



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 91104342.X

[51] Int.Cl⁵
C07D403/04

[43] 公开日 1992年1月1日

[22]申请日 91.6.17

[30]优先权

[32]90.6.18 [33]US [31]539,500

[71]申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72]发明人 阿尼·罗伯特·贝里民

詹姆斯·瓦林廷·俄雷 明-初·舒

司特乌·易克-凯·汤姆

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利

代理部

代理人 徐汝巽

/(C07D 403/04,207:335,243:18)

说明书页数: 10

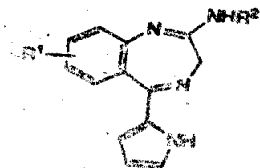
附图页数: 4

[54]发明名称 氨基苯吡二氮杂萘

[57]摘要

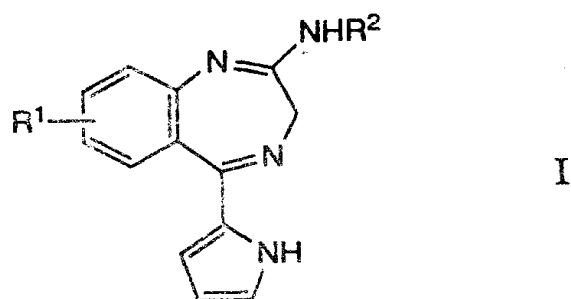
一种具有式 I 所示的氨基苯吡二氮杂萘及其药物上可接受的盐类,其中 R¹ 是氢, NO₂, 卤素, CF₃, 低级烷基, OH, 低级烷氧基或 CN, R² 是氢或 CH₃, 具有抗病毒的活性,可用于治疗或预防病毒感染,特别是反录病毒感染,诸如 HIV1 和 / 或 HIV2 感染,或使细胞免遭这类病毒感染。

这些化合物可由相应的苯吡二氮杂萘硫酮来制备。

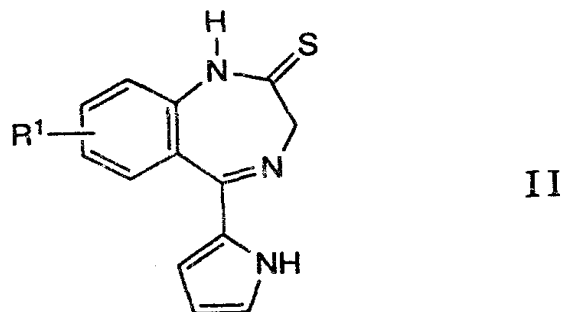


I

1. 一种制造具有式 I 所示的氨基苯骈二氮杂萆及其药物上可接受的盐类的方法



其中 R^1 是氢, NO_2 , 卤素, CF_3 , 低级烷基, OH , 低级烷氧基或 CN , R^2 是氢或 CH_3 , 它包括把具有式 II 所示的苯骈二氮杂萆



或相应的酰胺(即氧替代了硫)与 R^2-NH_2 进行反应而制得。

2. 一种如权利要求 1 所述的方法, 其中 R^1 是 Cl 。

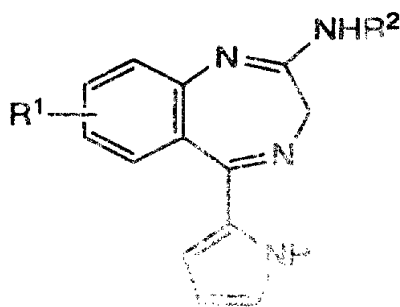
3. 一种如权利要求 1 或 2 所述的方法, 用它制备了 7-氯-N-甲基-5-(1H-吡咯-2-基)-3H-1,4-苯骈二氮杂萆-2-胺。

4. 一种制造一种药剂的方法，该药剂可用来治疗或预防病毒感染，特别是反录病毒感染，诸如H I V 1和/或H I V 2感染，或使细胞免遭这类感染；它包括把一种权利要求1，2或3中所述的具有式I的化合物或它的盐类，以及任何一种第二类抗病毒药剂，特别是逆转录酶抑制剂如d d C，A Z T，H I V蛋白酶抑制剂， α ， β 和/或 γ 干扰素，白介细胞素-2和/或G M - C S F制成草本制剂的形式。

5. 一种药剂，可用来治疗或预防病毒感染，特别是反录病毒感染，诸如H I V 1和/或H I V 2感染，或使细胞免遭这类感染，它含有一种权利要求1、2或3中所述的具有式I的化合物或它的盐类作为活性药物组分，以及任何一种第二类抗病毒药剂，特别是逆转录酶抑制剂如d d C，A Z T，H I T蛋白酶抑制剂， α ， β 和/或 γ 干扰素，白介细胞素-2和/或G M - C S F。

6. 把权利要求1、2或3所述的化合物用来制造一种药剂，它可用来治疗或预防病毒感染，特别是反录病毒感染，诸如H I V 1和/或H I V 2感染，或使细胞免遭这类感染。

7. 具有式I所示的氨基苯骈二氮杂葑及其药物上可接受的盐类，



I

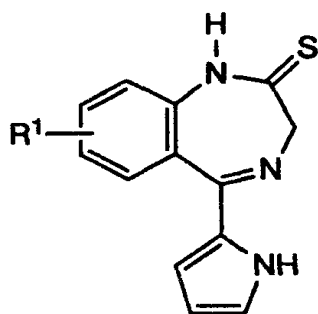
其中 R^1 是氢, NO_2 , 卤素, CF_3 , 低级烷基, OH , 低级烷氧基或 CN , R^2 是氢或 CH_3 , 无论是用权利要求 1 中所述的方法还是一种明显在化学上与之等价的方法所制备。

8. 如权利要求 7 中所述的化合物, 其中 R^1 是 C_1 , 无论是用权利要求 2 中所述的方法还是一种明显在化学上与之等价的方法所制备。

9. 7-氯-N-甲基-5-(1H-吡咯-2-基)-3H-1,4-苯骈二氮杂葑-2-胺, 无论是用权利要求 3 中所述的方法还是一种明显在化学上与之等价的方法所制备。

10. 上文所述的各种化合物, 组合物, 制造方法和用途, 特别是实例中所示的。

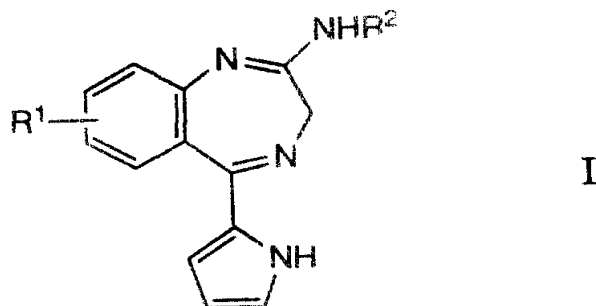
11. 具有式 II 所示结构的苯骈二氮杂葑硫酮, 其中 R^1 的定义如权利要求 1 中所述。



II

氨基苯骈二氮杂葸

本发明有关于具有式 I 结构的氨基苯骈二氮杂葸及其药物上可接受的盐类：



其中 R^1 是氢， NO_2 ，卤素， CF_3 ，低级烷基，OH，低级烷氧基或CN， R^2 是氢或 CH_3 。

本发明的目的是上述化合物本身以及将它们用作治疗药物，特别是治疗或预防病毒感染，尤其是反录病毒感染，诸如HIV 1和/或HIV 2感染，或使细胞免遭这类感染；

本发明还有关于制造这些化合物以及含有一种这类化合物及任意一种第二类抗病毒药剂，特别是逆转录酶抑制剂在内的药剂的方法，这第二类抗病毒药剂可以是ddC，AZT，HIV-蛋白酶抑制剂， α -， β -和/或 γ -干扰素，白介细胞素-2和/或GM-CSF。

本发明还包括应用这些化合物来制造药剂，特别是治疗和预防病毒感染，尤其是反录病毒感染，诸如HIV 1和/或HIV 2感染，或使细胞免遭这类感染的药剂。

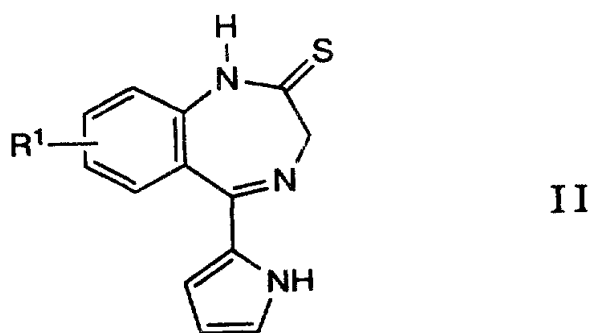
上面所用的术语“低级”烷基是指直链或支链的，不超过7个碳原子的烃链，比如甲基，乙基，丙基和异丙基等。

药物上可接受的盐可以是那些和有机酸如乳酸，醋酸，苹果酸，或对甲苯磺酸形成的盐类，或者是和无机酸如盐酸或硫酸形成的盐类。

上述化合物可能以立体异构或互变异构的形式存在，它们都被包括在本发明的范围内。

本发明中优选的化合物是那些 R^1 是氯的化合物，特别是7-氯-N-甲基-5-(1H-吡咯-2-基)-3H-1,4-苯并二氮杂革-2-胺。

具有式 I 所示结构的化合物可以用具有式 II 结构的苯并二氮杂革



或相应的酰胺（即氧替代了硫）与结构式为 $R^2 - NH_2$ 的化合物反应来制备。反应可以按通常的方式完成，例如在 $-78^\circ C$ 将苯并二氮杂革硫酮在四氢呋喃和甲醇中形成的溶液与氨反应，或在一种惰性溶剂如四氢呋喃，甲苯或二氧六环中，在一种 Lewis 酸如 $TiCl_4$ 或 $SnCl_4$ 存在的条件下，将对应的酰胺与 $R^2 - NH_2$ 进行反应。所用的苯并二氮杂革硫酮类化合物 II 可以由相应的酰胺和五硫化磷或 2,4-双-(4-甲氧基苯基)-1,3-二硫-2,4-二磷乙烷-2,4-二硫化物 (Lawesson 试剂)，于 $50-100^\circ C$ 在

四氢呋喃，甲苯，吡啶或二氧六环中进行反应来制备。

化合物 I 和它们的盐类具有有用的抗病毒活性，特别是抗反录病毒的活性，尤其是抗 HIV 的活性，这后一种病毒与爱滋病的发展有关，还和有关的疾病如 ARC（爱滋病有关的综合症）等有关。这些化合物也通过抑制重要的 HIV 病毒功能如 TAT（转活转录）活性而能抑制 HIV 复制。

可按下面的实验来试验化合物 I 抑制 HIV—细胞病的效果和减少与病毒抗原结合的细胞数目的效果：

在补充了 10% 的胎儿小牛血清和 0.1 毫克/毫升庆大霉素的 RPMI—1640 培养液中（Gibco 实验室），使高效价的病毒原株（HIV—1 NIT 毒株）在 CD₄⁺ CR10 细胞中生长。将所收集的培养液过滤并将病毒析离物浓缩 100 倍，储存于 -80 °C。把在同一种培养液中繁殖的 CD₄⁺ CEM 细胞，在感染倍数（MOI）等于 1 的条件下于 37 °C 用稀释的毒株孵育 60 分钟。把细胞用磷酸盐缓冲的食盐水洗涤，重新悬浮于培养液中，并使其浓度为 2 × 10⁵ 细胞/毫升，加入不同量的试验化合物在二甲亚砜中的溶液；感染 4 天后用台盼蓝分离法计数存活的细胞数目（参见 Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 1986, 1911）。同时，把等分的细胞用丙酮固定并用取自爱滋病人的抗体染色，接着第二次用荧光素结合的山羊抗人体免疫球蛋白（Cappel）染色。这样，经荧光抗体染色的细胞即可用荧光显微镜计数，实验结果表示为总的计数过的细胞中染色细胞的百分数（J. Med. Virol. 19, 1986, 325）。

实验结果可用 ID₅₀（ μ M）来表示，它是指能把免疫荧光呈阳性的细胞数目减少 50% 所需的试验化合物的浓度，对于实例 1 中

制得的产物(化合物A),此值为 0.5 至 $1 \mu\text{M}$,对于实例2中制得的产物(化合物B),此值为 $1 \mu\text{M}$ 。

为进行细胞毒性试验,可将CEM细胞用相似浓度的式I化合物处理,并通过计数存活细胞的数目来测量化合物的毒性。

附图1和附图2描绘了化合物A的抗HIV活性,图1是显示用化合物A处理过的被HIV-1感染过的CEM细胞的存活率。图1也显示当细胞用增加量的化合物A处理后,导致用HIV抗体感色后呈免疫荧光阳性的细胞的百分数降低。图2提供了化合物A与AZT、ddC在抗HIV活性方面的比较数据,是分别用细胞存活率, P24抗原和病毒的RNA量测定的。

试验化合物A和B的抗HIV-TAT活性的实验方法可按下列步骤进行:

(a)把分泌硷性磷酸脂酶(SEAP)的基因表达和病毒活性转移者TAT的基因表达都置于HIV促进剂LTR的控制下,后者可响应HIV活性转移者TAT的作用;

(b)用含有上述(a)中基因构成的原生质体转染培养的哺乳动物细胞,并引起转活因子TAT和SEAP的细胞增殖;

(c)加入被试验的药物,这里是化合物A和B,并通过测量SEAP酶活性来测定增殖的SEAP的量,藉助SEAP增殖被抑制的情况来和药物的抗TAT抑制活性相关连。在这一分析方法中,SEAP增殖的抑制和抗TAT的活性正性相关,即药物抑制SEAP增殖的能力愈大,它的抗TAT活性也愈大。

具体地说,有关下面报告的实验结果,是按下述试验方法测定其抗HIV-TAT活性的:

在转染24小时以后，往COS细胞的培养液中分别加入1, 10, 25和50 μM待试验的具有式I结构的化合物，这些COS细胞是用两种原生质体转染的，其中一种含有报道基因，它能在HIV-LTR控制下为SEAP编码，另一种含有HIV-TAT基因，它也在HIV-LTR控制之下，培养液的硷性磷酸酯酶活性在加入试验化合物48小时后，用对硝基苯基磷酸酯为底物，通过比色法进行测定。药物的抗TAT活性，是通过在HIV-LTR控制下SEAP基因表达的抑制百分数，相对于在RSV-LTR控制下的SEAP基因表达的抑制百分数来衡量的，RSV-LTR对TAT没有响应。每种被试验的化合物A和B，经过三次独立的分析测定，其抗HIV-TAT活性的平均值按上述抑制百分数计算均优于60%。

这些实验结果表明化合物A和B是HIV-TAT控制的基因表达的专一性抑制剂，而没有非专一性的细胞毒性效应。

化合物A和B作为TAT抑制剂的专一性可用一个平行试验来证实，在其中把SEAP的基因表达置于骨髓瘤病毒(RSV)-LTR的控制之下，它对TAT没有响应；这一试验消除了化合物A和B具有一般细胞毒性或抑制SEAP活性的可能性。

被试验的化合物的抗HIV-TAT活性，可通过细胞培养液的上清液中硷性磷酸酯酶的量来决定，在其中SEAP的基因表达是在HIV-LTR促进剂的控制之下；被试验化合物的专一性抑制活性可按下式计算：

$$100 \left[(1 - A/B) - (1 - C/D) \right]$$

其中A和B分别表示在有和没有试验化合物存在时被HIV-LTR

／S e A P增长的碱性磷酸酯酶的活性，C和D分别表示在有和没有试验化合物存在时被R S V - L T R / S e A P增长的碱性磷酸酯酶的活性。试验化合物的浓度范围从1至50 μ M，提供的结果是至少三次实验的平均值。试验化合物是在细胞被用原生质体转染24小时以后才加入的，这时S e A P专有的m R N A和蛋白质已经存在并且蛋白质是很稳定的。因此，用这一分析程序不可能观测到100%的抑制。图3报告了对化合物A进行测定的结果。

也曾用能在H I V - L T R控制下在组成上表达S e A P基因的细胞株来试验化合物A的抗H I V - T A T活性。细胞株193C，191F，199F是衍生自C H O细胞（中国仓鼠卵巢的细胞株）每一株都是无性系源的，并且在细胞染色体中整合有H I V - L T R / S e A P和H I V - L T R / T A T的序列。一天之后细胞被嗜斑（约30%点），然后往培养液中加入所需浓度的化合物A在D M S O中的溶液（浓度为0.05%）。一天之后洗涤细胞并补加化合物A；在第二次加入试验化合物的两天之后测定S e A P的活性。图4给出的细胞毒性测量的结果表明，化合物A有意义地抑制在H I V - L T R促进剂控制下的S e A P表达（由图中顶端的几条线可证实），同时对细胞没有细胞毒性效应（由图中下端的虚线证实）。

对于感染了H I V的人类患者，和有症状或无症状的H I V感染患者，具有式I结构的化合物或其盐类的抗病毒有效用药量为每天0.1至10毫克/公斤体重，最好是0.3至5毫克/公斤体重，更好是大约1至3毫克/公斤体重。这一剂量可通过在一天的不同时间间隔一次或分数次给药；非肠道给药或口服均可，但最好是每天口

服一次。

这些化合物也可以和别的抗病毒药物和/或生物应搭修饰剂一道用药。例如，它们可以和已知的RT（逆转录酶）抑制剂如ddC，AZT和ddI一道用药，也可以和其它能作用于别的HIV蛋白，如蛋白酶的抑制剂以及生物修饰剂如 α ， β 和/或 γ 干扰素，白介细胞素-2和/或GM-CSF等一道用药。对于ddC，用药范围在大约0.005-0.25毫克/公斤体重时，在大多数患者身上即有抑制病毒的效果。口服用药的初次剂量范围较宽，例如从0.001至0.25毫克/公斤体重，可相隔2，4，6，8或12小时，一次或多次服药。通常最好是每隔8小时按0.01毫克/公斤体重服用ddC。在联合治疗中，其它抗HIV药物可以和本发明中的化合物同时给药，但如果需要也可交错给药。两种（或更多种）药物可以联合用于一种组成中，当联合用药时每种药物的剂量可比单独用药时小一些。

对于本发明中的化合物，可以单独以溶液的形式给药。但最好是活性成份以药物制剂或组合物形式给药。这些制剂包含至少一种活性成份，还有一种或多种药物上可接受的载体或赋形剂以及任意其它药剂，例如蛋白酶抑制剂。这些载体包括那些适用于口服，直肠给药，经鼻腔给药，皮肤表面给药，颊部用药，舌下用药，阴道用药，非肠道用药（包括皮下、肌内、静脉内、真皮内的注射）的载体物质。

本发明的药剂组合物实例有活性组份在水或盐水中的溶液，胶囊如软明胶胶囊，粉剂或片剂，每种组合物都含事先决定好数量的活性成份，也可以是粒剂，溶液，或在水溶液中的悬浮液，或油在水中的乳液，或水在油中的乳液。片剂可包括一种或多种赋形剂如乳糖，微

晶纤维素，胶体二氧化硅，Croscarmellose钠，硬脂酸镁，硬脂酸等，着色剂和药物上合适的载体，适合于皮肤用药的制剂包括锭剂，其中的活性成份包含在一种调味剂，通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶中；软锭剂是把活性成份包含在一种惰性基质如明胶和甘油，或蔗糖和阿拉伯胶中；漱口药剂则把活性成份包含在合适的液体载体中。为直肠用药的制剂是由合适的基质包括可可脂或水杨酸酯制成的栓剂。适用于阴道用药的制剂可做成阴道栓剂，棉塞，乳膏，凝胶剂，糊剂，泡沫剂或喷雾剂；适用于非肠道给药的制剂包括水或非水的等渗无菌注射液，其中可含有抗氧化剂，缓冲剂，制菌剂，以及使制剂与受体的血液等渗的溶质；水和非水的无菌悬浮液可包含悬浮剂和增稠剂。制剂可包装在含有一次剂量或多次剂量的密封容器如安瓿和小瓶中，也可在冷冻干燥的条件下储存，当需要使用时只需加入无菌的液体载体比如水，即可供注射。临时的注射溶液和悬浮液可由前述的无菌粉剂、粒剂和片剂来制备。

实施例 1

把 0.5 克 7-氯-1,3-二氢-5-(1H-吡咯-2-基)-1,4-苯并二氮杂革-2-酮在 25 毫升 THF (四氢呋喃) 中形成的溶液在干冰/丙酮浴中冷却，往此溶液中通入甲胺气体并在搅拌下滴加 0.29 毫升 $TiCl_4$ ，在室温反应 5 小时后，再加入另外 0.2 毫升 $TiCl_4$ 。18 小时后加入小片冰并将反应混合物过滤，用 THF 洗涤并浓缩，产物由 CH_2Cl_2 /甲醇中结晶，再由乙醇中重结晶，得到 0.25 克 (48%) 7-氯-N-甲基-5-(1H-吡咯-2-基)-3H-1,4-苯并二氮杂革-

2-胺，熔点 251°C 。

实施例 2

a) 在搅拌下往 10 克 7-氯-1,3-二氢-5-(1H-吡咯-2-基)-1,4-苯并二氮革-2-酮在 400 毫升 THF 中形成的溶液中加入 10 克 P_4S_{10} ，反应混合物在 40°C 用超声波照射，2.5 小时后往混合物中加入另外 10 克 P_4S_{10} ，继续反应 2 小时。反应混合物冷却到室温并过滤。固体产物用 CH_2Cl_2 洗涤后，汇合的滤液真空蒸馏除去其中 80% 的溶剂，残余物用饱和碳酸氢钠溶液碱化，滤出沉淀的产物，滤液用 CH_2Cl_2 提取，然后减压浓缩，得到的固体由 THF/石油醚中重结晶，得到 9.9 克 (产率 94%) 7-氯-1,3-二氢-5-(1H-吡咯-2-基)-1,4-苯并二氮杂革-2-硫酮，熔点 $258-260^{\circ}\text{C}$ 分解。

b) 0.5 克上述 a) 的产物在 5 毫升 THF 及 200 毫升甲醇中形成的溶液冷却到 -78°C ，往其中通入 NH_3 气，然后使反应物慢慢升到室温并搅拌 12 小时，蒸去溶剂得到 7-氯-5-(1H-吡咯-2-基)-3H-1,4-苯并二氮杂革-2-胺，产率 40%，熔点 $177-179^{\circ}\text{C}$ 分解。

下列含有前面定义的化合物 I 或它的盐作为活性组分的草本制剂，可按通常已知的方法制备：

片剂配方：

成分	毫克/片
活性成分	20 毫克
乳糖	180 毫克

预凝胶化淀粉	15 毫克
口服液配方:	
成分	毫克/剂
活性成分	20.0 毫克
对一羟基苯甲酸甲酯	20.0 毫克
蔗 糖	适量
调味香料	适量
柠檬酸缓冲液	适量
纯化水加至	5 毫升

片剂配方	
成分	毫克/片
活性成分	20 毫克
淀 粉	40 毫克
微晶纤维素	80 毫克
乳 糖	274 毫克
硬脂酸镁	2 毫克
	416 毫克

软胶囊剂配方	
成 分	毫克/胶囊
活性成分	20 毫克
乙氧基化的脂肪酸	500 毫克
PEG 4000 (一种聚乙二醇)	100 毫克
植物油加至	1.0 毫升

化合物 A 在用 HIV-1 感染的 CEM 细胞中的抗 HIV 活性

图 2

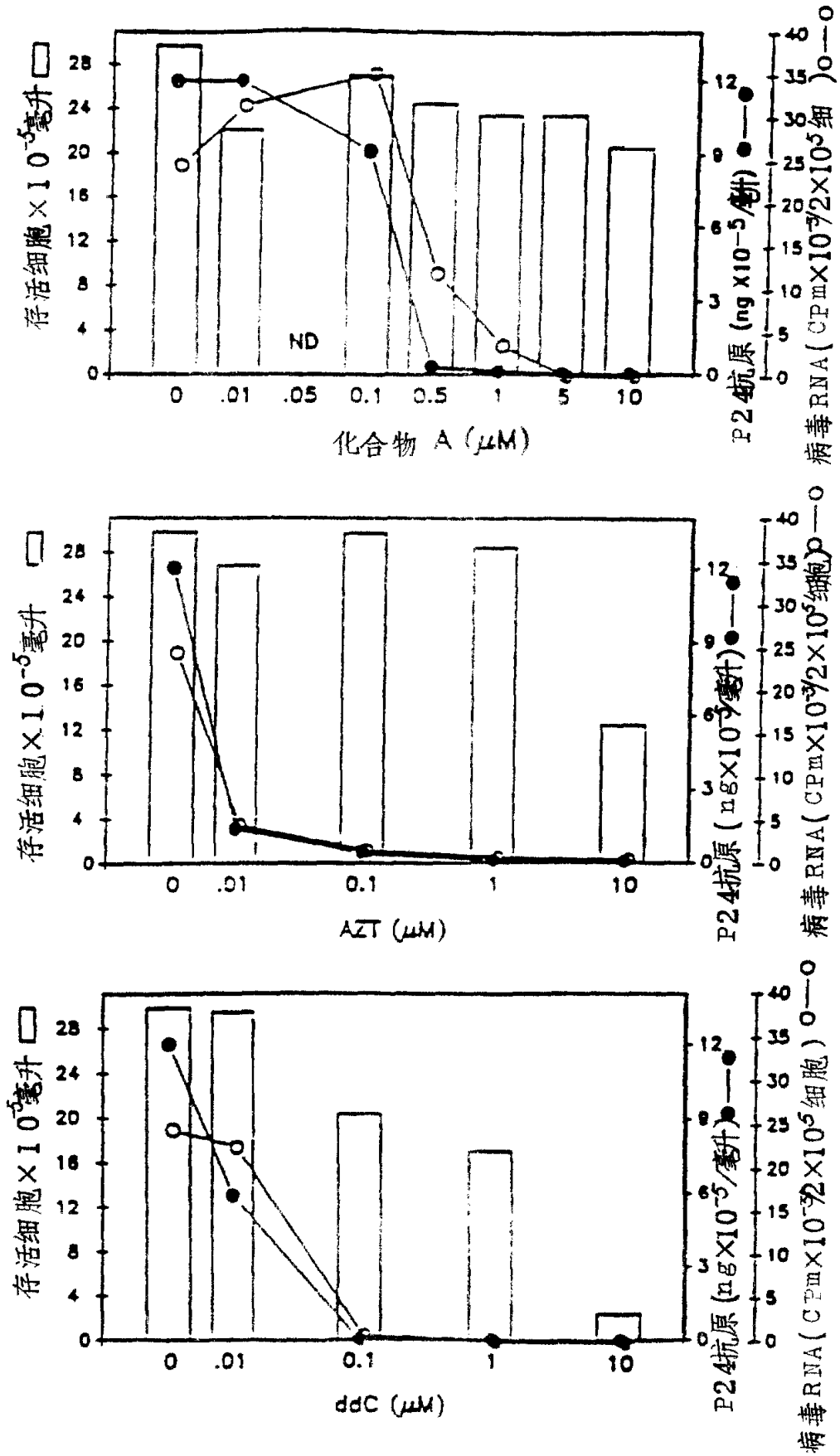


图 3

用基于转染测定实验证实的化合物 A 的抗 TAT 活性

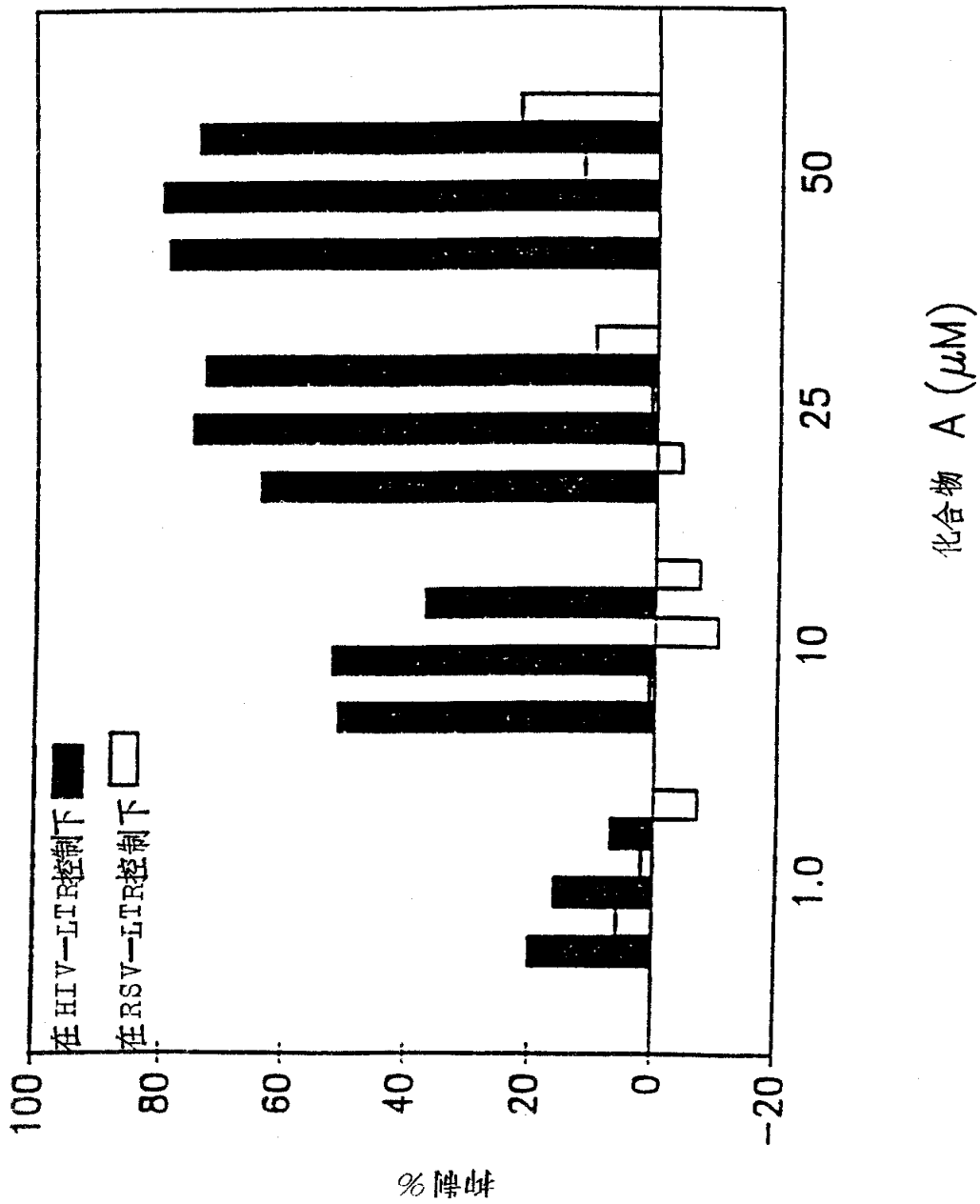


图 4

用组成细胞株系证实的化合物 A 的抗 T A T 活性

