованого алкілу, переважно- CF_3 ;

X являє собою відщеплювану групу, таку як галоген, $-O-SO_2-CH_3$, $-O-SO_2-CF_3$ або залишок структури:



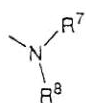
Z вибирають з $-NO_2$, галогену, $-CH_3$ або $-CF_3$;

A вибирають з $-O-$ або $-S-$, $-SO-$ або $-SO_2-$;

m є цілим числом від 0 до 3, переважно 1;

Y вибирають з:

a) залишку:



де R_7 і R_8 незалежно вибрані з групи H, C_1 - C_6 алкілу або фенілу;

b) групи, вибраної з тіофену, фурану, піролу, імідазолу, піразолу, тіазолу, ізотіазолу, ізоксазола або оксатіолану, група є необов'язково заміщеною 1-3 заступниками, незалежно вибраними з групи, що складається з водню, гідроксила, галогену, C_1 - C_4 алкілу, тригалогенметилу, C_1 - C_4 алкокси, тригалогенметокси, C_1 - C_4 ацилокси, C_1 - C_4 алкілтіо, C_1 - C_4 алкілсульфініла, C_1 - C_4 алкілсульфоніла, гідрокси(C_1 - C_4)алкілу, фенілу, необов'язково заміщеного 1-3 (C_1 - C_4)алкілом, $-CO_2H$, $-CN$, $-CONHR^1$, $-NH_2$, C_1 - C_4 алкіламіно, C_1 - C_4 діалкіламіно, $-NHSO_2R^1$, $-NHCOR^1$, $-NO_2$;

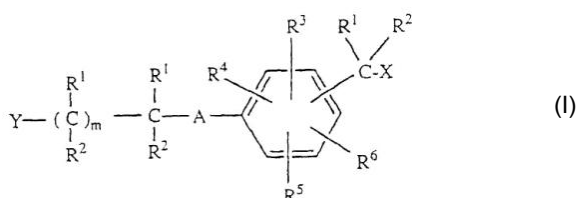
c) групи, вибраної з піридину, піразину, піримідину, піридазину, піперидину, морфоніну і пірану, група є необов'язково заміщеною 1-3 заступниками, незалежно вибраними з групи, що складається з водню, гідроксилу, галогену, C_1 - C_4 алкілу, тригалогенметилу, C_1 - C_4 алкокси, тригалогенметокси, C_1 - C_4 ацилокси, C_1 - C_4 алкілтіо, C_1 - C_4 алкілсульфініла, C_1 - C_4 алкілсульфоніла, гідрокси(C_1 - C_4)алкілу, фенілу, необов'язково заміщеного 1-3 (C_1 - C_4) алкілом, $-CO_2H$, $-CN$, $-CONHR^1$, $-NH_2$, C_1 - C_4 алкіламіно, C_1 - C_4 діалкіламіно, $-NHSO_2R^1$, $-NHCOR^1$, $-NO_2$;

d) групи, вибраної з азепіну, діазепіну, оксазепіну, тіазепіну, оксапіну і тієпіну, група є необов'язково заміщеною 1-3 заступниками, незалежно вибраними з групи, що складається з водню, гідроксилу, галогену, C_1 - C_4 алкілу, тригалогенметила, C_1 - C_4 алкокси, тригалогенметокси, C_1 - C_4 ацилокси, C_1 - C_4 алкілтіо, C_1 - C_4 алкілсульфініла, C_1 - C_4 алкілсульфоніла, гідрокси(C_1 - C_4)алкілу, феніла, необов'язково заміщеного 1-3 (C_1 - C_4)алкілом, $-CO_2H$, $-CN$, $-CONHR^1$, $-NH_2$, C_1 - C_4 алкіламіно, C_1 - C_4 діалкіламіно, $-NHSO_2R^1$, $-NHCOR^1$, $-NO_2$; або

e) біциклічного гетероцикла, вибраного з бензофурана, ізобензофурана, бензотіофена, індола, ізіндола, індолізіна, індазола, пурина, хінолізіна, ізохінолізіна, хіноліна, фталазіна, нафтридіна, хіноксаліна, хіназоліна і циноліна, група є необов'язково заміщеною 1-3 заступниками, незалежно вибраними з групи, що складається з водню, гідроксила, галогену, C_1 - C_4 алкілу, тригалогенметила, C_1 - C_4 алкокси, тригалогенметокси, C_1 - C_4 ацилокси, C_1 - C_4 алкілтіо, C_1 - C_4 алкілсульфініла, C_1 - C_4 алкілсульфоніла, гідрокси(C_1 - C_4)алкілу, фенілу, необов'язково заміщеного 1-3 (C_1 - C_4) алкілом, $-CO_2H$, $-CN$, $-CONHR^1$, $-NH_2$, C_1 - C_4 алкілуміно, C_1 - C_4 діалкіламіно, $-NHSO_2R^1$, $-NHCOR^1$, $-NO_2$;

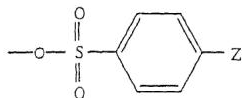
і їх фармацевтично прийнятні солі.

Подальшими переважними сполуками по даному винаходу є сполуки формули (I):



де:
R₁ і R₂ незалежно вибрані з Н; С₁-С₁₂алкілу, переважно С₁-С₆алкілу, або С₁-С₆перфторованого алкілу, переважно -CF₃;

Х є відщеплюваною групою, такою як галоген, -O-SO₂-CH₃, -O-SO₂-CF₃- або залишком структури:



Z вибирають з -NO₂, галогену, -CH₃ або -CF₃;

А вибирають з -O- або -S-, -SO- або -SO₂-;

m є цілим числом від 0 до 3, переважно 1;

Y вибирають з:

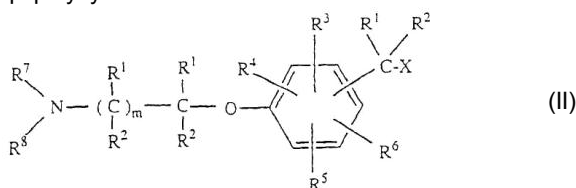
а) залишку:



де R₇ і R₈ незалежно вибрані з групи Н, С₁-С₆алкілу або фенілу; або б) групи, вибраної з тіофена, фурана, пірала, імідазола, піразола, тіазола, піридину, піразина, піримідину, піридазину, піперидину, індола або бензофурана, група є необов'язково заміщеною 1-3 заступниками, незалежно, вибраними з групи, що складається з водню, гідроксиду, галогену, С₁-С₄алкілу, тригалогенметила, С₁-С₄алкокси, тригалогенметоксиди, С₁-С₄ацилокси, С₁-С₄алкілтіо, С₁-С₄алкілсульфініла, С₁-С₄алкілсульфоніла, гідрокси(С₁-С₄)алкілу, фенілу, необов'язково заміщеного 1-3 (С₁-С₄)алкілом, -CO₂H, -CN, -CONHR¹, -NH₂, С₁-С₄алкіламіно, С₁-С₄діалкіламіно, -NHSO₂R¹, -NHCOR¹, -NO₂;

і їх фармацевтично прийнятні солі.

Серед найбільш переважних сполук по даному винаходу знаходяться сполуки, що мають загальну формулу:



де:

R₁ і R₂ незалежно вибрані з Н, С₁-С₆алкілу або С₁-С₆перфторованого алкілу, переважно, перфторованих алкільних груп, -CF₃;

R₃, R₄, R₅ і R₆ незалежно вибрані з Н, ОН або їх С₁-С₄складного ефіру або їх алкілових простого ефіру, галогену, -CN, С₁-С₆алкіла або трифторметила;

m є цілим числом від 0 до 3, переважно 1;

А вибирають з -S-, -O- або -SO₂-;

R₇ і R₈ незалежно вибрані з Н, С₁-С₆алкілу або з'єднані за допомогою -(CH₂)_p-, де p є цілим числом від 2 до 6, формуючи таким чином кільце, що є необов'язково заміщеним аж до трьох заступниками, вибраними з групи, що складається з водню, гідроксиду, галогену, С₁-С₄алкілу, тригалогенметила, С₁-С₄алкокси, тригалогенметоксиди, С₁-С₄алкілтіо, С₁-С₄алкілсульфініла, С₁-С₄алкілсульфоніла, гідрокси(С₁-С₄)алкілу, -CO₂H, -CN, -CONH(С₁-С₄), -NH₂, С₁-С₄алкіламіно, С₁-С₄діалкіламіно, -NHSO₂(С₁-С₄), -NHCO(С₁-С₄) і -NO₂; і

Х є таким, як визначено вище;

і їх фармацевтично прийнятні солі.

Серед найбільш переважних сполук даного винаходу знаходяться сполуки, що мають структурні формули II або III, вище, де R³-R⁶ є такими, як визначено вище; Х вибирають з групи Cl, -CF₃ або -CH₃; і Y являє собою залишок:



і R⁷ і R⁸ сполучені разом як -(CH₂)_g-, де g є цілим числом від 4 до 6, з утворенням кільця, необов'язково заміщеного аж до трьох заступниками, вибраними з групи водн., гідроксиду, галогену, С₁-С₄алкіла, тригалогенметила, С₁-С₄алкокси, тригалогенметоксиди, С₁-С₄алкілтіо, С₁-С₄алкілсульфініла, С₁-С₄алкілсульфоніла, гідрокси(С₁-С₄)алкіла, -CO₂H, -CN, -CONH(С₁-С₄), -NH₂, С₁-С₄алкіламіно, С₁-С₄діалкіламіно, -NHSO₂(С₁-С₄), -NHCO(С₁-С₄) і -NO₂;

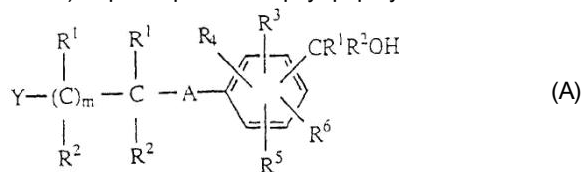
і їх фармацевтично прийнятні солі.

Далі, є переважним, щоб у випадку, коли R⁷ і R³ сполучені разом як -(CH₂)_p- або -(CH₂)_g-, утворене таким чином кільце було необов'язково заміщене 1-3 заступниками, вибраними з групи, що включає С₁-С₃алкіл,

трифторметил, галоген, водень, феніл, нітро, -CN.

Даний винахід також включає спосіб отримання вказаних вище сполук. Сполуки по даному винаходу можуть бути отримані одним з наступних способів:

а) перетворення спирту формули:



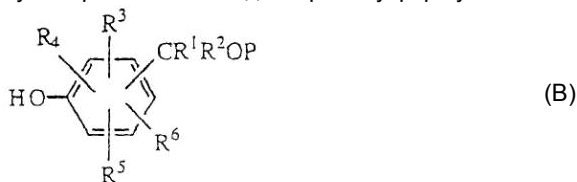
де т. А, Y і R¹⁻⁶ є такими, як визначено вище, у відповідну сполуку формули (I), де X є відщеплюваною групою, за допомогою відповідних засобів; наприклад, використовуючи галогенуючий, сульфонілюючий або ацилюючий агент, що містить відщеплювану групу X;

або

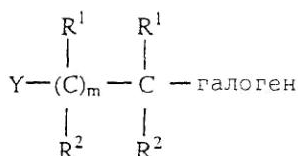
б) окислення сполуки формули I, де A є S, з отриманням відповідної сполуки формули I, де A є SO або -SO₂;

або

с) перетворення сполуки формули (I) в її фармацевтично прийнятну сіль. Сполуки формули (A) можуть бути отримані взаємодією фенолу формули:



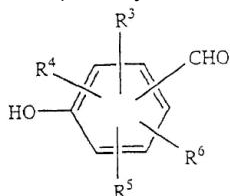
де Р являє собою гідрокси захисну групу, і R¹⁻⁶ є такими, як визначено вище (наприклад, R¹ і R² кожний є H або C₁-C₁₂алкілом), із сполукою формули:



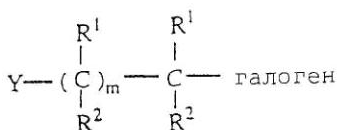
де Y, R¹, R² і m є такими, як визначено вище і галоген є F, Cl, Br або I, і видалення захисної групи.

Сполуки даного винаходу, в яких "A" є киснем, можуть бути синтезовані за допомогою наступних стадій способу:

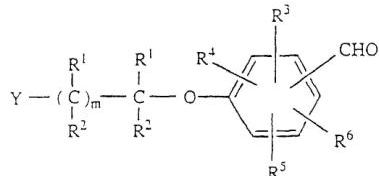
а) алкілювання відповідного гідроксибензальдегіда формули:



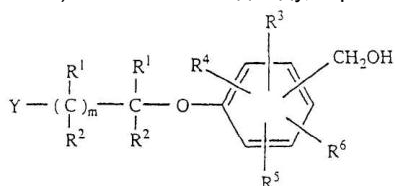
де R³-R⁶ є такими, як визначено вище, відповідним алкілгалогенидом формули:



де Y, R¹, R² і m є такими, як визначено в основній загальній і побічних групах вище, і галоген може бути Cl, F, Br або I, з отриманням альдегіду формули:



б) окислення альдегіду, отриманого на стадії а), з отриманням відповідного спирту, що має формулу:



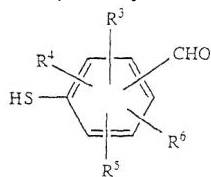
с) перетворення спирту з стадії б) в його хлорідратну сіль, наприклад, з допомогою HCl/ТГФ; і

д) перетворення спирту в переважну відщеплювану групу, наприклад, за допомогою обробки

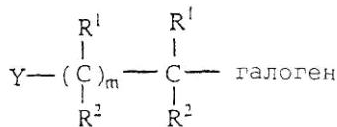
метансульфонілхлоридом, толуолсульфонілхлоридом або трифтороцтовим ангідридом, в присутності основи, подібної піридину або триетиламіну.

Подібно цьому, даний винахід передбачає спосіб отримання сполук по даному винаходу, де "А" являє собою сірку, здійснюючи стадії:

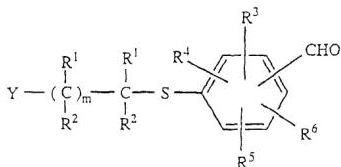
а) алкілювання сполуки формули:



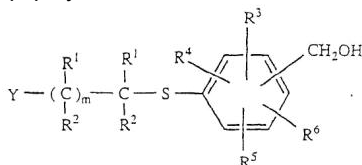
алкілюючим агентом формули:



де Y і m є такими, як визначено вище, і галоген вибирають з Cl, F, Br або I, з отриманням альдегіду формули:



б) відновлення альдегіду, отриманого на стадії а), наприклад, за допомогою боргідриду натрію, до спирту формули:



с) обробки спирту зі стадії б) газоподібним HCl з отриманням його хлорідрата; і

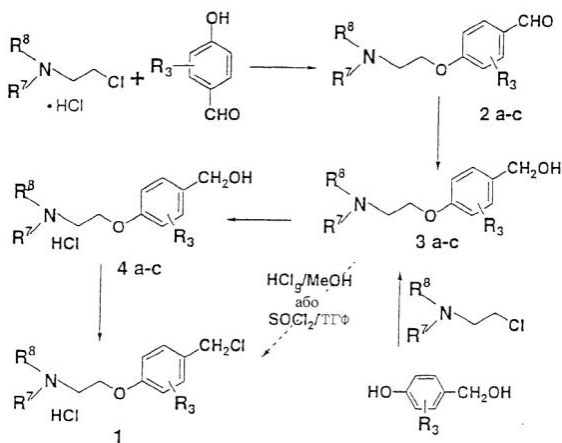
д) перетворенням хлорідрата спирту, отриманого на стадії с), в переважну відщеплювану групу, наприклад, шляхом обробки метансульфонілхлоридом, толуолсульфонілхлоридом або трифтороцтовим ангідридом, в присутності основи, подібної піридину або триетиламіну, або продовження обробки HCl з отриманням відповідного бензилхлориду; і,

е) необов'язкового завершення окислення сірки, що контролюється до сульфоксида або до сульфона, наприклад, за допомогою м-хлор-пербензойної кислоти.

Початковий матеріал, тіофеноксидальдегід зі стадії а) вище, може бути отриманий з його відповідного тіофенолальдегіда, наприклад, за допомогою гідриду натрію, що може розглядатися або не розглядатися як стадія описаного вище процесу.

Наведені далі схеми реакцій від I до IV демонструють синтез сполук по даному винаходу, використовуючи різні значення для змінної "Y". Реагенти і розчинники для конкретних стадій приведені тільки в ілюстративних цілях і можуть бути замінені іншими реагентами і розчинниками, відомими фахівцям в даній області.

СХЕМА I



a. R7 R8 = (CH2)5; b. R7 R8 = (CH2)6; c. R7 = R8 = CH3 и R3 = H.

СХЕМА II

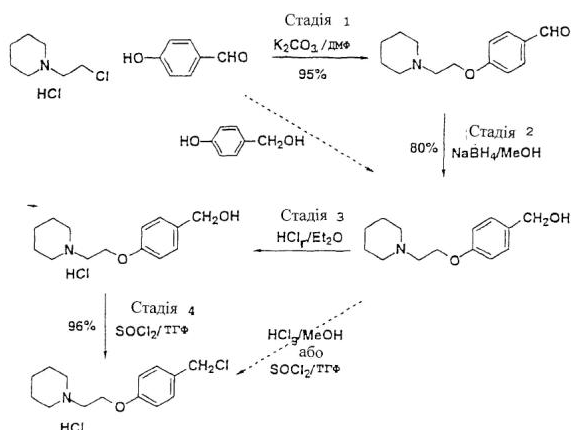


СХЕМА. IIa

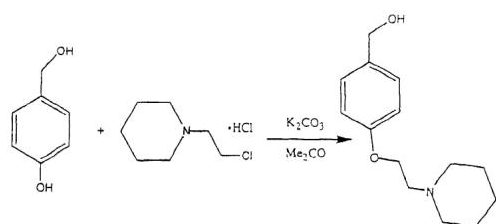
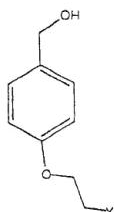


Схема IIa пропонує альтернативний шлях синтезу бензилових спиртів по даному винаходу на Прикладі синтезу 4-(2-піперидинилетокси) бензилового спирту. При цьому синтезі 4-гідроксибензиловий спирт обробляють з допомогою бажаного ариламиноалкілхлорида з отриманням відповідного алкоксибензилового спирту. У конкретному Прикладі схеми IIa 4-гідрокси-бензиловий спирт може бути оброблений 1-(2-хлоретил)піперидин хлорідом в присутності K_2CO_3/Me_2CO з отриманням 4-(2-піперидинилетокси)бензилового спирту.

Схема IIa також більш конкретно ілюструє інше переважно втілення даного винаходу. Даний винахід також включає спосіб отримання корисних для використання спиртових сполук формули:



де Y являє собою всі Y групи і їх необов'язкових заступників, як описане вище в найбільш загальному вигляді.

У переважній підгрупі цього способу, Y являє собою:

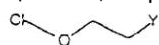
a) залишок



де R і R незалежно вибрані з групи H, C_1 - C_6 алкіла або фенілу; або b) п'яти-, шести- або семичленне ненасичене або частково ненасичене гетероциклічне кільце, що містить один або два атоми азоту, гетероциклічне кільце є з'єднаним за допомогою етокси-містка з атомом азоту в кільці і є необов'язково заміщеним від 1 до 3 групами, вибраними з галогену, C_1 - C_6 алкіла, C_1 - C_6 алкокси, C_1 - C_6 іоалкіла, $-CF_3$ або $-NO_2$.

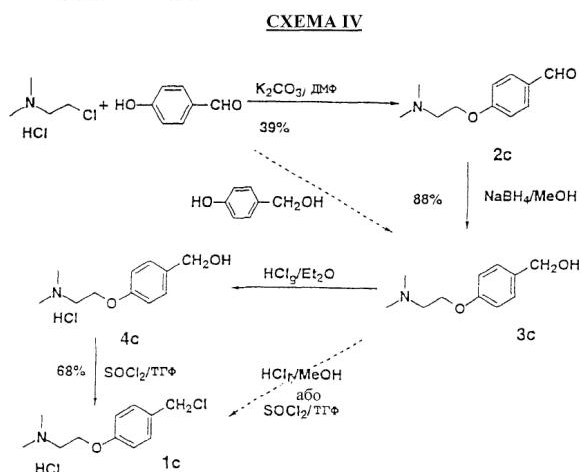
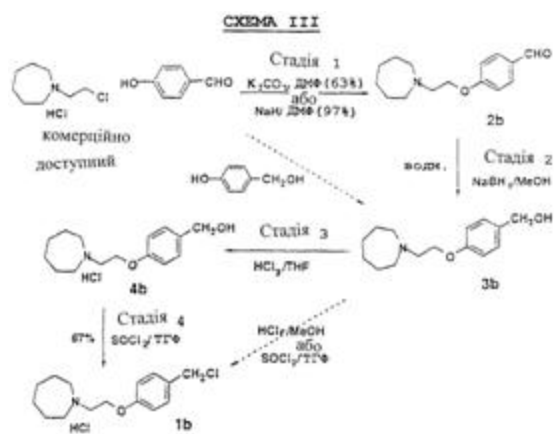
Переважними Y групами за даним способом є азепин, пірол, імідазолін, імідазолидин, гексаметиленимін, піролідін, піразолідін, піразолін, піперидін, піперазин,

Спосіб включає взаємодію, в лужному середовищі, 4-гідроксибензилового спирту з сіллю, такою як ацетатна, хлорідатна, бромідатна або йодідатна сіль, сполуки формули:

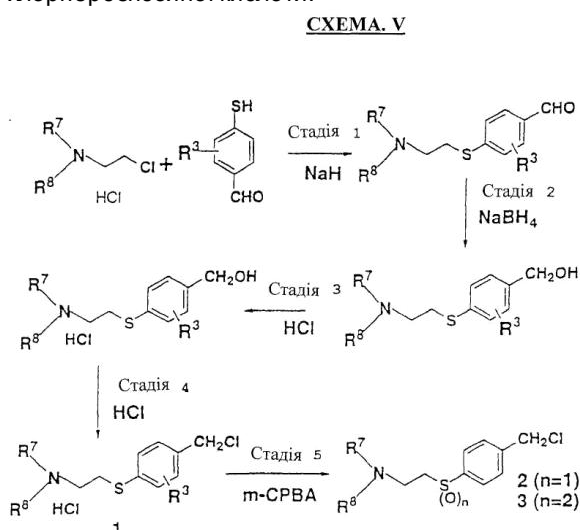


де Y є таким, як визначено вище.

Цю реакцію проводять в органічному розчиннику або системі розчинників, наприклад, в ацетоні, диметилформаміді або тетрагідрофурані. Переважно, рН середовища підтримують вище за рН, рівне 8, більш переважно, вище за рН, рівне 9.



Використовуючи подібні ж стадії, сполука за даним винаходом, де "А" є сірою, може бути отримана так, як показано нижче на схемі V. На першій стадії тіофеноксид може бути отриманий за допомогою гідриду натрію з подальшим алкілюванням і відновленням до відповідного альдегіду, наприклад, за допомогою боргідриду натрію, або каталітично, за допомогою водню і нікелю Ренея, або платини, або паладія на вугіллі. Спирт, що отримується в результаті може бути потім оброблений газоподібним HCl з отриманням його хлорідрата, з подальшою обробкою HCl до утворення бензилхлориду. Кінцевий продукт може потім бути отриманий шляхом окислення сірки, що контролюється до сульфоксида, а потім до сульфона, наприклад, за допомогою м-хлорпербензойної кислоти.



Наступні Приклади представлені швидше для ілюстрації, ніж для обмеження предмета винаходу.

У процедурах, вище, сполуки формули (I), де R^1 і R^2 , розташовані поряд із залишком X, являють собою водень, отримують з первинних спиртів (наприклад, схема I, з'єднання 3a-c), які самі по собі отримують шляхом відновлення попередників-альдегідів (наприклад, схема I, з'єднання 2a-c).

Аналогічні сполуки формули (I), де один з R^1 і R^2 , розташовані поряд із залишком X, являє собою алкіл або перфторалкіл, а інший є воднем, можуть бути отримані з відповідних вторинних спиртів, які самі по собі можуть бути отримані з відповідних кетонів, наприклад, із сполук, що мають COR^1 залишок, де R^1 є алкілом або перфторалкілом.

Аналоги сполук формули (I), де обидва R^1 і R^2 , розташовані поряд із залишком X, вибрані, кожний, з алкіла

і перфторалкіла, можуть бути отримані з відповідних третинних спиртів.

Приклад 1

4-(2-піперидин-1-ил-етокси)бензилальдегід (2a)

До суспензії, що добре перемішується п-гідроксибензалдегіда (33,5г, 0,68моль, 1,05екв.) і K_2SO_3 (224г, 1,6моль, 2,5екв.) в ДМФ (1л) додають хлорідрат 1-2-хлоретил)піперидина (120г, 0,65моль, 1/0екв.). Реакційну суміш нагрівають із зворотним холодильником протягом 2 годин з енергійним механічним перемішуванням. ТСХ на цьому етапі показує наявність, в основному, продукту без присутності початкового матеріалу, (EtOAc/гексан 1:1). Реакційну суміш фільтрують через Целіт, розбавляють EtOAc (2л) і промивають водою (3×500мл). Органічний шар концентрують за допомогою роторного випарника з отриманням 147г (97%) альдегіду (2a) у вигляді жовтого масла.

1H ЯМР ($CDCl_3/TMS$): 9,87 (с, 1H), 7,81 (д, 2H, $J=8,7$ Гц), 7,01 (д, 2H, $J=8,7$ Гц), 4,18 (т, 2H, $J=6,03$ Гц), 2,79 (т, 2H, $J=6,03$ Гц), 2,51 (м, 4H), 1,6-1,4 (м, 6H).

Приклад 2

4-(2-гексаметиленимин-1-ил-етоксі)бензилальдегід (2b)

До суспензії, що добре перемішується NaH (65г, 60-% масляна дисперсія, 1,6моль, 2,2екв.) в ДМФ (500мл) додають по краплях при 0°C розчин хлорідрата п-гідроксибензалдегіда (90г, 0,74моль, 1,0екв.). Реакційну суміш перемішують протягом 30хвил., потім додають по частинах 4-[2-(гексаметилениміно)]етилхлорид (153г, 0,77моль, 1,0екв.). Реакційну суміш перемішують протягом 1 години. ТСХ на даний момент показує основну наявність продукту і малі кількості початкового матеріалу, (EtOAc/гексан 1:1). Реакційну суміш розбавляють водою (1л) і екстрагують ефіром (5л). Органічний шар сушать над $MgSO_4$ і концентрують за допомогою роторного випарника з отриманням 176,8г (97%) альдегіду (2b) у вигляді жовтого масла.

1H ЯМР ($CDCl_3/TMS$): 9,87 (с, 1H), 7,81 (д, 2H, $J=8,7$ Гц), 7,02 (д, 2H, $J=8,7$ Гц), 4,14 (т, 2H, $J=6,09$ Гц), 2,98 (т, 2H, $J=6,14$ Гц), 2,78 (м, 4H), 1,66-1,61 (м, 8H)

Приклад 3

4-(2-диметиламіноетоксі)бензилальдегід (2c)

До суспензії, що добре перемішується п-гідроксибензалдегіда (9,54г, 0,078моль, 1,00екв.) і K_2CO_3 (27г, 0,195моль, 2,5екв.) в ДМФ (100мл) додають хлорідрат 1-(2-хлоретил)диметиламіна (11,26г, 0,078моль, 1,0екв.). Реакційну суміш перемішують протягом 2 годин при 60-70°C. ТСХ на цьому етапі показує наявність, в основному продукту і відсутність початкового матеріалу, (EtOAc/гексан/ Et_3N 3:7:1). Реакційну суміш виливають в суміш вода/лід (200мл) і екстрагують Et_2O (3×200мл). Органічний шар сушать над $MgSO_4$ і концентрують за допомогою роторного випарника з отриманням 5,9г (39%) альдегіду (2c) у вигляді рожевої рідини.

1H ЯМР ($CDCl_3/TMS$): 9,88 (с, 1H), 7,8 (д, 2H, $J=8,7$ Гц), 7,02 (д, 2H, $J=8,7$ Гц), 4,15 (т, 2H, $J=5,64$ Гц), 2,77 (т, 2H, $J=5,64$ Гц), 2,35 (с, 6H).

Приклад 4

4-(2-піперидин-1-ил-етокси)бензиловий спирт (3a)

До розчину альдегіду, що перемішується 2a (115г, 0,494моль, 1,0екв.) в метанолі (360мл) при 0/+5°C додають по частинах боргідрид натрію (9,44г, 0,249моль, 0,5екв.). Реакційну суміш перемішують протягом 30хвил. ТСХ на цей момент показує, в основному продукт і не показує початковий матеріал, (EtOAc/гексан/триетиламін 3:7:1). Реакційну суміш виливають у воду (1,1л), екстрагують метиленхлоридом (3×500мл) і сушать над $MgSO_4$. Розчин концентрують за допомогою роторного випарника з отриманням 91,6г (80%) спирту 3a у вигляді густого масла, яке кристалізується безпосередньо при введенні затравки.

1H ЯМР ($CDCl_3/TMS$): 7,23 (д, 2H, $J=8,5$ Гц), 6,80 (д, 2H, $J=8,5$ Гц), 4,56 (с, 2H), 3,99 (т, 2H, $J=6,12$ Гц), 2,69 (т, 2H, $J=6,14$ Гц), 2,47 (м, 4H), 1,6-1,25 (м, 6H)

^{13}C ЯМР ($DMCO-d_6$): 158,23, 135,34, 128,70, 114,84, 66,42, 63,44, 58,27, 55,29, 26,45, 24,80

Приклад 5

4-(2-піперидин-1-ил-етокси)бензиловий спирт (3a)

4-гідроксибензиловий спирт (6,2г, 0,05моль) розчиняють у водному розчині гідроксида натрію (5н, 30мл). Додають толуол (30мл), а потім хлорідрат 1-(2-хлоретил)піперидина (9,29г, 250,05моль) і бензилтриетиламоній бромід (0,3г). Реакційну суміш нагрівають з енергійним перемішуванням протягом 1,5 годин. Шари відділяють, водний шар екстрагують толуолом (2×15мл). Об'єднані органічні шари промивають водою (50мл), насиченим сольовим розчином (50мл), сушать над сульфатом натрію і концентрують за допомогою роторного випарника з отриманням 8,725г (75%) спирту (3a) у вигляді жовтувато-коричневого масла.

Приклад 6

4-(2-гексаметиленимин-1-ил-етоксі) бензиловий спирт (3b) До розчину альдегіду, що перемішується 2b (200г, 0,72моль, 1,0екв.) в метанолі (400мл) додають по частинах при 0/+5°C боргідрид натрію (15,6г, 0,41моль, 0,57екв.). Реакційну суміш перемішують протягом 30хвил. Результати ТСХ в цьому випадку демонструють в основному продукт без наявності початкового матеріалу, (EtOAc/гексан/триетиламін 3:7:1). Реакційну суміш розбавляють водою (400мл), екстрагують метиленхлоридом (3×400мл) і сушать над $MgSO_4$. Розчин концентрують за допомогою роторного випарника з отриманням 201г (100%) спирту 3b у вигляді густого масла.

1H ЯМР ($CDCl_3/TMS$): 7,27 (д, 2H, $J=8,5$ Гц), 6,87 (д, 2H, $J=8,5$ Гц), 4,60 (с, 2H), 4,05 (т, 2H, $J=6,21$ Гц), 2,93 (т, 2H, $J=6,15$ Гц), 2,77 (м, 4H), 1,7-1,5 (м, 8H)

Приклад 7

4-(2-диметиламіноетоксі)бензиловий спирт (3c)

До розчину альдегіду, що перемішується 2c (5,9г, 0,031моль, 1,0екв.) в метанолі (20мл) при 22°C додають по частинах боргідрид натрію (0,58г, 0,015моль, 0,5екв.). Реакційну суміш перемішують протягом 30хвил. ТСХ на цей момент показує головним чином продукт без присутності початкового матеріалу, (EtOAc/гексан/триетиламін 5:5:1). Реакційну суміш розбавляють водою (50мл), екстрагують метиленхлоридом (3×400мл) і сушать над $MgSO_4$. Розчин концентрують за допомогою роторного випарника з отриманням 5,25г

(88%) спирту 3с у вигляді густого масла.

^1H ЯМР (CDCl_3/TMS): 7,25 (д, 2Н, $J=8,64\text{Гц}$), 6,85 (д, 2Н, $J=8,64\text{Гц}$), 4,52 (с, 2Н), 3,99 (т, 2Н, $J=5,88\text{Гц}$), 2,67 (т, 2Н, $J=5,79\text{Гц}$), 2,29 (с, 6Н)

Приклад 8

Хлорідрат (4-хлорметилфенокси)етилпіперидин-1-ила (Ia)

Розчин спирту 3а (61,3г, 0,26моль, 1екв.) в ТГФ (500мл) охолоджують до 0/-5°C (баня лід-вода) і барботують газоподібний HCl. Барботування продовжують доти, поки не відбувається подальшого загустіння реакційної суміші. Охолоджуючу баню видаляють. Тіонилхлорид (29мл, 0,39моль, 1,5екв.) додають до густої суспензії хлорідрата 4а і суміш нагрівають до 50°C доти, поки вона не стане прозорою. Реакційну суміш охолоджують до -3°C і перемішують протягом 30хв. Отриманий білий твердий продукт фільтрують і сушать з отриманням 79г (96%) хлориду Ia.

4а: ^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 10,9 (с, HCl), 7,25 (д, 2Н, $J=8,5\text{Гц}$), 6,94 (д, 2Н, $J=8,5\text{Гц}$), 4,42 (м, 4Н), 3,41 (м, 4Н)

Ia: ^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 11 (ушир. С, HCl), 7,39 (д, 2Н, $J=8,5\text{Гц}$), 6,99 (д, 2Н, $J=8,5\text{Гц}$), 4,74 (с, 2Н), 4,46 (м, 2Н), 3,45 (м, 4Н), 2,69 (м, 2Н) і 1,9-1,2 (м, 6Н)

Приклад 9

Хлорідрат (4-хлорметилфенокси)етилгексаметиленимин-1-ила (1b)

До розчину спирту 3b (179г, 0,72моль, 1екв.) в ТГФ (300мл) додають по краплях розчин HCl (26,3г HCl в 263мл ТГФ, 0,72моль, 1,0екв.) при 0/+10°C. Утворюється білий осадок. Тіонилхлорид (80мл, 1,1моль, 1,5екв.) додають до густої суспензії хлорідрата 4b і суміш нагрівають до 50°C доти, поки вона не стане прозорою. Реакційну суміш концентрують до 350мл і тримають в холодильнику протягом ночі. Отриманий білий твердий продукт фільтрують, промивають холодним ТГФ (100мл) і сушать з отриманням 147г (67%) хлориду Ib.

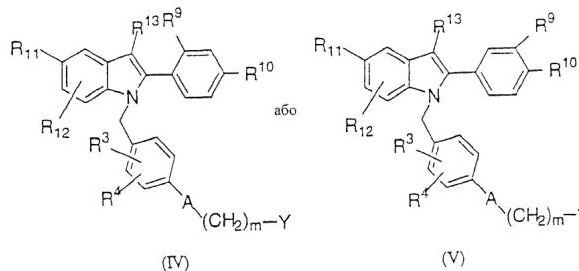
^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 11 (ушир. с, HCl), 7,40 (д, 2Н, $J=8,6\text{Гц}$), 7,00 (д, 2Н, $J=8,6\text{Гц}$), 4,74 (с, 2Н), 4,44 (т, 2Н, $J=5,25$), 3,64-3,39 (м, 4Н), 3,25-3,17 (м, 2Н), 1,84-1,54 (м, 8Н)

Приклад 10

(4-Хлорметилфенокси)етилдиметиламінохлорідрат (1с)

Через розчин спирту 3с (5,25г, 0,027моль, 1екв.) в ТГФ барботують при 0/+25°C протягом 15хв. (100мл) газоподібну HCl. Утворюється білий осадок. Тіонилхлорид (6мл, 9,6г, 0,081моль, 3,0екв.) додають до густої суспензії хлорідрата 4с, і суміш нагрівають до 30°C доти, поки не стане прозорою. Реакційну суміш концентрують до 350мл, і тримають в холодильнику протягом ночі. Отриманий білий твердий продукт фільтрують, промивають холодним ТГФ (100мл) і сушать з отриманням 4,57г (68%) хлориду 1с.

Серед фармакологічно активних сполук, які можуть бути отримані з використанням сполук по даному винаходу, знаходяться 2-феніл-1-[4-(2-аміноетокси)бензил]індолні сполуки, які корисні як естрогенні агенти. Вказані сполуки включають сполуки формул IV і V, нижче:



де:

R^{11} вибирають з H, OH або їх C_1 - C_{12} складного ефіру (з прямим або розгалуженим ланцюгом) або C_1 - C_{12} (з прямим або розгалуженим ланцюгом або циклічних) алкілових простого ефіру або галогенів; або галогенованих простих ефірів, включаючи трифторметиловий простий ефір і трихлорметиловий простий ефір.

R^{12} , R^9 і R^{10} незалежно вибирають з H, OH або їх C_1 - C_{12} складного ефіру (з прямим або розгалуженим ланцюгом) або C_1 - C_{12} алкілових простого ефіру (з прямим або розгалуженим ланцюгом або циклічних), галогенів або галогенованих простого ефіру, включаючи трифторметиловий простий ефір і трихлорметиловий простий ефір, ціано, C_1 - C_6 алкіл (з прямим або розгалуженим ланцюгом) або трифторметил, за умови, що у випадку, коли R_1 є H, R_2 не є OH.

R^{13} вибирають з H, C_1 - C_6 алкіла, ціано, нітро, трифторметила, галогену;

i -

Y, A, m, R^3 і R^4 є такими, як визначено тут.

2-Феніл-1-[4-(2-аміноетокси)бензил]індолні сполуки цього типу є частковими агоністами естрогенів і демонструють високу спорідненість до рецепторів естрогенів. Однак, на відміну від багатьох естрогенів, ці сполуки не спричиняють збільшення мокрої ваги матки. Такі сполуки є антиестрогенними в матці і можуть повністю антагонізувати трофічні впливи агоністів естрогенів в тканині матки. Вказані сполуки є корисними для використання при лікуванні або запобіганні хворобливим станам або синдромам у ссавців, які викликаються або зв'язуються з дефіцитом естрогенів.

Вказані сполуки мають здатність поводитися подібно агоністам естрогенів, знижуючи рівень холестерину і запобігаючи втратам кісткової тканини. З цієї причини, такі сполуки є корисними при лікуванні багатьох розладів, включаючи остеопороз, гіпертрофію простати, неродючість, рак грудей, рак слизової оболонки матки, серцево-судинні захворювання, контрацепцію, хворобу Альцгеймера і меланому. Крім того, дані сполуки можуть бути використані для гормонозамінюючої терапії у жінок в період після менопаузи або при інших станах з дефіцитом естрогенів, де було б корисно введення естрогенів.

2-Феніл-1-[4-(2-аміноетокси)бензил]індолні сполуки, що отримуються за допомогою сполук по даному винаходу, можуть бути також використані в способах лікування втрати кісткової тканини, яка може бути викликана дисбалансом між формуванням в організмі нових кісткових тканин і резорбцією більш старих

тканин, що веде в результаті до сумарних втрат кісткової тканини. Таке виснаження кісток відбувається у цілому ряду індивідумів, зокрема, у жінок в період після менопаузи, у жінок, які зазнавали гістеректомії, у тих, хто отримує або отримували тривале лікування кортикостероїдами, у тих, хто відчуває дисгенезію гонад, і у тих, хто страждає на синдром Кушинга. Специфічні потреби в заміні кісткової тканини також можуть бути задоволені, використовуючи ці сполуки, у індивідумів з переломами кісток, дефектними структурами кісток і у тих, хто отримує хірургічне лікування, пов'язане з кістками, і/або імплантацію протеза. На додаток до тих проблем, які описані вище, ці сполуки можуть бути використані при лікуванні остеоартриту, хворобі Пейже, остеомалаяції, остеохолестероза, раку слизової оболонки матки, множинної мієломи і інших форм раку, що мають негативний вплив на кісткові тканини. Способи лікування розладів, перерахованих тут, як мається на увазі, включають введення індивідуму, потребуваному такого лікування, фармацевтично ефективною кількістю однієї або декількох із сполук по даному винаходу або її фармацевтично прийнятної солі. Даний винахід також включає фармацевтичні композиції, що використовують одне або декілька з даних сполук, і/або їх фармацевтично прийнятні солі разом з одним або декількома прийнятними носіями, наповнювачами і тому подібне.

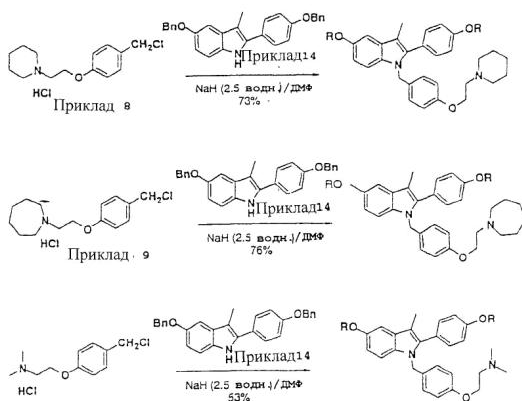
Є очевидним, що дозування, режим і спосіб введення 2-феніл-1-[4-(2-аміноетокси)бензил]індольних сполук будуть змінюватися відповідно до розладу і індивідуму, що зазнає лікування, і будуть об'єктом вибору лікаря, що бере участь в лікуванні. Є переважним, щоб введення однієї або декількох сполук, що згадуються тут починалося з низької дози і збільшувалося б доти, поки не будуть досягнуті бажані впливи.

Ефективне введення цих сполук може здійснюватися при дозах від близько 0,1мг/день до близько 1000мг/день. Переважно, введення буде починатися від близько 50мг/день до близько 600мг/день в одиничній дозі або в двох або більш розділених дозах. Такі дози можуть вводитися будь-яким способом, що підходить для спрямування згадуваних тут активних сполук в потік крові пацієнта, в тому числі перорально, парентерально (включаючи внутрішньовенні, внутрішньочеревинні і підшкірні ін'єкції) і трансдермально. Для цілей даного опису трансдермальне введення, як мається на увазі, включає всі види введення через поверхню тіла і внутрішні покриття проходів в тіло, включаючи епітеліальні і слизові тканини. Такі введення можуть проводитися з використанням даних сполук або їх фармацевтично прийнятних солей у вигляді примочок, кремів, пін, пластирів, суспензій, розчинів і супозиторіїв (ректальних і вагінальних).

Препарати для перорального введення, що містять активні сполуки по даному винаходу, можуть включати будь-які пероральні форми, що повсюдно використовуються, включаючи таблетки, капсули, льодяники, драже, коржики і рідини, суспензії або розчини для перорального використання. Капсули можуть містити суміші активної сполуки(сполук) з інертними наповнювачами і/або розріджувачами, такими як фармацевтично прийнятні крохмалі: (наприклад, кукурудзяний, картопляний або крохмаль з тапіоки), цукор, штучні підсолоджувачі, порошкоподібна целюлоза, такі як кристалічна і мікрокристалічна целюлоза, різні види борошна, желатину, смоли і тому подібне. Придатні для використання таблетки препаратів можуть бути виготовлені за допомогою способів звичайного пресування, вологого або сухого гранулювання і використовувати фармацевтично прийнятні розріджувачі, зв'язуючі агенти, що змащують речовини, розпушувачі, суспендує або стабілізуючі агенти, включаючи, але не обмежуючись ними, стеарат магнію, стеаринову кислоту, тальк, лаурилсульфат натрію, мікрокристалічну целюлозу, кальцій карбоксиметилцелюлозу, полівінілпіролідон, желатин, альгінову кислоту, смолу акації, ксантанову смолу, цитрат натрію, комплексні силікати, карбонат кальцію, гліцин, декстрин, сахарозу, сорбітол, дикальційфосфат, сульфат кальцію, лактозу, каолін, манітол, хлорид натрію, тальк, сухий крохмаль і порошкоподібний цукор. Препарати для перорального введення, що згадуються тут, можуть бути стандартними препаратами з контрольованим або уповільненим часом вивільнення для зміни поглинання активної сполуки(сполук). Препарати у вигляді супозиторіїв можуть бути зроблені з традиційних матеріалів, включаючи масло какао, з доданням воску для зміни температури плавлення супозиторія і гліцерину або без нього. Можуть також бути використані основи для водорозчинних супозиторіїв, такі як поліетилеогліколі з різною молекулярною масою.

Як показано на схемі VI, сполуки цієї групи можуть бути синтезовані шляхом алкілювання індольного азоту за допомогою сполук по даному винаходу, як ілюструється в Прикладах 11-13, нижче, використовуючи хлорідрат (4-хлорметил-фенокси)етилпіперидин-1-ила з Прикладу 8, хлорідрат (4-хлорметилфенокси)етилгексаметиленімін-1-ила з Прикладу 9 і (4-хлорметилфенокси)етилдиметиламінохлорідрат з Прикладу 10, відповідно. Крім NaN, можуть бути використані інші основи, включаючи т-бутоксид калію або т-бутоксид натрію.

СХЕМА VI



Приклад 10

Схеми VII і VIII демонструють Приклад синтезу хлорідрата і-[4-(2-азепан-1-ил-етокси)бензил]2-(4-гідроксифеніл)-3-метил-1Н-індол-5-ола з використанням проміжних сполук по даному винаходу.

СХЕМА VII

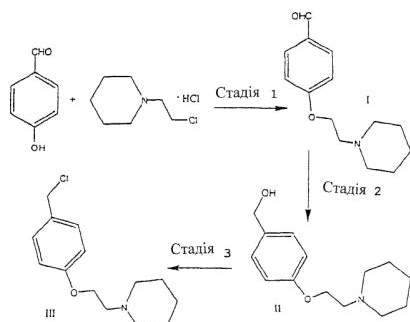
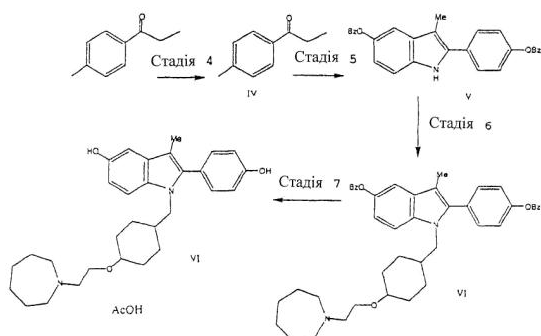


Схема VII ілюструє алкілювання 4-гідроксибензальдегіда з допомогою хлорідрата 2-(гексометиламіно)етилхлорида, яке може бути здійснене в присутності карбонату калію з отриманням відповідного альдегіду I (стадія 1). Коли реакція завершується, суміш може бути освітлена, перемішена з толуолом і промита водою. Розчин толуола потім може бути концентрований, і отриманий в результаті залишок нагрівають з ізопропанолом з отриманням розчину альдегіду I. Розчин ізопропанола з I може бути оброблений для каталітичного відновлення, наприклад, за допомогою нікелю Ренея, з отриманням спирту II (стадія 2). Услід за відновленням, реакційна суміш може бути освітлена і концентрована, при цьому залишок, що отримується розчиняють в етилендіхлориді з отриманням розчину, що містить спирт II. Цей розчин може бути оброблений тіонілхлоридом з подальшим концентруванням.

Отриманий в результаті залишок може потім бути оброблений 1,2-диметоксиетаном з отриманням жовтих кристалів III (стадія 3).

СХЕМА VIII



На схемі VIII, стадія 4, 4-бензилоксипропіофенон бромують в оцтовій кислоті бромом. Коли реакція завершується, суміш може бути погашена водою, і отриманий осадок промивають розбавленою оцтовою кислотою, водою і гептаном. Отриманий твердий продукт сушать з отриманням сполуки IV, хлорідрата 4-бензилоксианіліна. На стадії 5, суміш IV, N, N-диізопропілетиламіна і толуола нагрівають із зворотним холодильником з видаленням води. Коли реакція завершується, суміш може бути охолоджена і розбавлена метанолом. Отриманий твердий продукт може бути зібраний, промитий метанолом і висушений з отриманням індольної сполуки V. Суміш сполук V і III може бути змішана на стадії 6 з трет-бутоксидом натрію в N, N-диметилформаміді і перемішуватися доти, поки реакція не завершиться. Потім суміш може бути погашена насиченим сольовим розчином і екстрагована толуолом. Екстракти концентрують і залишок розбавляють метанолом. Отриманий твердий продукт може бути зібраний, розчинений в етилацетаті, освітлений і розбавлений метанолом. Твердий продукт може бути зібраний з цього розбавленого розчину і висушений з отриманням сполуки VI.

На стадії 7 (не показано) сполуки VI в розчині етанолу може бути гідрована за допомогою каталізатора Pd-деревне вугілля. Після освітлення, гідрогенований матеріал може бути змішаний з малою кількістю аскорбінової кислоти і оброблений оцтовою кислотою. Отриманий в результаті кристалічний осадок потім може бути зібраний, промитий етанолом і висушений з отриманням кінцевого продукту, хлорідрата 1-[4-(2-азепан-1-ил-етокси)бензил]-2-(4-гідроксифеніл)-3-метил-1Н-індол-5-ола. Продукт потім може бути кристалізований з етанолу, що необов'язково містить малу кількість аскорбінової кислоти, переважно, наприклад, від близько 0,5s, масового до близько 3,0: масових.

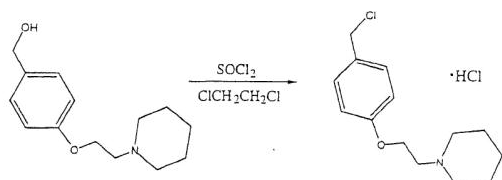
У наведених вище методиках проміжні сполуки від III до VI можуть бути легко ізольовані у вигляді твердих продуктів. Всі інші проміжні сполуки можуть більш переважно бути використані у вигляді розчинів в органічних розчинниках.

Схеми від IX до XII представляють синтез 2-(4-гідроксифеніл)-3-метил-1-[4-(2-піперидин-1-ил-етокси)бензил]-1Н-індол-5-ола з використанням проміжних сполук по даному винаходу. Схема IIa, описана вище, може розглядатися як перша стадія схеми IX або стадії перед нею. На цій стадії 4-гідроксибензиловий спирт обробляють з допомогою бажаного ариламіноалкілхлорида з отриманням відповідного

алкоксибензилового спирту. У конкретному Прикладі схеми ІІа 4-гідроксибензиловий спирт обробляють хлорідратом 1-(2-хлоретил) піперидина в присутності K_2CO_3/Me_2CO з отриманням 4-(2-піперидинилетокси)бензилового спирту. Толуол і насичений сольовий розчин можуть бути додані до отриманої суміші спиртів для розділення її фаз. Потім фаза толуола може бути промита послідовно водним розчином лугу і насиченим сольовим розчином. Отриманий матеріал потім може бути концентрований з подальшим доданням етилендихлорида для отримання проміжної сполуки, 4-(2-піперидинилетокси)бензилового спирту.

Розчин 4-(2-піперидинилетокси)бензилового спирту в етилендихлориді може бути об'єднаний з тіонілхлоридом і нагріватися доти, поки реакція не завершиться. При охолодженні суміш може бути концентрована з подальшим доданням 1,2-диметоксиетану і додатковим концентруванням. Осадок може бути зібраний і висушений з отриманням проміжної сполуки, хлорідрата 4-(2-піперидинилетокси)бензилхлорида, як показано на схемі ІХ.

СХЕМА ІХ



Як показано на схемі ІХ, розчин 4-(2-піперидинилетокси)бензилового спирту може бути об'єднаний з етилендихлоридом і тіонілхлоридом і нагрітий для створення реакційної суміші. При охолодженні, реакційна суміш може бути оброблена 1,2-диметоксиетаном і повторно концентрована. Отриманий осадок хлорідрата 4-(2-піперидинилетокси)бензилхлорида потім може бути зібраний і висушений.

СХЕМА Х

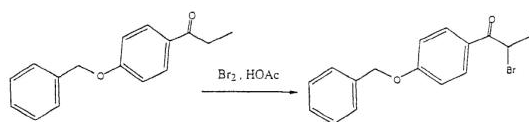
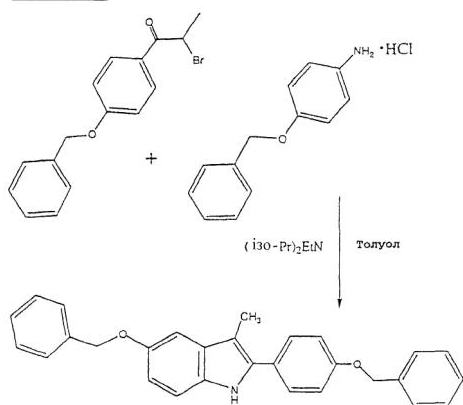
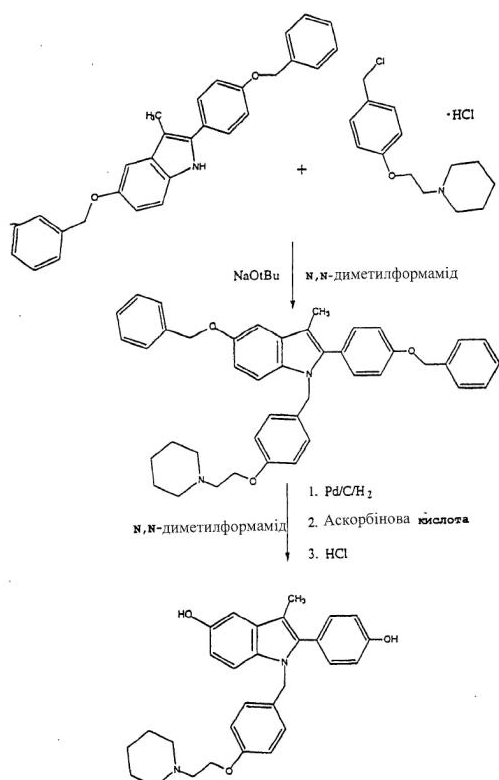


Схема Х зображає бромовання 4-бензилоксипропіофенону в оцтовій кислоті з бромом з отриманням 4'-(бензилокси)-2-бромпропіофенону. Коли ця реакція завершиться, суміш може бути погашена водою. Отриманий осадок може бути зібраний, промитий розбавленою оцтовою кислотою, водою і гептаном, і висушений.

СХЕМА ХІ



4'-(Бензилокси)-2-бромпропіофенон, що отримується на схемі Х, може бути нагрітий з хлорідратом 4-бензилоксианіліна в присутності N,N-диізопропілетиламіна і толуола із зворотним холодильником при азеотропному видаленні води, як показано на схемі ХІ. Коли реакція завершиться, суміш може бути охолоджена і розбавлена метанолом. Отриманий твердий продукт 3-метил-2-(4-бензилокси)феніл-5-бензилоксиіндол може бути зібраний, промитий метанолом і висушений.



3-Метил-2-(4-бензилокси)феніл-5-бензилоксиіндол, що отримується на схемі XI, може потім взаємодіяти з хлоргідратом 4-(2-піперидинілетокси)бензилхлорида в присутності трет-бутоксиду натрію в N, N-диметилформаміді. Отримана суміш може бути погашена насиченим сольовим розчином і екстрагована толуолом. Після освітлення, екстракти можуть бути концентровані і розбавлені метанолом. Отриманий твердий продукт, 5-бензилокси-2-(4-бензилоксифеніл)-3-метил-1H-індол може бути зібраний, розчинений в етилацетаті, розбавлений метанолом і висушений. Цей твердий продукт може бути розчинений в системі етанолтетрагідрофуран і гідрогенований за допомогою каталізатора Pd-деревне вугілля. Розчин потім може бути освітлений, необов'язково змішаний з невеликою кількістю аскорбінової кислоти, а потім оброблений водним розчином HCl. Потім осадок може бути зібраний, промитий сумішшю етанолтетрагідрофуран і водою і висушений з отриманням кінцевого продукту, 2-(4-гідроксифеніл)-3-метил-1-[4-(2-піперидин-1-ил-етокси)бензил]-1H-індол-5-ола.

Приклад 11

5-Бензилокси-2-(4-бензилоксифеніл)-3-1-[4-(2-піперидин-1-ил-етокси)бензил]-1H-індол

До розчину 5-бензилокси-2-(4-бензилоксифеніл)-3-метил-1H-індола (117,5г, 0,28моль, 1,0екв.) в ДМФ (1,3л), додають по частинах NaH (28,0г, 60 % масляна дисперсія, 0,7моль, 2,5екв.) при -5/-8°C протягом 1 години. Реакційну суміш перемішують протягом 2 годин. Розчин хлорида з Прикладу 8 в ТГФ (1,0л) додають по краплях при -10/0°C протягом 2 годин. Реакційну суміш перемішують при 25°C протягом ночі. ТСХ на цьому етапі показує наявність, в основному, продукту і не показує початкового матеріалу (EtOAc/гексан 1:5). Реакційну суміш розбавляють водою (6л), екстрагують EtOAc (2×3л) і сушать над Na₂SO₄. Розчин концентрують до 1л, виливають в MeOH (2,5л) і перемішують протягом 1 години. Осадок фільтрують і сушать з отриманням вказаної в заголовку сполуки (129г, 73%).

¹H ЯМР (CDCl₃/TMS); 7,64-6,63 (м, 21H), 5,12 (с, 2H), 5,09 (с, 2H), 5,07 (с, 2H), 4,07 (т, 2H, J=6,06Гц), 2,72 (т, 2H, J=6,06Гц), 2,48 (м, 4H), 2,24 (с, 3H), 1,62-1,24 (м, 6H)

Приклад 12

5-Бензилокси-2-(4-бензилоксифеніл)-3-1-[4-(2-гексаметиленимин-1-ил-етокси)бензил]-1H-індол

До суспензії NaH (20,0г, 60% масляна дисперсія, 0,5моль, 2,5екв.) додають розчин 5-бензилокси-2-(4-бензилоксифеніл)-3-метил-1H-індола (84г, 0,2моль, 1,0екв.) в ДМФ (100мл) при 0/+10°C протягом 1 години. Реакційну суміш перемішують протягом 30хв. Розчин хлорида з Прикладу 9 (67г, 0,22моль, 1,1екв.) в ДМФ (200мл) додають по краплях при 0/+10°C протягом 2 годин. Реакційну суміш перемішують при 25°C протягом 2 годин. ТСХ в цьому випадку показує, в основному, продукт і не показує початкового матеріалу, (EtOAc/гексан 1:5). Реакційну суміш розбавляють водою (1л), екстрагують EtOAc(3×1л) і сушать над MgSO₄. Розчин концентрують до 150мл, виливають в MeOH (750мл) і перемішують протягом ночі. Осадок фільтрують і сушать з отриманням вказаної в заголовку сполуки (99г, 76%).

¹H ЯМР (CDCl₃/TMS); 7,48-6,74 (м, 21H), 5,13 (с, 2H), 5,11 (с, 2H), 5,09 (с, 2H), 4,00 (т, 2H, J=6,24Гц), 2,91 (т, 2H, J=6,27Гц), 2,75 (м, 4H), 2,24 (с, 3H), 1,71-1,52 (м, 8H)

Приклад 13

5-Бензилокси-2-(4-бензилоксифеніл)-3-1-[4-(2-диметиламіно-етокси)бензил]-1H-індол

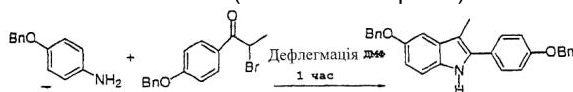
До суспензії NaH (1,1г, 60% масляна дисперсія, 0,05моль, 2,5екв.) додають розчин 5-бензилокси-2-(4-

бензилоксифеніл)-3-метил-1H-індола (6,97г, 0,017моль, 1,0екв.) в ДМФ (100мл) при 0/+10°C протягом 0,5 години. Реакційну суміш перемішують протягом 30хв. Розчин хлориду з Прикладу 10 (4,57г, 0,018моль, 1,1екв.) додають по частинах при 0/+10°C протягом 2 годин. Реакційну суміш перемішують при 25°C протягом 0,5 годин. ТСХ в цьому випадку показує, в основному, продукт і не показує початкового матеріалу (EtOAc/гексан 1:5). Реакційну суміш розбавляють водою (200мл), екстрагують EtOAc (3×200мл), і сушать над MgSO₄. Розчин концентрують до 150мл, виливають в MeOH (300мл) і перемішують протягом ночі. Осадок фільтрують і сушать з отриманням 5,6г (53%) вказаної в заголовку сполуки.

¹H ЯМР (CDCl₃/TMS): 7,50-6,66 (м, 21H), 5,13 (с, 2H), 5,11 (с, 2H), 5,09 (с, 2H), 3,99 (т, 2H, J=5,76Гц), 2,69 (т, 2H, J=5,73Гц), 2,31 (с, 6H), 2,42 (с, 3H)

Приклад 14

5-Бензилоксифеніл-2-(4-бензилоксифеніл)-3-метил-1H-індол



66414-19-5

Колбу завантажують 4-бензилоксифенілом (45г, 0,23моль), 4'-бензилоксифенілпропіофеноном (66414-19-5) (21г, 0,066моль) і 50мл ДМФ. Реакційну суміш нагрівають із зворотним холодильником протягом 30 хвилин і потім охолоджують до кімнатної температури, а потім розподіляють між 250мл EtOAc і 100мл 1N HCl (водн.). EtOAc промивають NaHCO₃ (водн.) і насиченим соловим розчином, сушать над MgSO₄. Розчин концентрують і залишок поглинають CH₂Cl₂ і додають гексани для осадження 25г сирого твердого продукту. Твердий продукт розчиняють в CH₂Cl₂ і упарюють на селікагелі, і піддають хроматографії, використовуючи суміш CH₂Cl₂/гексан (1:5) з отриманням 9,2г жовтувато-коричневого твердого продукту (33%); Т.пл.=150-152°C;

¹H ЯМР (DMSO) 10,88 (с, 1H), 7,56 (д, 2H, J=8,8Гц), 7,48 (д, 4H, J=7,9Гц), 7,42-7,29 (м, 6H), 7,21 (д, 1H, J=7,0Гц), 7,13 (д, 2H, J=8,8Гц), 7,08 (д, 1H, J=2,2Гц), 6,94 (дд, 1H, J=8,8, 2,4Гц), 5,16 (с, 2H), 5,11 (с, 2H), 2,33 (с, 3H);

IR (KBr) 3470, 2880, 2820, 1620cm⁻¹; MS el m/z 419.

Приклад 15

2-(4-Гідроксифеніл)-3-метил-1-[4-(2-піперидин-1-ил-етокси) бензил]-1H-індол-5-ол

Суспензію 10% Pd/C (1,1г) в EtOH нагрівають з розчином вказаної в заголовку сполуки з Прикладу 11 (2,2г, 3,4ммоль) в ТГФ/EtOH. Додають циклогексидієн (6,0мл, 63ммоль) і реакційну суміш перемішують протягом 48 годин. Каталізатор фільтрують через Целит і реакційну суміш концентрують і піддають хроматографії на силікагелі, використовуючи градієнтне елюювання сумішшю MeOH/CH₂Cl₂ (від 1:19 до 1:10) з отриманням 0,8г продукту у вигляді білого твердого продукту. Т.пл.=109-113°C; CHN розраховане для C₂₉H₃₂N₂O₃+0,5 H₂O;

¹H ЯМР 9,64 (с, 1H), 8,67 (с, 1H), 7,14 (д, 2H, J=8,6Гц), 7,05 (д, 1H, J=8,6Гц), 6,84 (д, 2H, J=8,8Гц), 6,79 (д, 1H, J=2,2Гц), 6,74 (с, 4H), 6,56 (дд, 1H, J=8,8, 2,4Гц), 5,09 (с, 2H), 3,95-3,93 (м, 2H), 2,60-2,51 (м, 2H), 2,39-2,38 (м, 4H), 2,09 (с, 3H), 1,46-1,45 (м, 4H), 1,35-1,34 (м, 2H);

IR (KBr) 3350 (ушир.), 2920, 1620, 1510cm⁻¹; MS (EI) m/z 456,

Дослідження скріплення in vitro рецепторів естрогена

Приготування рецепторів

Клітини яєчників китайського хом'яка (ЯКХ) надмірно експресуючі рецептори естрогена вирощують в 150мм чашках в суміші з навантаженої DMEM і 10% декстраном вуїльного пилу і фетальною (плідною) бичачою сироватки. Планшети промивають двічі фосфатним соловим буфером і один раз 10мМ Трис-HCl, pH7,4, 1мМ EDTA. Клітини збирають шляхом зскріблювання поверхні і потім клітинну суспензію вміщують на лід. Клітини руйнують за допомогою портативного електричного подрібнювача тканин, використовуючи два 10-секундних сеанси. Сирий препарат центрифугують при 12000g протягом 20 хвилин, а потім шляхом 60 хвилинного обертання при 10000g з отриманням цитозолу, що не містить рибосом. Потім цитозоль заморожують і зберігають при -80°C. Концентрація білків в цитозолі оцінюється з використанням дослідження BCA зі стандартним білком порівняння.

Умови для дослідження скріплення

Дослідження конкурентного скріплення проводять на 96-лунковому планшеті (polystyrene*), який зв'язує <2,0% від загального надходження [³H]-17_естрадіола, і кожну точку даних отримують триразово. 100мкг/100мкл препарату рецептора аліквотують на лунку. Додають насичуючу дозу з 2,5нМ [³H]-17_естрадіол + конкурент (або буфер) в об'ємі 50мкл при попередній конкуренції, коли оцінюють 100х і 500х конкурента, використовують тільки 0,8нМ [³H] 17_естрадіола. Планшет інкубують при кімнатній температурі протягом 2,5 годин. У кінці цього інкубаційного періоду додають 150мкл охолодженого на льоду, покритого декстраном деревного вуїлля (5% активованого деревного вуїлля, покритого 0,05% 69K декстрана) в кожну лунку, і планшет безпосередньо центрифугують при 99g протягом 5 хвилин при 4°C. 200мкл розчину супернатанта потім видаляють для рахунку сцинтиляцій. Відліки зразків проводять до 2% або 10 хвилин, в залежності від того, що відбувається спочатку. Оскільки полістирол поглинає малу кількість [³H]17_естрадіола, клітини, що містять радіоактивність і цитозоль, але не оброблені деревним вуїллям, включають в кількості доступного ізотопу, що визначаються. Крім того, лунки, що містять радіоактивність, але не цитозоль, обробляють деревним вуїллям для оцінки ДНХ, що не видаляється [³H]17_естрадіола. Використовують 96-лункові планшети Corning #25880-96, оскільки вони, як показано, зв'язують найменшу кількість естрадіола.

Аналіз результатів

Відліки на хвилину (ВНХ) радіоактивності автоматично перетворюють в число дезінтегрованих на хвилину (ДНХ) з допомогою Beckman LS 7500 Scintillation Counter з використанням набору погашених стандартів для отримання Н# для кожного зразка. Для обчислення % скріплення естрадіола в присутності 100-кратного або 500-кратного конкурента використовують наступну формулу:

((ДНХ зразок - ДНХ не в идалений за допомогою деревного вуїлля)/(ДНХ естрадіол - ДНХ не в идалений за допомогою

деревного вугілля) $\times 100\% = \%$ скріплення естрадіола

Для отримання кривих IC_{50} будують графіки $\%$ скріплення в залежності від сполуки. Залежності IC_{50} будують для сполук, які демонструють $>30\%$ конкуренцію при 500х концентрації конкурента. Опис цих методів [дивись в Hulme, B.C., ed. 1992, Receptor-Ligand Interactions: A Practical Approach. IRL Press, New York (дивись, зокрема, розділ 8)]. Посилання нижче в таблицях на сполуки з Прикладу 1 відносяться до кінцевого продукту, 2-(4-гідроксифеніл)-3-метил-1-[4-(2-піперидин-1-илетокси)бензил]-1H-індол-5-олу.

Афінність рецептора естрогена (вказується як RBA: 17- естр адіол=100)

Сполука	RBA
Raloxifene	200
Tamoxifen	1,8
Equilin	5,3
Приклад 15	400

Дослідження клітин Ішикави на лужну фосфатазу

Підтримка життєдіяльності і обробка клітин:

Клітини Ішикави витримують в суміші DMEM/F12 (50%:50%), що містить фенольний червоний +10% фетальної бичачої сироватки, і середа доповнюється 2мМ Glutamax, 1% Pen/Strap і 1мМ пирувата натрію. За п'ять днів перед початком кожного експерименту (обробка клітин) середу замінюють сироваткою, розділеною в суміші DMEM/F12 +10% деревного вугілля, покритого декстраном, вільної від фенольного червоного. У день перед обробкою клітини збирають з використанням 0,5% трипсин/ЕДТА і вміщують з щільністю 5×10^4 клітин/лунка в 96-лункових планшетах для культур тканин. Сполуки, що досліджуються дозують при 10^{-6} , 10^{-7} і 10^{-8} М при доданні до 10^{-6} М (сполуки)+ 10^{-9} 17_естрадіола для оцінки здатності сполук до функціонування в якості антиестрогенів. Клітини обробляють протягом 48 годин перед дослідженням. Кожний 96-лунковий планшет містить 17-естрадіол в якості контролю. Популяція зразка в кожній дозі складає n=8.

Дослідження лужної фосфатази:

У кінці 48 часового періоду середі відомоктують і клітини промивають три рази фосфатним сольовим буфером (ФСБ). 50мкл лізуючого буфера (0,1М Тріс-НСІ, рН9,8, 0,2% Triton X-100) додають в кожен лунку. Планшети витримують при -80°C протягом, щонайменше, 15 хвилин. Планшети розморожують при 37°C з подальшим доданням 150мкл 0,1М Тріс-НСІ, рН9,8, що містить 4мМ пара-нітрофенілфосфату (пНФФ) в кожен лунку (кінцева концентрація - 3мМ пНФФ). Обчислення поглинання і крутості кінетичної кривої здійснюють, з використанням програми KineticCalc Application (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). Результати виражаються як середнє значення \pm середньоквадратична дисперсія швидкості ферментативної реакції (крутість), усереднене по лінійній частині кінетичної кривої (реєстрації оптичної щільності кожні 5 хвилин протягом реєстрації поглинання за 30 хвилин). Результати для сполук узагальнені в формі процента відгуку, що стосується 1нМ 17_естрадіола. Різні сполуки оцінюють на естрогену активність за допомогою методу лужної фосфатази і обчислюють відповідні значення ED_{50} (95% C.I.). Чотири перерахованих нижче сполуки використовують як стандарти для порівняння:

17_естрадіол	0,03нМ	17_естрадіол	1,42нМ
естріол	0,13нМ	естрон	0,36нМ

Опис цих методів викладений в Holinka, C.F., Hata, H., Kuramoto, H. i Gurpide, E. (1986) Effects of steroid hormones i antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (Ishikawa Line). Cancer Research, 46:2771-2774, i by Littlefield, B.A., Gurpide, E., Markiewicz, L., McKinley, B. and Hochberg, R..B. (1990) A simple and sensitive microtiter plate estrogen bioassay based on stimulation alkaline phosphatase in Ishikawa cells; Estrogen action of D5 adrenal steroids. Endocrinology, 6:2757-2762.

Дослідження клітин Ішикави на лужну фосфатазу

Сполука	% Активування
17_естрадіол	100% активність
tamoxifen	0% активність (45% з 1нМ 17_естрадіола)
raloxifene	5% активність (5% з 1нМ 17_естрадіола)
Приклад 15	1% активність (1% з 1нМ 17_естрадіола)

Дослідження трансфекції 2X VIT ERE Підтримка і обробка клітин

Яйцеклітини китайського хом'яка (ЯМС), які стабільно трансфіковані рецептором естрогену людини, витримують в DMEM+10% фетальної бичачої сироватки (ФСБ). За 48 годин перед обробкою середу для вирощування замінюють DMEM, де відсутній фенольний червоний +10% ФСБ, на деревному вугіллі, навантаженому декстраном (середа для обробки). Клітини вміщують з щільністю 5000/лунка в 96-лункові планшети, що містять 200мкл середа/лунка.

Трансфекція фосфату кальцію

Репортерна ДНК (плазмид Promega pGL2, що містить дві тандемні копії вителогенина ERE попереду мінімального промотору тимідикінази, стимулюючого ген люциферази) об'єднують з плазмидом експресії В-галактозидази рСН110 (Pharmacia) і носія ДНК (рTZ18U) в наступному відношенні:

10мкг репортерної ДНК

5мкгДНКрСН110

5МКгpTZ18U

20мкг ДНК/1мл розчину для трансфекції

ДНК (20мкг) розчиняють в 500мкл 250мМ стерильного розчину $CaCl_2$ і додають по краплях до 500мкл 2xHeBS (0,28М NaCl, 50мМ HEPES, 1,5мМ Na_2HPO_4 , рН7,05) і інкубують при кімнатній температурі протягом

20 хвилин. 20мкл цієї суміші додають в кожну лунку з клітками і залишають на клітинах протягом 16 годин. У кінці цієї інкубації осадок видалають, клітини промивають середою, середою для обробки замінюють свіжою і клітини обробляють одним з носіїв, 1нМ 17_-естрадіолу, 1мкМ сполуки або 1мкМ сполуки +1нМ 17_-естрадіолу (тести на антагонізм до естрогену). Кожну умову обробки відтворюють на 8 лунках (n=8), які інкубують протягом 24 годин перед дослідженнями на люциферазу.

Дослідження на люциферазу

Після 24год. зіткнення із сполуками, середою видалають, і кожну лунку промивають 2×125мкл ФСБ, де відсутні Mg^{++} і Ca^{++} . Після видалення ФСБ додають в кожну лунку 25мкл лізуючого буфера Promega і дають можливість стояти при кімнатній температурі протягом 15хвил., потім 15хвил. при -80°C і 15хвил. при 37°C. 20Мкл лізату переносять на матовий 96-лунковий планшет для оцінки активності люциферази і лізат (5мкл), що залишився використовують для оцінки активності В-галактозидази (нормування трансфекції). Субстрат люциферан (Promega) додають в 100мкл аліквотах в кожну лунку автоматично за допомогою люмінометра і світло (відносні світлові одиниці), що виходить реєструють через 10 секунд після додання. Дослідження інфекції люциферази

Сполука	% Активації	
17-естрадіол	100% активність	
естриол	38% активність	
tamoxifen	0% активність	(10% с 1нМ 17- естрадіола)
raloxifene	0% активність	(0% с 1нМ 17- естрадіола)
Приклад 15	0% активність	(0% с 1нМ 17- естрадіола)

Дослідження В-галактозидази

До 5мкл лізата, що залишається додають 45мкл ФСБ. Потім додають 50мкл 2× буфери для дослідження В-галактозидази Promega, ретельно перемішують і інкубують при 37°C протягом 1 години. Для кожного експерименту підбирають планшет, що містить стандартну криву (0,1 до 1,5 міліюдиниць, трикратно). Планшети аналізують на спектрометричному реєстраторі планшетів Molecular Devices на довжині хвилі 410нм. Оптичні щільності, які невідомі, перетворюють в міліюдиниці активності шляхом математичної екстраполяції від стандартної кривої.

Аналіз результатів

Дані для люциферази отримують в формі відносних світлових одиниць (BCO), що збираються протягом 10 секундного вимірювання і автоматично переносяться в JMP (SAS Inc) файл, де віднімаються фонові BCO. Значення В-галактозидази автоматично імпортується в файл і ці значення діляться на BCO для нормування даних. Середні значення і стандартні відхилення визначають з n=8 для кожної обробки. Активність сполук порівнюють з

17_-естрадіолом для кожного планшета. Процент активності в порівнянні з 17_-естрадіолом обчислюють з використанням формули:

$$\% = (\text{Естрадіол-контроль}) / (\text{значення для сполуки}) \times 100.$$

Ці методики описані [Tzukerman, M.T., Esty, A., Santiso-Mere, D., Danielian, P., Parker, M.G., Stein, R.B., Pike, J.W. і McDonnell, D.F (1994)] Трансактиваційну здатність рецептора естрогену людини визначають, як в клітинному контексті, так і в контексті промотора, і опосередковують за допомогою двох функціонально різних інтрамолекулярних регіонів (дивись Molecular Endocrinology, 8:21-30).

Біологічні дослідження на утеротрофічність/антиутеротрофічність на пацюках

Естрогенні і антиестрогенні властивості сполук визначають в дослідженні на утеротрофічність у пацюків (4 дні), що не досягли зрілості, [як описано раніше L.J.Black і R.L.Goode. Life Sciences, 26, 1453 (1980)]. Пацюки лінії Sprague-Dawley, що не досягли зрілості (самці, вік 18 днів) досліджують в групах по шість тварин. Тварин лікують за допомогою щоденних внутрішньочеревних ін'єкцій з 10мкг сполуки, 100мкг сполуки, (100мкг сполуки +1мкг 17_-естрадіола) для перевірки антиестрогенності, і 1мкг 17_-естрадіола з 50% ДМСО/50% фізіологічного розчину в якості носія при ін'єкції. На 4 день тварин умертвляють шляхом задушення з допомогою CO₂ і їх матки видалають і позбавляють від надлишку липідів, видалають всю рідину і визначають вологу вагу. Невелику частину одного з рогоподібних паростків піддають гістологічному дослідженню і залишок використовують для витягання загальної РНК в порядку оцінки компліментарного компонента 3 експресії гена.

Моделі пацюків через 3 дні після видалення яєчників

Сполука	10мкг	10мкг
Tamoxifen	69,6мг	71,4мг
Raloxifen	47,5	43,2

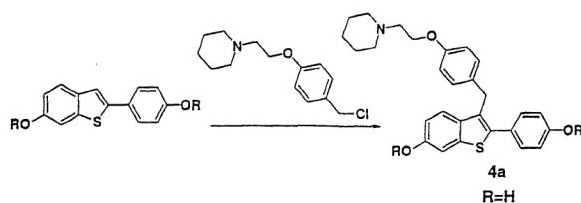
контроль =42,7мг 1мкг 17_-естрадіола =98,2

Сполука 10мкг 100мкг 100мкг+ 1мкг 17-естрадіола

Приклад 15 39,9мг 27,4мг 24,3мг

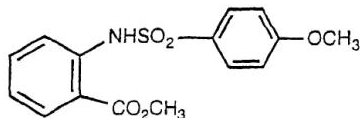
контроль =30,7мг 1мкг 17_-естрадіола =63,2

Сполука Raloxifen, хлорідрат [2-(4-гідроксифеніл)-6-гідроксибензо[b]тієн-3-ил][4-(1-піперидинил)]етокси]фенілметанона є представником класу сполук, відомих як селективні модулятори рецепторів естрогенів, яким притаманні впливи, подібні агоністам естрогенів на кісткові тканини і грубі (?) ліпіди, при цьому виявляючи антагонізм до естрогенам в тканинах матки і грудей. Palkowitz et al. пропонують в J. Med. Chem 1997, 40, 1407, активні аналоги препарату Raloxifen, які також можуть бути отримані з використанням сполук по даному винаходу. Наприклад, описана ними сполука 4а, хлорідрат [2-(4-гідроксифеніл)-6-гідроксибензо[b]тієн-3-ил][4-(1-піперидинил)етокси]фенілметана, може бути отримана згідно із загальною схемою реакції, представленою нижче.



Приклад 16

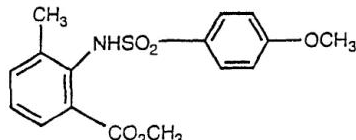
Метильний складний ефір 2-(4-метоксибензолсульфоніламіно) бензойної кислоти



До розчину 2,00г (0,013моль) метилантранілата, розчиненого в 20мл хлороформа, додають 3,2мл (0,039моль) піридина, а потім 2,733г (0,013моль) п-метоксибензолсульфонілхлорида. Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 5 годин і потім промивають 3н HCl і водою. Потім органічні шари сушать над Na_2SO_4 , фільтрують і концентрують у вакуумі. Отриманий в результаті білий твердий продукт промивають ефіром і сушать у вакуумі з отриманням 3,7г (87%) бажаного сульфонаміда. СІ Масс-спектрометрія: 322 (M+H).

Приклад 17

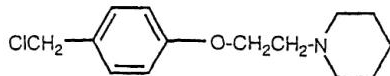
Метильний складний ефір 2-(4-метоксибензолсульфоніламіно)-3-метилбензойної кислоти



Таким же способом, як описано в Прикладі 16, 6,24г (0,038моль) метил 3-метилантранілата отримують 6,21г (49%) бажаного сульфонаміда у вигляді білого твердого продукту. Електроспрей масс-спектрометрія 336,2 (M+H).

Приклад 18

4-(2-Піперидин-1-ил-етокси)бензилхлорид

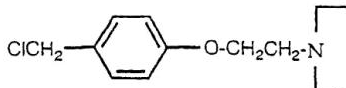


До розчину, що перемішується 4-гідроксибензальдегіда (12,2мг, 0,1моль) і K_2CO_3 (25мг, надлишок) в N,N-диметилформаміді (250мл) додають монохлорідат 1-(2-хлоретил)піперидина (20,0мг, 1,08моль). Реакційну суміш нагрівають до 80°C протягом 24 годин і охолоджують до кімнатної температури. Реакційну суміш гасять водою, змішану з льодом і екстрагують хлороформом. Органічні шари промивають водою, сушать над безводним MgSO_4 , фільтрують і концентрують у вакуумі. Залишок розчиняють в метанолі і при 0°C повільно додають бор гідрид натрію (10г, надлишок). Реакційну суміш промивають при кімнатній температурі протягом 2 годин і потім гасять за допомогою води. Спирт екстрагують хлороформом, органічні шари добре промивають водою, сушать над Na_2SO_4 , фільтрують і концентрують у вакуумі.

Сирий спирт, отриманий таким чином, розчиняють в ТГФ (200мл) і пропускають газоподібний HCl протягом 30 хвилин при 0°C. До суспензії отриманого таким чином хлорідрата повільно додають тіонілхлорид (30мл, надлишок). Реакційну суміш нагрівають із зворотним холодильником протягом тридцяти хвилин і охолоджують до кімнатної температури. Потім реакційну суміш концентрують досуху і розтирають з безводним ефіром. Осаджений твердий продукт фільтрують і сушать у вакуумі при кімнатній температурі з отриманням 25г (86%) продукту у вигляді білої твердої речовини, т.пл. 145-148°C. Електроспрей масс-спектрометрія: 256 (M+H).

Приклад 19

4-(2-N, N-Диетилетокси) бензилхлорид



До розчину, що перемішується 4-гідрокси бензальдегіда (12,2г, 0,1моль) і K_2CO_3 (25г, надлишок) в N,N-диметилформаміді (250мл) додають 2-диетиламіноетилхлорид монохлорідат (20,0г, 1,2моль). Реакційну суміш нагрівають при 80°C протягом 24 годин і охолоджують до кімнатної температури. Реакційну суміш гасять водою, змішану з льодом, і екстрагують хлороформом. Органічні шари промивають водою, сушать над безводним MgSO_4 , фільтрують і концентрують у вакуумі. Залишок розчиняють в метанолі і повільно додають боргідрид натрію (10г, надлишок) при 0°C. Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 2 годин і потім гасять водою. Спирт екстрагують хлороформом, ретельно промивають водою, сушать, фільтрують і концентрують у вакуумі.

Сирий спирт, отриманий таким чином, розчиняють в ТГФ (200мл) і пропускають газоподібний HCl протягом 30 хвилин при 0°C. До суспензії отриманого таким чином хлорідрата повільно додають тіонілхлорид (30мл, надлишок). Реакційну суміш нагрівають із зворотним холодильником протягом тридцяти хвилин і охолоджують до кімнатної температури. Потім реакційну суміш концентрують досуху і розтирають з безводним ефіром. Осаджений твердий продукт фільтрують і сушать у вакуумі при кімнатній температурі з отриманням 18г (65%) продукту у вигляді білої твердої речовини, т.пл. 76-79°C. Електроспрей масс-спектрометрія: 244 (M+H).

Приклад 20

N-Гідрокси-2-[(4-метоксифеніл)сульфоніл][4-[2-(1-піперидиніл)стоксифеніл]метил]аміно]-3-метилбензамід

До розчину 1,00г (2,985ммоль) метилового складного ефіру 2-(4-метоксибензолсульфоніламіно)-3-метилбензойної кислоти в 5мл ДМФ додають 0,952г (3,284ммоль) 4-(2-піперидин-1-ил-етокси)бензилхлорида і 1,65г (11,9ммоль) карбонату калію. Потім реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 18 годин, розбавляють водою і екстрагують ефіром. Потім органічні шари екстрагують розчином 6н HCl, а потім водний кислотний шар підлужують розчином 6н NaOH, а потім екстрагують ефіром. Отриманий в результаті ефірний шар сушать над сульфатом натрію, фільтрують і концентрують у вакуумі з отриманням 0,965г піперидинового складного ефіру у вигляді безбарвного масла. Електроспрей мас-спектрометрія: 553,5 (M+H)⁺.

До розчину 0,889г (1,611ммоль) піперидинового складного ефіру в 7мл ТГФ додають 0,203г гідроксида моногідрату літію. Отриману в результаті суміш нагрівають із зворотним холодильником протягом 15 годин і потім концентрують у вакуумі до отримання сухого залишку. Залишок розбавляють водою, нейтралізують розчином 5% HCl і екстрагують дихлорметаном. Органічний шар сушать над Na₂SO₄, фільтрують і концентрують у вакуумі з отриманням 0,872г карбонової кислоти у вигляді білої піни. Електроспрей мас-спектрометрія: 539,2 (M+H)⁺.

До розчину 0,814г (1,513ммоль) карбонової кислоти в 10мл ДМФ додають 0,245г (1,82ммоль) НОBT і 0,386г (2,01ммоль) EDC. Реакційну суміш потім перемішують протягом 1 години при кімнатній температурі і додають 0,46мл (7,57ммоль) 50% розчину гідроксиламіна у воді. Реакційну суміш перемішують протягом ночі і потім концентрують у вакуумі до отримання сухого залишку. Залишок розбавляють EtOAc, промивають водою і розчином бікарбонату натрію, сушать над Na₂SO₄, фільтрують і концентрують у вакуумі до отримання сухого залишку. Залишок розчиняють в 5мл дихлорметана і додають 0,69мл 1н розчину HCl в ефірі. Через 1 годину реакційну суміш розбавляють ефіром і отриману в результаті тверду речовину фільтрують і сушать у вакуумі з отриманням 0,179г гідроксаматамінової солі у вигляді білої твердої речовини. Електроспрей мас-спектрометрія: 554,5 (M+H)⁺.

Приклад 21

2-[[4-(2-Диетиламіноетокси)бензил]-(4-метоксибензолсульфоніл)аміно]-N-гідрокси-3-метилбензамід

До розчину 1,0г (2,653ммоль) метилового складного ефіру 2-(4-метоксибензолсульфоніламіно)-3-метилбензойної кислоти в 10мл ДМФ додають 0,811г (2,918ммоль) 4-(2-N,N-диетилетокси)бензилхлорида і 1,5г (10,9ммоль) карбонату калію. Потім реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 18 годин, розбавляють водою і екстрагують ефіром. Потім органічні шари екстрагують розчином 6н HCl і водний кислотний шар потім підлужують розчином 6н NaOH, а потім екстрагують ефіром. Отриманий в результаті ефірний шар сушать над сульфатом натрію, фільтрують і концентрують у вакуумі з отриманням 0,575г (37%) N,N-диетиламінового складного ефіру у вигляді жовтуватого-коричневої піни. Електроспрей мас-спектрометрія: 583,1 (M+H)⁺.

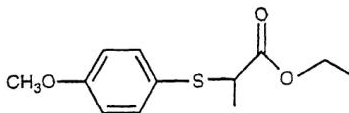
До розчину 0,539г (0,926ммоль) N,N-диетиламінового складного ефіру в дихлорметані додають 2мл трифтороцтової кислоти. Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 2 годин і потім концентрують у вакуумі до залишку. Залишок розтирають з ефіром і отриманий в результаті твердий продукт збирають фільтруванням і сушать у вакуумі з отриманням 0,369г карбонової кислоти у вигляді білої твердої речовини. Електроспрей мас-спектрометрія: 525,2 (M-H)⁻.

До розчину 0,328г (0,513ммоль) карбонової кислоти в 6,5мл дихлорметана додають 0,12мл ДМФ, а потім 0,77мл 2,0М оксалілхлорида в CH₂Cl₂, і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 1 години.

В окрему колбу при 0°C додають до суміші 0,47мл (7,7ммоль) 50% розчину гідроксиламіна у воді 8мл ТГФ і 1,7мл води. Після цього суміш перемішують протягом 15 хвилин при 0°C, додають до неї за один раз розчин хлорангідриду, і отриманому розчину дають можливість нагрітися до кімнатної температури при перемішуванні протягом ночі. Потім реакційну суміш підкисляють до pH3 за допомогою 10% HCl і екстрагують EtOAc. Об'єднані органічні шари сушать над Na₂SO₄, фільтрують і концентрують у вакуумі до отримання сухого залишку. Залишок розтирають з ефіром з отриманням 0,194г гідроксаматамінової солі у вигляді білої твердої речовини. Електроспрей мас-спектрометрія: 542,3 (M+H)⁺.

Приклад 22

Етиловий складний ефір 2-(4-метоксифенілсульфаніл)пропіонової кислоти

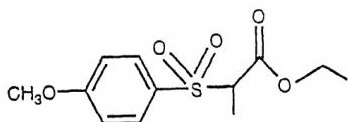


До розчину, що перемішується 4-метоксибензолтіола (2,5г, 14ммоль) і безводного K₂CO₃ (4,0г, надлишок) в сухому ацетоні (100мл) в круглодонній колбі додають етил 2-бромпропіонат (3,0г, 16ммоль) і реакційну суміш нагрівають із зворотним холодильником протягом 8 годин при доброму перемішуванні. У кінці реакційної суміші дають можливість охолотитися, фільтрують і реакційну суміш концентрують до отримання сухого залишку.

Залишок екстрагують хлороформом і промивають H₂O, і органічний шар сушать над MgSO₄, фільтрують і концентрують з отриманням етилового складного ефіру 2-(4-метоксифенілсульфаніл)пропіонової кислоти у вигляді ясно жовтого масла. Вихід 3,6г (94%).

Приклад 23

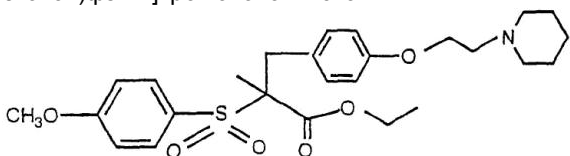
Етиловий складний ефір 2-(4-метоксибензолсульфоніл)пропіонової кислоти



До розчину 12,0г (50ммоль) етилового складного ефіру, що перемішується 2-(4-метоксифенілсульфоніл)пропіонової кислоти в 300мл метиленхлорида при 0°C повільно додають при швидкості, що дозволяє контролювати виділення тепла. Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 2 годин і розбавляють 600мл гексанів. Реакційну суміш фільтрують, і фільтрат перемішують з 500мл насиченого розчину Na_2SO_3 протягом 3 годин. Органічний шар упаривають, ретельно промивають водою, сушать і упаривають у вакуумі з отриманням 12г напівтвердої речовини.

Приклад 24

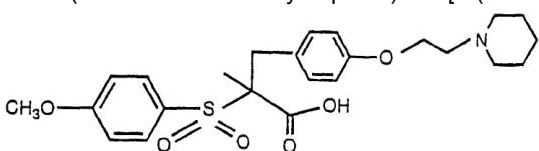
Етиловий складний ефір 2-(4-метоксифеніл)пропіонової кислоти



Суміш, що перемішується 2,7г (10ммоль) етилового складного ефіру 2-(4-метоксифеніл)пропіонової кислоти, 3,03г (10ммоль) 4-(2-піперидин-1-ил-етокси)бензилхлорида, 10г K_2CO_3 і 500мг 18-краун-6 в 250мл ацетону нагрівають із зворотним холодильником протягом 16 годин. У кінці реакційну суміш фільтрують і ацетоновий шар концентрують до отримання сухого залишку. Залишок екстрагують хлороформом, ретельно промивають водою, сушать над безводним MgSO_4 , фільтрують і концентрують до отримання сухого залишку. Отриманий залишок очищають з допомогою колонкової хроматографії на силікагелі з елюванням сумішшю 50% етилацетат-гексан з отриманням 4,8г (92%) бажаного продукту у вигляді масла. MS: 490($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Приклад 25

2-(4-Метоксифеніл)пропіонова кислота

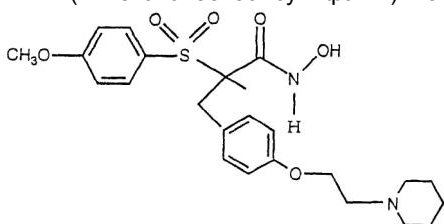


До розчину етилового складного ефіру, що перемішується 2-(4-метоксифеніл)пропіонової кислоти (4,9г, 10ммоль) в метиловому спирті додають 10н NaOH (20мл, надлишок). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 48 годин. У кінці реакційну суміш концентрують і обережно нейтралізують розбавленою HCl . Отриманий залишок екстрагують хлороформом, ретельно промивають водою, сушать і концентрують. Отриманий продукт очищають з допомогою колонкової хроматографії на селікагелі з елюванням сумішшю етилацетат:метанол (95:5) і з отриманням продукту даного Прикладу у вигляді безбарвних кристалів, т.пл. 106°C;

Мас-спектрометрія: 462,5 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. Вихід 4,1г, 88-1,

Приклад 26

2-(4-Метоксифеніл)пропіонамід



До розчину, що перемішується 2-(4-метоксифеніл)пропіонової кислоти (2,3г, 5ммоль), ДМФ (2 краплі) в CH_2Cl_2 (100мл) при 0°C додають по краплях оксалилхлорид (1,2г, 10ммоль). Після додання, реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 1 години. Одночасно з цим, в окремій колбі суміш хлорідрата гідроксиламіна (3,4г, 50ммоль) і триетиламіна (10,1г, 100ммоль) перемішують в суміші ТГФ:вода (5:1, 50мл) при 0°C протягом 1 години. Наприкінці 1 години оксалилхлоридну реакційну суміш концентрують і блідо-жовтий залишок розчиняють в 10мл CH_2Cl_2 і повільно додають до гідроксил аміну при 0°C. Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 24 годин і концентрують. Отриманий залишок екстрагують хлороформом і ретельно промивають водою. Отриманий продукт очищають з допомогою колонкової хроматографії на селікагелі і елюють етилацетатом. Продукт даного Прикладу виділяють у вигляді безбарвної твердої речовини, т.пл. 98°C; Вихід, 48%; MS: 477 ($\text{M}+\text{H}$)⁺;

¹H ЯМР (300МГц, CDCl_3): 1,2 (с, 3H), 3,5-1,5 (м, 16H), 3,9 (с, 3H), 4,4 (м, 1H); 6,5-7,8 (м, 8H); 10,8 (ушир.с, 1H).

Сполуки по даному винаходу досліджують на біологічну активність згідно з наступними процедурами

Дослідження in vitro з допомогою желатинази

Дослідження засновується на розщепленні тіопептидного субстрату ((Ac-Pro-Leu-Gly (2-меркапто-4-метилпентанол)-Leu-Gly-OEt), Bachern Bioscience) за допомогою ферменту желатинази, вивільняючи

субстратний продукт, який взаємодіє колориметрично з ДТНБ (5,5'-дитіо-біс(2-нітробензойна кислота)). Активність ферменту вимірюють з використанням швидкості збільшення інтенсивності кольору.) Свіжий тіопептидний субстрат приготують у вигляді 20мМ поживної середовища для культури в 100% ДМСО і ДТНБ розчиняють в 100% ДМСО як 100мМ поживну середовища, і зберігають в темряві при кімнатній температурі. Як субстрат, так і ДТНБ розбавляють разом перед використанням до 1мМ субстратним буфером (50мМ HEPES pH7,5, 5мМ CaCl₂). Поживну середовища з желатиназою нейтрофілів В людини розбавляють буфером для аналізу (50мМ HEPES, pH7,5, 5мМ CaCl₂, 0,02% Brij) до кінцевої концентрації 0,15нМ. Буфер для аналізу, фермент, ДТНБ/субстрат (кінцева концентрація 500мкМ) і носій або інгібітор додають на 96-лунковий планшет (загальний об'єм реакції 200мкл), і збільшення інтенсивності кольору відстежують спектрофотометрично протягом 5 хвилин на довжині хвилі 405нм за допомогою планшетного рідера. Будують графік збільшення OD405 і обчислюють крутість кривої, яка відповідає швидкості реакції. Лінійність швидкості реакції підтверджується ($r^2 > 0,85$). Середнє значення швидкості для контролю ($\bar{x} \pm \text{sem}$) обчислюють і порівнюють для статистичної значущості ($p < 0,05$) з швидкостями для зразків, оброблених ліками, і використовуючи тест багаторазових порівнянь Даннета. Співвідношення доза-відгук можуть бути отримані з використанням багаторазового введення ліків, і значення IC₅₀ з 95% CI встановлюють з використанням лінійної регресії (IPRED, НТБ).

Посилання: Weingarten, H і Feder, J., Spectrophotometric assay for vertebrate collagenase. Anal. Biochem. 147,437-440 (1985).

In vitro дослідження за допомогою колагенази

Дослідження засновується на розщепленні пептидного субстрату ((Dnp-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys (NMa)-NH₂), Peptide International, Inc.) за допомогою колагенази, що приводить до вивільнення флуоресцентної групи NMa, яка кількісно характеризується на флуориметрі. Dnp гасить флуоресценцію NMa в інтактному субстраті. Дослідження здійснюють в буфері для аналізу HCBC (50мМ HEPES, pH7,0, 5мМ Ca²⁺, 0,02% Brij, 0,5% цистеїн) з рекомбінантною колагеназою фібробласта людини (процесована, mw=18,828, WAR, Radnor). Субстрат розчиняють в метанолі і зберігають замороженим в 1мМ аліквотах. Колагеназу зберігають замороженою в буфері в 25мкМ аліквотах. Для аналізу субстрат розчиняють в буфері HCBC до кінцевої концентрації 10мкМ, а колагеназу до кінцевої концентрації 5нМ. Сполуки розчиняють в метанолі, ДМСО або HCBC. Метанол і ДМСО розбавляють HCBC до <1,0%. Сполуки додають на 96-лунковий планшет, що містить фермент, і реакція починається при доданні субстрату. Реакцію реєструють (збудження 340нм, емісія 444нм) протягом 10хвил., і графік збільшення флуоресценції згодом будується як пряма лінія. Обчислюють крутість лінії, і вона відповідає швидкості реакції. Лінійність швидкості реакції підтверджується ($r^2 > 0,85$). Середнє значення швидкості для контролю ($\bar{x} \pm \text{sem}$) обчислюють і порівнюють для статистичної значущості ($p < 0,05$) з швидкостями для зразків, оброблених ліками, і використовуючи тест багаторазових порівнянь Даннета. Співвідношення доза-відгук можуть бути отримані з використанням багаторазового введення ліків, і значення IC₅₀ з 95% CI встановлюють з використанням лінійної регресії (IPRED, НТБ).

Посилання: Bickett, D. M. et al., A high throughput fluorogenic substrate for interstitial collagenase (MMP-1) і gelatinase (MMP-9), Anal. Biochem. 212, 58-64 (1993).

Процедура вимірювання інгібування TACE

Використовуючи 96-лункові чорні планшети для мікротитрування, в кожен лунку вводять розчин, що складається з 10мкл TACE (Immunex, кінцева концентрація 1 мкг/мл), 70мкл Трис-буферу, pH7,4, що містить 10% гліцерину (кінцева концентрація 10мМ) і 10мкл розчини сполуки, що досліджується в ДМСО (кінцева концентрація 1мкМ, концентрація ДМСО <1%), і інкубують протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Реакція починається при доданні флуоресцентного пептидильного субстрату (кінцева концентрація 100мкМ) в кожен лунку з подальшим перемішуванням в шейкері протягом 5сек. Реакцію реєструють (збудження 340нм, емісія 420нм) протягом 10хвил., і графік збільшення флуоресценції згодом будується як пряма лінія. Крутість лінії обчислюють, і вона відповідає швидкості реакції. Лінійність швидкості реакції підтверджується ($r^2 > 0,85$). Середнє значення швидкості для контролю ($\bar{x} \pm \text{sem}$) обчислюють і порівнюють для статистичної значущості ($p < 0,05$) з швидкостями для зразків, оброблених ліками, і використовуючи тест багаторазових порівнянь Даннета. Співвідношення доза-відгук можуть бути отримані з використанням багаторазового введення ліків, і значення IC₅₀ з 95% CI встановлюють з використанням лінійної регресії.

Результати, отримані внаслідок цих стандартних експериментальних процедур дослідження, представлені в наступній таблиці.

IC₅₀ (нМ або % інгібування при 1 мікромоль)

Приклад	Ммр 1	ММП 9	ММП 13	TACE
26	238,6	8,9	1,4	41,00%

Процедури вимірювання інгібування ММП-1, ММП-9 і ММП-13

Ці дослідження засновуються на розщепленні тіопептидних субстратів, таких як Ac-Pro-Leu-Gly(2-меркапто-4-метил-пентаноїл)-Leu-Cly-OEt за допомогою матричних металопротеїназ ММП-1, ММП-13 (колагенази) або ММП-9 (желатиназа), внаслідок чого вивільняється субстратний продукт, який взаємодіє колориметрично з ДТНБ ((5,5'-дитіо-біс(2-нітробензойна кислота)). Активність ферменту вимірюють з використанням швидкості збільшення інтенсивності кольору. Приготують свіжий тіопептидний субстрат у вигляді 20мМ поживної середовища для культури в 100% ДМСО, і ДТНБ розчиняють в 100% ДМСО як 100мМ поживну середовища, і зберігають в темряві при кімнатній температурі. Як субстрат, так і ДТНБ перед використанням розбавляють разом до 1мМ субстратним буфером (50мМ HEPES pH7,5, 5мМ CaCl₂). Поживну середовища з ферментом розбавляють буфером для аналізу (50мМ HEPES, pH7,5, 5мМ CaCl₂, 0,02% Brij) до бажаної кінцевої концентрації. Буфер для аналізу, фермент, носій або інгібітор і ДТНБ/субстрат вводять у вказаному порядку на 96-лунковий планшет (загальний об'єм реакції 200мкл) і збільшення інтенсивності кольору відстежують спектрофотометрично протягом 5 хвилин на довжині хвилі 405нм з допомогою

планшетного рідера.)

Альтернативно, використовують флуоресцентний пептидний субстрат. При цьому аналізі пептидний субстрат містить флуоресцентну групу і гасячу групу. При розщепленні субстрату за допомогою ММП флуоресценція, яка генерується, кількісно характеризується з допомогою флуоресцентного планшетного рідера. Дослідження здійснюють в буфері для аналізу HCBC (50мМ HEPES, pH7,0, 5мМ Ca^{+2} , 0,02% Brij, 0,5% цистеїн) з рекомбінантною колагеназою людини MMP-1, MMP-9 або MMP-13. Субстрат розчиняють в метанолі і зберігають замороженим в 1 мМ аліквотах. Для аналізу субстрат і ферменти розбавляють буфером HCBC до бажаних концентрацій. Сполуки вводять на 96-лунковий планшет, що містить фермент, і реакція починається при доданні субстрату. Реакцію реєструють (збудження 340нм, емісія 444нм) протягом 10хвил. і графік збільшення флуоресценції згодом будують як пряму лінію.

Або для досліджень з тіопептидами, або з флуоресцентними пептидами, обчислюють крутість лінії, і вона відповідає швидкості реакції. Лінійність швидкості реакції підтверджується ($r^2 > 0.85$). Середнє значення швидкості для контролю ($\bar{x} \pm \text{sem}$) обчислюють і порівнюють для статистичної значущості ($p < 0,05$) з швидкостями для зразків, оброблених ліками, і використовуючи тест багаторазових порівнянь Даннета. Співвідношення доза-відгук можуть бути отримані з використанням багаторазового введення ліків, і значення IC_{50} з 95% CI встановлюються з використанням лінійної регресії.

Інгібування ММП in vivo

2см шматок діалізної трубки (межа молекулярної маси 12-14000, ширина в плоскому стані 10мм), що містить фермент матричної металопротеїнази (стромелізін, колагеназа або желатиназа в 0,5мл буфери), імплантують або внутрішньочеревинно, або підшкірно (на спині) пацюку (Sprague-Dawley, 150-200г) або миші (CD-1, 25-50г) під анестезією. Ліки вводять перорально, внутрішньочеревинно, підшкірно або внутрішньовенно через канюлю в яремній вені. Ліки вводять при об'ємі дози від 0,1 до 0,25мл/тварина. Вміст діалізних трубок, збирають і досліджують активність ферменту.

Обчислюють швидкості ферментативної реакції для кожної діалізної трубки. Трубки від не менш ніж 3 різних тварин використовують для обчислення середнього значення \pm середньоквадратичний розкид (sem). Статичну значущість ($p < 0,05$) значень для тварин, яких лікували ноїєм, по відношенню до тварин, яких лікували ліками, визначають шляхом аналізу розкиду (Agents та Actions 21: 331, 1987).

Процедура вимірювання інгібування TACE

Використовуючи 96-лункові чорні планшети для мікротитрування, в кожну лунку вводять розчин, що складається з 10мкл TACE (Immunex, кінцева концентрація 1мкг/мл), 70мкл Трис буфера, pH7,4, що містить 10% гліцерину (кінцева концентрація 10мМ) і 10мкл розчину сполуки, що досліджується в ДМСО (кінцева концентрація 1мкМ, концентрація ДМСО <1%) і інкубують протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Реакція починається при доданні флуоресцентного пептидильного субстрату (кінцева концентрація 100мкМ) в кожну лунку з подальшим перемішуванням в шейкері протягом 5сек.

Реакцію реєструють (збудження 340нм, емісія 420нм) протягом 10хвил., і графік збільшення флуоресценції згодом будують як пряму лінію. Крутість лінії обчислюють, і вона відповідає швидкості реакції.

Лінійність швидкості реакції підтверджується ($r^2 > 0.85$). Середнє значення швидкості для контролю ($\bar{x} \pm \text{sem}$) обчислюють і порівнюють для статистичної значущості ($p < 0,05$) з швидкостями для зразків, оброблених ліками, і використовуючи тест багаторазових порівнянь Даннета. Співвідношення доза-відгук можуть бути отримані з використанням багаторазового введення ліків, і значення IC_{50} з 95% CI встановлюються з використанням лінійної регресії.

Результати згаданих вище фармакологічних досліджень інгібування матричної металопротеїнази і інгібування TACE in-vitro та in-vivo представлені нижче в Таблиці 1.

Таблиця 1

Інгібування ММП і TACE In-vivo

Приклад	ММП-1 ¹	ММП-9 ¹	ММП-13 ¹	MMP ²	TACE ¹
20	176	6,9	56		277
21	96	2,3	8,8		215

1. IC_{50} нМ або % інгібування при концентрації 1мкМ

2. % інгібування в залежності від ММП-9 (доза, мг/кг), ip= внутрішньочеревно, po= перорально