

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 628**

21 Número de solicitud: 201630944

51 Int. Cl.:

C07C 259/06 (2006.01)

A61K 31/165 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.07.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.04.2017

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
HOSPITAL REAL. C/ HOSPICIO S/N
18071 GRANADA ES**

72 Inventor/es:

**GÓMEZ VIDAL, José Antonio;
DÍAZ GAVILÁN, Mónica;
FRANCO MONTALBÁN, Francisco;
MORILLAS MÁRQUEZ, Francisco;
CORPAS LÓPEZ, Victoriano;
MARTÍN SÁNCHEZ, Joaquina;
LÓPEZ-VIOTA GALLARDO, Margarita y
LÓPEZ-VIOTA GALLARDO, Julián**

54 Título: **COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIOSIS**

57 Resumen:

Compuestos para el tratamiento de la Leishmaniosis. La presente invención se refiere a una familia de compuestos que resultan efectivos frente a parásitos del género Leishmania y que presentan una baja toxicidad incluso a dosis altas del compuesto. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas, preferentemente aptas para administración oral, que comprenden esos compuestos y a su uso como medicamento, preferentemente para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos del género Leishmania.

ES 2 607 628 A1

DESCRIPCIÓN

COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIOSIS

SECTOR DE LA TÉCNICA

5 La presente invención se encuadra en general en el campo de la biomedicina y en particular se refiere a un nuevo compuesto útil como medicamento, preferentemente útil para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos del genero *Leishmania*.

10 **ESTADO DE LA TECNICA**

Leishmaniosis

15 La leishmaniosis es una enfermedad de transmisión vectorial causada por protozoos parásitos del género *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) y transmitidas por la picadura de la hembra de flebotomos (Insecta, Diptera, Phlebotomidae) pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. Es una de las enfermedades más importantes dentro de las enfermedades tropicales y está incluida dentro de las “*Neglected Tropical Diseases*” o enfermedades tropicales olvidadas. A pesar de ello no
20 está limitada a zonas tropicales y subtropicales, y se da también con carácter endémico en zonas templadas como nuestro país. El espectro clínico de la leishmaniosis es amplio y abarca desde una forma cutánea estricta que puede curar de forma espontánea dejando cicatriz, hasta una forma grave y mortal sin tratamiento como es la leishmaniosis visceral. Según la Organización Mundial de la Salud, hasta
25 350 millones de personas se encuentran en riesgo de padecer leishmaniosis en 98 países de zonas templadas y tropicales del planeta. Se considera que aproximadamente 12 millones de personas están actualmente infectadas, y cada año se producen 2 millones de casos nuevos, de los cuales 500.000 casos son de tipo visceral.

30 Las especies de *Leishmania* muestran dos fases morfológicas durante su ciclo de vida:

- Promastigote, con forma alargada y móvil con un flagelo anterior, en el intestino del vector.
- Amastigote, con forma esférica u ovoide y sin flagelo visible al microscopio
35 óptico, que se reproduce de forma obligada dentro de las células del sistema retículo endotelial del hospedador vertebrado (hombre y diversas especies de animales en función de la especie de *Leishmania*).

De la veintena de especies responsables de la leishmaniosis, únicamente dos, *L. donovani* y *L. infantum* (sinónimo *L. chagasi*) causan leishmaniosis visceral. *L. infantum* es la única especie identificada que causa tanto la enfermedad visceral como la cutánea. Además, también se ha identificado como agente causal de leishmaniosis cutáneo-mucosa y mucosa. Mientras en la leishmaniosis visceral el parásito prolifera en la médula ósea, el hígado y el bazo, órganos en los que abundan las células del sistema retículo endotelial, en la forma cutánea el parásito permanece en el sitio de picadura del flebotomo, lo que puede causar úlceras de larga duración que terminan por dejar cicatrices desfigurantes. Como decíamos anteriormente, la enfermedad en su forma visceral es mortal si no es tratada correctamente. *L. infantum* es la especie con distribución más amplia estando presente en 61 de los 98 países endémicos de leishmaniosis. *L. infantum* es endémica en todos los países de la Cuenca Mediterránea. A diferencia de *L. donovani*, la leishmaniosis debida a *L. infantum* es una zoonosis, siendo el principal reservorio el perro. En España, la prevalencia de leishmaniosis canina en muestreos aleatorios usando técnicas serológicas, varía entre el 5 y 30%, y pueden alcanzar valores del 100% en algunos focos si se usa la técnica de PCR [Martín-Sánchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Barón S, Díaz V, Morillas-Márquez F. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. Emerg Infect Dis. 2009 May;15(5):795-8. doi: 10.3201/eid1505.080969]. Estas elevadas prevalencias de infección son un considerable factor de riesgo para la emergencia de la enfermedad en humanos. En el perro, *L. infantum* causa la leishmaniosis canina que es un síndrome multisistémico de muy difícil curación por la falta de colaboración del sistema inmune del animal. Hasta ahora, ninguno de los fármacos utilizados para el tratamiento de la leishmaniosis canina (que son los mismos usados en el hombre) permite la eliminación completa del parásito en el animal. En España puede haber entre 6 y 13 millones de perros. Aunque las prevalencias de leishmaniosis canina varían entre regiones y según la técnica empleada, podemos estimar que el 30% de ellos están infectados; esto nos daría 2,8 millones de perros con leishmaniosis canina como potenciales receptores de fármacos frente a la leishmaniosis, sólo en España. A ellos habría que sumar los existentes en otros países endémicos como Portugal, Francia, Italia, Brasil, etc., además de otros no endémicos. Por ejemplo, en Alemania, a pesar de no ser un país endémico de leishmaniosis, se estima que hay 20.000 perros con leishmaniosis canina adquirida durante las vacaciones en los países de la Cuenca Mediterránea que serían también potenciales receptores.

Tratamiento de la Leishmaniosis

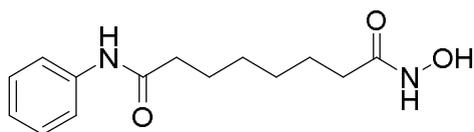
Los fármacos actualmente utilizados para el tratamiento de la leishmaniosis presentan diversos problemas, incluida la toxicidad para el hospedador, los efectos adversos, la aparición de resistencias y el elevado coste. Entre ellos, los derivados de antimonio pentavalente, como antimoniato de meglumina o metilglucamina antimoniato (Glucantime®) han sido considerados de primera elección durante un largo periodo de tiempo, a pesar de su elevada toxicidad. No obstante, el antimoniato de meglumina no es apto para administración oral dado que se absorbe mal y es sumamente irritante para el tracto gastrointestinal, por lo que hay que administrarlo por vía parenteral o por inyección local.

La pentamidina, la anfotericina B y la paromomicina han sido considerados como fármacos de segunda elección, aunque últimamente la anfotericina B liposomal está sustituyendo a los derivados del antimonio como fármaco de elección en algunas zonas geográficas. No obstante, la pentamidina y la anfotericina B tienen una toxicidad elevada que se consigue reducir con las formulaciones lipídicas de ésta última pero elevando considerablemente el precio. Por otro lado, la paromomicina tampoco se absorbe por vía oral, por lo que debe administrarse por vía parenteral o por vía tópica; se excreta por el riñón sin metabolizarse e induce nefrotoxicidad y ototoxicidad, al igual que otros aminoglucósidos [Ramos, J. y Segovia, M. - Revista española de Quimioterapia, 1997. p 26].

El último fármaco incorporado al arsenal terapéutico de la leishmaniosis es la miltefosina que concebida inicialmente como fármaco antineoplásico tiene la ventaja de permitir una administración oral pero no está exenta de toxicidad, tiene problemas de resistencias [Mondelaers A, y otros. "Genomic and Molecular Characterization of Miltefosine Resistance in *Leishmania infantum* Strains with Either Natural or Acquired Resistance through Experimental Selection of Intracellular Amastigotes". PLoS One. 2016 Apr 28;11(4):e0154101. doi: 10.1371/journal.pone.0154101], provoca efectos adversos gastrointestinales además de ser potencialmente teratogénico y abortivo.

Inhibidores de HDAC con actividad frente a la Leishmaniosis

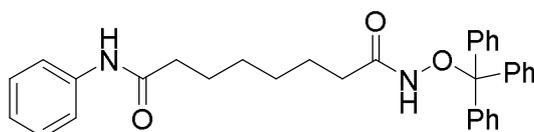
El fármaco vorinostat (también denominado SAHA) (Fórmula I) es un inhibidor de histonas desacetilasas (HDAC) que posee actividad frente a *Leishmania* [9, 10].



I

Vorinostat presenta como principal desventaja su toxicidad a concentraciones elevadas

- 5 Por otra parte, la patente ES 2 402 252, solicitada por la Universidad de Granada, describe una estructura con fórmula II que posee actividad frente a *Leishmania*.



II

- 10 Al igual que ocurre con antimonio de meglumina, el compuesto II no es apto para administración oral ya que no es químicamente estable a pH bajo. El grupo químico tritilo, presente en el compuesto II, es un conocido grupo protector inestable a pH ácido (4 y menor).

- 15 Existe pues la necesidad de encontrar un medicamento para el tratamiento de la infección por *Leishmania*, que solucione los problemas descritos en el estado de la técnica, especialmente que aporte una mayor eficacia en la eliminación del parásito, menor toxicidad y efectos adversos para el paciente (hospedador) y que permita la posibilidad de administración oral.

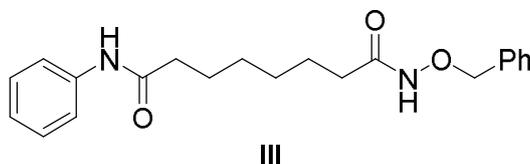
- 20 Además, el uso de sistemas de vehiculización y liberación tales como nanopartículas puede resolver problemas de solubilidad de compuestos de naturaleza hidrofóbica cuya utilización *in vivo* sería inviable, además de mejorar la eficacia y disminuir efectos adversos.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una familia de compuestos efectivos frente a parásitos del género *Leishmania* que presentan una baja toxicidad incluso a dosis altas del compuesto.

30

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al compuesto de fórmula III:



5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al compuesto de fórmula III según se ha descrito anteriormente y excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al compuesto de fórmula III soportado sobre nanopartículas farmacéuticamente aceptables, preferentemente nanopartículas de oro.

10 En un tercer aspecto la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula III o de las composiciones farmacéuticas que lo comprenden como medicamento. De forma particular la invención se refiere a su uso para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos del género *Leishmania*, preferentemente *L. infantum*.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Esquema de síntesis del compuesto III.

20 **Figura 2.-** Imagen obtenida por microscopía de las nanopartículas. En la imagen superior se observan sólo los núcleos de oro sin compuesto; en la inferior, las nanopartículas están vehiculizando el compuesto y se observa una corona alrededor de los núcleos de oro que casi duplica el tamaño hidrodinámico de las partículas de la imagen superior.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

30 El término "nanopartículas" como se describe en la presente invención se refiere a partículas de menos de 1 micrómetro en alguna de sus dimensiones, preferentemente en un rango de 10 a 900 nanómetros.

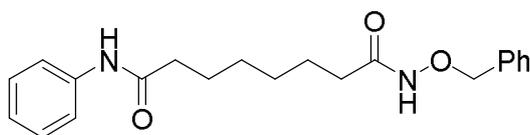
El término "tratamiento" o "tratar" en el contexto de este documento se refiere a la administración de un compuesto o una composición según la invención para mejorar o eliminar una enfermedad, condición patológica o uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad o condición en un mamífero, preferentemente en cánidos o humanos, más preferentemente en perros. "Tratamiento" también abarca la mejora o eliminación de las secuelas fisiológicas de la enfermedad. Concretamente, el concepto "tratar" se puede interpretar como:

- i. Inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- ii. Aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causa la regresión de la enfermedad o la condición patológica;
- iii. Estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones el término "comprende", que también podrá interpretarse como "consiste en", y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

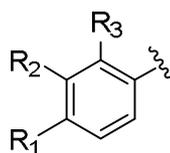
Compuestos de la invención

En un primer aspecto de la invención, la presente invención se refiere a compuestos ("compuestos de la invención"), de fórmula III



III

Donde Ph es un fenilo de fórmula:



Ph

Siendo:

R1 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO₂.

R2 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO₂

R3 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO₂

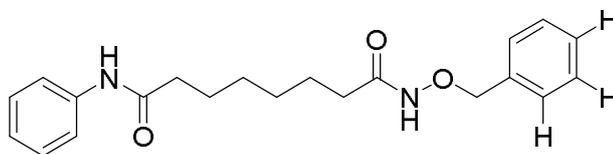
5 En una realización particular, los compuestos de la invención se presentan en forma cristalina como compuestos libres o solvatados (por ejemplo hidratos) o como enantiómeros, isómeros, o sales de dichos compuestos estando todas estas formas comprendidas en el ámbito de protección de la presente invención. Los métodos de solvatación son generalmente conocidos en el estado de la técnica.

10 También quedan comprendidos en el ámbito de la presente invención los profármacos de los compuestos de la invención.

15 En una realización particular los compuestos de la invención son compuestos de fórmula III caracterizados por que R1=H o R2=H o R3=H.

20 En una realización aún más particular, los compuestos de la invención son compuestos de fórmula III caracterizados porque al menos dos de los tres radicales del fenilo están formados por hidrógeno. Es decir, compuestos de fórmula III caracterizados por que R1=R2=H o R1=R3=H o R2=R3=H.

25 En una realización preferente, la invención se refiere a compuestos de fórmula IIIa consistentes en compuestos de fórmula III caracterizados por que los tres radicales del fenilo están formados por hidrógeno. Es decir, compuestos de fórmula III caracterizados por que R1=H, R2=H y R3=H.



IIIa

Composiciones farmacéuticas

30 En un segundo aspecto, la invención proporciona formulaciones o composiciones farmacéuticas, en adelante "formulaciones de la invención" o "composiciones de la invención" que comprenden como ingrediente activo al menos un compuesto de la invención, en particular un compuesto de los detallados en las realizaciones preferidas

del primer aspecto de la invención. Dichas formulaciones puede contener cualquier otro ingrediente activo en el tratamiento de leishmaniosis o bien caracterizarse por contener como principio activo únicamente un compuesto de la invención o una combinación de compuestos de la invención.

5

Los compuestos de la invención, **III**, por su naturaleza hidrofóbica, hace que sea inviable su utilización in vivo a menos que esté vehiculizado. En particular, el compuesto **III** en medio acuoso agrega rápidamente, imposibilitando su administración parenteral.

10

Así, dichas formulaciones farmacéuticas comprenden uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en las formulaciones de la invención son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas. Un ejemplo de vehículo farmacéuticamente aceptable es una nanopartícula de oro con un tamaño adecuado para su administración.

Opcionalmente la composición farmacéutica puede comprender otro principio activo. Además del requerimiento de la eficacia terapéutica, que puede necesitar el uso de agentes terapéuticos, además de los compuestos de la invención, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso de una combinación de un compuesto de la invención y otro agente terapéutico, tal y como en el tratamiento de enfermedades o afecciones que directa o indirectamente modulan la función de la sustancia.

Las formulaciones pueden contener además excipientes.

Los excipientes y los vehículos empleados tienen que ser farmacéutica y farmacológicamente tolerables, de modo que puedan ser combinados con otros componentes de la formulación o preparación y no ejerzan efectos adversos en el organismo tratado. Las composiciones farmacéuticas o formulaciones incluyen aquellas que son adecuadas para la administración oral o parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), aunque la mejor vía de administración depende del estado del paciente. Las formulaciones pueden ser en

35

forma de dosis sencillas. Las formulaciones se preparan de acuerdo con métodos conocidos en el campo de la farmacología. Las cantidades de sustancias activas para administrarse pueden variar en función de las particularidades de la terapia.

- 5 Las composiciones de la invención se preparan utilizando métodos habituales tales como aquéllos descritos o a los que se hace referencia en las Farmacopeas Española y Estadounidense y textos de referencia similares.

Formulación en nanopartículas

10

En una realización preferente de las composiciones de la invención el compuesto de la invención, **III**, está soportado sobre nanopartículas farmacéuticamente aceptables, más preferentemente sobre nanopartículas de oro.

15

En una realización particular, las nanopartículas de oro empleadas como vehículos transportadores del compuesto de la invención están recubiertas por citrato sódico.

20

En otra realización particular las nanopartículas de oro empleadas como vehículos transportadores del compuesto de la invención tienen un tamaño aproximado de entre 20 y 30 nm, preferentemente entre 22 y 26 nm.

El compuesto **III** así funcionalizado ha demostrado tener unas características de solubilidad mucho mejores que el compuesto solo, sin que su efectividad disminuya.

25

Uso de los compuestos de la invención

30

Un tercer aspecto de la invención consiste en el uso de los compuestos o composiciones de la invención como medicamento. En una realización particular, los compuestos o composiciones de la invención se emplean como medicamento para el tratamiento del Leishmaniosis, preferentemente Leishmaniosis causada por *L. infantum*.

35

De forma similar, la invención también se dirige al uso de los compuestos o composiciones de la invención en la elaboración de un medicamento. En una realización particular, los compuestos o composiciones de la invención se emplean en

la elaboración de un medicamento para el tratamiento del Leishmaniosis, preferentemente Leishmaniosis causada por *L. infantum*.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de pacientes afectados por Leishmaniosis mediante el uso de los compuestos o las composiciones de la invención. Los efectos de este método de tratamiento incluyen, pero no se limitan, a los efectos de eliminación de la enfermedad, el incremento del tiempo de progresión de la enfermedad y al índice de supervivencia. Los efectos del tratamiento incluyen a más largo plazo el control de la enfermedad.

10

Este tratamiento consiste en la administración a los individuos afectados por estas enfermedades de cantidades terapéuticamente efectivas de un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que lo incluya.

15

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a aquella cantidad de un compuesto de la invención que cuando se administra a un mamífero, preferentemente cánidos y humanos, más preferentemente perros, es suficiente para producir el tratamiento, tal como se define más abajo, de una enfermedad o condición patológica de interés en el mamífero, con preferencia cánidos y humanos, más preferentemente perros. La cantidad de un compuesto de la invención que constituye una cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la actividad del compuesto específico empleado; la estabilidad metabólica y duración de la acción del compuesto; la especie (preferentemente humana o canina), la forma clínica de la enfermedad humana (preferentemente visceral, cutánea o mucosa), la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; la vía de administración, dada la posibilidad de administración oral o sistémica; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la condición patológica particulares; y el sujeto que se somete a terapia, pero puede ser determinada por un

20

25

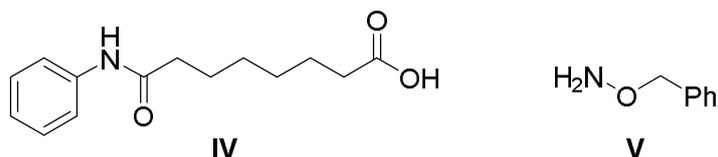
30

La administración de los compuestos de la invención, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada, se puede llevar a cabo por medio de los modos de administración de agentes aceptados para servir a similares utilidades.

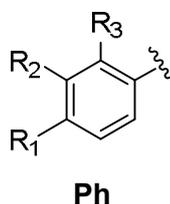
35

Procedimiento de síntesis de los compuestos de la invención

El procedimiento empleado para sintetizar los compuestos de la invención comprende [Figura 1] hacer reaccionar en una disolución un ácido de fórmula **IV**, con bencilhidroxil amina de fórmula **V**.



Donde Ph es un fenilo de fórmula



Siendo:

R1 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO2

R2 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO2

R3 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO2

Preferentemente la disolución se realizará en metanol/THF anhidro manteniendo la reacción en atmosfera de argón.

En una realización preferente, el compuesto de fórmula general **III** se obtiene a partir de una disolución con el derivado del ácido carboxílico de fórmula general **IV** (1 equiv.) cloroformiato de etilo (1.35 equiv.), trietilamina(3.5 equiv.) y bencilhidroxil amina (1.7 equiv.) en THF/metanol. La reacción debe mantenerse a 0° C y atmosfera de argón.

Funcionalización de III con nanopartículas de oro

En una realización preferente, las composiciones de la invención comprende el compuesto **III** funcionalizado con nanopartículas de oro.

Para llevar a cabo la funcionalización de las partículas de oro con el compuesto **III**, se

añade gota a gota la suspensión de partículas de oro a la solución del compuesto en dimetilsulfóxido (DMSO), preferentemente al 0.5%, y Triton X100, preferentemente al 0.1%. A continuación, la suspensión obtenida se añade gota a gota sobre una solución de

5 Tras una incubación durante al menos 2 horas, se concentran las partículas por centrifugación y se resuspenden en tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (Phosphate Buffered Saline o PBS) pH 7.2.

10 MODOS DE REALIZACIÓN

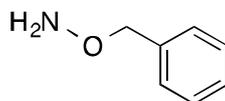
Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención:

15 Ejemplo de síntesis de compuestos de la invención

El compuesto O-bencilhidroxamato, **IIIa**, fue obtenido según un esquema de reacción (Figura 1) que deriva del procedimiento para síntesis de ácidos hidroxámicos. Así, el compuesto de fórmula **IIIa** se obtiene a partir de una disolución con el derivado del

20 ácido carboxílico de fórmula **IV** (1 equiv.), en THF anhidro bajo argón. La solución se enfría y se adiciona el cloroformiato de etilo (1.35 equiv.) seguido de trietilamina (3.5 equiv.). La mezcla se agita a baja temperatura en atmósfera de argón. El sólido precipitado obtenido se filtra y el líquido filtrado se adiciona a una disolución que contiene el compuesto de fórmula **Va** (1.7 equiv.) disuelto en metanol anhidro.

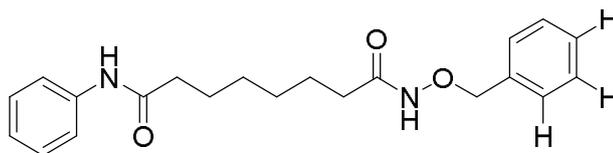
25



Va

Se mantiene en agitación durante 1.5 h a temperatura ambiente, tiempo tras el cual la reacción se diluye con acetato de etilo y se realiza un lavado con agua destilada (3x 15

30 mL). La fase orgánica resultante se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash utilizando una mezcla de diclorometano y metanol como eluyente para obtener **IIIa** (sólido blanco, 28 mg, 40% rendimiento).

**IIIa**

- 5 Mp 130-131 °C. ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 7.54 (m, 2H), 7.33-7.25 (m, 7H), 7.08 (m, 1H), 4.75 (s, 2H), 2.52 (m, 2H), 2.36 (m, 2H), 1.70-1.65 (m, 4H), 1.41 (m, 4H); ¹³C RMN (125 MHz, CD₃OD) δ 176.1, 174.6, 139.9, 138.0, 129.7, 129.5, 129.3, 128.5, 125.1, 121.3, 52.9, 37.9, 33.1, 30.1, 30.0, 26.8, 25.8; HRMS (ESI) m/z calculado para C₂₁H₂₇N₂O₃ [M + H]⁺ 355.2022, encontrado 355.2025. Pureza según HPLC (λ=254): 100%, tR= 11.14 min.
- 10 Método HPLC: Solución A (H₂O:ACN 70:30 + 0.1% HCOOH), solución B (ACN 100% + 0.1% HCOOH); solución isocrática A 2 min.; gradiente desde A a B 13 min; solución isocrática B 5 min.

15 **Conservación de los compuestos**

El compuesto **IIIa** se puede conservar a 4°C durante al menos 6 meses sin que se produzcan cambios aparentes en sus características físico-químicas ni pérdidas de actividad.

- 20 Por otro lado, el compuesto **IIIa** es químicamente estable a pH 2 y pH 5, lo que permite su administración oral.

Síntesis de partículas inorgánicas de oro-fármaco del compuesto IIIa

- 25 Inicialmente, las nanopartículas de oro fueron sintetizadas de acuerdo con el método descrito por Turkevich [J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, Discuss. Trans. Faraday Soc. 11 (1951) 55], basado en la reducción de sales de oro en presencia de citrato a altas temperaturas.
- 30 De acuerdo con el mismo, se preparó una solución de 4.5mg de tetracloroaurato (III) sódico dihidratado en un volumen de 25 mL. Bajo agitación magnética constante se sometió a la solución a temperatura de 180 °C bajo reflujo. Alcanzada esta condición, se añadió a la solución de oro, 1mL de una solución al 1% de citrato de sodio. Se dejó crecer a las partículas en presencia de los iones citrato durante un tiempo nunca inferior a 20

minutos. Posteriormente se dejó que la suspensión de partículas alcanzase temperatura ambiente antes de ser empleada. El resultado es una suspensión estable de partículas de oro, de color rojo vino.

5 Para llevar a cabo la funcionalización de las partículas de oro con el compuesto **IIIa**, en primer lugar se disolvió el compuesto a una concentración 0.25 % en una solución compuesta por Dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.5 % y Triton X100 al 0.1 %. Una vez disuelto el compuesto **IIIa** se le añade gota a gota 20 mL de suspensión de partículas de oro. Inmediatamente después, se añade gota a gota la suspensión de partículas de oro
10 funcionalizadas con el compuesto **IIIa** sobre una solución al 1 % de BSA. Se deja incubar durante un mínimo de 2 horas en presencia de BSA, y seguidamente después, se centrifuga a 14000 rpm para eliminar el exceso de BSA presente en el medio de las partículas conjugadas. Una vez centrifugadas las partículas, se retira el sobrenadante y se resuspenden en PBS pH 7.2 previo a su utilización.

15 Se ha comprobado que las suspensiones iniciales que tienen un color rosáceo, tienden a cambiar de color hacia el azul, cuando el volumen en el que se resuspenden las partículas es bajo. Por esta razón, con el fin de evitar la agregación de las partículas, se procede a resuspender en volúmenes superiores a 5 mL.

20 Mediante medidas realizadas por técnicas de dispersión de luz (*dynamyclightscattering*) y por microfotografías obtenidas por Microscopía de Transmisión de electrones como las mostradas en la imagen inferior, se ha determinado un tamaño aproximado para las partículas de oro empleadas como vehículos transportadores del fármaco **IIIa**, de (24 ± 2)
25 nm. La presencia de **IIIa** y BSA se observa claramente mediante técnicas de dispersión de luz, como una corona alrededor de los núcleos de oro, llegando a duplicarse el tamaño hidrodinámico de las partículas (47 ± 8) nm [Figura 2]. Las suspensiones tienen un color rosáceo.

30 La adsorción del fármaco **IIIa** sobre la superficie de las partículas de oro, muestra cambios en la carga eléctrica superficial de las partículas de oro. Las partículas de oro a pH fisiológico muestra carga eléctrica superficial (-36 ± 7) mV, mientras que las partículas de oro recubiertas de **IIIa** y BSA en las mismas condiciones de pH, muestran una carga eléctrica superficial de (-10 ± 4) mV. Desde el punto de vista electrocinético, cualquier
35 diferencia determinada sobre la carga eléctrica superficial es atribuida a la adsorción de cualquier ente sobre la superficie de las partículas, en este caso, el fármaco **IIIa** y la BSA.

Ejemplos de ensayos con los compuestos de la invención**Materiales y métodos**

5

Para llevar a cabo los ensayos *in vitro* e *in vivo* que se describen a continuación se ha utilizado como modelo el parásito *L. infantum*.

10

Los ensayos para la obtención de CC_{50} se han realizado sobre macrófagos derivados de médula ósea de ratones (BMDM) y sobre fibroblastos de ratón L929. Los ensayos *in vivo* se han realizado en ratones. Ambos, se explican a continuación.

Evaluación in vitro: Ensayos in vitro en amastigotes intracelulares

15

Para ensayar el porcentaje de infección por *L. infantum* se utilizaron macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de ratones tipo Swiss ICR (CD-1). Estas células se extrajeron conforme a lo establecido por [Zamboni, D, S.;Rabinovitch, M. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect. Immun.* **2003**, 71(3), 1225-1233]. Los BMDM se cultivaron sobre cubreobjetos en pocillos de placas de microtitulación de 24 pocillos, a una concentración de 4×10^5 BMDM en cada pocillo conteniendo medio RPMI-1640 con suero bovino fetal (FCS) al 10% y 5% de

20

medio de células L929. Las placas con BMDM se dejaron toda la noche a una temperatura de 37°C a 5% de CO₂ para que las células se adhieran. Las infecciones se realizaron conforme a lo establecido por [Zauli-Nascimento, R C., Miguel, D. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K.; Pereira, L. I., Pelli de Oliveira, M. A., Ribeiro-Dias, F., Doria, M. L. Uliana, S. R. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop. Med. Int. Health* **2010** 15(1) 68-76]

25

ajustadas a la proporción de 5 promastigotes en fase estacionaria de *L. infantum* por cada macrófago. Los promastigotes se adicionaron a los pocillos manteniéndolos durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ en RPMI-1640 con 10% de FCS. Pasado este tiempo el medio se retiró y los macrófagos se lavaron con medio RPMI-1640 para eliminar los

30

promastigotes.

Se adicionó un nuevo medio RPMI-1640 enriquecido con 10% SBF y 5% de medio condicionado de células L929 y que contuviera el fármaco en sus distintas concentraciones. Tras 48 h de incubación a 37°C, 5% CO₂, los cubres se fijaron con metanol y tiñeron con Giemsa 20%. Se contaron 200 macrófagos distribuidos por todos

los campos del cubre y se calculó el porcentaje de macrófagos infectados y no infectados. Se consideraron como infectados los macrófagos que contuvieran al menos un amastigote. Cada experimento se realizó por triplicado. Tras el tratamiento a diversas concentraciones de cada compuesto, la respuesta observada en forma de % de infección se convierte en % de reducción de infección. Por último se realiza un análisis de regresión lineal múltiple (software SPSS 150) para calcular la CI50 (concentración del compuesto que reduce al 50% la carga parasitaria) y CC50 (concentración del compuesto que mata al 50% de las células de mamífero) del producto evaluado. La actividad del compuesto **IIIa** frente al parásito responde a un patrón de doble inversa con la siguiente fórmula: $RP = 1/(0.0118124 + 0.00044687/C)$ ($R^2=97\%$), donde RP es la reducción en el porcentaje de infección y C es la concentración del compuesto **IIIa**.

Los resultados obtenidos para el compuesto **IIIa** se muestran en la Tabla 1, tras su evaluación in vitro frente a *L. infantum* intracelular (CI50) y su citotoxicidad en células de mamíferos (CC50). Como control se utilizaron los fármacos vorinostat (**I**), pentamidina (PI) y antimonio de meglumina (MA) o Glucantime®.

Compuesto	CI ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM) ^a	CC ₅₀ (µM) ^b
II	3.21±1.8	>100	>100
IIIa	0.69 ± 0.1	>100	>100
Vorinostat (I)	6.3 ± 3,8	5-20	NR ^c
PI	1.50 ± 0.1	5-20	6.08 ± 0.2
MA	144.40 ± 41.0	200-500	273.08 ± 12.2

Tabla 1. CI₅₀ y CC₅₀ del compuesto **IIIa**: Actividad frente a amastigotes de *L. infantum* en macrófagos y citotoxicidad en células de mamífero.

(a) CC₅₀ sobre macrófagos derivados de médula ósea de ratones (BMDM)

(b) CC₅₀ sobre fibroblastos de ratón L929

(c) NR: No realizado

Eficacia y toxicidad in vitro

El compuesto **IIIa** mostró una CI50 frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* aproximadamente 5 veces superior a la del compuesto (**II**) y mostrando, además, una actividad superior a los fármacos utilizados como control. Este hecho unido a su baja citotoxicidad (CC50 >100 µM), le confiere un índice de selectividad mayor a 100. Al igual que el compuesto **II**, el compuesto **IIIa** no mostró actividad frente a promastigotes de *L. infantum* en el rango de concentraciones 1- 100 µM.

Evaluación in vivo: Evaluación de la actividad in vivo del fármaco (IIIa) en un

modelo animal infectado con *L. infantum*

Toxicidad subaguda in vivo

El compuesto (**IIIa**) vehiculizado sobre nanopartículas de oro se administró a un grupo de 10 ratones Swiss ICR (CD-1) de 6 semanas de edad a una dosis de 500 mg/kg/día durante 10 días. Finalizado el tratamiento, se realizó una observación adicional de los animales durante dos semanas. Se evaluó la aparición de signos de dolor, sufrimiento, diarrea, pérdida de peso, hepato o esplenomegalia. Durante el tratamiento y posterior seguimiento, ningún animal murió ni apareció ninguno de los signos anteriormente indicados, lo que indica que el compuesto carece de toxicidad aguda o subaguda (dosis letal 50% (DL50) >500 mg/kg).

Procedimiento de infección y tratamiento

Se infectaron 35 ratones Balb/c hembra de 6 semanas de edad con 10 millones de promastigotes de *L. infantum* en fase estacionaria de crecimiento por vía intraperitoneal en un volumen de 0,4 mL de solución salina isotónica. Tras 28 días post-infección, los animales se dividieron en cinco grupos de 7 ratones cada uno que se sometieron a diferentes tratamientos diarios por vía intraperitoneal durante 10 días.

Los tratamientos utilizados in vivo son los siguientes:

- Grupo control tratado con nanopartículas de oro sin fármaco; grupo tratado con compuesto (**IIIa**) a 10 mg/kg;
- Grupo tratado con compuesto (**IIIa**) vehiculizado en nanopartículas de oro a 25 mg/kg;
- Grupo control de referencia tratado con antimonio de meglumina a 104 mg SbV/kg;
- Grupo tratado con una combinación de antimonio de meglumina a 104 mg SbV/kg y compuesto (**IIIa**) vehiculizado en nanopartículas de oro a 10 mg/kg.

Para la cuantificación de la carga parasitaria en los órganos de los ratones sacrificados tras el tratamiento, se pesan 20 mg de tejido se homogeniza y se extrae el ADN con un kit comercial adecuado, quedando éste resuspendido en un volumen de 20 microL. A continuación se realiza una PCR cuantitativa (a tiempo real). Esta PCR utiliza sondas TaqMan y es específica de *L. infantum*. Se calcula el número de parásitos presentes en cada muestra interpolando el Ct obtenido en una curva patrón previamente establecida usando diluciones seriadas de parásitos. A partir del número de parásitos presentes en la muestra y conociendo el peso del órgano utilizado para la extracción del ADN, se estima el número de parásitos/mg de órgano.

Resultados obtenidos *in vivo*

El compuesto **IIIa** vehiculado en nanopartículas de oro resultó muy eficaz a 25 mg/kg, reduciendo las cargas parasitarias en un 99% en hígado y un 93% en bazo, frente a la reducciones del 83% en hígado y 52% en bazo utilizando como fármaco control el antimonioato de meglumina.

En la Tabla 2 se muestra una comparación, en términos de reducción de carga parasitaria, de los compuestos **II** y **IIIa**, ambos vehiculizados en nanopartículas de oro.

	Compuesto II	Compuesto IIIa	MA
Reducción de la carga parasitaria en bazo	96 %	93 %	52 %
Reducción de la carga parasitaria en hígado	68 %	99 %	83 %

Tabla 2. Reducción en el porcentaje de infección por *L. infantum* con respecto al control sin tratamiento tras 14 días de tratamiento a una dosis de 25 mg/kg/día del compuesto **II** o 10 días de tratamiento a la misma dosis del compuesto **IIIa**. La dosis de antimonioato de meglumina (MA) fue de 390 mg/kg (equivalente a 104 mg/kg/día de antimonio SbV) y el tratamiento duró 14 días.

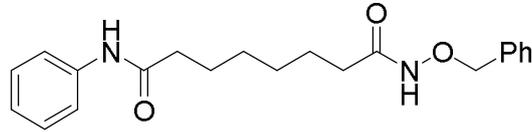
Evaluación de la toxicidad en animales infectados

En el tratamiento con el compuesto **IIIa** de los animales infectados experimentalmente con *L. infantum* no se observaron efectos adversos gastrointestinales, pérdida de peso, dolor u otros síntomas generales. Tampoco se observaron alteraciones en los valores bioquímicos y enzimáticos evaluados en suero o sangre, como transaminasas (GPT y GOT), urea, fosfatasa alcalina y creatinina. Tampoco se encontró hepato o esplenomegalia asociadas al tratamiento. Por tanto, el fármaco tampoco muestra toxicidad en ratones infectados.

El compuesto **IIIa** ha resultado ser un potente fármaco frente a los amastigotes de *L. infantum* siendo la actividad dosis dependiente. Existe una relación positiva entre la concentración administrada y el porcentaje de reducción de la infección encontrado. Además, no ha mostrado a las dosis evaluadas actividad sobre la forma promastigote. La dosis a la que se evidencian efectos citotóxicos es muy superior a la dosis antiparasitaria. El índice de selectividad es también superior al encontrado para pentamidina isetianato (IS = 4) y la meglumina antimonioato (IS = 2) que constituyen los fármacos control (fármacos habitualmente utilizados en el tratamiento de la leishmaniosis).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general III



III

5

así como compuestos racémicos, estereoisómeros, sales o solvatos del mismo; donde Ph es un fenilo de fórmula



Ph

10

Y donde

R1 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO2.

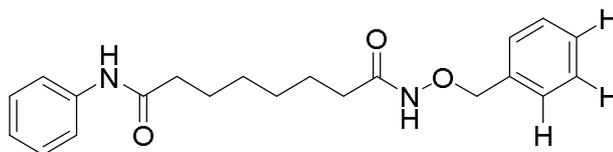
R2 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO2

R3 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO2

15

2. Compuesto según reivindicación anterior caracterizado por que R1=H o R2=H o R3=H.
3. Compuesto según reivindicación anterior caracterizado porque al menos dos de los tres radicales del fenilo están formados por hidrógeno
4. Compuesto según reivindicación anterior caracterizado por que R1=H, R2=H y R3=H (Compuesto IIIa).

25



IIIa

- 5 5. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como principio activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 6. Composición farmacéutica que comprende como único principio activo un compuesto, o una combinación de compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, junto un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 7. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 caracterizado porque los compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 están funcionalizados en nanopartículas de oro.
- 20 8. Composición según reivindicación anterior caracterizada porque las nanopartículas de oro están compuestas por núcleo de oro y recubrimiento con citrato sódico.
- 25 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 caracterizada porque las nanopartículas tienen un diámetro de entre 20 y 30 nm, preferentemente entre 22 y 26 nm.
- 30 10. Composición según reivindicaciones 5 a 9 apta para administración oral.
- 35 11. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 para la elaboración de un medicamento
12. Uso según la reivindicación anterior para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de Leishmaniosis.
13. Uso según la reivindicación anterior caracterizado por que la Leishmaniosis está causada por *L. Infantum*.

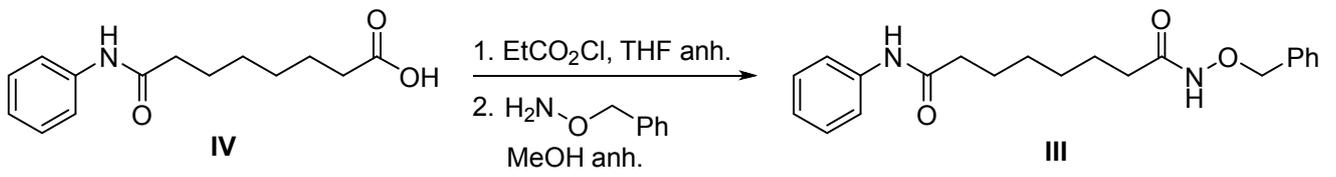


Figura 1

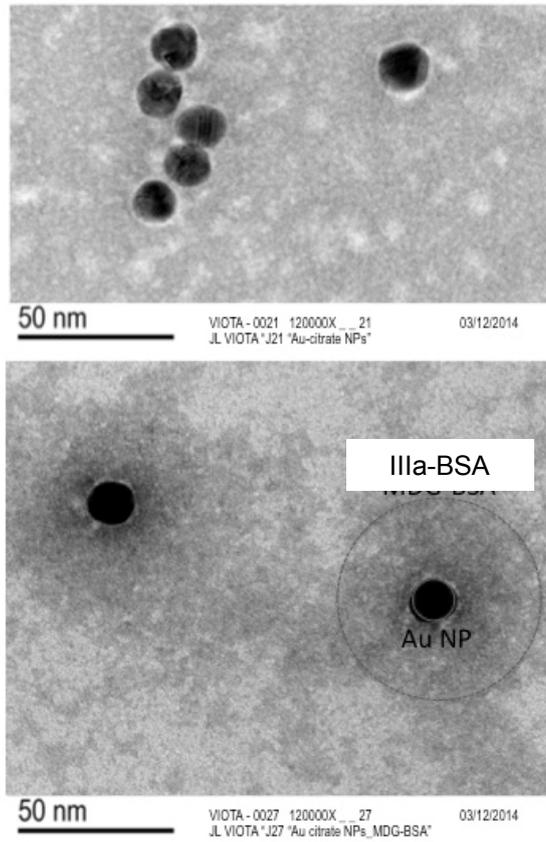


Figura 2



②① N.º solicitud: 201630944

②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.07.2016

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DANIEL, K.B. et al. "Dual-Mode HDAC Prodrug for Covalent Modification and Subsequent Inhibitor Release". Journal of Medicinal Chemistry 2015, Volumen 58, páginas 4812-4821. [Disponible en línea el 14.05.2015]. Ver página 4812, resumen; página 4814, resultados y discusión.	1-4
A	WO 2013/045734 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 04.04.2013, Página 1, líneas 3-5; página 2, fórmula I; página 3, líneas 5-15; página 6, líneas 20-22.	1-16
A	STEC, J. et al. "Synthesis, Biological Evaluation, and Structure-Activity Relationships of N-Benzoyl-2-hydroxybenzamides as Agents Active against <i>P. falciparum</i> (K1 strain), <i>Trypanosomes</i> , and <i>Leishmania</i> ". Journal of Medicinal Chemistry 2012, Volumen 55, páginas 3088-3100. [Disponible en línea el 21.02.2012]. Ver página 3088, resumen; página 3091, esquema 2.	1-16
A	GIANNINI, G. et al. "Hydroxamic acid based histone deacetylase inhibitors with confirmed activity against the malaria parasite". Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 2010, Volumen 25, páginas 459-461. [Disponible en línea el 19.12.2014]. Ver página 459, resumen; página 460, figuras 1-3.	1-16
A	BIELIAUSKAS, A.V. et al. "Structural requirements of HDAC inhibitors: SAHA analogs functionalized adjacent to the hydroxamic acid". Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 2007, Volumen 17, páginas 2216-2219. [Disponible en línea al 08.02.2007]. Ver página 2216, resumen y figura 1; página 2217, esquema 1.	1-16
A	LEONIDOVA, A. et al. "Selective Photorelease of an Organometallic-Containing Enzyme Inhibitor". Organometallics 2016, Volumen 35, páginas 851-854. [Disponible en línea el 07.03.2016]. Ver página 851, resumen.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
15.03.2017

Examinador
G. Esteban García

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C259/06 (2006.01)

A61K31/165 (2006.01)

A61P33/02 (2006.01)

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

C07C, A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, REGISTRY, CAPLUS, NPL, XPESP, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.03.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 5-16	SI
	Reivindicaciones 1-4	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 5-16	SI
	Reivindicaciones 1-4	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DANIEL, K.B. et al. Journal of Medicinal Chemistry 2015, Vol. 58, pp. 4812-4821.	14.05.2015

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un **compuesto** de fórmula general **III** derivado de ácido hidroxámico, una **composición farmacéutica** que lo comprende y el **uso** del compuesto para la elaboración de un medicamento.

El documento D01 divulga un profármaco del ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), que como inhibidor de la histona desacetilasa (HDACi), actúa sobre estados epigenéticos anormales asociados a diferentes patologías, incluyendo el cáncer. En concreto, dicho profármaco es el derivado SAHA-TAP, que comprende un anillo de *p*-benzoquinona sensible al grupo tiol (ver página 4812, resumen). Además se divulga el derivado bencilado de SAHA (SAHA-OBn), que fue utilizado como compuesto de control y que es exactamente el compuesto **IIIa** de la invención (ver página 4814, resultados y discusión).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-4** no es nuevo según lo divulgado en el documento D01 (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes 11/1986).

Sin embargo, no se ha encontrado en el estado de la técnica divulgación ni sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia la invención recogida en las reivindicaciones **5-9**, que se refieren a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula **III**; ni hacia las reivindicaciones **11-16**, relativas al uso de un compuesto de fórmula **III** o de la composición que lo comprende para la elaboración de un medicamento.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **5-16** reúne los requisitos de patentabilidad (novedad, actividad inventiva y aplicación industrial) establecidos en el Artículo 4.1 de la Ley de Patentes 11/1986.