

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 253**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/52** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**A61P 31/06** (2006.01)

**A61P 31/10** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2014** **E 14305215 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** **EP 2907514**

54 Título: **Compuestos derivados de purina para uso médico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.06.2020**

73 Titular/es:

**MANROS THERAPEUTICS (50.0%)**  
**Lieudit Presqu'île de Perharidy**  
**29680 Roscoff, FR y**  
**THE UNIVERSITY OF CHICAGO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MEIJER, LAURENT;**  
**OUMATA, NASSIMA;**  
**GALONS, HERVÉ;**  
**GABDOULKHAKOVA, AIDA;**  
**RIAZANSKI, VLADIMIR y**  
**NELSON, DEBORAH**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones:**

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

**ES 2 765 253 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Compuestos derivados de purina para uso médico

**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere a compuestos derivados de purina y derivados de imidazo[4,5-b]piridinas sustituidos para su uso para tratar una enfermedad caracterizada por una reducción en la destrucción bacteriana mediada por macrófagos, en particular macrófagos alveolares (AMs), y más particularmente una enfermedad resultante de la acidificación deteriorada de fago-lisosomas en macrófagos, en particular macrófagos alveolares.

10 Más particularmente, la invención se basa en dichos derivados, para su uso para el tratamiento de la fibrosis quística (CF) y, más en general, para el tratamiento de enfermedades que implican infecciones microbianas pulmonares, y aún más ampliamente para su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas pulmonares.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La fibrosis quística, la enfermedad hereditaria autosómica recesiva letal más común, está relacionada con CFTR (por el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística) de canales de cloruro no funcional.

15 La eliminación de fenilalanina 508 ( $\Delta$ 508F CFTR) en el gen que codifica la proteína CFTR representa la mutación más prevalente en pacientes con fibrosis quística, y representa casi el 70% de las mutaciones.

La proteína  $\Delta$ 508F CFTR no puede translocarse a la membrana plasmática, en la que la CFTR normalmente muestra su actividad fisiológica. Otras mutaciones de CFTR humana que pueden citarse son G542X, G551D, N1303K, W1282X, R553X, 621+1G, 1717-1G, R117H y R1162X. A lo largo de las 1900 mutaciones diferentes que se han descrito, solo cuatro de ellas, además de  $\Delta$ 508F, representan más del 1% de los casos.

20 Además del papel bien establecido de la CFTR en la función de las células epiteliales pulmonares, se ha demostrado la importancia de la CFTR en la actividad microbicida de los macrófagos pulmonares, así como que la CFTR también aumenta la capacidad microbicida de los neutrófilos.

Por lo tanto, una estrategia dirigida a desarrollar nuevas moléculas dirigidas a la causa raíz de la CF en lugar de los síntomas de la enfermedad, radica en la mejora de las funciones de CFTR mutante.

25 A pesar de un enorme esfuerzo en particular dentro de dicha estrategia realizada en las últimas dos décadas para comprender la patogénesis de la fibrosis quística, no existe cura para la enfermedad.

La (R)-roscovitina es un potente inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina que inicialmente se propuso utilizar para tratar varios tipos de cáncer (véase el documento WO 97/20842).

30 Se demostró que (R)-roscovitina, (2-(R)-(1-etil-2-hidroxi-etilamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina), que es un derivado sustituido de la purina, y derivados estrechamente relacionados de la misma, rescataron alguna translocación de la membrana plasmática de  $\Delta$ 508F CFTR (véase el documento WO 2006/042949).

35 Sin embargo, todavía no está claro por qué las células del sistema inmune innato, incluidos los macrófagos y los neutrófilos, no pueden erradicar la infección microbiana. En el pulmón de fibrosis quística, la colonización microbiana, predominantemente con *Pseudomonas aeruginosa*, y el daño masivo del tejido pulmonar por neutrófilos reclutados conducen a daño bronquial severo, insuficiencia respiratoria y muerte. Los defectos en el sistema inmune innato podrían tener consecuencias importantes para la defensa microbiana en pacientes con fibrosis quística.

40 El tratamiento actual de la fibrosis quística se basa en el tratamiento de infecciones microbianas que, en consecuencia, aparecen en una etapa de esta enfermedad. Los antimicrobianos, y más particularmente los antibióticos, se utilizan en gran medida, con numerosos inconvenientes debido a los microorganismos cada vez más resistentes a los antibióticos conocidos.

Para desarrollar una estrategia alternativa, los inventores investigaron otra vía, en relación con los macrófagos alveolares (AMs), e identificaron compuestos que podrían resolver la infección microbiana sin el uso de antimicrobianos.

45 Para realizar su función principal, los macrófagos deben ingerir y destruir los patógenos microbianos. Después de la absorción de los patógenos por la fagocitosis, los fagosomas se fusionan con los lisosomas en fago-lisosomas en los que los patógenos son digeridos por varias enzimas proteolíticas y lipolíticas. El funcionamiento óptimo de las enzimas degradantes lisosómicas requiere un pH ácido, que caracteriza la luz de los lisosomas. La generación de pH bajo de fago-lisosomas es impulsada principalmente por las V-ATPasas, bombas de protones que usan ATP citoplasmático para cargar H<sup>+</sup> en el orgánulo derivado durante la fusión de lisosomas a los fagosomas en maduración.

50

Recientemente se demostró que los macrófagos alveolares murinos emplean CFTR como un mecanismo principal de derivación de carga, lo que permite la acidificación del compartimento fago-lisosómico y la consiguiente destrucción bacteriana (Deriy et al., 2009; Diet et al., 2006).

5 De hecho, se demostró que el pH intra-fago-lisosómico de los macrófagos alveolares de individuos con fibrosis quística es menos ácido (pH 7,2), en comparación con los de individuos sanos (pH 5,2). Se demostró además que existe una estrecha correlación entre el genotipo de CFTR y los niveles de acidificación lisosómica y muerte microbiana.

Por consiguiente, existe la necesidad de proporcionar un método de tratamiento de la afección de fibrosis quística en un individuo que lo necesite.

10 Además, existe la necesidad de proporcionar un tratamiento para aliviar los síntomas asociados con la afección de fibrosis quística en un individuo que lo necesite.

Existe la necesidad de proporcionar un tratamiento de la infección microbiana que se asocia con mayor frecuencia con la afección de fibrosis quística en un individuo que lo necesita.

15 Existe la necesidad de proporcionar un tratamiento de la infección microbiana que se asocia más frecuentemente con la afección de fibrosis quística, limitando el uso de antibióticos en un individuo que lo necesite.

También existe la necesidad de proporcionar un tratamiento para aliviar los síntomas asociados con la afección de fibrosis quística en un individuo que lo necesite, siendo dicho tratamiento independiente de la mutación del gen que codifica CFTR.

20 Todavía existe la necesidad de proporcionar moléculas que rescaten la función microbicida en los macrófagos alveolares pulmonares CF (AMs).

M3 es un metabolito conocido de (R)-Roscovitina, que no exhibe propiedades inhibitoras de la cinasa. Se describió en particular en la solicitud de patente WO 2004/016612.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

25 Sorprendentemente, los inventores descubrieron que un subconjunto de compuestos derivados de purina y derivados de imidazo[4,5-b]piridinas sustituidos tiene la capacidad de restaurar las propiedades microbicidas de los macrófagos alveolares, basándose estas propiedades microbicidas en la acidificación del pH intra-fago-lisosomal de dichos macrófagos alveolares.

30 Por lo tanto, en uno de sus aspectos, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (I) como se define más adelante para su uso en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una reducción en la destrucción bacteriana mediada por macrófagos, particularmente macrófagos alveolares (AMs).

En un objeto adicional, la presente invención se centra más particularmente en dichos compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de enfermedades que implican infecciones microbianas pulmonares, y más particularmente fibrosis quística (CF).

#### LEYENDAS DE LAS FIGURAS

35 Figura 1. El metabolito M3 y los derivados relacionados potencian la acidificación fagosómica en los macrófagos alveolares humanos.

(A) Superposición de DIC de imagen de fluorescencia para macrófagos alveolares después de una carga de 120-200 min. con BioParticles®. Barras de escala: 10  $\mu$ m.

(B) Cinética de acidificación para compuestos representativos.

40 (C) Efecto comparativo de diversos compuestos sobre el pH fagosómico en macrófagos alveolares humanos. Resumen de datos de 3-10 pacientes para cada compuesto ensayado a 10  $\mu$ M. Los datos se obtuvieron por triplicado para cada paciente y se promediaron para todos los pacientes con barras de error que indicaban la SEM. Los datos se normalizaron a los cambios de fluorescencia observados en las células de control no tratadas para cada paciente antes del promedio.

45 Figura 2. Inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en macrófagos alveolares *cftr*<sup>-/-</sup> y  $\Delta$ F508 por el metabolito M3 y derivados. Se realizó una comparación del crecimiento bacteriano intracelular en macrófagos alveolares murinos individuales utilizando microscopía de células vivas. Las células fueron alimentadas con DS-Red que expresan *P. aeruginosa* durante 30 min. (MOI <10). Las células fueron expuestas al metabolito M3 durante 20 minutos antes de la exposición a las bacterias. Las bacterias adherentes y no ingeridas se eliminaron luego mediante lavado e incubación con antibióticos, y se observaron microscópicamente macrófagos alveolares vivos durante aproximadamente 6 horas.

50

(A) Células representativas de ratón mutante  $\Delta F508$  CFTR con bacterias ingeridas a las 3 y 8 horas después de la incubación. La localización intracelular de las bacterias se confirmó mediante la reconstrucción en 3D de las pilas Z confocales de fluorescencia bacteriana y la reflexión/retrodispersión celular.

5 (B-E) Datos resumidos de al menos 3 experimentos separados que comparan el crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo (analizado como intensidad de DS-Red media a  $\lambda = 607 \pm 20$  (F)), por célula) entre genotipos (B); en macrófagos alveolares  $\Delta F508$  CFTR en presencia y ausencia de 20  $\mu M$  de (R)-roscovitina (C); en macrófagos alveolares  $\Delta F508$  CFTR en presencia de 20  $\mu M$  del metabolito M3 (D); los datos de los macrófagos alveolares *cftr*<sup>-/-</sup> en presencia del metabolito M3 se muestran en (E). Los datos se presentan como medias de intensidades de fluorescencia  $\pm$  SEM. Las condiciones de control resumieron los datos obtenidos de: WT - 2 ratones, 38 células;  $\Delta F508$  - 6 ratones, 120 células; *cftr*<sup>-/-</sup> 4 ratones, 87 células. En presencia de (R)-roscovitina, se obtuvieron datos de: WT - 1 ratón, 7 células;  $\Delta F508$  - 5 ratones, 91 células; *cftr*<sup>-/-</sup> 1 ratón, 18 células. En presencia del metabolito M3, analizamos datos de:  $\Delta F508$  - 3 ratones, 57 células; *cftr*<sup>-/-</sup> 1 ratón, 67 células.

15 Figura 3. Ausencia de inhibición del crecimiento de cultivo de *P. aeruginosa* por metabolito M3 y derivados. Una dilución 1/100 de un cultivo nocturno de *P. Aeruginosa* se introdujo en medio de cultivo reciente, y los cultivos se incubaron a 37°C con 20  $\mu M$  de metabolito M3 o derivados, o 1  $\mu M$  de bafilomicina (control negativo). La densidad óptica (600 nm) se midió 2 h y 3,5 h después de comenzar el cultivo, y cada 30 min. durante 2,5 h.

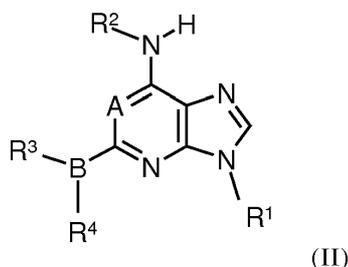
Figura 4. El metabolito M3 mejoró la fusión de lisosomas en macrófagos alveolares murinos.

20 (A) Rodamina-110, bis-(CBZ-L-Fenilalanil-L-Arginina Amida), es un sustrato no fluorescente sensible a la catepsina y selectivo que se convierte en monoamida fluorescente tras la escisión del péptido/aminoácido unido covalentemente. Añadimos Rodamina-110 a las células antes de las Bioparticles® de *E. coli* conjugadas con pHrodo-Red, proporcionando la absorción simultánea de ambas sondas en los fagosomas. La fusión de lisosomas en fagosomas nacientes trae proteasas que incluyen catepsina y desencadena la conversión de rodamina.

(B) El metabolito M3 (10  $\mu M$ ) mejoró la fusión de lisosomas en macrófagos alveolares de ratón con respecto a lo observado en las células de control después de la absorción de pHrodo-*E. coli*.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Según un primer aspecto, una materia objeto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (II):



30 en la que

A es N o CH,

B es N, O, o S,

R<sup>1</sup> es

- 35
- H,
  - un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), por ejemplo escogido entre metilo, etilo, propilo, 2-propilo (isopropilo), siendo preferentemente un 2-propilo (isopropilo),
  - un grupo metilcicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), por ejemplo escogido entre metilciclopropilo y metilciclobutilo, o
  - un grupo cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), por ejemplo un ciclopropilo,

40 R<sup>2</sup> es

- un arilo, estando dicho grupo arilo opcionalmente sustituido con un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi o un grupo arilo idéntico o diferente, o un grupo heteroarilo,

- un grupo arilmetilo, en particular bencilo, y bencilo sustituido con uno a tres grupos, tal como un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), un OH, un OMe o un grupo halógeno escogido entre F, Cl y Br, o
- un grupo metilheteroarilo, tal como metilpiridina y metiltiofeno,

R<sup>3</sup>

- 5
- está ausente cuando B es O o S, o es
  - H o un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) cuando B es N,

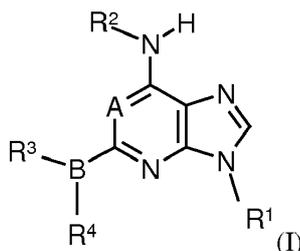
R<sup>4</sup> es un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) o un grupo cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>), portando cada grupo un grupo ácido carboxílico, y estando dicho grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) o cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>) opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, un grupo halógeno o un grupo metoxi, y

- 10
- cuando B es N, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> pueden formar juntos un heterociclo de 5 o 6 miembros sustituido con un grupo ácido carboxílico, y opcionalmente sustituido con un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi o un grupo hidroximetilo,

o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables,

- 15
- para uso en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una reducción en la destrucción bacteriana mediada por macrófagos.

Cuando en la fórmula (II) R<sup>2</sup> significa un grupo arilo sustituido con un grupo arilo o heteroarilo idéntico o diferente, construye un resto biarílico. En un aspecto, la invención se refiere al compuesto de fórmula (I):



en la que

- 20
- A es N,

R<sup>1</sup> es

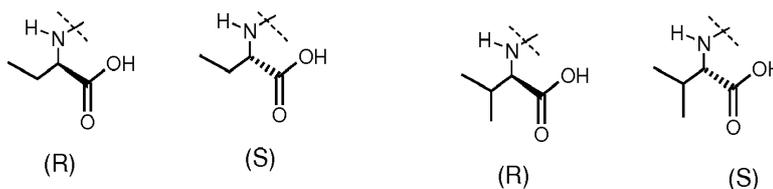
- H,
- un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), por ejemplo escogido entre metilo, etilo, propilo, isopropilo, siendo preferentemente un isopropilo,

- 25
- un grupo metilcicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), por ejemplo escogido entre metilciclopropilo y metilciclobutilo, o
  - un grupo cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), por ejemplo un ciclopropilo,

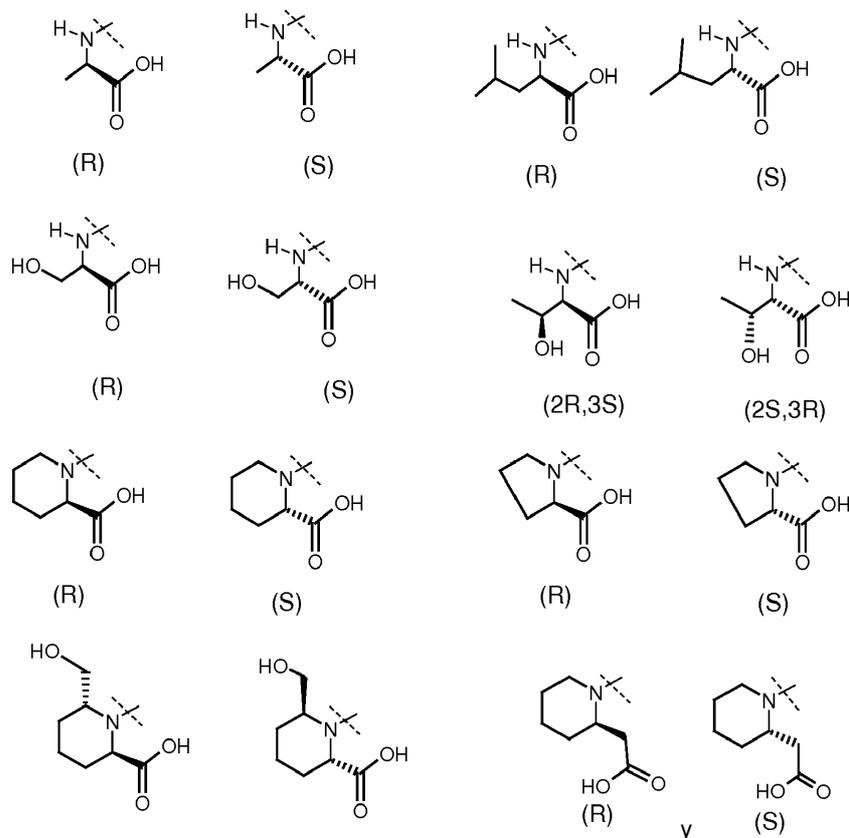
R<sup>2</sup> es

- un bencilo o un bencilo sustituido con uno a tres grupos,

y en la que B es N, y el grupo NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup> se escoge entre:



30



5 o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables,

para uso en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una reducción en la destrucción bacteriana mediada por macrófagos.

10 En el marco de la presente invención, una "enfermedad caracterizada por una reducción en la destrucción bacteriana mediada por macrófagos" abarca típicamente una enfermedad para la cual los macrófagos, particularmente los macrófagos alveolares, están deteriorados con respecto a la acidificación de los liso-fagosomas, lo que da por lo tanto como resultado una reducción de sus habilidades para matar bacterias.

En una realización particular, cuando  $R^2$  es un bencilo sustituido con uno a tres grupos, dicho grupo se selecciona de un grupo que comprende un grupo alquilo ( $C_1-C_3$ ), un OH, un OMe y un grupo halógeno escogido entre F, Cl y Br.

15 En una realización particular, dicha enfermedad caracterizada por una reducción en la destrucción bacteriana mediada por macrófagos se selecciona de un grupo que comprende asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, asma inflamatoria, neumonía y tuberculosis.

En otra realización particular, los compuestos de fórmula (I) según la presente invención se usan en el tratamiento de la fibrosis quística.

20 Según un aspecto particular, el tratamiento está destinado a pacientes que tienen fibrosis quística y que poseen cualquiera de las formas mutantes de CFTR humana.

Según un aspecto particular, el tratamiento está destinado a pacientes que tienen fibrosis quística y que poseen una mutación que es la supresión del  $\Delta F508$  en el gen que codifica CFTR, o que poseen una mutación que es una mutación diferente de la supresión de la  $\Delta F508$  en el gen que codifica CFTR. Las siguientes otras mutaciones pueden citarse como ejemplos: G542X, G551D, N1303K, W1282X, R553X, 621+1G, 1717-1G, R117H y R1162X.

25 En un aspecto particular adicional, los compuestos de fórmula (I) según la presente invención se usan para el tratamiento de enfermedades que implican infecciones microbianas pulmonares o de enfermedades inflamatorias pulmonares.

30 Según un aspecto de la presente invención, el compuesto de fórmula (I) según la presente invención puede ser útil para inhibir, prevenir y/o tratar la infección pulmonar por bacterias y otros microorganismos, lo que puede o no ser una consecuencia de fibrosis quística

Entre las bacterias en particular susceptibles de infectar a un individuo que tiene una fibrosis quística, se puede considerar una bacteria como: una bacteria del género *Staphylococcus*, tal como *S. aureus*; una bacteria del género *Haemophilus*, tal como *H. influenzae*; una bacteria del género *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*; una bacteria del género *Burkholderia*, por ejemplo *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenopacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. pyrrocinia*; una bacteria del género *Mycobacterium*, tal como *M. absessus*, *M. avium*, *M. tuberculosis*.

5

Las bacterias anaerobias también pueden considerarse dentro del alcance de la presente invención, tal como por ejemplo una bacteria del género *Prevotella*, *Veillonella*, *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, for example *S. pneumonia*, *Legionella*, por ejemplo *L. pneumophila*.

10

Se pueden considerar otras especies de bacterias dentro del alcance de la presente invención, tal como por ejemplo: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylooxidans*, *Ralstonia mannitolilytica*, *Ralstonia pickettii*, *Inquilinus limosus*, *Elizabethkingia meningoseptica*.

Según una realización particular, la enfermedad caracterizada por una reducción en la destrucción bacteriana mediada por macrófagos es una enfermedad que implica infección microbiana pulmonar, que puede seleccionarse de un grupo que comprende una infección por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Haemophilus influenza* y *Mycobacterium tuberculosis*.

15

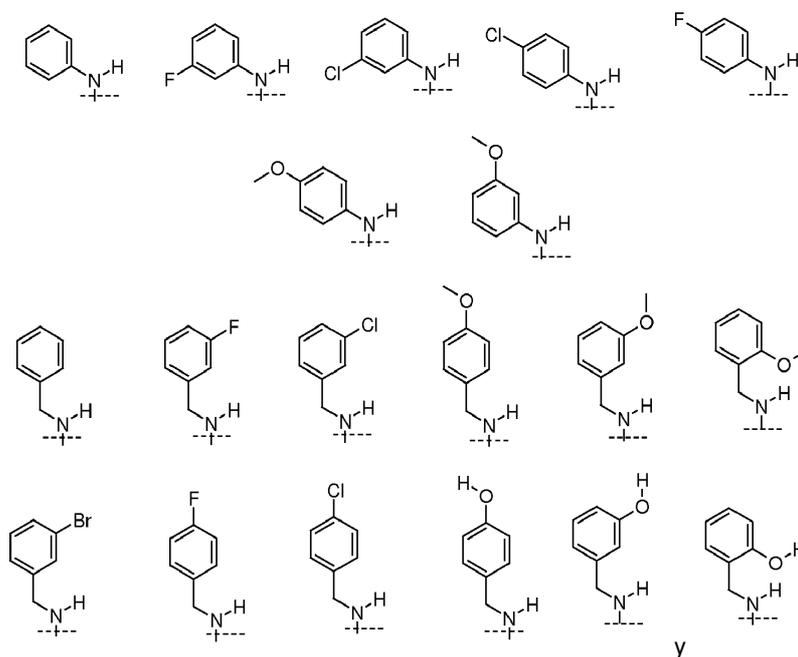
Además de las bacterias, otra categoría de microorganismos es susceptible de infectar a un individuo que tiene una fibrosis quística, a saber, hongos.

20

Entre los hongos, se pueden considerar más particularmente los hongos filamentosos, por ejemplo *Aspergillus fumigatus*, que sigue siendo con mucho el agente más común de colonización de las vías respiratorias, *Acrophialophora fusispora*, *Aspergillus terreus*, *Exophiala dermatitidis*, *Penicillium emersonii*, *Scedosporium apiospermum* y *Scedosporium prolificans*.

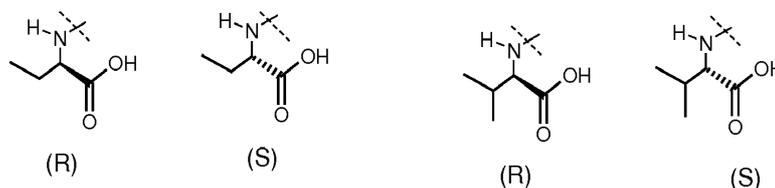
Según un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) como se definió anteriormente, en el que el grupo  $\text{NHR}^2$  se puede escoger entre uno de los siguientes grupos:

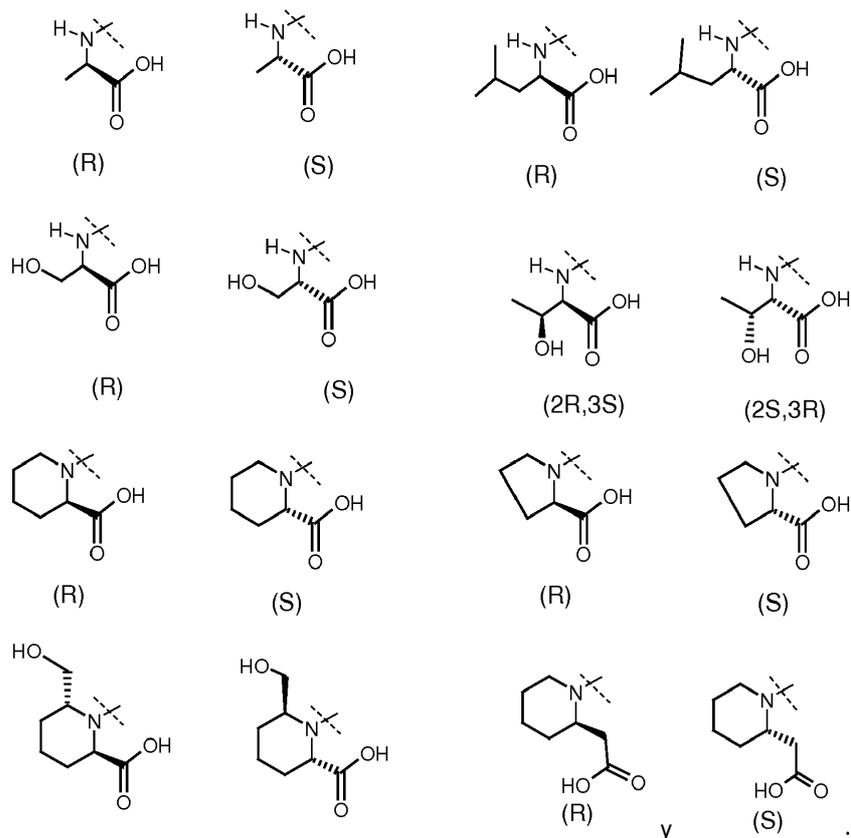
25



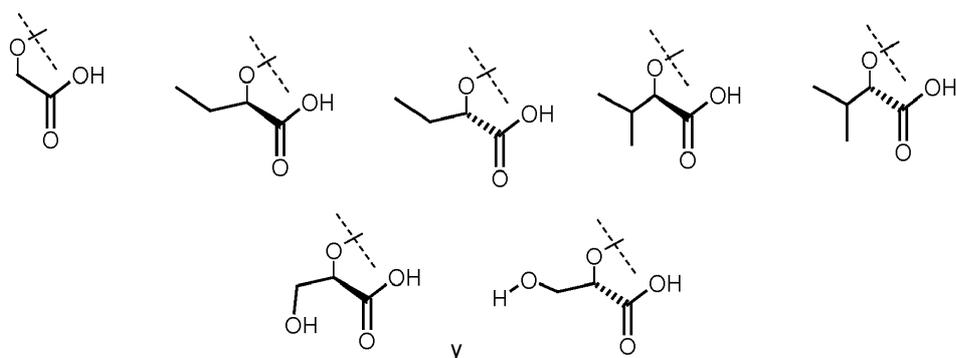
30

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) como se definió anteriormente, en el que B es N, y el grupo  $\text{NR}^3\text{R}^4$  se escoge entre:





- 5 Según otro aspecto, la presente descripción se refiere a un compuesto de fórmula (II) como se definió anteriormente, en el que B es O, y OR<sup>4</sup> se escoge entre:



- 10 Según otro aspecto, la presente descripción se refiere a un compuesto de fórmula (I) como se definió anteriormente, en el que R<sup>1</sup> representa un 2-propilo (isopropilo).

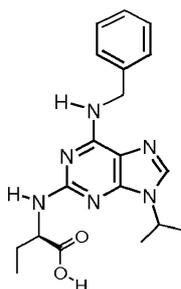
Según otro aspecto, la presente descripción se refiere a un compuesto de fórmula (I) como se definió anteriormente, en el que R<sup>2</sup> representa un grupo bencilo.

Según otro aspecto, la presente descripción se refiere a un compuesto de fórmula (I) como se definió anteriormente, en el que R<sup>3</sup> representa un átomo de hidrógeno.

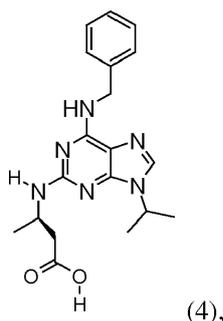
- 15 Según otro aspecto, la presente descripción se refiere a un compuesto de fórmula (I) como se definió anteriormente, en el que R<sup>4</sup> representa un grupo 1-carboxipropan-1-ilo.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) como se definió anteriormente, en el que R<sup>1</sup> representa un isopropilo, R<sup>2</sup> representa un grupo bencilo, R<sup>3</sup> representa un átomo de hidrógeno, y R<sup>4</sup> representa un grupo 1-carboxipropan-1-ilo, en forma (R) o (S), o en forma de una mezcla racémica de los mismos.

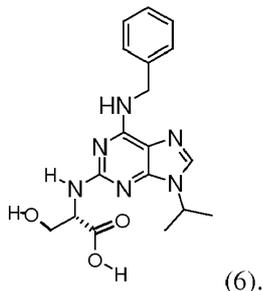
- 20 Según una realización más particular, la presente invención se centra particularmente en M3 o ácido (2R)-2-[[9-isopropil-6-(fenilmetilamino)purin-2-il]amino]butanoico:



De acuerdo con otra realización particular, la presente invención se centra particularmente en el ácido (3R)-3-[[6-(benzilamino)-9-isopropil-purin-2-yl]amino]butanoico:



5 y en ácido (2S)-2-[[6-(benzilamino)-9-isopropil-purin-2-yl]amino]-3-hidroxi-propanoico:



La presente invención se extiende además a dichos dos compuestos (4) y (6) que son nuevos, y a cualquier composición farmacéutica que los contenga.

10 Los compuestos de la invención pueden existir en forma de bases libres o de sales de adición con ácidos farmacéuticamente aceptables.

Las sales de adición de ácido fisiológicamente aceptables adecuadas de los compuestos de fórmula (I) incluyen hidrobromuro, tartrato, citrato, trifluoroacetato, ascorbato, hidrocloreuro, tartrato, triflato, maleato, mesilato, formiato, acetato y fumarato.

15 Los compuestos de fórmula (I) y/o sus sales pueden formar solvatos (por ejemplo, hidratos), y la invención incluye todos los solvatos.

En el contexto de la presente descripción, se entiende que el término:

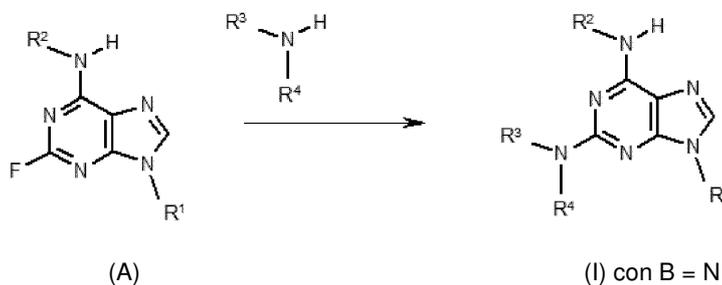
- "halógeno" significa cloro, flúor, bromo o yodo, y en particular denota cloro, flúor o bromo,
- "alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)", "alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)" y "alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)", como se usa en el presente documento, se refieren respectivamente a una cadena de hidrocarburo saturado lineal o ramificado de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Los ejemplos son, entre otros, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, *t*-butilo,
- los radicales "arilo" se escogen de fenilo, naftilo o indenilo,
- los radicales "heteroarilo" comprenden 3 a 10 miembros anulares, que comprenden opcionalmente uno o más heteroátomos escogidos de oxígeno, azufre y nitrógeno, en particular, tiazolilo, tienilo, pirrolilo, piridinilo, furilo, imidazolilo, oxazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, isoxadiazolilo, isotiadiazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, triazolilo, pirazolilo o indolilo,

- los radicales "heterociclo" comprenden 1 a 2 heteroátomos, y al menos un átomo de nitrógeno, y opcionalmente otro heteroátomo escogido de oxígeno, azufre o nitrógeno, y representan en particular piperidinilo, morfolinilo, pirrolidinilo, imidazolidinilo, pirazolidinilo, isotiazolidinilo, tiazolidinilo, isoxazolidinilo, oxazolidinilo, piperazinilo, 2-piperidona, 3-piperidona, 4-piperidona, 2-pirrolidona o 3-pirrolidona;
- 5 - "paciente" puede extenderse a animales mamíferos y no mamíferos, preferiblemente seres humanos o mamíferos no humanos, tales como gatos, perros o ganado.

Los compuestos de fórmulas (I) pueden comprender uno o más átomos de carbono asimétricos. Por lo tanto, pueden existir en forma de enantiómeros o de diastereoisómeros. Estos enantiómeros, diastereoisómeros y sus mezclas, incluidas las mezclas racémicas, están comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

- 10 Los compuestos de la presente invención pueden prepararse por métodos convencionales de síntesis orgánica practicados por los expertos en la técnica. En particular, el material de partida puede ser 6-cloro-2-fluoropurina. Un posible procedimiento se ilustra en el ejemplo 1 a continuación.

Cuando B es N, la introducción de aminoácidos en la posición 2 del armazón de purina se puede realizar de acuerdo con el siguiente esquema:



- 15
- La sustitución del halógeno en el compuesto de fórmula (A), en el que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son como se definieron anteriormente, se puede llevar a cabo haciéndolo reaccionar con un compuesto de fórmula R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>NH, en el que R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son como se definieron anteriormente, al calentar, por ejemplo 120 a 160°C, usando una base en una cantidad limitada, por ejemplo trifosfato de potasio, en un disolvente, por ejemplo DMSO. Dicha etapa del procedimiento es simple, y permite la introducción de una variedad de aminoácidos. Otra ventaja importante de dicha etapa del procedimiento radica en el tratamiento que es simple ya que los compuestos se pueden separar por cristalización o cromatografía en columna sobre gel de sílice usando una mezcla de disolvente (por ejemplo: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-EtOAc-THF) como eluyentes y, por lo tanto se puede evitar el uso de HPLC.

- 25 Según una realización adicional, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) según la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una reducción en la muerte bacteriana mediada por macrófagos, en particular una enfermedad seleccionada de un grupo que comprende asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, asma inflamatoria, neumonía y tuberculosis, o una enfermedad que
- 30 implica infección microbiana pulmonar, que puede seleccionarse de un grupo que comprende una infección por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Haemophilus influenza* y *Mycobacterium tuberculosis*.

La composición farmacéutica según la presente invención puede ser adecuada para administración oral, sistémica, parenteral, intrapulmonar, intrabronquial o intraalveolar.

- 35 Un compuesto de fórmula (I) según la invención puede formularse con excipientes y componentes que se usan comúnmente para composiciones orales, como por ejemplo, componentes grasos y/o acuosos, humectantes, espesantes, agentes conservantes, agentes de textura, agentes de sabor y/o agentes de recubrimiento, antioxidantes, conservantes.

- 40 Los agentes de formulación y los excipientes para una composición oral son conocidos en este campo, y no serán objeto de una descripción detallada en este documento.

Muchas composiciones orales se formulan mediante procedimientos habituales para producir comprimidos recubiertos, cápsulas de gel, geles, hidrogeles de liberación controlada, emulsiones, comprimidos y cápsulas.

- 45 En otro aspecto, un compuesto de fórmula (I) puede formularse en una composición farmacéutica adecuada para una administración sistémica o parenteral, y en particular para una administración por inyección. La administración parenteral comprende la administración subcutánea, intramuscular e intravenosa. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en formas de dosificación de una sola unidad, como ampollas o en envases multidosis. Las composiciones pueden formularse como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes adicionales, tales como conservantes, agentes emulsionantes y/o estabilizantes.

Alternativamente, un compuesto de fórmula (I) puede formularse como un polvo dispersable, que puede prepararse como una composición líquida, con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril, justo antes de su uso.

Un compuesto de fórmula (I) también puede formularse como una composición rectal, como por ejemplo un supositorio, que contiene bases de supositorio convencionales, como manteca de cacao u otros glicéridos.

- 5 En otro aspecto, un compuesto de fórmula (I) puede formularse como un aerosol para administración intrapulmonar, intrabronquial o intraalveolar.

Como ejemplo de dispositivos adecuados para implementar la presente invención, se pueden citar inhaladores de dosis medida a presión (pMDIs), inhaladores de polvo seco (DPIs) y nebulizadores, tales como nebulizador de chorro impulsado por presión o un nebulizador ultrasónico.

- 10 Cualquier tipo de formulaciones adaptadas para tal administración de aerosol es un conocimiento común para un experto en la técnica.

Un compuesto de fórmula (I) puede formularse como una disolución líquida, una suspensión líquida o un polvo.

- 15 En cuanto a la disolución o suspensión líquida, un vehículo puede ser típicamente estéril libre de pirógenos o una disolución alcohólica acuosa diluida. La disolución o suspensión líquida son preferiblemente isotónicas, por lo tanto pueden comprender cloruro de sodio. Los aditivos opcionales incluyen uno o más conservantes, como por ejemplo hidroxibenzoato de metilo, uno o más antioxidantes, uno o más agentes aromatizantes, uno o más aceites volátiles, uno o más agentes amortiguadores, y uno o más tensioactivos.

En cuanto a una formulación en polvo, se pueden añadir ingredientes comúnmente utilizados, tales como un diluyente en polvo, por ejemplo lactosa en polvo, y tensioactivo o tensioactivos.

- 20 Los inhaladores de dosis medida son dispensadores de aerosol presurizados, que típicamente comprenden una disolución o una suspensión del ingrediente activo, a saber, un compuesto de fórmula (I), y un propelente licuado. Los propelentes adecuados incluyen propelentes usados comúnmente en la técnica, tales como por ejemplo compuestos de clorofluorocarbono, en particular, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, y mezclas de los mismos.

- 25 Las formulaciones adecuadas también pueden comprender uno o más codisolventes, como por ejemplo etanol, uno o más tensioactivos, como ácido oleico y trioleato de sorbitán, uno o más antioxidantes, y uno o más agentes saborizantes adecuados.

- 30 Un régimen de dosificación adecuado para la administración de un compuesto de fórmula (I) cae dentro de las habilidades técnicas de un artesano en la técnica, y depende de múltiples parámetros. De hecho, un régimen de dosificación adecuado depende del género, la edad, el peso, y el progreso de la enfermedad. Dentro del alcance de la presente invención, un régimen de dosificación adecuado puede abarcar aproximadamente 1 a 500 mg del compuesto activo.

- 35 Por ejemplo, para una administración oral, un fármaco puede comprender aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg de compuesto activo, por ejemplo aproximadamente 20 a aproximadamente 250 mg de compuesto activo, por ejemplo aproximadamente 50 a 150 mg de compuesto activo.

Por ejemplo, para un modo de administración en aerosol, el compuesto activo puede administrarse de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg por inhalación.

En otro aspecto, la composición farmacéutica según la presente descripción puede administrarse antes, durante o después de otra composición farmacéutica que comprende un agente adicional.

- 40 En una realización adicional, la composición farmacéutica según la presente invención puede comprender un agente adicional seleccionado de un agente mucolítico, broncodilatador, un antibiótico, un bacteriófago, un agente antiinflamatorio o un agente antiinfeccioso.

Dicho agente adicional puede ser en particular un antibiótico adecuado para aliviar o aminorar la infección microbiana.

- 45 Tal antibiótico puede seleccionarse de un grupo que comprende amikacina, amoxicilina, azitromicina, aztreonam, cefalotina, ceftazidima, ciprofloxacina, claritromicina, colimicina, colistina, fosfomicina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem, netilmicina, piperacilina, rifampicina, sulbactam, tazobactam, ticarcilina, tobramicina, un derivado de los mismos y una mezcla de los mismos.

- 50 En otra realización, el agente adicional puede ser un agente mucolítico, un broncodilatador, un bacteriófago, un agente antiinflamatorio o un agente antiinfeccioso.

Se puede seleccionar un agente mucolítico entre acetilcisteína, ambroxol, bromhexina, carbocisteína, domiodol, dornasa alfa, eprazinona, erdosteína, letosteína, manitol, neltexina, sobrerol, estepronina, tiopronina.

Se puede seleccionar un broncodilatador entre albuterol, sulfato de metaprotenerol, sulfato de pirbuterol, salmeterol y sulfato de tetrabulina.

5 Un bacteriófago es adecuado para aliviar o aminorar la infección microbiana.

El bacteriófago adecuado puede ser un miovirus, por ejemplo,  $\phi$ NH-4 y un podovirus, por ejemplo,  $\phi$ MR299-2, según lo descrito por Alemayehu *et al.* (2012).

También se puede encontrar otro bacteriófago adecuado dentro del alcance de esta invención, por ejemplo en Cooper *et al.* (2013); Soothill (2013); Henry *et al.* (2013).

10 Un agente antiinflamatorio puede ser adecuado para aliviar o aminorar la inflamación del tejido que puede aparecer durante la infección microbiana. Dicho agente antiinflamatorio puede seleccionarse de un grupo que comprende un compuesto esteroide y un compuesto no esteroideo.

Entre los compuestos esteroides, se puede usar cortisol, betametasona, dexametasona, prednisona o prednisolona.

Entre los compuestos no esteroideos, se puede usar ibuprofeno, sildenafilo.

15 En un aspecto, la descripción proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una reducción en la muerte bacteriana mediada por macrófagos, que comprende la administración a un paciente que lo necesite de un compuesto de fórmula (I) según la presente invención, y en particular del compuesto M3.

20 En un aspecto, la enfermedad caracterizada por una reducción en la destrucción bacteriana mediada por macrófagos se selecciona de un grupo que comprende asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, asma inflamatoria, neumonía y tuberculosis.

Aún, en un aspecto más particular, la enfermedad caracterizada por una reducción en la muerte bacteriana mediada por macrófagos es la fibrosis quística.

En otro aspecto, el individuo se selecciona de un grupo que comprende un mamífero y un animal no mamífero, preferiblemente un animal mamífero, más preferiblemente un ser humano.

25 En ciertos aspectos, el paciente posee formas mutantes de CFTR humana.

En un aspecto particular, el paciente posee una forma mutante de CFTR humana que es la mutación  $\Delta$ 508F, o que es diferente de la mutación  $\Delta$ 508F.

30 Dentro del alcance de la presente descripción, los compuestos de fórmula (I) que se describen en el presente documento son susceptibles de usarse para diagnosticar enfermedades distintas de la fibrosis quística, siempre que estas enfermedades tengan una acidificación deteriorada de los lisofagosomas en los macrófagos.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente descripción se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad caracterizada por una reducción en la muerte bacteriana mediada por macrófagos en un individuo, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 35
- a) proporcionar macrófagos aislados de dicho individuo;
  - b) incubar dichos macrófagos con un microorganismo capaz de provocar una enfermedad pulmonar;
  - c) evaluar las capacidades de dichos macrófagos para matar dicho microorganismo.

Dicho método también puede denominarse método para determinar la función de destrucción bacteriana del fagosoma o la acidificación del fagosoma.

En un aspecto particular, los macrófagos pueden ser macrófagos alveolares.

40 En un aspecto todavía particular, los macrófagos alveolares pueden recogerse mediante lavado broncoalveolar o una biopsia del epitelio pulmonar.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para identificar a un paciente con una mayor probabilidad de responder a un compuesto de fórmula (I), en el que el paciente ha sido diagnosticado o tiene riesgo de desarrollar una infección pulmonar, comprendiendo dicho método:

- 45
- a) proporcionar macrófagos aislados de dicho individuo;
  - b) incubar dichos macrófagos con un microorganismo capaz de provocar una enfermedad pulmonar;

- c) proporcionar a dichos macrófagos una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I);  
 d) evaluar las capacidades de dichos macrófagos para matar dicho microorganismo.

Métodos para medir el pH intra-fago-lisosómico

5 Algunos compuestos colorantes específicos pueden servir como sensores específicos de fagocitosis e indicar además si el compartimento fago-lisosómico es funcional, es decir, tiene un valor de pH adecuado de aproximadamente 5,2.

Por ejemplo, el compuesto colorante puede ser casi no fluorescente a pH neutro, y puede fluorescer en un ambiente ácido, presentando por lo tanto pKa bajo.

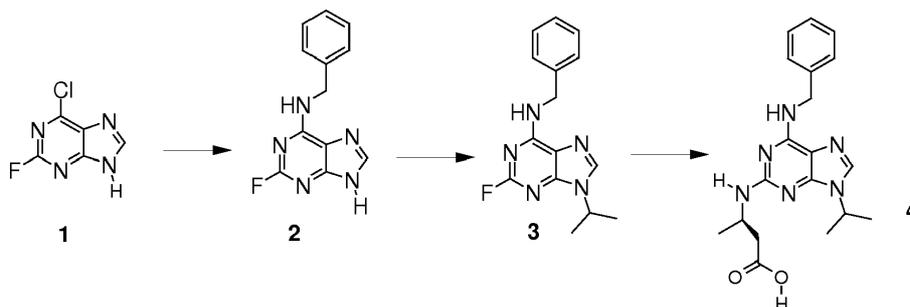
10 Los ejemplos de compuestos colorantes útiles a usar en la presente invención pueden ser aquellos disponibles comercialmente bajo el nombre pHrodo® Red, pHrodo® Green de Life technologies; LysoSensor® Yellow/Blue, LysoSensor® Blue, LysoSensor® Green, Oregon Green de Molecular Probes.

Estos compuestos colorantes pueden además conjugarse con bacterias, por ejemplo pHrodo Red *E. coli* BioParticles®, o una molécula grande, tal como zimosano y dextrano 10.000.

15 La fluorescencia relacionada puede evaluarse mediante citometría de flujo, microscopía, espectroscopía, o cualquier método adecuado conocido por un experto en la técnica.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Síntesis del ácido 3-[[6-(bencilamino)-9-isopropil-purin-2-il]amino]butanoico



20 Se prepararon 6-bencilamino-2-fluoropurina (2) y N-bencil-2-fluoro-9-isopropil-purin-6-amina (3) a partir de 6-cloro-2-fluoropurina utilizando un procedimiento partiendo de 2,6-dicloropurina (Oumata et al. 2009).

6-Bencilamino-2-fluoropurina (2).

P.f. 250°C. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm) 4.63 (brd, 2H, CH<sub>2</sub>); 7.31(m, 6H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> y 8-H).

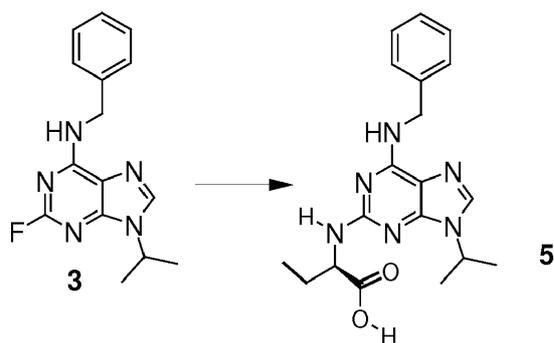
N-bencil-2-fluoro-9-isopropil-purin-6-amina (3).

25 P.f. 153°C. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) 1,59(d, 6H, J = 6,5 Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4,75(hept, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4,83(brs, 2H, CH<sub>2</sub>); 6,61(Brs, 1H, NH); 7,31(m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7,67(s, 1H, H-8).

Ácido (3R)-3-[[6-(bencilamino)-9-isopropil-purin-2-il]amino]butanoico (4)

30 Una mezcla de N-bencil-2-fluoro-9-isopropil-purin-6-amina (0,5 g, 1,7 mmoles) y ácido 3-aminobutanoico (1,26 g, 12,26 mmoles), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,743 g, 3,50 mmoles) en 1 ml de DMSO se calentó a 160°C durante 5 h. Después de enfriar a 20°C, la mezcla se diluyó con 5 ml de ácido cítrico (10% en agua, m:v). La mezcla se extrajo con EtOAc, y las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaCl saturado y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de la evaporación del disolvente a vacío, el producto bruto se purificó por cristalización en acetato de etilo para proporcionar 0,45 g de 4. El compuesto 4 también podría purificarse sobre gel de sílice usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-EtOAc-THF (6:2:1); RMN <sup>1</sup>H (DMSO-<sub>d6</sub>, 400MHz): 1,13(d, 3H, J= Hz, CH<sub>3</sub>CH); 1,46(d, 6H, J= Hz, iPr); 2,40(m, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 4,26(p, 1H, CHCH<sub>3</sub>); 4,51(hept, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)); 4,62(brs, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 6,14(d, 1H, NH); 7,21, 7,27, 7,29(t, t y d, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7,79(s, 1H, 8-H).

35 **Ejemplo 2: Síntesis del ácido (2R)-2-[[6-(bencilamino)-9-isopropil-purin-2-il]amino]butanoico. 5 = Compuesto M3.**

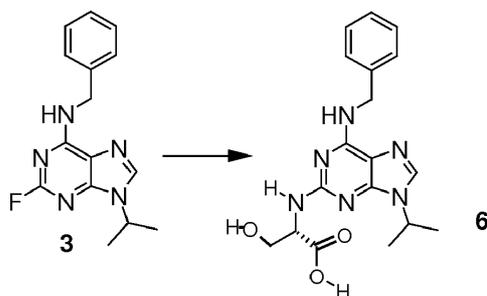


En las mismas condiciones, la fluoropurina 3 podría reaccionar con ácido (R)-2-aminobutanoico para proporcionar el producto 5.

5 RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400MHz): 0,99(t, 3H, *J*= 6,5 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 1,51(d, 6H, *J*= 6,5 Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,78(m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 4,24(m, 1H, CHN); 4,59 (hept, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)); 4,71(brs, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 6,43(brs, 1H, NH); 7,32, 7,34 y 7,36(t, t y d, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 7,86 (s, 1H, 8-H), 12,4(brs, 1H, COOH),

### Ejemplo 3: Síntesis de ácido (2S)-2-[[6-(bencilamino)-9-isopropil-purin-2-il]amino]-3-hidroxi-propanoico (6)

En las mismas condiciones, el compuesto 6 haciendo reaccionar 3 con L-serina para proporcionar el compuesto 6.



10 P.f. 120-130°C, RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 1,47(d, 1H, *J*=6,5 Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3,83(m, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 4,38(m, 1H, CH-N); 4,51(hept, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4,62(brs, 2H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) 7,21, 7,28, 7,36(t, t y d, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7,82(s, 1H, 8-H); 12,35(brs, 1H, COOH), RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 174,1(COOH),

### Ejemplo 4: El metabolito M3 y derivados relacionados potencian la acidificación fagosómica en macrófagos alveolares humanos.

#### 15 1) Material y métodos

El lavado broncoalveolar de seres humanos se realizó en adultos con consentimiento siguiendo un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Chicago. Los pacientes incluyeron hombres y mujeres, fumadores y no fumadores, sometidos a broncoscopia para biopsias de cáncer antes del tratamiento clínico. Los procedimientos utilizados para la recolección, aislamiento y cultivo de macrófagos alveolares humanos se han descrito previamente (Nelson et al., 1985).

En resumen, el fluido de lavado broncoalveolar se filtró a través de un filtro celular estéril de 70 μm en un tubo de centrífuga de tubo cónico de 50 ml con un volumen máximo de lavado broncoalveolar de 40 ml y un volumen mínimo de 10 ml, seguido de centrifugación a 1000 x g durante 5 min. a 4°C. El sobrenadante de lavado broncoalveolar se desechó entonces, y el pelete celular se resuspendió en 0,1-0,3 ml de medio completo frío: DMEM, FBS al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%. Las células se contaron en Countess® (Invitrogen) con un corte de distribución de 20-60 μm, y la viabilidad celular se determinó por exclusión con azul tripan.

En general, el número total de macrófagos por lavado broncoalveolar estaba entre 10<sup>4</sup> y 2x10<sup>5</sup>. Las células se sembraron en placas de fondo de vidrio MatTek® para videomicroscopía de células vivas como se indicó anteriormente, o en placas de 96 o 384 pocillos múltiples, según el rendimiento y la necesidad experimental. Se sembraron placas de múltiples pocillos a una densidad de 5-10x10<sup>3</sup> células por pocillo dependiendo del rendimiento. Las células de los pacientes no se agruparon, y se mantuvieron en cultivos individuales. Las células se incubaron sin perturbar durante al menos 3 horas para permitir la unión de macrófagos. Después de 3 h, se aspiró el medio de cada pocillo o placa, y las células se lavaron suavemente dos veces con medio completo reciente y calentado para eliminar todas las células no adherentes. Las células adherentes fueron ≥ 98% viables y CD68 positivas.

Después de 24 h de incubación, las células se expusieron a pHrodo Red BioParticles® (Life Technologies). La acidificación se midió en formato de placa de 96 pocillos con longitudes de onda de excitación y emisión de 560 y 580 nm a 37°C en un lector de placas Synergy MX, BioTek®. Para sincronizar la fagocitosis, la placa se centrifugó (300 x g) durante 3 minutos después de la adición de pHrodo Red BioParticle®.

5 2) Resultados

La acidificación fagosómica es un requisito previo para la destrucción bacteriana eficiente (Hackam et al., 1997), por lo tanto, se evaluaron varios compuestos para una acidificación fagosómica mejorada tras la internalización de biopartículas conjugadas con el colorante sensible al pH pHrodo Red BioParticle® como se muestra en la Fig. 1. Los macrófagos alveolares humanos se aislaron del lavado broncoalveolar, se colocaron en placas de múltiples pocillos y se alimentaron con *E. coli* liofilizada conjugada con pHrodo Red BioParticle® (Fig. 1A). La cinética de la acidificación fagosómica se leyó en un lector de placas durante un período de 3 h.

La (R)-roscovitina, el metabolito M3 y las purinas relacionadas se identifican como compuestos que mejoran significativamente la acidificación (Fig. 1 B-C) con respecto al pH fagosómico observado en células no tratadas. Los controles negativos en la pantalla incluyeron el inhibidor de la V-ATPasa, bafilomicina (Baf), y el potente inhibidor de la fosfolipasa C, edelfosina (ET-18-OCH<sub>3</sub>). Se ha demostrado previamente que la edelfosina también previene la absorción fagocítica a nivel del ensamblaje de actina.

Aunque la (R)-roscovitina es un potente inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina, sorprendentemente el metabolito M3 no comparte esta característica (véase la Tabla 1 a continuación).

Tabla 1. Valor de IC<sub>50</sub> de (R)-roscovitina y metabolito M3 con respecto a la inhibición de diversas cinasas.

Cinasas	(R)-roscovitina	Metabolito M3
CDK1/ciclina B	0,42	11
CDK2/ciclina A	0,14	23
CDK5/p25	0,22	41
CDK9/ciclina T	0,59	>10
CK1δ/ε	1,7	21
LmCK1	5,1	>100
CK2	>100	>100
CLK1	1,3	18
CLK2	0,69	14
CLK3	17	52
CLK4	0,69	19
DYRK1A	2,2	19
DYRK1B	2,1	22
DYRK2	2,3	23
DYRK3	59	>100
GSK-3α/β	51	>100
PfGSK-3	11	>100
Pim1	>100	>100

20

Estos resultados sugieren que la ruta de inhibición de la cinasa no está involucrada en el mecanismo que conduce a la acidificación de los lisofagosomas de macrófagos.

**Ejemplo 5: Inhibición del crecimiento bacteriano en macrófagos alveolares *cftr*<sup>-/-</sup> y ΔF508 por el metabolito M3.**

1) Material y métodos

Ratones deficientes en CFTR, o ratones mutantes *cftr*<sup>-/-</sup> (STOCK *Cftr* <tm1Unc>/TgN (FABPCFTR) # Jaw/Cwr y ΔF508 (C57BL/6 *Cftr* <tm1Kth>/TgN(FABPCFTR) #J aw/Cwr homocigotos para parejas reproductoras ΔF508 (van Heeckeren et al., 2004) se adquirieron originalmente de Case Western Reserve University's Cystic Fibrosis Animal Core. Estos ratones expresan la proteína hCFTR en el intestino bajo la influencia del promotor FABP de rata, y se denominan "de intestino corregido". Los ratones deficientes en CFTR (*cftr*<sup>-/-</sup>) se criaron como homocigotos, los ratones mutantes ΔF508 se criaron como heterocigotos. Todos los animales fueron alojados en una instalación específica de nivel 2 de riesgo biológico libre de patógenos mantenida por The University of Chicago Animal Resources Center (Chicago, IL). El genotipado animal se llevó a cabo por Transnetyx, Inc., (Cordova, TN).

2) Resultados

Hemos demostrado previamente que los macrófagos alveolares de los ratones *cftr*<sup>-/-</sup> y ΔF508 CFTR son defectuosos en la destrucción bacteriana (Deriy et al., 2009; Di et al., 2006). Dado el estrecho acoplamiento entre la acidificación fago-lisosómica y la destrucción bacteriana, examinamos si el metabolito M3 y sus derivados podrían restaurar la destrucción bacteriana en los macrófagos alveolares de ratones que expresan *cftr*<sup>-/-</sup> y ΔF508 CFTR.

Los macrófagos alveolares cultivados se expusieron a (R)-roscovitina, al metabolito M3 y a derivados del mismo (20 μM) durante 30 minutos antes de exponer las células a *Pseudomonas aeruginosa* que expresa DS-red. Se permitió que las células ingirieran bacterias en presencia continua del compuesto derivado de purina a analizar, y se observaron en videomicroscopía de células vivas durante un período de 6 h para un aumento en la fluorescencia indicativa de crecimiento bacteriano en el fagosoma o en el citoplasma después de la liberación del fagosoma (Fig. 2A).

El crecimiento bacteriano intracelular, medido como un aumento en la intensidad fluorescente en función del genotipo, se ve en la Fig. 2B. Como se esperaba, las células que expresan ΔF508 CFTR y las células *cftr*<sup>-/-</sup> mostraron crecimiento bacteriano, por lo tanto se confirma que son defectuosas en la destrucción bacteriana.

Por el contrario, las células *cftr*<sup>+/+</sup> de tipo salvaje no presentan aumento de fluorescencia, lo que sugiere una ausencia de crecimiento bacteriano. Los datos en la Fig. 2C demuestran que la (R)-roscovitina rescata significativamente la muerte bacteriana en las células que expresan ΔF508 CFTR, así como en las células *cftr*<sup>-/-</sup> (Fig. 2E) a niveles similares a los vistos en *cftr*<sup>+/+</sup>.

Sorprendentemente, los datos en la Fig. 2D y E que usan un metabolito M3 inactivo para cinasa mostraron que el rescate de la destrucción bacteriana es al menos tan eficiente como con (R)-roscovitina.

**Ejemplo 6: El metabolito M3 recupera la actividad microbicida fagolisosómica y no actúa como un compuesto antimicrobiano.**

Para evaluar si el efecto destructor del metabolito M3 hacia las células bacterianas es un efecto indirecto o directo, se probó la actividad bactericida del metabolito M3 y sus derivados en células bacterianas.

1) Métodos

*Pseudomonas aeruginosa* DsRed de una sola colonia se cultivó en TSB que contiene gentamicina durante la noche a 37°C con agitación a 300 RPM. Al día siguiente, se inició el nuevo cultivo a dilución 1/100, y se añadieron ciertos compuestos de bloqueador a los tubos. Medimos la densidad óptica (660 nm) de cultivo bacteriano cada 30 minutos.

2) Resultados

Tanto el metabolito M3 como sus derivados no pudieron prevenir el crecimiento bacteriano cuando se añadieron a las siguientes concentraciones: 20 μM de (R)-roscovitina, metabolito M3 o bafilomicina 1 μM (Fig. 3).

**Ejemplo 7: 4) El metabolito M3 mejoró la fusión de lisosomas en macrófagos alveolares murinos.**

1) Métodos

Los macrófagos alveolares de ratón aislados (de ratones *cftr*<sup>-/-</sup> o Δ508F CFTR) se cultivaron adheridos a los platos de fondo de vidrio recubiertos con poli-L-lisina durante 24-48 h. Luego fueron tratados con 10 μM de Rhodamine-110 durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con la siguiente incubación con 0,1 mg/ml de *E. coli* Bioparticles® conjugadas con pHrodo-Red durante 1 hora a 37°C. Rhodamine-110, bis-(CBZ-L-fenilalanil-L-arginina amida), es un sustrato no fluorescente sensible a la cathepsina y selectivo que se convierte en monoamida fluorescente tras la escisión del péptido/aminoácido unido covalentemente. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con 4% de PFA. Las imágenes se adquirieron inmediatamente después de la fijación en un microscopio confocal de láser de 2 fotones Leica SP5 con un objetivo de aceite 63X (NA1.4).

Los macrófagos de ratón aislados se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 3-6.000 células (20-60 µm de diámetro) por pocillo, se incubaron en DMEM completo (10% de FBS, 1% de penicilina-estreptomina) a 37°C a una presión de CO<sub>2</sub> de 5% durante 24-48 h. Las células se cargaron con 5 µM de Rhodamine-110 durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, se alimentaron con *E. coli* Bioparticles® conjugadas con pHrodo-Red durante 1 h a 37°C. La señal de Rhodamine-110 se leyó en un lector de placas Synergy MX, Biotek, con excitación de 498 nm y emisión de longitudes de onda de 521 nm.

2) Resultados

La Fig. 4A muestra que en presencia de R-roscovitina, la fluorescencia resultante del procesamiento de Rhodamine-110 por proteasas lisosómicas aumenta en comparación con el ensayo de control realizado en ausencia de R-roscovitina. Al mismo tiempo, la fluorescencia de la fagocitosis de *E. coli* Bioparticles® conjugadas con pHrodo-Red en los macrófagos alveolares disminuye en presencia de R-roscovitina, lo que sugiere que la fagocitosis de las células bacterianas fue seguida por la destrucción bacteriana.

La Fig. 4B muestra que el metabolito M3 permite el procesamiento de Rhodamine-110 por las proteasas lisosómicas de una manera incrementada en comparación con la condición en la que el metabolito M3 está ausente.

Estos resultados indican que la (R)-roscovitina y el metabolito M3 permiten una mayor actividad lisosómica.

Referencias

Referencias de patentes

WO 97/20842

WO 2004/016612

WO 2006/042949

Referencias no de patentes

Alemayehu et al. Bacteriophages φMR299-2 and φNH-4 Can Eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the Murine Lung and on Cystic Fibrosis Lung Airway Cells. *mBio* 3:2 Marzo/Abril 2012; doi:10.1128.

Cooper et al. Stability and purity of a bacteriophage cocktail preparation for nebulizer delivery. *Lett Appl Microbiol.* 2013 Sep 25. doi: 10.1111/lam.12161.

Deriy et al. Disease-causing Mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Determine the Functional Responses of Alveolar Macrophages, *Journal of Biological Chemistry*, 284, 51, 35926-35938, 2009.

Di et al. CFTR regulates phagosomes acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat. Cell Biol.* 2006; 8, 933-9442006.

Hackam et al. Regulation of phagosomal acidification. Differential targeting of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases, and vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPases. *The Journal of biological chemistry* 1997; 272, 29810-29820.

Henry et al. Predicting in vivo efficacy to guide the choice of therapeutic bacteriophages to treat pulmonary infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Sep 16.

Nelson et al. Immunoglobulin G-induced single ionic channels in human alveolar macrophage membranes. *Journal of Clinical Investigation* 1985; 76, 500-507.

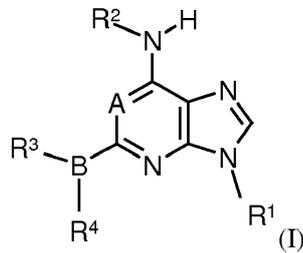
Oumata et al. Practical synthesis of roscovitine and CR8. *Organic Process Res. And Dev.* 2009, 13:641-644.

Soothill. Use of bacteriophages in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013 Sep;11(9):909-15.

Van Heeckeren et al. Role of Cfr genotype in the response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287, L944-952.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



en la que

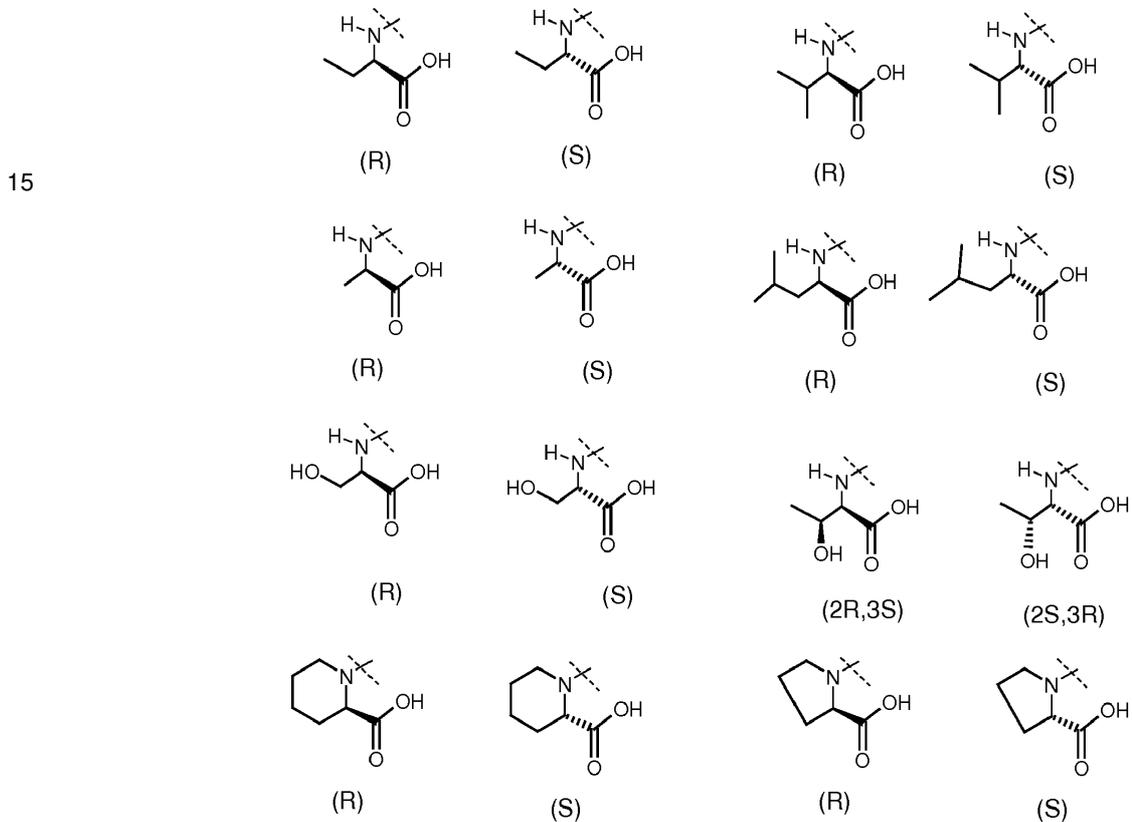
5        A es N,  
           R<sup>1</sup> es

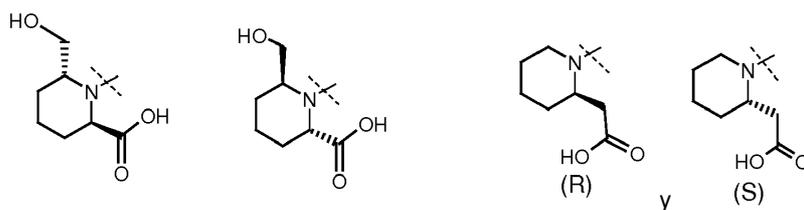
- H,
- un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), por ejemplo escogido entre metilo, etilo, propilo, isopropilo, siendo preferentemente un isopropilo,
- 10       - un grupo metilcicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), por ejemplo escogido entre metilciclopropilo y metilciclobutilo, o
- un grupo cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), por ejemplo un ciclopropilo,

R<sup>2</sup> es

- un bencilo o un bencilo sustituido con uno a tres grupos,

y en la que B es N, y el grupo NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup> se escoge entre:





o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables,

para uso en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una reducción en la destrucción bacteriana mediada por macrófagos.

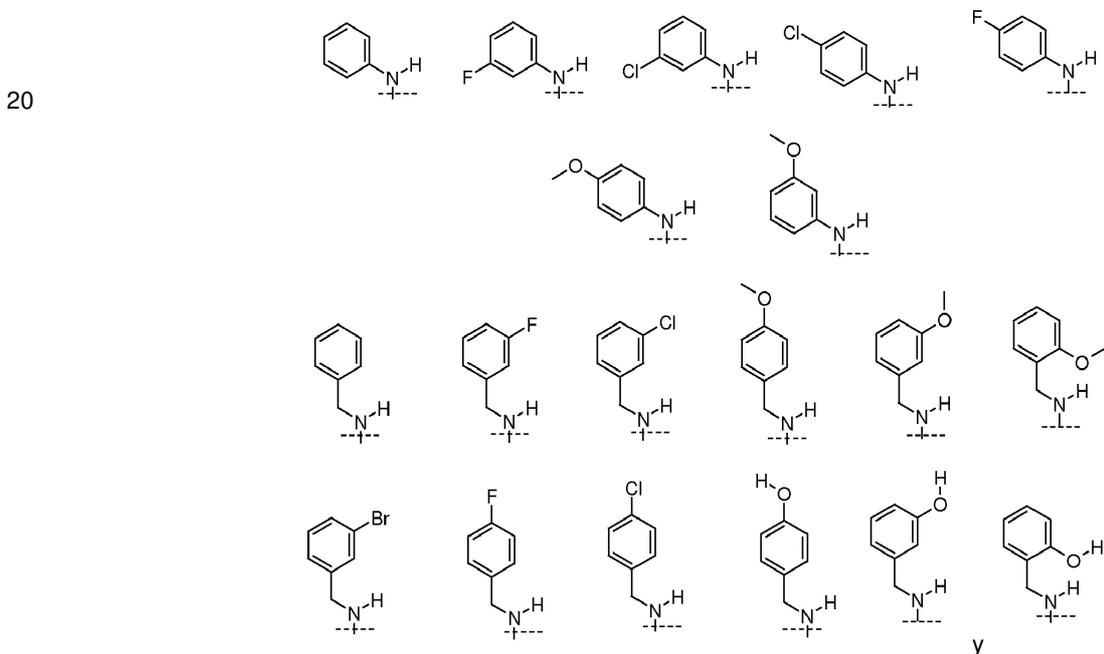
5 2. Compuesto de fórmula (I) para uso según la reivindicación 1, en el que cuando R<sup>2</sup> es un bencilo sustituido con uno a tres grupos, dicho grupo se selecciona de un grupo que comprende un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), un OH, un OMe y un grupo halógeno escogido entre F, Cl y Br.

10 3. Compuesto de fórmula (I) para uso según la reivindicación 1 o 2, en el que la enfermedad caracterizada por una reducción en la destrucción bacteriana mediada por macrófagos se selecciona de un grupo que comprende asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, asma inflamatoria, neumonía y tuberculosis.

15 4. Compuesto de fórmula (I) para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad caracterizada por una reducción en la destrucción bacteriana mediada por macrófagos es una enfermedad que implica infección microbiana pulmonar, que puede seleccionarse de un grupo que comprende una infección por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Haemophilus influenza* y *Mycobacterium tuberculosis*.

5. Compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de fibrosis quística.

6. Compuesto de fórmula (I) para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el grupo NHR<sup>2</sup> se escoge entre uno de los siguientes grupos:



25 7. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R<sup>1</sup> representa un isopropilo, R<sup>2</sup> representa un grupo bencilo, R<sup>3</sup> representa un átomo de hidrógeno, y R<sup>4</sup> representa un grupo 1-carboxipropan-1-ilo, en forma (R) o (S), o en forma de una mezcla racémica de los mismos.

8. Compuesto para uso según la reivindicación anterior, en el que es el metabolito M3 o ácido (2R)-2-[[9-isopropil-6-(fenilmetilamino)purin-2-il]amino]butanoico.

30 9. Un compuesto escogido entre ácido (3R)-3-[[6-(bencilamino)-9-isopropil-purin-2-il]amino]butanoico (4) y ácido (2S)-2-[[6-(bencilamino)-9-isopropil-purin-2-il]amino]-3-hidroxi-propanoico (6).

- 5 10. Compuesto de fórmula (I) para uso según la reivindicación 1 o 2, en el que la enfermedad caracterizada por una reducción en la destrucción bacteriana mediada por macrófagos es una infección pulmonar por bacterias y otros microorganismos, que es una consecuencia de fibrosis quística, bacterias la cual se puede seleccionar de un grupo que comprende una bacteria del género *Staphylococcus*, tal como *S. aureus*; una bacteria del género *Haemophilus*, tal como *H. influenzae*; una bacteria del género *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*; una bacteria del género *Burkholderia*, por ejemplo *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenopacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. pyrrocinia*; una bacteria del género *Mycobacterium*, tal como *M. absessus*, *M. avium*, *M. tuberculosis*.
- 10 11. Composición farmacéutica que comprende un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una reducción en la destrucción bacteriana mediada por macrófagos, en particular una enfermedad seleccionada de un grupo que comprende asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, asma inflamatoria, neumonía y tuberculosis, o una enfermedad que implica infección microbiana pulmonar, que puede seleccionarse de un grupo que comprende una infección por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Haemophilus influenza* y *Mycobacterium tuberculosis*.
- 15 12. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación anterior, en la que se administra por administración oral, sistémica, parenteral, intrapulmonar, intrabronquial o intraalveolar.
- 20 13. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 11 o 12, en la que comprende además un agente adicional seleccionado de un agente mucolítico, broncodilatador, un antibiótico, un bacteriófago, un agente antiinflamatorio o un agente antiinfeccioso.

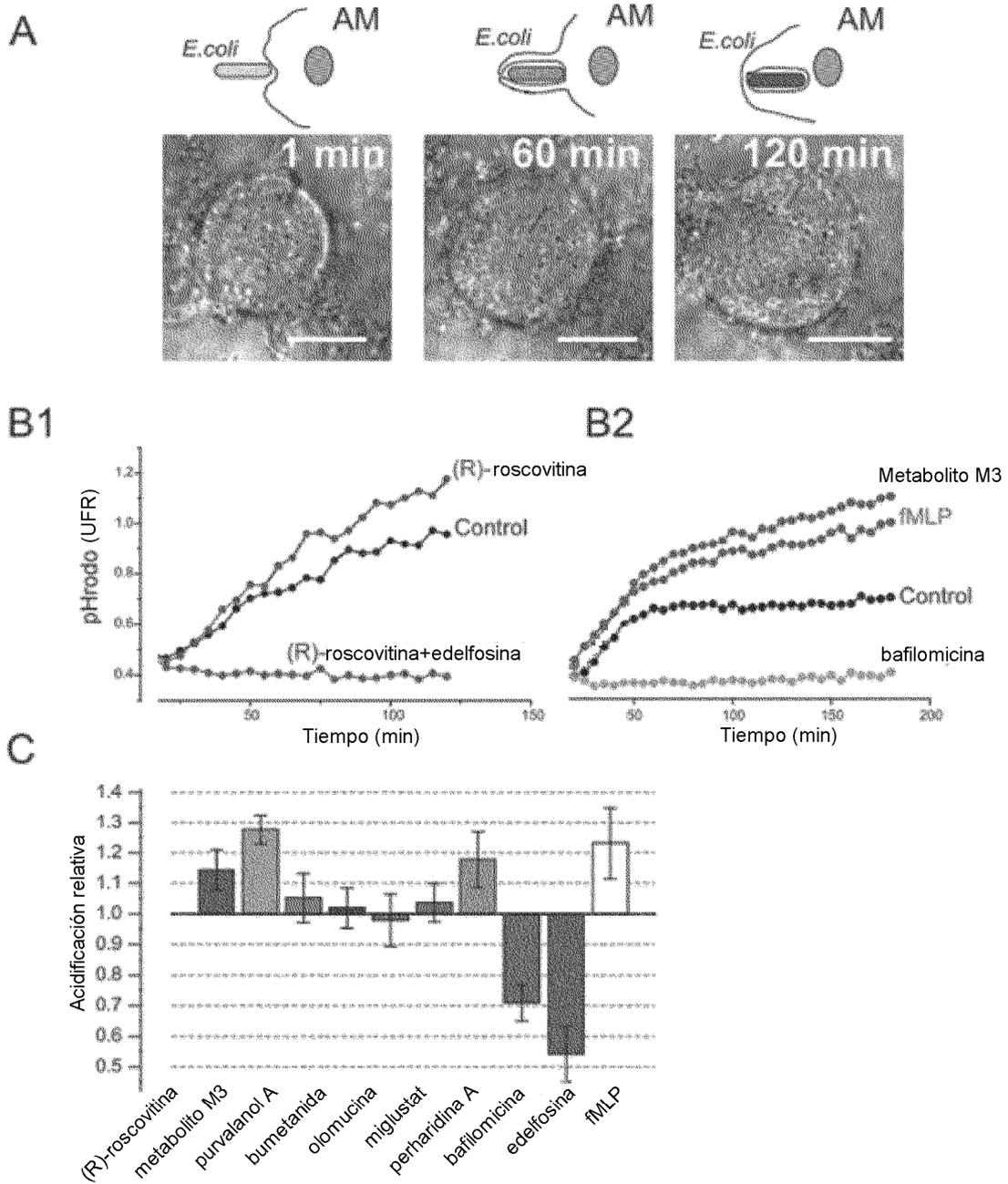


Figura 1

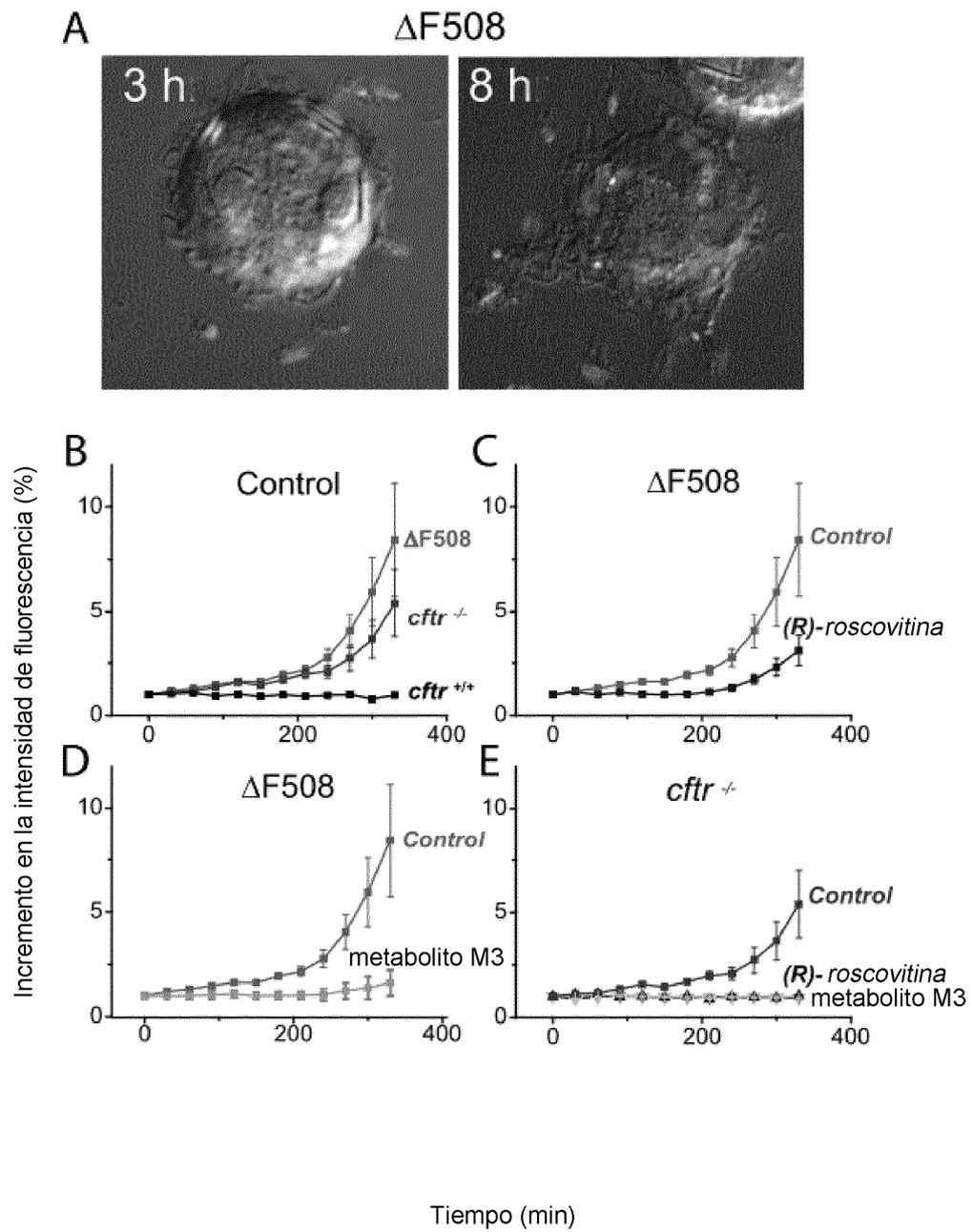


Figura 2

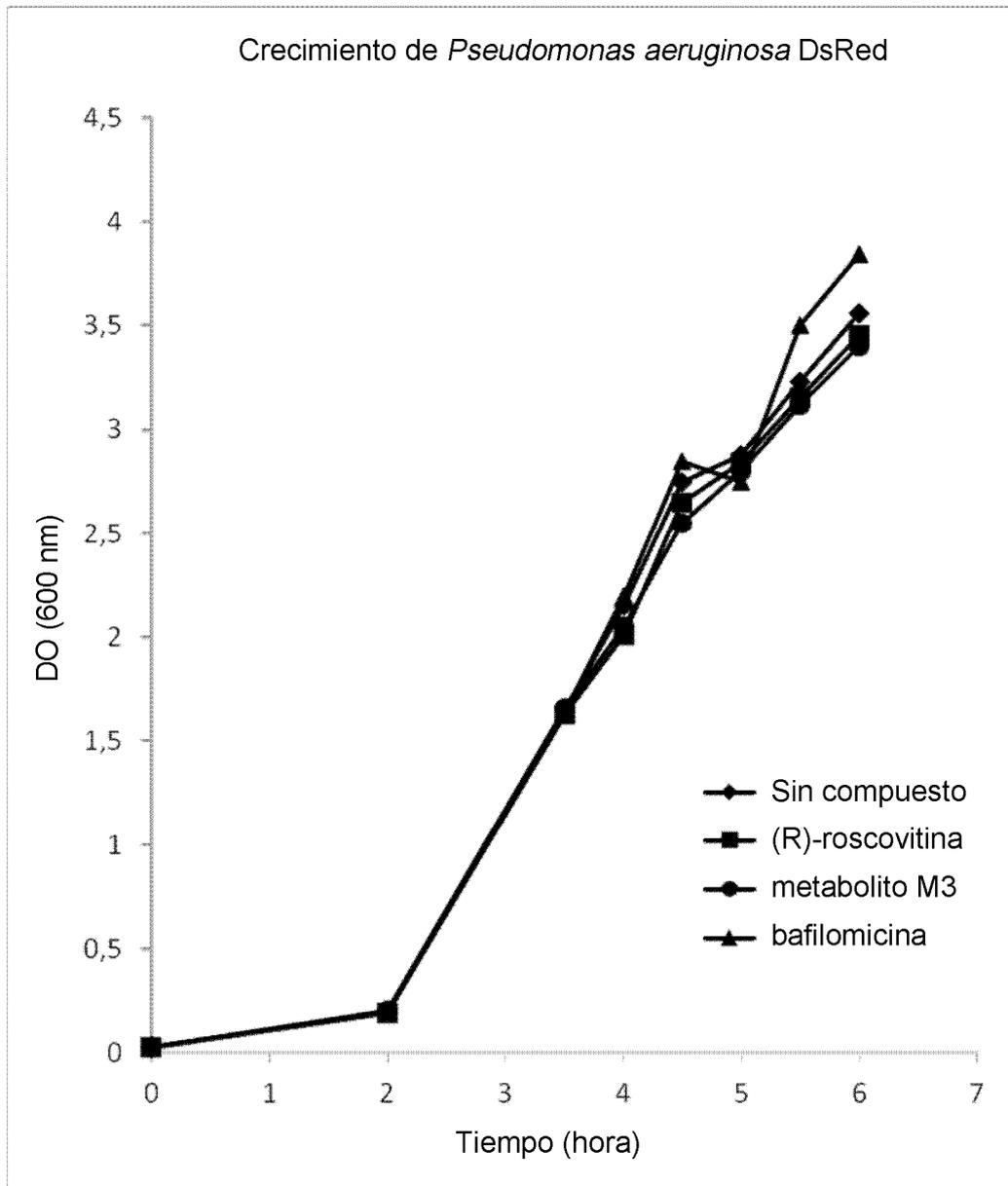


Figura 3

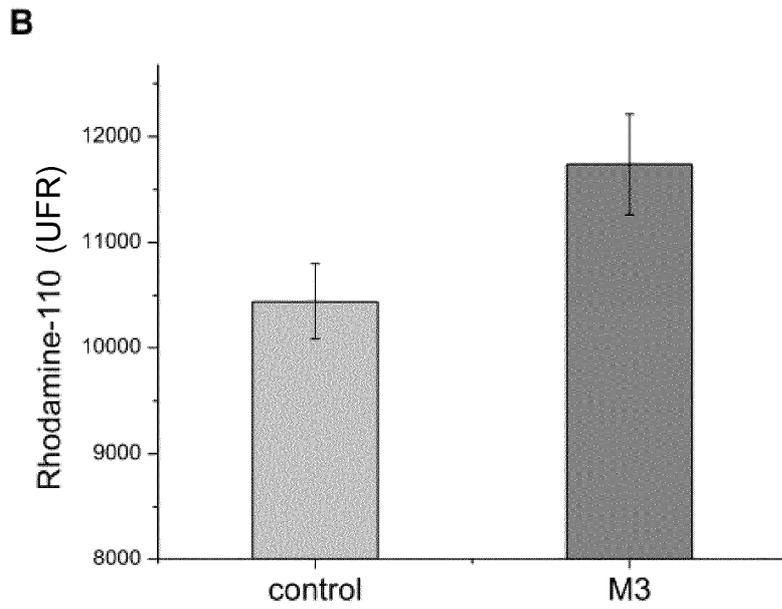
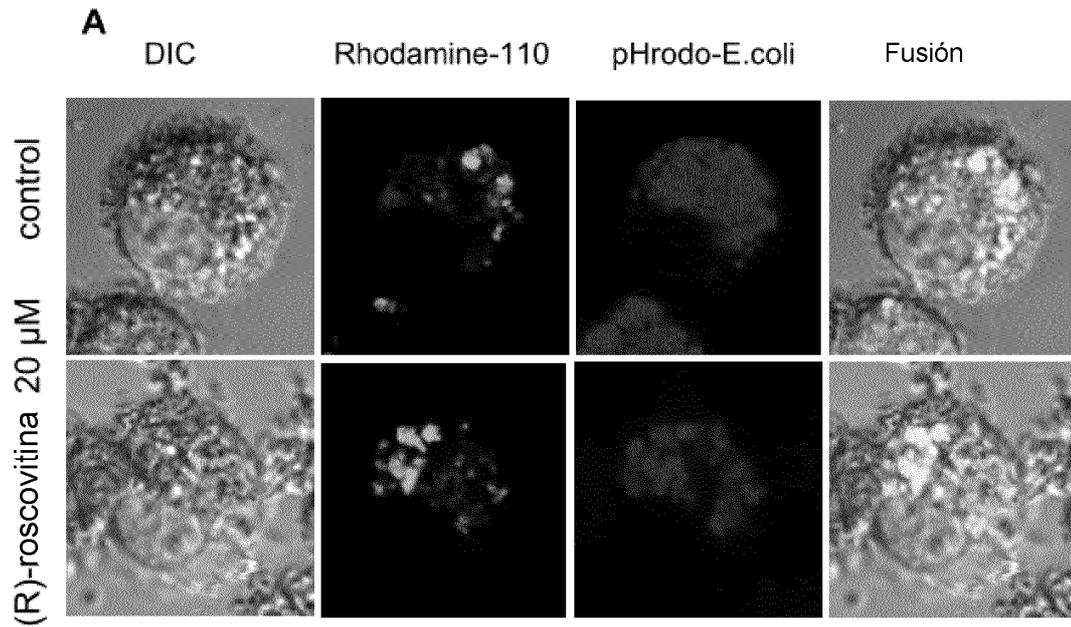


Figura 4