



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 23 344 T2 2005.05.12

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 973 750 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 23 344.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/03830

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 908 758.0

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 98/038170

(86) PCT-Anmeldetag: 27.02.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 03.09.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 26.01.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 21.04.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 12.05.2005

(51) Int Cl.⁷: C07D 235/20

A61K 31/415, A61K 31/505, A61K 31/495,
A61K 31/42, A61K 31/425

(30) Unionspriorität:

808321 28.02.1997 US

(73) Patentinhaber:

University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, N.C., US; Auburn University, Auburn, Ala., US; Georgia State University, Atlanta, Ga., US

(74) Vertreter:

Freischem und Kollegen, 50667 Köln

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

DYKSTRA, C., Christine, Auburn, US; BOYKIN, David, Atlanta, US; TIDWELL, R., Richard, Pittsboro, US

(54) Bezeichnung: SUBSTITUIERTE BENZIMIDAZOL-DERIVATE UND IHRE VERWENDUNG ZUR BEHANDLUNG RETROVIRALER INFektIONEN

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 eingelebt, 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**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Retroviren und insbesondere Verfahren zur Behandlung retroviraler Infektionen. Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verbindungen, die zur Behandlung retroviraler Infektionen geeignet sind.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Das Genom des typischen Retrovirus kodiert drei primäre Enzyme, welche den Virus-Replikationszyklus vermitteln. Reverse Transkriptase überführt das virale RNA-Genom in eine doppelsträngige DNA. Integrase insertiert diese DNA-Kopie unspezifisch in das Wirtszellen-Genom und Protease spaltet virale Struktur- und Nicht-Strukturproteine in ihre reifen Formen.

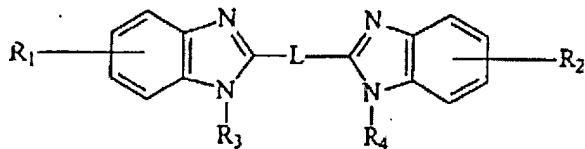
[0003] Ein essentieller Schritt des retroviroalen Lebenszyklus ist die Integration von dessen doppelsträngiger DNA-Kopie in das Wirts-Genom. H. Sakai et al., J. Virol. 67: 1169 (1993). Dieser Prozess erfordert Schritte zur Erkennung hochkonservierter Sequenzen und zur Spaltung. Aus diesem Grund sollte ein Heilmittel, das diesen Prozess unterbrechen kann, ein effektives und spezifisches anti-virales Mittel sein. Ein Protein am C-Terminus der viralen Polymerase, Integrase (IN), ist das einzige virale Protein, das für diesen Prozess erforderlich ist. R. La-Femina et al., J. Virol. 66: 7414 (1992).

[0004] A. Fesen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2399 (1993) diskutieren Untersuchungen, bei denen ein In-vitro-Integrase-Assay einer Auswahl von Chemikalien, als potentielle Human Immundefizienz-Virus Typ I (HIV-1) Integrase-Hemmer, verwendet wurde. Der Artikel berichtet über verschiedene Topoisomerase-Hemmer, wie Doxorubicin, Mitoxantrose, Ellipticine und Quercetin, als potente Hemmer. Während einige Topoisomerase-Hemmer exzellente Anti-Integrase-Mittel waren, wurde kein Zusammenhang mit antiviralen Effekten beobachtet. Man geht davon aus, dass dies zumindest teilweise auf der Tatsche beruht, dass eine Anzahl von Topoisomerase-Hemmern, in Abhängigkeit von ihrem Hemmungs-Mechanismus, ernste zytotoxische Wirkung besitzen.

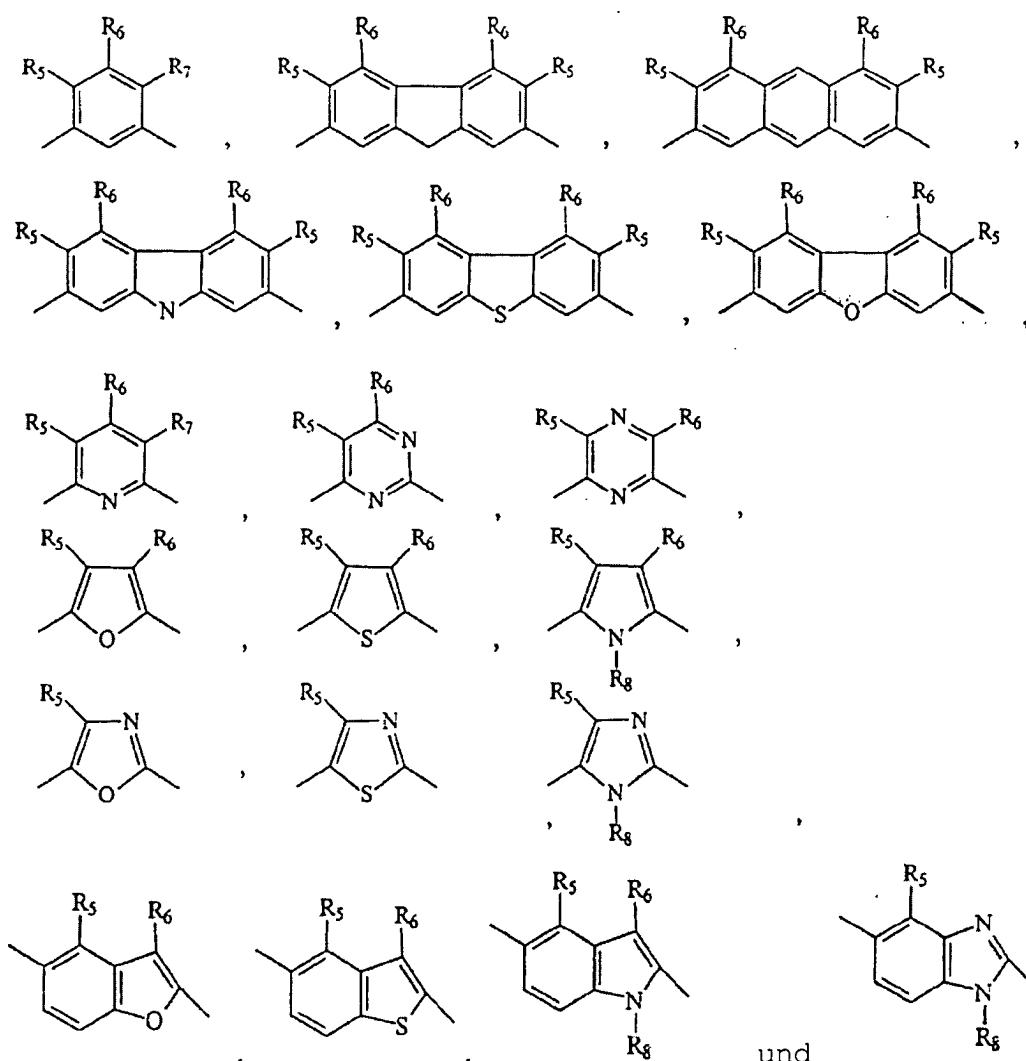
[0005] R. LaFemina et al., J. Virology 56: 7414 (1992) berichten über Untersuchungen zur Bewertung der Brauchbarkeit des Integrase-Enzyms als ein Ziel für spezifische anti-virale HIV-1-Heilmittel, indem dessen absoluter Erfordernis für produktive HIV-1-Infektionen bestimmt wurde. Der Artikel berichtet über die Ergebnisse der Einführung spezifischer Aminosäure-Substitution in rekombinante Integrase und bewertet die Befähigung der mutanten Proteine spezifische und nicht-spezifische Spaltung wie auch Integration ordnungsgemäß zu vermitteln.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] Als ersten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Verbindung der Formel I:

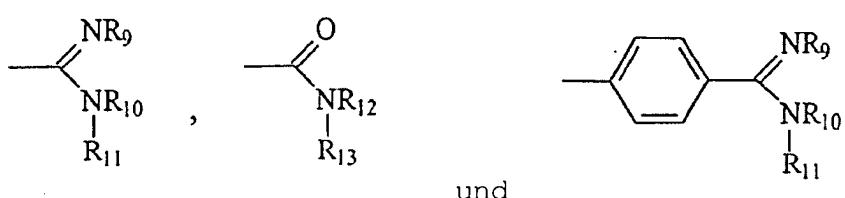


oder eines ihrer pharmazeutisch verträglichen Salze zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer retroviralen Infektion bei einem Subjekt, worin L eine Verbindungsgruppe der folgenden Formel ist:

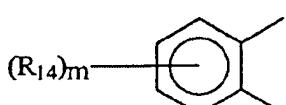


R_5 , R_6 , R_7 und R_8 sind jeweils individuell H, Alkyl, Halo, Aryl, Arylalkyl, Aminoalkyl, Aminoaryl, Oxoalkyl, Oxoaryl, oder Oxoarylalkyl;

R_1 und R_2 sind jeweils individuell



R_9 und R_{10} sind jeweils individuell H, Hydroxyl, Alkyl oder R_9 und R_{10} bilden zusammen $-(CH_2)_n-$, worin n 2, 3 oder 4 und



ist,

worin m 1, 2 oder 3 ist und R_{14} H oder $-CONHR_{15}NR_{16}R_{17}$ ist, worin R_{15} lineares, verzweigtes oder zyklisches C₁- bis C₈-Alkyl ist und R_{16} und R_{17} jeweils unabhängig voneinander H oder lineares, verzweigtes oder zyklisches C₁- bis C₈-Alkyl sind;

R_{11} ist H oder Alkyl;

R_{12} ist H oder Alkyl;

R_{13} ist Alkyl, Alkylamino, Alkylmorpholino und Alkylaminophenyl und

R_3 und R_4 sind jeweils individuell H, Alkyl und Alkoxy;

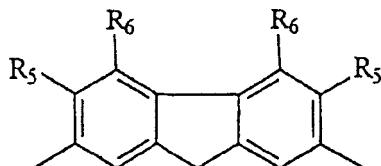
worin jede der Alkylgruppen, die gleich oder verschieden sein können, ein lineares, verzweigtes oder zyklis-

sches C₁- bis C₈-Alkyl ist und ausgewählt ist aus den Gruppen, bestehend aus Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Cyclopropyl, n-Butyl, Isobutyl, tert-Butyl, Cyclobutyl, Pentyl, Isopentyl, Cyclopentyl, Hexyl, Isohexyl, Cyclohexyl, Septyl, Isoseptyl, Octyl und Isooctyl, und jede der Arylgruppen, die gleich oder verschieden sein können, ein 5- bis 6-gliedriger Kohlenwasserstoff- oder heterozyklischer aromatischer Ring ist und ausgewählt ist aus den Gruppen, bestehend aus Cyclopentadienyl, Phenyl, Furan, Thiophen, Pyrrol, Pyran, Pyridin, Imidazol, Isothiazol, Isoxazol, Pyrazol, Pyrazin und Pyrimidin, und jede der Alkoxygruppen, die gleich oder verschieden sein können, eine lineare oder verzweigte C₁- bis C₈-Alkoxygruppe ist und ausgewählt ist aus den Gruppen, bestehend aus Methoxy, Ethoxy, Propoxy, Isopropanoxy, Butoxy, Isobutoxy, t-Butoxy, Pentoxy, Hexoxy und Octoxy.

[0007] Als zweiten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung irgendeiner der Verbindungen: 2,5-bis(5-Amidino-2-benzimidazolyl)pyrrol; 2,5-bis[5-(2-Imidazolinyl)-2-benzimidazolyl]pyrrol; 2,6-bis[5-(2-Imidazolinyl)-2-benzimidazolyl]pyridin; 1-Methyl-2,5-bis(5-amidino-2-benzimidazolyl)pyrrol; 1-Methyl-2,5-bis[5-(2-imidazolyl)-2-benzimidazolyl]pyrrol; 1-Methyl-2,5-bis[5-(1,4,5,6-tetrahydro-2-pyrimidinyl)-2-benzimidazolyl]pyrrol; 2,6-bis(5-Amidino-2-benzimidazolyl)pyridin; 2,6-bis[5-(1,4,5,6-Tetrahydro-2-pyrimidinyl)-2-benzimidazolyl]pyridin; 2,5-bis(5-Amidino-2-benzimidazolyl)furan; 2,5-bis[5-(2-Imidazolinyl)-2-benzimidazolyl]furan oder 2,5-bis(5-N-Isopropylamidino-2-benzimidazolyl)furan und deren physiologisch verträgliche Salze zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer retroviroalen Infektion bei einem Subjekt.

[0008] Bevorzugt ist diese retrovirale Infektion eine HIV-Infektion.

[0009] Als dritten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Verbindung der Formel I bereit, wie sie in Anspruch 1 definiert ist, worin L die folgende Verbindungsgruppe ist:



und R₁ bis R₁₃ wie in Anspruch 1 definiert sind.

[0010] Die vorangehenden und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung werden in der detaillierten Beschreibung und den unten dargelegten Beispielen ausführlich erklärt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

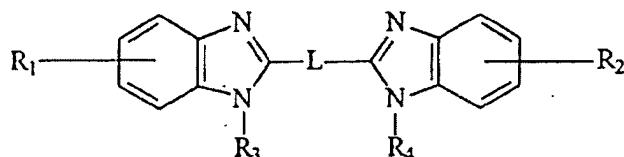
[0011] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "Alkyl" auf lineares, verzweigtes oder zirkuläres C₁- bis C₈-Alkyl. Spezifische Beispiele für Alkylgruppen im Geltungsbereich der vorliegenden Erfindung schließen ein, sind aber nicht begrenzt auf, Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Cyclopropyl, n-Butyl, Isobutyl, tert-Butyl, Cyclobutyl, Pentyl, Isopentyl, Cyclopentyl, Hexyl, Isohexyl, Cyclohexyl, Septyl, Isoseptyl, Octyl und Isooctyl und der gleichen. Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "Alkadienyl" auf ungesättigtes lineares oder verzweigtes C₂- bis C₈-Alkyl. Spezifische Beispiele für "Alkadienyl"-Gruppen innerhalb des Geltungsbereichs der vorliegenden Erfindung schließen ein, sind aber nicht begrenzt auf, Ethadienyl, 1-Propadienyl, 2-Propadienyl, 1-Butadienyl, 2-Butadienyl, 1,3-Butadienyl, 1-Hexadienyl, 1,3-Hexadienyl, 2-Hexadienyl, 2,4-Hexadienyl und der gleichen. Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "Aryl" auf 5- und 6-gliedrige Kohlenwasserstoff- und heterozyklische aromatische Ringe. Spezifische Beispiele von Arylgruppen schließen ein, sind aber nicht begrenzt auf, Cyclopentadienyl, Phenyl, Furan, Thiophen, Pyrrol, Pyran, Pyridin, Imidazol, Isothiazol, Isoxazol, Pyrazol, Pyrazin, Pyrimidin und der gleichen. Der Begriff "Alkoxy", wie er hierin verwendet wird, betrifft lineare oder verzweigte C₁- bis C₈-Alkoxygruppen. Spezifische Beispiele für Alkoxygruppen innerhalb des Geltungsbereichs der vorliegenden Erfindung schließen ein, sind aber nicht begrenzt auf, Methoxy, Ethoxy, Propoxy, Isopropanoxy, Butoxy, Isobutoxy, t-Butoxy, Pentoxy, Hexoxy und Octoxy und der gleichen.

[0012] Subjekte, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen behandelt werden können,

schließen tierische Subjekte und typischerweise Wirbeltiere ein. Noch spezifischer können die Subjekte sowohl Säugetiere (z. B. Mensch, Katze, Hund, Kuh, Pferd, Schaf, Schwein, Affe, Menschenaffe, Ratte, Maus, Kaninchen etc.) als auch Vogel-Subjekte (z. B. Huhn, Truthahn, Ente, Gans, Wachtel, Fasan etc.) einschließen.

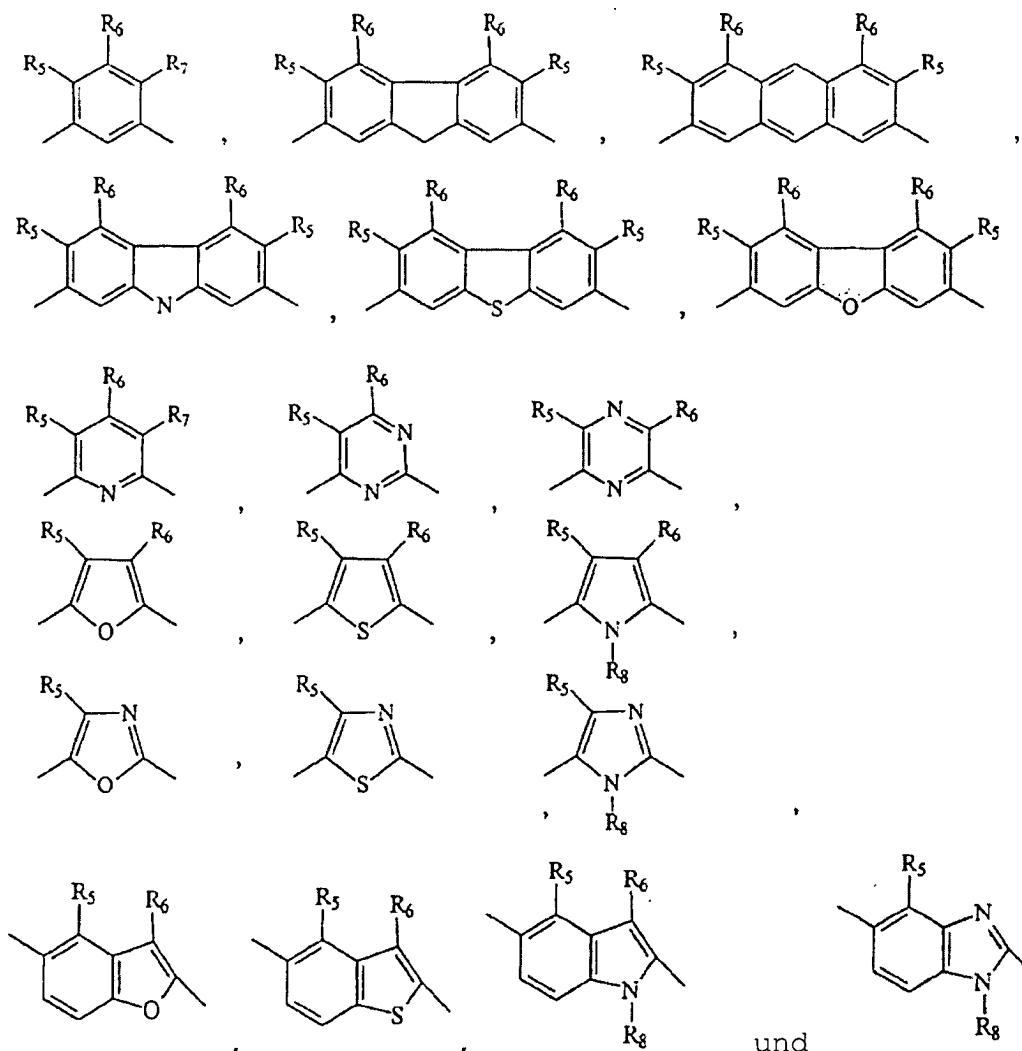
[0013] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können zur Behandlung verschiedener Retroviren, d. h. der gesamten Retroviren-Virusfamilie, eingesetzt werden. Die Familie umfasst alle Viren, welche ein RNA-Genom enthalten und eine RNA-abhängige enzymatische DNA-Polymerase-Aktivität (reverse Transkriptase) besitzen. Die Familie ist in drei Unterfamilien geteilt: (1) Oncoviren, einschließlich aller onkogener Mitglieder und vieler eng verwandter nicht-onkogener Viren; (2) Lentiviren, die "langsam" Viren, wie Visnavirus und (3) Spumaviren, die "foamy"-Viren, welche persistente Infektionen ohne jegliche klinische Krankheit induzieren. Interessierende Retroviren schließen menschliche Retroviren wie Human-Immundefizienz-Virus Typ-I (HIV-1), Vogel-Retroviren wie Vogel-Sarkom- und Leukose-Viren von Hühnern (ASLVs), endogene Viren bestimmter Fasan- und Wachtel-Spezies, Retikuloendothelose-Viren von Truthähnen und verwandte Viren von Enten und Hühner, und Viren der lymphoproliferativen Erkrankung von Truthähnen; Katzen-C-Typ-Retroviren, einschließlich Katzen-Leukämie-Virus (FeLV) und Katzen-Sarkom-Virus (FeSV) und endogene Retroviren (RD114 und CCC Isolate); Nerz-C-Typ-Retroviren einschließlich Nerz-Leukämie-Virus (MiLV); Schweine-C-Typ-Retroviren; Pferde-C-Typ-Retroviren einschließlich des infektiösen Anämie-Virus (EIAV); Rinder-C-Typ-Retroviren, einschließlich enzootischer Rinder-Leukose oder Lymphosarkom; Schaf-C-Typ-Retroviren und Primat-Retroviren, einschließlich Halbaffen-C-Typ-Retroviren, Simian-Sarkom- und Gibbonaffen-Leukämie-C-Typ-Retroviren, Pavian-C-Typ-Retroviren, Makak-C-Typ-Retroviren, Eulenaffe-C-Typ-Retroviren, Colobus-Affe-C-Typ-Retroviren, Mason-Pfizer-Affen-D-Typ-Retrovirus, Langur-D-Typ- und Totenkopfaffe-D-Typ-Retrovirus. Siehe N. Teich, Taxonomy of Retroviruses in MOLECULAR BIOLOGY OF TUMOR VIRUSES, R. Weiss et al. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, New York (Zweite Ausgabe, 1984), Seiten. 26–207,

[0014] Die vorliegende Erfindung schließt die Verwendung einer Verbindung der Formel I:



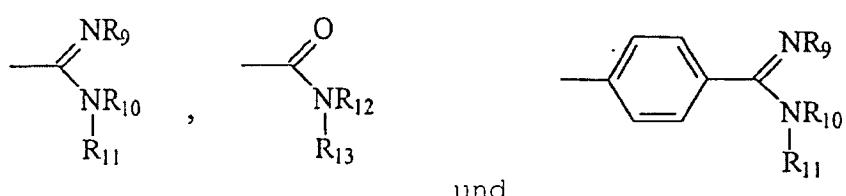
oder eines ihrer pharmazeutisch verträglichen Salze zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer retroviralen Infektion bei einem Subjekt ein.

[0015] Worin L eine Verbindungsgruppe ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

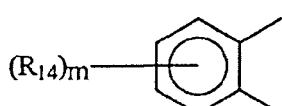


R_5 , R_6 , R_7 und R_8 sind jeweils individuell H, Alkyl, Halo, Aryl, Arylalkyl, Aminoalkyl, Aminoaryl, Oxoalkyl, Oxoaryl, oder Oxoarylalkyl;

R_1 und R_2 sind jeweils individuell



R_9 und R_{10} sind jeweils individuell H, Hydroxyl, Alkyl oder R_9 und R_{10} bilden zusammen $-(CH_2)_n-$, worin n 2, 3 oder 4 und



ist,

worin m 1, 2 oder 3 ist und R_{14} H oder $-CONHR_{15}NR_{16}R_{17}$ ist, worin R_{15} lineares, verzweigtes oder zyklisches C_1 - bis C_8 -Alkyl ist und R_{16} und R_{17} jeweils unabhängig voneinander H oder lineares, verzweigtes oder zyklisches C_1 - bis C_8 -Alkyl sind;

R_{11} ist H oder Alkyl;

R_{12} ist H oder Alkyl;

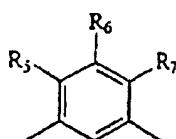
R_{13} ist Alkyl, Alkylamino, Alkylmorpholino und Alkylaminophenyl und

R_3 und R_4 sind jeweils individuell H, Alkyl und Alkoxy;

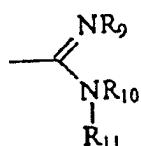
worin jede der Alkylgruppen, die gleich oder verschieden sein können, ein lineares, verzweigtes oder zyklische

sches C₁- bis C₈-Alkyl ist und ausgewählt ist aus den Gruppen, bestehend aus Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Cyclopropyl, n-Butyl, Isobutyl, tert-Butyl, Cyclobutyl, Pentyl, Isopentyl, Cyclopentyl, Hexyl, Isohexyl, Cyclohexyl, Septyl, Isoseptyl, Octyl und Isooctyl,
und jede der Arylgruppen, die gleich oder verschieden sein können, ein 5- bis 6-gliedriger Kohlenwasserstoff- oder heterozyklischer aromatischer Ring ist und ausgewählt ist aus den Gruppen, bestehend aus Cyclopenta dienyl, Phenyl, Furan, Thiophen, Pyrrol, Pyran, Pyridin, Imidazol, Isothiazol, Isoxazol, Pyrazol, Pyrazin und Pyrimidin,
und jede der Alkoxygruppen, die gleich oder verschieden sein können, eine lineare oder verzweigte C₁- bis C₈-Alkoxygruppe ist und ausgewählt ist aus den Gruppen, bestehend aus Methoxy, Ethoxy, Propano, Isopropano, Butoxy, Isobutoxy, t-Butoxy, Pentoxy, Hexoxy und Octoxy.

[0016] Bevorzugte Verbindungen der Formel I schließen Verbindungen ein, worin L ist:



und R₁ und R₂ jeweils

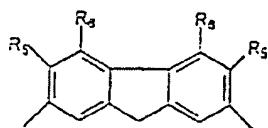


sind,

worin R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₉, R₁₀ und R₁₁ wie folgt definiert sind:

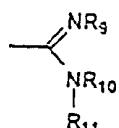
R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₉	R ₁₀	R ₁₁
H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	-(CH ₂) ₂ -	H	H
H	H	H	H	H			
H	H	H	H	H	H	H	Isopropyl
H	H	H	H	H	H	H	Isobutyl
H	H	H	H	H	H	H	Cyclopentyl
H	H	H	H	H	H	H	Cyclopropyl

[0017] Eine andere bevorzugte Verbindung der Formel I ist die Verbindung worin L



ist

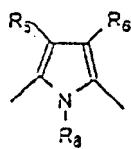
und R₁ und R₂ jeweils



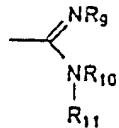
sind,

worin R₃, R₄, R₅, R₆, R₉ und R₁₀ jeweils H sind und R₁₁ Isopropyl ist.

[0018] Andere bevorzugte Verbindungen der Formel I schließen jene Verbindungen ein, worin L



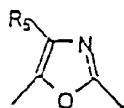
ist
und R₁ und R₂ jeweils



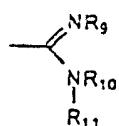
sind,
worin R₃, R₄, R₅, R₆, R₈, R₉, R₁₀ und R₁₁ wie folgt definiert sind:

R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀	R ₁₁
H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	CH ₃	H	H	H
H	H	H	H	H	H	- (CH ₂) ₂ -		H
H	H	H	H	H	CH ₃	- (CH ₂) ₂ -		H
H	H	H	H	H	H	H	H	Isopropyl
H	H	H	H	H	CH ₃	H	H	Isopropyl
H	H	H	H	H	H	H	H	Cyclopentyl
H	H	H	H	H	CH ₃	H	H	Cyclopentyl

[0019] Weitere bevorzugte Verbindungen der Formel I schließen Verbindungen ein, worin L



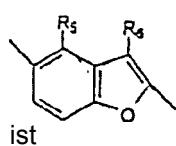
ist
und R₁ und R₂ jeweils



sind,
worin R₃, R₄, R₅, R₉, R₁₀ und R₁₁ wie folgt definiert sind:

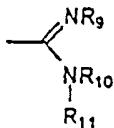
R ₃	R ₄	R ₅	R ₉	R ₁₀	R ₁₁
H	H	H	H	H	H
H	H	H	- (CH ₂) ₂ -		H
H	H	H	H	H	Isopropyl
H	H	H	H	H	Cyclopentyl

[0020] Eine andere Gruppe bevorzugter Verbindungen schließt die Verbindungen der Formel I ein, worin L



ist

und R₁ und R₂ jeweils



sind.

[0021] Worin R₃, R₄, R₅, R₆, R₉, R₁₀ und R₁₁ wie folgt definiert sind:

R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₉	R ₁₀	R ₁₁
H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	-(CH ₂) ₂ -		H
H	H	H	H	H	H	Isopropyl
H	H	H	H	H	H	Cyclopentyl

[0022] Einzelne der Verbindungen der Formel I sind im Stand der Technik bekannt und können in Übereinstimmung mit früher beschriebenen Verfahren synthetisiert werden.

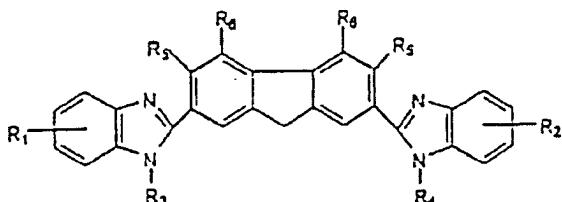
[0023] Gemäß einem Verfahren können die Verbindungen der Formel I hergestellt werden, indem ein geeigneter Dicarboxaldehyd (zum Beispiel Pyrrol-2,5-dicarboxaldehyd) einer heterozyklischen Verbindung (d. h. Pyrrol, Pyridin, Furan etc.), welcher gemäß der Lehre von T. Cresp et al., J. Chem. Soc. Perkins Tran. 1: 2961 (1973) hergestellt wird, mit der geeigneten Diaminophenylverbindung (zum Beispiel Diaminobenzamidin, hergestellt gemäß T. Fairley et al., Med. Chem, 36: 1746 (1993)), kondensiert wird. Die Kondensationsreaktion kann gemäß des Verfahrens von S. Kumar et al. Indian J. Chem 20B: 254–(1981) durchgeführt werden.

[0024] Die Diaminophenylverbindungen können beispielsweise durch Reduktion der Nitrogruppen des 3,4-Dinitrobrombenzols hergestellt werden, um 3,4-Diaminobrombenzol zu erhalten. Nitrilierung dieser Verbindung zum korrespondierenden 3,4-Diaminonitrilbenzol kann mittels Umsetzung von Kupfer-(I)-Cyanid mit dem auf diese Weise hergestellten 3,4-Dinitrobrombenzol in zum Rückfluss erhitzten DMF, gemäß der Standardverfahren, durchgeführt werden. Siehe J. Spyrala et al., European J. Med. Chem. 29: 363 (1994). Das Nitril kann dann mittels Pinner-Methodik, gemäß B. Das et al., J. Med. Chem. 20: 1219 (1977), in den Imidatester überführt werden. Der Imidatester kann in die Verbindungen der Formel (I) überführt werden, beispielsweise durch Reaktion mit Ammonium oder dem geeigneten Aminoalkan oder Diaminoalkan (wie Ethylendiamin, Propylendiamin etc.), um eine Amidinogruppe, eine Imidazolinylgruppe beziehungsweise eine 1,4,5,6-Tetrahydro-2-pyrimidinylgruppe zu bilden.

[0025] Das bis-Nitril kann auch durch direkte Fusion des Nitrils mit dem Hydrochloridsalz des geeigneten Diamins mittels Thermolyse in die bis-dikationische Verbindung überführt werden. Diese Technik ist insbesondere für die Herstellung von Verbindungen geeignet, worin die R₁- und R₂-Gruppen zusammen ein zyklisches Alkyl bilden.

[0026] Die Verbindungen obiger Formel I können auch hergestellt werden, indem zuerst ein geeignetes Zwischenprodukt, wie 2,5-bis(5-Brom-2-benzimidazolyl)pyrrol mittels basengestützter Kondensation, beispielsweise von 1-Brom-3,4-diaminobenzol und Pyrrol-2,5-dicarboxaldehyd gemäß des Verfahrens von S. Kumar et al., supra, hergestellt wird. Das Zwischenprodukt kann dann mittels Nitrilierung, gefolgt von Imidatesterbildung und Überführung in die korrespondierende Amidinoverbindung, wie oben beschrieben, erhalten werden.

[0027] Die Verbindungen der Formel I, die eine Fluoren-Verbindungsgruppe (L) besitzen, d. h. Verbindungen der Formel:



sind neue Verbindungen, die im Wesentlichen in Übereinstimmung mit den folgenden Verfahren hergestellt werden können.

[0028] Spezifische Beispiele der erfindungsgemäßen Verbindungen schließen ein, sind aber nicht begrenzt auf:

2,5-bis(5-Amidino-2-benzimidazolyl)pyrrol;
 2,5-bis[5-(2-Imidazoliny)-2-benzimidazolyl]pyrrol;
 2,6-bis[5-(2-Imidazoliny)-2-benzimidazolyl]pyridin;
 1-Methyl-2,5-bis(5-amidino-2-benzimidazolyl)pyrrol;
 1-Methyl-2,5-bis[5-(2-imidazolyl)-2-benzimidazolyl]pyrrol;
 1-Methyl-2,5-bis[5-(1,4,5,6-tetrahydro-2-pyrimidinyl)-2-benzimidazolyl]pyrrol;
 2,6-bis(5-Amidino-2-benzimidazolyl)pyridin;
 2,6-bis[5-(1,4,5,6-Tetrahydro-2-pyrimidinyl)-2-benzimidazolyl]pyridin;
 2,5-bis(5-Amidino-2-benzimidazolyl)furan;
 2,5-bis[5-(2-Imidazoliny)-2-benzimidazolyl]furan;
 2,5-bis(5-N-Isopropylamidino-2-benzimidazolyl)furan
 und deren physiologisch verträgliche Salze.

[0029] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in Form einer freien Base bereitgestellt und verabreicht werden oder sie können als deren pharmazeutisch verträgliche Salze vorliegen. Geeignete pharmazeutisch verträgliche Salze schließen anorganische Säureadditionssalze wie Hydrochlorid, Hydrobromid, Sulfat, Phosphat und Nitrat, organische Säureadditionssalze wie Acetat, Propionat, Succinat, Lactat, Glycolat, Malat, Tartrat, Citrat, Maleat, Fumarat, Methansulfonat, p-Toluolsulfonate und Ascorbat, Salze mit Aminosäuren wie Aspartat und Glutamat, Alkalimetallsalze wie Natriumsalz und Kaliumsalz, Erdalkalimetallsalze wie Magnesiumsalz und Calciumsalz, Ammoniumsalz, basische organische Salze wie Trimethylaminsalz, Triethylaminsalz, Pyridinsalz, Picolinsalz, Dicyclohexylaminsalz und N,N'-Dibenzylethylendiaminsalz und Salze mit basischen Aminosäuren wie Lysinsalz und Argininsalz ein.

[0030] Die Salzformen der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I können im allgemeinen durch Umsetzung von zwei Äquivalenten der freien Base der Verbindung der Formel I mit der gewünschten Säure in Lösung hergestellt werden. Nachdem die Reaktion abgeschlossen ist, werden die Salze mittels Zugabe einer geeigneten Menge Lösemittel, in welchem das Salz unlöslich ist, kristallisiert.

[0031] Wie oben erwähnt, stellt die vorliegende Erfindung pharmazeutische Zubereitungen bereit, welche die Verbindungen der Formel I oder deren pharmazeutisch verträgliche Salze in pharmazeutisch verträglichen Trägern, bevorzugt zur aerosolen, oralen und parenteralen Verabreichung, umfassen, wie unten detaillierter diskutiert wird. Die vorliegende Erfindung stellt auch solche Verbindungen oder deren Salze bereit, die lyophilisiert wurden und welche rekonstituiert werden können, um pharmazeutisch verträgliche Zubereitungen zur Verabreichung, wie mittels intravenöser oder intramuskulärer Injektion, zu bilden.

[0032] Die therapeutisch wirksame Dosierung einer jeden spezifischen Verbindung, deren Verwendung im Geltungsbereich der vorliegenden Erfindung liegt, wird von Verbindung zu Verbindung, Patient zu Patient etwas variieren und wird vom Zustand des Patienten und dem Zuführungsweg abhängen. Als allgemeiner Vorschlag wird eine Dosierung von ungefähr 0,1 bis ungefähr 20 mg/kg therapeutische Wirksamkeit besitzen, mit einer potentiell noch höheren angewendeten Dosierung bei oraler und/oder aerosoler Verabreichung. Bedenken wegen der Toxizität bei höherem Niveau können die intravenöse Dosierung auf ein niedrigeres Niveau, wie bis zu 10 mg/kg, beschränken, wobei alle Massen in Bezug auf die aktive Base berechnet sind, einschließlich der Fälle, bei denen ein Salz angewendet wird. Gewöhnlich wird eine Dosierung von ungefähr 0,56 mg/kg bis ungefähr 5 mg/kg verwendet werden. Unter bestimmten Umständen können höhere oder niedrigere Dosen geeignet sein. Die Dauer der Behandlung kann einmal täglich für einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen sein und kann über einen Zeitraum von Monaten oder sogar Jahren, beispielsweise bei der Behandlung chronischer Zustände, andauern. Geringere Dosen, die weniger häufig gegeben werden, können verwendet werden um das Auftreten oder Wiederauftreten der Infektion zu verhindern oder zu reduzieren. Die tägliche Dosis kann entweder als Einzeldosis in Form einer Einzeldoseinheit oder mehrerer kleiner Dosiseinheiten oder mittels mehrerer Verabreichungen unterteilter Dosierungen in bestimmten Intervallen verabreicht werden.

[0033] Die vorliegende Erfindung stellt auch pharmazeutische Zubereitungen, sowohl zur veterinär- als auch humanmedizinischen Verwendung, bereit, welche das retrovirale Integrase-Hemmungsmittel zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder mehreren pharmazeutisch verträglichen Trägern und optional irgendeinem anderen therapeutischen Bestandteil umfassen. Der Träger muss in der Hinsicht pharmazeutisch

verträglich sein, dass er mit den anderen Bestandteilen der Zubereitung kompatibel und nicht übermäßig schädlich für deren Empfänger ist, beziehungsweise die Träger müssen in der Hinsicht pharmazeutisch verträglich sein, dass sie mit den anderen Bestandteilen der Zubereitung kompatibel und nicht übermäßig schädlich für deren Empfänger sind.

[0034] Die Zubereitungen schließen jene ein, die zur oralen, rektalen, topischen, nasalen, ophthalmischen oder parenteralen (einschließlich subkutanen und intravenösen) Verabreichung geeignet sind. Zubereitungen, die zur aerosolen, oralen und parenteralen Verabreichung geeignet sind, sind bevorzugt.

[0035] Die Zubereitungen können zweckmäßigerweise in Form einer Dosiseinheit dargeboten werden und können durch jedes der Verfahren hergestellt werden, die im Stand der Technik der Pharmazie wohlbekannt sind. Alle Verfahren schließen den Schritt ein, bei dem der Wirkstoff mit einem Träger, der einen zusätzlichen Bestandteil oder mehrere zusätzliche Bestandteile enthält, in Verbindung gebracht wird. Allgemein werden die Zubereitungen dadurch hergestellt, dass der Wirkstoff gleichmäßig und innig mit einem flüssigen Träger, einem fein verteilten festen Träger oder beiden in Verbindung gebracht wird, und dann, falls erforderlich, das Produkt zur gewünschten Zubereitung geformt wird.

[0036] Erfindungsgemäße Zubereitungen, die zur oralen Verabreichung geeignet sind, können dargeboten werden als diskrete Einheiten, wie Kapseln, Oblatenkapseln, Tabletten oder Pastillen, wobei jede eine vorher bestimmte Menge des Integrase-Hemmungsmittels als Pulver oder Körnchen enthält, oder als Suspension in einem wässrigen Liquor oder nicht-wässrige Flüssigkeit wie einem Sirup, einem Elixir, einer Emulsion oder abgemessenen Dosis einer Arzneimittellösung.

[0037] Eine Tablette kann mittels Zusammenpressen oder Formpressen, optional mit einem Zusatzstoff oder mehreren Zusatzstoffen, hergestellt werden. Komprimierte Tabletten können durch Zusammenpressen in einer geeigneten Maschine hergestellt werden, wobei der Wirkstoff in rieselfähiger Form wie einem Pulver oder Körnchen vorliegt und optional mit einem Bindemittel, Abbaumittel, Schmierstoff, inerten Lösemittel, Oberflächenaktivstoff oder Dispersionsmittel vermischt ist. Formgepresste Tabletten, welche aus einer Mischung des pulverisierten Wirkstoffs mit einem geeigneten Träger bestehen, können mittels Formpressen in einer geeigneten Maschine hergestellt werden.

[0038] Ein Sirup kann durch Hinzufügen des Wirkstoffs zu einer konzentrierten wässrigen Lösung eines Zuckers, beispielsweise Saccharose, hergestellt werden, zu welcher auch irgendein Zusatzstoff oder Zusatzstoff hinzugefügt werden kann beziehungsweise können. Ein solcher Zusatzstoff beziehungsweise solche Zusatzstoffe können Geschmacksstoffe, geeignete Konservierungsmittel, ein Mittel um die Kristallisation des Zuckers zu verzögern und ein Mittel um die Löslichkeit irgendeines der anderen Bestandteile zu erhöhen, wie einen mehrwertigen Alkohol, beispielsweise Glycerin oder Sorbitol, einschließen.

[0039] Zubereitungen, die zur parenteralen Verabreichung geeignet sind, umfassen zweckmäßigerweise eine sterile wässrige Formulierung des Wirkstoffs, die bevorzugt isotonisch mit dem Blut des Empfängers und pyrogenfrei ist.

[0040] Nasenspray-Zubereitungen umfassen gereinigte wässrige Lösungen des Wirkstoffs mit Konservierungsmitteln und isotonischen Mitteln. Solche Zubereitungen werden bevorzugt auf einen pH und isotonischen Zustand eingestellt, die kompatibel mit den Nasenschleimhautmembranen sind.

[0041] Zubereitungen zur rektalen Verabreichung können als Zäpfchen mit einem geeigneten Träger wie Kakao butter oder Fetten oder hydrierten Fettcarbonsäuren dargeboten werden.

[0042] Ophthalmische Zubereitungen werden mittels eines Verfahrens hergestellt, das der Zubereitung von Nasenspray ähnelt, außer dass der pH und isotonische Faktoren bevorzugt derart angepasst werden, dass sie denen des Auges entsprechen.

[0043] Topische Zubereitungen umfassen den Wirkstoff gelöst oder suspendiert in einem Medium oder mehrere Medien wie Mineralöl, Petroleum, mehrwertigen Alkoholen oder anderen Basen, die für topische pharmazeutische Zubereitungen verwendet werden. Der Zusatz anderer Zusatzstoffe, siehe unten, kann wünschenswert sein.

[0044] Zusätzlich zu den oben erwähnten Bestandteilen können die erfindungsgemäßen Zubereitungen weiterhin einen Zusatzstoff oder mehrere Zusatzstoffe, ausgewählt aus Verdünnungsmitteln, Puffern, Ge-

schmacksstoffen, Bindemitteln, Abbaumitteln, Oberflächenaktivstoffen, Verdickungsmitteln, Schmierstoffen, Konservierungsmitteln (einschließlich Antioxidanzien) und dergleichen einschließen.

[0045] In Übereinstimmung mit den bevorzugten Ausführungsbeispielen des vorliegenden Verfahrens kann eine Verbindung der Formel I oder deren pharmazeutisch verträgliches Salz oral oder mittels Inhalation als Feststoff verabreicht werden, oder sie kann intramuskulär oder intravenös als Lösung, Suspension, oder Emulsion verabreicht werden. Alternativ kann auch die freie Base der Verbindung der Formel I oder deren Salz mittels Inhalation, intravenös oder intramuskulär als liposomale Suspension verabreicht werden. Wenn durch Inhalation verabreicht wird, sollten die Verbindung oder das Salz als Vielzahl fester Teilchen oder Tröpfchen vorliegen, die eine Teilchengröße von ungefähr 0,5 bis ungefähr 5 Mikron, bevorzugt von ungefähr 1 bis ungefähr 2 Mikron besitzen.

[0046] Die vorliegende Erfindung stellt auch pharmazeutische Zusammensetzungen bereit, die zur intravenösen oder intramuskulären Injektion geeignet sind. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen umfassen eine Verbindung der Formel I oder deren pharmazeutisch verträgliches Salz in irgendeinem pharmazeutisch verträglichen Träger. Wenn eine Lösung gewünscht wird, ist Wasser in Bezug auf wasserlösliche Verbindungen oder Salze der Träger der Wahl, ein organisches Vehikel wie Glycerin, Propylen, Glycol, Polyethylenglycol oder deren Mischungen, können geeignet sein. In letzterem Fall kann das organische Vehikel einen wesentlichen Anteil Wasser enthalten. Die Lösung kann in beiden Fällen dann in jeder geeigneten Art sterilisiert werden, bevorzugt mittels Filtration durch einen 0,22 Mikron Filter. Der Sterilisation folgend kann die Lösung in geeignete Aufnahmegefäße wie depyrogenierte Glasphiole gefüllt werden. Natürlich sollte die Abfüllung mittels eines aseptischen Verfahrens durchgeführt werden. Sterilierte Verschlüsse können dann auf die Phiole gesetzt werden und der Phioleininhalt kann, wenn gewünscht, lyophilisiert werden.

[0047] Zusätzlich zu Verbindungen der Formel (I) oder deren Salzen kann die pharmazeutische Zusammensetzung andere Zusatzstoffe wie Zusatzstoffe zur Einstellung des pH-Wertes enthalten. Insbesondere geeignete Mittel zur Einstellung des pH-Wertes schließen Säuren, Basen oder Puffer, wie Natriumlactat, Natriumacetat oder Natriumglukonat ein. Weiterhin können die Zusammensetzungen mikrobielle Konservierungsstoffe enthalten. Geeignete mikrobielle Konservierungsstoffe schließen Methylparaben, Propylparaben und Benzylalkohol ein. Der mikrobielle Konservierungsstoff wird gewöhnlich dann eingesetzt, wenn die Zubereitung in einen Behälter gefüllt wird, der für Mehrfachdosierungen konstruiert wurde. Wie erwähnt, kann die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung natürlich durch im Stand der Technik bekannte Verfahren lyophilisiert werden.

[0048] In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine injizierbare, stabile, sterile Zusammensetzung bereitgestellt, die eine Verbindung der Formel (I) oder deren Salz in Form einer Dosiseinheit in einem verschlossenen Behälter umfasst. Die Verbindung oder das Salz werden in Form eines Lyophilisats bereitgestellt, das geeignet ist, mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger rekonstituiert zu werden, um eine flüssige Zusammensetzung zu bilden, die zur Injektion bei einem Subjekt geeignet ist. Die Dosiseinheit umfasst gewöhnlich von ungefähr 10 mg bis ungefähr 10 Gramm der Verbindung oder des Salzes. Wenn die Verbindung oder das Salz im Wesentlichen wasserlöslich sind, kann eine ausreichende Menge eines Emulgators, der physiologisch verträglich ist, in einer Menge verwendet werden, die ausreichend ist, die Verbindung oder das Salz in einem wässrigen Träger zu emulgieren. Ein solcher geeigneter Emulgator ist Phosphatidylcholin.

[0049] Andere pharmazeutische Zusammensetzungen, wie Emulsionen auf wässriger Basis, können aus den wasserunlöslichen Verbindungen der Formel (I) oder deren Salzen hergestellt werden. In einem solchen Fall wird die Zusammensetzung eine ausreichende Menge eines pharmazeutisch verträglichen Emulgators enthalten um die gewünschte Menge der Verbindung der Formel (I) oder deren Salz zu emulgieren. Besonders geeignete Emulgatoren schließen Phosphatidylcholine und Lecithin ein.

[0050] Weiterhin stellt die vorliegende Erfindung liposomale Zubereitungen der Verbindungen der Formel (I) und derer Salze bereit. Die Technologie zur Herstellung liposomaler Suspensionen ist im Stand der Technik wohlbekannt. Wenn die Verbindung der Formel (I) oder deren Salz ein wasserlösliches Salz ist, kann dieses unter Verwendung konventioneller Liposom-Technologie in Lipid-Vesikel inkorporiert werden. In einem solchen Fall werden die Verbindung oder das Salz aufgrund der Wasserlöslichkeit der Verbindung oder des Salzes weitestgehend in das hydrophile Zentrum oder das Herz des Liposoms transportiert. Die verwendete Lipidschicht kann aus jeder üblichen Zusammensetzung bestehen und kann entweder Cholesterin enthalten oder Cholesterin-frei sein. Wenn die interessierende Verbindung oder das Salz wasserunlöslich sind, kann wieder unter Anwendung der üblichen Technologie für Liposom-Bildung, das Salz weitestgehend in die hydrophobe Lipid-Doppelschicht transportiert werden, welche die Struktur des Liposoms ausbildet. In beiden Fällen können

die erzeugten Liposomen in ihrer Größe reduziert werden, wie durch die Verwendung von Standard-Ultrschall- und Homogenisierungs-Techniken.

[0051] Natürlich können die liposomalen Zubereitungen, welche die Verbindungen der Formel (I) oder deren Salze enthalten, lyophilisiert werden um ein Lyophilisat zu erzeugen, das mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger wie Wasser rekonstituiert werden kann, um eine liposomale Suspension zurückzugewinnen.

[0052] Es werden auch pharmazeutische Zubereitungen bereitgestellt, die zur Verabreichung als Aerosol durch Inhalation geeignet sind. Diese Zubereitungen umfassen eine Lösung oder Suspension der gewünschten Verbindung der Formel (I) oder deren Salzes oder eine Vielzahl fester Teilchen der Verbindung oder des Salzes. Die gewünschte Zubereitung kann in eine kleine Kammer gegeben und vernebelt werden. Die Vernebelung kann mittels komprimierter Luft oder mittels Ultraschallenergie bewerkstelligt werden, so dass eine Vielzahl flüssiger Tröpfchen oder fester Teilchen, welche die Verbindungen oder Salze umfassen, ausgebildet werden. Die flüssigen Tröpfchen oder festen Teilchen haben eine Teilchengröße im Bereich von ungefähr 0,5 bis ungefähr 5 Mikron. Die festen Teilchen können durch Bearbeitung der festen Verbindung der Formel (I) oder deren Salz nach jeder im Stand der Technik bekannten geeigneten Art, wie Mikronisierung, erhalten werden. Am stärksten bevorzugt wird die Größe der festen Teilchen oder Tröpfchen zwischen ungefähr 1 bis ungefähr 2 Mikron liegen. Es sind kommerzielle Zerstäuber erhältlich, die den Zweck in dieser Hinsicht erfüllen. Wenn die zur Verabreichung als Aerosol geeignete pharmazeutische Zubereitung als Flüssigkeit vorliegt, wird die Zubereitung bevorzugt eine wasserlösliche Verbindung der Formel (I) oder deren Salz, in einem Wasser umfassenden Träger, umfassen. Es kann ein Oberflächenaktiv-Stoff anwesend sein, der die Oberflächenspannung der Zubereitung, wenn diese der Vernebelung unterworfen wird, ausreichend herabsetzt, um die Bildung von Tröpfchen innerhalb des gewünschten Größenbereiches zu bewirken.

[0053] Wie angegeben, stellt die vorliegende Erfindung sowohl wasserlösliche als auch wasserunlösliche Verbindungen und Salze bereit. Wie in der vorliegenden Beschreibung verwendet, soll der Begriff "wasserlöslich" jede Zusammensetzung beschreiben, die in Wasser in einer Menge von ungefähr 50 mg/ml oder mehr, löslich ist. Weiterhin soll der Begriff "wasserunlöslich", wie er in der vorliegenden Beschreibung verwendet wird, jede Zusammensetzung beschreiben, die in Wasser eine Löslichkeit von weniger als ungefähr 20 mg/ml besitzt. Für bestimmte Anwendungen können wasserlösliche Verbindungen oder Salze wünschenswert sein, wohingegen für andere Anwendungen wasserunlösliche Verbindungen oder Salze ebenso wünschenswert sein können.

[0054] Die folgenden Beispiele werden bereitgestellt um die vorliegende Erfindung zu veranschaulichen und sollten nicht als deren Begrenzung verstanden werden. In diesen Beispielen bedeutet "g" Gramm, "mg" Milligramm, "µg" Mikrogramm, "mmol" Millimol, "ml" Milliliter, "M" molar, "MM" millimolar, "UV" ultraviolet, "HCl" Chlorwasserstoff bzw. Salzsäure, "NaCl" Natriumchlorid, "EDTA" Ethyldiamintetraessigsäure, "MP" Schmelzpunkt, und "°C" Grad Celsius.

BEISPIEL 1

Herstellung von 2,5-bis(5-Amidino-2-benzimidazolyl)pyrrol

[0055] 2,5-bis(5-Amidino-2-benzimidazolyl)pyrrol. Eine Lösung aus Pyrrol-2,5-dicarboxaldehyd (T. Cresp, M. Sargent, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 2961 (1973)) (0,25 g, 2 mmol), 3,4-Diaminobenzamidin (T. A. Fairley, R. R. Tidwell, I. Donkor, N. A. Naiman, K. A. Chemeng, A. Bentley und M. J. Cory, Med. Chem. 36: 1746 (1993)) (0,6 g, 4 mmol) und 1,4-Benzochinon (0,432 g, 4 mmol) in Ethanol (40 ml) wurde vier Stunden lang (unter Stickstoff) zum Rückfluss erhitzt (S. Kumar, V. Konsal, A. Bhaduri, Indian J. Chem. 20B: 254 (1981)). Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur gekühlt und der dunkle Feststoff wurde mittels Filtration gesammelt, mit kaltem Ethanol und wasserfreiem Ether gewaschen und getrocknet, wodurch 0,45 g (59%) der freien Base erhalten wurden. Dieser Feststoff wurde langsam in heißem Ethanol (300 ml) gelöst und filtriert. Das Volumen des Filtrats wurde auf 70 ml reduziert und mit HCl-gesättigtem Ethanol angesäuert. Nach dem Stehenlassen im Kühlschrank über Nacht wurde der grüne Feststoff mittels Filtration gesammelt, mit wasserfreiem Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet, wodurch 0,5 g (76%) Feststoff als Ausbeute erhalten wurden. Mp > 300°C. ¹H-NMR(DMSO-d₆) (7,54 (s, 2H, Pyrrol), 7,80 (dd, J = 8,8 und 0,8 Hz, Ar-H, 2H), 7,87 (d, J = 8,4 Hz, 2H, Ar-H), 8,25 (s, 2H, Ar-H), 9,18, 9,48 (br s, br s, NH). Anal. (C₂₀N₁₇N₉·3HCl·3H₂O) C, H, N, MS: m/e 384 (M + 1).

BEISPIEL 2

Herstellung von 2,5-bis-[5-(2-Imidazolinyl)-2-benzimidazolyl]pyrrol

[0056] 2,5-bis-[5-(2-Imidazolinyl)-2-benzimidazolyl]pyrrol.

[0057] Für die Kondensation von Pyrrol-2,5-dicarboxaldehyd und 2-(3,4-Diaminophenyl)imidazolin wurde ein Protokoll verwendet, das dem im obigen Beispiel 1 verwendeten ähnelt, wodurch eine Ausbeute von 86% Feststoff erhalten wurde. Mp > 300°C. ¹H-NMR (DMSO-d₆) (4,04 (s, (8H, NCH₂CH₂N), 7,39 (s, 2H, Pyrrol), 7,86 (d, J = 8,8 Hz, 2H, Ar-H), 7,92 (dd, J = 8,4 und 1,6 Hz, 2H, Ar-H), 8,44 (s, 2H, Ar-H), 10,71 (s, NH). Anal. (C₂₄H₂₁N·3HCl·4H₂O) C, H, N. MS: m/e 436 (M + 1).

BEISPIEL 3

Herstellung von 2,6-bis[5-(2-Imidazolinyl)-2-benzimidazolyl]pyridin

[0058] 2,6-bis[5-(2-Imidazolinyl)-2-benzimidazolyl]pyridin. Für die Kondensation von 2,6-Pyridincarboxyaldehyd und 2-(3,4-Diaminophenyl)imidazolin wurde ein Protokoll verwendet, das den in den obigen Beispielen 1 und 2 verwendeten ähnelt, wodurch eine Ausbeute von 85% Feststoff erhalten wurde. Mp > 300°C. ¹H-NMR (DMSO-d₆) (4,05 (s, 8H, N-CH₂CH₂N), 7,96 (m, 4H, Ar-H), 8,30 (t, 1H, Pyridin), 8,49–8,51 (m, 4H, Ar-H), 10,71 (s, NH). Anal (C₂₅H₂₁N₉·3HCl·3H₂O) C, H, N. MS: m/e 448 (M + 1)

BEISPIEL 4

Herstellung von 1-Methyl-2,5-bis(5-amidino-2-benzimidazolyl)pyrrol

[0059] 1-Methyl-2,5-bis(5-amidino-2-benzimidazolyl)pyrrol. Für die Kondensation von 3,4-Diaminobenzamidin (T. A. Fairley, R. R. Tidwell, I. Donkor, N. A. Naiman, K. A. Ohemeng, A. Bentley und M. J. Cory, Med. Chem. 36: 1746 (1993)) mit 1-Methylpyrrol-2,5-dicarboxaldehyd wurde ein Protokoll verwendet, das den in den obigen Beispielen 1–3 beschriebenen ähnelt, wodurch 0,48 g (46%) Produkt erhalten wurden. Mp > 300°C. ¹H-NMR (DMSO-d₆) (4,72 (s, 3H, CH₃-N), 7,33 (s, 2H, Pyrrol), 7,73 (dd, J = 8 und 1,2 Hz, 2H, Ar-H), 7,80 (d, J = 8,4 Hz, Ar-H), 8,19 (s, 2H, Ar-H) 9,11, 9,38 (br s, br s, NH-Amidin). Anal. (C₂₁H₁₉N₉·3HCl·H₂O) C, H, N. MS: m/e 398 (M + 1).

BEISPIEL 5

Herstellung von 1-Methyl-2,5-bis[5-(2-imidazolyl)-2-benzimidazolyl]pyrrol

[0060] 1-Methyl-2,5-bis[5-(2-imidazolyl)-2-benzimidazolyl]-pyrrol. Für die Kondensation von 2-(3,4-Diaminophenyl)-imidazolin mit 1-Methylpyrrol-2,5-dicarboxaldehyd wurde ein Protokoll verwendet, das den in den obigen Beispielen 1–4 beschriebenen ähnelt. Es wurde eine Ausbeute von 83% Feststoff erhalten, Mp > 300°C. ¹H-NMR (4,04 (s, 8H, NCH₂CH₂N), 4,72 (s, 2H, Ar-H), 10,60 (s, NH). Anal. (C₂₅H₂₃N₉·3HCl·3H₂O) C, H, N. MS: m/e 450 (M + 1).

BEISPIEL 6

Herstellung von 1-Methyl-2,5-bis[5-(1,4,5,6-tetrahydro-2-pyrimidinyl)-2-benzimidazolyl]pyrrol

[0061] 1-Methyl-2,5-bis[5-(1,4,5,6-tetrahydro-2-pyrimidinyl)-2-benzimidazolyl]pyrrol. Für die Kondensation von 2-(3,4-Diaminophenyl)tetrahydropyrimidin mit 1-Methylpyrrol-2,5-dicarboxaldehyd wurde ein Protokoll verwendet, das den in den obigen Beispielen 1–5 beschriebenen ähnelt. Es wurde eine Ausbeute von 83% Feststoff, Mp > 300°C, erhalten. ¹H-NMR (2,01 (m, 4H, CH₂), 3,52 (br s, 8H, CH₂N), 4,72 (s, 3H, CH₃N), 7,31 (s, 2H, Pyrrol), 7,60 (d, J = 8,4 Hz, 2H, Ar-H), 7,80 (d, J = 8,4 Hz, 2H, AR-H), 8,06 (s, 2H, Ar-H), 9,99 (s, NH). Anal. (C₂₇H₂₇N₉·3HCl·4H₂O) C, H, N. MS: m/e 478 (M + 1).

BEISPIEL 7

Herstellung von 2,6-bis(5-Amidino-2-benzimidazoyl)pyridin

[0062] 2,6-bis(5-Amidino-2-benzimidazoyl)pyridin. Um 2,6-Pyridindicarboxaldehyd mit 3,4-Diaminobenzami-

din zu kondensieren wurde ein Protokoll verwendet, das den in den obigen Beispielen 1–6 beschriebenen ähnelt, wodurch 89% eines Feststoffs, Mp > 300°C, erhalten wurden. ¹H-NMR (DMSO-d₆) (7,79 (dd, J = 8,4 und 1,6 Hz, 2H, Ar-H), 7,94 (d, J = 8,4 Hz, 2H, Ar-H), 8,28–8,34 (m, 3H, Ar-H), Pyridin), 8,51 (d, J = 8 Hz, 2H, Pyridin), 9,12, 9,45 (br s, br s, NH). Anal. (C₂₁H₁₇N₉·3HCl·2H₂O) C, H, N. MS: m/e 396 (M + 1).

BEISPIEL 8

Herstellung von 2,6-bis[5-(1,4,5,6-Tetrahydro-2-pyrimidinyl)-2-benzimidazolyl]pyridin

[0063] 2,6-bis[5-(1,4,5,6-Tetrahydro-2-pyrimidinyl)-2-benzimidazolyl]pyridin. Um 2,6-Pyrimidindicarboxyaldehyd mit 2-(3,4-Diaminophenyl)tetrahydropyrimidin zu kondensieren wurde ein Protokoll verwendet, das den in den obigen Beispielen 1–7 beschriebenen ähnelt, wodurch 89% Ausbeute Feststoff, Mp > 300°C, erhalten wurden. ¹H-NMR (DMSO-d₆) (2,03 (m, 4H, CH₂), 3,54 (br s, 8H, CH₂N), 7,66 (d, J = 8,4 Hz, 2H, Ar-H), 7,84 (d, J = 8,4 Hz, 2H, Ar-H), 8,17 (s, 2H, Ar-H), 8,29 (t, 1H, Pyridin), 8,43 (d, J = 8 Hz, 2H, Pyridin), 10,04 (s, NH). Anal. (C₂₇H₂₅N₉·3HCl·4H₂O) C, H, N. MS: m/e 476 (M + 1).

BEISPIEL 9

Herstellung von 2,5-bis(5-Amidino-2-benzimidazolyl)furan

[0064] 2,5-bis(5-Amidino-2-benzimidazolyl)furan. Um 2,5-Furandicarboxyaldehyd mit 3,4-Diaminobenzamidin zu kondensieren, wurde ein Protokoll verwendet, das den in den obigen Beispielen 1–8 beschriebenen ähnelt. Eine Lösung aus 2,5-Furandicarboxyaldehyd (0,25 g, 2 mmol), 3,4-Diaminobenzamidin (0,6 g, 4 mmol) und Benzochinon (0,43 g, 4 mmol) in Ethanol (100 ml) wurde unter Stickstoff vier Stunden lang zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösmittel reduziert und zu dem Rückstand wurde trockener Ether gegeben. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit trockenem Ether gewaschen. Der gelb-grüne Feststoff wurde mit konzentrierter HCl angesäuert. Nach dem Stehenlassen über Nacht wurde Ether hinzugegeben und der Feststoff mittels Filtration gesammelt, mit trockenem Ether gewaschen und im Vakuum bei 90°C 48 Stunden lang getrocknet. Ausbeute 0,5 g (52,2%) gelb-grünes Pulver, Mp > 300°C. MS (FAB): m/z 385 (M⁺ + 1); HRMS: berechnete Masse (freie Base): 385,1525 (M⁺ + 1); ermittelte Masse: 385,1535, ¹H-NMR (DMSO-d₆, TMS) δ: 9,30 s, 4H (N-H); 8,95 s, 4H (N-H); 8,19 s, 2H (Phenyl); 7,81 d, 2H, J = 8,8 Hz; 7,72 d, 2H, J = 8,4 Hz; 7,60 s 2H (Furan), ¹³C-NMR (DMSO-d₆ + D₂O) δ: 166,8; 146,3; 146,1; 142,2; 139,7; 123,4; 122,7; 117,1; 116,1; 115,4. Anal. (C₂₀H₁₆N₈O·2HCl·1,5H₂O) C, H, N.

BEISPIEL 10

Herstellung von 2,5-bis[5-(2-Imidazolinyl)-2-benzimidazolyl]furan

[0065] 2,5-bis[5-(2-Imidazolinyl)-2-benzimidazolyl]furan. Um 2,5-Furandicarboxyaldehyd mit 2-(3,4-Diaminophenyl)imidazolin zu kondensieren, wurde ein Protokoll verwendet, das den in den obigen Beispielen 1–8 beschriebenen ähnelt. Eine Lösung aus 2,5-Furandicarboxyaldehyd (0,25 g, 2 mmol), 2-(3,4-Diaminophenyl)imidazolin (0,7 g, 4 mmol) und Benzochinon (0,43 g, 4 mmol) in Ethanol (100 ml) wurde unter Stickstoff vier Stunden lang zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Kühlen wurde das Lösemittel reduziert und zu dem Rückstand wurde trockener Ether hinzugefügt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit trockenem Ether gewaschen. Der gelb-grüne Feststoff wurde mit konzentrierter HCl angesäuert. Nach dem Stehenlassen über Nacht wurde Ether hinzugefügt und der Feststoff wurde mittels Filtration gesammelt, mit trockenem Ether gewaschen und im Vakuum bei 90°C 3 Tage lang getrocknet. Ausbeute 0,45 g (38,1%) des grünen Pulvers, Mp > 300°C. MS (FAB): m/z 437 (M⁺ + 1); HRMS: berechnete Masse (freie Base): 437,1838 (M⁺ + 1); ermittelte Masse: 437,1832. ¹H-NMR (DMSO-d₆, TMS) δ: 10,53 s, 4H (N-H); 8,38 s, 2H; 7,87 d, 2H, J = 8,5 Hz; 7,83 d, 2H, J = 8,2 Hz; 7,62 s, 2H; 4,04 s, 8H. ¹³C-NMR (DMSO-d₆, + D₂O, TMS) δ 166,3; 146,2; 146,1; 142,3; 139,8; 123,7; 117,6; 116,9; 116,1; 115,5; 45,0, Anal. (C₂₄H₂₀N₈O·2HCl·5H₂O) C, H, N.

BEISPIEL 11

Herstellung von 2,5-bis(5-N-Isopropylamidino-2-benzimidazolyl)furan

[0066] Herstellung von 2,5-bis(5-N-Isopropylamidino-2-benzimidazolyl)furan. Um 2,5-Furandicarboxyaldehyd mit 3,4-Diamino-N-isopropylbenzamidin zu kondensieren, wurde ein Protokoll verwendet, das den in den obigen Beispielen 1–8 beschriebenen ähnelt. Eine Lösung aus 2,5-Furandicarboxyaldehyd (0,25, 2 mmol), 3,4-Diamino-N-isopropylbenzamidin (0,77 g, 4 mmol) und Benzochinon (0,43 g, 4 mmol) in Ethanol (100 ml)

wurde unter Stickstoff 4 Stunden lang zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Kühlen wurde das Lösemittel reduziert und es wurde trockener Ether zu dem Rückstand hinzugegeben. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit trockenem Ether gewaschen. Nach dem Trocknen wurde der grüne Feststoff in mit HCl gesättigtem, wasserfreiem Ethanol (50 ml) gelöst und bis zum Beginn des Siedens erhitzt und dann abkühlen gelassen. Der grüne Feststoff wurde mittels Filtration gesammelt und im Vakuum bei 90°C 3 Tage lang getrocknet. Ausbeute 0,67 g (53,6%) des gelb-grünen Pulvers, Mp > 300°C. MS (FAB): m/z 469 (M⁺ + 1); HRMS: berechnete Masse (freie Base): 469,2464 (M⁺ + 1); ermittelte Masse: 469,2475. ¹H-NMR (DMSO-d₆, TMS) δ: 0,60 + 9,58 s + s, 2H (N-H); 9,45 s 2H (N-H); 9,45 s 2H (N-H); 9,04 s, 2H (N-H); 8,06 s, 2H (Phenyl); 7,82 d, 2H, J = 8,4 Hz; 7,69 s, 2H (Furan); 7,62 d, 2H, J = 8,2 Hz; 4,09 m, 2H (CH), J = 7,02 Hz; 1,32 d 12H(CH₃), J = 6,3 Hz; ¹³C-NMR (DMSO-d₆, + D₂O, TMS): δ 162,8; 145,9; 145,1; 140,9; 138,5; 124,5; 124,0; 116,9; 115,9; 115,9; 45,9; 21,7, Anal. (C₂₆H₂₈NRO·3HCl·5H₂O) C, H, N.

BEISPIEL 12

Herstellung von 2,5-Diformylbenzo[b]furan

[0067] Diisobutylaluminumhalogenid (4,26 g, 0,03 mol; 30 ml einer 1 M Lösung in Cyclohexan) wurde tropfenweise zu einer Lösung aus 2,5-Dicyanobenzo[b]furan (1,68 g, 0,01 mol) in 150 ml trockenem Methylenchlorid bei 15°C unter Stickstoff hinzugefügt. Die Mischung wird 15 Minuten lang gerührt und sie wurde dann 40 Minuten am Rückfluss gehalten. Die Reaktionsmischung wird gekühlt und 100 ml 1 M Schwefelsäure werden langsam hinzugefügt während die Temperatur unter 25°C gehalten wird. Nachdem die Zugabe der Schwefelsäure abgeschlossen ist, wird die Mischung eine Stunde lang gerührt und die Dichlormethan-Phase wird abgetrennt. Die wässrige Phase wird mit 100 ml Dichlormethan extrahiert und die beiden organischen Phasen werden vereinigt und mit 20% NaHCO₃ (wässrig) gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wird abdestilliert, wodurch sich ein Rückstand ergibt. Der Rückstand wird mit 1 : 1 Ether : Hexan pulverisiert und es bildet sich ein cremefarbener Feststoff, der abfiltriert und im Vakuum bei 60°C 4 Stunden lang getrocknet wird. Bei der Reaktion ergeben sich 1,2 g Produkt (69% Ausbeute), das einen Schmelzpunkt von 141–142°C besitzt. ¹H-NMR (DMSO-d₆/50°C) 10,1 (s, 1H), 9,92 (s, 1H), 8,48 (d, 1H, J = 0,8), 8,10 (s, 1H), 8,08 (dd, 1H, J = 8, J = 8,8), 7,90 (d, 1H, J = 8,8). ¹³C-NMR (DMSO-d₆/50°C) 191,8; 180,6; 158,1; 153,6; 132,9; 128,9; 127,5; 126,9; 118,8; 113,1.

Analyse berechnet für C₁₀H₆O₃·0,2H₂O (177,75) C: 67,56; H: 3,67; gefunden C: 67,83; H: 3,59.

BEISPIEL 13

Herstellung von 2,5-Bis[2-(5-N-substituiertem Amidino)benzimidazoyl]benzo[b]furan

[0068] Eine Mischung aus 2,5-Diformylbenzo[b]furan (0,174 g, 0,001 mol), 1,4-Benzochinon (0,216 g, 0,002 mol) und 4-substituiertem Amidino-1,2-diaminobenzol (0,002 mol) in 30 ml trockenem Ethanol wird in einer reinen Atmosphäre 8 Stunden lang zum Rückfluss erhitzt. Das Volumen wird unter Vakuum auf die Hälfte reduziert und mit trockenem Ether verdünnt und es bildet sich ein farbiger Feststoff. Der Feststoff wird abfiltriert und mit trockenem Ether gewaschen. Dann wird der Feststoff in 10 ml absolutem Methanol suspendiert und mit 10 ml gesättigter methanolischer HCl behandelt und die Mischung wird bei –40°C 30 Minuten lang gerührt. Das Lösemittel wird unter Vakuum abdestilliert, es wird mit trockenem Ether pulverisiert und dann filtriert, mit Ether gewaschen und im Vakuum bei 70°C 12 Stunden lang getrocknet, wodurch 69–77% Produkt erhalten wurden.

BEISPIEL 14

Herstellung von 2,5-Bis[2-(5-guanylbenzimidazoylvinyl)-benzo[b]-furan-tetrahydrochlorid

[0069] Ein blaugrauer Feststoff wird unter Verwendung des Verfahrens aus Beispiel 13 in 76% Ausbeute erhalten. Der Feststoff besitzt einen Schmelzpunkt von 332–334°C. ¹H-NMR (DMSO-d₆/D₂O/80°C) 8,6 (s, 1H), 8,27 (d, 1H, J = 8), 8,19 (d, 2H, J = 9,6), 7,89 (d, 1H, J = 8,8), 7,87 (s, 1H), 7,83 (d, 1H, J = 8,4), 7,78 (d, 1H, J = 8,4), 7,73 (d, 1H, J = 8,4), 7,68 (d, 1H, J = 8). ¹³C-NMR (DMSO-d₆/D₂O/80°C) 166,4; 165,9; 153,5; 147,4; 145,4; 141,6; 139,9; 139,1; 136,9; 128,6; 126,2; 123,3; 122,9; 122,6; 122,2; 122,1; 116,9; 115,8; 115,5; 115,0; 112,8; 108,6.

Analyse berechnet für C₂₄H₁₈N₈O·3HCl·H₂O (561,86) C: 51,30; H: 4,12; N: 19,94; gefunden C: 51,72; H: 4,14; N: 19,64.

BEISPIEL 15

Herstellung von 2,5-Bis{2-[5-(N-isopropylamidino)-benzimidazolinyl]}benzo[b]furan-tetrahydrochlorid

[0070] Ein metallisch grünlicher Feststoff, der einen Schmelzpunkt von 285–290°C besitzt, wird unter Verwendung des Verfahrens aus Beispiel 13 in 69% Ausbeute erhalten. ¹H-NMR (DMSO-d₆/80°C) 8,71 (s, 1H), 8,36 (d, 1H, J = 8,8), 8,08 (d, 2H, J = 9,2), 7,98 (d, 1H, J = 8,8), 7,96 (s, 1H), 7,85 (d, 1H, J = 8,8), 7,82 (d, 1H, J = 8,8), 7,64 (d, 1H, J = 8,8), 7,61 (d, 1H, J = 8,8), 4,02 (q, 2H, J = 6), 1,32 (d, 12H, J = 6). ¹³C-NMR (DMSO-d₆/D₂O/80°C) 162,9; 162,6; 157,5; 152,9; 147,4; 145,3; 141,1; 138,7; 137,8; 134,9; 129,2; 126,9; 125,7; 125,0; 124,5; 123,8; 123,2; 121,4; 116,9; 116,1; 115,7; 115,5; 113,9; 109,4; 46,2; 46,1; 21,6.
Analyse berechnet für C₃₀H₃₀N₈O·4HCl·0,5H₂O (673,47) C: 53,49; H: 5,23; N: 16,64; gefunden C: 53,53; H: 5,29; N: 16,45.

BEISPIEL 16

Herstellung von 2,5-Bis{2-(5-(N-cyclopentylamidino)-benzimidazoyl)}-benzo[b]furan-tetrahydrochlorid

[0071] Ein grauer Feststoff, der einen Schmelzpunkt von 290–294°C besitzt, wird unter Verwendung des Verfahrens aus Beispiel 13 in 73% Ausbeute erhalten. ¹H-NMR (DMSO-d₆/D₂O/80°C) 8,62 (s, 1H), 8,27 (d, 1H, J = 8,8), 8,08 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 7,95 (d, 1H, J = 8,8), 7,90 (s, 1H), 7,84 (d, 1H, J = 8,8), 7,79 (d, 1H, J = 8,4) 7,64 (d, 1H, J = 8,4), 7,57 (d, 1H, J = 8,8), 4,14 (br, 2H), 2,13 (2,06 (m, 4H), 1,81–1,56 (m, 12H). ¹³C-NMR (DMSO-d₆/D₂O/80°C) 163,4; 163,1; 156,9; 153,2; 147,6; 145,2; 141,1; 138,8; 136,2; 128,9; 126,5; 124,5; 124,1; 123,9; 123,5; 122,5; 122,4; 116,9; 116,1; 115,8; 115,7; 115,1; 113,2; 108,8; 54,9; 54,8; 31,7; 23,9.
Analyse berechnet für C₃₄H₃₄N₈O·4HCl (716,53) C: 56,99; H: 5,34; N: 15,64; gefunden C: 56,89; H: 5,34; N: 15,53.

BEISPIEL 17

Herstellung von 2,7-Diformylfluoren

[0072] Zu einer gerührten Lösung aus 2,7-Dicyanofluoren (2,16 g, 0,01 mol) in 150 ml trockenem Methylenchlorid wird Diisobutylaluminumhydrid (1 M in Cyclohexan, 4,26 g, 0,003 mol) unter Stickstoff bei Raumtemperatur hinzugefügt. Die Suspension wird eine Stunde lang auf 40°C erhitzt, gekühlt und es werden 100 ml 1 M Schwefelsäure tropfenweise hinzugefügt und es wird eine Stunde lang gerührt. Ein gelber Feststoff fällt aus und wird abfiltriert, wodurch 1,6 g (72%) Produkt erhalten werden, das einen Schmelzpunkt von 218–220°C besitzt. ¹H-NMR (DMSO-d₆/90°C) 10,08 (s, 2H), 8,16 (d, 2H, J = 8,0), 8,11 (s, 2H), 7,95 (d, 2H, J = 8,0), 4,10 (s, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-d₆/90°C) 191,9; 145,0; 144,7; 135,6; 128,5; 125,4; 121,1; 36,0. MS m/w 222 (M⁺).

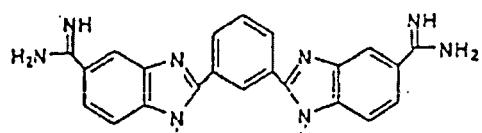
BEISPIEL 18

Herstellung von 2,7-Bis{2-[5-(N-isopropylamidino)-benzimidazolinyl]}-fluoren-tetrahydrochlorid

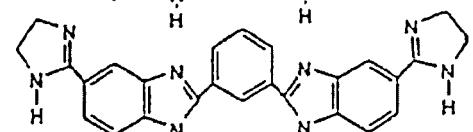
[0073] Eine Mischung aus 2,7-Diformylfluoren (0,222 g, 0,001 mol), 1,4-Benzochinon (0,216 g, 0,002 mol) und 4-(N-Isopropylamidino)-1,2-phenyldiamin (0,457 g, 0,002 mol) in 50 ml trockenem Ethanol wird 8 Stunden lang unter Stickstoff zum Rückfluss erhitzt. Das Volumen wird auf 15–18 ml reduziert und das Produkt abfiltriert, mit Ether : Ethanol (2 : 1) gewaschen und der Feststoff wird getrocknet. Der Feststoff wird dann in 20 ml absolutem Methanol suspendiert und dieses mit trockenem HCl-Gas gesättigt und es wird bei 40°C 2 Stunden lang gerührt. Das Volumen des Feststoffs wird unter Vakuum reduziert, der Rückstand mit trockenem Ether pulverisiert und der dunkle lila-grüne Feststoff wird abfiltriert und unter Vakuum bei 70°C 2 Stunden lang getrocknet. Die Reaktion ergibt 0,51 g (72%) Produkt, das einen Schmelzpunkt von 310–313°C besitzt. ¹H-NMR (DMSO-d₆/D₂O/90°C) 8,53 (s, 2H), 8,34 (d, 2H, J = 8,4) 8,22 (d, 2H, J = 8,11 (s, 2H), 7,85 (d, 2H, J = 8,4), 7,65 (d, 2H, J = 8,4), 4,23 (s, 2H), 4,09 (Quintett, 2H, J = 6,4), 1,33 (d, 12H, J = 6,4). ¹³C-NMR (DMSO-d₆/D₂O/90°C) 162,22; 153,1; 144,9; 143,5; 138,7; 136,3; 126,9; 125,7; 124,3; 123,6; 121,7; 115,6; 114,7; 45,3; 36,7; 21,1.
Analyse berechnet für C₃₅H₃₄N₈·4HCl (712,55) C: 58,99; H: 5,37; N: 15,73; gefunden C: 59,14; H: 5,59; N: 15,43.

BEISPIEL 19

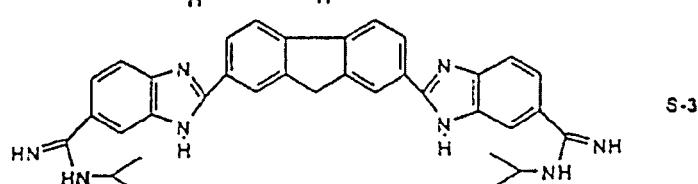
Strukturen ausgewählter Verbindungen



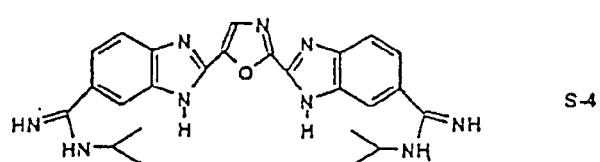
S-1



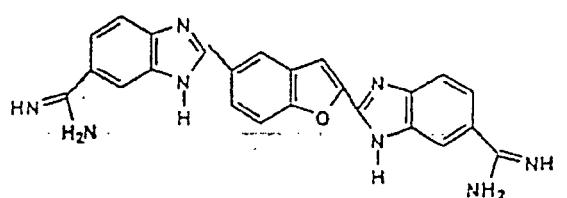
S-2



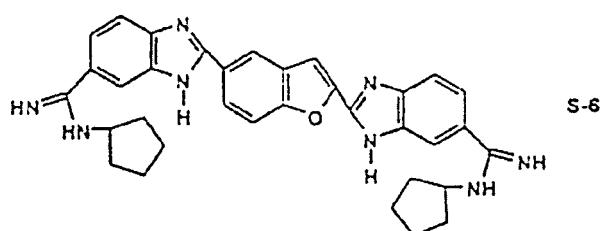
S-3



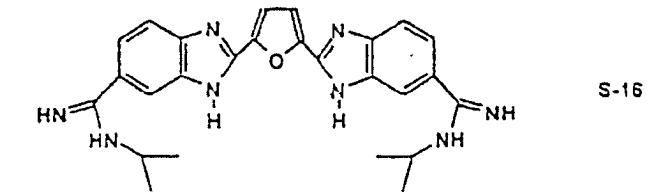
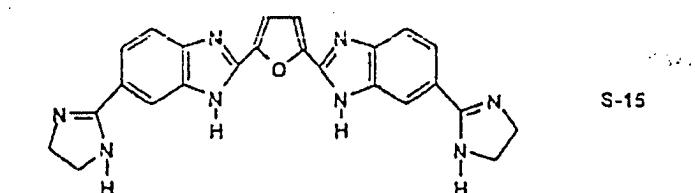
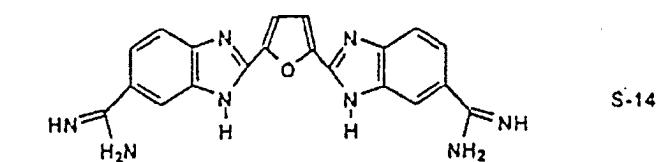
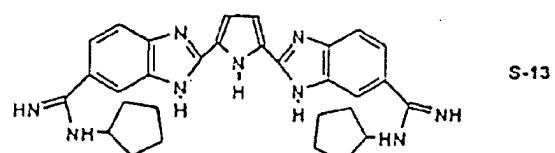
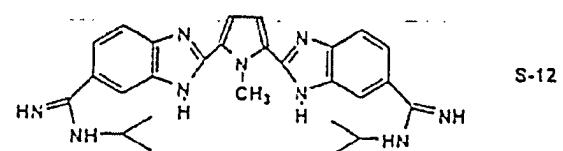
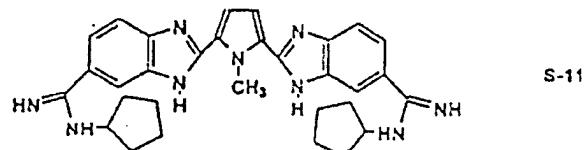
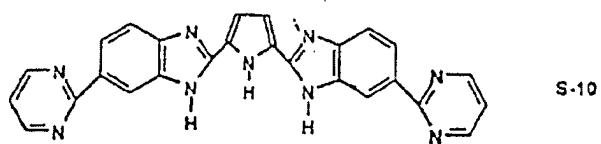
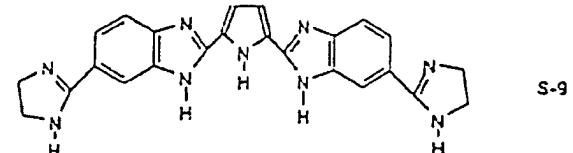
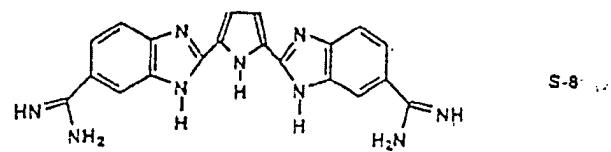
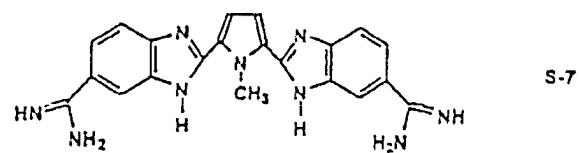
S-4



S-5



S-6



BEISPIEL 20

Herstellung und Assay von Integrase-Protein

[0074] Reinigung von Integrase-Protein. Integrase wurde in *E. coli* unter Verwendung der Integrase-kodierenden Region aus dem HXB2-Klon von HIV-1-DNA (L. Ratner et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 3: 57 (1987)), pT7fli-IN, durch ein induzierbares Plasmid überproduziert, das die Integrase-Sequenz unter Kontrolle einer lacI-gesteuerten T7-Polymerase enthält. Eine Ein-Liter-Kultur wurde bei einer OD von 0,6 mittels Zugabe von IPTG auf 0,5 mM induziert. Nach drei Stunden wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet und die Pellets wurden bei -70°C gelagert.

[0075] Das Integrase-Protein wurde mittels einer Modifikation des Verfahrens von Sherman und Fyfe, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5119 (1990) gereinigt. Die Zellen wurden lysiert, indem sie in einem Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA, 1 mg/ml Lysozym) auf Eis bei 6 ml/g Bakterienpellet 30 Minuten lang aufgetaut und dann bei 37°C 5 Minuten lang inkubiert wurden. Das Lysat wurde bei 12000 × g eine Stunde lang zentrifugiert. Die Pellets wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA, 1 M NaCl (4 ml/g Original-Bakterien) resuspendiert. Das Homogenat wurde 30 Minuten lang bei 4°C gerührt und wieder 30 Minuten lang bei 12000 × g zentrifugiert.

[0076] Der Überstand wurde in Ammoniumsulfat mittels langsamer Zugabe von Pulver unter Röhren über einen Zeitraum von 30 Minuten auf 0,8 M eingestellt. Der Extrakt wurde dann zentrifugiert um jeglichen Niederschlag zu entfernen und auf eine Phenylsepharose-Säule aufgebracht. Nach einer 50-ml-Waschung mit High-Salt-Puffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 2 M NaCl) wurde das Protein mit einem Gradienten von High-Salt- zu 0-Salt-Puffer, der 10% (Gewicht/Volumen) Glycerin enthielt, eluiert und über eine G75-Sephadex-Säule weiter gereinigt, um Hintergrund-Nuklease zu entfernen. Eine Ein-Liter-Kultur erzeugt genug Integrase-Aktivität, um mehr als eintausend Arzneimittel-Hemmungs-Assays durchzuführen.

[0077] Assays der Integrase-Aktivität. Die Enzym-Reinigungsschritte wurden mittels eines Endonuklease/Nicking-Assays und Western-Blots überwacht, wobei ein monoklonaler Antikörper gegen Integrase verwendet wurde, der durch W. Osherooff und R. Swanstrom am UNC – Chapel Hill erzeugt wurde. Supergeknäultes pBluescriptKS + II (0,3 µg) wurde mit Säulenfraktionen in einem Puffer, der 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM 2-Mercaptoethanol und 2 mM MnCl₂ enthielt, 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden mittels Zugabe von SDS auf 1% gestoppt und die Spaltung des DNA-Substrats wird mittels Elektrophorese auf einem 0,8% Agarosegel, das mit Ethidiumbromid gefärbt war und unter UV-Licht fotografiert wurde, bewertet.

[0078] Die Spaltung spezifischer Stellen wurde derart bewertet, wie es in Sherman et al., supra, beschrieben ist, mit der Ausnahme, dass der Assay-Puffer der gleiche war, wie er in Chow et al., Science 255: 723 (1992) beschrieben wurde. Das eingesetzte Substrat ist das gleiche wie es für die Verwendung im Dumbell-Assay in Chow et al., J. Virol. 68: 7869 (1994) beschrieben wurde, wobei diese Offenbarung in ihrer Gesamtheit hierin als Referenz einbezogen wird. Im Wesentlichen wird das Assay mit einem Oligonukleotide aus 31 Nukleotiden durchgeführt, das Self-Annealing unterliegt, wodurch eine Hantel-Form mit einem Nick darin ausgebildet wird. Dieses Substrat imitiert das integrierte Virus und wird spezifisch mittels Integrase erkannt, wodurch zwei Fragmente freigesetzt werden. Wenn das Substrat mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und T4-Polynukleotide-Kinase endmarkiert und mit Integrase-Protein behandelt wird, ist das Ergebnis ortsspezifische Spaltung des Substrats, wodurch ein sehr verschiedenes Molekulargewicht entsteht, wenn Elektrophorese auf einem Polyacrylamidgel durchgeführt wird. Das ermöglicht, dass die Reaktion leichter mit dem Phosphorimager quantifiziert werden kann. Dieses Assay repräsentiert den Schritt der Integrase-Reaktion, bei dem die Integrase ihre Aktion vollendet. Der in Tabelle 1 angegebene IC₅₀-Wert wird mittels Regressionsanalyse der prozentualen Kontrollreaktion mit Integrase bei verschiedenen Arzneimittelkonzentrationen erhalten. Das anfängliche Screening der Verbindungen wurde bei einer konstanten Konzentration von 10 µM für jede Testverbindung durchgeführt. Jene mit Aktivität bei 10 µM wurden dann verwendet, um IC₅₀-Werte zu bestimmen.

[0079] Das andere verwendete Assay bestand aus den einzelnen 20-mer-Oligonukleotiden, die entweder mit den U5- oder U3-Enden von HIV-1 korrespondierten, und diese werden mit ³²P endmarkiert, mit ihrem Komplement annealiert, gereinigt und unter den gleichen Bedingungen verwendet, wie sie oben für das Endonuklease-Assay beschrieben worden sind. Die Reaktionsprodukte werden mit Formamid denaturiert, der Elektrophorese an 20% denaturierenden Polyacrylamidgelen unterworfen und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Es kann sowohl die Spaltungs- als auch die Ligationsaktivität aus einem Gel bestimmt werden. Um die Ligationsaktivität alleine zu bestimmen wurde bei einigen Versuchen auch "vorgespaltenes" Substrat verwendet, das die mittels Verwendung eines radiomarkierten 18-mer-Oligonukleotiden künstlich erzeugte -2-Spal-

tung besaß.

[0080] Die Ergebnisse werden unten in Tabelle 2 angegeben.

BEISPIEL 21

Virus- und Zell-Kulturen

[0081] Die verwendeten Zell-Linien waren CEM-Zellen, eine menschliche T-Zellen Lymphom-Zell-Linie, A. Kaplan et al., J. Virol. 67: 4050–5 (1993), und "Magic"-Zellen, J. Kimpton et al., J. Virol. 66: 2232 (1992). Die CEM-Zellen wurden in RPM 1-1640 Medium, das mit 5% FCS ergänzt war, gezüchtet. Die "Magic"-Zellen, ein HEla-Derivat, wurden in DMEM/H, ergänzt mit 5% FCS, G418 (20 mg/ml) und Hygromycin (10 mg/ml), gezüchtet. Das HIV-Isolat gehörte zum Stamm HXB2, ursprünglich von Lee Ratner aus dem Labor von Robert Gallo am National Institutes of Health.

[0082] Die Ergebnisse werden unten in Tabelle 2 angegeben.

BEISPIEL 22

Toxizitäts-Assays

[0083] Es wurden drei verschiedene Toxizitätstests an den verwendeten Zell-Linien durchgeführt, um die Virus-Infektiosität zu messen.

[0084] Der erste Test auf Toxizität nutzt das XTT-Assay, wie es von Weislow et al., J. Natl. Cancer Inst. 81: 577 (1989) beschrieben wurde. Dieses ist das Standard-Assay, das ursprünglich verwendet wurde, um die Zell-Toxizität von potentiellen reverse-Transkriptase-Hemmern zu messen. Kurz gesagt, werden die Zellen auf Zellen/ml gezüchtet und Arzneimittel-Verdünnungen zu dem Medium hinzugefügt. Nach zwei Tagen Inkubation wird XTT-Reagenz hinzugegeben und die Inkubation wird vier Tage lang bei 37°C fortgesetzt. Im Anschluss an die Inkubation werden die Platten bei 450 minus 650 nm (der Wert 650 ist der Hintergrund-Wert, der automatisch subtrahiert wird) mit Kontrollen von Medien + XTT-Reagenz ohne Zellen und Zellen + Medien ohne Reagenz ausgelesen. Es wurde auch eine Kontrolle von Zellen + Medien + XTT-Reagenz für jede Platte durchgeführt. Medium ohne Phenolrot wurde eingesetzt, um die Hintergrundfarbe zu minimieren, weil das XTT-Reagenz von farblos (nicht reduziert) zu orange (reduziert) wechselt. Das XTT-Reagenz wurde am Tag des Assays wie folgt frisch hergestellt: 1 mg/ml XTT in 0,01 M Phenazinmethosulfat. Die Phenazinmethosulfat-Lösung wurde zuvor hergestellt und bei 4°C in einer dunklen Flasche gelagert. Das XTT-Reagenz wird in die Mikrotiter-Wellen mit 24 µl pro 100 µl Medium hinzugefügt. Die OD wurde mittels eines "Vmax Plate Reader" von Molecular Devices Co. mit Datenreduktion gemessen. Die Ergebnisse wurden als Prozent der unbehandelten Kontrollen ausgedrückt. Die am wenigsten toxischen Verbindungen waren die Verbindungen A, B, und F mit Toxizitätswerten von 500 µM oder größer.

[0085] Danach wurde mittels eines Plattierungseffizienz-Tests die Fähigkeit der Zelle zu wachsen gemessen, und zwar nach der einige Tage andauernden Inkubation mit dem Arzneimittel. "Magic"-Zellen wurden mit einer anfänglichen Zellkonzentration von $0,8 \times 10^4$ mit oder ohne verschiedene Konzentrationen der Testverbindung 6 Tage lang gezüchtet. Die Befähigung zur Plattierung der Zellen wurde mittels Plattierungs-Verdünnungen jeder Kultur auf Kunststoff bewertet. Die Ausbildung von koloniebildenden Einheiten wurde nach dem zwei- bis viertägigen Wachstum durch Zählen der Kolonien nach dem Färben der Platten bestimmt. Jede Probe wurde doppelt plattiert und die Koloniezahl wurde gemittelt.

[0086] Der dritte Test auf Zelltoxizität bewertete die Wachstumsrate in Anwesenheit der Testverbindung gegen eine Kontrollkultur. "Magic"-Zellen wurden über einen Zeitraum von 15 Tagen mit oder ohne verschiedene Verdünnungen der Testverbindungen gezüchtet. Aliquote wurden alle zwei Tage entnommen und die Zellen wurden in einem Hämozytometer gezählt.

[0087] Die Ergebnisse werden unten in Tabelle 2 gezeigt.

BEISPIEL 23

Integrase-Hemmungs-Assay

[0088] Testen als Integrase-Hemmer. In *E. coli* überproduzierte Integrase wurde in Übereinstimmung mit Sherman et al., supra, gereinigt, wie es oben beschrieben wurde, und beim Arzneimittel-Hemmungs-Assay verwendet. Die für diese Untersuchungen verwendete Integrase-Präparation war extrem rein und enthielt keine kontaminierende Nuklease-Aktivität. Verdünnungen der Hemmer-Verbindungen, welche im obigen Beispiel 1 beschrieben wurden, wurden vor der Zugabe des Enzyms mit Substrat gemischt. Das Assay war das gleiche, wie es in Beispiel 20 beschrieben wurde, und es wurde das in Beispiel 20 beschriebene Substrat verwendet. Jedes Assay wurde doppelt durchgeführt. Die Radioaktivität in Banden auf getrockneten Gelen wurde mit einem Phosphorimager quantifiziert, um Arzneimittel-Effekte sowohl auf die Spaltungs-, Nuklease- als auch Ligationsprodukte zu bewerten. Die IC₅₀-Werte der Integrase-Hemmung wurden sowohl für die spaltenden als auch verbindenden Anteile der Integrase-Reaktion nach Bestimmung der %-Hemmung der Kontrollreaktion für eine Reihe von Arzneimittelkonzentrationen berechnet.

[0089] Diese Ergebnisse werden unten in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

Zusammenfassung der Ergebnisse der Assays

Verbindung	Toxizität TD ₅₀ (µM)	Anti-HIV IC ₅₀ (µM)	Index TD ₅₀ /IC ₅₀	Integrase IC ₅₀ (µM)
S-1	40,02			1,0
S-2				>10
S-3				<10
S-4				<10
S-5		19,75		<10
S-6		30,05		1,4
S-7	90,30	63,30	1,42	0,85
S-8				0,5
S-9	212,59			>10
S-10				<10
S-11	732,02			>10
S-12	288,82			<10
S-13	78,21			<5
S-14	81,49	26,71	3,05	0,9
S-15	41,92	8,01	5,23	0,6
S-16	237,52	1,39	170,88	<10

[0090] Obwohl hier keine Festlegung auf irgendeine Theorie oder Erklärung der Erfindung beabsichtigt ist, geht man gegenwärtig davon aus, dass diese Verbindungen an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA mit einem AT-bias binden (siehe T. Fairley et al., J. Med. Chem. 36: 1746 (1993)) und höchst wahrscheinlich die Integrase mittels Verhinderung der Bindung der Integrase an ihre Erkennungssequenz an der langen terminalen Wiederholung ("LTR") des Virus hemmen. Dieser vorgeschlagene Mechanismus wird durch die Beobachtung gestützt, dass sowohl Spaltung als auch Ingeration gleichermaßen durch die Verbindungen beeinflusst werden. Gegenwärtig geht man auch davon aus, dass beide, nämlich die DNA-Sequenzspezifität und/oder die direkten Wechselwirkungen mit dem Integrase-Protein möglicherweise in den Mechanismus der Verbindung involviert sind. Da Integrase als Multimer wirkt, K. S. Jones et al., J. Biol. Chem. 267: 16037 (1992), ist es auch möglich, dass die DNA-Bindung der Verbindungen irgendwie das Multimer-Gleichgewicht beein-

flussen.

[0091] Die Ergebnisse zeigen an, dass die DNA-Bindungsstärke allein jedoch nicht der bestimmende Faktor ist. Gegenwärtig geht man auch davon aus, dass beide, nämlich die DNA-Sequenzspezifität und/oder die direkten Wechselwirkungen mit dem Integrase-Protein möglicherweise in den Mechanismus der Verbindung involviert sind. Da es sich gezeigt hat, dass Nukleosome präzise in der 5'-LTR von HIV-1 positioniert sind, A. Fesen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2399 (1993), könnte solches Phasing ein andere Weg sein auf dem die diaktionischen, furchenbindenden Arzneimittel die Integrase-Wirkung beeinträchtigen.

BEISPIEL 24

HIV-1-Hemmungs-Assays

[0092] Das von Kimpton et al., supra, beschriebene "Magic-Zellen"-Assay wurde verwendet, wie es beschrieben wurde. Dieses Assay identifiziert individuelle Zellen, die mit HIV-1 infiziert wurden, durch die Expression von tat, welches eine endogene Kopie des HIV-I-LTR transaktiviert, das nach der Integration mit dem lacZ-Reportergen verknüpft ist, wodurch β -Galactosidase-Expression induziert wird wenn Xgal zum Zellmedium hinzugefügt wird. Jede Zelle, die mit HIV-1 integriert ist, wird blau werden. Demnach stellt dieses Assay einen zweckmäßigen Weg bereit, um den Effekt von HIV-Hemmern bei einem frühen Schritt bis über die Expression von tat, einschließlich der Hemmung der Integration, zu bestimmen.

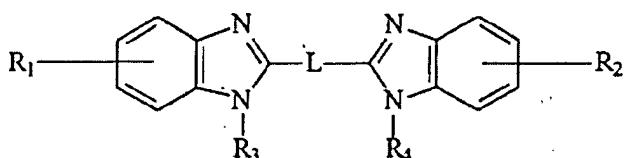
[0093] Die "Magic"-Zellen wurden einen Tag vor der Infektion in "twelve-well"-Platten plattiert. Das Standard-Assay schließt die Infektion mit ungefähr 200 infektiösen Einheiten von HIV-1 ein. Das ergibt ein Verhältnis von ungefähr 20 zu 1 von Signal zu Hintergrund und eine ausreichende Anzahl von Infektionereignissen um vage Effekte zu quantifizieren. Die Zellen werden vor der Virusinfektion 4 Stunden lang mit Arzneimittel vorbehandelt und die Virus-Adsorption findet eine Stunde lang statt. Die Zellen werden mit reinem Medium gewaschen und dann wird wieder Medium mit Hemmer auf die Zellen gegeben. Zwei Tage später werden die Zellen nach der Integration mit Xgal, dem Indikatorreagenz für die Produktion β -Galactosidase, fixiert. Die Anzahl der β -Galactosidase-exprimierenden Zellen wird mittels Lichtmikroskopie quantifiziert.

[0094] Der Ergebnisse von Vergleichen von infektiösen Einheiten mit oder ohne verschiedene Konzentrationen der bis-Benzimidazol-Arzneimittel im "Magic"-Zellen-Assay werden als IC₅₀-Werte ausgedrückt und sind oben in Tabelle 2 zusammengestellt. Hierbei sollte zur Kenntnis genommen werden, dass die besten Anti-HIV-Verbindungen generell auch die besten Integrase-Hemmer waren.

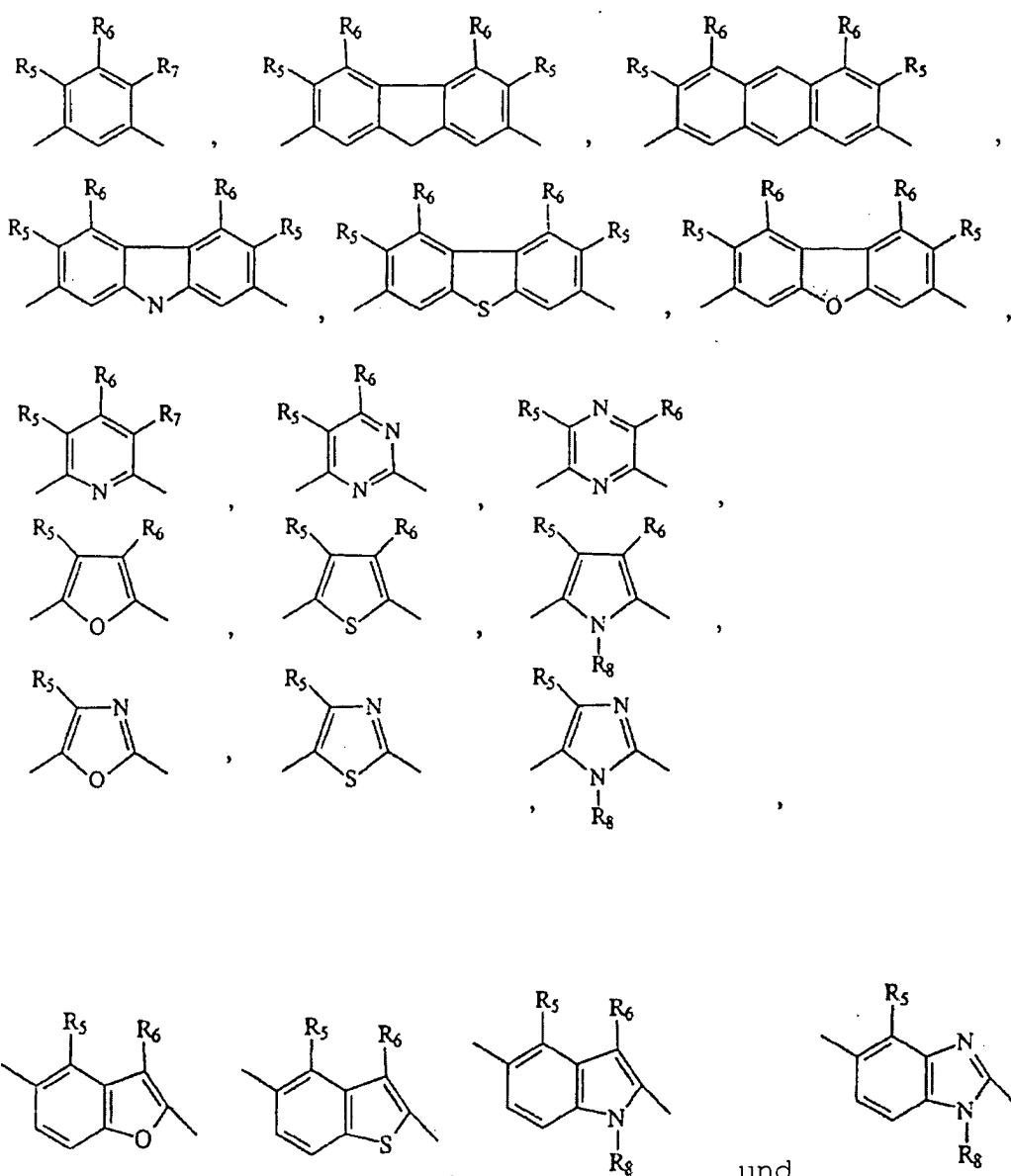
[0095] Das Vorangehende soll die vorliegende Erfindung beschreiben und nicht als deren Begrenzung betrachtet werden. Die Erfindung wird mittels der folgenden Ansprüche definiert, wobei Äquivalente der Ansprüche darin eingeschlossen sein sollen.

Patentansprüche

1. Verwendung einer Verbindung der Formel I:

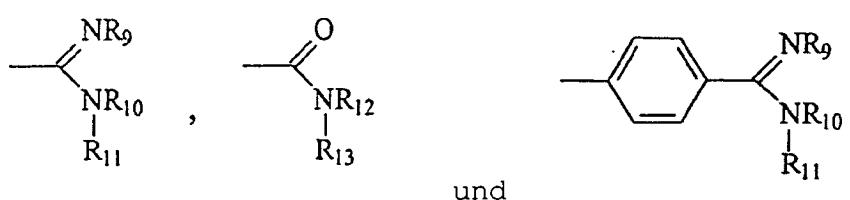


oder deren pharmazeutisch verträgliches Salz, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer retroviraalen Infektion bei einem Subjekt, worin L eine Verbindungsgruppe der folgenden Formel ist:

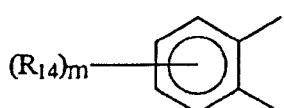


R_5 , R_6 , R_7 und R_8 sind jeweils individuell H, Alkyl, Halo, Aryl, Arylalkyl, Aminoalkyl, Aminoaryl, Oxoalkyl, Oxoaryl oder Oxoarylalkyl:

R_1 und R_2 sind jeweils individuell



R_9 und R_{10} sind jeweils individuell H, Hydroxyl, Alkyl oder R_9 und R_{10} bilden zusammen $-(CH_2)_n-$, worin n 2, 3 oder 4 und



ist.

ist, worin m 1, 2 oder 3 ist und R_{14} H oder $-CONHR_{15}NR_{16}R_{17}$ ist, worin R_{15} lineares, verzweigtes oder zyklisches C_1 - bis C_8 -Alkyl ist und R_{16} und R_{17} jeweils unabhängig voneinander H oder lineares, verzweigtes oder zyklisches C_1 - bis C_8 -Alkyl sind:

R_1 ist H oder Alkyl:

R_{12} ist H oder Alkyl;

R_{13} ist Alkyl, Alkylamino, Alkylmorpholino und Alkylaminophenyl und

R_3 und R_4 sind jeweils individuell H, Alkyl und Alkoxy;

worin jede der Alkylgruppen, die gleich oder verschieden sein können, ein lineares, verzweigtes oder zirkuläres C_1 - bis C_8 -Alkyl ist und ausgewählt ist aus den Gruppen, bestehend aus Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Cyclopropyl, n-Butyl, Isobutyl, tert-Butyl, Cyclobutyl, Pentyl, Isopentyl, Cyclopentyl, Hexyl, Isohexyl, Cyclohexyl, Septyl, Isoseptyl, Octyl und Isooctyl,

und jede der Arylgruppen, die gleich oder verschieden sein können, ein 5- bis 6-gliedriger Kohlenwasserstoff- oder heterozyklischer aromatischer Ring ist und ausgewählt ist aus den Gruppen, bestehend aus Cyclopenta-dienyl, Phenyl, Furan, Thiophen, Pyrrol, Pyran, Pyridin, Imidazol, Isothiazol, Isoxazol, Pyrazol, Pyrazin und Pyrimidin,

und jede der Alkoxygruppen, die gleich oder verschieden sein können, eine lineare oder verzweigte C_1 - bis C_8 -Alkoxygruppe ist und ausgewählt ist aus den Gruppen, bestehend aus Methoxy, Ethoxy, Propoxy, Isopropanoxy, Butoxy, Isobutoxy, t-Butoxy, Pentoxy, Hexoxy und Octoxy.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, worin diese Verbindung folgende ist:

2,5-bis(5-Amidino-2-benzimidazolyl)pyrrol;

2,5-bis[5-(2-Imidazolinyl)-2-benzimidazolyl]pyrrol;

2,6-bis[5-(2-Imidazolinyl)-2-benzimidazolyl]pyridin;

1-Methyl-2,5-bis(5-amidino-2-benzimidazolyl)pyrrol;

1-Methyl-2,5-bis[5-(2-imidazolyl)-2-benzimidazolyl]pyrrol;

1-Methyl-2,5-bis[5-(1,4,5,6-tetrahydro-2-pyrimidinyl)-2-benzimidazolyl]pyrrol;

2,6-bis(5-Amidino-2-benzimidazolyl)pyridin;

2,6-bis[5-(1,4,5,6-Tetrahydro-2-pyrimidinyl)-2-benzimidazolyl]pyridin;

2,5-bis(5-Amidino-2-benzimidazolyl)furan;

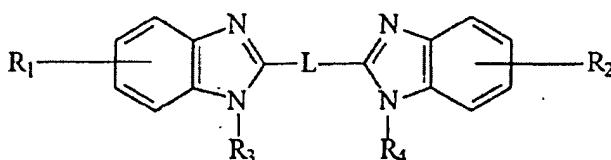
2,5-bis[5-(2-Imidazolinyl)-2-benzimidazolyl]furan oder

2,5-bis(5-N-Isopropylamidino-2-benzimidazolyl)furan und

deren physiologisch verträgliche Salze.

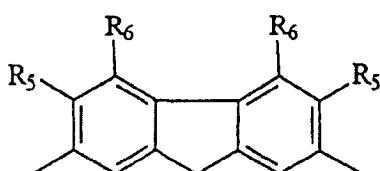
3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin diese retrovirale Infektion eine HIV-Infektion ist.

4. Verbindung gemäß Formel I, wie in Anspruch 1 definiert:



worin:

L die folgende Verbindungsgruppe ist:



und R_1 bis R_{13} wie in Anspruch 1 definiert sind.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen