



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 304 220**

⑫ Número de solicitud: 200700645

⑬ Int. Cl.:
C07C 205/04 (2006.01)
C07C 305/18 (2006.01)
C07C 57/42 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **02.03.2007**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2008**

Fecha de la concesión: **29.07.2009**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **11.09.2009**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
11.09.2009

⑲ Titular/es: **Universidad de Zaragoza**
c/ Baltasar Gracián, 1 – Entlo.
50005 Zaragoza, ES

⑳ Inventor/es: **Sancho Sanz, Javier;**
Velázquez Campoy, Adrián y
Cremades Casasín, Nunilo

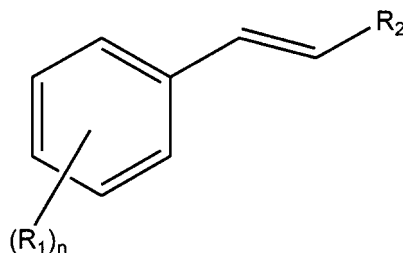
㉑ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉒ Título: **Composición para el tratamiento de enfermedades infecciosas.**

㉓ Resumen:

Composición para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Compuesto de fórmula general (I), o cualquiera de sus sales, para su uso como composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades infecciosas, más particularmente para el tratamiento de enfermedades causadas por *Helicobacter*. R_1 es un átomo de H, X ó un radical CX_mH_{3-m} ; X representa un halógeno seleccionado de entre F, Cl, Br ó I, y pueden ser igual o diferente, m toma valores de entre 1 a 3; R_2 es un grupo NO_2 , $COOR'$ ó SO_3R' ; R' representa un átomo de hidrógeno (H) ó un grupo C_1-C_6 alquilo; y n de entre 1 a 5.



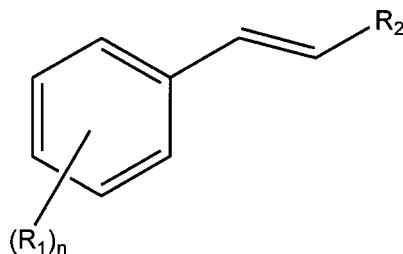
ES 2 304 220 B1

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

DESCRIPCIÓN

Composición para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

La presente invención se refiere a un compuesto, capaz de inhibir la flavodoxina, de fórmula general (I) para su uso como composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades infecciosas, más concretamente de aquellas causadas por *Helicobacter*.



(I)

Antecedentes de la invención

La infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una de las enfermedades crónicas más frecuentes en la actualidad; de hecho, esta bacteria se encuentra colonizando la mucosa gástrica de más del 50% de la población humana.

H. pylori es un bacilo gram-negativo que causa gastritis crónica, úlceras gástricas y duodenales y es factor de riesgo en el desarrollo de linfoma MALT y adenocarcinoma (uno de los tipos de cáncer más frecuente y letal).

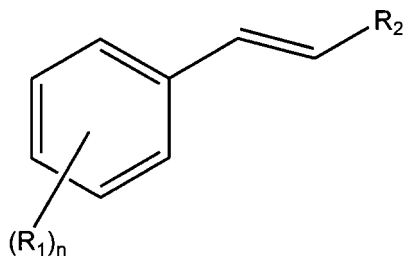
El tratamiento convencional utilizado actualmente para erradicar la infección por *Helicobacter pylori* consiste en dos antibióticos de amplio espectro y un inhibidor de la bomba de protones. Por tanto, no hay un tratamiento específico para esta afección ni especialmente efectivo ya que el número de pacientes tratados con éxito no supera el 80%. Además, su gran variabilidad mutacional está produciendo un declive de la eficacia de los tratamientos convencionales debido a un aumento creciente de resistencias a antibióticos convencionales.

Explicación de la invención

En la presente invención se describen nuevos compuestos para su uso como composiciones farmacéuticas. Además del uso de estas composiciones para el tratamiento de enfermedades infecciosas, y más concretamente enfermedades causadas por *H. pylori*.

Entendiendo por “composición farmacéutica” a un medicamento.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a unos compuestos (en adelante “compuestos de la invención”) cuya fórmula general es (I), o cualquiera de sus sales, para su uso como composición farmacéutica:



(I)

R_1 y n se definen a continuación:

R_1 es un átomo de hidrógeno (H), halógeno (X) ó un radical de tipo CX_mH_{3-m} ; donde, X es un halógeno que puede ser seleccionado de entre flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br) ó yodo (I), preferiblemente X es F ó Cl, y más preferiblemente X es F.

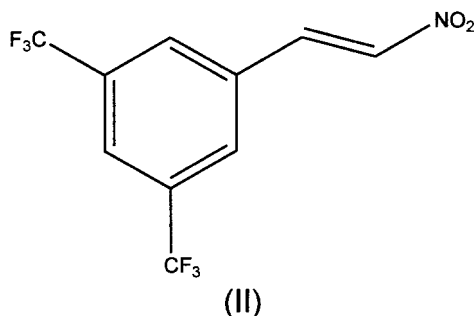
m indica el número de átomos de halógenos posibles, y toma los valores de entre 1 a 3. Cuando m es 2 ó 3, X pueden ser átomos de halógenos iguales o diferentes, y se seleccionan del grupo anteriormente citado. Preferiblemente m es 3, es decir un trihalogenuro (CX_3) y más preferentemente un CF_3 .

n indica el número de sustituyentes del anillo aromático, y toma valores de 1 a 5, preferentemente 1, 2 ó 3. Más preferentemente n es 2.

R₂ es un grupo seleccionado de entre los radicales NO₂, COOR' ó SO₃R', donde R' es un átomo de hidrógeno (H) ó un grupo C₁-C₆ alquilo. Preferiblemente R₂ se trata de un grupo NO₂, COOH ó SO₃H; más preferentemente NO₂.

El grupo C₁-C₆ alquilo puede ser lineal ó ramificado, preferiblemente se trata de un C₁-C₄ alquilo, como por ejemplo, pero sin limitarse, un grupo metilo, etilo, propilo, iso-propilo, ter-butilo y más preferiblemente un alquilo no sustituido.

En una realización preferida, el compuesto de la invención tiene la siguiente fórmula (II):



Otro aspecto de la presente invención, comprende el uso de los compuestos de fórmula general (I) para la elaboración de una composición farmacéutica. Esta composición se usa para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Algunas enfermedades infecciosas son causas por bacterias de tipo gram negativo, como es el caso de la bacteria *Helicobacter*.

Una diana terapéutica efectiva para el tratamiento de este tipo de enfermedades concretas es la flavodoxina, que es una proteína redox, de estructura α/β , cuya función es la transferencia de electrones en diversas rutas metabólicas. En *Helicobacter pylori* acepta electrones de la enzima piruvato flavodoxina oxidoreductasa (PFOR) en la ruta de descarboxilación oxidativa del piruvato, para convertir el piruvato en acetyl-CoA. Para realizar su función de mediador electrónico, la flavodoxina porta una molécula de flavin mononucleótido (FMN) unida de forma no covalente. Pese a su parecido estructural con flavodoxinas de otras especies, la de *H. pylori* presenta una diferencia muy significativa en el sitio de unión de FMN, donde un residuo de alanina reemplaza al residuo de triptófano característico de las demás flavodoxinas. Por esta razón presenta una hendidura adyacente al sitio de unión del cofactor que constituye un sitio adecuado para la unión de moléculas potencialmente inhibitorias de su actividad biológica, bien porque alteren el potencial redox del FMN impidiendo la transferencia de electrones a PFOR, o bien sencillamente porque bloquee el acoplamiento de las dos proteínas. El bloqueo de la ruta de oxidación de piruvato determina la muerte de la bacteria.

La flavodoxina, es por tanto, esencial para la supervivencia de la bacteria y está ausente en humanos y, como se describió anteriormente, constituye una diana, terapéutica apropiada para la erradicación de las enfermedades relacionadas con la infección.

Se demuestra (ver ejemplos), que los compuestos de la invención inhiben completamente, en el rango micromolar, esta bacteria *H. pylori*, mediante la oxidación de piruvato en la que interviene la flavodoxina de *H. pylori*.

Por lo tanto, una realización preferida de la presente invención, comprende el uso de los compuestos de fórmula general (I), para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias del género *Helicobacter*, preferentemente de la especie *Helicobacter pylori*.

Estos compuestos pueden, por tanto, ser utilizados para la elaboración de un medicamento ó composición farmacéutica para el tratamiento de estas enfermedades. La composición farmacéutica además de dichos compuestos, puede comprender excipientes, aditivos, etc., farmacéuticamente aceptables.

Por tanto, estos compuestos capaces de inhibir la flavodoxina, constituyen una muy buena alternativa para el tratamiento de enfermedades infecciosas, particularmente las causadas por *Helicobacter*, más concretamente por *H. Pylori*.

El uso de los compuestos con fórmula general (I), descritos en la presente invención, suplirían la ausencia de tratamiento específico contra este patógeno al tratarse de compuestos inhibidores específicos de la proteína flavodoxina. Por otro lado, la ausencia de una proteína homóloga en humanos hace que estos inhibidores representen una terapia molecular específica con nula o baja tasa de efectos secundarios en el organismo huésped.

Las enfermedades infecciosas causadas por *Helicobacter pylori* están relacionadas con patologías gastrointestinales como pueden ser, gastritis crónica, úlceras gástricas y/o duodenales, linfoma o cáncer gástrico. Por lo tanto, una realización aún más preferida, comprende el uso de los compuestos de la invención para el tratamiento de enfermedades infecciosas tales como gastritis crónica, úlceras gástricas y/o duodenales, linfoma o cáncer gástrico.

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 y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de la figura

Fig. 1.- Muestra una gráfica de comparación de curvas de formación de producto en la reacción esencial de *H. pylori* en presencia o ausencia del compuesto de fórmula (II) a una concentración de 50 μ M. Muestra la absorbancia (A) (a.u. es unidad de absorbancia) a 340 nm frente al tiempo (t) en segundo (s).

Ejemplos

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

Ejemplo 1

Clonaje del gen de la flavodoxina recombinante

El ADN genómico de *H. pylori* se aisló de muestras de pacientes antígeno-positivos usando el kit *Q/Aamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen).

La secuencia de ADN que codificó para la flavodoxina fue amplificado por PCR usando el cebador Nco (SEQ ID No.1) y el cebador BamHI (SEQ ID No. 2) y Taq DNA polimerasa (Madgen).

Tras la amplificación se detectaron fragmentos de unos 600 nucleótidos, correspondientes al fragmento del gen de la flavodoxina (613 nucleótidos).

Los fragmentos fueron purificados y clonados en los sitios NcoI-BamHI del vector de expresión pET28a (Novagen) usando técnicas estándar. La inserción del gen, así como su direccionalidad e integridad fueron comprobadas por secuenciación del ADN del plásmido a partir del promotor de fago T7.

Ejemplo 2

Expresión y purificación de flavodoxina de H. pylori recombinante

Se transformaron células de *E. coli* BL21 competentes con el plásmido pET28a que contiene el inserto y se cultivó en 10 ml de medio Luria-Bertani en presencia de kanamicina (30 μ gr/ml) a 37°C.

El cultivo fue diluido 10 veces en las mismas condiciones y dejado crecer hasta que la densidad óptica fue de 0.8 a 600 nm. Se indujo entonces con IPTG (concentración final de 1 mM) y se dejaron crecer las células 3-4 horas.

Tras este tiempo, se centrifugó el cultivo para obtener las células las cuales fueron limpiadas con 0.15 M de NaCl.

Después de la centrifugación se resuspendieron las células con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8, 1 mM β -mercaptoetanol, 1 mM EDTA y 1 mM PMSF.

La ruptura celular se llevó a cabo con ciclos de ultrasonidos y los restos celulares se eliminaron por centrifugación (45 min a 18000 rpm a 4°C).

El extracto crudo obtenido se precipitó al 65% de la concentración de saturación de sulfato amónico y se centrifugó. El sobrenadante se cargó en una columna de celulosa DEAE DE-52 equilibrada con Tris-HCl 50 mM, pH 8, al 65% de sulfato amónico.

La proteína eluyó con un gradiente reverso de 65 a 0% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de saturación.

Tras la diálisis de la proteína con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8, se cargó en otra columna de celulosa DEAE DE-52 equilibrada en el mismo tampón.

ES 2 304 220 B1

La proteína fue eluída a través de un gradiente de 0 a 1 M de NaCl. La proteína se obtiene pura tras esta columna, aunque para separar la forma apo (sin cofactor) y la forma holo (con cofactor) de la proteína es necesario pasar la muestra por una columna MonoQ-10 en un sistema FPLC.

5 La proteína se guardó a -20°C.

Ejemplo 3

10 Ensayos de inhibición

La flavodoxina es una proteína esencial para la supervivencia de *Helicobacter pylori* ya que participa en una reacción fundamental de obtención de energía a partir de la descarboxilación oxidativa del piruvato. En esa reacción, la flavodoxina transfiere electrones entre la enzima PFOR y la enzima FqrB, la cual los cede al NADP⁺.

15 En el siguiente ejemplo se utilizaron el cDNA correspondiente al gen de la enzima PFOR insertado en el vector pBS(KS), así como el del gen de la enzima FqrB insertado en el vector pET29b.

20 Ambas enzimas recombinantes son expresadas como fracción soluble, PFOR en células competentes JVQ2 de *E. coli* que son deficientes en reductasas (*nfsA* y *nfsB*) y FqrB en células competentes BL21 (DE3).

Las células crecen en medio LB a 37°C y seleccionadas por su resistencia a ampicilina en el caso de JVQ2 y kanamicina en el caso de BL21.

25 Posteriormente se inducen con IPTG y tras 3 horas de inducción (la densidad óptica es en torno a 0.8), son guardadas a -80°C.

30 La enzima FqrB es expresada con una cola de 6 histidinas en el N-terminal de la secuencia de aminoácidos para ser purificada a través de una cromatografía de afinidad por níquel. Así, las células son resuspendidas en el tampón de rotura (fosfato sódico 50 mM, 300 mM NaCl, pH 8 con 10 mM de imidazol) y fracturadas a través de ciclos de ultrasonidos de 10 segundos, descansando 1 minuto entre cada ciclo.

35 Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 10.000 rpm 30 min a 4°C y el sobrenadante se cargó en una columna de afinidad por níquel (Ni-NTA agarosa, Qiagen) que fue previamente equilibrada con tampón de rotura. Se realizan tres lavados con 20, 40 y 60 mM de imidazol para eliminar interacciones inespecíficas de la matriz con otras proteínas y la enzima FqrB es eluída de la columna con un gradiente de 250 mM de imidazol.

40 Por último, la enzima se dializó en el tampón de almacenamiento PBS con 10% de glicerol. Para los ensayos enzimáticos la cola de histidina no se eliminó ya que se vio que no influye.

La enzima PFOR se inactivó por su exposición al aire (se inactiva por el oxígeno), así que su purificación se realizó en un sistema donde se había pasado previamente un flujo de nitrógeno y las conexiones estaban herméticamente selladas.

45 Las células son resuspendidas en 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 con 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT y 10% glicerol, sonicadas mediante ciclos de ultrasonidos de 10 segundos descansando 1 minuto entre ciclos y centrifugadas a 8.000 rpm, 10 min a 4°C para eliminar los restos celulares. Posteriormente se realiza una centrifugación a mayor velocidad (2 h a 24.000 rpm) y se determina la concentración de proteína mediante la técnica de Bradford.

50 Se diluyó el extracto crudo con el tampón anterior hasta quedar 25 mg de proteína por ml. La proteína fue parcialmente purificada mediante una columna de DEAE DE-52 con un gradiente 0-0.5 M de cloruro sódico. Las fracciones que contenían la enzima se localizaron mediante un ensayo rápido en aerobiosis que consiste en que a fracciones de 50-100 µl de muestra se le añade 25 µl de tampón de reacción (500 mM piruvato, 10 mM CoA y 100 mM benzil viologeno) y las fracciones que contienen la enzima cambian el color de transparente a azul.

55 Posteriormente, las fracciones que contienen la enzima se dializaron en el tampón de almacenamiento (el mismo que se utiliza para resuspender las células). Posteriores pasos de purificación bajaron el rendimiento considerablemente y, ya que para los ensayos enzimáticos se vio que la actividad específica de la enzima no se ve alterada por las impurezas, para estos ensayos la enzima fue parcialmente purificada como se ha explicado.

60 La reacción secuencial de transferencia de electrones entre piruvato, PFOR, flavodoxina, FqrB y NADP⁺ (ensayo de actividad) se siguió espectroscópicamente mediante la aparición de señal a 340 nm al formarse NADPH. La mezcla de reacción contenía 100 mM fosfato potásico pH 7, 10 mM piruvato, 0.18 mM CoA, 1 mM MgCl₂, 0.3 mM NADP⁺, 0.09 mg/ml PFOR, 10 µM Fld y 0.15 µM FqrB. La mezcla, excepto el CoA, se colocó en una cubeta especialmente diseñada para anaerobiosis. Así, la eliminación de oxígeno se consiguió mediante ciclos de 5 minutos con flujo de vacío y argón alternativamente. La reacción se inició mediante la adición de 0.18 mM de coenzima A (CoA) que se encontraba en un compartimento a parte dentro de la misma cubeta. La reacción se finalizó a los 15 minutos de añadir el reactivo CoA y la ausencia de alguno de los componentes de la reacción dio lugar a la ausencia de formación de

NADPH, indicando que todos los componentes eran esenciales e insustituibles para la transferencia de electrones entre piruvato y NADP⁺.

Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo en las mismas condiciones que los ensayos de actividad anteriormente descritos añadiendo además en la cubeta de reacción 50 μM del compuesto de fórmula general (II) de la presente invención.

Tal y como se demuestra en la Fig. 1 se detectó una inhibición prácticamente total a esta concentración.

Ejemplo 4

Energética de unión de los inhibidores

La unión específica de los inhibidores de la presente invención a la flavodoxina de *H. pylori* fue confirmada mediante calorimetría de titulación isoterma (ITC). Esta técnica no sólo mide la afinidad de cada compuesto por la proteína diana, sino que determina la contribución de las componentes entálpica y entrópica de la unión.

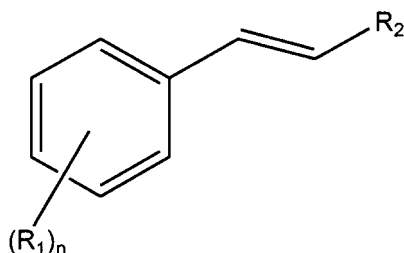
Los experimentos de unión se llevaron a cabo en tampón EPPS 50 mM, pH 9 al 7% DMSO, estando el inhibidor en la jeringa de inyección en concentración 300-500 μM y la proteína, entorno 20 μM , en la celda de medida.

La constante de afinidad de los inhibidores resultó entorno 1 μM , en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición (inhiben completamente, a concentraciones micromolares, la descarboxilación de piruvato).

En particular, el compuesto de fórmula general II presenta una afinidad por la flavodoxina de 8.0 ($\pm$ 2.0) μM .

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I), o cualquiera de sus sales, para su uso como composición farmacéutica,



(I)

donde:

R_1 es un átomo de H, X ó un radical CX_mH_{3-m} ; X representa un halógeno seleccionado de entre F, Cl, Br ó I, y pueden ser igual o diferente, m toma valores de entre 1 a 3;

R_2 es un grupo NO_2 , $COOR'$ ó SO_3R' ; R' representa un átomo de hidrógeno (H) ó un grupo C_1-C_6 alquilo;

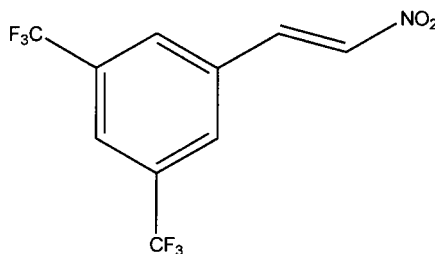
y
n de entre 1 a 5.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde n toma valores de 1 a 3, R_1 es un radical CX_mH_{3-m} donde X es F ó Cl y R_2 es un grupo NO_2 , $COOH$ ó SO_3H .

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde n es 2, m es 3 y R_2 es NO_2 .

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde X es F.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, de fórmula (II):



(II)

6. Composición farmacéutica que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, donde las enfermedades infecciosas son causadas por *Helicobacter*.

8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, donde las enfermedades infecciosas causadas por *Helicobacter pylori*.

9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde las enfermedades infecciosas son gastritis, úlcera gastroduodenal, linfoma o cáncer gástrico.

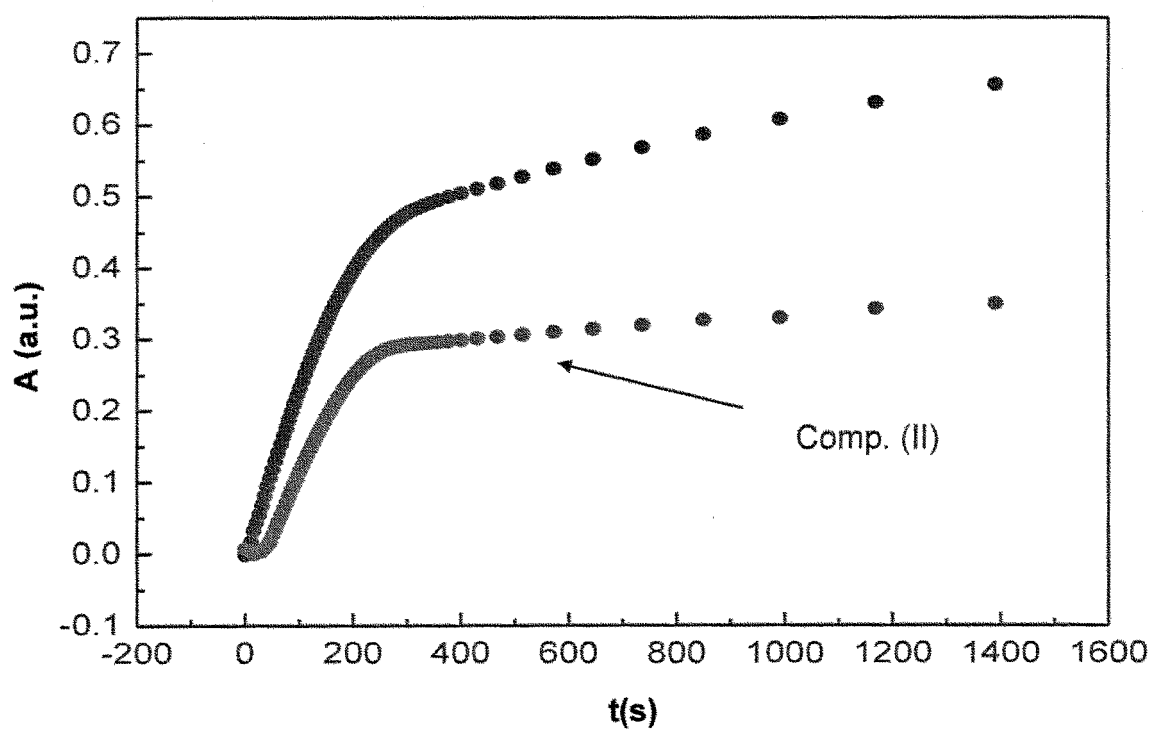


Fig. 1

ES 2 304 220 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Zaragoza

5 <120> COMPOSICIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

<130> ES1513.9.2

10 <160> 2

<170> PatentIn version 3.4

15 <210> 1

<211> 25

<212> DNA

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (1)..(25)

<223> Cebador Nco-

<400> 1

30 ggattgagca tatgggaaaa attgg

25

<210> 2

35 <211> 25

<212> DNA

<213> secuencia artificial

40 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(25)

45 <223> Cebador BamHI

<400> 2

50 gatcttaacc taggaagtaa caatc

25

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 304 220

⑫ Nº de solicitud: 200700645

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **02.03.2007**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 8803147 A1 (WARNER LAMBERT COMPANY) 05.05.1988, página 2, líneas 7-10; página 8, fórmula IV.	1-5
X	WO 0035856 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 22.06.2000, página 4, líneas 1,2; página 12, fórmula 6.	1-5

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

10.06.2008

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C 205/04 (2006.01)

C07C 305/18 (2006.01)

C07C 57/42 (2006.01)