

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 728**

51 Int. Cl.:

C07D 279/08 (2006.01)

A61K 31/5415 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2011 PCT/IB2011/055209**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12066518**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2011 E 11796822 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2640712**

54 Título: **Derivados de 2-piperazin-1-il-4H-1,3-benzotiazin-4-ona y su uso para el tratamiento de infecciones en mamíferos**

30 Prioridad:

19.11.2010 WO PCT/RU2010/000688

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

22.11.2018

73 Titular/es:

**ECOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE
LAUSANNE (EPFL) (100.0%)
EPFL-TTO Quartier de l'Innovation J
1015 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**MAKAROV, VADIM y
COLE, STEWART**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 690 728 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).

DERIVADOS DE 2-PIPERAZIN-1-IL-4H-1,3-BENZOTIAZIN-4-ONA Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES EN MAMÍFEROS

DESCRIPCIÓN

5

Campo técnico

10 La presente invención se refiere a nuevos derivados de 2-piperazin-1-il-4H-1,3-benzotiazin-4-ona y a su uso para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de enfermedades infecciosas de mamíferos provocadas por bacterias, en particular enfermedades como tuberculosis (TB), úlcera de Buruli y lepra que resultan de la infección con micobacterias estrechamente relacionadas.

Antecedentes de la invención

15 Las micobacterias han asolado a la humanidad durante varios milenios provocando enfermedades importantes como tuberculosis (TB), lepra y úlcera de Buruli. En cuanto a carga de enfermedad y mortalidad, la TB es indiscutiblemente la amenaza más importante y desafiante para la salud humana, en parte debido a la creciente prevalencia de resistencia primaria a los fármacos actuales. Existe por tanto la necesidad creciente de nuevos compuestos con un modo de acción novedoso (Balganesh, T.S., P.M. Alzari, y S.T. Cole. Trends Pharmacol Sci, 2008. 29(11): págs. 576-81) y estos pueden encontrar también aplicación en el tratamiento de otras enfermedades micobacterianas. La lepra está en vías de eliminación como problema de salud pública (Britton, W.J. y D.N. Lockwood. Lancet, 2004. 363(9416): págs. 1209-19), gracias a las medidas de control implementadas por la Organización Mundial de la Salud, mientras que la enfermedad emergente, úlcera de Buruli, es objeto de creciente preocupación (Demangel, C., T.P. Stinear, y S.T. Cole. Nat Rev Microbiol, 2009. 7(1): págs. 50-60).

25 En los últimos veinte años, la tuberculosis resistente a fármacos ha adquirido nuevas dimensiones alarmantes. En la década de 1990 era preocupante la forma multirresistente (MDR), en donde *Mycobacterium tuberculosis* había adquirido resistencia a los fármacos de primera línea principales isoniazida y rifampicina. Hay 500.000 casos estimados de TB MDR en el mundo de los cuales 70.000 se producen en Europa (Zignol, M. *et al.* J Infect Dis, 2006. 194: 479-485; Fears, R., S. Kaufmann, V. Ter Meulen & A. Zumla. Tuberculosis (Edinb) 2010. 90: 182-187).

35 En la última década, cepas MDR de *M. tuberculosis* han adquirido mutaciones de resistencia adicional a fármacos de segunda línea dando lugar a enfermedad ultrarresistente (XDR). Además de a isoniazida y rifampicina, las cepas XDR de *M. tuberculosis* son también resistentes a fluoroquinolonas y a los aminoglicósidos inyectables (Jassal, M. & W. R. Bishai. Lancet Infect Dis 2009. 9: 19-30). Más de 50 países han notificado ahora TB XDR subrayando de ese modo la necesidad e importancia de hallar nuevos fármacos para tratar tanto TB sensible a fármacos como TB resistente a fármacos. Además de un nuevo mecanismo de acción, otras características deseables requeridas de un nuevo fármaco contra la TB incluyen alta potencia, de manera que la duración del tratamiento pueda reducirse; alta especificidad, para evitar efectos secundarios no deseados incluyendo destrucción de la flora intestinal; y administración oral.

45 Pueden usarse 1,3-benzotiazin-4-onas sustituidas con 2-amino como fármacos para el tratamiento de enfermedades micobacterianas en seres humanos y mamíferos. El compuesto más activo disponible hasta ahora es 2-[(2S)-2-metil-1,4-dioxa-8-azaespiro[4.5]dec-8-il]-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona (BTZ043) (V. Makarov *et al.* Science, 2009, 324, 801; M.R. Pasca, *et al.* Antimicrob. Agents Chemother., 2010, 54, 1616).

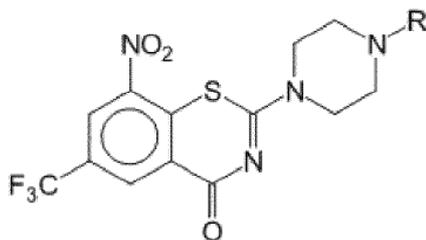
Se dan a conocer 1,3-benzotiazin-4-onas sustituidas con 2-amino específicas por ejemplo en los documentos WO 2007/134625 y WO 2009/010163.

50 En vista de estos antecedentes, es altamente deseable producir nuevas 1,3-benzotiazin-4-onas sustituidas con 2-piperazino, que no sólo tengan una alta actividad contra micobacterias sino que también presenten mejores propiedades de tipo fármaco que las 1,3-benzotiazin-4-onas descritas previamente. La presente invención describe una nueva generación de 1,3-benzotiazin-4-onas con actividad contra micobacterias como posibles nuevos fármacos contra TB en donde la sustitución con 2-amino se representa por piperazinas N-sustituidas.

55

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (1)



(1)

en la que

- 5 R se selecciona del grupo que consiste en ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 2-ciclohexiletilo, pentilo, heptilo, 1-metilbutilo, 3-ciclohexilpropilo, sec-butilo y 1-etilpropilo, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se da a conocer una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (1) de la invención y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 También se da a conocer un compuesto de fórmula (1) y/o sales farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad.

15 Se da a conocer además una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (1) y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo para su uso en un tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad.

Descripción de la figura

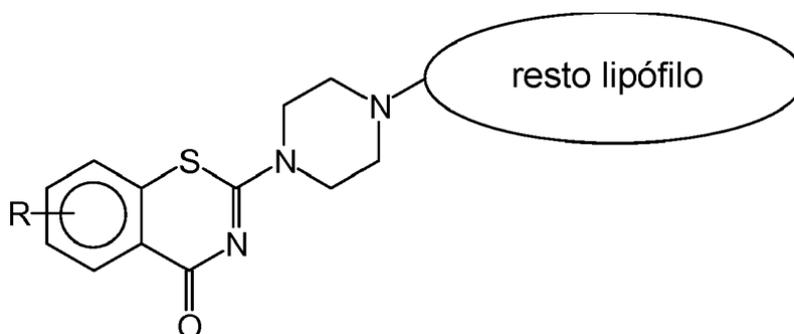
20 La figura 1 representa un diagrama y resultados estadísticos que muestran el efecto de los compuestos 2 y 8 en la reducción de la carga de UFC en los pulmones y bazo en comparación con el tratamiento con BTZ043 en un modelo murino de TB crónica. D0, carga de UFC al comienzo de tratamiento; NT, animales no tratados en el día 28; INH indica isoniazida; 43 = BTZ043; 169 = PBTZ169 indica compuesto 2; 134 = PBTZ134 indica compuesto 8.

25 Descripción detallada de la invención

Una de las desventajas de los derivados de 1,3-benzotiazin-4-ona sustituida con 2-amino era su baja solubilidad en agua, que limita su absorción en el estómago e intestino. Se han emprendido muchos esfuerzos para hacer que tales compuestos sean más solubles en agua, por ejemplo añadiendo un resto hidrófilo a derivados de 1,3-benzotiazin-4-ona, pero estos compuestos tenían una actividad antimicobacteriana muy baja.

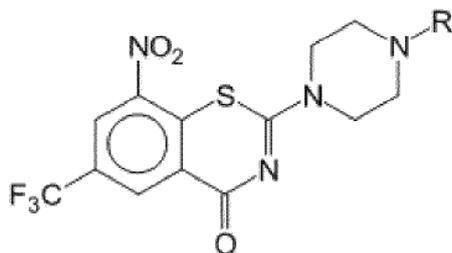
Por tanto, por un lado es mejor tener un compuesto más soluble en agua con parte hidrófila y, por otro lado, este compuesto debe conservar la lipofiliidad para poder atravesar la pared celular micobacteriana muy hidrófoba.

35 Estos problemas se han solucionado en la presente invención proporcionando compuestos en los que un resto hidrófilo pequeño (piperazina) está "escondido" entre dos fragmentos lipófilos grandes, siendo uno de ellos 1,3-benzotiazin-4-ona.



40

En un primer aspecto, la presente invención proporciona compuestos de fórmula 1



(1)

en la que

- 5 R se selecciona del grupo que consiste en ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 2-ciclohexiletilo, pentilo, heptilo, 1-metilbutilo, 3-ciclohexilpropilo, sec-butilo y 1-etilpropilo, y/o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

El término "comprender" o "que comprende" se usa generalmente en el sentido de incluir/que incluye, es decir que permite la presencia de una o más características o componentes. Adicionalmente, el término "que comprende" también abarca el término "que consiste".

Tal como se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

- 15 Tal como se usa en el presente documento, "al menos uno" significa "uno o más".

La invención se refiere a compuestos de fórmula (1) seleccionados del grupo que consiste en

20 2-(4-R-piperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona,

en la que R tiene los significados anteriores.

La presente invención se refiere incluso más particularmente a al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

25 2-(4-heptilpiperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona,

2-[4-(ciclohexilmetil)piperazin-1-il]-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona,

30 2-[4-(2-ciclohexiletil)piperazin-1-il]-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona,

2-[4-(3-metilbutil)piperazin-1-il]-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona,

35 2-[4-(2-metilbutil)piperazin-1-il]-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona.

Además, la presente invención se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de fórmula (1), por ejemplo clorhidrato, sulfato, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, etc.

40 Pueden sintetizarse compuestos con fórmula (1) mediante uno de los siguientes métodos descritos en la técnica anterior. Estos métodos incluyen:

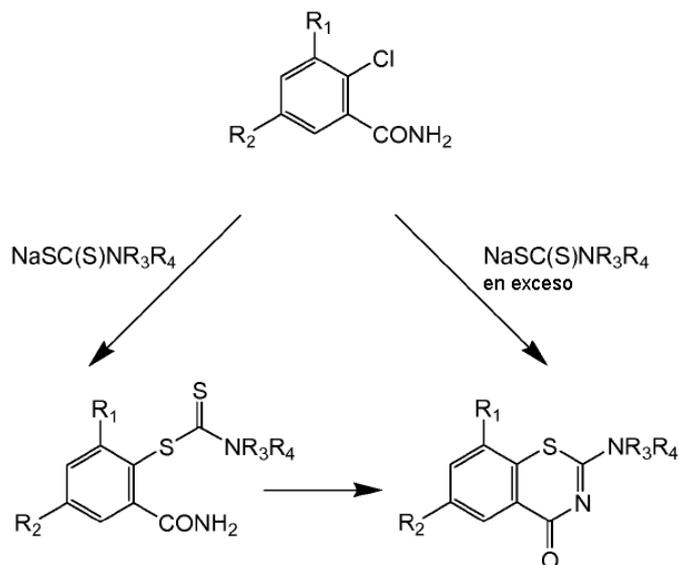
1) la reacción de sales de tiocianato con 2-clorobencilcloroanhídrido, y el tratamiento posterior de la masa de reacción con la amina correspondiente (véanse, por ejemplo, Coll. Czech. Chem. Commun., 1982, 47, 3268-3282; Coll. Czech. Chem. Commun., 1983, 48, 3315-3328; Coll. Czech. Chem. Commun., 1983, 48, 3427-3432);

45 2) la reacción de condensación de ácidos 6-mercaptobenzoicos 3,4-disustituidos con una cianamida adecuada (véase el documento US 3.522.247);

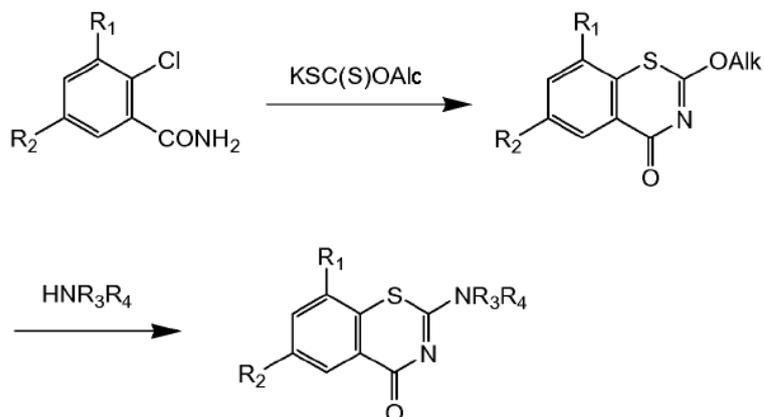
3) la conversión de una 2-halógeno-4H-1,3-benzotiazin-4-ona con una amina apropiada (véase el documento US 3.470.168).

50 4) se describen dos métodos para preparar 1,3-benzotiazin-4-onas 2-aminosustituidas en los documentos WO

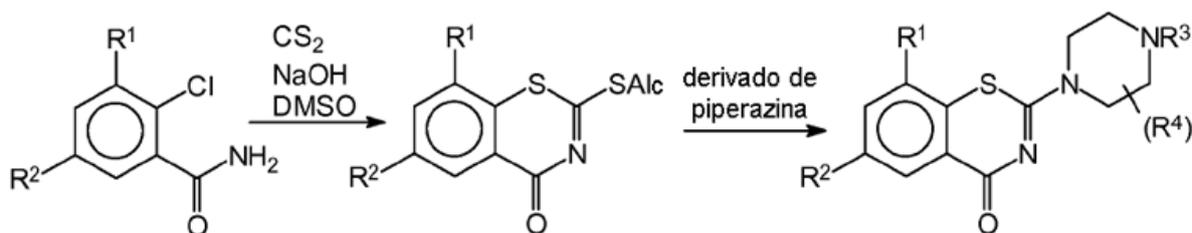
2007/134625 y WO 2009/010163 que dan a conocer los siguientes procedimientos:



5) el procedimiento presentado en el documento WO 2009/01063 es:



6) un procedimiento descubierto recientemente y muy útil de preparación de derivados de 2-amino-1,3-benzotiazin-4-ona que incluye la síntesis inicial de 2-alkilmercapto-4H-1,3-benzotiazin-4-ona y su condensación posterior con el derivado de piperazina correspondiente



Los seis métodos anteriormente descritos pueden usarse para la síntesis de compuestos de fórmula (1). Preferiblemente, se usa el método 6.

Los compuestos de fórmula (1) pueden convertirse fácilmente en sales farmacépticamente aceptables solubles en agua, por ejemplo clorhidrato, sulfato o acetato, tratando el ácido correspondiente en un disolvente apropiado conocido en la técnica.

Los compuestos seleccionados de fórmula (1) de la invención se sometieron a prueba para determinar su posible mutagenicidad usando el ensayo SOS-Chromotest (P. Quillardet, O. Huisman, R. D'Ari, M. Hofnung, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1982, 79, 5971-5;) y se encontró que no eran mutágenos a 25-50 µg por punto y eran negativos a 5 µg/ml en prueba de Ames en las cepas TA98, TA100 y TA1535 de *Salmonella typhimurium* (D.M. Maron y B.N. Ames, Mutation Res., 1983, 113, 173-215).

La diana principal de BTZ043 en micobacterias es la enzima esencial decaprenilfosforil-β-D-ribosa 2'-epimerasa y la resistencia a BTZ proviene de mutaciones de cambio de sentido en el gen correspondiente, *dprE1*. Se observó resistencia cruzada a compuestos seleccionados de fórmula (1) cuando se sometieron a prueba mutantes resistentes a BTZ de *Mycobacterium smegmatis* o *Mycobacterium bovis* BCG (Makarov, V. et al. Science 2009. 324: 801-804) para determinar su susceptibilidad a tales compuestos indicando de ese modo que las 1,3-benzotiazin-4-onas sustituidas con 2-piperazino comparten la misma diana que las 1,3-benzotiazin-4-onas.

Un segundo mecanismo de resistencia a BTZ043 se ha descrito en *Mycobacterium smegmatis* debido a la sobreproducción de la nitrorreductasa NfnB (Manina, G., et al. Mol Microbiol 2010. Pub. elec. 14/07/2010). Cuando se sometió a prueba el mutante MN39 que sobreproduce NfnB para determinar su susceptibilidad a las 1,3-benzotiazin-4-onas sustituidas con 2-piperazino seleccionadas, se encontró que la CIM era similar a la de la cepa original de tipo natural. En cambio, MN39 presentaba un aumento de 6 veces en la CIM para BTZ043. Esto sugiere que las 1,3-benzotiazin-4-onas sustituidas con piperazino pueden ser menos propensas a la nitrorreducción a partir de fuentes no deseadas que los derivados de 1,3-benzotiazin-4-ona.

Con el fin de comparar la citotoxicidad relativa de 1,3-benzotiazin-4-onas sustituidas con piperazino seleccionadas con la de BTZ043, se determinó la CI_{90} usando dos líneas celulares humanas diferentes. Ambas series de compuestos presentaban una CI_{90} en el intervalo de 12,5-100 µg/ml contra la línea celular neumocítica A549 tal como se midió mediante el ensayo de reducción de resazurina. Usando el mismo método, la CI_{90} estaba en el intervalo de 6,25-12,5 µg/ml contra la línea celular de hepatoma humano Huh7.

En un segundo aspecto de la invención, los compuestos de fórmula (1) y/o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos son útiles para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, en particular para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad provocada por una infección microbiana, más particularmente para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de tuberculosis y otras infecciones micobacterianas, o incluso para otras infecciones actinobacterianas tales como difteria, en seres humanos y en animales.

Sorprendentemente, los inventores han mostrado que compuestos seleccionados de la invención son terapéuticamente activos en el modelo murino de TB crónica tal como se determina por el nivel de reducción de unidades formadoras de colonias en los pulmones y bazos. La actividad de determinados compuestos es superior a la del fármaco contra TB principal, INH, que se usó como control positivo. Además, tal como se muestra en el ejemplo 12, algunos de los nuevos derivados de piperazino de 1,3-benzotiazin-4-onas son significativamente más activos en este modelo que las 2-amino-1,3-benzotiazin-4-onas, tal como se ejemplifica por BTZ043.

Los compuestos de la invención no son tóxicos tras la administración por vía oral de dosis que oscilan hasta 2000 mg/kg. El compuesto se toleró bien por animales en las primeras 24 horas después de su introducción. Durante 7 días de investigaciones el compuesto (2) no provocó cambios en el estado y comportamiento generales de los ratones, ni afectó a la actividad motora y refleja, ciclos activos y de calma, acicalamiento o consumo de alimento. No hubo casos de muerte animal. La DL_{50} para el compuesto (2) es > 2000 mg/kg.

En una realización, el compuesto de la invención y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo son útiles para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad. Preferiblemente, la enfermedad se selecciona del grupo que comprende tuberculosis, lepra o úlcera de Buruli.

Habitualmente, la infección microbiana está provocada por una bacteria que pertenece a los géneros *Corynebacterium* o *Nocardia* o *Mycobacterium*.

Nocardia asteroides es la especie de *Nocardia* que infecta más frecuentemente a seres humanos, y la mayoría de los casos se producen como una infección oportunista en pacientes inmunocomprometidos. Otras especies de interés médico son *N. brasiliensis* y *N. caviae*. La forma más común de enfermedad nocárdica humana es una neumonía que progresa lentamente.

El género *Corynebacterium* contiene los bacilos bacterianos responsables de provocar difteria.

Mycobacterium es un género de actinobacterias, que tiene su propia familia, *Mycobacteriaceae*. El género incluye patógenos que se sabe que provocan enfermedades graves en mamíferos, incluyendo tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) y lepra (*Mycobacterium leprae*).

Por consiguiente, el segundo aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un

compuesto de fórmula (1) y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En una realización, la composición farmacéutica comprende además un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se conocen bien en la técnica farmacéutica excipientes farmacéuticamente aceptables, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª ed., Mack Publishing Co., Nueva Jersey (1991). El excipiente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional. El excipiente debe ser aceptable en el sentido de no ser perjudicial para el receptor del mismo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere por ejemplo a vehículos, diluyentes, disolventes tales como alcoholes monohidroxilados tales como etanol, isopropanol y alcoholes polihidroxilados tales como glicoles y aceites comestibles tales como aceite de soja, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, ésteres oleosos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, aglutinantes, adyuvantes, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores, disgregantes, deslizantes, agentes lubricantes, agentes tamponantes, emulsionantes, agentes humectantes, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, colorantes, aromas, agentes de recubrimiento, conservantes, antioxidantes, agentes de procesamiento, modificadores de administración de fármacos y potenciadores tales como fosfato de calcio, estado de magnesio, talco, monosacáridos, disacáridos, almidón, gelatina, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, dextrosa, hidroxipropil-β-ciclodextrina, polivinilpirrolidona, ceras de bajo punto de fusión y resinas de intercambio iónico.

Los compuestos de la invención se formulan para su uso preparando una suspensión o disolución diluida en medio acuoso, orgánico o acuoso-orgánico farmacéuticamente aceptable para administración tópica o parenteral mediante inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, o para aplicación intranasal; o se preparan en forma de comprimido, cápsula o suspensión acuosa con excipientes convencionales para administración oral o como supositorios.

Los compuestos de esta invención pueden administrarse solos o en combinación con portadores farmacéuticamente aceptables por medio de, pero sin limitarse a, una o más de: administración oral (por ejemplo como comprimido, cápsula o como disolución ingerible), tópica, mucosa (por ejemplo como pulverizador nasal o aerosol para inhalación), nasal, parenteral (por ejemplo mediante una forma inyectable), gastrointestinal, intraespinal, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intrauterina, intraocular, intradérmica, intracraneal, intratraqueal, intravaginal, intracerebroventricular, intracerebral, subcutánea, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracameral), transdérmica, rectal, bucal, epidural y sublingual.

Más particularmente, los compuestos novedosos de la invención pueden administrarse en una amplia variedad de diferentes formas de dosificación, es decir, pueden combinarse con diversos portadores inertes farmacéuticamente aceptables en forma de comprimidos, cápsulas, pastillas para chupar, trociscos, caramelos duros, polvos, pulverizaciones, cremas, bálsamos, supositorios, gelatinas, pastas, lociones, pomadas, suspensiones acuosas, disoluciones inyectables, elixires, jarabes y similares. Tales portadores incluyen diluyentes sólidos o cargas, medios acuosos estériles y diversos disolventes orgánicos no tóxicos, etc. Además, las composiciones farmacéuticas orales pueden estar adecuadamente edulcoradas y/o aromatizadas.

La invención se refiere además a un compuesto de fórmula (1) y/o a las sales farmacéuticamente aceptables del mismo para su uso en un método para el tratamiento o la profilaxis de infecciones bacterianas en mamíferos. Los compuestos preferidos de fórmula (1) y/o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para su uso en tal método son los específicamente enumerados anteriormente.

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que los compuestos de la invención demuestran un alto nivel de selectividad para micobacterias y actinobacterias relacionadas, lo que reduce el potencial de efectos secundarios adversos. En el ejemplo 10 se facilitan resultados típicos determinados mediante el método de reducción de resazurina (J.C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaels, Antimicrob. Agents Chemother., 2002, 46, 2720-2).

Los compuestos pueden usarse en dosificaciones de desde 0,001-1000 mg/kg de peso corporal.

Los ejemplos que siguen en la parte experimental posterior sirven para ilustrar la invención pero no deben interpretarse como una limitación de la misma.

Las estructuras de los compuestos de la invención se establecieron mediante modos de síntesis y análisis elemental, y por resonancia magnética nuclear y espectros de masas.

Ejemplos

Se adquirieron productos químicos y disolventes de Alfa-Aesar (GB) o de Aldrich Co. (Sigma-Aldrich Company, St-

Louis, EE.UU.). Se usaron sin purificación adicional.

Se determinaron los puntos de fusión según el procedimiento de la BP y no se corrigieron (Electrothermal 9001, GB).

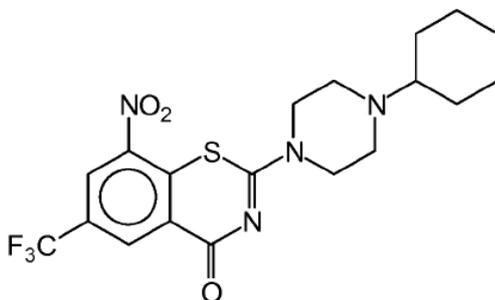
5 Si los análisis están indicados sólo por los símbolos de los elementos, los resultados analíticos están dentro de $\pm 0,3\%$ de los valores teóricos (Carlo-Erba 5500, Italia).

Se determinaron los espectros de RMN con un instrumento Varian Unity Plus 300 (EE.UU.). Se notifican los desplazamientos para ^1H -RMN en ppm campo abajo a partir de TMS (δ).

10 Se obtuvieron los espectros de masas usando un instrumento Finnigan SSQ-700 (EE.UU.) con inyección directa.

Se controlaron las reacciones y la pureza de los compuestos mediante CCF usando láminas de aluminio con gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck Co, Alemania).

15 Ejemplo 1



20 2-(4-Ciclohexilpiperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona (compuesto 1)

Se disolvió hidróxido de sodio (0,9 g; polvo) en 10 ml de DMSO, y se añadieron 2,1 ml de disulfuro de carbono a una temperatura de 10-15°C. Se añadieron 3,0 g de 2-cloro-3-nitro-5-trifluorometilbenzamida a la disolución en porciones pequeñas a una temperatura de 10°C. Después de 15 minutos, se añadieron 0,7 ml de MeI a una temperatura de 10-20°C. Se permitió que la reacción avanzara durante 30 min, y posteriormente se añadieron 100 ml de agua. Se separó mediante filtración el sólido amarillo resultante de 2-metiltilio-8-nitro-6-trifluorometil-4H-1,3-benzotiazin-4-ona.

Rendimiento: 47%

30 P.f.: 200-203°C (acetato de etilo)

EM (m/z): 322 (M⁺)

^1H -RMN (DMSO-d₆): δ 8,95 y 8,81 (dos 1H, dos s, 2CH), 2,73 (3H, s, CH₃) ppm

35 Anal. para C₁₀H₅F₃N₂O₃S₂:

Calc.: C, 37,28; H, 1,56; N, 8,69; S, 19,90

40 Hallado: C, 37,21; H, 1,54; N, 8,64; S, 20,03

Se trató una suspensión de 3,0 g de 2-metiltilio-8-nitro-6-trifluorometil-4H-1,3-benzotiazin-4-ona en 15 ml de etanol con 1,5 g de 4-ciclohexilpiperazina a temperatura ambiente. Se calentó la mezcla de reacción hasta 50-60°C durante 20 minutos. Después de enfriar, se añadieron 100 ml de agua. Se separó mediante filtración el sólido amarillo claro resultante de 2-(4-ciclohexilpiperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona.

Rendimiento: 74%

P.f.: 189-191°C (etanol)

50 EM (m/z): 442 (M⁺)

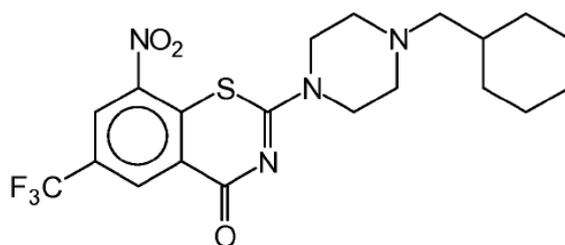
^1H -RMN (DMSO-d₆): δ 8,87 y 8,76 (dos 1H, dos s, 2CH), 3,89 (4H, s ancho, N(CH₂)₂), 2,66 (4H, s ancho, N(CH₂)₂), 2,32 (1H, m ancho, 1CH), 1,79, 1,58 y 1,20 (10H, 3 m ancho, C₅H₁₀) ppm.

Anal. para C₁₉H₂₁F₃N₄O₃S:

Calc.: C, 51,58; H, 4,78; N, 12,66

Hallado: C, 51,56; H, 4,72; N, 12,81

Ejemplo 2



2-[4-(Ciclohexilmetil)piperazin-1-il]-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona (compuesto 2)

Se preparó el compuesto 2 de la misma manera que en el ejemplo 1 pero usando 4-(ciclohexilmetil)piperazina como amina, y se obtuvo un sólido cristalino amarillo.

Rendimiento: 71%

P.f.: 184-186°C (etanol)

EM (m/z): 456 (M⁺)

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,86 y 8,76 (dos 1H, dos s, 2CH), 3,91 (4H, s ancho, N(CH₂)₂), 2,51 (4H, s ancho, N(CH₂)₂), 2,13 (2H, d, CH₂), 1,53 (1H, m ancho, 1CH), 1,70, 1,20 y 0,85 (10H, 3 m ancho, C₆H₁₀) ppm.

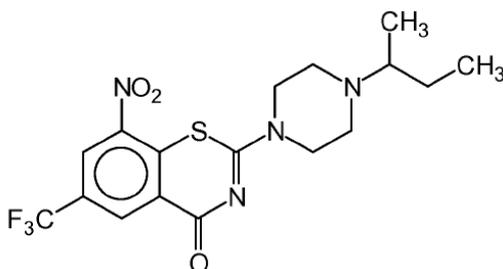
Anal. para C₂₀H₂₃F₃N₄O₃S:

Calc.: C, 51,62; H, 5,08; N, 12,27

Hallado: C, 52,60; H, 5,01; N, 12,34

Ejemplo 3

2-(4-sec-Butilpiperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona (compuesto 5)



Se preparó el compuesto 5 de la misma manera que en el ejemplo 1 pero usando 4-sec-butilpiperazina como amina, y se obtuvo un sólido cristalino amarillo.

Rendimiento: 62%

P.f.: 127-128°C (etanol)

EM (m/z): 416 (M⁺)

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,85 y 8,76 (dos 1H, dos s, 2CH), 3,90 (4H, s ancho, N(CH₂)₂), 2,67 (H, s ancho, CH), 2,50

(4H, s ancho, N(CH₂)₂), 1,41 (2H, d m, CH₂), 0,85 (6H, m, 2CH₃) ppm.

Anal. para C₁₇H₁₉F₃N₄O₃S:

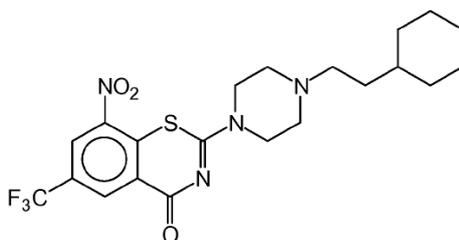
5 Calc.: C, 49,03; H, 4,60; N, 13,45

Hallado: C, 49,10; H, 4,51; N, 13,47

Ejemplo 4

10

2-[4-(2-Ciclohexiletil)piperazin-1-il]-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona (compuesto 6)



15 Se preparó el compuesto 6 de la misma manera que en el ejemplo 1 pero usando 4-(2-ciclohexiletil)piperazina como amina, y se obtuvo un sólido cristalino amarillo.

Rendimiento: 62%

20 P.f.: 175-177°C (etanol)

EM (m/z): 470 (M⁺)

25 ¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,86 y 8,76 (dos 1H, dos s, 2CH), 3,91 (4H, s ancho, N(CH₂)₂), 2,51 (4H, s ancho, N(CH₂)₂), 2,36 (2H, t, CH₂), 1,70-0,85 (13H, 4 m ancho, CH₂-CH(C₅H₁₀)) ppm.

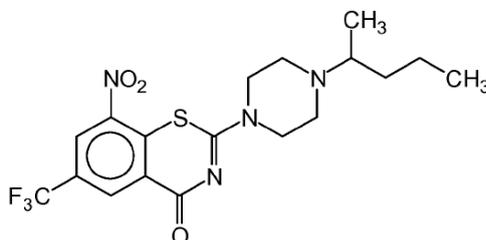
Anal. para C₂₁H₂₅F₃N₄O₃S:

30 Calc.: C, 53,61; H, 5,36; N, 11,91

Hallado: C, 53,52; H, 5,43; N, 11,81

Ejemplo 5

35 2-[4-(1-Metilbutil)piperazin-1-il]-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona (compuesto 7)



40 Se preparó el compuesto 7 de la misma manera que en el ejemplo 1 pero usando 4-(1-metilbutil)piperazina como amina, y se obtuvo un sólido cristalino amarillo.

Rendimiento: 55%

45 P.f.: 132-133°C (etanol)

EM (m/z): 471 (M⁺)

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,85 y 8,76 (dos 1H, dos s, 2CH), 3,85 (4H, s ancho, N(CH₂)₂), 2,65 (4H, s ancho, N(CH₂)₂),

2,54 (H, s ancho, CH), 1,47 y 1,32 (4H, 2 m, 2CH₂), 0,84 (6H, m, 2CH₃) ppm.

Anal. para C₁₈H₂₁F₃N₄O₃S:

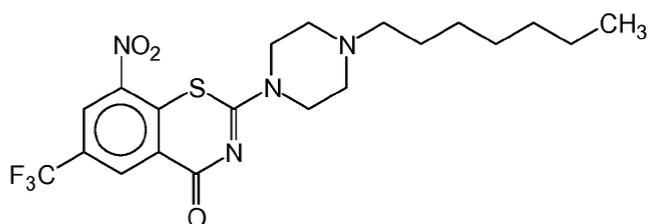
5 Calc.: C, 50,23; H, 4,92; N, 13,02

Hallado: C, 50,21; H, 5,06; N, 13,13

Ejemplo 6

10

2-(4-Heptilpiperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona (compuesto 8)



15 Se preparó el compuesto 8 de la misma manera que en el ejemplo 1 pero usando 4-heptilpiperazina como amina, y se obtuvo un sólido cristalino amarillo.

Rendimiento: 68%

20 P.f.: 125-127°C (etanol)

EM (m/z): 458 (M⁺)

25 ¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,85 y 8,76 (dos 1H, dos s, 2CH), 3,90 (4H, s ancho, N(CH₂)₂), 2,52 (4H, s ancho, N(CH₂)₂), 2,33 (3H, t, CH), 1,43 (2H, m ancho, CH₂), 1,28 (8H, m ancho, 4CH₂), 0,86 (3H, t, CH₃) ppm.

Anal. para C₂₀H₂₅F₃N₄O₃S:

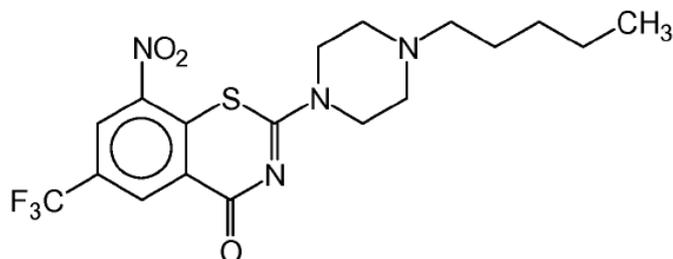
30 Calc.: C, 50,23; H, 4,92; N, 13,02

Hallado: C, 50,21; H, 5,06; N, 13,13

Ejemplo 7

35

8-Nitro-2-(4-pentilpiperazin-1-il)-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona (compuesto 12)



40 Se preparó el compuesto 12 de la misma manera que en el ejemplo 1 pero usando 4-pentilpiperazina como amina, y se obtuvo un sólido cristalino amarillo claro.

Rendimiento: 71%

45 P.f.: 133-134°C (etanol)

EM (m/z): 430 (M⁺)

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,85 y 8,76 (dos 1H, dos s, 2CH), 3,90 (4H, s ancho, N(CH₂)₂), 2,51 (4H, s ancho, N(CH₂)₂),

2,32 (2H, t, CH₂), 1,48 (2H, m, CH₂), 1,26 (4H, m, 2CH₂), 0,88 (3H, t, CH₃) ppm.

Anal. para C₁₈H₂₁F₃N₄O₃S:

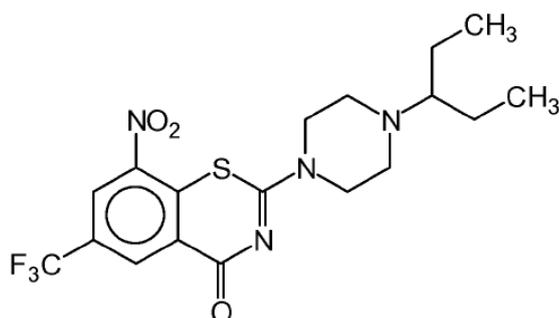
5 Calc.: C, 50,23; H, 4,92; N, 13,02

Hallado: C, 50,29; H, 4,85; N, 13,10

Ejemplo 8

10

2-[4-(1-Etilpropil)piperazin-1-il]-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona (compuesto 13)



15 Se preparó el compuesto 13 de la misma manera que en el ejemplo 1 pero usando 4-(1-etilpropil)piperazina como amina, y se obtuvo un sólido cristalino amarillo.

Rendimiento: 79%

20 P.f.: 152-153°C (etanol)

EM (m/z): 430 (M⁺)

25 ¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,85 y 8,76 (dos 1H, dos s, 2CH), 3,90 (4H, s ancho, N(CH₂)₂), 2,62 (4H, s ancho, N(CH₂)₂), 2,23 (H, c, CH), 1,47 (4H, dc, 2CH₂), 1,26 (4H, m, 2CH₂), 0,90 (6H, t, 2CH₃) ppm.

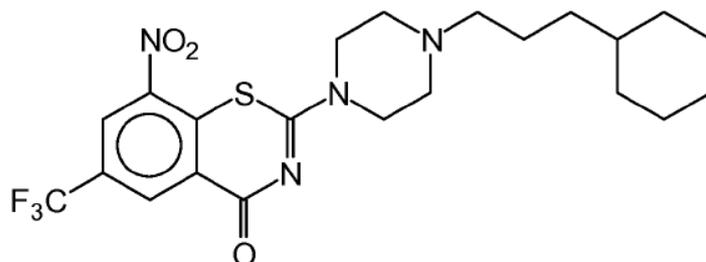
Anal. para C₁₈H₂₁F₃N₄O₃S:

30 Calc.: C, 50,23; H, 4,92; N, 13,02

Hallado: C, 50,14; H, 5,03; N, 12,92

Ejemplo 9

35 2-[4-(3-Ciclohexilpropil)piperazin-1-il]-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona (compuesto 14)



40 Se preparó el compuesto 14 de la misma manera que en el ejemplo 1 pero usando 4-(3-ciclohexilpropil)piperazina como amina, y se obtuvo un sólido cristalino amarillo.

Rendimiento: 63%

P.f.: 145-147°C (n-hexano)

EM (m/z): 484 (M+)

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6): δ = 8,85 y 8,76 (dos 1H, dos s, 2CH), 3,90 (4H, s ancho, $\text{N}(\text{CH}_2)_2$), 2,62 (4H, s ancho, $\text{N}(\text{CH}_2)_2$), 2,23 (2H, t, CH_2), 1,56, 1,49, 1,20 y 0,87 (15H, 4m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_5$) ppm.

Anal. para $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$:

Calc.: C, 54,53; H, 5,62; N, 11,56

Hallado: C, 54,48; H, 5,53; N, 11,71

Ejemplo 10

Determinación de la actividad inhibidora *in vitro* de los compuestos de la invención contra micobacterias.

Se determinó la actividad contra *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* H37Rv mediante el ensayo de reducción de rezaurina (CIM₉₉). El método se describió en detalle en: J.C. Palomino, A. Martín, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaels, Antimicrob. Agents Chemother., 2002, 46, 2720-2. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1

Actividad inhibidora <i>in vitro</i> de los compuestos de la invención contra actinobacterias – valores de CIM típicos (ng/ml)			
Compuesto	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. smegmatis</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i> A TCC13032
1	0,75	•170	NA
2	•0,19	•170	NA
5	0,37	•1,9	62
6	•0,19	•1,9	125
7	•0,19	•1,9	125
8	•0,19	•1,9	125
12	0,37	•1,9	15
13	0,37	•1,9	•1,9
14	•1,9	•1,9	750
NA - no disponible			

Ejemplo 11

Determinación de la eficacia *in vivo* del compuesto (2) de fórmula (1) contra *Mycobacterium tuberculosis* en el modelo de TB murina aguda.

Materiales y métodos. Se llevó a cabo la determinación de la actividad antituberculosis específica *in vivo* en ratones BALB/c/Cit machos que pesaban 22-23 g. Los ratones se infectaron mediante inyección intravenosa de 5×10^6 UFC de la cepa • 37Rv de *M. tuberculosis* en la vena lateral de la cola. Se hizo crecer *M. tuberculosis* en cantidades preparativas y se tomaron alícuotas en el laboratorio de inmunogenética del State Institution Central Research Institute of Tuberculosis, Russian Academy of Medical Sciences. Las alícuotas (1 ml) se sometieron a almacenamiento a -70°C . Con el fin de infectar a ratones, se descongelaron las alícuotas, se dispersaron en tampón fosfato con el 0,025% de Tween 80 y se ajustaron a $5 \cdot 10^6$ UFC/ratón. Se dividieron todos los animales experimentales en 10 grupos de 10 ratones cada uno. Se trataron los animales durante 4 semanas comenzando dos días después de la infección. Se administraron los compuestos por vía intragástrica cada día excepto el fin de semana (5 veces a la semana). El volumen administrado fue de 0,5 ml/ratón. Entonces se sacrificaron los animales mediante dislocación cervical para el examen microbiológico. Con el fin de determinar la eficacia de cada régimen de quimioterapia, se tomaron en consideración cambios macroscópicos en órganos parenquimatosos de animales y aislamiento de *M. tuberculosis* a partir de material patológico. Con el fin de determinar la UFC de *M. tuberculosis* en pulmones de los ratones infectados, se homogeneizaron los pulmones en 2 ml de solución salina, luego se preparó una serie de diluciones de diez veces en solución salina, y se sembraron en placa 50 μl de cada dilución en agar de Dubos. Se incubaron las placas con suspensión de células pulmonares durante 21 días a 37°C , entonces se contó el número de colonias y se determinó la cantidad de UFC en los pulmones.

Compuestos y preparación de disoluciones. Se puso la cantidad exacta (200 mg) de compuesto (2) en viales de vidrio y se añadieron 0,5 ml de ácido acético. El compuesto se disolvió inmediatamente y se añadieron 99,5 ml de agua a esta disolución. La disolución de compuesto estudiado así preparada se usó durante 4 semanas. El compuesto (2) se usó a una dosis de 50 mg/kg y se usó isoniazida (INH) en dosis de 25 mg/kg.

Resultados del estudio. En los animales del grupo de control negativo, los primeros signos de enfermedad aparecieron a los 19-20 días después de la infección: había pérdida de peso, los ratones formaban un grupo más menudo de lo que andaban activamente por la jaula, apareció "gibosidad", pero no hubo heces líquidas. La mortalidad en el grupo de control fue a los 26-29 días después de la infección. El examen macroscópico de los órganos internos de los ratones muertos de este grupo mostró muchos focos de proceso tuberculoso, focos confluyentes grandes. El bazo estaba agrandado 3 veces. El tratamiento con compuesto (2), BTZ043 e INH durante el tiempo prescrito dio como resultado una mejora marcada. El estado de los pulmones estaba próximo al normal, es decir ventilado, rosa, sin focos visibles de infección tuberculosa. 26 días después de la infección, se sacrificaron los 3 ratones supervivientes del grupo de control para la determinación de las UFC en los pulmones. Según el programa de estudio, se extrajeron los pulmones de grupos de 1-4 ratones para la determinación de las UFC 4 semanas después de que empezara el tratamiento. Los resultados del estudio se enumeran en la tabla 2.

Tabla 2

UFC de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en los pulmones de ratones 4 semanas después del tratamiento en el modelo de TB murina aguda.			
Compuesto estudiado	Dosis	Log de UFC de pulmones	Longevidad media (días) M ± EEM
Compuesto (2)	50 mg/kg	4,30	Vivo en el sacrificio
BTZ043*	50 mg/kg	4,78	Vivo en el sacrificio
Isoniazida	25 mg/kg	4,34	Vivo en el sacrificio
Control negativo	-	9,21	27 ± 0,22

* BTZ043 - 2-[(2S)-2-metil-1,4-dioxo-8-azaespiro[4.5]dec-8-il]-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona de V. Makarov *et al.* Science, 2009, 324, 801.

Este ejemplo demuestra claramente que las nuevas 2-piperazino-1,3-benzotiazin-4-onas que se representan en el presente documento mediante el ejemplo (2) son equivalentes a o más activas que las 1,3-benzotiazin-4-onas descritas previamente.

Ejemplo 12

Determinación de la eficacia *in vivo* de los compuestos de fórmula (1) contra *M. tuberculosis* en el modelo de TB murina crónica.

Materiales y métodos.

Se infectaron ratones BALB/c (Charles River Laboratories, Francia), de 4 a 6 semanas de edad (20-25 g) mediante la vía de aerosol con la cepa H37Rv (~100 UFC).

El tratamiento (5 ratones por grupo) comenzó cuatro semanas después de la infección, con los compuestos administrados mediante sonda gástrica una vez al día, seis veces/semana, durante 4 semanas. Se usaron fármacos a las siguientes concentraciones (mg/kg): BTZ043 a 50 mg/kg; INH a 25 mg/kg; compuestos 2 y 8 de la invención (ambos a 50 mg/kg). Se disolvió INH en agua, mientras que BTZ043 y los compuestos 2 y 8 se prepararon en carboximetilcelulosa al 0,5%.

Se sacrificaron los ratones de control y tratados, luego se homogeneizaron pulmones y bazos y se sembraron en placa diluciones en placas 7H10 para la enumeración de bacilos viables (recuentos de UFC).

Análisis estadístico. Se transformaron las UFC de pulmones antes del análisis como $\log_{10}(x+1)$ donde x es el recuento absoluto de UFC. Se compararon las diferencias en UFC medias/grupo entre controles y regímenes experimentales mediante análisis de la varianza de una vía usando GraphPad v5.0.

Resultados del estudio. En la figura 1 se presentan los resultados del experimento donde puede observarse que el tratamiento con los compuestos 2 y 8 fue significativamente más eficaz en la reducción de la carga de UFC en los pulmones y bazos que el tratamiento con BTZ043. El tratamiento con los compuestos 2 y 8 muestra una diferencia estadísticamente significativa con respecto a BTZ043, que era ligeramente inferior a INH. Estos resultados del modelo murino de TB crónica indican que los compuestos de la invención son prometedores como posibles agentes antituberculosos.

Ejemplo 13

Se llevaron a cabo una serie de experimentos de ADME/T *in vitro* comparativos para predecir si la eficacia mejorada observada en ratones con PBTZ169 (compuesto 2) en comparación con BTZ043 podría esperarse también en seres humanos.

Se midió, en primer lugar, la estabilidad química en líquido gástrico simulado de PBTZ169 a concentración 5 μ M y

después de 60 minutos el 67% del compuesto permanecía y se encontró que la semivida en plasma humano a (5 µM) era de > 60 minutos. A continuación, se incubaron PBTZ169 y BTZ043 a una concentración de 1 µg/ml con 0,1 mg de microsomas hepáticos de ratón o humanos (Invitrogen) con el fin de medir su aclaramiento intrínseco. Las cantidades relativas del compuesto original que permanecen a lo largo del tiempo se determinaron mediante HPLC. Se usaron carbamazepina y nifedipina como controles de aclaramiento intrínseco bajo y alto, respectivamente. Los resultados indican que tanto BTZ043 como PBTZ169 son compuestos de aclaramiento medio (9 < Clint < 47 µl/min/mg de proteína) en microsomas hepáticos tanto humanos como de ratón, mostrando PBTZ169 un ligero aumento en el aclaramiento intrínseco (tabla 3). Tanto nifedipina como carbamazepina mostraron el aclaramiento intrínseco alto y bajo deseado.

Valores de Clint para BTZ043, PBTZ169 y fármacos de control

Tabla 3.

	Aclaramiento intrínseco (Clint) µl/min/mg de proteína	
	Microsomas hepáticos humanos	Microsomas hepáticos de ratón
Carbamazepina	0,6	1,1
Nifedipina	55,3	48,4
BTZ043	16,2	10,3
PBTZ169	23,9	20,9

El índice de selectividad (IS) de un compuesto proporciona una buena indicación de la posible tolerabilidad de un candidato a fármaco. El IS es la concentración de compuesto que provoca un 50% del efecto citotóxico (CT50) dividido entre su CIM. Las TC50 de PBTZ169 y BTZ043 se establecieron usando dos líneas celulares humanas, la línea de hepatocitos HepG2 y la línea de neumocitos A549, usando el ensayo de reducción de resazurina después de la incubación con cantidades variables de los compuestos durante 72 h. Las TC50 de PBTZ169 y BTZ043 fueron de 66,7 y 6,3 µg/ml contra células HepG2, respectivamente. Las TC50 de PBTZ169 y BTZ043 fueron de 73,2 y 16,3 µg/ml contra células A549, respectivamente. Las CIM respectivas fueron de 1 y 2 ng/ml para PBTZ169 y BTZ043. Por consiguiente, dado que en ambos casos se observó considerablemente menos citotoxicidad con PBTZ169, su IS es enormemente superior al de BTZ043 (tabla 4). En términos clínicos, PBTZ169 debe ser más seguro y mejor tolerado que BTZ043.

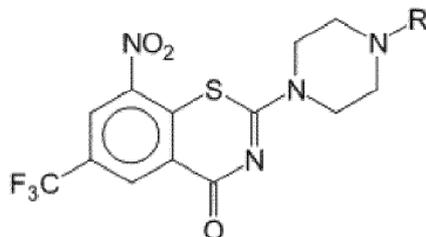
Comparación de IS para dos líneas celulares

Tabla 4.

Compuesto	IS para HepG2	IS para A549
PBTZ169	66.000	73.000
BTZ043	3.155	8.130

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (1)



(1)

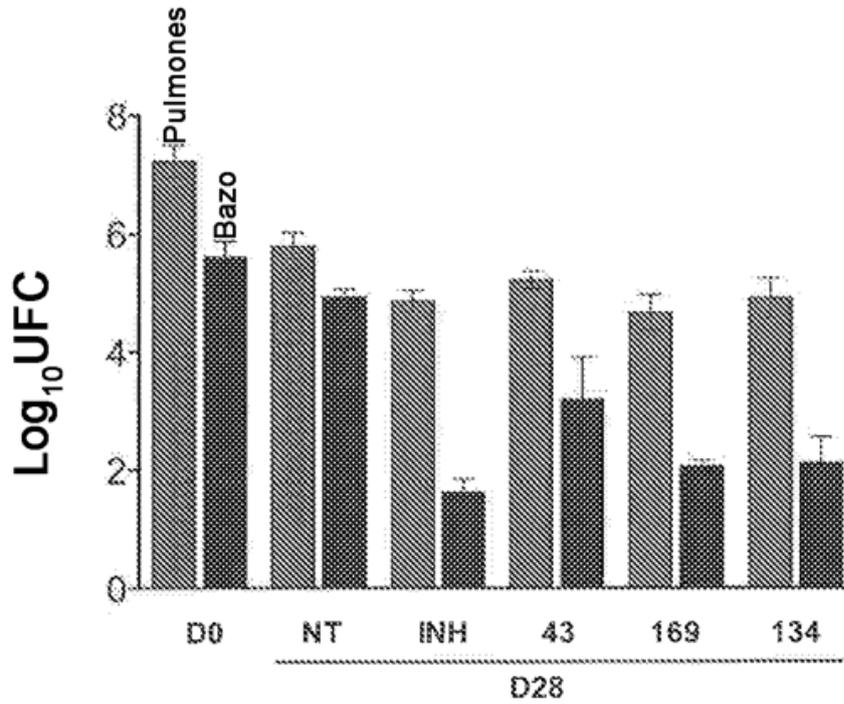
5

en la que

- 10 R se selecciona del grupo que consiste en ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 2-ciclohexiletilo, pentilo, heptilo, 1-metilbutilo, 3-ciclohexilpropilo, sec-butilo y 1-etilpropilo, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 15 2. Compuesto de fórmula (1) según la reivindicación 1, en el que el compuesto es 2-[4-(ciclohexilmetil)piperazin-1-il]-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona.
3. Compuesto de fórmula (1) según la reivindicación 1, en el que el compuesto es 2-(4-heptilpiperazin-1-il)-8-nitro-6-(trifluorometil)-4H-1,3-benzotiazin-4-ona.
- 20 4. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (1) y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4 que comprende además un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 6. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad.
7. Compuesto para su uso según la reivindicación 6, en el que la enfermedad está provocada por una infección microbiana.
- 30 8. Compuesto para su uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad provocada por una infección microbiana se selecciona del grupo que comprende tuberculosis, lepra o úlcera de Buruli.
9. Compuesto para su uso según la reivindicación 7, en el que la infección microbiana está provocada por una bacteria que pertenece al género *Mycobacterium*, *Corynebacterium* o *Nocardia*.

35

Figura 1



Pulmón	Valor de P (prueba t)	Diferencia significativa (p < 0,05)
43 frente a 169	0.0061	Sí
43 frente a 134	0.1036	No
INH frente a 43	0.0098	Sí
INH frente a 169	0.2528	No
INH frente a 134	0.7732	No

Bazo	Valor de P (prueba t)	Diferencia significativa (p < 0,05)
43 frente a 169	0.0078	Sí
43 frente a 134	0.0199	Sí
INH frente a 43	0.0329	Sí
INH frente a 169	0.0062	Sí
INH frente a 134	0.1987	No