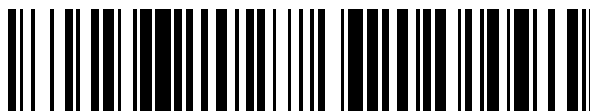


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 652**

51 Int. Cl.:

A61K 31/222 (2006.01)

C07C 259/18 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

A61P 33/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2011** E 11175252 (3)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016** EP 2550963

54 Título: **Ésteres de ácidos amidoxima-carboxílicos de la pentamidina como profármacos y su utilización como un medicamento**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.04.2017

73 Titular/es:
**DRITTE PATENTPORTFOLIO
BETEILIGUNGSGESELLSCHAFT MBH & CO. KG
(100.0%)
Berliner Strasse 1
12529 Schönefeld, DE**

72 Inventor/es:
**CLEMENT, BERND;
KOTTHAUS, JOSCHA;
KOTTHAUS, JÜRKE y
SCHADE, DENNIS**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 610 652 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

Ésteres de ácidos amidoxima-carboxílicos de la pentamidina como profármacos y su utilización como un medicamento

5 El presente invento se refiere a unos derivados de profármacos de la pentamidina, a su utilización para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades, en particular de enfermedades tumorales y cancerígenas, así como de la leishmaniasis, la tripanosomiasis, la neumonía causada por *Pneumocystis carinii* (PcP), así como de la malaria. La pentamidina es un compuesto con actividad antiparasitaria y antimicrobiana, cuya utilización se ha consagrado en el

10 tratamiento de la tripanosomiasis, la leishmaniasis así como de la neumonía causada por *Pneumocystis carinii* (PcP). Debido a las dos funciones de amidina que son fuertemente básicas, el compuesto está cargado eléctricamente en condiciones fisiológicas y después de una aplicación por vía oral no es asimilado por el organismo. Por este motivo, el compuesto tiene que ser administrado por vía parenteral, p.ej. intramuscular, intravenosa o por inhalación. En este contexto se ha de considerar que la mayoría de las infecciones causadas por

15 los patógenos precedentemente mencionados aparecen en países tropicales y subtropicales, en los cuales el abastecimiento médico es frecuentemente insuficiente. Unas costosas formas de aplicación, como las constituyen una aplicación por las vías intravenosa e inhalativa, dificultan por consiguiente una terapia segura con medicamentos precisamente en estos países. Por esta causa, el desarrollo de un profármaco de la pentamidina que esté biodisponible por vía oral presenta una enorme importancia, con el fin de mejorar decisivamente las

20 posibilidades de tratamiento. Otro aspecto negativo es la inexistente capacidad de acceso al sistema nervioso central (SNC), lo que conduce a que la pentamidina sea activa solamente en el estadio temprano y precoz de la tripanosomiasis (la enfermedad del sueño africana) y no en la fase meningoencefálica, en la que los agentes patógenos penetran en el SNC.

25 Otro posible sector de empleo de la pentamidina se sitúa en la terapia del cáncer. El efecto inhibitor de la pentamidina sobre la endo-exonucleasa se estudió detalladamente en los últimos años.^{1,2} Unos primeros estudios clínicos mostraron ya unos prometedores resultados en el caso del tratamiento de carcinomas de mama y de colon.³ También en el presente caso, el empleo de un profármaco de pentamidina, que esté disponible por vía oral, presenta una gran importancia.

30 Por estos motivos se llevaron a cabo numerosos ensayos para mejorar tanto la biodisponibilidad por vía oral así como también la capacidad de acceso al SNC de la pentamidina. En unos precedentes trabajos, la pentamidina se transformó en la diamidoxima de pentamidina, que es de carácter menos básico, lo que tiene como consecuencia un fuerte aumento de la lipofilia. Puesto que las amidoximas se presentan sin cargar eléctricamente en condiciones

35 fisiológicas, la absorción de estos compuestos desde el tracto gastrointestinal aumenta drásticamente.⁴ La pronunciada reducción de las amidoximas para dar las amidinas farmacológicamente activas se pudo mostrar por primera vez en el año 1988 con el compuesto modelo benzamidoxima.⁵ Más tarde se transfirió este principio a la pentamidina, con lo que se obtuvieron la monoamidoxima de pentamidina y la diamidoxima de pentamidina (**3**). En estudios con animales, ambos compuestos mostraron una pequeña biodisponibilidad por vía oral y una buena

40 aptitud de activación en la forma activa pentamidina.⁶ Entretanto se pudo identificar el sistema enzimático, que es responsable de la reducción, como un sistema que contiene molibdeno hasta ahora desconocido, el cual fue designado mARC (acrónimo del inglés "mitochondrial Amidoxime Reducing Component" = componente mitocondrial reductor de las amidoximas).^{7,8}

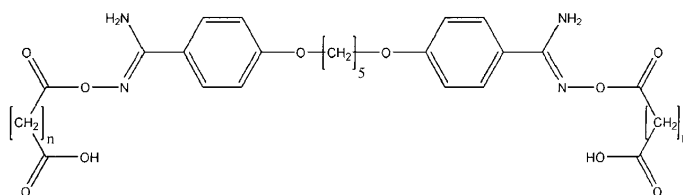
45 Con el fin de optimizar tanto el perfil farmacocinético para el mejoramiento de la biodisponibilidad como también la capacidad de acceso al SNC, se desarrollaron otros profármacos adicionales. Con la N,N-bis(acetoxi)pentamidina se obtuvo un compuesto que, en comparación con otros profármacos de la pentamidina, dispone de una lipofilia manifiestamente aumentada. También este profármaco pudo mostrar en estudios con animales una biodisponibilidad

50 por vía oral tanto en ratas así como también en cerdos. Una desventaja de la N,N-bis(acetoxi)pentamidina es, por una parte, su muy pequeña solubilidad en agua y, por otra parte, la biodisponibilidad determinada fue muy pequeña y no se pudo detectar ninguna capacidad de acceso al SNC.⁹ Unas iniciativas similares condujeron al desarrollo de la N,N'-bis(metoxi)pentamidina que, de un modo similar a la N,N'-bis(acetoxi)pentamidina, dispone de una muy pequeña solubilidad en agua. Otros principios de profármacos, que fueron transferidos a la pentamidina, son la hidroxilación para dar la N,N'-bis(dihidroxi)pentamidina y la conjugación con aminoácidos (en particular con valina)

55 para dar N,N'-bis(valoxi)pentamidina.¹⁰⁻¹² Resumiendo, se puede comprobar que hasta ahora no se pudo desarrollar ningún profármaco de la pentamidina que cumpla óptimamente los criterios necesarios (una buena biodisponibilidad por vía oral, una capacidad de acceso al SNC y una buena solubilidad).

60 Ante estos antecedentes, el invento estaba basado en la misión de poner a disposición unos profármacos de la pentamidina, que tengan unas propiedades mejoradas en comparación con las de los conocidos profármacos de la pentamidina.

El problema planteado por la misión mencionada se resuelve mediante un compuesto de la fórmula (I)



en la que n representa 2.

Conforme al invento, n representa 2 en la fórmula (I).

En otra forma de realización preferida, n representa 3 en la fórmula (I). En una forma de realización preferida, n representa 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 en la fórmula (I).

En particular, la N,N'-bis(succiniloxy)pentamidina (**1**) es manifiestamente superior en comparación con los profármacos de la pentamidina que se han descrito hasta ahora. Se comprobó en particular un considerable mejoramiento de la solubilidad, que constituye un parámetro muy crítico de otros profármacos de la pentamidina. Mediante esta solubilidad mejorada se influye positivamente sobre el comportamiento farmacocinético de la sustancia, puesto que unas buenas propiedades de disolución constituyen un parámetro importante en el caso de la absorción de los medicamentos.

El presente invento se refiere, además de esto, también a unas sales, unos solvatos y unos solvatos de las sales de los mencionados compuestos de la fórmula (I). Además, el presente invento se refiere a los mencionados compuestos de la fórmula (I) para el tratamiento y/o la profilaxis de ciertas enfermedades.

En una forma de realización preferida, el presente invento se refiere a los mencionados compuestos para la utilización en el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades oncológicas y enfermedades tumorales de cualquier patogénesis.

En otra forma de realización preferida, el presente invento se refiere a los mencionados compuestos para la utilización en el caso del tratamiento y/o la profilaxis de la leishmaniasis, la tripanosomiasis y/o la neumonía causada por *Pneumocystis carinii* (PcP).

En otra forma de realización preferida, el presente invento se refiere a los mencionados compuestos para la utilización en el caso del tratamiento y/o la profilaxis de la malaria.

Por añadidura, el presente invento se refiere también a un medicamento que comprende por lo menos uno de los mencionados compuestos de la fórmula (I) eventualmente en combinación con una o varias sustancia(s) auxiliar(es) inerte(s), no tóxica(s), farmacéuticamente apropiada(s).

El presente invento se refiere, además de esto, también a un medicamento que comprende por lo menos uno de los mencionados compuestos de la fórmula (I) en combinación con una o varias otra(s) sustancia(s) activa(s).

El presente invento se refiere, además de esto, también a un medicamento destinado a la administración por vía oral o parenteral.

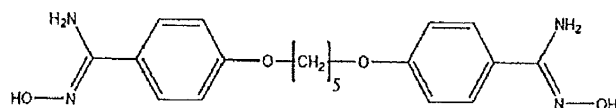
El presente invento se refiere, por lo demás, también a un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades oncológicas y enfermedades tumorales.

El presente invento se refiere también, además de esto, a un medicamento tal como se ha descrito más arriba, que se ha formulado de un modo resistente a los jugos gástricos.

Además de esto, el presente invento se refiere a un procedimiento para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades tumorales en el caso de seres humanos o animales mediante utilización de por lo menos uno de los mencionados compuestos de la fórmula (I) o de uno de los mencionados medicamentos.

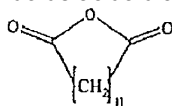
Por lo demás, el presente invento se refiere a un procedimiento para el tratamiento y/o la profilaxis de la leishmaniasis, la tripanosomiasis y/o la neumonía causada por *Pneumocystis carinii* (PcP).

El presente invento se refiere también a un procedimiento para la preparación de un compuesto tal como se ha descrito más arriba, en cuyo caso la amidoxima de la fórmula (A),



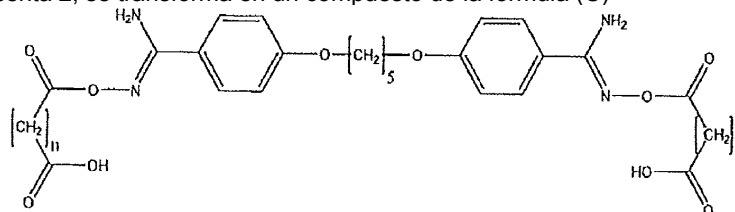
(A)

mediante reacción con un anhídrido de ácido dicarboxílico de la fórmula (B),



(B)

en la que n representa 2, se transforma en un compuesto de la fórmula (C)



(C)

5 Otro principio de fármaco que se ha desarrollado más aún, es el acoplamiento de amidoximas con ácidos dicarboxílicos, tal como se ha descrito en las solicitudes de patentes internacional y alemana WO2009095499 y DE102008007381.¹¹ Haciendo referencia a estos trabajos se han desarrollado unos correspondientes profármacos de la pentamidina. Los compuestos obtenidos se caracterizaron detalladamente y se investigaron en lo que respecta a su biodisponibilidad. Nuestros estudios mostraron que, en el caso de los derivados de ácidos dicarboxílicos de pentamidina, se trata de unos profármacos especialmente apropiados de la pentamidina que, junto a una buena solubilidad, poseen también una buena disponibilidad después de una administración por vía oral. Unas investigaciones comparativas con otros profármacos de la pentamidina mostraron en este caso la superioridad de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1) en comparación con los profármacos de la pentamidina que hasta ahora han sido descritos.

Descripción del invento

20 Hasta ahora, la utilización terapéutica de la pentamidina estaba muy restringida debido a la deficiente biodisponibilidad por vía oral. Precisamente en los países estructuralmente débiles del tercer mundo, el desarrollo de un medicamento que esté biodisponible por vía oral, constituye un considerable progreso en la farmacoterapia, puesto que de este modo se pueden evitar las costosas y arriesgadas aplicaciones por vía intravenosa. Además de esto, las actuales posibilidades de tratamiento, precisamente en el caso de las infecciones causadas por tripanosomas, *Pneumocystis carinii*, *Pneumocystis jirovecii* y leishmanias, no son satisfactorias. Por este motivo, el objetivo principal de este invento es el desarrollo de un profármaco de la pentamidina, que sea biodisponible por vía oral.

30 Además de esto, un profármaco de la pentamidina que sea utilizable por vía oral podría adquirir una considerable importancia en la terapia del cáncer. Actualmente, la pentamidina se investiga en estudios clínicos contra diversos tipos de cáncer (los carcinomas de mama y colon). Unos primeros estudios clínicos mostraron ya unos resultados prometedores.³ También en el presente caso, los nuevos profármacos de la pentamidina podrían encontrar empleo y mejorar la terapia, también en combinación con otras sustancias activas oncológicas.

35 Dentro del marco de este invento se desarrollaron unos nuevos profármacos de la pentamidina mediante la unión de la amidoxima de pentamidina (3) con ciertos ácidos dicarboxílicos. Los compuestos obtenidos fueron caracterizados detalladamente in vitro e in vivo, mostrando ellos una sobresaliente solubilidad así como una buena biodisponibilidad. Unas investigaciones comparativas con otros profármacos de la pentamidina mostraron, además de ello, la superioridad de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1) en comparación con los profármacos de la pentamidina descritos hasta ahora.

Síntesis

45 La preparación del profármaco (1, 2) se efectuó a partir de la diamidoxima de pentamidina (3) y del respectivo anhídrido de ácido (el anhídrido de ácido succínico o respectivamente de ácido glutárico). El compuesto de partida se calentó bajo reflujo en acetona secada mediante adición de anhídrido de ácido succínico durante 4 h (véase la Figura 1). Mediante un subsiguiente calentamiento a ebullición en tolueno y una directa separación por filtración se pudieron separar las sustancias 1 y 2 y se prepararon los compuestos deseados en un estado analíticamente puro.

Estabilidad

Las investigaciones mostraron, que el compuesto **1** es estable en el intervalo de pH neutro y ligeramente alcalino, por lo tanto entre un pH 7,4 y un pH 9,0. En un medio de carácter ácido, a un pH de 2,0, los compuestos son disociados rápidamente por vía hidrolítica (Figuras 2, 3).

En el caso de las investigaciones se puso de manifiesto, que la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**) se hidroliza en el medio acuoso para dar mono-succinil-pentamidina y diamidoxima de pentamidina (**3**). Mientras que esta hidrólisis tiene lugar solamente en escasa medida a pH 7,4 y pH 9,0, ella tiene lugar de manera pronunciada a un pH de 2,0 y en un plasma humano así como en un plasma de murido. La rápida hidrólisis de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**) a pH 2,0 (véanse las Figuras 2, 3) se ha clasificar como problemática en lo que respecta a la utilización como un profármaco. La N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**) conduciría, después de una aplicación por vía oral en el medio de carácter ácido del estómago, a una rápida hidrólisis del profármaco para dar la diamidoxima de pentamidina (**3**). Puesto que la porción principal de la absorción gastrointestinal se efectúa, no obstante, tan sólo en los segmentos superiores del intestino delgado, se ha de pretender una formulación resistente a los jugos gástricos de este profármaco. De esta manera, el profármaco podría superar sin daños el medio de carácter ácido del estómago y podría ser absorbido más tarde en el intestino delgado. La inestabilidad a un pH de 2,0 se ha de clasificar por lo tanto como no problemática para la utilización posterior del medicamento.

Solubilidad

La N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**) posee una muy buena solubilidad en el intervalo de valores del pH de 7,4 a 9,0 (véase la Tabla 1). La solubilidad en el medio de carácter ácido (pH 2,0) no se pudo caracterizar exactamente debido a la hidrólisis previamente descrita en este medio. Ciertos experimentos mostraron también aquí, no obstante, que la solubilidad se sitúa en el intervalo de los mM.

La Tabla 1 muestra la solubilidad de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**) en comparación con otros profármacos de la pentamidina que han sido desarrollados. A partir de estos datos se pone de manifiesto que, en el caso del derivado de ácido dicarboxílico (**1**), se trata del compuesto con la mejor solubilidad. Únicamente la monoamidoxima de pentamidina es asimismo soluble en el intervalo de los mM a unos valores de pH neutro y ligeramente alcalino. Este compuesto posee, sin embargo, todavía una función de amidina libre, que tiene un efecto muy desventajoso sobre la biodisponibilidad por vía oral. Estas excelentes propiedades de solubilidad favorecen una posterior utilización como un medicamento, puesto que una suficiente solubilidad constituye una premisa fundamental para una suficiente absorción por vía oral. Adicionalmente, mediante la buena solubilidad de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**) son posibles también unas formas de aplicación por vía parenteral, tales como unas inyecciones o infusiones.

Fijación a proteínas

Las investigaciones acerca de la fijación a proteínas del plasma mostraron que este compuesto, con una fijación a proteínas plasmáticas de aproximadamente 97 %, dispone de una fijación a proteínas bastante pronunciada. La fijación a proteínas que se ha determinado se sitúa en el intervalo, que se ha descrito también en el caso de otros profármacos de la pentamidina y por consiguiente no constituye ninguna desventaja en comparación con los otros profármacos.⁹

Concepto de profármaco

El concepto de profármaco propiamente dicho, que constituye su fundamento, fue descrito en las solicitudes de patentes WO2009095499 y DE102008007381.

La activación del profármaco conforme al invento transcurre a través de unas esterasas y del sistema enzimático mARC, y es por consiguiente independiente de las enzimas del citocromo P450. La participación de unas enzimas del P450 implica siempre el riesgo de interacciones, que no se han descrito en el caso del mecanismo de activación escogido por nosotros. Las enzimas del citocromo P450 participan en la metabolización de numerosos medicamentos. Si se ingieren varios medicamentos, que son metabolizados por este sistema enzimático, puede producirse un retraso de la degradación de los medicamentos con unos efectos secundarios clínicamente relevantes.

Activación in vitro

Los estudios de activación in vitro que se han llevado a cabo, muestran que la activación de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**) se efectúa en una buena medida (véase la Tabla 2). La incubación con carboxil esterasas de hígados de cerdo condujo a una rápida activación de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**) (véase la Figura 4). Ya después de un período de tiempo de incubación de 60 min había sido activado aproximadamente un 90 % del sustrato empleado. Este resultado muestra que la primera etapa de la activación de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**) para dar la diamidoxima transcurre con una sobresaliente velocidad.

En el caso de las incubaciones con unos preparados enzimáticos subcelulares se pudo comprobar la reducción para dar pentamidina (véase la Tabla 2). Por lo general, las fuentes enzimáticas de origen porcino son más activas que las de origen humano, lo que se ha de justificar con el modo de la obtención de los preparados enzimáticos. Se ha de tomar en cuenta que el tratamiento de órganos humanos, a causa de unas muy pequeñas cantidades de partida, es más problemático. Además los órganos de cerdo proceden por lo general de unos animales sanos, al contrario de lo cual unas muestras de tejidos humanos se extraen en la mayoría de los casos a pacientes de carcinoma después de una resección del órgano, lo que constituye una explicación para las bajas tasas de conversión en el caso de la utilización de unos preparados enzimáticos humanos.

Resumiendo se puede retener que en el caso de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**) se trata de un apropiado profármaco de la pentamidina. Este estudio proporciona la demostración general, de que la bioactivación de los profármacos tiene lugar para dar el compuesto activo. Se ha de esperar, que las tasas de conversión in vivo se sitúen en unos valores manifiestamente más altos, puesto que las enzimas requeridas están a disposición en unas cantidades más altas.

Biodisponibilidad por vía oral

En los estudios con animales que se han llevado a cabo se pudo demostrar la biodisponibilidad por vía oral de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**). Después de una aplicación por vía oral del profármaco no se pudo detectar ningún nivel en plasma de pentamidina, lo que se ha de justificar con la conocida alta tendencia a la acumulación de la pentamidina en ciertos órganos. El análisis de las muestras de órganos puso de manifiesto, que la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**) está biodisponible por vía oral. Después de una aplicación por vía oral del profármaco se pudieron detectar unas concentraciones relevantes en todos los órganos investigados (en el hígado, el riñón, el pulmón, el corazón, el cerebro y el bazo). Las concentraciones más altas se detectaron en estos casos en el riñón y el hígado (véase la Figura 5). Las concentraciones más altas en el bazo, el corazón, el cerebro y el pulmón fueron manifiestamente más pequeñas. La biodisponibilidad relativa por vía oral se pudo determinar, según fuese el órgano, con un valor de hasta un 98 % (véase la Tabla 3).

Resumiendo, los datos demuestran la sobresaliente idoneidad del principio de profármaco conforme al invento para la pentamidina. Las concentraciones de pentamidina detectadas en los órganos se sitúan en un intervalo, que hace posible la terapia de unas infecciones causadas tanto por tripanosomas (IC_{50} : 0,8 - 3,2 nM), leishmanias (IC_{50} : 820 - 2.590 nM) como también por plasmodios (IC_{50} : 35 - 129 nM).¹³⁻¹⁶

Recopilación

En el caso de los profármacos desarrollados de nuevas se trata de unos profármacos biodisponibles por vía oral de la pentamidina. El principio de profármaco utilizado conduce a un considerable mejoramiento de la solubilidad, que constituye un parámetro muy crítico de otros profármacos de la pentamidina. Mediante esta solubilidad mejorada se influye positivamente sobre el comportamiento farmacocinético de la sustancia, puesto que unas buenas propiedades de disolución constituyen un parámetro importante en el caso de la absorción de medicamentos, en particular en el tracto gastrointestinal.

El compuesto **1** posee una buena estabilidad química, con excepción del intervalo ácido de valores del pH. La pronunciada hidrólisis en el medio de carácter ácido conduce a que el profármaco debería ser administrado en el caso de la aplicación por vía oral como una formulación resistente a los jugos gástricos, con el fin de excluir una hidrólisis en el estómago.

En los ensayos de bioactivación in vitro se pudo detectar una rápida y extensa activación del profármaco para dar la pentamidina. La activación transcurre independientemente de las enzimas del citocromo P450 y no conlleva, por consiguiente, el riesgo de interacciones.

En los estudios con animales que se han llevado a cabo finalmente, se pudo confirmar también de manera experimental una buena biodisponibilidad por vía oral. Los contenidos de pentamidina detectados en los órganos se encuentran en un intervalo, que hace posible una actividad frente a infecciones causadas por tripanosomas, leishmanias y plasmodios.

Resumiendo, en el caso de los derivados de ácidos dicarboxílicos de pentamidina se trata de unos sobresalientes profármacos, que disponen de unos excelentes parámetros físico-químicos y de una buena biodisponibilidad por vía oral. A causa de estas propiedades, ellos son manifiestamente superiores a otros profármacos de la pentamidina. Es posible un empleo tanto en la terapia del cáncer como también en el caso del tratamiento de infecciones causadas por tripanosomas, leishmanias y Pneumocystis carinii.

El invento descrito se ilustra todavía más detalladamente mediante las Figuras adjuntadas.

Figura 1: Esquema de síntesis del profármaco de pentamidina

Figura 2: Estabilidad de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1) a diferentes valores del pH y en un plasma de mrido o respectivamente humano, así como en el caso de la incubación con una esterasa.

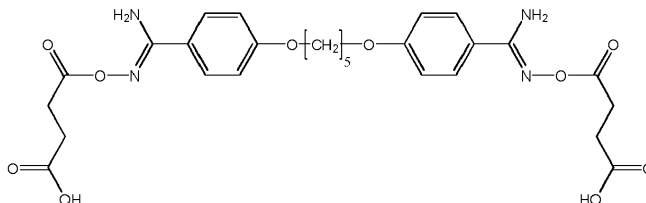
Figura 3: Estabilidad de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1) a diferentes valores del pH y en un plasma de mrido o respectivamente humano.

5 Figura 4: Activación de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1) por esterasas.

Figura 5: Contenido de pentamidina después de una aplicación por vía oral (50 mg//kg) de pentamidina y de N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1) en ciertos rganos. Se representan los valores promedios de todas las ratas investigadas.

10 **Material y métodos: Ejemplos de realización**

Síntesis



15 **4,4'-Pentametilendioxi-bis-[N-(carboxipropioniloxi)]benzamidina (N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina) (1):**

1 g de diamidoxima de pentamidina se disuelve en 250 ml de acetona y se añaden 540 mg de anhrido de ácido succínico. La tanda se agita bajo reflujo durante 4 h. A continuación, el disolvente se elimina en vacío y el residuo se cristaliza a partir de tolueno.

20

Rendimiento: 68 %

Punto de fusión: 141°C

25

IR (KBr):

$\nu^- = 3478, 3348, 2940, 2870, 1732, 1698, 1612, 1472, 1250 \text{ cm}^{-1}$

¹H RMN (DMSO-d₆):

30

$\delta/\text{ppm (TMS)} = 1,59 \text{ (m, 2H, CH}_2\text{)}, 1,79 \text{ (qn, 4H, } ^3\text{J} = 6,7 \text{ Hz, CH}_2\text{)}, 2,52 \text{ (t, 4H, } ^3\text{J} = 6,6 \text{ Hz, CH}_2\text{)}, 2,68 \text{ (t, 4H, } ^3\text{J} = 6,6 \text{ Hz, CH}_2\text{)}, 4,04 \text{ (t, 4H, } ^3\text{J} = 6,5 \text{ Hz, O-CH}_2\text{)}, 6,63 \text{ (s, 4H, NH}_2\text{)}, 6,99 \text{ (m}_c\text{, 4H, AA'BB', Ar-H)}, 7,65 \text{ (m}_c\text{, 4H, AA'BB', Ar-H)}, 12,18 \text{ (brs, 2H, COOH)}$

¹³C-RMN (DMSO-d₆):

35

$\delta/\text{ppm (TMS)} = 22,1 \text{ (CH}_2\text{)}, 27,9 \text{ (CH}_2\text{)}, 28,3 \text{ (CH}_2\text{)}, 28,8 \text{ (CH}_2\text{)}, 67,5 \text{ (O-CH}_2\text{)}, 113,9 \text{ (ArCH)}, 123,5 \text{ (ArC)}, 128,1 \text{ (ArCH)}, 156,2 \text{ (ArC)}, 160,3 \text{ (C-NH}_2\text{)}, 170,2 \text{ (COOR)}, 173,5 \text{ (COOH)}$

EM (ESI) m/z:

573 [M+H]⁺, 555 [M-H₂O+H]⁺, 473 [M-C₄H₄O₃+H]⁺, 455 [M-C₄H₄O₃-H₂O+H]⁺, 373 [DAO+H]⁺, 178

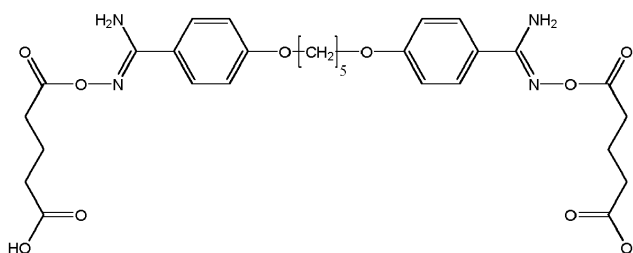
40

Análisis elemental C₂₇H₃₂N₄O₁₀ (masa molecular: 572,56):

Calculado: C 56,64, H 5,63, N 9,79

Encontrado: C 56,85, H 6,01, N 9,60

45



4,4'-Pentametilendioxi-bis-[N-(carboxibutioniloxi)]benzamidina (N,N'-bis(glutariloxi)pentamidina) (2):

1 g de la diamidoxima de pentamidina se disuelve en 250 ml de acetona y se añaden 616 mg de anhrido de ácido glutárico. La tanda se agita bajo reflujo durante 4 h. A continuación, el disolvente se elimina en vacío y el residuo se recrystaliza a partir de tolueno.

50

Rendimiento: 80%

Punto de fusión: 155°C

5 IR (KBr):
 $\nu^- = 3495, 3350, 2950, 2874, 1747, 1700, 1619, 1520, 14225, 1258 \text{ cm}^{-1}$

10 ^1H RMN (DMSO- d_6):
 δ/ppm (TMS) = 1,59 (m, 2H, CH_2), 1,81 (m, 8H, CH_2), 2,29 (t, 4H, $^3\text{J} = 7,4 \text{ Hz}$, CH_2), 2,49 (t, 4H, $^3\text{J} = 7,1 \text{ Hz}$, CH_2), 4,04 (t, 4H, $^3\text{J} = 6,4 \text{ Hz}$, O- CH_2), 6,63 (s, 4H, NH_2), 6,98 (m, 4H, AA'BB', Ar-H), 7,65 (m, 4H, AA'BB', Ar-H), 12,05 (s, 2H, COOH)

15 ^{13}C -RMN (DMSO- d_6):
 δ/ppm (TMS) = 19,9 (CH_2), 22,1 (CH_2), 28,3 (CH_2), 31,6 (CH_2), 32,8 (CH_2), 67,5 (O- CH_2), 114,1 (ArCH), 123,5 (ArC), 128,1 (ArCH), 156,1 (ArC), 160,3 (C- NH_2), 170,6 (COOR), 173,9 (COOH)

EM (ESI) m/z:
 601 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 169

20 Análisis elemental $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{10}$ (masa molecular: 600,62):
 Calculado: C 57,99, H 6,04, N 9,33
 Encontrado: C 58,05, H 6,24, N 9,72

25 Caracterización del profármaco de pentamidina

Investigaciones de la estabilidad de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1)

30 Para las investigaciones de la estabilidad se prepararon unas soluciones 0,1 mM de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1) en una mezcla de un tampón fosfato de potasio 50 mM / DMSO (90/10, v/v). La investigación se efectuó a los valores del pH 2,0, 7,4 y 9,0. Cada 15 min se sacó una muestra durante un período de tiempo de 150 min y estas muestras se analizaron inmediatamente por una HPLC.

35 Se llevaron a cabo otras investigaciones con unos plasmas humano y de mudo. Se mezclaron 900 μl del plasma con 100 μl de una solución 2 mM de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1). Por consiguiente, la concentración final de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1) fue de 0,2 mM. Las muestras se incubaron a 37 °C en un baño agitado de agua y se sacaron muestras después de 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 minutos. Para esto, se extrajeron en cada caso 100 μl y se mezclaron con 100 μl de acetonitrilo. Las muestras se agitaron, se centrifugaron durante 5 min y el material sobrenadante se midió mediante la HPLC.

40 Adicionalmente se llevaron a cabo unas incubaciones con la carboxilo esterasa de hígado de cerdo. Para esto, la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1) se incubó en una concentración de 0,1 mM con 1 U de esterasa en 250 μl de tampón fosfato de potasio 50 M de pH 7,4 a 37°C durante un período de tiempo de 60 min. A intervalos de tiempo en cada caso 15 min se analizaron las muestras con ayuda de la HPLC.

45 Las investigaciones de la estabilidad se evaluaron con ayuda del siguiente método de HPLC:

| | | |
|---------------------------|--|-------------------------------------|
| Sistema de HPLC | Waters Alliance™ HPLC-System con el Waters e2695 XC Separations Modul, Waters 2998 Photodiode Array Detector y el software de registro y evaluación Empower™ 2 | |
| Fase estacionaria | Synergi Max-RP 80A (Phenomenex, 250 x 4.6 mm; 4 μm) con una columna preliminar Phenomenex C18 (4 x 3.0 mm) | |
| Fase móvil | A 45 % | fosfato de potasio 20 mM, de pH 7,0 |
| | B 55 % | metanol |
| Detección | 210 - 400 nm (260 nm) | |
| Velocidad de flujo | 1,0 ml/min | |
| Tiempo de elución | 12 min | |
| Temperatura de la columna | 25°C | |
| Volumen de inyección | 10 μl | |
| Tiempos de retención | N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1): | 3,2 \pm 0,1 min |
| | succiniloxi-pentamidina: | 4,8 \pm 0,1 min |
| | diamidoxima de pentamidina (3): | 8,1 \pm 0,2 min |

Solubilidad de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1)

50 Una cantidad del compuesto insoluble en 100 μl se suspendió en un tampón fosfato 50 mM (de pH 7,4 o respectivamente pH 9,0) y se agitó durante 20 min. A continuación, la parte insoluble se separó por centrifugación

(12.000 rpm) y las muestras se midieron inmediatamente por HPLC. La evaluación de la solubilidad se efectuó a través de una calibración de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1) en DMSO. El compuesto es bien soluble (7,5 mM) a un valor del pH fisiológico de 7,4. La solubilidad se mejoró ulteriormente cuando se aumentó el valor del pH (véase la Tabla 1).

Como comparación se investigaron otros diferentes profármacos de pentamidina, con el fin de poder evaluar mejor la solubilidad en comparación con los derivados ya descritos. La determinación de las solubilidades se llevó a cabo análogamente al método descrito para el compuesto 1.

Tabla 1: Solubilidad de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1) y de otros profármacos de la pentamidina a diferentes valores del pH

| Profármaco de la pentamidina | Solubilidad [μM] | | |
|---|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| | pH 2,0 | pH 7,4 | pH 9,0 |
| N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1) | hidrólisis | 7.500 \pm 340 | 10.780 \pm 70 |
| Monomamidoxima de pentamidina | 22.285 \pm 1244 | 1.370 \pm 291 | 1.257 \pm 40 |
| Diamidoxima de pentamidina (3) | 4.211 \pm 231 | 12 \pm 1 | 4 \pm 1 |
| N,N'-bis(acetoxi)pentamidina | 14 \pm 8 | 2 \pm 1 | 3 \pm 2 |
| N,N'-bis(metoxi)pentamidina | 1.304 \pm 28 | 8 \pm 1 | 10 \pm 2 |
| N,N'-bis(dihidroxi)pentamidina | > 35.000 | 95 \pm 8 | 21 \pm 3 |
| N,N'-bis(valoxi)pentamidina | > 35.000 | 157 \pm 19 | 84 \pm 18 |

Determinación de la fijación a proteínas de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1)

La determinación de la fijación a proteínas del plasma se llevó a cabo en tres concentraciones diferentes (10, 20 y 50 μM). Como soluciones de proteínas se utilizó una solución de albúmina al 4 %. Se pipetearon en cada caso 50 μl de una solución de la sustancia concentrada a 10 veces en 450 μl de la solución de proteína. La incubación se efectuó durante 15 min en un baño agitado de agua a 37°C. A continuación, las muestras fueron transferidas a unas unidades de ultrafiltración (Vivaspin 500, límite de exclusión 10 kDa) y se centrifugaron durante 15 min a 10.000 rpm. El material filtrado se analizó por HPLC. Adicionalmente, para cada concentración se llevó a cabo un control, que no había sido mezclado con proteínas y no había sido centrifugado. Otro control adicional sin adición de proteínas, que sin embargo había sido separado por centrifugación a través de la unidad de filtración, sirvió para la validación de la metodología.

El análisis de la muestra determinó una fijación a proteínas de 97,1 \pm 1,2 % para el compuesto 1.

Investigación de la bioactivación de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1)

Determinación de la activación de los profármaco con diferentes sistemas de enzimas subcelulares

La activación del profármaco se determinó in vitro mediante unos preparados enzimáticos subcelulares. Como preparados enzimáticos se utilizaron unos materiales sobrenadantes de 9.000xg, microsomas y mitocondrios de tejidos de hígados y riñones porcinos. Las tandas de incubación se componían de un profármaco 500 μM , NaDH 1 mM, 1 U de una esterasa y 0,3 mg de un preparado enzimático, disueltos en 250 μl de tampón fosfato 100 mM de pH 6,3. La incubación se efectuó durante 20 min a 37 °C en un baño de agua agitado. La incubación se finalizó mediante la adición de 150 μl de metanol. A continuación, las muestras se agitaron durante 10 min y la proteína precipitada se separó por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min. El material sobrenadante se midió con ayuda de la HPLC. Las tasas de conversión química determinadas se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2: Activación de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (1) en la forma activa con unos preparados enzimáticos subcelulares, HL = hígado humano, HN = riñón humano, SL = hígado de cerdo, SN = riñón de cerdo 9000g = material sobrenadante de 9.000 g, MS = microsomas, Mt = mitocondrias

| Fuente de la enzima | Pentamidina [$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] |
|---------------------|--|
| HL 9000g | 0,04 \pm 0,01 |
| HL Ms | 0,02 \pm 0,02 |
| HL Mt | 0,56 \pm 0,43 |
| HN Mt | 0,08 \pm 0,02 |
| SL 9000g | 0,00 \pm 0,00 |
| SN 9000g | 0,49 \pm 0,03 |
| SL Ms | 0,69 \pm 0,13 |
| SN Ms | 2,25 \pm 0,58 |
| SL Mt | 1,44 \pm 0,22 |
| SN Mt | 0,41 \pm 0,09 |

Adicionalmente se llevaron a cabo incubaciones con 1 U de la carboxilo esterasa de hígado de cerdo. Para esto, el compuesto se incubó durante 60 minutos en una concentración de 500 μM con 1 U de una esterasa en 250 μl de tampón fosfato 100 mM de pH 7,4. Las incubaciones se finalizaron mediante la adición de 250 μl de acetonitrilo. Las incubaciones con unas carboxilo esterases procedentes de hígado de cerdo condujeron a una rápida activación de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**) (véase la Figura 4) Ya después de un tiempo de incubación se había activado aproximadamente un 90 % del sustrato empleado. Este resultado muestra que la primera etapa de la activación de la N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**) transcurre para dar la diamidoxima con una gran velocidad.

10

Método de HPLC para la determinación de la pentamidina

| | |
|-----------------------|---|
| Sistema de HPLC | Waters Alliance™ HPLC-System con el Waters e2695 XC Separations Modul, Waters 2998 Photodiode Array Detector y el software de registro y evaluación Empower 2 |
| Columna: | LiChroCart, LiChrospher 60 RP-select B, 125 x 4 mm, 5 μm |
| Flujo: | 1 ml/min |
| Agente eluyente: | 52% de cloruro de tetrametilamonio 20 mM /sulfonato de octilo 10 mM de pH 3,0 48% de MeOH |
| Tiempo de elución: | 15 min. |
| Detección: | 260 nm |
| Volumen de inyección: | 20 μl |
| Tiempo de retención: | pentamidina: 10,7 \pm 0,4 min |

Biodisponibilidad por vía oral (estudio con animales)

Se administró por vía intravenosa pentamidina a 10 ratas en una concentración de 10 mg/kg. La N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina (**1**) se aplicó en cada caso a 10 ratas en una concentración de 50 mg/kg en forma de una suspensión con goma arábiga (al 10 % m/V) por medio de una cánula de intubación faríngea. Para la preparación de la suspensión se utilizó un tampón fosfato de potasio 100 mM de pH 9,0, con el fin de evitar un desdoblamiento prematuro del éster succinílico en el medio ácido del estómago. Adicionalmente, a 3 ratas se les aplicó la pentamidina en una dosificación de 50 mg/kg por medio de una cánula de intubación, con el fin de determinar la biodisponibilidad por vía oral de la forma activa propiamente dicha.

Después de una administración por vía intravenosa, se extrajeron unas muestras de plasma después de 5, 10, 20, 40, 75, 150 y 300 min, o respectivamente, después de la aplicación por vía oral, después de 20, 40, 60, 90, 120, 240 y 360 min. Para esto se extrajeron 300 μl de sangre entera con una jeringa para insulina y se transfirieron a unas Microvetten CB 300 (de Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) revestidas con EDTA. Después de cada extracción, se enjuagó con 100 μl de una solución de cloruro sódico al 0,9 % o respectivamente en un intervalo de 60 min con una solución de heparina (250 U.I./ml). La muestra de sangre se agitó brevemente y se colocó sobre hielo hasta la centrifugación (4°C; 14.000 rpm; 10 min). El almacenamiento ulterior de las muestras se efectuó a -80°C.

El sacrificio de las ratas se efectuó mediante decapitación con una guillotina a las 6 horas después de la administración de los medicamentos. A continuación, se extrajeron los órganos. Todos los órganos fueron limpiados y congelados en 2-metil-butano enfriado con hielo seco. Se extrajeron el hígado, los riñones, los pulmones, el bazo, el corazón y el cerebro.

35

Tratamiento de las muestras

1. Muestras de plasma:

Las muestras de plasma se descongelaron a la temperatura ambiente. En cada caso se dispusieron previamente 65 μl de acetonitrilo y se les añadieron con pipeta 65 μl de las muestras de plasma. A continuación, las muestras se agitaron durante 45 min. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 10.000 rpm y el material sobrenadante se transfirió a unos viales para HPLC. Se utilizaron en cada caso 35 μl para las determinaciones mediante una HPLC.

Para la evaluación cuantitativa de las muestras de plasma, se llevaron a cabo o respectivamente de determinaron unas calibraciones y unos análisis para el hallazgo renovado de la pentamidina en un tampón fosfato de pH 7,4, o respectivamente en un plasma de mürido.

2. Muestras de órganos:

Los órganos se descongelaron a la temperatura ambiente y se pesaron. En dependencia del respectivo órgano se trataron diferentes cantidades de los tejidos. En el caso de las muestras de hígado se utilizaron aproximadamente 1.000 mg; y en el caso de todos los otros órganos aproximadamente 500 mg. Los órganos se desmenuzaron con ayuda de un mortero Potter. Para ello, los tejidos que se habían pesado, se desmenuzaron con en cada caso 1 ml de agua bidestilada durante 5 min. A continuación, el recipiente del mortero Potter se enjuagó con en cada caso 1 ml de agua bidestilada. Las muestras se transfirieron a unos recipientes de reacción y se añadió el mismo volumen de

55

acetoniitrilo, para precipitar las proteínas. Las muestras se agitaron durante 45 min y a continuación se centrifugaron durante 15 min a 12.000 rpm. El material sobrenadante se transfirió a unas botellas de vidrio y se concentró por evaporación bajo aire a presión. El residuo se lavó con 500 µl de acetoniitrilo, se centrifugó de nuevo y el material sobrenadante se añadió a las muestras restantes. El residuo se desechó. Después de haber concentrado por evaporación bajo aire a presión, las muestras se liofilizaron durante una noche.

La disolución incipiente de las muestras se efectúa con 400 µl de una mezcla de metanol y agua bidestilada (50/50). Las muestras se agitaron durante 1,5 horas a la temperatura ambiente y a continuación el residuo se separó por centrifugación (a 15.000 rpm, durante 15 min). La concentración de la pentamidina se determinó a partir del material sobrenadante mediante una HPLC.

Resultados del estudio con animales

El análisis de las muestras de plasma después de la aplicación por vía intravenosa de la pentamidina proporcionó un nivel en plasma detectable a lo largo de un período de tiempo de 300 min. Después de una aplicación por vía oral del profármaco no se pudo detectar ninguna concentración en plasma de pentamidina. Este fenómeno es conocido para los derivados de pentamidina, puesto que ellos tienden en una pronunciada medida a la acumulación en los tejidos. Por ello, no se pudo efectuar ningún cálculo directo de la biodisponibilidad a través de las concentraciones en plasma. Para la determinación de la biodisponibilidad relativa se utilizaron, por lo tanto, las concentraciones de pentamidina en los órganos investigados.

Evaluación de las muestras de órganos:

El análisis de las muestras tratadas de órganos proporcionó unos contenidos detectables de pentamidina en todos los órganos investigados - con las más altas concentraciones en el hígado y los riñones. Las concentraciones en el pulmón, el bazo y el corazón son manifiestamente más pequeñas. Las concentraciones más bajas de pentamidina se detectaron en los cerebros. Los resultados se han recopilado en la Figura 5.

Por lo general, la biodisponibilidad por vía oral de un compuesto se determina a través de las concentraciones en plasma después de una aplicación por vía oral e intravenosa del compuesto. A causa de la alta fijación a proteínas de la pentamidina y de su pronunciada tendencia a la acumulación en tejidos, después de una aplicación por vía oral del profármaco de la pentamidina no se pudo determinar, no obstante, ninguna concentración en plasma. Para el cálculo de la biodisponibilidad relativa no se utilizan, por lo tanto, las concentraciones en plasma, sino los contenidos detectables en los órganos investigados (el hígado, el riñón, el pulmón, el bazo, el corazón y el cerebro). A través de la comparación después de una aplicación por vía intravenosa de la forma activa y de una aplicación por vía oral del profármaco, se pudo calcular una biodisponibilidad relativa del profármaco de la pentamidina. Las diferentes dosificaciones se tomaron en cuenta al realizar el cálculo. Las biodisponibilidades relativas se han representado en la Tabla 3. La biodisponibilidad máxima se detectó con un 98 % en el hígado. La biodisponibilidad en los otros tejidos se ha reducido manifiestamente. La alta biodisponibilidad en el hígado puede explicarse con la bioactivación del profármaco. Ella tiene lugar predominantemente en el hígado, lo que explica las concentraciones comparativamente altas en este órgano. La concentración en el cerebro es muy pequeña, lo que apunta a que el profármaco sólo supera la barrera hematoencefálica en muy pequeña extensión.

Tabla 3: Biodisponibilidad relativa de los derivados de pentamidina

| Concentración de pentamidina [µg/g de órgano] y biodisponibilidad relativa [%] | | | | | |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------|---|----------------|
| | Pentamidina i.v. (10 mg/kg) | Pentamidina p.o. (50 mg/kg) | rBV [%] | N,N'-bis(succiniloxi)pentamidina p.o. (50 mg/kg) | rBV [%] |
| Hígado | 0,53 ± 0,33 | 0,12 ± 0,03 | 4,5 ± 1,1 | 2,68 ± 2,02 | 97,8 ± 73,7 |
| Riñón | 22,03 ± 4,16 | 1,24 ± 0,96 | ± 0,9 | 7,07 ± 3,15 | 6,2 ± 2,8 |
| Pulmón | 3,03 ± 1,04 | n.d. | - | 0,76 ± 0,42 | 4,9 ± 2,7 |
| Bazo | 1,97 ± 1,00 | n.d. | - | 0,10 ± 0,16 | 1,0 ± 1,6 |
| Corazón | 2,41 ± 0,74 | n.d. | - | 0,43 ± 0,16 | 3,5 ± 1,3 |
| Cerebro | 0,22 ± 0,12 | n.d. | - | 0,06 ± 0,05 | 5,3 ± 4,4 |

rBV = biodisponibilidad relativa

Analíticas por HPLC

Para realizar el análisis de las muestras de órganos y plasma después de una aplicación por vía intravenosa de la pentamidina, se utilizó la siguiente analítica por HPLC:

Sistema de HPLC Waters Autosampler 717plus, Waters 600 Controller, Waters 600 Pump, Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector y el software de registro y evaluación EZChrom Elite Client/Server (versión 2.8.3)

ES 2 610 652 T3

| | | |
|----------------------|---|--------------------------|
| Fase estacionaria | Superspher 60 RP-select B (250 x 3 mm); con una columna preliminar: Merck LiChrospher 60 RP-select B (4 x 4 mm, 5 µm) | |
| Fase móvil | 40 % de metanol 60 % de TFA al 0,1 %, pH 2,5 | |
| Detección | λ _{EX} = 275 nm | λ _{EX} = 340 nm |
| Velocidad de flujo | 0,32 ml/min | |
| Tiempo de elución | 35 min. | |
| Volumen de inyección | 35 µl | |
| Tiempo de retención | pentamidina: 22,4 ± 1,2 min | |

Para el análisis de las muestras de órganos y plasma después de una aplicación por vía oral del profármaco de la pentamidina se utilizó la siguiente analítica por HPLC:

| | | |
|----------------------|--|----------------|
| Sistema de HPLC | Waters Alliance™ HPLC-System con el Waters e2695 XC Separations Modul, Waters 2998 Photodiode Array Detector y el software de registro y evaluación Empower™ 2 | |
| Fase estacionaria | Superspher 60 RP-select B (250 x 3 mm); con una columna preliminar: Merck LiChrospher 60 RP-select B (4 x 4 mm, 5 µm) | |
| Fase móvil | 40 % de metanol 60 % de TFA al 0,1 %, pH 2,5 | |
| Detección | 210-300 nm (260 nm) | |
| Velocidad de flujo | 0,32 ml/min | |
| Tiempo de elución | 35 min | |
| Volumen de inyección | 35 µl | |
| Tiempo de retención | diamidoxima | 20,0 ± 0,3 min |
| | monoamidoxima: | 22,5 ± 0,4 min |
| | pentamidina: | 24,7 ± 0,5 min |

5

Lista de referencias:

1. Chow, T. Y.; Alaoui-Jamali, M. A.; Yeh, C.; Yuen, L.; Griller, D. The DNA double-stranded break repair protein endo-exonuclease as a therapeutic target for cancer. *Mol Cancer Ther* 2004, 3, 911-9.
- 10 2. Pharma, O. Inhibitors of Endo-Exonuclease activity for treating cancer. 2001.
3. Pharma, O. Pentamidine Combinations for Treating Cancer. 2010.
4. Clement, B. Reduction of N-hydroxylated compounds: amidoximes (N-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab Rev* 2002, 34, 565-79.
- 15 5. Clement, B.; Schmitt, S.; Zimmermann, M. Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine. *Arch Pharm (Weinheim)* 1988, 321, 955-6.
6. Clement, B.; Immel, M.; Terlinden, R.; Wingen, F. J. Reduction of amidoxime derivatives to pentamidine in vivo. *Arch Pharm (Weinheim)* 1992, 325, 61-2.
- 20 7. Havemeyer, A.; Bittner, F.; Wollers, S.; Mendel, R.; Kunze, T.; Clement, B. Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem* 2006, 281, 34796-802.
8. Gruenewald, S.; Wahl, B.; Bittner, F.; Hungeling, H.; Kanzow, S.; Kotthaus, J.; Schwering, U.; Mendel, R. R.; Clement, B. The fourth molybdenum containing enzyme mARC: cloning and involvement in the activation of N-hydroxylated prodrugs. *J Med Chem* 2008, 51, 8173-7.
- 25 9. Clement, B.; Burenheide, A.; Rieckert, W.; Schwarz, J. Diacetyldiamidoximeester of pentamidine, a prodrug for treatment of protozoal diseases: synthesis, in vitro and in vivo biotransformation. *ChemMedChem* 2006, 1, 1260-7.
10. Clement, B. R., C. Improvement of the bioavailability of active substances having an amidine function in medicaments. 2008.
11. Clement, B. R., C.; Hungeling, H. Use of amidoxime carboxylic acid esters and N-hydroxyguanidine carboxylic acid esters for producing prodrugs. 2009.
- 30 12. Reeh, C.; Wundt, J.; Clement, B. N,N'-dihydroxyamidines: a new prodrug principle to improve the oral bioavailability of amidines. *J Med Chem* 2007, 50, 6730-4.

13. Arafa, R. K.; Brun, R.; Wenzler, T.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D.; Stephens, C. E.; Boykin, D. W. Synthesis, DNA affinity, and antiprotozoal activity of fused ring dicationic compounds and their prodrugs. *J Med Chem* 2005, 48, 5480-8.

5 14. Brendle, J. J.; Outlaw, A.; Kumar, A.; Boykin, D. W.; Patrick, D. A.; Tidwell, R. R.; Werbovetz, K. A. Antileishmanial activities of several classes of aromatic dications. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46, 797-807.

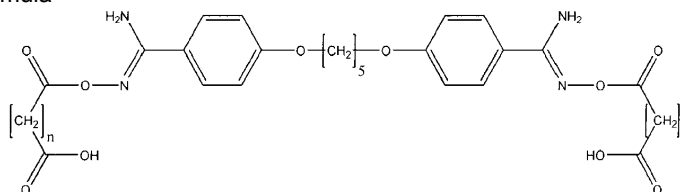
15. Donkor, I. O.; Huang, T. L.; Tao, B.; Rattendi, D.; Lane, S.; Vargas, M.; Goldberg, B.; Bacchi, C. Trypanocidal activity of conformationally restricted pentamidine congeners. *J Med Chem* 2003, 46, 1041-8.

16. Ismail, M. A.; Brun, R.; Wenzler, T.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D.; Boykin, D. W. Dicationic biphenyl benzimidazole derivatives as antiprotozoal agents. *Bioorg Med Chem* 2004, 12, 5405-13.

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula



5 en la que n representa 2.

2. Unas sales, unos solvatos y unos solvatos de las sales de los compuestos de acuerdo con la reivindicación 1.

10 3. El compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 2 para la utilización en el tratamiento y/o la profilaxis de ciertas enfermedades.

4. El compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 2 para la utilización en el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades oncológicas y de enfermedades tumorales de cualquier patogénesis.

15 5. El compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 2 para la utilización en el tratamiento y/o la profilaxis de la leishmaniasis, la tripanosomiasis y/o de la neumonía causada por *Pneumocystis carinii* (PcP).

20 6. El compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 2 para la utilización en el tratamiento y/o la profilaxis de la malaria.

7. Un medicamento que comprende por lo menos un compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 2, eventualmente en combinación con una o varias sustancias auxiliares inertes, no tóxicas, que son farmacéuticamente apropiadas.

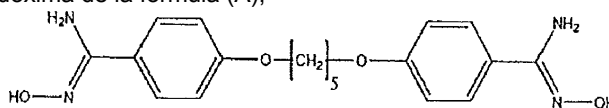
25 8. Un medicamento que comprende por lo menos un compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 2 en combinación con una o varias otras sustancias activas adicionales.

9. Un medicamento que comprende por lo menos un compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 2 para la aplicación por vía oral o parenteral.

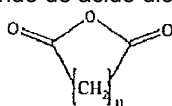
30 10. Un medicamento que comprende por lo menos un compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 2 para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades tumorales.

35 11. Un medicamento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 7 hasta 10, **caracterizado por que** el medicamento se formula de un modo resistente a los jugos gástricos.

12. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 2, **caracterizado por que** la amidoxima de la fórmula (A),

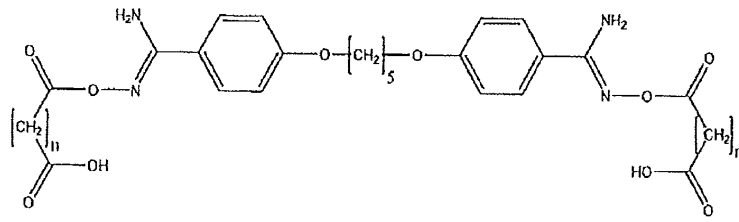


40 (A) mediante reacción con un anhídrido de ácido dicarboxílico de la fórmula (B),



(B)

en la que n representa 2,
se transforma en un compuesto de la fórmula (C)



(C).

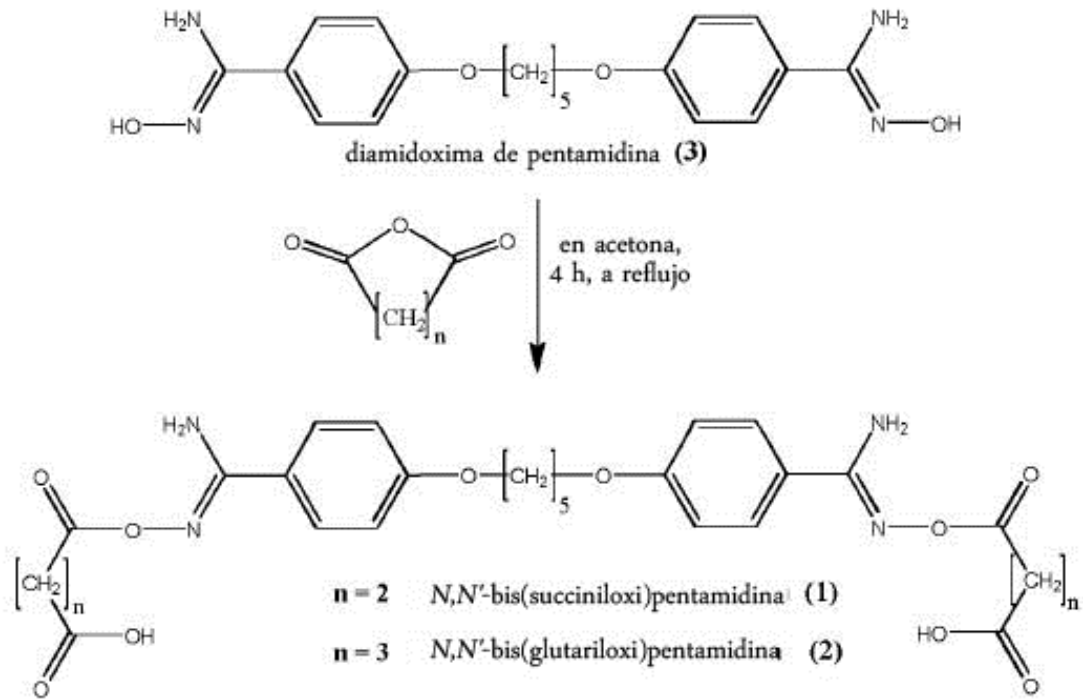


Figura 1

Estabilidad

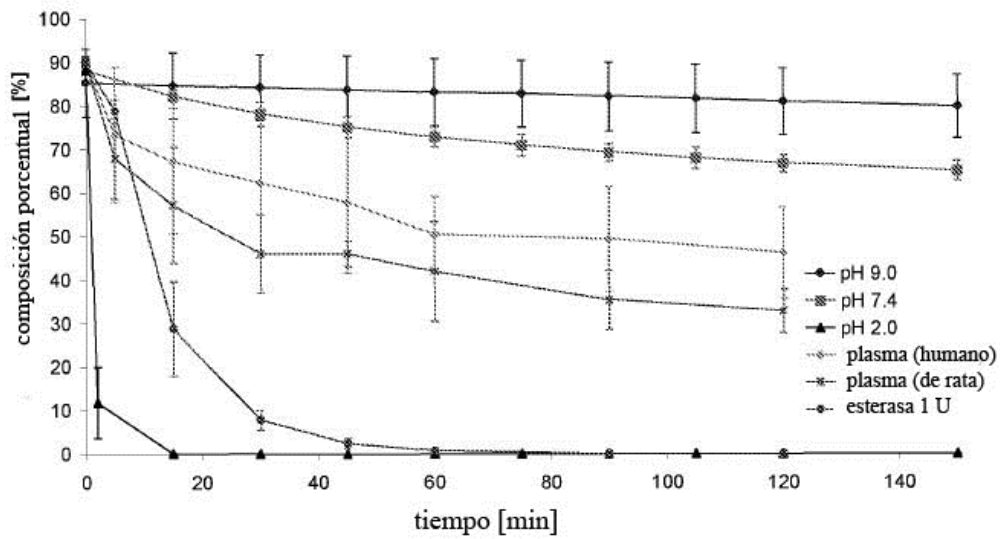


Figura 2

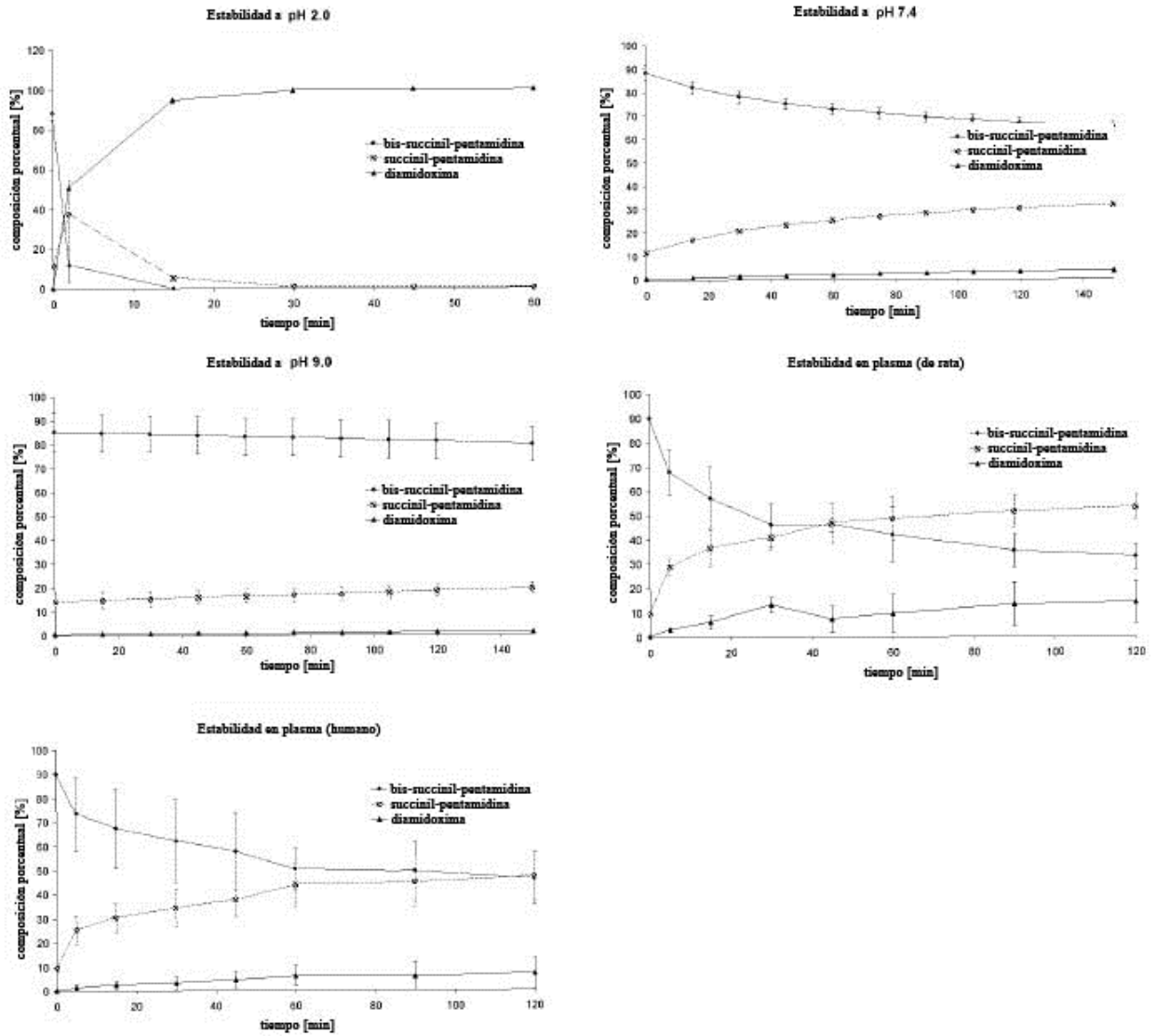


Fig. 3

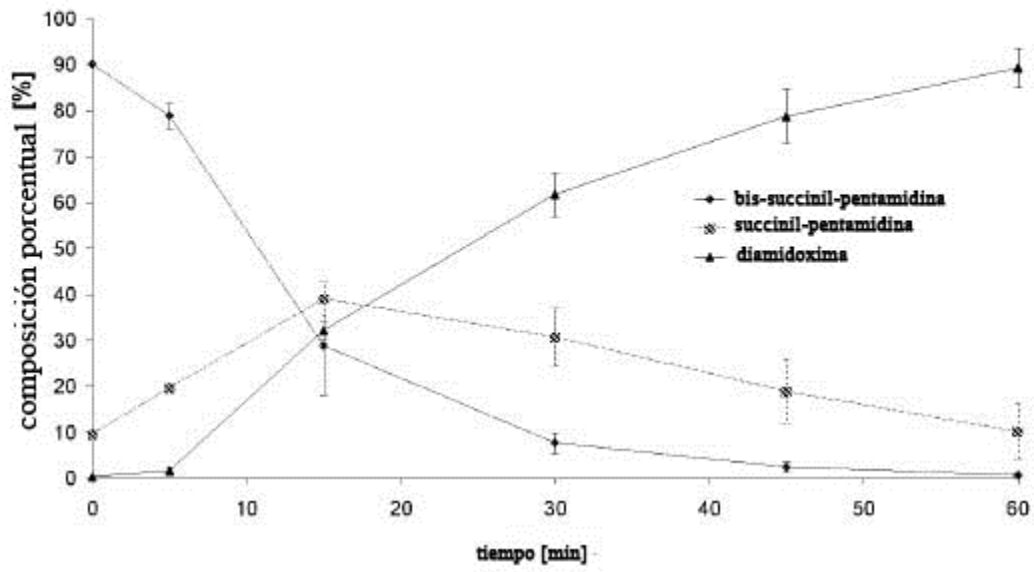


Figura 4

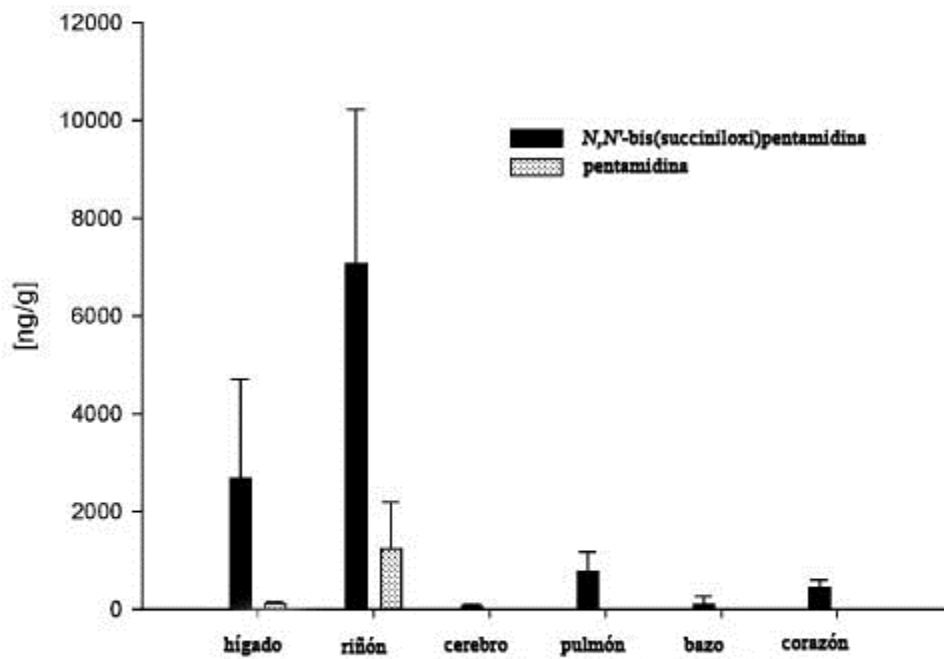


Figura 5