

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 801 674**

21 Número de solicitud: 201930604

51 Int. Cl.:

C07F 9/54 (2006.01)

A61K 31/66 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

01.07.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.01.2021

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (80.0%)
C/ Serrano, nº 117
28006 Madrid ES y
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(20.0%)**

72 Inventor/es:

**DARDONVILLE, Christophe;
CUETO DÍAZ, Eduardo José;
GAMARRO CONDE, Francisco;
MANZANO GONZÁLEZ, José Ignacio;
PEREA MARTÍNEZ, Ana;
ALUNDA RODRÍGUEZ, José María;
TORRADO DURÁN, Juan José y
OLÍAS MOLERO, Ana Isabel**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **SALES DE 4-HIDROXIFENIL FOSFONIO CON PROPIEDADES ANTIPARASITARIAS**

57 Resumen:

Sales de 4-hidroxifenil fosfonio con propiedades antiparasitarias.

La presente invención proporciona una nueva serie de compuestos derivados de 4-hidroxifenil fosfonio. Además, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende dichos compuestos y al uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por parásitos, preferiblemente parásitos tripanosomátidos. En particular, estos compuestos han demostrado eficacia in vivo para el tratamiento de la leishmaniasis visceral en un modelo murino. Estas enfermedades pueden producirse tanto en humanos como en animales.

ES 2 801 674 A1

DESCRIPCIÓN

SALES DE 4-HIDROXIFENIL FOSFONIO CON PROPIEDADES ANTIPARASITARIAS

5

La presente invención se refiere a derivados de 4-hidroxifenilfosfonio y a su potencial en el tratamiento de enfermedades, tanto humana como animal, provocadas por parásitos tripanosomátidos (leishmaniasis, tripanosomiasis). Por tanto, la invención se enmarca en el sector farmacéutico y veterinario.

10

ESTADO DE LA TECNICA

La leishmaniasis humana es una enfermedad con distribución mundial, cuya prevalencia alcanza los 12 millones de casos. Aparece sobre todo en las áreas tropicales y subtropicales, aunque se encuentra también en los países del Mediterráneo. Además, hay una fuerte incidencia de infección por *Leishmania* en pacientes inmunodeprimidos, especialmente entre los enfermos con SIDA (Alvar, J. et al. *Adv. Parasitol.* **2006**, *61*, 223-74). Los parásitos del género *Leishmania* producen diferentes formas de la enfermedad que van desde la leishmaniasis cutánea, más leve, a la leishmaniasis visceral, una forma mucho más grave de la enfermedad que resulta mortal si no se trata adecuadamente. La especie de *Leishmania* que aparece en la zona mediterránea y en concreto en España es *L. infantum*, que produce formas cutáneas y viscerales de la enfermedad. Las opciones terapéuticas para tratar la leishmaniasis incluyen los derivados antimoniales pentavalentes (estibogluconato sódico y antimonio de meglumina), el antibiótico anfotericina B y su formulación liposomal AmBisome®, el antibiótico paromomicina, el derivado de alquifosfocolina miltefosina, la 8-aminoquinolina sitamaquina y la diamidina pentamidina (Mishra, J. et al. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1153-69). Sin embargo, estos fármacos presentan varias limitaciones como son su toxicidad, su difícil administración, el alto precio y, lo más preocupante, la aparición de cepas resistentes a los antimoniales (Croft, S. L. et al. *Clin Microbiol Rev* **2006**, *19*, 111-26) y miltefosina (Srivastava, S. et al. *Parasites & Vectors* **2017**, *10*, 49) Además, el tratamiento de las formas más complejas de la enfermedad, así como en los casos de co-infección con VIH es poco eficaz.

Se ha descrito la actividad *in vivo* del bromuro de tetrafenilfosfonio sobre *L. braziliensis* (Hanson, W. L. et al. Technical reports ADA283312, 1994, 1-43) y la actividad leishmanicida *in vitro* de sales de bisfosfonio derivadas de la benzofenona (Luque-Ortega, J.R. et al. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1788-98). Además, se han descrito sales de fosfonio con actividad sobre *Trypanosoma brucei* derivadas de benzofenona (Taladriz, A. et al. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2606-2622), 4-hidroxibenzoato (Fueyo González, F. J. et al. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1509-1522; Ebiloma, G. U. et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *150*, 385-402), 4-hidroxibenzaldehído y ácido 4-hidroxibenzoico (Meco-Navas, A. et al. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 923-928), haluros de triarilbencilfosfonio (Patente US4187300A). También, se han descrito sales de trifenilfosfonio con actividad sobre *T. cruzi* (Long, T. E. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2976-2979; Cortes, L. A. et al. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136852). Además, se han descrito sales de fosfonio con actividad microbicida frente a los hongos *Venturi inaequalis*, *Piricularia oryzae*, *Botrytis cinerea* y *Puccinia recondita*, así como frente al protista *Plasmopara vitícola* (Patente DE3332716A).

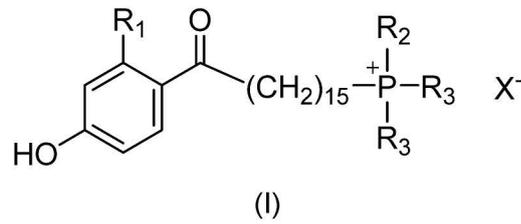
Sin embargo, no se han descrito sales de fosfonio derivadas de 1-(4-hidroxifenil)-oxoalcano con cadena alquílica larga (> 14 carbonos) entre el radical benzoilo y el grupo fosfonio como agentes leishmanicidas.

Una ventaja de los compuestos descritos en la presente patente es que son más estables frente al metabolismo hepático y plasmático que los derivados benzoatos descritos previamente. Además, estos compuestos son más selectivos frente a *Leishmania* que los mencionados benzoatos, y son efectivos sobre cepas fármaco-resistentes.

25 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los compuestos descritos en la presente invención pueden ser útiles para tratar infecciones causadas por protozoos tripanosomátidos (*Leishmania* y *Trypanosoma*).

30 Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I), sal farmacéuticamente aceptable, o solvato del mismo



donde:

R₁ se selecciona de entre OH y CH₃;

- 5 R₂ y R₃ se seleccionan independientemente entre alquilo C₁-C₆, cicloalquilo, arilo o heterociclo;

X es un halógeno.

10 A partir de ahora puede referirse a los compuestos de fórmula (I) como compuestos de la invención.

El término "solvato" pretende indicar una forma de solvato farmacéuticamente aceptable de un compuesto especificado que mantiene la eficacia biológica de dicho compuesto. Los ejemplos de solvatos incluyen compuestos de la invención junto con
 15 agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO (dimetilsulfóxido), acetato de etilo, ácido acético o etanolamina. El término "hidrato" se emplea cuando dicho disolvente es agua. Los métodos de solvatación son de conocimiento general en la materia.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales preparadas a partir de
 20 bases farmacéuticamente aceptables no tóxicas incluyendo bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, de litio, de magnesio, sales mangánicas, manganosas, de potasio, de sodio, de cinc y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas
 25 primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluidas aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas, y resinas de intercambio iónico básicas, tales como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etil-morfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina,
 30 metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina, y

similares. Cuando el compuesto de la presente invención es básico, pueden prepararse sales a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos inorgánicos y orgánicos. Tales ácidos incluyen el ácido acético, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, múxico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, ptoluenosulfónico y similares.

Los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio, y las formadas a partir de ácidos maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, pamoico, succínico, clorhídrico, sulfúrico, bismetilsalicílico, metanosulfónico, etanodisulfónico, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, glucónico, aspártico, esteárico, palmítico, itacónico, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, ciclohexilsulfámico, fosfórico y nítrico.

El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, ciclohexilo. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como alquínilo, alquenilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro o mercapto.

Por "halógeno" se entiende en la presente invención a un átomo de bromo, cloro, yodo o flúor.

En una realización preferida, R_1 se selecciona de entre OH y CH_3 , y más preferiblemente R_1 es OH.

En otra realización preferida, R_2 y R_3 son arilos, y más preferiblemente fenilo.

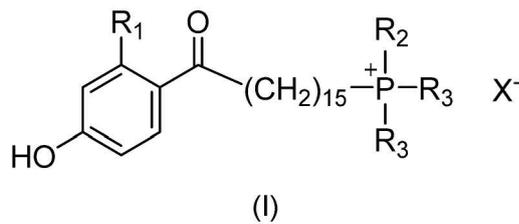
En otra realización preferida, R_2 y R_3 son 1-naftalenilo.

En otra realización preferida, R_2 es 2-piridilo y R_3 es fenilo.

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) se seleccionan de la lista que comprende:

- Bromuro de (15-(2,4-dihidroxifenil)-15-oxopentadecil)trifenilfosfonio (1) **TAO99**
- 5 - Bromuro de (16-(4-hidroxi-2-metilfenil)-16-oxohexadecil)trifenilfosfonio (2) **TAO100**
- Bromuro de (16-(4-hidroxi-2-metilfenil)-16-oxohexadecil)difenil(piridin-2-il)fosfonio (3) **TAO101**
- 10 - Bromuro de (16-(2,4-dihidroxifenil)-16-oxohexadecil)tri(naftalen-1-il)fosfonio (4) **TAO118**

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula general (I)



15

donde:

R_1 se selecciona de entre OH y CH_3 ;

R_2 y R_3 se seleccionan independientemente entre alquilo C_1-C_6 , cicloalquilo, arilo o heterociclo;

20 X es un halógeno.

junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son sustancias conocidas por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

30 Los compuestos y composiciones de esta invención pueden usarse con otros fármacos para proporcionar una terapia de combinación. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición, o pueden proporcionarse como una composición aparte para la administración al mismo tiempo o en un tiempo diferente.

Por tanto, en otra realización preferida, la composición de la invención se caracteriza porque además puede comprender al menos otro principio activo, preferiblemente un agente antiparasitario.

5

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto, de fórmula general (I), para la elaboración de un medicamento.

10 Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de la invención, de fórmula general (I), para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos, preferiblemente enfermedades causada por parásitos protozoarios. Estas enfermedades se producen en un animal, preferiblemente en un mamífero, incluyendo a humanos.

15

En una realización preferida, las enfermedades son enfermedades causadas por un parásito del género *Leishmania* o *Trypanosoma*. Y aún más preferiblemente los parásitos son de las especies *L. aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. arabica*, *L. archibaldi*, *L. aristedesii*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* (*syn. L. infantum*), *L. colombiense*, *L. deanei*, *L. donovani*, *L. enriettii*, *L. equatorensis*, *L. forattinii*, *L. garnhami*, *L. gerbilli*, *L. guyanensis*, *L. herreri*, *L. hertigi*, *L. infantum*, *L. killicki*, *L. lainsoni*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. pifanoi*, *L. shawi*, *L. tarentolae*, *L. tropica*, *L. turanica*, *L. venezuelensis*, *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*, *T. congolense*, *T. equinum*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. vivax*.

25

En otra realización preferida, la enfermedad se selecciona entre leishmaniasis, tripanosomiasis africana humana (enfermedad del sueño), tripanosomiasis animales, o tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas).

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de tratamiento y/o prevención de enfermedades parasitarias o causadas por parásitos que comprende la administración a un individuo infectado (en necesidad del mismo) de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de la invención de fórmula (I), o de

la composición farmacéutica según se describe en la presente invención. El individuo puede ser un animal, preferiblemente en un mamífero, incluyendo a humanos.

5 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, así como la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

10

Dicha composición terapéutica se puede preparar en forma sólida o en suspensión, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida.

15

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25

Fig. 1. Ruta sintética para la preparación de los derivados de fórmula (I): (i) HBr 48%, 110 °C; (ii) BF₃-Et₂O, 110 °C; (iii) trifenilfosfina (para **1** y **2**) o difenil-2-piridilfosfina (para **3**), CH₃CN, 80 °C, 5-18 días; (iv) tris(naftalen-1-il)fosfano (para **4**), DMF, 110 °C, 5 días.

30

Fig. 2. Concentración en plasma obtenida después de la administración oral de 20 mg / kg de compuesto **1** en DMSO al 5-8% a ratones BALB/c. Los valores corresponden a la mezcla de los plasmas obtenidos en los tiempos de muestreo (n = 3).

Ejemplos.

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los
 5 inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos descritos en la presente invención.

Los compuestos de fórmula (I) que a continuación se sintetizan están esquematizados
 en la Figura 1.

10

Ejemplo 1. Síntesis de los compuestos de la invención

Ácido 16-bromohexadecanoico (5). En un tubo Kimax con tapón de rosca, una
 disolución de ácido 16-hidroxihexadecanoico (1.0 g, 3.67 mmol) en ácido acético (4
 15 mL) y HBr 48% acuoso (4 mL) se agita a 110 °C durante 41 h. Una vez enfriada la
 mezcla de reacción, el sobrenadante precipitado se colecta por filtración, se lava con
 agua y se seca a vacío obteniéndose 1.671 g de producto crudo. El compuesto **5** se
 recrystaliza con hexano, obteniéndose cristales blancos (1.074 g, 87%). ¹H NMR (400
 MHz, CDCl₃) δ 3.34 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.79 (p, *J* = 7.2 Hz,
 20 2H), 1.57 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.40 – 1.12 (m, 22H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ
 179.9, 34.03, 34.02, 32.9, 29.62, 29.60, 29.58, 29.54, 29.44, 29.42, 29.2, 29.1, 28.8,
 28.2, 24.7.

16-bromo-1-(2,4-dihidroxifenil)hexadecan-1-ona (6a) En un tubo Kimax
 25 (previamente secado en la estufa) se añade resorcinol (33 mg, 0.3 mmol) y ácido 16-
 bromohexadecanoico **5** (104 mg, 0.3 mmol). A continuación, se añade BF₃·(Et₂O)₂ (1.5
 mL) bajo atmosfera de argón. El tubo se cierra con el tapón de rosca y la mezcla de
 reacción se agita a 110 °C durante 2 h. A continuación, la mezcla de reacción se deja
 enfriar y se vierte sobre hielo. La fase acuosa se extrae con EtOAc (25 mL). La fase
 30 orgánica se lava con salmuera (5 mL), se seca (MgSO₄), y se evapora obteniéndose
 un aceite marrón. El producto se purifica por cromatografía sobre sílice (10 g) eluyendo
 con hexano/EtOAc (100/0→90/10), obteniéndose **6a** como sólido blanco amorfo (58
 mg, 45%). HPLC (UV) >90%. ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 12.81 (s, 1H), 7.59
 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.40–6.20 (m, 2H), 6.11 (brs, 1H), 3.34 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.82 (t, *J*

= 7.5 Hz, 2H), 1.78 (p, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.65 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.45 – 1.06 (m, 20H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 205.6, 165.4, 162.7, 132.6, 114.0, 107.9, 103.7, 38.2, 34.3, 33.0, 29.76, 29.73, 29.67, 29.61, 29.57, 29.52, 28.9, 28.3, 25.1.

5 **16-bromo-1-(4-hidroxi-2-metilfenil)hexadecan-1-ona (6b)**. El compuesto **6b** se obtiene siguiendo el mismo procedimiento que para el compuesto **6a** partiendo de *m*-cresol (30.6 mg, 0.28 mmol). El compuesto se purifica por cromatografía sobre sílice con hexano/EtOAc (100/0 \rightarrow 30/1) obteniéndose un sólido blanco amorfo (15 mg, 13%). HPLC (UV) > 95%. ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 12.36 (s, 1H), 7.57 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 6.63 (dd, $J = 8.3, 1.5$ Hz, 1H), 3.34 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.89 – 2.84 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.25 – 2.18 (m, 2H), 1.83 – 1.74 (m, 2H), 1.66 (p, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.59 – 1.50 (m, 2H), 1.39 – 1.17 (m, 18H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 206.5, 162.8, 147.9, 130.0, 120.2, 118.7, 117.3, 38.4, 34.6, 34.2, 33.0, 29.74, 29.73, 29.68, 29.61, 29.59, 29.58, 29.49, 29.41, 29.29, 28.91, 28.33, 25.14, 15 24.86.

Bromuro de (15-(2,4-dihidroxifenil)-15-oxopentadecil)trifenilfosfonio (1) (TAO99). En un tubo Kimax con tapón de rosca se añade **6a** (75 mg, 0.18 mmol) y Ph_3P (51 mg, 0.19 mmol) en acetonitrilo anhidro (1.5 mL). La mezcla de reacción se agita durante 18 días a 80 °C bajo atmosfera de argón. A continuación, el tubo se deja en la nevera (4 °C) durante varios días hasta que aparezca un precipitado blanco. El sobrenadante se elimina y se añade un poco de acetonitrilo para lavar el precipitado. El tubo se centrifuga y se elimina el sobrenadante. Se repite la misma operación de lavado del precipitado con Et_2O . El producto **1** se aísla como un sólido blanco amorfo (85 mg, 25 100%). HPLC >95%, ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 12.71 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 7.78 – 7.56 (m, 15H), 7.48 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.55 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H), 6.33 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 3.41 (td, $J = 13.1, 12.6, 7.3$ Hz, 2H), 2.74 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.60 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.56 – 1.42 (m, 4H), 1.30 – 1.05 (m, 20H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 205.2, 165.3, 165.0, 135.3 (d, $J = 3.0$ Hz), 133.6 (d, $J = 9.9$ Hz), 132.2, 130.7 (d, $J = 12.5$ Hz), 118.2 (d, $J = 86.0$ Hz), 112.8, 108.7, 103.4, 37.9, 30.6 (d, $J = 15.5$ Hz), 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.14, 29.11, 29.08, 25.2 (d, $J = 1.8$ Hz), 22.8 (d, $J = 50.3$ Hz), 22.7 (d, $J = 4.5$ Hz). HRMS (ESI $^+$) m/z 609.3482 ($\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{PO}_3$ requiere: 609.3498).

Bromuro de (16-(4-hidroxi-2-metilfenil)-16-oxohexadecil)trifenilfosfonio (2) (TAO100). En un tubo Kimax se añade **6b** (6.9 mg, 0.016 mmol), Ph₃P (4.2 mg, 0.016 mmol) y 0.6 mL de DMF anhidra bajo atmosfera de argón. El tubo se cierra con el tapón de rosca y la mezcla de reacción se agita a 80 °C durante 5 días. El disolvente se evapora y el producto disuelto en MeOH se aísla por precipitación con Et₂O/hexano a 4 °C durante una noche. El sobrenadante se elimina y el precipitado se lava con sucesivamente con Et₂O y hexano. Sólido blanquecino amorfo (7.6 mg, 69%). HPLC > 95%. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 12.36 (s, 1H), 7.84 – 7.74 (m, 6H), 7.72 (td, *J* = 7.3, 1.8 Hz, 3H), 7.63 (td, *J* = 7.7, 3.5 Hz, 6H), 7.57 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.63 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 3.76 (dt, *J* = 13.2, 7.4 Hz, 2H), 2.87 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.66 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.60 – 1.50 (m, 2H), 1.38 – 1.07 (m, 22H). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 206.6, 162.8, 147.9, 135.1 (d, *J* = 3.0 Hz), 133.9 (d, *J* = 10.0 Hz), 130.6 (d, *J* = 12.5 Hz), 130.1, 120.3, 118.7 (d, *J* = 85.6 Hz), 118.6, 117.3, 38.4, 30.6 (d, *J* = 15.5 Hz), 29.71, 29.69, 29.67, 29.64, 29.57, 29.54, 29.45, 29.41, 29.3, 24.8, 23.0 (d, *J* = 49.3 Hz), 22.8 (d, *J* = 4.6 Hz), 22.1. HRMS (ESI⁺) *m/z* 607.3709 (C₄₁H₅₂PO₂ requiere: 607.3705).

Bromuro de (16-(4-hidroxi-2-metilfenil)-16-oxohexadecil)difenil(piridin-2-il)fosfonio (3) TAO101. Se utiliza el mismo procedimiento que para la síntesis del compuesto **2**. Una mezcla de **6b** (5.7 mg, 0.014 mmol) y Ph₃P (3.7 mg, 0.014 mmol) en acetonitrilo anhidro (0.6 mL) se agita a 80 °C durante 5 días bajo atmosfera de argón. El disolvente se evapora y el producto disuelto en MeOH se aísla por precipitación con Et₂O a 4 °C durante una noche. El sobrenadante se elimina y el precipitado se lava con sucesivamente con Et₂O y hexano. Sólido amorfo marrón (4.6 mg, 48%). HPLC > 95%. ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 12.36 (s, 1H), 8.81 (dt, *J* = 4.7, 1.5 Hz, 1H), 8.42 (ddt, *J* = 7.9, 5.9, 1.1 Hz, 1H), 8.09 (tdd, *J* = 7.9, 5.1, 1.8 Hz, 1H), 7.87 – 7.78 (m, 4H), 7.77 – 7.70 (m, 2H), 7.62 (tdd, *J* = 9.1, 4.5, 3.2 Hz, 5H), 7.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.71 (dd, *J* = 1.6, 0.9 Hz, 1H), 6.63 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 3.75 – 3.62 (m, 2H), 2.92 – 2.82 (m, 2H), 1.72 – 1.46 (m, 4H), 1.37 – 1.07 (m, 22H). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 206.6, 162.8, 151.9 (d, *J* = 19.1 Hz), 147.9, 145.4, 144.2, 138.8 (d, *J* = 10.3 Hz), 135.1 (d, *J* = 3.0 Hz), 134.1 (d, *J* = 9.6 Hz), 132.5 (d, *J* = 24.5 Hz), 130.5 (d, *J* = 12.6 Hz), 130.1, 128.1 (d, *J* = 3.5 Hz), 120.3, 118.6, 117.9 (d, *J* = 85.4 Hz), 117.3, 38.4, 30.6 (d, *J* = 15.2 Hz), 29.72, 29.70, 29.68, 29.63, 29.58, 29.56, 29.46, 29.32,

29.28, 24.8, 22.62, 22.59 (d, $J = 13.6$ Hz), 22.1, 22.0. HRMS (ESI⁺) m/z 608.3666 (C₄₀H₅₁PNO₂ requiere: 608.3657).

(16-(2,4-dihydroxyphenyl)-16-oxohexadecyl)tri(naphthalen-1-yl)phosphonium

5 **bromide (4) (TAO118)**. En un tubo Kimax se añade **6a** (53.6 mg, 0.13 mmol), tris(naftalen-1-il)fosfano (67.0 mg, 0.16 mmol) y 2.0 mL de DMF anhidra bajo atmosfera de argón. El tubo se cierra con el tapón de rosca y la mezcla de reacción se agita a 110 °C durante 5 días. Se evapora el disolvente y el sólido crudo obtenido se purifica por cromatografía sobre sílice con hexano/EtOAc (0→20%), obteniéndose una
 10 mezcla de **2** con óxido de tri(naftalen-1-il)fosfina. Este último se elimina mediante cromatografía de placa preparativa (PTLC) eluyendo con EtOAc/MeOH (8/2). El compuesto **4** puro es un sólido blanquecino (7 mg, 6.4%). HPLC > 95%. ¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.43 (dd, $J = 8.5, 1.5$ Hz, 3H), 8.20 – 8.11 (m, 6H), 7.97 (d, $J = 8.6$ Hz, 3H), 7.78 – 7.61 (m, 7H), 7.54 – 7.47 (m, 3H), 6.33 (ddd, $J = 8.8, 2.4, 0.6$ Hz,
 15 1H), 6.20 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.00 (br, 2H), 2.88 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.68 (p, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.63 – 0.95 (m, 22H). HRMS (ESI⁺) m/z 759.3981 (C₅₂H₅₆O₃P requiere 759.3967).

Ejemplo 2. Ensayos *in vitro* de la actividad leishmanicida de los compuestos de la invención

20

Los compuestos se evaluaron *in vitro* contra formas promastigote y amastigote intracelular del parásito *L. donovani* (cepa HU3) siguiendo el método colorimétrico de MTT descrito previamente (Kennedy ML, et al. *J Med Chem* **2001**, *44*, 4668-4676). Además, se evaluó su citotoxicidad sobre células humanas THP-1 y se calculó el
 25 índice de selectividad (IS) de cada compuesto (Tabla 1).

30

Los compuestos objetos de esta patente muestran actividades sobre promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. donovani* en el rango submicromolar (0,07 – 0,28 μM), siendo respectivamente dos y diez veces más potentes que los fármacos de referencia anfotericina B y miltefosina en este ensayo. Además, los compuestos muestran selectividad hacia *Leishmania* con índices de selectividad (IS) > 20 frente a las células humanas THP-1.

Tabla 1.^a

Ref.	Cmpto	EC ₅₀ (μM)			IS ^b
		<i>L. donovani</i> promastigotes	<i>L. donovani</i> amastigotes intracelulares	Células THP-1	
TAO99	1	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.02	2.81 ± 0.35	31.2
TAO100	2	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	2.45 ± 0.41	24.5
TAO101	3	0.28 ± 0.05	0.10 ± 0.02	2.11 ± 0.12	21.1
TAO118 ^d	4	3.54 ± 0.36	1.25 ± 0.22	12.85 ± 2.30	10.3
	AmB ^e	0.13 ± 0.02	0.24	27.85	116.0
	MIL ^f	6.51 ± 0.35	0.91 ± 0.05	26.25 ± 2.58	28.8

^a Parásitos y células THP-1 se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos. Los datos representan la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes. ^b IS= índice de selectividad (EC₅₀ THP-1 / EC₅₀ parásito (forma amastigote)). ^c no ensayado. ^d Datos de sensibilidad obtenidos en *L. infantum* LEM3049. ^e Anfotericina B. ^f Miltefosina.

10 **Ejemplo 3. Actividad del compuesto 1 frente a cepas fármaco-resistentes de *L. infantum*.**

No se encontraron diferencias significativas en la sensibilidad al compuesto **1** entre la línea de referencia fármaco-sensible (LEM3049) y las cepas LEM 3323 (resistente a Sb^{III}), LEM 5159 (resistente a miltefosina) y LEM 2126 (resistente a miltefosina y paramomicina) (Tabla 2).

15 **Tabla 2. Actividad leishmanicida del compuesto 1 sobre formas promastigote y amastigote intracelulares de aislados clínicos de *L. infantum***^a

EC ₅₀ (μM)	
Promastigotes	Intracelular amastigotes

<i>L. infantum</i>	Cmpto 1	AmB	Cmpto 1	AmB
LEM3049	0.08 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.12 ± 0.06	0.17 ± 0.02
LEM3323	0.10 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.15 ± 0.07	0.18 ± 0.02
LEM5159	0.11 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.03
LLM2126	0.12 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.01

^a Aislados clínicos de *L. infantum* utilizados: LEM 3049 como línea de referencia; LEM 3323, resistente a Sb^{III}; LEM 5159, resistente a miltefosina (MIL) y LEM 2126, resistente a MIL y paromomicina. Anfotericina B (AmB) se utilizó como fármaco de referencia. Los datos representan la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes

5

Ejemplo 4. Eficacia *in vivo* en un modelo murino de leishmaniasis visceral

El compuesto es poco soluble en agua, pero se solubiliza en 5-8% DMSO/agua, 20% EtOH/agua o se puede formular como una suspensión coloidal en 5% γ -ciclodextrina en agua para la administración oral (Tabla 3).

10

Tabla 3. Solubilidad termodinámica del compuesto 1 a las 24 h

Formulación	Solubilidad	
	μ M	mg/L
20% de etanol en agua milliQ	150 ± 10	100 ± 10
5% en peso de γ -ciclodextrina en agua milliQ	750 ± 10	520 ± 10

En base a los datos de farmacocinética, estabilidad y absorción, el compuesto 1 se administró de forma oral en un modelo murino BALB/c de leishmaniasis visceral. Se establecieron tres grupos de ratones: (i) G1, ratones no infectados + 30 μ g de compuesto 1 por ratón durante 4 días (una vez al día); (ii) G2, ratones infectados + γ -ciclodextrina en agua milliQ, y (iii) G3, ratones infectados + compuesto 1 siguiendo la misma pauta descrita para G1.

20

La carga parasitaria en los órganos diana (hígado y bazo) se determinaron 48 h después de finalizar el tratamiento con el compuesto 1. De esta manera, se observó

una reducción en la carga del 98.9% en bazo y del 95.3% en hígado al comparar los grupos de ratones infectados y tratados con el compuesto **1** con los infectados pero no tratados (Tabla 4).

- 5 **Tabla 4.** Actividad *in vivo* del compuesto **1** en el modelo murino (BALB/c) de leishmaniasis visceral empleando *Leishmania infantum*.

Grupo de estudio	Carga pasitaria	
	Hígado	Bazo
G1 (No infectado + compuesto 1 30 µg p.o. ^b durante 4 días)	-	-
G2 (Infectado + vehículo [5% γ-ciclodextrina] p.o. durante 4 días)	4.92 ± 1.21 ^a	607.25 ± 176.96
G3 (Infectado + compuesto 1 30 µg p.o. durante 4 días)	0.18 ± 0.07 (95.3) ^c	6.47 ± 1.77 (98.9)

^aMedia del número de amastigotes por miligramo de tejido. ^bp.o., oralmente. ^c El porcentaje de reducción frente a G2 está reflejado en el valor entre paréntesis.

- 10 La reducción observada en la carga parasitaria en órganos diana después del tratamiento con el compuesto **1** a dosis baja (1.5 mg/kg una vez al día durante 4 días) en nuestro modelo murino es similar a la obtenida con miltefosina a una dosis mucho más alta (i.e. 40 mg/kg una vez al día durante 5 días) en el caso de dicho fármaco (Sebastián-Pérez, V. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e00603-00618).
- 15 Por lo tanto, el compuesto **1** es más potente *in vivo* que el fármaco oral de referencia miltefosina.

Ejemplo 5. Farmacocinética, biodisponibilidad y metabolismo hepático

- 20 La biodisponibilidad de **1** después de la administración oral de 20 mg/kg de compuesto en DMSO al 5-8% a ratones BALB/c es muy alta ($C_{\max} = 182 \mu\text{M}$) y muy rápida ($T_{\max} = 1 \text{ h}$) (Tabla 5 y Figura 2).

El metabolismo hepático del compuesto **1** es dependiente de la especie. Se estudió la estabilidad microsomal de **1** hacia el metabolismo por el citocromo P450 (metabolismo de Fase I) y la uridina glucuronosil transferasa (UGT) (metabolismo de Fase II) en presencia de NADPH y UDPGA. El Compuesto **1** fue metabolizado rápidamente por microsomas hepáticos de ratón (CD-1) (alto aclaramiento intrínseco) con vida media < 30 min, lo que confirma los datos de farmacocinética observados *in vivo*. En contraste, **1** fue metabolizado lentamente por microsomas hepáticos humanos (aclaramiento intrínseco bajo a moderado) con $t_{1/2} > 2$ h, y muy lentamente por la fracción S9 del hígado humano dentro de las 2 h de la reacción (Tabla 5). En comparación, se observó un alto aclaramiento intrínseco del medicamento de control diclofenaco por fracciones humanas en las mismas condiciones ($t_{1/2} < 30$ min).

Tabla 5. Farmacocinética y metabolismo hepático

Farmacocinética del compuesto 1	
T_{max}	1 h
C_{max}	182 μ M
$t_{1/2}$	
First phase (< 6 h)	1 h
Second phase (6–72 h)	23 h
Metabolismo hepático del compuesto 1	
$t_{1/2}$ ratón (microsomas, fase I/II)	< 30 min
$t_{1/2}$ humano (microsomas, fase I)	> 2 h
$t_{1/2}$ humano (fracción S9, fase II)	> 2 h

Ejemplo 6. Ensayos *in vitro* de la actividad tripanocida de los compuestos de la invención.

Los compuestos de la invención muestran actividades en el rango nanomolar contra la cepa sensible (s427) y la cepa fármaco-resistencia B48 del parásito *Trypanosoma brucei* (Tabla 6).

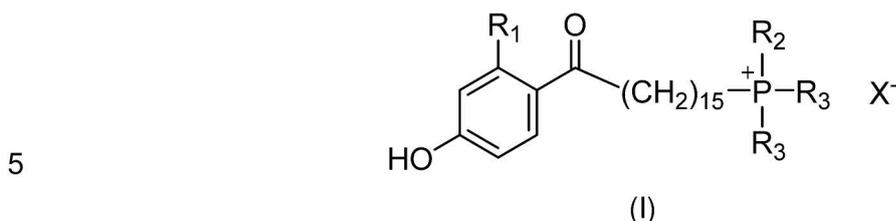
Tabla 6.^a

Ref.	Cmpto	EC ₅₀ (µM)		
		<i>T. brucei</i> ^b	<i>T. brucei</i> B48 ^c	FR ^d
TAO99	1	0.032 ± 0.0004	0.040 ± 0.027	1.27
TAO100	2	0.043 ± 0.0035	0.044 ± 0.007	1.01
TAO101	3	0.107 ± 0.006	0.096 ± 0.01	0.90
	Pent ^e	0.0033 ± 0.0006	0.55 ± 0.03	168
	Dimin ^f	0.101 ± 0.005	1.33 ± 0.14	13.1

^a Los datos representan la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes. ^b Cepa s427 de *T. b. brucei*. ^c Cepa B48 de *T. b. brucei* resistente a pentamidina y diminaceno. ^d FR = factor de resistencia (EC₅₀ *T. b.* B48 / EC₅₀ *T. b.* s427). ^e Pentamidina. ^f Diminaceno.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I), sal farmacéuticamente aceptable, o solvato del mismo



donde:

R₁ se selecciona de entre OH y CH₃;

R₂ y R₃ se seleccionan independientemente entre alquilo C₁-C₆, cicloalquilo, arilo o heterociclo;

X es un halógeno.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde R₁ es OH.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde R₂ y R₃ son arilos, y más preferiblemente fenilo.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde R₂ y R₃ son 1-naftalenilo.

20

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde R₂ es 2-piridilo y R₃ es fenilo.

6. Compuesto según la reivindicación 1 seleccionado de la lista que comprende:

- 25
- Bromuro de (15-(2,4-dihidroxifenil)-15-oxopentadecil)trifenilfosfonio (1) **TAO99**
 - Bromuro de (16-(4-hidroxi-2-metilfenil)-16-oxohexadecil)trifenilfosfonio (2) **TAO100**
 - Bromuro de (16-(4-hidroxi-2-metilfenil)-16-oxohexadecil)difenil(piridin-2-il)fosfonio (3) **TAO101**
 - 30 - Bromuro de (16-(2,4-dihidroxifenil)-16-oxohexadecil)tri(naftalen-1-il)fosfonio (4) **(TAO118)**

7. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula general (I) descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5
8. Composición según la reivindicación 7 que además comprende otro principio activo antiparasitario.
9. Compuesto de fórmula general (I) descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso como medicamento.
- 10
10. Compuesto de fórmula general (I) para su uso como medicamento según la reivindicación 9, donde el medicamento es para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos.
- 15
11. Compuesto de fórmula general (I) para su uso como medicamento según la reivindicación 10, donde la enfermedad está causada por parásitos protozoarios.
12. Compuesto de fórmula general (I) para su uso como medicamento según la reivindicación 11, donde los parásitos protozoarios son del género *Leishmania* o *Trypanosoma*.
- 20
13. Compuesto de fórmula general (I) para su uso como medicamento según la reivindicación 12, donde los parásitos son de las especies *L. aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. arabica*, *L. archibaldi*, *L. aristedesii*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* (*syn. L. infantum*), *L. colombiensis*, *L. deanei*, *L. donovani*, *L. enriettii*, *L. equatorensis*, *L. forattinii*, *L. garnhami*, *L. gerbili*, *L. guyanensis*, *L. herreri*, *L. hertigi*, *L. infantum*, *L. killicki*, *L. lainsoni*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. pifanoj*, *L. shawi*, *L. tarentolae*, *L. tropica*, *L. turanica*, *L. venezuelensis*, *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*, *T. congolense*, *T. equinum*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. vivax*.
- 25
- 30

14. Compuesto de fórmula general (I) para su uso como medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde las enfermedades se producen en animales, preferentemente en un mamífero.
- 5 15. Compuesto de fórmula general (I) para su uso como medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde la enfermedad se selecciona entre leishmaniasis, tripanosomiasis africana humana (enfermedad del sueño), tripanosomiasis animal, tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas).

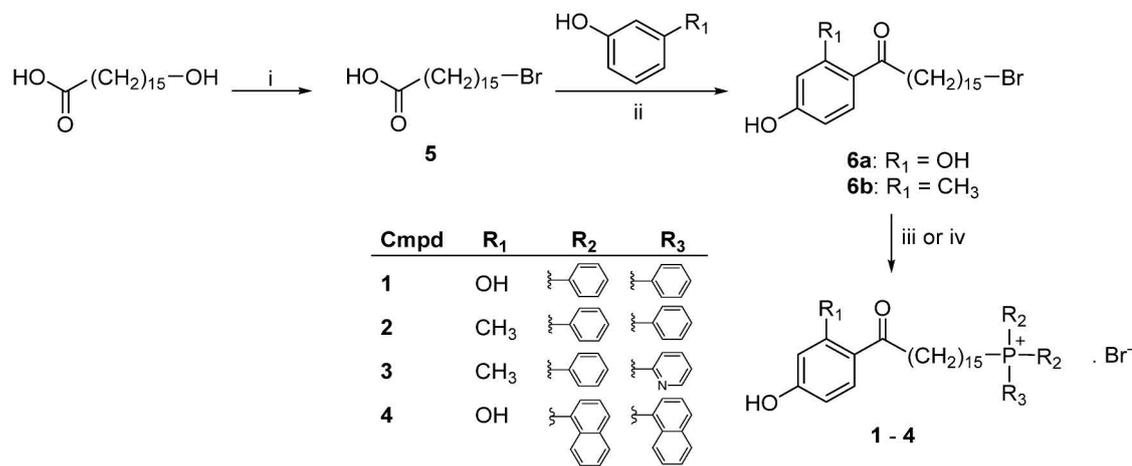


Fig. 1

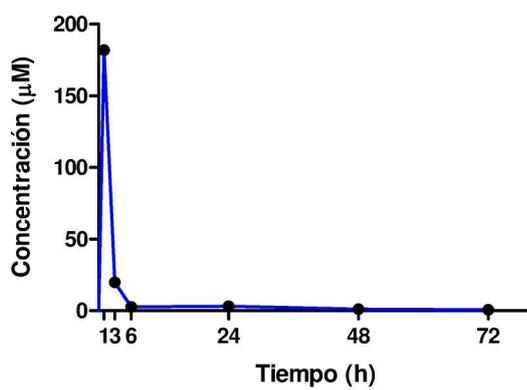


Fig. 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201930604

②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.07.2019

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07F9/54** (2006.01)
A61K31/66 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	G U EBILOMA et al. Inhibition of trypanosome alternative oxidase (TAO) without its N-terminal mitochondrial targeting signal by cationic and non-cationic 4-hydroxybenzoate and 4-alkoxybenzaldehyde derivatives active against <i>T. brucei</i> and <i>T. congolense</i> . <i>European Journal Medicinal Chemistry</i> , 2018, Vol. 150, Páginas 385-402. figura 1, tabla 1, resumen	1-15
A	L A CORTES et al. Novel gallate triphenylphosphonium derivatives with potent antichagasic activity. <i>PLoS One</i> , 2015, Vol. 10, Páginas e0136852. figura 1, resumen	1-15
A	A MECO-NAVAS et al. SAR of 4-alkoxybenzoic acid inhibitors of the Trypanosome Alternative Oxidase. <i>ACS Medicinal Chemistry Letters</i> , 2018, Vol. 9, Páginas 923-928. figuras 1 y 2, resumen	1-15
A	US 4187300 A (US ARMY) 05/02/1980, reivindicaciones	1-15

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
08.10.2019

Examinador
M. Fernández Fernández

Página
1/2

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

C07F, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, REGISTRY, PUBMED