(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 963462 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 963462

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07D495/04
C07D243:00
C07D333:00
C07D498/04
C07D267:00
C07D333:00
C07D513/04
C07D281:00
C07D333:00
A61K 31/55

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.01.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **04.09.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **04.09.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **30.01.1995 PCT/US1995/001275**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

07.03.1994 US 207330 12.12.1994 US 351611

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**Warner-Lambert Company,** Delaware, 201 Tabor Road, Morris Plains, NJ 07950, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Boschelli, Diane Harris,** Plymouth, MI 48170, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •**Connor, David Thomas,** Ann Arbor, MI 48105, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •**Kramer, James Bernard,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 •**Unangst, Paul Charles,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Bentsotiofeeni-, bentsofuraani- ja indolitiatsepinonit, -oksatsepinoni t ja -diatsepinonit soluadheesion estäjinä ja HIV:n estäjinä

Bensotiofen-, bensofuran- och indoltiazepinoner, -oxazepinoner och -di azepinoner som hämmare av celladhesion och hämmare av HIV

2,3-dihydro-[1]bentsotieno-1,4-tiatsepin-, -oksatsepin- ja diatsepin-5-onijohdannaiset soluadheesion estäjinä ja HIV:n estäjinä

Keksinnön tausta

Keksintö koskee uusia 2,3-dihydro-[1]bentsotieno-1,4-tiatsepin-, -oksatsepin- ja -diatsepin-5-onijohdannaisia ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja, joita käytetään estämään leukosyyttien adheesio endoteelisoluihin. Leukosyyttien adheesio verisuonten endoteeliin on olennainen osa tulehduksen patogeneesiä. Tarttumisprosessi edeltää leukosyyttien endoteelin läpi tapahtuvaa siirtymistä ympäröivään kudokseen ja seurauksena olevaa kudosvauriota. Yhdisteiden, jotka voivat estää tämän alussa tapahtuvan adheesiovuorovaikutuksen, odotetaan olevan tehokkaita hoidettaessa tulehdussairauksia, kuten nivelreumaa, nivelrikkoa, astmaa ja psoriasista. Muita hoidonaiheita olisivat, näihin kuitenkaan rajoittumatta, mm. ARDS (adult respiratory distress syndrome), reperfuusiovaurio, iskemia, haavainen paksusuolentulehdus, suonitulehdukset, valtimonkovetustauti, tulehduksellinen suolisairaus ja kasvainetäispesäkkeet.

Adheesioreseptorit ryhmitellään kolmeen pääryhmään: selektiinit, suuri immunoglobuliiniryhmä ja integriinit (*Nature*, **346**:426 (1990)). Kaikkien kolmen luokan jäsenet osallistuvat leukosyyttiadheesion välitykseen tulehduksen aikana (katso tämän alan katsauksia varten julkaisuja *Thrombosis and Hemostasis*, **65**(3):223 (1991), *Clinical and Experimental Allergy*, **20**:619 (1990), *Transplantation*, **48**:727 (1989), *Biochemical Pharm.*, **40**(8):1683 (1990)). Endoteelin leukosyytiadheesiomolekyyli-1 (ELAM-1 tai E-selektiini) kuuluu glykoproteiinien selektiiniryhmään, joka edistää solu-solu-adheesiota. E-selektiinin kuvataan ekspressoituvan maksimaalisesti endoteelisolujen pinnalla 4 tuntia endoteelisolujen sytokiineillä, kuten inter-

leukiini-1:llä (IL-1) tai tuumorinekroositekijä-α:lla (TNF-α) tai muilla tulehduksen välittäjillä, kuten lipopolysakkaridilla (LPS), stimuloinnin jälkeen (*Pro. Nat. Acad. Sci.*, **84**:9238 (1987).

Solujenvälinen adheesiomolekyyli-1 (ICAM-1) kuuluu suureen immunoglobuliiniryhmään. Se on myös siten säädetty, että maksimaalinen ekspressio tapahtuu 12 - 24 tuntia stimuloinnin jälkeen. On osoitettu, että 4 tuntia endoteelisolujen tulehduksenvälittäjällä stimuloinnin jälkeen solupinnalla on sekä E-selektiiniä että ICAM-1:tä (*J. Clin. Invest.*, **82**:1746 (1988) ja **J. Immun.**, **137**:1893 (1986), *Blood*, **78**:2721 (1991)).

Esillä olevan keksinnön mukaisten 2,3-dihydro-[1]bentsotieno-1,4-tiatsepin-, -oksatsepin- ja diatsepin-5-onijohdannaisten on osoitettu estävän *in vitro* -määrityksessä neutrofiilien adheesiota ihmisen napalaskimon endoteelisoluihin (HUVECS), joita stimuloitiin TNFα:lla.

Esillä olevan keksinnön mukaisia uusia tiatsepinoneja, oksatsepinoneja ja diatsepinoneja voidaan käyttää ihmisen immuunikatoviruksella (HIV) infektoituneiden ihmisten hoitamiseksi infektoiduissa ihmisissä latenttina olevan HIV:n aktivaation estämällä.

Ihmisen immuunikatoviruksen (HIV) patogeneesi on monimutkainen, eikä sitä vielä täysin ymmärretä. Viruksen elinkierto on teoreettisesti jaettu afferentti- ja efferenttikomponentteihin. Viruksen sitoutuminen, fuusioituminen, käänteistranskriptio ja lopuksi integroituminen ovat niiden tapahtumien joukossa, jotka käsittävät elinkierron afferenttikomponentin. Juuri HIV:n elinkierron afferenttikomponentti on vastuussa yksilössä tapahtuvasta HIV:n primaarisesta infektiosta, jota yleensä seuraa viremioiden purkaus kliinisten oireiden kanssa tai ilman.

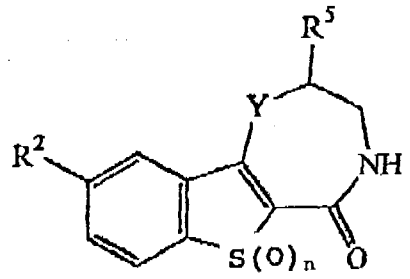
On kehitetty useita terapeuttisia strategioita, ja niitä on kohdistettu afferenttitapahtumien aikana tapahtuvaan interventioon. Katso esimerkiksi julkaisua Mitsuya, H., Broder, S., "Inhibition of the In Vitro Infectivity and Cytopathic Effect on Human T-lymphotropic Virus Type I-II/lymphadenopathy Virus-associated Virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-Dideoxynucleosides," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **83**:1911-1915 (1986).

Samalla kun afferenttikomponentin eri vaiheet tarjoavat mahdollisuuden tehokkaaseen terapeuttiseen interventioon, on tullut ilmeisemmäksi, että interventio pelkästään näissä kohdissa ei riitä. HIV:llä infektoitumisen jälkeen ja sairauden edettyä afferenttivaiheiden läpi yksilö kokee pitkäaikaisen kliinisen latenssijakson, joka voi kestää useita vuosia, ja yksilön terveys pysyy hyvänä. Tässä vaiheessa ääreisverisoluissa saavutetaan alhaiset/puuttuvat viremia- ja virusreplikaatiotasot. Myöhemmässä vaiheessa sairaus etenee kuitenkin lopulta hengenvaaralliseen immuunikatoon (AIDS), johon ei ole olemassa parannuskeinoa. Näillä myöhemmillä tapahtumilla tarkoitetaan HIV-infektion efferenssivaiheiden kliinisiä oireita.

HIV:n elinkierron efferenttikomponentti sisältää ne tapahtumat, jotka ovat välttämättömiä HIV-proviruksen menestyksekkääseen transkriptioon, translaatioon, kokoonpanoon ja virionien tuottamiseen. HIV-infektoitujen solujen oireettomasta, HIV:tä ekspressoimattomasta vaiheesta oireelliseen, HIV:tä ekspressoivaan vaiheeseen etenemiselle välttämättömien tapahtumien alkamista kutsutaan aktivaatioksi. Efferenttikomponenttia ja aktivaation soluperustaa ei nykyisin ymmärretä täysin. Siitä huolimatta, mikäli uusia terapeuttisia aineita ja strategioita kehitetään ja toteutetaan kliinisesti oireettoman faasin aikana AIDSin etenemisen estämiseksi, voidaan antaa jonkin verran toivoa arviolta miljoonalle infektoidulle, mutta kliinisesti latentille yksilölle.

Keksinnön yhteenveto

Niinpä esillä oleva keksintö koskee kaavan I mukaista yhdistettä:



I

tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävää happoadditiosuolaa, jossa kaavassa
R_2 on vety tai alempialkoksi;
R_5 on vety tai alempialkyyli;
Y on O, $S(O)_n$ tai NH; ja
n on kokonaisluku 0, 1 tai 2.

Esillä olevaan keksintöön luetaan mukaan farmaseuttiset koostumukset, jotka sisältävät terapeuttisesti tehokkaan määrän edellä olevan kaavan I mukaista yhdistettä yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan kanssa.

Menetelmässä sairauksien hoitamiseksi estämällä leukosyyttien adheesio endoteelisoluihin sitä tarvitsevalle isännälle annetaan farmaseuttista koostumusta, joka sisältää edellä olevaa kaavan I mukaista yhdistettä yksikköannosmuodossa.

Menetelmässä ihmisen tulehdussairauden hoitamiseksi annetaan tulehdusta estävä määrä kaavan I mukaista yhdistettä.

Menetelmässä HIV:llä infektoituneen isännän hoitamiseksi mainitulle isännälle annetaan farmaseuttista koostumusta, joka sisältää edellä olevan kaavan I mukaista yhdistettä yksikköannosmuodossa.

Yksityiskohtainen kuvaus

Esillä olevan keksinnön kaavan I mukaisten yhdisteiden määrittelyssä käytetyt käsitteet ovat seuraavat:

Alempi alkyyli ja alempi alkoksi tarkoittavat suoraketjuista tai haarautunutta alkyyli- tai alkoksiryhmää, jossa on 1 - 4 hiiliatomia, ja mukaan luetaan esimerkiksi metyyli, etyyli, propyyli, i-propyyli tai toisin sanoen (metyyli)etyyli ja t-butyyli tai toisin sanoen 1,1-(dimetyyli)etyyli, ja vastaavasti esimerkiksi metoksi, etoksi, i-propoksi tai toisin sanoen 1-(metyyli)etoksi tms.

Halogeeneihin luetaan mukaan fluori, kloori, bromi ja jodi.

Kaavan I mukaiset yhdisteet voivat edelleen muodostaa farmaseuttisesti hyväksyttäviä happoadditiosuoloja. Kaikki nämä muodot kuuluvat keksinnön suojapiiriin.

Kaavan I mukaisten yhdisteiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä happoadditiosuoloja ovat mm. suolat, jotka on johdettu epäorgaanisista hapoista, kuten kloorivety-, typpi-, fosfori-, rikki-, bromivety-, jodivety-, fluorivetyhaposta, fosforihapokkeesta ja vastaavista, samoin kuin suolat, jotka on johdettu myrkyttömistä orgaanisista hapoista, kuten alifaattisista mono- ja dikarboksyylihapoista, fenyylisubstituoiduista alkaanihapoista, hydroksialkaanihapoista, alkaanidihapoista, aromaattisista hapoista, alifaattisista ja aromaattisista sulfonihapoista ja vastaavista. Täten sellaisia suoloja ovat mm. sulfaatti, pyrosulfaatti, bisulfaatti, sulfiitti, bisulfiitti, nitraatti, fosfaatti, monovetyfosfaatti, divetyfosfaatti, metafosfaatti, pyrofosfaatti, kloridi, bromidi, jodidi, asetaatti, trifluoriasetaatti, propionaatti, kaprylaatti, isobutyraatti, oksalaatti, malonaatti, sukkinaatti, suberaatti, sebasaatti, fumaraatti, maleaatti, mandelaatti,

bentsoaatti, klooribentsoaatti, metyylibentsoaatti, dinitrobentsoaatti, ftalaatti, bentseenisulfonaatti, tolueenisulfonaatti, fenyyliasetaatti, sitraatti, laktaatti, maleaatti, tartraatti, metaanisulfonaatti ja vastaavat. Huomioon otetaan myös aminohappojen suolat, kuten arginaatti ja vastaavat, ja glukonaatti, galakturonaatti, N-metyyliglutamiini (katso esimerkiksi julkaisua Berge S.M. *et al.*, "Pharmaceutical Salts" *Journal of Pharmaceutical Science*, **66**:1-19 (1977)).

Mainittujen emäksisten yhdisteiden happoadditiosuolat valmistetaan saattamalla vapaa emäsmuoto kontaktiin riittävän määrän haluttua happoa kanssa suolan tuottamiseksi tavanomaisella tavalla. Vapaa emäsmuoto voidaan regeneroida saattamalla suolamuoto kontaktiin emäksen kanssa ja eristämällä vapaa emäs tavanomaisella tavalla. Vapaat emäsmuodot eroavat vastaavista suolamuodoistaan jonkin verran tiettyjen fysikaalisten ominaisuuksien, kuten polaarisiin liuottimiin liukoisuuden suhteen, mutta muuten suolat ja niiden vastaavat vapaat emäkset ovat esillä olevan keksinnön tarkoituksiin samanarvoisia.

Määrätyt esillä olevan keksinnön mukaiset yhdisteet voivat esiintyä solvatoimattomissa muodoissa samoin kuin solvatoiduissa muodoissa, mukaan lukien hydratoiduissa muodoissa. Yleensä solvatoidut muodot, mukaan lukien hydratoidut muodot, ovat samanarvoisia solvatoimattomien muotojen kanssa, ja ne on tarkoitettu keksinnön suojapiiriin kuuluviksi.

Erityisen arvokkaita keksinnön mukaisia yhdisteistä ovat: 2,3-dihydro-9-metoksi-[1]bentsotieno[2,3-f]-1,4-tiatsepin-5(4H)-oni, 2,3-dihydro-[1]bentsotieno[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5(4H)-oni, 2,3-dihydro-9-metoksi-[1]bentsotieno[2,3-f]-1,4-tiatsepin-5(4H)-oni-1-oksidi, 3,4-dihydro-9-metoksi-6-metyyli-2H-1,4-oksatsepino[6,7-b]-indol-5(6H)-oni, 2,3-dihydro-1H-bentsotieno-[3,2-e]-1,4-

diatsepin-5-oni, 2,3-dihydro-9-metoksi-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-oni, 2,3-dihydro-9-metoksi-6-oksidi-1H-bentsotieno-[2,3-f]oksatsepin-5-oni, 2,3-dihydro-9-metoksi-2-metyyli-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-oni, 2,3-dihydro-7,8,9,10-tetrakloori-1H-bentsotieno[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-oni, 3,4-dihydro-8-nitro-6-tert-butyyli-2H-1,4-oksatsepino[6,7-b]indol-5(6H)-oni, 3,4-dihydro-9-isopropoksi-6-fenoksimetyyli-2H-1,4-oksatsepino[6,7-b]indol-5(6H)-onihydrokloridi, 3,4-dihydro-8,10-dibromi-6-(3-klooribentsyyli-2H-1,4-oksatsepino[6,7-b]indol-5(6H)-oni, 2,3-dihydro-8-kloori-1H-bentsofurano[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-onimetaanisulfonaatti, 2,3-dihydro-1,2,3-trimetyyli-1H-bentsofurano[3,2-e]-1,4-diatsepin-5-oni ja 2,3-dihydro-3-heksyyli-1H-bentsofurano[2,3-f]-1,4-tiatsepin-5-oni.

Sen määrittämisessä, milloin soluadheesion estäjää tai HIV-aktivaation estäjää määrätään hoidoksi, on tietysti otettava huomioon mm. kulloinkin kyseessä oleva tila ja sen vakavuus, samoin kuin hoidettavan kohteen ikä, sukupuoli, paino ja vastaavat seikat, ja hoitava lääkäri osaa määrittää nämä.

Lääketieteelliseen käyttöön kaavan I mukaisen yhdisteen tai sen farmakologisesti hyväksyttävän happoadditiosuolan terapeuttiseen vaikutukseen vaadittava määrä vaihtelee tietysti sekä tietyn yhdisteen, antotavan, hoidettavan nisäkkään ja kulloinkin kyseessä olevan sairauden mukaan. Menetelmässä tulehdussairaudesta, kuten niveltulehduksesta tai turvotuksesta, kärsivien ihmisten hoitamiseksi hoitoa tarvitsevalle kohteelle annetaan tulehduksenvastaisesti tehokas määrä. Kaavan I mukaisen yhdisteen tai sen farmakologisesti hyväksyttävän happoadditiosuolan sopiva määrä nisäkkäälle, joka kärsii, tai joka todennäköisesti kärsii jostakin tässä edellä kuvatusta tilasta, on 0,1 µg - 500 mg yhdistettä/kg kehonpainoa. Systeemisen annon tapauksessa annos voi olla alueella 0,5 - 500 mg

yhdistettä/kg kehonpainoa, edullisimman annostelun ollessa 0,5 - 50 mg/kg nisäkkään kehonpainoa annettuna 2 - 3 kertaa päivässä. Paikallisen annon tapauksessa, esimerkiksi iholle tai silmään, sopiva annos voi olla alueella 0,1 ng - 100 µg yhdistettä/kg, tyypillisesti noin 0,1 µg/kg.

Niveltulehduksen tai tulehduksen yleensä hoitoon tai ehkäisemiseen, mistä hyvänsä syystä, tapahtuvan oraalisen annostelun tapauksessa, kaavan I mukaisen yhdisteen tai sen fysiologisesti hyväksyttävän happoadditiosuolan sopiva annos voi olla edellisessä kappaleessa määritelty, mutta on edullisimmin 1 - 10 mg yhdistettä/kg, edullisimman annostelun ollessa 1 - 5 mg/kg nisäkkään kehonpainoa, esimerkiksi 1 - 2 mg/kg.

Ymmärretään, että tavalliset taidot omaava lääkäri tai eläinlääkäri osaa helposti määrittää ja määrätä yhdisteen tehokkaan määrän, joka estää tai pysäyttää hoidonaiheena olevan tilan etenemisen. Näin edeten lääkäri tai eläinlääkäri voisi käyttää ensin suhteellisen pieniä annoksia, lisäten sen jälkeen annosta, kunnes saadaan maksimaalinen vaste.

Vaikka on mahdollista antaa aktiivista ainesosaa yksin, on edullista, että se on farmaseuttisena formulaationa, joka sisältää kaavan I mukaista yhdistettä tai sen farmakologisesti hyväksyttävää happoadditiosuolaa ja sitä varten tarkoitettua farmakologisesti hyväksyttävää kantajaa. Sellaiset formulaatiot muodostavat edelleen keksinnön erään ominaispiirteen.

Esillä olevan keksinnön mukaiset sekä eläin- että ihmislääketieteelliseen käyttöön tarkoitetut formulaatiot sisältävät aktiivista ainesosaa sitä varten tarkoitetun farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan ja mahdollisesti jonkin muun terapeuttisen ainesosan (muita terapeuttisia

ainesosia). Kantajan (kantajien) on oltava "hyväksyttävä" siinä mielessä, että se on yhteensopiva formulaatioiden muiden ainesosien kanssa eikä ole sen vastaanottajalle haitallinen.

Formulaatioita ovat mm. sellaiset, jotka soveltuvat oraaliseen, pulmonaariseen, silmään, rektaaliseen, parenteraaliseen (mukaan lukien ihonalaiseen, lihaksensisäiseen ja laskimonsisäiseen), nivelensisäiseen, paikalliseen, nasaaliseen tai poskeen antamiseen. Tekniikan alalla tunnettujen pitkävaikutteisten formulaatioiden ymmärretään olevan sellaisia formulaatioita.

Formulaatiot voivat olla käyttökelpoisessa yksikköannosmuodossa, ja ne voidaan valmistaa millä hyvänsä farmasian alalla hyvin tunnetulla menetelmällä. Kaikki menetelmät voivat sisältää vaiheen, jossa aktiivinen ainesosa saatetaan yhteen kantajan kanssa, joka muodostaa yhden tai useamman apuainesosan. Yleensä formulaatiot valmistetaan saattamalla aktiivinen ainesosa tasaisesti kiinteään kosketukseen nestemäisen kantajan tai hienojakoisen kiinteän kantajan kanssa ja muotoilemalla tuote sitten, mikäli se on tarpeellista, halutuksi formulaatioksi.

Esillä olevan keksinnön mukaiset oraaliseen antoon sopivat formulaatiot voivat olla erillisten yksiköiden, kuten kapselien (capsules), kapselien (cachets), tablettien tai pastillien muodossa, jotka kukin sisältävät ennaltamäärätyn määrän aktiivista ainesosaa; jauheen tai rakeiden muodossa; vesipohjaisessa nesteessä tai vedettömässä nesteessä olevan liuoksen tai suspension muodossa; tai öljyvedessä-emulsion tai vesi-öljyssä-emulsion muodossa. Aktiivinen ainesosa voi myös olla boluksen, sokeritahnan tai tahnan muodossa.

Esillä olevan keksinnön mukaisten yhdisteiden tehokkuus eri standarditestimenettelytavoissa osoittaa niiden ole-

van käyttökelpoisia leukosyyttien verisuonten endoteeliin tarttumisen estäjinä ja täten tulehdustyyppisten sairauksien tai tilojen hoidossa. Seuraavassa kuvataan kukin menettelytapa ja esimerkinomaisia testituloksia.

Solujenvälinen adheesiomolekyyli-1/HUVEC-ekspressiomäärityksen (ICAM-1) ja E-selektiini/HUVEC-ekspressiomäärityksen (ESEL) työohje

Soluviljelmä

T-25-kudosviljelypulloissa olevia ihmisen napanuoran endoteelisoluja (HUVEC-soluja) (ostettu yhtiöstä Clonetics), kasvatettiin saapumisen jälkeen 1 - 3 päivän ajan 37 °C:ssa ja 5 % hiilidioksidissa. Sitten HUVEC-solut jaettiin huuhtomalla T-25:ttä 5 - 10 s ajan 10 ml:lla liuosta, jossa oli 0,025 % trypsiiniä/0,01 % EDTA:ta, ja huuhteluliuos kaadettiin pois. Lisättiin vielä 10 ml trypsiini/EDTA-liuosta, ja soluja sekoitettiin 2 - 4 min ajan naputellen pullon sivua kynän pyyhekumilla. Sitten pullon sisältö kaadettiin 50 ml:iseen sentrifugiputkeen, joka sisälsi 40 ml väliainetta. Väliaine oli endoteeliperusväliainetta, joka ostettiin yhtiöstä Clonetics ja joka sisälsi hydrokortisonia (2 mg/l), epidermin kasvutekijää (0,05 µg/l), naudanaivouutetta (12 mg/l) ja lämmössä inaktivoitua naudan sikiöseerumia (6%) yhtiöstä Hyclone. Soluja sentrifugoitiin 10 - 15 min ajan 15 °C:ssa, supernatantti valutettiin pois ja solut suspendoitiin tuoreeseen väliaineeseen. Solut pestiin toisen kerran identtisellä tavalla, ja siirrostettiin sitten 96-kaivoisille kudosviljelylevyille.

Sytokiinistimulaatio

5 päivän sisällä solujen täydellisen yksikerroskasvun saavuttamisesta soluja stimuloitiin tuumorinekroositekijä-α:lla (TNFα:lla) (Genzyme) lopullisen väliainekonsent-

raation 140 U/ml saavuttamiseksi, ja niiden annettiin inkuboitua 37 °C:ssa 4 tunnin ajan. 4 tunnin inkuboinnin jälkeen väliaine poistettiin, ja sitä säilytettiin kemokiinituotannon analyysiä varten. Solut pestiin kolmesti kalsiumittomalla ja magnesiumittomalla fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella. Sitten monoviljelmät kiinnitettiin lisäämällä kaivoihin 15 minuutiksi 10 %:sta puskuroitua formaliinia. Kiinnityksen jälkeen solut pestiin kolmesti Dulbeccon modifioidulla Eagle-väliaineella (Gibco), joka sisälsi 2 % naudanseerumialbumiinia (DMEM/2 % BSA), ja pantiin jääkaappiin yön yli.

ELISA-määritys

Kuhunkin kaivoon lisättiin 0,5 µg/ml monoklonaalista hiiri-anti-humaani-ICAM-1:tä (R & D Systems, luettelo-nro BBA-4) tai monoklonaalista hiiri-anti-humaani-E-selektiiniä (R & D, luettelo-nro BBA-2) liuotettuna DMEM/2 % BSA:han, ja niiden annettiin inkuboitua 37 °C:ssa 2 tunnin ajan. Sitten HUVEC-monoviljelmät pestiin neljästi DMEM/2 % BSA:lla. Lisättiin peroksidaasikonjugoitua lammas-anti-hiiri-IgG:tä (Cappel) (laimennos 1:3 000), ja niiden annettiin inkuboitua 1 tunnin ajan 37 °C:ssa. Sitten solut pestiin neljästi DMEM:llä. Kiinnitettyihin soluihin lisättiin värireagenssia (Biorad), ja niitä inkuboitiin 15 min ajan huoneenlämpötilassa. Reaktio pysäytettiin 2 % oksaalihappoliuoksella, ja absorbanssi luettiin aallonpituudella 414 nm titertek-levylukijalla.

Yhdisteen testaus

Yhdisteet liuotettiin DMSO:hon 30 mmol konsentraationa, ja ne laimennettiin väliaineella lopullisten testauskonsentraatioiden saavuttamiseksi. HUVEC-soluihin lisättiin väliaineeseen liuotettua yhdistettä 30 min ennen TNFα-altistusta. Stimuloimattomien HUVEC-solujen absorbanssi vähennettiin TNFα:lla stimuloitujen solujen absorbans-

siarvoista ennen esto-%:n määrittämistä. Esto-% määritettiin vertaamalla kantajalla käsiteltyjen solujen absorbanssia lääkkeellä käsiteltyjen solujen absorbanssiin. IC_{50}-arvot määritettiin lineaarista regressioanalyysiä käyttämällä.

Menetelmä ihmisen neutrofiilin TNF-α:lla stimuloituihin ihmisen napanuoralaskimon endoteelisoluihin (ECA) tarttumisen eston määrittämiseksi

Soluviljelmä

Toisen sukupolven HUVEC-soluja (Clonetics Corporation, San Diego, Kalifornia, CC-2617) siirrostettiin Corning-yhtiön (lasitehdas Corning, Corning, New York) 96-kuoppaisiin soluviljelylevyihin noin 5 x 10^3 solua/kuoppa, ja niitä kasvatettiin täydelliseen yhteenkasvuun asti täydennetyllä endoteeliperusväliaineella (EBM, MCDB-131, Clonetics, 10 ng/ml EGF, 1 µg/ml hydrokortisonia, 0,4 % naudanaivouutetta, 5 % naudan sikiöseerumia). Päivää ennen määrityksen suoritusta, tyypillisesti 3 päivää siirrostuksen jälkeen, viljelmiin lisättiin taas 0,2 ml/kuoppa täydennettyä EBM:ää (S-EBM).

Testiyhdisteiden valmistaminen

Testiyhdisteet valmistettiin 10 ml:isiksi kantaliuoksiksi, joiden konsentraatio oli 1,0 mM. Yhdisteet liuotettiin aluksi 0,1 ml:aan DMSO:ta, minkä jälkeen lisättiin 9,9 ml S-EBM:ää. Sitten lääkevalmisteet laimennettiin yhdessä vaiheessa konsentraatioon 66,6 µM. Liuotukset ja laimennukset suoritettiin polystyreeniastioissa.

HUVEC-solujen stimulointi

S-EBM:ään valmistettiin 400 U/ml rekombinanttia humaanituumorinekroositekijä-α:aa (TNF, Genzyme, Boston, Mas-

sachusetts, koodi TNF-H). Kanta-TNF:ää valmistettiin 20 000 U/ml Delbeccon fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS, Gibco, Grand Island, New York) plus 0,1 %:iin BSA:-ta, ja sitä varastoitiin -70 °C:ssa. HUVEC-solut pestiin kerran 0,2 ml:lla lämmintä täydentämätöntä EBM:ää, ja niitä stimuloitiin sitten 4 tunnin ajan 37 °C:ssa 200 U/ml:lla TNF:ää, kun läsnä oli 33,3 µM testiyhdistettä. Tämä suoritettiin lisäämällä 0,1 ml 400 U/ml TNF:ää ja 0,1 ml 66,6 µM testiyhdistettä. Nämä lisäykset suoritettiin hitaasti, jottei olisi rikottu HUVEC-yksisolukerrosta. Kutakin yhdistettä testattiin 6 kuopassa. Kullakin levyllä ajettiin myös stimuloimattomat (kantajakontrolli) ja TNF-stimuloidut testiyhdisteettömät käsittelyt.

Neutrofiilien leimaus

Tuntia ennen neutrofiilien lisäämistä HUVEC-soluihin neutrofiilejä (5 x 10^6/ml) leimattiin 30 min ajan 37 °C:ssa 5 µM kalseiini-AM:llä (Molecular Probes, Eugene, Oregon) Hanksin tasapainotetussa suolaliuoksessa plus 0,45 % BSA:ssa. Kalseiinin kantaliuos valmistettiin 5 mM:ksi vedettömässä DMSO:ssa, ja sitä säilytettiin kuivattuna -20 °C:ssa. Inkuboinnin päätyttyä solut pestiin kahdesti kylmällä HBSS:llä ja suspendoitiin uudelleen lopulliseen konsentraatioon 1 x 10^6 solua/ml täydennetyssä EBM:ssä.

Neutrofiilien lisääminen HUVEC-soluihin

4-tuntisen stimuloinnin päätyttyä ja välittömästi ennen neutrofiilien lisäämistä HUVEC-yksisolukerrokseen levyt pestiin 0,2 ml:lla lämmintä täydentämätöntä EBM:ää TNF:n ja lääkkeen poistamiseksi. Kuhunkin käsitellyistä kaivoista lisättiin hitaasti neutrofiilejä (1 x 10^5 solua), ja niitä inkuboitiin 30 min ajan 37 °C:ssa. Inkuboinnin lopussa levyt pestiin kahdesti 0,2 ml:lla lämmintä täy-

dentämätöntä EBM:ää, minkä jälkeen lisättiin vielä 0,1 ml levyn tutkimista varten.

Suhteellisen fluoresenssin määritys

Suhteellinen fluoresenssi määritettiin käyttämällä Millipore Cytofluor 300 -järjestelmää (viritys = 480, emissio = 530, herkkyys = 4).

Laskelmat

Määritystä pidettiin pätevänä, mikäli HUVEC-solujen TNF-stimulointi sai aikaan neutrofiilitarttumisen 300 %:sen lisäyksen stimuloimattomiin HUVEC-soluihin verrattuna. Tulokset ilmaistiin TNF-stimuloidun tarttumisenesto-%:en keskiarvoina.

$$\text{Esto-\%} = 100 - \left[\frac{\text{stimuloitu tarttuminen (lääke)} - \text{stimuloimaton tarttuminen}}{\text{stimuloitu tarttuminen (kontrolli)} - \text{stimuloimaton tarttuminen}} \right]$$

Jotkin näistä yhdisteistä testattiin konsentraatioina 33,3 μM, 10,0 μM, 3,3 μM ja 1,0 μM IC_{50}-arvojen määrittämiseksi. IC_{50}-arvojen määritykseen käytettiin estoarvojen keskiarvojen lineaarista regressioanalyysiä.

Taulukossa I esitetään määrätyillä keksinnön mukaisilla yhdisteillä saadut tulokset.

Keksinnön mukaisten yhdisteiden, erityisesti kaavan III mukaisten, on havaittu estävän latenttina infektoiduissa ihmisissä olevan ihmisen immuunikatoviruksen (HIV) aktivaation, ja ne ovat sen vuoksi käyttökelpoisia AIDSin hoidossa.

Yritykset kliinisesti oireettoman ajanjakson virologisen ja soluperustan ymmärtämiseksi paljastavat, että HIV esiintyy piilevänä tai ekspressoitumattomana proviruksena kroonisesti infektoitujen solujen varastopopulaatiossa. Eräs erityinen HIV-tyyppi, HIV-1, on ollut kohteena lukuisissa eri tutkimusprojekteissa, jotka ovat osoittaneet, että virus esiintyy piilevänä tai ekspressoitumattomana proviruksena kroonisesti infektoituneiden T-imusolujen varastopopulaatiossa. Ekspressoimattoman viraalisen tilan ylläpidosta vastuussa olevien tuma- ja biokemiallisten mekanismien yksityiskohtaisempi esitys on kuitenkin tämän katsauksen piirin ulkopuolella, mutta se esitetään muissa julkaisuissa yksityiskohtaisesti. Mechanisms of HIV-1 Latency, Bednarik *et al.*, *AIDS* **6**:3-16 (1992).

Vielä hiljattain uskottiin, että HIV oli piilevänä tai ekspressoitumattomana kroonisesti infektoitujen solujen koko varastopopulaatiossa kliinisesti oireettoman ajanjakson aikana. Viremian ja virusreplikaation alhaisten/puuttuvien tasojen havainnot ääreisverisoluissa johtivat vaikutelmaan, ettei HIV-tauti ollut aktiivinen kliinisen oireettoman ajanjakson aikana. Eräs tutkijaryhmä on kuitenkin keksinyt, ettei HIV-infektion aikana esiinny todellista mikrobiologista latenssitilaa. Fauci A.S. *et al.*, HIV-infektion is Active and Progressive in Lymphoid Tissue During the Clinically Latent Stage of disease, *Nature* **362**:355-358 (1993).

Tutkijat kuvasivat kliinisen latenssin aikana viraalisen kuormituksen ja virusreplikaation tasojen välillä kahtiajakautuneisuutta ääreisveressä verrattuna imukudoselimiin. Tämän vuoksi tiedemiehet ovat näiden havaintojen perusteella keksineet, että "ääreisveri ei heijasta tarkasti HIV-sairauden todellista tilaa, varsinkaan HIV-infektion kliinisen kulun varhaisvaiheessa. Itse asiassa HIV-sairaus on aktiivinen ja etenevä myös silloin, kun

sairauden aktiivisuudesta on vähän todisteita ääreisverestä helposti mitattavien viraalisten parametrien mukaan ja potilas on sairauden kliinisesti latenssivaiheessa."

HIV:n tautitila etenee väistämättä kliinisesti oireettomasta latenssivaiheesta ekspressoivaan ja aktiiviseen oireelliseen vaiheeseen. Useita eri malleja käyttämällä on alettu ymmärtää solureittejä, jotka liittyvät HIV:n aktivoitumiseen laboratoriolatenssista. Julkaisun Butera *et al.*, *AIDS* **6**:994 (1992) mukaan useita latenttiuden solumalleja voidaan indusoida ekspressoimaan HIV-1:tä sytokiineillä käsittelyn jälkeen. Tämä osoittaa sen, että HIV-1 odottaa mikrobiologisessa latenssivaiheessa solunulkoista ärsykettä ennen replikaation aloitusta. Liukoisen sytokiinin vuorovaikutuksen reseptorinsa kanssa lisäksi tätä signaalia voivat välittää myös reseptori-reseptori-vuorovaiku-tukset, joita esiintyy solusta soluun tapahtuvan viestinnän tai solustressin, kuten UV-valolle altistuksen ja lämpöshokin, aikana. Lisäksi solunulkoinen induktiosignaali voi syntyä autokriinisesti tai parakriinisesti siten, että HIV-1-aktivoitu solu voi lisätä omaa ekspressiotaan samalla kun se aktivoi lähellä olevan latentin solun.

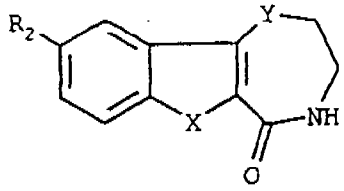
Ammattimiehet ovat olleet sitä mieltä, että HIV:n aktivoitumiseen osallistuu muita tekijöitä. Eräs tutkimus on osoittanut, että 12-O-tetradekanoyyliforboli-13-asetaatti (TPA) toimii välittäjänä CD4:n vähentämisessä ja virusekspressiossa HIV:llä infektoituneissa soluissa, Hamamoto *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**:339-344 (1989). Kiinnostavaa kyllä, Hamamoto tutki myös vahvojen proteiinikinaasi-C-estäjien staurosporiinin, H-7:n ja UCN-01:n vaikutusta TPA-välitteiseen CD4:n vähenemiseen ja HIV-ekspression lisäykseen. Staurosporiinin havaittiin olevan tehokas TPA-estäjä molempien näiden vaikutusten suhteen.

Solureitit, jotka liittyvät aktivointisignaalin välittämiseen plasmamembraanista integroituun virukseen aiheuttaen HIV-1-ekspression, ovat paljon huonommin selvillä. Latentin HIV:n aktivoitumisen mahdollisesti estämään pystyvien yhdisteiden evaluoimiseksi tarkoitetun luotettavan ja yksinkertaisen järjestelmän kehittäminen kuvattiin hiljattain tapahtumassa the National Cooperative Discovery Grant (NCDDG)/AIDS, P. Feorino, S.T. Butera, T.M. Folks, ja R.F. Schinazi, 3. - 7. marraskuuta 1991. Määritysjärjestelmässä käytettiin OM-10.1-solulinjaa, ainutlaatuista kroonisesti infektoitunutta promyelosyyttikloonia, joka pysyy CD4+-muodossa tuumorinekroositekijä-α:lla tapahtuvaan HIV-1:n aktivoitumiseen asti. CD4+:n ekspressiota solupinnalla ja käänteistranskriptaasin aktiivisuutta käytetään merkkeinä viraalisen ekspression kvantifioimiseksi. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muita ammattimiesten tuntemia HIV-merkkejä, kuten proteaasiaktiivisuutta. OM-10.1-solut pysyvät CD4+-muodossa viraaliseen aktivoitumiseen asti ja vastaavat tuumorinekroositekijän induktioon, ja sen vuoksi nämä viljelmät ovat käyttökelpoisia ja nopeita tutkittaessa farmakologisten aineiden kykyä estää CD4+:n ekspression heikkenemistä (CD4+:n ekspression vähenemistä solupinnalla) ja HIV-1:n ekspressiota.

Erilaisia yhdisteitä, joilla tiedetään olevan joko akuutisti tai kroonisesti infektoituneiden solujen vastaisia antiviraalisia ominaisuuksia, arvioitiin niiden kyvyn suhteen estää HIV-ekspressiota näissä OM-10.1-soluissa. Tutkittiin myös useita yhdisteitä, jotka ovat vuorovaikutuksessa biokemiallisten reittien kanssa, jotka voivat häiritä uudelleenaktivoitumisprosessia. Arvioinnin tulokset esitettiin julisteessa tapahtumassa the NCDDG/AIDS, San Diego, Kalifornia, 3. - 7. marraskuuta (1991). Noin 48 tutkitusta yhdisteestä 3'-fluori-3'-deoksitymidiiniä (FLT), interferoni Y:tä ja desferrioksamiinia pidettiin kohtuullisina HIV-1:n aktivoitumisen estäjinä.

Eräällä kaavan I mukaisella edustavalla yhdisteellä, 2,3-dihydro-9-metoksi-[1]bentsotieno[2,3-f]-1,4-tiatsepin-5(4H)-onilla, havaittiin IC_{50}-inhibitio 0,21 µM OM-10.1-soluissa (Taulukko I).

Taulukko I



2,3-dihydro-9-metoksi-[1]bentsotieno[2,3-f]-1,4-tiatsepin-5(4H)-oni

Esimerkki	R_2	X	Y	ECA (IC_{50})	ICAM/ESEL (IC_{50} tai esto-% @ 30 µM)	OM-10 (IC_{50} µM)
1	OMe	S	S	5,2	3,1/1,3	0,21
2	H	S	O		42 %/40 %	>30
4	OMe	NMe	O		14,7/14,2	
5	H	S	NH		64 %/47 %	
6	OMe	S	O		3,1/7,5	
7	OMe	S-O	O		30 %/30 %	
8	OMe	S	O (2-metyyli)		3,8/5,3	

Keksinnön mukaisilla yhdisteillä on osoitettu olevan aktiivisuutta myös *in vivo* -standardimäärityksissä, joita käytettiin mittaamaan yhdisteiden kykyä estää neutrofiilien sisäänvirtausta ja sen mukaisesti osoittamaan niiden käyttökelpoisuus tulehdustilojen hoidossa. Eräässä testissä, jota kutsuttiin käänteiseksi passiiviseksi "Arthus"-keuhkopussintulehdusmääritykseksi, koiraspuoliset sukusiitetyt Wistar-rotat (220 - 245 g, Charles River Laboratories) paastosivat 16 - 18 tunnin ajan. Kantajaa (1:1, etanoli:suolaliuos) tai keksinnön mukaista yhdistettä kantajaan liuotettuna annettiin laskimonsisäisesti.

Eläimet nukutettiin kevyesti eetterillä, ja naudanseerumialbumiinia (BSA) annettiin suonensisäisellä injektiolla 2,5 mg suolaliuoksessa. Välittömästi suonensisäisen injektion jälkeen kylkiluiden väliin tehtiin pieni avanne, ja keuhko-onteloon injisoitiin 0,2 ml kani-IgG-fraktio-anti-BSA:ta (10 mg/ml Dulbeccon fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS)) PBS:ssä käyttäen kokoa 20 olevaa oraalista annosteluneulaa. Sitten avanne suljettiin 9 mm:n ruostumattomasta teräksestä olevalla pidikkeellä. 4 tuntia myöhemmin eläimet tapettiin hiilidioksidilla ja keuhko-ontelo huuhdottiin 2 ml:lla 0,325 % fenolipunaliuosta PBS:ssä. Tulehdusnestepuskuri poistettiin keuhko-ontelosta analyysiä varten. Valkoiset verisolut (>90 % neutrofiilejä) laskettiin käyttämällä Coulter-laskuria. Keuhko-onteloon tihkuneen tulehdusnesteen tilavuus mitattiin värinlaimennosmenetelmällä (Carter G.W. *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.* **34**:66-67 (1982)). Lääkkeellä käsiteltyjä ryhmiä verrattiin kantajalla käsiteltyyn ryhmään, ja tilastollinen merkittävyys määritettiin Studentin t-testiä käyttämällä.

Kun esimerkin 1 yhdiste arvioitiin edellä olevassa testissä, se inhiboi seuraavasti:

Annos (mg/kg)	Tulehdus-nesteen esto-%	Neutrofiilin sisäänvirtauksen esto-%
0,3	40,5	18,6
1,0	28,4	8,9
3,0	28,2	15,9

Eräässä toisessa *in vivo* -määrityksessä, jota kutsutaan tioglykolaatti-indusoiduksi neutrofiilin sisäänvirtausmääritykseksi, naaraspuolisia sukusiitettyjä Balb/c-hiiriä sijoitetaan 7 eläimen ryhmissä häkkeihin vapaalla

ruoan ja juoman saannilla koko tutkimuksen ajan. Eläimille annostellaan oraalisesti kantajaa (0,5 % hydroksipropyylimetyyliselluloosa, jossa on 0,2 % Tween 80:aa) tai keksinnön mukaista yhdistettä kantajaan liuotettuna tai suspendoituna. Tunti oraalisen annon jälkeen hiiret nukutetaan dietyylieetteri-inhalaation avulla ja injisoidaan vatsaontelonsisäisesti 1,0 ml:lla 3 % tioglykollaattiväliainetta suolaliuoksessa. Kaksi tuntia tioglykollaattiinjektion jälkeen eläimet tapetaan tukehduttamalla hiilidioksidilla, ja niihin injisoidaan 6 ml Dulbeccon PBS:ää, joka sisältää 10 U/ml natriumhepariinia ja 0,1 % BSA:ta. Vatsaonteloa hierotaan ja onteloon tehdään avanne nesteen keräämiseksi 15 ml:n sentrifugiputkiin. Kustakin eläimestä otetaan alikvootti, ja kunkin alikvootin solujen kokonaislukumäärä lasketaan käyttämällä Coulter Counter -laitetta (malli ZBi, Coulter Instruments, Hialeah, Florida). Poistetaan toinen alikvootti mikroskopiaa varten Cytospin 2 -laitetta (Shandon Inc., Pittsburgh, Pennsylvania) käyttämällä, ja suoritetaan seuraavaksi värjäys (modifioitu Wrightin väri). Suoritetaan hematologiset differentiaalilaskut vatsaonteloon tihkuneiden neutrofiilien %-osuuden määrittämiseksi.

Kun esimerkin 1 yhdistettä evaluoitiin tässä määrityksessä, sillä oli 26,1 %:nen neutrofiilien sisäänvirtauksen esto annostelulla 10 mg/kg, 31,9 %:nen esto annostelulla 30 mg/kg ja 34,3 %:nen esto annostelulla 100 mg/kg.

Keksinnön mukaiset yhdisteet voidaan valmistaa seuraavilla menetelmillä.

Ensimmäinen yleinen lähestymistapa vaatii lähtöaineiksi rakenteen 1 mukaisia 3-hydroksi-, tioli- tai aminobentso[b]tiofeeni-, bentsofuraani- tai indoli-2-karboksylaattiestereitä (Kaavio 1). 3-hydroksi-bentso[b]tiofeeni-2-esterit valmistetaan julkaisussa Connor D.T. *et al.*, *J. Med. Chem.* **35**:958 (1992), kuvatulla tavalla. 3-

tio-bentso[b]tiofeeni-2-karboksylaattiesterit valmistetaan käsittelemällä analogista 3-kloorijohdannaista [Connor D.T. *et al.*, *J. Med. Chem.*, **35**:958 (1992)] tioasetamidilla, kun läsnä on emästä, kuten 1,8-diatsa-bisyklo-[5.4.0]-undek-7-eeniä (DBU), ja liuotinta, kuten N,N'-dimetyyliformamidia tai tetrahydrofuraania. 3-amino-bentso[b]tiofeeni-2-karboksylaattiesterit valmistetaan tunnetulla yleisellä menetelmällä [Beck J.R., *J. Org. Chem.* **37**:3224 (1972)]. 3-hydroksi-indoli-2-karboksylaattiesterit valmistetaan tunnetuilla menetelmillä, kuten Unangst P.C. *et al.*, *J. Heterocyclic Chem.*, **24**:811 (1987) ja Moyer M.P. *et al.*, *J. Org. Chem.* **51**:5106 (1986). 3-tio-indoli-2-karboksylaattiesterit valmistetaan tunnetuilla menetelmillä, kuten Unangst P.C. *et al.*, *J. Heterocyclic Chem.* **24**:811 (1987); Atkinson J.G. *et al.*, *Synthesis* **480** (1988); ja Nagarajan K. *et al.*, *Indian J. Chem.* **20B**:672 (1981). 3-amino-indoli-2-karboksylaattiesterit valmistetaan tunnetuilla menetelmillä, kuten Simakov S.V. *et al.*, *Khim.-Farm. Zu.* **17**:1183 (1983).

Tyypin 1 mukaisten yhdisteiden muuttaminen keksinnön mukaisiksi esitetään kaaviossa 1. Esterit käsitellään α-halogeeni-substituoidulla asetonitriilijohdannaisella, kuten bromiasetonitriilillä, emäksen, kuten kalium-t-butoksidin, läsnäollessa tetrahydrofuraanissa, asetonitriilissä tai dimetyylisulfoksidissa, 0 - 80 °C:ssa, jolloin saadaan tyypin 2 mukaisia estereitä. Nitriiliryhmä pelkistetään vastaavaksi primaariseksi amiiniksi, ja tulokseksi saatu välituote 3 syklisoidaan laktaamiksi 4. Edullinen muuttaminen on yhdisteen 2 hydraus Raney-kobolttikatalysaattorilla liuottimessa, kuten tetrahydrofuraanissa, emäksen, kuten trietyyliamiinin, läsnäollessa korotetussa lämpötilassa ja paineessa. Näissä olosuhteissa yhdiste 4 saadaan suoraan yhdisteestä 2. Jos välituote 3 eristetään, se syklisoidaan yhdisteeksi 4 emäksisissä, edullisesti NaOMe:tä metanolissa sisältävissä, tai happa-

missa olosuhteissa, edullisesti polyfosforihapolla, kohonneissa lämpötiloissa.

Joidenkin keksinnön mukaisten yhdisteiden synteesin aikana voi olla välttämätöntä tai toivottavaa muuttaa reaktiiviset ryhmät, kuten hydroksi-, amino- ja karboksiryhmät johdannaisiksi, jotka suojaavat niitä ei-toivotuilta sivureaktioilta toivotun reaktion tapahtuessa jossakin muussa kohdassa molekyyliä. Sellaisista suojatuista hydroksi-, amino- ja karboksiryhmistä suojaus poistetaan helposti tavanomaisilla menetelmillä. Yleisesti käytettyjä kemiallisia ryhmiä, jotka toimivat reaktiivisten ryhmien, kuten hydroksin, aminon ja karboksin suojaamiseksi, ja menetelmiä niiden kiinnittämiseksi ja poistamiseksi sen jälkeen kuvataan teoksessa Greene ja Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991.

Esimerkiksi 3-amino-, 3-hydroksi- tai 3-tioindoli, bentsotiofeeni tai bentsofuraani (Yhdiste 1 kaaviossa 1) voidaan saattaa reagoimaan β-halogeeni-etyleeniamiinin kanssa, jossa aminoryhmä on suojattu sopivalla suojaryhmällä (PG), kuten t-butoksikarbonyylillä (Boc) tai bentsyylioksikarbonyylillä (Cbz). Edellä kuvatun mukaisissa olosuhteissa suoritettavan reaktion avulla saadaan tyypin 5 mukaisia yhdisteitä. Tyypin 5 mukaisten yhdisteiden suojauksenpoistolla (ts. PG:n poistolla) standardiolosuhteissa, ts. trifluorietikkahapossa tai hapon vesiliuoksessa BOC:n poistamiseksi tai hydrogenolyysillä Cbz:n poistamiseksi, saadaan tyypin 3 mukaisia yhdisteitä, jotka syklisoidaan aikaisemmin mainitulla tavalla. Eräs toinen lähestymistapa on tyypin 1 mukaisten yhdisteiden reaktio etyleeni-imiinin kanssa alkoholiliuottimessa, jolloin saadaan suoraan tyypin 3 mukaisia yhdisteitä (katso Nagarajan K. *et al. Indian J. Chem.* **20B**:672 (1981)).

Eräs toinen yleinen lähestymistapa (kaavio 2) tyypin 4 mukaisten yhdisteiden saamiseksi on lähteä tyypin 6 mukaisista vastaavista 3-halogeenijohdannaisista. Yhdisteen 6 reaktiolla etyleenidiamiinin ja Cu(II)O:n kanssa liuottimessa, kuten pyridiinissä, emäksen, kuten kaliumkarbonaatin, läsnäollessa saadaan tyypin 3 mukaisia yhdisteitä, joissa Y on NH (katso Hiremath S.P. *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci., India* **60**:367 (1990)). Yhdisteen 6 reaktio kysteamiinin kanssa liuottimessa, kuten dimetyyliformamidissa, emäksen, kuten DBU:n, läsnäollessa tuottaa tyypin 3 mukaisia yhdisteitä, joissa Y on S. Yhdisteen 6 reaktio nitroetanolin kanssa liuottimessa, kuten tetrahydrofuraanissa emäksen, kuten kalium-t-butoksidin tai kaliumhydridin, läsnäollessa tuottaa tyypin 7 mukaisia yhdisteitä. Pelkistämällä seuraavaksi nitroryhmä amiiniksi saadaan tyypin 3 mukaisia yhdisteitä, joissa Y on O. Joissakin edellä olevista tapauksista yhdistettä 3 ei ehkä tarvitse eristää, vaan yhdiste 4 voidaan saada suoraan.

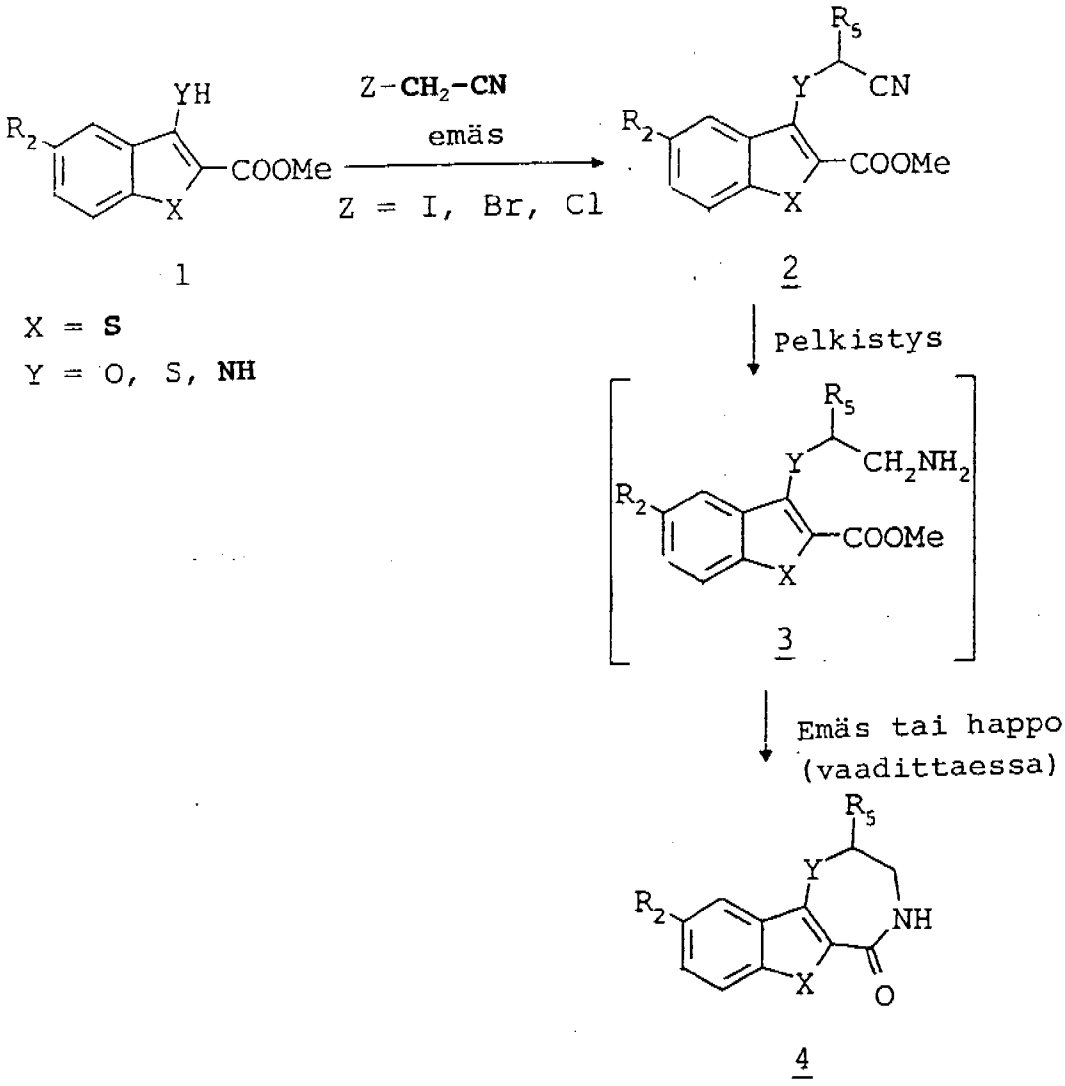
Eräässä kolmannessa yleisessä lähestymistavassa (kaavio 3) käytetään myös tyypin 6 mukaisia 3-halogeenijohdannaisia. 3-halogeenijohdannainen käsitellään primaarisella amiinilla, joka sisältää β-asemassa sopivasti suojatun amino-, hydroksi- tai tioliryhmän, jolloin muodostuu amidiryhmä, jolloin saadaan tyypin 7 mukainen välituote. Suojauksenpoistolla ja sitä seuraavalla syklisoinnilla saadaan tyypin 4 mukaisia yhdisteitä. Vastaava reaktioketju alkaa 3-hydroksi-, tioli- tai aminoyhdisteestä lisäämällä amiinia, jossa on β-asemassa sopiva poistuva ryhmä. Sitten tulokseksi saadut tyypin 8 mukaiset välituotteet syklisoidaan, jolloin saadaan tyypin 4 mukaisia yhdisteitä.

Ne tyypin 4 mukaiset yhdisteet, joissa X on S ja Y on O tai NH, voidaan muuttaa hapetusreagenssilla, kuten m-klooriperbentsoehapolla (m-CPBA) tai oksatsiridiinillä,

tyypin 9 mukaiseksi vastaavaksi sulfoksidiksi ja/tai sulfoniksi, reaktio-olosuhteiden määrätessä hapetuksen määrän (kaavio 4). Niillä tyypin 4 mukaisilla yhdisteillä, joissa Y on S, samanlainen hapetus tuottaisi joko tyypin 10 mukaisen sulfoksidin tai sulfonin.

Kaavioiden 1 - 4 kuvauksessa käytetyt olosuhteet ja niiden kuvauksessa esitetyt muunnelmat ovat tunnettuja, tai ne voidaan helposti määrittää ammattimiehen tuntemista analogisista reaktioista.

Kaavio 1



1

X = **S**

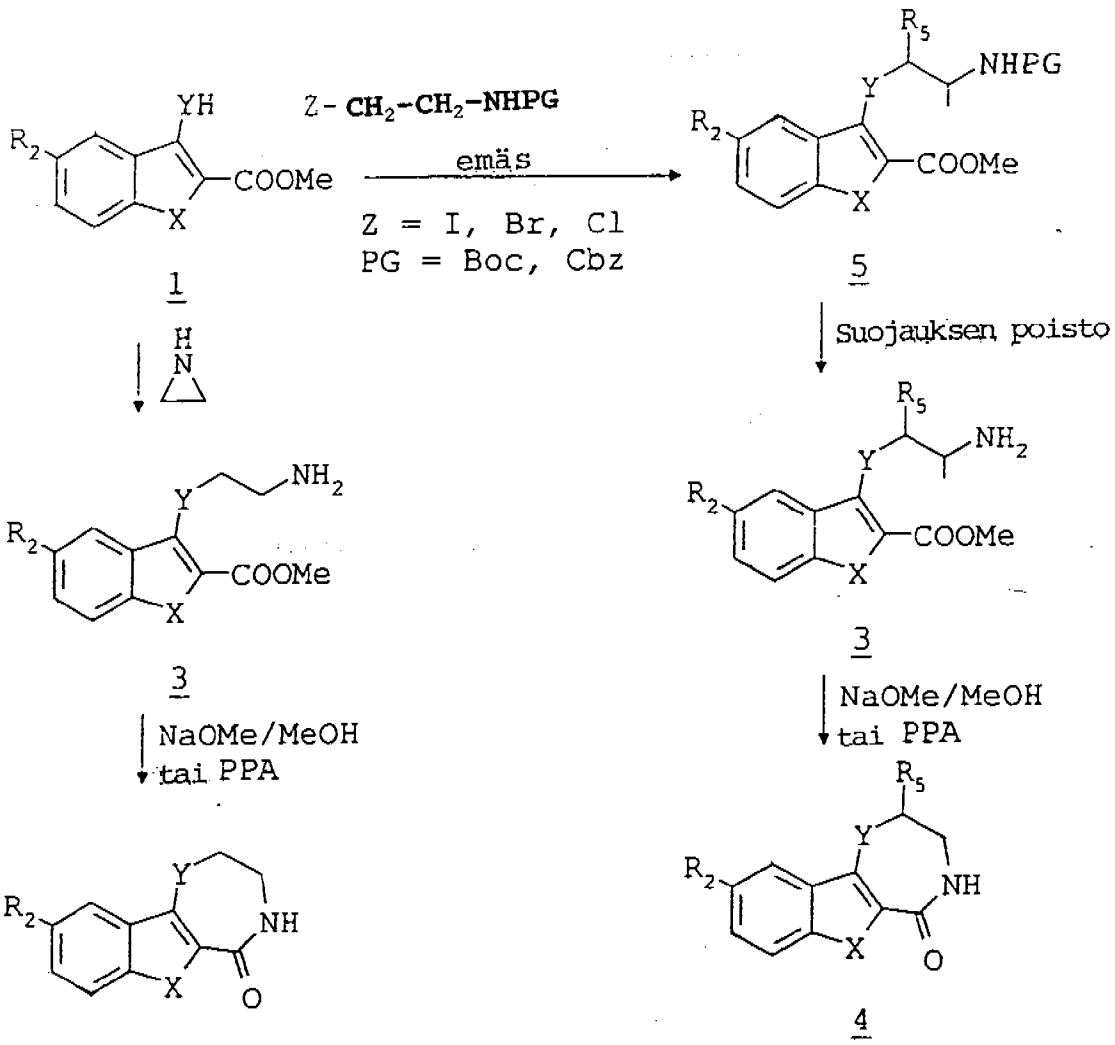
Y = O, S, **NH**

2

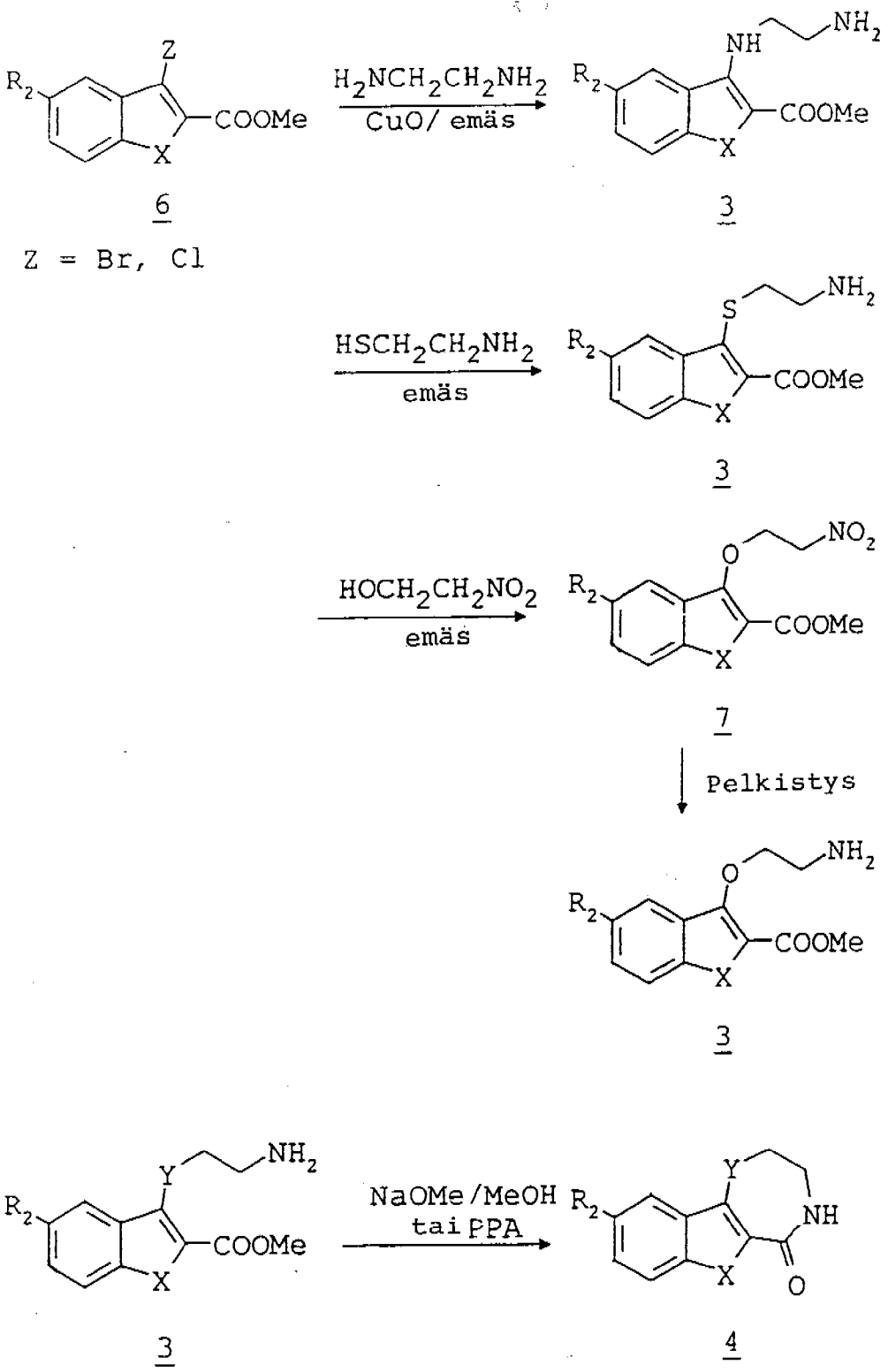
3

4

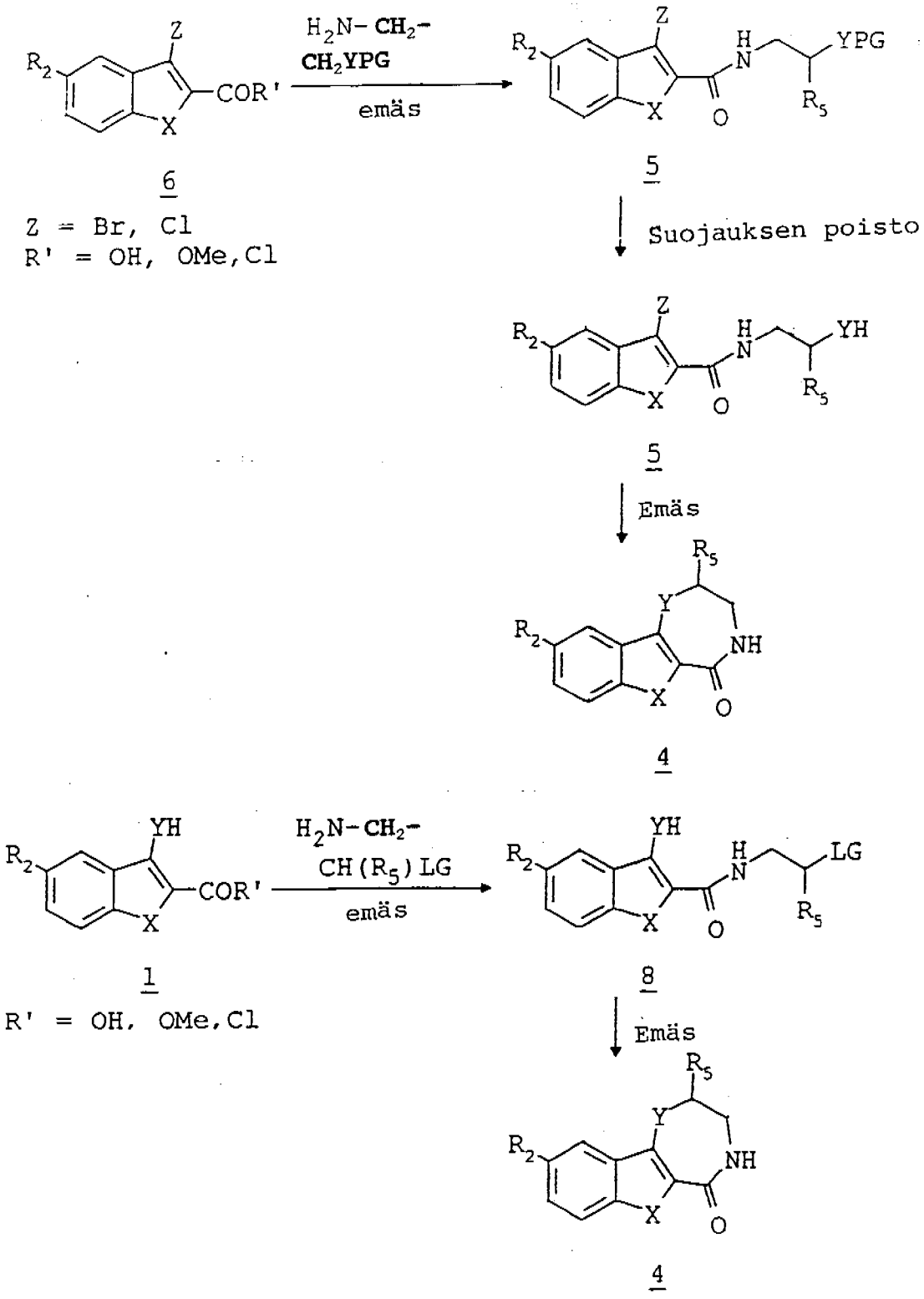
Kaavio 1 (jatkoa)



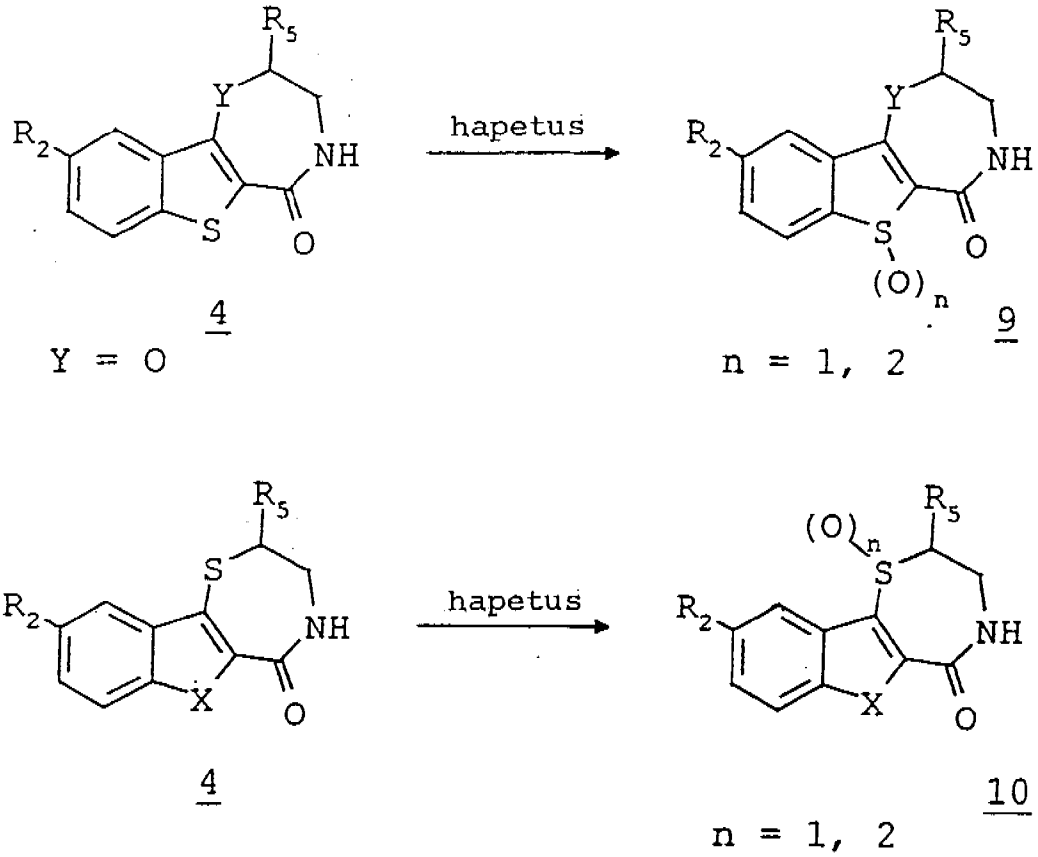
Kaavio 2


R2
Z
COOMe
X
6
Z = Br, Cl
H2NCH2CH2NH2
CuO/ emäs
NH
NH2
3
HSCH2CH2NH2
emäs
S
3
HOCH2CH2NO2
emäs
O
NO2
7
Pelkistys
3
Y
NaOMe/MeOH
tai PPA
NH
O
4

Kaavio 3


H2N-CH2-
CH2YPG
emäs
Z
R2
COR'
X
YPG
H
N
O
R5
6
Z = Br, Cl
R' = OH, OMe,Cl
5
Suojauksen poisto
YH
Emäs
NH
4
H2N-CH2-
CH(R5)LG
LG
8
1
R' = OH, OMe,Cl

Kaavio 4



Seuraavissa esimerkeissä kuvataan keksinnön mukaisten yhdisteiden valmistusta.

Esimerkki 1

2,3-dihydro-9-metoksi[1]bentsotieno[2,3-f]-1,4-tiatsepin-5(4H)-oni

Huoneenlämpötilassa olevaan liuokseen, jossa on metyyli-3-kloori-5-metoksi-bentso[b]tiofeeni-2-karboksylaattia (500 mg, 1,95 mmol) [valmistettu saattamalla tunnettu 3-kloori-5-metoksi-bentso[b]tiofeeni-2-karbonyylihappokloridi reagoimaan metanolin kanssa [*J. Med. Chem.* **35**:958 (1992)]] 20 ml:ssa DMF:ää, lisätään kysteamiini-HCl:ää (885 mg, 7,79 mmol), sen jälkeen DBU:ta (2,33 ml, 15,58 mmol). Reaktioseosta sekoitetaan huoneenlämpötilassa 1,5 tunnin ajan, ja lämmitetään sitten 70 °C:seen. Seos laimennetaan etyyliasetaatilla ja pestään HCl:n vesiliuoksella, vedellä ja suolaliuoksella. Orgaaninen kerros kuivataan $MgSO_4$:llä, suodatetaan ja konsentroidaan tyhjössä. Raakatuote uudelleenkiteytetään heksaanista ja etyyliasetaatista, jolloin saadaan 2,3-dihydro-9-metoksi[1]-bentsotieno[2,3-f]-1,4-tiatsepin-5(4H)-onia 74-%:sella saannolla; sp. 209 - 209,5 °C.

Esimerkki 2

2,3-dihydro-[1]bentsotieno[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5(4H)-oni

Seosta, jossa on 3-(syaanimetoksi)-bentso[b]tiofeeni-2-karboksyylihapon metyyliesteriä (405 mg, 1,64 mmol) [*J. Hetero. Chem.* **12**:1037 (1975)], 0,5 ml Et_3N:ää ja 0,50 g RaCo:a 50 ml:ssa THF:ää, kuumennetaan 100 °C:ssa vetypaineessa 8,3 MPa (1200 psi). Reaktioseos konsentroidaan tyhjössä. Pylväskromatografoidaan eluoiden gradientilla 1:1 heksaani:etyyliasetaatti → 100 % etyyliasetaatti, jolloin saadaan 2,3-dihydro-[1]bentsotieno[2,3-f]-1,4-

oksatsepin-5(4H)-onia 55 %:sella saannolla; sp. 244 - 245 °C.

Esimerkki 3

2,3-dihydro-9-metoksi-[1]bentsotieno[2,3-f]-1,4-tiatsepin-5(4H)-oni-1-oksidi

Seosta, jossa on 2,3-dihydro-9-metoksi-[1]bentsotieno-[2,3-f]-1,4-tiatsepin-5(4H)-onia (200 mg, 0,75 mmol) ja $NaBO_3$-$4H_2O$:ta (116 mg, 0,75 mmol) 18 ml:ssa AcOH:ta, sekoitetaan huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktioseos suodatetaan, ja suodokseen lisätään 60 ml vettä. Suodatetaan, jolloin saadaan 2,3-dihydro-9-metoksi-[1]bentsotieno[2,3-f]-1,4-tiatsepin-5(4H)-oni-1-oksidia 69 %:sella saannolla; sp. 215 - 216 °C (hajoaa).

Esimerkki 4

3,4-dihydro-9-metoksi-6-metyyli-2H-1,4-oksatsepino-[6,7-b]-indol-5(6H)-oni

A. Metyyli-3-(syaanimetoksi)-5-metoksi-1-metyyli-1H-indoli-2-karboksylaatti

Suspensiota, jossa on kalium-tert-butoksidia (3,2 g, 29 mmol) 60 ml:ssa dimetyylisulfoksidia, käsitellään metyyli-3-hydroksi-5-metoksi-1-metyyli-1H-indoli-2-karboksylaatin erillä (5,6 g, 24 mmol; Unangst P.C. *et al.*, *J. Heterocyclic Chem.* **24**:811 (1987)). Seosta sekoitetaan 15 min ajan, ja siihen lisätään tipoittain klooriasetonitriiliä (4,8 ml, 5,7 g, 76 mmol). Seosta kuumennetaan 90 min ajan 80 °C:ssa, seos jäähdytetään ja lisätään 800 g:aan jäätä ja vettä. Saostunut kiintoaines suodatetaan, pestään 10 %:sella metanoli-vedellä ja uudelleenkiteytetään vesipitoisesta asetonitriilistä, jolloin saadaan 3,9 g (60 %) tuotetta; sp. 136 - 137 °C.

B. Seosta, jossa on metyyli-3-(syaanimetoksi)-5-metoksi-1-metyyli-1H-indoli-2-karboksylaattia (0,60 g, 2,2 mmol)

ja trietyyliamiinia (0,40 ml, 0,29 g, 2,9 mmol) 35 ml:ssa tetrahydrofuraania painereaktorissa, käsitellään Raney-kobolttikatalysaattorilla (0,40 g). Reaktori paineistetaan vedyllä [4,1 MPa (590 psi)] ja kuumennetaan 10 tunnin ajan 80 °C:ssa. Jäähdytetty reaktioseos suodatetaan, ja suodos haihdutetaan. Öljymäinen jäännös liuotetaan 50 ml:aan metanolia, ja liuokseen lisätään natriummetoksidia (0,80 g, 15 mmol). Seosta kuumennetaan palautusjäähdyttäen 3 tunnin ajan, sitten se jäähdytetään ja haihdutetaan. Jäännös jaetaan 75 ml:n etyyliasetaattia ja 150 ml:n suolaliuosta välillä. Vesikerros uutetaan useita kertoja tuoreella etyyliasetaatilla. Yhdistetyt orgaaniset kerrokset pestään suolaliuoksella, kuivataan (vedetön natriumsulfaatti) ja haihdutetaan. Raakatuotejäännös puhdistetaan flash-kromatografialla (silikageeli, eluointi 5 % metanolilla dikloorimetaanissa), jolloin saadaan 0,18 g (33 %) tuotetta. Etyyliasetaatti-heksaanista uudelleenkiteytetyn näytteen sp. on 184 - 186 °C.

Esimerkki 5

2,3-dihydro-1H-bentsotieno-[3,2-e]-1,4-diatsepin-5-oni 3-(2-aminoetyyliamino)bentso[b]tiofeeni-2-karboksyylihappometyyliesterihydrokloridi

Liuosta, jossa on 2-(4,5-dihydro-1H-imidatsol-2-yyli)-bentseenitiolia (1,00 g, 5,62 mmol) [Hegen, H., Fleig, H., *Justus Liebigs Ann. Chem.* **11**:1994 (1975)] ja kloorimetyyliasetaattia (610 mg, 5,62 mmol) 15 ml:ssa metanolia, kuumennetaan palautusjäähdyttäen 90 min ajan. Reaktio jäähdytetään huoneenlämpötilaan ja suodatetaan. Suodos konsentroidaan kuiviin, ja jäännös liuotetaan kuumaan kloroformiin. Usean tunnin kuluttua tulokseksi saatu sakka kerätään ja kuivataan. Emäliuoksesta saadaan toinen saanto kiteitä, jolloin saadaan 3-(2-aminoetyyliamino)bentso[b]tiofeeni-2-karboksyylihappometyyliesterihydrokloridia kokonaissaannolla 61 %, sp. 219 - 220 °C.

2,3-dihydro-1H-bentsotieno-[3,2-e]-1,4-diatsepin-5-oni

Liuosta, jossa on 3-(2-aminoetyyliamino)bentso[b]-tiofeeni-2-karboksyylihappometyyliesterihydrokloridia (339 mg, 1,18 mmol) ja juuri valmistettua natriummetoksidia (134 mg:sta, 2,48 mmol:sta natriumia) 5 ml:ssa metanolia, kuumennetaan palautusjäähdyttäen 18 tunnin ajan. Jäähdytetään, minkä jälkeen reaktio säädetään neutraaliin pH-arvoon 25 ml:lla 1 N HCl:ää ja jäähdytetään tunnin ajan 0 °C:ssa. Tulokseksi saatu keltainen kiteinen materiaali suodatetaan ja kuivataan tyhjössä 60 °C:ssa useiden tuntien ajan, jolloin saadaan 2,3-dihydro-1H-bentsotieno-[3,2-e]-1,4-diatsepin-5-onia 64 %:sella saannolla. Kromatografoidaan eluoiden gradientilla 2 % metanoli/etyyliasetaatti → 5 % metanoli/etyyliasetaatti, jolloin saadaan analyyttisesti puhdasta 2,3-dihydro-1H-bentsotieno-[3,2-e]-1,4-diatsepin-5-onia, sp. 210 - 212 °C.

Esimerkki 6

2,3-dihydro-9-metoksi-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-oni

3-syaanimetoksi-5-metoksi-bentso[b]tiofeeni-2-karboksyylihappometyyliesteri

Huoneenlämpötilassa olevaan liuokseen, jossa on metyyli-3-hydroksi-5-metoksibentso[b]tiofeeni-2-karboksylaattia (1,00 g, 4,2 mmol) [Connor *et al.*, *J. Med. Chem.* **35**:959 (1992)] 20 ml:ssa DMSO:ta, lisätään kalium-t-butoksidia (494 mg, 4,41 mmol), sen jälkeen bromiasetonitriiliä (878 µl, 12,58 mmol). Seosta sekoitetaan huoneenlämpötilassa 1,5 tunnin ajan, sitten kaadetaan etyyliasetaattiin ja 1 N HCl:ään. Orgaaninen kerros pestään 1 N HCl:llä, sitten useilla erillä suolaliuosta ja kuivataan $MgSO_4$:llä. Suodatetaan, minkä jälkeen liuotin poistetaan tyhjössä, ja jäännös uudelleenkiteytetään etyyliasetaatti:heksaanista,

jolloin saadaan 413 mg. Emäliuoksesta voidaan saada lisäsaanto, jonka paino on 112 mg, sp. 159,5 - 160 °C.

2,3-dihydro-9-metoksi-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-oni

Liuosta, jossa on 3-syaanimetoksi-5-metoksi-bentso[b]-tiofeeni-2-karboksyylihappometyyliesteriä (2,5 g, 9,0 mmol) 50 ml:ssa THF:ää, kuumennetaan voimakkaasti palautusjäähdyttäen. Lisätään nopeasti boraani-dimetyylisulfidia (9,0 ml, 90,2 mmol), ja kuumennusta jatketaan 25 min ajan lisäten THF:ää sen haihtuessa. Lisätään vielä boraani-dimetyylisulfidia (4,0 ml), ja kuumennusta jatketaan 10 min ajan. Reaktioseos jäähdytetään 0 °C:seen, ja lisätään varovasti 50 ml 6 N HCl:ää. Vetykaasua kehittyy, ja reaktioseoksen lämpötila kohoaa. Tulokseksi saatu sakka kerätään suodattamalla, pestään vedellä ja kuivataan tyhjössä yön yli.

Kiinteä aine (2,3 g, 8,2 mmol) lisätään juuri valmistettuun liuokseen, jossa on natriummetoksidia (1,9 g:sta, 82,0 mmol:sta natriumia) 40 ml:ssa metanolia. Reaktioseosta lämmitetään 2 tunnin ajan 50 °C:seen, sitten kuumennetaan palautusjäähdyttäen 2 tunnin ajan. Kun on jäähdytetty huoneenlämpötilaan, sakka kerätään ja pestään kylmällä metanolilla, sen jälkeen kylmällä dietyylieetterillä. Kiinteää ainetta kuivataan tyhjössä yön yli, jolloin saadaan 1,18 g (52 %). 2,3-dihydro-9-metoksi-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-onin analyyttinen näyte saadaan uudelleenkiteyttämällä etyyliasetaatti:heksaanista, sp. 264 - 265 °C.

Esimerkki 7
2,3-dihydro-9-metoksi-6-oksidi-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-oni

Suspensioon, jossa on 2,3-dihydro-9-metoksi-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-onia (1,00 g, 4,0 mmol) 100 ml:ssa lämmintä metanolia, lisätään 30 % vetyperoksidia (8,0 ml, 80 mmol), sen jälkeen seleenidioksidia (445 mg, 4,01 mmol). Reaktioseosta sekoitetaan huoneenlämpötilassa 3 tunnin ajan, sitten kuumennetaan 30 °C:ssa 1,5 tunnin ajan, minkä jälkeen kuumennetaan 40 °C:ssa 2 tunnin ajan. Reaktioseos jäähdytetään -40 °C:seen, ja tulokseksi saatu sakka kerätään suodattamalla. Jäännös kromatografoidaan eluoiden aluksi 5 % metanolilla etyyliasetaatissa lisäten liuoksen polaarisuutta vähitellen 1:1 metanoli:etyyliasetaatiksi, jolloin saadaan 338 mg tuotetta. 2,3-dihydro-9-metoksi-6-oksidi-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-onin analyyttinen näyte saadaan uudelleenkiteyttämällä metanoli:etyyliasetaatista, sp. 273 - 274 °C.

Esimerkki 8
2,3-dihydro-9-metoksi-2-metyyli-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-oni

3-(1-syaanietoksi)-5-metoksi-bentso[b]tiofeeni-2-karboksyylihappometyyliesteri

Huoneenlämpötilassa olevaan liuokseen, jossa on metyyli-3-hydroksi-5-metoksibentso[b]tiofeeni-2-karboksylaattia (1,00 g, 4,2 mmol) [Connor *et al.*, *J. Med. Chem.* **35**:958 (1992)] 20 ml:ssa DMSO:ta, lisätään kalium-t-butoksidia (494 mg, 4,41 mmol), sen jälkeen 2-klooripropionitriiliä (1,1 ml, 12,6 mmol). Seosta sekoitetaan 1,5 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, sitten lämmitetään 3 tunniksi 82 °C:seen. Reaktioseos kaadetaan etyyliasetaattiin ja 1 N HCl:ään. Orgaaninen kerros pestään 1 N HCl:llä, sen jälkeen useilla erillä suolaliuosta, ja kuivataan $MgSO_4$:llä.

Suodatetaan, minkä jälkeen liuotin poistetaan tyhjössä, ja jäännös uudelleenkiteytetään etyyliasetaatti:heksaanista, jolloin saadaan 853 mg, sp. 127 - 129 °C.

2,3-dihydro-9-metoksi-2-metyyli-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-oni

Liuosta, jossa on 3-(1-syaanietoksi)-5-metoksibentso[b]-tiofeeni-2-karboksyylihappometyyliesteriä (400 mg, 1,37 mmol) 10 ml:ssa THF:ää, kuumennetaan voimakkaasti palautusjäähdyttäen. Lisätään tipoittain boraani-dimetyylisulfidia (1,4 ml, 13,7 mmol), ja kuumennusta jatketaan 20 min ajan lisäten THF:ää sen haihtuessa. Reaktioseos jäähdytetään huoneenlämpötilaan, ja lisätään varovasti 7,5 ml 6 N HCl:ää. 5 min kuluttua reaktioseos jäähdytetään 0 °C:seen, ja lisätään 68,5 ml 1 N NaOH:ta, sitten etyyliasetaattia. Kerrokset erotetaan, ja orgaaninen faasi pestään 1:1 suolaliuos:vedellä, sitten vielä suolaliuoksella. Orgaaninen faasi kuivataan $MgSO_4$:llä, suodatetaan ja konsentroidaan tyhjössä. Jäännös kromatografoidaan eluoiden gradientilla metanoli:heksaani:kloroformi 5:25:70 → metanoli:kloroformi 10:90 → metanoli:kloroformi 30:70, jolloin saadaan 135 mg tuotetta. 2,3-dihydro-9-metoksi-2-metyyli-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-onin analyyttinen näyte saadaan uudelleenkiteyttämällä etyyliasetaatti:heksaanista, sp. 185 - 186 °C.

Keksinnön mukaiset yhdisteet voidaan formuloida helposti tavallisten laimennusaineiden ja kantajien avulla ihmisille ja eläimille sopiviksi oraaliseen tai parenteraaliseen antoon sairauksien, kuten tulehduksen, erityisesti niveltulehduksen ja vastaavien, hoitoon. Seuraavat esimerkit kuvaavat tyypillisten farmaseuttisten formulaatioiden valmistusta.

Esimerkki 9

250 mg kapselin valmistus

2,3-dihydro-9-isopropoksi-7-kloori-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-onia (250 mg) sekoitetaan tasaiseksi 150 mg:n laktoosia ja 150 mg:n maissitärkkelystä kanssa. Seos kapseloidaan gelatiinikapseleihin. Sellaisia kapseleita annetaan oraalisesti 1 - 3 päivässä niveltulehduksen hoitoon.

Esimerkki 10

Oraaliseksi suspensioksi formulointi

Ainesosa	Määrä
2,3-dihydro-8-etyyli-10-trifluorimetyyli-6-oksidi-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-oni	500 mg
Sorbitoliliuos (70 % N.F.)	40 ml
Natriumbentsoaatti	150 mg
Sakariini	10 mg
Kirsikka-aromi	50 mg
Tislattu vesi	tarpeen mukaan 100 ml:ksi

Sorbitoliliuos lisätään 40 ml:aan tislattua vettä, ja oksatsepinoni suspendoidaan siihen. Lisätään ja liuotetaan sakariini, natriumbentsoaatti ja aromiaine. Tilavuus säädetään 100 ml:ksi tislatulla vedellä. Jokainen siirappimillilitra sisältää 5 mg oksatsepinonia. Tämä oraalinen formulaatio soveltuu ihanteellisesti tulehduksen hoitoon lasten hoidossa.

Esimerkki 11
Parenteraalisten liuosten valmistus

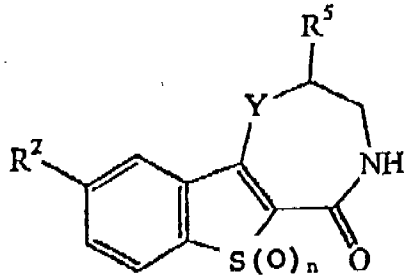
Liuokseen, jossa on 700 ml propyleeniglykolia ja 200 ml injektioon tarkoitettua vettä, liuotetaan 20,0 g 2,3-dihydro-7-dimetyyliamino-1H-bentsotieno-[3,2-e]-1,4-diatsepin-5-onia. Liuoksen pH säädetään suolahapolla happamaan pH-arvoon 5,5, ja tilavuus säädetään tislatulla vedellä 1000 ml:ksi. Formulaatio steriloidaan, kuhunkin 5,0 ml:n ampulliin lisätään 2,0 ml (jossa on 40 mg aktiivista diatsepinonia), ja suljetaan typen alla. Formulaatiota annetaan laskimonsisäisesti potilaille, joilla on tulehdus tai AIDS.

Esimerkki 12
Paikallisesti käytettävän voiteen valmistus

500 mg 2,3-dihydro-7-etoksi-bentsofurano-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-onia sekoitetaan 15 g:n setyylialkoholia, 1 g:n natriumlauryylisulfaattia, 40 g:n nestemäistä silikonia D.C. 200 (myy yhtiö Dow Corning Co., Midland, Michigan), 43 g:n steriiliä vettä, 0,25 g:n metyyliparabeeniä ja 0,15 g:n propyyliparabeeniä kanssa. Seos lämmitetään noin 75 °C:seen jatkuvasti sekoittaen ja jäähdytetään sitten huoneenlämpötilaan, jossa se hyytyy. Valmistetta lisätään tulehduksesta kärsivän henkilön iholle.

Patenttivaatimukset

1. 2,3-dihydro-[1]bentsotieno-1,4-tiatsepin-, -oksatsepin- tai -diatsepin-5-onijohdannainen, jolla on kaava I



I

tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä happoadditiosuola, **tunnettu** siitä, että
R_2 on vety tai alempialkoksi;
R_5 on vety tai alempialkyyli;
Y on O, $S(O)_n$ tai NH; ja
n on kokonaisluku 0, 1 tai 2.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen atsepiinijohdannainen, **tunnettu** siitä, että Y on O tai $S(O)_n$.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, joka on 2,3-dihydro-9-metoksi-[1]bentsotieno[2,3-f]-1,4-tiatsepin-5(4H)-oni.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, joka on 2,3-dihydro-[1]bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5(4H)-oni.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, joka on 2,3-dihydro-9-metoksi-[1]bentsotieno-[2,3-f]-1,4-tiatsepin-5(4H)-oni-1-oksidi.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, joka on 2,3-dihydro-1H-bentsotieno-[3,2-e]-1,4-diatsepin-5-oni.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, joka on 2,3-dihydro-9-metoksi-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-oni.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, joka on 2,3-dihydro-9-metoksi-6-oksidi-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-oni.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, joka on 2,3-dihydro-9-metoksi-2-metyyli-1H-bentsotieno-[2,3-f]-1,4-oksatsepin-5-oni.

10. Farmaseuttinen koostumus, **tunnettu** siitä, että se sisältää terapeuttisesti tehokkaan määrän patenttivaatimuksen 1 mukaista yhdistettä yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan kanssa.

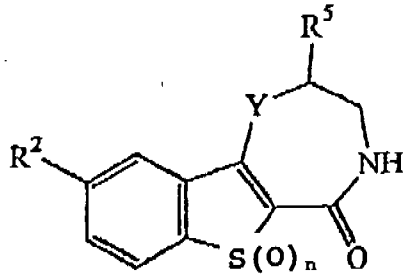
11. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen kaavan I yhdisteen käyttö valmistettaessa leukosyyttien adheesion endoteelisoluihin estävää lääkevalmistetta.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen käyttö valmistettaessa tulehdussairauden hoitoon tarkoitettua lääkevalmistetta.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen kaavan I yhdisteen käyttö valmistettaessa HIV:llä infektoituneiden nisäkkäiden hoitoon tarkoitettua farmaseuttista valmistetta.

Patentkrav

1. 2,3-dihydro-[1]bensotieno-1,4-tiazepin-, -oxazepin- eller -diazepin-5-onderivat med formeln I



I

eller ett farmaceutiskt godtagbart syraadditionssalt därav, **kännetecknat** därav, att
R_2 är väte eller lågalkoxi;
R_5 är väte eller lågalkyl;
Y är O, $S(O)_n$ eller NH; och
n är ett heltal 0, 1 eller 2.

2. Azepinderivat enligt patentkravet 1, **kännetecknat** därav, att Y är O eller $S(O)_n$.

3. Förening enligt patentkravet 1, vilken är 2,3-dihydro-9-metoxi-[1]bensotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-on.

4. Förening enligt patentkravet 1, vilken är 2,3-dihydro-[1]bensotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5(4H)-on.

5. Förening enligt patentkravet 1, vilken är 2,3-dihydro-9-metoxi-[1]bensotieno-[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-on-1-oxid.

6. Förening enligt patentkravet 1, vilken är 2,3-dihydro-1H-bensotieno-[3,2-e]-1,4-diazepin-5-on.

7. Förening enligt patentkravet 1, vilken är 2,3-dihydro-9-metoxi-1H-bensotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-on.

8. Förening enligt patentkravet 1, vilken är 2,3-dihydro-9-metoxi-6-oxid-1H-bensotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-on.

9. Förening enligt patentkravet 1, vilken är 2,3-dihydro-9-metoxi-2-metyl-1H-bensotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-on.

10. Farmaceutisk sammansättning, **kännetecknad** därav, att den innehåller en terapeutiskt effektiv mängd av en förening enligt patentkravet 1 tillsammans med en farmaceutiskt godtagbar bärare.

11. Användning av en förening med formeln I enligt patentkravet 1 för framställning av ett läkemedel, som hämmar leukocytadhesion till endotelceller.

12. Användning enligt patentkravet 11 för framställning av ett läkemedel för behandling av inflammationssjukdomar.

13. Användning av en förening med formeln I enligt patentkravet 1 för framställning av en farmaceutisk preparat för behandling av däggdjur, som infekterats med HIV.

Hak.n:o 963462

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

Käännä Vänd

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Proc. Natl. Acad. Sci. India sectA 60(1990):4
s. 367-78 (CA:115(1990)-232194)
Indian Journal of Chemistry vol 203 (1981) s. 622-29
(CA:105(1981)-226266)

26.09.03

Olli Parkkonen

Allekirjoitus