



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **328195**

(13) **B1**

NORGE

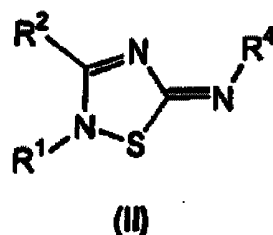
(51) Int Cl.

C07D 285/08 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 15/10 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/433 (2006.01)
C07D 417/12 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20042372	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.11.04 PCT/US02/35340
(22)	Inng.dag	2004.06.07	(85)	Videreføringsdag	2004.06.07
(24)	Løpedag	2002.11.04	(30)	Prioritet	2001.11.08, US, 337927
(41)	Alm.tilgj	2004.06.07			
(45)	Meddelt	2010.01.04			
(73)	Innehaver	Ortho-McNeil Pharmaceutical Inc, US Route #202, P O Box 300, NJ08869-0602 RARITAN, US Allen B Reitz, 109 Greenbriar Road, PA19466 LANSDALE, US Carlos R Plata-Salaman, 1313 Squire Drive, PA19002 AMBLER, US Boyu Zhao, 105 Weymouth Circle, PA19446 LANSDALE, US Kevin Pan, 409 Greene Lane, PA19460 PHOENIXVILLE, US Virginia Smith-Swintosky, 3163 Line Lexington Road, PA19440 HATFIELD, US Magdalena Eisinger, 30 Pine Terrace, NJ07627 DEMAREST, US Louis J Fitzpatrick, 205 Heatherfield Drive, PA18964 SOUDERTON, US Daniel H Lee, 361 Dutton Road, MA01776 SUDBURY, US			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vik, 0125 OSLO			
(54)	Benevnelse	Nye 1,2,4-tiadiazolderivater som melanokortinreseptormodulatorer			
(56)	Anførte publikasjoner	Ingen			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives nye 1,2,4-tiadiazolderivater med formel (II) der R¹, R² og R⁴ er ringholdige rester, brukbare som agonister eller antagonist av melanokortinreseptoren. Mer spesielt er forbindelsene ifølge oppfinnelsen brukbare for behandling av metabolske, CNS- og dermatologiske lidelser.



OPPFINNELSENS OMRÅDE

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer nye 1,2,4-tiadiazolderivater som kan benyttes
 5 for behandling av en lidelse mediert av en melanokortinreseptor. Mer spesielt er
 forbindelsene ifølge oppfinnelsen brukbare for behandling av metabolske, CNS- og
 dermatologiske lidelser som fedme, forringet oral glukosetoleranse, forhøyede
 blodglukosenivåer, type II diabetes, Syndrom X, diabetisk retinopati, akutte
 neurodegenerative lidelser, kroniske neurodegenerative lidelser, pleksopatier, mannlige
 10 erektile dysfunksjoner, øyenuuttørring, acne, tørr hud, aldrende hud, seborretiske
 dermatitt, rosacea, eksessiv ørevoks, meibomian kjertellidelse, pseudofolliculitt,
 gjærinfeksjoner, flass, hiradenitis suppurativa, okulær rosacea og eccrin kjertellidelse.

Oppfinnelsen vedrører videre et farmasøytisk preparat som innbefatter nevnte 1,2,4-
 15 tiadiazolderivater, og fremgangsmåte for fremstilling av preparatet.

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

Melanokortiner er neuropeptider som stammer fra pro-opiomelanocortin (POMC), som
 20 prevalent uttrykkes i den arkuate nucleus av hypothalamus, pituitærlappene og nucleus
 tractus solarius av hjernestammen [Gantz, I., et al., *Molecular Cloning, Expression, and
 Gene Localization of a Fourth Melanocortin Receptor*, J. Biolog. Chem., 1993, 268,
 15174-15179]. Disse peptider inkluderer ACTH, α -MSH, β -MSH, γ_{1-3} -MSH og den
 syntetiske analog NDP- α MSH (Wikberg, J. E. S., *Melanocortin receptors: new
 25 opportunities in drug discovery*, Exp. Opin. Ther. Patents, 2000, 11 (1), 61-76).

Disse peptider binder til fem typer melanokortinreseptorer (MC1-MC5), som er G-
 protein koblede reseptorer som alle positivt modulerer adenylatcyklase. MC4- og MC5-
 reseptorene er utstrakt fordelt i hjernen og ryggmargen, mens MC3 reseptoren er
 30 lokalisert hovedsakelig i hypothalamus [Gantz, I., et al., *supra*]. MC4-reseptoren
 aktiveres selektivt av α MSH og kan indusere neurittutvekst i Neuro 2A celler (Adan R.
 A. H., et al., *Molecular Brain Research*, 1996, 36, s. 37-44; Mountjoy, K. G., Mortrud,
 M. T., Low, M. J., Simerly, R. B., og Cone, R. D., *Mol. Endocrinol.*, 1994, 8, s. 1298-
 1308). ACHT er en mindre potent aktivator av MC4-reseptoren enn α MSH (Adan, R.
 35 A. H., Cone, R. D., Burbach, J. P. H., og Gispen, W. H., *mol. pharmacol.*, 1994, 46, s.
 1182-1190). MC5-reseptoren aktiveres, i størrelsesordens rekkefølge, av NDP $\approx$ α -
 MSH > ACHT (1-24) $\geq$ α MSH ACHT (1-39) = β MSH >> γ MSH (*The Melanocortin*

Receptors, Cone, R. D., red., Human Press Inc., Totowa, N. J., 2000, Chen, W., s. 449-472).

I hele dyr har studier ved rotte sciatic nerve knusemodellen vist at α -MSH øker
 5 neurittutvekst og, som den mest potente av ACTH avledede peptider, signifikant
 fremmer herveterminalforgrening, endeplateareal og perimeter [Bijlsma, W. A., et al.,
*The Enhanced Recovery of Sensorimotor Function in Rats is Related to the Melanotropic
 Moiety of ACTH/MSH Neuropeptides*, *Eur. J. Pharmacol.*, 1983, 92, 231-236; Van der
 Neut, R., et al., *Stimulation by Melanocortins of Neurite Outgrowth from Spinal and*
 10 *Sensory Neurons In Vitro*, *Peptides*, 1992, 13, 1109-1115; Van Der Zee, C.E.E.M., et
 al., *α -MSH and Org 2766 in Peripheral Nerve Regeneration: Different Route of
 Delivery*, *Eur. J. Pharmacol.*, 1988, 147, 351-357; Strand, F. L., et al., *Melanocortins as
 Factors in Somatic Neuromuscular Growth and Regrowth*, *Pharmac. Ther.*, 1994, 62, 1-
 27]. Videre blir gjenoppretelse av motorfunksjonen etter nerveskade forkortet ved
 15 applikasjon av α -MSH og andre melanokortiner [Strand, F. L., et al., *supra*].

Mus der MC4 reseptoren er gjort inaktiv ved geneinnsikting blir fete, noe som antyder
 at MC4 reseptoren er involvert ved mating [Huszar, D., et al., *Targeted Disruption of
 the Melanocortin-4 Receptor Results in Mice*, *Cell*, 1997, 88, 131-141]. Dette
 20 substansieres ved en rapport dit hen at forskjellige MC4 peptidagonister inhiberer
 spiseoppførselen hos *agouti* mus [Fan, W., et al., *Role of Melanocortingenic Neurons in
 Feeding and the Agouti Obesity Syndrome*, *Nature*, 1997, 385, 165-168]. α -MSH
 induserer en kjemmen oppførsel hos rotter, men signifikansen av dette er ikke klar og
 kan ikke medieres via MC4 reseptoren [Adan, R. A. H., et al., *Differential Effects of*
 25 *Melanocortin Peptides on Neural Melanocortin Receptors*, *Molecular Pharmacology*,
 1994, 46, 1182-1190].

Melanokortinene α -MSH og ACTH er også kjent for evnen til å stimulere pigmentering
 henholdsvis adrenal glukokortikoid sekresjon. Rollen til melanokortinene og særlig α -
 30 MSH ved regulering av sebaciøs kjertelaktivitet (en eksokrin kjertel med holokrin type
 sekresjon) var kjent opprinnelig hos rotter. Mer spesielt viste studiene at fjerning av
 intermediatlappen av den pituitære kjertel (som produserer POMC peptidene) resulterte
 i en redusert sebaciøs lipidproduksjon med fullstendig restaurering til normale nivåer
 etter erstatningsterapi med α -MSH (Thody, A. J. og Shuster, *Nature*, 237, 346-347,
 35 1972). I en studie av rotter etter total hypofysektomi resulterte behandling med α -MSH
 i en økning av sebumproduksjonen, selv om full gjenoppretting av sebumproduksjonen
 ble oppnådd kun etter behandling med en kombinasjon av α -MSH og testosteron

(Thody, A. J., Shuster, S., *J. Endocr.* 64, 503-510, 1975; Ebling, F. J., Ebling, E., Randall, V. og Skinner, J., *J. Endocr.* 66, 407-412, 1975). Knock-out mus der MC5 reseptoren var deletert ble observert å vise en alvorlig defekt i vannrepulsjonen og termoreguleringen på grunn av redusert produksjon av sebasiøse lipider (Chen, W.,
 5 Kelly, M. A., Opitz-Araya, X., Thomas, R. E., Low, M. J. og Cone, R., *Cell*, 91, 788-798, 1997).

MC5 reseptoren er kjent for å uttrykkes i humane sebaciøse kjertler og kan være involvert i reguleringen av human sebaciøs lipidsyntese. Human MC5-R er klonet og
 10 karakterisert (Chhajlani, V., Muceniece, R., Wikberg, JES., *Biochem Biophys. Res. Commun.* 195, 866-873, 1993). Videre er nærvær av MC5-R mRNA i human sebaciøse kjertler påvist ved RT-PCR og proteinet ble detektert ved immunohistokjemi og Western blot analyse (Thiboutot, D., Sivarajah, Gililand, K., Cong, Z. og Clawson, G.,
J. Invest. Dermatol. 115(4), 614-619, 2000).

15 Human sebum skiller seg når det gjelder sammensetning fra andre pattedyr. Hovedlipidene i human sebum er triglycerider, voksester og squalen (Greene, R. S., Downing, D. T., Poci, P. E., Strauss, J. S., *JID* 54, 240-247, 1970). Squalen finnes for eksempel ikke i mange pattedyr bortsett fra oter og bever. Triglycerid, som er en
 20 hovedkomponent av human sebum, er dårligere representert i andre spesier og synes hos mange å være fullstendig fraværende (for eksempel sjimpanser) (Thody, A. J., Shuster, S., *Physiol. Rev.* 69, 383-415, 1989). Videre kan melanokortiner ha forskjellige effekter på celler fra forskjellige spesier. For eksempel er både α -MSH ($EC_{50}=3,7$ nM) og ACTH ($EC_{50}=16,4$ nM) potente lipolytiske midler for kanin adipocytter, mens hos
 25 rotter har kun ACTH ($EC_{50}=1,34$ nM) noen potent lipolyttisk aktivitet (Ramachandran, J., Lee, V., 428, 339-346, 1987; Richter, W. O., Schwandt, P., *Neuropeptides* 9, 59-74, 1987). På tross av lipolyttisk aktivitet hos gnagere og kaniner, har ACTH meget liten innvirkning på lipolyse i isolerte human- og ikke-human primat adipocytter, selv ved konsentrasjoner helt opp til 1 μ M (Ng, T. B., *Comparative Biochem.* 97, 441-446,
 30 1990). En definisjon av rollen av melanocortiner og deres reseptorer i animalske sebaciøse modellsystemer er således ikke nødvendigvis prediktivt for deres rolle ved human sebaciøs lipidregulering.

I den senere tid har Basu et al. i WO99/55679 beskrevet isokinolinderivater,
 35 småmolekyl ikke-peptid forbindelser, som viste lavmikromolære affiniteter for MC1- og MC4-reseptorer, reduksjon av dermal inflammasjon induert av arakidonsyrer og reduksjoner av kroppsvekt og næringsinntak.

Nargund et al. har i WO99/64002 beskrevet spiropiperidinderivater som melanokortin-reseptoragonister, brukbare for behandling av sykdommer og lidelser som fedme, diabetes og seksuell dysfunksjon.

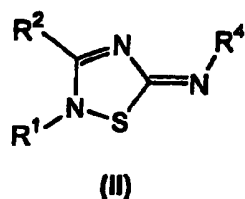
5

Det eksisterer således et behov for småmolekylmodulatorer av melanokortinreseptoren, mer spesielt melanokortin-3-, melanokortin-4- og/eller melanokortin-5-reseptorer.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

10

Foreliggende oppfinnelse er rettet mot forbindelser med den generelle formel (II)



15

der

R¹ er fenyl,

20

der fenylgruppen eventuelt er substituert med en eller flere substituerter uavhengig valgt blant halogen, C₁-C₆ alkyl eller C₁-C₆ alkoksy;

R² er fenyl,

25

der fenylgruppen eventuelt er substituert med en eller flere substituerter uavhengig valgt blant halogen, C₁-C₆ alkyl eller C₁-C₆ alkoksy;

30

R⁴ er valgt blant gruppen bestående av fenyl eller pyridyl, der fenylgruppen eventuelt er substituert med en eller flere substituerter valgt blant halogen, C₁-C₆ alkyl eller C₁-C₆ alkoksy;

og farmasøytisk akseptable salter derav.

Foretrukne forbindelser ifølge oppfinnelsen er definert i de vedheftede selvstendige krav.

- 5 Oppfinnelsen er videre rettet mot et farmasøytisk preparat omfattende en farmasøytisk akseptabel bærer og en hvilken som helst av de forbindelser som er beskrevet ovenfor. En illustrasjon på oppfinnelsen er et farmasøytisk preparat fremstilt ved å blande en hvilken som helst av forbindelsene som beskrevet ovenfor og en farmasøytisk akseptabel bærer. Oppfinnelsen vedrører således en fremgangsmåte for fremstilling av
- 10 et farmasøytisk preparat omfattende blanding av en hvilken som helst av forbindelsene som beskrevet ovenfor og en farmasøytisk akseptabel bærer.

- En terapeutisk effektiv mengde av en hvilken som helst av forbindelsene eller de farmasøytiske preparater som er beskrevet ovenfor kan administreres til et individ
- 15 for behandling av lidelser mediert av melanokortinreseptoren.

- Ved en utførelsesform kan en hvilken som helst av forbindelsene ovenfor anvendes for behandling av en lidelse valgt blant gruppen omfattende metabolske lidelser, CNS-lidelser og dermatologiske lidelser.

20

- En terapeutisk effektiv mengde av en hvilken som helst av forbindelsene eller farmasøytiske preparater som beskrevet ovenfor kan administreres til et individ for behandling av en lidelse valgt fra gruppen bestående av fedme, redusert oral glukosetoleranse, eleverte blodglukosenivåer, type II diabetes, Syndrom X, diabetisk
- 25 retinopati, spinalstrengskade, nerveskade, akutte neurodegenerative lidelser, kroniske neurodegenerative lidelser, pleksopatier, mannlige erektive dysfunksjoner, tørre øyne, acne, tørr hud, aldrende hud, seborretisk dermatitt, rosacea, eksessiv ørevoks, meibomian kjertellidelse, pseudofollikulitt, gjærinfeksjoner, flass, hidradenitis suppurativa, okulær rosacea og eccrin kjertellidelse.

30

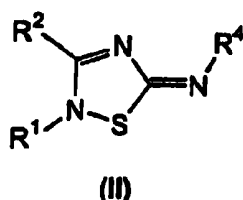
- Et eksempel på oppfinnelsen er bruken av en hvilken som helst av forbindelsene som beskrevet her ved fremstilling av et medikament for behandling av: (a) fedme, (b) forringet oral glukosetoleranse, (c) eleverte blodglukosenivåer, (d) type II diabetes, (e) Syndrom X, (f) diabetisk retinopati, (g) en akutt neurodegenerativ lidelse, (h) en kronisk
- 35 neurodegenerativ lidelse, (i) en pleksopati, (j) mannlig erektil dysfunksjon, (k) tørre øyne, (l) acne, (m) tørr hud, (n) aldrende hud, (o) seborretisk dermatitt, (p) rosacea, (q) eksessiv ørevoks, (r) meibomian kjertellidelse, (s) pseudofollikulitt, (t) gjærinfeksjoner,

(u) flass, (v) hidradenitis suppurativa, (w) okulær rosacea eller (x) eccrin kjertellidelse, hos et individ som trenger dette.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

5

Oppfinnelsen er rettet mot nye substituerte 1,2,4-tiadiazolderivater som kan benyttes for behandling av lidelser mediert av en melanokortinreseptor. Mer spesielt er oppfinnelsen rettet mot forbindelser med formel (II)



10

der R^1 , R^2 og R^4 er som beskrevet ovenfor, brukbare som melanokortinreseptoragonister eller -antagonister.

- 15 Som benyttet her, og hvis ikke annet er sagt, inkluderer uttrykket "lidelser som er mediert av en melanokortinreseptor" eller tilsvarende uttrykk, uten begrensning, fedme, forringet oral glukosetoleranse, forhøyede blodglukosenivåer, type II diabetes, Syndrom X, diabetisk retinopati, akutte neurodegenerative lidelser, kroniske neurodegenerative lidelser, pleksopatier, mannlig erektil dysfunksjon, tørre øyne, acne, 20 tørr hud, aldrende hud, seborretisk dermatitt, rosacea, eksessiv ørevoks, meibomian kjertellidelse, pseudofollikulitt, gjærinfeksjoner, flass, hidradenitis suppurativa, okulær rosacea og eccrin kjertellidelse.

- Som benyttet her, og hvis ikke annet er sagt, inkluderer uttrykket "metabolske lidelser" 25 eller lignende, uten begrensning, fedme, forringet oral glukosetoleranse, forhøyede blodglukosenivåer, type II diabetes og Syndrom X.

- Som benyttet her, og hvis ikke annet er sagt, inkluderer uttrykket "CNS-lidelser" eller lignende, uten begrensning, diabetisk retinopati, akutte neurodegenerative lidelser, 30 kroniske neurodegenerative lidelser og pleksopatier.

Som benyttet her, og hvis ikke annet er sagt, inkluderer uttrykket "dermatologiske lidelser", uten begrensning, tørre øyne, acne, tørr hud, aldrende hud, seborretisk

dermatitt, rosacea, eksessiv ørevoks, meibomian kjertellidelse, pseudofollikulitt, gjærinfeksjoner, flass, hidradenitis suppurativa, okular rosacea og eccrin kjertellidelse.

Som benyttet her, inkluderer akutte neurodegenerative lidelser forskjellige typer akutte
 5 neurodegenerative lidelser assosiert med neuronalcelledød eller kompromiss inkludert
 cerebrovaskulær insuffisiens, fokal eller diffus hjernetrauma, diffus hjerneskade og
 ryggradsskade, det vil si cerebral iskemi eller infarkt inkludert embolisk okklusjon og
 trombotisk okklusjon, reperfusjon etter akutt iskemi, perinatal hypoksisk-iskemisk
 skade, kardialstans, så vel som intrakranial hemorrhagi av en hvilken som helst type
 10 (inkludert, men ikke begrenset til, epidural, subdural, subaraknoid og intracerebral) og
 intrakraniale og intravertebrale lesjoner (inkludert, men ikke begrenset til, kontusjon,
 penetrasjon, skjær, kompresjon og lacerering) og nakkeslengrystet infant syndrom.

Som benyttet her, inkluderer kroniske neurodegenerative lidelser innen metodene ifølge
 15 oppfinnelsen Alzheimers sykdom, Picks sykdom, diffus Lewy kroppssykdom,
 progressiv supranukleær palsy (Steel-Richardson syndrom), multisystem degenerering
 (Shy-Drager syndrom), kroniske epileptiske tilstander assosiert med neurodegenerering,
 motor neuron sykdommer inkludert amyotrofisk lateral sklerose, degenerative ataksier,
 kortikal basal degenerering, ALS-Parkinson's-Dementia Guam kompleks, subakutt
 20 skleroserende panencefalitt, Huntingtons sykdom, Parkinsons sykdom, synukleinopati
 (inkludert multippel system atrofi), primær progressiv afasi, striatonigral degenerering,
 Machado-Joseph sykdom/spinocerebellar ataksi type 3 og olivopontocerebellar
 degenereringer, Gilles De La Tourettes sykdom, bulbar og pseudobulbar palsy, spinal og
 spinobulbar muskulær atrofi (Kennedys sykdom), primær lateral sklerose, arvelig
 25 spastisk paraplegi, Werdnig-Hoffman sykdom, Kugelberg-Welander sykdom, Tay-
 Sachs sykdom, Sandhoff sykdom, arvelig spastisk sykdom, Wohlfart-Kugelberg-
 Welander sykdom, spastisk paraparese, progressiv multifokal leukoencefalopati, arvelig
 dysautonomi (Riley-Day syndrom) og prion-sykdommer (inkludert, men ikke begrenset
 til, Creutzfeldt-Jakob, Gerstmann-Sträussler-Scheinker sykdom, Kuru og fatal, arvelig
 30 insomnia).

Som benyttet her, inkluderer pleksopatier plexus palsier, multifokale neuropatier,
 sensoriske neuropatier, motoneuropatier, sensorisk-motoneuropatier,
 infeksjonsneuropatier, autonome neuropatier, sensorisk-autonome neuropatier,
 35 demyeliniserende neuropatier (inkludert, men ikke begrenset til Guillain-Barre syndrom
 og kronisk inflammatorisk demyeliniserende polyradikuloneuropati), andre
 inflammatoriske og immune neuropatier, neuropatier som er indusert av medikamenter,

neuropatier induisert av farmakologiske behandlinger, neuropatier induisert av toksiner, traumatiske neuropatier (inkludert, men uten begrensning til, kompresjons-, knuse-, lacererings- og segmenteringsneuropatier), metabolske neuropatier, endokrine og paraneoplastiske neuropatier, samt andre neuropatier som Charcot-Marie-Tooth sykdom (type 1a, 1b, 2, 4a, 1-X-forbundet), Friedreichs ataksi, metakromatisk leukodystrofi, Refsums sykdom, adrenomyeloneuropati, Ataxia-telangiectasia, Déjerine-Sottas neuropati (typene A og B), Lambert-Eaton syndrom, samt lidelser i kranialnervene.

Som benyttet her, og hvis ikke annet er sagt, skal uttrykket "halogen" inkludere jod, brom, klor og fluor.

Som benyttet her, og hvis ikke annet er sagt, skal uttrykket "alkyl" benyttet alene eller som del av en substituent- gruppe inkludere rette og forgrenede kjeder omfattende ett til åtte karbonatomer. For eksempel inkluderer alkylrester metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sek-butyl, t-butyl, pentyl og lignende. Hvis ikke annet er sagt, betyr "lavere" når uttrykket benyttes sammen med alkyl en karbonkjede bestående av ett til fire karbonatomer.

Uttrykket "alkenyl", uansett om det benyttes alene eller som del av en substituentgruppe, skal inkludere rette og forgrenede alkenkjeder omfattende to til åtte karbonatomer. Egnede eksempler er vinyl, 1-propenyl, 2-propenyl, 1-butenyl, 2-butenyl, 1-pentenyl, 2-pentenyl, 1-isobut-2-enyl og lignende. På samme måte betyr uttrykket "alkynyl", uansett om det benyttes alene eller som del av en substituentgruppe, rette og forgrenede alkynkjeder omfattende to til åtte karbonatomer. Egnede eksempler er 2-propynyl, 2-butylnyl, 1-butylnyl, 1-pentylnyl og lignende.

Som benyttet her, og hvis ikke annet er sagt, skal "alkoksy" angi en oksygeneterrest av de ovenfor beskrevne rette eller forgrenede alkylgrupper. Eksempler er metoksy, etoksy, n-propoksy, sek-butoksy, t-butoksy, n-heksyloksy og lignende.

Som angitt her, skal angivelsen "*" angi nærværet av et stereogenisk senter.

Der forbindelsene ifølge oppfinnelsen har minst ett chiralt senter, kan de i henhold til dette foreligge som enantiomerer. Der forbindelsene har to eller flere chirale sentra, kan de i tillegg foreligge som diastereomerer. Det skal være klart at alle slike isomerer og blandinger derav ligger innenfor rammen av oppfinnelsen. Videre kan noen av de krystallinske former for forbindelsene foreligge som polymorfer og som sådan ment å

ligge innenfor oppfinnelsens ramme. I tillegg kan noen av forbindelsene danne solvater med vann (det vil si hydrater) eller vanlige organiske oppløsningsmidler, og slike solvater er også ment å omfattes av oppfinnelsens ramme.

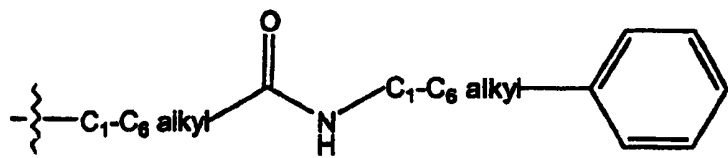
- 5 Når en spesiell gruppe er "substituert", kan denne gruppe ha en eller flere substituent, fortrinnsvis fra en til fem substituent, og aller helst fra en til tre substituent, spesielt fra en til to substituent, uavhengig valgt fra listen av substituent.

Det er ment at definisjonen av en hvilken som helst substituent eller variabel ved en spesiell lokasjon i et molekyl er uavhengig av dens definisjon ellers i molekylet. Det skal være klart at substituentene og substitusjonsmønstrene på forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan velges av fagmannen på området for å gi forbindelser som er kjemisk stabile og som lett kan syntetiseres ved teknikker som er kjente i teknikken, for eksempel de metoder som er beskrevet her.

15

Under den standard nomenklatur som benyttes i foreliggende beskrivelse angis den terminale delen av den angitte sidekjede først, fulgt av den ved siden av liggende funksjonalitet mot festepunktet. Således henviser for eksempel en "fenyl C₁-C₆ alkylaminokarbonyl C₁-C₆ alkyl" substituent til en gruppe med formelen:

20



25

Uttrykket "individ" slik det benyttes her henviser til et dyr, fortrinnsvis et pattedyr og aller helst et menneske, som er eller har vært gjenstand for behandling, observasjon eller forsøk.

- 30 Som benyttet her, er uttrykket "preparat" ment å omfatte et produkt omfattende de spesifiserte bestanddeler i de spesifiserte mengder, så vel som et hvilket som helst produkt som direkte eller indirekte resulterer fra kombinasjonen av de spesifiserte bestanddeler i de spesifiserte mengder.

Uttrykket "terapeutisk effektiv mengde" eller lignende betyr, slik det eller de benyttes her, den mengde av aktiv forbindelse eller farmasøytisk middel som elisiterer eller utløser den biologiske eller medisinske respons i et vevsystem, dyr eller menneske som
 5 tilsiktes av en forsker, veterinær, lege eller annen person, og som inkluderer lindring av symptomer av sykdommen eller lidelsen som behandles.

For bruk i medisin henviser saltene av forbindelsene ifølge oppfinnelsen til ikke-toksiske "farmasøytisk akseptable salter". Andre salter kan imidlertid være brukbare
 10 ved fremstilling av forbindelser ifølge oppfinnelsen eller av deres farmasøytisk akseptable salter. Egnede farmasøytisk akseptable salter av forbindelsene ifølge oppfinnelsen inkluderer syreaddisjonssalter som for eksempel kan dannes ved å blande en oppløsning av forbindelsen med en oppløsning av en farmasøytisk akseptabel syre som salt-, svovel-, fumar-, eple-, rav-, eddik-, benzo-, sitron-, vin-, karbon- eller
 15 fosforsyre.

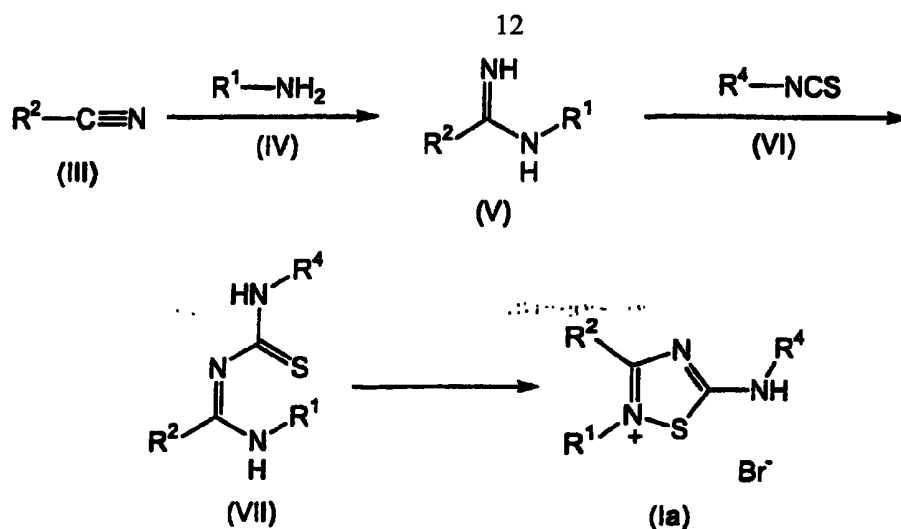
Foreliggende oppfinnelse inkluderer innenfor sin ramme prodrugs av forbindelsene ifølge oppfinnelsen. Generelt vil slike prodrugs være funksjonelle derivater av forbindelsene som lett *in vivo* kan konverteres til den krevede forbindelse. Ved
 20 metodene for behandling ifølge oppfinnelsen skal således uttrykket "administrering" omfatte behandling av de forskjellige lidelser som er beskrevet med forbindelsene som spesifikt er beskrevet eller med en forbindelse som ikke behøver spesifikt å være beskrevet, men som konverteres til den spesifiserte forbindelse *in vivo* etter administrering til pasienten. Konvensjonelle prosedyrer for valg og fremstilling av
 25 egnede prodrug-derivater er for eksempel beskrevet i "Design of Prodrugs", red. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Forkortelser som benyttes i den foreliggende beskrivelse og særlig i reaksjonsskjemaer og eksempler er som følger:

30	BHT	=	2,6-bis-(t-butyl)-4-metyl-fenol
	BSA	=	bovinserumalbumin
	cAMP eller		
	cyklisk AMP	=	cyklisk-adenosin monofosfat
35	DCE	=	1,2-dikloreten
	DEAD	=	dietyl azodikarboksylat
	DM	=	differensieringsmedium

	DMF	=	dimetylformamid
	DMEM	=	Dulbeccos minimale essensielle medium
	DMSO	=	dimetylsulfoksid
	DPBS	=	Dulbeccos fosfatbufrede saltoppløsning
5	EDTA	=	etylendiamintetraeddiksyre
	FBS	=	føtalbovinserum
	GDP	=	guanosindifosfat
	GTP	=	guanosintrifosfat
	GM	=	vekstmedium
10	HBSS	=	Hanks bufrede saltoppløsning
	HEPES	=	4-(2-hydroksyetyl)-1-piperizinetansulfonsyre
	HS	=	humanserum
	IgG	=	immunoglobulin G
	% Inh	=	prosent inhibering
15	MEM	=	minimum essensielt medium
	NBS	=	N-bromsuccinimid
	NCS	=	N-klorsuccinimid
	NDP α MSH	=	[Nle ⁴ , D-Phe ⁷] α MSH, en analog av α MSH
	PBS	=	fosfatbufret saltoppløsning
20	PEG	=	polyetylen glykol
	PNC	=	penicillin
	rt eller RT	=	romtemperatur
	SPA	=	scintillasjonsproksimitetsanalyse
	STM	=	streptomycin
25	TLC	=	tynnsjikt kromatografi
	TM	=	overføringsmedium
	TMS	=	trimetylsilyl

Forbindelsene med formel (I) der R³ er hydrogen kan fremstilles i henhold til den
 30 prosess som er skissert i Skjema 1:



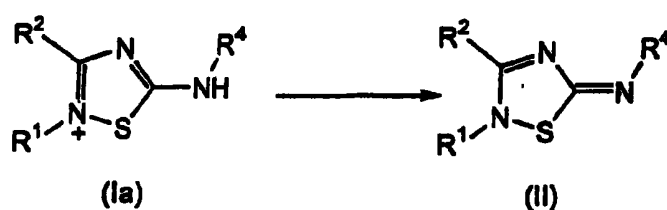
Skjema 1

- 5 Mer spesielt blir en egnet substituert cyanoforbindelse med formel (III), en kjent forbindelse eller forbindelse fremstilt ved kjente metoder, omsatt med et egnet substituert primært amin med formel (IV), en kjent forbindelse eller forbindelse fremstilt ved kjente metoder, i nærvær av en base som NaNH_2 , NaH , $\text{NaN}(\text{TMS})_2$ og lignende, fortrinnsvis NaNH_2 , ved en forhøyet temperatur, fortrinnsvis rundt tilbakebøl, for å gi den tilsvarende forbindelse med formel (V).

Forbindelsen med formel (V) kan omsettes med et egnet substituert tiocyanat med formel (VI), en kjent forbindelse eller forbindelse fremstilt ved kjente metoder, i nærvær av DCE, ved en forhøyet temperatur, fortrinnsvis rundt 45°C , for å gi den tilsvarende forbindelse med formel (VII).

Forbindelsen med formel (VII) kan underkastes ringlukning/oksidasjon, i nærvær av Br_2 , ved romtemperatur, for å gi den tilsvarende forbindelse med formel (Ia).

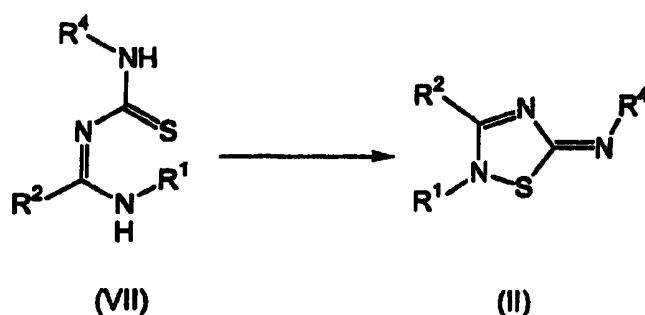
- 20 Forbindelser med formel (II) kan fremstilles fra egnede substituerte forbindelser med formel (I) der R^3 er hydrogen i henhold til prosessen som er skissert i Skjema 2.



Skjema 2

- 5 Mer spesielt kan en egnet substituert forbindelse med formel (Ia) omsettes med en base som NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NaOH og lignende, fortrinnsvis NaHCO_3 , ved romtemperatur, for å gi den tilsvarende forbindelse med formel (II).

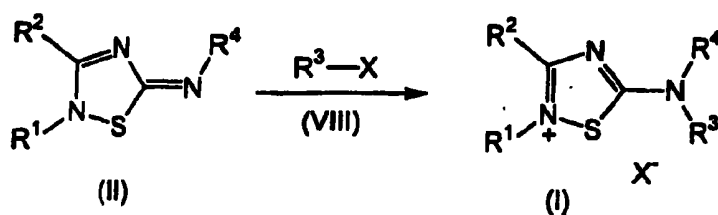
- 10 Forbindelser med formel (II) kan også fremstilles fra egnede substituerte forbindelser med formel (VII) i henhold til en prosess som skissert i Skjema 3:



Skjema 3

- 15 Mer spesielt blir en egnet substituert forbindelse med formel (VII) omsatt med et oksidasjonsmiddel som NBS, NCS, DEAD og lignende, fortrinnsvis NBS, ved romtemperatur, for å gi den tilsvarende forbindelse med formel (II). Fortrinnsvis blir forbindelsen med formel (II) ekstrahert fra en basisk, vandig oppløsning som NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NaOH og lignende.
- 20

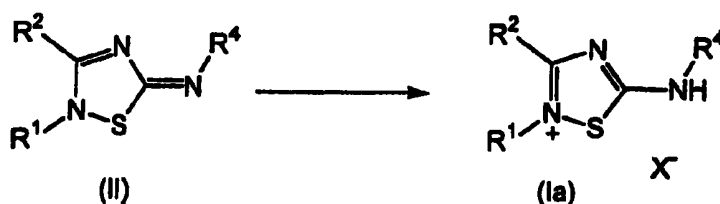
Forbindelser med formel (I) der R^3 er alkyl kan fremstilles fra en egnet substituert forbindelse med formel (II) i henhold til den prosess som er skissert i Skjema 4:



Skjema 4

I henhold til dette kan en egnet substituert forbindelse med formel (II) omsettes med en egnet substituert forbindelse med formel (VIII), en kjent forbindelse eller en forbindelse fremstilt ved kjente metoder, der X^- er trifluormetylsulfonat, Br^- og I^- , ved romtemperatur, for å gi den tilsvarende forbindelse med formel (I).

Forbindelser med formel (I) der R^3 er hydrogen kan fremstilles fra en egnet substituert forbindelse med formel (II) i henhold til den prosess som er skissert i Skjema 5:



Skjema 5

I henhold til dette blir en egnet substituert forbindelse med formel (II) omsatt med en farmasøytisk akseptabel syre som HCl, HBr, HNO₃ og lignende, fortrinnsvis HCl, ved romtemperatur, for å gi den tilsvarende forbindelse med formel (Ia) der X^- er Cl^- , Br^- , NO_3^- og lignende.

Når prosessene for fremstilling av forbindelsene ifølge oppfinnelsen gir opphav til en blanding av stereoisomerer, kan disse separeres ved konvensjonelle teknikker som preparativ kromatografi. Forbindelsene kan fremstilles i racemisk form, eller individuelle enantiomerer kan fremstilles enten ved enantiospesifikk syntese eller ved oppløsning. Forbindelsene kan for eksempel oppløses i sine komponent enantiomerer ved standard teknikker, som dannelsen av diastereomere par ved saltdannelse med en optisk aktiv syre, som (-)-di-p-toluoyl-d-vinsyre og/eller (+)-di-p-toluoyl-l-vinsyre fulgt av fraksjonell krystallisering og regenerering av den frie base. Forbindelsene kan også oppløses ved dannelsen av diastereomere estere eller amider, fulgt av kromatografisk separering og fjerning av chiral-hjelpemiddel. Alternativt kan forbindelsene oppløses ved bruk av en chiral HPLC kolonne.

Under en hvilken som helst av prosessene for fremstilling av forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan det være nødvendig og/eller ønskelig å beskytte sensitive eller reaktive grupper på et hvilket som helst av de deltagende molekyler. Dette kan oppnås

ved hjelp av konvensjonelle, beskyttende grupper, som de som er beskrevet i Protective Groups in Organic Chemistry, red. J. F. W. McOmie, Plenum Press, 1973; og T. W. Greene & P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 1991. De beskyttende grupper kan fjernes ved et hensiktsmessig etterfølgende trinn ved bruk av i og for seg kjente metoder.

Anvendeligheten av forbindelsene ifølge oppfinnelsen for å behandle lidelser mediert av en melanokortinreseptor kan bestemmes i henhold til de prosedyrer som er beskrevet i eksemplene 4-11. Forbindelsen kan administreres til en pasient som lider under en slik lidelse ved en hvilken som helst konvensjonell administreringsrute inkludert, men ikke begrenset til, intravenøst, oralt, subkuttant, intramuskulært, intradermalt, parenteralt og transdermalt.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også farmasøytiske preparater omfattende en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen forbundet med en farmasøytisk akseptabel bærer.

For å fremstille de farmasøytiske preparater ifølge oppfinnelsen blir en eller flere forbindelser med formel (I) og/eller (II) eller et salt derav (den aktive bestanddel) grundig blandet med en farmasøytisk bærer i henhold til konvensjonelle, farmasøytiske blandeteknikker, der bæreren kan ha et vidt spektrum av former avhengig av den preparatform som ønskes for administreringen, for eksempel oral eller parenteral slik som intramuskulær. Ved fremstilling av preparatene i oral doseringsform kan man benytte et hvilket som helst av de vanlige, farmasøytiske media. For flytende orale preparater som suspensjoner, eliksirer og oppløsninger inkluderer egnede bærere og additiver vann, glykoler, oljer, alkoholer, smaksstoffer, conserveringsmidler, farvestoffer og lignende; for faste, orale preparater som for eksempel pulvere, kapsler, caplets, gelcaps og tabletter inkluderer egnede bærere og additiver stivelser, sukkere, diluenter, granuleringsmidler, smøremidler, bindemidler, disintegreringsmidler og lignende. På grunn av den enkle administrering representerer tabletter og kapsler den mest fordelaktige, orale enhetsdoseform, i hvilket tilfelle åpenbart faste, farmasøytiske bærere benyttes. Hvis ønskelig, kan tabletter være sukkerbelagt eller enterisk belagt ved standard teknikker. For parenterale medikamenter vil bæreren vanligvis omfatte sterilt vann, selv om andre bestanddeler, for eksempel for å understøtte oppløselighet eller prerservering, kan innarbeides. Injiserbare suspensjoner kan også fremstilles, i hvilket tilfelle det benyttes egnede flytende bærere, suspensjonsmidler og lignende.

Topiske formuleringer som ligger innenfor oppfinnelsens ramme inkluderer, men er ikke begrenset til, kremer, lotioner, multippel emulsjoner, mikroemulsjoner, liposomale kremer eller geler, geler, oppløsninger, suspensjoner, salver, skum-aerosoler, hård- eller mykgelatinkapsler, masker, stifter, roll-ons, pulvere, spray-former og lignende. De

5 topiske formuleringer kan i tillegg til den eller de aktive bestanddeler inneholde en eller flere ikke-aktive komponenter, inkludert, men ikke begrenset til, chelaterings- eller buffermidler, fargestoffer, preservativer, duftstoffer, emulgatorer, surfaktanter, opasitetsgivende midler, fukte- eller oppløsningsmidler, solskjermer, viskositetsmodifiserende midler, antioksidanter, fuktere, permeasjonsforbedrere,

10 filmdannere og lignende.

Topiske formuleringer for acne-behandling som ligger innenfor oppfinnelsens ramme kan også inneholde en eller flere av de følgende komponenter, inkludert comedolytiske/keratolytiske midler, antimikrobielle midler og steroide eller ikke-

15 steroide, anti-inflammatoriske midler. (Comedolytiske midler henviser til en hvilken som helst forbindelse i stand til å bryte opp en komedo. Keratolytiske midler henviser til en hvilken som helst forbindelse som er i stand til å bryte fra hverandre keratinocytter som stammer fra eksfoliering av epidermis.) Egnede comedolytiske/keratolytiske midler inkluderer, men ikke begrenset til, retinoider, salicyl- eller glykolsyre, cetylbetain og

20 lignende. Egnede antimikrobielle midler inkluderer, men ikke begrenset til, benzoylperoksid, erytromycin, tetracyklin, clindamycin, azelainsyre og lignende. Topiske formuleringer inneholder typisk 0,01-1% aktiv bestanddel.

De farmasøytiske preparater som beskrives her vil per enhetsdose, for eksempel tablett,

25 kapsel, pulver, injeksjon, teskje og lignende, inneholde en mengde av den aktive bestanddel som er nødvendig for å avgi en effektiv dose som beskrevet ovenfor. De ikke-topiske, farmasøytiske preparater som beskrives her vil per enhetsdose, for eksempel tablett, kapsel, pulver, injeksjon, suppositorium, teskje og lignende, inneholde fra rundt 0,03 til 100 mg/kg, fortrinnsvis 0,1-30 mg/kg, og kan gis i doser fra rundt

30 0,1-300 mg/kg per dag, fortrinnsvis 1-50 mg/kg per dag. Dosene kan imidlertid varieres avhengig av pasientens behov, tilstandens alvor og den benyttede forbindelse. Bruken av enten daglig administrering eller post-periodisk dosering kan også benyttes.

Fortrinnsvis foreligger disse preparatene i enhetsdoseformer som tabletter, piller,

35 kapsler, pulvere, granuler, sterile parenterale oppløsninger eller suspensjoner, tildosert aerosol- eller væskespray, dråper, ampuller, autoinjektorinnretninger eller suppositorier; for oral parenteral, intranasal, sublingual eller rektal administrering, eller for

- administrering ved inhalering eller insufflering. Alternativt kan preparatet presenteres i en form som er egnet for administrering en gang per uke eller en gang per måned; for eksempel kan et uoppløselig salt av den aktive forbindelse som dekanotsalt tilpasses i et depotpreparat for intramuskulær injeksjon. For fremstilling av faste preparater som
- 5 tabletter blir hovedaktivbestanddelen blandet med en farmasøytisk bærer, for eksempel konvensjonelle tableteringsbestanddeler som maisstivelse, laktose, sukrose, sorbitol, talkum, stearinsyre, magnesiumstearat, dikalsiumfosfat eller gummier, og andre farmasøytiske diluenter som vann, for å gi et fast forformuleringspreparat inneholdende en homogen blanding av en forbindelse ifølge oppfinnelsen, eller et farmasøytisk
- 10 akseptabelt salt derav. Når man henviser til disse forformuleringspreparater som homogene, betyr det at den aktive bestanddel er dispergert jevnt i preparatet slik at preparatet lett kan finoppdeles i like, effektive doseringsformer som tabletter, piller og kapsler. Dette faste forformuleringspreparatet blir så underoppdelt i enhetsdoseformer av den type som er beskrevet ovenfor inneholdende fra 0,1 til rundt 500 mg av den
- 15 aktive bestanddel ifølge oppfinnelsen. Tablettene eller pillene av det nye preparat kan belegges eller på annen måte komponderes for å gi en doseringsform tilpasset fordelene ved forlenget virkning. For eksempel kan en tablett eller pille omfatte en indre dose- og en ytre dosekomponent, idet den sistnevnte har form av en omhylling over den førstnevnte. De to komponenter kan være adskilt av et enterisk sjikt som tjener til å
- 20 motstå disintegrering i maven og tillater den indre komponent å passere intakt inn i duodenum eller forsinkes hva frigivning angår. Et antall materialer kan benyttes for slike enteriske sjikt eller belegg, og slike materialer inkluderer et antall polymere syrer med slike materialer som skjellakk, cetylalkohol og celluloseacetat.
- 25 De flytende former i hvilke de nye preparater ifølge oppfinnelsen kan innarbeides for administrering oralt eller ved injeksjon inkluderer vandige oppløsninger, egnede smakssatte siruper, vandige eller olje suspensjoner samt smakssatte emulsjoner med spiselige oljer som bomullsfrø-, sesam-, kokosnøtt- eller jordnøttolje, så vel som eliksirer og tilsvarende farmasøytiske bærere. Egnede dispergerings- eller
- 30 suspensjonsmidler for vandige suspensjoner inkluderer syntetiske og naturlige gummier som tragant, akasia, alginat, dekstran, natriumkarboksymetylcellulose, metylcellulose, polyvinylpyrrolidon eller gelatin.

- Behandling av lidelser mediert av melanokortinreseptoren som beskrevet her kan også
- 35 gjennomføres ved bruk av et farmasøytisk preparat omfattende en hvilken som helst av forbindelsene som definert her og en farmasøytisk akseptabel bærer. Det ikke-topiske, farmasøytiske preparat kan inneholde mellom rundt 0,01 og 100 mg, fortrinnsvis rundt

5 til 50 mg, av forbindelsen og kan tildannes til en hvilken som helst form som er egnet for den valgte administreringsmodus. Bærere inkluderer nødvendige og inerte farmasøytiske eksipienter, inkludert, men ikke begrenset til, binde-, suspenderings-, smøre- eller smaksmidler, søtnere, preservativer, farvestoffer og belegg. Preparater egnet for oral administrering inkluderer faste former som piller, tabletter, caplets, kapsler (hver inneholdende formuleringer for umiddelbar, tidsstyrt eller opprettholdt frigivning), granuler og pulvere, samt flytende former som oppløsninger, siruper, eliksirer, emulsjoner og suspensjoner. Former som er brukbare for parenteral administrering inkluderer sterile oppløsninger, emulsjoner og suspensjoner.

Fortrinnsvis kan forbindelsene ifølge oppfinnelsen administreres i en enkelt daglig dose, eller den totale, daglige dose kan administreres i oppdelte doser på to, tre eller fire ganger daglig. Videre kan forbindelsene ifølge oppfinnelsen administreres i intranasal form via topisk bruk av egnede, intranasale bærere, eller via transdermale hudputer som er velkjente for fagfolk på området. For administrering i form av et transdermalt avleveringssystem vil doseringsadministreringen selvfølgelig være kontinuerlig heller enn intermitterende under doseringsregimet.

For oral administrering i form av en tablett eller kapsel kan for eksempel den aktive medikamentkomponent kombineres med en oral, ikke-toksisk, farmasøytisk akseptabel inert bærer som etanol, glycerol, vann og lignende. Videre, og hvis ønskelig eller nødvendig, kan egnede bindemidler, smøremidler, disintegreringsmidler eller farvestoffer også innarbeides i blandingen. Egnede bindemidler inkluderer, uten begrensning, stivelse, gelatin, naturlige sukkere som glukose eller β -laktose, maissøtnere, naturlige og syntetiske gummier som akasia, tragant eller natriumoleat, natriumstearat, magnesiumstearat, natriumbenzoat, natriumacetat, natriumklorid og lignende. Disintegratorer inkluderer, uten begrensning, stivelse, metylcellulose, agar, bentonitt, xantangummi og lignende.

De flytende former i egnede smakssatte suspenderings- eller dispergeringsmidler som de syntetiske og naturlige gummier, for eksempel tragant, akasia, metylcellulose og lignende. For parenteral administrering er det ønskelig med sterile suspensjoner og oppløsninger. Isotoniske preparater som generelt inneholder egnede preservativer benyttes når det er ønskelig med intravenøs administrering.

Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan også administreres i form av liposomavleveringssystemer, som for eksempel små unilamellære vesikler, store

unilamellære vesikler og multilamellære vesikler. Liposomer kan tildannes fra et antall fosfolipider, som kolesterol, stearylamin eller fosfatidylkolin.

- Forbindelser ifølge oppfinnelsen kan også avleveres ved bruk av monoklonale antistoffer som individuelle bærere hvortil forbindelsesmolekylene er koblet. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan også kobles med egnede polymerer som innsiktbare medikamentbærere. Slike polymerer kan inkludere polyvinylpyrrolidon, pyrankopolymer, polyhydroksypropylmetakrylamidfenol, polyhydroksyetylaspartamidfenol eller polyetyl enoksidpolylysin substituert med palmitoylrest.
- Videre kan forbindelsene ifølge oppfinnelsen være koblet til en klasse av bionedbrytbare polymerer som er brukbare for å oppnå kontrollert frigivning av et medikament, for eksempel polymelkesyre, polyepsilonkaprolakton, polyhydroksysmørsyre, polyortoestere, polyacetaler, polydihydropyraner, polycyanoakrylater og fornettede eller amfipatiske blokk kopolymerer av hydrogeler.

- Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan administreres i et hvilket som helst av de foregående preparater og i henhold til doseringsregimer som er veletablerte i teknikken uansett om det er nødvendig med behandling av lidelser som er medierte av en melanokortinreseptor.

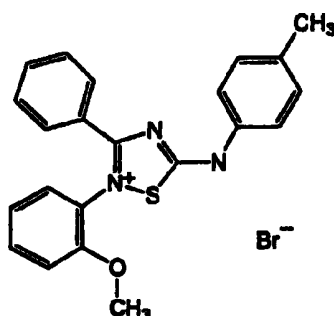
- Den daglige dose av produktene kan varieres over et vidt spektrum fra 0,01 til 1000 mg per voksen person per dag. For oral administrering blir preparatene fortrinnsvis tilveiebragt i form av tabletter inneholdende 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 150, 200, 250 og 500 mg aktiv bestanddel for den symptomatiske justering av dosen til pasienten som behandles. En effektiv mengde av medikamentet tilføres vanligvis i dosenivåer fra rundt 0,01 til rundt 100 mg per kg kroppsvekt per dag. Fortrinnsvis ligger området fra rundt 0,03 til rundt 10 mg per kg kroppsvekt per dag. Forbindelsene kan administreres i et regime fra 1 til 4 ganger per dag.

- Optimal dosering for administrering kan lett bestemmes av fagmannen og vil variere med den spesielle benyttede forbindelse, administreringsmodus, preparatstyrke og sykdommens tilstand. I tillegg vil faktorer assosiert med den spesielle pasient som behandles, inkludert alder, vekt, diett og administreringstid, kunne nødvendiggjøre justering av doseringene.

- De følgende eksempler skal lette forståelsen av oppfinnelsen og er ikke på noen måte ment å begrense den utover det som er angitt i kravene nedenfor.

EKSEMPEL 12-(2-metoksyfenyl)-3-fenyl-5-p-tolylamino-[1,2,4]tiadiazol-2-iumForbindelse # 31

5



TRINN A:

- 10 En blanding av *o*-anisidin (15,0 g, 121,8 mmol) og 50 vekt-% natriumamidsuspensjon i toluen (11,40 g, 146,2 mmol) i 200 ml vannfritt toluen ble omrørt i 1 time ved romtemperatur. Til blandingen ble det satt benzonitril (9,86 ml, 96,6 mmol) og det hele ble oppvarmet under tilbaketilbake i 16 timer. Reaksjonsblanding ble avkjølt og 150 ml 1,0N HCl ble tilsatt for å quenche reaksjonen. Aktivert karbon ble tilsatt og
- 15 reaksjonsblanding ble filtrert gjennom en celittpute. pH-verdien i blandingen ble justert til rundt 14 ved tilsetning av 200 ml 1,0N NaOH. Det vandige sjikt ble ekstrahert med 3 x 150 ml kloroform. Det kombinerte, organiske sjikt ble tørket over vannfri MgSO₄ og fordampet. Det resulterende faststoff ble vasket med heksan og tørket under vakuum og man oppnådde produktet som et blekt hvitt faststoff.

20

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) TM 3,83 (s, 3H), 4,79 (s, 2H), 6,96 (m, 3H), 7,04 (m, 1H), 7,43 (m, 3H), 7,93 (d, 2H)
MS (APCI, MH⁺) 227

25 TRINN B:

- En blanding av N-arylbenzamidin (3,0 g, 13,27 mmol), fremstilt som i trinn A, og 4-tolylisotiocyanat (2,18 g, 14,60) i 30 ml vannfri kloroform ble oppvarmet under tilbaketilbake i 16 timer. Reaksjonsblanding ble avkjølt og oppløsningsmidlet fordampet. Den resulterende rest ble rensert ved flash kolonnekromatografi med en mobilfase på
- 30 25% heksan i diklormetan. De kombinerte fraksjonene ble fordampet og det resulterende faststoff tørket under vakuum for å gi produktet som et gult faststoff.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2,36 (s, 3H), 3,66 (s, 3H), 6,76 (m, 1H), 6,97 (t, 1H), 7,17-7,39 (m, 7H), 7,47 (d, 2H), 7,60 (d, 2H), 8,20 (s, 1H), 14,18 (s, 1H)
MS (ES, MH^+) 376,29

5

TRINN C:

Til oppløsningen av tiourea (2,90 g, 7,73 mmol), fremstilt som i trinn B, i 15 ml vannfri kloroform ble det langsomt satt brom (438 μl , 8,51 mmol). Etter omrøring i 16 timer, ble oppløsningsmidlet fordampet. Det resulterende faststoff ble vasket med vannfri
10 etyleter. Det urene produkt ble omkrystallisert fra 20% vann i etanol og man oppnådde produktet som et gult faststoff.

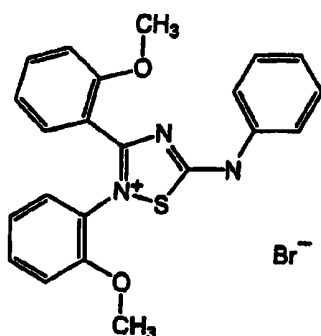
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2,39 (s, 3H), 3,66 (s, 3H), 6,96 (d, 1H), 7,06 (t, 1H), 7,20-8,07 (m, 7H), 7,61 (d, 2H), 7,80 (d, 2H), 12,40 (s, 1H)
15 MS (ES, MH^+) 374,25

EKSEMPEL 2

2-(2-metoksyfenyl)-3-(2-metoksyfenyl)-5-fenylamino-[1,2,4]tiadiazol-2-ium

Forbindelse # 74

20

**TRINN A:**

25 En blanding av *o*-anisidin (13,5 g, 110,0 mmol) og 50 vekt-% natriumamidsuspensjon i toluen (9,40 g, 120,0 mmol) i 200 ml vannfri toluen ble omrørt i 1 time ved romtemperatur. Til blandingen ble det satt 2-metoksybenzonitril (16 ml, 131,0 mmol) og reaksjonsblandingen ble oppvarmet under tilbakeløp i 16 timer.
Reaksjonsblandingen ble avkjølt og 150 ml 1,0N HCl ble tilsatt for å quenche
30 reaksjonen. Aktivert karbon ble tilsatt og reaksjonsblandingen filtrert gjennom en

- celittpute. pH-verdien i blandingen ble justert til rundt 14 ved tilsetning av 200 ml 1,0N NaOH. Det vandige sjikt ble ekstrahert med 3 x 150 ml kloroform. De kombinere, organiske sjikt ble tørket over vannfri MgSO_4 og fordampet. Det resulterende faststoff ble vasket med heksan og tørket under vakuum og man oppnådde produktet som et
- 5 blekt hvitt faststoff.
MS (APCI, MH^+) 257

TRINN B:

- En blanding av N-arylbenzamidin (15,5 g, 60,6 mmol), fremstilt som i trinn A, og
- 10 fenylisotiocyanat (8,70 ml, 72,7 mmol) i 30 ml vannfri kloroform ble oppvarmet til 45°C i 16 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt og oppløsningsmidlet fordampet. Den resulterende rest ble rensset ved flash kolonnekromatografi med en mobil fase av 25% heksan i diklormetan. De kombinerte fraksjoner ble fordampet og det resulterende faststoff tørket under vakuum for å gi produktet som et gult faststoff.
- 15 MS (ES, MH^+) 391,50

TRINN C:

- Til en oppløsning av tiourea (12,95 g, 33,1 mmol), fremstilt som i trinn B, i 15 ml vandig kloroform, ble det langsomt satt brom (1,78 ml, 34,75 mmol). Etter omrøring i
- 20 16 timer ble oppløsningsmidlet fordampet. Det resulterende faststoff ble vasket med vannfri etyleter. Det urene produkt ble omkrystallisert fra 20% vann i etanol og man oppnådde produktet som et gult faststoff.
- MS (ES, MH^+) 390,1

- 25 Ved å følge prosedyrene som beskrevet her ble representative forbindelser med formel (I) ifølge oppfinnelsen fremstilt som oppsummert i Tabell 1.

TABELL 1

ID nr.	R^1	R^2	R^3	R^4
1	4-metylfenyl	fenyl	H	4-metoksyfenyl
2	4-metylfenyl	fenyl	H	fenyl

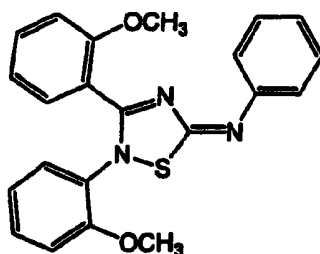
3	4-metylfenyl	fenyl	H	2-metoksyfenyl
4	4-metylfenyl	fenyl	H	4-metylfenyl
5	4-metylfenyl	fenyl	H	2-metylfenyl
6	4-metylfenyl	fenyl	H	4-klorfenyl
7	4-metylfenyl	fenyl	H	2-klorfenyl
8	2-metylfenyl	fenyl	H	fenyl
9	2-metylfenyl	fenyl	H	4-metoksyfenyl
10	2-metylfenyl	fenyl	H	2-metoksyfenyl
11	2-metylfenyl	fenyl	H	4-metylfenyl
12	2-metylfenyl	fenyl	H	2-metylfenyl
13	2-metylfenyl	fenyl	H	4-klorfenyl
14	2-metylfenyl	fenyl	H	2-klorfenyl
15	4-klorfenyl	fenyl	H	fenyl
16	4-klorfenyl	fenyl	H	4-metoksyfenyl
17	4-klorfenyl	fenyl	H	2-metoksyfenyl
18	4-klorfenyl	fenyl	H	4-metylfenyl
19	4-klorfenyl	fenyl	H	2-metylfenyl
20	4-klorfenyl	fenyl	H	4-klorfenyl
21	4-klorfenyl	fenyl	H	2-klorfenyl
22	fenyl	fenyl	H	fenyl
23	fenyl	fenyl	H	4-metoksyfenyl
24	fenyl	fenyl	H	2-metoksyfenyl
25	fenyl	fenyl	H	4-metylfenyl
26	fenyl	fenyl	H	2-metylfenyl
27	fenyl	fenyl	H	4-klorfenyl
28	2-metoksyfenyl	fenyl	H	fenyl
29	2-metoksyfenyl	fenyl	H	4-metoksyfenyl
30	2-metoksyfenyl	fenyl	H	2-metoksyfenyl
31	2-metoksyfenyl	fenyl	H	4-metylfenyl
32	2-metoksyfenyl	fenyl	H	2-metylfenyl
33	2-metoksyfenyl	fenyl	H	4-klorfenyl
34	2-metoksyfenyl	fenyl	H	2-klorfenyl
35	4-metoksyfenyl	fenyl	H	fenyl
36	4-metoksyfenyl	fenyl	H	4-metoksyfenyl
37	4-metoksyfenyl	fenyl	H	2-metoksyfenyl
38	4-metoksyfenyl	fenyl	H	4-metylfenyl

39	4-metoksyfenyl	fenyl	H	2-metylfenyl
40	4-metoksyfenyl	fenyl	H	4-klorfenyl
41	4-metoksyfenyl	fenyl	H	2-klorfenyl
42	2-klorfenyl	fenyl	H	fenyl
43	2-klorfenyl	fenyl	H	4-metoksyfenyl
44	2-klorfenyl	fenyl	H	2-metoksyfenyl
45	2-klorfenyl	fenyl	H	4-metylfenyl
46	2-klorfenyl	fenyl	H	2-metylfenyl
47	2-klorfenyl	fenyl	H	4-klorfenyl
48	2-klorfenyl	fenyl	H	2-klorfenyl
49	fenyl	fenyl	H	2-klorfenyl
50	4-metylfenyl	fenyl	CH ₃	4-metoksyfenyl
51	fenyl	fenyl	H	4-metoksybenzyl
52	fenyl	fenyl	H	2-metoksybenzyl
53	fenyl	fenyl	H	4-metylbenzyl
54	fenyl	fenyl	H	2-metylbenzyl
55	fenyl	fenyl	H	4-klorbenzyl
56	fenyl	fenyl	H	2-klorbenzyl
57	4-metoksyfenyl	4-metoksyfenyl	H	fenyl
58	4-metoksyfenyl	4-metoksyfenyl	H	4-metoksyfenyl
59	4-metoksyfenyl	4-metoksyfenyl	H	2-metoksyfenyl
60	4-metoksyfenyl	4-metoksyfenyl	H	4-metylfenyl
61	4-metoksyfenyl	4-metoksyfenyl	H	2-metylfenyl
62	4-metoksyfenyl	4-metoksyfenyl	H	4-klorfenyl
63	4-metoksyfenyl	4-metoksyfenyl	H	2-klorfenyl
64	4-metoksyfenyl	4-metoksyfenyl	H	3-pyridyl
65	2-metoksyfenyl	4-metylfenyl	H	fenyl
66	2-metoksyfenyl	4-metylfenyl	H	4-metoksyfenyl
67	2-metoksyfenyl	4-metylfenyl	H	2-metoksyfenyl
68	2-metoksyfenyl	4-metylfenyl	H	4-metylfenyl
69	2-metoksyfenyl	4-metylfenyl	H	2-metylfenyl
70	2-metoksyfenyl	4-metylfenyl	H	4-klorfenyl
71	2-metoksyfenyl	4-metylfenyl	H	2-klorfenyl
72	2-metoksyfenyl	4-metylfenyl	H	3-pyridyl
73	2-metoksyfenyl	fenyl	H	3-pyridyl
74	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	H	fenyl

75	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	H	4-metoksyfenyl
76	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	H	2-metoksyfenyl
77	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	H	4-metylphenyl
78	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	H	2-metylphenyl
79	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	H	4-klorfenyl
80	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	H	2-klorfenyl
81	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	H	3-pyridyl
84	fenyl	fenyl	H	benzyl
85	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	H	4-bromfenyl
86	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	H	2,6-difluorfenyl
87	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	H	2-klor-6-metylphenyl
88	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	H	3,5-difluorfenyl

EKSEMPEL 32-(2-metoksyfenyl)-3-(2-metoksyfenyl)-5-fenylamino-[1,2,4]-tiadiazolForbindelse # 89

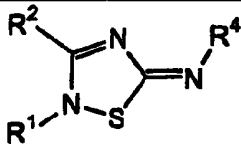
5



- Til en oppløsning av forbindelsen fremstilt som i trinn B i Eksempel 2 (0,921 g, 2,36 mmol) i 10 ml vannfri kloroform ble det satt N-klorosuccinimid (326 mg, 2,71 mmol). Reaksjonsblandingen ble så omrørt i 16 timer, røringen stanset og det hele ble vasket to ganger med vandig NaHCO₃. Det organiske sjikt ble tørket over magnesiumsulfat og det gjenværende oppløsningsmiddel fjernet under vakuum for å gi tittelforbindelsen som et faststoff.
- MS (ES, MH⁺) 390,1

Ved å følge prosedyrene som beskrevet ovenfor, ble det fremstilt representative forbindelser med formel (II) ifølge oppfinnelsen som oppsummert i Tabell 2.

TABELL 2

 (II)			
ID nr.	R ¹	R ²	R ⁴
82	4-metylfenyl	fenyl	fenyl
83	4-metylfenyl	fenyl	4-metoksyfenyl
89	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	fenyl
90	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	2,6-difluorfenyl
91	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	2-klor-6-metylfenyl
92	2-metoksyfenyl	2-metoksyfenyl	3,5-difluorfenyl

Hvis ikke annet er sagt, ble NMR-spektra målt på et Bruker Avance 300 MHz NMR
 5 spektrometer. Hvis ikke annet er sagt, ble molekylvektene målt ved bruk av et
 Micromass LC plattform elektrospray massespektrometer, som oppsummert i Tabell 3.

TABELL 3

ID nr.	MW1 (som +ion)	MW2 (w/Br-)	Målt MW
1	374.49	454.39	374.0
2	344.46	424.36	344.0
3	374.49	454.39	374.3
4	358.49	438.39	358.3
5	358.49	438.39	358.4
6	378.91	458.81	378.1, 380.3
7	378.91	458.81	378.2, 380.2
8	344.46	424.36	344.3
9	374.49	454.39	374.2
10	374.49	454.39	374.2
11	358.49	438.39	358.3
12	358.49	438.39	358.3
13	378.91	458.81	378.2, 380.2
14	378.91	458.81	378.2, 380.2
15	364.88	444.78	346.2, 366.2
16	394.90	474.81	394.1, 396.1
17	394.90	474.81	394.1, 396.1
18	378.91	458.81	378.2, 380.2
19	378.91	458.81	378.2, 380.2
20	399.32	479.23	398.1, 400.1
21	399.32	479.23	398.1, 400.0
22	330.43	410.34	330.3
23	360.46	440.37	360.3
24	360.46	440.37	360.3
25	344.46	424.37	344.4

26	344.46	424.37	344.3
27	364.88	444.78	364.2, 366.2
28	360.46	440.37	360.3
29	390.49	470.39	390.2
30	390.49	470.39	390.2
31	374.49	454.39	374.3
32	374.49	454.39	374.3
33	394.90	474.81	394.1, 396.1
34	394.90	474.81	394.1, 396.1
35	360.46	440.37	360.3
36	390.49	470.39	390.3
37	390.49	470.39	390.3
38	374.49	454.39	374.3
39	374.49	454.39	374.3
40	394.90	474.81	394.2, 396.2
41	394.90	474.81	394.2, 396.2
42	364.88	444.78	364.3, 366.3
43	394.90	474.81	394.2, 396.2
44	394.90	474.81	394.2, 396.2
45	378.91	458.81	378.2, 380.2
46	378.91	458.81	378.2, 380.2
47	399.32	479.23	398.1, 400.1
48	399.32	479.23	398.1, 400.1
49	364.88	444.78	364.2, 366.2
50	388.51	537.58	388.3
51	374.49	454.39	374.3
52	374.49	454.39	374.3
53	358.49	438.39	358.4
54	358.49	438.39	358.4
55	378.91	458.81	378.3, 380.3
56	378.91	458.81	378.3, 380.3
57	390.49	470.39	390.1

58	420.51	500.42	420.1
59	420.51	500.42	420.1
60	404.51	484.42	404.1
61	404.51	484.42	404.0
62	424.93	504.83	424.0, 426.0
63	424.93	504.83	424.0, 426.0
64	391.47	471.38	391.0
65	374.49	454.39	374.2
66	404.51	484.42	404.2
67	404.51	484.42	404.1
68	388.51	468.42	388.3
69	388.51	468.42	388.2
70	408.93	488.84	408.6, 410.0
71	408.93	488.84	408.1, 410.0
72	375.47	455.38	375.2
73	361.45	441.35	361.
74	390.49	470.39	390.2
75	420.51	500.42	420.2
76	420.51	500.42	420.2
77	404.51	484.42	404.1
78	404.51	484.42	404.1
79	424.93	504.84	424.1, 426.1
80	424.93	504.84	424.1, 426.1
81	391.47	471.38	391.1
82	343.45		344.3
83	373.48		374.3
84	344.46	424.36	344.3
85	469.38	549.29	
86	426.5	506.4	426.3
87	439.0	518.9	438.3, 440.3
88	426.5	506.4	426.2
89	389.5		390.1

90	425.5		426.2
91	437.9		438.3, 440.3
92	425.5		426.2

EKSEMPEL 4**Melanokortin MC-4 reseptorbindingsanalyse**

5

Melanokortin [MC-4]-membran (ervert fra Reseptor Biology Inc.) ble koblet til hvetegerm agglutininbelagt polyvinyl toluen-scintillasjons Proximity Assay kuler (ervert fra Amersham Pharmacia Inc.) i 30 minutter ved 25°C. Inn i hver brønn av en 96-brønners optiplate (ervert fra Packard, CA), ble 2,5 µg membran og 0,25 mg kuler

10 blandet i et volum på 100 µl medium. Dette medium var 50 mM HEPES, pH 7,4, inneholdende 0,1% bovinserumalbumin, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ og proteaseinhibitorer. 1,5 µl av testforbindelsen ved 1 mM i 30% DMSO-50 mM HEPES, pH 7,4 buffer, ble satt til separate brønner på platen. Radioaktiv ligand ¹²⁵I-NDP-melanocyttstimulerende hormon (NEN, 2000 Ci/mmol) ble satt til hver brønn (48,5 µl

15 per brønn, 40 pM sluttkonsentrasjon). Platen ble så forseglet og satt hen i 16 timer ved 25°C. NDP-melanocyttstimulerende hormonpeptid og α-melanocyttstimulerende hormonpeptid (ervert fra Palomar Research Inc., 1 mM) ble benyttet som referanse inhibitorforbindelser for å definere ikke-spesifikk binding (N). Den totale binding ble definert ved bruk av 30% DMSO-50 mM HEPES, pH 7,4 buffer. Bundet radioaktivitet

20 for hver brønn (Y), målt som tellinger per minutt (cpm) ble målt i en TopCount (Packard, CA). Prosent inhibering ble beregnet som:

$$[(T - Y) / (T - N)] * 100\%$$

25

EKSEMPEL 5**Cyklisk-adenosin monofosfat [cAMP] stimuleringsanalyse**

Human Bowes melanomceller som uttrykker human melanokortin MC-4 reseptor ble dyrket til konfluens på en 24-brønners kulturplate. Vekstmediet ble kassert og til hver

30 brønn ble det satt 0,5 ml Hanks oppløsning. Testforbindelsen ble satt til brønnene på en 96-brønners plate. NDP-melanocyttstimulerende hormonpeptid (1 µM) ble tilsatt til de positive kontrollbrønner, mens de negative kontrollbrønner mottok bærer som 30% DMSO-50 mM HEPES, pH 7,4 buffer. Platen ble inkubert ved 37°C og 5% CO₂ i 30 minutter. Supernatanten ble kassert og cellene vasket to ganger med Hanks oppløsning.

0,5 ml 80% etanol ble satt til hver brønn og platene inkubert ved 4°C i 30 minutter. Innholdet av cyklisk AMP ble målt ved bruk av NEN Flashplate settet (NEN). En melanokortinreseptoragonist er definert som en testforbindelse som resulterte i en økning i cAMP-produksjonen i denne analyse.

5

EKSEMPEL 6

G-protein aktiveringsanalyse

For hver analyse ble membraner som uttrykker melanokortin MC-4 reseptoren (5 µg) inkubert i 5 minutter ved 25°C med 0,5 nM ^{35}S -GTPγS i 100 µl 25 mM HEPES buffer, pH 7,5 inneholdende 100 mM NaCl, proteaseinhibitorer, 0,5 µM 2-merkapttoetanol, 1 mM MgCl₂ sammen med testforbindelsen, 1 µM NDP-melanocytststimulerende hormon eller en kombinasjon av NDP-melanocytststimulerende hormon og testforbindelsen. Basal ^{35}S -GTPγS binding ble definert ved 10 mM HEPES, pH 7,4 buffer inneholdende 15 30% DMSO. Reaksjonen ble avsluttet ved tilsetning av 50 µl termineringsbuffer inneholdende 25 mM HEPES, pH 7,5, 20 mM MgCl₂, proteaseinhibitorer, 100 µM GDP, 100 µM GTP, 5 mM 2-merkapttoetanol med detergenter (0,5% digitonin, 0,2% natriumdeoksykholat og 0,5% NP-40). Membranene ble oppløseliggjort i 30 minutter ved 25°C. ^{35}S -GTPγS bundet Gαs-protein ble immunopresipitert ved bruk av anti-Gαs 20 (0,5 µg) som bandt til anti-kanin IgG protein A konjugert SPA. Bundet radioaktivitet ble målt i en TopCount (Packard). Ikke-spesifikk ^{35}S -GTPγS binding ble definert ved ^{35}S -GTPγS immunopresipitert ved vanlig kanin IgG (0,5 µg).

Basal binding (B)	=	midlere tellinger per minutt (cpm)
25		immunopresipitert med anti-Gαs.
Ikke-spesifikk binding (NSB) =		midlere cpm immunopresipitert med normal kanin IgG.
Spesifikk basal binding (SB) =		B-NSB
Cpm i hver brønn	=	C
30 Netto cpm i hver brønn (N) =		C-NSB
% stimulering	=	$[(N-SB)/SB] \times 100\%$

Prosedyrene som beskrevet ovenfor for melanokortin MC-4 reseptorene ble gjentatt for melanokortin MC-3 reseptoren. Ved å følge prosedyrene som beskrevet ble 35 representative forbindelser ifølge oppfinnelsen testet på binding i MC-4 og/eller MC-3 analysen som oppsummert i Tabell 4.

TABELL 4

ID nr.	IC ₅₀ MC-4 (μM) (Filtrering)	IC ₅₀ MC-4 (nM) (SPA)
1	1.1	174
2	1.5	234
3	0.7	159
4	inaktiv	297
5	1.3	207
6	2.5	293
7	2.2	218
8	1.4	201
9	1.1	217
10	2.3	130(90)
11	2.4	243
12	uoppløselig	uoppløselig
13	3.4	347
14	5.6	234
15	4.5	482
16	4.3	424
17	7.7	351
18	6.0	463
19	3.9	460
20	3.5	636

21	7.8	392
22		124
23		124
24		76
25		57
26		63
27		89
28		68
29		48
30		103
31		22
32		48
33		91
34		46
35		100
36		79
37		72
38		159
39		146
40		133
41		483
42		482
43		237
44		89
45		246
46		368
47		874
48		444
49		96
50		30,000
51		1,000
52		1,000

53		1,000
54		800
55		800
56		3,000
57		inaktiv
58		inaktiv
59		inaktiv
60		inaktiv
61		inaktiv
62		inaktiv
63		1,000
64		1,200
65		114
66		120
67		130
68		110
69		139
70		566
71		234
72		155
73		725
74		194
75		103
76		332
77		4.4
78		99
79		216
80		378
81		672
82	1.5	826
83	1.9	833
84	82 nm	

EKSEMPEL 7Gnagermating: Næringsinntak i næringsberøvede rotter (MC-4)

Long-Evans hannrotter med vekt 180 til 200 g ble huset individuelt og holdt på en matplan med foring en gang per dag (det vil si, 10 a.m. inntil 4 p.m.) i fem dager etter karantene for å tillate dyrene akklimatisering til føde på pulverformig chow (#5002 PMI Certified Rodent Meal) i løpet av den tilskrevne tid. Denne chow ble gjort tilgjengelig i en åpen beholder, forankret til buret med en tråd, med en metallfølger som dekket næringen for å minimalisere spill. Vann var tilgjengelig ad libitum.

10

Dyrene ble fastet 18 timer før testing. Ved slutten av fasteperioden ble dyrene administrert enten en testforbindelse eller en bærer. Bærer og testforbindelse ble administrert enten oralt (5 ml/kg) 60 minutter før forsøket, subkutan (1 ml/kg) 30 minutter før forsøket, eller intraperitonealt (1 ml/kg) 30 minutter før forsøket.

15

Testforbindelsene ble administrert oralt som en suspensjon i vandig 0,5% metylcellulose-0,4% Tween 80, eller intraperitonealt som en oppløsning eller suspensjon i PEG 200; forbindelseskonsentrasjonene lå karakteristisk fra 1 mg/kg til 100 mg/kg og fortrinnsvis fra 10-30 mg/kg. Næringsinntaket ble målt ved 2, 4 henholdsvis 6 timer etter administrering ved veiing av den spesielle beholder inneholdende næringen før forsøket og til de spesifiserte tider. Etter ferdig forsøk, ble alle dyr gitt en en-ukes utvaskingsperiode før nye forsøk.

20

Ved å følge prosedyren som beskrevet ovenfor ble utvalgte forbindelser ifølge oppfinnelsen testet for å måle effekten på næringsinntaket hos fastende rotter som oppsummert i tabellene 5 og 6.

25

TABELL 5

ID nr.	[mg/kg] administreringsmåte	Næringsinntak 0-2 timer	Næringsinntak 2-6 timer
PEG-200	ip	8,25 g	13,38 g
1	10 µ, ip	7,29 g	8,43 g

TABELL 6

ID nr.	[mg/kg] administreringsmåte	Forandring i næringsinntak 0,2 timer (%)	Forandring i næringsinntak 2-6 timer (%)
MCT kontroll	po	0	0
PEG-200	ip	0	0
1	10, ip	-11,60%	-37,00%
1	30, po	-21,2	-6,7
84	10, ip	-7	-24,5
84	10, ip	3,9	-17,8
84	30, po	-7	32
26	10, ip	-12,7	-32,3
27	30, ip	-27,4	-29,1
29	30, po	-26,3	-3,7
29	10, ip	-62,3	-70,7
31	3, ip	-37,8	-50
31	1, ip	-20,6	-71,2
31	30, po	-23,6	31,5
31	10, po	-10,1	39,7
31	3, po	-9	52,1
31	1, po	1,2	19,5
32	10, ip	-29,6	-60,2
32	30, po	-12,5	-15
32	10, po	-20	-1
32	3, po	-11,5	31,17
32	1, po	-13,8	26
34	10, ip	-38	-72
34	30, po	-7,5	2
34	10, po	-1,3	-6
49	30, ip	-20,6	-21,2

EKSEMPEL 8**Neurittcelleutvekst analyse****Cellekultur:**

- 5 Dissosierte hippocampale og kortikale cellekulturer ble etablert fra embryoniske dag 18 rottefötuser som beskrevet av Mattson, M. P., Barger, S. W., Begley, J., og Mark, R. J., *Methods Cell Biol.*, 1994, 46:087-216. Kort sagt ble føtusene fjernet via keisersnitt fra svangre mødre (Sprague-Dawley) og anestesisert med halotan i henhold til AVMA panelet på eutanasi. Ungene ble dekapitert, og hjernene fjernet og anbragt i HEPES-
- 10 bufret Hanks balanserte saltoppløsning (HBSS; Gibco). Hippocampi og cortiser ble dissekert ut og samlet i henhold til vevstype. Vevet ble tryptinisert i 15 minutter (1 mg/ml trypsin-HBSS; Worthington), skyllet med frisk HBSS, inkubert i trypsininhibitor (1 mg/ml; Sigma) i 5 minutter, skyllet igjen med frisk HBSS og så trituret i 1 ml frisk HBSS med en flammepolert glasspipette. Dissosierte celler ble sådd ut med 30.000
- 15 celler per brønn på poly-D-lysin-belagte 96-brønners plater (Collaborative BioScience). Hver brønn inneholdt 100 µl Eagles minimale essensielle medium (MEM; Gibco) supplert med 26 mM NaHCO₃ (Sigma), 56 mM glukose (Sigma), 15 mM KCl (Sigma), 1 mM natriumpyruvat (Sigma), 1,1 mM L-glutamin (Sigma), 10% (volum/volum) varmeinaktivert fetalbovinserum (Hyclone) og 0,001% gentamicinsulfat (Sigma) (pH
- 20 7,4). Cellene ble tillatt festing i 24 timer i en fuktet 37°C 5% CO₂ inkubator før den eksperimentelle behandling. Kulturmediet ble aspirert og byttet ut med friske media hver tredje dag.

Analyse:

- 25 24 timer etter at de var bragt på plate ble kulturene behandlet med bærer (PBS+0,1% BSA), α -melanocyttstimulerende hormon (α -MSH) eller testforbindelse (fortynnet i DPBS). Hver behandlingstilstand ble kjørt i kvadruplikat. På tredje dag i kultur ble media sugd av og erstattet med frisk media og testforbindelse. Etter en uke i kultur ble cellene fiksert med 10% fosfatbufret formalin i 15 minutter og så skyllet med DPBS
- 30 (Sigma) og anbragt i blokkerende serum i 30 minutter (hesteserum; 1:50 fortynning i DPBS; Vector Labs). Kulturene ble skyllet igjen med DPBS og så inkubert i primært antistoff i 2 timer (mikrotubulassosiert protein-2 (MAP-2) er en selektiv markør for dendritiske prosesser; anti-muse monoklonal (Chemicon); 1:1000 fortynning av MAP-2 i antistoffdiluent (Zymed)). Negative kontrollbrønner ble inkubert i antistoffdiluent
- 35 alene. Bakgrunnssignalet ble bestemt ved blanke brønner (cellefrie) inkubert med eller uten antistoff. Kulturer ble skyllet igjen med DPBS og så anbragt i fluorescein i 1 time (FITC; anti-muse IgG; rotteadsorbent; 1:50 fortynning i DPBS; Vector Labs). Kulturene

ble skyllet en siste gang med DPBS og platene så avlest på en Cytofluor 4000 fluorescens plateleser. Neurittutvekst ble uttrykt som prosent forandring fra kontrollen (bærer).

- 5 Valgte forbindelser ifølge oppfinnelsen ble testet i analysen ovenfor med de resultater som er oppsummert i Tabell 7. Data er uttrykt som prosent forandring i forhold til vehikkelresponsen. Alle forbindelser ble avsøkt ved 50 nM. Forkortelsen NA antyder ingen forandring/ikke aktiv; forkortelsen ND indikerer at forbindelsen ikke ble testet/responsen ikke bestemt.

10

TABELL 7: Neurittutvekst

Forb.nr.	Hippocamp.cell.	Kortikal cell.
Vehikkel	19%	4%
1	6%	NA
2	18%	18%
3	17%	23%
4	20%	21%

15

5	28%	9%
6	23%	24%
7	NA	11%
8	NA	12%
9	NA	NA
10	7%	11%
11	9%	10%
12	28%	20%
13	29%	32%
14	30%	19%
15	18%	31%
16	8%	18%
17	8%	17%
18	17%	17%
19	22%	NA
20	17%	NA
21	27%	2%
22	NA	30%
23	10%	20%
24	10%	16%
25	NA	23%
26	16%	47%
27	17%	52%
28	NA	25%
29	NA	8%
30	NA	NA
31	NA	16%
32	NA	6%
33	NA	21%
34	NA	22%
35	NA	28%
36	NA	16%

37	NA	26%
38	NA	NA
39	NA	ND
40	26%	NA
41	36%	5%
42	26%	NA
43	30%	37%
44	43%	19%
45	46%	25%
46	40%	19%
47	20%	13%
48	NA	19%
49	16%	51%
50	46%	NA
51	74%	28%
52	65%	NA
53	67%	NA
54	45%	NA
55	19%	NA
56	33%	NA
57	9%	NA
58	72%	10%
59	61%	21%
60	66%	14%
61	66%	17%
62	13%	13%
63	20%	17%
64	22%	12%
82	14%	15%
83	11%	9%
84	ND	17%

Dataene ovenfor viser at kulturer testet med valgte forbindelser ifølge oppfinnelsen resulterte i en signifikant økning i neurittutveksten målt ved MAP2-FITC immunofluorescens. En sammenligning mellom testforbindelsen og α -MSH antyder at mange av testforbindelsene var overlegne α -MSH når det gjelder å fremme
 5 neurittutvekst ved de testede konsentrasjoner. I tillegg viste flere av testforbindelsene selektive effekter på neurittutvekst i hippocampale eller kortikale celler.

EKSEMPEL 9

In vivo facial nervekompresjonsmodell

10

Evnen til å teste forbindelsen for å gi neuroprotektive eller neuroregenerative effekter ble undersøkt i en facial nervekompresjonsmodell. Facial nervemotoraksoner stammer utelukkende fra neuroner i "pons" i en veldefinert nucleus. Facial nervekompresjonen resulterer i retrogradreaksjoner proksimalt til lesjonsetet og en walleriansk degenerering
 15 ved dens distale del, som forårsaker redusert whisker-bevegelse på lesjonssiden.

Long-Evans hannrotter med kroppsvekt 150 til 180 g ble anestesisert med 3-5% isofloran for induksjon og 2% for opprettholdelse under kirurgiske prosedyrer. Den høyre faciale nerve ble eksponert og komprimert med pinsetter i 30 sekunder ved
 20 uttreden fra den stylomastoide åpning. Den venstre faciale nerve ble skamoperert og tjente som indre kontroll. Nervekompresjon forårsaker paralysen av whisker-musklene, derfor den reduserte whisker-bevegelse på den lesjonerte side, som observeres umiddelbart etter anestesi opphører. De følgende morfologiske abnormaliteter forbundet med den funksjonelle defisitt ble observert:

25

- (1) en økning i antall perineuronale glialceller i facial nucleus på den lesjonerte siden, med økning observert til en topp rundt D3-6;
- (2) en tynnere myelinomhylling og mindre myelin basisk proteinfarving i den komprimerte facialnerve omtrent en uke etter lesjonen;
- 30 (3) morfologiske endringer rundt N-M forbindelsen og whisker follikkel-områder og gradvis degenerering av motoneuronene i facial nuclei.

Etter opphør av anestesi ble rottene vilkårlig delt i grupper for dosering med bærer, α -MSH eller testforbindelse, med 6 dyr per gruppe. α -MSH (s.c., 70 μ g per hver 48
 35 timer) ble benyttet som positiv kontroll. Testforbindelsene ble dosert p.o. ved 20 mg per kg bid i 14 dager. Gjenopprettelse av whisker-bevegelsene ble overvåket daglig etter operasjonen ved bruk av to kriterier:

- (1) frekvens av whisker-bevegelse på den lesjonerte side relativt den motsatte side (skamoperert) som tjente som ba sislinjekontroll;
- (2) semi-kvantitative målinger (0 til 4+) på styrken av whisker-musklene, karakteristikk basert på observasjoner av prosent andel bevegede whiskere, muskeltone i whisker-musklene og nesens posisjon. For alle observasjoner var forsøksoppsettet blindt for oppførselsobservatøren.

Resultatene av oppførselsbedømmelsen viste at begge testforbindelser, forbindelse nr. 31 og nr. 84, akselererte gjenvinningstiden for å gjenopprette whisker-muskelbevegelsen i de lesjonerte rotter sammenlignet med bærerkontrollene ($p < 0,05$). Gjenvinningsgraden for whisker-bevegelsen ble uttrykt som prosentandel av sin egen indre kontroll (skamoperert), som oppsummert i Tabell 8.

TABELL 8

Funksjonell gjenvinning av whisker-bevegelse etter oral administrering av forbindelse nr. 31 og nr. 84 ved facial nervekompresjonsmodellen

	Prosent gjenvinning					
	D9	D10	D11	D12	D13	D14
Ikke-lesjonert sete	100	100	100	100	100	100
Vehikkel	0	$5,0 \pm 6,8$	$27,6 \pm 15,9$	$72,5 \pm 21,2$	$86,4 \pm 14,5$	$91,3 \pm 8,3$
α -MSH	$2,0 \pm 2,8$	$24,6 \pm 15,8$	$60,1 \pm 19,3$	$93,8 \pm 14,0$	$98,1 \pm 5,3$	$100 \pm 0,0$
Forb. nr. 31 (246377)	0	$3,5 \pm 3,1$	$67,8 \pm 9,5$	$98,5 \pm 3,7$	$100 \pm 0,0$	$100 \pm 0,0$
Forb. nr. 84 (153791)	0	$4,8 \pm 4,3$	$35,1 \pm 12,9$	$90,0 \pm 10,9$	$98,3 \pm 4,1$	$100 \pm 0,0$

20

EKSEMPEL 10

In Vitro analyse: Måling av regulering av sebaciøs lipid syntese

TRINN A: Fremstilling av et matersjikt

- Semikonfluente kulturer av 3T3 muse-fibroblaster (Swiss Albino mus, ATCC CCL-92) ble behandlet med mitomycin C ($4 \mu\text{g/ml}$) i 3 timer, trypsinisert og sådd ut ved en densitet på $2,5 \times 10^5$ per $9,5 \text{ cm}^2$ vevkulturplate i Dulbeccos minimale essensielle

25

medium (DMEM) inneholdende 10% Colorado kalveserum, PNC (100 µ/ml), STM (100 µg/ml), L glutamin (0,3 mg/ml), natriumpyruvat (1 mM) og ikke-essensielle aminosyrer (100 µM). Cellene ble inkubert ved 37°C i 24 timer før anvendelse som et matersjikt for sebocytter.

5

TRINN B: Isolering av human sebocytter

Human sebocytter ble isolert fra dermatom-avskrap av postoperative stykker av humanhud med en dybde på 0,4-0,8 mm (denne del av huden ble tidligere vist å være anriket på sebaciøse kjertler). Således oppnådde avskrap ble behandlet med 1% Dispase i Iscoves medium inneholdende 10% serum i 20 minutter ved 37°C. Vevet ble så anbragt i 0,3% trypsin/1% EDTA i fosfatbufret saltoppløsning (PBS) i 10 minutter ved 37°C. Etter inkubering ble cellene forsiktig skrapet fra vevet i vekstmedium (GM) inneholdende DMEM:F12 mediumblanding (3:1), supplert med 8% varmeinaktivert FBS, 2% varmeinaktivert humanserum (HS), 1 mM natriumpyruvat, epidermal vekstfaktor (10 ng/ml), insulin (10 µg/ml), hydrokortison (0,4 µg/ml) og +/-koleratoksin (100 µg/ml), L-glutamin og antibiotika. Således oppnådde celler ble filtrert gjennom nylonduk med porestørrelse 100 µm, sentrifugert ved 750 omdr/min, resuspendert i GM og tallet.

20 TRINN C: Kulturer av human sebocytter

Resulterende celler fra isolasjonsprosedyren ovenfor ble bragt på plate på 3T3 matersjikt med $2 \times 10^5 / 9,5 \text{ cm}^2$ i vekstmedium og holdt ved 37°C og 5% CO₂ i 3 dager (fase I). Etter den første vekstperioden ble de overført til et overgangsmedium (TM) som besto av DMEM:F12 medium supplert med 1 mM natriumpyruvat, insulin (10 µg/ml) transferrin (6,7 ng/ml) og selenium (5,5 µg/ml) (ITS), 2% varmeinaktivert FBS og 2% varmeinaktivert humanserum så vel som +/-koleratoksin (ch.t) (100 µg/ml), L-glutamin og antibiotika (fase II). Tre dager senere ble cellene flyttet til differensieringsmedium (DM), DMEM:F12 supplert med ITS, 3,3',5-trijod-L-tyronin-natrium (3 nM), 1 volum-% sporelementblanding og valget av differensieringsmiddel, det vil si bovin pituitær ekstrakt (10 µg/ml). Dette medium ble byttet hver tredje dag (fase III).

TRINN D: Testing av stimulatorer eller inhibitorer for sebocytt differensiering og lipidproduksjon.

35 Hormoner, blandinger av hormoner, det vil si bovin pituitær ekstrakt eller forbindelser som skal testes, ble satt til kulturen ved begynnelsen av fase III. To kriterier ble benyttet for å evaluere effekten av disse materialer på sebaciøse kulturer: 1) visuelle

observasjoner og 2) evaluering av sebaciøs lipidakkumulering og syntese. Evalueringen av lipidakkumuleringen ble fullført ved bruk av Nil-rødt metoden. Denne metode er basert på visualiseringen av nøytrale lipider med Nil-rødt og kvantitering ved avlesning av fluorescens ved 535 nm eksitering og 580 nm emisjon ved bruk av en plateleser.

- 5 Lipidsyntesen ble evaluert ved radioaktiv merking ved bruk av ^{14}C acetat og kvantitert med Bio Rad Phosphoimager (Molecular Imager, FX) ved bruk av 4.1 program.

TRINN E: Visuelle observasjoner og Nil-rødt evaluering av lipidakkumulering.

- Morfologisk evaluering av lipidakkumulering ble lett erkjent fordi cellene ble store og viste lipidgranuler som i lysfelt lysmikroskopi syntes som gulaktige sirkler i cellene. Kvantitering av akkumulering/inhibering av nøytrale lipider i sebocytter ble fullført ved Nil-rødt bindingsanalyse. Kort sagt ble, etter eksponering av sebocytene til testforbindelsene, cellene tillatt å interagere med 1 μM Nil-rødt i Hanks bufrede saltoppløsning inneholdende DMSO og Pluronic F127. Etter 4 timers inkubering, vasking og inkubering over natten, ble fluorescensen avlest ved 535 eksitering og 580 emisjon ved bruk av en fluorescens plateleser. For å bestemme hvorvidt forbindelsene hadde en inhibitorisk effekt på cellevekst, ble celletelling gjennomført.

- Etter prosedyren som beskrevet ovenfor ble valgte forbindelser ifølge oppfinnelsen testet for visuell og Nil-rødt evaluering av lipidakkumulering, med de resultater som er oppsummert i Tabell 9.

TABELL 9

ID nr.	% inh. 0,4 μM	% inh. 0,8 μM	Visuell* 0,4 μM	Visuell* 0,8 μM	MC5-R IC ₅₀
74	72	100	+++	++++	154 nM
76	48	88	++	+++	317 nM
80	61	91	++	++++	138 nM
67	N.T.	N.T.	++	+++	246 nM
50	0	0	0	0	Ingen binding
84	0	0	0	0	Ingen binding

- 25 * Øket antall + tegn antyder grad av inhibering der ++++ = 100%, +++ = 75%, ++ = 50% og + = 25% inhibering av lipidgranulddannelse.

TRINN F: Evaluering av sebaciøs lipid syntese ved sebaciøse celler.

Ved kulturens dag 11 ble sebocytterne merket med ^{14}C acetat til en sluttkonsentrasjon på 2 μCi per ml i 24 timer i serumfritt kulturmedium. Cellene ble så skrapet fra platene og frosset ved -80°C i glassampuller. Lipidekstrahering ble gjennomført ved bruk av Bligh-Dyer metoden (Bligh, E. G. og Dyer, W. J., *Can. J. Biochem Physiol.*, 1959, 37, s. 911-916) med en lett modifikasjon som detaljert her. Kort sagt ble cellene homogenisert i en 2:1 kloroform:metanol blanding i nærvær av KCl. Den organiske fase ble fjernet fra blandingen, de separerte lipider tørket under argon og farvet for høy-ytelses tynnsjikt-kromatografi (HPTLC) plater. Platene ble fremkalt ved tre forskjellige mobile faser. Den første var heksan (til toppen av platen), fulgt av toluen (til toppen) og til slutt en 70:30:1 blanding av heksan:eter:eddiksyre (halvveis opp på platen – 10 cm). Platene ble så eksponert til radiografisk film for visualisering av de radioaktive lipid-spesier. For visualisering av ikke-merkede lipider ble platene sprayet med 8% kobberII-syre og brent på en varm plate. Kvantitering av resultatene skjedde ved Image Pro Plus 3.0 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD).

Etter prosedyren som beskrevet ovenfor, ble utvalgte forbindelser ifølge oppfinnelsen testet på deres inhibitoriske effekt ved differensiering av human sebocytter. Visuelt viste farvede cellekulturer som var behandlet med Forbindelse nr. 74 fullstendig forsvinning av lipidgranuler i sebocyttekulturer etter syv dagers behandling. De samme celler som ble undersøkt på lipidsyntese viste inhibering av skvalen, kolesterol- og voksester, målt ved radioaktivt merkede lipider, separert ved HPTLC. Celleplatene ble kvantitert ved måling av intensiteten av båndene ved bruk av Image Pro Plus (versjon 5.0). % inhibering ble beregnet basert på differansen mellom behandlede prøver og bærerbehandlede kontroller, med de resultater som er oppsummert i Tabell 10.

TABELL 10

Lipid	Induserer	Cellekjønn	% inh. @ 0,4 μM	% inh. @ 0,6 μM
Skvalen	Koleratoksin & bovin pituitær ekstrakt	F/M	100/100	100/100
Kolesterolester	”	F/M	85/64	88/76
Ukjent	”	F/M	75/68	85/80
Voksester	”	F/M	70/50	67/42
Triglycerid	”	F/M	0	0

EKSEMPEL 11In Vivo evaluering av testforbindelsevirkningen på sebumproduksjon: Humanhud – SCID muse chimera modellen

5

Alvorligkombinerte immunodefekte mus (SCID) gir en uvurderlig modell for hud-xenopoding. Disse dyr er frie for både T- og B-celle immunitet. Human hudpodinger i SCID-mus bibeholder humancellulærvevkomponenter inkludert hudimmunceller, det vil si Langerhans-celler, makrofager og lymfocytter, og også en del av det podede endothelium (Kaufmann, R., et al., Exp. Dermatol. 1993, 2: 209-216, 1993). Disse egenskaper tillater et studium av fysiologiske og/eller patologiske responser i humanhudceller overfor en testforbindelse.

TRINN A: Transplantasjonsmetode.

15 C.B-17 scid/scid mus (Taconic, Germantown, N.Y.) ble benyttet for poding ved en alder på 5-6 uker. Fulltykkelse humanfacial hud ble skavet av til ca. -0,4 mm ved bruk av en Forman Dermatome. Hudprøvene ble vasket 3 ganger i antibiotika og antimykotika (penicillin, streptomycin, fungizon) (Life Technologies) in Dulbeccos modifiserte Eagle medium (DMEM, Life Technologies). Eliptisk hud - 2,0-2,5 x 1,0-1,5 ble podet på det

20 preparerte podingssjikt og suturert ved bruk av 4,0 silke. Under kirurgiske prosedyrer var musene anestesisert ved bruk av en blanding av Ketaset (0,16 mg/g kroppsvekt) og Rompun (8,0 µg/g kroppsvekt).

Det er godt akseptert at sårhelingsprosessen i den transplanterte hud på SCID-musen tar

25 en måned, ved hvilket tidsrom humanhuden kan benyttes for forsøksformål. Søker har også funnet at det er en gradvis regenerering av sebaciøse kjertler i den transplanterte humanhud og at disse kjertler regenereres fullt og skiller ut sebum etter 7 uker som vist ved Sebutape og histo-morfometri. Maksimalstørrelse for kjertlene ble observert 3 måneder etter transplantering. Kjertlene bibeholdt sin evne til å produsere

30 humanspesifikk sebum og glandulærvevet uttrykte humanspesifikke markører inkludert MC5-R. Fordi kjertlene nådde sin maksimale størrelse 2-3 måneder etter transplantering, ble virkningene av inhibitorene av sebumsekresjon prøvet på dette punkt.

35 TRINN B: Behandlingsmetode.

Mus ved 2-3 måneder etter transplantering med human facialhud ble benyttet for studiene. Podingsarealet ble behandlet med testforbindelsen i den eller de ønskede

konsentrasjoner oppløst i polyetylenglykol-etanol ($20 \mu\text{l}/2 \text{ cm}^3$). Kontroller ble behandlet med bærer alene. Testforbindelsene ble lagt på daglig, bortsett fra helgene. Sebumsekresjonen ble bestemt ved bruk av Sebutape på dag 15 og dag 30 etter behandling.

5

TRINN C: Avslutning av forsøket.

Avslutningen av forsøket ble bestemt ved preliminær klinisk bedømmelse av sebumproduksjonen ved bruk av SEBUTAPE. På dette tidspunkt ble humanhudpodingene skåret ut og representative prøver ble samlet for histologisk bedømmelse. Mer spesielt ble 2 mm stanse-biopsier preparert og benyttet for evaluering av lipidsyntese og total lipidakkumulering i de behandlede vev.

TRINN D: Evaludering av lipidsyntese og total lipidakkumulering i de undersøkte vev. De samlede 2 mm stanse-biopsier ble anbragt individuelt i 96-brønners plater i Krebs buffer og merket med $10 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ acetat i 3 timer. Etter denne merkeperiode ble prøvene vasket i medium og 5 biopsier slått sammen, veiet og benyttet for lipidekstrahering. Lipidekstraheringen og analysen ved HPTLC var den samme som beskrevet for vevkulturavledede celler.

Etter prosedyren ovenfor ble forbindelse nr. 74 ifølge oppfinnelsen testet på inhibering av sebaciøs kjertelaktivitet etter 11 dagers behandling av humanhud transplantert på SCID-mus.

Visuell evaluering av den sebaciøse kjertel etter topisk behandling med 0,1% oppløsning av forbindelse nr. 74 resulterte i synlig krymping av den sebaciøse kjertel og nedregulering av sebaciøse lipider. Topisk behandling i 15 dager med 0,05% henholdsvis 0,005% oppløsninger var ikke tilstrekkelig til å regulere ned lipidene. Numerisk evaluering av inhibering av human sebaciøse lipider for disse celler ble analysert ved bruk av HPTLC, resultaltene er oppsummert i tabellene 11, 12 og 13. Tallene for % inhibering er anført relativt kontrollen.

30

TABELL 11

Effekt av forbindelse nr. 74 på human sebaciøse lipider (11 dagers behandling)

Lipid	% inh. ved 0,1%	% inh. ved 0,5%	% inh. ved 0,01%
Skvalen	70	0	0
W/E	80	10	25
Triglycerider	50	0	0

5

TABELL 12

Effekt av forbindelse nr. 74 på lipidakkumulering (30 dagers behandling)

Lipid	% inh. ved 0,05%	% inh. ved 0,01%
Skvalen	73	82
Kolesterolester	21	44
Voksester	93	86
Triglycerider	90	75
Kolesterol	82	33

10

TABELL 13

Effekt av forbindelse nr. 74 på sebaciøs lipid syntese (30 dagers behandling)

Lipid	% inh. ved 0,05%	% inh. ved 0,01%
Skvalen	90	80
Voksester	93	86
Triglycerider	90	75
Kolesterol	82	33

15

Som vist i tabellene 12 og 13 ovenfor, var både total sebaciøs lipidakkumulering og de novo syntese av sebaciøse lipider signifikant redusert etter 30 dagers topisk behandling med en 0,05% henholdsvis 0,01% oppløsning av forbindelse nr. 74.

EKSEMPEL 12Oral formulering

- Som en spesiell utførelsesform av et oralt preparat ble 100 mg av forbindelse nr. 74 fra
- 5 Eksempel 2 formulert med tilstrekkelig finoppdelt laktose til å gi en totalmengde på 580 til 590 mg for å fylle en størrelse 0 hårdgelkapsel.

EKSEMPEL 13Topiske formuleringer

10

A: Mikroemulsjon

Som en spesiell utførelsesform blandes det et mikroemulsjonspreparat med de følgende komponenter, under oppvarming etter behov:

Polysorbat 60 (f. eks. Tween 60 fra ICI Surfactants)	20 deler
Isopriopylpalmitat	20 deler
Sorbitanoleat (f. eks. Span 80 fra ICI Surfactants)	13 deler
2-etylheksandiol-1,3	4 deler
Butylert hydroksytoluen	0,05 deler
Forbindelse nr. 74	0,05 deler

15

Til den blandede blanding settes det så langsomt 42,9 vektdeler vann med blanding etter behov for å oppnå en emulsjon.

B. Hydroalkoholisk gel

- 20 Som en spesiell utførelsesform blandes et hydroalkoholisk gelpreparat av 10 vektdeler polypropylenglykol, 10 vektdeler butylenglykol, 2 vektdeler benzylalkohol, 0,05 vektdeler EDTA og 0,05 vektdeler BHT med 74,85 vektdeler vann til sammen. Blandingen blandes inntil alle komponenter er oppløst. Karbomer (for eksempel Carbopol 934P fra Goodrich) i en mengde av 3 vektdeler tilsettes så langsomt under
- 25 konstant vending for å oppnå en gel. 0,05 vektdeler forbindelse nr. 74 dispergeres så i gelen under blanding. Gelens pH-verdi justeres til rundt pH 3-4.

C: Vannfri gel

Som en spesiell utførelsesform av oppfinnelsen i form av en vannfri gel blir 20 vektdeler isopropanol satt til 20 vektdeler butylenglykol. 0,05 vektdeler BHT og 1,0 vektdeler benzylalkohol settes så til isopropanol:butylenglykol blandingen. Til den resulterende blanding settes det så cyklotetrasiloksan (D₄) og organopolysiloksan 11 (for eksempel Gransil GSM Gel fra Grant Industries) i en mengde av 58,85 vektdeler, under kontinuerlig blanding. 0,1 vektdeler forbindelse nr. 74 mikroniseres ved og dispergeres inn i gelen under kontinuerlig blanding inntil det hele er enhetlig fordelt.

10 D: Krem

Som en spesiell utførelsesform av oppfinnelsen blir en olje-i-vann krem tilblandet fra de nedenfor angitte komponenter i de angitte mengder i vektdeler. Sluttblandingen justeres til en pH-verdi rundt pH 2 med saltsyre.

Cetearylalkohol	4,3 deler
Mikrokrystallinsk voks	9,0 deler
Ceteth-20 surfaktant (f. eks. Brij 58 fra ICI Surfactants)	1,1 deler
Kaprin/Kaprylsyre triglycerider (f. eks. Tegosoft CT fra Goldsmith)	3,6 deler
Glycin	0,6 deler
Forbindelse nr. 74	0,1 deler
BHT	0,05 deler
Vann	81,25 deler

15

Mens beskrivelsen ovenfor forteller om prinsippene ved oppfinnelsen og også eksemplene gitt for illustrering, skal det være klart at gjennomføring av oppfinnelsen omfatter alle de vanlige variasjoner, tilpasninger og/eller modifikasjoner som ligger innenfor rammen av de vedlagte krav og deres ekvivalenter.

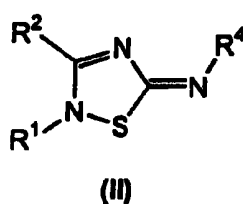
20

P a t e n t k r a v

1.

Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d formel (II)

5



10 der

R¹ er fenyl,

der fenylgruppen eventuelt er substitueret med en eller flere substituer uafhængig
valgt blandt halogen, C₁-C₆ alkyl eller C₁-C₆ alkoksy;

15

R² er fenyl,

der fenylgruppen eventuelt er substitueret med en eller flere substituer uafhængig
valgt blandt halogen, C₁-C₆ alkyl eller C₁-C₆ alkoksy;

20

R⁴ er valgt blandt gruppen bestående af fenyl eller pyridyl, der fenylgruppen eventuelt er
substitueret med en eller flere substituer valgt blandt halogen, C₁-C₆ alkyl eller C₁-C₆
alkoksy;

25 og farmasøytisk akseptable salter derav.

2.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at

R¹ er 2-metoksyfenyl;30 R² er 2-metoksyfenyl;

R⁴ er valgt fra gruppen bestående af fenyl, 4-metoksyfenyl, 2,6-difluorfenyl, 3,5-
difluorfenyl og 2-klor-6-metylphenyl;

og farmasøytisk akseptable salter derav.

3.

Forbindelse ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er
valgt fra gruppen bestående av [2-(2-metoksyfenyl)-3-(2-metoksyfenyl)-2H-[1,2,4]-
5 tiadiazol-5-yliden]-fenylamin og farmasøytisk akseptable salter derav.

4.

Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det
omfatter en forbindelse som angitt i krav 1 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

10

5.

Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at det omfatter blanding av en forbindelse ifølge krav
1 med en farmasøytisk akseptabel bærer.

15