



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 31 158 T2** 2004.08.26

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 865 434 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 31 158.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/00486**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 903 481.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/020932**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.01.1996**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **11.07.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.09.1998**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **17.12.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.08.2004**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C07D 239/48**

**C07D 473/32, C07C 279/18, C07C 279/02,  
A61K 31/52, A61K 31/155, A61K 31/505,  
C07D 251/48, C07D 473/34**

(30) Unionspriorität:

<b>369830</b>	<b>06.01.1995</b>	<b>US</b>
<b>463405</b>	<b>05.06.1995</b>	<b>US</b>

(73) Patentinhaber:

**Picower Institute for Medical Research,  
Manhasset, N.Y., US**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &  
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,  
MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**BUKRINSKY, I., Michael, Glenwood Landing, US;  
CERAMI, Anthony, Shelter Island, US; ULRICH,  
Peter, Old Tappan, US; BERGER, J., Bradley,  
Greenlawn, US**

(54) Bezeichnung: **VERBINDUNGEN UND DEREN VERWENDUNG ZUR BEHANDLUNG VON INFEKTIÖSEN ER-  
KRANKUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****1 BEREICH DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen, die mit spezifischen Sequenzen in Proteinen reagieren. Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere eine Klasse von Verbindungen, die unter physiologischen Bedingungen mit Proteinen reagieren, die an Lysine angrenzen oder danebenliegen. Die Verbindungen der Erfindung können zur Kennzeichnung speziell dieser Proteine für Forschungszwecke und zur Störung ihrer Funktion für pharmakologische Zwecke verwendet werden. Die Verbindungen der Erfindung können auch zur Behandlung von Infektionskrankheiten wie HIV-Infektion und Malaria verwendet werden.

**2 HINTERGRUND DER ERFINDUNG****2.1 DIE DERIVATISIERUNG VON PROTEINEN**

[0002] Mit dem Stand der Technik vertraute Personen verstehen, dass viele Verbindungen mit spezifischen Aminosäurerückständen in Proteinen reagieren können, z.B. mit Sulfhydryl-, Amino-, Carboxyl-Komponenten. Diese Reagenzien sind insofern substratspezifisch als das jedes nur mit einer oder einigen wenigen spezifischen Aminosäuren reagiert, wenn sie in der Sequenz eines Proteins auftreten. Die Reaktivität solcher Reagenzien wird jedoch nicht von angrenzenden oder benachbarten Aminosäuren beeinflusst, die das Umfeld der reaktiven Komponenten bilden. Somit ist die Reaktivität solcher Verbindungen nicht kontext- oder nachbarschaftsspezifisch.

**2.2 KERNIMPORT**

[0003] Die Funktion eines intrazellulären Proteins ist gewöhnlich das Ergebnis der gesamten dreidimensionalen (tertiären) Struktur des Proteins. Der Kernimport wird jedoch durch die einfache Anwesenheit einer kurzen Sequenz, des so genannten Kernlokalisierungssignals (Nuclear Localisation Signal, NLS) bestimmt, welches relativ unabhängig von seiner Position im Verhältnis zum Rest der Objektstruktur, die importiert wird, funktioniert. In eukaryotischen Zellen werden alle Proteine im Cytoplasma produziert, welches sich außerhalb des Zellkerns befindet. Im Allgemeinen müssen Proteine von mehr als 40 kD, die spezifisch im Zellkern lokalisiert sind, über einen von der Zellteilung unabhängigen ATP-abhängigen Mechanismus durch die Kernmembran vom Cytoplasma aktiv in den Zellkern importiert werden. Bei den Proteinen und anderen Objekten, die importiert werden, befindet sich ein Kernlokalisierungssignal (NLS) im NH<sub>2</sub>-Endsegment des Proteins. Mehrere solcher Signalsequenzen sind bekannt:

- a. PKKKRKV vom großen T-Antigen des SV40, Kalderon, D., et al., 1984, Cell 39: 499-509;
- b. [AV]KRPAATKKAGQAKKKK[LD] von Nukleoplasmin, bei dem nur eine der beiden in Klammern angegebenen Sequenzen erforderlich ist, Dingwall, C., et al., 1988, J. Cell Biol. 107: 841-49;
- c. PRRRRSQS von Hepatitis B HbcAg- Yeh, C. T., 1990, J. Virol.
- d. KRSAEGGNPPKPLKKLR aus dem Retinoblastom-Genprodukt p110<sup>rb1</sup> – Zacksenhaus E., et al., 1993, Mol. Cell. Biol. 13: 4588
- e. KIRLPRGGKKKYKLLK aus dem Matrixprotein von HIV-1, Bukrinsky, M. I., et al., 1993, Nature 365: 666.

[0004] Andere Viren mit NLS-Sequenzen umfassen den Herpes simplex- und Masern-Virus. Die Erkennung einer NLS-Sequenz ist zum großen Teil unabhängig von der detaillierten Struktur des Objekts, die das Objekt und seinen Anhaftungsort umfasst. Goldfarb, D. S. et al., 1986, Nature 332: 641-44; Lanford, R. E., 1986, Cell 46: 575. Die reine Nebeneinanderstellung der Aminosäuren des NLS ist für die Funktion nicht ausreichend; so wird die NLS-Funktion z. B. nicht durch das Peptid mit der gleichen Sequenz von Aminosäuren in umgekehrter Reihenfolge wie die NLS-Sequenz übertragen. Adam, S. A., et al., 1989, Nature 337: 276-79.

[0005] Die primäre Struktur, d. h. die Linearsequenz des NLS enthält meist aufeinander folgende Lysine, die N<sup>+</sup>-Komponenten, die vermutlich nahe zueinander kommen, d. h. sie sind Nachbarn. Bestimmten funktionalen NLS-Peptiden fehlen jedoch die konsekutiven Lysine. Robbins, J. et al., 1991, Cell 64: 615-23. Vermutlich verursacht die sekundäre und tertiäre D-Struktur dieser so genannten „zweiteiligen“ NLS-Peptide die Bildung benachbarter N<sup>+</sup>-Komponenten, was für deren Aktivität wichtig sein kann.

[0006] Die zellulären Proteine oder Proteinkomplexe, welche Proteine mit NLS-Sequenzen erkennen und transportieren, sind vollkommen erforscht. Scheinbar gibt es Proteine auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran, welche das NLS erkennen, und nach dieser Erkennung wird dieser Komplex durch den Zellporenkomplex transportiert. Review: Stochaj, U., et al., Eur. J. Cell Biol. 59: 1-11; Hurt., E. C., 1993, FEBS Letters 325: 76-80; Pante, N., et al., 1993, J. Cell. Biol. 122: 977-84; Forbes, D. J., 1992, Ann. Rev. Cell Biol. 8: 495-527.

- [0007] Ein Rezeptor für die NLS-Sequenz wurde vor kurzem in einem *Xenopus*-System beschrieben. Görlich, D., 1994, *Cell* 79: 767. Es handelt sich um ein mit zuvor beschriebenen Proteinen von unbekannter Funktion gleichwertiges cytoplasmatisches 60-kDa-Protein., SRP1p der Hefe, Yano, R., et al., 1992, *Mol. Cell. Biol.* 12:5640 und Rch1 von Säugetieren, Cuomo C. A., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 6156.
- [0008] Zwei Inhibitoren des Kernlokalisierungsprozesses wurden beschrieben. Die Kernlokalisierung wurde durch Lectine inhibiert (z. B. Weizenkeim-Agglutinin (Wheat Germ Agglutinin, WGA)), das sich an die mit der Kernlokalisierung assoziierten O-verknüpften Glycoproteine bindet. Dabauvalle, M.-C., 1988, *Exp. Cell Res.* 174: 291–96; Sterne-Marr R., et al., 1992, *J. Cell Biol.* 116: 271. Der auch von der GTP-Hydrolyse abhängige Kernlokalisierungsprozess wird durch ein nicht-hydrolysierbares Analog von GTP blockiert, z. B. ( $\gamma$ -S)GTP, Melchior, F., 1993, *J. Cell Biol.* 123: 1649.
- [0009] Weder ( $\gamma$ -S)GTP noch WGA können jedoch als Pharmazeutika verwendet werden. Proteine wie WGA können nur mit beträchtlichen Schwierigkeiten in das Innere einer Zelle eingeführt (5) werden. Die gleiche Einschränkung gilt auch für Thiotriphosphate wie ( $\gamma$ -S)GTP. Außerdem sind GTPasen an einer Vielzahl von Zell- und intrazellulären Signalprozessen beteiligt, so dass der Gebrauch eines allgemeinen Inhibitors von GTPasen wahrscheinlich nicht akzeptable Nebenwirkungen haben würde.

## 2.3 DIE BEDEUTUNG DES ZELLIMPORTS BEI HIV-1-INFEKTIONEN

- [0010] Obwohl es sich bei HIV-1 um einen Retrovirus handelt, sind er und andere Lentiviren von Viren der Oncoretrovirus-Gruppe, die nicht mit fortschreitenden, tödlichen Infektionen assoziiert sind, zu unterscheiden. Zum Beispiel replizieren sich Lentiviren in nicht-wuchernden Zellen wie z. B. terminal differenzierte Makrophagen, Weinberg, J. B., 1991 *J. Exp. Med.* 172: 1477–82, was bei Onkoretroviren nicht der Fall ist. Humphries, E. H., & Temin, H. M., 1974, *J. Virol.* 14: 531–46. Zweitens können Lentiviren sich in nicht-integrierter, extrachromosomaler Form in ruhenden T-Zellen bewahren. Stevenson, M., et al., 1990, *EMBO J.* 9: 1551–60; Bukrinsky, M. I., et al., 1991, *Science* 254: 423; Zack, J. L. et al., 1992, *J. Virol.* 66: 1717–25. Es ist jedoch unklar, ob dieses Phänomen mit der Anwesenheit von latent infizierten peripheren Blutlymphozyten (PBL) bei mit HIV-1 infizierten Personen, bei denen das Virus in einer Provirus-Form vorhanden ist, zusammenhängt. Schnittman, S. M., 1989, *Science* 245: 305; Brinckmann, J. E., et al., 1991, *J. Virol.* 65: 2019; Chapel, A., et al., 1992 *J. Virol.* 66: 3966.
- [0011] Die produktive Infektion einer Zelle durch ein Retrovirus umfasst die Schritte der Penetration in die Zelle, Synthese eines DNA-Genoms aus genetischem RNA-Material im Virion und Einführung des DNA-Genoms in ein Chromosom des Hosts und dadurch Bildung eines Provirus. Sowohl Lenti- als auch Onkoretroviren erhalten während der Mitose, bei der sich die Kernmembran auflöst, Zugang zum Zellkern des Hosts. Die Lentiviren sind jedoch auch fähig die Kernmembran zu durchqueren, da Virenproteine mit Kernlokalisierungsfrequenzen mit dem viralen Nukleoproteinkomplex assoziiert sind.
- [0012] Die produktive Infektion terminal differenzierter Makrophagen im Zentralnervensystem wird für die mit AIDS assoziierte Demenz verantwortlich gemacht. Keonig, S., et al., 1986, *Science* 233: 1089; Wiley, C. A., et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 7089–93; Price, R. W., et al., 1988, *Science* 239: 586–92. Die Infektion terminal differenzierter Makrophagen im Lymphsystem erzeugt bekanntermaßen eine anomale Cytokinproduktion. Guilian, D., et al., 1990 *Science* 250: 1593; Fauci, A. S., et al., 1991, *Ann. Int. Med.* 114: 678. Somit ist die mit HIV-1 assoziierte Auszehrung wahrscheinlich ein pathologischer, vom Verlust von CD<sub>4</sub>-T-Zellen unabhängiger Prozess. Die Pathobiologie der Auszehrung steht vielmehr in engem Zusammenhang mit der Pathobiologie der Kachexie bei chronisch entzündlichen und malignen Erkrankungen. Weiss, R. A., 1993, *Science* 260: 1273. Aus diesen Gründen stellt die Inhibition der HIV-1-Infektion der Makrophagen und anderer nichtgeteilter Zellen bekanntermaßen eine sehr wünschenswerte Modalität bei der Behandlung der HIV-1-Infektion dar, insbesondere bei Patienten, deren klinischer Zustand von Demenz oder Kachexie dominiert ist.
- [0013] Makrophagen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Übertragung von HIV. In den Anfangsstadien der Infektion könnten Makrophagen und von Makrophagen abstammende Zellen (z. B. dendritische Zellen) das primäre Reservoir von HIV-1 im Körper sein und die Infektion von T-Zellen durch Antigenpräsentationsaktivitäten, Pantaleo, G., et al., 1993, *Nature* 362: 355–358, sowie durch die Freisetzung des freien Virus unterstützen. Die direkte Übertragung des Virus von Zelle zu Zelle kann die Hauptmethode darstellen, mit der sich Infektion nach der Auflösung der anfängliche Virämie in den frühen Krankheitsstadien ausbreitet.
- [0014] Es ist in dieser Hinsicht erwähnenswert, dass makrophagen-trophe HIV-1-Stämme in den Anfangsstadien der Infektion vorherrschen. Somit scheint die Infektion von Makrophagen während der Entwicklung eines chronischen Infektionszustands des Hosts bei einer frisch infizierten Person besonders wichtig zu sein. Zweitens sind Makrophagen der HIV-empfindliche Zelltyp, der während des Geschlechtsverkehrs am leichtesten von einer HIV-infizierten Person in den Kreislauf einer nicht infizierten Person übertragen werden kann.
- [0015] Zum Schluss wurde die Infektion von ruhenden T-Zellen *in vitro* nachgewiesen, Stevenson, M., et al., 1990, *EMBO J.* 9: 1551–1560; Zack, J. A., 1990, *Cell* 61: 213–222, und sie stellt wahrscheinlich einen wichtigen Pfad für die Ausbreitung der Infektion *in vivo* in verschiedenen Krankheitsstadien dar. Bukrinsky, M. I., et al.,

1991, Science 254: 423–427. Obwohl HIV-1 zwar keine produktive Replikation in ruhenden T-Zellen bewirkt, kann die extrachromosomale retrovirale DNA für einen erheblichen Zeitraum im Cytoplasma solcher Zellen verharren und nach Aktivierung der Host-Zelle eine Replikation initiieren. Stevenson, M., et al., 1990, EMBO J. 9: 1551–1560; Spina, C. A., et al., J. Exp. Med. 179: 115–123; Miller, M. D., et al., 1994, J. Exp. Med. 179: 101–113. Aus einem jüngsten Bericht geht hervor, dass die Dauer des Verharrens des Virus in ruhenden T-Zellen von der Anwesenheit eines funktionierenden NLS abhängt. von Schwedler, U., et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 6992–6996. Deshalb erkennen Ärzte, wie wünschenswert es ist, die Infektion von Makrophagen mit HIV zu verhindern und sie verstehen, dass ein pharmakologisches Mittel zur Verhütung der HIV-Infektion dieser Zellen wesentliche Vorteile bringen würde.

[0016] Der Mechanismus mit dem HIV-Viren, jedoch nicht Onkoretroviren, nichtgeteilte Zellen infizieren, ist heute in groben Zügen bekannt. Es steht fest, dass die Funktion des Präintegrationskomplexes des Retrovirus in dieser Beziehung nicht von den Zellmechanismen der Mitose oder DNA-Replikation an sich abhängig ist. Der Integrationskomplex muss vielmehr nur Zugang zum Zellkern erhalten, Brown, P. O., et al., 1987, Cell 49: 347. Onkoretroviren erhalten durch die Auflösung der Zellmembran während der Mitose Zugang zum Zellkern. Im Gegensatz dazu enthalten Lentiviren zwei ausgeprägte Proteine, die bei Fehlen der Zellteilung den Zugang zum Zellkern über den Zellporenkomplex vermitteln. Beim ersten dieser Proteine, dem Matrixprotein (MA oder p17), ist die Kernimportierungsaktivität eindeutig auf das Vorhandensein einer Trilysyl-enthaltenden NLS-Sequenz zurückzuführen. Bukrinsky, M. I., et al., 1993, Nature 365: 666; von Schwedler, U., et al., 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 6992. Ein zweites Protein, das die Funktion des Kerneintritts unterstützt, das so genannte VPr-Protein, enthält keine identifizierbare NLS-Konsensussequenz. Emerman, M., et al., 1994, Nature 369: 108; Heinzinger, N. K., et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 7311. Das VPr-Protein bildet vielmehr einen Komplex mit einem zellulären Protein, das eine solche NLS-Sequenz besitzt.

[0017] Die Bedeutung der NLS-Sequenz für den Import von HIV-1 in den Kern nichtgeteilter Zellen wurde in Experimenten gezeigt, bei denen das Vorhandensein einer hohen Konzentration (0,1 M) des Peptids mit der Sequenz des SV40 T-Antigen NLS im Medium den Import von HIV-1 in den Kern von aphidicolin-inhibierten CD4+ M74-Zellen blockierte. Gulizia, J., et al., 1994, J. Virol. 68: 2021–25.

## 2.4 INFektionsKRANKHEITEN UND DEREN BEHANDLUNG

[0018] Bei der Behandlung von Infektionskrankheiten mit Chemikalien wird der Infektionserreger, der frei-lebende und parasitische Organismen umfassen kann, abgetötet oder im Wachstum arretiert. Parasitische Erkrankungen sind in der Tierwelt weit verbreitet, wo ein parasitischer Organismus auf Kosten eines Host-Organismus lebt und Schäden verursacht oder seinen Host tötet. Menschen, Haustiere und Vieh sind ebenfalls Hosts für eine Vielzahl von Parasiten. Parasiten umfassen keine einzelne taxonomische Gruppe, sondern sind u. a. in den Protozoen und Metazoen zu finden. Parasitische Infektionskrankheiten ähneln in vielerlei Hinsicht infektiösen Erkrankungen, die durch mikrobiologische Elemente wie Fungi, Bakterien und Viren verursacht wurden.

[0019] Malaria ist weiterhin eines der größten Gesundheitsprobleme in den Tropen. Jedes Jahr werden schätzungsweise 300 Millionen Menschen mit Malaria infiziert (World Health Organization, 1990, Malaria, S. 15–27). In Tropical Diseases, Progress in Research 1989–1990, Genf). Malaria wird in endemischen Gebieten durch die Anophelesmücke und in nichtendemischen Gebieten oft durch Bluttransfusionen verbreitet.

[0020] Beim Menschen wird Malaria durch mindestens vier Protozoen-Spezies von Plasmodium verursacht: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*. Der ungeschlechtliche erythrozytische Parasit, Merozoit, ist das Stadium im Lebenszyklus, der die Malariakrankheit mit einem charakteristischen Muster von Fieber, Schüttelfrost und Schweißausbrüchen verursacht. Anämie, akutes Nierenversagen und Bewusstseinsstörungen sind oft mit einer Malariainfektion assoziiert. *P. falciparum* kann rasch eine große Anzahl von Parasiten im Blut produzieren und verursacht die höchste Morbidität und Mortalität.

[0021] Die wichtigste Behandlungsmethode für Malaria ist bis jetzt Chemotherapie mit einer Reihe von natürlichen und synthetischen Medikamenten Antifolate wie z. B. Pyrimethamin inhibieren die Dihydrofolat-Reduktase, und Aminoquinoline wie Chloroquin (4-Aminoquinolin) wirken hauptsächlich auf die Verdauungsvakuolen. Vor der Einführung von Chloroquin in den 40er Jahren war Chinin das einzige wirksame Behandlungsmittel für Malaria. Chloroquin wird gewöhnlich zur Behandlung akuter Infektionen mit allen vier Spezies verwendet, hat jedoch keine Wirkung auf Rückfälle von Infektionen durch *P. vivax* oder *P. ovale*. Chloroquin (500 mg wöchentlich) kann auch zur Verhütung von Malaria verwendet werden, indem die Stadien der Multiplikation in den Erythrozyten, die die Symptome verursachen, unterdrückt werden.

[0022] Der Einsatz dieser Medikamente wird in bestimmten Gebieten und in der Zukunft jedoch stark durch das Auftreten medikamentenresistenter Parasiten beeinträchtigt. Chloroquin-Resistenz ist weit verbreitet und wird sich weiterhin auf neue Gebiete ausdehnen. Wegen der Möglichkeit einer Resistenz wird das Vorhandensein von Parasiten im Blut (d. h. Parasitämie) während der Behandlung sorgfältig überwacht, und falls indiziert werden alternative Medikamente eingeführt. Die Entscheidung über die medikamentöse Behandlung ist

vom Ursprung der Infektion abhängig. Zur Behandlung von Chloroquin-resistentem *P. falciparum* wird eine Kombinationstherapie, wie z. B. Chinin und Fansidar (Pyrimethamin und Sulfadoxin) eingesetzt. Auf Grund des Vorhandenseins von multimedikamentenresistentem *P. falciparum* in vielen Teilen der Welt ist die Verhütung von Malaria durch Chemoprophylaxe mit den derzeit zur Verfügung stehenden Medikamenten nicht immer wirksam.

[0023] In den letzten 20 Jahren wurden nur einige Medikamente zur Behandlung von *P. falciparum* entwickelt, wie Mefloquin-, Halofantrin- und Artemisinin-Derivate. (Kosten et al., 1995, Drug Saf. 12: 264–73). Angesichts der anhaltenden Ausbreitung des multimedikamentenresistenten *P. falciparum* liegt die Notwendigkeit neuer wirksamer Chemotherapeutika für den Einsatz zur Bekämpfung von Malaria auf der Hand.

[0024] US-Patent 4.051.256 bezieht sich auf N,N-R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>-disubstituierte Guanidine als Anti-Rhinovirusmittel.

[0025] US-Patent 3.908.013 bezieht sich auf pharmazeutische Zusammensetzungen mit vasokonstriktiver Aktivität, die N-(3-Acetylphenyl)guanidin umfassen.

[0026] FR-A-2 113 916 bezieht sich auf pharmazeutische Zusammensetzungen mit vasokonstriktiver Aktivität, die N-(4-Acetylphenyl)guanidin umfassen.

[0027] Chemical Abstracts, Vol. 100, Nr. 10 1984; Abstract Nr. 68812E, Yuki, Y. et al., Kobunshi Ronbunshu, Vol. 40, Nr. 12, 1983, JP, Seite 777–783 und XP002061167 beziehen sich auf polymerisierbare Isopropenyl-S-Triazine.

[0028] WO 95/19767 offenbart N-(3,5-Diacetylphenyl)guanidin und N-(3,5-Diacetylphenyl)biguanidin als Synthesenzwischenprodukte.

### 3 ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0029] Die Erfindung betrifft eine Klasse von Acryl-Alkyl-Carbonyl-Verbindungen wie in Anspruch 1 und den davon abhängigen Ansprüchen definiert, insbesondere divalente Aryl-Carbonyl-Komponenten, die über die Arene mit einer stickstoffhaltigen heterozyklischen Funktionalität N-glykosidisch verknüpft sind, z. B. eine Acetyl- oder Propanoyl-substituierte Anilin-Komponente, die N-glykosidisch mit einer Pyrimidin- oder Triazin-Komponente verknüpft ist. Die Erfindung umfasst weiterhin Methoden für den Einsatz der Verbindungen der Erfindung wie in den Ansprüchen 17 und 18 definiert zur Bildung von Tandem-Schiffbasen in Proteinen mit benachbarten N<sup>ε</sup>-Komponenten von Lysin-Rückständen. Wie hierin verwendet sind die benachbarten N<sup>ε</sup>-Komponenten zwei N<sup>ε</sup>-Komponenten eines Proteins, die sich einander so sehr nähern wie die Carbonyl- der Arylenbis(Methylcarbonyl)-Verbindungen der Erfindung, wenn sich das Protein in seiner naturierten Konformation befindet. Wie hierin verwendet sind „benachbart“, „angrenzend“ und „nebeneinander gestellt“ gleichwertige Ausdrücke in Bezug auf die N 4-Komponenten und beziehen sich auf die physikalischen Positionen der N<sup>ε</sup>-Komponenten in der Struktur des nativen Proteins und nicht auf die Positionen der Lysine in der linearen Sequenz.

[0030] Die Erfindung umfasst weiterhin den Gebrauch der Verbindungen wie in Anspruch 19 und den davon abhängigen Ansprüchen definiert zur Präparation eines Medikaments zur Hemmung der produktiven Infektion durch HIV-1 von terminal differenzierten (nichtgeteilten Zellen), insbesondere Makrophagen, durch die Hemmung des Imports des cytoplasmatischen HIV-1-Komplexes in den Zellkern. Die Erfindung betrifft insbesondere die direkte Einführung durch die cytoplasmatische Membran einer Zelle von Verbindungen, die solch einen Import blockieren. Somit umfasst die Erfindung in einem Ausführungsbeispiel den Gebrauch der oben beschriebenen Verbindungen zur Verhütung einer produktiven Infektion von terminal differenzierten Makrophagen und ruhenden T-Zellen bei HIV-1-infizierten Patienten. Ohne Begrenzung hinsichtlich der Theorie herrscht der Glaube, dass die Erfindung die HIV-1-Replikation durch die Bildung von Tandem-Schiffbasen mit benachbarten N<sup>ε</sup>-Komponenten der viralen Proteine blockiert, was zur Folge hat, dass der virale Nukleoproteinkomplex nicht durch eine Interaktion mit dem Kernporen-Transportkomplex und/oder anderen zellulären Komponenten die Kernmembran durchquert.

[0031] Die Erfindung umfasst weiterhin den Gebrauch der Verbindungen der Erfindung zur Präparation eines Medikaments zur Behandlung oder Verhütung von Infektionskrankheiten wie derjenigen, die durch Parasiten verursacht werden, insbesondere Plasmodium-Spezies, die Malaria bewirken.

### 4 KURZBESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0032] **Abb. 1A–C.** Die Strukturen der Beispiolverbindungen Nr. 2, 11 und 13 sind in **Abb. 1A**, 1B bzw. 1C dargestellt.

[0033] **Abb. 2A–C.** Die Wirkung der verschiedenen Konzentrationen von Verbindung Nr. 2 auf die RT-Aktivität im Überstand von HIV-1-infizierten Monozyten. **Abb. 2A:** Multiplizität (Multiplicity of Infection, MOI) 1 ng p24/10<sup>6</sup> Monozyten, kultiviert in Gegenwart von M-CSF. **Abb. 2B:** MOI 8 ng p24/10<sup>6</sup> Monozyten, kultiviert in Abwesenheit von M-CSF. **Abb. 2C:** MOI 0,8 ng p24/10<sup>6</sup> Monozyten, kultiviert in Abwesenheit von M-CSF.

[0034] **Abb. 3.** Die Wirkung der verschiedenen Konzentrationen der Verbindung Nr. 2 auf die RT-Aktivität im

Überstand von HIV-1 infizierten mitogen-stimulierten peripheren Blutleukozyten infiziert mit 10 und 1,0 ng p24/10<sup>6</sup> Zellen, **Abb.** 3A bzw. 3B.

[0035] **Abb.** 4A–F. Die Strukturen der in Beispiel 7 verwendeten Verbindungen sind in **Abb.** 4A bzw. 4F dargestellt. **Abb.** 4A: 2-Amino-4-(3,5-Diacetylphenyl)Amino-1,6-Dimethylpyrimidiniumchlorid (CNI-0294). **Abb.** 4B: 2-Amino-4-(3,5-Diacetylphenyl)Amino-6-Methylpyrimidin (CNI-1194). **Abb.** 4C: 2-Amino-4-(3-Acetylphenyl)Amino-6-Methylpyrimidin (CNI-1594). **Abb.** 4D: 2-Amino-4-(4-Acetylphenyl)Amino-6-Methylpyrimidin (CNI-1794). **Abb.** 4E: 3,5-Diacetylanalin (CNI-1894). **Abb.** 4F: 4-Phenylamino-2-Amino-6-Methylpyrimidin (CNI-4594).

[0036] **Abb.** 5. Repräsentative Plasmakonzentrationen im Zeitablauf bei mit CNI-1194 behandelten Mäusen. Weibliche ND4 Swiss-Webster-Mäuse erhielten eine einzige 50-mg/kg-Injektion intraperitoneal (Kreise) oder oral (Vierecke). Die berechneten Plasmakonzentrationen, in µg/ml, wurden gegen die Probenentnahmezeit geplottet.

[0037] **Abb.** 6A–6B. Chromatogramme der Plasmaextrakte von mit CNI-0294 oder CNI-1594 behandelten Tieren.

[0038] Weibliche ND4 Swiss-Webster-Mäuse erhielten eine einzige intraperitoneale Dosis von 50 mg/kg CNI-0294 (A) oder 20 mg/kg CNI-1594 (B). Das für CNI-0294 dargestellte Chromatogramm wurde am 2-Stunden-Zeitpunkt erfasst und das für CNI-1594 am 1-Stunden-Zeitpunkt. Die mit „2“ und „15“ bezeichneten Spitzen sind die Ursprungsspitzen für CNI-0294 bzw. CNI-1594. Die anderen Spitzen im Chromatogramm repräsentieren potenzielle Metaboliten (mit „x“ gekennzeichnet) und endogene Plasmaspitzen.

[0039] **Abb.** 7A–7D. Der in vitro Metabolismus der CNI-Verbindungen. Die Medikamente wurden über verschiedene Zeiträume mit post-mitochondrialen Mäuseleber-Überständen und NADPH inkubiert. Die dargestellten Chromatogramme wurden am 60-Minuten-Zeitpunkt für (A) CNI-0294, (B) CNI-1194, (C) CNI-1594 und (D) CNI-1894 erfasst. Die mit „2, 11, 15, 18“ bezeichneten Spitzen beziehen sich auf die Ursprungsverbindungsspitzen, und die mit „a–n“ bezeichneten Spitzen beziehen sich auf putative Metabolitspitzen, die im Zeitverlauf zunahmten und in Kontrollinkubationen nicht vorhanden waren. Alle Spitzen außerhalb der Skala waren einzelne Spitzen, und die Skala wurde gewählt, um die Präsentation von Spurenmetabolitspitzen zu ermöglichen.

[0040] **Abb.** 8A–8D. Der in vivo Metabolismus der CNI-Verbindungen. Weibliche ND4 Swiss-Webster-Mäuse erhielten eine einzige intraperitoneale Dosis von (A) 50 mg/kg CNI-0294, (B) 50 mg/kg CNI-1994, (C) 20 mg/kg CNI-1594 oder (D) 50 mg/kg CNI-1894. In allen vier Graphen repräsentiert der offene Balken den Spitzenbereich der Ursprungsverbindung und die schwarzen Balken repräsentieren die ersichtlichen Metabolitspitzen. Folgende Metabolitspitzen sind dargestellt (von links nach rechts in jedem Graph): (a) Spitze „d“ (die Buchstabenkennzeichnung der Spitzen ist in **Abb.** 7 zu finden), Spitze „a“, Spitze „c“ und eine nach 13 Minuten eluierende Spitze; (b) Spitze „h“, Spitze „e“, Spitze „f“, Spitze „g“, eine nach 14 Minuten eluierende Spitze und eine nach 23 Minuten eluierende Spitze; (c) Spitze „j“, Spitze „i“, Spitze „1“ und eine nach 14 Minuten eluierende Spitze; (d) Spitze „m“, Spitze „n“ und eine nach 11 Minuten eluierende Spitze. Die Spitzenbereichseinheiten sind arbiträr und vom HPLC-Betriebssystem berechnet.

[0041] **Abb.** 9. Die Aktivität von CNI-0294 gegen mit dem Erreger Plasmodium berghei infizierte Mäuse. Weibliche ND4 Swiss-Webster-Mäuse wurden mit infizierten Erythrozyten infiziert und dann einmal täglich für 4 Tage mit 50 mg/kg CNI-0294 oder destilliertem Wasser behandelt. Sechs Stunden nach der letzten Dosis wurden von jedem der Tiere dünne Blutabstriche gemacht und die Parasitämie bestimmt. Die Balken repräsentieren die mittlere Parasitämie (n = 4 für Kontrollen und n = 5 für behandelte Tiere).

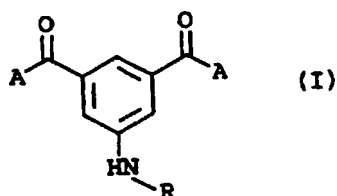
## 5 DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

### 5.1 DIE VERBINDUNGEN UND METHODEN IHRER SYNTHESE

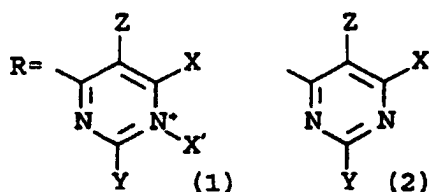
[0042] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können durch Reaktion von Anilin – zur Bildung einer Verbindung von Formel II, nachfolgend beschrieben, worin P = 1 – oder von Diacetyl- oder Dipropanoyl-Anilinderivat – zur Bildung einer Verbindung der Formel I oder Formel II, wobei P = 2 – mit einem Chlorderivat von Purin, Aminomethylpyrimidine, Diamino-Triazin oder mit einem Cyanoguanidin synthetisiert werden. Die Reaktion kann bei 90–100°C in einer wässrigen Lösung unter Verwendung einer Mineralsäure durchgeführt werden und ergibt das entsprechende Aminophenylpyridin oder -triazin. Das Pyrimidinium kann durch Reaktion mit einem überschüssigen Methyljodid bei 40–45°C unter Reflexbedingungen in 1 : 1 Acetonitril/Tetrahydrofuran oder in einer 1 : 1 : 2 Mischung von Dichloromethan/Acetonitril/Tetrahydrofuran synthetisiert werden.

[0043] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel sind die Verbindungen der Erfindung Bisketonarylenverbindungen mit einem dritten stickstoffhaltigen Substituent. Das stickstoffhaltige Substituent kann mit einer aromatischen stickstoffhaltigen heterozyklischen Verbindung weiter substituiert werden.

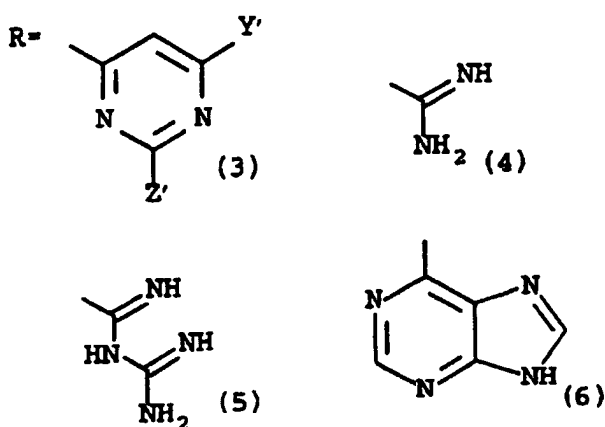
[0044] Genauer gesagt werden die Verbindungen der Erfindung mit Formel (I) gebildet:



worin A = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> und



worin X = NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; X = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; Y = NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und Z = H, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> oder



worin Y und Z, unabhängig, = H, NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> oder N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> oder deren Salze.

## 5.2 DIE INHIBITION DES HIV-1-IMPORTS IN DEN KERN NICHTGETEILTER ZELLEN

[0045] Eine quantitative Messung der Aktivität der Verbindungen der Erfindung zur Blockierung der Replikation von HIV-1 in nichtgeteilten Zellen lässt sich durch eine Kultur eines makrophagen-trophen HIV-1-Stamms auf peripheren, blutabgeleiteten Makrophagen durchführen. Die Zellen werden 5–6 Tage vor der Infektion in einem Medium kulturiert, das aus DMEM mit Zusatz von 10% Humanserum Typ AB-Zusatz und 200 U/ml Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor, bestand, wobei die Hälfte des Mediums nach 3 Tage ausgewechselt wurde, um eine Dichte von ca. 10<sup>6</sup> Zellen pro 5 ml Lösung zu erhalten. Auf diesen Zellen kann ein makrophagen-tropher Virenstock gezüchtet werden. Die Konzentration der infektiösen Partikel dieses Virenstocks wird durch Messung der p24-Antigen-Konzentration geschätzt.

[0046] Um die Wirkung der Verbindungen der Erfindung auf die HIV-1-Infektion in dem oben beschriebenen Kultursystem zu testen, wird das Medium entfernt und durch ein Medium ersetzt, das HIV-1 in einer Konzentration von 1 ng von p24 (10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (TCID = tissue culture infectious dose [Infektionsdosis für eine Gewebeskultur]) und eine bekannte Konzentration der Verbindung der Erfindung (den Inhibitor) enthält. Nach 24 Stunden werden die Kulturen gewaschen, um den nicht-adhären Virus zu entfernen, und danach wird der Kultur wieder Medium mit dem Inhibitor in der gewünschten Konzentration zugesetzt. Die Replikationsmenge des HIV-1 wird mit Hilfe eines Assays der reversen Transkriptase-Aktivität oder durch ein Assay der Konzentration des p24-Antigens im Kulturmedium alle 2–3 Tage während des Postinfektionszeitraums geschätzt. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel wird die Anti-HIV-Potenz des Medikamentenanwärters durch einen Vergleich der Konzentration der reversen Transkriptase (RT) oder des p24-Antigens im Medium der behandelten und Kontrollkulturen zum Zeitpunkt des Spitzenwerts in nicht-behandelten Kontrollkulturen, d. h. 5 bis 6 Tage nach der Infektion, gemessen. Wiederholungen mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors ermöglichen die Berechnung der Konzentration des Inhibitors, mit dem eine Inhibition des viralen Wachstums von 50%, IC<sub>50</sub>, erreicht wird. In Tabelle I ist die IC<sub>50</sub> der verschiedenen Inhibitoren angegeben.

Tabelle I

Verbindung	IC <sub>50</sub>
2-Amino-4-(3,5-Diacetylphenyl)amino-1,6-Dimethylpyrimidinium-Iodid (Verbindung Nr. 2)	1 nM
2-Amino-4-(3-Acetylphenyl)amino-1,6-Dimethylpyrimidinium-Iodid (Verbindung Nr. 14)	10 nM

Tabelle I (Fortsetzung)

Verbindung	IC <sub>50</sub>
2-Amino-4-(3,5-Diacetylphenyl)amino-6-Methylpyrimidin (Verbindung Nr. 11)	50 nM
4-(3-Acetylphenyl)amino-2-Amino-6-Dimethylpyrimidin (Verbindung Nr. 15)	15 nM

[0047] Alternativ können die Verbindungen alle hinsichtlich der Inhibition der HIV-Replikation mit einer fixierten Konzentration verglichen werden. In Tabelle II sind die Verbindungen präsentiert, die mit einer Konzentration von 100 nM zur Inhibition der Produktion von HIV-1 in kulturierten Monozyten, die 10 Tage vor dem Assay mit HIV-1 infiziert wurden (10 ng von p24/10<sup>6</sup> Zellen), verwendet wurden. Die HIV-1-Produktion in jeder behandelten Kultur ist als Prozentsatz der unbehandelten Kontrolle berichtet.

Tabelle II

Verbindung	Virenproduktion
N-(3,5-Diacetylphenyl)biguanid-Hydrochlorid (Verbindung Nr. 12)	12 %
2-(3,5-Diacetylphenyl)amino-4,6-Diamino-1,3,5-Triazin (Verbindung Nr. 13)	14 %
4-(3-Acetylphenyl)amino-2-Amino-6-Methylpyrimidin (Verbindung Nr. 17)	20 %
3,5-Diacetylanilin	20 %
N,N-Dimethyl-3,5-Diacetylanilin	25 %
2,6-Diacetylanilin	28 %
3,5-Diacetylpyridin	58 %

[0048] In **Abb. 2A** sind weitere Ergebnisse zur Verwendung der aktivsten Verbindung aus Tabelle I, Verbindung Nr. 2, zur Blockierung der Replikation von HIV-1 in gereinigten Monozyten, die in mit Monozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (M-CSF) angereichertem Medium kultiviert wurden, präsentiert. Die Kulturen wurden mit keiner oder zwischen 10<sup>-12</sup> und 10<sup>-6</sup> M der Verbindung Nr. 2 behandelt und die Zellen wurden gleichzeitig mit dem Behandlungsbeginn für 2 Stunden dem monozyten-trophen Stamm HIV-1<sub>ADA</sub> bei ca. 0,01 TCID<sub>50</sub>/Zelle (1 ng p24/10<sup>6</sup> Zellen) ausgesetzt. Am Tag 3, 6, 10, 14 und 17 nach der Infektion wurden Proben entnommen und auf reverse Transkriptionsaktivität hin untersucht. Verbindung Nr. 2 weist keine reverse Transkriptase auf, Daten nicht dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die IC<sub>50</sub>-Konzentration unter diesen Bedingungen zwischen 0,1 und 1,0 nM liegt und dass eine Konzentration zwischen 0,1 µM und 1,0 µM die Replikation des Virus vollständig inhibiert.

[0049] In **Abb. 2B** und **2C** sind die Wirkungen verschiedener Konzentrationen der Verbindung Nr. 2 auf die Produktion von HIV-1 in Monozytenkulturen ohne M-CSF-Zusatz dargestellt. In diesen Studien lag die MOI, die durch die Konzentration des p24-Antigens bestimmt wurde, in **Abb. 2B** bei (8 ng/10<sup>6</sup> Zellen) und in **Abb. 2C** bei (0,8 ng/10<sup>6</sup> Zellen). Diese Experimente zeigten IC<sub>50</sub>-Werte von ca. 10 nM bzw. von weniger als 1,0 nM.

[0050] Die Inhibition der Replikation von HIV-1 ist nicht auf allgemeine cytotoxische Wirkungen der Verbindung zurückzuführen. Selbst so hohe Konzentrationen der Verbindung Nr. 2 wie 10 µM hatten keine toxischen

Wirkungen auf die Myozytenkulturen, was durch Laktatdehydrogenasefreisetzung und Trypan-Blau-Exklusion nachgewiesen wurde. Weitere Nachweise der Spezifität der Inhibition durch Verbindung Nr. 2 werden durch die in **Abb. 3A** und **3B** angegebenen Daten geliefert, worin mitogen-stimulierte periphere Blutleukozyten in Medium mit IL-2-Zusatz kulturiert und HIV-1<sub>ADA</sub> in p24-Konzentrationen von 10 bzw. 1 ng/10<sup>6</sup> ausgesetzt wurden. In diesem Experiment hatten bis zu 10 µM von Verbindung Nr. 2 nur marginale Auswirkungen auf die Virenproduktion bei der höheren MOI. Bei der niedrigeren MOI bewirkten 1 und 10 µM von Verbindung Nr. 2 eine ca. zweifache Reduktion des Virenausgangs.

[0051] Die Inhibition des HIV-1-Imports in den Kern nichtgeteilter Zellen lässt sich auch direkt messen. In einer geeigneten Methode zur direkten Bestimmung der Aktivität von Verbindungen der Erfindung wird eine für die HIV-1-Infektion empfindliche Zelllinie, z. B. MT-4-Zellen, die mit Aphidicolin im Wachstum arretiert und HIV-1 ausgesetzt wurden, verwendet. Zur Erkennung doppelsträngiger, geschlossener zirkulärer HIV-1-Genome, die nur nach dem Kernimport gebildet werden, wurde PCR-Amplifikation verwendet, indem Primer gewählt wurden, die die Verbindungsstelle der Genome überbrücken. Für mehr Details siehe Bukrinsky, M. I., et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 6580–84.

### 5.3 BEHANDLUNG VON HIV-INFEKTION

[0052] Die vorliegende Erfindung liefert den Gebrauch einer Verbindung mit Formel (I) zur Präparation eines Medikaments zur Behandlung von HIV-1-Infektion. In einem Ausführungsbeispiel ist die zu verabreichende Verbindung die Verbindung Nr. 2. Für die orale, intraperitoneale und intravenöse Verabreichung geeignete pharmazeutische Verbindungen können in der Praxis der Erfindung verwendet werden. Solche pharmazeutischen Verbindungen umfassen beispielsweise u. a. wässrige Lösungen der Chlorid-, Bicarbonat-, Phosphat- und Acetatsalze der Verbindung Nr. 2 und deren pH-gepufferte Mixturen. Das Chlorinsalz von Verbindung Nr. 2 wird hierin mit CNI-0294 bezeichnet. Verbindung Nr. 11 und Verbindung Nr. 15 sind ebenfalls bekannt als CNI-1194 bzw. CNI-1594.

[0053] Die effektive Dosis des Wirkstoffs lässt sich durch Methoden bestimmen, die mit den Techniken der medizinischen Chemie und Pharmakologie vertrauten Personen gut bekannt sind. Eine effektive Dosis ist die Dosis, mit der in der Plasmakonzentration des Patienten eine ausreichende Menge des Wirkstoffs erzielt wird, um die Replikation von HIV-1 in Monozytenkulturen wie im nachfolgenden Abschnitt 5.4 beschrieben zu inhibieren, die jedoch nicht zu cytopathischen Effekten in solchen Kulturen führt.

[0054] Die Tagesdosis und der Dosierplan für einen Patienten kann von mit der Technik vertrauten Personen mit Hilfe der in Tabelle III angegebenen pharmakokinetischen Konstanten festgelegt werden, um die Zielplasmakonzentrationen zu erhalten. Die Zielplasmakonzentration kann mit der Technik vertrauten Personen bekannten routinemäßigen pharmakologischen und klinischen Untersuchungsmethoden gewählt werden und auf einer Spanne von Konzentrationen basieren, die die für die jeweilige Verbindung berechneten IC<sub>50</sub> umfasst. So kann die Dosis zum Beispiel angepasst werden, um eine Spanne von Zielplasmakonzentrationen zu erhalten, die die IC<sub>50</sub> für die Verbindungen einschließen, wie in Tabelle I oben gezeigt.

Tabelle III

Pharmakokinetische Parameter der CNI-Verbindungen.							
	CNI-0294	CNI-0294	CNI-0294	CNI-1194	CNI-1194	CNI-1594	CNI-1894
Injektionsweg	i.p.	i.p.	oral	i.p.	oral	i.p.	i.p.
Dosis (mg/kg)	50	50	50	50	50	20	50
Vehikel	DP*	W*	DP	W	W	W	W
AUC (µ <sup>h</sup> /ml)	9,15	8,83	0,56	3,93	0,57	0,82	20,20
C <sub>max</sub> (µg/ml)	18,76	18,93	0,41	5,70	0,35	1,93	13,43
t <sub>max</sub> (min)	5	5	60	15	15	15	5
α (h <sup>-1</sup> )	1,12	1,74	--	1,83	--	2,14	1,19
β (h <sup>-1</sup> )	0,15	0,19	--	0,19	--	0,04	0,03
A (µg/ml)	14,00	16,07	--	5,22	--	1,10	14,93
B (µg/ml)	0,07	0,05	--	0,14	--	0,01	0,15
t <sub>1/2α</sub> (h)	0,62	0,40	--	0,38	--	0,32	0,58
t <sub>1/2β</sub> (h)	4,62	3,65	--	3,65	--	17,33	23,10
V <sub>D</sub> (L)	14,14	19,80	--	5,21	--	39,60	6,60
Cl <sub>tot</sub> (ml/min)	35,35	62,70	--	16,50	--	26,40	3,30
Bioverfügbarkeit	--	--	0,06	--	0,15	--	--

\*DP = DMSO/Erdnussöl, W = Wasser

[0055] So lassen sich zum Beispiel mit Hilfe der oben angegebenen pharmakokinetischen Konstanten, insbesondere der Clearance, die Tagesdosis und der Dosierplan berechnen, die für den Erhalt einer bestimmten Zielplasmakonzentration erforderlich sind. Die Ergebnisse solcher Berechnungen für Verbindung 2, 11 und 15 sind in Tabelle N angegeben. Die berechneten Dosen für die Verbindungen Nr. 2 und 15 liegen weit unter den toxischen Spiegeln, wie durch die LD<sub>50</sub> dieser Verbindungen gemessen wurde. Siehe nachfolgender Abschnitt 6.4.

Tabelle IV

Verbindung Nr.	M.W.	Zielserumkonz.	Clearance <sup>++</sup> (ml/min)	Dosis (mg/kg/Tag)
2*	334	10 nM	35,35	6,80
11	280	50 nM	16,50	13,3

<sup>++</sup>gemessen in einer Maus von 25 g

\*Chloridsalz (CNI-0294)

Tabelle IV (Fortsetzung)

Verbindung Nr.	M.W.	Zielserumkonz.	Clearance <sup>++</sup> (ml/min)	Dosis (mg/kg/Tag)
15	250	15 nM	26,40	5,70

<sup>++</sup>gemessen in einer Maus von 25 g

[0056] Unter Verwendung solcher Methoden kann eine Dosis zur Erlangung einer vorbestimmten Zielplasmakonzentration berechnet werden. Eine praktikable Zielplasmakonzentration für Verbindung Nr. 2 reicht von 0,5 nM bis 10 nM, für Verbindung Nr. 11 von (5) 25 nM bis 100 nM und für Verbindung Nr. 15 von 7,5 nM bis 50 nM.

[0057] Personen, die vom Gebrauch der Verbindungen der Erfindung profitieren können, umfassen alle mit HIV-1 infizierten Personen. Genauer gesagt gehören dazu erstens diejenigen, bei denen die Gefahr der Entwicklung von ZNS-Symptomen der HIV-1-Infektion besteht oder die solche bereits haben und/oder Personen, die unter einem signifikanten Gewichtsverlust leiden, und zweitens diejenigen, die erst vor kurzem HIV-1 ausgesetzt wurden und bei denen noch keine chronische Infektion eingetreten ist.

#### 5.4 PHARMAZEUTISCHE FORMELN

[0058] Auf Grund ihrer pharmakologischen Merkmale können die Verbindungen der vorliegenden Erfindung insbesondere als Mittel zur Behandlung von Patienten mit HIV eingesetzt werden und als Mittel zur Behandlung von Patienten, die unter anderen viralen Infektionen oder chronischen Krankheiten leiden, die von der Kernlokalisierung als Teil ihres pathogenen Prozesses abhängig sind. Die Verbindungen der Erfindung können auch zur Behandlung oder Verhütung von anderen Infektionskrankheiten eingesetzt werden, wie parasitische Krankheiten und insbesondere Malaria. Eine solche Verbindung kann dem Patienten entweder alleine oder in pharmazeutischen Zusammensetzungen verabreicht werden, in denen sie mit geeigneten Trägern bzw. Exzipienten gemischt werden.

[0059] Die Verwendung pharmazeutisch akzeptabler Träger zur Umsetzung der hierin offenbarten Verbindungen für die Praxis der (5) Erfindung in für die systemische Verabreichung geeigneten Dosierungen liegt innerhalb des Umfangs der Erfindung. Mit der angemessenen Wahl der Träger und geeigneten Herstellungspraktiken können die Verbindungen der vorliegenden Erfindung, insbesondere die als Lösungen formulierten, parenteral wie z. B. durch intravenöse Injektionen verabreicht werden. Die Verbindungen lassen sich leicht mit pharmazeutisch akzeptablen und nach dem Stand der Technik bekannten Trägern zu Dosierungen formulieren, die für die orale Verabreichung geeignet sind. Mit Hilfe solcher Träger lassen sich die Verbindungen dieser Erfindung zu Tabletten, Pillen, Kapseln, Flüssigkeiten, Gel, Sirup, Brei, Suspensionen und Ähnliches für die orale Einnahme durch den zu behandelnden Patienten verarbeiten.

[0060] Für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignete pharmazeutische Zusammensetzungen umfassen Zusammensetzungen, bei denen die Wirkstoffe in einer effektiven Menge zum Erreichen des vorgesehenen Zwecks enthalten sind. Die Bestimmung der effektiven Mengen liegt im Rahmen der Fähigkeiten mit der Technik vertrauter Personen, insbesondere angesichts der hierin enthaltenen detaillierten Offenbarung.

[0061] Neben den Wirkstoffen können diese pharmazeutischen Zusammensetzungen auch geeignete und pharmazeutisch akzeptable Träger enthalten, die Hilfsmittel umfassen, welche die Verarbeitung der aktiven

Verbindungen zu pharmazeutisch verwendbaren Präparaten erleichtern. Für die orale Verabreichung formulierte Präparate können die Form von Tabletten, Dragees, Kapseln oder Lösungen haben.

[0062] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können auf bekannte Arten hergestellt werden, z. B. durch herkömmliches Mischen, Auflösen, Granulieren, Dragee-Formen, Suspendieren, Emulgieren, Einkapseln, Umhüllen oder Lyophilisieren.

[0063] Pharmazeutische Zusammensetzungen für die parenterale Verabreichung umfassen wässrige Lösungen der aktiven Verbindungen in wasserlöslicher Form. Weiterhin können Suspensionen der aktiven Verbindungen wie für ölige Injektionssuspensionen angemessen hergestellt werden. Zu den geeigneten lipophilen Lösungsmitteln oder Trägern gehören fettige Öle wie Sesamöl, oder synthetische Fettsäureester wie Ethyloleat oder Triglyzeride oder Liposome. Wässrige Injektionssuspensionen können Substanzen enthalten, welche die Viskosität der Suspension erhöhen, wie z. B. Natriumcarboxymethylcellulose, Sorbitol oder Dextran. Wahlweise können die Suspensionen auch geeignete Stabilisatoren enthalten oder Substanzen, die die Löslichkeit der Verbindungen erhöhen, um die Präparation hochkonzentrierter Lösungen zu ermöglichen.

[0064] Pharmazeutische Präparate für den oralen Gebrauch lassen sich erreichen, indem die aktiven Verbindungen mit festen Trägern kombiniert und dann wahlweise zermahlen und die Körnchen dann nach Zugabe geeigneter Hilfsmittel, falls erwünscht, zu Tabletten oder Drageekernen verarbeitet werden. Geeignete Träger sind insbesondere Füllstoffe wie Zucker, einschließlich Laktose, Sukrose, Mannitol oder Sorbitol; Cellulosepräparate wie z. B. Maisstärke, Weizenstärke, Reisstärke, Kartoffelstärke, Gelatine, Tragantgummi, Methylzellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose und/oder Polyvinylpyrrolidon (PVP). Nach Wunsch können Zersetzungsmittel hinzugefügt werden, wie das querverbundene Polyvinylpyrrolidon, Agar oder Alginsäure oder deren Salze wie Natriumalginat.

[0065] Drageekerne werden mit geeigneten Umhüllungen versehen. Zu diesem Zweck können konzentrierte Zuckerlösungen verwendet werden, die wahlweise Gummiarabikum, Talkum, Polyvinylpyrrolidon, Carbopolgel, Polyethylenglycol und/oder Titandioxid, Lacklösungen und geeignete organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelmischungen enthalten können. Den Tabletten- oder Drageeumhüllungen können zur Identifikation oder zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Kombinationen der Wirkstoffdosen Färbemittel oder Pigmente hinzugefügt werden.

[0066] Pharmazeutische Präparate für den oralen Gebrauch umfassen zusammensteckbare Gelantinekapseln sowie weiche, versiegelte Gelantinekapseln und einen Weichmacher wie Glycerol oder Sorbitol. In den Steckkapseln können den Wirkstoffen Füllstoffe wie Laktose, Bindemitteln wie Stärken und/oder Gleitmitteln wie Talkum oder Magnesiumstearat und wahlweise Stabilisatoren beigemischt sein. In weichen Kapseln können die Wirkstoffe in geeigneten Flüssigkeiten wie fettige Ölen, flüssiges Paraffin oder flüssiges Polyethylenglykolen aufgelöst oder suspendiert sein. Es können auch Stabilisatoren hinzugefügt werden.

## 5.5 GEBRAUCH DER VERBINDUNGEN DER ERFINDUNG ZUR DERIVATISIERUNG VON PROTEINEN

[0067] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung nach Formel II, worin  $P = 1$  oder  $2$ , können zur Derivatisierung eines Zielproteins und dadurch zur Bestimmung des Vorhandenseins von benachbarten  $N^{\epsilon}$ -Komponenten verwendet werden. Die Testreaktion kann in einem wässrigen Puffer mit mild oder moderat alkalischem pH zwischen ca. 7,2 und 8,0 durchgeführt werden. Die spezifische Derivatisierung des Zielproteins kann mit jedem Mittel, das die proteingebundene und frei derivatisierende Verbindung trennt, erkannt werden. Die derivatisierende Verbindung kann wahlweise auch durch radioaktive Markierung erkannt werden. In einem Ausführungsbeispiel kann die Verbindung mit  $^{14}\text{C}$ -Methyliodid an Stelle von Methyliodid synthetisiert werden. Alternativ kann die starke UV-Absorption oder Fluoreszenz der derivatisierenden Verbindung genutzt werden. Verbindung Nr. 2 hat beispielsweise eine Absorptionsspitze von  $16.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei  $\lambda = 298 \text{ nm}$ . In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel wird das Zielprotein durch eine Verbindung der Erfindung derivatisiert, mit Natriumborhydrid oder Cyanborhydrid irreversibel reduziert und durch Trypsin oder Ähnliches in Peptide fragmentiert. Die resultierenden Peptide können mit den aus einer unreaktierten Probe des Proteins erhaltenen Peptiden durch eine Analyse verglichen werden, zu der eine Peptide aufreinigende chromatographische oder elektrophoretische Technik verwendet wird, z. B. Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC). Nachdem die Peptide durch ein Chromatographieverfahren mit hoher Auslösung aufgereinigt wurden, sind die derivatisierten Peptide anhand ihrer veränderten Elutionszeit und der Absorbanz bei  $\lambda = 298 \text{ nm}$  leicht nachzuweisen.

[0068] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel wird der Praktiker die Reaktion an verschiedenen pH-Punkten durchführen, um zu bestimmen, ob an einem Punkt innerhalb des erwarteten Bereichs ein positives Ergebnis erzielt werden kann. Als ein positives Ergebnis, d. h. ein Ergebnis, das das Vorhandensein von benachbarten  $N^{\epsilon}$ -Komponenten anzeigt, gilt ein Ergebnis, bei dem ein hoher Anteil jedes einer begrenzten Anzahl von Peptiden des Zielproteins, z. B. zwischen 1–4, derivatisiert wird und unerheblich Mengen anderer Peptide betroffen sind.

[0069] Die oben beschriebene Proteinderivatisierungstechnik kann verwendet werden, um zu bestimmen, ob

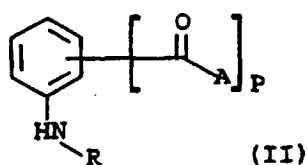
ein Verbindungsanwärter gemäß der Erfindung dazu verwendet werden kann, die produktive HIV-1-Infektion von Makrophagen zu verhindern. Es kann ein Vergleich der Aktivität eines Verbindungsanwärters mit der Aktivität von Verbindung Nr. 2 als Derivatisierungsmittel speziell für Kernlokalisierungssequenzen angestellt werden. Eine Verbindung, die die gleichen Peptide im gleichen Ausmaß derivatisiert wie Verbindung Nr. 2, kann zur Praktizierung der Erfindung verwendet werden.

## 5.6 DIE BEHANDLUNG VON INFEKTIONSKRANKHEITEN

[0070] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können zur Verhütung oder Behandlung von Infektionskrankheiten in Tieren, einschließlich Säugetieren und vorzugsweise Menschen verwendet werden, und diese Verbindungen eignen sich insbesondere für die Behandlung von parasitischen Krankheiten, besonders Malaria. Die hierin beschriebene Erfindung liefert den Gebrauch der Verbindungen der vorliegenden Erfindung zur Behandlung von Infektionen, einschließlich und ohne Einschränkung, Infektionen durch Parasiten und zur Verhütung von mit solchen Infektionen assoziierten Krankheiten. Die Verbindungen können bei Verabreichung an ein mit Parasiten infiziertes Tier die Parasitämie reduzieren.

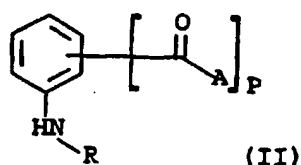
[0071] Zu den Infektionskrankheiten gehören ohne Einschränkung: Protozoen-Krankheiten wie die durch Kinetoplastida verursachten wie Trypanosoma und Leishmania, die durch Diplomonadina verursachten wie Giardia, die durch Trichomonadida verursachten wie Dientamoeba und Trichomonas, die durch Gymnamoebia verursachten wie Naegleria und die durch Amoebia verursachten wie Entamoeba und Acanthamoeba, die durch Sporozoasida verursachten wie Babesia, die durch Coccidiasina verursachten wie Isospora, Toxoplasma, Cryptosporidium, Eimeria, Thellera sowie Plasmodium; Metazoen-Krankheiten wie die durch den Nematoda (Ringwurm) verursachten wie Ascaris, Toxocara, die Hakenwürmer, Strongyloides, Peitschenwürmer, Madenwürmer, Draculus, Trichinella und die Fadenwürmer sowie durch die Platyhelminthes (Flachwürmer) verursachten wie Trematoda wie Schistosoma, die Blutegel, Leberegel, Darmegel und Lungenegel, und die Cestoda wie Bandwürmer; virale und Chlamydia-Krankheiten einschließlich z. B. solcher durch Poxviridae, Iridoviridae, Herpesviridae, Adenoviridae, Papovaviridae, Hepadnaviridae, Parvoviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Togaviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Retroviridae, Picornaviridae, Calciviridae und durch Chlamydia verursachte; bakterielle Krankheiten; mikrobakterielle Krankheiten; Spirochätenkrankheiten; Rickettsienkrankheiten und Pilzkrankheiten.

[0072] In einem Ausführungsbeispiel werden die Verbindungen der Erfindung mit anti-infektiöser Aktivität gemäß Formel (I) wie in Abschnitt 5.1 beschrieben gebildet. Weiterhin können die Verbindungen der Erfindung mit anti-infektiöser Aktivität auch gemäß Formel II gebildet werden:

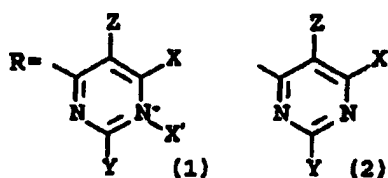


[0073] Amoebida wie Entamoeba und Acanthamoeba, durch Sporozoasida wie Babesia und der Coccidiasina wie Isospora, Toxoplasma, Cryptosporidium, Eimeria, Thellera und Plasmodium; Metazoen-Krankheiten wie die durch den Nematoda (Ringwurm) Verursachten wie Ascaris, Toxocara, die Hakenwürmer, Strongyloides, Peitschenwürmer, Madenwürmer, Draculus, Trichinella und die Fadenwürmer sowie durch die Platyhelminthes (Flachwürmer) verursachten wie Trematoda wie Schistosoma, die Blutegel, Leberegel, Darmegel und Lungenegel, und die Cestoda wie Bandwürmer; virale und Chlamydia-Krankheiten einschließlich z. B. solcher durch Poxviridae, Iridoviridae, Herpesviridae, Adenoviridae, Papovaviridae, Hepadnaviridae, Parvoviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Togaviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Retroviridae, Picornaviridae, Calciviridae und durch Chlamydia Verursachter; bakterielle Krankheiten; mikrobakterielle Krankheiten; Spirochätenkrankheiten; Rickettsienkrankheiten und Pilzkrankheiten.

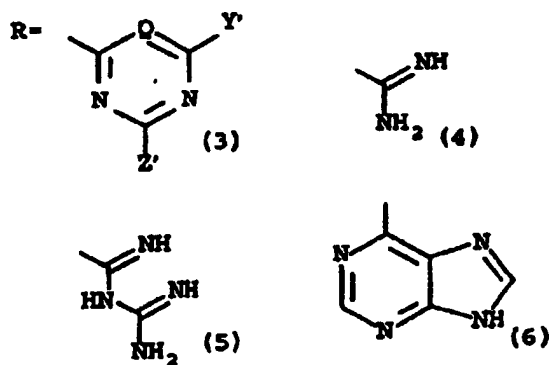
[0074] In einem Ausführungsbeispiel werden die Verbindungen der Erfindung mit anti-infektiöser Aktivität gemäß Formel (I) wie in Abschnitt 5.1 beschrieben gebildet. Weiterhin können die Verbindungen der Erfindung mit anti-infektiöser Aktivität auch gemäß Formel II gebildet werden:



wobei A, unabhängig, = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> und P = 1 oder 2 und



wobei X = NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; X = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; -Y = NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und Z = H, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> oder



wobei Y und Z, unabhängig, = H, NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> oder N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; Q ist N oder CH und deren Salze, mit der Maßgabe wie in Anspruch 1 definiert.

[0075] In einem weiteren Ausführungsbeispiel können die Verbindungen der Erfindung wie in Anspruch 19 und den davon abhängigen Ansprüchen definiert therapeutisch bei Infektionen mit Plasmodium-Spezies wie *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* eingesetzt werden, die im Menschen akute und rekurrende Malaria verursachen. Die Verbindungen der Erfindung sind auch aktiv gegen Infektionen durch andere Plasmodium-Spezies, einschließlich *P. berghei*, *P. knowlesi*, *P. simium*, *P. cynomolgi bastianelli* und *P. brasilianum*.

[0076] In noch einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung können die Verbindungen nützlich sein für die Chemoprophylaxe für Personen mit Infektionsrisiko, z. B. bei Reisen in endemische Gebiete. Durch die Aufrechterhaltung einer wirksamen Konzentration einer Verbindung der Erfindung im Kreislauf kann Malaria verhindert werden, indem die pathologischen Stadien der Infektion mit Plasmodium-Spezies unterdrückt werden. Ohne durch eine Theorie gebunden zu sein können die Verbindungen der Erfindung effektiv gegen 5 verschiedene Stadien des Lebenszyklus der Parasiten sein, einschließlich Sporozoiten und Merozoiten, sowie gegen ruhende, ungeschlechtliche und geschlechtliche Stadien. Die Verbindungen der Erfindung können im Blutstrom, in den Erythrozyten, in der Leber und in anderem Gewebe, wo der Malaria-Parasit residieren könnte, aktiv sein.

[0077] In einem spezifischen Ausführungsbeispiel der Erfindung kann die Verbindung der Erfindung zur Vorbeugung oder Behandlung von Malaria oder zur Behandlung von Infektionen mit anderen Plasmodium-Spezies, die gegen Antimalariamittel wie u. a. Chloroquin und Pyrimethamin resistent sind, eingesetzt werden. Die Antimalaria-Merkmale der Verbindungen sind bei *P. falciparum*, das bekanntermaßen resistent ist gegenüber Chloroquin oder Pyrimethamin, nicht vermindert (siehe Abschnitt 8 *infra*). Ohne an eine Theorie des Mechanismus der Verbindungen gebunden sein zu wollen, wird in Erwägung gezogen, dass die Verbindungen mit den biochemischen Zielen interagieren, die verschieden und unabhängig sind von denen, auf die diese beiden klassischen Antimalariamittel wirken. Somit können die Verbindungen der Erfindung bevorzugt zur Behandlung von Malaria-Infektionen eingesetzt werden, die aus Gebieten stammen, in denen bekannter- oder vermutetermaßen medikamentenresistente Plasmodium-Spezies residieren.

[0078] In einem weiteren Ausführungsbeispiel können die Verbindungen eine einzige Acyl-Gruppe auf dem Arylen-Ring enthalten, d. h. P = 1, und/oder der heterozyklische Substituent, d. h. R, kann ungeladen sein. Im Ausführungsbeispiel der Erfindung, worin es auf dem Arylen-Ring zwei Acyl-Gruppen gibt, d. h. P = 2, wird es vorgezogen, dass solche Acyl-Gruppen sich nicht in einer Ortho-Anordnung zueinander befinden. In einem weiteren bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung sind die Verbindungen, die potenzielle Antimalaria-Aktivität besitzen, Arylenbis(methylketon)-Verbindungen, die einen geladenen heterozyklischen Ring enthalten wie Pyrimidinium, wie in CM-0294 (siehe **Abb. 4A**).

[0079] Die Antimalaria-Eigenschaften der Verbindungen der Erfindung können mit nach dem Stand der Technik gut bekannten Techniken, Assays und experimentellen Tiermodellen analysiert werden. So lässt sich z. B. die Inhibition des Wachstums von *Plasmodium falciparum* durch die Verbindungen in (5) *vitro* durch die Hypoxanthinaufnahmemethode beurteilen (Desjardins et al., 1979, *Anti-microb. Ag. Chemother.* 16: 710–718). Die *in vitro* antiparasitischen Aktivitäten mehrerer Beispielsverbindungen der Erfindung wurde mit dieser Methode beurteilt, und die Ergebnisse sind in Abschnitt 8 beschrieben. Die *in vivo* Wirksamkeit der Verbindungen kann

auch in Mausmodellen getestet werden, in denen die Parasitämie nach der Verabreichung der Verbindung enumeriert ist (Ager, A. L., 1984, Rodent malaria models, S. 225–264). Im Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 68, Antimalarial Drugs, Peters and Richards eds. Springer-Verlag, Berlin). Die in vivo Aktivität mehrerer Beispielsverbindungen wurde in einem 4-tägigen Unterdrückungsmodell in Mäusen beurteilt und die Ergebnisse sind in Abschnitt 8 angegeben. [0069] Die vorliegende Erfindung liefert auch pharmazeutische Zusammensetzungen. Diese pharmazeutischen Zusammensetzungen umfassen eine prophylaktisch oder therapeutisch wirksame Menge der Verbindung wie in Anspruch 8 und den davon abhängigen Ansprüchen definiert, sowie einen pharmazeutischen Träger, wie die in Abschnitt 5.4 beschriebenen. Eine wirksame Menge bedeutet, genauer gesagt, die Menge, die zur Verhütung der Entwicklung oder zur Linderung der vorhandenen Symptome der zu behandelnden Person wirksam ist. Die Bestimmung der effektiven Mengen liegt im Rahmen der Fähigkeiten mit der Technik vertrauter Personen, insbesondere angesichts der hierin enthaltenen detaillierten Offenbarung. Für jede in der Methode der Erfindung verwendete Verbindung kann die effektive Dosis anfänglich durch ein in vitro Assay bestimmt werden. Eine Dosis kann in Tiermodellen formuliert werden, um den Zirkulationsbereich zu erhalten, der die  $IC_{50}$  (d. h. die Konzentration der Verbindung, mit der eine halb-maximale Wachstumsinhibition des Parasiten erreicht wird) umfasst wie im in vitro Assay bestimmt. Solche Informationen können zur genaueren Bestimmung nützlicherer Dosen in Versuchsobjekten, z. B. Menschen, verwendet werden. Die Dosierung kann innerhalb dieses Bereichs je nach der verwendeten Dosierungsform und der Verabreichungsmethode schwanken. Verschiedene Verabreichungssysteme sind bekannt und können zur Verabreichung der Verbindung verwendet werden, z. B. Einkapselung in Liposome. Andere Verabreichungsmethoden umfassen u.a. interdermale, intramuskuläre, intraperitoneale, intravenöse, subkutane, intranasale und orale Wege.

[0080] In einem anderen Ausführungsbeispiel liefert die Erfindung den Gebrauch der Verbindung wie in Anspruch 19 und den davon abhängigen Ansprüchen definiert zur Präparation eines Medikaments zur Verhütung oder Behandlung von Malaria. Die Erfindung liefert auch den Gebrauch einer Verbindung der Erfindung und ein Antimalariamittel bei der Herstellung eines Medikaments zur Verhütung oder Behandlung von Malaria. Solche Antimalariamittel können u.a. Chinin, Aminoquinoline (Chloroquin und Primaquin), Pyrimethamin, Mefloquin, Halofantrin und Artemisinin umfassen.

[0081] Die „Zusatzverabreichung“ einer Verbindung der Erfindung und eines Antimalariamittels bedeutet, dass die beiden entweder als Mixtur oder nacheinander verabreicht werden. Bei der aufeinander folgenden Verabreichung kann die Verbindung vor oder nach dem Antimalariamittel gegeben werden, solange das zuerst verabreichte Mittel zum Zeitpunkt der Verabreichung des zweiten Mittels im Tier immer noch malaria-aktiv ist. Jede der oben beschriebenen Verabreichungsmethoden kann zur Gabe der Verbindung und des Antimalariamittels in Kombination verwendet werden.

[0082] Die vorliegende Erfindung soll so verstanden werden, dass sie alle solche Verwendungsmöglichkeiten einbezieht und der Begriff „Zusatzverabreichung“ muss dementsprechend ausgelegt werden. Wenn eine Verbindung der Erfindung und ein Antimalariamittel zusätzlich als Mixtur verabreicht werden, sollten sie vorzugsweise in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung gegeben werden, die beide Mittel enthält. Somit ist in einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung eine pharmazeutische Zusammenstellung geliefert, die eine Verbindung der Erfindung und ein Antimalariamittel zusammen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger umfasst.

## 6 BEISPIELE

### 6.1 SYNTHESE DER SPEZIFISCHEN VERBINDUNGEN

[0083] Verbindung Nr. 2, **Abb. 1A**: Eine Suspension von Verbindung Nr. 11 (2-Amino-4-(3,5-Diacetylphenyl)amino-6-Methylpyrimidin) (0,284 g) wurde in 1 : 1 Acetonitril-Tetrahydrofuran suspendiert, mit Methyljodid (2 ml) behandelt und für 18 Stunden bei 40–45°C unter einem Rückflusskühler erhitzt. Die Kühlung und Filtration ergab 0,35 g von 2-Amino-4-(3,5-Diacetylphenyl)amino-1,6-Dimethylpyrimidinium-Iodid, Schmp. 292°C.

[0084] 2-Amino-4-(3,5-Diacetylphenyl)amino-1,4-Dihydro-1,6-Dimethylpyrimidin. Eine Suspension von 21 g (49,3 mmol) 2-Amino-4-(3,5-Diacetylphenyl)amino-1,6-Dimethylpyrimidinium-Iodid (Verbindung Nr. 2, wie in Abschnitt 6.1 beschrieben synthetisiert) in 1 : 1 Methanol/Wasser (750 ml) bei 60°C wurde mit überschüssigem 2 N NaOH behandelt, mit Kühlung um ca. 60°C beizubehalten. Weitere 200 ml Wasser wurden hinzugegeben und die Mischung wurde in Eis gekühlt und gefiltert, um 14,69 g 2-Amino-4-(3,5-Diacetylphenyl)imino-1,4-Dihydro-1,6-Dimethylpyrimidin als gelbe Kristalle zu ergeben, Schmp. 219–220°C.

[0085] 2-Amino-4-(3,5-Diacetylphenyl)amino-1,6-Dimethylpyrimidinium-Chlorid (CNI-0294). CNI-0294 ist das Chloridsalz der Verbindung Nr. 2. Die Base 2-Amino-4-(3,5-Diacetylphenyl)imino-1,4-Dihydro-1,6-Dimethylpyrimidin (14,35 g, 48 mmol) wurde in 500 ml Methanol und mit HCl-Gas behandelt, bis die Präzipitation komplett erschien. Die Filtration ergab 12,8 g weiße Kristalle mit einer leichten Gelbfärbung, Schmp. 306,5–307,5°C.

[0086] Verbindung Nr. 11 (CNI-1194): Eine Suspension von 3,5-Diacetylanilin (0,885 g) in Wasser (18 ml) wur-

de mit 2-Amino-4-Chloro-6-Methylpyrimidin (0,718 g) und konzentriertem HCl (0,42 ml) behandelt und 30 Minuten bei 90–100°C erhitzt. Nach der Abkühlung wurde die Mixtur mit 10 ml wässrigem 1 N KOH behandelt. Die Mixtur wurde 10 Minuten gerührt und der Feststoff herausgefiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet und ergab 1,322 g 5 beige Kristalle. Die Rekristallisierung aus Ethylacetat-2-Methoxyethanol ergab 1,175 g von 2-Amino-4-(3,5-Diacetylphenyl)amino-6-Methylpyrimidin als helle, glänzende Kristalle, Schmp. 240–241°C.

[0087] Verbindung Nr. 12: Eine Suspension von 3,5-Diacetylanilin (0,531 g) in Wasser (8 ml) wurde mit Cyanoguanidin (0,285 g) und konz. HCl (0,25 ml) behandelt und unter Rückfluss erhitzt. Nach 6 Stunden war die Mixtur abgekühlt und konzentriert und es wurden 0,248 g eines cremfarbenen Feststoffs herausgefiltriert und getrocknet, um N-(3,5-Diacetylphenyl)biguanid-Hydrochlorid zu ergeben, Schmp. 260–270°C (Grad Celsius).

[0088] Verbindung Nr. 13: Eine Suspension von 3,5-Diacetylanilin (1,95 g) in Wasser (10 ml) wurde mit 2-Chloro-4,6-Diamino-1,3,5-Triazin (1,455 g) und konzentriertem HCl (0,1 ml) behandelt und unter Rückfluss für 20 Minuten erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Hydrochlorid aus Verbindung Nr. 13 als weißes Pulver ausgeschieden. Dieses wurde ausgefiltriert, in 60 ml kochendem, wässrigem 75%igen Methanol aufgelöst und mit Triethylamin (1,5 ml) behandelt. Nach dem Abkühlen wurden weiße Flocken abgesondert. Die Filtration und Trocknung ergab 1,79 g von 2-(3,5-Diacetylphenyl)amino-4,6-Diamino-1,3,5-Triazin, Schmp. 271–272°C.

[0089] Verbindung Nr. 14: 4-(3-Acetylphenyl)amino-2-Amino-6-Methylpyrimidin. Verbindung Nr. 15 (0,968 g) wurde in Methyl-Iodid (2 ml) enthaltendem Aceton (5 ml) suspendiert und bei Rückfluss für 48 Stunden erhitzt. Die Filtration nach dem Abkühlen ergab 0,657 g von 4-(3-Acetylphenyl)amino-2-Amino-1,6-Dimethylpyrimidinium-Iodid als weißes Pulver, Schmp. 238–240°C.

[0090] Verbindung Nr. 15 (CNI-1594): Eine Suspension von m-Aminoacetophenon (2,7 g) und 2-Amino-4-Chloro-6-Methylpyrimidin (2,87 g) in 40 ml Wasser wurde mit 1,7 ml konzentriertem HCl behandelt und für 1 Stunde bei Rückfluss erhitzt. Die Zugabe von 40 ml 1 N KOH ergab einen hellen, glänzenden Feststoff, der ausgefiltriert und getrocknet wurde und 3,8 g 4-(3-Acetylphenyl)amino-2-Amino-6-Methylpyrimidin ergab, Schmp. 196–198°C.

[0091] Verbindung Nr. 16: Eine Suspension von 3,5-Diacetylanilin (0,531 g) in Wasser (10 ml) wurde mit 6-Chloro-Purin (0,464 g) und konzentriertem HCl (0,25 ml) behandelt und 30 Minuten bei Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Mixtur mit 6 ml wässrigem 1 N KOH behandelt. Die Mixtur wurde 10 Minuten gerührt und der Feststoff herausgefiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet und ergab 0,80 g von 6-[(3,5-Diacetylphenyl)amino]purin, Schmp. (Grad Celsius) 340–350°C.

[0092] Verbindung Nr. 17 (CNI-1794): Eine Suspension von p-Aminocetophenon (1,35 g) und 2-Amino-4-Chloro-6-Methylpyrimidin (1,435 g) in 20 ml Wasser wurde mit 0,85 ml konz. HCl behandelt und 1 Stunde unter Rückfluss erhitzt. Die Zugabe von 20 ml 1 N KOH ergab einen hellen, glänzenden Feststoff, der ausgefiltriert und getrocknet wurde und 2,28 g 4-(3-Acetylphenyl)amino-2-Amino-6-Methylpyrimidin ergab, Schmp. 194–196°C. Davon wurden 1,21 g mit Methyljodid (3 ml) in Dimethylformamid (15 ml) bei Raumtemperatur 42 Stunden lang behandelt. Die Verdünnung mit Ethylacetat und Filtration ergab 1,11 g 4-(4-Acetylphenyl)amino-2-amino-1,6-Dimethylpyrimidinium-Iodid in Form eines weißen Pulvers, Schmp. 302–303°C.

[0093] Verbindung Nr. 45 (CNI-4594): Eine Mixtur aus Anilin (0,93 g) und 2-Amino-4-Chloro-6-Methylpyrimidin, (1,44 g) in 36 ml Wasser wurde mit 0,84 ml konz. HCl behandelt und 1 Stunde unter Rückfluss erhitzt. Die Zugabe von 20 ml 1 N KOH ergab einen hellen, glänzenden Feststoff, der herausgefiltriert, getrocknet und aus Ethylacetat/2-Methoxyethanol und Ethylacetat/Hexan rekristallisiert wurde und 0,69 g 4-Phenylamino-2-Amino-6-Methylpyrimidin ergab, Schmp. 179–180°C.

[0094] Verbindung Nr. 46: Eine Suspension von 4-Phenylamino-2-Amino-6-Methylpyrimidin, Verbindung Nr. 45, (0,25 g) in Ethanol (4 ml) wurde mit Methylmethansulfonat (0,090 g) behandelt und 5 Tage unter Rückfluss erhitzt. Weiteres Methylmethansulfonat (0,090 g) wurde hinzugegeben und die Mixtur weitere 2 Tage unter Rückfluss erhitzt. Die Konzentration und Rekristallisierung aus einer Mixtur von Methanol, Ethylacetat und Tertbutylethylether ergab 0,10 g von 4-Phenylamino-2-Amino-1,6-Dimethylpyrimidinium-Methansulfonat.

[0095] 3,5-Diacetylanilin (CNI-1894) wurde gemäß Ulrich et al., (1983, J Med Chem 27: 35-40) synthetisiert. In anderen Positionen substituierte Diacetylamine können gemäß Ulrich et al. oben oder McKinnon et al. (1971, Can J Chem 49: 2019–2022) synthetisiert werden. Alle anderen Grundstoffe wurden von der Aldrich Chemical Co. bezogen. Die kernmagnetischen Resonanzspektren und Elementanalysen stimmten mit den erwarteten Werten überein.

## 6.2 DER GEBRAUCH VON VERBINDUNG NR. 2 ZUR INHIBITION DER HIV-REPLIKATION IN PRIMÄREN MAKROPHAGENLINIEN

### 6.2.1 Materialien und Methoden

[0096] Durch Ficoll-Hypaque-Zentrifugation und Adhärenz zu Plastik, wie zuvor beschrieben, wurden primäre humane Monozyten aus peripherem Blut gewonnen. Gartner S. P. et al., 1986, Science 233: 215. Kurz gesagt

wurden die PBMCs nach Ficoll-Hypaque (Pharmacia) 4 Mal mit DMEM gewaschen (die letzte Wäsche erfolgte bei 800 U/min zur Entfernung der Blutplättchen) und in Monozyten-Kulturmedium resuspendiert [DMEM mit Zusatz von 1 nM Glutamin, 10% hitze-inaktiviertem Humanserum, 1% Penicillin + Streptomycin-Lösung (Sigma)] bei einer Dichte von  $6 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Zellen wurden auf 24 Mikrotiterplatten ausgesät (1 ml pro Platte) und 2 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 3 Mal mit DMEM gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen, und die Inkubation wurde dann in mit 250 U/ml humanem M-CSF (Sigma) angereichertem Monozyten-Kulturmedium fortgesetzt. Die Zellen wurden vor der Infektion mit dem monozyten-tropen Stamm HIV-1<sub>ADA</sub> 7 Tage lang ausgereift. Nuovo, G. J., et al., 1992, Diagn. Mol. Pathol. 1: 98. Zwei Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit Medium gewaschen und RPMI mit 10% Humanserum-Zusatz kulturiert. In Experimenten, in denen eine PCR-Analyse vorgenommen wurde, wurde der Virus 2 Stunden bei Raumtemperatur mit RNase-freier DNase (Boehringer-Mannheim) vorbehandelt und dann vor der Injektion durch einen Nitrocellulosefilter (0,2 µm Porengröße) gefiltert.

[0097] PBMCs wurden durch Ficoll-Hypaque-Zentrifugation gereinigt und mit 10 µg/ml PHA-P (Sigma) sowie 20 U/ml rekombinantem humanem IL-2 (rhIL-2) in RPMI 1640 mit 10% FBS (HyClone)-Zusatz aktiviert. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen gewaschen und mit HIV-1<sub>ADA</sub> in RPMI 1640 mit 10% FBS-Zusatz inokuliert. Nach 2 h Adsorption wurde freier Virus ausgewaschen und die Zellen wurden in RPMI 1640 mit Zusatz von 10% FBS und 20 U/ml rhIL-2 kulturiert. Virenstock und Infektion. Der makrophagen-trophe Stamm HIV-1<sub>ADA</sub> wurde in primären humanen Monozyten amplifiziert und konzentriert, um einen Virenstock mit einer TCID<sub>50</sub> von ca. 10<sup>5</sup>/ml zu produzieren. Die HIV-1-Konzentration wurde dann durch Immunoassay der viralen p24-Konzentration unter Verwendung eines Umrechnungsfaktors von 1 ng/200 HIV-1-Partikel bestimmt.

#### 6.2.2 P24 und RT-Assay

[0098] Für das p24-Assay wurden sequenzielle Verdünnungen von 1 : 9 des Kulturüberstands erstellt und mit ELISA wie vom Hersteller (Cellular Products, Buffalo, NY) empfohlen analysiert. Für das reverse Transkriptase (RT) Assay wurden 10 µl Kulturüberstand 40 µl Reaktionsmischung hinzugefügt (die endgültige Zusammensetzung war 50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 20 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 0,1% Triton X-100; 0,2 OD/ml polyA; 0,2 OD/ml oligo(dT)<sub>12-18</sub> und 40 µCi/ml <sup>3</sup>H-dTTP (76 Ci/mmol, DuPont) und für 2 h bei 37°C inkubiert. 5 µl der Reaktionsmischung wurden dann auf das DE 81 (Whatman) Papier aufgetupft. Das Papier wurde luftgetrocknet und 5 Mal mit 5% NaHP<sub>2</sub>O<sub>4</sub> gewaschen und dann mit destilliertem Wasser gespült. Nach dem Lufttrocknen wurde das Papier auf eine Flexi-Filterplatte (Packard) gelegt, mit Szintillationsflüssigkeit überschichtet und in einem TopCount Mikrotiterplattenzähler (Packard) gezählt. Die Ergebnisse wurden als counts per minute in 1 ml Überstand (cpm/ml) angegeben.

#### 6.2.3. Ergebnisse für teilende und ruhende Zellen

[0099] Die Zytotoxizität der Verbindung Nr. 2 wurde in Monozytenkulturen durch Trypan-Blau-Exklusionsassay oder Laktat-Dehydrogenase (LDH) Freisetzung getestet. In beiden Assays wurden bei Konzentrationen der Verbindung bis zu 10 µM keine zytotoxischen Wirkungen beobachtet (Daten nicht dargestellt). Die in **Abb. 2** dargestellten Ergebnisse zeigen die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Verbindung Nr. 2 auf die HIV-1-Replikation in Monozyten. Auf Grund dieses Experiments schätzen wir, dass die IC<sub>50</sub> für diese Verbindung zwischen 0,1 und 1 nM liegt. Ähnliche und höhere Konzentrationen der Verbindung wurden auch auf aktivierten PBLs getestet. Die anti-virale Wirkung dieser Verbindung war in diesen sich aktiv teilenden Zellpopulationen weit weniger bemerkbar (**Abb. 3**). Es wurde keine anti-virale Wirkung festgestellt, wenn replizierende Zellkulturen mit der Multiplizität der Infektion von Monozyten infiziert wurden.

#### 6.2.4. AZT und Verbindung Nr. 2 in Kombination

[0100] AZT ist ein Medikament, das routinemäßig zur Behandlung HIV-1-infizierter Personen eingesetzt wird. Es sind jedoch zwei Faktoren bekannt, die die Wirkung von AZT beeinträchtigen: seine Toxizität und das Erscheinen resistenter mutanter HIV-1-Stämme. Die Effekte dieser beiden Faktoren können verringert werden, indem ein zweites, synergistisches HIV-1-hemmendes Mittel zusammen mit AZT verabreicht wird.

[0101] Angesichts dieser Prämissen wurden die Wirkungen der verschiedenen Konzentrationen von AZT, allein oder in Kombination mit 100 nM der Verbindung Nr. 2, auf die HIV-1-Replikation in humanen Monozytenkulturen mit den in Abschnitt 6.2.1 und 6.2.2 genannten Protokollen getestet. Die Medikamente wurden zusammen mit HIV-1 bei ca. 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml den Monozytenkulturen hinzugefügt. Die Medikamentenkonzentration wurde bei der Rückspeisung aufrechterhalten. Die HIV-1-Replikation wurde durch ein Assay des Überstands für reverse Transkriptase-Aktivität beurteilt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung (cpm × 10<sup>-3</sup>) in Tabelle V angegeben.

TABELLE V

<b>Wirkungen der Kombination von AZT/Verbindung Nr. 2 auf HIV-1-infizierte Monozytenkulturen</b>				
	<b>Tag 7</b>		<b>Tag 11</b>	
<b>[AZT]</b>	<b>(-) Nr. 2</b>	<b>(+) Nr. 2</b>	<b>(-) Nr. 2</b>	<b>(+) Nr. 2</b>
0	1,46 ± 0,43	0,37 ± 0,07	1,81 ± 0,75	0,72 ± 0,30
10 pM	0,92 ± 0,21	0,15 ± 0,05	1,63 ± 0,81	0,18 ± 0,06
100 pM	0,79 ± 0,14	0,13 ± 0,04	1,34 ± 0,59	0,15 ± 0,06
1 nM	0,60 ± 0,28	0,04 ± 0,02	1,07 ± 0,49	0,09 ± 0,03
10 nM	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,07 ± 0,03

[0102] Diese Ergebnisse zeigen, dass zwischen AZT und Verbindung Nr. 2 Synergie besteht. Die synergistischen Wirkungen sind bei den niedrigeren Dosen von AZT an Tag 11 am ausgeprägtesten. Zum Beispiel produzieren 10 pM AZT allein eine Reduzierung der RT-Aktivität von ca. 20% an Tag 11, 100 nM Verbindung Nr. 2 allein produzieren eine Reduzierung von ca. 60%. Ohne Synergie sollte die Kombination eine Reduzierung von 70% produzieren ( $100 \times (1 - (0,8 \times 0,4))$ ). Stattdessen wurde eine Reduzierung von 90% beobachtet.

### 6.3 DIE VERBINDUNGEN DER ERFINDUNG BEWIRKEN KEINE BLOCKIERUNG DES KERNIMPORTS VON ESSENZIELLEN PROTEINEN IN ZELLEN

#### 6.3.1. Direkte Demonstration der Inhibition des Zellimports von HIV-1 durch Verbindung Nr. 2

[0103] Die Wirkungen von Verbindung Nr. 2 auf den Kernimport von HIV-1-Präintegrationskomplexen kann die Erkennung des Vorhandenseins von zirkulärer Duplex-HIV-1 Genom-DNA direkt messen. Diese Duplex-Ringe können mit PCR-Amplifikation mit Primern, die die Verbindungsstelle des zirkulären HIV-1-Genoms überbrücken, leicht erkannt werden. Bukrinsky, M. I., et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 6580–84.

[0104] Kurz gesagt wurde die Wirksamkeit der Kerntranslokation durch das Verhältnis zwischen den 2-LTR- und pol-spezifischen PCR-Produkten, welches den Anteil der LTR-2-Ring-DNA-Moleküle als einen Teil des gesamten Pools intrazellulärer HIV-1-DNA reflektiert, geschätzt. Virale 2-LTR-Ring-DNA wird ausschließlich im Kern infizierter Zellen gebildet und ist somit ein praktischer Marker für eine erfolgreiche Kerntranslokation. Bukrinsky, M. I., (5) 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 6580–84; Bukrinsky, M. I., 1993, Nature 365: 666–669. PCR-Analyse der HIV-1-DNA: Mit dem IsoQuick Extraktionskit (Microprobe Corp., Garden Grove, CA) wurde Gesamt-DNA aus HIV-1-infizierten Zellen extrahiert. Die DNA wurde dann mit PCR mit Primer-Paaren analysiert, die folgende Sequenzen amplifizieren: ein Fragment von HIV-1 (LTR/gag) das während der reversen Transkription als Letztes synthetisiert wird und somit den Pool viraler DNA-Moleküle mit voller Länge repräsentiert; ein Fragment des Polymerase-Gens (pol); eine 2-LTR-Verbindungsregion, die nur in HIV-1 2-LTR Ring-DNA-Molekülen zu finden ist oder ein Fragment des zellulären  $\alpha$ -Tubulin-Gens. Verdünnungen von 8E5-Zellen (die eine integrierte Kopie der HIV-1-DNA pro Genom enthalten) in CEM-Zellen dienten als Standards. Die Amplifikationsprodukte wurden auf Nylonmembranfilter transferiert und zu  $^{32}\text{P}$ -markierten Oligonukleotiden hybridisiert, die für jedes PCR-Amplifikationsfragment spezifischen internen Sequenzen entsprechen, gefolgt von einer Exposition mit Kodak XAR-S-Film oder einem Phosphorfilm.

[0105] Quantitation der PCR-Reaktionen: Nach der Hybridisierung enthüllte Bänder der richtigen Größe wurden mit einem Phosphorimager (Molecular Dynamics) quantifiziert, indem die gesamte Dichte (integriertes Volumen) der das entsprechende Produktband umschließenden Rechtecke gemessen wurde. Die Schätzung der Wirksamkeit der Kerntranslokation der HIV-1-DNA erfolgte durch Messung der Menge der 2-LTR-Ring-DNA ( $N_{2\text{-LTR}}$ ) in Bezug auf die gesamte virale DNA ( $N_{\text{tot}}$ ) in jeder Kultur, indexiert auf das gleiche Verhältnis der entsprechenden Kontrollkulturen. Somit ist der Translokationsindex =  $(N_{2\text{-LTR}}/N_{\text{tot}})/(C_{2\text{-LTR}}/C_{\text{tot}}) \times 100$ .

[0106] Ergebnisse: Primäre humane Monozyten wurden in Anwesenheit von 100 nM Konzentration von Verbindung Nr. 2 oder ohne Medikamente (Kontrolle) mit HIV-1<sub>ADA</sub> infiziert. Die Hälfte des Mediums wurde alle 3 Stunden erneuert, und während des gesamten Experiments waren Medikamente vorhanden. 48 und 96 Stunden nach der Infektion wurden Zellproben entnommen und der Translokationsindex in Bezug auf die medikamentenfreie Kontrolle wurde bestimmt. Zu beiden Zeitpunkten betrug der Translokationsindex weniger als 10, was bedeutet, dass eine Inhibition des Kernimports von mehr als 90% vorlag.

## 7 PHARMAKOKINETIK AND TOXIKOLOGISCHE STUDIEN

[0107] Dieser Abschnitt enthält eine detaillierte Beschreibung der Techniken, die zur Studie der toxikologischen und pharmakologischen Merkmale der Verbindungen der Erfindung verwendet wurden.

## 7.1 Medikamentenanalyse

[0108] Für jeden Test wurden Standardadditionskurven konstruiert, indem Maus- oder humanem A<sup>+</sup>-Plasma erhöhte Medikamentenmengen hinzugegeben wurden (Long Island Blood Services; Melville, NY). Der Plasmaprobe wurde die gleiche Menge von 10 mM Tetramethylammoniumchlorid/10 mM Heptansulfonat/4,2 mM HP<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Puffer A) hinzugegeben und diese wurde dann in eine gewaschene 1 g Cyanopropylsilan (oder Octadecylsilan für CNI-1894) Festphasenextraktionssäule (Fisher Scientific) geladen. Die Säule wurde mit 1,0 ml Wasser gewaschen und dann mit 1,0 ml von 10 mM Tetramethylammoniumchlorid/10 mM Heptansulfonat/4,2 mM HP<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/95% CH<sub>3</sub>CN/5% H<sub>2</sub>O (Puffer C) eluiert. Die eluierte Probe wurde in einem Rotationsverdampfer zu Trockenheit reduziert und in 1,0 ml Puffer A resuspendiert.

[0109] Zweihundert µl der resuspendierten Probe wurden in ein Hewlett-Packard Modell 1090 Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographiesystem (HPLC) (Wilmington, DE) injiziert, das mit einem Fotodiodenarray-ultraviolett-sichtbaren spektrofotometrischen Detektor, Autosampler und Chemstation-Betriebssoftware ausgerüstet war. Die verwendete Säule war eine 250 × 4,6 mm Zorbax RX-C8 Säule (Mac-Mod Analyticals; Chadd's Ford, PA), die auf Raumtemperatur gehalten und mit 1,5 ml/min laufen gelassen wurde. Die verwendete mobile Phase war Puffer A und 10 mM Tetramethylammoniumchlorid/10 mM Heptansulfonat/4,2 mM HP<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/75% CH<sub>3</sub>CN/25% H<sub>2</sub>O (Puffer B) und alle Durchläufe wurden mit 10% Puffer B initiiert. Dann wurde ein linearer 30-Min-Gradient zu 60% Puffer B durchgeführt, gefolgt von einem 4-Min-Umkehrgradient zu den ursprünglichen Bedingungen. Die Verbindungen CNI-0294, -1194, -1594 und -1794 wurden durch ultraviolette Absorbanz bei 300 nm erkannt, CNI-1894 bei 240 nm und Pentamidin bei 265 nm. In diesem Assay-System hatten die CNI-Testverbindungen eine lineare Reaktion und sind bis hinunter zu mindestens 19,5 ng pro Injektion nachweisbar.

## 7.2 TOXIZITÄTSSTUDIEN

## 7.2.1 Methode

[0110] Die Dosen der Verbindungen der Erfindung, die bei 50% der Mäuse letal waren (LD<sub>50</sub>), wurden durch intraperitoneale Injektion in Gruppen von 5 Tieren mit zunehmenden Dosen jeder Verbindung bestimmt. CNI-0294 wurde mit 0, 2, 10, 20, 40, 80, 100, 160, 320, 640, 1280 mg/kg in 0,5 ml Wasser/HCl verabreicht; CNI-1594 mit 0, 2,4, 5, 10, 20, 40, 80 mg/kg in 0,5 ml Wasser/HCl; CNI-1794 mit 0, 20, 50, 80 mg/kg in 0,5 ml Wasser/HCl und CNI-1894 mit 0, 10, 20, 40, 80, 240, 480, 960 mg/kg in Wasser/HCl. Alle Tiere wurden auf sichtbare Anzeichen für akute oder langfristige Toxizität hin beobachtet. Der Prozentsatz der in jeder Gruppe gestorbenen Tiere wurde zur Berechnung des LD<sub>50</sub> durch nicht-lineare Kurvenanpassung mit der Enzfitter-Software (Elsevier Bioscience; Cambridge, UK), die mit der Chou-Formel (Chou 1976, J Theor Biol 39: 253–276) programmiert war, verwendet.

## 7.2.2 Ergebnisse

[0111] Die Verbindungen (**Abb. 4A–E**) wurden mit einem modifizierten LD<sub>50</sub>-Assayverfahren wie oben beschrieben in einem nicht zuchtverwandten Mäusetamm untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI folgendermaßen dargestellt:

TABELLE VI

Die Toxizität der Verbindungen, gemessen durch die bestimmte mittlere letale Dosis wie oben beschrieben.	
Verbindung	LD <sub>50</sub> ± Standardabweichung (mg/kg)
0294	587,77 ± 65,79
1194	>160*
1594	49,04 ± 0,08
1794	48,93 ± 0,12
1894	258,64 ± 1,37

\*Höhere Dosen wurden wegen der begrenzten Menge der Verbindung nicht getestet.

[0112] CNI-0294 erwies sich als sehr gut verträglich (siehe Tabelle VI), ohne erkennbare offenkundige Anzeichen für Toxizität bei  $LD_{50}$  nahe kommenden Dosen. Die anderen Verbindungen in der CNI-Serie wurden entwickelt, um Struktur-Funktionsverhältnisse hinsichtlich Aktivität und Toxizität zuzulassen. CNI-1194, welche sich von CNI-0294 nur durch das Fehlen einer Methyl-Gruppe auf dem heterozyklischen Stickstoff unterscheidet, war ebenfalls gut verträglich, mit einer hohen  $LD_{50}$  (Tabelle VI). CNI-1594, welche ähnlich ist wie bei CNI-1194 bis auf die Auslassung einer der Acetyl-Gruppen auf den Benzenringen, war merklich stärker letal (Tabelle VI). Die Toxizität war sofortig und der Tod trat in Minuten ein, und die Tiere zeigten Symptome einer akuten Neurotoxizität. CNI-1794, die identisch ist mit CNI-1594, nur dass die einzelne Acetyl-Gruppe neben den heterozyklischen Substituenten versetzt wurde, hatte eine ähnliche  $LD_{50}$  wie CNI-1594 (Tabelle VI). CNI-1894, die ähnlich ist wie CNI-0294 und -1194, der jedoch der heterozyklische Ring fehlt, war ebenfalls ziemlich gut verträglich. Tiere, die große Dosen von CNI-1894 erhielten, starben 2–3 Tage nach der Injektion und zeigten keine Anzeichen für eine sofortige Toxizität. Auf Grund der obigen Beobachtung wird die Schlussfolgerung gezogen, dass die Anwesenheit des heterozyklischen Rings in den Verbindungen der Erfindung nur eine kleine Rolle spielt für die Bestimmung der Toxizität, wohingegen das Vorhandensein von zwei Acetylgruppen auf dem Benzenring sehr wichtig ist. Somit enthält eine bevorzugte Verbindung der Erfindung mit niedriger Toxizität zwei Acetylgruppen auf dem Benzenring.

### 7.3 PHARMAKOKINETISCHE STUDIEN

#### 7.3.1 Methoden

[0113] Weibliche ND4 Swiss-Webster-Mäuse (21–24 g) wurden von Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN) bezogen und in randomisierten Fünfergruppen in Käfige mit freiem Zugang zu Nahrung und Wasser gegeben. Jede Tiergruppe erhielt 50 mg/kg von CNI-0294, -1194 oder -1894 oder 20 mg/kg von CNI-1594 in einem Volumen von 0,5 ml. Die Verbindung CNI-0294 wurde intraperitoneal oder über orale Sondenfütterung als Lösung in Wasser oder als Suspension in 10% DMSO/Erdnussöl verabreicht. Die anderen CNI-Verbindungen wurden intraperitoneal oder über orale Sondenfütterung als Lösung in Wasser, das mit ausreichend HCl zur Auflösung des Medikaments titriert war, verabreicht. Zu verschiedenen Zeitpunkten von 5 Minuten bis zu 4 Tagen wurde eine einzige Tiergruppe durch Kohlendioxidinhalation euthanisiert und durch Herzpunktion und mit Heparin als Antikoagulanzen ausgeblutet. Das Blut der fünf Mäuse der Gruppe wurde gepoolt und bei  $14.000 \times g$  für 10 Minuten zentrifugiert. Das Plasmavolumen wurde gemessen und die gleiche Menge von Puffer A hinzugegeben, und die Mixtur wurde wie oben beschrieben extrahiert und analysiert, außer dass die getrockneten Eluate in 200  $\mu$ l Puffer A resuspendiert wurden und 100  $\mu$ l in ein Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographiesystem (HPLC) injiziert wurde.

[0114] Da die Untersuchung der Blutkonzentration-Zeitkurven für eine einzige i.p.-Injektion ein typisches biphasisches Erscheinungsbild aufwies, wurden Standardmethoden der pharmakokinetischen Messungen angewendet (1982, Gibaldi et al., Pharmacokinetik. Marcel Dekker, New York). Es wurde die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) bestimmt und die Bioverfügbarkeit wurde als  $AUC_{oral}/AUC_{i.p.}$  gemessen. A und B repräsentieren den Null-Zeit-Abschnitt der Distributions- bzw. Eliminationsphasen, und  $\alpha$  und  $\beta$  die jeweiligen Phasensteigungen, multipliziert mit 2,303. Die  $t_{1/2\alpha}$ - und  $t_{1/2\beta}$ -Werte sind die kalkulierten Halbwertszeiten des Medikaments in jeder Phase ( $0,693/\alpha$  bzw.  $0,693/\beta$ ). Das Distributionsvolumen ( $V_D$ ) wurde als Dosis/B berechnet und die gesamte Clearance-Rate ( $Cl_{tot}$ ) als  $\beta \cdot V_D \cdot C_{max}$  und  $t_{max}$  sind die maximale Plasmakonzentration bzw. der Zeitpunkt dieser Messung.

#### 7.3.2 Ergebnisse

[0115] Nach den Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven einer einzigen intraperitonealen Injektion zu urteilen hat jede Verbindung in der CNI-Serie trotz struktureller Unterschiede ähnliche pharmakokinetische Eigenschaften. Die kinetischen Parameter sind in Tabelle III zusammengefasst und in **Abb. 5** ist ein typisches Muster für CNI-1194 gezeigt. Die Medikamente wurden rasch absorbiert, mit Erreichen der maximalen Plasmakonzentration in 5–15 Minuten, und hatten auch eine rasche Distributionsphase mit einem  $t_{1/2\alpha}$  von 0,32–0,62 h. Unterschiede wurden in der maximalen Plasmakonzentration und in den Parametern der Eliminationsphase festgestellt. CNI-0294 erzielte den höchsten maximalen Plasmaspiegel für eine einzige i.p.-Injektion von 50 mg/kg mit 18,76  $\mu$ g/ml und CNI-1894 war sehr ähnlich mit einem Wert von 13,43  $\mu$ g/ml. Da CNI-1194 Vergleich zu CNI-0294 einen deutlich niedrigeren maximalen Plasmaspiegel und eine langsamere  $t_{max}$  hatte, scheint das Vorhandensein des Methylsubstituenten auf dem heterozyklischen Stickstoff die Absorption des Medikaments aus dem Peritoneum zu verbessern. Ein Vergleich von CNI-1194 und CNI-1594 deutet an, dass die Anzahl der Acetyl-Gruppen wenig Auswirkung auf die Medikamentenabsorption hatte. Die Werte hinsichtlich der Elimination ( $\beta$ , B,  $t_{1/2\beta}$ ,  $V_D$ ,  $Cl_{tot}$ ) schwankten, es konnte jedoch kein eindeutiger struktureller Zusammenhang festgestellt werden. Alle Verbindungen mit Ausnahme von CNI-1894, waren nach 24 h im Plasma nicht mehr nach-

weisbar und erreichten ihre Nachweisbarkeitsgrenze nach 5–6 Stunden. Somit ist ein allgemeines Merkmal der Verbindungen ihre rasche Absorption und Elimination. Eine bevorzugte Verbindung der Erfindung hat einen Methyl-Substituenten auf dem heterozyklischen Ring, Stickstoff in Position 1 und besitzt erhöhte Absorption aus dem Peritoneum.

[0116] Mit CNI-0294 und -1194 wurden auch Experimente zur Bestimmung der relativen Bioverfügbarkeit durchgeführt. Durch den Vergleich von  $AUC_{oral}$  mit  $AUC_{i.p.}$  für eine einzige Dosis von 50 mg/kg wurde für CNI-0294 eine relative Bioverfügbarkeit von 6% und für CNI-1194 von 15% festgestellt. Der maximale Plasmaspiegel betrug 0,4 µg/ml für CNI-0294 und 0,35 µg/ml für CNI-1194 und die Medikamente waren mindestens 6 Stunden im Plasma nachweisbar (siehe **Abb. 5**).

## 7.4 METABOLISCHE STUDIEN

[0117] Während der Analyse der Plasmaproben für die pharmakokinetischen Parameter wurden eine Reihe weiterer HPLC-Spitzen entdeckt, die über die Zeit zu- und abnahmen. Zusätzliche Spitzen dieser Art waren in Proben jeder Verbindung in der CNI-Serie zu beobachten, wie in **Abb. 8A–8D** dargestellt. Da die Möglichkeit besteht, dass es sich bei diesen Spitzen um Metaboliten der CNI-Verbindungen handelt, wurden die Verbindungen der Erfindung in einem einfachen Modell für primären Metabolismus geprüft.

### 7.4.1 Methode

[0118] Mehrere weibliche ND4 Swiss-Webster-Mäuse wurden durch Kohlendioxidinhalation euthanisiert und ihre Lebern wurden exzidiert und mit eiskalter phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (pH 7,4) gespült. Dann wurden die Lebern zerkleinert, in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) mit einem Dounce Homogenisiergerät vorsichtig homogenisiert und 20 Minuten bei  $9.600 \times g$  zentrifugiert. Der post-mitochondriale Überstand wurde behalten, 20% wurde mit Glycerol versetzt und bei  $-70^{\circ}C$  in 1,0 ml Aliquot bis zum Gebrauch gefroren. Für jede Inkubation wurde 1,0 ml einer 1,0-mg/kg-Medikamentenlösung, 3,0 ml eines 50-mM-Phosphatpuffers (pH 7,4), 1,0 ml von 2 mg/ml NADPH in 50 mM Phosphat (pH 7,4) und 1,0 ml des post-mitochondrialen Überstands hinzugegeben. Fünfhundert µl jedes Inkubats wurden dann sofort in ein eiskaltes Röhrchen transferiert, um Null-Zeit-Proben zu erhalten, und weitere 500 µl Aliquote wurden nach 8, 15, 30 und 60 Minuten in eiskalte Röhrchen gegeben. Die Proben wurden dann extrahiert und wie in Abschnitt 7.1 beschrieben analysiert. Es wurden auch Kontrollinkubationen vorgenommen, bei denen das Medikament oder der post-mitochondriale Überstand weggelassen wurden. Eine Inkubation mit Pentamidin wurde vorgenommen, um die mikrosomale Aktivität zu bestätigen (Berger et al., 1992, Antimicrob. Ag. Chemother. 36: 1825-1831). Spitzen in den CNI-Verbindungsinkubationen, die über die Zeit zunahmten und in den Kontrollproben ohne das Enzympräparat nicht vorhanden waren, wurden als putative Metabolite behandelt.

### 7.4.2 Ergebnisse

[0119] Unter Verwendung von post-mitochondrialen Überständen von homogenisierten Mäuselebern als Enzymquelle wurden die Medikamente in Anwesenheit von NADPH inkubiert. Wie in Berger et al. oben beschrieben wurde Pentamidin als positive Kontrolle verwendet und die sieben erwarteten primären Metabolite waren nachweisbar, was die Aktivität des Enzympräparats bestätigte. Die Extraktion und Analyse der CNI-Inkubate ergab das Vorhandensein zahlreicher putativer Metabolitspitzen, die in den negativen Kontrollinkubationen nicht vorhanden waren (**Abb. 6**). Bei der Inkubation von CNI-0294, -1594 oder -1194 wurde die Produktion von drei kleineren und einem größeren Metaboliten festgestellt und CNI-1894 hatte einen kleineren und einen größeren Metaboliten. Für den größeren Metaboliten wurde festgestellt, dass er für CNI-0294, -1194- und -1594 0,9–1,2 Min näher an der Lösungsmittelfront eluiert, woraus sich schließen lässt, dass in jeder dieser Verbindungen die gleiche Position geändert wurde. Die metabolische Umwandlung im post-mitochondrialen Überstand war bedeutend, mit einer Änderung im Verlauf einer 60-minütigen Inkubation von 43,5% von CNI-0294, 65,19% von CNI-1194, 11,74% von CNI-1594 und 17,28% von CNI-1894 (nach der Spitzenfläche zu urteilen). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein nennenswerter Metabolismus der Verbindungen der Erfindung in vivo stattfinden sollte.

[0120] Die erneute Untersuchung der Plasmaproben bestätigte, dass mehrere der unbekannten Plasmaspitzen, die in **Abb. 6A** und **6B** zu sehen sind, mit den putativen Metaboliten in **Abb. 7A–7D** übereinstimmen. Mit dem metabolischen Modellsystem konnten jedoch nicht alle in den Plasmaproben sichtbaren unbekannten Spitzen produziert werden. Im Besonderen war bei allen Verbindungen in vivo eine bei 11–14 Minuten eluierende Plasmaspitze zu sehen, die im in vitro-Testsystem jedoch überhaupt nicht auftrat. Wie aus den Plasma-Zeit-Kurven ersichtlich war, schien in vivo in allen Verbindungen, unabhängig von der Verabreichungsmethode, eine starke metabolische Umwandlung stattzufinden.

## 7.5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

[0121] Die Toxizität, Pharmakokinetik und der Metabolismus der neuartigen Arylenbis(Methylketon)-Verbindungen der Erfindung und mehrerer neuartiger Analoge davon, ebenfalls der Erfindung, wurden in Mäusen untersucht. Mit einer mittleren letalen Dosis von 587,77 mg/kg war CNI-0294 bei der intraperitonealen Verabreichung gut verträglich. Analoge, die ebenfalls zwei Acetyl-Gruppen auf der Phenyl-Komponente hatten, waren ebenfalls gut verträglich, mit mittleren letalen Dosen von mehr als 160 mg/kg i.p. Alle sichtbaren toxischen Reaktionen schienen reichlich verzögert zu sein (im Allgemeinen 2–3 Tage nach der Injektion). Es wurden zwar keine Biopsie-Proben entnommen, eine solche Verzögerung würde jedoch mit Organschäden durch sehr hohe Dosen dieser Verbindung im Einklang stehen. Verbindungen mit nur einer Acetyl-Gruppe erwiesen sich als stärker toxisch, mit mittleren letalen Dosen von 48,93–49,04 mg/kg i.p. Während die sichtbaren Symptome nach der Injektion von CNI-1594 oder -1794 auf eine letale Neurotoxizität schließen lassen, weisen die strukturellen Unterschiede zwischen den beiden Verbindungen jedoch darauf hin, dass ein Antagonismus eines endogenen Neurotransmitters unwahrscheinlich ist.

[0122] In Versuchstieren besaßen alle Verbindungen sehr rasche pharmakokinetische Eigenschaften, d. h. die maximale Plasmakonzentration für intraperitoneale Injektion wurde in 5–15 Minuten und bei oraler Verabreichung in 15–60 Minuten erreicht. Bei CNI-0294 wurde eine maximale Plasmakonzentration von 18,76–18,93 µg/ml nach einer i.p.-Injektion von 50 mg/kg erreicht. Die anderen getesteten Verbindungen erreichten niedrigere Plasmaspiegel (1,9–13,43 µg/ml). Die Halbwertszeit der Distributionsphase ( $t_{1/2\alpha}$ ) betrug 0,32–0,62 Stunden und die für die Eliminationsphase ( $t_{1/2\beta}$ ) 3,65–23,10 Stunden. Alle kinetischen Parameter stehen im Einklang mit Medikamenten, die sehr rasch aus dem Plasma eliminiert werden und nicht über lange Zeit im Gewebe verbleiben. CNI-0294 und CNI-1194 wurden oral absorbiert, mit einer relativen Bioverfügbarkeit von 6 bzw. 15 Prozent. Diese letztere Eigenschaft ist sehr vorteilhaft für die weitere Entwicklung dieser Verbindungen als Anti-Infektionsmittel, insbesondere als antivirale und antiparasitische Mittel und spezifisch als anti-retrovirale und Anti-Protozoen-Mittel und ganz besonders als Anti-HIV- und Antimalariamittel. Die Toxizitäts-, kinetischen und Bioverfügbarkeitsdaten lassen darauf schließen, dass mit häufigen, hohen, oralen Dosen von CNI-0294 therapeutisch wirksame Plasmakonzentrationen sicher aufrechterhalten werden können.

[0123] Der Metabolismus der Medikamente wurde in einem post-mitochondrialen Mausleber-Überstandssystem beurteilt und es wurde ein erheblicher Metabolismus entdeckt (11,74–65,19 metabolisiert in einer 60-minütigen Inkubation). Die Untersuchung der Plasmaproben zeigte einen erheblichen in vivo Metabolismus, mit mindestens 4–6 Metaboliten, die in den ersten 3 Stunden nach der i.p.-Verabreichung der Testverbindungen leicht zu erkennen waren. Die Metabolitspiegel überschritten rasch die Plasmakonzentrationen der Ausgangsverbindung. Die HPLC-Retentionszeiten weisen darauf hin, dass die Verbindungen wahrscheinlich in der gleichen Position geändert wurden. Außerdem scheinen die Metaboliten, wie auch die Ausgangsverbindungen, eine sehr rasche Plasmakinetik zu haben.

## 8. BEISPIEL: DEMONSTRATION DER ANTIMALARIA-AKTIVITÄT

## 8.1 DIE VERBINDUNGEN HABEN ANTIMALARIA-AKTIVITÄT IN VITRO

## 8.1.1 Methode

[0124] Die Antimalaria-Aktivität der Verbindungen wurde im Wesentlichen wie in Desjardins et al. oben beschrieben bestimmt. Fünfzig µl verschiedener Konzentrationen einer Verbindung der Erfindung, Chloroquin oder Pyrimethamin wurden in die Mulden von Mikrotiterplatten aufgetragen, gefolgt von 200 µl synchronisierten, mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten im Ring-Stadium (letztes Hämatokrit = 1,5%, letzte Parasitämie = 1–5%). Die Platten wurden für 24 h in einem Candle Jar mit 37°C inkubiert und dann wurden 25 µl [<sup>3</sup>H]-Hypoxanthin (Amersham, Arlington Heights, IL; 2,5 µl Ci/well) hinzugegeben. Danach wurden die Platten für weitere 24 h inkubiert und dann auf Unifilter-96 GF/C Filtermikroplatten (Packard; Meriden, CT) geerntet. Jeder Mulde der Filtermikroplatte wurde 25 µl Microscint Szintillationsflüssigkeit (Packard) hinzugegeben, die dann in einem TopCount Mikroplatten-Szintillationszähler (Packard) gezählt wurde. Der Prozentsatz der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Hypoxanthin im Verhältnis zur infizierten Erythrozyten-Kontrolle wurde zur Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Werts für die Verbindungen durch nichtlineare Regression für die LD<sub>50</sub> Bestimmung verwendet.

## 8.1.2 Ergebnisse

[0125] Bei Verwendung der Hypoxanthinaufnahmemethode zur Beurteilung des in vitro-Wachstums von *Plasmodium falciparum* wie oben beschrieben wurde für CNI-0294 eine beachtliche Antimalaria-Aktivität festgestellt (Tabelle VII).

Tabelle VII

Die Antimalaria-Aktivität von CNI-0294, Chloroquin und Pyrimethamin *in vitro* auf mehrere *Plasmodium falciparum*-Klons. Die mittlere inhibitorische Konzentration wurde wie oben beschrieben bestimmt.

Klon	Chloroquin IC <sub>50</sub>	Pyrimethamin IC <sub>50</sub> (μM)	CNI-0294 IC <sub>50</sub> (μM)
D10	26,99±2,42*	170,70±24,60	4,00±0,41
Dd2	122,54±7,26	103,70±9,79	3,52±0,10
FCR-3	104,68±9,98	0,04±0,01	3,09±0,30
HB3	6,73±0,16	8,97±2,75	1,79±0,27
W2mef	143,79±13,30	17,81±13,46	2,29±0,22

Jeder Wert ist ± Standardabweichung (n = 4 für Chloroquin und CNI-0294 und n = 2 für Pyrimethamin).

[0126] Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) für CNI-0294 wurde auf 1,79–4,00 μM berechnet für eine Reihe von geklonten Parasiten mit verschiedenen Sensitivitäten für Chloroquin oder Pyrimethamin (Tabelle VII).

[0127] Der Dd2-Klon von *P. falciparum*, der sowohl Chloroquin- als auch Pyrimethamin-resistent war, wurde für den Vergleich der Antimalaria-Aktivität der übrigen CNI-Verbindungen verwendet (Tabelle VIII).

TABELLE VIII

Die Antimalaria-Aktivität der CNI-Verbindungen gegenüber dem Chloroquin- und Pyrimethamin-resistentem *P. falciparum* Dd2-Klon. Die mittlere inhibitorische Konzentration wurde wie oben beschrieben bestimmt.

Verbindung	IC <sub>50</sub> ±Standardabweichung (μM)
0294	3,67±0,57*
1194	20,27±1,62
1594	23,73±0,59
1894	>200**
4594	25,11±0,72

n = 4 für alle. Die CNI-0294 Replikate waren unabhängig von den in Tabelle VII dargestellten.

\*\*Höchste getestete Konzentration.

[0128] In unabhängigen Messungen wurden mit CNI-0294 ähnliche Ergebnisse erzielt wie in Tabelle VII angegeben und CNI-1194 erwies sich als ca. 5 Mal weniger aktiv. Diese Differenz lässt darauf schließen, dass die heterozyklische Methyl-Gruppe für maximale Aktivität erforderlich ist. CNI-1594 hatte die gleiche IC<sub>50</sub> wie CNI-1194 oder CNI-4594, was zeigt, dass der Verlust einer oder beider Acetyl-Gruppen wenig Auswirkung auf die Antimalaria-Aktivität haben kann. CNI-1894 war jedoch auch bei den höchsten getesteten Konzentrationen inaktiv.

## 8.2 DIE VERBINDUNGEN HABEN EINE ANTIMALARIA-AKTIVITÄT IN VIVO

### 8.2.1 Methode

[0129] Die Beurteilung der Antimalaria-Aktivität von CNI-0294 *in vivo* erfolgte durch die Infektion weiblicher ND4 Swiss-Webster-Mäuse mit 100 μl *Plasmodium berghei* NYU-2 infizierten Mauserythrozyten (50% Parasitämie) durch intraperitoneale Injektion. Die Tiere wurden anschließend einmal täglich an Tag 1–4 der Infektion intraperitoneal mit 0,5 ml Wasser oder 0,5 ml von 50 mg/kg CNI-0294 in Wasser injiziert. Vier Stunden nach der letzten Injektion wurden kleine Blutproben aus dem 5. Schwanz entnommen, und dünne Abstriche mit Dif-Quick (Baxter, Miami, FL) gefärbt. Die Parasitämie der Kontroll- und behandelten Tiere wurde durch die Untersuchung von mindestens 1000 Erythrozyten in jedem Tier enumeriert.

### 8.2.2 Ergebnisse

[0130] Da die IC<sub>50</sub> von CNI-0294 für *P. falciparum* für ca. eine Stunde nach einer einzigen i.p.-Injektion von 50 mg/kg in Mäusen im erzielten Bereich lag, wurde die Verbindung auch *in vivo* mit *Plasmodium berghei* infizierten Mäusen getestet. Im viertägigen Unterdrückungstest, bei dem die Parasitämie nach vier täglichen Injektionen der Testverbindung (in diesem Fall 50 mg/kg i.p.) enumeriert wird, wurde festgestellt, dass CNI-0294 die Parasitämie signifikant (P 0,01) um das 10-fache senkte (Abb. 9).

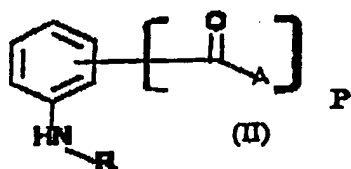
## 8.3 SCHLUSSFOLGERUNGEN

[0131] Wie in Tabelle VII gezeigt war CNI-0294 wirksam gegen verschiedene Klons von *P. falciparum*. Die Gleichförmigkeit der  $IC_{50}$  von CNI-0294 über einen solchen Bereich der  $IC_{50}$  von Chloroquin und Pyrimethamin lässt darauf schließen, dass CNI-0294 einen anderen Wirkungsmechanismus besitzt als diese beiden etablierten Antimalariamittel.

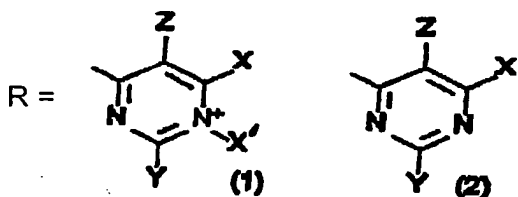
[0132] Tägliche i.p.-Injektionen von 50 mg/kg über einen Zeitraum von 4 Tagen hat die *P. berghei*-Injektion in Mäusen zwar stark unterdrückt, aber die Tiere wurden während dieser Behandlungsrunde nicht vollständig geheilt. Der Unterschied zwischen diesen in vivo-Ergebnissen und den erstaunlicheren in vitro-Ergebnissen mit *P. falciparum* sind wahrscheinlich auf die kinetischen und metabolischen Eigenschaften der Verbindung zurückzuführen. In vitro werden die Parasiten für 48 Stunden einem konstanten Spiegel des Medikaments ausgesetzt, ohne eine Quelle für Host-metabolisierende Enzyme. Im in vivo-Fall lieferte die tägliche i.p.-Injektion nur für ca. 1 Stunde therapeutische Plasmakonzentrationen, und es besteht ein beträchtlicher Metabolismus bei Verbindungen mit reduzierter antiplasmodischer Aktivität. In Anbetracht dieser Beobachtungen könnte eine mit der Technik vertraute Person die Dosierung weiter optimieren.

## Patentansprüche

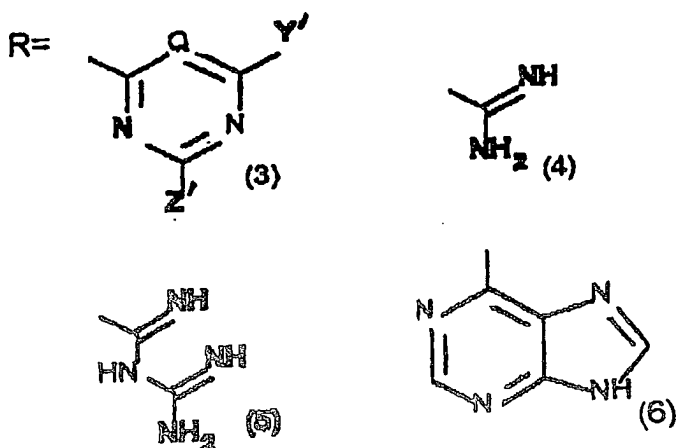
1. Verbindung mit der Formel:



worin A, unabhängig, =  $CH_3$  oder  $CH_2CH_3$ , P = 1 oder 2; und

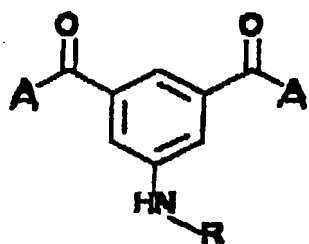


worin X =  $NH_2$ ,  $CH_3$  oder  $CH_2CH_3$ , X' =  $CH_3$  oder  $CH_2CH_3$ ; Y =  $NH_2$ ,  $NHCH_3$ ,  $N(CH_3)_2$ ; und Z = H,  $CH_3$  oder  $CH_2CH_3$ ; oder

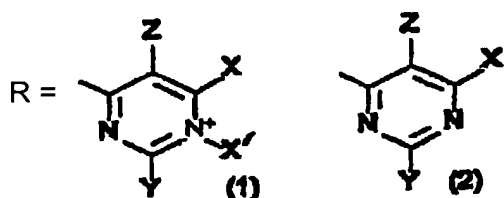


worin Y' und Z', unabhängig, = H,  $NH_2$ ,  $NHCH_3$ ,  $N(CH_3)_2$  oder  $N^+(CH_3)_3$ ; Q ist N oder CH; und deren Salze, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht 2-Amino-4-(p-acetylanilino)-6-methylpyrimidin, 3'-Acetylphenylguanidin, 4'-Acetylphenylguanidin, m-Acetylphenylbiguanid, N-(3,5-Diacetylphenyl)guanidin oder N-(3,5-Diacetylphenyl)biguanid ist.

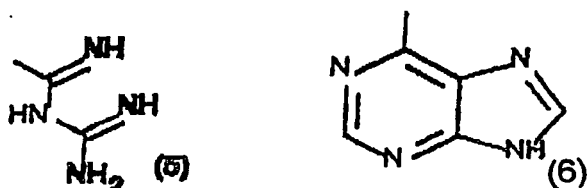
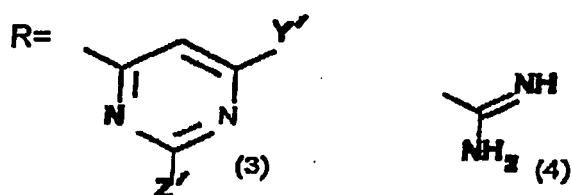
2. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Formel:



worin A = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> und



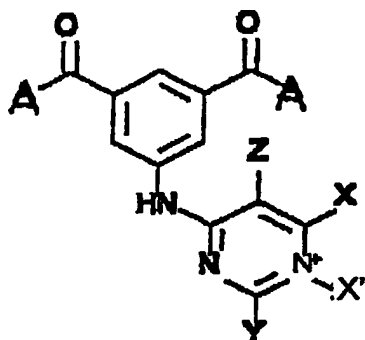
worin X = NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; X' = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; Y = NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; und Z = H, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; oder



worin Y' und Z', unabhängig, = H, NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> oder N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; und deren Salze.

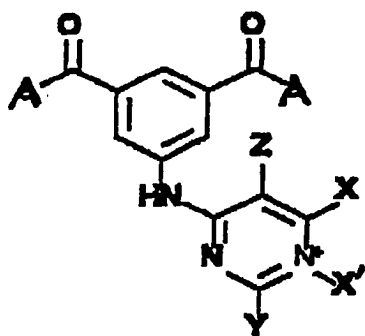
3. Verbindung nach Anspruch 2, worin A = CH<sub>3</sub>.

4. Verbindung nach Anspruch 2 mit der Formel:



und deren Salze, worin X = NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; X' = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; Y = NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; und Z = H, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

5. Verbindung nach Anspruch 3 mit der Formel:

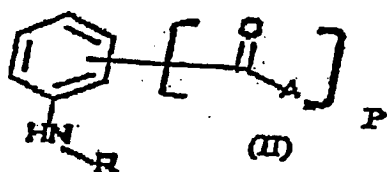


und deren Salze, worin  $X = \text{NH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $X' = \text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $Y = \text{NH}_2$ ,  $\text{NHCH}_3$ ,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ; und  $Z = \text{H}$ ,  $\text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ .

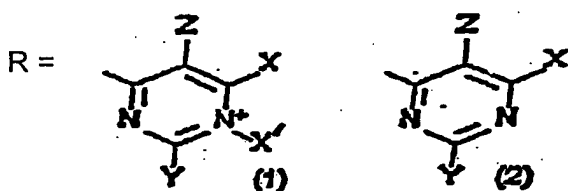
6. Verbindung nach Anspruch 4, worin  $Z = \text{H}$ ,  $Y = \text{NH}_2$ ,  $X$  und  $X' = \text{CH}_3$ , und deren Salze.

7. Verbindung nach Anspruch 5, worin  $Z = \text{N}$ ,  $Y = \text{NH}_2$ ,  $X$  und  $X' = \text{CH}_3$ , und deren Salze.

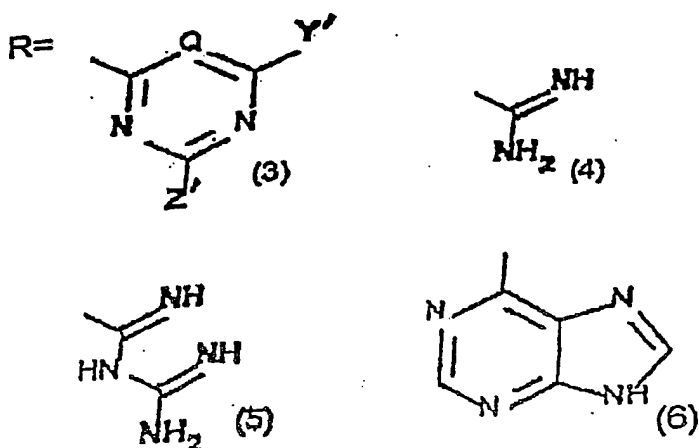
8. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine wirksame Menge einer Verbindung mit der Formel:



worin A, unabhängig,  $= \text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $P = 1$  oder  $2$ ; und

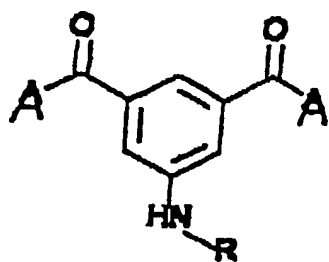


worin  $X = \text{NH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $X' = \text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $Y = \text{NH}_2$ ,  $\text{NHCH}_3$ ,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ; und  $Z = \text{H}$ ,  $\text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ; oder

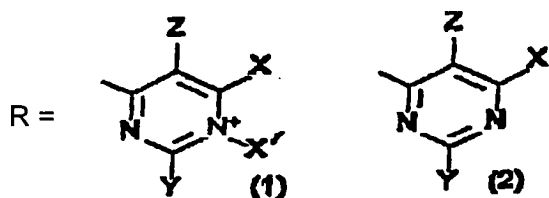


worin  $Y'$  und  $Z'$ , unabhängig,  $= \text{H}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NHCH}_3$ ,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$  oder  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ; Q ist N oder CH; oder deren Salze, mit der Maßgabe, dass die Verbindung nicht 3'-Acetylphenylguanidin oder 4'-Acetylphenylguanidin ist; und einen pharmazeutischen Träger.

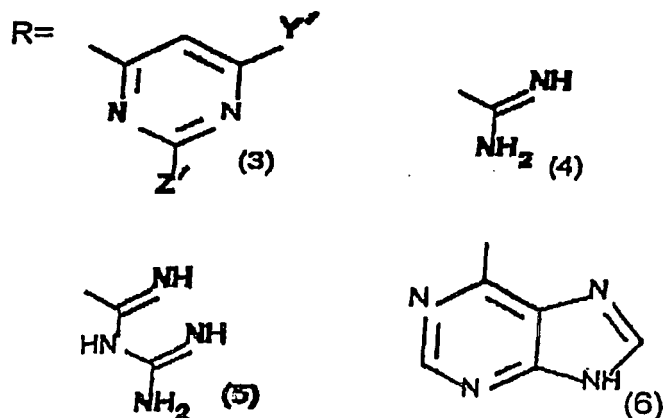
9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8, worin die Verbindung die Formel aufweist:



worin A = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> und



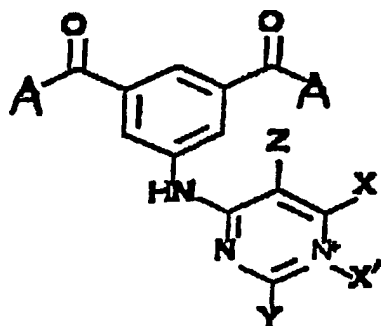
worin X = NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; X' = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; Y = NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; und Z = H, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; oder



worin Y' und Z', unabhängig, = H, NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> oder N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; oder deren Salze.

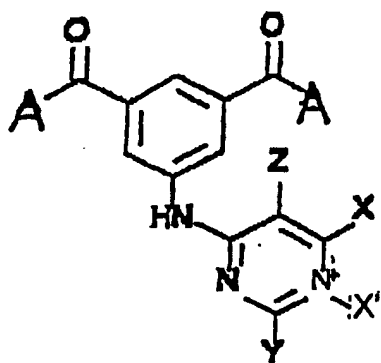
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9, worin A = CH<sub>3</sub>.

11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9, worin die Verbindung die Formel aufweist:



oder deren Salze, worin X = NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; X' = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; Y = NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; und Z = H, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 10, worin die Verbindung die Formel aufweist:



oder deren Salze, worin  $X = \text{NH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $X' = \text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $Y = \text{NH}_2$ ,  $\text{NHCH}_3$ ,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ; und  $Z = \text{H}$ ,  $\text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ .

13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, worin  $Z = \text{N}$ ,  $Y = \text{NH}_2$ ,  $X$  und  $X' = \text{CH}_3$  oder deren Salze.

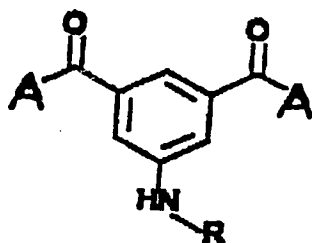
14. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 12, worin  $Z = \text{H}$ ,  $Y = \text{NH}_2$ ,  $X$  und  $X' = \text{CH}_3$  oder deren Salze.

15. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 8 bis 14, welche außerdem ein Antimalariamittel umfasst.

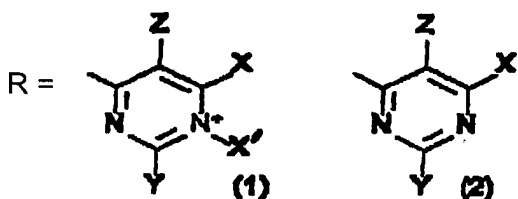
16. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 8 bis 14, welche außerdem eine therapeutisch wirksame Menge von AZT umfasst.

17. Verfahren zum Nachweisen von benachbarten  $\text{N}^\epsilon$ -Komponenten in einem Protein, welches die Schritte umfasst:

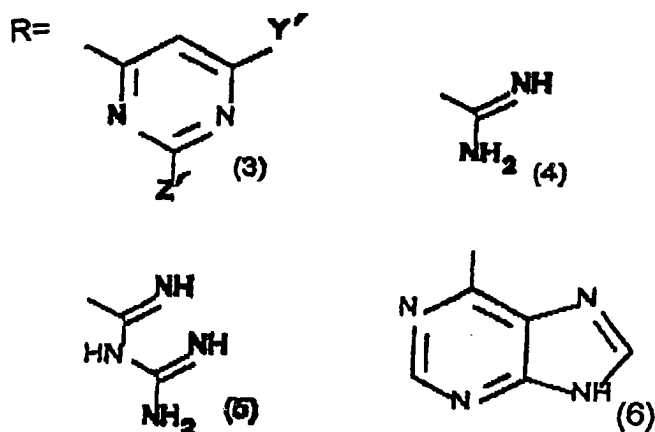
a) Umsetzen eines Proteins mit einer Verbindung mit der Formel



worin  $A = \text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$  und



worin  $X = \text{NH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $X' = \text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $Y = \text{NH}_2$ ,  $\text{NHCH}_3$ ,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ; und  $Z = \text{H}$ ,  $\text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ; oder



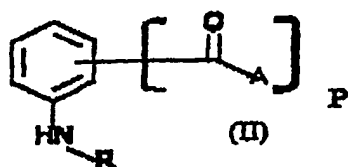
worin Y' und Z', unabhängig, = H, NH<sub>2</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> oder N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, oder deren Salzen,

b) Einwirkenlassen eines Reduktionsmittels auf das umgesetzte Protein; und

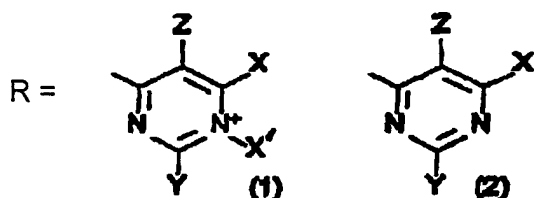
c) Messen einer Menge der Verbindung, welche kovalent an das Protein oder an Fragmente des Proteins gebunden ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, welches außerdem den Schritt des Spaltens des reduzierten Proteins in eine Vielzahl von Peptiden umfasst.

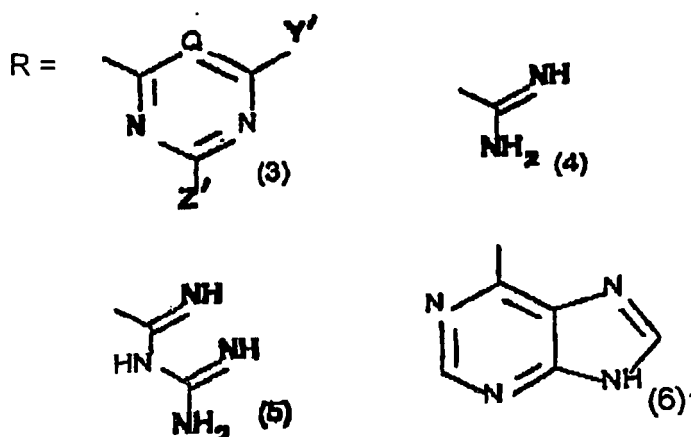
19. Verwendung einer Verbindung mit der Formel:



worin A, unabhängig, = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, P = 1 oder 2; und

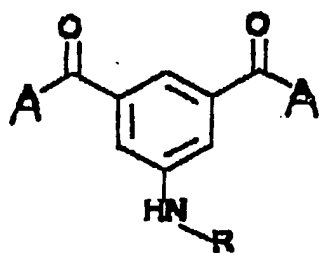


worin X = NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; X' = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; Y = NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; und Z = N, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; oder

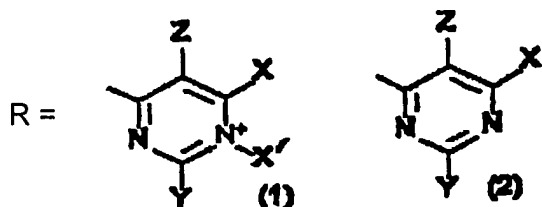


worin Y' und Z', unabhängig, = N, NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> oder N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; Q ist N oder CH; oder deren Salze zum Herstellen eines Medikaments zum Behandeln oder Verhüten einer Infektionskrankheit in einem Tier.

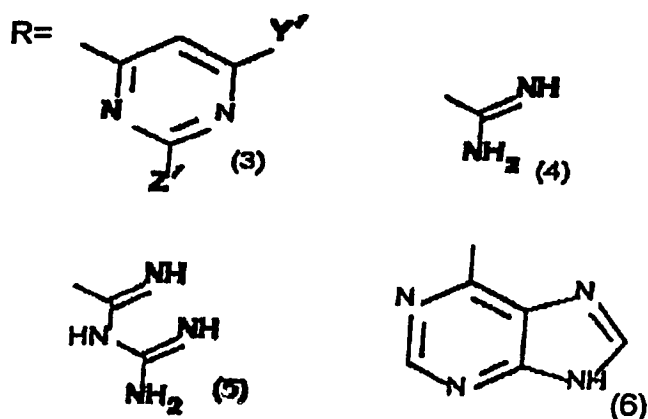
20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei die Verbindung die Formel aufweist:



worin A = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> und



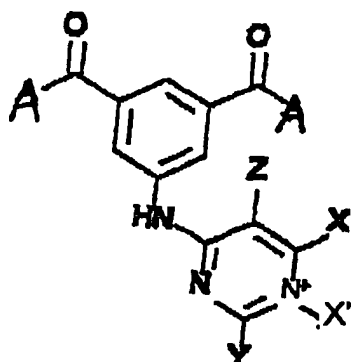
worin X = NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; X' = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; Y = NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; und Z = H, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; oder



worin Y' und Z', unabhängig, = H, NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> oder N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; oder deren Salze.

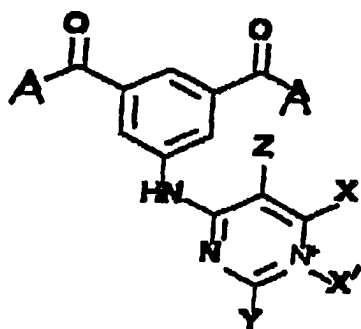
21. Verwendung nach Anspruch 20, worin die Verbindung A = CH<sub>3</sub> aufweist.

22. Verwendung nach Anspruch 20, worin die Verbindung die Formel aufweist:



oder deren Salze, worin X = NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; X' = CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; Y = NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; und Z = H, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

23. Verwendung nach Anspruch 21, worin die Verbindung die Formel aufweist:



oder deren Salze, worin  $X = \text{NH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $X' = \text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $Y = \text{NH}_2$ ,  $\text{NHCH}_3$ ,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ; und  $Z = \text{H}$ ,  $\text{CH}_3$  oder  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ .

24. Verwendung nach Anspruch 22, worin die Verbindung  $Z = \text{N}$ ,  $Y = \text{NH}_2$ ,  $X$  und  $X' = \text{CH}_3$  aufweist, oder deren Salze.

25. Verwendung nach Anspruch 23, worin die Verbindung  $Z = \text{H}$ ,  $Y = \text{NH}_2$ ,  $X$  und  $X' = \text{CH}_3$  aufweist, oder deren Salze.

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 25, worin die Verbindung ein Arylenbis(methylketon) ist.

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 25, worin die Verbindung 2-Amino-4-(3,5-Diacetylphenyl)amino-1,6-dimethylpyrimidiniumchlorid ist.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 27, worin das Tier ein Mensch ist.

29. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 28, worin die Infektionskrankheit durch einen Parasiten verursacht wird.

30. Verwendung nach Anspruch 29, worin die Infektionskrankheit Malaria ist.

31. Verwendung eines Antimalariamittels und einer Verbindung, wie sie in einem der Ansprüche 19 bis 25 definiert ist, oder deren Salze, zum Herstellen eines Kombinationspräparats für die gleichzeitige, getrennte oder aufeinanderfolgende Verwendung zum Behandeln oder Verhüten einer Infektionskrankheit in einem Tier.

32. Verwendung nach Anspruch 31, worin die Verbindung ein Arylenbis(methylketon) ist.

33. Verwendung nach Anspruch 31, worin die Verbindung 2-Amino-4-(3,5-diacetylphenyl)amino-1,6-dimethylpyrimidiniumchlorid ist.

34. Verwendung nach einem der Ansprüche 31 bis 33, worin das Tier ein Mensch ist.

35. Verwendung nach einem der Ansprüche 31 bis 34, worin die Infektionskrankheit durch einen Parasiten verursacht wird.

36. Verwendung nach Anspruch 35, worin die Infektionskrankheit Malaria ist.

Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1A

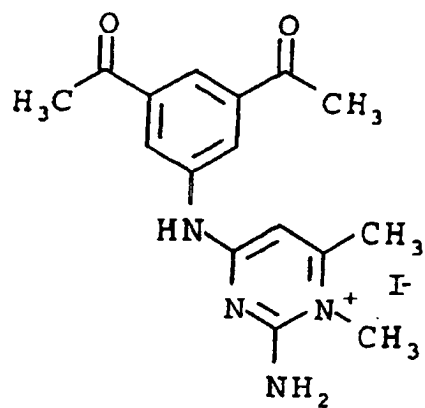


FIG. 1B

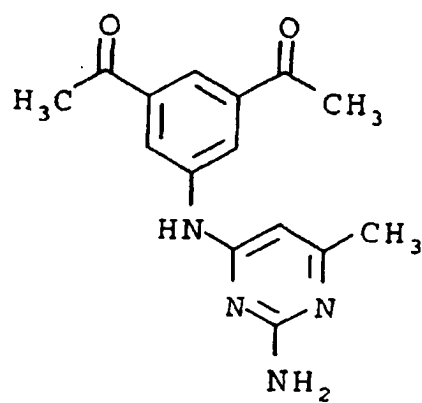
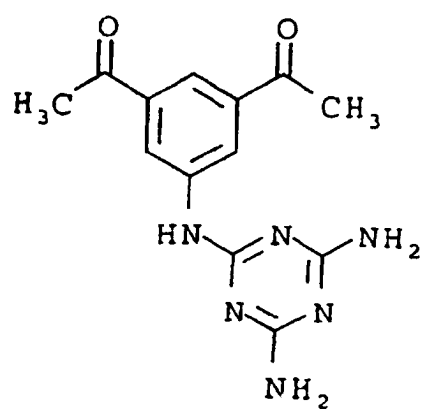


FIG. 1C



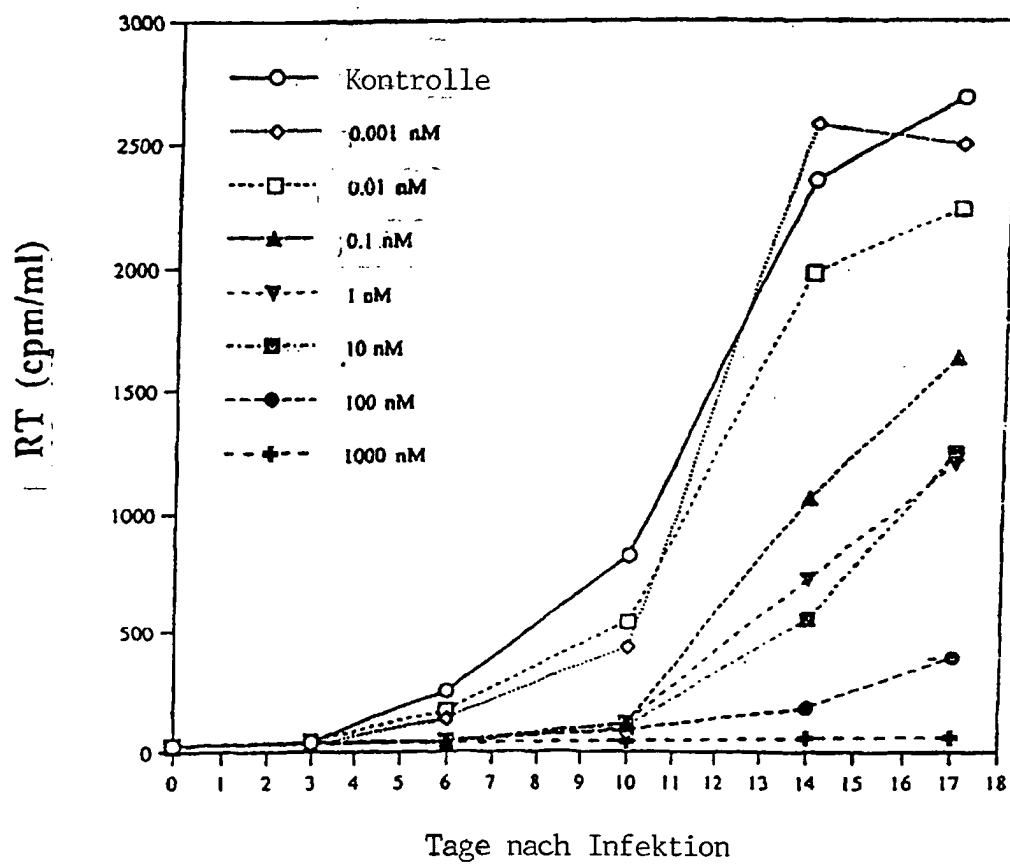


FIG. 2A

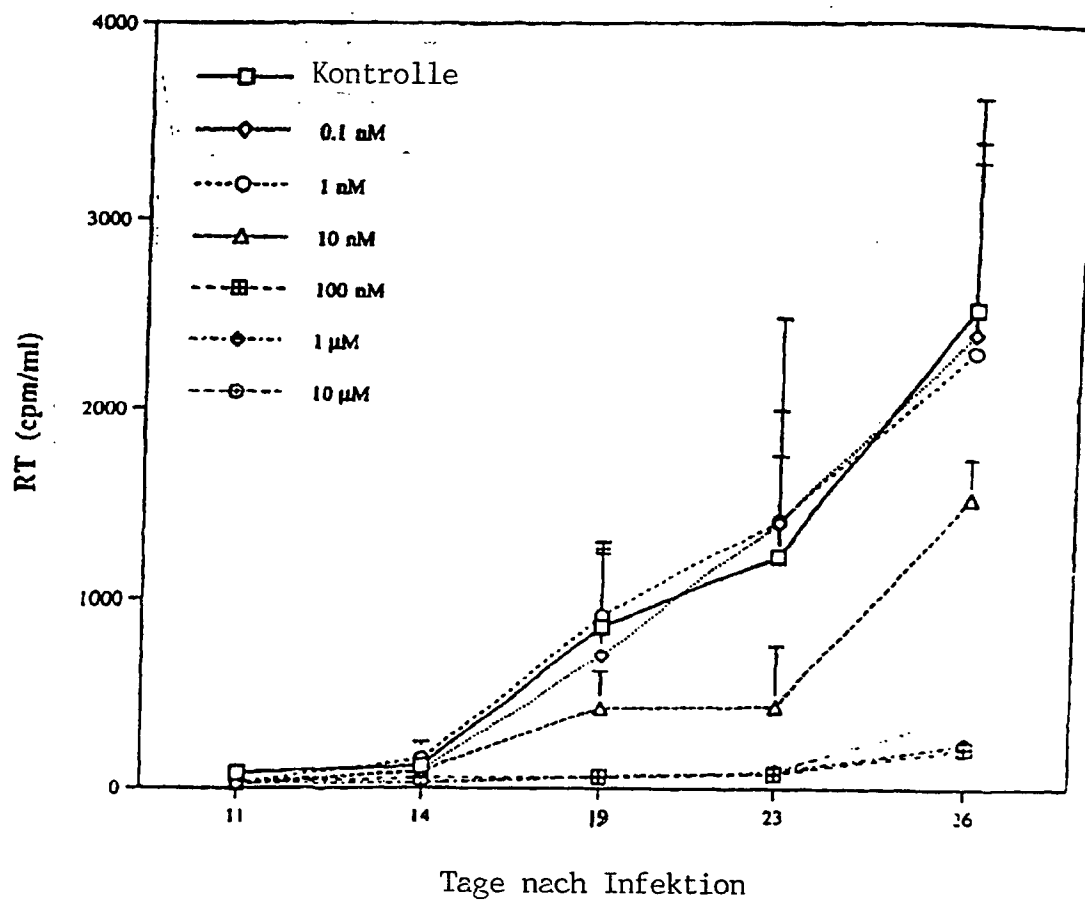


FIG. 2B

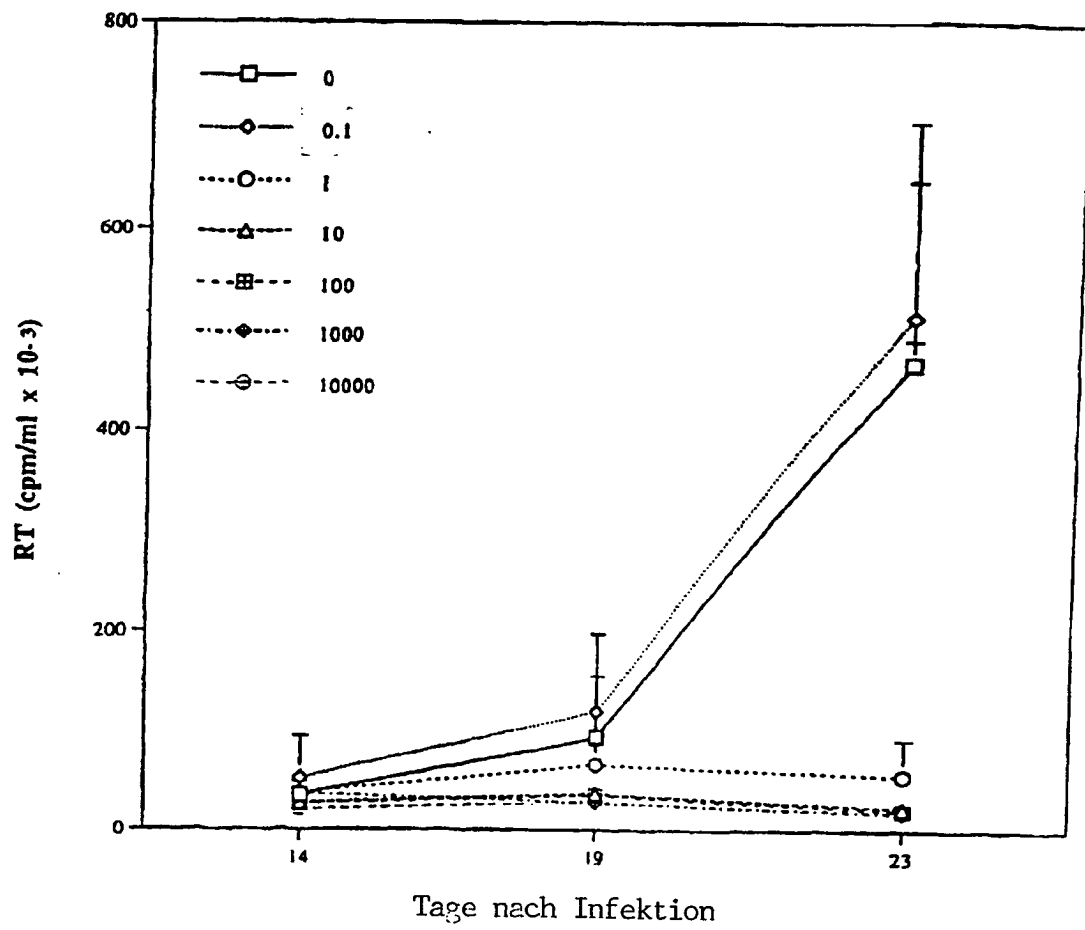


FIG. 2C

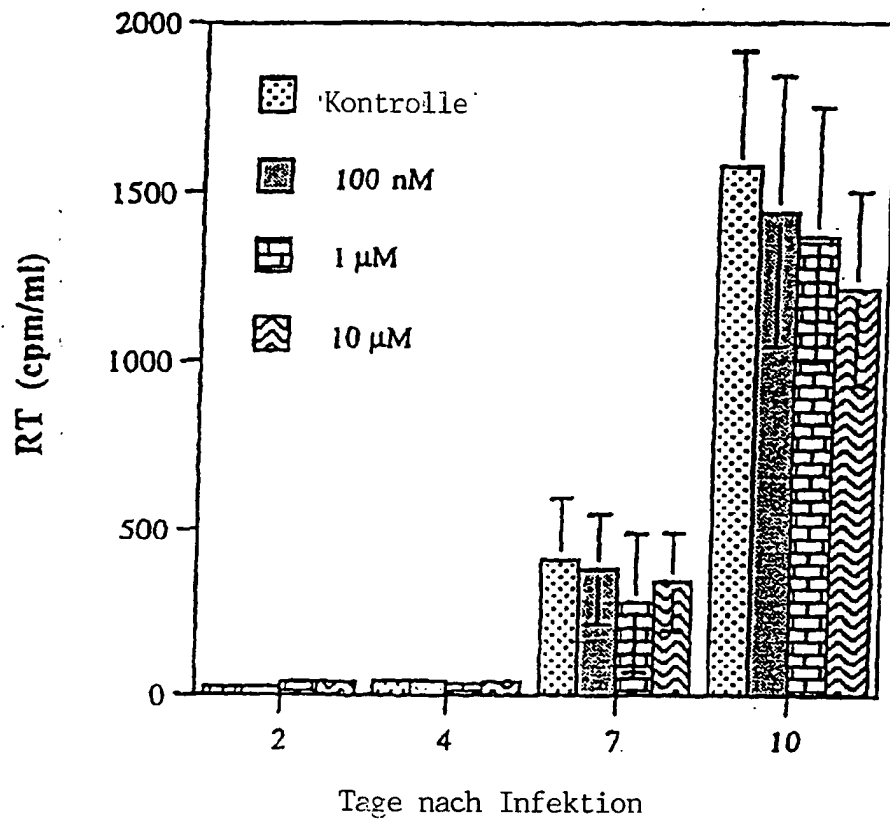


FIG. 3A

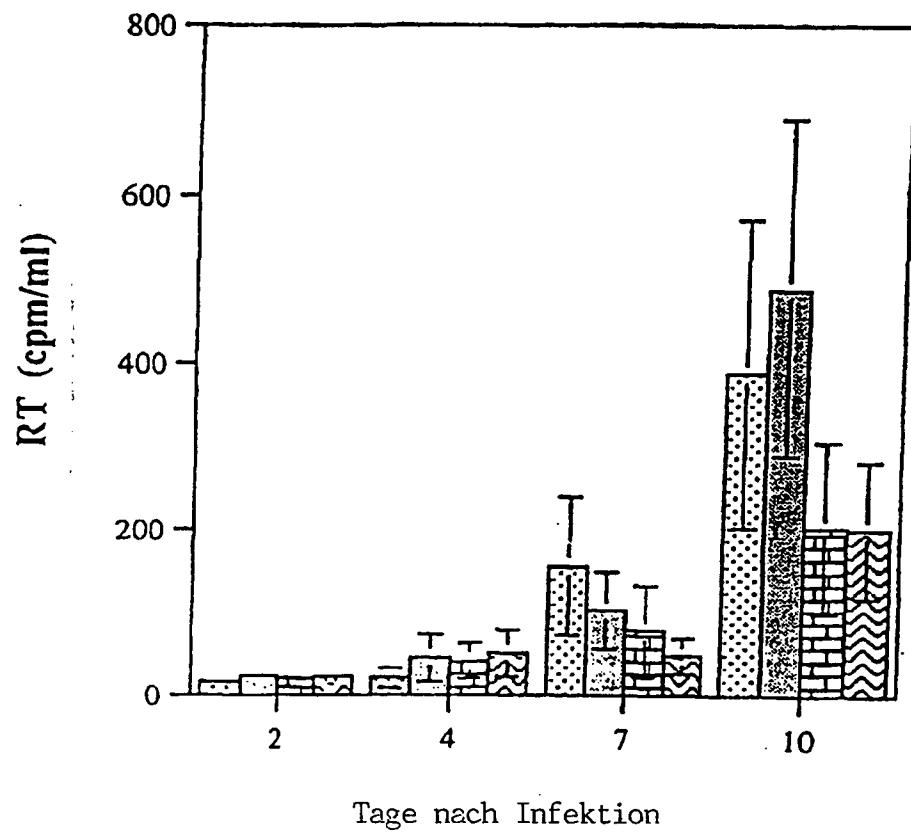


FIG. 3B

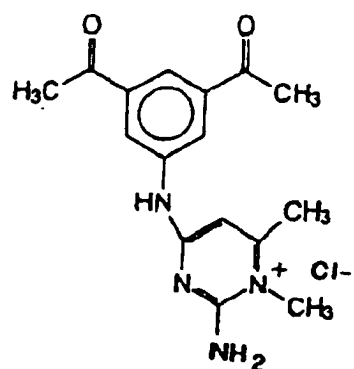


FIG. 4A

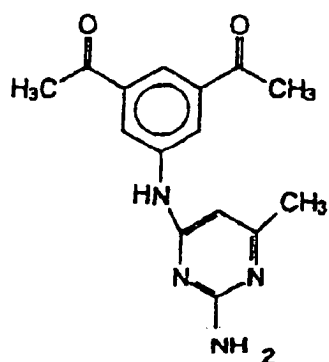


FIG. 4B

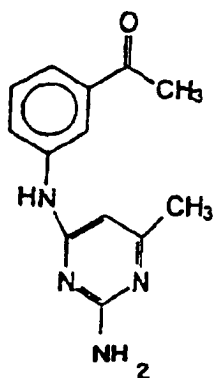


FIG. 4C

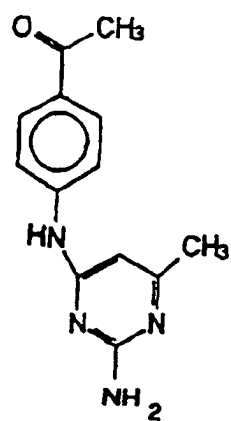


FIG. 4D

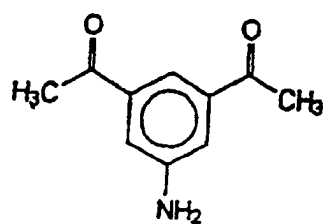


FIG. 4E

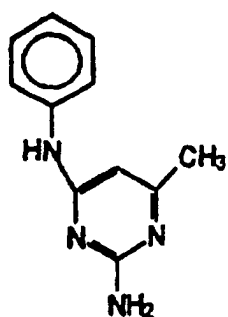


FIG. 4F

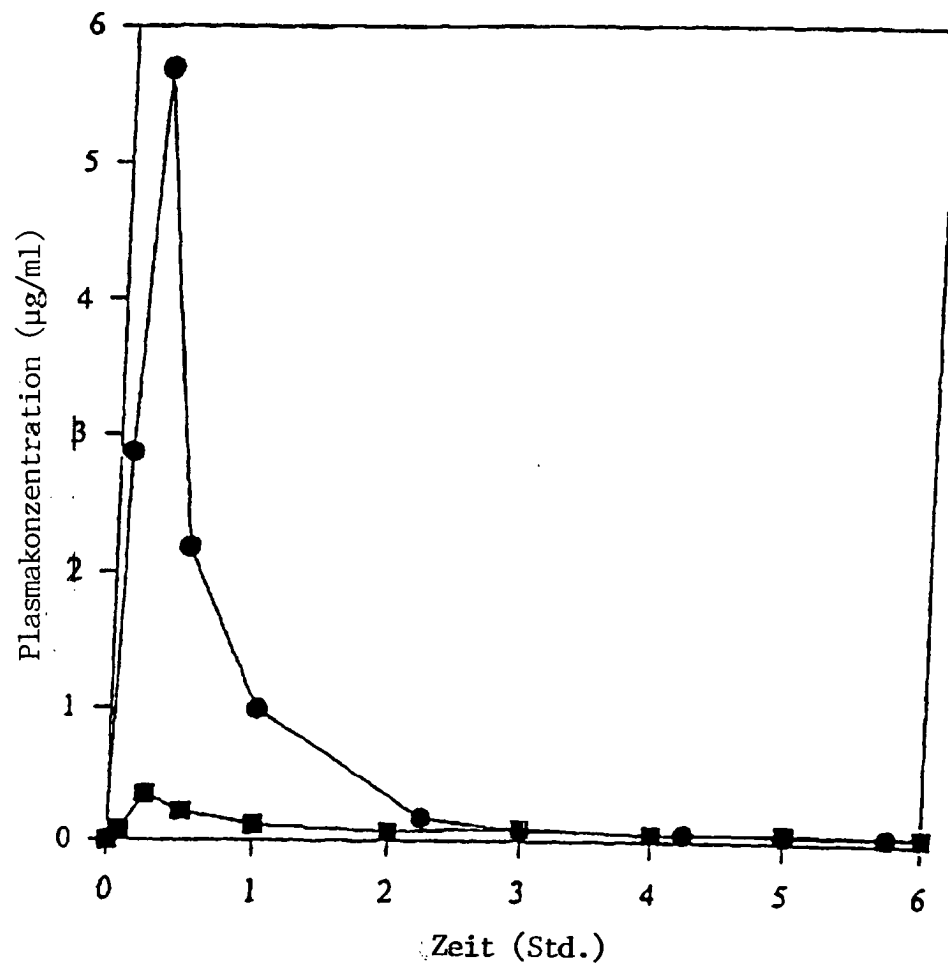


FIG. 5

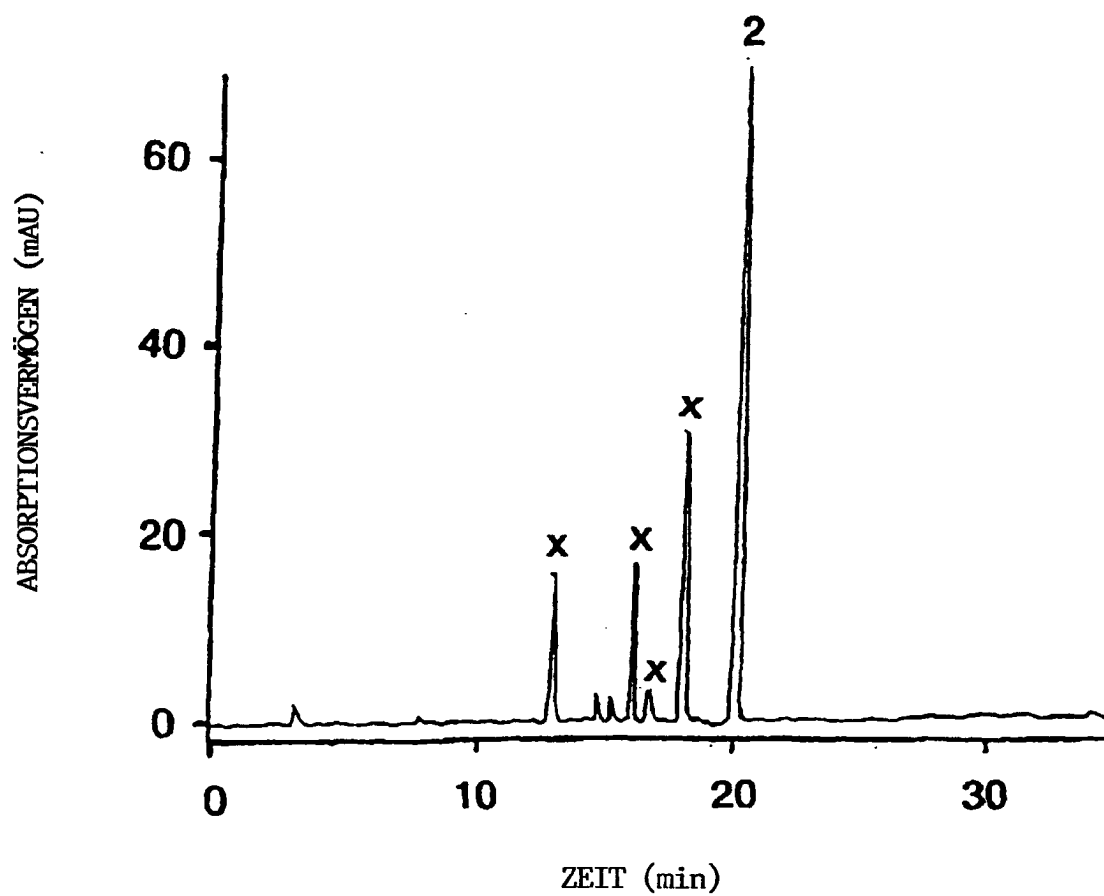


FIG. 6A

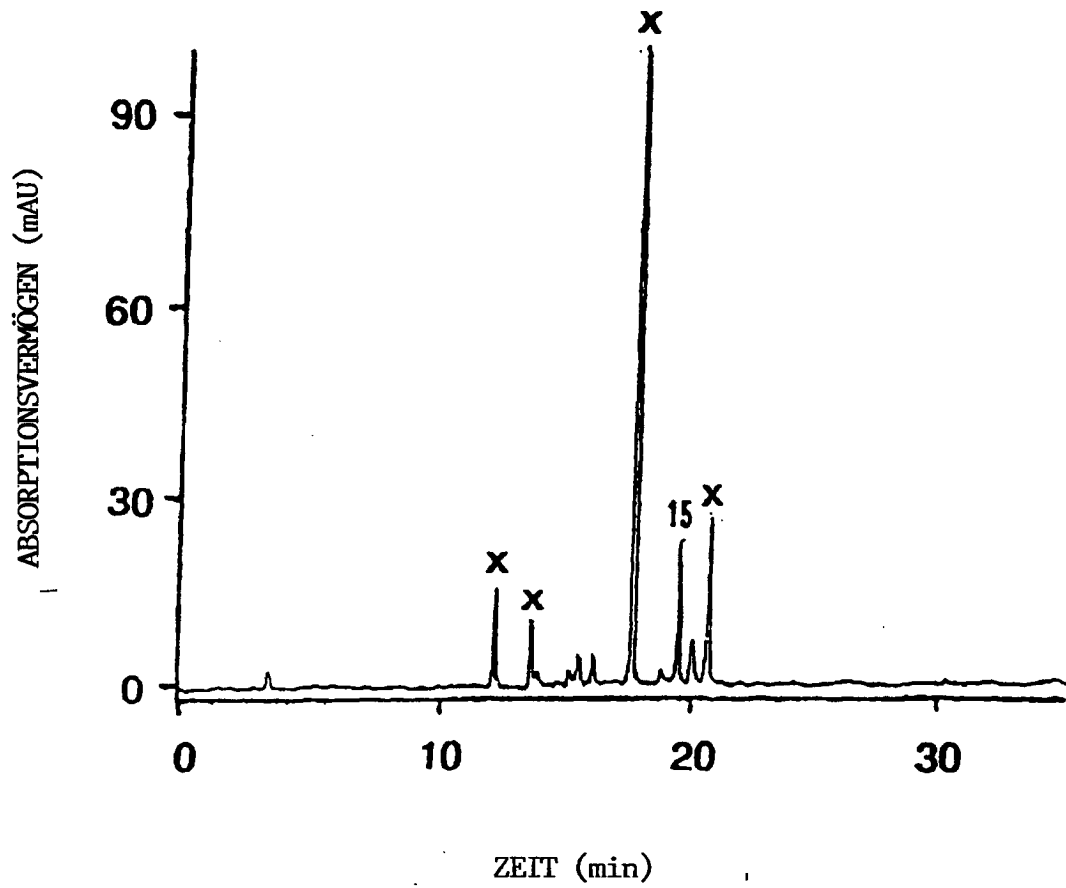


FIG. 6B

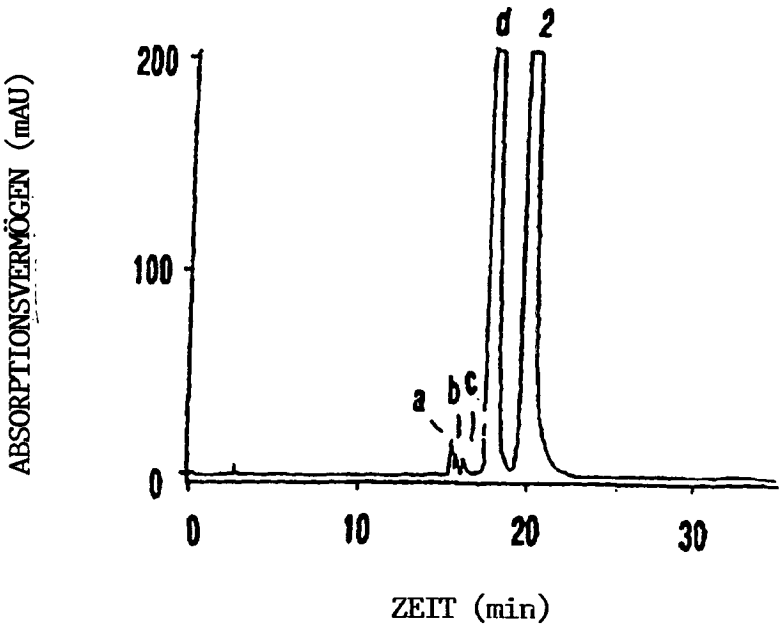


FIG. 7A

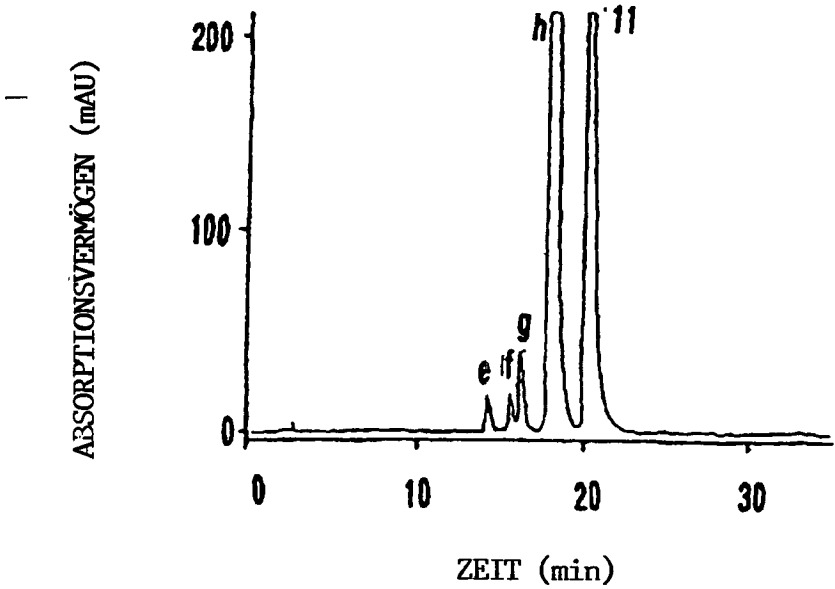


FIG. 7B

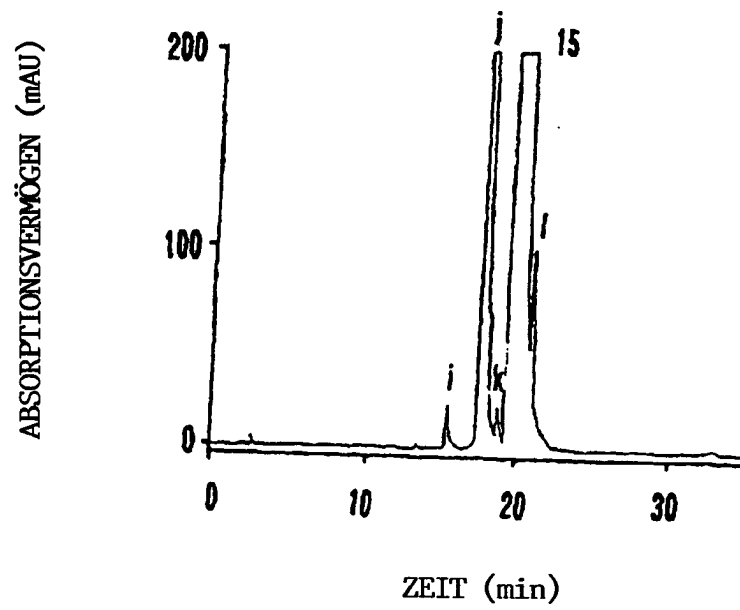


FIG. 7C

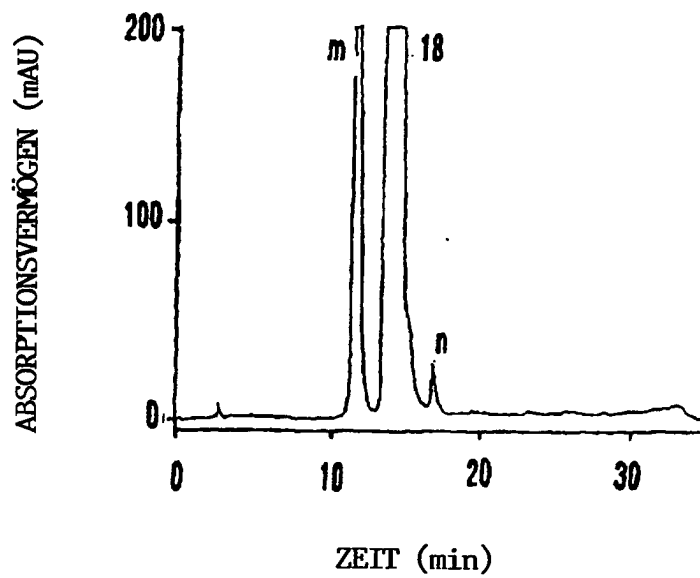


FIG. 7D

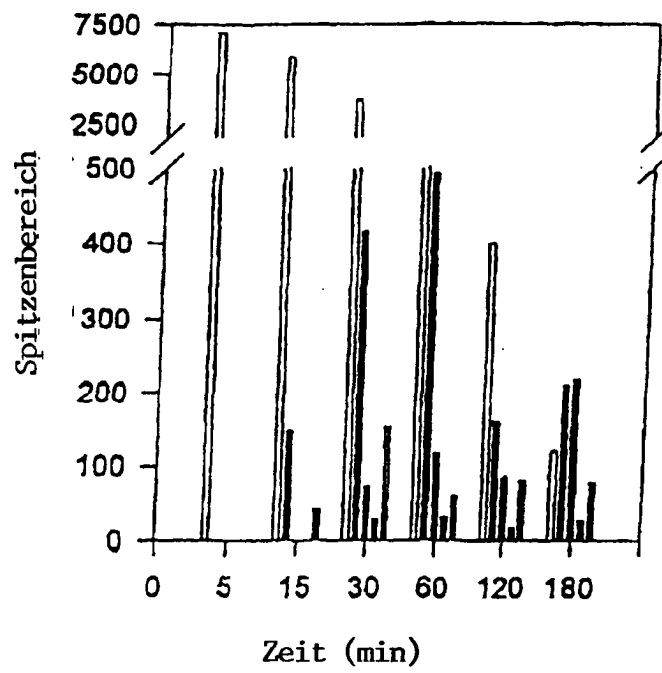


FIG. 8A

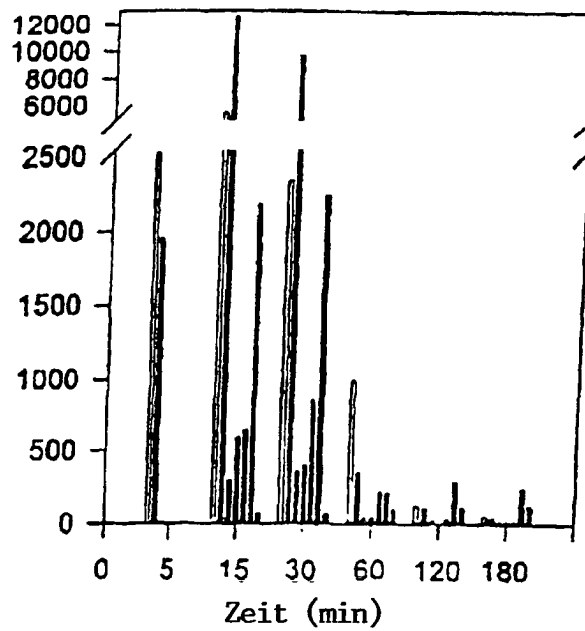


FIG. 8B

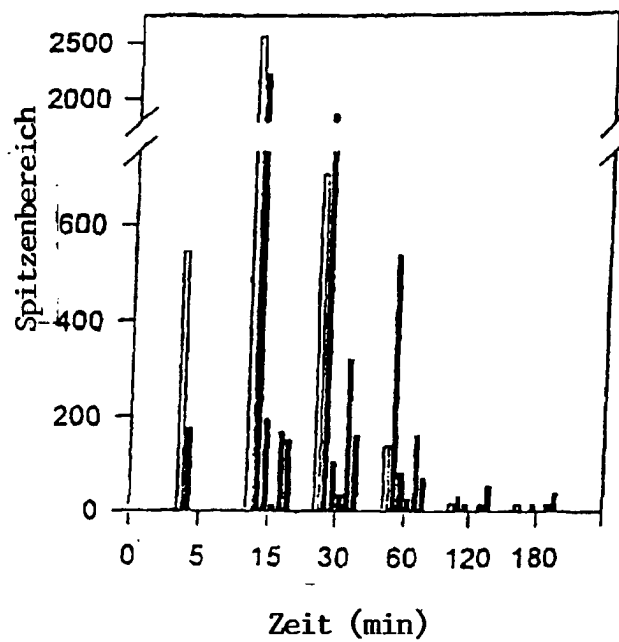


FIG. 8C

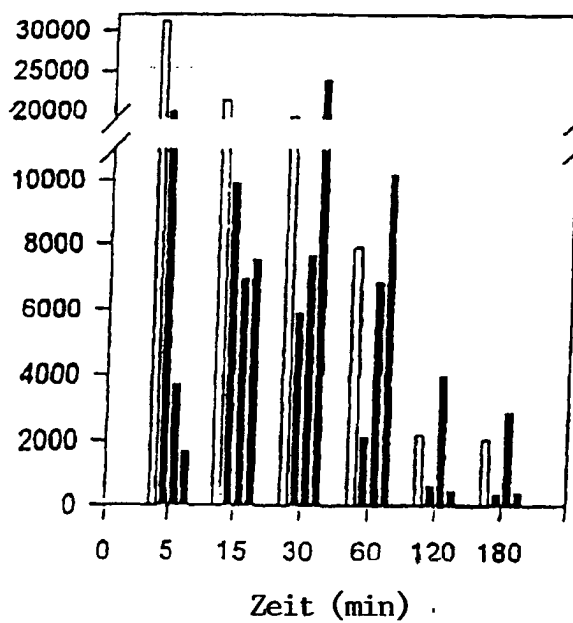


FIG. 8D

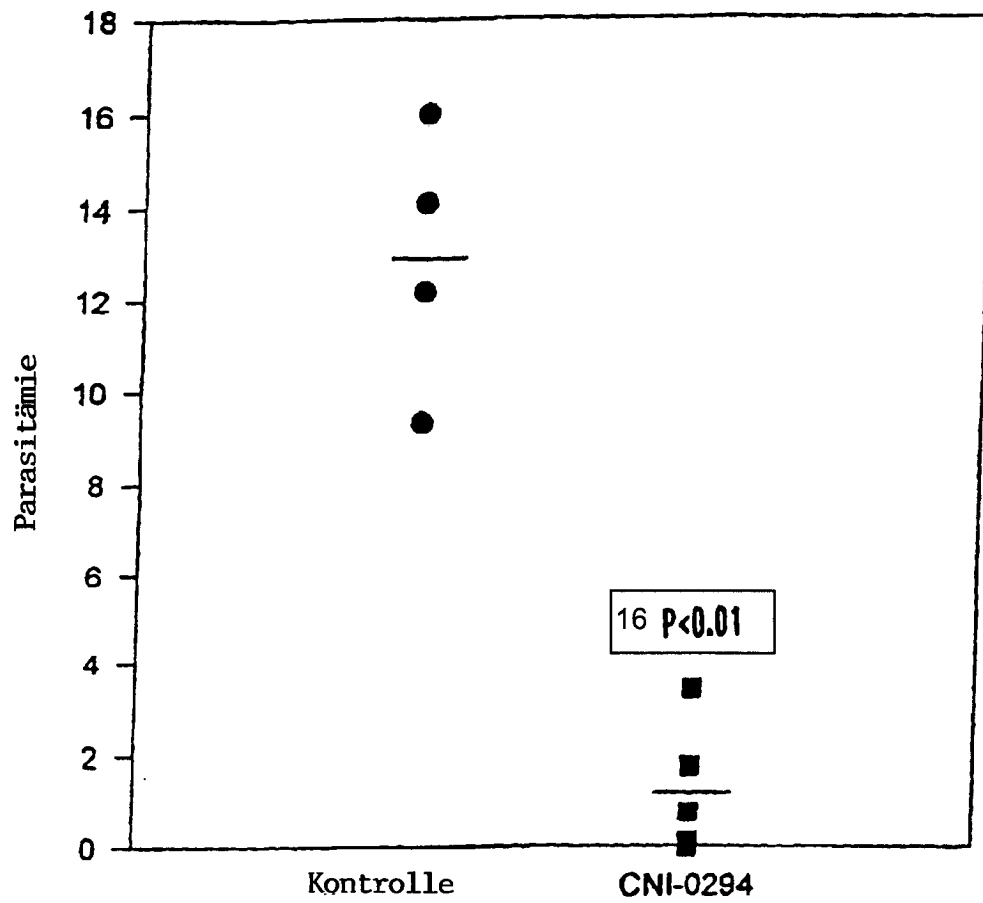


FIG. 9