



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **336742**

(13) **B1**

NORGE

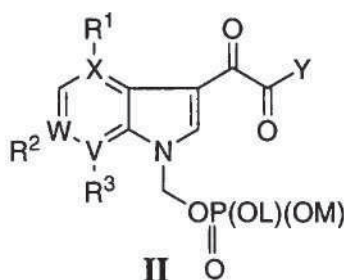
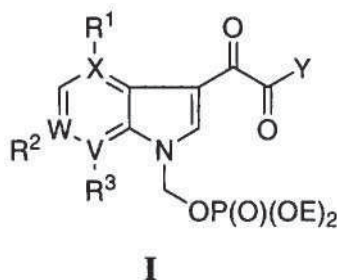
(51) Int Cl.

C07F 9/09 (2006.01)
A61K 31/6615 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20064062	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2005.03.03 PCT/US2005/06980
(22)	Inng.dag	2006.09.08	(85)	Videreføringsdag	2006.09.08
(24)	Løpedag	2005.03.03	(30)	Prioritet	2004.03.15, US, 60/553,320 2004.12.10, US, 60/635,231
(41)	Alm.tilgj	2006.12.08			
(45)	Meddelt	2015.10.26			
(73)	Innehaver	Bristol-Myers Squibb Co, P O Box 4000, US-NJ08543-4000 PRINCETON, USA Yasutsugu Ueda, 46 Olde Orchard Road, US-CT06413 CLINTON, USA John F Kadow, 9 Quarry Run, US-CT06492 WALLINGFORD, USA Nicholas A Meanwell, 15 Valli Drive, US-CT06424 EAST HAMPTON, USA Tao Wang, 1312 Town Brooke, US-CT06457 MIDDLETOWN, USA Zhongxing Zhang, 14 Martleshamheath Lane, US-CT06443 MADISON, USA Kap-Sun Yeung, 164 Dorset Lane, US-CT06443 MADISON, USA Chung-Pin Chen, 92 Joshua Trail, US-CT06443 MADISON, USA Shawn K Pack, 1212 Aspen Drive, US-NJ08536 PLAINSBORO, USA Timothy P Connolly, 6 Elizabeth Road, US-CT06480 PORTLAND, USA David Kenneth Leahy, 44 Mustang Trail, US-NJ08873 SOMERSET, USA Nachimuthu Soundararajan, 10 Talia Road, US-NJ08824 KENDALL PARK, USA Pierre Sirard, 117 De Rouville, CA-QCJ2W1A5 ST JEAN SUR RICHELIEU, Canada Kathia Levesque, 585 Leveillee, CA-QCJ5C1 STE-CATHERINE, Canada Dominique Thoraval, 2 Avenue Naples, CA-QCJ5R5 CANDIAC, Canada			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Piperazinderivater, fremstilling av disse, mellomprodukter for fremstilling av slike, farmasøytisk preparat omfattende slike samt anvendelse av slike for behandling av sykdom			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 0076521 A WO 0162255 A WO 0204440 A1 WO 02062423 A1			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer prodrug Forbindelser I, farmasøytiske preparater derav og anvendelse av dem ved behandling av HIV-infeksjon. Oppfinnelsen tilveiebringer også mellomprodukt-forbindelser II nyttige for fremstilling av prodrug-forbindelser I.



KRYSS-REFERANSE TIL BESLEKTEDE SØKNADER

Denne søknaden krever prioritet fra U.S. Provisional søknad nr. 60/635,231 innlevert 10. desember 2004 og 60/553,320 innlevert 15. mars 2004.

OPPFINNELSENS OMRÅDE

5

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer forbindelser som har medikament- og bio-påvirkende egenskaper, farmasøytiske preparater derav og anvendelse av slike. Spesielt beskrives nye prodrug-derivater med antiviral aktivitet. Mer spesielt angår foreliggende oppfinnelse forbindelser anvendelige for behandling av HIV og AIDS.

10

KJENT TEKNIKK

HIV-1- (humant immunsvikt-virus -1) infeksjon er fortsatt et stort medisinsk problem, med beregnet 42 millioner mennesker infisert verden over ved slutten av 2002. Antallet tilfeller av HIV og AIDS (ervert immundefekt syndrom) har steget raskt. I 2002 ble ~5,0 millioner nye infeksjoner rapportert og 3,1 millioner mennesker døde av AIDS. For tiden tilgjengelige medikamenter for behandling av HIV omfatter ti nukleoside revers transkriptase- (RT) inhibitorer eller godkjente

enkelpille-kombinasjoner (zidovudin eller AZT (eller Retrovir[®]), didanosin (eller Videx[®]), stavudin (eller Zerit[®]), lamivudin (eller 3TC eller Epivir[®]), zalcitabin (eller DDC eller Hivid[®]), abacavir-succinat (eller Ziagen[®]), Tenofovir-disoproxil-fumaratsalt (eller Viread[®]), Combivir[®] (inneholder -3TC pluss AZT), Trizivir[®] (inneholder abacavir, lamivudin og zidovudin) og Emtriva[®] (emtricitabin); tre ikke-nukleoside revers transkriptase-inhibitorer: nevirapin (eller Viramune[®]), delavirdin (eller Rescriptor[®]) og efavirenz (eller Sustiva[®]), ni peptidomimetiske proteaseinhibitorer eller godkjente formuleringer: saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, Kaletra[®](lopinavir og Ritonavir), Atazanavir (Reyataz[®]), Fosamprenavir[®] og én fusjons-inhibitor som målsøker viral gp41 T-20 (FUZEON[®]). Hvert av disse medikamenter kan bare forbigående hindre viral

replikasjon hvis anvendt alene. Imidlertid, når anvendt i kombinasjon, har disse medikamenter en sterk effekt på viremi og sykdomsprogresjon. Faktisk er betydelige reduksjoner i dødsfall blant AIDS-pasienter nylig dokumentert som en konsekvens av omfattende anvendelse av kombinasjonsterapi. Imidlertid, til tross for disse

5 imponerende resultater svikter til slutt kombinerte medikamentterapier 30 til 50% av pasientene. Utilstrekkelig medikamentstyrke, uoverensstemmelse, begrenset vev-penetrering og medikament-spesifikke begrensninger innen visse celletyper (f.eks. kan de fleste nukleosid-analoger ikke fosforyleres i hvilende celler) kan være årsak til ufullstendig undertrykking av sensitive virus. Videre fører høy replikasjonshastighet

10 og rask sirkulasjon av HIV-1 kombinert med hyppig innføring av mutasjoner, til fremkomst av medikament-resistente varianter og behandlingssvikt når sub-optimale medikamentkonsentrasjoner er til stede (Larder og Kemp; Gulick; Kuritzkes; Morris-Jones *et al*; Schinazi *et al*; Vacca og Condra; Flexner; Berkhout og Ren *et al*; (Ref. 6-14)). Derfor er nye anti-HIV-midler som har distinkte resistensmønstre og

15 fordelaktig farmakokinetikk så vel som sikkerhetsprofiler nødvendige for å gi flere behandlingsalternativer.

For tiden markedsførte HIV-1-medikamenter er dominert av enten nukleoside revers transkriptase-inhibitorer eller peptidomimetiske proteaseinhibitorer. Ikke-nukleoside revers transkriptase-inhibitorer (NNRTI) har nylig fått en økende viktig

20 rolle i terapien av HIV-infeksjoner (Pedersen & Pedersen, Ref 15). Minst 30 forskjellige klasser av NNRTI er beskrevet i litteraturen (De Clercq, Ref. 16) og mange NNRTI er evaluert i kliniske forsøk. Dipyridodiazepinon (nevirapin), benzoksazinon (efavirenz) og bis(heteroaryl) piperazin-derivater (delavirdin) er godkjent for klinisk anvendelse. Imidlertid er den store ulempe ved utvikling og

25 anvendelse av NNRTI tilbøyeligheten til rask fremkomst av medikament-resistente stammer, både i vevcellekultur og hos behandlede individer, spesielt de underkastet monoterapi. Som en konsekvens er det betraktelig interesse for identifikasjon av NNRTI mindre tilbøyelige til utvikling av resistens (Pedersen & Pedersen, Ref 15). En nyere oversikt over ikke-nukleoside revers transkriptase-inhibitorer: "Perspectives

30 on novel therapeutic compounds and strategies for the treatment of HIV infection". er presentert (Buckheit, referanse 99). En oversikt som dekker både NRTI og NNRTI er presentert (De Clercq, referanse 100). En oversikt over teknikkens stand for HIV-medikamenter er publisert (De Clercq, referanse 101).

Mange indolderivater omfattende indol-3-sulfoner, piperazino-indoler, pyrazino-indoler og 5H-indolo[3,2-b][1,5]benzotiazepin-derivater er rapportert som HIV-1 revers transkriptase-inhibitorer (Greenlee et al, Ref. 1; Williams et al, Ref. 2; Romero et al, Ref. 3; Font et al, Ref. 17; Romero et al, Ref. 18; Young et al, Ref. 19; 5 Genin et al, Ref. 20; Silvestri et al, Ref. 21). Indol 2-karboksamider er også beskrevet som inhibitorer av celledhesjon og HIV-infeksjon (Boschelli et al, US 5,424,329, Ref. 4). 3-substituerte indol naturlige produkter (Semicochliodinol A og B, didemetylasterrikinon og isocochliodinol) er beskrevet som inhibitorer av HIV-1 protease (Fredenhagen et al, Ref. 22).

10 Strukturelt beslektede aza-indol-amid-derivater er beskrevet tidligere (Kato et al, Ref. 23(a); Levacher et al, Ref. 23(b); Dompe Spa, WO-09504742, Ref. 5(a); SmithKline Beecham PLC, WO-09611929, Ref. 5(b); Schering Corp., US-05023265, Ref. 5(c)). Imidlertid skiller disse strukturer seg fra de krevet her ved at de er monoaza-indol-mono-amid heller enn oksoacetamid-derivater og det er ingen 15 angivelse av at disse forbindelser er anvendelige for behandling av virale infeksjoner, spesielt HIV.

Nye medikamenter for behandling av HIV er nødvendige for behandling av pasienter som er resistente mot for tiden godkjente medikamenter beskrevet ovenfor som målsøker revers transkriptase eller protease. Én metode for å oppnå disse 20 medikamenter er å finne molekyler som hemmer nye og forskjellige mål i viruset. En generell klasse av inhibitorer som er under aktiv studie er HIV-entry-inhibitorer. Denne generelle klassifisering omfatter medikamenter rettet mot mange mål som omfatter kjemokinreseptor- (CCR5 eller CXCR4) inhibitorer, fusjonsinhibitorer som målretter viral gp41 og inhibitorer som forhindrer binding av den virale kappe, 25 gp120, dens humane cellulære mål CD4. Flere oversikter eller generelle artikler om virale entry-inhibitorer er nylig fremkommet og noen valgte referanser er:

Chemokine receptor antagonists as HIV entry inhibitors. Expert Opinion on Therapeutic Patents (2004), 14(2), 251-255.

30

Inhibitors of the entry of HIV into host cells. Meanwell, Nicholas A.; Kadow, John F. Current Opinion in Drug Discovery & Development (2003), 6(4), 451-461.

Virus entry as a target for anti-HIV intervention. Este, Jose A. Retrovirology Laboratory irsiCaixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain. *Current Medicinal Chemistry* (2003), 10(17), 1617-1632.

5

New antiretroviral agents. Rachline, A.; Joly, V. Service de Maladies Infectieuses et Tropicales A, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, Fr. *Antibiotiques* (2003), 5(2), 77-82.

10 *New antiretroviral drugs.* Gulick, R. M. Cornell HIV Clinical Trials Unit, Division of International Medicine and Infectious Diseases, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY, USA. *Clinical Microbiology and Infection* (2003), 9(3), 186-193.

15 *Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics.* Reeves, Jacqueline D.; Gallo, Stephen A.; Ahmad, Navid; Miamidian, John L.; Harvey, Phoebe E.; Sharron, Matthew; Pohlmann, Stefan; Sfakianos, Jeffrey N.; Derdeyn, Cynthia A.; Blumenthal, Robert; Hunter, Eric; Doms, Robert W. Department of Microbiology, University of
20 Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2002), 99(25), 16249-16254. CODEN: PNASA6 ISSN: 0027-8424.

Opportunities and challenges in targeting HIV entry. Biscone, Mark J.; Pierson, Theodore C.; Doms, Robert W. Department of Microbiology, University of
25 Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA. *Current Opinion in Pharmacology* (2002), 2(5), 529-533.

HIV entry inhibitors in clinical development. O'Hara, Bryan M.; Olson, William C. Progenics Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY, USA. *Current Opinion in
30 Pharmacology* (2002), 2(5), 523-528.

Resistance mutation in HIV entry inhibitors. Hanna, Sheri L.; Yang, Chunfu; Owen,

Sherry M.; Lal, Renu B. HIV Immunology and Diagnostics Branch, Division of AIDS, STD, Atlanta, GA, USA. AIDS (London, United Kingdom) (2002), 16(12), 1603-1608.

- 5 *HIV entry: are all receptors created equal?* Goldsmith, Mark A.; Doms, Robert W. Genencor International, Inc., Palo Alto, CA, USA. Nature Immunology (2002), 3(8), 709-710. CODEN: NIAMCZ ISSN: 1529-2908.

10 *Peptide and non-peptide HIV fusion inhibitors.* Jiang, Shibo; Zhao, Qian; Debnath, Asim K. The New York Blood Center, Lindsley F. Kimball Research Institute, New York, NY, USA. Current Pharmaceutical Design (2002), 8(8), 563-580.

Det er to generelle metoder for forhindring av den innledende binding av viral membran, gp120, til cellulær CD4 som er a) inhibitorer som binder til human CD4 og
 15 blokkerer binding av viral kappe (gp120) og b) inhibitorer som binder til viral gp120 og forhindrer binding av cellulær CD4. Den andre metoden har fordelen at den hemmer et viral målt og, hvis selektiv, minimaliserer sjanser for forstyrrelse av normal human fysiologi eller forårsaker bivirkninger. Ved denne metoden er det, for å overvinne et spekter av mottagelighet for medikament forårsaket av variabilitet i
 20 sekvensene av viral kappe og undertrykke utvikling av resistens, viktig å oppnå plasma-nivåer av medikament som er så mange ganger mulig over EC50 eller andre mål for konsentrasjon av medikament som er nødvendig for å drepe virus. Som beskrevet senere, må disse inhibitorer for å være sikre for bred utnyttelse for mennesker, derfor være i stand til å oppnå eksponeringsnivåer tilstrekkelige til å
 25 frembringe virus-undertrykkelse. Jo høyere multippel av medikamentnivåer over nivået som er nødvendig for å å hemme viral vekst, jo mer effektiv og fullstendig er undertrykkelse av viral replikasjon og jo lavere sjansen for viral mutasjon og påfølgende utvikling av resistens mot behandling. Således omfatter viktige aspekter som bidrar til effektiviteten av virale bindingsinhibitorer ikke bare iboende potens og
 30 sikkerhet, men også farmakokinetikk og farmasøytiske egenskaper som tillater oppnåelse av høy plasma-eksponering ved fysisk mulig dose og et akseptabelt, fortrinnsvis hensiktsmessig, administreringsregime. Foreliggende oppfinnelse beskriver en prodrug-metode som sterkt forbedrer maksimal eksponering og evne til å

øke eksponeringsmultipl (dvs. multipler av medikament-eksponering større enn EC₅₀ eller EC₉₀) ved dose-eskalering av effektive medlemmer av en tidligere beskrevet klasse av HIV-binding-inhibitorer.

En rekke nyere publikasjoner og beskrivelser karakteriserer og beskriver en
5 forbindelse merket som BMS-806, et innledende medlem av en klasse av virale entry-inhibitorer som målsøker viral gp-120 og forhindrer binding av virus til vert CD4.

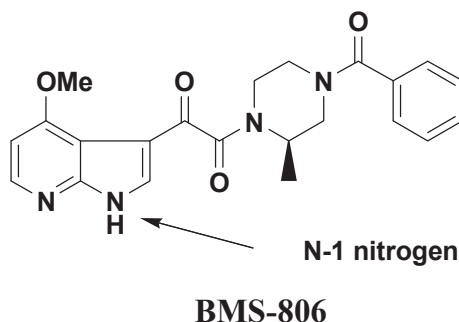
A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. Lin, Pin-Fang; Blair, Wade; Wang, Tao; Spicer, Timothy; Guo, Qi;
10 Zhou, Nannan; Gong, Yi-Fei; Wang, H. -G. Heidi; Rose, Ronald; Yamanaka, Gregory; Robinson, Brett; Li, Chang-Ben; Fridell, Robert; Deminie, Carol; Demers, Gwendeline; Yang, Zheng; Zadjura, Lisa; Meanwell, Nicholas; Colonno, Richard. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2003), 100(19), 11013-11018.

15 *Biochemical and genetic characterizations of a novel human immunodeficiency virus type 1 inhibitor that blocks gp120-CD4 interactions.* Guo, Qi; Ho, Hsu-Tso; Dicker, Ira; Fan, Li; Zhou, Nannan; Friborg, Jacques; Wang, Tao; McAuliffe, Brian V.; Wang, Hwei-gene Heidi; Rose, Ronald E.; Fang, Hua; Scarnati, Helen T.; Langley, David R.; Meanwell, Nicholas A.; Abraham, Ralph; Colonno, Richard J.; Lin, Pin-fang. Journal of Virology (2003), 77(19), 10528-10536.
20

Method using small heterocyclic compounds for treating HIV infection by preventing interaction of CD4 and gp120. Ho, Hsu-Tso; Dalterio, Richard A.; Guo, Qi; Lin,
25 Pin-Fang. PCT Int. søkn. (2003), WO 2003072028A2.

Discovery of 4-benzoyl-1-[(4-methoxy-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)oxoacetyl]-2-(R)-methylpiperazine (BMS-378806): A Novel HIV-1 Attachment Inhibitor That Interferes with CD4-gp120 Interactions. Wang, Tao; Zhang, Zhongxing; Wallace,
30 Owen B.; Deshpande, Milind; Fang, Haiquan; Yang, Zheng; Zadjura, Lisa M.; Tweedie, Donald L.; Huang, Stella; Zhao, Fang; Ranadive, Sunanda; Robinson, Brett S.; Gong, Yi-Fei; Ricarrdi, Keith; Spicer, Timothy P.; Deminie, Carol; Rose, Ronald; Wang, Hwei-Gene Heidi; Blair, Wade S.; Shi, Pei-Yong; Lin, Pin-fang; Colonno,

Richard J.; Meanwell, Nicholas A. Journal of Medicinal Chemistry (2003), 46(20), 4236-4239.



5

Indol, azaindol og andre okso-amid-inneholdende derivater fra denne klassen er beskrevet i flere forskjellige PCT- og bevilgede U.S. patentsøknader (Referanse 93-95, 106, 108, 109, 110, 111 og 112) og disse referanser angår direkte forbindelsene i denne patentsøknad. Ingen av forbindelsene i disse referanser fra

10 kjent teknikk inneholder en metyl-dihydrogenfosfat- (eller salt eller mono- eller diester av fosfat- gruppen) gruppe bundet til N-1 nitrogen og således representerer forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse nye sammensetninger. Denne gruppen øker dramatisk nytten av stamforbindelsene ved å fungere som en prodrug-

15 modifikasjon som dramatisk øker maksimal systemisk eksponering av de parentale molekyler i prekliniske modeller av human eksponering. Vi mener ingenting i tidligere teknikk referanser kan betraktes å beskrive eller foreslå de nye forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse og anvendelse av dem for å hemme HIV-infeksjon.

Foreliggende oppfinnelse beskriver prodrug av spesifikke indol og azaindol-ketopiperazin-amider som er ekstremt effektive til å forbedre oral nytte av de

20 parentale molekyler som antivirale midler, spesielt som anti-HIV-medikamenter. De parentale molekyler er relativt uoppløselige og lider av oppløsning-begrenset eller solubilitet- begrenset absorpsjon som betyr at når dosen økes over et maksimumsnivå, oppløses mindre og mindre av medikamentet i tide til å bli absorbert i sirkulasjonen og det blir istedet ført gjennom kroppen for å bli fjernet som svin. Forbedringene

25 tilveiebragt ved prodrug er nødvendig, for de tillater at medikamentnivåer i kroppen blir øket betydelig, hvilket gir større effektivitet mot HIV-virus og spesielt mot mindre sensitive eller mer resistente stammer. Prodrug er spesielt viktig for denne klassen av medikamenter siden medikamentene målsøker kappen av HIV-virus, et

mål som varierer fra stamme til stamme og således hvor maksimale eksponeringsmultipler er ønsket. Fordi med et prodrug, mer av medikamentet vil bli absorbert og nå målet, kan pille-byrden, kostnadene for pasienten og doseringsintervaller reduseres. Identifikasjon av prodrug med disse egenskaper er vanskelig og hverken
 5 en enkel eller en klar metode for vellykket prodrug-design er beskrevet i litteraturen. Det er ingen klar beskrivelse i tidligere teknikk av hvilken prodrug-kjemi som skal anvendes eller som vil være mest effektiv. Den følgende omtale og data vil vise at prodrug beskrevet for foreliggende oppfinnelse virker overraskende godt. Det frigjør parentalt medikament ekstremt raskt og effektivt og forbedrer eksponering for nivåer
 10 som er høyere enn angitt for mange prodrug.

Anvendelse av prodrug-strategier eller metoder for markert å forbedre egenskapene til et medikament eller å overvinne en iboende mangel i de farmasøytiske eller farmakokinetiske egenskaper til et medikament kan anvendes under visse omstendigheter for markert å forbedre nytten av et medikament. Prodrug
 15 skiller seg fra formuleringer ved at kjemiske modifikasjoner fører til en fullstendig ny kjemisk enhet som ved administrering til pasienten, regenererer det parentale molekyl i kroppen. En myriade av prodrug-strategier eksisterer som gir valg for modulering av betingelsene for regenerering av stam-medikamentet, de fysiske, farmasøytiske eller farmakokinetiske egenskaper til prodrug-forbindelsen og funksjonaliteten til
 20 hvilken prodrug-modifikasjoner kan være tilknyttet. Imidlertid beskriver ingen av disse publikasjoner hvilken metode som kan anvendes som resulterer i det spesifikke prodrug oppfunnet her. Flere oversikter eller beskrivelser av prodrug-strategier er publisert og en ikke fullstendig liste er gitt nedenfor:

25 *Hydrolysis in Drug and prodrug Metabolism*. Richard Testa and Joachim Mayer, 2003 Wiley-VCH publisher, ISBN 3-906390-25-x.

Design of Prodrugs, Bundgard, H. Editor, Elsevier, Amsterdam, 1985.

Pharmacokinetics of drug targeting: specific implications for targeting via prodrugs.

Stella, V. J.; Kearney, A. S. Dep. Pharm. Chem., Univ. Kansas, Lawrence, KS,
 30 USA. Handbook of Experimental Pharmacology (1991), 100(Targeted Drug Delivery), 71-103. CODEN: HEPHD2 ISSN: 0171-2004. Journal; General Review written in English. CAN 116:158649 AN 1992:158649 CAPLUS (Copyright 2004 ACS on SciFinder (R)).

Prodrugs. Do they have advantages in clinical practice? Stella, V. J.; Charman, W. N. A.; Naringrekar, V. H. Dep. Pharm. Chem., Univ. Kansas, Lawrence, KS, USA. *Drugs* (1985), 29(5), 455-73. CODEN: DRUGAY ISSN: 0012-6667.
5 Journal; General Review written in English. CAN 103:115407 AN 1985:515407 CAPLUS (Copyright 2004 ACS on SciFinder (R)).

Trends in prodrug research. Stella, V. J.; Naringrekar, V. H.; Charman, W. N. A. Dep. Pharm. Chem., Univ. Kansas, Lawrence, KS, USA. *Pharmacy International*
10 (1984), 5(11), 276-9. CODEN: PHINDQ ISSN: 0167-3157. Journal; General Review written in English. CAN 102:72143 AN 1985:72143 CAPLUS (Copyright 2004 ACS on SciFinder (R)).

Mens noen teknologier er kjent å ha spesifikke anvendelser, dvs. for å
15 forbedre oppløselighet eller absorpsjon er for eksempel utvikling av prodrug, i stor grad, fortsatt en empirisk øvelse. Således må flere strategier eller kjemiske modifikasjoner vanligvis utforskes og de resulterende forbindelsene evalueres i biologiske modeller for å sikre og måle suksessen av prodrug strategier.

En vellykket prodrug-strategi krever at et kjemisk reaktivt sete i et molekyl
20 blir modifisert via tilsetning av prodrug-gruppen og at senere under de ønskede betingelser hos pasientene prodrug-gruppen vil avmaskeres og frigjøre det parentale medikament. Prodrug-molekylet må ha egnet stabilitet i en akseptabel doseform før dosering. I tillegg må frigjøringsmekanismen tillate at prodrug-forbindelsen regenererer det parentale medikament effektivt og med kinetikk som gir terapeutiske
25 nivåer av parentalt medikament ved sykdomsmålet. I våre molekyler representerer indol- eller azaindol-nitrogenet et akseptabelt bindingspunkt for en prodrug-gruppe.

Forslaget at en fosfatgruppe bundet ved en passende kjemi eller linker kan forbedre oral eksponering av et parentalt medikament er et konsept kjent på området. Imidlertid, som det vil bli beskrevet nedenfor, er det uforutsigbart å vite om
30 anvendelse av en fosfatgruppe for å skape et prodrug vil virke med en gitt medikament-substans. Fosfatgruppen endrer midlertidig de fysiske egenskaper til medikamentet og er således et prodrug som øker den vandige oppløselighet av det resulterende molekyl, inntil det blir spaltet av alkalisk fosfatase i kroppen eller annen

kjemisk reaksjon av en rasjonelt utformet linker. I for eksempel den følgende referanse konkluderer forfatterne med at fosfater *kan* forbedre oral effektivitet. I denne referanse viste et fosfatderivat av en alkoholgruppe i et dårlig vannoppløselig, lipofilt medikament bedre oral biotilgjengelighet enn to andre prodrug og syntes å
5 være fordelaktig fremfor det parentale molekyl som hadde lav oral biotilgjengelighet.

Evaluation of a targeted prodrug strategy to enhance oral absorption of poorly water-soluble compounds. Chan, O. Helen; Schmid, Heidi L.; Stilgenbauer, Linda A.; Howson, William; Horwell, David C.; Stewart, Barbra H. *Pharmaceutical Research* (1998), 15(7), 1012-1018.
10

To meget relevante og nyere artikler er publisert som beskriver vanskelighetene med identifisering av fosfat-prodrug med betydelige fordeler fremfor det parentale molekyl for oral anvendelse.

15 En artikkel betegnet “Absorption Rate Limit Considerations for Oral Phosphate Prodrugs” av Tycho Heimbach et. al. i *Pharmaceutical Research* 2003, Vol 20, nr. 6 sider 848-856 angir “The surprising inability to use phosphate prodrugs by the oral route prompted a study in a system being used to screen drug candidates for absorption potential.” Denne artikkel gir også oversikt over grunnene til at mange
20 fosfat-prodrug var uegnet for oral anvendelse og beskriver mange potensielle hastighets-begrensende faktorer i medikamentet-absorpsjons-prosessen. Artikkelen identifiserer også de få vellykkede anvendelser. Artikkelen forsøker å identifisere egenskaper som kan gjøre noen medikamenter egnet for oral levering som fosfat-prodrug, men budskapet er klart at dette fortsatt er en empirisk vitenskap. Dette er
25 fremhevet av konklusjonene i en andre artikkel av samme forfattere betegnet “Enzyme mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs” av Tycho Heimbach et. al i *International Journal of Pharmaceutics* 2003, 261, 81-92. Forfatterne angir i sammendraget at mange orale fosfat-prodrug har mislykkes i å forbedre hastigheten eller graden av absorpsjon sammenlignet med deres
30 uoppløselige parentale medikamenter. Rask parental medikament-dannelse via intestinal alkalisk fosfatase kan resultere i supermettede løsninger, hvilket fører til parental medikament-utfelling. Dette ville begrense nytten av orale fosfater. Konklusjonene i denne artikkel angir (sitat) “In summary, precipitation of parent

drugs from phosphate prodrugs can be enzyme mediated. Precipitation of certain drugs can also be observed for certain drugs in the Caco-2 model. Since induction times decrease and nucleation times increase with high supersaturation ratios, parent drugs can precipitate when targeted prodrugs concentration are much higher than than
 5 the parent drug's solubility ie for parent drugs with high supersaturation ratios. The extent to which a parent drug precipitates during conversion of the prodrug is dependent on the prodrug to parent conversion rates, prodrug effect on the precipitation of parent drug, and the solubilization of the parent drug." Som det kan sees av forfatterens konklusjon, er prosessen kompleks og er avhengig av mange
 10 faktorer som er umulig å forutsi på forhånd så som supermetningsforhold, hastighet av prodrug-omdannelser *in vivo* og evne til det intestinale miljø til å solubilisere parentale og prodrug blandinger.

De to referanser av Heimbach beskriver den kliniske status av fosfat-prodrug og beskriver de mange mislykkede og få vellykkede eksempler. Ett eksempel på
 15 klinisk svikt og ett eksempel på suksess er gitt nedenfor:

Etoposid® er et anticancer-medikament som blir administrert enten via iv eller orale ruter. Etoposidfosfat-prodrug blir anvendt klinisk, men disse strukturer skiller seg fra derivatene ifølge foreliggende søknad ettersom dette prodrug inneholder et fosfat dannet ved direkte binding til en fenolgruppe i stam-medikamentet.
 20 Hovedgrunnene for fremstilling av et fosfat-prodrug av medikamentet etoposid var for å forbedre intravenøs anvendelse via øket oppløselighet og reduksjon av tilsetningsmidler. Selv om fosfat-prodrugforbindelsen ble evaluert oralt både preklinisk og klinisk er den bare anvendt klinisk for iv-administrering.

25 *Synthesis of etoposide phosphate, BMY-40481: a water-soluble clinically active prodrug of etoposide.* Saulnier, Mark G.; Langley, David R.; Kadow, John F.; Senter, Peter D.; Knipe, Jay O.; Tun, Min Min; Vyas, Dolatrai M.; Doyle, Terrence W. Bristol-Myers Squibb Co., Wallingford, CT, USA. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (1994), 4(21), 2567-72 og referanser deri.

30 Som det kan sees fra de følgende to referanser, var fordelene med fosfat-gruppe for oral dosering ikke klar.

Randomized comparison of etoposide pharmacokinetics after oral etoposide

phosphate and oral etoposide. De Jong, R. S.; Mulder, N. H.; Uges, D. R. A.; Kaul, S.; Winograd, B.; Sleijfer, D.Th.; Groen, H. J. M.; Willemse, P. H. B.; van der Graaf, W. T. A.; de Vries, E. G. E. Department of Medical Oncology, University Hospital Groningen, Groningen, Neth. British Journal of Cancer (1997), 75(11), 1660-1666. Denne artikkel sammenlignet parentalt medikament og prodrug direkte og konkluderte med at oral etoposid-fosfat ikke gir en klinisk relevant fordel fremfor oral etoposid.

Etoposide bioavailability after oral administration of the prodrug etoposide

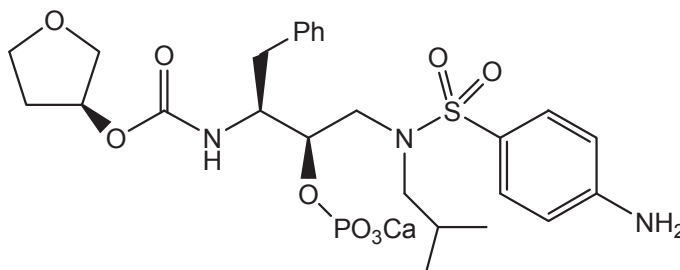
phosphate in cancer patients during a phase I study. Chabot, G. G.; Armand, J.-P.; Terref, C.; De Forni, M.; Abigeres, D.; Winograd, B.; Igwemezie, L.; Schacter, L.; Kaul, S.; et al. Department Medicine, Gustave-Roussy Institute, Villejuif, Fr. Journal of Clinical Oncology (1996), 14(7), 2020-2030.

Denne tidligere artikkel fant at sammenlignet med litteraturdata, hadde oral EP 19% høyere F-verdi sammenlignet med oral E både ved lave og høye doser. De konkluderte med at denne høyere F i E fra orale prodrug EP syntes å være en farmakologisk fordel som kunne være av potensiell farmakodynamisk betydning for dette medikament. Imidlertid ble den tidligere nevnte studie som nådde motsatte konklusjoner utført senere og det syntes at de direkte sammenligningsdata var mer gyldige. Således er tilsetning av en fosfat-gruppe for å forbedre oppløselighet ikke en garanti for forbedret oral effektivitet.

Et fosfat-prodrug av HIV-proteaseinhibitoren Amprenavir ble fremstilt og er den aktive bestanddel i det som nå er et forbedret medikament for oral anvendelse.

Dette er et eksempel på en sjelden suksess av denne metoden. Fosfatet er direkte bundet til en hydroksygruppe og tjener til å forbedre oppløselighet. Fosamprenavir alene eller i kombinasjon med en annen proteaseinhibitor ritonavir, som tjener til å hemme Cytochrome P450 3A4-mediert metabolsk deaktivering, tillater at pasienter kan motta færre piller, mindre piller (på grunn av behovet for mindre tilsetningsmidler) og å anvende et mindre hyppig doseringsregime. Klart er strukturen av Amprenavir betydelig forskjellig fra molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse og forutsier ikke suksess med andre klasser av medikamenter eller fosfat-linker kjemi. To referanser til Fosamprenavir er inkludert nedenfor men de nyeste

data kan finnes ved søking i en database velkjent på området så som IDDB (En kommersiell database betegnet Investigational Drugs Database produsert av Current Drugs Ltd.).



5

Fosamprenavir vertex Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline. [Erratum to document cited in CA138:130388]. Corbett, Amanda H.; Kashuba, Angela D. M. School of Pharmacy, The University of North Carolina Hospitals, Chapel Hill, NC, USA. Current Opinion in Investigational Drugs (PharmaPress Ltd.) (2002), 3(5), 824.

10

Fosamprenavir Vertex Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline. Corbett, Amanda H.; Kashuba, Angela D. M. School of Pharmacy, The University of North Carolina Hospitals, Chapel Hill, NC, USA. Current Opinion in Investigational Drugs (PharmaPress Ltd.) (2002), 3(3), 384-390.

15

Søking i litteraturen for eksempler som kan finnes listet opp under nøkkelordene “prodrug av indoler” eller “prodrug av azaindoler” identifiserer flere referanser som er beskrevet. Vi er ikke kjent med noen referanser hvor azaindol-prodrug ble fremstilt via anvendelse av en metyl-dihydrogenfosfat- (eller salt eller mono- eller diester av fosfatgruppen) gruppe bundet til N-1.

20

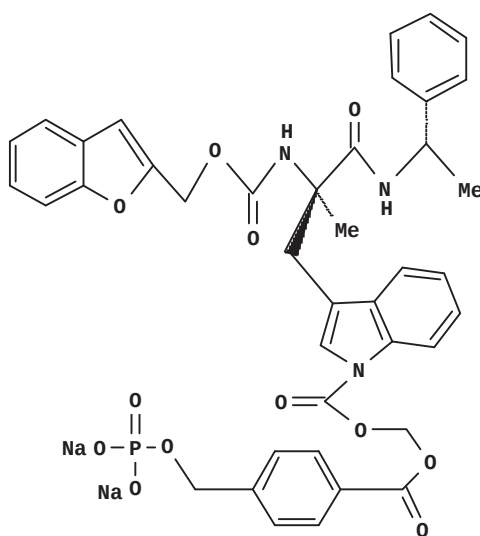
Når det gjelder indol-fosfat-prodrug beskriver publikasjon av Zhu et. al. en undersøkelse for å finne et effektivt fosfat-prodrug av PD 154075. I dette molekyl var enten det direkte indol-fosfat eller et metyl-dihydrogen-fosfat- eller salt-prodrug av indol-nitrogenet uegnet prodrug på grunn av langsom regenereringshastighet av det parentale molekyl. Således ble den nye og komplekse linker vist nedenfor utviklet for å innføre et solubiliserende fosfat.

25

Phosphate prodrugs of PD 154075. Zhu, Zhijian; Chen, Huai-Gu; Goel, Om P.;

Chan, O. Helen; Stilgenbauer, Linda A.; Stewart, Barbra H. Division of Warner-Lambert Company, Chemical Development, Parke-Davis Pharmaceutical Research, Ann Arbor, MI, USA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2000), 10(10), 1121-1124.

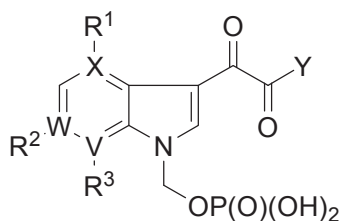
5



I

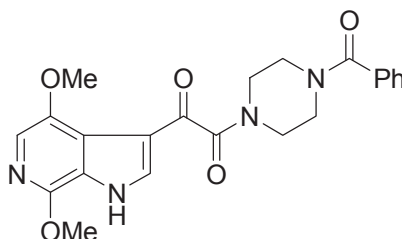
Mange av referansene beskriver utforming av prodrug for formål forskjellige fra å overvinne oppløsning-begrenset absorpsjon. Flere av prodrug-forbindelsene er ikke bundet til indol- eller azaindol-nitrogenet eller er utformet for å frigjøre radikal-
 10 mellomprodukter heller enn stam-medikamentet. Prodrug beskrevet på dette området og deres egenskaper gir ikke opplagte løsninger for å forbedre egenskapene til de parentale HIV-binding-inhibitorer.

Det er nå funnet at nye metyl-dihydrogen-fosfat-produg og farmasøytisk
 15 akseptable salter med den generelle struktur vist nedenfor er anvendelige som anti-HIV-midler med en ny mekanisme som for tiden ikke er anvendt for eksisterende medikamenter. Behovet for medikamenter med nye mekanismer er stort siden pasienter ikke har noen alternativer hvis de blir resistente mot de aktuelle medikament-klasser. I tillegg kan medikamenter med nye mekanismer anvendes i
 20 kombinasjon med kjente klasser av inhibitorer for å dekke fremkomst av resistens mot disse medikamenter siden stammer av resistente virus sannsynlig fortsatt er mottagelige for medikamenter med en alternativ mekanisme.



Vi har funnet at disse prodrug er mer vannoppløselige enn de parentale
 5 molekylar og raskt omdannes til de parentale etter oral dosering til gnagere eller i *in vitro* forsøk med humane enzymer eller vev. I tillegg, i én oral dose-
 eskaleringsstudie, ga et prodrug overraskende forbedringer i medikament-eksponering
 (AUC) og maksimum konsentrasjon (Cmaks) ettersom dosen øket. Disse prediktive
 undersøkelser indikerer at disse prodrug gir fordeler i hunder og mennesker.

10

**IVa**

Stamforbindelsen **IVa** er undersøkt i humane kliniske forsøk. Forbindelsen
 ble dosert til friske humane frivillige. En kurve av eksponering vs dose er vist i Figur
 15 1.

Som det kan sees er enkle doser av en kapselformulering (røde triangler)
 rangert i størrelse fra 200-2400 mg med 200 mg økninger. Det er også lett klart fra
 orale AUC, at økninger i medikament-eksponering øket meget langsommere og
 mindre enn proporsjonalt med dosen. Forskjellene eller økning i eksponering over
 20 800 mg er faktisk minimal. Med doseforhold på 1:2:4:6:9:12 for kapsel-behandling
 under fastede betingelser er forholdene av gjennomsnittlige Cmaks- og AUC-verdier
 henholdsvis 1:1,3:2,4:2,3:2,1:2,7 og 1:1,5:2,3:2,0:1,9:2,4. Mellom 200-800 mg
 doseområde er økningene i systemisk eksponering dose-relatert selv om mindre enn
 dose-proporsjonal, mens slik eksponering er dose-uavhengig over en dose på 800 mg.
 25 Dette fenomen indikerer at absorpsjonen av forbindelse **IVa** med kapsel-

formuleringen anvendt kan mettes under fastede betingelser.

Dose-proporsjonalitet ved systemisk eksponering synes å være meget bedre presentert under matede betingelser (høyfett måltid) ettersom forhold av C_{maks} og AUC er henholdsvis 1,6 og 1,5, når doseforholdet er 1:2,3 (800 mg vs. 1800 mg).

5 Som det kan sees ved å sammenligne den enkle 200 mg dose av en løsning av IVa (mørkerøde kvadrater) med den for 200 mg kapseldose, var eksponering fra løsningen høyere. Dosering med en løsning øket Forbindelse **IVa** eksponering. C_{maks} og AUC av løsningen var henholdsvis omtrent 8- og 3-ganger de til kapselen (200 mg). Den relative biotilgjengelighet (32%) av kapselen til løsningsformuleringen indikerer
10 at absorpsjon er oppløsningshastighet-begrenset, hvilket indikerer et potensiale for å forbedre systemisk eksponering ved å forbedre formuleringen.

Et høyfett måltid hadde en positiv mat-effekt på forbindelsen. C_{maks} etter matet behandling var omtrent 2,6 og 4,6 ganger for henholdsvis 800 og 1800 mg doser, til de med fastet behandling. AUC etter matet behandling var omtrent 2,5 og
15 4,7 ganger for henholdsvis 800 og 1800 mg doser, i forhold til de med fastet behandling. De relative biotilgjengelighets- (matet vs. fastet) verdier var 293% og 509% for henholdsvis 800 mg og 1800 mg doser. Median T_{maks} ble endret fra 1,25 eller 2 (fastet) til 4 (matet) timer.

For 800 mg kapsel med mat er gjennomsnittlig plasmakonsentrasjon 1001 og
20 218 ng/ml henholdsvis 8 og 12 timer etter dosering. Resultatene støttet et q12 timer eller q8 timer doseringsregime for en målrettet C_{min} -verdi på minst 200 ng/ml etter multiple doser. Denne verdien ble valgt basert på prekliniske data. En ytterligere oppsummering av noen av disse data presentert som et stolpediagram er vist i det andre stolpediagram i Figur 2B.

25

MULTIPPEL DOSESTUDIE I FRISKE MENNESKER

En placebo-kontrollert, stigende multipel-dose studie for å bedømme sikkerhet, tolerabilitet og farmakokinetikk av forbindelse **IVa** hos friske mennesker
30 ble utført. Dosering ble fortsatt med 12 timers intervaller i 14 dager. Som oppsummering viste de preliminaire PK-resultater at, etter enkle og multiple Q12H doser av forbindelse **IVa**, er eksponeringen generelt dose-proporsjonal over

doseområder på 400 til 1200 mg og 400 til 800 mg med henholdsvis høyfett måltid og lett måltid, idet eksponeringen synes å være dose-uavhengig over disse dosenivåer med de forskjellige måltidtyper, akkumuleringen er lav til moderat (opptil ~1,5 ganger) og at det er en døgnvariasjon i eksponering ved at eksponeringen er høyere etter en kveldsdose enn etter en morgendose. Således ble eksponeringen bedre når dosering ble kombinert med et høyfett-måltid og eksponeringsøkning med dose ble høyere med et høyfett-måltid.

Dette er lignende resultatene oppnådd i enkel-dose-studien ovenfor.

MULTIPPEL DOSESTUDIE I HIV-PASIENTER

Basert på eksponeringsdata fra undersøkelsene i normale frivillige, ble en effektivitetsstudie utført for HIV-pasienter. En innledende beskrivelse av disse data er gjort i et foredrag og publisert sammendrag. "Antiviral Activity, Safety and Tolerability of a Novel, Oral Small-Molecule HIV-1 Attachment Inhibitor, IVa, in HIV-1-Infected Subjects" G. Hanna, J. Lalezari, J. Hellinger, D. Wohl, T. Masterson, W. Fiske, J. Kadow, P-F. Lin, M. Giordano, R. Colonna, D. Grasela. Abstract J-32, 02/11/2004, 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), San Francisco, CA. Studieutformingen omfattet HIV+ voksne som enten var antiretroviral terapi-naïve eller av antiretroviral terapi i ≥ 16 uker. Deres CD4-tellinger måtte være ≥ 250 celler/mm³ og plasma HIV-1 RNA måtte være i området 5,000-500,000 c/ml. Det var 15 individer for hver dose og forholdet av pasienter som mottok medikament:placebo var 4:1.

Den placebo-kontrollerte, sekvensielle undersøkelse av **IVa** anvendte en innledende dose på 800 mg PO hver 12 timer fulgt av en andre dose på 1800 mg PO administrert hver 12 timer. Det er viktig å bemerke at medikamentet ble administrert i en kapsel og i kombinasjon med et høyfett-måltid for å øke eksponering og plasma-nivåer. Studiemedikament ble administrert i 7 dager og om morgenen på dag 8. Individene ble fulgt i 14 dager.

Studieresultater (for 18 av de 24 pasienter som mottok Medikament IVa)

		Forbindelse IVa	Placebo
Dag 8 forandring i HIV RNA over 14 dager, log ₁₀ c/ml	Gj.snitt (SD)	-0,72 (0,51)	-0,02 (0,40)

	Område	+0,34 til -1,37	+0,45 til -0,26
Maksimal forandring i HIV RNA over 14days, log ₁₀ c/ml	Gj.snitt (SD)	-1,00 (0,50)	-0,30 (0,08)
	Område	-0,32 til -1,60	-,22 til -0,38
Dag 8 forandring i CD4, celler/mm ³	Gj.snitt (SD)	106 (151)	6 (57)
	Område	-214 til +272	-35 til +47

Studieresultater (for 18 av de 24 pasienter som mottok medikament IVa)

		Forbindelse IVa	Placebo
Maksimal forandring i HIV RNA over 14 dager n (%)	>0,5 log ₁₀ c/ml	8(67%)	0
	>1,0 log ₁₀ c/ml	7 (58%)	0
	>1,5 log ₁₀ c/ml	3 (25%)	

1. Som det kan sees av dataene for 800 mg doseringsnivået i kombinasjon med et høyfett-måltid, ble betydelig antiviral aktivitet observert. Imidlertid hadde bare 58% av pasientene >1,0 log fall i viral belastning. En mer robust antiviral respons ble sett med 1800 mg doseringsregimet med et høyfett-måltid hvor den gjennomsnittlige respons var -,96 log₁₀ fall i viral belastning. Disse data viser at dette medikament har betydelig antiviral aktivitet i doser på 800 mg og 1800 mg (og således de mellom) hver 12 timer i kombinasjon med et høyfett-måltid og derfor kan spille en betydelig rolle i kombinasjonsterapi. En oppdatert oppsummering av resultatene med BMS-043 hos mennesker kan oppnås ved å se sammendraget eller slides fra den muntlige presentasjon: "Antiviral Activity, Safety, and Tolerability of a Novel, Oral Small-Molecule HIV-1 Attachment Inhibitor, BMS-488043, in HIV-1-Infected Subjects" G. Hanna, J. Lalezari, J. Hellinger, D. Wohl, T. Masterson, W. Fiske, J. Kadow, P-F. Lin, M. Giordano, R. Colonno, D. Grasela. Abstract J-32, 02/11/2004, 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), San Francisco, CA.

Uheldigvis vil det være utenkelig å levere dette medikamentet kronisk over mange måneder som involverer administrering av totalt 9 kapsler på 200 mg hver, to ganger pr. dag i kombinasjon med et høyfett-måltid av opplagte helsegrunner så en ny

formulering vil være nødvendig som gir øket eksponering fra en lavere dose og som eliminerer behovet for et høyfett-måltid.

Således viser kliniske data at en metode for å forbedre eksponering av dette medikament fra lavere doser og i fravær av et høyfett-måltid er nødvendig.

5 Således forutsier de innledende data for prodrug ifølge foreliggende oppfinnelse overraskende at de vil forbedre eksponering av molekyler så som IVa og levere stam-medikamentet i konsentrasjoner som vil tillate at medikamentene anvendes i fravær av høyfett-måltider, med lavere kapsel-byrde og kronisk som en komponent i antiretroviral terapi.

10 Innledende data oppnådd fra dosering av faststoff kapsler av enten prodrug Iab (lysinsalt) eller faststoff parentalt molekyl (IVa) til hunder er oppsummert i det første stolpediagram Figur 2A i Figur 2. Som det kan sees, etter dosering av prodrug Iab (mono-lysinsalt) enten til fastede eller hunder matet med høyfett-måltid, er eksponeringen overraskende høy sammenlignet med dosering av parentalt molekyl.

15 Effekten av matet vs fastet tilstand er også minimal om noen som helst for prodrug som allikevel har en opplagt effekt på eksponeringen etter dosering av det faste parentale molekyl. Således viser eksponering av det parentale molekyl etter dosering av prodrug, overraskende ingen avhengighet av et høyfett-måltid, hvilket forutsier mer konsistente eksponeringsnivåer etter dosering enn de fra parentalt molekyl.

20 Stolpediagrammet i Figur 2B oppsummerer de tidligere beskrevne humane data for parentalt molekyl IVa og viser avhengigheten av eksponering for molekylet for høyfett-måltid, de ikke-proporsjonale økninger i eksponering vs dose og den bedre eksponering fra dosering av en løsning heller enn en fast formulering. Som beskrevet nedenfor, viser denne oppløsnings- eller absorpsjons-hastighet begrenset eksponering

25 som i preklinisk modeller synes å være overraskende forbedret ved anvendelse av fosfat-prodrug-forbindelsen. Anvendelse av fosfat-prodrug øket også eksponering hos fastede hunder vs parentalt for to andre prodrug. Detaljer om disse forsøk er inneholdt i den eksperimentelle seksjon. I tillegg demonstrerer detaljer fra forskjellige undersøkelser i rotter, hunder og aper for to ytterligere prodrug-eksempler

30 og i rotter for ytterligere to prodrug den overraskende nytte av disse prodrug for å øke eksponering over den oppnådd med parentalt molekyl i doser som korrelerer med de sannsynlige å være nyttige for behandling og hemning av HIV viral replikasjon.

REFERANSER SITERT

PATENT-DOKUMENTER

1. Greenlee, W.J.; Srinivasan, P.C. Indole reverse transcriptase inhibitors. U.S. Patent 5,124,327.
- 5 2. Williams, T.M.; Ciccarone, T.M.; Saari, W. S.; Wai, J.S.; Greenlee, W.J.; Balani, S.K.; Goldman, M.E.; Theohrides, A.D. Indoles as inhibitors of HIV reverse transcriptase. Europeisk Patent 530907.
- 10 3. Romero, D.L.; Thomas, R.C.; Preparation of substituted indoles as anti-AIDS pharmaceuticals. PCT WO 93 / 01181.
4. Boschelli, D.H.; Connor, D.T.; Unangst, P.C. Indole-2-carboxamides as inhibitors of cell adhesion. U.S. Patent 5,424,329.
- 15 5. (a) Mantovanini, M.; Melillo, G.; Daffonchio, L. Tropyl 7-azaindol-3-ylcarboxyamides as antitussive agents. PCT WO 95/04742 (Dompe Spa). (b) Cassidy, F.; Hughes, I.; Rahman, S.; Hunter, D. J. Bisheteroaryl-carbonyl and carboxamide derivatives with 5HT 2C/2B antagonists activity. PCT WO 96/11929.
- 20 (c) Scherlock, M. H.; Tom, W. C. Substituted 1H-pyrrolopyridine-3-carboxamides. U. S. Patent 5,023,265. (d) Hutchison, D. R.; Martinelli, M. J.; Wilson, T. M. Preparation or pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as sPLA2 inhibitors PCT WO 00/00201.

ANDRE PUBLIKASJONER

- 25 6. Larder, B.A.; Kemp, S.D. Multiple mutations in the HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science*, **1989**, 246,1155-1158.
- 30 7. Gulick, R.M. Current antiretroviral therapy: An overview. *Quality of Life Research*, **1997**, 6, 471-474.

8. Kuritzkes, D.R. HIV resistance to current therapies. *Antiviral Therapy*, **1997**, 2 (Supplement 3), 61-67.
9. Morris-Jones, S.; Moyle, G.; Easterbrook, P.J. Antiretroviral therapies in
5 HIV-1 infection. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **1997**, 6(8),1049-1061.
10. Schinazi, R.F.; Larder, B.A.; Mellors, J.W. Mutations in retroviral genes associated with drug resistance. *International Antiviral News*, **1997**, 5, 129-142.
- 10 11. Vacca, J.P.; Condra, J.H. Clinically effective HIV-1 protease inhibitors. *Drug Discovery Today*, **1997**, 2, 261-272.
12. Flexner, D. HIV-protease inhibitors. *Drug Therapy*, **1998**, 338, 1281-1292.
- 15 13. Berkhout, B. HIV-1 evolution under pressure of protease inhibitors: Climbing the stairs of viral fitness. *J. Biomed. Sci.*, **1999**, 6, 298-305.
14. Ren, S.; Lien, E. J. Development of HIV protease inhibitors: A survey. *Prog. Drug Res.*, **1998**, 51, 1-31.
- 20 15. Pedersen, O.S.; Pedersen, E.B. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: the NNRTI boom. *Antiviral Chem. Chemother.* **1999**, 10, 285-314.
16. (a) De Clercq, E. The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Antiviral Research*, **1998**, 38, 153-179.
- 25 (b) De Clercq, E. Perspectives of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV infection. *IL. Farmaco*, **1999**, 54, 26-45.
17. Font, M.; Monge, A.; Cuartero, A.; Elorriaga, A.; Martinez-Irujo, J.J.; Alberdi, E.; Santiago, E.; Prieto, I.; Lasarte, J.J.; Sarobe, P. and Borrás, F. Indoles and pyrazino[4,5-*b*]indoles as nonnucleoside analog inhibitors of HIV-1 reverse
30 transcriptase. *Eur. J. Med. Chem.*, **1995**, 30, 963-971.

18. Romero, D.L.; Morge, R.A.; Genin, M.J.; Biles, C.; Busso, M.; Resnick, L.; Althaus, I.W.; Reusser, F.; Thomas, R.C and Tarpley, W.G. Bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) reverse transcriptase inhibitors: structure-activity relationships of novel substituted indole analogues and the identification of 1-[(5-methanesulfonamido-1H-indol-2-yl)-carbonyl]-4-[3-[1-methylethyl)amino]-pyridinyl]piperazine momomethansulfonate (U-90152S), a second generation clinical candidate. *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 1505-1508.
19. Young, S.D.; Amblard, M.C.; Britcher, S.F.; Grey, V.E.; Tran, L.O.; Lumma, W.C.; Huff, J.R.; Schleif, W.A.; Emini, E.E.; O'Brien, J.A.; Pettibone, D.J. 2-Heterocyclic indole-3-sulfones as inhibitors of HIV-reverse transcriptase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 5, 491-496.
20. Genin, M.J.; Poel, T.J.; Yagi, Y.; Biles, C.; Althaus, I.; Keiser, B.J.; Kopta, L.A.; Friis, J.M.; Reusser, F.; Adams, W.J.; Olmsted, R.A.; Voorman, R.L.; Thomas, R.C. and Romero, D.L. Synthesis and bioactivity of novel bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) reverse transcriptase inhibitors: structure-activity relationships and increased metabolic stability of novel substituted pyridine analogs. *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 5267-5275.
21. Silvestri, R.; Artico, M.; Bruno, B.; Massa, S.; Novellino, E.; Greco, G.; Marongiu, M.E.; Pani, A.; De Montis, A and La Colla, P. Synthesis and biological evaluation of 5H-indolo[3,2-b][1,5]benzothiazepine derivatives, designed as conformationally constrained analogues of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor L-737,126. *Antiviral Chem. Chemother.* **1998**, 9, 139-148.
22. Fredenhagen, A.; Petersen, F.; Tintelnot-Blomley, M.; Rosel, J.; Mett, H and Hug, P. J. Semicochliodinol A and B: Inhibitors of HIV-1 protease and EGF-R protein Tyrosine Kinase related to Asterriquinones produced by the fungus *Chrysosporium nardarium*. *Antibiotics*, **1997**, 50, 395-401.

23. (a) Kato, M.; Ito, K.; Nishino, S.; Yamakuni, H.; Takasugi, H. New 5-HT₃ (Serotonin-3) receptor antagonists. IV. Synthesis and structure-activity relationships of azabicycloalkaneacetamide derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, **1995**, *43*, 1351-1357. (b) Levacher, V.; Benoit, R.; Duflos, J.; Dupas, G.; Bourguignon, J.;
5 Queguiner, G. Broadening the scope of NADH models by using chiral and non chiral pyrrolo [2,3-*b*] pyridine derivatives. *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 429-440.
24. (a) Resnyanskaya, E. V.; Tverdokhlebov, A. V.; Volovenko, Y. M.; Shishkin, O. V.; Zubatyuk, R. I. A simple synthesis of 1-acyl-3-aryl-3H-
10 pyrrolo[2',3',:4,5]pyrimido[6,1-*b*]benzothiazol-6-ium-2-olates: Betainic derivatives of a novel heterocyclic system. *Synthesis*, **2002**, *18*, 2717-2724. (b) Cook, P. D.; Castle, R. N. Pyrrolopyridazines. 1. Synthesis and reactivity of [2,3-*d*]pyridazine 5-oxides. *J. Het. Chem.* **1973**, *10*(4), 551-557.
- 15 25. Shadrina, L.P.; Dormidontov, Yu.P.; Ponomarev, V.G.; Lapkin, I.I. Reactions of organomagnesium derivatives of 7-aza- and benzoindoles with diethyl oxalate and the reactivity of ethoxalylindoles. *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, **1987**, 1206-1209.
26. Sycheva, T.V.; Rubtsov, N.M.; Sheinker, Yu.N.; Yakhontov, L.N. Some
20 reactions of 5-cyano-6-chloro-7-azaindoles and lactam-lactim tautomerism in 5-cyano-6-hydroxy-7-azaindoles. *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, **1987**, 100-106.
27. (a) Desai, M.; Watthey, J.W.H.; Zuckerman, M. A convenient preparation of 1-aroypiperazines. *Org. Prep. Proced. Int.*, **1976**, *8*, 85-86. (b) Adamczyk, M.;
25 Fino, J.R. Synthesis of procainamide metabolites. N-acetyl desethylprocainamide and desethylprocainamide. *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 470-474. (c) Rossen, K.; Weissman, S.A.; Sager, J.; Reamer, R.A.; Askin, D.; Volante, R.P.; Reider, P.J. Asymmetric Hydrogenation of tetrahydropyrazines: Synthesis of (*S*)-piperazine 2-tert-butylcarboxamide, an intermediate in the preparation of the HIV protease
30 inhibitor Indinavir. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 6419-6422. (d) Wang, T.; Zhang, Z.; Meanwell, N.A. Benzoylation of Dianions: Preparation of mono-Benzoylated Symmetric Secondary Diamines. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 7661-7662.

28. Li, H.; Jiang, X.; Ye, Y.-H.; Fan, C.; Romoff, T.; Goodman, M. 3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-one (DEPBT): A new coupling reagent with remarkable resistance to racemization. *Organic Lett.*, **1999**, *1*, 91-93.
- 5 29. Harada, N.; Kawaguchi, T.; Inoue, I.; Ohashi, M.; Oda, K.; Hashiyama, T.; Tsujihara, K. Synthesis and antitumor activity of quaternary salts of 2-(2'-oxoalkoxy)-9-hydroxyellipticines. *Chem. Pharm. Bull.*, **1997**, *45*, 134-137.
30. Schneller, S. W.; Luo, J.-K. Synthesis of 4-amino-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (1,7-Dideazaadenine) and 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-ol (1,7-Dideazahypoxanthine). *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*, 4045-4048.
- 10 31. Shiotani, S.; Tanigochi, K. Furopyridines. XXII [1]. Elaboration of the C-substituent *alpha* to the heteronitrogen atom of furo[2,3-*b*]-, -[3.2-*b*]-, -[2.3-*c*]- and -[3,2-*c*]pyridine. *J. Het. Chem.*, **1997**, *34*, 901-907.
- 15 32. Minakata, S.; Komatsu, M.; Ohshiro, Y. Regioselective functionalization of 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine via its N-oxide. *Synthesis*, **1992**, 661-663.
33. Klemm, L. H.; Hartling, R. Chemistry of thienopyridines. XXIV. Two transformations of thieno[2,3-*b*]pyridine 7-oxide (1). *J. Het. Chem.*, **1976**, *13*, 1197-1200.
- 20 34. Antonini, I.; Claudi, F.; Cristalli, G.; Franchetti, P.; Crifantini, M.; Martelli, S. Synthesis of 4-amino-1- β -D-ribofuranosyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine (1-Deazatubercidin) as a potential antitumor agent. *J. Med. Chem.*, **1982**, *25*, 1258-1261.
- 25 35. (a) Regnouf De Vains, J.B.; Papet, A.L.; Marsura, A. New symmetric and unsymmetric polyfunctionalized 2,2'-bipyridines. *J. Het. Chem.*, **1994**, *31*, 1069-1077. (b) Miura, Y.; Yoshida, M.; Hamana, M. Synthesis of 2,3-fused quinolines from 3-substituted quinoline 1-oxides. Part II, *Heterocycles*, **1993**, *36*, 1005-1016. (c) Profft, V.E.; Rolle, W. Über 4-merkaptoverbindungen des 2-methylpyridins. *J. Prakt. Chem.*, **1960**, 283 (11), 22-34.
- 30

36. Nesi, R.; Giomi, D.; Turchi, S.; Tedeschi, P., Ponticelli, F. A new one step synthetic approach to the isoxazolo[4,5-*b*]pyridine system. *Synth. Comm.*, **1992**, 22, 2349-2355.
- 5 37. (a) Walser, A.; Zenchoff, G.; Fryer, R.I. Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. 75. 7-Hydroxyaminobenzodiazepines and derivatives. *J. Med. Chem.*, **1976**, 19, 1378-1381. (b) Barker, G.; Ellis, G.P. Benzopyrone. Part I. 6-Amino- and 6-hydroxy-2-substituted chromones. *J. Chem. Soc.*, **1970**, 2230-2233.
- 10 38. Ayyangar, N.R.; Lahoti, R J.; Daniel, T. An alternate synthesis of 3,4-diaminobenzophenone and mebendazole. *Org. Prep. Proced. Int.*, **1991**, 23, 627-631.
39. Mahadevan, I.; Rasmussen, M. Ambident heterocyclic reactivity: The
15 alkylation of pyrrolopyridines (azaindoles, diazaindenes). *Tetrahedron*, **1993**, 49, 7337-7352.
40. Chen, B.K.; Saksela, K.; Andino, R.; Baltimore, D. Distinct modes of human immunodeficiency type 1 proviral latency revealed by superinfection of
20 nonproductively infected cell lines with recombinant luciferase-encoding viruses. *J. Virol.*, **1994**, 68, 654-660.
41. Bodanszky, M.; Bodanszky, A. "The Practice of Peptide Synthesis" 2nd Ed., Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, Tyskland, **1994**.
- 25 42. Albericio, F. *et al.* *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9678.
43. Knorr, R. *et al.* *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927.
- 30 44. (a) Jaszay Z. M. *et al.* *Synth. Commun.*, **1998** 28, 2761 and references cited therein; (b) Bernasconi, S. *et al.* *Synthesis*, **1980**, 385.

45. (a) Jaszay Z. M. *et al. Synthesis*, **1989**, 745 and references cited therein; (b) Nicolaou, K. C. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1669.
46. Ooi, T. *et al. Synlett.* **1999**, 729.
- 5 47. Ford, R. E. *et al. J. Med. Chem.* **1986**, 29, 538.
48. (a) Yeung, K.-S. *et al. Bristol-Myers Squibb Unpublished Results.* (b) Wang, W. *et al. Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2501.
- 10 49. Brook, M. A. *et al. Synthesis*, **1983**, 201.
50. Yamazaki, N. *et al. Tetrahedron Lett.* **1972**, 5047.
- 15 51. Barry A. Bunin "The Combinatorial Index" 1998 Academic Press, San Diego / London sider 78-82.
52. Richard C. Larock Comprehensive Organic Transormations 2nd Ed. 1999, John Wiley and Sons New York.
- 20 53. M.D. Mullican *et.al. J.Med. Chem.* **1991**, 34, 2186-2194.
54. Protective groups in organic synthesis 3rd ed. / Theodora W. Greene and Peter G.M. Wuts. New York : Wiley, 1999.
- 25 55. Katritzky, Alan R. Lagowski, Jeanne M. The principles of heterocyclic Chemistry New York : Academic Press, 1968.
56. Paquette, Leo A. Principles of modern heterocyclic chemistry New York: Benjamin.
- 30 57. Katritzky, Alan R.; Rees, Charles W.; Comprehensive heterocyclic

chemistry: the structure, reactions, synthesis, and uses of heterocyclic compounds 1st ed. Oxford (Oxfordshire); New York: Pergamon Press, 1984. 8 v.

58. Katritzky, Alan R. Handbook of heterocyclic 1st ed. Oxford (Oxfordshire); New York: Pergamon Press, 1985.

59. Davies, David I. Aromatic Heterocyclic Oxford; New York: Oxford University Press, 1991.

10 60. Ellis, G. P. Synthesis of fused Chichester [Sussex]; New York: Wiley, c1987-c1992. Chemistry of heterocyclic compounds; v. 47.

61. Joule, J. A. Mills, K., Smith, G. F. Heterocyclic Chemistry, 3rd ed. London; New York: Chapman & Hall, 1995.

15

62. Katritzky, Alan R., Rees, Charles W., Scriven, Eric F. V. Comprehensive heterocyclic chemistry II: a review of the literature 1982-1995.

63. The structure, reactions, synthesis, and uses of heterocyclic compounds 1st ed. 20 Oxford; New York: Pergamon, 1996. 11 v. in 12: ill.; 28 cm.

64. Eicher, Theophil, Hauptmann, Siegfried. The chemistry of heterocycles : structure, reactions, syntheses, and applications Stuttgart; New York: G. Thieme, 1995.

25

65. Grimmett, M. R. Imidazole and benzimidazole Synthesis London; San Diego: Academic Press, 1997.

66. Advances in heterocyclic chemistry. Published in New York by Academic 30 Press, starting in 1963-present.

67. Gilchrist, T. L. (Thomas Lonsdale) Heterocyclic chemistry 3rd ed. Harlow, Essex: Longman, 1997, 414 p: ill.; 24 cm.

68. Farina, Vittorio; Roth, Gregory P. Recent advances in the Stille reaction;
Adv. Met.-Org. Chem. **1996**, 5, 1-53.
- 5 69. Farina, Vittorio; Krishnamurthy, Venkat; Scott, William J. The Stille
reaction; *Org. React. (N. Y.)* (1997), 50, 1-652.
70. Stille, J. K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 508-524.
- 10 71. Norio Miyaura and Akiro Suzuki *Chem Rev.* **1995**, 95, 2457.
72. Home, D.A. *Heterocycles* **1994**, 39, 139.
73. Kamitori, Y. et.al. *Heterocycles*, **1994**, 37(1), 153.
- 15 74. Shawali, J. *Heterocyclic Chem.* **1976**, 13, 989.
75. a) Kende, A.S.et al. *Org. Photochem. Synth.* **1972**, 1, 92. b) Hanks, L.V.;
Biochem. Prep. **1966**, 11, 63. c) *Synth. Meth.* 22, 837.
- 20 76. Hulton et. al. *Synth. Comm.* **1979**, 9, 789.
77. Pattanayak, B.K. et.al. *Indian J. Chem.* **1978**, 16, 1030.
- 25 78. *Chemische Berichte* **1902**, 35, 1545.
79. *Chemische Berichte* Ibid **1911**, 44, 493.
80. Moubarak, I., Vessiere, R. *Synthesis* **1980**, Vol. 1, 52-53.
- 30 81. *Ind J. Chem.* **1973**, 11, 1260.
82. Roomi et.al. *Can J. Chem.* **1970**, 48, 1689.

83. Sorrel, T.N. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1589.
84. Nitz, T.J. et. al. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 5828-5832.
- 5 85. Bowden, K. et.al. *J. Chem. Soc.* **1946**, 953.
86. Nitz, T.J. et. al. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 5828-5832.
- 10 87. Scholkopf et. al. *Angew. Int. Ed. Engl.* **1971**, 10(5), 333.
88. (a) Behun, J. D.; Levine, R. *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 3379. (b) Rossen, K.; Weissman, S.A.; Sager, J.; Reamer, R.A.; Askin, D.; Volante, R.P.; Reider, P.J. Asymmetric Hydrogenation of tetrahydropyrazines: Synthesis of (S)-piperazine 2-
15 tert-butylcarboxamide, an intermediate in the preparation of the HIV protease inhibitor Indinavir. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 6419-6422. (c) Jenneskens, L. W.; Mahy, J.; den Berg, E. M. M. de B.-v.; Van der Hoef, I.; Lugtenburg, J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1995**, 114, 97.
- 20 89. Wang, T.; Zhang, Z.; Meanwell, N.A. Benzoylation of Dianions: Preparation of mono-Benzoylated Symmetric Secondary Diamines. *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 7661-7662.
90. (a) Adamczyk, M.; Fino, J.R. Synthesis of procainamide metabolites. N-acetyl desethylprocainamide and desethylprocainamide. *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, 28, 470-474. (b) Wang, T.; Zhang, Z.; Meanwell, N.A. Regioselective mono-Benzoylation of Unsymmetrical Piperazines. *J. Org. Chem.*, in press.
- 25 91. Masuzawa, K.; Kitagawa, M.; Uchida, H. *Bull Chem. Soc. Jpn.* **1967**, 40, 244-245.
- 30 92. Furber, M.; Cooper, M. E.; Donald, D. K. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1351-1354.

93. Blair, Wade S.; Deshpande, Milind; Fang, Haiquan; Lin, Pin-fang; Spicer, Timothy P.; Wallace, Owen B.; Wang, Hui; Wang, Tao; Zhang, Zhongxing; Yeung, Kap-sun. Preparation of antiviral indoleoxoacetyl piperazine derivatives US patent 6,469,006. Preparation of antiviral indoleoxoacetyl piperazine derivatives. PCT Int. Appl. (PCT/US00/14359), WO 0076521 A1, filed May 24, 2000, published December 21, 2000.
94. Wang, Tao; Wallace, Owen B.; Zhang, Zhongxing; Meanwell, Nicholas A.; Bender, John A. Antiviral azaindole derivatives. U.S. patent 6476034 and Wang, Tao; Wallace, Owen B.; Zhang, Zhongxing; Meanwell, Nicholas A.; Bender, John A. Preparation of antiviral azaindole derivatives. PCT Int. Appl. (PCT/US01/02009), WO 0162255 A1, filed January 19, 2001, published August 30, 2001.
95. Wallace, Owen B.; Wang, Tao; Yeung, Kap-Sun; Pearce, Bradley C.; Meanwell, Nicholas A.; Qiu, Zhilei; Fang, Haiquan; Xue, Qiufen May; Yin, Zhiwei. Composition and antiviral activity of substituted indoleoxoacetic piperazine derivatives. U.S. Patentsøknad nummer 10/027,612 innlevert 19. desember 2001, som er en CIP-søknad av U.S. nummer 09/888,686 innlevert 25. juni 2001 (svarende til PCT Int. søknad. (PCT/US01/20300), WO 0204440 A1, innlevert 26. juni 2001, publisert 17. januar 2002.
96. J. L. Marco, S. T. Ingate, and P. M. Chinchon Tetrahedron 1999, 55, 7625-7644.
97. C. Thomas, F. Orecher, and P. Gmeiner Synthesis 1998, 1491.
98. M. P. Pavia, S. J. Lobbestael, C. P. Taylor, F. M. Hershenson, and D. W. Miskell.
99. Buckheit, Robert W., Jr. Expert Opinion on Investigational Drugs 2001, 10(8), 1423-1442.

100. Balzarini, J.; De Clercq, E.. *Antiretroviral Therapy* 2001, 31-62.
101. E. De clerq *Journal of Clinical Virology*, 2001, 22, 73-89.
- 5 102. Merour, Jean-Yves; Joseph, Benoit. *Curr. Org. Chem.* (2001), 5(5), 471-506.
103. T. W. von Geldern et al. *J. Med. Chem* 1996, 39, 968.
- 10 104. M. Abdaoui et al. *Tetrahedron* 2000, 56, 2427.
105. W. J. Spillane et al. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1982, 3, 677.
106. Wang, Tao; Zhang, Zhongxing; Meanwell, Nicholas A.; Kadow, John F.; Yin,
15 Zhiwei; Xue, Qiufen May. (USA). *Composition and antiviral activity of substituted azaindoleoxoacetic piperazine derivatives*. U.S. Pat. søkn. Publ. (2003), US 20030207910 A1 publisert 6. Nov 2003 som er U.S. Patent-søknad nummer 10/214,982 innlevert 7. august 2002, som er en CIP-søknad av U.S. nummer 10/038,306 innlevert 2. januar 2002 (svarende til PCT Int. søkn. (PCT/US02/00455)),
20 WO 02/062423 A1, innlevert 2. januar 2002, publisert 15. august 2002.
107. a) Nickel, Bernd; Szelenyi, Istvan; Schmidt, Jurgen; Emig, Peter; Reichert, Dietmar; Gunther, Eckhard; Brune, Kay. *Preparation of indolylglyoxylamides as antitumor agents*. PCT Int. søkn. (1999), 47 s. CODEN: PIXXD2 WO 9951224
25 b) Emig, Peter; Bacher, Gerald; Reichert, Dietmar; Baasner, Silke; Aue, Beate; Nickel, Bernd; Guenther, Eckhard. *Preparation of N-(6-quinoliny)-3-indolylglyoxylamides as antitumor agents*. PCT Int. søkn. (2002), 4WO 2002010152A2 c) Nickel, Bernd; Klenner, Thomas; Bacher, Gerald; Beckers, Thomas; Emig, Peter; Engel, Juergen; Bruyneel, Erik; Kamp, Guenter; Peters,
30 Kirsten. *Indolyl-3-glyoxylic acid derivatives comprising therapeutically valuable properties*. PCT Int. søkn. (2001), WO 2001022954A2.
108. Wang, Tao; Wallace, Owen B.; Meanwell, Nicholas A.; Zhang, Zhongxing; Bender, John A.; Kadow, John F.; Yeung, Kap-Sun. *Preparation of indole,*

azaindole, and related heterocyclic piperazinecarboxamides for treatment of AIDS.
PCT Int. søkn. WO 2002085301A2.

109. Kadow, John F.; Xue, Qiufen May; Wang, Tao; Zhang, Zhongxing;
5 Meanwell, Nicholas A. *Preparation of indole, azaindole and related heterocyclic
pyrrolidine derivatives as antiviral agents.* PCT Int. søkn. WO 2003068221A1.

110. Wang, Tao; Wallace, Owen B.; Meanwell, Nicholas A.; Kadow, John F.;
Zhang, Zhongxing; Yang, Zhong. *Bicyclo 4.4.0 antiviral derivatives* PCT Int. søkn.
10 (2003), WO 2003092695A1.

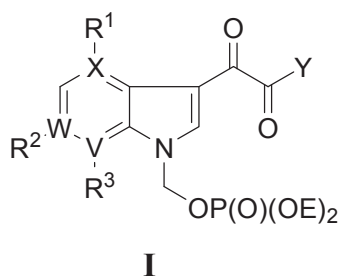
111. Preparation of indolyl-, azaindolyl-, and related heterocyclic
sulfonylureidopiperazines for treatment of HIV and AIDS. Kadow, John F.;
Regueiro-Ren, Alicia; Xue, Qiufen May. PCT Int. søkn. (2003), WO2004000210
15 A2.

112. *Composition and antiviral activity of substituted azaindoleoxoacetic
piperazine derivatives.* Wang, Tao; Zhang, Zhongxing; Meanwell, Nicholas A.;
Kadow, John F.; Yin, Zhiwei; Xue, Qiufen May; Regueiro-Ren, Alicia; Matiskella,
20 John D.; Ueda, Yasutsugu. U.S. Pat. søkn. Publ. (2004), US 2004110785A1.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse omfatter forbindelser med formel I, deres
25 farmasøytiske formuleringer og anvendelse av dem for pasienter som lider av eller er
mottagelige for et virus så som HIV. Forbindelsene med formel I, som omfatter ikke-
toksiske farmasøytisk akseptable salter derav, har formelen og betydningen som
beskrevet nedenfor.

Foreliggende oppfinnelse omfatter en forbindelse med formel I,



hvor:

- 5 X er C eller N med det forbehold at når X er N, eksisterer R¹ ikke;

W er C eller N med det forbehold at når W er N, eksisterer R² ikke;

V er C;

10

R¹ er hydrogen, metoksy eller halogen;

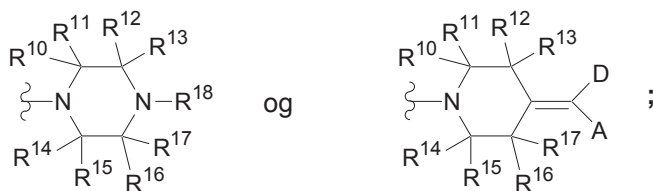
R² er hydrogen;

- 15 R³ er metoksy eller heteroaryl, som hver uafhængig kan være eventuelt substitueret med én substituent valgt fra G; hvor heteroaryl er triazolyl, pyrazolyl eller oksadiazolyl;

E er hydrogen eller et farmasøytisk akseptabelt mono- eller bis-salt derav;

20

Y er valgt fra gruppen bestående av



- 25 R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷ er hver uafhængig H eller metyl, med det forbehold at ikke mer enn to av R¹⁰-R¹⁷ er metyl;

R^{18} er valgt fra gruppen bestående av C(O)-fenyl, C(O)-pyridinyl, pyridinyl, pyrimidinyl, kinolinyl, isokinolinyl, kinazolinyl, kinoksalinyl, naftyridinyl, ftalazinyl, azabenzofuryl og azaindolyl, som hver uavhengig kan være eventuelt substituert med fra én til to grupper valgt fra gruppen bestående av metyl, -amino, -NHMe, -NMe₂,
 5 metoksy, hydroksymetyl og halogen;

D er valgt fra gruppen bestående av cyano, S(O)₂R²⁴, halogen, C(O)NR²¹R²², fenyl og heteroaryl; hvor nevnte fenyl eller heteroaryl uavhengig er eventuelt substituert med ett til tre like eller forskjellige halogenatomer eller fra én til tre like eller forskjellige
 10 substituenten valgt fra G; hvor heteroaryl er valgt fra gruppen bestående av pyridinyl og oksadiazolyl;

A er valgt fra gruppen bestående av fenyl, pyridinyl, furyl, tienyl, isoksazolyl og oksazolyl hvor nevnte fenyl, pyridinyl, furyl, tienyl, isoksazolyl og oksazolyl
 15 uavhengig er eventuelt substituert med ett til tre like eller forskjellige halogenatomer eller fra én til tre like eller forskjellige substituenten valgt fra G;

G er valgt fra gruppen bestående av (C₁₋₆)alkyl, (C₁₋₆)alkenyl, fenyl, hydroksy, metoksy, halogen, -NR²³C(O)-(C₁₋₆)alkyl, -NR²⁴R²⁵, -S(O)₂NR²⁴R²⁵, COOR²⁶ og
 20 -CONR²⁴R²⁵; hvor nevnte (C₁₋₆)alkyl eventuelt er substituert med hydroksy, dimetylamino eller ett til tre like eller forskjellige halogenatomer;

R²⁶ er valgt fra gruppen bestående av hydrogen og (C₁₋₆)alkyl;

25 R²⁰, R²¹, R²², R²³, R²⁴, R²⁵ er uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, (C₁₋₆)alkyl og -(CH₂)_nNR²⁷R²⁸;

n er 0-6; og

30 R²⁷ og R²⁸ er hver uavhengig H eller metyl.

En mer foretrukket utførelsesform er forbindelser ovenfor hvor:

X og W hver er N;

eller forbindelser ovenfor hvor:

5 X er C; og

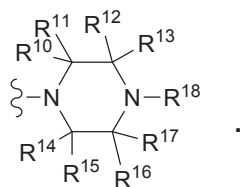
W er N.

En annen foretrukket utførelsesform er forbindelser som beskrevet ovenfor
10 hvor:

R^{18} er $-C(O)-Ph$; og

Y er

15



En annen foretrukket utførelsesform er forbindelser som beskrevet ovenfor
hvor:

20 R^3 er metoksy eller triazolyl; hvor nevnte triazolyl eventuelt er substituert med én substituent valgt fra G;

$R^{10} - R^{17}$ er hver H; og

25 G er metyl.

En annen foretrukket utførelsesform er forbindelser som beskrevet ovenfor
hvor:

R^1 er F og R^3 er 1,2,3-triazolyl tilknyttet i stilling N-1.

30

En annen foretrukket utførelsesform er forbindelser som beskrevet ovenfor hvor:

R^1 er OMe og R^3 er 3-metyl-1,2,4-triazolyl tilknyttet i stilling N-1.

5 En annen foretrukket utførelsesform er forbindelser som beskrevet ovenfor hvor:

R^1 og R^3 hver er metoksy.

En annen foretrukket utførelsesform er forbindelser som beskrevet ovenfor
10 hvor saltet er natrium, lysin eller trometamin.

En annen foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen er et farmasøytisk preparat som omfatter en antiviralt effektiv mengde av en forbindelse med formel I, omfattende farmasøytisk akseptable salter derav og én eller flere farmasøytisk
15 akseptable bærere, tilsetningsmidler eller fortynningsmidler.

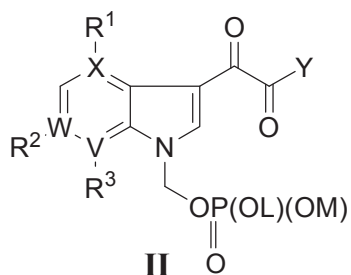
En annen foretrukket utførelsesform er det farmasøytiske preparatet ovenfor, anvendelig for behandling av infeksjon med HIV, som i tillegg omfatter en antiviralt effektiv mengde av et AIDS behandlingsmiddel valgt fra gruppen bestående av:

- 20 (a) et AIDS antiviralt middel;
 (b) et anti-infektivt middel;
 (c) en immunomodulator; og
 (d) HIV-entry-inhibitorer.

25 Også omfattet av utførelsesformene er anvendelse for fremstilling av medikament for behandling av et pattedyr infisert med HIV-virus av en forbindelse med formel I, omfattende farmasøytisk akseptable salter derav og én eller flere farmasøytisk akseptable bærere, tilsetningsmidler eller fortynningsmidler.

30 En annen utførelsesform er en anvendelse beskrevet ovenfor, hvor medikamentet er for anvendelse, i kombinasjon med en antiviralt effektiv mengde av et AIDS-behandlingsmiddel valgt fra gruppen bestående av et AIDS antiviralt middel; et anti-infektivt middel; en immunomodulator; og en HIV-entry-inhibitor.

En annen utførelsesform er mellomprodukt-forbindelser med formel II, anvendelige for fremstilling av forbindelser I,



5

hvor:

X er C eller N med det forbehold at når X er N eksisterer R¹ ikke;

10

W er C eller N med det forbehold at når W er N eksisterer R² ikke;

V er C;

15 R¹ er hydrogen, metoksy eller halogen;

R² er hydrogen;

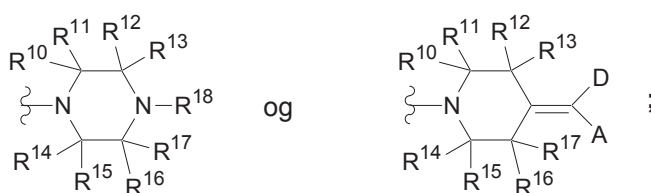
R³ er metoksy eller heteroaryl, som hver uavhengig kan være eventuelt substituert med én substituent valgt fra G; hvor heteroaryl er triazolyl, pyrazolyl eller oksadiazolyl;

20

L og M er uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, C₁-C₆ alkyl, fenyl, benzyl, trialkylsilyl, -2,2,2-trikloretoksy og 2-trimetylsilyletoksy med det forbehold at ikke mer enn én av L og M kan være hydrogen;

25

Y er valgt fra gruppen bestående av



R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , R^{17} er hver uavhengig H eller metyl, med det forbehold at ikke mer enn to av R^{10} - R^{17} er metyl;

5

R^{18} er valgt fra gruppen bestående av C(O)-fenyl, C(O)-pyridinyl, pyridinyl, pyrimidinyl, kinolinyl, isokinolinyl, kinazolinyl, kinoksalinyl, naftyridinyl, ftalazinyl, azabenzofuryl og azaindolyl, som hver uavhengig kan være eventuelt substituert med fra én til to grupper valgt fra gruppen bestående av metyl, -amino, -NHMe, -NMe₂, metoksy, hydroksymetyl og halogen;

10

D er valgt fra gruppen bestående av cyano, S(O)₂R²⁴, halogen, C(O)NR²¹R²², fenyl og heteroaryl; hvor nevnte fenyl eller heteroaryl uavhengig er eventuelt substituert med ett til tre like eller forskjellige halogenatomer eller fra én til tre like eller forskjellige substituenten valgt fra G; hvor heteroaryl er valgt fra gruppen bestående av pyridinyl og oksadiazolyl;

15

A er valgt fra gruppen bestående av fenyl, pyridinyl, furyl, tienyl, isoksazolyl og oksazolyl hvor nevnte fenyl, pyridinyl, furyl, tienyl, isoksazolyl og oksazolyl uavhengig er eventuelt substituert med ett til tre like eller forskjellig halogenatomer eller fra én til tre like eller forskjellig substituenten valgt fra G;

20

G er valgt fra gruppen bestående av (C₁₋₆)alkyl, (C₁₋₆)alkenyl, fenyl, hydroksy, metoksy, halogen, -NR²³C(O)-(C₁₋₆)alkyl, -NR²⁴R²⁵, -S(O)₂NR²⁴R²⁵, COOR²⁶ og -CONR²⁴R²⁵; hvor nevnte (C₁₋₆)alkyl eventuelt er substituert med hydroksy, dimetylamino eller ett til tre like eller forskjellige halogenatomer;

25

R²⁶ er valgt fra gruppen bestående av hydrogen og (C₁₋₆)alkyl;

R^{20} , R^{21} , R^{22} , R^{23} , R^{24} , R^{25} er uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, (C_{1-6}) alkyl og $-(CH_2)_nNR^{27}R^{28}$;

R^{27} og R^{28} er hver uavhengig H eller metyl; og

5

n er 0-6.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

10 Figur 1 illustrerer AUC (område under kurven) versus dose i humane kliniske forsøk for Forbindelse IVa.

Figur 2 illustrerer AUC for Forbindelse IVa og Prodrug Iab under fastede og matede betingelser i hund- og menneske-undersøkelser

Figur 3 illustrerer IVc oral AUC i rotter versus dose plot

15 Figur 4 illustrerer IVc oral C_{maks} i rotter versus dose plot

Figur 5 illustrerer plasmaprofiler av IVc i rotter etter oral dosering av Ic

Figur 6 illustrerer sammenligning av IVa C_{maks} og AUC i hannrotter gitt enten IVa eller Iab

20 Figur 7 illustrerer sammenligning av IVa C_{maks} og AUC i hunder gitt enten IVa eller Iab

Figur 8 illustrerer hydrolyse av Iab i humane placentale ALP-løsninger og dannelse av IVa

Figur 9 illustrerer plasmakonsentrasjon versus tid profiler av Iab og IVa etter IV og oral administrering av Iab i Rotter og fra de historiske data av IVa i rotter

25 Figur 10 illustrerer plasmakonsentrasjon versus tid profiler av Iab og IVa etter IV og oral administrering av Iab i Hunder og fra de historiske data av IVa i hunder

Figur 11 illustrerer plasmakonsentrasjon versus tid profiler av Iab og IVa etter IV og oral administrering av Iab i aper og fra de historiske data av IVa i aper

30 Figur 12 illustrerer sammenligning av IVb C_{maks} og AUC i hannrotter gitt enten IVb eller Ibb

Figur 13 illustrerer sammenligning av IVb C_{maks} og AUC i hunder gitt enten IVb eller Ibb

Figur 14 illustrerer hydrolyse av Ibb i humane placentale ALP-løsninger og dannelse av IVb

Figur 15 illustrerer plasmakonsentrasjon versus tid profiler av Ibb og IVb etter IV og oral administrering av Ibb i rotte og de historiske data av IVb i rotte

5 Figur 16 illustrerer plasmakonsentrasjon versus tid profiler av Ibb og IVb etter IV og oral administrering av Ibb i Hund og de historiske data av IVb i hund

Figur 17 illustrerer plasmakonsentrasjon versus tid profiler av Ibb og IVb etter IV og oral administrering av Ibb i ape og de historiske data av IVb i ape

10 Figur 18 illustrerer Sammenligning av IVc Cmaks og AUC i hannrotter gitt enten IVc eller Icb

Figur 19 illustrerer sammenligning av IVc Cmaks og AUC i hunder gitt enten IVc eller Icb

Figur 20 illustrerer hydrolyse av Icb i humane placentale ALP-løsninger og dannelse av IVc

15 Figur 21 illustrerer plasmakonsentrasjon versus tid profiler av Icb og IVc etter IV og oral administrering av Icb i rotte og de historiske data av IVc i rotte

Figur 22 illustrerer plasmakonsentrasjon versus tid profiler av Icb og IVc etter IV og oral administrering av Icb i hund og de historiske data av IVc i hund

20 Figur 23 illustrerer plasmakonsentrasjon versus tid profiler av Icb og IVc etter IV og oral administrering av Icb i ape og de historiske data av IVc i ape

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

25 Ettersom forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan ha asymmetriske sentere og derfor forekomme som blandinger av diastereomerer og enantiomerer, omfatter foreliggende oppfinnelse de individuelle diastereoisomere og enantiomere former av forbindelsene med formel I i tillegg til blandingene derav.

DEFINISJONER

Betegnelsen "C₁₋₆ alkyl" som anvendt her og i kravene (hvis ikke spesifisert på annen måte) betyr lineære eller forgrenede alkylgrupper så som metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, t-butyl, amyl og heksyl.

“Halogen” angir klor, brom, jod eller fluor.

5 En “aryl” gruppe angir en karbon monocyklisk eller kondensert ring polycyklisk (dvs. ringer som deler nabostilte par av karbonatomer) gruppe som har et fullstendig konjugert pi-elektron-system. Eksempler, på arylgrupper er fenyl, naftalenyl og antracenyl. Arylgruppen kan være substituert eller usubstituert. Når substituert er den (de) substituerte gruppe(r) fortrinnsvis én eller flere valgt fra alkyl, 10 cykloalkyl, aryl, heteroaryl, heteroalicyklisk, hydroksy, alkoksy, aryloksy, heteroaryloksy, heteroalicykloksy, tiohydroksy, tioaryloksy, tiheteroaryloksy, tiheteroalicykloksy, cyano, halogen, nitro, karbonyl, O-karbamyl, N-karbamyl, C-amido, N-amido, C-karboksy, O-karboksy, sulfinyl, sulfonyl, sulfonamido, trihalogenmetyl, ureido, amino og -NR^xR^y, hvor R^x og R^y uavhengig er valgt fra 15 gruppen bestående av hydrogen, alkyl, cykloalkyl, aryl, karbonyl, C-karboksy, sulfonyl, trihalogenmetyl og kombinert, en fem- eller seks-leddet heteroalicyklisk ring.

Som anvendt her angir en “heteroaryl” gruppe en monocyklisk eller kondensert ring- (dvs. ringer som deler et nabostilt par av atomer) gruppe som har i 20 ringen(e) ett eller flere atomer valgt fra gruppen bestående av nitrogen, oksygen og svovel og, i tillegg, har et fullstendig konjugert pi-elektron-system. Hvis ikke annet er angitt kan heteroarylgruppen være tilknyttet ved enten et karbon- eller nitrogenatom i heteroarylgruppen. Det skal bemerkes at betegnelsen heteroaryl skal omfatte et N-oksyd av det parentale heteroaryl hvis et slikt N-oksyd er kjemisk mulig, 25 som er kjent på området. Eksempler på heteroarylgrupper er furyl, tienyl, benzotienyl, tiazolyl, imidazolyl, oksazolyl, oksadiazolyl, tiadiazolyl, benzotiazolyl, triazolyl, tetrazolyl, isoksazolyl, isotiazolyl, pyrrolyl, pyranyl, tetrahydropyranyl, pyrazolyl, pyridyl, pyrimidinyl, kinolinyl, isokinolinyl, purinyl, karbazolyl, benzoksazolyl, benzimidazolyl, indolyl, isoindolyl, pyrazinyl, diazinyl, pyrazin, 30 triazinyltriazin, tetrazinyl og tetrazolyl. Når substituert er den (de) substituerte gruppe(r) fortrinnsvis én eller flere valgt fra alkyl, cykloalkyl, aryl, heteroaryl, heteroalicyklisk, hydroksy, alkoksy, aryloksy, heteroaryloksy, heteroalicykloksy, tiohydroksy, tioaryloksy, tiheteroaryloksy, tiheteroalicykloksy, cyano, halogen,

nitro, karbonyl, O-karbamyl, N-karbamyl, C-amido, N-amido, C-karboksy, O-karboksy, sulfinyl, sulfonyl, sulfonamido, trihalogenmetyl, ureido, amino og $-NR^xR^y$, hvor R^x og R^y er som definert ovenfor.

Som anvendt her angir “heteroalicyklisk” gruppe en monocyklisk eller
 5 kondensert ringgruppe som i ringen(e) har ett eller flere atomer valgt fra gruppen bestående av nitrogen, oksygen og svovel. Ringer er valgt fra de som gir stabile arrangementer av bindinger og er ikke ment å omfatte systemer som ikke kan eksistere. Ringene kan også ha én eller flere dobbeltbindinger. Imidlertid har ringene ikke et fullstendig konjugert pi-elektron-system. Eksempler på heteroalicykliske
 10 grupper er azetidiny, piperidyl, piperaziny, imidazoliny, tiazolidiny, 3-pyrrolidin-1-yl, morfoliny, tiomorfoliny og tetrahydropyrany. Når substituert er den (de) substituerte gruppe(r) fortrinnsvis én eller flere valgt fra alkyl, cykloalkyl, aryl, heteroaryl, heteroalicyklyl, hydroksy, alkoksy, aryloksy, heteroaryloksy, heteroalicykloksy, tiohydroksy, tioalkoksy, tioaryloksy, tiheteroaryloksy,
 15 tiheteroalicykloksy, cyano, halogen, nitro, karbonyl, tiokarbonyl, O-karbamyl, N-karbamyl, O-tiokarbamyl, N-tiokarbamyl, C-amido, C-tioamido, N-amido, C-karboksy, O-karboksy, sulfinyl, sulfonyl, sulfonamido, trihalogenmetansulfonamido, trihalogenmetansulfonyl, silyl, guany, guanidino, ureido, fosfonyl, amino og $-NR^xR^y$, hvor R^x og R^y er som definert ovenfor.

20 En “alkyl” gruppe angir et mettet alifatisk hydrokarbon omfattende lineære og forgrenede grupper. Fortrinnsvis har alkylgruppen 1 til 20 karbonatomer (når et nummerisk område; f.eks. “1-20”, er angitt her, betyr det at gruppen, i dette tilfellet alkylgruppen kan inneholde 1 karbonatom, 2 karbonatomer, 3 karbonatomer, etc. opptil og omfattende 20 karbonatomer). Mer foretrukket er den alkyl med medium
 25 størrelse som har 1 til 10 karbonatomer. Mest foretrukket er den en lavere alkyl som har 1 til 4 karbonatomer. Alkylgruppen kan være substituert eller usubstituert. Når substituert er substituentgruppe(r) fortrinnsvis én eller flere individuelt valgt fra trihalogenalkyl, cykloalkyl, aryl, heteroaryl, heteroalicyklisk, hydroksy, alkoksy, aryloksy, heteroaryloksy, heteroalicykloksy, tiohydroksy, tioalkoksy, tioaryloksy,
 30 tiheteroaryloksy, tiheteroalicykloksy, cyano, halogen, nitro, karbonyl, tiokarbonyl, O-karbamyl, N-karbamyl, O-tiokarbamyl, N-tiokarbamyl, C-amido, C-tioamido, N-amido, C-karboksy, O-karboksy, sulfinyl, sulfonyl, sulfonamido,

trihalogenmetansulfonamido, trihalogenmetansulfonyl og kombinert, en fem- eller seks-leddet heteroalicyklisk ring.

En “cykloalkyl” gruppe angir en karbon monocyklisk eller kondensert ring (dvs. ringer som deler nabostilte par av karbonatomer) hvor én eller flere ringer ikke har et fullstendig konjugert pi-elektron-system. Eksempler, på cykloalkylgrupper er
 5 cyklopropan, cyklobutan, cyklopentan, cyklopenten, cykloheksan, cykloheksadien, cykloheptan, cykloheptatrien og adamantan. En cykloalkylgruppe kan være substituert eller usubstituert. Når substituert, er substituentgruppe(r) fortrinnsvis én eller flere individuelt valgt fra alkyl, aryl, heteroaryl, heteroalicyklyl, hydroksy,
 10 alkoksy, aryloksy, heteroaryloksy, heteroalicykloksy, tihydroksy, tioalkoksy, tioaryloksy, tiheteroaryloksy, tiheteroalicykloksy, cyano, halogen, nitro, karbonyl, tiokarbonyl, O-karbamyl, N-karbamyl, O-tiokarbamyl, N-tiokarbamyl, C-amido, C-tioamido, N-amido,
 C-karboksy, O-karboksy, sulfinyl, sulfonyl, sulfonamido, trihalogen-
 15 metansulfonamido, trihalogenmetansulfonyl, silyl, guanyl, guanidino, ureido, fosfonyl, amino og $-NR^xR^y$ med R^x og R^y som definert ovenfor.

En “alkenyl” gruppe angir en alkylgruppe, som definert her, bestående av minst to karbonatomer og minst én karbon-karbon dobbeltbinding.

En “alkynyl” gruppe angir en alkylgruppe, som definert her, bestående av
 20 minst to karbonatomer og minst én karbon-karbon trippelbinding.

En “hydroksy” gruppe angir en -OH gruppe.

En “alkoksy” gruppe angir både en -O-alkyl- og en -O-cykloalkylgruppe som definert her.

En “aryloksy” gruppe angir både en -O-aryl- og en -O-heteroarylgruppe, som
 25 definert her.

En “heteroaryloksy” gruppe angir en heteroaryl-O-gruppe med heteroaryl som definert her.

En “heteroalicykloksy” gruppe angir en heteroalicyklisk-O-gruppe med heteroalicyklisk som definert her.

30 En “tihadroksy” gruppe angir en -SH-gruppe.

En “tioalkoksy” gruppe angir både en S-alkyl- og en -S-cykloalkylgruppe, som definert her.

En "tioaryloksy" gruppe angir både en -S-aryl- og en -S-heteroarylgruppe, som definert her.

En "tioheteroaryloksy" gruppe angir en heteroaryl-S-gruppe med heteroaryl som definert her.

5 En "tioheteroalicykloksy" gruppe angir en heteroalicyklyl-S-gruppe med heteroalicyklyl som definert her.

En "karbonyl" gruppe angir en $-C(=O)-R$ gruppe, hvor R" er valgt fra gruppen bestående av hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, cykloalkyl, aryl, heteroaryl (bundet gjennom et ringkarbon) og heteroalicyklyl (bundet gjennom et ringkarbon),
10 som hver er definert her.

En "aldehyd" gruppe angir en karbonylgruppe hvor R" er hydrogen.

En "tiokarbonyl" gruppe angir en $-C(=S)-R$ -gruppe, med R" som definert her.

En "keto" gruppe angir en $-CC(=O)C-$ gruppe hvor karbonet på en eller begge
15 sider av $C=O$ kan være alkyl, cykloalkyl, aryl eller et karbon i en heteroaryl- eller heteroalicyklyl gruppe.

En "trihalogenmetankarbonyl" gruppe angir en $Z_3CC(=O)-$ gruppe hvor nevnte Z er halogen.

En "C-karboksy" gruppe angir en $-C(=O)O-R$ -gruppe, med R" som definert
20 her.

En "O-karboksy" gruppe angir en $R^"C(=O)O-$ gruppe, med R" som definert her.

En "karboksylsyre" gruppe angir en C-karboksygruppe hvor R" er hydrogen.

En "trihalogenmetyl" gruppe angir en $-CZ_3-$ gruppe hvor Z er halogen som
25 definert her.

En "trihalogenmetansulfonyl" gruppe angir en $Z_3CS(=O)_2-$ gruppe med Z som definert ovenfor.

En "trihalogenmetansulfonamido" gruppe angir en $Z_3CS(=O)_2NR^X-$ gruppe med Z og R^X som definert her.

30 En "sulfinyl" gruppe angir en $-S(=O)-R$ -gruppe, med R" som definert her og, i tillegg, som bare en binding; dvs. $-S(O)-$.

En "sulfonyl" gruppe angir en $-S(=O)_2R$ -gruppe med R" som definert her og, i tillegg som bare en binding; dvs. $-S(O)_2-$.

En "S-sulfonamido" gruppe angir $-S(=O)_2NR^X R^Y$, med R^X og R^Y som definert her.

En "N-sulfonamido" gruppe angir en $R^X S(=O)_2NR^Y$ -gruppe med R^X som definert her.

5 En "O-karbamyl" gruppe angir $-OC(=O)NR^X R^Y$ som definert her.

En "N-karbamyl" gruppe angir en $R^X OC(=O)NR^Y$ gruppe, med R^X og R^Y som definert her.

En "O-tiokarbamyl" gruppe angir en $-OC(=S)NR^X R^Y$ -gruppe med R^X og R^Y som definert her.

10 En "N-tiokarbamyl" gruppe angir en $R^X OC(=S)NR^Y$ -gruppe med R^X og R^Y som definert her.

En "amino" gruppe angir en $-NH_2$ -gruppe.

En "C-amido" gruppe angir en $-C(=O)NR^X R^Y$ gruppe med R^X og R^Y som definert her.

15 En "C-tioamido" gruppe angir en $-C(=S)NR^X R^Y$ gruppe, med R^X og R^Y som definert her.

En "N-amido" gruppe angir en $R^X C(=O)NR^Y$ -gruppe, med R^X og R^Y som definert her.

20 En "ureido" gruppe angir en $-NR^X C(=O)NR^Y R^{Y2}$ -gruppe med R^X og R^Y som definert her og R^{Y2} definert lik R^X og R^Y .

En "tioureido" gruppe angir en $-NR^X C(=S)NR^Y R^{Y2}$ -gruppe med R^X og R^Y som definert her og R^{Y2} definert lik R^X og R^Y .

En "guanidino" gruppe angir en $-R^X NC(=N)NR^Y R^{Y2}$ -gruppe, med R^X , R^Y og R^{Y2} som definert her.

25 En "guanyl" gruppe angir en $R^X R^Y NC(=N)$ -gruppe, med R^X og R^Y som definert her.

En "cyano" gruppe angir en $-CN$ -gruppe.

En "silyl" gruppe angir $-Si(R^X)_3$, med R^X som definert her.

En "fosfonyl" gruppe angir $P(=O)(OR^X)_2$ med R^X som definert her.

30 En "hydrazino" gruppe angir en $-NR^X NR^Y R^{Y2}$ -gruppe med R^X , R^Y og R^{Y2} som definert her.

Hvilke som helst to nabostilte R-grupper kan være kombinert for å danne en ytterligere aryl-, cykloalkyl-, heteroaryl- eller heterocyklyl-ring kondensert til ringen som initielt bærer de R-grupper.

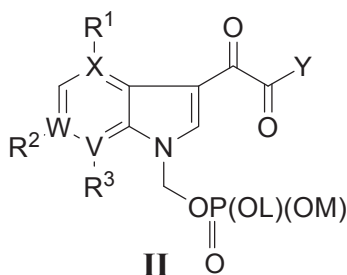
Det er kjent på området at nitrogenatomer i heteroarylsystemer kan “delta i en heteroarylring-dobbelbinding” og dette angir formen av dobbeltbindinger i de to tautomere strukturer som omfatter de fem-leddede ring-heteroarylgrupper. Dette dikterer hvorvidt nitrogener kan være substituert som er velkjent av kjemikere på området. Beskrivelsen og kravene for foreliggende oppfinnelse er basert på de kjente generelle prinsipper for kjemisk binding. Det skal forstås at kravene ikke omfatter strukturer kjent å være ustabile eller ikke i stand til å eksistere basert på litteraturen.

Fysiologisk akseptable salter av prodrug-forbindelsene beskrevet her er innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse. Betegnelsen “farmasøytisk akseptabelt salt” som anvendt her og i kravene skal omfatte ikke-toksiske base-addisjonssalter. Betegnelsen "farmasøytisk akseptabelt salt" som anvendt her er også ment å omfatte salter av sure grupper, så som et karboksylat eller fosfat eller fosfat-monoester, med slike motioner som ammonium, alkalimetallsalter, spesielt natrium eller kalium, jordalkalimetallsalter, spesielt kalsium eller magnesium, overgangsmetallsalter så som sink og salter med egnede organiske baser så som lavere alkylaminer (metylamin, etylamin, cykloheksylamin og lignende) eller med substituerte lavere alkylaminer (f.eks. hydroksyl-substituerte alkylaminer så som dietanolamin, trietanolamin eller mono-trometamin (også betegnet TRIS eller 2-amino-2-(hydroksymetyl)propan-1,3-diol) tris(hydroksymetyl)-aminometan), lysin, arginin, histidin, N-metylglukamin eller med baser så som piperidin eller morfolin. Det skal forstås at farmasøytisk akseptable salter, når isolert i fast eller krystallinsk form også omfatter hydrater eller vann-molekyler fanget i den resulterende forbindelse I substans. Støkiometri-muligheter er velkjent for fagfolk på området. Beskrivelser av farmasøytisk akseptable salter og lister over mulige salter er inneholdt i de følgende referanser:

Preparation of water-soluble compounds through salt formation. Stahl, P. Heinrich. Cosmas Consult, Freiburg im Breisgau, Tyskland. Ed.: Wermuth, Camille Georges. Practice of Medicinal Chemistry (2. Ed.) (2003), 601-615. Publisher: Elsevier, London, UK CODEN: 69EOEZ.

Handbook of pharmaceutical salts: properties, selection, and use av Stahl, P. Heinrich, Wermuth, Camille G., International Union of Pure and Applied Chemistry. Weinheim; New York: VHCA ; Wiley-VCH, 2002.

- 5 I et annet aspekt ved oppfinnelsen er nye fosfater-mellomprodukt Forbindelser II beskrevet.



- 10 I tilfellet av fosfater eksisterer muligheten for mono eller bis og begge er dekket av foreliggende oppfinnelse.

- Som anvendt her betyr betegnelsen "antiviralt effektiv mengde" den totale mengden av hver aktive komponent av metoden som er tilstrekkelig til å oppvise en meningsfull pasient-fordel, dvs. helbreding av akutte lidelser karakterisert ved
- 15 hemning av HIV-infeksjon. Når anvendt for en individuell aktiv bestanddel, administrert alene, angir betegnelsen den bestanddel alene. Når anvendt for en kombinasjon, angir betegnelsen kombinerte mengder av de aktive bestanddelene som resulterer i den terapeutiske effekt, hvorvidt administrert i kombinasjon, serielt eller samtidig. Betegnelsene "behandle, behandling av, behandling" som anvendt her og i
- 20 kravene betyr forhindring eller forbedring av sykdommer forbundet med HIV-infeksjon.

- Foreliggende oppfinnelse angår også kombinasjoner av forbindelsene med ett eller flere midler anvendelige ved behandling av AIDS. For eksempel kan forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse effektivt administreres, hvorvidt i en
- 25 periode med pre-eksponering og/eller post-eksponering, i kombinasjon med effektive mengder av AIDS antivirale midler, immunomodulatorer, antiinfektive midler eller vaksiner, så som de i den følgende tabell.

ANTIVIRALE MIDLER

	<i>Medikament-navn</i>	<i>Produsent</i>	<i>Indikasjon</i>
5	097	Hoechst/Bayer	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (ikke-nukleosid revers trans- kriptase (RT) inhibitor)
10	Amprenavir 141 W94 GW 141	Glaxo Wellcome	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (proteaseinhibitor)
15	Abacavir (1592U89) GW 1592	Glaxo Wellcome	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (RT-inhibitor)
20	Acemannan	Carrington Labs (Irving, TX)	ARC
	Acyklovir	Burroughs Wellcome	HIV-infeksjon, AIDS, ARC, i kombinasjon med AZT
25	AD-439	Tanox Biosystems	HIV-infeksjon, AIDS, ARC
30	AD-519	Tanox Biosystems	HIV-infeksjon, AIDS, ARC
	Adefovir dipivoxil AL-721	Gilead Sciences Ethigen (Los Angeles, CA)	HIV-infeksjon ARC, PGL HIV-positive, AIDS
35	Alfa Interferon	Glaxo Wellcome	Kaposi's sarkom, HIV i kombinasjon m/Retrovir
40	Ansamycin LM 427	Adria Laboratories (Dublin, OH) Erbamont (Stamford, CT)	ARC
	Antistoff som	Advanced Biotherapy	AIDS, ARC

	nøytraliserer pH labilt alfa-avvikende interferon	Concepts (Rockville, MD)	
5	AR177	Aronex Pharm	HIV-infeksjon, AIDS, ARC
10	Beta-fluor-ddA BMS-232623 (CGP-73547)	Nat'l Cancer institute Bristol-Myers Squibb/ Novartis	AIDS-assosierte sykdommer HIV-infeksjon, AIDS, ARC (proteaseinhibitor)
15	BMS-234475 (CGP-61755)	Bristol-Myers Squibb/ Novartis	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (proteaseinhibitor)
20	CI-1012 Cidofovir	Warner-Lambert Gilead Science	HIV-1-infeksjon CMV retinitt, herpes, papillomavirus
25	Curdlan-sulfat Cytomegalovirus immunglobin	AJI Pharma USA MedImmune	HIV-infeksjon CMV retinitt
30	Cytoven Ganciclovir	Syntex	Synstruing CMV perifer CMV retinitt
35	Delaviridin	Pharmacia-Upjohn	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (RT-inhibitor)
40	Dekstran-sulfat	Ueno Fine Chem. Ind. Ltd. (Osaka, Japan)	AIDS, ARC, HIV- positive asymptomatiske

	ddC Dideoksytydin	Hoffman-La Roche	HIV-infeksjon, AIDS, ARC
5	ddI Dideoksyinosin	Bristol-Myers Squibb	HIV-infeksjon, AIDS, ARC; kombinasjon med AZT/d4T
10	DMP-450	AVID (Camden, NJ)	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (proteaseinhibitor)
15	Efavirenz (DMP 266) (-)6-klor-4-(S)- cyklopropyletynyl- 4(S)-trifluor- metyl-1,4-dihydro- 2H-3,1-benzoksazin- 2-on, STOCRINE	DuPont Merck	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (ikke-nukleosid RT- inhibitor)
20	EL10	Elan Corp, PLC (Gainesville, GA)	HIV-infeksjon
25	Famciclovir	Smith Kline	herpes zoster, herpes simplex
30	FTC	Emory University	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (revers transkriptase- inhibitor)
35	GS 840	Gilead	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (revers transkriptase- inhibitor)
40	HBV097	Hoechst Marion Roussel	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (ikke-nukleosid revers transkriptase- inhibitor)
45	Hypericin	VIMRx Pharm.	HIV-infeksjon, AIDS, ARC

	Rekombinant human interferon beta	Triton Biosciences (Alameda, CA)	AIDS, Kaposi's sarkom, ARC
	Interferon alfa-n3	Interferon Sciences	ARC, AIDS
5	Indinavir	Merck	HIV-infeksjon, AIDS, ARC, asymptomatisk HIV positiv også i kombinasjon med AZT/ddI/ddC
10	ISIS 2922	ISIS Pharmaceuticals	CMV retinititt
	KNI-272	Nat'l Cancer Institute	HIV-assos. sykdommer
15	Lamivudin, 3TC	Glaxo Wellcome	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (revers transkriptase-inhibitor); også med AZT
20	Lobucavir	Bristol-Myers Squibb	CMV-infeksjon
25	Nelfinavir	Agouron Pharmaceuticals	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (proteaseinhibitor)
30	Nevirapin	Boeheringer Ingelheim	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (RT-inhibitor)
	Novapren	Novaferon Labs, Inc. (Akron, OH)	HIV-inhibitor
35	Peptid T Oktapeptid-sekvens	Peninsula Labs (Belmont, CA)	AIDS
40	Trinatrium-fosfonoformiat	Astra Pharm. Products, Inc.	CMV retinititt, HIV-infeksjon, andre CMV-infeksjoner

	PNU-140690	Pharmacia Upjohn	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (proteaseinhibitor)
5	Probucol	Vyrex	HIV-infeksjon, AIDS
10	RBC-CD4	Sheffield Med. Tech (Houston, TX)	HIV-infeksjon, AIDS, ARC
15	Ritonavir	Abbott	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (proteaseinhibitor)
	Saquinavir	Hoffmann- LaRoche	HIV-infeksjon, AIDS, ARC (proteaseinhibitor)
20	Stavudin; d4T Didehydrodeoksy- tymidin	Bristol-Myers Squibb	HIV-infeksjon, AIDS, ARC
25	Valaciclovir	Glaxo Wellcome	Genitale HSV- & CMV- infeksjoner
	Virazol Ribavirin	Viratek/ICN (Costa Mesa, CA)	asymptomatisk HIV positiv, LAS, ARC
30	VX-478	Vertex	HIV-infeksjon, AIDS, ARC
35	Zalcitabin	Hoffmann-LaRoche	HIV-infeksjon, AIDS, ARC, med AZT
40	Zidovudin; AZT	Glaxo Wellcome	HIV-infeksjon, AIDS, ARC, Kaposi's sarkom, i kombinasjon med andre terapier
	Tenofovir disoproxil, fumaratsalt (Viread®)	Gilead	HIV-infeksjon, AIDS,

			(revers transkriptase-inhibitor)
5	Emtriva [®] (Emtricitabin)	Gilead	HIV-infeksjon, AIDS, (revers transkriptase-inhibitor)
10	Combivir [®]	GSK	HIV-infeksjon, AIDS, (revers transkriptase-inhibitor)
15	Abacavir succinat (eller Ziagen [®])	GSK	HIV-infeksjon, AIDS, (revers transkriptase-inhibitor)
20	Reyataz [®] (eller atazanavir)	Bristol-Myers Squibb	HIV-infeksjon AIDS, protease-inhibitor
25	Fuzeon [®] (eller T-20)	Roche / Trimeris	HIV-infeksjon AIDS, viral fusjons-inhibitor
30	Lexiva [®] (eller Fosamprenavir kalsium)	GSK/Vertex	HIV-infeksjon AIDS, viral protease-inhibitor

IMMUNOMODULATORER

	<i>Medikament-navn</i>	<i>Produsent</i>	<i>Indikasjon</i>
35	AS-101	Wyeth-Ayerst	AIDS
	Bropirimin	Pharmacia Upjohn	Fremskreden AIDS
40	Acemannan	Carrington Labs, Inc. (Irving, TX)	AIDS, ARC

	CL246,738	American Cyanamid Lederle Labs	AIDS, Kaposi's sarkom
5	FP-21399	Fuki ImmunoPharm	Blokkerer HIV-fusjon med CD4+ celler
10	Gamma Interferon	Genentech	ARC, i kombinasjon m/TNF (tumor- nekrose-faktor)
	Granulocytt Makrofag koloni- stimulerende faktor	Genetics Institute Sandoz	AIDS
15	Granulocytt Makrofag koloni- stimulerende faktor	Hoechst-Roussel Immunex	AIDS
20	Granulocytt Makrofag koloni- stimulerende faktor	Schering-Plough	AIDS, kombinasjon m/AZT
25	HIV Kjernepartikkel immunostimulant	Rorer	Seropositiv HIV
	IL-2 Interleukin-2	Cetus	AIDS, i kombinasjon m/AZT
30	IL-2 Interleukin-2	Hoffman-LaRoche Immunex	AIDS, ARC, HIV, i kombinasjon m/AZT
35	IL-2 Interleukin-2 (aldeslukin)	Chiron	AIDS, økning i CD4-celletellinger
	Immunglobulin Intravenøs (human)	Cutter Biological (Berkeley, CA)	Pediatrisk AIDS, i kombinasjon m/AZT
40	IMREG-1	Imreg (New Orleans, LA)	AIDS, Kaposi's sarkom, ARC, PGL

	IMREG-2	Imreg (New Orleans, LA)	AIDS, Kaposi's sarkom, ARC, PGL
5	Imutiol-dietyl- ditiokarbamat	Merieux Institute	AIDS, ARC
10	Alfa-2 Interferon	Schering Plough	Kaposi's sarkom m/AZT, AIDS
	Metionin- enkefalin	TNI Pharmaceutical (Chicago, IL)	AIDS, ARC
15	MTP-PE Muramyl-tripeptid	Ciba-Geigy Corp.	Kaposi's sarkom
20	Granulocyt koloni-stimulerende faktor	Amgen	AIDS, i kombinasjon m/AZT
	Remune	Immune Response Corp.	Immunoterapeutisk
25	rCD4 Rekombinant oppløselig human CD4	Genentech	AIDS, ARC
30	rCD4-IgG- hybrider		AIDS, ARC
	Rekombinant oppløselig human CD4	Biogen	AIDS, ARC
35	Interferon alfa 2a	Hoffman-La Roche	Kaposi's sarkom AIDS, ARC, i kombinasjon m/AZT
40	SK&F106528 Oppløselig T4	Smith Kline	HIV-infeksjon
	Tymopentin	Immunobiology	HIV-infeksjon

Research Institute
(Annandale, NJ)

5	Tumor-nekrose-faktor; TNF	Genentech	ARC, i kombinasjon m/gamma interferon
---	---------------------------	-----------	---------------------------------------

ANTI-INFEKTIVE MIDLER

10	<i>Medikament-navn</i>	<i>Produsent</i>	<i>Indikasjon</i>
	Clindamycin med Primaquin	Pharmacia Upjohn	PCP
15	Fluconazol	Pfizer	Kryptokokk-meningitt, candidiasis
20	Pastille Nystatin Pastille	Squibb Corp.	Forebygging av oral candidiasis
	Ornidyl Eflornithin	Merrell Dow	PCP
25	Pentamidin Isetionat (IM & IV)	LyphoMed (Rosemont, IL)	PCP-behandling
	Trimethoprim		Antibakteriell
30	Trimethoprim/sulfa		Antibakteriell
	Piritrexim	Burroughs Wellcome	PCP-behandling
35	Pentamidin isetionat for inhalering	Fisons Corporation	PCP-forebygging
	Spiramycin	Rhone-Poulenc	Cryptosporidial diaré

5	Intrakonazol- R51211	Janssen-Pharm.	Histoplasmose; kryptokokk- meningitt
	Trimetrexat	Warner-Lambert	PCP
	Daunorubicin	NeXstar, Sequus	Kaposi's sarkom
10	Rekombinant human erythropoetin	Ortho Pharm. Corp.	Alvorlig anemi assos. med AZT- terapi
15	Rekombinant humant veksthormon	Serono	AIDS-relatert magring, kakeksi
	Megestrol-acetat	Bristol-Myers Squibb	Behandling av anoreksi assos. m/AIDS
20	Testosteron	Alza, Smith Kline	AIDS-relatert magring
25	Total enteral ernæring	Norwich Eaton Pharmaceuticals	Diaré og malabsorpsjon relatert til AIDS

I tillegg kan forbindelsene ifølge oppfinnelsen her anvendes i kombinasjon med en annen klasse av midler for behandling av AIDS som er betegnet HIV-entry-inhibitorer. Eksempler på slike HIV-entry-inhibitorer er beskrevet i DRUGS OF
30 THE FUTURE 1999, 24(12), s. 1355-1362; CELL, Vol. 9, s. 243-246, 29. okt. 29, 1999; og DRUG DISCOVERY TODAY, Vol. 5, nr. 5, mai 2000, s. 183-194 og *Inhibitors of the entry of HIV into host cells*. Meanwell, Nicholas A.; Kadow, John F. Current Opinion in Drug Discovery & Development (2003), 6(4), 451-461. Spesifikt kan forbindelsene anvendes i kombinasjon med andre bindingsinhibitorer,
35 fusjonsinhibitorer og kjemokinreseptorantagonister rettet mot enten CCR5- eller CXCR4-koreseptor.

Det vil forstås at omfanget av kombinasjoner av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse med AIDS antivirale midler, immunomodulatorer, anti-

infektive midler, HIV-entry-inhibitorer eller vaksiner ikke er begrenset til listen i tabellen ovenfor, men omfatter i prinsippet hvilken som helst kombinasjon med hvilket som helst farmasøytisk preparat anvendelig for behandling av AIDS.

Foretrukne kombinasjoner er samtidig eller alternerende behandlinger med en
 5 forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse og en inhibitor for HIV-protease og/eller en ikke-nukleosid inhibitor av HIV revers transkriptase. En eventuell fjerde komponent i kombinasjonen er en nukleosid inhibitor av HIV revers transkriptase, så som AZT, 3TC, ddC eller ddI. En foretrukket inhibitor av HIV protease er Reyataz® (aktiv bestanddel Atazanavir). Typisk blir en dose på 300 til 600 mg administrert én
 10 gang pr. dag. Denne kan være samadministrert med en lav dose av Ritonavir (50 til 500 mg). En annen foretrukket inhibitor av HIV-protease er Kaletra®. En annen anvendelig inhibitor av HIV-protease er indinavir, som er sulfatsaltet av N-(2(R)-hydroksy-1-(S)-indanyl)-2(R)-fenylmetyl-4-(S)-hydroksy-5-(1-(4-(3-pyridyl-metyl)-2(S)-N'-(t-butylkarboksamido)-piperazinyll))-pentanamid-etanolat og blir syntetisert i
 15 henhold til U.S. 5,413,999. Indinavir blir generelt administrert i en dose på 800 mg tre ganger pr. dag. Andre foretrukne proteaseinhibitorer er nelfinavir og ritonavir. En annen foretrukket inhibitor av HIV-protease er saquinavir som blir administrert i en dose på 600 eller 1200 mg tid. Foretrukne ikke-nukleoside inhibitorer av HIV revers transkriptase omfatter efavirenz. Fremstilling av ddC, ddI og AZT er også beskrevet i
 20 EPO 0,484,071. Disse kombinasjoner kan ha uventede effekter på å begrense spredning og grad av infeksjon av HIV. Foretrukne kombinasjoner omfatter de med de følgende (1) indinavir med efavirenz og, eventuelt, AZT og/eller 3TC og/eller ddI og/eller ddC; (2) indinavir og hvilken som helst av AZT og/eller ddI og/eller ddC og/eller 3TC, spesielt, indinavir og AZT og 3TC; (3) stavudin og 3TC og/eller
 25 zidovudin; (4) zidovudin og lamivudin og 141W94 og 1592U89; (5) zidovudin og lamivudin.

I slike kombinasjoner kan forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse og andre aktive midler administreres separat eller sammen. I tillegg kan administrering av ett element skje før, samtidig med eller påfølgende administrering av andre midler.

De følgende forkortelser, som mesteparten er konvensjonelle forkortelser velkjent for fagfolk på området, blir anvendt gjennom hele beskrivelsen av oppfinnelsen og eksemplene. Noen av forkortelsene anvendt er som følger:

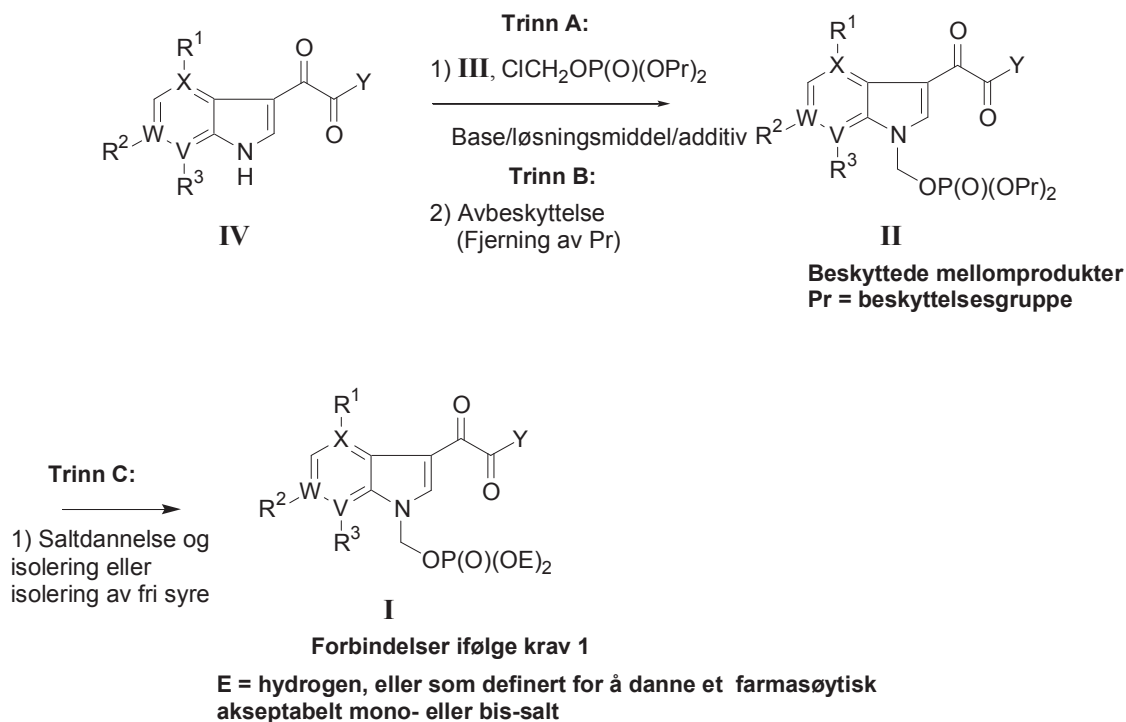
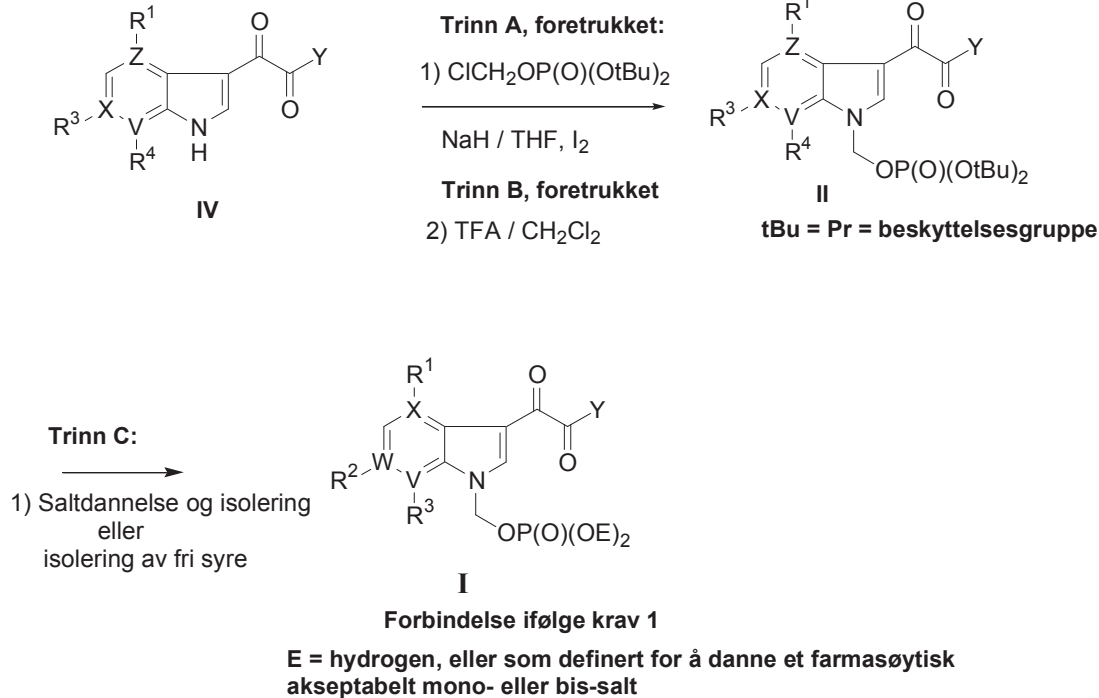
5	h	=	time(r)
	r.t.	=	romtemperatur
	mol	=	mol
	mmol	=	millimol
	g	=	gram
10	mg	=	milligram
	ml	=	milliliter
	TFA	=	Trifluoreddiksyre
	DCE	=	1,2-dikloretan
	CH ₂ Cl ₂	=	diklormetan
15	TPAP	=	tetrapropylammonium-perruthenat
	THF	=	Tetrahydrofuran
	DEPBT	=	3-(dietoksyfosforyloksy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on
	DMAP	=	4-dimetylamino-pyridin
	P-EDC	=	Polymer-båret 1-(3-dimetylamino-propyl)-3-
20			etylkarbodiimid
	EDC	=	1-(3-dimetylamino-propyl)-3-etylkarbodiimid
	DMF	=	<i>N,N</i> -dimetylformamid
	Hunig's Base	=	<i>N,N</i> -diisopropyletylamin
	MCPBA	=	<i>meta</i> -klorperbenzosyre
25	azaindol	=	1 <i>H</i> -pyrrolo-pyridin
	4-azaindol	=	1 <i>H</i> -pyrrolo[3,2- <i>b</i>]pyridin
	5-azaindol	=	1 <i>H</i> -pyrrolo[3,2- <i>c</i>]pyridin
	6-azaindol	=	1 <i>H</i> -pyrrolo[2,3- <i>c</i>]pyridin
	7-azaindol	=	1 <i>H</i> -pyrrolo[2,3- <i>b</i>]pyridin
30	4,6-diazaindol	=	5 <i>H</i> -pyrrolo[3,2- <i>d</i>]pyrimidin
	5,6-diazaindol	=	1 <i>H</i> -pyrrolo[2,3- <i>d</i>]pyridazin
	5,7-diazaindol	=	7 <i>H</i> -pyrrolo[2,3- <i>d</i>]pyrimidin

	PMB	=	4-metoksybenzyl
	DDQ	=	2, 3-diklor-5, 6-dicyano-1, 4-benzokinon
	OTf	=	Trifluormetansulfonoksy
	NMM	=	4-metylmorfolin
5	PIP-COPh	=	1-benzoylpiperazin
	NaHMDS	=	Natrium-heksametyldisilazid
	EDAC	=	1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylkarbodiimid
	TMS	=	Trimetylsilyl
	DCM	=	Diklormetan
10	DCE	=	Dikloreten
	MeOH	=	Metanol
	THF	=	Tetrahydrofuran
	EtOAc	=	Etylacetat
	LDA	=	Litium-diisopropylamid
15	TMP-Li	=	2,2,6,6-tetrametylpiperidinyllitium
	DME	=	Dimetoksyetan
	DIBALH	=	Diisobutylaluminium-hydrid
	HOBT	=	1-hydroksybenzotriazol
	CBZ	=	Benzyloksykarbonyl
20	PCC	=	Pyridinium-klorkromat
	TRIS	=	Trometamin eller 2-amino-2-(hydroksymetyl)propan-1,3-diol

KJEMI

25 Foreliggende oppfinnelse omfatter forbindelser med formel I, deres farmasøytiske formuleringer og anvendelse av dem for pasienter som lider av eller er mottagelige for HIV-infeksjon.

Skjema A viser en oversikt over fremgangsmåten for fremstilling av prodrug I ifølge oppfinnelsen fra de parentale molekyler IV.

Skjema A**Skjema B**

For å utarbeide metoden, som vist i Skjema A, blir den antivirale parentale forbindelse av interesse, IV, omdannet til fosfat-mellomprodukt II, ved N-alkylering

med klorid-mellomprodukt III, i nærvær av en egnet base så som natriumhydrid, kaliumhydrid, natriumamid, natrium-t-butoksyd, natrium-(bis-trimetylsilyl)-amid, kalium-(bis-trimetylsilyl)-amid eller kombinasjoner derav så som natriumhydrid pluss natrium-bis-(trimetylsilyl)amid. Fremstilling av reagens III og metodologien for anvendelse for fremstilling av prodrug ved alkylering av hydroksygrupper er 5 beskrevet i Y. Ueda et.al. U.S. Patent 6,362,172B2. Alkyleringsbetingelser, beskyttelsesgrupper, beskyttelsesgruppe-fjerning og betingelser for saltdannelse er generelt anvendbare for vår søknad til tross for det faktum at vi alkylerer en azaindol i indolringen istedenfor en hydroksygruppe. I foreliggende søknad kan fra 1,1 til 5,0 10 ekvivalenter av base anvendes, idet mellom 2 og 4 ekvivalenter er foretrukket. Fra 1,1 opptil 12 ekvivalenter av reagens III kan anvendes, idet 5 til 10 er foretrukket avhengig av substratet. Reagenset kan tilsettes i én porsjon eller inkrementelt i mange porsjoner over tid. En kilde for jodid-ion blir vanligvis satt til reaksjonen for å gi økede utbytter. Elementær jod er for tiden foretrukket som kilden for jodid. 0,1 15 til 1,5 ekvivalenter av jod blir vanligvis tilsatt pr. azaindol/indol NH som blir alkylert, idet 1,0 til 1,2 ekvivalenter av jod er foretrukket siden utbytter er høyest. Alternative kilder for jodid omfatter for eksempel natriumjodid, litiumjodid, cesiumjodid, kobberjodid eller tetrabutyl-ammoniumjodid. Funksjonen av jod er antagelig for å danne det tilsvarende jodmetyl-reagens IIIa in situ fra klormetyl-reagenset III. Jod- 20 eller brom-reagensene svarende til III kunne sannsynlig anvendes direkte i reaksjonen istedenfor kloridet III. Alkylerings-reaksjonen i trinn A blir vanligvis utført i et inert, organisk løsningsmiddel så som tetrahydrofuran ved en temperatur fra ca. 0°C til 50°C, mer foretrukket mellom 20° og 40°C. Andre vannfrie organiske løsningsmidler så som metyl-tetrahydrofuran, metyl-t-butyleter, dioksan, 25 etylenglykol-dimetyleter, dimetylacetamid eller N,N-dimetylformamid kan også være nyttige. Ester-mellomprodukt II blir deretter underkastet et konvensjonelt avbeskyttelsestrinn for å fjerne beskyttelsesgruppene Pr. Reagensene anvendt i slike trinn vil avhenge av beskyttelsesgruppen anvendt, men vil være velkjent for fagfolk på området. Den mest foretrukne beskyttelsesgruppe er t-butylgruppen som kan 30 fjernes med trifluoreddiksyre, saltsyre eller maursyre i et passende inert organisk løsningsmiddel. Det inerte løsningsmiddel kan være diklormetan eller muligens, for eksempel dikloretan, toluen eller trifluormetyl-benzen. I metylenklorid kan trifluoreddiksyre-avbeskyttelse utføres ved anvendelse av fra 1 til 15 ekvivalenter av

syre (eller syren kan måles forskjellig som for eksempel en 5% løsning i løsningsmiddel etter volum) og temperaturer på mellom 0° og 40°. Generelt, jo større overskudd av TFA anvendt, desto lavere er temperaturen anvendt. Nøyaktige betingelser varierer med substratet. Trinn 3 beskriver isolering av den frie syren eller

5 salter som kan dannes via mange standard metoder som er velkjent på området. Generelt, etter TFA-avbeskyttelse, blir en vandig opparbeiding anvendt hvor overskudd av syre blir nøytralisert med en base og de organiske urenheter fjernet via ekstraksjon med et organisk løsningsmiddel så som etylacetat eller diklormetan. For eksempel kan overskudd av vandig NaOH anvendes for å gjøre reaksjonsblandingen

10 basisk. Dette er velkjent for en fagmann på området. Surgjøring påny av den vandige fasen til pH 2,5 med vandig 1N HCl og deretter ekstraksjon med et organisk løsningsmiddel vil gi, etter fjerning av løsningsmiddel i vakuum, den frie syren. Den frie syren kan omdannes til uorganiske salter ved tilsetning av passende baser i løsningsmidler så som vann, metanol, etanol, etc. For eksempel tilveiebringer

15 tilsetning av natriumkarbonat til en vandig løsning av fosfat-prodrug og justering av pH til omtrent 7,6, en løsning som ved fjerning av vann via lyofilisering gir dinatriumsaltet av prodrug-forbindelsen. Kaliumkarbonat kan anvendes tilsvarende. Vandige løsninger av natriumbikarbonat eller kaliumbikarbonat kan anvendes tilsvarende. Mono-kalium- eller mono-natriumsalter kan dannes ved forsiktig

20 titrering av fosfat-syreløsninger med kalium- eller natrium-2-etyl-heksanoat. Aminsalter kan dannes ved oppløsning av den frie syren i organiske løsningsmidler så som etylacetat eller acetonitril eller lavmolekylære alkoholer eller blandinger av disse løsningsmidler, eventuelt inneholdende vann. Noen aminer potensielt anvendelige for saltdannelse omfatter: lavere alkylaminer (metylamin, etylamin, cykloheksylamin og lignende) eller substituerte lavere alkylaminer (f.eks. hydroksyl-substituerte

25 alkylaminer så som dietanolamin, trietanolamin eller tris(hydroksymetyl)-aminometan), lysin, arginin, histidin, N-metylglukamin eller baser så som piperidin eller morfolin. Langsom tilsetning av et amin til en omrørt løsning ved lav temperatur kan gi enten mono- eller bis-aminsaltet avhengig av støkiometrien.

30 Aminsalter kan også oppnås ved omrøring av løsningen og fjerning av løsningsmidlet i vakuum istedenfor krystallisering eller utfelling. Omkrystalliseringsprosedyrer vil variere med forbindelse og salt men er tilgjengelig for fagfolk på området. Skjema B

viser en foretrukket sekvens og sett av reagenser og betingelser for å utføre den generelle sekvens vist i Skjema A.

En alternativ og i mange tilfeller den foretrukne metode for å utføre sekvensen i trinn C som omfatter avbeskyttelse av diesteren for å gi mellomprodukt-syre *in situ* fulgt av saltdannelse i reaksjonsmediet kan anvendes. For eksempel kan oppvarmning av diester II i en blanding av vann og et vannblandbart medløsningsmiddel så som for eksempel aceton, metanol, etanol eller isopropanol, produsere den frie syren av I i reaksjonsmediet (*in situ*). Et foretrukket løsningsmiddel er aceton og isopropanol. Temperaturer mellom omgivelse og kokepunktet av løsningsmidlene kan anvendes. Typisk er 40° til 60° C i det foretrukne område. Tilsetning av en base eller mer foretrukket et amin som beskrevet ovenfor til reaksjonsblandingen inneholdende den frie syren i vannet og medløsningsmidlet kan produsere saltet direkte. Hvis de passende betingelser blir valgt kan saltet krystallisere eller presipitere direkte fra reaksjonsmediet og isoleres ved filtrering og tørking. Spesifikke eksempler er inneholdt i den eksperimentelle seksjon.

Den foretrukne metode for fremstilling av mellomprodukter IIa, IIb og IIc og syrene Iac, Ibc og Ic gir flere betydelige fordeler fremfor metodene anvendt initielt for fremstilling av IIa, IIb og IIc under forskningsforsøk. De innledende oppdagelsesruter for fremstilling av alle tre mellomprodukter II anvendte fremstilling av di-tertbutylklormetylfosfat som krevet anvendelse av relativt dyrt tetrabutylammonium-di-tert-butylfosfat som ble omsatt med et 10 ganger overskudd av dyrt og potensielt risikabelt klorjodmetan. Overskudd av flyktige stoffer og jodmetan ble fjernet i vakuum for å gi det rå reagens som ble anvendt uten ytterligere rensning. Minst et 5 ganger overskudd av dette reagens ble anvendt for å reagere med forbindelser IV, hvilket betyr at minst 5 ekvivalenter av tetrabutylammonium-fosfat og 50 ekvivalenter av klorjodmetan ble anvendt sammenlignet med mengder av enten IVa, b eller c. I tillegg ble alkylering av forbindelser IV med dette reagens oppnådd ved anvendelse av NaH som base og jod som et additiv for å fremme alkylering. Disse betingelser produserte en reaksjonsblanding inneholdende den ønskede forbindelse II som et hovedprodukt og biprodukter som ble fjernet ved anvendelse av silikagel-kromatografi, en omstendelig, tidkrevende og dyr operasjon spesielt for reaksjoner i økende skala. Svikt i å fjerne biprodukter, resulterte i produkter I fra neste trinn, ved fjerning av beskyttelsesgruppene, som inneholdt urenheter som var

meget vanskelige å fjerne på en tilfredsstillende måte i enten et rimelig utbytte eller tidsramme.

Den forbedrede fremstilling av di-tertbutylklormetylfosfat anvender mindre dyrt ditertbutyl-kaliumfosfat og bare omtrentlig 2 ganger overskudd av dette reagens
5 sammenlignet med den andre reaktant klormetylsulfonylklorid. Di-terbutylklor-metylfosfatet fremstilt ved denne metoden blir isolert i ren form ved hensiktsmessig destillering.

For omdannelsen av IVa til IIa ble bare 1,2 ekvivalenter av dette reagens anvendt for å alkylere forbindelser IV. I tillegg ble en mindre reaktiv og økonomisk
10 base, kaliumkarbonat, anvendt sammen med DMSO for å oppnå en alkylering hvor forbindelsene II produsert er tilstrekkelig fri for biprodukter til at de kan anvendes uten kromatografisk rensning som inntak for avbeskyttelsesreaksjonen. Den frie syren Iac eller salter så som Iab kan for eksempel oppnås i ren form fra IIa fremstilt på denne måten uten kromatografi.

15 For syntesen av forbindelser IIb og IIc som er langsommere til å reagere enn IVa, ble 2 til 2,5 ekvivalenter av di-terbutylklormetylfosfat anvendt og modifiserte betingelser (cesiumkarbonat som base med KI i løsningsmidlet, NMP) ble anvendt for å alkylere enten IVb og IVc og realisere høy omdannelse til henholdsvis IIb og IIc.

Igjen ga de nye betingelser forbindelser II med tilstrekkelig renhet til å tillate
20 at de kan anvendes for å produsere forbindelser I uten behov for kromatografisk rensning. Således reduserer de nye betingelser mengdene og støkiometri av reagenser nødvendig for å fremstille forbindelsen I ifølge foreliggende oppfinnelse og unngår behovet for kromatografisk rensning av mellomprodukter II. Utgangsmaterialene anvendt for å fremstille di-tertbutylklormetylfosfat er mer økonomiske og mindre
25 risikable og sluttproduktet blir produsert med høyere renhet. Endelig eliminerer betingelsene utviklet for alkylering av IVa, IVb og IVc behovet for den reaktive, brennbare natriumhydrid-base som var anvendt i overskudd og anvender enten kalium- eller cesiumkarbonat.

I alkyleringstrinnet kan en egnet base anvendes så som M_2CO_3 (M er litium,
30 natrium, kalium, rubidium eller cesium). For omdannelse av IVa til IIa, er K_2CO_3 foretrukket (1-5 molekvivalenter, fortrinnsvis 2 molekvivalenter pr. mol av IVa). For omdannelse av IVb til IIb eller IVc til IIc, er cesiumkarbonat foretrukket.

Også et egnet løsningsmiddel er nødvendig, så som dimetylsulfoksyd, N-dimetylformamid, aceton, acetonitril, N-metylpyrrolidinon, formamid, tetrahydrofuran, etc. (2-50 ml/gram av IV, med 5 ml/gram foretrukket); dimetylsulfoksyd er foretrukket for omdannelse av IVa til IIa; N-metylpyrrolidinon er foretrukket for omdannelse av IVb til IIb eller IVc til IIc.

En egnet løsningsmiddel jodkilde omfatter, men er ikke begrenset til, MI (M er for eksempel litium, natrium, kalium, jod, tetrabutylammonium, etc.); med kaliumjodid foretrukket (0,1-5 molekvivalenter/mol av forbindelse IV; 2 ekvivalenter foretrukket).

Alkyleringsmidlet, di-tert-butylklormetylfosfat, kan anvendes i 1-10 molekvivalenter pr. mol av IV; men ca. 1,2 molekvivalenter er foretrukket.

Reaksjonstemperaturen kan være 10-60°C (30°C foretrukket).

I avbeskyttelsestrinnet, når de to tert-butylgrupper fjernes fra IIa for å danne Iac, blir dette utført i nærvær av et egnet løsningsmiddel så som diklormetan (foretrukket), diklorethan, kloroform, karbontetraklorid, toluen, benzen, etc. (2-50 ml/gram av IV, fortrinnsvis 10 ml/gram)

For avbeskyttelse av IIb og IIc for å oppnå henholdsvis Ibc og Ic, blir dette utført i aceton/vann ved en temperatur på ca. 40°C.

I tillegg, under avbeskyttelse av IIa, er det foretrukket å ha en syre til stede så som trifluoreddiksyre (foretrukket), saltsyre, svovelsyre, salpetersyre, etc. (2-100 molekvivalenter basert på IVa, med 15 molekvivalenter foretrukket).

KJEMI

Generelt:

Ytterligere fremstillinger av utgangsmaterialer og forløpere er omfattet i Wang et. al. U.S. Patent 6,476,034 bevilget 5. november 2002.

Alle væskekromatografi- (LC) data ble registrert på en Shimadzu LC-10AS væskekromatograf ved anvendelse av en SPD-10AV UV-Vis detektor med massespektrometri- (MS) data bestemt ved anvendelse av en Micromass Platform for LC i elektrospray modus.

LC/MS-METODE (DVS. FORBINDELSE-IDENTIFIKASJON)

	Kolonne A:	YMC ODS-A S7 3,0x50 mm kolonne
5	Kolonne B:	PHX-LUNA C18 4,6x30 mm kolonne
	Kolonne C:	XTERRA ms C18 4,6x30 mm kolonne
	Kolonne D:	YMC ODS-A C18 4,6x30 mm kolonne
10	Kolonne E:	YMC ODS-A C18 4,6x33 mm kolonne
	Kolonne F:	YMC C18 S5 4,6x50 mm kolonne
15	Kolonne G:	XTERRA C18 S7 3,0x50 mm kolonne
	Kolonne H:	YMC C18 S5 4,6x33 mm kolonne
	Kolonne I:	YMC ODS-A C18 S7 3,0x50 mm kolonne
20	Kolonne J:	XTERRA C-18 S5 4,6x50mm kolonne
	Kolonne K:	YMC ODS-A C18 4,6x33mm kolonne
25	Kolonne L:	Xterra MS C18 5uM 4,6x30mm kolonne
	Kolonne M:	YMC ODS-A C18 S3 4,6x33mm kolonne

30 STANDARD LC-KJØREBETINGELSER (ANVENDT HVIS IKKE PÅ ANNEN MÅTE ANGITT):

Gradient: 100% Løsningsmiddel A / 0% Løsningsmiddel B til 0%
Løsningsmiddel A / 100% Løsningsmiddel B

Løsningsmiddel A = 10% MeOH - 90% H₂O - 0,1% TFA, Løsningsmiddel B = 90% MeOH - 10% H₂O - 0,1% TFA; og R_t i min.

Gradient-tid: 2 minutter

Holdetid 1 minutt

5 Strømningshastighet: 5 ml/min

Detektor-bølgelengde: 220 nm

Løsningsmiddel A: 10% MeOH / 90% H₂O / 0,1% trifluoreddiksyre

Løsningsmiddel B: 10% H₂O / 90% MeOH / 0,1% trifluoreddiksyre

10 ALTERNATIVE LC KJØREBETINGELSER B:

Gradient: 100% Løsningsmiddel A / 0% Løsningsmiddel B til 0%

Løsningsmiddel A / 100% Løsningsmiddel B

Løsningsmiddel A = 10% MeOH - 90% H₂O - 0,1% TFA, Løsningsmiddel B = 90%

15 MeOH - 10% H₂O - 0,1% TFA; og R_t i min.

Gradient-tid: 4 minutter

Holdetid 1 minutt

Strømningshastighet: 4 ml/min

Detektorbølgelengde: 220 nm

20 Løsningsmiddel A: 10% MeOH / 90% H₂O / 0,1% trifluoreddiksyre

Løsningsmiddel B: 10% H₂O / 90% MeOH / 0,1% trifluoreddiksyre

Forbindelser renset ved preparativ HPLC ble fortynnet i MeOH (1,2 ml) og renset ved anvendelse av de følgende metoder på et Shimadzu LC-10A automatisert preparativ HPLC-system eller på et Shimadzu LC-8A automatisert preparativ HPLC-system med detektor (SPD-10AV UV-VIS) bølgelengde og løsningsmiddelsystemer (A og B) samme som ovenfor.

PREPARATIV HPLC-METODE (DVS. FORBINDELSE-RENSNING)

30

Rensningsmetode: Innledende gradient (40% B, 60% A) stigning til endelig gradient (100% B, 0% A) over 20 minutter, hold i 3 minutter (100% B, 0% A)

Løsningsmiddel A: 10% MeOH / 90% H₂O / 0,1% trifluoreddiksyre

Løsningsmiddel B: 10% H₂O / 90% MeOH / 0,1% trifluoreddiksyre
 Kolonne: YMC C18 S5 20x100 mm kolonne
 Detektor-bølgelengde: 220 nm

5 For de eksperimentelle prosedyrer nedenfor ble de følgende HPLC-betingelser eller modifikasjoner av standardprosedyrene anvendt:

HPLC betingelser for rutine LC renhet:

Deteksjon ved 254 nm; Gradient 0-100% B/A; A 10% CH₃CN-90% H₂O-0,1% TFA, B 90% CH₃CN-10% H₂O-0,1% TFA; Gradient-tid 4 min; Kolonne YMC

10 ODS-AQ eller ORD-A 4,6x50mm 3 mikron.

HPLC-betingelser for LC/MS-analyse:

Kolonne J: XTERRA C-18 S5 4,6x50mm kolonne, Gradient: 100% løsningsmiddel A/0% løsningsmiddel B til 0% løsningsmiddel A / 100% løsningsmiddel B

Løsningsmiddel A = 10% MeOH - 90% H₂O - 0,1% TFA, Løsningsmiddel B = 90%

15 MeOH -10% H₂O - 0,1% TFA; og Rt i min; Gradient-tid: 3 minutter;

Strømningshastighet: 4 ml/min; Detektor-bølgelengde: 220 nm

Utgangsmaterialer kan anskaffes fra kommersielle kilder eller fremstilles ved anvendelse av litteratur-prosedyrer.

20 FREMSTILLING AV PARENTALE FORBINDELSER IV:

Fremstilling av parentale Forbindelser **IV** er beskrevet tidligere i de følgende, referanser:

U.S. Patent 6,469,006 bevilget 22. oktober 2002 til W. S. Blair et al;

25 U.S. Patent 6,476,034 bevilget 5. november 2002 til Wang et al;

U.S. Patent 6,573,262 bevilget 3. juni 2003 til Meanwell et al;

U.S. nummer 10/630,278 innlevert 30. juli 2003 til J. Kadow et al; som er en CIP av

U.S. nummer 10/214,982 innlevert 7. august 2002, som er en CIP av U.S. nummer

10/038,306 innlevert 2. januar 2002, som svarer til PCT WO 02/062423, innlevert 2.

30 januar 2002, publisert 15. august 2002;

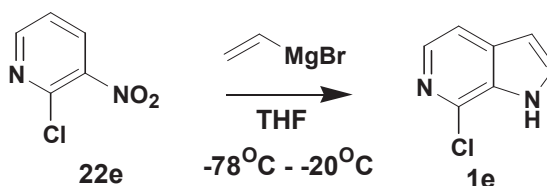
U.S. nummer 10/871,931 innlevert 18. juni 2004 til Yeung et al;

U.S. nummer 10/762,108 innlevert 21. januar 2004 til Wang et al, svarende til PCT WO 2004/043337 publisert 27. mai 2004.

Utvalgte detaljerte prosedyrer er gitt nedenfor:

TYPISK PROSEDYRE FOR FREMSTILLING AV MELLOMPRODUKTER FOR
5 FREMSTILLING AV DE PARENTALE FORBINDELSER IV

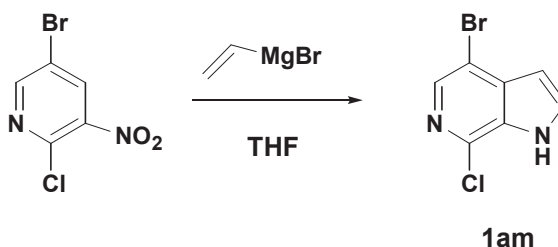
1) Fremstilling av azaindol 1



10

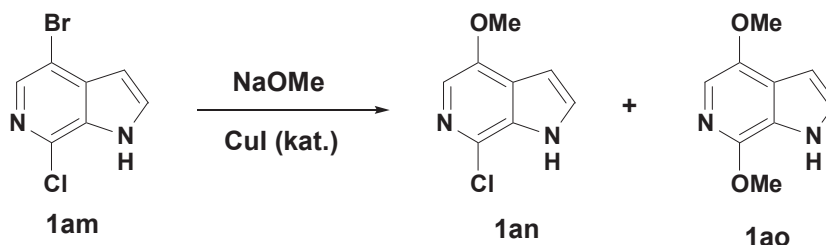
Fremstilling av azaindol, Metode A: Fremstilling av 7-klor-6-azaindol **1e**: 2-klor-3-nitropyridin **22e** (5,0 g) ble oppløst i tørr THF (200 ml). Etter at løsningen var avkjølt til -78°C ble et overskudd av vinyl-magnesiumbromid (1,0 M i THF, 100 ml) tilsatt. Deretter fikk reaksjonsblandingen stå ved -20°C i åtte timer
15 før den ble behandlet med 20% NH_4Cl (150 ml). Den vandige fasen ble ekstrahert med EtOAc (3 x 150 ml). De samlede organiske lag ble tørket over MgSO_4 . Etter filtrering og konsentrasjon ble råproduktet rensert ved silikagel-kolonnekromatografi, hvilket ga 1,5 g 7-klor-6-azaindol **1e** i 31% utbytte.

20 Forbindelser **5an**, **IVa** og **5ap** er beskrevet nedenfor.



Forbindelse **1am**, 4-brom-7-klor-6-azaindol (gult fast stoff) ble fremstilt ved
25 samme metode som anvendt for azaindol **1e**, men utgangsmaterialet anvendt var 5-brom-2-klor-3-nitropyridin. (tilgjengelig fra Aldrich, Co.). MS m/z : $(\text{M}+\text{H})^+$ beregnet

for $C_7H_5BrClN_2$: 230,93; funnet 231,15. HPLC-retensjonstid: 1,62 minutter (kolonne B).



5

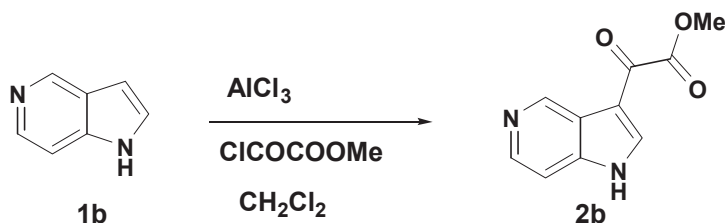
Forbindelse **1an** (4-metoksy-7-klor-6-azaindol) og forbindelse **1ao** (4,7-dimetoksy-6-azaindol): En blanding av 4-brom-7-klor-6-azaindol (1 g), CuI (0,65 g) og NaOMe (4 ml, 25%) i MeOH (16 ml) ble oppvarmet ved 110 - 120°C i 16 timer i et lukket rør. Etter avkjøling til omgivelsestemperatur ble reaksjonsblandingen nøytralisert med 1N HCl for å oppnå pH 7. Den vandige løsningen ble ekstrahert med EtOAc (3 x 30 ml). Deretter ble de samlede organiske lag tørket over $MgSO_4$ og konsentrert i vakuum, hvilket ga en rest, som ble renset ved silikagel- (50 g) kromatografi ved anvendelse av 1:7 EtOAc : heksan som elueringsmiddel. (Kolonne-dimensjon: 20mm x 30 cm), hvilket ga 0,3 g 4-metoksy-7-klor-6-azaindol (hvitt fast stoff) og 0,1 g 4,7-dimetoksy-6-azaindol (hvitt fast stoff).

15

Forbindelse **1an** (4-metoksy-7-klor-6-azaindol). MS m/z : $(M+H)^+$ beregnet for $C_8H_8ClN_2O$: 183,03; funnet 183,09. HPLC retensjonstid: 1,02 minutter (kolonne B).

Forbindelse **1ao** (4,7-dimetoksy-6-azaindol). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,28 (m, 2H), 6,63 (m, 1H), 4,14 (s, 3H), 3,95 (s, 3H). MS m/z : $(M+H)^+$ beregnet for $C_9H_{11}N_2O_2$: 179,08; funnet 179,05. HPLC retensjonstid: 1,36 minutter (kolonne B).

20



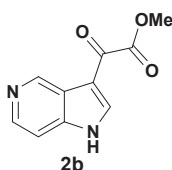
25

*Acylering av azaindol, metode B: Fremstilling av metyl-(5-azaindol-3-yl)-oksoacetat **2b***: 5-azaindol (**1b**) (0,5 g, 4,2 mmol) ble satt til en suspensjon av $AlCl_3$

(2,8 g, 21,0 mmol) i CH₂Cl₂ (100 ml). Omrøring ble fortsatt ved romtemperatur i 1 time før metylkloroksoacetat (2,5 g, 21,0 mmol) ble tilsatt dråpevis.

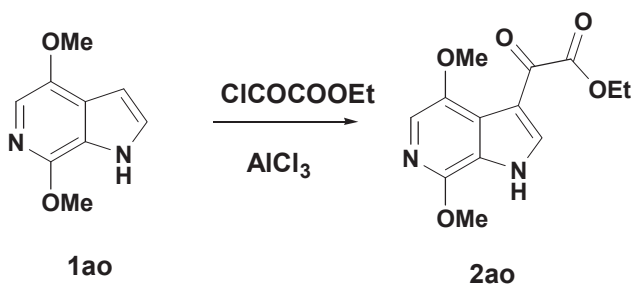
Reaksjonsblandingen ble omrørt i 8 timer. Etter at 20 ml MeOH var tilsatt forsiktig for å stanse reaksjonen, ble løsningsmidler fjernet under vakuum. Det faste residuet
5 ble rensset ved silikagel-kolonnekromatografi (EtOAc/MeOH = 10 : 1), hvilket ga 0,6 g (70%) av det acylerte produkt **2b**.

Karakterisering av forbindelser **2**:

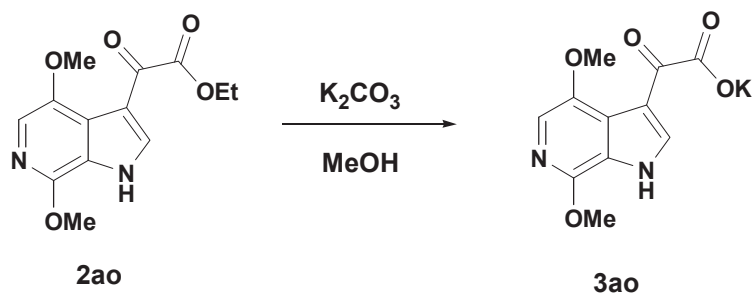


10

Forbindelse **2b** (*Metyl-(5-azaindol-3-yl)-oksoacetat*): ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 9,61 (s, 1H), 9,02 (s, 1H), 8,59 (d, 1H, *J* = 6,63 Hz), 8,15 (d, 1H, *J* = 6,60 Hz), 4,00 (s, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 178,9, 163,0, 145,6, 144,2, 138,3, 135,0, 124,7, 116,3, 112,1, 53,8. MS *m/z*: (M+H)⁺ beregnet for C₁₀H₉N₂O₃: 205,06;
15 funnet 205,04. HPLC retensjonstid: 0,32 minutter (kolonne A).

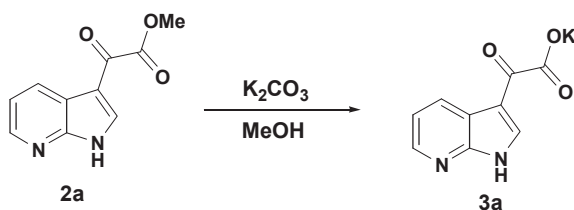


Forbindelse **2ao** (*etyl-(4,7-dimetoksy-6-azaindol-3-yl)-oksoacetat*) ble
20 fremstilt ved samme metode som anvendt for forbindelse **2b**, men utgangsmaterialet anvendt var 4,7-dimetoksy-6-azaindol. Forbindelsen ble rensset ved silikagel-kromatografi ved anvendelse av 2 : 3 EtOAc : heksan som elueringsmiddel, hvilket ga en gul olje: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9,50 (s, 1H), 8,21 (s, 1H), 7,47 (s, 1H), 4,39 (q, 2H, *d* = 7,05 Hz), 4,13 (s, 3H), 3,93 (s, 3H), 1,40 (t, 3H, *d* = 7,2 Hz). MS
25 *m/z*: (M+H)⁺ beregnet for C₁₃H₁₅N₂O₅: 279,10; funnet 279,16. HPLC retensjonstid: 1,28 minutter (kolonne B).



2) Fremstilling av kalium-azaindol-3-glyoksylat 3

5



10 *Fremstilling av kalium-(7-azaindol-3-yl)-oksoacetat 3a*: Forbindelse **2a** (43 g, 0,21 mol) og K_2CO_3 (56,9 g, 0,41 mol) ble oppløst i MeOH (200 ml) og H_2O (200 ml). Etter 8 timer ble produkt **3a** utfelt fra løsningen. Filtrering ga 43 g av forbindelse **3a** som et hvitt, fast stoff i 90,4% utbytte.

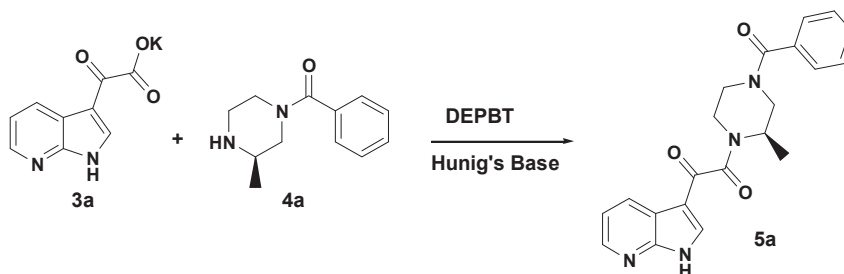
Karakterisering av forbindelser **3**:

15 Forbindelse **3a**, *Kalium-(7-azaindol-3-yl)-oksoacetat*: 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,42 (d, 1H, $J = 7,86$ Hz), 8,26 (d, 1H, $J = 4,71$ Hz), 8,14 (s, 1H), 7,18 (dd, 1H, $J = 7,86, 4,71$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 169,4, 148,9, 143,6, 135,1, 129,3, 118,2, 117,5, 112,9. MS m/z : (M+H) $^+$ av den tilsvarende syre av forbindelse **3a** (**3a**-K+H) beregnet for $C_9H_7N_2O_3$: 191,05; funnet 190,97. HPLC retensjonstid: 0,48 minutter (kolonne A).

20 Forbindelse **3ao** (kalium-(4,7-dimetoksy-6-azaindol-3-yl)-oksoacetat) ble fremstilt (som et gult, fast stoff), ved samme metode som anvendt for å fremstille forbindelse **3a**, bortsett fra at etyl-(4,7-dimetoksy-6-azaindol-3-yl)-oksoacetat ble anvendt som utgangsmateriale. MS m/z : (M+H) $^+$ av den tilsvarende syre av forbindelse **3ao** (M-K+H) $^+$ beregnet for $C_{11}H_{11}N_2O_5$: 251,07; funnet 251,09. HPLC retensjonstid: 0,69 minutter (kolonne B).

25

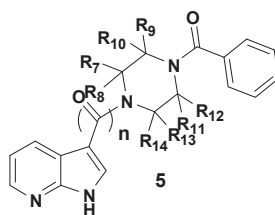
Eksempelprosedyre for fremstilling av 5a



5 Fremstilling av (R)-N-(benzoyl)-3-metyl-N'-[(7-azaindol-3-yl)-oksoacetyl]-piperazin **5a**: Kalium-7-azaindol-3-glyoksylat **3a** (25,4 g, 0,111 mol), (R)-3-metyl-N-benzoylpiperazin **4a** (22,7 g, 0,111 mol), 3-(dietoksyfosforyloksy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on (DEPBT) (33,3 g, 0,111 mol) og Hunig's Base (28,6 g, 0,222 mol) ble samlet i 500 ml DMF. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 8 timer.

10 DMF ble fjernet ved inndampning ved redusert trykk og residuet ble fordelt mellom etylacetat (2000 ml) og 5% Na₂CO₃ vandig løsning (2 x 400 ml). Det vandige laget ble ekstrahert med etylacetat (3 x 300 ml). De organiske faser ble kombinert og tørket over vannfri MgSO₄. Konsentrasjon i vakuum ga et råprodukt som ble renset ved silikagel-kolonnekromatografi med EtOAc/MeOH (50:1), hvilket
15 ga 33 g av produkt **5a** i 81% utbytte.

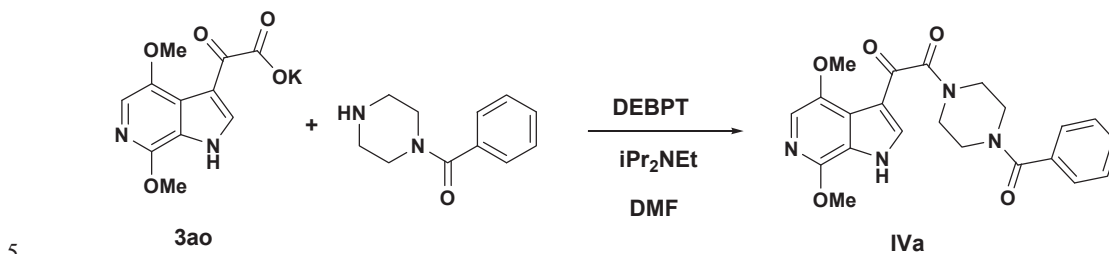
Karakterisering av forbindelser **5** med den følgende sub-struktur:



20 Forbindelse **5a**, n = 2, R₇₋₁₃ = H, R₁₄ = (R)-Me, (R)-N-(benzoyl)-3-metyl-N'-[(7-azaindol-3-yl)-oksoacetyl]-piperazin: ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8,57 (d, 1H, J = 5,97 Hz), 8,38 (d, 1H, J = 4,20 Hz), 8,27 (m, 1H), 7,47 (s, 5H), 7,35 (t, 1H, J = 5,13 Hz), 4,75-2,87 (m, 7H), 1,31 (b, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 185,6, 172,0, 166,3, 148,9, 144,6, 137,0, 134,8, 130,2, 129,9, 128,4, 126,6, 118,6, 118,0,
25 112,2, 61,3, 50,3, 45,1, 35,5, 14,9, 13,7. MS m/z: (M+H)⁺ beregnet for C₂₁H₂₁N₄O₃:

377,16; funnet 377,18. HPLC retensjonstid: 1,21 minutter (kolonne A). Anal.

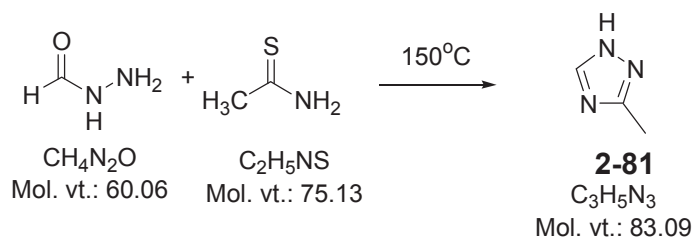
Beregnet for $C_{21}H_{20}N_4O_3$: C, 67,01; H, 5,36; N, 14,88. Funnet: C, 66,01; H, 5,35; N, 14,61.



Forbindelse **IVa**, N-(benzoyl)-N'-[(4,7-dimetoksy-6-azaindol-3-yl)-
 oksoacetyl]piperazin, ble fremstilt ved samme metode som anvendt for å fremstille
 forbindelse **5a**, men utgangsmaterialet var kalium-(4,7-dimetoksy-6-azaindol-3-yl)-
 10 oksoacetat. Forbindelsen ble renset ved silikagel-kromatografi ved anvendelse av
 EtOAc som eluerings-løsningsmiddel, hvilket ga et hvitt, fast stoff. 1H NMR (500
 MHz, DMSO- d_6) δ 13,0 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,40 (m, 6H), 4,00 (s, 3H), 3,83 (s,
 3H), 3,63-3,34 (m, 8H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 185,5, 169,3, 166,5,
 146,2, 145,7, 136,6, 135,3, 129,6, 128,4, 126,9, 122,2, 122,1, 119,2, 114,4, 56,8,
 15 52,9, 45,5, 39,9. MS m/z : $(M+H)^+$ beregnet for $C_{22}H_{23}N_4O_5$: 423,17; funnet 423,19.
 HPLC retensjonstid: 1,33 minutter (kolonne B). Anal. Beregnet. For $C_{22}H_{21}N_4O_5$: C,
 62,7; H, 5,02; N, 13,29. Funnet: C, 61,92; H, 5,41; 13,01. Smeltepunkt: 229,5 -
 232°C.

20 PROSEDYRER FOR FREMSTILLING AV PARENTAL FORBINDELSE IVC

Fremstilling av 3-metyl-1,2,4-triazol (2-81)



25

Prosedyre: En fast blanding av maursyrehydrazid (68 g, 1,13 mol) og tioacetamid
 (85 g, 1,13 mol) i en 500 ml rundbunnet kolbe ble oppvarmet med omrøring ved

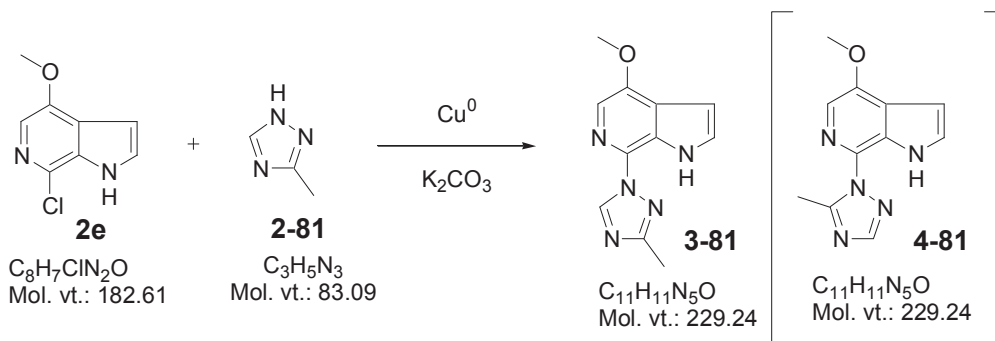
150°C (oljebad temp.) i 1,5 timer med en svak strøm av nitrogen, med fjerning av H₂S og vann (ca. 18 ml væske oppsamlet) dannet under reaksjonen.

Reaksjonsblandingen ble destillert under redusert trykk, med oppsamling av 60,3 g (0,726 mol, Y. 63,3%) av tittelforbindelsen ved 102°C / 0,35 1 mmHg som et hvitt, fast stoff etter fjerning av et væske-forløp. : ¹H NMR (CDCl₃) δ ppm 2,51 (3H, s, 3-Me), 8,03 (1H, s, 5-H), 9,5 (1H, br, NH); TLC R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂) = 0,3 (fosfomolybdat-brenning, hvit flekk).

Referanse: Vanek, T.; Velkova, V.; Gut, Jiri *Coll. Czech. Chem. Comm.* **1985**, *49*, 2492.

10

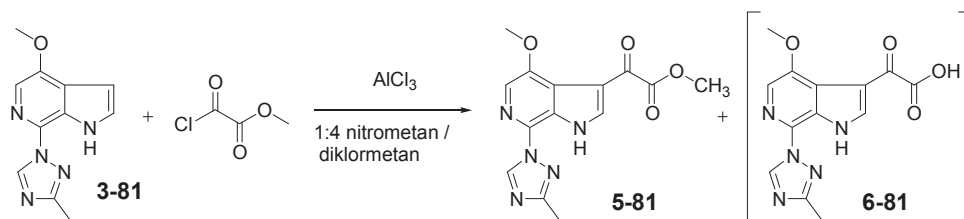
Fremstilling av 3-81



- 15 **Prosedyre:** En 500 ml rundbunnet kolbe ble fylt med 4-metoksy-7-klor-6-azaindol **2e** (9,1 g, 50 mmol; tørket i vakuum), kaliumkarbonat (13,8 g, 100 mmol, 2 ekv.), kobberpulver (6,35 g, 100 mmol, 2 ekv.) og 3-metyl-1,2,4-triazol (83 g, 1,0 mol, 20 ekv.). Den faste blandingen ble oppvarmet til smelting ved 170-175°C (ytre oljebad-temperatur) under en svak strøm av vannfri nitrogen i 12 timer, på hvilket tidspunkt
- 20 HPLC-analyse viste at mengden av toppen for utgangsmaterialet var 5-30% og den ønskede produkt-topp var ca. 45% med isomer biprodukt-topp 15%. Ettersom reaksjonsblandingen ble avkjølt, ble MeOH (150 ml) langsomt satt til den varme, omrørte blanding. Etter avkjøling ble det uoppløselige materialet (kobber-pulver) filtrert gjennom et Celite-sjikt og skyllet med metanol. Filtratet ble konsentrert i
- 25 vakuum til en tykk pasta som ble fortynnet med vann (1 L) og ekstrahert med EtOAc (3x150 ml). EtOAc-ekstraktene ble tørket (MgSO₄), filtrert og konsentrert for å oppnå ca. 8 g rått residuum som ble krystallisert ved oppløsning i varm CH₃CN (50 ml), fulgt av fortynning med vann (100 ml) og avkjøling ved 0°C for å oppsamle 1,45

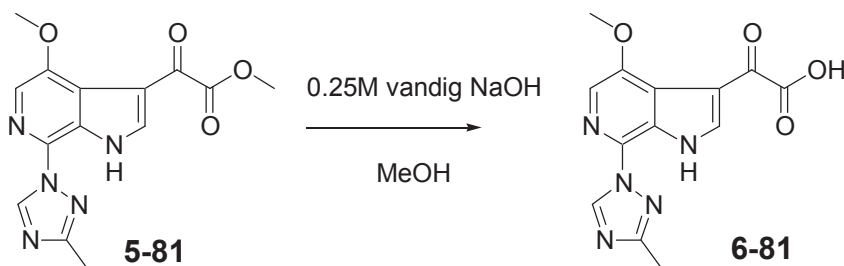
- g (12,7%) av tittelforbindelsen som hvitt fast stoff. Filtratet ble renset ved C-18 revers fase silikagel (YMC ODS-A 75 μ m) eluert med 15-30% CH₃CN/H₂O. Passende fraksjoner ble samlet og den vandige løsningen etter fjerning av CH₃CN ved rotasjonsinndamper ble lyofilisert, hvilket ga ytterligere 1,15 g av
- 5 tittelforbindelsen **3-81**. Det rå vandige lag ble videre ekstrahert med EtOAc mange ganger. Etylacetat-ekstraktene ble tørket (MgSO₄), filtrert, konsentrert og krystallisert fra MeOH, hvilket ga ytterligere 200 mg av tittelforbindelsen **3-81**. Det totale utbytte: 2,8 g (12,2 mmol, Y. 24,5%); MS m/z 230 (MH), HRMS (ESI) m/z beregnet for C₁₁H₁₂N₅O (M+H), 230,1042, funnet 230,1038 (Δ -1,7 ppm); ¹H NMR
- 10 (CDCl₃) δ ppm 2,54 (3H, s, CH₃), 4,05 (3H, s, OCH₃), 6,73 (1H, s, H-3), 7,40 (1H, s, H-2), 7,56 (1H, s, H-5), 9,15 (1H, s, triazol-H-5); ¹³C NMR (CDCl₃, 125,7 MHz) δ ppm 14,2 (triazol-Me), 56,3 (OMe), 100,5 (C-3), 116,9 (C-5), 123,5, 127,2, 127,5 (C-2), 129,5 (C-7), 141,2 (C-5'), 149,5 (C-4), 161,8 (C-3'); Anal. Beregnet for C₁₁H₁₁N₅O: C 57,63, H 4,83, N 30,55, funnet C 57,37, H 4,64, N 30,68.
- 15 Strukturen ble bekreftet ved en enkel røntgenkrystallografisk analyse ved anvendelse av krystaller oppnådd fra C-18 kolonne-fraksjoner. En porsjon av C-18 kolonne-fraksjoner inneholdende en blanding av den ønskede 3-metyl-1,2,4-triazolyl-analog **3-81** og isomer 5-metyl-1,2,4-triazolyl-analog **4-81** ble ytterligere renset ved C-18 revers fase kolonne under eluering med 8-10% CH₃CN/H₂O. Passende
- 20 fraksjoner ble ekstrahert med CH₂Cl₂ og langsom avdampning av løsningsmidlet ga krystallinsk materiale av den isomere 7-(5-metyl-1,2,4-triazolyl)-4-metoksy-6-azaindol (**4-81**): MS m/z 230 (MH), ¹H NMR (CDCl₃) δ ppm 3,05 (3H, s, CH₃), 4,07 (3H, s, OCH₃), 6,74 (1H, q, J=2,4, H-2), 7,37 (1H, t, J=2,4, H-3), 7,65 (1H, s, H-5), 8,07 (1H, s, triazol-H-3). Strukturen ble bekreftet ved en enkel
- 25 røntgenkrystallografisk analyse.

Fremstilling av 5-81



Prosedyre: AlCl₃ (40 g, 0,3 mol, 15 ekv.) ble oppløst i en løsning av CH₂Cl₂ (100 ml) og nitrometan (20 ml) under tørr nitrogen. Til denne løsningen ble satt forbindelse **3-81** (4,58 g, 0,02 mol) under omrøring og under N₂, fulgt av metylkloroksoacetat (9,8 g, 0,08 mol, 4 ekv.). Blandingen ble omrørt under N₂ ved romtemperatur i 1,5 timer. Blandingen ble tilsatt dråpevis til en kald og omrørt løsning av 20% vandig ammoniumacetat-løsning (750 ml). Blandingen ble omrørt i 20 min og det resulterende, utfelte stoff ble filtrert, vasket grundig med vann og tørket i vakuum for å oppnå 4,7 g (0,015 mol, Y. 75%) av tittelforbindelsen **5-81** som hvitt fast stoff: MS m/z 316 (MH); HRMS (ESI) m/z beregnet for C₁₄H₁₄N₅O₄ (M+H), 316,1046; funnet 316,1041 (Δ -1,6 ppm); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ ppm 2,58 (3H, s, CH₃), 3,96 (3H, s, OCH₃), 4,05 (3H, s, OCH₃), 7,76 (1H, s, H-5), 8,34 (1H, d, J=3Hz, H-2), 9,15 (1H, s, triazol-H-5), 11,0 (1H, brs, NH). Mer tittelforbindelse **5-81** og hydrolysert syre **6-81** kan oppnås fra filtratet ved syre-base ekstraksjon med EtOAc.

Fremstilling av 6-81



Prosedyre: Til en suspensjon av metylesteren **5-81** (2,2 g, 7,0 mmol) i MeOH (50 ml) ble satt 0,25M NaOH-løsning i vann (56 ml, 14 mmol, 2 ekv.) ved romtemperatur og blandingen ble omrørt i 15 min på hvilket tidspunkt HPLC viste at hydrolysen var fullstendig. Blandingen ble raskt konsentrert i vakuum for å fjerne MeOH og til den gjenværende løsning ble tilsatt vann (100 ml) og 1N HCl (14 ml) med omrøring for å nøytralisere blandingen. Det resulterende fine presipitat ble filtrert, vasket med vann og tørket i vakuum for å oppnå 1,98 g (6,58 mmol, U. 94%) av tittelforbindelsen **6-81** som gråhvitt fast stoff: MS m/z 302 (MH); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm 2,50 (3H, s, overlappet med DMSO-topper), 3,98 (3H, s, CH₃O), 7,87 (1H, s, H-5), 8,29 (1H, d, J=3,5Hz, H-2), 9,25 (1H, s, triazol-H-5), 12,37 (1H, s, NH).

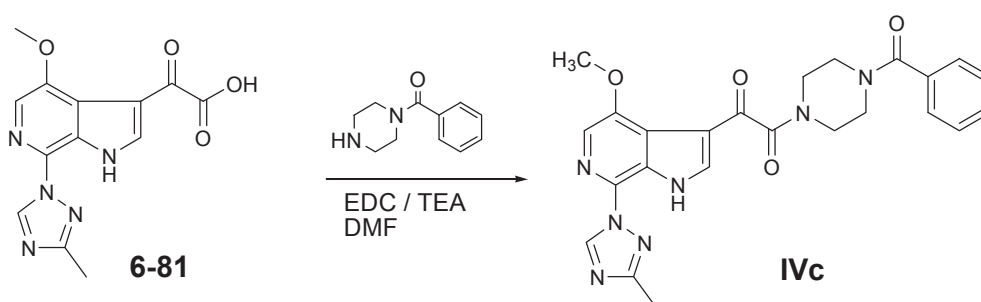
Alternativ prosedyre: Til en suspensjon av metylesteren **5-81** (10,7 g, 34 mmol) i MeOH (150 ml) ble satt 0,25M NaOH-løsning i vann (272 ml, 68 mmol, 2 ekv.) ved romtemperatur og blandingen ble omrørt i 20 min på hvilket tidspunkt HPLC viste at hydrolysen var fullstendig. Blandingen ble raskt konsentrert i vakuum for å fjerne MeOH og den gjenværende løsning ble ekstrahert med EtOAc for å fjerne eventuelle nøytrale urenheter. Til den vandige fasen ble satt 1N HCl (68 ml, 68 mmol) for å nøytralisere produktet. Den resulterende blandingen ble frosset og lyofilisert for å oppnå 14,1 g (33,7 mmol, U. 99,2%) av tittelforbindelsen **6-81**, inneholdende 2 mol-

10 ekvivalenter av NaCl som gråhvitt fast stoff. Dette materialet ble anvendt i den påfølgende reaksjon uten ytterligere rensning. Dinatriumsaltet av tittelforbindelsen **6-81** ble oppnådd ved C-18 revers fase kolonnekromatografi etter natriumbikarbonat-behandling: HPLC >97% (AP, uv ved 254 nm); HRMS (Na-salt, ESI ⁻) m/z beregnet for C₁₃H₁₀N₅O₄ (M-H), 300,0733; funnet 300,0724 (Δ -3 ppm); ¹H NMR (Na-salt, DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm 2,37 (3H, s, Me), 3,83 (3H, s, CH₃O), 7,56 (1H, s, H-5), 8,03 (1H, s, H-2), 9,32 (1H, s, triazol-H-5); ¹³C NMR (Na salt, DMSO-*d*₆, 125,7 MHz) δ ppm 13,8 (triazol-Me), 57,2 (OMe), 114,8 (C-3), 120,0 (C-5), 125,1, 143,5 (C-5'), 149,8 (C-4), 160,0 (C-3'), 171,7, 191,3.

15

20

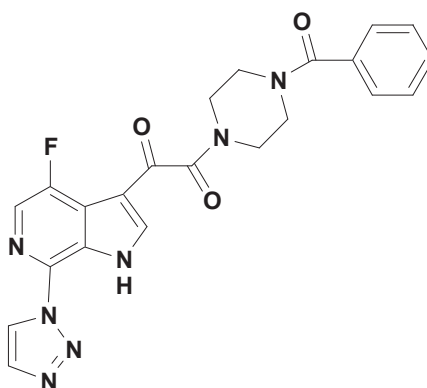
Fremstilling av Forbindelse IVc



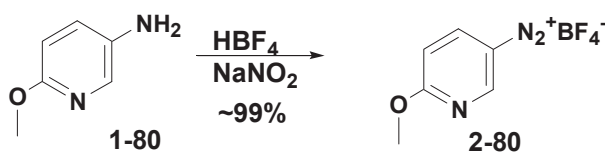
Prosedyre: Til en løsning av syren **6-81** (3,01 g, 10 mmol) og benzoylpiperazin-
 25 hydroklorid (3,39 g, 15 mmol) i DMF (50 ml) ble satt trietylamin (10,1 g, 100 mmol, 10 ekv.), fulgt av 1-[3-(dimetyl-amino)propyl]-3-etylkarbodiimid-hydroklorid (EDC; 5,75 g, 30 mmol) under N₂ og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 22 timer etter ultralydbehandling og ved 40°C i 2 timer. Blandingen ble konsentrert i vakuum

for å fjerne DMF og TEA og til den gjenværende løsning ble satt vann (200 ml) under omrøring og ultralydbehandling. Fellingene dannet ble oppsamlet, vasket med vann og tørket i vakuum for å oppnå 2,8 g (5,9 mmol, U. 59%) av tittelforbindelsen **IVc** som gråhvitt fast stoff. Filtratet ble ekstrahert med CH₂Cl₂ (x2). CH₂Cl₂-ekstrakter
 5 ble tørket (Na₂SO₄), filtrert og konsentrert til gummi som ble utgnidd med Et₂O for å oppnå et fast stoff. Dette faste stoffet ble suspendert og utgnidd med MeOH for å oppnå 400 mg av tittelforbindelsen **IVc** som gråhvitt fast stoff. Totalt utbytte: 3,2 g (6,8 mmol, U. 68%): MS m/z 474 (MH); HRMS (ESI) m/z beregnet for C₂₄H₂₄N₇O₄ (M+H) 474,1890, funnet 474,1884 (Δ -1,2 ppm); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm 2,50
 10 (3H, s, overlappet med DMSO-topper), 3,43 (4H, br, CH₂N), 3,68 (4H, br, CH₂N), 3,99 (3H, s, CH₃O), 7,46 (5H, br. s, Ar-Hs), 7,88 (1H, s, indol-H-5), 8,25 (1H, s, indol-H-2), 9,25 (1H, s, triazol-H-5), 12,40 (1H, s, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm 13,78, 40,58, 45,11, 56,78, 114,11, 120,95, 122,71, 123,60, 126,98, 128,34, 129,6, 135,43, 138,52, 142,10, 149,15, 161,29, 166,17, 169,22, 185,42; UV (MeOH)
 15 λ maks 233,6 nm (ϵ 3,43x10⁴), 314,9 nm (ϵ 1,73x10⁴); Anal: Beregnet for C₂₄H₂₄N₇O₄·1/5H₂O; C 60,42, H 4,94, N 20,55, Funnet; C 60,42, H 5,03, N 20,65; KF (H₂O) 0,75%.

Denne reaksjonen kan også utføres ved anvendelse av HATU og DMAP for å gi mer
 20 konsistent utbytte av tittelforbindelsen: Til en suspensjon av syren **6-81** (15,6 mmol) og HATU [O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluronium-heksafluorofosfonat] (8,90 g, 23,4 mmol; 1,5 ekv.) i DMF (60 ml) og CH₂Cl₂ (60 ml) ble satt en blanding av DMAP (5,72 g, 46,8 mmol, 3 ekv.) og benzoylpiperazinhydroklorid (5,30 g, 23,4 mmol; 1,5 ekv.) i DMF (60 ml) ved romtemperatur og
 25 blandingen ble omrørt under nitrogen-atmosfære i 4 timer. Blandingene ble konsentrert i vakuum for å fjerne CH₂Cl₂ og mesteparten av DMF og til den gjenværende løsning ble satt vann under omrøring og ultralydbehandling. Fellingene dannet ble oppsamlet, vasket med vann og tørket i vakuum for å oppnå 5,38 g (11,4 mmol, U. 72,8%) av tittelforbindelsen **IVc** som gråhvitt fast stoff: HPLC >95% (AP,
 30 uv ved 254 nm).

**Forbindelse IVb**

Syntetiske eksperimentelle prosedyrer for beste fremstilling av Forbindelse IVb

**FV = 223**

5

5-amino-2-metoksypridin (50 g, 0,4 mol) ble satt til en omrørt blanding av absolutt etanol (280 ml) og HBF₄ (48% i vann, 172 ml) og avkjølt til 0°C. Natriumnitritt (129 g) ble oppløst i vann (52 ml) og tilsatt porsjonsvis over 1 time). Omrøringen ble fortsatt ved 0°C i 2 timer. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med eter (1L). Det faste produktet ble oppsamlet ved filtrering og vasket med 500 ml 50:50 EtOH/eter og deretter mange ganger med eter inntil produktet ble svakt rosa av farge. Det blekrosa faste stoff 90 g (~100% utbytte) ble holdt i en eksikator over P₂O₅.

10

Samme prosedyre ble fulgt for å utføre reaksjonen i større skala:

(1) (200 g, 1,6 mol); HBF₄ (688 ml); NaNO₂ (116 g); EtOH (1,12 L); H₂O (208 ml)

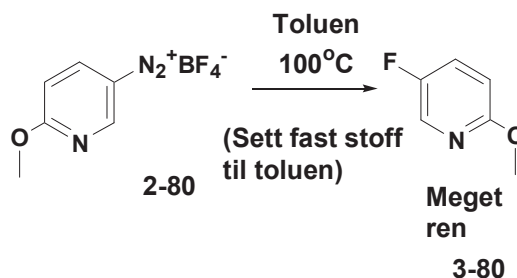
Reaksjonen ble kjørt 4 ganger (totalt 800 gram (1-80)). Produktet ble tørket over P₂O₅ i 48 timer (bare 24 timer for første porsjon).

15

Totalt 1,293 g (2-80) ble oppnådd, (91% utbytte).

Ref: J. Heterocyclic Chem., 10, 779, 1973 (for reaksjonene ovenfor, omfattende analytiske data)

20



Dekomponering av diazoniumsaltet ble kjørt i 3 porsjoner:

- 5 206 g, 219 g og 231 g ved anvendelse av henholdsvis 1,3L, 1,4L og 1,6L vannfri tolueen.

Toluenet ble foroppvarmet under nitrogen til 100°C (indre temperatur) i en 2L 3-halset rundbunnet kolbe utstyrt med en mekanisk rører. Det faste stoffet ble tilsatt porsjonsvis via en øse gjennom en pulvertrakt som var festet til et adapter med svakt

10 utgående positiv nitrogenstrøm. Under tilsetningen ble temperaturen holdt mellom 99-102°C (satt ved 100°C) og omrørt kraftig. Total tilsetningstid var 60 min. for de mindre to porsjoner og 70 min. for den siste. Etter at tilsetningen var avsluttet, ble hver omrørt reaksjon oppvarmet ved 110°C i 1 time. Oppvarmningskappen ble fjernet og omrøring ble stanset. Reaksjonsblandingene fikk stå i 2 timer (omgivelse temp

15 oppnådd). *Sikkerhetsbemerkning: Reaksjonen inneholder BF₃ slik at arbeid med reaksjonsblandingen varm eksponerer damper som forårsaket hudirritasjon hos noen mennesker. Ingen tilfeller ble registrert ved omgivelsestemperatur (6 forskjellige mennesker).* Den varme tolueen fra reaksjonsblandingen ble hellet i en 4L Erlenmeyer (en mørkebrun olje og residuum forble i kolben). Residuet ble vasket

20 med 50 ml tolueen og hellet i de opprinnelige tolueen-ekstrakter.

Tilsett 1,5L av 1N NaOH til tolueenlaget, ekstraher og vask med ~100 ml mettet vandig NaCl.

Kombinerer NaCl med NaOH-laget, re-ekstraher med 150 ml tolueen, vask med 50 ml mettet NaCl.

- 25 Kombinerer tolueenlag.

Tilsett 1L av 1N NaOH til residuet i reaksjonskolbe og virvle for å oppløse så meget residuum som mulig, tilsett deretter 500 ml Et₂O og hell i Erlenmeyer.

Tilsett ~500 ml til av 1N NaOH til reaksjonskolben og virvle ~500 ml Et₂O.

Kombiner mørk Et₂O og NaOH vaskevæsker i Erlenmeyer-kolben.

- 5 Et₂O/NaOH-blandingen ble hellet gjennom pulvertrakt inneholdende plugg av glassull for å oppsamle mørkt viskøst fast stoff. (Tilsett ~500 ml mer eter for vask) i 6L sep. trakt.

Ekstraher. Vask eterlaget med ~200 ml H₂O og deretter 100 ml mettet NaCl.

- 10 Kombiner alle vaskevæsker med opprinnelig NaOH vandig lag og re-ekstraher med 500 ml eter. Vask med 100 ml H₂O og 100 ml NaCl.

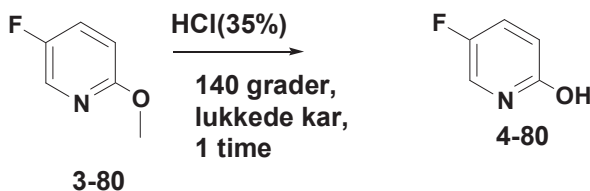
Kombinerer eter-ekstrakter. Toluen og eter ekstrakter ble kontrollert ved LC/MS rent produkt.

Eteren ble konsentrert på en rotovap og residuet ble kombinert med toluenekstraktene for å fremstille en homogen løsning som blir anvendt for neste trinn som den er.

- 15 De andre to kjøringer ble samlet og opparbeidet på samme måte.

Alle vandige lag ble kontrollert ved LC/MS = intet produkt.

Ref: J. Heterocyclic Chem., 10, 779, 1973 (forreaksjonene ovenfor, omfattende analytiske data)



20

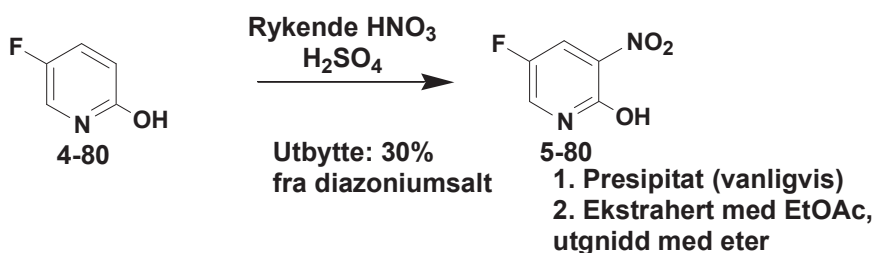
Totalt 4,6L av toluenløsning inneholdende **3-80** ble plassert i flere lukkede rør og behandlet med 900 ml 35% HCl ved 145°C i 2 timer. LC/MS viste intet utgangsmateriale, bare 4. Toluenløsningen ble dekantert og kastet. Den vandige

fasen ble vasket med EtOAc og konsentrert for å fjerne flyktig stoff, hvilket ga et brunt, fast stoff inneholdende det ønskede fluor-hydroksypyridin **4-80**.

Totalt 244 g av dette faste stoffet ble oppsamlet og anvendt for neste trinn som det var (det var ikke fullstendig tørt).

- 5 Merk: Vi har deretter kjørt dette ved dekantering av toluenlaget først før oppvarming for å redusere volumer. Samme reaksjon ble utført ved anvendelse av HBr (48% i H₂O) ved 100°C i 6 timer med lignende resultat til litteratur-prosedyren 49% utbytte.

Ref: *J. Heterocyclic Chem.*, 10, 779, 1973 (for reaksjonene ovenfor, omfattende
10 analytiske data)



- Det faste stoffet ovenfor inneholdende (**4-80**) ble delt i 4 porsjoner og
15 behandlet med H₂SO₄ og rykende HNO₃ som vist nedenfor. Mengdene anvendt var:

	porsjon 1	porsjon 2	porsjon 3	porsjon 4
(1)	25 g	54 g	75 g	90 g
rykende HNO ₃	20,8 ml	45 ml	62,4 ml	75 ml
H ₂ SO ₄ (for addisjon)	5,6 ml+	12 ml+	16,8 ml+	20 ml+
(for løsn.)	56 ml	120 ml	168 ml	200 ml

- Forbindelse **4-80** ble oppløst i svovelsyre (de større mengder angitt ovenfor) ved romtemperatur og deretter oppvarmet til 65°C. En forhåndsannet løsning av rykende salpetersyre og svovelsyre (den mindre mengde angitt ovenfor) ble tilsatt
20 dråpevis. Temperaturen ble holdt mellom 65°C og 80°C (reaksjonen er eksoterm og selv om bad er ved 65°C, går temperaturen høyere, vanligvis 75, noen ganger 80°C).

Etter at tilsetningen var fullstendig ble reaksjonsblandingen oppvarmet ved 65°C i ytterligere en time. Reaksjonsblandingen ble deretter avkjølt til romtemperatur og hellet i en kolbe inneholdende is) (20 g is/g forbindelse, utvikling av gass skjedde). Et fast stoff ble utfelt og det ble oppsamlet ved filtrering (¹HNM viste **4-80** og noe annet (kastet)).

Det vandige laget ble ekstrahert med AcOEt mange ganger (3-5) og konsentrert på en rotasjonsinndamper under vakuum, hvilket ga et fast stoff som ble utgitt med eter, hvilket ga **5-80** som et klart gult fast stoff. Totalt 117 g av ønsket produkt ble oppsamlet i den første porsjon (27% utbytte fra diazoniumsalt). En porsjon

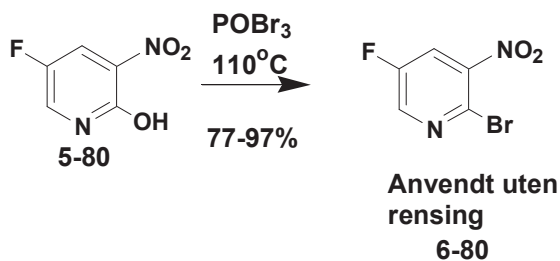
10 krystalliserte ikke: denne oljen ble utgitt med MeOH og Et₂O, hvilket ga 3,6 g av **5-80**; en andre utfelling fra moderluten ga ytterligere 6,23 g av det ønskede produkt **5-80**.

Totalt: 117,0+3,6+6,23 = 126,83. 30,4%). Utbytte i 3 trinn (dekomponering av diazoniumsalt; avbeskyttelse og nitring).

15 Analytiske data fra Notebook: 53877-115: ¹H NMR(δ, MeOD): 8,56-8,27 (dd, J= 7,5, 3,3 Hz, 1H), 8,01 (d, J=3,3 Hz, 1H); LC/MS(M+1)⁺= 158,9; rt = 0,15 min.

Merk: En porsjon av den vandige sure løsning ble tatt og nøytralisert med Na₂CO₃ inntil brusing stanset og deretter ble den ekstrahert med AcOEt ⇒ Et forskjellig produkt ble oppnådd. Intet ønsket produkt i disse ekstrakter.

20



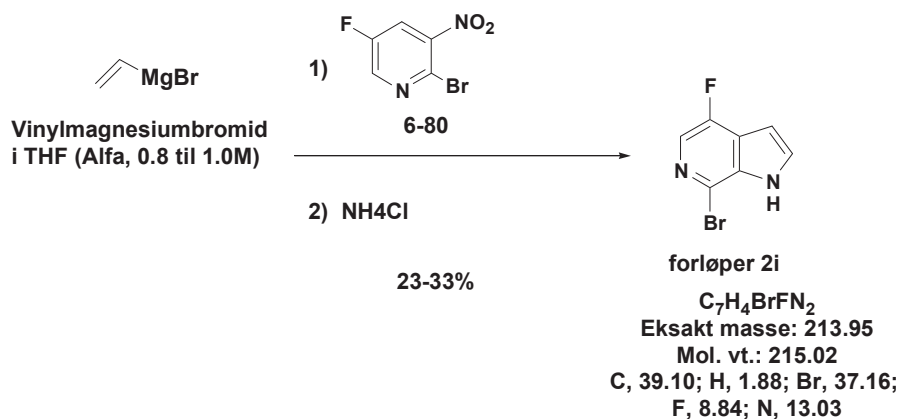
Totalt 117 g av **5-80** ble delt i 4 porsjoner på 30 g x 3 og 27 g x 1 og behandlet med POBr₃ (3 ekv.; 163 g x 3 og 155 g x 1) og en katalytisk mengde av DMF (15 ml) ved

25 romtemperatur (DMF ble tilsatt forsiktig ⇒ gass-utvikling). Etter 5 min. ved

romtemperatur ble løsningene oppvarmet ved 110°C i 3 timer. LC/MS viste at utgangsmateriale var forbrukt. Reaksjonsblandingene fikk avkjøles til romtemperatur. Reaksjonskolbene ble plassert i et isbad; og deretter ble is tilsatt meget langsomt og forsiktig porsjonsvis til kolben, gass-utvikling skjedde på grunn av HBr-dannelse; væsken og det sorte fast stoff som ble dannet ble hellet i et beger med is. EtOAc ble tilsatt og blandingen ble deretter ekstrahert mange ganger med EtOAc. Det organiske laget ble vasket med mettet vandig NaHCO₃; H₂O og saltvann; tørket over Na₂SO₄ og filtrert. Produktet ble tørket i pumpen natten over for å gi 123 g **6-80** som et brunt, fast stoff (77% utbytte).

10 *Merk:* Reaksjonen er fullført i løpet av 1 time.

¹H NMR (δ, CDCl₃): 8,52 (m, 1H), 7,93 (m, 1H).



15 800 ml vinylmagnesiumbromid (1M i THF, Aldrich) ble avkjølt under -60°C med kraftig omrøring under N₂. 2-brom-5-fluor-3-nitro-pyridin (43,3 g, 0,196 mol) i 200 ml THF ble tilsatt dråpevis via tilsetningstrakt med en slik hastighet at temperaturen ble holdt under -60°C. Dette tok ~ 1,25 timer. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til -40 til -50°C og omrørt i 1 time til. Deretter ble 1L mettet vandig NH₄Cl tilsatt

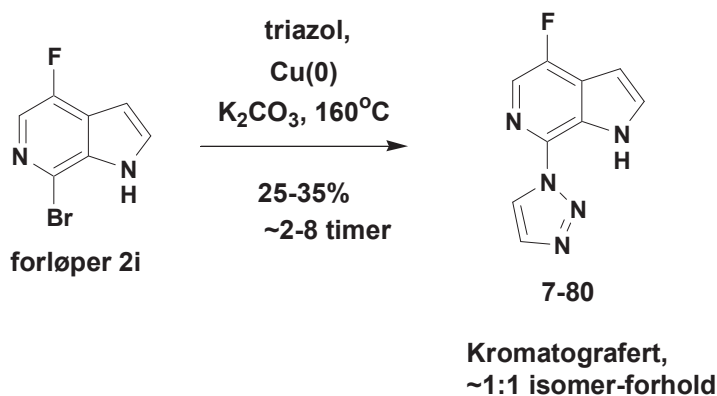
20 langsomt og forsiktig. Først forekom skumming og betraktelig fast stoff var til stede, men dette ble i det vesentlige oppløst ettersom tilsetningen ble fullført og materialet oppvarmet til romtemperatur. Lagene ble separert og det vandige laget ekstrahert 3 ganger med etylacetat. De organiske ekstrakter ble vasket med saltvann, tørket over Na₂SO₄, filtrert og konsentrert, hvilket ga ~ 50 g av et sort gummiaktig fast stoff.

HPLC viste 57-58% produkt. Til dette ble satt CH₂Cl₂ og det faste stoffet ble oppsamlet ved filtrering og vasket med CH₂Cl₂, hvilket ga 12,5 g produkt som et brunt, fast stoff. Reaksjonen ble gjentatt i nøyaktig samme skala og opparbeidet på samme måte. Fra CH₂Cl₂ utgning ble oppnådd 12,4 g av **Forløper 2i** (HPLC
5 ~97% ren). Det rå materialet ble gjenvunnet og fikk stå i diklormetan. Ved henstand separerte 3,6 g ytterligere produkt og ble gjenvunnet ved filtrering.

Totalt utbytte = 29,5 g (35%).

¹H NMR(δ, CDCl₃): 8,69(bs, 1H), 7,92 (d, J= 1,8 Hz, 1H), 7,41 (m, 1H), 6,77 (m,1H); LC/MS(M+1)⁺ = 216.-217,9; rt = 1,43 min.

10



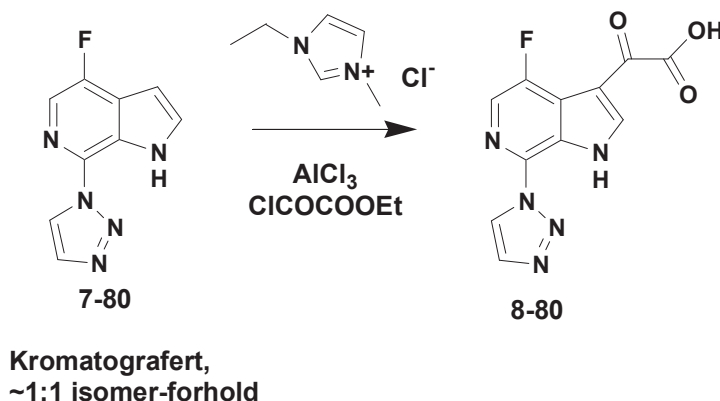
Reaksjonen ble utført i en 250 ml kolbe (skumming skjedde ved oppvarming og en kolbe med stor størrelse er mer hensiktsmessig). En blanding av **forløper 2i** (3 g,
15 13,95 mmol), 1,2,3-triazol (15 g, 217,6 mmol, 15 ekv.), K₂CO₃ (1,9 g, 13,95 mmol, 1 ekv.) og Cu(0)(0,9 g, 13,9 mmol, 1 ekv.) ble oppvarmet ved 160°C i 7 timer (fra romtemperatur til 160°C i totalt 7 timer) under N₂ (avhengig av Cu(0)-porsjonen, kan reaksjonstiden variere fra 2 timer til 7 timer). Den resulterende blandingen ble fortynnet med MeOH, filtrert gjennom filterpapir (for å fjerne kobberet). Vasket med
20 MeOH (20 ml) og vann (30 ml).

Filtratet ble konsentrert (løsningsmiddel fjernet i rotovap) og fortynnet med etylacetat. Det vandige laget ble ekstrahert med etylacetat. De samlede organiske lag ble tørket over natriumsulfat, filtrert og konsentrert. Residuet ble oppløst i MeOH (20 ml), **7-80** (750 mg) krystalliserte fra metanolen som et hvitt, fast stoff og ble

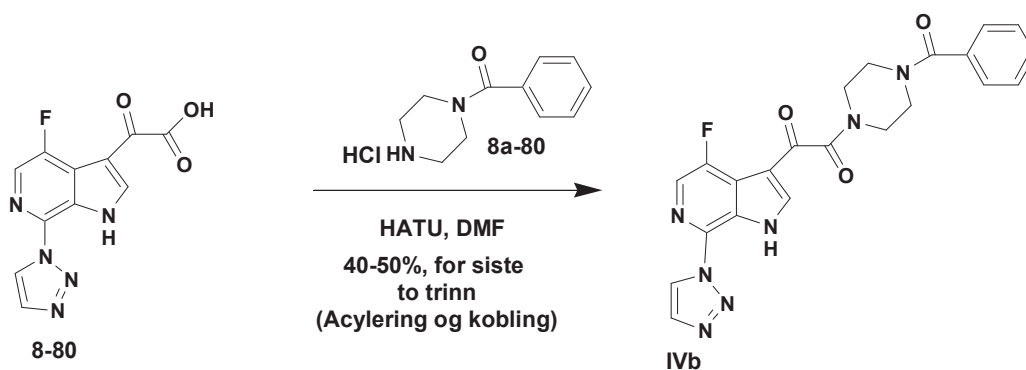
oppsamlet ved filtrering. (Langsom gradient-volum, silikagel heks /AcOEt (0→18%) av moderlutene gir vanligvis 5-10% mer av **7-80**.

^1H NMR (δ , CDCl_3): 10,47 (bs, 1H), 8,76 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,53 (m, 1 H), 6,78 (m, 1H); LCMS($\text{M}+1$) $^+$ = 204; rt = 1,29 min.

5



- Etyl-metylimidazoliumklorid (4,3 g, 29,6 mmol, 3 ekv.) ble plassert i en 250 ml kolbe. AlCl_3 (11,8 g, 88,6 mmol, 9 ekv.) ble tilsatt kolben i én porsjon. En flytende suspensjon ble dannet (noe av AlCl_3 forble som fast stoff). Etter omrøring i 5-10 min. ble forbindelse (1) (2,0 g, 9,85 mmol) tilsatt i én porsjon fulgt av langsom tilsetning (via en sprøyte) av etylkloroksalacetat (3,3 ml, 29,6 mmol, 3 ekv.). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 20 timer. LCMS viste forbindelse **8-80**:forbindelse **7-80** = 6:2. (Forbindelse I har sterk UV-absorpsjon).
- Reaksjonen ble stanset ved forsiktig tilsetning av isvann (~75 ml) ved 0°C. Et gult, fast stoff ble utfelt på dette tidspunkt. Den resulterende suspensjonen ble filtrert og det faste stoffet ble vasket med vann. MeOH og etylacetat (for å fjerne uomsatt SM) og det faste stoffet ble tørket i luft. (LCMS renhet 70% ~ 80%) 2 g av fast stoff inneholdende **8-80** ble oppnådd og anvendt i neste trinn uten ytterligere rensning.
- LCMS($\text{M}+1$) $^+$ = 276; rt = 0,97 min.



En blanding av forbindelse **8-80** (4,9 g, 17,8 mmol) og N-benzoylpiperazin-
 hydroklorid **8a-80** (HCl-salt; 6,0 g, 26,7 mmol, 1,5 ekv.) i DMF (30 ml) ble omrørt
 ved romtemperatur natten over (16 timer). En oppslemning ble dannet. Ytterligere
 20 ml DMF ble satt til oppslemningen. Deretter ble HATU (12,2 g, 26,7 mmol, 1,5
 ekv.) tilsatt fulgt av DMAP (4,3 g, 35,6 mmol, 2 ekv.). Reaksjonsblandingen ble
 omrørt i 30 min. LCMS viste at utgangsmaterialet **8-80** var fullstendig omdannet til
 produkt (EKSEMPEL 216). Den resulterende blandingen ble filtrert og det faste
 stoffet vasket med vann. Filtratet ble konsentrert i vakuum. Vann ble satt til residuet
 og det faste stoffet ble oppsamlet ved filtrering. De faste stoffene ble samlet og
 vasket med vann, MeOH og EtOAc. Deretter ble det faste stoffet tørket i luft. LCMS
 og HPLC viste IVb, >99% rent. Det faste produktet ble ytterligere rensset ved
 utfelling og krystallisering i 5~10% CH₃OH/CHCl₃.

15

Rensning av IVb

Rå forbindelse **IVb** oppnådd som ovenfor (15,3 g) ble oppløst i 10% MeOH/CHCl₃
 (600 ml). En lysebrun suspensjon ble dannet, filtrert gjennom filterpapir og vasket
 med MeOH to ganger. Det brunaktige faste stoff ble kastet (~1,2 g). Forbindelse
 IVb ble krystallisert i filtratet, det faste stoffet ble oppsamlet ved filtrering og det
 hvite, faste stoffet ble tørket i luft. Filtratet ble anvendt for å gjenta krystalliseringen
 flere ganger. Det faste stoffet oppnådd fra hver filtrering ble analysert ved HPLC.
 Alle de rene fraksjoner ble samlet. De ikke så rene fraksjoner ble krystallisering
 påny med MeOH og CHCl₃. Totalt 12,7 g av forbindelse IVb ble oppnådd fra
 omkrystallisering og utfelling. Moderluten ble konsentrert og rensset på silikagel-

25

kolonne (EtOAc, deretter CHCl₃/MeOH (0-2%)) for å gi 506 mg av produkt) som et hvitt, fast stoff.

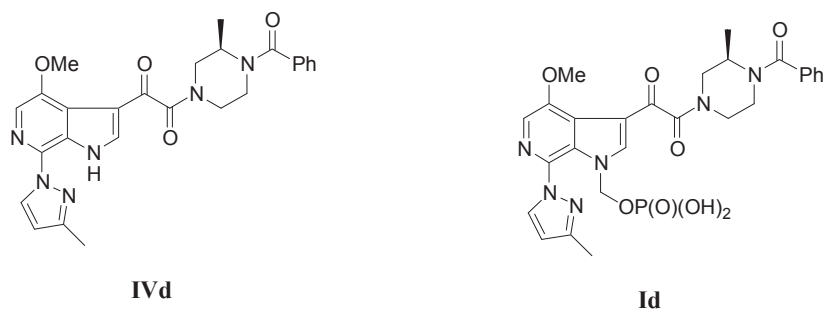
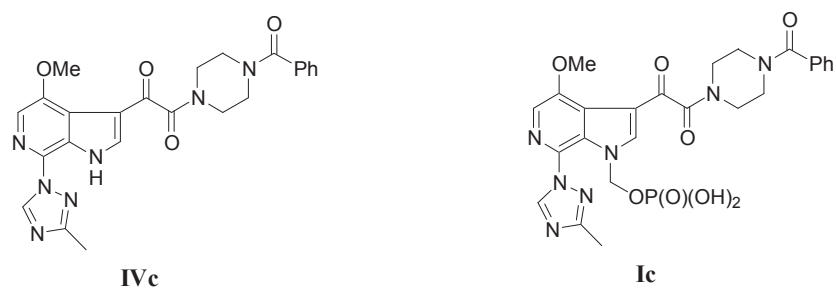
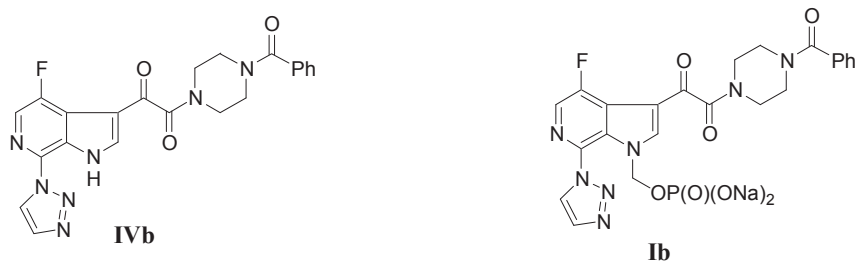
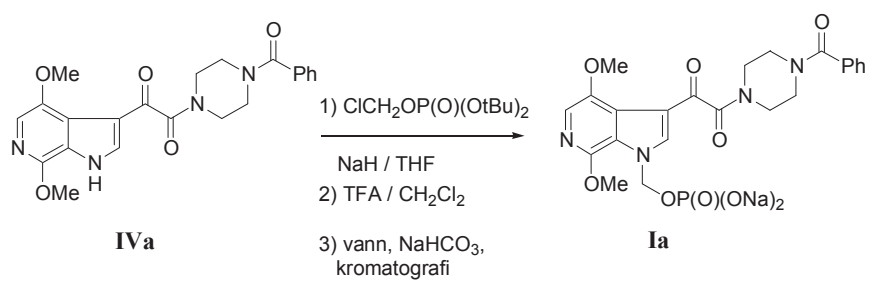
¹HNMR (d, DMSO) 13,1 (bs, 1H), 9,0 (s, 1H), 8,4 (s, 1H), 8,3 (s, 1H), 8,2 (s, 1H), 7,4 (bs, 5H), 3,7 (bs, 4H), 3,5 (bs, 4H); MS m/z 448 (MH). Anal: Calc for
5 C₂₂H₁₈FN₇O₃; C 59,05, H 4,05, N 21,91, F 4,24. Funnet; C 57,28, H 4,14, N 21,22; F 4,07%.

Eksempler 1-4:

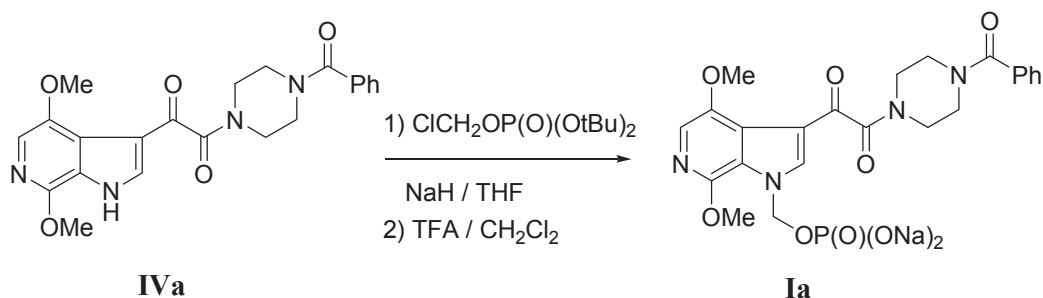
Fremstilling av Prodrug I fra parentale Forbindelser IV

10

Synteseskjema for Eksempler 1-4



Eksempel 1
Fremstilling av Ia

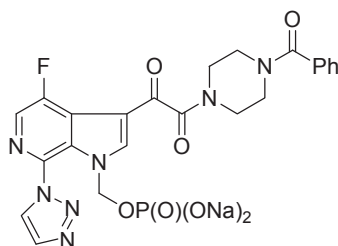


5

Prosedyre: En suspensjon av **IVa** (211 mg, 0,5 mmol) i THF (2 ml; Sure Seal) under vannfri N₂-atmosfære ble behandlet med NaH (86 mg, 2,2 mmol; 4,4 ekv.; 60% olje-dispersjon). Etter noen få minutters omrøring ved romtemperatur ble di-tert-butylklormetylfosfat (782 mg, 3,0 mmol; fremstilling, se US Patent 6,362,172) tilsatt og blandingen omrørt i 1-5 dager, med overvåkning for fullførelse av reaksjonen ved HPLC (ytterligere 1-2 ekv. av hver av NaH og fosfat kan være nødvendig for å bringe reaksjonen til nær fullførelse). Etter at utgangsmaterialet var oppbrukt ble blandingen konsentrert i vakuum til tørrhet og residuet, som syntes å være en blanding av N-alkylert indol-mono- og bis-t-butylfosfat, oppløst i CH₂Cl₂ (5 ml) ble behandlet med TFA (5 ml) ved romtemperatur i 2 timer. Blandingen ble konsentrert i vakuum og residuet ble rensset ved C-18 revers fase silikagel, under eluering med 5-10% CH₃CN i vann inneholdende NaHCO₃, for å oppnå 75 mg (0,13 mmol; U. 26 %) av tittelforbindelsen **Ia** som et gråhvitt pulver (dinatriumsalt): HPLC >99% (AP ved 254 nm); LC/MS (ESI⁺) m/z 533 (M+H minus 2Na)⁺; HRMS (ESI) m/z beregnet for C₂₃H₂₆N₄O₉P (M+H minus 2Na)⁺ 533,1437, funnet 533,1426 (Δ -2,1 ppm); ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δppm 3,51 (2H, m), 3,67 (2H, m), 3,73-3,79 (2H, m), 3,89-3,95 (2H, m), 3,94, 3,95 (3H, 2s), 4,05, 4,07 (3H, 2s), 6,02-6,04-6,05-6,07 (2H, ABq.), 7,43, 7,44 (1H, 2s), 7,45-7,56 (5H, m), 8,49, 8,52 (1H, 2s).

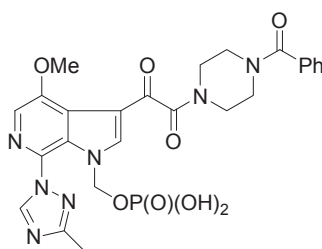
Ved anvendelse av en lignende prosedyre og betingelser ble **Ib** fremstilt fra **IVb**. **Ic** og **Id** ble fremstilt fra henholdsvis **IVc** og **IVd**, men vann istedenfor natriumbikarbonat-løsning ble anvendt for rensingen.

Eksempel 2

**Ib**

Ib: Utbytte 13 % (dinatriumsalt); HPLC >96% (AP ved 254 nm); LC/MS (ESI+) m/z 558 (M+H minus 2Na)⁺; ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δppm 3,59 (2H, m), 3,70-3,84 (4H, m), 3,93-3,95 (2H, m), 5,28-5,29-5,30-5,32 (2H, ABq.), 7,4-7,6 (5H, m), 8,09, 8,10 (1H, 2s), 8,34, 8,36 (1H, 2s), 8,59, 8,61 (1H, 2s), 8,72, 8,75 (1H, 2s).

Eksempel 3

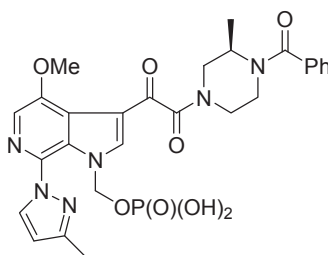
**Ic**

10

Ic: Utbytte 37% (syreform. Vann ble anvendt istedenfor vandig natriumbikarbonat under rensingen; HPLC >98% (AP ved 254 nm); LC/MS (ESI+) m/z 584 (M+H); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δppm 2,40 (3H, s), 3,44 (4H, br.s), 3,66 (4H, brs), 4,04 (3H, s), 5,79 (1H, s), 5,82 (1H, s), 7,46 (5H, brs), 8,07 (1H, s), 8,41 (1H, s), 8,88 (1H, s).

15

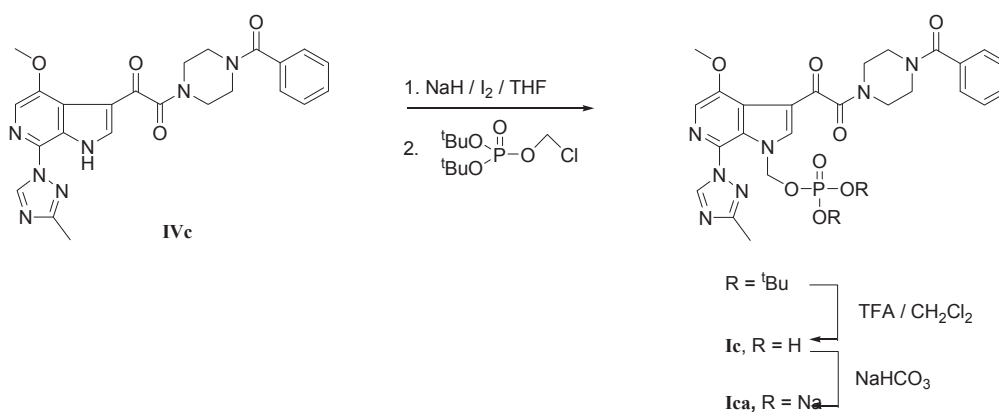
Eksempel 4

**Id**

Id: Utbytte 7% (syreform). Vann ble anvendt istedenfor vandig natriumbikarbonat under rensingen; LC/MS (ESI+) m/z 597 (M+H); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ ppm 1,16, 1,21 (3H, 2d, $J = 6,5$ Hz), 2,29 (3H, s), 2,3-4,5 (7H, m), 4,00, 4,01 (3H, 2s), 5,79-5,85 (2H, m), 6,36 (1H, t, $J = 2$ Hz), 7,42-7,47 (5H, m), 7,99 (1H, s), 8,08, 8,09 (1H, 2s), 8,34, 8,44 (1H, 2s).

Eksempel 5

Fremstilling av Ica, (dinatriumsalt)



Generell prosedyre: En suspensjon av **IVc** (0,24 g, 0,5 mmol) i vannfri THF (4 ml) under nitrogen-atmosfære ble behandlet med natriumhydrid (60% oljedispersjon, 0,08 g, 2,0 mmol) og omrørt inntil gass-utvikling opphørte (omtrent 5 minutter).

Reaksjonsblandingen ble behandlet med jod (0,13 g, 0,5 mmol) og omrørt i 2-3 minutter fulgt av tilsetning av di-*tert*-butylklormetylfosfat (1,6 g, 6,0 mmol, rå). En strøm av nitrogen fikk passere over reaksjonen for å lette fjerning av meget eller alt THF. Reaksjonsblandingen ble omrørt natten over. HPLC-analyse av råmateriale viste utgangs **IVc** (ca. 56%) og ønsket addukt (ca. 32%).

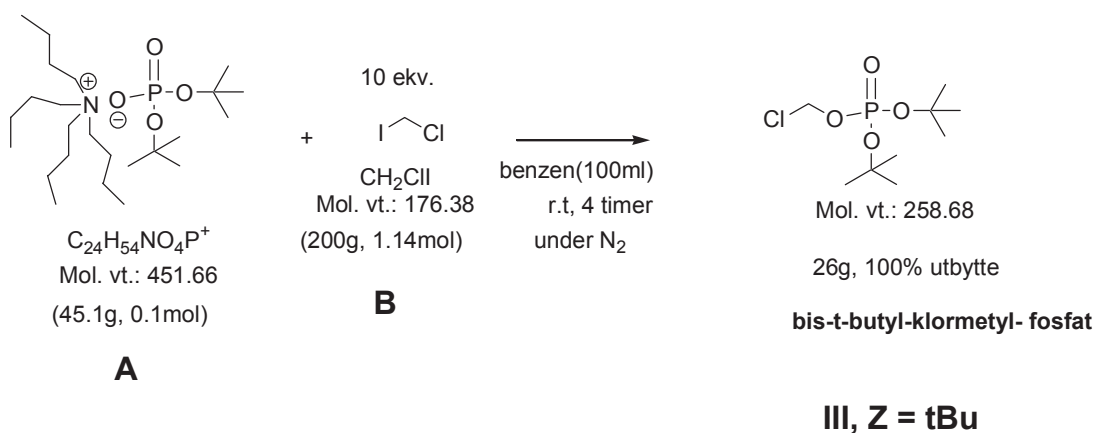
Mange rå reaksjonsblandinger (totalt 6,7 mmol basert på utgangsmateriale **IVc**) ble gjenopløst i diklormetan, kombinert, konsentrert i vakuum for å fjerne eventuelt gjenværende THF. Residuet ble suspendert i diklormetan og TFA (1:1, omtrent 40 ml totalt volum). Blandingen ble omrørt i 1,5 - 2 timer og deretter ble løsningsmiddel fjernet i vakuum. Residuet ble suspendert i diklormetan og ekstrahert inn i vann (omtrent 60 ml) og gjort svakt basisk med fast eller vandig natriumbikarbonat. Det

vandige laget ble redusert i volum ved rotasjonsinndamping hvis nødvendig og løsningen ble fylt på en C-18 revers fase kolonne (omtrent 80 g C-18, YMC ODS-AQ, 50 mikron) og eluert med vann, fulgt av vann inneholdende 2,5% acetonitril. Fraksjoner inneholdende rent produkt ble samlet og organisk løsningsmiddel ble fjernet med rotasjonsinndamper. Renset produkt ble gjenvunnet etter lyofilisering, hvilket ga 1,00 g (1,30 mmol, 19% over 2 trinn) av tittelforbindelsen **Ica** (dinatriumsalt) som et gråhvitt pulver: HPLC renhet >99% AP ved 254 nm (gradient 0-100% B/A; A 10% CH₃CN-90% H₂O-0,1% TFA, B 90% CH₃CN-10% H₂O-0,1% TFA, gradient-tid 4 min, kolonne YMC ODS-AQ 4,6x50mm 3 mikron); MS-ESI-
 10 m/z 482 (M-H minus 2Na)⁻; HRMS (ESI) m/z beregnet for C₂₅H₂₇N₇O₈P (M+H minus 2Na)⁺ 584,1659, funnet 584,1651 (Δ -1,3 ppm); ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ ppm 2,53, 2,54 (3H, 2s), 3,56 (2H, s, CH₂N), 3,72 (2H, br.s, CH₂N), 3,78, 3,83 (2H, 2br.s, CH₂N), 3,94, 3,96 (2H, 2br.s, CH₂N), 4,14 (3H, s, CH₃O), 5,38, 5,40 (2H, 2d, J=11Hz), 7,45-7,59 (5H, m, Ar-Hs), 8,07, 8,09 (1H, 2s, indol-H-5), 8,64, 8,67 (1H, 2s, indol-H-2), 8,87, 8,89 (1H, 2s, triazol-H-5); ¹³C-NMR (125,7MHz, D₂O) δ ppm 15,43 (N-Me), 44,03, 44,47, 44,66, 45,05, 48,20, 48,82, 49,60, 50,23, 59,78 (OMe), 75,81 (NCH₂O), 115,6, 126,0, 127,2, 129,6, 131,0, 131,7, 132,1, 133,5, 136,8, 147,6, 150,1, 154,2, 164,8, 170,4, 175,8, 189,2; UV (H₂O) λ maks 220 nm (ε 3,91x10⁴), 249 nm (ε 2,00x10⁴), 303 nm (ε 1,60x10⁴); Anal: Beregnet for C₂₅H₂₄N₇O₈PNa₂·8H₂O·0,2NaHCO₃; C 38,39, H 5,14, N 12,44, P 3,93, Na 6,42 Funnet; C 38,16, H 4,81, N 12,43, P 3,72, Na 6,05; KF (H₂O) 17,3%.
 15 En mindre ren fraksjon ble oppsamlet for å oppnå 0,22 g (0,29 mmol, U. 4%) av tittelforbindelsen **Ica** (dinatriumsalt): HPLC-renhet >95% (AP ved 254nm).

25 Eksempel 6

Fremstilling av Iab (Hydratisert lysinsalt)

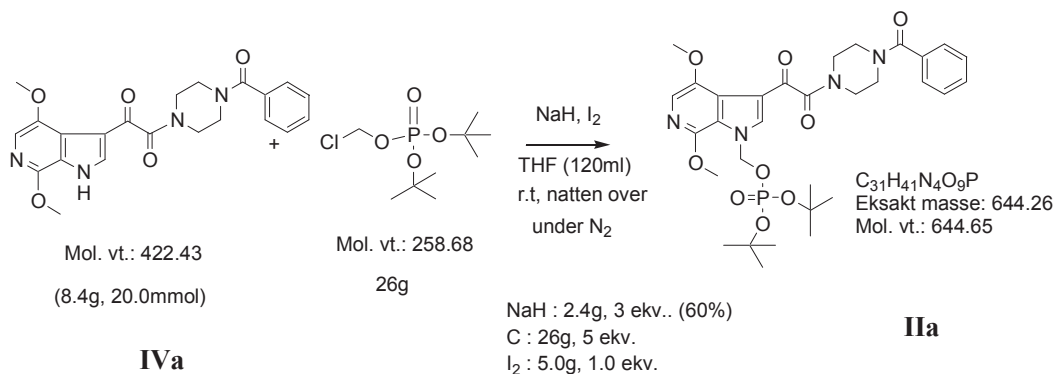
Trinn én



Fosfat-ester **A** (45,1 g, 0,1 mol) og klorjodmetan **B** (200 g, 1,14 mol) ble samlet i 100 ml benzen og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i fire timer før benzen ble fjernet under vakuum. Deretter ble 500 ml etyleter satt til residuet og uoppløselig fast stoff ble filtrert bort. Konsentrasjon av filtratet ga di-tert-butylklormetylfosfat, som ble anvendt i neste trinn uten noen rensning.

Trinn to

10

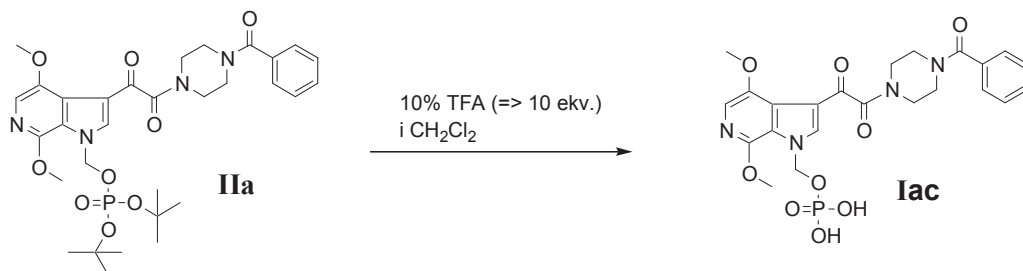


NaH (2,4 g, 60% i olje) ble satt langsomt til en suspensjon av **IVa** i tørr THF (120 ml) og blandingen ble omrørt i en time ved romtemperatur. Jod (5 g) oppløst i tørr THF (10 ml) ble tilsatt langsomt til den omrørte løsningen. Etter fullføring av tilsetningen ble den resulterende blandingen omrørt ved omgivelsestemperatur i ytterligere 15 minutter og deretter ble forbindelsen di-tert-butylklormetylfosfat, oppnådd fra trinn én, tilsatt. Etter omrøring i 16 timer ble reaksjonsblandingens hellet i isvann (120 ml), fulgt av ekstraksjon med EtOAc (3 x 300 ml). De samlede organiske ekstrakter ble vasket med vann (100 ml) og deretter saltvann (100 ml), tørket over Na₂SO₄ og konsentrert under vakuum, hvilket ga en rest, som ble rensset

ved silikagel-kromatografi (eluering med EtOAc/Et₃N (100/1) og deretter EtOAc/MeOH (100/1)), hvilket ga diester **IIa** i utbytter på 70 - 80%.

Trinn tre

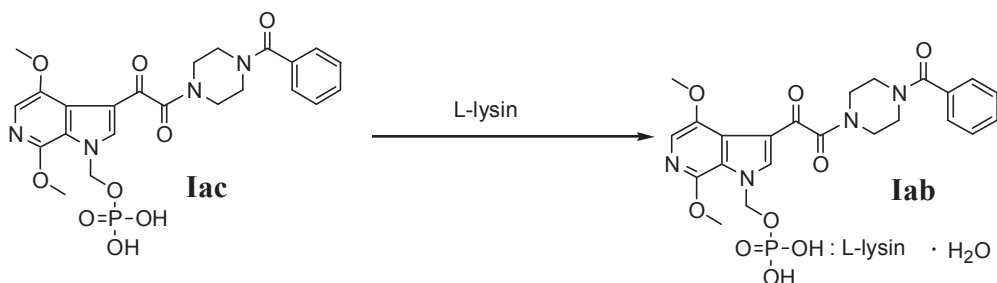
5



En blandet løsning av TFA (50 ml) og diklormetan (450 ml) ble satt til en rundbunnet kolbe inneholdende 43,3 g av diester **IIa**. Etter omrøring ved romtemperatur i 16 timer ble reaksjonsblandingen konsentrert under vakuum for å gi et residuum av **Iac** som ble anvendt i neste trinn uten noen rensning.

10

Trinn fire



15

Det ovenfor 55 g råprodukt **Iac** ble satt til en vandig løsning av L-lysine (1,36M, 70 ml) ved romtemperatur. Den resulterende suspensjonen (pH=1,83) ble satt til en lysin-løsning (1,36 M, ~40 ml) til pH 4,88. Den resulterende suspensjonen ble filtrert gjennom et sjikt av Celite. Det klare lysegule filtrat (~200 ml) ble blandet med aceton (200 ml) og oppvarmet til 45°C. Aceton (1400 ml) ble tilsatt over 2 timer ved 45°C. Den klare løsningen ble podet og omrørt ved 45 °C i 2 timer og langsomt avkjølt til romtemperatur (5 timer) og suspensjonen omrørt natten over. Det hvite, faste stoffet ble oppsamlet ved filtrering og tørket under husvakuum ved 50°C over 24 timer, hvilket ga 41,2 g **Iab** som et gråhvitt, fast stoff.

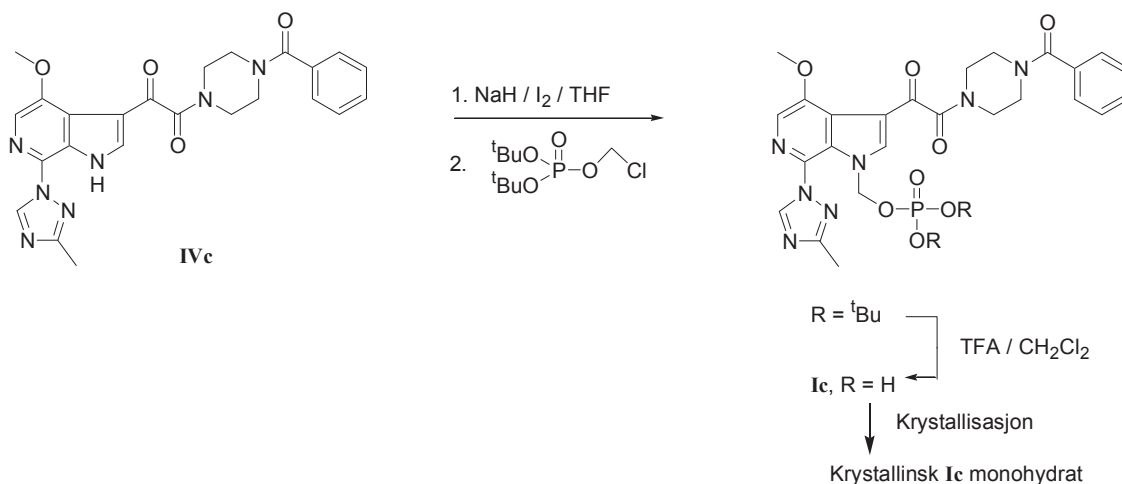
25

Det faste stoffet ovenfor ble oppløst i 1:1 vann-aceton (560 ml) ved 45°C. Aceton (700 ml) ble tilsatt over en periode på 1 time ved 45°C. Den klare løsningen ble podet og omrørt ved 45°C i 2 timer. Langsomt avkjølt til romtemperatur (5 timer) og suspensjonen omrørt ved romtemperatur natten over. Det hvite, faste stoffet ble
 5 oppsamlet ved filtrering og tørket under husvakuum ved 50°C over 36 timer, hvilket ga 33 g **Iab** som et gråhvitt, fast stoff. AP var >99% ved HPLC.

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 8,42 (s, 1/2H), 8,39 (s, 1/2H), 7,52 (m, 6H), 6,12 (m, 2H), 4,07 (s, 3H), 3,93 (m, 5H), 3,72 (m, 3H), 3,67 (m, 2H), 3,52 (m, 2H), 3,05 (m,
 10 2H), 1,93 (m, 2H), 1,74 (m, 2H), 1,50 (m, 2H); MS *m/z*: (M+H-lysin)⁺ beregnet for C₂₃H₂₆N₄O₉P 533,14, funnet 533,03. SM.P. 166,7 til 172,2 grader. Ved anvendelse av komparativ ¹H NMR integrering av mange forskjellige topper, blir forholdet av lysin til IVa beregnet til et område fra 1,05 : 1 til 1,2 : 1 ekvivalenter av lysin til parentalt prodrug. Saltformen ble funnet å være et hydrat. Basert på DSC
 15 (diffraksjon scannings-kalorimetri) og TGA (termisk gravitet-analyse), var det observerte vann-innhold 2,80%. Teoretisk beregning for et monohydrat er 2,58%. Således kan forholdet av vann til parentalt molekyl i hydratat være i området 1 : 1 til ~1,5 : 1.

20 Eksempel 7

Fremstilling av krystallinsk Ic (fri syre mono-hydrat)



Til en blanding av **IVc** (600 mg, 1,27 mmol) i vannfri THF (10 ml) i en ovnstørket rundbunnet kolbe under nitrogen ved romtemperatur ble satt NaH (153 mg, 6,38 mmol, tørt pulver, 95%) og den hvite suspensjonen ble omrørt inntil ingen gass- utvikling ble observert. Blandingen ble deretter tilsatt I₂ (375 mg, 1,48 mmol) og omrørt ved romtemperatur i 3 timer. Til reaksjonsblandingen ble satt NaH (153 mg, 6,38 mmol, tørt pulver, 95%) og blandingen omrørt i ca. 5 til 10 min. Det rå klormetyl-di-tert-butylfosfat (2,0 g, ca. 1,6 ml, 7,79 mmol) ble satt til blandingen, som deretter ble omrørt ved romtemperatur i 15 timer. LCMS-analyse av reaksjonen viste >97% omdannelse av utgangsmaterialet. Etter inndampning av de flyktige stoffene ble residuet tilsatt CH₂Cl₂ (10 ml), avkjølt i et is-vann-bad, langsomt tilsatt TFA (10 ml) og omrørt ved romtemperatur i 3 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter inndampet og residuet fordelt mellom CH₂Cl₂ (50 ml) og H₂O (50 ml). CH₂Cl₂-laget ble hellet i reaksjonskolben som inneholdt noe uoppløst brunaktig fast stoff og denne blandingen ble ekstrahert med en fortynnet vandig NaHCO₃-løsning (50 ml). Den vandige blandingen ble rensset ved revers fase preparativ HPLC (løsningsmiddel A: 10% MeOH-90% H₂O-0,1%TFA; løsningsmiddel B: 90% MeOH-10% H₂O-0,1%TFA; start %B = 0, endelig %B = 100; gradient-tid = 6 min; strømningshastighet = 45 ml/min; kolonne: Phenomenex-Luna 30 x 50 mm, S5; fraksjon oppsamlet: 3,65 til 4,05 min). Fraksjonene oppsamlet ble inndampet til tørrhet og residuet tørket under høyvakuum for å oppnå syren **Ic** som et blekgult, fast stoff (356,6 mg); ¹H NMR: (500 MHz, CD₃OD) δ 9,05 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,47 (b s, 5H), 5,93 (d, *J* = 12, 2H), 4,10 (s, 3H), 4,00-3,40 (b s, 8H), 2,53 (s, 3H); ¹⁹F NMR analyse viste at materialet inneholdt gjenværende TFA (prosentdelen ble ikke kvantifisert); Analytisk HPLC metode: Start %B = 0, Endelig %B = 100, Gradienttid = 2min, Strømningshastighet = 5 ml/min, Kolonne: Xterra MS C18 7u 3,0x50mm, LC/MS: (ES+) *m/z* (M+H)⁺ = 584, HPLC R_t = 0,983.

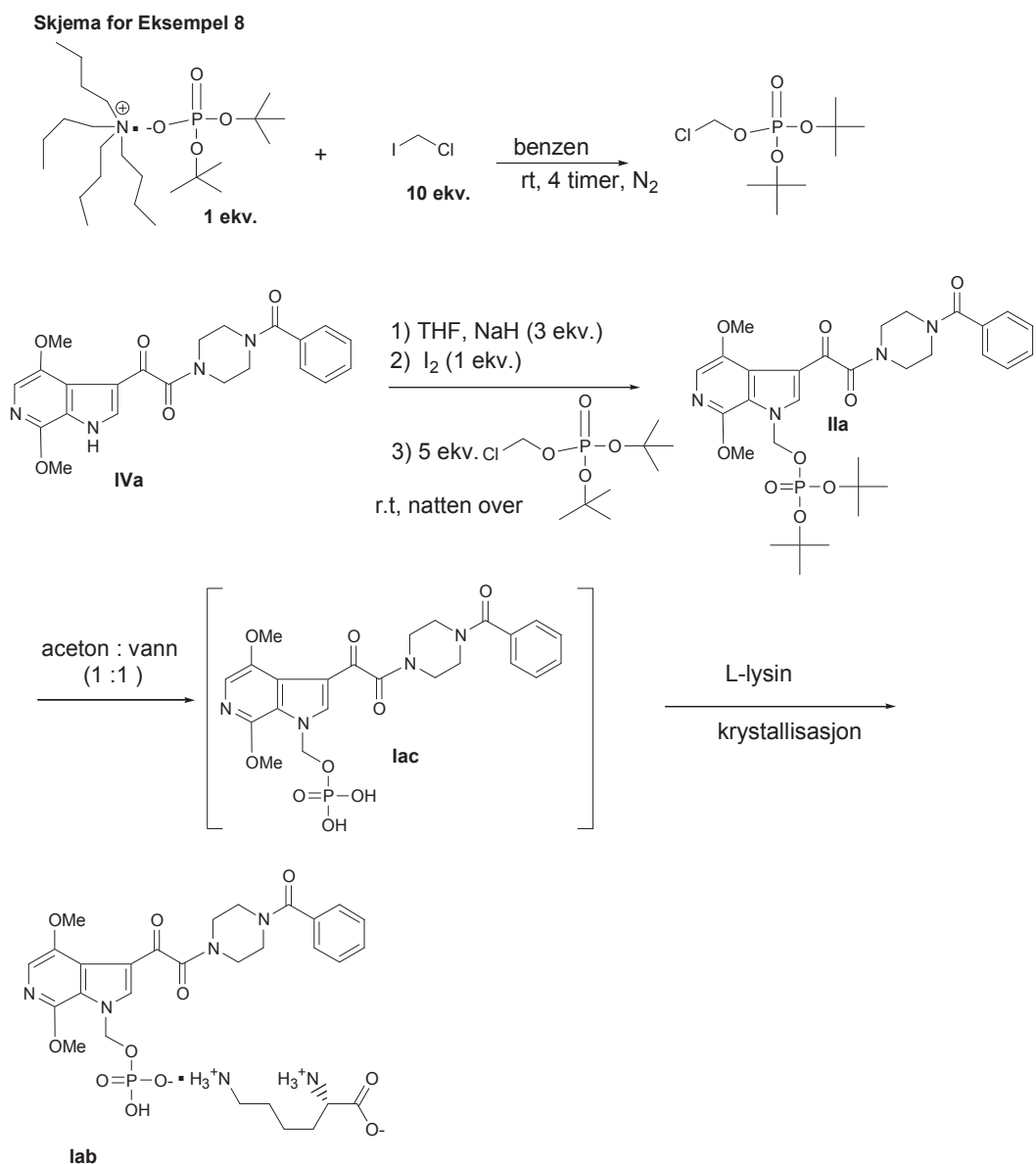
172,2 mg av den rensede syre **Ic** ble oppløst i 1 ml H₂O og deretter ble ca. 0,3 ml absolutt EtOH (200 proof) tilsatt. Blandingen fikk stå i kjøleskap (temperatur ca. 3°C) natten over, etter hvilken tid, krystallinsk materiale ble observert. Blandingen ble deretter oppvarmet til omgivelsestemperatur, fortynnet med H₂O til et volumn på 3 ml og deretter ble 20 ml MeCN tilsatt langsomt. Etter fullføring av tilsetningen ble blandingen omrørt ved romtemperatur i 2 timer og deretter filtrert. Det faste stoffet oppsamlet (90 mg) ble tørket i vakuum og deretter under høyvakuum. Dette

materialet ble vist ved pulver-røntgen-undersøkelser å være krystallinsk; Element-analyse beregnet for $C_{25}H_{26}N_7O_8P \cdot H_2O$: C 49,92; H 4,69; N 16,30; observert: C 49,66; H 4,62; N 15,99; Sm.p. = 205°C (målt ved differensiell scanningskalorimetri).

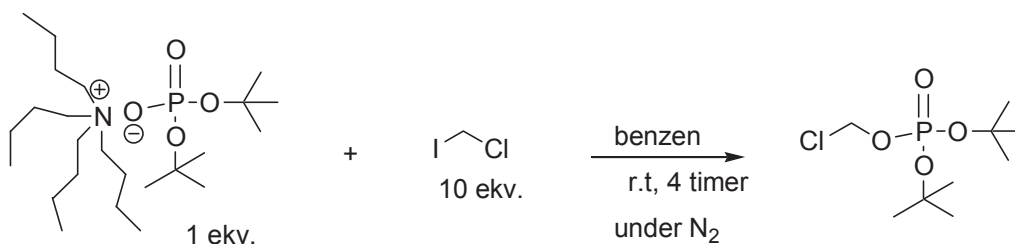
1H NMR mønster for krystallinsk materiale ble sammenlignet med det fra den
5 rensede syre og begge var i samsvar med strukturen.

Eksempel 8

Fremstilling av Iab (mono L-lysinsalt): {3-[(4-benzoylpiperazin-1-yl)(okso)acetyl]-
4,7-dimetoksy-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-1-yl}metyl-dihydrogen-fosfat, L-lysinsalt
10 (1:1). Sekvensen av reaksjoner er beskrevet i Skjema for Eksempel 8.



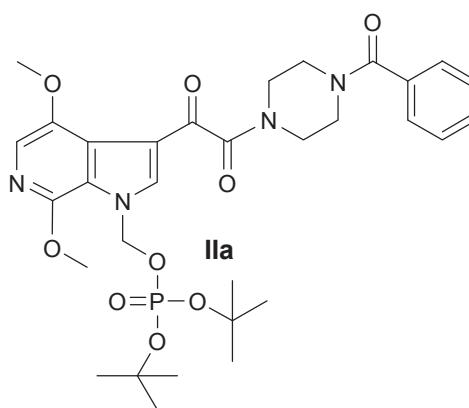
Fremstilling av di-tert-butylklormetylfosfat



- 5 Tetrabutylammoniumsalt av bis-tert-butylfosfat (45,1 g, 0,1 mol) og klorjodmetan (200 g, 1,14 mol) ble samlet i 100 ml benzen og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i fire timer og deretter ble benzen fjernet under vakuum. En porsjon av 500 ml etyleter ble satt til residuet og uoppløselig fast stoff ble filtrert vekk. Konsentrasjon av filtratet i vakuum og fjerning av flyktig stoff på en
- 10 vakuumpumpe ga di-tert-butylklormetylfosfat, som en lysegul eller lysebrun olje som ble anvendt i neste trinn uten ytterligere rensning.

Fremstilling av IIa: (3-(2-(4-benzoylpiperazin-1-yl)-2-oksoacetyl)-4,7-dimetoksy-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-1-yl)metyl-di-tert-butylfosfat

15



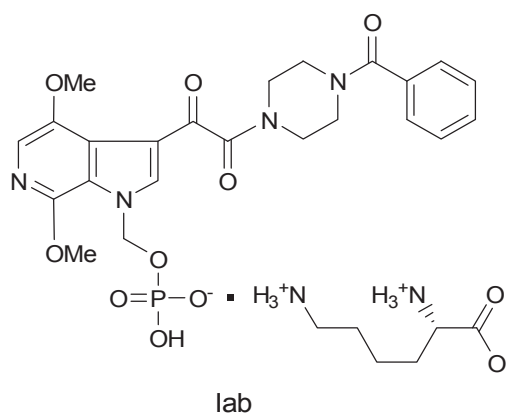
- NaH (2,4 g, 60 mmol, 60% i olje) ble langsomt satt til en suspensjon av (8,4 g, 20 mmol) IVa i tørr THF (120 ml) og blandingen ble omrørt i en time ved
- 20 romtemperatur. Jod (5 g, 20 mmol) oppløst i tørr THF (10 ml) ble tilsatt langsomt og forsiktig til den omrørte løsningen med en hastighet som holdt skumming under kontroll. Etter fullføring av tilsetningen ble den resulterende blandingen omrørt ved

omgivelsestemperatur i ytterligere 15 minutter og deretter ble ~0,1 mol di-tert-butylklormetylfosfat, oppnådd som beskrevet i trinn én, tilsatt. Etter omrøring i 16 timer ble reaksjonsblandingen helle i iset NH₄OAc (30%) (120 ml), fulgt av ekstraksjon med EtOAc (3 x 300 ml). De samlede organiske ekstrakter ble vasket med vann (100 ml) og deretter saltvann (100 ml), tørket over Na₂SO₄ og konsentrert in
 5 vakuum, hvilket ga et residuum, som ble rensed ved silikagel kromatografi (eluering med EtOAc/Et₃N (100/1) og deretter EtOAc/MeOH (100/1), hvilket ga diester IIa (9,0-10,3 gs, AP ~75%) som et lysegult, fast stoff i utbytter på 70 - 80% over mange kjøring.

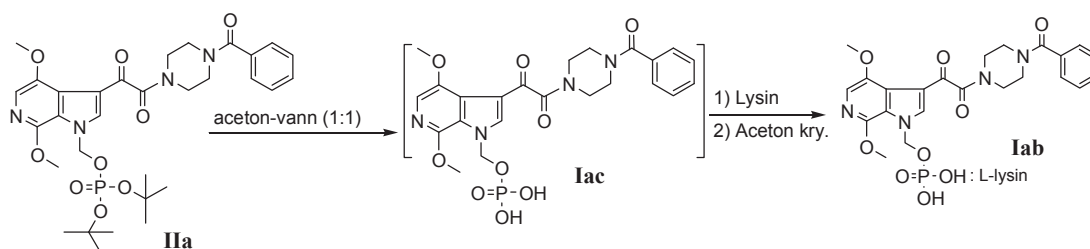
10

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,09 (s, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,40 (b, 5H), 6,15 (d, 2H, *J* = 11,5 Hz), 4,05 (s, 3H), 3,90 (s, 3H), 3,90 - 3,30 (b, 8H), 1,39 (s, 18H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 185,5, 170,7, 166,5, 146,9, 146,2, 139,6, 135,3, 130,2, 128,7, 128,4, 127,2, 124,5, 122,0, 120,8, 115,8, 83,8, 73,2, 57,3, 53,5, 46,1, 41,7, 29,8; MS
 15 *m/z*: (M+H)⁺ beregnet for C₃₁H₄₂N₄O₉P 645,27, funnet 645,10.

*Fremstilling av Iab: {3-[(4-benzoylpiperazin-1-yl)(okso)acetyl]-4,7-dimetoksy-1H-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-1-yl}metyl-dihydrogenfosfat, L-lysinsalt (1:1)*



20



500 mg av diester IIa ble oppløst i en blanding av vann (3 ml) og aceton (3 ml). Den resulterende blandingen ble omrørt ved 40°C i 16 timer for å tillate at solvolyse ble fullført. Til denne reaksjonsblandingen (~69 AP) ble satt 4M vandig lysin-løsning for å regulere pH til 4,83. Aceton (35 ml) ble langsomt tilsatt til reaksjonsblandingen i 30 min ved 45 - 50°C. Ved 45°C ble den klare løsningen podet med krystallinsk Iab og holdt omrørt ved denne temperatur i 45 min. Etter fullstendig tilsetning av aceton ble løsningen avkjølt til romtemperatur i 4 timer og krystallisering av Iab fullført natten over. Det faste stoffet ble oppsamlet ved filtrering og sug under nitrogen i 2 timer. Det hvite krystallinske fast stoff ble tørket under husvakuum ved 50 - 55°C i 24 timer, hvilket ga 343 mg Iab.

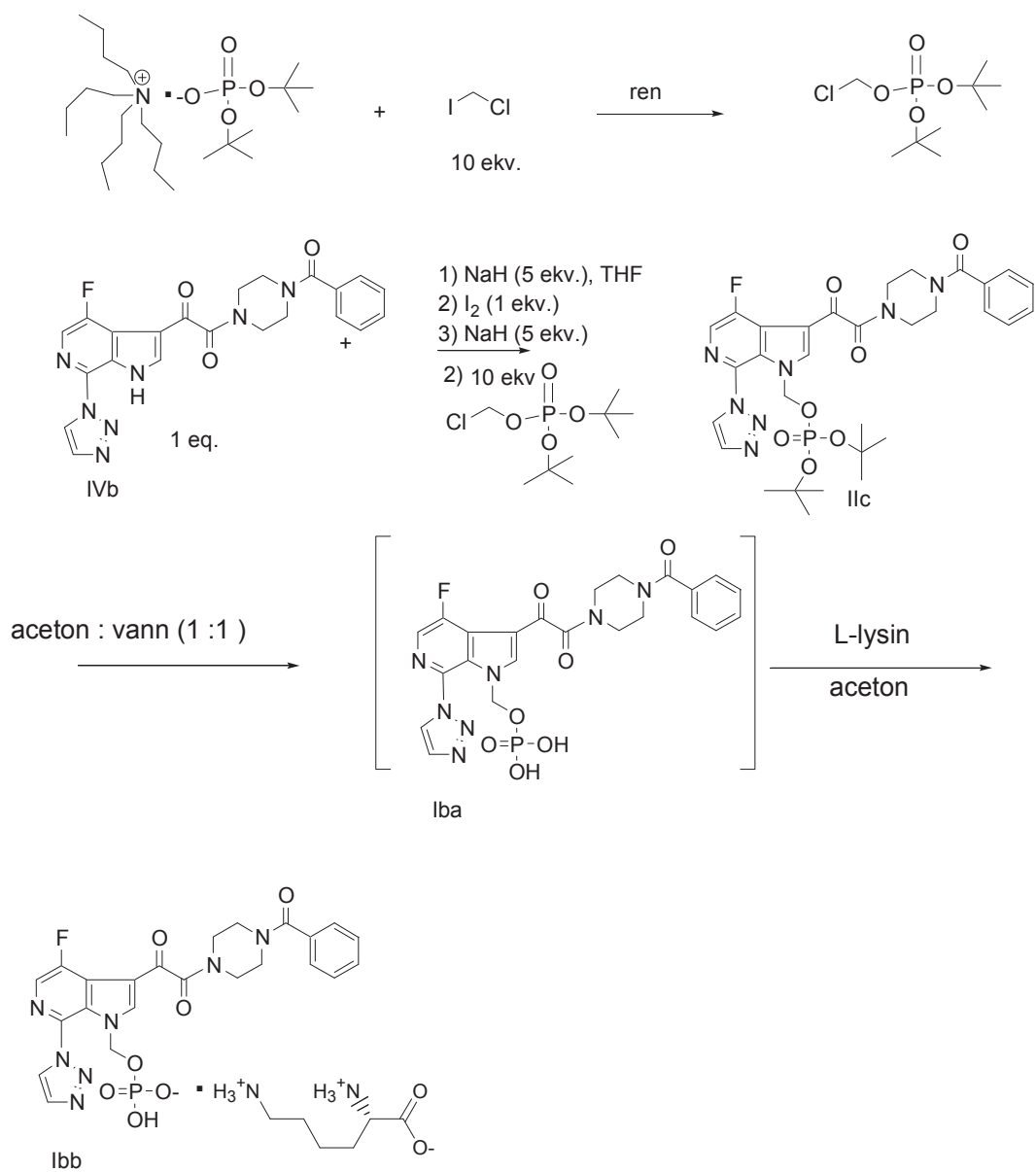
Iab oppnådd ved operasjonen ovenfor: ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8,38 (s, 1H), 7,49 (m, 6H), 6,13 (d, 2H, *J* = 10,5 Hz), 4,06 (s, 3H), 3,92 (s, 3H), 4,00 - 3,40 (m, 8H), 3,58 (t, 1H, *J* = 6 Hz), 2,92 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz), 1,90 - 1,40 (m, 6H); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 186,1, 173,2, 171,8, 167,8, 147,4, 146,4, 141,0, 135,4, 130,4, 128,8, 127,2, 124,6, 122,3, 120,2, 114,6, 73,2, 56,6, 54,7, 53,1, 46,0, 41,6, 39,2, 30,5, 27,0, 22,0. HRMS *m/z*: (M-lysin+H)⁺ beregnet for C₂₃H₂₆N₄O₉P 533,1437, funnet 533,1437. Anal. Beregnet. C, 51,32; H, 5,79; N, 12,38; P, 4,56; funnet: C, 48,54; H, 5,32; N, 11,76; P, 4,04. Smeltepunkt 170°C.

Oppnådd ved annen prosess (hydrolyse med TFA i metylenklorid) var Iab et 1,70 molar hydrat og 1,14 molar lysinsalt. ¹H NMR (500 MHz, D₂O, 60°C) δ 8,72 (s, 1H), 7,84 (m, 6H), 6,44 (d, 2H, *J* = 10Hz), 4,41 (s, 3H), 4,27 (s, 3H), 4,3 - 3,7 (m, 8H), 4,10 (t, 1H, *J* = 5Hz), 3,39 (t, 2H, *J* = 5Hz), 2,30 - 1,80 (m, 6H); ¹³C NMR (125 MHz, D₂O, 27°C) δ 186,7, 174,9, 173,2, 167,9, 147,7, 145,7, 142,6, 134,3, 131,1, 129,2, 127,1, 124,3, 122,4, 120,1, 113,8, 73,5, 57,1, 54,9, 54,4, 47,7, 47,1, 46,3, 45,7, 42,6, 42,1, 42,0, 41,5, 39,5, 30,2, 26,8, 21,8. HRMS *m/z*: (M-lysin+H)⁺ beregnet for C₂₃H₂₆N₄O₉P 533,1437, funnet 533,1425. Anal. Beregnet. C, 49,11; H 6,13; N, 12,05; funnet: C, 48,93; H 6,26; N 12,07. SM.P. 168 - 172°C.

Eksempel 9

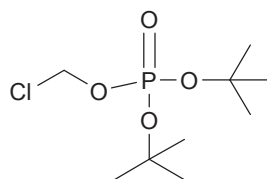
Fremstilling av Ibb (mono-*L*-lysinsalt): [3-[(4-benzoylpiperazin-1-yl)(okso)acetyl]-4-fluor-7-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-1-yl]metyl-dihydrogenfosfat, *L*-lysinsalt (1:1). Sekvensen av reaksjoner er beskrevet i skjemaet for Eksempel 9.

Skjema for Eksempel 9



Fremstilling av di-tert-butylklormetylfosfat

5

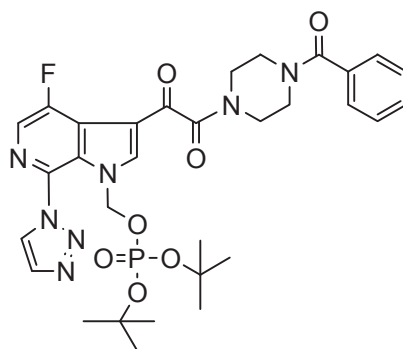


Tetrabutylammoniumsalt av bis-tert-butylfosfat (57 g, 0,126 mol, Digital Specialty Chemicals) og klorjodmetan (221 g, 1,26 mol) ble omrørt ved romtemperatur i fire timer og deretter ble de flyktige stoffene fjernet i vakuum. 500 ml etyleter ble satt til residuet og uoppløselig fast stoff ble filtrert vekk.

- 5 Konsentrasjon av filtratet og endelig fjerning av flyktige stoffer ved anvendelse av en vakuumpumpe ga di-tert-butylklormetylfosfat (112 g), typisk som en lys gul eller brun olje, som ble anvendt i neste trinn uten noen ytterligere rensning.

Fremstilling av IIb: (3-(2-(4-benzoylpiperazin-1-yl)-2-oksoacetyl)-4-fluor-7-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-1-yl)metyl-di-tert-butylfosfat

10



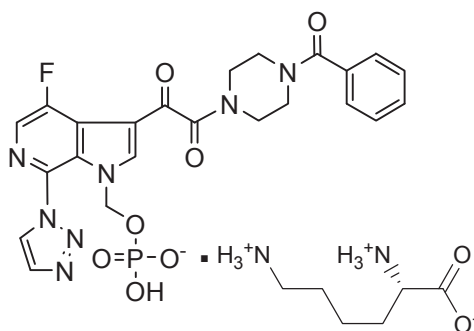
IIb

- NaH (5,65 g, 95% dispersjon i mineralolje, 0,224 mol) ble satt langsomt til en suspensjon av IVb (20 g, 44,7 mmol) i tørr THF (400 ml) og blandingen ble omrørt i 0,5 time ved romtemperatur. En løsning av jod (11,3 g, 44,5 mmol) oppløst i tørr THF (20 ml) ble tilsatt langsomt til den omrørte løsningen med en hastighet som holdt reaksjonen fra å bli voldsom. Den resulterende blandingen ble omrørt i ytterligere 3 timer før en andre porsjon av 95% NaH (5,65 g, 0,224 mol) ble innført.
- 20 Etter 15 minutter ved omgivelsestemperatur ble di-tert-butylklormetylfosfat, (112 g), oppnådd fra trinn én, tilsatt i én porsjon. Etter omrøring i 16 timer ved omgivelsestemperatur ble reaksjonsblandingens hellet i iset NH₄OAc (30%) (200 ml) og deretter ekstrahert med EtOAc (3 x 500 ml). De samlede organiske ekstrakter ble vasket med vann (200 ml) og deretter saltvann (200 ml), tørket over Na₂SO₄ og
- 25 konsentrert under vakuum, hvilket ga et residuum, som ble rensset ved silikagel-

kromatografi (eluering med EtOAc/MeOH/Et₃N (100/1/1), hvilket ga 15,0 g (43% utbytte korrigert i 85% AP) av diester IIb som et lysegult, fast stoff.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ8,36 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 8,21 (s, 1H), 7,88 (s, 1H), 7,41 (b, 5H), 5,90 (d, 2H, *J* = 14,5Hz), 3,90 - 3,40 (b, 8H), 1,23 (s, 18H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ182,9, 170,7, 165,1, 154,6, 152,5, 144,1, 135,1, 134,0, 131,9, 130,3, 128,7, 128,3, 127,2, 125,9, 124,3, 114,0, 84,1, 74,1, 46,2, 41,9, 29,6; HRMS *m/z*: (M+H)⁺ beregnet for C₃₁H₃₈FN₇O₇P 670,26, funnet 670,34.

10 *Fremstilling av Ibb (mono-L-lysinsalt): [3-[(4-benzoylpiperazin-1-yl)(okso)acetyl]-4-fluor-7-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-1-yl]metyl-dihydrogenfosfat, L-lysinsalt (1:1)*



Ibb

15

Diester IIb (27 g) ble oppløst i en blanding av vann (55 ml) og aceton (55 ml). Den resulterende blandingen (pH: ikke bestemt) ble omrørt ved 40°C i 16 timer for å fullføre solvolysen. Til denne reaksjonsblanding ble satt 4M vandig lysin-løsning for å regulere pH til 3,51. EtOH (500 ml) ble tilsatt til løsningen og kolbeveggen ble belagt med noe produkt etter henstand natten over. Den klare løsningen ble deretter overført til en annen kolbe og EtOH (1500 ml) ble langsomt satt til reaksjonsblanding i ~3 timer. Etter fullstendig tilsetning av etanol ble løsningen omrørt ved romtemperatur i 48 timer og det resulterende faste stoffet (Ibb) ble oppsamlet ved filtrering og skyllet med etanol. Det hvite krystallinske faste stoff ble tørket under husvakuum ved 55°C i 24 timer, hvilket ga 10,92 g Ibb (98 AP).

20

25

Dette faste stoffet ble videre blandet med 12,5 g salt oppnådd fra andre operasjoner i 70 ml vann. EtOH (1000 ml) ble deretter tilsatt og den resulterende løsning ble omrørt ved romtemperatur i over 20 timer. Det faste stoffet ble oppsamlet ved filtrering, skyllet med EtOH (2 x 80 ml) og tørket under husvakuum ved 50°C
 5 under nitrogenatmosfære i 44 timer, hvilket ga 21,5 g Ibb i AP på 98,7.

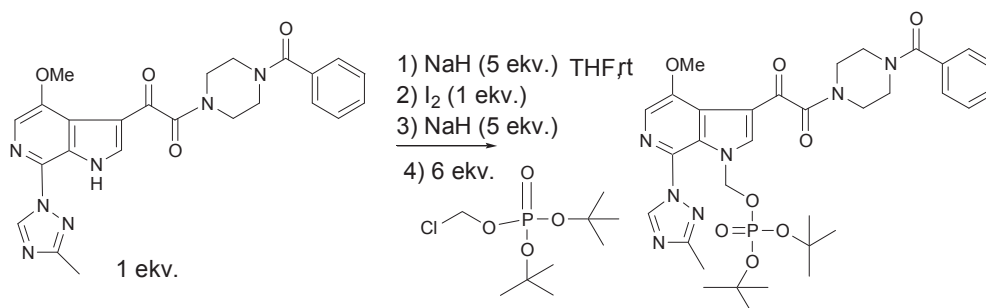
Ibb oppnådd ved prosedyren ovenfor var ~1 molar lysinsalt med 1,12% av vann, 0,8% av TFA og 0,05% av etanol. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , 50°C) δ 8,94 (s, 1H), 8,87 (s, 1H), 8,69 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,83 (m, 5H), 5,81 (d, 2H, J = 12,5Hz), 4,30 - 3,70 (m, 8H), 4,08 (t, 1H, J = 6,5Hz), 3,67 (t, 2H, J = 10Hz), 2,26 (m,
 10 2H), 2,07 (m, 2H), 1,88 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O , 30°C) δ 185,2, 174,9, 173,3, 166,8, 153,1, 146,8, 134,8, 134,3, 131,3, 131,1, 130,3, 129,3, 128,9, 128,7, 128,5, 127,2, 124,2, 112,6, 74,0, 54,9, 47,9, 47,2, 46,4, 45,9, 42,7, 42,2, 42,0, 41,7, 39,5, 30,3, 26,8, 21,8. MS m/z : (M-lysine+H) $^+$ beregnet for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{FN}_7\text{O}_7\text{P}$ 558,1302, funnet 558,1293. Anal. Beregnet. C, 48,75; H, 5,07; N, 17,63; P, 4,33; funnet: C,
 15 49,02; H 4,90; N, 17,90; P, 4,37. SM.P. 193°C. pKa (potensiometrisk) 6,1, 9,1.

Eksempel 10

Fremstilling av Icb (mono-trometaminsalt): [3-[(4-benzoylpiperazin-1-yl)(okso)acetyl]-4-metoksy-7-(3-metyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-
 20 c]pyridin-1-yl]metyl-dihydrogenfosfat, 2-amino-2-(hydroksymetyl)propan-1,3-diol salt (1:1). Sekvensen av reaksjonene er beskrevet i Skjema for Eksempel 10.

En blanding av tetrabutylammonium-di-tert-butylfosfat (57 g, 0,126 mol, Digital Specialty Chemicals) og klorjodmetan (221 g, 1,26 mol) ble omrørt ved romtemperatur i fire timer før de flyktige stoffene ble fjernet under vakuum. 500 ml etyleter ble satt til residuet og uoppløselig fast stoff ble filtrert vekk. Konsentrasjon
 5 av filtratet i vakuum og fjerning av gjenværende flyktige stoffer ved anvendelse av en vakuumpumpe ga di-tert-butylklormetylfosfat som en lys brun eller gul olje, som ble anvendt i neste trinn uten ytterligere rensning.

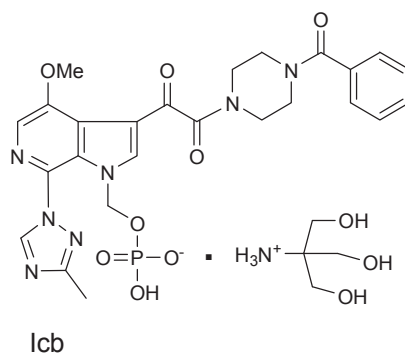
Fremstilling av IIc: (3-(2-(4-benzoylpiperazin-1-yl)-2-oksoacetyl)-4-metoksy-7-(3-metyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-1-yl)metyl-di-tert-butylfosfat
 10



NaH (2,6 g, 10,3 mmol, 95% i olje, 5 ekv.) ble satt langsomt til en suspensjon av IVc (10,0 g, 21,1 mmol) i tørr THF (100 ml) og blandingen ble omrørt i 0,5 time
 15 ved romtemperatur. En løsning av jod (5,27 g, 20,8 mmol) oppløst i tørr THF (10 ml) ble satt langsomt til den omrørte løsningen med en hastighet som forhindret skumming eller en voldsom reaksjon. Den resulterende blandingen ble omrørt i ytterligere 3 timer før en andre 2,6 g porsjon av NaH ble innført. Etter 15 minutter ved omgivelsestemperatur ble di-tert-butylklormetylfosfat, hele porsjonen av di-tert-
 20 butylklormetylfosfat, oppnådd fra trinn én, tilsatt. Etter omrøring i 16 timer ble reaksjonsblandingens hellet i iset NH₄OAc (30%) (120 ml), fulgt av ekstraksjon med EtOAc (3 x 300 ml). De samlede organiske ekstrakter ble vasket med vann (100 ml) og deretter saltvann (100 ml), tørket over Na₂SO₄ og konsentrert under vakuum, hvilket ga et residuum, som ble rensset ved silikagel-kromatografi (eluering med
 25 EtOAc/Et₃N (50/1) og deretter EtOAc/MeOH (100/1)), hvilket ga 8,0 g (~75% AP, ~41% utbytte) av diester IIc som et lysegult, fast stoff.

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 8,82 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,47 (b, 5H), 6,00 (d, 2H, $J = 14,5\text{Hz}$), 4,10 (s, 3H), 4,00 - 3,40 (b, 8H), 2,49 (s, 3H), 1,28 (s, 18H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 18,6, 176,4, 172,9, 168,0, 162,6, 152,6, 147,5, 144,0, 136,5, 131,5, 130,8, 129,9, 129,1, 128,3, 126,1, 124,0, 116,2, 85,8, 75,4, 61,6, 57,7, 30,1, 22,2, 13,7; HRMS m/z : $(\text{M}+\text{H})^+$ beregnet for $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_8\text{P}$ 696,29, funnet 696,34.

Fremstilling av Icb (mono-L-trometaminsalt): [3-[(4-benzoylpiperazin-1-yl)(okso)acetyl]-4-metoksy-7-(3-metyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-1-yl]metyl-dihydrogenfosfat, 2-amino-2-(hydroksymetyl)propan-1,3-diol salt (1:1)



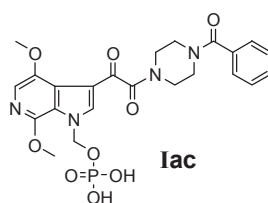
500 mg (~75 AP, 0,54 mmol) av diester IIc ble oppløst i en blanding av vann (2,5 ml) og aceton (2,5 ml). Den resulterende blandingen ble omrørt ved 40°C i 16 timer for å fullføre solvolyse. Til denne reaksjonsblanding ble satt 3,0M vandig TRIS- (mono-trometamin) løsning for å regulere pH til 3,32. Aceton (30 ml) ble langsomt satt til reaksjonsblanding i 1 time.* Etter fullstendig tilsetning av aceton, ble løsningen omrørt natten over for å fullføre krystallisering av Icb. Det faste stoffet ble oppsamlet ved filtrering og skyllet med 20:1 aceton-vann (2 x 5 ml). Det hvite krystallinske faste stoff ble tørket under hus-vakuum under nitrogenatmosfære ved 50°C i 24 timer, hvilket ga 290 mg Icb (>98,5 AP).

*Etter tilsetning av ca. 15 og 20 ml aceton, ble reaksjonsblanding podet med krystallinsk Icb.

Icb oppnådd ved operasjonen ovenfor: ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 8,83 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,02 (s, 1H) 7,49 (b, 5H), 5,469 (d, 2H, $J = 13$ Hz), 4,11 (s, 3H), 4,00 - 3,40 (m, 8H), 3,66 (s, 6H), 2,50 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 185,6, 171,9, 167,4, 161,4, 151,7, 146,9, 143,8, 135,4, 130,3, 129,7, 128,8, 127,2, 124,9, 122,6, 114,3, 73,5, 61,8, 59,9, 56,5, 46,0, 41,7, 12,6. HRMS m/z : (M-trisamin+H) $^+$ beregnet for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_8\text{P}$ 584,1659, funnet 584,1664. Anal. Beregnet. C, 49,43; H, 5,29; N, 15,90; P, 4,39; funnet: C, 49,18; H, 5,38; N, 15,59; P, 4,26. Smeltepunkt 203°C.

Oppnådd ved andre prosess (hydrolyse med TFA i metylenklorid), er salt Icb ~ 1 molar mono-trometaminsalt med 0,47% av vann, 0,1% av aceton og 0,05% av metanol. ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO, 30°C) δ 8,77 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 8,00 (s, 1H) 7,44 (b, 5H), 5,42 (d, 2H, $J = 15$ Hz), 4,02 (s, 3H), 3,70 - 3,30 (m, 8H), 3,41 (s, 6H), 2,38 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 30°C) δ 184,8, 169,0, 165,8, 160,3, 150,4, 146,2, 143,2, 135,4, 129,4, 128,9, 128,2, 127,7, 126,9, 123,2, 122,2, 112,9, 72,3, 60,7, 59,0, 56,7, 13,4. MS m/z : (M-trisamin+H) $^+$ beregnet for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_8\text{P}$ 584,2, funnet 584,0. Anal. Beregnet. C, 49,11; H, 5,37; N, 15,76; P, 4,32; funnet: C, 48,88; H 5,28; N, 15,71; P, 4,16. SM.P. 201 - 205°C.

Generell prosedyre for å danne ytterligere salter av Iac



Prosedyre A:

25

1,2 ekv. av metallalkoksyd ble satt til en løsning av fosforsyre i THF og presipitat ble oppsamlet som saltform.

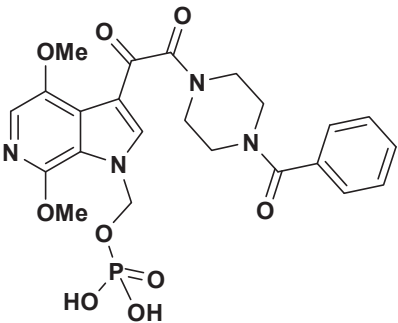
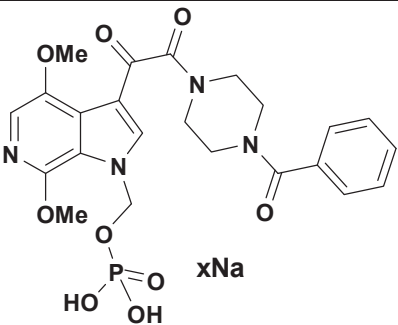
Prosedyre B:

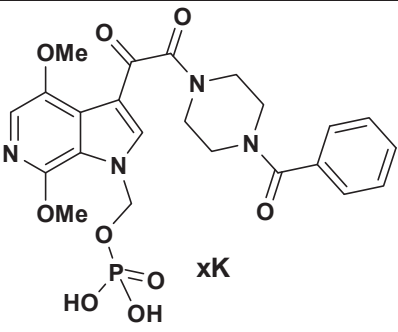
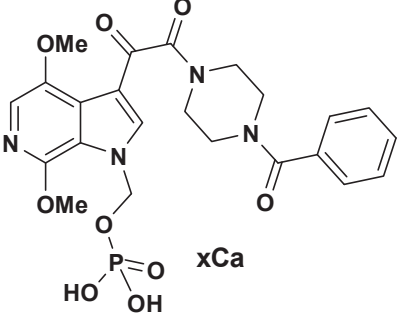
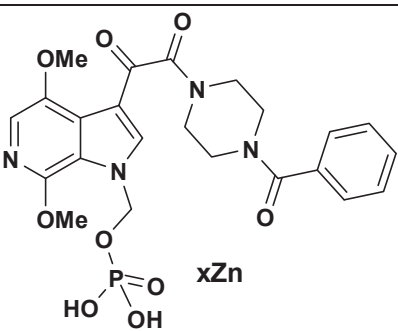
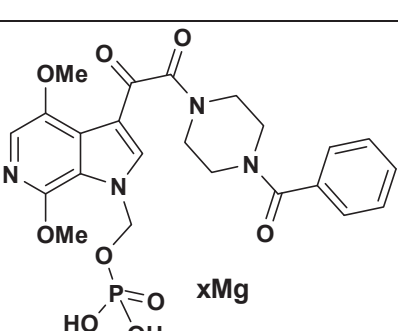
30

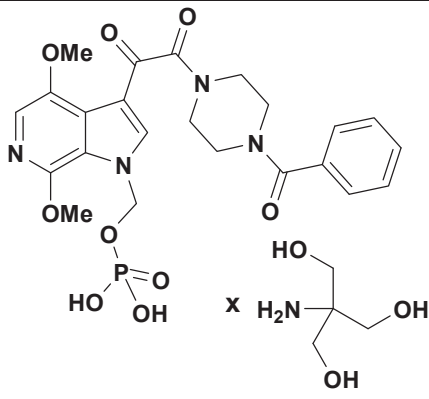
2,2 ekv. (for Na, K) eller 1,2 ekv. (for Mg) av metallalkoksyd ble satt til en løsning av fosforsyre i THF. Etter 2 timer ble løsningsmiddel inndampet og MeOH ble tilsatt for å gi en klar løsning. EtOH eller iPrOH ble deretter satt til løsningen inntil den ble uklar. Deretter ble MeOH tilsatt forsiktig for å la løsningen akkurat bli klar igjen. Den blandede løsningen fikk stå åpen for luft i 16 timer og resulterende presipitat ble oppsamlet som saltformen.

Prosedyre C:

2,2 ekv. amin ble satt til en løsning av fosforsyre i THF. Etter 2 timer ble løsningsmidlet inndampet og MeOH ble tilsatt for å gi en klar løsning. EtOH eller iPrOH ble deretter satt til løsningen inntil den ble uklar. Deretter ble MeOH tilsatt forsiktig for å la løsningen akkurat bli klar igjen. Den blandede løsning fikk stå åpen for luft i 16 timer og resulterende presipitat ble oppsamlet som saltform.

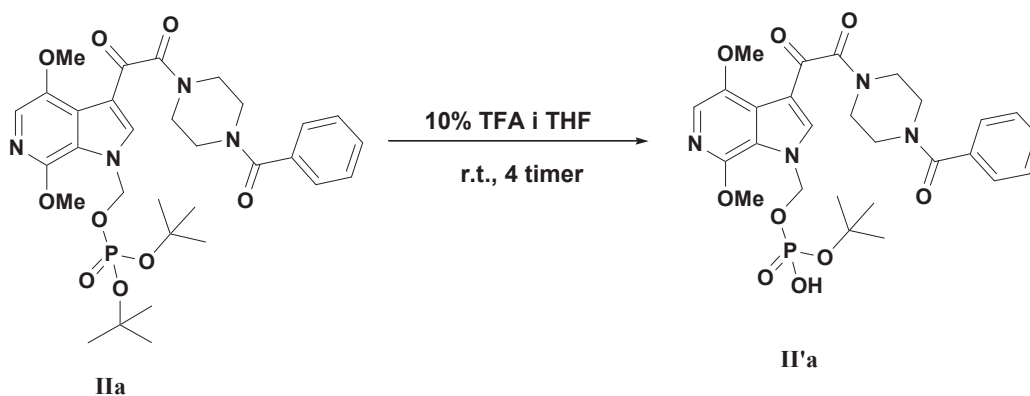
Forbindelse	Stammolekyl	Element - analyse (Teoretisk sammenset.)	Element-analyse (Observert sammensetn. %)	Prosedyre anvendt
Iac		C 51,88% H 4,73% N 10,52% P 5,82%		
	Saltform	Element - analyse (Teoretisk sammenset.)	Element -analyse (Observert sammensetn. %)	
Blanding av lad med liten mengde av Ia		Mono-Na-salt C 49,83% H 4,36% N 10,11% P 5,59% Na 4,15% Di Na salt C 47,93% H 4,02% N 9,72% P 5,37% Na 7,89%	C 47,43% H 4,59% N 9,24% P 5,72% Na 4,48% <u>Hovedsakelig mono-Na-salt</u>	Prosedyre B NaOMe anvendt

Blanding av læ og læ	 Chemical structure of a pyrazole derivative with a phosphate group and a benzyl carbamate group, labeled xK.	Mono-K-salt C 48,42% H 4,24% N 9,82% P 5,43% K 6,85% Di K salt C 45,39% H 3,81% N 9,21% P 5,09% K 12,85%	C 49,36% H 5,25% N 9,56% P 4,25% (4,33%) K 3,31% (3,18%) <u>Blanding av K-salt og fri syre</u>	Prosedyre B KOMe anvendt
~1:1 blanding av læ og læ	 Chemical structure of a pyrazole derivative with a phosphate group and a benzyl carbamate group, labeled xCa.	0,5 Ca-salt C 50,09% H 4,39% N 10,16% P 5,62% Ca 3,63% Mono Ca-salt C 48,42% H 4,06% N 9,82% P 5,43% Ca 7,03%	C 46,77% H 4,22% N 9,33% P 5,52% (5,70%) Ca 4,95% (5,30%) <u>Blanding av 0,5 Ca-salt og mono-Ca-salt (~1:1)</u>	Prosedyre A Ca(OMe)₂ anvendt
læ	 Chemical structure of a pyrazole derivative with a phosphate group and a benzyl carbamate group, labeled xZn.	0,5 Zn-salt C 48,97% H 4,29% N 9,93% P 5,49% Zn 5,80% Mono-Zn-salt C 46,36% H 3,89% N 9,40% P 5,20% Zn 10,97%	C 44,87% H 4,08% N 9,00% P 5,54% (5,45%) Zn 9,18% (9,47%) <u>Hovedsælgelig mono-Zn-salt</u>	Prosedyre A Zn(O-tBu)₂ anvendt
Hovedsælgelig læ	 Chemical structure of a pyrazole derivative with a phosphate group and a benzyl carbamate group, labeled xMg.	0,5 Mg salt C 50,82% H 4,45% N 10,31% P 5,70% Mg 2,24% Mono Mg salt C 49,80% H 4,18% N 10,10% P 5,58% Mg 4,38%	C 46,22% H 4,48% N 8,90% P 3,88% Mg 3,60% <u>Hovedsælgelig mono-Mg-salt</u>	Prosedyre B Mg(OEt)₂ anvendt

Blanding av lam og lan		Mono -Tris-salt C 49,62% H 5,55% N 10,72% P 4,74% Di Tris salt C 48,06% H 6,11% N 10,85% P 4,00%	C 45,30% H 5,60% N 9,59% P 2,98% <u>Hovedsakelig di-Tris-salt blandet med Tris</u>	Prosedyre C Trometamin anvendt
------------------------	---	---	--	---------------------------------------

Eksempel 11

Fremstilling av Forbindelse II'a fra IIa



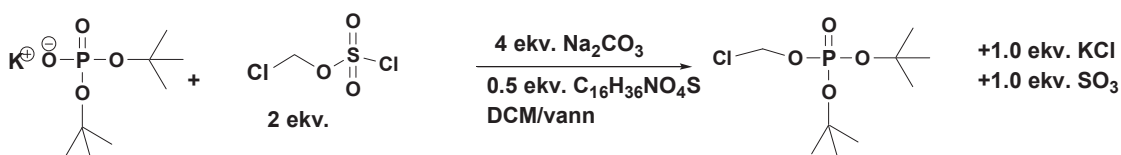
5

Di-fosfat-ester IIa (500 mg) ble oppløst i 5 ml 10% TFA i THF.

Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 4 timer før den ble behandlet med 10% vandig Na₂CO₃-løsning (30 ml). Etter vasking med EtOAc (50 ml) ble den vandige fasen konsentrert under vakuum for å gi et residuum som ble renset ved anvendelse av Shimadzu automatisert preparativ HPLC System, hvilket ga det ønskede mono-fosfat II'a (26,5 mg). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,13 (s, 1H), 7,40 (b, 6H), 6,13 (d, 2H, J = 11,5Hz), 4,05 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,90 - 3,40 (m, 8H), 1,39 (s, 9H); MS m/z : (M+H)⁺ beregnet for C₂₇H₃₄N₄O₉P 589,21, funnet 589,13; LC retensjonstid 1,32min (kolonne: Xterra 4,6x50mmC18 5 μ m).

15

Alternativ fremstilling av di-tert-butylklormetylfosfat



Reaksjon

Til reaktoren som var gjort inert ble satt di-tert-butyl-kaliumfosfat (1,69 kg),
5 4,0 ekv. natriumkarbonat og 0,05 ekv. tetrabutyl-ammonium-hydrogensulfat gjennom
en smal passasje ("manway"). Metylenklorid (7,7 L/kg) ble deretter pumpet gjennom
"sprayball" for å vaske ned reaktorveggene. Med manteltemperatur under 10°C, ble
eksoterm vann-tilsetning tilsatt i løpet av ti minutter (7,6 L/kg). Den assosierte
eksoterm ble mindre med en batch-temperatur som steg fra 11,1 til 16,2°C over
10 forløpet av tilsetningen. Med mantel- og batch-temperatur nær henholdsvis 7 og
15°C, ble 2,0 ekv. av klormetylsulfonylklorid (CMCS) tilsatt via tilsetningstrakt.
Tilsetningen fortsatte i 2 timer mens manteltemperaturen langsomt ble hevet til 20°C
under tilsetningen. Maksimum batch-temperatur under CMCS-tilsetningen var
25,3°C. Manteltemperaturen ble langsomt hevet under tilsetningen for å sikre at
15 eksotermen startet ettersom preliminare laboratorie-data indikerte at eksotermen kan
sinkes ved lavere batch-temperaturer. Reaksjonsblandingen ble omrørt og etter 3,5
timer viste en NMR-prøve at reaksjonen var utviklet til 72%. Reaksjonen fikk løpe
natten over med en batch-temperatur mellom 19,7 og 23,6°C (Delta V historian). En
NMR-prøve tatt etter 16 timer viste en reaksjonsomdannelse på 76%. Laboratorie-
20 batcher var i området omdannelse fra 60 til 80%.

Opparbeidelse

Etter at reaksjonen var ansett fullstendig ble ytterligere vann med 9,3 L/kg satt
25 til batchen for å bevirke fase-separering. Produktrik lavere fase ble overført til en
glassballong og den øvre vandige fase ble sendt til avfall. Et lite avfallslag ble holdt
med produktrikt organisk materiale. Den organiske fasen ble returnert til R-1A og
ytterligere vann med 5,1 L/kg ble tilsatt som vask. Fasene ble spaltet, med det
produktrike organiske materiale, omtrent 18,5 kg, sendt til en glassballong mens den
30 øvre vandige fase ble sendt som avfall. Intet avfallslag eller faste stoffer ble
observert i den andre separeringen. Det er imidlertid anbefalt å polere filter-
produktrikt organisk materiale for å fjerne utfelte salter.

Metylenklorid-destillering

Produktrikt organisk materiale ble overført til rotovap-bollen av EVAPO-1A. Destillering av metylenkloridet ble initiert med en manteltemperatur på omtrent 22°C. Destilleringshastigheten avtok etter 4,5 timer og en batch-prøve ble tatt for å analysere metylenklorid-innholdet. NMR-analyse viste et 4:1 forhold av di-tert-butylklormetylfosfat til metylenklorid. Typisk vil laboratorie-resultater av denne strøm indikere et 10:1 forhold, så destillering ble fortsatt med en økning i rotovap-mantel-temperatur. Etter ytterligere 2,5 timer stanset destilleringen. En NMR-prøve av batchen viste at forholdet hadde øket til 5:1 di-tert-butylklormetylfosfat til metylenklorid. Maksimum rotovap-manteltemperatur var 28,4°C.

10

Renhet av di-tert-butylklormetylfosfat-olje

NMR-analyse av di-tert-butylklormetylfosfat-oljen viste at potensen var større enn 100%. Utviklingsarbeid produserte typisk materiale med en potens på $100 \pm 10\%$. Karl-Fischer-analyse målte vanninnhold på 0,02 vekt% og GC-analyse målte metylenklorid på 10,69 vekt%. Således er den angitte potens 89,29 vekt% som gjør rede for metylenklorid- og vann-tilskudd i oljen.

15

Lagring av di-tert-butylklormetylfosfat

Di-tert-butylklormetylfosfat-olje ble plassert i et kaldt rom og temperaturen ble overvåket med en Stripchart registrator. Laboratorie-batcher ble typisk holdt mellom 0 til 5°C. NMR av produktet etter 104 timer henstand i det kalde rom viste at materialet ikke hadde mistet styrke.

20

(Sikkerhetstesting utført under kampanjen indikerer at ved henstand selvoppheves oljen med en påfølgende trykk-oppbygning).

25

NMR standard prep and prøve prep

Fremstilling av trimetylfosfat (TMPO₄) standard løsning:

30

En standard løsning av TMPO₄ må fremstilles basert på et 100 M% teoretisk utbytte. For eksempel: 10 g innføring av di-t-butyl-kaliumfosfat salt må gi 10,41 g (0,402 mol) av di-tert-butylklormetylfosfat. Volumet av diklormetan i

reaksjonsblandingen vil være 75 ml. Molariteten av løsningen er 0,536. En TMPO_4 -løsning må fremstilles med den molaritet og 0,5 ml av den løsningen må kombineres med 0,5 ml av diklormetanlaget fra reaksjonen. Integralene funnet ved ^{31}P NMR kan sammenlignes direkte og vil gi % omdannelse av di-tert-butylklormetylfosfat.

5

Bestemmelse av % uomsatt utgangsmateriale i den vandige fase i reaksjonen:

Etter registrering av volumet av vandig fase i reaksjonen, overfør nøyaktig 0,500 ml i et 1-dram medisinglass inneholdende en kjent vekt av indre standard TMPO_4 . Tilsett omtrent 0,24 ml D_2O . Rist for å blande grundig. Oppnå ^{31}P -kvant. spektra.

10

Beregning av % uomsatt utgangsmateriale:

15

sp. vand ig vol.	mg TMPO_4	248,30 Mv st. mat.	^{31}P NMR integrering st. mat.	10 0	% uomsatt utgangs- materiale i reaksjonen. vandig
G	x	x	x	x	
akt. inpt.	vol. prøve (0,5 ml)	140,08 Mv TMPO_4	^{31}P NMR integrering TMPO_4	10 00	

Eksempel:

212 ml	13,4 mg TMPO_4	248,30 Mv st. mat.	9,617	10 0	3,26% uomsatt utgangs- materiale
11,0	x	x	x	x	
g akt.	0,500 ml	140,08 Mv TMPO_4	270,392	10 00	

20 *Bestemmelse av % potens av produktoljen:*

Etter registrering av netto vekt av den destillerte produktolje, tarer et 1-dram, skrukork medisinglass inneholdende en kjent vekt av indre standard TMPO_4 . Overfør omtrent 0,02 ml produktolje til medisinglasset og registrer netto vekt av produkt-oljen. Tilsett omtrent 0,7 ml CDCl_3 . Rist for å blande grundig. Oppnå ^{31}P -kvant. spektra. Inspiser ^1H NMR-spektra for tilstedeværelsen av gjenværende fase-

25

overføringskatalysator (tetra-n-butyl-ammonium-bisulfat) og metylenklorid.

Rapporter disse som mol% i forhold til produkt.

Beregning av % potens:

5

$$\frac{\text{mg TMPO}_4}{\text{mg prøve}} \times \frac{258,68 \text{ Mv produkt}}{140,08 \text{ Mv TMPO}_4} \times \frac{{}^{31}\text{P NMR integreringsprodukt}}{{}^{31}\text{P NMR integrerings-TMPO}_4} \times 100 = \boxed{\% \text{ potens (vekt/vekt) av produkt-oljen}}$$

Eksempel:

$$\frac{13,7 \text{ mg TMPO}_4}{22,3 \text{ mg prøve}} \times \frac{258,68 \text{ Mv produkt}}{140,08 \text{ Mv TMPO}_4} \times \frac{44,744}{55,256} \times 100 = \boxed{91,9\% \text{ potens (vekt/vekt) av produkt-oljen}}$$

10

NMR-data for di-tert-butylklormetylfosfat

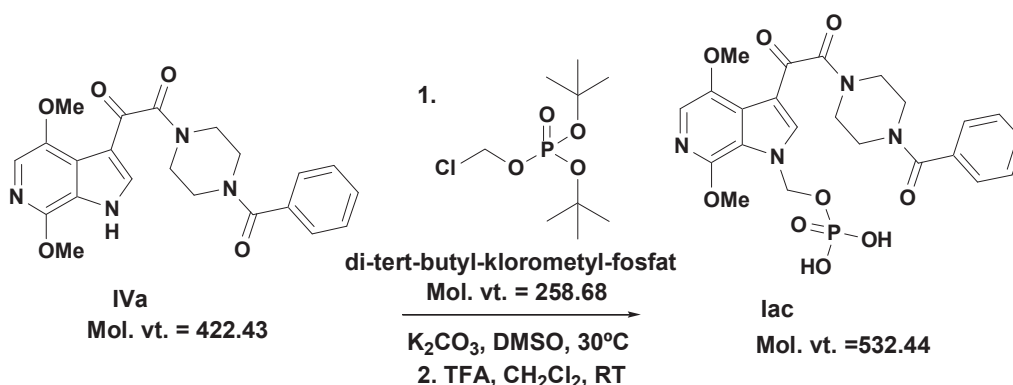
^1H NMR (300,13 MHz, CDCl_3): δ 1,52 (s, 18H), δ 5,67 (d, J = 15,5, 2H)

^{13}C NMR (75,47 MHz, CDCl_3): δ 29,77 (d, J = 4,5, 6C), δ 73,34 (d, J = 7,5, 1C), δ

15

^{31}P NMR (121,49 MHz, CDCl_3): δ -10,51 (s, 1P)

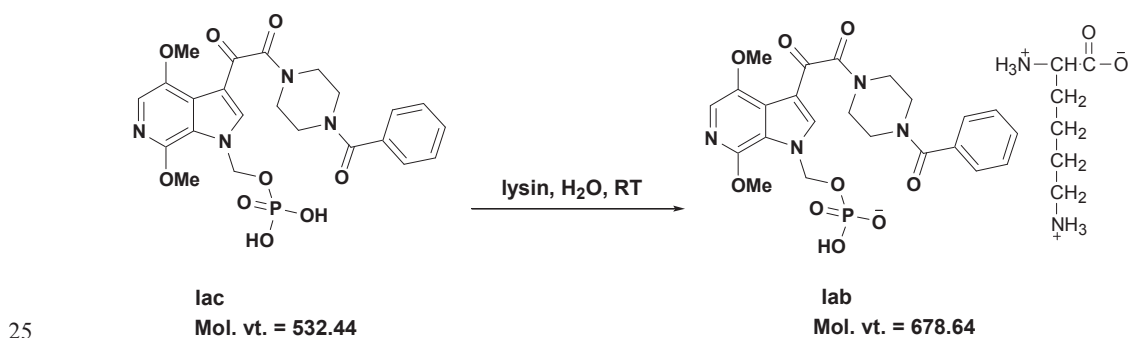
Eksempel 12: Alternativ fremstilling av Iab (prodrug for IVa)



20

En 500 ml 4-halset rundbunnet kolbe utstyrt med en overhengende rører, termoelement, tilsetningstrakt, et nitrogen-innløp og septa ble tilsatt IVa (20,01 g, 47,37 mmol), K_2CO_3 (13,13 g, 95,00 mmol) og DMSO (100 ml, 1,41 mol) og

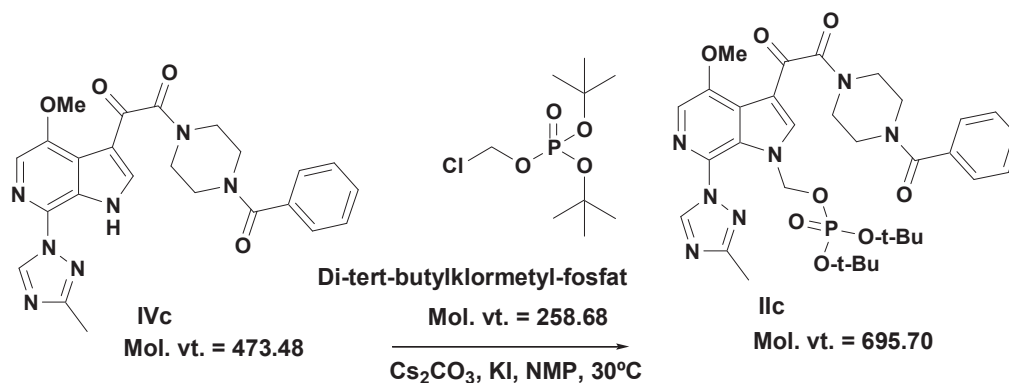
reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur, hvilket resulterte i en lysebrun heterogen suspensjon. Di-tert-butylklormetylfosfat (14,83 g, 57,32 mmol) ble tilsatt via tilsetningstrakt og reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 30°C i 16-24 timer etter hvilken tid reaksjonsblandingen ble avkjølt til 10°C. Til reaksjonen ble satt DCM (200 ml) deretter langsomt behandlet med vann (200 ml) som opprettholder reaksjonstemperaturen under 20°C hvilket resulterte i en bifasisk blanding. Det produkttrike bunnlaget lag ble separert, vasket med vann (200 ml), deretter overført til en 500 ml 4-halset rundbunnet kolbe utstyrt med en overhengende rører, termoelement, tilsetningstrakt og nitrogeninnløp. Trifluoreddiksyre (53,0 ml, 700,94 mmol) ble tilsatt via tilsetningstrakt hvilket resulterte i en svak eksoterm. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 1-3 timer og deretter avkjølt til 0°C. Metanol (300 ml) ble tilsatt mens reaksjonstemperaturen ble holdt under 20°C og deretter avkjølt til 0°C. Reaksjonskolben ble utstyrt med et destilleringsapparat og konsentrert under vakuum til et volum på 200 ml (200 Torr, < 30°C). Reaksjonen ble podet med Iac (0,200 g), deretter omrørt natten over ved romtemperatur, hvilket resulterte i en oppslemming. Oppslemningen ble filtrert og deretter ble den våte kaken vasket med THF (300 ml) og deretter tørket i en vakuumovn ved 50°C natten over, hvilket resulterte i et blekgult til hvitt pulver (23,94 g, 95%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,30 (s, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,44 (s, 5H), 6,12 (d, *J* = 10,6 Hz, 2H), 3,97 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 3,80-3,22 (m, 8H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 185,49, 169,26, 166,06, 146,20, 145,60, 140,64, 135,50, 129,68, 128,41, 127,04, 123,46, 121,17, 120,08, 114,32, 72,43, 56,92, 53,32, 45,22, 40,50; ES⁺ MS *m/z* (rel. intensitet) 533(MH⁺, 100), 453(MH⁺ - H₃PO₄, 15).



Til en 10L 4-halset reaktor utstyrt med et termoelement, overhengende rører, kjøler og nitrogen-innløp ble satt Iac (611 g, 1,15 mol) og vann (3875 ml). Til den

resulterende suspensjonen ble satt lysin (168 g, 1,15 mol). Reaksjonsblandingen ble omrørt i én time ved romtemperatur, oppvarmet til 50°C og deretter holdt ved 50°C med omrøring i en ytterligere time. Den resulterende uklare løsning (pH = 4,55) ble filtrert gjennom et 10 mikron Cuno-filter til en 20L 4-halset reaktor utstyrt med termoelement, overhengende rører, kjøler og nitrogen-innløp. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 50°C og deretter ble aceton (8 L) tilsatt raskt. Reaksjonen fikk oppvarmes til 50°C og deretter ble aceton (4 L) tilsatt med en moderat hastighet for å holde reaksjonstemperaturen over 45°C. Reaksjonen ble podet med Iab (0,200 g) og deretter avkjølt til romtemperatur over 5 timer, hvilket resulterte i en oppslemning. Oppslemningen ble omrørt natten over ved romtemperatur og deretter filtrert. Den våte kaken ble vasket med aceton (4 L) og deretter tørket i en vakuumovn ved 25°C natten over med en lufting av fuktig luft, hvilket resulterte i et dunaktig hvitt pulver (751 g, 96%).

Eksempel 13: Alternativ fremstilling av Icb (Prodrug for IVc)

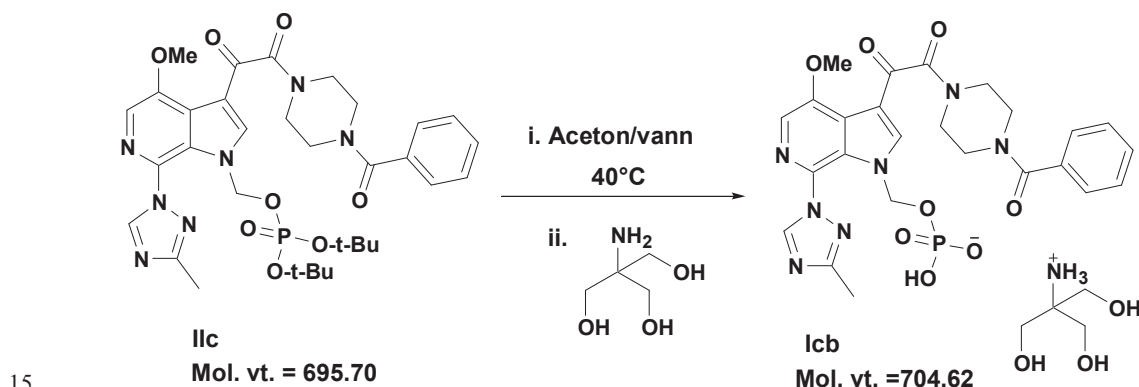


Til en 10 L reaktor utstyrt med en overhengende rører, termoelement, destilleringsapparat og nitrogen-innløp ble satt IVc (200,00 g, 422,39 mmol), Cs₂CO₃ (344,06 g, 1,06 mol), KI (140,24 g, 844,81 mmol) og NMP (1,00 L, 10,38 mol). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur, hvilket resulterte i en lysebrun heterogen suspensjon. Di-tert-butylklormetylfosfat (273,16 g, 1,06 mol) ble tilsatt via tilsetningstrakt og reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 30°C i 16-24 timer med omrøring etter hvilken tid reaksjonsblandingen ble avkjølt til 5°C. Til reaksjonen ble satt DCM (1,5 L) og deretter ble reaksjonsblandingen langsomt behandlet med vann (3,5 L) mens reaksjonstemperaturen holdes under 20°C, hvilket resulterer i en bifasisk blanding. Det produktrike bunnlaget ble separert, vasket med vann (3,5 L x

3), deretter overført tilbake til reaktoren. Løsningen ble konsentrert under vakuum til et volum på 1 L mens temperaturen ble holdt under 25°C. IPA ble tilsatt (2 L) og deretter ble reaksjonsblandingen konsentrert under vakuum til et volum på 2L mens temperaturen ble holdt under 25°C. Reaksjonen ble deretter podet med IIc (0,200 g),

5 omrørt natten over ved romtemperatur hvilket resulterte i en oppslemning.

Oppslemningen ble filtrert og den våte kaken ble vasket med MTBE (1 L) og tørket i en vakuumovn ved 50°C natten over, hvilket resulterte i et gult/hvitt pulver (207,1 g, 70%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,54 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,42 (s, 5H), 5,95 (d, *J* = 14,2 Hz, 2H), 4,06 (s, 3H), 3,97-3,36 (m, 8H), 2,50 (s, 3H), 1,27 (s, 18H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 184,64, 170,65, 165,91, 161,60, 150,82, 145,38, 141,89, 134,96, 130,20, 129,59, 128,68, 127,58, 127,10, 124,77, 122,64, 115,22, 83,90, 83,83, 73,69, 73,63, 56,95, 46,04, 41,66, 29,61, 29,56, 13,90; ES⁺ MS *m/z* (rel. intensitet) 696 (MH⁺,10), 640 (MH⁺ - isobutylen, 30), 584 (MH⁺ - 2 isobutylen, 100).

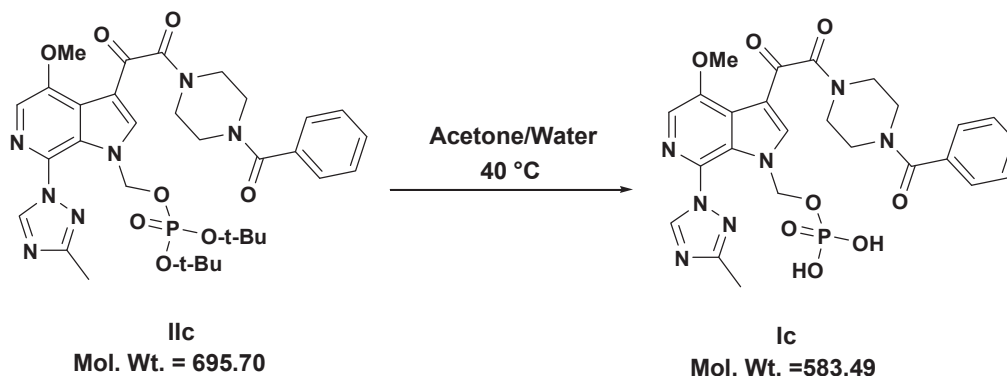


Til en 10L 4-halset reaktor utstyrt med termoelement, overhengende rør, kjøler og nitrogeninnløp ble satt IIc (200,24 g, 287,82 mmol), aceton (800,00 ml, 10,88 mol) og vann (800,00 ml, 44,41 mol). Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 40°C og omrørt i 18-24 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til 20°C og deretter ble trometamin (33,62 g, 277,54 mmol) tilsatt. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 40°C og deretter omrørt i en ytterligere time inntil alle faste stoffer var oppløst. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til 20°C og deretter filtrert gjennom et 10 mikron Cuno-filter til en 10L 4-halset reaktor utstyrt med termoelement, overhengende rør og nitrogeninnløp. Aceton (3 L) ble tilsatt raskt, fulgt av poding med Icb (0,500 g), deretter ble ytterligere aceton (3 L) tilsatt. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur natten over, hvilket resulterte i en oppslemning og deretter filtrert.

Den våte kaken ble vasket med aceton (800 ml), deretter tørket i en vakuumovn ved 50°C natten over, hvilket resulterte i et dunaktig hvitt pulver (165,91 g, 82%).

Supplerende informasjon:

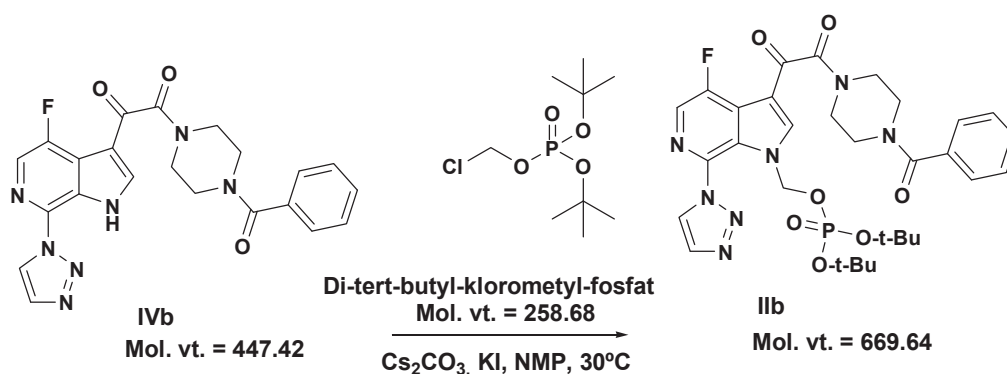
5 *Isolering av det fri syre mellomprodukt Ic:*



I en 250 ml 3-halset reaktor utstyrt med termoelement, overhengende rører, kjøler og nitrogeninnløp ble tilsatt IIc (10,0 g, 14,37 mmol), aceton (40,00 ml, 544,15 mmol) og vann (40,00 ml, 2,22 mol). Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 40°C og omrørt i 14-24 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til 20°C og deretter omrørt i tre timer, hvilket resulterte i en oppslemming. Oppslemningen ble filtrert, deretter ble den våte kaken vasket med aceton (40,00 ml) og deretter tørket i en vakuumovn ved 50°C natten over, hvilket resulterte i et dunaktig hvitt pulver (7,00 g, 83%).

NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,84 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 7,45 (s, 5H), 5,81 (d, *J* = 12,3 Hz, 2H), 4,03 (s, 3H), 3,91-3,19 (m, 8H), 2,39 (s, 3H); ¹³C NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 185,20, 169,32, 165,85, 160,75, 150,51, 146,30, 143,24, 135,53, 129,74, 129,22, 128,46, 127,34, 127,09, 123,67, 122,73, 113,94, 72,90 (d, ²*J*_{C-P} = 5 Hz), 57,01, 45,2 (bs), 40,8 (bs), 13,66. ES⁺ MS *m/z* (rel. intensitet) 486 (MH⁺ - H₃PO₄, 100).

Eksempel 14: Alternativ fremstilling av Ibb (prodrug av IVb)



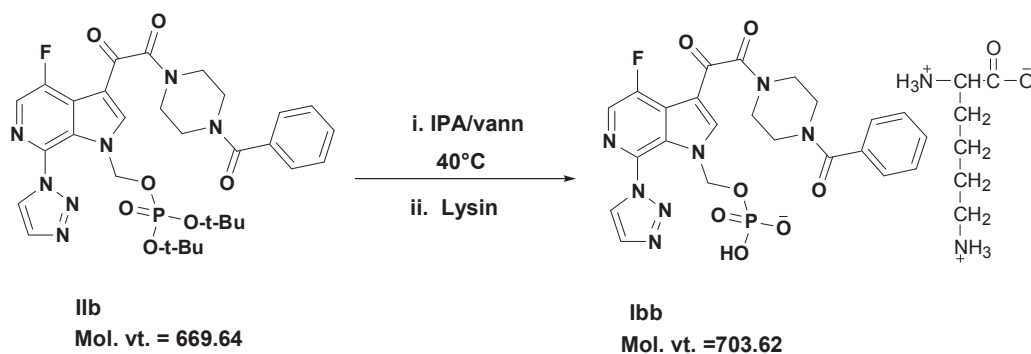
Til en 10 L reaktor utstyrt med en overhengende rører, termoelement og nitrogeninnløp ble satt IVb (400,00 g, 894,73 mmol), Cs_2CO_3 (873,70 g, 2,68 mol),

5 KI (297,70 g, 1,79 mol) og NMP (1,00 L, 10,38 mol). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur, hvilket resulterte i en lysebrun heterogen suspensjon. Di-tert-butylklormetylfosfat (460,50 g, 1,78 mol) ble tilsatt via tilsetningstrakt og reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 30°C i 16-24 timer på hvilket tidspunkt reaksjonsblandingen ble avkjølt til 5°C . Til reaksjonen ble satt n-BuOAc (2,4 L) og

10 deretter ble reaksjonsblandingen langsomt behandlet med vann (4 L) mens reaksjonstemperaturen holdes under 20°C hvilket resulterte i en bifasisk blanding. Det vandige bunnlag ble fjernet fra reaktoren, deretter ble det produktrike topplag podet med IIc (0,40 g) og deretter omrørt i 3 timer ved romtemperatur, hvilket resulterte i en oppslemning. Oppslemningen ble filtrert og deretter ble den våte

15 kaken vasket med MTBE (1,6 L) og deretter tørket i en vakuumovn ved 50°C natten over, hvilket resulterte i et gult/hvitt pulver (483,2 g, 81%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,35 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,42, (s, 5H), 5,92, (d, $J = 14,9$ Hz, 2H), 4,02-3,40 (m, 8H), 1,24 (s, 18H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 182,75, 170,64, 152,07, 144,03, 134,91, 133,96, 131,82, 130,21, 128,68, 128,27,

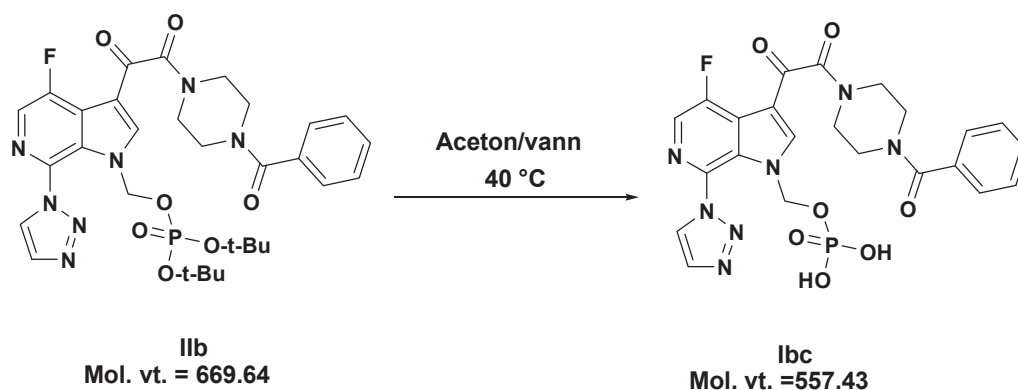
20 128,00, 127,07, 125,81, 124,01, 113,82, 84,00, 83,93, 73,97, 46,12, 41,90, 29,57, 29,53; ES^+ MS m/z (rel. intensitet) 558(MH^+ , 100).



Til en 300 ml 4-halset reaktor utstyrt med termoelement, overhengende rør, kjøler og nitrogen-innløp ble satt IIb (18,0 g, 26,87 mmol), IPA (36,00 ml, 470,92 mol) og vann (36,00 ml, 2,0 mol). Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 40°C og omrørt i 18-24 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til 20°C og deretter ble lysin (3,73, 25,54 mmol) tilsatt. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 1 time inntil alle faste stoffer var oppløst. IPA (54 ml) ble tilsatt over 30 minutter fulgt av poding med Ibb (0,180 g) og omrøring i ytterligere 30 minutter. IPA ble tilsatt (18 ml) over 1 time og deretter ble reaksjonsblandingen oppvarmet til 50°C, hvilket resulterte i en tynn oppslemming. Reaksjonsblandingen ble podet med Ibb (0,180 g) og deretter ble IPA (36 ml) tilsatt over 2 timer og deretter omrørt i 12 timer, hvilket resulterte i en oppslemming. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 70-80°C i 2 til 3 timer og deretter avkjølt til 50°C. IPA (59 ml) ble tilsatt over 1 time og deretter ble ytterligere IPA (121 ml) tilsatt over 1 time. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til 20°C over 2 timer og deretter omrørt i ytterligere 2 timer og deretter filtrert. Den våte kaken ble vasket med IPA (180 ml), deretter tørket i en vakuumovn ved 50°C natten over, hvilket resulterte i et hvitt pulver (15,43 g, 82%).

20 *Supplerende informasjon:*

Prosedyre for isolering av fri syre mellomprodukt Ibc:



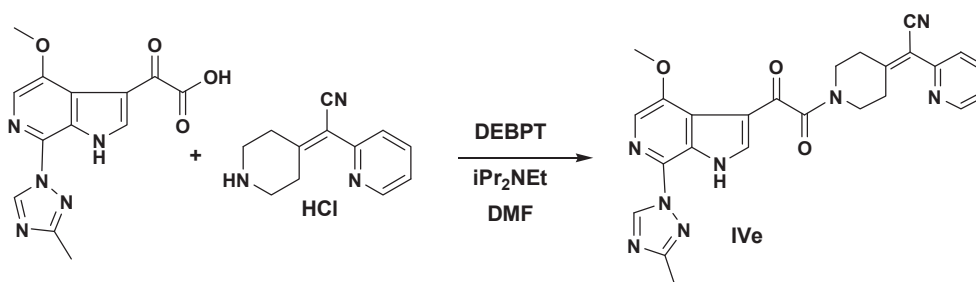
I en 500 ml 3-halset kolbe utstyrt med termoelement, overhengende rører, kjøler og nitrogen innløp ble tilsatt IIb (50,00 g, 74,76 mmol), aceton (100,00 ml, 1,36 mol) og vann (100,00 ml, 5,55 mol). Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 40°C og omrørt i 18-24 timer.

I en 250 ml 3-halset kolbe utstyrt med en pH-probe, magnetisk rørestav og nitrogeninnløp ble tilsatt 150 ml av Ibc-løsningen ovenfor, deretter ble pH regulert til pH = 6,2 med 10N NaOH. Løsningen ble overført til en separasjonstrakt, deretter vasket med EtOAc (100 ml), deretter DCM (100 ml), og deretter overført tilbake til den 250 ml 3-halsede kolben. pH ble regulert til pH = 1,3 med 2N HCl fulgt av omrøring i tre timer, hvilket resulterte i en oppslemning som ble filtrert. Den våte kaken ble gjenopslemmet i MTBE (150 ml) og deretter filtrert, fulgt av gjenopslemning i THF/vann (100:1, 130 ml) i 45 minutter, deretter filtrert og tørket i en vakuumovn ved 50°C natten over, hvilket resulterte i et hvitt pulver (10,0 g, 33%).

NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,69 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,41 (s, 5H), 5,47 (d, *J* = 13,3 Hz, 2H), 3,99-3,18 (m, 8H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 183,97, 169,23, 165,20, 151,69, 145,91, 135,48, 133,83, 131,59, 129,65, 129,11, 129,03, 128,42, 127,77, 127,49, 127,03, 122,62, 112,08, 72,57. ES⁺ MS *m/z* (rel. intensitet) 558 (MH⁺, 100).

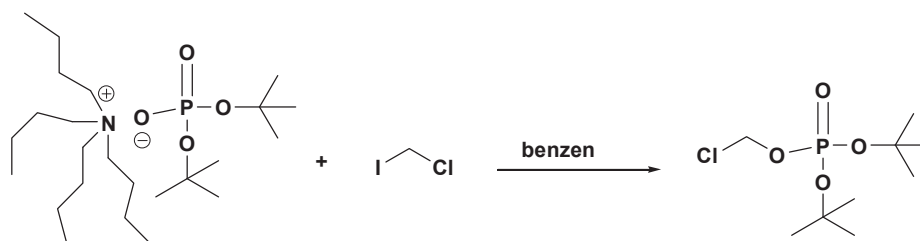
Eksempel 15: Fremstilling av Prodrug Ie

Trinn én



- Fremstilling av 2-(1-(2-(4-metoksy-7-(3-metyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-3-yl)-2-oksoacetyl)piperidin-4-yliden)-2-(pyridin-2-yl)acetonitril (IVe): 2-(4-metoksy-7-(3-metyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-3-yl)-2-oksoeddiksyre (1,5 g), 2-(piperidin-4-yliden)-2-(pyridin-2-yl)acetonitril-hydroklorid (1,5 g), 3-(dietoksyfosforyloksy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on (DEBPT) (2,1 g) og Hunig's Base (2 ml) ble samlet i 20 ml DMF. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 16 timer.
- DMF ble fjernet ved inndampning ved redusert trykk og residuet ble fordelt med MeOH (80 ml). Fellingen ble oppsamlet ved filtrering for å gi 0,85 g av produktet, 2-(1-(2-(4-metoksy-7-(3-metyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-3-yl)-2-oksoacetyl)piperidin-4-yliden)-2-(pyridin-2-yl)acetonitril (IVe). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,42 (s, 1H), 9,23 (m, 1H), 8,69 (m, 1H), 8,27 (m, 1H), 7,89 (m, 2H), 7,58 (m, 1H), 7,52 (m, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,99 - 2,70 (m, 8H), 2,60 (m, 3H). MS m/z : (M+H) $^+$ beregnet for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_8\text{O}_3$ 483,19, funnet 483,18.

Trinn to

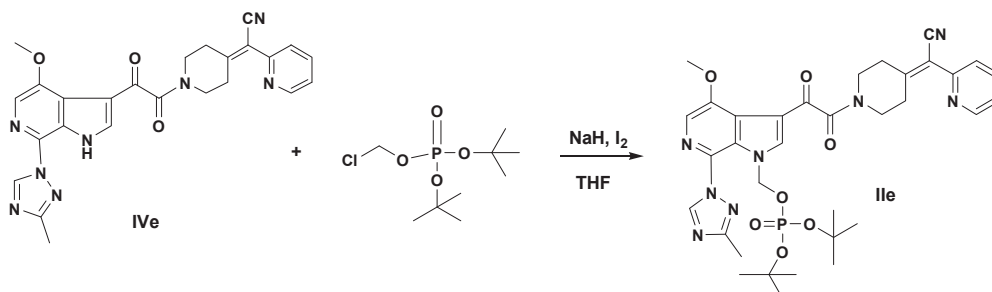


20

Fosfat-ester (45,1 g, 0,1 mol) og klorjodmetan (200 g, 1,14 mol) ble samlet i 100 ml benzen og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i fire timer før benzen ble fjernet under vakuum. Deretter ble 500 ml etyleter satt til residuet og uoppløselig

fast stoff ble filtrert vekk. Konsentrasjon av filtratet ga di-tert-butylklormetylfosfat, som ble anvendt i neste trinn uten noen ytterligere rensning.

Trinn tre

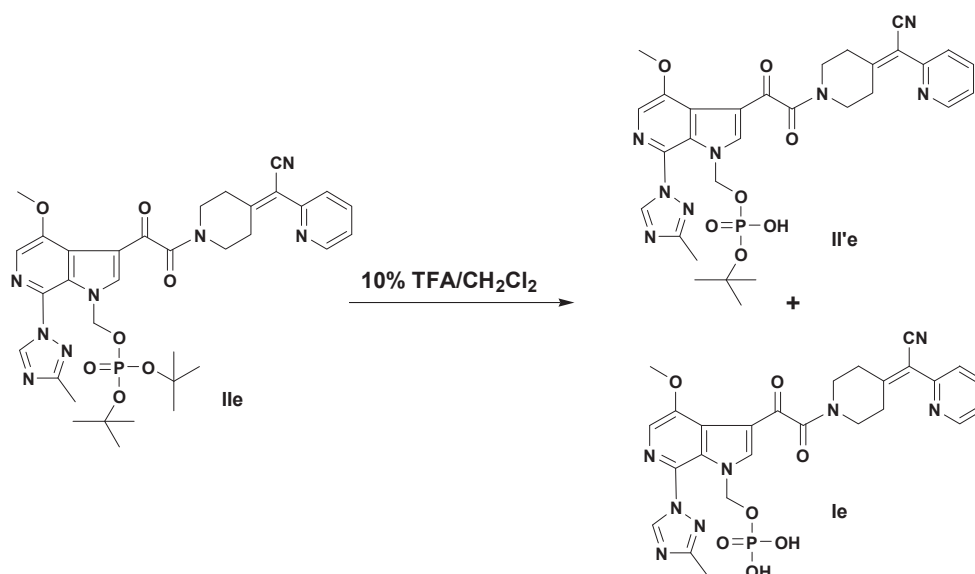


5

NaH (0,2 g, 95%) ble satt langsomt til en suspensjon av 2-(1-(2-(4-metoksy-7-(3-metyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-3-yl)-2-oksoacetyl)piperidin-4-yliden)-2-(pyridin-2-yl)acetonitril (IVe) i tørr THF (20 ml) og
 10 blandingen ble omrørt i en time ved romtemperatur. Jod (0,4 g) oppløst i tørr THF (2 ml) ble tilsatt langsomt til den omrørte løsningen. Blandingen ble omrørt i ytterligere 3 timer før 0,2 g av NaH ble tilsatt. Etter fullføring av tilsetningen ble den resulterende blandingen omrørt ved omgivelsestemperatur i ytterligere 15 minutter og deretter ble di-tert-butylklormetylfosfat, oppnådd fra trinn to, tilsatt. Etter omrøring i
 15 16 timer ble reaksjonsblandingens hellet i iset NH₄OAc (30%) (50 ml), fulgt av ekstraksjon med EtOAc (3 x 100 ml). De samlede organiske ekstrakter ble vasket med vann (50 ml) og deretter saltvann (50 ml), tørket over Na₂SO₄ og konsentrert under vakuum, hvilket ga et residuum, som ble rensert ved silikagel-kromatografi (eluering med EtOAc/Et₃N (100/1)), hvilket ga 330 mg av di-tert-butyl-(3-(2-(4-(cyano(pyridin-2-yl)metylen)piperidin-1-yl)-2-oksoacetyl)-4-metoksy-7-(3-metyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-1-yl)metylfosfat (IIe). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8,85 (m, 1H), 8,66 (m, 1H), 8,45 (m, 1H), 8,06 (m, 1H), 7,92 (m, 1H), 7,60 (m, 1H), 7,43 (m, 1H), 6,05 (m, 2H), 4,11 (s, 3H), 4,00 (m, 1H), 3,82 (m, 1H), 3,76 (m, 1H), 3,60 (m, 1H), 3,04 (m, 1H), 2,95 (m, 1H), 2,85 (m, 1H), 2,80 (m, 1H), 2,52 (s, 3H), 1,30 (m, 18H). MS m/z: (M+H)⁺ beregnet for C₃₄H₄₂N₈O₇P 705,29, funnet 605,30.

25

Trinn fire



Di-tert-butyl-(3-(2-(4-(cyano(pyridin-2-yl)metylen)piperidin-1-yl)-2-oksoacetyl)-4-metoksy-7-(3-metyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-1-yl)metylfosfat (IIe) ble oppløst i 8 ml av en blandet løsning av TFA og diklormetan (10% TFA/CH₂Cl₂) og blandingen ble omrørt i tre timer. Alle løsningsmidlene ble fjernet under vakuum og residuet ble rensset ved anvendelse av et Shimadzu automatisert preparativt HPLC-system, hvilket ga 25 mg av tert-butyl-(3-(2-(4-(cyano(pyridin-2-yl)metylen)piperidin-1-yl)-2-oksoacetyl)-4-metoksy-7-(3-metyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-1-yl)metyl-hydrogenfosfat (II'e) og 33 mg av (3-(2-(4-(cyano(pyridin-2-yl)metylen)piperidin-1-yl)-2-oksoacetyl)-4-metoksy-7-(3-metyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-1-yl)metyl-dihydrogenfosfat (Ie).

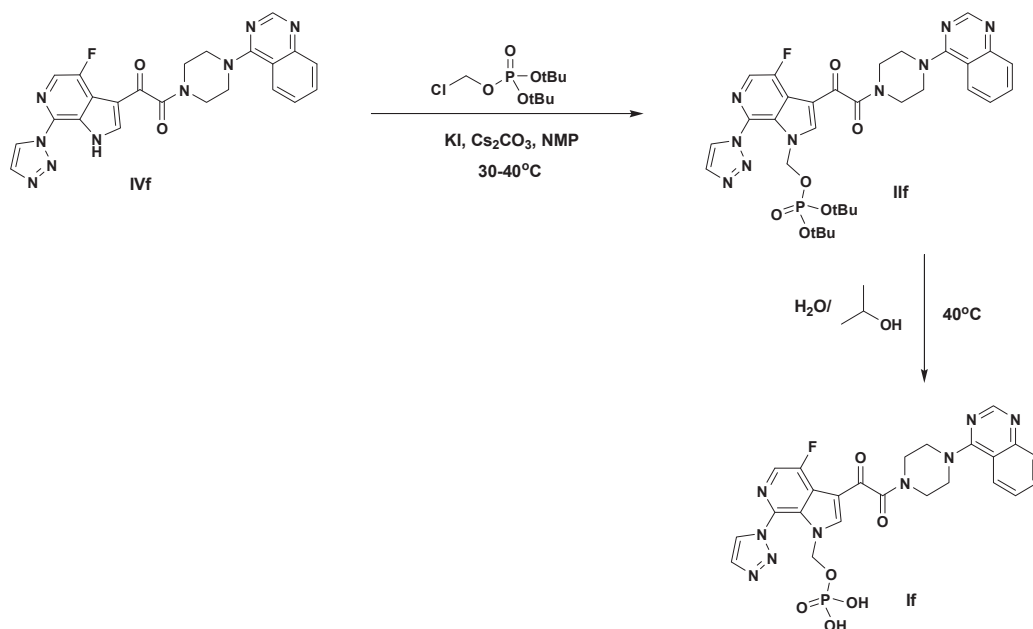
tert-butyl-(3-(2-(4-(cyano(pyridin-2-yl)metylen)piperidin-1-yl)-2-oksoacetyl)-4-metoksy-7-(3-metyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-1-yl)metyl-hydrogenfosfat (II'e): ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8,83 (m, 1H), 8,55 (m, 1H), 8,35 (m, 1H), 7,92 (m, 2H), 7,54 (m, 1H), 7,41 (m, 1H), 5,86 (m, 2H), 3,98 (s, 3H), 3,96 (m, 1H), 3,72 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,47 (m, 1H), 2,92 (m, 1H), 2,85 (m, 1H), 2,71 (m, 1H), 2,65 (m, 1H), 2,40 (s, 3H), 1,15 (m, 9H). MS *m/z*: (M+H)⁺ beregnet for C₃₀H₃₄N₈O₇P 649,23, funnet 649,22.

(3-(2-(4-(cyano(pyridin-2-yl)metylen)piperidin-1-yl)-2-oksoacetyl)-4-metoksy-7-(3-metyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-1-yl)metyl-

dihydrogen-fosfat (Ie): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,88 (m, 1H), 8,65 (m, 1H), 8,50 (m, 1H), 8,06 (m, 1H), 7,90 (m, 1H), 7,49 (m, 2H), 5,82 (m, 2H), 4,04 (s, 3H), 3,96 (m, 1H), 3,88 (m, 1H), 3,72 (m, 1H), 3,46 (m, 1H), 2,94 (m, 1H), 2,82 (m, 2H), 2,73 (m, 1H), 2,40 (m, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 185,2, 165,6, 160,6, 159,1, 151,0, 150,4, 149,5, 146,2, 143,1, 137,4, 129,1, 127,2, 124,4, 123,6, 122,6, 117,4, 116,3, 113,9, 110,0, 72,8, 56,9, 48,4, 44,4, 36,4, 34,0, 13,6. MS m/z : $(\text{M}+\text{H})^+$ beregnet for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}_7\text{P}$ 593,17, funnet 593,14.

Eksempel 16: Fremstilling av Prodrug If

10



Til en blanding av **IVf** (99,5 mg, 0,21 mmol) i 1-metyl-2-pyrrolidinon (1,0 ml) ved romtemperatur i et medisinglass med kork ble satt KI (144 mg, 0,87 mmol) og Cs_2CO_3 (416 mg, 1,28 mmol)) og blandingen ble omrørt i ca. 5 min. Di-tertbutylklormetylfosfat-reagens (218 mg, 0,84 mmol) ble deretter tilsatt dråpevis. Den resulterende blandingen ble deretter omrørt ved 35 til 40°C i 20 timer. Blandingen ble deretter fortynnet med H_2O (ca. 8 ml) og ekstrahert med EtOAc (ca. 8 ml). Den organiske ekstrakten ble separert og inndampet, hvilket ga di-tertbutylklormetylfosfat; Analytisk HPLC-metode: Løsningsmiddel A 10% MeOH-90% H_2O -0,1% TFA; Løsningsmiddel B 90% MeOH-10% H_2O -0,1% TFA; Start %B = 0, Endelig %B = 100, Gradient-tid = 2min, Strømningshastighet = 5 ml/min, Kolonne:

Xterra MS C18 S7 3,0x50mm; **LC/MS:** (ES⁺) m/z (M+H)⁺ = 694,22, HPLC R_t = 1,243.

En blanding av **Mellomprodukt II** i H₂O/isopropanol (1,0 ml/1,0 ml) i en korket rundbunnet kolbe ble omrørt ved 40°C i 9,5 timer. Blandingen ble deretter
 5 avkjølt til romtemperatur og løsningen overført til et medisinglass ved anvendelse av en pipette. MeCN (1,0 ml) ble satt til denne løsningen, som deretter ble tilsatt isopropanol langsomt og med periodisk omrøring ved anvendelse av en spatel. De gråhvite presipitater ble deretter filtrert, vasket med isopropanol (2 x 1,0 ml) og deretter tørket under høyvakuum, hvilket ga prodrug **If**; ¹H NMR (500 MHz):
 10 (DMSO-*d*₆) δ 8,76 (s, 1H), 8,71 (s, 1H), 8,69 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,09 (d, *J* = 8, 1H), 8,06 (s, 1H), 7,89 (d, *J* = 7, 1H), 7,85 (app t, 1H), 7,59 (app t, 1H), 5,68 (d, *J* = 13, 2H), 4,00 (b m, 2H), 3,90 (b m, 2H), 3,85 (b m, 2H), 3,65 (b m, 2H); Analytisk HPLC metode: Løsningsmiddel A 10% MeOH-90% H₂O-0,1%TFA; Løsningsmiddel B 90% MeOH-10% H₂O-0,1%TFA; Start %B = 0, Endelig %B = 100, Gradient-tid = 2 min,
 15 Strømningshastighet = 5 ml/min, Kolonne: Xterra MS C18 S7 3,0x50mm; **LC/MS:** (ES⁺) m/z (M+H)⁺ = 582,00, HPLC R_t = 1,797.

For å bli vellykket må omdannelsen av prodrug til parental forbindelse initieres ved alkaliske fosfataser i mennesker. Kvalitativ *in vitro* undersøkelser ved anvendelse av human placentale alkalisk fosfatase og *in vivo* undersøkelser i rotter
 20 viste at omdannelse av prodrug var rask både *in vitro* med humane enzymer og *in vivo* i rotter. Ideelt vil omdannelseshastigheten være rask slik at bare begrenset eksponering for prodrug forekommer og maksimum eksponering for aktiv parentalt antiviralt middel vil resultere. Data fra undersøkelser (nedenfor) viser at i alle tre prodrug-eksempler evaluert i rotter, blir prodrug raskt omdannet til aktivt parentalt
 25 medikament og at plasma-nivåer av prodrug er meget lave sammenlignet med parentalt medikament ved alle datapunkter. Disse undersøkelser ble utført med doser hvor doser av parentalt medikament og dosen ekvivalent fra fosfat-prodrug var lav og omtrent lik, ~5 mg/kg. Siden fordelene med prodrug er å overvinne oppløsnings-begrenset absorpsjon, vil i lave doser fordelene med prodrug fremfor mindre
 30 oppløselige parentale molekyler for klinisk anvendelse hos pasienter ikke være åpenbare. Lav-dose *in vivo* undersøkelser ble anvendt for å bestemme hvorvidt prodrug genererte det parentale molekyl. Oppløseligheten av de parentale molekyler IV, er avhengig av krystallinsk form. En krystallinsk form er foretrukket for

medikament-utvikling. Dataene for alle de parentale molekyler kan oppsummeres ved å angi at den vandige oppløselighet av krystallinsk materiale for alle parentale molekyler IV er $< 50\mu\text{g/ml}$ og i noen tilfeller meget mindre. Således er den iboende vandige oppløselighet av de parentale molekyler lav og spiller en vesentlig rolle i å

5 forårsake oppløsnings-begrenset absorpsjon i høyere doser.

Tabell 1 - Biologiske og farmasøytiske egenskaper
av *N-metyl-dihydrogen-fosfat (eller salter) azaindoloeksoeddiksyre-piperazin-*
derivater

	<i>Forbindelse Ia</i> (dinatriumsalt)	<i>Forbindelse Ib</i> (dinatriumsalt)	<i>Forbindelse Ic</i> (syreform)
Oppløselighet (mg/ml), pH 6,5	>18	>8	1
In vitro omdannelse i alkalisk fosfatase (fotnote 1)	Fullstendig og rask omdannelse til parentalt uten noen mellomprodukt- dannelse	Fullstendig og rask omdannelse til parentalt uten noen mellomprodukt- dannelse	Fullstendig og rask omdannelse til parentalt uten noen mellomprodukt-dannelse
In vivo omdannelse i rotte-oral (fotnote 2) MAP studie	Rask dannelse av parental i plasma	Rask dannelse av parental i plasma	Rask dannelse av parental i plasma
In vivo omdannelse i rotter-iv (fotnote 2) MAP studie	Rask dannelse av parental i plasma	Rask dannelse av parental i plasma	Rask dannelse av parental i plasma

10 *Fotnote 1:* Prodrug-derivatet (kons. $\sim 0,2$ mM) ble inkubert med alkalisk fosfatase (human placenta, Sigma, $\sim 1,4$ enhet) i pH 8 Tris buffer (kons. $\sim 0,03\text{M}$, 1 ml) og forsvinning av prodrug og dannelse av den parentale forbindelse ble overvåket ved HPLC og LC/MS. I de fleste tilfeller forsvant prodrug-forbindelsen fullstendig, svarende til dannelse av den parentale forbindelse innen en time eller to og ingen

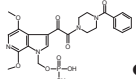
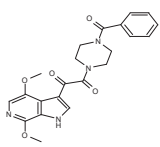
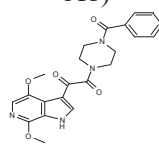
15 andre mellomprodukter ble detektert.

Fotnote 2: Prodrug-forbindelsen ble administrert til rotter ved oral (i dosen ekv. med 5 mg/kg av den parentale) eller ved intravenøs rute (i dosen ekv. med 1 mg/kg av den parentale). Plasmanivåene indikerer rask omdannelse til den parentale forbindelse

20 med ingen detekterbar mengde av prodrug (po).

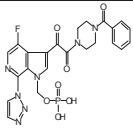
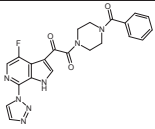
I tabellene nedenfor betyr betegnelsen "LLQ" nedre grense for kvantifisering (dvs. ikke detektert).

5 Tabell 2: MAP Studie A: Oppsummering av PK etter PO and IV administrering av prodrug Ia til rotter. Sammenligning med historisk PO av forbindelse IVa i rotter

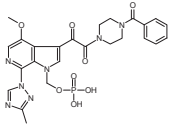
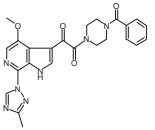
PK (5 mg/kg po)	Ia Etter prodrug dosering	IVa Etter prodrug dosering	Historisk IVa Etter dosering av parental IVa (Studie A1)
	 dinatriumsalt		
Dose PO (mpk)	6,3 mpk	ekvivalent med 5 mpk av IVa)	5 mpk
Cmaks (uM)	LLQ	1,4 ± 0,6	4,5 ± 1,5
Tmaks (timer)	LLQ	1,7	2
AUC 0-24 timer (uM*timer)	LLQ	5,9 ± 1	14,9 ± 6,2
Cp @ 24 timer p.o. (nM)	LLQ	35,2 (n=1)	9,2 (n=1)
Dose IV (mpk)	1,26 mpk	ekvivalent til 1 mpk of 'IVa)	1
CL i.v. (ml/min/kg)	16 ± 0,95	-	13 ± 4,6
Vss i.v. (L/kg)	0,095 ± 0,001	-	1,4 ± 0,4
T1/2 i.v. (timer)	0,14 ± 0,02	2,8 ± 1,5	4 ± 2,6
T1/2 p.o. (timer)		3,3 ± 2,2	1,9 ± 0,8
AUC0 tot forhold etter IV administrering*		0,534	
AUCtot forhold etter PO administrering**		0,39	

Tabell 3: MAP Studie B: Oppsummering av PK etter PO og IV administrering av Prodrug Ib til rotter. Sammenligning med historisk PO av forbindelse IVb i rotter

PK (5 g/kg po)	Ib Etter prodrug dosering	IVb Etter prodrug dosering	Historisk IVb Etter dosering av parental IVb (Studie B1)
-------------------	------------------------------	-------------------------------	---

 dinatriumsalt			
Dose PO (mpk)	7 mpk	ekvivalent med 5 mpk av IVb)	5
Cmaks (uM)	LLQ	3,9 ± 0,8	9,5 ± 2,8
Tmaks (timer)	LLQ	1,1	4,6
AUC 0-24 timer (µM*timer)	LLQ	13,7 ± 2,6	86 ± 33
Cp @ 24 timer p.o. (nM)	LLQ	7,5 (n=1)	161
Dose IV (mpk)	1,4	ekvivalent til 1 mpk av IVa)	1
CL i.v. (ml/min/kg)	46 ± 10	-	1,6 ± 0,2
Vss i.v. (L/kg)	0,97 ± 0,47	-	0,49 ± 0,26
T1/2 i.v. (timer)	1,8 ± 1,2	1,5 ± 0,2	5,9 ± 4,9
T1/2 p.o. (timer)		2,4 ± 0,5	3,7 ± 0,9
AUC0 tot forhold etter IV adminis- trering*		0,10	
AUCtot forhold etter PO adminis- trering**		0,14	

Tabell 4: MAP Studie C: Oppsummering av PK etter PO og IV administrering av Prodrug Ic til rotter. Sammenligning med historisk PO av forbindelse IVc i rotter

PK (5 mg/kg po)	Ic Etter prodrug dosering	IVc Etter prodrug dosering	Historisk IVc Etter dosering av parental IVc (Studie C1)
			
Dose PO (mpk)	6,5 mpk	ekvivalent med 5 mpk av IVc)	5
Cmaks (uM)	LLQ	10,2 ± 2,1	13,4 ± 3,6

<i>T_{maks}</i> (timer)	LLQ	0,8 ± 0,1	4
<i>AUC 0-24</i> timer ($\mu\text{M} \cdot \text{timer}$)	LLQ	56 ± 7,5	110 ± 25
<i>C_p @ 24</i> timer p.o. (nM)	LLQ	84,3 (n=2)	61
<i>Dose IV</i> (mpk)	1,3	ekvivalent med 1 mpk av 'IVa)	1
<i>CL i.v.</i> (ml/min/kg)	77,9 ± 44,3	-	1,3 ± 0,2
<i>V_{ss} i.v.</i> (L/kg)	1,8 ± 2,6	-	0,4 ± 0,09
<i>T_{1/2} i.v.</i> (timer)	1,2 ± 1	3,2 ± 0,2	4,3 ± 1,1
<i>T_{1/2} p.o.</i> (timer)		2,7 ± 1	3,0 ± 0,3
<i>AUC_{0 tot}</i> forhold etter IV adminis- trering*		0,54	
<i>AUC_{tot}</i> forhold etter PO adminis- trering**		0,43	

Nøkkel for alle tre tabeller 2, 3 og 4:

***AUC_{tot} forhold =**

$$5 \quad \frac{\text{Total AUC av parental etter IV administrering av prodrug}}{\text{Total AUC av parental etter IV administrering av parental (historiske data)}}$$

****AUC_{tot} forhold =**

$$\frac{\text{Total AUC av parental etter PO administrering av prodrug}}{\text{Total AUC av parental etter PO administrering av parental (historiske data)}}$$

En dose-eskaleringsstudie **D** av én av prodrug-forbindelsene (Ica) ble utført i
 10 rotter for å demonstrere de betydelige fordeler av prodrug fremfor den parentale for
 potensiell anvendelse ved behandling av HIV-1 pasienter etter oral dosering.
 Eksponeringsdata og målte parametere fra prodrug-doseeskaleringsstudien ble
 sammenlignet med lignende data fra historiske undersøkelser utført med parentale
 molekyler.

15 Figurer 3 og 4 sammenligner AUC (området under kurven, et mål for
eksponering for medikament i rotten) av IVc etter oral dosering av prodrug Ica (studie

D) med det oppnådd etter dosering av parentalt molekyl IVc (Studie E) og en rotte toksikokinetisk studie (TK). Detaljer for historisk IVc doseeskalerings (Studie E) og rotte TK studie (F) er vist i disse figurer.

Som det kan sees fra Figurer 3 og 4, er AUC og Cmaks for parentalt molekyl etter oral administrering av prodrug-forbindelsen (triangler) større enn de som resulterte fra administrering av stam-medikamentet i to separate undersøkelser. Dataene viser klart at for å maksimere eksponeringsmultipler av medikament i plasma, gir prodrug-forbindelsen overraskende en fordel. Siden de kjemiske strukturene til denne klassen av molekyler er lignende, er prodrug av klassen forventet å vise økning i eksponering etter administrering av prodrug istedenfor det parentale. Gitt usikkerheten om forbedret oral eksponering med fosfat-prodrug og nyheten av de nye forbindelsene, er dette resultat ikke opplagt og er overraskende i størrelse.

Tabell 5. Rotte TK-studie; Studie F; Historisk undersøkelse av PO IVc i rotter ved tre doser

	Forbindelse IVc (Historical Data)		
Dose (mg/kg)	15 (løsn.)	75 (susp)	200 (susp)
Konstituent	80/10/10 PEG-400/Etanol/ 0,1N NaOH		
Gjennomsnitt Cmaks (µM)	42	65	76
Gjennomsnitt AUC 0-24 timer (µM*timer)	418	792	1077
Doseforhold	1 : 5 : 13		
Cmaks forhold	1 : 1,5 : 1,8		
AUC forhold	1 : 1,9 : 2,6		

IV og oral rotte PK studieprotokoll av fosfat-prodrug-undersøkelser A, B og C

Forbindelser Ic (fosfat-prodrug av IVc), Ib (fosfatprodrug av IVb) og Ia (fosfatprodrug av IVa) ble administrert separat til grupper av tre Sprague-Dawley hannrotter ved IV bolus (1 mg/kg; alle doser listet opp i dette dokument var parental forbindelse-ekvivalent) eller oral mating (5 mg/kg). Rottene for orale doseringsundersøkelser ble fastet natten over. Forbindelse Ic ble administrert som fri syre, mens de andre to var som natriumsalter. Dosering-løsningene av alle tre prodrug for

både IV og oral administrering ble fremstilt i 100% normal saltløsning med 1 mg/ml (doseringsløsnings-konsentrasjoner var parental forbindelse-ekvivalent). Plasma-prøver ble oppsamlet i EDTA vacutainere over 24 timer og analysert ved LC/MS/MS for både prodrug og parentale molekyler. Farmakokinetisk analyse ble utført på Kinetica™.

Prosedyrer for LC/MS/MS-analyse er vist i protokollene nedenfor.
Resultatene av denne undersøkelsen er vist i Tabeller 2-4, midtre to kolonner.

Oral dose-eskalering studieprotokoll for Ica i rotter (studie D)

Grupper på tre fastede Sprague-Dawley hannrotter ble oralt administrert forbindelse Ica (dinatriumsalt) med 4,5, 21 og 163 mg/kg (doser var IVc ekvivalente). Doseringsløsninger ble fremstilt i vann med 1, 5 og 20 mg (forbindelse Ic (fri syre) ekvivalent)/ml for dosene på henholdsvis 4,5, 21 og 163 mg (forbindelse IVc ekvivalent)/kg. Plasmaprøver ble oppsamlet i EDTA vacutainere over 24 timer og analysert ved LC/MS/MS for både Ic og IVc. Farmakokinetisk analyse ble utført på Kinetica™.

Resultatene av denne undersøkelsen er vist i Tabell 46 og Figurer 3-5.

20

Tabell 46. Oral rottedose eskaleringsstudie

	Dosering av Ica IVc etter fosfat prodrug Ica (Na-salt) (alle doser er IVc ekvivalente) (n = 3)			IVc (n = 2) Historiske data		
Dose (mg/kg)	5 (løsn.)	25 (løsn.)	200 (løsn.)	25 (løsn.)	75 (susp)	200 (susp)
Konstituent	Vann			80/10/10 PEG-400/Etanol/ 0,1N NaOH		
Partikkelstørrelse (µm)	Løsn.	Løsn.	Løsn.	Løsn.	27	31
Gjennomsnitt Cmaks (µM)	29 ± 14	98 ± 21	281 ± 55	46	86	42
C-24 timer (µM)	0,029 ± 0,008	0,35 ± 0,13	58 ± 36	0,61	5,2	10 (n = 1)
Gjennomsnitt AUCtot (µM*timer)	109 ± 15	586 ± 53	2925 ± 304 *	458	1071	518 *
Gjennomsnitt Tmaks (timer)	0,50 ± 0,25	1,7 ± 2,0	1,1 ± 0,80	4,0	5,0	4,0
Gjennomsnitt T1/2 (timer)	2,3 ± 0,07	2,5 ± 0,15	13 ± 7,5	3,4	6,8	20

Doseforhold	1 : 5 : 40	1 : 3 : 8
Avg. Cmaks forhold	1 : 3,4 : 9,7	1 : 1,9 : 0,91
Avg. AUC Forhold	1 : 5,4 : 27	1 : 2,6 : 1,1*

1. * AUC var fra 0-24 timer siden AUC (24 timer-uendelig) var minst større enn 35% av den totale AUC (0-uendelig). Denne del var for stor til å få nøyaktig mål for total AUC.
- 5 2. AUC omdannelsesforhold med 5 mg/kg av IVc fra Ica, beregnet som forholdet av IVc AUC etter Ica dosering dividert med IVc AUC etter direkte dosering av IVc, var 0,99.
3. Prodrug Ica ble bare detektert ved ~20-40 nM i én til to prøver i hver rotte i 200 mg/kg dosegruppen.

10

In vivo metoder

Prosedyre for studie A1: PO and IV administrering av IVa til rotter; PO dose var 5 mg/kg

- Forbindelse IVa ble administrert i en polyetylenglykol 400 (PEG400)/etanol-
 15 (EtOH) løsning (90/10, volum/volum) hvis ikke angitt på annen måte. Plasma- og vev-prøver ble oppsamlet og lagret ved -20°C inntil analyse. Sprague-Dawley hannrotter (300 - 350 g, Hilltop Lab Animals, Inc., Scottsdale, PA 15683) med kanyler implantert i jugular-venen og/eller gallegangen ble anvendt i de farmakokinetiske undersøkelser av forbindelse IVa. Rotter ble fastet natten over ved PO-undersøkelser.
 20 Blodprøver (0,3 ml) ble oppsamlet fra jugular-venen i EDTA-inneholdende mikrotainer rør (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ 07147) for å oppnå plasma. Ved IV-undersøkelser ble en dose på 1 mg/kg administrert til 3 rotter over 0,5 min og serielle plasmaprøver ble oppsamlet før dosering og 2, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480 og 1440 min etter dosering. Ved PO-undersøkelsene mottok rotter (n = 3)
 25 PO-doser på 5 og 100 mg/kg. Serielle plasmaprøver ble tatt før dosering og 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480 og 1440 min etter dosering.

De orale (PO) resultater av denne undersøkelsen er vist i kolonnen lengst til høyre i Tabell 2.

Parenalt medikament studie B1

- 30 For IV og PO farmakokinetiske undersøkelser av forbindelse IVb i rotter ble FORBINDELSE IVb oppløst i PEG-400/etanol (90/10) som en løsning. For IV og

PO farmakokinetiske undersøkelser av forbindelse IVb i hunder ble FORBINDELSE IVb oppløst i PEG-400/etanol (90/10) med pH-justering med 0,1 N NaOH. Detaljer for formuleringene er gitt i Tabell 6.

Rotte. Sprague-Dawley hannrotter (300–350 g, Hilltop Lab Animals, Inc., Scottsdale, PA) med kanyler implantert i jugular-venen og/eller gallegangen ble anvendt. Rottene ble fastet natten over ved de PO farmakokinetiske undersøkelser. Blodprøver på 0,3 ml ble oppsamlet fra jugular-venen i EDTA-inneholdende mikrotainer-rør (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) og sentrifugert for å separere plasma.

Ved IV-studien ble FORBINDELSE IVb levert med 1 mg/kg som bolus over 0,5 min (n = 3). Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 2, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480 og 1440 min etter dosering.

I PO-studien av forbindelse IVb mottok rottene (n = 3) en oral dose på 5 mg/kg av forbindelse IVb. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480 og 1440 min etter dosering.

Resultatene av denne orale (PO) studie er vist i Tabell 3, høyre kolonne.

Tabell 6: Formuleringer av IVb for in vivo undersøkelser

Forbindelse IVb Undersøkelser	Form	Konstituent	Kons. (mg/ml)	Partikkelstørrelse
Rotte PK (Studie B1)	amorf	90:10, PEG400/EtOH adj. til pH 8,6-9,0	3	NA (løsn.)

Bioanalytiske metoder for in vivo undersøkelse analysering for IVb

Dette angir en metode for analysering av konsentrasjonsnivåer av IVb i rotte plasmaprøver (anvendt for undersøkelser B og B1).

Kvantifisering av forbindelse IVb ved LC/MS/MS i plasma. Aliquoter av plasmaprøver fra rotte-, hund-, ape- eller sjimpanse-undersøkelser ble fremstilt for analyse ved utfelling av plasma-proteiner med to volumer av acetonitril inneholdende den indre standard, FORBINDELSE IVa. De resulterende supernatanter ble separert fra de utfelte proteiner ved sentrifugering i 10 minutter og overført til autosampler glass.

Prøver ble enten fremstilt manuelt eller ved anvendelse av Tomtec automatisert væske-håndterer. En aliquot på 5 µL ble injisert for analyse.

HPLC-systemet besto av to Shimadzu LC10AD pumper (Columbia, MD), en Shimadzu SIL-HTC autosampler (Columbia, MD) og et Hewlett Packard Series 1100 kolonne-kammer (Palo Alto, CA). Kolonnen var YMC Pro C18 (2,0 x 50 mm, 3 µm partikler, Waters Co., Milford, MA), holdt ved 60°C og en strømningshastighet på 0,3 ml/min. Den mobile fasen besto av 10 mM ammonium-formiat og 0,1% maursyre i vann (A) og 100% 10 mM ammonium-formiat og 0,1% maursyre i metanol (B). Den innledende mobile fase-sammensetning var 95% A. Etter prøveinjeksjon ble den mobile fasen endret til 15% A/85% B over 2 minutter og holdt med den sammensetningen i ytterligere 1 minutt. Den mobile fasen ble deretter returnert til de innledende betingelser og kolonnen reekvilibrert i 1 minutt. Total analysetid var 4 minutter.

HPLC ble tilpasset til Micromass Quattro LC. Ultra høyrenhet nitrogen ble anvendt som forstøvende og desolvaterende gass med strømningshastigheter på 100 L/timer for forstøvning og 1100 L/timer for desolvatering. Desolvateringstemperatur var 300°C og kildetemperatur var 150°C. Dataoppsamling anvendte selektert reaksjonsovervåkning (SRM). Ioner som representerer (M+H)⁺ arter for IVb og den indre standard ble valgt i MS1 og kollisjons-dissosiert med argon ved et trykk på 2 x 10⁻³ Torr for å danne spesifikke produkt-ioner som deretter ble overvåket ved MS2. Omdannelser, spenninger og retensjonstider er oppsummert i Tabell 7.

Tabell 7: Parametere for MS/MS analyse av FORBINDELSE IVB og FORBINDELSE IVa (IS)

	FORBINDELSE IVB	FORBINDELSE IVa
SRM omdannelse	mz 448 >105	423 > 205
Konus-spenning (V)	22	30
Kollisjonsenergi (V)	16	30
Retensjonstid (minutter)	2,6	2,4

Plasma standardkurve var i området fra 4 til 8000 ng/ml, hjernekurve fra 1-1000 ng/ml. Kurvene ble tilpasset kvadratisk regresjon vektet ved resiprok konsentrasjon ($1/x$). Standarder ble analysert in duplo. Kvalitetskontroll- (QC) prøver, fremstilt i blankt plasma, i tre konsentrasjoner innen området av kalibrerings-
5 kurven ble også analysert in triplo med hvert plasma analytiske sett. For denne forbindelsen var de antatte konsentrasjoner på 90% av plasma QC innen 20% av nominell konsentrasjon, som indikerer akseptabel forsøksytelse.

Konstituenten og formuleringer. Med henvisning til Tabell 8, når konstituenten anvendt inneholder NaOH, ble Forbindelse IVc løsningsformuleringer pH-regulert
10 ved anvendelse av NaOH for å oppnå en pH på 8,6-9,0, hvor forbindelsen er delvis ionisert, basert på dens pKa ved 8,4.

Tabell 8: Formuleringer av forbindelse IVc for in vivo undersøkelser

Forbindelse IVc Undersøkelser	Form-parti	Tilstand	Konstituent	Kons. (mg/ml)	Partikkelstørrelse
Rotte PK (Studie C1)	02-001 02-003	ukjent	90:10, PEG400/EtOH adj. til pH 8,6-9,0	3	NA
Pre-Tox eskalerende dose (Studie E)	02-004	krystallinsk	80:10:10 PEG400/EtOH/0,1N NaOH	2,5 7,5 20	NA gjennomsnitt = 27,22 µm (95% <84,4 µm) Multi-modal distribusjon, 3 topper Totalt gjennomsnitt = 31,07µ m(95% <157,7 µm)
Pre-ECN Rotte Tox (Rotte TK) (Studie F)	02-005	ukjent	80:10:10 PEG400/EtOH/0,1N NaOH	3 15 40	NA Multi-modal distribusjon, 2 topper Totalt gjennomsnitt = 19,25µ m(95% <52,3µm) Multi-modal distribusjon, 2 topper Totalt gjennomsnitt = 21,78µm (95% <57,5µm)

Kvantifisering av forbindelse IVc ved LC/MS/MS i plasma (anvendt i undersøkelser C, C1 and D). Aliquoter av plasmaprøver fra rotte-, hund-, ape- og sjimpanse-undersøkelser ble produsert for analyse ved utfelling av plasmaproteiner med to volumer av acetonitril inneholdende den indre standard, forbindelse IVa. De resulterende supernatanter ble separert fra de utfelte proteiner ved sentrifugering i 10 minutter og overført til autosamplers glass. Prøver ble enten fremstilt manuelt eller ved anvendelse av Tomtec automatisert væske-håndterer. HPLC-systemet besto av to Shimadzu LC10AD pumper (Columbia, MD), en Shimadzu SIL-HTC autosampler Columbia, MD) og et Hewlett Packard Series 1100 kolonne-kammer (Palo Alto, CA). Kolonnen var YMC Pro C18 (2,0 x 50 mm, 3 µm partikler, Waters Co., Milford, MA), holdt ved 60°C og en strømningshastighet på 0,3 ml/min. Den mobile fasen besto av 10 mM ammoniumformiat og 0,1% maursyre i vann (A) og 100% 10 mM ammonium-formiat og 0,1% maursyre i metanol (B). Den innledende mobile fase-sammensetning var 95% A. Etter prøveinjeksjon ble den mobile fasen endret til 15% A/85% B over 2 minutter og holdt ved den sammensetning i ytterligere 1 minutt. Den mobile fasen ble deretter returnert til innledende betingelser og kolonnen reekvilibrert i 1 minutt. Total analyse-tid var 4 minutter.

HPLC ble tilpasset Micromass Quattro LC. Ultra høyrenhet nitrogen ble anvendt som forstøvende og desolvaterende gass med strømningshastigheter på 100 L/time for forstøvning og 1100 L/time for desolvatering. Desolvateringstemperatur var 300°C og kildetemperatur var 150°C. Data-oppsamling anvendte selektert reaksjons- overvåkning (SRM). Ioner som representerer (M+H)⁺ arter for IVc og den indre standard ble selektert i MS1 og kollisjons-dissosiert med argon ved et trykk på 2×10^{-3} Torr for å danne spesifikke produkt-ioner som deretter ble overvåket ved MS2. Omdannelser, spenninger og retensjonstider er oppsummert i Tabell 9.

Tabell 9: Parametere for MS/MS analyse av IVc og IVa (IS)

	IVc	IVa
SRM omdannelse	m/z 474 >256	m/z 423 > 205
Konusspenning (V)	22	30
Kollisjonsenergi (V)	22	30
Retensjonstid (minutter)	2,5	2,4

10

Plasma standardkurve var i området fra 4 til 8000 ng/ml, hjernekurve fra 1-1000 ng/ml. Kurvene ble tilpasset kvadratisk regresjon vektet ved resiprok konsentrasjon (1/x). Standarder ble analysert in duplo. Kvalitetskontroll- (QC) prøver, fremstilt i blankt plasma, ved tre konsentrasjoner innen området av kalibreringskurvem ble også analysert in triplo med hvert plasma analytiske sett. For denne forbindelsen var de antatte konsentrasjoner av 90% av plasmaet QC innen 20% av nominell konsentrasjon, hvilket indikerer akseptabel forsøksytelse.

Kvantifisering av tre prodrug-forbindelser og deres parentale forbindelser ved LC/MS/MS i biologiske matrikser

20 Dette LC/MS/MS-forsøk ble utviklet for å undersøke tre prodrug-forbindelser og deres respektive parentale molekyler i biologiske matrikser. De tre prodrug-forbindelser var: Forbindelser **Ia**, **Ic** og **Ib** og deres andre respektive salter eller fri syrer. Merk at dette forsøket blir anvendt for den frie syren og saltformer av de tre prodrug som molekyllær-ion detektert uavhengig av salt-motion. Deres respektive parentale forbindelser var: **IVa**, **IVc** og **IVb**.

25

HPLC-systemet besto av Shimadzu LC10ADvp pumper (Columbia, MD) og HTC PAL autosampler (Leap Technologies, Cary, NC) bundet til en Synergi Hydro-RP analytisk kolonne (2,0 x 50 mm, Phenomenex, Torrance, CA). Mobil fase A besto av 0,1% maursyre i vann; mobil fase B var 0,1% maursyre i acetonitril. LC strømningshastighet var 0,4 ml/min i massespektrometeret. Den innledende mobile fase-sammensetning var 10% B med økning til 75% B over 1,75 min, holdt ved den sammensetning i 0,25 min, med økning til 100% B over 0,1 min, holdt i 0,6 min, returnert til innledende betingelser over neste 0,1 minutt og deretter reekvilibrert. Total analysetid var 4 min. Retensjonstider for alle analytter var mellom 1,5 og 2,6 min.

HPLC-systemet ble tilpasset Sciex API3000 trippel kvadrupolt massespektrometer (Toronto, Canada) utstyrt med Turboionspray kilde satt til 450°C og ionspray-spenning satt til 4,5 kV. UHP nitrogen ble anvendt som forstøver- og hjelpe-gass med trykk på henholdsvis 5,6 kg/cm² og 7L/min. Analysen ble utført i positiv ione-modus. Omdannelsene overvåket for alle forbindelser og deres kollisjons-energien (CE) var: m/z 533,41 > 435,24 for **Ia** (CE=19); m/z 584,46 > 486,29 for **Ic** (CE=23); m/z 558,31 > 432,13 for **Ib** (CE=19); 423,39 > 204,96 for **Iva** (CE=31); 474,36 > 255,97 for **Ivc** (CE=29); 448,35 > 105,20 for **Ivb** (CE=35).

For å tilpasse en rekke biologiske prøvematrikser, ble acetonitril-utfelling anvendt for prøve-preparering. Testprøver og standarder ble overført til en 96-brønn plate ved anvendelse av Packard Multiprobe II (Packard Instruments, Downers Grove, IL). 200 µL av acetonitril inneholdende den indre standard (BMS-647257, 500 nM) ble satt til 100 µL aliquoter av både testprøver og standarder i 96-brønn platen ved anvendelse av Tomtec Quadra 96. Platen ble deretter virvlet i omtrent 3 minutter og sentrifugert ved 3000 rpm i 15 minutter. Ved anvendelse av Tomtec Quadra 96, ble 150 µL supernatant overført fra platen til en ren 96 dyp brønnplate. 150 µL av 0,2% maursyre i vann ble deretter satt til hver brønn ved anvendelse av Tomtec Quadra 96 og platen ble virvlet før analyse.

Standard kurver ved åtte konsentrasjoner fra 5 nM til 10 µM ble fremstilt fra lagerløsninger i acetonitril og serielt fortynnet i matriks for både prodrug og parentale forbindelser. Standardkurver ble overført i duplikate 100 µL aliquoter til en 96-brønn

plate inneholdende testprøver, ekstrahert med testprøver som beskrevet ovenfor og injisert i begynnelsen, midten og enden av den analytiske sekvens. Standardkurver ble tilpasset en lineær regresjon vektet $1/x^2$. Data og kromatografiske topper ble prosessert og konsentrasjoner av standarder og ukjente ble kvantifisert ved

5 anvendelse av PEBiosystems Analyst™ 1.1.

In vivo metoder

Betingelser for Studie C1, E og F (Rotte PK, MAP og TK undersøkelser)

For IV og PO farmakokinetiske undersøkelser av forbindelse IVc i rotter, ble forbindelse IVc oppløst i PEG-400/etanol (90/10) som en løsning. Referanse til

10 Tabell 8.

Rotte. Sprague-Dawley hannrotter (300–350 g, Hilltop Lab Animals, Inc., Scottsdale, PA) med kanyler implantert i jugular-venen og/eller gallegangen ble anvendt. Rottene ble fastet natten over ved de PO farmakokinetiske undersøkelser. Blodprøver på 0,3 ml ble oppsamlet fra jugular-venen i EDTA-inneholdende mikrotainerør

15 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) og sentrifugert for å separere plasma.

I en IV-studie ble forbindelse IVc levert med 1 mg/kg som bolus over 0,5 min ($n = 3$). Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 2, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480 og 1440 min etter dosering.

PO Enkeldose studie C1

20 I PO studie C1 av forbindelse IVc, mottok rottene ($n = 3$) en oral dose på 5 mg/kg av forbindelse IVc. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480 og 1440 min etter dosering. De orale (PO) resultater fra undersøkelse C1 er i Tabell 4, høyre kolonne.

25

Oral (PO) dose-eskaleringsstudie E

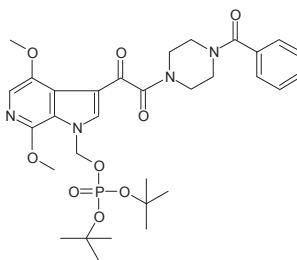
I den orale doseeskalerings-studie E av forbindelse IVc, mottok grupper av rotter (n = 2 pr. gruppe) orale doser på 25, 75 og 200 mg/kg. Ved 25 mg/kg var doseringsløsningen i løsning; ved de høyere doser var doseringsløsningene suspensjoner. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480 og 1440 min etter dosering. Hjerneprøver ble oppsamlet ved 1440 min for å bedømme hjernepenetrering. Hjerneprøver ble trykket tørre og våt-vekter ble registrert. De orale (PO) resultater fra undersøkelse E er i Tabell 46.

2-uker oral dose rotte toksikologi studie F

I den 2-ukers orale rotte-studie F (n=seks/kjønn/gruppe) ble Forbindelse IVc administrert i daglige doser på 15, 75 eller 200 mg/kg. Toksikokinetiske evalueringer på dager 1 og 14 viste at systemisk eksponering ($AUC_{0-24 \text{ timer}}$) av forbindelse IVc var generelt doserelatert men var ikke dose-proporsjonal (se Tabell 5), med intet bevis på autoinduksjon eller akkumulering. På dag 14 var $AUC_{0-24 \text{ timer}}$ verdier litt høyere hos hunner ($\leq 644 \mu\text{g} \cdot \text{timer/ml}$) sammenlignet med hanner ($\leq 526,88 \mu\text{g} \cdot \text{timer/ml}$) ved doser $\leq 200 \text{ mg/kg/dag}$. De orale (PO) resultater fra undersøkelse F er i Tabell 5.

Map studie G: PO and IV doseringsundersøkelse av diester IIa i rotter

Struktur av forbindelse IIa



20

Metoden for den orale doseringsdel av MAP studie A1 ble fulgt, bortsett fra at diester IIa ble anvendt istedenfor forbindelse IVa. Analyse av forbindelse IVa viste at dosering av diesteren IIa ved oral rute produserte vesentlig IVa. Dataene er angitt i Tabell 10 nedenfor:

25

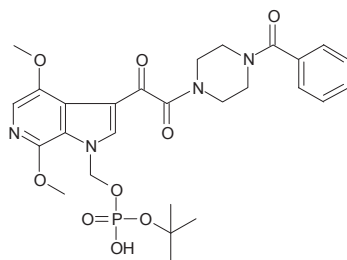
Tabell 10 for MAP studie G

	Data målt for IVa etter PO-dosering av diester IIa (di-tert-butylester prodrug av IVa)
Dose og rute: PO 5 mg/kg	
Cmaks p.o. (nM)	1123 ± 270 (IVa kons.)
Tmaks p.o. (timer)	2,7 ± 1,2 (IVa)
F (%)	33 (IVa)
AUC p.o. (µM*timer)	4,0 ± 1,0 (IVa)
Cp @ 24 timer p.o. (nM)	Ikke detektert
T1/2 p.o. (timer)	1,3 ± 0,26 (IVa)

MAP-studie H: PO and IV doseringsundersøkelse av monoester II'a i rotter

Struktur av forbindelse II'a

5



Metoden for den orale doseringsdel av MAP studie A1 ble fulgt, bortsett fra at monoester II'a ble anvendt istedenfor forbindelse IVa. Analyse for forbindelse IVa viste at dosering av monoester II'a ved oral rute produserte vesentlig IVa. Dataene er beskrevet i tabellen nedenfor:

10

Tabell 11 for MAP studie H

	Data målt for IVa etter PO-dosering av monester II'a (mono-tert-butylester prodrug av IVa)
Dose og rute: PO 5 mg/kg	
Cmaks p.o. (nM)	1586 ± 615 (IVa kons.)
Tmaks p.o. (timer)	2,0 ± 1,7 (IVa)
F (%)	44 (av IVa)
AUC p.o. (µM*timer)	5,9 ± 2,2 (IVa)
Cp @ 24 timer p.o. (nM)	3,61 (n=2/3)
T1/2 p.o. (timer)	2,8 ± 1,6 (IVa)

15

Et betydelig antall av undersøkelser ble utført for å demonstrere og karakterisere den overraskende nytte av prodrug I. Doseeskaleringsforsøk som sammenligner eksponering av parentale molekyler etter dosering av prodrug og parentalt ble utført i rotter og hunder for prodrug I av parentale molekyler IVa, IVb og IVc. Effekten av mat og dose på eksponering av IVa etter dosering av prodrug Iab eller parental IVa ble sammenlignet i hunder. Prodrug-forbindelsen viste overraskende evne til å forbedre eksponering og unngå effekter av mat sammenlignet med den parentale. Lavdose fulle farmakokinetisk undersøkelser (oral og IV dosering) ble utført i rotter, hunder og aper for prodrug Iab, Ibb og Icb for å vise omdannelse til henholdsvis parentale forbindelser IVa, IVb, og IVc. Orale doseringsundersøkelser i rotter ble utført for prodrug Ie (fri syre) og for parental forbindelse IVf for å demonstrere omdannelse og systemisk eksponering av henholdsvis parentale IVe og IVf. Data er vist ovenfor eller nedenfor i denne søknaden.

15 *Ytterligere profilering av seksjon 1*

Ytterligere undersøkelser med Iab:

Iac er den frie syre fosfat-prodrug av N-hydroksymetyl-addukt av IVa og blir hydrolysert ved alkalisk fosfatase (ALP) for å danne IVa. Iab, et mono-lysinsalt av Iac, ble anvendt for alle de følgende undersøkelser.

20 IV og PO farmakokinetiske undersøkelser av Iab ble utført i rotter, hunder og aper. I alle tilfeller ble blodprøver oppsamlet i nærvær av EDTA. Tilstedeværelse av EDTA, en kjent ALP-inhibitor, minimaliserte betydelig *ex vivo* omdannelse av Iab under prøve-prosessering. IVa ble raskt dannet etter IV-administrering av Iab. Gode orale biotilgjengeligheter (62-94%) av IVa ble observert etter administrering av Iab i 25 rotter, hunder og aper med meget liten eller ingen Iab til stede i plasma. Siden det er høye nivåer av ALP-ekspresjon i tarmen, er det sannsynlig at etter oral administrering av Iab, blir Iab hydrolysert av ALP til stede ved "brush border" membraner av tarmlumen for å danne IVa, som raskt blir absorbert på grunn av dens høye permeabilitet.

30 *In vitro* inkuberingsundersøkelser ble utført for en kvalitativ bedømmelse av ALP-avhengig hydrolyse av Iab i forskjellig vev. Iab ble hydrolysert i nærvær av

serum og hepatocytter fra rotte, hund, ape og menneske, så vel som human placenta-ALP. I de tilfellene hvor Iab og IVa ble målt, var omdannelsen av Iab til IVa nær støkiometrisk. På grunn av hydrolyse i serum, kunne proteinbinding av Iab ikke bestemmes. Basert på *in vitro* data er det antatt at Iab vil bli hydrolysert av human
5 ALP og at IVa vil bli dannet etter oral administrering av Iab til mennesker.

Den krystallinske oppløselighet av Iab ved romtemperatur øker fra 0,22 mg/ml ved pH 1,4 til >12 mg/ml ved pH 5,4 og pH 8,9; vandige løsninger inneholdende >100 mg/ml blir fremstilt for *in vivo* toksikologiske undersøkelser. Som sammenligning ble den vandige oppløselighet av stamforbindelsen, IVa, ved
10 romtemperatur som krystallinsk materiale, funnet å være 0,04 - 0,9 mg/ml (pH-område 1,5 - 10). Iab oppviser akseptable løsnings- og faststoff-stabiliteter.

Den høyere vandige oppløselighet av Iab tilveiebringer en metode for å overvinne den oppløsningsgrad-begrensede absorpsjon av IVa under visse doser og øker derved eksponering for IVa ved orale dose-eskalerings- og toksikokinetiske
15 undersøkelser. Iab, når dosert oralt med ~200 mg/kg av IVa ekvivalent, ga 2-ganger høyere AUC av IVa i rotter og hunder, uten betydelig plasma-eksponering for prodrug-forbindelsen, sammenlignet med AUC fra historiske IVa suspensjonsundersøkelser med lignende dose. Videre var AUC- og Cmaks-verdier av IVa i fastede hunder som mottar Iab tørr-fylte kapsler (200 mg/hund av IVa ekvivalent)
20 henholdsvis 38 og 58 ganger de oppnådd i fastede hunder gitt IVa klinisk kapselformulering og henholdsvis 4 og 6 ganger de oppnådd i matede hunder gitt IVa klinisk kapselformulering.

Ingen betydelige forskjeller i AUC og Cmaks av IVa ble observert mellom fastede og matede hunder som mottar Iab, mens en 9-ganger forbedring ble observert
25 for matede hunder sammenlignet med fastede hunder som mottar IVa. Disse data indikerer at effektive blodnivåer av IVa kan oppnås hos HIV-infiserte pasienter uten krav til et høyfett måltid. Den spraytørkede form av IVa ga opphav til lignende eksponeringsnivåer av IVa som de observert fra Iab i hunder.

Enkel-dose toksikokinetisk tolerabilitetsstudie i CD-rotter

En 1-dag oral toksikokinetisk studie i rotter ble utført ved anvendelse av prodrug Iab (monolysinsalt). Iab ble administrert i doser på 16, 72 og 267 mg/kg (fri syre) ved oral mating til tre hannrotter/gruppe ved anvendelse av vann som konstituent (løsningsformulering). Dosene av prodrug fri syre svarer til IVa (parental) molekvivalente doser på henholdsvis 13, 57 og 211 mg/kg. Sluttpunkt evaluert var plasma-toksikokinetikk av Iab og IVa i de individuelle rotter.

Gjennomsnittlige toksikokinetiske verdier er gitt i Tabell 12.

Tabell 12: Gjennomsnittlige toksikokinetiske verdier for Iab and IVa i hannrotter gitt ≤ 267 mg/kg av Iab som en enkel oral dose

	Doser (mg/kg)					
	16		72		267	
Iab						
IVa	13		57		211	
molar ekv.						
	Iab	IVa	Iab	IVa	Iab	IVa
Cmaks (μM)	0,068	26	0,095	104	0,11	214
C _{24 timer} (μM)	<LLQ ¹	0,090	<LLQ	0,027	<LLQ	1,9
AUC ($\mu\text{M}\cdot\text{timer}$)	0,020 ²	67 ³	0,049 ²	261 ³	0,057 ²	1161 ³
T1/2 (timer)	0,64	3,2	0,37	2,3	0,045	3,4

10 Verdier representerer gjennomsnitt fra 1-3 rotter/gruppe for Iab-data og 3 rotter/gruppe for IVa-data.

¹ Under nedre grense for kvantifisering.

² AUC fra null til tid for siste kvantifiserbare prøve

³ AUC fra null til ∞

Gjennomsnittlig maksimum plasmakonsentrasjon (Cmaks) for både Iab (prodrug) og IVa (parental) ble oppnådd innen 1,1 time etter dosering. Plasmaområdet under plasmakonsentrasjon-tid-kurven (AUC) for prodrug var $\leq 0,03\%$ til den for den parentale. (I rotter gitt ≤ 267 mg/kg av Iab, øket AUC for IVa proporsjonalt med Iab-dose og Cmaks øket på en mindre enn dose-proporsjonal måte mellom 72 og 267 mg/kg av Iab.

En sammenligning av IVa AUC oppnådd i rotter gitt enten IVa (2) eller Iab, er vist i Figur 6.

Oppløselighet i prekliniske formuleringer er et spørsmål. AUC av IVa er ekvivalent for både parental forbindelse og prodrug ved lavere doser (f.eks. ≤ 50 mg/kg) fordi begge ble formulert som løsninger (PEG-400 for parental og vann for prodrug) men ved en høy dose (f.eks. 200 mg/kg) ble den nøytrale parentale forbindelse formulert som en suspensjon mens prodrug-saltet ble formulert som en vandig løsning.

En 2-ukers rotte toksisitetsstudie ved anvendelse av doser på 5, 50 eller 500 mg/kg BID for å støtte IND er pågående (3). I live fasen av undersøkelsen er fullført og det var ingen bemerkelsesverdige i live observasjoner.

Enkel-dose toksikokinetisk og tolerabilitetsstudie i hunder

En multi-fase studie ble utført for å bedømme tolerabiliteten til prodrug-forbindelsen Iab (monolysinsalt) i doser på 24, 90 eller 240 mg/kg (fri syre, molekvivalent til henholdsvis 19, 71 eller 190 mg/kg av parental IVa) og toksikokinetikk av Iab og IVa (4). Iab ble administrert til to hunnhunder/gruppe én gang daglig enten som en vandig løsning (24 eller 90 mg/kg) eller tørr-fylte kapsler (24, 90 [én gang og to ganger daglig] eller 240 mg/kg). Slutt punktet var: kliniske tegn, kroppsvekt, matkonsum og plasma toksikokinetikk av Iab og IVa. I alle tilfeller ble en 1-ukes utvaskingsperiode anvendt mellom doser for alle faser av undersøkelsen.

Plasma toksikokinetiske verdier fra den innledende fase av undersøkelsen er vist i Tabell 13.

Tabell 13: Toksikokinetiske verdier for IVa i hunnhunder gitt ≤ 90 mg/kg av Iab som en enkel oral dose

Formulering	Doser (mg/kg)					
	24		90		24	
	19		71		19	
Løsning	Løsning		Løsning		Tørr-fylt kapsel	
	Hund #1201	Hund #1202	Hund #3201	Hund #3202	Hund #4201	Hund #4202
Cmaks (μM)	72,3	66,5	124	125	79,7	85,6
C _{24 timer} (μM)	0,61	0,33	3,2	2,2	1,4	0,87
AUC _{0-∞} ($\mu\text{M} \cdot \text{timer}$)	465	330	844	838	486	514
T1/2 (timer)	3,2	3,1	4,4	3,9	4,2	3,4

Iab ble ikke detektert i plasmaprøvene. Gjennomsnittlig maksimum plasmakonsentrasjon (Cmaks) av IVa ble oppnådd mellom 1-2 timer etter dosering.

- 5 Når Iab ble gitt som en løsning, øket både Cmaks og AUC på mindre enn dose-proporsjonal måte mellom 24 og 90 mg/kg. Brekning ble observert ca. 30 minutter etter dosering hos begge hunder gitt 90 mg/kg. Cmaks og AUC for IVa var ekvivalente etter Iab administrering med 24 mg/kg ved anvendelse av enten tørr-fylte kapsler eller en vandig løsning.

- 10 Annet enn brekning var det ingen kliniske tegn observert og det var ingen effekter på kroppsvekt og matkonsum.

- 15 For å bestemme hvorvidt brekning kunne elimineres/reduceres ved administrering av Iab som tørr-fylte kapsler, ble neste fase av undersøkelsen utført ved anvendelse av doser på 90 eller 240 mg/kg og 90 mg/kg gitt to ganger 4 timer fra hverandre (BID). De toksikokinetiske verdier er vist i Tabell 14.

Tabell 14: Toksikokinetiske verdier for IVa hos hunnhunder gitt ≤ 240 mg/kg av Iab som en enkel oral dose eller to ganger daglig dosering (BID)

Ibb	Doser (mg/kg)					
	90		240		180 (90 BID)	
	71		190		142 (71 BID)	
Formulering	Løsning		Løsning		Tørr-fylt kapsel	
	Hund #1201	Hund #1202	Hund #2201	Hund #2202	Hund #3201	Hund #3202
Cmaks (μM)	214	152	172	189	311	248
C _{24 timer} (μM)	4,6	0,89	2,8	6,6	34	50
AUC _{0-∞} ($\mu\text{M} \cdot \text{timer}$)	1740	960	1186	1584	3305 ¹	2485
T1/2 (timer)	3,6	2,9	3,7	4,5	6,1	13

¹ AUC fra null til 24 timer

Det var ingen forskjell i Cmaks eller AUC mellom hunder gitt 90 eller 240 mg/kg av Iab administrert ved tørr-fylte kapsler. Brekning ble observert hos Hunder #1201, #2201 og #2202 ca. 1 time etter dosering. Oppkastet ble oppsamlet og
undersøkt for Iab-innhold for å bedømme mengden av den totale dose som ble tapt;
prosentdelen av beregnet total dose tapt var <1% for #1201, $\approx 90\%$ for #2201, $\approx 9\%$
for #2202. Selv om estimatene av “dose tapt” ikke syntes å være kvantitativt i
overensstemmelse med plasma AUC data, indikerer det at testprøven kan finnes i
oppkast kort tid etter dosering. Iab ble detektert i plasma til hundene, 0,005-0,049
 μM 1 time etter dosering og 0,005-0,006 μM 2 timer etter dosering; idet prodrug
ikke var detekterbart på senere tidspunkter.

En sammenligning av IVa AUC oppnådd i hunder gitt enten IVa (5, 6) eller Iab, er vist i Figur 7.

Konstituenten og formuleringer

Oppsummering av formuleringer anvendt for nøkkel PK og sikkerhets-undersøkelser

Alle *in vivo* PK-undersøkelser i rotter, hunder og aper ble utført ved anvendelse av vandige løsninger for PO- og IV-dosering. Toksikologi og

eksponerings-undersøkelser i hunder ble utført med vandige løsninger med doser på 24 og 90 mg/kg og medikament i kapselformuleringer med doser på 24, 90 og 240 mg/kg av Iab, mono-lysinsalt.

I rotte oral dose eskaleringsstudien, ble Iab dosert som vandige løsninger i konsentrasjoner på 4,5, 20,0 og 73,5 mg/ml (mono-lysinsaltform av prodrug). En betydelig forbedring i AUC og Cmaks av IVa, parental, etter oral dosering av Iab, prodrug, ble observert sammenlignet med de historiske data for IVa oral dosering.

Medikament i kapselformuleringer av Iab med doser på 20 mg/kg av IVa ekvivalent ble anvendt for mat-effekt-undersøkelser i hunder. Prodrug-forbindelsen ble sammenlignet med den kliniske kapselformulering av stamforbindelsen, IVa, ved 20 mg/kg. Når IVa klinisk kapsel ble dosert, ble 9-ganger økning i eksponering sett hos hunder matet et høy-fett måltid sammenlignet med fastede hunder. Ved dosering av prodrug Iab, var eksponering av IVa betydelig høyere og som forventet, var eksponeringen ikke betydelig forskjellig mellom fastede og matede hunder.

15 *Metabolisme og farmakokinetikk oppsummering*

Oppsummering av funn og tolkning

Iab er fosfat-prodrug av N-hydroksymetyl-addukt av IVa og blir hydrolysert ved alkalisk fosfatase (ALP) for å danne IVa. Etter administrering av Iab til dyr, ble derfor plasmaprøver fremstilt fra blod oppsamlet i nærvær av EDTA, en kjent ALP-inhibitor. Omdannelse av Iab til IVa var minimal (< 2%) i rotte-, ape- og humant blod inneholdende EDTA og omtrent 6% i hundeblood inneholdende EDTA. Ingen betydelig *ex vivo* omdannelse av Iab er forventet under prøvelagring (-20°C) og analyse av Iab.

Hydrolyse av Iab ble studert i dyr og menneske *in vitro* systemer. Siden multiple ALP-isoformer er bredt fordelt i forskjellige vev, ble kvantitative *in vitro* til *in vivo* korrelasjoner ikke forsøkt (Fishman *et al.*, 1968; Komoda *et al.*, 1981; Moss, 1983; Yora og Sakagishi, 1986; Sumikawa *et al.*, 1990). Derfor ble undersøkelsene begrenset til en kvalitativ bedømmelse av ALP-avhengig hydrolyse i forskjellig vev. Iab ble hydrolysert i nærvær av serum og hepatocytter fra rotte, hund, ape og menneske, så vel som i human placenta ALP. I tilfeller hvor Iab og IVa ble målt, var

omdannelsen av Iab til IVa nær støkiometrisk. På grunn av hydrolyse i serum kunne proteinbinding av Iab ikke bestemmes.

Ingen eller meget lave nivåer av Iab ble detektert i rotte-, hund- og ape-plasma etter oral administrering av Iab. IVa ble raskt dannet etter IV-administrering av Iab til
5 rotter, hunder og aper. IV AUC omdannelsesforhold var 1,5 i rotter, 0,80 i hunder og 0,70 i aper, hvilket indikerte god omdannelse fra Iab til IVa.

Gode orale biotilgjengeligheter (62-94%) av IVa ble observert etter administrering av Iab til rotter, hunder og aper. Mer betydningsfullt, minket høyere vandig oppløselighet av Iab den oppløsningsgrad-begrensede absorpsjon av IVa under
10 visse doser og øket derved eksponering av IVa ved orale doseeskalerings- og toksikokinetiske undersøkelser (Tabeller 12-14 og Fig. 6-7). AUC-nivåer av IVa for fastede hunder som mottok Iab-kapsler var ca. 40 ganger nivåene til fastede hunder gitt IVa i klinisk form kapsler. Selv om en 40-ganger forskjell sannsynligvis er en overprediksjon av den kliniske situasjon, basert på utviklings-erfaring med IVa,
15 demonstrerte Iab klart potensiale for å forbedre den oppløsningsgrad-begrensede absorpsjon sett med parental IVa.

For å undersøke effekten av mat på oral absorpsjon av IVa i hunder, ble Iab og IVa administrert i kapsler under fastende og matede betingelser. Ingen betydelige forskjeller i AUC og Cmaks ble observert med Iab, mens en 9-ganger forbedring ble
20 observert med IVa etter mating. Disse data indikerer potensielle kliniske fordeler for HIV-infiserte pasienter, for hvilke effektive blodnivåer av IVa kan oppnås uten krav til et høyfett måltid.

Metoder

Undersøkelsene beskrevet i denne rapport anvendte mono-lysinsalt av Iab,
25 hvis ikke angitt på annen måte.

Kvantifisering av Iab og IVa ved LC/MS/MS

En LC/MS/MS-metode ble utviklet for analyse av Iab og IVa i plasmaprøver fra farmakokinetiske undersøkelser i dyr så vel som i acetonitrilsupernatant fra *in*

vitro inkuberingsundersøkelser. For analyse i plasma ble et Packard Multiprobe instrument anvendt for overføring av 50 µL av hver standard, QC og plasmaprøve til en ren 96-brønn plate for protein-utfellingsekstraksjon. Etter tilsetning av 200 µL av acetonitril inneholdende den indre standard IVc, ble prøvene ble virvlet blandet og
5 den resulterende supernatant ble separert fra de utfelte proteiner ved sentrifugering i 10 min. For analyse i supernatanten dannet fra *in vitro* undersøkelsene, ble et likt volum av supernatanten og acetonitril inneholdende den indre standard blandet. En aliquot av supernatanten ovenfor ble overført ved anvendelse av en Tomtec automatisert væske-håndterer til en andre ren 96-brønn plate. Et likt volum av vann
10 ble tilsatt og platen ble lukket og virvleblandet.

HPLC-systemet besto av Shimadzu LC10ADvp pumper (Columbia, MD) og en HTC PAL autosampler (Leap Technologies, Cary, NC) bundet til en Phenomenex Synergi Fusion-RP analytisk kolonne (2,0 x 50 mm, 5 µ; Torrance, CA). Mobil fase A besto av 5 mM ammonium-formiat i vann; mobil fase B var 100% acetonitril. LC
15 strømningshastighet var 0,38 ml/min. Den innledende mobile fase-sammensetning var 3% B, øket til 60% B over 1,75 min og holdt i 0,25 min, øket til 100% B over 0,1 min og holdt i 0,8 min, returnert til de innledende betingelser over neste 0,1 min og re-ekvilibrert. Total analysetid var 4,0 min. Retensjonstiden for Iab, IVa og IVc var henholdsvis 1,50, 1,67 og 1,73 min.

20 HPLC-systemet ble tilpasset et Sciex API4000 trippel kvadrupol massespektrometer (Toronto, Canada) utstyrt med Turboionspray kilde satt til 550°C og ionspray-spenning satt til 4,5 kV. UHP nitrogen ble anvendt som forstøver- og hjelpe-gass med trykk på henholdsvis 5,6 kg/cm² og 7 L/min. Kollisjonsenergier for Iab, IVa og IVc var henholdsvis 21, 29 og 31 volt. Data-oppsamling anvendte
25 selektert reaksjonsovervåkning (SRM). Ioner som representerer positiv ionemodus (M+H)⁺ arter for Iab, IVa og den indre standard ble selektert i MS1 og kollisjonsdissosiert med nitrogen og optimaliserte kollisjonsenergier for å danne spesifikke produksjoner deretter overvåket ved MS2. SRM-omdannelser for Iab, IVa og IVc var henholdsvis *m/z* 533→435, 423→205 og 474→256.

30 Standard kurver i området fra 5 nM til 10 µM ble produsert fra lagerløsninger og serielt fortynnet i matriks for både Iab og IVa. Standardkurver ble aliquotert in

duplo, ekstrahert med prøvene og injisert i begynnelsen, midten og enden av den analytiske sekvens. Standardkurver ble tilpasset lineær regresjon vektet ved resiprok konsentrasjon $1/x^2$. Data og kromatografiske topper ble prosessert og konsentrasjoner av standarder og ukjente ble kvantifisert ved anvendelse av

5 PEBiosystems Analyst™ 1.1.

In vitro metoder

(1) *Stabilitet av Iab i EDTA Blod, Serum and Tris-HCl-buffer*

Stabiliteten til Iab ble studert i friskt blod og serum fra rotte, hund, ape og menneske ($n = 2$). Blodet ble oppsamlet i vacutainere inneholdende K_2EDTA

10 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Serum ble oppsamlet i vacutainere inneholdende intet antikoagulant. Iab ble inkubert med en startkonsentrasjon på omtrent $10 \mu M$ i 60-90 min ved $37^\circ C$. Serielle prøver ble tatt på forhåndsbestemte tider. Aliquoter av blodprøver ($200 \mu L$) ble først blandet med $100 \mu L$ vann fulgt av $400 \mu L$ acetonitril. Serumsprøvene ($50 \mu L$) ble tilsatt til mikrotainere inneholdende

15 K_2EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) fulgt av tilsetning av $100 \mu L$ acetonitril. Supernatanten ble analysert for både Iab og IVa ved LC/MS/MS.

Stabiliteten til Iab ble også evaluert, som beskrevet ovenfor, i Tris-HCl-buffer ($0,1 M$, pH 7,5).

20 (2) *Hydrolyse av Iab i nærvær av human placenta-ALP*

Faststoff human placenta-ALP ble oppnådd fra Sigma (P-3895, St. Louis, MO). En løsning av 1000 enheter/L ble fremstilt i Tris-HCl-buffer ($0,1 M$, pH 7,5). Løsninger av 100 og 10 enheter/L ble oppnådd ved seriefortynning. Iab ble inkubert i 10, 100 og 1000 enheter/L løsninger ($n = 2$) ved $37^\circ C$ i 2 timer. Utgangs-

25 konsentrasjon av Iab i inkuberingen var $10 \mu M$. Aliquoter av $100 \mu L$ prøver ble tatt på forhåndsbestemte tider og tilsatt til K_2EDTA mikrotainere fulgt av tilsetning av $200 \mu L$ acetonitril. Supernatanten ble analysert for både Iab og IVa ved LC/MS/MS.

In vivo undersøkelser

Alle blodprøver (0,3 ml) ble oppsamlet i mikrotainere inneholdende K₂EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) og plassert på knust is. Etter sentrifugering ble plasma separert og lagret ved -20°C inntil analyse. Mono-lysinsaltet av Iab (Form 3, parti 1) ble anvendt for de farmakokinetiske undersøkelser. Doseringsløsninger av Iab ble fremstilt i enten sterilt vann (for IV-administrering i hunder og aper) eller destillert vann (for all annen doseadministrering).

(1) In vivo undersøkelser i rotte

Sprague-Dawley hannrotter (300–350 g, Hilltop Lab Animals, Inc., Scottsdale, PA) med kanyler implantert i jugular-venen ble anvendt. Rottene ble fastet natten over ved de PO farmakokinetiske undersøkelser. Blodprøver ble oppsamlet fra jugular-venen.

Ved IV-studien ble Iab levert med 1,4 mg/kg (fri syre eller 1,1 mg/kg av IVa ekvivalent) som bolus over 0,5 min (n = 3). Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 1,4 mg/ml og doseringsvolumet var 1 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 2, 10, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

Ved PO-studien ble Iab administrert med 7,9 mg/kg (fri syre eller 6,3 mg/kg av IVa ekvivalent) ved oral mating (n = 3). Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 4,0 mg/ml og doseringsvolumet var 2 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

(2) In vivo undersøkelser i hund

IV- og PO-undersøkelser av Iab ble utført i en kryssundersøkelse i tre beagle hannhunder (11 ± 1,1 kg, Marshall Farms USA Inc., North Rose, NY). Det var en to-ukers utvaskingsperiode mellom IV- og PO-undersøkelsene.

Ved IV-studien ble Iab infusert via kefal-venen med 1,2 mg/kg (fri syre eller 0,95 mg/kg av IVa ekvivalent) over 5 min med en konstant hastighet på 0,1 ml/kg/min. Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 2,4 mg/ml og

doseringsvolumet var 0,5 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet fra femoral-arterien før dosering og 5, 10, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

Ved PO-studien ble hundene fastet natten over før dosering. Iab ble administrert ved oral mating med 6,6 mg/kg (fri syre eller 5,2 mg/kg av IVa ekvivalent). Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 13,2 mg/ml og doseringsvolumet var 0,5 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

For å studere effekten av mat på oral absorpsjon av IVa etter administrering av Iab og IVa, ble disse to forbindelser administrert i kapsler som fast stoff til en gruppe på tre hunder i en kryss-undersøkelse av fasting natten over og matede tilstander. Det var en én-ukes utvaskingsperiode mellom hver studie. Iab ble administrert med 200 mg pr. hund (ca 20 mg/kg) av IVa ekvivalent; IVa ble administrert i en klinisk kapsel-formulering med 200 mg pr. hund (ca 20 mg/kg). I undersøkelsene hvor hundene ble matet, ble det følgende måltid produsert: 2 skiver bacon, 2 egg, 2 skiver toast med smør og syltetøy, 113 g.kroketter ("hash browns") og 237 ml helmelk. Etter homogenisering ved anvendelse av en laboratorieblender, ble måltidet delt opp i fem like porsjoner og holdt frosset. Før undersøkelsen ble måltidene tint og hver hund ble matet én porsjon.

Ytterligere formuleringsundersøkelser av IVa ble utført i fastede hunder (n = 2 pr. dosegruppe). Hundene ble administrert enten den kliniske form eller spraytørket form av IVa i kapsler. Den kliniske kapselform av IVa ble administrert i en enkel dose på 20 mg/kg. Den spraytørkede form av IVa ble administrert med 20, 75 og 200 mg/kg.

(3) *In vivo undersøkelser i ape*

IV- og PO-undersøkelser av Iab ble utført i en kryssundersøkelse i tre cynomolgus hannaper ($11 \pm 1,2$ kg, Charles River Biomedical Research Foundation, Houston, TX). Det var en to-ukers utvaskingsperiode mellom IV- og PO-undersøkelsene.

Ved IV-studien ble Iab infusert via femoral-venen med 1,3 mg/kg (fri syre eller 1,1 mg/kg av IVa ekvivalent) over 5 min med en konstant hastighet på 0,1 ml/kg/min. Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 2,6 mg/ml og doseringsvolumet var 0,5 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet fra femoral-arterien før dosering og 5, 10, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

Ved PO-studien ble apene fastet natten over før dosering. Iab ble administrert ved oral mating av 7,1 mg/kg (fri syre eller 5,6 mg/kg av IVa ekvivalent). Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 14,2 mg/ml og doseringsvolumet var 0,5 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

(4) *Dataanalyse*

Alle resultater er uttrykt som gjennomsnitt $\pm$ SD, hvis ikke spesifisert på annen måte.

De farmakokinetiske parametre av Iab og IVa ble beregnet ved non-compartmental analyse ved anvendelse av KINETICA™ programvare (versjon 4.0.2, InnaPhase Co., Philadelphia, PA). Cmaks og Tmaks verdier ble registrert direkte fra eksperimentelle observasjoner. AUC0-n og AUCtot verdier ble beregnet ved anvendelse av blandede log-lineære trapezoide summasjoner. Den totale kroppsutskilling (Cl), gjennomsnittlig oppholdstid (MRT) og stasjonært volum av distribusjon (Vss) ble også beregnet etter intravenøs administrering. Den absolutte orale biotilgjengelighet (uttrykt som %) ble beregnet ved å beregne forholdet av dose-normaliserte AUC-verdier etter orale doser til disse etter intravenøse doser.

Hepatisk utskilling Cl_H ble beregnet fra den følgende ligning ved anvendelse av vel-rørt modell:

$$Cl_H \text{ (ml/min/kg)} = \frac{Qh \times Cl_{\text{int.in vivo}}}{Qh + Cl_{\text{int.in vivo}}}$$

hvor Qh er lever-blodstrøm på 55, 31, 44 og 21 ml/min/kg for henholdsvis rotte, hund, ape og menneske (Davis og Morris, 1993).

Hepatisk ekstraksjonsgrad (ER) ble beregnet som følger:

$$ER = Cl_H / Q_h$$

Student's t-test ble anvendt for statistisk analyse (Microsoft® Excel, Redmond, WA). Forskjeller ble betraktet statistisk signifikante ved nivået $P < 0,05$.

5 *In vitro undersøkelser*

Stabilitet av Iab i EDTA blod, serum og Tris-HCl-buffer

Som del av analytisk forsøksvalidering, ble stabiliteten til Iab studert i blod inneholdende EDTA, som er kjent å være en inhibitor for alkaliske fosfataser (Bowers, Jr. og McComb, 1966; Yora og Sakagishi, 1986). Etter inkubering ved 37°C i 60 min, var det 1,2% omdannelse fra den innledende konsentrasjon av Iab til IVa i rotteblod (Tabell 15) og mindre enn 1% omdannelse i ape- og humant blod (Tabeller 15 og 16). Det var omtrent 6% omdannelse i hundeblood og prosentdelene av omdannelse var lignende mellom to forskjellige hunder, så vel som i samme hund ved to forskjellige test-tilfeller (Tabeller 15 og 16). Under prøvelagringsbetingelsene på -20°C, er de ovenfor små prosentdelene av omdannelse observert ved 37°C ikke forventet å innføre noen som helst betydelig *ex vivo* omdannelse under analysen av Iab.

Iab var stabil i Tris-HCl-buffer ved 37°C under 60 min studieperioden (Tabell 17).

20

Tabell 15: *Stabilitet av Iab i friskt EDTA blod fra rotte, hund og ape*

Tid (min)	Rotteblod (n = 2)			Hund A blod (n = 2)			Apeblod (n = 2)		
	Iab (μM)	IVa Dannet (μM)	% IVa Dannet *	Iab (μM)	IVa Dannet (μM)	% IVa Dannet *	Iab (μM)	IVa Dannet (μM)	% IVa Dannet *
0	8,0	0,019	0,24	12	0,036	0,30	8,5	0,011	0,13
20	8,8	0,056	0,70	12	0,29	2,4	9,2	0,024	0,28
40	10	0,072	0,90	11	0,49	4,1	9,2	0,041	0,48
60	10	0,093	1,2	11	0,74	6,2	8,7	0,048	0,56

* Prosentdel dannet som start-konsentrasjon av Iab.

Tabell 16: *Stabilitet av Iab i friskt EDTA blod fra hund (repetisjon) og menneske*

Tid (min)	Hund A blod (n = 2)			Hund B blod (n = 2)			Humant blod (n = 2)		
	Iab (μM)	IVa Dannet (μM)	% IVa Dannet *	Iab (μM)	IVa Dannet (μM)	% IVa Dannet *	Iab (μM)	IVa Dannet (μM)	% IVa Dannet *
0	11	0,069	0,63	12	0,084	0,68	11	0,061	0,55
15	11	0,25	2,3	11	0,25	2,0	11	0,067	0,59
30	11	0,37	3,4	11	0,43	3,5	7,1	0,057	0,50
45	11	0,53	4,8	13	0,56	4,5	9,8	0,073	0,65
60	10	0,67	6,1	14	0,72	5,8	9,8	0,084	0,75

* Prosentdel dannet som startkonsentrasjon av Iab.

5

Tabell 17: *Stabilitet av Iab i Tris-HCl-buffer*

Tid (min)	Tris-HCl (n = 2)		
	Iab (μM)	IVa Dannet (μM)	% IVa Dannet *
0	10	0,011	0,11
20	10	0,008	0,081
40	7,6	0,008	0,076
60	10	0,009	0,088

* Prosentdel dannet som start-konsentrasjon av Iab.

For å undersøke hydrolyse av Iab i systemetisk sirkulasjon, ble Iab inkubert i friskt serum (rotte, hund, ape og menneske) ved 37°C i 90 min. Graden av hydrolyse var raskest i rotteserum, fulgt av hund-, ape- og humane sera (Tabell 18). Omdannelsen av Iab til IVa var nær støkiometrisk.

Serum inneholder lavere ALP-aktiviteter sammenlignet med vev (McComb *et al.*, 1979a). I tillegg inneholder serum også ALP-isoformer fra vevkilder så som ben, lever og tarm, som blir tilskrevet lekkasje gjennom blodkar (Moss, 1983). Derfor ble hydrolyse av Iab i serum sannsynligvis mediert av multiple isoformer av ALP.

15

Tabell 18: *Stabilitet av Iab i friskt serum fra rotte, hund, ape og menneske*

Tid (min)	Rotteserum (n = 2)		Hundeserum (n = 2)		Apeserum (n = 2)		Humant serum (n = 2)	
	Iab (μM)	IVa Dannet (μM)	Iab (μM)	IVa Dannet (μM)	Iab (μM)	IVa Dannet (μM)	Iab (μM)	IVa Dannet (μM)
0	6,8	0,25	9,2	0,066	9,0	0,20	9,5	0,10
15	5,8	1,1	9,0	0,85	7,3	0,48	9,2	0,10
30	5,4	1,8	7,8	1,6	6,8	0,75	9,0	0,15
45	4,9	2,8	7,8	2,5	6,5	1,2	9,6	0,20
60	4,3	3,7	7,1	3,2	6,3	1,5	9,1	0,24
90	3,3	5,4	6,7	4,4	6,3	2,0	9,4	0,32
t _{1/2} (min)*	80		182**		365**		>2000	

* Beregnet som forsvinning av Iab. ** Halveringstidene er større enn inkuberingsperioden.

Hydrolyse av Iab i nærvær av human placenta ALP

For å studere hydrolysen av Iab i en rensert form av human ALP, ble Iab inkubert i human placenta ALP-løsninger med 10, 100 og 1000 enheter/L ved 37°C i 2 timer. Forsvinning t_{1/2} av Iab ble bestemt og angitt i Tabell 19. Som forventet var graden av hydrolyse raskere i løsningene med høyere ALP-aktiviteter. IVa ble også dannet tilsvarende (Fig. 8). Dette indikerer at Iab blir hydrolysert av ALP avledet fra mennesker for å danne IVa.

Tabell 19: *Hydrolyse av Iab i human placenta ALP-løsninger*

	ALP-aktivitet (Enheter/L) (n = 2)		
	10	100	1000
t _{1/2} (min)	186	14	1,4

Merk: Iab ble inkubert ved en start-konsentrasjon på ~10 μM ved 37°C i 120 min.

In vivo undersøkelser

In vivo undersøkelser i rotte

De farmakokinetiske parametere av Iab og IVa i rotter etter IV og oral administrering av Iab er oppsummert i Tabell 20. Plasmakonsentrasjon versus tid

profiler er vist i Figur 9. For sammenligning er historiske data fra de farmakokinetiske undersøkelser av IVa i rotter også vist.

Den totale kropp-utskilling (Cl) av Iab etter IV-administrering var 14 ml/min/kg, hvilket indikerer at Iab er en forbindelse med lav utskilling i rotter.

5 Eliminerings-halveringstid ($t_{1/2}$) og gjennomsnittlig oppholdstid (MRT) etter IV-administrering var henholdsvis 0,16 timer og 0,14 timer. Iab ble ikke detektert etter 2 timer. Volumet av distribusjon av Iab ved likevekt (V_{ss}) var 0,12 L/kg, hvilket indikerer meget begrenset vevdistribusjon. Dannelse av IVa fra Iab etter IV-administrering var rask; IVa ble detektert på første prøvetagnings-tidspunkt 2 min

10 (data ikke vist). IV AUC-forhold av IVa dannet fra Iab vs. historisk IVa undersøkelse var 1,5 (teoretisk verdi for fullstendig omdannelse = 1), hvilket indikerer fullstendig omdannelse av Iab til IVa.

Med unntak av én prøve (5 nM; Tabell 20) ble Iab ikke detektert i noen prøver etter oral administrering. Tmaks av IVa etter oral administrering av Iab var 0,83

15 timer, som er kortere enn historisk Tmaks av IVa på 2,0 timer, som indikerer raskere absorpsjon av IVa etter oral administrering av prodrug-forbindelsen. Den raskere absorpsjon av IVa fra prodrug er sannsynligvis resultatet av bedre vandig oppløselighet av Iab så vel som rask hydrolyse av Iab for å danne IVa i tarmen. Selv om den absolutte orale biotilgjengelighet av IVa fra Iab var 62%, lavere enn de

20 historiske IVa data, var eksponering av IVa fra Iab rotte oral dose eskaleringsstudien overlegen sammenlignet med de historiske data for IVa (Tabell 16 og Fig. 8).

De terminale plasmakonsentrasjon vs. tid profiler av IVa dannet fra Iab er lignende de historiske IVa profiler.

25 **Tabell 20:** *Farmakokinetiske parametere av Iab og IVa etter IV og oral administrering av Iab i rotter (gjennomsnitt $\pm$ SD, n = 3)*

PK-parametere	Iab	IVa dannet etter dosering med Iab	Historisk IVa
IV			
Dose (mg/kg)	1,4 fri syre eller 1,1 av IVa ekvivalent		1
AUC _{tot} ($\mu\text{M} \cdot \text{timer}$)	3,3 $\pm$ 1,0	5,4 $\pm$ 0,93	3,3 $\pm$ 1,1

CL _{tot} (ml/min/kg)	14 ± 4,2	NA	13 ± 4,0
t _{1/2} (timer)	0,16 ± 0,052	4,4 ± 1,9	2,4 ± 0,32
MRT (timer)	0,14 ± 0,020	NA	2,2 ± 1,5
Vdss (L/kg)	0,12 ± 0,019	NA	1,5 ± 0,25
IV AUC forhold av IVa	NA	1,5*	NA
<i>PO</i>			
Dose (mg/kg)	7,9 fri syre eller 6,3 of IVa ekvivalent		5
Tmaks (timer)	ND	0,83 ± 0,29	2,0
Cmaks (µM)	ND**	3,9 ± 0,98	4,5 ± 1,5
C-24 timer (µM)	ND	ND	9 (n = 1)
AUC _{tot} (µM•timer)	ND	13 ± 1,4	15 ± 6,3
t _{1/2} (timer)	ND	1,5 ± 0,24	1,7 ± 0,92
Biotilgjengelighet (%)	ND	62***	90
PO AUC forhold av IVa	NA	0,69 *	NA

NA - ikke anvendbar; ND - ikke detektert (<5 nM).

* Forholdene ble beregnet fra $\frac{\text{'043 AUC etter prodrug dosering}}{\text{'043 AUC etter '043 dosering}}$ for henholdsvis IV og PO.

** Iab ble detektert bare i én rotte ved 15 min (5 nM).

5 *** Beregnet fra historiske IV-data for IVa.

31. *In vivo undersøkelser i hund*

De farmakokinetiske parametere for Iab og IVa i hunder etter IV og oral administrering av Iab er oppsummert i Tabell 21. Plasmakonsentrasjon versus tid profiler er vist i Figur 10. For sammenligning, er historiske data fra de

10 farmakokinetiske undersøkelser av IVa i hunder også vist.

Cl av Iab etter IV-administrering var 70 ml/min/kg, som er betydelig høyere enn leverblodstrømmen på 31 ml/min/kg i hunder, hvilket indikerer potensiell involvering av ekstrahepatisk hydrolyse og/eller andre bane(r) for eliminering (f.eks. nyre-ekskresjon). T_{1/2} og MRT etter IV-administrering var henholdsvis 0,15 timer og

15 0,07 timer. Iab ble ikke detektert etter 45 min. Vss av Iab var 0,30 L/kg, hvilket indikerer lavt potensiale for vevdistribusjon. Dannelse av IVa fra Iab etter IV-administrering var rask; IVa ble detektert på det første prøvetagningspunkt på 5 min

(data ikke vist). IV AUC-forhold av IVa dannet fra Iab vs. historisk IVa undersøkelse var 0,80, hvilket indikerer god omdannelse av Iab til IVa.

Iab ble detektert med 5 nM (LLQ) bare 15 min og 30 min i én hund etter oral administrering. Tmaks av IVa etter oral administrering av Iab var 0,25 time, som er kortere enn historisk Tmaks av IVa på 2,9 timer, hvilket indikerer raskere absorpsjon av IVa etter oral administrering av prodrug. Den absolutte orale biotilgjengelighet av IVa fra Iab var 94%, høyere enn de historiske IVa data på 57%. De terminale plasmakonsentrasjon vs. tid profiler for IVa dannet fra Iab er lignende de historiske IVa profiler.

10 Tabell 21: Farmakokinetiske parametere av Iab og IVa etter IV og oral administrering av Iab i hunder (gjennomsnitt $\pm$ SD, n = 3)

PK Parametere	Iab	IVa dannet etter dosering med Iab	Historisk IVa
<i>IV</i>			
Dose (mg/kg)	1,2 fri syre eller 0,95 IVa ekvivalent		1
AUC _{tot} ($\mu\text{M}\cdot\text{timer}$)	0,56 $\pm$ 0,12	13 $\pm$ 2,2	17 $\pm$ 3,5
CL _{tot} (ml/min/kg)	70 $\pm$ 16	NA	2,4 $\pm$ 0,43
t _{1/2} (timer)	0,15 $\pm$ 0,010	5,2 $\pm$ 1,0	2,6 $\pm$ 1,2
MRT (timer)	0,07 $\pm$ 0,006	NA	3,3 $\pm$ 0,71
Vdss (L/kg)	0,30 $\pm$ 0,094	NA	0,45 $\pm$ 0,083
IV AUC forhold av IVa	NA	0,80	NA
<i>PO</i>			
Dose (mg/kg)	6,6 fri syre eller 5,2 av IVa ekvivalent		5
Tmaks (timer)	ND	0,25	2,9 $\pm$ 1,9
Cmaks (μM)	ND*	14 $\pm$ 1,3	6,5 $\pm$ 1,2
C-24 timer (μM)	ND	0,26 $\pm$ 0,12	0,15 $\pm$ 0,093
AUC _{tot} ($\mu\text{M}\cdot\text{timer}$)	ND	83 $\pm$ 16	47 $\pm$ 7,2
t _{1/2} (timer)	ND	4,1 $\pm$ 0,52	3,8 $\pm$ 0,81
Biotilgjengelighet (%)	ND	94	57 $\pm$ 17
PO AUC-forhold av IVa	NA	1,7	NA

* Iab ble detektert ved 5 nM (LLQ) bare ved 15 min og 30 min i én hund.

For å studere effekten av mat på oral absorpsjon av IVa etter administrering av Iab og IVa, ble hundene administrert enten Iab eller IVa i kapsler under fastede og matede tilstander. Undersøkelsen ble utført i en kryss-undersøkelse, med en én-ukes utvaskingsperiode mellom hver studie. Ingen betydelige forskjeller i AUC og Cmaks ble observert mellom fastet og matet tilstand etter administrering av Iab (Tabell 22), mens en 9-ganger forbedring i AUC og Cmaks ble observert etter administrering av IVa med mating (Tabell 23). Totalt var effekten av mating mer fremtredende i hunder (Tabell 23) enn i mennesker (Tabell 24) som mottar IVa. Dette indikerer kvantitative arts-forskjeller i effekten av mat på oral absorpsjon av IVa.

Oral absorpsjon av IVa ble vist å være oppløsningsgrad-begrenset hos mennesker og dyrearter. Forbedring av IVa eksponering hos mennesker etter mating med et høyfett måltid var antagelig på grunn av øket sekresjon av gallesyresalter som lettet oppløsning av IVa. I hunder indikerer mangelen på effekt av mat på oral absorpsjon av IVa etter Iab administrering potensielle fordeler for mennesker, for hvilke diett-modifikasjon ikke blir nødvendig.

Tabell 22: *Effekt av mat på oral eksponering av IVa i hunder etter oral administrering av Iab i tørr-fylte kapsler (20 mg/kg av IVa ekvivalent) (gjennomsnitt ± SD, n = 3)*

<i>Parametere</i>	<i>Fastet</i>	<i>Matet</i>
AUC _{tot} (µM•timer)	414 ± 70	422 ± 57
Cmaks (µM)	70 ± 12	130 ± 102
Tmaks (timer)	2,0	1,5 ± 0,87
t _{1/2} (timer)	4,2 ± 0,42	3,2 ± 1,0

Merk: Iab ble detektert med <200 nM i noen få prøver på tidlige tidspunkter.

Tabell 23: *Effekt av mat på oral eksponering av IVa i hunder etter oral administrering av IVa i klinisk form kapsler (20 mg/kg) (gjennomsnitt $\pm$ SD, n = 3)*

Parametere	Fastet	Matet	Matet/Fastet forhold
AUC _{tot} ($\mu\text{M} \cdot \text{timer}$)	11 $\pm$ 1,4	96 $\pm$ 10*	9,0 $\pm$ 2,2
Cmaks (μM)	1,2 $\pm$ 0,22	11 $\pm$ 0,99*	9,1 $\pm$ 0,92
Tmaks (timer)	3,3 $\pm$ 1,2	4,0	
t _{1/2} (timer)	5,3 $\pm$ 2,7	8,0 $\pm$ 3,1	

* Betydelig forskjellig fra verdiene i fastet tilstand.

5 **Tabell 24:** *Effekt av mat på oral eksponering av IVa i den første-i-human studie (gjennomsnitt $\pm$ SD, n = 6)*

	800 mg			1800 mg		
	Fastet	Matet	Matet/fastet forhold	Fastet	Matet	Matet/fastet forhold
AUC _{total} ($\mu\text{M} \cdot \text{timer}$)	22 $\pm$ 12	53 $\pm$ 10	2,4	19 $\pm$ 5,8	82 $\pm$ 16	4,3
Cmaks (μM)	3,7 $\pm$ 1,1	9,8 $\pm$ 1,3	2,6	3,3 $\pm$ 0,84	15 $\pm$ 5,0	4,5

Ytterligere kapselformulerings-undersøkelser ble utført i samme fastede hunder med kliniske og spraytørkede former av IVa for å sammenligne med Iab. Som
10 vist i Tabell 25, ble ved 20 mg/kg av IVa ekvivalent, lignende eksponering av IVa observert etter administrering av Iab og den spraytørkede form av IVa. Imidlertid ga Iab betydelig høyere eksponering av IVa sammenlignet med den kliniske form av IVa. AUC og Cmaks av IVa fra prodrug var henholdsvis 37 ganger og 45 ganger
15 høyere enn verdiene fra den kliniske form av IVa. Ganger økning i hunder er sannsynligvis en over-prediksjon av den kliniske situasjon basert på erfaring med IVa i utvikling (data ikke vist).

I doseeskaleringsundersøkelsen av den spray-tørkede form av IVa i hunder, var økningene av AUC og Cmaks fra 20 mg/kg til 75 mg/kg mindre enn proporsjonal med doseøkning (Tabell 26). Ingen betydelige ytterligere økninger i eksponering ble
20 observert fra 75 mg/kg til 200 mg/kg.

Tabell 25: *Oral eksponering av IVa i hunder etter oral administrering av Iab og forskjellige formuleringer av IVa i kapsler (kryssundersøkelser)*

Parametere	Hund#4201	Hund#4202	Hund#4201	Hund#4202	Hund#4201	Hund#4202
Formu- lering	Iab	Iab	IVa spray- tørket	IVa spray- tørket	'IVa klinisk form	'IVa klinisk form
Dose (mg/kg; 'IVa ekv.)	19	19	20	20	20	20
AUC _{tot} ($\mu\text{M} \cdot \text{timer}$)	486	514	303*	338	11	16
Cmaks (μM)	80	86	46	81	1,3	2,4
Tmaks (timer)	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0	4,0
t _{1/2} (timer)	4,2	3,4	57	4,2	7,1	4,5

* AUC var 0-24 timer.

5 **Tabell 26:** *Oral eksponering av IVa i hunder etter oral administrering av spray-tørket form av IVa i kapsler*

Parametere	Hund #4201*	Hund #4202*	Hund #1201	Hund #1202	Hund #2201	Hund #2202
Dose (mg/kg)	20	20	75	75	200	200
AUC _{tot} ($\mu\text{M} \cdot \text{timer}$)	303**	338	759	923	935**	1209
Cmaks (μM)	46	81	156	192	178	210
Tmaks (timer)	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0
t _{1/2} (timer)	57	4,2`	2,1	1,9	3,0	2,3
Doseforhold	1 : 3,8 : 10					
Gj.snitt AUC forhold	1 : 2,6 : 3,4					
Gj.snitt Cmaks forhold	1 : 2,7 : 3,0					

** Som i Tabell 25. ** AUC var 0-24 timer.

In vivo undersøkelser i ape

De farmakokinetiske parametere av Iab og IVa i aper etter IV og oral administrering av Iab er oppsummert i Tabell 27. Plasmakonsentrasjon versus tid profiler er vist i Figur 11. For sammenligning er historiske data fra de

5 farmakokinetiske undersøkelser av IVa i aper også vist.

Cl av Iab etter IV-administrering var 4,4 ml/min/kg, hvilket indikerer at Iab er en forbindelse med lav utskilling i aper. $T_{1/2}$ og MRT etter IV-administrering var henholdsvis 1,0 timer og 0,18 timer. MRT reflekterte et mer realistisk estimat av varigheten av Iab i plasmaet siden plasmakonsentrasjoner av Iab i den terminale fase

10 var lav (Fig. 11). Iab ble ikke detektert etter 6 timer. Vss av Iab var 0,048 L/kg, hvilket indikerer meget begrenset vevdistribusjon. Dannelse av IVa fra Iab etter IV-administrering var rask; IVa ble detektert på første prøvetagnings-tidspunkt på 5 min (data ikke vist). IV AUC-forhold av IVa dannet fra Iab vs. historisk IVa undersøkelse var 0,70, hvilket indikerer god omdannelse av Iab til IVa.

15 Iab ble detektert i en konsentrasjon på 18 nM ved 15 min i bare én ape etter oral administrering. Tmaks av IVa etter oral administrering av Iab var 0,83 timer, som er kortere enn historisk Tmaks av IVa på 2,7 timer, som indikerer raskere absorpsjon av IVa etter oral administrering av prodrug-forbindelsen. Den absolutte orale biotilgjengelighet av IVa fra Iab var 66%, lignende historiske IVa data på 60%.

20 Den terminale plasmakonsentrasjon vs. tid profiler av IVa dannet fra Iab er lignende historiske IVa profiler.

Tabell 27: *Farmakokinetiske parametere av Iab og IVa etter IV og oral administrering av Iab i aper (gjennomsnitt $\pm$ SD, n = 3)*

<i>PK-parametere</i>	<i>Iab</i>	<i>IVa dannet etter dosering med Iab</i>	<i>Historisk IVa</i>
<i>IV</i>			
Dose (mg/kg)	1,3 fri syre eller 1,1 av IVa ekv.		1
AUC _{tot} (μ M•timer)	9,5 $\pm$ 0,38	7,1 $\pm$ 1,0	9,2 $\pm$ 0,53
CL _{tot} (ml/min/kg)	4,4 $\pm$ 0,18	NA	4,3 $\pm$ 0,26

$t_{1/2}$ (timer)	$1,0 \pm 0,78$	$4,8 \pm 1,9$	$4,7 \pm 0,31$
MRT (timer)	$0,18 \pm 0,059$	NA	$2,4 \pm 0,15$
Vdss (L/kg)	$0,048 \pm 0,017$	NA	$0,63 \pm 0,39$
IV AUC-forhold av IVa	NA	0,70	NA
<i>PO</i>			
Dose (mg/kg)	7,1 fri syre eller 5,6 av IVa ekv.		5
Tmaks (timer)	ND	$0,83 \pm 0,14$	$2,7 \pm 1,2$
Cmaks (μ M)	ND*	$16 \pm 6,4$	$5,8 \pm 1,2$
C-24 timer (μ M)	ND	$0,067 \pm 0,039$	$0,074 \pm 0,032$
AUC _{tot} (μ M•timer)	ND	$34 \pm 2,7$	$27 \pm 2,9$
$t_{1/2}$ (timer)	ND	$4,8 \pm 1,3$	$4,2 \pm 0,64$
Biotilgjengelighet (%)	ND	66	60 ± 4
PO AUC-forhold av IVa	NA	1,1	NA

* Iab ble detektert ved 18 nM ved 15 min i bare én ape.

Ytterligere profilering Seksjon 2

Ytterligere undersøkelser med prodrug Ibb

- 5 IV og PO farmakokinetiske undersøkelser av Ibb ble utført i rotter, hunder og aper. I alle tilfeller ble blodprøver oppsamlet i nærvær av EDTA. Tilstedeværelse av EDTA, en kjent ALP-inhibitor, minimaliserte betydelig *ex vivo* omdannelse av Ibb under prøve-prosessering. IVb ble raskt dannet etter IV-administrering av Ibb. God oral biotilgjengelighet av IVb (50-310%; beregnet ved anvendelse av historisk IV
- 10 AUC av IVb) ble observert etter administrering av Ibb til rotter, hunder og aper med meget lave nivåer av Ibb til stede i plasma. Siden det er høye nivåer av ALP-ekspresjon i tarmen, er det sannsynlig at etter oral administrering av Ibb, blir Ibb hydrolysert av ALP til stede på "brush border" membraner i tarm-lumen for å danne IVb, som raskt blir absorbert på grunn av dens høye permeabilitet.
- 15 *In vitro* inkuberingsundersøkelser ble utført for en kvalitativ bedømmelse av ALP-avhengig hydrolyse av Ibb i forskjellige vev. Ibb ble hydrolysert i nærvær av serum og hepatocytter fra rotte, hund, ape og menneske, så vel som human placenta

ALP. I tilfeller hvor Ibb og IVb ble målt, var omdannelsen av Ibb til IVb nær støkiometrisk. På grunn av hydrolyse i serum kunne protein-binding av Ibb ikke bestemmes. Basert på *in vitro* data, er det antatt at Ibb vil bli hydrolysert av human ALP og at IVb vil bli dannet etter oral administrering av Ibb til mennesker.

5 Den krystallinske oppløselighet av Ibb-03 ved romtemperatur er >11 mg/ml i pH-området 1,5 til 8,7; vandige løsninger inneholdende >75 mg/ml blir fremstilt for *in vivo* toksikologi-undersøkelser. Som sammenligning ble den vandige oppløselighet av stamforbindelsen, IVb, ved romtemperatur som krystallinsk materiale, funnet å være 0,007 – 0,19 mg/ml (pH-område 1,0 - 9,6). Ibb-03 oppviser
10 akseptable løsnings- og faststoff-stabiliteter.

Den høyere vandige oppløselighet av Ibb tilveiebringer en metode for å overvinne oppløsningsgrad-begrenset absorpsjon av IVb under visse doser og øker derved eksponering av IVb ved orale doseeskalerings- og toksikokinetiske undersøkelser. Ibb, når dosert oralt opptil 200 mg/kg av IVb bmsekvivalent, ga
15 henholdsvis 11- og 2,6-ganger (BID) høyere AUC for IVb i rotter og hunder, , med relativt lav plasmaeksponering for prodrug-forbindelsen (<0,9 µM), sammenlignet med AUC fra historiske IVb suspensjonsundersøkelser med lignende dose.

Enkel-dose toksikokinetisk studie i Sprague Dawley rotter

En 1-dag oral toksikokinetisk studie i rotter ble utført ved anvendelse av
20 prodrug Ibb (monolysinsalt). Ibb ble administrert i doser på 19, 64 og 236 mg/kg (fri syre) ved oral mating til tre hannrotter/gruppe ved anvendelse av vann som konstituent (løsnings-formulering). Dosene av prodrug fri syre svarer til IVb (parental) molekvivalente doser på henholdsvis 15, 51 og 190 mg/kg. Sluttpunktet evaluert var plasma toksikokinetikk av Ibb og IVb i de individuelle rotter.

25 Gjennomsnittlige toksikokinetiske verdier er gitt i Tabell 28.

Tabell 28: Gjennomsnittlige toksikokinetiske verdier for Ibb og IVb i hannrotter gitt ≤ 200 mg/kg av Ibb som en enkel oral dose

		Doser (mg/kg)				
Ibb	19	64		236		
IVb molar ekv.	15	51		190		
	Ibb	IVb	Ibb	IVb	Ibb	IVb
Cmaks (μ M)	0,027	58	0,14	135	0,25	290
C _{24 timer} (μ M)	<LLQ	0,048	<LLQ	0,29	<LLQ	29
AUC (μ M•timer)	0,030 ¹	283 ²	0,18 ¹	997 ²	0,49 ¹	3700 ²
T1/2 (timer)	1,3	2,1	4,6	2,1	3,6	5,8

Verdier representerer gjennomsnittet av én til tre rotter/gruppe for Ibb data og 3 rotter/gruppe for IVb data. LLQ er den nedre grense for kvantifisering.

¹ AUC fra null til siste tidspunkt.

² AUC fra null til ∞

5

Gjennomsnittlig maksimum plasmakonsentrasjon (Cmaks) av IVb (parental) ble oppnådd innen ≈ 1 -3 timer etter dosering. I rotter gitt ≤ 236 mg/kg av Ibb, var økningen i AUC for IVb nesten proporsjonal med Ibb-dose og Cmaks øket på en mindre enn dose-proporsjonal måte mellom 19 og 236 mg/kg av Ibb. Ibb ble
10 detektert i plasma til rotter gitt ≥ 19 mg/kg av Ibb, men i meget lave konsentrasjoner i forhold til de for IVb.

En sammenligning av IVb Cmaks og AUC oppnådd i rotter gitt enten IVb eller Ibb er vist i Figur 12.

15 Eksponering for IVb blir vesentlig øket etter administrering av Ibb sammenlignet med den oppnådd etter dosering av IVb.

Enkel-dose toksikokinetisk og tolerabilitet-studie i hunder

En to-fase studie ble utført for å bedømme tolerabiliteten av prodrug, Ibb (monolysinsalt) i doser på 25, 92 eller 250 mg/kg (fri syre, molekvivalent til henholdsvis 20, 74 eller 201 mg/kg av parental IVb) og toksikokinetikken for Ibb og
20 IVb (1). På dag 1 ble Ibb administrert til én hund/kjønn/gruppe én gang daglig i tørr-

fylte kapsler i dosene ovenfor. En 1-ukes utvaskingsperiode ble anvendt mellom doser i undersøkelsen. På dag 8 ble Ibb administrert til én hund/kjønn/gruppe én gang daglig som en vandig løsning med 25 mg/kg eller to ganger daglig i tørr-fylte kapsler med 46 eller 125 mg/kg BID. Sluttpunktene var: kliniske tegn, kroppsvekt, mat-konsum, serumkjemi, hematologi og plasma-toksikokinetikk for Ibb og IVb.

Plasma toksikokinetiske verdier fra individuelle hunder er vist i Tabell 29.

Tabell 29: Toksikokinetiske verdier for IVb i hunder gitt ≤ 250 mg/kg av Ibb

				Doser (mg/kg)			
Ibb		25 ¹		92 ²		250 ³	
IVb molar ekv.		20		75		203	
Dyr	2101M	2201F	3101M	3201F	4101M	4201F	
Cmaks (µM)							
dag 1	72	34	28 ⁴	66 ⁴	61 ⁴	93 ⁴	
dag 8	56	33	74 ⁴	108 ⁵	158 ⁵	88 ^{4,5}	
C_{24 timer} (µM)							
dag 1	0,008	0,688	1,90	0,202	2,61	0,704	
dag 8	0,547	0,107	10,6	0,307	54,2	1,96	
AUC_{0-∞} (µM•h)							
dag 1	259	136	111 ⁴	329 ⁴	334 ⁴	745 ⁴	
dag 8	324	139	478 ⁴	1053 ⁵	1393 ⁵	978 ^{4,5}	
T1/2 (h)							
dag 1	1,5	4,5	3,6	2,3	4,1	3,2	
dag 8	3,3	3,4	5,2	2,4	8,0	3,3	

¹ Formulert som tørr-fylte kapsler på dag 1 og som en vandig løsning på dag 8 formulert (QD dosering på begge dager)

² Som 92 mg/kg QD på dag 1 og som 46 mg/kg BID på dag 8; formulert som tørr-fylte kapsler på begge dager

³ Som 250 mg/kg QD på dag 1 og som 125 mg/kg BID på dag 8; formulert som tørr-fylte kapsler på begge dager

⁴ Brekning observert innen 2 timer av dosering med kapselrester til stede

⁵ Brekning observert innen 2 timer av dosering med ingen kapselrester

Lave nivåer ($\leq 0,9 \mu\text{M}$) av Ibb ble detektert i noen plasmaprøver på dager 1 og 8. Gjennomsnittlig maksimum plasmakonsentrasjon (C_{maks}) av IVb ble oppnådd mellom 1-4 timer etter dosering for QD-dosering og 1-2 timer etter andre dosering for BID dosering. Med 25 mg/kg QD, ble ekvivalent C_{maks} og AUC av IVb observert
5 når Ibb ble administrert som enten tørr-fylte kapsler eller en vandig løsning. På dag 1 ble oppkast (hvitt, stripet med rødt som inneholdt kapselrester) observert ca. 0,5-1,25 timer etter dosering hos alle hunder gitt $\geq 92 \text{ mg/kg QD}$ (3101M, 3201F, 4101M og 4201F), som sannsynligvis bidro til den flate eksponering mellom 92 og 250 mg/kg. På dag 8 ble oppkast (hvitt eller brunt) observert innen 2 timer etter dosering hos alle
10 hunder gitt $\geq 46 \text{ mg/kg BID}$; kapselrester ble bare observert i oppkast til to hunder (3101M post-første dose og 4201F post-andre dose). To ganger daglig dosering ga større eksponering for IVb i hunder enn én gang daglig dosering.

Annet enn brekning ble ingen kliniske tegn observert og det var ingen effekter på kroppsvekt og matkonsum.

15 Til tross for brekningen observert i hunder, er en høyere IVb AUC observert i hunder gitt Ibb enn den i hunder gitt IVb. En sammenligning av IVb AUC oppnådd i hunder gitt enten Ibb eller IVb (2) er vist i Figur 13.

Den absolutte orale biotilgjengelighet av IVb, parental forbindelse, etter administrering av vandige løsninger av Ibb-03, fosfat-prodrug, var i området fra 50%
20 til 310% i rotter, hunder og aper. Disse beregninger er basert på historiske IV-data. Eksponering av IVb, etter oral administrering av vandige løsninger av prodrug, er Ibb-03, dosert opptil 190 mg/kg av IVb ekvivalent 3-10 ganger høyere i rotte oral doseeskalerings-studie sammenlignet med de historisk data for IVb. Når Ibb-03 blir dosert BID som medikament i kapsel til hunder, blir 2-3 ganger forbedring i
25 eksponering oppnådd sammenlignet med historiske data fra pre-ECN toksikologi-undersøkelser med BID-dosering av IVb som suspensjoner. *In vivo* eksponeringsdata for medikament i kapselformuleringer indikerer at oral eksponering av IVb hos mennesker kan bli betydelig forbedret ved administrering av tradisjonelle faststoff orale doseformer av Ibb.

Ibb er fosfat-prodrug av N-hydroksymetyl-addukt av IVb og blir hydrolysert ved alkalisk fosfatase (ALP) for å danne IVb. Etter administrering av Ibb til dyr, ble derfor plasmaprøver fremstilt fra blod oppsamlet i nærvær av EDTA, en kjent ALP inhibitor. Omdannelse av Ibb til IVb var minimal ($< 2\%$) i blodet inneholdende
5 EDTA (rotte, hund, ape og menneske). Ingen betydelig *ex vivo* omdannelse av Ibb er forventet under prøvelagring (-20°C) og analyse av Ibb.

Hydrolysen av Ibb ble studert i dyr og humane *in vitro* systemer. Siden multiple ALP-isoformer er bredt fordelt i forskjellige vev, ble kvantitative *in vitro* til
10 *in vivo* korrelasjoner ikke forsøkt (Fishman *et al.*, 1968; Komoda *et al.*, 1981; Moss, 1983; Yora og Sakagishi, 1986; Sumikawa *et al.*, 1990). Derfor ble undersøkelsene begrenset til en kvalitativ bedømmelse av ALP-avhengig hydrolyse i forskjellige vev. Ibb ble hydrolysert i nærvær av serum (rotte, hund, ape og menneske), hepatocytter (rotte, hund og menneske) så vel som i human placenta ALP. Ingen omsetning ble observert i ape-hepatocytter. Omdannelsen av Ibb til IVb var nær støkiometrisk. På
15 grunn av hydrolyse i serum kunne proteinbinding av Ibb ikke bestemmes.

Ibb ble fullstendig hydrolysert for å danne IVb i Caco-2 celler og, som forventet, ble meget lave nivåer av Ibb detektert i rotte-, hund- og ape-plasma etter oral administrering av Ibb. Disse data er i overensstemmelse med rapporter som beskriver de høye nivåer av ALP-ekspressjon i tarmen (McComb *et al.*, 1979a;
20 Butterworth, 1983). Det membran-bundede ALP er for det meste lokalisert i "brush border" membraner av mikrovilli som dekker tarmen-lumen (Butterworth, 1983; Testa og Mayer, 2003). Det er sannsynlig at etter oral administrering av Ibb, blir Ibb hydrolysert av ALP til stede ved "brush border" membraner av tarm-lumen for å danne IVb, som raskt blir absorbert på grunn av dens høye permeabilitet.

25 Selv om forskjellige isoformer av ALP eksisterer i forskjellige vev og arter, er substratspesifisiteten for ALP relativt bred (Heimbach *et al.*, 2003), som er i overensstemmelse med funnene ovenfor for Ibb.

IVb ble raskt dannet etter IV-administrering av Ibb i rotter, hunder og aper. IV AUC omdannelsesforhold var 0,62 i rotter, 1,6 i hunder og 1,7 i aper, hvilket
30 indikerer tilfredsstillende til god omdannelse fra Ibb til IVb.

Gode orale biotilgjengeligheter (50-310%; beregnet ved anvendelse av historisk IV AUC for IVb) for IVb ble observert etter administrering av Ibb i rotter, hunder og aper. Mer betydningsfullt minket den høyere vandige oppløselighet av Ibb i den oppløsningsgrad-begrensede absorpsjon av IVb og øket derved øket eksponering for IVb ved orale doseeskalerings- og toksikokinetiske undersøkelser sammenlignet med eksponering fra historiske IVb-undersøkelser (Fremlegging av toksikologi seksjon Tabeller 28-29 og Fig. 12-13).

Metoder

Undersøkelsene beskrevet i denne rapport anvendte mono-lysinsalt av Ibb.

10 Kvantifisering av Ibb og IVb ved LC/MS/MS

En LC/MS/MS-metode ble utviklet for analyse av Ibb og IVb i plasmaprøver fra farmakokinetiske undersøkelser i dyr så vel som i acetonitril-supernatant fra *in vitro* inkuberingsundersøkelser. For analyse i plasma ble et Packard Multiprobe instrument anvendt for overføring av 50 µL av hver standard, QC og plasmaprøve til en ren 96-brønn plate for proteinutfelling-ekstraksjon. Etter tilsetning av 200 µL av acetonitril inneholdende den indre standard IVc, ble prøvene virvlet blandet og den resulterende supernatant ble separert fra de utfelte proteiner ved sentrifugering i 10 min. For analyse i supernatanten dannet fra *in vitro* undersøkelsene, ble et likt volum av supernatanten og acetonitril inneholdende den indre standard, blandet. En aliquot av supernatanten ovenfor ble overført ved anvendelse av en Tomtec automatisert væskehåndterer til en andre ren 96-brønn plate. Et likt volum av vann ble tilsatt og platen ble lukket og virvleblandet.

HPLC-systemet besto av Shimadzu LC10ADvp pumper (Columbia, MD) og en HTC PAL autosampler (Leap Technologies, Cary, NC) bundet til en Phenomenex Synergi Fusion-RP analytisk kolonne (2,0 x 50 mm, 5 µ; Torrance, CA). Mobil fase A besto av 5 mM ammoniumformiat i vann; mobil fase B var 100% acetonitril. LC strømningshastighet var 0,38 ml/min. Det innledende mobil fase-preparat var 2% B, øket til 50% B over 1,8 min og holdt i 0,5 min, øket til 100% B over 0,1 min og holdt i 0,5 min, returnert til innledende betingelser over neste 0,1 min og reekvilibrert.

Total analysetid var 4,0 min. Retensjonstiden for Ibb, IVb og IVc var henholdsvis 1,42, 2,21 og 1,73 min.

HPLC-systemet ble tilpasset til et Sciex API4000 trippel kvadrupol massespektrometer (Toronto, Canada) utstyrt med Turboionspray-kilde satt til 550°C og ionspray-spenning satt til 4,5 kV. UHP nitrogen ble anvendt som forstøver- og
5 hjelpe-gass henholdsvis med trykk på 5,6 kg/cm² og 7 L/min. Kollisjonsenergier for Ibb, IVb og IVc var henholdsvis 19, 25 og 29 volt. Data-oppsamling anvendte selektert reaksjonsovervåkning (SRM). Ioner som representerer positiv ionemodus (M+H)⁺ arter for Ibb, IVb og den indre standard ble valgt i MS1 og kollisjons-
10 dissosiert med nitrogen og optimaliserte kollisjonsenergier for å danne spesifikke produksjoner deretter overvåket ved MS2. SRM-omdannelser for Ibb, IVb og IVc var henholdsvis m/z 558→432, 448→202 og 474→256.

Standardkurver i området fra 5 nM til 10 µM ble fremstilt fra lagerløsninger og serielt fortynnet i matriks for både Ibb og IVb. Standardkurver ble aliquotert in
15 duplo, ekstrahert med prøvene og injisert i begynnelsen, midten og enden av den analytiske sekvens. Standardkurvene ble tilpasset en lineær regresjon vektet av resiprok konsentrasjon $1/x^2$. Data og kromatografiske topper ble prosessert og konsentrasjoner av standarder og ukjente ble kvantifisert ved anvendelse av PEBiosystems Analyst™ 1.1.

20

In vitro metoder

(1) *Stabilitet av Ibb i EDTA blod, serum og Tris-HCl buffer*

Stabiliteten til Ibb ble studert i friskt blod og serum fra rotte, hund, ape og menneske (n = 2). Blodet ble oppsamlet i vacutainere inneholdende K₂EDTA
25 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Serum ble oppsamlet i vacutainere inneholdende ingen antikoagulant. Ibb ble inkubert ved utgangskonsentrasjon på omtrent 15 µM i 90 min ved 37°C. Serielle prøver ble tatt på forhåndsbestemte tider. Aliquoter av blodprøver (200 µL) ble først blandet med 100 µL vann fulgt av 400 µL acetonitril. Serumsprøvene (50 µL) ble tilsatt til mikrotainere inneholdende

K₂EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) fulgt av tilsetning av 100 µL av acetonitril. Supernatanten ble analysert for både Ibb og IVb ved LC/MS/MS.

Stabiliteten til Ibb ble også evaluert, som beskrevet ovenfor, i Tris-HCl buffer (0,1 M, pH 7,5).

5 (2) *Hydrolyse av Ibb i nærvær av human placenta ALP*

Faststoff human placenta ALP ble oppnådd fra Sigma (P-3895, St. Louis, MO). En løsning av 1000 enheter/L ble fremstilt i Tris-HCl-buffer (0,1 M, pH 7,5). Løsninger av 100 og 10 enheter/L ble oppnådd ved seriefortynning. Ibb ble inkubert i 10, 100 og 1000 enheter/L løsninger (n = 2) ved 37°C i 2 timer. Utgangs-
10 konsentrasjonen av Ibb ved inkuberingen var 10 µM. Aliquoter på 100 µL prøver ble tatt på forhånds-bestemte tider og tilsatt til K₂EDTA mikrotainere fulgt av tilsetning av 200 µL acetonitril. Supernatanten ble analysert for både Ibb og IVb ved LC/MS/MS.

In vivo undersøkelser

15 Alle blodprøver (0,3 ml) ble oppsamlet i mikrotainere inneholdende K₂EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) og plassert på knust is. Etter sentrifugering ble plasma separert og lagret ved -20°C inntil analyse. Mono-lysinsaltet av Ibb (Form 3) ble anvendt for de farmakokinetiske undersøkelsene. Doseringsløsninger av Ibb ble fremstilt i enten sterilt vann (for IV-administrering til hunder og aper) eller
20 destillert vann (for all annen doseadministrering).

(1) *In vivo undersøkelser i rotte*

Sprague-Dawley hannrotter (300–350 g, Hilltop Lab Animals, Inc., Scottsdale, PA) med kanyler implantert i jugular-venen ble anvendt. Rottene ble fastet natten over ved de PO farmakokinetiske undersøkelser. Blodprøver ble
25 oppsamlet fra jugular-venen.

Ved IV-studien ble Ibb gitt med 1,3 mg/kg (fri syre eller 1,0 mg/kg av IVb ekvivalent) som bolus over 0,5 min (n = 3). Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 1,3 mg/ml og doseringsvolumet var 1 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 2, 10, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

Ved PO-studien ble Ibb administrert med 6,6 mg/kg (fri syre eller 5,2 mg/kg av IVb ekvivalent) ved oral mating (n = 3). Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 1,3 mg/ml og doseringsvolumet var 5 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

5

(2) *In vivo undersøkelser i hund*

IV- og PO-undersøkelser av Ibb ble utført i beagle hannhunder ($10 \pm 0,78$ kg, Marshall Farms USA Inc., North Rose, NY). Tre hunder ble anvendt i hver studie. Av de tre hunder, ble samme to hunder anvendt for både IV- og PO-undersøkelser.

10 Det var en to-ukers utvaskingsperiode mellom IV- og PO-undersøkelser.

Ved IV-studien ble Ibb infusert via kefal-venen med 1,3 mg/kg (fri syre eller 1,0 mg/kg av IVb ekvivalent) over 5 min med en konstant hastighet på 0,1 ml/kg/min. Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 2,6 mg/ml og doseringsvolumet var 0,5 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet fra femoral-arterien før dosering og 5, 10,

15 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

Ved PO-studien ble hundene fastet natten over før dosering. Ibb ble administrert ved oral mating med 7,0 mg/kg (fri syre eller 5,6 mg/kg av IVb ekvivalent). Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 7,0 mg/ml og doseringsvolumet var 1 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 15, 30, 45

20 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

(3) *In vivo undersøkelser i ape*

IV- og PO-undersøkelser av Ibb ble utført i en kryss-undersøkelse av tre cynomolgus hannaper ($9,9 \pm 2,4$ kg, Charles River Biomedical Research Foundation, Houston, TX). Det var en to-ukers utvaskingsperiode mellom IV- og PO-

25 undersøkelser.

Ved IV-studien ble Ibb infusert via femoral-venen med 1,3 mg/kg (fri syre eller 1,1 mg/kg av IVb ekvivalent) over 5 min med en konstant hastighet på 0,1 ml/kg/min. Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 2,7 mg/ml og

doseringsvolumet var 0,5 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet fra femoral-arterien før dosering og 5, 10, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

Ved PO-studien ble apene fastet natten over før dosering. Ibb ble administrert ved oral mating med 5,8 mg/kg (fri syre eller 4,7 mg/kg av IVb ekvivalent).

- 5 Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 5,8 mg/ml og doseringsvolumet var 1 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

(4) *Dataanalyse*

- Alle resultater er uttrykt som gjennomsnitt $\pm$ SD, hvis ikke spesifisert på
10 annen måte.

- De farmakokinetiske parametere for Ibb og IVb ble beregnet ved non-compartmental analyse ved anvendelse av KINETICA™ programvare (versjon 4.0.2, InnaPhase Co., Philadelphia, PA). Cmaks og Tmaks verdier ble registrert direkte fra eksperimentelle observasjoner. AUC_{0-n} og AUC_{tot} verdier ble beregnet ved
15 anvendelse av blandet log-lineær trapezoide summasjoner. Den totale kroppsutskilling (Cl), gjennomsnittlig oppholdstid (MRT) og likevekt volum av distribusjon (Vss) ble også beregnet etter intravenøs administrering. Den absolutte orale biotilgjengelighet (uttrykt som %) ble beregnet ved å ta forholdet av dose-normaliserte AUC-verdier etter orale doser til de etter intravenøse doser.

- 20 *In vitro* naturlig utskilling av Ibb i hepatocytter (Cl_{int}) ble beregnet som følger:

$$Cl_{int} (\mu L/min/million \text{ celler}) = Rate / C_E$$

hvor Rate er graden av metabolisme i hepatocytter (pmol/min/million celler) og C_E er konsentrasjonen av Ibb i inkuberingen.

- 25 *In vivo* naturlig hepatisk utskilling av Ibb (Cl_{int,in vivo}) ble beregnet som følger:

$$Cl_{int,in \text{ vivo}} (ml/min/kg) = Cl_{int} \times \frac{120 (\text{million celler})}{g \text{ lever}} \times \frac{\chi \text{ g lever}}{kg \text{ kroppsvekt}} \times \frac{1}{1000}$$

hvor χ er 40, 32, 30 og 26 g lever/kg kroppsvekt for henholdsvis rotte, hund, ape og menneske (Davis og Morris, 1993).

Den hepatiske utskilling Cl_H ble beregnet fra den følgende ligning ved anvendelse av vel-rørt modell:

$$5 \quad Cl_H \text{ (ml/min/kg)} = \frac{Qh \times Cl_{\text{int.in vivo}}}{Qh + Cl_{\text{int.in vivo}}}$$

hvor Qh er lever-blodstrøm på henholdsvis 55, 31, 44 og 21 ml/min/kg for rotte, hund, ape og menneske (Davis og Morris, 1993).

Den hepatiske ekstraksjonsrasjon (ER) ble beregnet som følger:

$$ER = Cl_H / Qh$$

- 10 Student's t-test ble anvendt for statistisk analyse (Microsoft® Excel, Redmond, WA). Forskjeller ble betraktet statistisk signifikante ved nivået av $P < 0,05$.

In vitro undersøkelser

Stabilitet av Ibb i EDTA blod, serum og Tris-HCl-buffer

- 15 Som del av den analytiske forsøksvalidering, ble stabiliteten til Ibb studert i blod inneholdende EDTA, som er kjent å være en inhibitor for ALP (Bowers, Jr. og McComb, 1966; Yora og Sakagishi, 1986). Etter inkubering ved 37°C i 90 min, var det mindre enn 2% omdannelse av Ibb til IVb i blod inneholdende EDTA og i nærvær av Tris-HCl-buffer (Tabeller 30 og 31). De små prosentdelene ovenfor for omdannelse observert ved 37°C indikerer at omdannelse under prøve-lagringsbetingelser (-20°C)
- 20 er usannsynlig. Derfor er relativt minimal *ex vivo* omdannelse til IVb forventet under analysen av Ibb.

Tabell 30: *Stabilitet av Ibb i friskt EDTA blod fra rotte, hund og ape*

Tid (min)	Rotteblod (n = 2)			Hundeblod (n = 2)			Apeblod (n = 2)		
	Ibb (μ M)	IVb Dannet (μ M)	% IVb Dannet *	Ibb (μ M)	IVb Dannet (μ M)	% IVb Dannet *	Ibb (μ M)	IVb Dannet (μ M)	% IVb Dannet *
0	15	0,23	1,6	13	0,089	0,68	16	0,075	0,47
15	15	0,22	1,5	12	0,079	0,60	19	0,12	0,76
30	18	0,26	1,7	15	0,085	0,65	18	0,13	0,80
45	15	0,29	1,9	16	0,095	0,73	18	0,13	0,82
60	16	0,31	2,0	13	0,088	0,67	19	0,14	0,86
90	17	0,32	2,1	16	0,11	0,82	17	0,14	0,89

* Prosentdel dannet som startkonsentrasjon av Ibb.

Tabell 31: *Stabilitet av Ibb i friskt EDTA-blod fra menneske og Tris-HCl-buffer*

Tid (min)	Humant blod (n = 2)			Tris-HCl-buffer (n = 2)		
	Ibb (μ M)	IVb Dannet (μ M)	% IVb Dannet *	Ibb (μ M)	IVb Dannet (μ M)	% IVb Dannet *
0	16	0,099	0,62	14	0,30	2,2
15	15	0,093	0,58	12	0,30	2,1
30	16	0,097	0,60	13	0,33	2,3
45	16	0,11	0,67	12	0,41	2,9
60	16	0,10	0,65	13	0,51	3,7
90	18	0,12	0,73	12	0,51	3,6

* Prosentdel dannet som startkonsentrasjon av Ibb.

For å undersøke hydrolyse av Ibb i systemisk sirkulasjon, ble Ibb inkubert i friskt serum (rotte, hund, ape og menneske) ved 37°C i 90 min. Hastigheten av hydrolyse var raskest i apeserum, fulgt av humane, hund- og rotte-sera (Tabell 3). Omdannelsen av Ibb til IVb var nær støkiometrisk.

Serum inneholder lavere ALP-aktiviteter sammenlignet med vev (McComb *et al.*, 1979a). I tillegg inneholder serum også ALP-isoformer fra vevkilder så som ben, lever og tarm, som et resultat av enzym-lekkasje gjennom blodkar (Moss, 1983). Derfor ble hydrolyse av Ibb i serum sannsynligvis mediert av multiple isoformer av ALP.

Tabell 32: Stabilitet av Ibb i friskt serum fra rotte, hund, ape og menneske

Tid (min)	Rotteserum (n = 2)		Hundeserum (n = 2)		Apeserum (n = 2)		Humant serum (n = 2)	
	Ibb (μM)	IVb Dannet (μM)	Ibb (μM)	IVb Dannet (μM)	Ibb (μM)	IVb Dannet (μM)	Ibb (μM)	IVb Dannet (μM)
0	12	0,095	13	0,13	14	0,34	13	0,14
15	9,4	0,33	12	0,66	6,6	6,5	9,0	0,96
30	9,2	0,60	11	1,2	3,1	8,5	10	2,0
45	9,4	0,92	10	1,7	1,7	10	10	3,1
60	9,3	1,3	10	2,4	0,85	11	8,0	3,6
90	9,0	2,2	8,9	3,6	0,22	13	6,5	5,0
$t_{1/2}$ (min)*	704**		167**		15		75	

* Beregnet som forsvinning av Ibb. ** Halveringstidener er større enn inkuberingsperioden.

Hydrolyse av Ibb i nærvær av human placenta ALP

For å studere hydrolysen av Ibb i en rensset form av human ALP, ble Ibb
 5 inkubert ved 37°C (2 timer) med løsninger inneholdende human placenta ALP (10,
 100 og 1000 enheter/L). Forsvinning $t_{1/2}$ av Ibb ble bestemt (Tabell 4). Som
 forventet var hydrolysehastigheten raskere i løsningene med høyere ALP-aktiviteter.
 IVb ble også dannet tilsvarende (Fig. 14). Dette indikerer at Ibb blir hydrolysert av
 ALP avledet fra mennesker for å danne IVb.

10 Tabell 33: Hydrolyse av Ibb i human placenta ALP-løsninger

$t_{1/2}$ (min)	ALP-aktivitet (Enheter/L) (n = 2)		
	10	100	1000
$t_{1/2}$ (min)	198	16	2,0

Merk: Ibb ble inkubert med en startkonsentrasjon på 10 μM ved 37°C i 120 min.

In vivo undersøkelser

In vivo undersøkelser i rotte

15 De farmakokinetiske parametere av Ibb og IVb i rotter etter IV og oral
 administrering av Ibb er oppsummert i Tabell 34. Plasmakonsentrasjon versus tid

profiler er vist i Figur 15. For sammenligning er historiske data fra de farmakokinetiske undersøkelser av IVb i rotter også vist.

Den totale kroppsutskilling (Cl) av Ibb etter IV-administrering var 19 ml/min/kg, hvilket indikerer at Ibb er en forbindelse med lav til moderat utskilling i rotter. Eliminerings-halveringstid ($t_{1/2}$) og gjennomsnittlig oppholdstid (MRT) etter IV-administrering var henholdsvis 0,18 timer og 0,079 timer. Iab ble ikke detektert etter 2 timer. Volumet av distribusjon av Ibb ved likevekt (V_{ss}) var 0,10 L/kg, hvilket indikerer meget begrenset vevdistribusjon. Dannelse av IVb fra Ibb etter IV-administrering var rask; IVb ble detektert ved det første prøvetagnings-tidspunkt på 2 min (data ikke vist). IV AUC-forhold av IVb dannet fra Ibb vs. historisk IVb-studie var 0,62 (teoretisk verdi for fullstendig omdannelse = 1), som indikerer tilfredsstillende omdannelse av Ibb til IVb i rotter etter IV-dosering.

Ibb ble detektert (< 10 nM) i plasmaet (0,25 og 0,5 time) etter oral administrering. Tmaks for IVb etter oral administrering av Ibb var 0,83 timer, som er kortere enn historisk Tmaks for IVb på 4,7 timer, som indikerer raskere absorpsjon av IVb etter oral administrering av prodrug-forbindelsen. Den raskere absorpsjon av IVb fra prodrug er sannsynligvis resultatet av bedre vandig oppløselighet av Ibb så vel som rask hydrolyse av Ibb for å danne IVb i tarmen. Den absolutte orale biotilgjengelighet av IVb fra Ibb var 50%, lignende den historiske IVb verdi på 60% (Tabell 34). Videre var eksponering av IVb fra Ibb rotte oral doseeskaleringsstudie overlegen sammenlignet med historiske data for IVb (Tabell 31 og Fig. 14).

Tabell 34: *Farmakokinetiske parametere for Ibb and IVb etter IV og oral administrering av Ibb til rotte (gjennomsnitt $\pm$ SD, $n = 3$)*

PK-parametere	Ibb (03-002)	IVb dannet etter dosering med Ibb	Historisk IVb
IV			
Dose (mg/kg)	1,3 fri syre eller 1,0 av IVb ekv.		1
AUC _{tot} (μ M*timer)	2,5 $\pm$ 1,4	15 $\pm$ 5,4	24 $\pm$ 3,2

CL _{tot} (ml/min/kg)	19 ± 8,9	NA	1,6 ± 0,20
T _{1/2} (timer)	0,18 ± 0,050	3,0 ± 1,8	5,9 ± 4,9
MRT (timer)	0,079 ± 0,041	NA	5,6 ± 3,6
V _{dss} (L/kg)	0,10 ± 0,093	NA	0,49 ± 0,26
IV IVb AUC forhold	NA	0,62 *	NA
<i>PO</i>			
Dose (mg/kg)	6,6 fri syre eller 5,2 av IVb ekv.		5
T _{maks} (timer)	0,25	0,83 ± 0,14	4,7 ± 1,2
C _{maks} (μM)	0,008 ± 0,003	19 ± 1,8	9,5 ± 2,8
C-24 timer (μM)	ND	0,009 ± 0,004	0,16 (n = 2)
AUC _{tot} (μM*timer)	ND	62 ± 3,3	86 ± 33
T _{1/2} (timer)	ND	2,2 ± 0,11	3,7 ± 0,86
Biotilgjengelighet (%)	ND	50 **	60
PO IVb AUC forhold	NA	0,69 *	NA

NA - ikke anvendbar; ND - ikke detektert (<5 nM).

* Forholdene ble beregnet fra IVb AUC etter prodrug dosering / IVb AUC etter IVb dosering for henholdsvis IV og PO.

5 ** Beregnet fra historiske IV data for IVb.

In vivo undersøkelser i hund

De farmakokinetiske parametere for Ibb og IVb i hunder etter IV og oral administrering av Ibb er oppsummert i Tabell 35. Plasmakonsentrasjon versus tid
10 profiler er vist i Figur 16. For sammenligning er historiske data fra de farmakokinetiske undersøkelser av IVb i hunder også vist.

Cl av Ibb etter IV-administrering var 27 ml/min/kg, lignende lever-
blodstrømmen på 31 ml/min/kg i hunder, hvilket indikerer at Ibb er en forbindelse
med høy utskilling i hunder. T_{1/2} og MRT etter IV-administrering var henholdsvis
15 0,83 time og 0,21 time. MRT reflekterte et mer realistisk estimat av varigheten av Ibb i plasmaet siden plasmakonsentrasjonene av Ibb i den terminale fase var lave (Fig. 3). Ibb ble ikke detektert etter 4 timer. V_{ss} av Ibb var 0,35 L/kg, hvilket

indikerer begrenset vevdistribusjon. Dannelse av IVb fra Ibb etter IV-administrering var rask; IVb ble detektert ved første prøvetagnings-tidspunkt ved 5 min (data ikke vist). IV AUC-forhold av IVb dannet fra Ibb vs. historisk IVb-studie var 1,6, hvilket indikerer fullstendig omdannelse av Ibb til IVb i hunder etter IV-administrering.

5 Ibb ble detektert ($C_{maks} = 0,034 \text{ nM}$) i plasmaprøver på tidlige tidspunkter (opptil 2 timer i én hund) etter oral administrering. T_{maks} for IVb etter oral administrering av Ibb var 0,40 time, lignende historisk T_{maks} for IVb på 0,50 time. Den absolutte orale biotilgjengelighet av IVb fra Ibb var 310%, lignende historisk IVb data på 179%. Videre var eksponering av IVb fra Ibb hund tolerabilitetsstudie
10 (dose-eskalering) større sammenlignet med de historiske data for IVb (Tabell 31 og Fig. 15).

De terminale plasmakonsentrasjon vs. tid profiler for IVb dannet fra Ibb er lignende de historiske IVb-profiler (Fig. 16).

Tabell 35: *Farmakokinetiske parametere av Ibb og IVb etter IV og oral administrering av Ibb til hund (gjennomsnitt $\pm$ SD, n = 3)*

<i>PK-parametere</i>	<i>Ibb</i>	<i>IVb dannet etter dosering med Ibb</i>	<i>Historisk IVb</i>
<i>IV</i>			
Dose (mg/kg)	1,3 fri syre (03-001) eller 1,0 av IVb ekv.		1 (n = 2)
AUC _{tot} (μ M*timer)	1,4 $\pm$ 0,18	6,2 $\pm$ 0,80	3,8
CL _{tot} (ml/min/kg)	27 $\pm$ 3,2	NA	9,8
T _{1/2} (timer)	0,83 $\pm$ 0,58	2,0 $\pm$ 0,21	1,6
MRT (timer)	0,21 $\pm$ 0,043	NA	1,8
Vdss (L/kg)	0,35 $\pm$ 0,091	NA	1,1
IV IVb AUC forhold	NA	1,6*	NA
<i>PO</i>			
Dose (mg/kg)	7,0 fri syre (03-002) eller 5,6 av IVb ekv.		5 (n = 3)
Tmaks (timer)	0,33 $\pm$ 0,14	0,40 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,25
Cmaks (μ M)	0,034 $\pm$ 0,018	20 $\pm$ 2,4	7,7 $\pm$ 0,71
C-24 timer (μ M)	ND	0,037 $\pm$ 0,026	0,034 (n = 2)
AUC _{tot} (μ M*timer)	0,059 (n = 1)	66 $\pm$ 17	30 $\pm$ 11
T _{1/2} (timer)	NA	2,6 $\pm$ 0,21	2,7 $\pm$ 0,40
Biotilgjengelighet (%)	NA	310**	179 $\pm$ 56
PO IVb AUC forhold	NA	2,2*	NA

* Forholdene ble beregnet fra IVb AUC etter prodrug dosering/IVb etter IVb dosering for henholdsvis IV og PO.

** Beregnet fra historiske IV data for IVb

In vivo undersøkelser i ape

De farmakokinetiske parametere av Ibb og IVb i aper etter IV og oral administrering av Ibb er oppsummert i Tabell 36. Plasmakonsentrasjon versus tid

profiler er vist i Figur 17. For sammenligning er historiske data fra de farmakokinetiske undersøkelser av IVb i aper også vist.

CI av Ibb etter IV-administrering var 28 ml/min/kg, hvilket indikerer at Ibb er en forbindelse med moderat til høy utskilling i aper. $T_{1/2}$ og MRT etter IV-administrering var henholdsvis 0,10 time og 0,093 time. V_{ss} av Ibb var 0,15 L/kg, hvilket indikerer meget begrenset vedistribusjon. Dannelse av IVb fra Ibb etter IV-administrering var rask; IVb ble detektert ved første prøvetagnings-tidspunkt på 5 min (data ikke vist). IV AUC-forhold for IVb dannet fra Ibb vs. historisk IVb-studie var 1,7, hvilket indikerer fullstendig omdannelse av Ibb til IVb i aper etter IV-dosering.

Ibb ble ikke detektert (LLQ = 5 nM) i noen plasmaprøver etter oral administrering. T_{maks} for IVb etter oral administrering av Ibb var 1,5 timer, lignende historisk T_{maks} for IVb på 2,5 timer. Den absolutte orale biotilgjengelighet av IVb fra Ibb var 187%, som er høyere enn de historiske IVb data på 49% (Tabell 36).

De terminale plasmakonsentrasjon vs. tid profiler av IVb dannet fra Ibb er lignende de historiske IVb-profiler (Fig. 17).

Tabell 36: Farmakokinetiske parametere for Ibb og IVb etter IV og oral administrering av Ibb til ape (gjennomsnitt $\pm$ SD, $n = 3$)

PK-parametere	Ibb	IVb dannet etter dosering med Ibb	Historisk IVb
IV			
Dose (mg/kg)	1,3 fri syre eller 1,1 avVb ekv.		1 ($n = 3$)
AUC _{tot} (μ M*timer)	1,5 $\pm$ 0,40	19 $\pm$ 1,8	10 $\pm$ 1,2
CL _{tot} (ml/min/kg)	28 $\pm$ 6,8	NA	3,7 $\pm$ 0,43
$T_{1/2}$ (timer)	0,10 $\pm$ 0,042	6,5 $\pm$ 2,4	19 $\pm$ 20
MRT (timer)	0,093 $\pm$ 0,00076	NA	5,6 $\pm$ 6,3
Vdss (L/kg)	0,15 $\pm$ 0,039	NA	1,2 $\pm$ 1,4
IV IVb AUC	NA	1,7*	NA

forhold			
<i>PO</i>			
Dose (mg/kg)	5,8 fri syre eller 4,7 av IVb ekv.		5 (n = 2)
Tmaks (timer)	NA	1,5 ± 0,87	2,5
Cmaks (µM)	ND	31 ± 11	4,2
C-24 timer (µM)	ND	0,11 ± 0,075	0,24
AUC _{tot} (µM*timer)	ND	88 ± 4,6	24
T _{1/2} (timer)	NA	4,1 ± 1,1	11
Biotilgjengelighet (%)	NA	187**	49
PO IVb AUC forhold	NA	3,4*	NA

* Forholdene ble beregnet fra IVb AUC etter prodrug dosering / IVb for AUC etter IVb dosering henholdsvis IV og PO.

** Beregnet fra historiske IV data for IVb

5

Profilering seksjon 3:

Ytterligere undersøkelser med prodrug Icb

Enkel-dose toksikokinetisk tolerabilitetsstudie i CD-rotter

10 En 1-dag oral toksikokinetisk studie i rotter ble utført ved anvendelse av prodrug Icb (dinatriumsalt). Icb ble administrert i doser på 5, 25 og 200 mg/kg (fri syre) ved oral mating til tre hannrotter/gruppe ved anvendelse av vann som konstituent (løsningsformulering). Dosene av prodrug fri syre svarer til IVc (parental) molekvivalente doser på henholdsvis 4,5, 21 og 163 mg/kg. Slutt punktet

15 evaluert var plasma-toksikokinetikk av Icb og IVc i de individuelle rotter.

Gjennomsnittlige toksikokinetiske verdier er gitt i Tabell 37.

Tabell 37: Gjennomsnittlige toksikokinetiske verdier for Icb og IVc i hannrotter gitt ≤ 200 mg/kg av Icb som en enkel oral dose

		Doser (mg/kg)	
Icb	5	25	200
IVc molar ekv.	4,5	21	163
IVc		IVc	IVc
Cmaks (μM)	29	98	281
C _{24 timer} (μM)	0,029	0,35	58
AUC ($\mu\text{M}\cdot\text{timer}$)	109 ¹	586 ¹	2925 ²
T1/2 (timer)	3,2	2,3	3,4

Verdier representerer gjennomsnitt fra tre rotter/gruppe for Icb-data og 3 rotter/gruppe for IVc-data.

¹ AUC fra null til ∞

² AUC fra null til 24 timer

- 5 Gjennomsnittlig maksimum plasmakonsentrasjon (Cmaks) av IVc (parental) ble oppnådd innen $\approx 1,7$ time post-dose. I rotter gitt ≤ 267 mg/kg av Icb, var økningen i AUC for IVc nesten proporsjonal med Icb-dosen og Cmaks øket på en mindre enn dose-proporsjonal måte mellom 25 og 200 mg/kg av Icb. Icb ble ikke detektert i plasma til rotter gitt ≤ 25 mg/kg av Icb og meget lave konsentrasjoner ($\approx 0,02$ - $0,04$ μM) ble detektert i plasma til rotter gitt 200 mg/kg av Icb ved noen få tidspunkter.
- 10

En sammenligning av IVc AUC oppnådd i rotter gitt enten IVc (1) eller Icb, er vist i Figur 18.

- AUC for IVc er lignende etter administrering av enten parental eller prodrug i lavere doser (*f.eks.* ≤ 25 mg/kg) fordi begge kan formuleres som løsninger (PEG-400/etanol/0,1N NaOH for parental og vann for prodrug) men ved en høy dose (*f.eks.* 200 mg/kg) kan den nøytrale parentale bare formuleres som en suspensjon mens prodrug-saltet kan formuleres som en vandig løsning, som gir overlegen eksponering av IVc.
- 15

Enkel-dose toksikokinetisk og tolerabilitetsstudie i hunder

En to-fase studie ble utført for å bedømme tolerabilitet av prodrug, Icb (monotrometaminsalt) ved doser på 25, 92 eller 250 mg/kg (fri syre, molekvivalent til henholdsvis 20, 75 eller 203 mg/kg av parental IVc) og toksikokinetikk av Icb og IVc

5 (2). På dag 1 ble Icb administrert til én hund/kjønn/gruppe én gang daglig i tørr-fylte kapsler i dosene ovenfor. En 1-ukes utvaskingsperiode ble anvendt mellom doser i undersøkelsen. På dag 8 ble Icb ble administrert til én hund/kjønn/gruppe én gang daglig som en vandig løsning med 25 mg/kg eller to ganger daglig i tørr-fylte kapsler med 46 eller 125 mg/kg BID. Sluttpunktene var: kliniske tegn, kroppsvekt,

10 matkonsum, serumkjemi, hematologi og plasma-toksikokinetikk av Icb og IVc.

Plasma toksikokinetiske verdier fra individuelle hunder er vist i Tabell 38.

Tabell 38: Toksikokinetiske verdier for IVc i hunder gitt ≤ 250 mg/kg av Icb

		Doser (mg/kg)					
Icb		25 ¹		92 ²		250 ³	
IVc molar ekv.		20		75		203	
	Dyr	2101M	2201F	3101M	3201F	4101M	4201F
C _{maks} (µM)							
	dag 1	65,1	24,6	117 ⁴	157	92,6 ⁴	88,9 ⁴
	dag 8	59,4	46,8	121	104	226 ⁵	96,9 ⁴
C _{24 timer} (µM)							
	dag 1	0,008	0,688	1,90	0,202	2,61	0,704
	dag 8	0,547	0,107	10,6	0,307	54,2	1,96
AUC _{0-∞} (µM•timer)							
	dag 1	365	122	820 ⁴	730	739 ⁴	523 ⁴
	dag 8	362	173	1137	490	3783 ⁵	596 ^{4,5}
T _{1/2} (timer)							
	dag 1	1,5	4,5	3,6	2,3	4,1	3,2
	dag 8	3,3	3,4	5,2	2,4	8,0	3,3

¹ Formulert som tørr-fylte kapsler på dag 1 og som en vandig løsning på dag 8 formulert (QD dosering på begge dager)

² Som 92 mg/kg QD på dag 1 og som 46 mg/kg BID på dag 8; formulert som tørr-fylte kapsler på begge dager

³ Som 250 mg/kg QD på dag 1 og som 125 mg/kg BID på dag 8; formulert som tørr-fylte kapsler på begge dager

5 ⁴ Oppkast observert innen 2 timer av dosering med kapsel-rest til stede

⁵ Oppkast observert innen 2 timer av dosering med ingen kapsel-rest

Lave nivåer ($\leq 0,1 \mu\text{M}$) av Icb ble detektert i noen plasmaprøver på dager 1 og 8. Gjennomsnittlig maksimum plasmakonsentrasjon (C_{maks}) av IVc ble oppnådd mellom 1-2 timer post-dose for QD dosering og 1-2 timer post-andre dose for BID dosering. Med 25 mg/kg QD, ble ekvivalente C_{maks} og AUC for IVc observert når Icb ble administrert som enten tørr-fylte kapsler eller en vandig løsning. På dag 1 ble oppkast (hvitt eller brunt, stripet med rødt som inneholdt kapselrester) observert ca. 1-1,25 timer etter dosering i hunder gitt $\geq 92 \text{ mg/kg QD}$ (3101M, 4101M og 4201F), som sannsynligvis bidro til den flate eksponering mellom 92 og 250 mg/kg. På dag 8 ble oppkast observert innen 2 timer etter dosering hos begge hunder gitt 125 mg/kg BID men med forskjellige resultater. Dyr 4101M hadde vesentlig eksponering til tross for oppkast, i overensstemmelse med fravær av kapselrest i oppkastet.

20 Bare lave nivåer ($\leq 0,1 \mu\text{M}$) av Icb ble detektert i noen plasmaprøver på dag 1 og 8.

Annet enn brekning, ble ingen kliniske tegn observert og det var ingen effekter på kroppsvekt og matkonsum.

Til tross for brekningen observert i hunder, blir en høyere IVc AUC observert i hunder gitt Icb enn i hunder gitt IVc. En sammenligning av IVc AUC oppnådd i 25 hunder gitt enten Icb eller IVc (3, 4) er vist i Figur 19.

Konstituenten og formuleringer

Oppsummering av formuleringer anvendt for nøkkel PK- og sikkerhetsundersøkelser

Alle *in vivo* PK-undersøkelser i rotter, hunder og aper ble utført ved anvendelse av vandige løsninger for PO- og IV-dosering. Pre-ECN toksikologi-undersøkelser i hunder ble utført med vandige løsninger fremstilt med 20 mg/kg IVc ekvivalent dose og som medikament i kapselformuleringer i doser på 20, 75 og 203 mg/kg av IVc-ekvivalenter.

I rotte oral dose-eskaleringsstudie, ble Icb-03 dosert som vandige løsninger i doser på 4,5, 21 og 163 mg/kg av IVc-ekvivalenter. Betydelige forbedringer i AUC og Cmaks av IVc, parental forbindelse, etter oral dosering av Icb, prodrug-forbindelsen, ble observert sammenlignet med de historiske data etter IVc oral dosering.

Metabolisme og farmakokinetikk oppsummering

Oppsummering av funn og tolkning

Icb er fosfat-prodrug av N-hydroksymetyl-addukt av IVc og blir hydrolysert av alkalisk fosfatase (ALP) for å danne IVc. Etter administrering av Icb til dyr, ble derfor plasmaprøver fremstilt fra blod oppsamlet i nærvær av EDTA, en kjent ALP-inhibitor. Omdannelse av Icb til IVc var minimal (< 2%) i blodet inneholdende EDTA (rotte, hund, ape og menneske). Ingen betydelig *ex vivo* omdannelse av Icb er forventet under prøvelagring (-20°C) og analyse av Icb.

Hydrolyse av Icb ble studert i dyr og humane *in vitro* systemer. Siden multiple ALP-isoformer er bredt fordelt i forskjellige vev, ble kvantitativ *in vitro* til *in vivo* korrelasjoner ikke forsøkt (Fishman *et al.*, 1968; Komoda *et al.*, 1981; Moss, 1983; Yora og Sakagishi, 1986; Sumikawa *et al.*, 1990). Derfor ble undersøkelsene begrenset til en kvalitativ bedømmelse av ALP-avhengig hydrolyse i forskjellige vev. Icb ble hydrolysert i nærvær av serum (rotte, hund, ape og menneske), hepatocytter (rotte, hund og menneske) så vel som i human placenta ALP. Ingen omsetning ble observert i ape-hepatocytter. Omdannelsen av Icb til IVc var nær støkiometrisk. På grunn av hydrolyse i serum, kunne proteinbinding av Icb ikke bestemmes.

IVc ble raskt dannet etter IV administrering av Icb i rotter, hunder og aper. IV AUC-omdannelse-forhold var 1,0 i rotter, 0,67 i hunder og 0,90 i aper, hvilket indikerer god omdannelse fra Icb til IVc.

5 Gode orale biotilgjengeligheter (80-122%) av IVc ble observert etter administrering av Icb til rotter, hunder og aper. Mer betydningsfullt minnet høyere vandig oppløselighet av Icb den oppløsningsgrad-begrensede absorpsjon av IVc under visse doser og øket derved øket eksponering av IVc ved orale doseeskalerings- og toksikokinetiske undersøkelser sammenlignet med eksponering fra historiske IVc-undersøkelser.

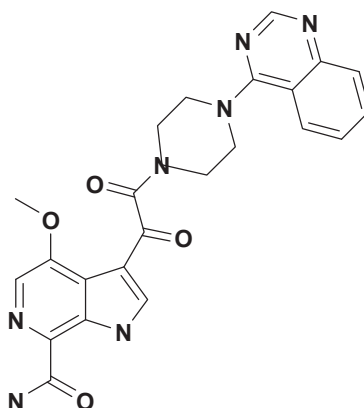
10 Metoder

Undersøkelsene beskrevet i denne rapport anvendte monotrometaminsalt av Icb, hvis ikke angitt på annen måte.

Kvantifisering av Icb og IVc ved LC/MS/MS

En LC/MS/MS metode ble utviklet for analyse av Icb og IVc i plasmaprøver
15 fra farmakokinetiske undersøkelser i dyr så vel som i acetonitril-supernatant fra *in vitro* inkuberingsundersøkelser. For analyse i plasma ble Packard Multiprobe instrument anvendt for overføring av 50 µL av hver standard, QC og plasmaprøve til en ren 96-brønn plate for proteinutfellings-ekstraksjon. Etter tilsetning av 200 µL av acetonitril inneholdende den indre standard Forbindelse X nedenfor, ble prøvene
20 virvle-blandet og den resulterende supernatant ble separert fra de utfelte proteiner ved sentrifugering i 10 min. For analyse av supernatanten dannet fra *in vitro* undersøkelser, ble et likt volum av supernatanten og acetonitril inneholdende den indre standard blandet. En aliquot av supernatanten ovenfor ble overført ved anvendelse av en Tomtec automatisert væske-håndterer til en andre ren 96-brønn
25 plate. Et likt volum av vann ble tilsatt og platen ble lukket og virvleblandet.

Forbindelse X



4-metoksy-3-(2-okso-2-(4-(kinazolin-4-yl)piperazin-1-yl)acetyl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-7-karboksamid

HPLC-systemet besto av Shimadzu LC10ADvp pumper (Columbia, MD) og en HTC PAL autosampler (Leap Technologies, Cary, NC) bundet til en Phenomenex Synergi Fusion-RP analytisk kolonne (2,0 x 50 mm, 5 μ ; Torrance, CA). Mobil fase
 5 A besto av 5 mM ammoniumformiat i vann; mobil fase B var 100% acetonitril. LC strømningshastighet var 0,4 ml/min. Den innledende mobil fase-sammensetning var 3% B, øket til 60% B over 1,75 min og holdt i 0,5 min, øket til 100% B over 0,1 min og holdt i 0,5 min, returnert til innledende betingelser over neste 0,1 min og re-ekvilibrert. Total analysetid var 4,0 min. Retensjonstiden for Icb, IVc og Forbindelse
 10 X var henholdsvis 1,2, 1,7 og 1,6 min.

HPLC-systemet ble tilpasset et Sciex API4000 trippel kvadrupol massespektrometer (Toronto, Canada) utstyrt med Turboionspray-kilde satt til 550°C og ionesprayspenning satt til 4,5 kV. UHP nitrogen ble anvendt som forstøver og hjelpe-gass med henholdsvis trykk på 5,6 kg/cm² og 7 L/min. Kollisjonsenergier for
 15 Icb, IVc og Forbindelse X var henholdsvis 23, 29 og 37 volt. Data-oppsamling anvendte selektert reaksjonsovervåkning (SRM). Ioner som representerer positiv ionemodus (M+H)⁺ arter for Icb, IVc og den indre standard ble selektert i MS1 og kollisjons-dissosiert med nitrogen og optimaliserte kollisjonsenergier for å danne spesifikke produksjoner deretter overvåket ved MS2. SRM-omdannelser for Icb, IVc
 20 og Forbindelse X var henholdsvis m/z 584→486, 474→256 og 460→218.

Standardkurver i området fra 5 nM til 10 µM ble fremstilt fra lagerløsninger og serielt fortynnet i matriks for både Icb og IVc. Standardkurver ble aliquotert in duplo, ekstrahert med prøvene og injisert i begynnelsen, midten og enden av den analytiske sekvens. Standardkurvene ble tilpasset en lineær regresjon vektet ved
 5 resiprok konsentrasjon $1/x^2$. Data og kromatografiske topper ble prosessert og konsentrasjoner av standarder og ukjente ble kvantifisert ved anvendelse av PEBiosystems Analyst™ 1.1.

In vitro metoder

(1) *Stabilitet av Icb i EDTA blod, serum og Tris-HCl-buffer*

10 Stabiliteten til Icb ble studert i friskt blod og serum fra rotte, hund, ape og menneske (n = 2). Blod ble oppsamlet i vacutainere inneholdende K₂EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Serum ble oppsamlet i vacutainere inneholdende ingen antikoagulant. Icb ble inkubert med en startkonsentrasjon på omtrent 10 µM i 90 min ved 37°C. Serielle prøver ble tatt på forhåndsbestemte tider. Aliquoter av
 15 blodprøver (200 µL) ble først blandet med 100 µL av vann fulgt av 400 µL av acetonitril. Serumsprøvene (50 µL) ble satt til mikrotainere inneholdende K₂EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) fulgt av tilsetning av 100 µL av acetonitril. Supernatanten ble analysert for både Icb og IVc ved LC/MS/MS.

Stabiliteten til Icb ble også evaluert, som beskrevet ovenfor, i Tris-HCl-buffer
 20 (0,1 M, pH 7,5).

(2) *Hydrolyse av Icb i nærvær av human placenta ALP*

Faststoff human placenta ALP ble oppnådd fra Sigma (P-3895, St. Louis, MO). En løsning av 1000 enheter/L ble fremstilt i Tris-HCl-buffer (0,1 M, pH 7,5). Løsninger av 100 og 10 enheter/L ble oppnådd ved seriefortynning. Icb ble inkubert i
 25 10, 100 og 1000 enheter/L løsninger (n = 2) ved 37°C i 2 timer. Utgangskonsentrasjon av Icb i inkuberingen var 10 µM. Aliquoter av 100 µL prøver ble tatt på forhånds-bestemte tider og tilsatt til K₂EDTA mikrotainere fulgt av tilsetning av 200 µL av acetonitril. Supernatanten ble analysert for både Icb og IVc ved LC/MS/MS.

(1) *In vivo undersøkelser i rotte*

Sprague-Dawley hannrotter (300–350 g, Hilltop Lab Animals, Inc., Scottsdale, PA) med kanyler implantert i jugular-venen ble anvendt. Rottene ble fastet natten over ved de PO farmakokinetiske undersøkelser. Blodprøver ble
5 oppsamlet fra jugular-venen.

Ved IV-studien ble Icb gitt med 1,4 mg/kg (fri syre eller 1,1 mg/kg av IVc ekvivalent) som bolus over 0,5 min (n = 3). Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 1,4 mg/ml og doseringsvolumet var 1 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 2, 10, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

10 Ved PO-studien ble Icb administrert med 6,9 mg/kg (fri syre eller 5,6 mg/kg av IVc ekvivalent) ved oral mating (n = 3). Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 1,4 mg/ml og doseringsvolumet var 5 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

(2) *In vivo undersøkelser i hund*

15 IV- og PO-undersøkelser av Icb ble utført i en kryssundersøkelse i tre beagle hannhunder ($12 \pm 2,8$ kg, Marshall Farms USA Inc., North Rose, NY). Det var en to-ukers utvaskingsperiode mellom IV- og PO-undersøkelsene.

Ved IV-studie ble Icb infusert via kefalvenen med 1,3 mg/kg (fri syre eller 1,0 mg/kg av IVc ekvivalent) over 5 min med en konstant hastighet på 0,1 ml/kg/min.
20 Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 2,6 mg/ml og doseringsvolumet var 0,5 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet fra femoral-arterien før dosering og 5, 10, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

Ved PO-studien ble hundene fastet natten over før dosering. Icb ble administrert ved oral mating med 6,0 mg/kg (fri syre eller 4,9 mg/kg av IVc
25 ekvivalent). Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 12 mg/ml og doseringsvolumet var 0,5 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

(3) *In vivo undersøkelser i ape*

IV- og PO-undersøkelser av Icb ble utført i en kryssundersøkelse i tre cynomolgus hannaper ($10 \pm 1,6$ kg, Charles River Biomedical Research Foundation, Houston, TX). Det var en to-ukers utvaskingsperiode mellom IV- og PO-undersøkelsene.

5 Ved IV-studien ble Icb infusert via femoral-venen med 1,4 mg/kg (fri syre eller 1,1 mg/kg av IVc ekvivalent) over 5 min med en konstant hastighet på 0,1 ml/kg/min. Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 2,8 mg/ml og doseringsvolumet var 0,5 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet fra femoral-arterien før dosering og 5, 10, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

10 Ved PO-studien ble apene fastet natten over før dosering. Icb ble administrert ved oral mating med 4,9 mg/kg (fri syre eller 4,0 mg/kg av IVc ekvivalent). Konsentrasjonen av doseringsløsningen var 9,8 mg/ml og doseringsvolumet var 0,5 ml/kg. Serielle blodprøver ble oppsamlet før dosering og 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8 og 24 timer etter dosering.

15 (4) *Dataanalyse*

Alle resultater er uttrykt som gjennomsnitt $\pm$ SD, hvis ikke spesifisert på annen måte.

De farmakokinetiske parametere for Icb og IVc ble beregnet ved non-compartmental analyse ved anvendelse av KINETICA™ programvare (versjon 4.0.2, InnaPhase Co., Philadelphia, PA). Cmaks og Tmaks verdier ble registrert direkte fra eksperimentelle observasjoner. AUC_{0-n} og AUC_{tot} verdier ble beregnet ved anvendelse av blandede log-lineære trapezoide summasjoner. Den totale kroppsutskilling (Cl), gjennomsnittlig oppholdstid (MRT) og likevekt volum-distribusjon (Vss) ble også beregnet etter intravenøs administrering. Den absolutte
25 orale biotilgjengelighet (uttrykt som %) ble beregnet ved å beregne forholdet av dose-normaliserte AUC-verdier etter orale doser med de etter intravenøse doser.

In vitro naturlig utskilling av Icb i hepatocytter (Cl_{int}) ble beregnet som følger:

$$Cl_{int} (\mu\text{L}/\text{min}/\text{million celler}) = \text{Rate} / C_E$$

hvor Rate er graden av metabolisme i hepatocytter (pmol/min/million celler) og C_E er konsentrasjonen av Icb i inkuberingen.

In vivo naturlig hepatisk utskilling av Icb ($Cl_{int, in vivo}$) ble beregnet som følger:

$$Cl_{int, in vivo} \text{ (ml/min/kg)} = Cl_{int} \times \frac{120 \text{ (million celler)}}{g \text{ lever}} \times \frac{\chi \text{ g lever}}{kg \text{ kroppsvekt}} \times \frac{1}{1000}$$

- 5 hvor χ er 40, 32, 30 og 26 g lever/kg kroppsvekt for henholdsvis rotte, hund, ape og menneske (Davis og Morris, 1993).

Hepatisk utskilling Cl_H ble beregnet fra den følgende ligning ved anvendelse av vel-rørt modell:

$$Cl_H \text{ (ml/min/kg)} = \frac{Qh \times Cl_{int, in vivo}}{Qh + Cl_{int, in vivo}}$$

- 10 hvor Qh er lever-blodstrømmen på 55, 31, 44 og 21 ml/min/kg for henholdsvis rotte, hund, ape og menneske (Davis og Morris, 1993).

Hepatisk ekstraksjonsforhold (ER) ble beregnet som følger:

$$ER = Cl_H / Qh$$

Student's t-test ble anvendt for statistisk analyse (Microsoft® Excel, Redmond, WA).

- 15 Forskjeller ble betraktet statistisk signifikante på nivået av $P < 0,05$.

In vitro undersøkelser

Stabilitet av Icb i EDTA blod, serum og Tris-HCl-buffer

- 20 Som del av den analytiske forsøksvalidering ble stabiliteten til Icb studert i blod inneholdende EDTA, som er kjent å være en inhibitor for alkaliske fosfataser (Bowers, Jr. og McComb, 1966; Yora og Sakagishi, 1986). Etter inkubering ved 37°C i 90 min, var det mindre enn 2% omdannelse av Icb til IVc i blod inneholdende EDTA og i nærvær av Tris-HCl-buffer (Tabeller 39 og 40). Under prøvelagringsbetingelser på -20°C, er de små prosentdelene ovenfor av omdannelse observert ved

37°C ikke forventet å innføre noen som helst betydelig *ex vivo* omdannelse under analysen av Icb.

Tabell 39: Stabilitet av Icb i friskt EDTA blod fra rotte, hund og ape

Tid (min)	Rotteblod (n = 2)			Hundeblood (n = 2)			Apeblod (n = 2)		
	Icb (μM)	IVc Dannet (μM)	% IVc Dannet *	Icb (μM)	IVc Dannet (μM)	% IVc Dannet *	Icb (μM)	IVc Dannet (μM)	% IVc Dannet *
0	12	0,21	1,7	10	0,087	0,72	12	0,26	2,2
15	11	0,26	2,2	10	0,087	0,72	12	0,17	1,4
30	15	0,37	3,1	9,4	0,087	0,72	11	0,16	1,4
45	14	0,38	3,2	11	0,10	0,86	12	0,19	1,6
60	14	0,41	3,4	11	0,10	0,84	11	0,19	1,6
90	12	0,39	3,3	11	0,11	0,91	11	0,19	1,5

* Prosentdel dannet som start-konsentrasjon av Icb

5 Tabell 40: Stabilitet av Icb i friskt EDTA blod fra menneske og Tris-HCl-buffer

Tid (min)	Humant blod (n = 2)			Tris-HCl-buffer (n = 2)		
	Icb (μM)	IVc Dannet (μM)	% IVc Dannet *	Icb (μM)	IVc Dannet (μM)	% IVc Dannet *
0	11	0,083	0,69	11	0,17	1,5
15	11	0,088	0,74	11	0,18	1,5
30	13	0,091	0,76	11	0,23	1,9
45	12	0,10	0,80	11	0,24	2,0
60	11	0,092	0,76	10	0,26	2,2
90	11	0,091	0,76	11	0,30	2,5

* Prosentdel dannet som start-konsentrasjon av Icb

For å undersøke hydrolyse av Icb i systemisk sirkulasjon, ble Icb inkubert i friskt serum (rotte, hund, ape og menneske) ved 37°C i 90 min. Hastigheten av hydrolyse var raskest i apeserum, fulgt av rotte-, menneske- og hunde-sera (Tabell 10 41). Omdannelse av Icb til IVc var nær støkiometrisk.

Serum inneholder lavere ALP-aktiviteter sammenlignet med vev (McComb *et al.*, 1979a). I tillegg inneholder serum også ALP-isoformer fra vevkilder så som ben, lever og tarm, som et resultat av enzymlekkasje gjennom blodkar (Moss, 1983).

Derfor ble hydrolyse av Icb i serum sannsynligvis mediert av multiple isoformer av ALP.

Tabell 41: Stabilitet av Icb i friskt serum fra rotte, hund, ape og menneske

Tid (min)	Rotteserum (n = 2)		Hundeserum (n = 2)		Apeserum (n = 2)		Humant serum (n = 2)	
	Icb (μM)	IVc Dannet (μM)	Icb (μM)	IVc Dannet (μM)	Icb (μM)	IVc Dannet (μM)	Icb (μM)	IVc Dannet (μM)
0	7,6	0,23	10	0,046	9,3	0,15	10	0,087
15	6,5	1,4	9,7	0,52	7,1	2,4	8,8	1,2
30	4,9	3,4	9,1	1,5	4,5	4,8	7,7	2,7
45	4,4	5,6	8,5	2,3	3,3	7,2	6,6	3,9
60	3,4	7,1	8,1	3,0	2,3	8,4	5,9	4,6
90	2,1	8,7	6,9	4,0	1,1	9,6	4,7	6,1
$t_{1/2}$ (min)*	42		156**		30		89	

* Beregnet som forsvinning av Icb. ** Halveringstidene er større enn inkuberingsperioden.

5 Hydrolyse av Icb i nærvær av human placenta ALP

For å studere hydrolyse av Icb i en renset form av human ALP, ble Icb inkubert ved 37°C (2 timer) med løsninger inneholdende human placenta ALP (10, 100 og 1000 enheter/L). Forsvinning $t_{1/2}$ av Icb ble bestemt (Tabell 42). Som forventet var hastigheten av hydrolyse raskere i løsningene med høyere ALP-aktiviteter. IVc ble også dannet tilsvarende (Fig. 20). Dette indikerer at Icb blir hydrolysert av ALP avledet fra mennesker for å danne IVc.

Tabell 42: Hydrolyse av Icb i humane placenta ALP-løsninger

	ALP-aktivitet (Enheter/L) (n = 2)		
	10	100	1000
$t_{1/2}$ (min)	250	29	2,4

Merk: Icb ble inkubert ved en start-konsentrasjon på 10 μM ved 37°C i 120 min.

*In vivo undersøkelser**In vivo undersøkelser i rotte*

De farmakokinetiske parametere for Icb og IVc i rotter etter IV og oral administrering av Icb er oppsummert i Tabell 43. Plasmakonsentrasjon versus tid
5 profiler er vist i Figur 21. For sammenligning er historiske data fra de farmakokinetiske undersøkelser av IVc i rotter også vist.

Den totale kroppsutskilling (Cl) av Icb etter IV-administrering var 49 ml/min/kg, hvilket indikerer at Icb er en forbindelse med høy utskilling i rotter. Eliminerings-halveringstid ($t_{1/2}$) og gjennomsnittlig oppholdstid (MRT) etter IV-
10 administrering var henholdsvis 0,084 time og 0,072 time. Volumet av distribusjon av Icb ved likevekt (V_{ss}) var 0,21 L/kg, hvilket indikerer meget begrenset vevdistribusjon. Dannelse av IVc fra Icb etter IV-administrering var rask; IVc ble detektert ved første prøvetagningstidspunkt på 2 min (data ikke vist). IV AUC-forhold for IVc dannet fra Icb vs. fra historisk IVc-studie var 1,0 (teoretisk verdi for
15 fullstendig omdannelse = 1), hvilket indikerer fullstendig omdannelse av Icb til IVc.

Icb ble ikke detektert (LLQ = 5 nM) i noen plasmaprøver etter oral administrering. Tmaks av IVc etter oral administrering av Icb var 0,80 time, som er kortere enn historisk Tmaks for IVc på 4,0 timer, som indikerer raskere absorpsjon av IVc etter oral administrering av prodrug-forbindelsen. Den raskere absorpsjon av
20 IVc fra prodrug er sannsynligvis resultatet av bedre vandig oppløselighet av Icb så vel som rask hydrolyse av Icb for å danne IVc i tarmen. Den absolutte orale biotilgjengelighet av IVc fra Icb var 80%, lignende den historiske IVc-verdi på 82% (Tabell 43). Videre var eksponering av IVc fra Icb rotte oral doseeskalerings-studie overlegen sammenlignet med de historiske data for IVc (Tabell 37 og Fig. 18).

25 De terminale plasmakonsentrasjon vs. tid profiler av IVc dannet fra Icb er lignende de historiske IVc profiler (Fig. 21).

Tabell 43: *Farmakokinetiske parametere for Icb og IVc etter IV og oral administrering av Icb i rotte (gjennomsnitt $\pm$ SD, n = 3)*

<i>PK-parametere</i>	<i>Icb (03-002)</i>	<i>IVc dannet etter dosering med Icb</i>	<i>Historisk IVc</i>
<i>IV</i>			
Dose (mg/kg)	1,4 fri syre eller 1,1 av IVc ekv.		1
AUC _{tot} (μ M*timer)	0,84 $\pm$ 0,24	30 $\pm$ 4,1	27 $\pm$ 4,0
CL _{tot} (ml/min/kg)	49 $\pm$ 12	NA	1,3 $\pm$ 0,19
T _{1/2} (timer)	0,084 $\pm$ 0,012	2,9 $\pm$ 0,14	4,3 $\pm$ 1,1
MRT (timer)	0,072 $\pm$ 0,008	NA	4,5 $\pm$ 0,77
Vdss (L/kg)	0,21 $\pm$ 0,033	NA	0,36 $\pm$ 0,098
IV IVc AUC- forhold	NA	1,0*	NA
<i>PO</i>			
Dose (mg/kg)	6,9 fri syre eller 5,6 av IVc ekv.		5
Tmaks (timer)	ND	0,80 $\pm$ 0,30	4,0
Cmaks (μ M)	ND	23 $\pm$ 0,60	13 $\pm$ 3,6
C-24 timer (μ M)	ND	0,14 $\pm$ 0,063	0,19 $\pm$ 0,048
AUC _{tot} (μ M*timer)	ND	122 $\pm$ 17	111 $\pm$ 25
T _{1/2} (timer)	ND	3,1 $\pm$ 0,42	3,0 $\pm$ 0,28
Biotilgjengelighet (%)	ND	80**	82
PO IVc AUC- forhold	NA	0,98*	NA

NA - ikke anvendbar; ND - ikke detektert (<5 nM).

5 * Forholdene ble beregnet fra IVc AUC etter prodrug-dosering / IVc AUC etter IVc dosering for henholdsvis IV og PO.

** Beregnet fra historiske IV data for IVc

In vivo undersøkelser i hund

10 De farmakokinetiske parametere for Icb og IVc i hunder etter IV og oral administrering av Icb er oppsummert i Tabell 44. Plasmakonsentrasjon versus tid

profiler er vist i Figur 22. For sammenligning er de historiske data fra de farmakokinetiske undersøkelser av IVc i hunder også vist.

Cl av Icb etter IV administrering var 64 ml/min/kg, betydelig høyere enn lever-blodstrømmen på 31 ml/min/kg i hunder og indikerer involvering av ekstrahepatisk hydrolyse og/eller andre ruter for eliminering (f.eks. nyre-ekskresjon). $T_{1/2}$ og MRT etter IV-administrering var henholdsvis 0,25 time og 0,14 time. Icb ble ikke detektert etter 2 timer. Vss av Icb var 0,50 L/kg, hvilket indikerer lavt potensiale for vevdistribusjon. Dannelse av IVc fra Icb etter IV-administrering var rask; IVc ble detektert ved første prøvetagningstidspunkt på 5 min (data ikke vist). IV AUC-forhold for IVc dannet fra Icb vs. fra historisk IVc-studie var 0,67, hvilket indikerer moderat omdannelse av Icb til IVc i hunder etter IV-administrering.

Icb ble ikke detektert (LLQ = 5 nM) i noen plasmaprøver etter oral administrering. Tmaks av IVc etter oral administrering av Icb var 0,58 time, som er kortere enn historisk Tmaks for IVc på 1,3 timer, som indikerer raskere absorpsjon av IVc etter oral administrering av prodrug-forbindelsen. Den absolutte orale biotilgjengelighet av IVc fra Icb var 104%, lignende de historiske IVc-data på 89%. Videre var eksponering av IVc fra Icb hund tolerabilitetsstudie (doseeskalerings) bedre sammenlignet med historiske data for IVc (Tabell 41 og Fig. 21).

De terminale plasmakonsentrasjon vs. tid profiler av IVc dannet fra Icb er lignende de historiske IVc-profiler (Fig. 22).

Tabell 44: Farmakokinetiske parametere for Icb og IVc etter IV og oral administrering av Icb i hund (gjennomsnittlig $\pm$ SD, $n = 3$)

PK-parametere	Icb (03-002)	IVc dannet etter dosering med Icb	Historisk IVc
IV			
Dose (mg/kg)	1,28 fri syre eller 1,04 av IVc ekv.		1
AUC _{tot} (μ M*timer)	0,61 $\pm$ 0,20	9,8 $\pm$ 3,6	14 $\pm$ 2,5
CL _{tot} (ml/min/kg)	64 $\pm$ 18	NA	2,6 $\pm$ 0,46
$T_{1/2}$ (timer)	0,25 $\pm$ 0,10	4,1 $\pm$ 0,54	4,6 $\pm$ 1,7

MRT (timer)	0,14 ± 0,021	NA	6,3 ± 1,9
Vdss (L/kg)	0,50 ± 0,088	NA	0,93 ± 0,14
IV IVc AUC-forhold	NA	0,67*	NA
<i>PO</i>			
Dose (mg/kg)	6,05 fri syre eller 4,92 av IVc ekv.		5
Tmaks (timer)	ND	0,58 ± 0,38	1,3 ± 0,58
Cmaks (µM)	ND	16 ± 3,9	9,6 ± 0,87
C-24 timer (µM)	ND	0,22 ± 0,16	0,15 ± 0,027
AUC _{tot} (µM*timer)	ND	72 ± 27	63 ± 2,4
T _{1/2} (timer)	ND	4,2 ± 0,58	3,6 ± 0,042
Biotilgjengelighet (%)	ND	104**	89 ± 12
PO IVc AUC-forhold	NA	1,2*	NA

* Forholdene ble beregnet fra IVc AUC etter prodrug-dosering / IVc AUC etter IVc dosering for henholdsvis IV og PO.

** Beregnet fra historiske IV data for IVc

5 *In vivo undersøkelser i ape*

De farmakokinetiske parametere for Icb og IVc i aper etter IV og oral administrering av Icb er oppsummert i Tabell 45. Plasmakonsentrasjon versus tid profiler er vist i Figur 23. For sammenligning er de historiske data fra de farmakokinetiske undersøkelser av IVc i aper også vist.

- 10 Cl av Icb etter IV-administrering var 47 ml/min/kg, lignende lever-blodstrømmen på 44 ml/min/kg i aper, hvilket indikerer at Icb er en forbindelse med høy utskilling i aper. T_{1/2} og MRT etter IV-administrering var henholdsvis 0,089 time og 0,097 time. Vss for Icb var 0,27 L/kg, hvilket indikerer begrenset vevdistribusjon. Dannelse av IVc fra Icb etter IV-administrering var rask; IVc ble
- 15 detektert ved prøvetagningstidpunkt på 5 min (data ikke vist). IV AUC-forhold for IVc dannet fra Icb vs. fra historisk IVc-studie var 0,90, hvilket indikerer god omdannelse av Icb til IVc.

Icb ble ikke detektert (LLQ = 5 nM) i noen plasmaprøver etter oral administrering. Tmaks av IVc etter oral administrering av Icb var 0,92 time, som er kortere enn historisk Tmaks for IVc på 2,3 timer, hvilket indikerer raskere absorpsjon av IVc etter oral administrering av prodrug-forbindelsen. Den absolutte orale biotilgjengelighet av IVc fra Icb var 122%, som er høyere enn historiske IVc data på 64% (Tabell 45).

De terminale plasmakonsentrasjon vs. tid profiler for IVc dannet fra Icb er lignende de historiske IVc-profiler (Fig. 23).

Tabell 45: Farmakokinetiske parametere for Icb og IVc etter IV og oral administrering av Icb i ape (gjennomsnitt $\pm$ SD, n = 3)

PK-parametere	Icb (03-002)	IVc dannet etter dosering med Icb	Historisk IVc
IV			
Dose (mg/kg)	1,4 fri syre eller 1,1 av IVc ekv.		1
AUC _{tot} (μM*timer)	0,87 $\pm$ 0,14	5,0 $\pm$ 0,57	5,0 $\pm$ 1,0
CL _{tot} (ml/min/kg)	47 $\pm$ 8,1	NA	7,5 $\pm$ 1,5
T _{1/2} (timer)	0,089 $\pm$ 0,031	1,2 $\pm$ 0,063	0,92 $\pm$ 0,30
MRT (timer)	0,097 $\pm$ 0,003	NA	0,87 $\pm$ 0,085
Vdss (L/kg)	0,27 $\pm$ 0,043	NA	0,40 $\pm$ 0,097
IV IVc AUC- forhold	NA	0,90*	NA
PO			
Dose (mg/kg)	4,9 fri syre eller 4,0 of IVc ekv.		5
Tmaks (timer)	ND	0,92 $\pm$ 0,14	2,3 $\pm$ 1,5
Cmaks (μM)	ND	9,5 $\pm$ 1,2	4,2 $\pm$ 2,6
C-24 timer (μM)	ND	0,007 $\pm$ 0,002	0,017 $\pm$ 0,011
AUC _{tot} (μM*timer)	ND	24 $\pm$ 4,6	14 $\pm$ 4,0
T _{1/2} (timer)	ND	3,2 $\pm$ 0,37	3,3 $\pm$ 0,53
Biotilgjengelighet (%)	ND	122**	64 $\pm$ 29
PO IVc AUC- forhold	NA	2,1*	NA

* Forholdene ble beregnet fra IVc AUC etter prodrug dosering / IVc AUC etter oral dosering for henholdsvis IV og PO.

** Beregnet fra historiske IV data for IVc

5 *Ytterligere profilering seksjon 4:*

Ytterligere undersøkelser med prodrug Ie

Prodrug Ie ble dosert oralt til rotter ved anvendelse av metodikk lignende den beskrevet ovenfor for de andre prodrug. Etter PO-dosering ble parentalt molekyl IVe
10 detektert i plasma.

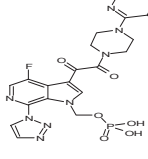
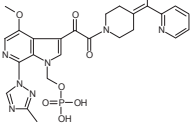
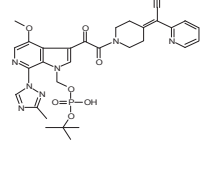
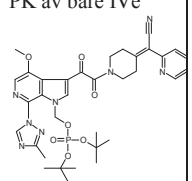
Ytterligere profiling seksjon 5:

Ytterligere undersøkelser med prodrug If

Prodrug If ble dosert oralt til rotter ved anvendelse av metodikk lignende den
15 beskrevet ovenfor for andre prodrug. Etter PO-dosering ble parentalt molekyl IVf detektert i plasma.

Den følgende Tabell 47 viser dataene omfattet av orale doseringsundersøkelser i rotter som beskrevet i ytterligere profileringsseksjoner 4 og 5.

20

<i>Forbindelse dosert</i>	<i>If</i>	<i>Ie</i>	<i>II''e</i>	<i>Ile</i>
Detaljer og struktur av forbindelse dosert	Fosfat prodrug av IVf PO 1,3 mg/kg (IVf ekv) PK av bare IVf 	Fosfat-prodrug av IVe PO 6,0 mg/kg (IVe ekv) PK av bare IVe 	Monoester prodrug av IVe PO 6,0 mg/kg (IVe ekv) PK av bare IVe 	Diester prodrug av IVe PO 7,0 mg/kg (IVe ekv) PK av bare IVe 
Cmaks p.o. (nM)	2960 ± 859	10058 ± 2755	4678 ± 3295	1545 ± 332
Tmaks p.o. (timer)	1,3 ± 0,66	0,58 ± 0,14	0,92 ± 0,95	3,3 ± 1,2
F (%) (ber. for historiske IV data for parental)	91	28	11	7,7
AUC p.o. (µM*timer)	12,5 ± 5,1	22 ± 6,3	8,7 ± 2,7	6,9 ± 1,8
Cp @ 24 timer p.o. (nM)	Ikke detektert	53,9 (1/3 rotter)	Ikke detektert	8,17 (1/3 rotter)
CL i.v. (ml/min/kg)	Ingen IV	Ingen IV	Ingen IV	Ingen IV
Vss i.v. (L/kg)	Ingen IV	Ingen IV	Ingen IV	Ingen IV
T1/2 p.o. (timer)	1,9 ± 0,66			

T1/2 i.v. (timer)	Ingen IV	Ingen IV	Ingen IV	Ingen IV
-------------------	----------	----------	----------	----------

Notat om deteksjon av prodrug i plasma og annet vev. Når en saltform av et prodrug blir administrert, er det forstått at omkasting i kroppen av saltet kan forekomme.

Imidlertid detekterer forsøkene anvendt for å kvantifisere prodrug i de aktuelle dyremodeller ved analyse den frie syren av fosfatet. Denne analysering av for eksempel et lysinsalt Iab eller en fri syre Iac er antatt å være analyserende av samme arter og er ikke ment å implisere at artene detektert faktisk var lysinsaltet. Ved denne anvendelse, gjelder denne konvensjon prøver oppnådd bare fra in vivo undersøkelser og prøver

10

Biologi

- “μM” betyr mikromolar;
- “ml” betyr milliliter;
- 15 • “μl” betyr mikroliter;
- “mg” betyr milligram;
- “DMSO” betyr dimetylsulfoksyd

Materialene og eksperimentelle prosedyrer anvendt for å bedømme anti-HIV-aktivitet til stamforbindelsene som er dannet fra prodrug-forbindelsen in vivo er beskrevet nedenfor:

Celler:

- 25 • Den humane T-cellelinje MT-2 og PM1 (AIDS Research and Reference Reagent Program, National Institutes of Health) ble holdt og propagert i medium RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA), inneholdende 10% føtalt bovint serum. (FBS, Sigma, St. Louis, MO).

30 *Virus:*

- Laboratoriestammer av HIV-1 - den T-tropiske stamme LAI ble oppnådd gjennom AIDS Research and Reference Reagent Program, National Institutes of

Health. De ble amplifisert i MT-2 celler og titrert ved anvendelse av et virus utbytte forsøk (2). Deteksjon ble oppnådd gjennom anvendelse av et revers transkriptase forsøk (3), tilpasset for anvendelse med en Scintillation Proximity deteksjonsprotokoll (1) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

5

Forsøk

1. Forbindelse-lagere ble fremstilt ved oppløsning i DMSO til 30 mM. For fortynningsplater, ble forbindelser serielt fortynnet 3 ganger i DMSO, ved
10 anvendelse av 96-brønn polypropylen-plater, slik at konsentrasjonene var 100 ganger større enn den endelige forsøkskonsentrasjon. For antivirale og cytotoksisitetsforsøk, ble 2 µl tilsatt pr. brønn (1% endelig DMSO-konsentrasjon).
2. Forbindelser ble tilsatt fra fortynningsplater til 96-brønn vevkulturplater
15 inneholdende 100 µl medium RPMI-1640, inneholdende 10 % føtalt bovint serum i en konsentrasjon på <20 µM.
3. For antivirale forsøk ble celler infisert med en infeksjonsmultiplisitet på 0,005. Etter 1 time ved 37°C ble infiserte celler fortynnet til 200.000 celler pr. ml i medium RPMI-1640, inneholdende 10% føtalt bovint serum. 100 µl av denne
20 løsningen ble tilsatt pr. brønn, hvilket ga et endelig volum på 200 µl.
4. Plater ble inkubert ved 37°C i en fuktet CO₂ inkubator og høstet etter 5 dager.
5. Virale infeksjoner ble overvåket ved å måle revers transkriptase-aktivitet i supernatantene av infiserte brønner som beskrevet ovenfor. Prosent hemning for hver forbindelse ble beregnet ved kvantifisering av utlesningsnivå i celler infisert
25 i nærvær av hver forbindelse som en prosentdel av den observert for celler infisert i fravær av forbindelse og subtraksjon av en slik bestemt verdi fra 100.
6. EC₅₀ tilveiebringer en metode for sammenligning av antiviral potens av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse. Den effektive konsentrasjon for 50% hemning (EC₅₀) ble beregnet med Microsoft Excel Xlfit kurvetilpasnings-programvare. For hver forbindelse ble kurver dannet fra prosent hemning
30 beregnet ved 8 forskjellige konsentrasjoner ved anvendelse av en fire paramenter logistisk modell (modell 205). EC₅₀-data for forbindelsene er vist i Tabell 48.

Resultater

Biologisk datanøkkel for EC₅₀

Forbindelser med EC ₅₀ >5μM	Forbindelser med EC ₅₀ >1 μM men <5μM	Forbindelser med EC ₅₀ >50nM men ennå ikke testet ved høyere konsentrasjoner	Forbindelser med EC ₅₀ < 1 μM
Gruppe C	Gruppe B	Gruppe A'	Gruppe A

5

Tabell 48. Antiviral aktivitet av forbindelser IV (parentale molekyler)

	Forbindelse IVa	Forbindelse IVb (natriumsalt)	Forbindelse IVc (syreform)	Forbindelse IVd (syreform)
EC ₅₀ -LAI	A	A	A	A

10 Anti-HIV-aktivitet til prodrug-forbindelsen selv er ikke relevant siden de parentale molekyler, som vist ved undersøkelsene nedenfor, blir dannet fra prodrug in vivo og er den aktive bestanddel og også de vesentlige arter i plasma. I tillegg kan prodrug langsomt omdannes til parentale i in vitro forsøket i det minste i en begrenset grad og således komplisere tolkning av de antivirale data.

15 Cytotoksisitet

1. Cytotoksisitet-forsøk ble utført med samme MT-2-celler ved anvendelse av metodikk velkjent på området. Denne metoden er beskrevet i litteraturen (4). Kort angitt ble celler inkubert i nærvær av medikament i seks dager, hvorefter
 20 celle-levedyktighet ble målt ved anvendelse av et redoks-aktivt farge-reduksjons-forsøk. 50 μl av XTT-reagens (1 mg/ml 2,3-bis[2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-karboksanilid, 10 μg/ml fenazin-metosulfat oppløst i fosfatbufret saltløsning) ble satt til hver brønn og inkubert i 3 timer. Farge-dannelse av aktivt respirerende celler ble kvantifisert i en plateleser ved 450 nm
 25 og anvendt for å bestemme CC₅₀. CC₅₀ for IVa, IVb, IVc og IVd parentale molekyler var større enn 10 μM når målt ved denne metoden. Cytotoksisitetsdata

er en sekundær screening som viser at forbindelsene ikke ikke-spesifikt dreper cellene som ble anvendt i det antivirale forsøk og gir ytterligere støtte for påstanden at forbindelsene har antiviral aktivitet.

Således, i henhold til foreliggende oppfinnelse tilveiebringes videre en metode
5 for behandling og et farmasøytisk preparat for behandling av virale infeksjoner så som HIV-infeksjon og AIDS. Behandlingen involverer administrering til en pasient med behov for slik behandling av et farmasøytisk preparat omfattende en farmasøytisk bærer og en terapeutisk effektiv mengde av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse.

10 Det farmasøytiske preparatet kan være i form av oralt administrerbare suspensjoner eller tabletter; nesespray-preparater, sterile injiserbare preparater, for eksempel som sterile injiserbare vandige eller oljeaktige suspensjoner eller suppositorier.

Når administrert oralt som en suspensjon blir disse preparater fremstilt i
15 henhold til teknikker velkjent på området farmasøytisk formulering og kan inneholde mikrokrystallinsk cellulose for å gi volum, alginsyre eller natriumalginat som et suspenderingsmiddel, metylcellulose som en viskositetsforbedrer og søtnings/smaksgivende midler kjent på området. Som tabletter for umiddelbar frigjøring kan disse preparater inneholde mikrokrystallinsk cellulose, dikalsiumfosfat,
20 stivelse, magnesiumstearat og laktose og/eller andre tilsetningsmidler, bindemidler, fyllmidler, desintegreringsmidler, fortynningsmidler og glattemidler kjent på området.

De injiserbare løsninger eller suspensjoner kan formuleres i henhold til kjent teknikk, ved anvendelse av egnede ikke-toksiske, parenteralt akseptable fortynningsmidler eller løsningsmidler, så som mannitol, 1,3-butandiol, vann,
25 Ringer's løsning eller isotonisk natriumklorid-løsning eller egnede dispergerings- eller fukte- og suspenderingsmidler, så som sterile, milde, fikserte oljer, omfattende syntetiske mono- eller diglycerider og fettsyrer, omfattende oleinsyre.

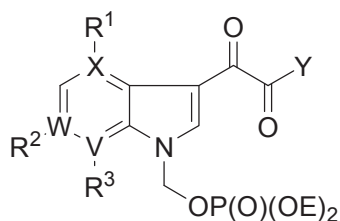
Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan administreres oralt til mennesker i et doseområde på 1 til 100 mg/kg kroppsvekt i oppdelte doser. Ett
30 foretrukket doseområde er 1 til 10 mg/kg kroppsvekt oralt i oppdelte doser. Andre foretrukne doseområder er 1 til 20 mg/kg og 1 til 30 mg/kg kroppsvekt oralt i oppdelte doser. Det vil imidlertid forstås at det spesifikke dosenivå og hyppighet av dosering for hvilken som helst spesiell pasient kan variere og vil avhenge av en rekke

faktorer omfattende aktiviteten til den spesifikke forbindelse som anvendes, den metabolske stabilitet og virkningsvarighet av forbindelsen, alderen, kroppsvekten, den generelle helse, kjønn, diett, modus og tid for administrering, utskillingshastighet, medikament-kombinasjon, alvorlighetsgraden av den spesielle

5 lidelsen og verten som gjennomgår terapi.

PATENTKRAV

1. Forbindelse, karakterisert ved formel I,



I

5

hvor:

X er C eller N med det forbehold at når X er N, eksisterer R¹ ikke ;

10

W er C eller N med det forbehold at når W er N, eksisterer R² ikke ;

V er C;

15 R¹ er hydrogen, metoksy eller halogen;

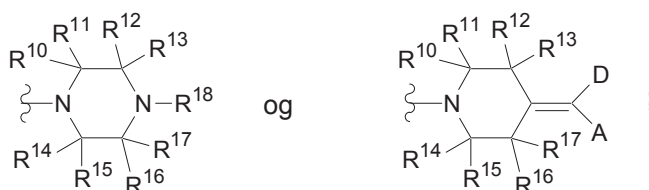
R² er hydrogen;

R³ er metoksy eller heteroaryl, som hver uavhengig kan være eventuelt substituert med én substituent valgt fra G; hvor heteroaryl er triazolyl, pyrazolyl eller oksadiazolyl;

20

E er hydrogen eller et farmasøytisk akseptabelt mono- eller bis-salt derav;

25 Y er valgt fra gruppen bestående av



R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , R^{17} hver uavhengig er H eller metyl, med det forbehold at ikke mer enn to av R^{10} - R^{17} er metyl;

5 R^{18} er valgt fra gruppen bestående av C(O)-fenyl, C(O)-pyridinyl, pyridinyl, pyrimidinyl, kinolinyl, isokinolinyl, kinazolinyl, kinoksalinyl, naftyridinyl, ftalazinyl, azabenzofuryl og azaindolyl, som hver uavhengig kan være eventuelt substituert med fra ett til to elementer valgt fra gruppen bestående av metyl, -amino, -NHMe, -NMe₂, metoksy, hydroksymetyl og halogen;

10

D er valgt fra gruppen bestående av cyano, S(O)₂R²⁴, halogen, C(O)NR²¹R²², fenyl og heteroaryl; hvor nevnte fenyl eller heteroaryl uavhengig eventuelt er substituert med ett til tre like eller forskjellige halogenatomer eller fra én til tre like eller forskjellige substituenten valgt fra G; hvor heteroaryl er valgt fra gruppen bestående av pyridinyl og oksadiazolyl;

15

A er valgt fra gruppen bestående av fenyl, pyridinyl, furyl, tienyl, isoksazolyl og oksazolyl hvor nevnte fenyl, pyridinyl, furyl, tienyl, isoksazolyl og oksazolyl uavhengig eventuelt er substituert med ett til tre like eller forskjellige halogenatomer eller fra én til tre like eller forskjellige substituenten valgt fra G;

20

G er valgt fra gruppen bestående av (C₁₋₆)alkyl, (C₁₋₆)alkenyl, fenyl, hydroksy, metoksy, halogen, -NR²³C(O)-(C₁₋₆)alkyl, -NR²⁴R²⁵, -S(O)₂NR²⁴R²⁵, COOR²⁶ og -CONR²⁴R²⁵; hvor nevnte (C₁₋₆)alkyl eventuelt er substituert med hydroksy, dimetylamino eller ett til tre like eller forskjellige halogenatomer;

25

R^{26} er valgt fra gruppen bestående av hydrogen og (C₁₋₆)alkyl;

R^{20} , R^{21} , R^{22} , R^{23} , R^{24} , R^{25} er uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, (C₁₋₆)alkyl og -(CH₂)_nNR²⁷R²⁸;

30

n er 0-6; og

R^{27} og R^{28} er hver uavhengig H eller metyl.

2. Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

5 R^1 er metoksy eller fluor;

R^{18} er valgt fra gruppen bestående av C(O)-fenyl, C(O)-pyridinyl, isokinolinyl, kinazolinyl og ftalazinyl; hvor nevnte isokinolinyl, kinazolinyl eller ftalazinyl eventuelt uavhengig kan være substituert med fra ett til to elementer valgt fra gruppen
10 bestående av metyl, -amino, -NHMe, -NMe₂, metoksy, hydroksymetyl og halogen;

D er valgt fra gruppen bestående av cyano, fenyl og heteroaryl; hvor nevnte heteroaryl er pyridinyl eller oksadiazolyl; hvor nevnte fenyl eller heteroaryl uavhengig er eventuelt substituert med én til tre like eller forskjellige substituenten valgt fra
15 gruppen bestående av C₁₋₆ alkyl, trifluormetyl, metoksy og halogen;

A er valgt fra gruppen bestående av fenyl, pyridinyl, furyl, tienyl, isoksazolyl eller oksazolyl hvor nevnte fenyl, pyridinyl, furyl, tienyl, isoksazolyl eller oksazolyl uavhengig er eventuelt substituert med ett til tre like eller forskjellige halogenatomer
20 eller fra én til tre like eller forskjellige substituenten valgt fra gruppen bestående av metyl, halogen, metoksy og -NH₂; og

R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , R^{17} er hver uavhengig H eller metyl med det forbehold at et maksimum på én av R^{10} - R^{17} er metyl.

25

3. Forbindelse ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

X og W hver er N.

30 4. Forbindelse ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

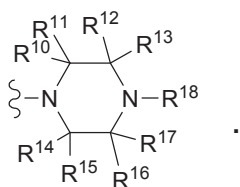
X er C; og

W er N.

5. Forbindelse ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

5 R¹⁸ er -C(O)-Ph; og

Y er



10

6. Forbindelse ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

R³ er metoksy eller triazolyl; hvor nevnte triazolyl eventuelt er substituert med én substituent valgt fra G;

15

R¹⁰ - R¹⁷ er hver H; og

G er metyl.

20

7. Forbindelse ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

R¹ er F og R³ er 1,2,3-triazolyl tilknyttet i stilling N-1.

8. Forbindelse ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

25

R¹ er metoksy; og

R³ er 3-metyl-1,2,4-triazolyl tilknyttet i stilling N-1.

30

9. Forbindelse ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

R^1 og R^3 er hver metoksy.

10. Forbindelse ifølge krav 6, karakteriseret ved at saltet er natrium,
5 lysin eller trometamin.

11. Forbindelse ifølge krav 7, karakteriseret ved at saltet er lysin.

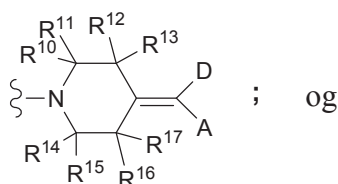
12. Forbindelse ifølge krav 8, karakteriseret ved at saltet er trometamin.

10

13. Forbindelse ifølge krav 9, karakteriseret ved at saltet er lysin.

14. Forbindelse ifølge krav 1, karakteriseret ved at:

15 Y er



20 R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , R^{17} er hver uafhængig H eller metyl, med det forbehold at ikke mer enn to av R^{10} - R^{17} er metyl;

15. Forbindelse ifølge krav 14, karakteriseret ved at:

R^1 er metoksy eller fluor;

25

D er valgt fra gruppen bestående av cyano, fenyl og pyridinyl, hvor nevnte fenyl eller pyridinyl uafhængig er eventuelt substituert med én substituent valgt fra gruppen bestående av metyl og halogen; og

A er valgt fra gruppen bestående av fenyl, pyridinyl, hvor nevnte fenyl eller pyridinyl uavhengig er eventuelt substituert med én substituent valgt fra gruppen bestående av metyl og halogen.

5 16. Forbindelse ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

D er cyano;

A er valgt fra gruppen bestående av fenyl eller pyridinyl;

10

X er C;

W er N;

15 G er metyl;

R^3 er metoksy eller triazolyl hvor nevnte triazolyl uavhengig eventuelt kan være substituert med én substituent valgt fra G; og

20 $R^{10}, R^{11}, R^{12}, R^{13}, R^{14}, R^{15}, R^{16}, R^{17}$ er hver H.

17. Forbindelse ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

R^1 er metoksy; og

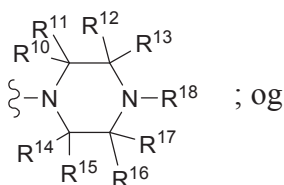
25

R^3 er triazolyl hvor nevnte triazolyl uavhengig eventuelt kan være substituert med én substituent valgt fra G.

18. Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

30

Y er



R^{18} er valgt fra gruppen bestående av kinolinyl, isokinolinyl, kinazolinyll, kinoksalinyll, naftyridinyll eller ftalazinyl, som hver uavhengig eventuelt kan være
 5 substituert med fra ett til to elementer valgt fra gruppen bestående av metyl, -amino, -NHMe, -NMe₂, metoksy, hydroksymetyl og halogen.

19. Forbindelse ifølge krav 18, k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

10 R^1 er metoksy eller fluor;

R^{18} er valgt fra gruppen bestående av isokinolinyl, kinazolinyll og ftalazinyl; hvor nevnte isokinolinyl, kinazolinyll eller ftalazinyl eventuelt uavhengig kan være substituert med én gruppe fra enten metyl eller halogen; og

15

$R^{10}, R^{11}, R^{12}, R^{13}, R^{14}, R^{15}, R^{16}, R^{17}$ er hver uavhengig H.

20. Forbindelse ifølge krav 19, k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

20 X er C;

W er N;

G er metyl; og

25

R^3 er metoksy eller triazolyl hvor nevnte triazolyl uavhengig kan være eventuelt substituert med én substituent valgt fra G.

21 Forbindelse ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t v e d a t:

30

R¹ er metoksy;

R³ er triazolyl hvor nevnte triazolyl uavhengig eventuelt kan være substituert med én substituent valgt fra G; og

5

R¹⁸ er kinazolinyl.

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

10 R¹ er metoksy eller fluor;

R¹⁸ er C(O)-fenyl;

R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷ er hver H; og

15

G er metyl.

23. Forbindelse ifølge krav 22, k a r a k t e r i s e r t v e d at:

20 X er C; og

W er N.

24. Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en antiviral effektiv mengde av en forbindelse med formel I ifølge krav 1 og én eller flere farmasøytisk akseptable bærere, tilsetningsmidler eller fortynningsmidler.

25 25. Farmasøytisk preparat ifølge krav 24, anvendelig for behandling av infeksjon av HIV, k a r a k t e r i s e r t v e d at det i tillegg omfatter en antiviral effektiv
30 mengde av et AIDS behandlingsmiddel valgt fra gruppen bestående av:

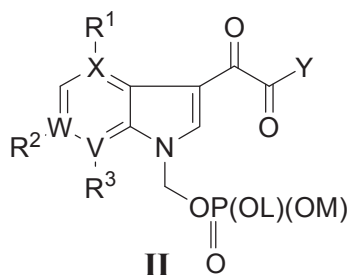
- (a) et AIDS antiviralt middel;
- (b) et anti-infektivt middel;

- (c) en immunomodulator; og
- (d) HIV-entry-inhibitorer.

26. Forbindelse med formel I ifølge krav 1 og én eller flere farmasøytisk
5 akseptable bærere, tilsetningsmidler eller fortynningsmidler for behandling av et pattedyr infisert med HIV virus.

27. Forbindelse ifølge krav 26, omfattende administrering til nevnte pattedyr av
en antiviral effektiv mengde av en forbindelse med formel I, i kombinasjon med en
10 antiviral effektiv mengde av et AIDS-behandlingsmiddel valgt fra gruppen bestående
av et AIDS antiviralt middel; et anti-infektivt middel; en immunomodulator; og en
HIV-entry-inhibitor.

28. Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d formel II
15



hvor:

20 X er C eller N med det forbehold at når X er N, eksisterer R¹ ikke;

W er C eller N med det forbehold at når W er N, eksisterer R² ikke;

V er C;

25

R¹ er hydrogen, metoksy eller halogen;

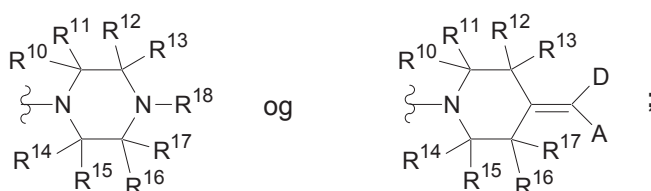
R² er hydrogen;

R^3 er metoksy eller heteroaryl, som hver uavhengig eventuelt kan være substituert med én substituent valgt fra G; hvor heteroaryl er triazolyl, pyrazolyl eller oksadiazolyl;

5

L og M er uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, C_1 - C_6 alkyl, fenyl, benzyl, trialkylsilyl, -2,2,2-trikloretoksy og 2-trimetylsilyletoksy med det forbehold at ikke mer enn én av L og M kan være hydrogen;

10 Y er valgt fra gruppen bestående av



R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , R^{17} er hver uavhengig H eller metyl, med det
15 forbehold at ikke mer enn to av R^{10} - R^{17} er metyl;

R^{18} er valgt fra gruppen bestående av C(O)-fenyl, C(O)-pyridinyl, pyridinyl, pyrimidinyl, kinolinyl, isokinolinyl, kinazolinyl, kinoksalinyl, naftyridinyl, ftalazinyl, azabenzofuryl og azaindolyl, som hver uavhengig eventuelt kan være substituert med
20 fra ett til to elementer valgt fra gruppen bestående av metyl, -amino, -NHMe, -NMe₂, metoksy, hydroksymetyl og halogen;

D er valgt fra gruppen bestående av cyano, S(O)₂R²⁴, halogen, C(O)NR²¹R²², fenyl og heteroaryl; hvor nevnte fenyl eller heteroaryl uavhengig er eventuelt substituert med
25 ett til tre like eller forskjellige halogenatomer eller fra én til tre like eller forskjellige substituenten valgt fra G; hvor heteroaryl er valgt fra gruppen bestående av pyridinyl og oksadiazolyl;

A er valgt fra gruppen bestående av fenyl, pyridinyl, furyl, tienyl, isoksazolyl og
30 oksazolyl hvor nevnte fenyl, pyridinyl, furyl, tienyl, isoksazolyl og oksazolyl

uavhengig er eventuelt substituert med ett til tre like eller forskjellige halogenatomer eller fra én til tre like eller forskjellige substituenten valgt fra G;

G er valgt fra gruppen bestående av (C₁₋₆)alkyl, (C₁₋₆)alkenyl, fenyl, hydroksy, metoksy, halogen, -NR²³C(O)-(C₁₋₆)alkyl, -NR²⁴R²⁵, -S(O)₂NR²⁴R²⁵, COOR²⁶ og -CONR²⁴R²⁵; hvor nevnte (C₁₋₆)alkyl eventuelt er substituert med hydroksy, dimetylamino eller ett til tre like eller forskjellige halogenatomer;

R²⁶ er valgt fra gruppen bestående av hydrogen og (C₁₋₆)alkyl;

10

R²⁰, R²¹, R²², R²³, R²⁴, R²⁵ er uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, (C₁₋₆)alkyl og -(CH₂)_nNR²⁷R²⁸;

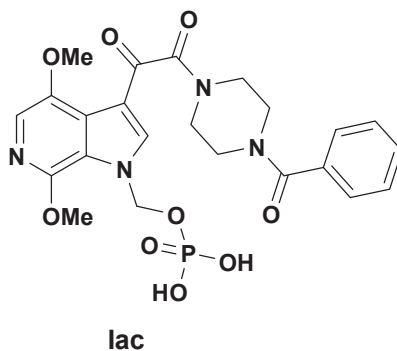
R²⁷ og R²⁸ er hver uavhengig H eller metyl; og

15

n er 0-6.

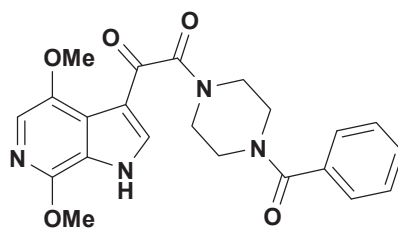
29. Fremgangsmåte for fremstilling av Forbindelse Iac som har strukturen

20



karakterisert ved at den omfatter:

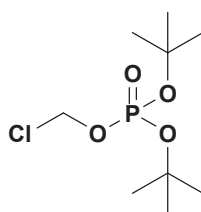
25 (a) alkylering av Forbindelse IVa som har strukturen



IVa

med ca. 1,2 molekvivalenter av di-tert-butylklormetylfosfat pr. mol av IVa, som har strukturen Z

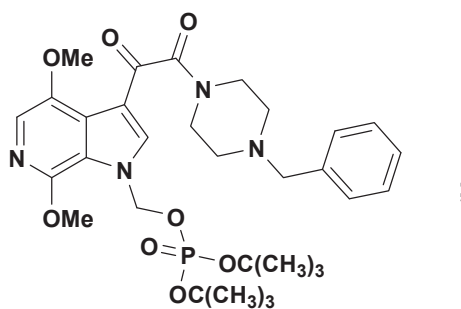
5



(Z)

i nærvær av ca. 2 molekvivalenter av K_2CO_3 som en base, pr. mol av forbindelse IVa og ca. 5-10 ml N-metylpyrrolidinon som et løsningsmiddel pr. gram av IVa, ved en reaksjonstemperatur på ca. $30^\circ C$, for å danne Forbindelse R som har strukturen

10



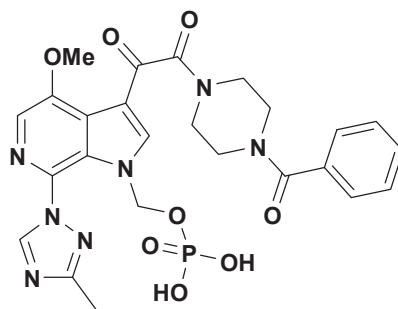
(R)

(b) avbeskyttelse ved romtemperatur av forbindelse R av begge tert-butylgrupper ved tilsetning til den resulterende reaksjonsblanding fra trinn (a), av ca. 10 ml diklormetan-løsningsmiddel pr. gram av IVa og ca. 15 molekvivalenter av trifluoreddiksyre pr. mol av IVa; og

15

(c) gjenvinning av Forbindelse Iac.

30. Fremgangsmåte for fremstilling av Forbindelse Ic som har strukturen



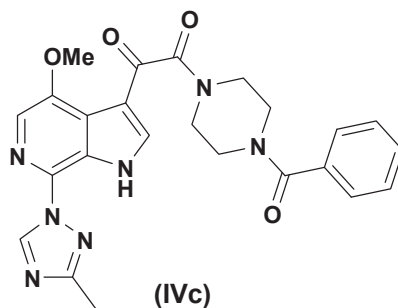
(Ic)

5

karakterisert ved at den omfatter:

(a) alkylering av Forbindelse IVc som har strukturen

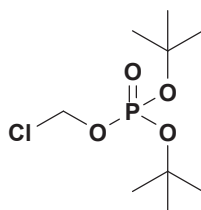
10



(IVc)

med ca. 2,5 molekvivalenter av di-tert butylklormetylfosfat pr. mol av IVc som har strukturen Z

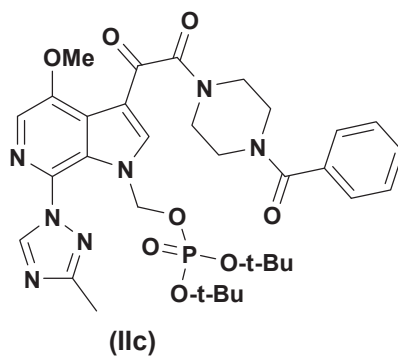
15



(Z)

i nærvær av ca. 2,5 molekvivalenter av Cs_2CO_3 som en base pr. mol av IVc, ca. 2 molekvivalenter av KI pr. mol av IVc og ca. 5-10 ml N-metyl-pyrrolidinon pr. gram av IVc, ved en reaksjonstemperatur på ca. 25-30°C, for å danne en forbindelse IIc som har strukturen

5

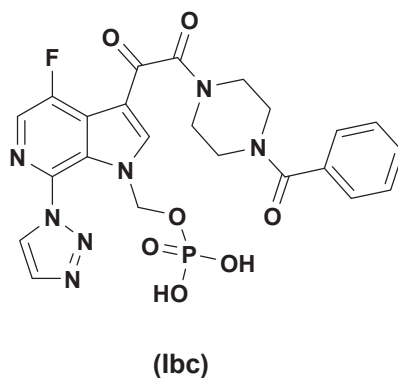


(b) avbeskyttelse ved en temperatur på ca. 40°C av Forbindelse IIc av begge tert-butylgrupper i et overskudd av aceton og vann; og

10

(c) gjenvinning av Forbindelse Ic.

31. Fremgangsmåte for fremstilling av Forbindelse Ibc som har strukturen

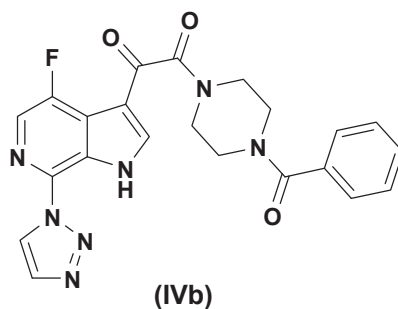


15

karakterisert ved at den omfatter:

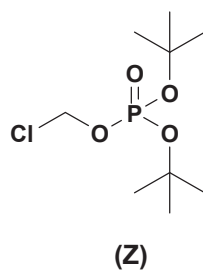
(a) alkylering av Forbindelse IVb som har strukturen

20



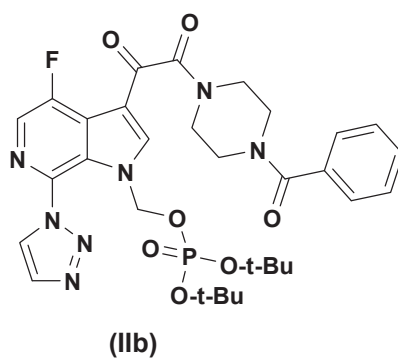
med ca. 2 molekvivalenter av di-tert-butylklormetylfosfat pr. mol av IVb som har strukturen Z

5



i nærvær av ca. 2 molekvivalenter av Cs_2CO_3 som base pr. mol av IVb, ca. 2 molekvivalenter av KI pr. mol av IVB og ca. 2,5 ml N-metyl-pyrrolidinon pr. gram av IVb, ved en reaksjonstemperatur på ca. 30°C, for å danne en forbindelse IIb som har strukturen

10



(b) avbeskyttelse ved en temperatur på ca. 40°C av Forbindelse IIb av begge tert-butylgrupper i et overskudd av aceton og vann; og

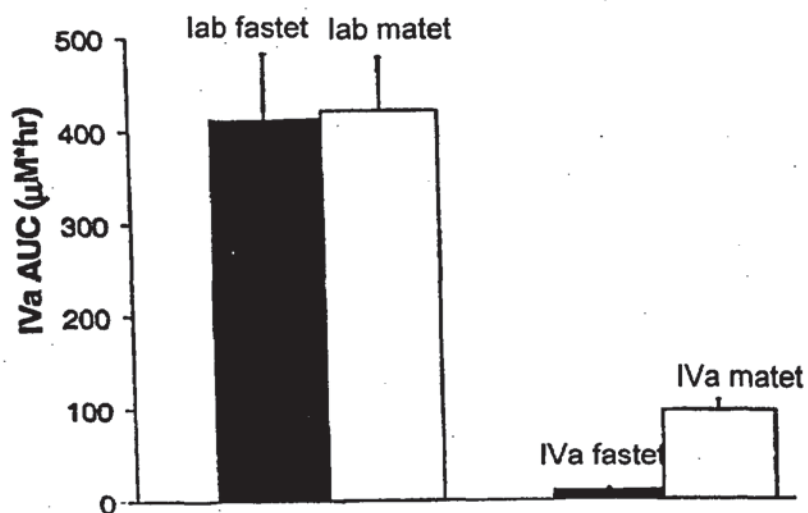
15

(c) gjenvinning av Forbindelse Ibc.

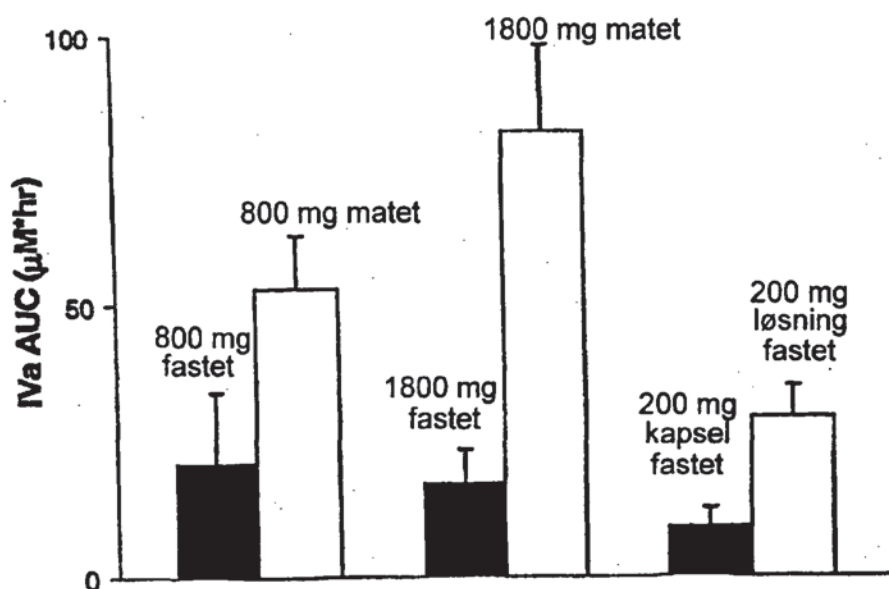
2 / 23

Preklinisk profil: Parental IVa vs. lab (prodrug)

IVa AUC for hunder etter
lab eller IVa kapsel-dosering (20 mg/kg IVa ekv.)

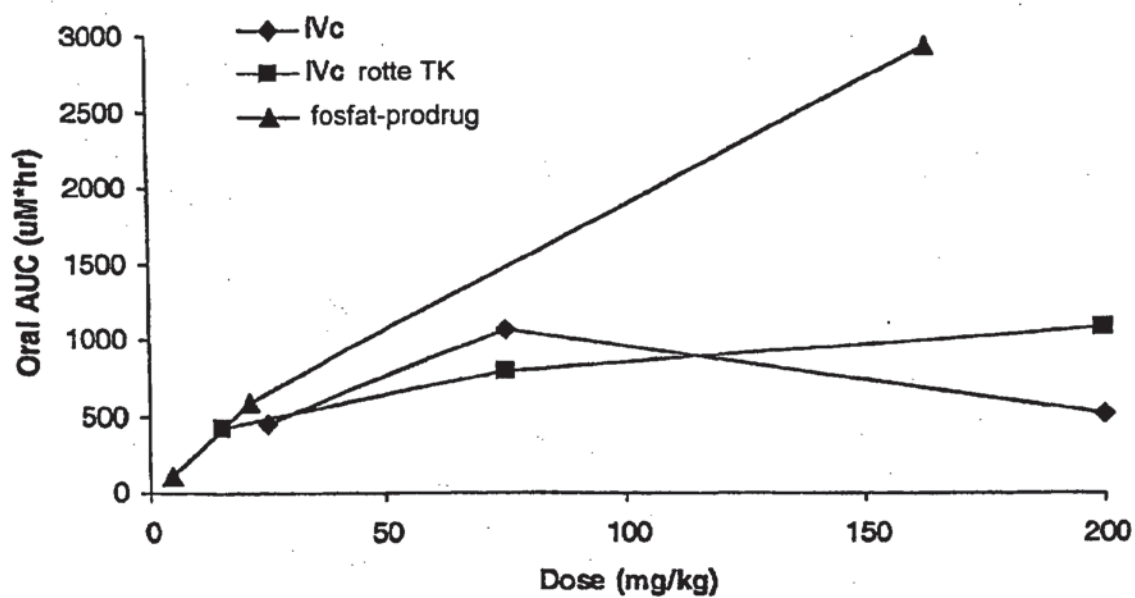
**FIG. 2A**

IVa AUC i humane studier

**FIG. 2B**

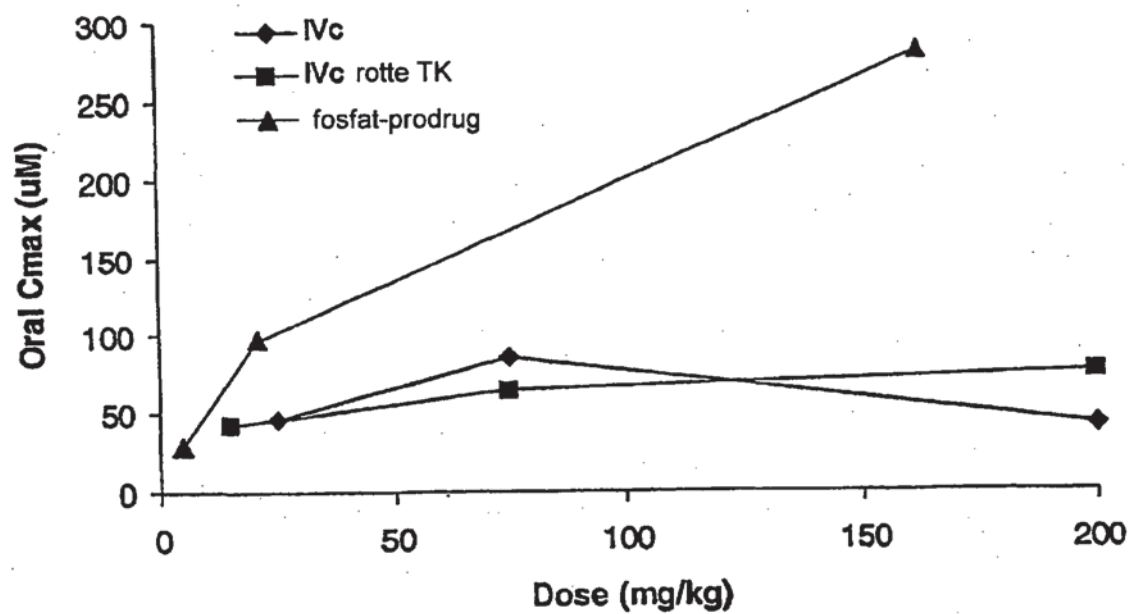
3 / 23

IVc oral AUC i rotter vs. dose plott
(alle doser er IVc ekvivalente)

**FIG. 3**

4 / 23

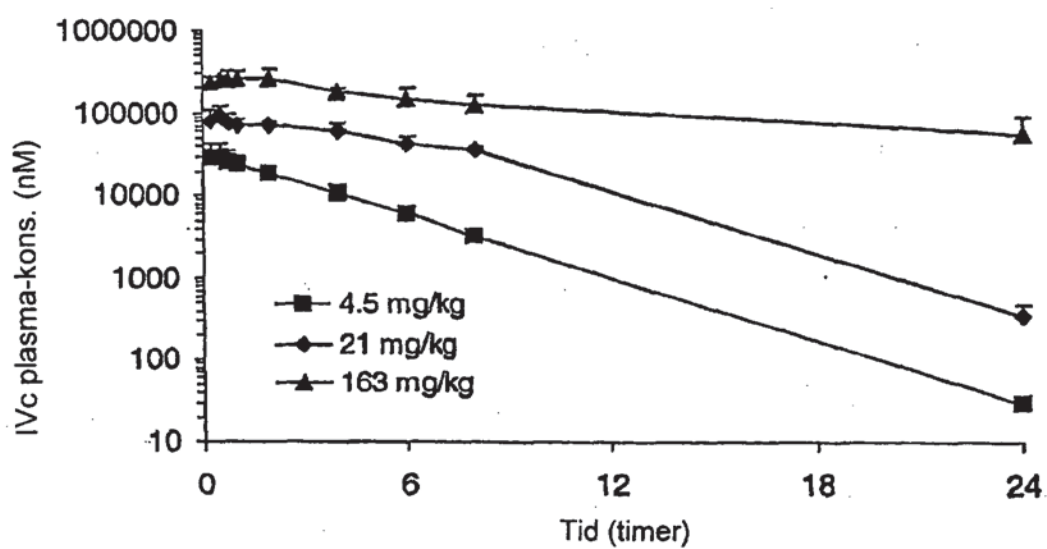
IVc oral Cmaks i rotter vs. dose plott
(alle doser er IVc ekvivalente)

**FIG. 4**

5 / 23

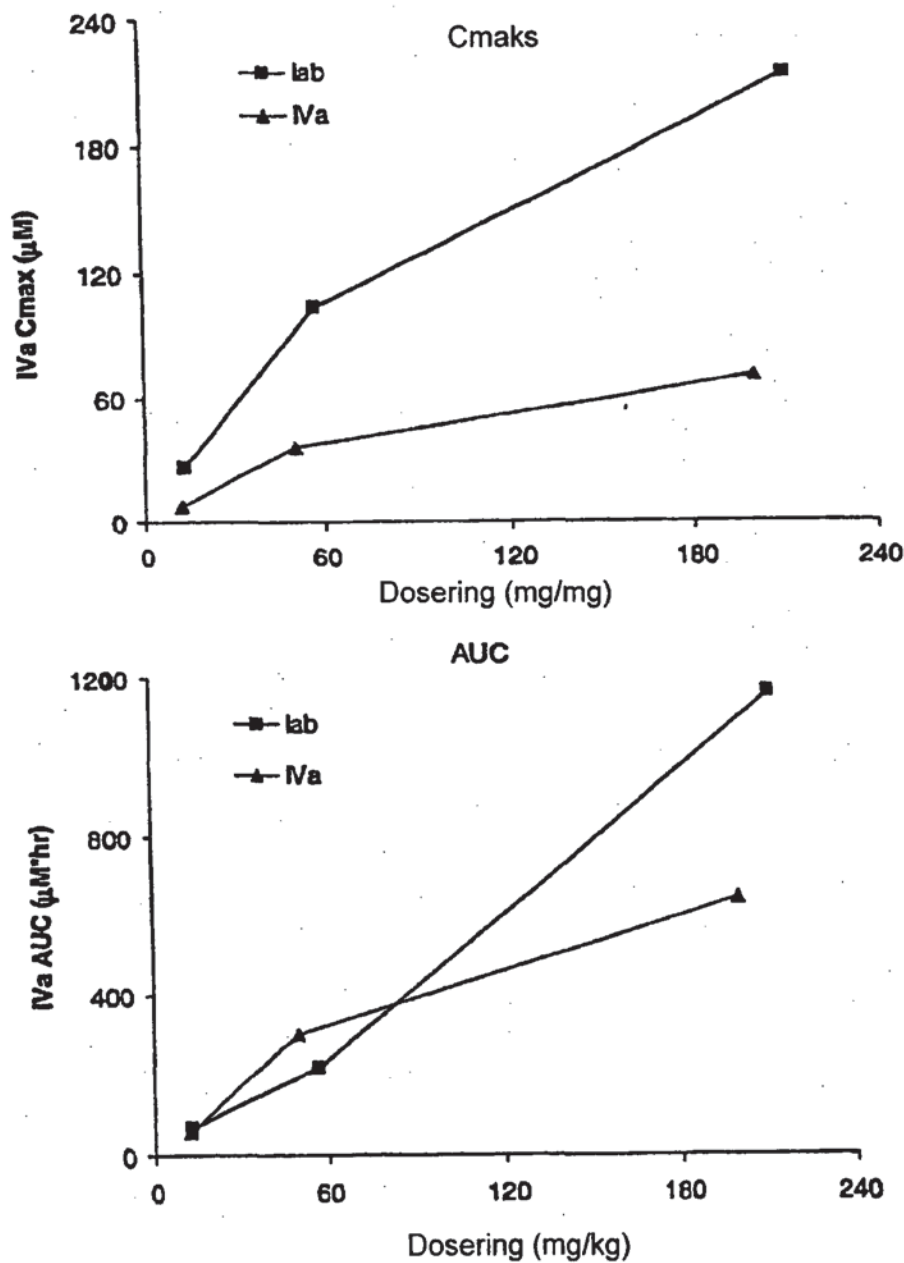
Studie D data

Plasma-profiler av IVc i rotter etter oral dosering
av Ic (alle doser er IVc ekvivalente)

**FIG. 5**

6 / 23

Sammenligning av IVa Cmaks og AUC i rotter
gitt enten IVa eller lab

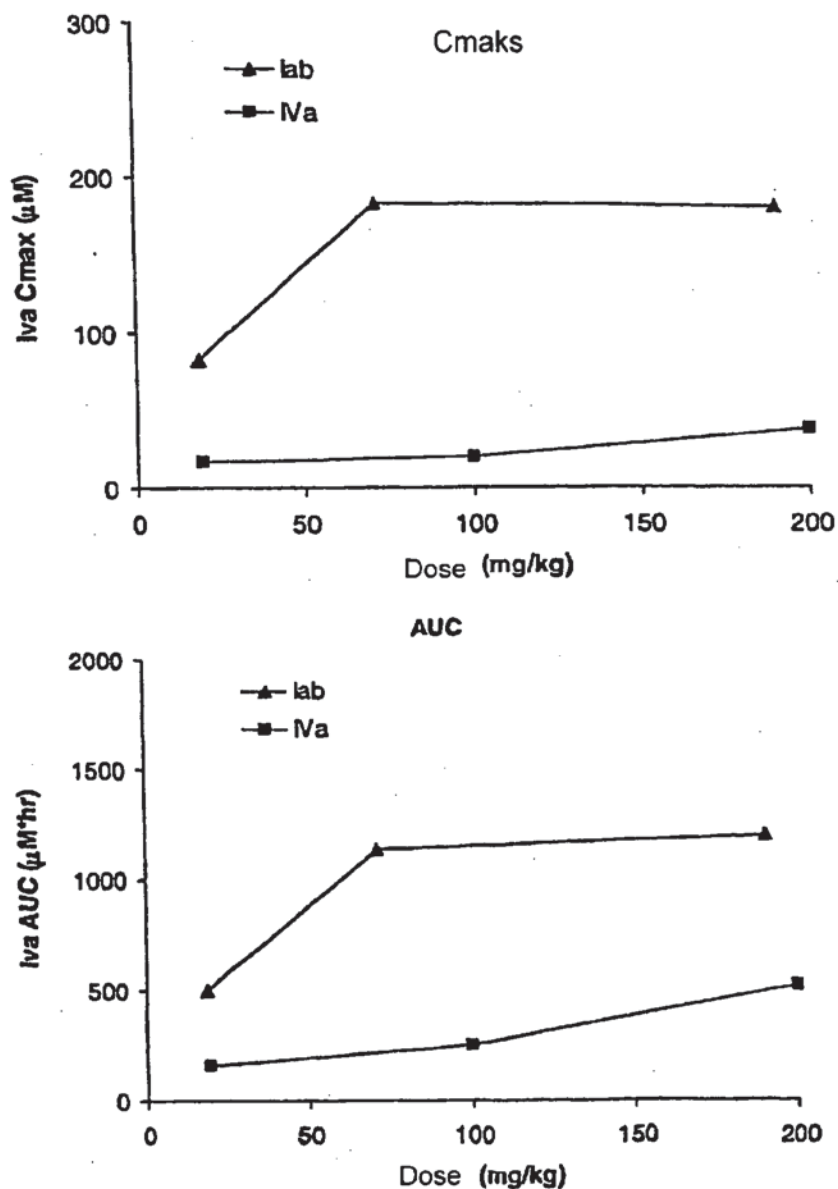


Data for lab er fra enkelt-dose toksikokinetisk studie og data for IVa er fra dag 1 av en 2 ukers utforskende oral dose-toksisitetsstudie. Doser av lab er presentert som IVa molare ekvivalenter

FIG. 6

7 / 23

Sammenligning av IVa Cmaks og AUC i hunder gitt enten IVa eller lab

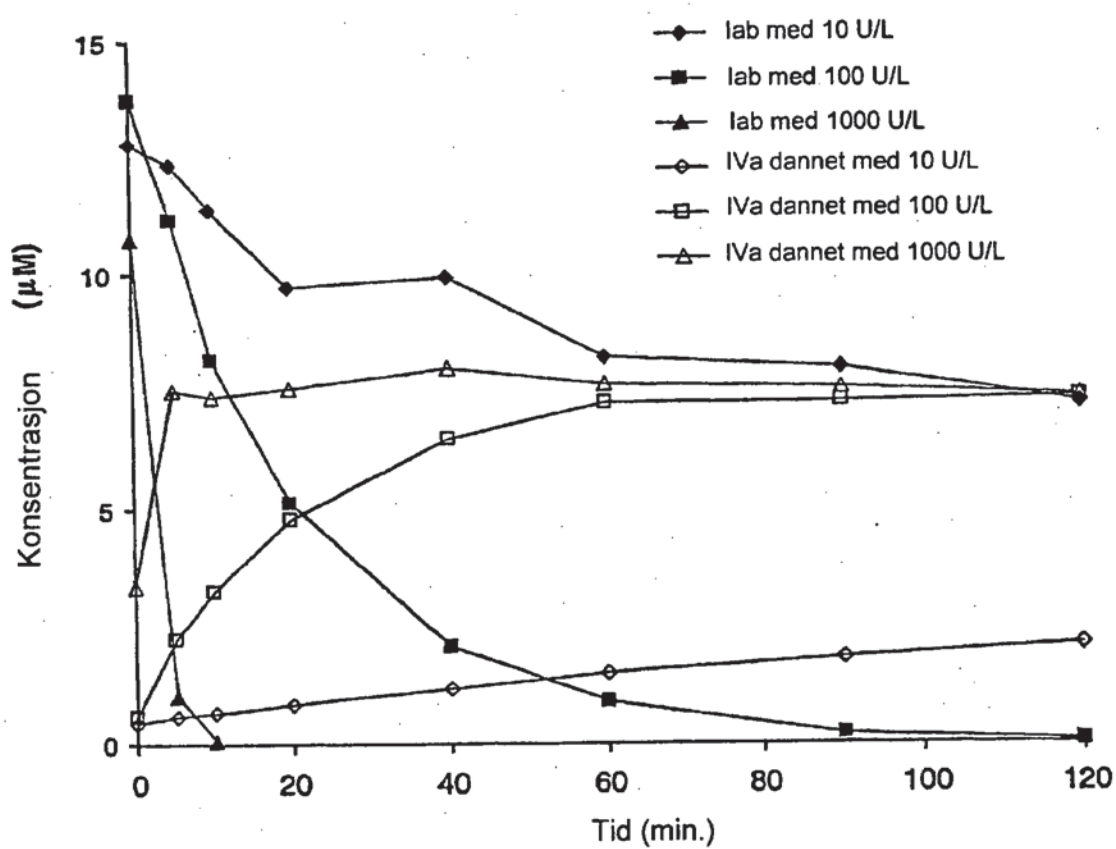


Data for lab er fra en enkel-dose toksikokinetisk og tolerabilitet-studie, og data for IVa er fra dag 1 av enten en 10 dager undersøkende oral dose toksisitetstudie i doser på 20 og 100 mg/kg eller en 2-uker oral dose-toksisitet-studie med en dose på 200 mg/kg. Doser av lab er presentert som IVa molare ekvivalenter

FIG. 7

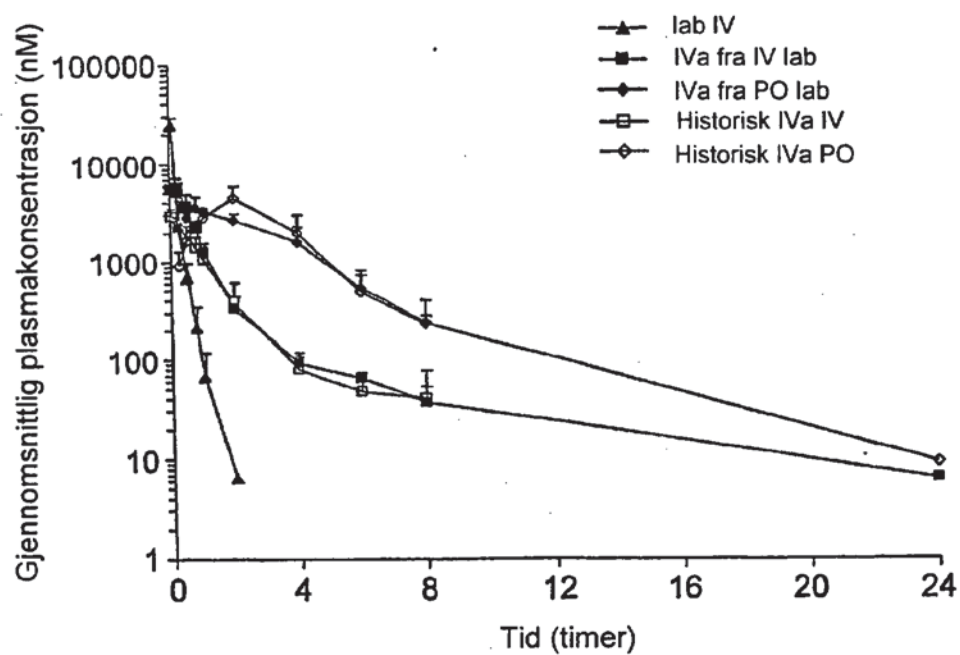
8 / 23

Hydrolyse av lab i humane placentale ALP-løsninger
og dannelse av IVa

**FIG. 8**

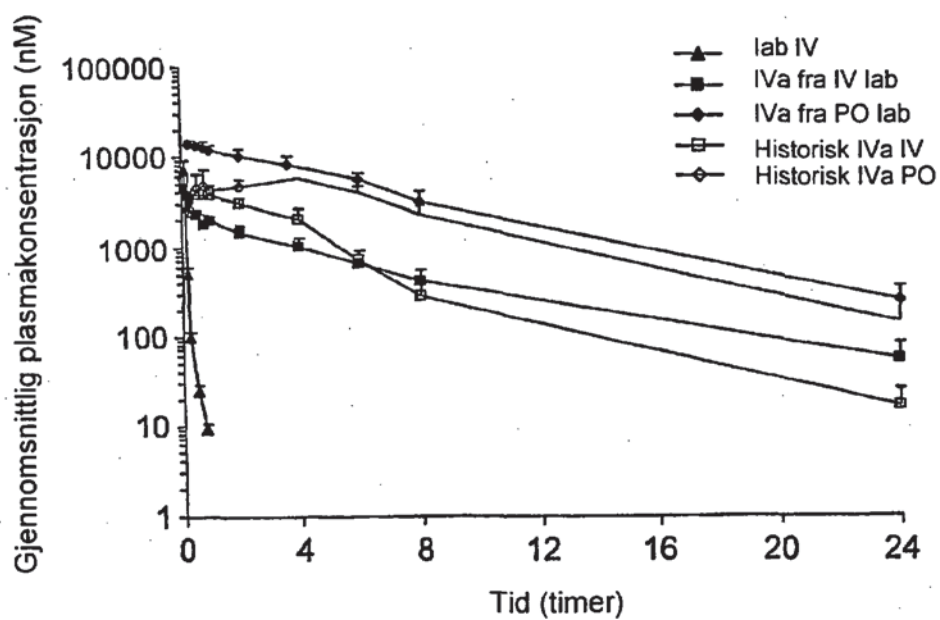
9 / 23

Pasmakonsentrasjon vs. tid profiler av lab og IVa etter
IV og oral administrering av lab i rotter og fra
historiske data for IVa i rotter

**FIG. 9**

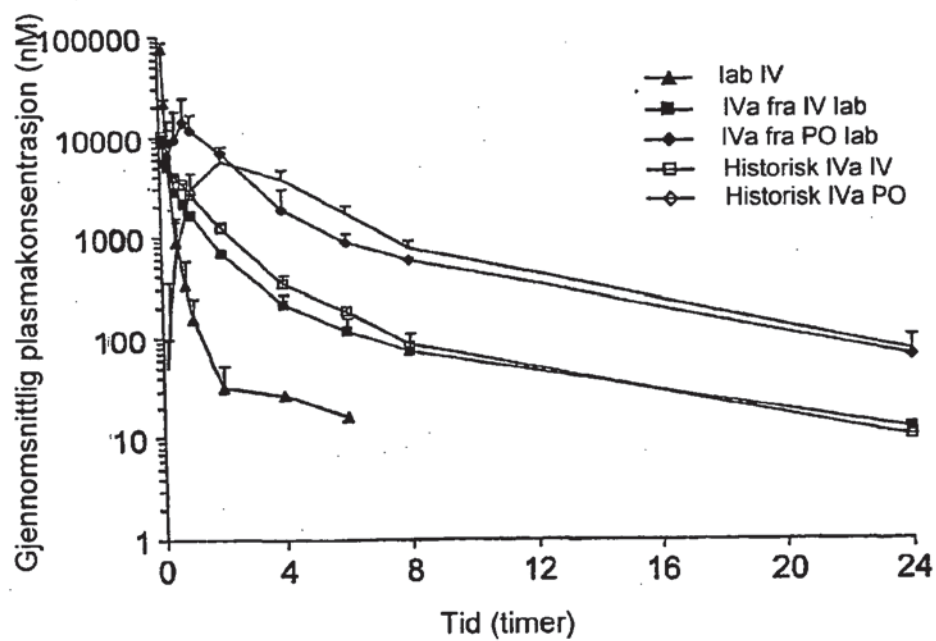
10 / 23

Plasmakonsentrasjon vs. tid profiler av lab og IVa
etter IV og oral administrering av lab i hunder og fra
historiske data for IVa i hunder

**FIG. 10**

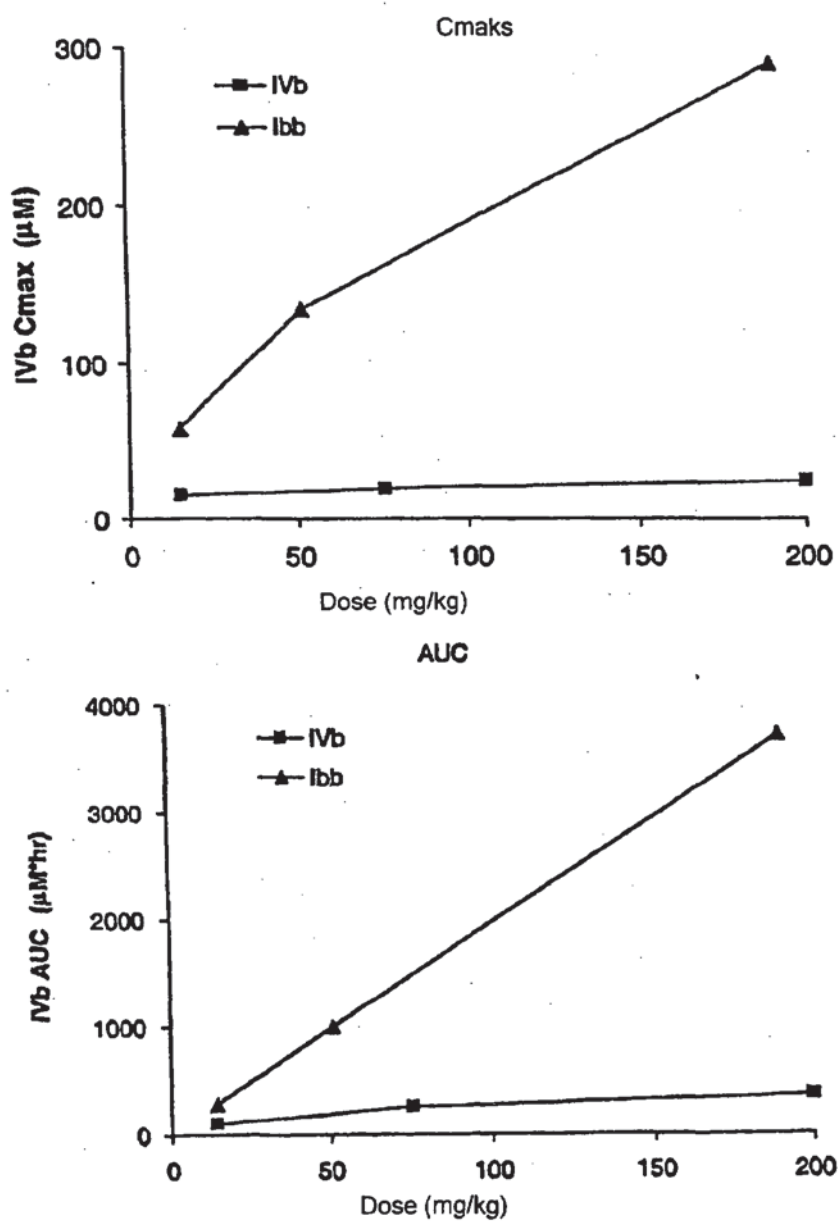
11 / 23

Plasmakonsentrasjon vs. tid profiler av lab og IVa etter IV og oral administrering av lab i aper og fra historiske data for IVa i aper

**FIG. 11**

12 / 23

Sammenligning av IVb Cmaks og AUC i hannrotter
gitt enten IVb eller lbb

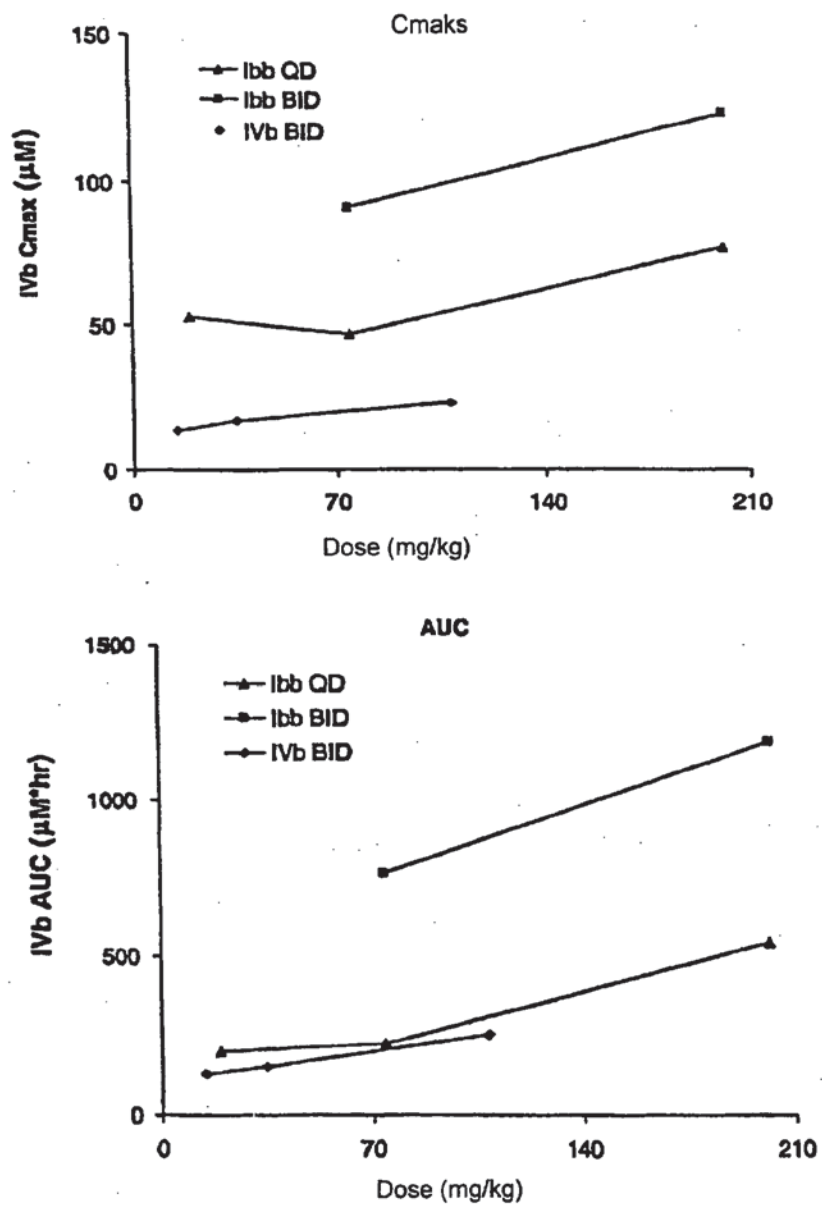


Data for både lbb og IVb er fra enkelt-dose toksikokinetiske undersøkelser.
Doser av lbb er presentert som IVb molare ekvivalenter

FIG. 12

13 / 23

Sammenligning av IVb Cmaks og AUC i hunder gitt enten IVb eller Ibb



Data for Ibb er enkeldose toksikokinetisk og tolerabilitets-studie
og data for IVb (BID-dosering) er fra toksikokinetisk og tolerabilitets-studie.
Doser av Ibb er presentert som IVb molare ekvivalenter

FIG. 13

14 / 23

Hydrolyse av Ibb i humane placentale ALP-løsninger
og dannelse av IVb

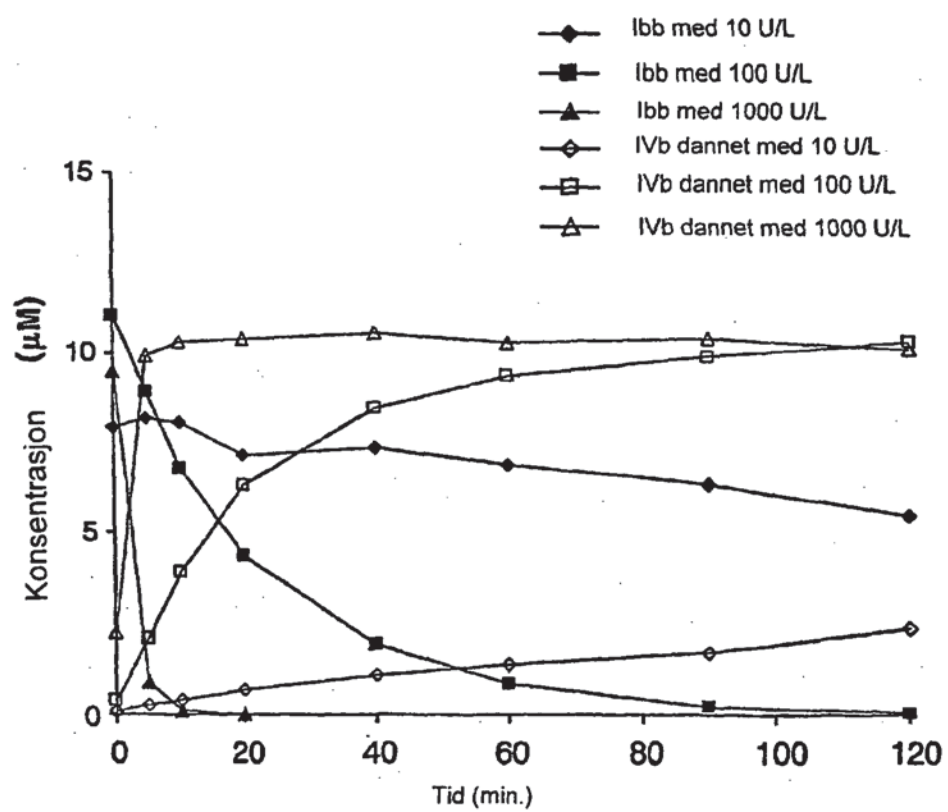
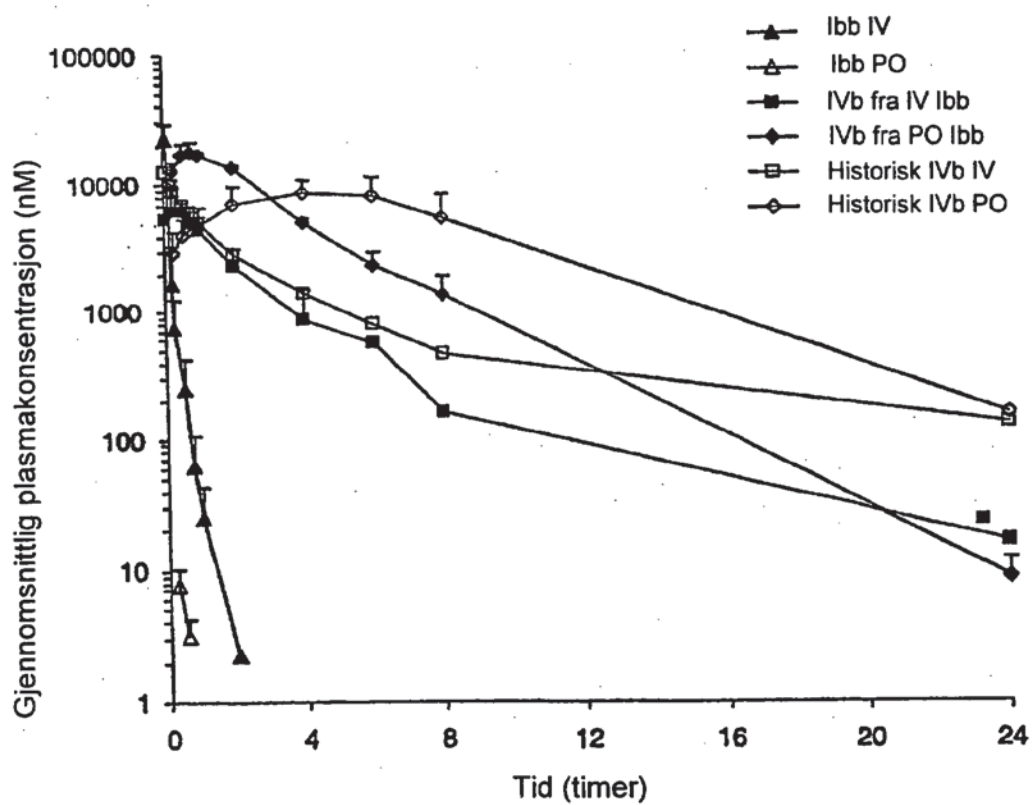


FIG. 14

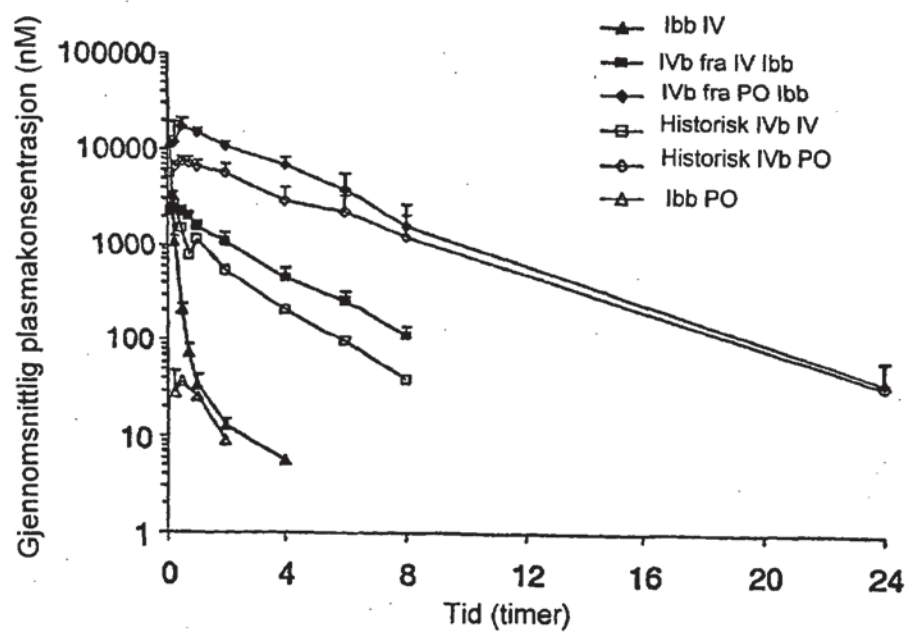
15 / 23

Plasmakonsentrasjon vs. tid profiler av lbb og IVb etter IV og oral administrering av lbb til rotte, og historiske data for IVb i rotte

**FIG. 15**

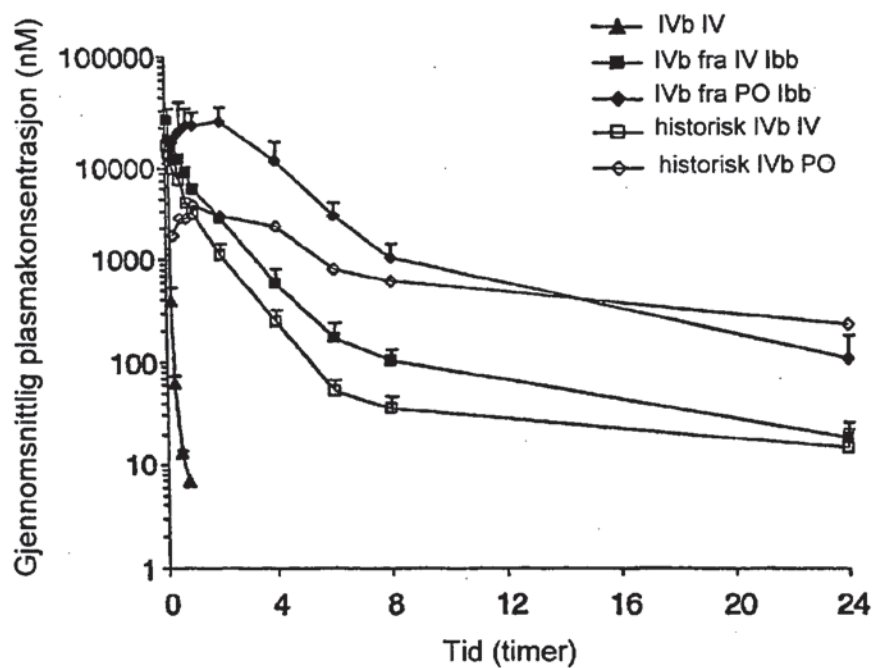
16 / 23

Plasmakonsentrasjon vs. tid profiler av lbb og IVb
etter IV og oral administrering av lbb til hund, og
historiske data for IVb i hund

**FIG. 16**

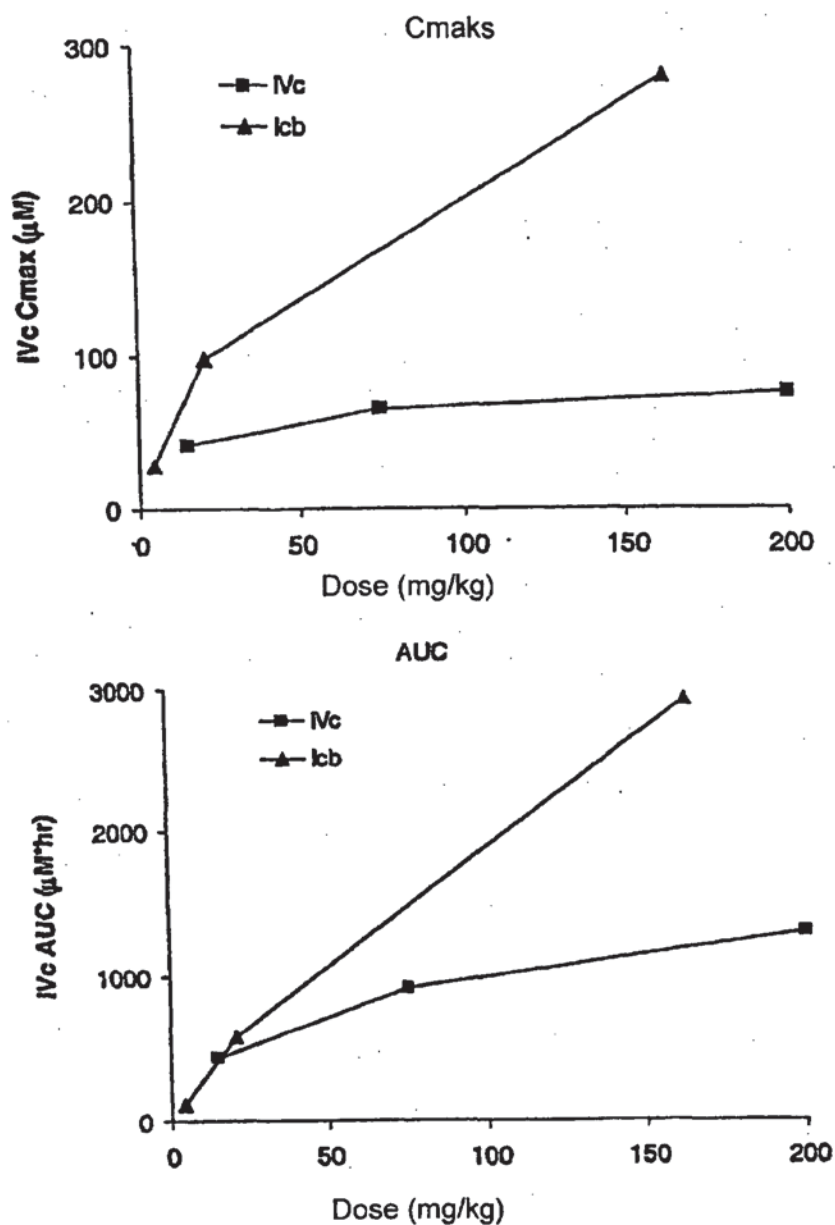
17 / 23

Plasmakonsentrasjon vs. tid profiler for lbb og IVb etter IV og oral administrering av lbb i ape, og historiske data for IVb i ape

**FIG. 17**

18 / 23

Sammenligning av IVc Cmaks i hannrotter
gitt enten IVc eller lcb

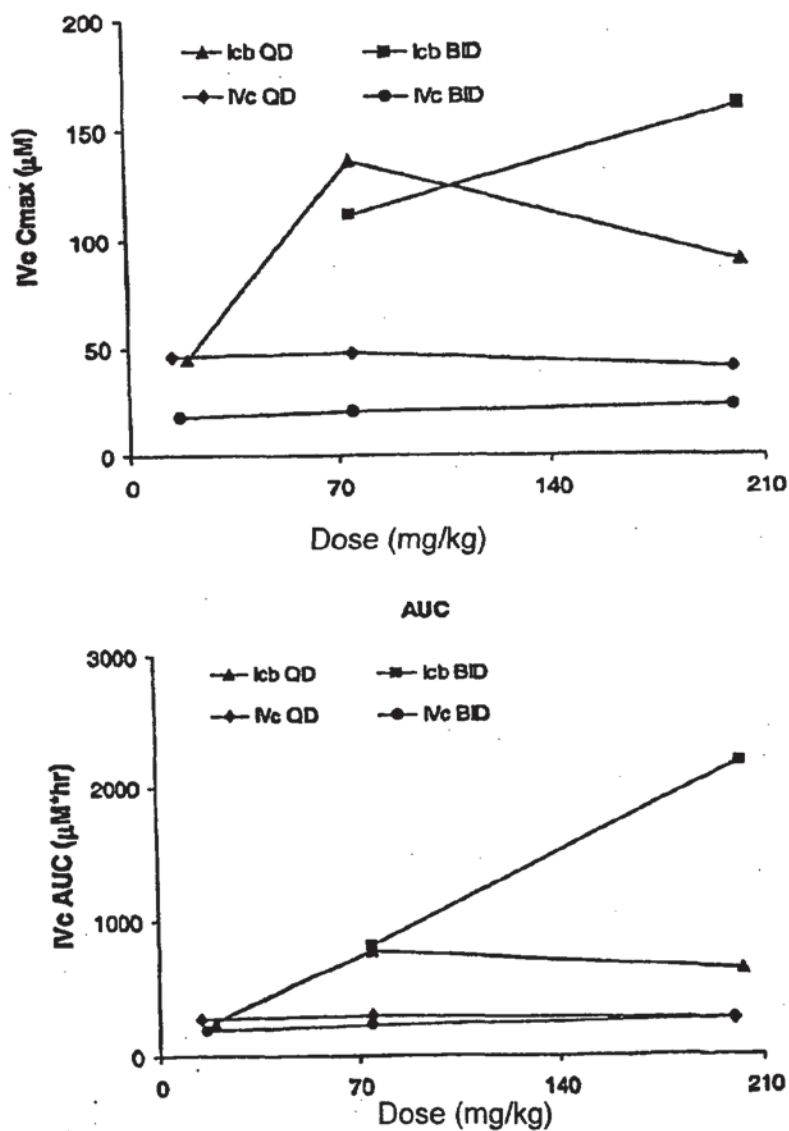


Data for lcb fra enkeldose toksikokinetiske studier og fra dag av en 2-uker
toksisitetsstudie for IVc. Doser av lcb er presentert som IVc molare ekvivalenter

FIG. 18

19 / 23

Sammenligning av IVc Cmaks og AUC i hunder gitt enten IVc eller Icb

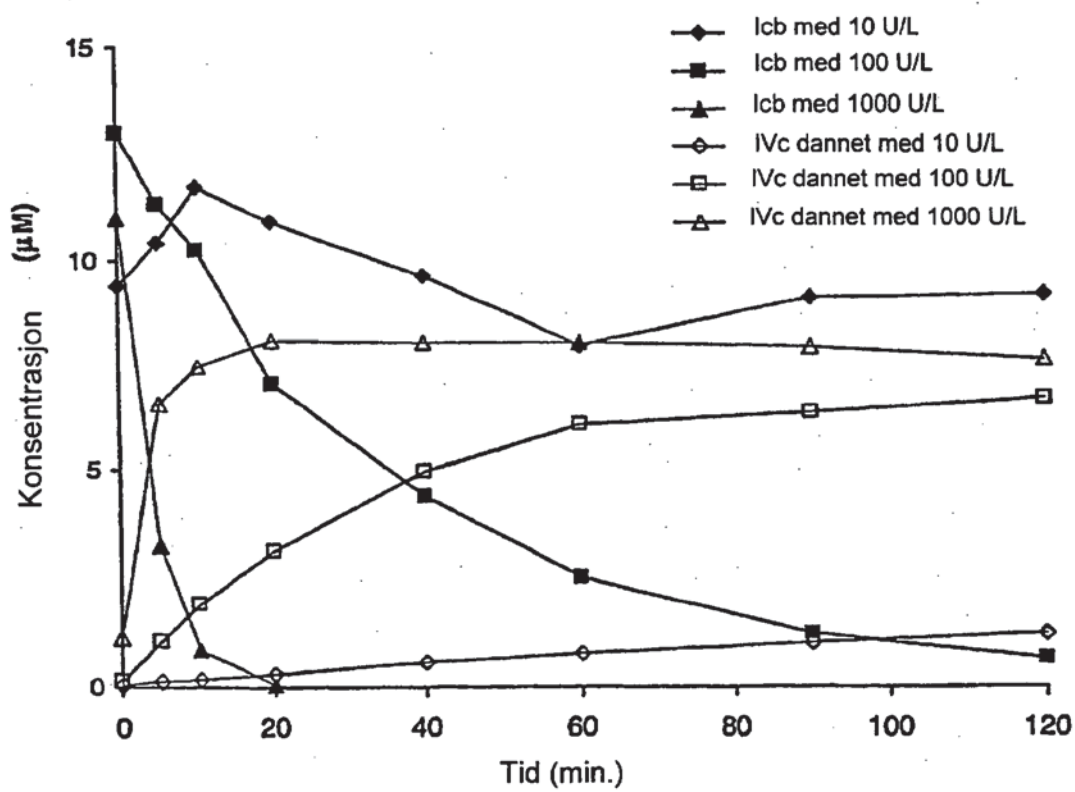


Data for Icb er fra enkel-dose toksikokinetisk og tolerabilitets-studie og data for IVc er fra enkel-dose toksikokinetisk og tolerabilitets-studie. Doser av Icb er presentert som IVc molare ekvivalenter

FIG. 19

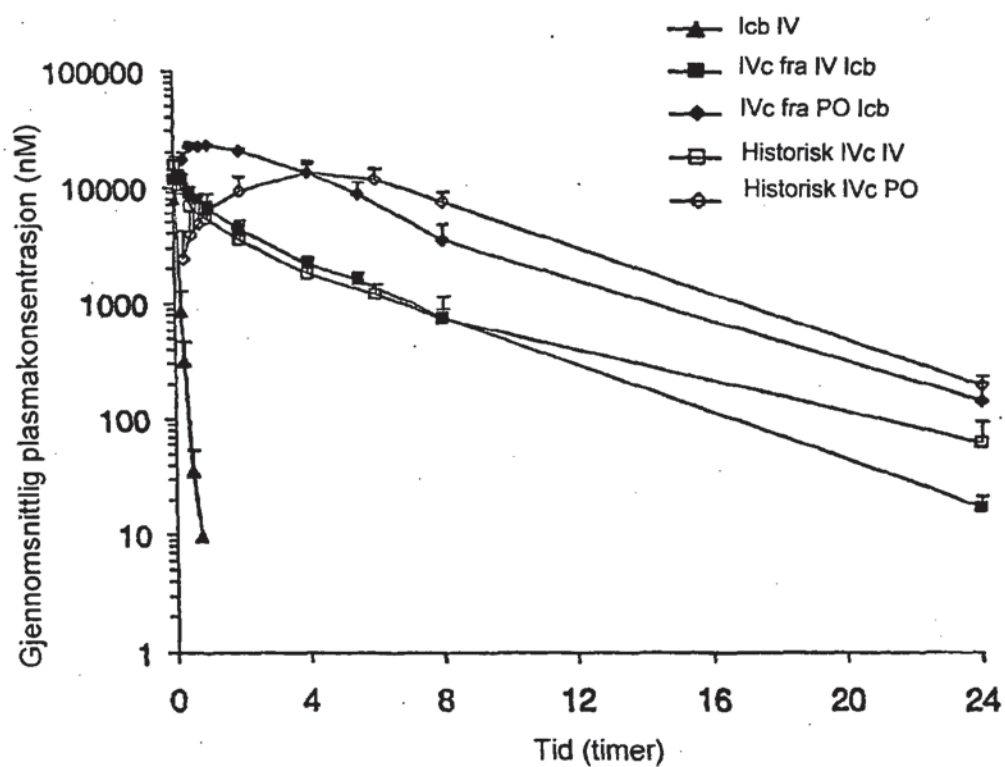
20 / 23

Hydrolyse av Icb i humane placentale ALP-løsninger
og dannelse av IVc

**FIG. 20**

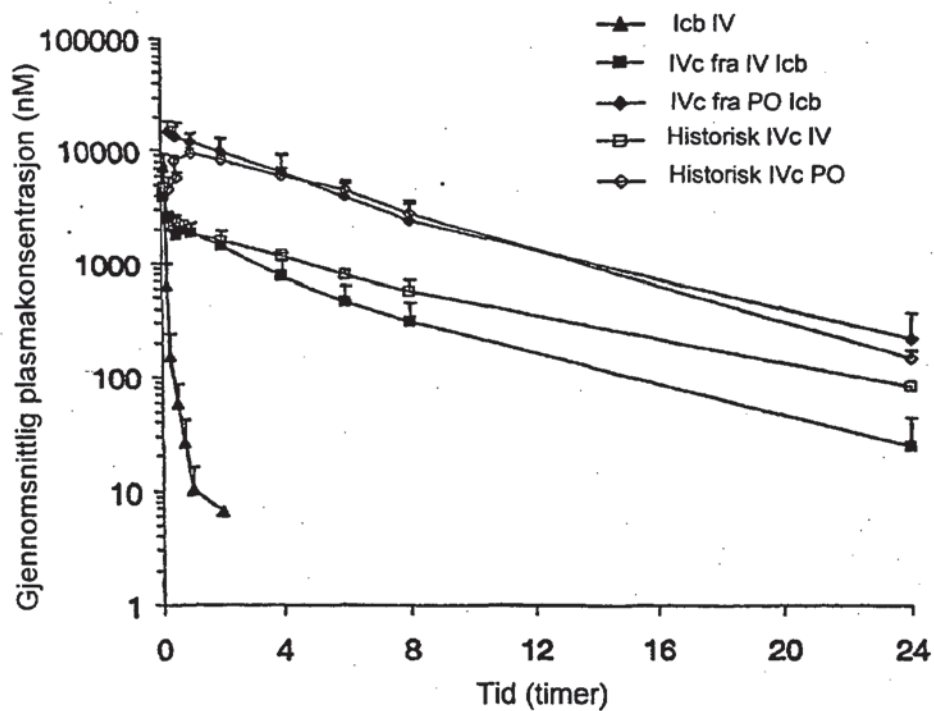
21 / 23

Plasmakonsentrasjon vs. tid profiler for lcb og IVc etter
IV og oral administrering av lcb i rotte, og
historiske data for IVc i rotte

**FIG. 21**

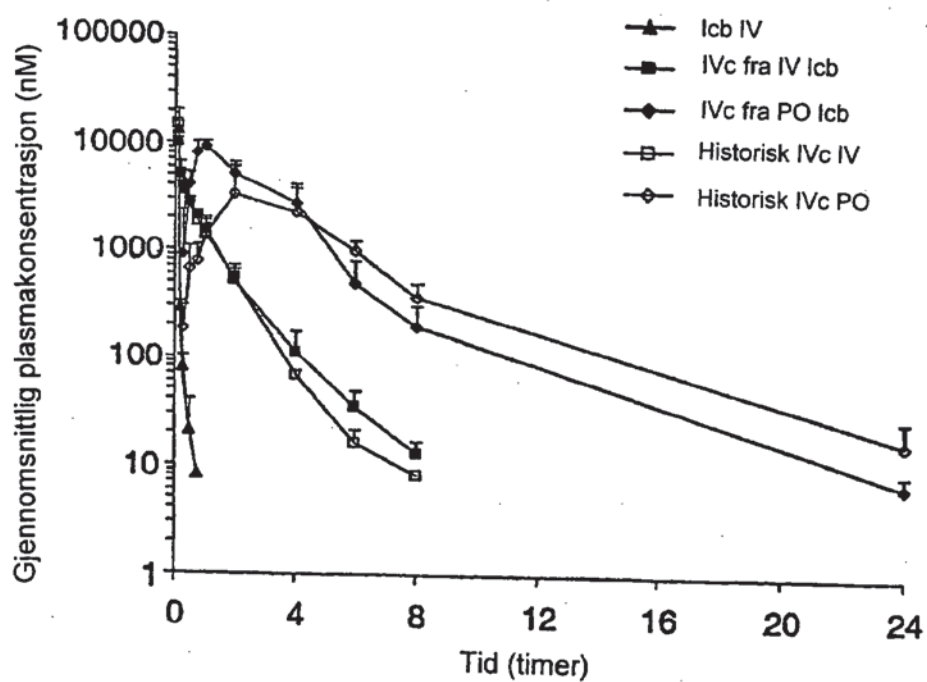
22 / 23

Plasmakonsentrasjon vs. tid profiler for lcb og IVc
etter IV og oral administrering av lcb til hund, og
historiske data for IVc i hund

**FIG. 22**

23 / 23

Plasmakonsentrasjon vs. tid profiler for lcb og IVc
etter IV og oral administrering av lcb i hund, og
historiske data for IVc i hund

**FIG. 23**