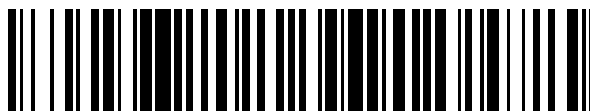


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 501**

51 Int. Cl.:

C07D 221/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2007** **E 07825822 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014** **EP 2029545**

54 Título: **Derivados de bisnaftalimidopropilo con actividad anti-parasitaria y anticancerígena**

30 Prioridad:

19.06.2006 PT 10350306

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.03.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DO PORTO (100.0%)
RUA D. MANUEL II
4050 345 PORTO, PT**

72 Inventor/es:

**CORDEIRO DA SILVA, ANABELA;
PINTO DA COSTA TAVARES, JOANA
ALEXANDRA y
KONG THOO LIN, PAUL**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 532 501 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

Derivados de bisnaftalimidopropilo con actividad anti-parasitaria y anticancerígena

Dominio técnico de la invención

5 Los nuevos derivados del bisnaftalimidopropilo, el proceso de preparación de los mismos, la composición farmacéutica que los comprende y su uso en el cáncer y las enfermedades parasitarias, a saber, la leishmaniasis, la tripanosomiasis y la malaria, con aplicación de la industria farmacéutica.

10 La presente invención se refiere a un proceso de preparación de los nuevos compuestos derivados del bisnaftalimidopropilo y a las composiciones farmacéuticas que los comprenden. Estos compuestos tienen un papel en la inhibición del crecimiento de los parásitos protozoa *Leishmania infantum* y propiedades citotóxicas en las células cancerosas.

Estado anterior de la técnica

15 Los derivados naftalimido muestran un considerable potencial como agentes citotóxicos para la quimioterapia del cáncer (Brana et al., 2001). Hemos informado anteriormente de la síntesis y la actividad biológica de una nueva serie de compuestos poliaminas de bisnaftalimidopropilo (Kong et al., 2000). El trabajo posterior reveló que la presencia de la funcionalidad del bisnaftalimidopropilo era esencial para la actividad biológica óptima ya que la presencia de un átomo de oxígeno en la posición alfa del anillo de naftalimido tiende a reducir la actividad (Pavlov et al., 2001).

20 La mayoría de la investigación se centró tradicionalmente en la modificación de los anillos naftalimido para mejorar las actividades contra el cáncer mediante el aumento del enlace y la escisión del ADN. Por ejemplo, se introdujo acenaftalimida en el cromóforo naftalimida para aumentar la solubilidad de los compuestos bisnaftalimida (Patten et al., 1992). Se adicionaron los heterociclos de furano al cromóforo de naftalimida y aquellos compuestos muestran fuertes propiedades de enlace de ADN con toxicidad para las células de leucemia CEM que están en la concentración nanomolar (Brana et al., 1995). Recientemente los heterociclos de pirazina también se han fusionado a naftalimidias y esos pirazino-naftalimidias mostraron una toxicidad in vitro con valores de IC₅₀ que van desde 0.002 hasta 7.8 µM después de 72 horas de tratamiento en el células cancerosas HT 29, HeLa, y PC 3 (Bailly et al., 2003).

25 Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos desarrollado fragmentos de bisnaftalimidopropilo unidos a poliaminas naturales como putrescina, espermidina y espermina. Los derivados de la espermidina y la espermina mostraron solubilidad acuosa mejorada mientras se mantiene una buena actividad biológica (Carrasco et al., 2003 and Kong et al., 2003). En las células de cáncer de mama MCF 7, se observaron compuestos dentro de los núcleos de las células después de 6 y 12 horas de exposición al fármaco, siendo el transporte potencialmente dependiente de la energía (Dance et al., 2005). Dentro de las células MCF7, los compuestos bisnaftalimidopropilo produjeron daños cuantitativos significativos en el ADN. También se encontró por primera vez que los derivados bisnaftalimido propilo ejercen efectos antiproliferativos significativos en el ciclo de vida de *Leishmania infantum*, el agente causal de la leishmaniasis visceral y estos fármacos también indujeron la muerte de promastigotes por apoptosis (Tavares et al., 2005).

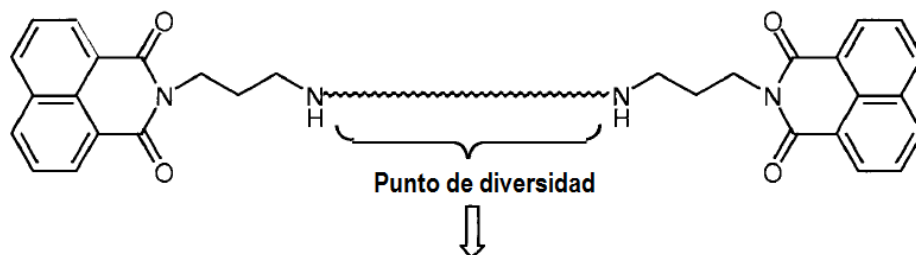
35 En la leishmaniasis la primera línea de quimioterapia se limita al uso de derivados de antimonio pentavalente (Murry et al., 2001). Como consecuencia del mucho transcurso de la terapia, las reacciones adversas aparecen y las resistencias inducen la búsqueda de nuevos fármacos más eficientes. También se incluyó la eficacia del tratamiento en la situación de la inmunodeficiencia, en particular en la co-infección *Leishmania*/VIH.

40 La poliamina natural, putresceína, espermidina, y espermina están presentes en la mayoría de las células eucariotas y tienen un papel importante en la proliferación y la diferenciación celular (Muller et al., 2001). En el caso de los tripanosomátidos las poliaminas tienen un papel adicional en el equilibrio oxi-redox endógeno por el compuesto tripanotión [N1, N8-bis (glutación) espermidina]. Estas moléculas y reacciones enzimáticas se han considerado como una buena diana del fármaco (Fairlamb and Cerami, 1992; Barrete et al., 1999). Interferir con la función reguladora de las poliaminas ha sido una estrategia para buscar nuevos compuestos con actividad anti-cancerígena y antiparasitaria. Los inhibidores de la síntesis de poliaminas como DFMO (alfa-difluormetilornitina) mostraron que son activos frente a diferentes etapas de parásitos de *Plasmodium* sp. Este parásito tiene una enzima bifuncional con la actividad de ornitina y descarboxilasa de S-adenosilmetionina, lo que se convirtió en atractivo como diana de fármacos ya que está ausente en las células huésped (Müller et al., 2001).

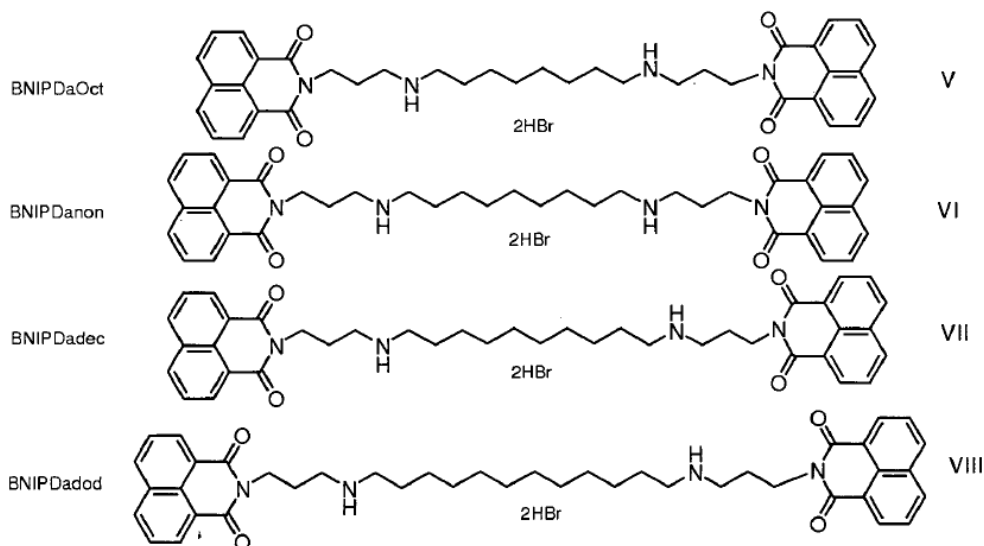
50 Interferir con la función reguladora de las poliaminas se convirtió en una estrategia para buscar los compuestos de eficacia con actividad anticancerígena y anti-parasitaria.

En esta invención se reporta la síntesis de los análogos bisnaftalimidopropilo di- y tri- aminas: **BNIPDaoct**, **BNIPDanon**, **BNIPDadec** y **BNIPDadod**, basándose en nuestro compuesto líder **BNIPPut** (I) (derivado de la

espermidina) con modificación de la cadena central. La modificación consiste en una longitud de alquilo diferente de la cadena central con 2 o 3 átomos de nitrógeno, modulando así el número de cargas positivas en las moléculas. También se discuten las propiedades citotóxicas in vitro de estos compuestos recién sintetizados en las células del cáncer de colon (CaCo-2) y parásitos (*Leishmania infantum*, promastigotes). Las modificaciones incluyen la potencia, la especificidad, la biodistribución oral, penetración en el tejido diana y la duración de acción, en relación con los nuevos compuestos de la formulación general A.



compuestos BNIPDiaminoalquilo



en donde:

la cadena central alquilo tiene modificaciones en la longitud y en la introducción de átomos de nitrógeno.

10 Los compuestos mostrados en la formulación de A son:

5.

Bisnaphthalimidopropildiaminooctano - BNIPDaOct (V)

6.

Bisnaphthalimidapropildiaminononano - BNIPDanon (VI)

15 7.

Bisnaphthalimidapropildiaminodecano - BNIPDadec (VII)

8.

Bisnaphthalimidapropildiaminododecano - BNIPDadod (VIII)

Otro aspecto de la invención se refiere al proceso de preparación, formulación farmacéutica hecha en combinación de un compuesto de fórmula V, VI, VII, VIII con un vehículo o excipiente de seguridad farmacéutica.

Descripción de la invención

La síntesis de los compuestos protegidos en esta invención se basó en los métodos descritos anteriormente por nuestro grupo (Kong et al., 2003). Los compuestos bisnaftalimido con la cadena conector que contiene 2 nitrógenos fueron sintetizados previamente simplemente, mediante la reacción de la alquiltetraamina correspondiente con 1,8-anhídrido naftálico (Brana et al., 1995). Con el fin de introducir más heteroátomos en la cadena del enlazador, la reacción de N-alquilación se eligió de acuerdo con un método modificado por Kong (Kong et al., 1998). El intermedio común para la síntesis de diferentes compuestos fue toluenosulfoniloxipropilnaftalimida. Éste se preparó haciendo reaccionar primero 1,8-anhídrido naftálico con aminopropanol para dar la N- (3-hidroxipropil) naftalimida que tras la reacción con cloruro de tosilo dio la toluenosulfoniloxipropilnaftalimida, con un rendimiento del 60%. Para obtener el bisnaftimida la poliamina utilizada depende del compuesto a sintetizar y en primer lugar fueron protegidos con 2, 4, 5- trimetilsulfonil cloruro (Mts-Cl) en piridina seguido de su N-alquilación con toluenosulfoniloxipropilnaftalimida produjo el derivado de bisnaftalimida protegida. La desprotección se obtuvo con ácido bromhídrico/ácido acético glacial en diclorometano para dar el derivado respectivo como sus sales de hidrobromuro.

Las células CaCo-2 (ECACC, 86010202) se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares. Todos los reactivos fueron adquiridos de Aldrich, Fluka and Lancaster y se usaron sin purificación. La TLC se realizó sobre placas de Kieselgel (Merck) 60 F₂₅₄ en cloroformo:metanol (97:3 o 99:1). La cromatografía en columna se realizó con silica gel 60, de 230-400 mallas usando cloroformo y metanol como eluyente. Los espectros de masas-FAB- se obtuvieron en un espectrómetro VG Analytical AutoSpec (25 Kv); Los espectros de EC/CI se realizaron en un Micromass Quatro II (baja resolución) o un instrumento VG Analytical ZABE (masa exacta). Los espectros ¹H y ¹³C NMR se registraron en un espectrómetro JEOL JNM-EX90 FT NMR.

BNIPSpd y BNIPPut se sintetizaron de acuerdo con nuestros métodos reportados anteriormente (Kong et al ..., 2003 and Tavares et al., 2005).

Estudios de citotoxicidad

La citotoxicidad se evaluó para CaCo-2 de carcinoma de colon utilizando el ensayo MTT con los protocolos apropiados para el sistema de ensayo individual. Las células CaCo-2^{11, 13} se mantuvieron en Medio Esencial Mínimo de Earle (Sigma), suplementado con suero fetal bovino al 10% (Biosera), L-glutamina 2 mM (Sigma), aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma), 100 IU/mL⁻¹ de penicilina y 100 mg/mL⁻¹ de estreptomina (Sigma). Las células que crecen exponencialmente se sembraron a 2 x 10⁴ células cm⁻² en placas de 96 pozos y se incubaron durante 24 h antes de la adición de los fármacos. Las soluciones madre de los compuestos se disolvieron inicialmente en DMSO al 20% y se diluyó adicionalmente con medio completo fresco.

Después de 24 y 48 h de incubación a 37 °C, se retiró el medio y se adicionaron a cada pozo 200 µl de reactivo MTT (1 mg/mL) en medio libre de suero. Las placas se incubaron a 37 °C, durante 4 h. Al final del periodo de incubación, se retiró el medio y se adicionó a cada pozo DMSO puro (200 µl). El producto MTT metabolizado disuelto en DMSO se cuantificó mediante la lectura de la absorbancia a 560 nm en un lector de micro placas (Dynex Technologies, EE.UU.). Los valores de IC₅₀ se definen, como las concentraciones del fármaco requeridas para reducir la absorbancia en un 50% de los valores de control. Los valores de IC₅₀ se calcularon a partir de la ecuación de la recta logarítmica determinada mediante el ajuste de la mejor recta (Excel Microsoft) a la curva formada a partir de los datos. El valor de IC₅₀ se obtuvo de la ecuación para y = 50 (valor 50%).

Los promastigotes de Leishmania infantum (clon MHOM/MA671TMA-P263) transfectados con el gen indicador que codifica para la enzima luciferasa (Roy et al., 2000) se cultivaron a 27 °C en medio RPMI (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10% inactivado con calor (FBS- Gibco), L-glutamina 2 mM (Gibco), Hepes 20 mM (Gibco), 100 U/mL de penicilina (Gibco) y 100 µ/mL de estreptomina (Gibco). Los parásitos (10⁶/mL) en la fase logarítmica (2 días de cultivo) se incubaron con un rango en serie de concentraciones de cada fármaco durante 3 días a 27 °C y el crecimiento de los parásitos se determinó mediante el uso de la actividad de luciferasa usando luciferina como sustrato.

El axénico de amastigote de Leishmania infantum (clon MHOM/MA671TMA-P263) transfectado con el gen indicador que codifica para la enzima luciferasa (Roy et al., 2000) se cultivó a 37 °C con 5% de CO₂ en un medio libre de células llamado MAA (medio para el amastigote cultivado axénicamente). El medio MAA/20, consistió en medio 199 modificado (sales equilibradas de Hanks) suplementado con triptocaseína de soja al 0.5%, D-glucosa 15 mM, L-glutamina 5 mM, NaHCO₃ 4 mM, hemina bovina 0.023mM, HEPES 25 mM pH final, 6,5 y suero fetal bovino al 20% inactivado. Los parásitos fueron incubados con diferentes concentraciones durante 3 días a 37 °C con 5% de CO₂. El crecimiento de los parásitos se realizó mediante la medición de la actividad de luciferasa usando luciferina como sustrato. Los amastigotes intracelulares de L. infantum se cultivaron en un macrófago diferenciado de línea celular

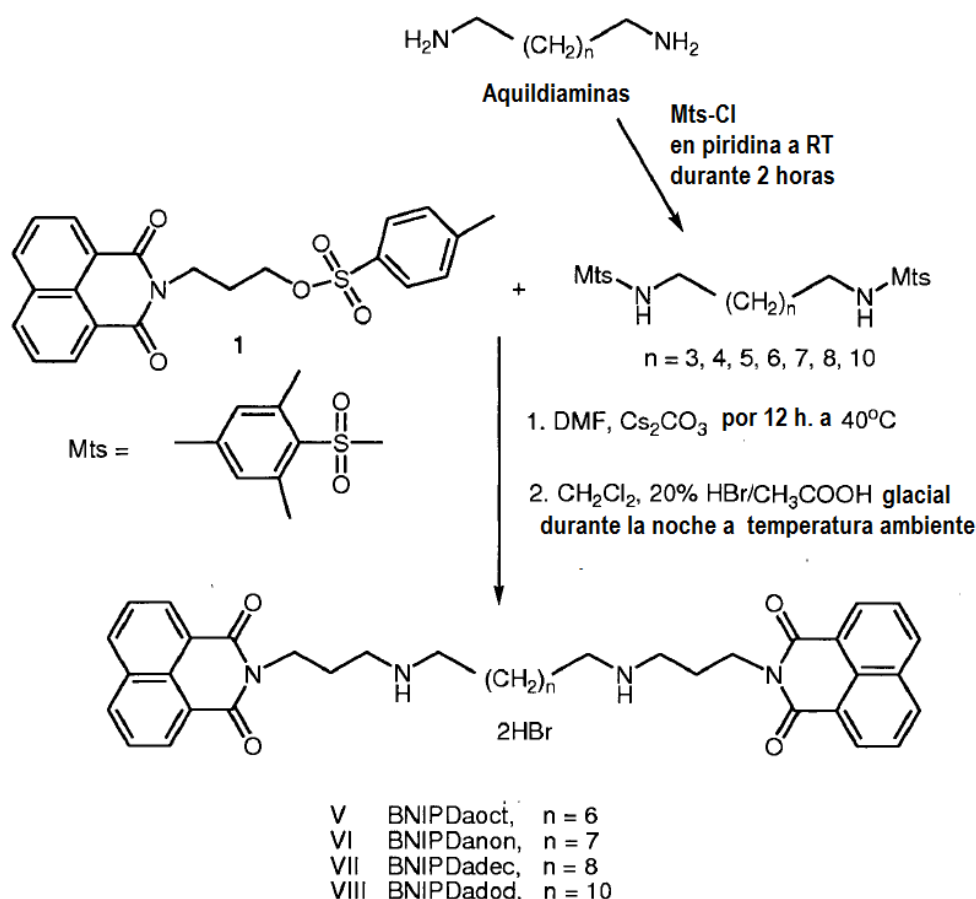
de leucemia monocítica humana (células THP-1). Las células THP-1 fueron diferenciadas durante 2 días con 20 ng/mL de PMA en medio RPMI-1640 suplementado con FCS al 10%, glutamina 2 mM, 100 IU de penicilina/mL y 100 mg/mL de estreptomicina. Las células no diferenciadas se lavaron con medio precalentado y las células adherentes infectadas con axénicos de amastigotes que expresan luciferasa en una proporción parásito/macrófago de 3:1 durante 4 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Los parásitos no internalizados se retiraron y se hicieron diluciones en serie de cada fármaco en el medio RPMI suplementado con 10% de FCS. Después de 3 días de exposición al fármaco, los pozos que contenían células THP-1 adherentes diferenciadas se lavaron y se determinó la actividad de luciferasa.

Resultados

Química

La estrategia de síntesis adoptada para sintetizar los derivados de bisnaftalimidopropilo BNIPDaoct, BNIPDanon, BNIPDadec y BNIPDadod, basada en métodos desarrollados previamente en nuestro laboratorio (Kong et al., 2000). La protección y activación de todas las di- y tri-aminas se realizaron con cloruro de mesitileno en piridina a temperatura ambiente para dar los compuestos **1-5** con un alto rendimiento. La N-alquilación de los últimos compuestos con O-tosilpropilnaftalimida **6** con Carbonato de cesio en DMF anhidra, proporcionó los derivados bisnaftalimidopropilo totalmente protegidos que, tras la desprotección con ácido bromhídrico /ácido acético glacial en CH₂Cl₂ dio BNIPDaoct, BNIPDanon, BNIPDadec y BNIPDadod con un rendimiento que varía de 50 -70%.

Esquema 1. Estrategia de síntesis para la síntesis de los derivados de Bisnaftalimidopropilalquilaminas



Actividades Biológicas

La citotoxicidad in vitro de todos los derivados de bisnaftalimidopropilo descritos anteriormente fueron estudiados contra las líneas celulares de cáncer de colon CaCo-2 y el parásito Leishmania infantum. En la línea celular de cáncer, se determinaron los valores de IC₅₀ de cada compuesto después de la exposición al fármaco 24 y 48 h (Tabla 1). Todos los compuestos ejercieron valores de IC₅₀ entre 0.15 y 8.00 µM. En el mismo orden de actividad, el compuesto BNIPDadec mostró una IC₅₀ de 0.77 y 0.36 µM, después de 24h y 48h de incubación, respectivamente.

La eliminación de un átomo de nitrógeno de la cadena conector no parece afectar sustancialmente las propiedades citotóxicas de estos compuestos. Hemos informado anteriormente de que cuando el grupo alquilo central es una cadena de butilo, el compuesto (BNIPPut) no es soluble en la mayoría de los solventes y la solubilidad acuosa de los compuestos bisnaftalimidopropilo se mejora, por medio de la introducción de un heteroátomo como nitrógeno en la cadena central (Kong et al., 2000). En este documento, mediante el aumento de la longitud de la cadena central de alquilo tal como en BNIPDaoct, BNIPDanon y BNIPDadec, también se ayuda a la solubilidad acuosa. Nosotros razonamos que con la cadena de alquilo más larga, los dos anillos naftalimido no tienden a apilarse en la parte superior de cada otra por interacciones T-T entre los anillos aromáticos y por lo tanto favorece la solubilidad acuosa. Entre estos últimos compuestos, BNIPDadec mostró la mayor citotoxicidad contra las células CaCo-2 con valores de IC_{50} de 0.36 μM (48 h) y 0.77 μM (24 h).

Tabla 1: Citotoxicidad de los análogos de poliamina contra células cancerosas CaCo-2

Compuesto ^a	IC_{50} (μM)	
	24h	48h
BNIPDaoct	6,20	3,20
BNIPDanon	3,60	0,67
BNIPDadec	0,77	0,36
BNIPDadod	4,50	2,70
^a Citotoxicidad determinada por el ensayo de MTT. Los datos obtenidos después de tratar las células CaCo-2 con diferentes concentraciones de análogos (0.01 a 40 μM), durante 24 y 48 horas. Los datos son la media $\pm$ SD de 6 repeticiones. ND: no determinado.		

Figura 1. La curva de crecimiento de formas promastigotes de luciferasa y axénicos de amastigotes. El efecto in vitro de diferentes derivados bisnaftalimidopropilo en el crecimiento del parásito. Los resultados son representativos de 5 ensayos realizados de forma independiente. Los promastigotes y axénicos de amastigotes se incubaron con un rango en serie de concentraciones de fármaco desde 0.30 hasta 12.5 μM , a 27 °C y 3.125 a 100 μM a 37 °C en 5% de CO_2 , respectivamente, durante 3 días. Las curvas de crecimiento representadas indican el porcentaje de crecimiento relacionado con el control para cada concentración después de la determinación de la actividad de luciferasa. Cada punto representa una media de 3 ensayos $\pm$ STD.

El tratamiento de las diferentes formas del parásito *Leishmania infantum*, promastigote, axénico de amastigote y amastigote intracelular, con los compuestos, BNIPDaoct y BNIPDanon, en el rango de concentración de 0.39 a 12.50 μM dio como resultado una inhibición dependiente de la dosis de crecimiento del parásito, excepto el axénico de amastigote incubado con BNIPDaoct, que no inhibió el crecimiento del parásito hasta una concentración de 50 μM (Figura 1). Hemos observado que el crecimiento del parásito fue bloqueado completamente después de 6.25 μM para el promastigote y 50 μM para el axénico de amastigote, excepto con el BNIPDaoct.

En el caso del promastigote, las $IC_{50} \pm SD$ determinadas fueron ≤ 0.39 , 2.09 ± 0.54 μM para BNIPDaoct, BNIPDanon, respectivamente. El compuesto más activo para esta forma de parásito fue BNIPDaoct.

En el caso de la forma axénico de amastigote las $IC_{50} \pm SD$ determinadas fueron > 50.00 , 17.42 ± 0.97 , μM , para los siguientes compuestos BNIPDaoct, BNIPDanon, respectivamente. El compuesto más activo para esta forma parasitaria fue BNIPDanon.

En el caso de la forma amastigote intracelular las $IC_{50} \pm SD$ determinadas fueron 2.43 ± 0.19 , 6.03 ± 0.67 , μM , para los siguientes compuestos, BNIPDaoct, BNIPDanon, respectivamente. El compuesto más activo para esta forma parasitaria fue BNIPDaoct.

De acuerdo con los resultados obtenidos todos los compuestos en estudio tienen actividad antiparasitaria que proveen fármacos potenciales para el tratamiento de la leishmaniasis.

Tabla 2. Citotoxicidad de compuestos derivados de bisnaftalimidopropilo en diferentes formas del parásito *Leishmania infantum*

IC ₅₀ (μM)			
Compuestos ^a	Promastigotes	Axénicos de Amastigotes	Amastigote intracelular
BNIPDaoct	≤ 0,39	≥ 50,00	2,43 ± 0,19
BNIPDanon	2,09 ± 0,54	17,42 ± 0,97	6,03 ± 0,67
BNIPDadec	ND	ND	ND
BNIPDadod	ND	ND	ND

5 Citotoxicidad determinada mediante el ensayo de luciferasa. Los resultados fueron obtenidos después del tratamiento de las diferentes formas de parásitos con un rango de diferentes concentraciones del fármaco 0.30 a 100 μM después de 72 h de incubación. Los resultados fueron representativos de la mediana ± SD al menos 5 ensayos. ND: no determinado.

En conclusión, los nuevos derivados bisnaftalimidopropilo muestran citotoxicidad, que puede desarrollar aún más como agentes terapéuticos antitumoral y/o anti-parasitario.

10 Conclusión

El uso de los compuestos de la fórmula V, VI, VII, VIII podría ser una ventaja en el tratamiento de cáncer y enfermedad parasitaria a saber, el tratamiento de la leishmaniasis, tripanosomiasis y la malaria.

15 Para la preparación de las composiciones farmacéuticas con los compuestos de fórmula V, VI, VII, VIII, se mezcla un adyuvante farmacéutico inerte con los compuestos activos. El adyuvante utilizado podría ser sólido o líquido. Las formas sólidas incluyen polvos, pastillas, granulado disperso y cápsulas. El adyuvante sólido puede ser una o más sustancias que podrían ser diluyentes, agentes aromatizantes, edulcorantes, solventes, lubricantes, agentes de suspensión, agentes aglutinantes o agentes disgregantes y podría ser un agente encapsulante.

La preparación farmacéutica se presenta preferentemente en forma de dosis única, el envase contiene cantidades discretas de la preparación en forma de pastillas, cápsulas, polvo en frasco o ampolla y fórmula de liposomas.

20 La dosis podría variar de acuerdo con las necesidades del animal o el paciente, la gravedad de la enfermedad y el compuesto a utilizar. Las determinaciones de la dosis para una situación particular se estiman por los expertos en la materia. Por conveniencia, la dosis diaria total se podría planificar y distribuir la administración durante el día.

Descripción detallada de la invención

Método general para la síntesis de diamina mesitilada

25 La diamina o triamina correspondiente se disolvió en piridina anhidra seguido de la adición de cloruro de mesitileno (exceso 2.1 molar de diamina y exceso 3.1 molar de triamina). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La eliminación de la piridina, seguido por la adición de agua fría resultó en la formación de un precipitado. Este último se separó por filtración y se lavó a fondo con agua. El producto en bruto se recrystalizó a partir de etanol absoluto.

30 N¹,N⁸-Dimesitiloctano 2- (70%), ¹³C NMR (CDCl₃) d: 20.82 (CH₃, Mts), 22.85 (CH₃, Mts), 26.34 (CH₂), 28.70 (CH₂), 29.41 (CH₂), 41.05 (N-CH₂), 47.58 (CH₂), 133 (Carbonos aromáticos, Mts).

N¹,N⁹-Dimesitilnonano 3- (36%), ¹³C NMR (CDCl₃) d : 20.82 (CH₃, Mts), 22.85 (CH₃, Mts), 26.34 (CH₂), 28.70 (CH₂), 29.41 (CH₂), 41.05 (N-CH₂), 47.58 (CH₂), 133 (Carbonos aromáticos, Mts).

35 N¹,N¹⁰-Dimesitildecano 4- (48%), ¹³C NMR (CDCl₃) d : 20.82 (CH₃, Mts), 22.85 (CH₃, Mts), 26.34 (CH₂), 28.70 (CH₂), 29.41 (CH₂), 41.05 (N-CH₂), 47.58 (CH₂), 133 (Carbonos aromáticos, Mts).

Síntesis de O-tosilpropilnaftalimida

Se disolvió el anhídrido naftálico (6.34 g, 0.032 mol) en DMF (50 mL) seguido de la adición de aminopropanol 3 (2.45 g, 0.032 mol) y DBU (4.87 g, 0.032 mol). La solución se dejó en agitación a 85 °C, durante 4 h. El solvente DMF se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se vertió en agua fría con agitación (200 mL) para formar un precipitado. Este último se filtró usando un embudo Buchner y se lavó a fondo con (i) agua, (ii) una solución saturada de bicarbonato. Se encontró que el rendimiento de la reacción fue 95%. Este compuesto, Naftalimidopropanol fue lo suficientemente puro y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. NMR (CDCl₃): δ = 8.65-7.80 (m, 6H, protones aromáticos), 4.39 (t, 2H, -N-CH₂), 3.69 (t, 2H, CH₂-O-), 3.20 (s, amplitud, 1 H, OH), 2.06 (p, 2H, CH₂). ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 161.70 (C=O), 135.70-122.90 (carbonos aromáticos), 74.90, 59.90, 30.90 (3xCH₂).

Se disolvió el naftalimidopropanol (5.10 g, 20 mmol) en piridina anhidra (80 mL). La solución se agitó durante 15 min a 4 °C. Se adicionó cloruro de tosilo (5.72 g, 30 mmol), en pequeñas porciones, durante 30 minutos. La solución se dejó durante la noche a 4 °C y se vertió en agua con hielo (200 mL) para formar un sólido en reposo. El sólido formado se separó por filtración y se lavó a fondo con agua. El producto en bruto se recrystalizó a partir de etanol o acetato de etilo para dar Otosilpropilnaftalimida 6 (53%). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.65-7.80 (m, 6H, protones aromáticos), 4.45 (t, 2H, CH₂), 4.35 (t, 2H, CH₂), 2.50 (s, 3H, CH₃), 2.25 (p, 2H, CH₂). ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 161.30 (C=O), 145.10-123.10 (carbonos aromáticos), 73.10, 67.90, 28.70 (3 x CH₂), 22.10 (CH₃). LRMS (FAB): Calculado para C₁₂H₁₉NO₆S 425.09, Encontrado: 426 [MH]⁺.

Reacción General de N-alkilación (Etapa 1 en el esquema 1)

Se disolvieron las poliaminas mesitiladas (**2-6**) (0.651 mmol) en DMF anhidra (13.5 mL) seguido de la adición de **7** (0.13 mmol) y carbonato de cesio (1.06 g). La solución se dejó a 85 °C y la finalización de la reacción se controló por cromatografía de capa fina. Se eliminó la DMF con vacío y el residuo se vertió en agua fría y el precipitado resultante se filtró y lavó a fondo con agua. Después de secar el producto en bruto se recrystalizó a partir de etanol para dar el producto puro completamente protegido con un alto rendimiento (75-85%).

Reacción de desprotección general (etapa 2 en el esquema 1)

Los derivados de poliamina totalmente protegida (0.222 mmol) se disolvieron en diclorometano anhidro (10 mL), seguido de la adición de ácido bromhídrico/ácido acético glacial (1 mL). La solución se dejó agitar a temperatura ambiente durante 24 h. El precipitado amarillo formado, se separó por filtración y se lavó con diclorometano, acetato de etilo y éter.

Utilizando el proceso descrito y los procesos relacionados, utilizados actualmente por los expertos en la técnica, usando la cadena de alquilo apropiada, se sintetizaron,

- Bisnaftalimidopropildiaminooctano (BNIPDaoct) (85%), DMSO-d₆, δ : 24.43 (CH₂), 25.30 (CH₂), 25.66 (CH₂), 28.07 (CH₂), 44.72 (N-CH₂), 46.60 (N-CH₂), 121.99, 127.13, 130.62, 131.21, 134.31 (Carbonos Aromáticos), 163.61 (C=O). LRMS (FAB): Calculado para C₃₈H₄₂N₄O₄ H 619.3279, Encontrado: 619.3282 [M-H-2Br]⁺.

- Bisnaftalimidapropildiaminononano (BNIPDanon) (85%), DMSO-d₆, δ : 24.88 (CH₂), 25.84 (CH₂), 26.16 (CH₂), 28.76 (CH₂), 45.29 (N-CH₂), 47.29 (N-CH₂), 121.94, 127.51, 131.12, 131.42, 134.76 (Naftalimido Carbonos aromáticos), 164.00 (C=O). LRMS (TAB): Calculado para C₃₉H₄₄N₄O₄ H 633.3435, Encontrado: 633.3440 [M-H-2Br]⁺.

- Bisnaftalimidapropildiaminodecano (BNIPDadec) (75%), DMSO-d₆, δ : 24.97 (CH₂), 25.90 (CH₂), 26.22 (CH₂), 28.79 (CH₂), 29.00 (CH₂), 45.35 (N-CH₂), 47.38 (N-CH₂), 121.05, 127.66, 131.30, 131.51, 134.94 (Carbonos aromáticos Naftalimido), 164.21 (C=O). LRMS (FAB): Calculado para C₄₀H₄₆N₄O₄ H 647.4, Encontrado: 647.4 [M-H-2Br]⁺.

- Bisnaftalimidapropildiaminododecano (BNIPDadod). LRMS (FAB): calc. para C₄₂H₅₀N₄O₄ H 836.71, Encontrado: 675,4 [M-2H-2br]⁺.

Ejemplo 1: Síntesis de BNIPDaoct

La diamina se disolvió en piridina anhidra seguido de la adición de cloruro de mesitileno (exceso 2.1 molar). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La eliminación de la piridina, seguido por la adición de agua fría resultó en la formación de un precipitado. Este último se separó por filtración y se lavó a fondo con agua. El producto en bruto se recrystalizó a partir de etanol absoluto.

N¹,N⁸-Dimesitiloctano 2- (70%), ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 20.82 (CH₃, Mts), 22.85 (CH₃, Mts), 26.34 (CH₂), 28.70 (CH₂), 29.41 (CH₂), 41.05 (N-CH₂), 47.58 (CH₂), 133 (Carbonos aromáticos, Mts).

- El anhídrido naftálico (6.34 g, 0.032 mol) se disolvió en DMF (50 mL) seguido de la adición de aminopropanol 3 (2.45 g, 0.032 mol) y DBU (4.87 g, 0.032 mol). La solución se dejó en agitación a 85 °C, durante 4 h. El solvente DMF se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se vertió en agua fría con agitación (200 mL) para formar un precipitado. Este último se filtró utilizando un embudo Buchner y se lavó a fondo con (i) agua, (ii) una solución saturada de bicarbonato. Se encontró que el rendimiento de la reacción fue 95%. Este compuesto, el Naftalimidopropanol fue lo suficientemente puro y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. NMR (CDCl₃): δ = 8.65-7.80 (m, 6H, protones aromáticos), 4.39 (t, 2H, -N-CH₂), 3.69 (t, 2H, CH₂-O-), 3.20 (s, amplitud, 1 H, OH), 2.06 (p, 2H, CH₂). ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 161.70 (C=O), 135.70-122.90 (carbonos aromáticos), 74.90, 59.90, 30.90 (3xCH₂).
- Se disolvió el naftalimidopropanol (5.10 g, 20 mmol) en piridina anhidra (80 mL). La solución se agitó durante 15 min a 0 °C. Se adicionó cloruro de tosilo (5.72 g, 30 mmol), en pequeñas porciones, durante 30 minutos. La solución se dejó durante la noche a 4 °C y se vertió en agua con hielo (200 mL) para formar un sólido en reposo. El sólido formado se separó por filtración y se lavó a fondo con agua. El producto en bruto se recrystalizó a partir de etanol o acetato de etilo para dar Otosilpropilnaftalimida 6 (53%). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.65-7.80 (m, 6H, protones aromáticos), 4.45 (t, 2H, CH₂), 4.35 (t, 2H, CH₂), 2.50 (s, 3H, CH₃), 2.25 (p, 2H, CH₂). ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 161.30 (C=O), 145.10-123.10 (carbonos aromáticos), 73.10, 67.90, 28.70 (3xCH₂), 22.10 (CH₃). LRMS (FAB): Calculado para C₁₂H₁₉NO₆S 425.09, Encontrado: 426 [MH]⁺.
- Las poliaminas mesitiladas (0.651 mmol) se disolvieron en DMF anhidra (13.5 mL) seguido de la adición de 7x (0.13 mmol) y carbonato de cesio (1.06 g). La solución se dejó a 85 °C y la finalización de la reacción se controló por cromatografía de capa fina. Se eliminó la DMF con vacío y el residuo se vertió en agua fría y el precipitado resultante se filtró y lavó a fondo con agua. Después de secar, el producto en bruto se recrystalizó a partir de etanol para dar el producto puro completamente protegido con un alto rendimiento (75-85%).
- Los derivados de poliamina totalmente protegidos (0.222 mmol) se disolvieron en diclorometano anhidro (10 mL) seguido de la adición de ácido bromhídrico/ácido acético glacial (1 mL). La solución se dejó agitar a temperatura ambiente durante 24 h. El precipitado amarillo formado, se separó por filtración y se lavó con diclorometano, acetato de etilo y éter.
- De esta forma se sintetizó el Bisnaftalimidopropildiaminooctano- (BNIPDaoct) (85%), DMSO-d₆, δ :24.43 (CH₂), 25.30 (CH₂), 25.66 (CH₂), 28.07 (CH₂), 44.72 (N-CH₂), 46.60 (N-CH₂), 127.13, 130.62, 131.21, 134.31 (Carbonos Aromáticos), 163.61 (C=O). LRMS (FAB): Calculado para C₃₈H₄₂N₄O₄H 619.3279, Encontrado: 619.3282 [M-H-2Br]⁺.

Bibliografía

1. Brana, M.F.; Ramos, A., Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents, 2001, 1, 237.
2. Kong Thoo Lin, P.; Pavlov, V. A. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2000, 70, 1609.
3. Pavlov, V. A.; Kong Thoo Lin, P.; Rodilla, V. Chemico-Biological Interactions, 2001, 137, 15.
4. Patten, A.D.; Sun, J-H; Ardecky, R.J. U.S. Patent, 5,086,059, 1992.
5. Brana, M.F.; Castellano, J.M. ; Moran, M.; Perez de Vega, M.J.; Qian, X.D.; Romerdahl, C.A.; Kcilhaucr, G. European Journal of Medicinal Chemistry, 1995,30,235.
6. Bailly, C; Carrasco, C; Joubert, A.; Bal, C; Wattez, N.; Hildebrand, M-P.; Lansiaux, A.; Colson, P.; Houssier, C; Cacho, M.; Ramos, A.; Brana, M.F. Biochemistry, 2003, 42, 4136.
7. Carrasco, C; Joubert, A.; Tardy, C; Maestre, N.; Cacho, M.; Brana, M.F.; Bailly, C. Biochemistry, 2003, 42, 11751.
8. Kong Thoo Lin, P.; Dance, A.M.; Bestwick, C; Milne, L. Biochemical Society Transactions, 2003, 31, 407.
9. Pavlov, V.A.; Rodilla, V.; Kong Thoo Lin, P. Life Sciences, 2002, 71, 1161.
10. Dance, A.M.; Ralton, L.; Fuller, Z.; Milne, L.; Diathie, S.; Bestwick, C. S.; Kong Thoo Lin, P. Biochemical Pharmacology, 2005, 69, 19
11. Tavares, J.; Quaiissi, A.; Kong Thoo Lin, P.; Tomas, A.; Cordeiro-da-Silva, A. International Journal for Parasitology, 2005, 35, 637.

12. Murry, H.W. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45, 2185.
13. Muller, S.; Coombs, G.H.; Walter, R.D. Trends Parasitology, 2001, 17, 242.
14. Fairlamb, A.H.; Cerami, A. Annual Review Microbiology, 1992, 46, 695.
15. Barrett, M.P.; Mottram, J.C.; Coombs, G.H. Trends in Microbiology, 1999, 7, 82.
- 5 16. Thoo Lin, P.K. and. Pavlov, V.A. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 1998, 10, 1609.
17. Roy, G.; Dumas, C; Sereno,D.; Wu5Y.; Singh, A.K.; Tremblay, MJ.; Ouellette, M.; Olivier, M.; and Papadopoulou, B. Molecular and Biochemical Parasitology, 2000, 110, 195.

REIVINDICACIONES

1. Los compuestos derivados de la fórmula A,



caracterizados porque los compuestos se seleccionan de:

- 5 1.
Bisnftalimidopropildiaminooctano - BNIPDaoct (V)
2.
Bisnftalimidopropildiaminononano - BNIPDanon (VI)
3.
10 4. Bisnftalimidopropildiaminodecano - BNIPDadec (VII)
4.
Bisnftalimidopropildiaminododecano - BNIPDadod (VIII)
2. Los compuestos, de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer.
- 15 3. Los compuestos, de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades parasitarias, a saber, la tripanosomiasis, la leishmaniasis y la malaria.
4. Los compuestos, de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento y/o prevención de infecciones, condiciones inducidas por el parásito del género *Leishmania*, incluyendo las especies, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis*, *Trypanosoma* incluyendo las especies, *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. gambiense*, y *Plasmodium*, incluyendo las especies, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*.
- 20 5. Las composiciones farmacéuticas, **caracterizadas porque** comprenden al menos un compuesto de la reivindicación 1, en asociación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptado.
6. Las composiciones farmacéuticas, de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizadas porque** comprenden además una combinación de otro tipo de sustancia activa, además de los compuestos definidos en la reivindicación 1.
- 25 7. Las composiciones farmacéuticas, de acuerdo con la reivindicación 6, en donde las sustancias activas son miltefosina, derivados antimoniales pentavalentes, anfotericina B, pentamidina y sus derivados, melarsoprol, benznidazol, nifurtimox, ketoconazol, difluorometilornitina, cloroquina y sus derivados y la quinina.
8. Las composiciones farmacéuticas, de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 7, para uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer.
- 30 9. Las composiciones farmacéuticas, de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 7, para uso en el tratamiento y/o prevención de las enfermedades parasitarias, a saber, la tripanosomiasis, la leishmaniasis y la malaria.
10. Las composiciones farmacéuticas, de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 6, para su uso en el tratamiento y/o prevención de afecciones parasitarias inducidas por el parásito del género *Leishmania* incluyendo las especies, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis*, *Trypanosoma* incluyendo

las especies, *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. gambiense*, y *Plasmodium*, incluyendo las especies, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*.

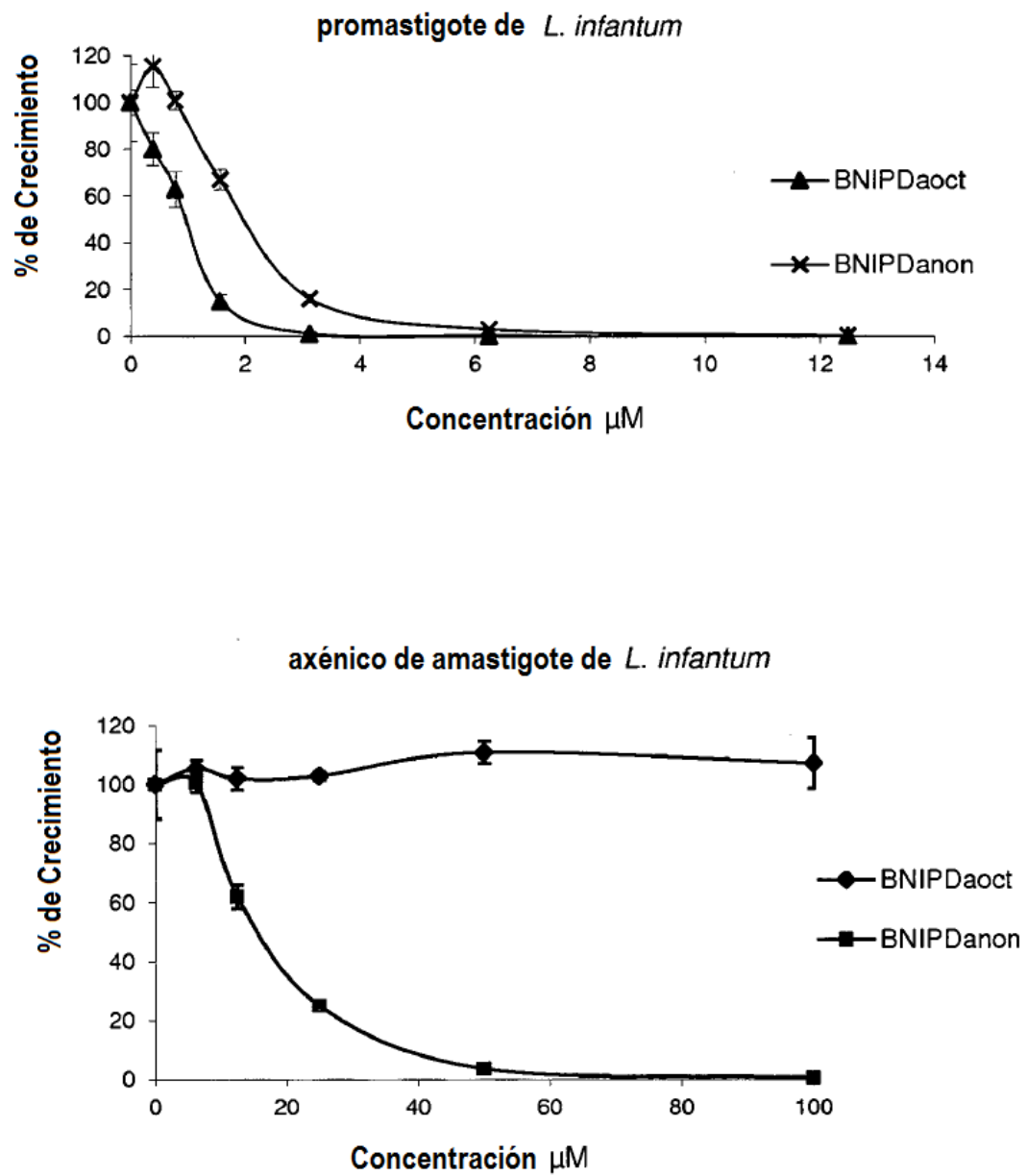


Fig. 1