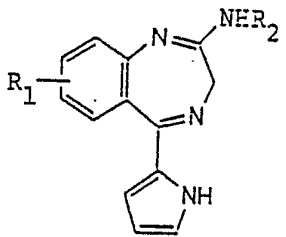
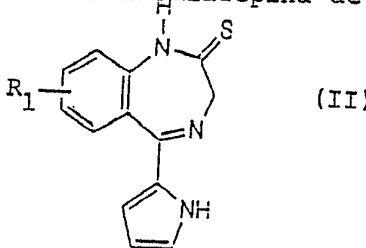



Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (61)
98.007 J			
Requerente (71): F.HÖFFMANN-LA ROCHE AG., suíça, industrial, com sede em 124 Grenzacherstrasse, CH-4002 Basel, Suíça			
Inventores (72): ANNE ROBERTE BELLEMIN, JAMES VALENTINE EARLEY, MING-CHU HSU e STEVE YIK-KAI TAM			
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)
Data do pedido	Pais de Origem	N.º de pedido	
18.06.1990	US	539,500	
Epígrafe: (54) "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE AMINOBENZODIAZEPINAS E DE COMPOSI- ÇÕES FARMACÊUTICAS QUE AS CONTÊM"			
Resumo: (máx. 150 palavras) (57)			
Descreve-se um processo para a preparação de compos- tos de fórmula geral			
 (I)			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS



Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido (22)	Classificação Internacional (61)
Resumo (continuação) (57)			<u>2</u>
<p>e dos seus sais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico que consiste em fazer reagir uma benzodiazepina de fórmula geral</p>			
 <p>(II)</p>			
<p>ou a amida correspondente em que o átomo de oxigênio representa o átomo de enxofre, com um composto de fórmula geral</p>			
R_2-NH_2			
<p>Estes compostos utilizam-se no tratamento ou na profilaxia de infecções virais, especialmente de infecções retrovirais tais como as provocadas por HIV1 e/ou HIV2, ou para proteger as células contra este tipo de infecções.</p>			
<p style="text-align: right;"> (Dr. Jorge Garin)</p>			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBRADAS

4.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE AMINOBENZODIAZEPINAS E DE
COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE AS CONTÊM"

A presente invenção refere-se a aminobenzodiazepinas de fórmula geral I na qual R_1 representa um átomo de hidrogênio ou de halogênio ou um grupo nitro, trifluorometilo alquil inferior hidroxi alcoxi inferior oceano e R_2 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo metilo e os seus sais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.

Os objectivos da presente invenção são os compostos citados anteriormente por si só e a sua aplicação como agentes terapêuticos activos especialmente no tratamento ou na profilaxia de infecções virais, particularmente infecções retrovirais tais como, as infecções por HIV 1 e/ou HIV 2 ou para protecção das células contra essas infecções; ainda um processo para a preparação destes compostos e medicamentos contendo um ou mais dos compostos citados e, eventualmente, um segundo agente anti-viral, especialmente um inibidor de transcriptase inversa tal como, ddC, AZT o inibidor da protease de HIV, α , β - e/ou γ -interferon, interleucina-2 e/ou GM-CSF e a aplicação destes compostos para a preparação de medicamentos especialmente no tratamento ou na profilaxia de infecções virais particularmente infecções retrovirais tais como as infecções por HIV 1 e/ou HIV 2 ou para a protecção das células contra essas infecções.

Tal como aqui se utiliza o termo "inferior" refere-se a cadeias hidrocarbonadas de cadeia linear ou ramificada até 7 átomos de carbono tais como metil, etil, propilo e isopropilo.

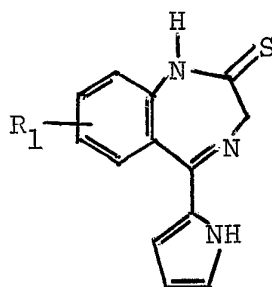
4.

Os sais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico podem ser sais de ácidos orgânicos por exemplo de ácido lático, ácido acético, ácido málico, ou ácido p-toluenossulfônico; e/ou sais de ácidos minerais tais como o ácido clorídrico ou o ácido sulfúrico.

Os compostos citados anteriormente podem existir sob formas estereoisoméricas ou tautoméricas sendo todos incluídos no âmbito da presente invenção.

Os compostos preferidos da presente invenção são aqueles em que o símbolo R_1 representa um átomo de cloro, em especial 7-cloro-N-metil-5-(1H-pirrol-2-il)-3H-1,4-benzodiazepina-2-amina.

Os compostos de fórmula geral I podem preparar-se fazendo-se reagir uma benzodiazepina de fórmula geral II



II

na qual R_1 , tem o significado definido antes ou a amida correspondente na qual O está substituído por enxofre, com um composto de fórmula geral R_2-NH_2 . Pode realizar-se a reacção de uma forma convencional, por exemplo mediante reacção da benzodiazepinotona em tetra-hidrofurano e metanol à temperatura de $-78^{\circ}C$ com amoníaco ou mediante a reacção da amida correspondente com uma amina de fórmula geral R_2-NH_2 em um dissolvente inerte, tal como tetra-hidrofurano, tolueno ou dioxano na presença de um ácido de Lewis, tal como o tetracloreto de titânio ou tetraclo-

reto de estanho. As benzodiazepinotinas de fórmula geral II podem preparar-se fazendo-se reagir a amida correspondente com pentassulfureto fosforoso ou com 2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3-ditio-2,4-difosfetano-2,4-dissulfureto (reagente de Lawessen's), por exemplo, em tetra-hidrofurano, em tolueno, piridina ou dioxano, de preferência a uma temperatura compreendida entre 50 e 100°C.

Os compostos de fórmula geral I e os seus sais têm actividade anti-viral, em especial anti-retroviral particularmente contra HIV, o virus associado com o desenvolvimento da SIDA e doenças relacionadas tais como ARC (complexo relacionado com a SIDA). Estes compostos também inibem a replicação de HIV mediante a inibição de funções virais de HIV importantes como actividade TAT (transactivação transcricional).

Os compostos de fórmula geral I foram testados relativamente à inibição do efeito citopático sobre HIV e redução dos anti-génios virais associados com a célula numa experiência que se desenvolveu como segue:

Famílias de vírus de título alto (estirpe HIV-1 NIT) foram desenvolvidas em células CR10 CD₄⁺ em meio de RMPI-1640 dos Laboratórios Gibco suplementado com soro de vitela fetal a 10% e 0,1 mg/ml de gentamicina. Recolheu-se o meio que se filtrou e os isolados de virus concentraram-se 100 vezes e conservaram-se à temperatura de -80°C. Lavaram-se as células com solução de cloreto de sódio tamponada com fosfato e resuspende-ram-se no meio na concentração de 2 x 10⁵/ml. Adicionaram-se quantidades variáveis dos compostos em ensaio em dimetilsulfóxido. Quatro dias após a infecção, contaram-se o número de células vivas por exclusão azul de tripano (Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 1986, 1911). Simultaneamente fixaram-se alíquotas de células com acetona e coraram-se com anti-corpos provenientes de doen

tes com SIDA seguido por uma segunda cloração com IgG anti-humana de caprino conjugada com fluoresceína (Cappel). As células coradas com anti-corpo fluorescente contaram-se usando-se um microscópio de fluorescência e os resultados foram expressos sob a forma de percentagem do número total de células contadas (J. Med. Virol. 19, 1986, 325).

Os resultados expressaram-se sob a forma de DI_{50} (μM) isto é a concentração do composto ensaiado que reduz o número de células positivas à imunofluorescência em 50%, quantidades de 0,5 e μM para o produto do Exemplo 1 (composto A) e μM para o produto do Exemplo 2 (composto B).

Para testar a citotoxicidade trataram-se células CEM com um composto de fórmula geral I com concentrações similares e mediu-se a toxicidade do composto por contagem das células vivas.

As figuras 1 e 2 apresentam actividade anti-HIV do Composto A. A figura 1 mostra a taxa de sobrevivência de células CEM infectadas com HIV-1 tratadas com o composto A. A Figura 1 também demonstra que o tratamento das células com quantidades crescentes do composto A resulta na diminuição, em percentagem, das células que se apresentam positivas com imunofluorescência após a cloração com os anti-corpos HIV. A Figura 2 proporciona uma comparação da actividade HIV, medida avaliada pela sobrevivência das células e o antigénio p24 e quantidade de RNA viral do Composto A versus AZT e ddC.

Os Compostos A e B foram também testados para actividade anti-HIV-TAT num ensaio constituído pelas fases seguintes:

(a) submissão da expressão de o gene de fosfatase alcalina segregada (SeAP) e do gene TAT transactivador viral sob

o control do promotor de HIV LTR responsável pela acção do transactivador de HIV TAT;

(b) transfecção de células de mamífero cultivadas com plasmídios que contêm as construções genéticas citadas em (a), anteriormente, e causam a produção celular do factor de transactivação TAT e SeAP;

(c) adição do agente a testar, aqui os compostos A e B; e determinação da quantidade de SeAP produzida medindo-se a actividade enzimática de SeAP, portanto a inibição da produção de SeAP relacionada com a actividade de inibição anti-TAT. Neste ensaio, a inibição de SeAP relaciona-se positivamente com a actividade anti-TAT. Quanto maior for a capacidade de um agente para inibir a fosfatase alcalina segregada, maior é a sua actividade anti-TAT.

Especificamente, no que se refere aos resultados referidos em seguida, o ensaio anti-HIV-TAT desenvolveu-se do seguinte modo:

24 horas após a transfecção, adicionaram-se 1,10,25 e μM do composto em ensaio de fórmula geral I a um meio de cultura com células COS transfectadas com dois plasmídios, um contendo o gene informador que codifica para SeAP sob o control de HIV-LTR e outro contendo gene HIV-TAT também sob control de HIV-LTR. Actividade de fosfatase alcalina no meio foi doseada 48 horas após a adição do composto ensaiado por meio de um ensaio colorimétrico usando-se como substracto para nitrofenilfosfato. A actividade anti-TAT é avaliada pela percentagem da inibição da expressão do gene de fosfatase alcalina segregada sob RSV-LTR que não responde a TAT. Uma inibição superior a 60% foi a determinada com uma média de três ensaios independentes

de cada um dos compostos ensaiados A e B.

Os resultados comprovam que os compostos A e B são inibidores específicos da expressão do gene que regula HIV-TAT sem efeitos citotóxicos não específicos.

A especificidade dos compostos A e B como inibidores de TAT ficou demonstrada com um ensaio paralelo em que a expressão do gene da fosfatase alcalina segregada é colocada sob o control do vírus de sarcoma Rous (RSV-LTR) que não reage a TAT. Este ensaio portanto elimina a possibilidade dos compostos A e B serem agentes citotóxicos gerais ou inibirem a actividade da fosfatase alcalina segregada.

As actividades anti-HIV-TAT dos compostos ensaiados foram determinadas pela avaliação da quantidade fosfatase alcalina no meio de sobrenadantes das culturas das células em que a expressão do gene SeAP estava sob o control do promotor HIV-LTR. As actividades inibidoras específicas dos compostos em ensaio foram calculadas de acordo com a fórmula:

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

na qual A e B representam as actividades de fosfatase alcalina produzidas por HIV-LTR/SeAP na presença e ausência, respectivamente do composto em ensaio e C e D são actividades de fosfatase alcalina produzidas por RSV-LTR/SeAP na presença e ausência, respectivamente, do composto em ensaio. As concentrações testadas variaram entre 1-50 μ M. Os resultados obtidos são a média de pelo menos três ensaios. O composto ensaiado foi adicionado 24 horas após a transfecção das células com os plasmídios quando RNA específico de SeAP estavam já presentes, e a proteína era muito estável. Portanto a inibição de 100% não será observada com este processo de ensaio. A Figura 3 refere os resultados

dos ensaios com o composto A.

Também se testou o Composto A relativamente à actividade entre HIV-TAT com linhas de células que cuja constituição inclui a expressão do gene SeAP sob o control de HIV-LTR. As linhas de células 193C, 191F e 199F foram derivadas de células CHO (linhas de células originais de ovário de hamster chinês). Cada linha é de origem colunar e tem as sequências de HIV-LTR/SeAP e de HIV-LTR/TAT integradas no cromossoma da célula. Decorrido um dia sobre a placagem das células, confluência aproximadamente 30%, adicionou-se o composto A em dimetilsulfóxido com uma concentração 0,05% num meio de cultura em concentrações desejadas. As células foram lavadas e o composto A foi repostado após um dia. Analisou-se a actividade de fosfatase alcalina segregada dois dias após segunda adição do composto em ensaio. Os resultados da avaliação da citotoxicidade apresentados na Figura 4 demonstram que, enquanto o composto A inibe significativamente a expressão SeAP sob o control do promotor de HIV-LTR, (demonstrado pelas linhas no topo), ele não tem efeito citotóxico sobre as células (linhas a tracejado na parte inferior).

Relativamente aos doentes humanos infectados com HIV e doentes com infecções por HIV sintomáticas ou assintomáticas, uma quantidade com eficácia anti-viral de um composto de fórmula geral ou do seu sal encontra-se nos limites aproximados de 0,1 e 10 mg/kg, de preferência aproximadamente 0,3 a 5 mg/kg, de forma mais conveniente entre cerca de 1 e 3 mg/kg de massa corporal e por dia. Esta dose pode ser administrada por via parentérica ou oral em uma ou mais doses com vários intervalos diários de preferência por via oral e uma vez ao dia.

Os presentes compostos também podem ser administrados

com outros agentes anti-virais e/ou modificadores da reacção biológica. Por exemplo podem ser administrados com inibidores de transcriptase reversa conhecidos tais como ddC, AZT e ddI ou outros inibidores que actuam contra outras proteínas HIV tais como protease assim como modificadores biológicos tais como α , β e/ou γ -interferon, interleucina-2 e/ou GM-CSF. Para ddC o valor entre 0,005-0,25 mg/Kg de massa corporal aproximado é virustático em maioria dos doentes. As doses preliminares para administração oral têm limites um pouco mais amplos, por exemplo 0,001 e 0,25 mg/Kg administrados em uma ou mais doses com intervalos de 2,4,6,8 ou 12 horas. Habitualmente, prefere-se uma dose de 0,01 mg/Kg de massa corporal de ddC administrada de 8 em 8 horas. Quando feita uma terapêutica associada, podem ser administrados outros compostos anti-HIV simultaneamente, o composto da presente invenção, ou a dosagem pode ser reduzida, quando apropriado. Os dois ou mais fármacos podem também ser associados numa composição. As doses de cada fármaco pode ser inferior quando utilizada em associação de quando são utilizados isoladamente.

É possível para os compostos desta invenção serem administrados isoladamente em solução. Contudo é preferível que os componentes activos sejam administrados sob a forma de uma composição farmacêutica. Estas composições contêm pelo menos um componente activo conjuntamente com o veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico ou um excipiente e podem, eventualmente incluir outros agentes terapêuticos, por exemplo o inibidor da protease. Estes veículos incluem os veículos adequados para administração oral, rectal, nasal, tópica, bucal, sublingual, vaginal ou parentérica, incluindo a via subcutânea, intramuscular, intravenosa e intradérmica.

Exemplos das composições da presente invenção são soluções dos componentes activos, por exemplo em água ou solução de cloreto de sódio; cápsulas, por exemplo cápsulas de gelatina mole; saquetas ou comprimidos, contendo cada um uma quantidade previamente determinada do componente activo por exemplo sob a forma de grânulos; soluções ou suspensões em um líquido aquoso ou uma emulsão de água em óleo ou uma emulsão líquida de óleo em água. Os comprimidos podem incluir um ou mais excipientes como lactose, celulose microcristalina, dióxido de silicóne, coloidal, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, ácido esteárico ou outros excipientes, agentes corantes e veículos com compatibilidade farmacêutica. As composições apropriadas para a administração tópica incluem pastilhas que contêm componente activo, um agente apaladante, usualmente sacarose e acácia tragacanta; as pastilhas que contêm o componente activo têm uma base inerte como por exemplo gelatina e glicerina ou sacarose e acácia; elixires para lavagens bucais que contêm o componente activo no veículo líquido apropriado. As composições para administração rectal podem apresentar-se sob a forma de supositórios com uma base apropriada contendo manteiga de cacau ou um salicilato. As composições apropriadas para administração vaginal podem-se apresentar sob a forma de pessários, tampões, cremes, geles, pastas, espumas ou fórmulas em spray. As composições apropriadas para administração parentérica incluem líquidos aquosos ou não aquosos, soluções injectáveis estéreis isotónicas que podem conter agentes anti-oxidantes, agentes tampão, bacteriostáticos e solutos que tornam a composição isotónica com o sangue do recipiente a que se destina; as suspensões aquosas e não aquosas estéreis podem incluir agentes suspensores e agentes espessantes. As composições podem-se apresentar sob a forma unitária

ou de dose múltipla em contentores selados, por exemplo ampolas ou frascos e podem ser conservadas sob uma forma liofilizada re^u querendo apenas a adição de um veículo estéril líquido, por exemplo água para injectáveis, imediatamente antes do uso. As soluções injectáveis extemporâneas e as soluções podem prepara^r -se a partir de um pó estéril, grânulos ou comprimidos da espécie anteriormente referida.

EXEMPLO 1

Uma solução de 0,5 g de 7-cloro-1,3-diidro-5-(1H-pirrol-2-il)-1,4-benzodiazepina-2-ona em 25 ml de tetra-hidrofurano foi arrefecida num banho de gelo e acetona. Fez-se borbulhar através da solução cloreto de metileno e adicionou-se-lhe 0,29 ml de tetracloreto de titânio gota a gota sob agitação após 5 horas à temperatura ambiente e adicionaram-se mais 0,2 ml de tetracloreto de titânio. Após 18 horas adicionou-se uma pequena porção de gelo e filtrou-se a mistura, lavou-se com tetra-hidro furano e concentrou-se. A cristalização com cloreto de metileno/metanol e recristalização com etanol forneceu 0,25 g (rendi^u mento 48%) de 7-cloro-N-metil-5-(1H-pirrol-2-il)-3H-1,4-benzo diazepin-2-amina, P.F. 251°C.

EXEMPLO 2

a) A uma solução de 10 g de 7-cloro-1,3-diidro-5-(1H-pirrol-2-il)-1,4-benzodiazepin-2-ona em 400 ml de tetra-hidrofurano, adicionaram-se 10 g de P_4S_{10} sob agitação e fez-se irradiar a mistura com ultrasons à temperatura de 40°C. Após 2,5 ho^u ras adicionaram-se mais 10 g de P_4S_{10} a essa mistura. Continua^u -se a reacção durante 2 horas. Arrefeceu-se a mistura à tempera^u

tura ambiente e filtrou-se. Após a lavagem do produto sólido com cloreto de metileno, 80% do dissolvente proveniente dos filtrados reunidos foram removidos sob vácuo. A solução residual alcalinizou-se com solução de carbonato de hidrogênio e sódio saturada. O produto precipitado foi filtrado. Extraíu-se o filtrado com cloreto de metileno seguido de concentração sob vácuo. Os produtos sólidos recristalizaram com uma mistura de tetra-hidrofurano/éter do petróleo para se obterem 9,9 g (rendimento 94%) de 7-cloro-1,3-di-hidro-5-(1H-pirrol-2-il)-1,4-benzodiazepin-2-tiona, p.f. 258-260°C com decomposição.

b) Fez-se borbulhar amoníaco através de uma solução de 0,5 g do produto obtido na alínea a) em 5 ml de tetra-hidrofurano e 200 ml de metanol, arrefecendo-se para -78°C. Em seguida deixou-se a reacção retomar a temperatura ambiente e agitou-se durante mais 12 horas. Evaporou-se o dissolvente para se obter 7-cloro-5-(1H-pirrol-2-il)-3H-1,4-benzodiazepin-2-amina com um rendimento de 40%, p.f. 177-179°C com decomposição.

As composições galénicas seguintes contendo um composto de fórmula geral I ou o seu sal como componentes activos, como definidas anteriormente, podem preparar-se de uma forma convencional:

com composições em comprimidos

<u>Componentes</u>	<u>mg/comprimido</u>
Componente activo	20 mg
Lactose	180 mg
Amido pré-gelatinizado	15 mg

Composição líquida para administração oral:

<u>Componentes</u>	<u>mg/composição</u>
Componente activo	20,0 mg
Metilparabeno	20,0 mg
Sacarose	q.b.
Agente apaladante	q.b.
Tampão de citrato	q.b.
Água purificada q.b.p.	5,0 ml

Composição em comprimidos:

<u>Componentes</u>	<u>mg/comprimido</u>
Componente activo	20 mg
Amido	40 mg
Avicel	80 mg
Lactose	274 mg
Estearato de magnésio	<u>2</u> mg
	416 mg

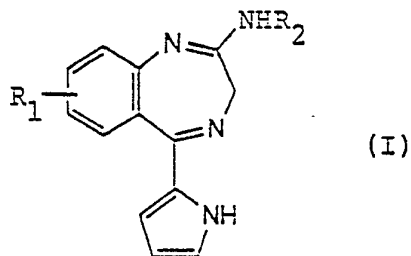
Composição sob a forma de cápsulas de gelatina mole:

<u>Componentes</u>	<u>mg/cápsula</u>
Componente activo	20 mg
Ácidos gordos etoxilados	500 mg
PEG 4000	100 mg
Óleos vegetais q.b.p.	1,0 ml

4.

REIVINDICAÇÕES

1.- Processo para a preparação de compostos de fórmula geral



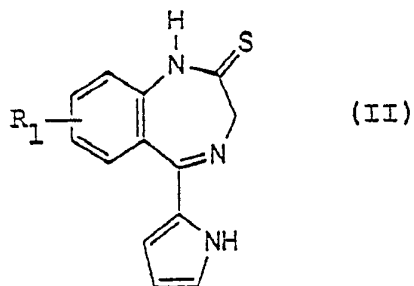
na qual

R₁ representa um átomo de hidrogênio ou de halogênio ou um grupo NO₂, CF₃, alquilo inferior, OH, alcoxi inferior ou CN; e

R₂ representa um átomo de hidrogênio ou um grupo CH₃,

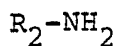
e dos seus sais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico, ca

racterizado pelo facto de se fazer reagir uma benzodiazepina de fórmula geral



na qual

R_1 tem os significados definidos antes, ou a amida correspondente em que o átomo de oxigénio representa o átomo de enxofre, com um composto de fórmula geral



na qual

R_2 tem os significados definidos antes.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de compostos de fórmula geral I na qual R_1 representa um átomo de cloro, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

3.- Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, para a preparação de 7-cloro-N-metil-5(1H-pirrol-2-il)-3H-1,4-benzodiazepin-2-amina, caracterizado pelo facto de se utilizarem compostos iniciais correspondentemente substituídos.

...

4.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas para o tratamento ou a profilaxia de infecções virais, especialmente de infecções retrovirais como, por exemplo, infecções provocadas por HIV2 ou para a protecção das células contra este tipo de infecções, caracterizado pelo facto de se converter em uma forma de dosagem galénica uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto de fórmula geral I, preparado pelo processo de acordo com as reivindicações 1, 2 ou 3 ou de um seu sal, eventualmente em associação com um segundo agente antiviral, especialmente um inibidor da transcriptase inversa tal como ddc, AZT, um inibidor da protease de HIV, interferon α , β e/ou, γ interleucina-2 e/ou GM-CSF.

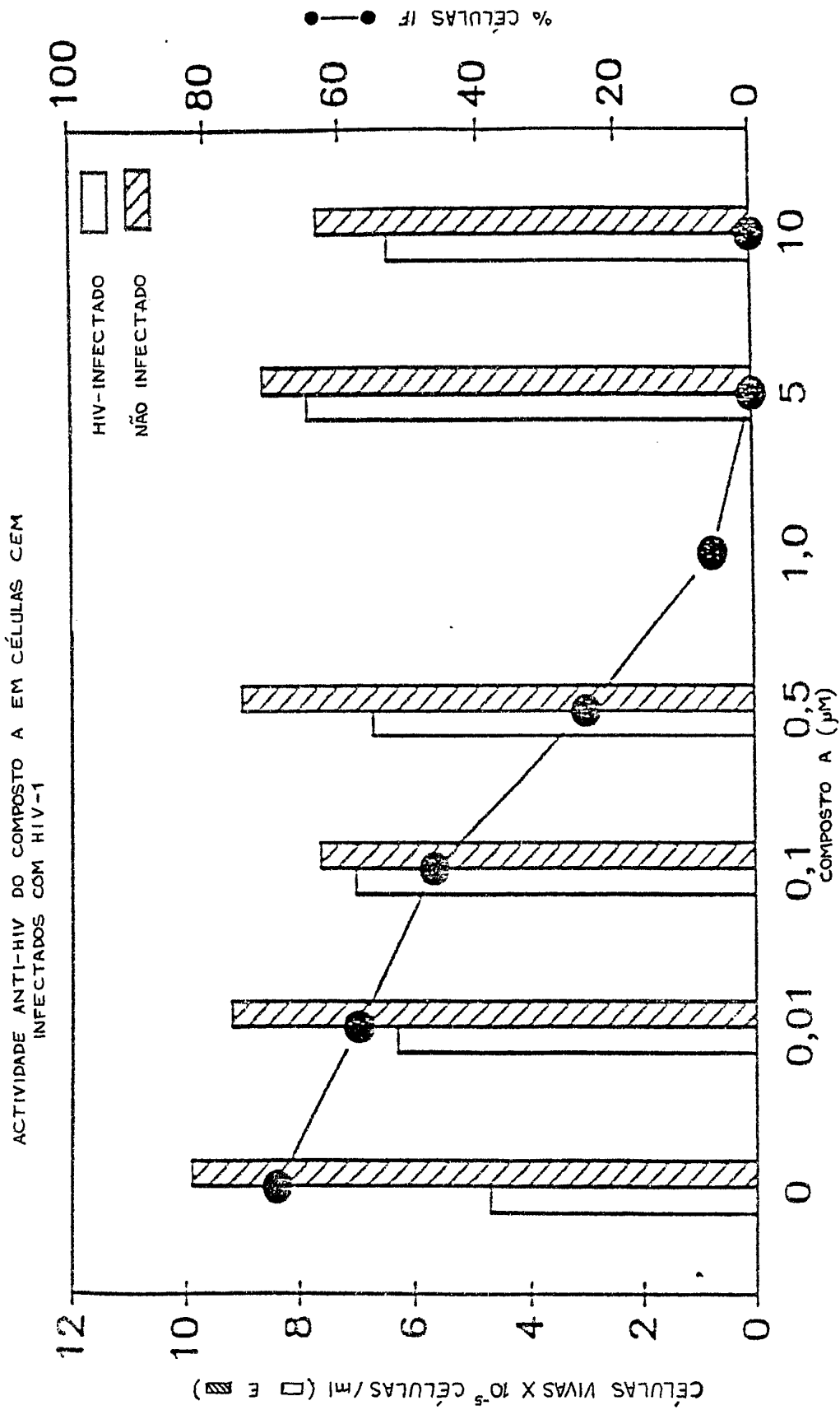
5.- Método para o tratamento ou a profilaxia de infecções virais, especialmente de infecções retrovirais tais como as provocadas por HIV e/ou HIV2 ou para a protecção das células contra este tipo de infecções, caracterizado pelo facto de se administrar diariamente a um doente uma quantidade eficaz, compreendida entre aproximadamente 0,1 e 10 mg/Kg, de preferência entre aproximadamente 0,3 e 5 mg/Kg, mais preferivelmente entre aproximadamente 1 e 3 mg/Kg de peso do corpo, de um composto de fórmula geral I, preparado pelo processo de acordo com as reivindicações 1, 2 ou 3, ou de um seu sal, eventualmente em associação com um segundo agente antiviral, especialmente um inibidor da transcriptase inversa tal como ddc, AZT, um inibidor da protease de HIV, interferon

α, β e/ou γ , interleucina-2 e/ou GM-CSF.

© Agente Oficial da Propriedade Industrial

Eng. L. Horn

FIGURA 1



Handwritten mark resembling a stylized 'D' or 'R'.

FIGURA 2

ACTIVIDADE ANTI-HIV DO COMPOSTO A EM CÉLULAS CEM
INFECTADAS COM HIV-1

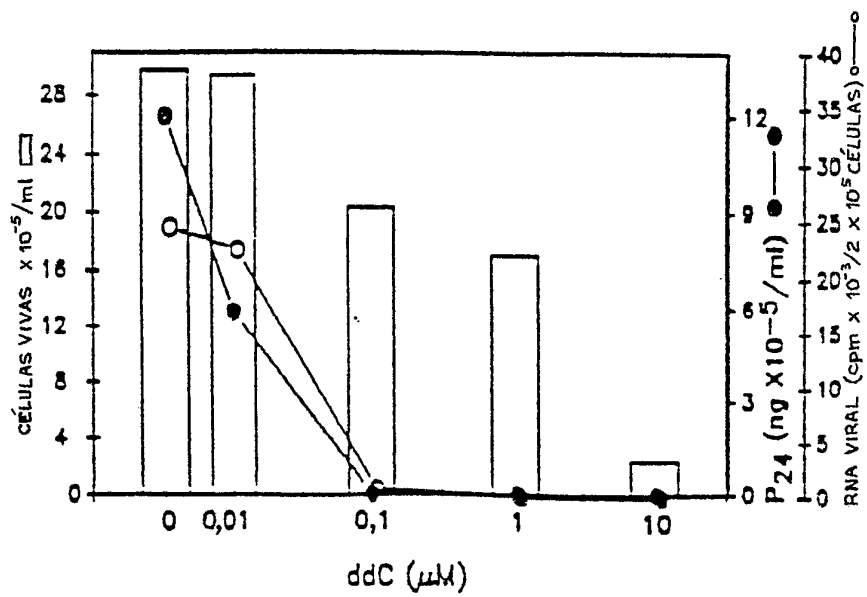
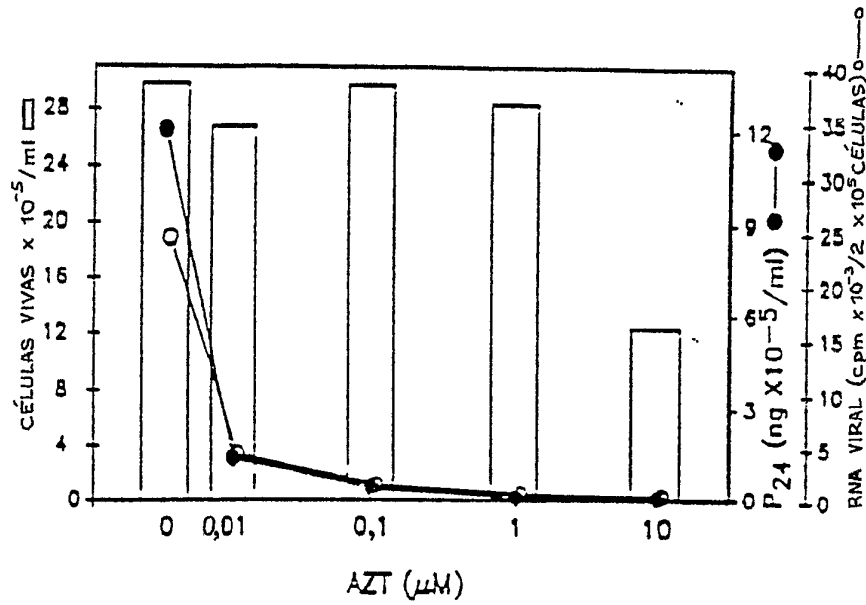
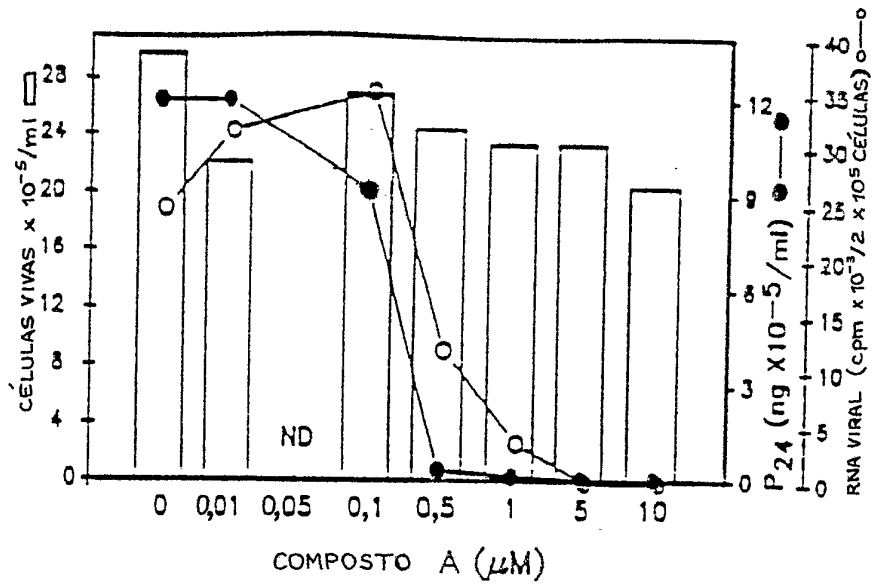
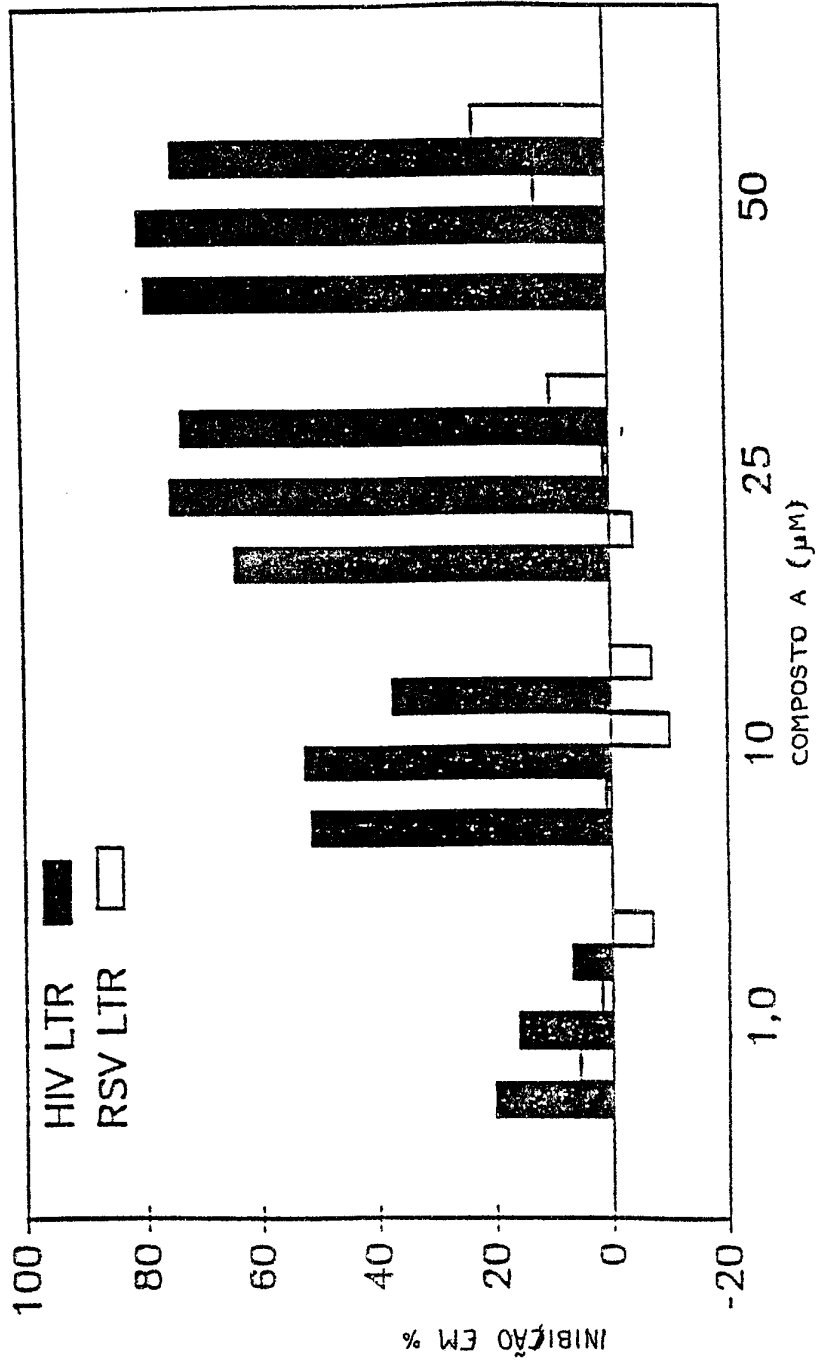


FIGURA 3

ACTIVIDADE ANTI-TAT DE COMPOSTO A DEMONSTRADA PELO
ENSAIO COM BASE NA TRANSFECCÃO



Handwritten signature or mark.

FIGURA 4

ACTIVIDADE ANTI-TAT DO COMPOSTO A DEMONSTRADA
ATRAVÉS DAS LINHAS DE CÉLULAS CONSTITUTIVAS

