



(12) PATENT

(19) NO

(11) 330433

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07D 311/22 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

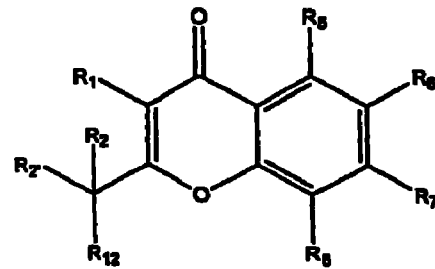
A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

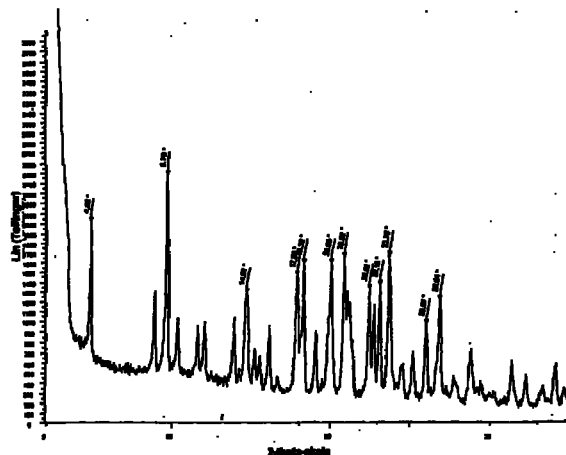
Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20044662	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2003.04.11 PCT/US2003/11432
(22)	Inng.dag	2004.10.28	(85)	Videreføringssdag	2004.10.28
(24)	Løpedag	2003.04.11	(30)	Prioritet	2002.04.17, US, 373454 2002.09.13, US, 410682
(41)	Alm.tilgj	2005.01.14			
(45)	Meddelt	2011.04.11			
(73)	Innehaver	SmithKline Beecham Corp, P O Box 7929, US-PA19101 PHILADELPHIA, USA Cytokinetics Inc, 280 East Grand Avenue, Suite 2, US-CA94080 SOUTH SAN FRANCISCO, USA			
(72)	Oppfinner	David John C Morgans Jr, 781 Vista Grande Avenue, US-CA94024 LOS ALTOS, USA Bainian Feng, 1033 Egret Street, US-CA94404 FOSTER CITY, USA Dashyant Dhanak, c/o GlaxoSmithKline, UW2220, P O Box 1539, US-PA19406 KING OF PRUSSIA, USA Steven D Knight, 709 Swedeland Road, US-PA19406 KING OF PRUSSIA, USA Andrew McDonald, 1554 Green St., Apartment F, US-CA94123 SAN FRANCISCO, USA Gustave Bergenes, 74 Kathleen Court, US-CA94044 PACIFICA, USA Kenneth A Newlander, c/o GlaxoSmithKline, UW2220, P O Box 1539, US-PA19406 KING OF PRUSSIA, USA			
(74)	Fullmektig	Christopher S Brook, c/o GlaxoSmithKline, UW2220, P O Box 1539, US-PA19406 KING OF PRUSSIA, USA Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	KSP-inhibitorer samt anvendelse derav og sammensetning			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 00/26212 A1, WO 01/98278 A1			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives forbindelser som er egnet til behandling av cellulære proliferative sykdommer og forstyrrelser, ved å modulere aktiviteten av KSP.



Figur 1 - Tilberedning A



Oppfinnelsesområde

Denne oppfinnelse vedrører forbindelser som er inhibitorer av det mitotiske kinesin KSP samt anvendelse derav og sammensetning. Forbindelsene er anvendelige ved behandlingen av cellulære proliferative sykdommer, for eksempel cancer, hyperplasier, restenose, kardial hypertrofi, immunforstyrrelser og inflammasjon.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Blant de terapeutiske midler som benyttes til behandling av cancer er taxaner og vinca-alkaloider, som virker på mikrotubuli. Mikrotubuli er det primære strukturelement av mitosespindelen. Mitosespindelen er ansvarlig for fordeling av replikatkopier av genomet til hver av de to dattercellene som oppstår ved celledeling. Det antas at forstyrrelsen av mitosespindelen med disse medikamentene resulterer i inhibering av cancercelledeling og induksjon av cancercelledød. Mikrotubuli danner imidlertid andre typer av cellulære strukturer, inklusivt spor for intracellulær transport i nerveprosesser. Siden disse midlene ikke spesifikt målsøker mitosespindler, har de bivirkninger som begrenser deres nytte.

Forbedringer av spesifisiteten av midler til kreftbehandling er av betydelig interesse på grunn av de terapeutiske fordeler som ville kunne realiseres dersom de bivirkninger som er assosiert med administreringen av disse midlene kunne reduseres. Tradisjonelt er dramatiske forbedringer ved behandlingen av cancer forbundet med identifiseringen av terapeutiske midler som virker gjennom nye mekanismer. Eksempler på dette er ikke bare taxanene, men også camptothecin-klassen av topoisomerase I-inhibitorer. Ut fra begge disse perspektiver er mitotiske kinesiner attraktive mål for nye anticancermidler.

Mitotiske kinesiner er enzymer som er essensielle for sammensetning og funksjon av mitosespindelen, men er ikke generelt del av andre mikrotubulusstrukturer, så som i nerveprosesser. Mitotiske kinesiner spiller en essensiell rolle under alle faser av mitosen. Disse enzymene er «molekylære motorer» som omdanner energi frigitt ved hydrolyse av ATP, til mekanisk kraft som driver den retningsbestemte bevegelse av cellulært gods langs mikrotubuli. Det katalytiske domenet som er tilstrekkelig for denne oppgave, er en kompakt struktur på ca. 340 aminosyrer. Under mitose organiserer kinesiner mikrotubuli til den bipolare struktur som er mitosespindelen. Kinesiner medierer bevegelse av kromosomer langs

spindel-mikrotubuli, så vel som strukturelle endringer i mitosespindelen assosiert med spesifikke mitosefaser. Eksperimentell forstyrrelse av mitotisk kinesinfunksjon bevirker misdannelse eller dysfunksjon av mitosespindelen som ofte resulterer i cellyklusstans og celledød.

5 Blant de mitotiske kinesinene som er blitt identifisert, er KSP. KSP tilhører en evolusjonært konservert kinesin-subfamilie av plus-ende-rettede mikrotubulus-motorer som setter seg sammen til bipolare homotetramerer bestående av anti-parallele homodimerer. Under mitose forbinder KSP seg med mikrotubuli i mitose-spindelen. Mikroinjeksjon av antistoffer rettet mot KSP i menneskeceller forhindrer 10 spindelpol-separasjon under pro-metafase, hvilket fører til monopolare spindler og bevirker mitosestans og induksjon av programmert celledød. KSP og beslektede kinesiner i andre, ikke humane, organismer, setter sammen antiparallele mikrotubuli og forskyver dem i forhold til hverandre og tvinger dermed de to spindelpolene fra hverandre. KSP kan også medvirke i anafase B spindelelongering og fokusering av 15 mikrotubuli til spindelpolen.

Humant KSP (også betegnet HsEg5) har vært beskrevet (Blangy, *et al.*, Cell, 83:1159-69 (1995); Whitehead *et al.*, Arthritis Rheum., 39:1635-42 (1996); Galgio, *et al.*, J. Cell Biol., 135:339-414 (1996); Blangy, *et al.*, J. Biol. Chem., 272:19418-24 (1997); Blangy, *et al.*, Cell Motil Cytoskeleton, 40:174-82 (1998); Whitehead & 20 Rattner, J. Cell Sci., 111:2551-61 (1998); Kaiser, *et al.*, JBC 274:18925-31 (1999); GenBank tilgangsnummer: X85137, NM004523 og U37426) og et fragment av KSP-genet (TRIP5) har vært beskrevet (Lee, *et al.*, Mol. Endocrinol., 9:243-54 (1995); GenBank tilgangsnummer L40372). Xenopus KSP-homologer (Eg5), så vel som Drosophila KLP61 F/KRP1 30 har vært rapportert.

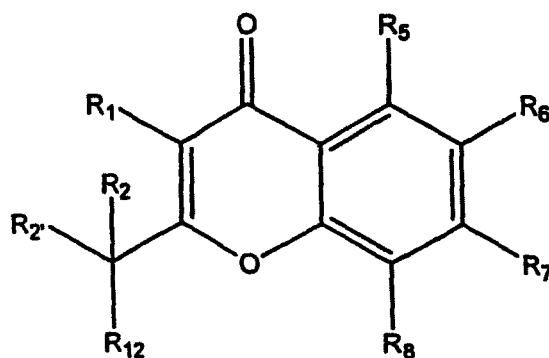
25 Mitotiske kinesiner, inklusivt KSP, er attraktive siktemål for oppdagelse og utvikling av nye antimitotiske kjemoterapeutika. Det er derfor et formål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe forbindelser som er anvendelige ved inhiberingen av KSP.

30 Sammenfatning av oppfinnelsen

I henhold til de ovenfor skisserte formål, tilveiebringer foreliggende oppfinnelse forbindelser som kan benyttes til å behandle cellulære proliferative sykdommer. Forbindelsene er KSP-inhibitorer, særlig humane KSP-inhibitorer. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også sammensetninger som omfatter slike forbindelser.

I henhold til ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen anvendelse av en forbindelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9, eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat, eller solvat av et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av en cellulær proliferativ sykdom. Ifølge den foreliggende oppfinnelsen er den nevnte cellulære proliferative sykdom valgt fra cancer, hyperplasier, restenose, kardial hypertrofi, immunforstyrrelser og inflammasjon.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre forbindelse, kjennetegnet ved at den har strukturen:



hvor:

R₁ er benzyl, halogenbenzyl, metoksybenzyl eller cyanobenzyl;

R₂ er isopropyl;

R_{2'} er hydrogen;

R₅ er hydrogen;

R₆ er hydrogen;

R₇ er halogen, cyano eller metoksy;

R₈ er hydrogen; og

R₁₂ er -N(R₄)(COR₃) hvor R₃ er tolyl og R₄ er aminopropyl;

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav; eller

et farmasøytisk akseptabelt solvat derav;

eller et farmasøytisk akseptabelt solvat av et farmasøytisk akseptabelt salt

derav. Ifølge oppfinnelsen er R₂ og R_{2'} hver koblet til et stereogent senter som har en R-konfigurasjon eller en S-konfigurasjon.

Forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes for behandling av cellulære proliferative sykdommer og andre forstyrrelser som kan behandles ved

inhibering av KSP ved administrering av en terapeutisk effektiv mengde av forbindelse; et farmasøytisk akseptabelt salt derav; eller et farmasøytisk akseptabelt solvat av et farmasøytisk akseptabelt salt derav. Slike sykdommer og forstyrrelser omfatter cancer, hyperplasi, restenose, kardial hypertrofi, immunforstyrrelser og inflammasjon.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre sammensetning kjennetegnet ved at den omfatter en farmasøytisk eksipient og en forbindelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9 eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat eller solvat av et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

Kort beskrivelse av figurene

Oppfinnelsen vil bedre forstås ved referanse til den følgende beskrivelse i sammenheng med de ledsagende tegninger.

Figurene 1 og 2 representerer henholdsvis et XRPD- og MDSC-opptak av et salt fremstilt ifølge Fremstilling A.

Figur 3 representerer et XRPD-opptak av et salt fremstilt ifølge Fremstilling B.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Farmasøytisk akseptable salter refererer seg til de salter som beholder den biologiske effektivitet av den frie forbindelse og som ikke biologisk eller på annen måte er uønskede, dannet med en egnet syre eller base, og innbefatter farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter og baseaddisjonssalter. **Farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter** innbefatter de som er avledet fra uorganiske syrer, så som saltsyre, hydrogenbromidsyre, svovelsyre, salpetersyre, fosforsyre og lignende, og de som er avledet fra organiske syrer, så som eddiksyre, propionsyre, glykolsyre, 2-oksopropansyre, oksalsyre, maleinsyre, malonsyre, ravsyre, fumarsyre, vinsyre, sitronsyre, benzoesyre, kanelisyre, mandelsyre, metansulfonsyre, etansulfonsyre, p-toluensulfonsyre, salisylysyre og lignende.

Farmasøytisk akseptable baseaddisjonssalter innbefatter de som er avledet fra uorganiske baser, så som natrium-, kalium-, litium-, ammonium-, kalsium-, magnesium-, jern-, sink-, kobber-, mangan-, aluminiumsalter og lignende. Særlig foretrukket er ammonium-, kalium-, natrium-, kalsium- og magnesiumsaltene. Baseaddisjonssalter innbefatter også de som er avledet fra farmasøytisk akseptable organiske ugiftige baser, inklusivt salter av primære, sekundære og tertiære aminer,

substituerte aminer, inklusivt naturlig forekommende substituerte aminer, cykliske aminer og basiske ionebytterharpikser, så som isopropylamin, trimetylamin, dietylamin, trietylamin, tripropylamin og etanolamin.

Beskyttelsesgruppe har den konvensjonelle betydning som er assosiert med organisk syntese, dvs. en gruppe som selektivt blokkerer én eller flere reaktive seter i en multifunksjonell forbindelse, slik at en kjemisk reaksjon kan foretas selektivt på et annet ubeskyttet reaktivt sete, og slik at gruppen lett kan fjernes etter at den selektive reaksjon er fullført. En rekke beskyttelsesgrupper er beskrevet for eksempel i T.H. Greene & P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3. utg. John Wiley & Sons, New York (1999), som herved med hele sitt innhold inkorporeres ved referanse. For eksempel er en hydroksy-beskyttet form en form hvor minst én av hydroksylgruppene som forekommer i en forbindelse er beskyttet med en hydroksy-beskyttende gruppe. På samme måte kan aminer og reaktive grupper beskyttes.

Solvat refererer seg til forbindelsen dannet ved interaksjon mellom et løsningsmiddel og en forbindelse heri eller et salt derav. Egnede solvater av forbindelsene heri er farmasøytisk akseptable solvater, så som hydrater, inklusivt monohydrater og hemihydrater.

Mange av de her beskrevne forbindelser inneholder ett eller flere asymmetrisentre (f.eks. det karbon som R_1 og R_2 er tilknyttet, hvor R_1 er forskjellig fra R_2) og kan derfor føre til enantiomerer, diastereomerer og andre stereoisomere former som kan defineres med hensyn til absolutt stereokjemi, så som (R)- eller (S)-. Foreliggende oppfinnelse er ment å omfatte alle slike mulige isomerer, inklusivt racemiske sammensetninger, optisk rene former og mellomproduktblandinger. Optisk aktive (R)- og (S)-isomerer kan fremstilles ved å benytte kirale syntesekomponenter eller kirale reagenser, eller løses på nytt under bruk av konvensjonelle teknikker. Dersom de her beskrevne forbindelsene inneholder olefiniske dobbeltbindinger eller andre sentre med geometrisk asymmetri, og om intet annet er angitt, er det ment at forbindelsene inkluderer både E- og Z-geometriske isomerer. Alle tautomere former og rotasjonsisomerer er likeledes ment å være inkludert.

Når det ønskes kan R- og S-isomerene spaltes etter fremgangsmåter kjent for fagmannen, for eksempel ved dannelsen av diastereoisomere salter eller komplekser som kan separeres, for eksempel ved krystallisering; via dannelsen av diastereoisomere derivater som kan separeres, for eksempel ved krystallisering, gass- eller væskechromatografi; selektiv reaksjon mellom én enantiomer og et enantiomer-

spesifikt reagens, for eksempel enzymatisk oksydasjon eller reduksjon, etterfulgt av separasjon av de modifiserte og umodifiserte enantiomerer; eller gass- eller væskekromatografi i et kiralt miljø, for eksempel på en kiralt bærer, så som silika, med en bundet kiralt ligand eller i nærvær av et kiralt løsningsmiddel. Det er

5 underforstått at når den ønskede enantiomer omdannes til en annen kjemisk entitet etter én eller flere av de ovenfor beskrevne separasjonsteknikker, kan det kreves et ytterligere trinn for å frigi den ønskede enantiomere form. Alternativt kan en spesifikk enantiomer syntetiseres ved asymmetrisk syntese under bruk av optisk aktive reagenser, substrater, katalysatorer eller løsningsmidler, eller ved omdannelse av én

10 enantiomer til en annen ved asymmetrisk transformasjon.

Forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse

Foreliggende oppfinnelse er rettet mot en klasse av nye forbindelser som kan beskrives som benzopyran-4-oner eller kromen-4-oner, som er inhibitorer av ett eller

15 flere mitotiske kinesiner. Ved inhibering av mitotiske kinesiner, men ikke andre kinesiner (f.eks. transport-kinesiner), oppnås spesifikk inhibering av cellulær proliferasjon. Uten ønske om binding til en bestemt teori, dreier foreliggende oppfinnelse seg hovedsakelig om det funn at forstyrrelse av mitotisk kinesinfunksjon forårsaker misdannelse eller dysfunksjon av mitotiske spindler, hvilket ofte resulterer i

20 stans av cellyklus og celledød. Forbindelsene kan hemme det mitotiske kinesin, KSP. Forbindelsene kan videre inhibere det mitotiske kinesin, KSP, så vel som modulering av én eller flere av de humane mitotiske kinesinene som er valgt fra gruppen bestående av HSET (se US-patent 6.361.993); MCAK (se US-patent 6.331.424); CENP-E (se PCT-publikasjon WO 99/13061); Kif4 (se US-patent

25 6.440.684); MKLP1 (se US-patent 6.448.025); Kif15 (se US-patent 6.355.466); Kid (se US-patent 6.387.644); Mpp1, CMKrp, Kinl-3 (se US-patent 6.461.855); Kip3a (se PCT publikasjon nr. WO 01/96593); Kip3d (se US-patent 6.492.151); og RabK6.

Fremgangsmåtene for inhibering av et humant KSP-kinesin omfatter kontakting av en inhibitor ifølge oppfinnelsen med et kinesin, særlig et humant

30 kinesin, fortrinnsvis humant KSP eller fragmenter og varianter derav. Inhiberingen kan være av ATP-hydrolyseaktiviteten av KSP-kinesinet og/eller aktiviteten av den mitotiske spindeldannelse, slik at de mitotiske spindler forstyrres. Meiotiske spindler kan også forstyrres.

Et formål ved foreliggende oppfinnelse er å utvikle inhibitorer av mitotiske kinesiner, særlig KSP, og spesielt humant KSP, til behandlingen av forstyrrelser assosiert med celleproliferasjon. Tradisjonelt har dramatiske forbedringer ved behandlingen av cancer, én type av cellulær proliferativ forstyrrelse, vært assosiert med identifisering av terapeutiske midler som virker gjennom nye mekanismer. Eksempler på dette inkluderer ikke bare taxanklassen av midler, som synes å virke på mikrotubulusdannelse, men også kamptotecinklassen av topoisomerase I inhibitorer. De her beskrevne forbindelsene og blandingene kan adskille seg i deres selektivitet og benyttes fortrinnsvis til å behandle cellulære proliferasjonssykdommer, inklusivt, men ikke begrenset til, cancer, hyperplasier, restenose, kardial hypertrofi, immunforstyrrelser og inflammasjon.

Syntese av forbindelsene med Formel I

Forbindelsene med Formel I kan fremstilles ved å følge de beskrevne fremgangsmåter ved referanse til Reaksjonsskjemaene nedenfor eller ved å benytte teknikker som er velkjente på området. Se for eksempel Hirao *et al.*, (1984) Synthesis 1076-1078 og Coppola *et al.*, (1981) Synthesis 523-526, som herved inkorporeres ved referanse.

Om intet annet er angitt, betyr betegnelsene «løsningsmiddel», «inert organisk løsningsmiddel» eller «inert løsningsmiddel» et løsningsmiddel som er inert under de reaksjonsbetingelser som er beskrevet i sammenheng med disse [inkludert for eksempel benzen, toluen, acetonitril, tetrahydrofuran («THF»), dimetylformamid («DMF»), kloroform, metylenklorid (eller diklormetan), dietyleter, metanol, pyridin og lignende]. Om intet annet er angitt er løsningsmidlene benyttet i reaksjonene ifølge foreliggende oppfinnelse inerte organiske løsningsmidler.

Betegnelsen «q.s.» betyr tilsetning av en tilstrekkelig mengde til å oppnå en angitt funksjon, f.eks. for å bringe en løsning til det ønskede volum (dvs. 100%).

Generelt kan estere av karboksylsyrer fremstilles etter konvensjonelle forestringsmetoder, for eksempel kan alkylestere fremstilles ved å behandle den nødvendige karboksylsyre med den passende alkanol generelt under sure betingelser. Likeledes kan amider fremstilles ved å benytte konvensjonelle amidningsmetoder, for eksempel kan amider fremstilles ved å behandle den relevante karboksylsyre med det passende amin. Alternativt kan en lavere-alkylester, så som en metylester av syren, behandles med et amin for å gi det nødvendige amid,

eventuelt i nærvær av trimetylaluminium, ved å følge fremgangsmåten beskrevet i Tetrahedron Lett. 48, 4171-4173 (1977). Karboksylgrupper kan beskyttes som alkylestere, for eksempel metylestere, estere som kan fremstilles og spaltes ved bruk av konvensjonelle fremgangsmåter, en hensiktsmessig metode for omdannelse av karbometoksy til karboksyl er anvendelsen av vandig litiumhydroksyd.

De salter og solvater av forbindelsene som er angitt her kan fremstilles etter konvensjonelle fremgangsmåter. Dersom for eksempel en forbindelse ifølge oppfinnelsen er en syre, kan et ønsket baseaddisjonssalt fremstilles ved behandling av den frie syre med en uorganisk eller organisk base, så som et amin (primært, sekundært eller tertiært); et alkalimetall- eller jordalkalimetallhydroksyd; eller lignende. Illustrerende eksempler på egnede salter er organiske salter avledet fra aminosyrer, så som glycin og arginin; ammoniakk, primære, sekundære og tertiære aminer, så som etylendiamin og cycliske aminer, så som cykloheksylamin, piperidin, morfolin og piperazin; så vel som uorganiske salter avledet av natrium, kalsium, kalium, magnesium, mangan, jern, kobber, sink, aluminium og litium.

Dersom en forbindelse er en base, kan et ønsket syreaddisjonssalt fremstilles etter en hvilken som helst egnet fremgangsmåte kjent på området, inklusivt behandling av den frie base med en uorganisk syre, så som saltsyre, hydrogenbromidsyre, svovelsyre, salpetersyre, fosforsyre og lignende, eller med en organisk syre, så som eddiksyre, maleinsyre, ravsyre, mandelsyre, fumarsyre, malonsyre, 2-oksopropansyre, oksalsyre, glykolsyre, salicylsyre, pyranosidylsyre, så som glukuronsyre eller galakturonsyre, alfa-hydroksysyre, så som sitronsyre eller vinsyre, aminosyre, så som asparaginsyre eller glutaminsyre, aromatisk syre, så som benzoesyre eller kanelsyre, sulfonsyre, så som p-toluensulfonsyre, metansulfonsyre, etansulfonsyre eller lignende.

Isolering og rensing av forbindelsene og mellomprodukter beskrevet her kan foretas om ønskes, etter en hvilken som helst passende separasjons- eller rensemetode, så som for eksempel filtrering, ekstraksjon, krystallisasjon, kolonnekromatografi, tynnsjikt-kromatografi, «tykksjikt-kromatografi» eller en kombinasjon av disse fremgangsmåter. Spesifikke illustrasjoner av passende separasjons- og isolasjonsmetoder fremgår av eksemplene nedenfor. Andre likeverdige separasjons- eller isolasjonsmetoder kan imidlertid selvsagt også benyttes.

Kort beskrivelse av reaksjonsskjemaene

Reaksjonsskjema 1 illustrerer en syntese av forbindelser med formel 109, et mellomprodukt ved syntesen av forbindelser med Formel I.

Reaksjonsskjema 2 illustrerer en syntese av forbindelser med Formel I, hvor
5 R_{12} er $-N(R_4)(COR_3)$.

Reaksjonsskjema 4 illustrerer en syntese av forbindelser med Formel I, hvor R_7 er $-OCH_3$.

Reaksjonsskjema 5 illustrerer en annen syntese av forbindelser med Formel I, hvor R_{12} er $-N(R_4)(COR_3)$.

10 Reaksjonsskjema 14 illustrerer en syntese av forbindelser med Formel 1407 som kan benyttes som et mellomprodukt ved syntesen av forbindelser med Formel I.

Reaksjonsskjema 15 illustrerer en syntese av forbindelser med Formel 1505 som kan benyttes som et mellomprodukt ved syntesen av forbindelser med Formel I.

15 **Utgangsmaterialer**

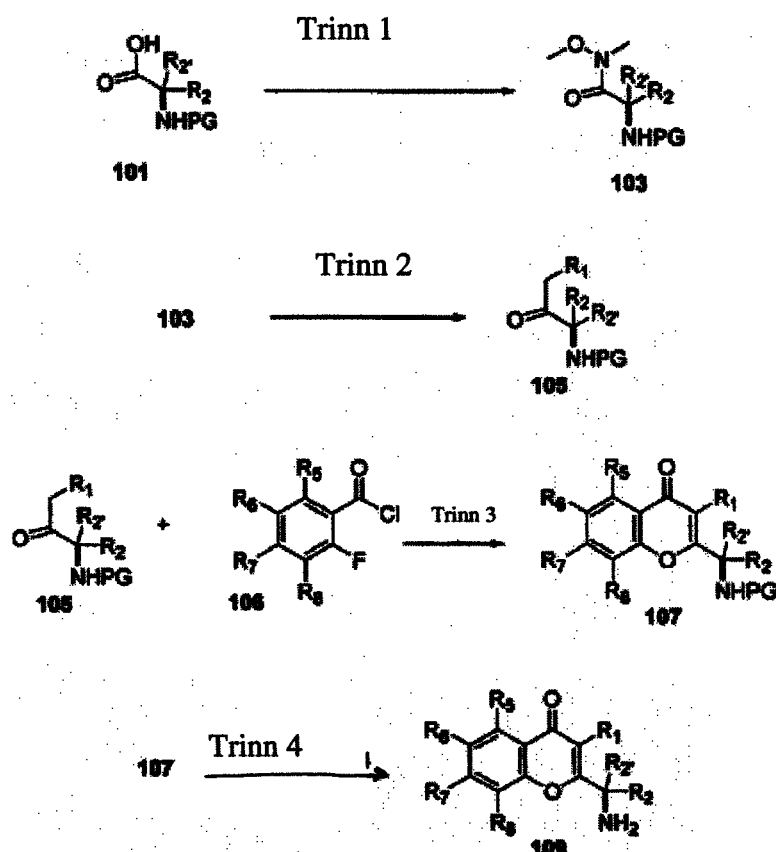
De eventuelt substituerte forbindelser med Formel 101 er kommersielt tilgjengelige, f.eks. fra Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI. Andre reaktanter er likeledes kommersielt tilgjengelige eller kan lett fremstilles av fagmannen ved å benytte vanlig anvendt syntesemetodikk.

20

25

30

Reaksjonsskjema 1



Fremstilling av forbindelser med Formel 103

Ifølge Reaksjonsskjema 1, Trinn 1, tilsettes i løpet av ett minutt ca. én ekvivalent etylklorformiat til en 0-5°C løsning av en forbindelse med Formel 101 (fortrinnsvis hvor den aminobeskyttende gruppe, PG, er en Boc-gruppe) og en base, så som trietylamin i et upolart, aprotisk løsningsmiddel, så som THF. Etter ca. 15 minutter tilsettes en blanding av et overskudd av dimetylhydroksylamin-hydroklorid (fortrinnsvis ca. 1,2 ekvivalenter) og en base, så som trietylamin i et upolart, aprotisk løsningsmiddel, så som THF, i løpet av 5 minutter. Produktet, en forbindelse med Formel 103, isoleres og benyttes uten videre rensing.

Fremstilling av forbindelser med Formel 105

Ifølge Reaksjonsskjema 1, Trinn 2, fremstilles et Grignard-reagens ved å blande en forbindelse med formel R₁CH₂Br (vanligvis ca. 3 ekvivalenter) og magnesium-dreiespon i et upolart, aprotisk løsningsmiddel, så som dietyleter. Etter ca. 1,5 timer er i alminnelighet Grignardreaksjonen fullført. En løsning av en forbindelse med Formel 103 i et upolart, aprotisk løsningsmiddel, så som eter, tilsettes til Grignardreagenset. Temperaturen bør overvåkes og må ikke overskride ~30°C. Produktet, en forbindelse med Formel 105, isoleres og renses.

Fremstilling av forbindelser med Formel 107

Ifølge Reaksjonsskjema 1, Trinn 3, tilsettes litium-bis(trimetylsilyl)amid (ca. 3,3 ekvivalenter) langsomt i løpet av ~3 minutter til en -78°C løsning av en forbindelse med Formel 105 i et upolart, aprotisk løsningsmiddel, så som THF. Temperaturen i reaksjonsløsningen bør overvåkes og tilsetningen av base foretas med en hastighet som er tilstrekkelig til å forhindre at temperaturen overskrider ca. -54°C. Etter at tilsetningen er fullført, holdes den resulterende løsning ved -78°C i ca. 30 minutter. Et syreklorid med Formel 106 (fortrinnsvis uforynnet) tilsettes deretter. Reaksjonsløsningen holdes ved -78°C i ca. 30 minutter. Produktet isoleres og benyttes uten videre rensing.

En blanding av ovennevnte råprodukt, en base så som kaliumkarbonat og et polart, aprotisk løsningsmiddel, så som DMF, holdes ved ca. romtemperatur i ca. 30 minutter. Produktet, en forbindelse med Formel 107, isoleres og renses.

15

Fremstilling av forbindelser med Formel 109

Ifølge Reaksjonsskjema 1, Trinn 4, kan beskyttelsesgruppen, PG, eventuelt fjernes fra aminet. Fagmannen på området vil innse at betingelsene for fjerning av beskyttelsesgruppen vil variere med forskjellige beskyttelsesgrupper. Slike betingelser er velkjente på området og finnes f.eks. i Greene *et al, supra*. Når PG er Boc, kan den fjernes ved behandling med en forbindelse med Formel 107 med en blanding av vandig TFA (fortrinnsvis TFA:H₂O, 97,5:2,5) ved romtemperatur. Produktet, en forbindelse med Formel 109, isoleres og renses.

Fremstilling av optisk aktive forbindelser

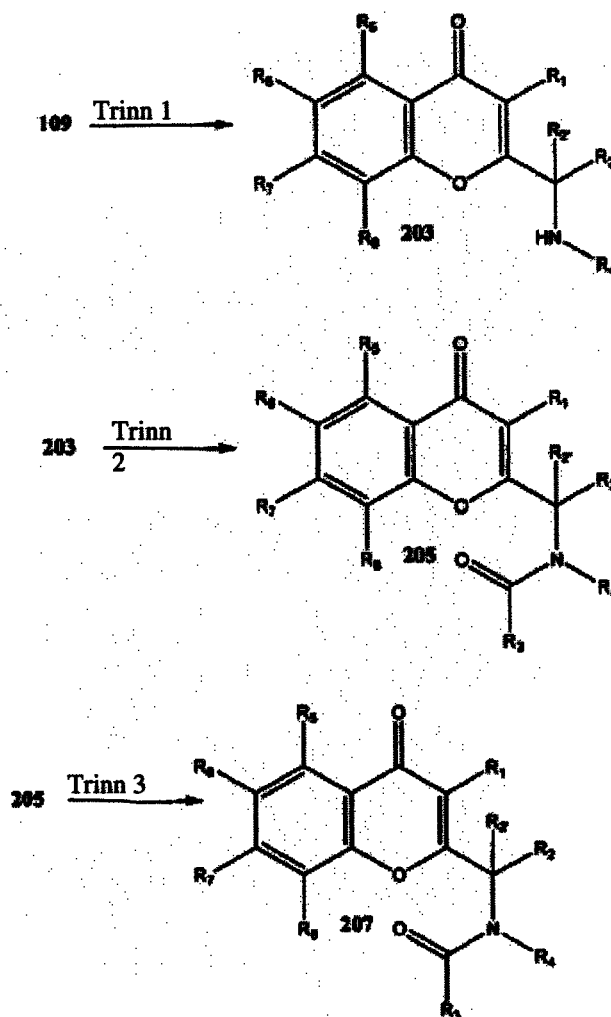
I forbindelser ifølge oppfinnelsen hvor R₂ er forskjellig fra R_{2'}, kan en spesiell stereokonfigurasjon (så som (R)-isomeren) være å foretrekke i det stereogene senter som R₂ og R_{2'} er tilkoblet. Den optisk aktive forbindelse kan fremstilles etter velkjente fremgangsmåter. For eksempel løses et amin med Formel 109 i et inert organisk løsningsmiddel (så som IPA) og oppvarmes til 60°C. I en separat beholder løses et spaltende middel (så som dibenzoyl-D-vinsyre), fortrinnsvis i det samme varme løsningsmiddel, og tilsettes raskt (under omrøring) til den varme aminløsningen. Reaksjonsblandingen får stå for å krystallisere ved avkjøling til romtemperatur i 16

30

timer under kontinuerlig omrøring. Den ønskede isomer, f.eks. (R)-isomeren av en forbindelse med Formel 109, isoleres og renses.

For korthets skyld er det i den gjenstående beskrivelse av syntesen av forbindelser med Formel I, underforstått at enten en enkeltisomer eller en blanding av isomerer kan benyttes for å gi det tilsvarende produkt.

Reaksjonsskjema 2



Fremstilling av Formel 203

- 10 Ifølge Reaksjonsskjema 2, Trinn 1, tilsettes en løsning av en forbindelse med Formel 109, suksessivt et svakt overskudd (fortrinnsvis ca. 1,2 ekvivalenter) av et aldehyd omfattende R₄ (dvs. en forbindelse som har formelen R₄·CHO, hvor R₄·CH₂- er likeverdig med R₄, og R₄ er som ovenfor beskrevet eller er en beskyttet forløper til en slik substituent, f.eks. (3-oksopropyl)-karbaminsyre-tert-butylester) og et
- 15 reduksjonsmiddel, så som natriumtriacetoksydborhydrid. Den resulterende blanding omrøres i flere timer. Produktet, en forbindelse med Formel 203, isoleres og renses.

Fremstilling av Formel 205

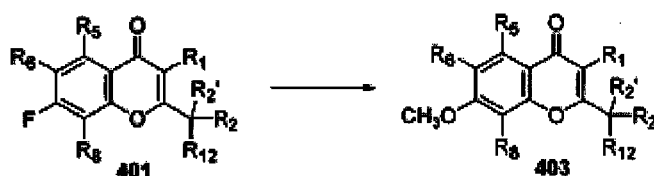
Ifølge Reaksjonsskjema 2, Trinn 2, tilsettes en løsning av en forbindelse med Formel 203 og en aminbase, så som diisopropyletylamin i et upolart, aprotisk løsningsmiddel så som diklormetan, et R₃-acylklorid (så som Cl-C(O)-R₃, hvor R₃ er som ovenfor beskrevet). Den resulterende løsning omrøres under nitrogen ved romtemperatur i flere timer. Produktet, en forbindelse med Formel 205, isoleres og renses.

10 Fremstilling av Formel 207

Eventuelt fjernes deretter enhver beskyttelsesgruppe på forbindelser med Formel 205. Omfatter for eksempel R₄ et beskyttet amin hvor den beskyttende gruppe er en Boc-gruppe, kan Boc-gruppen fjernes ved behandling av forbindelsen med Formel 205 med en syre, så som trifluoreddiksyre i et upolart, aprotisk løsningsmiddel, som f.eks. diklormetan, mens reaksjonen opprettholdes ved ca. romtemperatur. Reaksjonen overvåkes, f.eks. ved TLC. Etter fullført omsetning isoleres og renses produktet, en forbindelse med Formel 207.

Reaksjonsskjema 4

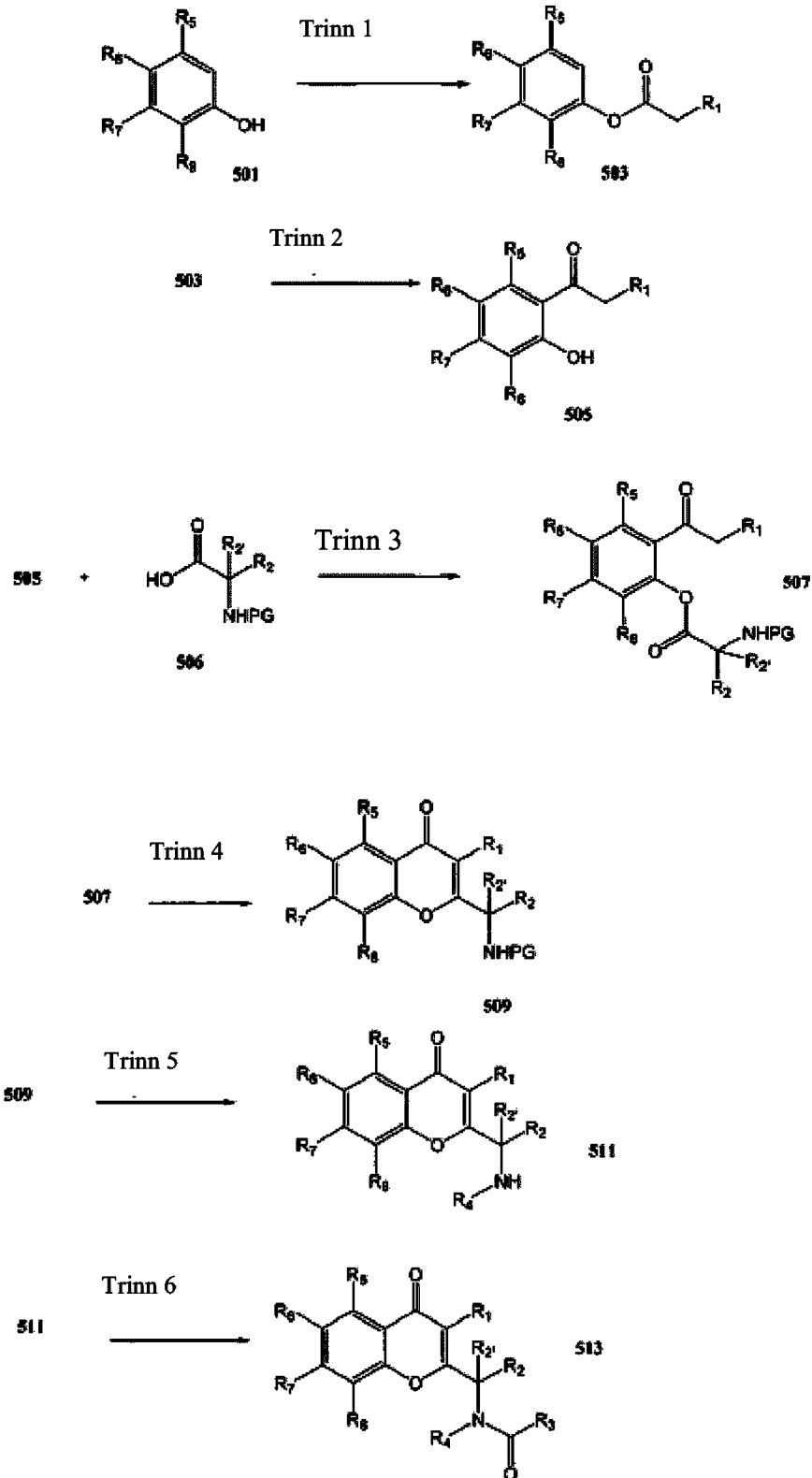
20



Ifølge Reaksjonsskjema 4, løses en forbindelse med Formel 401 i 0,5M natriummetoksyd i metanol og oppvarmes til ca. 70°C. Temperaturen holdes ved ca. 70°C i ca. 12 timer, og senkes deretter til romtemperatur. Produktet, en forbindelse med Formel 403, isoleres og renses.

30

Reaksjonsskjema 5



Ifølge Reaksjonsskjema 5, Trinn 1, tilsettes en løsning av en forbindelse med Formel 501 og en base så som trietylamin i et upolart, aprotisk løsningsmiddel så som CH_2Cl_2 ved romtemperatur, ca. én ekvivalent av et syreklorid med formel $\text{Cl}(\text{CO})\text{-CH}_2\text{R}_1$ i løpet av ca. 5 minutter. Etter ca. 30 minutter isoleres produktet, en forbindelse med Formel 503, som benyttes uten videre rensing.

Fremstilling av forbindelser med Formel 505

Ifølge Reaksjonsskjema 5, Trinn 2, tilsettes AlCl_3 (ca. 1,3 ekvivalenter) langsomt i løpet av ca. 15 minutter til en forbindelse med Formel 503 ved ca. 140°C . Etter opphørt gassutvikling avkjøles reaksjonsblandingen til romtemperatur. Produktet, en forbindelse med Formel 505, isoleres og renses.

Fremstilling av forbindelser med Formel 507

Ifølge Reaksjonsskjema 5, Trinn 3, holdes en forbindelse med Formel 505 og en aminosyre med Formel 506 (fortrinnsvis ca. 1,1 ekvivalenter) hvor amingruppen er blitt passende beskyttet med en beskyttelsesgruppe PG (fortrinnsvis en Boc-gruppe), et koblingsreagens så som HBTU (fortrinnsvis ca. 1,2 ekvivalenter), en base så som TEA og et upolart, aprotisk løsningsmiddel så som CH_2Cl_2 , ved romtemperatur i ca. 5 timer. Produktet, en forbindelse med Formel 507, isoleres og renses.

Fremstilling av forbindelser med Formel 509

Ifølge Reaksjonsskjema 5, Trinn 4, oppvarmes en blanding av ester med Formel 507 og en base så som kaliumkarbonat i et polart, aprotisk løsningsmiddel så som DMF, til ca. 140°C . Etter ca. 30 minutter isoleres og renses produktet, en forbindelse med Formel 509.

Fremstilling av forbindelser med Formel 511

Ifølge Reaksjonsskjema 5, Trinn 5, fjernes deretter den aminbeskyttende gruppe PG. Når PG er Boc, kan dette skje ved behandling av en forbindelse med Formel 509 med vandig syre (fortrinnsvis 97,5:2,5 TFA: H_2O) ved romtemperatur i ca. én time. Det frie amin isoleres og benyttes uten videre rensing.

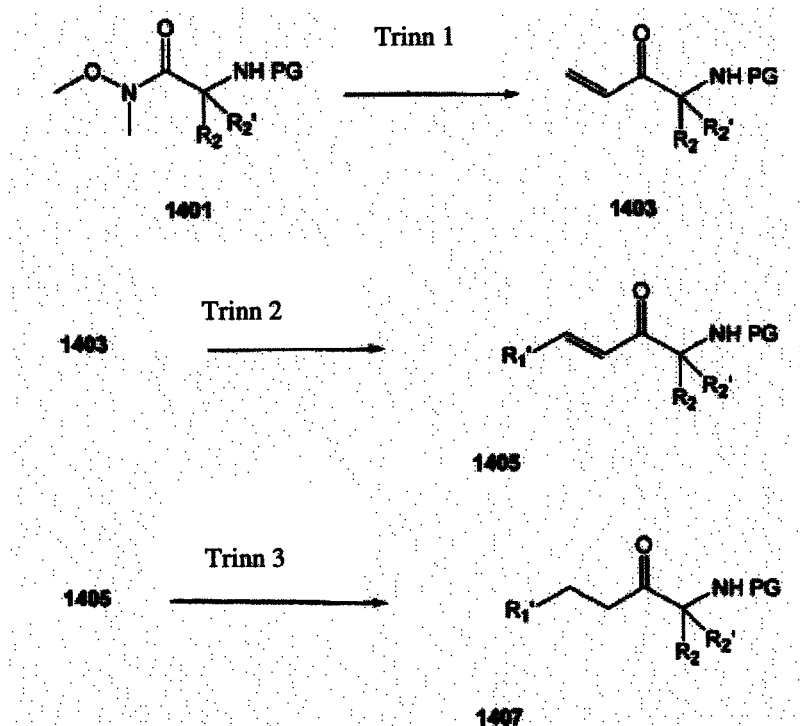
Det resulterende produkt, et aldehyd omfattende R_4 (dvs. en forbindelse som har formelen $\text{R}_4\text{-CHO}$, hvor $\text{R}_4\text{-CH}_2\text{-}$ er likeverdig med R_4 , og R_4 er som ovenfor

beskrevet eller er en beskyttet forløper til en slik substituent, f.eks. (3-oksopropyl)-
 karbaminsyre-tert-butylester; fortrinnsvis ca. 1,45 ekvivalenter); et reduksjonsmiddel
 så som Na(OAc)₃BH; og et upolart, aprotisk løsningsmiddel så som CH₂Cl₂ holdes
 ved romtemperatur i ca. 3 timer. Produktet, en forbindelse med Formel 511, isoleres
 5 og renses.

Fremstilling av forbindelser med Formel 513

Ifølge Reaksjonsskjema 5, Trinn 6, tilsettes en løsning av en forbindelse med
 Formel 511, en base så som diisopropyletylamin og et upolart, aprotisk løsnings-
 10 middel så som CH₂Cl₂ ved romtemperatur, et syreklorid med formel R₃COCl (for-
 trinnsvis ca. 2 ekvivalenter). Etter ca. 2,5 timer isoleres og renses produktet, en
 forbindelse med Formel 513.

Reaksjonsskjema 14



15

Fremstilling av forbindelser med Formel 1403

20 Ifølge Reaksjonsskjema 14, Trinn 1, avkjøles et upolart, aprotisk løsnings-
 middel så som THF, og et overskudd av en løsning av et eventuelt substituert vinyl-

magnesiumbromid i et upolart, aprotisk løsningsmiddel (og mer foretrukket, ca. tre ekvivalenter av en 1,0M løsning av et eventuelt substituert vinylmagnesiumbromid i THF), til -78°C under omrøring under nitrogenatmosfære. Blandingen behandles dråpevis med en løsning av en forbindelse med Formel 1401 i et upolart, aprotisk løsningsmiddel, så som THF, i løpet av ca. 30 minutter. Etter omrøring av blandingen i 30 minutter ved -78°C , fjernes kjølebadet og reaksjonsblandingen oppvarmes langsomt til romtemperatur over natten (ca. 15 timer). Produktet, en forbindelse med Formel 1403, isoleres og renses.

10 **Fremstilling av forbindelser med Formel 1405**

Ifølge Reaksjonsskjema 14, Trinn 2, tilsettes en løsning av en forbindelse med Formel 1403 i et vannfritt, upolart, aprotisk løsningsmiddel, så som acetonitril under inert atmosfære, så som argon, ca. én ekvivalent av en forbindelse med Formel $\text{R}_1\text{-X}$, hvor R_1 er eventuelt substituert vinyl, eventuelt substituert aryl eller eventuelt substituert heteroaryl og X er I, Br eller $-\text{OTf}$, og en base så som trietylamin, etterfulgt av palladium(II)acetat (fortrinnsvis ca. 0,025 ekvivalenter). Den resulterende løsning oppvarmes til ca. 80°C . Etter ca. 15 timer får reaksjonsblandingen avkjøles til romtemperatur. Produktet, en forbindelse med Formel 1405, isoleres og renses umiddelbart.

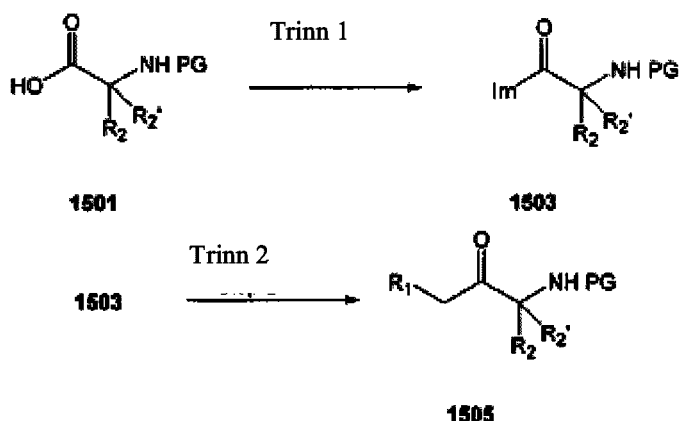
20

Fremstilling av forbindelser med Formel 1407

Til en løsning av en forbindelse med Formel 1405 i et upolart, aprotisk løsningsmiddel, så som etylacetat under nitrogen, tilsettes 10 vekt% palladium på kull. Nitrogenet erstattes med en hydrogenballong og kolben spyles. Etter 3 timer spyles reaksjonskolben med nitrogen og filtreres gjennom et lag Celite (rensing med et løsningsmiddel så som etylacetat). Produktet, en forbindelse med Formel 1407, isoleres og renses.

30

Reaksjonsskjema 15

**Fremstilling av forbindelser med Formel 1503**

Ifølge Reaksjonsskjema 15, Trinn 1, tilsettes ca. én ekvivalent karbonyl-
 5 diimidazol langsomt til en romtemperert løsning av en forbindelse med Formel 1501 (fortrinnsvis hvor den aminobeskyttende gruppe PG er Boc) i et upolart, aprotisk løsningsmiddel så som THF. Etter ca. én time isoleres produktet, en forbindelse med Formel 1503, som benyttes uten videre rensing.

10 Fremstilling av forbindelser med Formel 1505

Ifølge Reaksjonsskjema 15, Trinn 2, fremstilles et Grignardreagens fra en
 forbindelse med Formel $\text{R}_1\text{CH}_2\text{Br}$ og magnesium-dreiespon i et upolart, aprotisk
 løsningsmiddel så som THF. En løsning av en forbindelse med Formel 1503 i et
 upolart, aprotisk løsningsmiddel så som THF, avkjøles til ca. $0-5^\circ\text{C}$. Løsningen av
 15 Grignardreagentet tilsettes deretter med en sprøyte til $0-5^\circ\text{C}$ løsningen av for-
 bindelsen med Formel 1503. Temperaturen overvåkes ved innvendig termometer og
 får ikke overskride ca. 15°C . Reaksjonsblandingen holdes ved ca. $0-5^\circ\text{C}$ i ca. én
 time. Produktet, en forbindelse med Formel 1505, isoleres og renses.

20 Foretrukne fremgangsmåter og avsluttende trinn

En forbindelse med Formel I bringes eventuelt i kontakt med en farmasøytisk
 akseptabel syre eller base for å danne det tilsvarende syre- eller baseaddisjonssalt.

Et farmasøytisk akseptabelt syreaddisjonssalt av en forbindelse med Formel I
 bringes eventuelt i kontakt med en base for å danne den tilsvarende frie base av
 25 Formel I. Et farmasøytisk akseptabelt baseaddisjonssalt av en forbindelse med

Formel I bringes eventuelt i kontakt med en syre for å danne den tilsvarende frie syre med Formel I.

Foretrukne saltformer

5 Foretrukne forbindelser vil i alminnelighet være i stand til å danne syreaddisjonssalter (dvs. vil omfatte et sete som reagerer med en farmasøytisk akseptabel syre for å danne et syreaddisjonssalt). Foreliggende oppfinnelse inkluderer farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter av forbindelsene med Formel I. Syreaddisjonssalter ifølge foreliggende oppfinnelse fremstilles etter
10 standard fremgangsmåter i et passende løsningsmiddel fra opphavsforbindelsen og et overskudd av en syre, så som saltsyre, hydrogenbromidsyre, svovelsyre, fosforsyre, eddiksyre, maleinsyre, ravsyre eller metansulfonsyre. Foretrukne saltformer er saltsyre-, fosforsyre- og oksalsyresalter, hvorav saltsyre-saltformen spesielt foretrekkes.

15 Saltene og/eller solvatene av forbindelsene med Formel (I) som ikke er farmasøytisk akseptable, kan være nyttige som mellomprodukter ved fremstillingen av farmasøytisk akseptable salter og/eller solvater av forbindelser med Formel (I) eller forbindelsene med Formel (I) som sådanne, og utgjør således et annet aspekt ved foreliggende oppfinnelse.

20

Anvendelighet, testing og administrasjon

Generell anvendelighet

Etter at forbindelsene ifølge oppfinnelsen er fremstilt, kan de benyttes for en rekke anvendelser som involverer endring av mitose. Som fagmannen vil innse kan
25 mitosen endres på en rekke måter; man kan påvirke mitose enten ved å øke eller minske aktiviteten av en komponent i mitoseveien, uttrykt annerledes, kan mitose påvirkes (f.eks. forstyrres) ved å forstyrre likevekten, enten ved inhibering eller aktivering av visse komponenter. Lignende tilnærminger kan benyttes for å endre meiose.

30 I en foretrukket utførelsesform benyttes forbindelsene ifølge oppfinnelsen til å inhibere dannelsen av den mitotiske spindel, hvilket bevirker forlenget cellesyklusstans i mitose. Ved «inhibere» menes i denne sammenheng minske eller forstyrre den mitotiske spindeldannelse eller forårsake mitospindel-dysfunksjon. Ved «mitotisk spindeldannelse» menes her organisering av mikrotubuli til bipolare

strukturer av mitotiske kinesiner. Ved «mitosespindel-dysfunksjon» menes her mitosestans og monopolar spindeldannelse.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er egnet til å binde til og/eller inhibere aktiviteten av et mitotisk kinesin, KSP. I en foretrukket utførelsesform er KSP humant KSP, selv om forbindelsene kan benyttes til å binde til eller inhibere aktiviteten av KSP-kinesiner fra andre organismer. I denne sammenheng betyr «inhibere» enten å øke eller minske spindelpol-separasjon, forårsake misdannelse, dvs. forvriddning av mitotiske spindelpoler, eller på annen måte bevirke morfologisk forstyrrelse av den mitotiske spindel. Inkludert i definisjonen av KSP er i denne sammenheng varianter og/eller fragmenter av KSP. Se US-patent 6.437.115, som herved med hele sitt innhold inkorporeres ved referanse. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen har vist seg å ha spesifisitet for KSP. Foreliggende oppfinnelse inkluderer imidlertid anvendelsen av forbindelsene til binding til eller modulering av andre mitotiske kinesiner.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen benyttes til behandling av cellulære proliferasjonssykdommer. Slike sykdomstilstander som kan behandles med forbindelsene, blandingene, og fremgangsmåter som her angitt, men er ikke begrenset til, cancer (diskutert videre nedenfor), autoimmunsykdom, artritt, transplantatforkastelse, inflammatory bowel disease, cellulær proliferasjon induert etter medisinske inngrep, inklusivt, men ikke begrenset til, kirurgi, angioplastikk og lignende. Behandling inkluderer inhibering av cellulær proliferasjon. I enkelte tilfeller behøver ikke cellene være i en unormal tilstand, men fremdeles fordre behandling. I én utførelsesform inkluderer oppfinnelsen således anvendelser på celler eller individer angrepet av eller som kan være utsatt for en hvilken som helst av disse lidelser eller tilstander.

Forbindelsene, blandingene og de her angitte fremgangsmåter ansees som særlig egnet til behandlingen av cancer, inklusivt solide tumorer, så som hud-, bryst-, hjerne-, cervix-karsinomer, testikkelkarsinomer, etc. Nærmere bestemt omfatter de cancere som kan behandles med forbindelsene, blandingene og fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen: hjerte: sarkom (angiosarkom, fibrosarkom, rabdomyosarkom, liposarkom), myxom, rabdomyom, fibrom, lipom og teratom; lunge: bronkogen karsinom (skvamøscelle, udifferensiert småcellet, udifferensiert storcellet, adenokarsinom), alveolært (bronkiolært) karsinom, bronkialt adenom, sarkom, lymfom, kondromatøst hamartom, mesoteliom; mage/tarm: øsofagus (skvamøst celle-

karsinom, adenokarsinom, leiomyosarkom, lymfom), mavesekk (karsinom, lymfom, leiomyosarkom), pankreas (duktalt adenokarsinom, insulinom, glukagonom, gastrinom, karsinoide tumorer, vipom), tynntarm (adenokarsinom, lymfom, karsinoide tumorer, Karposis sarkom, leiomyom, hemangiom, lipom, neurofibrom, fibrom),
 5 tykktarm (adenokarsinom, tubulært adenom, villøst adenom, hamartom, leiomyom);
 urogenitaltrakt: nyre (adenokarsinom, Wilm's tumor (nefroblastom), lymfom, leukemi),
 blære og urethra (skvamøst cellekarsinom, transisjonelt cellekarsinom, adenokarsinom), prostata (adenokarsinom, sarkom), testikkel (seminom, teratom, embryonalt karsinom, teratokarsinom, koriokarsinom, sarkom, interstitielt celle-
 10 karsinom, fibrom, fibroadenom, adenomatoide tumorer, lipom); lever: hepatom (hepatocellulært karsinom), kolangiokarsinom, hepatoblastom, angiosarkom, hepatocellulært adenom, hemangiom; ben: osteogent sarkom (osteosarkom), fibrosarkom, malignt fibrøst histiocytom, kondrosarkom, Ewing's sarkom, malignt lymfom (retikulum-cellesarkom), multippelt myelom, malignt kjempecelletumor,
 15 kordom, osteokronfrom (osteokartilaginære eksostoser), beningt kondrom, kondroblastom, kondromyxofibrom, osteoid osteom og kjempecelletumorer;
 nervesystem: skalle (osteom, hemangiom, granulom, xantom, osteitis deformans), meninger (mengiom, meningosarkom, gliomatose), hjerne (astrocytom, medulloblastom, gliom, ependymom, germinom (pinealom), glioblastoma multiforme,
 20 oligodendrogliom, schwannom, retinoblastom, kongenitale tumorer), ryggmargs-neurofibrom, meningiom, gliom, sarkom); gynekologiske: uterus, endometrielt karsinom), cervix, cervikalt karsinom, pre-tumor cervikal dysplasi), ovarier (ovarialkarsinom (serøst cystadenokarsinom, mucinøst cystadenokarsinom, uklassifisert karsinom), granulosa-theca celletumorer, Sertoli-Leydig celletumorer, dysgerminom,
 25 malignt teratom), vulva (skvamøst cellekarsinom, intraepitelialt karsinom, adenokarsinom, fibrosarkom, melanom), vagina (klarcellekarsinom, skvamøst cellekarsinom, botryoid sarkom (embryonalt rbdomyosarkom), eggledere (karsinom); hematologisk: blod (myeloid leukemi (akutt og kronisk), akutt lymfoblastisk leukemi, kronisk lymfocytisk leukemi, myeloproliferative sykdommer, multippelt myelom,
 30 myelodysplastisk syndrom), Hodgkins sykdom, nonHodgkins lymfom og malignt lymfom); hud: malignt melanom, basalcellekarsinom, skvamøst cellekarsinom, Karposis sarkom, moles dysplastic nævus, lipom, angiom, dermatofibrom, keloider, psoriasis; og binyrer: neuroblastom. Betegnelsen «kankrøs celle» inkluderer således

i denne sammenheng en celle angrepet av hvilken som helst av ovennevnte tilstander.

Testing

5 For bestemmelse av KSP-modulerende aktivitet bindes i alminnelighet enten KSP eller en forbindelse i henhold til oppfinnelsen, ikke diffunderbart til en uløselig bærer som har isolerte prøvemottagende områder (f.eks. en mikrotiterplate, en matrise, etc.). Den uløselige bærer kan være fremstilt av en hvilken som helst sammensetning som prøven kan bindes til og som forøvrig er forlikelig med
10 screeningmetoden. Overflaten av slike bærere kan være faste eller porøse og av en hvilken som helst hensiktsmessig form. Eksempler på egnede uløselige bærere er mikrotiterplater, matriser, membraner og kuler. Disse er i alminnelighet fremstilt av glass, plast (f.eks. polystyren), polysakkarider, nylon eller nitrocellulose, Teflon™, etc. Mikrotiterplater og matriser er spesielt hensiktsmessige siden det kan foretas et stort
15 antall tester samtidig ved å benytte små mengder reagenser og prøver. Den bestemte bindingsmåte av prøven er ikke avgjørende så lenge den er forenelig med reagensene og metodene ifølge oppfinnelsen, opprettholder aktiviteten av prøven og ikke er diffunderbar. Foretrukne bindingsmetoder omfatter anvendelsen av antibiotika (som ikke sterisk blokkerer verken ligandbindingssetet eller aktiveringssekvensen når
20 proteinet er bundet til bæreren), direkte binding til «klebende» eller ioniske bærere, kjemisk kryssbinding, syntesen av proteinet eller midlet på overflaten, etc. Etter binding av prøven fjernes overskudd av ubundet materiale ved vasking. Det prøvemottagende område kan deretter blokkeres gjennom inkubering med bovint serumalbumin (BSA), kasein eller annet uskadelig protein eller andre deler.

25 Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan benyttes som sådanne for å inhibere aktiviteten av et mitotisk kinesin, særlig KSP. I én utførelsesform kombineres en forbindelse ifølge oppfinnelsen med KSP og aktiviteten av KSP bestemmes. Kinesin- (inkludert KSP-) aktivitet er kjent på området og inkluderer én eller flere kinesin-virkninger. Kinesin-virkninger inkluderer evnen til å påvirke ATP-hydrolyse;
30 mikrotubulus-binding; gliding og polymerisasjon/depolymerisasjon (effekter på mikrotubulus-dynamikk); binding til andre spindelproteiner; binding til proteiner involvert i cellykluskontroll; tjeneste som et substrat for andre enzymer, så som kinaser eller proteaser; og spesifikke cellulære kinesin-virkninger, så som spindelpol-separasjon.

Fremgangsmåter for gjennomføring av motilitetstester er velkjent for fagmannen (se f.eks. Hall, *et al.*, (1996). *Biophys. J.*, 71:3467-3476, Turner, *et al.*, 1996, *Anal. Biochem.*, 242(1):20-5; Gittes, *et al.*, 1996, *Biophys. J.* 70(1):418-29; Shirakawa, *et al.*, 1995, *J. Exp. Biol.* 198:1809-15; Winkelmann, *et al.*, 1995, *Biophys. J.*, 68:2444-53; Winkelmann, *et al.*, 1995, *Biophys. J.*, 68:72S).

Metoder som er kjent på området for bestemmelse av ATPase-hydrolyseaktivitet kan også benyttes. Fortrinnsvis benyttes løsningsbaserte tester. US-patent 6.410.254, som herved med hele sitt innhold inkorporeres ved referanse, beskriver slike tester. Alternativt kan konvensjonelle metoder benyttes. For eksempel kan P_i-frigjøring fra kinesin kvantifiseres. I én foretrukket utførelsesform gjør ATPase-hydrolyseaktiviteten bruk av 0,3M PCA (perklorsyre) og malakittgrønt-reagens (8,27 mM natrium-molybdat II, 0,33 mM malakittgrønt-oksalat, og 0,8 mM Triton X-100). For å foreta testen bråkjøles 10 µL av reaksjonsblandingen i 90 µL kald 0,3M PCA. Fosfatstandarder benyttes slik at dataene kan omdannes til mM frigitt uorganisk fosfat. Når alle reaksjoner og standarder er bråkjølt i PCA, tilsettes 100 µL malakittgrønt-reagens til de relevante brønner i f.eks. en mikrotiterplate. Blandingen får utvikles i 10-15 minutter, hvorpå platen avleses ved en absorbans på 650 nm. Dersom fosfatstandarder ble benyttet, kan absorbans-avlesninger omdannes til mM P_i og innplottes over tid. Dessuten omfatter de ATPase-tester som er kjent på området luciferasetesten.

ATPase-aktivitet av motoriske kinesindomener kan også benyttes til å overvåke virkningene av midler og er velkjent for fagmannen. I én utførelsesform foretas ATPase-bestemmelser av kinesin i fravær av mikrotubuli. I en annen utførelsesform foretas ATPase-bestemmelsen i nærvær av mikrotubuli. Forskjellige typer midler kan påvises i ovennevnte tester. I en foretrukket utførelsesform er effekten av et middel uavhengig av konsentrasjonen av mikrotubuli og ATP. I en annen utførelsesform kan effekten av midlene på kinesin ATPase minskes ved å øke konsentrasjonen av ATP, mikrotubuli eller begge deler. I nok en annen utførelsesform økes effekten av midlet ved å øke konsentrasjonen av ATP, mikrotubuli eller begge deler.

Forbindelser som inhiberer den biokjemiske aktivitet av KSP *in vitro*, kan deretter underkastes screening *in vivo*. *In vivo* screeningmetoder inkluderer tester av cellyklusfordeling, cellelevedyktighet eller nærværet, morfologien, aktiviteten, fordelingen eller antallet av mitotiske spindler. Metoder for overvåkning av cellyklusfordeling av en cellepopulasjon, for eksempel ved strømningscytometri, er

velkjent for fagmannen i likhet med metoder for bestemmelser av cellelevedyktighet. Se for eksempel US-patent 6.437.115, som herved med hele sitt innhold inkorporeres ved referanse. Mikroskoperingsmetoder for overvåkning av spindeldannelse og misdannelse er velkjent for fagmannen (se f.eks. Whitehead & Rattner (1998), J. Cell Sci. 111:2551-61; Galgio *et al.*, (1996), J. Cell Biol., 135:399-414), som herved med

5 hele sitt innhold inkorporeres ved referanse.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen inhiberer KSP-kinesinet. Et mål på inhibering er IC_{50} , definert som den konsentrasjon av forbindelsen hvor aktiviteten av KSP er nedsatt med 50% i forhold til en kontroll. Foretrukne forbindelser har IC_{50} -verdier på mindre enn ca. 1 mM, og foretrukne utførelsesformer har IC_{50} -verdier på

10 mindre enn ca. 100 μ M, mer foretrukne utførelsesformer har IC_{50} -verdier på mindre enn ca. 10 μ M, særlig foretrukne utførelsesformer har IC_{50} -verdier på mindre enn ca. 1 μ M og spesielt foretrukne utførelsesformer har IC_{50} -verdier på mindre enn ca. 100 nM og de mest foretrukne utførelsesformer har IC_{50} -verdier på mindre enn

15 ca. 10 nM. Måling av IC_{50} foretas ved å benytte en ATPase-test slik som her beskrevet.

Et annet mål for inhibering er K_i . For forbindelser med IC_{50} på mindre enn 1 μ M er K_i eller K_d definert som dissosiasjonshastighetskonstanten for interaksjonen mellom de her beskrevne forbindelser og KSP. Foretrukne forbindelser har K_i -verdier

20 på mindre enn ca. 100 μ M, og foretrukne utførelsesformer har K_i -verdier på mindre enn ca. 10 μ M og særlig foretrukne utførelsesformer har K_i -verdier på mindre enn ca. 1 μ M og spesielt foretrukne utførelsesformer har K_i -verdier på mindre enn ca. 100 nM og de mest foretrukne utførelsesformer har K_i -verdier på mindre enn ca. 10 nM.

K_i -verdien for en forbindelse bestemmes fra IC_{50} -verdien basert på tre antagelser og Michaelis-Menten-ligningen. For det første binder bare ett molekyl av forbindelsen til enzymet og det er intet samvirke. For det andre er konsentrasjonen av aktivt enzym og forbindelsen som testes kjent (dvs. det finnes ingen vesentlige mengder forurensninger eller inaktive former i preparatene). For det tredje er den

25 enzymatiske hastighet av enzym-inhibitor-komplekset null. Hastighets- (dvs. forbindelseskonsentrasjons-) data tilpasses ligningen:

30

$$V = V_{\max} E_0 \left[1 - \frac{(E_0 + I_0 + K_d) - \sqrt{(E_0 + I_0 + K_d)^2 - 4 E_0 I_0}}{2E_0} \right]$$

5 hvor V er den observerte hastighet, V_{\max} er hastigheten av det frie enzym, I_0 er inhibitor-konsentrasjon, E_0 er enzymkonsentrasjon og K_d er dissosiasjonskonstanten av enzym-inhibitor-komplekset.

Et annet mål på inhibering er GI_{50} , definert som den konsentrasjon av den forbindelse som resulterer i en minsket celleveksthastighet på 50%. Foretrukne forbindelser har GI_{50} -verdier på mindre enn ca. 1 mM, de som har en GI_{50} på mindre enn ca. 20 μ M er mer foretrukket; de som har en GI_{50} på mindre enn ca. 10 μ M enda mer; de som har en GI_{50} på mindre enn ca. 1 μ M enda mer, de som har en GI_{50} på mindre enn ca. 100 nM enda mer og de som har en GI_{50} på mindre enn ca. 10 nM enda mer. Måling av GI_{50} foretas ved å benytte en celleproliferasjonstest slik som her beskrevet. Forbindelser av denne klasse ble funnet å inhibere celleproliferasjon.

15 *In vitro* styrken av små molekylinhibitorer bestemmes for eksempel ved å måle humane ovariecancer-celler (SKOV3) med henblikk på levedyktighet etter en 72 timers eksponering for en 9 punkts fortynningsrekke av forbindelse. Cellelevedyktighet bestemmes ved å måle absorbansen av formazon, et produkt som dannes ved bioreduksjonen av MTS/PMS, et kommersielt tilgjengelig reagens. Hvert punkt på dose-responskurven beregnes som prosentandel av ubehandlede kontrollceller ved 72 timer minus bakgrunnsabsorpsjon (fullstendig celledød).

20 Anti-proliferative forbindelser som med hell har vært benyttet i klinikken for behandling av cancer (cancer-kjemoterapeutika) har GI_{50} -verdier som varierer betydelig. I A649-celler er for eksempel paklitaxel GI_{50} -verdien 4 nM, doksorubicin er 63 nM, 5-fluoruracil er 1 μ M og hydroksyurea er 500 μ M (data fra National Cancer Institute, Developmental Therapeutic Program, <http://dtp.nci.nih.gov/>). Forbindelser som inhiberer cellulær proliferasjon uansett konsentrasjon, som oppviser inhibering, kan derfor være anvendelige.

30 For å benytte forbindelsene ifølge oppfinnelsen i en fremgangsmåte for screening med henblikk på forbindelser som binder til KSP-kinesin, bindes KSP til en bærer, og en forbindelse ifølge oppfinnelsen tilsettes. Alternativt bindes forbindelsen ifølge oppfinnelsen til bæreren, hvorpå KSP tilsettes. Klasser av forbindelser hvor iblant det kan søkes etter nye bindingsmidler, omfatter spesifikke antistoffer, ikke

naturlige bindingsmidler, identifisert ved screeninger av kjemiske bibliotek, peptid-analoger, etc. Av særlig interesse er screeningstester med henblikk på middelkandidater som har lav toksisitet for humanceller. Et stort utvalg av tester kan benyttes for dette formål, inklusivt merkede *in vitro* protein-protein-bindingstester, 5 tester på elektroforetisk mobilitet, immunoassays for proteinbinding, funksjonelle tester (fosforyleringstester, etc.) og lignende.

Bestemmelsen av bindingen av forbindelsen ifølge oppfinnelsen til KSP kan foretas på en rekke måter. I en foretrukket utførelsesform merkes forbindelsen, for eksempel med en fluorescerende eller radioaktiv del og bindingen bestemmes 10 direkte. Dette kan for eksempel foretas ved å feste hele eller en del av KSP til en fast bærer, tilsette en merket testforbindelse (for eksempel en forbindelse ifølge oppfinnelsen, hvor minst ett atom er erstattet med en påvisbar isotop), fjerning av reagensoverskudd ved vasking og bestemmelse av om mengden av merkingen er den som forekommer på den faste bærer.

Med «merket» menes her at forbindelsen enten direkte eller indirekte er 15 merket med en merking som gir et påvisbart signal, f.eks. radioisotop, fluorescerende merking, enzym, antistoffer, partikler, som f.eks. magnetiske partikler, kjemiluminescensmerking eller spesifikke bindingsmolekyler, etc. Spesifikke bindingsmolekyler inkluderer par, så som biotin og streptavidin, digoksin og anti- 20 digoksin, etc. For de spesifikke bindingselementene vil det komplementære element normalt bli merket med et molekyl som sørger for deteksjon, i henhold til kjente fremgangsmåter, som skissert ovenfor. Merkingen kan direkte eller indirekte gi et påvisbart signal.

I enkelte utførelsesformer merkes kun én av komponentene. For eksempel 25 kan kinesinproteinene merkes i tyrosinposisjonene ved å benytte ¹²⁵I eller med fluoroforer. Alternativt kan mer enn en én komponent merkes med ulike merkinger; ved for eksempel å benytte ¹²⁵I for proteinene og en fluorofor for de antimitotiske midlene.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan også benyttes som konkurrenter ved 30 screening med henblikk på ytterligere medikamentkandidater. «Middelkandidat» eller «medikamentkandidat» eller grammatisk likeverdige begreper beskriver her et hvilket som helst molekyl, f.eks. protein, oligopeptid, lite organisk molekyl, polysakkarid, polynukleotid, etc., som skal testes for bioaktivitet. De kan være direkte eller indirekte i stand til å endre den cellulære proliferasjons-fenotype eller ekspresjonen av en

cellulær proliferasjonssekvens, inklusivt både nukleinsyresekvenser og proteinsekvenser. I andre tilfeller er endring av cellulær proliferasjonsproteinbinding og/eller aktivitet gjenstand for screening. Screeninger av denne type kan foretas i eller uten nærvær av mikrotubuli. I de tilfeller hvor proteinbinding eller aktivitet er gjenstand for screening, utelukker foretrukne utførelsesformer molekyler som allerede er kjent for å binde til vedkommende protein, for eksempel polymerstrukturer så som mikrotubuli, og energikilder så som ATP. Middelkandidater kan omfatte adskillige kjemiske klasser, men er i alminnelighet organiske molekyler, fortrinnsvis små organiske forbindelser som har en molekylvekt på mer enn 100 og mindre enn ca. 2500 dalton. Middelkandidater omfatter funksjonelle grupper som er nødvendige for strukturell interaksjon med proteiner, særlig hydrogenbinding og lipofilbinding, og inkluderer i alminnelighet minst én amin-, karbonyl-, hydroksyl-, eter- eller karboksylgruppe, fortrinnsvis minst to av de funksjonelle kjemiske gruppene. Middelkandidatene omfatter ofte sykliske karbon- eller heterosykliske strukturer og/eller aromatiske eller polyaromatiske strukturer substituert med én eller flere av ovennevnte funksjonelle grupper. Middelkandidater finnes også blant biomolekyler, inklusivt peptider, sakkarider, fettsyrer, steroider, puriner, pyrimidiner, derivater, strukturanaloger eller kombinasjoner herav.

Middelkandidater oppnås fra et stort utvalg av kilder, inklusivt bibliotek av syntetiske eller naturlige forbindelser. For eksempel er det tilgjengelig en rekke måter for tilfeldig og rettet syntese av et stort utvalg organiske forbindelser og biomolekyler, inklusivt ekspresjon av randomiserte oligonukleotider. Alternativt er det tilgjengelig bibliotek av naturlige forbindelser i form av bakterie-, sopp-, plante- og dyre-ekstrakter, eller kan disse lett produseres. Dessuten modifiseres naturlige eller syntetisk produserte bibliotek og forbindelser lett på konvensjonell kjemisk, fysikalsk og biokjemisk måte. Kjente farmakologiske midler kan være gjenstand for rettet eller randomisert kjemisk modifikasjon, så som acylering, alkylering, forestring og/eller amidering for å frembringe strukturanaloger.

Kompetitive screeningtester kan foretas ved å kombinere KSP og en medikamentkandidat i en første prøve. En andre prøve omfatter en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse, KSP og en medikamentkandidat. Dette kan foretas enten i nærvær eller fravær av mikrotubuli. Bindingen av medikamentkandidaten bestemmes for begge prøver, og en endring eller forskjell i binding mellom de to prøvene indikerer nærværet av en medikamentkandidat som kan binde til KSP og potensielt

inhibere dens aktivitet. Det vil si at dersom bindingen av medikamentkandidaten i den andre prøven er forskjellig fra den første prøven, er medikamentkandidaten i stand til binding til KSP.

Binding av middelkandidaten til KSP kan bestemmes gjennom anvendelsen av en kompetitiv bindingstest. I denne utførelsesform er konkurrenten et bindingsmolekyl som er kjent for å binde til KSP, så som et antistoff, peptid, bindingspartner, ligand, etc. Under enkelte omstendigheter kan det være kompetitiv binding, så som mellom middelkandidaten og bindingsdelen, hvor bindingsdelen fortrenger middelkandidaten.

I én utførelsesform er middelkandidaten merket. Enten middelkandidaten eller konkurrenten eller begge tilsettes først til KSP i tilstrekkelig tid til å muliggjøre binding, om den forekommer. Inkuberinger kan foretas ved en hvilken som helst temperatur som letter optimal aktivitet, typisk mellom 4 og 40°C.

Inkubasjonsperioder velges for optimal aktivitet, men kan også være optimalisert for å lette hurtig massescreening. Typisk vil mellom 0,1 og 1 time være tilstrekkelig. Overskytende reagens fjernes eller vaskes i alminnelighet bort. Den andre komponenten tilsettes deretter og nærvær eller fravær av den merkede komponent følges for å indikere binding.

I en foretrukket utførelsesform tilsettes konkurrenten først og deretter middelkandidaten. Fortrengning av konkurrenten er en indikasjon på at kandidatmidler binder til KSP og således er i stand til binding til, og eventuelt inhibering av, aktiviteten av KSP. I denne utførelsesform kan begge komponentene være merket. Dersom for eksempel konkurrenten merkes, indikerer nærværet av merking i vaskeløsningen fortrenghing med midlet. Dersom middelkandidaten merkes indikerer nærvær av merkingen på bæreren fortrenghing.

I en alternativ utførelsesform tilsettes middelkandidaten først, med inkubering og vasking, etterfulgt av konkurrenten. Manglende binding med konkurrenten kan indikere at middelkandidaten er bundet til KSP med høyere affinitet. Dersom middelkandidaten merkes, kan nærværet av merkingen på bæreren koblet med manglende konkurrent-binding, indikerer at middelkandidaten er i stand til binding til KSP.

Inhibering testes ved screening av middelkandidater som kan inhibere aktiviteten av KSP, og som omfatter de trinn å kombinere en middelkandidat med KSP, som ovenfor, og bestemme en endring i den biologiske aktivitet av KSP. I denne utførelsesform bør middelkandidaten således binde til KSP (selv om dette ikke

behøver være nødvendig) og endre dens biologiske eller biokjemiske aktivitet, som her definert. Fremgangsmåtene inkluderer både *in vitro* screeningmetoder og *in vivo* screening av celler med henblikk på endringer i cellesyklusfordeling, cellelevedyktighet eller nærvær, morfologi, aktivitet, fordeling eller mengde av mitotiske spindler, som generelt skissert ovenfor.

Alternativt kan differensiell screening benyttes for å identifisere medikamentkandidater som binder til det naturlige KSP, men ikke kan binde til modifisert KSP.

Positiv kontroll og negativ kontroll kan benyttes i testene. Fortrinnsvis foretas alle kontroll- og testprøver i minst tre parallellbestemmelser for å oppnå statistisk signifikante resultater. Inkubering av alle prøver skjer i et tidsrom som er tilstrekkelig for bindingen av midlet til proteinet. Etter inkubering vaskes alle prøver fritt for ikke-spesifikt bundet materiale, og mengden av bundet, i alminnelighet merket, middel bestemmes. Når det for eksempel benyttes en radioaktiv merking kan prøvene telles i en scintillasjonsteller for å bestemme mengden av bundet forbindelse.

En rekke andre reagenser kan inkluderes i screeningtestene. Disse omfatter reagenser som salter, nøytrale proteiner, f.eks. albumin, overflateaktive midler, etc., som kan benyttes for å lette optimal protein-protein-binding og/eller redusere uspesifikke interaksjoner eller bakgrunn. Reagenser som på annen måte forbedrer effektiviteten av testen, så som proteaseinhibitorer, nukleaseinhibitorer, antimikrobielle midler, etc., kan også benyttes. Blandingen av komponenter kan tilsettes i en hvilken som helst rekkefølge som sørger for den nødvendige binding.

Administrering

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen administreres følgelig til celler. Med «celler» menes her en hvilken som helst celle, hvori mitose eller meiose kan endres. Ved «administrert» menes her administrering av en terapeutisk effektiv dose av en forbindelse ifølge oppfinnelsen til en celle, enten i cellekultur eller i en pasient. Med «terapeutisk effektiv dose» menes her en dose som frembringer de effekter som den administreres for. Den eksakte dose vil avhenge av formålet med behandlingen, og vil kunne fastslås av fagmannen gjennom bruk av kjente teknikker. Som kjent på området kan det være nødvendig med tilpasninger for systemisk *versus* lokal administrering, administrasjonsmåte, alder, kroppsvekt, generell helsetilstand, kjønn, diett, tidspunkt for administrering, formuleringens natur, medikament-interaksjon og den nøyaktige tilstand som fordrer behandling, samt dens alvor, hvilket av fag-

mannen vil kunne fastslås gjennom rutinemessig eksperimentering. En effektiv mengde av en forbindelse med Formel I for behandlingen av neoplastisk vekst (typisk ved intravenøs administrering), for eksempel kolon- eller brystkarsinom, vil i alminnelighet være i området fra 0,1 til 100 (inkludert 1 til 100) mg/m² av mottagerens overflateareal per dose fra én gang per uke til én gang per måned, og vanligvis i 5 området fra 2 til 30 mg/m² av mottagerens overflateareal per dose fra én gang per uke til én gang per måned. En effektiv mengde av et salt, solvat eller solvat av et salt av en forbindelse med Formel I kan bestemmes som en andel av den effektive mengde av forbindelsen med Formel I som sådan. Det forventes at lignende 10 doseringer vil være passende for behandling av de øvrige tilstander som det her refereres til.

En «pasient» omfatter i denne sammenheng både mennesker og andre dyr, særlig pattedyr, og andre organismer. Fremgangsmåtene er således anvendelige både for humanterapi og veterinære anvendelser. I den foretrukne utførelsesform er 15 pasienten et pattedyr, og i den mest foretrukne utførelsesform er pasienten et menneske.

Forbindelser ifølge oppfinnelsen som har den ønskede farmakologiske aktivitet kan administreres, fortrinnsvis som en farmasøytisk akseptabel blanding som omfatter et farmasøytisk hjelpemiddel, til en pasient slik som her beskrevet. Avhengig 20 av tilførselsmåten kan forbindelsene formuleres på en rekke måter som omtalt nedenfor. Konsentrasjonen av terapeutisk aktiv forbindelse i formuleringen kan variere fra ca. 0,1 til 100 vekt%.

Midlene kan administreres alene eller i kombinasjon med andre behandlinger, dvs. strålebehandling eller behandling med andre kjemoterapeutiske midler, så som 25 taxan-klassen som synes å virke på mikrotubulus-dannelse, eller camptothecin-klassen av topoisomerase I-inhibitorer. Når andre kjemoterapeutiske midler benyttes, kan de administreres før, samtidig med eller etter administrering av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse. I henhold til ett aspekt ved oppfinnelsen ko-administreres en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse med én eller flere andre 30 kjemoterapeutiske midler. Med «ko-administrering» menes at foreliggende forbindelser administreres en pasient slik at foreliggende forbindelser, så vel som den ko-administrerte forbindelse, kan finnes i pasientens blodstrøm på samme tid, uansett når forbindelsene faktisk administreres, inkludert simultant.

Administreringen av forbindelsene og blandingene ifølge foreliggende oppfinnelse kan foretas på en rekke måter, inklusivt, men ikke begrenset til, peroralt, subkutant, intravenøst, intranasalt, transdermalt, intraperitonealt, intramuskulært, intrapulmonalt, vaginalt, rektalt eller intraokulært. I enkelte tilfeller, for eksempel ved
5 behandlingen av sår og inflammasjon, kan forbindelsen eller blandingen påføres direkte som en løsning eller spray.

Farmasøytiske doseringsformer omfatter en forbindelse med Formel I eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav og ett eller flere farmasøytiske hjelpestoffer. Som kjent på området er farmasøytiske hjelpestoffer sekundæringredienser
10 med den funksjon å forbedre avleveringen av et medikament eller medisin i en rekke doseringsformer (f.eks. perorale former, så som tabletter, kapsler og væsker, topiske former, så som former for hud, øye og øre; suppositorier; injeksjonsvæsker; respiratoriske former og lignende). Farmasøytiske hjelpestoffer omfatter inerte eller inaktive ingredienser, synergister eller kjemikalier som vesentlig bidrar til de
15 medisinske effektene av virkestoffet. For eksempel kan farmasøytiske hjelpestoffer forbedre strømningsegenskapene, produkt-jevnhet, stabilitet, smak eller utseende, for å øke håndtering og administrering av dosen, for å lette anvendelsen eller kontrollere biotilgjengelighet. Mens farmasøytiske hjelpestoffer vanligvis beskrives som inerte eller inaktive, regner man på området med at det er en relasjon mellom
20 egenskapene til de farmasøytiske hjelpestoffene og doseringsformene som de inngår i.

Farmasøytiske hjelpestoffer egnet for bruk som bærere eller fortynningsmidler er velkjent på området og kan benyttes i en rekke formuleringer. Se f.eks. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. utg., A.R. Gennaro, red., Mack Publishing
25 Company (1990); Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20. utg., A.R. Gennaro, red., Lippincott Williams & Wilkins (2000); Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3. utg., A.H. Kibbe, red., American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press (2000); og Handbook of Pharmaceutical Additives, utarbeidet av Michael og Irene Ash, Gower (1995), som samtlige herved
30 inkorporeres ved referanse.

Faste perorale doseringsformer som f.eks. tabletter, vil i alminnelighet omfatte ett eller flere farmasøytiske hjelpestoffer, som for eksempel kan bidra til å gi tilfredsstillende bearbeidnings- og komprimerings-egenskaper, eller gi tabletten andre ønskelige fysiske egenskaper. Slike farmasøytiske hjelpestoffer kan velges fra

fortynningsmidler, bindemidler, glidemidler, smøremidler, sprengemidler, fargestoffer, aromastoffer, søtningsmidler, polymerer, voks eller andre løselighetsforsinkende materialer.

Sammensetninger for intravenøs administrering vil i alminnelighet omfatte
 5 intravenøse væsker, dvs. sterile løsninger av enkle kjemikalier, så som sukkere, aminosyrer eller elektrolytter, som lett kan transporteres med kretsløpssystemet og assimileres. Slike væsker fremstilles med vann for injeksjon, USP.

Væsker som vanligvis benyttes for intravenøs (IV) anvendelse er angitt i Remington, the Science and Practice of Pharmacy [fullstendig referanse ovenfor] og
 10 inkluderer:

alkohol (f.eks. i dekstrose og vann («D/W»)) [f.eks. 5% dekstrose] eller dekstrose og vann [f.eks. 5% dekstrose] i normal saltløsning («NSS»); f.eks. 5% alkohol);

en syntetisk aminosyre så som Aminosal, FreAmine, Travasol, f.eks. henholds-
 15 vis 3,5 eller 7; 8,5; 3,5, 5,5 eller 8,5%;

ammoniumklorid, f.eks. 2,14%;

dekstran 40, i NSS, f.eks. 10% eller i D5/W, f.eks. 10%;

dekstran 70, i NSS, f.eks. 6% eller i D5/W, f.eks. 6%;

dekstrose (glukose, D5/W), f.eks. 2,5-50%;

20 dekstrose og natriumklorid, f.eks. 5-20% dekstrose og 0,22-0,9% NaCl;

laktatholdig Ringerløsning (Hartmann's), f.eks. NaCl 0,6%, KCl 0,03%, CaCl₂ 0,02%;

laktat 0,3%;

mannitol, f.eks. 5%, eventuelt sammen med dekstrose, f.eks. 10% eller NaCl,
 25 f.eks. 15 eller 20%;

multiple elektrolytt-løsninger med varierende kombinasjoner av elektrolytter, dekstrose, fruktose, invertsukker-Ringerløsninger, f.eks. NaCl 0,086%, KCl 0,03%, CaCl₂ 0,033%;

natriumbikarbonat, f.eks. 5%;

30 natriumklorid, f.eks. 0,45, 0,9, 3 eller 5%;

natriumlaktat, f.eks. 1/6M; og

sterilt vann for injeksjon.

pH i slike væsker kan variere og vil i alminnelighet være fra 3,5 til 8, så som kjent på området.

Eksempler

Eksempel 1

- 5 a) Fremstilling av {3-[1-(3-benzyl-7-klor-4-okso-4H-kromen-2-yl)-2-metyl-propylamino]-propyl}-karbaminsyre-tert-butylester

Kromenon **8** (420 mg, 1,24 mmol), aldehyd **12** (280 mg, 1,6 mmol), NaCN(OAc)₃BH (790 mg, 3,7 mmol) og CH₂Cl₂ (4,1 mL) ble holdt ved 23°C i 3 timer. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med EtOAc (20 mL) og vasket med 1N NaOH (5 mL) og saltvann (5 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO₄), filtrert og konsentrert. Det resulterende residuum ble renset ved hurtigkromatografi (5:1 heksaner:EtOAc; 3:1 heksaner:EtOAc), hvilket ga 460 mg (75%) av **13** som en viskøs olje.

- 15 b) Fremstilling av {3-[[1-(3-benzyl-7-klor-4-okso-4H-kromen-2-yl)-2-metyl-propyl]- (4-metyl-benzoyl)-amino]-propyl}karbaminsyre-tert-butylester

Til en løsning av kromenon **13** (1,3 g, 2,6 mmol), diisopropyletylamin (DIEA, 1,8 mL) og CH₂Cl₂ (7,5 mL) ble det ved 23°C tilsatt p-toluoylchlorid (0,7 mL, 5,22 mmol). Etter 2,5 timer ble reaksjonsblandingen fortynnet med EtOAc (100 mL) og vasket med en mett vandig løsning av NaHCO₃ (2 x 20 mL) og saltvann (20 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO₄), filtrert og konsentrert. Det resulterende residuum ble renset ved hurtigkromatografi (3:1 heksaner:EtOAc), hvilket ga 1,43 g (89%) av **14** som en fargeløs olje.

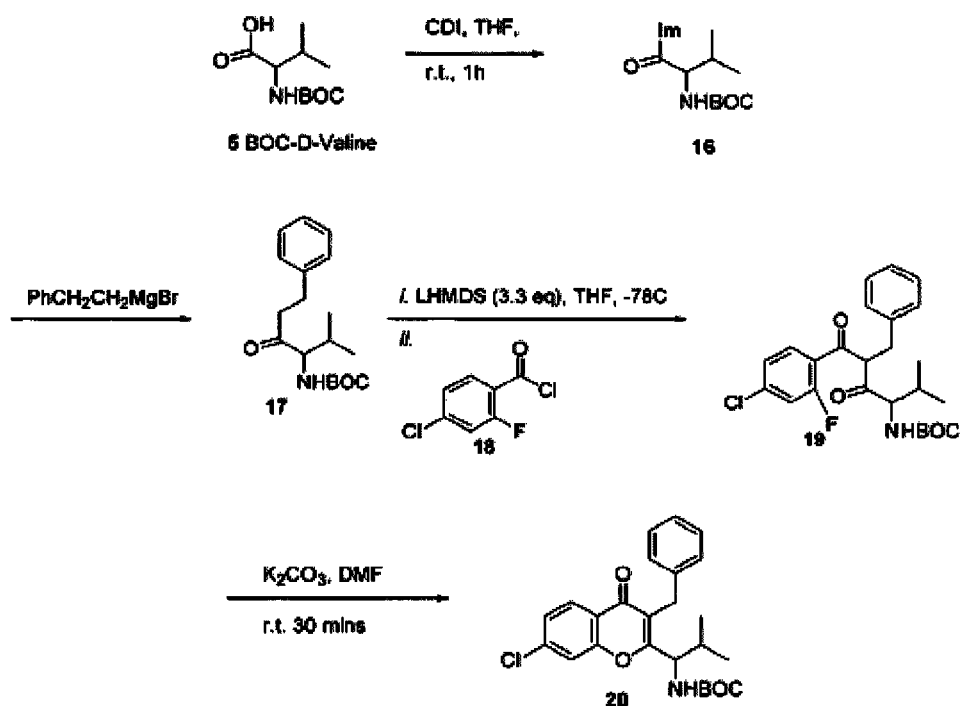
- c) Fremstilling av N-(3-aminopropyl)-N-[1-(3-benzyl-7-klor-4-okso-4H-kromen-2-yl)-2-metylpropyl]-4-metyl-benzamid

25 Kromenon **14** (1,43 g, 2,32 mmol) og TFA:H₂O (97,5:2,5, 30 mL) ble holdt ved 23°C i 1 time. Reaksjonsblandingen ble konsentrert. Residuet ble løst i EtOAc (100 mL) og vasket med 1N NaOH (25 mL) og saltvann (25 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO₄), filtrert og konsentrert for å gi et hvitt faststoff som ifølge ¹H-NMR- og LCMS-analyse ble vurdert som >95% rent.

30

Eksempel 2

Syntese av forbindelser



Mellomprodukt

Karbyldiimidazol (9,14 g, 56,37 mmol) ble langsomt tilsatt til en romtemperert løsning av BOC-D-valin (5, 12,25 g, 56,37 mmol) og THF (185 mL). Etter 1 time ble løsningen vasket med 50% vandig NaCl (200 mL), etterfulgt av saltvann (2 x 200 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO₄), filtrert og konsentrert for å gi et hvitt faststoff, som ble benyttet uten videre rensing.

(2-brometyl)benzen (2,51 mL, 18,38 mmol), magnesium-dreiespon (477 mg, 19,62 mmol) og THF (20 mL) ble oppvarmet til 60°C i 1 time og fikk deretter avkjøles til r.t. En løsning av 16 (2,0 g, 9,19 mmol) og THF (20 mL) ble avkjølt til 0-5°C. Løsningen av fenetylmagnesiumklorid ble deretter tilsatt med en sprøyte til 0-5°C løsningen av valinimidazolet. Temperaturen ble overvåket med et innvendig termometer, og fikk ikke overskride 15°C. Reaksjonsblandingen ble holdt ved 0-5°C i 1 time. Reaksjonsblandingen ble avkjølt med mettet vandig NH₄Cl (20 mL) og fortynnet med EtOAc (100 mL). Lagene ble separert og det organiske lag vasket med saltvann (30 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO₄), filtrert og konsentrert. Det resulterende residuum ble rensert ved hurtigkromatografi (10:1 heksaner:EtOAc; 5:1 heksaner:EtOAc), hvilket ga 1,15 g (41%) av 17. LRMS (MH-tBuOCO) m/z 201,6.

LHMDS (1M i THF, 9,53 mL, 3,3 ekv.) ble med sprøyte langsomt tilsatt til en -78°C løsning av keton 17 (882 mg, 2,89 mmol). Etter fullført tilsetning ble den

resulterende lysorange løsning holdt ved -78°C i 40 minutter. Ufortynnet 4-klor-2-fluorbenzoylchlorid (**18**, $460\ \mu\text{L}$, $2,89\ \text{mmol}$) (antatt tetthet $1,20\ \text{g/mL}$) ble tilsatt dråpevis med sprøyte. Reaksjonsblandingen antok en orange farge som ble opprettholdt i 40 minutter. Reaksjonen ble avbrutt med mettet vandig NH_4Cl ($20\ \text{mL}$), og reaksjons-

5 blandingen ble fortynnet med EtOAc ($50\ \text{mL}$). Lagene ble separert og det organiske lag vasket med saltvann ($30\ \text{mL}$). Det organiske lag ble tørket (MgSO_4), filtrert og konsentrert. Det resulterende residuum ble rensset ved hurtigkromatografi (10:1

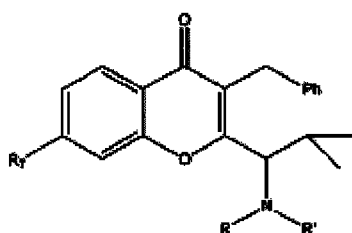
heksaner:EtOAc), hvilket ga $1,15\ \text{g}$ (86%) av **19**. LRMS (MH-HF) m/z 442,1.

En blanding av **19** ($1,15\ \text{g}$, $2,49\ \text{mmol}$), K_2CO_3 ($420\ \text{mg}$, $3,04\ \text{mmol}$) og DMF

10 ($12\ \text{mL}$) ble holdt ved r.t. i 30 minutter. Den gule reaksjonsblandingen ble avkjølt med saltvann ($50\ \text{mL}$) og fortynnet med Et_2O ($50\ \text{mL}$). Lagene ble separert og det organiske lag vasket med saltvann ($2 \times 50\ \text{mL}$). Det organiske lag ble tørket (MgSO_4), filtrert og konsentrert. Det resulterende residuum ble rensset ved hurtig-

kromatografi (10:1 heksaner:EtOAc) for å gi **20**. LRMS (MH) m/z 442,1.

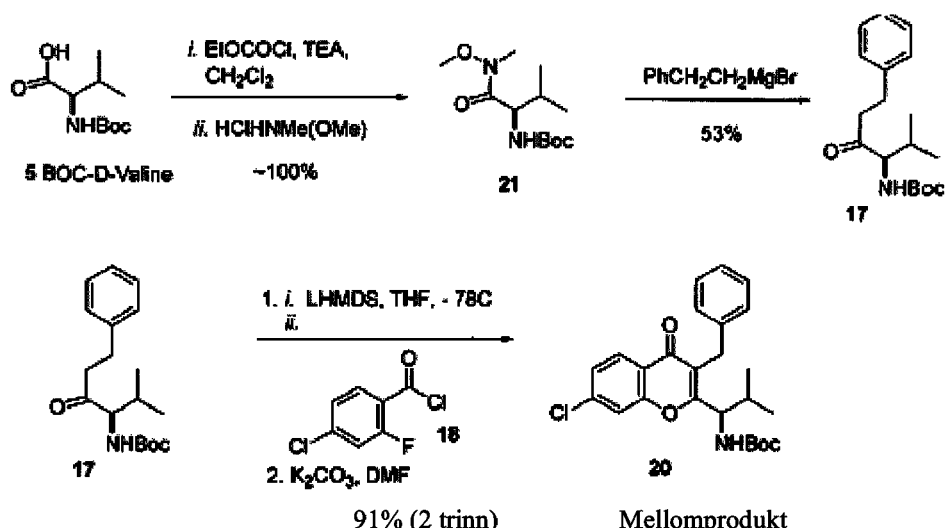
15 Ved å benytte fremgangsmåter analoge med de som er beskrevet ovenfor i Eksempel 2 og 3, ble de etterfølgende forbindelser fremstillet.



R_7	R	R'	Stereokjemi (R/S)
Cl	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3-$	p-toluoyl	3/1
Cl	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3-$	p-toluoyl	R
Cl	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3-$	p-toluoyl	S
F	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3-$	p-toluoyl	3/1

Eksempel 3

Alternative fremgangsmåter for fremstilling av forbindelser



Etylchlorformiat (11,0 mL, 115 mmol) ble i løpet av 1 minutt tilsatt til en $0-5^\circ\text{C}$ løsning av BOC-D-valin (5, 25,0 g, 115 mmol), trietylamin (16,0 mL, 115 mmol) og THF (145 mL) under N_2 . Den innvendige temperatur i reaksjonsløsningen steg til 9°C . Etter 15 minutter ble en blanding av dimetylhydroksylamin-hydroklorid (13,46 g, 138 mmol), trietylamin (32,0 mL, 230 mmol) og THF (110 mL) tilsatt i løpet av 5 minutter. Den innvendige temperatur steg til 17°C . Etter fullført tilsetning ble is/ H_2O -badet fjernet og reaksjonsblandingen holdt ved 23°C i 1 time. Reaksjonsblandingen ble deretter konsentrert. Det rå residuum ble løst i EtOAc (200 mL) og vasket med 1N HCl (200 mL) og saltvann (100 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO_4), filtrert og konsentrert for å gi 30 g (~100%) av 21 som en fargeløs olje som ble benyttet uten videre rensing.

(2-brometyl)benzen (38,0 mL, 273 mmol), magnesium-dreiespon (7,0 g, 289 mmol) og Et_2O (500 mL) ble blandet i en 1 L rundkolbe forsynt med tilbakeløpskjøler ved 23°C under N_2 -atmosfære. Etter ~10 minutter begynte reaksjonsblandingen å utvikle varme, og reaksjonsblandingen fikk utvikle seg til kokepunktet med leilighetsvis avkjøling med et is/ H_2O -bad. Etter 1,5 timer var Grignard-reaksjonen fullført og blandingen avkjølt til 23°C . En løsning av 21 (18,0 g, 82,7 mmol) og Et_2O (200 mL) ble tilsatt via kanyle til 20°C løsningen av fenetyl-magnesiumbromidet. Temperaturen ble overvåket med et innvendig termometer og ble holdt under $\sim 30^\circ\text{C}$. Reaksjonsblandingens temperatur ble kontrollert med innvendig termometer og holdt mellom $20-30^\circ\text{C}$ med et is/ H_2O -bad. Etter 1 time ved 23°C ble reaksjonsblandingen avkjølt ved å helles over i 1N HCl (300 mL). Lagene

ble separert, og det organiske lag ble vasket med saltvann (100 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO_4), filtrert og konsentrert. Det resulterende residuum ble rensset ved hurtigkromatografi (10:1 heksaner:EtOAc), hvilket ga 13,4 g (53%) av **17**. LRMS (MH-tBuOCO) m/z 206,1.

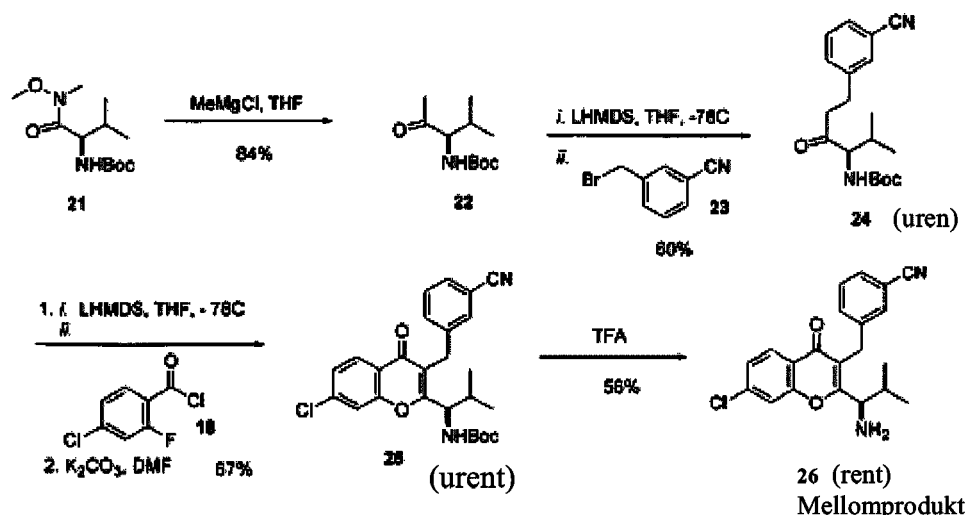
5 Litium-bis(trimetylsilyl)amid (LHMDS, 1,0 M i THF, 94,0 mL, 3,3 ekv.) ble langsomt tilsatt via kanyle i løpet av ~3 minutter til en -78°C løsning av keton **17** (8,74 g, 28,62 mmol) og THF (100 mL). Reaksjonsblandingens temperatur ble kontrollert ved hjelp av innvendig termometer, og tilsetning av basen ble gjort med en hastighet som var tilstrekkelig til å hindre temperaturen i å overskride -54°C . Etter
10 fullført tilsetning ble den resulterende løsningen holdt ved -78°C i 30 minutter. Ufortynnet 4-klor-2-fluorbenzoylklorid (**18**, 4,58 mL, 28,62 mmol) (antatt tetthet 1,20 g/mL) ble dråpevis med sprøyte tilsatt i løpet av ~1 minutt (temperaturen steg fra -78°C til -59°C). Reaksjonsløsningen ble holdt ved -78°C i 30 minutter. Reaksjonsløsningen ble avkjølt med 1N HCl (100 mL). Lagene ble separert og det
15 organiske lag vasket med saltvann (100 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO_4), filtrert og konsentrert. Det resulterende residuum ble benyttet uten videre rensing.

En blanding av råproduktet ovenfor, K_2CO_3 (4,75 g, 34,34 mmol) og DMF (100 mL) ble holdt ved 23°C i 30 minutter. Reaksjonsblandingen ble avkjølt ved tilsetning av Et_2O (200 mL) og saltvann (200 mL). Lagene ble separert og det
20 organiske lag vasket med saltvann (2 x 200 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO_4), filtrert og konsentrert. Det resulterende residuum ble absorbert på silikagel (CH_2Cl_2) og rensset ved hurtigkromatografi (10:1 heksaner:EtOAc) for å gi 11,5 g (91% i to trinn) av **20** som et hvitt faststoff. LRMS (MH) m/z 442,1.

25

30

Eksempel 4



Metylmagnesiumklorid (82,5 mL, 3,0 M i THF, 247 mmol) ble tilsatt i løpet av 5 minutter til en 0-5°C løsning av **21** (17,95 g, 69,0 mmol) og THF (200 mL) under N₂-atmosfære. Reaksjonsblandingens temperatur ble overvåket med et innvendig termometer, og tilsetning av Grignardreagens ble gjort med en hastighet som var tilstrekkelig til å hindre at temperaturen overskred 19°C. Etter fullført tilsetning ble kjølebadet fjernet og reaksjonsblandingen holdt ved 23°C i 2 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter avkjølt med 1N HCl (100 mL). Lagene ble separert og det organiske lag vasket med saltvann (100 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO₄), filtrert og konsentrert for å gi 12,5 g (84%) av **22** som et hvitt faststoff (> 95% rent ifølge ¹H NMR) som ble benyttet uten videre rensing.

LHMDS (128 mL, 1,0M i THF) ble tilsatt ved hjelp av sprøyte i løpet av 3 minutter til en -78°C løsning av keton **22** (12,5 g, 58,1 mmol) og THF (200 mL). Reaksjonsløsningens temperatur ble kontrollert ved hjelp av et innvendig termometer, og tilsetning av basen ble gjort med en hastighet som var tilstrekkelig til å hindre at temperaturen overskred -58°C. Etter 30 minutter ble en løsning av α-brom-m-tolunitril (**23**, 12,5 g, 63,9 mmol) og THF (50 mL) tilsatt i løpet av 30 sekunder (temperaturen steg fra -78 til -60°C). Kjølebadet ble umiddelbart erstattet med et is/H₂O-bad og reaksjonsblandingen holdt ved ~0°C i 20 minutter. Reaksjonen ble avbrutt med 1N HCl (100 mL). Lagene ble separert og det organiske lag vasket med saltvann (100 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO₄), filtrert og konsentrert. Det resulterende residuum ble renset ved hurtigkromatografi (10:1 heksaner:EtOAc), hvilket ga 11,6 g (60%) av **24**. Undersøkelse av ¹H NMR-spekteret viste at **24** kun var

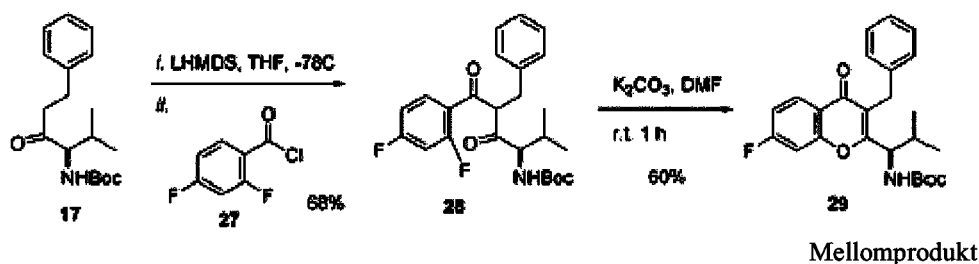
~80% rent, men ingen ytterligere rensing ble foretatt. LRMS (MH-tBuOCO) m/z 231,1.

Litium-bis(trimetylsilyl)amid (LHMDS, 1,0 M i THF, 28,4 mL, 3,3 ekv.) ble langsomt tilsatt via en sprøyte til en -78°C løsning av keton **24** (2,84 g, 8,6 mmol) og THF (40 mL). Reaksjonsblandingens temperatur ble overvåket med et innvendig termometer, og tilsetning av basen ble gjort med en hastighet som var tilstrekkelig til å hindre temperaturen i å overskride -48°C. Etter fullført tilsetning ble den resulterende løsning holdt ved -78°C i 30 minutter. Ufortynnet 4-klor-2-fluorbenzoyl-klorid (**18**, 1,38 mL, 8,6 mmol) (antatt tetthet 1,20 g/mL) ble dråpevis tilsatt via en sprøyte. Reaksjonsblandingen antok en orange farge som ble opprettholdt i 30 minutter. Reaksjonsblandingen ble avkjølt med 1N HCl (20 mL). Lagene ble separert og det organiske lag vasket med saltvann (20 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO₄), filtrert og konsentrert. Det resulterende residuum ble benyttet uten videre rensing.

En blanding av råproduktet ovenfor, K₂CO₃ (1,43 g, 10,34 mmol) og DMF (43 mL) ble holdt ved 23°C i 1 time. Reaksjonsblandingen ble avkjølt ved tilsetning av Et₂O (100 mL) og saltvann (200 mL). Lagene ble separert og det organiske lag vasket med saltvann (2 x 200 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO₄), filtrert og konsentrert. Det resulterende residuum ble absorbert på silikagel (CH₂Cl₂) og renses ved hurtigkromatografi (5:1 heksaner:EtOAc), hvilket ga 2,7 g (67% for 2 trinn) av **25**. Undersøkelse av ¹H NMR-spekteret viste at **25** kun var ~80% rent, men ingen ytterligere rensing ble foretatt. LRMS (MH) m/z 467,1.

Kromenon **25** (2,71 g, 5,80 mmol) og TFA:H₂O (97,5:2,5, 25 mL) ble holdt ved 23°C i 1 time. Reaksjonsblandingen ble konsentrert. Residuet ble løst i EtOAc (100 mL) og vasket med 1N NaOH (25 mL) og saltvann (25 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO₄), filtrert og konsentrert. Det resulterende residuum ble renses ved hurtigkromatografi (1:1 heksaner:EtOAc; 1:2 heksaner:EtOAc; 1:4 heksaner:EtOAc) for å gi 1,20 g (56%) av **26**. LRMS (MH) m/z 367,1.

Eksempel 5



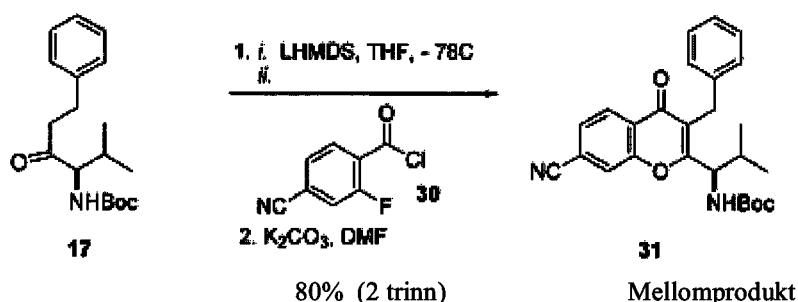
5 Litium-bis(trimetylsilyl)amid (LHMDS, 1,0 M i THF, 23,5 mL, 3,3 ekv.) ble
 langsomt tilsatt med en sprøyte til en -78°C løsning av keton **17** (2,18 g, 7,14 mmol)
 og THF (20 mL). Reaksjonsløsningens temperatur ble overvåket med et innvendig
 termometer, og tilsetning av basen ble gjort med en hastighet som var tilstrekkelig til
 å hindre temperaturen i å overskride -50°C . Etter fullført tilsetning ble den
 10 resulterende blanding holdt ved -78°C i 30 minutter. Ufortynnet 2,4-difluorbenzoyl-
 klorid (**27**, 1,05 mL, 8,57 mmol) ble dråpevis tilsatt med sprøyte. Reaksjonsløsningen
 antok en orange farge som ble opprettholdt i 30 minutter. Reaksjonsblandingen ble
 avkjølt med 1N HCl (20 mL). Lagene ble separert og det organiske lag vasket med
 saltvann (20 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO_4), filtrert og konsentrert. Det
 15 resulterende residuum ble renset ved hurtigkromatografi (10:1 heksaner:EtOAc) for
 å gi 2,16 g (68%) av **28**. Undersøkelse av ^1H NMR-spekteret viste at **28** kun var
 ~85% rent, men ingen ytterligere rensing ble foretatt.

En blanding av **28** (2,16 g, 4,9 mmol), K_2CO_3 (812 mg, 5,86 mmol) og DMF
 (24 mL) ble holdt ved 23°C i 1 time. Reaksjonsblandingen ble avkjølt med saltvann
 20 (50 mL) og fortynnet med Et_2O (50 mL). Lagene ble separert og det organiske lag
 vasket med saltvann (2 x 50 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO_4), filtrert og
 konsentrert. Det resulterende residuum ble renset ved hurtigkromatografi (10:1
 heksaner:EtOAc) for å gi 1,25 g (60%) av **29**. LRMS (MH) m/z 426,2.

25

30

Eksempel 6



Litium-bis(trimetylsilyl)amid (LHMDS, 1,0 M i THF, 47 mL, 3,3 ekv.) ble
 5 langsomt tilsatt med en sprøyte til en -78°C løsning av keton **17** (4,37 g, 14,31 mmol)
 og THF (55 mL). Reaksjonsløsningens temperatur ble overvåket med et innvendig
 termometer, og tilsetning av basen ble gjort med en hastighet som var tilstrekkelig til
 å hindre at temperaturen overskred -50°C . Etter fullført tilsetning ble den
 resulterende blanding holdt ved -78°C i 30 minutter. En løsning av 4-cyano-2-fluor-
 10 benzoylklorid (**30**, 1,38 mL, 8,6 mmol) og THF (5 mL) ble hurtig tilsatt med en sprøyte
 (temperaturen steg fra -78 til -50°C). Reaksjonsløsningen antok en mørkerød farge
 som ble opprettholdt i 30 minutter. Reaksjonsblandingen ble avkjølt med 1N HCl
 (20 mL). Lagene ble separert og det organiske lag vasket med saltvann (20 mL). Det
 organiske lag ble tørket (MgSO_4), filtrert og konsentrert. Det resulterende residuum
 15 ble benyttet uten videre rensing.

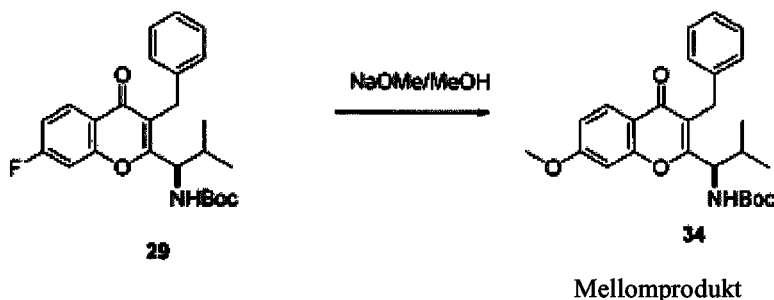
En blanding av råproduktet ovenfor, K_2CO_3 (2,40 g, 17,17 mmol) og DMF
 (70 mL) ble holdt ved 23°C i 1 time. Reaksjonsblandingen ble avkjølt ved tilsetning av
 Et_2O (200 mL) og saltvann (200 mL). Lagene ble separert og det organiske lag
 vasket med saltvann (2 x 200 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO_4), filtrert og
 20 konsentrert. Det resulterende residuum ble rensert ved hurtigkromatografi (10:1
 heksaner:EtOAc), hvilket ga 4,95 g (80% for 2 trinn) av **31**. LRMS (MH) m/z 433,2.

Eksempel 7

25 7-fluor-kromenon **32** (96 mg, 0,19 mmol) ble løst i 0,5 M natriummetoksyd i
 metanol (10 mL) og oppvarmet til 70°C . Temperaturen ble holdt ved 70°C i 12 timer
 og blandingen deretter avkjølt til romtemperatur. Løsningsmidlet ble fjernet under
 redusert trykk. Det gjenværende residuum ble tilsatt EtOAc (20 mL) og vann (20 mL).

Lagene ble separert og den vandige fase ekstrahert med ytterligere EtOAc (3 x 15 mL). De organiske fasene ble kombinert, vasket med saltvann (25 mL) og tørket (Na_2SO_4). Konsentrasjon i vakuum ga et amorft hvitt faststoff som ble rensert ved hurtigkromatografi (20:1 DCM:MeOH) for å gi 92 mg (94%) av **33**. LRMS (MH)
 5 m/z 509,3.

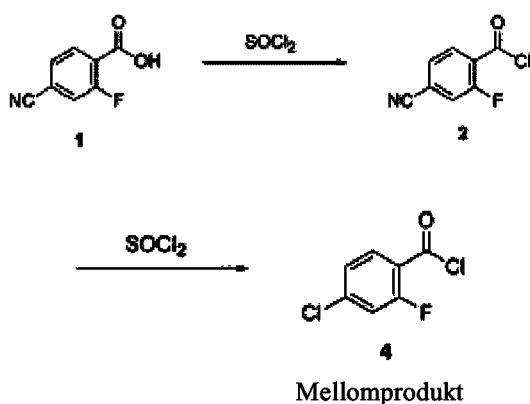
Eksempel 8



10

Forbindelse **29** (608 mg, 1,43 mmol) ble løst i en løsning av 0,5 M natriummetoksyd i metanol (40 mL). Blandingen ble oppvarmet til kokepunktet i 3 timer (eller til LC-MS viste at det ikke var utgangsmateriale tilbake). Deretter ble løsningsmidlet fordampet. Residuet ble løst i diklormetan (200 mL) og vann (200 mL)
 15 tilsatt, hvorefter blandingens pH ble justert til 9 ved tilsetning av 2N HCl-løsning. De samlede organiske lag ble tørket med natriumsulfat. Etter fordampning av løsningsmidlet ble sluttproduktet **34** (580 mg, 92%) tørket under vakuum.

Eksempel 9



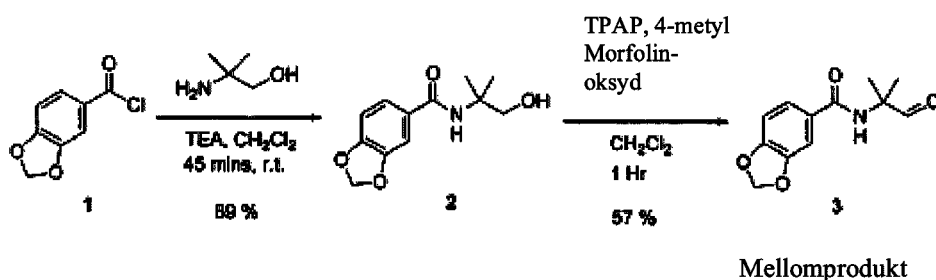
20

En blanding av 4-cyano-2-fluorbenzoesyre (**1**, 25 g), DMF (0,1 mL) og tionylklorid (50 mL) i en 250 mL rundkolbe forsynt med tilbakeløpskjøler under N_2 -

atmosfære, ble kokt under tilbakeløpskjøling i et 90°C oljebad i 30 minutter. Kjøleren ble erstattet med et destillasjonshode og overskudd av tionylklorid avdestillert fra reaksjonskolben. Oljebad-temperaturen ble øket til 120°C for å lette destillasjon. Etter 2 timer ble reaksjonskolben avkjølt til 23°C og anbragt under redusert trykk (~25 Torr). Reaksjonskolben ble deretter oppvarmet til 90°C i 20 minutter og deretter til 130°C i 90 minutter for å fjerne eventuelt overskudd av gjenværende tionylklorid. Reaksjonskolben ble deretter avkjølt til 23°C og anbragt under høyvakuum (~0,2 Torr). Reaksjonskolben ble forsynt med et rent destillasjonshode og en oppsamlingskolbe. Kolben ble anbragt i et 137°C oljebad og produktet destillert fra reaksjonsbeholderen (kp. = 107°C ca. 0,2 Torr). Etter avkjøling størknet destillatet og ga **2** som et hvitt faststoff i tilnærmet kvantitativt utbytte.

En blanding av 4-klor-2-fluorbenzoesyre (**3**, 25 g), DMF (0,1 mL) og tionylklorid (50 mL) i en 250 mL rundkolbe forsynt med tilbakeløpskjøler under N₂-atmosfære, ble kokt under tilbakeløpskjøling i et 90°C oljebad i 30 minutter. Tilbakeløpskjøleren ble erstattet med et destillasjonshode og overskudd av tionylklorid destillert fra reaksjonsbeholderen. Oljebad-temperaturen ble øket til 120°C for å lette destillasjon. Etter 2 timer ble reaksjonskolben avkjølt til 23°C og anbragt under redusert trykk (~25 Torr). Reaksjonskolben ble deretter oppvarmet til 90°C i 20 minutter og deretter til 120°C i 90 minutter for å fjerne eventuelt overskudd av gjenværende tionylklorid. Reaksjonskolben ble deretter avkjølt til 23°C og så forsynt med et rent destillasjonshode og en oppsamlingskolbe. Kolben ble anbragt i et 160°C oljebad og produktet destillert fra reaksjonsbeholderen (kp. = 124°C ca. 25 Torr) og ga **4** som en fargeløs olje i tilnærmet kvantitativt utbytte.

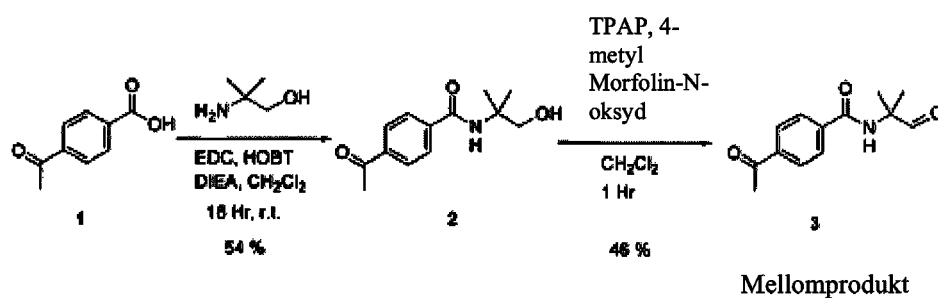
25 Eksempel 10



Piperonylchlorid (1, 7,8 g, 42 mmol) ble tilsatt til en løsning av 2-amino-2-metyl-1-propanol (4 mL, 42 mmol), CH₂Cl₂ (200 mL) og trietylamin (11,7 mL, 84 mmol) ved romtemperatur. Reaksjonsløsningen ble konsentrert etter 45 minutter, og det resulterende residuum ble fortynnet med EtOAc (40 mL) og vasket med saltvann (30 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO₄), filtrert og konsentrert for å gi en lysebrun olje. Råmaterialet (2, 8,8 g) ble benyttet uten videre rensing.

Tetrapropylammonium-perruthenat (TPAP, 638 mg, 1,8 mmol) ble porsjonsvis tilsatt til en løsning av 2 (8,6 g, 36,3 mmol), CH₂Cl₂ (73 mL, 2 mL/mmol), 4-metylmorfolin-N-oksyd (6,4 g, 54,5 mmol) og molekylsikt, 4Å, aktivert pulver (18 g, 500 mg/mmol) ved 0°C under N₂. Reaksjonsblandingen fikk oppvarmes til r.t. etter 15 minutter. Etter 1 time var reaksjonen fullført (TLC), og reaksjonsblandingen ble filtrert gjennom silika og eluert med EtOAc (100 mL) og filtratet konsentrert. Dette ga 7 g hvitaktig faststoff (3). Materialet ble omkrystallisert. EtOAc (30 mL), MeOH (10 mL) og heksaner (1 mL) ble porsjonsvis tilsatt under oppvarming og ultralyd-behandling. Det ble anbragt i et oljebad, hvorpå heksan (100 mL) ble tilsatt under avkjøling. Det utfeltes umiddelbart krystaller etter som løsningen ble avkjølt. Blandingen ble filtrert og krystallene vasket med heksan (10 mL) for å gi 4,88 g (57%) av 3 som hvitaktige luftige krystaller.

Eksempel 11

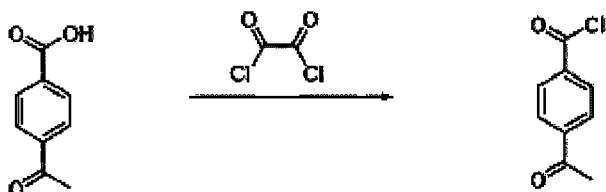


En blanding av 2-amino-2-metyl-1-propanol (4 mL, 42 mmol), CH₂Cl₂ (200 mL), 4-acetylbenzoesyre (1, 6,9 g, 42 mmol), EDC (1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylkarbodiimid HCl, 12,1 g, 63 mmol), HOBT (N-hydroksybenzotriazol H₂O, 6,4 g, 42 mmol) og Hunings base (diisopropyletylamin, 22 mL, 126 mmol) ble omrørt ved romtemperatur i 18 timer. Etter fullføring (TLC, LC/MS) ble reaksjonsblandingen konsentrert og det resulterende residuum fortynnet med EtOAc (50 mL) og vasket med NaHCO₃ (2 x 40 mL) og saltvann (40 mL). Det organiske lag ble tørket (MgSO₄),

filtrert og filtratet konsentrert. Råmaterialet ble rensert ved hurtigkromatografi (4:1:1 heksaner:EtOAc:CH₂Cl₂; 1:1:1 heksaner:EtOAc:CH₂Cl₂; 1:1 EtOAc:CH₂Cl₂) for å fjerne bisacylert materiale. Alkohol **2** ble oppnådd i 54% utbytte (5,36 g).

Tetrapropylammonium-perruthenat (TPAP, 387 mg, 1,1 mmol) ble porsjonsvis tilsatt til en løsning av **2** (5,36 g, 22,8 mmol), CH₂Cl₂ (46 mL, 2 mL/mmol), 4-metylmorfolin-N-oksyd (4 g, 34,2 mmol) og molekylsikt, 4Å, aktivert pulver (11,4 g, 500 mg/mmol) ved 0°C under N₂. Reaksjonsblandingen fikk oppvarmes til r.t. etter 15 minutter. Etter 1 time var reaksjonen fullført (TLC), og blandingen ble filtrert gjennom silika, som ble eluert med EtOAc (100 mL), hvorpå filtratet ble konsentrert. Dette førte til 4,4 g lyst rosa faststoff (**3**). Materialet ble omkrystallisert: 1:1 heksaner:EtOAc (5 mL), CH₂Cl₂ (20 mL) og MeOH (10 mL) ble porsjonsvis tilsatt under oppvarming og ultralydbehandling. Blandingene ble bragt til kokepunktet, hvorpå heksan (100 mL) ble tilsatt under avkjøling. Det utfeltes umiddelbart krystaller etter som løsningen ble avkjølt. Blandingene ble filtrert og krystallene vasket med heksan (10 mL) for å gi 2,46 g (46%) av **3** som hvitaktige luftige krystaller.

Eksempel 12



20

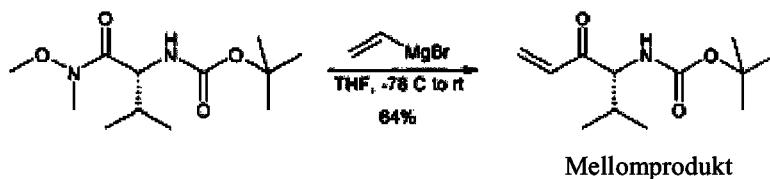
Mellomprodukt

En løsning av 4-acetylbenzoesyre (500 mg) i oksalyklorid (5 mL) ble kokt under tilbakeløpskjøling i 2 timer. Eventuelt gjenværende oksalyklorid ble fordampet med rotasjonsfordamper og residuet tørket i vakuum. Utbyttet av produktet var kvantitativt.

25

30

Eksempel 13



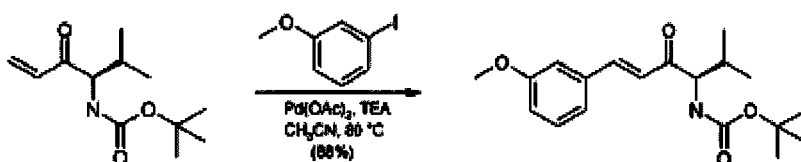
5

((R)-1-isopropyl-2-okso-but-3-enyl)-karbaminsyre-tert-butylester

Tetrahydrofuran (THF, 100 mL) og en 1,0M løsning av vinylmagnesiumbromid i THF (360 mL, 360 mmol, 3,1 ekv.) ble avkjølt til -78°C under omrøring under nitrogenatmosfære. Blandingen ble behandlet dråpevis med en løsning av [(R)-

10 (metoksy-metyl-karbamoyl)metylpropyl]-karbaminsyre-tert-butylester (30,3 g, 116 mmol, 1 ekv.) i THF (50 mL) i 30 minutter. Etter at den resulterende mørkgule blandingen var omrørt i 30 minutter ved -78°C , ble kjølebadet fjernet og reaksjonsblandingen langsomt oppvarmet til romtemperatur over natten (15 timer). Reaksjons-

15 blandingen ble langsomt helt over i en isavkjølt løsning av 1N vandig saltsyre (700 mL) og deretter oppvarmet til romtemperatur. De organiske lagene ble ekstrahert med (3 x 600 mL) etylacetat, tørket over natriumsulfat, filtrert og konsentrert i vakuum. Rensing ved hurtigkromatografi (5-10% etylacetat/heksaner) førte til produktet som et hvitt faststoff (16,8 g, 64%). ESMS $[\text{M}+\text{H}]^+$: 228,4.



20

[(R)-(E)-1-isopropyl-4-(3-metoksyfenyl)-2-okso-but-3-enyl]-karbaminsyre-tert-butylester

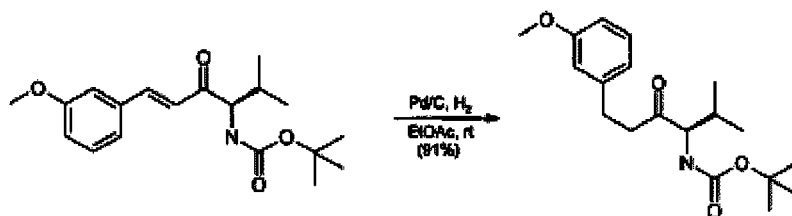
Til en løsning av ((R)-1-isopropyl-2-okso-but-3-enyl)-karbaminsyre-tert-butylester (13,54 g, 59,6 mmol) i tørr acetonitril (150 mL) under argon, ble det tilsatt

25 3-jodanisol (13,96 g, 59,6 mmol), trietylamin (9,1 mL, 65,6 mmol) etterfulgt av palladium(II)acetat (335 mg, 1,49 mmol). Den resulterende klare gule løsningen ble oppvarmet til 80°C . Etter oppvarming ble reaksjonsblandingen mørk og det inntrekkte utfelling av palladium-sort. Etter 15 timer fikk reaksjonsblandingen avkjøles til romtemperatur, reaksjonen ble avbrutt med vann (150 mL), og reaksjonsblandingen ble

fortynnet med eter (150 mL). Eterlaget ble vasket med saltvann (100 mL) og de kombinerte vandige lagene ekstrahert med eter (to 50 mL porsjoner). Ekstraktene ble tørket over magnesiumsulfat, filtrert og konsentrert under redusert trykk. Residuet ble umiddelbart rensert ved silikagel-kromatografi (9:1 heksaner/EtOAc) for å gi 17,6 g (88%) [(R)-(E)-1-isopropyl-4-(3-metoksy-fenyl)-2-okso-but-3-enyl]-karbaminsyre-tert-butylester som en gul olje. MS (ES+) m/e 334,0 [M+H]⁺.

[(R)-(Z)-4-(3-cyano-fenyl)-1-isopropyl-2-okso-but-3-enyl]-karbaminsyre-tert-butylester

Ved å følge fremgangsmåten beskrevet for [(R)-(E)-1-isopropyl-4-(3-metoksy-fenyl)-2-okso-but-3-enyl]-karbaminsyre-tert-butylester med 3-jodbenzonitril (5,50 g, 24,0 mmol, 1 ekv.) ble tittelforbindelsen oppnådd som et gult faststoff (7,4 g av ~90% rent materiale). ESMS [M+H]⁺ 329,2.

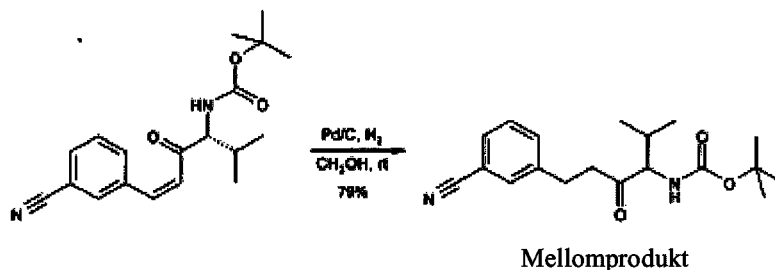


Mellomprodukt

[(R)-(E)-1-isopropyl-4-(3-metoksy-fenyl)-2-okso-butyl]-karbaminsyre-tert-butylester

Til en løsning av [(R)-(E)-1-isopropyl-4-(3-metoksy-fenyl)-2-okso-but-3-enyl]-karbaminsyre-tert-butylester (17,6 g, 52,9 mmol) i etylacetat (450 mL) under nitrogen, ble det tilsatt 10 vekt% palladium på kull (300 mg). Nitrogenet ble erstattet med hydrogen og kolben spylt. Etter 3 timer ble reaksjonskolben spylt med nitrogen og filtrert gjennom et lag Celite (rensing med etylacetat). Filtratet ble konsentrert under redusert trykk og residuet rensert ved silikagel-kromatografi (9:1 heksaner/EtOAc) for å gi 16,2 g (91%) [(R)-(E)-1-isopropyl-4-(3-metoksy-fenyl)-2-okso-butyl]-karbaminsyre-tert-butylester som en fargeløs olje. MS (ES+) m/e 336,4 [M+H]⁺.

$[\alpha]_D^{20} = +19,1$ (c = 0,755, MeOH). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,21 (m, 1H), 6,80-6,77 (m, 2H), 6,75 (s, 1H), 5,13 (d, J=8,4Hz, 1H), 4,28 (dd, J=8,8, 4,4Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 2,93-2,88 (m, 2H), 2,85-2,76 (m, 2H), 2,14 (m, 1H), 1,46 (s, 9H), 1,00 (d, J=6,8Hz, 3H), 0,75 d, J=6,8Hz, 3H).

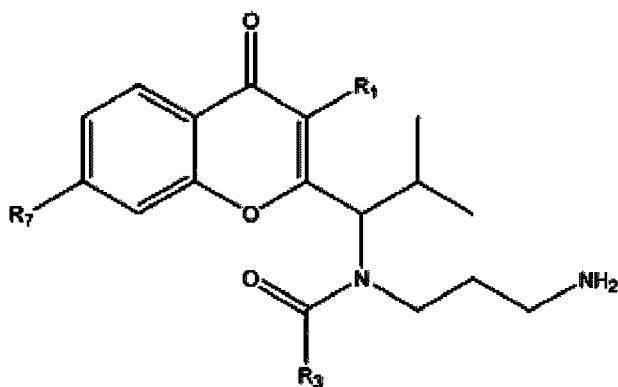


[(R)-4-(3-cyano-fenyl)-1-isopropyl-2-okso-butyl]-karbaminsyre-tert-butylester

- 5 Palladium på kull (740 mg, av 10 vekt% Pd/C) ble tilsatt til en avgasset løsning av [(R)-(Z)-4-(3-cyano-fenyl)-1-isopropyl-2-okso-but-3-enyl]-karbaminsyre-tert-butylester (7,4 g, 22,5 mmol, 1 ekv.) i metanol (200 mL) ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble grundig avgasset og fylt tilbake med hydrogengass fra en ballong. Hydrogenering fortsatte ved atmosfæretrykk i 2,5 timer. Den (avgassede)
- 10 reaksjonsblandingen ble deretter fortynnet med dietyler (300 mL), filtrert gjennom Celite og vasket med mer eter (2 x 100 mL). Etter konsentrering i vakuum ble residuet rensert ved hurtigkromatografi (20% etylacetat-heksaner) for å gi ketonproduktet som et hvitt faststoff (5,9 g, 79%). ESMS $[M+H]^+$: 331,2.
- $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7,51 (m, 2H), 7,46 (m, 1H), 7,41 (m, 1H), 5,07 (m, 1H), 4,24 (m, 1H), 2,98 (m, 2H), 2,86 (m, 2H), 2,11 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 0,98 (d, 3H, $J=6,76\text{Hz}$), 0,74 (d, 3H, $J=6,78\text{Hz}$). $[\alpha]_D^{20} = +24,74$ ($c=0,95$, CH_3OH).
- 15

Eksempel 14

- 20 Ved å følge fremgangsmåter analoge med de angitt ovenfor, ble følgende forbindelser fremstilt:



R ₇	R ₁	R ₃	[M+H] ⁺	
F	3-MeO-Ph-CH ₂ -	4-Me-Ph-	531	
5	CN	3-MeO-Ph-CH ₂ -	4-Me-Ph-	538
	Cl	3-MeO-ph-CH ₂	4-Me-Ph-	547
	MeO-	3-MeO-Ph-CH ₂ -	4-Me-Ph-	543

Eksempel 15

10 En farmasøytisk blanding for intravenøs administrering fremstilles på følgende måte.

1 mg/mL (fri base) IV-løsning hvor bæreren var 50 mM natriumacetatbuffer, pH 5,0, inneholdende 3,5% (vekt/vol) mannitol:

Sammensetning*	Enhetsformulering (mg/mL)
15 Forbindelse ifølge Eksempel 2 (fri base)	1,000
Iseddik	1,081
Natriumacetat-trihydrat	4,355
Mannitol, pyrogenfritt	35,000
20 Vann for injeksjon (WFI)	q.s. til 1 mL

* alle komponenter utenom virkestoffet er USP eller Ph. Eur.

En passende blandebeholder fylles til ca. 75% av volumet av hovedmengden løsning med WFI. Iseddikken (1,081 g), natriumacetat-trihydrat (4,355 g), mannitol
25 (35,000 g) og virkestoff (1,000 g) veies og tilsettes hver for seg til beholderen. Etter tilsetningene løses ingrediensene i blandingen ved omrøring med en mikser. pH av hovedløsningen måles og justeres til 5,0 med 5N NaOH eller 5N eddiksyre. Løsningen bringes til et sluttvolum (1 liter) med WFI. Når den virksomme forbindelse er et farmasøytisk akseptabelt salt, hydrat eller salt av et hydrat, f.eks. et monoklorid-
30 salt eller et hydrat av et monokloridsalt, tilsettes den mengde virkestoff som tilsvarer den frie base.

Eksempel 16

Fremstilling av et hydrokloridsalt av N-(3-aminopropyl)-N-[(R)-1-3-benzyl-7-klor-4-okso-4H-kromen-2-yl]-2-metylpropyl]-4-metyl-benzamid

I én utførelsesform dannes et hydrokloridsalt av N-(3-aminopropyl)-N-[(R)-1-3-benzyl-7-klor-4-okso-4H-kromen-2-yl]-2-metylpropyl]-4-metyl-benzamid, som fremstilt
5 i henhold til Eksempel 2, på følgende måte. Et HCl-salt fremstilles hensiktsmessig ved å omsette den frie base (f.eks. løst i et egnet løsningsmiddel, så som én eller flere av TBME, THF og etylacetat) med saltsyre, passende vandig saltsyre eller på annen måte i nærvær av vann. Blandingen podes med HCl-salt for å bidra til krystallisasjon. Det resulterende salt kan isoleres ved bruk av konvensjonelle
10 teknikker, så som filtrering og tørking (passende vasking av saltet med et løsningsmiddel, så som ett eller flere av TBME, THF og etylacetat).

I en særlig utførelsesform fremstilles saltet som følger:

1. Løs den frie base i 10 volumer TBME og 5 volumer THF, oppløsningen foretas hensiktsmessig ved romtemperatur;
- 15 2. tilsett vandig HCl, f.eks. 6,0M eller 12,0M, hensiktsmessig 1,1 ekv., f.eks. dråpevis;
3. pod løsningen med krystaller av HCl-salt, f.eks. fremstilt i henhold til Tilberedning B nedenfor;
4. omrør inntil krystalldannelse;
- 20 5. isoler krystallene, hensiktsmessig ved filtrering, under vasking med et passende løsningsmiddel, så som TBME, og tørking.

I en mer spesiell utførelsesform fremstilles et salt som følger:

Tilberedning A

- 25 Tilsett til et glass forsynt med en rørestav, 500 mg N-(3-aminopropyl)-N-[(R)-1-(3-benzyl-7-klor-4-okso-4H-kromen-2-yl)-2-metylpropyl]-4-metyl-benzamid og 3 mL TBME og løs den frie base i TBME ved romtemperatur. Boble HCl-gass inn i ca. 30 sekunder inntil et hvitt faststoff dannes. Filtrer og rens faststoffet to ganger med 500 µL TBME. Overfør faststoffet til et reagensrør, tilsett 4 mL TBME og en rørestav,
30 og rør om ved romtemperatur (saltet løser seg ikke). Anbring reagensrøret som inneholder blandingen i en Argonaut RS10 varmeblokk (Argonaut Technologies, Foster City, California) eller tilsvarende, og foreta temperatursyklisering som følger:
1. 30 min ved romtemperatur,

2. øk til 40°C i løpet av 30 min og hold ved 40°C i 30 min,
3. returner til romtemperatur i løpet av 30 min og hold ved romtemperatur i 30 min,
4. senk til 10°C i løpet av 30 min og hold ved 10°C i 30 min,
5. øk til romtemperatur i løpet av 30 min og hold ved romtemperatur i 30 min,
- 5 6. gjenta 2 til 5 etter behov.

Etter 20 timers syklisering fordampes noe løsningsmiddel, det dannes et hvitt pulver på sidene og et smeltelignende faststoff dannes i bunnen av reagensrøret. Tilsett 2 mL TBME. Etter 15 dager, frafiltrer det lysegule faststoff og vask to ganger med ca. 0,5 mL TBME og deretter to ganger med 1 mL heksan. Tørk i en vakuum-
10 ovn ved romtemperatur i 12-24 timer for å oppnå ca. 440 mg HCl-salt.

Figur 1 og 2 representerer henholdsvis et XRPD- og MDSC-opptak av et salt fremstilt i henhold til Tilberedning A.

Tilberedning B

15 Løs opp 4,23 g N-(3-aminopropyl)-N-[(R)-1-(3-benzyl-7-klor-4-okso-4H-kromen-2-yl)-2-metylpropyl]-4-metyl-benzamid i 5 volumer (21 mL) THF. Tilsett 10 volumer (42 mL) TBME (tert-butyl-metyleter), deretter 1,1 ekv. 12N HCl (750 µL) i én porsjon. Pod med HCl-salt, f.eks. det fremstilt under Tilberedning A (f.eks. i tre til-
setninger på ca. 10 mg hver fordelt over ca. 10 minutter). Omrør blandingen over
20 natten, f.eks. i ca. 12-24 timer. Filtrer blandingen, vask faststoffet med TBME og tørk faststoffet i en vakuumovn ved romtemperatur over natten, f.eks. i ca. 12-24 timer, for å oppnå ca. 4,3 g HCl-salt.

Figur 3 representerer et XRPD-opptak av et salt fremstilt i henhold til Tilberedning B.

25 Foreliggende oppfinnelse inkluderer krystallinsk N-(3-aminopropyl)-N-[(R)-1-(3-benzyl-7-klor-4-okso-4H-kromen-2-yl)-2-metylpropyl]-4-metyl-benzamid-hydrokloridsalt som har karakteristiske røntgendiffraksjonstopper ved ca. 4,8, 9,7, 14,7, 17,9 18,3, 20,1, 20,9, 22,5, 23,2, 23,8, 26,1 og 26,9 grader 2-theta.

30

Eksempel 17

Inhibering av cellelevedyktighet i tumorcellelinjer behandlet med KSP-inhibitorer.

Materialer og løsninger:

- Celler: SKOV3, ovariecancer (human)
- 5 - Medium: fenolrødt-fritt RPMI + 5% føtalt bovint serum + 2 mM L-glutamin.
- Kolorimetrisk middel for bestemmelse av cellelevedyktighet: Promega MTS tetrazoliumforbindelse.
- Kontrollforbindelse for maksimal celledød: Topotecan, 1 μ M.

10 **Fremgangsmåte: Dag 1 - Utplating av celler:**

Adherente SKOV3-celler vaskes med 10 mL PBS og tilsettes deretter 2 mL 0,25% trypsin og inkuberes i 5 minutter ved 37°C. Cellene renses fra flasken ved å benytte 8 mL medium (fenolrødt-fritt RPMI + 5% FBS) og overføres til en ny flaske. Cellekonsentrasjon bestemmes ved å benytte en Coulter Counter, og det passende volum av celler for å oppnå 1000 celler/100 μ L beregnes. 100 μ L medium-celle-

15 suspensjon (justert til 1000 celler/100 μ L) tilsettes til alle brønner i 96-brønns plater, etterfulgt av inkubering i 18 til 24 timer ved 37°C, 100% luftfuktighet og 5% CO₂, slik at cellene kleber til platene.

20 **Fremgangsmåte: Dag 2 - Tilsetning av forbindelse**

Til en kolonne av brønnene i en autoklavert testblokk tilsettes først 2,5 μ L testforbindelser ved 400X den høyest ønskede konsentrasjon. 1,25 μ L 400X (400 μ M) Topotecan tilsettes til andre brønner (optisk tetthet fra disse brønnene benyttes til å subtrahere bakgrunnsabsorbansen av døde celler og bærer). 500 μ L medium uten

25 DMSO tilsettes til de brønnene som inneholder testforbindelse og 250 μ L til Topotecan-brønnene. 250 μ L medium + 0,5% DMSO tilsettes til alle øvrige brønner som testforbindelsene rekkefortynnes i. Radvis, er forbindelsesholdig medium gjentak (i to paralleller) fra testblokken til de tilsvarende celleplater. Celleplatene inkuberes i 72 timer ved 37°C, 100% luftfuktighet og 5% CO₂.

30

Fremgangsmåte: Dag 4 - MTS-tilsetning og OD-avlesning:

Platene uttas fra inkubatoren og hver brønn tilsettes 40 μ L MTS/PMS. Plater inkuberes deretter i 120 minutter ved 37°C, 100% luftfuktighet, 5% CO₂, etterfulgt av avlesning av OD-verdiene ved 490 nm etter en 5 sekunders ristesyklus i et 96-brønns spektrofotometer.

5

Data-analyse

Den normaliserte %-verdi av kontroll (absorbans - bakgrunn) beregnes og en XL-tilpasning benyttes til å utvikle en dose-responskurve, hvorfra den konsentrasjon av forbindelse som trengs for å inhibere levedyktighet med 50% beregnes. Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse oppviser aktivitet når de testes etter denne metode, som beskrevet ovenfor.

10

Eksempel 18

Enantiomer-separasjon

15

En anrikt 3:1 R:S-blanding av kromenon-enantiomerer ble separert i deres rene enantiomerer ved kiral kromatografi under følgende betingelser: kolonne - Chiralpak AD, 250 x 4,6 mm (Diacel Inc.). Prøve - 22,5 mg/mL i 1:1 i-PrOH:heksaner. Betingelser - 40 min isokratisk 50% i-PrOH i heksaner, (S)-enantiomer elueres ved 18,35 min, (R)-enantiomer elueres ved 26,87 min. (R)-enantiomerer var signifikant mer potent enn (S)-enantiomerer av forbindelsen fra Eksempel 2.

20

Eksempel 19

Monopolar spindel-dannelse etter anvendelse av en KSP-inhibitor

25

Humane tumorceller Skov-3 (ovarie) ble utplatet i 96-brønns plater i tettheter på 4000 celler per brønn, hvor de fikk klebe i 24 timer og ble behandlet med forskjellige konsentrasjoner av kromenonforbindelsene i 24 timer. Celler ble fiksert i 4% formaldehyd og farget med antitubulin antistoffer (senere gjenkjent ved å benytte fluorescensmerket sekundært antistoff) og Hoechst fargestoff (som farger DNA).

30

Visuell inspeksjon viste at forbindelsene forårsaket cellyklusstans i pro-metafasetrinnet av mitosen. DNA ble kondensert og spindel-dannelse hadde startet, men stansede celler oppviste jevnt over monopolare spindler, hvilket indikerer at det skjedde en inhibering av separasjon av spindelpol-legemet. Mikroinjeksjon av anti-

KSP-antistoffer forårsaker også mitosestans, hvor stansede celler oppviser monopolare spindler.

Eksempel 20

5 Inhibering av cellulær proliferasjon i tumorcellelinjer behandlet med KSP-inhibitorer

Celler ble utplatet i 96-brønns plater i tettheter fra 1000 til 2500 celler/brønn i en 96-brønns plate, hvor de fikk klebe/vokse i 24 timer. De ble deretter behandlet med forskjellige konsentrasjoner av medikament i 48 timer. Tidspunktet hvor forbindelsene tilsettes ansees som T_0 . En tetrazolium-basert test ved bruk av reagenset 10 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium (MTS) (patent nr. 5.185.450) (se Promega produktkatalog nr. G3580, CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay) ble benyttet til å bestemme antallet levedyktige celler ved T_0 og antall gjenværende celler etter 48 timers eksponering for 15 forbindelse. Antallet av gjenværende celler etter 48 timer ble sammenlignet med antallet levedyktige celler ved tidspunktet for medikamenttilsetning, som muliggjør beregning av vekstinhibering.

Veksten i løpet av 48 timer av celler i kontrollbrønner som var blitt behandlet kun med bærer (0,25% DMSO) ansees som 100% vekst og veksten av celler i 20 brønner med forbindelser sammenlignes med denne.

En GI_{50} -verdi ble beregnet ved å plote konsentrasjonen av forbindelse i μM vs. prosentandelen av cellevekst i behandlede brønner. GI_{50} -verdien beregnet for forbindelsene er den anslåtte konsentrasjon ved hvilken veksten inhiberes med 50% sammenlignet med kontroll, dvs. den konsentrasjon hvor:

$$25 \quad 100 \times [(Treated_{48} - T_0)/(Control_{48} - T_0)] = 50$$

hvor $Treated_{48}$ er verdien ved 48 timer for de behandlede celler og $Control_{48}$ er verdien ved 48 timer for kontrollpopulasjonen.

Alle konsentrasjoner av forbindelser testes i to paralleller og for kontroller tas 30 gjennomsnittet for 12 brønner. Et meget likt 96-brønns plate-layout- og GI_{50} -beregningsskjema benyttes av National Cancer Institute (se Monks, *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 83:757-766 (1991)). Den fremgangsmåte som the National Cancer Institute beregner celleantall etter, benytter ikke MTS, men anvender i stedet alternative metoder.

Forbindelser ifølge Eksempel 1-11 ovenfor inhiberte celleproliferasjon i humane ovarietumorcellelinjer (SKOV-3).

Eksempel 21

5 Beregning av IC₅₀:

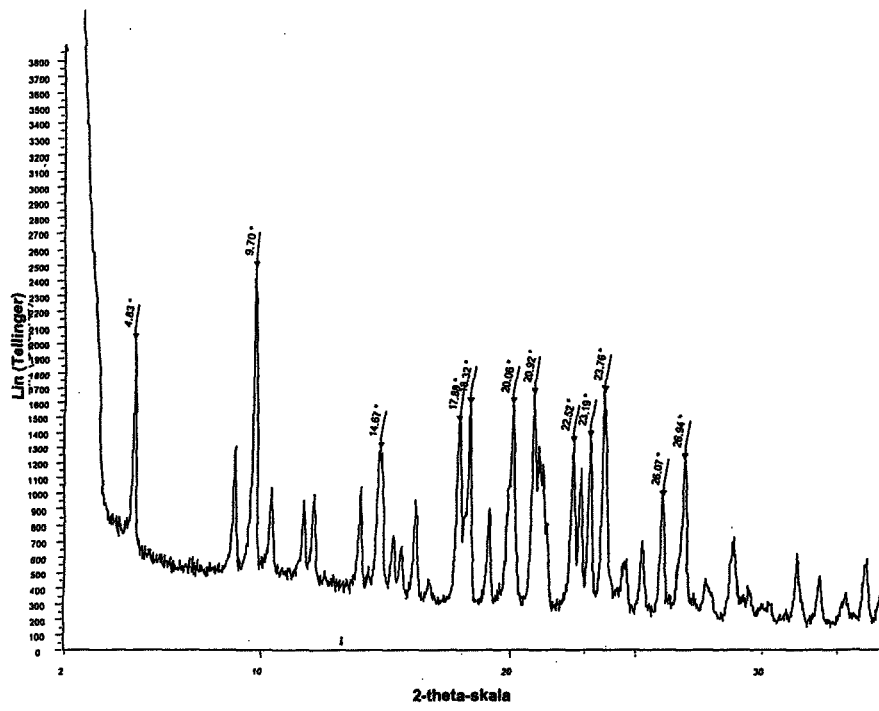
Måling av en forbindelses IC₅₀ for KSP-aktivitet gjør bruk av en ATPase-test. Følgende løsninger benyttes: Løsning 1 består av 3 mM fosfoenolpyruvat-kaliumsalt (Sigma P-7127), 2 mM ATP (Sigma A-3377), 1 mM IDTT (Sigma D-9779), 5 μM paklitaxel (Sigma T-7402), 10 ppm antiskum 289 (Sigma A-8436), 25 mM Pipes/KOH pH 6,8 (Sigma P6757), 2 mM MgCl₂ (VWR JT400301) og 1 mM EGTA (Sigma E3889). Løsning 2 består av 1 mM NADH (Sigma N8129), 0,2 mg/mL BSA (Sigma A7906), pyruvat-kinase 7U/mL, L-laktat-dehydrogenase 10 U/mL (Sigma P0294), 100 nM KSP motor-domene, 50 μg/mL mikrotubuli, 1 mM DTT (Sigma D9779), 5 μM paklitaxel (Sigma T-7402), 10 ppm antiskum 289 (Sigma A-8436), 25 mM Pipes/KOH pH 6,8 (Sigma P6757), 2 mM MgCl₂ (VWR JT4003-01) og 1 mM EGTA (Sigma E3889). Rekkefortynninger (8-12 to gangers fortynninger) av forbindelsen fremstilles i en 96-brønns mikrotiter plate (Corning Costar 3695) ved å benytte Løsning 1. Etter rekkefortynning har hver brønn 50 μL av Løsning 1. Reaksjonen startes ved å tilsette 50 μL av Løsning 2 til hver brønn. Dette kan fortas med en flerkanalspipette, enten manuelt eller med automatisert væskehåndteringsutstyr. Mikrotiterplatene overføres deretter til en mikroplate absorbanseleser, og multiple absorbanseavlesninger ved 340 nm foretas for hver brønn i kinetisk modus. Den observerte hastighet av endring, som er proporsjonal med ATPase-hastigheten, plottes deretter som funksjon av konsentrasjonen av forbindelse. For en standard IC₅₀-bestemmelse tilpasses de avleste data etter den følgende fire-parameters ligning under bruk av et ulineært tilpasningsprogram (f.eks. Grafit 4):

$$y = \frac{\text{Område}}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^s} + \text{Bakgrunn}$$

30

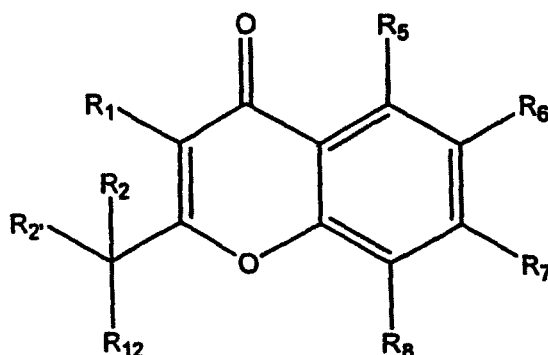
hvor y er den observerte hastighet og x konsentrasjon av forbindelsen.

Figur 1 – Tilberedning A



PATENTKRAV

1. Forbindelse, karakterisert ved at den har strukturen:



5 hvor:

R₁ er benzyl, halogenbenzyl, metoksybenzyl eller cyanobenzyl;

R₂ er isopropyl;

R₂' er hydrogen;

R₅ er hydrogen;

10 R₆ er hydrogen:

R₇ er halogen, cyano eller metoksy;

R₈ er hydrogen; og

R₁₂ er -N(R₄)(COR₃) hvor R₃ er tolyl og R₄ er aminopropyl;

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav; eller

15 et farmasøytisk akseptabelt solvat derav;

eller et farmasøytisk akseptabelt solvat av et farmasøytisk akseptabelt salt

derav.

2. Forbindelse ifølge krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat, eller
20 solvat av et farmasøytisk akseptabelt salt derav,

karakterisert ved at R₂ og R₂' er hver koblet til et stereogent senter som har en R-konfigurasjon.

3. Forbindelse ifølge krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat, eller
25 solvat av et farmasøytisk akseptabelt salt derav,

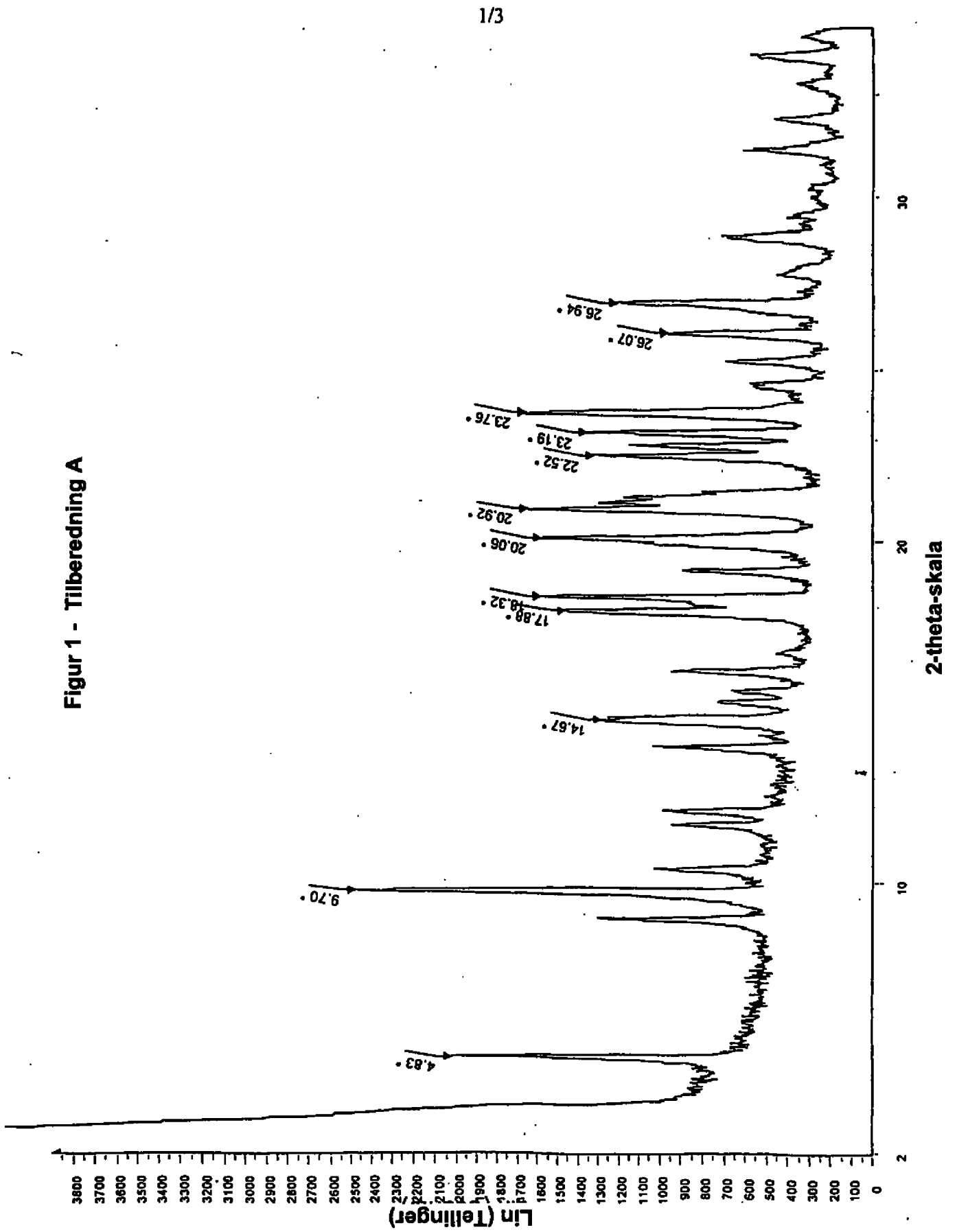
karakterisert ved at R₂ og R₂' er hver koblet til et stereogent senter som har en S-konfigurasjon.

4. Forbindelse ifølge krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat, eller solvat av et farmasøytisk akseptabelt salt derav, karakterisert ved at det er et hydroklorid-, fosforsyre- eller oksalsyresalt.
- 5 5. Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at den er N-(3-aminopropyl)-N-[1-(3-benzyl-7-klor-4-okso-4H-kromen-2-yl)-2-metyl-propyl]-4-metyl-benzamid, eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat, eller solvat av et farmasøytisk akseptabelt salt derav.
- 10 6. Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at den er N-(3-aminopropyl)-N-[1-(3-benzyl-7-klor-4-okso-4H-kromen-2-yl)-2-metyl-propyl]-4-metyl-benzamidhydrokloridhydrat.
7. Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at den er N-(3-aminopropyl)-N-[(R)-1-(3-benzyl-7-klor-4-okso-4H-kromen-2-yl)-2-metyl-propyl]-4-metyl-benzamid, eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat, eller solvat av et farmasøytisk akseptabelt salt derav.
- 15
8. Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at den er N-(3-aminopropyl)-N-[(R)-1-(3-benzyl-7-klor-4-okso-4H-kromen-2-yl)-2-metyl-propyl]-4-metyl-benzamidhydrokloridhydrat.
- 20
9. Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at den er N-(3-aminopropyl)-N-[(R)-1-(3-benzyl-7-klor-4-okso-4H-kromen-2-yl)-2-metyl-propyl]-4-metyl-benzamidhydrokloridhydrat med pulver XRPD topper (2 θ) valgt fra de som har omtrent følgende verdier: 4.8, 9.7, 20.1 og 23.8.
- 25
10. Sammensetning, karakterisert ved at den omfatter en farmasøytisk eksipient og en forbindelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9 eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat eller solvat av et farmasøytisk akseptabelt salt derav.
- 30
11. Anvendelse av en forbindelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9, eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat, eller solvat av et farmasøytisk akseptabelt

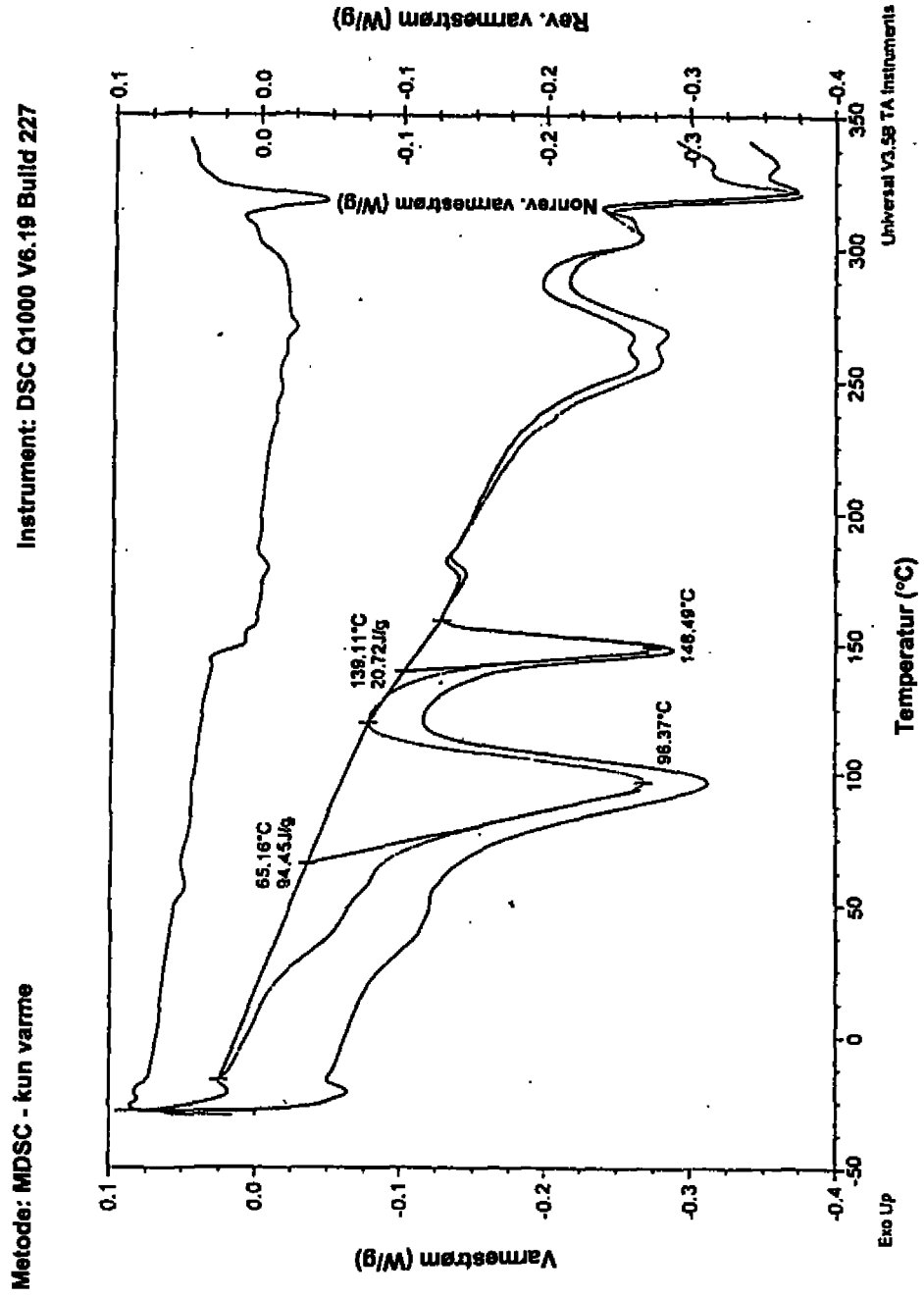
salt derav, for fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av en cellulær proliferativ sykdom.

12. Anvendelse ifølge krav 11, hvor nevnte cellulære proliferative sykdom er valgt
5 fra cancer, hyperplasier, restenose, kardial hypertrofi, immunforstyrrelser og
inflammasjon.

Figur 1 - Tilberedning A



Figur 2 - Tilberedning A



Figur 3 - Tilberedning B

