



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2203444 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07D 403/12 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.12.16
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.07.24
(86)	Europeisk søknadsnr	08834252.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.09.25
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.07.07
(30)	Prioritet	2007.09.28, US, 975846 P
(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
(73)	Innehaver	Lexicon Pharmaceuticals, Inc., 8800 Technology Forest Place, The Woodlands, TX 77381, USA
(72)	Oppfinner	BEDNARZ, Mark, S., 90 West Afton Avenue, No. 169, Yardley, PA 19067, USA DE PAUL, Susan, Berninastrasse 11, CH-8057 Zürich, Sveits KANAMARLAPUDI, Ramanaiah, C., 10 Langon Hollow Road, Bridgewater, NJ 08807, USA PERLBERG, Anett, Niederhofweg 11, CH-4617 Gunzgen, Sveits ZHANG, Haiming, 1002 Sturwood Way, Lawrenceville, NJ 08648, USA
(74)	Fullmektig	Håmsø Patentbyrå ANS, Postboks 171, 4302 SANDNES, Norge

(54)	Benevnelse	Faste former av (S) -etyl2-amino-3- (4- (2-amino- 6- ((R) -1- (4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-YL) fenyl) -2, 2, 2-trifluoretoksy) -pyrimidin-4-YL) fenyl) propanoat og fremgangsmåter for deres anvendelse
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-2007/089335 WO-A-2008/073933 BASTIN R J ET AL: "Salt Selection and Optimisation for Pharmaceutical New Chemical Entities" ORGANIC PROCESS RESEARCH AND DEVELOPMENT, CAMBRIDGE, GB, vol. 4, no. 5, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 427-435, XP002228592 CAIRA M R: "CRYSTALLINE POLYMORPHISM OF ORGANIC COMPOUNDS" TOPICS IN CURRENT CHEMISTRY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 198, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 163-208, XP001156954 ISSN: 0340-1022 SHI ZHI-CAI ET AL: "Modulation of peripheral serotonin levels by novel tryptophan hydroxylase inhibitors for the potential treatment of functional gastrointestinal disorders" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, US AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. WASHINGTON, vol. 51, no. 13, 10 July 2008 (2008-07-10), pages 3684-3687, XP002494320 ISSN: 0022-2623 [retrieved on 2008-06-17]

Faste former av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat og fremgangsmåter for deres anvendelse

Beskrivelse

- 5 Denne søknaden krever prioritet fra US midlertidige søknad nr. 60/975, 846, inngitt den 28. september 2007.

1. OPPFINNELSENS OMRÅDE

- Denne oppfinnelsen angår faste former av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat og salter derav.
- 10

2. OPPFINNELSENS BAKGRUNN

- Forskjellige faste former av samme forbindelse kan ha vesentlig forskjellige egenskaper. For eksempel kan den amorfe formen av et medikament oppvise forskjellige løsningsegenskaper og forskjellige biotilgjengelighetsmønstre enn dens krystallinske form(er), egenskaper som kan påvirke hvordan medikamentet må bli administrert for å oppnå optimal effekt. Amorfe og krystallinske former av et medikament kan også ha forskjellige håndteringsegenskaper (f.eks. risleevne, kompressibilitet), løsningshastigheter, løseligheter og stabiliteter, alle faktorer som kan påvirke fremstillingen av dose-
- 15
- ringsformer. Følgelig er adgang til flere former av et medikament ønskelig for en rekke grunner. Videre kan de bestemmende myndighetene (f.eks. US Food and Drug Administration) kreve identifisering av alle faste (f.eks. polymorfe) former av en ny medikamentsubstans før produkter inneholder forbindelsen. Se A. Goho, Science News 166(8):122-123 (2004).
- 20

- Forbindelser kan eksistere i én eller flere krystallinske former, men deres eksistens og egenskaper kan ikke forutsies med sikkerhet. I tillegg eksisterer ingen standardprosedyre for fremstillingen av alle mulige polymorfe former av en forbindelse. Og selv etter
- 25

at en polymorf har blitt identifisert, kan eksistensen av og egenskapene til andre former bare bestemmes av ytterligere eksperimentering. Id.

WO 2007/089335 avdekker multisykliske forbindelser som er inhibitorer av tryptofanhydroksylase.

5 **3. OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN**

Denne oppfinnelsen er delvis rettet mot krystallinske, faste former av tryptofanhydroksylaseinhibitoren (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat, og farmasøytisk akseptable salter derav.

10 En utførelsesform av oppfinnelsen omfatter farmasøytiske sammensetninger som omfatter de faste formene som er beskrevet i dette dokumentet.

En annen utførelsesform vedrører fremgangsmåter for å behandle, håndtere og forebygge forskjellige sykdommer og tilstander, som omfatter bruken av faste former som er beskrevet i dette dokumentet.

15 **4. KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE**

Figur 1 er et røntgenpulverdiffraksjonsmønster av en krystallinsk form av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat. Diffraktogrammet ble oppnådd ved hjelp av et Rigaku Miniflex-diffraktometer (kobber K α -stråling).

20 Figur 2 er et røntgenpulverdiffraksjonsmønster av en krystallinsk form av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoathippurat. Diffraktogrammet ble oppnådd ved hjelp av en Bruker D8 Advance (kobber K α -stråling).

25 Figur 3 er et FT-Ramanspektrum av en krystallinsk form av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoathippurat. Spekteret ble oppnådd ved bruk av et Bruker RFS100-spektrometer (1064 nm eksitering).

30 Figur 4 er et røntgenpulverdiffraksjonsmønster av en krystallinsk form av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoatsuksinat. Diffraktogrammet ble oppnådd ved hjelp av en Bruker D8 Advance (kobber K α -stråling).

5. DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Denne oppfinnelsen er delvis rettet mot krystallinske, faste former av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat og farmasøytisk akseptable salter derav.

5 Forbindelsen er en inhibitor av tryptofanhydroksylase. Når de administreres til dyr, reduserer forbindelsen perifere serotoninnivåer, og kan anvendes for å behandle et bredt spekter av sykdommer og lidelser. Se US patentsøknad nr. 60/874,596, inngitt den 12. desember 2006.

10 Denne oppfinnelsen er også rettet mot doseringsformer som omfatter krystallinske, faste former av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat og farmasøytisk akseptable salter derav, og vedrører fremgangsmåter for deres bruk.

5.1. Definisjoner

15 Dersom ikke annet er angitt, betyr uttrykkene "sykdom eller lidelse mediert av perifert serotonin" og "sykdom og lidelse mediert av perifert serotonin" en sykdom og/eller lidelse som har ett eller flere symptomer, og hvis alvor er påvirket av perifere serotoninnivåer.

20 Dersom ikke annet er angitt, betyr uttrykkene "håndtering" i forskjellige grammatikalske former, å forebygge tilbakefall av den angitte sykdommen eller lidelsen hos en pasient som allerede har lidd av sykdommen eller lidelsen, og/eller forlenge tidsrommet en pasient som har lidd av sykdommen eller lidelsen forblir i remisjon. Uttrykkene omfatter modulering av terskelen, utviklingen og/eller varigheten av sykdommen eller lidelsen, eller å endre måten en pasient reagerer på sykdommen eller lidelsen.

25 Dersom ikke annet er angitt, betyr uttrykket "forebygge" i forskjellige grammatikalske former, en handling som inntreffer før en pasient begynner å lide av den angitte sykdommen eller lidelsen, som inhiberer eller reduserer alvorret av sykdommen eller lidelsen. Med andre ord omfatter uttrykkene profylakse.

30 Dersom ikke annet er angitt, er en "profylaktisk effektiv mengde" av en forbindelse en mengde tilstrekkelig til å forhindre en sykdom eller tilstand, eller ett eller flere symptomer assosiert med sykdommen eller tilstanden, eller for å hindre gjentagelse. En profylaktisk effektiv mengde av en forbindelse betyr en mengde av terapeutisk middel, alene eller i kombinasjon med andre midler, noe som gir en profylaktisk fordel i forebygging av sykdommen eller tilstanden. Uttrykket "profylaktisk effektiv mengde" kan

omfatte en mengde som forbedrer den totale profylaksen eller forsterker den profylaktiske effekten for et annet profylaktisk middel.

Dersom ikke annet er angitt er en "terapeutisk effektiv mengde" av en forbindelse en mengde som er tilstrekkelig til å tilveiebringe en terapeutisk fordel i behandling eller håndtering av en sykdom eller tilstand, eller for å forsinke eller minimere ett eller flere symptomer assosiert med sykdommen eller tilstanden. En terapeutisk effektiv mengde av en forbindelse betyr en mengde av terapeutisk middel, alene eller i kombinasjon med andre terapier, som gir en terapeutisk fordel ved behandling eller håndtering av sykdommen eller tilstanden. Uttrykket "terapeutisk effektiv mengde" kan omfatte en mengde som forbedrer den totale behandlingen/terapien, reduserer eller unngår symptomer eller årsaker til en sykdom eller tilstand, eller øker den terapeutiske effekten av et annet terapeutisk middel.

Dersom ikke annet er angitt, omfatter uttrykkene "behandle" i forskjellige grammatikalske former en handling som oppstår mens en pasient lider av den angitte sykdommen eller lidelsen, som reduserer alvoret av sykdommen eller lidelsen eller ett eller flere av dens symptomer, eller forsinke eller reduserer progresjonen av sykdommen eller lidelsen.

Dersom ikke annet er angitt, har uttrykket "inkludere" samme betydning som "inkluderer, men er ikke begrenset til", og uttrykket "inkluderer" har samme betydning som "inkluderer, men er ikke begrenset til". Tilsvarende har uttrykket "som" samme betydning som uttrykke "som, men ikke begrenset til".

Dersom ikke annet er angitt, skal ett eller flere adjektiver umiddelbart forut for en serie av substantiver skulle forstås som å gjelde for hvert av disse. For eksempel har uttrykket "eventuelt substituert alkyl, aryl eller heteroaryl" samme betydning som "eventuelt substituert alkyl, eventuelt substituert aryl eller eventuelt substituert heteroaryl."

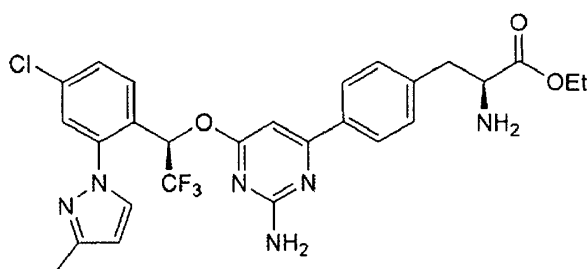
Dersom ikke annet er angitt, omfatter en struktur eller navn på en forbindelse eller slekt av forbindelser alle former av den forbindelsen eller slekten av forbindelser, og alle blandinger omfattende forbindelsen eller slekten av forbindelser.

Det bør også bemerkes at et hvilket som helst atom vist i en tegning med utilfredsstilte valenser antas å være festet til nok hydrogenatomer for å tilfredsstille valensene. I tillegg omfatter kjemiske bindinger avbildet med en heltrukket linje parallelt med en stiplet linje både enkle og doble (f.eks. aromatiske) bindinger, hvis valensene tillater dette. Strukturer som representerer forbindelser med ett eller flere kirale sentre, men

som ikke indikerer stereokjemi (f.eks. med heltrukne eller stiplede linjer) omfatter rene stereoisomerer og blandinger (f.eks. racemiske blandinger) derav. Tilsvarende omfatter navn på forbindelser som har ett eller flere kirale sentre som ikke angir stereokjemien for disse sentrene, rene stereoisomerer og blandinger derav.

5 **5.2. Former av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat**

Denne oppfinnelsen er rettet mot krystallinske, faste former av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat:



og farmasøytisk akseptable salter derav.

En utførelsesform av oppfinnelsen omfatter krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoatfri base. En form av denne forbindelsen har et smeltepunkt på omtrent 104 °C som bestemt ved differensiell skanningskalorimetri (DSC) (starttemperatur). Dette skjemaet gir et røntgenpulverdiffraksjons (XRPD)-mønster som inneholder topper ved rundt 10,7, 12,2, 12,8, 17,7 og/eller 22,0 grader 2θ. Som de fagkyndige på området er vel klar over kan de relative intensitetene for toppene i et XRPD-mønster av et krystallinsk materiale variere avhengig av hvordan prøven ble fremstilt, og hvordan dataene samles. Med tanke på dette er et eksempel på et XRPD-mønster for denne krystallinske formen gitt i figur 1.

En annen utførelsesform omfatter krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoathippurat. En form av denne forbindelsen har et smeltepunkt på omtrent 142 °C (DSC-starttemperatur, med en topp ved rundt 147 °C). Dette skjemaet gir et XRPD-mønster som inneholder topper ved rundt 8,2, 9,5, 12,6, 16,9, 21,8, 22,0, 22,7, 24,3 og/eller 29,1 grader 2θ. Et eksempel på et XRPD-mønster for denne

krystallinske formen er gitt i figur 2. Et eksempel på et FT-Ramanspektrum for denne krystallinske formen er gitt i figur 3.

En annen utførelsesform omfatter krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoatsuksinat. En form for denne forbindelsen gir et XRPD-mønster som inneholder topper ved rundt 7,7, 11,5, 11,7, 15,7, 17,9, 21,1 og/eller 23,2 grader 2 θ . Et eksempel på et røntgenpulverdiffraksjonsmønster for denne krystallinske formen er gitt i figur 4.

Denne oppfinnelsen angår faststoffer som er blandinger av både amorfe og krystallinske former. Visse slike faststoffer omfatter krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav i en mengde på minst rundt 50, 75, 80, 85, 90, 95 eller 99 vektprosent.

Krystallinske salter av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat kan fremstilles ved: å bringe en løsning omfattende (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat i kontakt med farmasøytisk akseptabel syre under betingelser tilstrekkelig til å gi et salt av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat; å redusere løseligheten av saltet i løsningen under betingelser tilstrekkelige til å gi et krystallinsk salt av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat; og å isolere det krystallinske saltet.

Løsningen kan omfatte løsningsmidler som isopropylacetat, etylacetat, etanol, isopropanol, metyl-t-butyleter og metylisobutylketon. Bestemte syrer inkluderer hippur- og ravsyre.

Løseligheten av saltet i løsningen kan reduseres ved å avkjøle løsningen, ved å øke konsentrasjonen av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat i løsningen, eller ved å sette et anti-løsningsmiddel (dvs. et løsningsmiddel hvori saltet er uløselig) til løsningen. Heptan er et eksempel på et anti-løsningsmiddel.

Krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat fri base kan fremstilles

ved tilsetning av en basisk, vandig løsning til en organisk suspensjon for å gi en blanding med organiske og vandige komponenter, hvori den organiske suspensjonen omfatter et salt (f.eks. et hippursalt) av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat og et organisk løsningsmiddel; isolere den organiske komponenten fra blandingen; og avkjøle og/eller konsentrere den organiske komponenten for å gi krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat.

Eksempler på organiske løsningsmidler inkluderer etere. Eksempler på basiske vandige løsninger inkluderer vandige løsninger av natriumbikarbonat.

5.3. Behandlingsfremgangsmåter

Den foreliggende oppfinnelsen omfatter fremgangsmåte for inhibering av tryptofanhydroksylase (TPH), som omfatter å bringe TPH i kontakt med en forbindelse ifølge oppfinnelsen (dvs. en forbindelse som er beskrevet i dette dokumentet). I en bestemt metode er TPH TPH1-isoformen. I en bestemt fremgangsmåte er inhiberingen *in vitro*. I en annen er inhiberingen *in vivo*.

Den foreliggende oppfinnelsen omfatter forbindelser og farmasøytiske doseringsformer for anvendelse i fremgangsmåter for å behandle, forebygge og håndtere forskjellige sykdommer og lidelser mediert av perifert serotonin, som omfatter inhibering av TPH1-aktivitet hos en pasient som har behov for slik behandling, forebygging eller håndtering.

Spesielle sykdommer og lidelser inkluderer karsinoid syndrom og gastrointestinale sykdommer og lidelser. Eksempler på spesifikke sykdommer og lidelser omfatter abdominal smerte (f.eks. forbundet med medullært karsinom i skjoldbruskkjertelen), angst, karsinoid syndrom, cøliaki, forstoppelse (f.eks. forstoppelse som har en iatro-gen årsak, og idiopatisk konstipasjon), Crohns sykdom, depresjon, diabetes, diaré (f.eks. gallesyrediaré, enterotoksin-indusert sekretorisk diaré, diaré med en iatrogen årsak, idiopatisk diaré (f.eks. idiopatisk sekretorisk diaré), og reisediaré), oppkast, funksjonell magesmerte, funksjonell dyspepsi, irritabelt tarmsyndrom (IBS), laktoseintoleranse, MEN type I og -II, Ogilvies syndrom, Kolera-syndrom i bukspyttkjertelen, insuffisiens i bukspyttkjertelen, feokromacytom, sklerodermi, somatiseringslidelse, og Zollinger-Ellison-syndrom.

5.4. Farmasøytiske sammensetninger

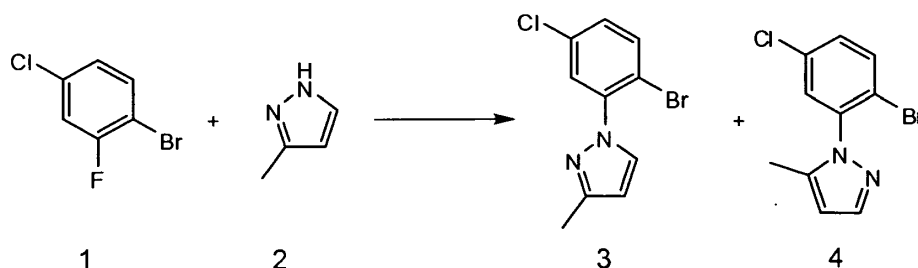
Den foreliggende oppfinnelsen omfatter farmasøytiske sammensetninger og doseringsformer omfattende faste former ifølge oppfinnelsen. Farmasøytiske sammensetninger og doseringsformer ifølge oppfinnelsen kan eventuelt inneholde én eller flere farmasøytisk akseptable bærere eller eksipienser. Visse farmasøytiske sammensetninger er enkeltenhetsdoseformer egnet for oral, topisk, mukosal (f.eks. nasal, pulmonal, sublingual, vaginal, bukal eller rektal), parenteral (f.eks. subkutan, intravenøs, bolusinjeksjon, intramuskulær eller intraarteriell), eller transdermal administrering til en pasient. Eksempler på doseringsformer inkluderer, men er ikke begrenset til: tabletter, kapletter, kapsler, som f.eks. myke elastiske gelatinkapsler, sugetabletter, trochéer, pastiller, dispersjoner, stikkpiller, salver, kataplasmer (omslag), pastaer, pulvere, dressinger, kremer, plastere, løsninger; lapper, aerosoler (f.eks. nesenspray eller inhalatorer), geler, væskeformige doseringsformer egnet for oral eller mukosal administrering til en pasient, inkludert suspensjoner (f.eks. vandige eller ikke-vandige, flytende suspensjoner, olje-i-vann emulsjoner, eller en vann-i-olje flytende emulsjon), og løsninger og eliksirer, væskeformige doseringsformer egnet for parenteral administrering til en pasient, og sterile faststoffer (f.eks. krystallinske eller amorfe faststoffer) som kan rekonstitueres for å gi flytende doseringsformer egnet for parenteral administrering til en pasient.

Formuleringen bør passe med administreringsmåten. For eksempel kan oral administrering kreve enteriske belegg for å beskytte den aktive bestanddelen mot nedbryting i fordøyelseskanalen. I et annet eksempel kan den aktive bestanddelen administreres i en liposomal formulering for å skjerme den mot nedbrytende enzymer, lette transport i sirkulasjonssystemet og/eller bevirke levering over cellemembraner til intracellulære områder.

Sammensetning, form og type av doseringsformene ifølge oppfinnelsen vil typisk variere med bruken. For eksempel kan en doseringsform som brukes ved akutt behandling av en sykdom inneholde større mengder av ett eller flere av de aktive bestanddelene det omfatter enn en doseringsform som brukes ved kronisk behandling av den samme sykdommen. Tilsvarende kan en parenteral doseringsform inneholde mindre mengder av ett eller flere av de aktive bestanddelene den omfatter enn en oral doseringsform som brukes til å behandle de samme sykdommene. Disse og andre måter der spesifikke doseringsformer som omfattes av oppfinnelsen vil variere fra hverandre, vil være åpenbare for fagfolk innen teknikken. Se f.eks. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. utg., Mack Publishing, Easton PA (1990).

6. EKSEMPLER

6.1. Fremstilling av 1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoetanon

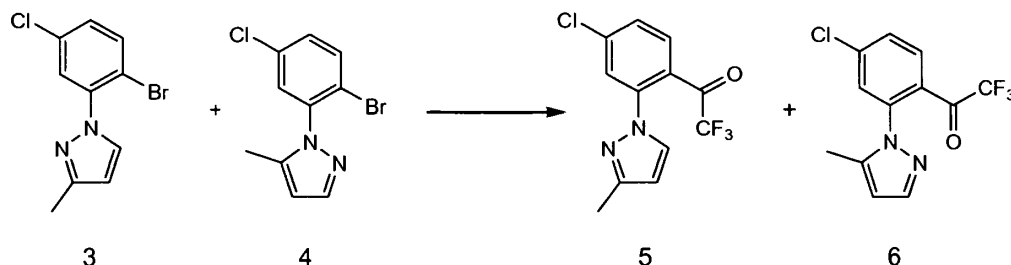


En 3 liters 3-halset rundkolbe utstyrt med en mekanisk rører, en temperaturregulator, og et nitrogeninnløp ble fylt med kalium-tert-butoksid (Aldrich 95 %, 84,6 g, 0,716 mol) og DMSO (400 ml, 4X) ved romtemperatur og omrørt i 15 minutter. Til denne løsningen ble det tilsatt pyrazol 2 (59 g, 0,719 mol) etterfulgt av en DMSO-vasking (50 ml, 0,5 x). Den resulterende oransjefargede uklare løsningen ble omrørt i 15 min og fluorid **1** (100 g, 0,477 mol) ble tilsatt fulgt av en DMSO-vasking (50 ml, 0,5 x). Denne blandingen ble deretter oppvarmet til 50 °C og holdt i 5 timer ved denne temperaturen. Etter avkjøling til romtemperatur ble reaksjonsblandingen fortynnet med MTBE (750 ml) og vann (500 ml) ble tilsatt for å gi en brun, uklar blanding. Etter 15 min omrøring ble det organiske laget separert og vasket sekvensielt med 1 N HCl (250 ml), saltløsning (250 ml) og vann (250 ml). Løsningsanalyse av det organiske laget ble utført ved hjelp av GC (omdanning > 99 %, løsningsutbytter av **3** og dens regioisomer **4** var 83 % henholdsvis 17 %). MTBE-løsningen ble deretter konsentrert under vakuum til et totalt volum på rundt 200 ml (KF viste 0,737 % vann). THF (500 ml) ble tilsatt og konsentrert til 2 x løsning (KF = 0,158 %). THF - tilsetningskonsentreringssekvensen ble gjentatt for å gi en 2 x løsning (KF = 0,023 %) som ble benyttet direkte i neste trinn.

Analytiske prøver av forbindelsene **3** og **4** ble rensert ved kolonnekromatografi og karakterisert: forbindelse **3**: hvite krystaller;

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,80 (1H, d, *J* = 2,3 Hz), 7,61 (1H, d, *J* = 8,6 Hz), 7,58 (1H, d, *J* = 2,5 Hz), 7,22 (1H, dd, *J* = 8,6, 2,6 Hz), 6,27 (1H, d, *J* = 2,5 Hz), 2,38 (3H, s); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 150,8, 140,6, 134,6, 134,1, 132,0, 129,0, 128,2, 115,4, 107,0, 13,6. Forbindelse **4**: hvite krystaller; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,65 (1H, d, *J* = 8,6 Hz), 7,62 (1H, d, *J* = 1,5 Hz), 7,43 (1H, d, *J* = 2,5 Hz), 7,35 (1H, dd, *J* = 8,6, 2,2 Hz), 6,21 (1H, s), 2,19 (3H, s);

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 140,6, 140,2, 140,0, 134,1, 133,9, 130,8, 130,2, 120,7, 105,9, 11,4.



5 Den ovennevnte THF-løsningen ble overført til en 3 l 3-halset rundkolbe med kappe utstyrt med en mekanisk rører, en temperaturregulator, og et nitrogeninnløp. Etter fortynning med THF (800 ml), ble vanninnholdet i løsningen undersøkt ved KF (0,053 %). Til den ovennevnte løsningen ble det tilsatt en løsning av i-PrMgCl i THF (Aldrich 2 M, 286 ml, 0,572 mol) ved 0-10 °C i løpet av 1 time. Den resulterende løs-

10 ningen ble omrørt i 30 min ved 10 °C (GC viste fullføring av magnesium-bromutbyttingsreaksjonen). Etyltrifluoroacetat (74 ml, 0,620 mol) ble deretter tilsatt til Grignard-løsningen ved en temperatur på mellom -20 og -10 °C i løpet av 45 minutter, deretter oppvarmet langsomt til 0 °C og omrørt i 30 min ved den samme temperaturen. Reaksjonsblandingen ble helt i 2 N HCl (300 ml) ved 0 °C, og omrørt i 30 mi-

15 nutter ved romtemperatur. Det organiske laget ble fortynnet med MTBE (500 ml), og vasket med saltløsning (250 ml) etterfulgt av vann (250 ml). Løsningsanalysen av det organiske laget ble utført ved hjelp av GC (forbindelse **5**: 67 % løsningsutbytte, den tilsvarende regioisomeren **6** var til stede i en mengde på rundt 20 % i forhold til **5**). Løsningen ble deretter konsentrert under vakuum til 2 x løsningen. For å fjerne vann

20 ble THF (500 ml) tilsatt, og fordampet til 2 x løsningen. THF-tilsetningskonsentreringen ble gjentatt for å gi en 2 x løsning. Heptan (500 ml) ble tilsatt og konsentrert til 2 x løsningen for å bytte ut løsningsmidlet for omkrystallisering. Heptan (500 ml) ble tilsatt igjen og konsentrert til 3,5 x løsning.

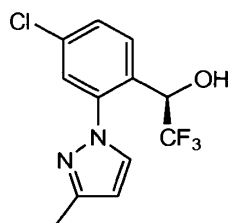
3,5 x heptanløsningen ble så overført til en 1 liters 3-hals rundbunnet kolbe med kappe utstyrt med en mekanisk rører, en temperaturregulator, og et nitrogeninnløp. Løs-

25 ningen ble oppvarmet til 60 °C, og den resulterende homogene løsningen ble langsomt (1-2 timer) avkjølt til romtemperatur under omrøring, ytterligere avkjølt til 0 °C og omrørt i 30 min ved den samme temperaturen. Krystallene ble samlet og vasket med iskald heptan (200 ml) og tørket under vakuum ved 50 °C for å gi et lysegult faststoff

30 (forbindelse **5**, 85,7 g, 99 % rent ved GC, 62 % utbytte fra fluorid-**1**). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,85 (1H, d, J = 2,5 Hz), 7,48 (1H, d, J = 1,7 Hz), 7,38 (1H, d, J = 8,3

Hz), 7,31 (1H, dd, $J = 8,1, 1,8$ Hz), 6,33 (1H, d, $J = 2,5$ Hz), 2,30 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 184,2 (q, $J_{\text{C-F}} = 36,6$ Hz), 151,7, 138,7, 138,5, 130,7, 126,4, 125,7, 124,5, 116,8, 116,1 (q, $J_{\text{C-F}} = 289,8$ Hz), 109,7, 13,0; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) $\delta = -76,8(\text{s})$.

6.2. Fremstilling av (R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretanol

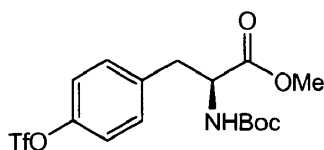


En 3 l 3-halset rundbunnet kolbe med kappe, utstyrt med en mekanisk rører, en temperaturregulator, og et nitrogeninnløp ble fylt sekvensielt med diklor(pentametylsyklopentadienyl)iridium(III)dimer ($[\text{Cp}^*\text{IrCl}_2]_2$, STREM, CAS#: 12354-85-7, 34 mg, 0,043 mmol), (1*R*,2*R*)-(-)-*N*-(4-toluensulfonyl)-1,2-difenyletylendiamin (STREM, CAS#: 144222-34-4, 32 mg, 0,087 mmol) og vann (400 ml, 4 x) ved romtemperatur. Den resulterende blandingen ble omrørt i 3 timer ved 40 °C for å gi en homogen, oransjefarget løsning. Til denne aktive katalysatorløsningen ble det tilsatt kaliumformat (145,5 g, 1,73 mol) og en løsning av ketonet 1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)-fenyl)-2,2,2-trifluoretanon (100 g, > 99 % renhet ved GC, 0,346 mol) i CH_3CN (500 ml, 5 x) ved 40 °C. Reaksjonsblanding ble deretter omrørt ved 40 °C i 2 timer, ved hvilket tidspunkt reaksjonen ble bestemt å være fullført ved GC. Etter avkjøling til 30 °C ble det vandige laget (ca. 480 ml) fjernet. Det organiske laget (ca. 600 ml, 6 x) ble behandlet med aktivkarbon (Darco G-60, 20 g, 0,2 x) ved 45 °C i 2 timer og filtrert gjennom et 6,35 mm lag av Celpure P65 (USP-NF, Pharmaceutical grade, Sigma) og vasket med CH_3CN (200 ml, 2 x). Filtratet ble konsentrert til 250 ml (2,5 x) og overført til en 2 liters 3-halset, rundbunnet kolbe med kappe utstyrt med en mekanisk rører og en temperaturregulator. Ytterligere CH_3CN (50 ml, 0,5 x) ble tilsatt for å øke løsningsvolumet 300 ml (3 x). Denne løsningen ble oppvarmet til 60 °C og vann (500 ml, 5 x) ble tilsatt til løsningen ved den samme temperaturen. Etter omrøring i 15 minutter ved 60 °C ble den resulterende, emulsjonslignende melkeaktige blandingen langsomt avkjølt til romtemperatur. Krystallene ble så filtrert ved romtemperatur og vasket med CH_3CN vann (1:2, 150 ml, 1,5 x). Den våte kaken (108 g, KF: 8,83 %) ble tørket under vakuum ved 45 °C i 4 timer for å gi den ønskede alkoholen (hvitt

faststoff, 95 g, 94 % utbytte, > 99 % kjemisk renhet > 99 % ee, KF: 0,014 %).

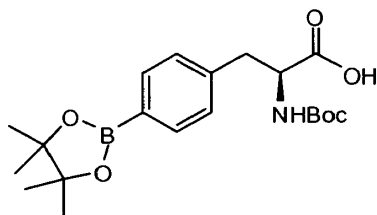
^1H NMR (metanol- d_4 , 400 MHz) δ 2,19 (br. s., 3H), 5,23 (dd, 6,8 Hz, 7,2 Hz, 1 H), 6,19 (d, 2,4 Hz, 1 H), 7,29 (d, 2 Hz, 1H), 7,42 (dd, 2,0 Hz, 6,4 Hz, 1 H), 7,59 (d, 2,4 Hz, 1 H), 7,68 (d, 8,4 Hz, 1 H). ^{13}C NMR (metanol- d_4) δ 13,4, 67,2, 108,3, 121,7, 124,5, 127,4, 130,1, 131,9, 134,1, 136,4, 141,6, 152,3. LC/MS: $\text{MH}^+ = 291$.

6.3. Fremstilling av (S)-metyl 2-(tert-butoksykarbonylamino)-3-(4-(trifluormetylsulfonyloksy)fenyl)propanoat



Denne forbindelsen ble fremstilt basert på litteraturprosedyre (Shieh, et al., J. Org. Chem. 57:379-381 (1992)). Til en løsning av Boc-Tyr-OMe (Bachem, California, 100 g, 0,34 mol) og N-metylmorfolin (51 g, 1,5 ekv.) i diklormetan (1000 ml) ble det tilsatt triflicanhydrid (100 g, 1,05 ekv.) over to timer ved -5 til 15 °C. Den resulterende røde løsningen ble omrørt ved -10 °C i 10 minutter. HPLC-analyse viste fullstendig forsvinning av utgangsmaterialet. Reaksjonen ble undertrykket med 10 % sitronsyre (500 ml). Det organiske laget ble vasket med 10 % sitronsyre (500 ml) fulgt av vann (500 ml). Den resulterende lyserosa løsningen ble konsentrert under redusert trykk til 200 ml. Dette ble fortynnet med acetonitril (600 ml) og konsentrert videre til en 200 g løsning. Denne løsningen ble anvendt i det neste trinnet uten ytterligere rensing. Beregnet utbytte var 98 % ved å strippe en prøve til tørrhet for å gi et lavtsmeltende lysegult faststoff. LC-MS (ESI): $\text{MH}^+ = 428,0$, $\text{MNH}_4^+ = 445,0$. ^1H NMR (CDCl_3) δ 7,16 (m, 4H), 4,95 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 4,53 (m, 1H), 3,64 (s, 3H), 3,10 (dd, $J_1 = 5,7$ Hz, $J_2 = 13,8$ Hz, 1H), 2,97 (dd, $J_1 = 6,3$ Hz, $J_2 = 13,6$ Hz, 1H), 1,34 (s, 9H). ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 172,3, 155,4, 149,0, 137,4, 131,5, 121,7, 119,1 (q, $J = 321$ Hz), 80,54, 54,62, 52,7, 38,3, 28,6. ^{19}F NMR(CDCl_3) δ -73,4.

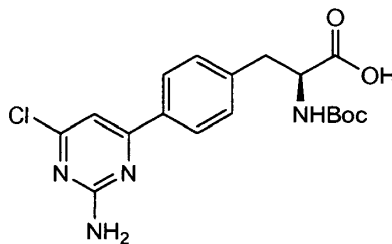
6.4. Fremstilling av (S)-2-(tert-butoksykarbonylamino)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioksaborolan-2-yl)fenyl)propansyre



Denne forbindelsen ble fremstilt basert på en litteraturprosedyre (Firooznia, et al., Tetrahedron Lett. 40:213-216 (1999)). Bis(pinacolato)dibor (90 g, 1,1 ekv.), kaliumacetat (63 g, 2 ekv.), trisykloheksylfosfin (2,3 g, 2,5 mol %), og palladiumacetat (0,72 g, 1 mol %) ble blandet i acetonitril (950 ml) og den resulterende blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 5 minutter. (S)-metyl 2-(tert-butoksykarbonylamino)-3-(4-(trifluormetylsulfonyloksy)-fenyl)propanoatløsning (190 g, 0,32 mol) ble tilsatt og den resulterende blandingen ble oppvarmet til 80 °C i 1 time og avkjølt. HPLC viste fullstendig forbruk av utgangsmaterialet. Reaksjonsblandingen ble stoppet med vandig kaliumbikarbonatløsning (57 g i 475 ml vann) og den resulterende blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 30 minutter. Blandingen ble filtrert gjennom en pute av cellulose for å fjerne palladium black. En prøve av det organiske laget ble konsentrert og renset ved kolonnekromatografi (gradient: 1:10 til 1:4 etylacetat/heksaner) for å gi (S)-metyl 2-(tert-butoksykarbonylamino)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioksaborolan-2-yl)fenyl)propanoat som en klar olje. LC-MS (ESI): $MH^+ = 406,2$, $MNH_4^+ = 423,2$, $M_2H^+ = 811,5$, $M_2NH_4^+ = 428,5$. 1H NMR($CDCl_3$) δ 7,76 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,15 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 4,96 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 4,60 (m, 1 H), 3,72 (s, 3H), 3,13 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,36 (s, 12H).

Det ovennevnte organiske laget av esteren ble omrørt med vandig litiumhydroksidløsning (23 g i 500 ml vann) ved romtemperatur i 30 minutter. pH i den resulterende oppslemmingen ble justert til rundt 10 med 6 N saltsyre og filtrert. Kaken ble vasket med vann (200 ml). Acetonitril ble fjernet fra filtratet under redusert trykk for å gi en vandig oppslemming (950 ml, ytterligere vann ble tilsatt under destilleringen). Oppslemmingen ble filtrert gjennom en pute av cellulose og vasket med vann (200 ml). Filtratet ble vasket med MTBE (500 ml) og fortynnet igjen med 700 ml MTBE. Blandingen ble surgjort til pH rundt 4,5 med 6 N saltsyre. Det organiske laget ble vasket med vann (500 ml) og konsentrert under redusert trykk til syreforbindelsen som en brun olje (206 g, 95 % utbytte basert på estimert renhet ved NMR). Råproduktet kan anvendes direkte i det følgende trinnet. Alternativt kan forbindelsen renses ved krystallisering fra MTBE/heptan for å gi et hvitt faststoff som inneholder en liten mengde av den tilsvarende boronsyren, (S)-3-(4-boronofenyl)-2-(tert-butoksykarbonylamino)propansyre. MS(ESI): $MH^+ = 392,2$, $MNH_4^+ = 409,2$, $M_2H^+ = 783,4$, $M_2NH_4^+ = 800,4$. 1H NMR($CDCl_3$) δ 7,95 (br s, 1H), 7,76 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,21 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 5,03 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 4,62 (m, 1H), 3,18 (m, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,35 (s, 12H). ^{13}C NMR($CDCl_3$) δ 175,8, 155,7, 139,7, 135,4, 129,2, 84,2, 80,5, 54,5, 38,3, 28,7, 25,2.

6.5. Fremstilling av (S)-3-(4-(2-amino-6-klorpyrimidin-4-yl)fenyl)-2-(tert-butoksykarbonylamino)propansyre



Til en 2 l 3-halset rundkolbe utstyrt med en mekanisk rører og en temperaturregulator ble det tilsatt (S) 2-(tert-butoksykarbonylamino)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioksaborolan-2-yl)fenyl)propansyre (30,3 g, 0,078 mol), 2-amino-4,6-diklorpyrimidin (38,03 g, 3,0 ekv.), POPd6-katalysator (0,605 g, 1,0 mol-%, CombiPhos Catalysts, Inc., New Jersey) og etanol (728 ml). Til den ovennevnte omrørte oppslemmingen ble det så langsomt tilsatt vandig kaliumbikarbonatløsning (27,85 g, 3,5 ekv. i 173 ml H₂O) slik at CO₂-gassutviklingen ikke var heftig. Denne blandingen ble så oppvarmet til 75 °C i 6 timer, på hvilket tidspunkt HPLC-analyse viste mer enn 99 % omdannelse av utgangsmaterialet. Etanol ble fjernet fra blandingen under redusert trykk for å gi en vandig oppslemming (~200 ml), ytterligere H₂O (90 ml) ble tilsatt, og løsningen ble konsentrert til ~ 250 ml. Vann (90 ml) ble tilsatt oppslemmingen, som deretter ble filtrert og vasket med vann (60 ml x 2). Filtratet ble ekstrahert med etylacetat (150 ml). Den vandige løsningen ble behandlet med Darco-G60 (6,0 g) ved 60 °C i 2 timer, filtrert gjennom celitt (Celpure 300, 10 g), og fortynnet med THF (240 ml) og toluen (180 ml). Til blandingen ble det langsomt tilsatt 6N HCl ved romtemperatur inntil pH nådde 4,0. Det organiske laget ble separert og vasket med vann (180 ml) og Darco-G60 (6,0 g) ble tilsatt: den resulterende blandingen ble oppvarmet til 60 °C i 2 timer. Løsningen ble avkjølt til romtemperatur og filtrert gjennom celitt (Celpure 300, 10 g). Kaken ble vasket med THF (30 ml x 2). Den resulterende løsningen ble konsentrert under vakuum til ~ 180 ml totalvolum, på hvilket tidspunkt produktet utfelte ut av løsningen. Oppslemmingen ble deretter avkjølt til romtemperatur, filtrert og filterkaken ble vasket med toluen (30 ml x 2). Faststoffet ble ovnstørket under vakuum ved 50 °C over natten for å gi 24,0 g av produktet som et lysegult faststoff som ved ¹H NMR inneholdt ~ 8,0 vekt-% toluen i 75 % (korrigert) utbytte. HPLC viste 91 % renhet med 9,0 % disyreurenhet.

6.6. Alternativ prosedyre for fremstilling av (S)-3-(4-(2-amino-6-klorpyrimidin-4-yl)fenyl)-2-(tert-butoksykarbonylamino)propansyre fra (S)-2-amino-3-(4-boronofenyl)propansyre ved hjelp av kaliumkarbonat som base

(S)-2-amino-3-(4-boronofenyl)propansyre (Ryscor Science, Inc., North Carolina, 1,0 g, 4,8 mmol) og kaliumkarbonat (1,32 g, 2 ekv.) ble blandet i vandig etanol (15 ml etanol og 8 ml vann). Di-*tert*-butyldikarbonat (1,25 g, 1,2 ekv.) ble tilsatt i én porsjon. Etter 30 min omrøring ved romtemperatur viste HPLC-analyse fullstendig forbruk av utgangsforbindelsen og dannelse av (S)-3-(4-boronofenyl)-2-(tert-butoksykarbonylamino)propansyre. 2-amino-4,6-diklorpyrimidin (1,18 g, 1,5 ekv.) og katalysatoren bis(trifenylfosfin)palladium(II)diklorid (34 mg, 1 mol-%) ble tilsatt, og den resulterende blandingen ble oppvarmet til 65-70 °C i 3 timer. HPLC-analyse viste fullstendig forbruk av mellomproduktet, (S)-3-(4-boronofenyl)-2-(tert-butoksykarbonyl-amino)propansyre. Etter konsentrering og filtrering viste HPLC-analyse av den resulterende, vandige løsningen mot en standardløsning av tittelforbindelsen 1,26 g (67 % utbytte).

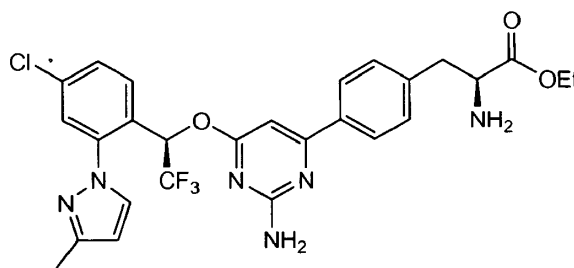
6.7. Alternativ prosedyre for fremstilling av (S)-3-(4-(2-amino-6-klorpyrimidin-4-yl)fenyl)-2-(tert-butoksykarbonylamino)propansyre fra (S)-2-amino-3-(4-boronofenyl)propansyre ved hjelp av kaliumkarbonat/kaliumbikarbonat som base

(S)-2-amino-3-(4-boronofenyl)propansyre (10 g, 48 mmol) og kaliumbikarbonat (14,4 g, 3 ekv.) ble blandet i vandig etanol (250 ml etanol og 50 ml vann). Di-*tert*-butyldikarbonat (12,5 g, 1,2 ekv.) ble tilsatt i én porsjon. HPLC-analyse indikerte at reaksjonen ikke var fullstendig etter omrøring over natten ved romtemperatur. Kaliumkarbonat (6,6 g, 1,0 ekv.) og ytterligere di-*tert*-butyldikarbonat (3,1 g, 0,3 ekv.) ble tilsatt. Etter 2,5 timers omrøring ved romtemperatur viste HPLC-analyse fullstendig forbruk av utgangsforbindelsen og dannelse av (S)-3-(4-boronofenyl)-2-(tert-butoksykarbonylamino)propansyre.

2-amino-4,6-diklorpyrimidinet (11,8 g, 1,5 ekv.) og katalysatoren bis(trifenylfosfin)palladium(II)-diklorid (0,34 g, 1 mol-%) ble tilsatt, og den resulterende blandingen ble oppvarmet til 75-80 °C i 2 timer. HPLC-analyse viste fullstendig forbruk av mellomproduktet, (S)-3-(4-boronofenyl)-2-(tert-butoksykarbonylamino)propansyre. Blandingen ble konsentrert under redusert trykk og filtrert. Filtratet ble vasket med etylacetat (200 ml) og fortynnet med 3:1 THF:MTBE (120 ml). Denne blandingen ble surgjort til pH rundt 2,4 med 6 N saltsyre. Det organiske laget ble vasket med saltløsning og konsentrert under redusert trykk. Resten ble utfelt i isopropanol, filtrert og tørket ved 50 °C under vakuum for å gi tittelforbindelsen som et hvitaktig faststoff (9,0 g, 48 % utbytte). Renhet: 92,9 % ved HPLC-analyse. Konsentrasjon av moder-

luten ga ytterligere 2,2 g hvitaktig pulver (12 % utbytte). Renhet: 93,6 % ved HPLC-analyse.

6.8. Fremstilling av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat



En 500 ml 3-halset rundkolbe utstyrt med en mekanisk rører, en temperaturregulator, og en kondensator ble fylt med monokloridet (S)-3-(4-(2-amino-6-klorpyrimidin-4-yl)fenyl)-2-(tert-butoksykarbonylamino)propansyre (20,0 g, 51 mmol), (R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretanol (>99 % ee, 16,3 g, 56 mmol, 1,1 ekv.), Cs₂CO₃ (24,9 g, 76 mmol, 1,5 ekv.) og vannfri 1,4-dioksan (150 ml, 7,5 x, KF = 0,003 %). Blandingen ble omrørt under nitrogen og temperaturen økt til 100 °C under god omrøring. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 100 °C i 1 time og ytterligere Cs₂CO₃ (33,2 g, 102 mmol, 2,0 ekv.) ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble deretter omrørt i 18 timer ved 100 °C. Den heterogene reaksjonsblandingen ble avkjølt til 90 °C og vann (150 ml, 7,5 x) ble tilsatt under god omrøring. Blandingen ble avkjølt til romtemperatur.

Til den bifasiske løsningen ble det tilsatt di-*tert*-butyldikarbonat (1,11 g, 5,1 mmol, 0,1 ekv.) ved romtemperatur og omrørt i 2 timer ved den samme temperaturen. Toluen (100 ml, 5 x) ble tilsatt, den resulterende blandingen omrørt i 15 min ved romtemperatur og fasene ble splittet. Vann (100 ml, 5 x) ble tilsatt til det organiske laget, og den resulterende blandingen ble omrørt i 15 min ved romtemperatur og fasene ble splittet. Det vandige laget (pH = 10,5) ble deretter surgjort til pH 7-6 ved anvendelse av 6 N HCl ved romtemperatur. EtOAc (100 ml, 5 x) ble tilsatt til denne blandingen, og ytterligere surgjøring til pH 4 ble utført ved anvendelse av 6 N HCl ved romtemperatur under god omrøring. Etter splitting av det organiske laget ble det vandige laget ekstrahert med EtOAc (100 ml, 5 x). De kombinerte organiske lagene ble vasket med saltløsning (100 ml, 5 x). EtOAc-laget ble deretter konsentrert under vakuum til et totalt volum på rundt 40 ml (2 x). EtOH (100 ml, 5 x) ble tilsatt og konsentrert til 2 x løsning. EtOH (150 ml, 7,5 x) tilsetningskonsentreringssekvensen ble gjentatt for å gi en 2 x løsning av (S)-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-

yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)-2-(tert-butoksykarbonylamino)propansyre, som ble brukt direkte i det neste kjemiske trinnet. Løsningsanalyse viste at utbyttet var omtrent 75 % fra (S)-3-(4-(2-amino-6-klorpyrimidin-4-yl)fenyl)-2-(tert-butoksykarbonylamino)propansyre under den antakelsen at forbindelsens renhet var 100 %. Analytisk ren Boc-syre ble oppnådd ved kolonnekromatografi og karakterisert: ¹H NMR(DMSO-d₆, 400 MHz) δ 1,30 (s, 9H), 2,34 (s, 3H), 2,86 (dd, 1H), 3,07 (dd, 1H), 4,14 (m, 1H), 6,45 (d, 1H), 6,83 (s, 1H), 7,29 (dd, 1H), 7,33 (d, 2H), 7,61 (dd, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,99 (d, 2H), 8,21 (d, 1H), 12,5-12,8 (br, s., 1H). ¹³C NMR(DMSO-d₆) δ 13,99, 13,89, 22,05, 27,78, 28,08, 28,32, 31,21, 36,22, 54,83, 67,41, 67,73, 78,03, 91,15, 107,69, 124,99, 125,18, 126,59, 128,12, 129,30, 130,23, 132,69, 134,65, 135,08, 140,73, 140,89, 150,41, 155,39, 162,76, 166,17, 168,22, 173,40. Anal. beregnet for C₃₀H₃₀ClF₃N₆O₅: C, 55,69; timer, 4,67; N, 12,99. Funnet: C, 55,65; timer, 4,56; N, 12,74.

Den ovennevnte 2 x løsningen ble fortynnet med EtOH (60 ml, 3 x) og CH₃CN (100 ml, 5 x) ved romtemperatur. TBTU (97 % ren, Fluka, 19,7 g, 61 mmol, 1,2 ekv.) og *N*-metylmorfolin (6,17 ml, 56 mmol, 1,1 ekv.) ble tilsatt til denne løsningen (KF = 0,034 %) under nitrogen. Den resulterende løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 4 timer. HPLC indikerte at Boc-syren kvantitativt ble omdannet til Boc-esteren (S)-etyl 3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)-2-(tert-butoksykarbonylamino)propanoat. Reaksjonsblandingen ble konsentrert til rundt 2 x under redusert trykk (40 °C bade-temperatur, 100 mbar) og fortynnet med EtOAc (100 ml, 5 x) og vann (100 ml, 5 x). Det organiske laget ble vasket med mettet, vandig KHCO₃ (pH ~ 8,5) (2 x 100 ml, 5 x) og saltløsning (50 ml, 2,5 x). Dette røde organiske laget ble deretter behandlet med aktivkarbon (Darco G-60, 8 g, 0,4 x) ved 50 °C i 1,5 timer og filtrert gjennom et 6,35 mm lag av Celpure P65 (USP-NF, Pharmaceutical grade, Sigma), og kaken ble vasket med CH₃CN (100 ml, 5 x). Det resulterende gul-fargede filtratet ble konsentrert til en 2 x løsning. CH₃CN (100 ml, 5 x) ble tilsatt og løsningen konsentrert til en 2 x løsning. CH₃CN-tilsetningskonsentreringssekvensen ble gjentatt for å gi en 2 x CH₃CN-løsning av Boc-esteren som ble anvendt direkte i neste trinn. En analytisk ren Boc-ester ble oppnådd ved kolonnekromatografi og karakterisert: ¹H NMR(DMSO-d₆, 300 MHz) δ 1,11 (t, J=7,06 Hz, 3H), 1,31 (s, 9H), 2,34 (s, 3H), 2,85-3,08 (m, 2H), 4,1-4,2 (m, 1H), 6,45 (d, J=2,29 Hz, 1 H), 6,84 (s, 1H), 7,25-7,41 (m, 3 H), 7,66 (dd, J=8,58, 2,10 Hz, 1H) 7,71 (d, J=2,1Hz, 1H) 7,80 (d, J=8,58 Hz, 1H) 8,0 (d, J=8,39 Hz, 2 H) 8,21 (d, J=2,29 Hz, 1 H). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 13,2, 14,0, 22,1, 24,7, 27,7, 28,0, 28,3, 28,4, 31,2, 33,9, 34,1, 36,2, 36,6, 55,0, 56,3, 60,4, 67,1, 67,4, 67,7, 68,0, 78,2, 78,5, 91,1, 107,7, 122,1, 125,0, 125,2, 126,6, 127,7, 128,1,

129,3, 130,2, 132,7, 134,7, 135,1, 140,4, 140,7, 150,4, 154,2, 155,3, 162,8, 166,1, 168,2, 171,9. Anal. beregnet for $C_{32}H_{34}ClF_3N_6O_5$: C, 56,93; timer, 5,08; N, 12,45. Funnet: C, 57,20; timer, 4,86; N, 12,21.

Den ovennevnte 2 x løsningen ble fortynnet med ytterligere CH_3CN (160 ml, 8 x) ved romtemperatur. Metansulfonsyre (18,4 ml, 255 mmol) ble satt til denne løsningen (KF = 0,005 %) ved romtemperatur og omrørt ved 45 °C i 1 time på hvilket tidspunkt HPLC antydte at de-Boc-reaksjonen var fullstendig. Reaksjonsblandingen ble konsentrert til 2 x, avkjølt til 0-5 °C og fortynnet med iskaldt vann (100 ml, 5 x) og denne vandige løsningen ble vasket med kald isopropylacetat to ganger (IPAc, 100 ml, 5 x og 50 ml, 2,5 x). Det vandige laget ble deretter gjort basisk til pH = 6 med 20 % vandig Na_2CO_3 ved 5 °C under omrøring. IPAc (100 ml, 5 x) satt til denne blandingen og ytterligere basifisering til pH 8,5 ble utført under anvendelse av 20 % vandig Na_2CO_3 ved romtemperatur under god omrøring. Etter splitting av det organiske laget ble det vandige laget ekstrahert med IPAc (50 ml, 2,5 x). De kombinerte uklare organiske lagene ble konsentrert til en 2 x løsning. IPAc (100 ml, 5 x) ble tilsatt og blandingen konsentrert til en 2 x løsning som inneholdt uorganiske salter. Blandingene ble filtrert og faststoffene vasket med IPAc (100 ml, 5 x) og filtratet konsentrert til en 2 x løsning. HPLC-analyse av denne klare IPAc-løsningen viste 20,8 g av tittelforbindelsen (36 mmol, > 99 % ved HPLC, 71 % løsningsutbytte).

Analytisk ren tittelforbindelse ble oppnådd ved kolonnekromatografi og karakterisert: 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 1,15 (t, J=7,07 Hz, 3H), 2,39 (s, 3H), 2,50 (m, 2H), 3,63 (t, J=6,82 Hz, 1H), 4,07 (q, J=7,07, 14,5 Hz, 2H), 6,50 (d, J=2,27 Hz, 2H), 6,87 (s, 1H), 7,33 (m, 3H), 7,65 (dd, J=8,59, 2,27 Hz, 1H), 7,71 (d, J=2,27 Hz, 1H), 7,81 (d, J=8,59 Hz, 1H), 8,01 (d, J=8,08 Hz, 2H), 8,26 (d, J=2,27 Hz, 1H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 13,4, 13,9, 18,5, 21,0, 21,5, 25,4, 55,6, 56,0, 59,9, 66,9, 67,1, 67,4, 67,7, 68,0, 91,1, 107,7, 122,1, 124,9, 125,0, 125,2, 126,5, 127,7, 128,1, 129,4, 130,2, 132,7, 134,6, 135,1, 140,7, 140,9, 150,4, 162,8, 166,2, 168,2, 174,8. Anal. beregnet for $C_{27}H_{26}ClF_3N_6O_3$: C, 56,40; timer, 4,56; N, 14,62. Funnet: C, 56,51; timer, 4,52; N, 14,51.

6.9. Fremstilling av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoathippurat

2 x IPAc-løsningen av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat ble satt til en tynn oppslemming av hippursyre (6,49 g, 36 mol, 1,0 ekv.) i IPAc (208 ml, 10 x)

og EtOH (42 ml, 2 x) ved 60 °C. Den klare, gule løsningen ble deretter avkjølt til 50 °C, ved hvilket tidspunkt såing ble tilsatt og omrørt i 1 time ved den samme temperaturen. Suspensjonen ble så langsomt avkjølt til romtemperatur og omrørt i 14 timer ved romtemperatur. Faststoffene ble filtrert, vasket med iskald IPAc (0-5 °C, 42 ml, 2 x) og tørket under vakuum ved 50 °C over natten for å gi et hvitt faststoff (19,0 g, 69 % utbytte). Sm.p.: 145 °C (DSC-starttemperatur).

6.10. Fremstilling av krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat fri base

Totalt 35,79 g hippuratsalt ble suspendert i 350 ml metyl *tert*-butyleter. pH-verdien for denne omrøringssuspensjonen ble justert til pH 9,6 ved tilsetning av 125 ml 10 % vekt/volum vandig natriumkarbonat. Etter 1,5 timer ble den øvre organiske fasen trukket ut og vasket med 100 ml saltløsning. Konsentrering av det organiske laget ga 28,47 g av en lyseoransje til gul glassaktig olje som krystalliserte ved henstand over helgen. Faststoffene ble brutt opp og triturert med 400 ml heptan ved rundt 45 °C. Etter avkjøling til omgivelsestemperatur ble de suspenderte krystallene isolert ved filtrering, vasket med heptan og tørket under vakuum til rundt 40 °C for å gi 25,49 g av tittelforbindelsen som et krystallinsk, hvitt pulver. Sm.p.: 104 °C (DSC-starttemperatur).

6.11. Fremstillingen av krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoatsuksinat

(S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat (80,2 mg) ble suspendert i 0,2 ml THF. En løsning av ravsyre i THF (16,4 mg i 0,372 ml løsning, 1 ekv.) ble tilsatt til denne løsningen under omrøring med en magnetrører. Heptan (1,8 ml) ble tilsatt dråpevis, og den resulterende suspensjonen ble omrørt i 1,5 timer. Ytterligere heptan (1 ml) ble tilsatt, og suspensjonen ble omrørt ved romtemperatur over natten (19,5 timer). Det hvite faste stoffet ble isolert ved filtersentrifugering (15 000 opm, 5 minutter, 0,22 µm PVDF-membran).

P a t e n t k r a v

1. Krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

2. Forbindelse ifølge krav 1, som er krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat, hvori:

a) forbindelsen har et smeltepunkt på rundt 104 °C;

b) forbindelsen har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster med topper ved én eller flere av rundt 10,7, 12,2, 12,8, 17,7 og/eller 22,0 grader 2θ; eller

c) forbindelsen har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster som hovedsakelig er det samme som det som vist i figur 1.

3. Krystallinsk salt av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat.

4. Det krystallinske saltet ifølge krav 3 som er et hippuratsalt der:

a) det krystallinske saltet har et smeltepunkt på rundt 145 °C;

b) det krystallinske saltet har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster som omfatter topper ved én eller flere av rundt 8,2, 9,5, 12,6, 16,9, 21,8, 22,0, 22,7, 24,3 og/eller 29,1 grader 2θ;

c) det krystallinske saltet har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster som i det vesentlige er det samme som det som er vist i figur 2; eller

d) det krystallinske saltet har et Raman-spektrum som er i det vesentlige det samme som det som er vist i figur 3.

5. Det krystallinske saltet ifølge krav 3, som er et suksinatsalt, der:

a) det krystallinske saltet har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster som omfatter topper ved én eller flere av rundt 7,7, 11,5, 11,7, 15,7, 17,9, 21,1 og/eller 23,2 grader 2θ; eller

b) det krystallinske saltet har et røntgenpulverdiffraksjonsmønster som er i det vesentlige det samme som det som er vist i figur 4.

6. Fremgangsmåte for fremstilling av et krystallinsk salt av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat, som omfatter:

å bringe en løsning omfattende (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat i kontakt med farmasøytisk akseptabel syre under betingelser tilstrekkelig til å gi et salt av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat;

å redusere løseligheten for saltet i løsningen under betingelser tilstrekkelig til å gi et krystallinsk salt av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat; og

å isolere det krystallinske saltet.

7. Fremgangsmåten ifølge krav 6, der:

a) løsningen omfatter isopropylacetat, etylacetat, etanol, isopropanol, metyl-t-butyl-eter eller metylisobutylketon;

b) syren er hippur- eller ravsyre;

c) løseligheten av saltet reduseres ved avkjøling av løsningen;

d) mengden av det løste saltet reduseres ved å øke konsentrasjonen av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat i løsningen;

eller

e) løseligheten av saltet reduseres ved å tilsette et anti-løsningsmiddel til løsningsmiddel.

8. Fremgangsmåte for fremstilling av krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat, som omfatter:

tilsetning av en basisk vandig løsning til en organisk suspensjon for å gi en blanding med organiske og vandige komponenter, der den organiske suspensjonen omfatter et salt av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat og et organisk løsnings-

5

middel;
å isolere den organiske komponenten fra blandingen; og

avkjøling og/eller konsentrering av den organiske komponenten for å gi krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat; og

10

å isolere den krystallinske, frie basen.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, der saltet av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat er et hippuratsalt; og der:

a) det organiske løsningsmidlet er en eter;

15

b) den basiske, vandige løsningen omfatter natriumbikarbonat; eller

c) fremgangsmåten videre omfatter å vaske det krystallinske (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoatet med et organisk løsningsmiddel.

20

10. Farmasøytisk doseringsform omfattende krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat, eller et krystallinsk salt av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat.

25

11. Den farmasøytiske doseringsformen ifølge krav 10, der det krystallinske saltet av (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat er et hippurat- eller suksinatsalt.

30

12. Terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluoretoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav for anvendelse som et medikament.

13. Terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluor-etoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav for anvendelse som et medikament for behandling, forebygging eller håndtering av karsinoid syndrom.

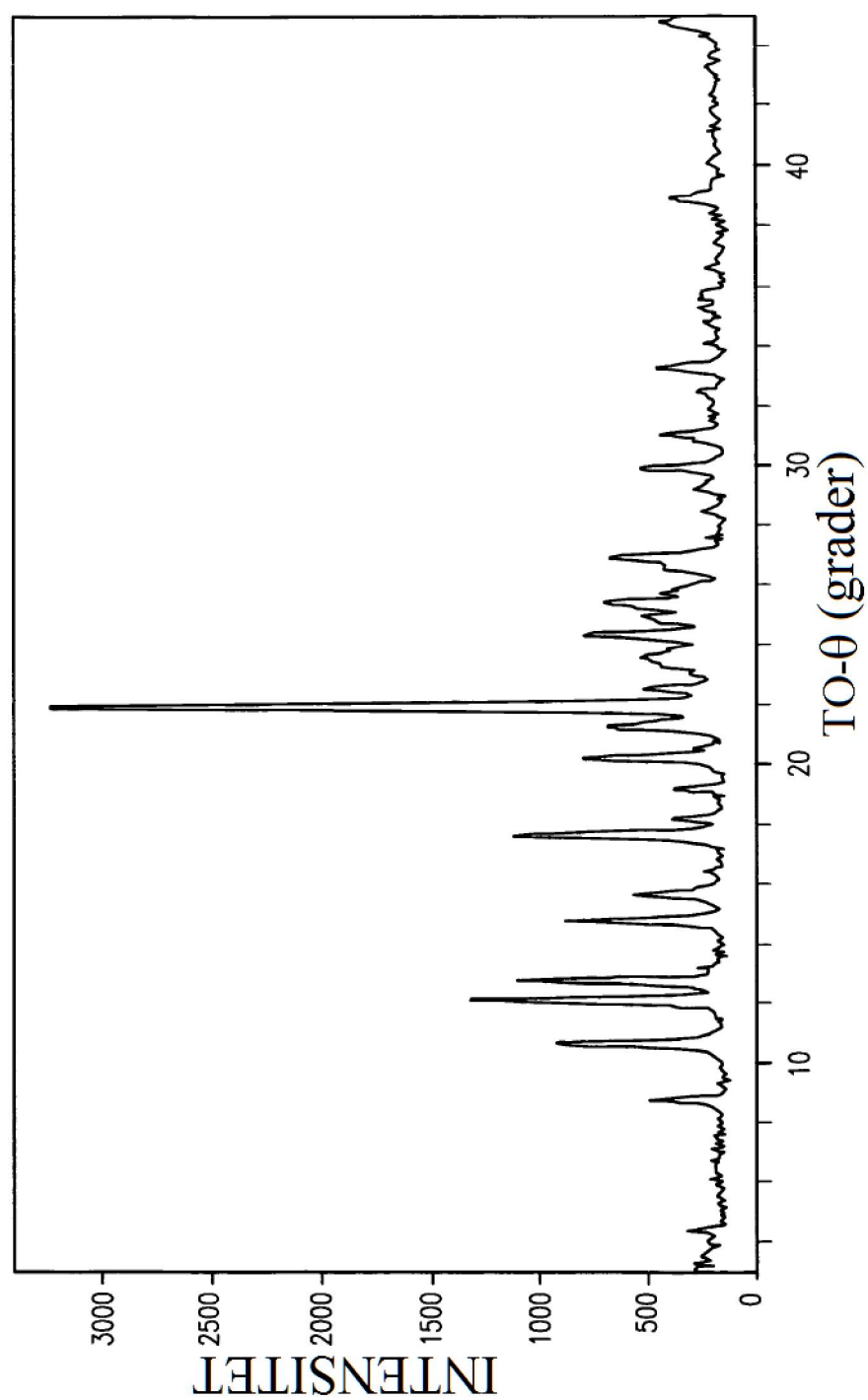
5

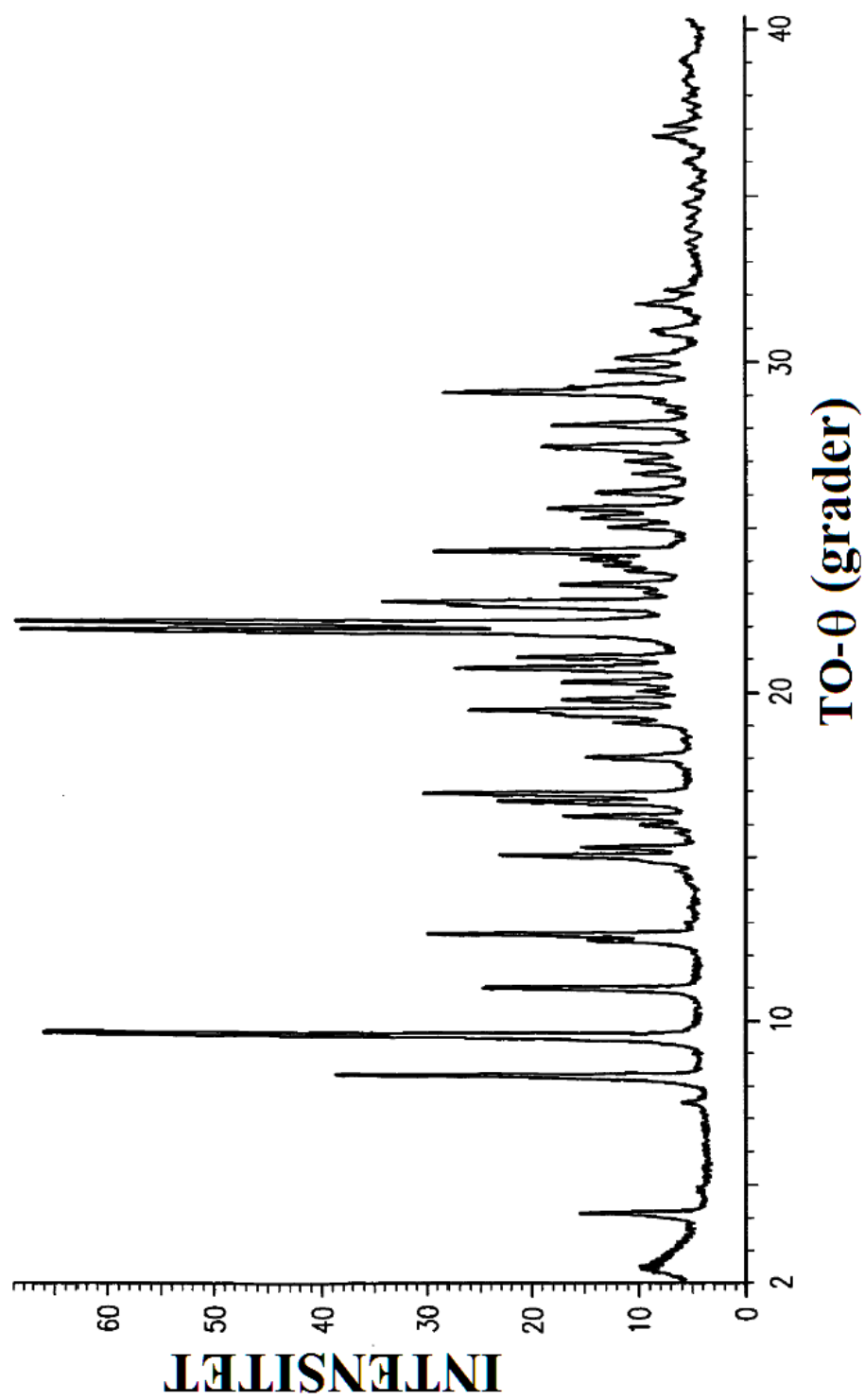
14. Terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluor-etoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav for anvendelse som et medikament for behandling, forhindring eller håndtering av en gastrointestinal sykdom eller lidelse.

10

15. Terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av krystallinsk (S)-etyl 2-amino-3-(4-(2-amino-6-((R)-1-(4-klor-2-(3-metyl-1H-pyrazol-1-yl)fenyl)-2,2,2-trifluor-etoksy)pyrimidin-4-yl)fenyl)propanoat eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav for anvendelse som et medikament for behandling, forebygging eller håndtering av irritabelt tarmsyndrom.

15

*FIG. 1*

*FIG. 2*

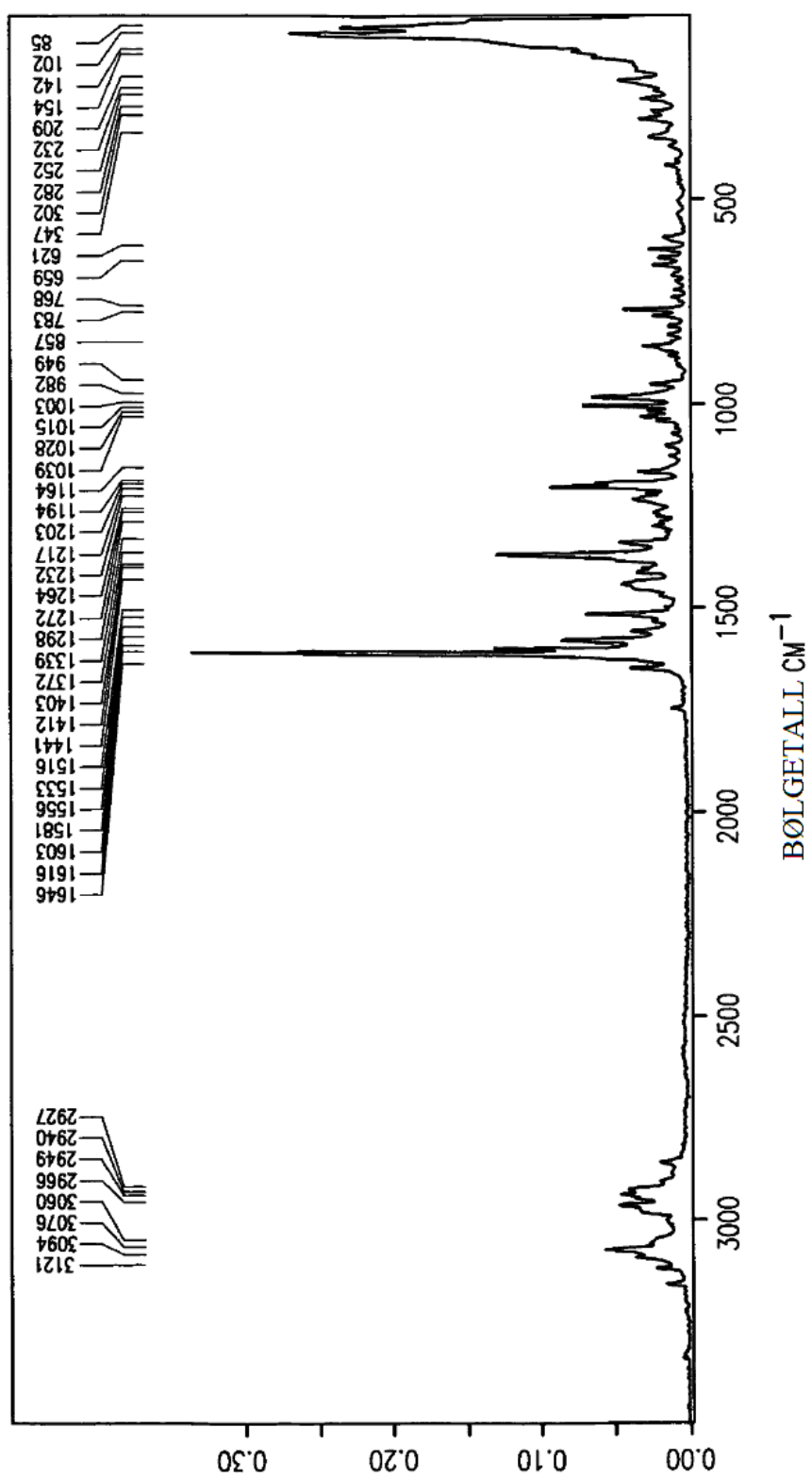
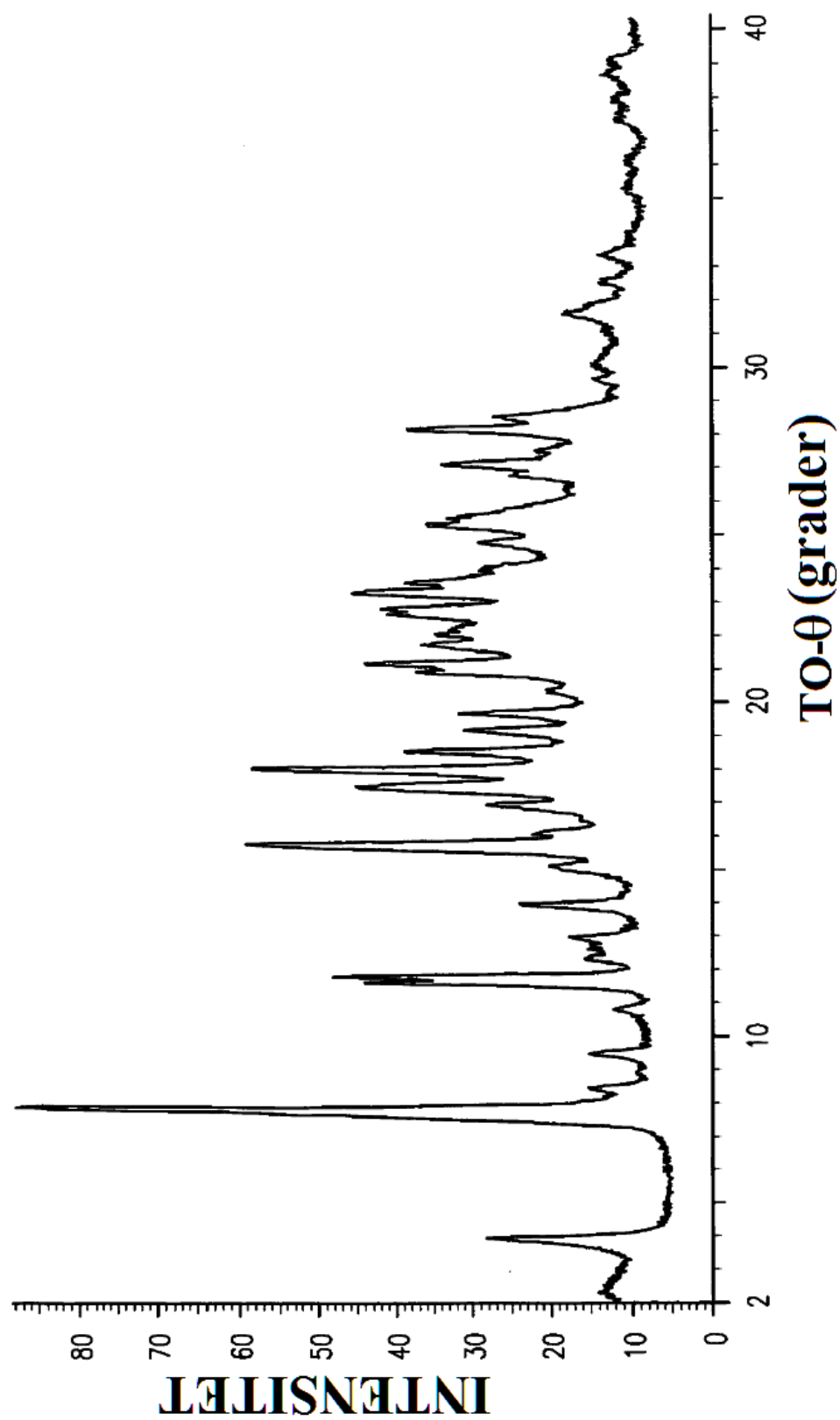


FIG. 3

*FIG. 4*