



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 313384

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 07 D 498/04, A 61 K 31/55

Patentstyret

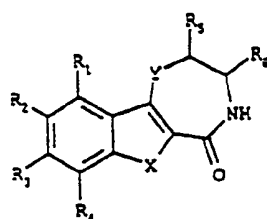
(21) Søknadsnr	19963744	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1995.01.30, PCT/US95/01275
(22) Inng. dag	1996.09.06	(85) Videreføringsdag	1996.09.06
(24) Løpedag	1995.01.30	(30) Prioritet	1994.03.07, US, 207330
(41) Alm. tilgj.	1996.09.06		1994.12.12, US, 351611
(45) Meddelt dato	2002.09.23		

(71) Patenthaver	Warner-Lambert Co, 201 Tabor Road, Morris Plains, NJ 07950, US
(72) Oppfinner	Diane Harris Boschelli, Plymouth, MI, US David Thomas Connor, Ann Arbor, MI, US James Bernard Kramer, Sylvania, OH, US Paul Charles Unangst, Ann Arbor, MI, US
(74) Fullmektig	Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) **Benevnelse** Benzotiofen-, benzofuran- og indol-tiazepinoner, -oksazepinoner og -diazepinoner som inhibitorer av celleadhesjon og som inhibitorer av celleadhesjon og som inhibitorer av HIV

(56) **Anførte publikasjoner** Chemical Abstracts 1986, vol. 105, no. 226266q

(57) **Sammendrag**



(I)

Benzotiofen-, benzofuran- og indoltiazepinoner, -oksazepinoner, og -diazepinoner med formel I så vel som metoder for fremstilling derav er beskrevet som midler som hemmer leukocyt-adherens til vaskulært endotel og er som sådanne effektive terapeutiske midler for behandling av inflammatoriske lidelser; disse forbindelsene hemmer også aktivering av menneskelig immunsvikt-virus (HIV)

Bakgrunn for oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår nye benzotiofen-, benzofuran- og indol-tiazepinoner, -oksazepinoner og diazepinoner og farmasøytisk godtagbare salter
5 derav, som anvendes for å hindre adhesjon av leukocytter til endotel-celler.

Leukocytt-adherens til vaskulært endotel er vesentlig for patogenese ved
inflammasjon. Adhesjonsprosessen skjer før transendotel migrering av leukocytter
inn i omkringliggende vev og resulterende vevskade. Forbindelser som kan blokkere
denne første adhesive interaksjon forventes å være effektive for behandling av
10 inflammatoriske sykdommer så som reumatoid artritt, osteoartritt, astma og
psoriasis. Andre indikasjoner kan omfatte, men er ikke begrenset til, akutt lungesvikt
(RDS) hos voksne, reperfusjonsskade, ischemi, ulcerativ kolitt, vaskulitt,
aterosklerose, inflammatorisk tarm-sykdom og tumor-metastaser.

Adhesjonsreseptorer er inndelt i tre hovedfamilier: selektiner, immunoglobulin-
15 superfamilien og integriner (Nature, **346**:426 (1990), Medlemmer av alle tre klasser
er involvert ved mediering av leukocytt-adhesjon ved betennelse (for en oversikt over
dette området, se: Thrombosis and Hemostasis, **65** (3); 223 (1991), Clinical and
Experimental Allergy, **20**:619 (1990), Transplantation, **48**:727 (1989), Biochemical
Pharm, **40**(8):1683 (1990)). Endotel-leukocytt-adhesjons-molekyl-1 (ELAM-1 eller E-
20 selektin) er medlem av selektin-familien av glykoproteiner som fremmer celle-celle
adhesjon. E-selektin er angitt å være maksimalt uttrykt på overflaten av endotelceller
4 timer etter stimulering av endotel-celler med cytokiner, så som interleukin-1 (IL-1)
eller tumor-nekrose-faktor α (TNF- α) eller andre inflammasjons-mediatorer så som
lipopolysakkarid (LPS) (Pro. Nat. Acad. Sci. **84**:9238 (1987)).

25 Intercellulært adhesjons-molekyl-1 (ICAM-1) er medlem av immunoglobulin-
superfamilien. Også dette reguleres opp med maksimum ekspresjon 12-24 timer
etter stimulering. Det er blitt vist at 4 timer etter at endotel-cellene er stimulert med
en inflammasjons-mediator er både E-selektin og ICAM-1 til stede på celle-overflaten
(J. Clin. Invest. **82**:1746 (1988) og J. Immun., **137**:1893 (1986), Blood, **78**:2721
30 (1991)).

Benzotiofen-, benzofuran- og indol-tiazepinonene, -oksazepinonene og
diazepinonene ifølge foreliggende oppfinnelse er vist å hemme adhesjon av
neutrofiler til humane umbilikalvene-endotelceller (HUVECS) stimulert med TNF α i et
in vitro forsøk.

Foreliggende oppfinnelse angår også anvendelse av de nye tiazepionene, oksazepionene og diazepionene for behandling av menneskelig humansvikt-virus (HIV) ved at de hemmer aktivering av HIV som er latent hos infiserte mennesker.

Patogenesen til menneskelig humansvikt-virus (HIV) er komplisert og er ennå ikke fullstendig forstått. Livs-zyklusen til viruset er teoretisk blitt oppdelt i afferente og efferente komponenter. Virus-binding, fusjon, revers transkripsjon og til slutt integrering er blant de hendelser som utgjør de afferente delene av HIV-livsløpet. Det er de afferente delene av HIV-livsløpet som er ansvarlige for den primære infeksjon med HIV hos et individ, generelt fulgt av et utbrudd av viremi, med eller uten kliniske symptomer.

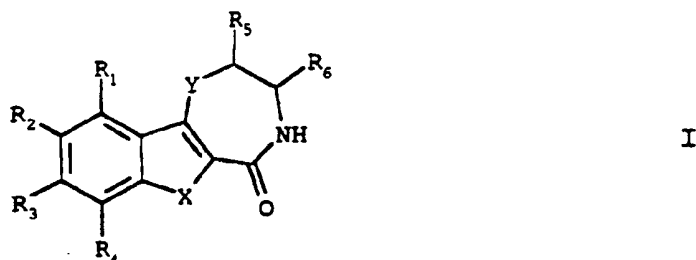
Mange terapeutiske strategier er blitt utviklet og rettet mot inngrep under de afferente hendelsene. Se f.eks. Mitsuya H, Broder S, "Inhibition of the In Vitro Infectivity and Cytopathic Effect on Human T-lymphotropic Virus Type III/lymphadenopathy Virus-associated Virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-Dideoxynucleosides", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **83**:1911-1915 (1986).

Selv om de forskjellige stadier i den afferente komponent gir potensiale for effektiv terapeutisk innvirkning, er det blitt mer og mer klart at intervensjon bare på disse punkter er utilstrekkelig. Etter å være infisert med HIV og mens sykdommen utvikler seg gjennom de afferente stadiene, opplever individet en lenger periode med klinisk latens som kan vare i flere år, og individet har fortsatt god helse. På denne tiden fås lave eller ingen nivåer av viremi og virus-replikasjon i perifere blodceller. Ved et senere tidspunkt utvikler imidlertid sykdommen seg til livstruende immunosuppresjon (AIDS) som det ikke finnes helbredelse for. Disse senere hendelsene er de kliniske manifestasjonene av de efferente stadier av HIV-infeksjon.

Den efferente delen av livsløpet til HIV omfatter de hendelsene som er nødvendige for at HIV provirus med hell skal kunne transkribes, translateres, samles og produsere virioner. Begynnelsen av hendelsene som er nødvendige for at HIV-infiserte celler skal utvikles fra et asymptomatisk, ikke-HIV-uttrykkende stadium til et symptomatisk, HIV-uttrykkende stadium er betegnet som aktivering. Den efferente komponenten og den cellulære basis for aktivering er ennå ikke fullstendig forstått. Ikke desto mindre kan, hvis nye terapeutiske midler og strategier blir utviklet og anvendt under den klinisk asymptomatiske fasen for å bekjempe utviklingen mot AIDS, noe håp gis til de antatt én million infiserte, men klinisk latente, individer.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse omfatter således en forbindelse med formel (I) eller et farmasøytisk godtagbart syreaddisjonssalt derav:



5

hvor R_1 , R_2 , R_3 og R_4 hver uavhengig er hydrogen, hydroksy, halogen, C_1 - C_4 alkyl, C_1 - C_4 alkoksy, trifluormetyl eller $-NR_8R_9$, hvor R_8 og R_9 hver uavhengig er hydrogen eller C_1 - C_4 alkyl;

R_5 og R_6 er hver uavhengig hydrogen eller C_1 - C_4 alkyl;

10

X er O, $S(O)_n$ eller NR_7 ;

Y er O, $S(O)_n$ eller NR_8 ;

R_7 er hydrogen eller C_1 - C_4 alkyl;

R_8 er hydrogen eller C_1 - C_4 alkyl;

n er et helt tall 0, 1 eller 2;

15

med de forbehold at

1) når X er NH, Y er NH, R_1 er H, R_3 er H og R_4 er Br, da er R_2 ikke metyl;

2) når X er NH, Y er NH og R_1 , R_3 og R_4 er H, da er R_2 ikke metoksy eller etoksy, og

3) når X er NH og Y er S, da må minst én av R_1 , R_2 , R_3 og R_4 være forskjellig fra H.

20

Foreliggende oppfinnelse omfatter farmasøytiske preparater omfattende en terapeutisk effektiv mengde av en forbindelse med formel I ovenfor, sammen med en farmasøytisk godtagbar bærer.

Sykdommer mediert ved hemning av adhesjon av leukocytter til endotel-celler, kan behandles ved administrering av et farmasøytisk preparat inneholdende en forbindelse med formel I ovenfor i enhetsdoseform, til et individ som trenger dette.

25

En foretrukket behandling av en inflammatorisk sykdom hos mennesker omfatter administrering av en antiinflammatorisk mengde av en forbindelse med formel I.

Behandling av et individ som er infisert med HIV, omfatter administrering av et farmasøytisk preparat inneholdende en forbindelse med formel I i enhetsdoseform, til individet.

5 Detaljert beskrivelse

Betegnelsene anvendt for å definere forbindelsene med formel I ifølge foreliggende oppfinnelse, er angitt som følger:

C_1 - C_4 alkyl og C_1 - C_4 alkoksy betyr en lineær eller forgrenet alkyl- eller alkoksy-gruppe med 1 til 4 karbonatomer og omfatter f.eks. metyl, etyl, propyl, i-propyl, eller ellers betegnet som (metyl)etyl og t-butyl, eller ellers betegnet som 1,1-(dimetyl)etyl og tilsvarende, f.eks. metoksy, etoksy, i-propoksy, eller ellers betegnet som 1-(metyl)etoksy og lignende.

Halogen omfatter fluor, klor, brom og jod.

15 Forbindelsene med formel I kan også danne farmasøytisk godtagbare syreaddisjonssalter. Alle disse formene omfattes av foreliggende oppfinnelse.

Farmasøytisk godtagbare syreaddisjonssalter av forbindelsene med formel I omfatter salter avledet fra uorganiske syrer så som saltsyre, salpetersyre, fosforsyre, svovelsyre, bromhydrogensyre, jodhydrogensyre, fluorhydrogensyre, fosforsyrling og 20 lignende, såvel som salter avledet fra ikke-toksiske organiske syrer, så som alifatiske mono- og dikarboksylysyre, fenylysubstituerte alkansyrer, hydrokso-alkansyrer, alkandisyre, aromatiske syrer, alifatiske og aromatiske sulfonsyrer, etc. Slike salter omfatter således sulfat, pyrosulfat, bisulfat, sulfitt, bisulfitt, nitrat, fosfat, monohydrogenfosfat, dihydrogenfosfat, metafosfat, pyrofosfat, klorid, bromid, jodid, 25 acetat, trifluoracetat, propionat, kaprylat, isobutyrat, oksalat, malonat, succinat, suberat, sebakat, fumarat, maleat, mandelat, benzoat, klorbenzoat, metylbenzoat, dinitrobenzoat, ftalat, benzensulfonat, toluensulfonat, fenylacetat, citrat, laktat, maleat, tartrat, metansulfonat og lignende. Også salter av aminosyrer så som arginat og lignende og glukonat, galakturonat, N-metyl-glutamin er mulige (se f.eks. 30 Berge S. M., et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, **66**:1-19 (1977)).

Syreaddisjonssaltene av nevnte basiske forbindelser fremstilles ved å bringe den frie baseformen i kontakt med en tilstrekkelig mengde av den ønskede syren til å produsere saltet på vanlig måte. Den frie baseformen kan regenereres ved å bringe

saltformen i kontakt med en base og isolere den frie basen på vanlig måte. De frie baseformene avviker noe fra deres respektive saltformer når det gjelder visse fysikalske egenskaper, så som oppløselighet i polare oppløsningsmidler, men saltene er ellers ekvivalente med de respektive frie basene for formålet med foreliggende oppfinnelse.

Noen av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan eksistere i usolvaterede så vel som solvaterede former, innbefattet hydratiserte former. Generelt er solvaterede former, innbefattet hydratiserte former, ekvivalente med usolvaterede former, og omfattes innen omfanget av foreliggende oppfinnelse.

En foretrukket utførelsesform for foreliggende oppfinnelse er en forbindelse med formel I hvor R_1 , R_3 og R_4 er hydrogen og R_2 er som definert ovenfor.

En mer foretrukket utførelsesform for foreliggende oppfinnelse er en forbindelse med formel I hvor R_1 , R_3 og R_4 er hydrogen; R_2 er hydrogen eller C_1 - C_4 alkoksy; X er O, $S(O)_n$ eller NR_7 ; Y er O eller $S(O)_n$; R_7 er hydrogen eller C_1 - C_4 alkyl og n er 0, 1 eller 2.

Spesielt verdifulle er:

2,3-dihydro-9-metoksy-[1]-benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-on,

2,3-dihydro-[1]benzotieno[2,3-f]-1,4-oksazepin-5(4H)-on,

2,3-dihydro-9-metoksy-[1]benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-on-1-oksyd,

3,4-dihydro-9-metoksy-6-metyl-2H-1,4-oksazepino[6,7-b]-indol-5(6H)-on,

2,3-dihydro-1H-benzotieno[3,2-e]-1,4-diazepin-5-on,

2,3-dihydro-9-metoksy-1H-benzotieno[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on,

2,3-dihydro-9-metoksy-6-oksyd-1H-benzotieno[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on,

2,3-dihydro-9-metoksy-2-metyl-1H-benzotieno[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on,

2,3-dihydro-7,8,9,10-tetraklor-1H-benzotieno[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on,

3,4-dihydro-9-isopropoksy-6-fenoksymetyl-2H-1,4-oksazepin[6,7-b]indol-5(6H)-on-hydroklorid,

2,3-dihydro-8-klor-1H-benzofurano[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on-metansulfonat og

2,3-dihydro-1,2,3-trimetyl-1H-benzofurano[3,2-e]-1,4-diazepin-5-on.

Ved bestemmelse av når en celle-adhesjons-inhibitor eller inhibitor for HIV-aktivering er indikert, må selvfølgelig bl.a. den spesielle lidelsen som er aktuell og alvorlighetsgraden av denne, så vel som alder, kjønn, vekt og lignende til individet som skal behandles, tas i betraktning, og denne bestemmelsen ligger innenfor området til den behandlende legen.

For medisinsk anvendelse vil den nødvendige mengden av en forbindelse med formel I eller et farmakologisk godtagbart syreaddisjonssalt derav for å oppnå terapeutisk effekt, selvfølgelig variere både med den spesielle forbindelsen, administreringsveien, pattedyret som behandles og den spesielle lidelsen som er aktuell. Ved en foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en metode for behandling av mennesker som lider av en inflammatorisk sykdom, så som artritt eller opphovning, som omfatter administrering av en antiinflammatorisk effektiv mengde til individet som har behov for behandling. En egnet dose av en forbindelse med formel I eller et farmakologisk godtagbart syreaddisjonssalt derav for et pattedyr som lider av eller sannsynligvis lider av en hvilken som helst lidelse som beskrevet ovenfor, er 0,1 µg til 500 mg av forbindelsen pr. kg kroppsvekt. Ved systemisk administrering kan dosen være i området 0,5 til 500 mg forbindelse pr. kg kroppsvekt, idet den mest foretrukne dosen er 0,5 til 50 mg/kg kroppsvekt av pattedyret, administrert to til tre ganger daglig. Ved topisk administrering, dvs. på hud eller øye, kan en egnet dose være i området 0,1 ng til 100 µg forbindelse pr. kg, typisk ca. 0,1 µg/kg.

Ved oral dosering for behandling eller profylakse av artritt eller inflammasjon generelt, med hvilken som helst årsak, kan en egnet dose av en forbindelse med formel I eller et fysiologisk godtagbart syreaddisjonssalt derav, være som angitt i ovenstående avsnitt, men er mest foretrukket fra 1 mg til 10 mg av forbindelsen pr. kg, idet den mest foretrukne dosen er fra 1 mg til 5 mg/kg kroppsvekt, f.eks. fra 1 til 2 mg/kg.

Det er klart at en normalt kompetent lege eller veterinær lett vil kunne bestemme og foreskrive den effektive mengden av forbindelsen for å hindre eller stanse utviklingen av lidelsen som blir behandlet. Ved slik behandling kan legen eller veterinæren anvende relativt lave doser til å begynne med, og derefter øke dosen inntil maksimal respons er oppnådd.

Selv om det er mulig å administrere den aktive bestanddel alene, er det foretrukket å gi den som et farmasøytisk preparat som omfatter en forbindelse med formel I eller et farmakologisk godtagbart syreaddisjonssalt derav og en farmakologisk godtagbar bærer. Slike preparater utgjør et ytterligere trekk ved oppfinnelsen.

Preparatene ifølge oppfinnelsen, både for veterinær- og human-medisinsk anvendelse, omfatter en aktiv bestanddel sammen med en farmasøytisk godtagbar

bærer, og eventuelt én eller flere andre terapeutiske bestanddeler. Bæreren(e) må være "godtagbar(e)" i den forstand at de er kompatible med de andre bestanddelene i preparatene og ikke skadelige for mottageren.

Preparatene omfatter de som er i en form egnet for oral, pulmonær, oftalmisk, rektal, parenteral (innbefattet subkutan, intramuskulær og intravenøs), intraartikulær, 5 topisk, nasal eller bukkal administrering. Preparatene omfatter langtidsvirkende preparater kjent på området.

Preparatene kan hensiktsmessig presenteres i enhetsdoseform og kan fremstilles ved en hvilken som helst metode velkjent innen farmasi. Alle metodene 10 kan omfatte det trinn at den aktive bestanddel bringes sammen med bæreren som kan være én eller flere tilleggsbestanddeler. Generelt fremstilles preparatene ved jevnt og inngående å bringe den aktive bestanddel sammen med en flytende bærer eller en findelt fast bærer eller begge, og derefter, om nødvendig, forme produktet til det ønskede preparat.

Preparater ifølge oppfinnelsen som er egnet for oral administrering, kan være i 15 form av adskilte enheter så som kapsler, pulverkapsler, tabletter eller pastiller, som hver inneholder en forutbestemt mengde av den aktive bestanddel; i form av pulver eller granuler; i form av en oppløsning eller suspensjon i en vandig væske eller ikke-vandig væske; eller i form av en olje-i-vann-emulsjon eller en vann-i-olje-emulsjon. 20 Den aktive bestanddel kan også være i form av et bolus-preparat, latverge eller pasta.

Anvendeligheten av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse som inhibitorer for leukocyt-adherens til vaskulært endotel og således for behandling av betennelses-relaterte sykdommer eller lidelser, kan demonstreres ved deres 25 effektivitet ved forskjellige standard testmetoder. En beskrivelse av hver testmetode og eksempelvis test-resultater følger.

Protokoll for intercellulært adhesjon molekyl-1/HUVEC-ekspresjons-forsøk (ICAM-1) og E-selektin/HUVEC ekspresjons-forsøk (ESEL)

Celle-kultur

Humane navlestreng-endotel-celler (HUVEC) fra Clonetics ble anskaffet i T-25 vevkultur-kolber og fikk vokse i 1-3 dager etter ankomst ved 37°C og 5% karbondioksyd. HUVEC ble derefter skilt ved skylling av T-25 med 10 ml av 0,025%

trypsin/0,01% EDTA i 5-10 sekunder, og skylleoppløsningen ble hellet av. Ytterligere 10 ml av trypsin/EDTA-oppløsning ble tilsatt, og cellene ble omrørt i 2-4 minutter mens siden på kolben ble banket med et viskelær. Innholdet i kolben ble derefter hellet i et 50 ml sentrifugerør inneholdende 40 ml medium. Mediet var endotel-basal-medium anskaffet fra Clonetics inneholdende hydrokortison (2 mg/l), epidermal vekstfaktor (0,05 µg/l), bovin hjerneekstrakt (12 mg/l) og varme-inaktivert føtalt kalveserium (6%) fra Hyclone. Cellene ble sentrifugert ved 15°C i 10-15 minutter, den overliggende væsken ble hellet av og cellene resuspendert med friskt medium. Cellene ble vasket på samme måte en andre gang og derefter podet i 96 brønns vevkultur-plater.

Cytokin-stimulering

Innen 5 dager etter sammenløp ble cellene stimulert med tumor nekrose-faktor alfa (TNF α) (Genzyme) for å oppnå en endelig medium-konsentrasjon på 140 U/ml og ble inkubert ved 37°C i 4 timer. Etter den 4 timers inkuberingen ble mediet fjernet og lagret for analyse av chemokin-produksjon. Cellene ble vasket 3 ganger med kalsium- og magnesium-fri fosfat-bufret saltoppløsning. Monokulturene ble derefter fiksert ved tilsetning av 10% bufret formalin til brønnene i 15 minutter. Etter fikseringen ble cellene vasket 3 ganger med Dulbeccos Modified Eagle Media (Gibco) inneholdende 2% bovint serum-albumin (DMEM/2%BSA) og avkjølt natten over.

ELISA

Murint monoklonalt anti-humant ICAM-1 (R & D Systems, Cat. No. BBA-4) eller murint monoklonalt anti-humant E-selektin (R & D, Cat. No. BBA-2) oppløst i DMEM/2%BSA ble satt til hver brønn i 0,5 µg/ml og ble inkubert ved 37°C i 2 timer. HUVEC monokulturer ble derefter vasket 4 ganger med DMEM/2%BSA. Peroksydase-konjugert sau anti-mus IgG (Cappel) ble tilsatt (1:3000 fortykning) og ble inkubert 1 time ved 37°C. Cellene ble derefter vasket 4 ganger med DMEM. Et farve-reagens (Biorad) ble satt til de fikserte cellene og inkubert 15 minutter ved romtemperatur. Reaksjonen ble stanset med en 2% oksalsyre-oppløsning og absorbansen lest ved 414 nm på en titertek plateleser.

Forbindelse-testing

Forbindelsene ble oppløst i DMSO i en konsentrasjon på 30 mmol og fortynnet med medium for å oppnå de endelige test-konsentrasjonene. HUVEC mottok forbindelse oppløst i medium 30 minutter før $\text{TNF}\alpha$ -påvirkning. Absorbansen av ikke-stimulert HUVEC ble subtrahert fra absorbans-verdiene til $\text{TNF}\alpha$ -stimulerte celler før prosent hemning ble bestemt. Prosent hemning ble bestemt ved å sammenligne absorbans av bærer-behandlede celler med medikament-behandlede celler. IC_{50} ble bestemt ved anvendelse av lineær regresjons-analyse.

10 **Metode for bestemmelse av hemning av human neutrofil adhesjon til $\text{TNF}\alpha$ -stimulerte humane umbilikalvene-endotel-celler (ECA)**

Celle-kultur

En andre porsjon HUVEC (Clonetics Corporation, San Diego, California, CC-2617) ble podet i Corning (Corning glass works, Corning, New York) 96 brønns cellekultur-plater med ca. 5×10^3 celler/brønn og dyrket til de løp sammen i supplert endotel-basal-medium (EBM, MCDB-131, Clonetics, 10 ng/ml EGF, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, hydrokortison, 0,4% bovin hjerneekstrakt, 5% føtalt bovint serum). En dag før forsøket ble kjørt, ble, typisk 3 dager etter poding, kultufene gitt 0,2 ml/brønn supplert EBM (S-EBM).

Fremstilling av test-forbindelser

Test-forbindelser ble fremstilt som 10 ml lager-oppløsninger i en konsentrasjon på 1,0 mM. Disse forbindelsene ble først solubilisert i 0,1 ml DMSO fulgt av tilsetning av 9,9 ml S-EBM. Medikamentene ble derefter fortynnet i ett trinn til en konsentrasjon på 66,6 μM . Solubiliseringer og fortynninger ble utført i polystyren-beholdere.

Stimulering av HUVEC

30 Rekombinant human tumor-nekrose-faktor- α (TNF, Genzyme, Boston, Massachusetts, kode TNF-H) ble fremstilt med 400 U/ml i S-EBM. Lagerbeholdning av TNF ble fremstilt med 20.000 U/ml i Delbeccos fosfatbufret saltoppløsning (PBS, Gibco, Grand Island, New York) pluss 0,1% BSA og lagret ved -70°C . HUVEC ble vasket én gang med 0,2 ml varm ikke-supplert EBM og derefter stimulert i 4 timer

ved 37°C med 200 U/ml TNF i nærvær av 33,3 µM testforbindelse. Dette ble oppnådd ved tilsetning av 0,1 ml av 400 U/ml TNF og 0,1 ml 66,6 µM testforbindelse. Disse tilsetningene ble gjort langsomt for ikke å ødelegge HUVEC monolaget. Hver forbindelse ble undersøkt i seks brønner. Ikke-stimulerte (bærer-kontroll) og TNF-stimulerte uten test-forbindelse-behandling ble også kjørt på hver plate.

Merking av neutrofiler

En time før tilsetning av neutrofilene til HUVEC ble neutrofilene (5×10^6 /ml) merket i 30 minutter ved 37°C med 5 µM kalcein-AM (Molecular Probes, Eugene, Oregon) i Hanks balanserte salt-oppløsning pluss 0,45% BSA. Lagerbeholdning av kalcein ble fremstilt i 5 mM i vannfri DMSO og lagret tørket ved -20°C. Etter inkubasjonen ble cellene vasket to ganger i kald HBSS og resuspendert til en endelig konsentrasjon på 1×10^6 celler/ml i supplert EBM.

Tilsetning av neutrofiler til HUVEC

Efter 4 timers stimulering og umiddelbart før tilsetning av neutrofilene til HUVEC monolaget, ble platene vasket med 0,2 ml varm ikke-supplert EBM for å fjerne TNF og medikament. Neutrofilene (1×10^5 celler) ble langsomt tilsatt til hver av de behandlede brønnene og inkubert i 30 minutter ved 37°C. Etter inkuberingen ble platene vasket to ganger med 0,2 ml varm ikke-supplert EBM fulgt av en siste tilsetning på 0,1 ml for plate-scanning.

Bestemmelse av relativ fluorescens

Den relative fluorescensen ble bestemt ved anvendelse av et Millipore Cytofluor 300 system (eksitering = 480, emisjon = 530, sensitivitet = 4).

Beregninger

Forsøket ble betraktet som gyldig hvis TNF-stimulering av HUVEC resulterte i en 300% økning i neutrofil adherens i forhold til adherens til ustimulert HUVEC. Resultatene ble uttrykt som gjennomsnitt av prosent hemning av TNF-stimulert adherens.

$$\%hemning = 100 - \left[\frac{\text{stimulert adherens}_{(medikament)} - \text{ustimulert adherens}}{\text{stimulert adherens}_{(kontroll)} - \text{ustimulert adherens}} \right]$$

Noen av disse forbindelsene ble undersøkt i konsentrasjoner på 33,3 μM , 10,0 μM , 3,3 μM og 1,0 μM for å bestemme IC_{50} -verdier. Lineær regresjons-analyse av gjennomsnittet av hemningsverdiene ble anvendt for å bestemme IC_{50} .

Resultatene oppnådd med noen av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er vist i tabell I.

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse, spesielt de med formel III, er funnet å hemme aktivisering av menneskelig immunsvikt-virus (HIV) som er latent hos infiserte pattedyr, og er derfor nyttige for behandling av AIDS.

Forsøk på å forstå den virologiske og cellulære basis for den kliniske asymptomatiske perioden viser at HIV eksisterer som et sovende eller ikke-uttrykt provirus i en reservoar-populasjon av kronisk infiserte celler. En spesifikk type HIV, HIV-1 har vært underkastet en rekke forskjellige forskningsprosjekter som har vist at viruset eksisterer som et sovende eller ikke-uttrykt provirus i en reservoar-populasjon av kronisk infiserte T-lymfocyt-celler. Flere detaljer angående de nukleære og biokjemiske mekanismer som er ansvarlige for å opprettholde den ikke-ekspresserte virale tilstand, ligger imidlertid utenfor omfanget av denne beskrivelse, men kan finnes detaljert andre steder. Mechanisms of HIV-1 Latency, Bednarik et al., AIDS 6:3-16 (1992).

Inntil nylig var det antatt at HIV var sovende eller ikke-ekspressert i hele reservoar-populasjonen av kronisk infiserte celler i den klinisk asymptomatiske perioden. Observasjoner av lave eller fraværende nivåer av viremi og virus-replikasjon i perifere blodceller førte til antagelsen at HIV-sykdommen ikke var aktiv i den klinisk asymptomatiske perioden. Et lag av vitenskapsmenn har imidlertid oppdaget at en virkelig tilstand av mikrobiologisk latens ikke eksisterer under forløpet av en HIV-infeksjon. Fauci A.S. et al, HIV Infection is Active and Progressive in Lymphoid Tissue During the Clinically Latent Stage of disease, Nature 362:355-358 (1993).

Vitenskapsmennene beskrev dikotomi mellom nivåene av viral byrde og virus-replikasjon i perifert blod i forhold til lymfoide organer under den kliniske latens-perioden. Basert på disse resultater har derfor vitenskapsmennene funnet at "perifert blod ikke reflekterer det aktuelle stadium av HIV-sykdom riktig, spesielt tidlig i det kliniske forløpet av en HIV-infeksjon. HIV-sykdommen er i virkeligheten aktiv og progressiv selv når det er lite tegn til sykdomsaktivitet, vist ved lett målbare virale parametere i perifert blod, og pasienten opplever klinisk latens."

Sykdoms-stadiet ved HIV utvikles uunngåelig fra den klinisk latente asymptomatiske perioden til den uttrykte og aktive symptomatiske perioden. Ved anvendelse av flere forskjellige modeller har man begynt å forstå den cellulære banen involvert ved HIV-aktivering fra laboratorie-latens. I henhold til Butera et al, AIDS, 6:994 (1992) kan mange av de cellulære latens-modellene fås til å uttrykke HIV-1 ved behandling med cytokiner. Dette indikerer at i det mikrobiologiske latens-stadiet avventer HIV-1 en ekstracellulær stimulus før de innleder replikasjon. Dette signalet kan ikke bare medieres ved en oppløselig cytokin-interaksjon med reseptoren, men også ved reseptor-reseptor interaksjoner som forekommer ved celle til celle kommunikasjon eller cellulært stress så som utsettelse for UV-lys og varmesjokk. Videre kan et ekstracellulært induksjons-signal genereres autokrint eller parakrint slik at en HIV-1-aktivert celle kan formere sin egen ekspresjon mens den aktiverer en nærliggende latent celle.

Ytterligere faktorer har av fagfolk på området vært antatt å være involvert ved aktivering av HIV. En undersøkelse har vist at 12-O-tetradekanoyl-forbol-13-acetat (TPA) medierer CD4 ned-regulering og viral ekspresjon i HIV-infiserte celler. Hamamoto et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 164:339-344 (1989). Interessant har Hamamoto også undersøkt virkningen av de potente protein-kinase C inhibitorer staurosporin, H-7 og UCN-01 på TPA-mediert CD4 nedregulering og økning av HIV-ekspresjon. Staurosporin ble funnet å være en effektiv TPA-inhibitor for begge disse virkninger.

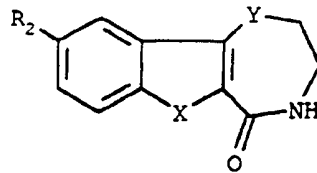
De cellulære banene involvert ved mediering av det aktiverende signal fra plasma-membranen til det integrerte virus, som resulterer i HIV-1-ekspresjon, er mindre klare. Nylig har utvikling av et pålitelig og enkelt system for evaluering av forbindelser som kan hindre aktivering av latent HIV vært rapportert ved the National Cooperative Discovery Grant (NCDDG)/AIDS av P. Feorino, S.T. Butera, T.M. Folks og R.F. Schinazi, 3-7 november, 1991. Forsøkssystemet omfattet OM-10.1 cellelinje, en unik kronisk infisert promyelocyt-kclone som forblir CD4+ inntil HIV-1-aktivering med tumor nekrose-faktor- α . Ekspresjonen av CD4+ på celle-overflaten og aktiviteten til revers transkriptase anvendes som markører for kvantifisering av viral ekspresjon. Alternativt kan andre HIV-markører, så som protease-aktivitet, kjent for fagfolk på området, anvendes. OM-10.1-celler forblir CD4+ inntil viral aktivering og reagerer på tumor-nekrose-faktor-induksjon, og disse kulturene anvendes derfor for hensiktsmessig og raskt å undersøke medikamenters evne til å forhindre CD4+

ned-modulering (reduksjon i ekspresjon av CD4+ på celleoverflaten) og HIV-1-ekspresjon.

En rekke forbindelser kjent for å ha antivirale egenskaper mot enten akutt eller kronisk infiserte celler ble vurdert for deres evne til å hemme HIV-ekspresjon i disse
 5 OM-10.1 cellene. Flere forbindelser som interagerer med biokjemiske baner som kan påvirke reaktiverings-prosessen ble også undersøkt. Resultatene av evalueringen ble presentert på en plakat ved NCDDG/AIDS, San Diego, California, 3.-7. november (1991). Blant ca. 48 forbindelser som ble evaluert, ble 3'-fluor-3'-deoksythymidin (FLT), interferon Y og desferrioksamin betraktet som beskjedne
 10 inhibitorer for aktivering av HIV-1.

En representativ forbindelse med formel I, 2,3-dihydro-9-metoksy-[1]benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-on viste en IC₅₀ på 0,21 µM for hemning i OM-10.1-celler (tabell I).

15 **Tabell I**



2,3-dihydro-9-metoksy-[1]benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-on

Eks.	R ₂	X	Y	ECA (IC ₅₀)	ICAM/ESEL (IC ₅₀ eller % hemning med 30 µM)	OM-10 (IC ₅₀ µM)
1	OMe	S	S	5,2	3,1/1,3	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-metyl)		3,8/5,3	

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen har også vist aktivitet ved standard in vivo forsøk anvendt for å bestemme deres evne til å hemme neutrofil tilstrømning og følgelig deres anvendelighet for behandling av inflammasjons-lidelser. Ved en undersøkelse betegnet "Reverse Passive Arthus Pleurisy Assay, ble utavlede Wistar hannrotter (220-245 g, Charles River Laboratories) fastet i 16 til 18 timer. Bærer (1:1, etanol:saltoppløsning) eller en forbindelse ifølge oppfinnelsen oppløst i bærer ble administrert iv. Dyrene ble bedøvet lett med eter og gitt en iv-injeksjon av 2,5 mg bovint serum-albumin (BSA) i saltoppløsning. Umiddelbart etter iv-injeksjonen ble et lite snitt gjort mellom ribbena, og 0,2 ml av en kanin IgG fraksjon anti-BSA (10 mg/ml i Dulbeccos fosfatbufret saltoppløsning (PBS) i PBS ble injisert i brysthulen ved anvendelse av en 20-gauge oral doseringsnål. Snittet ble derefter lukket med en 9 mm rustfri sårklype. Fire timer senere ble dyrene avlivet med karbondioksyd og brysthulen ble spylt med 2 ml av en 0,325% fenol-rød oppløsning i PBS. Eksudatbufferen ble fjernet fra brysthulen for analyse. Hvite blodceller (>90% neutrofiler) ble 15 tellet ved anvendelse av en Coulter-teller. Bryst-eksudat-volumet ble målt ved en farvefortynningsmetode (Carter G.W. et al, J. Pharm. Pharmacol. 34:66-67 (1982)). Medikament-behandlede grupper ble sammenlignet med bærer-behandlede grupper, og statistisk signifikans ble bestemt ved anvendelse av Students t-test.

Da forbindelsen fra eksempel 1 ble evaluert i ovenstående forsøk, oppviste 20 den følgende hemning:

Dose (mg/kg)	Prosent hemning av eksudat	Prosent hemning av neutrofil tilstrømning
0,3	40,5	18,6
1,0	28,4	8,9
3,0	28,2	15,9

Ved et annet in vivo forsøk betegnet tioglykollat-fremkalt neutrofil 25 tilstrømnings-forsøk ble innavlede Balb/c hunnmus anbragt i grupper på 7 med fri tilgang til mat og vann gjennom hele undersøkelsen. Dyrene ble oralt dosert med bærer (0,5% hydroksypropylmetylcellulose med 0,2% Tween 80) eller en forbindelse ifølge oppfinnelsen oppløst eller suspendert i bærer. En time etter oral administrering ble musene bedøvet ved dietyleter-inhalering og injisert 30 intraperitonealt med 1,0 ml 3% tioglykollat-medium i saltoppløsning. To timer etter

tioglykollat-injeksjonen ble dyrene avlivet ved kvelning med karbondioksyd og ble injisert med 6 ml Dulbeccos PBS inneholdende 10 U/ml natriumheparin og 0,1% BSA. Bukhulen masseres og et snitt gjøres i hulen for at væsken skal kunne oppsamles i 15 ml sentrifuge-rør. En aliquot tas fra hvert dyr, og det totale antall
5 celler i hver aliquot telles ved anvendelse av en Coulter-teller (modell ZBi, Coulter Instruments, Hialeah, Florida). En andre aliquot tas ut for mikroskopi ved anvendelse av Cytospin 2 (Shandon Inc., Pittsburgh, Pennsylvania), og påfølgende merking (modifisert Wrights merking) utføres. Hematologiske differensialer tas for å bestemme prosentdel neutrofiler som har sivet ut i bukhulen.

10 Da forbindelsen fra eksempel 1 ble evaluert ved dette forsøket, oppviste den 26,1% hemning av neutrofil tilstrømning ved 10 mg/kg, 31,9% hemning ved 30 mg/kg og 34,3% hemning ved 100 mg/kg.

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved de følgende metoder.

15 Den første generelle begynnelsen krever 3-hydrokso-, tiol- eller amino-benzo[b]tiofen-, -benzofuran- eller -indol-2-karboksyilat-estere med formel 1 (Skjema 1) som utgangsmaterialer. 3-hydrokso-benzo[b]tiofen-2-estere fremstilles som beskrevet [Connor D.T. et al, J. Med. Chem., 35:958 (1992)]. 3-tio-benzo[b]tiofen-2-karboksyilat-estere fremstilles ved behandling av det analoge 3-klor-derivat
20 [Connor D.T. et al, J. Med. Chem., 35:958 (1992)] med tioacetamid i nærvær av en base så som 1,8-diaza-bicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU) og et oppløsningsmiddel så som N,N'-dimetylformamid eller tetrahydrofuran. 3-amino-benzo[b]tiofen-2-karboksyilat-estere fremstilles ved en kjent generell metode [Beck J.R., J. Org. Chem. 37:3224 (1972)]. 3-hydrokso-indol-2-karboksyilat-estere fremstilles ved kjente
25 metoder så som Unangst P.C. et al, J. Heterocyclic Chem., 24:811 (1987) og Moyer M.P. et al., J. Org. Chem., 51:5106 (1986). 3-tio-indol-2-karboksyilat-estere fremstilles ved kjente metoder så som Unangst P.C. et al, J. Heterocyclic Chem., 24:811 (1987); Atkinson J. G. et al, Synthesis, 480 (1988); og Nagarajan K. et al, Indian J. Chem., 20B:672 (1981). 3-amino-indol-2-karboksyilat-estere fremstilles ved
30 kjente metoder så som Simakov S.V. et al., Khim.-Farm. Zu, 17:1183 (1983).

Omdannelse av forbindelser av type 1 til forbindelsene ifølge oppfinnelsen er vist i Skjema 1. Estrene behandles med et α -halogen-substituert acetonitril-derivat så som bromacetonitril, i nærvær av en base så som kalium-t-butoksyd i tetrahydrofuran, acetonitril eller dimetylsulfoksyd ved 0-80°C for å få estere av type

2. Nitril-gruppen reduseres til det tilsvarende primære amin, og det resulterende mellomprodukt 3 cycliseres til laktamet 4. Den foretrukne omdannelsen er hydrogenering av 2 med Raney-kobolt-katalysator i et oppløsningsmiddel så som tetrahydrofuran i nærvær av en base så som trietylamin ved forhøyet temperatur og trykk. Under disse betingelsene oppnås 4 direkte fra 2. Hvis mellomproduktet 3 isoleres, cycliseres det til 4 under basiske betingelser, fortrinnsvis NaOMe i metanol, eller sure betingelser, fortrinnsvis polyfosforsyre, ved forhøyede temperaturer.

Under syntesen av noen av forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan det være nødvendig eller ønskelig å omdanne reaktive grupper så som hydroksy, amino og karboksy, til derivater som vil beskytte dem fra uønskede bireaksjoner når en ønsket reaksjon finner sted et annet sted i molekylet. Slike beskyttede hydroksy-, amino- og karboksy-grupper avbeskyttes lett ved konvensjonelle metoder. Vanlig anvendte kjemiske enheter som tjener til å beskytte reaktive grupper så som hydroksy, amino og karboksy, og metoder for deres binding og påfølgende fjerning, er beskrevet av Greene og Wuts i Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991.

F.eks. kan et 3-amino-, 3-hydroksy- eller 3-tio-indol, -benzotiofen eller -benzofuran (forbindelse 1 i skjema 1) omsettes med et β -halogen-etylenamin hvor aminogruppen er beskyttet med en egnet beskyttende gruppe (PG) så som t-butoksykarbonyl (Boc) eller benzyloksykarbonyl (Cbz). Omsetning under samme betingelser som beskrevet ovenfor, gir forbindelser av type 5. Avbeskyttelse (dvs. fjerning av PG) av 5 under standard betingelser, dvs. trifluoreddiksyre eller vandig syre for fjernelse av Boc eller hydrogenolyse for fjernelse av Cbz, gir forbindelser av type 3 som cycliseres som angitt tidligere. En annen metode er omsetning av forbindelser av type 1 med etylenimin i et alkoholisk oppløsningsmiddel for direkte å få 3 (se: Nagarajan K. et al, Indian J. Chem., 20B:672 (1981)).

En andre generell metode (Skjema 2) for å oppnå forbindelser av type 4 er fra de tilsvarende 3-halogen-derivater 6. Omsetning av 6 med etylendiamin og kobber(II)oksyd i et oppløsningsmiddel så som pyridin i nærvær av en base så som kaliumkarbonat, gir forbindelser av type 3 hvor Y er NH (se: Hiremath S. P. et al, Proc. Nat. Acad. Sci., India, 60:367 (1990)). Omsetning av 6 med cysteamin i et oppløsningsmiddel så som dimetylformamid i nærvær av en base så som DBU gir forbindelser av type 3 hvor Y er S. Omsetning av 6 med nitroetanol i et oppløsningsmiddel så som tetrahydrofuran i nærvær av en base så som kalium-t-

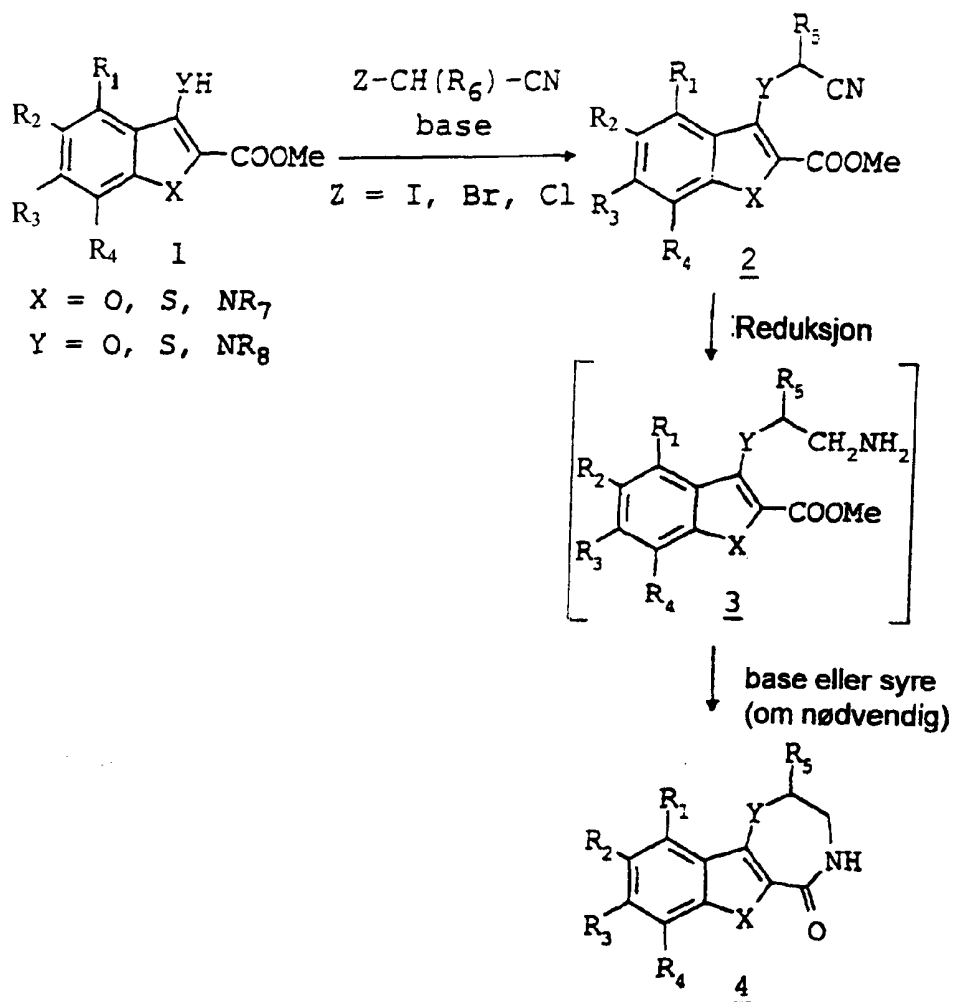
butoksyd eller kaliumhydrid, gir forbindelser av type 7. Påfølgende reduksjon av nitrogruppen til et amin fører til forbindelser av type 3 hvor Y er O. I noen av tilfellene ovenfor blir 3 ikke isolert, og 4 oppnådd direkte.

En tredje generell metode (Skjema 3) anvender også 3-halogen-derivatene 6.
5 3-halogen-derivatet behandles med et primært amin som inneholder en hensiktsmessig beskyttet amino-, hydrokso- eller tiol-gruppe i β -stilling, for å få en amidgruppe, hvilket gir et mellomprodukt av type 7. Avbeskyttelse fulgt av cyclisering gir forbindelser av type 4. En lignende sekvens begynner med at 3-hydrokso-, tiol- eller amino-forbindelsen tilsettes et amin med en egnet utgående
10 gruppe i β -stilling. De resulterende mellomprodukter av type 8 cycliseres derefter for å gi 4.

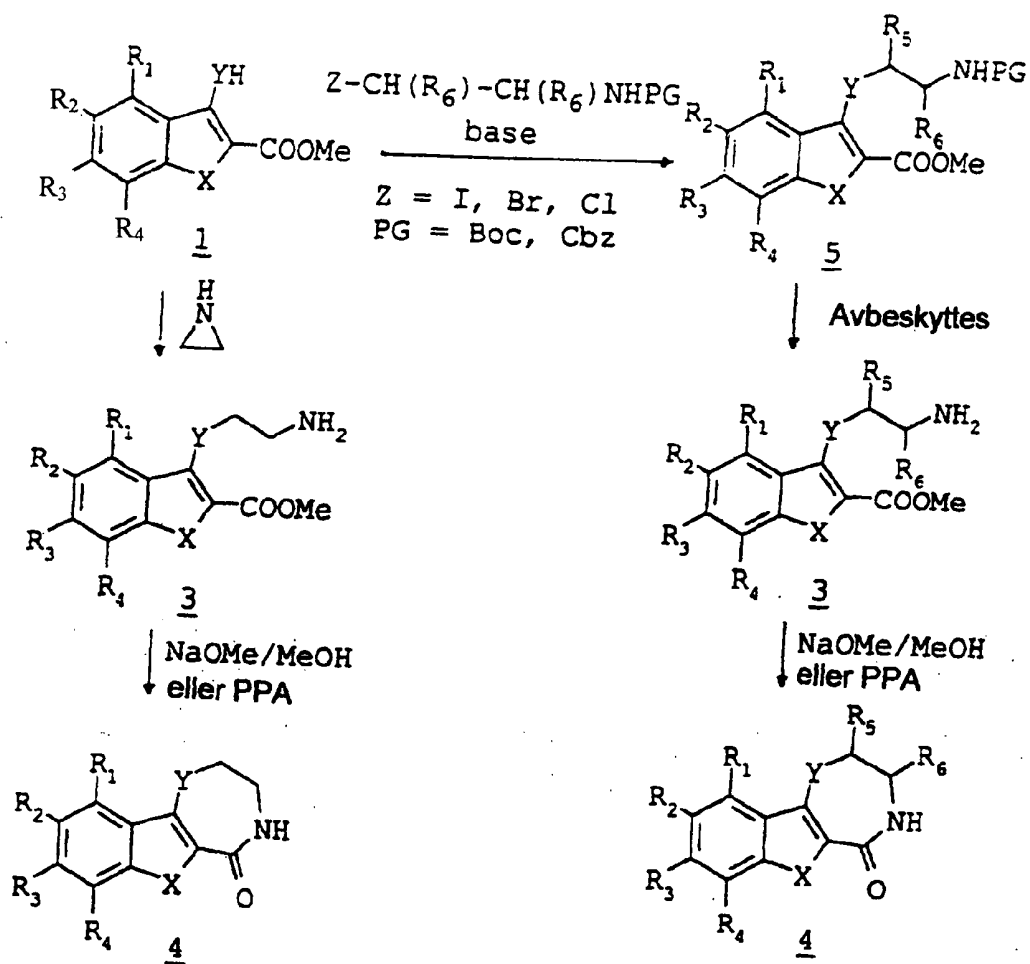
Forbindelsene av type 4 hvor X er S og Y er O eller NR, kan omdannes til det tilsvarende sulfoksyd og/eller sulfon 9 med et oksydasjonsmiddel så som m-klorperbenzoesyre (m-CPBA) eller et oksaziridin under reaksjonsbetingelser som
15 bestemmer graden av oksydasjon (Skjema 4). For de forbindelsene av type 4 hvor Y er S, ville en lignende oksydasjon gi enten sulfoksydet eller sulfonet av type 10.

Betingelsene omfattet av beskrivelsen i Skjema 1 til 4 og variasjoner derav i beskrivelsen er kjent eller kan lett bestemmes fra analoge reaksjoner kjent for fagfolk på området.

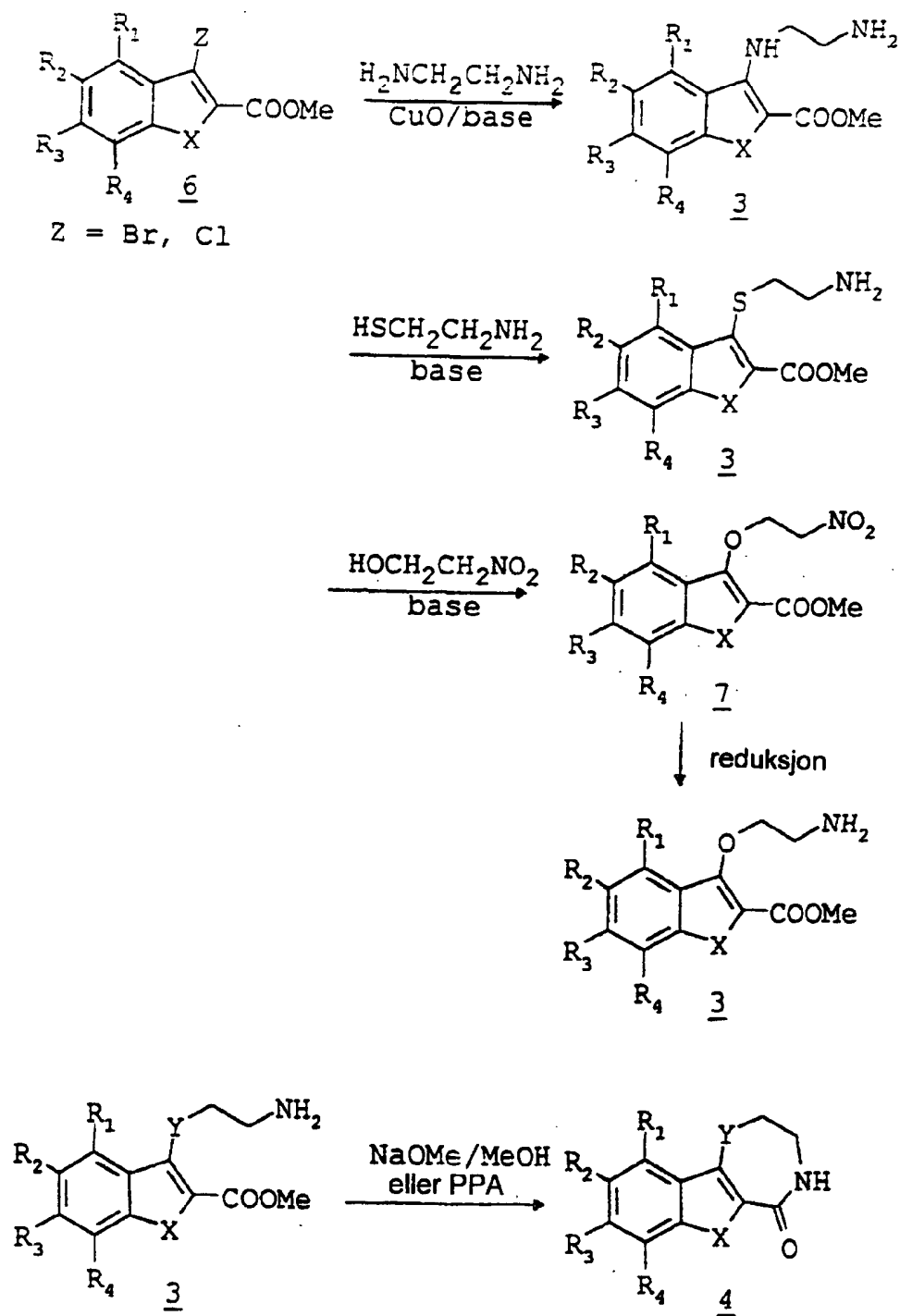
Skjema 1



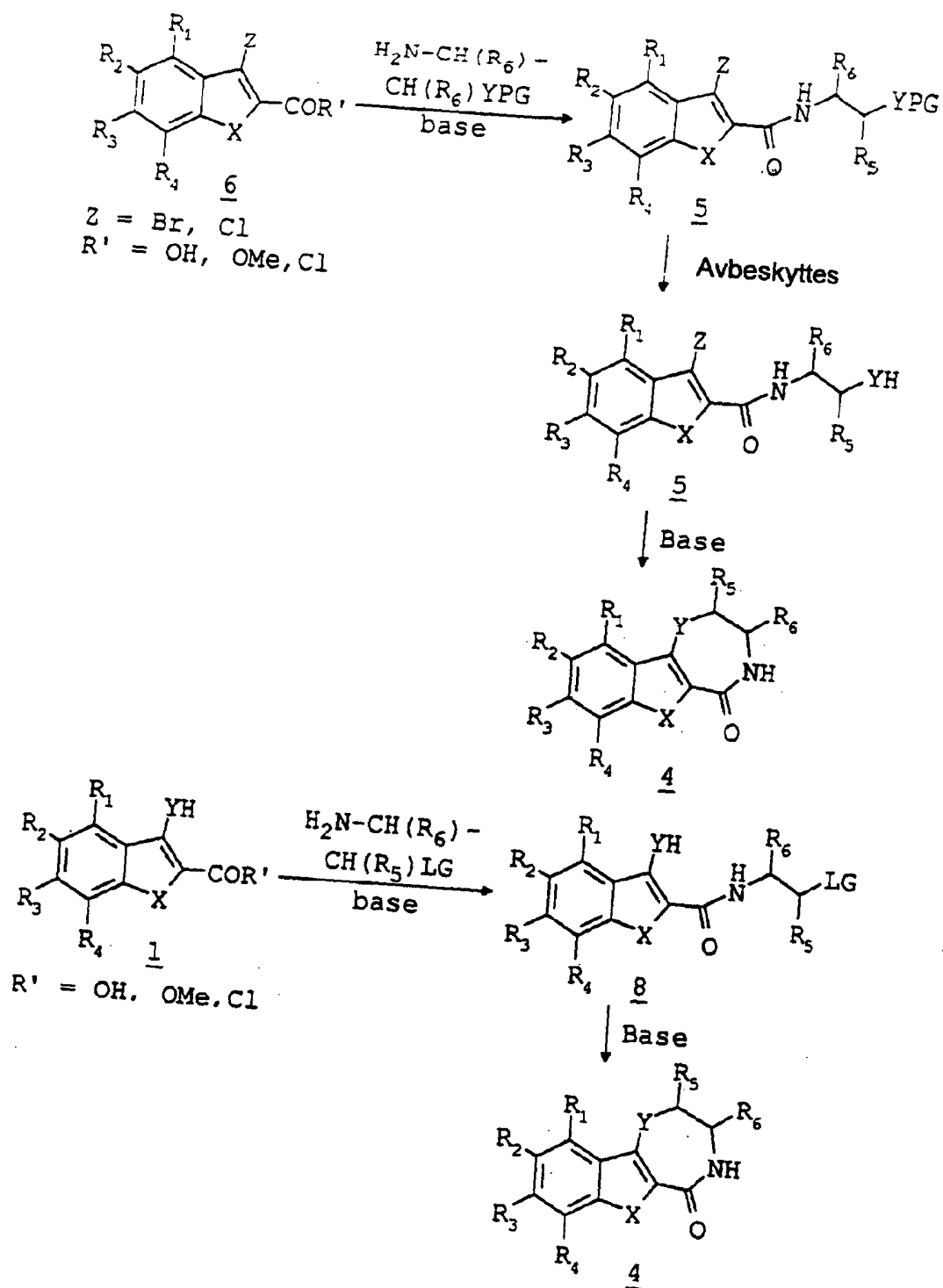
Skjema 1 (fortsatt)



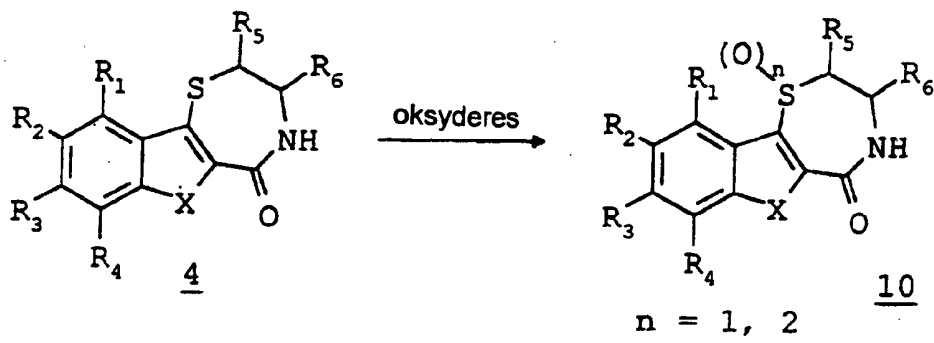
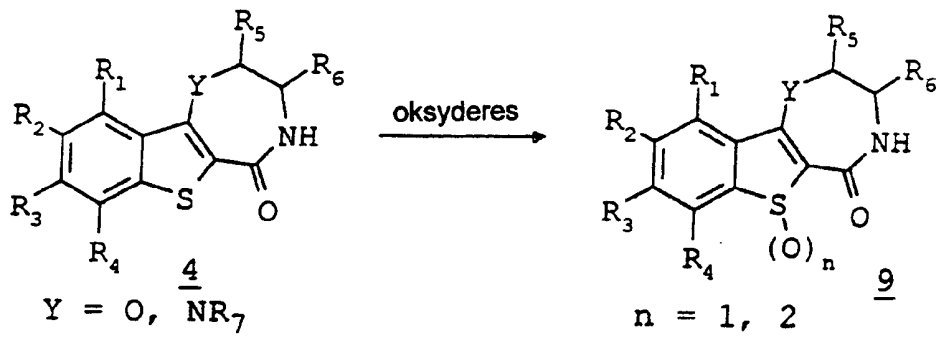
Skjema 2



Skjema 3



Skjema 4



De følgende eksempler illustrerer fremstilling av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse.

Eksempel 1

5

2,3-dihydro-9-metoksy[1]benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-on

Til en oppløsning av metyl-3-klor-5-metoksy-benzo[b]tiofen-2-karboksyilat (500 mg, 1,95 mmol) [fremstilt ved omsetning av det kjente 3-klor-5-metoksy-benzo[b]tiofen-2-karbonylchlorid med metanol [J. Med. Chem., 35:958 (1992)]] i 20 ml DMF ved romtemperatur, settes cysteamin-HCl (885 mg, 7,79 mmol), fulgt av DBU (2,33 ml, 15,58 mmol). Reaksjonsblandingen omrøres ved romtemperatur i 1,5 timer og oppvarmes derefter til 70°C. Blandingen fortynnes med etylacetat og vaskes med vandig HCl, vann og saltoppløsning. Det organiske laget tørres over MgSO₄, filtreres og konsentreres i vakuum. Råproduktet omkrystalliseres fra heksan og etylacetat, hvilket gir 2,3-dihydro-9-metoksy[1]benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-on i 74% utbytte; sm.p. 209-209,5°C.

Eksempel 2

2,3-dihydro-[1]benzotieno[2,3-f]-1,4-oksazepin-5(4H)-on

En blanding av metylesteren av 3-(cyanometoksy)-benzo[b]tiofen-2-karboksylysyre (405 mg, 1,64 mmol) [J. Hetero. Chem., 12:1037 (1975)], 0,5 ml Et₃N og 0,50 g RaCo i 50 ml THF oppvarmes ved 100°C under 84 kg/cm² hydrogen. Reaksjonsblandingen konsentreres i vakuum. Kolonnekromatografi under eluering med en gradient på 1:1 heksan:etylacetat til bare etylacetat gir 2,3-dihydro-[1]benzotieno[2,3-f]-1,4-oksazepin-5(4H)-on i 55% utbytte; sm.p. 244-245°C.

Eksempel 3

2,3-dihydro-9-metoksy-[1]benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-on-1-oksyd

En blanding av 2,3-dihydro-9-metoksy[1]benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-on (200 mg, 0,75 mmol) og NaBO₃-4H₂O (116 mg, 0,75 mmol) i 18 ml AcOH omrøres ved romtemperatur natten over. Reaksjonsblandingen filtreres, og 60 ml

30

vann settes til filtratet. Filtrering gir 2,3-dihydro-9-metoksy-[1]benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-on-1-oksyd i 69% utbytte; sm.p. 215-216°C (dek.).

Eksempel 4

5

3,4-dihydro-9-metoksy-6-metyl-2H-1,4-oksazepino[6,7-b]-indol-5(6H)-on

A. Metyl-3-(cyanometoksy)-5-metoksy-1-metyl-1H-indol-2-karboksylat

En suspensjon av kalium-tert-butoksyd (3,2 g, 29 mmol) i 60 ml dimetylsulfoksyd behandles porsjonsvis med metyl-3-hydroksy-5-metoksy-1-metyl-1H-indol-2-karboksylat (5,6 g, 24 mmol; Unangst P.C. et al, J. Heterocyclic Chem., 24:811 (1987)). Blandingen omrøres i 15 minutter, og kloracetonitril (4,8 ml, 5,7 g, 76 mmol) tilsettes dråpevis. Blandingen oppvarmes ved 80°C i 90 minutter, avkjøles og settes til 800 g is og vann. Det utfelte, faste stoffet frafiltreres, vaskes med 10% metanol-vann og omkrystalliseres fra vandig acetonitril, hvilket gir 3,9 g (60%) produkt; sm.p. 136-137°C.

15

B. En blanding av metyl-3-(cyanometoksy)-5-metoksy-1-metyl-1H-indol-2-karboksylat (0,60 g, 2,2 mmol) og trietylamin (0,40 ml, 0,29 g, 2,9 mmol) i 35 ml tetrahydrofuran i et trykk-reaksjonskar, behandles med Raney-kobolt-katalysator (0,40 g). Reaktoren settes under trykk med hydrogen (41,3 kg/cm²) og oppvarmes ved 80°C i 10 timer. Den avkjølte reaksjonsblandingen filtreres og filtratet inndampes. Olje-residuet oppløses i 50 ml metanol, og natriummetoksyd (0,80 g, 15 mmol) tilsettes til oppløsningen. Blandingen oppvarmes under tilbakeløp i 3 timer og avkjøles og inndampes derefter. Residuet fordeles mellom 75 ml etylacetat og 150 ml saltoppløsning. Det vandige laget ekstraheres flere ganger med frisk etylacetat. De samlede organiske lag vaskes med saltoppløsning, tørres (vannfritt natriumsulfat) og inndampes. Råprodukt-residuet renses ved "flash" kromatografi (silikagel, 5% metanol i diklormetan eluering), hvilket gir 0,18 g (33%) produkt. En prøve omkrystallisert fra etylacetat-heksan har sm.p. 184-186°C.

20

25

Eksempel 52,3-dihydro-1H-benzotieno-[3,2-e]-1,4-diazepin-5-on

5

3-(2-aminoetyl-amino)benzo[b]tiofen-2-karboksylysyre-metylester-hydroklorid

En oppløsning av 2-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)benzotieno (1,00 g, 5,62 mmol) [Hegen, H., Fleig, H., Justus Liebigs Ann. Chem. **11**:1994 (1975)] og klormetylacetat (610 mg, 5,62 mmol) i 15 ml metanol oppvarmes under tilbakesløp i 90 minutter. Reaksjonsblandingen avkjøles til romtemperatur og filtreres. Filtratet konsentreres til tørrhet, og residuet oppløses i varm kloroform. Etter flere timer oppsamles det resulterende utfelte stoff og tørres. Moderlutene gir en andre porsjon krystaller som gir 3-(2-aminoetyl-amino)benzo[b]tiofen-2-karboksylysyre-metylester-hydroklorid i et totalt utbytte på 61%, sm.p. 219-220°C.

15

2,3-dihydro-1H-benzotieno-[3,2-e]-1,4-diazepin-5-on

En oppløsning av 3-(2-aminoetyl-amino)benzo[b]tiofen-2-karboksylysyre-metylester-hydroklorid (339 mg, 1,18 mmol) og nyfremstilt natriummetoksyd (fra 134 mg, 2,48 mmol natrium) i 5 ml metanol oppvarmes under tilbakesløp i 18 timer. Etter avkjøling nøytraliseres reaksjonsblandingen med 25 ml 1N HCl og avkjøles til 0°C i 1 time. Det resulterende gule, krystallinske materialet filtreres fra og tørres under vakuum ved 60°C i flere timer, hvilket gir 2,3-dihydro-1H-benzotieno-[3,2-e]-1,4-diazepin-5-on i 64% utbytte. Kromatografi under eluering med en gradient av 2% metanol i etylacetat til 5% metanol i etylacetat, gir analytisk rent 2,3-dihydro-1H-benzotieno-[3,2-e]-1,4-diazepin-5-on, sm.p. 210-212°C.

25

Eksempel 62,3-dihydro-9-metoksy-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on

30

3-cyanometoksy-5-metoksy-benzo[b]tiofen-2-karboksylysyre-metylester

Til en oppløsning av metyl-3-hydroksey-5-metoksybenzo[b]tiofen-2-karboksylysyre (1,00 g, 4,2 mmol) [[Connor et al, J. Med. Chem., **35**:959 (1992)] i 20 ml DMSO ved romtemperatur settes kalium-t-butoksyd (494 mg, 4,41 mmol) fulgt av bromacetonitril

(878 μ l, 12,58 mmol). Blandingen omrøres ved romtemperatur i 1,5 timer og helles derefter i etylacetat og 1N HCl. Det organiske laget vaskes med 1N HCl, fulgt av flere porsjoner saltoppløsning og tørres over $MgSO_4$. Filtrering fulgt av fjernelse av oppløsningsmiddel i vakuum og omkrystallisering av residuet fra etylacetat:heksan gir 413 mg. En ytterligere porsjon på 112 mg kan oppnås fra moderluten, sm.p. 159,5-160°C.

2,3-dihydro-9-metoksy-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on

En oppløsning av 3-cyanometoksy-5-metoksy-benzo[b]tiofen-2-karboksytsyremetylester (2,5 g, 9,0 mmol) i 50 ml THF oppvarmes til kraftig tilbakesløp. Borandimetylsulfid (9,0 ml, 90,2 mmol) tilsettes raskt, og oppvarmning fortsettes i 25 minutter mens THF tilsettes når det avdampes. En ytterligere mengde borandimetylsulfid (4,0 ml) tilsettes, og oppvarmning fortsettes i 10 minutter.

Reaksjonsblandingen avkjøles til 0°C og 50 ml 6N HCl tilsettes forsiktig.

Hydrogengass utvikles og temperaturen i reaksjonsblandingen øker. Det resulterende utfelte stoff oppsamles ved filtrering, vaskes med vann og tørres under vakuum natten over.

Det faste stoffet (2,3 g, 8,2 mmol) settes til en nyfremstilt oppløsning av natriummetoksyd (fra 1,9 g, 82,0 mmol natrium) i 40 ml metanol.

Reaksjonsblandingen oppvarmes til 50°C i 2 timer og oppvarmes derefter under tilbakesløp i 2 timer. Etter avkjøling til romtemperatur blir det utfelte stoffet oppsamlet og vasket med kald metanol, fulgt av kald dietyleter. Det faste stoffet tørres under vakuum natten over, hvilket gir 1,18 g (52%). En analytisk prøve av 2,3-dihydro-9-metoksy-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on oppnås ved omkrystallisering fra etylacetat:heksan, sm.p. 264-265°C.

Eksempel 7

2,3-dihydro-9-metoksy-6-oksyd-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on

Til en suspensjon av 2,3-dihydro-9-metoksy-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on (1,00 g, 4,0 mmol) i 100 ml varm metanol settes 30% hydrogenperoksyd (8,0 ml, 80 mmol) fulgt av selendioksyd (445 mg, 4,01 mmol).

Reaksjonsblandingen omrøres ved romtemperatur i 3 timer og oppvarmes derefter ved 30°C i 1,5 timer fulgt av oppvarmning ved 40°C i 2 timer. Reaksjonsblandingen

avkjøles til -40°C , og det resulterende utfelte stoffet oppsamles ved filtrering.

Residuet kromatograferes under eluering først med 5% metanol i etylacetat og gradvis økning av oppløsningsmiddel-polariteten til 1:1 metanol:etylacetat, hvilket gir 338 mg produkt. En analytisk prøve av 2,3-dihydro-9-metoksy-6-oksyd-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on oppnås ved omkrystallisering fra metanol:etylacetat, sm.p. $273-274^{\circ}\text{C}$.

Eksempel 8

2,3-dihydro-9-metoksy-2-metyl-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on

3-(1-cyanoetoksy)-5-metoksy-benzo[b]tiofen-2-karboksylysyre-metylester

Til en oppløsning av metyl-3-hydroksy-5-metoksybenzo[b]tiofen-2-karboksylylat (1,00 g, 4,2 mmol) [Connor et al, J. Med. Chem., 35:958 (1992)] i 20 ml DMSO ved romtemperatur, settes kalium-t-butoksyd (494 mg, 4,41 mmol) fulgt av 2-klorpropionitril (1,1 ml, 12,6 mmol). Blandingen omrøres ved romtemperatur i 1,5 timer og oppvarmes derefter til 82°C i 3 timer. Reaksjonsblandingen helles i etylacetat og 1N HCl. Det organiske laget vaskes med 1N HCl, fulgt av flere porsjoner saltoppløsning, og tørres over MgSO_4 . Filtrering fulgt av fjernelse av oppløsningsmiddel i vakuum og omkrystallisering av residuet fra etylacetat:heksan gir 853 mg, sm.p. $127-129^{\circ}\text{C}$.

2,3-dihydro-9-metoksy-2-metyl-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on

En oppløsning av 3-(1-cyanoetoksy)-5-metoksybenzo[b]-tiofen-2-karboksylysyre-metylester (400 mg, 1,37 mmol) i 10 ml THF oppvarmes til kraftig tilbakeløp. Boran-dimetylsulfid (1,4 ml, 13,7 mmol) tilsettes dråpevis og oppvarming fortsettes i 20 minutter mens THF tilsettes når det avdampes. Reaksjonsblandingen avkjøles til romtemperatur og 7,5 ml 6N HCl tilsettes forsiktig. Etter 5 minutter avkjøles reaksjonsblandingen til 0°C , og 68,5 ml 1N NaOH tilsettes, fulgt av etylacetat. Lagene separeres, og den organiske fasen vaskes med 1:1 saltoppløsning:vann og derefter med ytterligere saltoppløsning. Den organiske fasen tørres over MgSO_4 , filtreres og konsentreres i vakuum. Residuet kromatograferes under eluering med en gradient av 5:25:70 metanol:heksan:kloroform til 10:90 metanol :kloroform til 30:70 metanol:kloroform hvilket gir 135 mg produkt. En

analytisk prøve av 2,3-dihydro-9-metoksy-2-metyl-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on oppnås ved omkrystallisering fra etylacetat:heksan, sm.p. 185-186°C.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen fremstilles lett med vanlige
5 forfynningsmidler og bærere for hensiktsmessig oral eller parenteral administrering til mennesker og dyr for behandling av sykdommer, som f.eks. betennelse, særlig artritt og lignende. De følgende eksempler illustrerer fremstilling av typiske farmasøytiske preparater.

10 Eksempel 9

Fremstilling av 250 mg kapsel

2,3-dihydro-9-isopropoksy-7-klor-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on
(250 mg) blandes jevnt med 150 mg laktose og 150 mg maisstivelse. Blandingen
15 innkapsles i gelatinkapsler. Slike kapsler administreres oralt i en mengde på 1 til 3 hver dag for behandling av artritt.

Eksempel 10

20 Preparat for oral suspensjon

Bestanddel	Mengde
2,3-dihydro-8-etyl-10-trifluormetyl-6-oksyd-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on	500 mg
Sorbitol-oppløsning (70% N.F.)	40 ml
Natriumbenzoat	150 mg
Sakkarin	10 mg
Kirsebær-smaksstoff	50 mg
Destillert vann q.s. ad.	100 ml

Sorbitol-oppløsningen settes til 40 ml destillert vann, og oksazepinonet
suspenderes på dette. Sakkarin, natriumbenzoat og smaksstoff tilsettes og
25 oppløses. Volumet reguleres til 100 ml med destillert vann. Hver milliliter sirup

inneholder 5 mg av oksazepinonet. Dette orale preparatet er velegnet for behandling av inflammasjon hos barn.

Eksempel 11

5

Fremstilling av parenterale oppløsninger

I en oppløsning av 700 ml propylenglykol og 200 ml destillert vann for injeksjon oppløses 20,0 g 2,3-dihydro-7-dimetylamino-1H-benzotieno-[3,2-e]-1,4-diazepin-5-on. pH i oppløsningen reguleres til 5,5 med saltsyre, og volumet settes opp til 1000 ml med destillert vann. Preparatet steriliseres, fylles i 5,0 ml ampuller som hver inneholder 2,0 ml (som representerer 40 mg aktivt diazepinon) og forsegles under nitrogen. Preparatet administreres intravenøst til pasienter som lider av inflammasjon eller AIDS.

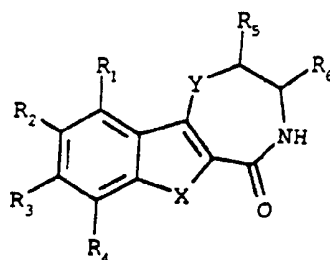
15 Eksempel 12

Fremstilling av en topisk krem

500 mg 2,3-dihydro-7-etoksy-benzofurano-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on blandes med 15 g cetylalkohol, 1 g natriumlaurylsulfat, 40 g flytende silikon D.C. 200 (solgt av Dow Corning Co, Midland, Michigan), 43 g sterilt vann, 0,25 g metylparaben og 0,15 g propylparaben. Blandingen oppvarmes til ca. 75°C under konstant omrøring og avkjøles derefter til romtemperatur hvorved den stivner. Preparatet påføres på hudoverflaten til en person som lider av inflammasjon.

Patentkrav

1. Forbindelse med formelen



5

eller et farmasøytisk godtagbart syreaddisjonssalt derav,

hvor R_1 , R_2 , R_3 og R_4 hver uavhengig er hydrogen, hydroksy, halogen, C_1 - C_4 alkyl, C_1 - C_4 alkoksy, trifluormetyl eller $-NR_8R_9$, hvor R_8 og R_9 hver uavhengig er hydrogen eller C_1 - C_4 alkyl;

10

R_5 og R_6 er hver uavhengig hydrogen eller C_1 - C_4 alkyl;

X er O, $S(O)_n$ eller NR_7 ;

Y er O, $S(O)_n$ eller NR_8 ;

R_7 er hydrogen eller C_1 - C_4 alkyl;

15

R_8 er hydrogen eller C_1 - C_4 alkyl;

n er et helt tall O, 1 eller 2;

med de forbehold at

1) når X er NH, Y er NH, R_1 er H, R_3 er H og R_4 er Br, da er R_2 ikke metyl;

2) når X er NH, Y er NH og R_1 , R_3 og R_4 er H, da er R_2 ikke metoksy eller etoksy,

20

og

3) når X er NH og Y er S, da må minst én av R_1 , R_2 , R_3 og R_4 være forskjellig fra H.

2. Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at R_1 , R_3 og R_4 er hydrogen.

25

3. Forbindelse ifølge krav 2, karakterisert ved at R_2 er hydrogen eller C_1 - C_4 alkoksy; X er O, $S(O)_n$ eller NR_7 ; Y er O eller $S(O)_n$; R_7 er hydrogen eller C_1 - C_4 alkyl, og n er 0, 1 eller 2.

4. Forbindelse ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er valgt fra
2,3-dihydro-9-metoksy-[1]benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-on,
2,3-dihydro-[1]benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5(4H)-on,
2,3-dihydro-9-metoksy-[1]benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-on-1-oksyd,
5 3,4-dihydro-9-metoksy-6-metyl-2H-1,4-oksazepino[6,7-b]-indol-5(6H)-on,
2,3-dihydro-1H-benzotieno-[3,2-e]-1,4-diazepin-5-on,
2,3-dihydro-9-metoksy-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on,
2,3-dihydro-9-metoksy-6-oksyd-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on og
2,3-dihydro-9-metoksy-2-metyl-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oksazepin-5-on.

10

5. Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en
terapeutisk effektiv mengde av en forbindelse ifølge krav 1 sammen med en
farmasøytisk godtagbar bærer.