



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 341 215**

② Número de solicitud: 200803551

⑤ Int. Cl.:

C07H 19/06 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **15.12.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2010**

Fecha de la concesión: **12.04.2011**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **26.04.2011**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
26.04.2011

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 51 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Alcalá (Titular al 49 %)

⑱ Inventor/es: **Gago Badenas, Federico;**
Rico Galán, Eva;
Camarasa Rius, María José;
Jiménez Ruiz, Antonio;
Casanova Malpica, Elena;
Moreno Mateos, David y
Pérez Pérez, María Jesús

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Nucleósidos modificados para el tratamiento de infecciones por *Leishmania*.**

㉒ Resumen:

Nucleósidos modificados para el tratamiento de infecciones por *Leishmania*.

Compuestos derivados de nucleósidos y su uso para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por *Leishmania*. Además la invención se refiere a las composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos.

ES 2 341 215 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Nucleósidos modificados para el tratamiento de infecciones por *Leishmania*.

5 La presente invención se refiere a compuestos derivados de nucleósidos, su uso para el tratamiento de infecciones por *Leishmania*, además de las composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos.

Estado de la técnica anterior

10 Los parásitos del género *Leishmania* deben su nombre a W.B. Leishman, quién desarrolló las primeras técnicas de detección de los parásitos en 1901. Este parásito es el causante de la leishmaniasis, una enfermedad presente en 22 países de América y 66 naciones del viejo mundo, con especial incidencia en Asia Sur-oriental, África Oriental y Brasil. En Europa es posible encontrar casos de infección en humanos en 16 países, entre los cuales destacan
15 Francia, Italia, Grecia, Malta, España y Portugal. La enfermedad presenta diversas manifestaciones que, en su mayoría, dependen de la especie causante de la infección. La mayor parte de los casos corresponden a la forma cutánea, que afecta a la piel de los pacientes, siendo responsable de severas desfiguraciones. Sin embargo, los casos más relevantes desde el punto de vista de la salud corresponden a la forma visceral de la enfermedad (LV), que causa miles de muertes al año.

20 Aproximadamente el 60% de los casos de LV, también conocida como Kala azar, ocurren en el subcontinente indio (Bangladesh, India y Nepal), principalmente entre la población más pobre de las áreas rurales. El resto de los casos se localizan en África oriental (Etiopía, Kenia y Sudán) y en Brasil. La LV es causada por dos especies diferentes, *L. donovani* y *L. infantum*, cada una de ellas con una distribución geográfica propia. *L. infantum* infecta principalmente
25 a niños e individuos inmuno-suprimidos, mientras que *L. donovani* infecta a individuos de todas las edades. Se estima que cada año se producen unas 50.000 muertes a causa de esta enfermedad y se registran 500.000 nuevos casos. Entre las enfermedades causadas por parásitos, esta tasa de muerte es sólo superada por la malaria.

30 El perro es el principal reservorio de las especies causantes de LV. Existen evidencias que demuestran una disminución de la incidencia de la enfermedad, tanto en perros como en niños, como consecuencia de un amplio análisis serológico de la población de perros y la posterior eliminación de los animales infectados. Sin embargo, esta estrategia de control es considerada como poco aceptable y serían deseables otras medidas conducentes al control de la enfermedad en éstos animales. Datos recientes muestran una incidencia muy elevada de la infección en perros domésticos de los países de la cuenca mediterránea, considerándose de hecho una de las enfermedades más frecuentes y letales entre
35 estos animales (Solano-Gallego, L., P. Morell, *et al.* 2001. *J Clin Microbiol* 39: 560-3).

40 El tratamiento de la LV está basado en el empleo de fármacos anti-leishmania y en un agresivo control de cualquier infección bacteriana o parasitaria concomitante, de posibles anemias, hipovolemia y malnutrición. Los antimoniales pentavalentes estibogluconato sódico y antimoniato de meglumina han constituido la primera línea de tratamiento en muchas áreas del planeta durante más de 70 años. Los antimoniales son fármacos tóxicos con frecuentes efectos adversos tales como arritmias cardíacas, y pancreatitis agudas. Los pacientes con edades menores de 2 años o superiores a los 45 con la enfermedad avanzada y/o con malnutrición severa presentan un elevado riesgo de muerte durante la terapia con antimoniales como consecuencia de su elevada citotoxicidad, lentitud de acción y/o complicaciones de la enfermedad (Chappuis, F., S. Sundar, *et al.* 2007. *Nat Rev Microbiol* 5(11): 873-82).

45 El tratamiento con Anfotericina B convencional ha reemplazado a los antimoniales en el tratamiento de la LV en algunas áreas, en las que la tasa de fallo de los antimoniales supera el 60%. Fiebre, escalofríos y rigor son efectos casi universales del tratamiento con Anfotericina B convencional y no es extraño encontrar efectos adversos con grave riesgo para la vida como la caída de la concentración de potasio en sangre, nefrototoxicidad e incluso choques
50 anafilácticos tras la primera dosis. Además, este fármaco es costoso y su régimen de administración es complicado (15 infusiones lentas en días alternos) (Chappuis, F., S. Sundar, *et al.* 2007. *Nat Rev Microbiol* 5(11): 873-82).

55 A pesar de la existencia de algunas alternativas a estos tratamientos, como es el caso de la anfotericina B liposomal, la miltefosina (un fármaco originalmente desarrollado como anti-tumoral), la paramomicina (antibiótico aminoglicósido), y la Sitamaquina (8-aminoquinolina), existe todavía una gran necesidad de avanzar en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos que mejoren el repertorio de estrategias disponibles para el control de la enfermedad.

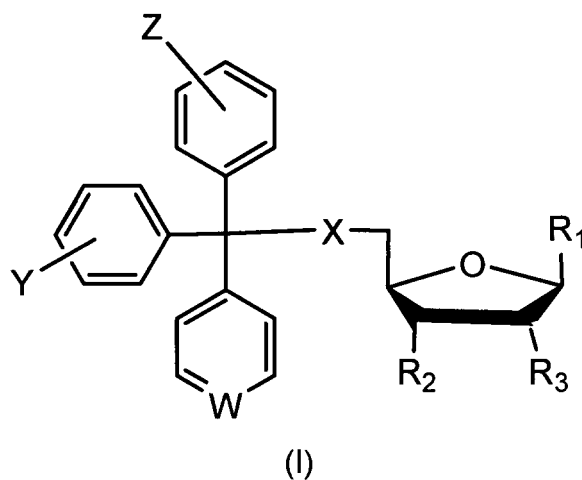
Descripción de la invención

60 La presente invención proporciona un grupo de moléculas con capacidad de inhibición del crecimiento del parásito, *Leishmania*, que constituye una nueva herramienta con importancia tanto desde el punto de vista médico como veterinario.

65

ES 2 341 215 B1

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) (a partir de ahora compuestos de la invención):



donde:

25 Z se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, halógeno, alquilo (C_1-C_4), éster ($-COOR_b$) o amida ($-CONH_2$ ó $-CONHR_d$);

W es CH ó nitrógeno (N);

30 Y es un hidrógeno (H) o alquilo (C_1-C_4);

X se selecciona de entre O, NH ó S;

35 R_1 es una base nitrogenada.

R_2 es un grupo éster ($-OCOR_c$);

40 R_3 se selecciona de entre hidrógeno (H), hidroxilo (OH) o alcoxilo ($-OR_a$);

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

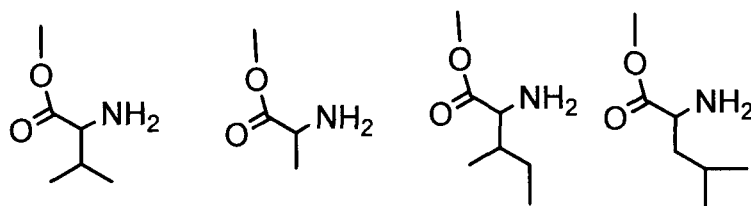
45 El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo ó *sec*-butilo. Preferiblemente el grupo alquilo es un metilo.

El término "alcoxilo" se refiere en la presente invención a un grupo de fórmula $-OR_a$ en la que R_a es un alquilo (C_1-C_4), por ejemplo, pero sin limitarse a metoxilo, etoxilo ó propoxilo. Preferiblemente es un grupo metoxilo.

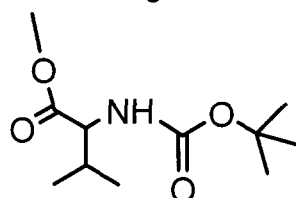
50 Por "base nitrogenada" se entiende en la presente invención a los compuestos orgánicos cíclicos, que incluyen dos o más átomos de nitrógeno. Preferiblemente las bases nitrogenadas se seleccionan de entre púricas o pirimidínicas, si es purina se unen a través del N9 y si es pirimidina se une a través del N1. Más preferiblemente las bases nitrogenadas se seleccionan del grupo que comprende timin-1-il, uracil-1-il, citosin-1-il, hipoxantin-9-il, adenin-9-il ó guanin-9-il. Aún más preferiblemente la base nitrogenada es timina.

55 El término "éster" se refiere en la presente invención a un grupo de fórmula $-OCOR_b$ ó de fórmula $-OCOR_c$. Cuando Z es un éster, R_b es un hidrógeno o un grupo alquilo (C_1-C_4) tal y como se ha descrito anteriormente. Cuando R_2 es un éster R_c es un grupo alquilo, lineal ó ramificado y/o sustituido por un grupo amino. Preferiblemente es cualquier aminoácido libre (como por ejemplo, pero sin limitarse a valina, alanina o isoleucina) o protegido, como por ejemplo, pero sin limitarse a los grupos t-butoxicarbonilo, fenilxicarbonilo o 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Más preferiblemente R_2 se selecciona de los siguientes grupos:

65



ó



R_2 puede ser también de fórmula $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{O}-R_e$, donde R_e es un grupo, aminoácidos libres o protegidos, como los descritos anteriormente. R_2 puede contener un aminoácido como espaciador y una valina en la posición distal del tipo $-\text{OCOCHR}'\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)\text{NH}_2$, siendo R' la cadena lateral del aminoácido del espaciador.

El término “amida” se refiere en la presente invención a un grupo de fórmula $-\text{CONH}_2$ ó $-\text{CONHR}_d$ en la que R_d es un alquilo (C_1-C_4), tal y como se ha descrito anteriormente.

R_3 , es un radical sobre la posición 2' de la ribosa del nucleósido, dando lugar a los compuestos desoxi (cuando R_3 es H), ribo o arabino (cuando R_3 es OH, dependiendo de su estereoquímica) o ribo (cuando R_3 es $-\text{OR}_a$, preferiblemente $-\text{OCH}_3$).

En una realización preferida de la presente invención los radicales Y y/o Z se encuentran en las posiciones 3 y 4 de sus anillos aromáticos respectivos. En otra realización preferida Y es hidrógeno. Más preferiblemente Z es hidrógeno y/o W es CH. Más preferiblemente X es oxígeno y aún más preferiblemente R_3 es hidrógeno.

En otra realización preferida los compuestos de la invención se seleccionan de la lista que comprende:

(S)-3'-O-[N-(Fluorenilmetoxicarbonil)valil]-5'-O-tritiltimidina;

3'-O-L-Valil-5'-O-tritiltimidina; o

Ácido 4-[(2R,3S,5R)-5-(timin-1-il)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-iloxi]-4-oxobutanoico;

[(2R,3S,5R)-5-(Timin-1-il)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]succinato de 2-hidroxi etilo;

[(2R,3S,5R)-5-(Timin-1-il)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]succinato de 2-[(S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-metilbutanoiloxi]etilo; ó

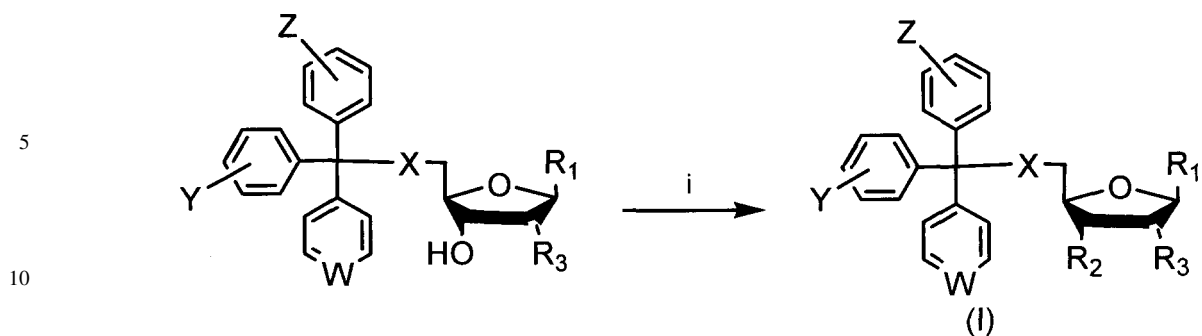
[(2R,3S,5R)-5-(Timin-1-il)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]succinato de 2-[(S)-2-amino-3-metilbutanoiloxi]etilo.

Más preferiblemente, los compuestos de la invención tienen las fórmulas:

3'-O-L-Valil-5'-O-tritiltimidina; ó

[(2R,3S,5R)-5-(Timin-1-il)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]succinato de 2-[(S)-2-amino-3-metilbutanoiloxi]etilo

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de los compuestos de la invención que cualquier experto en la materia podría deducir de los siguientes esquemas de reacción, además del contenido de los ejemplos.



15 Donde: R_1 , R_2 , R_3 , X, Z, Y y W están definidos anteriormente. En el paso (i) tiene lugar la adición de los grupos éster, introduciendo aminoácidos previamente protegidos o grupos aminoácidos junto con otros grupos espaciadores tal y como se define en el grupo R_2 , también previamente protegidos.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por *Leishmania*.

25 La leishmaniasis, es una enfermedad que afecta, sobre todo a vertebrados, es decir, tanto en humanos o animales vertebrados, como por ejemplo a marsupiales, cánidos, roedores o primates.

30 Existen varios tipos de leishmaniasis dependiendo del tipo de órganos se ven afectados por esta enfermedad y que son: leishmaniasis visceral (LV), que es principalmente causada por dos especies *L. donovani* y *L. infantum*. leishmaniasis cutánea o Leishmaniasis mucosa o mucocutánea. Dada la semejanza de las diferentes especies de *Leishmania*, los compuestos de la invención se utilizan para el tratamiento de cualquier tipo de leishmaniasis.

35 Aún otro aspecto más de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los compuestos de la invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El uso de dicha composición para el tratamiento de las enfermedades infecciosas será en una cantidad terapéuticamente efectiva.

40 Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

45 Los compuestos de la invención, sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos, así como las composiciones farmacéuticas que los contienen, pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o un profármaco, solvato, derivado o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

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

55 Dicha composición terapéutica se puede preparar en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía oral, tópica, rectal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, etc.). Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid, o en otros habituales o similares de las Farmacopeas Española y de Estados Unidos.

65 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

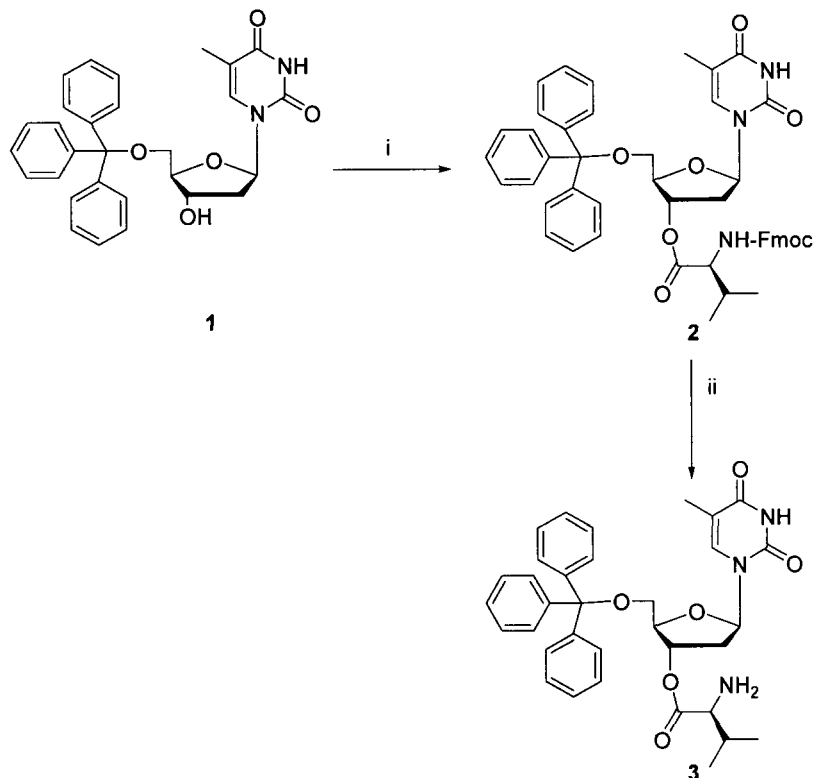
Ejemplos

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

Ejemplo 1

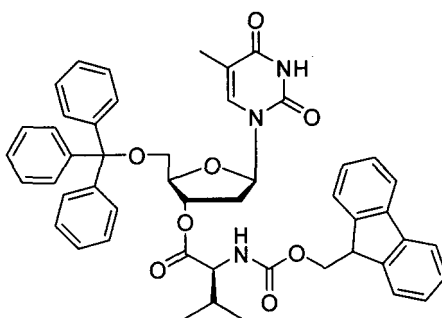
Síntesis del compuesto 3

Se describe en el siguiente esquema 1:



Esquema 1: donde (i) es Fmoc-Val-OH, BOP, CH₂Cl₂, Et₃N, DMAP, temperatura ambiente, 16 h. (ii) piperidina, DMF, temperatura ambiente, 5 min.

(S)-3'-O-[N-(Fluorenilmetoxicarbonil)valil]-5'-O-tritylimidina (2)



ES 2 341 215 B1

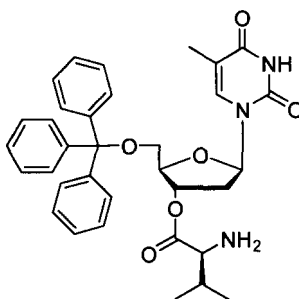
A una disolución de 5'-*O*-tritiltimidina (1) (Gilham, P. T.; Khoraka H. G. 1958, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 6212-6222) (150 mg, 0.31 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml), se le añade Fmoc-L-Val-OH (210 mg, 0.62 mmol), utilizando BOP (hexafluoruro de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio) (165 mg, 0.37 mmol) como agente de acoplamiento y Et₃N (51 μl, 0.37 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche, se diluye con acetato de etilo (25 ml) y se lava con una disolución de ácido cítrico al 5% (10 ml). La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaHCO₃ (10 ml) y salmuera, se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora. El crudo obtenido se purifica por cromatografía circular centrífuga en capa fina CCTLC en el Cromatotron usando como eluyente CH₂Cl₂. Se obtienen 199 mg (80%) como un sólido blanco.

Pf: 104-106°C (CH₂Cl₂:MeOH)

EM (ES, modo positivo): *m/z* 829 (M+Na)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 0.83 (m, 6H, CH₃-γ), 1.46 (s, 3H, 5-CH₃), 2.02 (m, 1H, CH-β), 2.28 (m, 2H, H-2'), 3.24 (m, 2H, H-5'), 3.93 (t, *J* = 1.2 Hz, CH-α), 4.02 (m, 1H, H-4'), 4.18-4.31 (m, 3H, CH₂CH-Fmoc), 5.33 (m, 1H, H-3'), 6.22 (pseudo t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-1'), 7.25-7.39 (m, 19H, CPh₃, Ph-Fmoc), 7.50 (s, 1H, H-6), 7.71 (pseudo t, *J* = 6.8 Hz, 2H, Ph-Fmoc), 7.86 (m, 3H, Ph-Fmoc, NH), 11.39 (s ancho, 1H, 3-NH).

3'-*O*-L-Valil-5'-*O*-tritiltimidina (3)



A una disolución del compuesto 2 (134 mg, 0.17 mmol) en N,N-dimetilformamida (1 ml) se le añade piperidina (50 μl, 0.51 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 5 min y se concentra hasta sequedad a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotron usando como eluyente CH₂Cl₂/MeOH (10:1). Se obtienen 89 mg (92%) como un sólido blanco.

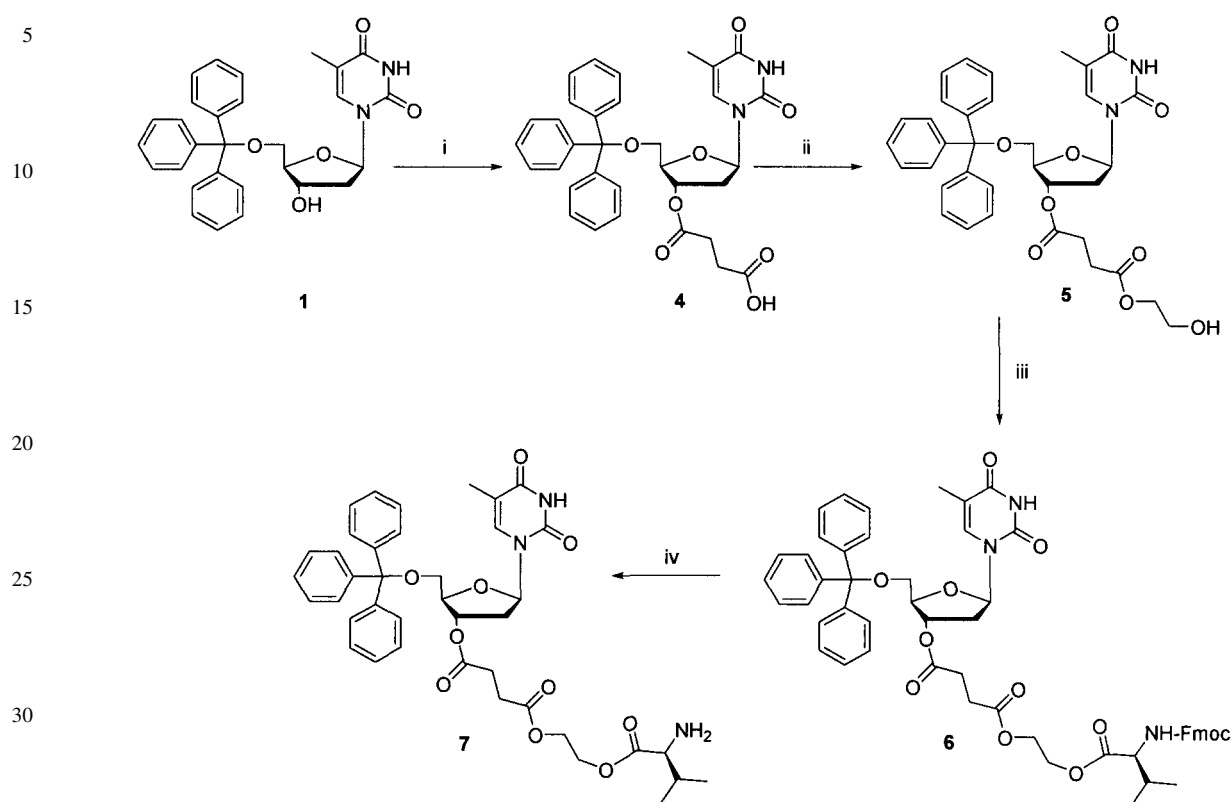
Pf: 88-90°C (CH₂Cl₂:MeOH)

EM (ES, modo positivo): *m/z* 607 (M+Na)⁺.

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 0.74 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃-γ), 0.82 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃-γ), 1.46 (s, 3H, 5-CH₃), 1.78 (m, 1H, CH-β), 2.30 (m, 2H, H-2'), 3.10 (d, *J* = 5.1 Hz, CH-α), 3.25 (m, 2H, H-5'), 4.02 (m, 1H, H-4'), 5.32 (m, 1H, H-3'), 6.21 (pseudo t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-1'), 7.27-7.39 (m, 15H, CPh₃), 7.52 (s, 1H, H-6), 11.38 (s ancho, 1H, 3-NH).

Análisis (%) para C₃₄H₃₇N₃O₆. Calculado: C, 69.96; H, 6.39; N, 7.20. Encontrado: C, 69.85; H, 6.21; N, 6.99.

Síntesis del compuesto 7

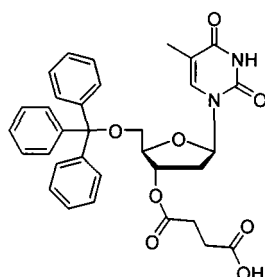


Esquema 2.- donde: (i) anhídrido succínico, CH_2Cl_2 , Et_3N , temperatura ambiente, 4 h (ii) etilenglicol, BOP, CH_2Cl_2 , Et_3N , temperatura ambiente, 3 h. (iii) Fmoc-Val-OH, BOP, CH_2Cl_2 , Et_3N , temperatura ambiente, 16 h. (iv) piperidina, N,N-dimetilformamida (DMF), temperatura ambiente, 5 min.

40

Ácido 4-[(2R,3S,5R)-5-(timin-1-il)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-iloxi]-4-oxobutanoico (4)

45



Una disolución de 5'-O-tritiltimidina (1) (Gilham, P. T.; Khoraka H. G. 1958, *J. Am. Chem. Soc.* 80, 6212-6222) (150 mg, 0.31 mmol), en CH_2Cl_2 (5 ml) se hace reaccionar con anhídrido succínico (62 mg, 0.62 mmol) en presencia de Et_3N (86 μl , 0.62 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (37 mg, 0.31 mmol) durante 4 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluye en CH_2Cl_2 (50 ml), y se lava dos veces con disolución de KH_2PO_4 al 10% (2 x 30 ml) y con H_2O (30 ml), la fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora. El residuo se purifica a través de un cartucho de Sílica SPE[®] usando como eluyente un gradiente de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (300:1 a 200:1). Se obtienen 149 mg (82%) como un sólido blanco.

60
65

ES 2 341 215 B1

Pf: 97-99°C (CH₂Cl₂:MeOH)

EM (ES, modo positivo): m/z 584 (M)⁺.

5 ¹H-RMN (CDCl₃): δ 1.38 (s, 3H, 5-CH₃), 2.41 (m, 1H, H-2'), 2.51 (m, 1H, H-2''), 2.59-2.72 (m, 4H, CH₂CH₂), 3.42, 3.48 (dd, *J* = 10.6, 2.5 Hz, 2H, H-5'), 4.17 (m, 1H, H-4'), 5.46 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-3'), 6.38 (dd, *J* = 9.0, 5.4 Hz, 1H, H-1'), 7.24-7.41 (m, 15H, CPh₃), 7.61 (s, 1H, H-6), 9.72 (s, 1H, 3-NH).

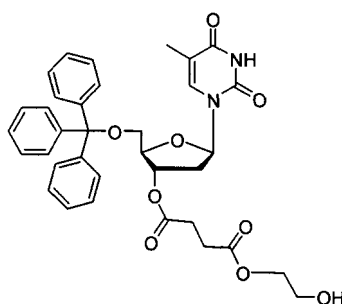
10 ¹³C-RMN (CDCl₃): δ 12.0 (CH₃), 29.3, 29.7 (CH₂CH₂), 38.4 (C-2'), 64.2 (C-5'), 76.0 (C-3'), 83.8 (C-4'), 84.8 (C-1'), 88.1 (C-Ph₃), 112.1 (C-5), 127.9, 129.1 (CH-Ph), 136.1 (C-6), 143.6 (C-Ph), 151.1 (C-2), 164.9 (C-4), 172.0 (COO), 176.4 (COOH).

Análisis (%) para C₃₃H₃₂N₂O₈. Calculado: C, 67.80; H, 5.52; N, 4.79. Encontrado: C, 67.56; H, 5.81; N, 4.58.

15

[(2R,3S,5R)-5-(Timin-1-il)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]succinato de 2-hidroxietilo (5)

20



25

30

A una disolución del compuesto 4 (130 mg, 0.22 mmol) en CH₂Cl₂ (1 ml), se le añade etilenglicol (50 μl, 0.89 mmol), BOP (119 mg, 0.27 mmol) y finalmente Et₃N (37 μl, 0.27 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 h. A continuación se diluye con acetato de etilo (25 ml) y se lava con una disolución de ácido cítrico al 5% (10 ml). La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaHCO₃ (10 ml) y salmuera, se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora. El crudo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotron usando como eluyente CH₂Cl₂/MeOH (20:1). Se obtienen 128 mg (92%) de un sólido blanco.

35

Pf: 73-74°C (CH₂Cl₂:MeOH)

40

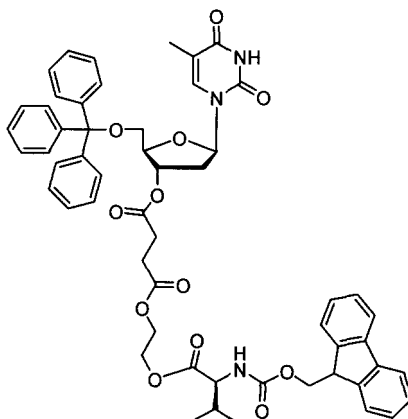
EM (ES, modo positivo): m/z 651 (M+Na)⁺.

45 ¹H-RMN (CDCl₃): δ 1.36 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H, 5-CH₃), 2.47 (m, 2H, H-2'), 2.67 (m, 4H, OCCH₂CH₂CO), 3.47 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, H-5'), 3.82 (m, 2H, CH₂OH), 4.14 (m, 1H, H-4'), 4.24 (m, 2H, CH₂O), 5.49 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H-3'), 6.40 (dd, *J* = 8.8, 5.7 Hz, 1H, H-1'), 7.24-7.40 (m, 15H, CPh₃), 7.60 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H-6), 8.24 (s, 1H, 3-NH).

50

[(2R,3S,5R)-5-(Timin-1-il)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]succinato de 2-[(S)-2-((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino]-3-metilbutanoiloxi]etilo (6)

55



60

65

ES 2 341 215 B1

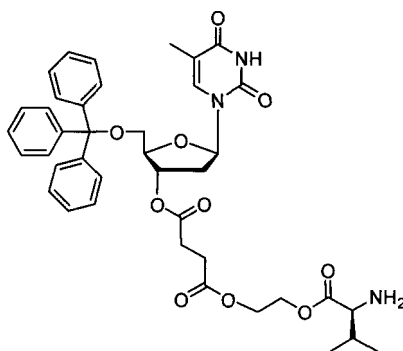
A una disolución de 5 (160 mg, 0.25 mmol) en CH_2Cl_2 (1.5 ml), se le añade Fmoc-L-Val-OH (130 mg, 0.38 mmol) y BOP (135 mg, 0.30 mmol) y tras unos minutos se le añade Et_3N (37 μl , 0.30 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. A continuación se diluye con acetato de etilo (25 ml) y se lava con una disolución de ácido cítrico al 5% (10 ml). La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaHCO_3 (10 ml) y salmuera, se seca con MgSO_4 anhidro, se filtra y se evapora. El crudo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotron usando como eluyente CH_2Cl_2 /acetato de etilo (6:4). Se obtienen 170 mg (70%) de un sólido blanco.

Pf: 87-89°C (CH_2Cl_2 :MeOH)

EM (ES, modo positivo): m/z 973 ($M+1$)⁺.

¹H-RMN (CDCl_3): δ 0.83-0.99 (m, 6H, CH_3 - γ), 1.35 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H, 5- CH_3), 2.16 (m, 1H, CH- β), 2.45 (m, 2H, H-2'), 2.63 (s, 4H, CH_2CH_2), 3.47 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H, H-5'), 4.12 (m, 1H, H-4'), 4.23 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH- α), 4.32-4.41 (m, 7H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, CH_2 -Fmoc, CH-Fmoc), 5.34 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-3'), 5.41 (m, 1H, NH), 6.40 (dd, $J = 8.1, 6.2$ Hz, 1H, H-1'), 7.25-7.44 (m, 19H, CPh_3 , Ph-Fmoc), 7.58-7.61 (m, 3H, H-6, Ph-Fmoc), 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ph-Fmoc), 8.06 (s, 1H, 3-NH).

[(2R,3S,5R)-5-(Timin-1-il)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]succinato de 2-[(S)-2-amino-3-metilbutanoiloxi]etilo (7)



A una disolución de 6 (79 mg, 0.08 mmol) en N,N -dimetilformamida anhidra (1 ml) se le añade piperidina (50 μl , 0.51 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 5 min, y se concentra hasta sequedad a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotron usando como eluyente CH_2Cl_2 /MeOH (10:1). Se obtienen 60 mg (96%) de un sólido blanco.

Pf: 62-64°C (CH_2Cl_2 :MeOH)

EM (ES, modo positivo): m/z 728 ($M+1$)⁺.

¹H-RMN (CDCl_3): δ 0.90 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3 - γ), 0.97 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3 - γ), 1.36 (s, 3H, 5- CH_3), 2.01 (m, 1H, CH- β), 2.45 (m, 2H, H-2'), 2.67 (s, 4H, CH_2CH_2), 3.33 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, CH- α), 3.47 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H, H-5'), 4.13 (m, 1H, H-4'), 4.32 (s, 4H, CH_2O), 5.50 (m, 1H, H-3'), 6.40 (dd, $J = 8.2, 6.2$ Hz, 1H, H-1'), 7.25-7.43 (m, 15H, CPh_3), 7.58 (s, 1H, H-6).

Análisis (%) para $\text{C}_{40}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_{10} \cdot \text{H}_2\text{O}$. Calculado: C, 64.42; H, 6.35; N, 5.63. Encontrado: C, 64.03; H, 6.03; N, 5.70.

Ejemplo 2

Capacidad inhibitoria del crecimiento de promastigotes en fase logarítmica de crecimiento por compuestos (comp. 3 y 7)

Promastigotes de *Leishmania infantum* en fase logarítmica de crecimiento se incubaron en placas multipocillo en 200 μL de medio de cultivo a una concentración de 100.000 parásitos por ml. A los controles positivos de crecimiento se les añadió un volumen de 5 μl de dimetilsulfóxido(DMSO). Cada uno de los compuestos 3 y 7 se añadió a los cultivos a una concentración de 12 μM en un volumen de 5 μl de DMSO. La evaluación del crecimiento de los parásitos se realizó mediante la adición en el momento del inicio del cultivo de 20 μl de Alamar Blue, para alcanzar una concentración final del 10%. El número de células presentes en cada uno de los pocillos se estimó a las 24 horas mediante medida de las absorbancias a 570 nm y 630 nm, según el método descrito por el fabricante (Biosource TM). El porcentaje de inhibición del crecimiento de cada uno de los compuestos se estimó por comparación con el crecimiento de los controles con DMSO.

ES 2 341 215 B1

Los resultados obtenidos muestran una fuerte capacidad inhibidora del crecimiento de los parásitos en el caso de los compuestos 3 y 7.

5

TABLA 1

Porcentaje de inhibición del crecimiento de promastigotes logarítmicos de *Leishmania infantum* en medio de cultivo

10

Compuesto	% inhibición crecimiento \pm DE [compuesto]=12 μ M Tiempo ensayo: 24h
3	95 \pm 1
7	92 \pm 1

15

20

Comparación del efecto citotóxico de los compuestos 3 y 7 en células humanas (Jurkat) y promastigotes de *Leishmania*

25

El efecto citotóxico de los compuestos 3 y 7 en promastigotes de *L. infantum* y en células humanas se evaluó por citometría de flujo mediante el análisis de los parámetros de Tamaño/complejidad celular (Forward scatter and Side Scatter; FSC/SSC). Los resultados obtenidos (tabla 2) indican que, tras 24 horas de incubación con una concentración de 6,25 μ M del compuesto 3, tan sólo el 20% de los parásitos permanecen vivos. A esta misma concentración el 38% de las células Jurkat son viables. A una concentración de 12,5 μ M del compuesto 3 en las mismas condiciones de cultivo tan sólo el 2% de los parásitos permanece vivo, mientras que un 14% de las células Jurkat se mantienen viables.

30

En el caso del compuesto 7, tras 24 horas de incubación a una concentración de 6,25 μ M, tan sólo el 14% de los parásitos permanecen vivos. A esta misma concentración el 73% de las células Jurkat son viables. A una concentración de 12,5 μ M del compuesto 7 en las mismas condiciones de cultivo, tan sólo el 2,5% de los parásitos permanece vivo, mientras que un 35% de las células Jurkat se mantienen viables.

35

40

TABLA 2

Comparación de la toxicidad celular de los compuesto 3 y 7 en células humanas (Jurkat) y promastigotes del *Leishmania infantum*

45

	<i>L. infantum</i> % Células vivas	Células Jurkat % Células vivas
Compuesto 3 6,25 μ M	20%	38%
Compuesto 3 12,5 μ M	2%	14%
Compuesto 7 6,25 μ M	14%	73%
Compuesto 7 12,5 μ M	2,5%	35%

50

55

60

65

ES 2 341 215 B1

Comparación del efecto citotóxico de los compuestos 3, 7 y miltefosina en promastigotes de Leishmania infantum

La comparación del efecto citotóxico de los tres compuestos frente a promastigotes logarítmicos de *Leishmania infantum* se llevó a cabo por citometría de flujo mediante el análisis de los parámetros de Tamaño/complejidad celular (Forward scatter and Side Scatter; FSC/SSC). Los resultados indican una actividad leishmanicida claramente superior de los compuestos 3 y 7 en el rango de concentraciones entre 6,25 y 12,5 μM (tabla 3).

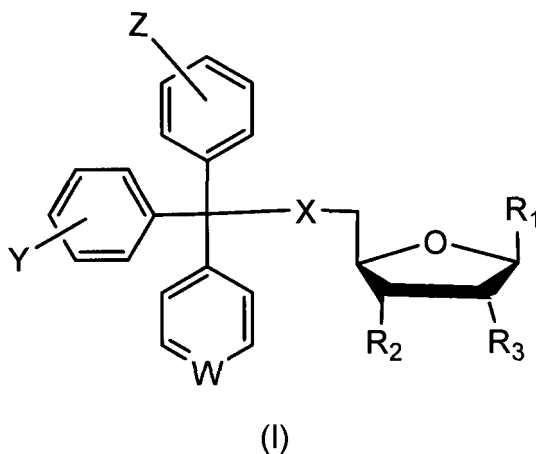
TABLA 3

Comparación de la actividad citotóxica de los compuestos 3, 7 y miltefosina en promastigotes de Leishmania infantum

Concentración compuesto	%Parásitos muertos Compuesto 3	%Parásitos muertos Compuesto 7	%Parásitos muertos Miltefosina
6,25 μM	80 %	86 %	2 %
12,5 μM	98 %	97,5 %	1 %

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



donde:

Z se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, halógeno, alquilo (C₁-C₄), éster o amida;

W es CH o N;

Y es hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄);

X se selecciona de la lista que comprende O, NH ó S;

R₁ es una base nitrogenada;

R₂ es un grupo éster; y

R₃ se selecciona de la lista que comprende hidrógeno, hidroxilo o alcoxilo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde Z y/o Y son hidrógeno.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde W es el grupo CH.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R₁ se selecciona de la lista que comprende timina, uracilo, citosina, guanina, adenina o hipoxantina.

5. Compuesto según la reivindicación 4, donde R₁ es timina.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R₃ es hidrógeno.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R₂ es un aminoácido, libre o protegido.

8. Compuesto según la reivindicación 7, donde el aminoácido es valil, alanil o isoleucil.

9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde X es O.

10. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:

(S)-3'-O-[N-(Fluorenilmetoxicarbonil)valil]-5'-O-tritiltimidina;

3'-O-L-Valil-5'-O-tritiltimidina; o

Ácido 4-[(2R,3S,5R)-5-(timin-1-il)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-iloxi]-4-oxobutanoico;

[(2R,3S,5R)-5-(Timin-1-il)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]succinato de 2-hidroxietilo;

ES 2 341 215 B1

[(2R,3S,5R)-5-(Timin-1-il)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]succinato de 2-[(S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi) carbonilamino)-3-metilbutanoiloxi]etilo; ó

5 [(2R,3S,5R)-5-(Timin-1-il)-2-(tritoloximetil)tetrahidrofuran-3-il]succinato de 2-[(S)-2-amino-3-metilbutanoiloxi] etilo.

10 11. Uso del compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la elaboración de una composición farmacéutica.

12. Uso del compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por *Leishmania*.

15 13. Uso del compuesto según la reivindicación anterior, para el tratamiento en humanos o animales.

14. Composición farmacéutica que comprende al menos uno de los compuestos de fórmula general (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 15. Composición farmacéutica según la reivindicación anterior, que además comprende otro principio activo.

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 341 215

② N° de solicitud: 200803551

③ Fecha de presentación de la solicitud: 15.12.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Base de datos Registry [recuperado el 14.04.2010]. STN International, Columbus, Ohio (EEUU). Compuestos con RN 887230-90-2 y RN 887230-53-7. Fecha de entrada en Registry 08.06.2006.	1-9
X	Base de datos Registry [recuperado el 14.04.2010]. STN International, Columbus, Ohio (EEUU). Compuestos con RN 106570-14-3 y RN 106546-89-8. Fecha de entrada en Registry 14.02.1987.	1-9
X	Base de datos Registry [recuperado el 14.04.2010]. STN International, Columbus, Ohio (EEUU). Compuesto con RN 90802-63-4. Fecha de entrada en Registry 16.11.1984.	1-9
A	US 4918179 A (WATANABE KYOICHI, A. y col.) 17.04.1990, columna 9, líneas 29-33.	1-15
A	JP 63008334 A (SASAKI, TAKUMA, y col.) 14.01.1988, resumen.	1-15
A	LIEKENS, S. y col. 5'-O-Tritylated Nucleoside Derivatives: Inhibition of Thymidine Phosphorylase and Angiogenesis. Molecular Pharmacology. 2006, Vol. 70, páginas 501-509. Todo el documento en especial página 503, figura 1.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

16.04.2010

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07H 19/06 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07H, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, HCAPLUS, BEILSTEIN, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.04.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	10-15	SÍ
	Reivindicaciones	1-9	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	10-15	SÍ
	Reivindicaciones	1-9	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Base de datos Registry.	08-06-2006
D02	Base de datos Registry	14-02-1987
D03	Base de datos Registry.	16-11-1984
D04	US 4918179 A	17-04-1990
D05	JP 63008334 A	14-01-1988
D06	Molecular Pharmacology.	2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a nucleósidos modificados de fórmula general (I), las composiciones farmacéuticas que los contienen solos o en combinación con otros principios activos y su uso para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por Leishmania.. Todos los ejemplos descritos en la presente solicitud tienen como sustituyente de R1 la base nitrogenada timina, Z e Y son H, W es un grupo CH, R3 es H y X es O.

Las referencias que constituyen los documentos D01 a D03 describen compuestos como los recogidos en la fórmula (I) de la presente solicitud según se define en las reivindicaciones 1 a 9.

En consecuencia las reivindicaciones 1 a 9 carecen de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

El documento D04 divulga la actividad como inhibidores del crecimiento de Leishmana tropica de los derivados de nucleósido 9-(2'-Desoxi-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosil) hipoxantina.

El documento D05 en su resumen menciona que nucleósidos derivados de purina 3'-Desoxi y con fluor en la posición 3', presentan actividad antiprotzoaria, en especial contra Leishmania.

El documento D06 divulga compuestos estructuralmente muy próximos a los compuestos de la invención, que contienen un grupo tritiloximetil unido al nucleósido, con uso potencial como agentes anticancerígenos.

No se ha encontrado divulgado, ni sugerido en el estado de la técnica compuestos como los recogidos en la reivindicación 10 de la solicitud, ni su composición farmacéutica, ni su uso en el tratamiento de enfermedades causadas por Leishmania.

En consecuencia, se considera que las reivindicaciones 10 a 15 de la presente solicitud tienen novedad e implican actividad inventiva (Arts. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).