



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **323721**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07D 241/44 (2006.01)

C07D 405/10 (2006.01)

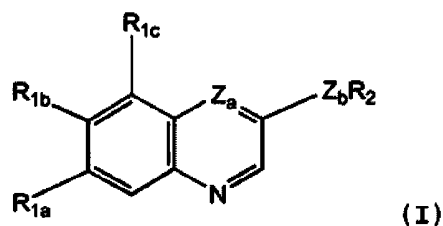
A61K 31/47 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19995819	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.05.28 PCT/US98/10999
(22)	Inng.dag	1999.11.26	(85)	Videreføringsdag	1999.11.26
(24)	Løpedag	1998.05.28	(30)	Prioritet	1997.05.28, US, 864455 1997.11.18, US, 972614
(41)	Alm.tilgj	1999.11.26			
(45)	Meddelt	2007.06.25			
(73)	Innehaver	Aventis Pharmaceuticals Inc, P O Box 6800, NJ08807-0800 BRIDGEWATER, US			
(72)	Oppfinner	Michael R Myers, 205 Lincoln Road, Reading, PA 19606, US Martin P Maguire, 6 Kimball Court, Apartment 300, Woburn, MA 01801, US Paul E Persons, 526 Charlestown Meadow Drive, Westborough, MA 01581, US Alfred P Spada, 473 Painter Way, Lansdale, PA 19446, US			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO			
(54)	Benevnelse	Kinolin- og kinoksalinforbindelser som inhiberer blodplateavledet vekstfaktor og/eller P56^{lck}-tyrosinkinase og farmasøytisk formulering inneholdende det samme, samt anvendelse derav			
(56)	Anførte publikasjoner	Ingen			
(57)	Sammendrag				

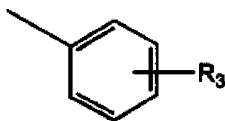
Denne oppfinnelse er rettet på kinolin/kinoksalinforbindelser som inhiberer blodplateavledet vekstfaktor tyrosinkinase og/eller Lck tyrosinkinase, farmasøytiske sammensetninger omfattende disse forbindelser, og anvendelsen av disse forbindelser for å behandle en pasient som lider av eller er utsatt for forstyrrelser/tilstander som innbefatter cellulær differensiering, proliferasjon, ekstracellulær matriksproduksjon eller mediatorfrigivelse og/eller T-celleaktivering og proliferasjon.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en forbindelse som er særpreget ved at den har formel I



hvor

- 5 R_{1a} og R_{1b} er uavhengig av hverandre C₁₋₃-alkoksy
R_{1c} er hydrogen,



R₂ er

R₃ er hydrogen eller meta-halogen;

Z_a er N eller CH; og

- 10 Z_b er NH eller O,

eller et N-oksid, hydrat, solvat eller salt derav.

- Et annet aspekt av oppfinnelsen er rettet på en farmasøytisk blanding omfattende en farmasøytisk effektiv mengde av en forbindelse med formel I og en farmasøytisk akseptabel bærer. Oppfinnelsen er også rettet mot anvendelsen av en forbindelse med formel I for fremstilling av et middel eller medikament som definert i kravene 22 - 32.
- 15

2. Teknikkens stand

- Et antall litteraturreporter beskriver tyrosinkinaseinhibitorer som er selektive for tyrosinkinasereseptorenzymer så som EGF-R eller PDGF-R eller ikke-reseptoriske cytosoliske tyrosinkinase-enzymmer så som v-abl, p56lck eller c-src. Nyere oversikter av Spada og Myers (*Exp. Opin. Ther.*
- 20

Patents 1995, 5(8), 805) og Bridges (*Exp. Opin. Ther. Patents* 1995, 5(12), 1245) oppsummerer litteraturen for tyrosinkinaseinhibitorer og EGF-R-selektive inhibitorer respektive. I tillegg har Law og Lydon oppsummert anticancerpotensialet av tyrosinkinaseinhibitorer (*Emerging Drugs: The Prospect For Improved Medicines* 1996, 241-260).

Kjente inhibitorer av PDGF-R-tyrosinkinaseaktivitet innbefatter kinolinbaserte inhibitorer rapportert av Maguire et al. (*J. Med. Chem.* 1994, 37, 2129), og av Dolle et al. (*J. Med. Chem.* 1994, 37, 2627). En klasse fenylamino-pyrimidinbaserte inhibitorer ble nylig rapportert av Traxler et al. I EP 564409 og av Zimmerman, J.; og Traxler, P. et al. (*Biorg. & Med. Chem. Lett.* 1996, 6(11), 1221-1226) og av Buchdunger, E. et al. (*Proc. Nat. Acad. Sci.* 1995, 92, 2558). Til tross for fremgangen på området er det ingen midler fra disse klasser av forbindelser som er blitt godkjent for anvendelse på mennesker for å behandle proliferativ sykdom.

Korrelasjonen mellom den multifaktoriske sykdom restenose med PDGF og PDGF-R er veldokumentert i hele den vitenskapelige litteratur. Imidlertid er det slik at den senere tids forskning vedrørende forståelsen av fibrotiske sykdommer i lungene (Antoniades, H. N.; et al. *J. Clin. Invest.* 1990, 86, 1055), nyrene og leveren (Peterson, T. C. *Hepatology*, 1993, 17, 486) har også implisert PDGF og PDGF-R for å spille en rolle. For eksempel er glomerulonefritt en viktig årsak til renal svikt, og PDGF har vist seg å være et potent mitogen for mesangiale celler *in vitro*, som påvist av Shultz et al. (*Am. J. Physiol.* 1988, 255, F674) og av Floege, et al. (*Clin. Exp. Immun.* 1991, 86, 334). Det er blitt rapportert av Thornton, S. C.; et al. (*Clin. Exp. Immun.* 1991, 86, 79) at TNF-alfa og PDGF (erholdt fra menneskelige revmatoid artrittpasienter) er de viktigste cytokiner involvert i proliferasjon av synoviale celler. Videre er spesifikke tumorcelletyper blitt identifisert (se Silver, B. J., *BioFaktors*, 1992, 3, 217) så som glioblas-

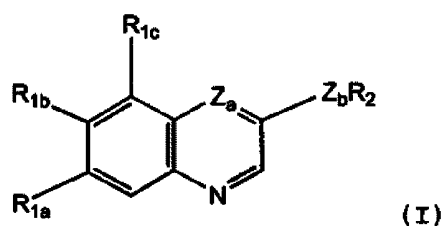
toma og Kaposi sarkom som overuttrykker enten PDGF-proteinet eller reseptoren og således fører til ukontrollert vekst av cancerceller via en autokrin eller parakrin mekanisme. Derfor er det nærliggende å tro at en PDGF-tyrosinkinaseinhibitor vil være nyttig når det gjelder å behandle flere forskjellige tilsynelatende ubeslektede menneskelige sykdomstilstander som kan karakteriseres ved medvirkning av PDGF og eller PDGF-R i sin etiologi.

Rollen til forskjellige ikke-reseptoriske tyrosinkinaser, så som p56^{lck} (i det følgende "Lck") i inflammasjonsrelaterte tilstander som innbefatter T-celleaktivering og proliferasjon, er blitt gjennomgått av Hanke, et al (*Inflamm. Res.* 1995, 44, 357) og av Bolen og Brugge (*Ann. Rev. Immunol.*, 1997, 15, 371). Disse inflammatoriske tilstander innbefatter allergi, autoimmun sykdom, revmatoid artritt og transplantatrejeksjon. En annen nylig oversikt oppsummerer forskjellige klasser av tyrosinkinaseinhibitorer inklusive forbindelser som har Lck-inhiberende aktivitet (Groundvann, et. al *Progress i Medicinal Chemistry*, 1996, 33, 233). Inhibitorer av Lck-tyrosinkinaseaktivitet innbefatter flere naturlige produkter som generelt er ikke-selektive tyrosinkinaseinhibitorer så som staurosporin, genistein, visse flavoner og erbstatin. Damnacanthol ble nylig beskrevet som en lav-nM-inhibitor av Lck (Faltynek, et. al, *Biochemistry*, 1995, 34, 12404). Eksempler på syntetiske Lck-inhibitorer innbefatter: en serie av dihydroksyisokinolininhibitorer beskrevet med lavmikromolar til submikromolar aktivitet (Burke, et. al *J. Med. Chem.* 1993, 36, 425); og et kinolinderivat som har vist seg å være meget mindre aktivt og ha en Lck IC₅₀ på 610 mikromol. Forskerne har også beskrevet en serie av 4-substituerte kinazoliner som inhiberer Lck i det lavmikromolare til submikromolare område (Myers et al, WO95/15758 og Myers, et. al *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 7, 417). Forskerne ved Pfizer (Hanke, et. al *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 695) har beskrevet to spesifikke pyrazolopyrimidininhibitorer kjent som PP1 og PP2 som har lavnanomolar potens mot Lck og Fyn.

(en annen Src-beslektet kinase). Ingen Lck-inhibisjon er blitt rapportert vedrørende kinolin- eller kinoksalinbaserte forbindelser. Derfor er det nærliggende å tro at en kinolin- eller kinoksalinbasert inhibitor av Lck-tyrosinkinaseaktivitet vil kunne være nyttig når det gjelder å behandle flere forskjellige tilsynelatende ubeslektede menneskelige sykdomstilstander som kan karakteriseres ved medvirkning av Lck-tyrosinkinasesignaling i sin etiologi.

10 OPPSUMMERING av OPPFINNELSEN

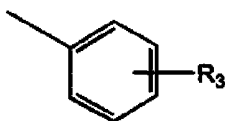
Denne oppfinnelse er rettet mot en forbindelse med formel I



hvor

R_{1a} og R_{1b} er uavhengig av hverandre C₁₋₃-alkoksy

15 R_{1c} er hydrogen,



R₂ er

R₃ er hydrogen eller metahalogen;

Z_a er N eller CH; og

Z_b er NH eller O,

20 eller et N-oxid derav, hydrat derav, solvat derav eller salt derav.

Et annet aspekt av oppfinnelsen er rettet mot en farmasøytisk blanding omfattende en farmasøytisk effektiv mengde av en forbindelse med formel I og en farmasøytisk akseptabel

bærer. Mellomprodukter som er nyttige ved fremstilling av forbindelser med formel I, fremgangsmåter for fremstilling av mellomproduktene og forbindelsene med formel I er beskrevet. Anvendelsen av en forbindelse med formel I for fremstilling av et middel eller medikament som definert i kravene 22 - 32 er omfattet av oppfinnelsen.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Anvendt ovenfor og gjennom hele beskrivelsen av oppfinnelsen, har følgende uttrykk, hvis intet annet er sagt, følgende betydninger:

Definisjoner

"Pasient" betyr et pattedyr inklusive et menneske.

"Effektiv mengde" betyr en mengde av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse som er effektiv når det gjelder å inhibere PDGF-R-tyrosinkinaseaktivitet og eller Lck-tyrosinkinaseaktivitet, og således fremkalle den ønskede terapeutiske virkning.

"Alkyl" betyr en alifatisk hydrokarbongruppe som kan være forgrenet eller rettkjedet med ca. 1 til ca. 10 karbonatomer. Foretrukket alkyl er "lavere alkyl" med ca. 1 til ca. 3 karbonatomer; mer foretrukket er metyl. Forgrenet betyr at en eller flere lavere alkylgrupper så som metyl, etyl eller propyl er bundet til en lineær alkylkjede. Alkylgruppen er også eventuelt substituert med alkoksy, halogen, karboksy, hydroksey eller R_5R_6N - (hvor R_5 og R_6 er uavhengig hydrogen eller alkyl, eller R_5 og R_6 tatt sammen med nitrogenatomet som R_5 og R_6 er knyttet til, danner azaheterocykl); mer foretrukket eventuelt substituert med fluor. Eksempler på alkyl innbefatter metyl, fluormetyl, difluormetyl, trifluormetyl, etyl, n-propyl, isopropyl, butyl, sec-butyl, t-butyl, amyl og heksyl.

"Cykloalkyl" betyr et ikke-aromatisk monocyklisk ringsystem av ca. 3 til ca. 7 karbonatomer. Foretrukket innbefatter monocykliske cykloalkylringer cyklopentyl, cykloheksyl og cykloheptyl; mer foretrukket er cykloheksyl og cyklopentyl.

5 "Aryl" betyr et aromatisk karbocyklisk radikal inneholdende ca. 6 til ca. 10 karbonatomer. Eksempler på aryl innbefatter fenyl eller naftyl, eller fenyl eller naftyl substituert med en eller flere arylgruppesubstituenten som kan være like eller forskjellige, hvor "arylgruppesubstituent" inn-
10 befatter hydrogen, hydroksy, halogen, alkyl, alkoksy, karboksy, alkoksykarbonyl eller Y^1Y^2NCO- , hvori Y^1 og Y^2 er uavhengig hydrogen eller alkyl.

"Heteroaryl" betyr et ca. 5- til ca. 10-leddet aromatisk monocyklisk eller multicyklisk hydrokarbonringsystem hvori
15 et eller flere av karbonatomene i ringsystemet er element(er) som ikke er karbon, for eksempel nitrogen, oksygen eller svovel. "Heteroarylet" kan også være substituert med en eller flere av ovennevnte "arylgruppesubstituenten". Eksempler på heteroarylgrupper innbefatter substituert pyra-
20 zinyll, furanyll, tienyll, pyridyll, pyrimidinyl, isoksazolyl, isotiazolyl, oksazolyl, tiazolyl, pyrazolyl, furazanyll, pyrrolyll, imidazo[2,1-b]tiazolyl, benzofurazanyll, indolyl, azaindolyl, benzimidazolyl, benzotienyll, kinolinyl, imidazolyl og isokinolinyl.

25 "Heterocyklyll" betyr et ca. 4- til ca. 7-leddet monocyklisk ringsystem hvori et eller flere av atomene i ringsystemet er et element som ikke er karbon valgt blant nitrogen, oksygen eller svovel. Betegnelsen av aza eller oksa som et prefiks foran heterocyklyll definerer at minst ett nitrogen-
30 eller oksygenatom er nærværende respektive som et ringatom. Eksempler på monocykliske heterocyklyllgrupper innbefatter piperidyll, pyrrolidinyl, piperazinyl, morfolinyl, tiomorfolinyl, tiazolidinyl, 1,3-dioxolanyll, 1,4-dioksanyll, tetrahydrofuranyll, tetrahydrotiofenyll, tetrahydrotiopyranyll og
35 lignende. Eksempler på heterocyklyllgrupper innbefatter ki-

nuklidyl, pentametylensulfid, tetrahydropyranyl, tetrahydrotiofenyl, pyrrolidinyll, tetrahydrofuranlyl eller 4-piperidinopiperidin.

"Heterocyklylkarbonyloksy" betyr en heterocyklyl-C(O)O-gruppe hvori heterocyklylet er som definert heri. Et eksempel på en heterocyklylkarbonyloksygruppe er [1,4']-bipiperidin-1'-ylkarbonyloksy(4-piperidinopiperid-1-ylkarbonyloksy).

"Acyl" betyr en H-CO- eller alkyl-CO-gruppe hvori alkylgruppen er som tidligere beskrevet. Foretrukne acylgrupper inneholder et lavere alkyl. Eksempler på acylgrupper innbefatter formyl, acetyl, propanoyl, 2-metylpropanoyl, butanoyl og caproyl.

"Alkoksy" betyr en alkyl-O-gruppe hvori alkylgruppen er som tidligere beskrevet. Foretrukket er alkoksy "lavere alkoksy" med ca. 1 til ca. 3 karbonatomer; mer foretrukket er metoksy. Alkoksygruppen kan eventuelt være substituert med en eller flere alkoksy, karboksy, alkoksylkarbonyl, karboksyaryl eller R_5R_6N - (hvori R_5 og R_6 er som definert ovenfor). Eksempler på alkoksygrupper innbefatter metoksy, etoksy, n-propoksy, i-propoksy, n-butoksy, heptoksy, 2-(morfolin-4-yl)etoksy og 2-(etoksy)etoksy.

"Cykloalkyloksy" betyr en cykloalkyl-O-gruppe hvori cykloalkylgruppen er som tidligere beskrevet. Eksempler på cykloalkyloksygrupper innbefatter cyklopentyloksy eller cykloheksyloksy.

"Heterocyklyloksy" betyr en heterocyklyl-O-gruppe hvori heterocyklylgruppen er som tidligere beskrevet. Eksempler på heterocyklyloksygrupper innbefatter pentametylensulfidoksy, tetrahydropyranyloksy, tetrahydrotiofenyloksy, pyrrolidinyloksy eller tetrahydrofuranlyloksy.

"Aryloksy" betyr aryl-O-gruppe hvori arylgruppen er som tidligere beskrevet.

"Heteroaryloksy" betyr heteroaryl-O-gruppe hvori heteroarylgruppen er som tidligere beskrevet.

5 "Acyloksy" betyr en acyl-O-gruppe hvori acylgruppen er som tidligere beskrevet.

"Karboksy" betyr en HO(O)C-gruppe (karboksylsyre).

"R₅R₆N-" betyr en substituert eller usubstituert amino-gruppe, hvori R₅ og R₆ er som tidligere beskrevet. Eksem-
10 pler på grupper innbefatter amino (H₂N-), metylamino, etyl-
metylamino, dimetylamino og dietylamino.

"R₅R₆NCO-" betyr en substituert eller usubstituert karbamoylgruppe, hvori R₅ og R₆ er som tidligere beskrevet. Eks-
15 empler på grupper er karbamoyl (H₂NCO-) og dimetylamino-
karbamoyl (Me₂NCO-).

"AcylR₅ N-" betyr en acylaminogruppe hvori R₅ og acyl er som definert heri.

"Halogen" betyr fluor klor, brom eller jod. Foretrukket er fluor klor eller brom, og mer foretrukket er fluor eller
20 klor.

"Solvat" betyr en fysikalsk forening av en forbindelse ifølge denne oppfinnelse med en eller flere løsningsmiddel-
molekyler. Denne fysikalske forening involverer varierende grader av ionisk og kovalent binding, inklusive hydrogen-
25 binding. I visse tilfeller vil solvatet kunne isoleres, for eksempel når en eller flere løsningsmiddelmolekyler er innlemmet i det krystallinske faste stoffs krystallgitter.
"Solvat" innbefatter både oppløsningsfasen og uløselige solvater. Representative solvater innbefatter etanolater,

metanolater og lignende. "Hydrat" er et solvat hvori løsningsmiddel-molekylet(ene) er H_2O .

Foretrukne utførelsesformer

Et foretrukket forbindelsesaspekt av oppfinnelsen er en forbindelse med formel I hvori R_{1a} er; foretrukket R_{1a} er metoksy, etoksy, 2-(etoksy)etoksy.

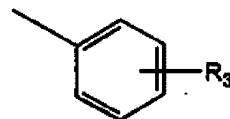
Et annet foretrukket forbindelsesaspekt ifølge oppfinnelsen er en forbindelse med formel I hvori R_{1b} er, uavhengig av R_{1a} , C_{1-3} alkoksy; foretrukket R_{1b} er metoksy eller etoksy.

10 Et annet foretrukket forbindelsesaspekt ifølge oppfinnelsen er en forbindelse med formel I hvori R_{1a} og R_{1b} er C_{1-3} alkoksy; mer foretrukket metoksy eller etoksy.

Et annet foretrukket forbindelsesaspekt ifølge oppfinnelsen er en forbindelse med formel I hvori R_{1c} er hydrogen.

15 Et annet foretrukket forbindelsesaspekt ifølge oppfinnelsen

er en forbindelse med formel I hvori R_2 er



Et annet foretrukket forbindelsesaspekt ifølge oppfinnelsen er en forbindelse med formel I hvori R_3 er hydrogen eller metahalogen.

20 Et annet foretrukket forbindelsesaspekt ifølge oppfinnelsen er en forbindelse med formel I hvori Z_a er N.

Et annet foretrukket forbindelsesaspekt ifølge oppfinnelsen er en forbindelse med formel I hvori Z_a er CH.

25 Et annet foretrukket forbindelsesaspekt ifølge oppfinnelsen er en forbindelse med formel I hvori Z_b er NH.

Et annet foretrukket forbindelsesaspekt ifølge oppfinnelsen er en forbindelse med formel I hvori Z_b er O.

Foretrukne forbindelser i henhold til oppfinnelsen er valgt fra de følgende:

5

2-((S)- α -Metylbenzyl-amino)-6,7-dietoksykinoksalin;

2-Benzylamino-6,7-dietoksykinoksalin;

(6-Metoksykinoksalin-2-yl)-(3-metylphenyl)-amin;

6-Metoksy-2-fenylamino-kinoksalin;

10

2-Anilino-6-etoksykinoksalin;

2-(3-Metoksyfenylamino)-6,7-dietoksykinoksalin;

2-(4-Fluorfenylamino)-6,7-dietoksykinoksalin;

6,7-Dietoksy-2-phenoksykinoksalin;

2-Fenylamino-6,7-dietoksykinoksalin;

15

(6,7-Dimetoksykinoksalin-2-yl)-(3-fluorphenyl)-amin;

2-(3-Fluorfenylamino)-6,7-dietoksykinoksalin;

(3-Bromphenyl)-(6,7-dimetoksykinoksalin-2-yl)-amin;

(6,7-Dimetoksykinoksalin-2-yl)-fenylamin; og

(3-Klorphenyl)-(6,7-dimetoksykinoksalin-2-yl)-amin.

20

Mer foretrukne arter er de følgende:

6,7-Dietoksy-2-phenoksykinoksalin;

2-Fenylamino-6,7-dietoksykinoksalin;

(6,7-Dimetoksykinoksalin-2-yl)-(3-fluorphenyl)-amin;

25

2-(3-Fluorfenylamino)-6,7-dietoksykinoksalin;

(3-Bromphenyl)-(6,7-dimetoksykinoksalin-2-yl)-amin;

(6,7-Dimetoksykinoksalin-2-yl)-fenylamin; og

(3-Klorphenyl)-(6,7-dimetoksykinoksalin-2-yl)-amin.

30

Det bør være underforstått at denne oppfinnelse dekker alle egnede kombinasjoner av de spesielle og foretrukne grupperinger omtalt heri.

Forbindelsene ifølge denne oppfinnelse kan fremstilles ved å anvende prosedyrer kjent i litteraturen utgående fra

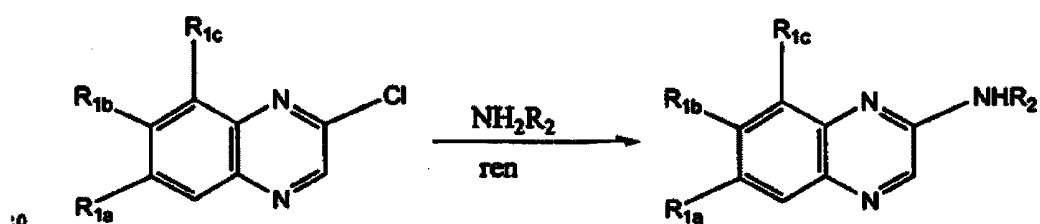
35

kjente forbindelser eller lettfremstilte mellomprodukter.

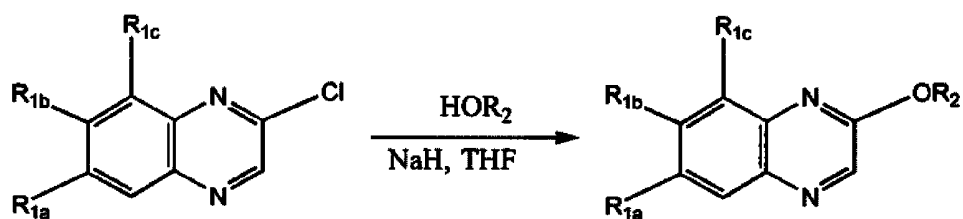
Eksempler på generelle prosedyrer følger.

Dessuten fremstilles forbindelser med formel I i henhold til følgende skjemaer I-VI, hvori variablene er som beskrevet ovenfor, med unntagelse av de variabler som en fagkyndig person ville forstå ville være uoverensstemmende med den beskrevne metode.

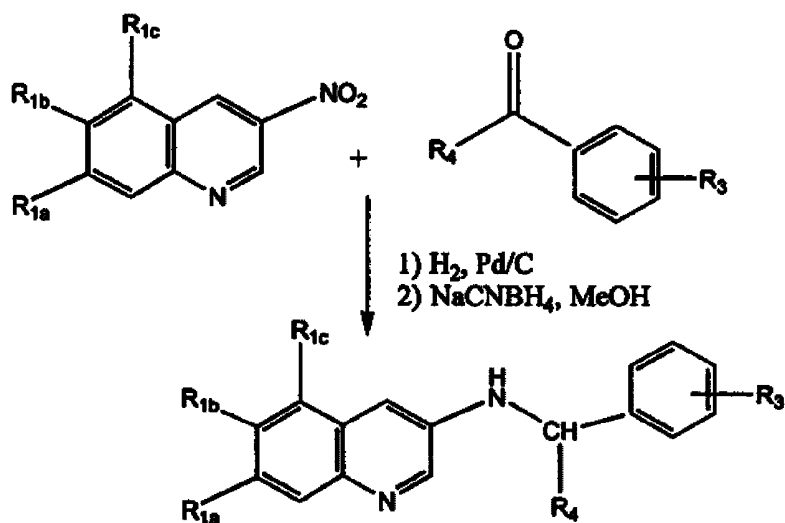
Skjema I

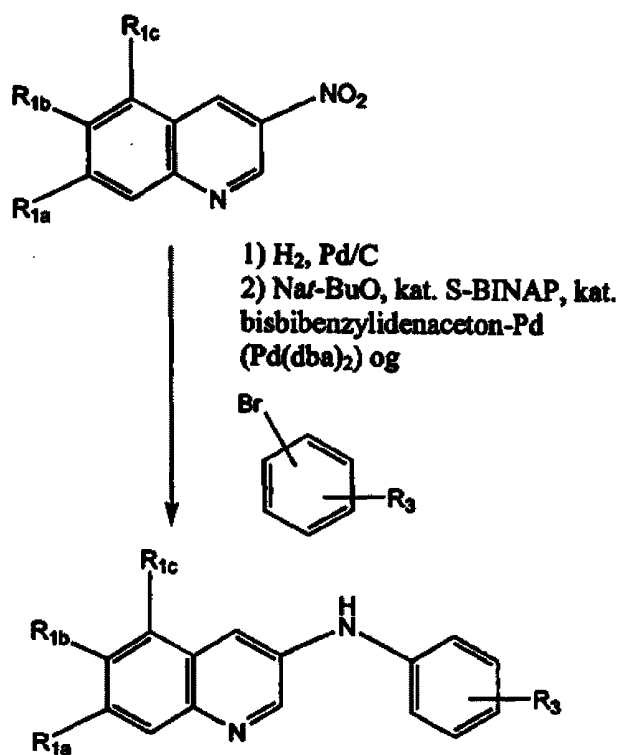
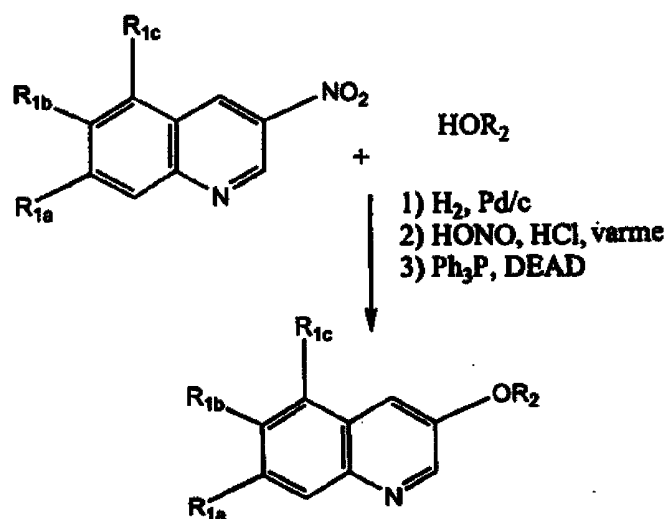


Skjema II

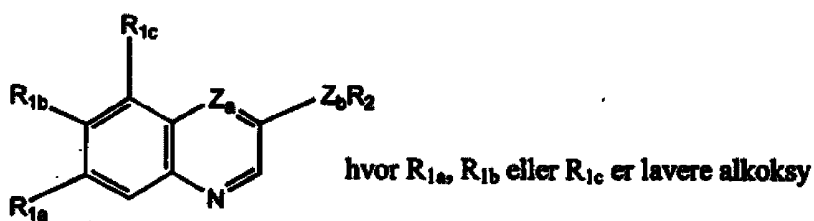


Skjema III

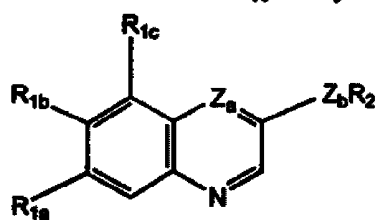


Skjema IVSkjema V

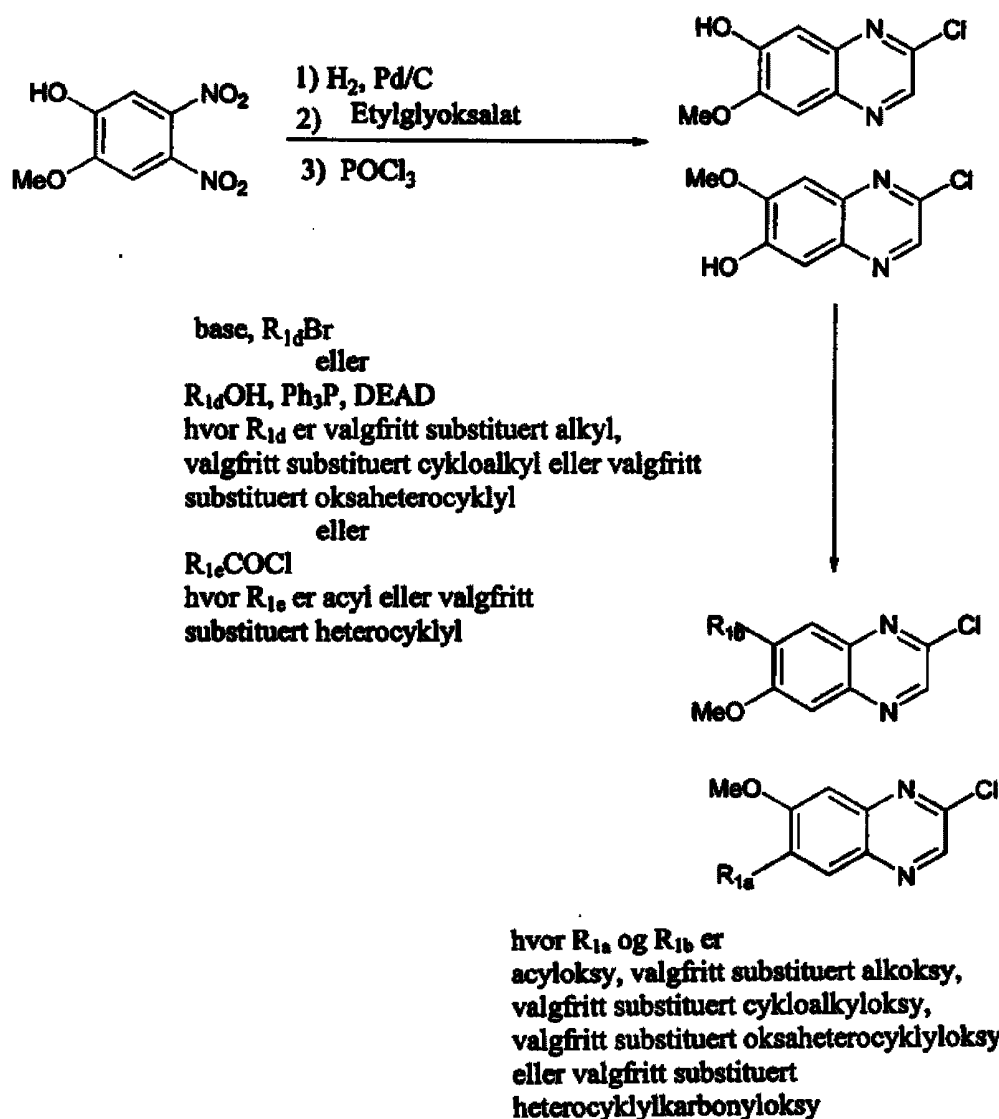
Skjema VI



1) NaSEt
 2) base, $R_{1d}Br$
 eller
 $R_{1d}OH$, Ph_3P , DEAD
 hvor R_{1d} er valgfritt substituert alkyl,
 valgfritt substituert cykloalkyl eller
 valgfritt substituert oksaheterocyklyl
 eller
 $R_{1e}COCl$
 hvor R_{1e} er acyl eller valgfritt substituert heterocyklyl



hvor den R_{1a} , R_{1b} eller R_{1c} som tilsvarer
 det ovennevnte alkoksy, nå er acyloksy, valgfritt substituert
 alkoksy, valgfritt substituert cykloalkyloksy, valgfritt substituert
 oksaheterocyklyloksy eller valgfritt substituert heterocyklylkarbonyloksy

Skjema VIII. Generelle prosedyrer:1. Kobling av 2-klorsubstituert kinoksalin og aminer eller aniliner

- s En blanding av 2-klor-6,7-dimetoksykinoksalin (1 ekv.) og et amin (ca. 1 til ca. 5 ekv.) oppvarmes ved ca. 160 til ca. 180 °C fra ca. tre timer og over natten. Det mørkebrune residuum oppløses i metanol/ metylenklorid (0%-10%) og

kromatograferes på silikagel eluert med heksan/etylacetat eller metanol/metylenklorid (0%-100%) hvilket gir det ønskede produkt. Det ønskede produkt kan renses videre ved omkrystallisering i metanol, metylenklorid eller metanol/vann.

2. Kobling av 2-klorsubstituert kinoksalin og alkoholer eller fenoler

En suspensjon av en alkohol eller et merkaptan (1 ekv.) og natriumhydrid (ca. 1 til ca. 3 ekv.) i vannfritt DMF/THF (0%-50%) oppvarmes under tilbakeløp i 1 time før tilsetning av 2-klor-6,7-dimetoksykinoksalin (1 ekv.). Den resulterende blanding oppvarmes under tilbakeløp i ca. en til ca. fire timer. Suspensjonen nøytraliseres til ca. pH 5-8 og fordeles mellom metylenklorid og saltvann. Residuet etter konsentrering av metylenklorid kromatograferes på silikagel eluert med heksan/etylacetat eller metanol/metylenklorid (0%-100%) hvilket gir det ønskede produkt.

3. Reduktiv amineringsreaksjon med amino-kinoliner og aldehyder eller ketoner.

Et passende substituert 3-aminokinolin (1 ekv.) omrøres med 1 ekv. av et passende aldehyd eller keton i metanol (eller noe annet som egner seg som løsningsmiddelblanding) inntil TLC indikerer at imindannelsen er fullstendig. Et overskudd av NaCNBH_4 eller NaBH_4 , eller noe annet som egner seg som reduksjonsmiddel tilsettes, og blandingen omrøres inntil TLC viser forbruk av det intermediære amin. Blandingens konsentreres, og residuet kromatograferes på silikagel med heksan/etylacetat (0-100 %) eller kloroform/metanol (0-20%) hvilket gir det ønskede produkt.

4. Koblingsreaksjon av 3-aminosubstituerte kinoliner og bromfenylforbindelser.

Et passende substituert 3-aminokinolin (1 ekv.) omrøres med ~1,4 ekv. av en sterk base så som natrium-t-butoksid, 1
5 ekv. av en passende bromfenylforbindelse, og katalytiske mengder av 2,2'-bis(difenylfosfino)-1-1'-binaftyl (S-BINAP) og bis(dibenzylidenaceton)-palladium (Pd(dba)₂) blandes i et inert organisk løsningsmiddel så som toluen under en inert atmosfære så som argon og oppvarmes til ca. 80°C over
10 natten. Blandingen avkjøles, fortynnes med et løsningsmiddel så som eter, filtreres, konsentreres og kromatograferes med 50% EtOAc/heksan hvilket gir det ønskede produkt.

5. Eterdannelse fra 3-hydroksysubstituerte kinoliner ved Mitsunobus betingelser.

15 En THF-løsning av et passende substituert hydroksykinoksalin (ved ca. 0 til ca. 25 °C) behandles med 1 ekv. av den ønskede alkohol, trifenylfosfin og til slutt diethylazodikarboksyilat (DEAD) eller noe tilsvarende. Reaksjonsforløpet overvåkes via TLC, og når reaksjonen er fullstendig (ca. 1
20 til ca. 24 timer), konsentreres blandingen, og residuet kromatograferes på silikagel hvilket gir det ønskede produkt.

6. Dealkylering av et lavere alkoksysubstituert kinolin eller kinoksalin og påfølgende alkylering.

25 Et passende lavere alkoksysubstituert kinolin eller kinoksalin (1 ekv.) i DMF behandles med et overskudd av natrium-etantiolat (vanligvis ca. 2 eller mer ekv.), og reaksjonsblandingen omrøres med oppvarming fra ca. 1 til ca. 24 timer. Blandingen fordeles mellom vann og etylacetat. Ekstraherende opparbeidelse etterfulgt av kromatografi, hvis nødvendig, tilveiebringer det tilsvarende ønskede hydroksy-
30 substituerte kinolin- eller kinoksalinprodukt.

Det hydroksysubstituerte kinolin- eller kinoksalinprodukt kan alkyleres under anvendelse av betingelsene for Mitsunobus reaksjon som angitt nærmere ovenfor. Alternativt enkel alkylering under anvendelse av metoder som er velkjent i faget, med et reaktivt alkyl- eller benzyhalogenid under anvendelse av NaH eller en annen passende base som egner seg som løsningsmiddel, tilveiebringer det ønskede alkylerte produkt.

7. Oksidasjon av et nitrogen i et kinolin eller kinoksalin til det tilsvarende N-oksid.

En amingruppe (=N-) i en kinolin- eller kinoksalinforbindelse med formel (I), kan omdannes til den tilsvarende forbindelse hvori imingruppen er oksidert til et N-oksid, fortrinnsvis ved omsetning med en persyre, for eksempel pereddiksyre i eddiksyre eller m-klorperoksybenzosyre i et inert løsningsmiddel så som diklormetan, ved en temperatur fra ca. romtemperatur til tilbakeløpstemperaturen, fortrinnsvis ved forhøyet temperatur.

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er nyttige i form av den frie base eller syre eller i form av et farmasøytisk akseptabelt salt derav. Alle former er innenfor omfanget av oppfinnelsen.

Hvor forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse er substituert med en basisk gruppe, dannes syreaddisjonssalter, og de er helt enkelt en mer bekvem anvendelsesform; og i praksis er anvendelse av saltformen ensbetydende med anvendelse av den frie baseform. Syrene som kan anvendes for å fremstille syreaddisjonssaltene innbefatter fortrinnsvis de som tilveiebringer, når de kombineres med den frie base, farmasøytisk akseptable salter, dvs. salter hvis anioner er ikke-toksiske for pasienten i farmasøytiske doser av saltene, slik at de velgjørende inhiberende virkninger på PDGF som er inherent i den frie base, ikke spoles av bivirkninger som kan tilskrives anionene. Skjønt farmasøytisk ak-

septable salter av nevnte basiske forbindelser er foretrukket, er alle syreaddisjonssalter nyttige som kilder for den frie baseform selv om det spesielle salt i seg selv er ønskelig bare som mellomprodukt, som f.eks. når saltet dannes

5 bare for rensingens skyld, og for identifikasjon, eller når det anvendes som mellomprodukt ved fremstilling av et farmasøytisk akseptabelt salt ved ioneutbytningsprosedyrer. Farmasøytisk akseptable salter innenfor omfanget av oppfinnelsen er de som er avledet fra følgende syrer: mineralsy-

10 rer så som saltsyre, svovelsyre, fosforsyre og sulfaminsyre; og organiske syrer så som eddiksyre, sitronsyre, melkesyre, vinsyre, malonsyre, metansulfonsyre, etansulfonsyre, benzensulfonsyre, p-toluensulfonsyre, cykloheksylsulfaminsyre, kininsyre og lignende. De tilsvarende syreaddi-

15 sjonssalter omfatter de følgende: hydrohalogenider, f.eks. hydroklorid og hydrobromid, sulfat, fosfat, nitrat, sulfamat, acetat, citrat, laktat, tartrat, malonat, oksalat, salicylat, propionat, succinat, fumarat, maleat, metylen-bis-

20 di-p-toluoyltartratmetansulfonat, etansulfonat, benzensulfonat, p-toluensulfonat, cykloheksylsulfamat hhv. kinat.

I henhold til et ytterligere trekk av oppfinnelsen, fremstilles syreaddisjonssalter av forbindelsene ifølge denne oppfinnelse ved omsetning av den frie base med en passende

25 syre, ved anvendelse eller tilpasning av kjente metoder. For eksempel syreaddisjonssaltene av forbindelsene ifølge denne oppfinnelse fremstilles enten ved å oppløse den frie base i vandig eller vandig-alkoholisk oppløsning eller noe annet som egner seg som løsningsmiddel inneholdende en pas-

30 sende syre og isolere saltet ved å inndampe løsningen, eller ved å omsette den frie base og syre i et organisk løsningsmiddel, hvori vedkommende salt utskilles direkte eller kan erholdes ved konsentrering av løsningen.

Forbindelsene ifølge denne oppfinnelse regenereres fra syreaddisjonssaltene ved anvendelse eller tilpasning av

35 kjente metoder. For eksempel moderforbindelsene ifølge opp-

finnelsen regenereres fra sine syreaddisjonssalter ved behandling med et alkali, f.eks. vandig natriumbikarbonatløsning eller vandig ammoniakkløsning.

Hvor forbindelsen ifølge oppfinnelsen er substituert med en sur gruppe, kan baseaddisjonssalter dannes, og de er helt enkelt en mer bekvem anvendelsesform; og i praksis er anvendelse av saltformen ensbetydende med anvendelse av den frie syreform. Basene som kan anvendes for å fremstille baseaddisjonssaltene innbefatter fortrinnsvis de som tilveiebringer, når de kombineres med den frie syre, farmasøytisk akseptable salter, dvs. salter hvis kationer er ikke-toksiske for dyreorganismen i farmasøytiske doser av saltene, slik at de velgjørende inhiberende virkninger på PDGF som er inherent i den frie syre ikke spoles av bivirkninger som kan tilskrives kationene. Farmasøytisk akseptable salter, inklusive for eksempel alkali- og jordalkalimetallsalter, innenfor omfanget av oppfinnelsen er de som er avledet fra følgende baser: natriumhydrid, natriumhydroksid, kaliumhydroksid, kalsiumhydroksid, aluminiumhydroksid, litiumhydroksid, magnesiumhydroksid, sinkhydroksid, ammoniak, trimetylammoniakk, trietylammoniakk, etylendiamin, n-metyl-glukamin, lysin, arginin, ornitin, kolin, N,N'-dibenzyletylendiamin, klorprokain, dietanolamin, prokain, n-benzylfenetylamin, dietylamin, piperazin, tris(hydroksymetyl)aminometan, tetrametylammoniumhydroksid og lignende.

Metallsalter av forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse kan erholdes ved å omsette et hydrid, hydroksid, karbonat eller en lignende reaktiv forbindelse av det valgte metall i et vandig eller organisk løsningsmiddel med den frie syreform av forbindelsen. Det anvendte vandige løsningsmiddel kan være vann, eller det kan være en blanding av vann med et organisk løsningsmiddel, fortrinnsvis en alkohol så som metanol eller etanol, et keton så som aceton, en alifatisk eter så som tetrahydrofuran, eller en ester så som etylacetat. Slike reaksjoner utføres vanligvis ved om-

givelsestemperatur, men de kan, hvis ønskelig, utføres med oppvarming.

Aminsalter av forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse kan erholdes ved å omsette et amin i et vandig eller organisk løsningsmiddel med den frie syreform av forbindelsen. Passende vandige løsningsmidler innbefatter vann og blandinger av vann med alkoholer så som metanol eller etanol, etere så som tetrahydrofuran, nitriler så som acetonitril, eller ketoner så som aceton. Aminosyresalter kan fremstilles på lignende måte.

Forbindelsene ifølge denne oppfinnelse regenereres fra baseaddisjonssaltene ved anvendelse eller tilpasning av kjente metoder. For eksempel moderforbindelsene ifølge oppfinnelsen regenereres fra sine baseaddisjonssalter ved behandling med en syre, f.eks. saltsyre.

Foruten å være nyttige i seg selv som aktive forbindelser, er salter av forbindelsene ifølge oppfinnelsen nyttige for å rense forbindelsene, for eksempel ved å utnytte løslighetsforskjellene mellom saltene og moderforbindelsene, biproduktene og/eller utgangsmaterialene ved hjelp av teknikker som er velkjent for fagkyndige personer.

Forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse kan inneholde asymmetriske sentre. Disse asymmetriske sentre kan uavhengig være i enten R- eller S-konfigurasjonen. Det vil også være åpenbart for fagkyndige personer at visse forbindelser med formel I kan oppvise geometrisk isomeri. Geometriske isomerer innbefatter cis- og trans-formene av forbindelser av oppfinnelsen, dvs. forbindelser som har alkenylgrupper eller substituenten på ringsystemene. I tillegg bicykloringsystemene innbefatter endo- og exo-isomerer. Foreliggende oppfinnelse omfatter de individuelle geometriske isomerer, stereoisomerer, enantiomerer og blandinger derav.

Slike isomerer kan separeres fra sine blandinger, ved anvendelse eller tilpasning av kjente metoder, for eksempel kromatografiske teknikker og omkrystallisasjonsteknikker, eller de fremstilles separat fra de egnede isomerer av sine mellomprodukter, for eksempel ved anvendelse eller tilpasning av metoder beskrevet heri.

Utgangsmaterialene og mellomproduktene fremstilles ved anvendelse eller tilpasning av kjente metoder, for eksempel metoder som beskrevet i referanseeksemlene eller deres åpenbare kjemiske tilsvaregheter, eller ved hjelp av metoder beskrevet i henhold til oppfinnelsen heri.

Foreliggende oppfinnelse er videre eksemplifisert, men ikke begrenset av de følgende illustrative eksempler som beskriver fremstillingen av forbindelsene i henhold til oppfinnelsen.

Videre er følgende eksempler representative for fremgangsmåtene som anvendes for å syntetisere forbindelsene ifølge denne oppfinnelse.

EKSEMPEL 1

20 2-(3-Fluorfenylamino)-6,7-dietoksykinoksalin

Til 0,25 g (0,989 mmol) av 2-klor-6,7-dietoksykinoksalin tilsettes 2 ml av *m*-fluoranilin. Denne blanding oppvarmes under nitrogen over natten til 120°C. Den resulterende blanding kromatograferes (30:1 CH₂Cl₂: EtOH) for å gi et delvis rensset produkt. Dette faste stoff tritureres med etylacetat hvilket tilveiebringer 0,175 g av produktet som et brunaktig gult fast stoff i 54,1% utbytte (smp. 193°C). Anal. beregnet for C₁₈H₁₈N₃O₂F•0,25 H₂O: C, 65,15; H, 5,62; N, 12,66. Funnet: C, 65,30; H, 5,30; N, 12,41.

De følgende forbindelser fremstilles på lignende måte begynnende med det passende utgangsmaterial.

2-Fenylamino-6,7-dietoksykinoksalin, smp. 239°C;

(6,7-Dimetoksykinoksalin-2-yl)-(3-fluorfenyl)-amin, smp. 99-100°C, Anal. beregnet for $C_{16}H_{14}FN_3O_2$: C, 64,21; H, 4,71; F, 6,35; N, 14,04. Funnet: C, 64,35; H, 4,61; N, 13,84;

(3-Bromfenyl)-(6,7-dimetoksykinoksalin-2-yl)-amin, smp. 197-198°C, Anal. beregnet for $C_{16}H_{14}BrN_3O_2$: C, 53,35; H, 3,92; Br, 22,18; N, 11,67. Funnet: C, 53,39; H, 3,82; N, 11,64;

(6,7-Dimetoksykinoksalin-2-yl)-fenyl-amin, smp. 88-90°C, Anal. beregnet for $C_{16}H_{15}N_3O_2$: C, 68,31; H, 5,37; N, 14,94. Funnet: C, 68,02; H, 5,52; N, 14,91; og

(3-Klorfenyl)-(6,7-dimetoksykinoksalin-2-yl)-amin, smp. 187-188°C, Anal. beregnet for $C_{16}H_{14}ClN_3O_2$: C, 60,86; H, 4,47; Cl, 11,23; N, 13,31. Funnet: C, 60,85; H, 4,59; N, 13,26.

EKSEMPEL 3

2-Benzylamino-6,7-dietoksykinoksalin

Til 0,3 g (1,19 mmol) 2-klor-6,7-dietoksykinoksalin tilsettes 2 ml benzylamin. Denne blanding oppvarmes under nitrogen over natten til 120°C. Den resulterende blanding fordeles mellom CH_2Cl_2 og mettet $NaHCO_3$ -løsning. Det organiske lag konsentreres, og residuet kromatograferes (30:1 CH_2Cl_2 ; EtOH) for å tilveiebringe 0,337 g av produktet som et gult fast stoff i 87,6% utbytte (smp. 136°C). Anal. beregnet for $C_{19}H_{21}N_3O_2$: C, 70,57; H, 6,54; N, 12,99. Funnet: C, 70,54; H, 6,66; N, 12,80.

De følgende forbindelser fremstilles på lignende måte begynnende med de riktige utgangsmaterialer.

2-Benzylamino-6,7-dietoksykinoksalin, n.p. 136°C, Anal. beregnet for $C_{19}H_{21}N_3O_2$: C, 70,57; H, 6,55; N, 12,99. Funnet: C, 70,54; H, 6,66; N, 12,80.

EKSEMPEL 4

5 2-((S)- α -Metylbenzyl-amino)-6,7-dietoksykinoksalin

Som et eksempel på fremgangsmåte kan 2-((R)- α -Metylbenzyl-amino-6,7-dietoksykinoksalin fremstilles. Til 0,3 g (1,19 mmol) 2-klor-6,7-dietoksykinoksalin tilsettes 2 ml (R)-(+)- α -metylbenzylamin. Denne blanding oppvarmes i tre dager
10 under nitrogen til 120°C. Den resulterende blanding fordeles mellom $CHCl_3$ og mettet $NaHCO_3$ -løsning. Det organiske lag konsentreres, og residuet kromatograferes (30:1 CH_2Cl_2 : EtOH) for å tilveiebringe 0,118 g av produktet som et gult fast stoff i 29,4% utbytte (smp. 53-56°C). Anal. beregnet
15 for $C_{20}H_{23}N_3O_2 \cdot 0,25 H_2O$: C, 70,26; H, 6,93; N, 12,29. Funnet: C, 70,56; H, 6,80; N, 12,35.

Følgende forbindelse som er omfattet av oppfinnelsen fremstilles på lignende måte begynnende med de riktige utgangsmaterialer.

20 2-((S)- α -Metylbenzylamino)-6,7-dietoksykinoksalin, smp. 55-58°C, Anal. beregnet for $C_{20}H_{23}N_3O_2 \cdot 0,25 H_2O$: C, 70,26; H, 6,93; N, 12,29. Funnet: C, 70,49; H, 6,89; N, 12,23.

EKSEMPEL 5

6,7-Dietoksy-2-phenoksykinoksalin

25 Som et eksempel på fremgangsmåte men ikke omfattet av oppfinnelsen, kan 2,7-Bis-cykloheksyloksy-6-metoksy-kinoksalin fremstilles. Til en DMF-løsning (5 ml) av NaH (0,32 g, 8 mmol) under argon, tilsettes sykloheksanol (0,7 ml, 6,7 mmol) dråpevis. Blandingen omrøres ved romtemperatur i 25
30 minutter, hvorefter 2-klor-6,7-dietoksykinoksalin tilset-

tes porsjonsvis. Reaksjonsblandingen omrøres i 15 minutter ved romtemperatur, ved 90°C i 2 timer og ved 110°C i 1 time. Blandingen avkjøles, reaksjonen undertrykkes med H₂O, og blandingen fordeles mellom EtOAc/ H₂O. Det organiske lag
 5 vaskes med H₂O og saltvann, tørkes (MgSO₄) og kromatograferes (10% EtOAc/heksaner) for å tilveiebringe et voksaktig hvitt fast stoff (smp. 75-78°C). Anal. beregnet for C₂₁H₂₈N₂O₃: C, 70,76; H, 7,92; N, 7,86; Funnet: C, 70,81; H, 7,79; N, 7,70.

- 10 Følgende forbindelse som er omfattet av oppfinnelsen fremstilles på lignende måte begynnende med de riktige utgangsmaterialer.

6,7-Dietoksy-2-phenoksykinoksalin, smp. 130-131°C, Anal. beregnet for C₁₈H₁₈N₂O₃: C, 69,66; H, 5,85; N, 9,03. Fun-
 15 net: C, 69,53; H, 5,82; N, 8,91.

MELLOMPRODUKTEKSEMPLER

Nedenfor følger eksempler på mellomprodukter som kan anvendes til å fremstille sluttprodukter ifølge oppfinnelsen.

MELLOMPRODUKTEKSEMPEL 1

- 20 4-Brom-5-metoksy-benzen-1,2-diamindihydroklorid

Til en løsning av EtOAc (50 ml) og 5-brom-4-metoksy-2-nitro-fenylamin (2,5 g, 10 mmol) under argon tilsettes 5% Pd/C (0,5 g). Reaksjonsblandingen hydrosjeneres ved 50 psi i 1 time. Blandingen filtreres gjennom celitt inn i en løs-
 25 ning av HCl/IPA/EtOAc, og filterputen vaskes med ytterligere EtOAc. Den resulterende felling avfiltreres for å tilveiebringe et hvitt fast stoff.

MELLOMPRODUKTEKSEMPEL 27-Brom-6-metoksy-kinoksalin-2-ol og 6-Brom-7-metoksy-kinoksalin-2-ol

Til en løsning av MeOH (15 ml) under argon tilsettes pulveriserte NaOH-perler (0,86 g, 21 mmol) og 4-brom-5-metoksybenzen-1,2-diamindihydroklorid (2,7 g, 9,3 mmol). Blandingen omrøres i 10 minutter, hvorefter en løsning av 45% etylglyoksylat i toluen (2,7 g, 12 mmol) tilsettes portionsvis. Reaksjonsblandingen oppvarmes under tilbakeløp i 1 time og avkjøles deretter. Vann tilsettes, og deretter filtreres suspensjonen. Det resulterende faste stoff vaskes suksessivt med H₂O, MeOH, IPA og Et₂O for å tilveiebringe et gult pulver.

MELLOMPRODUKTEKSEMPEL 37-Brom-2-klor-6-metoksy-kinoksalin og 6-Brom-2-klor-7-metoksy-kinoksalin

Til en blanding av 7-brom-6-metoksy-kinoksalin-2-ol og 6-brom-7-metoksy-kinoksalin-2-ol (1 g, 3,9 mmol) tilsettes POCl₃ (5 ml). Reaksjonsblandingen oppvarmes under tilbakeløp i 1 time, helles i isvann og filtreres, vaskes deretter med vann for å tilveiebringe et lysebrunt fast stoff. Forholdet 7-brom-2-klor-6-metoksykinoksalin : 6-brom-2-klor-7-metoksykinoksalin er tilnærmelsesvis 7:1 ved ¹H NMR.

MELLOMPRODUKTEKSEMPEL 45-Klor-4-metoksy-2-nitroanilin

Til en løsning av N-(5-klor-4-metoksy-2-nitrofenyl)-acetamid (2 g, 8,2 mmol) i 5N HCl (20 ml) tilsettes 1,4-dioksan (10 ml), og blandingen omrøres ved 60°C i 1,5 timer. Reaksjonsblandingen konsentreres og fordeles mellom EtOAc/ 2N NaOH. Det vandige lag vaskes med EtOAc (3X), saltvann, tør-

kes (MgSO_4), adsorberes på silikagel og kromatograferes (70% EtOAc/heksaner) for å tilveiebringe et oransje pulver.

MELLOMPRODUKTEKSEMPEL 5

4-Klor-5-metoksy-benzen-1,2-diamindihydroklorid

- 5 Til en løsning av EtOAc (25 ml) og 5-klor-4-metoksy-2-nitro-fenylamin (1,6 g, 7,9 mmol) under argon tilsettes 5% Pd/C (0,5 g). Reaksjonsblandingen hydrosjeneres ved 50 psi i 1 time. Blandingen filtreres under N_2 gjennom celitt inn i en løsning av 1 N HCl/ Et_2O i EtOAc, og filterputen vaskes
10 med ytterligere EtOAc. Den resulterende felling avfiltreres for å tilveiebringe et hvitt fast stoff.

MELLOMPRODUKTEKSEMPEL 6

7-Klor-6-metoksy-kinoksalin-2-ol og 6-Klor-7-metoksy-kinoksalin-2-ol

- 15 Til en løsning av 4-klor-5-metoksy-benzen-1,2-diamindihydroklorid (1,8 g, 7,2 mmol) i EtOH (15 ml) under argon tilsettes TEA (2,5 ml, 18 mmol) ved 0°C . Blandingen omrøres i 20 minutter, hvorefter en løsning av 45% etylglyksylat i toluen (2,1 g, 9,3 mmol) tilsettes porsjonsvis. Reaksjons-
20 blandingen oppvarmes til romtemperatur, kokes under tilbakeløp i 1,5 time og avkjøles deretter. Vann tilsettes, og deretter filtreres suspensjonen og vaskes suksessivt med H_2O , IPA og Et_2O for å tilveiebringe et lysegult pulver. Produktet destilleres azeotropisk flere ganger med toluen
25 og tørkes in vacuo før anvendelse.

MELLOMPRODUKTEKSEMPEL 7

2,7-Diklor-6-metoksy-kinoksalin og 2,6-diklor-7-metoksy-kinoksalin

Til en blanding av 7-klor-6-metoksy-kinoksalin-2-ol og 6-klor-7-metoksy-kinoksalin-2-ol (1 g, 4,7 mmol) under et CaCl_2 -tørkerør tilsettes POCl_3 (5 ml). Reaksjonsblandingen oppvarmes under tilbakeløp 30 minutter, helles i kald met-
 5 tet NaHCO_3 løsning, filtreres, vaskes deretter med vann for å tilveiebringe et fast stoff. Forholdet 2,7-diklor-6-metoksy-kinoksalin : 2,6-diklor-7-metoksy-kinoksalin er tilnærmelsesvis 6:1 ved ^1H NMR.

Forbindelsene med formel I som beskrevet heri inhiberer in-
 10 hiberingen av celleproliferasjon og/eller cellematriksproduksjon og/eller cellebevegelse (kjemotakse) via inhiberingen av PDGF-R-tyrosinkinaseaktivitet. Et stort antall sykdomstilstander forårsakes av enten ukontrollert reproduksjon av celler eller overproduksjon av matriks eller
 15 dårlig regulert programmert celledød (apoptose). Disse sykdomstilstander involverer flere forskjellige celletyper og innbefatter forstyrrelser så som leukemi, cancer, glioblastoma, psoriasis, inflammatoriske sykdommer, bensykdommer, fibrotiske sykdommer, aterosklerose og som opptrer etter angioplastikk av koronar-, femoral- eller nyrearteriene
 20 eller fibroproliferativ sykdom så som i artritt, fibrose i lungene, nyrene og leveren. Spesielt PDGF og PDGF-R har vist seg å være implisert i spesifikke typer av kreft og tumorer så som hjernekreft, eggstokkekraft, tarmkreft,
 25 prostatacancer, lungecancer, Kaposi sarkom og ondartet melanom. I tillegg er ukontrollerte cellulære proliferative tilstander en følge av koronar bypasskirurgi. Inhiberingen av tyrosinkinaseaktivitet antas å kunne utnyttes i reguleringen av ukontrollert reproduksjon av celler eller over-
 30 produksjon av matriks eller dårlig regulert programmert celledød (apoptose).

Denne oppfinnelse vedrører modulering og/eller inhibering av celsignalisering, celleproliferasjon og/eller cellematriksproduksjon og/eller cellebevegelse (kjemotakse), re-
 35 guleringen av abnorm cellevekst og cellulær inflammatorisk respons. Mer spesifikt vedrører denne oppfinnelse anvendel-

sen av substituerte kinolin- og kinoksalinforbindelser som oppviser selektiv inhibering av differensiering, proliferasjon, matriksproduksjon, kjemotakse eller mediatorfrigivelse ved effektivt å inhibere blodplateavledet vekstfaktorreseptorisk (PDGF-R) tyrosinkinaseaktivitet.

Initiering av autofosforylering, dvs. fosforylering av vekstfaktorreseptoren i seg selv, og av fosforyleringen av en vert i intracellulære substrater er noen av de biokjemiske foreteelser som er involvert i celledisignalisering, celleproliferasjon, matriksproduksjon, kjemotakse og mediatorfrigivelse.

Ved effektivt å inhibere Lck-tyrosinkinaseaktivitet, er forbindelsene ifølge denne oppfinnelse anvendt ved fremstilling av medikamenter også nyttige i behandlingen av resistens mot transplantasjon og autoimmune sykdommer så som revmatoid artritt, multippel sklerose og systemisk lupus erytematose, i transplantatrejeksjon, i "graft versus host"-sykdom, i hyperproliferative forstyrrelser så som tumorer og psoriasis, og i sykdommer hvori celler mottar proinflammatoriske signaler så som astma, inflammatorisk tarm sykdom og pankreatitt. I behandlingen av resistens mot transplantasjon kan et medikament inneholdende forbindelse(r) ifølge denne oppfinnelse anvendes enten profylaktisk eller i respons til en skadelig reaksjon i pasienten mot et transplantert organ eller vev. Anvendt profylaktisk kan det tenkes at et medikament inneholdende en forbindelse ifølge denne oppfinnelse kan administreres til pasienten eller til vevet eller organet som skal transplanteres før transplantasjonsoperasjonen. Profylaktisk behandling kan også tenkes å innbefatte administrasjon av medisineringsen etter transplantasjonsoperasjonen, men før noen tegn på skadelig reaksjon til transplantasjon er iaktatt. Administrert i respons til en skadelig reaksjon administreres en forbindelse ifølge denne oppfinnelse direkte til pasienten for å behandle resistens mot transplantasjon etter ytre tegn på at resistens er blitt manifestert.

I henhold til et ytterligere trekk av oppfinnelsen tilveiebringes en medikament som kan anvendes for behandlingen av en pasient som lider av, er utsatt for tilstander som kan lindres eller forhindres ved å administrere en inhibitor av PDGF-R-tyrosinkinaseaktivitet og/eller Lck-tyrosinkinaseaktivitet, for eksempel tilstander som beskrevet ovenfor.

Det bør være underforstått at henvisninger til tenkt behandling innbefatter profylaktisk terapi samt behandling av fastslåtte tilstander.

10 Foreliggende oppfinnelse innbefatter også innenfor sitt omfang farmasøytiske sammensetninger som omfatter en farmasøytisk akseptabel mengde av minst én av forbindelsene med formel I i blanding med en farmasøytisk akseptabel bærer, for eksempel en adjuvant, diluent, belegg og eksipient.

15 I praksis kan forbindelsene eller sammensetningene for behandling ifølge foreliggende oppfinnelse administreres på enhver passende måte, for eksempel ved inhalering, topisk, parenteralt, rektalt eller oralt; mer foretrukket oralt. Mer spesifikke administrasjonsmåter innbefatter intravenøs, 20 intramuskulær, subkutan, intraokular, intrasynovial, kolonisk, peritoneal, transepitel administrasjon inklusive transdermal, oftalmisk, sublingval, bukkal, dermal, okular administrasjon, nasal inhalering via insufflasjon, og aerosoladministrasjon.

25 Forbindelsene med formel I kan foreligge i former som muliggjør administrasjon på den mest egnede måte, og oppfinnelsen vedrører også farmasøytiske sammensetninger inneholdende minst én forbindelse i henhold til oppfinnelsen som egner seg for anvendelse som et medikament i en pasient. Disse sammensetninger kan fremstilles i henhold til 30 vanlige metoder, under anvendelse av en eller flere farmasøytisk akseptable adjuvanter eller eksipienser. Adjuvantene omfatter bl.a. diluenter, sterile vandige medier og forskjellige ikke-toksiske organiske løsningsmidler. Sam-

mensetningene kan foreligge i form av tabletter, piller, granuler, pulvere, vandige løsninger eller suspensjoner, injiserbare løsninger, eliksirer eller siruper, og kan inneholde et eller flere midler valgt fra gruppen omfattende

5 søtningsstoffer så som sukrose, laktose, fruktose, sakkarin eller Nutrasweet®, aromastoffer så som peppermynteolje, vintergrønnolje eller kirsebær- eller appelsinaroma, fargestoffer eller stabiliseringsstoffer så som metyl- eller propylparaben for å oppnå farmasøytisk akseptable prepa-

10 ter.

Valget av vehikkel og innholdet av aktiv substans i vehikket bestemmes vanligvis i henhold til produktets oppløselighet og kjemiske egenskaper, den spesielle administrasjonsmåte og bestemmelsene som må iakttas i farmasøytisk

15 praksis. For eksempel eksipienser så som laktose, natriumcitrat, kalsiumkarbonat, dikalsiumfosfat og disintegreringsmidler så som stivelse, alginsyrer og visse komplekse silikageler kombinert med glidemidler så som magnesiumstearat, natriumlaurylsulfat og talkum kan anvendes for å frem-

20 stille tabletter, pastiller, piller, kapsler og lignende. For å fremstille en kapsel er det fordelaktig å anvende laktose og en flytende bærer, så som høymolekylære polyetylenglykoler. Forskjellige andre materialer kan være nærværende som belegg eller på annen måte modifisere doserings-

25 enhetens fysiske form. For eksempel tabletter, piller, eller kapsler kan være belagt med skjellakk, sukker eller begge deler. Når vandige suspensjoner anvendes, kan de inneholde emulgeringsmidler eller midler som underletter suspensjon. Diluenter så som sukrose, etanol, polyoler så som

30 polyetylenglykol, propylenglykol og glyserol, og kloroform eller blandinger derav kan også anvendes. I tillegg kan den aktive forbindelse være innlemmet i preparater og formuleringer med vedvarende frigivelse.

For oral administrasjon kan den aktive forbindelse admi-

35 nistreres for eksempel med en inert diluent eller med en assimilerbar spiselig bærer, eller den kan være innkapslet

i hard- eller bløtskallede gelatinkapsler, eller den kan være presset til tabletter, eller den kan innlemmes direkte i føden, eller kan være innlemmet med eksipiens og anvendes i form av fordøyelige tabletter, bukkale tabletter, pastiller, kapsler, eliksirer, suspensjoner, siruper, lameller og lignende.

For parenteral administrasjon kan emulsjoner, suspensjoner eller løsninger av forbindelsene i henhold til oppfinnelsen i vegetabilsk olje, for eksempel sesamolje, jordnøttolje eller olivenolje, eller vandig-organiske løsninger så som vann og propylenglykol, injiserbare organiske estere så som etyloleat, samt sterile vandige løsninger av de farmasøytisk akseptable salter, anvendes. De injiserbare former må være flytende i den grad at de lett kan fylles i sprøyter, og passende fluiditet kan opprettholdes for eksempel ved å anvende et belegg så som lecitin, ved å opprettholde den nødvendige partikkelstørrelse når det gjelder dispersjon og anvende surfaktanter. Forlenget absorpsjon av de injiserbare sammensetninger kan frembringes ved å anvende midler som forsinker absorpsjonen, for eksempel aluminiummonostearat og gelatin. Løsninger av saltene av produktene i henhold til oppfinnelsen er spesielt nyttige for administrasjon ved intramuskulær eller subkutan injeksjon. Løsninger av den aktive forbindelse som en fri base eller farmakologisk akseptabelt salt kan fremstilles i vann i passende blanding med en surfaktant så som hydroksypropylcellulose. Dispersjoner kan også fremstilles i glyserol, flytende polyetylenglykoler og blandinger derav og i oljer. De vandige løsninger, også omfattende løsninger av saltene i rent destillert vann, kan anvendes for intravenøs administrasjon med det forbehold at deres pH er passende innstilt, at de er skjønnsomt bufret og gjort isotonisk med en tilstrekkelig mengde glukose eller natriumklorid og at de er sterilisert ved oppvarming, bestråling, mikrofiltrering, og/eller med forskjellige antibakterielle og antisopp midler, for eksempel parabener, klorbutanol, fenol, sorbinsyre, time-ro-sal og lignende.

Sterile injiserbare løsninger fremstilles ved å innarbeide den aktive forbindelse i den nødvendige mengde i et passende løsningsmiddel med forskjellige andre ingredienser angitt ovenfor, alt etter behov, etterfulgt av filtersterilisering. Generelt fremstilles dispersjoner å innarbeide den aktuelle steriliserte aktive ingrediens i ett sterilt vehikkel som inneholder det basiske dispersjonsmedium og de nødvendige andre ingredienser blant dem som er angitt ovenfor. Når det gjelder sterile pulvere for fremstillingen av sterile injiserbare løsninger, er den foretrukne fremstillingsmetode vakuumtørking og frysetørking hvilket gir et pulver med den aktive ingrediens pluss enhver ytterligere ønskelig ingrediens fra en på forhånd sterilfiltrert løsning derav.

Topisk administrasjon, geler (vann- eller alkoholbasert), kremer eller salver inneholdende forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan anvendes. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan være også innlemmet i en gel- eller matriksbase for anvendelse i et plaster, som vil muliggjøre en kontrollert frigivelse av forbindelsen gjennom den transdermale barriere.

For administrasjon ved inhalering, forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan oppløses eller suspenderes i en passende bærer for anvendelse i en forstøver eller en suspensjons- eller løsningsaerosol, eller kan absorberes eller adsorberes på en passende fast bærer for anvendelse i en tørrpulverinhalator.

Faste sammensetninger for rektal administrasjon innbefatter stikkpiller formulert i henhold til kjente metoder og inneholdende minst én forbindelse med formel I.

Sammensetninger i henhold til oppfinnelsen kan også formuleres på en måte som motstår hurtig frigivelse fra den vaskulære (arterielle eller venøse) vegg ved konveksjon og/eller diffusjon, og øker dermed oppholdstiden for de vi-

rale partikler ved det ønskede aksjonssete. Et periadventisielt depot omfattende en forbindelse i henhold til oppfinnelsen kan anvendes for forhalet frigivelse. Et slikt nyttig depot for administrering av en forbindelse i henhold
 5 til oppfinnelsen kan være en kopolymer matriks, så som etylenvinylacetat, eller en polyvinylalkoholgel omgitt av et silastikk-skall. Alternativt en forbindelse i henhold til oppfinnelsen kan avgis lokalt fra en silikonpolymer implantert i adventisia.

- 10 En alternativ metode for å minimalisere utvasking av en forbindelse i henhold til oppfinnelsen under perkutan, transvaskulær avgivelse omfatter anvendelsen av ikke-difunderbare, medikamenteluerende mikropartikler. Mikropartiklene kan være omfattet av flere forskjellige syntetiske
 15 polymerer, så som polylaktid for eksempel eller naturlige substanser, inklusive proteiner eller polysakkarider. Slike mikropartikler muliggjør strategisk manipulering av variablene inklusive medikamentets totale dose og kinetikken for dets frigivelse. Mikropartikler kan injiseres effektivt inn
 20 i den arterielle eller venøse vegg gjennom et porøst ballongkateter eller en ballong over en stent, og tilbakeholdes i den vaskulære vegg og det periadventitielle vev i minst ca. to uker. Formuleringer og metodologier for lokal, intravaskulær setespesifikk avgivelse av terapeutiske mid-
 25 ler er omtalt i Reissen et al. (*J. Am. Coll. Cardiol.* 1994; 23: 1234-1244), og hele innholdet deri er herved innlemmet ifølge referanse.

- En sammensetning i henhold til oppfinnelsen kan også omfatte en hydrogel som fremstilles fra enhver biokompatibel
 30 eller ikke-cytotoksisk (homo eller hetero) polymer, så som en hydrofil polyakrylsyrepolymer som kan virke som en medikamentabsorberende svamp. Slike polymerer er blitt beskrevet for eksempel i søknad WO93/08845, og hele innholdet deri er herved innlemmet ifølge referanse. Visse av dem, så
 35 som spesielt de som er erholdt fra etylen- og/eller propylenoksid, er kommersielt tilgjengelig.

Ved anvendelse av forbindelser i henhold til oppfinnelsen for å behandle sykdomstilstander som er forbundet med hyperproliferative forstyrrelser kan forbindelsene i henhold til oppfinnelsen administreres på forskjellige måter. For
5 behandlingen av restenose administreres forbindelsene ifølge oppfinnelsen direkte til blodkarveggen ved hjelp av en angioplastikkballong som er belagt med en hydrofil film (for eksempel en hydrogel) som er mettet med forbindelsen, eller ved hjelp av ethvert annet kateter inneholdende et
10 infusjonskammer for forbindelsen, som således kan tilføres på en presis måte til stedet som skal behandles og muliggjøre forbindelsens frigivelse lokalt og effektivt ved det sted hvor de celler som skal behandles, befinner seg. Denne administrasjonsmetode gjør det på fordelaktig måte mulig å
15 bringe forbindelsen hurtig i kontakt med cellene i behov av behandling.

Behandlingsmetoden ifølge oppfinnelsen består fortrinnsvis i å innføre en forbindelse i henhold til oppfinnelsen ved
20 stedet som skal behandles. For eksempel kan en hydrogelholdig sammensetning påføres direkte på overflaten av vevet som skal behandles, for eksempel under et kirurgisk inngrep. Med fordel tilføres hydrogelen til det ønskede intravaskulære sete ved belegning av et kateter, for eksempel et
ballongkateter, og avgivelse til den vaskulære vegg, for-
25 trinnsvis under angioplastikk. Det er spesielt fordelaktig å tilføre den mettede hydrogel ved stedet som skal behandles ved hjelp av et ballongkateter. Ballongen kan være beskyttet av et beskyttende lag idet kateteret føres mot målkaret for å minimalisere medikamentutvaskelsen etter at ka-
30 teteret er innført i blodstrømmen.

En annen utførelsesform av oppfinnelsen tilveiebringer en forbindelse i henhold til oppfinnelsen for administrasjon ved hjelp av perfusjonsballonger. Disse perfusjonsballonger som gjør det mulig å opprettholde en blodstrøm og således
35 redusere risikoen for iskemi av myocardium, gjør det også mulig ved oppblåsing av ballongen å avgi forbindelsen lo-

kalt ved normalt trykk i relativt lang tid, mer enn tjue minutter, hvilket kan være nødvendig for optimal virkning. Alternativt kan et ballongkateter med kanaler ("channelled balloon angioplasty catheter", Mansfield Medical, Boston Scientific Corp., Vanntown, MA) anvendes. Sistnevnte består av en konvensjonell ballong belagt med et lag av 24 perforerte kanaler som perfuseres via en uavhengig lyskilde gjennom en ytterligere infusjonsblender. Forskjellige typer av ballongkatetre, så som en dobbeltballong, porøs ballong, mikroporøs ballong, kanalballong, ballong over en stent og hydrogelkateter, som alt kan anvendes for å utøve oppfinnelsen, er beskrevet i Reissen et al. (1994), og hele innholdet deri er herved innlemmet ifølge referanse.

Anvendelsen av et perfusjonsballongkateter er spesielt fordelaktig, idet dette har de fordeler at ballongen holdes oppblåst i en lengre tidsperiode ved å bibeholde egenskapene å underlette glidningen og hydrogelens steds-spesifisitet, hvilke oppnås samtidig.

Et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse vedrører en farmasøytisk blanding omfattende en forbindelse i henhold til oppfinnelsen og en poloksamer, så som Poloksamer 407, som er en ikke-toksisk, biokompatibel polyol, kommersielt tilgjengelig (BASF, Parsippany, NJ).

En poloksamer impregnert med en forbindelse i henhold til oppfinnelsen kan påføres direkte på overflaten av vevet som skal behandles, for eksempel under et kirurgisk inngrep. Poloksamer innehar hovedsakelig de samme egenskaper som hydrogel mens den har en lavere viskositet.

Anvendelsen av et kanalballongkateter med en poloksamer impregnert med en forbindelse i henhold til oppfinnelsen er spesielt fordelaktig. I dette tilfelle oppnås fordelene at ballongen holdes oppblåst i en lengre tidsperiode, mens egenskapene lettere glidning og poloksamerens stedsspesifisitet samtidig opprettholdes.

Prosentandelen av aktiv ingrediens i sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan varieres, og det er nødvendig at den utgjør en andel slik at en passende dosering oppnås. Naturligvis kan flere doseringsformer administreres ved om-
5 trent samme tid. En anvendt dose kan bestemmes av en lege eller kvalifisert medisinsk profesjonell person, og avhenger av den ønskede terapeutiske virkning, administrasjonsruten og behandlingens varighet og pasientens tilstand. I et voksent menneske er dosene generelt fra ca. 0,001 til
10 ca. 50, fortrinnsvis ca. 0,001 til ca. 5, mg/kg kroppsvekt pr. dag ved inhalering, fra ca. 0,01 til ca. 100, fortrinnsvis 0,1 til 70, mer spesielt 0,5 til 10, mg/kg kroppsvekt pr. dag ved oral administrasjon, og fra ca. 0,001 til ca. 10, fortrinnsvis 0,01 til 10, mg/kg kropps-
15 vekt pr. dag ved intravenøs administrasjon. I hvert enkelt tilfelle bestemmes dosene i henhold til faktorene som er særegne for pasienten som skal behandles, så som alder, vekt, generell helsetilstand og andre karakteristika som kan innvirke på effektiviteten av forbindelsen i henhold
20 til oppfinnelsen.

Forbindelsene/sammensetningene i henhold til oppfinnelsen kan administreres så ofte som nødvendig for å oppnå den ønskede terapeutiske virkning. Noen pasienter kan reagere hurtig på en høyere eller lavere dose og kan finne meget
25 svakere opprettholdelsesdoser adekvate. For andre pasienter kan det være nødvendig å ha langtidsbehandlinger i et antall av 1 til 4 doser pr. dag, i henhold til hver enkelt pasients fysiologiske behov. Generelt kan det aktive produkt administreres oralt 1 til 4 ganger pr. dag. For andre
30 pasienter vil det naturligvis være nødvendig å ordinere ikke mer enn én eller to doser pr. dag.

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan også formuleres for anvendelse i blanding med andre terapeutiske midler eller i tilknytning til anvendelsen av terapeutiske
35 teknikker for å behandle farmakologiske tilstander som kan

lindres ved å anvende en forbindelse med formel I, så som følgende:

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes i behandlingen av restenose etter angioplastikk under anvendelse av enhver anordning så som ballong, ablasjon eller laserteknikk. Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes i behandlingen av restenose etter en stentplassering i vaskulaturen enten som 1) primær behandling for vaskulær blokkering, eller 2) i tilfeller hvor angioplastikk under anvendelse av enhver anordning mislykkes i å gi en åpen arterie. Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes enten oralt, ved parenteral administrasjon eller forbindelsen kan påføres topisk ved hjelp av en spesifikk anordning eller som et passende formulert belegg på en stentanordning.

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes i behandlingen av restenose i kombinasjon med et hvert antikoagulerende, antiblodplatisk, antitrombotisk eller profibrinolytisk middel. Ofte behandles pasienter samtidig før, under og etter intervensjonsprosedyrer med midler av disse klasser enten for på sikker måte å utføre den intervensjonsprosedyre eller for å forebygge skadelige virkninger av trombusdannelse. Noen eksempler på klasser av midler kjent for å være antikoagulerende, antitrombotiske eller profibrinolytiske midler innbefatter enhver formulering av heparin, lavmolekylære hepariner, pentasakkarider, fibrinogenreseptorantagonister, trombininhibitorer, Faktor Xa-inhibitorer eller Faktor VIIa-inhibitorer.

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes i kombinasjon med ethvert antihypertensivt middel eller kolesterol- eller lipidregulerende middel i behandlingen av restenose eller aterosklerose samtidig med behandlingen av høyt blodtrykk eller aterosklerose. Noen eksempler på midler som er nyttige i behandlingen av høyt blodtrykk, innbefatter forbindelser av følgende klasser; beta-blokkere,

ACE-inhibitorer, kalsiumkanalantagonister og alfa-reseptor-antagonister. Noen eksempler på midler som er nyttige i behandlingen av forhøyde kolesterolnivåer eller disregulerte lipidnivåer, innbefatter forbindelser kjent for å være

5 HMGCoA-reduktase-inhibitorer, forbindelser av fibratklassen,

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes i behandlingen av forskjellige former av cancer enten alene eller i kombinasjon med forbindelser som er kjent for å

10 være nyttige i behandlingen av cancer.

Det er underforstått at foreliggende oppfinnelse innbefatter kombinasjoner av forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse med en eller flere av de tidlige nevnte terapeutiske midler

15 Forbindelser innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse oppviser markante farmakologiske aktiviteter i henhold til tester beskrevet i litteraturen, hvilke tester antas å korrelere med farmakologisk aktivitet i mennesker og andre pattedyr. De følgende farmakologiske *in vitro* og *in vivo*

20 testresultater er typiske for å karakterisere forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse.

Fremstilling av Farmasøytiske sammensetninger og

Farmakologisk Testavsnitt

Forbindelser innenfor omfanget av denne oppfinnelse oppviser 25 signifikant aktivitet som proteiniske tyrosinkinaseinhibitorer og innehar terapeutisk verdi som cellulær anti-proliferative midler for behandlingen av visse tilstander inklusive psoriasis, aterosklerose og restenoseskader. Forbindelser innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse

30 oppviser modulering og/eller inhibering av celledifferensiering og/eller celleproliferasjon og/eller matriksproduksjon og/eller kjemotakse og/eller cellulær inflammatorisk re-

spons, og kan anvendes for å forebygge eller forsinke forekomsten eller ny forekomst av slike tilstander eller på annen måte behandle tilstanden.

For å bestemme effektiviteten av forbindelser ifølge denne oppfinnelse utnyttes de farmakologiske tester som er beskrevet nedenfor, og som er akseptert i faget og anerkjent for å korrelere med farmakologisk aktivitet i pattedyr. Forbindelser innenfor omfanget av denne oppfinnelse er blitt underkastet disse forskjellige tester, og de erholdte resultater antas å korrelere med nyttig cellulær differensieringsmediatorisk aktivitet. Resultatene av disse tester antas å tilveiebringe tilstrekkelig informasjon til personer som er kyndige i faget farmakologisk og medisinsk kjemi, slik at de kan bestemme parametrene for å anvende de studerte forbindelser i en eller flere av terapiene beskrevet heri.

1. PDGF-R-tyrosinkinaseautofosforylerings-ELISA-undersøkelse

Tittelundersøkelsen utføres som beskrevet av Dolle et al. (J. Med. Chem. 1994, 37, 2627), som er inkorporert heri i henhold til referanse, med unntagelse av at det anvendes cellelysater avledet fra Menneskelige aortiske glattmuskelceller (HAMSC) som beskrevet nedenfor.

2. Generell prosedyre for mitogeneseundersøkelse

a. Cellekultur

Menneskelige aortiske glattmuskelceller (passasje 4-9) sås ut i skåler i 96 brønners skåler i et vekstfremmende medium ved 6000 celler/brønn og får vokse 2-3 dager.

Ved tilnærmelsesvis 85% konfluens stoppes celleveksten med serumfritt medium (SFM).

b. Mitogeneseundersøkelse

Etter 24 timers serumforsakelse fjernes mediet og erstattes med testforbindelse/vehikkel i SFM (200 µl/brønn). Forbindelsene oppløses i cellekultur-DMSO ved en konsentrasjon av 10 mM, og videre fortynninger fremstilles i SFM.

Etter 30 min forhåndsinkubering med forbindelse stimuleres cellene med PDGF ved 10 ng/ml. Bestemmelsene utføres i duplikat med stimulerte og ustimulerte brønner ved hver konsentrasjon av forbindelsen.

Fire timer senere tilsettes 1 µCi ³H tymidin/brønn.

Kulturene avsluttes 24 timer etter tilsetning av vekstfaktor. Cellene heves med trypsin og høstes på en filtermatte under anvendelse av et automatisk celleinnhøstningsapparat (Wallac MachII96). Filtermatten telles i et scintillasjonstelleapparat (Wallac Betaplate) for å bestemme DNA-innlemmede merkede stoffer.

3. Kjemotakseundersøkelse

Menneskelige aortiske glattmuskelceller (HASMC) ved tidligere passasjer erholdes fra ATCC. Cellene dyrkes i Clonetics SmGM 2 SingleQuots (medium og celler ved passasjene 4-10 anvendes. Når cellene er 80% konfluent, tilsettes en fluorescerende probe, calcein AM (5 mM, Molecular Probe), til mediet, og cellene inkuberes i 30 minutter. Etter vasking med HEPES-bufret saltvann heves cellene med trypsin og nøytraliseres med MCDB 131 buffer (Gibco) med 0,1% BSA, 10 mM glutamin og 10% føtalt kalveserum. Etter sentrifugering vaskes cellene en gang til og suspenderes på nytt i det samme buffer uten føtalt kalveserum ved 30000 celler/50 ml. Cellene inkuberes ved forskjellige konsentrasjoner av en forbindelse med formel I (DMSO-sluttkonsentrasjon = 1 %) i 30 min ved 37°C. For kjemotaksestudiene anvendes 96 brønners modifiserte Boyden-kammere (Neuroprobe, Inc.) og en

polykarbonatmembran med 8 mm porestørrelse (Poretics, CA). Membranen er belagt med kollagen (Sigma C3657, 0,1 mg/ml). PDGF- $\beta\beta$ (3 ng/ml) i buffer med og uten en forbindelse med formel I anbringes i det lavere kammer. Celler (30,000),
 5 med og uten inhibitor anbringes i det øvre kammer. Cellene inkuberes i 4 timer. Filtermembranen fjernes, og cellene på den øvre membranside fjernes. Etter tørking bestemmes fluorescensen på membranen under anvendelse av Cytofluor II (Millipore) ved eksitasjons/emisjonsbølgelengder på 485/530
 10 nm. I hvert eksperiment erholdes en gjennomsnittlig celledigrasjon fra seks replikater. Den prosentuelle inhibering bestemmes fra DMSO-behandlede kontrollverdier. Fra fem punkters konsentrasjonsavhengige inhiberinger beregnes IC_{50} -verdien. Resultatene er angitt som et gjennomsnitt $\pm$
 15 SEM fra fem slike eksperimenter.

4. EGF-reseptorrensing

EGF-reseptorrensingen er basert på prosedyren av Yarden og Schlessinger. A431-cellene dyrkes i 80 cm² flasker til konfluens (2×10^7 celler pr. flaske). Cellene vaskes to
 20 ganger med PBS og høstes med PBS inneholdende 11,0 mmol EDTA (1 time ved 37°C, og sentrifugeres ved 600g i 10 minutter. Cellene oppløses i 1 ml pr. 2×10^7 celler kald solubiliseringbuffer (50 mmol HEPES buffer, pH 7,6, 1% Triton X-100, 150 mmol NaCl, 5 mmol EGTA, 1 mmol PMSF, 50
 25 mg/ml aprotinin, 25 mmol benzamidin, 5 mg/ml leupeptisk og 10 mg/ml soyabønnetrypsinisk inhibitor) i 20 minutter ved 4°C. Etter sentrifugering ved 100.000g i 30 minutter anbringes supernatanten på en WGA-agarosekolonne (100 ml pakket harpiks pr. 2×10^7 celler) og rystes i 2 timer ved
 30 4°C. Det uabsorberte material fjernes, og harpiksen vaskes to ganger med HTN-buffer (50 mmol Hepes, pH 7,6, 0,1% Triton X-100, 150 mmol NaCl), to ganger med HTN-buffer inneholdende 1 M NaCl, og to ganger med HTNG-buffer (50 mmol Hepes, pH 7,6, 0,1% Triton X-100, 150 mmol NaCl, og 10%
 35 glyserol). EGF-reseptoren evalueres satsvis med HTNG-buffer inneholdende 0,5 M N-acetyl-D-glucosamin (200 ml pr. $2 \times$

10⁷ celler.). Det evaluerede material lagres i aliquoter ved -70°C og fortynnes før anvendelse med TMTNG-buffer (50 mmol Tris-Mes-buffer, pH 7,6, 0,1% Triton X-100, 150 mmol NaCl, 10% glyserol).

5. Inhibering av EGF-R-autofosforylering

A431-cellene dyrkes til konflux i skåler med vevskulturer belagt med menneskelig fibronektin. Etter vasking 2 ganger med iskald PBS lyseres cellene ved tilsetning av 500 ml/skål lyseringsbuffer (50 mmol Hepes, pH 7,5, 150 mmol NaCl, 1,5 mmol MgCl₂, 1 mmol EGTA, 10% glyserol, 1% triton X-100, 1 mmol PMSF, 1 mg/ml aprotinin, 1 mg/ml leupeptin) og inkubering 5 minutter ved 4°C. Etter EGF-stimulering (500 mg/ml 10 minutter ved 37°C) utføres immunopresipitering med anti EGF-R (Ab 108) og autofosforyleringsreaksjonen (50 ml aliquoter, 3 mCi [γ-³²P]ATP) utføres i nærvær av 2 eller 10 mM av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse, i 2 minutter ved 4°C. Reaksjonen stoppes ved tilsetning av varm elektroforeseprøvebuffer. SDS-PAGE-analyse (7,5% els) etterfølges av autoradiografi, og reaksjonen kvantifiseres ved densitometri- skanning av røntgenfilmene.

a. Cellekultur

Celler kalt HER 14 og K721A fremstilles ved transfeksjon av NIH3T3-celler (klone 2.2) (Fra C. Fryling, NCI, NIH), som mangler endogene EGF-reseptorer, med cDNA-deler av villtype EGF-reseptor eller mutant EGF-reseptor som mangler tyrosinkinaseaktivitet (hvor Lys 721 ved ATP-bindingssitet er erstattet med en Ala-rest, respektive). Alle celler dyrkes i DMEM med 10% kalveserum (Hyclone, Logan, Utah).

6. Selektivitet versus PKA og PKC bestemmes under anvendelse av kommersielle kits:

a. Pierce Colorimetric PKA Assay Kit, Spinzyme Format

Kortfattet protokoll:

PKA-enzym (bovint hjerte) 1U/prøverør

Kemtid-peptid (fargemerket) substrat

45 minutter @ 30°C

5 Absorbans ved 570 nm

b. Pierce Colorimetric PKC Assay kit, Spinzyme Format

Kortfattet protokoll:

PKC enzym (rottehjerne) 0,025U/assay tube

Neurogranin peptid (fargemerket) substrat

10 30 minutter @ 30°C

Absorbans ved 570 nm

7. p56^{lck}-tyrosinkinaseinhiberende Aktivitet Measurements

p56^{lck}-tyrosinkinaseinhiberende aktivitet bestemmes i henhold til en prosedyre beskrevet i United States Patent No.

15 5,714,493, inkorporert heri i henhold til referanse.

Alternativt bestemmes tyrosinkinaseinhiberende aktivitet i henhold til følgende metode. Et substrat (tyrosinholdig substrat, Biot-(β Ala)₃-Lys-Val-Glu-Lys-Ile-Gly-Glu-Gly-Thr-Tyr-Glu-Val-Val-Tyr-Lys-(NH₂) påvist ved P56^{lck}, 1 μ M)

20 fosforyleres først i nærvær eller fravær av en gitt konsentrasjon av testforbindelsen, av en gitt mengde av enzym

(enzymet fremstilles ved ekspresjon av P56^{lck} gene i en

gjær-byggedel) renses fra en klonet gjærsort (rensing av enzymet utføres ifølge klassiske metoder) i nærvær av ATP

25 (10 μ M) MgCl₂ (2,5mM), MnCl₂ (2,5mM), NaCl (25mM), DTT

(0,4mM) i HEPES 50mM, pH 7,5, over 10 min ved omgivelsestemperatur. Det totale reaksjonsvolum er 50 μ l, og reaksjo-

nene utføres i en sort 96-brønners fluorplate. Reaksjonen

stoppes ved tilsetning av 150 μ l stoppebuffer (100mM HEPES

30 pH7,5, KF 400mM, EDTA 133 mM, BSA 1g/l.) inneholdende et

utvalgt antityrosinantistoff merket med Europium-kryptat

(PY20-K) ved 0,8 μ g/ml og allofykocyaninmerket streptavidin

(XL665) ved 4 μ g/ml. Merkingen av Streptavidin og anti-tyro-

sin-antistoffer ble utført av Cis-Bio International

35 (France). Blandingen telles under anvendelse av et Packard

Discovery-telleapparat som kan måle tidsbestemt homogen fluorescensoverføring (eksitasjon ved 337 nm, avlesning ved 620 nm og 665 nm). Forholdet 665 nm signal/620nm signal er et mål på den fosforylerte tyrosinkonsentrasjon. Blindprøven erholdes ved å erstatte enzym med buffer. Det spesifikke signal er forskjellen mellom forholdet erholdt uten inhibitor og forholdet med blindprøven. Prosentandelen av spesifikt signal beregnes. IC_{50} beregnes med 10 konsentrasjoner av inhibitor i duplikat under anvendelse av Xlfit soft. Referanseforbindelsen er staurosporin (Sigma), og det oppviser en IC_{50} på 30 ± 6 nM ($n=20$).

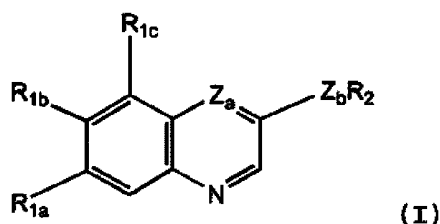
Resultatene erholdt ved hjelp av ovennevnte eksperimentelle metoder viser at forbindelsene innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse innehar nyttige PDGF-reseptorproteiniske tyrosinkinaseinhiberende egenskaper eller $p56^{lck}$ -tyrosinkinaseinhiberende egenskaper, og således innehar terapeutisk verdi. Ovennevnte farmakologiske testresultater kan anvendes for å bestemme doseringen og administrasjonsmodusen for den spesielle terapi som søkes.

Foreliggende oppfinnelse kan utføres i andre spesifikke former uten å avvike fra dens ånd eller essensielle egenskaper.

P a t e n t k r a v

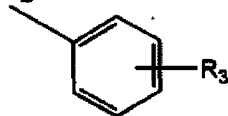
1. Forbindelse

k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n h a r f o r m e l I



5 h v o r i

R_{1a} og R_{1b} er uafhængig af hverandre C₁₋₃-alkoksy
R_{1c} er hydrogen,



R₂ er

R₃ er hydrogen eller meta-halogen;

10 Z_a er N eller CH; og

Z_b er NH eller O,

eller et N-oxid derav, hydrat derav, solvat derav eller
salt derav.

2. Forbindelse ifølge krav 1

15 k a r a k t e r i s e r t v e d a t R_{1a} og R_{1b} uafhængig
af hverandre er metoksy eller etoksy.

3. Forbindelse ifølge krav 1

k a r a k t e r i s e r t v e d a t R₃ er hydrogen eller
metafluor, metaklor eller metabrom.

20 4. Forbindelse ifølge krav 1

k a r a k t e r i s e r t v e d a t Z_a er N.

5. Forbindelse ifølge krav 1

k a r a k t e r i s e r t v e d a t Z_a er CH.

6. Forbindelse ifølge krav 1

25 k a r a k t e r i s e r t v e d a t Z_b er NH.

7. Forbindelse ifølge krav 1
karakteriseret ved at Z_b er O.

8. Forbindelse ifølge krav 1
karakteriseret ved at den er valgt fra de
følgende:

6,7-Dietoksy-2-fenoksykinoksalin;
2-Fenylamino-6,7-dietoksykinoksalin;
(6,7-Dimetoksykinoksalin-2-yl)-(3-fluorfenyl)-amin;
2-(3-Fluorfenylamino)-6,7-dietoksykinoksalin;
(3-Bromfenyl)-(6,7-dimetoksykinoksalin-2-yl)-amin;
(6,7-Dimetoksykinoksalin-2-yl)-fenylamin; og
(3-Klorfenyl)-(6,7-dimetoksykinoksalin-2-yl)-amin, eller
et N-oxid derav, hydrat derav, solvat derav eller et far-
masøytisk akseptabelt salt derav.

9. Forbindelse ifølge krav 1
karakteriseret ved at den er 2-((S)- α -me-
tylbenzylamino)-6,7-dietoksykinoksalin, eller et N-oxid
derav, hydrat derav, solvat derav eller et farmasøytisk ak-
septabelt salt derav.

10. Forbindelse ifølge krav 1
karakteriseret ved at den er 2-benzylamino-
6,7-dietoksykinoksalin, eller et N-oxid derav, hydrat
derav, solvat derav eller et farmasøytisk akseptabelt salt
derav.

11. Forbindelse ifølge krav 1
karakteriseret ved at den er
(6-Metoksykinoksalin-2-yl)-(3-metylfenyl)-amin, eller et N-
oxid derav, hydrat derav, solvat derav eller et farmasøy-
tisk akseptabelt salt derav.

12. Forbindelse ifølge krav 1
karakteriseret ved at den er
6-Metoksy-2-fenylamino-kinoksalin, eller et N-oxid derav,

hydrat derav, solvat derav eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

13. Forbindelse ifølge krav 1

karakterisert ved at den er

5 2-Anilino-6-etoksykinoksalin, eller et N-oksid derav, hydrat derav, solvat derav eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

14. Forbindelse ifølge krav 1

karakterisert ved at den er

10 2-(3-Metoksyfenylamino)-6,7-dietoksykinoksalin, eller et N-oksid derav, hydrat derav, solvat derav eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

15. Forbindelse ifølge krav 1

karakterisert ved at den er

15 2-(4-Fluorfenylamino)-(6,7-dietoksykinoksalin, eller et N-oksid derav, hydrat derav, solvat derav eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

16. Forbindelse ifølge krav 1

karakterisert ved at den er

20 6,7-Dietoksy-2-phenoksykinoksalin, eller et N-oksid derav, hydrat derav, solvat derav eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

17. Forbindelse ifølge krav 1

karakterisert ved at den er

25 2-Fenylamino-6,7-dietoksykinoksalin, eller et N-oksid derav, hydrat derav, solvat derav eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

18. Forbindelse ifølge krav 1

karakterisert ved at den er

30 (6,7-Dimetoksykinoksalin-2-yl)-(3-fluorfenyl)-amin, eller et N-oksid derav, hydrat derav, solvat derav eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

19. Forbindelse ifølge krav 1

k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n e r

(3-Bromfenyl)-(6,7-dimetoksykinoksalin-2-yl)-amin, eller et
N-oksid derav, hydrat derav, solvat derav eller et farma-
søytisk akseptabelt salt derav.

20. Forbindelse ifølge krav 1

k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n e r

(3-Klorfenyl)-(6,7-dimetoksykinoksalin-2yl)-amin, eller et
N-oksid derav, hydrat derav, solvat derav eller et farma-
søytisk akseptabelt salt derav.

21. Farmasøytisk blanding

k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n o m f a t t e r f o r b i n -
delsen ifølge krav 1 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

22. Anvendelse av forbindelse av krav 1 ved fremstilling

av et middel som er egnet til inhibering av PDGF-tyrosinki-
naseaktivitet.

23. Anvendelse av forbindelse ifølge krav 1 ved fremstil-
ling av et middel som er egnet til inhibering av Lck-tyro-
sinkinaseaktivitet.

24. Anvendelse av forbindelse ifølge krav 1 ved fremstil-
ling av et medikament som er egnet til å inhibere cellepro-
liferasjon, differensiering, eller mediatorfrigivelse i en
pasient som lider av en forstyrrelse som karakteriseres ved
slik proliferasjon og/eller differensiering og/eller media-
torfrigivelse.

25. Anvendelse av forbindelse ifølge krav 1 ved fremstil-
ling av et medikament som er egnet til å behandle en pato-
logi forbundet med en hyperproliferativ forstyrrelse.

26. Anvendelse ifølge krav 25, hvori nevnte patologi er
restenose.

27. Anvendelse av forbindelse ifølge krav 1 ved fremstilling av et medikament som er egnet til å behandle inflammasjon.

28. Anvendelse ifølge krav 26, hvor forbindelsen ifølge
5 krav 1 foreligger i form av et belegg på en stent-anordning.

29. Anvendelse ifølge krav 25, hvor sykdommen knyttet til en hyperproliferativ lidelse er kreft som er mottakelig for behandling ved inhibering av PDGF tyrosinkinase.

30. Anvendelse ifølge krav 29, hvor krefttypen er hjerne-
10 kreft, eggstokkekraft, tarmkraft, prostatakraft, lungekraft, Kaposi's sarkom eller ondartet melanom.

31. Anvendelse ifølge krav 24, hvor sykdommen er leukemi, kreft, glioblastom, psoriasis, inflammatoriske sykdommer, bensykdommer, fibrotiske sykdommer, artritt, lungefibrose,
15 nyrefibrose, leverfibrose, aterosklerose eller restenose som opptrer etter angioplastikk av de koronare, femorale eller nyrearterier.

32. Anvendelse av forbindelse ifølge krav 1 ved fremstilling av et medikament som er egnet til behandling av revmatoid artritt, multippel sklerose, systemisk lupus erythematosose, transplantat-mot-vert-sykdom, astma, inflammatorisk tarmsykdom eller pankreatitt, hvor forbindelsen ifølge krav
20 1 foreligger i en inhibitorisk mengde for Lck tyrosinkinase.