

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 494**

21 Número de solicitud: 201631335

51 Int. Cl.:

C07C 65/05 (2006.01)

C07C 233/65 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

17.10.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.05.2018

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2017/070686

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (60.0%)**

C/ Serrano, nº 117

28006 Madrid ES y

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY
OF GLASGOW (40.0%)**

72 Inventor/es:

DARDONVILLE, Christophe;

DE KONING, Hendrik Pieter y

EBILOMA, Godwin Unekwojo

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **INHIBIDORES ALOSTERICOS DE TAO COMO AGENTES ANTIPARASITARIOS
Y ANTIFÚNGICOS**

57 Resumen:

Inhibidores alostericos de TAO como agentes antiparasitarios y antifúngicos.

La presente invención proporciona una nueva serie de compuestos derivados del ácido 2,4-dihidroxibenzoico. Además, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende dichos compuestos y al uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades causadas por parásitos, preferiblemente parásitos protozoarios u hongos. Estas enfermedades pueden producirse tanto en humanos como en animales.

ES 2 668 494 A1

**INHIBIDORES ALOSTERICOS DE TAO COMO AGENTES ANTIPARASITARIOS Y
ANTIFÚNGICOS**

DESCRIPCION

5

La presente invención se refiere a derivados del ácido 2,4-dihydroxibenzoico y a su potencial para el tratamiento de enfermedades infecciosas (antiparasitario) tanto humanas como animales. Por tanto, la invención se enmarca en el sector farmacéutico y veterinario.

10

ESTADO DE LA TECNICA

La tripanosomiasis africana humana (enfermedad del sueño) es una parasitosis, transmitida por la mosca tse-tsé, provocada por dos subespecies de *Trypanosoma* 15 *brucei*, *gambiense* y *rhodesiense*. Otras especies y subespecies de *Trypanosoma* (*T. congolense*, *T. brucei* subs. *brucei*) infectan el ganado, causando la enfermedad denominada nagana, con grandes daños económicos en estos países del África subsahariana. Esta enfermedad está resurgiendo en las últimas décadas y tiene un coste humano y económico enorme. Existen hoy en día cuatro fármacos registrados 20 para tratar dicha enfermedad: la fase primaria se trata con pentamidina o con suramina mientras que en la fase tardía, (neurológica) se usa el arsenical melarsoprol, cuyo tratamiento tiene un 5-10% de mortalidad. La única alternativa al melarsoprol, la eflornitina (DFMO), es cara, activa sólo contra *T. b. gambiense* y de administración compleja e incómoda, por lo que su uso está reservado a casos refractarios al 25 melarsoprol (Dardonville *Expert Opin. Ther. Patents*, 2005, 15, 1241-1257). Estos fármacos presentan muchos inconvenientes debido a una eficacia selectiva dependiendo de la subespecie de tripanosoma o el estado de la infección. Además, tanto su alta toxicidad como el modo de administración parenteral y la emergente resistencia de los fármacos actuales ponen de manifiesto la necesidad de encontrar 30 nuevas armas terapéuticas para el tratamiento de la HAT. En particular, el descubrimiento de nuevos fármacos que penetren en el sistema nervioso central y curen la fase tardía de la enfermedad, para el cual no hay medicamentos satisfactorios, sigue siendo una prioridad en medicina tropical.

Por otra parte, está aumentando el fenómeno de resistencia a los fármacos veterinarios (diminaceno, bromuro de etidio) utilizados para tratar la tripanosomiasis animal en el ganado. Por lo tanto, el descubrimiento de nuevos fármacos tripanocidas para uso veterinario es un tema altamente prioritario.

5

Los tripanosomas adaptan su metabolismo energético en función de la disponibilidad de sustratos. Así pues, los tripomastigotes sanguíneos (forma del parásito presente en el huésped mamífero) principalmente producen su energía mediante glicólisis de la glucosa presente en la sangre del huésped puesto que no poseen una cadena respiratoria funcional (Grant, *et al.*, *Biochem. J.* **1960**, 76, 229-237). Clarkson *et al.* han demostrado que la respiración de los tripomastigotes sanguíneos de *T. b. brucei* depende de una enzima denominada “oxidasa alternativa de tripanosoma” (TAO en sus siglas en inglés) (Clarkson *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 17770-17776.). TAO es la única oxidasa disponible para re-oxidar el NADH que se acumula durante la glicólisis. TAO es una oxidasa del ubiquinol independiente de citocromo que no es inhibida por cianuro. Al contrario, dicha enzima es sensible a inhibidores específicos como el ácido salicilhidroxámico (SHAM) o la ascofuranona (Minagawa, *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, 84, 271-280).

20 TAO es una enzima que no tienen los mamíferos y que es esencial para la viabilidad de los tripomastigotes sanguíneos. Por lo tanto, TAO es una buena diana para la quimioterapia ya que un inhibidor selectivo no debería producir efectos secundarios en el huésped (Chaudhuri, *et al.*, *Trends Parasitol.* **2006**, 22, 484-491). Además, esta enzima se conserva entre las diferentes subespecies de *T. brucei* por lo que los inhibidores de TAO podrían ser útiles para las diferentes subespecies de tripanosomas. Estudios anteriores tanto *in vitro* como *in vivo* han mostrado el potencial de los inhibidores de TAO para inhibir el crecimiento de los tripanosomas, y, en ciertos casos, curar modelos murinos de tripanosomiasis (Yabu, *et al.*, *Parasitol. Int.* **2003**, 52, 155-164).

30

Otros parásitos, como *Cryptosporidium parvum*, u hongos, como *Candida albicans*, poseen una oxidasa alternativa (AOX) que resulta esencial para su crecimiento. Es conocido que la inhibición de la AOX del hongo *Candida albicans* aumenta la susceptibilidad de dicho hongo al tratamiento por medicamentos de la familia de los

azoles (Yan, *et al. J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, *64*, 764-773). Por lo tanto, los inhibidores de TAO descritos en esta patente podrían ser útiles para el tratamiento de la candidiasis.

- 5 Hasta la fecha, se han descrito principalmente tres familias de inhibidores de TAO basadas en la estructura del ácido salicilhidroxámico (SHAM), el ácido 3,4-dihidroxibenzoico y el antibiótico de origen natural ascofuranona. Dichos inhibidores se unen al sitio activo de la enzima de manera similar al sustrato endógeno ubiquinona.
- 10 Sin embargo, los inhibidores descritos hasta la fecha presentan varias limitaciones relacionadas con su toxicidad, su baja selectividad o una baja potencia inhibitoria.

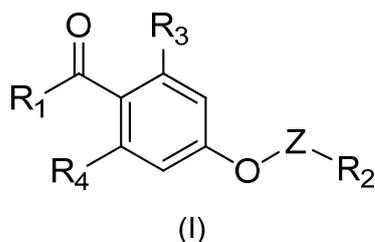
En esta la presente invención, se propone una estrategia para remediar dichos problemas mediante la preparación de nuevos inhibidores alostéricos de TAO que se unen en la interfaz de la enzima que interacciona con los lípidos de membrana de la mitocondria. Al no competir con el sustrato ubiquinona, estos inhibidores presentan baja citotoxicidad para las células humanas.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

20

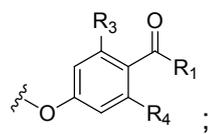
Los compuestos descritos en la presente invención pueden ser útiles para tratar infecciones causadas por protozoos tripanosomátidos (*Trypanosoma*), apicomplejos (*Cryptosporidium*), u hongos (*Candida*).

- 25 Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I), sal farmacéuticamente aceptable, o solvato del mismo



donde:

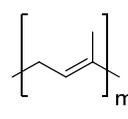
- 30 R₁ se selecciona de entre H, OH, NHOH, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₄;

R₂ se selecciona de entre halógeno, OCHO, y  ;

R₃ se selecciona de entre OH, halógeno, y alquilo C₁-C₄;

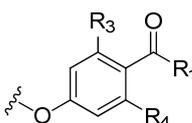
R₄ se selecciona de entre H y alquilo C₁-C₄;

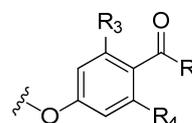
Z se selecciona de entre -(CH₂)_n donde n es un número entero comprendido

5 entre 6 y 20, y  donde m es un número entero comprendido entre 1 y 3;

con la condición de que cuando

- R₁ es H, R₃ es OH, R₄ es H y R₂ es Br, n es diferente a 6, 8, 9, 10 y 12;

10 - R₁ es H, R₃ es OH, R₄ es H y R₂ es  , n es diferente a 6, 8, 10 y 12; o

- R₁ es OH, R₃ es OH, R₄ es H y R₂ es  , n es diferente a 6 y 10.

15 A partir de ahora puede referirse a los compuestos de fórmula (I) como compuestos de la invención.

20 El término "solvato" pretende indicar una forma de solvato farmacéuticamente aceptable de un compuesto especificado que mantiene la eficacia biológica de dicho compuesto. Los ejemplos de sales incluyen compuestos de la invención junto con agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO (dimetilsulfóxido), acetato de etilo, ácido acético o etanolamina. El término "hidrato" se emplea cuando dicho disolvente es agua. Los métodos de solvatación son de conocimiento general en la materia.

25 El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales preparadas a partir de bases farmacéuticamente aceptables no tóxicas incluyendo bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, de litio, de magnesio, sales mangánicas,

manganosas, de potasio, de sodio, de cinc y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluidas aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas, y resinas de intercambio iónico básicas, tales como

5 arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etil-morfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina, y

10 similares. Cuando el compuesto de la presente invención es básico, pueden prepararse sales a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos inorgánicos y orgánicos. Tales ácidos incluyen el ácido acético, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico,

15 mandélico, metanosulfónico, mícico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, ptoluenosulfónico y similares.

Los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio, y las formadas a partir de ácidos maleico,

20 fumárico, benzoico, ascórbico, pamoico, succínico, clorhídrico, sulfúrico, bismetilensalicílico, metanosulfónico, etanodisulfónico, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, glucónico, aspártico, esteárico, palmítico, itacónico, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, ciclohexilsulfámico, fosfórico y nítrico.

25 El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo o *sec*-butilo. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 2 átomos de carbono y más preferiblemente son un grupo metilo. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más

30 sustituyentes tales como alquínilo, alquenilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro o mercapto.

Por "halógeno" se entiende en la presente invención a un átomo de bromo, cloro, yodo o flúor.

En una realización preferida, R_1 se selecciona de entre H y OH, y más preferiblemente R_1 es OH.

- 5 En otra realización preferida, R_2 es halógeno, y más preferiblemente bromo.

En otra realización preferida, R_2 es OCHO.



10

En otra realización preferida, R_3 se selecciona de entre F, OH y CH_3 , y más preferiblemente R_3 es OH.

En otra realización preferida, R_4 es H.

15

En otra realización preferida, Z es $-(CH_2)_n$ donde n es un número entero comprendido entre 8 y 20, y aún más preferido n es un número entero y par comprendido entre 10 y 16.

- 20 En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (I) se seleccionan de la lista que comprende:

Ácido 4-((10-bromodecil)oxi)-2-hidroxibenzoico (**7f**),

Ácido 4-((10-(formiloxi)decil)oxi)-2-hidroxibenzoico (**8f**),

Ácido 4-((12-bromododecil)oxi)-2-hidroxibenzoico (**7g**),

- 25 Ácido 4-((12-(formiloxi)dodecil)oxi)-2-hidroxibenzoico (**8g**),

Ácido 4,4'-(dodecano-1,12-diilbis(oxi))bis(2-hidroxibenzoico) (**15g**),

Ácido 4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-hidroxibenzoico (**7h**),

Ácido 4-((14-(formiloxi)tetradecil)oxi)-2-hidroxibenzoico (**8h**),

Ácido 4,4'-(tetradecano-1,14-diilbis(oxi))bis(2-hidroxibenzoico) (**15h**),

- 30 Ácido 4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-metilbenzoico (**9h**),

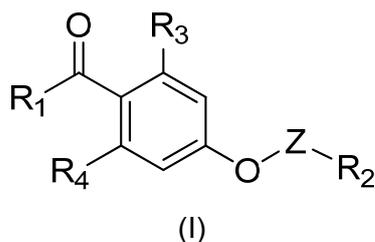
Ácido 4-((14-(formiloxi)tetradecil)oxi)-2-metilbenzoico (**10h**),

Ácido 4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-fluorobenzoico (**11h**),

4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-hidroxibenzaldehido (**12h**),
 14-(4-formil-3-hidroxifenoxi)tetradecil formiato (**13h**),
 Ácido 4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-hidroxi-6-metilbenzoico (**14h**),
 Ácido 4,4'-(tetradecano-1,14-diilbis(oxi))bis(2-metilbenzoico) (**16h**),
 5 4,4'-(tetradecano-1,14-diilbis(oxi))bis(2-hidroxibenzaldehido) (**17h**),
 Ácido 4,4'-(tetradecano-1,14-diilbis(oxi))bis(2-hidroxi-6-metilbenzoico) (**18h**),
 Ácido 4-((16-bromohexadecil)oxi)-2-hidroxibenzoico (**7i**),
 Ácido 4-((16-(formiloxi)hexadecil)oxi)-2-hidroxibenzoico (**8i**) y
 Ácido 4,4'-(hexadecano-1,16-diilbis(oxi))bis(2-hidroxibenzoico) (**15i**).

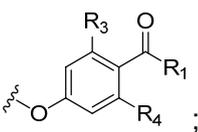
10

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula general (I)



15 donde:

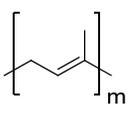
R₁ se selecciona de entre H, OH, NHOH, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₄;

R₂ se selecciona de entre halógeno, OCHO, y  ;

R₃ se selecciona de entre OH, halógeno, y CH₃;

R₄ se selecciona de entre H y CH₃;

20 Z se selecciona de entre -(CH₂)_n donde n es un número entero comprendido

entre 6 y 20, y  donde m es un número entero comprendido entre 1 y 3;

junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son sustancias conocidas por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

Los compuestos y composiciones de esta invención pueden usarse con otros fármacos para proporcionar una terapia de combinación. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición, o pueden proporcionarse como una
5 composición aparte para la administración al mismo tiempo o en un tiempo diferente.

Por tanto, en otra realización preferida, la composición de la invención se caracteriza por que además puede comprender al menos otro principio activo, preferiblemente un agente antiparasitario.
10

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de la invención, de fórmula general (I), para la elaboración de un medicamento.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de la invención, de fórmula general (I), para la elaboración de un medicamento para la
15 prevención y/o el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos u hongos, preferiblemente enfermedades causada por parásitos protozoarios. Estas enfermedades se producen en un animal, preferiblemente en un mamífero, incluyendo a humanos.

En una realización preferida, las enfermedades son enfermedades causadas por un parásito del género *Trypanosoma*, *Cryptosporidium*, o un hongo del género *Candida*. Y aún más preferiblemente los parásitos son de las especies *Trypanosoma brucei*,
20 *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma equinum*, *Trypanosoma equiperdum*,
25 *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax*, *Cryptosporidium parvum*, o *Candida albicans*.

En otra realización preferida, la enfermedad se selecciona entre tripanosomiasis africana humana (enfermedad del sueño), tripanosomiasis animal, criptosporidiosis, o
30 candidiasis.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de tratamiento y/o prevención de enfermedades parasitarias o causadas por parásitos que comprende la administración a un individuo en necesidad del mismo de una cantidad

terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto de la invención de fórmula (I), o de la composición farmacéutica según se describe en la presente invención. El individuo puede ser un animal, preferiblemente en un mamífero, incluyendo a humanos.

5

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, así como la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

10

Dicha composición terapéutica se puede preparar en forma sólida o en suspensión, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida.

15

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" 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. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

25

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Ruta sintética para la preparación de los derivados de fórmula (I): (i) $\text{Br}-(\text{CH}_2)_n-$ Br ($n = 6, 10, 12, 14, \text{ and } 16$; 1 equiv.), NaHCO_3 , DMF o CH_3CN , 65 °C.

30

Ejemplos.

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los
 5 inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos
 descritos en la presente invención.

Los compuestos de fórmula (I) que a continuación se sintetizan están esquematizados
 en la Figura 1.

10

Ejemplo 1. Síntesis de los compuestos de la invención**Procedimiento general**

La reacción se lleva a cabo en un tubo Kimax bajo atmosfera de argón. Una cantidad
 15 equimolar de ácido 2,4-dihidroxi-benzóico **1** (142 mg, 0,9 mmol), NaHCO₃ (78 mg, 0,9
 mmol), y dibromoalcano (0,9 mmol) en DMF anhidra (10 mL) se calienta 65 °C durante
 24h. El disolvente se evapora a vacío obteniéndose un crudo sólido que contiene 3
 productos mayoritarios **7**, **8**, y **15**. La purificación se lleva a cabo por cromatografía
 sobre sílice (columna precompactada de 10 g) usando hexano/EtOAc (100/0 → 50/50)
 20 como eluyente, obteniéndose **7** (producto mayoritario, > 30%), **8** (< 10%), y **15** (<
 30%).

Ácido 4-((10-bromodecil)oxi)-2-hidroxi-benzóico (7f)

Se sigue el procedimiento general usando 1,10-dibromodecano (276 mg, 0.92 mmol).
 25 **7f** se aísla con una mezcla de hexano/EtOAc (98/2). Sólido blanquecino (127 mg,
 37%). HPLC (UV) > 91%; P.f = 41.3 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11.06 (s, 1H),
 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.43 – 6.33 (m, 2H), 6.08 – 5.59 (brs, 1H), 4.30 (t, *J* = 6.6 Hz,
 2H), 3.40 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.92 – 1.20 (m, 16H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ
 170.19, 163.79, 162.12, 131.98, 107.91, 106.23, 103.26, 65.34, 34.18, 32.95, 29.50,
 30 29.46, 29.31, 28.85, 28.73, 28.29, 26.08. LRMS (ES⁺) *m/z* 375 [M+H]⁺.

Ácido 4-((10-(formiloxi)decil)oxi)-2-hidroxi-benzoico (8f)

8f se aísla con una mezcla hexano/EtOAc (96/4). Sólido blanco (20 mg, 5.8%). HPLC
 (UV) > 95%; P.f = 62–68 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.96 (s, 1H), 7.99 (s, 1H),

7.66 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.33 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.30 (dd, $J = 2.4, 8.5$ Hz, 1H), 4.23 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 4.10 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.72 – 1.09 (m, 16H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.18, 163.84, 162.27, 161.63, 131.95, 107.93, 106.18, 103.29, 65.31, 64.43, 29.84, 29.49, 29.28, 29.26, 28.71, 28.64, 26.08, 25.94. LRMS (ES^+) m/z 339 [M+H] $^+$.

Ácido 4,4'-(decano-1,10-diilbis(oxi))bis(2-hidroxibenzoico) (15f)

15f se aísla con una mezcla hexano/EtOAc (70/30). Sólido blanco (83 mg, 24%). HPLC (UV) > 95%; P.f. = 118.6–120.1 °C. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.76 (br, 3H), 7.62 (dd, $J = 4.4, 8.8$ Hz, 2H), 6.36 (dt, $J = 3.6, 7.7$ Hz, 2H), 6.28 (dd, $J = 2.5, 5.1$ Hz, 2H), 4.25 (t, $J = 6.4$ Hz, 4H), 1.68 (p, $J = 6.5$ Hz, 4H), 1.30 (m, 12H). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 169.26, 164.21, 162.79, 131.44, 108.31, 103.97, 102.43, 64.61, 28.76, 28.53, 28.01, 25.36. LRMS (ES^+) m/z 447 [M+H] $^+$.

15 Ácido 4-((12-bromododecil)oxi)-2-hidroxibenzoico (7g)

Se sigue el procedimiento general usando 1,12-dibromododecano (142 mg, 0.92 mmol). **7g** se aísla con una mezcla hexano/EtOAc (97/3). Sólido blanco (176 mg, 48%). HPLC (UV) > 95%; P.f = 48–51 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 11.00 (s, 1H), 7.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.33 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.30 (dd, $J = 2.3, 8.4$ Hz, 1H), 5.68 (brs, 1H), 4.23 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.33 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.86 – 1.61 (m, 6H), 1.44 – 1.12 (m, 14H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.19, 163.77, 162.04, 131.99, 107.89, 106.26, 103.26, 65.38, 34.23, 32.97, 29.62, 29.55, 29.35, 28.89, 28.73, 28.31, 26.09. LRMS (ES^+) m/z 401, 403 [M+H] $^+$.

25 Ácido 4-((12-(formiloxi)dodecil)oxi)-2-hidroxibenzoico (8g)

8g se aísla con una mezcla hexano/EtOAc (90/10). Sólido amorfo blanco (14.6 mg, 4%). HPLC (UV) > 95%; P.f = 68–70 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.99 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.66 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.34 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.31 (dd, $J = 2.4, 8.4$ Hz, 1H), 6.15 (brs, 1H), 4.23 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 4.10 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.73 – 1.56 (m, 6H), 1.22 (m, 14H). LRMS (ES^+) m/z 367 [M+H] $^+$.

Ácido 4,4'-(dodecano-1,12-diilbis(oxi))bis(2-hidroxibenzoico) (15g)

15g se aísla con una mezcla hexano/EtOAc (50/50). Sólido amorfo blanco (90 mg, 24%). HPLC (UV) > 95%; P.f = 96–97 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.91 (s, 2H),

9.32 (s, 2H), 7.61 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.35 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.32 (dd, $J = 2.4, 8.6$ Hz, 2H), 4.21 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.12 (s, 2H), 1.68 (t, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.35 – 1.20 (m, 14H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.26, 164.05, 163.75, 131.53, 108.31, 104.87, 103.05, 64.96, 29.73, 29.52, 29.27, 28.68, 26.02. LRMS (ES^+) m/z 475 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5

Ácido 4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-hidroxibenzoico (7h)

Se sigue el procedimiento general usando 1,14-dibromotetradecano (285 mg, 0.8 mmol). **7h** se aísla usando hexano/EtOAc (98/2). Sólido blanco (123 mg, 36%). HPLC (UV) > 95%; P.f = 72–73.8 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.99 (s, 1H), 7.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.34 – 6.31 (m, 1H), 6.29 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 5.59 (brs, 1H), 4.23 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.33 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.90-1.55 (m, 6H), 1.52 – 1.01 (m, 18H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.18, 163.81, 162.01, 132.00, 107.87, 106.31, 103.26, 65.39, 34.23, 32.99, 29.73, 29.68, 29.63, 29.57, 29.37, 28.91, 28.75, 28.36, 28.32, 26.10. LRMS (ES^+) m/z 429, 431 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

15

Ácido 4-((14-(formiloxi)tetradecil)oxi)-2-hidroxibenzoico (8h)

8h se aísla usando hexano/EtOAc (96/4). Sólido blanco (3 mg, 0.9%). HPLC (UV) > 95%; P.f = 70–71 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.96 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.66 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.38 – 6.22 (m, 2H), 5.66 (br, 1H), 4.24 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 4.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.74 – 1.52 (m, 6H), 1.33 – 1.22 (m, 18H). LRMS (ES^+) m/z 395 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

20

Ácido 4,4'-(tetradecano-1,14-diilbis(oxi))bis(2-hidroxibenzoico) (15h)

15h se aísla usando hexano/EtOAc (70/30). Sólido blanco (61 mg, 18%). HPLC (UV) > 95%, P.f = 132.7–134.8 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.97 (brs, 2H), 7.62 (dd, $J = 2.0, 7.3$ Hz, 2H), 6.33 – 6.25 (m, 4H), 4.21 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H), 1.67 (p, $J = 6.5$ Hz, 4H), 1.40 – 1.15 (m, 20H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.22, 163.77, 163.27, 131.64, 108.20, 104.89, 102.59, 65.05, 29.56, 29.52, 29.47, 29.21, 28.60, 25.95. LRMS (ES^+) m/z 503 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

25

Ácido 4-((16-bromohexadecil)oxi)-2-hidroxibenzoico (7i)

Se sigue el procedimiento general usando 1,16-dibromohexadecano (93 mg, 0.24 mmol). **7i** se aísla usando hexano/EtOAc (98/2). Sólido amorfo blanco (35 mg, 32%). HPLC (UV) > 95%; P.f = 58–60 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.98 (s, 1H), 7.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.33 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.30 (dd, $J = 2.5, 8.4$ Hz, 1H), 5.43 (brs, 1H),

30

4.23 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.34 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.78 (p, $J = 6.9$ Hz, 4H), 1.67 (p, $J = 6.8$ Hz, 4H), 1.46 – 1.23 (m, 20H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.16, 163.85, 161.94, 132.00, 107.83, 106.35, 103.27, 65.37, 34.22, 33.00, 29.79, 29.76, 29.70, 29.69, 29.65, 29.59, 29.39, 28.92, 28.76, 28.33, 26.12. LRMS (ES^+) m/z 456, 458
5 [M+H] $^+$.

Ácido 4-((16-(formiloxi)hexadecil)oxi)-2-hidroxibenzoico (8i)

8i se aísla usando hexano/EtOAc (96/4). Sólido blanco (11 mg, 10%). HPLC (UV) > 95%; P.f = 76–77 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.96 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.67 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.33 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.29 (dd, $J = 2.4, 8.5$ Hz, 1H), 5.36 (brs, 1H),
10 $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.23 (t, $J = 6.5$ Hz, 3H), 4.10 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.89 – 0.97 (m, 28H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.38, 164.16, 162.21, 161.71, 132.23, 108.04, 106.62, 103.54, 65.59, 64.60, 30.11, 30.01 (m, solapamiento de picos), 29.91, 29.87, 29.60, 29.55, 29.01, 28.91, 26.36, 26.19. LRMS (ES^+) m/z 423 [M+H] $^+$.

15

Ácido 4,4'-(hexadecano-1,16-diilbis(oxi))bis(2-hidroxibenzoico) (15i)

15i se aísla usando hexano/EtOAc (70/30). Sólido amorfo blanco (3 mg, 2.7%). HPLC (UV) > 95%; P.f = 106–110 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.99 (s, 2H), 7.70 – 7.57 (m, 2H), 6.29 (m, 4H), 4.21 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H), 1.81 – 1.56 (m, 4H), 1.55 – 0.99 (m, 20H), 0.77 (m, 4H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.25, 163.77, 163.31, 131.68,
20 108.25, 104.96, 102.71, 102.64, 65.09, 32.60, 30.74, 30.08, 29.72, 29.65, 29.58, 29.53, 29.27, 28.65, 26.00, 25.77. LRMS (ES^+) m/z 531 [M+H] $^+$.

Ácido 4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-metilbenzoico (9h)

9h se aísla usando hexano/EtOAc (90/10). Sólido blanco (41 mg, 7%); Pf = 54.4 – 57.3 °C; HPLC (UV) > 95 %. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.81 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, ArH), 6.66 – 6.60 (m, 2H, 2×ArH), 6.17 (s.a., 1H, COOH), 4.18 (s, 2H, CH_2O), 3.33 (t, $J = 6.83$ Hz, 2H, CH_2Br), 2.49 (s, $J = 3.23$ Hz, 3H, Ar CH_3) 2.03 – 0.83 (m, 24H, 12× CH_2).
25 ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 167.8, 159.2, 143.4, 133.4, 122.0, 118.5, 112.8, 65.0, 34.2, 33.0, 32.95, 29.8, 29.7, 29.69, 29.65, 29.6, 29.5, 29.4, 28.9, 28.3, 26.3, 22.4. LRMS (ESI^+) m/z 427, 429 (M+H) $^+$. HRMS (ESI^+) m/z 426.1790 ($\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{BrO}_3$ requiere 426.1770).

30

Ácido 4-((14-(formiloxi)tetradecil)oxi)-2-metilbenzoico (10h)

10h se aísla usando hexano/EtOAc (80/20). Sólido amarillento (31 mg, 6%); Pf = 59.0 – 60.5 °C; HPLC (UV) > 95 %. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.00 (s, 1H, OCHO), 7.86 – 7.75 (m, 1H, ArH), 6.66 – 6.60 (m, 2H, 2×ArH), 6.36 (s.a., 1H, COOH), 4.18 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂OCHO), 4.10 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂O), 2.49 (s, 3H, ArCH₃), 1.70 – 1.53 (m, 4H, 2×CH₂CH₂O), 1.34 – 1.15 (m, 20H, 10×CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 167.8, 161.7, 159.2, 143.4, 133.4, 122.0, 118.5, 112.8, 65.0, 64.5, 29.8, 29.7, 29.64, 29.61, 29.5, 29.37, 29.28, 28.9, 28.6, 26.4, 26.3, 25.9, 22.4. LRMS (ESI⁺) *m/z* 393 (M+H)⁺. HRMS (ESI⁺) *m/z* 392.2548 (C₂₃H₃₆O₅ requiere 392.2563).

10 Ácido 4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-fluorobenzoico (11h)

Sólido beige (16 mg, 20%); Pf = 42 – 48 °C; HPLC (UV) > 95 %. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.95 (s, 1H, COOH), 7.66 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, ArH), 6.46 – 6.19 (m, 2H, ArH), 4.24 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH₂O), 3.91 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, CH₂O), 3.35 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂Br), 1.97 – 0.57 (m, 24H, 12×CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.2, 165.2, 164.0, 131.3, 108.0, 105.6, 101.3, 68.1, 33.9, 33.8, 32.8, 32.7, 29.0, 28.01, 27.96, 25.4. LRMS (ESI⁺) *m/z* 431, 433 (M+H)⁺.

4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-hidroxibenzaldehido (12h)

12h se aísla usando hexano/EtOAc (97/3). Sólido blanco (17 mg, 4%); Pf = 55.5 – 58.6 °C; HPLC (UV) > 95 %; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11.41 (s, 1H, CHO), 9.64 (s, 1H, OH), 7.35 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 6.46 (dd, *J* = 2.4, 8.6 Hz, 1H, ArH), 6.34 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 3.93 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂O), 3.34 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂Br), 1.82 – 1.69 (m, 4H, CH₂CH₂O, CH₂CH₂Br), 1.23 (m, 20H, 10×CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 194.4, 166.6, 164.7, 135.3, 115.2, 108.9, 101.2, 68.8, 34.2, 33.0, 29.9, 29.74, 29.68, 29.6, 29.5, 29.1, 28.9, 28.3, 26.1. LRMS (ESI⁺) *m/z* 413, 415 (M+H)⁺. HRMS (ESI⁺) *m/z* 412.1621 (C₂₁H₃₃BrO₃ requiere 412.1613).

14-(4-formil-3-hidroxifenoxi)tetradecil formiato (13h)

13h se aísla usando hexano/EtOAc (97/3). Sólido amarillento (40 mg, 9%); Pf = 63.5 – 68.8 °C; HPLC (UV) > 95 %. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11.41 (s, 1H, CHO), 9.63 (s, 1H, OH), 7.99 (s, 1H, OCHO), 7.34 (dd, *J* = 3.3, 8.7 Hz, 1H, ArH), 6.45 (dd, *J* = 2.4, 8.7 Hz, 1H, ArH), 6.34 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, ArH), 4.09 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH₂OCHO), 4.03 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH₂OCHO), 3.93 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂O-), 1.82 – 1.42 (m, 8H, 2×CH₂CH₂O, 2×CH₂CH₂CH₂O), 1.42 – 1.04 (m, 16H, 8×CH₂). ¹³C NMR (75 MHz,

CDCl₃) δ 194.4, 166.6, 164.7, 161.4, 135.3, 115.1, 108.9, 101.2, 68.7, 64.3, 29.74, 29.69, 29.68, 29.63, 29.4, 29.3, 29.1, 28.64, 28.57, 26.1, 26.0. LRMS (ESI⁺) *m/z* 379 (M+H)⁺. HRMS (ESI⁺) *m/z* 378.2417 (C₂₂H₃₄O₅ requiere 378.2406).

5 **Ácido 4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-hidroxi-6-metilbenzoico (14h)**

14h se aísla usando hexano/EtOAc: 95/5. Sólido blanco (155 mg, 26%); Pf = 62.5 – 64.7 °C; HPLC (UV) > 95 %. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11.88 (s, 1H, COOH), 6.28 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, ArH), 6.22 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, ArH), 5.38 (s, 1H, ArOH), 4.33 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂O), 3.41 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂Br), 2.50 (s, 3H, ArCH₃), 1.93 – 1.67 (m, 4H, CH₂CH₂O, CH₂CH₂Br), 1.52 – 1.14 (m, 20H, 10×CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172.0, 165.5, 160.3, 144.1, 111.4, 106.0, 101.4, 65.7, 34.2, 33.0, 29.7, 29.7, 29.67, 29.61, 29.3, 28.9, 28.7, 28.3, 26.3, 24.6. LRMS (ESI⁺) *m/z* 443, 445 (M+H)⁺. HRMS (ESI⁺) *m/z* 442.1709 (C₂₂H₃₅BrO₄ requiere 442.1719).

15 **Ácido 4,4'-(tetradecano-1,14-diilbis(oxi))bis(2-metilbenzoico) (16h)**

16h se aísla usando hexano/EtOAc: 90/10. Sólido blanco (15 mg, 6.6%); Pf = 42 – 46 °C; HPLC (UV) > 95 %. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.82 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H, 2×ArH), 6.74 (m, 2H, 2×ArH), 6.64 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, 2×ArH), 4.21 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H, 2×CH₂O), 2.51 (s, 6H, 2×ArCH₃), 1.73 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H, 2×CH₂CH₂O), 1.49 – 1.03 (m, 20H, 10×CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 168.8, 161.5, 143.8, 133.9, 121.3, 118.9, 113.3, 65.3, 30.3, 30.22, 30.20, 29.9, 29.4, 26.8, 22.6. LRMS (ESI⁺) *m/z* 499 (M+H)⁺. HRMS (ESI⁺) *m/z* 498.2995 (C₃₀H₄₂O₆ requiere 498.2981).

4,4'-(tetradecano-1,14-diilbis(oxi))bis(2-hidroxibenzaldehido) (17h)

17h se aísla usando hexano/EtOAc: 97/3. Sólido blanco (12 mg, 3%); Pf = 111.0 – 112.8 °C; HPLC (UV) > 95 %. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11.46 (s, 2H, 2×CHO), 9.69 (s, 2H, 2×OH), 7.40 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2×ArH), 6.51 (dd, *J* = 2.4, 8.7 Hz, 2H, 2×ArH), 6.39 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, 2×ArH), 3.98 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H, 2×CH₂O), 1.83 – 1.20 (m, 24H, 12×CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 194.4, 166.6, 164.7, 135.3, 115.2, 108.9, 101.2, 68.8, 29.8, 29.77, 29.71, 29.5, 29.1, 26.1. LRMS (ESI⁺) *m/z* 471 (M+H)⁺. HRMS (ESI⁺) *m/z* 470.2667 (C₂₈H₃₈O₆ requiere 470.2668).

Ácido 4,4'-(tetradecano-1,14-diilbis(oxi))bis(2-hidroxi-6-metilbenzoico) (18h)

18h se aísla usando hexano/EtOAc: 85/15. Sólido blanco (29.6 mg, 5%); HPLC (UV) 89%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.90 (s.a., 2H), 10.02 (s.a., 2H), 6.25 – 6.06 (m, 4H), 4.22 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 2.30 (s, 6H), 1.73 – 1.58 (m, 4H), 1.46 – 1.16 (m, 20H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃+ CD₃OD) δ 170.2, 161.8, 161.3, 141.1, 110.5, 107.0, 100.5, 64.8, 29.05, 28.97, 28.6, 28.1, 25.6, 22.5, 21.3. LRMS (ESI⁺) *m/z* 531 (M+H)⁺.

Ejemplo 2. Ensayos de la capacidad inhibitoria de TAO y de la actividad tripanocida de los compuestos de la invención

Los compuestos se evaluaron como inhibidores de la enzima TAO recombinante purificada en el ensayo de ubiquinol-oxidasa. En este ensayo, la actividad ubiquinol-oxidasa se mide mediante el registro del cambio de absorbancia del ubiquinol-1 a 278 nm en presencia de rTAO en Tris-HCl (pH 7,4) a 25 °C. La enzima rTAO se purificó siguiendo el protocolo de Kido *et al* (Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. **2010**, 1797, 4:443-450).

Los ensayos *in vitro* de actividad sobre el parásito *T. b. brucei* (tripomastigotes de las cepas silvestre y resistente Lister 427 y B48, respectivamente) se realizaron siguiendo el método descrito previamente (Rodenko, *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51, 3796-3802) utilizando el test del “Alamar blue”.

Inhibición de TAO

Los compuestos objetos de la presente patente son potentes inhibidores de rTAO con valores de IC₅₀ en el rango nanomolar (6,9 – 150 nM). Estos valores son del mismo orden que el compuesto de referencia ascofuranona y hasta 1000 veces más potentes que el fármaco de referencia SHAM (Tabla 1).

Cabe destacar el efecto potenciador de la actividad inhibitoria de TAO del sustituyente R² (formula I) en comparación con el compuesto sin sustituir (ej. Comparación de los valores de **8f** y **15f** con el ácido 4-(deciloxi)-2-hidroxibenzoico).

Estos compuestos son particularmente interesantes al unirse a un sitio alostérico de TAO, cerca de la interfaz con la membrana interna de la mitocondria.

Actividad tripanocida en presencia de glicerol

La co-incubación con glicerol (un inhibidor de la glucólisis anaeróbica) aumenta de manera significativa la actividad tripanocida de los compuestos objetos de esta patente, o de SHAM, mientras que no tiene efecto sobre la actividad de los fármacos de referencia pentamidina y diminaceno (Tabla 1). Esto indica que TAO es una diana de dichos compuestos en *T. brucei*.

Tabla 1. Valores de EC₅₀ (μM) sobre *T. b. brucei* WT en presencia de glicerol (5 mM) y valores de IC₅₀ (μM) para la inhibición de la enzima rTAO purificada.

Ref	Compuesto	<i>T. b. brucei</i> ^a	FR ^b	rTAO ^c
TAO31	7g	6.2 ± 0.3	0.42	0.0174
TAO34	7i	11.1 ± 0.6	0.24	0.0124
TAO26	8f	17.5 ± 0.9	0.55	0.15
TAO33	8i	5.1 ± 0.5	0.43	0.0144
TAO29	15f	12.2 ± 0.6	0.25	0.0069
TAO22	15g	13.6 ± 1.2	0.41	0.007
TAO30	15h	15.9 ± 1.5	0.38	0.0157
TAO32	15i	12.4 ± 0.3	0.46	0.0123
	SHAM ^d	7.0 ± 0.3	0.18	5.9
	4-DHBM ^e			>50
	A-4-DHB ^f			1.9
	AF ^g			0.002
	Pentamidina	0.004 ± 0.0006	1.32	
	Diminaceno	0.063 ± 0.002	0.97	

^a Tripomastigotes de *T. b. brucei* s427 (n = 3). ^b Factor de resistencia factor relativo a la cepa s427 sin glicerol: FR = EC₅₀ (en presencia de glicerol)/EC₅₀ (sin glicerol). ^c Enzima TAO recombinante purificada de *T. b. brucei* (n = 3). ^d Ácido salicilhidroxámico.

^e 4-(Deciloxi)-2-hidroxibenzoato de metilo. ^f Ácido 4-(deciloxi)-2-hidroxibenzoico. ^g Ascofuranona.

Actividad tripanocida sobre *T. brucei* y *T. congolense*, y citotoxicidad

5 Los compuestos objetos de esta patente muestran actividades sobre *T. brucei* en el rango micromolar (3,8 – 49 μM) siendo **10h** y **13h** hasta 10 veces más potentes que SHAM en este ensayo. Estos compuestos son igualmente activos sobre la cepa resistente B48 (factor de resistencia ≈ 1) por lo que no muestran resistencia cruzada con otros fármacos tripanocidas como la pentamidina y el diminaceno. Cabe destacar

10 el efecto potenciador sobre la actividad tripanocida de la presencia de una cadena metilénica de más de 4 carbonos. En efecto, el compuesto de estructura **7e** con cadena metilénica de 4 carbonos (**7e**: Z = $(\text{CH}_2)_4$, R¹ = OH, R² = Br, R³ = OH, R⁴ = H) no muestra actividad tripanocida a la concentración de 400 μM (concentración más alta ensayada) mientras que el análogo de cadena metilénica de 6 carbonos (**7f**: Z =

15 $(\text{CH}_2)_6$, R¹ = OH, R² = Br, R³ = OH, R⁴ = H) tiene una EC₅₀ = 17.7 μM sobre *T. brucei* WT (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de EC₅₀ (μM) sobre *T. b. brucei*, *T. congolense* y citotoxicidad sobre células humanas.

	Compuesto	<i>T. brucei</i> WT ^a EC ₅₀ (μM)	<i>T. brucei</i> B48 ^b EC ₅₀ (μM)	FR ^c	<i>T.</i> <i>congolense</i>	Células HFF ^d CC ₅₀ (μM)	IS ^e
TAO41	7f	17.7 \pm 0.5	20.5 \pm 1.8	1.20	nd	nd	
TAO31	7g	14.5 \pm 1.0	14.9 \pm 1.0	1.02	59.1 \pm 3.7	>400	>28
TAO34	7i	45.7 \pm 1.5	49 \pm 0.6	1.07	>100	>400	>9
TAO26	8f	31.8 \pm 0.9	22.1 \pm 4.0	0.69	>100	>400	>12
TAO33	8i	11.9 \pm 1.6	13.0 \pm 3.7	1.21	>100	>400	>34
TAO38	9h	14.4 \pm 0.1	14.4 \pm 0.2	1.0	nd	nd	
TAO39	10h	4.1 \pm 0.1	4.44 \pm 0.02	1.1	nd	nd	
TAO51	11h	14.7 \pm 0.14	17.3 \pm 0.2	1.2	nd	nd	
TAO35	12h	17.6 \pm 0.5	15.5 \pm 0.8	0.9	nd	nd	
TAO37	13h	3.8 \pm 0.1	3.6 \pm 0.2	1.0	nd	nd	
TAO43	14h	14.6 \pm 0.2	15.6 \pm 0.2	1.1	nd	nd	
TAO29	15f	49.0 \pm 7.8	41.6 \pm 5.5	0.85	>100	>400	>8
TAO22	15g	32.9 \pm 0.9	33.6 \pm 1.0	1.02	>100	>400	>12

TAO30	15h	42.1 ± 2.8	36.5 ± 0.9	0.87	>100	>400	>9
TAO32	15i	26.7 ± 5.5	31.9 ± 8.0	1.20	>100	>400	>15
	4-DHBM ^f	135 ± 35	nd			>400	
	A-4-DHB ^g	> 100	nd			>400	
	SHAM ^h	49.4 ± 4.2	nd			nd	
	PAO ⁱ	nd	nd			0.036±0.004	

^a Tripomastigotes de *T. b. brucei* s427 (n>4). ^b Cepa de *T. b. brucei* resistente a pentamidina y diminaceno. ^c Factor de resistencia = EC₅₀(B48)/EC₅₀(s427). ^d Citotoxicidad sobre células humanas HFF (Human Foreskin Fibroblast) (n = 2); no se observa actividad citotóxica hasta 50 µM. ^e Índice de selectividad = EC₅₀(*T. brucei*) / CC₅₀. ^f 4-(Deciloxi)-2-hidroxibenzoato de metilo. ^g Ácido 4-(deciloxi)-2-hidroxibenzoico. ^h Ácido salicilhidroxámico. ⁱ Óxido de fenilarsina.

Ejemplo 3. Cinética de unión a rTAO determinada por Resonancia de Plasmones de Superficie (SPR) de los compuestos de la invención

10 La cinética de unión a rTAO de los compuestos se determinó en un instrumento Biacore T200 mediante ensayos de tipo "single-cycle kinetics". Como ejemplo representativo de esta serie de compuestos, se presentan los valores de constantes de asociación y disociación de **15i** (TAO32) con rTAO medidos por SPR. El hecho de que los sensogramas se ajusten mejor a un modelo de ligando heterogéneo que al

15 modelo 1:1 de unión (Tabla 3) sugiere que los compuestos se unen a un sitio alostérico de TAO, distinto al sitio activo de ubiquinol. Estos resultados están de acuerdo con datos de co-cristalización de **15f** con rTAO que demuestran que **15f** no se une al sitio activo de TAO sino a otro sitio de la enzima que interacciona con los lípidos de membrana.

20

Tabla 3. Valores de constantes de asociación y disociación de **15i** (TAO32) con rTAO medidos por SPR

Modelo	K _a 1(1/Ms)	K _d 1(1/s)	K _D 1 (nM)	K _a 2 (1/Ms)	K _d 2 (1/s)	Chi ² (RU ²)	U-value
Unión 1:1	3.964×10 ³	2.319×10 ⁻³	584.9			0.413	2
Ligando heterogéneo	2.804×10 ⁴	9.829×10 ⁻³	350.6	1.579×10 ²	3.561×10 ⁻⁴	0.0856	N/A

Límite de detección: K_a = 10⁻³ - 5×10⁻⁷ (1/Ms); K_d = 10⁻⁵ - 1 (1/s)

Ejemplo 4. Eficiencia de los ligandos (LE) e índice de eficiencia de unión (BEI) de los compuestos de la invención

- 5 Se calcularon la eficiencia de los ligandos (LE) y el índice de eficiencia de unión (BEI) a rTAO de los compuestos de la invención para determinar si eran buenos candidatos a fármacos (Tabla 4). Normalmente, un compuesto con $LE > 0.3$ se considera como buen candidato a fármaco. Cuanto más alto sea el BEI, mejor. Seis de los siete compuestos tienen un $LE > 0.3$ por lo que se pueden considerar candidatos a fármaco.

10

Tabla 4.

Compound	pIC ₅₀	NHA	LE	pK _D	BEI
TAO31 (7g)	7.759	24	0.453	6.051	15.1
TAO34 (7i)	7.907	28	0.395	6.764	14.8
TAO33 (8i)	7.841	30	0.366	6.895	16.3
TAO29 (15f)	8.161	32	0.357	6.398	14.3
TAO22 (15g)	8.155	34	0.336	6.680	14.1
TAO30 (15h)	7.804	36	0.303	6.532	13.0
TAO32 (15i)	7.910	38	0.291	6.455	12.2
AF	9.921	29	0.479	10.32	24.5

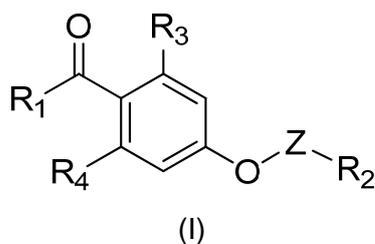
pIC₅₀ = $-(\log IC_{50})$; NHA: átomos que no son hidrógeno ("Non hydrogen atoms"); LE: Eficiencia del ligando ("Ligand efficiency") en kcal/mol/NHA [calculado como $1.4 \times pIC_{50}/NHA$]; pK_D = $-(\log K_D)$; BEI: Índice de eficiencia de unión ("Binding efficiency index") [calculado como pK_D/MW

- 15 (kDa)], AF: Ascofuranona.

REIVINDICACIONES

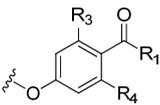
1. Compuesto de fórmula general (I), sal farmacéuticamente aceptable, o solvato del mismo

5



donde:

R₁ se selecciona de entre H, OH, NHOH, NH₂ y NH-alquiloC₁-C₄;

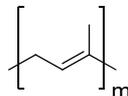
R₂ se selecciona de entre halógeno, OCHO, y  ;

10

R₃ se selecciona de entre OH, halógeno, y alquiloC₁-C₄;

R₄ se selecciona de entre H y alquiloC₁-C₄;

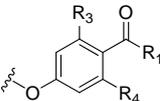
Z se selecciona de entre -(CH₂)_n donde n es un número entero comprendido entre

6 y 20, y  donde m es un número entero comprendido entre 1 y 3;

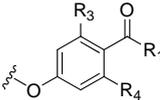
15

con la condición de que cuando

- R₁ es H, R₃ es OH, R₄ es H y R₂ es Br, n es diferente a 6, 8, 9, 10 y 12;

- R₁ es H, R₃ es OH, R₄ es H y R₂ es  , n es diferente a 6, 8, 10 y 12;
o

20

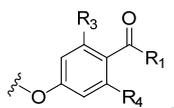
- R₁ es OH, R₃ es OH, R₄ es H y R₂ es  , n es diferente a 6 y 10.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde R₁ se selecciona de entre H y OH, y preferiblemente R₁ es OH.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde R₂ es halógeno, preferiblemente bromo.
4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde R₂ es OCHO.

5

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde R₂ es



6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R₃ se selecciona de entre F, OH y CH₃, y preferiblemente R₃ es OH.

10

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R₄ es H.

8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde Z es -(CH₂)_n- donde n es un número comprendido entre 8 y 20, y preferiblemente n es un número entero y par comprendido entre 10 y 16.

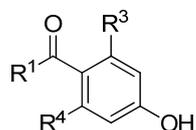
15

9. Compuesto según la reivindicación 1 seleccionado de la lista que comprende:

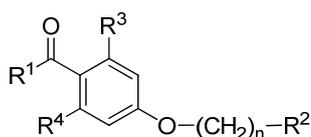
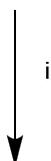
- 20 Ácido 4-((10-bromodecil)oxi)-2-hidroxibenzoico,
- Ácido 4-((10-(formiloxi)decil)oxi)-2-hidroxibenzoico,
- Ácido 4-((12-bromododecil)oxi)-2-hidroxibenzoico,
- Ácido 4-((12-(formiloxi)dodecil)oxi)-2-hidroxibenzoico,
- Ácido 4,4'-(dodecano-1,12-diilbis(oxi))bis(2-hidroxibenzoico),
- Ácido 4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-hidroxibenzoico,
- 25 Ácido 4-((14-(formiloxi)tetradecil)oxi)-2-hidroxibenzoico,
- Ácido 4,4'-(tetradecano-1,14-diilbis(oxi))bis(2-hidroxibenzoico),
- Ácido 4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-metilbenzoico,
- Ácido 4-((14-(formiloxi)tetradecil)oxi)-2-metilbenzoico,
- Ácido 4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-fluorobenzoico,
- 30 4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-hidroxibenzaldehído,
- 14-(4-formil-3-hidroxifenoxi)tetradecil formiato,
- Ácido 4-((14-bromotetradecil)oxi)-2-hidroxi-6-metilbenzoico,

- Ácido 4,4'-(tetradecano-1,14-diilbis(oxi))bis(2-metilbenzoico),
4,4'-(tetradecano-1,14-diilbis(oxi))bis(2-hidroxibenzaldehido),
Ácido 4,4'-(tetradecano-1,14-diilbis(oxi))bis(2-hidroxi-6-metilbenzoico),
Ácido 4-((16-bromohexadecil)oxi)-2-hidroxibenzoico,
5 Ácido 4-((16-(formiloxi)hexadecil)oxi)-2-hidroxibenzoico y
Ácido 4,4'-(hexadecano-1,16-diilbis(oxi))bis(2-hidroxibenzoico).
10. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula general (I)
descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, junto con un vehículo
10 farmacéuticamente aceptable.
11. Composición según la reivindicación 10 que además comprende otro principio
activo antiparasitario.
- 15 12. Uso de un compuesto de fórmula general (I) descrito según cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 9 para la elaboración de un medicamento.
13. Uso de un compuesto de fórmula general (I) descrito según cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 9 para la elaboración de un medicamento para la prevención
20 y/o el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos u hongos.
14. Uso según la reivindicación 13, donde la enfermedad es una enfermedad causada
por parásitos protozoarios.
- 25 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde las enfermedades
son enfermedades causadas por un parásito del género *Trypanosoma* o
Cryptosporidium.
16. Uso según la reivindicación 15, donde los parásitos son de las especies
30 *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma equinum*,
Trypanosoma equiperdum, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax*,
Cryptosporidium parvum.

17. Uso según la reivindicación a 13, donde la enfermedad es una enfermedad causada por un hongo del género *Candida*.
- 5 18. Uso según la reivindicación 17, donde el hongo es *Candida albicans*.
19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, donde las enfermedades se producen en animales, preferentemente en un mamífero.
- 10 20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, donde la enfermedad se selecciona entre tripanosomiasis africana humana (enfermedad del sueño), tripanosomiasis animal, criptosporidiosis, o candidiasis.



- 1: R¹ = OH, R³ = OH, R⁴ = H
- 2: R¹ = OH, R³ = CH₃, R⁴ = H
- 3: R¹ = OH, R³ = F, R⁴ = H
- 4: R¹ = H, R³ = OH, R⁴ = H
- 5: R¹ = OH, R³ = OH, R⁴ = CH₃

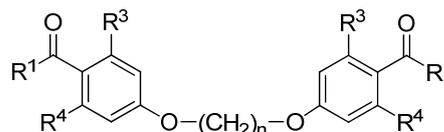


- n = 10, **7f**: R¹ = OH, R² = Br, R³ = OH, R⁴ = H
- 8f**: R¹ = OH, R² = OCHO, R³ = OH, R⁴ = H

- n = 12, **7g**: R¹ = OH, R² = Br, R³ = OH, R⁴ = H
- 8g**: R¹ = OH, R² = OCHO, R³ = OH, R⁴ = H

- n = 14, **7h**: R¹ = OH, R² = Br, R³ = OH, R⁴ = H
- 8h**: R¹ = OH, R² = OCHO, R³ = OH, R⁴ = H
- 9h**: R¹ = OH, R² = Br, R³ = CH₃, R⁴ = H
- 10h**: R¹ = OH, R² = OCHO, R³ = CH₃, R⁴ = H
- 11h**: R¹ = OH, R² = Br, R³ = F, R⁴ = H
- 12h**: R¹ = H, R² = Br, R³ = OH, R⁴ = H
- 13h**: R¹ = H, R² = OCHO, R³ = OH, R⁴ = H
- 14h**: R¹ = OH, R² = Br, R³ = OH, R⁴ = CH₃

- n = 16, **7i**: R¹ = OH, R² = Br, R³ = OH, R⁴ = H
- 8i**: R¹ = OH, R² = OCHO, R³ = OH, R⁴ = H



- n = 10, **15f**: R¹ = OH, R³ = OH, R⁴ = H

- n = 12, **15g**: R¹ = OH, R³ = OH, R⁴ = H

- n = 14, **15h**: R¹ = OH, R³ = OH, R⁴ = H

- 16h**: R¹ = OH, R³ = CH₃, R⁴ = H

- 17h**: R¹ = H, R³ = CH₃, R⁴ = H

- 18h**: R¹ = OH, R³ = OH, R⁴ = CH₃

- n = 16, **15i**: R¹ = OH, R³ = OH, R⁴ = H

Fig. 1