



MD 1688 G2 2001.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1688 (13) G2

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C 07 D 495/04, 498/04, 513/04; A 61 K 31/5517, 31/5513; A 61 P 29/02, 31/18 //(C 07 D 495/04, 333:00, 243:00)(C 07 D 498/04, 267:00, 209:00)(C 07 D 498/04, 333:00, 276:00)(C 07 D 513/04, 333:00, 281:00)

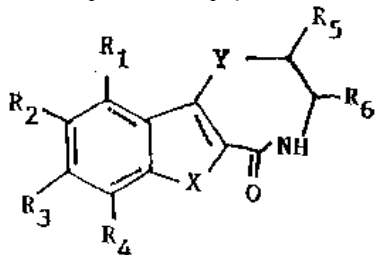
(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: 96-0230	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2001.06.30, BOPI nr. 6/2001
(22) Data depozit: 1995.01.30	(85) 1996.09.05
(31) Nr.: 08/351,611; 08/207,330	(86) PCT/US95/01275, 1995.0130
(32) Data: 1994.12.12; 1994.03.07	(87) WO 95/24408; 1995.09.14
(33) Țara: US	
(41) Data publicării cererii: 1997.10.31, BOPI nr. 10/1997	
(71) Solicitant: WARNER-LAMBERT COMPANY, US	
(72) Inventatori: BOSCHELLI, Diane Harris, US; CONNOR, David Thomas, US; KRAMER, James Bernard, US; UNANGST, Paul Charles, US	
(73) Titular: WARNER-LAMBERT COMPANY, US	
(74) Reprezentant : SIMANENKOVA Tatiana, MD	

(54) Benzotiofen, benzofuran și indoltiazepinone, oxazepinone și diazepinone, compoziție farmaceutică, metodă de inhibare a aderenței leucocitelor la celulele endoteliale pentru tratamentul proceselor inflamatorii și metodă de tratament al mamiferelor infectate cu HIV infecție

(57) Rezumat:

Invenția se referă la domeniul chimiei și medicinei, în special la compușii cu formula (I)



2  
Esența invenției constă în sinteza benzotiofenului, benzofuranului și indoltiazepinonelor, oxazepinonelor și diazepinonelor cu formula (I), utilizate ca ingrediente active în compoziția farmaceutică, care inhibă aderența leucocitelor la celulele endoteliale, precum și activitatea HIV. Astfel compușii revendicați pot fi folosiți la tratamentul proceselor inflamatorii și infecției HIV.

Revendicări: 15

15  
sau sărurile de adiție acidă folosite pentru tratamentul proceselor inflamatorii și infecției HIV.

MD 1688 G2 2001.06.30

## MD 1688 G2 2001.06.30

3

### Descriere:

Invenția se referă la benzotiofen, benzofuran și indoltiazepinone, oxazepinone și diazepinone noi și săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, folosite pentru prevenirea aderenței leucocitelor la celulele endoteliale. Aderența leucocitului la endoteliul vascular este indispensabilă pentru patogeniza inflamației. Procesul aderenței precede migrarea transendotelială a leucocitelor în țesutul înconjurător și care urmează distrugerii țesutului.

Compușii care blochează această interacțiune de aderență inițială sunt de așteptat să aibă eficacitate în tratamentul bolilor inflamatorii ca artrită reumatoidă, osteoartrită, astm și psoriazis. Alte indicații vor include, însă fără să se limiteze, sindromul insuficienței respiratorii la adulți, leziunea de reperfuzare, ischemia, colita ulceroasă, vasculite, ateroscleroză, boala inflamatorie intestinală și metastazele tumorale.

Receptorii de aderență sunt organizați în trei familii principale: selectinele, superfamilia imunoglobulinei și integrinele (Nature, 346, 426 (1990)). Membrii acestor trei clase sunt implicați în medierea aderenței leucocitare în timpul inflamației (pentru revederea acestui domeniu vezi: Thrombosis and Hemostasis 65 (3); 223 (1991), Clinical and Experimental Allergy, 20:619 (1990), Transplantation, 48:727 (1989), Biochemical Pharm., 40 (8); (1990)). Molecula 1 de aderență leucocitară endotelială (ELAM-1) sau selectina E este un membru al familiei selectinei de glicoproteine care inițiază aderența celulă-celulă. Selectina E este raportată a fi exprimată maximal pe suprafața celulelor endoteliale la 4 ore după stimularea celulelor endoteliale cu citokine ca interleukină-1 (IL-1) sau factorul alfa de necroză tumorală (TNF- $\alpha$ ) sau alți mediatori inflamatori ca lipopolizaharida (LPS) (Proc. Nat. Acad. Sci., 84:9238 (1987)).

Molecula 1 de aderență intercelulară (ICAM-1) este un membru al superfamiliei imunoglobulinei. El este de asemenea, reglat crescător cu maximul expresiei întâlnite la 12-24 ore după stimul. S-a dovedit că la 4 ore după stimularea celulelor endoteliale cu un mediator inflamator atât selectina E, cât și ICAM-1 sunt prezente pe suprafața celulei (J. Clin. Invest., 82: 1746 (1988) și J. Immun., 137:1893 (1986), Blood, 78:2721 (1991)).

Benzotiofenul, benzofuranul și indoltiazepinonele, oxazepinonele și diazepinonele conform invenției s-au dovedit a inhiba aderența neutrofilelor la celulele endoteliale ale venei ombilicale umane (HUVECs) stimulate cu TNF- $\alpha$  într-un test *in vitro*.

Invenția de față se referă de asemenea la noi tiazepinone, oxazepinone și diazepinone pentru tratarea oamenilor infectați cu virusul imunodeficienței umane (HIV) prin inhibarea activării HIV latent la oameni infectați.

Patogeneza virusului imunodeficienței umane (HIV) este complicată și nu este încă înțeleasă complet. Ciclul vieții virusului s-a divizat teoretic în componente aferente și eferente. Legarea virală, fuziunea, transcrierea inversă și integrarea finală sunt printre acele evenimente în care sunt cuprinse componentele aferente ale ciclului de viață. Există componente aferente ale ciclului vieții HIV care sunt responsabile pentru infecția primară a HIV la un individ urmate în general de o explozie a viremiei cu sau fără simptome clinice.

Numeroase strategii terapeutice s-au dezvoltat și au ținut intervenția în timpul evenimentelor aferente (Vezi de exemplu, 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. Nat. Acad. Sci. (USA), 83:1911-1915 (1986)).

Sunt cunoscute indolobenzoxazepine substituite. Însă ele dau dovadă de activitate în calitate de depresante ale sistemului central nervos și se utilizează la fel în calitate de tranchilizante [1].

Sunt cunoscuți derivații diazepinei care posedă activitate antivirală. Sunt descrise la fel obținerea lor și compozițiile lor conținute. Compoziția farmaceutică conține o cantitate terapeutic eficientă a compusului sus-menționat sau a sărurilor lui acceptabile farmaceutic în combinație cu un purtător potrivit. Compoziția farmaceutică se prepară în formă utilă pentru administrare orală sau perorală [2].

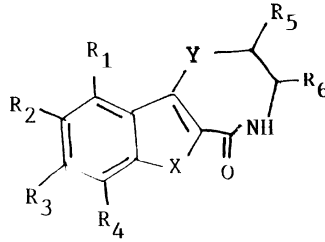
În timp ce diferite stadii ale componentei aferente oferă potențialul pentru intervenția terapeutică eficientă, a devenit evident din ce în ce mai mult că numai intervenția la aceste puncte este insuficientă. După ce devine infectat cu HIV și boala progresează prin stadiile eferente, un individ prezintă o perioadă prelungită de latență clinică care se poate extinde timp de câțiva ani și individul rămâne într-o stare de sănătate bună. La acest moment, în timp se ating niveluri scăzute până la absente ale viremiei și replicării virale în celulele sanguine periferice. La un moment ulterior, totuși, boala progresează eventual spre imunosupresie amenințătoare pentru viață (SIDA) pentru care nu rămâne nici un tratament. Aceste evenimente ulterioare sunt manifestările clinice ale stadiilor eferente ale infecției HIV.

Componenta eferentă a ciclului vieții HIV include acele evenimente necesare pentru provirusul HIV să transcrie cu succes să se transleze, asambleze și să producă virioni. Izbucnirea evenimentelor necesare pentru celulele infectate HIV de a progresa de la un stadiu asimptomatic inexpressiv HIV la un stadiu simptomatic expresiv HIV este cunoscută ca activare. Până în prezent componenta eferentă și baza celulară pentru activare nu este complet înțeleasă. Cu toate acestea, dacă sunt dezvoltate noi agenți terapeutici și noi strategii și implementate în timpul fazei clinice asimptomatice pentru lupta împotriva progresării SIDA, se poate acorda o oarecare speranță indivizilor estimați la un milion de infectați, dar clinic latenți.

# MD 1688 G2 2001.06.30

4

Pentru conformitate, prezenta invenție este un compus cu formula (I) sau o sare de adiție acidă acceptabilă farmaceutic a acestuia:



- 5 in care R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> și R<sub>4</sub> sunt fiecare independent hidrogen, hidroxil, halogen, alchil inferior, alcoxi inferior, benziloxi, trifluormetil, nitro sau -NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub> în care R<sub>8</sub> și R<sub>9</sub> sunt fiecare independent hidrogen sau alchil inferior; R<sub>5</sub> și R<sub>6</sub> sunt fiecare independent hidrogen, alchil inferior sau fenil; X este O, S(O)<sub>n</sub> sau NR<sub>7</sub>; Y este O, S(O)<sub>n</sub> sau NR<sub>8</sub>;
- 10 R<sub>7</sub> este hidrogen, alchil inferior, fenil, benzil, CH<sub>2</sub>OR<sub>8</sub> sau alchil inferior, fenil, benzil substituit cu halo; R<sub>8</sub> este hidrogen, alchil inferior sau fenil; n este un număr întreg de 0, 1 sau 2; cu condiția că
- 15 1) când X este NH, Y este NH, R<sub>1</sub> este H, R<sub>3</sub> este H și R<sub>4</sub> este Br, R<sub>2</sub> nu este metil;  
2) când X este NH, Y este NH, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> și R<sub>4</sub> sunt H, R<sub>2</sub> nu este metoxi sau etoxi, și  
3) când X este NH, Y este S, cel puțin unul dintre R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> și R<sub>4</sub> nu este H.
- Prezenta invenție include compoziții farmaceutice care cuprind o cantitate eficientă terapeutică a unui compus cu formula I, împreună cu un purtător acceptabil farmaceutic.
- 20 Un al treilea aspect al prezentei invenții este o metodă de tratare a bolilor mediate prin inhibarea aderării leucocitelor la celulele endoteliale care cuprinde administrarea la o gazdă care are nevoie de aceasta a unei compoziții farmaceutice care conține un compus cu formula I în formă de unitate dozată.
- O realizare preferată este o metodă pentru tratarea bolii inflamatoare la oameni care cuprinde administrarea unei cantități antiinflamatoare a unui compus cu formula I.
- 25 Un al patrulea aspect al prezentei invenții este o metodă de tratare a unei gazde infectate cu HIV care cuprinde administrarea la numita gazdă a unei compoziții farmaceutice conținând un compus cu formula I sub formă de unitate dozată.
- Termenul folosit în definierea compușilor cu formula I ai prezentei invenții sunt definiți după cum urmează.
- Alchil inferior și alcoxi inferior înseamnă o grupare alchil sau alcoxi lineară sau ramificată având 1 la 4 atomi de carbon și include, de exemplu metil, etil, propil, i-propil sau altele asemenea, cunoscute ca (metil)etil și t-butil sau altele asemenea, și cunoscute ca 1,1-(dimetil)etil și corespunzător, de exemplu, metoxi, etoxi, i-propoxi sau altele asemenea, cunoscute ca 1-(metil)etoxi și altele asemenea.
- Halogenii include fluor, clor, brom sau iod.
- 30 Compușii cu formula I sunt capabili să formeze ulterior săruri de adiție acidă acceptabile farmaceutic. Toate aceste forme sunt în cuprinsul invenției.
- 35 Săruri de adiție acidă acceptabile farmaceutic ale compușilor cu formula I includ săruri derivate de la acizi anorganici precum clorhidric, nitric, fosforic, sulfuric, bromhidric, iodhidric, fluorhidric, fosforos și altele asemenea, precum și săruri derivate de la acizi organici netoxici ca acizii alifatici mono- și dicarboxilici, acizii alcanici substituiți fenil, acizii hidroxicarboxilici, acizii alcanoici, acizii aromatici, acizii sulfonici alifatici și aromatici etc. Astfel de săruri includ sulfat, piro-sulfat, bisulfat, sulfat, bisulfat, nitrat, fosfat, monohidrogen fosfat, dihidrogen fosfat, metafosfat, pirofosfat, clorură, bromură, iodură, acetat, trifluoracetat, propionat, caprilat, izobutirat, oxalat, malonat, succinat, suberat, sebacat, fumarat, maleat, mandelat, benzoat, clorbenzoat, metilbenzoat, dinitrobenzoat, ftalat, benzensulfonat, toluensulfonat, fenilacetat, citrat, lactat, maleat, tartrat, metansulfonat și altele asemenea. De asemenea, sunt avute în vedere și săruri ale aminoacizilor ca arginat și altele asemenea și gluconat, galacturonat, N-metil glutamină (vezi, de exemplu, Berge S.E. et al., Pharmaceutical Salts, Journal of Pharmaceutical Science, 66: 1-19 (1977)).
- 45 Sărurile de adiție acidă ale numiților compuși bibazici sunt preparate prin contactarea formei bază liberă cu o cantitate suficientă a acidului dorit pentru a produce sarea în mod convențional. Forma bază liberă poate fi regenerată prin contactarea formei de sare cu o bază și izolarea bazei libere în mod convențional. Formele bază liberă diferă de formele lor respective de sare prin aceea că au anumite proprietăți fizice cum ar fi solubilitate în solvenți polari, dar altfel sărurile sunt echivalente pentru scopurile prezentei invenții bazelor lor libere respective.
- 50

# MD 1688 G2 2001.06.30

5

Unii dintre compușii prezentei invenții pot exista în forme nesolvate precum și forme solvate incluzând forme hidratate. În general, formele solvate incluzând formele hidratate sunt echivalente formelor nesolvate și există intenția să fie cuprinse în întinderea prezentei invenții.

5 O realizare preferată a prezentei invenții este un compus cu formula I în care R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> și R<sub>4</sub> sunt hidrogen și R<sub>2</sub> este definit ca mai sus.

O realizare mai preferată a prezentei invenții este un compus cu formula I în care R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> și R<sub>4</sub> sunt hidrogen; R<sub>2</sub> este hidrogen sau alcoxi inferior; X este O, S(O)<sub>n</sub> sau NR<sub>7</sub>; Y este O, sau S(O)<sub>n</sub>; R<sub>7</sub> este hidrogen sau alchil inferior și n este 0, 1, 2.

În mod deosebit sunt valoroși următorii compuși:

- 10 2,3-dihidro-9-metoxi-(1)benzotieno[2,3,-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-onă,  
2,3-dihidro-(1)benzotieno[2,3-f]-1,4-oxazepin-5(4H)-onă,  
2,3-dihidro-9-metoxi-(1)benzotieno[2,3,-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-onă-1-oxid,  
3,4-dihidro-9-metoxi-6-metil-2H-1,4-oxazepino[6,7-b]-indol-5(6H)-onă,  
2,3-dihidro-1H-benzotieno-[3,2-e]-1,4-diazepin-5-onă,  
15 2,3-dihidro-9-metoxi-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă,  
2,3-dihidro-9-metoxi-6-oxid-1H-benzotieno-[2,3-f]oxazepin-5-onă,  
2,3-dihidro-9-metoxi-2-metil-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă,  
2,3-dihidro-7,8,9,10-tetraclor-1H-benzotieno[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă,  
3,4-dihidro-8-nitro-6-terț-butil-2H-1,4-oxazepin[6,7-b]indol-5(6H)-onă,  
20 3,4-dihidro-9-izopropoxi-6-fenoximetil-2H-1,4-oxazepin[6,7-b]indol-5(6H)-onă clorhidrică,  
3,4-dihidro-8,10-dibrom-6-(3-clorbenzil-2H-1,4-oxazepin[6,7-b]indol-5(6H)-onă,  
metansulfonatul de 2,3-dihidro-8-clor-1H-benzofuran[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă,  
2,3-dihidro-1,2,3-trimetil-1H-benzofuran[3,2-e]-1,4-diazepin-5-onă și  
2,3-dihidro-3-hexil-1H-benzofuran[2,3-f]-1,4-tiazepin-5-onă.

25 În determinarea când un inhibitor de aderență celulară sau inhibitor al activării HIV este indicat, desigur între altele, trebuie luată în considerare condiția particulară în cauză și severitatea sa, precum și vârsta, sexul, greutatea și altele asemenea ale subiectului de tratat și determinarea aceasta face parte din pregătirea medicului clinician.

30 Pentru utilizare medicală cantitatea necesară a unui compus cu formula I sau a unei sări de adiție acide acceptabile farmacologic a acestuia pentru a obține efectul terapeutic desigur va varia atât cu compusul anume, calea de administrare, mamiferul sub tratament și tulburarea în particular a bolii în cauză. Într-o realizare preferată, invenția asigură o metodă pentru tratarea oamenilor care suferă de boală inflamatorie ca artrită sau inflamație care cuprinde administrarea unei cantități antiinflamatoare eficiente la subiectul având nevoie de tratament. O doză adecvată a unui compus cu formula I sau a unei sări de adiție acide acceptabile farmacologic a acestuia pentru un mamifer care suferă de sau probabil suferă de oricare din condițiile descrise mai sus este 0,1 μg la 500 mg/kg greutate corporală. În cazul administrării sistemice doza poate fi în domeniul de 0,5 la 500 mg/kg greutate corporală, doza cel mai preferat fiind 0,5 la 50 mg/kg greutate corporală a mamiferului administrat de 2-3 ori pe zi. În cazul administrării topice, de exemplu, pe piele sau ochi, o doză corespunzătoare poate fi în domeniul 0,1 ng la 100 μg/kg, de obicei cca 0,1 μg/kg.

40 În cazul dozării orale pentru tratamentul sau profilaxia artritei sau inflamației în general, datorată oricărei cauze, o doză corespunzătoare a compusului cu formula I sau a unei sări de adiție acide acceptabile fiziologic a acestuia, poate fi cum s-a specificat în paragraful precedent, dar cea mai preferată este de la 1 mg la 10 mg/kg, cel mai preferat dozaj fiind de la 1 mg la 5 mg/kg greutate corporală a mamiferului, de exemplu, de la 1 la 2 mg/kg.

45 Se înțelege că un clinician sau veterinar cu pregătire obișnuită va determina imediat și va prescrie cantitatea eficientă de compus pentru a preveni sau stopa progresul condiției pentru care se administrează tratamentul. Procedând astfel clinicianul sau veterinarul poate folosi la început doze relativ scăzute crescând în continuare doza până când se obține un răspuns maxim.

50 Cu toate că este posibil ca un ingredient activ să fie administrat singur, este de preferat ca el să fie prezent într-o formulare farmaceutică cuprinzând un compus cu formula I sau o sare de adiție acidă acceptabilă farmacologic a acestuia și un purtător acceptabil farmacologic. Astfel de formulări constituie o caracteristică suplimentară a prezentei invenții.

Formulările atât veterinare, cât și pentru uz medical uman, ale prezentei invenții cuprind un ingredient activ, în asociere cu un purtător acceptabil farmaceutic pentru acesta și opțional, alt sau alte ingrediente terapeutice. Purtătorul (ii) trebuie să fie "acceptabil (i)" în sensul de a fi compatibil (i) cu alte ingrediente ale formulărilor și să nu fie dăunător (i) pentru receptorul acestora.

55 Formulările includ pe cele într-o formă adecvată pentru administrare orală, pulmonară, oftalmică, rectală, parenterală (inclusiv subcutanată, intramusculară și intravenoasă), intraarticulară, topică, nazală sau bucală. Asemenea formulări se înțelege că includ și formulări cu acțiune prelungită cunoscute în domeniu.

# MD 1688 G2 2001.06.30

6

5 Formulările pot fi prezentate convenabil sub formă de unitate dozată și pot fi preparate prin oricare dintre metodele bine cunoscute în domeniul farmaciei. Toate metodele pot include etapa aducerii ingredientului activ în asociere cu purtătorul care constituie unul sau mai multe ingrediente accesorii. În general, formulările se prepară prin aducerea uniformă și intimă a ingredientului activ în asociere cu un purtător lichid sau un purtător solid fin divizat sau ambele, și apoi dacă este necesar, formarea produsului în formularea dorită.

10 Formulările prezentei invenții adecvate pentru administrare orală pot fi sub formă de unități concrete precum capsule, cașete, tablete sau pastile fiecare conținând o cantitate predeterminată de ingredient activ; sub formă de pudră sau granule; sub forma unei soluții sau unei suspensii într-un lichid apos sau lichid neapos; sau sub forma unei emulsii ulei-in-apă sau unei emulsii apă-in-ulei. Ingredientul activ poate fi de asemenea sub forma unui bol, unguent sau cremă.

15 Utilitatea compușilor prezentei invenții ca inhibitori ai aderenței leucocitelor la endoteliul vascular și astfel, în tratarea bolilor sau condițiilor asociate inflamației se poate demonstra prin diverse proceduri test standard. Urmează o descriere a fiecărei proceduri și rezultate exemplificatoare ale testului.

## **Protocol pentru testul expresiei adeziunii intercelulare**

### **Molecula 1/HUVEC (ICAM-1) și testul expresiei selectină E/HUVEC (ESEL)**

#### **Cultura celulară**

20 S-au procurat de la Clonetics celule endoteliate cordale ombilicale umane (HUVECs) în baloane de cultură celulară T-25 și s-au lăsat să crească 1-3 zile după ajungere la 37°C și 5% dioxid de carbon. Apoi HUVEC-urile s-au separat prin clătirea T-25 cu 10 ml de 0,025% tripsină/0,01% EDTA timp de 5-10 s aruncând soluția de clătire. S-au adăugat alți 10 ml de soluție tripsină/EDTA și celulele s-au agitat 2-4 min în același timp răzuind marginea balonului cu un creion cu gumă. Apoi conținuturile balonului s-au turnat într-o eprubetă de centrifugă de 50 ml care conține 40 ml de mediu. Mediul a fost mediu endotelial de bază procurat de la Clonetics care conține hidroclorid de cortizon (2 mg/L), factor de creștere epidermală (0,05 μg/L), extract din creier bovin (12 mg/L) și ser fetal de vițel inactivat termic (6%) de la Hyclone. Celulele s-au centrifugat la 15°C timp de 10-15 min, s-a eliminat supernatantul și s-au resuspendat celulele în mediu proaspăt. Celulele s-au spălat într-un mod identic a 2-a oară și apoi s-au însămânțat în plăci de cultură de țesut cu 96 godeuri.

#### **Stimulare citokină**

30 În 5 zile după atingerea confluentei celulele s-au stimulat cu factor alfa de necroză tumorală (TNF-α) (Genzyme) pentru a obține o concentrație finală a mediului de 140 U/ml și s-au lăsat la incubat la 37°C 4 h. După 4 h de incubare, s-a recuperat mediul și s-a depozitat pentru analiza producerii chemokinei. Celulele s-au spălat de 3 ori cu fosfat salin tamponat fără calciu și magneziu. Apoi, monoculturile s-au fixat prin adăugare timp de 15 min la godeuri a 10% formalină tamponată. După fixare, celulele s-au spălat de 3 ori cu mediu Dulbecco modificat Eagle (Gibco) conținând 2% albumină serică bovină (DMEM/2% BSA) și s-a refrigerat peste noapte.

#### **ELISA**

40 S-au adăugat la fiecare godeu la 0,5 μg/ml și s-au lăsat să incubeze la 37°C timp de 2 h monoclonal murin anti-uman ICAM-1 (R&D Systems Cat. nr. BBA-2) sau monoclonal murin anti-uman selectină E (R&D Systems Cat. nr. BBA-2) dizolvate în DMEM/2% BSA. Apoi, monoculturile HUVEC s-au spălat de 4 ori cu DMEM/2% BSA. S-a adăugat o peroxidază conjugată oaie anti-șoarece IgG (Cappel) (diluție 1:3000) și s-a lăsat la incubat 1 h la 37°C. Celulele s-au spălat apoi de 4 ori cu DMEM. S-a adăugat la celulele fixate un reactiv colorat (Biorad) și s-a incubat 15 min la temperatura camerei. Reacția s-a oprit cu o soluție 2% de acid oxalic și absorbanta s-a citit la 414 nm pe un cititor de plăci Titertek.

#### **Compusul de testat**

45 Compușii s-au dizolvat în DMSO la o concentrație de 30 mM și s-au diluat cu mediu pentru a obține concentrațiile finale de testat. HUVEC-urile au primit compusul dizolvat în mediu 30 min înaintea provocării TNF-α. Absorbanta HUVEC-urilor nestimulate s-a scăzut din valorile absorbantei celulelor stimulate TNF-α înainte fiind determinat procentul inhibării. Procentul inhibării s-a determinat prin compararea absorbantei celulelor tratate cu vehicul cu a celulelor tratate cu medicament. S-au determinat IC<sub>50</sub> folosind analiza de regresie lineară.

50 **Metoda pentru determinarea inhibării aderenței neutrofilelor umane la celulele endoteliale din vena ombilicală umană (ECA) stimulate TNF-α**

#### **Cultura celulară**

55 Al doilea pasaj HUVEC (Clonetics Corporation, San Diego, California, CC-2617) s-a însămânțat în plăci de cultură celulară cu 96 godeuri Corning (Corning glass warks, Corning, New York) la aproximativ  $5 \times 10^3$  celule/godeu și s-a crescut până la confluente în mediu endotelial de bază suplimentat (EBM, MCDB-131, Clonetics, 10 ng/ml EGF, 1 μg/ml hidroclorid de cortizon, 0,4% extract de creier bovin, 5% ser bovin fetal) . O zi înaintea derulării testului, de obicei, 3 zile post însămânțare, culturile s-au realimentat cu 0,2 ml/godeu suplimentat EBM (S-EBM).

# MD 1688 G2 2001.06.30

7

## **Prepararea compușilor de testat**

5 Compușii test s-au preparat ca soluții stoc de 10 ml la o concentrație de 1,0 mM. Compușii s-au solubilizat inițial în 0,1 ml DMSO urmat de adăugarea a 9,9 ml S-EBM. Preparatele de medicament s-au diluat apoi într-o etapă la o concentrație de 66,6 μM. Solubilizările și diluțiile s-au realizat în recipiente de polistiren.

## **Stimularea HUVEC**

10 S-a preparat la 400 U/ml în S-EBM factor alfa recombinant al necrozei tumorale umane (TNF, Genzyme, Boston, Massachusetts, Cod TNF-H). Stocul TNF s-a preparat la 20 000 U/ml în fosfat salin tamponat Dulbecco (PBS, Gibco, Grand Island, New York) plus 0,1% BSA și s-a depozitat la -70°C. S-a spălat o dată HUVEC cu 0,2 ml EBM cald nesuplimentat și apoi s-au stimulat 4 h la 37°C cu 200 U/ml TNF în prezența a 33,3 μM compusul de testat. Aceasta s-a realizat prin adăugarea a 0,1 ml de 400 U/ml TNF și 0,1 ml 66,6 μM compus de testat. Aceste adăugări s-au făcut încet pentru a nu distruge monostratul HUVEC. Fiecare compus s-a testat în 6 godeuri. De asemenea, s-au realizat în fiecare placă tratamente nestimulate (martor vehicul) și stimulate TNF fără compusul de testat.

## **Marcarea neutrofilelor**

15 Cu 1 h înainte de adăugarea neutrofilelor la HUVEC, neutrofilele ( $5 \times 10^6$ /ml) s-au marcat 30 min la 37°C cu 5 μM calceină-AM (Molecular Probes, Eugene, Oregon) în soluție de săruri echilibrate Hanks plus, 0,45% BSA. Calceina stoc s-a preparat la 5 mM în DMSO anhidru și s-a păstrat desicată la -20°C. La sfârșitul incubării celulele s-au spălat de 2 ori în HBSS rece și s-au resuspendat la o concentrație finală de  $1 \times 10^6$  celule/ml în EBM suplimentat.

## **Adăugarea neutrofilelor la HUVEC**

20 La sfârșitul celor 4 h de stimulare și imediat înaintea adăugării neutrofilelor la monostratul HUVEC, plăcile s-au spălat cu 0,2 ml EBM cald nesuplimentat pentru a îndepărta TNF și medicamentul. Neutrofilele ( $1 \times 10^5$  celule) s-au adăugat încet la fiecare dintre godeurile tratate și s-au incubat 30 min la 37°C. La sfârșitul incubării plăcile s-au spălat de 2 ori cu 0,2 ml EBM cald nesuplimentat urmat de o adăugare finală de 0,1 ml pentru scanarea plăcii.

## **Determinarea fluorescenței relative**

25 Fluorescența relativă s-a determinat folosind un sistem Millipore Cytofluor 300 (excitare = 480, emisie = 530, sensibilitate = 4).

## **Calcul**

30 Testul s-a considerat valid dacă stimularea TNF a HUVEC a avut ca urmare o creștere de 300% a aderenței neutrofilului față de aderență la HUVEC nestimulate. Rezultatele s-au exprimat ca medii ale procentului inhibiției aderenței stimulate TNF.

$$\text{Inhibiție, \%} = 100 - \left[ \frac{\text{aderență stimulată (medicament)} - \text{aderență nestimulată}}{\text{aderență stimulată (martor)} - \text{aderență nestimulată}} \right]$$

Câțiva dintre acești compuși s-au testat la concentrații de 33,3 μM, 10,0 μM, 3,3 μM și 1,0 μM pentru determinarea valorilor IC<sub>50</sub>.

35 Analiza regresiei lineare a mediilor valorilor inhibiției s-a folosit pentru a determina IC<sub>50</sub>.

Rezultatele obținute cu anumiți compuși ai prezentei invenții sunt prezentate în tab. 1.

Compușii prezentei invenții în special cei cu formula III s-au dovedit a inhiba activarea virusului HIV, latent la mamifere infectate și, prin urmare, sunt utili în tratamentul SIDA.

40 Încercările de înțelegere a bazei virologice și celulare pentru perioada clinică asimptomatică arată că HIV există ca un provirus în stare latentă sau care nu se exprimă într-o populație rezervor de celule infectate cronic. Un tip specific al HIV, HIV-1 a fost subiectul a numeroase proiecte diferite de cercetare care au dovedit că virusul există ca un provirus în stare latentă sau care nu se exprimă într-un rezervor de populație de celule limfocitare T infectate cronic. Detalii mai multe referitoare la mecanismele nucleare și biochimice responsabile pentru menținerea stării virale neexpresive, totuși, sunt în afara ariei acestei lucrări, dar pot fi găsite în detaliu pretutindeni (Mechanisms of HIV-1 Latency, Bednarik et al., Aids 6: 3-16 (1992)).

45 Până recent s-a crezut că HIV a fost latent sau nu se exprimă în toate rezervele de populație ale celulelor infectate cronic în timpul perioadei clinice asimptomatice. Observații ale nivelurilor scăzute sau absente ale viremiei și replicării virusului în celule sanguine periferice conduc la impresia că moartea HIV nu a fost activă în timpul perioadei clinice asimptomatice. O echipă de cercetători a descoperit totuși că o stare adevărată de latență microbiologică nu există în cursul infecției HIV (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)).

50 Cercetătorii au raportat o dihotomie între nivelurile încărcării virale și replicarea virală în sângele periferic față de organele limfoide în timpul latenței clinice. Pe baza acestei constatări, cercetătorii au descoperit că "sângele periferic nu reflectă cu precizie starea actuală a bolii HIV, în special devreme în cursul infecției clinice a HIV. De fapt, boala HIV este activă și progresivă chiar când există o dovadă mică a activității bolii prin parametrii virali măsurați imediat în sângele periferic și pacientul este supus latenței clinice".

# MD 1688 G2 2001.06.30

8

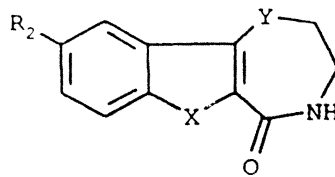
Inevitabil, starea de boală a HIV progresa de la perioada latenței asimptomatice clinic până la perioada expresivă și activă simptomatic. Prin utilizarea a câtorva modele diferite, o înțelegere a căilor celulare implicate în activarea HIV din starea de latență a început să se dezvăluie. Conform lui Butera et al., AIDS 6: 994 (1992), numeroase modele celulare de latență pot fi induse să exprime HIV-1 la tratament cu citokine. Aceasta arată că în starea de latență microbiologică, HIV-1 așteaptă un stimul extracelular înainte de inițierea replicării. Acest semnal poate fi mediat nu numai dacă o citokină solubilă interacționează cu receptorul său ci de asemenea prin interacțiuni receptor-receptor care se întalnesc în timpul comunicării de la celulă la celulă sau stress-ului celular cum ar fi expunere la lumină UV și șoc termic. Mai mult decât atât, un semnal de inducere extracelular poate fi generat în mod autocrin sau paracrin, astfel încât o celulă activată HIV-1 poate propaga expresia proprie în același timp activând o celulă latentă din apropiere.

Factori suplimentari au fost considerați de către cei cu pregătire în domeniu a fi implicați în activarea HIV. O lucrare a arătat că 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetatul (TPA) mediază scăderea CD4 și expresia virală în celule infectate HIV (Hamamoto et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 164: 339-344 (1989)). Interesant, Hamamoto a examinat de asemenea efectul inhibitorilor proteinkinazei C potențiale, staurosporina, H-7 și UCN-01 asupra scăderii CD4 mediată TPA și creșterii expresiei HIV. Staurosporina s-a găsit a fi un inhibitor TPA eficient pentru ambele aceste acțiuni.

Căile celulare implicate în medierea semnalului de activare de la membrana plasmatică la virusul integrat care are ca urmare expresia HIV-1 sunt mai puțin clare. Recent, a fost raportată dezvoltarea unui sistem simplu și ușor de realizat pentru evaluarea compușilor care ar putea preveni activarea HIV latent la National Cooperative Discovery Grant (NCDDG)/AIDS de către P. Feorino, S.T. Butera, T.M. Folks și R.F. Schinazi, 3-7 noiembrie, 1991. Sistemul de testare a folosit linia celulară OM-10.1, o clonă promielocitică unică infectată cronic care rămâne CD4+ până la activarea HIV-1 cu factorul alfa de necroză tumorală. Expresia CD4+ pe suprafața celulei și activitatea transcriptazei inverse, s-au folosit ca marcheri pentru cuantificarea expresiei virale. Alternativ, se pot folosi alți marcheri HIV ca activitatea proteazei care sunt cunoscuți pentru cei cu pregătire în domeniu. Celulele OM-10.1 rămân CD4+ până la activarea virală și răspund la inducerea factorului de necroză tumorală și prin urmare aceste culturi sunt folosite pentru a examina convenabil și rapid medicamente, pentru capacitatea de a preveni modularea în scădere CD4+ (descresștere în expresia CD4+ pe suprafața celulei) și expresia HIV-1.

O diversitate de compuși cunoscuți a avea proprietăți antivirale împotriva celulelor infectate fie acut, fie cronic s-au evaluat pentru capacitatea lor de a inhiba expresia HIV în aceste celule OM-10.1. Câțiva compuși care interacționează cu căile biochimice care pot interfera cu procesul de reactivare au fost de asemenea examinate. Rezultatele evaluării au fost prezentate într-un poster la NCDDG/AIDS, San Diego, California, 3-7 noiembrie (1991). Dintre acești 48 de compuși evaluați, 3'-fluor-3'-deoxitimidina (FLT), interferonul Y și desferioxamina au fost considerați inhibitori modești ai activării HIV-1.

Un compus reprezentativ cu formula I, 2,3-dihidro-9-metoxi-(1)benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-onă, a arătat un IC<sub>50</sub> al inhibării de 0,21 μM în celule OM-10.1 (tab. 1).



2,3-dihidro-9-metoxi-(1)benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-onă

Tabelul 1

40

Exemplu	R <sub>2</sub>	X	Y	ECA, IC <sub>50</sub>	ICAM/ESEL (IC <sub>50</sub> sau % inhib. 30 μM)	OM-10.1, IC <sub>50</sub> μM
1	OMe	S	S	5,2	3,1/1,3	0,21
2	H	S	O		42%/40%	>30
4	OMe	NMe	O		14,7/14,2	
5	H	S	NH		64%/47%	
6	OMe	S	O		3,1/7,5	
7	OMe	S-O	O		30%/30%	
8	OMe	S	O(2-metil)		3,8/5,3	

# MD 1688 G2 2001.06.30

9

Activitatea compușilor invenției s-a demonstrat de asemenea în analize standard *in vivo* pentru a măsura capacitatea lor de a inhiba influxul de neutrofile și pentru conformitate, utilitatea lor de a trata condiții de inflamație. Intr-un test denumit Reverse Passive Arthus Pleurisy Assay, s-au înfometat șobolani Wistar masculi (220-245 g, Charles River Laboratories) 16-18 h. S-a administrat i/v vehicul (1:1, etanol : soluție salină) sau un compus al invenției dizolvat în vehicul. Animalele s-au anesteziat ușor cu eter și au primit o injecție i/v de 2,5 mg albumina serică bovină (BSA) în soluție salină. Imediat după injecția i/v s-a făcut o incizie mică între coaste și s-a injectat 0,2 ml dintr-o fracție IgG de iepure anti-BSA (10 mg/ml) în fosfat salin tamponat Dulbecco (PBS) în cavitatea pleurală folosind un ac de dozare orală de mărime 20. Incizia a fost apoi închisă cu o agrafă din oțel inoxidabil de 9 mm. După 4 h, animalele au fost supuse eutanasiei cu dioxid de carbon și cavitatea pleurală a fost inundată cu 2 ml dintr-o soluție roșu de fenol 0,325% în PBS. Tamponul exudat s-a îndepărtat din cavitatea pleurală pentru analiză. S-au numărat celulele sanguine albe într-un numărător Coulter (90% neutrofile). Volumul exudatului pleural s-a măsurat printr-o metodă de diluție a colorantului (Carter, C.W. et al., J. Pharm. Pharmacol. 34: 66-67 (1982)). Grupurile tratate cu medicament s-au comparat cu un grup tratat cu vehicul și s-a determinat semnificația statistică folosind testul t Student.

20 Cand compusul exemplului 1 s-a evaluat în testul de mai sus, el a prezentat următoarele inhibiții:

Doză (mg/kg)	% inhibării exudatului	% inhibării influxului de neutrofile
0,3	40,5	18,6
1,0	28,4	8,9
3,0	28,2	15,9

25 În alt test *in vivo*, denumit testul influxului de neutrofile indus tioglicolat, s-au găzduit șoareci femele Balb/c în grupe de 7 cu acces liber la hrană și apă în timpul studiului. Animalele s-au dozat oral cu vehicul (0,5% hidroxipropilmetilceluloză cu 0,2% Tween 80) sau compusul invenției dizolvat sau suspendat în vehicul. La 1 h după administrare orală șoarecii s-au anesteziat prin inhalare cu eter dietilic și s-au injectat intraperitoneal cu 1,0 ml de 3% mediu tioglicolat în soluție salină. La 2 h, după injecție de tioglicolat, animalele s-au supus eutanasiei prin asfixie cu dioxid de carbon și s-au injectat cu 6 ml PBS Dulbecco conținând 10 U/ml heparină sodică și 0,1% BSA. S-a masat cavitatea peritoneală și s-a făcut o incizie în cavitate pentru a permite fluidului să fie colectat în eprubete de centrifugă de 15 ml. S-a recuperat un alicot de la fiecare animal și s-a numărat numărul total de celule din fiecare alicot folosind un numărător Coulter (Model ZB, Coulter Instruments, Hialeah, Florida). Un al 2-lea alicot se recuperează pentru microscopie folosind Cytospin 2 (Shandon Inc., Pittsburgh, Pennsylvania), și colorare ulterioară (colorație Wright modificată). S-au realizat diferențele hematologice pentru a determina procentul neutrofilelor care au extravazat cavitatea peritoneală.

35 Cand compusul exemplului 1 s-a evaluat în acest test el a prezentat inhibiție 26,1% influxului de neutrofile la 10 mg/kg, inhibiție 31,9% la 30 mg/kg și inhibiție 34,3% la 100 mg/kg.

Compușii prezentei invenții se pot prepara prin metodele care urmează.

40 Prima abordare generală necesită ca materii prime 3-hidroxi, tiol sau aminobenzo(b)tiopen, benzofuran sau esteri indol-2-carboxilat de structura 1 (schema 1). Esterii 3-hidroxi-benzo(b)tiopen-2 se prepară conform Connor D.T. et al., J. Med. Chem., 35:958 (1992). Esterii 3-tio-benzo(b)tiopen-2-carboxilat sunt preparați prin tratamentul derivatului analog 3-clor (Connor D.T. et al., J. Med. Chem., 35:958 (1992)) cu tioacetamidă în prezența unei baze ca 1,8-diaza-biciclo[5.4.0]-undec-7-enă (DBU) și un solvent ca N,N'-dimetilformamidă sau tetrahidrofuran. Esterii 3-amino-benzo(b)tiopen-2-carboxilat sunt preparați prin metoda generală cunoscută (Beck J.R., J. Org. Chem., 37:3224 (1972)). Esterii 3-hidroxi-indol-2-carboxilat sunt preparați prin metode cunoscute (Unangst P.C. et al., J. Heterocyclic Chem., 24:811 (1987); Moyer M.P. et al., J. Org. Chem., 51:5106 (1986)). Esterii 3-tio-indol-2-carboxilat sunt preparați prin metode cunoscute ca Unangst P.C. et al., J. Heterocyclic Chem., 24:811 (1987); Atkinson J.G. et al., Synthesis, 480 (1988); Nagarajan K. et al., Indian J. Chem., 20B:672 (1981). Esterii 3-amino-indol-2-carboxilat sunt preparați prin metode cunoscute precum Simakov S.V. et al., Khim. Farm. Zu., 17:1183 (1983).

50 Transformarea compușilor de tipul 1 la cei ai acestei invenții este arătată în schema 1. Esterii sunt tratați cu un derivat acetonitril substituit  $\alpha$ -halo ca bromacetonitril în prezența unei baze ca t-butoxid de potasiu tetrahidrofuran, acetonitril sau dimetilsulfoxid la 0-80°C pentru a da esterii de tipul 2. Gruparea nitril se reduce la amina primară corespondentă și intermediarul 3 rezultat se ciclizează la lactama 4. Transformarea preferată este hidrogenarea lui 2 cu catalizatorul Raney cobalt în prezența unui solvent ca tetrahidrofuran în prezența unei baze ca trietilamină la temperatură și presiune ridicată. În aceste condiții se obține 4 direct din 2. Dacă se izolează intermediarul 3 el se



## MD 1688 G2 2001.06.30

10

ciclizează la 4 în condiții bazice, de preferință NaOMe în metanol, sau acide, de preferință acid polifosforic, la temperaturi ridicate.

5 În timpul sintezei unora dintre compușii invenției poate fi necesar sau de dorit să se convertească grupări reactive ca hidroxi, amino și carboxi la derivați care le vor proteja de reacții laterale nedorite când o reacție dorită poate avea loc în altă parte în moleculă. Astfel de grupări protejate hidroxi, amino și carboxi, sunt deprotejate imediat prin metode convenționale. Radicalii chimici folosiți în mod obișnuit care servesc pentru protejarea grupărilor reactive ca hidroxi, amino și carboxi și metode pentru atașarea lor și îndepărtarea ulterioară sunt descrise de către Greene și Wuts în *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991.

10 De exemplu, un 3-amino, 3-hidroxi sau 3-tioindol, benzotiofen sau benzofuran (compusul 1 în schema 1) poate fi reacționat cu o  $\beta$ -halo-etilenamină când gruparea amino este protejată cu o grupare de protecție adecvată (PG) ca t-butoxicarbonil (Boc) sau benziloxicarbonil (Cbz). Reacția în aceleași condiții precum cele descrise mai sus dă compuși de tip 5. Deprotejarea (alias, îndepărtarea PG) a lui 5 în condiții standard, adică acid trifluoracetic sau acid apos pentru îndepărtarea Boc sau hidrogenoliză pentru îndepărtarea Cbz asigură compușii de tip 3 care sunt ciclizați cum s-a remarcat mai devreme. Altă abordare este reacția compușilor de tip 1 cu etilenimină într-un solvent alcoolic pentru a da direct 3 (vezi: Nagarajan K. et al., *Indian J. Chem.*, 20B:672 (1981)) .

15 O a doua abordare generală (schema 2) pentru compușii de tipul 4 este de la derivații 3-halo corespondenți 6. Reacția lui 6 cu etilendiamină și oxid cupric într-un solvent ca piridină în prezența unei baze precum carbonat de potasiu dă compuși de tip 3 unde Y este NH (vezi: Hiremath S.P. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, India, 60:367 (1990)). Reacția lui 6 cu cisteamină într-un solvent ca dimetilformamidă în prezența unei baze ca DBU dă compuși de tip 3 unde Y este S. Reacția lui 6 cu nitroetanol într-un solvent ca tetrahidrofuran în prezența unei baze ca t-butoxid de potasiu sau hidrură de potasiu dă compuși de tip 7. Reducerea ulterioară a grupării nitro la o amină conduce la compuși de tip 3 unde Y este O. În unele din cazurile de mai sus 3 nu se poate izola, dar 4 se poate obține direct.

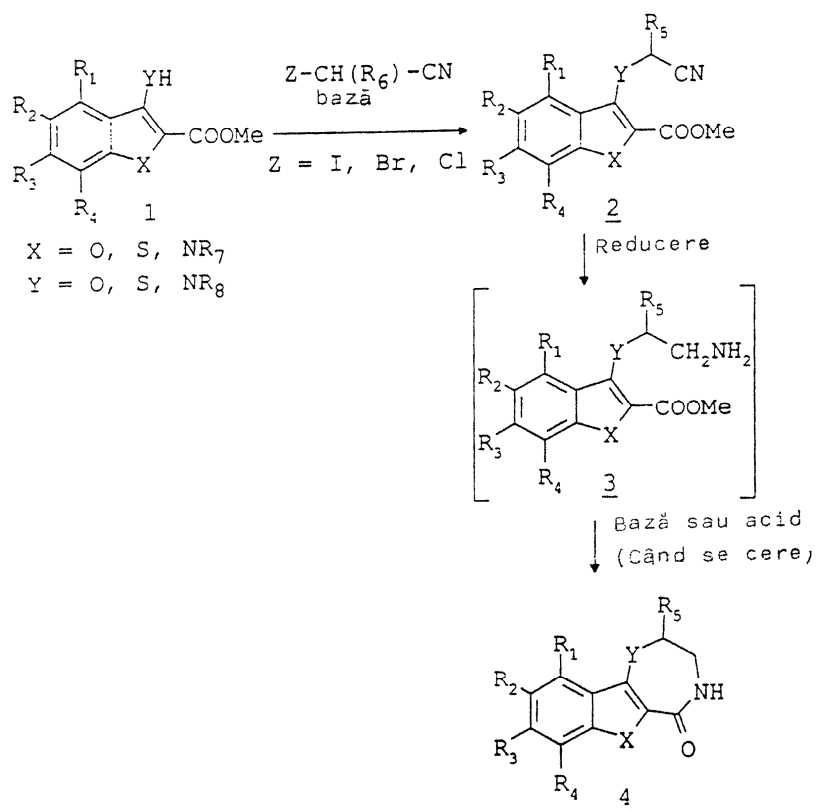
20 O a treia abordare generală (schema 3) utilizează de asemenea derivații 3-halo 6. Derivatul 3-halo se tratează cu o amină primară care conține o grupare adecvată amino, hidroxi sau tiol protejată la poziția  $\beta$  pentru a forma o grupare amidă asigurând un intermediar de tip 7. Deprotejarea urmată de ciclizare duce la compuși de tipul 4. O secvență similară începe cu 3-hidroxi, tiol sau compus amino adăugând o amină cu o grupare reziduală corespunzătoare la poziția  $\beta$ . Intermediarii rezultați de tipul 8 sunt apoi ciclizați pentru a da 4.

25 Acei compuși de tip 4 unde X este S și Y este O sau NR pot fi transformați la sulfoxidul și/sau sulfona corespondentă 9 cu un agent de oxidare ca acid m-clorperbenzoic (m-CPBA) sau oxaziridină cu condiții de reacție care determină mărimea oxidării (schema 4). Pentru acei compuși de tip 4 în care Y este S, oxidarea similară va da fie sulfoxidul sau sulfona de tip 10.

30 Schema 1

# MD 1688 G2 2001.06.30

11

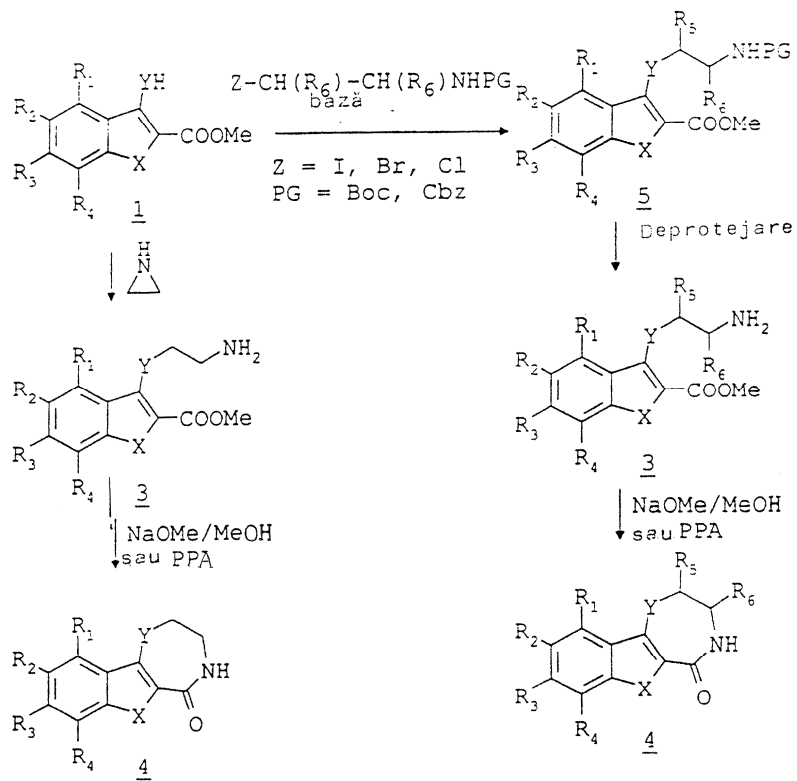


5

Schema 1 (continuare)

# MD 1688 G2 2001.06.30

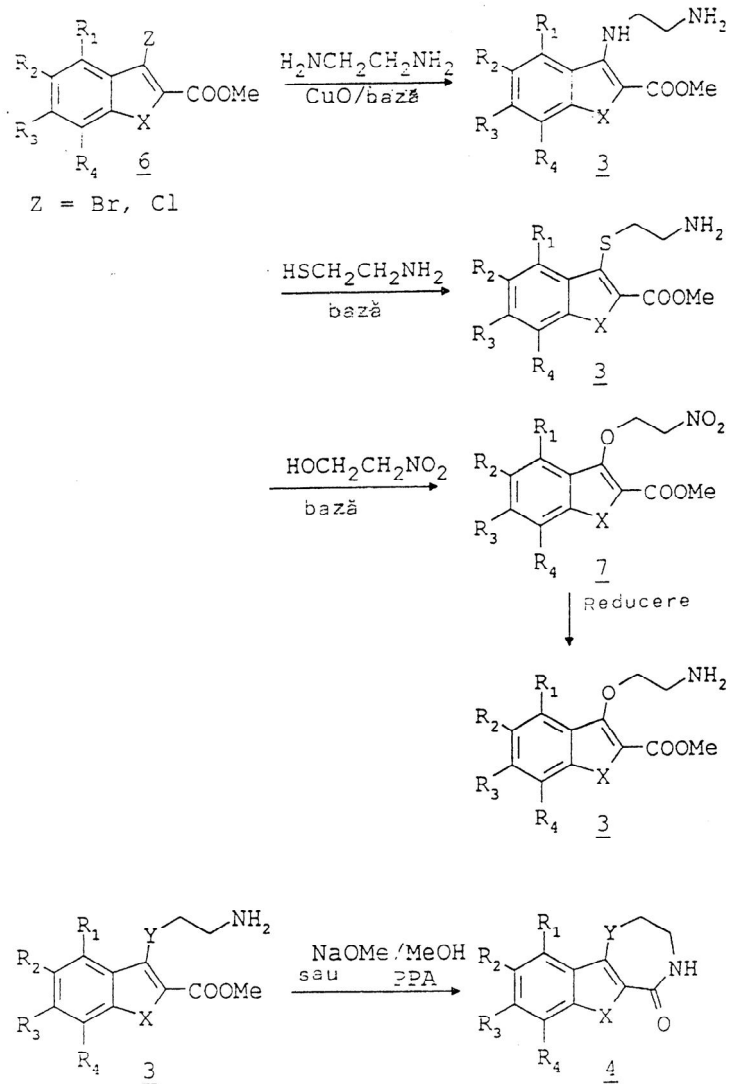
12



# MD 1688 G2 2001.06.30

13

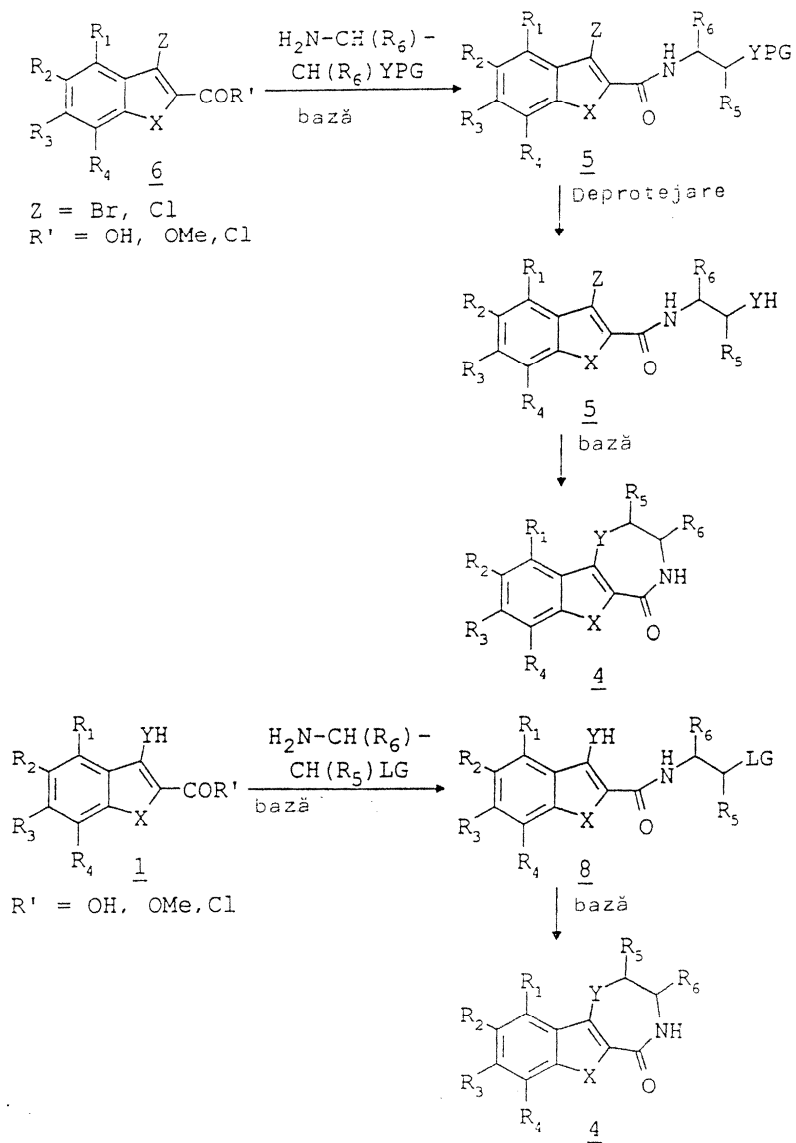
Schema 2



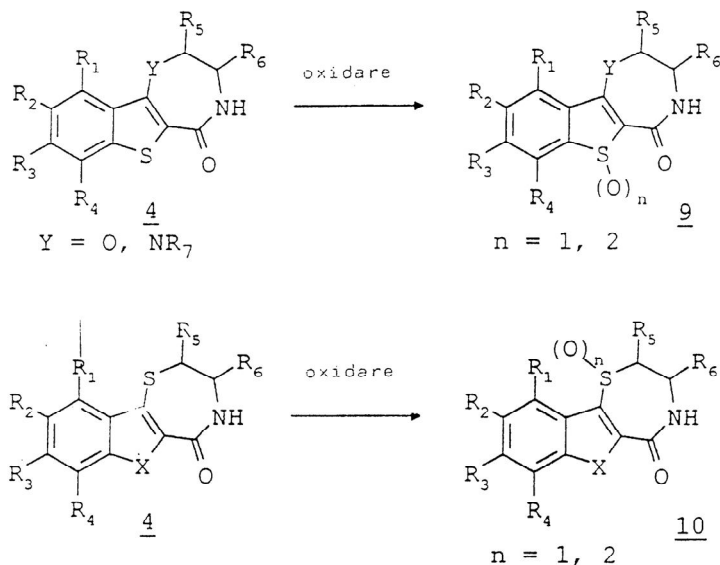
# MD 1688 G2 2001.06.30

14

Schema 3



Schema 4



5

Următoarele exemple sunt ilustrative pentru prepararea compușilor invenției de față.

*Exemplul 1. 2,3-Dihidro-9-metoxi-(1)benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-onă*

La temperatura camerei la o soluție de metil 3-clor-5-metoxibenzo(b)tiofen-2-carboxilat (500 mg, 1,95 mmoli), preparată prin reacția cunoscută clorură de 3-clor-5-metoxi-benzo(b)tiofen-2-carbonil cu metanol (J. Med. Chem., 35: 958 (1992)), în 20 ml DMF se adaugă cisteamină-HCl (885 mg, 7,79 mmoli) urmată de DBU (2,33 ml, 15,58 mmoli). Amestecul de reacție se agită la temperatura camerei 1,5 h, apoi se încălzește la 70°C. Amestecul se diluează cu acetat de etil și se spală cu HCl apos, apă și saramură. Stratul organic se usucă pe MgSO<sub>4</sub>, se filtrează și se concentrează în vid. Produsul brut se recristalizează din hexan și acetat de etil pentru a da 2,3-dihidro-metoxi(1)benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-onă cu randament 74%; p. t. 209-209,5°C.

15 *Exemplul 2. 2,3-Dihidro-(1)benzotieno[2,3-f]-1,4-oxazepin-5(4H)-onă*

Un amestec de ester metilic al acidului 3-(cianometoxi)-benzo(b)tiofen-2-carboxilic (405 mg, 1,64 mmoli) (J. Hetero. Chem. 12:1037 (1975)), 0,5 ml de Et<sub>3</sub>N și 0,50 g de RaCo în 50 ml de THF se încălzește la 100°C sub 1200 psi de hidrogen. Amestecul de reacție se concentrează în vid. Coloana de cromatografie eluată cu un gradient 1:1 hexan:acetat de etil până la tot acetat de etil dă 2,3-dihidro-(1)benzotieno[2,3-f]-1,4-oxazepin-5(4H)-onă cu randament 55%; p.t. 244-245°C.

*Exemplul 3. 2,3-Dihidro-9-metoxi-(1)benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-onă-1-oxid*

Un amestec de 2,3-dihidro-9-metoxi-(1)benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-onă (200 mg, 0,75 mmoli) și NaBO<sub>3</sub> - 4H<sub>2</sub>O (116 mg, 0,75 mmoli) în 18 ml de AcOH se agită la temperatura camerei peste noapte. Amestecul de reacție se filtrează și se adaugă filtratului 60 ml de apă. Filtrarea asigură 2,3-dihidro-9-metoxi-(1)benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-onă-1-oxid cu randament 69%; p.t. 215-216°C (dec).

*Exemplul 4. 3,4-Dihidro-9-metoxi-6-metil-2H-1,4-oxazepino[6,7-b]-indol-5(6H)-onă*

*A. Metil 3-(cianometoxi)-5-metoxi-1-metil-1H-indol-2-carboxilat*

O suspensie de terț-butoxid de potasiu (3,2 g, 29 mmoli) în 60 ml de dimetilsulfoxid se tratează în porții cu metil 3-hidroxi-5-metoxi-1-metil-1H-indol-2-carboxilat (5,6 g, 24 mmoli; Unangst P.C. et al., J. Heterocyclic Chem., 24: 811 (1987)). Amestecul se agită 15 min și se adaugă în picătură cloracetnitril (4,8 ml, 5,7 g, 76 mmoli). Amestecul se încălzește la 80°C timp de 90 min, se răcește și se adaugă la 800 g gheață și apă. Precipitatul solid se filtrează, se spală cu 10% metanol-apă și se recristalizează din acetnitril apos pentru a da 3,9 g (60%) de produs; p.t. 136-137°C.

*B.* Un amestec de metil 3-(cianometoxi)-5-metoxi-1-metil-1H-indol-2-carboxilat (0,60 g, 2,2 mmoli) și trietilamină (0,40 ml, 0,29 g, 2,9 mmoli) în 35 ml de tetrahidrofuran într-un vas de reacție de presiune se tratează cu catalizator Raney cobalt (0,40 g). Reactorul se presurizează cu hidrogen (590 psi) și se încălzește la 80°C timp de 10 h. Amestecul de reacție răcit se filtrează și filtratul se evaporă. Reziduuil uleios se dizolvă în 50 ml metanol și la

## MD 1688 G2 2001.06.30

16

soluție se adaugă metoxid de sodiu (0,80 g, 15 mmoli). Amestecul se încălzește la reflux timp de 3 h, apoi se răcește și evaporă. Reziduu se repartizează între 75 ml acetat de etil și 150 ml saramură. Stratul apos se extrage de câteva ori cu acetat de etil proaspăt. Straturile organice combinate s-au spălat cu saramură, uscat (sulfat de sodiu anhidru) și s-au evaporat. Produsul rezidual brut se purifică prin flash cromatografie (silicagel, 5% metanol, în eluție diclormetan) pentru a da 0,18 g (33%) de produs. O probă recristalizată din acetat de etil-hexan a avut p.t. 184-186°C.

5 *Exemplul 5. 2,3-Dihidro-1H-benzotieno-[3,2-e]-1,4-diazepin-5-onă*

*Esterul metilclorhidric al acidului 3-(2-aminoetilamino)benzo[b]tiofen-2-carboxilic*

10 O soluție de 2-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)benzotiofenol (1,00 g, 5,62 mmoli) (Hegen. H., Fleig, H., Justus Liebigs Ann. Chem., 11:1994 (1975)) și acetat de clorometil (610 mg, 5,62 mmoli) în 15 ml de metanol se încălzește la reflux 90 min. Reacția se încălzește la temperatura camerei și se filtrează. Filtratul se concentrează la sec și reziduu se dizolvă în cloroform fierbinte. După câteva ore precipitatul rezultat se colectează și se usucă. Soluția-mamă permite o a doua recoltă de cristale dând esterul metilclorhidric al acidului 3-(2-aminoetilamino)benzo[b]tiofen-2-carboxilic într-un randament total de 61%, p.t.219-220°C.

15 *2,3-Dihidro-1H-benzotieno-[3,2-e]-1,4-diazepin-5-onă*

O soluție de ester metilclorhidric al acidului 3-(2-aminoetilamino)benzo[b]tiofen-2-carboxilic (339 mg, 1,18 mmoli) și metoxid de sodiu preparat proaspăt (din 134 mg, 2,48 mmoli de sodiu) în 5 ml de metanol se încălzește la reflux 18 h. Pe răcire, reacția se neutralizează cu 25 ml de HCl 1N și se răcește la 0°C 1 h. Materialul cristalin galben care rezultă se filtrează și se usucă sub vid la 60°C timp de câteva ore pentru a da 2,3-dihidro-1H-benzotieno-[3,2-e]-1,4-diazepin-5-onă cu randament 64%. Cromatografia, eluarea cu un gradient de 2% metanol în acetat de etil în 5% metanol în acetat de etil dă 2,3-dihidro-1H-benzotieno-[3,2-e]-1,4-diazepin-5-onă analitic pură, p.t. 210-212°C.

*Exemplul 6. 2,3-Dihidro-9-metoxi-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă*

*Esterul metilic al acidului 3-cianometoxi-5-metoxi-benzo[b]tiofen-2-carboxilic*

25 La o soluție de metil 3-hidroxi-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-carboxilat (1,00 g, 4,2 mmoli) (Connor et al., J. Med. Chem., 35:959 (1992)) în 20 ml de DMSO la temperatura camerei s-a adăugat t-butoxid de potasiu (494 mg, 4,41 mmoli) urmat de bromacetoneitril (878 ul, 12,58 mmoli). Amestecul s-a agitat la temperatura camerei 1,5 h, apoi se toarnă în acetat de etil și HCl 1N. Stratul organic s-a spălat cu HCl 1N, urmat de câteva porții de saramură și s-a uscat pe MgSO<sub>4</sub>. Filtrarea urmată de îndepărtarea solventului în vid și recristalizarea reziduului din acetat de etil:hexan a dat 413 mg. S-a obținut o recoltă suplimentară de 112 mg din soluția-mamă, p.t. 159,5-160°C.

30 *2,3-Dihidro-9-metoxi-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă*

O soluție de ester metilic al acidului 3-cianometoxi-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-carboxilic (2,5 g, 9,0 mmoli) în 50 ml de THF s-a încălzit până la reflux viguros. S-a adăugat rapid sulfură de bor-dimetil (9,0 ml, 90,2 mmoli) și încălzirea s-a continuat timp de 25 min fiind adăugat THF pe măsura evaporării. O cantitate adițională de sulfură de bor-dimetil (4,0 ml) s-a adăugat și încălzirea s-a continuat timp de 10 min. Amestecul de reacție s-a răcit până la 0°C și s-a adăugat cu grijă 50 ml de HCl 6N. S-a degajat hidrogen gazos și temperatura amestecului de reacție a crescut. Precipitatul rezultat s-a colectat prin filtrare, s-a spălat cu apă și s-a uscat in vid peste noapte.

35 Solidul (2,3 g, 8,2 mmoli) s-a adăugat la o soluție proaspăt preparată de metoxid de sodiu (din 1,9 g, 82,0 mmoli de sodiu) în 40 ml metabol. Amestecul de reacție s-a încălzit la 50°C timp de 2 h, apoi s-a încălzit la reflux timp de 2 h. După răcire la temperatura camerei, precipitatului s-a colectat și s-a spălat cu metanol rece, urmat de eter dietilic rece. Solidul s-a uscat în vid peste noapte pentru a obține 1,18 g (52%). O probă analitică de 2,3-dihidro-9-metoxi-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă s-a obținut prin recristalizare din acetat de etil:hexan, p.t. 264-265°C.

*Exemplul 7. 2,3-Dihidro-9-metoxi-6-oxid-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă*

45 La o suspensie de 2,3-dihidro-9-metoxi-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă (1,00 g, 4,0 mmoli) în 100 ml de metanol cald s-a adăugat apă oxigenată 30% (8,0 ml, 80 mmoli) urmat de dioxid de seleniu (445 mg, 4,01 mmoli). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei 3 h, apoi s-a încălzit la 30°C 1,5 h urmat de încălzire la 40°C 2 h. Amestecul de reacție se răcește până la -40°C și precipitatul rezultat se colectează prin filtrare. Reziduu se cromatografiază eluând inițial cu 5% metanol în acetat de etil crescând gradat polaritatea solventului până la 1:1 metanol:acetat de etil pentru a da 338 mg de produs. Se obține o probă analitică de 2,3-dihidro-9-metoxi-6-oxid-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă prin recristalizare din metanol:acetat de etil, p.t. 273-274°C.

50 *Exemplul 8. 2,3-Dihidro-9-metoxi-2-metil-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă*

*Esterul metilic al acidului 3-(1-cianoetoxi)-5-metoxi-benzo[b]tiofen-2-carboxilic*

55 La o soluție de metil 3-hidroxi-5-metoxibenzo[b]tiofen-2-carboxilat (1,00 g, 4,2 mmoli) (Connor et al., J. Med. Chem. 35:958 (1992)) în 20 ml DMSO la temperatura camerei se adaugă t-butoxid de potasiu (494 mg, 4,41 mmoli) urmat de 2-clorpropionitril (1,1 ml, 12,6 mmoli). Amestecul se agită la temperatura camerei 1,5 h, apoi se încălzește până la 82°C timp de 3 h. Amestecul de reacție se toarnă în acetat de etil și HCl 1N. Stratul organic se spală cu HCl 1N urmat de câteva porțiuni de saramură și se usucă pe MgSO<sub>4</sub>. Filtrarea urmată de îndepărtarea solventului în vid și recristalizarea reziduului din acetat de etil:hexan dă 853 mg, p.t. 127-129°C.

*2,3-Dihidro-9-metoxi-2-metil-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă*

# MD 1688 G2 2001.06.30

17

O soluție de ester metilic al acidului 3-(1-cianoetoxi)-5-metoxibenzo[b]-tiofen-2-carboxilic (400 mg, 1,37 mmoli) în 10 ml de THF se încălzește la reflux viguros. Se adaugă în picătură sulfură de bor-dimetil (1,4 ml, 13,7 mmoli) și încălzirea continuă 20 min adăugându-se THF pe măsura evaporării. Amestecul de reacție se răcește până la temperatura camerei și se adaugă atent 7,5 ml de HCl 6N. După 5 min, amestecul de reacție se răcește la 0°C și se adaugă 68,5 ml de NaOH 1N urmat de acetat de etil. Straturile se separă și faza organică se spală cu 1:1 saramură:apă, apoi cu saramură suplimentară. Faza organică se usucă pe MgSO<sub>4</sub>, se filtrează și se concentrează în vid. Reziduu se cromatografiază eluând cu un gradient de 5:25:70 metanol:hexan:cloroform până la 10:90 metanol:cloroform până la 30:70 metanol:cloroform pentru a da 135 mg produs. Se obține o probă analitică de 2,3-dihidro-9-metoxi-2-metil-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă prin recristalizare din acetat de etil:hexan, p.t. 185-186°C.

Compușii invenției sunt formulați cu ușurință cu diluanți și purtători comuni pentru administrare orală sau parenterală convenabilă la oameni și animale pentru tratamentul bolilor ca inflamație, în special artrite și altele asemenea. Următoarele exemple ilustrează prepararea de formulări farmaceutice tipice.

*Exemplul 9. Prepararea capsulei de 250 mg*

2,3-Dihidro-9-izopropoxi-7-clor-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă (250 mg) se amestecă până la uniformitate cu 150 mg de lactoză și 150 mg amidon de porumb. Amestecul se capsulează în capsule de gelatină. Astfel de capsule se administrează oral de la 1 la 3 pe zi pentru tratamentul artritei.

*Exemplul 10. Formulare pentru suspensie orală*

Ingredient	Cantitate
2,3-Dihidro-8-etil-10-trifluor-metil-6-oxid-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă	500 mg
Soluție de sorbitol (70% N.F.)	40 ml
Benzoat de sodiu	150 ml
Zaharină	10 mg
Aromă de vișine	50 mg
Apă distilată q.s. ad.	100 ml

Soluția de sorbitol se adaugă la 40 ml de apă distilată și oxazepinona se suspendă în acestea. Se adaugă și se dizolvă zaharina, benzoatul de sodiu și aromatizantul. Volumul se aduce la 100 ml cu apă distilată. Fiecare ml de sirop conține 5 mg de oxazepinonă. Această formulare orală este corespunzătoare pentru tratarea inflamațiilor în îngrijirea copiilor.

*Exemplul 11. Prepararea soluțiilor parenterale*

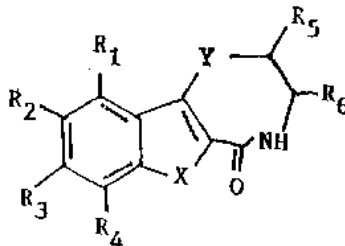
Intr-o soluție de 700 ml propilenglicol și 200 ml apă distilată pentru injectare se dizolvă 20,0 g de 2,3-dihidro-7-dimetilamino-1H-benzotieno-[3,2-e]-1,4-diazepin-5-onă. Se corectează pH-ul soluției până la 5,5 cu acid clorhidric și se aduce volumul la 1000 ml cu apă distilată. Formularea se sterilizează, se introduce în fiole de 5,0 ml fiecare conținând 2,0 ml (care reprezintă 40 mg diazepinonă activă) și se închide sub azot. Formularea se administrează intravenos la pacienți care suferă de inflamație sau SIDA.

*Exemplul 12. Prepararea cremei topice*

Se amestecă 500 mg 2,3-dihidro-7-etoxi-benzofurano-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă cu 15 g alcool cetilic, 1 g laurilsulfat de Na, 40 g silicon lichid D.C. 200 (de la Dow Corning Co, Midland, Michigan), 43 g apă sterilă, 0,25 g metilparaben și 0,15 g depropilparaben. Amestecul se încălzește la cca 75°C cu agitare constantă și apoi răcire la temperatura camerei la care se solidifică. Preparatul se aplică pe suprafața pielii unei persoane care suferă de inflamație.

## (57) Revendicări:

1. Compus cu formula (I)



40

sau o sare de adiție acidă acceptabilă farmaceutic a acestuia în care R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> și R<sub>4</sub> sunt fiecare independent hidrogen, hidroxi, halogen, alchil inferior, alcoxi inferior, benziloxi, trifluormetil, nitro sau -NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>, în care R<sub>8</sub> și R<sub>9</sub> sunt fiecare independent hidrogen sau alchil inferior;



# MD 1688 G2 2001.06.30

18

- $R_5$  și  $R_6$  sunt fiecare independent hidrogen, alchil inferior sau fenil;  
X este O, S ( $O$ )<sub>n</sub> sau NR<sub>7</sub>;  
Y este O, S ( $O$ )<sub>n</sub> sau NR<sub>8</sub>;  
 $R_7$  este hidrogen, alchil inferior, fenil, benzil, CH<sub>2</sub>OR<sub>8</sub> sau alchil inferior, fenil, benzil substituit cu halo;  
5  $R_8$  este hidrogen, alchil inferior sau fenil;  
n este un număr întreg de 0, 1 sau 2;  
cu condiția că
- 1) in cazul in care X este NH, Y este NH,  $R_1$  este H,  $R_3$  este H și  $R_4$  este Br,  $R_2$  nu este metil;
  - 2) in cazul in care X este NH, Y este NH,  $R_1$ ,  $R_3$  și  $R_4$  sunt H,  $R_2$  nu este metoxi sau etoxi;
  - 10 3) in cazul in care X este NH, Y este S, cel puțin unul dintre  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  și  $R_4$  nu este H.
2. Compus conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**  $R_1$ ,  $R_3$  și  $R_4$  sunt H.
  3. Compus conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că**  $R_2$  este H sau alcoxi inferior; X este O, S( $O$ )<sub>n</sub> sau NR<sub>7</sub>; Y este O, S( $O$ )<sub>n</sub>;  $R_7$  este H sau alchil inferior și n este 0, 1 sau 2.
  - 15 4. Compus conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** este 2,3-dihidro-9-metoxi-(1)benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-onă.
  5. Compus conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** este 2,3-dihidro-(1)benzotieno[2,3-f]-1,4-oxazepin-5(4H)-onă.
  6. Compus conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** este 2,3-dihidro-9-metoxi-(1)benzotieno[2,3-f]-1,4-tiazepin-5(4H)-onă-1-oxid.
  - 20 7. Compus conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** este 3,4-dihidro-9-metoxi-6-metil-2H-1,4-oxazepino[6,7-b]-indol-5(6H)-onă.
  8. Compus conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** este 2,3-dihidro-1H-benzotieno-[3,2-e]-1,4-diazepin-5-onă.
  9. Compus conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** este 2,3-dihidro-9-metoxi-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă.
  - 25 10. Compus conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** este 3,4-dihidro-9-metoxi-6-oxid-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă.
  11. Compus conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** este 3,4-dihidro-9-metoxi-2-metil-1H-benzotieno-[2,3-f]-1,4-oxazepin-5-onă.
  - 30 12. Compoziție farmaceutică ce posedă proprietatea de inhibare a aderării leucocitelor la celulele endoteliale și antiHIV, care cuprinde o cantitate eficientă terapeutică compusă definită în revendicarea 1 împreună cu un purtător acceptabil farmaceutic.
  13. Metodă de inhibare a aderării leucocitelor la celulele endoteliale în afecțiunile cauzate de aceasta, **caracterizată prin aceea că** cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic sub formă de unitate dozată a unei compoziții farmaceutice definite în revendicarea 12.
  - 35 14. Metodă conform revendicării 13, **caracterizată prin aceea că** afecțiunile reprezintă procese inflamatorii.
  15. Metodă de tratament al mamiferelor infectate cu HIV, **caracterizată prin aceea că** cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic sub formă de unitate dozată a unei compoziții farmaceutice definite in revendicarea 12.
  - 40

## (56) Referințe bibliografice:

1. US 4013641
2. WO 94/17075

Șef Secție:	EGOROVA Tamara
Examinator:	GROȘU Petru
Redactor:	ANDRIUȚĂ Victoria