



NORGE

(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **304886**

(13) **B1**

(51) Int Cl⁶ C 07 D 265/18, A 61 K 31/535

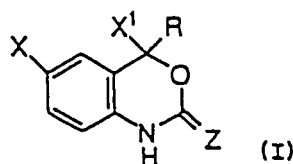
Patentstyret

(21) Søknadsnr	19950424	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	06.08.1993, PCT/US93/07376
(22) Inng. dag	06.02.1995	(85) Videreføringdag	06.02.1995
(24) Løpedag	06.08.1993	(30) Prioritet	07.08.1992, US, 926607
(41) Alm. tilgj.	06.04.1995		27.04.1993, US, 54805
(45) Meddelt dato	01.03.1999		
(73) Patenthaver	Merck & Co Inc, P.O. Box 2000, Rahway, NJ 07065-0906, US		
(72) Oppfinner	Steven D. Young, Lansdale, PA, US Susan F. Britcher, Norristown, PA, US Linda S. Payne, Lansdale, PA, US Lekhanh O. Tran, West Chester, PA, US William Carl Lumma Jr., Pennsburg, PA, US		
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, 0306 Oslo		

(54) **Benevnelse** **Benzoksazinoner som inhibitorer av HIV-revers transkriptase**

(56) **Anførte publikasjoner** Ingen

(57) **Sammendrag** **Visse benzoksazinoner av formel (I),**



hvori: X er halogen, X¹ er trihalometyl eller pentahaloetyl, Z er O, er anvendbare ved inhibering av HIV-revers transkriptase (innbefattende dens resistente varianter), forhindring eller behandling av HIV-infeksjon og behandling av AIDS, enten som forbindelser, farmasøytisk akseptable salter, farmasøytiske preparatbestanddeler, eventuelt i kombinasjon med andre antivirale midler, immunmodulatorer, antibiotika eller vaksiner. Metoder for behandling av AIDS og metoder for forhindring eller behandling av HIV-infeksjon er også beskrevet.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Et retrovirus betegnet som humant immunsvekkelsesvirus (HIV), er det etiologiske middel for den komplekse sykdom som innbefatter progressiv destruksjon av immunsystemet (ervert immunsvekkelsessyndrom; AIDS) og degenerering av det sentrale og perifere nervesystem. Dette virus var tidligere kjent som LAV, HTLV-III eller ARV. Et fellestrekk ved retrovirusreplikasjon er revers transkripsjon av RNA-genomet med en viralt kodet revers transkriptase for å danne DNA-kopier av HIV-sekvenser, et nødvendig trinn i viral replikasjon. Det er kjent at enkelte forbindelser er revers transkriptaseinhibitorer og er effektive midler ved behandling av AIDS og lignende sykdommer, f.eks. azidotymidin eller AZT.

Nukleotidsekvensering av HIV viser nærvær av et *pol*-gen i en åpen leseramme [Ratner, L. et al., Nature, 313, 277 (1985)]. Aminosyresekvenshomologi viser at *pol*-sekvensen koder for revers transkriptase, en endonuklease og en HIV-protease [Toh, H. et al., EMBO J. 4, 1267 (1985); Power, M.D. et al., Science, 231, 1567 (1986); Pearl, L.H. et al., Nature 329, 351 (1987)].

Søkeren har vist at forbindelsene ifølge oppfinnelsen er inhibitorer av HIV-revers transkriptase. De særlige fordeler ved foreliggende forbindelser er deres utviste inhibering av resistent HIV-revers transkriptase.

Kort beskrivelse av oppfinnelsen

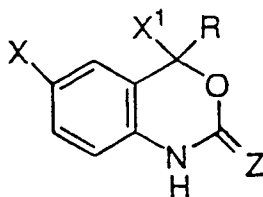
Forbindelser av formel I som her definert, er beskrevet. Disse forbindelser er anvendbare ved inhibering av HIV-revers transkriptase (og dens resistente varianter), forhindring av HIV-infeksjon, behandling av infeksjon med HIV og ved behandling av AIDS og/eller ARC, enten som forbindelser, farmasøytisk akseptable salter (hvor dette er egnet), farmasøytiske preparatbestanddel, eventuelt i kombinasjon med andre antivirale midler, anti-infeksjonsmidler, immunmodulatorer, antibiotika eller vaksiner. Metoder for behandling av AIDS, metoder for forhindring av HIV-infeksjon og metoder for behandling av infeksjon med HIV er også beskrevet.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen og foretrukne utførelsesformer

Foreliggende oppfinnelse angår forbindelser som er kjennetegnet ved formelen:

5

10



hvor:

15 X er halogen;

X¹ er trihalometyl;

Z er O;

R er

(a) C₁₋₈-alkyl, usubstituert eller substituert med
20 A, og A er halogen, C₃₋₆-sykloalkyl, CN, hydrok-
sy, C₁₋₄-alkoksy, fenyl, C₁-C₄-alkyl, C₁-C₄-alkok-
sykarbonyl, nitro, di(C₁₋₂-alkyl)amino, pyrro-
lidin, oksazolidinon eller fenyltio;

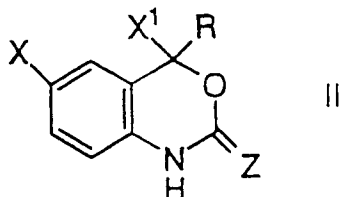
(b) C₂₋₄-alkenyl, usubstituert eller substituert med
25 (i) A, eller
(ii) fenyl, usubstituert eller substituert med
A;

(c) C₂₋₅-alkynyl, usubstituert eller substituert med
30 (i) A, eller
(ii) fenyl, usubstituert eller substituert med
A;

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

Oppfinnelsen omfatter også et farmasøytisk preparat
som er kjennetegnet ved at det omfatter en effektiv mengde av
35 en forbindelse av formel II

5



10 og en farmasøytisk akseptabel bærer,
hvor

X er halogen;

X¹ er trihalometyl; C₂₋₅-alkyl; C₃₋₅-sykloalkyl; eller
fenyl;

15 Z er O eller S;

R er

(a) C₁₋₈-alkyl, usubstituert eller substituert med
A, og A er halogen, C₃₋₆-sykloalkyl, CN, hydrok-
sy, C₁₋₄-alkoksy, fenyl, C₁-C₄-alkyl, C₁-C₄-alkok-
sykarbonyl, nitro, di(C₁₋₂-alkyl)amino, pyrro-
lidin, oksazolidinon eller fenyltio;

(b) C₂₋₄-alkenyl, usubstituert eller substituert med
(i) A, eller
(ii) fenyl, usubstituert eller substituert med
A;

(c) C₂₋₅-alkynyl, usubstituert eller substituert med
(i) A, eller
(ii) fenyl, usubstituert eller substituert med
A;

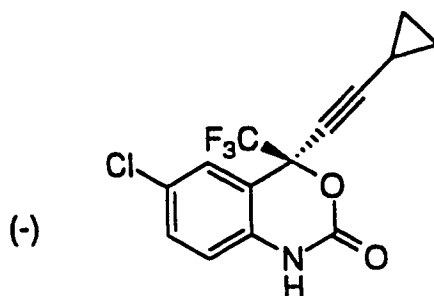
30 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

Foretrukne forbindelser innbefatter forbindelsene
37, 2, 4, 2, 5 og 24 i tabell I nedenfor, i en rekkefølge med
avtagende preferansegrad. Disse forbindelser har følgende
struktur:

35

Forbindelse 37,2:

5

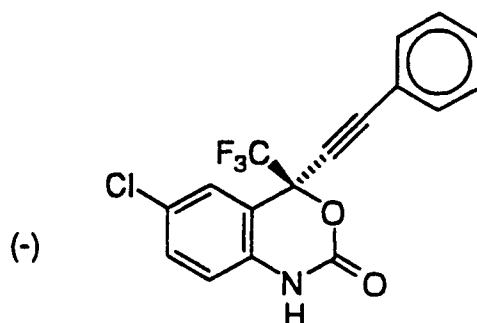


10

(-)-6-klor-4-syklopropyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on, den mest foretrukne;

15 Forbindelse 4:

20

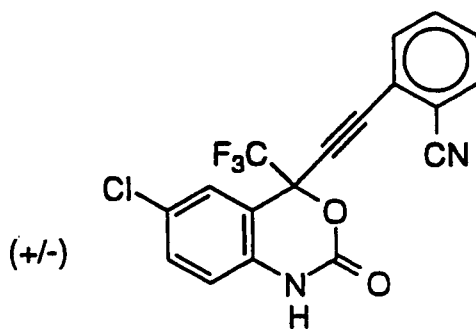


25

(-)-6-klor-4-fenyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on;

Forbindelse 2:

5

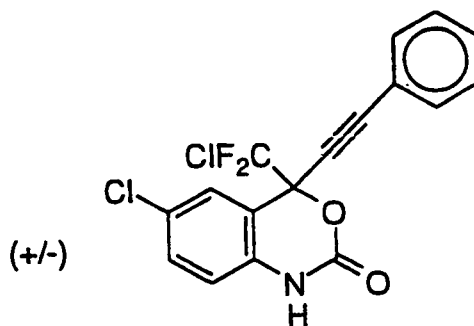


(+/-)-6-klor-4-(2-cyanofenyl)etynyl-4-(1,1,1-trifluormetyl)-
1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on;

15

Forbindelse 5:

20

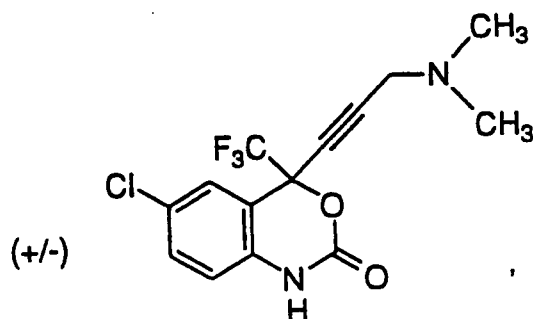


(+/-)-4-(1-klor-1,1-difluormetyl)-4-(2-fenyletynyl)-6-klor-
30 1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on;

Forbindelse 24:

5

10



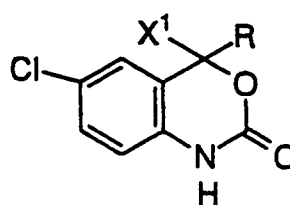
(+/-)-4-(2-[dimetylaminometyl]etynyl)-4-trifluormetyl-6-klor-
15 1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on;

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

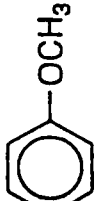
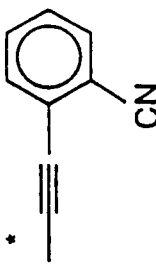


Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er spesifikt illus-
20 trert i tabellene I og II i det etterfølgende:

Tabell I

25

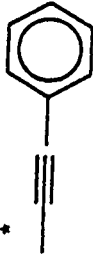
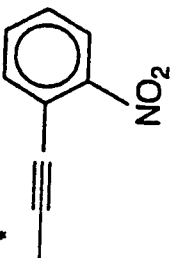
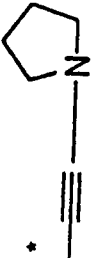



Tabell I (forts.)

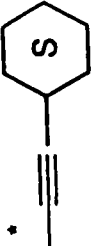
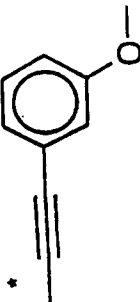
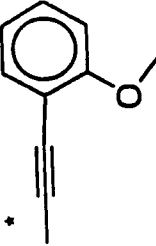

<u>Forbindelse</u>	<u>R</u>	<u>X¹</u>	<u>Smp. (°C)</u>	<u>IC^{* 50} wt</u>	<u>IC^{* 50} dm</u>	<u>CIC^{* 95}</u>
1		-CF ₃	186- 187,5	58nM	4100nM	
2		-CF ₃	245- 246	25	480	6nM
3(+)		-CF ₃	178- 179	2900	37.000	>200
4(-)		-CF ₃	"	8,6	69	12

*målt i nM eller nanomol/liter.

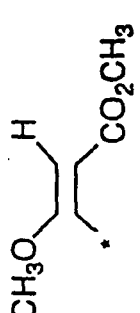


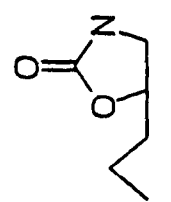

Tabell I (forts.)

<u>Forbindelse</u>	<u>R</u>	<u>X¹</u>	<u>Smp. (°C)</u>	<u>IC*₅₀ wt</u>	<u>IC*₅₀ dm</u>	<u>CIC*₉₅</u>
5		-CF ₂ Cl	154- 155	12nM	350nM	
6		-CF ₃	225- 226	1.700	19.000	
7		-CF ₃	160- 161	91	3.460	
8		-CF ₃	183- 184	163	8.470	

Tabell I (forts.)

<u>Forbindelse</u>	<u>R</u>	<u>X¹</u>	<u>Smp. (°C)</u>	<u>IC^{*50} wt</u>	<u>IC^{*50} dm</u>	<u>ClC^{*95}</u>
9		-CF ₃	168- 171	83nM	210nM	
10		-CF ₃	159- 160	18	390	
11		-CF ₃	185- 186	16	270	6,0nM
12 (+/-)		-CF ₃	137- 147	12	280	25




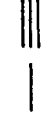

Tabell I (forts.)

<u>Forbindelse</u>	<u>R</u>	<u>X¹</u>	<u>Smp. (°C)</u>	<u>IC^{*50} wt</u>	<u>IC^{*50} dm</u>	<u>ClC^{*95}</u>
13	 <chem>COCC(C)C(=O)OC</chem>	-CF ₃	157	390nM	10 ⁵ nM	
14	 <chem>CCCCl</chem>	-CF ₃	174- 176	130	65.000	
15	 <chem>CCC=C</chem>	-CF ₃	165- 166	29	>10 ⁵	
16	 <chem>CCC1OC(=O)N1</chem>	-CF ₃	230- 240	1900	1900	78.000
17	 <chem>CCC</chem>	-CF ₃	132- 133	2300	>10 ⁵	











Tabell I (forts.)

Forbindelse	R	X ¹	Smtp. (°C)	IC ^{*₅₀} wt	IC ^{*₅₀} dm	CIC ^{*₉₅}
18		-CF ₃	148- 149	15nM	2.650nM	50nM
19	*	-CF ₃	136- 137	24	25.000	
20	*	-CF ₃	162- 164	145	10 ⁵	
21	*	-CF ₃	145- 146	860	125.000	
22	*	"	150- 151	55	3.650	









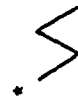
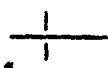
Tabell I (forts.)

<u>Forbindelse</u>	<u>R</u>	<u>X¹</u>	<u>Smp. (°C)</u>	<u>IC^{*50} wt</u>	<u>IC^{*50} dm</u>	<u>CIC^{*95}</u>
23	* 	-CF ₃	131- 133	1300nM>	30.000nM	
24	* 	-CF ₃	146,5- 147,5	43	1950	100
25	* 	-CF ₃	122- 124	220	>10 ⁵	
26	* 	-CF ₃	224- 225	0,24	>10 ⁵	
27	* 	"	203- 204	550	>10 ⁵	

Tabell I (forts.)

<u>Forbindelse</u>	<u>R</u>	<u>X¹</u>	<u>Smp. (°C)</u>	<u>IC*₅₀ wt</u>	<u>IC*₅₀ dm</u>	<u>CIC*₉₅</u>
28	* 	* 	118- 120	307nM	114.250nM	1500nM
29	* 	* 	166- 168	1,900	>10 ⁵	
30	* 	* 	100- 101,5	410	3000	
31	* 	* 	140,5- 141,5	410	4250	
32	* 	* 	172- 173	5400		

Tabell I (forts.)


<u>Forbindelse</u>	<u>R</u>	<u>X¹</u>	<u>Smp. (°C)</u>	<u>IC^{*50} wt</u>	<u>IC^{*50} dm</u>	<u>CIC^{*95}</u>
33	* 	* 	277- 278	300nM		
34	* 	* 	125- 126	16,500	>300.000nM	
35	* 	* 	184- 185	650	>300.000	
36	* 	* 	151- 152	52	>300.000	
37	* 	* 	186- 187	5,300	>10 ⁵	

5

10

15

Tabell I (forts.)













<u>Forbindelse</u>	<u>R</u>	<u>X¹</u>	<u>Smtp. (°C)</u>	<u>IC*₅₀</u> <u>wt</u>	<u>IC*₅₀</u> <u>dm</u>	<u>CIC*₉₅</u>
37,2 (-)	* 			2nM	85 ⁺ nM	




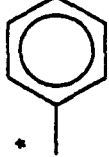




* andre data for forbindelse 38 er angitt i eksempelseksjonen.

15

Tabell II (forts.)

Forbindelse	R	X ¹	Smp. (°C)	IC ^{*50} wt	IC ^{*50} dm	CIC ^{*95}
38	* 	* 	177- 179	136nM	>300.000nM	
39	* 	* 	135- 136	510	>300.000nM	
40	* 	* 	125- 126	48	29.000	
41	* 	* 		1400nM	>300.000nM	
42	* 	* 	218- 220	1450		
43	* 	* 	187- 188	610		

Tabell II (forts.)

<u>Forbindelse</u>	<u>R</u>	<u>X¹</u>	<u>Smp. (°C)</u>	<u>IC^{*50} wt</u>	<u>IC^{*50} dm</u>	<u>CIC^{*95}</u>
44	* 	* 	206- 207	15nM	>300.000nM	100nM
45	* 	* 	147- 148	560	>300.000nM	
46	* 	* 	186- 187	41	>300.000nM	

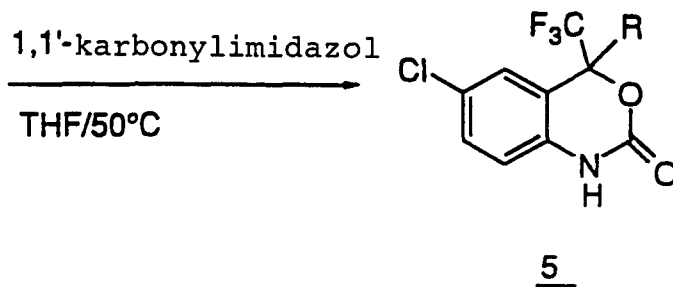
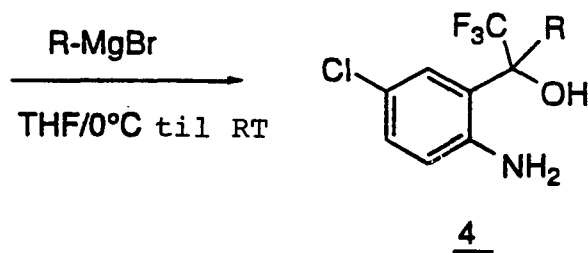
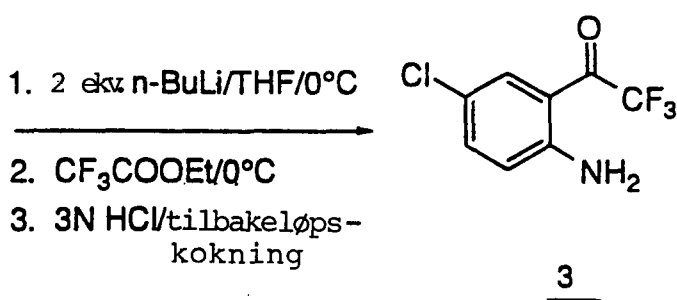
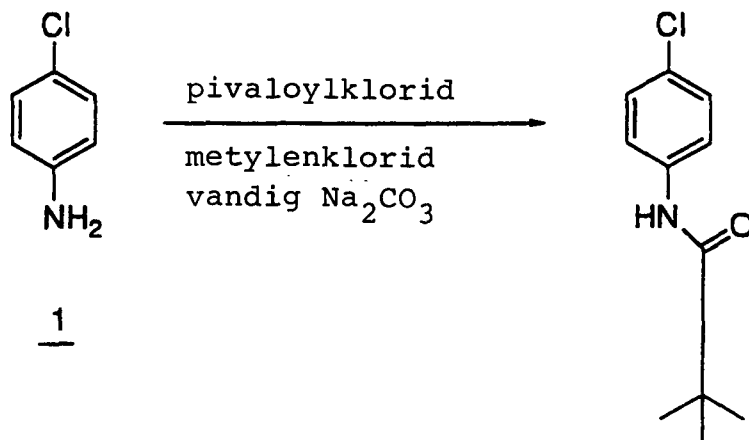
Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan ha asymmetriske sentre og kan foreligge, bortsett fra når det er angitt spesifikt, som racemater, racemiske blandinger eller som individuelle diastereomerer, eller enantiomerer, hvor alle 5 isomere former er innbefattet innen foreliggende oppfinnelse. Uttrykket (+/-) er beregnet på å omfatte (+) optiske isomerer eller (-) optiske isomerer eller blandinger derav.

Når enhver variabel (f.eks. R) oppstår mer enn én gang i enhver bestanddel eller i formel I, er dens definisjon 10 ved hver forekomst uavhengig av dens definisjon ved hver annen forekomst. Kombinasjoner av substituenten og/eller variabler er også mulig bare hvis slike kombinasjoner resulterer i stabile forbindelser.

Som anvendt her, med mindre annet er angitt, er 15 "alkyl" beregnet på å innbefatte både forgrenede og rettkjedede, mettede, alifatiske hydrokarbongrupper med det spesifiserte antall karbonatomer; "alkenyl" er beregnet på å dekke både forgrenede og rettkjedede alkylgrupper med minst én karbon-karbon-dobbeltbinding; "alkynyl" er beregnet på å dekke 20 både forgrenede og rettkjedede alkylgrupper med minst én karbon-karbon-trippelbinding. "Halogen" eller "halo" som anvendt her, betyr fluor, klor, brom og jod.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan syntetiseres ved følgende metoder.

Reaksjonsskjema I



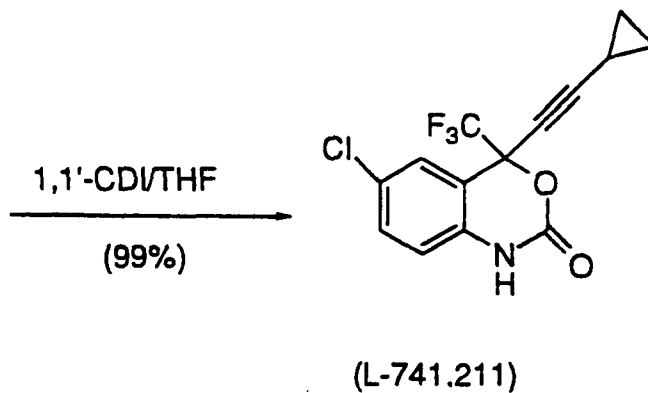
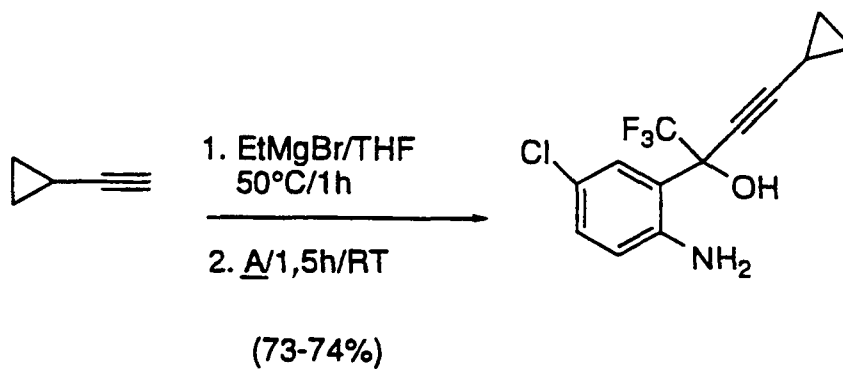
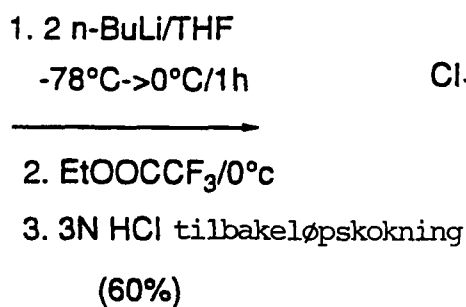
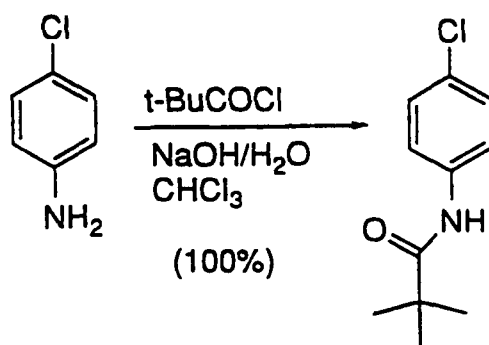
Ved syntesen av benzoksazinene ifølge foreliggende oppfinnelse innbefatter den generelle metode typisk syklisering på en benzenkjerne som et sluttrinns. Se reaksjonsskjema I. Aminogruppen av parakloranilin beskyttes først med f.eks. 5 pivaloylchlorid under dannelse av 2. Andre mindre foretrukne aminobeskyttende grupper innbefatter t-butoksykarbonyl-, acetat- eller isovaleroylgrupper. Ca. 2 ekvivalenter av et alkyl-litium omsettes deretter med 2, fortrinnsvis n-butyllitium. Ingen andre organometalliske forbindelser er egnet for dette 10 metalleringstrinn. Etterfølgende omsetning med CF_3COOEt etterfulgt av stansing av reaksjonen, gir 3.

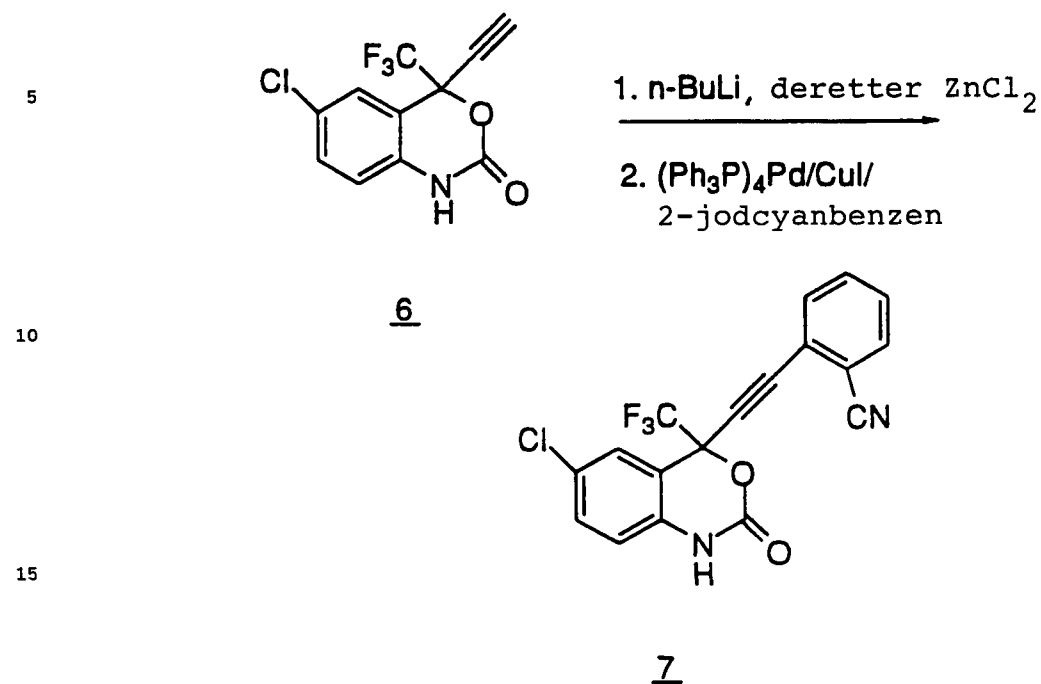
Syntesen av den tertiære karbinol 4 finner deretter sted ved Grignard-addisjon til ketonet av 3. Grignard-reagenset må være et salt av et divalent kation, f.eks. Mg^{++} eller 15 Zn^{++} . Monovalente kationer er funnet å være uegnet, slik som Li^+ eller Na^+ . Egnede løsningsmidler innbefatter, men er ikke begrenset til, THF eller eter. Et vidt område av temperaturbetingelser er mulig mellom ca. 0°C og ca. romtemperatur.

Ringlukning for å gi forbindelsene ifølge oppfinnelsen 5 utføres med kondenseringsmidler slik som 1,1'-karbonyl-diimidazol, fosgen, dimetylkarbonat, difenylkarbonat eller di-(paranitrofenyl)karbonat. Syklisering kan utføres med enhver 20 av disse forbindelser, så vel som et stort antall andre.

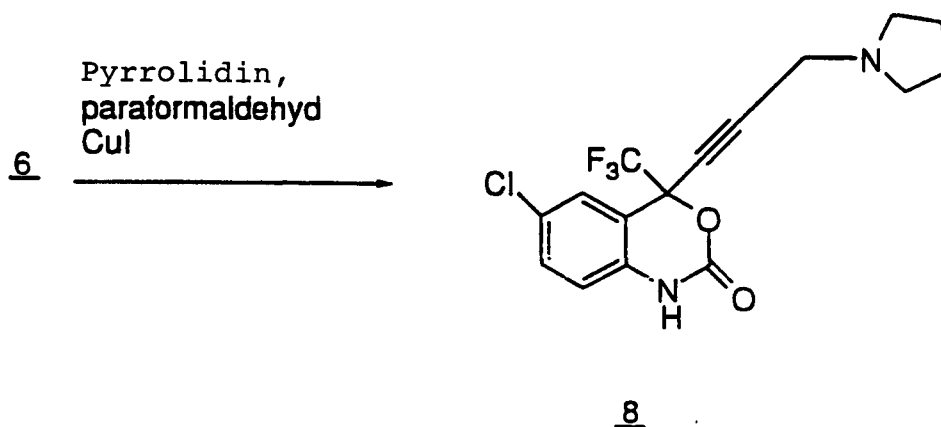
Et spesifikt tilfelle for reaksjonsskjema I er angitt 25 i reaksjonsskjema IA. Det viser syntesen av L-741.211 som er et racemat av forbindelse 37,2, som ytterligere tilveiebrakt i eksempel 6.

Reaksjonsskjema IA



Reaksjonsskjema II

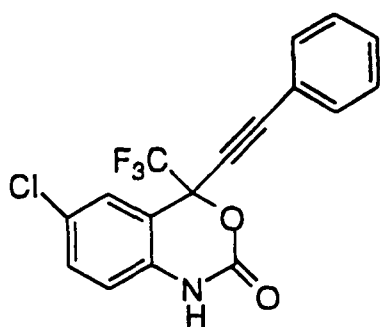
20 Reaksjonsskjema II angir en metode for derivatisering
 av acetylensubstitusjoner ved 4-stillingen av benzoksazinkjer-
 nen. Eksempelvis metalliseres forbindelse 6, og et sinksalt
 tilsettes deretter. I Heck-reaksjonen anvendes katalysatoren
 tetrakis-(trifenylfosfin)palladium(0) kompleksdannet med CuI
 25 for å gi 7.

Reaksjonsskjema III

Reaksjonsskjema III illustrerer substitusjon av en 4-acetylennguppe med en N-holdig heterosyklus. Mannich-reaksjonen innbefatter en kondensasjonsreaksjon av formaldehyd med heterosyklusen, f.eks. pyrrolidin. Substitusjon på det terminale karbon skjer deretter i nærvær av CuI som katalysator.

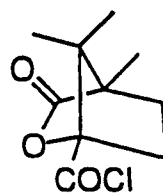
Reaksjonsskjema IV

10

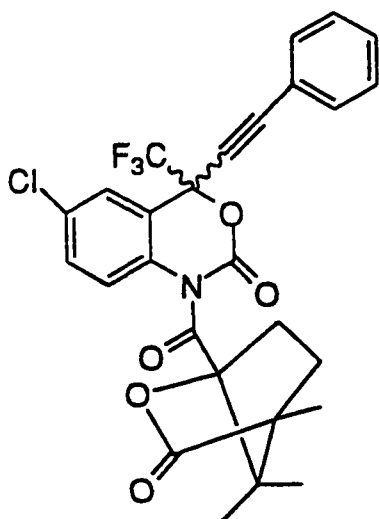


15

(+/-)

Et₃N/4-DMAP/CH₂Cl₂

20



25

1. Kromatografi på silikagel

2. K₂CO₃/H₂O/2-propanol

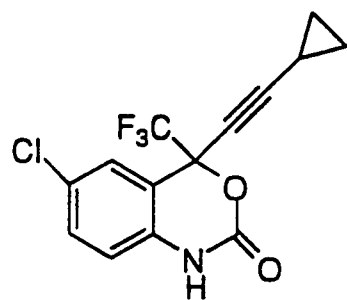
30

Reaksjonsskjema IV illustrerer oppløsning av optiske isomerer av forbindelsene av formel I eller formel II. I dette eksempel er (-)-kamfansyre det oppløsende middel. Et stort antall andre oppløsningsmidler er egnet, innbefattende 0-metyl-mandelsyreklorid eller Moshers reagens. Det vil være innlysende for fagmannen hvordan slike isomerer separeres.

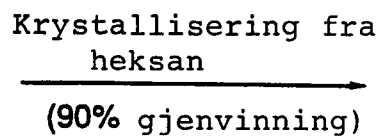
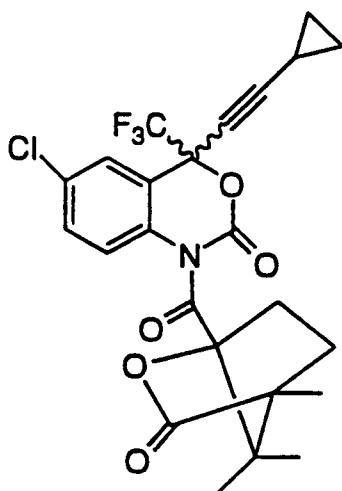
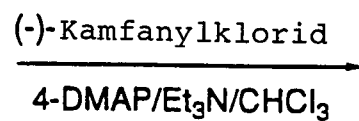
Reaksjonsskjema IVA er spesifikt tilpasset til opp-

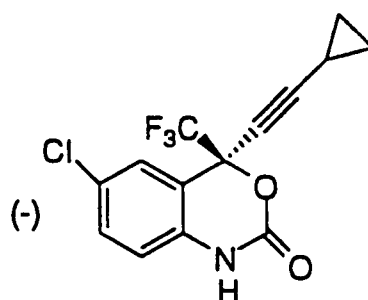
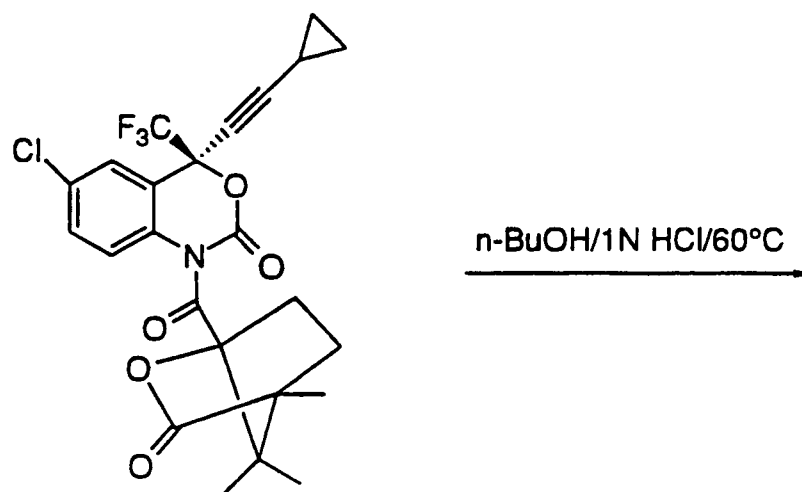
løsningen av L-741.211 ved isolering av L-743.726. Se reaksjonsskjema IVA og eksempel 6.

5

Reaksjonsskjema IVA

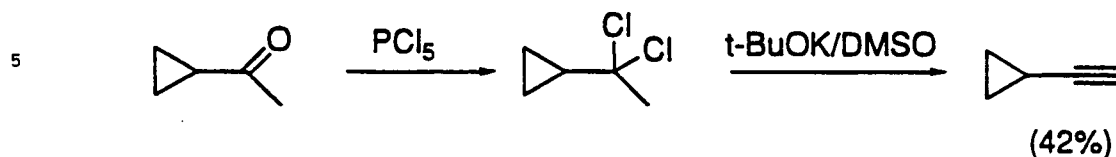
(L-741.211)





L-743.726

Forbindelse 37,2

Reaksjonsskjema V

10

Syklopropylacetylen fremstilles ved reaksjonsskjema V i henhold til publiserte prosedyrer, f.eks. C.E. Hudson et al., J. Am. Chem. Soc. 94, 1158 (1972) og W. Schoberth et al., Synthesis, 703 (1972).

15

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er anvendbare ved fremstilling og utøvelse av screeningsutprøvnings for anti-virale forbindelser. Eksempelvis er forbindelsene ifølge oppfinnelsen anvendbare for isolering av enzymmutanter som er glimrende screeningsverktøy for mer kraftfulle antivirale forbindelser. Enn videre er forbindelsene ifølge oppfinnelsen anvendbare ved etablering eller bestemmelse av det bindende sete av andre antivirale midler overfor HIV-revers transkriptase, f.eks. ved konkurrerende inhibering. Således er forbindelsene ifølge oppfinnelsen kommersielle produkter som skal selges for disse formål.

25

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er anvendbare ved inhibering av HIV-revers transkriptase, forhindring eller behandling av infeksjon av humant immunsvekkelsesvirus (HIV) og behandling av derpå følgende patologiske tilstander slik som AIDS. Behandling av AIDS eller forhindring eller behandling av infeksjon med HIV er definert som å innbefatte, men er ikke begrenset til, behandling av et stort område av tilstander av HIV-infeksjon: AIDS, ARC (AIDS-relatert kompleks), både symptomatisk og asymptomatisk, og reell eller potensiell eksponering overfor HIV. Eksempelvis er forbindelsene ifølge oppfinnelsen anvendbare ved behandling av HIV-infeksjon etter mistenkt tilbaketilført eksponering overfor HIV, f.eks. ved blodtransfusjon, utbytting av kroppsvæsker, bitt, tilfeldige nåle-

35

stikk eller eksponering overfor pasientblod under kirurgi.

Den spesielle fordel ved forbindelsene ifølge oppfinnelsen er deres sterke inhibering overfor HIV-revers transkriptase som er gjort resistent overfor andre antivirale midler, slik som L-697.661, som er 3-([(4,7-diklor-1,3-benzoksazol-2-yl)metyl]-amino)-5-etyl-6-metylpyridin-2(1H)-on; eller L-696.229, som er 3-[2-(1,3-benzoksazol-2-yl)etyl]-5-etyl-6-metylpyridin-2(1H)-on; eller AZT.

For disse formål kan forbindelsene ifølge oppfinnelsen administreres oralt, parenteralt (innbefattende subkutane injeksjoner, intravenøs, intramuskulær, intrasternal injeksjon eller infusjonsteknikker), ved inhaleringspray, eller rektalt, i doseringsenhetsformuleringer inneholdende konvensjonelle, ikke-toksiske, farmasøytisk akseptable bærere og adjuvanser.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det således ytterligere tilveiebrakt et farmasøytisk preparat for behandling av HIV-infeksjon og AIDS.

Disse farmasøytiske preparater kan være i form av oralt administrerbare suspensjoner eller tabletter; nasalsprayer; sterile, injiserbare preparater, f.eks. som sterile, injiserbare, vandige eller oljeaktige suspensjoner eller stikkpiller.

Når de administreres oralt som en suspensjon, fremstilles disse preparater i henhold til teknikker velkjente innen det farmasøytiske fag, og kan inneholde mikrokrySTALLinsk cellulose for å tilføre masse, alginsyre eller natriumalginat som et suspenderingsmiddel, metylcellulose som en viskositetsforøker, og søtningsmidler/smaksgivende midler kjent innen faget. Som tabletter med umiddelbar frigivelse kan disse preparater inneholde mikrokrySTALLinsk cellulose, dikalsiumfosfat, stivelse, magnesiumstearat og laktose og/eller andre eksipienser, bindemidler, ekstendere, oppbrytende midler, fortynningsmidler og smøremidler kjent innen faget.

Når de administreres som nasal aerosol eller ved inhalering, fremstilles disse preparater i henhold til teknikker velkjente innen det farmasøytiske fag, og kan fremstilles som løsninger i saltvann, under anvendelse av benzylalkohol eller andre egnede konserveringsmidler, absorpsjonsaktivatorer for å

øke biotilgjengeligheten, fluorkarboner og/eller andre oppløseliggjørende eller dispergerende midler kjent innen faget.

De injiserbare løsninger eller suspensjoner kan formuleres i henhold til kjent teknikk under anvendelse av
5 egnede, ikke-toksiske, parenteralt akseptable fortynningsmidler eller løsningsmidler, slik som mannitol, 1,3-butandiol, vann, Ringers løsning eller isotonisk natriumkloridløsning, eller egnede dispergerings- eller fukte- og suspenderingsmidler, slik som sterile, milde fettoljer innbefattende syntetiske
10 iske mono- eller diglyserider, og fettsyrer innbefattende oljesyre.

Når de administreres rektalt i form av stikkpiller, kan disse preparater fremstilles ved blanding av legemidlet med en egnet ikke-irriterende eksipiens, slik som kakaosmør,
15 syntetiske glyseridestere eller polyetylenglykoler som er faste ved vanlige temperaturer, men som forvæskes og/eller oppløses i det rektale hulrom for å frigi legemidlet.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan administreres oralt til mennesker i et doseringsområde på 1 til 100 mg/kg
20 kroppsvekt i oppdelte doser. Et foretrukket doseområde er 0,1 til 10 mg/kg kroppsvekt oralt i oppdelte doser. Et annet foretrukket doseområde er 0,1 til 20 mg/kg kroppsvekt oralt i oppdelte doser. For kombinasjonsterapi med nukleoside analoger er et foretrukket doseområde 0,1 til 20 mg/kg kroppsvekt for
25 forbindelsene ifølge oppfinnelsen administrert oralt i oppdelte doser, og 50 mg til 5 g/kg kroppsvekt for nukleosidanaloger administrert oralt i oppdelte doser. Det skal imidlertid forstås at det spesifikke dosenivå og doseringshyppighet for enhver bestemt pasient kan variere og vil avhenge av et utall
30 faktorer innbefattende aktiviteten av den spesifikke forbindelse som anvendes, den metabolske stabilitet og lengden av virkningen av denne forbindelse, alder, kroppsvekt, generell helse, kjønn, diett, administreringstid og -måte, utskillelsesgrad, legemiddelkombinasjon, strengheten av den bestemte
35 tilstand og den vert som gjennomgår behandling.

Foreliggende oppfinnelse er også rettet mot kombinasjoner av HIV-revers transkriptaseinhibitorforbindelsene med ett eller flere midler som er anvendbare ved behandling av AIDS. Eksempelvis kan forbindelsene ifølge oppfinnelsen admin-

istreres effektivt, enten ved perioder for preeksonering og/eller posteksonering, i kombinasjon med effektive mengder av AIDS-antivirale midler, immunmodulatorer, antiinfektive midler eller vaksiner, slik som de som er angitt i den etterfølgende tabell.

TABELL

Antivirale midler		
Legemiddelnavn	Fabrikant	Indikasjon
"AL-721"	Ethigen (Los Angeles, CA)	ARC, PGL HIV-positiv, AIDS
Rekombinant, humant interferon- beta	Triton Biosciences (Alameda, CA)	AIDS, Kaposis sarkom, ARC
"Acemannan"	Carrington Labs. (Irving, TX)	ARC (se også immun- modulatorer)
"Cytovene"	Syntex (Palo Alto, CA)	syns- truende CMV
"Ganciclovir"	Syntex (Palo Alto, CA)	perifer CMV retinitt
d4T didehydrodeoksy- tymidin	Bristol-Myers (New York, NY)	AIDS, ARC
ddI dideoksyinosin	Bristol-Myers (New York, NY)	AIDS, ARC
"EL10"	Elan Corp., PLC (Gainesville, GA)	HIV-infeksjon (se også immun- modulatorer)

Trinatriumindikasjon fosfonoformiat	Astra Pharm. Products, Inc. (Westborough, MA)	CMV-retinitt, HIV-infeksjon, andre CMV-infeksjoner
5 Dideoksytydin; ddC	Hoffman-LaRoche (Nutley, NJ)	AIDS, ARC
"Novapren"	Novaferon Labs, Inc. (Akron, OH) (Diapren, Inc. (Roseville, MN, markedsfører)	HIV-inhibitor
Peptid-T-oktapeptidsekvens	Peninsula Labs. (Belmont, CA)	AIDS
"Zidovudine"; AZT	Burroughs Wellcome (Rsch. Triangle Park, NC)	AIDS, adv, ARC pediatrisk AIDS, Kaposis sarkom, asymptomatisk HIV-infeksjon, mindre alvorlig HIV-sykdom, neurologisk involvering, i kombinasjon med andre terapier.
10 "Ansamycin LM 427"	Adria Laboratories (Dublin, OH) Erbamont (Stamford, CT)	ARC
Dekstransulfat	Ueno Fine Chem. Ind. Ltd. (Osaka, Japan)	AIDS, ARC, HIV-positiv, asymptomatisk
"Virazole" "Ribavirin"	Viratek/ICN (Costa Mesa, CA)	asymptomatisk HIV-positiv, LAS, ARC

	Burroughs Wellcome (Rsch. Triangle Park, NC)	Kaposis sarkom, HIV i kombinasjon med "Retrovir"
	Burroughs Wellcome	AIDS, ARC, asymp- tomatisk HIV-posi- tiv, i kombinasjon med AZT
5	Advanced Biotherapy Concepts (Rockville, MD)	AIDS, ARC
	Merck (Rahway, NJ)	AIDS, ARC, asymp- tomatisk HIV-posi- tiv, også i kombi- nasjon med AZT
10	Merck (Rahway, NJ)	AIDS, ARC, asymp- tomatisk HIV-posi- tiv, også i kombi- nasjon med AZT
	Merck (Rahway, NJ)	AIDS, ARC, asymp- tomatisk HIV-posi- tiv, også i kombi- nasjon med AZT

Immunmodulatorer		
Legemiddelnavn	Fabrikant	Indikasjon
"AS-101"	Wyeth-Ayerst Labs. (Philadelphia, PA)	AIDS
5 "Bropirimine"	Upjohn (Kalamazoo, MI)	fremskreden AIDS
"Acemannan"	Carrington Labs., Inc. (Irving, TX)	AIDS, ARC (se også anti- virale midler)
"CL246.738"	American Cyanamid (Pearl River, NY) Lederle Labs. (Wayne, NJ)	AIDS, Kaposis sarkom
"EL10"	Elan Corp., PLC (Gainesville, GA)	HIV-infeksjon (se også anti- virale midler)
Gamma-interferon	Genentech (S. San Francisco, CA)	ARC, i kombinasjon med TNF (tumor- nekrosefaktor)
10 Granulocyttnakro- fagkolonistimuler- ende faktor	Genetics Institute (Cambridge, MA) Sandoz (East Hanover, NJ)	AIDS
15 Granulocyttnakro- fagkolonistimuler- ende faktor	Hoechst-Roussel (Somerville, NJ) Immunex (Seattle, WA)	AIDS
Granulocyttnakro- fagkolonistimuler- ende faktor	Schering-Plough (Madison, NJ)	AIDS AIDS, i kombina- sjon med AZT

	HIV kjernepartikkel-immunstimulerende middel	Rorer (Ft. Washington, PA)	serumpositiv HIV
5	IL-2 Interleukin-2	Hoffman-LaRoche (Nutley, NJ) Immunex	AIDS, ARC, HIV, i kombinasjon med AZT
	Immunglobulin intravenøst (humant)	Cutter Biological (Berkeley, CA)	pediatrisk AIDS, i kombinasjon med AZT
	"IMREG-1"	Imreg (New Orleans, LA)	AIDS, Kaposis sarkom, ARC, PGL
10	"IMREG-2"	Imreg (New Orleans, LA)	AIDS, Kaposis sarkom, ARC, PGL
	Imutiol-dietyl-ditiokarbamat	Merieux Institute (Miami, FL)	AIDS, ARC
	Alfa-2-interferon	Schering Plough (Madison, NJ)	Kaposis sarkom med AZT: AIDS
15	Metionin-enkefalin	TNI Pharmaceutical (Chicago, IL)	AIDS, ARC
	MTP-PE-muramyltripeptid	Ciba-Geigy Corp. (Summit, NJ)	Kaposis sarkom
	Granulocyttkolonistimulerende faktor	Amgen (Thousand Oaks, CA)	AIDS, i kombinasjon med AZT
20	rCD4 rekombinant, løselig human CD4	Genentech (S. San Francisco, CA)	AIDS, ARC
	Rekombinant, løselig, human CD4	Biogen (Cambridge, MA)	AIDS, ARC
25	Interferon-alfa 2a	Hoffman-LaRoche (Nutley, NJ)	Kaposis sarkom AIDS, ARC, i kombinasjon med AZT

	"SK&F106528" løselig T4	Smith, Kline & French Laboratories (Philadelphia, PA)	HIV-infeksjon
	Tymopentin	Immunobiology Research Institute (Annandale, NJ)	HIV-infeksjon
5	Tumornekrosefak- tor; TNF	Genentech (S. San Francisco, CA)	ARC, i kombinasjon med gamma- interferon
Antiinfektive midler			
	Legemiddelnavn	Fabrikant	Indikasjon
10	"Clindamycin" med "Primaquine"	Upjohn (Kalamazoo, MI)	PCP
	"Fluconazole"	Pfizer (New York, NY)	cryptokokk- meningitt, candidiasis
	"Pastille Nystatin Pastille"	Squibb Corp. (Princeton, NJ)	Forhindring av oral candidiasis
15	Ornidyl- eflornitin	Merrell Dow (Cincinnati, OH)	PCP
	Pentamidin- isetionat (IM & IV)	LyphoMed (Rosemont, IL)	PCP-behandling
	"Piritrexim"	Burroughs Wellcome (Rsch. Triangle Park, NC)	PCP-behandling
20	Pentamidin- isetionat for inhalering	Fisons Corporation (Bedford, MA)	PCP-profylakse

"Spiramycin"	Rhone-Poulenc Pharmaceuticals (Princeton, NJ)	cryptosporidisk diaré
Intraconazol- R51211	Janssen Pharm. (Piscataway, NJ)	histoplasmosse; cryptokokk- meningitt
Trimetreksat	Warner-Lambert	PCP
Andre		
Legemiddelnavn	Fabrikant	Indikasjon
Rekombinant, humant erytro- poietin	Ortho Pharm. Corp. (Raritan, NJ)	alvorlig anemi assosiert med AZT- terapi
Megestrolacetat	Bristol-Myers (New York, NY)	behandling av anoreksi forbundet med AIDS
"Total Enteral Nutrition"	Norwich Eaton Pharmaceuticals (Norwich, NY)	diaré og mal- absorpsjon rela- tert til AIDS

15

Det skal forstås at rammen for kombinasjoner av forbindelsene ifølge oppfinnelsen med AIDS-antivirale midler, immunmodulatorer, antiinfektive midler eller vaksiner ikke er begrenset til listen i den ovenfor angitte tabell, men innbefatter i prinsippet enhver kombinasjon med ethvert farmasøytisk preparat som er anvendbart for behandling av AIDS. Eksempelvis kan en forbindelse av formel I eller formel II hensiktsmessig administreres i kombinasjon med en nukleosidanalogs med kjent biologisk aktivitet overfor HIV-revers transkriptase. Egnede nukleosidaloger er generelt kjedeavsluttere og innbefatter AZT, ddC, ddI, D4T, HEPT og 3'-fluor-2',3'-dideok-sytymidin.

25

AZT syntetiseres ved metodene ifølge J.P. Horwitz et

al., J. Org. Chem. 29, 2076 (1964); R.P. Glinski et al., J. Org. Chem. 38, 4299 (1973); C.K. Chu et al., Tetrahedron Letters 29, 5349 (1988). Anvendelse av AZT som et terapeutisk legemiddel ved behandling av AIDS er beskrevet i U.S.

5 4 724 232.

Forbindelse ddC syntetiseres ved metodene ifølge J.P. Horwitz et al., J. Org. Chem. 32, 817 (1967); R. Marumoto, Chem. Pharm. Bull. 22, 128 (1974); og T.-S. Lin et al., J. Med. Chem. 30, 440 (1987).

10 D4T syntetiseres ved metodene ifølge Herdewijn, P. et al., J. Med. Chem. 30, 1270 (1987).

HEPT syntetiseres ved metodene ifølge Miyasaka, T. et al., J. Med. Chem. 32, 2507 (1989); og A. Rosowsky, J. Med. Chem. 24, 1177 (1981). Syntesen av ddC, ddI og AZT er også
15 beskrevet i EPO 484071.

Forbindelsen 3'-fluor-2',3'-dideoksytymidin syntetiseres ved prosedyren ifølge Herdewijn, P. et al., J. Med. Chem. 30, 1270 (1987). Forbindelsen L-735.524 er N-(2(R)-hydroksy-1(S)-indanyl)-2(R)-fenylmetyl-4-(S)-hydroksy-5-(1-(4-(3-pyridylmetyl)-2(S)-N'-(t-butylkarboksamido)-piperazinyl))-pentanamid, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav. L-697.661
20 eller '661' er 3-([(4,7-diklor-1,3-benzoksazol-2-yl)metyl]-amino)-5-etyletyl-6-metylpyridin-2(1H)-on; L-696.229 er 3-[2-(1,3-benzoksazol-2-yl)-etyl]-5-etyl-6-metylpyridin-2(1H)-on.
25 Syntesen av L-697.661 og L-696.229 er beskrevet i EPO 484071 og EPO 462800, begge inkorporert her ved referanse.

Foretrukne kombinasjoner er samtidige, intermitterende eller alternerende behandlinger av L-743.726 med eller uten en inhibitor av HIV-protease. En eventuell tredje komponent i kombinasjonen er en nukleosidinhibitor av HIV-revers
30 transkriptase, slik som AZT, ddC eller ddI. En foretrukket inhibitor av HIV-protease er L-735.524. Andre foretrukne inhibitorer av HIV-revers transkriptase innbefatter L-697.661. Disse kombinasjoner har synergistisk effekt på begrensning av
35 spredningen av HIV. Foretrukne kombinasjoner innbefatter følgende: (1) L-743.726 med L-735.524, og eventuelt hvilke som helst av L-697.661, AZT, ddI eller ddC; (2) L-743.726 og hvilke som helst av L-697.661, AZT, ddI eller ddC. Farmasøyt-

isk akseptable salter av disse kombinasjoner er også innbefattet.

Eksempel 1

5 (+/-)-4-(1,1,1-trifluormetyl)-4-(1-buten-4-yl)-6-klor-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on; (forbindelse 15)

Trinn A: N-(4-klorfenyl)-2,2-dimetylpropanamid

Til en 5-liters 3-halset rundkolbe med en topprører
10 ble det tilsatt 127,57 g (1 mol) 4-kloranilin, 1200 ml CHCl_3 og 1200 ml mettet, vandig Na_2CO_3 -løsning. En tilsetningstrakt ble koblet til kolben og fylt med 129 ml (1,05 mol) 2,2-dimetylpropanoylklorid. Syrekloridet ble dråpevis tilsatt til den kraftig omrørte blanding i løpet av 1 time. Den resulterende
15 blanding ble omrørt ved omgivende temperatur i ytterligere 23 timer. Noe av produktet utskiltes fra blandingen som hvite krystaller. Disse krystaller ble oppsamlet ved filtrering. Filtratet ble overført til en skilletrakt, og lagene ble separert. Kloroformlaget ble vasket med vann og saltvann.
20 Tørking (MgSO_4), filtrering og fjerning av løsningsmidlet i vakuum ga ytterligere produkt. De to porsjoner av produkt ble kombinert og omkrystallisert fra kokende EtOAc-heksaner under dannelse av 185,6 g N-(4-klorfenyl)-2,2-dimetylpropanamid som et hvitt, krystallinsk, fast materiale.

25

Trinn B: 1-(2-amino-5-klorfenyl)-2,2,2-trifluoetanon

Til en ovnstørket, 3-liters 3-halset rundkolbe utstyrt med topprører, argoninnløp og en 500 ml ovnstørket tilsetningstrakt ble det tilsatt 100 g (472 mmol) N-(4-klorfenyl)-2,2-dimetylpropanamid og 1 l tørt THF. Denne løsning
30 ble avkjølt på et isbad til 0°C , og tilsetningstrakten ble fylt med n-butyllitium (387 ml av en 2,5 M-løsning i heksan, 986 mmol). n-butyllitiumløsningen ble dråpevis tilsatt langsomt til amidløsningen i løpet av 1 time idet temperaturen ble
35 holdt under $+5^\circ\text{C}$. Den resulterende løsning ble aldret ved 0°C i 1 time, under hvilket tidsrom et oransje bunnfall ble dannet. Til denne blanding ble det tilsatt 115 ml (986 mmol) etyl-1,1,1-trifluoracetat dråpevis i løpet av 1 time. Den resulterende, klare løsning ble aldret i ytterligere 30 minutter.

Reaksjonen ble stanset med 5% vandig HCl. Blandingen ble for-
tynnet med 1 l EtOAc, og lagene ble separert. Den organiske
fase ble vasket med saltvann, ble tørket (MgSO₄), filtrert og
konsentrert i vakuum under dannelse av 160 g av en gul olje.
5 Dette materiale ble suspendert i 1 l 3N vandig HCl, og løsnin-
gen ble oppvarmet til tilbakeløpskokning i 24 timer. Den av-
kjølte løsning ble fortynnet med 1 l EtOAc, og blandingen ble
gjort basisk med konsentrert NH₄OH. Lagene ble separert, og den
organiske fase ble vasket med saltvann, ble tørket (MgSO₄),
10 filtrert, konsentrert i vakuum og kromatografert på 1,5 kg
silikagel under anvendelse av 15% EtOAc i heksan som eluer-
ingsmiddel. Det kromatograferte materiale ble omkrystallisert
fra kokende heksan under dannelse av 57 g (54%) rent 1-(2-
amino-5-klorfenyl)-2,2,2-trifluoretanon som klare, gule krys-
15 taller, sm.p.: 91-92°C. ¹H NMR (CDCl₃): δ 6,46 (br s, 2H), 6,69
(d, 1H, J=9,2 Hz), 7,32 (dd, 1H, J=2,4, 9,2 Hz), 7,70 (d, 1H,
J=2,4 Hz).

Trinn C: (+/-)-2-(2-amino-5-klorfenyl)-1,1,1-trifluor-5-
20 heksen-2-ol

Til en 300 ml ovnstørket, 3-halset rundkolbe med en
rørestav, argoninnløp, tilsetningstrakt og tilbakeløpskjøler
ble det tilsatt 3,03 g (125 mmol) magnesiumringer og 75 ml
tørt THF. Til denne godt omrørte blanding ble det tilsatt
25 12,0 ml (118,21 mmol) 4-brom-1-buten i en slik hastighet at en
forsiktig tilbakeløpskokning ble opprettholdt. Når tilsetnin-
gen var fullført, ble blandingen aldret i 30 minutter og ble
deretter avkjølt til 0°C på et isbad. Til denne godt omrørte
løsning ble det tilsatt en løsning av 5,00 g (22,36 mmol) 1-
30 (2-amino-5-klorfenyl)-2,2,2-trifluoretanon i 35 ml THF dråpe-
vis i løpet av 30 minutter. Kjølebadet ble fjernet, og blan-
dingen ble omrørt i 20 timer ved omgivende temperatur. Reak-
sjonsblandingen ble fortynnet med EtOAc og 10% vandig sitron-
syre. Denne blanding ble omrørt i 4 timer. Lagene ble separ-
35 ert, og den organiske fase ble vasket med vandig NaHCO₃ og
saltvann. Tørking (MgSO₄), filtrering, fjerning av løsningsmid-
let i vakuum og kromatografi på 300 g silikagel under anven-
delse av 15% EtOAc i heksan som elueringsmiddel ga 4,80 g
(+/-)-2-(2-amino-5-klorfenyl)-1,1,1-trifluor-5-heksen-2-ol som

et gult, fast materiale.

Trinn D: (+/-)-4-(1,1,1-trifluormetyl)-4-(1-buten-4-yl)-6-klor-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on

5 Til en 200 ml rundkolbe utstyrt med rørestav, argoninnløp og en tilbakeløpskjøler ble det tilsatt 4,80 g (17,16 mmol) (+/-)-2-(2-amino-5-klorfenyl)-1,1,1-trifluor-5-heksen-2-ol, 13,91 g (85,81 mmol) 1,1'-karbonyldiimidazol og 75 ml tørt THF. Denne blanding ble oppvarmet til 60°C i
10 18 timer. Den avkjølte reaksjonsblanding ble fortynnet med EtOAc og ble vasket med 3 x 200 ml H₂O og 250 ml saltvann. Tørking (MgSO₄), filtrering, fjerning av løsningsmidlet i vakuum, etterfulgt av omkrystallisering fra kokende EtOAc-heksan ga 3,22 g (+/-)-4-(1,1,1-trifluormetyl)-4-(1-buten-4-yl)-
15 6-klor-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on som et hvitt, krystallinsk, fast materiale, sm.p.: 165-166°C. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1,99 (m, 1H), 2,09-2,40 (m, 3H), 5,00 (d, 1H, J=1,4 Hz), 5,03 (dd, 1H, J=1,4, 7,9), 5,78 (m, 1H), 6,85 (d, 1H), J=8,6 Hz), 7,21 (br s, 1H), 7,35 (dd, 1H, J=2,2, 8,6 Hz), 9,63 (br
20 s, 1H).

Eksempel 2

(+/-)-6-klor-4-etynyl-4-(1,1,1-trifluormetyl)-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on (forbindelse 26)

25 Trinn A: 2-(2-amino-5-klorfenyl)-1,1,1-trifluor-3-butyn-2-ol
En 500 ml 3-halset rundkolbe utstyrt med en tilsetningstrakt, argoninnløp, rørestav og digitaltermometer, ble fylt med etynylmagnesiumbromid (0,5 M i heksan; 268 ml,
30 134 mmol) og ble deretter avkjølt til -78°C. Dråpevis tilsetning av en løsning av 6,0 g (26,8 mmol) 1-(2-amino-5-klorfenyl)-2,2,2-trifluoretanon i 50 ml THF ble fullført etter 15 minutter, idet temperaturen ble holdt ved ≤ -55°C. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 16 timer etter langsom oppvarming
35 til romtemperatur. Den mørkerøde løsning ble ved -5°C dråpevis tilsatt 60 ml mettet, vandig ammoniumkloridløsning. Etylacetatekstraksjon etterfulgt av vasking med 10% sitronsyre, mettet natriumbikarbonat, vann og saltvann ga 8,5 g urent produkt etter tørking over natriumsulfat, filtrering og fordampning av

løsningsmidlet. Rensing via flashkromatografi under anvendelse av 15-20% etylacetat:heksan ga ren 2-(2-amino-5-klorfenyl)-1,1,1-trifluor-3-butyn-2-ol (5 g lysebrun olje, 75% utbytte).

5 Trinn B: (+/-)-6-klor-4-etynyl-4-(1,1,1-trifluormetyl)-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on

En THF-løsning av 5,0 g 2-(2-amino-5-klorfenyl)-1,1,1-trifluor-3-butyn-2-ol (20,0 mmol i 225 ml THF) ble behandlet med 13,0 g (80,0 mmol) 1,1'-karbonyldiimidazol og ble oppvarmet i et oljebad til 60°C i 17 timer. THF ble fjernet i vakuu, residuet ble oppløst i etylacetat og ble deretter vasket med 10% sitronsyre, natriumbikarbonat, vann og saltvann før tørking over natriumsulfat. Etter filtrering og fordampning i vakuu ble det urene produkt isolert (3,6 g) og ble omkrystallisert fra etylacetat:heksan. Produktet, (+/-)-6-klor-4-etynyl-4-(1,1,1-trifluormetyl)-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on, ble isolert som et hvitt, krystallinsk, fast materiale (3,22 g, 58,4% utbytte): sm.p.: 226-227°C. ¹H-NMR (CDCl₃ + spor DMSO): δ 3,16 (s, 1H), 6,98 (d, J=3,3 Hz, 1H), 7,35 (m, 1H), 7,51 (s, 1H), 10,66 (s, 1H).

Eksempel 3

25 (+/-)-6-klor-4-(1,1,1-trifluormetyl)-4-[(3-(1-pyrrolidinyl))-1-propynyl]-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on (forbindelse 7)

En dioksanløsning av 150 mg (0,544 mmol) (+/-)-6-klor-4-etynyl-4-(1,1,1-trifluormetyl)-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on, 52,2 µl (0,626 mmol) pyrrolidin, 20,5 mg (0,681 mmol) paraformaldehyd, 31,1 µl (0,544 mmol) eddiksyre og 20,5 mg kopper(I)klorid (0,207 mmol i 3,5 ml dioksan) ble oppvarmet til 50°C i et oljebad i ca. 2 timer. Reaksjonsblandingen ble helt over i 2N HCl og ble ekstrahert med etylacetat. Det vandige lag ble nøytralisert med fast kaliumkarbonat og ble ekstrahert tre ganger med etylacetat. De kombinerte ekstrakter ble vasket med vann og saltvann før tørking over natriumsulfat under dannelse av 140 mg urent produkt. Kromatografisk rensing på silikagel og omkrystallisering fra etylacetat:heksan ga krystallinsk (+/-)-6-klor-4-(1,1,1-trifluormetyl)-4-[(3-(1-pyrrolidinyl))-1-propynyl]-1,4-dihydro-2H-3,1-

benzoksazin-2-on (89 mg, 46% utbytte): sm.p.: 160-161°C
(spaltn.) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,85-1,89 (m, 4H), 2,68-2,71 (m, 4H), 3,67 (s, 1H), 6,88 (d, $J=8,55$ Hz, 1H), 7,40 (dd, $J=2,19, 8,54$ Hz, 1H) 7,55 (s, 1H), 9,45 (s, 1H).

5

(+/-)-6-klor-4-(2-cyanofenyl)etynyl-4-(1,1,1-trifluormetyl)-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on (forbindelse 2)

En løsning av 138 mg (0,5 mmol) 6-klor-4-etynyl-4-(1,1,1-trifluormetyl)-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on i
10 3 ml tørt THF ble omrørt ved -78°C . Til denne løsning ble det tilsatt 0,4 ml (1,0 mmol) n-butyllitium, 2,5 M i heksan. Anionet ble aldret i 10 minutter ved -78°C , hvorefter 1 ml ZnCl_2 - (1 M i eter) løsning ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved -78°C i 15 minutter, isbadet ble fjernet og
15 blandingen ble langsomt oppvarmet til 0°C i løpet av 30 minutter. Til reaksjonsblandingen ble det tilsatt en løsning av 149 mg (0,65 mmol) 2-jodbenzonitril i 2 ml THF, etterfulgt av 56 mg (0,05 mmol) tetrakis(trifenylfosfin)palladium(0). Reaksjonsblandingen fikk oppvarmes til romtemperatur og ble omrørt
20 i 15 timer. Reaksjonsblandingen ble tilsatt 10 ml 2N HCl, ble ekstrahert med 2 x 200 ml EtOAc, og de kombinerte ekstrakter ble vasket med H_2O , saltvann og ble tørket over MgSO_4 . Løsningsmidlet ble fjernet under dannelse av 195 mg av en olje som ble flashkromatografert på silikagel (20% EtOAc i heksan)
25 under dannelse av 60 mg av det uomsatte utgangsmateriale og 35 mg av det koblede produkt. Det sistnevnte ble trituret med eter under dannelse av 25 mg (+/-)-6-klor-4-(2-cyanofenyl)-etynyl-4-(1,1,1-trifluormetyl)-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on. Sm.p.: 245-246°C. FAB MS $M+1=377$ m/e. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3):
30 δ 6,82-6,85 (d, $J=8,5$ Hz, 1H); 7,40-7,44 (dd, $J=2,1, 8,5$ Hz, 1H); 7,56-7,79 (m, 5H); 8,00 (s, 1H).

Eksempel 4

(+/-)-4-(1-klor-1,1-difluormetyl)-4-(2-fenyletynyl)-6-klor-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on (forbindelse 5)

35

Trinn A: 1-(2-amino-5-klorfenyl)-2-klor-2,2-difluoretanon

Til en ovnstørket, 300 ml 3-halset rundkolbe med magnetisk rørestav, argoninnløp og en 100 ml ovnstørket tilset-

ningstrakt ble det tilsatt 10 g (47,2 mmol) N-(4-klorfenyl)-2,2-dimetylpropanamid og 100 ml tørt THF. Denne løsning ble avkjølt på et isbad til 0°C, og tilsetningstrakten ble fylt med n-butyllitium (38,7 ml av en 2,5 M-løsning i heksan, 5 96,8 mmol). n-butyllitiumløsningen ble dråpevis tilsatt til amidløsningen langsomt i løpet av 1 time, idet temperaturen ble holdt under +5°C. Den resulterende løsning ble aldret ved 0°C i 1 time under hvilket tidsrom et oransje bunnfall ble dannet. Til denne blanding ble det tilsatt 10,2 ml (96,8 mmol) 10 etyl-1-klor-1,1-difluoracetat dråpevis i løpet av 15 minutter. Den resulterende, klare løsning ble aldret i ytterligere 30 minutter. Reaksjonen ble stanset med 5% vandig HCl. Blandingen ble fortynnet med 1 l EtOAc, og lagene ble separert. Den organiske fase ble vasket med saltvann, ble tørket (MgSO₄), 15 filtrert og konsentrert i vakuum under dannelse av 160 g av en gul olje. Dette materiale ble suspendert i 200 ml 3N vandig HCl, og løsningen ble oppvarmet til tilbakeløpskokning i 24 timer. Den avkjølte løsning ble fortynnet med 500 ml EtOAc, og blandingen ble gjort basisk med konsentrert NH₄OH. Lagene 20 ble separert og den organiske fase ble vasket med saltvann, ble tørket (MgSO₄), filtrert, konsentrert i vakuum og kromatografert på 350 g silikagel under anvendelse av 15% EtOAc i heksan som elueringsmiddel. Det kromatograferte materiale ble omkrystallisert fra kokende heksan under dannelse av 5,5 g 25 urent 1-(2-amino-5-klorfenyl)-2-klor-2,2-difluoretanon som klare, gule krystaller, sm.p.: 55-56°C. ¹H NMR (CDCl₃): δ 6,43 (br s, 2H), 6,69 (d, 1H, J=9,0 Hz), 7,31 (dd, 1H, J=2,4, 9,0 Hz), 7,80 (d, 1H, J=2,4 Hz).

30 Trinn B: (+/-)-2-(2-amino-5-klorfenyl)-4-fenyl-1-klor-1,1-difluor-3-butyn-2-ol

Til en 100 ml ovnstørket, 3-halset rundkolbe med en rørestav, argoninnløp, tilbakeløpskjøler og en membran ble det tilsatt 2,13 g (20,83 mmol) etynylbenzen, 50 ml tørt THF og 35 etylmagnesiumbromid (6,94 ml av en 3,0M-løsning i eter). Denne blanding ble aldret i 2 timer ved omgivende temperatur hvorpå en løsning av 1,00 g (4,17 mmol) 1-(2-amino-5-klorfenyl)-2-klor-2,2-difluoretanon i 6 ml THF ble tilsatt med en sprøyte. Den resulterende oransjerøde løsning ble omrørt ved omgivende

temperatur i 21,5 timer. Reaksjonen ble stanset ved tilsetning av 50 ml 1N-HCl, og blandingen ble deretter fortynnet med EtOAc. Løsningen ble deretter gjort basisk med konsentrert NH₄OH, og lagene ble separert. Den organiske fase ble vasket med vann og saltvann. Tørking (MgSO₄), filtrering, fjerning av løsningsmidlet i vakuum og kromatografi på silikagel under anvendelse av 20% EtOAc i heksan som elueringsmiddel ga 1,02 g (+/-)-2-(2-amino-5-klorfenyl)-4-fenyl-1-klor-1,1-difluor-3-butyn-2-ol som et off-hvitt, fast materiale. ¹H NMR (CDCl₃):

10 δ 4,42 (br s, 2H), 5,10 (br s, 1H), 6,65 (d, 1H, J=8,5 Hz), 7,15 (dd, 1H, J=2,4, 8,5 Hz), 7,38 (m, 3H), 7,55 (m, 2H), 7,70 (d, J=2,4 Hz).

Trinn C: (+/-)-4-(1-klor-1,1-difluormetyl)-4-(2-fenyletynyl)-6-klor-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on

15 Til en 100 ml rundkolbe med en rørestav, tilbakeløpskjøler og et argoninnløp ble det tilsatt 0,81 g (2,37 mmol) (+/-)-2-(2-amino-5-klorfenyl)-4-fenyl-1-klor-1,1-difluor-3-butyn-2-ol, 25 ml tørt THF og 1,919 g (11,84 mmol) 1,1'-karbonyldiimidazol. Denne løsning ble oppvarmet til 60°C i

20 20 timer. Den avkjølte reaksjonsblanding ble fortynnet med EtOAc og ble vasket med 0,5N-HCl, H₂O og saltvann. Tørking (MgSO₄), filtrering og fjerning av løsningsmidlet i vakuum ga 890 mg av en olje. Dette materiale ble kromatografert på 80 g

25 silikagel under anvendelse av 20% EtOAc i heksan som elueringsmiddel. Det kromatograferte materiale ble omkrystallisert fra kokende EtOAc-heksan under dannelse av 507 mg (58%) (+/-)-4-(1-klor-1,1-difluormetyl)-4-(2-fenyletynyl)-6-klor-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on som hvite nåler, sm.p.: 154-

30 155°C. ¹H NMR (CDCl₃): δ 6,89 (d, 1H, J=8,4 Hz), 7,35-7,48 (m, 4H), 7,56 (m, 2H), 7,64 (br s, 1H), 9,19 (br s, 1H).

Eksempel 5

(-)-6-klor-4-fenyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on (forbindelse 4)

5 Trinn A: 2-(2-amino-5-klorfenyl)-4-fenyl-1,1,1-trifluor-3-butyn-2-ol

En løsning av litiofenylacetylid, fremstilt fra 4,83 ml fenylacetylen (0,044 mol) og 17,2 ml av en 2,5N-løsning av n-butyllitium i heksan (0,043 mol) i 50 ml THF ved
10 -78°C, ble behandlet med 11,4 g magnesiumbromideterat (0,044 mol) i løpet av 5 minutter. Blandingen ble oppvarmet til -20°C, og omrøringen under argon ble fortsatt i 30 minutter. Blandingen ble deretter avkjølt til -60°C, og en løsning inneholdende 2,5 g (0,011 mol) 1-(2-amino-5-klor)-2,2,2-tri-
15 fluormetyletanon på forhånd kompleksdannet med en ekvivalent (2,8 g, 0,011 mol) magnesiumbromideterat i 25 ml THF, ble til-satt. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 15° i én time før den ble avkjølt til 0°C og ble dråpevis behandlet med en blanding av 30 ml hver av mettet, vandig ammoniumkloridløsning og vann.
20 Blandingen ble ekstrahert med 2 x 100 ml porsjoner av etyl-eter, de kombinerte, organiske faser ble vasket med saltvann og ble tørket over MgSO₄. Fjerning av tørkemidlet og løsningsmidlet ga 6 g av en olje som ble flashkromatografert på silikagel og ble eluert med 20% EtOAc i heksan, under dannelselse av
25 2,5 g 2-(2-amino-5-klorfenyl)-4-fenyl-1,1,1-trifluor-3-butyn-2-ol. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 4,63 (br s, 3H), 6,69 (d, J=8,5 Hz, 1H), 7,15 (d, J=2 Hz, 1H), 7,17 (d, J=2 Hz, 1H) 7,35-7,44 (m, 3H), 7,53-7,56 (m, 2H), 7,66 (d, J=2 Hz, 1H). FAB MS M+H = 326 m/e.

30

Trinn B: (±)-6-klor-4-fenyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on (forbindelse 12)

En løsning av 2,0 g (6,1 mmol) 2-(2-amino-5-klorfenyl)-4-fenyl-1,1,1-trifluor-3-butyn-2-ol og 11,0 g
35 (12,0 mmol) 1,1'-karbonyldiimidazol i 300 ml tørt THF ble omrørt under argon ved 55°C i 24 timer. Løsningsmidlet ble fjernet på en rotasjonsfordamper, og residuet ble fordelt mellom 200 ml eter og 400 ml vann. Lagene ble separert, og det vandige lag ble ekstrahert ytterligere én gang med eter. De kom-

binerte eterekstrakter ble vasket med 2 x 200 ml 10% sitronsyre og deretter med saltvann før tørking over $MgSO_4$. Fjerning av tørkemiddel og løsningsmiddel ga 1,5 g (70%) av den urene tittelforbindelsen som en olje. Triturering med eter-heksan ga 5 875 mg (\pm)-6-klor-4-fenyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on som et hvitt, fast materiale som delvis smeltet ved 137°C og var klart ved 147°C. 1H -NMR ($CDCl_3$): δ 6,92 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7,30-7,49 (m, 4H), 7,58-7,65 (m, 3H), 8,99 (s, 1H).

10

Trinn C: 6-klor-1-(1S)-kamfanoyl-4-fenyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on

Til en løsning inneholdende 2,24 g (6,37 mmol) (\pm)-6-klor-4-fenyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on, 0,10 g (0,8 mmol) 4-dimetylaminopyridin og 2,07 g 15 (9,55 mmol) (-) kamfansyreklorid i 60 ml tørt diklormetan, omrørt under argon på et isbad, ble tilsatt 2,22 ml (15,9 mmol) trietylamin. Kjølebadet ble fjernet, og reaksjonen fikk forløpe ved romtemperatur. Når reaksjonen var fullført 20 ved tynnsjikt-kromatografi (SiO_2 , 4% EtOAc i $CHCl_3$), ble løsningen fortynnet med 200 ml $CHCl_3$ og ble vasket to ganger med 10% sitronsyre og deretter med saltvann. Etter tørking ($MgSO_4$) ble løsningsmidlet fjernet på en rotasjonsfordamper, og det skumaktige residuum ble underkastet flashkromatografi og eluering med $CHCl_3$. Det ble erholdt 575 mg av diastereomer I av 25 6-klor-(1S)-kamfanoyl-4-fenyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on som en olje, 1H -NMR ($CDCl_3$): δ 0,85 (s, 3H), 1,08 (s, 3H), 1,22 (s, 3H), 1,73-1,85 (m, 1H), 1,92-2,08 (m, 1H), 2,450-2,67 (m, 2H), 7,30-7,79 (m, 8H). Dette ble 30 etterfulgt av 1,52 g av blandede fraksjoner (diastereomerer I og II). Fortsatt eluering ga 680 mg av den langsommere bevegelige diastereomer (II) av tittelforbindelsen som etter triturerering med en eter/heksan-blanding ga klumper av hvite nåler, sm.p. 177-178,5°C; 1H -NMR ($CDCl_3$): δ 0,83 (s, 3H), 1,12 (s, 35 3H), 1,23 (s, 3H), 1,73-1,86 (m, 1H), 1,93-2,06 (m, 1H), 2,50-2,63 (m, 2H), 7,38-7,51 (m, 4H), 7,49-7,62 (m, 2H) 7,72 (d, $J=9$ Hz, 1H), 7,76 (d, $J=2$ Hz, 1H).

1,52 g av isomerblandingen fra flashkromatografien ble oppløst i 75 ml eter, løsningen ble fortynnet med 50 ml

heksan og ble deretter sådd med en krystall av isomer II. Langsom krystallisering ga ytterligere 385 mg isomer II som ble omkrystallisert fra eter/heksan under dannelse av >96% diastereomert rent materiale ved HPLC.

5

Trinn D: (-)-6-klor-4-fenyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on

53 mg (0,10 mmol) av den krystallinske diastereomer (II) av 6-klor-1-(1S)-kamfanoyl-4-fenyletynyl-4-trifluormetyl-1,2-dihydro-4(H)-3,1-benzoksazin-2-on ble oppløst i 8 ml 2-propanol ved 45°C under en argonatmosfære. Til løsningen ble det tilsatt 0,27 ml av en 10% vandig løsning av K₂CO₃. Omrøringen ble fortsatt i 10 minutter ved hvilket tidspunkt alt av utgangsmaterialet var forbrukt (TLC, SiO₂, 4% EtOAc i CHCl₃).

15 Løsningen ble konsentrert i vakuum, og residuet ble tatt opp i eter. Etter vasking med 0,1N-HCl og saltvann ble eterløsningen tørket (MgSO₄), filtrert og fordampet i vakuum til et oljeaktig, fast materiale som ble rensert ved SiO₂-kromatografi med 5% 2-propanol i heksan som elueringsmiddel. (-)-6-klor-4-fenyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on ble

20 erholdt som hvite nåler fra eter/heksan, sm.p.: 178-179°C; [α]_D²⁰ = -92,5° (CHCl₃, c=0,0012 g ml⁻¹); ¹H-NMR (CDCl₃): δ 6,87 (d, J=8,5 Hz, 1H), 7,37-7,50 (m, 4H), 7,56-7,63 (m, 3H), 8,60 (s, 1H).

25

Trinn E: (+)-6-klor-4-fenyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on (forbindelse 3)

(+)-6-klor-4-fenyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on ble fremstilt fra det ikke-krystallinske produkt fra trinn C, diastereomer I, på samme måte som i

30 trinn D: sm.p.: 178-179°C; [α]_D²⁰ = +87,6° (CHCl₃, c=0,0050 g ml⁻¹); ¹H-NMR (CDCl₃): δ 6,87 (d, J=8,5 Hz, 1H), 7,37-7,50 (m, 4H), 7,56-7,63 (m, 3H), 8,60 (s, 1H).

35

Eksempel 6

(-)-6-klor-4-syklopropyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on (L-743.726, forbindelse 37,2) og (+)-6-klor-4-syklopropyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on (L-743.725)

Trinn A: 2-(2-amino-5-klorfenyl)-4-syklopropyl-1,1,1-trifluor-3-butyn-2-ol

En løsning av brommagnesiumsyklopropylacetylid ble fremstilt fra 23 g syklopropylacetylen (0,348 mol) i 250 ml THF ved dråpevis tilsetning av 116 ml av en 3,0M-løsning av etylmagnesiumbromid i eter (0,348 mol) i løpet av 1 time. Denne løsning ble opprettholdt ved 0°C i 1 time og deretter ved 40°C i 3 timer. Til denne løsning, avkjølt på nytt til 0°C, ble det tilsatt porsjonsvis 15,56 g 1-(2-amino-5-klorfenyl)-2,2,2-trifluormetyletanon (0,0696 mol) som et fast materiale i løpet av 5 minutter. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 0° i 1,5 time. Reaksjonen ble stanset ved 0°C ved dråpevis tilsetning av 700 ml mettet, vandig ammoniumkloridløsning. Blandingen ble ekstrahert med 2 x 400 ml porsjoner av etylacetat, de kombinerte, organiske faser ble vasket med saltvann og ble tørket over MgSO₄. Fjerning av tørkemidlet og løsningsmidlene ga et gult, fast materiale. Dette materiale ble omkrystallisert fra kokende heksan (100 ml sluttvolum) under dannelse av 14,67 g 2-(2-amino-5-klorfenyl)-4-syklopropyl-1,1,1-trifluor-3-butyn-2-ol. En andre masse (2,1 g) ble beholdt ved konsentrering av modervæskene. Sm.p.: 153-154°C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,84 (m, 2H), 0,90 (m, 2H), 1,38 (m, 1H), 4,50 (br s, 3H), 6,69 (d, J=8,5 Hz, 1H), 7,13 (dd, J=2,5, 8,5 Hz, 1H), 7,55 (d, J=2,5 Hz, 1H).

Trinn B: (±)-6-klor-4-syklopropyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on (L-741.211)

En løsning av 15,00 g (0,0518 mol) 2-(2-amino-5-klorfenyl)-4-syklopropyl-1,1,1-trifluor-3-butyn-2-ol og 41,98 g (0,259 mol) 1,1'-karbonyldiimidazol i 250 ml tørt THF ble omrørt under argon ved 55°C i 24 timer. Løsningsmidlet ble fjernet på en rotasjonsfordamper, og residuet ble fordelt mellom 500 ml etylacetat og 400 ml vann. Lagene ble separert, og den

vandige fase ble ekstrahert ytterligere én gang med etylacetat. De kombinerte etylacetatekstrakter ble vasket med 2 x 200 ml 2% vandig HCl, mettet, vandig NaHCO₃ og saltvann. Tørking over MgSO₄, filtrering og fjerning av løsningsmidlet i vakuu
 5 vakuu ga 16,42 g av tittelforbindelsen som et fast materiale. Omkrystallisering fra etylacetat-heksan ga 12,97 g av analytisk rent (±)-6-klor-4-syklopropyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on som hvite krystaller, sm.p.: 178-180°C. ¹H-NMR (CDCl₃): 0,85 (m, 2H), 0,94 (m, 2H), 1,40 (m,
 10 1H), 6,81 (d, J=8,5 Hz, 1H), 7,37 (dd, J=2,5, 8,5 Hz, 1H), 7,49 (d, J=2,5 Hz, 1H), 8,87 (br s, 1H).

Trinn C: 6-klor-1-(1S)-kamfanoyl-4-syklopropyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on

15 Til en løsning inneholdende 12,97 g (0,041 mol) (±)-6-klor-syklopropyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on, 1,02 g (0,0083 mol) 4-dimetylamino-pyridin og 14,22 g (0,06556 mol) (-) kamfansyreklorid i 350 ml tørt diklormetan, omrørt under argon på et isbad, ble tilsatt
 20 22,84 ml (0,164 mol) trietylamin. Kjølebadet ble fjernet, og reaksjonen fikk forløpe ved romtemperatur. Etter 75 minutter ble reaksjonen bedømt som fullført ved tynnsjiktskromatografi (SiO₂, 4% EtOAc i CHCl₃), og løsningen ble fortynnet med 500 ml CHCl₃ og ble deretter vasket to ganger med 10% sitronsyre, én
 25 gang med vann og én gang med saltvann. Tørking (MgSO₄), filtrering og fjerning av løsningsmidlet i vakuu ga et fargeløst skum. Dette materiale ble trituret med 200 ml kokende heksan. Ved avkjøling til romtemperatur ble det ønskede diastereomere kamfanatimid utfelt. Det faste materiale ble oppsamlet på en
 30 fritte, ble vasket med litt kald heksan og ble tørket i vakuu under dannelsen av 7,79 g 6-klor-1-(1S)-kamfanoyl-4-syklopropyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on som hvite krystaller. Sm.p.: 164-165°C. HPLC-renhet: 99,2% @ 254 nm. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,77 (s, 3H), 0,86-0,96 (m, 4H), 1,08
 35 (s, 3H), 1,19 (s, 3H), 1,44 (m, 1H), 1,76 (m, 1H), 1,95 (m, 1H), 2,51 (m, 2H), 7,42 (dd, J=2,4, 9,0 Hz, 1H), 7,63 (m, 2H).

Trinn D: (-)-6-klor-4-syklopropyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on (L-743.726, forbindelse 37,2)

7,50 g (0,01512 mol) 6-klor-1-(1S)-kamfanoyl-4-syklopropyletynyl-4-trifluormetyl-1,2-dihydro-4(H)-3,1-benzoksazin-2-on ble oppløst i 150 ml n-butanol ved 60°C under en argonatmosfære. Til denne løsning ble det tilsatt 10 ml 1N HCl. Denne løsning ble opprettholdt ved 60°C i 72 timer. Blandingen ble nøytralisert med vandig NaHCO₃, hvorefter n-butanol ble fjernet i vakuum. Residuet ble oppløst i 150 ml THF og ble behandlet med 50 ml 2N LiOH i 3 timer ved romtemperatur. Denne blanding ble fortynnet med etylacetat og ble vasket med to porsjoner vann og én porsjon saltvann. Tørring (MgSO₄), filtrering og fjerning av løsningsmidlet i vakuum ga et hvitt, fast materiale. Dette materiale ble omkrystallisert fra varm heksan under dannelse av 3,43 g (-)-6-klor-4-syklopropyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on som hvite krystaller, sm.p.: 131-132°C; $[\alpha]_D^{20} = -84,7^\circ$ (CHCl₃, c=0,005 g ml⁻¹); ¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,85 (m, 2H), 0,94 (m, 2H), 1,40 (m, 1H), 6,81 (d, J=8,5 Hz, 1H), 7,37 (dd, J=2,5, 8,5 Hz, 1H), 7,49 (d, J=2,5 Hz, 1H), 8,87 (br s, 1H).

Trinn E: (+)-6-klor-4-syklopropyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on (L-743.725)

Modervæskene fra trinn C ovenfor ble rensert ved kolonnekromatografi på silikagel under anvendelse av 10% etylacetat i heksan som elueringsmiddel. Den rene, ikke-ønskede diastereomer (et fargeløst skum) ble hydrolysert i henhold til trinn D. Det enantiomere benzoksazinon, (+)-6-klor-4-syklopropyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on, ble erholdt som hvite krystaller, sm.p.: 131-132°C; $[\alpha]_D^{20} = +84,4^\circ$ (CHCl₃, c=0,005 g ml⁻¹); ¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,85 (m, 2H), 0,94 (m, 2H), 1,40 (m, 1H), 6,81 (d, J=8,5 Hz, 1H), 7,37 (dd, J=2,5, 8,5 Hz, 1H), 7,49 (d, J=2,5 Hz, 1H), 8,87 (br s, 1H).

Revers transkriptase-utprøvnig

Utprøvnigen måler inkorporeringen av tritiert deoksyguanosinmonofosfat med rekombinant HIV-revers transkriptase (HIV RT_R) (eller annen RT) i syreutfellbart cDNA ved Km-verdier på dGTP og poly r(C)·oligo d(G)₁₂₋₁₈. Inhibitorene ifølge oppfinnelsen inhiberer denne inkorporering.

Utprøvnigene ble utført i 55 mM Tris (pH 8,2)-30 mM KCl-30 mM MgCl₂-1 mM ditiotreititol-20 µg rC:dG₁₂₋₁₈ (Pharmacia) pr. ml-8 mM [³H]dGTP (New England Nuclear)-0,01% "Triton X-100"-50 mM etylenglykol-bis(β-aminoetyler)-N,N,N'N'-tetraeddiksyre (EGTA)-1 mg kvegserumalbumin pr. ml. Etter 60 minutters inkubering ved 37°C ble syreutfellbart materiale oppsamlet på glassfiberfiltre ved anvendelse av en halvautomatisk cellehøster. Bakterielle celleekstrakter inneholdende RT, ble fortynnet til innen det lineære område av bestemmelsen, og aktiviteten ble bestemt i nærvær og i fravær av inhibitor. Renset HIV-1 RT-heterodimer fremstilt i *E. coli*, tjente også som en kontroll. Resultater er bestemt som inhibitorkonsentrasjon som gir 50% inhibering (IC₅₀ vekt), i nanomol/liter.

For den doble mutantbestemmelse (dm) ble A17 RT anvendt i bestemmelsen. A17 RT er resistent overfor forskjellige aminopyridoner som beskrevet i Nunberg, J.H. et al., *J. Virol.* 65, 4887 (1991). Resultater er målt som IC₅₀ dm i nanomol/liter.

Cellespredningsbestemmelse

Inhibering av spredningen av HIV i cellekultur ble målt i henhold til Nunberg, J. H. et al., *J. virol.* 65, 4887 (1991). I denne bestemmelse ble MT-4 T-lymfoide celler infisert med HIV-1 (villtype, med mindre annet er angitt) under anvendelse av et på forhånd bestemt inokulum, og kulturene ble inkubert i 24 timer. Ved dette tidspunkt var ≤ 1% av cellene positive ved indirekte immunfluorescens. Cellene ble deretter grundig vasket og fordelt i 96-brønns kulturskiver. Serievis, doble fortynninger av inhibitor ble tilsatt til brønnene, og dyrkningen ble fortsatt i ytterligere 3 dager. Ved 4 dagers postinfeksjon var 100% av cellene i kontrollkulturene infisert. HIV-1 p24-akkumulering var direkte korrelert med virus-

spredning. Den cellekultur-inhiberende konsentrasjon ble definert som inhibitorkonsentrasjonen i nanomol/liter som reduserte spredningen av infeksjon med minst 95% eller CIC_{95} .

5 Sammendrag av resultatene for forbindelse 37,2

A. Revers transkriptase-utprøving og celledispersjonsutprøving:

	<u>WT</u>	<u>K103N*</u>	<u>Y181C</u>	<u>DM</u>	<u>RT-2</u>
10 IC ₅₀ (μ M)	0,002	0,030	0,008	0,085	80,8
CIC ₉₅ (μ M)	<0,006(N=2)	0,100	<0,025	0,400	N.D.

15 B. Farmakologiske data:

Rhesus: 1 mg kg⁻¹ i.v.: $t_{1/2}$ =210 min.

20 10 mg kg⁻¹ p.o. (methocel): C_{max} =4,4 μ M @ 2h
 C_{24h} =1,1 μ M

} O.B.=0,55
(A.U.C.)

Proteinbinding: 98,0% normalt, humant plasma (HPLC-metode)

25 * Mutantene K103N og Y181C er legemiddelresistente HIV-1-revers transkriptaser. DM er den doble mutant som diskutert i revers transkriptasebestemmelsen. RT-2 er revers transkriptase av HIV-2.

30 Synergistiske effekter

A. Fremstilling av HIV-infisert MT-4-cellesuspensjon

MT-celler ble infisert ved dag 0 til en konsentrasjon på 250.000 pr. ml med en 1:1.000 fortykning av HIV-1 stamme
 35 IIIb-forråd (sluttelig 125 pg p24/ml; tilstrekkelig til å gi \leq 1% infiserte celler på dag 1 og 25-100% på dag 4). Cellene ble infisert og dyrket i følgende medium: RPMI 1640 (Whittaker BioProducts), 10% inaktivert kalvefosterserum, 4 mM glutamin (Gibco Labs) og 1:100 "Penicillin-Streptomycin" (Gibco Labs).

Blandingen ble inkubert over natten ved 37°C i 5% CO₂-atmosfære.

B. Behandling med inhibitorer

5 En matriks av nanomolare områdekonsentrasjoner av de parvise kombinasjoner (se tabell S) ble fremstilt. Ved dag 1 ble aliquoter på 125 µl inhibitorer tilsatt til like volumer HIV-infiserte MT-4-celler (50.000 pr. brønn) i en 96-brønns mikrotitercellekulturplate. Inkubering ble fortsatt i 3 dager
10 ved 37°C i 5% CO₂-atmosfære.

C. Måling av virusspredning

Under anvendelse av en multikanalpipette ble de avsatte celler resuspendert, og 125 µl ble høstet i en separat
15 mikrotiterplate. Supernatanten ble undersøkt med hensyn på HIV p24-antigen.

Konsentrasjonen av HIV p24-antigen ble målt ved en enzymimmunbestemmelse beskrevet som følger. Aliquoter av p24-antigen som skulle måles, ble tilsatt til mikrobrønner belagt
20 med et monoklonalt antistoff som var spesifikt overfor HIV-kjerneantigen. Mikrobrønnene ble vasket ved dette punkt og ved andre egnede trinn som fulgte. Biotinylert, HIV-spesifikt antistoff ble deretter tilsatt, etterfulgt av konjugert strepavidin-pepperrotperoksidase. En fargereaksjon fant sted fra det
25 tilsatte hydrogenperoksid og tetrametylbenzidinsubstrat. Fargeintensiteten er proporsjonal med konsentrasjonen av HIV p24-antigen.

Beregning av graden av synergji

30 Parvise kombinasjoner av inhibitorer (se tabell 5) ble funnet å utvise markert forøkt inhibering av virusspredning sammenlignet med hver inhibitor alene, eller i sammenligning med den additive inhibering av hver inhibitor. Den parvise kombinasjon av f.eks. 726 og AZT ble funnet å utvise markert forøkt inhibering av virusspredning i sammenligning med
35 726 alene eller AZT alene, eller i sammenligning med summen av 726-inhibitor og AZT-inhibering.

Disse data ble bearbeidet som følger: fraksjonelle, inhiberende konsentrasjonsforhold (FIC) ble beregnet i henhold

til Elion et al., J. Biol. Chem., 208, 477 (1954). Den minimale sum av FICS som er den maksimale synergi, ble bestemt for forskjellige parvise kombinasjoner. Alternativt ble en midlere sum av FICS beregnet som er den midlere synergi. Se tabell S.

5 Disse resultater indikerer vesentlig synergi ved inhibering av virusspredning. Jo mindre tallet er, jo større er synergien.

TABELL S

10	Parvise kombinasjoner*	Maksimal synergi
	726 + ddI	0,81
	726 + AZT	0,62
	726 + 524	0,65
	726 + 524 + AZT	

15

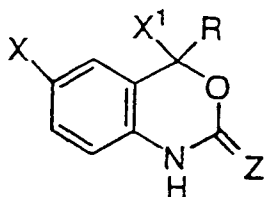
524 er L-735.524. Andre forbindelser er også definert i tabell C ovenfor.

20

P a t e n t k r a v

1. Forbindelse,
k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:

25



30

hvor:

- X er halogen;
- 35 X¹ er trihalometyl;
- Z er O;

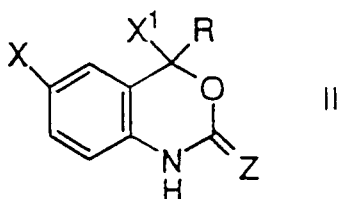
R er

- (a) C₁₋₈-alkyl, usubstituert eller substituert med A, og A er halogen, C₃₋₆-sykloalkyl, CN, hydrok-
 5 sy, C₁₋₄-alkoksy, fenyl, C₁-C₄-alkyl, C₁-C₄-alkok-
 sykarbonyl, nitro, di(C₁₋₂-alkyl)amino, pyrro-
 lidin, oksazolidinon eller fenyltio;
- (b) C₂₋₄-alkenyl, usubstituert eller substituert med
 (i) A, eller
 (ii) fenyl, usubstituert eller substituert med
 10 A;
- (c) C₂₋₅-alkynyl, usubstituert eller substituert med
 (i) A, eller
 (ii) fenyl, usubstituert eller substituert med
 A;
- 15 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

2. Farmasøytisk preparat,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en effek-
 tiv mengde av en forbindelse av formel II

20



25

og en farmasøytisk akseptabel bærer,

30 hvori

- X er halogen;
- X¹ er trihalometyl; C₂₋₅-alkyl; C₃₋₅-sykloalkyl; eller
 fenyl;
- Z er O eller S;
- 35 R er
- (a) C₁₋₈-alkyl, usubstituert eller substituert med A, og A er halogen, C₃₋₆-sykloalkyl, CN, hydrok-
 sy, C₁₋₄-alkoksy, fenyl, C₁-C₄-alkyl, C₁-C₄-alkok-
 sykarbonyl, nitro, di(C₁₋₂-alkyl)amino, pyrro-

lidin, oksazolidinon eller fenyltio;

(b) C₂₋₄-alkenyl, usubstituert eller substituert med
(i) A, eller

(ii) fenyl, usubstituert eller substituert med
A;

(c) C₂₋₅-alkynyl, usubstituert eller substituert med
(i) A, eller

(ii) fenyl, usubstituert eller substituert med
A;

10 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

3. Forbindelse ifølge krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den er

(-)-6-klor-4-syklopropyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-
15 dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on,

(-)-6-klor-4-fenyletynyl-4-trifluormetyl-1,4-dihydro-
2H-3,1-benzoksazin-2-on,

(+/-)-6-klor-4-(2-cyanofenyl)etynyl-4-(1,1,1-tri-
fluormetyl)-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on,

20 (+/-)-4-(1-klor-1,1-difluormetyl)-4-(2-fenyletynyl)-
6-klor-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on, eller

(+/-)-4-(2-[dimetylaminometyl]etynyl)-4-trifluor-
metyl-6-klor-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoksazin-2-on,

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

25

4. Farmasøytisk preparat anvendbart for inhibering av
HIV-revers transkriptase,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en effek-
tiv mengde av en forbindelse ifølge hvilket som helst av

30 kravene 1, 2 eller 3, og en farmasøytisk akseptabel bærer.

5. Farmasøytisk preparat anvendbart for forhindring
eller behandling av infeksjon med HIV eller for behandling av
AIDS eller ARC,

35 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en effek-
tiv mengde av en forbindelse av formel I eller formel II eller
ifølge krav 3, og en farmasøytisk akseptabel bærer.

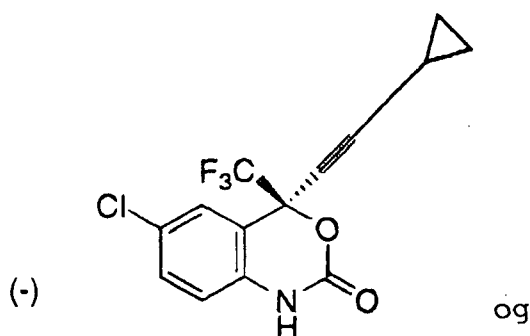
6. Kombinasjon,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en forbindelse av formel I eller formel II med en nukleosidanalogue med biologisk aktivitet overfor HIV-revers transkriptase.

- 5 7. Synergistisk kombinasjon, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter AIDS-antivirale forbindelser, som er

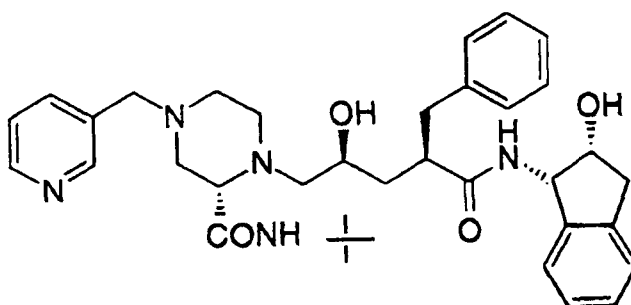
10

15



20

25

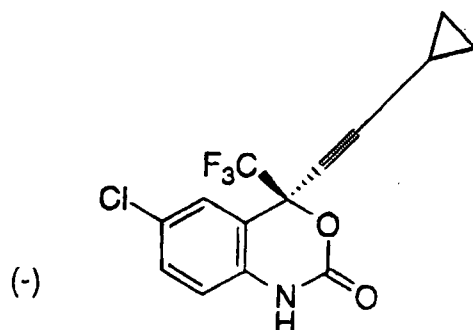


30

og, eventuelt, én eller flere av HIV-inhibitorene valgt fra gruppen bestående 3-([(4,7-diklor-1,3-benzoksazol-2-yl)metyl]-amino)-5-etyl-6-metylpyridin-2(1H)-on, AZT, ddI eller ddC.

35

8. Synergistisk kombinasjon, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter AIDS-antivirale forbindelser, som er



og én eller flere av HIV-inhibitorerne valgt fra gruppen bestående av 3-([(4,7-diklor-1,3-benzoksazol-2-yl)metyl]amino)-5-etyl-6-metylpyridin-2(1H)-on, AZT, ddI eller ddC.