

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 148**

21 Número de solicitud: 201930445

51 Int. Cl.:

**C07D 271/12** (2006.01)

**A61K 31/4245** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**21.05.2019**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**25.11.2020**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (65.2%)**  
**Campus Plz. San Francisco (Edf. Interfacultades)**  
**C/ Pedro Cerbuna, nº 12**  
**50009 Zaragoza ES;**  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES**  
**CIENTÍFICAS (5.0%);**  
**FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACION**  
**SANITARIA DE ARAGÓN (8.8%);**  
**FUNDACIÓN AGENCIA ARAGONESA PARA LA**  
**INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO (1.0%) y**  
**INSTITUT PASTEUR (20.0%)**

72 Inventor/es:

**SANCHO SANZ, Javier;**  
**SALILLAS BERGES, Sandra;**  
**LANAS ARBELOA, Ángel;**  
**CARRODEGUAS, José Alberto;**  
**AÍNSA CLAVER, José Antonio;**  
**MAHÍA MOROS, Alejandro;**  
**GALANO FRUTOS, Juan José;**  
**DÍAZ DE VILLEGAS, María Dolores;**  
**VELÁZQUEZ CAMPOY, Adrián;**  
**MICHEL, Valérie y**  
**TOUATI, Eliette**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **Compuestos para el tratamiento de enfermedades causadas por Helicobacter**

57 Resumen:

Compuestos para el tratamiento de enfermedades causadas por Helicobacter.

La presente invención se refiere a nuevos compuestos que son benzo [c] [1,2,5] oxadiazol. derivados, y su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por Helicobacter pylori. Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica y a una preparación combinada que comprende dichos compuestos.

**ES 2 796 148 A1**

## DESCRIPCIÓN

### Compuestos para el tratamiento de enfermedades causadas por *Helicobacter*

5 La invención se refiere a derivados de benzo [c] [1,2,5] oxadiazol, y al uso de los mismos como antibióticos y, concretamente, para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias, en particular de las enfermedades causadas por *Helicobacter*.

### ESTADO DEL ARTE

10

*Helicobacter pylori* (*Hp*) es una bacteria gram-negativa que establece infecciones de por vida en humanos mediante la colonización de su mucosa gástrica, generalmente durante la infancia. La infección de *Hp* es la infección bacteriana más común en todo el mundo con una prevalencia que varía entre el 10 y el 94% en diferentes países. La transmisión de *Hp* se da de persona a persona, por vía oral-oral, fecal-oral, acuática o iatrogénica. En la mayoría de los casos, esta infección es asintomática, pero el daño progresivo de la mucosa gástrica puede inducir gastritis crónica y, posteriormente úlceras pépticas, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica (MALT) y adenocarcinoma gástrico. *Hp* es la principal causa de cáncer gástrico en todo el mundo y, hasta ahora, la única bacteria clasificada como carcinógeno del grupo I. La erradicación de la infección causada por *Hp* es imprescindible para el tratamiento de las úlceras pépticas y podría prevenir el cáncer gástrico, el tercer cáncer con más muertes asociadas. Por todo ello, se necesitan tratamientos efectivos y asequibles para reducir el impacto de la infección por *Hp* en esas enfermedades. Además, se ha sugerido que la infección por *Hp* puede estar implicada en otros trastornos extra-gastrointestinales y puede modificar la biodisponibilidad y absorción de nutrientes esenciales y los niveles plasmáticos de ciertas hormonas metabólicas.

La terapia convencional contra la *Hp* consiste en un triple o, más a menudo ahora, cuádruple tratamiento empírico basado en un inhibidor de la bomba de protones más una combinación de dos o tres antimicrobianos de amplio espectro, tales como claritromicina (Cla), amoxicilina, Metronidazol (Mnz), tetraciclina y sales de bismuto. La resistencia de *Hp* a estos antimicrobianos comunes, especialmente a Cla y Mnz, está creciendo en todo el mundo, lo cual ha acarreado una disminución de la eficacia de las terapias disponibles. Por lo tanto, se requiere el desarrollo de nuevos tratamientos específicos y que las estrategias de erradicación se adapten geográficamente. Por otro

lado, las investigaciones sobre vacunas contra la *Hp* que se han desarrollado, no han tenido éxito hasta ahora, probablemente debido a la variabilidad genética de *Hp* y la compleja respuesta inmune del huésped frente la bacteria. Las actuales alternativas a los tratamientos convencionales incluyen la aplicación de regímenes terapéuticos basados en patrones locales de susceptibilidad antimicrobiana y el uso de tratamientos personalizados consistentes en la pre-identificación de la susceptibilidad / resistencia de *Hp* frente a antimicrobianos convencionales mediante métodos moleculares o guiados por cultivos. El uso de péptidos antimicrobianos y el desarrollo de nuevos compuestos que actúen sobre dianas específicas de *Hp* también se han propuesto como terapias alternativas. Siguiendo este último enfoque, se han identificado varias dianas específicas de *Hp*, todas ellas esenciales para las bacterias y ausentes en humanos. Una de ellas es la flavodoxina de *Hp* (*Hp-Fld*), una pequeña proteína redox que contiene una molécula de cofactor mononucleótido de flavina unido.

Las flavodoxinas son proteínas bacterianas que participan en una variedad de reacciones de transferencia de electrones. En particular, *Hp-Fld* acepta electrones del complejo piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), que cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato, y los transfiere a la flavodoxina quinona reductasa. Ambas, *Hp-Fld* y *Hp-PFOR* son esenciales para la supervivencia de la bacteria y, por tanto, aquellos compuestos que interfieren con esta vía podrían ser útiles en terapias de erradicación de *Hp*.

A diferencia de otras flavodoxinas, *Hp-Fld* contiene un bolsillo cerca del sitio activo donde pequeñas moléculas podrían unirse interfiriendo así con la unión o la transferencia de electrones entre la *Hp-Fld* y las proteínas de la ruta de descarboxilación del piruvato. Debido a que las flavodoxinas no están presentes en los seres humanos como tal, y que el dominio tipo-flavodoxina encontrado en la citocromo P450 reductasa humana carece de un bolsillo equivalente cerca de su sitio activo, no se prevén efectos secundarios en terapias dirigida contra *Hp-Fld*.

Las propiedades biofísicas de *Hp-Fld* han sido caracterizadas y se han identificado pequeñas moléculas capaces de unirse a ella mediante experimentos de cribado de alto rendimiento. Algunas de ellas inhiben la descarboxilación del piruvato mediada por *Hp-Fld* y actúan como agentes bactericidas específicos para *Hp*.

Además, el documento WO2015104433A1 describe derivados de benzo [c] [1,2,5] oxadiazol y su uso como antibióticos y, en particular, para el tratamiento y / o prevención de enfermedades causadas por bacterias, en particular de enfermedades causadas por *Helicobacter*. De manera similar, el documento ES2304221A1 se refiere a un compuesto para uso en una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por *Helicobacter pylori*.

La presente invención representa una mejora con respecto a la técnica anterior, ya que se refiere a nuevos derivados de benzo [c] [1,2,5] oxadiazol que muestran mejores propiedades bactericidas que los ya conocidos. Además, su toxicidad en ratones después de la administración oral se reduce altamente en comparación con los derivados de benzo [c] [1,2,5] oxadiazol conocidos en el estado de arte. Estos nuevos derivados son efectivos contra aislados clínicos de *Hp* resistentes a metronidazol, claritromicina y rifampicina.

15

#### DESCRIPCION DE LA INVENCION

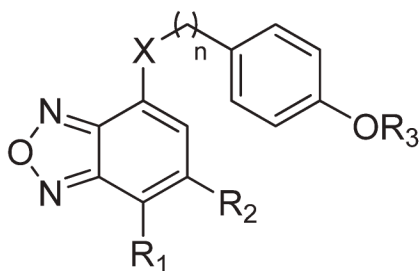
La presente invención describe nuevos compuestos para su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas, y más específicamente, enfermedades causadas por *Helicobacter pylori* (también referido en la presente invención como *Hp* o *H. pylori*).

20

Se ha demostrado (ver ejemplos) que los compuestos de la invención inhiben completamente la bacteria *Hp* en el rango de concentración micro molar por la inhibición de oxidación de piruvato en la que participa la flavodoxina de *Hp*.

25

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



(I)

30 una sal farmacéuticamente aceptable, un isómero o un solvato del mismo, donde R<sub>1</sub> es un grupo NO<sub>2</sub> o NH<sub>2</sub>,

R<sub>2</sub> es H o halógeno, el cual preferiblemente se selecciona entre F, Cl, Br o I,  
X es -S-, -SO- o -SO<sub>2</sub>-,

R<sub>3</sub> es H o un grupo alquilo (C1-C3) opcionalmente sustituido con al menos un grupo  
seleccionado de: -OH, -NH<sub>2</sub>, halógeno (F, Cl, Br o I) o combinaciones de los mismos,

5 n es un número entero entre 1 y 3,

con la condición de que R<sub>2</sub> sea halógeno cuando X es -S- y R<sub>3</sub> es -CH<sub>3</sub>.

En una realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) en la que X  
es -SO-.

10

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) en la que R<sub>2</sub>  
es H o Cl.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) en la que R<sub>3</sub>  
15 es CH<sub>3</sub>.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) en la que R<sub>3</sub>  
es H o un alquilo (C1-C3) sustituido con al menos un grupo -OH, más preferiblemente  
R<sub>3</sub> es propilo sustituido por dos grupos OH e incluso más preferiblemente es -CH<sub>2</sub>-  
20 CHOH-CH<sub>2</sub>OH.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) en la que n  
es 1.

25 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) en la que X  
es -SO- y R<sub>2</sub> es H.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) en la que R<sub>1</sub>  
es un grupo NO<sub>2</sub> o NH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> es H o Cl, X es -S-, -SO- o -SO<sub>2</sub>-, R<sub>3</sub> es CH<sub>3</sub> y n es 1.

30

En una realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) en la que R<sub>1</sub>  
es un Grupo NO<sub>2</sub> o NH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> es H, X es -SO- o -SO<sub>2</sub>-, R<sub>3</sub> es CH<sub>3</sub> y n es 1.

En una realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) seleccionado  
35 de:

5-cloro-7 - ((4-metoxibencil) tio) benzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-amina

7 - ((4-metoxibencil) sulfinil) benzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-amina

4 - ((4-metoxibencil) sulfinil) -7-nitrobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol

7 - ((4-metoxibencil) sulfonil) benzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-amina

3- (4 - (((7-nitrobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-il) tio) metil) fenoxi) propano-1,2-diol

5 3- (4 - (((7-aminobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-il) tio) metil) fenoxi) propano-1,2-diol,  
o

3- (4 - (((7-aminobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-il) sulfinil) metil) fenoxi) propano-1,2-diol

10 Los compuestos de la presente invención contienen uno o más nitrógenos básicos y, por lo tanto, podrían formar sales con ácidos, tanto orgánicos como inorgánicos. Ejemplos de tales sales incluyen: sales con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico; y sales con ácidos orgánicos tales como ácido  
15 metanosulfónico, ácido trifluorometano sulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido fumárico, oxálico ácido, ácido acético, ácido maleico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido glicólico, ácido succínico y ácido propiónico, entre otros. Algunos compuestos de la presente invención pueden contener uno o más protones ácidos y,  
20 por lo tanto, también pueden formar sales con bases. Ejemplos de tales sales incluyen: sales con cationes inorgánicos tales como sodio, potasio, calcio, magnesio, litio, aluminio, zinc, etc; y sales formadas con aminas farmacéuticamente aceptables tales como amoniaco, alquilaminas, hidroxialquilaminas, lisina, arginina, N-metilglucamina, procaína y similares.

25

No hay limitación sobre el tipo de sal que puede usarse, pero siempre y cuando se use para fines terapéuticos, tendrán que ser farmacéuticamente aceptables. Se entiende por sales farmacéuticamente aceptables aquellas sales que, según criterios médicos, son adecuadas para uso en contacto con tejidos de humanos u otros mamíferos sin  
30 causar indebida toxicidad, irritación, respuesta alérgica o similares. Las sales farmacéuticamente aceptables son ampliamente conocidas por los expertos en el tema.

Las sales de un compuesto de fórmula (I) se pueden obtener durante el aislamiento  
35 final y purificación de los compuestos de la invención o pueden prepararse por tratamiento de un compuesto de fórmula (I) con una cantidad suficiente del ácido o

base deseado para dar la sal de una manera convencional. Las sales de los compuestos de fórmula (I) pueden a su vez ser transformados en otras sales de compuestos de fórmula (I) por intercambio iónico por un ion resina de intercambio.

- 5 Los compuestos de fórmula (I) y sus sales pueden diferir en ciertas propiedades físicas, pero son equivalentes a los efectos de la invención. Todas las sales de los compuestos de fórmula (I) están incluidos dentro del alcance de la invención.

10 Los compuestos de la presente invención pueden formar complejos con disolventes en los que se hacen reaccionar o con los cuales precipitan o cristalizan. Estos complejos son conocidos como solvatos. En este documento, el término solvato se refiere a un complejo de estequiometría variable formado por un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo (soluto) y un solvente. Ejemplos de disolventes incluyen disolventes farmacéuticamente aceptables como agua, etanol y similares. Un complejo con agua  
15 se conoce como hidrato.

Los solvatos de los compuestos de la invención (o sus sales), incluidos los hidratos, están englobados dentro del alcance de la invención.

20 Debe entenderse que la presente invención abarca todos los isómeros de los compuestos de fórmula (I), es decir, todas las formas geométricas, tautoméricas y ópticas, y sus mezclas (por ejemplo, mezclas racémicas). Cuando hay más centros quirales en los compuestos de fórmula (I), la presente invención incluye, dentro de su alcance, todas los posibles diastereómeros, incluidas sus mezclas. Las diferentes  
25 formas isoméricas pueden ser separadas o resueltas entre ellas utilizando métodos convencionales o se puede obtener cualquier isómero utilizando métodos sintéticos convencionales o por medio de síntesis estereoespecífica, estereoselectiva o asimétrica.

30 Los compuestos de fórmula (I) pueden existir en diferentes formas físicas, es decir, en formas amorfas y cristalinas. Además, los compuestos de la presente invención pueden tener la capacidad de cristalizar a partir de más de una forma, una característica que se conoce como polimorfismo. Los polimorfos pueden diferenciarse por diversas propiedades físicas bien conocidas por los expertos en la técnica, tales  
35 como difractogramas de rayos X, puntos de fusión o solubilidad. Todas las formas

físicas de los compuestos de fórmula I, incluidas todas sus formas polimórficas ("polimorfos") se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

5 A menos que se indique lo contrario, los compuestos de la invención también incluyen compuestos que solo difieren en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, compuestos que tienen dicha estructura, excepto la sustitución de un hidrógeno por un deuterio o tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido en  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$  o un nitrógeno enriquecido en  $^{15}\text{N}$ , están dentro del alcance de esta invención.

10

El término "alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ ", en la presente invención, se refiere a radicales de hidrocarburo, lineales o cadenas ramificadas que tienen de 1 a 3 átomos de carbono, preferiblemente 1, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo. Los grupos alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_3$  pueden estar  
15 opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes hidroxilo, amina o halógenos o combinaciones de estos.

Un segundo aspecto de la invención se refiere al compuesto de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable, un isómero o un solvato del mismo, para su uso como  
20 medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al compuesto de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable, un isómero o un solvato del mismo para uso en el tratamiento de infecciones infecciosas causadas por *Helicobacter*, más  
25 preferiblemente por *Helicobacter pylori*.

En una realización de la presente invención, el compuesto de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable, un isómero o un solvato del mismo, se utiliza para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por la cepa NTCT 11637, 26695 o  
30 SS1 de *Helicobacter pylori*.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al compuesto 4 - ((4-metoxibencil) sulfinil) -7-nitrobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol para uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por la cepa NTCT 11637, 26695 o SS1 de  
35 *Helicobacter pylori*.



En una realización preferida, la presente invención se refiere al compuesto 5-cloro-7 - ((4-metoxibencil) tio) benzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-amina para uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por la cepa NTCT 11637 o 26695 de *Helicobacter pylori*.

5

En una realización preferida, la presente invención se refiere al compuesto 7 - ((4-metoxibencil) sulfinil) benzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-amina para uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por la cepa SS1 de *Helicobacter pylori*.

10 En una realización preferida, el compuesto de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable, un isómero o un solvato del mismo, se administra por vía oral.

La dosis y la frecuencia de las dosis variarán según la naturaleza y la gravedad de la enfermedad a tratar, la edad, el estado general y el peso del paciente, como así como el compuesto particular administrado y la vía de administración, entre otros factores.

15

Sin embargo, en una realización preferida, el compuesto de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable, un isómero o un solvato del mismo, se administra a un sujeto en una dosis entre 0.1 y 20 mg / 100gr bw (peso corporal) / día, más preferiblemente en una dosis de 20 mg / 100gr bw / día.

20

En otra realización, el compuesto de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable, un isómero o un solvato del mismo, se administra a un sujeto una vez al día, dos veces al día o tres veces al día; más preferiblemente, una vez al día o dos veces al día; aún más preferiblemente, una vez al día.

25

Las enfermedades infecciosas causadas por *Helicobacter pylori* están relacionadas con patologías gastrointestinales como gastritis crónica, úlceras gástricas o duodenales, linfoma, MALT linfoma (linfoma de la mucosa asociado con tejido linfoide) y cáncer gástrico. Por lo tanto, una realización más preferida comprende el uso de los compuestos de la invención para el tratamiento de enfermedades infecciosas tales como gastritis crónica, y / o úlceras duodenales, linfoma y cáncer gástrico.

30

Tanto el cáncer gástrico como el linfoma gástrico, en particular, el linfoma MALT, son enfermedades que pueden ser causadas por *H. pylori* y esta bacteria se ha clasificado en el grupo I de carcinógenos por la Agencia Internacional de Investigación.

35

A lo largo de la presente descripción, el término "tratamiento" se refiere a eliminar, reducir o disminuir la causa o efectos de una enfermedad. A los efectos de este invención, el tratamiento incluye, pero no se limita a, lo mismo, aliviar, ralentizar o eliminando uno o más síntomas de la enfermedad; para reducir el grado de enfermedad, estabilizar (es decir, no empeorar) el estado de la enfermedad, retrasando o retardando la progresión de la enfermedad, aliviando o mejorando el estado de la enfermedad y conduciendo a la recesión (total o parcial).

Para su aplicación terapéutica, los compuestos de fórmula (I), los isómeros, sales o solvatos de los mismos, estarán en una farmacéuticamente aceptable o sustancialmente forma pura, es decir, con un grado de pureza farmacéuticamente aceptable, excluyendo aditivos farmacéuticos habituales, como diluyentes y vehículos, sin incluir material considerado tóxico a dosis normales. Los niveles de pureza para el ingrediente activo son preferiblemente mayores que 50%, más preferiblemente, mayores que 70%, más preferiblemente, superior al 90%. En una realización preferida, son más del 95% de los compuestos de fórmula (I) o de sus sales, solvatos o isómeros.

Los compuestos de la presente invención capaces de inhibir la flavodoxina constituyen una buena alternativa al tratamiento de enfermedades infecciosas, en particular las causadas por *Helicobacter*, más específicamente por *H. pylori*.

Los compuestos de la invención, cuando se administran individualmente en dosis diarias únicas durante 8 días en un modelo de ratón de infección por *Hp* (ver ejemplos), se redujo significativamente las tasas de colonización gástrica de *Hp* e incluso fueron capaces de erradicar la infección en hasta el 60% de los ratones. Estos inhibidores de flavodoxina constituyen una nueva familia de antimicrobianos que pueden ayudar a combatir el aumento constante de las cepas de *Hp* resistentes a los antimicrobianos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una preparación combinada que comprende, al menos, un compuesto como se define en el primer aspecto de la invención (compuesto de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable, un isómero o un solvato) de la misma) y otro ingrediente activo, en el que dicho ingrediente activo puede ser un antiácido; otro antibiótico, como, pero no limitado a, amoxicilina, metronidazol, claritromicina o levofloxacina; un inhibidor de la bomba de protones,

como, por ejemplo, omeprazol, pantoprazol o rabeprazol; o cualquier combinación de los mismos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la preparación combinada para uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por *Helicobacter*, más preferiblemente, por *Helicobacter pylori*. Por lo tanto, el otro ingrediente activo proporciona una terapia combinada. y puede administrarse por separado, simultánea o secuencialmente con respecto a compuesto de fórmula (I) definido en el primer aspecto de la invención.

10

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica. que comprende, al menos, el compuesto definido en el primer aspecto de la invención (compuesto de fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable, un isómero o un solvato) del mismo) o al menos la preparación combinada como se definió previamente. Además, la composición farmacéutica, de estos compuestos, puede comprender excipientes farmacéuticamente aceptables.

15

Los excipientes deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la composición y no deben ser nocivos para tomar dicho composición.

20

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica definida anteriormente como un medicamento, preferiblemente para uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por *Helicobacter*, más preferiblemente por *Helicobacter pylori* e incluso más preferiblemente por NTCT 11637, 26695 o cepa SS1 de *Helicobacter pylori*.

25

La composición puede administrarse por cualquier vía de administración adecuada, para lo cual dicha preparación se formula en la forma de dosificación adecuada para la ruta de administración elegida. En una realización particular, la administración del compuesto de fórmula (I), que proporciona esta invención, se lleva a cabo por vía oral, tópica, rectal o parenteral (incluyendo vía subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, vía intravenosa, etc.). Las diferentes formas farmacéuticas de administración de fármacos y los excipientes son conocidos por los expertos en el tema.

35

En una realización preferida, la invención se refiere a la composición farmacéutica definida anteriormente, en la que la composición es adecuada para su administración oral.

- 5 Las composiciones sólidas para administración oral incluyen tabletas, granulados, cápsulas y cápsulas de liberación prolongada. En cualquier caso, el método de fabricación se basa en una mezcla simple, granulación seca o granulación húmeda del ingrediente activo con excipientes. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes tales como lactosa, celulosa microcristalina, manitol o fosfato de calcio;
- 10 agentes aglutinantes tales como almidón, gelatina o polivinilpirrolidona; desintegrantes como el carboximetil almidón de sodio o croscarmelosa sódica; y agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Los polvos y granulados para la preparación de suspensiones orales se pueden

15 obtener por adición de agua, mezclando el ingrediente activo con agentes dispersantes o humectantes; agentes de suspensión y conservantes. Otros excipientes, por ejemplo edulcorantes, saborizantes y colorantes, también pueden ser añadidos.

- 20 Como formas líquidas para administración oral, emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires que contienen diluyentes inertes de uso común, como agua destilada, etanol, sorbitol, glicerol, polietilenglicoles (macrogoles) y propilenglicol. Dichas composiciones también pueden contener adyuvantes como agentes humectantes, agentes de suspensión, edulcorantes, sabores, conservantes y
- 25 tampones.

En una realización particular, la invención se refiere a una composición en la que el compuesto de fórmula (I) se disuelve en aceite, preferiblemente en aceite de oliva, para mejorar la solubilidad de dicho compuesto y, por tanto, para mejorar su eficacia.

30 De tal manera que un disolvente no acuoso y más preferiblemente el aceite de oliva funciona como coadyuvante, como disolvente y / o como vehículo del compuesto de fórmula (I).

Así, en otra realización, la invención se refiere a la composición farmacéutica que se

35 definió anteriormente, donde el solvente es un solvente no acuoso, más preferiblemente el solvente es un aceite y aún más preferiblemente es aceite de oliva.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado tal como se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que esta invención pertenece. Métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica de la presente invención. El uso de la expresión "constar de" y sus variaciones a lo largo de la descripción no pretende excluir otras características técnicas, aditivas, componentes, o etapas. Complementos adicionales, ventajas y características de la invención se harán evidentes para los expertos en la materia al examinar la descripción o pueden ser aprendidas mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1.** Variación del peso de los ratones durante la infección por *H. pylori* y tratamiento en los experimentos de eficacia *in vivo*. Se han realizado cuatro ensayos (A, B, C y D) para determinar la eficacia *in vivo* de los compuestos de la invención a cinco dosis diferentes (0,1, 1, 5, 10 y 20 mg / 100 g de ratón). Los ratones se pesaron al comienzo del experimento, a mitad del experimento y el día del sacrificio. Los resultados se representan como peso por ratón para cada grupo. Cada línea representa un grupo de animales que recibió el mismo tratamiento.

**FIG. 2.** Viabilidad de las células HeLa tratadas con los diferentes compuestos ensayados.

**FIG. 3.** Estudio histológico de la toxicidad *in vivo* de los inhibidores 120 y IV descritos en el ejemplo 1 y pertenecientes a los inhibidores del estado de arte.

**FIG. 4.** Los datos de colonización gástrica para los compuestos IV, 120 y SS16 y dosis probadas se representan junto a los de los grupos de control correspondientes en la Figura 4A, mientras que los porcentajes de ratones erradicados por *Hp* después del tratamiento se muestran en la Figura 4B.

### EJEMPLOS

35

#### Ejemplo 1: Síntesis de los compuestos de la invención

Varios compuestos incluidos en la fórmula (I) y definidos en la presente invención han sido sintetizados tal y como se describe a continuación.

### **Procedimientos generales sintéticos y analíticos.**

5

Todos los reactivos fueron de grado analítico y se utilizaron tal como se obtuvieron de fuentes comerciales. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando disolventes anhidros. Los espectros de  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR y  $^{19}\text{F}$  RMN se adquirieron a temperatura ambiente a 400, 100 y 376 MHz, respectivamente, utilizando una sonda de 5 mm. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportan en partes por millón del tetrametilsilano con la resonancia del disolvente como estándar interno. Las constantes de acoplamiento (J) se citan en hercios. Los patrones de división se reportan como s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuartete), dd (doblete de dobletes), m (multiplete), bs (singlete ancho). Los espectros de prueba de protones fueron adquiridos para determinar los tipos de señales de carbono, y los espectros de correlación de enlaces múltiples heteronucleares se adquirieron para confirmar la posición de los heteroátomos. No se tomaron precauciones especiales tales como la desgasificación de la muestra. La pureza de los compuestos se determinó que era  $> 95\%$  por cromatografía de HPLC, utilizando un sistema Waters HPLC equipado con una bomba 600-E, un detector de matriz de fotodiodos 2996, y un inyector automático 2707. Se realizaron mediciones de masa de alta resolución utilizando un analizador microTOF (tiempo de vuelo) y los espectros se registraron a partir de soluciones metanólicas en modo de ionización por electro spray positivo (ESI +). Las reacciones fueron agitadas magnéticamente y monitorizadas por TLC siempre que fue posible. La TLC se realizó en placas precubiertas de poliéster de gel de sílice y los productos se visualizaron utilizando luz ultravioleta (254 nm), ninhidrina, permanganato de potasio y solución de ácido fosfomolibdico tras calentamiento. La cromatografía en columna se realizó utilizando gel de sílice (Kiesegel 60, tamaño de malla 230-400 (mesh)).

20  
25  
30 

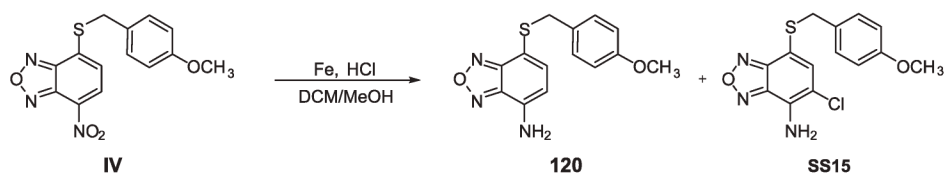
### **Reacciones sintéticas**

Los compuestos de la presente invención **SS15**, **SS16**, **SS17**, **SS21** han sido fácilmente sintetizados utilizando las rutas descritas en los esquemas 1-4 a partir del compuesto **IV**, el cual se describió previamente en la invención anterior  
35 (ES2304221A1):

La reducción de nitro-compuesto **IV** con hierro y ácido clorhídrico, usando diclorometano y metanol como disolventes, proporcionaron una mezcla del producto deseado **SS15** y la molécula **120**, previamente sintetizada (Esquema 4) de la cual fue separado por cromatografía en columna.

5

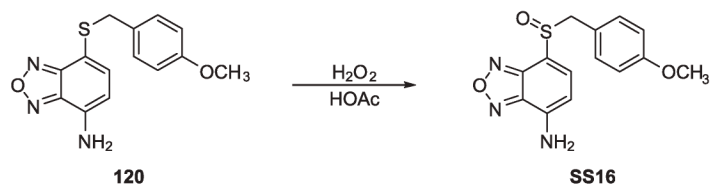
**Esquema 1.** Reducción del compuesto nitro **IV** para obtener una mezcla del compuesto amino **120** y el compuesto amino-clorado **SS15**



El amino sulfóxido **SS16** y la amino sulfona **SS21** pueden obtenerse por oxidación del tioéter de las moléculas **120** (ya descritas en el documento WO2015104433A1) y **IV**, respectivamente, con peróxido de hidrógeno en presencia de ácido acético glacial (Esquemas 2 y 3).

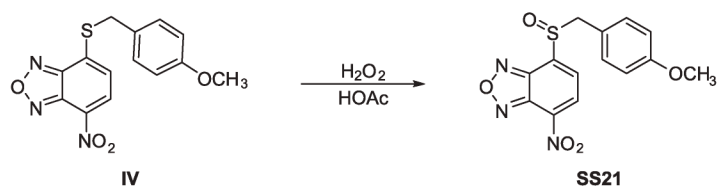
10

**Esquema 2.** Oxidación del sulfuro **120** al sulfóxido **SS16**.



15

**Esquema 3.** Oxidación del sulfuro **IV** a sulfóxido **SS21**.



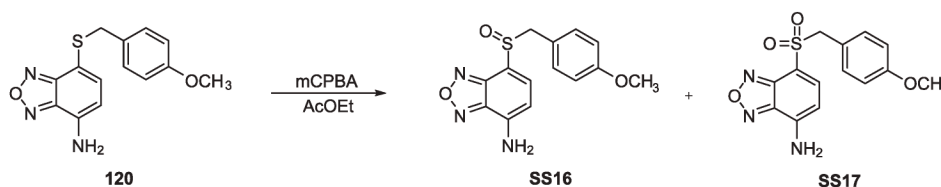
La amino-sulfona **SS17** se sintetizó por oxidación del compuesto **120** utilizando ácido metacloroperbenzoico en acetato de etilo como oxidante.

20

El compuesto **SS17** se obtuvo como una mezcla con el compuesto **SS16**, del cual fue separado por cromatografía flash (Esquema 4).

**Esquema 4.** Oxidación del sulfuro **120** a una mezcla de sulfóxido **SS16** y sulfona **SS17**.

5



**Procedimientos sintéticos**

**4 - ((4-metoxibencil) tio) -7-nitrobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol (IV).** 4-cloro-7-nitrobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol (Alfa Aesar), (4-metoxifenil) metanotiol (Alfa Aesar) y piridina se disolvieron en etanol (Esquema 5) y la mezcla se agitó bajo atmósfera de argón a 79 ° C durante 2 horas. La purificación del residuo por cromatografía dio el producto deseado **IV** (64% de rendimiento).

**5-cloro-7 - ((4-metoxibencil) tio) benzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-amina (SS15).** Una mezcla de diclorometano (2,83 ml), ácido clorhídrico conc. (170 µl) y metanol (1,29 ml) se colocó en un matraz que contenía el compuesto **IV** (25 mg, 0,08 mmol). Después de agregar hierro en polvo (30,42 mg, 0,54 mmol), la reacción se agitó a temperatura ambiente hasta la desaparición del compuesto nitro por TLC. La mezcla se vertió en agua (3 ml) y se extrajo con diclorometano (4 x 3 ml). Las capas orgánicas fueron combinadas, se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y luego se evaporaron a vacío. El monitoreo por TLC reveló que se había obtenido una mezcla de dos productos, uno de ellos un compuesto sintetizado previamente, **120**, y el otro **SS15**. El bruto de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: Hex / EtOAc: 6/4). La eliminación de los disolventes a presión reducida produjo 16 mg (61% rendimiento) de **SS15** puro. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.23 (s, 1H), 7.14-7.12 (m, 2H), 6.94 (s, 2H), 6.83-6.81 (m, 2H), 4.19 (s, 2H), 3.70 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 158.3, 149.6, 144.6, 137.8, 132.2, 130.0, 129.1, 113.8, 108.1, 106.4, 55.0, 37.1 ppm. HRMS (ESI +) m / z [M + Na]<sup>+</sup> calc para C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>S 344.0231, encontrado 344.0232.



**7 - ((4-metoxibencil) sulfinil) benzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-amina (SS16).** El compuesto **120** (495 mg, 1,72 mmol) se disolvió en una mezcla de ácido acético glacial (20,70 ml) y 33% de peróxido de hidrógeno acuoso (1,38 ml) y se mantuvo a 25°C durante 2,5 h. La mezcla marrón amarillenta obtenida se inactivó con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (50 ml) y se extrajo con diclorometano (5 x 30 ml). Las capas orgánicas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y, una vez que el disolvente se evaporó bajo presión reducida, el crudo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: Hex / AcOEt: 2/8) para dar 378 mg (73% de rendimiento) del producto deseado. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.38 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.31 (s, 2H), 6.94-6.92 (m, 2H), 6.80-6.78 (m, 2H), 6.33 (d, J = 8 Hz, 1H), 4.41 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 4.21 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 3,70 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 158.9, 145.7, 144.5, 140.3, 135.7, 131.3, 121.9, 113.6, 111.5, 103.1, 58.2, 55.0 ppm. HRMS (ESI +) m / z [M + Na]<sup>+</sup> calc para C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>S 326.0570, encontrado 326.0575.

15

**7 - ((4-metoxibencil) sulfonil) benzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-amina (SS17).** A una solución agitada del compuesto **120** (29 mg, 0.1 mmol) en acetato de etilo (1.43 mL) a temperatura ambiente, se añadió ácido 3-cloroperbenzoico (34,5 mg, 0,2 mmol). La reacción fue seguida por TLC hasta su finalización (1,5 h). Las trazas de los ácidos 3-cloroperbenzoico y 3-clorobenzoico se neutralizaron con una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 2 mL). Después de extraer con acetato de etilo (3 x 3 ml), las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. El monitoreo por TLC reveló que se había obtenido una mezcla de **SS16** y **SS17**. El crudo se purificó por cromatografía (eluyente: Hex / EtOAc: 3/7) para proporcionar 27 mg (rendimiento del 85%) de **SS17**. <sup>1</sup>H-NMR puro (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.95 (s, 2H), 7.57 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.01-6.98 (m, 2H), 6.82-6.80 (m, 2H), 6.29 (d, J = 8 Hz, 1H), 4.55 (s, 2H), 3.70 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 159.2, 146.0, 144.0, 143.5, 140.9, 131.9, 120.6, 113.7, 106.6, 102.0, 59.7, 55.0 ppm. HRMS (ESI +) m / z [M + Na]<sup>+</sup> calc para C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub>S 342.0519, encontrado 342.0523.

30

**4 - ((4-metoxibencil) sulfinil) -7-nitrobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol (SS21).** El compuesto **IV** (96 mg, 0,30 mmol) se disolvió en una mezcla de ácido acético glacial (5,66 ml) y de 33% de peróxido de hidrógeno (242 µl) y la reacción se agitó a 25 °C durante 24 h. La mezcla aceitosa naranja-marrón obtenida se extrajo con diclorometano (3 x 10 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato

35

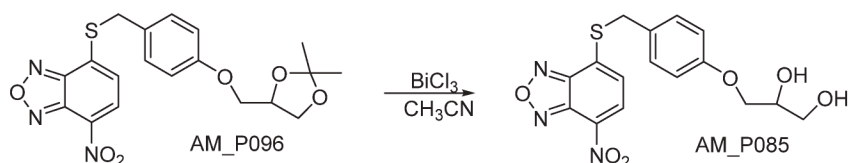
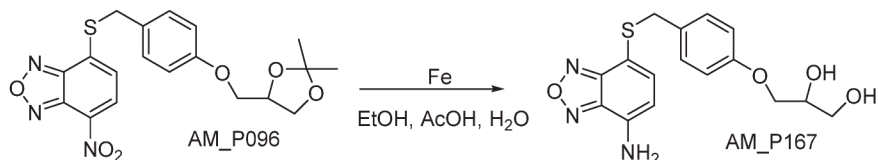
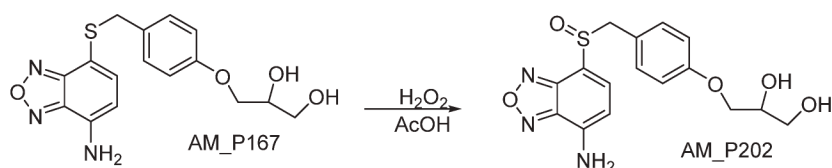
de magnesio anhidro, se filtraron y el disolvente se evaporó a presión reducida. Se realizó un cromatografía de la mezcla con el fin de purificar el producto deseado. De esta forma, se obtuvieron 84,3 mg (88%) de **SS21** puro, que se almacenó en un matraz sellado bajo una atmósfera de argón a 4 ° C hasta su uso para evitar la

5 descomposición espontánea debido a su sensibilidad al oxígeno. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.47 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.89-6.87 (m, 2H), 6.77-6.74 (m, 2H), 4.61 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 4.32 (d, J = 13,6 Hz, 1H), 3,77 (s, 3H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 160.2, 146.1, 142.6, 142.3, 131.3, 129.1, 128.7, 119.6, 114.1, 59.5, 55.3 ppm. HRMS (ESI +) m / z [M + Na] + calc. para C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>5</sub>S

10 356.0312, encontrado 356.0308.

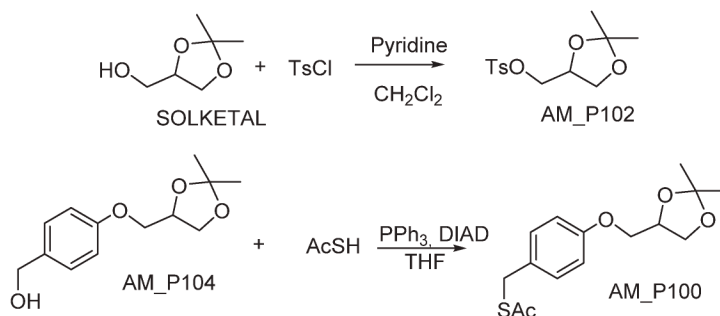
Los compuestos de la presente invención **AM\_P085**, **AM\_P167** y **AM\_P202** han sido sintetizados utilizando las rutas descritas en los esquemas 6-8 del compuesto **AM\_P096**:

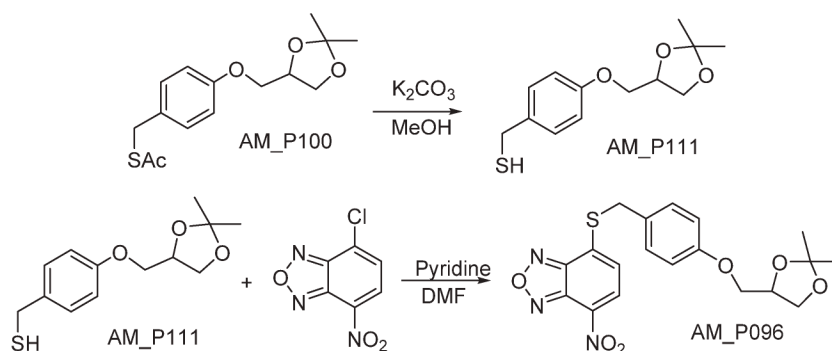
15

**Esquema 6: Síntesis del compuesto AM\_P085****Esquema 7: Síntesis del compuesto AM\_P167****Esquema 8: Síntesis del compuesto AM\_P202**

20

El compuesto **AM\_P096** se sintetizó de acuerdo con el **Esquema 9**:





## 5 Procedimientos sintéticos

### 2,3-di( $\lambda^1$ -oxidanil)propil 4-methylbenzenosulfonato (AM P102)

Solketal (Alfa Aesar), piridina y cloruro de 4-toluenosulfonilo (Alfa Aesar) se disolvieron en diclorometano anhidro. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16  
 10 horas. La purificación del residuo por cromatografía dio el producto deseado **AM\_P102** (rendimiento del 85%).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.82-7.74 (m, 2H), 7.38-7.31 (m, 2H), 4.31-4.22 (m, 1H), 4.06-3.92 (m, 3H), 3.75 (dd,  $J = 9,0$  Hz,  $J = 5,1$  Hz, 1H), 10 2,44 (s, 3H), 1,33 (s, 3H), 1,30 (s, 3H) ppm.

### Compuesto de (4- (2,3-di ( $\lambda^1$ -oxidanil) propoxi) fenil) metanol con neopentano (1: 1) (AM P104)

Se añadió carbonato de potasio seco a una solución del compuesto AM\_P102 y 4-15  
 (hidroximetil) fenol (Alfa Aesar) en DMF anhidra. La mezcla se mantuvo a 90°C durante 16 horas y el residuo se vertió en agua desionizada y se extrajo con  
 20 diclorometano. El bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice para dar **AM\_P104** (rendimiento del 51%).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.32-7.25 (m, 2H), 6.93-6.87 (m, 2H), 4.61 (s, 2H), 4.53-4.43 (m, 1H), 4.17 (dd,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 20 4.06 (dd,  $J = 9.6$  Hz,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 3.94 (dd,  $J = 9.6$  Hz,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 3.90 (dd,  $J = 8.4$  Hz,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 1.83 (sa, 1H), 1.47 (s, 3H), 1.41 (s, 3H) ppm.

### Compuesto de S- (4- (2,3-di ( $\lambda^1$ -oxianil) propoxi) bencil) etanotioato con neopentano (1: 1) (AM P100)

Trifenilfosfina y el DIAD se disolvieron en THF anhidro y se agitaron a 0°C en  
 atmósfera de argón durante 20 minutos. El ácido tioacético (Alfa Aesar) y AM\_P104 se  
 30 agregaron luego al crudo, que se agitó a 0°C durante 1 hora. Después de eso, se mantuvo a temperatura ambiente durante una hora adicional. El disolvente se evaporó

y el bruto se purificó por cromatografía para obtener **AM\_P100** puro (rendimiento del 61%). <sup>1</sup>H NMR 30 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.23-7.16 (m, 2H), 6.87-6.80 (m, 2H), 4.51-4.40 (m, 1H), 4.15 (dd, J = 8.4 Hz, J = 6.6 Hz, 1H), 4.07 (s, 2H), 4.03 (dd, J = 9.6 Hz, J = 5.4 Hz, 1H), 3.96-3.83 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.40 (s, 3H) ppm.

5

Compuesto de (4- (2,3-di (1-oxidanil) propoxi) fenil) metanotiol con neopentano (1: 1) (AM\_P111)

Una solución de compuesto AM\_P100 y carbonato de potasio seco en metanol seco se agitó bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla se acidificó con HCl y se extrajo con diclorometano. Se llevó a cabo una cromatografía para purificar el producto deseado **AM\_P111** (67% de rendimiento). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.26-7.20 (m, 2H), 6.89-6.82 (m, 2H), 4.51-4.43 (m, 1H), 4.16 (dd, J = 8.4 Hz, J = 6.4 Hz, 1H), 4.04 (dd, J = 9.6 Hz, J = 5.6 Hz, 1H), 3.92 (dd, J = 9.6 Hz, J = 6.0 Hz, 1H), 3.89 (dd, J = 8.4 Hz, J = 5.8 Hz, 1H), 3.70 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 1.73 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.40 (s, 3H) ppm.

15

4 - ((4 - ((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il) metoxi) bencil) tio) -7-nitrobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol (AM\_P096)

El compuesto AM\_P111, 4-cloro-7-nitrobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol (Alfa Aesar) y piridina anhidra se disolvieron en DMF anhidro bajo atmósfera de argón. La mezcla se agitó bajo atmósfera de argón a 80°C durante 4 horas. Una vez completada la reacción, el DMF se eliminó a presión reducida y el bruto se purificó por cromatografía para dar el producto deseado **AM\_P096** (45% de rendimiento). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.34 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.38-7.31 (m, 2H), 7.18 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.93-6.86 (m, 2H), 4.51-4.43 (m, 1H), 4.47 (s, 2H), 4.16 (dd, J = 8.4 Hz, J = 6.4 Hz, 1H), 4.04 (dd, J = 9.6 Hz, J = 5.6 Hz, 1H), 3.93 (dd, J = 9.6 Hz, J = 5.6 Hz, 1H), 3.89 (dd, J = 8.4 Hz, J = 5.6 Hz, 1H), 1.45 (s, 3H), 1.39 (s, 3H) ppm

25

**3- (4 - (((7-nitrobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-il) tio) metil) fenoxi) propano-1,2-diol (AM\_P085)**

30

A una solución vigorosamente agitada de **AM\_P096** en acetonitrilo, se añadieron cloruro de bismuto y agua desionizada. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 horas y luego se concentró a vacío. La purificación del residuo por cromatografía produjo **AM\_P085** (79% de rendimiento). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, acetona-d<sub>6</sub>): δ 8.56 (d, J = 8.0 Hz, 3H), 7.63 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.52-7.40 (m, 2H), 7.00-6.93

35

( m, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.14-4.05 (m, 2H), 4.02-3.93 (m, 2H), 3.83-3.77 (m, 1H), 3.71-3.60 (m, 2H) ppm.

**3- (4 - (((7-aminobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-il) tio) metil) fenoxi) propano-1,2-diol (AM\_P167)**

El compuesto **AM\_P096** se disolvió en una mezcla de etanol, ácido acético y agua desionizada. Tras la adición de polvo de hierro, la mezcla se sonicó (baño de ultrasonidos JP Selecta, 40 kHz) a 30°C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se filtró para eliminar el exceso de hierro, se detuvo con una solución saturada de carbonato de potasio y se extrajo con diclorometano. El crudo se disolvió en acetónitrilo y se agregaron cloruro de bismuto y agua desionizada. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 horas. La purificación del crudo por cromatografía produjo **AM\_P167** (rendimiento del 58%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.08 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.05-6.98 (m, 2H), 6.81-6.73 (m, 2H), 6.19 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.07 (s, 2H), 4.01-3.96 (m, 1H), 3.96-3.86 (m, 2H), 3.66 (dd, J = 11.2 Hz, J = 4.8 Hz, 1H), 3.61 (dd, J = 11,2 Hz, J = 5,2 Hz, 1H) ppm.

**3- (4 - (((7-aminobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-il) sulfinil) metil) fenoxi) propano-1,2-diol (AM\_P202)**

El compuesto **AM\_P167** se disolvió en una mezcla de ácido acético glacial y peróxido de hidrógeno acuoso al 35%, y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Una vez completada la reacción, el bruto se purificó por cromatografía para dar el producto **AM\_P202** (82% de rendimiento). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.39 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.99-6.92 (m, 2H), 6.85-6.78 (m, 2H), 6.31 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 13.0 Hz, 1H), 4.39 (d, J = 13.0 Hz, 1H), 4.03-3.96 (m, 1H), 3.96-3.87 (m, 2H), 3.70-3.58 (m, 2H) ppm.

**Ejemplo 2: Concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) en cepas de referencia de *Hp* (NCTC 11637, 26695, SS1 y UA 1182)**

Para el ensayo de microdilución MIC, las cepas de referencia de *Hp* NCTC 11637 (ATCC 43504, cepa resistente a Mnz), 26695 (ATCC 700392) (Tomb, J. F. et al. The Complete Genome Sequence of the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. Nature **1997**, 389 (6649), 412) SS1 (Sydney Strain 1) (Lee, A. et al. Standardized Mouse Model of *Helicobacter pylori* Infection: Introducing the Sydney Strain. Gastroenterology **1997**, 112 (4), 1386–1397) y UA 1182 (ATCC 700684, cepa resistente a Cla)

(patógeno de Bioseguridad Nivel 2) se cultivaron en el medio de cultivo conocido como infusión cerebro-corazón (BHI) suplementado con 4% de suero bovino fetal (FBS) a 37° C bajo condiciones de microaerofilia y luego se diluyeron a densidad óptica a 600 nm de 0.01. Se dispensaron muestras de 100 µl de la suspensión bacteriana diluida en cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos, excepto en el primer pocillo de cada fila, en el cual se dispensaron 200 µL de la suspensión bacteriana junto con 2 µL del compuesto (de una solución madre en dimetilsulfóxido (DMSO) a 6,4 µg / µL). Se realizaron diluciones seriadas a la mitad, lo que permitió evaluar los compuestos en un rango de concentraciones de 64 a 0.031 µg / mL. Lo controles positivo y negativo consistieron en BHI suplementado con 4% de FBS e inoculado o no con la suspensión bacteriana de *Hp* diluida, respectivamente. Nos aseguramos de que la concentración de DMSO se mantuviera en 1% v/v o inferior, para evitar un efecto tóxico para las células de *Hp*. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas bajo atmósfera microaerófila. Las MIC se correspondieron con las concentraciones más bajas de compuestos que producen a una inhibición completa del crecimiento de *Hp*. Los valores de MIC fueron determinados al registrar el cambio de color observado después de la adición de 30 µL de resazurina (0,1 mg / ml; Sigma-Aldrich) a cada pocillo en la placa de 96 pocillos. Las MICs fueron confirmadas adicionalmente mediante la siembra de 10 µL de dos pocillos consecutivos (uno con la más alta concentración de compuesto que permitió el crecimiento bacteriano, y el pocillo adyacente, el cual tiene la concentración más baja de compuesto que impidió el crecimiento bacteriano) en placas de Columbia Agar con sangre de oveja (Oxoid) seguido de la incubación a 37°C durante 48 h bajo condiciones microaerófilas. El crecimiento o ausencia de crecimiento de *Hp* permitió determinar la concentración bactericida mínima de los compuestos. Cada experimento fue realizado dos veces por triplicado. Ambos ensayos confirmaron los valores de CIM obtenidos por el método de microdilución.

#### **MIC en cepas de *Hp* resistentes a fármacos**

Se seleccionaron seis cepas de *Hp* resistentes a fármacos obtenidas en el Hospital Universitario Lozano Blesa (España) de pacientes con patologías gástricas (dispepsia y / o úlcera péptica) que fallaron a, al menos, dos terapias convencionales recomendadas en las guías nacionales. Estas cepas fueron aisladas de biopsias gástricas obtenidas durante procedimientos rutinarios endoscópicos gastrointestinales superiores y, posteriormente, cultivadas. De acuerdo con los criterios del Comité Europeo sobre Evaluación de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST) (EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint Tables for

Interpretation of MICs and Zone Diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. 2018), tres de estas cepas de *Hp* eran resistentes al metronidazol, dos a metronidazol / claritromicina, y uno a la rifampicina. Los compuestos **120**, **SS15**, **SS16** y **SS17** se probaron en todas estas cepas. La determinación de su MIC se realizó mediante microdilución y se siguió el método colorimétrico basado en la resazurina, anteriormente explicado.

#### **Concentraciones mínimas citotóxicas (MCC<sub>50</sub>)**

Se cultivaron células HeLa en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10%, 100 U / ml de penicilina y 100 g / ml de estreptomycin a 37°C en una Atmósfera 5% CO<sub>2</sub>. La toxicidad de los compuestos sobre las células HeLa fue determinado por el método del XTT (2,3-Bis- (2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil) -2H-tetrazolio-5-método de la sal sódica de carboxanilida) utilizando el kit de proliferación celular II (Roche), tal y como se describe en (Cremades, N. et al. J. Discovery of Specific Flavodoxin Inhibitors as Potential Therapeutic Agents against *Helicobacter pylori* Infection. *ACS Chem. Biol.* **2009**, 4 (11), 928–938. Galano, J. J. et al. Improved Flavodoxin Inhibitors with Potential Therapeutic Effects against *Helicobacter pylori* Infection. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (15), 6248–6258). De forma resumida, se agregaron volúmenes de 0.1 µL de compuesto disuelto en DMSO para obtener concentraciones finales de los compuestos de 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750 y 1000 µM, en Placas de 96 pocillos (con 30,000 células en 100 µL en cada pocillo). El control no tratado consistió en 30,000 células por pocillo en 100 µL de medio completo (con 0.1% de DMSO). La viabilidad celular se calculó a partir de la absorbancia de los pocillos a 450 y 650 nm. Se utilizaron curvas de citotoxicidad (es decir, porcentaje de la viabilidad celular frente a la concentración del compuesto) para calcular la concentración de compuestos que produce un 50% de lisis celular (MCC<sub>50</sub>). Todos Los experimentos se realizaron dos veces por triplicado. Los índices terapéuticos (TI) fueron calculado como MCC<sub>50</sub> / MIC.

30

#### **Ensayos de toxicidad en ratones**

La toxicidad *in vivo* de los compuestos se probó en ratones hembra C57BL/6J de 48 semanas de edad libres de patógenos obtenidos de Charles River Laboratories España (Barcelona, España), alimentados con una dieta comercial estándar para roedores y agua *ad libitum*. Las hembras fueron seleccionadas por su menor agresividad. La toxicidad de los compuestos **IV** y **120** se probó a tres dosis diferentes:

10, 20 y 40 mg / 100 g de peso corporal. Suponiendo que los compuestos administrados se distribuyen uniformemente en todo el cuerpo del animal, estas dosis varían de 12 a 1600 veces las MIC de los compuestos. Se utilizaron diez grupos de 4-5 animales. A nueve de ellos, y por cada compuesto, la dosis diaria correspondiente se administró en volúmenes de 100 µl por sonda oral durante 7 días. Al grupo de control, se le administró el vehículo solo (aceite de oliva, 5% de DMSO). Tras el tratamiento, los ratones se sacrificaron por asfixia con CO<sub>2</sub> y la sangre se recogió mediante punción cardíaca. Se utilizó un analizador automático (VetScan, Abaxis) para determinar las alteraciones bioquímicas. La evaluación histopatológica se realizó con muestras de corazón, estómago, hígado, pulmón y riñón mediante tinción con hematoxilina-eosina de secciones de tejido.

### Ensayos antibacterianos en ratones

El análisis *in vivo* de la actividad anti-*Hp* de los compuestos se llevó a cabo en ratones (SPF) NMRI (Instituto de Investigación Médica Naval) de 6 semanas de edad (Laboratorios Charles River, Francia). El nivel de colonización gástrica de *Hp* en el modelo de ratones es similar en machos y hembras, por lo que los ensayos se realizaron en hembras porque son menos agresivas que los machos bajo las condiciones de hospedador. Se realizaron cuatro experimentos diferentes para probar los compuestos **IV**, **120**, **SS15** y **SS16** a algunas de las siguientes dosis: 0.1, 1, 5, 10 y 20 mg / 100 g de peso corporal. En todos los experimentos, se analizaron 7 ratones para cada condición estudiada. Los ratones fueron infectados orogastricamente en los días 1 y 3 de la primera semana del experimento con 100 µl de una suspensión de la cepa de *Hp* SS1 (5·10<sup>8</sup> CFU/ml) conocida por colonizar eficientemente la mucosa gástrica del ratón. De acuerdo al modelo de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Hp* establecido previamente (Correia, M. *et al.* Docosahexaenoic Acid Inhibits *Helicobacter pylori* Growth In Vitro and Mice Gastric Mucosa Colonization. *PLoS One* **2012**, 7, e35072), la administración de los compuestos comenzó el día 8. Cien µl de cada compuesto solubilizado en 5-10% de DMSO (Euromedex) / 95-90% aceite de oliva (Sigma-Aldrich) como vehículo a las dosis definidas se administró diariamente por vía oral durante 8 días consecutivos. Los grupos de control no infectados recibieron por vía oral 100 µL de caldo de tripsina con peptona. Además, los grupos de control infectados y no tratados fueron administrados con 100 µl de vehículo. No se observaron signos de toxicidad asociados al vehículo o al tratamiento de los compuestos: es decir, no se observaron variaciones de peso (Figura 1) ni alteraciones en el apetito. 8 días después del tratamiento (día 24), los ratones se sacrificaron por



inhalação de CO<sub>2</sub>, se aislaron los estómagos y se determinó la colonización gástrica de *Hp* como se describió con anterioridad (Ferrero, R. L. *et al.* Immune Responses of Specific-Pathogen-Free Mice to Chronic *Helicobacter pylori* (Strain SS1) Infection. *Infect. Immun.* **1998**, *66* (4), 1349–1355). Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C en una atmósfera microaerófila creada por el sistema Anoxomat AN2CTS (MART Microbiology B.V.). La actividad antibacteriana de los compuestos se evaluó mediante el recuento del número de colonias bacterianas viables expresadas como CFU por gramo de tejido gástrico.

#### 10 **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos de los ensayos de eficacia en ratones se realizaron con el software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc. CA, EE. UU.). Los test de “Mann-Whitney U” y “Unpaired t” se utilizaron para evaluar las diferencias en la colonización gástrica del ratón entre los grupos infectados por *Hp* y tratados con vehículo y compuestos. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para  $p \leq 0.05$ .

#### **Determinación del aclaramiento intrínseco de compuestos en microsomas hepáticos en ratones macho CD-1**

20 El aclaramiento intrínseco de los compuestos se estudió en microsomas hepáticos, que son vesículas del retículo endoplasmático del hepatocito que contienen enzimas de fase I, concretamente CYP, monooxigenasas que contienen flavinas, esterasas, amidasas e hidrolasas epóxidas, y también enzimas de fase II, tales como UDP-glucuroniltransferasas. Los microsomas se preparan por centrifugación diferencial, y los de hígado son el modelo de elección (junto con los hepatocitos humanos) para estudios de metabolismo de fármacos.

El procedimiento operativo estándar se describe a continuación:

Las disoluciones madre de los compuestos a ensayar, el NADPH y el tampón fosfato (pH 7,4) se añaden a tubos de incubación precalentados a 37°C durante 3 minutos. Por separado, los microsomas son también precalentados a 37°C durante 3 minutos. Tras esto, se agregan los microsomas a los tubos de incubación y se mezclan bien. Las muestras se toman a tiempos predeterminados (2, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos). En cada punto, se extrae una muestra de la incubación y se neutraliza con una mezcla de metanol helado que contiene un estándar interno en proporciones 1: 4. Los tubos de incubación son agitados a 37 ° C durante todo el experimento.

Las condiciones de incubación finales estándar son: 1  $\mu$ M de compuesto en un tampón que contiene 0,5 mg / ml de proteína microsomal, 0,9% (v / v) de acetonitrilo y 0,1% (v / v) de DMSO.

- 5 Las muestras neutralizadas se mezclan bien y la proteína se precipita a -20°C durante un mínimo de 12 horas. Las muestras se centrifugan a 4°C y los sobrenadantes se transfieren a una placa nueva de 96 pocillos para su análisis.

Los marcadores de control positivo están incluidos y consisten en: Diclofenaco (metabolizado por CYP2C9 y CYP3A4) y Diltiazem (principalmente metabolizado por CYP3A4).

El análisis se llevó a cabo utilizando un híbrido Espectrómetro de masas cuadrupolo-orbitrap Thermo Scientific Q-Exactive Focus con sistema Vanquish Flex UHPLC.

15

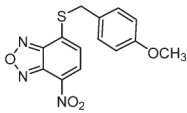
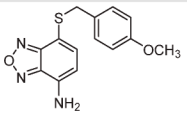
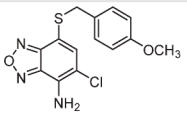
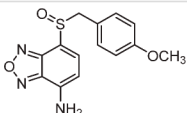
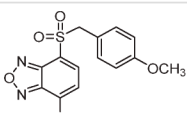
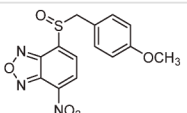
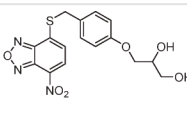
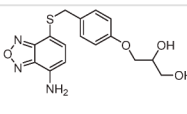
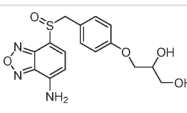
## RESULTADOS

### Mejora de los índices terapéuticos modificando el estado de oxidación de los grupos químicos presentes en las moléculas inhibidoras de la flavodoxina

20 Varios compuestos dentro de la fórmula (I) de la presente invención han sido sintetizados y probados. Todos ellos son menos citotóxicos para las células HeLa que sus correspondientes compuestos cabecera (Tabla 1 y Tabla 1'). De hecho, la mayoría de los derivados no son citotóxicos a concentraciones tan altas como 1 mM (Figura 2). Las actividades anti-*Hp* *in vitro* de algunos compuestos han sido evaluados utilizando tres o cuatro cepas de referencia de *Hp* (Tabla 1 y Tabla 1'). El impacto específico en los TI provocado por la modificación del estado de oxidación de los grupos nitro, azufre de los inhibidores se ha evaluado por comparaciones de pares de compuestos analizados.

**Tabla 1.** Actividad *in vitro* de los inhibidores de flavodoxina contra cepas de referencia de *H. pylori*<sup>a</sup>

Compuesto	Estructura	MCC <sub>50</sub> <sup>b</sup> ( $\mu$ M)	MIC <sup>c</sup> ( $\mu$ M)	TI <sup>d</sup> (MCC <sub>50</sub> /MIC)
-----------	------------	--	--------------------------------	---

		HeLa	SS1	NCTC 11637	2669 5	SS1	NCTC 11637	26695
<b>IV<sup>a</sup></b>		7	0.78	1.6	6.3	9.0	4.4	1.1
<b>120<sup>a</sup></b>		>1000	13.9	27.8	27.8	>72	>36	>36
<b>SS15</b>		>1000	5.9	11.8	5.9	>170	>85	>170
<b>SS16</b>		>1000	105	53	26	>9.5	>19	>39
<b>SS17</b>		>1000	100	100	100	>10	>10	>10
<b>SS21</b>		179	12	6	6	15	30	30
<b>AM_P085</b>		17.23	1.33	2.65	2.65	12.99	6.5	6.50
<b>AM_P167</b>		>1000	46.11	46.11	46.1 1	21.6	21.69	21.69
<b>AM_P202</b>		>1000	705.2 6	705.2 3	705.2 3	1.42	1.42	1.42

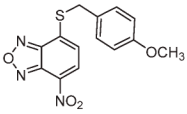
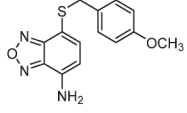
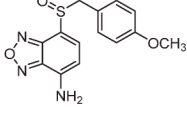
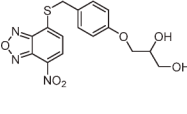
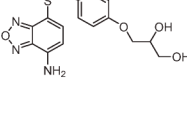
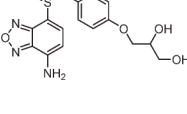
<sup>a</sup>Compuesto ya incluido en la invención anterior.

<sup>b</sup>Mínima concentración citotóxica (MCC<sub>50</sub>) probada en células HeLa

<sup>c</sup>Mínima concentración inhibitoria (MIC) probada en tres cepas de referencia diferentes de *H. pylori* (NCTC 11637 (resistente a Mnz), y 26695 y Sydney Strain 1 (Susceptibles a Mnz))

<sup>d</sup>Los índices terapéuticos (TI) se han calculado como MCC<sub>50</sub> / MIC

**Tabla 1'.** Actividad *in vitro* de los inhibidores de flavodoxina contra cepas de referencia de *H. pylori*<sup>a</sup>

Compuest o	Estructura	MIC <sup>c</sup> ( $\mu$ M)	TI <sup>d</sup> (MCC <sub>50</sub> /MIC)
		UA 1182	UA 1182
<b>IV<sup>a</sup></b>		1.58	4.26
<b>120a</b>		13.92	71.84
<b>SS16</b>		54.75	18.96
<b>AM_P085</b>		2.65	6.50
<b>AM_P167</b>		46.11	21.69
<b>AM_P202</b>		352.62	2.84

El compuesto **IV** contiene un grupo nitro, que, en este caso, está unido a un anillo de benzoxadiazol. En este compuesto cabecera, la reducción del grupo nitro a amina reduce la toxicidad tanto (> 100 veces) que la disminución moderada concomitante de la actividad observada (alrededor de 10 veces) se combina para dar un TI 10 veces mayor en el compuesto **120**, que también se describe en la invención anterior. La toxicidad del compuesto **IV** también se reduce considerablemente (25 veces) por oxidación del átomo de azufre a sulfóxido, lo cual causa una disminución menos pronunciada de la actividad y, por lo tanto, también eleva la TI. La oxidación del átomo

de azufre a sulfóxido en **120**, compuesto **SS16**, causa de manera similar una menor disminución de la actividad, mientras que no se puede determinar una posible mayor disminución de la toxicidad porque **120** ya no es tóxico a la mayor concentración probada (1 mM). La oxidación adicional del átomo de azufre en **120** a sulfona, compuesto **SS17**, disminuye la actividad. Sin embargo, la cloración de **120** la aumenta. La actividad antimicrobiana es de 2 a 4 veces y no introduce toxicidad, lo que lleva a un alto TI del compuesto **SS15** (de > 85 a > 170, dependiendo de la cepa de referencia de *Hp* probada).

#### 10 **Eficacia de los compuestos frente a las cepas *Hp* resistentes a los antimicrobianos**

Además, varios derivados nitro-reducidos del compuesto **IV** (es decir, **120**, **SS15**, **SS16**) muestran, para las dos cepas sensibles a Mnz (metronidazol) probadas (cepas SS1 y 26695), TIs cercanos a los del Mnz, o incluso superiores. Para explorar la utilidad potencial de estos inhibidores de flavodoxina hacia otras cepas resistentes a los fármacos *Hp*, hemos determinado la actividad de 6 antimicrobianos representativos de uso común en seis cepas de *Hp* obtenidas de pacientes que han recaído o son refractarios a, al menos, dos terapias convencionales (Gisbert, J. P. et al. IV Spanish Consensus Conference on *Helicobacter pylori* Infection Treatment. *Gastroenterol Hepatol* **2016**, *39* (10), 697–721). Tres de estas cepas (aislamientos 1-3) son resistentes a Mnz, dos lo son tanto a Mnz como a Cla (aislamientos 4 y 6) y uno lo es a rifampicina (aislante 5) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Perfiles de resistencia a los antimicrobianos de los aislados clínicos resistentes al fármaco de *H. pylori* siguiendo los criterios EUCAST. (S = sensible; R = resistente)

Compuesto	Aislado	Aislado	Aislado	Aislado	Aislado	Aislado
	1	2	3	4	5	6
<b>Amoxicilina</b>	S	S	S	S	S	S
<b>Claritromicina</b>	S	S	S	R	S	R
<b>Tetraciclina</b>	S	S	S	S	S	S
<b>Levofloxacina</b>	S	S	S	S	S	S
<b>Metronidazol</b>	R	R	R	R	S	R
<b>Rifampicina</b>	S	S	S	S	R	S

El análisis del efecto de algunos inhibidores de flavodoxina en estos aislamientos clínicos (Tabla 3 y la Tabla 4) confirma las tendencias de actividad observadas previamente cuando se evaluaron contra cepas de referencia (Tabla 1). Según los criterios de EUCAST, **SS15** es eficaz contra dos cepas resistentes a Mnz (aislamientos 1 y 2) y contra las dos resistentes a Cla y Mnz (aislamientos 4 y 6). Además, **SS15** también es eficaz contra la cepa resistente a rifampicina (aislado 5). Solo una cepa resistente a Mnz (aislamiento 3) mostró un TI bajo para **SS15** (Tabla 3).

**Tabla 3.** Valores de TI ( $MCC_{50}/MIC$ ) de varios compuestos desarrollados contra aislados clínicos de *H. pylori* resistentes a fármacos <sup>a</sup>

Compuesto	Aislado	Aislado	Aislado	Aislado	Aislado	Aislado
	1	2	3	4	5	6
<b>120</b>	<b>144</b>	<b>72</b>	9.0	<b>144</b>	9.0	<b>72</b>
<b>SS15</b>	<b>161</b>	<b>322</b>	10.0	<b>80</b>	<b>40</b>	<b>322</b>

<sup>a</sup>Las células HeLa se han usado para determinar la Mínima Concentración Citotóxica ( $MCC_{50}$ ), como se indica en la Tabla 1. En negrita se muestran los valores de TI indicativos de efectividad, de acuerdo con los criterios de EUCAST.

**Table 4. Dosis testadas para cada compuesto en los experimentos de eficacia en ratones<sup>a</sup>**

Compuestos	Dosis (mg/100g peso)				
	0.1	1	5	10	20
<b>IV</b>	43 % (P<0.05)	0% (P < 0.05)	P < 0.05	17 % (P<0.001)	NS
<b>120</b>	NS	13 % (P<0.001)	P < 0.01	P < 0.001	NS
<b>SS16</b>		0% (P < 0.01)		5 % (P<0.001)	60% (P < 0.05)

<sup>a</sup>Medido como el porcentaje de ratones donde se ha erradicado completamente la infección de *Hp*. NS: no significativo al comparar la colonización gástrica de *Hp* en ratones infectados con *Hp* y tratados frente a los no tratados.

### Eficacia de los compuestos contra la colonización gástrica de *Hp* en ratones

La actividad anti-*Hp* de estos nuevos compuestos también se ha investigado en el modelo de ratón de la infección por *Hp*. Primero, se evaluó la toxicidad de los inhibidores conocidos (**IV** y **120**) a las dosis de 10, 20 y 40 mg / 100 g de peso corporal. La administración diaria del compuesto **120** durante 8 días no tuvo efectos perjudiciales en el estómago, hígado, corazón, pulmón y riñón a ninguna de las dosis probadas, según el examen histopatológico (Figura 3) y el análisis de sus parámetros bioquímicos (datos no mostrados). En la Figura 3, se representan muestras teñidas con hematoxilina-eosina de estómago de ratones no tratados (A; 40 ×) y ratones tratados (B-G). Las imágenes B-D corresponden a ratones tratados con el compuesto **120** a 10 mg / 100 g (B; 100 ×), 20 mg / 100 g (C; 100 ×) y 40 mg / 100 g (D; 100 ×), y las imágenes E-G a ratones tratados con compuesto **IV** a 10 mg / 100 g (E; 40 ×), 20 mg / 100 g (F; 40 ×) y 40 mg / 100 g (G; 100 ×). El compuesto **IV** no indujo alteraciones significativas a ninguna dosis en hígado, corazón, pulmón o riñón, pero provocó alteraciones histológicas en estómago cuando fue administrado a la dosis más alta, 40 mg / 100 g (compuesto **IV**) (Figura 3). Las alteraciones histológicas encontradas en el estómago incluyen hiperplasia, inflamación y necrosis del epitelio y la mucosa gástrica. Ninguno de estos compuestos fue asociado con el aumento de los niveles de parámetros bioquímicos probados en comparación con animales que no recibieron los compuestos. La falta de alteraciones bioquímicas o histológicas asociadas a la administración de altas dosis de **120** indican que la reducción del grupo nitro en el compuesto **IV** a amina elimina la toxicidad ejercida en el estómago por el compuesto **IV** cuando se administra por vía oral a ratones en dosis altas. En el posterior análisis *in vivo* de la actividad anti-*Hp*, las dosis del compuesto **IV** han sido mantenidas por debajo de las que producen alteraciones histológicas en el estómago de ratones.

Se han realizado varios experimentos en ratones infectados con la cepa SS1 de *Hp* para probar la actividad anti-*Hp* de los compuestos cabecera (compuesto **IV**) y de varios derivados: **120** y **SS16**. Las dosis testadas oscilaron entre 0,1 y 20 mg / 100 g peso. Como era de esperar, todos los ratones control han proporcionado un fondo limpio para la interpretación: todos los ratones de los grupos infectados y no tratados han demostrado una eficiente colonización estomacal de *Hp* ( $10^5$  a  $10^6$  CFU / g de tejido gástrico) y no se han encontrado colonias de *Hp* en ningún grupo correspondiente a ratones no infectados. La eficacia de los diferentes compuestos sobre la colonización gástrica de *Hp* se ha determinado comparando las CFU / g tejido gástrico de cada grupo infectado y tratado con el correspondiente grupo de control

infectado y no tratado. El aceite de oliva (90-95%) / DMSO (10-5%), utilizado como vehículo para solubilizar compuestos, no influyó en la colonización gástrica de *Hp* (datos no mostrados). Todos los datos recogidos en el ensayo para los compuestos **IV** y **120** y el derivado de la presente invención, **SS16**, se presentan en la Figura 4. Los datos de colonización gástrica para todos los compuestos y dosis ensayados se presentan junto con los de los correspondientes grupos de control en la Figura 4A, mientras que los porcentajes de ratones erradicados por *Hp* después del tratamiento se muestra en la Figura 4B.

El compuesto original **IV** y los derivados de amina **120** y **SS16**, redujeron significativamente la tasa de colonización en la mayoría de las dosis probadas (Figura 4A) y consiguieron erradicar la infección en algunos ratones (Figura 4B). El compuesto **IV** redujo la colonización a las dosis 0.1, 1, 5 y 10 mg / 100 g peso ( $p = 0.044$ ;  $0.041$ ;  $0.048$  y  $0.0002$ , respectivamente) y consiguió erradicar la infección en un 43% (3/7) y un 17% (3/18) de los ratones tratados a 0.1 y 10 mg / 100 g de peso corporal, respectivamente. El compuesto **120** también inhibió la colonización gástrica a 1, 5 y dosis de 10 mg / 100 g peso ( $p = 0,0001$ ;  $0,0018$  y  $0,0004$ , respectivamente) y erradicó la infección en un 13% (4/31) de los ratones tratados a 1 mg / 100 g de peso corporal. Finalmente, el compuesto **SS16**, la versión de sulfóxido del compuesto **120**, disminuyó la colonización a las dosis 1, 10 y 20 mg / 100 g de peso corporal ( $p = 0,005$ ,  $0,0002$  y  $0,0122$ , respectivamente) y erradicó la infección en el 60% (3/5) de los animales a la dosis más alta y al 5% (1/20) de los ratones a 10 mg / 100 g.

#### **Aclaramiento intrínseco de los compuestos**

Algunos compuestos de la invención, los compuestos de referencia IV y 120 de la invención anterior y los antibióticos clásicos Diclofenac y Dilitazem han sido evaluados.

Los resultados se muestran en la Tabla 5:

<b>Tabla 5.</b> Vida media y aclaramiento intrínseco de los compuestos en microsomas hepáticos		
Compuesto	Vida media ( $t_{1/2}$ ) (min)	Aclaramiento intrínseco ( $Cl_{int}$ ) ( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ )



IV	< 3.0	> 460.0
120	< 3.0	> 460.0
93	< 3.0	> 460.0
SS15	< 3.0	> 460.0
SS16	4.5	307.2
SS17	< 3.0	> 460.0
AMP85	< 3.0	> 460.0
AMP167	14.8	93.9
AMP202	115.5	12.0
Diclofenaco (referencia)	22.1	62.8
Diltiazem (referencia)	< 3.0	> 460.0

Los compuestos **IV**, **120**, **SS15** y **SS17** experimentan un metabolismo rápido por los microsomas hepáticos, por lo que su vida media es muy corta. El metabolismo del compuesto **AM\_P085** es peculiar debido a que se realiza en dos fases. Primero, se metaboliza casi por completo y luego sigue una tendencia más gradual. De todos modos, la vida media de este compuesto es también muy breve. Por otro lado, **AM\_P202**, **AM\_P167** y **SS16** son los compuestos desarrollados más estables (en orden de aparición). En consecuencia, estos tres compuestos son los más solubles en agua, y esto no es una coincidencia; el metabolismo de CYP se correlaciona positivamente con log D, por lo que, los análogos más lipófilos de una serie tenderán a metabolizarse más rápidamente que sus análogos con menor log D. Como enzimas oxidativas, los CYP tenderán a oxidar compuestos lipofílicos en sitios de densidad electrónica significativa.

## 15 DISCUSIÓN

Para intentar mejorar aún más sus índices terapéuticos, los inventores han sintetizado nuevos variantes que muestran diferentes formas redox de los grupos nitro o azufre

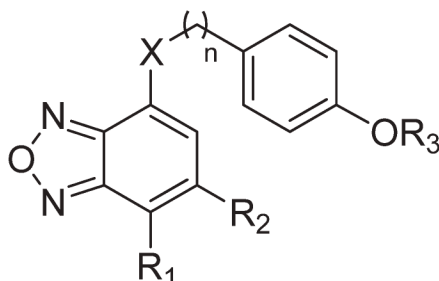
presentes en inhibidores conocidos. Su potencial para la erradicación de *Hp* ha sido probada en el modelo de ratones de la infección, y su actividad contra las cepas clínicas de *Hp* resistentes a los fármacos se han determinado. Los compuestos de la invención exhiben TIs mucho más grandes para cepas de referencia de *Hp* que su compuesto cabecera (Tabla 1 y 1 '). De hecho, algunos de estos inhibidores de flavodoxina muestran TI comparables a los de Mnz y son efectivos contra una variedad de aislados clínicos de *Hp* resistentes a antimicrobianos comunes, tales como claritromicina, metronidazol o rifampicina. Es importante destacar que estos inhibidores, utilizados de forma individual contra la infección provocada por *Hp* en el modelo de ratones, pueden disminuir significativamente la carga gástrica de *Hp* (Figura 4A) y, en algunos ratones, erradicar la infección (Figura 4B). Por lo tanto, los compuestos de la presente invención constituyen una nueva familia prometedora de compuestos químicos con potencial como antimicrobianos contra el aumento de cepas de *Hp* resistentes a los fármacos convencionales.

15

Además, la solubilidad de algunos inhibidores de la presente invención ha aumentado y, por lo tanto, su biodisponibilidad se ha incrementado, lo que puede garantizar un efecto sistémico de los mismos.

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



5

una sal farmacéuticamente aceptable, un isómero o un solvato del mismo, donde

R<sub>1</sub> es un grupo NO<sub>2</sub> o NH<sub>2</sub>,

R<sub>2</sub> es H o halógeno,

10 X es -S-, -SO- o -SO<sub>2</sub>-

R<sub>3</sub> es H o un grupo alquilo (C1-C3) opcionalmente sustituido con al menos un grupo seleccionado de: -OH, -NH<sub>2</sub>, halógeno o combinaciones de los mismos,

n es un número entero de 1 a 3,

con la condición de que R<sub>2</sub> es halógeno cuando X es -S- y R<sub>3</sub> es CH<sub>3</sub>.

15

2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X es -S- o -SO-.

3. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde R<sub>2</sub> es H o Cl.

20

4. Compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en el que R<sub>3</sub> es -CH<sub>3</sub> o -CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>OH.

5. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que n es

25 1.

6. Compuesto de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que X es -SO- y R<sub>2</sub> es H.

30 7. Compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona de:

- 5-cloro-7 - ((4-metoxibencil) tio) benzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-amina  
7 - ((4-metoxibencil) sulfinil) benzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-amina  
4 - ((4-metoxibencil) sulfinil) -7-nitrobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol  
7 - ((4-metoxibencil) sulfonil) benzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-amina  
5 3- (4 - (((7-nitrobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-il) tio) metil) fenoxi) propano-1,2-diol  
3- (4 - (((7-aminobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-il) tio) metil) fenoxi) propano-1,2-diol, y  
3- (4 - (((7-aminobenzo [c] [1,2,5] oxadiazol-4-il) sulfinil) metil) fenoxi) propano-1,2-  
diol
- 10 8. Compuesto de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso como medicamento.
9. Compuesto de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en el tratamiento de infecciones infecciosas causadas por *Helicobacter*.
- 15 10. Compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que las enfermedades infecciosas son causadas por *Helicobacter pylori*.
11. Compuesto para su uso según la reivindicación 10, en el que las enfermedades  
20 infecciosas son causada por la cepa NTCT 11637, 26695 o SS1 de *Helicobacter pylori*.
12. Compuesto para su uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en el que el compuesto es administrado por vía oral.
- 25 13. Compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-12 en el que el compuesto es administrado a un sujeto en una dosis de entre 0,1 y 20 mg / 100 gr peso / día.
14. Compuesto para su uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9-13 en el  
30 que la enfermedad infecciosa es gastritis, úlcera gastroduodenal, linfoma o cáncer gástrico.
15. Preparación combinada que comprende, al menos, un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y otro ingrediente activo, en el que el  
35 ingrediente activo es un antiácido, un antibiótico, un inhibidor de la bomba de protones o cualquier combinación de los mismos.

16. Preparación combinada según la reivindicación 15 para uso en el tratamiento de infecciones infecciosas causadas por *Helicobacter*.
- 5 17. Preparación combinada para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en la que *Helicobacter* es *Helicobacter pylori*.
18. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o, al menos, la preparación combinada de  
10 acuerdo con la reivindicación 15.
19. Composición farmacéutica según la reivindicación 18 para uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por *Helicobacter*.
- 15 20. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en la que *Helicobacter* es *Helicobacter pylori*.

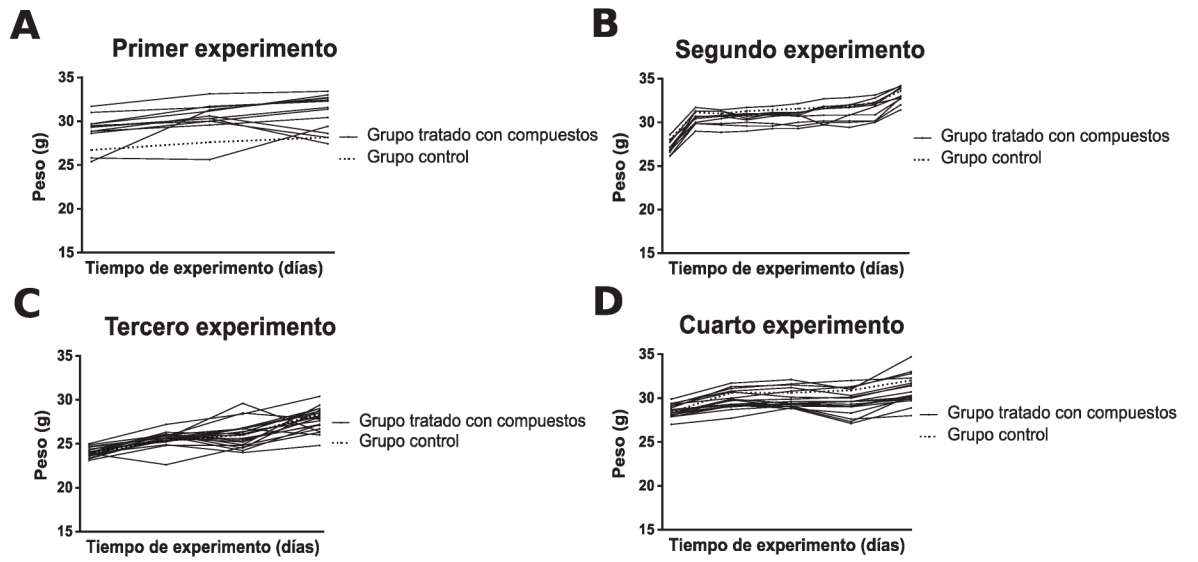


FIG. 1

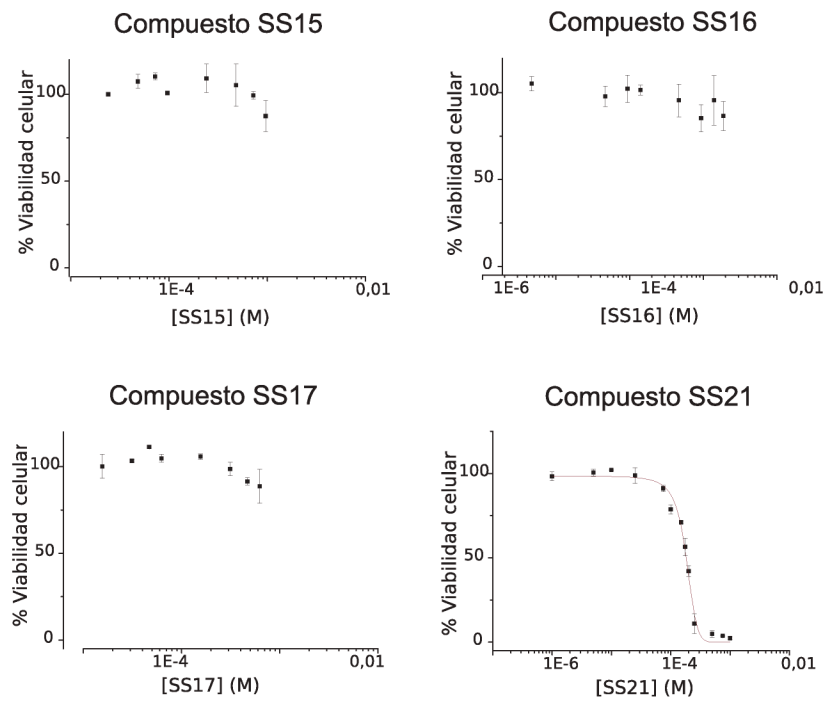


FIG. 2

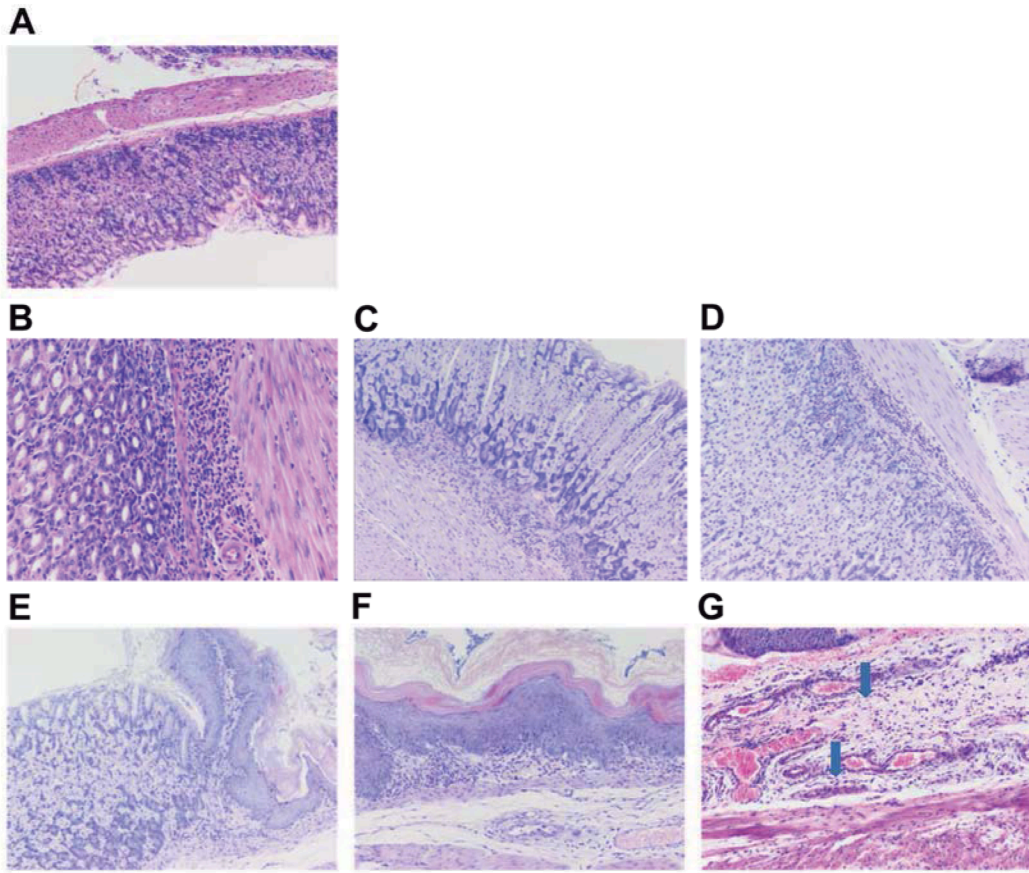


FIG. 3







OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201930445

22 Fecha de presentación de la solicitud: 21.05.2019

32 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2015104433 A1 (UNIV ZARAGOZA et al.) 16/07/2015, Compuestos E y 2 de la tabla 1 de la página 28.	1-20
A	ES 2304221 A1 (UNIV ZARAGOZA) 16/09/2008, fórmula II, reivindicación 8	1-20
A	CREMADES NUNILO et al. Discovery of Specific Flavodoxin Inhibitors as Potential Therapeutic Agents against Helicobacter pylori Infection. ACS Chemical Biology NOV 2009. , 31/10/2009, Vol. 4, Páginas 928-938, ISSN 1554-8929(print) ISSN 1554-8937(electronic), <DOI: doi: 10.1021/cb900166q>. compuesto IV de la figura 4	1-20
A	GALANO JUAN J et al. Improved Flavodoxin Inhibitors with Potential Therapeutic Effects against Helicobacter pylori Infection. Journal of Medicinal Chemistry AUG 8 2013. , 08/08/2013, Vol. 56, Páginas 6248-6258, ISSN 0022-2623(print) ISSN 1520-4804(electronic), <DOI: doi: 10.1021/jm400786q>. compuestos 117, 118, 120 y 150 (esquema 5)	1-20
A	ULRICH KESSLER et al. Discovery and synthesis of novel benzofurazan derivatives as inhibitors of influenza A virus. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 20131001 Pergamon. , 01/10/2013, Vol. 23, Páginas 5575 - 5577, ISSN 0960-894X, <DOI: doi:10.1016/j.bmcl.2013.08.048>. compuestos 8 y 9a del esquema 1	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
02.03.2020

Examinador  
H. Aylagas Cancio

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07D271/12** (2006.01)

**A61K31/4245** (2006.01)

**A61P31/04** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, PATENW, NPL, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS