



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **324246**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07D 231/46 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20025566	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.05.24 PCT/US01/16863
(22)	Inng.dag	2002.11.20	(85)	Videreføringsdag	2002.11.20
(24)	Løpedag	2001.05.24	(30)	Prioritet	2000.05.25, US, 207084 2000.08.30, US, 228929
(41)	Alm.tilgj	2003.01.22			
(45)	Meddelt	2007.09.17			
(73)	Innehaver	SmithKline Beecham Corp, P O Box 7929, PA19101 PHILADELPHIA, US Glaxo Group Ltd, Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, UB60NN GREENFORD, MIDDLESEX, GB			
(72)	Oppfinner	Kevin J Duffy, 1250 South Collegeville Road, Collegeville, PA 19426, US Connie L Erickson-Miller, 1250 South Collegeville Road, Collegeville, PA 19426, US Daniel F Eppley, 3332 South 21st Street, Abilene, TX 79605, US Julian Jenkins, 891-995 Greenford Road, Greenford, Middlesex UB6 0HE, England, GB Juan I Luengo, 1250 South Collegeville Road, Collegeville, PA 19426, US Nannan Liu, 1250 South Collegeville Road, Collegeville, PA 19426, US Alan T Price, 1250 South Collegeville Road, Collegeville, PA 19426, US Antony N Shaw, 1250 South Collegeville Road, Collegeville, PA 19426, US Sophie Visonneau, 1250 South Collegeville Road, Collegeville, PA 19426, US Kenneth Wiggall, 1250 South Collegeville Road, Collegeville, PA 19426, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO			
(54)	Benevnelse	Trombopoietin-etterliknere			
(56)	Anførte publikasjoner	J. Org. Chem. 59(15), 4285-4296, 1994			
(57)	Sammendrag				

Oppfinnelsen er ikke-peptid TPO-etterliknere. Også oppfunnet er nye prosesser og intermediater benyttet i prepareringen av de foreliggende, oppfunnete forbindelsene. Også oppfunnet er en fremgangsmåte for behandling av trombocytopeni i et pattedyr, som inkluderer et menneske med behov derav, som omfatter tilførsel til slikt pattedyr, en effektiv mengde av et valgt hydroksy-1-azobenzon derivat.

TROMBOPOIETIN-ETTERLIKNERE

OPPFINNELSENS OMRÅDE

- 5 Denne oppfinnelsen relaterer seg til trombopoietin (TPO) etterliknere og deres anvendelse som akseleratorer av trombopoiese og megakaryocytopoiese.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

- 10 Megakaryocytter er benmargsderivererte celler, som er ansvarlige for produksjon av sirkulerende blodplater. Selv om de omfatter <0,25% av benmargsceller har de fleste arter, har de >10 ganger volumet av typiske margceller. Se Kuter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:11104-11108 (1994). Megakaryocytter gjennomgår en prosess kjent som endomitose hvorved de replikerer sine kjerner, men svikter i å gjennomgå
15 celledeling og derved gi opphav til polyploide celler. Som reaksjon på svekket blodplateantall øker den endomitotiske raten, høyere ploide megakaryocytter dannes, og antallet megakaryocytter kan øke opptil det tredobbelte. Se Harker J. Clin. Invest. 47:458-465 (1968). I motsetning, som reaksjon på forhøyet blodplateantall, reduseres den endomitotiske raten, lavere ploide megakaryocytter dannes og antallet
20 megakaryocytter kan reduseres med 50%.

- Den nøyaktige fysiologiske tilbakemeldingsmekanismen der den sirkulerende blodplatemassen regulerer den endomitotiske raten og antall benmarg megakaryocytter, er ikke kjent. Den sirkulerende trombopoietiske faktor som er involvert i formidlingen av denne tilbakemeldingssløyfen, er nå antatt å være trombopoietin (TPO). Mer
25 spesifikt er TPO vist å være den viktigste humorale regulatoren i situasjoner som involverer trombocytopeni. Se for eksempel Metcalf Nature 369:519-520 (1994). TPO har i flere studier vist å øke blodplateantall og platestørrelse, og øke isotopinkorporering i blodplater hos mottakerdyr. Spesifikt er TPO tenkt å innvirke på megakaryocytopoesien på flere måter: (1) det produserer økning i
30 megakaryocytstørrelse og antall; (2) det produserer en økning i DNA-innhold i megakaryocytter i form av polyploiditet; (3) det øker megakaryocyttdomitose; (4) det produserer øket modning av megakaryocytter; og (5) det produserer en økning i prosentandelen av forløperceller i form av små acetylcholinesterase-positive celler i benmarg.

- 35 Fordi blodplater (trombocytter) er nødvendige for blodkoagulasjon, og når deres antall er svært lavt, og en pasient risikerer død pga. katastrofal blødning, har TPO potensiell nyttig anvendelse i både diagnose og behandling av ulike hematologiske

forstyrrelser, for eksempel sykdommer primært pga. blodplatedefekter (se Harker et al. Blood 91:4427-4433 (1998)). Pågående kliniske forsøk med TPO har indikert at TPO kan bli tilført pasienter på en sikker måte. Se Bassier et al. Blood 89:3118-3128 (1997); Fanucchi et al. New Engl. J. Med. 336:404-409 (1997). I tillegg har nyere studier brakt
 5 tilveie en basis for overføring av effektivitet av TPO-terapi ved behandling av trombocytopeni og spesielt trombocytopeni, fra kjemoterapi, strålingsterapi eller benmargstransplantasjon som behandling av cancer eller lymfom. (se Harker, Curr. Opin. Hematol. 6:127:134 (1999)).

Genet som koder for TPO har blitt klonet og karakterisert. Se Kuter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:11104-11108 (1994); Barley et al., Cell 77:1117-1124 (1994);
 10 Kaushansky et al., Nature 369:568-571 (1994); Wendling et al., Nature 369:571-574 (1994); og Sauvage et al., Nature 369:533-538 (1994). Trombopoietin er et glykoprotein med minst to former med tilsynelatende molekyulære masser på 25 kDa og 31 kDa, med en felles N-terminal aminosyresekvens. Se Baatout, Haemostasis 27:1-8 (1997);
 15 Kaushansky, New Engl. J. Med. 339:746-754 (1998). Trombopoietin viser å ha to distinkte regioner separert ved et potensielt Arg-Arg spaltingssete. Den aminoterminal regionen er sterkt konservert i menneske og mus, og har noe homologi med erytropoietin og interferon-a og interferon-b. Den karboksyterminale region viser sterk arts-divergens.

DNA-sekvensene og kodende peptidsekvenser for human TPO-reseptor (TPO-R; også kjent som c-mpl) har blitt beskrevet. Se Vigon et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5640-5644 (1992). TPO-R er et medlem av hematopoietin vekstfaktorreseptorfamilien, en familie karakterisert ved en felles strukturell
 oppbygging av det ekstracellulære doméne, som inkluderer konserverte C-rester i den
 25 N-terminale delen og et WSXWS-motiv nær den transmembrane region. Se Bazan Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6934-6938 (1990). Bevis på at denne reseptor spiller en funksjonell rolle i hematopoese inkluderer at observasjoner av dens ekspresjon er begrenset til milt, benmarg eller føtal lever i mus. (Se Souri et al., Cell 63:1137-1147 (1990)) og til megakaryocytter, blodplater og CD34⁺-celler i mennesker (se Methia et
 30 al. Blood 82:1395-1401 (1993)). Det faktum at eksponering av CD34⁺-celler for syntetisk oligonukleotid-antisens til TPO-R RNA signifikant inhiberer tilsynekomst av megakaryocyt-kolonier uten å innvirke på erytroid- eller myeloid-kolonidannelse, er et videre bevis for TPO-R som en nøkkelregulator for megakaryopoese. Noen forskere postulerer at reseptoren virker som en homodimér liknende situasjonen med reseptorene
 35 for G-CSF og erytropoietin. Se Alexander et al., EMBO J. 14:5569-5578 (1995).

Den trege gjenvinningen av blodplatenivåer i pasienter som lider av trombocytopeni er et alvorlig problem, og har vist nødvendigheten av å lete etter en

blodvekstagonist som er i stand til å akselerere blodplateregenerering. Se Kuter, Seminars in Hematology, 37: Supp 4:41-49 (2000).

Det ville være ønskelig å tilveiebringe forbindelser som muliggjør behandling av trombocytopeni ved å virke som en TPO-etterlikner.

5 Som angitt heri har det uventet blitt oppdaget at enkelte hydroksy-1-azobenzenderivater er effektive som agonister av TPO-reseptoren, og de er potente TPO-etterliknere.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

10

Denne oppfinnelsen relaterer seg til en forbindelse kjennetegnet ved at den er valgt fra gruppen bestående av 3'-{N'-[1-(3,4-dimetylphenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol]-4-yliden]hydrazin}-2'-hydroksybifenyl-3-karboksylsyre, 3-{N'-[1-(3,4-dimetylphenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-2-hydroksy-3'-(tetrazol-5-yl)bifenyl, et farmasøytisk akseptabelt salt, et hydrat, et solvat og en ester av disse.

Denne oppfinnelsen er relatert til en farmasøytisk sammensetning kjennetegnet ved at den omfatter en forbindelse og en farmasøytisk akseptabel bærer.

Den foreliggende oppfinnelsen er også relatert til en fremgangsmåte for å fremstille en farmasøytisk sammensetning inneholdende en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel og en effektiv mengde av forbindelsen kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter det å bringe nevnte forbindelse i kontakt med den farmasøytisk aktive bærer eller fortynningsmiddel.

I et videre aspekt angår oppfinnelsen anvendelse av en forbindelse for fremstilling av medikament for behandling av trombocytopeni.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Denne oppfinnelsen er relatert til en forbindelse kjennetegnet ved at den er valgt fra gruppen bestående av 3'-{N'-[1-(3,4-dimetylphenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol]-4-yliden]hydrazin}-2'-hydroksybifenyl-3-karboksylsyre, 3-{N'-[1-(3,4-dimetylphenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-2-hydroksy-3'-(tetrazol-5-yl)bifenyl, et farmasøytisk akseptabelt salt, et hydrat, et solvat og en ester av disse.

I en foretrukken utførelsesform er forbindelsen et farmasøytisk aksepterbart salt.

35

I en annen foretrukken utførelsesform er forbindelsen kjennetegnet ved at forbindelsen er 3'-{N'-[1-(3,4-dimetylfenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol]-4-yliden]hydrazin}-2'-hydroksybifenyl-3-karboksylsyre.

I en annen foretrukken utførelsesform er forbindelsen kjennetegnet ved at forbindelsen er 3'-{N'-[1-(3,4-dimetylfenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-2'-hydroksy-3'-(tetrazol-5-yl)bifenyl.

Betegnelsen "behandling" og derivater derav, som anvendt heri, har betydningen profylaktisk og terapeutisk terapi.

Alle publikasjoner beskrevet i denne spesifikasjonen, som inkluderer, men ikke er begrenset til patenter og patentsøknader, er inkorporert heri ved fullstendig referanse.

Der en -COOH eller -OH gruppe er tilstede, kan farmasøytisk akseptable estere benyttes, for eksempel metyl, etyl pivaloyloksymetyl og liknende og liknende for -COOH, og acetatmaleat og liknende for -OH, og de estere som er kjent i faget for å modifisere oppløselighet eller hydrolyseegenskaper for anvendelse som vedvarende frigivelses- eller promedikamentformuleringer.

De nye forbindelsene ifølge oppfinnelsen er fremstilt som vist i reaksjonsskjemaene I til IV nedenfor, eller ved analoge fremgangsmåter. Alle utgangsmaterialene er kommersielt tilgjengelige, eller kan enkelt lages fra kommersielt tilgjengelige utgangsmaterialer av fagfolk innenfor området.

Behandlingen av trombocytopeni, som beskrevet heri, er gjennomført ved å øke produksjonen av blodplater.

Betegnelsen "ko-administrering" og derivater derav som benyttes heri, har betydningen samtidig tilførsel eller enhver måte for separat sekvensiell tilførsel av en TPO-etterliknende forbindelse, som beskrevet her, og en ytterligere aktiv ingrediens eller ingredienser, kjent for å behandle trombocytopeni, som inkluderer kjemoterapiindusert trombocytopeni og benmargstranplantasjon og andre tilstander som undertrykker blodplateproduksjon. Betegnelsen ytterligere aktiv ingrediens eller ingredienser som benyttes heri, inkluderer enhver forbindelse eller terapeutisk middel kjent for eller som demonstrerer fordelaktige egenskaper når den/det tilføres med TPO eller en TPO-etterlikner. Hvis tilførselen ikke er samtidig, vil forbindelsene fortrinnsvis tilføres i tidsmessig nærhet til hverandre. Videre spiller det ingen rolle om forbindelsene blir tilført i den samme doseringsformen. En forbindelse kan for eksempel tilføres topisk og en annen forbindelse kan tilføres oralt.

Eksempler på en ytterligere aktiv ingrediens eller ingredienser for anvendelse i kombinasjon med de foreliggende forbindelser av TPO-etterliknere ifølge foreliggende oppfinnelse, inkluderer, men er ikke begrenset til: Kjemobeskyttende eller myelobeskyttende midler, slik som G-CSF, BB10010 (Clemons et al., Breast Cancer

Res. Treatment, 1999, 57, 127), amifostine (Ethyol) (Fetcher et al., Current Opinion in Hemat., 2000, 7, 255-60), SCF, IL-11, MCP-4, IL-1-beta, AcSDKP (Gaudron et al., Stem Cells, 1999, 17, 100-6), TNF-a, TGF-b, MIP-1a (Egger et al., Bone Marrow Transpl., 1998, 22 (Suppl. 2), 34-35), og andre molekyler identifisert som har anti-
 5 apoptotiske, overlevelses- eller reproduksjons-egenskaper.

TPO har blitt demonstrert å virke som en mobilisator for stamceller til det perifere blodet (Neumann T. A: et al., Cytokines, Cell & Mol. Ther., 2000, 6, 47-56). Denne aktiviteten kan ha synergier med stamcellemobilisatorer, slik som G-CSF (Somolo et al., Blood, 1999, 93, 2798-2806). De TPO-etterliknende forbindelsene ifølge
 10 foreliggende oppfinnelsen er således nyttige for å øke antallet av stamceller i sirkulasjon hos donorer før leukaferese for hematopoetisk stamcelletransplantasjon hos pasienter som mottar myelo-ablativ kjemoterapi.

På liknende måte stimulerer TPO vekst av myeloide celler, spesielt de av granulocyt/makrofag-linje (Holly et al., US-5989537). Granulocyt/makrofag forløpere
 15 er celler fra den myeloide linjen som modner til neutrofiler, monocytter, basofiler og eosinofiler. Forbindelsene beskrevet i den foreliggende oppfinnelsen har således terapeutisk anvendelse ved stimulering av proliferasjon av neutrofiler i pasienter med neutropeniske tilstander.

Ytterligere eksempler på en ytterligere aktiv ingrediens eller ingredienser for
 20 anvendelse i kombinasjon med de foreliggende TPO-etterliknere ifølge foreliggende oppfinnelse, inkluderer, men er ikke begrenset til: Stamcelle, megakaryocyt, neutrofilmobilisatorer, slik som kjemoterapeutiske midler (dvs. cytoksan, etoposid, cisplatina, Ballestrero, A. et al., Oncology, 2000, 59, 7-13), kjemokiner, IL-8, Gro-beta (King, A. G. et al., J. Immun., 2000, 164, 3774-82), reseptoragonist- eller antagonist-
 25 antistoffer, småmolekylære cytokin- eller reseptoragonister eller -antagonister, SCF, Flt3-ligand, adhesjonsmolekylinhitorer eller antistoffer, slik som: Anti-VLA-4 (Kikuta, T. et al., Exp. Hemat., 2000, 28, 311-7) eller anti-CD44 (Vermeulen, M. et al., Blood, 1998, 92, 894-900), cytokin/kjemokin/interleukin eller reseptoragonist- eller -antagonist-antistoffer, MCP-4 (Berkout, T. A. et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 16404-
 30 16413; Ugucioni, M. et al., J. Exp. Med., 1996, 183, 2379-2384).

Fordi de farmasøytisk aktive forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er aktive som TPO-etterliknere, fremviser de terapeutisk anvendelse i behandling av trombocytopeni og andre tilstander med undertrykket blodplateproduksjon.

Betegnelsen "trombocytopeni" og derivater derav, som benyttet heri, betyr i
 35 store trekk enhver reduksjon i antall blodplater under det som er betraktet som normalt, eller ønsket for et friskt individ. Trombocytopeni er kjent for å ha mange årsaksgivende faktorer, som inkluderer, men ikke er begrenset til stråleterapi, kjemoterapi,

immunterapi, immuntrombocytopenisk purpura (ITP, Bussel, J. B., Seminars in Hematology, 2000, 37, Suppl. 1, 1-49), myelodysplastisk syndrom (MDS), aplastisk anemi, AML, CML, virale infeksjoner (som inkluderer, men ikke begrenset til; HIV, hepatitt-C, parvovirus) leversykdom, myeloablasjon, benmargstransplantasjon, stamcelletransplantasjon, perifert blod-stamcelle-transplantasjon, stamcelledefekt, polymorfismer i stamceller og forløper-celler, defekter i TPO, neutropeni (Sawai, N., J. Leukocyte Biol., 2000, 68, 137-43), dendrittcellemobilisasjon (Kuter, D., Seminars in Hematology, 2000, 37, Suppl. 4, 41-49), reproduksjon, aktivisering eller differensiering. De farmasøytisk aktive forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse er nyttige for behandling av trombocytopeni uten hensyn til faktoren eller faktorene som forårsaker tilstanden. De farmasøytisk aktive forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er også nyttige for behandling av trombocytopeni når årsaksfaktoren(e) til tilstanden er ukjente eller ennå ikke har blitt identifisert.

Profylaktisk anvendelse av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse vurderes når en reduksjon i blod eller blodplater er forventet. Profylaktisk anvendelse av forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse resulterer i en oppbygging av blodplater eller en begynnelse av blodplateproduksjon før et forventet tap av blod eller blodplater. Profylaktisk anvendelse av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse inkluderer, men er ikke begrenset til transplantasjonskirurgi, anestesi før fødsel og tarmbeskyttelse.

Humane dendrittceller har vist å uttrykke TPO-reseptoren (Kumamoto et al., Br. J. Haem., 1999, 105, 1025-1033) og TPO er en potent mobilisator for dendrittceller. TPO-etterliknere-forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelsen er også nyttige som et vaksinemiddel ved at de øker aktiviteten og mobiliteten til dendrittceller. De farmasøytisk aktive forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er nyttige som et immunologisk middel, ved å gis i kombinasjon med en oral, transdermal, eller subkutan tilført vaksine og/eller immunmodulator, ved å øke aktiviteten og mobiliteten til dendrittceller.

TPO er kjent å ha ulike effekter inkludert anti-apoptotisk/overlevelseseffekter på megakaryocytter, blodplater og stamceller, og replikerende effekter på stamceller og megakaryocyt-celler (Kuter, D., J. Seminars in Hematology, 2000, 37, 41-9). Disse TPO-aktivitetene øker effektivt antall stamceller og forløperceller slik at det er synergistiske effekter når TPO benyttes i forbindelse med andre cytokiner som induserer differensiering.

TPO-etterlikner-forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er også nyttige i å påvirke celler for overlevelse eller replikasjon i forbindelse med andre midler, kjent for å påvirke celler for overlevelse eller replikasjon. Slike andre midler inkluderer, men er ikke begrenset til: G-CSF, GM-CSF, TPO, M-CSF, EPO, Gro-beta, IL-11, SCF, FLT3-

ligand, LIF, IL-3, IL-6, IL-1, Progenipoietin, NESP, SD-01, IL-8 eller IL-5 eller et biologisk aktivt derivat av ethvert av de ovenfor nevnte midlene, KT6352 (Shiotsu, Y. et al., Exp. Hemat. 1998, 26, 1195-1201), uteroferin (Laurenz, J. C. et al., Comp. Biochem. & Phys., Part A. Physiology, 1997, 116, 369-77), FK23 (Hasegawa, T. et al., Int. J. Immunopharm., 1996, 18, 103-112) og andre molekyler identifisert ved å ha anti-apoptotiske, overlevelsesh- eller proliferative- egenskaper for stamceller, forløperceller, eller andre celler som uttrykker TPO-reseptorer.

Ved bestemmelse av potensialet som TPO-etterliknere har, ble de følgende tester benyttet:

10 Luciferase test

Forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse ble testet for potensiale som etterliknere av TPO-reseptoren har i en luciferase-test slik som beskrevet i Lamb et al., Nucleic Acids Research, 23:3283-3289 (1995) og Seidel et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:3041-3045 (1995) ved å erstatte HepG2-cellene anvendt deri med en TPO-responsiv BaF3-cellelinje (Vigon et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, (1992) 89: 5640-5644). De murine BaF3-cellene uttrykker TPO-reseptorer og likner mønsteret for STAT (signal transdukere og aktivatorer for transkripsjon) aktivering observert i primære, murine og humane benmargsceller.

20 Proliferasjonstest

Noen av de mest foretrukne forbindelsene ifølge oppfinnelsen var aktive i en *in vitro* proliferasjonstest ved anvendelse av den humane UT7TPO-cellelinjen. UT7TPO-celler er en human megakaryoblastisk cellelinje som uttrykker TPO-R, der dens overlevelse og vekst er avhengig av tilstedeværelse av TPO (Komatsu et al., Blood 25 (1996), 87, 4552).

Differensieringstest

Likeledes var noen av de mest foretrukne forbindelsene ifølge oppfinnelsen også positive i stimulering av modningen av megakaryocytter fra humane benmargsceller. I denne testen ble rensset, humant CD34+ forløperceller inkubert i væskkultur med testforbindelser i 10 dager og antall celler som uttrykker transmembranglykoproteinet CD41 (gpIIb), en megakaryocyt-markør, ble så målt ved flow cytometry (se Cwirla, S. E. et al., Science, 1997, 276, 1696).

De farmasøytisk aktive forbindelsene innenfor rammen av denne oppfinnelsen er nyttige som TPO-etterliknere i pattedyr, spesielt mennesker med behov derav.

Noen av de foretrukne forbindelsene innenfor rammen av denne oppfinnelsen viste aktivering fra omkring 4% til 100% av kontroll ved en konsentrasjon på 0,001-10

μM i luciferasetesten. De foretrukne forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse fremmet også prolifereringen av UT7TPO og 32D-mpl-celler ved en konsentrasjon på 0,003 til 30 μM . De foretrukne forbindelsene viste også aktivitet i CD41-megakaryocyttesten ved en konsentrasjon på 0,003 til 30 μM .

- 5 Foreliggende oppfinnelse angår også farmasøytisk sammensetning kjennetegnet ved at den omfatter en forbindelse ifølge krav 1 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

En foretrukken utførelsesform angår en farmasøytisk sammensetning kjennetegnet ved at den ytterligere omfatter en terapeutisk effektiv mengde av et stoff utvalgt fra gruppen bestående av en kolonistimulerende faktor, cytokin, kjemokin,
10 interleukin og cytokinreseptoragonist.

En annen utførelsesform angår en farmasøytisk sammensetning kjennetegnet ved at stoffet er valgt fra gruppen bestående av; G-CSF, GM-CSF, TPO, M-CSF, EPO, Gro-beta, IL-11, SCF, FLT3-ligand, LIF, IL-3, IL-6, IL-1, IL-5, og et biologisk aktivt derivat av en hvilken som helst av nevnte stoffer.

- 15 De farmasøytiske sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse kan være i mange anvendelige doseringsformer, slik som kapsler, tabletter eller injiserbare prepareringer. Faste eller flytende farmasøytiske bærere er benyttet. Bærere i fast stoff inkluderer stivelse, laktose, kalsiumsulfatdihydrat, terra alba, sukrose, talkum, gelatin, agar, pektin, akasie, magnesiumstearat og stearinsyre. Væskebærere inkluderer sirup,
20 peanøttolje, olivenolje, saltoppløsning og vann. På liknende måte kan bæreren eller fortynningsmiddelet inkludere ethvert vedvarende frigivelsesmateriale slik som glyseryl monostearat eller glyseryl distearat, alene eller med en voks. Mengden av faststoff-bærer varierer betraktelig, men vil fortrinnsvis være omkring 25 mg til omkring 1 g pr. doseringsenhet. Når en væskebærer benyttes vil preparatet være i form av en sirup,
25 eliksir, emulsjon, myk gelatinkapsel, steril injiserbar væske som en ampulle, eller en vandig eller ikke-vandig flytende suspensjon.

- De farmasøytiske preparatene er laget ifølge konvensjonelle teknikker for en farmasøytisk kjemiker som involverer blanding, granulering og komprimering, når det er nødvendig for tablettformer, eller blanding, fylling og oppløsning av ingrediensene,
30 som hensiktsmessig for å gi de ønskete orale eller parenterale produkter.

- Doser av de farmasøytisk aktive forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse i en farmasøytisk doseringsenhet, vil være en effektiv ikke-toksisk mengde, fortrinnsvis valgt i området av 0,001-100 mg/kg av aktiv forbindelse, fortrinnsvis 0,001-50 mg/kg. Ved behandling av en human pasient med behov for en TPO-etterlikner, er den valgte
35 dosen tilført fortrinnsvis fra 1-6 ganger daglig, oralt eller parenteralt. Foretrukne former av parenteral tilførsel inkluderer topisk, rektal, transdermal, ved injeksjon og ved kontinuerlig infusjon. Orale doseringsenheter for human tilførsel inneholder fortrinnsvis

fra 0,05 til 3500 mg av aktiv forbindelse. Oral tilførsel som benytter lavere doseringer er foretrukket. Parenteral tilførsel ved høyere doseringer kan imidlertid også benyttes når den er sikker og bekvem for pasienten.

5 Optimale doseringer som skal tilføres, kan enkelt bestemmes av de med dyktighet innen fagfeltet, og vil variere med den bestemte TPO-etterlikneren som anvendes, styrken av preparatet, måten for tilførsel og utviklingen av sykdomstilstanden. Ytterligere faktorer avhengig av den enkelte pasienten som skal behandles, vil resultere i et behov for å justere doseringene, dette inkluderer pasientens alder, vekt, diett og tid for tilføring.

10 Oppfinnelsen angår også en fremgangsmåte for å fremstille en farmasøytisk sammensetning inneholdende en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel og en effektiv mengde av forbindelsen, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter det å bringe nevnte forbindelse i kontakt med den farmasøytisk aktive bærer eller fortynningsmiddel.

15 Oppfinnelsen tilveiebringer også anvendelse av en forbindelse for fremstilling av medikament for behandling av trombocytopeni.

Oppfinnelsen tilveiebringer også en anvendelse der forbindelsen administreres oralt eller parenteralt.

20 Oppfinnelsen tilveiebringer også anvendelse som ytterligere omfatter koadministrering av en terapeutisk effektiv mengde av et stoff utvalgt fra gruppen bestående av kolonistimulerende faktor, cytokin, kjemokin, interleukin eller cytokinreseptoragonister eller -antagonister, løselig reseptor, reseptoragonist- eller antagonistantistoff, og små molekyler eller peptider som virker via samme mekanismen som en eller flere av ovennevnte stoffer.

25 Oppfinnelsen tilveiebringer også anvendelse der stoffet er valgt fra gruppen bestående av; G-CSF, GM-CSF, TPO, M-CSF, EPO, Gro-beta, IL-11, SCF, FLT3 - ligand, LIF, IL-3, IL-6, IL-1, Progenipoietin, NESP, SD-01, IL-8, IL-5 og et biologisk aktivt derivat av et hvilket som helst av nevnte stoffer.

30 Oppfinnelsen tilveiebringer også anvendelse der nevnte trombocytopeni skyldes myelosuppresjon forårsaket av kjemoterapi eller stråleterapi.

Oppfinnelsen tilveiebringer også anvendelse der nevnte trombocytopeni skyldes en organtransplantasjon.

Oppfinnelsen tilveiebringer også anvendelse der nevnte trombocytopeni skyldes benmargs-, stamceller eller levertransplantasjon.

35 Oppfinnelsen tilveiebringer også anvendelse der nevnte trombocytopeni skyldes idiopatisk trombocytopenisk purpura (ITP).

Oppfinnelsen tilveiebringer også anvendelse der nevnte trombocytopeni skyldes myelodysplastisk syndrom (MDS), aplastisk anemi eller leukemi.

Oppfinnelsen tilveiebringer også anvendelse der nevnte trombocytopeni skyldes virusinfeksjon, soppinfeksjon, mikrobiell eller parasittisk infeksjon.

5 Oppfinnelsen tilveiebringer også anvendelse der nevnte trombocytopeni skyldes leverdysfunksjon.

Oppfinnelsen tilveiebringer også anvendelse der nevnte trombocytopeni skyldes kirurgiske inngrep.

Oppfinnelsen tilveiebringer også anvendelse der nevnte trombocytopeni skyldes
10 behandling med antivirale eller antibiotiske midler.

Ingen uakseptable toksiske effekter er forventet når forbindelser av oppfinnelsen tilføres i overensstemmelse med den foreliggende oppfinnelsen.

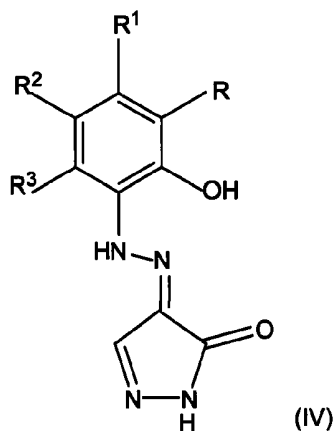
I tillegg kan de farmasøytisk aktive forbindelsene til foreliggende oppfinnelse bli ko-administrert med ytterligere aktive ingredienser slik som andre forbindelser kjent for
15 å behandle trombocytopeni, som inkluderer kjemoterapi-indusert-trombocytopeni og benmargstranplantasjon og andre tilstander som svekker blodplateproduksjon eller forbindelser kjent for å ha nytte når de benyttes i kombinasjon med en TPO-etterlikner.

EKSPERIMENTELLE DETALJER

20

Eksempel 1

Tilberedning av 4'-{N'-[1-(3,4-dimetylphenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}- 3'-hydroksybifenyl-4-karboksylsyre



25 a) 5-brom-2-nitrofenol

3-bromfenol (32,9 g, 0,19 mol) ble sakte tilsatt til en kald (10 °C) løsning av natriumnitrat (29,0 g, 0,34 mol) i konsentrert svovelsyre; (40,0 g) og vann (70,0 ml) og

den resulterende blanding ble omrørt ved romtemperatur i 2 timer. Vann (200 ml) ble tilsatt og den resulterende blanding ble ekstrahert med dietyleter og ekstraktet ble tørket (MgSO_4), filtrert og konsentrert. Konsentrasjonsresten ble rensset ved flashkromatografi (silicagel, 10% etylacetat/heksaner) for først å gi tittelforbindelsen (8,1 g, 20%),

- 5 smeltepunkt 40-42 °C, og så den uønskede isomeren, 3-brom-4-nitrofenol, som et gult, fast stoff (12,7 g, 31%). Sm.p. 125-127 °C.

b) 3'-hydroksy-4'-nitrobifenyl-4-karboksylsyre

- En løsning av forbindelsen fra eksempel 1a) (2,18 g, 0,01 mol), 4-
10 karboksyfenylborsyre; (1,74 g, 0,0105 mol), 2M vandig natriumkarbonat (10,0 ml; 0,02 mol) og tetrakistriphenylfosfinpalladium (0) (0,5 g) i 1,4-dioksan (60,0 ml) ble omrørt og varmet under tilbakestrømning under nitrogenatmosfære i 24 timer.

- Reaksjonsblandingen ble så avkjølt og inndampet og konsentrasjonsresten behandlet med 6M vandig saltsyre; (100 ml). Det rå presipitatet ble filtrert og godt
15 vasket med vann og så dietyleter for å gi tittelforbindelsen (2,3 g, 88%) som et fargeløst, fast stoff.

^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 13,5-10,5 (br s, 2H), 8,06 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,03 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,83 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,45 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,35 (dd, J = 8,6, 1,8 Hz, 1H).

20

c) 4'-amino-3'-hydroksybifenyl-4-karboksylsyre; hydrokloridsalt

- En løsning av forbindelsen fra eksempel 1b) (1,6 g, 0,0062 mol) i etanol (75,0 ml), vann (50,0 ml) og 3M vandig natriumhydroksid (2,0 ml, 0,0062 mol) ble hydrogenert over 10% palladium på karbon (0,2 g) ved romtemperatur og 50 psi. i 2
25 timer.

Reaksjonsblandingen ble filtrert, behandlet med 3M vandig saltsyre; (25,0 ml), så inndampet og konsentrasjonsresten finfordelt med litt vann for å gi tittelforbindelsen (1,18 g; 72%) som et brunt, fast stoff.

- ^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 10,90 (s, 1H), 10,5-8,5 (br s, 3H), 8,03 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,71 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,41 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,36 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,22 (dd, J = 8,2, 1,6 Hz, 1H).

30

d) 1-(3,4-dimetylfenyl)-3-metyl-3-pyrazolin-5-on.

- En løsning av 3,4-dimetylfenylhydrazin hydroklorid (17,7 g; 0,1 mol),
35 etylacetoacetat (13,0 g; 0,1 mol) og natriumacetat (8,2 g; 0,1 mol) i iseddiksyre; (250 ml) ble omrørt og varmet under tilbakestrømning i 24 timer.

Blandingen ble avkjølt og inndampet og konsentrasjonsresten oppløst i

dietyleter (1L) og forsiktig vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonat (5 x 200 ml). Eter-laget ble inndampet for å gi tittelforbindelsen (15,4 g; 76%).

^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 11,30 (br s, 1H), 7,49 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H), 7,43 (dd, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,14 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 5,31 (s, 1H), 2,20 (s, 3H), 2,22 (s, 3H), 2,08 (s, 3H); MS(ES) m/z 203 [M+H].

e) 4'-{N'-[1-(3,4-dimetylfenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-3'-hydroksybifenyl-4-karboksylysyre; hemihydrat

En suspensjon av forbindelsen fra eksempel 1c) (1,0 g; 0,0044 mol) i 1M vandig saltsyre (15,0 ml) ble avkjølt til 5 °C, og så behandlet dråpevis med en løsning av natriumnitritt (0,32 g; 0,0046 mol) i vann (5,0 ml). Den gule blandingen ble omrørt ved 5 °C i 10 minutter, så behandlet i en porsjon med forbindelsen fra eksempel 1d) (0,882 g, 0,0044 mol) fulgt av den porsjonsvise tilsetningen av natriumhydrogenkarbonat (1,8 g; 0,022 mol) og etanol (20,0 ml) for å sikre at reaksjonsblandingens endelig pH er omtrentlig 7-8. Den røde løsningen ble så omrørt ved romtemperatur i 24 timer.

Blandingene ble filtrert for å gi et rødt, fast stoff som ble blandet i vann (50,0 ml) og så surgjort med konsentrert saltsyre. Filtrering ga tittelforbindelsen (0,68 g; 35%) som et oransj pulver. Sm.p. = 280 °C (dec.).

^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 13,62 (s, 1H), 13,2-12,2 (br s, 1H), 10,92 (s, 1H), 8,02 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,73-7,69 (m, 5H), 7,63 (d, 8,2 Hz, 1H), 7,31 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,19 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 2,30 (s, 3H), 2,26 (s, 3H), 2,2 (s, 3H); Anal. ($\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4, 0,5 \text{ H}_2\text{O}$) kalk: C, 66,51; H, 5,13; N, 12,41. Funnet: C, 66,74; H, 5,08; N, 12,36.

Eksempel 2

Tilberedning av 4'-{N'-[1-(3,4-dimetylfenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-3'-hydroksybifenyl-3-karboksylysyre

a) 3'-hydroksy-4' nitrobifenyl-3-karboksylysyre.

Ved å følge prosedyren fra eksempel 1b), med unntak av anvendelse av 4-karboksyfenylborsyre i stedet for 3-karboksyfenylborsyre, ble tittelforbindelsen tilberedt (1,75 g; 68%) som et brunt pulver.

^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 13,16 (br s, 1H), 11,18 (s, 1H), 8,20 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H), 8,03 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,96 (dd, $J = 7,8, 0,9$ Hz, 1H), 7,66 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,34 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H).

b) 4-amino-3'-hydroksybifenyl-3-karboksylsyre,, hydrokloridsalt

Ved å følge prosedyren fra eksempel 1c) med unntak av anvendelse av 3'-hydroksy-4'-nitrobifenyl-3-karboksylsyre; i stedet for 3'-hydroksy-4'-nitrobifenyl-4-karboksylsyre,, ble tittelforbindelsen tilberedt, (1,32 g; 83%) som et brunt, fast stoff.

- 5 ^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 10,96 (s, 1H), 10,5-9,5 (br s, 3H), 8,12 (t, J = 2,6 Hz, 1H), 7,96 (dt, J = 7,9, 1,3 Hz, 1H), 7,86 (dt, J = 8,2, 1,3 Hz, 1H), 7,62 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 7,44 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,35 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 7,21 (dd, J = 8,2, 1,9 Hz, 1H).

10 c) 4'-{N'-[1-(3,4-dimetylphenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-3'-hydroksybifenyl-3-karboksylsyre.

Ved å følge prosedyren fra eksempel 1e), med unntak av anvendelse av 4-amino-3'-hydroksybifenyl-3-karboksylsyre,, hydrokloridsalt for 4-amino-3'-hydroksybifenyl-4-karboksylsyre,, hydrokloridsalt, ble tittelforbindelsen tilberedt (1,04 g; 62%) som et oransj, fast stoff. Smeltepunkt 282 °C (dec.).

- 15 ^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 13,66 (s, 1H), 13,15 (s, 1H), 10,89 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,94 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,88 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,73-7,71 (m, 2H), 7,65-7,57 (m, 2H), 7,32-7,30 (m, 2H), 7,20 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 2,31 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,22 (s, 3H); Anal. ($\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 0,25 \text{H}_2\text{O}$) kalk: C, 67,18; H, 4,97; N, 12,53. Funnet: C, 67,26; H, 4,96; N, 12,46.

20

Eksempel 3

Tilberedning av 3'-{N'-[1-(3,4-dimetylphenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol]-4-yliden]hydrazin}-2'-hydroksybifenyl-3-karboksylsyre

25

a) 2-brom-6-nitrofenol

Ved å følge prosedyren fra eksempel 1a), med unntak av anvendelse av 2-bromfenol i stedet for 3-bromfenol, ble tittelforbindelsen tilberedt (10,9 g; 25%) som et lysegult, fast stoff.

- 30 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 11,10 (s, 1H), 8,13 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,89 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 6,90 (t, J = 7,9 Hz, 1H).

b) 2-brom-6-nitroanisol

- 35 En blanding av forbindelsen fra eksempel 2a) (10,8 g; 0,0495 mol), metyliodid (3,4 ml; 0,00545 mol) og kaliumkarbonat (8,2 g; 0,0592 mol) i aceton (250 ml) ble omrørt og oppvarmet under tilbakestrømning i 24 timer.

Blandingen ble inndampet og konsentrasjonsresten finfordelt med vann for å gi tittelforbindelsen (8,7 g; 76%). Sm.p. 55-56°C.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,81-7,74 (m, 2H), 7,13 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4,02 (s, 3H); Anal. ($\text{C}_7\text{H}_6\text{NO}_3\text{Br}$) kalk: C, 36,24;

5 H, 2,61; N, 6,04. Funnet: C, 36,30; H, 2,59; N, 5,73.

c) 2'-metoksy-3'-nitrobifenyl-3-karboksylsyre.

Ved å følge prosedyren fra eksempel 1b), med unntak av anvendelse av forbindelsen fra eksempel 3b) i stedet for 5-brom-2-nitrofenol, og anvendelse av 3-
10 karboksylfenylborsyre i stedet for 4-karboksylfenylborsyre ble tittelforbindelsen tilberedt (2,13 g; 47%) som et brunt pulver.

^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 8,12 (s, 1H), 8,03 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,94 (dd, $J = 7,9$ Hz, 1,5 Hz, 1H), 7,85 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,76 (dd, $J = 7,5$, 1,5 Hz, 1H), 7,66 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,46 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 3,46 (s, 3H).

15

d) En løsning av forbindelsen fra eksempel 3c) (2,13 g; 0,0077 mol) i iseddiksyre; (25,0 ml) og 48% vandig/hydrobromsyre; (25,0 ml) ble omrørt og varmet under tilbakestrømning i 5 timer.

Blandingen ble avkjølt og filtrert for å gi tittelforbindelsen (1,57 g; 79%) som et
20 brunt pulver.

^1H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 13,90 (s, 1H), 10,66 (s, 1H), 8,12 (t, $J = 1,7$ Hz, 1H), 8,07 (dd, $J = 8,4, 1,7$ Hz, 1H), 7,98 (dt, 7,8, 1,5 Hz, 1H), 7,79 (dt, $J = 8,1$, 1,7 Hz, 1H), 7,74 (dd, $J = 7,5$, 1,7 Hz, 1H), 7,62 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,17 (dd, $J = 8,4$, 7,5 Hz, 1H).

25 e) 3'-amino-2'-hydroksybifenyl-3-karboksylsyre; hydrokloridsalt)

Ved å følge prosedyren fra eksempel 1c), med unntak av anvendelse av forbindelsen fra eksempel 3d) i stedet for 3'-hydroksy-4-nitrobifenyl-4-karboksylsyre; ble tittelforbindelsen tilberedt (1,51 g; 100%) som et brunt, fast stoff.

11,3-8,7 (br s, 4H), 8,08 (s, 1H), 7,95 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,74 (dt, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,61
30 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,34 (dd, $J = 7,8$ 1,4 Hz, 1H), 7,24 (dd, $J = 7,8$, 1,3 Hz, 1H), 7,04 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H).

f) 3'-{N'-[1-(3,4-dimetylphenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol]-4-yliden}hydrazin}- 2'-hydroksybifenyl-3-karboksylsyre; hydrat

35 Ved å følge prosedyren fra eksempel 1e), med unntak av anvendelse av forbindelsen fra eksempel 3e) i stedet for 4'-amino-3'-hydroksybifenyl-4-

karboksylsyre, hydrokloridsalt, ble tittelforbindelsen tilberedt (0,055 g; 32%) som et oransj, fast stoff.

Sm.p. 228 °C (dec.).

¹H NMR (300 MHz, d₆-DMSO) δ 13,76 (s, 1H), 13,12 (s, 1H), 9,70 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,97 (odd, J = 7,7 Hz, 1H), 7,81 (dd, J = 7,7 Hz, 1H), 7,74-7,60 (m, 5H), 7,22-7,13 (m, 3H), 2,34 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,23 (s, 3H); Anal. (C₂₅H₂₂N₄O₄·1,0 H₂O)

Kalk: C, 65,21; H, 5,25; N, 12,17. Funnet: C, 65,60; H, 4,96; N, 12,04.

Eksempel 4

10 Tilberedning av 3'-{N'-[1-(4-*tert*-butylfenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-2'-hydroksybifenyl-3-karboksylsyre; hemihydrat

a) 1-(4-*tert*-butyl)-3-metyl-3-pyrazolin-5-on.

Ved å følge prosedyren fra eksempel 1d), med unntak av anvendelse av 4-*tert*-butylfenylhydrazin saltsyre i stedet for 3,4-dimetylfenylhydrazinsaltsyre, ble
15 tittelforbindelsen tilberedt (13,8 g; 60%).

¹H NMR (300 MHz, d₆-DMSO) δ 11,32 (s, 1H), 7,68 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,40 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 5,32 (s, 1H), 2,09 (s, 3H), 1,33 (s, 9H).

20 b) 3'-{N'-[1-(4-*tert*-butylfenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-2'-hydroksybifenyl-3-karboksylsyre; hemihydrat

Ved å følge prosedyren fra eksempel 1e), med unntak av anvendelse av forbindelsen fra eksempel 3e) i stedet for 4'-amino-3'-hydroksybifenyl-4-karboksylsyre, hydrokloridsalt og forbindelsen fra eksempel 4a) i stedet for 1-(3,4-dimetylfenyl)-3-metyl-3-pyrazolin-5-on, ble tittelforbindelsen tilberedt (0,391 g; 42%)
25 som et oransj, fast stoff. Sm.p. 145 °C (dec.). ¹H NMR (300 MHz, d₆-DMSO) δ 13,76 (s, 1H), 13,07 (s, 1H), 9,72 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,98 (dd, J = 7,8, 1,2 Hz, 1H), 7,83 (t, J = 8,7 Hz, 1H), 7,73 (dd, J = 6,4, 3,1 Hz, 1H), 7,63 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,20-7,16 (m, 2H), 2,35 (s, 3H), 1,31 (s, 9H). Anal. (C₂₇H₂₆N₄O₄·0,5 H₂O)
30 kalk: C, 67,63; H, 5,67; N, 11,68. Funnet: C, 67,53; H, 5,46; N, 11,66.

Eksempel 7

3-aza-3'-{N'-[1-(4-tert-butylfenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-2'-hydroksybifenyl-5-karboksylsyre

- 5 a) 5-(5-klor-2-metoksyfenyl)-nikotinsyre.

Ved å følge prosedyren fra eksempel 1b), med unntak av anvendelse av 2-metoksy-5-klorfenylborsyre; for 4-karboksyfenylborsyre, og benytte bromnikotinsyre i stedet for forbindelsen fra eksempel 1a), ble tittelforbindelsen tilberedt.

MS(ES) m/z 264 [M+H].

10

- b) 6-(5-klor-2-hydroksyfenyl)-pyridin-2-karboksylsyre.

Ved å følge prosedyren fra eksempel 3d), med unntak av at forbindelsen fra eksempel 7a) ble erstattet med forbindelsene fra eksempel 3c), ble tittelforbindelsen tilberedt. MS(ES) m/z 250 [M+H].

15

- c) 6-(5-klor-2-hydroksy-3-nitrofenyl)-pyridin-2-karboksylsyre.

Til løsningen av 6-(5-klor-2-hydroksyfenyl)-pyridine-2-karboksylsyre (2,3 g, 10,1 mmol) i 100 ml eddiksyre, ble det tilsatt 1 ml skummende salpetersyre og omrørt ved 35 °C til 40 °C i 30 minutter. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med vann og pH justert til 2.5. Det resulterte presipitatet ble samlet, vasket og tørket for å gi fast stoff (2,74g; 78%, tre trinn). MS(ES) m/z 295 [M+H].

20

- d) 3-aza-3'-{N'-[1-(4-tert-butylfenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-2'-hydroksybifenyl-5-karboksylsyre.

25

Ved å følge prosedyren fra eksempel 1c), med unntak av anvendelse av forbindelsen fra eksempel 7c), i stedet for forbindelsen fra eksempel 1b), ble råproduktet isolert. En suspensjon av råproduktet (0,0015mol) i 1M vandig saltsyre (25,0 ml) ble avkjølt til 5 °C, så behandlet dråpevis med en løsning av natriumnitritt (0,11 g; 0,0015 mol) i vann (5,0 ml). Den gule blandingen ble omrørt ved 5 °C i ytterligere 10 minutter, så behandlet i en porsjon med forbindelsen fra eksempel 4a) (0,34 g, 0,0015 mol) etterfulgt av den porsjonsvise tilsetningen av natriumhydrogenkarbonat og etanol for å sikre slutt-pH for reaksjonsblandingen på omtrentlig 7-8. Den røde løsningen ble så omrørt ved romtemperatur i 24 timer.

30

Blandingen ble filtrert for å gi et rødt, fast stoff som ble blandet i vann (50,0 ml) og så surgjort med konsentrert saltsyre. Filtrering ga tittelforbindelsen (0,2 g; 29%) som et pulver. ¹H NMR (300 MHz, d₆DMSO) δ 13,8 (br, 2H), 9,08 (s, 1H), 8,9 (s, 1H), 8,4 (s, 1H), 7,82 (d, J = 7,7Hz, 2H), 7,75 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,50

35

(d, J = 7,0 Hz, 2H), 7,20 (m, 2H), 2,34 (s, 3H), 1,32(s, 9H). MS(ES) m/z 472 (M+H)⁺.

Eksempel 12

3'-{N'-[1-(3,4-dimetylphenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-2-
5 hydroksy-3'-(tetrazol-5-yl)bifenyl

a) 5-(5'-klor-2'-metoksybifenyl-3-yl)-1H-tetrazol.

Ved å følge prosedyren fra eksempel 1b), med unntak av å benytte 2-metoksy-5-klorfenylborsyre i stedet for 4-karboksyfenylborsyre, og å benytte 5-(3-bromfenyl)-1H-tetrazol i stedet for forbindelsen fra eksempel 1a), ble tittelforbindelsen tilberedt (1,36 g;
10 100%) som et hvitt, fast stoff.

¹H NMR (300 MHz, d₆-DMSO) δ 8,16(s, 1H), 8,05 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,7 (d, J = 6,6Hz, 1H), 7,67(t, J = 7,7Hz, 1H), 7,48(m, 2H), 7,2(d, J = 9,1 Hz, 1H), 3,8 (s, 3H),
MS(ES) m/z 287 [M+H].

15

b) 5-(5'-klor-2'-hydroksybifenyl-3-yl)-1H-tetrazol.

Ved å følge prosedyren fra eksempel 3d), unntatt å benytte forbindelsen fra eksempel 12a) i stedet for forbindelsene fra eksempel 3c), ble tittelforbindelsen tilberedt. MS(ES) m/z 250 [M+H].

20

c) 5-(5'-klor-2'-hydroksybifenyl-3'-nitro-3-yl)-1H-tetrazol.

Ved å følge prosedyren fra eksempel 7c), med unntak av å benytte forbindelsen fra eksempel 12b) i stedet for forbindelsen fra 7c), ble tittelforbindelsen tilberedt som et gult, fast stoff (0,5 g; 84%).

25

¹H NMR (300 MHz, d₆-DMSO) δ 8,2(s, 1H), 8,1 (d, J = 5,9 Hz, 1H), 8,09 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,8 (d, J = 2,7Hz, 1H), 7,75 (m, 2H), MS(ES) m/z 295 [M+H].

d) 3'-{N'-[1-(3,4-dimetylphenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-2-hydroksy-3'-(tetrazol-5-yl)bifenyl.

30

Ved å følge prosedyren fra eksempel 1c), med unntak av å benytte forbindelsen fra eksempel 12c), i stedet for forbindelsen fra eksempel 1b), ble råstoffproduktet isolert. En suspensjon av råstoffproduktet (0,0015mol) i 1M vandig saltsyre (25,0 ml) ble avkjølt til 5 °C og så behandlet dråpevis med en løsning av natriumnitritt (0,11 g; 0,0015 mol) i vann (5,0 ml). Den gule blandingen ble omrørt ved 5 °C i ytterligere 10 minutter, så behandlet i en porsjon med forbindelsen fra eksempel 1d) (0,34 g, 0,0015 mol) etterfulgt av den porsjonsvise tilsetningen av natriumhydrogenkarbonat og etanol, for å forsikre at slutt-pH på reaksjonsblandingen er omtrentlig 7-8. Den røde løsningen

35

ble så omrørt ved romtemperatur i 24 timer. Blandingen ble filtrert for å gi et rødt, fast stoff som ble blandet i vann (50,0 ml) og så surgjort med konsentrert saltsyre. Filtrering ga tittelforbindelsen (0,14 g; 20%) som et pulver.

¹H NMR (300 MHz, d₆-DMSO) δ 13,7 (s, 1H), 9,8 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,1(d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,75(m, 3H), 7,6 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,2 (m, 3H), 2,35 (s, 3H), 2,25 (d, J = 2,2 Hz, 6H).

Eksempel 115 - Kapselsammensetning

En oral doseringsform for tilførsel av en forebyggende oppfunnet agonist av TPO-reseptoren er fremstilt ved å fylle en standard hard gelatinkapsel i to deler med ingrediensene i porsjonene vist i tabell I nedenfor.

Tabell 1

<u>INGREDIENSER</u>	<u>MENGDE</u>
4'-{N'-[1-(3,4-dimetylphenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-3'-hydroksybifenyl-4-karboksylysyre; (forbindelse fra eksempel 1)	25 mg
laktose	55 mg
talkum	16 mg
magnesiumstearat	4 mg

Eksempel 116 - Injiserbar parenteral sammensetning

En injiserbar form for tilførsel av en foreliggende oppfunnet agonist av TPO-reseptoren er fremstilt ved å omrøre 1,5% ved vekt av 4'-{N'-[1-(3,4-dimetylphenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-3'-hydroksybifenyl-3-karboksylysyre; i 10% ved volum propylenglykol i vann.

Eksempel 117 - Tablett sammensetning

Sukrosen, kalsiumsulfatdihydratet og en foreliggende oppfunnet agonist av TPO-reseptoren, som vist i Tabell II nedenfor, er blandet og granulert i porsjonene vist med en 10% gelatinløsning. De våte granulene er screenet, tørket og blandet med stivelsen, talkum og stearinsyre, screenet og presset til en tablett.

Tabell II

<u>INGREDIENSER</u>	<u>MENGDE</u>
3'-{N'-[1-(3,4-dimetylfenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-2'-hydroksybifenyl-3-karboksytsyre; (forbindelse fra eksempel 3)	20 mg
kalsiumsulfatdihydrat	30 mg
sukrose	4 mg
stivelse	2 mg
talkum	1 mg
stearinsyre	0,5 mg

- 5 Mens de foretrukne utførelsene av den foreliggende oppfinnelse er illustrert som ovenfor, må det forstås at oppfinnelsen ikke er begrenset til de eksakte instruksjonene angitt heri, og at retten til alle modifikasjoner som faller innenfor rekkevidden av de etterfølgende krav, er forbeholdt.

P a t e n t k r a v

1.
Forbindelse, karakterisert ved at den er valgt fra gruppen bestående av 3'-{N'-
5 [1-(3,4-dimetylfenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol]-4-yliden]hydrazin}- 2'-
hydroksybifenyl-3-karboksytsyre, 3-{N'-[1-(3,4-dimetylfenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-
dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-2-hydroksy-3'-(tetrazol-5-yl)bifenyl, et farmasøytisk
akseptabelt salt, et hydrat, et solvat og en ester av disse.
- 10 2.
Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at forbindelsen er et farmasøytisk
akseptable salt.
3.
15 Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at forbindelsen er 3'-{N'-[1-(3,4-
dimetylfenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol]-4-yliden]hydrazin}- 2'-
hydroksybifenyl-3-karboksytsyre.
4.
20 Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at forbindelsen er 3'-{N'-[1-(3,4-
dimetylfenyl)-3-metyl-5-okso-1,5-dihydropyrazol-4-yliden]hydrazin}-2-
hydroksy-3'-(tetrazol-5-yl)bifenyl.
5.
25 Farmasøytisk sammensetning, karakterisert ved at den omfatter en forbindelse
ifølge krav 1 og en farmasøytisk akseptabel bærer.
6.
Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 5, karakterisert ved at den
30 ytterligere omfatter en terapeutisk effektiv mengde av et stoff utvalgt fra gruppen
bestående av en kolonistimulerende faktor, cytokin, kjemokin, interleukin og
cytokinreseptoragonist.
7.
35 Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 6, karakterisert ved at stoffet er
valgt fra gruppen bestående av; G-CSF, GM-CSF, TPO, M-CSF, EPO, Gro-beta, IL-11,

SCF, FLT3- ligand, LIF, IL-3, IL-6, IL-1, IL-5, og et biologisk aktivt derivat av en hvilken som helst av nevnte stoffer.

8.

- 5 Fremgangsmåte for å fremstille en farmasøytisk sammensetning inneholdende en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel og en effektiv mengde av forbindelsen ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter det å bringe nevnte forbindelse i kontakt med den farmasøytisk aktive bærer eller fortynningsmiddel.

10

9.

Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 1, for fremstilling av medikament for behandling av trombocytopeni.

15 10.

Anvendelse ifølge krav 9, der forbindelsen administreres oralt.

11.

Anvendelse ifølge krav 9, der forbindelsen administreres parenteralt.

20

12.

- Anvendelse ifølge krav 9, som ytterligere omfatter koadministrering av en terapeutisk effektiv mengde av et stoff utvalgt fra gruppen bestående av kolonistimulerende faktor, cytokin, kjemokin, interleukin eller cytokinreseptoragonister eller –antagonister, løselig reseptor, reseptoragonist- eller antagonistantistoff, og små molekyler eller peptider som virker via samme mekanismen som en eller flere av ovennevnte stoffer.

25

13.

- Anvendelse ifølge krav 12, der stoffet er valgt fra gruppen bestående av; G-CSF, GM-CSF, TPO, M-CSF, EPO, Gro-beta, IL-11, SCF, FLT3 -ligand, LIF, IL-3, IL-6, IL-1, Progenipoietin, NESF, SD-01, IL-8, IL-5 og et biologisk aktivt derivat av et hvilket som helst av nevnte stoffer.

30

14.

- 35 Anvendelse ifølge krav 9, der nevnte trombocytopeni skyldes myelosuppresjon forårsaket av kjemoterapi eller stråleterapi.

15.

Anvendelse ifølge krav 9, der nevnte trombocytopeni skyldes en organtransplantasjon.

16.

5 Anvendelse ifølge krav 9, der nevnte trombocytopeni skyldes benmargs-, stamceller eller levertransplantasjon.

17.

10 Anvendelse ifølge krav 9, der nevnte trombocytopeni skyldes idiopatisk trombocytopenisk purpura (ITP).

18.

15 Anvendelse ifølge krav 9, der nevnte trombocytopeni skyldes myelodysplastisk syndrom (MDS), aplastisk anemi eller leukemi.

19.

Anvendelse ifølge krav 9, der nevnte trombocytopeni skyldes virusinfeksjon, soppinfeksjon, mikrobiell eller parasittisk infeksjon.

20 20.

Anvendelse ifølge krav 9, der nevnte trombocytopeni skyldes leverdysfunksjon.

21.

25 Anvendelse ifølge krav 9, der nevnte trombocytopeni skyldes kirurgiske inngrep.

22.

Anvendelse ifølge krav 9, der nevnte trombocytopeni skyldes behandling med antivirale eller antibiotiske midler.