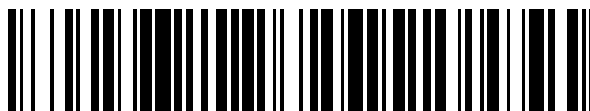


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 130**

51 Int. Cl.:
A61K 31/445 (2006.01)
A61K 31/4196 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 31/10 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07829080 .6**
96 Fecha de presentación: **03.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2070536**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.06.2009**

54 Título: **COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE CONTIENE UN DERIVADO DE FENILAMIDINA Y MÉTODO DE UTILIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA EN COMBINACIÓN CON UN AGENTE ANTIFÚNGICO.**

30 Prioridad:
06.10.2006 JP 2006274709

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.03.2012

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

72 Inventor/es:
NISHIKAWA, Hiroshi

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 376 130 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 que contiene un derivado de fenilamidina y método de utilización de la composición farmacéutica en combinación con un agente antifúngico

5

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que resulta útil para el tratamiento de infecciones fúngicas causadas por hongos patógenos y que contiene un nuevo derivado de fenilamidina o una sal del mismo y uno o más agentes como se define en la reivindicación 1. También se describe un método de utilización del nuevo derivado de fenilamidina o de una sal en combinación con los agentes para el tratamiento de infecciones fúngicas.

10

Técnica anterior

15

Una micosis profunda grave, tal como la candidiasis invasiva, puede ser con frecuencia una enfermedad fatal. En el pasado, se ha considerado que el mecanismo protector principal por parte de un organismo hospedador frente a hongos tales como *Candida* es la inmunización no específica por neutrófilos. Cuando este mecanismo protector funciona normalmente, existe poco riesgo de infectarse con hongos. Sin embargo, en los últimos años, el riesgo de sufrir micosis profunda se ha incrementado debido al mayor número de pacientes con enfermedades subyacentes que reducen la función inmunológica del organismo, tales como tumores malignos (en particular, tumores malignos hematopoyéticos, tales como la leucemia aguda o el linfoma maligno) y el SIDA, al uso frecuente de agentes anticancerosos o de inmunosupresores, al uso excesivo de antibióticos antibacterianos o de hormonas esteroideas, al uso a largo plazo de hiperalimentación venosa central o de cateterización venosa y similares (Documento no relacionado con patentes 1).

20

Los agentes utilizados para el tratamiento de dicha micosis profunda son muy escasos en comparación con los agentes antibacterianos usados, e incluyen sólo la anfotericina B, la flucitosina, el miconazol, el fluconazol, el fosfluconazol, el itraconazol, el voriconazol, la micafungina y similares.

30

Por otra parte, existe una creciente necesidad de agentes seguros y efectivos frente a infecciones fúngicas oportunistas causadas por hongos patógenos tales como *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*.

Aunque los agentes utilizados actualmente, por ejemplo la anfotericina B, tienen una acción fungicida extremadamente potente, tienen un problema en cuanto a efectos colaterales tales como nefrotoxicidad, de tal forma que su uso clínico es limitado. La flucitosina tiene problemas de desarrollo de resistencia. La micafungina tiene una baja actividad frente a *Cryptococcus*. Los azoles tales como el fluconazol y el voriconazol son los más frecuentemente utilizados actualmente debido a su equilibrio entre efectividad y seguridad, aunque su acción fungicida es inferior a la de la anfotericina B (Documentos no relacionados con patentes 2 y 3).

40

Se están utilizando métodos para el uso en combinación de agentes antifúngicos con fines tales como incrementar los efectos del tratamiento (Documento no relacionado con patentes 4). También está progresando la investigación hacia la combinación de agentes antifúngicos (Documentos de Patente 1, 2 y 3). Sin embargo, el número de agentes combinados es limitado, lo que significa que no se pueden garantizar efectos satisfactorios del tratamiento.

45

Además, se conocen derivados de fenilamidina que tienen actividad antifúngica (Documento de Patente 4).

[0005]

50

Documento de Patente 1: Patente Japonesa Nº 3.288.051
 Documento de Patente 2: JP-A-11-504.931
 Documento de Patente 3: JP-A-2003-527.314
 Documento de Patente 4: Publicación de Patente Internacional Nº WO2006/003.881

55

EP 1.481.966 A1 describe derivados de arilamidina y agentes antifúngicos que los contienen.

Documento no relacionado con patentes 1: Rinsho to Biseibutsu (Clinics and Microorganisms), Vol. 17, pp. 265-266, 1990
 Documento no relacionado con patentes 2: Rinsho to Biseibutsu (Clinics and Microorganisms), Vol. 21, pp. 277-283, 1994
 Documento no relacionado con patentes 3: Rinsho to Biseibutsu (Clinics and Microorganisms), Vol. 30, pp. 595-614, 2003
 Documento no relacionado con patentes 4: Diagnosis and treatment guideline of deep mycosis, pp. 20, 29, Ishiyaku Publishers, Inc., 2003

65

M. H. Beers: "The Merck Manual", 1999, Merck and Co., N.J. (EE.UU.), páginas 1209-1213, se relaciona con enfermedades fúngicas sistémicas y menciona, entre otros, agentes antifúngicos de itraconazol, fluconazol y voriconazol.

5 Descripción de la invención

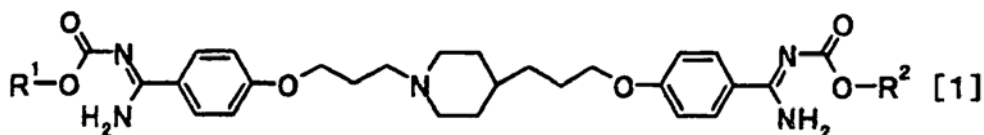
Problema que la invención ha de resolver

10 Es deseable una composición farmacéutica que sea útil para tratar infecciones fúngicas y que tenga una potente actividad antifúngica y aun así pocos efectos colaterales, y un método para el uso combinatorio de agentes antifúngicos.

Medios para resolver el problema

15 En estas circunstancias, como resultado de un estudio intensivo, los presentes inventores descubrieron que una composición farmacéutica que contiene un derivado de fenilamidina o una sal del mismo, representado por la fórmula general [1], que es un nuevo compuesto:

[Fórmula química 1]



20 donde R¹ y R² son iguales y representan un grupo n-butilo, y uno o más agentes seleccionados entre agentes antifúngicos triazólicos, el agente antifúngico poliénico anfotericina B, el agente antifúngico de candina micafungina y el agente antifúngico de fluoropirimidina flucitosina, tiene una potente actividad antifúngica y es útil para el tratamiento de infecciones fúngicas, y que un método para el uso en combinación de estos agentes antifúngicos es útil para el tratamiento de infecciones fúngicas, llegando así a la presente invención.

Efecto de la invención

30 La composición farmacéutica que contiene el nuevo derivado de fenilamidina o una sal del mismo y uno o más agentes seleccionados entre agentes antifúngicos azólicos, agentes antifúngicos poliénicos, agentes antifúngicos de candina y agentes antifúngicos de fluoropirimidina, tiene una potente actividad antifúngica y es útil para el tratamiento de infecciones fúngicas. El método para el uso combinatorio de estos agentes antifúngicos es útil como método excelente de tratamiento de infecciones fúngicas.

35 Mejor modo de realización de la invención

La presente invención será ahora descrita con más detalle.

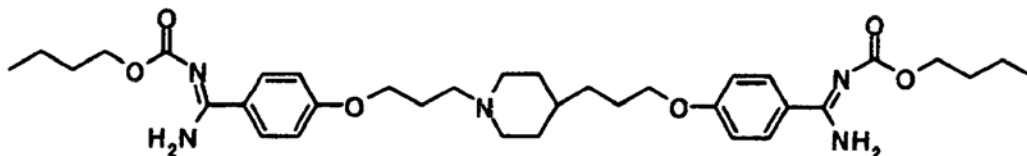
40 En la presente memoria, a menos que se indique en contrario, un átomo de halógeno se refiere a un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo o un átomo de yodo, y un grupo alquilo C₃₋₄ significa propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo y terc-butilo.

45 Como ejemplos de las sales del compuesto representado por la fórmula general [1], se incluyen las sales de ácidos minerales, tales como el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico, el ácido fosfórico y el ácido sulfúrico; las sales de ácidos carboxílicos orgánicos, tales como el ácido succínico, el ácido maleico y el ácido fumárico; y las sales de ácidos sulfónicos, tales como el ácido metanosulfónico, el ácido bencenosulfónico, el ácido p-toluensulfónico, el ácido mesitileno sulfónico y el ácido naftaleno sulfónico.

50 Como sales preferidas del compuesto representado por la fórmula general [1], se incluyen sales farmacológicamente aceptables.

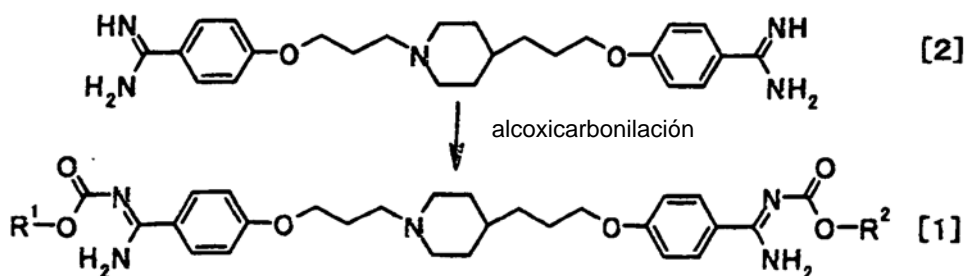
En los compuestos de fórmula general [1] utilizados para la presente invención, los compuestos preferidos son los compuestos en los cuales R¹ es un grupo n-butilo y en los cuales R² es un grupo n-butilo.

55 Concretamente, para el compuesto de fórmula general [1], se utiliza el siguiente compuesto.

[Fórmula química 2]

A continuación, se explican métodos de fabricación de los compuestos de la presente invención.

- 5 Se producen los compuestos de la presente invención por combinación de métodos convencionales *per se*; por ejemplo, se pueden fabricar por los métodos mostrados a continuación.

[Método de fabricación]

- 10 donde R¹ y R² tienen los mismos significados que antes.

Se puede fabricar el compuesto de fórmula general [1] sometiendo el compuesto de fórmula [2] y el derivado reactivo a una reacción de alcoxicarbonilación en presencia o ausencia de base.

- 15 En cuanto al solvente utilizado en esta reacción, éste no está limitado, particularmente en la medida en que no afecte a la reacción de forma adversa; por ejemplo, se dan amidas tales como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida y 1-metil-2-pirrolidona; hidrocarburos halogenados, tales como diclorometano, cloroformo y dicloroetano; hidrocarburos aromáticos, tales como benceno, tolueno y xileno; éteres, tales como dioxano, tetrahydrofurano, anisol, di(etilenglicol) dimetil éter, di(etilenglicol) dietil éter y etilenglicol monometil éter; nitrilos, tales como acetonitrilo; sulfóxidos, tales como sulfóxido de dimetilo; cetonas, tales como acetona y 2-butanona; ésteres, tales como acetato de etilo; ácidos carboxílicos, tales como ácido acético; heteroaromáticos, tales como piridina, y agua, y se pueden mezclar éstos y se puede utilizar la mezcla.

- 25 En cuanto al derivado reactivo utilizado en esta reacción, se dan, por ejemplo, ésteres clorocarbónicos tales como cloroformiato de propilo, cloroformiato de isopropilo, cloroformiato de butilo y cloroformiato de isobutilo; y ésteres activos, tales como propilcarbonato de 4-nitrofenilo, isopropilcarbonato de 4-nitrofenilo, 4-nitrofenilcarbonato de butilo y 4-nitrofenilcarbonato de isobutilo. Se pueden usar estos derivados reactivos tras preparación *in situ* sin aislamiento.

- 30 En cuanto a la base que se desea utilizar en esta reacción, se dan, por ejemplo, alcóxidos metálicos, tales como metóxido de sodio, etóxido de sodio, terc-butóxido de potasio y terc-butóxido de sodio; bases inorgánicas, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidrógeno carbonato de sodio, carbonato de sodio, carbonato de potasio, hidruro de sodio e hidruro de potasio, y bases orgánicas, tales como trietilamina, N,N-diisopropiletilamina, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) y piridina. La cantidad del derivado reactivo y de la base utilizada es de 2-100 veces las moles del compuesto de fórmula [2], y es preferiblemente de 2-10 veces esas moles.

Esta reacción puede ser llevada a cabo a una temperatura de -20 a 100°C, preferiblemente de 0 a 50°C, durante 1 minuto a 24 horas.

- 40 En cuanto al compuesto en el procedimiento de fabricación antes descrito, se pueden usar solvatos, hidratos y diversos tipos de cristales.

Se fabrica el compuesto de fórmula [2], que es una materia prima de producción de la presente invención, por combinación de métodos convencionales *per se*; por ejemplo, se puede fabricar por los métodos descritos en el documento de patente 4.

Son ejemplos de los agentes antifúngicos triazólicos fluconazol, fosfluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol, BMS-379224, BAL-8557 y CS-758.

Son más preferidos el fluconazol, el fosfluconazol, el voriconazol y el itraconazol, e incluso son más preferidos el fluconazol y el voriconazol.

Los agentes antifúngicos poliénicos usados en la presente invención son la anfotericina B y formulaciones liposomales de la misma (v.g., Abelcet (marca registrada) o AmBisome (marca registrada)).

El agente antifúngico de candina usado en la presente invención es la micafungina.

El agente antifúngico de fluoropirimidina usado en la presente invención es la flucitosina.

La vía de administración del derivado de fenilamidina o de su sal representado por la fórmula general [1] no está especialmente limitada y el derivado de fenilamidina o su sal pueden ser administrados por vía intravenosa, oral, intramuscular o subcutánea o por alguna otra vía de administración. Además, el derivado de fenilamidina o su sal representado por la fórmula general [1] pueden ser también administrados simultáneamente, por separado o en un orden específico con los agentes antifúngicos azólicos, los agentes antifúngicos poliénicos, los agentes antifúngicos de candina y los agentes antifúngicos de fluoropirimidina.

La composición farmacéutica de la presente invención exhibe una excelente acción frente a hongos tales como *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*. La composición farmacéutica de la presente invención exhibe una excelente acción especialmente frente a *Candida*, tal como *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis* y *Candida lusitanae*; *Cryptococcus*, tal como *Cryptococcus neoformans*; y *Aspergillus*, tal como *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor* y *Aspergillus restrictus*.

La composición farmacéutica de la presente invención es efectiva en la prevención y el tratamiento de una variedad de infecciones fúngicas, tales como la candidiasis, la criptococosis y la aspergilosis.

Con la composición farmacéutica de la presente invención, se pueden tratar infecciones fúngicas más graves. Además, como se exhibe una potente acción antifúngica incluso si se disminuye la cantidad de cada uno de los agentes administrados, se pueden reducir los efectos colaterales de los respectivos agentes.

Cuando se usan las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se pueden mezclar habitualmente de manera apropiada ayudas farmacéuticas tales como excipientes y agentes de soporte y diluyentes, los cuales son utilizados para preparaciones farmacéuticas, y éstos pueden ser administrados por métodos convencionales en una morfología oral o parenteral, tal como tabletas, formulaciones encapsuladas, polvos, jarabes, gránulos, píldoras, agentes suspensores, emulsiones, fármacos líquidos, formulaciones en polvo, supositorios, lavados oftálmicos, gotas nasales, gotas óticas, parches, ungüentos o inyecciones. Además, se pueden seleccionar apropiadamente los métodos de medicación, las dosificaciones y el número de medicaciones según la edad, el peso corporal y los síntomas del paciente. Normalmente, para un adulto, se puede dividir la dosificación de 0,01 a 1.000 mg/kg en varias porciones y administrarla una vez al día de una a varias veces por administración oral o parenteral (por ejemplo, inyección, infusión continua y administración rectal).

Ejemplo

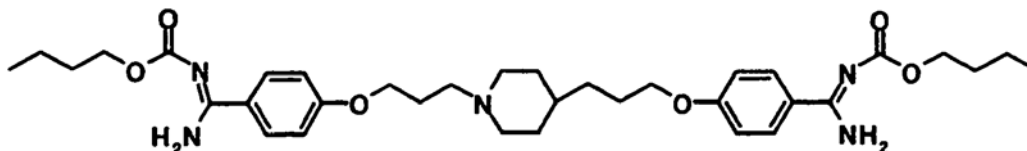
La presente invención será ahora descrita con más detalle mediante Ejemplos de ensayo. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Las respectivas abreviaturas tienen el siguiente significado.

FLCZ: fluconazol; MCFG: micafungina; AMPH-B: anfotericina B; 5-FC: flucitosina; VCZ: voriconazol

Se seleccionó el siguiente compuesto como compuesto de ensayo. A continuación, se ilustra la fórmula estructural química de este compuesto.

[Fórmula química 3]



Como agentes, se seleccionaron fluconazol, micafungina, anfotericina B, voriconazol y flucitosina.

5 Ejemplo de ensayo 1: prueba *in vivo* (Candida)

Se evaluó la actividad *in vivo* en una infección sistémica murina causada por *Candida albicans*.

Se administraron intraperitonealmente a ratones (ratones ICR machos de 4 semanas de edad (en el momento de la infección), 5 ratones por grupo) 200 mg/kg de ciclofosfamida 4 días antes de la infección y 100 mg/kg el día siguiente a la infección. Se suspendió *Candida albicans* TIMM1623, preparada por cultivo durante la noche en una placa de Agar Dextrosa de Sabouraud a 35°C, en solución salina fisiológica estéril. Después de hacer un recuento del número de células de la suspensión con un microscopio biológico, se diluyó la suspensión con solución salina fisiológica estéril para obtener la solución de inóculo. Se indujo la infección sistémica en ratones por inoculación intravenosa de 0,2 mL de la solución de inóculo en la vena de la cola ($2,6 \times 10^4$ UFC/ratón).

Se disolvió el compuesto de ensayo en una pequeña cantidad de ácido clorhídrico de 0,1 mol/L y se diluyó la solución con agua esterilizada para preparar concentraciones predeterminadas.

Se diluyó fluconazol (denominación comercial: FLANOS intravenous drip solution 100 mg, fabricado por Toyama Chemical Co., Ltd.) con agua esterilizada para preparar soluciones de fluconazol de concentraciones predeterminadas.

Se disolvió micafungina sodio (denominación comercial: Funguard 50 mg for infusion, fabricada por Astellas Pharma Inc.) en solución salina fisiológica estéril para preparar soluciones de micafungina de concentraciones predeterminadas.

Se disolvió anfotericina B para inyección (denominación comercial: FUNGIZONE, fabricada por Bristol Pharmaceutical Ltd.) en glucosa al 5% para preparar una solución de anfotericina B de una concentración predeterminada.

Se administraron el compuesto de ensayo (0,25 y 0,5 mg/kg) y fluconazol (0,25 y 0,5 mg/kg) por vía oral. Se administraron micafungina (0,125 y 0,25 mg/kg) y anfotericina B (0,1 mg/kg) por vía subcutánea. Se realizaron estas administraciones una vez 2 horas después de la infección y luego una vez al día durante los siguientes 6 días, totalizando 7 veces.

Por una parte, se administró cada uno de los agentes individualmente, y por otra se administró cada uno de los agentes inmediatamente después de administrar el compuesto de ensayo.

Se evaluó la eficacia en base a la tasa de supervivencia el día 21 después de la infección.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la terapia de combinación del compuesto de ensayo y fluconazol frente a la infección por *Candida albicans*, en la Tabla 2 se muestran los resultados de la terapia de combinación del compuesto de ensayo y micafungina y en la Tabla 3 se muestran los resultados de la terapia de combinación del compuesto de ensayo y anfotericina B.

[TABLA 1]

Composición administrada	Compuesto de ensayo 0,5 mg/kg	FLCZ 0,25 mg/kg	FLCZ 0,5 mg/kg	Compuesto de ensayo 0,25 mg/kg, FLCZ 0,25 mg/kg
Tasa de supervivencia	0	20	40	60

[TABLA 2]

Composición administrada	Compuesto de ensayo 0,5 mg/kg	MCFG 0,125 mg/kg	MCFG 0,25 mg/kg	Compuesto de ensayo 0,5 mg/kg, MCFG 0,125 mg/kg
Tasa de supervivencia	0	0	40	80

[TABLA 3]

Composición administrada	Compuesto de ensayo 0,5 mg/kg	AMPH-B 0,1 mg/kg	Compuesto de ensayo 0,25 mg/kg, AMPH-B 0,1 mg/kg
Tasa de supervivencia	0	20	80

En la infección sistémica murina causada por *Candida albicans*, la administración combinada del compuesto de ensayo y fluconazol, del compuesto de ensayo y micafungina y del compuesto de ensayo y anfotericina B exhibía excelentes efectos terapéuticos.

Ejemplo de ensayo 2: prueba *in vivo* (*Aspergillus*)

Se evaluó la actividad *in vivo* en una infección sistémica murina causada por *Aspergillus fumigatus*.

Se administraron intraperitonealmente a ratones (ratones ICR machos de 4 semanas de edad (en el momento de la infección), 5 ratones por grupo) 200 mg/kg de ciclofosfamida 4 días antes de la infección y 100 mg/kg el día después de la infección. Se diluyó una suspensión de conidios de *Aspergillus fumigatus* IFM46895 con solución salina fisiológica estéril que contenía un 0,05% de Tween 80 (fabricado por Difco Laboratories) en solución salina fisiológica estéril para obtener la solución de inóculo. Se indujo la infección sistémica en ratones por inoculación intravenosa de 0,2 mL de la solución de inóculo en la vena de la cola ($1,6 \times 10^5$ UFC/ratón).

Se disolvió el compuesto de ensayo en una pequeña cantidad de ácido clorhídrico de 0,1 mol/L y se diluyó la solución con agua esterilizada para preparar concentraciones predeterminadas.

Se suspendió flucitosina (fabricada por Sigma Company) en metilcelulosa líquida al 0,5% para preparar concentraciones predeterminadas para administración.

Se diluyó voriconazol (denominación comercial: Vfend 200 mg for intravenous use, fabricado por Pfizer Inc.) con agua esterilizada para preparar soluciones de voriconazol de concentraciones predeterminadas para administración.

Se administraron por vía oral el compuesto de ensayo (1 y 3 mg/kg), flucitosina (50 y 250 mg/kg) y voriconazol (5 y 10 mg/kg). Se realizaron las administraciones una vez 2 horas después de la infección y luego una vez diariamente durante los 6 días siguientes, totalizando 7 veces.

Por una parte, se administró cada uno de los agentes individualmente, y por otra parte se administró cada uno de los agentes inmediatamente después de administrar el compuesto de ensayo. Se evaluó la eficacia en base a la tasa de supervivencia el día 21 después de la infección.

En la Tabla 4 se muestran los resultados de la terapia de combinación del compuesto de ensayo y flucitosina frente a la infección por *Aspergillus fumigatus*, y en la Tabla 5 se muestran los resultados de la terapia de combinación del compuesto de ensayo y voriconazol.

[TABLA 4]

Composición administrada	Compuesto de ensayo 3 mg/kg	5-FC 250 mg/kg	Compuesto de ensayo 3 mg/kg, 5-FC 50 mg/kg
Tasa de supervivencia	20	0	80

[TABLA 5]

Composición administrada	Compuesto de ensayo 1 mg/kg	Compuesto de ensayo 3 mg/kg	VCZ 10 mg/kg	Compuesto de ensayo 1 mg/kg, VCZ 5 mg/kg
Tasa de supervivencia	0	20	0	40

En la infección sistémica murina causada por *Aspergillus fumigatus*, la administración combinada del compuesto de ensayo y flucitosina y del compuesto de ensayo y voriconazol exhibía excelentes efectos terapéuticos. Especialmente la flucitosina, como es habitual, no tiene casi ningún efecto frente a *Aspergillus fumigatus*. En la prueba anterior, la administración de 250 mg/kg de flucitosina no tuvo ningún efecto terapéutico. Sin embargo, la administración combinada de un quinto de 250 mg/kg de flucitosina y del compuesto de ensayo mostró un efecto antifúngico notablemente excelente.

Ejemplo de ensayo 3: prueba *in vivo* (*Cryptococcus*)

Se evaluó la actividad *in vivo* en una infección sistémica murina causada por *Cryptococcus neoformans*.

Se administraron intraperitonealmente a ratones (ratones ICR machos de 4 semanas de edad (en el momento de la infección), 5 ratones por grupo) 200 mg/kg de ciclofosfamida 4 días antes de la infección y 100 mg/kg el día siguiente a la infección. Se suspendieron células de *Cryptococcus neoformans* ATCC90112, preparadas por cultivo durante la noche en una placa de Agar Dextrosa de Sabouraud a 35°C, en solución salina fisiológica estéril. Después de contar el número de células de la suspensión con un microscopio biológico, se diluyó la suspensión con solución salina fisiológica estéril para obtener la solución de inóculo. Se indujo la infección sistémica en ratones por inyección intravenosa de 0,2 mL de la solución de inóculo en la vena de la cola ($8,5 \times 10^4$ UFC/ratón).

Se disolvió el compuesto de ensayo en una pequeña cantidad de ácido clorhídrico de 0,1 mol/L y se diluyó la solución con agua esterilizada para preparar concentraciones predeterminadas.

Se diluyó fluconazol (denominación comercial: FLANOS intravenous drip solution 100 mg, fabricado por Toyama Chemical Co., Ltd.) con agua esterilizada para preparar soluciones de fluconazol de concentraciones predeterminadas.

Se administraron por vía oral el compuesto de ensayo (0,5 y 1 mg/kg) y fluconazol (20 mg/kg). Se realizaron las administraciones una vez 2 horas después de la infección y luego una vez diariamente durante los 6 días siguientes, totalizando 7 veces.

Por una parte, se administró cada uno de los agentes individualmente, y por otra se administró cada uno de los agentes inmediatamente después de administrar el compuesto de ensayo. Se evaluó la eficacia en base a la tasa de supervivencia el día 21 después de la infección.

En la Tabla 6 se muestran los resultados de la combinación del compuesto de ensayo y fluconazol frente a la infección causada por *Cryptococcus neoformans*.

[TABLA 6]

Composición administrada	Compuesto de ensayo 1 mg/kg	FLCZ 20 mg/kg	Compuesto de ensayo 0,5 mg/kg, FLCZ 20 mg/kg
Tasa de supervivencia	0	20	60

En la infección sistémica murina causada por *Cryptococcus neoformans*, la administración combinada del compuesto de ensayo y fluconazol exhibía excelentes efectos terapéuticos. Además, el compuesto de ensayo no mostró toxicidad alguna cuando se administró por vía oral consecutivamente a los ratones utilizados en las pruebas anteriores a 25 mg/kg durante 2 semanas, y el compuesto de ensayo presentaba una alta seguridad.

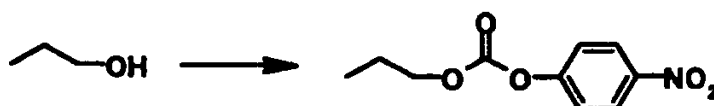
Está claro por los resultados anteriores que la combinación del derivado de fenilamidina o de una sal del mismo representado por la fórmula general [1] con diversos agentes antifúngicos o similares exhibe actividad antifúngica y efectos de tratamiento sinérgicos y que es efectiva en el tratamiento de infecciones fúngicas causadas por hongos patógenos.

[Preparación]

A continuación, se describirá ahora la presente invención con más detalle mediante Ejemplos de referencia y Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos.

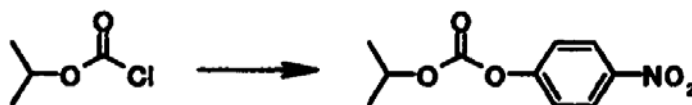
La razón de mezcla en el eluyente es una razón de capacidad y el soporte para la cromatografía en columna de gel de sílice es gel de sílice B.W., BW-127ZH (Fujisilysia Chemical Ltd).

Ejemplo de referencia 1

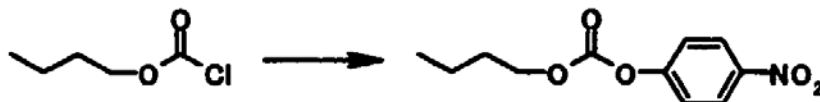


Se añadió gota a gota a una solución en 10 mL de tetrahidrofurano de 0,75 g de propanol y 1,90 mL de trietilamina una solución en 15 mL de tetrahidrofurano de 2,50 g de cloroformiato de 4-nitrofenilo bajo refrigeración con hielo. Se añadieron acetato de etilo y agua a la mezcla de reacción después de agitar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de separar la capa orgánica, de recogerla y de lavarla con agua y con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio secuencialmente, se secó la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro y se destiló a continuación el solvente. Tras añadir hexano al residuo, la filtración de los insolubles y la eliminación del solvente a presión reducida dieron 2,59 g de propilcarbonato de 4-nitrofenilo como un aceite amarillo claro. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) valor δ : 1,03 (3H,t,J=7,4Hz), 1,71-1,85 (2H,m), 4,26 (2H,t,J=6,7Hz), 7,39 (2H,d,J=9,0Hz), 8,28 (2H,d,J=9,0Hz).

Ejemplo de referencia 2

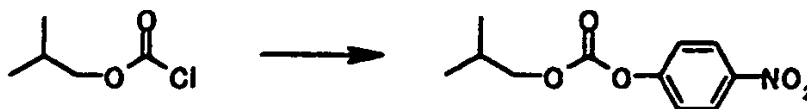


A una solución en 30 mL de tetrahidrofurano de 3,00 g de 4-nitrofenol y 3,31 mL de trietilamina, se le añadieron gota a gota 2,46 mL de cloroformiato de isopropilo bajo refrigeración con hielo. Se añadieron acetato de etilo y agua a la mezcla de reacción tras agitar a la misma temperatura durante 10 minutos. Después de separar la capa orgánica, de recogerla y de lavarla con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secó la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, seguido de destilación del solvente a presión reducida. Tras disolver el residuo en 50 mL de acetato de etilo y lavarlo con una solución acuosa al 5% de carbonato de potasio y con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio secuencialmente, se secó la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro y se destiló a continuación el solvente a presión reducida, para obtener 3,00 g de isopropilcarbonato de 4-nitrofenilo como un sólido amarillo claro. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) valor δ : 1,41 (6H,d,J=6,3Hz), 4,96-5,07 (1H,m), 7,36-7,41 (2H,m), 8,25-8,30 (2H,m).

Ejemplo de referencia 3

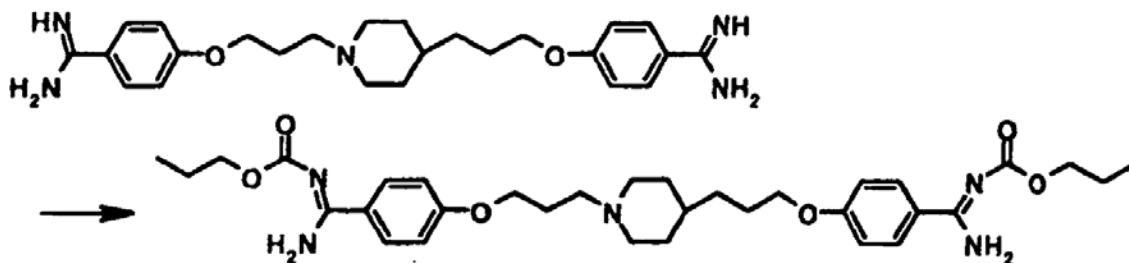
5 A una solución en 30 mL de tetrahidrofurano de 3,00 g de 4-nitrofenol y 3,31 mL de trietilamina, se le añadieron gota a gota 2,75 mL de cloroformato de butilo bajo refrigeración con hielo. Se añadieron acetato de etilo y agua a la mezcla de reacción después de agitar a la misma temperatura durante 10 minutos. Tras separar la capa orgánica, recogerla y lavarla con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secó la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro y se destiló el solvente a continuación, para obtener 4,60 g de butilcarbonato de 4-nitrofenilo como un aceite amarillo claro.

10 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) valor δ : 0,99 (3H,t,J=7,4Hz), 1,41-1,52 (2H,m), 1,70-1,80 (2H,m), 4,30 (2H,t,J=6,6Hz), 7,36-7,41 (2H,m), 8,26-8,31 (2H,m).

Ejemplo de referencia 4

15 De forma similar al ejemplo de referencia 3, se obtuvieron 5,63 g de 4-nitrofenilcarbonato de isobutilo como un aceite amarillo claro a partir de 3,00 g de 4-nitrofenol y 2,80 mL de cloroformato de isobutilo.

20 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) valor δ : 1,02 (6H,d,J=6,6Hz), 2,02-2,13 (1H,m), 4,08 (2H,d,J=6,6Hz), 7,39 (2H,d,J=9,1Hz), 8,28 (2H,d,J=9,1Hz).

Ejemplo 1 (referencia)

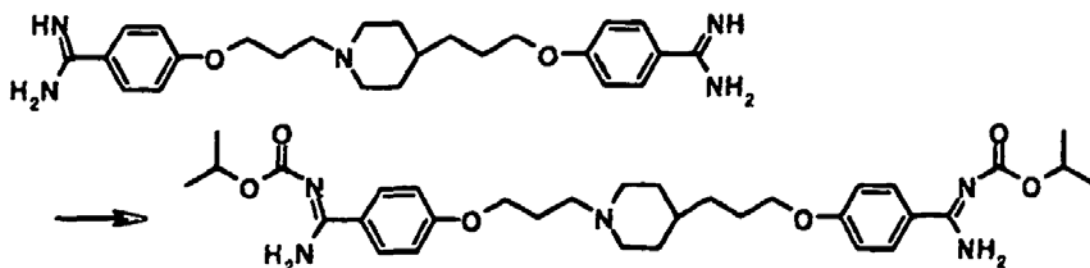
25 Se añadieron a una solución en 15 mL de N,N-dimetilformamida de 1,71 g de carbonato de 4-nitrofenilpropilo 1,50 g de 4-{3-[4-(3-[4-[amino(imino)metil]fenoxi)propil]-1-piperidinil]propoxi}benzamidina a temperatura ambiente y se agitó la solución a la misma temperatura durante 4 horas. Se añadieron cloroformo y agua a la mezcla de reacción. Después de separar la capa orgánica, de recogerla y de lavarla con agua, con una solución acuosa al 5% de carbonato de potasio dos veces y con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio secuencialmente, se secó la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, seguido de destilación del solvente. Se purificó el residuo obtenido por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente, cloroformo:metanol=4:1]. Se disolvió el sólido obtenido en cloroformo; después de lavar la solución con una solución acuosa al 5% de carbonato de potasio y una

30

solución acuosa saturada de cloruro de sodio secuencialmente, se secó la solución sobre sulfato de magnesio anhidro, seguido de destilación del solvente, para obtener 1,25 g de 4-{3-[4-(3-[4-[amino(propoxicarbonilimino)metil]fenoxi)propil]-1-piperidinil]propoxi}-N'-(propoxicarbonil)benzamidina como un sólido blanco.

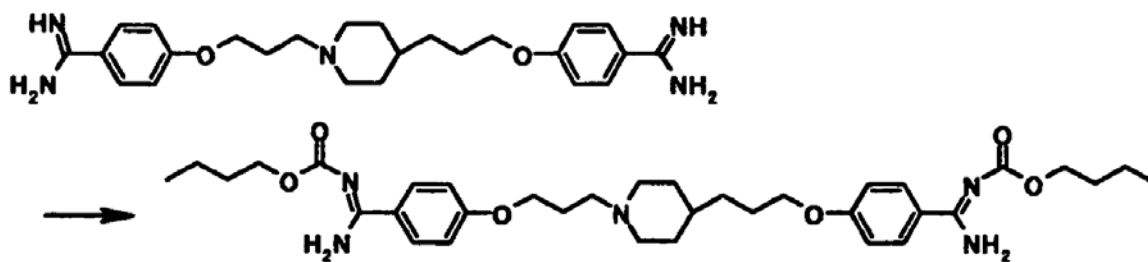
5 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) valor δ : 0,99 (6H,t,J=7,4Hz), 1,22-1,45 (5H,m), 1,66-1,86 (8H,m), 1,90-2,04 (4H,m), 2,46-2,54 (2H,m), 2,90-2,98 (2H,m), 3,99 (2H,t,J=6,5Hz), 4,06 (2H,t,J=6,3Hz), 4,11 (4H,t,J=7,0Hz), 6,88-6,96 (4H,m), 7,82-7,88 (4H,m).

Ejemplo 2 (referencia)

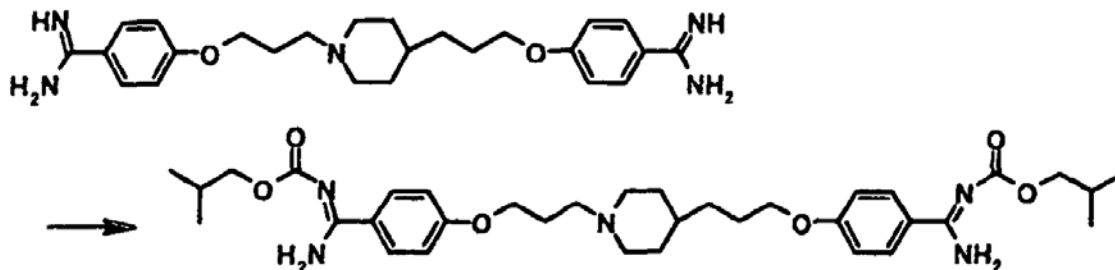


10 De forma similar al ejemplo 1, se obtuvieron 1,35 g de 4-{3-[4-(3-[4-[amino(isopropoxicarbonilimino)metil]fenoxi)propil]-1-piperidinil]propoxi}-N'-(isopropoxicarbonil)benzamidina como un sólido blanco a partir de 1,71 g de isopropilcarbonato de 4-nitrofenilo y 1,50 g de 4-{3-[4-(3-[4-[amino(imino)metil]fenoxi)propil]-1-piperidinil]propoxi}benzamidina. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) valor δ : 1,20-1,46 (5H,m), 1,34 (12H,d,J=6,3Hz), 1,56-1,86 (4H,m), 1,88-2,04 (4H,m), 2,46-2,54 (2H,m), 2,90-2,98 (2H,m), 3,99 (2H,t,J=6,5Hz), 4,06 (2H,t,J=6,3Hz), 4,94-5,04 (2H,m), 6,88-6,96 (4H,m), 7,80-7,88 (4H,m).

Ejemplo 3



25 De forma similar al ejemplo 1, se obtuvieron 1,39 g de 4-{3-[4-(3-[4-[amino(butoxicarbonilimino)metil]fenoxi)propil]-1-piperidinil]propoxi}-N'-(butoxicarbonil)benzamidina como un sólido blanco a partir de 1,82 g de 4-nitrofenilcarbonato de butilo y 1,50 g de 4-{3-[4-(3-[4-[amino(imino)metil]fenoxi)propil]-1-piperidinil]propoxi}benzamidina. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) valor δ : 0,95 (6H,t,J=7,3Hz), 1,20-1,50 (9H,m), 1,60-2,05 (12H,m), 2,45-2,54 (2H,m), 2,90-3,00 (2H,m), 3,99 (2H,t,J=6,6Hz), 4,06 (2H,t,J=6,3Hz), 4,16 (4H,t,J=6,8Hz), 6,88-6,96 (4H,m), 7,82-7,88 (4H,m).

Ejemplo 4 (referencia)

Se añadieron a una solución en 15 mL de N,N-dimetilformamida de 1,82 g de 4-nitrofenilcarbonato de isobutilo 1,50 g de 4-{3-[4-(3-{4-[amino(imino)metil]fenoxi}propil)-1-piperidinil]propoxi}benzamidina a temperatura ambiente y se dejó que la solución reaccionara a la misma temperatura durante 17 horas. Se añadieron cloroformo y agua a la mezcla de reacción. Después de separar la capa orgánica, de recogerla y de lavarla con agua, con una solución acuosa al 5% de carbonato de potasio y con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio secuencialmente, se secó la capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, seguido de destilación del solvente. Se purificó el residuo obtenido por cromatografía en columna de gel de sílice [eluyente, cloroformo:metanol=4:1]. Se disolvió el residuo obtenido en cloroformo; después de lavar la solución con una solución acuosa al 5% de carbonato de potasio y con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio secuencialmente, se secó la solución sobre sulfato de magnesio anhidro, seguido de destilación del solvente, para obtener 1,43 g de 4-{3-[4-(3-{4-[amino(isobutoxicarbonilimino)metil]fenoxi}propil)-1-piperidinil]propoxi}-N'-(isobutoxicarbonil)benzamidina como un sólido blanco.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) valor δ : 0,99 (12H,d,J=6,8Hz), 1,20-1,45 (5H,m), 1,55-2,12 (10H,m), 2,46-2,53 (2H,m), 2,90-3,00 (2H,m), 3,94 (4H,d,J=6,8Hz), 3,99 (2H,t,J=6,5Hz), 4,06 (2H,t,J=6,3Hz), 6,88-6,96 (4H,m), 7,80-7,90 (4H,m).

Ejemplo farmacéutico 1

Se añadieron 100 mg del compuesto obtenido en el ejemplo 3 y 18 g de cloruro de sodio a 1,8 L de agua para inyección. Se ajustó a pH 4 con ácido clorhídrico, se disolvió y se diluyó a un volumen total de 2 L con agua para inyección. Se filtró la solución disuelta a través de un filtro de membrana de 0,22 μm y se empaquetaron 100 mL de la solución farmacéutica obtenida y se sellaron en una ampolla para administrar inyecciones.

Ejemplo farmacéutico 2

Se mezclaron 500 mg del compuesto obtenido en el ejemplo 3, 350 mg de lactosa, 250 mg de almidón de maíz y 400 mg de celulosa cristalina [denominación comercial: CEOLUS PH101: Asahi Kasei Chemicals Corporation], se añadieron 0,6 mL de una solución acuosa al 5% de hidroxipropilcelulosa y agua a la mezcla y se amasó la mezcla. Después de secar la mezcla obtenida a 60°C, se añadieron 100 mg de crospovidona [denominación comercial: Kollidon CL, BASF], 100 mg de ácido silícico anhidro ligero y 20 mg de estearato de magnesio a la mezcla y se mezcló la mezcla. Se formularon 175 mg de la mezcla en tabletas circulares de un diámetro de 8 mm para obtener tabletas.

Ejemplo farmacéutico 3

Se mezclaron 500 mg del compuesto obtenido en el ejemplo 3, 200 mg de lactosa y 530 mg de almidón de maíz, se añadieron 0,6 mL de una solución acuosa al 5% de hidroxipropilcelulosa y agua a la mezcla y se amasó la mezcla. Después de secar la mezcla obtenida a 60°C, se añadieron 70 mg de crospovidona [denominación comercial: Kollidon CL, BASF], 180 mg de celulosa cristalina [denominación comercial: CEOLUS PH302, Asahi Kasei Chemicals Corporation] y 20 mg de estearato de magnesio a la mezcla y se mezcló la mezcla resultante. Se empaquetaron 150 mg de la mezcla en cápsulas de gelatina de tipo 3 para obtener cápsulas.

[Aplicabilidad industrial]

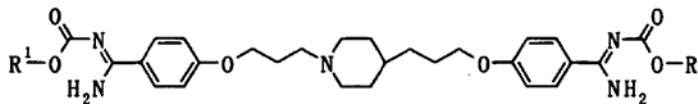
La composición farmacéutica que contiene el nuevo derivado de fenilamidina o una sal del mismo y uno o más agentes antifúngicos seleccionados entre agentes antifúngicos azólicos, agentes antifúngicos poliénicos, agentes antifúngicos de candina y agentes antifúngicos de fluoropirimidina tiene una potente actividad antifúngica y es útil para el tratamiento de infecciones fúngicas. El método de uso en combinación de estos agentes antifúngicos es útil como excelente método de tratamiento de infecciones fúngicas.

REIVINDICACIONES

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

5

[FÓRMULA QUÍMICA 1]



donde R¹ y R² son iguales y representan un grupo n-butilo, y uno o más agentes seleccionados entre agentes antifúngicos triazólicos, anfotericina B, micafungina y flucitosina.

10

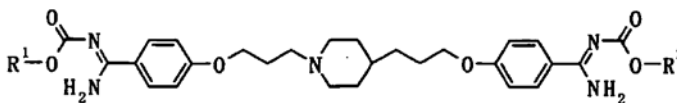
2. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, donde el agente antifúngico triazólico es fluconazol, fosfluconazol, voriconazol o itraconazol.

15

3. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1 ó 2, donde la infección fúngica está causada por un hongo patógeno seleccionado entre Candida, Cryptococcus y Aspergillus.

4. Derivado de fenilamidina, o una sal del mismo, representado por la fórmula:

[FÓRMULA QUÍMICA 2]



20

donde R¹ y R² son iguales y representan un grupo n-butilo, en combinación con uno o más agentes seleccionados entre agentes antifúngicos triazólicos, anfotericina B, micafungina y flucitosina para uso en un método de tratamiento de infecciones fúngicas causadas por hongos patógenos.

25

5. El derivado de fenilamidina para uso según la reivindicación 4, donde el agente antifúngico triazólico es fluconazol, fosfluconazol, voriconazol o itraconazol.

6. El derivado de fenilamidina para uso según la reivindicación 4 ó 5, donde la infección fúngica está causada por un hongo patógeno seleccionado entre Candida, Cryptococcus y Aspergillus.