

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 078**

51 Int. Cl.:

A61K 31/445 (2006.01)

A61K 31/4196 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06731152 .2**

96 Fecha de presentación: **05.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1867332**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2007**

54 Título: **COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA Y MÉTODO QUE USA UN AGENTE ANTIFÚNGICO EN COMBINACIÓN.**

30 Prioridad:
07.04.2005 JP 2005110784

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.11.2011

73 Titular/es:
**TOYAMA CHEMICAL CO., LTD.
2-5, 3-CHOME, NISHISHINJUKU, SHINJUKU-KU
TOKYO 160-0023, JP**

72 Inventor/es:
**NOMURA, Nobuhiko;
NISHIKAWA, Hiroshi y
FUJINO, Noritomo**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 368 078 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica y método que usa un agente antifúngico en combinación

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un composición farmacéutica que es útil en el tratamiento de infecciones fúngicas originadas por patógenos fúngicos y que comprende un derivado de arilamidina o una sal del mismo, y uno o más agentes seleccionados de agentes antifúngicos de azol, agentes antifúngicos de polieno, agentes antifúngicos de candina, agentes antifúngicos de fluoropirimidina e inmunosupresores. También se desvela un método para el uso en combinación de los agentes para tratar infecciones fúngicas.

Técnica antecedente

15 Por el documento EP-A1 481 966 se conocen derivados de arilamidina y sales de los mismos, que tienen acción antifúngica. Una micosis grave tal como la candidiasis invasiva puede ser con frecuencia una enfermedad letal. En el pasado, se ha considerado que el principal mecanismo protector por parte de un organismo hospedador contra hongos tales como *Candida* es una inmunización inespecífica por los neutrófilos. Cuando este mecanismo protector funciona con normalidad hay poco riesgo de infectarse con hongos. Sin embargo, en los últimos años, el riesgo de padecer una micosis grave ha aumentado debido al incremento del número de pacientes con enfermedades subyacentes que disminuyen la función inmunológica del cuerpo, tales como tumores malignos (en particular, tumores malignos hematopoyéticos tales como leucemia aguda o linfoma maligno) y SIDA, el uso frecuente de agentes anticancerígenos o inmunosupresores, el uso excesivo de antibióticos antibacterianos u hormonas esteroides, el uso prolongado de hiperalimentación venosa central o cateterización venosa y similares (Documento 1, que no es una patente).

Los agentes usados para el tratamiento de tales micosis graves son muy pocos, cuando se comparan con los agentes antibacterianos usados, e incluyen solo anfotericina B, flucitosina, miconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, micafungina y similares.

Por consiguiente, hay un incremento de la necesidad de agentes seguros y eficaces contra las infecciones fúngicas oportunistas causadas por patógenos fúngicos tales como *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*.

Aunque los agentes que se usan en la actualidad, por ejemplo, anfotericina B, tienen una acción fungicida extremadamente fuerte, tienen un problema respecto a los efectos secundarios tales como nefrotoxicidad, así que su uso clínico es limitado. En la actualidad es raro que se use flucitosina individualmente porque este agente tiene problemas con, por ejemplo, el desarrollo de resistencia. La micafungina tiene baja actividad contra *Cryptococcus*. Los azoles tales como fluconazol y voriconazol son los que se usan más frecuentemente en la actualidad debido a su equilibrio entre eficacia y seguridad, aunque su acción antifúngica es inferior a la de la anfotericina B (Documentos 2 y 3, que no son una patente).

Malassezia, que es un hongo patógeno de infecciones fúngicas superficiales, es un hongo patógeno que se piensa que es una causa o factor de exacerbación en enfermedades cutáneas tal como tiña versicolor, dermatitis seborreica y dermatitis atópica. Por consiguiente, el uso de agentes antifúngicos para el tratamiento de estas enfermedades sería eficaz. Sin embargo, los agentes antifúngicos que tienen una actividad antifúngica excelente contra *Malassezia* se limitan a sólo unos pocos agentes antifúngicos tales como ketoconazol e itraconazol. Además, ha habido informes de brotes reiterados una vez que ha finalizado el tratamiento, lo que significa que los efectos del tratamiento satisfactorio no se pueden garantizar. (Documento 4, que no es una patente).

Se están usando métodos para el uso en combinación de agentes antifúngicos para fines tales como reforzar los efectos del tratamiento (Documento 5, que no es una patente). La investigación también está progresando en la combinación de agentes antifúngicos (Documentos de Patente 1, 2 y 3). Sin embargo, el número de agentes que se combinan es limitado, lo que significa que los efectos satisfactorios del tratamiento no se pueden garantizar.

Por otro lado, se conocen derivados de arilamidina que tienen actividad antifúngica (Documento de Patente 4).

Documento de Patente 1: Patente Japonesa N° 3288051.

Documento de Patente 2: JP-A-11-504931.

Documento de Patente 3: JP-A-2003-527314.

60 Documento de Patente 4: Publicación de Patente Internacional N° WO03/074476 (EP-A 1481966).

Documento 1, que no es una patente: Rinisho to Biseibutsu (Clinics and Microorganisms), Vol, 17, págs 265-266, 1990.

Documento 2, que no es una patente: Rinisho to Biseibutsu (Clinics and Microorganisms), Vol, 21, págs 277-283, 1994.

65 Documento 3, que no es una patente: Rinisho to Biseibutsu (Clinics and Microorganisms), Vol, 30, págs 595-614, 2003.

Documento 4, que no es una patente: Nippon Ishinkin Gakkai (Japanese Journal of Medical Mycology), Vol. 46, págs 163-167, 2005.

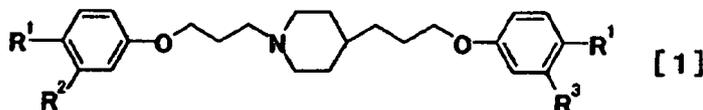
Documento 5, Shinzaisei Shinkinsho no Shindan & Chiryō Gaidorain (Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Deep Mycosis), pág. 20, pág. 29, 2003 (Ishiyaku Pub. Inc.).

Divulgación de la invención

Se desea una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de infecciones fúngicas, que tenga una fuerte actividad antifúngica pero pocos efectos secundarios, y para su uso en un método para uso de agentes antifúngicos en combinación.

Bajo tales circunstancias como resultado de un estudio intensivo, los inventores de la presente invención descubrieron que una composición farmacéutica que comprende un derivado de arilamidina o una sal del mismo, representado por la siguiente fórmula [1]

[Fórmula 1]



en la que R^1 representa un grupo amidino; y R^2 y R^3 representan un átomo de hidrógeno; y uno o más agentes antifúngicos seleccionados de agentes antifúngicos de azol, agentes antifúngicos de polieno, agentes antifúngicos de candina y agentes antifúngicos de fluoropirimidina, tiene una fuerte actividad antifúngica y es útil en el tratamiento de infecciones fúngicas, y que un método para el uso en combinación de estos agentes antifúngicos es útil en el tratamiento de infecciones fúngicas, lográndose así la presente invención como se define en las reivindicaciones.

Además, los inventores de la presente invención encontraron que una composición farmacéutica que comprende un derivado de la arilamidina, representado por la fórmula [1] o una sal del mismo e inmunosupresores tiene una fuerte actividad antifúngica y es útil en el tratamiento de infecciones fúngicas y enfermedades cutáneas tales como dermatitis atópica, y que un método para uso de estos agentes en combinación es útil en el tratamiento de infecciones fúngicas y enfermedades cutáneas tales como la dermatitis atópica.

La composición farmacéutica que comprende un derivado de la arilamidina o una sal del mismo que tiene actividad antifúngica, y uno o más agentes antifúngicos seleccionados de agentes antifúngicos de azol, agentes antifúngicos de polieno, agentes antifúngicos de candina y agentes antifúngicos de fluoropirimidina, tiene una fuerte actividad antifúngica y es útil en el tratamiento de infecciones fúngicas. Un método para el uso de estos agentes antifúngicos en combinación es útil como un método excelente de tratamiento de infecciones fúngicas.

Mejor modo para realizar la invención

La presente invención se describirá a continuación con más detalle.

El compuesto representado por la fórmula [1] usado en la presente invención es el siguiente.

Para el compuesto representado por la fórmula [1] o una sal del mismo, en los casos en los que exista el solvato o el hidrato, se puede usar tal solvato o hidrato. Además se pueden usar cristales que tengan diversas formas.

Los ejemplos de sales del compuesto representado por la fórmula [1] incluyen las sales de ácidos minerales, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico; las sales de ácidos carboxílicos orgánicos, tales como ácido tartárico, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tricloroacético y ácido trifluoroacético; las sales de ácidos sulfónicos tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido mesitilenosulfónico y ácido naftalenosulfónico; y las sales del ácido fosfórico.

Las sales preferidas del compuesto representado por la fórmula [1] incluyen sales aceptables farmacológicamente, y son más preferidas las sales clorhidrato.

Aunque el compuesto de fórmula [1] usado en la presente invención puede producirse por métodos convencionales, también puede producirse mediante los métodos descritos en, por ejemplo, el folleto de la publicación de patente internacional N° WO2006/003881.

Los ejemplos de los agentes antifúngicos de azol usados en la presente invención incluyen agentes antifúngicos de

triazol, tales como fluconazol, fosfluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol, BMS-379224, BAL-8557 y CS-758, así como agentes antifúngicos de imidazol, tales como ketoconazol, miconazol, bifonazol, lanconazol y luliconazol.

5 Los ejemplos preferidos de los agentes antifúngicos de azol incluyen agentes antifúngicos de triazol, tales como fluconazol, fosfluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol, BMS-379224, BAL-8557 y CS-758. Son más preferidos fluconazol, fosfluconazol, voriconazol, e itraconazol, y aún más preferidos fluconazol, voriconazol e itraconazol.

10 Los ejemplos de agentes antifúngicos de polieno usados en la presente invención incluyen anfotericina B y formulaciones liposomales de la misma (por ejemplo, Abelcet (nombre comercial) o AmBisome (nombre comercial)), nistatina, tricomicina, SPK.843 y pimarinina.

15 Los ejemplos preferidos de agentes antifúngicos de polieno incluyen anfotericina B y formulaciones liposomales de la misma (por ejemplo, Abelcet (nombre comercial) o AmBisome (nombre comercial)).

Los ejemplos de agentes antifúngicos de candina usados en la presente invención incluyen micafungina, caspofungina, anidalfungina y aminocandina.

20 Los ejemplos preferidos de agentes antifúngicos de candina usados en la presente invención incluyen micafungina.

Los ejemplos de agentes antifúngicos de fluoropirimidina usados en la presente invención incluyen flucitosina.

25 La vía de administración del derivado de arilamidina o la sal del mismo representado por la fórmula [1] no está limitada especialmente, y el derivado de arilamidina o la sal del mismo se pueden administrar por vía intravenosa, oral, intramuscular, subcutánea o por alguna otra vía de administración. Además, el derivado de arilamidina o la sal del mismo representado por la fórmula [1] se puede administrar simultáneamente, por separado, o en un orden específico, con los agentes antifúngicos de azol, agentes antifúngicos de polieno, agentes antifúngicos de candina, y agentes antifúngicos de fluoropirimidina.

30 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención exhibe una excelente acción contra hongos tales como *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* y *Malassezia*. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención exhibe una acción especialmente excelente contra *Candida* tal como *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliemondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis* y *Candida lusitanae*; *Cryptococcus*, tal como *Cryptococcus neoformans*; *Aspergillus* tal como *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor* y *Aspergillus restrictus*; *Malassezia* tal como *Malassezia furfur*, *Malassezia pachydermatis*, *Malassezia sympodialis* y *Malassezia slooffiae*.

40 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es eficaz en la prevención y tratamiento de una variedad de infecciones fúngicas, tales como candidiasis, criptococosis, aspergilosis y malasseziosis.

45 Con la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, pueden tratarse infecciones fúngicas más graves. Además, como se manifiesta una fuerte acción antifúngica aunque se disminuya la cantidad de cada uno de los agentes que se administran, se pueden reducir los efectos secundarios de los respectivos agentes.

Ejemplos

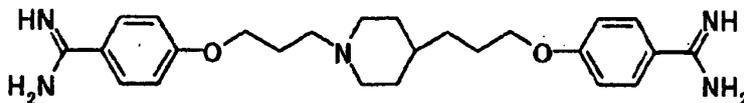
50 La presente invención se describirá a continuación con mayor detalle en referencia a los siguientes ejemplos de ensayo. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Las respectivas abreviaturas tienen el siguiente significado:

55 FLCZ: fluconazol; MCFG: micafungina; AMPH-B: anfotericina B; ITCZ: itraconazol; 5-FC: flucitosina; VLCZ: voriconazol; KCZ: ketoconazol; y TAC: tacrolimus.

El siguiente compuesto se seleccionó como el compuesto de ensayo. La fórmula química estructural de este compuesto se muestra a continuación.

[Fórmula 5]



5 Se seleccionaron como agentes fluconazol (producto disponible en el mercado), micafungina (producto disponible en el mercado), anfotericina B (producto disponible en el mercado), itraconazol (producto disponible en el mercado), voriconazol (producto disponible en el mercado), ketoconazol (producto disponible en el mercado), tacrolimus (producto disponible en el mercado) y flucitosina (Sigma).

10 Ejemplo de ensayo 1. Ensayo in vitro (*Aspergillus* y *Cryptococcus*)

Se llevó a cabo un ensayo de susceptibilidad de hongos usando un método de dilución en caldo.

15 El medio usado en el ensayo de susceptibilidad consistió en RPMI1640 (Sigma) (RPMI/MOPS) ajustado a un pH de 7,0 con 0,165 mol/l de ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) y 1,0 mol/l de hidróxido sódico.

El compuesto de ensayo se disolvió en una pequeña cantidad de 0,1 mol/l de ácido clorhídrico. Se diluyó la solución con agua estéril y después se preparó a una concentración predeterminada usando RPMI/MOPS.

20 Los agentes se disolvieron en una pequeña cantidad de agua estéril o dimetilsulfóxido, y las soluciones resultantes se prepararon después a una concentración predeterminada usando RPMI/MOPS.

25 Cada inóculo se preparó diluyendo de una suspensión de *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 que se había cultivado durante dos noches a 35 °C en una placa de agar Sabouraud o diluyendo una suspensión de conidios de *Aspergillus fumigatus* TIMM0063 suspendidos en solución salina fisiológica estéril a una concentración predeterminada usando RPMI/MOPS (concentración final para cada solución: aproximadamente 1×10^3 células/ml y aproximadamente 1×10^4 CFU/ml). Finalmente se hizo una microplaca que contenía las concentraciones predeterminadas del compuesto de ensayo y de los respectivos agentes, así como el medio y los hongos. La placa se cultivó a 35 °C durante 48 a 72 horas. La absorbancia a 630 nm se midió antes y después del cultivo usando un espectrofotómetro automático. La concentración más baja a la que se observó un 50% de inhibición del crecimiento comparado con un control del crecimiento en el que no se añadió la sustancia de ensayo se definió como CI_{50} .

35 Se calculó un índice FIC comparando la CI_{50} para el compuesto de ensayo con las de fluconazol, micafungina, anfotericina B, itraconazol y flucitosina cuando se usan individualmente y cuando se usan en combinación, y evaluando la actividad antifúngica del respectivo agente en combinación con el compuesto de ensayo mediante el método del tablero de ajedrez. El índice FIC toma el valor mínimo de los valores determinados de acuerdo con: (valor de CI_{50} cuando se usa en combinación con el compuesto de ensayo/valor de CI_{50} cuando se usa individualmente con el compuesto de ensayo) + (valor de CI_{50} cuando se usa en combinación con el agente/valor de CI_{50} cuando se usa individualmente con el agente).

40 En los casos en los que el índice FIC fue de 0,5 o menor, se determinó que había un fuerte efecto sinérgico como resultado de la combinación de ambos agentes (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 39, pág. 1691, 1995).

Los resultados de la combinación del compuesto de ensayo con los agentes respectivos contra *Aspergillus fumigatus* TIMM0063 se muestran en la Tabla 1.

45 [Tabla 1]

Composición	Compuesto de ensayo MCFG	Compuesto de ensayo AMPH-B	Compuesto de ensayo 5-FC
Índice FIC	0,31	0,25	≤0,14

50 Se confirmó un fuerte efecto sinérgico para el compuesto de ensayo con micafungina, anfotericina B y flucitosina.

Los resultados de la combinación del compuesto de ensayo con los agentes respectivos contra *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 se muestran en la Tabla 2.

[Tabla 2]

Composición	Compuesto de ensayo FLCZ	Compuesto de ensayo ITCZ	Compuesto de ensayo AMPH-B	Compuesto de ensayo 5-FC
Índice FIC	0,31	0,38	0,38	0,38

Se confirmó un fuerte efecto sinérgico para el compuesto de ensayo con fluconazol, itraconazol, anfotericina B y flucitosina.

5

Ejemplo de ensayo 2. Ensayo in vitro (Malassezia)

Se llevó a cabo un ensayo de susceptibilidad de hongos usando un método de dilución en caldo.

10 El medio usado en el ensayo de susceptibilidad consistió en una mezcla (m RPMI/MOPS) de RPMI1640 (Sigma) ajustada a un pH de 7,0 con 0,165 mol/l de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) y 1,0 mol/l de hidróxido sódico, glucosa, bilis de buey, glicerol y Tween 20 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

15 El compuesto de ensayo se disolvió en una pequeña cantidad de 0,1 mol/l de ácido clorhídrico. Se diluyó la solución con agua estéril, y después se preparó a una concentración predeterminada usando m RPMI/MOPS. Se disolvieron itraconazol, ketoconazol y tracolimus en dimetilsulfóxido, y las soluciones resultantes se prepararon después a una concentración predeterminada usando m RPMI/MOPS.

20 Se preparó un inóculo suspendiendo *Malassezia furfur* NBRC0656 que se había cultivado durante 2 noches a 30 °C en un medio de agar 103 (un medio formado preparando una mezcla de glucosa al 1%, peptona al 0,5%, extracto de levadura al 0,3 % y extracto de malta al 0,3%, a un pH de 5,6 usando 1,0 mol/l de ácido clorhídrico, cargando la mezcla con aceite de oliva al 1% y polvo de agar al 1,5% y después sometiendo la mezcla resultante a esterilización por vapor a alta presión) a una concentración predeterminada usando m RPMI/MOPS (concentración final para la solución: aproximadamente 1×10^3 células/ml). Finalmente, se preparó una microplaca que contenía las concentraciones predeterminadas del compuesto de ensayo, los respectivos agentes, el medio y los hongos. La placa se cultivó a 30 °C durante 70 a 72 horas. La concentración más baja a la que no se observó crecimiento de hongos después de que el cultivo terminara se definió como la MIC. Se calculó un índice FIC comparando la MIC para el compuesto de ensayo con la del itraconazol, ketaconazol y tracolimus cuando se usaron individualmente y cuando se usaron en combinación, y evaluando la actividad antifúngica de la combinación de agentes respectiva con el compuesto de ensayo mediante un método del tablero de ajedrez. El índice FIC toma el valor mínimo de los valores determinados de acuerdo con: (valor de MIC cuando se usa en combinación con el compuesto de ensayo/valor de MIC cuando se usa individualmente con el compuesto de ensayo) + (valor de MIC cuando se usa en combinación con el compuesto de ensayo/valor de MIC cuando se usa individualmente con el agente).

35 Los resultados de la combinación del compuesto de ensayo con los agentes respectivos contra *Malassezia furfur* NBRC0656 se muestran en la Tabla 3

[Tabla 3]

Composición	Compuesto de ensayo ITCZ	Compuesto de ensayo KCZ	Compuesto de ensayo TAC
Índice FIC	0,99	0,48	≤0,43

40 Se confirmó un fuerte efecto sinérgico para el compuesto de ensayo con itraconazol, ketaconazol y tracolimus.

Ejemplo de ensayo 3: Ensayo in vivo (Candida)

45 La actividad en vivo se evaluó usando un modelo de infección sistémica de ratón por *Candida albicans*.

A los ratones (ratones IRC macho, de cuatro semanas (en el momento de la infección), 10 ratones por grupo) se les administró por vía intraperitoneal ciclofosfamida 4 días antes de la infección (200 mg/kg) y el día antes de la infección (100 mg/kg). Se preparó un inóculo suspendiendo *Candida albicans* TIMM1623 en una placa de agar Sabouraud que se había cultivado durante una noche a 35 °C en una solución salina fisiológica estéril, contando el número de células usando un microscopio biológico, y después diluyendo con una solución salina fisiológica estéril. Los ratones se inocularon por vía intravenosa en sus colas con 0,2 ml del inóculo para inducir la infección (aproximadamente 3×10^4 UFC/ratón).

55 El compuesto de ensayo se disolvió en una pequeña cantidad de 0,1 mol/l de ácido clorhídrico, y la solución resultante se diluyó con solución salina fisiológica estéril.

Se prepararon fluconazol y micafungina usando solución salina fisiológica estéril.

Se disolvió anfotericina B en glucosa al 5%. Se administraron por vía subcutánea el compuesto de ensayo (0,0313 mg/kg), fluconazol (0,25 mg/kg), anfotericina B (0,1 mg/kg) y micafungina (0,25 mg/kg) 2 horas después de la infección y después una vez al día durante 6 días para un total de 7 veces. El ensayo se llevó a cabo para el caso en el que cada uno de los agentes se administró individualmente y en combinación mediante la administración de cada uno de los agentes inmediatamente después de que se hubiera administrado el compuesto de ensayo.

Se ensayaron el tiempo de supervivencia para los grupos en los que se administró individualmente el compuesto de ensayo o cada uno de los agentes, y el tiempo de supervivencia para los grupos en los que el compuesto de ensayo se administró en combinación con cada uno de los agentes, para determinar si había una diferencia significativa en el nivel de significado bilateral del 5% con respecto al tiempo de supervivencia de un grupo al que no se le había administrado ningún agente usando el ensayo Log-rank de Kaplan-Meier (comparación de múltiples grupos). Los resultados del ensayo se muestran en las Figuras 1 a 3.

No se observó que ninguno de los grupos de administración individual tuviera un efecto de prolongación de la vida significativo ($p > 0,05$) en comparación con el grupo al que no se le administró ningún agente. Por otro lado, se observó que los grupos de administración combinada del compuesto de ensayo y fluconazol, el compuesto de ensayo y anfotericina B y el compuesto de ensayo y micafungina tenían un efecto de prolongación de la vida significativo ($p \leq 0,0001$) en comparación con el grupo al que no se le administró ningún agente.

En el modelo de infección sistémica de ratón por *Candida albicans*, se observó que la administración combinada del compuesto de ensayo y el fluconazol, el compuesto de ensayo y la anfotericina B y el compuesto de ensayo y la micafungina mostraban excelentes efectos de tratamiento.

Ejemplo de ensayo 4: Ensayo in vivo (*Aspergillus*)

La actividad in vivo se evaluó usando un modelo de infección sistémica de ratón con *Aspergillus fumigatus*.

En cuanto al inóculo, se administró por vía intraperitoneal ciclofosfamida a ratones (ratones IRC macho, de cuatro semanas (en el momento de la infección), 10 ratones por grupo) 4 días antes de la infección (200 mg/kg) y el día antes de la infección (100 mg/kg). Se diluyó una suspensión de conidios de *Aspergillus fumigatus* TIMM0063 con solución salina fisiológica estéril que contiene 0,05 % de Tween 80 (fabricado por Difco Laboratories) para preparar un inóculo. Se inocularon los ratones por vía intravenosa en sus colas con 0,2 ml del inóculo para inducir la infección (aproximadamente 4×10^4 UFC/ratón).

El compuesto de ensayo se disolvió en una pequeña cantidad de 0,1 mol/l de ácido clorhídrico, y se diluyó la solución restante con solución salina fisiológica estéril.

Se disolvió voriconazol en 50 mg/ml de solución acuosa de sulfobutil éter β -ciclodextrina sódica (SIDIX).

Se suspendió flucitosina en solución de metilcelulosa al 0,5 %.

El compuesto de ensayo (0,1 mg/kg) y el voriconazol (5 mg/kg) se administraron por vía subcutánea y la flucitosina (50 mg/kg) se administró por vía oral 2 horas después de la infección y después una vez al día durante 6 días para un total de 7 veces. El ensayo se llevó a cabo para el caso en el que cada uno de los agentes se administró individualmente y en combinación mediante la administración de cada uno de los agentes inmediatamente después de que se hubiera administrado el compuesto de ensayo. La eficacia en el ensayo de susceptibilidad se evaluó por la tasa de supervivencia 15 días después de la infección.

Los resultados de la combinación del compuesto de ensayo y voriconazol contra *Aspergillus fumigatus* se muestran en la Tabla 4. Los resultados de la combinación del compuesto de ensayo y flucitosina contra *Aspergillus fumigatus* se muestran en la Tabla 5.

[Tabla 4]

Composición	Compuesto de ensayo	VLCZ	Compuesto de ensayo VLCZ	Grupo sin administrar
Tasa de supervivencia (%)	10	10	50	0

[Tabla 5]

Composición	Compuesto de ensayo	VLCZ	Compuesto de ensayo VLCZ	Grupo sin administrar
Tasa de supervivencia (%)	10	10	50	0

En el modelo de infección sistémica de ratón por *Aspergillus fumigatus*, la administración combinada del compuesto de ensayo y voriconazol y el compuesto de ensayo y flucitosina mostraron excelentes efectos de tratamiento.

5 Ejemplo de ensayo 5: Ensayo in vivo (Cryptococcus)

La actividad in vivo se evaluó empleando un modelo de infección sistémica de ratón con *Cryptococcus neoformans*.

10 Se administró por vía intraperitoneal ciclofosfamida a ratones (ratones IRC macho, de cuatro semanas (en el momento de la infección), 10 ratones por grupo) 4 días antes de la infección (200 mg/kg) y el día antes de la infección (100 mg/kg). Se preparó un inóculo suspendiendo *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 en solución salina fisiológica estéril en una placa plana SDA que se había cultivado durante una noche a 35 °C, contando el número de células usando un microscopio biológico, y después diluyendo con solución salina fisiológica estéril. Los ratones se inocularon por vía intravenosa en sus colas con 0,2 ml del inóculo para inducir la infección (aproximadamente 8×10^4 UFC/ratón).

15 El compuesto de ensayo se disolvió en una pequeña cantidad de 0,1 mol/l de ácido clorhídrico, y la solución resultante se diluyó con solución salina fisiológica estéril.

20 Se preparó fluconazol usando solución salina fisiológica estéril.

Se disolvió anfotericina B en solución acuosa de glucosa al 5%.

25 Se administraron por vía subcutánea el compuesto de ensayo (0,125 mg/kg), fluconazol (5 mg/kg) y anfotericina B (0,25 mg/kg) 2 horas después de la infección y después una vez al día durante 6 días un total de 7 veces. El ensayo se llevó a cabo para el caso en el que cada uno de los agentes se administró individualmente y en combinación mediante la administración de cada uno de los agentes inmediatamente después de que se hubiera administrado el compuesto de ensayo. La eficacia en el ensayo de susceptibilidad se evaluó por la tasa de supervivencia 22 días después de la infección.

30 Los resultados de la combinación del compuesto de ensayo y fluconazol contra *Cryptococcus neoformans* se muestran en la Tabla 6. Los resultados de la combinación del compuesto de ensayo y anfotericina B contra *Cryptococcus neoformans* se muestran en la Tabla 7.

35 [Tabla 6]

Composición	Compuesto de ensayo	FLCZ	Compuesto de ensayo FLCZ	Grupo sin administrar
Tasa de supervivencia (%)	20	10	80	0

[Tabla 7]

Composición	Compuesto de ensayo	AMPH-B	Compuesto de ensayo AMPH-B	Grupo sin administrar
Tasa de supervivencia (%)	0	20	70	0

40 En el modelo de infección sistémica de ratón por *Cryptococcus neoformans*, la administración combinada del compuesto de ensayo y fluconazol, y la del compuesto de ensayo y la anfotericina B mostraban excelentes efectos de tratamiento.

45 Está claro a partir de los resultados anteriores que la combinación del derivado de arilamidina o de la sal del mismo, representados por la fórmula [1], con varios agentes antifúngicos o similares muestra actividad antifúngica sinérgica y efectos de tratamiento, y es eficaz en el tratamiento de infecciones fúngicas causadas por patógenos fúngicos.

50 A continuación, el derivado de arilamidina o la sal del mismo, representados por la fórmula [1], usados en la presente invención se describirán con referencia a los ejemplos de producción y ejemplos de formulación de fármacos.

La proporción de mezcla en el eluyente está en proporción a su capacidad. Al menos que se indique lo contrario, el vehículo para el gel de sílice en la columna de cromatografía es B.W. Silica Gel, BW-127ZH, Fuji Silysia Chemical Ltd.

55 Las respectivas abreviaturas tienen el siguiente significado.

Ac: acetilo; Boc: terc-butoxicarbonilo; Et: etilo; DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido deuterado.

Ejemplo de producción 1



5 A una solución en tetrahidrofurano (100 ml) de 10,7 g de 4-(3-hidroxiopropil)-1-piperidincarboxilato de terc-butilo se le añadieron 19,0 g de tetrabromuro de carbono enfriando con agua, a la que se añadieron después 15,0 g de trifetilfosfina durante un periodo de 13 minutos. Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante dos horas y 30 minutos y se dejó reposar durante 13 horas. A la mezcla de reacción se le añadió agua, acetato de etilo, y una solución acuosa saturada de cloruro sódico. La fase orgánica se separó, se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro sódico, y se secó con sulfato de magnesio anhidro, seguido de la retirada del disolvente por destilación a presión reducida. El residuo resultante se purificó usando una cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente; hexano:acetato de etilo = 3:1) para proporcionar 13,2 g de 4-(3-bromopropil)-1-piperidincarboxilato de terc-butilo como una forma oleosa incolora.

10 RMN-H¹ (CDCl₃) valor δ : 1,00-1,20 (2H, m), 1,20-1,50 (3H, m), 1,45 (9H, s), 1,60-1,70 (2H, m), 1,80-1,95 (2H, m), 2,60-2,75 (2H, m), 3,40 (2H, t, J = 6,8 Hz), 3,90-4,25 (2H, m).

Ejemplo de producción 2



20 A una solución en dimetilsulfóxido (130 ml) de 13,2 g de 4-(3-hidroxiopropil)-1-piperidincarboxilato de terc-butilo se le añadieron 5,13 g de 4-cianofenol y 11,9 g de carbonato potásico a temperatura ambiente, que después se agitó a la misma temperatura durante 26 horas. Se añadió la mezcla de reacción a una mezcla de tolueno y agua. La fase orgánica se separó, se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro sódico, y se secó con sulfato de magnesio anhidro, seguido de la retirada del disolvente por destilación a presión reducida para proporcionar 14,5 g de 4-[3-(4-cianofenoxi)propil]-1-piperidincarboxilato de terc-butilo en forma de un sólido blanco. RMN-H¹ (CDCl₃) valor δ : 1,05-1,20 (2H, m), 1,40-1,50 (3H, m), 1,46 (9H, s), 1,65-1,75 (2H, m), 1,75-1,90 (2H, m), 2,60-2,80 (2H, m), 3,99 (2H, t, J=6,3 Hz), 4,00-4,20 (2H, m), 6,93 (2H, d, J=8,7 Hz), 7,58 (2H, d, J=8,7 Hz).

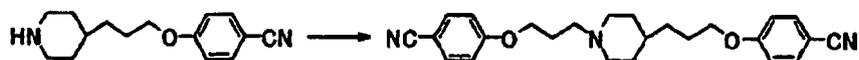
Ejemplo de producción 3



35 A una solución en cloroformo (100 ml) de 14,0 g de 4-[3-(4-cianofenoxi)propil]-1-piperidincarboxilato de terc-butilo se le añadieron gota a gota 40 ml de ácido trifluoroacético enfriando con agua durante un periodo de 10 minutos. Esta mezcla se agitó a la misma temperatura durante 20 minutos, y después se agitó a temperatura ambiente durante 35 minutos. Después de la retirada del disolvente por destilación a presión reducida, se añadieron cloroformo y agua. Se añadió una solución acuosa de hidróxido sódico a la misma para ajustar el pH a 13,0. La fase orgánica se separó, y se extrajo la fase acuosa con cloroformo. La fase orgánica y el extracto se combinaron, después se lavaron con una solución acuosa de hidróxido sódico, y se secaron con carbonato potásico, seguido de la destilación del solvente a presión reducida para proporcionar 10,3 g de 4-[3-(4-piperidinil)propoxi]benzonitrilo en forma de un sólido amarillo pálido.

40 RMN-H¹ (CDCl₃) valor δ : 1,05-1,20 (2H, m), 1,35-1,45 (3H, m), 1,65-1,90 (4H, m), 2,50-2,65 (2H, m), 3,00-3,15 (2H, m), 3,99 (2H, t, J=6,6 Hz), 4,78 (1H, s), 6,93 (2H, d, J=9,0 Hz), 7,58 (2H, d, J=9,0 Hz).

Ejemplo de producción 4

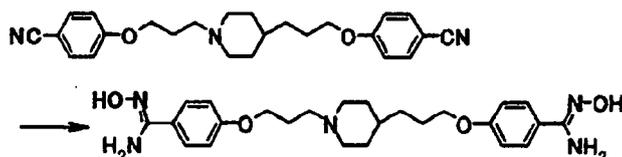


50 A una solución en N,N-dimetilformamida (150 ml) de 10,2 g de 4-[3-(4-piperidinil)propoxi]benzonitrilo se le añadieron

secuencialmente 11,2 g de carbonato potásico y 9,72 g de 4-(3-bromopropoxi)benzonitrilo a temperatura ambiente, que después se agitó a la misma temperatura durante 18 horas. Se añadieron tolueno y agua a la mezcla de reacción. Se recogió el precipitado por filtración para proporcionar 13,7 g de 4-(3-{4-[3-(4-cianofenoxi)propil]-1-piperidinil}propoxi) benzonitrilo en forma de un sólido blanco.

RMN- ^1H (CDCl_3) valor δ : 1,20-1,45 (5H, m), 1,65-2,05 (8H, m), 2,40-2,55 (2H, m), 2,85-3,00 (2H, m), 3,99 (2H, t, $J=6,5$ Hz), 4,06 (2H, t, $J=6,3$ Hz), 6,93 (2H, d, $J=8,8$ Hz), 6,94 (2H, d, $J=8,8$ Hz), 7,57 (2H, d, $J=8,8$ Hz), 7,57 (2H, d, $J=8,8$ Hz).

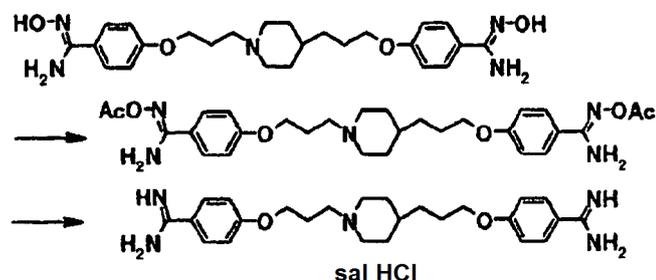
Ejemplo de producción 5



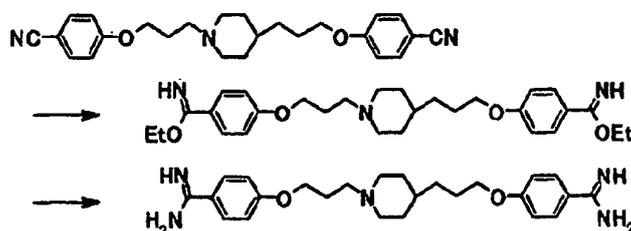
A una suspensión en dimetilsulfóxido (126 ml) de 12,6 g de 4-(3-{4-[3-(4-cianofenoxi)propil]-1-piperidinil}propoxi)benzonitrilo se le añadieron 19,1 ml de una solución acuosa de hidroxilamina al 50 %, que después se agitó a 50 °C durante 19 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se añadieron gota a gota 260 ml de agua durante un periodo de 50 minutos, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos y después enfriamiento con agua durante 2 horas. Se recogió el precipitado por filtración para proporcionar 15,0 g de 4-3-4{4-[amino(hidroxiimino)metil]fenoxi}propil)-1-piperidinil}propoxi}-N'-hidroxibenzamidina en forma de un sólido blanco.

RMN- ^1H (DMSO-d_6) valor δ : 1,05-1,40 (5H, m), 1,60-1,80 (4H, m), 1,80-1,90 (4H, m), 2,35-2,45 (2H, m), 2,80-2,90 (2H, m), 3,96 (2H, t, $J=6,5$ Hz), 4,01 (2H, t, $J=6,5$ Hz), 5,65-5,75 (4H, m), 6,85-6,95 (4H, m), 7,55-7,65 (4H, m), 9,43 (1 H, s), 9,43(1 H, s).

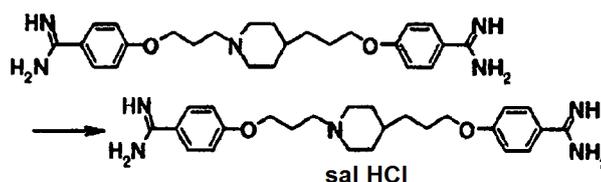
Ejemplo de producción 6



A una suspensión en ácido acético (150 ml) de 14,9 g de 4-3-4-{4-[amino(hidroxiimino)metil]fenoxi}propil)-1-piperidinil}propoxi}-N'-hidroxibenzamidina se le añadieron 5,97 ml de anhídrido acético a temperatura ambiente, que después se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y 20 minutos. A esta mezcla se le añadieron 1,50 g de paladio-carbono al 5%, y después se agitó en una atmósfera de hidrógeno durante 4 horas y 40 minutos. Se retiró por filtración la materia insoluble, y después se añadieron 55 ml de ácido clorhídrico a 6,0 mol/l. El solvente se retiró por destilación a presión reducida, y se añadió etanol al residuo resultante. La materia sólida se recogió por filtración para proporcionar 14,0 g de 4-{3-[4-(3-{4-[amino(imino)metil]fenoxi}propil)-1-piperidinil}propoxi]benzamidina en forma de un sólido blanco. RMN- ^1H (DMSO-d_6) valor δ : 1,30-1,45 (2H, m), 1,45-1,70 (3H, m), 1,70-1,90 (4H, m), 2,15-2,30 (2H, m), 2,80-3,00 (2H, m), 3,10-3,20 (2H, m), 3,45-3,55 (2H, m), 4,10 (2H, t, $J=6,2$ Hz), 4,19 (2H, t, $J=6,1$ Hz), 7,15 (2H, d, $J=8,4$ Hz), 7,16 (2H, d, $J=8,4$ Hz), 7,84 (2H, d, $J=8,4$ Hz), 7,86 (2H, d, $J=8,4$ Hz), 8,90-9,00 (4H, m), 9,15-9,30 (4H, m), 10,60-10,80 (1H, ancho).

Ejemplo de producción 7

Se introdujo cloruro de hidrógeno en una suspensión en etanol (20 ml) de 1,15 g de 4-(3-{4-[3-(4-cianofenoxy)propil]-1-piperidinil}propoxi)benzonitrilo enfriando con hielo, que después se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El solvente se retiró por destilación a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en 20 ml de etanol. Se añadieron 1,54 g de acetato amónico, que se calentó después a reflujo durante 3 horas y 45 minutos. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadió agua, seguido de la retirada del etanol por destilación a presión reducida. Se añadió cloroformo al residuo resultante, al que se le añadieron después 5,0 mol/l de solución acuosa de hidróxido sódico para ajustar el pH a 12,5. El precipitado se recogió por filtración para proporcionar 1,13 g de 4-{3-[4-(3-{4-[amino(imino)metil]fenoxi]propil)-1-piperidinil]propoxi}benzamidina en forma de un sólido blanco. RMN- H^1 (DMSO- d_6) valor δ : 1,00-1,40 (5H, m), 1,60-1,80 (4H, m), 1,80-1,95 (4H, m), 2,35-2,45 (2H, m), 2,80-2,90 (2H, m), 3,98 (2H, t, J=6,5 Hz), 4,03 (2H, t, J=6,3 Hz), 6,30-7,20 (4H, ancho), 6,85-7,00 (4H, m), 7,65-7,80 (4H, m).

Ejemplo de producción 8

A una suspensión en etanol (10 ml) de 0,50 g de 4-{3-[4-(3-{4-[amino(imino)metil]fenoxi]propil)-1-piperidinil]propoxi}benzamidina se le añadieron 1,77 ml de una solución de 2,6 mol/ml de cloruro de hidrógeno/etanol a temperatura ambiente, la cual después se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas y 15 minutos. El precipitado se recogió por filtración para proporcionar 0,49 g de clorhidrato de 4-{3-[4-(3-{4-[amino(imino)metil]fenoxi]propil)-1-piperidinil]propoxi}benzamidina en forma de un sólido incoloro.

Los datos del espectro de RMN- H^1 en DMSO- d_6 coincidieron con los valores del ejemplo de producción 6.

Ejemplo de formulación de fármaco 1

En agua para inyección, se disolvieron 1,25 g del compuesto obtenido en el ejemplo de producción 6 y 0,5 g de manitol-D para proporcionar una cantidad total de 100 ml. La solución se filtró a través de un filtro de membrana de 0,22 μ m, y 10 ml de la solución farmacológica resultante se introdujeron en una ampolla y se sellaron, seguido de esterilización por vapor para proporcionar un agente de inyección.

Aplicabilidad industrial

Una composición farmacéutica que tiene actividad antifúngica de acuerdo con la presente invención que comprende un derivado de arilamidina o una sal del mismo, y uno o más agentes seleccionados de agentes antifúngicos de azol, agentes antifúngicos de polieno, agentes antifúngicos de candina, y agentes antifúngicos de fluoropirimidina, tiene una fuerte actividad antifúngica y es útil en el tratamiento de infecciones fúngicas producidas por patógenos fúngicos. Además, el método de tratamiento es útil como un método excelente de tratamiento de infecciones fúngicas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una curva de supervivencia para los resultados del uso de FLCZ junto con el compuesto de ensayo (Ejemplo de ensayo 2). Los círculos negros indican los resultados para el grupo al que no se le administró ningún agente, los cuadrados negros indican los resultados para el grupo al que se le administraron 0,25 mg/kg de FLCZ; los rombos negros indican los resultados del grupo al que se le administraron 0,0313 mg/kg del compuesto de ensayo; y los triángulos negros indican los resultados para el grupo al que se le administraron 0,0313 mg/kg del

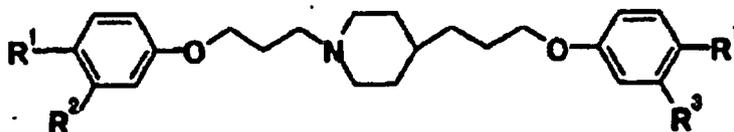
compuesto de ensayo y 0,25 mg/kg de FLCZ;

- 5 la Figura 2 es una curva de supervivencia para los resultados del uso de AMPH-B junto con el compuesto de ensayo (Ejemplo de ensayo 2). Los círculos negros indican los resultados para el grupo al que no se le administró ningún agente; los cuadrados negros indican los resultados para el grupo al que se le administraron 0,1 mg/kg de AMPH-B; los rombos negros indican los resultados del grupo al que se le administraron 0,0313 mg/kg del compuesto de ensayo; y los triángulos negros indican los resultados para el grupo al que se le administraron 0,0313 mg/kg del compuesto de ensayo y 0,1 mg/kg de AMPH-B; y
- 10 la Figura 3 es una curva de supervivencia para los resultados del uso de MCFG junto con el compuesto de ensayo (Ejemplo de ensayo 2). Los círculos negros indican los resultados para el grupo al que no se le administró ningún agente; los cuadrados negros indican los resultados para el grupo al que se le administraron 0,25 mg/kg de MCFG; los rombos negros indican los resultados del grupo al que se le administraron 0,0313 mg/kg del compuesto de ensayo; y los triángulos negros indican los resultados para el grupo al que se le administraron 0,0313 mg/kg del compuesto de ensayo y 0,25 mg/kg de de MCFG.
- 15

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de infecciones fúngicas, que comprende un derivado de arilamidina o una sal del mismo, representado por la fórmula general:

5



en la que R^1 representa un grupo amidino; y R^2 y R^3 representan un átomo de hidrógeno; y uno o más agentes seleccionados de agentes antifúngicos de triazol, anfotericina B, micafungina, tracolimus, ketaconazol y flucitosina.

10

2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que los agentes antifúngicos de triazol son fluconazol, voriconazol o itraconazol.

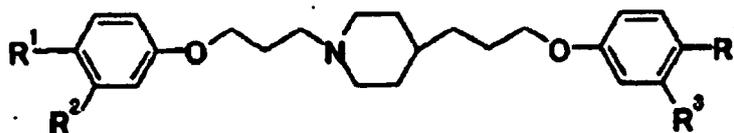
3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la infección fúngica se produce por un patógeno fúngico seleccionado entre Candida, Cryptococcus, Aspergillus y Malassezia.

15

4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la infección fúngica se produce por un patógeno fúngico seleccionado entre Candida, Cryptococcus, Aspergillus.

20

5. Un derivado de arilamidina o una sal del mismo, representado por la siguiente fórmula general:



en la que R^1 representa un grupo amidino; y R^2 y R^3 representan un átomo de hidrógeno; para su uso en combinación con uno o más agentes seleccionados entre agentes antifúngicos de triazol, anfotericina B, micafungina, tracolimus, ketoconazol y flucitosina, en el tratamiento de infecciones fúngicas producidas por patógenos fúngicos.

25

6. Un derivado de arilamidina o una sal del mismo como se define en la reivindicación 5, para su uso como se define en la reivindicación 5, en el que los agentes antifúngicos de triazol son fluconazol, voriconazol o itraconazol.

30

7. Un derivado de arilamidina o una sal del mismo como se define en la reivindicación 5 o 6, para su uso como se define en la reivindicación 5 o 6, en el que las infecciones fúngicas se producen por patógenos fúngicos seleccionados entre Candida, Cryptococcus, Aspergillus y Malassezia.

35

8. Un derivado de arilamidina o una sal del mismo como se define en la reivindicación 5 o 6, para su uso como se define en la reivindicación 5 o 6, en el que las infecciones fúngicas se producen por patógenos fúngicos seleccionados entre Candida, Cryptococcus y Aspergillus.

FIG. 1

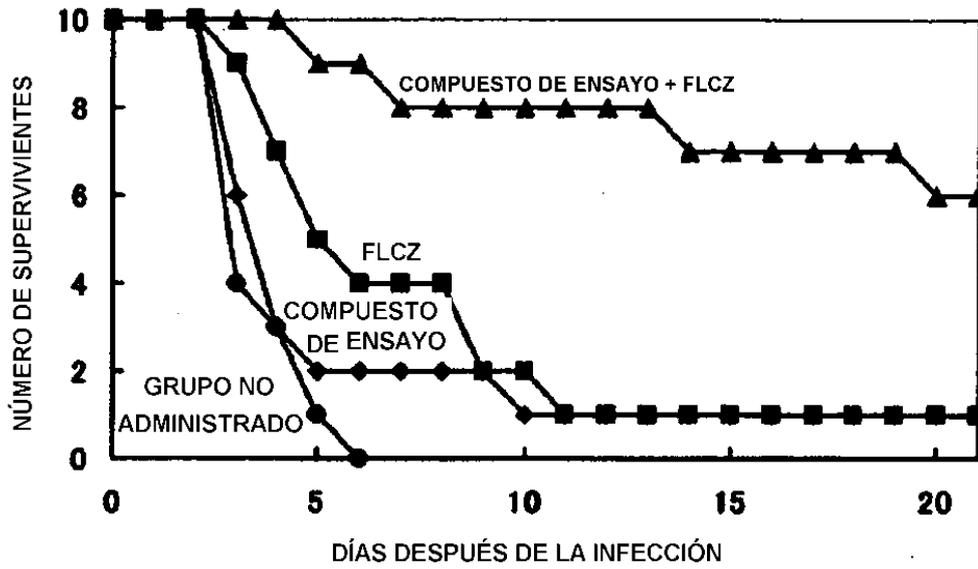


FIG. 2

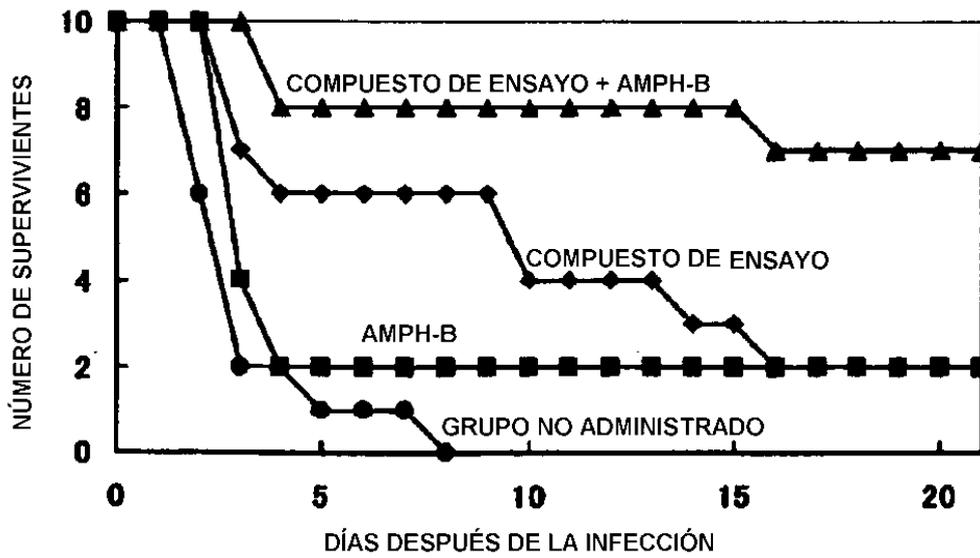


FIG. 3

