(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 762 984**

(51) Int. CI.:

***C07F 9/177*** (2006.01)
***A61K 31/6615*** (2006.01)
***A61P 31/04*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2016 PCT/EP2016/080545**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017 WO17098033**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2016 E 16808705 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3386994**

(54) Título: **4,6-di-(O-tiofosfato)-inositol-1,2,3,5-tetra-O-sulfato para la infección por C. difficile**

(30) Prioridad:

**11.12.2015 EP 15199681**
**07.04.2016 EP 16164300**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**26.05.2020**

(73) Titular/es:

**ETH ZÜRICH (100.0%)**
**Rämistrasse 101**
**8092 Zürich, CH**

(72) Inventor/es:

**IVARSSON, MATTIAS;**
**LEROUX, JEAN-CHRISTOPHE y**
**CASTAGNER, BASTIEN**

(74) Agente/Representante:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

4,6-di-(O-tiofosfato)-inositol-1,2,3,5-tetra-O-sulfato para la infección por *C. difficile*

La presente invención se refiere a 4,6-di-(O-tiofosfato)-inositol-1,2,3,5-tetra-O-sulfato y a su uso como un activador entérico de la toxina de *Clostridium difficile* en la prevención y el tratamiento de los síntomas tóxicos asociados con la infección por *C. difficile*.

### Antecedentes de la invención

Las infecciones con *Clostridium difficile* pueden conducir a diarrea grave, incluso potencialmente mortal. Los síntomas son causados por dos toxinas sintetizadas por *C. difficile*, TcdA y TcdB. Las toxinas pueden entrar en las células que recubren el colon, donde son activadas por el hexaquisfosfato de inositol citosólico (IP6), y ejercen su función tóxica. Una intervención terapéutica sugerida es la activación de las toxinas en el espacio extracelular de la luz del colon. Las toxinas activadas ya no pueden entrar en las células del colon, y dentro de la luz del colon no pueden ejercer su función tóxica. Por lo tanto, la activación de las toxinas dentro de la luz del colon hace que las toxinas sean inofensivas para el paciente afectado.

IP6 no puede usarse para la intervención terapéutica, porque precipita debido a la alta concentración de calcio en la luz del colon.

El documento WO2013045107A1 muestra compuestos de fosfato de inositol modificados con PEG y compuestos mixtos de sulfato-fosfato de inositol y su uso en la activación de la toxina de *C. difficile*. La actividad de los compuestos mostrados en el mismo es prometedora, sin embargo, las mejoras frente a los resultados relacionados del mismo serían ventajosas. Por lo tanto, el problema subyacente a la presente invención es proporcionar activadores de la toxina de *C. difficile* que presenten una actividad más potente a una alta concentración de calcio.

*CHEMBIOCHEM - A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY*, vol. 16, no. 7, 12 de marzo 2015, páginas 1030-1032, titulado "New Paradigms for the Chiral Síntesis de Inositol Phosphates".

*DISS. ETH NO.* 22532, 2015, páginas 1-84 titulado "Chemical Síntesis de Biomolecules Analogs: Inositol Phosphate/Sulfate Hybrids And Fluorinated Carbohidratos".

*MedChemComm*, vol. 3, no. 7, 2012, página 735, titulado "The use of phosphate bioisosteres in medicinal chemistry and chemical biology".

*BIOCHEMICAL JOURNAL*, vol. 246, no. 3, 1987, páginas 771-774, titulado "myo-Inositol phosphorothioates, fosfatase-resistant analogues of myo -inositol fosfatos. Synthesis of dl-myo -inositol 1,4-bisphosphate and dl-myo -inositol 1,4-bisphosphorothioate".

El documento US9200015 B2 desvela compuestos derivados del hexaquisfosfato de inositol eficaces para tratar una infección por *Clostridium difficile* y para neutralizar las toxinas bacterianas producidas por la misma.

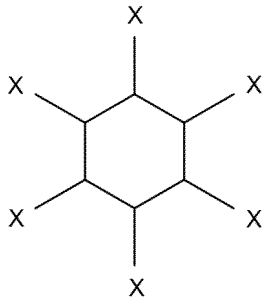
El documento EP0269105 A2 desvela derivados de ciclohexano para aplicaciones farmacéuticas.

Este problema se resuelve con la materia objeto de las reivindicaciones independientes.

### Descripción de la invención

Durante una investigación de la clase de compuestos que se muestra por primera vez en el documento WO2013045107A1, sorprendentemente, se descubrió que un pequeño subconjunto de compuestos de bistiofosfato de tetraquis-sulfato de inositol mixtos tiene un efecto muy superior al de los compuestos de sulfato-fosfato mixtos investigados previamente (véase la Fig. 1).

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto caracterizado por la fórmula general (I),

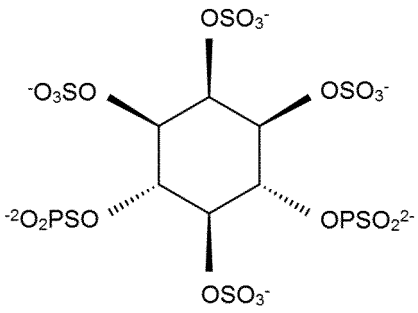



(I)

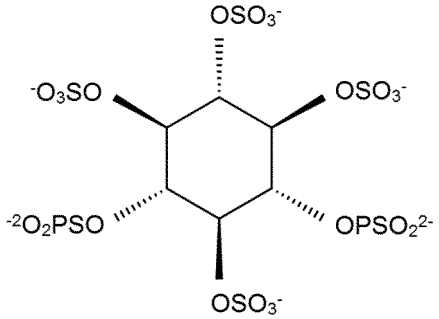
en donde dos de seis X son $OPSO_2^{2-}$ y los X restantes son $OSO_3^-$.

Las líneas rectas de la fórmula I pretenden indicar que la estereoquímica de los átomos de carbono del anillo individual no está definida. La fórmula pretende abarcar cualquier diastereómero.

En ciertas realizaciones, el compuesto se caracteriza por la fórmula general (IIa) o (IIb)




(IIa)




(IIb).

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona el compuesto según lo especificado por las fórmulas (I), (II), (IIa) o (IIb) para su uso como un medicamento en el tratamiento o en la prevención de una enfermedad.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona el compuesto según lo especificado por las fórmulas (I), (IIa) o (IIb) para su uso en el tratamiento o en la prevención de la infección por *C. difficile*, o en el tratamiento o en la prevención de los síntomas asociados con la infección por *C. difficile*.

Los compuestos de acuerdo con la invención no necesitan penetrar en las membranas de mamíferos ni de bacterias para ser activos. Además, es improbable que los compuestos de acuerdo con la invención ejerzan una presión selectiva sobre las bacterias de *C. difficile*, evitando así los problemas relacionados con la resistencia.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una forma farmacéutica que comprende el compuesto según lo especificado por las fórmulas (I), (IIa) o (IIb), en particular, para su uso en el tratamiento o en la prevención de la infección por *C. difficile*, o en el tratamiento o en la prevención de los síntomas asociados con la infección por *C. difficile*.

En ciertas realizaciones, la forma farmacéutica es una formulación oral, en particular, un comprimido, una cápsula, una pastilla para chupar, un polvo, una solución o un jarabe.

De acuerdo con un aspecto alternativo de la invención, se proporciona el compuesto según lo especificado en los aspectos anteriores de la invención como un medicamento, en particular, un medicamento formulado para su uso en la prevención o en el tratamiento de síntomas asociados con la infección por *C. difficile*.

En ciertas realizaciones, el medicamento comprende el compuesto como se especifica en los aspectos anteriores de la invención solo o junto con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

El medicamento puede administrarse solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos, particularmente, en combinación con un fármaco antibacteriano, más particularmente, en combinación con un fármaco antibacteriano seleccionado del grupo que comprende (a modo de ejemplos no limitantes) metronidazol, vancomicina o fidaxomicina.

De acuerdo con otro aspecto más de la divulgación, se proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de los síntomas asociados con la infección por *C. difficile*, que comprende la administración del compuesto según lo

especificado por las fórmulas (I), (IIa) o (IIb) a un sujeto que lo necesite. La administración puede realizarse por cualquiera de los medios mencionados anteriormente.

El compuesto puede administrarse a un paciente ya diagnosticado con infección por *C. difficile*, o a un paciente sospechoso de padecer infección por *C. difficile*. Como alternativa, el compuesto se puede usar como profiláctico para pacientes con riesgo de contraer la infección, tales como pacientes en tratamiento con fármacos antibacterianos en entornos hospitalarios.

De acuerdo con otro aspecto más de la divulgación, se proporciona un procedimiento de tratamiento de la infección por *C. difficile*, que comprende la administración de un fármaco antibacteriano, particularmente, metronidazol, vancomicina o fidaxomicina en combinación con el compuesto según lo especificado por las fórmulas (I), (IIa) o (IIb) a un sujeto que lo necesite.

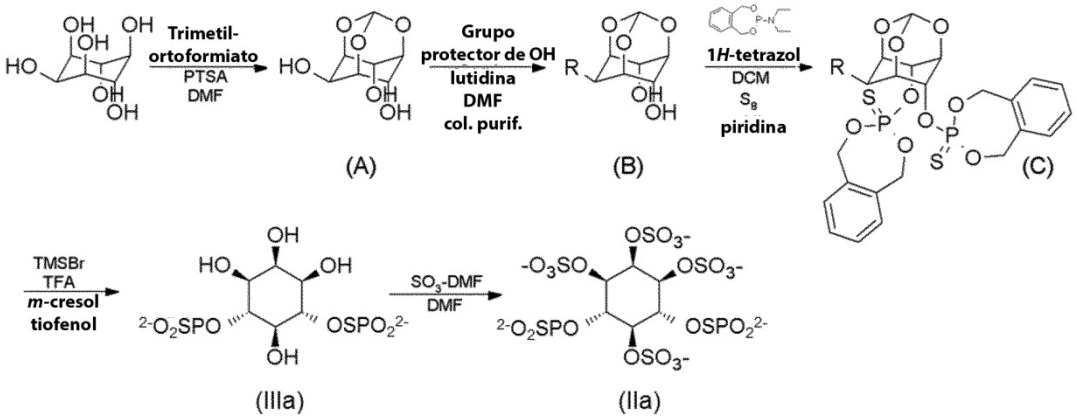
**Breve descripción de las figuras**

La Fig. 1 muestra el grado de escisión de TcdB en presencia y ausencia de $Ca^{2+}$ (10 mM) para IP6, IP2S4 y compuesto activador IT2S4 (IIa).
La Fig. 2 muestra RMN de $^{1}H$ y RMN de $^{31}P$ del compuesto (IIa).
La Fig. 3 muestra el grado de escisión de TcdB en presencia de $CaCl_2$ 10 mM para el hexafosfato de inositol (IP6), hexasulfato de inositol (IS6) y dos compuestos mixtos de fosfato-sulfato.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1: Síntesis del compuesto (IIa)**

La síntesis siguió la secuencia representada en el siguiente esquema:




PTSA: ácido *p*-toluenosulfónico; DMF: dimetilformamida; TBDMSCI: cloruro de *terc*-butildimetilsililo; DCM: diclorometano; S8: azufre elemental; pir.: piridina; TMSBr: bromuro de trimetilsililo, TFA: ácido trifluoroacético

*Fosforilación*

Se evaporó el ortoformiato de 2-*terc*-butildimetilsilil-inositol 3 veces junto con tolueno y se disolvió en diclorometano (DCM). Se añadieron a la reacción 1*H*-tetrazol (4 eq.), seguido de fosforamidita (8 eq.), y se agitó durante la noche. Se añadió piridina, seguida de escamas de azufre trituradas (20 eq.) a la reacción, y se agitaron durante la noche. Se diluyó la mezcla en bruto resultante con DCM y se lavó con solución saturada de $NaHCO_3$, se secó con $Na_2SO_4$, se filtró y se concentró. El producto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida con DCM en tolueno.
RMN de $^{1}H$ (400 MHz; $CDCl_3$): δ 7,35-7,29 (m, 4H), 7,15 (dd, *J* = 6,6; 2,1 Hz, 2H), 7,07-7,04 (m, 2H), 5,54 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H), 5,45-5,41 (m, 2H), 5,30-4,97 (m, 8H), 4,51-4,49 (m, 1H), 4,33-4,32 (m, 2H), 4,27 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H), 0,93 (s, 9H), 0,13 (s, 6H);
RMN de $^{31}P$ (162 MHz; $CDCl_3$): δ 70,1

*Desprotección*

Las siguientes condiciones de desprotección están en analogía con la síntesis publicada en *Journal of the American Chemical Society* [JACS 2005, 127, 5288].

Se trató el material de partida (50 mg) con tiofenol (300 µl), *m*-cresol (300 µl), ácido trifluoroacético (1,8 ml). Luego, se añadió TMSBrOH lentamente (360 µl). Se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Se evaporó dos veces en

tolueno. Se diluyó con DCM y aprox. 5 ml de agua. Se neutralizó con NaOH 1 N. Se vertió la capa acuosa (ligeramente turbia) directamente en el cartucho SolEx C18 (Thermofisher, 1 g, 6 ml). Se eluyó con agua. En algunos casos, se encontraron algunas impurezas aromáticas, pero, con el tiempo, precipitarían en agua y pudieron filtrarse.
RMN de $^{1}H$ (500 MHz; $D_2O$): δ 4,36 (c, *J* = 9,6 Hz, 2H), 4,02 (t, *J* = 2,7 Hz, 1H), 3,64 (dd, *J* = 9,7; 2,8 Hz, 2H), 3,50 (t, *J* = 9,3 Hz, 1H).
RMN de $^{31}P$ (203 MHz; $D_2O$): δ 45,7

*Sulfatación*

La reacción de sulfatación del tiofosfato debe realizarse con cuidado, porque el tiofosfato finalmente se convierte en fosfato en las condiciones de reacción. De este modo, se controló la sulfatación cuidadosamente y se vio que la reacción se había completado tras aprox. 30 minutos, y que no se pudo observar descomposición en este momento. Por lo tanto, se añadió complejo de trióxido de azufre y dimetilformamida ($SO_3$-DMF) (12 eq.) a una suspensión de fosfato de inositol en DMF, y se agitó la reacción durante 35 minutos. La reacción se inactivó mediante la adición de NaOH 1 N, hasta aprox. pH 8, seguido de aprox. 3 ml de metanol (MeOH) para precipitar las sales. El sólido se purificó mediante una columna Sephadex LH-20, eluyendo con agua.
RMN de $^{1}H$ (500 MHz; $D_2O$): δ 5,06 (s, 1H), 5,04-4,98 (m, 4H), 4,79-4,76 (m, 1H).
RMN de $^{31}P$ (203 MHz; $D_2O$): δ 44,5
Los resultados de RMN de $^{1}H$ y RMN de $^{31}P$ se muestran en la Fig. 2.

**Ejemplo 2: Comparación de la eficiencia de la escisión**

Se compararon IP6, el compuesto activador (IIa) e IP2S4 con respecto al grado de escisión de TcdB (Fig. 1). Se añadió el compuesto de prueba a 1 mM a 150 ng de toxina B en presencia o ausencia de $Ca^{2+}$ 10 mM en Tris 100 mM, pH 7,4, y se incubó durante 3 h a 37 ºC. Los fragmentos de proteína escindidos se separaron mediante SDS-PAGE y se visualizaron mediante tinción con plata. El grado de escisión se cuantificó a partir de las intensidades de la banda de proteínas usando el paquete de software ImageJ. Las señales se normalizaron para la escisión de los controles positivos y negativos. Los resultados muestran que los inositoles de di-tiofosfato-tetrasulfato son sorprendentemente superiores incluso en comparación con los inositoles de di-fosfato-tetra-sulfato, que, a su vez, son significativamente superiores al hexasulfato de inositol y al hexafosfato de inositol publicados anteriormente (Fig. 3 y ejemplo comparativo 3).

**Ejemplo 3 (comparativo): Eficiencia de escisión de inositol de P2S4, IP6 e IS6**

Las muestras se prepararon y se procesaron como se describe en el ejemplo 2. Las barras de error muestran la D.T.; El asterisco indica la diferencia estadística en comparación con **IP2S4** ($p$ <0,05); $n$ = 3.

Procedimientos:

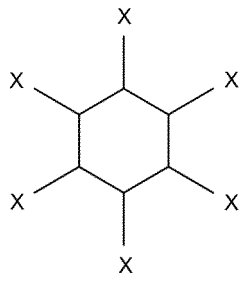
**Mediciones de solubilidad de análogos mediante ICP-MS**. Se prepararon soluciones 100 mM de análogos de hexaquisfosfato de inositol (IP6) con o sin $CaCl_2$ 10 mM en tris 10 mM, pH 7,4, y se incubaron con agitación durante 2 h a 37 ºC. Las soluciones se filtraron inmediatamente a través de filtros de nylon de 0,2 mm equilibrados a 37 ºC. Se determinó el contenido de fósforo de cada filtrado mediante espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Los valores obtenidos se dividieron entre el número de fosfatos de cada análogo de IP6 para determinar la concentración del compuesto en las soluciones.

**Cuantificación de iones de calcio libres.** Se preparó una solución 1 mM nueva de muréxido (Merck, Alemania) en tris 10 mM, pH 7,4. Para cada análogo de IP6, se prepararon muestras que contenían análogo 0,5 mM, muréxido y $CaCl_2$ en 50 ml de tris 10 mM por triplicado. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se centrifugaron las muestras a 20.000 g durante 2 min y se transfirieron los 40 ml superiores del sobrenadante a una placa de 384 pocillos. También se prepararon muestras sin análogo de IP6 que contenían $CaCl_2$ que variaban de 1 mM a 20 mM, y de 20 mM, y se usaron para calibrar cada experimento. Se midió la absorbancia a 474 nm y a 544 nm, y los datos se analizaron según lo informado por Ohnishi. [*Anal. Biochem*. 85, 165 (1978)]. El experimento se repitió por triplicado.

**Ensayos de escisión con holotoxina.** Se equilibraron análogos de IP6 1 mM con $CaCl_2$ 10 mM en tris 100 mM, pH 7,4 durante 15 min a 37 ºC antes de la adición de 150 ng de TcdB (TgcBiomics, Alemania) en un volumen total de 20 ml. También se incluyó un control negativo (sin IP6, $CaCl_2$ 10 mM) y un control positivo (IP6 1 mM) en cada gel. Las mezclas de reacción se incubaron durante 3 h a 37 ºC y luego se colocaron en hielo. Se añadió tampón de muestra Laemmli (x5) para detener las reacciones y se añadió EDTA 10 mM a las muestras que contenían $CaCl_2$ antes de calentar a 95 ºC durante 3 minutos. Los productos de escisión se visualizaron mediante SDS-PAGE (usando geles de Tris-Glicina Precise™ de acrilamida al 8 % de 15 pocillos, ThermoScientific, EE. UU.), seguido de la tinción con plata de acuerdo con un protocolo Vorum modificado [Proteomics 1, 1359 (2001)] con la etapa de sensibilización con tiosulfato prolongada hasta 10 min. La linealidad del protocolo de tinción se verificó con diluciones en serie de TcdB partiendo de 160 ng/carril a 20 ng/carril. Las intensidades de banda se cuantificaron como se describe para los ensayos de escisión con toxina recombinante. El experimento se realizó por triplicado.

**REIVINDICACIONES**

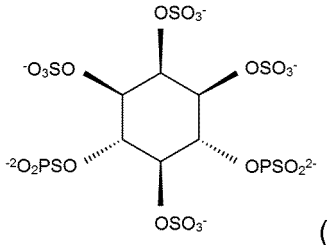
1. Un compuesto **caracterizado por** la fórmula general (I)



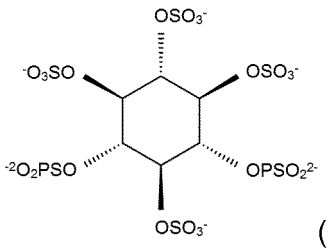

(I),

en donde dos de seis X son $OPSO_2^{2-}$ y los X restantes son $OSO_3^-$.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por** la fórmula (IIa) o (IIb)




(IIa)




(IIb).

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para su uso como un medicamento.

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento o en la prevención de la infección por *C. difficile*, o en la prevención o en el tratamiento de los síntomas asociados con la infección por *C. difficile*.

5. Una forma farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.

Fig. 1

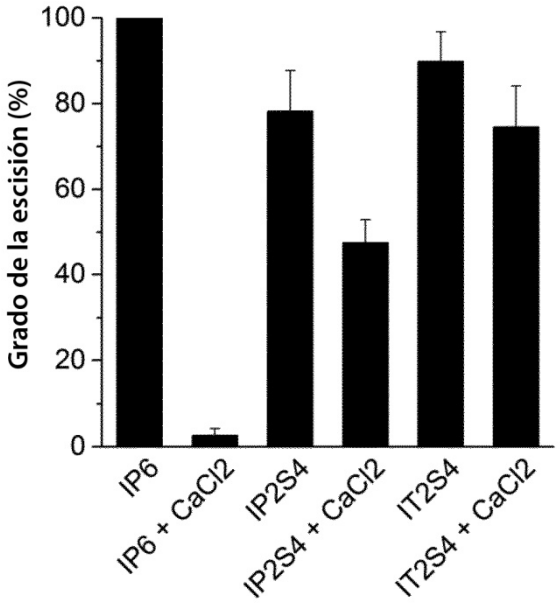

Grado de la escisión (%)
100
80
60
40
20
0
IP6
IP6 + CaCl2
IP2S4
IP2S4 + CaCl2
IT2S4
IT2S4 + CaCl2

Fig. 2 a

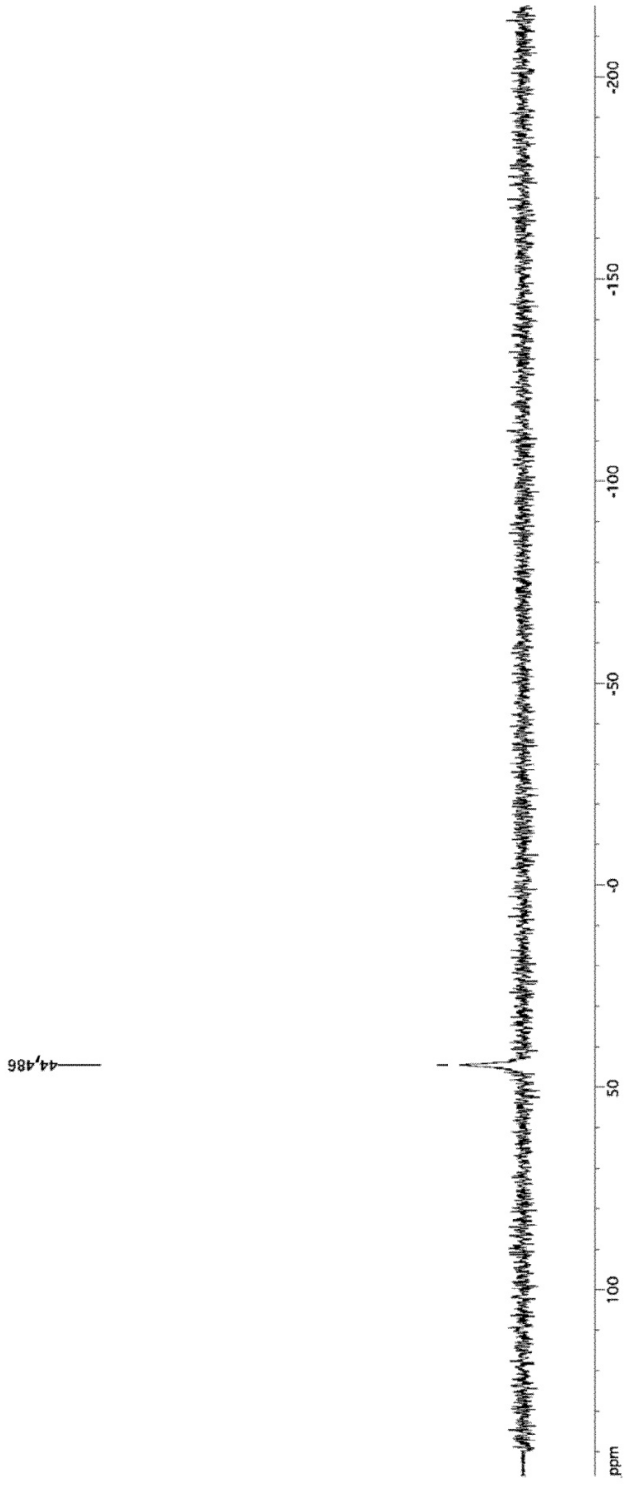


Fig. 2 b

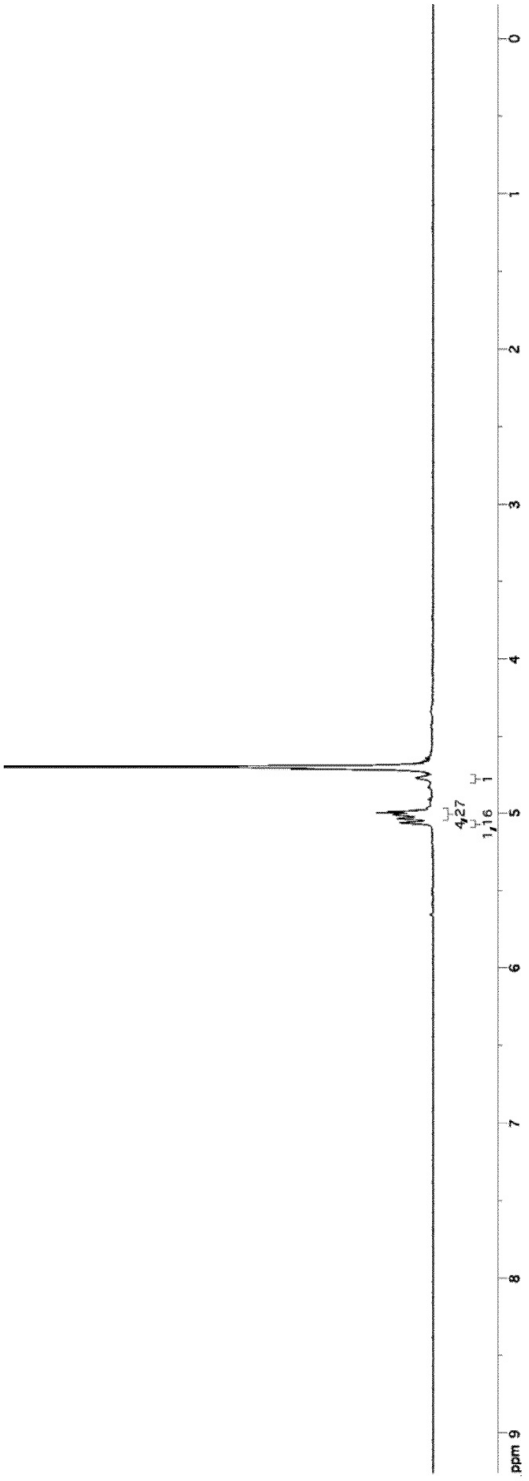
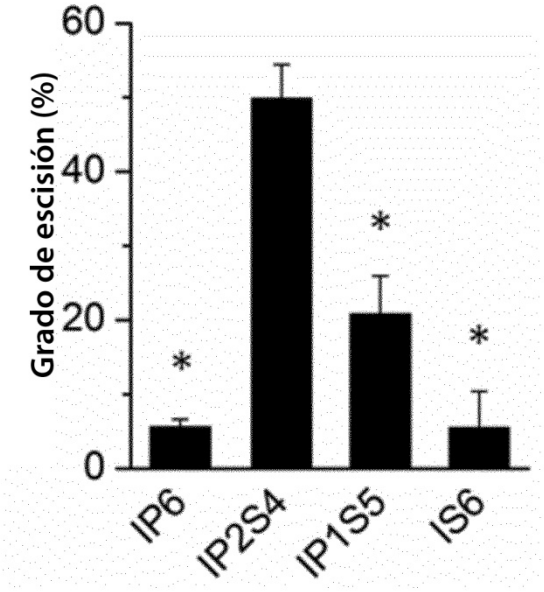



Fig. 3