



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2201012 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.10.20
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.06.25
(86)	Europeisk søknadsnr	08806741.8
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.10.09
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.06.30
(30)	Prioritet	2007.10.11, US, 979192 P 2008.04.25, US, 47862
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(73)	Innehaver	AstraZeneca AB, , 151 85 Södertälje, SE-Sverige
(72)	Oppfinner	JOHNSON, Paul, David, AstraZeneca R&D AlderleyAlderley Park, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG, GB-Storbritannia LEACH, Andrew, AstraZeneca R&D AlderleyAlderley Park, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG, GB-Storbritannia LUKE, Richard, William, Arthur, AstraZeneca R&D AlderleyAlderley Park, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG, GB-Storbritannia MATUSIAK, Zbigniew, Stanley, AstraZeneca Intellectual PropertyAstraZeneca R&D AlderleyAlderley Park/, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG, GB-Storbritannia MORRIS, Jeffrey, James, AstraZeneca Intellectual PropertyAstraZeneca R&D AlderleyAlderley Park, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG, GB-Storbritannia
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	PYRROLO[2,3-D]PYRIMIDINDERIVATER SOM PROTEINKINASE-B-HEMMERE
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-2006/046023 WO-A-2006/046024 BARNETT ET AL: "The Akt/PKB Family of Protein Kinases: A Review of Small Molecule Inhibitors and Progress Towards Target Validation" CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, HILVERSUM, NL, vol. 5, no. 2, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 109-125, XP009074071 ISSN: 1568-0266

Beskrivelse

[0001] Den foreliggende oppfinnelsen angår en bisyklisk heterosyklus som kan være nyttig ved behandling eller forebygging av en sykdom eller medisinsk tilstand gjennom proteinkinase B (PKB, også kjent som AKT). En slik forbindelse kan derfor være
5 nyttig i behandling eller forebygging av mange forskjellige krefttyper. Oppfinnelsen angår også farmasøytiske sammensetninger omfattende forbindelsen, prosesser for fremstilling av forbindelsen og fremgangsmåter for behandling av sykdommer mediert av PKB ved hjelp av forbindelsen.

[0002] PKB er en komponent av fosfatidyl-3-kinase-(PI3K)-signalreaksjonsveien, som spiller en viktig rolle i celleprolifisering og overlevelse, inkludert cellulære
10 responser på vekstfaktorer. Ved binding av en vekstfaktor, for eksempel epidermal vekstfaktor (EGF), til dens celleoverflatereseptortyrosinkinase, for eksempel EGF-reseptor (EGFR), dimeriserer reseptoren og gjennomgår autofosforylering. Denne autofosforyleringshendelsen gjør at den 85 kD regulatoriske subenheten av PI3K (p85)
15 kan interagere med reseptoren, enten direkte eller via et adapterprotein, for eksempel vekstfaktorreseptorbundet protein 2 (GRB2), og derved aktivere den 110 kDa katalytiske subenheten av PI3K (p110). Ved aktivering katalyserer p110 fosforyleringen av fosfatidylinositol-4,5-bisfosfat (PIP₂) for å produsere fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfat (PIP₃), et andre messengermolekyl som rekrutterer
20 både fosfatidylinositol-avhengig kinase 1 (PDK1) og PKB til plasmamembranen der PDK1 fosforylerer og aktiverer PKB.

[0003] Det er tre kjente isoformer av PKB (PKB α /AKT1, PKB β /AKT2 og PKB γ /AKT3), avledet fra tre forskjellige gener. Aktivering av PKB α er forbundet med
25 celledesignalhendelser som medierer celleproliferasjon og overlevelse, mens aktivering av PKB β er forbundet med invasjon, motilitet og insulinmedierte metabolske prosesser. Aktiverte PKB-beskytter cellene mot apoptose ved å inaktivere proapoptotiske faktorer, f.eks. BAD-, prokaspase-9- og gaffelhode-(FKHR)-transkripsjonsfaktorene, og aktivering av transkripsjonsfaktorer som oppregulerer antiapoptotiske gener, for eksempel syklisk-AMP-responselementbindingsprotein (CREB). PKB kan også bidra
30 til celleoverlevelse ved inaktivering av p53 via fosforylering av MDM2. Tilsvarende induserer aktivert PKB celleproliferasjon ved å aktivere proteiner involvert i cellevekst og metabolisme, for eksempel ved en reaksjonsvei som fører til aktivering av pattedyrmålet for rapamycin (mTOR) og via glykogensyntasekinase-3 (GSK3).

[0004] PKB-mediert stimulering av celleproliferasjon og beskyttelse mot apoptose
35 favoriserer derfor tumorigenese og genetiske forstyrrelser av komponenter innenfor PI3K-reaksjonsveien blir ofte funnet i kreft. For eksempel er mutasjon eller forsterkning av genene som koder for p110-isoformene av PI3K funnet i brystkreft, tarmkreft, eggstokkreft, hodet og nakken og cervikale skvamøse kreftformer, mage- og lungekreft, angioplastiske oligodendrogliomer, amaplastiske astrocytomer,

glioblastoma multiforme og medulloblastomaer. Tilsvarende er mutasjonsforsterkning og/eller overuttrykking av genene som koder for PKB-isoformene funnet i pankreas-, bryst- og eggstokkrefttumorer. Videre inaktiveres genet som koder for PTEN (en fosfatase som har en omvendt rolle til PI3K, som katalyserer omdannelsen av PIP₃ to PIP₂) i mange tumortyper, inkludert ovarie, kolorektal, bryst, gliom, melanom, lunge, leukemier og lymfomer; dette resulterer i aktivering av PKB/AKT.

[0005] På bakgrunn av viktigheten av PI3K-signalreaksjonsveien i tumorcelleproliferering og overlevelse, kan en hvilken som helst forbindelse som forstyrret denne reaksjonsveien, inkludert PKB-inhibitorer, være nyttige ved behandling av kreft.

Detaljerte vurderinger av PI3K-signalreaksjonsveien og dens engasjement i tumorigenese leveres av Hennessy et al., Nature Reviews / Drug Discovery (desember 2005) bind 4, 988-1004. og Cully et al., Nature reviews / Cancer (mars 2006) bind 6, 184-192.

[0006] Den spenningsavhengige kaliumkanalen kodet for av det humane eter-a-go-go-relaterte genet (hERG) antas å spille en nøkkelrolle i repolarisering av det ventrikulære hjertevirkningspotensialet. Endringer i dens aktivitet, forårsaket enten av nedarvede mutasjoner av gensekvensen eller den farmakologiske modifikasjonen, kan føre til forlengelse av aksjonspotensialvarighet. Dette kan føre til forlengelse av QT-intervallet registrert hos mennesket på et elektrokardiogram og til en potensielt dødelig hjertearytmi kjent som Torsades de Pointes (Vandenberg et al. (2001). Trends Pharmacol. Sci. 22, 240-246). Nylige regulatoriske retningslinjer (CPMP/ICH/539/00) anbefaler at en *in vitro*-analyse som undersøker effektene av testforbindelser på hERG-kanalen kan være et element av en pre-klinisk strategi som tar sikte på å forutsi sannsynligheten for at nye kjemiske entiteter (eng.: chemical entities) vil forlenge QT-intervallet registrert hos mennesket på et elektrokardiogram. Som sådan forblir elimineringen av hERG-blokkerende aktivitet en viktig betraktning i utviklingen av et hvilket som helst nytt medikament.

[0007] En rekke forbindelser er blitt beskrevet som målretter PI3K-reaksjonsveien. For eksempel beskriver WO2006/046023 og WO2006/046024 (Astex Therapeutics Limited) purin-, purinon- og deazapurinonforbindelser som inhiberer eller modulerer aktiviteten til proteinkinase B (PKB) og proteinkinase A (PKA). Det eksisterer fremdeles et behov for ytterligere forbedrede midler som har overlegen styrke mot PKB og/eller fordelaktige fysiske egenskaper (for eksempel høyere vandig løselighet, høyere permeabilitet og/eller lavere plasmaproteinbinding) og/eller fordelaktige toksisitetsprofiler (f.eks. en minsket hERG-blokkerende tilbøyelighet) og/eller fordelaktige metabolske profiler i sammenligning med andre kjente PKB-hemmere.

[0008] Søkerne har overraskende funnet at et visst bisyklisk heterosyklusderivat er

spesielt effektivt ved inhibering av PKB-aktivitet og kan derfor være nyttig i behandling av sykdomstilstander der PKB-aktiviteten impliseres, for eksempel kreft.

[0009] Ifølge én utførelsesform ifølge oppfinnelsen tilveiebringes det en forbindelse, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av dette, som er:

(S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid.

[0010] Syntesen av optisk aktive forbindelser kan utføres ved standard metoder av organisk kjemi godt kjent i teknikken, for eksempel ved syntese fra optisk aktive utgangsmaterialer eller ved oppløsning av en racemisk form. Racemiske forbindelser og racemiske mellomprodukter av disse er tegnet i dette dokumentet som flate strukturer mens stereospesifikke forbindelser og stereospesifikke mellomprodukter av disse er trukket med den hensiktsmessige angitte stereokjemien.

[0011] Oppfinnelsen vedrører også hvilken som helst og alle tautomere former av forbindelsen ifølge oppfinnelsen som er inhibitorer av PKB-aktivitet.

[0012] Et egnet farmasøytisk akseptabelt salt av en forbindelse ifølge oppfinnelsen er for eksempel et syreaddisjonssalt av en forbindelse ifølge oppfinnelsen som er tilstrekkelig basisk, for eksempel et syreaddisjonssalt med for eksempel en uorganisk eller organisk syre, for eksempel saltsyre, hydrobromsyre, svovelsyre, fosforsyre, trifluoreddiksyre, sitronsyre eller maleinsyre.

[0013] Det vil forstås at forbindelsen ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan eksistere i solvatiserte, for eksempel hydratiserte, så vel som usolvatiserte former. Det skal forstås at den foreliggende oppfinnelsen omfatter alle slike solvatiserte former som er hemmere av PKB-aktiviteten.

[0014] Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan administreres i form av et promedikament som brytes ned i menneske- eller dyrekroppen for å gi forbindelsen ifølge oppfinnelsen. Eksempler på promedikamenter inkluderer *in vivo*-hydrolyserbare estere av en forbindelse ifølge oppfinnelsen. Forskjellige former for promedikamenter er kjent i teknikken. For å se eksempler på slike promedikamentderivater, se:

a) Design of Prodrugs, publisert av H. Bundgaard, (Elsevier, 1985) og Methods in Enzymology, bind 42, s. 309-396, publisert av K. Widder, et al. (Academic Press, 1985);

b) A Textbook of Drug Design and Development, publisert av Krogsgaard-Larsen and H. Bundgaard, kapittel 5 "Design and Application of Prodrugs", av H. Bundgaard s. 113-191 (1991);

c) H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, 8, 1-38 (1992);

d) H. Bundgaard, et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, 285 (1988); og N. Kakeya, et al., Chem Pharm Bull, 32, 692 (1984).

[0015] I henhold til et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen tilveiebringes det en farmasøytisk sammensetning, som omfatter en forbindelse ifølge oppfinnelsen, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av dette, som definert ovenfor i dette dokumentet sammen med et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel eller bærer.

[0016] Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan være i en form egnet for oral anvendelse (for eksempel som tabletter, pastiller, harde eller myke kapsler, vandige eller oljeaktige suspensjoner, emulsjoner, dispergerbare pulvere eller granuler, siruper eller eliksirer), for topisk anvendelse (for eksempel som kremer, salver, geler eller vandige eller oljeaktige løsninger eller suspensjoner), for administrering ved inhalering (for eksempel som et finfordelt pulver eller en flytende aerosol), for administrering ved insufflasjon (for eksempel som et finfordelt pulver) eller for parenteral administrering (for eksempel som en steril vandig eller oljeaktig løsning for intravenøs, subkutan, intramuskulær eller intramuskulær dosering eller som en stikkpille for rektal dosering).

[0017] Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan oppnås ved konvensjonelle prosedyrer ved hjelp av konvensjonelle farmasøytiske eksipienter, godt kjent innen teknikken. Dermed kan sammensetningene som er ment for oral anvendelse inneholde, for eksempel, ett eller flere fargestoffer, søtningsstoffer, smaksstoffer og/eller konserveringsmidler.

[0018] Forbindelsen ifølge oppfinnelsen vil normalt bli administrert til et varmblodig dyr ved en enhetsdose innenfor intervallet 5-5000 mg/m² kroppsområde av dyret, dvs. omtrent 0,1-100 mg/kg, og dette gir normalt en terapeutisk effektiv dose. En enhetsdoseform, så som en tablett eller kapsel inneholder vanligvis for eksempel 1-250 mg aktiv bestanddel. Det benyttes fortrinnsvis en daglig dose i intervallet 1-50 mg/kg, for eksempel 4-7 mg/kg to ganger daglig. Den daglige dosen vil imidlertid nødvendigvis varieres avhengig av verten som behandles, den bestemte administreringsveien og alvorlighetsgraden av sykdommen som behandles. Følgelig kan helsepersonellet som behandler hvilken som helst bestemt pasient bestemme den optimale doseringen.

[0019] For eksempel kan en farmasøytisk sammensetning ifølge den foreliggende oppfinnelsen egnet for oral administrering omfatte 1-200 mg/ml av forbindelsen ifølge oppfinnelsen, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne, (for eksempel (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid) i 0,5 % hydroksypropylmetylcellulose (HPMC).

[0020] I forbindelse med den foreliggende beskrivelsen inkluderer begrepet "behandling" også "profylakse" med mindre det er spesifikke indikasjoner på det motsatte. Begrepene "terapeutisk" og "terapeutisk" skal tolkes tilsvarende.

[0021] Som anvendt i dette dokumentet er begrepet "behandling" ment å ha sin normale dagligdagse betydning med å håndtere en sykdom for å helt eller delvis å avlaste en, noen eller alle av symptomene sine, eller for å korrigere eller kompensere

for den underliggende patologien.

[0022] Som anvendt i dette dokumentet er begrepet "profylakse" ment å ha sin normale dagligdagse mening og inkluderer primær profylakse for å hindre utviklingen av sykdommen og den sekundære profylaksen hvorved sykdommen allerede har utviklet seg, og pasienten beskyttes midlertidig eller permanent mot eksaserbasjon eller forverring av sykdommen eller utvikling av nye symptomer forbundet med sykdommen.

[0023] Som et resultat av dens PKB-hemmende aktivitet, forventes forbindelsen ifølge den foreliggende oppfinnelsen å være nyttig ved behandling av sykdommer eller medisinske tilstander mediert alene eller delvis av PKB-aktivitet, for eksempel kreft. De kreftformene som kan være mottakelige for behandling ved hjelp av forbindelsen ifølge den foreliggende oppfinnelsen inkluderer, men er ikke begrenset til, eggstokkreft, cervikal kreft, kolorektalkreft, brystkreft, kreft i bukspyttkjertelen, gliom, glioblastom, melanom, prostatakreft, leukemi, lymfom, ikke-Hodgkins lymfom, magekreft, lungekreft, hepatocellulær kreft, magekreft, gastrointestinal stromal tumor (GIST), gliom, tyreoidkreft, gallegangkreft, endometriumkreft, nyrekreft, anaplastisk storcellelymfom, akutt myeloid leukemi (AML), multippelt myelom, melanom og mesoteliom. Brystkreft, og nærmere bestemt, luminal brystkreft, kan være særlig mottakelig for behandling ved anvendelse av forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelsen.

[0024] Det er tenkt at for fremgangsmåtene for behandling av kreft nevnt i dette dokumentet, vil forbindelsen ifølge oppfinnelsen administreres til et pattedyr, nærmere bestemt et menneske. Tilsvarende, for anvendelsene av en forbindelse ifølge oppfinnelsen for behandling av kreft nevnt i dette dokumentet, er det forutsatt at forbindelsen ifølge oppfinnelsen blir administrert til et pattedyr, nærmere bestemt et menneske.

[0025] I henhold til et annet aspekt ifølge oppfinnelsen tilveiebringes det en forbindelse ifølge oppfinnelsen, som definert ovenfor i dette dokumentet eller et farmasøytisk akseptabelt salt av dette, for anvendelse som et medikament.

[0026] I henhold til et ytterligere aspekt ifølge oppfinnelsen tilveiebringes det en forbindelse ifølge oppfinnelsen, som definert ovenfor i dette dokumentet eller et farmasøytisk akseptabelt salt av dette, for anvendelse i behandling av en sykdom mediert gjennom PKB. I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen er sykdommen som medieres gjennom PKB kreft. I en ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen velges kreften fra eggstokkreft, cervikal kreft, kolorektalkreft, brystkreft, kreft i bukspyttkjertelen, gliom, glioblastom, melanom, prostatakreft, leukemi, lymfom, ikke-Hodgkins lymfom, magekreft, lungekreft, hepatocellulær kreft, magekreft, gastrointestinal stromal tumor (GIST), gliom, tyreoidkreft, gallegangkreft, endometriumkreft, nyrekreft, anaplastisk storcellelymfom, akutt myeloid leukemi

(AML), multippelt myelom, melanom og mesoteliom. I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen velges kreften fra brystkreft, ikke-Hodgkins lymfom, kreft i bukspyttkjertelen, hepatocellulær kreft, magekreft, prostatakreft og lungekreft. I én bestemt utførelsesform er kreften brystkreft, nærmere bestemt luminal brystkreft.

5 **[0027]** I henhold til et ytterligere aspekt ifølge oppfinnelsen tilveiebringes anvendelsen av en forbindelse ifølge oppfinnelsen, som definert ovenfor i dette dokumentet, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av dette, for fremstilling av et medikament for behandling av en sykdom mediert gjennom PKB. I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen er sykdommen som medieres gjennom PKB kreft. I en ytterligere
10 utførelsesform ifølge oppfinnelsen velges kreften fra eggstokkreft, cervikal kreft, kolorektalkreft, brystkreft, kreft i bukspyttkjertelen, gliom, glioblastom, melanom, prostatakreft, leukemi, lymfom, ikke-Hodgkins lymfom, magekreft, lungekreft, hepatocellulær kreft, magekreft, gastrointestinal stromal tumor (GIST), gliom, tyreoidakreft, gallegangkreft, endometriumkreft, nyrekreft, anaplastisk
15 storcellelymfom, akutt myeloid leukemi (AML), multippelt myelom, melanom og mesoteliom. I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen velges kreften fra brystkreft, ikke-Hodgkins lymfom, kreft i bukspyttkjertelen, hepatocellulær kreft, magekreft, prostatakreft og lungekreft. I én bestemt utførelsesform er kreften brystkreft, nærmere bestemt luminal brystkreft.

20 **[0028]** I henhold til et ytterligere aspekt ifølge oppfinnelsen tilveiebringes anvendelsen av en forbindelse ifølge oppfinnelsen som definert ovenfor i dette dokumentet, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av dette, for fremstilling av et medikament for behandling av kreft. I en utførelsesform ifølge oppfinnelsen velges kreften fra eggstokkreft, cervikal kreft, kolorektalkreft, brystkreft, kreft i
25 bukspyttkjertelen, gliom, glioblastom, melanom, prostatakreft, leukemi, lymfom, ikke-Hodgkins lymfom, magekreft, lungekreft, hepatocellulær kreft, magekreft, gastrointestinal stromal tumor (GIST), gliom, tyreoidakreft, gallegangkreft, endometriumkreft, nyrekreft, anaplastisk storcellelymfom, akutt myeloid leukemi (AML), multippelt myelom, melanom og mesoteliom. I én utførelsesform ifølge
30 oppfinnelsen velges kreften fra brystkreft, ikke-Hodgkins lymfom, kreft i bukspyttkjertelen, hepatocellulær kreft, magekreft, prostatakreft og lungekreft. I én bestemt utførelsesform er kreften brystkreft, nærmere bestemt luminal brystkreft.

[0029] Kreftbehandlingen definert ovenfor i dette dokumentet kan anvendes som enkelt behandling eller kan involvere, i tillegg til forbindelsen ifølge oppfinnelsen,
35 konvensjonell kirurgi eller strålebehandling eller kjemoterapi. Slik kjemoterapi kan inkludere én eller flere av de følgende kategoriene av anti-tumormidler:-

(i) andre antiproliferative/antineoplastiske medikamenter og kombinasjoner av disse, som anvendt i medisinsk onkologi, som f.eks. alkyleringsmidler (for eksempel cis-platin, oksaliplatin, karboplatin, syklofosamid, nitrogensennep, melfalan, klorambucil,

busulfan, temozolamid og nitrosourinstoffer); antimetaboliter (for eksempel gemcitabin og antifolater som for eksempel fluorpyrimidiner som 5-fluoruracil og tegafur, raltitrexed, metotreksat, cytosinarabinosid og hydroksyurea); antitumorantibiotika (for eksempel antrasykliner som adriamycin, bleomycin, doksorubicin, daunomycin, epirubicin, idarubicin, mitomycin-C, daktinomycin og mitramycin); antimitotiske midler (for eksempel vinkaalkaloider som vinkristin, vinblastin, vindesin og vinorelbin og taksoider som taksol og taksotere og polokinasehemmere); og topoisomerasehemmere (for eksempel epipodofyllotoksiner som etoposid og teniposid, amsakrin, topotekan og kamptotecin);

(ii) cytostatika som antiøstrogener (for eksempel tamoksifen, fulvestrant, toremifen raloksifen droloksifen og jodxyfen), antiandrogener (for eksempel bikalutamid, flutamid, nilutamid og cyproteronacetat), LHRH-antagonister eller LHRH-agonister (for eksempel goserelin, leuprorelin og buserelin), progestogener (for eksempel megestrolacetat), aromatasehemmere (for eksempel som anastrozol, letrozol, vorazol og eksemestan) og hemmere av 5 α -reduktase som for eksempel finasterid;

(iii) anti-invasjonsmidler (for eksempel c-Src-kinasefamiliehemmere som 4-(6-klor-2,3-metylendioksyanilino)-7-[2-(4-metylpiperazin-1-yl)etoksy]-5-tetrahydropyran-4-yloksykinazolin (AZD0530; internasjonal patentsøknad WO 01/94341) og N-(2-klor-6-metylfenyl)-2-{6-[4-(2-hydroksyetyl)piperazin-1-yl]-2-metylpyrimidin-4-ylamino}tiazol-5-karboksamid (dasatinib, BMS-354825; J. Med. Chem., 2004, 47, 6658-6661), og metalloproteinasehemmere som marimastat, hemmere av urokinaseplasminogenaktivatorreseptorfunksjon eller antistoffer mot heparanase);

(iv) inhibitorer av vekstfaktorfunksjon, for eksempel omfatter inhibitorer som inkluderer vekstfaktorantistoffer og vekstfaktorreseptorantistoffer (for eksempel anti-erbB2-antistoffet trastuzumab [HerceptinTM], anti-EGFR-antistoffet panitumumab, anti-erbB1-antistoffet cetuximab [Erbix, C225] og hvilken som helst vekstfaktor- eller vekstfaktorreseptorantistoffer offentliggjort av Stem et al. Critical reviews in oncology/haematology, 2005, Vol. 54, s. 11-29); slike hemmere inkluderer også tyrosinkinaseinhibitorer, for eksempel hemmere av den epidermale vekstfaktorfamilien (for eksempel EGFR-familietyrosinkinasehemmere, som for eksempel N-(3-klor-4-fluorfenyl)-7-metoksy-6-(3-morfolinopropoksy)kinazolin-4-amin (gefitinib, ZD1839), N-(3-etynylfenyl)-6,7-bis(2-metoksyetoksy)kinazolin-4-amin (erlotinib, OSI-774) og 6-akrylamido-N-(3-klor-4-fluorfenyl)-7-(3-morfolinopropoksy)-kinazolin-4-amin (CI 1033), erbB2-tyrosinkinasehemmere som for eksempel lapatinib, hemmere av hepatocyttevekstfaktorfamilien, hemmere av den blodplateavlede vekstfaktorfamilien som for eksempel imatinib, hemmere av serin-/treoninkinaser (for eksempel Ras/Raf-signaleringshemmere, som for eksempel farnesyltransferasehemmere, for eksempel sorafenib (BAY 43-9006)), hemmere av celledifferensiering gjennom MEK- og/eller AKT-kinaser, hemmere av hepatocyttevekstfaktorfamilien, c-kit-hemmere, abl kinase-

hemmere, IGF-reseptor-(insulinlignende vekstfaktor)-kinaseinhibitorer; aurorakinasehemmere (for eksempel AZD1152, PH739358, VX-680, MLN8054, R763, MP235, MP529, VX-528 og AX39459) og syklinavhengige kinasehemmere som f.eks. CDK2- og/eller CDK4-hemmere;

(v) antiangiogene midler så som de som hemmer virkningene av vaskulær endotel vekstfaktor, [for eksempel det anti-vaskulære endotelcellevekstfaktorantistoffet bevacizumab (Avastin™) og VEGF-reseptortyrosinkinasehemmere, som for eksempel 4-(4-brom-2-fluoranilino)-6-metoksy-7-(1-metylpiperidin-4-ylmetoksy)kinazolin (ZD6474; eksempel 2 inne i WO 01/32651), 4-(4-fluor-2-metylindol-5-yloksy)-6-metoksy-7-(3-pyrrolidin-1-ylpropoksy)kinazolin (AZD2171; eksempel 240 inne i WO 00/47212), vatalanib (PTK787; WO 98/35985) og SU11248 (sunitinib; WO 01/60814), forbindelser som for eksempel de som er offentliggjort i de internasjonale patentsøknadene WO97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 og WO 98/13354 og forbindelser som virker ved andre mekanismer (for eksempel linomid, hemmere av integrin- $\alpha\beta$ 3-funksjon og angiostatin)];

(vi) vaskularskadende midler som for eksempel Combretastatin A4 og forbindelser offentliggjort i den internasjonale patentsøknadene WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 og WO 02/08213;

(vii) antisensebehandlinger, for eksempel de som er rettet mot målene listet opp ovenfor, så som ISIS 2503, en anti-ras-antisense;

(viii) genbehandlingstilnærminger, inkludert for eksempel tilnærminger mot å erstatte avvikende gener, som for eksempel avvikende p53 eller avvikende BRCA1 eller BRCA2, GDEPT-(genrettet enzympromedikamentbehandling)-tilnærminger som for eksempel de som anvender cytosindeaminase, tymidinkinase eller et bakterielt nitroreduktaseenzym og tilnærminger for å øke pasientens toleranse for kjemoterapi eller radioterapi, som f.eks. flermedikamentresistensgenbehandling; og

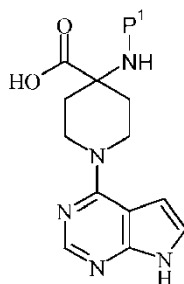
(ix) immunbehandlingstilnærminger, inkludert for eksempel ex-vivo- og in-vivo-tilnærminger for å øke immunogenisiteten til pasienttumorer, som for eksempel transfeksjon med cytokiner, som for eksempel interleukin 2, interleukin 4 eller granulocyttmakrofagkolonistimulerende faktor, tilnærminger for å redusere T-celleenergi, tilnærminger ved hjelp av transfekterte immunceller, som for eksempel cytokin-transfekte dendritiske celler, tilnærminger ved hjelp av cytokin-transfekte tumorcellelinjer og tilnærminger ved hjelp av anti-idiotypiske antistoffer.

[0030] Forbindelsen i henhold til oppfinnelsen, eller et salt av denne, kan fremstilles ved hvilken som helst prosess kjent for å være anvendbar for fremstilling av slike forbindelser eller strukturelt beslektede forbindelser. Funksjonelle grupper kan beskyttes og avbeskyttes ved hjelp av konvensjonelle fremgangsmåter. For eksempler på beskyttende grupper som for eksempel amino- og karboksylsyrebeskyttelsesgrupper (så vel som midler for dannelsen og eventuell avbeskyttelse), se T.W. Greene and

P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", andre utgave, John Wiley & Sons, New York, 1991.

[0031] Visse prosesser for syntesen av forbindelsen ifølge oppfinnelsen tilveiebringes som et ytterligere trekk ifølge oppfinnelsen. I henhold til et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen tilveiebringes det dermed en prosess for fremstilling av en forbindelse ifølge oppfinnelsen, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av dette, som omfatter:

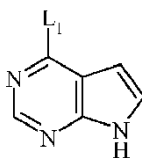
(a) omsetning av en syre med formel (II) med (S)-3-amino-3-(4-klorfenyl)propan-1-ol:



(II)

der **P¹** representerer en egnet beskyttende gruppe, for eksempel tert-butoksykarbonyl; eller

(b) omsetning av (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)piperidin-4-karboksamid med en bisyklisk heterosyklus av formel (V);



(V)

der **L₁** representerer en egnet beskyttende gruppe, for eksempel klorin; og deretter, om nødvendig:

(i) fjerning av den beskyttende gruppen; og/eller

(ii) dannelselse av et farmasøytisk akseptabelt salt av denne.

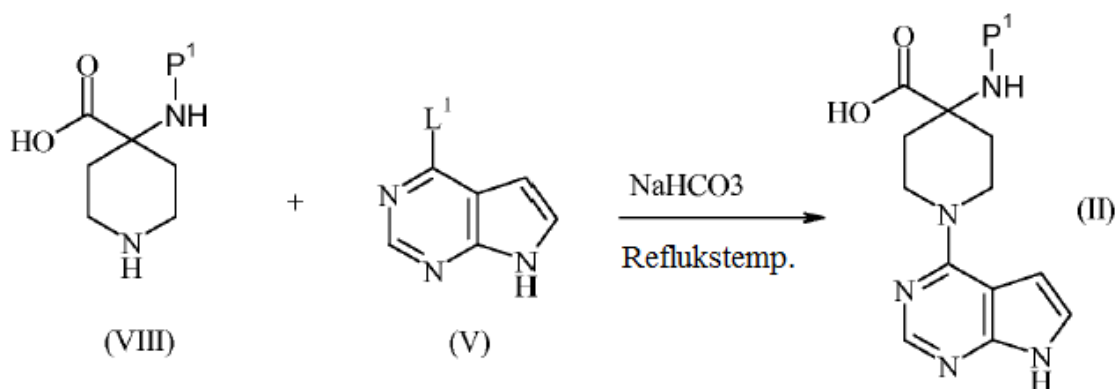
[0032] Spesifikke reaksjonstilstander for prosessene (a) og (b) ovenfor er som følger:

Prosess (a) - syrer med formel (II) og aminer så som (S)-3-amino-3-(4-klorfenyl)propan-1-ol kan omsettes sammen i nærvær av en egnet koblingsreagens, f.eks. O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (HATU), og en egnet base, for eksempel N,N'-diisopropyletylamin (DIPEA), i et egnet løsningsmiddel, for eksempel dimetylacetamid (DMA), og ved en egnet temperatur, for eksempel 50 til 70 °C, mer hensiktsmessig rundt 60 °C; prosess (b) - karboksamider som for eksempel (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)piperidin-4-karboksamid og heterosykluser med formel (V) kan omsettes sammen i nærvær av en

egnet base, for eksempel N,N'-diisopropyletylamin (DIPEA), i et egnet løsningsmiddel, for eksempel butan-1-ol, og ved en egnet temperatur, for eksempel 50 til 70 °C, mer hensiktsmessig rundt 60 °C;

[0033] Forbindelser med formel (I) eller (II) kan fremstilles ifølge skjema 1:

5



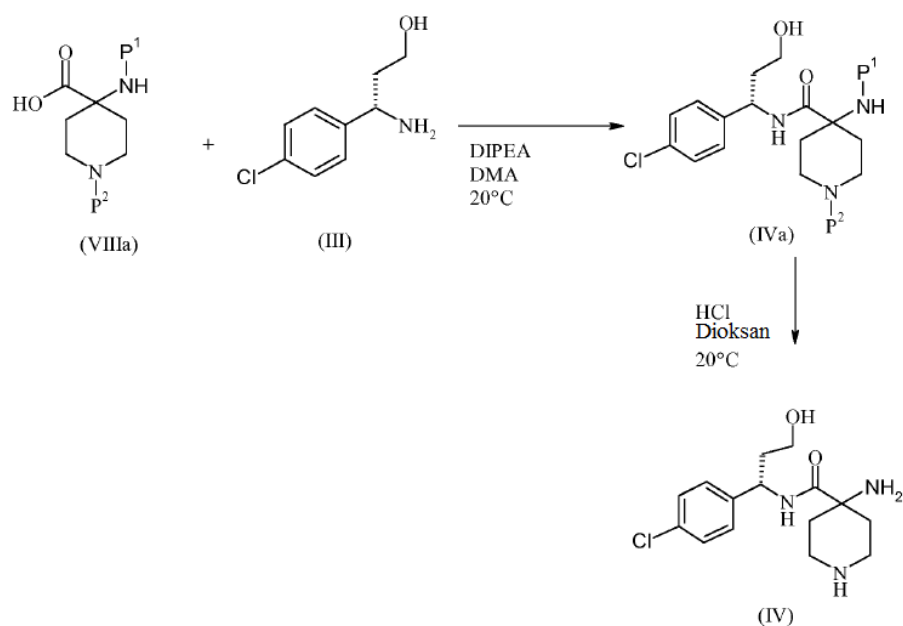
Skjema 1

10

der P¹ er en egnet beskyttende gruppe, for eksempel tert-butoksykarbonyl; L¹ er en egnet avspaltbar gruppe, for eksempel klorin.

[0034] Forbindelser som for eksempel (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)piperidin-4-karboksamid kan fremstilles i henhold til skjema 2:

15



Skjema 2

der P¹ og P² er egnede beskyttende grupper, for eksempel tert-butoksykarbonyl.

[0035] Forbindelser, som f.eks. (S)-3-amino-(4-klorfenyl)propan-1-ol og forbindelser med formlene (V) og (VIII) er kommersielt tilgjengelige, kjent i litteraturen, fremstilt ved standard prosesser som er kjent innen teknikken, eller kan fremstilles i henhold til prosessene beskrevet i dette dokumentet.

5 **[0036]** De følgende eksemplene er for illustrasjonsformål og ikke beregnet på å begrense omfanget av denne søknaden. Hver eksemplifiserte forbindelse representerer et bestemt og uavhengig aspekt av oppfinnelsen. Alle utgangsmaterialene er kommersielt tilgjengelige forbindelser eller de er kjent i litteraturen eller de fremstilles ved standard prosesser kjent innen teknikken.

10 **[0037]** Med hensyn til de følgende eksemplene er generelt:

(i) temperaturene gitt i grader Celsius (°C); operasjonene ble utført ved romtemperatur eller omgivelsestemperatur, dvs. ved en temperatur i området fra 18 til 25 °C;

15 (ii) organiske løsninger ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat eller vannfritt natriumsulfat; fordampning av løsningsmiddel ble utført under anvendelse av en roterende fordamper under redusert trykk (600 til 4000 Pascals; 4,5 til 30 mmHg) med en badetemperatur på opptil 60 °C;

(iii) kromatografi betyr flashkromatografi på silikagel; tynnsjikt-kromatografi (TLC) ble utført på silikagelplater;

20 (iv) generelt ble reaksjonsforløpet fulgt av TLC og/eller analytisk LC-MS, og reaksjonstidene er kun gitt for illustrasjon.

(v) sluttproduktene hadde tilfredsstillende protonkjernemagnetisk resonans (NMR)-spektra og/eller massespektraldata;

25 (vi) utbytterne er kun gitt for illustrasjon og er ikke nødvendigvis de som kan oppnås ved grundig prosessutvikling; fremstillingene ble gjentatt hvis det var nødvendig med mer materiale;

(vii) når de gis er NMR-data i form av deltaverdier for viktige diagnostiske protoner, gitt i deler per million (ppm) i forhold til tetrametylsilan (TMS) som en indre standard, bestemt ved 500 MHz under anvendelse av perdeuteriodimetylsulfoksid (DMSO-d₆) som løsningsmiddel, med mindre annet er angitt; de følgende forkortelsene er blitt

30 anvendt: s, singlett; d, dublett; t, triplett; q, kvartett; m, multiplt; bs, bred singlett;

(viii) kjemiske symboler har de vanlige betydningene sine; SI-enheter og symboler er anvendt;

(ix) massespektra- (MS) og LC-MS-data ble generert på et LC-MS-system der HPLC-komponenten generelt omfattet et Agilent 1100, Waters Alliance HT (2790 & 2795)

35 utstyr eller en HP1100-pumpe og diodeanalyse med CTC-autosampler og ble kjørt på en Phenomenex Gemini C18 5 µm, 50 x 2 mm kolonne (eller tilsvarende) eluert med enten syreeluent (for eksempel ved hjelp av en gradient mellom 0 - 95 % vann/acetonitril med: 5 % av en 1 % maursyre i 50:50 vann:acetonitril (v/v) blanding), eller basisk eluent (for eksempel ved hjelp av en gradient mellom 0 - 95 %

vann/acetonitril med 5 % av en 0,1 % 880 ammoniakk i acetonitrilblanding); og MS-komponenten omfattet generelt en Waters ZQ-massespektrometerscanning over et hensiktsmessig masseområde. Kromatogrammer for elektropray-(ESI)-positiv og negativ basetoppintensitet og UV totalt absorpsjonskromatogram fra 220-300 nm, genereres og verdier for m/z er gitt; generelt angis bare ioner som indikerer opphavsmassen, og med mindre annet er angitt er den siterte verdien (M+H)+ for positiv ionmodus og (M-H)- for negativ ionmodus;

(x) med mindre annet er angitt har forbindelser som inneholder et asymmetrisk substituert karbon- og/eller svovelatom ikke blitt løst;

(xi) alle mikrobølgeresaksjonene ble utført i enten en Biotage Optimizer EXP- eller en CEM Explorer-mikrobølge;

(xii) preparativ væskekromatografi med høy ytelse (HPLC) ble utført på et Gilson-instrument ved hjelp av de følgende tilstandene:

Kolonne: C18-reversert-fasesilika, for eksempel Waters 'Xbridge', 5 µm silika, 19 x 100 mm, eller 30 x 100 mm, ved hjelp av avtagende polare løsningsmiddelblandinger som eluent (avtagende forhold mellom løsningsmiddel A og løsningsmiddel B)

Løsningsmiddel A: Vann med 1 % ammoniumhydroksid

Løsningsmiddel B: Acetonitril

Strømningshastighet: 28 ml/min eller 61 ml/min

Gradient: Tilpasset for å passe hver forbindelse - vanligvis 7-10 min i lengde

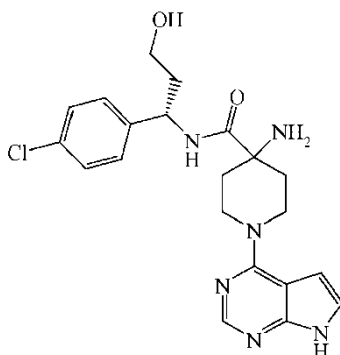
Bølgelengde: 254 nm

Forkortelser

[0038]

Boc	Tert-butoksykarbonyl
DCM	diklormetan
DIPEA	N,N'-diisopropyletylamin
DMA	dimetylacetamid
DMF	dimetylformamid
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroniumheksafluorfosfat
NMP	N-metylpyrrolidinon
OBD	optimal sjikttetthet
PTFE	polytetrafluoretylen
SCX	sterk kationutveksling
SFC	superkritisk strømningskromatografi
THF	tetrahydrofuran

Eksempel 9: (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid (E9)
[0039]



5

[0040] HCl (4M i dioksan) (3,00 ml, 12,00 mmol) ble tilsatt til (S)-tert-butyl-4-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)-1-(7H-pyrrolo [2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-ylkarbamat (mellomprodukt 22) (1,27 g, 2,40 mmol) i diklormetan

10

(20 ml). Den resulterende suspensjonen ble omrørt ved 20 °C i 16 timer. Reaksjonsblandingen ble filtrert gjennom en PTFE-filterkopp og det urene faststoffet ble rensed ved preparativ HPLC (Waters XTerra C18-kolonne, 5 µm silika, 19 mm diameter, 100 mm lengde), ved hjelp av minkende polare blandinger av vann (som inneholder 1 % TFA) og MeCN som eluenter. Fraksjoner som inneholder den ønskede

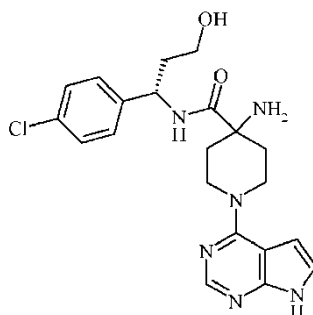
15

forbindelsen ble rensed ved ionebyttekromatografi, ved hjelp av en SCX-kolonne. Det ønskede produktet ble eluert fra kolonnen ved hjelp av 7M NH₃/MeOH, og de rene fraksjonene ble fordampet til tørrhet for å gi (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid (0,200 g, 19,4 %) i form av et hvitt faststoff.

20

¹H NMR (399,9 MHz, DMSO-d₆) δ 1,45 (2H, d), 1,86 (1H, d), 1,90 - 1,93 (1H, m), 2,19 (2H, s), 3,38 (2H, q), 3,51 - 3,58 (2H, m), 4,35 - 4,38 (2H, m), 4,53 (1H, t), 4,88 (1H, d), 6,58 (1H, t), 7,16 (1H, t), 7,32 - 7,38 (4H, m), 8,12 (1H, s), 8,43 (1H, d), 11,63 (1H, s), m/z (ESI+) (M+H)⁺ = 429; HPLC t_R = 1,46 min.

Eksempel 9 alternativ vei 1: (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid
[0041]



5

[0042] N-etyldiisopropylamin (1,676 ml, 9,62 mmol) ble tilsatt til (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)piperidin-4-karboksamid (mellomprodukt 49) (1 g, 3,21 mmol) og 4-klor-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (0,493 g, 3,21 mmol) i butan-1-ol (15 ml). Den resulterende løsningen ble omrørt ved 60 °C i 18 timer.

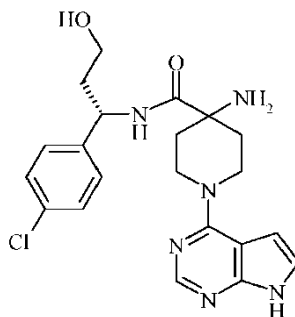
Reaksjonsblandingen ble fortynnet med EtOAc (50 ml) og vasket sekvensielt med vann (25 ml), og mettet saltløsning (25 ml). Det organiske laget ble tørket over MgSO₄, filtrert og fordampet for å gi det urene produktet. Det urene produktet ble rensert ved flashsilikakromatografi, elueringsgradient 0 til 6 % MeOH med ammoniakk i DCM.

De rene fraksjonene ble fordampet til tørrhet for å gi (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid (842 mg) i form av et hvitt skum. (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid ble omrørt i etylacetat (7 ml) i 18 timer. Faststoffet ble oppsamlet ved filtrering, vasket med en liten mengde etylacetat og vakuumovnstørket ved 55 °C i 18 timer for å gi (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid (0,585 g, 42,5 %) i form av et hvitt faststoff. m/z (ES⁺) (M+H)⁺ = 429; HPLC t_R = 1,60 min.

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-d₆) δ 1,39 - 1,47 (2H, m), 1,80 - 2,02 (4H, m), 2,17 (2H, s), 3,35 - 3,40 (2H, m), 3,50 - 3,59 (2H, m), 4,34 - 4,41 (2H, m), 4,53 (1H, t), 4,88 (1H, d), 6,57 (1H, m), 7,14 - 7,16 (1H, m), 7,31 - 7,37 (4H, m), 8,12 (1H, s), 8,42 (1H, d), 11,62 (1H, s)

25

Eksempel 9 alternativ vei 2: (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid
[0043]



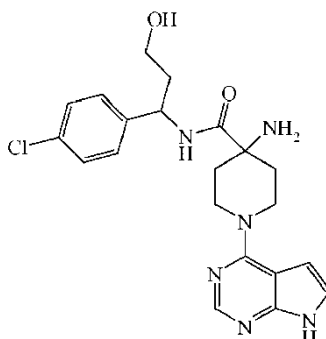
5

[0044] (S)-3-amino-3-(4-klorfenyl)propan-1-ol (**mellomprodukt 47**) (2,055 g, 11,07 mmol) ble tilsatt i en del til 4-(tert-butoksykarbonylamino)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksylysyre (**mellomprodukt 1**) (4 g, 11,07 mmol) og DIPEA (5,80 ml, 33,20 mmol) i DMA (40 ml). HATU (4,63 g, 12,18 mmol) ble tilsatt og den resulterende løsningen ble omrørt ved 20 °C i 24 timer. Reaksjonsblandingen ble fordampet til tørrhet og deretter fortynnet med EtOAc (300 ml), og vasket sekvensielt med vann (50 ml) and mettet saltløsning (50 ml). Det organiske laget ble tørket over MgSO₄, filtrert og fordampet for å gi det urene produktet. Det urene produktet ble rensset ved flashsilikakromatografi, elueringsgradient 2 til 6 % MeOH med ammoniakk i DCM. De rene fraksjonene ble fordampet til tørrhet og triturerert med dioksan (40 ml) for å gi (S)-tert-butyl-4-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-ylkarbammat (**mellomprodukt 22**) (4,82 g, 82 %) i form av et hvitt faststoff. (S)-tert-butyl-4-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-ylkarbammat (**mellomprodukt 22**) (4,82 g, 82 %) ble suspendert i dioksan (40,0 ml) og 4M hydrogenklorid i dioksan (7,69 ml, 221,36 mmol) ble tilsatt. Reaksjonen ble omrørt ved omgivelsestemperatur i 2 timer. Det urene produktet ble rensset ved ionebytterkromatografi, ved hjelp av en SCX-kolonne. Det ønskede produktet ble eluert fra kolonnen ved hjelp av 3,5M NH₃/MeOH og de rene fraksjonene ble fordampet til tørrhet. Det urene produktet ble rensset ved preparativ HPLC (Waters XBridge Prep C18 OBD kolonne, 5 µm silika, 19 mm diameter, 100 mm lengde), ved hjelp av minkende polare blandinger av vann (som inneholdt 1 % TFA) og MeCN som eluenter. Fraksjonene som inneholdt den ønskede forbindelsen ble fordampet til tørrhet for å gi (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid (1,200 g, 25,3 %) i form av et hvitt faststoff. m/z (ES⁺) (M+H)⁺ = 429; HPLC tR = 1,67 min.

¹H NMR samsvarer med den forrige.

30

Eksempel 13: 4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid
[0045]

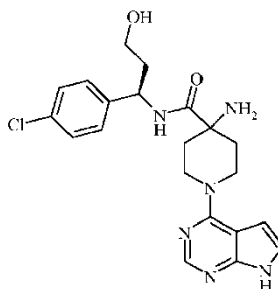


5

[0046] TFA (0,7 ml) ble tilsatt til en suspensjon av tert-butyl-4-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-ylkarbamat (**mellomprodukt 36**) (175 mg, 0,33 mmol) i diklormetan (7 ml) under argon. Den resulterende løsningen ble omrørt ved 20 °C i 16 timer. Løsningsmidlene ble fjernet under vakuum, og reaksjonsblandingen ble rensset ved preparativ HPLC ved hjelp av en Waters X-Bridge-reversfasekolonne (C-18, 5 mikroner silika, 19 mm diameter, 100 mm lengde) med avtagende polare blandinger av vann (inneholdt 0,2 % ammoniumkarbonat) og acetonitril som elueringsmiddel. De rene fraksjonene ble fordampet til tørrhet for å gi 4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid (99 mg, 69,8 %) i form av et hvitt skum.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 1,38 -1,46 (2H, m), 1,81 - 1,91 (4H, m), 2,25 (2H, br s), 3,48 (2H, m), 3,35 - 3,54 (2H, m), 4,35 - 4,41 (2H, m), 4,57 (1H, t), 4,87 (1H, m), 6,58 δ (1H, d), 7,16 (1H, d), 7,31 - 7,37 (4H, m), 8,11 (1H, s), 8,45 (1H, d), 11,65 (1H, s), m/z (ESI+) (M+H)⁺ = 429; HPLC tR = 1,58 min.

Eksempel 15: (R)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid
[0047]



[0048] HCl (4M i dioksan) (0,378 ml, 1,51 mmol) ble tilsatt til (R)-tert-butyl-4-(1-(4-

25

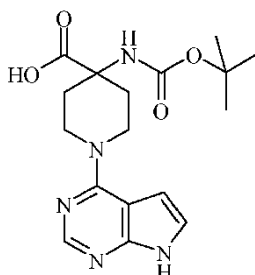
klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-ylkarbamat (**mellomprodukt 42**) (0,160 g, 0,30 mmol) i DCM (3 ml). Den resulterende suspensjonen ble omrørt ved 20 °C i 3 timer. Reaksjonsblandingen ble fordampet. Det urene produktet ble rensset ved preparativ HPLC (Waters XTerra C18-
 5 kolonne, 5 µm silika, 19 mm diameter, 100 mm lengde), ved hjelp av minkende polare blandinger av vann (som inneholdt 1 % ammoniakk) og MeCN som eluenter.

Fraksjonene som inneholdt den ønskede forbindelsen ble fordampet til tørrhet for å gi (R)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid (0,051 g, 39,3 %) i form av et hvit faststoff.

¹H NMR (399,9 MHz, DMSO-d₆) δ 1,46 (2H, d), 1,86 (1H, d), 1,90 - 1,93 (1H, m), 2,10 (2H, m), 3,37 (1H, t), 3,55 (2H, d), 4,40 (2H, d), 4,53 (2H, m), 4,88 (1H, d), 6,58 (1H, t), 7,16 (1H, t), 7,32 - 7,38 (4H, m), 8,14 (1H, d), 8,43 (1H, d), 11,63 (1H, s) ingen synlig NH₂.

MS m/e MH⁺ 429; HPLC tR = 1,46 min.

Mellomprodukt 1: 4-(tert-butoksykarbonylamino)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksylsyre
[0049]

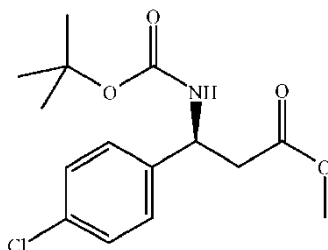


[0050] En blanding av 4-[(2-metylpropan-2-yl)oksykarbonylamino]piperidin-4-karboksylsyre (115,6 g) i CH₃CN-H₂O (6 l) ble tilsatt til NaHCO₃ (181 g), etterfulgt av 4-klor-7H-pyrrol[2,3-d]pyrimidin (72,7 g). Blandingen ble oppvarmet til tilbakeløp
 25 over natten under nitrogen i 24 timer og deretter ekstrahert med EtOAc (1 l x 4). Det vandige laget ble konsentrert og MeOH (1,5 l) ble tilsatt. Blandingen ble ristet i 30 min ved 45 °C og filtrert. Filtratet ble konsentrert på nytt, og løst opp i H₂O (300 ml). 6N HCl ble tilsatt inntil pH-en nådde 4,5 (ca. 80 ml). Blandingen ble filtrert, og kaken ble tørket under vakuum for å gi det urene produktet, som ble ytterligere rensset ved
 30 silikagelkromatografi (ved eluering med MeOH: DCM = 1:3), for å gi 4-[(2-metylpropan-2-yl)oksykarbonylamino]-1-(3,5,7-triazabisyklo[4.3.0]nona-2,4,8,10-tetraen-2-yl)piperidin-4-karboksylsyre i form av et lysegrått faststoff (105 g, 63 %).
¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-d₆) δ 1,40 (9H, s), 1,88 - 1,95 (2H, m), 2,02 - 2,06 (2H, m), 3,44 - 3,51 (2H, m), 4,30 (2H, d), 6,60 - 6,61 (1H, m), 7,16 - 7,18 (1H, m),

7,29 (1H, s), 8,14 (1H, s), 11,68 (1H, s).

MS m/e MH^+ 362.

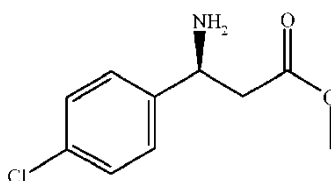
**Mellomprodukt 19: (S)-metyl-3-(tert-butoksykarbonylamino)-3-(4-
klorfenyl)propanoat**
[0051]



[0052] Jodmetan (1,038 ml, 16,68 mmol) ble tilsatt i en del til (S)-3-(tert-butoksykarbonylamino)-3-(4-klorfenyl)propansyre (1 g, 3,34 mmol) og kaliumkarbonat (0,922 g, 6,67 mmol) i DMF (15 ml). Den resulterende suspensjonen ble omrørt ved 80 °C i 24 timer. Reaksjonsblandingen ble konsentrert og fortynnet med EtOAc (50 ml) med vann (50 ml). Det organiske laget ble tørket over $MgSO_4$, filtrert og fordampet for å gi (S)-metyl 3-(tert-butoksykarbonylamino)-3-(4-klorfenyl)propanoat (1,340 g, 128 %) i form av et oransje faststoff.

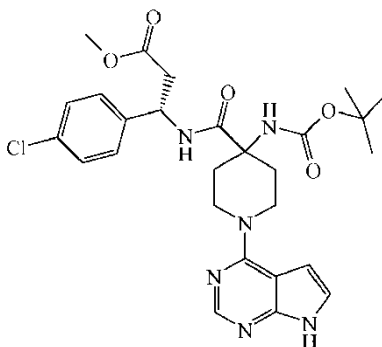
1H NMR (399,9 MHz, $DMSO-d_6$) δ 1,36 (9H, s), 2,71 - 2,74 (1H, m), 2,74 - 2,80 (1H, m), 3,57 (3H, s), 4,91 (1H, d), 7,33 (2H, d), 7,39 (2H, d), 7,49 (1H, d), m/z (ESI-) (M-H)- = 312; HPLC tR = 2,57 min.

Mellomprodukt 20: (S)-metyl 3-amino-3-(4-klorfenyl)propanoat (hydroklorid)
[0053]



[0054] Saltsyre (4,0M i 1,4-dioksan) (4,18 ml, 16,73 mmol) ble tilsatt i en porsjon til (S)-metyl-3-(tert-butoksykarbonylamino)-3-(4-klorfenyl)propanoat (**mellomprodukt 19**) (1,05 g, 3,35 mmol) i DCM (20 ml) ved 20 °C. Den resulterende løsningen ble omrørt ved 20 °C i 5 timer. Reaksjonsblandingen ble fordampet for å gi (S)-metyl-3-amino-3-(4-klorfenyl)propanoat (hydroklorid) (0,850 g, 102 %) i form av et hvitt faststoff. 1H NMR (399,9 MHz, $DMSO-d_6$) δ 2,98 - 3,04 (1H, m), 3,16 - 3,21 (1H, m), 3,58 (3H, s), 4,62-4,66 (1H, m), 7,50 - 7,52 (2H, m), 7,57 - 7,59 (2H, m), 8,66 (3H, s), m/z (ESI+) (M+H)+ = 214; HPLC tR = 1,71 min.

Mellomprodukt 21: (S)-metyl-3-(4-(tert-butoksykarbonylamino)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamido)-3-(4-klorfenyl)propanoat
[0055]

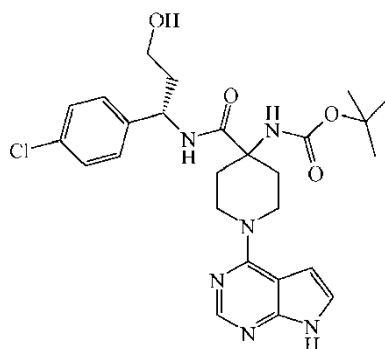


[0056] O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (1,157 g, 3,04 mmol) ble tilsatt i en porsjon til 4-(tert-butoksykarbonylamino)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksylsyre (**mellomprodukt 1**) (1 g, 2,77 mmol) og N,N-diisopropyletylamin (1,006 ml, 6,09 mmol) i NMP (10 ml) ved 20 °C. Den resulterende løsningen ble omrørt ved 20 °C i 5 minutter. (S)-metyl-3-amino-3-(4-klorfenyl)propanoat (hydroklorid) (**mellomprodukt 20**) (0,692 g, 2,77 mmol) ble deretter tilsatt til løsningen og omrørt ved romtemperatur i 3 timer. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med EtOAc (100 ml) og vasket sekvensielt med vann (2 x 50 ml) og saltløsning (50 ml). Det organiske laget ble tørket over MgSO₄, filtrert og fordampet for å gi det urene produktet. Det urene produktet ble rensset ved flashsilikakromatografi, elueringsgradient 0 til 5 % MeOH i DCM. De rene fraksjonene ble fordampet til tørrhet for å gi (S)-metyl-3-(4-(tert-butoksykarbonylamino)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamido)-3-(4-klorfenyl)propanoat (1,27 g, 82 %) i form av et hvitt faststoff.

¹H NMR (399,9 MHz, DMSO-d₆) δ 1,40 (9H, s), 1,99 (2H, s), 2,04 - 2,07 (2H, m), 2,79 - 2,84 (2H, m), 3,56 (3H, s), 3,60 - 3,66 (1H, m), 3,67 - 3,70 (1H, m), 4,20 (2H, t), 5,20 - 5,26 (1H, m), 6,73 (1H, d), 7,13 (1H, s), 7,27 (1H, t), 7,35 (4H, q), 8,14 (1H, d), 8,21 (1H, s), 11,98 (1H, s), m/z (ESI+) (M+H)⁺ = 557; HPLC t_R = 2,12 min.

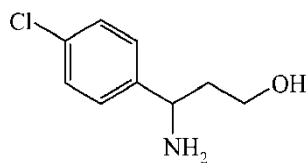
Mellomprodukt 22: (S)-tert-butyl-4-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-ylkarbamat
[0057]

5



[0058] LiAlH₄ (2,280 ml, 2,28 mmol) ble tilsatt dråpevis til (S)-metyl-3-(4-(tert-butoksykarbonylamino)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamido)-3-(4-klorfenyl)propanoat (**mellomprodukt 21**) (1,27 g, 2,28 mmol) i THF (70 ml) avkjølt til 0 °C under nitrogen. Den resulterende løsningen ble omrørt ved 20 °C i 1 time. Reaksjonsblandingen ble quenched med natriumhydroksid (2M) (2 ml) og vann (1 ml). Løsningen ble filtrert og fortynnet med EtOAc (200 ml), og vasket sekvensielt med vann (100 ml), vann (100 ml) og mettet saltløsning (100 ml). Det organiske laget ble tørket over MgSO₄, filtrert og fordampet for å gi (S)-tert-butyl-4-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-ylkarbamat (1,04 g, 86 %) i form av et hvitt faststoff. M/z (ESI+) (M+H)⁺ = 529; HPLC tR = 2,00 min.

Mellomprodukt 29: 3-amino-3-(4-klorfenyl)propan-1-ol
[0059]



[0060] Boran-tetrahydrofurankomplekset (94,0 ml, 93,92 mmol) ble tilsatt dråpevis til en omrørt suspensjon av 3-amino-3-(4-klorfenyl)propionsyre (2,50 g, 12,52 mmol) i THF (75 ml) ved 0 °C i løpet av en 20 minutters periode under nitrogen. Den resulterende suspensjonen ble omrørt ved 0 °C i 30 minutter og deretter ved 22 °C i 5 timer. Reaksjonsblandingen ble tilsatt porsjonsvis til metanol (500 ml). Blandingen ble konsentrert, gjenoppløst i metanol (250 ml) og rekonsentrert (denne prosessen ble gjentatt tre ganger). Resten ble oppløst i DCM (200 ml) og vasket med 1N NaOH

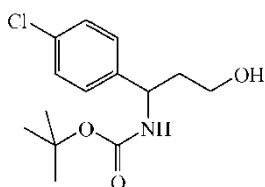
(150 ml). Det vandige laget ble ekstrahert med DCM (5 x 100 ml) og ekstraktene ble kombinert med det organiske laget. De kombinerte organiske emnene ble vasket med mettet saltløsning (2 x 150 ml), tørket over MgSO_4 og konsentrert for å gi et hvitt halvfast stoff. Det urene produktet ble rensert ved flashsilikakromatografi,

5 elueringsgradient 5 til 7 % (10:1 MeOH/kons. NH_3 (vandig)) i DCM. De rene fraksjonene ble fordampet til tørrhet for å gi 3-amino-3-(4-klorfenyl)propan-1-ol (1,320 g, 56,8 %) i form av et hvitt faststoff.

^1H NMR (399,902 MHz, CDCl_3) δ 1,87 (2H, m), 2,34 (2H, br,s), 3,79 (2H, m), 4,13 (1H, t), 7,24 (2H, d), 7,32 (2H, d).

10 MS m/e MH^+ 169

Mellomprodukt 30: Tert-butyl-1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamat
[0061]

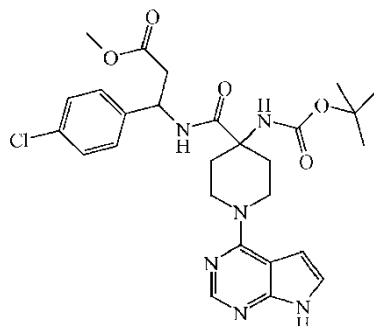


15 **[0062]** Di-tert-butyldikarbonat (0,705 g, 3,23 mmol) ble tilsatt til 3-amino-3-(4-klorfenyl)propan-1-ol (mellomprodukt 29) (0,500 g, 2,69 mmol) i DCM (30 ml) ved 22 °C. Den resulterende løsningen ble omrørt ved 22 °C i 2 timer. Blandingen ble

20 konsentrert, og resten ble rensert ved flashsilikakromatografi, elueringsgradient fra 0 til 4 % (10:1 MeOH/kons. NH_3 (vandig)) i DCM. De rene fraksjonene ble fordampet til tørrhet for å gi tert-butyl-1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamat (0,759 g, 99 %) i form av et hvitt faststoff. ^1H NMR (399,902 MHz, CDCl_3) δ 1,43 (9H, s), 1,81 (1H, m), 2,04 (1H, m), 2,74 (1H, br,s), 3,69 (2H, m), 4,88 (1H, br,s), 5,04 (1H, d), 7,23 (2H, d), 7,32 (2H, d).

25 MS m/e MH^+ 284, 286

Mellomprodukt 35: Metyl-3-(4-(tert-butoksykarbonylamino)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamido)-3-(4-klorfenyl)propanoat
[0063]



5

[0064] O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroniumheksafluorofosfat

(84 mg, 0,22 mmol) ble tilsatt i én del til 4-(tert-butoksykarbonylamino)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksylsyre (mellomprodukt 1) (72,3 mg,

10 0,20 mmol), 3-amino-3-(4-klor-fenyl)-propionsyremetylesterhydroklorid (50 mg, 0,20 mmol) og N,N-diisopropyletylamin (0,104 ml, 0,60 mmol) i N-metyl-2-

pyrrolidinon (1,5 ml) ved 20 °C under argon. Den resulterende løsningen ble omrørt i

5 t. Reaksjonsblandingen ble rensed ved preparativ HPLC ved hjelp av en Waters X-Bridge-reversfasekolonne (C-18, 5 mikroner silika, 19 mm diameter, 100 mm lengde,

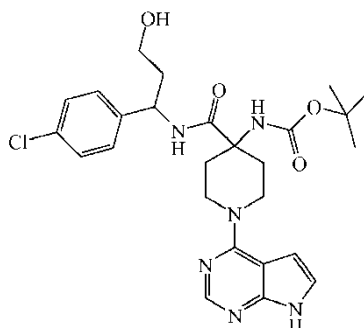
15 strømningshastighet på 40 ml/minutt) med avtagende polare blandinger av vann (som inneholdt 0,2 % ammoniumkarbonat) og acetonitril som elueringsmiddel. Fraksjonene

som inneholdt den ønskede forbindelsen ble fordampet til tørrhet for å gi 3-(4-(tert-butoksykarbonylamino)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamido)-3-(4-klorfenyl)propanoat (71,0 mg, 63,8 %) i form av hvitt krystallinsk

20 faststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 1,36 (9H, s), 1,94 - 2,00 (4H, m), 2,79 - 2,86 (2H, dq), 3,54 (3H, s), 3,52 - 3,61 (2H, m), 4,19 (2H, t), 5,22 (1H, q), 6,56 (1H, d), 6,9 (1H br s), 7,13 (1H, d), 7,33 (4H, q), 7,98 (1H, d), 8,12 (1H, s), 11,53 (1H, s),
m/z (ESI+) (M+H)⁺ = 557; HPLC t_R = 3,18 min.

Mellomprodukt 36: tert-butyl-4-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-ylkarbamat
[0065]



5

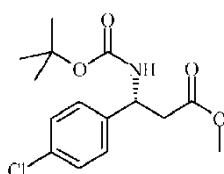
[0066] Natriumborhydrid (1,019 g, 26,93 mmol) ble tilsatt i én porsjon til en omrørt suspensjon av metyl-3-(4-(tert-butoksykarbonylamino)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamido)-3-(4-klorfenyl)propanoat (**mellomprodukt 35**)

(1,0 g, 1,80 mmol) oppløst i EtOH (400 ml) under argon. Den resulterende suspensjonen ble omrørt ved 20 °C i 70 timer. Noen få dråper vann ble tilsatt for å kvele overskuddet av hydrid, og blandingen ble omrørt i 1 time. Blandingen ble fordampet til tørrhet og resten ble fordelt mellom CH₂Cl₂ og vann mettet med NaCl. Den organiske fasen ble tørket og konsentrert for å gi urent produkt i form av hvite krystaller. Det urene produktet ble rensert ved flashkromatografi på silikagel og eluert med 0 til 10 % metanol i diklormetan. De rene fraksjonene ble fordampet til tørrhet for å gi tert-butyl-4-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-ylkarbamat (286 mg, 30,1 %) i form av et hvitt faststoff. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 1,41 (9H, s), 1,79 - 1,99 (6H, m), 3,31 - 3,37 (2H, m), 3,51 (2H, m), 4,21 - 4,28 (2H, m), 4,55 (1H, s), 4,90 (1H, q), 6,59 (1H, d), 7,06 (1H, s), 7,16 (1H, d), 7,31 (4H, s), 8,01 (1H, d), 8,12 (1H, s), 11,67 (1H, s), m/z (ESI+) (M-H)⁻ = 529; HPLC t_R = 2,93 min.

20

Mellomprodukt 39: (R)-metyl 3-(tert-butoksykarbonylamino)-3-(4-klorfenyl)propanoat
[0067]

25



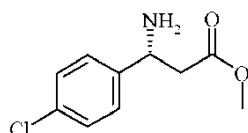
30

[0068] Jodmetan (0,987 ml, 15,85 mmol) ble tilsatt i én del til boc-(R)-3-amino-3-(4-klor-fenyl)-propionsyre (950 mg, 3,17 mmol) og kaliumkarbonat (876 mg, 6,34 mmol)

i DMF (15 ml). Den resulterende suspensjonen ble omrørt ved 80 °C i 24 timer. Reaksjonsblandingen ble konsentrert og fortynnet med EtOAc (25 ml) med vann (25 ml). Det organiske laget ble tørket over MgSO₄, filtrert og fordampet for å gi (R)-metyl-3-(tert-butoksykarbonylamino)-3-(4-klorfenyl)propanoat (990 mg, 100 %) i form av et oransje faststoff.

¹H NMR (399,9 MHz, DMSO-d₆) δ 1,36 (9H, s), 2,67 - 2,70 (1H, m), 2,71 - 2,80 (1H, m), 3,57 (3H, s), 4,91 (1H, d), 7,32 - 7,34 (2H, m), 7,38 - 7,40 (2H, m), 7,49 (1H, d). MS m/e MH⁺ 312; HPLC tR = 2,57 min.

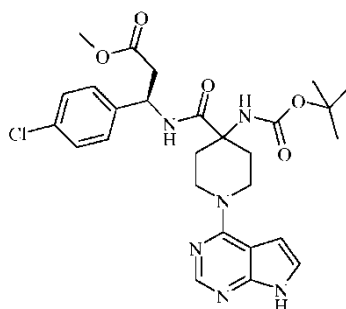
Mellomprodukt 40: (R)-metyl 3-amino-3-(4-klorfenyl)propanoat (hydroklorid) [0069]



[0070] Saltsyre (4,0M i 1,4-dioksan) (7,89 ml, 31,55 mmol) ble tilsatt i én porsjon til (R)-metyl-3-(tert-butoksykarbonylamino)-3-(4-klorfenyl)propanoat (mellomprodukt 39) (990 mg, 3,16 mmol) i DCM (20 ml) ved 20 °C. Den resulterende løsningen ble omrørt ved 20 °C i 3 timer. Reaksjonsblandingen ble fordampet for å gi (R)-metyl-3-amino-3-(4-klorfenyl)propanoat (hydroklorid) (777 mg, 98 %) i form av et gult faststoff.

¹H NMR (399,9 MHz, DMSO-d₆) δ 2,99 - 3,05 (1H, m), 3,18 - 3,23 (1H, m), 3,58 (3H, d), 4,62 - 4,65 (1H, m), 7,49 - 7,53 (2H, m), 7,57 - 7,61 (2H, m), 8,72 (3H, s). MS m/e MH⁺ 214; HPLC tR = 1,71 min.

Mellomprodukt 41: (R)-metyl-3-(4-(tert-butoksykarbonylamino)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamido)-3-(4-klorfenyl)propanoat [0071]



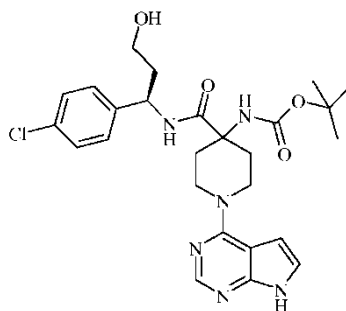
[0072] O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (0,579 g, 1,52 mmol) ble tilsatt i én porsjon til 4-(tert-butoksykarbonylamino)-1-(7H-

pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksylysyre (**mellomprodukt 1**) (0,5 g, 1,38 mmol) og DIPEA (0,503 ml, 3,04 mmol) i NMP (5 ml) ved 20 °C. Den resulterende løsningen ble omrørt ved 20 °C i 5 minutter. (R)-metyl 3-amino-3-(4-klorfenyl)propanoat (hydroklorid) (**mellomprodukt 40**) (0,346 g, 1,38 mmol) ble deretter tilsatt til løsningen og omrørt ved romtemperatur i 3 timer.

Reaksjonsblandingen ble fortynnet med EtOAc (100 ml) og vasket sekvensielt med vann (50 ml), vann (50 ml) og vann (50 ml). Det organiske laget ble tørket over MgSO₄, filtrert og fordampet for å gi det urene produktet. Det urene produktet ble rensset ved flashsilikakromatografi, elueringsgradient 0 til 5 % MeOH i DCM. De rene fraksjonene ble fordampet til tørrhet for å gi (R)-metyl-3-(4-(tert-butoksykarbonylamino)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamido)-3-(4-klorfenyl)propanoat (0,800 g, 100 %) i form av et hvitt faststoff. ¹H NMR (399,9 MHz, DMSO-d₆) δ 1,40 (9H, s), 1,94 - 1,98 (2H, m), 2,00 - 2,01 (2H, m), 2,83 (1H, d), 2,85 - 2,87 (2H, m), 3,55 (3H, s), 3,60 (2H, s), 4,21 (2H, s), 5,23 (1H, d), 6,60 - 6,61 (1H, m), 7,16 - 7,18 (1H, m), 7,35 (4H, q), 8,09 - 8,14 (2H, m), 11,65 (1H, s).

MS m/e MH⁺ 557; HPLC tR = 2,29 min.

Mellomprodukt 42: (R)-tert-butyl-4-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-ylkarbammat
[0073]



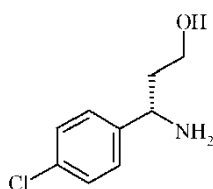
[0074] LiAlH₄ (1,398 ml, 1,40 mmol) ble tilsatt dråpevis til (R)-metyl-3-(4-(tert-butoksykarbonylamino)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamido)-3-(4-klorfenyl)propanoat (mellomprodukt 41) (779 mg, 1,40 mmol) i THF (40 ml) avkjølt til 0 °C under nitrogen. Den resulterende løsningen ble omrørt ved 20 °C i 3 timer. Reaksjonsblandingen ble quenched med vann (1 ml), og nøytralisert med 2M HCl. Reaksjonsblandingen ble fordampet til tørrhet and gjenoppløst i DCM (100 ml) og vasket med vann (100 ml). Det organiske laget ble tørket over MgSO₄, filtrert og fordampet for å gi det urene produktet. Det urene produktet ble rensset ved flashsilikakromatografi, elueringsgradient 0 til 10 % MeOH i DCM. De rene

fraksjonene ble kombinert og fordampet for å gi (R)-tert-butyl-4-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-ylkarbammat (160 mg, 21,63 %) i form av et faststoff.

¹H NMR (399,9 MHz, DMSO-d₆) δ 1,37 - 1,41 (9H, s), 1,86 - 1,92 (2H, m), 1,94 (2H, d), 2,00 (2H, d), 3,38 (2H, s), 3,53 - 3,55 (2H, m), 4,25 (2H, t), 4,52 (1H, s), 4,91 (1H, d), 6,60 - 6,62 (1H, m), 7,01 (1H, s), 7,16 - 7,18 (1H, m), 7,33 (4H, m), 7,98 - 8,00 (1H, m), 8,14 (1H, s), 11,67 (1H, s).

MS m/e MH⁺ 529; HPLC tR = 2,01 min.

Mellomprodukt 47: (S)-3-amino-3-(4-klorfenyl)propan-1-ol
[0075]

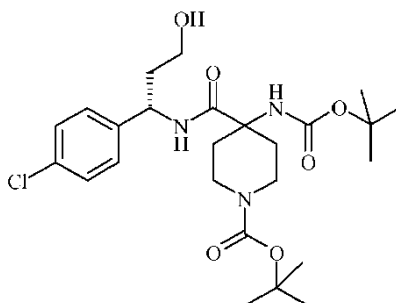


[0076] Boran-tetrahydrofurankomplekset (376 ml, 375,69 mmol) ble tilsatt dråpevis til en omrørt suspensjon av (S)-3-amino-3-(4-klorfenyl)propansyre (10 g, 50,09 mmol) i THF (500 ml) ved 0 °C i løpet av en 45 minutters periode under nitrogen. Den resulterende suspensjonen ble omrørt ved 0 °C i 30 minutter og deretter ved 22 °C i 5 timer. Reaksjonsblandingen ble tilsatt porsjonsvis til metanol (500 ml). Løsningen ble omrørt ved romtemperatur i tre dager. Blandingen ble konsentrert, gjenoppløst i metanol (250 ml) og rekonsentrert (denne prosessen ble gjentatt tre ganger). Resten ble oppløst i DCM (75 ml) og vasket med 1N NaOH (50 ml). Det vandige laget ble ekstrahert med DCM (3 x 100 ml) og ekstraktene ble kombinert med det organiske laget. De kombinerte organiske emnene ble vasket med mettet saltløsning (50 ml), tørket over MgSO₄ og konsentrert for å gi et urent produkt. Det urene produktet ble rensert ved flashsilikakromatografi, elueringsgradient 2 til 6 % MeOH/ammoniakk i DCM. De rene fraksjonene ble fordampet til tørrhet for å gi (S)-3-amino-3-(4-klorfenyl)propan-1-ol (5,76 g, 61,9 %) i form av et hvitt faststoff.

¹H NMR (400,13 MHz, CDCl₃) δ 1,84 - 1,93 (2H, m), 3,76 - 3,81 (2H, m), 4,13 (1H, t), 7,23 - 7,25 (2H, m), 7,30 - 7,34 (2H, m).

MS m/e MH⁺ 186.

Mellomprodukt 48: (S)-tert-butyl-4-(tert-butoksykarbonylamino)-4-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)piperidin-1-karboksylat
[0077]



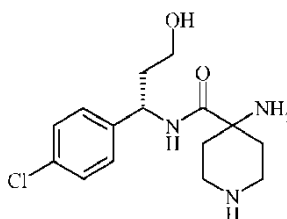
5

[0078] (S)-3-amino-3-(4-klorfenyl)propan-1-ol (**mellomprodukt 47**) (1,09 g, 5,87 mmol) ble tilsatt i én del til 1-(tert-butoksykarbonyl)-4-(tert-butoksykarbonylamino)piperidin-4-karboksylsyre (**mellomprodukt 70**) (2,022 g, 5,87 mmol) og DIPEA (3,08 ml, 17,61 mmol) i DMA (20 ml). O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (2,456 g, 6,46 mmol) ble tilsatt og den resulterende løsningen ble omrørt ved 20 °C i 24 timer. Reaksjonsblandingen ble fordampet til tørrhet og deretter fortynnet med EtOAc (300 ml), og vasket sekvensielt med vann (50 ml) og mettet saltløsning (50 ml). Det organiske laget ble tørket over MgSO₄, filtrert og fordampet, deretter tritureert med dietyler for å gi urent (S)-tert-butyl-4-(tert-butoksykarbonylamino)-4-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)piperidin-1-karboksylat (4,66 g, 155 %) i form av et hvitt faststoff. ¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-d₆) δ 1,39 (18H, s), 1,71 - 1,92 (6H, m), 3,06 (2H, s), 3,36 (2H, t), 3,54 - 3,65 (2H, m), 4,52 (1H, t), 4,89 (1H, q), 6,89 (1H, s), 7,29 - 7,34 (4H, m). MS m/e M+Na⁺ 534.

20

Mellomprodukt 49: (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)piperidin-4-karboksamid
[0079]

25

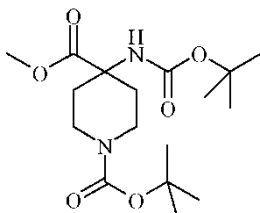


[0080] Hydrogenklorid 4M i dioksan (11,72 ml, 46,87 mmol) ble tilsatt til (S)-tert-butyl-4-(tert-butoksykarbonylamino)-4-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)piperidin-1-karboksylat (**mellomprodukt 48**) (3 g,

30

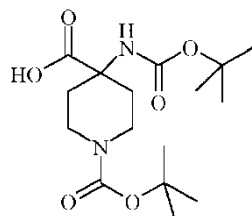
5,86 mmol) i dioksan (30 ml). Den resulterende løsningen ble omrørt ved 20 °C i 2 timer. Reaksjonsblandingen ble oppløst i metanol og rensset ved ionutvekslingskromatografi, ved hjelp av en SCX-kolonne. Det ønskede produktet ble eluert fra kolonnen ved hjelp av 3,5*N* ammoniakk/MeOH og de rene fraksjonene ble fordampet til tørrhet for å gi (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)piperidin-4-karboksamid (1,970 g, 108 %) i form av en fargeløs gummi. ¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,20 - 1,28 (2H, m), 1,75 - 1,91 (4H, m), 2,67 - 2,83 (2H, m), 3,30 (2H, m), 4,87 (1H, s), 7,30 - 7,37 (4H, m). MS *m/e* MH⁺ 312.

Mellomprodukt 69: 1-tert-butyl 4-metyl-4-(tert-butoksykarbonylamino)piperidin-1,4-dikarboksylat
[0081]



[0082] Metyl-4-(tert-butoksykarbonylamino)piperidin-4-karboksylat (WO2008075109) (10 g, 38,71 mmol) ble oppløst i DCM (194 ml). Til dette ble det tilsatt di-tert-butyldikarbonat (10,67 ml, 46,46 mmol) porsjonsvis. Etter tilsetningen ble reaksjonen omrørt ved 25 °C i 1 time. Det urene produktet ble vasket med mettet natriumbikarbonat (3x50 ml) og de organiske lagene ble tørket over MgSO₄ før de ble fordampet til tørrhet for å gi 1-tert-butyl-4-metyl-4-(tert-butoksykarbonylamino)piperidin-1,4-dikarboksylat (13,6 g, 98 %) i form av et hvitt faststoff. ¹H NMR (400,13 MHz, DMSO) δ 1,39 (9H, s), 1,40 (9H, s), 1,70-1,77 (2H, td), 1,88-1,92 (2H, d), 3,05 (2H, bred), 3,61 (3H, s), 3,62-3,65 (2H, m), 7,33 (bred, utbytte).

Mellomprodukt 70: 1-(tert-butoksykarbonyl)-4-(tert-butoksykarbonylamino)piperidin-4-karboksylsyre
[0083]



5

[0084] Litiumhydroksidmonohydrat (8,13 g, 193,62 mmol) ble tilsatt til 1-tert-butyl-4-metyl-4-(tert-butoksykarbonylamino)piperidin-1,4-dikarboksylat (**mellomprodukt 69**) (13,88 g, 38,72 mmol) i vann (21.51 ml), THF (86 ml) og metanol (86 ml). Den resulterende løsningen ble omrørt ved 20 °C i 1 dag. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med EtOAc (75 ml) og vasket med vann (75 ml). Det vandige ble justert til pH 5 med 1M sitronsyreløsning, deretter ekstrahert med EtOAc (3x200 ml). De organiske ekstraktene ble vasket med mettet saltløsning (50 ml), deretter tørket over MgSO₄, filtrert og inndampet for å gi det ønskede produktet 1-(tert-butoksykarbonyl)-4-(tert-butoksykarbonylamino)piperidin-4-karboksylsyre (10,36 g, 78 %) i form av et fint hvitt faststoff. ¹H NMR (400,13 MHz, DMSO) δ 1,39 (9H, s), 1,40 (9H, s), 1,68-1,76 (2H, td), 1,89-1,92 (2H, d), 3,03 (2H, bred), 3,62-3,65 (2H, d), 7,16 (utbytte), 12,36 (utbytte).

[0085] De biologiske effektene av forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan testes som skissert nedenfor.

In vitro-MDA-MB-468-humant brystadenokarsinom-GSK-3-fosforyleringsanalyse

[0086] Denne analysen bestemmer testforbindelsenes evne til å hemme fosforylering av serin-9-rest i glykogensyntasekinase-3beta (GSK-3β) som en surrogatmarkør for cellulær PKB (Akt)-aktivitet, som bedømt ved hjelp av Acumen Explorer Fluorescent-plateleserteknologi. En MDA-MB-468-human brystadenokarsinomcellelinje (LGC Promochem, Teddington, Middlesex, UK, katalog nr. HTB-132) ble rutinemessig vedlikeholdt i Dulbeccos modifiserte Eagles vekstmedium (DMEM; Invitrogen Limited, Paisley, UK-katalog nr. 11966-025) som inneholdt 10 % varmeinaktivert føtalt kalveserum (FCS; Sigma, Poole, Dorset, UK, katalog nr. F0392) og 1 % L-glutamin (Gibco, katalog nr. 25030-024) ved 37 °C med 5 % CO₂ opptil en konfluens på 70-90 %.

[0087] For fosforyleringsanalysen ble cellene løsnet fra dyrkningskolben ved hjelp av Trypsin-EDTA (Invitrogen Limited, katalog nr. 25300-062) og sådd inn brønnene på en sort gjennomsiktig bunn Coming Costar polystyren-96-brønners plate (Fisher Scientific UK, Loughborough, Leicestershire, UK; katalog nr. 3904 og DPS-130-

35

020K) ved en tetthet på 5000 celler per brønn i 100 µl komplett vekstmedium. Cellene ble inkubert over natten ved 37 °C med 5 % CO₂ for å la de feste seg.

[0088] På dag 2 ble cellene behandlet med testforbindelser og inkubert i 2 timer ved 37 °C med 5 % CO₂. Testforbindelsene ble fremstilt som 10 mM forrâdsløsninger i DMSO og dosert direkte til påkrevet konsentrasjon i testbrønnene ved hjelp av ikke-kontakt (akustisk dispensering av flere 2,5 nl dråper direkte inn i analysebrønnene) ECHO-doseringsteknologi (Labcyte Inc. Sunnyvale, California, USA). Hver plate inneholdt kontrollbrønner uten testforbindelse.

[0089] 20 µl fikseringsbuffer (fosfatbufret saltløsning (PBS) som inneholdt 10 % formaldehyd; Sigma; katalog nr. F1635) ble deretter tilsatt til hver brønn for å gi en endelig brønnkonsentrasjon på 1,6 %. Platene ble deretter inkubert i 30 minutter ved romtemperatur før det fiksative ble fjernet. Hver brønn ble vasket én gang med 250 µg PBS, og deretter 50 µl PBS tilsatt til hver brønn. PBS ble deretter aspirert og cellene permeabilisert og blokkert ved å inkubere hver brønn med 50 µl av permeabiliserings-/blokkeringsbufferen (PBS som inneholder 0,5 % Tween 20 (Sigma; katalog nr. P5927) og 5 % Marvel-melkepulver (Andrews Pharmacy Ltd, Macclesfield, Cheshire, UK; katalog nr. APC100199)) i 1 time ved romtemperatur før fargingen.

[0090] Etter fjerning av Perm-/blokkeringsbuffer ble det tilsatt 50 µl primært anti-fosfo-GSK-3β-antistoff (Cell Signalling Technology (New England Biolabs (Uk) Ltd.), Hitchin, Hertfordshire, UK; katalog nr. 9336 fortynnet 1:400 i blokkeringsbuffer (PBS inneholdende 5 % Marvel og 0,05 % Tween/polysorbat 20) til hver brønn og inkubert over natten ved 4 °C.

[0091] Hver brønn ble vasket tre ganger i 250 µg vaskebuffer (PBS inneholdende 0,05 % polysorbat 20), og cellene ble inkubert i 1 time ved romtemperatur med 50 µl sekundært fluorescensmerket-merket anti-kanin-antistoff Alexa Fluor 488-antistoff (Molecular Probes, Invitrogen Limited, katalog nr. A11008) fortynnet 1:750 i blokkeringsbuffer. Platene ble vasket tre ganger i 250 µl vaskebuffer og lagret som inneholdt 50 µl PBS ved 4 °C inntil nødvendig.

[0092] Platene ble analysert ved hjelp av en Acumen Explorer plateleser for å kvantifisere graden av fluorescerende signal som representerer mengden fosforylert-GSK-3β. Aktive forbindelser forårsaket en reduksjon i fosfo-GSK-3β-fosforylering i forhold til den maksimale (udoserte) kontrollen for hver analyse, som måles med antallet fosforylerte gjenstander per brønn, og aktiverte potens av PKB (Akt)-inhibitorer som skal bestemmes.

[0093] IC₅₀-beregning - IC₅₀ er konsentrasjonen av forbindelsen som er nødvendig for å gi 50 % effekt over aktivitetsområdet påvirket av forbindelsen, mellom maksimum (ingen forbindelse) og minimum (overskuddsnivå av forbindelse) responskontrolldata. IC₅₀-verdiene ble bestemt ved å tilpasse den korrigerte bakgrunnen, doseresponsanalysedata til en 4-parameterlogistisk kurvetilpasningsmodell med den

minimale responsinnstillingen innstilt på null. Dette ble gjort ved hjelp av en egenutviklet algoritme i Origin-grafprogramvarepakken (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

5 **[0094]** Eksempler fra oppfinnelsen ble testet i den ovennevnte analysen og de gjennomsnittlige IC₅₀-verdiene ble beregnet. Disse verdiene ble vist i tabell G.

In vitro-AKT3-kinaseanalyse

10 **[0095]** Denne analysen detekterer hemmere av AKT1 (PKB α)-kinaseaktivitet ved hjelp av LabChip LC3000. Caliper-off-chip-inkuberingsmobilitetsskiftanalysen anvender en mikrofluidbrikke for å måle omdannelsen av et fluorescerende merket peptid til et fosforylert produkt ved en respektiv kinase. Den komplette enzymreaksjonen utføres i mikrotiterplater og quenches deretter. De resulterende løsningene blir serielt "nippet" gjennom en kapillær på brikken, der peptidsubstratet og det fosforylerte produktet ble separert ved elektroforese. De blir deretter detektert via

15 laserindusert fluorescens. Substrat og produkt separeres i to topper ved anvendelse av et høyelektrisk felt, og detektert direkte ved hjelp av fluorescens. Signaturen til det fluorescerende signalet avdekker omfanget av reaksjonen.

20 **[0096]** For Echo-dosering var løsningsmidlet 100 % DMSO. En masterplate ble fremstilt med 40 μ l av 10 mM forråd fra vår primære flytende oppbevaring i kvadrant 1 av en Labcyte 384-brønnsplate. En 1 i 100 fortykning ble gjort fra kvadrant 1 inn i kvadrant 2 ved å fjerne 0,4 μ l og legge det til 39,6 μ l DMSO. Etterfølgende 1 av 100 fortygninger ble gjort i kvadrant 3 fra kvadrant 2 og kvadrant 4 fra kvadrant 3.

25 **[0097]** Flere 2,5 nl dråper ble utlevert fra hver kvadrant av masterplaten ved hjelp av ECHO-doseringsteknologi (Labcyte Inc. Sunnyvale, California, USA) for å generere doseområdet som var nødvendig i testen. Doseområdet som hyppigst ble anvendt var som følger: 100 μ M, 30 μ M, 10 μ M, 3 μ M, 1 μ M, 0,3 μ M, 0,1 μ M, 0,03 μ M, 0,01 μ M, 0,003 μ M, 0,001 μ M, 0,0001 μ M. Hver brønn ble på nytt fylt med dimetylsulfoksid (DMSO) til et totalt volum på 120 nl, slik at når enzym- og substratblandingen ble tilsatt var den endelige DMSO-konsentrasjonen 1 %. DMSO ble tilsatt til maks

30 kontrollbrønner som 120 nl, minimum kontrollbrønner ble behandlet med 120 nl forbindelse ved en konsentrasjon som hemmet enzymaktiviteten 100 %.

35 **[0098]** Etter tilsetning av forbindelse eller kontroll til analyseplaten ble det tilsatt 6 μ l peptidblanding som inneholdt 3 μ M substrat (5-FAM-GRPRTSSFAEG-CONH₂; CRB) og 40 μ M ATP i kinasebasebuffer (100 mM Hepes pH 7,5, 0,015 % Brij-35) og 6 μ l enzymblanding som inneholdt 8nM AKT1/PKB α -aktivt enzym (Upstate Biotechnology, kat. nr. 14-276), 8 mM DTT og 20 mM MgCl₂ i kinasebasebuffer ble tilsatt. Alle bufferne ble tillagd med 18M Ω vann. Platene ble forsegle og inkubert ved romtemperatur i 50 minutter. Reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 10 μ l stoppbuffer (100 mM Hepes pH 7,5, 0,015 % Brij-35-løsning, 0,1 % beleggsreagens

#3, 40 mM EDTA, 5 % DMSO) til hver brønn (NB! platene kan fryses etter stopping og avleses senere). Platene ble deretter analysert ved hjelp av Caliper LabChip LC3000 Drug Discovery System (Caliper Life Sciences, 1 Wellfield, Preston Brook, Runcorn, WA7 3AZ) ved hjelp av de følgende separasjonsforholdene; -1,8 PSI, -500 oppstrøms spenning, -1700 nedstrøms spenning, prøvelurktid (eng.: sample sip time) på 0,2 sek, etterprøvesiptid på 30 sek og en avsluttende forsinkelse på 120 sek. Integrering av substrat- og produkttoppene ble utført ved hjelp av Caliper LabChip-programvare og IC₅₀-kurver ble beregnet ved hjelp av Origin™-programvare (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Eksempler fra oppfinnelsen ble testet i in vitro-AKT1-
 enymanalysen og de gjennomsnittlige, oppnådde IC₅₀-verdiene ble presentert i tabell G.

Tabell G

Eksempelnummer	Cellulær PKB gjennomsnittlig IC₅₀ (µM)	In vitro PKBa gjennomsnittlig IC₅₀ (µM)
9	0,09	0,0032
13	0,09	0,0042
15	>3,10	0,093

hERG-analyse

Cellekultur

[0099] De hERG-uttrykkende kinesiske hamsterovarie K1-(CHO)-cellene beskrevet av (Persson, Carlsson, Duker, & Jacobson, 2005) ble dyrket til semikonfluens ved 37 °C i et fuktet miljø (5 % CO₂) i F-12-Hammedium som inneholdt L-glutamin, 10 % føtalt kalveserum (FCS) og 0,6 mg/ml hygromycin (alle fra Sigma-Aldrich). Før
 anvendelse ble monolaget vasket med en forvarmet (37 °C) 3 ml alikvot av Versene 1:5000

[0100] (Invitrogen). Etter aspirasjon av denne løsningen ble kolben inkubert ved 37 °C i en inkubator med ytterligere 2 ml Versene 1:5000 i en 6 minutters periode. Cellene ble deretter løsnet fra bunnen av kolben ved forsiktig "tapping" og 10 ml Dulbeccos fosfatbufrede saltløsning inneholdende kalsium (0,9 mM) og magnesium (0,5 mM) (PBS; Invitrogen) ble deretter tilsatt til kolben og aspirert inn i en 15 ml sentrifugerør før sentrifugering (50 g, i 4 minutter). Den resulterende supernatanten ble kassert og pelleten ble forsiktig resuspendert i 3 ml PBS. En 0,5 ml alikvot av celleduspensjonen ble fjernet og antallet levedyktige celler (basert på trypan blå ekskludering) ble bestemt i en automatisert leser (Cedex; Innovatis) slik at celleresuspensjonsvolumet kunne justeres med PBS for å gi den ønskede endelige cellekonsentrasjonen. Det er cellekonsentrasjonen på dette punktet i analysen som er sitert når det refereres til denne parameteren. CHO-Kv1.5-celler, som ble anvendt til å

justere spenningsforskyvningen på IonWorks™ HT, ble opprettholdt, og klargjort for anvendelse på samme måte.

Elektrofysiologi

[0101] Prinsippene og driften av denne enheten har blitt beskrevet av (Schroeder, Neagle, Trezise, & Worley, 2003). Kort fortalt er teknologien basert på en 384-brønners plate (PatchPlate™) der et opptak er forsøkt i hver brønn ved hjelp av sug for å posisjonere og holde en celle i et lite hull som skiller to isolerte væskekamre. Etter at forseglingen hadde funnet sted ble løsningen på undersiden av PatchPlate™ endret til én som inneholdt amfotericin B. Dette permeabiliserer plasteret av cellemembranen som dekker hullet i hver brønn og tillater i praksis at det skal utføres et perforert helcelle-patch-clamp-opptak.

[0102] Det ble anvendt en β -test IonWorks™ HT fra Essen Instrument. Det er ingen mulighet for å varme løsninger i denne enheten og derved ble den operert ved romtemperatur (~ 21 °C), som følger. Reservoaret i "buffer"-posisjonen ble lastet med 4 ml PBS og det i "celler"-posisjonen med CHO-hERG-cellesuspensjonen som beskrevet ovenfor. En 96-brønners plate (V-bunn, Greiner Bio-one) som inneholdt forbindelsene som skal testes (ved 3 ganger ovenfor sin endelige testkonsentrasjon) ble plassert i "plate 1"-posisjonen og en PatchPlate™ ble innspent i PatchPlate™-stasjonen. Hver forbindelsesplate ble lagt ut i 12 kolonner for å aktivere ti, 8-punkts konsentrasjonseffektkurver som skal bygges; de gjenværende to kolonnene på platen ble tatt opp med vehikkel (sluttkonsentrasjon 0,33 % DMSO), for å definere analysegrunnlinjen, og en supra-maksimal blokkeringskonsentrasjon av cisaprid (sluttkonsentrasjon 10 μ M) for å definere 100 % inhiberingsnivået. Fluidikkhodet (F-Head) i IonWorks™ HT tilsatte deretter 3,5 μ l PBS til hver brønn på PatchPlate™ og dens underside ble perfusert med "indre" løsning som hadde følgende sammensetning (i mM): K-glukonat 100, KCl 40, MgCl₂ 3,2, EGTA 3 og HEPES 5 (alle fra Sigma-Aldrich; pH 7,25-7,30 ved hjelp av 10 M KOH). Etter priming og avbobling beveget elektronikkhodet (E-hode) seg deretter rundt PatchPlate™ og utførte en hulltest (dvs. påføre en spenningspuls for å bestemme om hullet i hver brønn var åpen). F-hodet dispenserte deretter 3,5 μ l av cellesuspensjonen beskrevet ovenfor, i hver brønn av PatchPlate™ og cellene ble gitt 200 sekunder for å nå frem til og tette til hullet i hver brønn. Etter dette beveget E-hodet seg rundt PatchPlate™ for å bestemme tetningsmotstanden oppnådd i hver brønn. Deretter ble løsningen på undersiden av PatchPlate™ endret til "access"-løsning som hadde følgende sammensetning (i mM): KCl 140, EGTA 1, MgCl₂ 1 og HEPES 20 (pH 7,25-7,30 ved hjelp av 10 M KOH) pluss 100 μ g/ml amfotericin B (Sigma-Aldrich). Etter å ha latt patch-perforeringen finne sted i 9 minutter, beveget E-hodet seg rundt PatchPlate™ 48-brønnene i en tid for å oppnå forforbindelses-hERG-strømmålinger. F-hodet tilsatte så 3,5 μ l løsning fra

hver brønn av forbindelsesplaten til 4 brønner på PatchPlate™ (den endelige DMSO-konsentrasjonen var 0,33 % i hver brønn). Dette ble oppnådd ved å bevege seg fra den mest fortynnede til den mest konsentrerte brønnen av forbindelsesplaten for å minimere virkningen av hvilken som helst forbindelsesoverheng. Etter omtrent 3,5 min

5 inkubasjon flyttet E-hodet seg deretter rundt alle 384-brønnene på PatchPlate™ for å oppnå etter-forbindelses-hERG-strømmålinger. På denne måten kunne ikke-kumulative konsentrasjonseffektkurver fremstilles der tilveiebringelse av akseptanskriteriene ble oppnådd i en tilstrekkelig prosentandel av brønner (se nedenfor), effekten av hver konsentrasjon testforbindelse var basert på opptak fra mellom 1 og 4 celler.

10 **[0103]** Før- og etterforbindelses-hERG-strømmen ble fremkalt av en enkelt spenningspuls som bestod av en 20 s periodeopphold på -70 mV, et 160 ms trinn til -60 mV (for å oppnå et anslag over lekkasjen), et 100 ms trinn tilbake til -70 mV, et 1 s trinn til + 40 mV, et 2 s trinn til -30 mV og til slutt et 500 ms trinn til -70mV. Mellom før- og etterforbindelsesspenningsimpulsene var det ingen klemming (eng.: clamping) av membranpotensialet. Strømningene ble lekkasjetrukket basert på estimatet av strøm fremkalt under + 10mV-trinnet i starten av spenningspulsprotokollen. Enhver spenningsforskyvning i IonWorks™ HT ble justert på én av to måter. Ved fastsettelse av forbindelsespotensen, ble det påført en depolariserende spenningsrampe på CHO-Kv1-5-celler og spenningen notert ved hvilken det var et vendepunkt i strømsporet (dvs. det punktet der kanalaktivering ble sett med en rampeprotokoll). Spenningen ved hvilken dette skjedde hadde på forhånd blitt bestemt ved hjelp av den samme spenningskommandoen i konvensjonell elektrofysiologi og funnet å være -15 mV (data ikke vist); dermed kunne et forskyvningspotensiale legges inn i IonWorks™ HT-programvaren ved hjelp av denne verdien som et referansepunkt. Ved fastsettelse av de grunnleggende elektrofysiologiske egenskapene til hERG, ble enhver forskyvning justert ved å bestemme det hERG-halestrømreverserende potensialet (eng.: the hERG tail current reversal potential) i IonWorks™ HT, og sammenligne den med den som finnes i konvensjonell elektrofysiologi (-82 mV) og deretter foreta de nødvendige forskyvningsjusteringene i IonWorks™-HT-programvaren. Strømsignalet ble prøvetatt ved 2,5 kHz.

30 **[0104]** Før- og etter-scan-hERG-strømstyrken ble målt automatisk fra de lekkasjetrukne sporene av IonWorks™ HT-programvaren ved å ta et 40 ms gjennomsnitt av strømmen under den innledende holdeperioden på -70 mV (grunnlinjestrøm) og trekke dette fra toppen av halestrømresponsen (eng.: the tail current response). Akseptanskriteriene for strømningene fremkalt i hver brønn var: før-scantetningsmotsand > 60 MΩ, før-scan-hERG-halestrømmplitude > 150 pA; etter-scantetningsmotstand >60 MΩ. Graden av hemming av hERG-strømmen ble bestemt ved å dividere post-scan-hERG-strømmen av den respektive før-scan-hERG-strømmen for hver brønn.

Referanser

[0105] Persson, F., Carlsson, L., Duker, G., & Jacobson, I. (2005). Blocking characteristics of hERG, hNav1.5, and hKvLQT1/hminK after administration of the novel anti-arrhythmic compound AZD7009. *J Cardiovasc. Electrophysiol.*, 16, 329-341.

[0106] Schroeder, K., Neagle, B., Trezise, D. J., & Worley, J. (2003). Ionworks HT: a new high-throughput electrophysiology measurement platform. *J Biomol Screen.*, 8, 50-64.

Resultater av hERG-analysen

[0107] Eksempel 9, (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid, ble testet opptil 100 µM ifølge prosedyren beskrevet ovenfor, og en gjennomsnittlig hERG IC₅₀-verdi på 177 µM ble utledet ved ekstrapolering av kurven.

In vivo-forsøk

Farmakodynamisk analyse av PKB-substratproteinene GSK3β og PRAS40 som respons på (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid

[0108] 2,5 x 10⁶ U87-MG-celler (ATCC-nummer HTB-14TM) + 50 % matrigel ble injisert s.c. (subkutan) i flanken av nakne mus. Når tumorene nådde et volum på omtrent 0,5 cm³ ble det gitt en akutt dose på 150 eller 300 mg/kg (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid (E9) p.o. (oral sonde). Dyrene ble avlivet på det angitte tidspunktet og tumorene ble dissekert ut og hurtigfrosset i flytende nitrogen.

[0109] Ex-vivo-tumorlysater ble fremstilt i 10 % Triton-X-100 Tris-lyseringsbuffer som inneholdt protease- og fosfatasehemmere ved hjelp av 'FastPrep 24'-metodologien (MP Biomedicals matrix #6910-500). Proteinkonsentrasjonene ble estimert mot en BSA-standardkurve som anvender Pierce BCA-settet (#23225). pGSK3β ble målt ved Western blotting og pPRAS40 av fastfase-sandwich ELISA (Biosource KHO0421).

[0110] For western blotting ble tilsvarende mengder protein løst ved 4-12 % gradient Bis-Tris-polyakrylamidforhåndsstøpte geler (Invitrogen NP0323), overført til Hybond C Extra nitrocellulosemembraner (Invitrogen LC2001) og inkubert med primært antiserum (pGSK3β ser9, Cell Signaling Technology #9336; total GSK3β, BD Transduction Labs #610202) og deretter med enten pepperrotperoksidasekonjugert anti-kanin IgG (Cell Signaling Technology #7074) eller anti-muse-IgG (Cell Signaling Technology #7076). De immunreaktive proteinene ble oppdaget av forbedret kjemiluminescens (#34076 Pierce Supersignal Dura) og båndene ble kvantifisert med en ChemiGenius II (Syngene). De plottede verdiene viser den prosentvise hemmingen av pGSK3β i forhold til vehikkelkontroller, etter normalisering for total pGSK3β.

[0111] For ELISA (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay), ble det tilsatt ekvivalente mengder av protein til en 96 brønners plate forhåndsbelagt med et 'capture' pPRAS40-spesifikt monoklonalt antistoff. Et 'deteksjons'-antistoff spesifikt for pPRAS40(Thr 246) ble deretter tilsatt etterfulgt av et HRP-merket anti-kanin-IgG-antistoff. Analysen ble deretter kvantifisert ved hjelp av stabilisert TMB (tetrametylbenzidin) ved 450 nm på en plateleser. Fargeintensiteten er proporsjonal med konsentrasjonen av pPRAS40 (Thr 246). Resultatene er vist i figur 1.

MCF-7-anti-tumorstudie ved hjelp av (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid (E9)

[0112] Alvorlig kombinerte immunmangelfulle (SCID)-mus ble oppnådd fra Charles River Laboratories. Musene ble huset og vedlikeholdt i bestemte, patogenfrie forhold. For *in vivo*-implantat ble cellene høstet fra T225-vevskulturflasker med en 2 til 5 minutters behandling med 3 x trypsin (Invitrogen) i EDTA-løsning, etterfulgt av suspensjon i basisk medium og tre vaskinger i fosfatbufret saltløsning (Invitrogen). Bare enkeltcellesuspensjoner på mer enn 90 % levedyktighet, som bestemt ved trypan blå eksklusjon, ble anvendt for injeksjon. MCF-7-brysttumorceller (ATCC-nummer HTB-22™) (5×10^6 celler + 50 % Matrigel™) ble injisert subkutan i den venstre siden på dyret i et volum på 0,1 ml. Før implantering av MCF-7-cellene ble SCID-musene bedøvet og implantert med en 0,5 mg/21-dagers varighetsøstrogenpellet. Når gjennomsnittlig tumorstørrelse nådde $-0,3 \text{ cm}^3$, ble musene tilfeldig delt inn i kontroll- og behandlingsgrupper. Behandlingsgruppen mottok 300 mg/kg E9 oppløst i en vehikkel som bestod av 10 % (v/v) DMSO, 25 % (w/v) Kleptose™ i vann, ved oral sonde. Kontrollgruppen mottok vehikkelen alene, én gang daglig ved oral sonde. Tumorvolum (målt ved kaliper) ble registrert ved intervaller i løpet av studien. Mus ble avlivet ved CO₂-eutansi. Tumorvolumet ble beregnet (ved å ta lengden som å være den lengste diameteren på tvers av tumoren og bredden som den tilsvarende vinkeldiameteren ved hjelp av formelen: $(\text{lengde} \times \text{bredde}) \times \sqrt{(\text{lengde} \times \text{bredde}) \times (\pi/6)}$). Veksthemming fra starten av behandlingen ble fastslått ved sammenligning av forskjellene i tumorvolum mellom kontroll- og behandlede grupper. Fordi variansen i gjennomsnittlig tumorvolumdata øker proporsjonalt med volumet (og er derfor uforholdsmessig mellom grupper), ble data log-transformert for å fjerne alle størrelsesavhengigheter før statistisk evaluering. Statistisk signifikans ble evaluert ved hjelp av en én-halet, to-prøve t-test. Resultatene er vist i figur 2.

Human doseforutsigelse

[0113] Human doseforutsigelse for kliniske studier krever et estimat av humane farmakokinetiske (PK) parametere som er viktige for å definere elimineringen $T_{1/2}$ og

formen og størrelsen på plasmakonsentrasjon vs tidsprofilen ved en bestemt dose. Disse estimerte parametrene inkluderer Clearance, distribusjonsvolum ved stabil tilstand (V_{ss}), absorpsjonshastighetskonstant (K_a), biotilgjengelighet (F) og doseringsfrekvens. Humane doseforutsigelser krever også noe farmakologisk bevis for

5 hvordan eksponering er knyttet til effekt (McGinnity, Collington, Austin & Riley, Current Drug Metabolism 2007 8 463-479).

[0114] For (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid (E9), ble human utskillelse estimert fra intrinsiske utskillellesdata (Clint) bestemt i humane hepatocytter korrigert til *in vivo*-

10 utskillelse ved innføring av den brønnrørte modellen (Riley, McGinnity & Austin, Drug Metabolism & Disposition 2005 33(9) 1304-1311). Mindre forskjeller ble observert i plasmaproteinbindingen av forbindelsen over rotte, hund og menneske; følgelig ble de observerte rotte- og hund- V_{ss} -verdiene korrigert med faktoren F_u , human/ F_u (rotte eller hund) (der F_u = fraksjon ubundet i plasma). Menneskelig VSS

15 ble estimert til å være 3,3 l/kg ved hjelp av denne tilnærmingen. Fraksjon absorbert (F_{abs}) hos mennesker ble tatt som gjennomsnittet over rotten og hunden. Denne F_{abs} -parameteren ble deretter justert til biotilgjengelighet (F) ved korreksjon for hepatisk ekstraksjon. Absorpsjonshastigheten (K_a) ble innstilt for å sikre at T_{maks} var 1 t for E9, en forholdsvis konservativ verdi gitt som observerte før-klinisk, og bør likefullt

20 resultere i en konservativ C_{max} -verdi for anvendelse i beregning av marginer med hensyn til sikkerhetsstudier. Den klinisk ønskede doseringsfrekvensen ble antatt å være to ganger daglig (BID).

[0115] Etter å ha definert formen og størrelsen på den humane plasmakonsentrasjon vs tidskurven, var det siste trinnet for å justere dosen slik at plasmakonsentrasjoner

25 oppnås som er sannsynlige å oppnå effekt. I muse-PD-studier, er hemming av pGSK (et surrogatendepunkt for anti-tumoraktivitet) blitt observert når de frie plasmakonsentrasjonene oversteg 1 ganger IC_{50} for hver forbindelse som målt i celleanalysen av AKT-hemmende aktivitet, korrigert for binding på grunn av føtalt kalveserum til stede i analysen. Følgelig antok den humane PK-modellen at fri

30 eksponering for E9 må overstige den frie PKB IC_{50} for å sikre klinisk effekt.

[0116] Ved å samle alle disse dataene sammen spås (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid (E9) å kreve en human dose på rundt 7 mg/kg for å oppnå effekt, med en halveringstid anslått til å være rundt 6 timer.

FIGURFORTEGNELSE

[0117]

Figur 1: GSK3 β - og PRAS40-fosforyleringsnivåene i prøver tatt fra U87-MG-tumorene dyrket i nakne mus etter en akutt dose på 150 eller 300 mg/kg (S)-4-amino-

N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid (E9), n = 5 per tidspunkt.

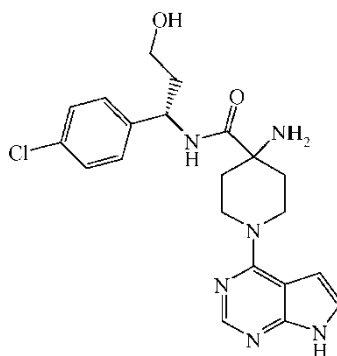
Figur 2: Resultatene av MCF-7-antitumorstudien i SCID-mus ved anvendelse av en én gang daglig (QD) dose på 300 mg/kg (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-

5 hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid (E9).

P a t e n t k r a v

1. Forbindelsen: (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid:

5



eller et farmasøytisk akseptabelt salt av dette.

10 2. Farmasøytisk sammensetning omfattende forbindelsen ifølge krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne, sammen med et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel eller bærer.

15 3. Forbindelse ifølge krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne, for anvendelse som et medikament.

4. Forbindelse ifølge krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne, for anvendelse i behandling av kreft.

20 5. Forbindelse ifølge krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne, for anvendelse i behandling av kreft, der kreften velges fra brystkreft, ikke-Hodgkins lymfom, pankreatisk kreft, hepatocellulær kreft, magekreft, prostatakreft og lungekreft.

25 6. Forbindelse ifølge krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne, for anvendelse i behandling av brystkreft.

7. Anvendelse av forbindelsen krevet i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne, for fremstilling av et medikament for behandling av kreft.

30 8. Anvendelse av forbindelsen krevet i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne, for fremstilling av et medikament for behandling av kreft, der kreften velges fra brystkreft, ikke-Hodgkins lymfom, bukspyttkjertelkreft, hepatocellulær kreft, magekreft, prostatakreft og lungekreft.

9. Anvendelse av forbindelsen krevet i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av denne, for fremstilling av et medikament for behandling av brystkreft.

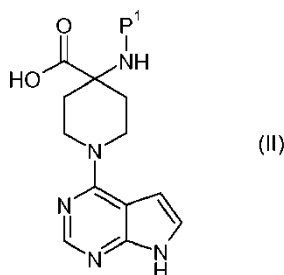
10. Forbindelsen: (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-karboksamid, som krevet i krav 1.

11. Forbindelsen ifølge krav 10 for anvendelse i behandling av kreft.

12. Forbindelsen ifølge krav 10 for anvendelse i behandling av kreft der kreften velges fra brystkreft, ikke-Hodgkins lymfom, bukspyttkjertelkreft, hepatocellulær kreft, magekreft, prostatakreft og lungekreft.

13. Forbindelsen ifølge krav 10 for anvendelse i behandling av brystkreft.

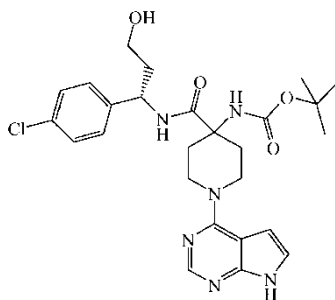
14. Prosess for fremstilling av forbindelsen krevet i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av dette, der prosessen omfatter reaksjonen av en syre med formel (II) med (S)-3-amino-3-(4-klorfenyl)propan-1-ol:



der **P¹** representerer en egnet beskyttende gruppe; og deretter, om nødvendig: fjerning av den beskyttende gruppen; og/eller danne et farmasøytisk akseptabelt salt av dette.

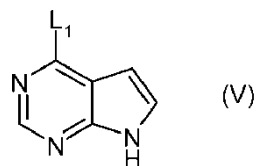
15. Prosessen som krevet i krav 14, der **P¹** representerer en tert-butoksykarbonylbeskyttende gruppe.

16. Forbindelsen: (S)-tert-butyl-4-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropylkarbamoyl)-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidin-4-ylkarbammat:



17. Prosess for fremstilling av forbindelsen krevet i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt av dette, der prosessen omfatter reaksjonen av (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)piperidin-4-karboksamid med en bisyklisk heterosyklus av formel (V):

5



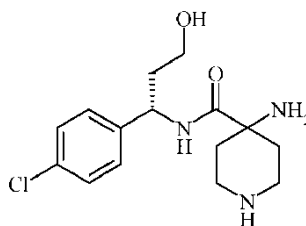
der L_1 representerer en egnet utgående gruppe; og deretter, om nødvendig, å danne et farmasøytisk akseptabelt salt av denne.

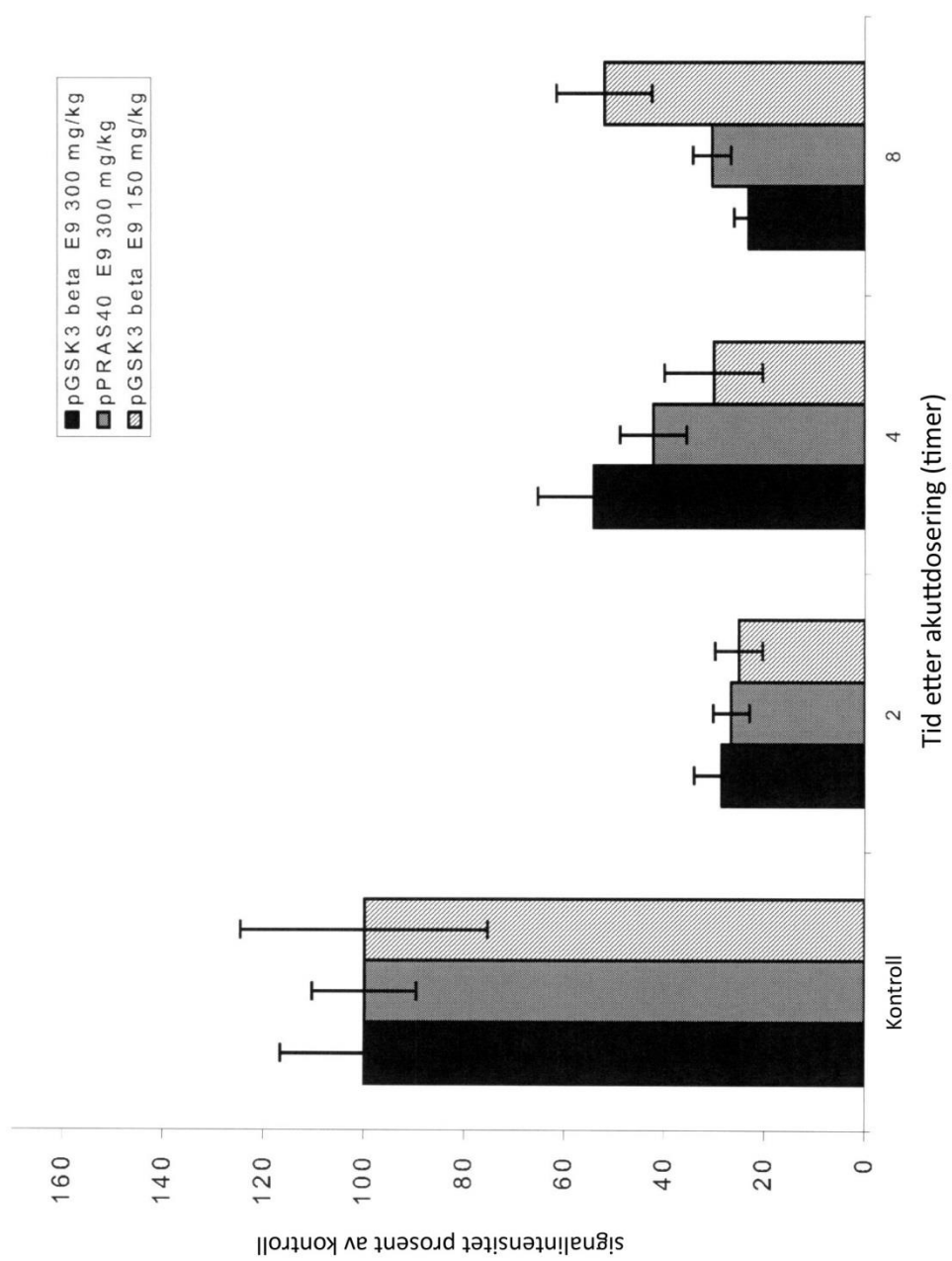
10

18. Prosessen som krevet i krav 17, der L_1 er klorin.

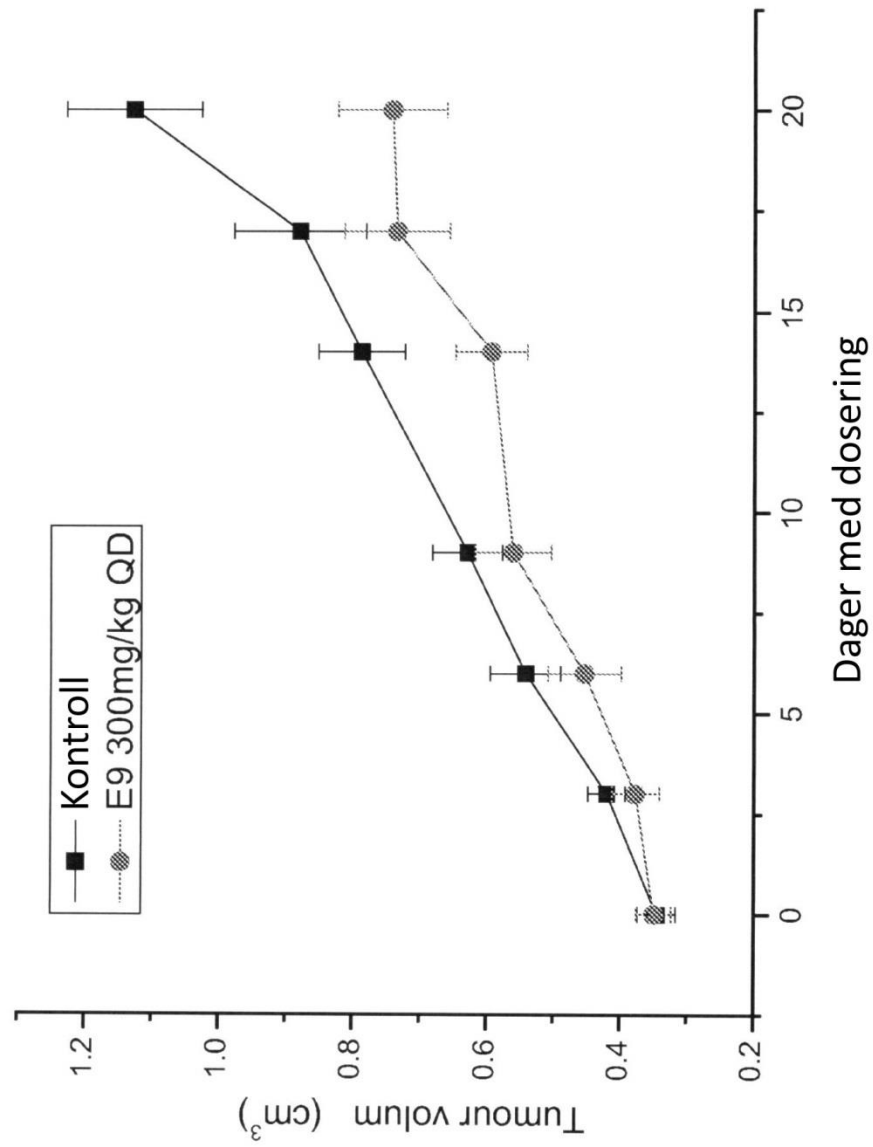
19. Forbindelsen: (S)-4-amino-N-(1-(4-klorfenyl)-3-hydroksypropyl)piperidin-4-karboksamid:

15





Figur 1



Figur 2