



(12) PATENT

(19) NO

(11) 326341

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07D 401/06 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 401/04 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

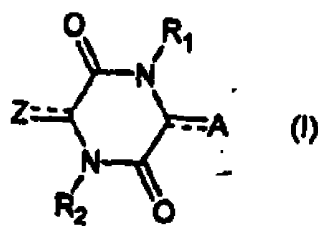
C07D 405/14 (2006.01)

C07D 409/14 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20025373	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.05.08 PCT/US01/14721
(22)	Inng.dag	2002.11.08	(85)	Videreføringsdag	2002.11.08
(24)	Løpedag	2001.05.08	(30)	Prioritet	2000.05.09, US, 304191
(41)	Alm.tilgj	2002.12.13			
(45)	Meddelt	2008.11.10			
(73)	Innehaver	Che-Ming Teng, 100 Sgy-Wei Road, Taipei 106, TW Hui-Po Wang, 3rd Floor, 13 Lane 199, Shin-Yi Road, Sec 4, Taipei 106, TW AngioRx Corp, 7 F, No 210, Section 4, Sinyi Road TAIPEI, TW			
(72)	Oppfinner	Che-Ming Teng, 100 Sgy-Wei Road, Taipei 106, TW Hui-Po Wang, 3rd Floor, 13 Lane 199, Shin-Yi Road, Sec 4, Taipei 106, TW Eric I C Li, No 74-J Lane 93, Tung-Lin Road, Tainan City, TW On Lee, 8 Lane 127, Gia-Hsing Street, Taipei 110, TW Jih-Hwa Guh, B1 Floor No 60, Lane 394, Wu-Shin Street, Taipei 110, TW Huei-Ting Chen, 4th Floor 27, Lane 143, Ren-Ai Road, Sec 3, Taipei, TW Yan-Bing Fan, 35 Fwu-Tay Street, Tay-Shan 143, TW Ya-Lan Chen, No 26-1, Lane 112, Wei-Kuo Street, East Area, Taiwan City, TW			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO			
(54)	Benevnelse	Piperazindion-forbindelser, samt anvendelse derav.			
(56)	Anførte publikasjoner	D1: WO 95/21832 A1			
(57)	Sammendrag				

Piperazindion-forbindelser med formel (I) hvor hver av --- og = uavhengig er en enkeltbinding eller en dobbeltbinding; A er H eller $\text{CH}(\text{R}^a\text{R}^b)$ når --- er en enkeltbinding, eller $\text{C}(\text{R}^a\text{R}^b)$ når = er en dobbeltbinding; Z er $\text{R}_3\text{O}-(\text{Ar})-\text{B}$, hvor B er $\text{CH}(\text{R}^c)$ når --- er en enkeltbinding, eller $\text{C}(\text{R}^c)$ når = er en dobbeltbinding; Ar er heteroaryl; og R_3 er H, alkyl, aryl, heteroaryl, $\text{C}(\text{O})\text{R}^d$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}^d$, $\text{C}(\text{O})\text{NR}^d\text{R}^e$ eller SO_2R^d idet hver en av R_1 og R_2 er uavhengig $\text{HC}(\text{O})\text{R}^d$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}^d$, $\text{C}(\text{O})\text{NR}^d\text{R}^e$ eller SO_3R^d ; og hver av R^a , R^b , R^c , R^d og R^e er uavhengig H, alkyl, aryl, heteroaryl, cyklyl eller heterocyklyl. Eventuelt er R^a og R^b tatt sammen cyklyl eller heterocyklyl; og, også eventuelt, er R_1 og R^a eller R_1 og R^b tatt sammen cyklyl eller heterocyklyl.



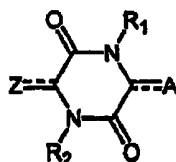
Foreliggende oppfinnelse vedrører piperazindion-forbindelser, samt anvendelse derav.

Behandling av tumorer kan bli tilnærmet ved flere forskjellige metoder for terapi, inkludert kirurgi, bestråling, kjemoterapi eller en hvilken som helst kombinasjon av hvilke som helst av disse behandlingene. Blant disse er kjemoterapi nødvendig for ikke opererbare eller metastaseformer for cancer. Ved å betrakte hvordan forskjellige typer tumorer er med hensyn på celletype, morfologi, vekstrate og andre cellulære karaktertrekk, har U.S. National Cancer Institute (NCI) utviklet en "sykdoms-orientert" tilnærming til anti-tumor aktivitets-screening. Boyd, M.R. (1989) I *Principle of Practice of Oncology* Devita, J. T., Hellman, S., og Rosenberg. S.A (Eds.) vol. 3, PPO Update, Nr. 10. Dette *in vitro* screening-systemet er basert på humane tumorcellelignende paneler bestående av omtrent 60 cellelinjer med hovedhumane tumorer (f.eks. leukemi, lungecancer, tarmcancer, CNS cancer, melanom, ovariecancer, nyrecancer, prostatacancer eller brystcancer), og virker som et redskap for identifisering av forbindelser som innehar anti-tumoraktiviteter.

Av spesiell interesse er anti-tumorforbindelser som virker via en eller flere av følgende fire mekanismer: (1) inhibering av G₂/M progresjon av cellecyklus som kan til slutt indusere apoptose i tumorceller (Yeung *et al.* (1999) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 263: 398-404); (2) forstyrning av tubulinoppstilling/oppløsning, som kan inhibere cellemitose og indusere celleapoptose (Panda *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10560-10564); (3) inhibering av endotelial celleproliferasjon og angiogeneseeffekt (Witte *et al.* (1998) *Cancer Metastasis Rev.* 17: 155-161; Prewett *et al.* (1999) *Cancer Res.* 59: 5209-5218); eller (4) regulering av Ras protein-avhengig signal transduksjonsreaksjonsvei (Hernandez-Alcoceba *et al.* (2000) *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 65-76; Buolamwini (1999) *Cur. Opin. Che. Biol.* 3: 500-509).

Denne oppfinnelsen er delvis basert på oppdagelsen av at piperazindion-forbindelser har anti-tumoraktiviteter identifisert ved NCI screeningssystemet og virker ved en eller flere av ovennevnte fire mekanismer.

Et aspekt av foreliggende oppfinnelse vedrører piperazindion-forbindelser med formel:



hvor:

hvor hver av --- og = , er en dobbeltbinding;

A er $\text{CH}(\text{R}^a)$;

5 Z er $\text{R}_3\text{O}-(\text{Ar})-\text{B}$, hvor B er CH;

Ar er pyridyl bundet til B i posisjon 2; og R_3 er CH_2 -fenyl;

hvor fenyl er usubstituert eller substituert med en eller flere substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen, hydroksyl, amino, C_1 - C_6 alkyl, C_2 - C_6 alkoksy og fenyl;

10 hver av R_1 og R_2 er H;

og

R^a er tienyl, furyl, pyridinyl, indolyl, 2-okso-indolyl, eller fenyl;

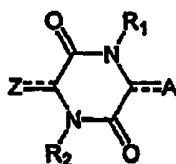
hvor fenyl er usubstituert eller substituert med en eller flere substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen, hydroksyl, amino, nitro, C_1 - C_6 alkyl, C_2 - C_6 alkoksy og

15 fenyl.

Det refereres til ovennevnte formel og en undergruppe av piperazindion-forbindelser ifølge oppfinnelsen er slik at både --- og = er dobbeltbindinger.

Et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av en forbindelse som har formelen:

20



hvor

hver av --- og = er en dobbeltbinding;

25 A er $\text{CH}(\text{R}^a)$;

Z er $\text{R}_3\text{O}-(\text{Ar})-\text{B}$, hvor B er CH;

Ar er pyridyl bundet til B i posisjon 2; og R_3 er CH_2 -fenyl;

hvor fenyl er usubstituert eller substituert med en eller flere substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen, hydroksyl, amino, C₁-C₆alkyl, C₂-C₆alkoksy og fenyl;

hver av R₁ og R₂ er H;

5 og

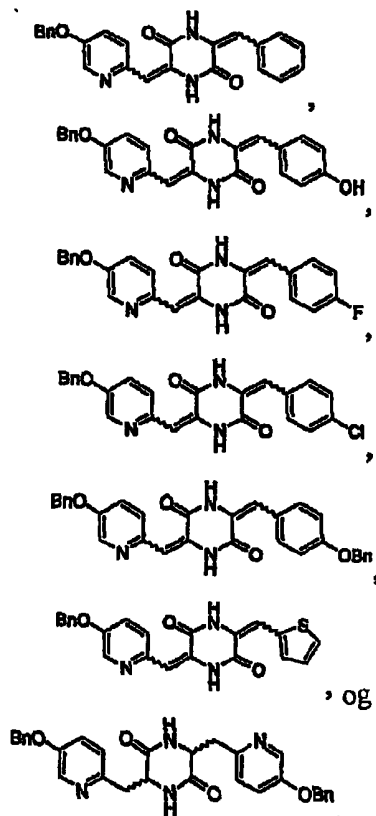
R^a er tienyl, furyl, pyridinyl, indolyl, 2-okso-indolyl, eller fenyl;

hvor fenyl er usubstituert eller substituert med en eller flere substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen, hydroksyl, amino, nitro, C₁-C₆alkyl, C₂-C₆alkoksy og fenyl for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling av tumor.

10 I et aspekt omfatter foreliggende oppfinnelse at R₃O er koblet til posisjon 5 av pyridyl eller er benzyloksy.

Syv eksempelvis piperazindion-forbindelser er 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-fenylmetylidenpiperazin-2,5-dion, 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-p-hydroksyfenylmetylidenpiperazin-2,5-dion, 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-p-fluorfenylmetylidenpiperazin-2,5-dion, 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-p-klorfenylmetylidenpiperazin-2,5-dion, 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-p-fenylmetoksy, fenylmetylidenpiperazin-2,5-dion, 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-[(tien-2-yl)metyliden]piperazin-2,5-dion og 3,6-di[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyl]-piperazin-2,5-dion. Deres strukturer er vist nedenfor:

20



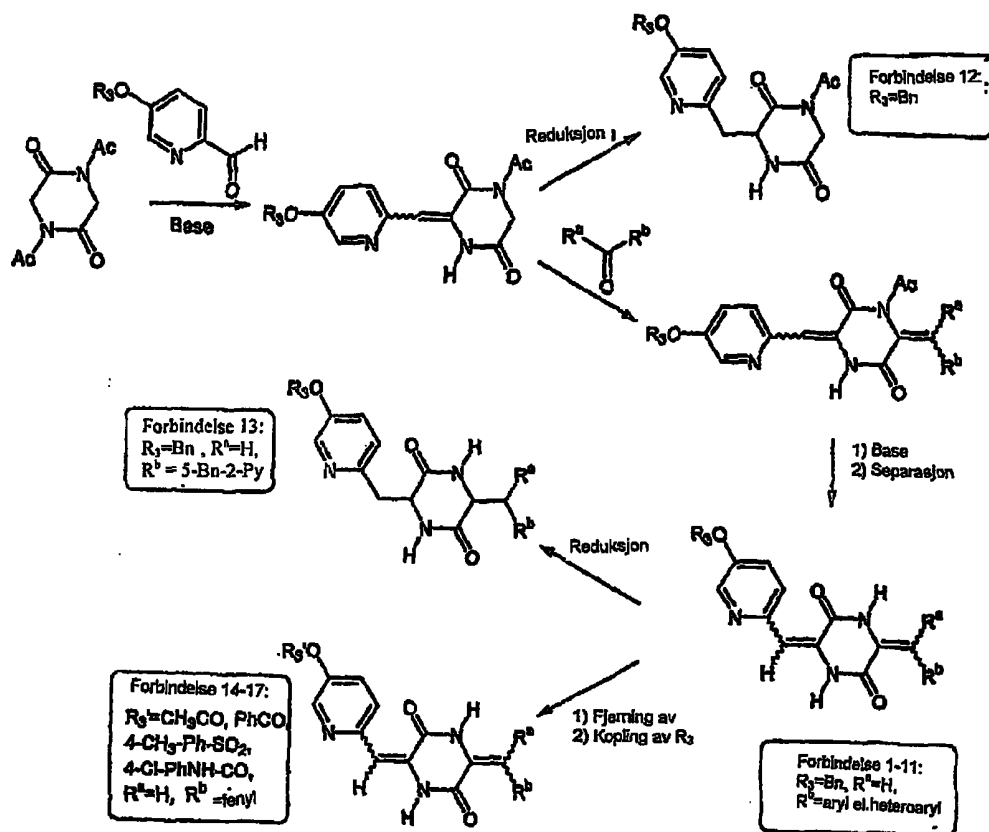
Piperazindion-forbindelsene beskrevet ovenfor innbefatter selve forbindelsene, og også deres salter. Slike salter kan for eksempel bli dannet mellom en positivt ladet substituent (f.eks. amino) på en piperazindion-forbindelse og et anion. Egnete anioner innbefatter, men er ikke begrenset til, klorid, bromid, jodid, sulfat, nitrat, fosfat, sitrat, metansulfonat, trifluoracetat og acetat. Likeledes kan en negativt ladet substituent (f.eks. karboksylat) på en piperazindion-forbindelse danne et salt med et kation. Egnete kationer innbefatter, men er ikke begrenset til, natriumion, kaliumion, magnesiumion, kalsiumion og et ammoniumkation så som tetraetylammoniumion.

Andre trekk eller fordeler ved foreliggende oppfinnelse vil være innlysende ut fra følgende detaljerte beskrivelse av flere utførelsesformer og også ut fra vedlagte krav.

Piperazindion-forbindelsene beskrevet ovenfor kan blir fremstilt ved fremgangsmåter som er velkjente innenfor fagområdet, og også ved synteseveier beskrevet heri. For eksempel kan man omsette en piperzin-2,5-dion-forbindelse med et heteroarylformaldehyd for å danne et mellomprodukt heteroarylmetylidenpiperazin-2,5-dion. Mellomproduktet kan deretter bli redusert til

heteroarylmetylpiperazin-2,5-dion (en forbindelse ifølge denne oppfinnelsen), eller omsatt med et keton eller et annet aldehyd, etterfulgt av behandling med en base for å danne en blanding av pipereazin-dion isomerer som er cis- eller trans- eller E- eller Z-dobbeltbinding isomere former. Det ønskete isomere produktet kan bli separert fra andre ved høytrykksvæskeskromatografi (HPLC). Hvis det er foretrukket, kan riktige funksjonelle grupper bli introdusert inn i heteroarylringen ved ytterligere modifikasjoner. Alternativt kan et ønsket redusert produkt blir oppnådd ved omsetning av produktet med et reduksjonsmiddel.

Nedenfor er det vist et skjema som angir syntese av sytten piperzaindion-forbindelser.



Detaljer angående syntese av forbindelse 1-17 er beskrevet i henholdsvis eksemplene 1-17. For å danne andre piperazindion-forbindelser, kan pyridinyl (vist i ovenfor angitte skjema) bli erstattet med en aryl eller annen heteroaryl (f.eks. furyl, pyrrolyl, imidazolyl, pyrimidinyl eller indolyl), og en av de to acetylgruppene (Ac) på

piperazindion-ringen (også vist i ovennevnte skjema) kan bli erstattet med en annen substituent (f.eks. karbonyl, karbamido, karbamyl eller karboksyl).

Det er å bemerke at piperazindion-forbindelsene inneholder minst to dobbeltbindinger og kan videre inneholde en eller flere asymmetriske sentere. De kan
 5 følgelig oppstå som rasemater og rasematiske blandinger, enkelt enantiomere, individuelle diastomerer, diastomere blandinger og cis- og trans- eller E- eller Z-dobbeltbinding isomere former. Alle slike isomere former kommer i betraktning.

En effektiv mengde av en eller flere piperazindion-forbindelser beskrevet i oppsummeringsdelen ovenfor kan administreres til et individ som trenger
 10 tumorbehandling. Piperazindion-forbindelser kan virke via en eller flere av ovennevnte virkningsmekanismer, eller via en hvilken som helst annen mekanisme. "En effektiv mengde" refererer til den mengden av forbindelsen som er nødvendig for å utvise en terapeutisk effektiv på det behandlede individet. Innbyrdes forhold mellom doseringer for dyr og mennesker (basert på milligram pr. kvadratmeter
 15 kroppsoverflate) er beskrevet i Freireich *et al.*, (1966) *Cancer Chemother Rep* 50: 219. Areal av kroppsoverflate kan bli omtrentlig bestemt ut fra høyden og vekten til pasienten. Se for eksempel Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, N.Y., 1970, 537. En effektiv mengde av piperazindion-forbindelser kan variere fra omtrent 0,1 mg/kg til omtrent 50 mg/kg. Effektive doser vil også variere som kjent for fagfolk
 20 innenfor dette området, og avhenger av typer av tumorer som blir behandlet, vei for administrering, anvendelse av eksipient og muligheten av sambruk ved andre terapeutiske behandlinger så som anvendelse av andre antitumor-midler eller bestrålingsterapi.

En sammensetning inneholdende en piperazindion-forbindelse kan bli
 25 administrert oralt, parenteralt, ved inhaleringsspray, topisk, rektalt, nasalt, bukkalt, vaginalt eller via et implantert reservoir. Betegnelsen "parenteral" som anvendt heri, innbefatter subkutan, intrakutan, intravenøs, intramuskulær, intraartikulær, intraarteriell, intrasynovial, intrasternal, intratekal, intralesjonal og intrakranial injeksjon eller infusjonsteknikker.

30 En steril injiserbar sammensetning, for eksempel en steril injiserbar vandig eller oljeholdig suspensjon kan bli formulert ifølge teknikker kjent innenfor fagområdet ved anvendelse av egnede disperings- eller fuktmidler (så som for eksempel Tween 80) og suspenderingsmidler. Sterilt injiserbart preparat kan også være en steril injiserbar løsning eller suspensjon i et ikke-toksisk parenteralt

akseptabelt fortynningsmiddel eller et løsningsmiddel, for eksempel en løsning i 1,3-butandiol. Blant akseptable bærere og løsningsmidler som kan bli anvendt, er mannitol, vann, Ringers løsning og isotonisk natriumkloridløsning. I tillegg blir sterile, fikserte oljer hensiktsmessig anvendt som et løsningsmiddel eller suspenderingsmedium (f.eks. syntetiske mono- eller diglycerider). Fettsyrer, så som oljesyre og dets glyceridderivater er nyttige for fremstilling av injiserbare stoffer, så som også naturlig farmasøytisk akseptable oljer, så som olivenolje eller lakserolje, spesielt i deres polyoksyetylerter versjoner. Disse oljeløsningene eller suspensjonene kan også inneholde et langkjedet alkoholfortynningsmiddel eller et dispergeringsmiddel, eller karboksymetylcellulose eller lignende disperingsmidler. Andre vanlig anvendte overflateaktive midler som Tween eller Span eller andre lignende emulgeringsmidler eller forsterkere av biotilgjengelighet som vanligvis blir anvendt ved fremstilling av farmasøytisk akseptabelt faststoff, væske eller andre doseringsformer, kan også bli anvendt for formål av formulering.

En sammensetning for oral administrering kan være en hvilken som helst oral akseptabel doseringsform som inkluderer, men ikke begrenset til, kapsler, tabletter, emulsjoner og vandige suspensjoner, dispersjoner og løsninger. Når det gjelder tabletter for oral anvendelse, innbefatter bærere som vanligvis blir anvendt, laktose og maisstivelse. Smøremidler, så som magnesiumstearat, blir også typisk tilsatt. For oral administrering i en kapselform innbefatter nyttige fortynningsmidler laktose og tørket maisstivelse. Når vandige suspensjoner eller emulsjoner blir administrert oralt, kan det aktive ingredienset bli suspendert eller oppløst i en oljeholdig fase kombinert med emulgeringsmidler eller suspenderingsmidler. Om ønskelig, kan visse søtningsmidler, smaksstoffer eller farvemidler bli tilsatt. En nasal aerosol eller inhalerings-sammensetning kan bli dannet ifølge teknikker som er velkjente innenfor fagområdet farmasøytisk formulering, og kan bli fremstilt som løsninger i saltvann ved anvendelse av benzyalkohol eller andre egnede konserveringsmidler, absorpsjonsfremmende midler for å forsterke biotilgjengeligheten, fluorkarboner og/eller andre oppløsningsmidler eller dispergeringsmidler som er kjent innenfor fagområdet. En sammensetning inneholdende piperazindion-forbindelse kan også bli administrert i form av suppositorier for rektal administrering.

Bæreren i den farmasøytiske sammensetningen må være "akseptabel" i det henseende at den er kompatibel med det aktive ingredienset til formuleringen (og som fortrinnsvis har evne til å stabilisere den) og ikke være skadelig for individet som

blir behandlet. For eksempel kan oppløsningsmidler så som cyclodekstriner som danner spesifikke, mer oppløselige komplekser med piperazindion-forbindelsene, eller en eller flere oppløsningsmidler, bli anvendt som farmasøytiske eksipienter for levering av piperazindion-forbindelsene. Eksempler på andre bærere innbefatter

5 kolloidal silisiumdioksid, magnesiumstearat, cellulose, natriumlaurylsulfat og D&C Yellow # 10.

Piperazindion-forbindelsene kan hovedsakelig bli screenet for deres effektivitet for behandling av cancer ved en eller flere av følgende *in vitro* analyser.

En analyse er basert på NCI screeningssystemer som består av omtrent

10 60 cellelinjer av hovedhumane tumorer. Se Monks, *et al.*, (1991) *JNCI, J. Natl. Cancer Inst.* 83: 757-766; Alley, *et al.*, (1988) *Cancer Res.* 48: 589-601; Shoemaker, *et al.* (1988) *Prog. Clin. Biol. Res.* 276: 265-286; og Stinson *et al.* (1989) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 30: 613. Forklart i korte trekk blir en celsuspensjon som blir fortynnet ifølge den bestemte celletypen og ventet målcelletetthet (5,000-40,000

15 celler pr. brønn basert på karaktertrekkene til celleveksten) tilsatt (100 µl) inn i en 96-brønn mikrotiterplate. En pre-inkubasjon blir utført ved 37°C i 24 t. Fortynninger i to av antatt testkonsentrasjon blir tilsatt ved tid null i 100 µl alikvoter til hver brønn av mikrotiterplaten. Vanligvis blir en testforbindelse vurdert ved 5-10 ganger fortynninger. I en rutinemessig testing er den høyeste konsentrasjon av test-

20 forbindelsen 10^{-4} M. Inkubasjoner blir utført i 48 t i 5% CO₂ atmosfære og 100% fuktighet. Cellene blir analysert ved anvendelse av sulforodamin B analyse beskrevet av Rubinstein, *et al.* (1990), *NJCI, J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1113-1118) og Skehan, *et al.*, (1990, *NJCI, J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1107-1112). En plateleser blir anvendt for å avlese de optiske tetthetene, og en mikrocomputer bearbeider de

25 optiske tetthetene til kjemiske konsentrasjonsparametere. NCI har gitt en IC₅₀ verdi et nytt navn, konsentrasjonen som forårsaker 50% vekstinhibisjon, en GI₅₀ verdi for å fremheve korreksjon for celletallet ved tid null; dermed måler GI₅₀ den veksthemmende kraften til testforbindelsen. Se Boyd, *et al.* (1992) i *Cytotoxic Anticancer Drugs; Models and Concepts for Drug Discovery and Development*;

30 Vleriotte, F.A.; Corbett, T.H.; Baker, L.H. (Eds.); Kluwer Academic; Hingham, MA, s. 11-34.

I en annen analyse blir en piperazindion-forbindelse testet for dets cytotoksisitet på PC-3 celler (en prostata cancer cellelinje). Mer spesifikt blir cellene

inkubert med en testforbindelse i et resumfritt medium i 24 t. Den cytotoksiske effekten kan bli bestemt ved anvendelse av 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid (MTT) analysemetoden beskrevet i Boyd (I *Principle of Practice of Oncology* Devita, J.T., Hellman, S., og Rosenberg, S.A. (Eds.) Vol. 3, PPO Update, Nr. 10, 1989).

En annen *in vitro* analyse kan bli anvendt for å vurdere effektiviteten av en piperazindion-forbindelse for hemming av cellecyklusprogresjon. Mer spesifikt blir en testpiperazindion-forbindelse tilsatt til PC-3 cellene på en konsentrasjons-avhengig måte ved anvendelse av propidiumjodid-farvet strømningscytometrisk vurdering.

Cellepopulasjonen til sub-G₀/G₁, G₀/G₁, S og G₂/M fasen blir deretter bestemt. I tillegg kan effekten av en piperazindion-forbindelse på Ras-aktiviteten bli undersøkt for å bestemme dets regulering av Ras-proteinavhengig signaltransduksjonsreaksjonsvei.

Anti-tumoraktiviteten til en piperazindion-forbindelse kan bli ytterligere vurdert ved en *in vivo* dyremodell. Ved anvendelse av SCID mus som modell, blir PC-3 cellene subkutan injisert inn i mus for å utvikle en prostata tumor. Anti-tumoraktiviteten til en piperazindion-forbindelse blir bestemt etter behandling. I tillegg kan anti-tumoraktiviteten til en piperazindion-forbindelse også bli vurdert ved anvendelse av *in vivo* anti-angiogenesetesting. For eksempel kan nakne mus bli anvendt for å teste effekten av en piperazindion-forbindelse på bFGF-indusert angiogenese. En matrigel med bFGF eller vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF) blir subkutan injisert inn i mus med samtidig intraperitoneal administrering av en piperazindion-forbindelse. Etter flere dager med inkubasjon bli matrigelen kuttet ned for undersøkelse av angiogenese.

Følgende spesifikke utførelsesformer er derfor konstruert for å illustrere oppfinnelsen.

Eksempel 1; Syntese av 3-[(5-benzyloksyppyridin-2-yl)metyliden]-6-fenylmetyliden pipereazin-2,5-dion (forbindelse 1)

1,4-diacetylpiperazin-2,5-dion (8,6 g) ble tilsatt til en løsning av 5-benzyloksyppyridin-2-yl-formaldehyd (4,0 g) i 5,6 ml trietylamin og 40 ml dimetylformamid. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 16 t og deretter avkjølt på isbad for å danne et gult presipitat. Presipitatet ble deretter samlet og vasket med

etylacetat for å gi 5,4 g (77%) 1-acetyl-3-[(5-benzylloksypyridin-2-yl)metyliden]piperazin-2,5-dion (forbindelse A).

Smp: 189-191°C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ2,52 (s, 3H), δ4,54 (s, 3H), δ4,33 (s, 2H), δ5,25 (s, 2H), δ6,85 (s, 1H); δ7,384-δ7,488 (m, 5H, aromatisk), δ7,499 (d, J=8,8, 1H), δ7,689 (d, J=8,8, 1H), δ8,533 (s, 1H) og δ12,147 (s, 1H).

Forbindelse A (3,51 g) ble tilsatt til en 40 ml dimetylformamidløsning inneholdende likt molar av benzaldehyd og 4 ekvivalenter trietylamin. Løsningen ble tilbakestrømmet ved 60°C i 16 t og avkjølt på isbad for å danne et gult presipitat.

Presipitatet ble deretter samlet og vasket med etylacetat for å gi 3,3 g (83%) av ønsket produkt 3-[(5-benzylloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-fenylmetylidenpiperazin-2,5-dion (forbindelse 1) som en blanding av isomerer. Blandingen ved hovedsaklig ZZ og EZ isomerer.

Smp: 223-225°C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ5,245 (s, 2H), δ6,695 (s, 1H), δ6,812 (s, 1H), δ7,346-δ7,634 (m, 12H, aromatisk), δ8,528 (s, 1H), δ10,245 (s, 1H) og δ12,289 (s, 1H).

Eksempel 2: Syntese av 3-[(5-benzylloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-p-hydroksyfenylmetylidenpiperazin-2,5-dion (forbindelse 2)

Forbindelse A (3,51 g), oppnådd fra eksempel 1, ble tilsatt til en 40 ml dimetylformamidløsning inneholdende 1,5 g 4-hydroksybenzaldehyd og 4 ekvivalenter trietylamin. Løsningen ble tilbakestrømmet ved 130°C i 16 t og avkjølt på isbad for å danne et gult presipitat. Presipitatet ble deretter samlet og vasket med etylacetat for å gi 3,3 g (83%) av ønsket 3-[(5-benzylloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-p-hydroksyfenylmetylidenpiperazin-2,5-dion (forbindelse 2).

Smp: 260-263°C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ5,244 (s, 2H), δ6,669 (s, 1H), δ6,753 (s, 1H), δ6,798 (s, 1H, aromatisk), δ6,819 (s, 1H, aromatisk), δ7,347-δ7,467 (m, 9H, aromatisk), δ9,821 (s, 1H), δ10,064 (s, 1H) og δ12,216 (s, 1H).

Eksempel 3: Syntese av 3-[(5-benzylloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-p-metoksyfenylmetylidenpiperazin-2,5-dion (forbindelse 3)

Forbindelse A (3,51 g), oppnådd fra eksempel 1, ble tilsatt til en 40 ml dimetylformamidløsning inneholdende 1,4 g 4-metoksybenzaldehyd og 4 ekvivalenter trietylamin. Løsningen ble itlbakestrømmet ved 130°C i 16 t og avkjølt på isbad for å danne et gult presipitat. Presipitatet ble deretter samlet og vasket med etylacetat for å gi 3,3 g (83%) av ønsket 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-metoksyfenylmetylidenpiperazin-2,5-dion (forbindelse 3).

Smp: 238-240°C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ5,244 (s, 2H), δ6,669 (s, 1H), δ6,753 (s, 1H), δ6,798 (s, 1H, aromatisk), δ6,819 (s, 1H, aromatisk), δ7,347-δ7,647 (m, 9H, aromatisk), δ9,821 (s, 1H), δ10,064 (s, 1H) og δ12,216 (s, 1H).

Eksempel 4: Syntese av 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-p-fluorfenylmetylidenpiperazin-2,5-dion (forbindelse 4)

Forbindelse A (3,51 g), oppnådd fra eksempel 1, ble tilsatt til en 40 ml løsning av dimetylformamid inneholdende 1,3 g 4-fluorbenzaldehyd og 4 ekvivalenter trietylamin. Løsningen ble deretter tilbakestrømmet ved 130°C i 16 t og avkjølt på et isbad for å danne et gult presipitat. Presipitatet ble deretter samlet og vasket med etylacetat for å gi 3,12 g (75%) av ønsket 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-p-fluorfenylmetylidenpiperazin-2,5-dion (forbindelse 4).

Smp: 242-244°C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ5,237 (s, 2H), δ6,688 (s, 1H), δ6,794 (s, 1H), δ7,209-δ7,624 (m, 11H, aromatisk), δ8,520 (s, 1H), δ10,348 (s, 1H) og δ12,279 (s, 1H).

Eksempel 5: Syntese av 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-p-klorfenylmetylidenpiperazin-2,5-dion (forbindelse 5)

Forbindelse A (3,51 g), oppnådd fra eksempel 1, ble tilsatt til en 40 ml løsning av dimetylformamid inneholdende 1,3 g 4-klorbenzaldehyd og 4-ekvivalenter trietylamin. Løsningen ble tilbakestrømmet ved 130°C i 16 t og avkjølt på isbad for å danne et gult presipitat. Deretter ble presipitatet samlet og vasket med etylacetat for å gi 3,45 g (80%) av ønsket 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-p-klorfenylmetylidenpiperazin-2,5-dion (forbindelse 5).

Smp: 250-251-°C.

Eksempel 6: Syntese av 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-p-benzyloksyfenylmetylidenpiperazin-2,5-dion (forbindelse 6)

Forbindelse A (3,51 g), oppnådd fra eksempel 1, ble tilsatt til en 40 ml
 5 dimetylformamidløsning inneholdende 1,45 g 4-benzyloksybenzaldehyd og
 4 ekvivalenter trietylamin. Løsningen ble tilbakestrømmet ved 130°C i 16 t og avkjølt
 på et isbad for å danne et gult presipitat. Presipitatet ble deretter samlet, vasket
 med etylacetat og omkrystallisert fra dimetylformamid for å gi 3,45 g (80%) av ønsket
 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-p-benzyloksyfenylmetylidenpiperazin-2,5-
 10 dion (forbindelse 6).

Smp: 253-255°C.

¹HNMR (400 MHz, DMSO): δ5,142 (s, 2H), δ5,235 (s, 2H), δ6,672 (s, 1H),
 δ6,777 (s, 1H), δ7,041~δ7,639 (m, 16H), aromatisk δ8,520 (s, 1H), δ10,180 (s, 1H)
 og δ12.235 (s, 1H).

Eksempel 7: Syntese av 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-[(furan-2-yl)metyliden]piperazin-2,5-dion (forbindelse 7)

Forbindelse A (2,8 g), oppnådd fra eksempel 1, ble tilsatt til en 40 ml løsning
 av dimetylformamid inneholdende 2 ml furfural og 4 ekvivalenter trietylamin.
 20 Løsningen ble tilbakestrømmet ved 60°C i 48 t og avkjølt på isbad for å danne et gult
 presipitat. Presipitatet ble deretter samlet, vasket med etylacetat og omkrystallisert
 fra dimetylformamid for å gi 2,5 g (80%) av ønsket 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-[(furan-2-yl)metyliden]piperazin-2,5-dion (forbindelse 7).

Smp: 256-257°C.

25 ¹HNMR (400 MHz, DMSO): δ5,245 (s, 2H), δ6,656 (d, J=1,6, 1H), δ6,664 (d,
 J=1,6, 1H), δ6,685 (s, 1H), δ6,720 (s, 1H), δ7,349~δ7,942 (m, 8H, aromatisk), δ8,527
 (s, 1H), δ9,515 (s, 1H) og δ12,312 (s, 1H).

Eksempel 8: Syntese av 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-[(tien-2-yl)metyliden]piperazin-2,5-dion (forbindelse 8)

30 Forbindelse A (2,8 g), oppnådd fra eksempel 1, ble tilsatt til en 40 ml
 dimetylformamidløsning inneholdende 2 ml tiofen-2-karbaldehyd og 4 ekvivalenter
 trietylamin. Løsningen ble deretter tilbakestrømmet ved 60°C i 2 dager og avkjølt på

et isbad for å danne et gult presipitat. Presipitatet ble deretter samlet og vasket med etylacetat, og omkrystallisert fra dimetylformamid for å gi 1,9 g (59%) av ønsket 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-[(tiofen-2-yl)metyliden]piperazin-2,5-dion (forbindelse 8).

Smp: 215-217°C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ5,245 (s, 2H), δ6,716 (s, 1H), δ6,974 (s, 1H), δ7,186 (s, 1H), δ7,348-δ7,746 (m, 9H, aromatisk), δ8,525 (s, 1H), δ9,753 (s, 1H) og δ12,288 (s, 1H).

Eksempel 9: Syntese av 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-[(2-pyridinyl)metyliden]piperazin-2,5-dion (forbindelse 9)

Forbindelse A (2,8 g), oppnådd fra eksempel 1, ble tilsatt til en 40 ml løsning av dimetylformamid inneholdende 2 ml pyridin-2-karbaldehyd og 4 ekvivalenter trietylamin. Løsningen ble deretter tilbakestrømmet ved 60°C i 2 dager og avkjølt på et isbad for å danne et gult presipitat. Presipitatet ble deretter samlet og vasket med etylacetat, og omkrystallisert fra dimetylformamid for å gi 2,7 g (85%) av ønsket 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-[(2-pyridinyl)metyliden]piperazin-2,5-dion (forbindelse 9).

Smp: 248-250°C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ5,246 (s, 2H), δ6,709 (s, 1H), δ6,788 (s, 1H), δ7,349-δ7,661 (m, 8H, aromatisk), δ7,923 (d, J=8, 1H, aromatisk), δ8,473 (d, J=3,6, 1H), δ8,533 (d, J=2,8, 1H), δ8,680 (d, J=2, 1H), δ10,667 (s, 1H) og δ12,324 (s, 1H).

Eksempel 10: Syntese av 3,6-di[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]piperazin-2,5-dion (forbindelse 10)

Forbindelse A (0,31 g), oppnådd fra eksempel 1, ble tilsatt til en 40 ml løsning av dimetylformamid inneholdende likt molar av 5-benzyloksypyridin-2-yl-formamid og 4 ekvivalenter av trietylamin. Løsningen ble deretter tilbakestrømmet ved 130°C over natt og avkjølt på et isbad for å danne et gult presipitat. Presipitatet ble deretter samlet og vasket med etylacetat for å gi 0,36 g (80%) av ønsket 3,6-di[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]piperazin-2,5-dion (forbindelse 10).

Smp: 283-28°C.

¹HNMR (400 MHz, DMSO): δ5,145 (s, 4H), δ6,780 (s, 2H), δ7,240–δ7,394 (m, 14H, aromatisk), δ8,381 (s, 2H), δ10,145 (s, 1H) og δ12,58 (s, 1H).

Eksempel 11: Syntese av 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-(2-okso-3-indolyilden)piperazin-2,5-dion (forbindelse 11)

Forbindelse A (2,8 g), oppnådd fra eksempel 1, ble tilsatt til en 40 ml løsning av dimetylformamid inneholdende 1,5 g isatin og 4 ekvivalenter trietylamin. Løsningen ble tilbakestrømmet ved 130°C i 2 t og avkjølt på isbad for å danne et gult presipitat. Presipitatet ble deretter samlet og vasket med etylacetat for å gi 3,04 g (87%) av ønsket 3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-(2-okso-3-indolyilden)piperazin-2,5-dion (forbindelse 11).

Smp: >300°C.

Eksempel 12: Syntese av 1-acetyl-3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyl]piperazin-2,5-dion (forbindelse 12)

En suspensjon av 3,51 g 1,4-diacetylpiperazin-2,5-dion og et overskudd av zinkpulver i en blanding av 100 ml eddiksyre og 10 ml vann ble omrørt og tilbakestrømmet i 5-10 minutter og avkjølt. Blandingen ble filtrert. Faststoffet oppnådd på denne måten ble samlet og vasket med vann for å gi 2,0 g av ønsket 1-acetyl-3-[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyl]piperazin-2,5-dion (forbindelse 12).

Smp: 215-216°C.

Eksempel 13: Syntese av 3,6-di[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyl]piperazin-2,5-dion (forbindelse 13)

En suspensjon av 3,6-di[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyliden]piperazin-2,5-dion (0,2 g) og et overskudd av zinkpulver i en blanding av 100 ml eddiksyre og 10 ml vann ble omrørt og tilbakestrømmet i 5-10 minutter og filtrert mens den var varm. Vann ble tilsatt for å oppløse zinkacetat. Filtratet ble konsentrert og filtrert. Faststoffet oppnådd på denne måten ble samlet og vasket med vann for å gi 80 mg (40%) av ønsket 3,6-di[(5-benzyloksypyridin-2-yl)metyl]piperazin-2,5-dion (forbindelse 13).

Smp: 228-321°C.

Eksempel 14: Syntese av 3-[(5-acetoksyppyridin-2-yl)metyliden]-6-(benzylmetyliden)piperazin-2,5-dion (forbindelse 14)

3-[(5-benzyloksyppyridin-2-yl)metyliden]-6-benzylmetyliden)piperazin-2,5-dion (forbindelse 1,05 g, 1,26 mmol) og NaOH (0,5 g, 12,5 mmol) ble løst opp i 100 ml metanol. Blandingen ble hydrogenert med 0,5 g palladium/trekull under 1 atmosfære trykk. Etter at reaksjonen var fullført som registrert ved TLC, ble katalysatoren fjernet ved filtrering, og filtratet ble deretter avdampet i vakuum for å danne en rest. Resten ble tilsatt ved 50 ml vann, og den oppnådde vandige løsningen ble justert til pH=7. Et presipitat ble dannet og samlet for å oppnå et produkt på 0,27 g av 3-[(5-hydroksypyridin-2-yl)metyliden]-6-(benzylmetyliden)piperazin-2,5-dion (forbindelse B) (70% utbytte).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6,758 (s, 1H), δ 7,087 (s, 1H), δ 7,290– δ 7,580 (m, 7H, aromatisk), δ 8,328 (s, 1H) og δ 12,289 (s, 1H).

En løsning av forbindelse B (0,05 g, 0,16 mmol) i eddiksyreanhydrid (50 ml) ble tilbakestrømmet ved 150°C i 24 timer. Den ureagerte eddiksyreanhydrid og dannet eddiksyre ble fjernet i vakuum for å oppnå en rest. Resten ble kromatografert ved anvendelse av silikagelkolonne med et utviklende løsningsmiddel (CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1) for å gi 0,051 g (90%) av forbindelse 14 som en blanding av isomerer. Blandingen var hovedsakelig ZZ isomer.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 2,377 (s, 3H), δ 6,786 (s, 1H), δ 7,107 (s, 1H), δ 7,368– δ 8,496 (m, 7H, aromatisk), δ 8,224 (s, 1H) og δ 12,498 (s, 1H).

Eksempel 15: Syntese av 3-[(5-benzoyloksypyridin-2-yl)metyliden]-6-(benzylmetyliden)piperazin-2,5-dion (forbindelse 15)

En reaksjonsblanding inneholdende forbindelse B (0,05 g, 0,16 mmol; oppnådd fra eksempel 14), benzoylklorid (15 ml, 0,16 mmol) og 50 ml kloroform ble oppvarmet til 150°C i 2 t. Kloroform ble deretter fjernet i vakuum for å danne en rest. Resten ble kromatografert ved anvendelse av silikagelkolonne med et utviklende løsningsmiddel (CH_2Cl_2) for å gi 0,007 g (10%) av forbindelse 15.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6,786 (s, 1H), δ 7,107 (s, 1H), δ 7,368– δ 8,496 (m, 13H, aromatisk) og δ 8,223 (s, 1H).

Eksempel 16: Syntese av 3-[(5-(4-toluensylfonyl)pyridin-2-yl)metyliden]-6-(benzylmetyliden) piperazin-2,5-dion (forbindelse 16)

En reaksjonsblanding av forbindelse B (0,05 g, 0,16 mmol; oppnådd fra eksempel 14), toluensulfonylklorid (0,03 g, 0,16 mmol) og 50 ml toluen ble oppvarmet til 150°C i 2 t. Toluen ble fjernet i vakuum for å danne en rest. Resten ble kromatografert ved anvendelse av silikagelkolonne med et utviklende løsningsmiddel (CH₂Cl₂) for å gi 0,007 g (10%) av forbindelse 16.

¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ2,503 (s, 3H), δ6,751 (s, 1H), δ7,102 (s, 1H), δ7,343–δ8,159 (m, 12H, aromatisk), δ8,223 (s, 1H) og δ12,315 (s, 1H).

Eksempel 17: Syntese av 3-[(5-(4-klorofenylkarbamin)pyridin-2-yl)metyliden]-6-(benzylmetyliden) piperazin-2,5-dion (forbindelse 17)

En reaksjonsblanding av forbindelse B (0,05 g, 0,16 mmol; oppnådd fra eksempel 14), 4-klorfenylisocyanat (0,024 g, 0,16 mmol) og 50 ml kloroform ble oppvarmet til 100°C i 24 t. Kloroform ble fjernet, og det ble dannet en rest. Resten ble kromatografert ved anvendelse av silikagelkolonne med et utviklende løsningsmiddel (CH₂Cl₂) for å gi 0,01 g (15%) av forbindelse 17.

Eksempel 18: Skrining for anti-tumoraktiviteter (NCI cellelinjer)

De cytotoksiske aktivitetene til et antall piperazindion-forbindelser ble målt mot et panel på 60 forskjellige NCI humane tumorcellelinjer.

Alle testforbindelser ble funnet å være aktive. Den minst potente forbindelsen utviste GI₅₀ verdier <10⁻⁴ M for 4 cellelinjer. Den mest potente forbindelsen utviste GI₅₀ verdier på <10⁻⁴ M for alle 60 cellelinjer, med GI₅₀ verdier på <10⁻⁸ M for 9 cellelinjer.

Eksempel 19: Skrining for anti-tumoraktiviteter (en prostata cellelinje)

De cytotoksiske aktivitetene til et antall piperazindion-forbindelser og taksol (et velkjent anti-tumormiddel) ble testet på CD-3 celler. Cellene ble inkubert i nærvær av hver forbindelse i et serumfritt medium i 24 timer. De cytotoksiske aktivitetene ble bestemt ved MTT analyse. Alle testforbindelsene var aktive. Det var uventet at den mest potente piperazindion-forbindelsen har en EC₅₀ verdi rundt 0,3 mikrom, <30 ganger mer potent enn taksol.

Eksempel 20: *In vitro* analyse (inhibisjon av G₂/M progresjon av cellecyklusen)

PC-3 celler ble inkubert i nærvær av en piperazindion-forbindelse i et serumfritt medium og høstet, fiksert og farvet med propidiumjodid ved henholdsvis, 6., 12., 18. og 24. time. Stadier av cellecyklusene ble bestemt basert på målinger ved strømningscytometri. Testforbindelsen induserte en hemming av cellecyklusen som vist ved et stort antall celler i G₂/M fasen. I tillegg hadde en piperazindion-forbindelse en betydelig effekt på regulering av Ras-aktiviteten.

Eksempel 21: *In vitro* analyse (forstyrrelse av tubulin/mikrotubulin oppstilling)

Tubulin/mikrotubulin ble inkubert i nærvær av en piperazindion-forbindelse ved forskjellige konsentrasjoner i en løsning (0,1 M MES, 1 mM EGTA, 0,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA og 2,5 M glycerol) ved 37°C. Deretter ble GTP tilsatt for å indusere polymerisering av tubulin/mikrotubulin. Den optiske tettheten (OD) ble målt ved 350 nm ved forskjellige tidspunkter for å bestemme grad av polymerisering. Testforbindelsen inhiberte polymerisasjonen ved 10⁻⁶ – 10⁻⁵ M.

Eksempel 22: *In vivo* analyse (inhibisjon av forstørrelse av tumor)

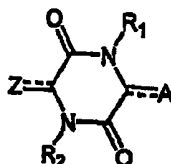
SCID mus, subkutan injisert inn i PC-3 celler, utviklet en tumor som var mer enn 800 mm³ i volum. En piperazindion-forbindelse reduserte i betydelig grad volumet til tumoren etter en 14-28 dager lang behandling.

Eksempel 23: *In vivo* analyse (regulering av angiogeneseaktivitet)

Etter subkutan inkubasjon av en bFGF eller VEGF-innholdende matrigelplugg (0,5 ml/20 g mus) i 6 dager, ble en betydelig angiogen effekt detektert i pluggen. Intraperitoneal injeksjon av en piperazindion-forbindelse reduserte nesten fullstendig den angiogene effekten.

Patentkrav

1. Forbindelse, karakterisert ved at den har formelen:



5 hvor:

hvor hver av --- og = , er en dobbeltbinding;

A er $\text{CH(R}^a\text{)}$;

10 Z er $\text{R}_3\text{O-(Ar)-B}$, hvor B er CH;

Ar er pyridyl bundet til B i posisjon 2; og R_3 er CH_2 -fenyl;

hvor fenyl er usubstituert eller substituert med en eller flere substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen, hydroksyl, amino, $\text{C}_1\text{-C}_6$ alkyl, $\text{C}_2\text{-C}_6$ alkoksy og fenyl;

15 hver av R_1 og R_2 er H;

og

R^a er tienyl, furyl, pyridinyl, indolyl, 2-okso-indolyl, eller fenyl;

hvor fenyl er usubstituert eller substituert med en eller flere substituenten valgt fra gruppen bestående av halogen, hydroksyl, amino, nitro, $\text{C}_1\text{-C}_6$ alkyl, $\text{C}_2\text{-C}_6$ alkoksy og fenyl.

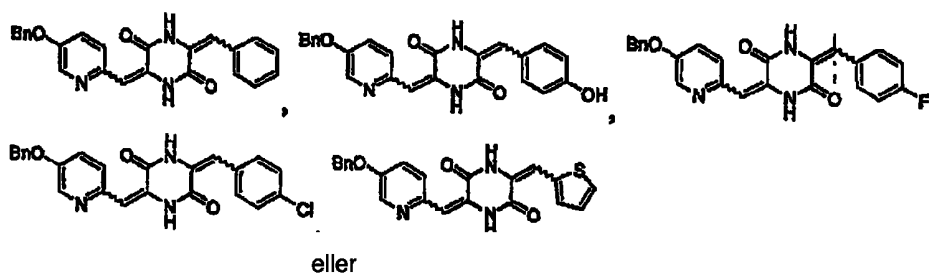
20

2. Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at R_3O er koblet til posisjon 5 av pyridyl.

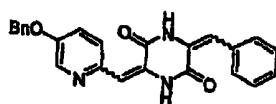
25

3. Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at R_3O er benzyloksy.

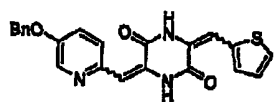
4. Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at forbindelsen er



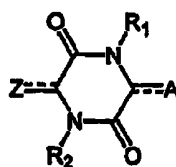
5. Forbindelse ifølge krav 4, karakterisert ved at forbindelsen er



6. Forbindelse ifølge krav 4, karakterisert ved at forbindelsen er



7. Anvendelse av en forbindelse som har formelen:



hvor

hver av --- og --- er en dobbeltbinding;

A er $\text{CH}(\text{R}^a)$;

Z er $\text{R}_3\text{O}-(\text{Ar})-\text{B}$, hvor B er CH;

Ar er pyridyl bundet til B i posisjon 2; og R_3 er CH_2 -fenyl;

hvor fenyl er usubstitueret eller substitueret med en eller flere substituenten valgt fra gruppen bestående af halogen, hydroksyl, amino, C₁-C₆alkyl, C₂-C₆alkoksy og fenyl;

hver af R₁ og R₂ er H;

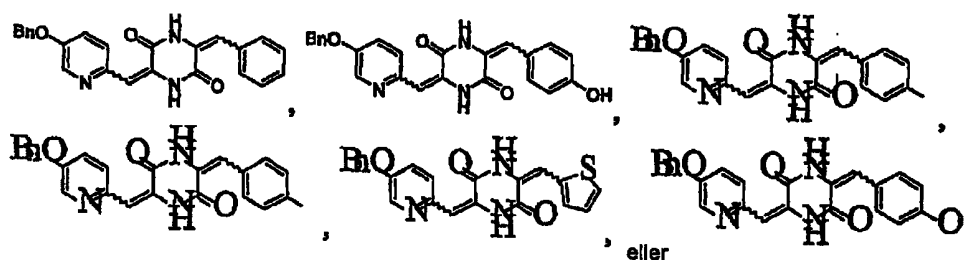
5 og

R^a er tienyl, furyl, pyridinyl, indolyl, 2-okso-indolyl, eller fenyl;

hvor fenyl er usubstitueret eller substitueret med en eller flere substituenten valgt fra gruppen bestående af halogen, hydroksyl, amino, nitro, C₁-C₆alkyl, C₂-C₆alkoksy og fenyl for fremstilling af en farmasøytisk sammensætning for behandling af tumor.

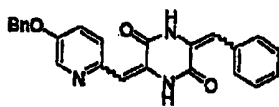
10

8. Anvendelse ifølge krav 7, idet forbindelsen er



15

9. Anvendelse ifølge krav 8, idet forbindelsen er



10. Anvendelse ifølge krav 8, idet forbindelsen er

20

