



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **45 967** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **A 61K 31/55 A, C 07D 495/04 B**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 96093473, 30.01.1995

(24) Дата начала действия патента: 15.05.2002

(30) Приоритет: 07.03.1994 US 08/207,330

(46) Дата публикации: 15.05.2002

(86) Заявка РСТ:
РСТ/US95/01275, 19950130

(72) Изобретатель:

Боскелли Дайен Херрис, US,
Коннор Дейвид Томес, US,
Креймер Джеймс Бернارد, US,
Аненгст Пол Чарлз, US

(73) Патентовладелец:

ВЕРНЕР-ЛАМБЕРТ КОМПАНИ, US

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ БЕНЗОТИОФЕНА, БЕНЗОФУРАНА, ИНДОЛТИАЗЕПИНОНА, ОКСАЗЕПИНОНА И ДИАЗЕПИНОНА, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ИНГИБИРУЮЩАЯ АДГЕЗИЮ КЛЕТОК И АКТИВАЦИЮ ВИЧ, СПОСОБ ТОРМОЖЕНИЯ АДГЕЗИИ ЛЕЙКОЦИТОВ К ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМ КЛЕТКАМ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(57) Реферат:

Описываются производные бензотиофена, бензофурана, индолтиазеপিнона, оксазепинона и диазепинона. Данные гетероциклические соединения могут представлять собой активное начало фармацевтической композиции, ингибирующей клеточную адгезию или активацию ВИЧ. Кроме того, данные соединения можно применять для торможения адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам при лечении

воспалительных заболеваний, а также для лечения человека и животных, инфицированных ВИЧ.

Официальный бюллетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2002, N 5, 15.05.2002. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

U A 4 5 9 6 7 C 2

U A 4 5 9 6 7 C 2



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **45 967** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61K 31/55 A, C 07D 495/04**
B

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 96093473, 30.01.1995

(24) Effective date for property rights: 15.05.2002

(30) Priority: 07.03.1994 US 08/207,330

(46) Publication date: 15.05.2002

(86) PCT application:
PCT/US95/01275, 19950130

(72) Inventor:

Boscelli Dyane Herris, US,
Connor David Tomes, US,
Kramer James Bernard, US,
Anengst Paul Charles, US

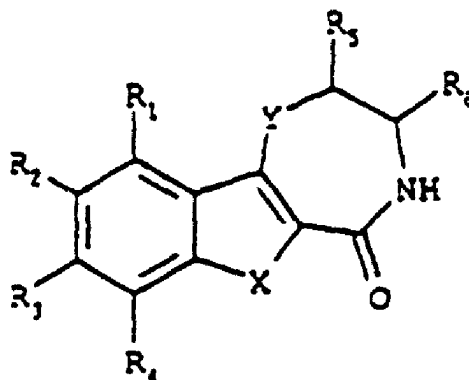
(73) Proprietor:

VERNER-LAMBERT COMPANY, US

(54) **BENZOTHIOPHENE, BENZOFURAN, INDOLETHIAZEPINONES, OXAZEPINONES AND DIAZEPINONES DERIVATIVES, CELL ADHESION AND HIV ACTIVATION-INHIBITING PHARMACEUTICAL FORMULATION, METHOD FOR INHIBITING LEUKOCYTE ADHERENCE TO VASCULAR ENDOTHELIUM, THERAPEUTIC AGENTS FOR TREATING INFLAMMATORY DISEASES AND HIV INFECTION**

(57) Abstract:

Benzothiophene, benzofuran and indolethiazepinones, oxazepinones and diazepinones of formula (I) as well as methods of preparation thereof are described as agents which inhibit leukocyte adherence to vascular endothelium and, as such, are effective therapeutic agents for treating inflammatory diseases; these compounds also inhibit the activation of human immunodeficiency virus (HIV).



Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2002, N 5, 15.05.2002. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **45 967** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **A 61K 31/55 A, C 07D 495/04 B**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
96093473, 30.01.1995

(24) Дата набуття чинності: 15.05.2002

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 07.03.1994 US 08/207,330

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 15.05.2002

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору РСТ:
PCT/US95/01275, 19950130

(72) Винахідник(и):

Боскеллі Дайен Херріс , US,
Коннор Дейвід Томес , US,
Креймер Джеймс Бернارد , US,
Аненгст Пол Чарлз , US

(73) Власник(и):

ВЕРНЕР-ЛАМБЕРТ КОМПАНІ, US

(54) ПОХІДНІ БЕНЗОТІОФЕНУ, БЕНЗОФУРАНУ, ІНДОЛТІАЗЕПІНОНУ, ОКСАЗЕПІНОНУ І ДІАЗЕПІНОНУ, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО МАЄ ІНГІБУЮЧУ КЛІТИННУ АДГЕЗІЮ АБО ВІЛ АКТИВНІСТЬ, СПОСІБ ГАЛЬМУВАННЯ АДГЕЗІЇ ЛЕЙКОЦИТІВ ДО ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН ПРИ ЛІКУВАННІ ХВОРОБ, ЩО ВИЗВАНІ НЕЮ, СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ССАВЦІВ, ЩО ЗАРАЖЕНІ ВІЛ

(57) Реферат:

Описано похідні бензотіофену, бензофурану, індолтіазепінону, оксазепінону і діазепінону. Зазначені гетероциклічні сполуки можуть гальмувати адгезію лейкоцитів до ендотелію судин

і завдяки цьому можуть бути ефективними терапевтичними агентами для лікування запальних процесів. Крім того, ці сполуки можуть також інгібувати активацію вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ).

U A 4 5 9 6 7 C 2

U A 4 5 9 6 7 C 2

Опис винаходу

Изобретение относится к новым гетероциклическим соединениям, обладающим биологической активностью, более конкретно к производным бензотиофена, бензофурана, индолтиазепинона, оксазепинона и диазепинона, фармацевтической композиции, обладающей ингибирующей клеточную адгезию или ВИЧ активностью, способу торможения адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам при лечении вызванных ею болезней и способу лечения млекопитающих, зараженных ВИЧем.

Адгезия лейкоцитов к сосудистому эндотелию является неотъемлемой частью патогенеза воспаления. Процесс адгезии предшествует трансэндотелиальной миграции лейкоцитов в окружающую ткань и последующему повреждению ткани. От соединений, способных к торможению этого начального адгезионного взаимодействия, ожидают эффективность при лечении воспалительных заболеваний, таких, как, например, ревматоидный артрит, остеоартрит, астма, псориаз. Другие показания включают, например, респираторный дистресс-синдром у взрослых, травму в связи с повторной перфузией, ишемию, язвенный колит, васкулит, атеросклероз, воспалительную кишечную болезнь и метастазы опухолей.

Рецепторы адгезии можно подразделять на три главные семьи: селектины, суперсемейство иммуноглобулинов и интегрины (см. "Nature", 345:426 (1990)). Члены всех трех классов содействуют адгезии лейкоцитов во время воспаления (отн. обзоров см. "Thrombosis and Hemostasis", 65(3); 223 (1991); "Clinical and Experimental Allergy", 20:619 (1990); "Transplantation", 48:727 (1989); "Biochemical Pharm.", 40(8):1683 (1990)). Молекула-1 адгезии лейкоцитов к эндотелию (в дальнейшем: "Е-селектин") является членом семьи служащих в качестве селектина гликопротеинов, способствующих межклеточной адгезии. В литературе есть сведения о максимальной экспрессии Е-селектина на поверхности эндотелиальных клеток через 4 часа после стимуляции эндотелиальных клеток цитокинами, такими, как, например, интерлейкин-1, фактор а некроза опухолей или другие медиаторы воспаления как, например, липополисахариды (см. "Pro. Nat. Acad. Sci.", 34:9238 (1987)).

Молекула-1 межклеточной адгезии (в дальнейшем: "ICAM-1") является членом суперсемейства иммуноглобулинов. Максимальная экспрессия наблюдается через 12 - 24 часа после стимуляции. Есть сведения о том, что через 4 часа после стимуляции эндотелиальных клеток медиатором воспаления и Е-селектин, и ICAM-1 находятся на клеточной поверхности (см. "J. Clin. Invest.", 82:1746 (1988); "J. Immun.", 131:1893 (1986); "Blood", 78:2721 (1991)).

Бензотиофен, бензофуран и индолтиазепиноны, оксазепиноны и диазепиноны данного изобретения тормозят адгезию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам пупочной вены человека, стимулированным фактором а некроза опухолей в рамках испытания ин витро.

Настоящее изобретение также относится к новым тиазепинонам, оксазепинонам и диазепинонам для лечения зараженных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) пациентов путем торможения активации ВИЧа, являющегося латентным в зараженных лицах.

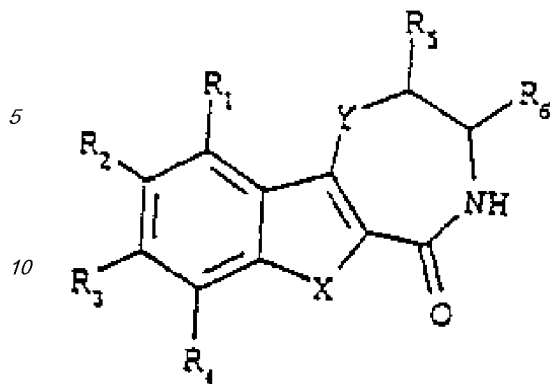
Патогенез вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) является сложным и пока полностью не выявлен. Жизненный цикл вируса теоретически разделяют на афферентные и эфферентные компоненты. Связывание, слияние, обратная транскрипция и, в заключение, интеграция вируса являются событиями афферентного компонента жизненного цикла. Именно афферентные компоненты жизненного цикла ВИЧа отвечают за первичную инфекцию индивидуума ВИЧем, после чего обычно наблюдается вспышка вiremии с клиническими симптомами или же без них.

Было разработано множество терапевтических стратегий с целью вмешательства в афферентные события (см., например, Н. Mitsuya, S. Broder, "Inhibition of the In Vitro Infectivity and Cytopathic Effect on Human T-lymphotropic Virus Type III/lymphadenopathy Virus-associated Virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-Dideoxynucleosides", Proc. Natl. Sci. (USA), 83:1911 - 1915 (1986)).

В то время, как разные стадии афферентного компонента позволяют эффективное терапевтическое вмешательство, становилось все более очевидным, что вмешательство лишь в этот период недостаточно. После заражения ВИЧем и прогрессирования болезни по афферентным стадиям индивидуум переживает продолжительный период клинической латентности, который может длиться несколько лет, и индивидуум является здоровым. В этот момент достигается низкая или нулевая степень вiremии и вирусной репликации в периферических клетках крови. Позже, однако, болезнь в конечном счете прогрессирует до угрожающей жизни иммуносупрессии (СПИД), способ лечения которой не известен. Эти более поздние события представляют собой клинические проявления эфферентных стадий заражения ВИЧем.

Эфферентный компонент жизненного цикла ВИЧа включает события, необходимые провирусу ВИЧа для успешной транскрипции, трансляции, сборки и продукции вирионов. Начало событий, необходимых для прогрессирования ВИЧ-зараженных клеток от бессимптомной, непроявляющей ВИЧ стадии к симптоматической, проявляющей ВИЧ стадии называют активацией. В настоящее время эфферентный компонент и клеточная основа активации полностью не выявлены. Несмотря на это, разработка новых терапевтических средств и стратегий и их применение во время клинически бессимптомного периода в целях борьбы с прогрессированием к СПИДу может вселять определенную надежду предполагаемому числу одного миллиона зараженных, но клинически латентных, индивидуумов.

С учетом вышеизложенного первым объектом изобретения являются производные бензотиофена, бензофурана, индолтиазепинона, оксазепинона и диазепинона формулы (I)



15 где

R₁, R₂, R₃ и R₄ независимо друг от друга означают водород, гидроксил, низший алкил, низший алкоксил,

R₅ и R₆ независимо друг от друга означают водород или низший алкил,

X - группа S(O)_n или NH,

Y - кислород, группа S(O)_n или NH,

n - 0, 1 или 2, при условии, что

20 1) если X означает группу NH, Y означает группу NH, R₁ означает водород и R₃ - водород, то R₂ не означает метил,

2) если X означает группу NH, Y означает группу NH, R₁, R₃ и R₄ означают водород, то R₂ не означает метоксил или этоксил, и

25 3) если X означает группу NH, Y означает серу, то по меньшей мере один из радикалов R₁, R₃ и R₄ не означает водород, или их фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли.

Вторым объектом изобретения является фармацевтическая композиция, обладающая ингибирующей клеточную адгезию или ВИЧ активностью, содержащая активное начало и фармацевтически приемлемый носитель, которая содержит терапевтически эффективное количество соединения вышеприведенной формулы (I) и фармацевтически приемлемый носитель.

30 Третьим объектом изобретения является способ торможения адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам при лечении вызванных ею болезней, который заключается в том, что включает введение терапевтически эффективного количества предлагаемой фармацевтической композиции в виде дозирочной единицы. Предпочтительный вариант данного способа заключается в том, что лечению подвергается воспалительная

35 Четвертым объектом изобретения является способ лечения млекопитающих, т.е. человека или животного, зараженных ВИЧем, который заключается в том, что включает введение терапевтически эффективного количества предлагаемой фармацевтической композиции в виде дозирочной единицы.

Соединения вышеприведенной формулы (I) относятся к категории малотоксичных веществ.

40 Фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли соединений формулы (I) включают соли неорганических кислот, таких, как, например, хлористоводородная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота, серная кислота, бромистоводородная кислота, йодистоводородная кислота, фтористоводородная кислота, фосфористая кислота, а также соли нетоксических органических кислот, таких, как, например, алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенил-замещенные алканкарбоновые кислоты, оксиалканкарбоновые кислоты, алкандикарбоновые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфокислоты. В качестве примеров таких солей можно назвать сульфат, пиросульфат, бисульфат, сульфит, бисульфит, нитрат, фосфат, вторичный фосфат, первичный фосфат, метафосфат, пиррофосфат, хлорид, бромид, йодид, ацетат, трифторацетат, пропионат, каприлат, изобутират, оксалат, малонат, сукцинат, суберат, себакат, фумарат, малеат, манделат, бензоат, хлорбензоат, метилбензоат, динитробензоат, фталат, бензолсульфонат, толуолсульфонат, фенилацетат, цитрат, лактат, малеат, тартрат, метансульфонат. Кроме того, можно применять соли аминокислот, например аргинат и тому подобному, а также глюконат, галактуронат, N-метилглутамин (см., например, С. М. Берге и др., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 66: 1 - 19 (1977)).

55 Кислотно-аддитивные соли приведенных основных соединений получают путем контактирования свободного основания с достаточным количеством желаемой кислоты с получением соли стандартным образом. Свободное основание можно высвобождать путем контактирования соли с основанием и выделением свободного основания стандартным образом. Свободные основания немного отличаются от их соответствующих солей по некоторым физическим свойствам, например, по растворимости в полярных растворителях, но в остальном биологические свойства солей являются эквивалентными соответствующему свободному основанию.

60 Некоторые из соединений данного изобретения могут иметься и в несольватированных формах, и в сольватированных формах, включая гидрированные формы. В общем сольватированные формы, включая гидрированные формы, являются эквивалентными несольватированным формам и все указанные формы охватываются настоящим изобретением.

Предпочтительными соединениями формулы (I) являются те, у которых R₁, R₃ и R₄ означают водород.

65 Кроме того, предпочтительными соединениями формулы (I) являются еще те, у которых R₁, R₃ и R₄ означают водород, R₂ означает водород или низший алкоксил, X означает группу S(O)_n или NH, Y означает

кислород или группу S(O)n, а n означает 0, 1 или 2.

В частности предпочитают соединения из группы, включающей:

2,3-дигидро-9-метокси-[1]-бензотиено[2,3-f]-1,4-тиазепин-5(4H)-он,
2,3-дигидро-9-метокси-[1]-бензотиено[2,3-f]-1,4-оксазепин-5(4H)-он, 2,3-дигидро-9-метокси-[1]-
бензотиено[2,3-f]-1,4-тиазепин-5(4H)-он-1 -оксид,

3,4-дигидро-9-метокси-6-метил-2H-1,4-оксазепино[6,7-b]-индол-5(6H)-он, 2,3-дигидро-1
H-бензотиено-[3,2-e]-1,4-дiazепин-5-он, 2,3-дигидро-9-метокси-1H-бензотиено-[2,3-f]-1,4-оксазепин-5-он,
2,3-дигидро-9-метокси-6-оксид-1H-бензотиено-[2,3-f]оксазепин-5-он,

2,3-дигидро-9-метокси-2-метил-1H-бензотиено-[2,3-f]-1,4-оксазепин-5-он.

При определении показания к ингибитору клеточной адгезии или ингибитору активации ВИЧа лечащий врач будет учитывать, конечно среди прочего, соответствующее состояние пациента, серьезность состояния, а также возраст, пол, вес и т.п.

Для достижения терапевтического эффекта необходимое количество соединения формулы (I) или его фармакологически приемлемой кислотно-аддитивной соли конечно варьируется в зависимости от соответствующего соединения, пути введения средства, проходящего курс лечения пациента, определенного расстройства или соответствующей болезни. Предпочтительный вариант изобретения охватывает метод лечения лиц, страдающих от воспалительной болезни, такой, как, например артрит или припухлость, включающий дачу соединения в эффективном противовоспалительном количестве. Подходящей дозой соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой кислотно-аддитивной соли для пациента, страдающего или предрасположенного к страданию от любого из вышеописанных состояний, является 0,1мкг - 500мг соединения на килограмм веса тела. В случае системной дачи доза может составлять 0,5 - 500мг соединения на килограмм веса тела, предпочтительно 0,5 - 50мг/кг веса тела пациента два - три раза в день. В случае местного применения, например, на коже или на глазах, подходящая доза может составлять 0,1нг - 100мкг соединения на килограмм, обычно приблизительно 0,1мкг/кг.

В случае оральной дачи соединения для лечения или профилактики артрита или воспаления, вызванных любой причиной, подходящая доза соединения формулы (I) или его физиологически приемлемой кислотно-аддитивной соли может быть той же самой, что и в предыдущем абзаце, но предпочтительно применяют 1 - 10мг соединения на килограмм, а более предпочтительно 1 - 5мкг/кг веса тела пациента, например, 1 - 2мкг/кг.

Само собой разумеется, что специалист в данной области (врач или ветеринар) будет определять и прописывать эффективное количество соединения для предотвращения или прекращения прогрессирования соответствующего состояния. При этом, врач или ветеринар может поступать так, что в начале курса лечения дает относительно низкие дозы, после чего повышает дозу до достижения максимальной реакции.

Активное начало можно, правда, давать отдельно, но предпочтительно дают его в виде фармацевтической композиции, включающей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую кислотно-аддитивную соль и фармацевтически приемлемый носитель. Такие композиции являются дополнительным объектом настоящего изобретения.

Для применения в области ветеринарии, а также в области медицины композиции данного изобретения содержат активное начало вместе с фармацевтически приемлемым носителем и, факультативно, другой (другие) терапевтический(ие) ингредиент(ы). Носитель(и) должен(ны) быть "приемлемым(и)" в том смысле, что он(и) должен(ны) быть совместимым(и) с другими ингредиентами композиций и неврежденным(и) для пациента.

Композиции включают препараты, пригодные для орального, легочного, глазного, ректального, парентерального (включая подкожного, внутримышечного и внутривенного), внутрисуставного, местного, носового или трансбуккального введения. Такие композиции включают известные препараты длительного или продленного действия.

Композиции можно выпускать в виде препарата, включающего дозировочные единицы. Их можно получать любым известным в области фармацевтики способом. Эти способы могут охватывать стадию контактирования активного начала с носителем, представляющим собой по меньшей мере одно вспомогательное вещество. Обычно композиции получают путем равномерного и гомогенного контактирования активного начала с жидким носителем и/или тонкоизмельченным твердым носителем и, в случае необходимости, переведения продукта в желаемый препарат.

Пригодные для оральной аппликации препараты согласно изобретению могут иметься в виде дискретных единиц, таких, как, например, капсулы, крахмальные капсулы, таблетки, лепёшки, содержащие predetermined количество активного начала; в виде порошка или гранул; в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости; или же в виде эмульсии типа масла в воде или эмульсии типа воды в масле. Активное начало может также иметься в виде болюса, электуария или пасты.

Пригодность соединений данного изобретения в качестве ингибиторов адгезии лейкоцитов к васкулярному эндотелию и, следовательно, пригодность для лечения связанных с воспалением болезней или состояний можно определять на основе их эффективности в рамках различных стандартных испытаний. В нижеследующем приведены описание хода анализов и результаты испытаний.

Испытание экспрессии молекулы-1 межклеточной адгезии и E-селектина в эндотелиальных клетках пупочной вены человека

Клеточная культура

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (поставляемые фирмой Клоне-тике) в склянках T-25 культивируют в течение 1 - 3 дней при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% двуокиси углерода.

Потом клетки расщепляют путем обработки 10мл раствора, содержащего 0,025% трипсина и 0,01% эти-лендиаминотетрауксусной кислоты (далее: "ЭДТУК"), в течение 5 - 10 секунд. После декантирования промывочного раствора добавляют еще 10мл раствора трипсина и ЭДТУК и клетки перемешивают в течение 2 - 4 минут, слегка ударяя резинкой по стенке склянки. Затем содержимое склянки подают в пробирку для центрифугирования емкостью 50мл, содержащую 40мл среды. Среда представляет собой эндотелиальную базальную среду (поставляемую фирмой Клонетике), содержащую 2мг/л гидрокортизона, 0,05мкг/л эпидермального фактора роста, 12мг/л экстракта бычьего мозга и 6%-ную термически инактивированную фетальную телячью сыворотку (поставляемую фирмой Хайклон). Клетки центрифугируют при 15°С в течение 10 - 15 минут, надсадочную жидкость удаляют и клетки ресуспендируют в свежей среде. Клетки вышеописанным образом еще раз обрабатывают, после чего их высеивают в пластинку с 96 чашками.

Стимулирование цитокином

Через 5 дней после достижения слияния клетки стимулируют фактором α некроза опухолей (поставляемым фирмой Гензайм) для получения окончательной концентрации среды, равной 140единиц/мл и инкубируют при 37°С в течение 4 часов. Потом среду удаляют из инкубатора и хранят для анализа производства хемокина. Клетки три раза промывают фосфатсодержащим буфером солевого раствора, не содержащего кальция или магния. Затем монокультуры фиксируют путем добавления к чашкам буферсодержащего 10%-ного формалина в течение 15 минут. Потом клетки три раза промывают модифицированной по способу Дульбекко средой Игла (далее: "среда ДМЕМ") (поставляемой фирмой Гибко), содержащей 2% альбумина бычьей сыворотки, и хранят в холодильнике в течение ночи.

Твердофазный иммуноферментный анализ

Мышиные моноклональные античеловеческие молекулы-1 межклеточной адгезии (поставляемые фирмой R & D Systems, кат. № BBA-4) или мышинный моно-клональный античеловеческий E-селектин (фирмы R & D Systems, кат. № BBA-2) растворяют в среде ДМЕМ, содержащей 2% альбумина бычьей сыворотки. Указанные молекулы-1 или E-селектин в концентрации 0,5мкг/мл добавляют к каждой чашке и инкубируют при 37°С в течение 2 часов. Монокультуры 4 раза промывают средой ДМЕМ, содержащей 2% альбумина бычьей сыворотки. Добавляют разведенный в соотношении 1: 3000 конъюгированный пероксидазой выделившийся из овца противомышиный иммуноглобулин (поставляемый фирмой Каппел) и инкубируют при 37°С в течение часа. Клетки четыре раза промывают средой ДМЕМ. Затем к зафиксированным клеткам добавляют окрашивающий реактив и инкубируют 15 минут при комнатной температуре. Реакцию прекращают добавлением 2%-ного раствора щавелевой кислоты. Абсорбция составляет 414нм на аппарате для чтения титрационных пластинок.

Испытание соединений

Соединения растворяют в диметилсульфоксиде при концентрации 30ммоль и разбавляют средой для достижения конечной концентрации. К клеткам добавляют растворенное в среде соединение за 30 минут до стимуляции фактором α некроза опухолей. Абсорбцию нестимулированных клеток вычитают из значений абсорбции стимулированных фактором α некроза опухолей клеток перед определением процента торможения. Процент торможения определяют путем сравнения абсорбции обработанных только носителем соединений клеток (контрольный опыт) с клетками, обработанными исследуемым соединением. Значения KT_{50} определяют с помощью линейно-регрессионного анализа.

Метод определения торможения адгезии нейтрофилов человека к стимулированным фактором α некроза опухолей эндотелиальным клеткам пупочной вены человека

Клеточная культура

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека второго пассажа (поставляемые фирмой Клонетикс Корпорейшн, Сан Диего, Калифорния, CC-2617) высеивают в пластинки с 96 чашками (поставляемые фирмой Корнинг гласе вёркс, Корнинг, Нью-Йорк) плотностью приблизительно 5×10^3 клеток на чашку и выращивают до слияния в полной эндотелиальной базальной среде (EBM, MCDB, поставляемой фирмой Клонетикс), содержащей 10нг/мл эпидермального фактора роста, 1мкг/мл гидрокортизона, 0,4% экстракта бычьего мозга и 6%-ную фетальную телячью сыворотку. За один день до проведения испытания, обычно через 3 дня после высевания клеток, к культурам добавляют еще 0,2мл полной эндотелиальной базальной среды на чашку.

Изготовление испытуемых соединений

Испытуемые соединения переводят в маточный раствор объемом 10мл, концентрация которого составляет 1,0ммоль. Сначала соединения солибилизируют в 0,1мл диметилсульфона, после чего добавляют 9,9мл полной эндотелиальной базальной среды. Затем испытуемые соединения в одну стадию разбавляют до достижения концентрации 66,6мкм. Операции солибилизации и разбавления осуществляют в полистирольных сосудах.

Стимулирование эндотелиальных клеток пупочной вены человека Рекомбинантный человеческий фактор α некроза опухолей (поставляемый фирмой Гензайм, Бостон, Массачусетс, код TNF-H) получают в концентрации, равной 400единиц/мл в полной эндотелиальной базальной среде. Маточный раствор фактора α некроза опухолей состоит из 20000единиц/мл фосфатсодержащего буфера солевого раствора (PBS, поставляемого фирмой Гибко, Грэнд Айленд, Нью-Йорк) и 0,1% альбумина бычьей сыворотки. Его хранят при температуре -70°С. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека один раз промывают 0,2мл теплой неполной эндотелиальной базальной среды, после чего их стимулируют фактором α некроза опухолей, взятым в концентрации 200единиц/мл, в присутствии 33,3мкм испытуемого соединения при температуре 37°С в течение 4 часов. Эту операцию осуществляют путем добавления 0,1мл фактора α некроза опухолей, взятым в концентрации 400единиц/мл, и 0,1мл (66,6мкм) испытуемого соединения. Вещества добавляют медленно для

предотвращения разрыва монослоя эндотелиальных клеток. Каждое соединение испытывают в шести чашках. Кроме того, в каждой пластинке проводят контрольный опыт с нестимулированными клетками и опыт с клетками, стимулированными фактором а некроза опухолей без обработки испытуемым соединением.

Мечение нейтрофилов

За час до добавления нейтрофилов к эндотелиальным клеткам нейтрофилы в концентрации 5×10^6 /мл подвергают мечению 5мкм кальцеина-АМ (поставляемого фирмой Молекулар Пробе, Юджин, Орегон) в сбалансированном солевом растворе Хэнкса, содержащем 0,45% альбумина бычьей сыворотки, при температуре 37°C в течение 30 минут. Маточный кальцеин получают в концентрации 5ммоль в безводном диметилсульфоксиде, высушивают и хранят при -20°C. После инкубации клетки два раза промывают холодным сбалансированным солевым раствором Хэнкса и ресуспендируют до конечной концентрации, равной 1×10^6 клеток/мл в полной эндотелиальной базальной среде.

Добавление нейтрофилов к эндотелиальным клеткам

После четырехчасового стимулирования и непосредственно до добавления нейтрофилов к монослою эндотелиальных клеток пластинки обрабатывают 0,2мл теплой неполной эндотелиальной базальной среды для удаления фактора а некроза опухолей и испытуемого соединения. К каждой обрабатываемой чашке медленно добавляют нейтрофилы (1×10^5 клеток) и инкубируют при 37°C в течение 30 минут. Потом пластинки два раза промывают 0,2мл теплой неполной эндотелиальной базальной среды, после чего добавляют еще 0,1мл среды для сканирования пластинки.

Определение относительной флюоресценции

Относительную флюоресценцию определяют с помощью системы Millipore Cytofluor 300 (возбуждение = 480, эмиссия = 530, чувствительность = 4).

Расчеты

Испытание считается действительным, если стимулирование клеток фактором а некроза опухолей приводит к 300%-ному повышению адгезии нейтрофилов по сравнению с нестимулированными клетками. Результаты приведены в процентах торможения стимулированной фактором а некроза опухолей адгезии.

$$\% \text{ торможения} = 100 - \frac{\text{стимулированная адгезия (испытуемое соединение)} - \text{нестимулированная адгезия}}{\text{стимулированная адгезия (контроль)} - \text{нестимулированная адгезия}}$$

Некоторые соединения согласно изобретению подвергали испытанию в концентрациях 33,3мкмоль, 10,0мкмоль, 3,3мкмоль и 1,0мкмоль для определения средних значений KT_{50} , которые определялись с помощью линейно-регрессионного анализа.

Результаты испытаний соединений согласно изобретению приведены в таблице I.

Было найдено, что соединения согласно изобретению, в частности соединения формулы (III), тормозят активацию вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), являющегося латентным в зараженных людях и животных, и, следовательно, являются пригодными для лечения СПИДа.

Попытки понять вирусные и клеточные основы клинического бессимптомного периода показывают, что ВИЧ представляет собой покоящийся или неэкспри-мирующийся провирус в популяции хронически зараженных клеток. Специфический вид вируса ВИЧ, ВИЧ-1, подвергали ряду различных испытаний, в результате которых стало ясно, что вирус является покоящимся или неэкспримирующимся провирусом в популяции хронически зараженных Т-лимфоцитов. Однако, в рамках данных испытаний не излагаются подробности ядерных и биохимических механизмов, которые являются основой латентного вирусного состояния. О подробной информации см. статью Беднарника и др. "Mechanisms of HIV-1 Latency" в журнале Aids, № 6, стр. 3 - 16, 1992 г.

Вплоть до недавнего времени предполагалось, что во время клинического бессимптомного периода ВИЧ является покоящимся или неэкспримирующимся во всех популяциях хронически зараженных клеток. Вследствие наблюдений низких или отсутствующих степеней вирусемии и репликации вируса в периферических гемоцитах предполагалось, что ВИЧ не является активным во время клинического бессимптомного периода. Однако, было найдено, что настоящего скрытого состояния во время заражения вирусом ВИЧ не существует (см. статью Фоки и др., "HIV Infection is Active and Progressive in Lymphoid Tissue During the Clinically Latent Stage of disease", в журнале Nature, № 362, стр. 355 - 358, 1993 г.).

Во время клинического скрытого состояния наблюдается дихотомия между степенями вирусного груза и репликации вируса в периферических гемоцитах по отношению к лимфатическим органам. На основе данных наблюдений было установлено, что периферические гемоциты не точно отражают настоящую стадию заболевания вирусом ВИЧ, в частности в начале клинического хода ВИЧ-инфекции. На самом деле, заболевание вирусом ВИЧ является активным и развивается, даже в таком случае, если активность, измеряемая в периферических гемоцитах вирусными показателями, низкая и пациент находится в клиническом скрытом состоянии.

Неизбежно, стадия заболевания развивается начиная с клинически латентного бессимптомного периода до экспрессионного и активного симптомного периода. Согласно Бутера и др. (см. AIDS, № 6, стр. 994, 1992 г.), были разработаны различные клеточные модели, которые при обработки цитокинами могут экспримировать ВИЧ-1. Значит, что на стадии микробиологического скрытого состояния ВИЧ-1 начинает репликацию только

после получения внеклеточного сигнала. Этот сигнал может быть вызван не только взаимодействием растворимого цитокина с рецептором, но и межрецепторным взаимодействием, происходящим во время межклеточной коммуникации или воздействия на клетки ультрафиолетовым излучением или температурным шоком. Кроме того, внеклеточный сигнал может быть вызван аутокринным или паракринным способом, так что активированная вирусом ВИЧ-1 клетка может продолжать экспримироваться и одновременно активировать смежную латентную клетку.

Предполагается, что и дополнительные факторы участвуют в активации вируса ВИЧ. Было установлено, что применение 12-О-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетата приводит к снижению количества рецепторов CD4 и к вирусной экспрессии в зараженных вирусом ВИЧ клетках (см. Хамамото и др. в журнале *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, № 164, стр. 339 - 344, 1989 г.). Интересно, что Хамамото исследовал также эффект высокоактивных ингибиторов протеинкиназы С, таких, как, например, стауроспорин, Н-7, UCN-01, на вызываемое 12-О-тетрадеcanoилфорбо-13-ацетатом снижение количества рецепторов CD4 и повышение экспрессии ВИЧ. Найдено, что стауроспорин представляет собой эффективный ингибитор как снижения количества рецептора CD4, так и экспрессии вируса ВИЧ.

Клеточные пути, передающие сигнал активации от плазматической мембраны к вирусу, что приводит к экспрессии ВИЧ-1, менее известны. Недавно, на симпозиуме National Cooperative Discovery Grant (NCDDG)/AIDS, состоявшемся 3 - 7 ноября 1991 г., П. Феорино, С.Т. Бутера, Т.М. Фолкс и Р.Ф. Шинаци сообщили о разработке надежной и простой системы определения соединений, способных предотвращать активацию латентного вируса ВИЧ. Испытательная система включает клеточную линию OM-10.1, т.е. уникальный хронически зараженный промиелоцитарный клон, который сохраняет уровень рецептора CD4 + до активации ВИЧ-1 фактором а некроза опухолей. Экспрессия рецептора CD4 + на поверхности клеток, а также активность обратной транскриптазы используют для определения экспрессии вируса.

Альтернативно, для определения экспрессии вируса ВИЧ можно применять и активность протеазы. Клетки OM-10.1 сохраняют уровень рецептора CD4 + до активации вируса и реагируют на индукцию фактора а некроза опухолей. Поэтому эти культуры используют для удобного и быстрого исследования фармакологических свойств соединений в отношении их способности предотвращать снижение количества рецептора CD4 + на поверхности клеток и экспрессию вируса ВИЧ.

Исследовали ряд соединений, проявляющих антивирусную активность в отношении остро или хронически зараженных клеток, проверяя их способность тормозить экспрессию вируса ВИЧ в клетках OM-10.1. Кроме того, исследовали ряд соединений, которые взаимодействуют с биохимическими путями, которые могут отрицательно влиять на реактивацию. Результаты исследования были показаны на плакате, представленном на симпозиуме NCDDG/AIDS, состоявшемся 3-7 ноября 1991 г. в Сан Диего в шт. Калифорния, США. Из числа приблизительно 48 исследованных соединений низкодоступными ингибиторами активации ВИЧ-1 считают 3'-фтор-3'-деокситимидин, интерферон γ и десферри-оксамин.

Охватываемое формулой (I) соединение, 2,3-дигидро-9-метокси-[1]бензотиено[2,3-f]-1,4-тиазепин-5(4H)-он, в концентрации 0,21мкМ проявляет 50%-ное торможение в клетках OM-10.1 (см. таблицу 1).

Предлагаемые" соединения проявляют активность и в обычных опытах *in vivo*, в которых измеряют способность веществ предотвращать втекание нейтрофилов, и соответственно их полезность для лечения воспалений. В одном опыте крыс-самцов типа Вистар весом в 220 - 245г не кормят в течение 16 - 18 часов. Им внутривенно дают буфер (смесь этанола и солевого раствора в соотношении, равном 1:1) или предлагаемое соединение в буфере. Крыс слабо анестезируют диэтиловым эфиром, им дают внутривенную инъекцию раствора 2,5мг альбумина бычьей сыворотки в солевом растворе. Непосредственно после внутривенной инъекции делают маленький разрез между ребрами и с помощью подходящей иглы в плевральную полость инъецируют раствор 0,2мл выделенного из кроличего иммуноглобулина G антиальбумина бычьей сыворотки в фосфат-содержащем солевом растворе (концентрация: 10мг/мл солевого раствора).

Затем разрез закрывают зажимом из нержавеющей стали размером в 9мм. Через 4 часа крыс умерщвляют с помощью двуокиси углерода и плевральную полость промывают 2мл 0,325%-ного раствора красного фенола в фосфатсо-держателем солевом растворе. Выходящий из плевральной полости поток буфера подвергают анализу. Лейкоциты (> 90% нейтрофилов) подсчитают счетчиком фирмы Каультер. Объем выходящего потока буфера измеряют способом разведения с применением красителя (см. статью Г.В. Картера и др. в журнале "J. Pharm. Pharmacol.", № 34, стр. 66 - 67, 1982г.). Животных, которым дали предлагаемое соединение, сравнивают с животными, которым дали только буфер. При этом статистическую значимость активности испытуемых соединений определяют с помощью t-опыта по Стьюденту.

Результаты данного анализа, которому подвергают соединение примера 1, приведены в таблице 2.

В другом опыте *in vivo* мышей-самок типа Balb/c помещают в клетках группами по семи. Во время проведения опыта мыши имеют свободный доступ к пище и воде. Им орально дают носитель (0,5%-ный раствор гидроксипропилметилцеллюлозы, содержащий 0,2% Твина 80) или предлагаемое соединение, растворенное или суспендированное в указанном носителе. Через час после оральной подачи мышей анестезируют путем ингаляции диэтилового эфира и им внутрибрюшинно инъецируют 1,0мл 3%-ного тиогликолата в солевом растворе. Через 2 часа после инъекции тиогликолата мышей умерщвляют с помощью двуокиси углерода и им инъецируют 6мл фосфатсодержащего солевого раствора, содержащего 10ед./мл гепарина натрия и 0,1% альбумина бычьей сыворотки. Брюшинную полость массируют и разрезают и вытекающую жидкость собирают в центрифужных пробирках емкостью в 15мл. От каждой мыши берут аликвотную пробу и с помощью счетчика фирмы Каультер (модель ZBi, поставляемая фирмой Каультер Инструменте, г. Hialeah, шт. Флорида, США) подсчитают общее количество клеток в каждой аликвотной пробе. Берут другую аликвотную пробу с целью ее

исследования под микроскопом с последующим окрашиванием модифицированным красителем фирмы Райт. С помощью гематологического анализа определяют процентное количество нейтрофилов, вытекших в брюшинную полость.

В данном опыте соединение примера 1 проявляет следующее торможение втекания нейтрофилов: 26,1% при концентрации 10мг/кг, 31,9% при концентрации 30мг/кг, и, соответственно, 34,3% при концентрации 100мг/кг.

Предлагаемые соединения могут получаться следующими способами.

Согласно первому способу в качестве исходных соединений применяют 3-ги-дрокси-, 3-тиол-, 3-аминобензо[б]тиофен-, бензофуран- или индол-2-карбокси-лат 1 (схема 1). Сложные эфиры 3-гидрокси-бензо[б]тиофена-2 получают по способу, описанному Коннором и др. в журнале J. Med. Chem., № 35, стр. 958, 1992 г. 3-тиобензо[б]тиофен-2-карбоксилат получают взаимодействием соответствующего 3-хлор-производного (см. Коннор и др. в журнале J. Med. Chem., № 35, стр. 958, 1992 г.) с тиаоацетамидом в присутствии основания, такого, как 1,8-диазабцикло[5.4.0]-ундек-7-ен, в среде растворителя, такого, как N.N'-диметилформамид или тетрагидрофуран. 3-аминобензо[б]тиофен-2-карбоксилат получают по общеизвестному методу, описанному Бекком в журнале J. Org. Chem., № 37, стр. 3224, 1972 г. 3-гидроксииндол-2-карбоксилат получают известными способами, описанными, например, Унангстом и др. в журнале J. Heterocyclic Chem., № 24, стр.811, 1987г., и Мойером и др. в журнале J. Org. Chem., № 51, стр. 5106, 1986 г. 3-тиоиндол-2-карбоксилат получают по известным методам, описанным, например, Унангстом и др. в журнале J. Heterocyclic Chem., № 24, стр. 811, 1987 г., Аткинсоном и др. в журнале Synthesis, стр. 480, 1988 г., Нагараяном и др. в журнале Indian J. Chem., № 20В, стр. 672, 1981 г. 3-аминоиндол-2-карбоксилат получают известными способами, описан-ыми С.В. Симаковым и др. в Химико-Фармацевтическом Журнале, № 17, стр. 1183, 1983 г.

Схема 1 поясняет превращение соединений 1 до предлагаемых соединений. Сложные эфиры подвергают взаимодействию с производным замещенного а-галогеном ацетонитрила, таким, как бромацетонитрил, в присутствии основания, как трет.-бутилата калия, в тетрагидрофуране, ацетонитриле или диметил-сульфоксиде при температурах 0 - 80°C. Получают сложные эфиры 2. Нитрил восстанавливают до соответственного первичного амина и получаемый при этом промежуточный продукт 3 циклизуют с получением лактама 4. Предпочтительной реакцией является гидрирование сложных эфиров 2 на кобальтовом катализаторе типа Ренея в среде растворителя, такого, как тетрагидрофуран, в присутствии основания как триэтиламина, при повышенных температурах и под давлением. В таких условиях сложные эфиры 2 превращаются непосредственно до лактама 4. В случае предварительного выделения промежуточный продукт 3 циклизуют до лактама 4 в основных условиях, предпочтительно в присутствии метилата натрия в метаноле, или в кислотных условиях, предпочтительно в присутствии полифосфорной кислоты, при повышенных температурах.

При синтезе некоторых предлагаемых соединений необходимо или желательнее переводить реакционноспособные группы, как гидроксил, amino или карбоксил, в производные, защищающие их от нежелательных побочных реакций. Защитные группы снимают с гидроксила, amino-группы или карбоксила стандартными методами. Общепринятые химические группы, способные защищать реакционноспособные группы, как гидроксил, amino и карбоксил, а также методы их введения в молекулу и последующего снятия описаны Грином и Бутсом в источнике "Protective Groups in Organic Synthesis", из-во Джон Уайлей & Соне, Инк., Нью-Йорк, 1991 г.

Так, например, 3-амино-, 3-гидрокси- или 3-тиоиндол, бензотиофен или бен-зофуран (соединение 1 в схеме 1) можно подвергать взаимодействию с β-галогенэтиленамином, причем amino-группа защищена пригодным остатком, таким, как трет.-бутоксикарбонил или бензилоксикарбонил. При осуществлении реакции в вышеуказанных условиях получают соединения 5. Снятием защитных групп в соединении 5 общеизвестными способами, такими, как применение трифторуксусной кислоты или водной кислоты в случае трет.-бутоксикарбони-ла, или гидрогенолиз в случае бензилоксикарбонила, получают соединения 3, которые циклизуют вышеуказанным способом. Другим способом получения соединений 3 является взаимодействие соединений 1 с этиленимином в среде спиртового растворителя (см. статью Нагараяна и др. в журнале Indian J. Chem., № 20В, стр. 672, 1981 г.).

Вторым общим способом получения соединений 4 (см. схему 2) является взаимодействие соответственных 3-галогенпроизводных 6 с этилендиамином и окисью меди в среде растворителя, такого, как пиридин, в присутствии основания, такого, как карбонат калия, с получением соединений 3, где Y означает группу NH (см. С.М. Хайермат и др. в журнале Proc. Nat. Acad. Sci., India, № 60, стр. 367, 1990 г.). Взаимодействием 3-галогенпроизводных с 2-аминоэтанолом в среде растворителя, такого, как диметилформамид, в присутствии основания, такого, как диазабциклоундекан, получают соединения 3, где Y означает серу. Взаимодействием 3-галогенпроизводных с нитроэтанолом в среде растворителя, такого, как тетрагидрофуран, в присутствии основания, такого, как трет.-бутилата калия или гидрид калия, получают соединения 7. Последующим восстановлением нитро-группы до амина получают соединения 3, где Y - кислород. В некоторых случаях соединения 3 не выделяют, а непосредственно превращают до соединений 4.

В третьем общем способе получения соединения 4 тоже используют 3-галоген-производные 6 (см. схему 3), которые подвергают взаимодействию с первичным амином, содержащим в р-положении пригодную защищенную aminoгруппу, гидроксильную или тиол-группу. Получают промежуточный продукт 7. Снятием защитной группы с последующей циклизацией получают соединения 4. В аналогичном способе осуществляется взаимодействие 3-гидроксил-, 3-тиол-или 3-амино-производного с амином, имеющим в р-положении пригодную удаляемую группу. Получаемые при этом промежуточные продукты 8 циклизуют с получением соединения 4.

Соединения 4, где X означает серу, а Y - кислород или группу NR, могут быть превращены до соответствующих сульфоксидов и/или сульфонов 9 с помощью агента окисления, такого, как хлорнадбензойная кислота, или оксазиридина, причем степень окисления зависит от условий реакции (схема 4). Аналогичным окислением соединений 4, где Y означает серу, получают либо сульфоксид, либо сульфон 10.

Условия реакций по схемам 1 - 4 широко известны или могут определяться простым образом.

Нижеследующие примеры поясняют получение соединений настоящего изобретения.

Пример 1

2,3-дигидро-9-метокси[1]бензотиено[2,3-f]-1,4-тиазепин-5(4H)-он

К 500мг (1,95ммоль) имеющего комнатную температуру раствора метил-3-хлор-5-метокси-бензо[b]тиофен-2-карбоксилата, полученного в результате взаимодействия известного 3-хлор-5-метокси-бензо[b]тиофен-2-карбонилхлорида с метанолом (см. J. Med. Chem., 35:958 (1992)) в 20мл диметилформамида добавляют сначала 885мг (7,79ммоль) 2-аминоэтантола в виде гидрохлорида, а потом 2,33мл (15,58ммоль) диазабициклоундекана. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1,5 часов, после чего нагревают до 70°C. Смесь разбавляют этилацетатом и промывают водной соляной кислотой, водой и рассолом. Органический слой сушат над сульфатом магния, фильтруют и сгущают в вакууме. Сырой продукт перекристаллизируют из смеси гексана и этилацетата с получением 2,3-дигидро-9-метокси[1]бензотиено[2,3-f]-1,4-тиазепин-5(4H)-она с выходом 74%. Т.п. 209 - 209,5°C.

Пример 2

2,3-дигидро-[1]бензотиено[2,3-f]-1,4-оксазепин-5(4H)-он

Смесь 405мг (1,64ммоль) сложного метилового эфира 3-(цианометокси)-бензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты (см. J. Hetero. Chem., 12:1037 (1975)), 0,5мл триэтиламина и 0,50г кобальта Ренея в 50мл тетрагидрофурана нагревают при 100°C в атмосфере 84,372 кг/см² водорода. Реакционную смесь сгущают в вакууме. В результате колоночной градиентной хроматографии с применением в качестве элюента сначала смеси гексана и этилацетата в соотношении 1: 1 и затем этилацетата получают 2,3-дигидро-[1]бензотиено[2,3-f]-1,4-оксазепин-5(4H)-она с выходом 55%. Т. п. 244 - 245°C.

Пример 3

2,3-дигидро-9-метокси-[1]бензотиено[2,3-1]-1,4-тиазепин-5(4H)-он-1-оксид

Смесь 200мг (0,75ммоль) 2,3-дигидро-9-метокси-[1]бензотиено[2,3-f]-1,4-тиазепин-5(4H)-она и 116мг (0,75ммоль) NaVO₃-4H₂O в 18мл уксусной кислоты перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь фильтруют, после чего к фильтрату добавляют 60мл воды. В результате фильтрации получают 2,3-дигидро-9-метокси-[1]бензотиено[2,3-f]-1,4-тиазепин-5(4H)-он-1-оксид с выходом 69%. Т. п. 215 - 216°C (разл.).

Пример 4

3,4-дигидро-9-метокси-6-метил-2H-1,4-оксазепино[6,7-b]-индол-5(6H)-он

А. Метил-3-(цианометокси)-5-метокси-1-метил-1H-индол-2-карбоксилат

Суспензию 3,2г (29ммоль) трет.бутилата калия в 60мл диметилсульфоксида обрабатывают порциями 5,6г (24ммоль) метил-3-гидрокси-5-метокси-1-метил-1H-индол-2-карбоксилата (см. Унангст и др., J. Heterocyclic Chem., 24:811 (1987)). Смесь перемешивают в течение 15 минут, после чего прикалывают 4,8мл (5,7г, 76ммоль) хлорацетонитрила. Смесь нагревают при 80°C в течение 90 минут, охлаждают и подают в 800г льда и воды. Осажденное твердое вещество фильтруют, промывают 10%-ным раствором метанола в воде и перекристаллизируют из водного ацетонитрила с получением 3,9г (60%) продукта. Т.п. 136 - 137°C.

Б.

Смесь 0,60г (2,2ммоль) метил-3-(цианометокси)-5-метокси-1-метил-1H-индол-2-карбоксилата и 0,40мл (0,29г, 2,9ммоль) триэтиламина в 35мл тетрагидрофурана в автоклаве обрабатывают 0,40г кобальта Ренея в качестве катализатора. В автоклаве создают повышенное давление с применением водорода (41,4829кг/см²) и нагревают при 80°C в течение 10 часов. Реакционную смесь охлаждают, фильтруют и фильтрат упаривают. Масляный остаток растворяют в 50мл метанола, после чего к раствору добавляют 0,80г (15ммоль) метилата натрия. Смесь нагревают с обратным холодильником в течение 3 часов, охлаждают и упаривают. Остаток распределяют между 75мл этилацетата и 150мл рассола. Водный слой экстрагируют несколько раз свежим этилацетатом. Объединенные органические слои промывают рассолом, сушат над безводным сульфатом натрия и упаривают. Остаточный сырой продукт очищают путем флеш-хроматографии на силикагеле. Элюацию осуществляют 5%-ным раствором метанола в дихлорметане с получением 0,18г (33%) продукта. Образец, перекристаллизованный из смеси этилацетата и гексана, имеет т.п. 184 -186°C.

Пример 5

2,3-дигидро-1 H-бензотиено-[3,2-e]-1,4-дiazепин-5-он

Гидрохлорид сложного метилового эфира 3-(2-аминоэтиламино)бензо[b]тио-фен-2-карбоновой кислоты

Раствор 1,00г (5,62ммоль) 2-(4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)бензолтиола (см. Н. Недеп, Н. Fleig, "Justus Liebigs Ann. Chem." Ц:1994 (1975)) и 610мг (5,62ммоль) хлорметилацетата в 15мл метанола нагревают с обратным холодильником в течение 90 минут. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и фильтруют. Фильтрат сгущают досуха и остаток растворяют в горячем хлороформе. По истечении нескольких часов полученный осадок собирают и сушат. Маточный раствор позволяет получать второй выход кристаллов в качестве гидрохлорида сложного метилового эфира 3-(2-аминоэтиламино)бензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты. Общий выход: 61%. Т.п. 219 -220°C.

2,3-дигидро-1H-бензотиено-[3,2-e]-1,4-diazепин-5-он

Раствор 339мг (1,18ммоль) гидрохлорида сложного метилового эфира

3-(2-аминоэтиламино)бензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты и свежееизготовленного метилата натрия (из 134мг (2,48ммоль) натрия) в 5мл метанола нагревают с обратным холодильником в течение 18 часов. Смесь охлаждают, нейтрализуют 25мл 1-н. соляной кислоты и охлаждают до 0°C в течение часа. Получаемый желтый кристаллический продукт фильтруют и сушат в вакууме при 60°C в течение нескольких часов с получением 2,3-дигидро-1Н-бензотиено-[3,2-е]-1,4-дiazепин-5-она. Выход: 64%. В результате колоночной градиентной хроматографии с применением в качестве элюента сначала 2%-ного раствора метанола в этилацетате и затем 5%-ного раствора метанола в этилацетате получают аналитически чистый 2,3-дигидро-1Н-бензотиено-[3,2-е]-1,4-дiazепин-5-он. Т.п. 210 - 212°C.

Пример 6

2,3-дигидро-9-метокси-1Н-бензотиено-[3,2-т]-1,4-оксазепин-5-он

Сложный метиловый эфир 3-цианометокси-5-метокси-бензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты

К имеющему комнатную температуру раствору 1,00г (4,2ммоль)

метил-3-окси-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоксилата (см. Коннор и др., J. Med. Chem. 25:959 (1992)) в 20мл диметилсульфоксида добавляют 494мг (4,41ммоль) трет.-бутилата калия, а потом 878 мкл (12,58ммоль) бромацетонитрила. Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1,5 часов, после чего ее подают в этилацетат и 1-н. соляную кислоту. Органический слой сначала промывают 1-н. соляной кислотой, потом несколькими порциями рассола, после чего сушат над сульфатом магния. В результате фильтрации, удаления растворителя в вакууме и перекристаллизации остатка из смеси этилацетата и гексана получают 413мг продукта. Дополнительный выход в количестве 112мг можно получать из маточного раствора. Т.п. 159,5 - 160°C.

2,3-дигидро-9-метокси-1Н-бензотиено-[2,3-ф]-1,4-оксазепин-5-эн Раствор 2,5г (9,0ммоль) сложного метилового эфира 3-цианометокси-5-мет-окси-бензо[b]-тиофен-2-карбоновой кислоты в 50мл тетрагидрофурана нагревают до интенсивного кипения. Быстро добавляют 9,0мл (90,2ммоль) боран-диметилсульфида, продолжают нагревание в течение 25 минут и добавляют тетрагидрофуран в момент испарения. Добавляют еще 4,0мл борандиметил-сульфида и нагревание продолжают в течение 10 минут. Реакционную смесь охлаждают до 0°C и осторожно добавляют 50мл 6-н. соляной кислоты. Водородный газ выделяется и температура реакционной смеси повышается. Полученный осадок собирают путем фильтрации, промывают водой и сушат в вакууме в течение ночи.

2,3г (8,2ммоль) твердого вещества подают в свежееизготовленный раствор метилата натрия (из 1,9г (82,0ммоль) натрия) в 40мл метанола. Реакционную смесь нагревают до 50°C в течение 2 часов, после чего нагревают с обратным холодильником в течение 2 часов. После охлаждения до комнатной температуры осадок собирают и промывают сначала холодным метанолом, а потом холодным диэтиловым эфиром. Твердое вещество сушат в вакууме в течение ночи с выходом 1,18г (52%) продукта. Аналитический образец 2,3-дигидро-9-метокси-1Н-бензотиено-[2,3-ф]-1,4-оксазепин-5-она получают в результате перекристаллизации из смеси этилацетата и гексана. Т.п. 264 - 265°C.

Пример 7

2,3-дигидро-9-метокси-6-оксид-1Н-бензотиено-[2,3-ф]-1,4-оксазепин-5-он

К суспензии 1,00г (4,0ммоль) 2,3-дигидро-9-метокси-1Н-бензотиено-[2,3-1,4-оксазепин-5-она в 100мл теплого метанола добавляют сначала 8,0мл (80ммоль) 30%-ной перекиси водорода, а потом 445мг (4,01ммоль) двуокиси селена. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3 часов, после чего нагревают при 30°C в течение 1,5 часов, а потом при 40°C в течение 2 часов. Реакционную смесь охлаждают до -40°C и полученный осадок собирают путем фильтрации. Остаток подвергают колоночной градиентной хроматографии с применением в качестве элюента 5%-ного метанола в этилацетате при постепенном увеличении концентрации метанола до получения его смеси с этилацетатом в соотношении 1:1. Получают 338мг продукта. Аналитический образец 2,3-дигидро-9-метокси-6-оксид-1Н-бензотиено-[2,3-ф]-1,4-оксазепин-5-она получают путем перекристаллизации из смеси метола и этил-ацетата. Т.п. 273 - 274°C.

Пример 8

2,3-дигидро-9-метокси-2-метил-1Н-бензотиено-[2,3-ф]-1,4-оксазепин-5-он

Сложный метиловый эфир 3-(1-цианоэтокси)-5-метокси-бензо[b]-тиофен-2-карбоновой кислоты

К имеющему комнатную температуру раствору 1,00г (4,2ммоль)

метил-3-окси-5-метоксибензо[b]тиофен-2-карбоксилата (см. Коннор и др., J. Med. Chem. 25:958 (1992)) в 20мл диметилсульфоксида добавляют сначала 494мг (4,41ммоль) трет.-бутилата натрия, а потом 1,1мл (12,6ммоль) 2-хлорпропионитрила. Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1,5 часов, после чего нагревают до 82°C в течение 3 часов. Реакционную смесь подают в этилацетат и 1-н. соляную кислоту. Органический слой сначала промывают 1-н. соляной кислотой, потом несколькими порциями рассола, после чего сушат над сульфатом магния. В результате фильтрации, удаления растворителя в вакууме и перекристаллизации остатка из смеси этилацетата и гексана получают 853мг продукта. Т.п. 127 - 129°C.

2,3-дигидро-9-метокси-2-метил-1Н-бензотиено-[2,3-ф]-1,4-оксазепин-5-он

Раствор 400мг (1,37ммоль) сложного метилового эфира

3-(1-цианоэтокси)-5-метоксибензо[b]-тиофен-2-карбоновой кислоты в 10мл тетрагидрофурана нагревают до интенсивного кипения. Прикальвают 1,4мл (13,7ммоль) боранди-метилсульфида и нагревание продолжают в течение 20 минут с добавлением тетрагидрофурана в момент испарения. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и осторожно добавляют 7,5мл 6-н. соляной кислоты. Через 5 минут реакционную смесь охлаждают до 0°C и добавляют 68,5мл 1-н. гидроокиси натрия, а затем этилацетат. Слои разделяют и

органическую фазу промывают сначала смесью рассола и воды в соотношении 1:1, потом дополнительным рассолом. Органическую фазу сушат над сульфатом магния, фильтруют и сгущают в вакууме. Остаток подвергают колоночной градиентной хроматографии с применением в качестве элюента смеси метанола, гексана и хлороформа в соотношении 5:25:70, потом смеси метанола и хлороформа в соотношении 10:90, а затем смеси метанола и хлороформа в соотношении 30:70, в результате чего получают 135мг продукта. Аналитический образец 2,3-дигидро-9-метокси-2-метил-1 Н-бензотиено-[2,3-f]-1,4-оксазепин-5-она получают путем перекристаллизации из смеси этилацетата и гексана. Т.п. 185 -186°С.

Соединения согласно изобретения легко поддаются переработке со стандартными разбавителями и носителями для удобной оральной или парентеральной дачи людям и животным для лечения болезней, таких, как, например, воспаление, в частности артрит и тому подобному. Нижеследующие примеры поясняют получение типичных фармацевтических композиций.

Пример 9

Получение капсулы емкостью 250 мг

250мг 2,3-дигидро-9-изопропокси-7-хлор-1Н-бензотиено[2,3-f]-1,4-оксазепина-5-она смешивают с 150мг лактозы и 150мг кукурузного крахмала до получения гомогенной смеси. Смесь подают в желатиновые капсулы, которые дают орально в количестве 1 - 3 в сутки для лечения артрита.

Пример 10

Композиция для оральной суспензии

Ингредиент	Количество
2,3-дигидро-8-этил-10-трифторметил-6-оксид-1Н-бензотиено[2,3-f]-1,4-оксазепин-5-он	500 мг
Раствор сорбита (70 %)	40 мл
Бензоат натрия	150 мг
Сахарин	10 мг
Вишневый аромат	50 мг
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор сорбита подают в 40мл дистиллированной воды и оксазепин суспендируют. К смеси добавляют сахарин, бензоат натрия и аромат и растворяют. Объем доводят до 100мл добавлением дистиллированной воды. Каждый миллилитр сиропа содержит 5мг оксазепина. Данная композиция для оральной дачи идеально годится для лечения воспаления в области педиатрии.

Пример 11

Получение растворов для парентеральной дачи

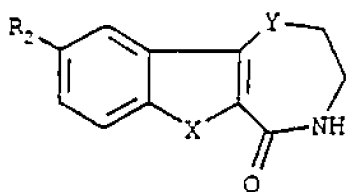
В растворе 700мл пропиленгликоля и 200мл дистиллированной воды для инъекции растворяют 20,0г 2,3-дигидро-7-диметиламино-1Н-бензотиено-[3,2-e]-1,4-дiazепин-5-она. Значение pH раствора хлористоводородной кислотой доводят до 5,5 и объем доводят до 1000мл добавлением дистиллированной воды. Композицию стерилизуют, разливают в ампулы емкостью 5,0мл, каждая из которых содержит 2,0мл композиции (что представляет собой 40мг активного diaзепина) и герметизируют в атмосфере азота. Композицию внутривенно дают пациентам, страдающим от воспаления или СПИДа.

Пример 12

Получение крема для местного применения

500мг 2,3-дигидро-7-этокси-бензофурано-[2,3-f]-1,4-оксазепин-5-она смешивают с 15г цетилового спирта, 1г лаурилсульфата натрия, 40г жидкого силикона марки D.C. 200 (торговый продукт фирмы Дау Корнинг Ко., Мидленд, Мичиган), 43г стерильной воды, 0,25г метилпарабена и 0,15г пропилпарабена. Смесь нагревают приблизительно до 75°С при постоянном перемешивании, после чего охлаждают до комнатной температуры, при которой смесь затвердевает. Препарат наносят на поверхность кожи пациента, страдающего от воспаления.

Таблица 1



2.3-дигидро-9-метокси-[1]бензотиено[2,3-f]-1,4-тиазепин-5(4H)-он

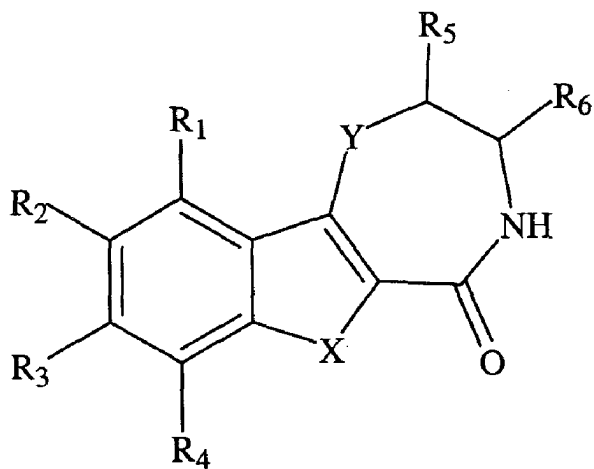
Пример №	R ₂	X	Y	ECA ¹⁾ (KT ₅₀)	ICAM ²⁾ /ESEL ³⁾ (KT ₅₀ или % ингиб. @ 30 мкм)	OM-10 (KT ₅₀ мкм)
1	OMe	S	S	5,2	3,1/1,3	.21
2	H	S	O		42 %/40 %	>30
3	OMe	NMe	O		14,7/14,2	
5	H	S	NH		64 %/47 %	
6	OMe	S	O		3,1/7,5	
7	OMe	S-O	O		30 %/30 %	
8	OMe	S	O (2-метил)		3,8/5,3	

¹⁾ Метод определения торможения адгезии нейтрофилов человека к стимулированным фактором а некроза опухолей эндотелиальным клеткам пупочной вены человека

^{2)/3)} Испытание экспрессии молекулы-1 межклеточной адгезии и E-селектина в эндотелиальных клетках пупочной вены человека

Формула винаходу

1. Производные бензотиофена, бензофурана, индолтиазепинона, оксазепинона и диазепинона формулы (I)



, (I)

где

R₁, R₂, R₃ и R₄ независимо друг от друга означают водород, гидроксил, галоген, низший алкил, низший алкоксил,

R₅ и R₆ независимо друг от друга означают водород или низший алкил, X - группа S(O)_n или NH,

Y - кислород, группа S(O)_n или NH,
n - 0, 1 или 2, при условии, что

1) если X означает NH, Y - NH, R₁ - водород и R₃ - водород, то R₂ не означает метил,

2) если X означает NH, Y - NH, R₁, R₃ и R₄ - водород, то R₂ не означает метокси или этокси, и

3) если X означает NH, Y - серу, то по меньшей мере один из радикалов R₁, R₃, и R₄ не означает водород, или их фармацевтически приемлемые кислотнo-аддитивные соли.

2. Производные бензотиофена, бензофурана, индолтиазепинона, оксазепинона и диазепинона по п. 1, где R₁, R₃ и R₄ означают водород.

3. Производные бензотиофена, бензофурана, индолтиазепинона, оксазепинона и диазепинона по п. 2, где R₂ означает водород или низший алкоксил, X означает группу S(O)_n или NH, Y означает кислород или группу S(O)_n и n означает 0, 1 или 2.

4. Производное индолтиазепинона по п. 3, представляющее собой 2,3-дигидро-9-метокси-[1]бензотиено[2,3-f]-1,4-тиазепин-5(4H)он.

5. Производное оксазепинона по п. 3, представляющее собой 2,3-дигидро[1]бензотиено[2,3-f]-1,4-оксазепин-5(4H)он.

6. Производное индолтиазепинона по п. 3, представляющее собой 2,3-дигидро-9-метокси[1]бензотиено[2,3-f]-1,4-тиазепин-5(4H)он-1-оксид.

7. Производное оксазепинона по п. 3, представляющее собой 3,4-дигидро-9-метокси-6-метил-2H-1,4-оксазепино[6,7-b]индол-5(6H)он.

8. Производное диазепинона по п. 3, представляющее собой 2,3-дигидро-1H-бензотиено[3,2-e]-1,4-дiazепин-5-он.

9. Производное оксазепинона по п. 3, представляющее собой 2,3-дигидро-9-метокси-1H-бензотиено-[2,3-f]-1,4-оксазепин-5-он.

10. Производное оксазепинона по п. 3, представляющее собой 2,3-дигидро-9-метокси-6-оксид-1H-бензотиено-[2,3-f]-1,4-оксазепин-5-он.

11. Производное оксазепинона по п. 3, представляющее собой 2,3-дигидро-9-метокси-2-метил-1H-бензотиено-[2,3-f]-1,4-оксазепин-5-он.

12. Фармацевтическая композиция, обладающая ингибирующей клеточную адгезию или ВИЧ активностью, содержащая активное начало и фармацевтически приемлемый носитель, отличающаяся тем, что в качестве активного начала она включает терапевтически эффективное количество соединения по п. 1.

13. Способ торможения адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам при лечении вызванных ею болезней, отличающийся тем, что включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 12 в виде дозирочной единицы.

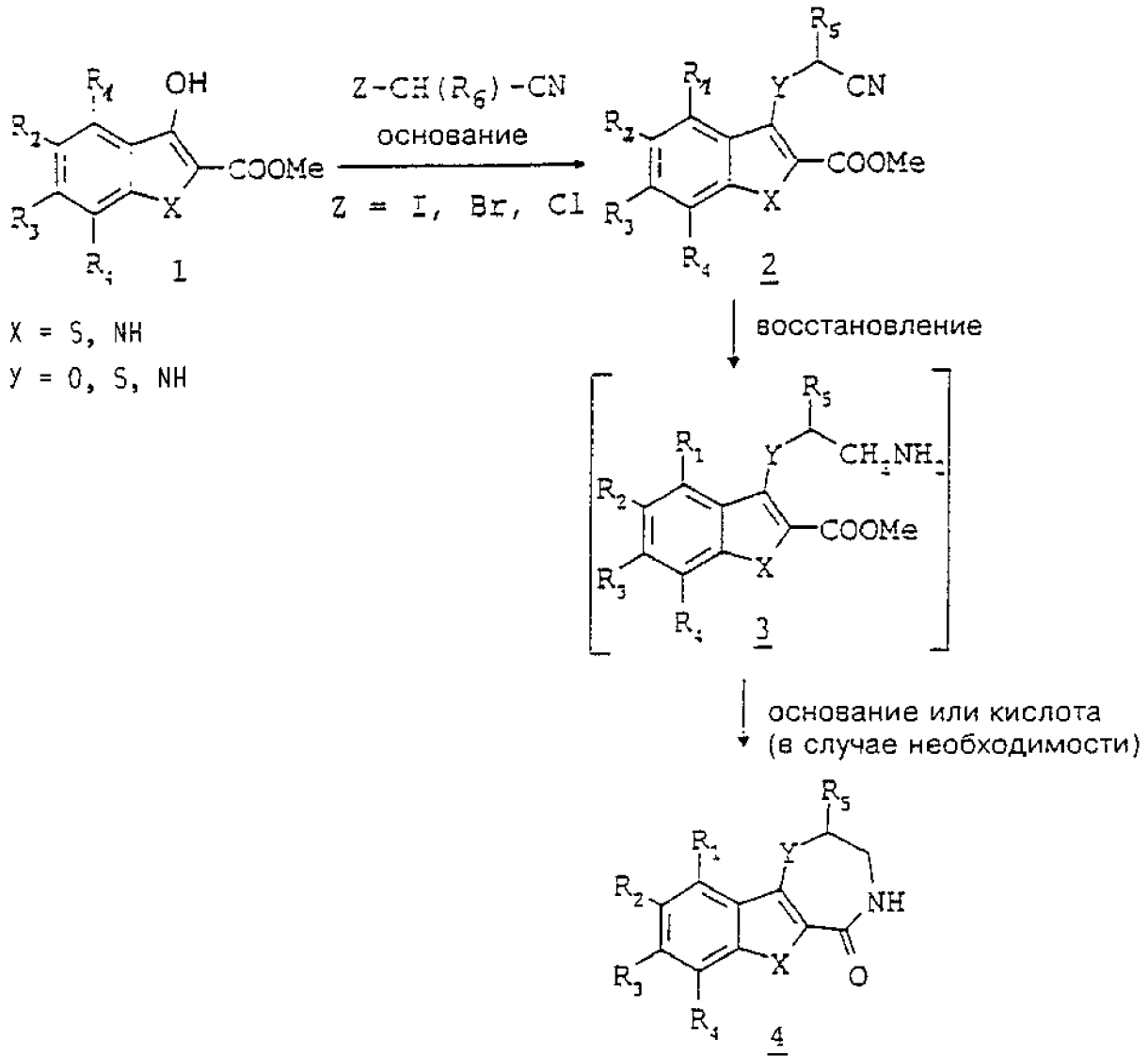
14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что лечению подвергают воспалительную болезнь.

15. Способ лечения млекопитающих, зараженных ВИЧ, отличающийся тем, что включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 12 в виде дозирочной единицы.

Таблица 2

Доза (мг/кг)	Процент торможения выходящего потока	Процент торможения втекания нейтрофилов
0,3	40,5	18,6
1,0	28,4	8,9
3,0	28,2	15,9

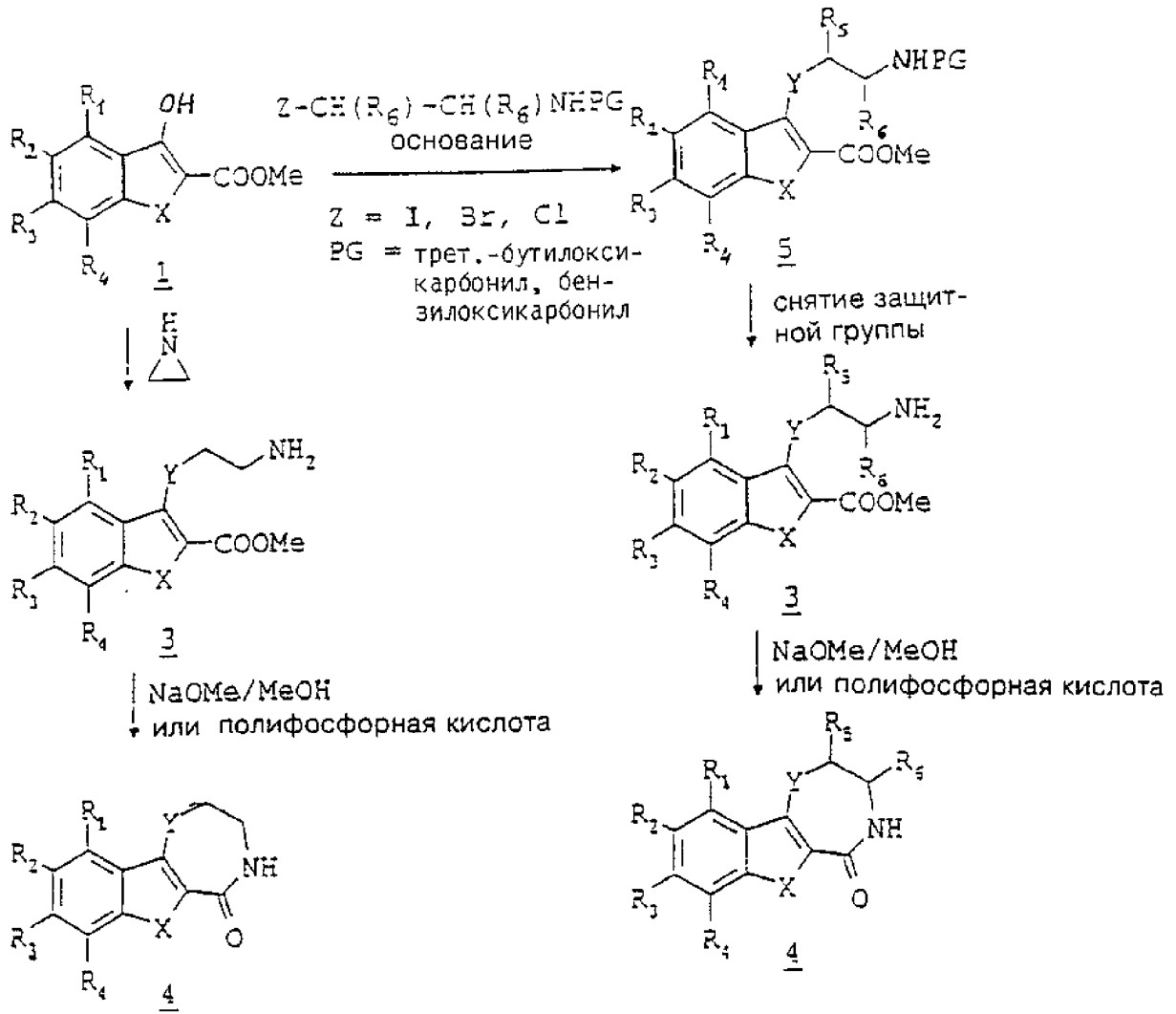
Схема 1



U A 4 5 9 6 7 C 2

U A 4 5 9 6 7 C 2

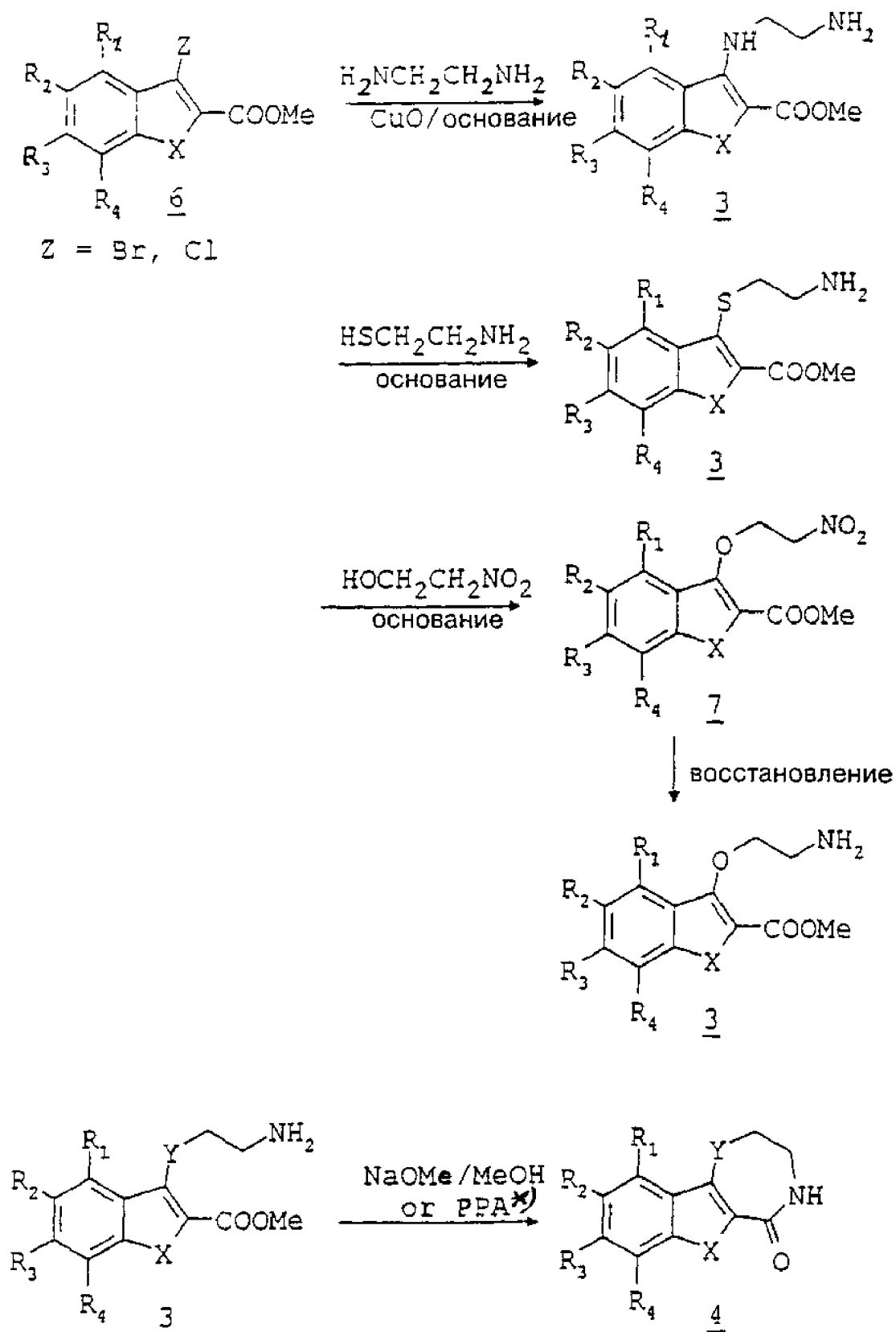
Схема 1 (продолжение)



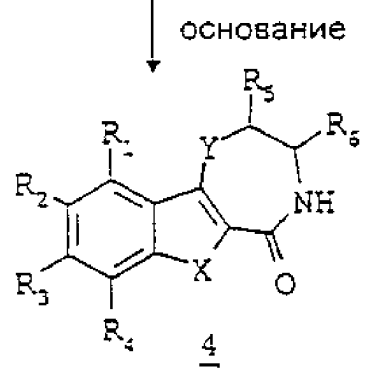
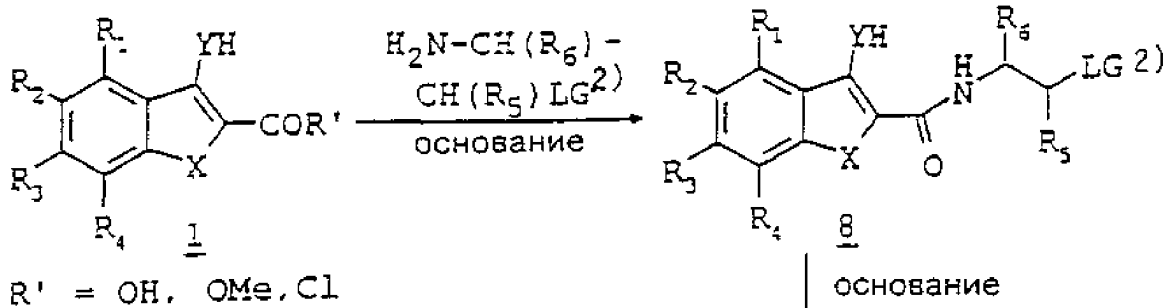
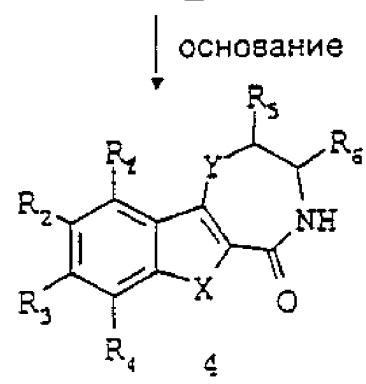
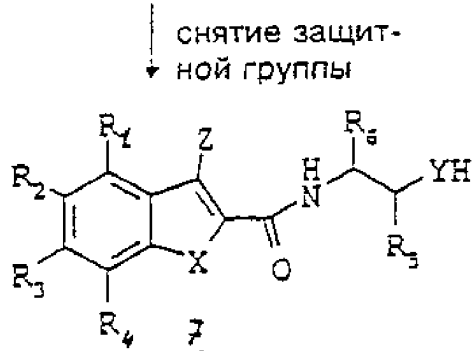
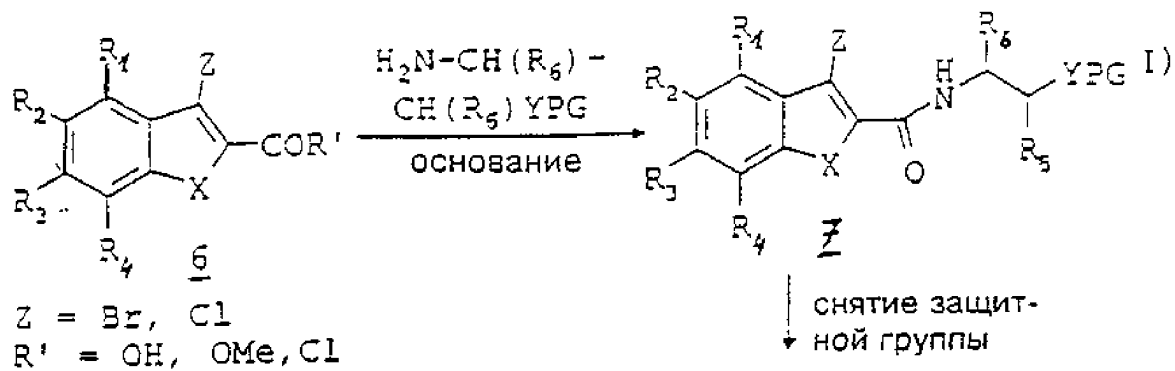
U A 4 5 9 6 7 C 2

U A 4 5 9 6 7 C 2

Схема 2

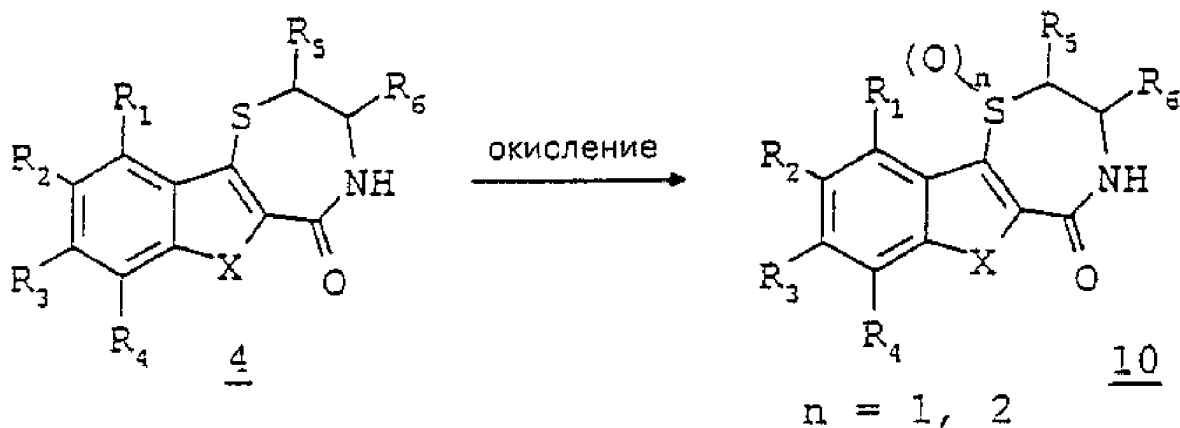
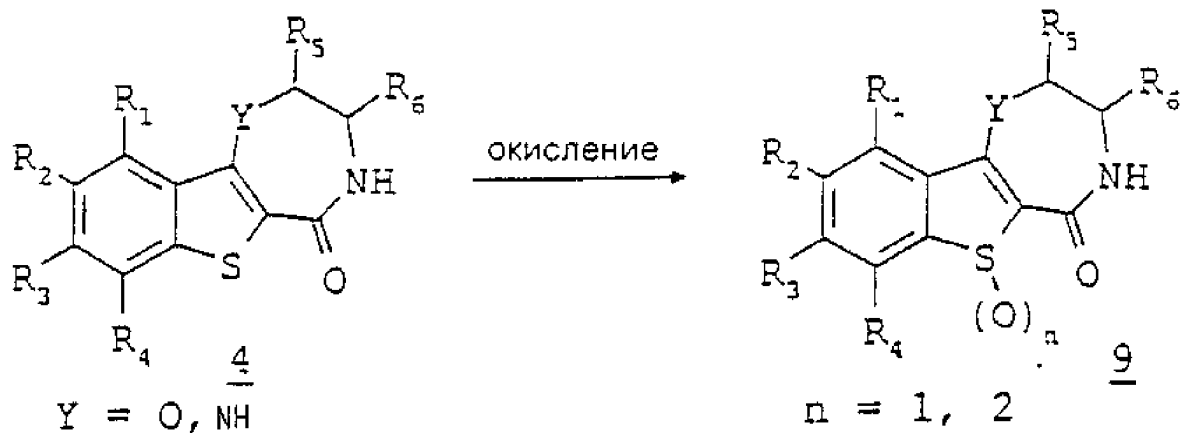


*) или полифосфорная кислота



- 1) см. схему I
 2) удаляемая группа
 Me = метил

Схема 4



Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2002, N 5, 15.05.2002. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

UA 45967 C2

UA 45967 C2