



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **310656**

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 07 D 213/56, 405/06, A 61 K 31/395

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19982151	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1996.11.12. PCT/US96/18126
(22) Inng. dag	1998.05.12	(85) Videreføringsdag	1998.05.12
(24) Løpedag	1996.11.12	(30) Prioritet	1995.11.13, US. 6571
(41) Alm. tilgj.	1998.07.03		1995.11.13, US. 6573
(45) Meddelt dato	2001.08.06		

(71) Patenthaver	SmithKline Beecham Corp, P.O. Box 7929, Philadelphia, PA 19103, US
(72) Oppfinner	Nycomed Austria GmbH, St. Peter Strasse, A-4021 Linz, AT Pradip Kumar Bhatnagar, Exton, PA, US Dirk Andries Heerding, Malvern, PA, US James Francis Callahan, Philadelphia, PA, US Michael Hartmann, Linz, AT Johann Hiebl, Linz, AT Peter Kremminger, Asten, AT Franz Rovenszky, Linz, AT
(74) Fullmektig	Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) **Benevnelse** **Hemoregulatoriske forbindelser**

(56) **Anførte publikasjoner** Ingen

(57) **Sammendrag** Det beskrives nye forbindelser som har hemoregulatoriske aktiviteter og kan anvendes til å stimulere hematopoiese og for behandlingen av virale-, sopp- og bakterielle infeksjonssykdommer.

Foreliggende oppfinnelse angår nye forbindelser som har hemo-regulatoriske aktiviteter og kan anvendes til å stimulere hematopoese og for behandlingen av virale-, sopp- og bakterielle infeksjonssykdommer.

Det hematopoetiske system er en livslang cellefornyelsesprosess hvor en definert stamcellepopulasjon gir opphav til en stor populasjon av modne, differensierte blodceller (Dexter TM. Stem cells in normal growth and disease. Br. Med. J., 1987; 195:1192-1194) av minst ni forskjellige cellelinjer (erytrocytter, blodplater, eosinofiler, basofiler, neutrofiler, monocytter/makrofager, osteoklaster og lymfocytter) (Metcalfe D. The Molecular Control of Blood Cells. 1988; Harvard University Press, Cambridge, MA). Stamceller er også i siste instans ansvarlig for regenerering av benmarg etter behandling med cytotoksiske midler eller etter benmargstransplantasjon.

De viktigste dosebegrensende toksisiteter av de fleste standard anti-neoplastiske medikamenter er relatert til benmargsuppresjon, som hvis alvorlig og langvarig, kan gi opphav til livstruende infeksjoner og blødningskomplikasjoner. Beinmargsuppresjon er forutsigbar og har blitt rapportert å være dosebegrensende i mer enn 50% av enkelt-middel fase I studier cytotoksiske forbindelser (Merrouche Y, Catimel G, Clavel M., "Hematopoietic growth factors and chemoprotectants; should we move toward a two-step process for phase I clinical trials in oncology?" Ann. Oncol. 1993; 4:471-474). Risikoen for infeksjon er direkte relatert til graden av beinmargsuppresjon som målt ved alvorlighetsgraden og varighet av neutropeni (Brody GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ. "Quantitative relationship between circulating leukocytes and infections with acute leukemia." Ann. In. Med., 1965; 64:328-334).

Kontrollen av hematopoese involverer samspillet av en rekke cytokiner og vekstfaktorer gjennom forskjellige stadier av den hematopoetiske kaskade, som omfatter tidlige pluripotente stamceller og modne sirkulerende effektorceller. Disse regulatoriske molekyler omfatter "granulocyt-kolonistimulerende faktor" (G-CSF), "granulocyt-makrofag stimulerende faktor" (GM-CSF), "makrofagkoloni-stimulerende faktor" (M-CSF) og en rekke interleukiner som har overlappende, additive og synergistiske virkninger som spiller en hovedrolle i vertsforsvaret. Mekanistisk, er dette oppnådd ved øke produksjonen av granulocytter og makrofager, så vel som ved aktivering av effektorcellefunksjoner (Moore MAS. Hemopoietic growth factor interactions: *in vitro* and *in vivo* preclinical evaluation.

Cancer Surveys 1990; 9:7-80). Disse koordinerte aktiviteter understøtter optimalt vertsforsvar som er nødvendig for å bekjempe bakterielle-, virale- og sopp-infeksjoner.

Strategier for å forhindre eller redusere alvorlighetsgraden av neutropeni og benmargstoksisitet omfatter anvendelse av hematopoetiske vekstfaktorer og/eller andre hematopoetiske cytokiner. Slik behandling er begynt å bli vanlig praksis, ved at de tilbyr muligheten av økende doser av cytotoksiske midler som kan forbedre den terapeutiske virkningen av antineoplastiske midler og redusere sykdommen forbundet med anvendelse av dem (Steward WP. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony stimulating factors, Lancet 1993; 342:153-157). Kliniske studier har vist at G-, GM- og/eller M-CSF kan redusere varigheten av neutropeni, akselerere myeloid gjenvinning og redusere neutropeni-assosierte infeksjoner og andre infeksjøs komplikasjoner i pasienter med ondartet svulst som mottar cytotoksisk kjemoterapi eller i pasienter som har høy infeksjonsrisiko etter benmargstransplantasjon (Steward WP. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony stimulating factors, Lancet 1993; 342:153-157 and Munn DH, Cheung NKV. Preclinical and clinical studies of macrophage colony-stimulating factor. Semin. Oncol., 1992; 19:395-407).

Syntetiske peptider har blitt rapportert å indusere syntesen og frigivelsen av hematopoetiske mediatorer, som omfatter m-CSF fra benmarg stromale elementer se US patentsøknad 08/001905.

Vi har nå funnet visse nye ikke-peptidforbindelser som har en stimulerende effekt på myelopoetiske celler. De er nyttige i å stimulere myelopoese i pasienter som lider av redusert myelopoetisk aktivitet, som omfatter benmargskade, agranulocytose og aplastisk anemi som omfatter pasienter som har nedsatt benmargsfunksjon på grunn av immunundertrykkende behandling for å undertrykke vevsreaksjoner dvs., i benmargstransplantatkirurgi. De kan også bli anvendt til å fremme raskere regenerering av benmarg etter cytostatisk kjemoterapi og strålingsterapi for neoplastiske og virale sykdommer. De kan være av spesiell verdi hvor pasienter har alvorlige infeksjoner på grunn av en mangel på immunrespons etter benmargssvikt. De er også nyttige i behandlingen og i forhindring av viral-, sopp- og bakteriell sykdom.

Foreliggende oppfinnelse omfatter forbindelser, nedenfor representert som Formel (I), som har hemoregulatoriske aktiviteter og som kan være anvendt til å

stimulere hematopoese og i forebygging og behandling av bakterielle-, virale- og soppsykdommer.

Disse forbindelser er nyttige i gjenoppbygging av leukocytter i pasienter med senket celletall resulterende fra en rekke kliniske situasjoner, slik som kirurgisk indusert myelondertrykking, AIDS, ARDS, medfødt myelodysplasi, benmarg- og organtransplantater; i beskyttelsen av pasienter med leukopeni fra infeksjon; ved behandling av alvorlig brente pasienter og i forbedringen av benmargsuppresjon observert med noen celle-syklusspesifikke antivirale midler og ved behandling av infeksjoner i pasienter som har hatt benmargstransplantater, spesielt de med transplantat mot vertssykdom, ved behandling av tuberkulose og ved behandling av feber av ukjent opprinnelse i mennesker og i dyr. Forbindelsene er også nyttige i behandlingen og i forhindring av virus-, sopp- og bakterielle infeksjonssykdommer, spesielt Candidiasis og Herpes i både immunundertrykte og "normale" individer. De er nyttige ved behandling av blodforgiftning forårsaket av gram-negative og gram-positive organismer.

Disse forbindelser kan også bli anvendt i kombinasjon med det myelondertrykkende midler ifølge vedlagt US søknadsnr. 07/799.465 og US patent nr. 4499081, inkorporert ved referanse heri, for å fremskaffe alternerende topper av høy og lav aktivitet i benmargscellene, således øker den naturlige kretsløpsrytme av hematopoese. På denne måten, kan cytostatisk terapi bli gitt ved perioder med lav benmargsaktivitet, således reduseres risikoen for benmargsskade, mens regenerering vil bli fremmet ved den etterfølgende topp av aktivitet. Foreliggende oppfinnelse er også et farmasøytisk preparat, som omfatter en forbindelse med formel (II) og en farmasøytisk godtagbar bærer.

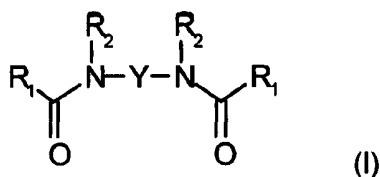
Foreliggende oppfinnelse konstituerer videre en fremgangsmåte for å stimulere det myelopoetisk systemet i et dyr, inkludert mennesker, som omfatter administrering til et dyr som trenger det, av en effektiv mengde av en forbindelse med formel (I).

Foreliggende oppfinnelse utgjør også en metode for forhindring og behandling av virus-, sopp- og bakterielle infeksjoner i immunundertrykte og normale dyr, inkludert mennesker, som omfatter administrering til et dyr som trenger det, en effektiv mengde av en forbindelse med formel (I).

Foreliggende oppfinnelse videre konstituerer en metode for forhindring og behandling av blodforgiftning forårsaket av gram-positive og gram-negative

organismer i dyr, inkludert mennesker, som omfatter administrering til et dyr som trenger det, en effektiv mengde av en forbindelse med formel (I).

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er representert ved strukturformel (I)



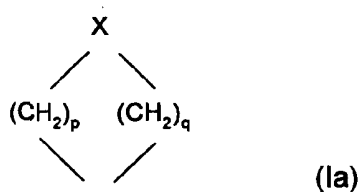
hvor:

R₁ er en pyridylgruppe,

R₂ er hydrogen,

Y er (CH₂)_n, hvor minst et karbon er gem-substituert med R₃ og R₄;

R₃ og R₄ er uavhengig C₁₋₄ alkyl som kan være substituert med OH, eller R₃ og R₄ kan sammen danner en sykklisk eller heterosyklisk ring med formel (Ia):



hvor p og q er uavhengig et helt tall fra 0 til 3;

X er O eller CH₂ ;

eller farmasøytiske godtagbare salt derav;

forutsatt at:

p og q er ikke begge 0.

C₁₋₄ alkylgrupper kan være lineær eller forgrenet.

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan inneholde én eller flere asymmetriske karbonatomer og kan eksistere i rasemisk og optisk aktiv form. Alle disse forbindelser og diastereomerene er betraktet å være innenfor foreliggende oppfinnelse.

5

5

10

10

10

10

10

10

10

15

20

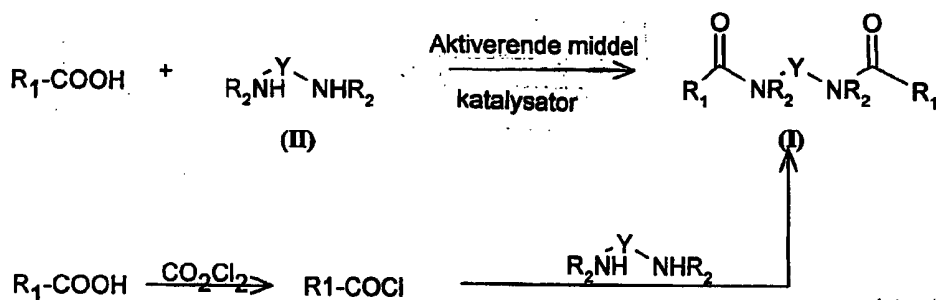
25

25



30

Skjema I



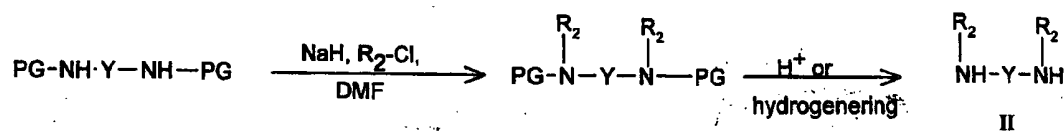
ved omsetning av en egnet aktivert syre ($\text{R}_1\text{-COOH}$) med et egnet diamin ($\text{R}_2\text{-NH-Y-NH-R}_2$) eller dets salt dannet i et egnet oppløsningsmiddel slik som metylenklorid (CH_2Cl_2) eller N,N-dimetylformamid (DMF) hvilket gir sluttproduktet.

Karboksytsyren er aktivert med et egnet aktiveringsmiddel slik som 1,3-dicycloheksylkarbodiimid (DCC), benzotriazol-1-yloksy-tris(dimetyl-amino)fosfonium heksafluorofosfat (BOP reagens) eller 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluronium tetrafluorborat (TBTU reagens). Reaksjonen blir katalysert ved en egnet katalysator slik som 1-hydroksybenzotriazolhydrat (HOBt) eller 4-dimetylamino-pyridin (DMAP). Hvis aminet er i sin saltform, må det nøytraliseres med en egnet base slik som trietylamin, Hunig's base eller N-metyl morfolin.

Alternativt, transformeres syren til et syrehalogenid som omsettes med et amin i nærvær av en egnet base slik som trietylamin, Hunig's base eller N-metyl morfolin, i et egnet oppløsningsmiddel så som CH_2Cl_2 , benzen eller DMF for å danne forbindelsen med formel (I).

Aminene med formel (II) ($\text{R}_2\text{-NH-Y-NH-R}_2$) kan oppnås som vist i skjema II

Skjema II

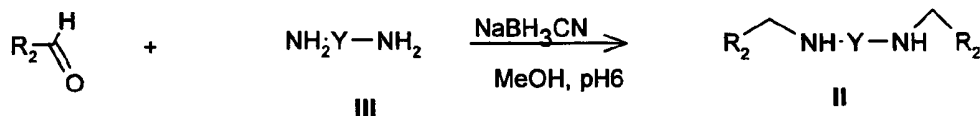


PG = beskyttelsesgruppe t-BOC eller Z

ved omsetning av et passende beskyttet diamin ($\text{NH}_2\text{-Y-NH}_2$) med et alkylhalogenid i nærvær av base slik som NaH. Reaksjonen kan utføres i dioksan eller DMF. De mest vanlig anvendte beskyttelsesgrupper er t-butyloksykarbonyl (t-Boc-) eller karbobenzylloxy (Z-). Metodene for å fjerne disse beskyttelsesgruppene er velkjent i feltet.

Aminene med formel (II) hvor R_2 er C_{2-4} alkyl eller $\text{C}_{2-4}\text{alkylC(O)R}_6$ kan også fremstilles som vist i skjema (III)

Skjema III

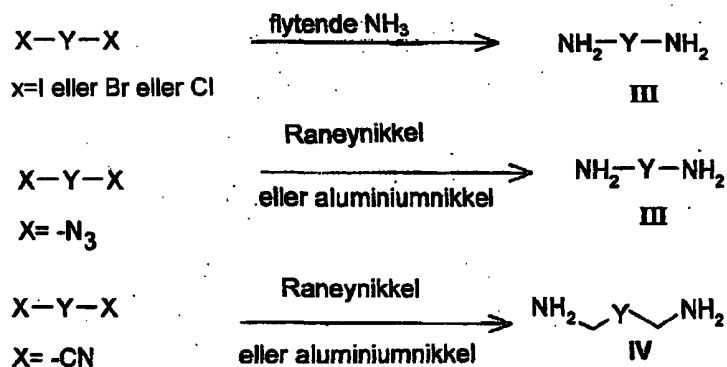


ved omsetning av aminer med formel III eller IV med en aldehyd ($\text{R}_2\text{-CHO}$) og et egnet reduksjonsmiddel slik som natriumcyanoborhydrid i et egnet oppløsningsmiddel slik som metanol.

Aminene med formel III ($\text{NH}_2\text{-Y-NH}_2$) kan oppnås kommersielt eller bli fremstilt ved å la et egnet bisalkylhalogenid reagere med ammoniakk.

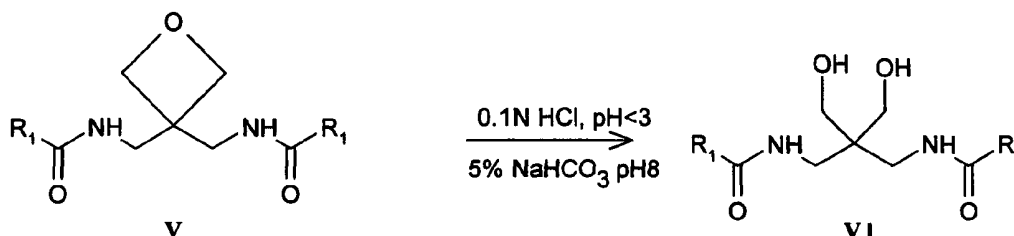
Aminene med formel III eller IV kan også fremstilles ved å redusere bisalkylnitiler eller bisalkylazider som vist i skjema IV

Skjema IV



Forbindelsene med formel VI blir fremstilt som vist i skjema V

Skjema V



ved sekvensielt å reagere forbindelser med formel V med en vandig syre og vandig base hvilket gir de ønskede forbindelser.

For å anvende en forbindelse med formel (I) eller et farmasøytisk godtagbart salt derav for behandlingen av mennesker og andre pattedyr formuleres det normalt i overensstemmelse med standard farmasøytisk praksis til et farmasøytisk preparat.

Preparatene ifølge oppfinnelsen kan være presentert for eksempel i en form egnet for oral-, nasal-, parenteral- eller rektal administrering.

Som anvendt her, omfatter betegnelsen "farmasøytisk" veterinærbruksområder ifølge foreliggende oppfinnelse. Disse forbindelsene kan være innkapslet, i tablettform eller fremstilt i en emulsjon eller sirup for oral administrering.

Farmasøytisk godtagbart fast stoff eller flytende bærere kan være tilsatt for å forsterke eller stabilisere preparatet eller for å lette fremstilling av preparatet.

Flytende bærere omfatter sirup, peanøttolje, olivenolje, glyserin, saltvann og vann.

Fastbærere omfatter stivelse, laktose, kalsiumsulfatdihydrat, terra-alba, magnesiumstearat eller stearinsyre, talg, pektin, acacia, agar eller gelatin.

Bæreren kan også omfatte et forsinket frigjøringsmateriale slik som et glycerylmonostearat eller glyceryldistearat, alene eller med en voks. Mengden av fast bærer varierer men, vil fortrinnsvis være mellom omtrent 20 mg til omtrent 1 g pr.

doseenhet. De farmasøytiske fremstillingene er laget etter de konvensjonelle teknikkene i farmasi som involverer kverning, blanding, granulering og kompresjon, når nødvendig, for tablettformer; eller kverning, blanding og fylling for harde gelatinkapselformer. Kapsler inneholdende én eller flere aktive bestanddeler kan være produsert, for eksempel ved å blande de aktive bestanddelene med inert bærere, slik som laktose eller sorbitol og å fylle blandingen i gelatin-

kapsler. Når en flytende bærer blir anvendt, vil fremstillingen være i form av en sirup, eliksir, emulsjon eller en vandig eller ikke-vandig suspensjon. En slik flytende formulering kan bli administrert direkte p.o. eller fylt i en myk gelatin kapsel. Organspesifikke bærersystemer kan også bli anvendt.

5 Alternativt kan farmasøytiske preparater av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse eller derivater derav, være formulert som løsninger av lyofiliserte pulvere for parenteral administrering. Pulvere kan være rekonstituert ved tilsetning av et egnet fortynningsmiddel eller andre farmasøytiske godtagbare bærere før anvendelse. Den flytende formuleringen er generelt en bufret, 10 isotonisk, vandig løsning. Eksempler på egnede fortynningsmidler er normal isotonisk saltvannsløsning, standard 5% dekstrose i vann eller bufret natrium- eller ammoniumacetat-løsning. En slik formulering er spesielt egnet for parenteral administrering, men kan også anvendes for oral administrering og inneholdes i en gradert doseinhalerer eller forstøver for insufflasjon. Det kan være ønskelig å 15 tilsette tilsetningsmidler slik som polyvinylpyrrolidon, gelatin, hydroksycellulose, acacia, polyetylglykol, mannitol, natriumklorid eller natriumcitrat.

For rektal administrering, kan et pulverisert pulver av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse være kombinert med tilsetningsmidler slik som kakao-smør, glycerin, gelatin eller polyetylglykoler og formet i en stikkpille. Det 20 pulveriserte pulver kan også bli forbundet med en oljeforbindelse, gel, krem eller emulsjon, bufret eller ubufret og administrert gjennom et transdermalt plaster.

Nasalsprayer kan formuleres på samme måte i vandig løsning og pakkes i spraybeholdere enten med et aerosoldrivmiddel eller gitt ved hjelp av manuell kompresjon.

25 Doseenheter som inneholder forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse inneholder fortrinnsvis 0,05-50 mg, for eksempel 0,05-5 mg av forbindelsen med formel (I) og (II) eller salt derav.

Det beskrives en metode for stimulering av myelopoese som omfatter å administrere en effektiv mengde av en farmasøytisk forbindelse med formel (II) 30 som ovenfor definert til et emne.

Ingen uakseptable toksikologiske effekter er forventet når forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse er administrert.

De biologiske aktivitetene av forbindelsene med formel (I) er vist ved følgende tester.

Induksjon av hematopoetisk synergistisk aktivitet i stromalceller

Benmarg avledet fra musestromalcelle linje, C6,4 ble dyrket i 12 brønnplater i RPMI 1640 med 10% FBS. Når de nådde konfluens, ble C6,4 cellene vasket og mediumet byttet med frisk RPMI 1640 uten FBS. Konfluente cellelag av mus C6,4 celler ble behandlet med forbindelse. Cellefrie supernatanter ble samlet 18 timer senere. Supernatantene ble fraksjonert med en Centricon-30 molekylvekt "sperre" membran. C6,4 celle hematopoetisk synergistisk faktor (HSF) aktivitet ble målt i en mus-CFU-C analyse.

CFU-C analyse

Benmargceller ble oppnådd fra C57B1/6 hunnmus og suspendert i RPMI 1640 med 10% FBS. Benmargceller ($7,5E+4$ celler/ml) ble dyrket med sub-optimale nivåer av CFU pluss fortykning av test C6,4 celle 30K-E supernatanter fra ovenfor i en standard mus mykagar CFU-C analyse. Celleaggregater >50 celler ble talt som kolonier. Antallet av agarkolonier talt er proporsjonalt med mengden av HSF til stede i C6,4 benmargstromallinje supernatanten.

Effektor cellefunksjonsanalyse

Hunn-C57B1-mus ble gitt testforbindelse IP eller PO daglig i 8 dager. Peritoneale eksudatceller (PEC) benyttet *ex vivo* fra behandlet eller ubehandlet mus ble høstet med kald kalsium og magnesium-fri DPBS tilsatt heparin og antibiotika innen 2-4 timer etter den siste injeksjonen. Vedhengene PEM populasjoner ble fremstilt ved å inkubere standardiserte PEC suspensjoner i mikrotiter plater i 2 timer ved 37°C (5% CO_2) og å fjerne ikke-vedhengende-celler ved å vaske brønnene med varm buffer.

Superoksyd dismutase-inhibiterbare (SOD) superoksyd avgitt fra effektor-celler i respons til en *in vitro* stimulering av forbolmyristatacetat (PMA) (100-200nM) eller pre-opsonisert (autolog serum) levende *C. albicans* (E:T = 1:10) ble kvantifisert i en mikrotiter jerncytokrom c reduksjonsanalyse. Analysen ble utført i nærvær av 1% gelatin/HBSS og 80uM jerncytokrom c i et total volum på 200ul/brønn. Nano-molene av cytokrom c redusert/brønn ble beregnet fra spektrofotometriske avlesninger (550 nm) tatt etter en 1 time inkubering ved 37°C

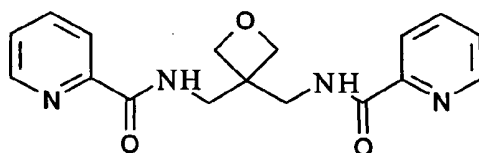
medregningen av brønner inneholdende SOD (200 U/brønn). Basislinje superoksyd avgitt ble bestemt i fravær av stimuli. Eksperimentelle data ble utrykt som en prosent av kontrollgruppen.

De følgende eksempler er illustrative og er ikke begrensende for forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse.

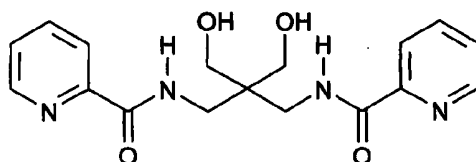
Alle temperaturer er gitt i celsius.

EKSEMPEL 1

3,3-Bis(pikolinamidometyl)oxetan



Til en oppløsning av 3,3-bisaminometyloxetan dihydrobromid (0,05 g, 0,18 mmol) i DMF (3 ml) ble det tilsatt pikolinsyre (0,07 g, 0,56 mmol), BOP reagens (0,24 g, 0,54 mmol), HOBt hydrat (0,07 g, 0,52 mmol) og $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (0,16 ml, 0,92 mmol). Etter 24 timer, ble reaksjonen stoppet ved å helle i 50% saltvann (10 ml) og ekstrahere med EtOAc (3 x 15 ml). De samlede organiske ekstrakter ble tørret over Na_2SO_4 og konsentrert hvilket ga en gul olje (0,82 g). Flashkromatografi (gradient 50% EtOAc/ heksan til 100% EtOAc, silikagel) ga 0,02 g, (34%) av det ovenfor navngitte produkt som et hvitt, fast stoff. ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz) δ 8,82 (t, 2H, $J=7$ Hz), 8,61 (m, 2H), 8,23 (d,d, 2H, $J=7,7$, 1 Hz), 7,87 (d,t, 2H, $J=7,7$, 1,6 Hz), 7,45 (m, 2H), 4,59 (s, 4H), 3,87 (d, 4H, $J=7\text{Hz}$); MS (ES+) m/e 327,4 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

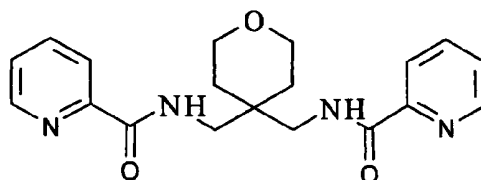
EKSEMPEL 2**2,2-Bis (pikolinoylamidometyl) 1,3 propandiol**

5

3,3-Bis(pikolinamidometyl)oxetan (eksempel 1) (25,6 mg, 0,078 mmol) ble oppløst i 8 ml 0,1 N HCl (vandig) og omrørt ved romtemperatur i 18 timer.

Reaksjonen ble laget enkelt (pH~8) med 5% NaHCO₃ (vandig) og fordampet til tørrhet. Resten ble tatt i 10% MeOH/CHCl₃, filtrert og inndampet og det resulterende materiale ble rensset ved flashkromatografi (silikagel, 3x20 cm, 2% MeOH/CHCl₃) hvilket ga to fraksjoner. Den først fraksjonen inneholdt 5 mg (0,015 mmol, 19%) og gjenvunnet startmateriale. MSES m/e 327 (M+H)⁺. Den andre fraksjon inneholdt 19,3 mg (0,056 mmol, 72%) av det ovenfor nevnte produkt. ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ 8,77 (t, 2H, J=7Hz), 8,61 (m, 2H), 8,21 (d,d, 2H, J= 7,8, 1 Hz), 7,88 (t,d, 2H, J= 7,8, 1,7 Hz), 7,47 (m, 2H), 4,44 (t, 1H, J= 7Hz), 3,48 (d, 4H, J=7Hz), 3,37 (d, 4H, J=7Hz); MS(ES⁺) m/e 345 [M+H]⁺.

20

EKSEMPEL 3**4,4-Bis(pikolinamidometyl)tetrahydro-4H-pyran**

Til en omrørt blanding av tetrahydro-4H-pyran-4,4-dikarbonitril (0,33g, 0,002 mol) i MeOH (10ml) og 2N NaOH (9ml) ved 0° ble det tilsatt i porsjoner, aluminiumnikkel katalysator (0,59g, 0,01mol). Reaksjonsblandingen ble tilbake-

25

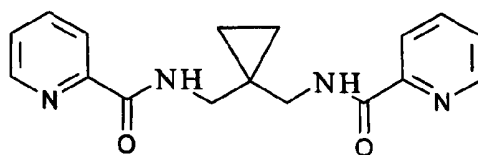
løpskokt i 4 timer. Den avkjølte blandingen ble regulert til pH2 ved dråpevis tilsetning av konsentrert HCl. Blandingen ble deretter konsentrert under redusert trykk ved 40° hvilket ga et gråhvitt fast stoff.

Til en oppløsning av pikolinsyre (0,59g, 0,0048 mol) i benzen (25 ml) og én dråpe av DMF ble tilsatt under argon, oksalyklorid (0,64 g, 0,0048 mol).

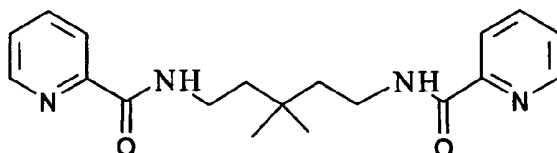
Reaksjonen ble omrørt ved romtemperatur i 3 timer og deretter avkjølt til 0°. Til denne ble tilsatt i én porsjon en suspensjon av diaminotetrahydropyran dihydroklorid salt av (0,35 g, 0,0016 mol) i kloroform (5ml) inneholdende diisopropyletylamin (2,06 g, 0,016 mol). Reaksjonen ble omrørt under argon ved romtemperatur i 2 timer. Blandingen ble hellet over i 50ml saltvann og ekstrahert to ganger med EtOAc. EtOAc-ekstraktene ble tørret (Na₂SO₄), filtrert og konsentrert ved 40° til en brun olje. Oljen ble flashkromatografert på silikagel under eluering med EtOAc hvilket ga 22,5mg av det ovenfornevnte produkt som en fargeløs olje. ¹H NMR(CDCl₃) δ: 8,9(bred t, 2H), 8,6(m, 2H), 8,3(m, 2H), 7,8(m, 2H), 7,5(m, 2H), 3,9(t, 4H), 3,5(d, 4H), 1,6(t, 4H); MS (ES+) m/e 355 [M+H]⁺; 377 [M+H+Na]⁺.

EKSEMPEL 4

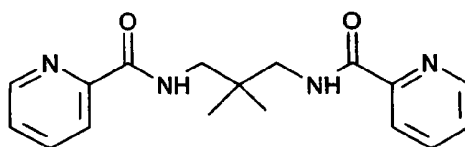
1,1-Bis(pikolinamidometyl)cyklopropan



På en måte analog til den i Eksempel 3, ga 1,1-diaminometyl-cyclopropan (0,53 g, 3,09 mmol), pikolinsyre (1,14 g, 9,26 mmol), BOP-reagens (4,10 g, 9,26 mmol), HOBt-hydrat (1,25 g, 9,25 mmol) og Et₃N (2,60 ml, 18,6 mmol) 0,83 g (87%) av det ovennevnte produkt som et hvitt skum. MS (ES+) m/e 311,4 [M+H]⁺.

EKSEMPEL 5**N,N'-Bis(pikolinoyl)-1,5-diamino-3,3-dimethylpentan**

På en måte analogt til det i eksempel 1, ga 3,3-dimetyl-1,5-diaminopentan (0,22 g, 1,70 mmol), pikolinsyre (0,46 g, 3,74 mmol), BOP-reagens (1,65 g, 3,74 mmol), HOBt-hydrat (0,50 g, 3,74 mmol) og $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (2,96 ml, 17,0 mmol) en gul olje. Utgning fra varm EtOAc ga 0,24 g (42%) av det ovennevnte produkt som hvite krystaller. MS(ES⁺) m/e 341,0 [M+H⁺].

EKSEMPEL 6**N,N'-Bis(pikolinoyl)-1,3-diamino-2,2-dimetylpropan**

En oppløsning av 2,2-dimetyl-1,3-propandiamin (5,00 g, 48,9 mmol) i DMF (500 ml) ble behandlet med pikolinsyre (12,6 g, 0,10 mol), 1-hydroksybenzotriazolhydrat (13,9 g, 0,10 mol), 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylkarbodiimidhydroklorid (19,7 g, 0,10 mol) og $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (17,9 ml, 0,10 mol) ved romtemperatur. Etter 18 timer, ble reaksjonsblandingen fordampet under vakuum og resten renses ved flashkromatografi (75% EtOAc/heksaner, silikagel) hvilket ga 13,95 g (91%) av det ovenfor nevnte produkt som et klart fast stoff. En fraksjon av dette produktet (5,63 g) ble omkrystallisert fra etylacetat/heksan ved sakte fordampning hvilket ga 3,92 g rent produkt som hvite nåler. MS (ES⁺) m/e 313 [M+H⁺].

EKSEMPEL 7

Preparater for farmasøytiske anvendelse som innbefatter forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse som kan fremstilles i forskjellige former og med en rekke tilsetningsmidler. Eksempler på slike preparater er gitt nedenfor.

5

<u>Tabletter/Bestanddeler</u>	<u>Pr. Tablett</u>
1. Aktiv bestanddel (Forb. av Form. I)	0,5 mg
2. Maisstivelse	20 mg
10 3. Alginsyre	20 mg
4. Natriumalginat	20 mg
5. Mg stearat	1,3 mg

Prosedyre for tabletter:

15

- Trinn 1 Bland bestanddeler nr. 1, nr. 2, nr. 3 og nr. 4 i en egnet blander.
- Trinn 2 Tilsett tilstrekkelig vann porsjonsvis til blandingen fra Trinn 1 med forsiktig blanding etter hver tilsetning. Slike tilsetninger av vann og blanding inntil massen er av en konsistens til å tillate dets omdannelse til våte granulater.
- 20 Trinn 3 Den våte massen blir omdannet til granulater ved å føre det gjennom en oscillerende granulator ved anvendelse av en nr. 8 mesh (2,38 mm) skjerm.
- Trinn 4 De våte granulatene blir deretter tørret i en ovn ved 60°C (140°F) inntil de var tørre.
- 25 Trinn 5 De tørre granulatene er smurt med bestanddel nr. 5.
- Trinn 6 De smurte granulatene er sammenpresset på en egnet tablettpresse.

Parenteral formulering

30

Et farmasøytiske preparat for parenteral administrering blir fremstilt ved å løse opp en passende mengde av en forbindelse med formel (I) i polyetylenglykol ved å varme opp. Denne løsningen blir deretter fortynnet med vann for injeksjoner Ph Eur. (til 100 ml). Løsningen blir deretter sterilisert ved filtrering gjennom et 0,22 mikron membranfilter og forseglert i sterile beholdere.

3. Forbindelse ifølge krav 2, karakterisert ved at R₁ er 2-pyridinyl, R₃ og R₄ er C₁₋₂ alkyl, som kan være substituert med OH, eller R₃ og R₄ kan sammen danner en heterosyklisk ring med formel (Ia) hvor X er O; og p og q er 1 eller 2.

5

4. Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at den er valgt fra gruppen bestående av:

3,3-Bis(pikolinamidometyl)oxetan;

4,4-Bis(pikolinamidometyl)tetrahydro-4H-pyran;

10 2,2-Bis (pikolinoylamidometyl) 1,3 propanediol;

N,N'-Bis(pikolinoyl)-1,3-diamino-2,2-dimetylpropan;

N,N'-Bis(pikolinoyl)-1,5-diamino-3,3-dimetylpentan; og

1,1-Bis(pikolinamidometyl)cyklopropan.

15

5. Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at den er N,N'-Bis(pikolinoyl)-1,3-diamino-2,2-hydroksymetylpropan;

6. Farmasøytisk preparat, karakterisert ved at det omfatter en forbindelse med formel (I) ifølge krav 1 og en farmasøytisk bærer eller et
20 tilsetningsmiddel.

20

7. Anvendelse av en effektiv mengde av en forbindelse med formel I ifølge krav 1 for fremstilling av et farmasøytisk preparat for å forhindre eller behandle virale-, sopp- eller bakterielle infeksjoner som omfatter administrering til et dyr som
25 trenger det.

25

8. Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 1 for fremstilling av et farmasøytisk preparat for å stimulere myelopoese i et dyr som trenger det.

30

9. Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 1 for fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av eller forhindre blodforgiftning i et dyr som trenger det.

10. Fremgangsmåte for fremstilling av en forbindelse, karakterisert ved formel (I) som omfatter:

(a) bisacylering av et diamin med formel (II):

5



hvor R_2 og Y er som definert i Formel (I) eller Y kan ytterligere være beskyttet av en egnet beskyttelsesgruppe; med en forbindelse med formel (IV):

10



hvor R_1 er som definert i Formel (I), ved anvendelse av et egnet aktiveringsmiddel i et egnet polart aprotontisk løsningsmiddel, etterfulgt av fjernelse av hvilke som helst beskyttelsesgrupper og, om ønsket, ved saltdannelse; eller alternativt ved:

15

(b) omforme syren med formel (IV) til et syrehalogenid:



20

hvor R_1 er som definert i Formel (I) og X' er et halogenatom, som er omsatt med diamin med formel (II)



25

hvor R_2 og Y er som definert i Formel (I) eller Y kan ytterligere bli beskyttet ved en egnet beskyttelsesgruppe; i nærvær av en egnet base, i et egnet oppløsningsmiddel, fulgt av fjernelse av hvilken som helst beskyttelsesgrupper og, om ønsket, ved saltdannelse.

30