



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 284 184**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/47 (2006.01)

C07D 215/40 (2006.01)

A61P 33/06 (2006.01)

A61P 33/08 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **97917709 .4**

(86) Fecha de presentación : **28.03.1997**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0907363**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.1999**

(54) Título: **Medicamento que comprende (-)-8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina para el tratamiento de infecciones parasitarias y oportunistas.**

(30) Prioridad: **29.03.1996 US 14292 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

(73) Titular/es: **The University of Mississippi
School of Pharmacy
University, Mississippi 38677, US**

(72) Inventor/es: **McChesney, James D.;
Nanayakkara, Dhammika N. P.;
Bartlett, Marilyn y
Ager, Arba L.**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Medicamento que comprende (-)-8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina para el tratamiento de infecciones parasitarias y oportunistas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una nueva composición que comprende (-)-8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina enantiómeramente pura, útil para tratar infecciones parasitarias y oportunistas. Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de esta composición en la fabricación de un medicamento para tratamiento de neumonía por *Pneumocystis carinii* (PCP), toxoplasmosis, malaria, tripanosomiasis y leishmaniasis en mamíferos y la prevención de PCP y malaria en mamíferos.

Fundamento de la invención

Las enfermedades parasitarias son un problema de salud principal en el mundo. La malaria, debida a una de cuatro especies de *Plasmodium*, es la enfermedad parasitaria más extendida, con un total informado de 100 millones de casos clínicos que conducen a más de 1 millón de muertes anualmente. Las tripanosomiasis son enfermedades causadas por los protozoos del género *Trypanosoma*. Dos formas principales de esta enfermedad tienen lugar en el hombre: la tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño) y la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas). Alrededor de 16-18 millones de personas son infectadas con *T. cruzi*, la causa de la tripanosomiasis americana, y se estima que 50 millones de personas en alrededor de 36 países están en riesgo de contraer la enfermedad del sueño africana [Ann. Trop. Med. Parasitol. 85, 43 (1991) M.L. Ruiz *et al.*]. Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias humanas causadas por protozoos del género *Leishmania* y se manifiestan en tres formas principales: cutánea, mucocutánea y visceral. La leishmaniasis visceral, debida principalmente a *Leishmania donovani*, es fatal si no se trata. Las terapias actuales para ésta y las otras enfermedades parasitarias padecen de inconvenientes significativos.

Además de la morbilidad y mortalidad significativas asociadas con las infecciones parasitarias, con la venida del SIDA, enfermedades parasitarias oportunistas epidémicas tales como neumonía por *Pneumocystis carinii*, toxoplasmosis y criptosporidiosis se han convertido en la causa principal de muerte entre pacientes con SIDA por todo el mundo. La no disponibilidad de fármacos seguros y eficaces y la resistencia a fármacos han impedido el tratamiento eficaz de todas estas enfermedades.

La primaquina es una 8-aminoquinolina y el fármaco de elección para la cura radical de malaria reincente [Drugs, 39, 160(1990) D.M. Panisko *et al.* *ibid* 39, 337(1990) J.S. Keystone] causada por *Plasmodium vivax* y *P. ovale* y también se está usando como agente profiláctico contra todas las formas principales de malaria humana [Am. J. Trop. Med. Hyg. (supl.), 49(3), Abs. 417(1990) J.K. Baird *et al.*]. Se ha encontrado que este fármaco tiene actividad esporontocida y gametocitocida significativa [Military Med., 134, 802-819(1969) K.H. Rieckman *et al.*] pero muy baja actividad contra parásitos de malaria en fase de sangre con dosis terapéuticas [Prog. Med. Chem., 28, 1(1991) E.A. Nodiff *et al.*]. Además, se ha informado que la primaquina es activa en modelos de animales de otras infecciones parasitarias, incluyendo tripanosomiasis [PQ Activity vs. Trypanosoma, J. Parasit., 74, 748 (1988) R.E. McCabe]. Además de su actividad contra las infecciones parasitarias, la primaquina en combinación con clindamicina se ha usado con éxito para el tratamiento así como la profilaxis de neumonía por *Pneumocystis carinii* en pacientes con SIDA [South. Med. J., 83, 403(1990) R. Kay *et al.*; Lancet i, 1046(1989) E. Toma *et al.*; Clin. Infect. Dis., 14: 183 (1992) G.S. Noskin *et al.*]. Este fármaco también tiene una actividad significativa contra otros parásitos causantes de enfermedades tales como *Trypanosoma* [J. Parasit., 74, 748(1988) R.E. McCabe] y *Leishmania* [Am. J. Trop. Med. Hyg., 32, 753(1983) D.J. Berman *et al.*]. Hay tres informes sobre el uso de primaquina para el tratamiento de infección por *Trypanosoma cruzi* en seres humanos [J. Parasit., 74, 748(1988) R.E. McCabe]. La principal limitación de primaquina y otros antimalaria de 8-aminoquinolina es que causan metemoglobinemia [N. Engl. J. Med., 279, 1127(1968) R.J. Cohen *et al.*] y hemólisis [Arch. Intern. Med. 109, 209(1962) A.R. Tarlow *et al.*] en individuos que padecen deficiencia en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Durante años, se han hecho varios intentos para mejorar el índice terapéutico de primaquina contra la malaria y *Leishmania* mediante la modificación de su estructura química. La introducción de grupos 4-metil y 5-fenoxi [J. Med. Chem. 25, 1094(1982) M.P. LaMontagne *et al.*; *ibid*, 25, 1097(1982) E.A. Nodiff *et al.*] o alcoxi [J. Med. Chem. 30, 1193(1987) E.H. Chen *et al.*] ha producido análogos con actividad esquizontocida muy superior en tejidos y sangre. Sin embargo, los estudios de toxicidad han mostrado que estos análogos tienen también un potencial mayor de producción de metemoglobina [Fundam. Appl. Toxicol., 10, 270(1988) J. Anders *et al.*]. Recientemente, LaMontagne [J. Med. Chem., 32, 1728(1989) M.P. LaMontagne *et al.*] ha informado de que la introducción de un metoxilo en posición 2 del anillo quinolina reduce la toxicidad de algunos de estos compuestos, especialmente inducción de metemoglobina, sin perder actividad. En base a estos resultados, el Ejército de los EE.UU. seleccionó un derivado de 8-aminoquinolina, WR-238.605, como sustitución potencial de primaquina para el tratamiento de malaria reincente [Pharm. Res., 8, 1505(1991) R.P. Brueckner *et al.*].

De modo similar, el Ejército de los EE.UU. había seleccionado WR-6026, un análogo de 4-metilprimaquina, como fármaco potencial para el tratamiento de leishmaniasis [Xenobiotica, 20, 31(1990) L.A. Shipley *et al.*]. Puesto que el compuesto WR-6026 se seleccionó como candidato potencial para el tratamiento de leishmaniasis en 1978 [Am. J. Trop. Med. Hyg., 27, 751(1978) K.E. Kinnamon *et al.*], se ha sintetizado un gran número de análogos de 5-fenoxi o

5-alcoxi-4-metilprimaquina. Algunos de estos análogos han mostrado mayor actividad antileishmania que WR-6026 en un ensayo *in vitro* [Am. J. Trp. Med. Hyg., 32, 753(1983) D.J. Berman *et al.*].

Después del primer informe [Antimicrob. Ag. Chemotherap., 32, 807(1988) S.F. Queener *et al.*] de la actividad antineumocística de primaquina en combinación con clindamicina, se evaluó la actividad antineumocística de varias otras 8-aminoquinolinas [Antimicrob. Ag. Chemotherap. 34: 277(1991) M.S. Bartlett *et al.*, *ibid.*, 37, 2166(1993) S. Queener] y se encontró que algunas de ellas, incluso cuando se usan solas, son superiores a la combinación primaquina/clindamicina.

El efecto del isomerismo en la actividad biológica y la toxicidad está bien documentado. Sin embargo, este fenómeno ha recibido poca atención en el caso de las 8-aminoquinolinas. Schmidt *et al.* [Antimicrob. Ag. Chemotherap., 12, 51(1977) L.H. Schmidt] examinaron las actividades curativa y tóxica relativas de primaquina y sus isómeros *d*- y *l*- en ratones y monos rhesus. Confirmaron un informe anterior de que la *d*-primaquina era aproximadamente 4 veces tan tóxica como la forma *l*- en ratones, pero que lo opuesto era cierto en el mono rhesus, en el que la forma *l*- era de 3 a 5 veces tan tóxica como la *d*-primaquina y al menos dos veces tan tóxica como la primaquina racémica. De modo más importante, las tres formas de primaquina, *d*-, *l*- y *dl*-, mostraban esencialmente idénticas propiedades curativas contra infecciones por *P. cynomolgi* inducidas por esporozitos. En estudios sobre el metabolismo de isómeros *d*- y *l*- se mostró que las proporciones metabólicas para los isómeros *d*- y *l*- eran diferentes [J. Pharm. Sci., 77, 380(1988) J.K. Baker *et al.*]. Otros varios estudios han mostrado también diferentes actividades y toxicidades para isómeros *d*- y *l*- [Biochem. Pharmacol. 37: 4605(1988) S. Argawal *et al.*; FEBS Letts., 214, 291(1987) A. Brossi *et al.*].

La presente invención se refiere a una nueva composición más activa y menos tóxica para el tratamiento de infecciones y enfermedades parasitarias y oportunistas. Esta composición comprende un estereoisómero enantiómeramente puro de un análogo de 8-aminoquinolina con el mejor perfil de actividad y toxicidad para el tratamiento y prevención de neumonía por *Pneumocystis carinii* (PCP), toxoplasmosis, malaria, tripanosomiasis y leishmaniasis en mamíferos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a mejoras en la quimioterapia de enfermedades parasitarias mediante la separación de un compuesto de 8-aminoquinolina racémico con perfiles de actividad y toxicidad deseables en enantiómeros puros y la selección del enantiómero puro con perfil terapéutico y de toxicidad mejorado para un tratamiento aumentado.

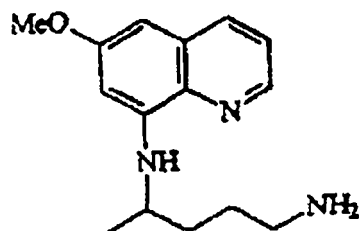
Se observó sorprendentemente que el enantiómero (-) de DN3-27-1 poseía una actividad significativamente mayor que el enantiómero (+) en el modelo de ratón de PCP. Se especuló con que el enantiómero activo es responsable de la actividad observada de DN3-27-1 con dosis eficaces mínimas. Por ello, la presente invención comprende el uso de este enantiómero (-) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento aumentado de infecciones y enfermedades parasitarias incluyendo infecciones y enfermedades parasitarias oportunistas.

Descripción detallada de la invención

En la investigación experimental que condujo a la presente invención, los solicitantes prepararon y evaluaron las actividades antineumocística, antitoxoplasma, antimalaria (actividad escozontocida de la sangre), antitripanosoma y antileishmania de análogos de 8-aminoquinolina, que incluían algunos compuestos en su forma racemato de los que se había informado previamente ser activos contra malaria [J. Med. Chem., 25, 1094(1982) M.P. LaMontagne *et al.*, *ibid.*, 25, 1097(1982) E.A. Nodiff *et al.*, J. Med. Chem., 30, 1193(1987) E.H. Chen *et al.*], y algunos nuevos análogos en su forma racémica. La separación de los racematos proporcionó isómeros enantiómeramente puros de los que se encontró que presentaban perfiles terapéuticos y/o de toxicidad mejorados.

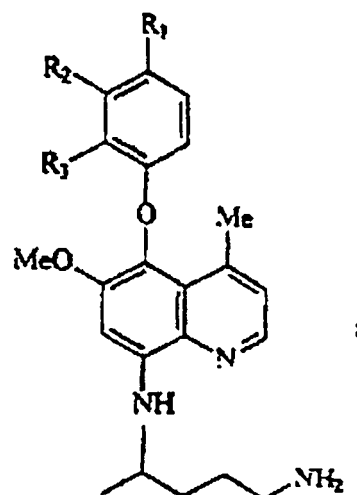
(Esquema pasa a página siguiente)

Los compuestos de la Tabla I tienen las siguientes fórmulas:

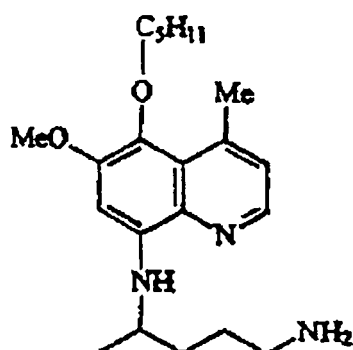


Primaquina

;

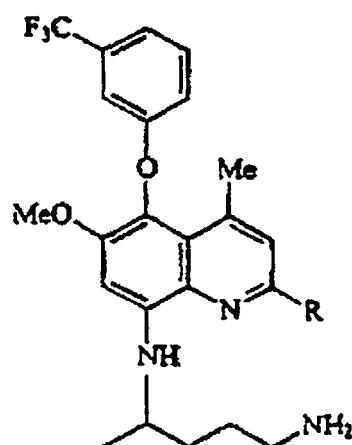


DNJ-27-1: $R_1=R_2=Cl$, $R_3=H$
 1: $R_1=R_3=H$; $R_2=F$
 2: $R_1=R_2=F$; $R_3=H$
 3: $R_1=R_3=F$; $R_2=F$



4

; y



WR-238,605 $R=OMe$

WR-225,448 $R=H$

La primaquina, los compuestos 1 a 4, WR-238,605 y WR-225,448 son compuestos de referencia.

Actividad antimalaria

La actividad esquizonticida de la sangre de 8-aminoquinolinas seleccionadas (Tabla I) se determinó como se describe aquí. La eficacia profiláctica de 8-aminoquinolinas seleccionadas se determinó como se describe aquí.

ES 2 284 184 T3

TABLA I

Actividad antimalaria de 8-aminoquinolinas: actividad esquizonticida de la sangre contra *P. berghei* en ratones

Ratones que sobreviven 60 días/Ratones infectados y tratados.

Dosis oral, mg/kg,día; (dosis total, mg/kg)				
	1 (3)	4 (12)	16 (48)	64 (192)
Compuesto				
Primaquina	0/7	0/7	1/7	3/7
DN 3-27-1	7/7	7/7	7/7	7/7
1	4/7	7/7	7/7	1/7
2	6/7	7/7	7/7	5/7
3	2/7	7/7	7/7	6/7
4	7/7	7/7	4/7	0/7
WR-225,448	7/7	7/7	7/7	4/7
WR-238,605	0/7	1/7	7/7	1/7
Testigo	0/7			

El DN3-27-1 es el más activo y también el menos tóxico (ningún ratón mostró toxicidad con la dosis más alta ensayada). Este compuesto había mostrado también excelente actividad por vía de administración subcutánea [J. Med. Chem., 25, 1094(1982) M.P. LaMontagne *et al.*] (véase Tabla 2) y una actividad curativa radical más alta (Tabla 3) que la primaquina [J. Med. Chem., 25, 1094(1982) M.P. LaMontagne *et al.*].

TABLA 2

Actividad antimalaria supresiva de DN3-27-1; actividad esquizonticida de la sangre contra *P. berghei* en ratones (J. Med. Chem., 25, 1094(1982) M.P. LaMontagne *et al.*) subcutáneamente como una dosis simple

Ratones infectados y tratados/ratones supervivientes 60 días.

Compuesto	Dosis, mg/kg							
	5	10	20	40	80	160	320	640
DN3-27-1	5/4	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Testigo	0/5							

Se trataron los ratones con una dosis simple del compuesto administrada subcutáneamente 72 h después de la infección. El número de curas es el número de ratones supervivientes, de cinco, 60 días post-infección.

TABLA 3

Actividad curativa antimalaria radical de DN3-27-1 contra P. cynomolgi en mono rhesus (J. Med. Chem., 25, 1094 (1982) M.P. LaMontagne et al.)

Dosis múltiples oralmente

Monos infectados y tratados/curados.

Compuesto	Dosis, mg/kg/día; (X7)		
	0,1	0,316	1,0
DN3-27-1	0/3	1/2	3/3
Primaquina		0/2	1/2

La primaquina se ha usado eficazmente como profiláctico contra la malaria. Se ensayó la actividad profiláctica oral de varios compuestos. Los ratones tratados con una dosis simple de 2 mg/kg de compuesto DN3-27-1 dentro del período de 2 días pre-infección a 2 días post-infección fueron protegidos completamente de la malaria (Tabla 4).

TABLA 4

Actividad profiláctica de DN3-27-1

Ratones infectados y ratones/tratados supervivientes el día 60.

Día de tratamiento	dosis, mg/kg			
	2	8	32	128
-3	0/5	5/5	5/5	5/5
-2	5/5	5/5	5/5	5/5
-1	5/5	5/5	5/5	5/5
1	5/5	5/5	5/5	5/5
2	5/5	5/5	5/5	5/5

TABLA 5

Actividad profiláctica anti-malaria de enantiómeros de DN3-27-1 (dosis simple de 2 mg/kg)

(para enantiómero X e Y, véase páginas 16 y 17)

Compuesto	Día de tratamiento	Ratones supervivientes el día 60/ratones infectados y tratados
DN3-27-1	-5	0/5
Enantiómero X	-5	0/5
Enantiómero Y	-5	0/5
DN3-27-1	-4	0/5
Enantiómero X	-4	0/5
Enantiómero Y	-4	0/5
DN3-27-1	-3	0/5
Enantiómero X	-3	0/5
Enantiómero Y	-3	0/5
DN3-27-1	-2	0/5
Enantiómero X	-2	0/5
Enantiómero Y	-2	1/5
DN3-27-1	2	2/5
Enantiómero X	2	0/5
Enantiómero Y	2	5/5
Testigos		0/5

Actividad antineumocistis

La primaquina en combinación con clindamicina se está usando actualmente para el tratamiento y como profilaxis de neumonía por *P. carinii* en pacientes con SIDA [South. Med. J., 83, 403(1990) R. Kay *et al.*, Lancet i, 1046(1989) E. Toma *et al.*, Clin. Infect. Dis., 14: 183(1992) G.S. Noskin *et al.*]. Algunas de las 8-aminoquinolinas, especialmente las que llevan grupos 4-metil y 5-fenoxi o alcoxi han mostrado actividad antineumocistis *in vivo* superior en ratones comparadas con primaquina incluso cuando se ensayan solas [Antimicrob. Ag. Chemotherap., 34: 277(1991) M.S. Bartlett *et al.*, *ibid.*, 37, 2166(1993) S Queener]. Se evaluó la actividad antineumocistis *in vitro* (Tabla 6) e *in vivo* (Tabla 7) de DN3-27-1 por los métodos descritos a continuación.

TABLA 6

Actividad antineumocistis in vitro de DN3-27-1

Concentración (µg/ml)	% de testigo el día 7
10	3,2
1,0	40,5
0,1	76,7

ES 2 284 184 T3

TABLA 7

Actividad antineumocistis oral de DN3-27-1 en ratones

Número de animales con organismo después del tratamiento/Número de animales tratados

Compuesto	Dosis: mg/kg/día (x21)	Coloración Giemsa	Coloración plata
DN3-27-1	1,2	1/10	1/10
TMP/SMX	50/250	1/10	1/10
Testigo		10/10	10/10

Se prepararon enantiómeros de primaquina y se evaluó su actividad antineumocistis. Un enantiómero mostró una actividad significativamente mayor que el otro.

TABLA 8

Actividad anti-Pneumocistis carinii oral de primaquina en ratones

(referencia)

Número de animales con organismo después del tratamiento/Número de animales tratados

Compuesto	Dosis: mg/kg/día (x21)	Coloración Giemsa
Primaquina	10	5/10
Enantiómero (+)	10	1/10
Enantiómero (-)	10	10/10
Primaquina	5	10/10
Enantiómero (+)	5	7/10
Enantiómero (-)	5	10/10
Primaquina	2	10/10
Enantiómero (+)	2	10/10
Enantiómero (-)	2	10/10
TMP/SMX	50/250	1/10
Testigo		10/10

Actividad antileishmania

El DN3-27-1 ha mostrado actividad *in vitro* con muy bajas concentraciones contra una variedad de cepas de Leishmania.

TABLA 9

Actividad anti-leishmania in vitro de DN-3-27-1

Compuesto	Organismo	Cuentas Giemsa
Ninguno (testigo)	<i>L. mexicana amazonensis</i>	15,10 ± 2,18
DN-3-27-1 10 µg/ml	<i>L. mexicana amazonensis</i>	1,30 ± 0,38
Ninguno (testigo)	<i>L. Donovanii Chagasi PP75</i>	6,35 ± 0,68
DN-3-27-1 50 ng/ml	<i>L. Donovanii Chagasi PP75</i>	0,95 ± 0,27
DN-3-27-1 150 ng/ml	<i>L. Donovanii Chagasi PP75</i>	0,10 ± 0,03
DN-3-27-1 450 ng/ml	<i>L. Donovanii Chagasi PP75</i>	0,00 ± 0,00
Atovaquona 1.350 ng/ml	<i>L. Donovanii Chagasi PP75</i>	5,05 ± 0,21

Actividad antitoxoplasma

Una evaluación preliminar de DN3-27-1 *in vitro* contra *Toxoplasma gondii* mostró que tenía actividad a alrededor de 50 µM.

Actividad antitripanosoma: Tabla 10

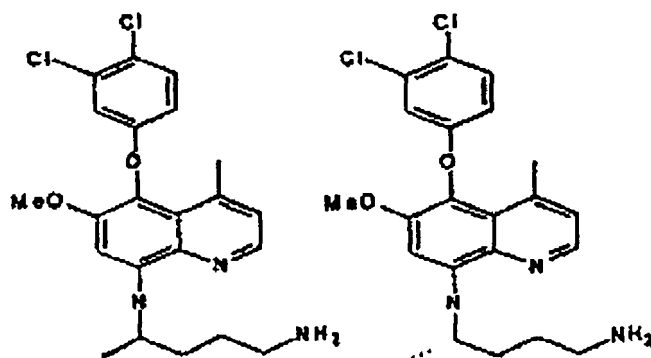
Se ensayaron los compuestos frente a aislados de tripanosoma desarrollados como formas de sangre en HMI-18 (Hirumi, H., Hirumi, K. 1989. Continuous Cultivation of Trypanosoma brucei bloodstream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. J. Parasitol. 75:985-989) que contenía 20% de suero de caballo. Las cuentas en hemacitómetro o las cuentas Coulter se hicieron diariamente y se determinaron después de 48 h los valores IC₅₀.

IC ₅₀ (µM)				
EATRO		KETRI		269
Lab 110		243As103		243
X	8,3	36	34	37,0
Y	13,5	17,5	11	27,0
DN3-27-1	9,4	10,9	29	5,0

La presente invención, por lo tanto, se refiere al hallazgo de que el enantiómero (-) de DN3-27-1 tiene una actividad significativamente mayor y menos toxicidad que el otro enantiómero en el tratamiento de infecciones y enfermedades parasitarias y oportunistas. La presente invención se refiere a los enantiómeros puros de DN3-27-1 y también al uso de este compuesto como un producto farmacéutico cuando se combina con un excipiente farmacéutico aceptable en el tratamiento de infecciones y enfermedades parasitarias y oportunistas. La presente composición puede usarse también como profiláctico para la prevención de infecciones o enfermedades parasitarias u oportunistas.

La actividad antiparasitaria de la composición incluye, por ejemplo, actividad antimalaria y actividad antineumocística. En cada caso, la composición se emplearía usando la cantidad de (-)-DN3-27-1 enantiómeramente puro que sea una cantidad eficaz para obtener la actividad antiparasitaria o antiinfecciosa deseada.

Según una realización específica de la presente invención, se propone utilizar (-) 8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina (Y) para tratar neumonía por *Pneumocystis carinii* (PCP), toxoplasmosis, malaria, tripanosomiasis o leishmaniasis.

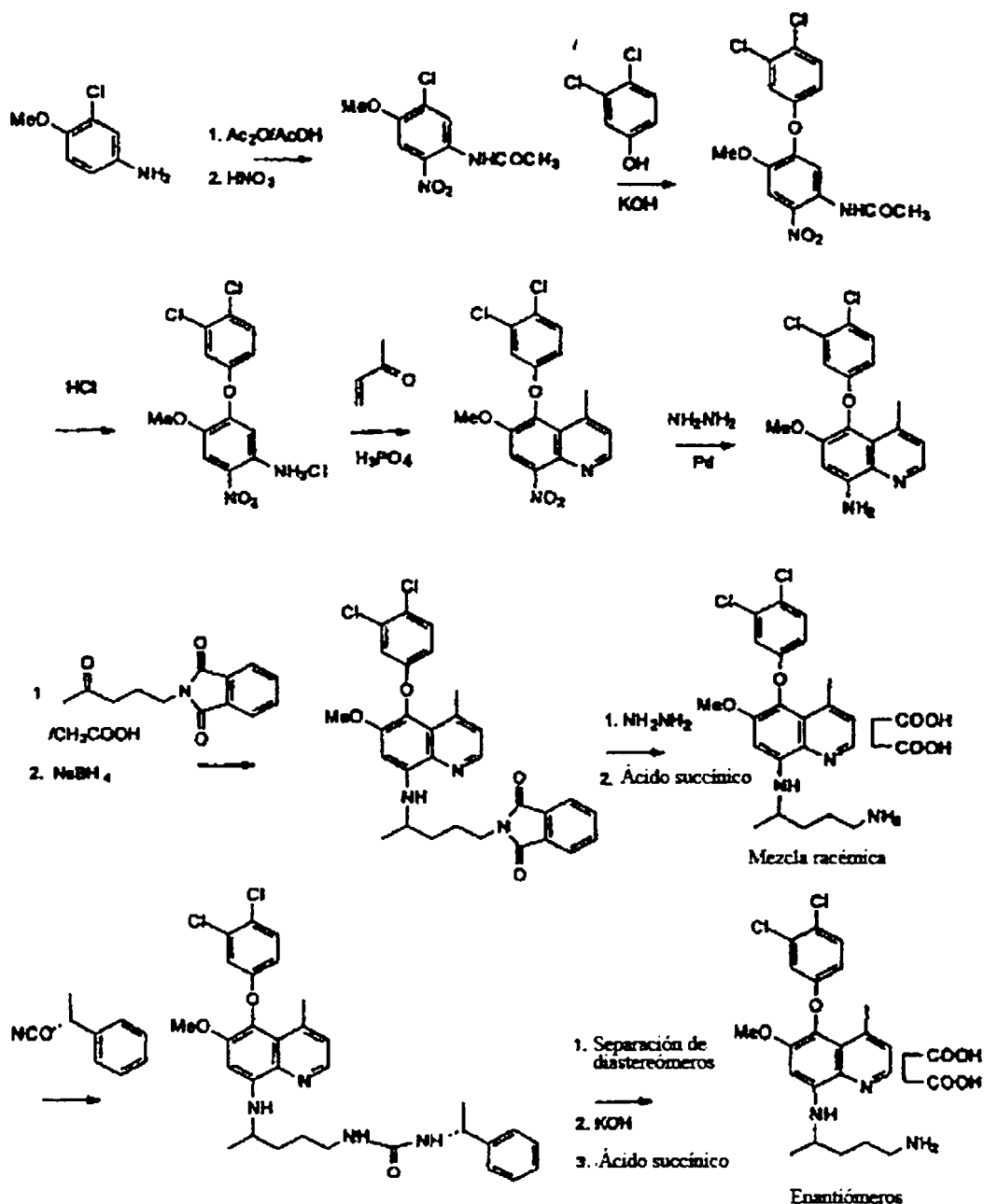


La administración del compuesto de la invención puede ser administración parenteral, oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intrapleurar, intratecal, intraperitoneal, por aerosol o transdérmica para conseguir el efecto antiparasitario deseable. Cuando se administran oralmente, los compuestos de la invención pueden estar en forma de pastillas (de capa simple o múltiple, revestidas o no revestidas), cápsulas o grageas. Estas formulaciones orales pueden mezclarse con un excipiente sólido tal como lactosa, sacarosa, almidón, celulosa microcristalina, estearato magnésico o talco. Cuando puede indicarse administración parenteral, puede emplearse una solución acuosa o una formulación oleaginosa del agente. Pueden prepararse soluciones acuosas en agua, solución salina fisiológica, solución de Ringer o similares, con o sin tampones. La formulación oleaginosa puede hacerse en aceites naturales (como aceite de cacahuete o aceite de oliva), o en benzoato de bencilo, por ejemplo.

La cantidad de dosificación real administrada puede determinarse por factores físicos y fisiológicos tales como peso corporal, gravedad del estado e idiopatía del paciente. Teniendo en cuenta estas consideraciones, puede determinarse fácilmente la dosificación de (-)-DN3-27-1 para un sujeto particular y/o el desarrollo del tratamiento.

La presente invención se refiere a (-) 8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina ((-)-DN3-27-1) enantiómeramente puro. La separación enantiómera está dentro de la experiencia en la técnica. Un método preferido en la presente invención es derivación con isocianato de (R)(+)- α -metilbencilo y separación usando cromatografía de columna de fase inversa C-18 o cristalización fraccionada. Otro método preferido en la presente invención es derivación con isocianato de S(-)- α -metilbencilo y separación usando cromatografía de columna de fase inversa C-18 o cristalización fraccionada.

Un esquema de reacción general para la preparación de DN3-27-1 así como compuestos enantiómericamente puros es como sigue:



Con el fin de ilustrar adicionalmente la presente invención y sus ventajas, se dan los siguientes ejemplos específicos.

En los ejemplos que siguen, así como en cualquier lugar en esta memoria descriptiva, todas las temperaturas son en grados Celsius (°C).

Reacciones para la preparación de DN3-27-1 y los compuestos X e Y

2-Nitro-4-metoxi-5-(3,4-diclorofenoxi)acetanilida

Una solución de 50 g de 3,4-diclorofenol (0,307 moles) y 20,2 g de KOH del 85% (0,307 moles) en 250 ml de DMF seca se añadió a una solución de 67,6 g de 2-nitro-4-metoxi-5-cloroacetanilida (0,275 moles) en 250 ml de DMF a 120°C con agitación bajo atmósfera de nitrógeno. Tras completarse la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 5 horas más a esta temperatura. La mezcla de reacción se vertió en agua fría con agitación. El precipitado resultante se separó por filtración y se cristalizó en cloroformo/metanol para producir 84 g del producto, 2-nitro-4-metoxi-5-(3,4-diclorofenoxi)acetanilida.

ES 2 284 184 T3

Hidrocloreto de 2-nitro-4-metoxi-5-(3,4-diclorofenoxi)anilina

Una mezcla de 84 g de 2-nitro-4-metoxi-5-(3,4-diclorofenoxi)acetanilida (0,22 moles) y 100 ml de HCl concentrado en 1 l de etanol se tuvo a reflujo durante 5 horas. Se separó el disolvente bajo vacío y el producto obtenido se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

5-(3,4-Diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metil-8-nitroquinolina

Una mezcla de 83 g de hidrocloreto de 2-nitro-4-metoxi-5-(3,4-diclorofenoxi)anilina (0,22 moles), ácido polifosfórico en 250 ml de ácido fosfórico del 85%, se calentó en una atmósfera de nitrógeno a 110-120°C, y se añadieron gota a gota bajo agitación vigorosa 32,17 g de metilvinilcetona (0,46 moles). Tras completarse la adición, la mezcla se agitó y mantuvo a 110-120°C durante 4 horas más. Se añadieron 14 g adicionales de metilvinilcetona (0,2 moles) y la mezcla se calentó durante 4 horas más. La mezcla de reacción se vertió en solución de hidróxido sódico enfriada con hielo (pH 10-12) y se dejó durante la noche. El precipitado resultante se separó por filtración y secó. El sólido se disolvió en cloroformo y se mezcló con carbón vegetal activado y se filtró a través de un lecho de celite. El lecho de celite se lavó con cloroformo y el filtrado se concentró hasta 400 ml bajo vacío y se diluyó con metanol hasta aparecer una turbidez y se dejó durante la noche. El producto cristalino formado se separó por decantación y se cristalizó en cloroformo para dar 8 g de producto puro, 5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metil-8-nitroquinolina. Los filtrados combinados se evaporaron a sequedad y el residuo se cromatografió sobre gel de sílice con 30% de cloroformo en hexano para producir una fracción de la que se cristalizó el producto (cloroformo/metanol) para dar 13 g de producto.

8-Amino-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina

A una mezcla de 13 g de 5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metil-8-nitroquinolina y 800 mg de Pd al 10% sobre carbono en 500 ml de etanol se añadieron 20 ml de hidraceno hidrato del 98% por porciones con agitación. Tras completarse la adición, la mezcla de reacción se tuvo a reflujo durante 6 horas. La mezcla de reacción se filtró mientras estaba caliente y evaporó. El residuo se repartió entre agua y acetato de etilo, la capa orgánica se lavó con agua, secó y evaporó para dar 12,4 g de producto cristalino que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

5-(3,4-Diclorofenoxi)-6-metoxi-1-metil-8[(4-ftalimido-1-metilbutil)amino]quinolina

Una mezcla de 12,4 g de 8-amino-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina (36 mM) y 11,6 g de 4-oxo-1-ftalimidopentano (50 mM) en ácido acético glacial se agitó durante 15 min bajo nitrógeno, y se añadieron por porciones 2,6 g de borohidruro sódico (70 mM) manteniendo la temperatura a 25-35°C. Tras la adición, se agitó la mezcla de reacción durante 30 min y se vertió después en una solución enfriada con hielo de hidróxido sódico concentrado. El precipitado resultante se filtró y cromatografió sobre gel de sílice. La elución con hexanos:acetato de etilo 90:10 produjo el producto esperado de 5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metil-8[(4-ftalimido-1-metilbutil)amino]quinolina, que se cristalizó en éter para dar 12,4 g (22 mM) de producto cristalino amarillo.

8-[(4-Amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina

Una mezcla de 12,2 g de 5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metil-8[(4-ftalimido-1-metilbutil)amino]quinolina (21,6 mM) y 4 ml de hidraceno hidrato del 98% en 500 ml de etanol se tuvo a reflujo durante 5 horas. La mezcla de reacción se evaporó bajo vacío y el residuo se repartió entre 400 ml de hidróxido potásico del 10% y 400 ml de acetato de etilo. La capa orgánica se lavó dos veces con 300 ml de hidróxido potásico del 10% y después cuatro veces con agua, se secó con sulfato sódico anhidro y se evaporó. El residuo se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

8-[(4-(N-(R)-1-feniletilcarbamoil)-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina

A una solución agitada de 8 g (18,4 mM) de 8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina en tolueno a 10°C, se añadieron gota a gota 2,98 g (20,3 mM) de isocianato de (R)(+)- α -metilbencilo. La mezcla se agitó durante 30 min y se evaporó después el disolvente bajo vacío y el residuo se hirvió en 200 ml de acetato de etilo y se filtró. La fracción soluble en acetato de etilo se cristalizó dos veces en acetato de etilo para dar un diastereoisómero (I) en forma pura, 1,2 g.

La fracción soluble en acetato de etilo se recrystalizó cuatro veces en metanol para dar otro diastereoisómero (II) en forma pura (420 mg).

Succinato de (-)-8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina (Y)

Una mezcla de 800 mg de diastereómero I de 8-[(4-(N(R)-1-feniletilcarbamoil)-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina y 8 g de hidróxido potásico del 85% en 80 ml de n-butanol se tuvo a reflujo bajo nitrógeno durante 30 horas. El disolvente se evaporó bajo vacío y el residuo se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa de acetato de etilo se separó y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las capas de acetato de etilo combinadas se lavaron cuatro veces con agua, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se evaporaron. La goma obtenida se cromatografió sobre alúmina básica y la elución con acetato de etilo:metanol produjo 462 mg de 8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina (1,06 mM). Éste se disolvió en 10 ml de etanol que contenía 126 mg de ácido succínico, se diluyó con 30 ml de dietiléter y se dejó durante la noche a 4°C.

ES 2 284 184 T3

El sólido resultante se separó por filtración para producir 373 mg de succinato de (-)-8-[(4-amino-1-metilbtil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina.

Succinato de (+)-8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina (X) (referencia)

Una mezcla de 285 mg de diastereómero II de 8-[[4-(N(R)-1-feniletilcarbamoil)-1-metilbutil]amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina y 3 g de hidróxido potásico del 85% en 30 ml de n-butanol se tuvo a reflujo bajo nitrógeno durante 30 horas. El disolvente se evaporó bajo vacío y el residuo se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa de acetato de etilo se separó y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las capas de acetato de etilo combinadas se lavaron cuatro veces con agua, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se evaporaron. La goma obtenida se cromatografió sobre alúmina básica y la elución con acetato de etilo:metanol produjo 157 mg (0,36 mM) de 8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina. Éste se disolvió en 10 ml de etanol que contenía 43 mg (0,36 mM) de ácido succínico, se diluyó con 30 ml de dietiléter y se dejó durante la noche a 4°C. El sólido resultante se separó por filtración para producir 158 mg de succinato de (+)-8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina. Los diastereómeros obtenidos tras derivación con isocianato de (R)(+)- α -metilbencilo se separaron también usando cromatografía de columna de fase inversa C-18. Este método de análisis de HPLC y espectroscopía de NMR protónica se usaron para determinar la pureza de los diastereómeros.

Análisis de HPLC. La instrumentación consistía en un Waters LC Module I Multisolvent Delivery System, auto-inyector Waters 715, bomba Waters 600, detector de UV Waters 486 que trabaja a 254 nm (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division, Milford, MA) y un ordenador (NEC power mate 386/33i, Millennium 2000) para control del sistema analítico, recogida de datos y tratamiento.

La cromatografía se realizó usando una columna de fase inversa C-18 Waters Resolve® (esférico de 5 μ m, 3,9 x 30 mm) y fase móvil de acetonitrilo:tetrahidrofurano:ácido láctico del 85% (76,5:13,5:10) con un caudal de 2 ml/min. Los compuestos se detectaron usando un detector UV que trabajaba a 254 nm.

(+) y (-) Primaquina (referencia)

La primaquina se compró a Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) y se separó en enantiómeros (+) y (-) usando el procedimiento descrito por Carroll *et al.* [J. Med. Chem., 21, 326 (1978), F.I. Carroll *et al.*].

Procedimientos de ensayo biológico en animales

Ensayo esquizonticida de la sangre (Infección por Plasmodium berghei inducida por trofozoitos en ratones, Universidad de Miami, sistema de ensayo: Thompson Test)

Se mezclaron fármacos en 0,5% de hidroxixelulosa, 0,1% de Tween 80 y se administraron oralmente b.i.d. los días 3, 4 y 5 post-infección. Se infectaron ratones CD-1 machos o hembras, de 5 semanas de edad, con 5×10^4 eritrocitos parasitados de cepa KBG-173 mm de *Plasmodium berghei*. Se tomaron películas de sangre el día +6 y después semanalmente hasta el día +60. Se calcularon parasitemias y el valor SD90 (dosis que suprime el 90% de los parásitos en grupos tratados, en comparación con los testigos no tratados infectados) el día +6 post-infección. Los datos de mortalidad se tabularon durante 60 días, en cuyo momento todos los ratones supervivientes que eran negativos en la película de sangre se consideraron curados.

Los compuestos X e Y se ensayaron con tres niveles de dosis, 4, 1 y 0,25 mg/kg de peso corporal por día. La actividad de estos compuestos se comparó con el testigo sin tratar y "racemato", que es una mezcla de igual cantidad de cada enantiómero X y Y. En los testigos sin tratar, la muerte tuvo lugar en 8-9 días. Los compuestos que son eficaces contra la infección por *Plasmodium berghei* aumentan el tiempo de supervivencia medio de los animales infectados en comparación con los testigos no tratados. Los ratones que sobreviven después de treinta días y están libres de parásitos en sangre se consideran curados.

La eficacia del fármaco se determina por el número de curas al final de un período de 30 días y el aumento del tiempo de supervivencia medio sobre el testigo (Δ MST). También podía determinarse el efecto de los fármacos en ensayo por la reducción de la parasitemia (porcentaje de los hematíes detectados con los parásitos) sobre el testigo no tratado el día 6, un día después de completarse el tratamiento. Ambos métodos produjeron resultados virtualmente idénticos. Si la dosis de compuestos de ensayo es inadecuada, después de la limpieza inicial, los parásitos residuales se multiplicarán y tendrán lugar recaídas en treinta días. Las actividades esquizonticidas de la sangre (antimalaria supresiva) de X, Y y el racemato contra *P. berghei* en ratones se muestran en la Tabla 11.

Ensayo profiláctico

Se mezclaron fármacos en 0,5% de hidroxietilcelulosa, 0,1% de Tween 80 y se administraron oralmente b.i.d. los días 5, 4, 3, 2 o 1 antes de la infección o 1 o 2 días post-infección. Se infectaron ratones CD-1 machos o hembras, de 5 semanas de edad, con 5×10^4 eritrocitos parasitados de cepa KBG-173 mm de *Plasmodium berghei*. Se tomaron películas de sangre el día +6 y después semanalmente hasta el día +30. Se tabularon datos de mortalidad durante 30 días, en cuyo momento todos los ratones supervivientes que eran negativos en la película de sangre se consideraron curados. Las actividades profilácticas de X, Y y el racemato contra *P. berghei* en ratones se muestran en la Tabla 5.

Ensayo anti-Pneumocystis carinii (infección por Pneumocystis carinii inducida en ratones)

Este ensayo se diseña para evaluar la eficacia de compuestos de ensayo para el tratamiento de neumonía por *Pneumocystis carinii* en animales inmunosuprimidos.

Se utilizaron ratones con virus y exentos de *Pneumocystis carinii*. Los animales recibieron comida estándar que contenía 23% de proteína, y recibieron también tetraciclina (0,5 mg/ml) en el agua de bebida.

Los animales se inmunosuprimieron con dexametasona a razón de 1,2 mg/kg o 4,8 mg/kg en agua de bebida y se inoculó a los animales transtraquealmente de 7-14 días con *P. carinii* y se siguió con agentes inmunosupresores. Para inoculación transtraqueal, se anestesió intramuscularmente a los animales con 0,02 ml de un cóctel de cetamina que contenía hidrocloreto de cetamina (80,0 mg/ml), atropina (0,38 mg/ml) y acepromazina (1,76 mg/ml), y se hizo una incisión de aproximadamente 1 cm sobre la tráquea, que se expuso después por disección directa. El inóculo de 10^6 organismos en 0,05 ml y 0,4 ml de aire se inyectó secuencialmente. La herida se cerró con una pinza simple. Se siguió en los animales con agentes inmunosupresores. A las 3 semanas post-inoculación, se inició el tratamiento y se continuó durante tres semanas. Los compuestos X e Y se ensayaron con 4 niveles de dosis, 5, 1, 0,5 y 0,25 miligramos por kilogramo de peso corporal y por día. Se ensayó un racemato, que es una mezcla de cantidades iguales de cada enantiómero X e Y, con niveles de dosis de 1,3 y 0,25 mg/kg/día. Un grupo de animales sin tratar sirvió como testigo y un grupo de animales tratados con trimetoprim (TMP)/sulfametoxazol (SMX) (50/250 mg/kg/día) sirvió como testigo de tratamiento positivo. Al final de las tres semanas de terapia, se anestesiaron los animales y se desangraron por pinchazo cardíaco. Se separaron los pulmones y se usaron porciones representativas para hacer frotis de impresión. Se evaluó la presencia de *P. carinii* en cuatro frotis de impresión, fijados en metanol, coloreando con Giemsa y nitrato de plata modificado con metanamina. Se cegaron platinas y examinaron microscópicamente por tres examinadores que las puntuaron según la siguiente base: más de 100 organismos por campo x1.000, 5+; 11-100 organismos por campo, 4+; 1-10 por campo, 3+; 2-9 en diez campos, 2+; 1 en diez o más campos, 1+; sin organismo en 50 campos, 0. Se determinaron separadamente medias de estas puntuaciones para los frotis de impresión coloreados con Giemsa y coloreados con plata. Las coloraciones con Giemsa revelaron formas de trofozoitos y formas de quistes vivos. Las coloraciones con plata revelaron formas de quistes vivos y muertos. Por esta razón, las coloraciones con Giemsa proporcionan resultados más fiables y los datos de coloraciones con plata se usaron para confirmar las conclusiones. La actividad anti-neumonía por *Pneumocystis carinii* de X, Y y el racemato contra *Pneumocystis* en ratones se muestra en la Tabla 12.

*Actividad biológica**Datos de ensayo de actividad antimalaria*

TABLA 11

Actividad antimalaria supresiva de X, Y y racemato contra *P. berghei* en ratones

Compuesto	mg/kg/día	mg/kg total	días de Δ MST	Ratones vivos el día 26	Parasitemia el día 6
X	4	12	11	0/5	1,1
	1	3	6	0/5	27,4
	0,25	0,75	0	0/5	28,2
Y	4	12		5/5	0,0
	1	3	13,6	4/5	0,0
	0,25	0,75	11,6	0/0	0,2
Racemato	1	3	10,2	0/5	0,1
	0,25	0,75	11,6	0/5	4,8
Testigo	0	0	0	0/5	31,8

Δ MST = aumento del tiempo de supervivencia medio sobre el testigo

TABLA 12

Actividad anti-*Pneumocystis carinii* oral de X, Y y racemato en ratones

Compuesto	Dosis: mg/kg/día (x21)	<u>Coloración Giemsa</u>		<u>Coloración plata</u>	
		<u>Puntuación I/T</u>		<u>Puntuación I/T</u>	
X	5	0/10	0,0	0/10	0,0
Y	5	0/10	0,0	0/10	0,0
Racemato	1,3	0/10	0,0	0/10	0,0
X	1	0/10	0,0	0/10	0,0
Y	1	0/10	0,0	0/10	0,0
X	0,5	2/10	0,20±0,10	2/10	0,1±0,1
Y	0,5				
X	0,25	4/10	0,55±0,16	9/10	1,15±0,16
Y	0,25	0/10	0,0	0/10	0,0
Racemato	0,25	2/10		—	
TMP/SMX	50/250	1/10	0,03±0,02	0/10	0,0
Testigo		10/10	4,43±0,12	10/10	3,80±0,08

I/T = Número de animales con organismo después del tratamiento/Número de animales tratados

Datos de ensayo anti-Pneumocystis carinii

Salvo definición en contrario, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención.

REIVINDICACIONES

5 1. Una (-)-8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina enantiómeramente pura.

2. El uso de una (-)-8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina enantiómeramente pura para la preparación de una composición farmacéutica.

10 3. El uso de una (-)-8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina enantiómeramente pura para la preparación de una composición farmacéutica para prevención o tratamiento de neumonía por *Pneumocystis carinii*, toxoplasmosis, malaria, leishmaniasis o tripanosomiasis.

15 4. El uso según las reivindicaciones 2ª o 3ª para la preparación de una composición que comprende además un excipiente aceptable farmacéuticamente.

5. Una composición que comprende (-)-8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-5-(3,4-diclorofenoxi)-6-metoxi-4-metilquinolina enantiómeramente pura.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65