



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 326 115**

(51) Int. Cl.:  
**C07D 215/48** (2006.01)  
**A61K 31/47** (2006.01)  
**A61P 31/18** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02795314 .0**  
(96) Fecha de presentación : **14.10.2002**  
(97) Número de publicación de la solicitud: **1461319**  
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2004**

(54) Título: **Derivados de la quinoleína, procedimiento de síntesis, y medicamentos que contienen estos derivados.**

(30) Prioridad: **12.10.2001 FR 01 13209**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.10.2009**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.10.2009**

(73) Titular/es: **BioAlliance Pharma**  
**49, boulevard du Général Martial Valin**  
**75015 Paris, FR**  
**Université Paris-Sud (Paris XI),**  
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA**  
**RECHERCHE MEDICALE (INSERM),**  
**Institut Gustave Roussy y**  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE (CNRS)**

(72) Inventor/es: **D'Angelo, Jean;**  
**Bayle, Marie;**  
**Benard, Christophe;**  
**Desma Le, Didier;**  
**Danet, Michèle;**  
**Janson, Laurence;**  
**Le Bret, Marc;**  
**Leh, Hervé;**  
**Mouscadet, Jean-François;**  
**Subra, Frédéric y**  
**Zouhiri, Fatima**

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Derivados de la quinoleína, procedimiento de síntesis, y medicamentos que contienen estos derivados.

La invención tiene por objeto los derivados de quinoleína que poseen particularmente propiedades inhibitoras de las integrasas de los retrovirus. Incluye igualmente un procedimiento de síntesis de estos derivados, y los medicamentos que los contienen en su principio activo.

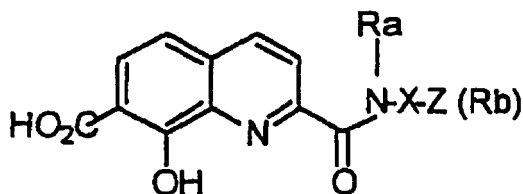
En la solicitud WO 98/45269 a nombre del CNRS, se describen derivados de la quinoleína que poseen propiedades inhibitoras de la integrasa del VIH-1. Al continuar los trabajos sobre este tipo de compuestos, de forma inesperada, ha aparecido ahora que, al elaborar derivados de la quinoleína que comprendan a la vez un grupo identificado como farmacóforo, en las posiciones 7 y 8 de la quinoleína, y un brazo espaciador amida, o derivado de amida, entre la quinoleína y un grupo sustituyente del ciclo de la quinoleína, era posible disponer de una nueva familia fuertemente inhibidora de las integrasas retrovirales.

Por tanto, la invención tiene por objeto proporcionar nuevos derivados de la quinoleína dotados particularmente de propiedades antiintegrasas de retrovirus.

Igualmente, tiene por objeto un procedimiento de síntesis de estos derivados.

Según aún otro aspecto, la invención incluye igualmente composiciones farmacéuticas que comprenden estos derivados.

Los derivados de quinoleína según la invención se caracterizan en que corresponden a la Fórmula I



(I)

en la cual

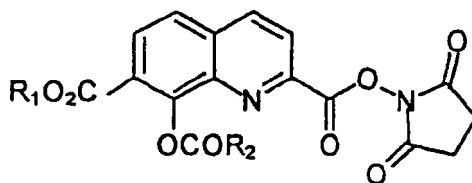
- X representa una cadena alquílica  $-(CH_2)_n-$  en la cual n es igual a 0, 1 ó 2, O, ó N,
- Z representa un anillo aromático, que puede incluir heteroátomos, seleccionados de entre O, N ó S, en sustitución de los átomos de carbono que forma en mencionado anillo aromático, pudiendo estar sustituido el ciclo por Rb,
- Rb representa de 1 a 3 sustituyentes idénticos o diferentes, escogidos de entre los grupos -OH, -OR, -COOH, -COOR, -COH, -COR, -NH<sub>2</sub>, -NH(R), -NH(R,R'), -SH y -SR y CN,
- Ra representa un átomo de hidrógeno o un grupo  $-(CH_2)_{n'}-Y$ , para el cual n' es igual a 0, 1, 2 ó 3, e Y representa -CH<sub>3</sub>, -COOH, -COOR, -CN, -OH, -OR, SR, o un grupo arilo eventualmente sustituido por R
- R y R', idénticos o diferentes, representan una cadena alquílica lineal o ramificada, de 1 a 4 átomos de carbono, y
- sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los derivados preferidos son las 7-carboxi-8-hidroxiquinoleínas, y sus sales farmacéuticamente aceptables, escogidas de entre el ácido 2-(3,4-dihidroxibencilcarbamoil)-8-hidroxiquinoleín-7-carboxílico, el ácido 2-(2,4-dihidroxibencilcarbamoil)-8-hidroxi-quinoleín-7-carboxílico, el ácido 2-(2,3,4-trihidroxibencilcarbamoil)-8-hidroxi-quinoleín-7-carboxílico, y sus sales sódicas.

La invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de síntesis de los derivados definidos más arriba.

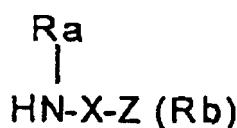
## ES 2 326 115 T3

Este procedimiento se caracteriza por comprender la reacción de un quinoleincaboxilato de succinimidilo de la Fórmula II



II

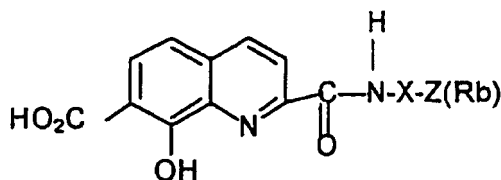
en la cual R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, idénticos o diferentes, representan radicales alquílicos de 1 a 4 C, con una amina de la Fórmula III



III

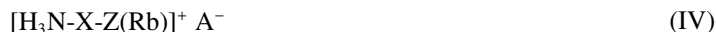
si es necesario en forma de sal, seguida por una saponificación y, si es necesario, por una acidificación.

En un modo de realización de la invención, para preparar derivados de la Fórmula IA con un brazo espaciador amida,



(IA)

en la cual Rb y Z son tal como se han definido más arriba, y X representa un grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- como se ha definido más arriba, se hace reaccionar un quinoleincaboxilato de succinimidilo de la Fórmula II con una sal de amina de la Fórmula IV siguiente:



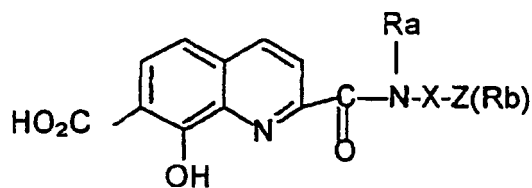
en la cual Z y Rb son tal como se han definido más arriba, X = -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- como se ha definido más arriba, y A<sup>-</sup> es un anión de sal orgánica, o un haluro.

La condensación del quinoleincaboxilato de succinimidilo de la Fórmula I sobre la sal de amina se efectúa en piridina a temperatura ambiente. Al trabajar a aproximadamente 20°C, el tiempo de reacción es del orden de 10 a 15 horas.

La sal de amina es en concreto un para-toluensulfonato.

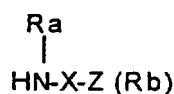
La amida IA se obtiene a continuación mediante saponificación, seguida por una acidificación. La saponificación se realiza, por ejemplo, con una solución de sosa 3 N. Esta reacción puede llevarse a cabo en metanol a temperatura ambiente, durante aproximadamente de 2 a 4 horas, particularmente 2 horas. Para la acidificación, se recurre en concreto al ácido sulfúrico diluido.

En otro modo de realización de la invención, para preparar derivados de la Fórmula IB con un brazo espaciador amida sustituido,



(IB)

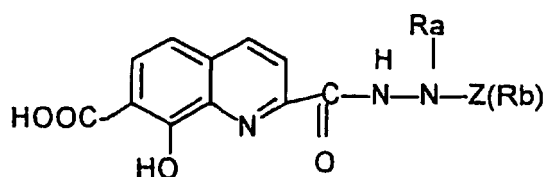
en el cual Rb y Z son tal como se han definido más arriba, y X representa un grupo  $-(CH_2)_n-$  como se ha definido más arriba, se hace reaccionar un quinoleincaboxilato de succinimidilo de la Fórmula II con una amina de la Fórmula V siguiente o su sal orgánica:



(V)

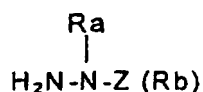
Esta reacción va seguida a continuación por una saponificación.

En otro modo de realización de la invención, para preparar derivados de la Fórmula IC con un brazo espaciador hidrazida,



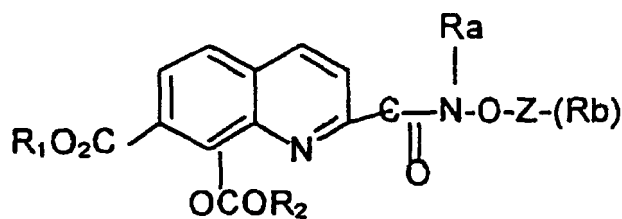
(IC)

en la cual los diferentes sustituyentes son tal como se han definido más arriba, se hace reaccionar el quinoleincaboxilato de succinimidilo de la Fórmula II con la hidrazina de la Fórmula VI siguiente:



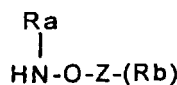
(VI)

En aún otro modo de realización de la invención, para preparar derivados de la Fórmula ID con un brazo espaciador hidrazida,



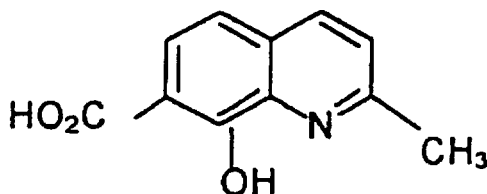
(ID)

en la cual los diferentes sustituyentes son tal como se han definido más arriba, se hace reaccionar el quinoleincaboxilato de succinimidilo de la Fórmula II con la hidroxilamina de la Fórmula VII siguiente:



(VII)

De forma ventajosa, los derivados protegidos del quinoleincaboxilato de succinimidilo de la Fórmula II se obtienen a partir del ácido 8-hidroxi-7-quinaldina carboxílico de la Fórmula VIII:



(VIII)

La protección de los grupos  $\text{-COOH}$  y  $\text{-OH}$  se efectúa con ayuda de derivados capaces de introducir grupos protectores específicos con respecto a las funciones afectadas, y que pueden a continuación cortarse selectivamente sin alterar el resto de la molécula.

Por ejemplo, se procederá en primer lugar a la esterificación del grupo  $\text{-COOH}$ , a continuación a la del grupo  $\text{-OH}$ .

De este modo se obtienen resultados satisfactorios al someter el hidroxilácido de la Fórmula VIII a la acción de un alcohol alifático, como el metanol o el butanol, en presencia de ácido fosfórico, luego en presencia de un halogenuro de acilo, especialmente de un cloruro de acilo, como el cloruro de pivaloilo, en presencia de piridina.

La primera reacción de esterificación se realiza a una temperatura del orden de  $100^{\circ}\text{C}$ , durante aproximadamente de 50 a 80 horas, especialmente durante aproximadamente 70 horas.

El tratamiento del éster obtenido con un halogenuro de acilo se efectúa a temperatura ambiente en presencia de piridina, durante aproximadamente de 30 minutos a 2 horas, y especialmente durante 1 hora.

A continuación se procede a la oxidación en dos etapas del derivado diéster obtenido. A lo largo de la primera etapa, se oxida el grupo  $\text{-CH}_3$  en C-2 de la quinoleína a un grupo  $\text{-COH}$ , mediante tratamiento con un agente de oxidación de grupos  $\text{-CH}_3$ , tal como el óxido de selenio. Se trabaja ventajosamente con reflujo de un solvente tal como el dioxano, durante aproximadamente de 10 a 15 horas, especialmente 12 horas, con objeto de obtener el aldehído correspondiente. Durante el curso de una segunda etapa, este aldehído se oxida a su vez a ácido. Los agentes de oxidación apropiados comprenden el clorito sódico. Al trabajar en una mezcla agua/solvente orgánico, como el t-butanol, en presencia de dihidrogenofosfato de sodio y de 2-metil-2-butenol, se obtiene el ácido correspondiente con un rendimiento satisfactorio.

Para preparar el quinoleincaboxilato de succinimidilo de la Fórmula II, se procede a la activación del grupo  $\text{-COOH}$  con la ayuda de N-hidroxi-succinimida. La condensación del ácido con la N-hidroxi-succinimida se realiza de forma ventajosa en presencia de dicitlohexilcarbodiimida. Al trabajar a temperatura ambiente, del orden de  $20^{\circ}\text{C}$ , la reacción dura aproximadamente de 10 a 15 horas, especialmente 12 horas.

El estudio de las propiedades de los derivados de la invención ha permitido poner en evidencia su actividad antiviral dirigida en general contra las integrasas retrovirales animales y humanas, y especialmente las del VIH-1, VIH-2, VIS y VSR. La eficacia de estos derivados se han observado a concentraciones submicromolares. De este modo se obtienen  $\text{IC}_{50}$  que no exceden de 1 mM, ventajosamente de 0,5 mM, e incluso de 0,1 mM.

Estos derivados presentan además la ventaja de una gran inocuidad y de una biodisponibilidad satisfactoria del fármaco activo.

Estas propiedades son por tanto explotadas conforme a la invención al utilizar estos derivados como principios activos de medicamentos.

La invención concierne por tanto a composiciones farmacéuticas que se caracterizan por comprender una cantidad eficaz de al menos un derivado tal como los definidos más arriba, en asociación con vehículos farmacéuticamente aceptables.

Estas composiciones se utilizan ventajosamente en combinación con otros medicamentos anti-VIH, en particular medicamentos dotados de un efecto inhibitor con respecto de la transcriptasa inversa y/o de la proteasa.

Las posologías y los modos de administración se adaptarán en función del tratamiento de mono o politerapia utilizado.

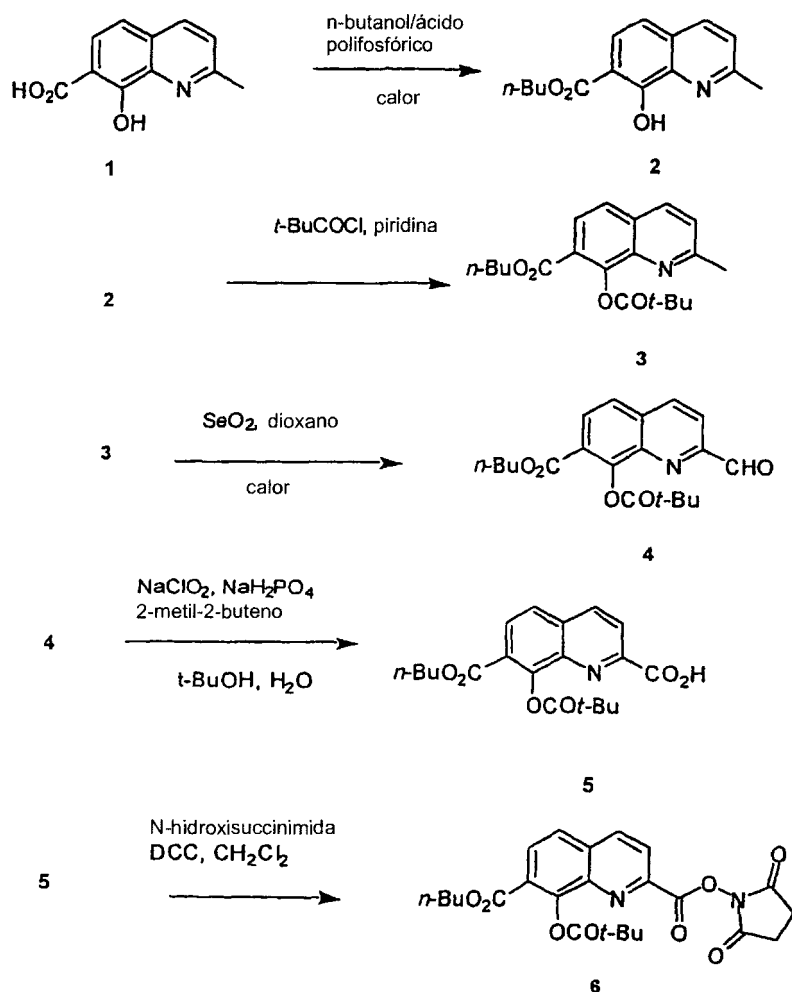
La invención concierne igualmente a la utilización de derivados definidos más arriba, en tanto que reactivos biológicos utilizables en particular en estudios de mecanismos que conciernen la infección vírica.

Otras características y ventajas de la invención se describen en los ejemplos que siguen, relativos a la síntesis de derivados conformes a la invención, y al estudio de sus propiedades antivíricas dirigidas contra las integrasas retrovirales. En estos ejemplos se hace referencia a las Figuras 1 a 3, las cuales muestran respectivamente:

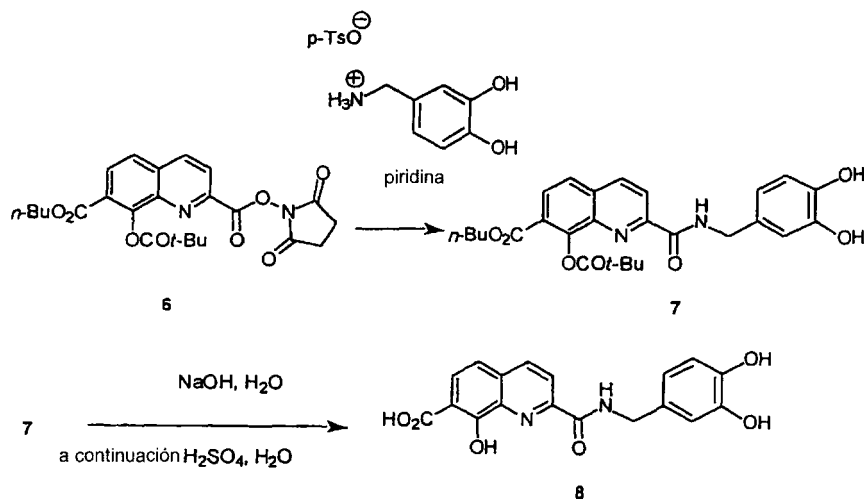
- las Figuras 1A y 1B, la eficacia antiretroviral de los compuestos de la invención,
- las Figuras 2A y 2B, su ausencia de toxicidad sobre las células adherentes y en suspensión, y
- las Figuras 3A y 3B, la inhibición de la totalidad del ADN vírico integrado (Figura 3a) y la detección del ADN vírico total (Figura 3B).

#### I. Síntesis general de las amidas 10, de las hidrazidas 12, y de las alcoxiámidas 14

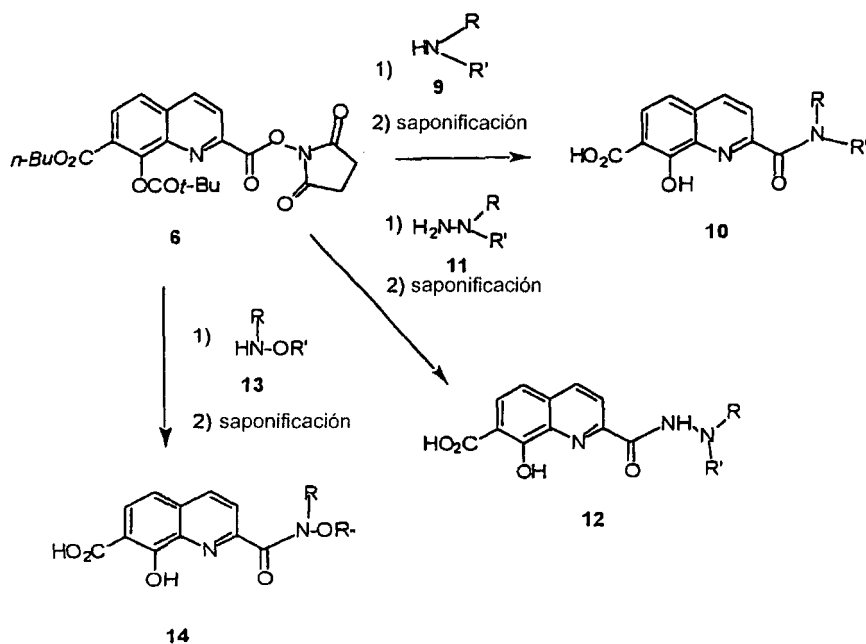
El hidroxiaácido 1 descrito previamente en la literatura<sup>1</sup> se trata a 100°C durante 72 horas con n-butanol, en presencia de ácido polifosfórico<sup>2</sup> para proporcionar el éster butílico 2. Este éster, tratado con cloruro de pivaloilo en piridina durante 1 hora a 20°C da el diéster 3. Éste se oxida por medio de dióxido de selenio con reflujo de dioxano durante 12 horas para rendir el aldehído 4, el cual se oxida en ácido 5 por medio de clorito de sodio en una mezcla agua:tert-butanol durante 12 horas, en presencia de dihidrogenofosfato de sodio y de 2-metil-2-butenol. El quinoleincarboxilato de succinimidilo 6 se prepara condensando el ácido 5 sobre N-hidroxi-succinimida en presencia de dicitclohexilcarbodiimida durante 12 horas a 20°C.



La condensación del quinoleincarboxilato de succinimidilo 6 sobre el p-toluensulfonato de 3,4-dihidroxibencilamina (preparado mediante hidrogenación catalítica de la oxima correspondiente por medio de paladio sobre carbono, en etanol y en presencia de ácido p-toluensulfónico) en piridina, durante 12 horas, a 20°C, proporcionó la amida 7, la cual, mediante saponificación con una solución de soda 3 N en metanol, durante 3 horas a 20°C, y a continuación con acidificación con ácido sulfúrico diluido, proporciona la amida 8.



De manera similar la condensación de 6 con una amina de la fórmula general 9 proporciona las amidas 10. La condensación de 6 con una hidrazina 11 o una hidroxilamina 13 seguida de saponificación, conduce respectivamente a las hidrazidas 12 y a las alcoxiамidas 14.



## II. Descripción de los modos de operación y de los productos

### Síntesis del 2-(3,4-dihidroxibencilcarbamoil)-8-hidroxiquinoleín-7-carboxilato de sodio

#### 1ª etapa

#### Preparación del 8-hidroxi-2-metil-quinoleín-7-carboxilato de n-butilo (2)

Una mezcla de ácido 8-hidroxi-7-quinolindina-carboxílico 1 (12 g, 59 mmol) y de ácido polifosfórico (30 g) en 60 ml de n-butanol se calienta a 100°C durante 72 horas, durante las cuales se añaden regularmente, cada 12 horas, porciones suplementarias de 30 g de ácido polifosfórico y de 30 ml de n-butanol. Después de enfriarla a 20°C, la

## ES 2 326 115 T3

mezcla de reacción se lleva a pH 4 con una solución de hidróxido potásico 6 N, a continuación se añaden 200 ml de diclorometano. Se separan las fases, y la fase acuosa se extrae con diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre sulfato de magnesio, y se concentran bajo presión reducida. El residuo se cromatografía sobre una columna de sílice y se eluyen con una mezcla ciclohexano/acetato de etilo 1/1 para proporcionar 11 g (72%) de 8-hidroxi-2-metil-quinoleín-7-carboxilato de n-butilo 2 en forma de sólido blanco.

F = 50°C

R<sub>f</sub> = 0,63 (acetato de etilo)

IR (puro, cm<sup>-1</sup>) ν: 1650; 2959

RMN <sup>1</sup>H (δ en ppm, CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) 0,90 (t, J=7,4 Hz, 3H); 1,41 (hex, J=7,4 Hz, 2H); 1,70 (quint, J=6,7 Hz, 2H); 2,68 (s, 3H); 4,32 (t, J=6,7 Hz, 2H); 7,09 (d, J=8,7 Hz, 1H); 7,26 (d, J=8,5 Hz, 1H); 7,70 (d, J=8,7 Hz, 1H); 7,86 (d, J=8,5 Hz, 1H) RMN <sup>13</sup>C (δ en ppm, CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz): 13,6; 19,1; 25,3; 30,5; 65,3; 109,3; 117,3; 124,3; 124,6; 130,3; 135,6; 139,0; 158,4; 159,3; 170,4.

Microanálisis: (C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>)

Teoría: C 69,48%; H 6,61%; N 5,40%

Exp.: C 69,33%; H 6,77%; N 5,37%

2ª etapa

*Preparación del 8-(2,2-dimetilpropioniloxi)-2-metil-quinoleín-7-carboxilato de n-butilo (3)*

A una solución del éster precedente 2 (etapa 1) (11,0 g, 42 mmol) en piridina (45 ml), se le adicionan, a 0°C, 10,4 ml (84 mmol) de cloruro de pivaloilo. Transcurrida 1 hora a 20°C, se destila la piridina bajo presión reducida, a continuación se añaden 20 ml de agua y 50 ml de diclorometano. Se separan las fases, y la fase acuosa se extrae con diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre sulfato de magnesio, y se concentran bajo presión reducida. El residuo se cromatografía sobre una columna de sílice y se eluyen con una mezcla ciclohexano/acetato de etilo 2/1 para proporcionar 11,7 g (82%) de 8-(2,2-dimetilpropioniloxi)-2-metil-quinoleín-7-carboxilato de n-butilo 3 en forma de sólido amarillo.

F = 52°C

R<sub>f</sub> = 0,88 (acetato de etilo)

IR (puro, cm<sup>-1</sup>) ν: 1725; 1753;

RMN <sup>1</sup>H (δ en ppm, CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) 0,86 (t, J=7,5 Hz, 3H); 1,36 (hex, J=7,5 Hz, 2H); 1,46 (s, 9H); 1,65 (quint, J=6,8 Hz, 2H); 2,52 (s, 3H); 4,24 (t, J=6,7 Hz, 2H); 7,17 (d, J=8,4 Hz, 1H); 7,48 (d, J=8,4 Hz, 1H); 7,84 (d, J=8,6 Hz, 2H)

Microanálisis: (C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>)

Teoría: C 69,95%; H 7,34%; N 4,08%

Exp.: C 70,04%; H 7,40%; N 3,99%

3ª etapa

*Preparación del 8-(2,2-dimetilpropioniloxi)-2-formil-quinoleín-7-carboxilato de n-butilo (4)*

Una mezcla del diéster precedente 3 (etapa 2) (11,5 g, 34 mmol) y de dióxido de selenio (6,7 g, 60 mmol) en 50 ml de dioxano-1,4 se lleva a reflujo durante 12 horas. Después de enfriarla a 20°C, la mezcla de reacción se filtra sobre Célite® y se concentra bajo presión reducida. El residuo se cromatografía sobre una columna de sílice y se eluye con una mezcla ciclohexano/acetato de etilo 4/1 para proporcionar 8,6 g (71%) de 8-(2,2-dimetilpropioniloxi)-2-formil-quinoleín-7-carboxilato de n-butilo 4. Sólido blanco.

F = 108°C

R<sub>f</sub> = 0,88 (acetato de etilo)

IR (puro, cm<sup>-1</sup>) ν: 1712; 1729; 1752.



## ES 2 326 115 T3

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 200 Mhz) 0,90 (t,  $J=7,3$  Hz, 3H); 1,41 (hex,  $J=7,3$  Hz, 2H); 1,50(s, 9H); 1,72(quint,  $J=6,7$  Hz, 2H); 4,31 (t,  $J=6,7$  Hz, 2H); 7,71 (d,  $J=8,7$  Hz, 1H); 8,00 (d,  $J=8,4$  Hz, 1H); 8,09 (d,  $J=8,7$  Hz, 1H); 8,24 (d,  $J=8,4$  Hz, 1H); 10,05 (s, 1H) RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 50 Mhz) 13,7; 19,2; 27,5; 30,8; 39,5; 65,5; 119,0; 124,4; 124,8; 129,5; 132,7; 137,2; 141,4; 149,5; 152,8; 164,1; 176,5; 192,7.

Microanálisis: ( $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ )

Teoría: C 67,21%; H 6,49%; N 3,92%

Exp.: C 67,05%; H 6,52%; N 3,90%

4ª etapa

*Preparación del ácido 8-(2,2-dimetilpropioniloxi)-7-butoxicarbonil-quinoleín-2-carboxílico (5)*

Una mezcla del aldehído precedente 4 (etapa 3) (3,5 g, 10 mmol) de dihidrogenofosfato de sodio (1,7 g, 12 mmol), de 2-metil-2-butenol (6,1 ml, 57 mmol) y de clorito de sodio (2,6 g, 29 mmol) se agita a 20°C en 160 ml de mezcla ter-butanol/agua 5/1 y 30 ml de diclorometano, durante 12 horas. El medio de reacción se concentra bajo presión reducida. El residuo se cromatografía sobre columna de sílice y se eluye con acetato de etilo para proporcionar 2,4 g (64%) del ácido 8-(2,2-dimetilpropioniloxi)-7-butoxicarbonil-quinoleín-2-carboxílico 5 en forma de cristales blancos.

F = 158°C

Rf = 0,41 (acetato de etilo)

IR (puro,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$ : 1693; 1730; 1753.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) 0,98 (t,  $J=7,2$  Hz, 3H); 1,46 (hex,  $J=7,2$  Hz, 2H); 1,50 (s, 9H); 1,78 (quint,  $J=6,8$  Hz, 2H); 4,35 (t,  $J=6,8$  Hz, 2H); 7,79 (d,  $J=8,7$  Hz, 1H); 8,13 (d,  $J=8,7$  Hz, 1H); 8,29 (d,  $J=8,5$  Hz, 1H); 8,40 (d,  $J=8,5$  Hz, 1H); 9,27 (s ancho, 1H)

Microanálisis: ( $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ )

Teoría: C 64,33%; H 6,21%; N 3,75%

Exp.: C 64,33%; H 6,35%; N 3,70%

5ª etapa

*Preparación del 8-(2,2-dimetilpropioniloxi)-7-butoxicarbonil-quinoleín-carboxilato de 2,5-dioxopirrolidín-1-ilo (6)*

Una mezcla del ácido precedente 5 (etapa 4) (1,2 g, 3,2 mmol), de dicitlohexilcarbodiimida (0,7 g, 3,2 mmol) y de N-hidroxi-succinimida (0,4 g, 3,2 mmol) en 12 ml de diclorometano se agita a 20°C durante 12 horas. El medio de reacción se concentra bajo presión reducida. El residuo se cromatografía sobre una columna de sílice y se eluye con una mezcla ciclohexano/acetato de etilo 2/1 para proporcionar 2,1 g (80%) de 8-(2,2-dimetilpropioniloxi)-2-formil-quinoleín-carboxilato de 2,5-dioxopirrolidín-1-ilo (6).

F = 143°C

Rf = 0,71 (acetato de etilo)

IR (puro,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$ : 1709; 1735; 1736.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) 0,90 (t,  $J=7,4$  Hz, 3H); 1,42 (hex,  $J=7,4$  Hz, 2H); 1,50 (s, 9H); 1,78 (quint,  $J=7,0$  Hz, 2H); 2,91 (s, 4H); 4,38 (t,  $J=7,0$  Hz, 2H); 7,76 (d,  $J=8,8$  Hz, 1H); 8,17(d,  $J=8,8$  Hz, 1H); 8,22 (d,  $J=8,6$  Hz, 1H); 8,34(d,  $J=8,6$  Hz, 1H)

Microanálisis: ( $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_8$ )

Teoría: C 61,27%; H 5,57%; N 5,95%

Exp.: C 61,39%; H 5,75%; N 6,02%

## 6ª etapa

*Preparación del 2-(3,4-dihidroxi-bencilcarbamoil)-8-(2,2-dimetilpropioniloxi)-quinoleín-7-carboxilato de n-butilo (7)*

Una mezcla del producto precedente 6 (etapa 5) (1,4 g, 2,9 mmol) y de paratoluensulfonato de 3,4-dihidroxibencilamina (0,9 g, 2,9 mmol) en 10 ml de piridina se agita a 20°C durante 12 horas. La mezcla se concentra bajo presión reducida, y se añaden 10 ml de agua. La mezcla se acidifica a pH 4 con una solución de ácido clorhídrico 2 N, a continuación se añaden 20 ml de diclorometano. Se separan las fases, y la fase acuosa se extrae con diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre sulfato de magnesio, y se concentran bajo presión reducida. El residuo se cromatografía sobre una columna de sílice y se eluye con una mezcla ciclohexano/acetato de etilo 2/1 para proporcionar 1,1 g (80%) de 2-(3,4-dihidroxibencilcarbamoil)-8-(2,2-dimetilpropioniloxi)-quinoleín-7-carboxilato de n-butilo 7. Sólido beis.

F = 189°C

Rf = 0,73 (acetato de etilo)

IR (puro, cm<sup>-1</sup>) ν: 1657; 1719; 1754; 3181; 3369; 3494.

RMN <sup>1</sup>H (δ en ppm, DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz) 0,98 (t, J=7,4 Hz, 3H); 1,41 (s, 9H); 1,45 (hex, J=7,4 Hz, 2H); 1,75 (quint, J=7,0 Hz, 2H); 4,35 (t, J=7,0 Hz, 2H); 4,51 (d, J=5,7 Hz, 2H); 6,07 (t, J=5,7 Hz, 1H móvil); 6,63 (dd, J=1,8 Hz, J=8,0 Hz, 1H); 6,77 (d, J=8,0 Hz, 1H); 6,80 (d, J=1,8 Hz, 1H); 7,70 (d, J=8,5 Hz, 1H); 8,05 (d, J=8,5 Hz, 1H), 8,25 (d, J=8,5 Hz, 1H), 8,32 (d, J=8,5 Hz, 1H)

Microanálisis: (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)

Teoría: C 65,58%; H 6,11%; N 5,66%

Exp.: C 65,57%; H 6,13%; N 5,56%

## 7ª etapa

*Preparación del ácido 2-(3,4-dihidroxibencilcarbamoil)-8-hidroxi-quinoleín-7-carboxílico (8)*

Una mezcla de la amida precedente 7 (etapa 6) (0,5 g, 1,0 mmol) y de 6,5 ml de una solución de hidróxido sódico 3 N, en 10 ml de metanol, se agita a 20°C durante 3 horas. El pH se ajusta a 4 con una solución de ácido sulfúrico 1 N. La mezcla de reacción se concentra bajo presión reducida, a continuación se seca bajo vacío sobre anhídrido fosfórico. El residuo se retoma en 10 ml de etanol anhidro caliente, y el sulfato de sodio insoluble se filtra. El filtrado se concentra bajo presión reducida, a continuación se retoma en 2 ml de etanol anhidro. El medio se enfría: cristaliza un sólido amarillento. Éste último se lava con diclorometano, a continuación se seca bajo vacío sobre anhídrido fosfórico para dar 250 mg de ácido 8 en forma de un sólido de color castaño.

F = 232°C (descomposición)

IR (puro, cm<sup>-1</sup>) ν: 1645; 1670; 3249

RMN <sup>1</sup>H (δ en ppm, DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz) 4,40 (d, J=6,2 Hz, 2H); 6,60 (dd, J=1,75 Hz, J=8,04 Hz, 1H); 6,65 (d, J=8,0 Hz, 1H); 6,75 (d, J=1,7 Hz, 1H); 7,22 (d, J=8,5 Hz, 1H); 7,88 (d, J=8,5 Hz, 1H), 8,15 (d, J=8,5 Hz, 1H), 8,40 (d, J=8,6 Hz, 1H), 8,72 (s ancho, 1H), 8,85 (s ancho, 1H), 9,27 (t, J=6,2 Hz, 1H).

Microanálisis: (C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, 1,5 H<sub>2</sub>O)

Teoría: C 56,69%; H 4,49%; N 7,35%

Exp.: C 57,13%; H 4,17%; N 7,33%

## 8ª etapa

*Preparación del 2-(3,4-dihidroxibencilcarbamoil)-8-hidroxi-quinoleín-7-carboxilato de sodio*

Una mezcla de la amida precedente 8 (etapa 7) (20 mg, 0,06 mmol) y 0,66 ml de una solución de hidróxido sódico 0,1 se agitan a 20°C durante 10 minutos. La sal de sodio obtenida se liofiliza para proporcionar cuantitativamente 22 mg de sólido marrón oscuro.

## ES 2 326 115 T3

### Otros productos

#### Preparación del ácido 2-(2,4-dihidroxibencilcarbamoil)-8-hidroxi-quinoleín-7-carboxílico

5 Se pone en práctica el mismo procedimiento de preparación que el descrito para el ácido (8).

F = 196°C (descomposición)

IR (puro,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$ : 1624; 1638; 3311.

10

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  en ppm, DMSO- $\text{d}_6$ , 200 MHz) 4,45 (d, J=5,8 Hz, 2H); 6,20 (dd, J=2,4 Hz, J=8,2 Hz, 1H); 6,38 (d, J=2,4 Hz, 1H); 7,05 (d, J=8,2 Hz, 1H); 7,34 (d, J=8,7 Hz, 1H); 7,95 (d, J=8,6 Hz, 1H); 8,22 (d, J=8,5 Hz, 1H); 8,50 (d, J=8,6 Hz, 1H); 9,17 (s ancho, 1H); 9,28 (t, J=5,8 Hz, 1H); 9,58 (s ancho, 1H)

15

Microanálisis: ( $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$ )

Teoría: C 55,39%; H 4,65%; N 7,18%

Exp.: C 55,97%; H 4,57%; N 6,73%

20

#### Preparación del ácido 2-(2,3,4-trihidroxibencilcarbamoil)-8-hidroxi-quinoleín-7-carboxílico

El mismo procedimiento de preparación que para el ácido (8).

25

F = 208°C (descomposición)

IR (puro,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$ : 1625; 1659; 3300.

30

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  en ppm, DMSO- $\text{d}_6$ , 200 MHz) 4,45 (d, J=6,0 Hz, 2H); 6,29 (d, J=8,5 Hz, 1H); 6,53 (d, J=8,5 Hz, 1H); 7,40 (d, J=8,8 Hz, 1H); 7,92 (d, J=8,6 Hz, 1H); 8,28 (d, J=8,6 Hz, 1H); 8,52 (d, J=8,5 Hz, 1H); 8,72 (s ancho, 1H); 8,89 (s ancho, 1H); 9,50 (t, J=6,0 Hz, 1H)

Microanálisis: ( $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_7$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ )

35

Teoría: C 55,67%; H 4,15%; N 7,21%

Exp.: C 56,54%; H 4,66%; N 6,31%

40

### III. Estudio de las propiedades antivíricas dirigidas contra las integrasas retrovirales de los derivados según la invención

45

A continuación se describe, a título ilustrativo, los resultados obtenidos con el 2-(3,4-dihidroxibencilcarbamoil)-8-hidroxi-quinoleín-7-carboxilato de sodio, el 2-(2,3,4-trihidroxibencilcarbamoil)-8-hidroxi-quinoleín-7-carboxilato de sodio, y el 2-(2,4-dihidroxibencilcarbamoil)-8-hidroxi-quinoleín-7-carboxilato de sodio. Estos compuestos se denominarán respectivamente BioA53, BioA162, BioA163.

#### Ejemplo 1

50

#### Inhibición de la actividad *in vitro*

La actividad de la integrasa del VIH-1 se midió mediante los ensayos siguientes:

55

1. La actividad endonucleotídica de la proteína recombinante se ensayó sobre un oligonucleótido de doble hebra de 21 pares de bases; marcado radiactivamente en el extremo 5'. La actividad de la integrasa se tradujo en la eliminación del dinucleótido en el extremo 3'.

60

2. En ensayo de transferencia de hebras se realizó con un oligonucleótido de doble hebra de 21 pares de bases que imitaba el extremo del ADN vírico cuyo dinucleótido 3' terminal había sido suprimido. La actividad de la proteína se tradujo en la inserción covalente de este oligonucleótido en un oligonucleótido homólogo.

65

3. El ensayo de la desintegración se realizó con un sustrato que imitaba la estructura del ADN vírico integrado. Se mide la cantidad de ADN escindido por la integrasa. Este último ensayo tan sólo mide la actividad catalítica de la proteína, excluyendo su actividad de fijación al ADN.

Las actividades enzimáticas se ensayaron en presencia de manganeso y/o magnesio.

Los compuestos según la presente invención inhiben las actividades enzimáticas igual de bien en presencia de manganeso como de magnesio.

## 5 Ejemplo 2

### *Inhibición de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1)*

Se utilizaron dos ensayos para determinar la eficacia antivírica del compuesto según la invención.

El primer ensayo consiste en poner en contacto células de una línea linfocitaria establecida, células CEM, con un sobrenadante de células infectadas que contienen los viriones infecciosos. El ensayo se realiza de la manera siguiente: las células CEM, cultivadas en suspensión en medio RPMI complementado con un 10% de suero fetal bovino, se infectan mediante un sobrenadante vírico con una multiplicidad de infección de 0,5. Transcurridas dos horas de infección, las células se lavan dos veces con RPMI con objeto de eliminar las partículas víricas residuales. Entonces se colocan las células en medio RPMI que contiene el compuesto según la invención. La carga vírica se evalúa después de 72 horas de cultivo. Ésta se cuantifica mediante los dos procedimientos siguientes:

1. La cantidad de proteína vírica p24 se determina mediante un ensayo ELISA.
2. La carga en virus infecciosos se estima mediante infección de células HeLa  $\beta$ -gal CD4+. La eficacia de la integración retroviral se estima mediante un ensayo colorimétrico (CPRG).

El segundo ensayo consiste en poner en contacto células HeLa  $\beta$ -gal CD4+ (células fibroblásticas humanas que contienen el gen de la  $\beta$ -galactosidasa bajo control transcripcional del transactivador vírico Tar, y que expresan el receptor de membrana CD4) con el sobrenadante de células transfectadas con el plásmido pNL43, que contiene los viriones infecciosos, y los compuestos según la invención. En la práctica, las células HeLa  $\beta$ -gal CD4+ se cultivan en placas de 96 pocillos, en medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino, se ponen en contacto con 5 ng de p24 (procedentes de una transfección de células 293T con el plásmido pHL43), y con diluciones del compuesto según la invención. Transcurridas 48 horas, se lisan las células y se cuantifica la  $\beta$ -galactosidasa mediante coloración con CPRG.

Los resultados obtenidos se representan en las Figuras 1A (-♦- BioA53) y 1B (-♦- BioA53; -■- BioA162 -▲- BioA163).

En los dos ensayos de actividad, los compuestos según la invención muestran un efecto protector contra la infección por el virus VIH-1. En efecto, este efecto protector se traduce en una inhibición de la producción de partículas víricas en el primer ensayo, y en una inhibición de la coloración CPRG en el segundo ensayo, a concentraciones micromolares, e incluso submicromolares. En relación a las eficacias retrovirales, los IC<sub>50</sub> varían de 0,3 mM a 4 mM.

## Ejemplo 3

### *Citotoxicidad de los compuestos*

La toxicidad de los compuestos se evaluó mediante un ensayo de biotransformación de MTT- en formazán por parte de las deshidrogenasas mitocondriales celulares.

Se constata que el compuesto ensayo está además desprovisto de citotoxicidad a 500 mM, tanto sobre células adherentes (HeLa) como en suspensión (CEM), tal como se ilustra mediante los resultados descritos en las Figuras 2A (-♦- CEM; -■- HeLa) y 2B (-♦- BioA53; -■- BioA162; -▲- BioA163).

## Ejemplo 4

### *Inhibición de la integración del ADN vírico en el genoma huésped*

Este ensayo consiste en poner en contacto células CEM con el sobrenadante de células infectadas que contienen los viriones infecciosos. Transcurridas 2 horas, las células se lavan y se colocan durante 24 horas en medio RPMI que contiene el compuesto según la invención (BioA53).

El ADN de las células se extrae entonces utilizando un equipo de preparación de ADN genómico (QiaBlood, Qiagen™). Este ADN es el blanco de amplificaciones mediante la PCR, las cuales tienen por objeto evaluar, por una parte, la cantidad de ADN vírico total presente en la solución, y, por otra parte, la cantidad de ADN vírico integrado en el genoma celular. Esta última amplificación tiene lugar en dos pasos: la primera etapa utiliza un cebador de PCR homólogo de una secuencia del ADN retroviral; el segundo cebador es homólogo de las secuencias genómicas repetidas Alu. La segunda etapa es una PCR anidada que permite revelar el ADN retroviral.

La cantidad de ADN se evalúa mediante densitometría después de la separación de los productos de amplificación en gel de agarosa.

El compuesto según la presente invención muestra una disminución de al menos el 80% de la cantidad de ADN integrado para una concentración de 50 mM, y una inhibición de la totalidad del ADN integrado a 100 mM (Figura 3A), a la vez que la cantidad de ADN vírico total no está afectada por el tratamiento de las células con el compuesto (Figura 3B).

## Ejemplo 5

### *Preparación de comprimidos*

Se prepararan comprimidos que comprenden el BioA53 procediendo del modo siguiente:

Se añade a una solución acuosa de hidroxipropilcelulosa una cantidad terapéuticamente activa del compuesto BioA53, de almidón de maíz, y de celulosa microcristalina. Se hace pasar la mezcla a través de un tamiz para producir gránulos. Después del secado, se mezcla con estearato de magnesio, y se formula en comprimidos de 250 mg según las técnicas habituales.

### Referencias bibliográficas

1- Meek, W. H.; Fuschman, C. H. J.; *J. Chem. Eng. Data* 1969, 14, 388-391.

2- Bader, A.R.; Kontowicz, A.D. *J. Am. Chem. Soc.* 1953, 75, 5416-5417.

3- Epstein, J., Michel, H.O., Rosenblatt, D.H., Plapinger, R.E., Stephani, R.A., Cook, E. *J. Am. Chem. Soc.* 1964, 86, 4959-4963.

### Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

### Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9845269 A [0002]

### Documentos que no son patentes citados en la descripción

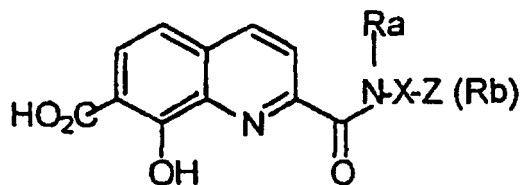
- MEEK, W. H.; FUSCHMAN, C. H. J. *J. Chem. Eng. Data*, 1969, vol. 14, 388-391 [0065]

- BADER, A.R.; KONTOWICZ, A.D. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, vol. 75, 5416-5417 [0065]

- EPSTEIN, J.; MICHEL, H.O.; ROSENBLATT, D.H.; PLAPINGER, R.E.; STEPHANI, R.A.; COOK, E. *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, vol. 86, 4959-4963 [0065]

## REIVINDICACIONES

1. Derivados del ácido 2-carbamoil-8-hidroxiquinoleín-7-carboxílico, y sus sales farmacéuticas aceptables, **carac-**  
**terizados** por responder a la fórmula general 1:



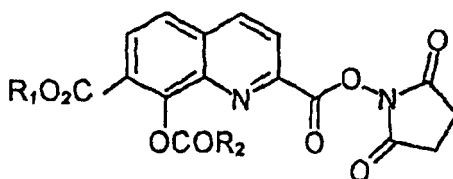
(I)

en la cual

- X representa una cadena alquílica  $-(CH_2)_n-$  en la cual n es igual a 0, 1 ó 2, u O, o N,
- Z representa un anillo aromático, que puede incluir heteroátomos, seleccionados de entre O, N ó S, en sustitución de los átomos de carbono que forman dicho anillo aromático, pudiendo estar sustituido el ciclo por Rb,
- Rb representa de 1 a 3 sustituyentes idénticos o diferentes, escogidos de entre los grupos -OH, -OR, -COOH, -COOR, -COH, -COR, -NH<sub>2</sub>, -NH(R), -NH(R,R'), -SH, -SR y CN,
- Ra representa un átomo de hidrógeno o un grupo  $-(CH_2)_{n'}-Y$ , para el cual n' es igual a 0, 1, 2 ó 3, e Y representa -CH<sub>3</sub>, -COOH, -COOR, -CN, -OH, -OR, SR, o un grupo arilo eventualmente sustituido por Rb,
- R y R', idénticos o diferentes, representan una cadena alquílica lineal o ramificada, de 1 a 4 átomos de carbono, y
- sus sales farmacéuticamente aceptables.

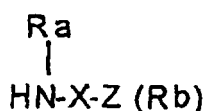
2. Derivados del ácido 2-carbamoil-8-hidroxiquinoleín-7-carboxílico escogidos de entre el ácido 2-(3,4-dihidroxi-bencilcarbamoil)-8-hidroxi-quinoleín-7-carboxílico, el ácido 2-(2,4-dihidroxibencilcarbamoil)-8-hidroxi-quinoleín-7-carboxílico, el ácido 2-(2,3,4-trihidroxibencilcarbamoil)-8-hidroxi-quinoleín-7-carboxílico, y sus sales sódicas.

3. Procedimiento de síntesis de derivados según la reivindicación 1, **caracterizado** por comprender la reacción del quinoleincarboxilato de succinimidilo de la Fórmula II



II

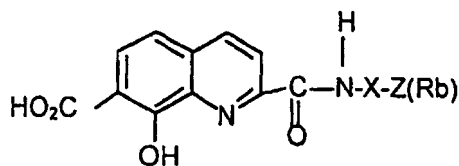
en la cual R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, idénticos o diferentes, representan radicales alquílicos de 1 a 4 C, con una amina de la Fórmula



III

si es necesario en forma de sal, seguida por una saponificación y, si es necesario, por una acidificación.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque, para preparar los derivados de la Fórmula IA con un brazo espaciador amida,



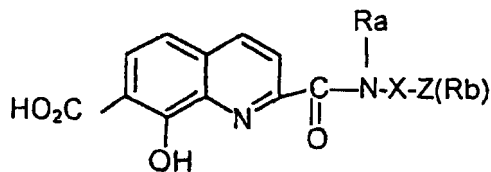
(IA)

en la cual Rb y Z son tal como se han definido más arriba, y X representa un grupo  $-(CH_2)_n-$  como se ha definido más arriba, se hace reaccionar el quinoleincarboxilato de succinimidilo de la Fórmula II con una sal de amina de la Fórmula IV siguiente:



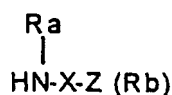
en la cual Z y Rb son tal como se han definido más arriba, y  $A^-$  es un anión de sal orgánica, especialmente un p-toluensulfonato, recuperándose los derivados de amida mediante saponificación, seguida por un acidificación.

5. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque, para preparar los derivados de la Fórmula IB con un brazo espaciador sustituido,



(IB)

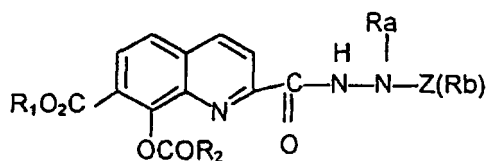
en la cual Rb y Z son tal como se han definido más arriba, y X representa un grupo  $-(CH_2)_n-$  conocido, definido más arriba, se hace reaccionar el derivado de la Fórmula II con una amina de la Fórmula V siguiente:



(V)

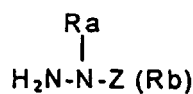
en la cual los sustituyentes son tal y como se han definido más arriba, y siendo seguida esta reacción por una saponificación.

6. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque, para preparar los derivados de la Fórmula IC con un brazo espaciador hidrazida,



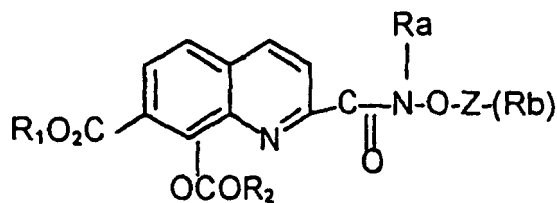
(IC)

en la cual los diferentes sustituyentes son tal como se han definido más arriba, se hace reaccionar el compuesto de la Fórmula II con la hidrazina de la Fórmula VI siguiente:



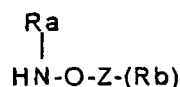
(VI)

7. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque, para preparar los derivados de la Fórmula ID con un brazo espaciador alcoxiamida,



(ID)

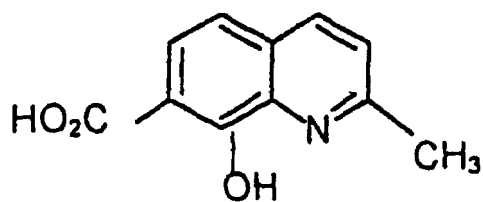
en la cual los diferentes sustituyentes son tal como se han definido más arriba, se hace reaccionar el compuesto de la Fórmula II con la hidroxilamina de la Fórmula VII siguiente:



(VII)

en la cual Ra, Rb y Z son tal como se definieron más arriba.

8. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque los derivados protegidos de quinoleína de la Fórmula II se obtienen a partir de un hidroxíácido de quinoleína de la Fórmula VIII:



(VIII)

9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** por la protección de los grupos -COOH y -OH con ayuda de derivados capaces de generar grupos protectores específicos con respecto a las funciones afectadas, y que pueden a continuación cortarse selectivamente sin alterar el resto de la molécula.

10. Composiciones farmacéuticas **caracterizadas** porque comprenden una cantidad eficaz de al menos un derivado tal como los definidos en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en asociación con vehículos farmacéuticamente aceptables.

11. Derivados según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para su utilización como reactivos biológicos.

12. Derivados según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para su utilización como medicamento antivírico.



## ES 2 326 115 T3

13. Derivados según la reivindicación 12, tales que el mencionado medicamento es inhibidor de las integrasas de VIH-1, VIH-2, VIS y VSR.

5 14. Derivados según una cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, tales que el mencionado medicamento está destinado a tratar el VIH.

15. Combinación de un derivado según la reivindicación 1 ó 2 con otros medicamentos anti-VIH.

10 16. Utilización de un derivado según la reivindicación 1 ó 2 para la preparación de un medicamento para tratar el VIH.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

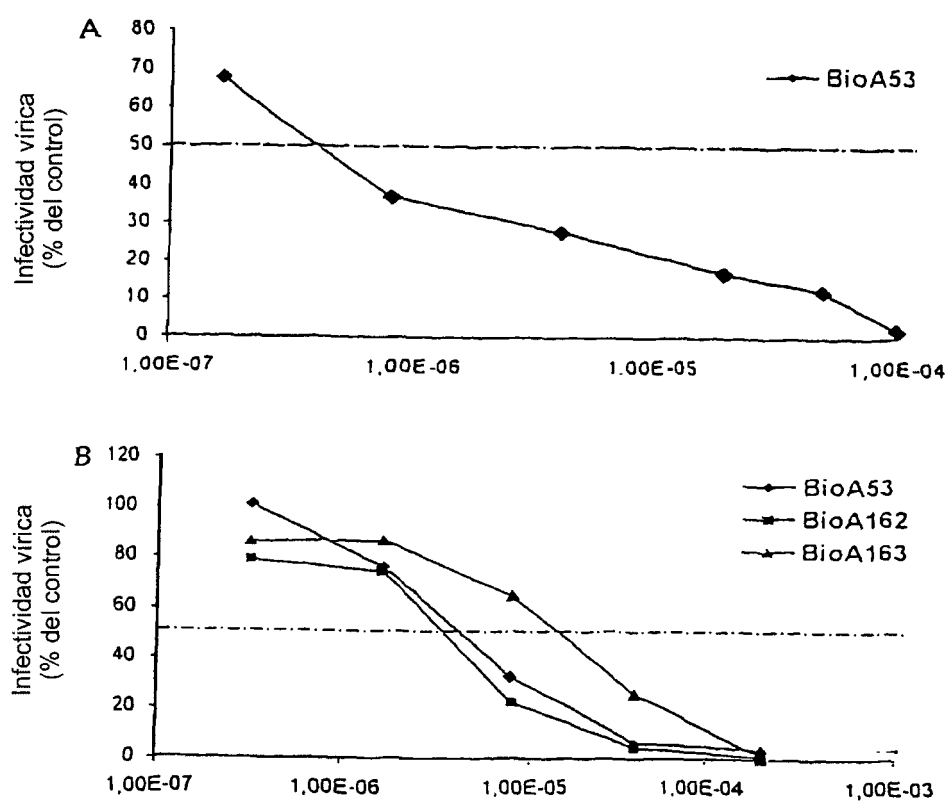


FIGURA 2

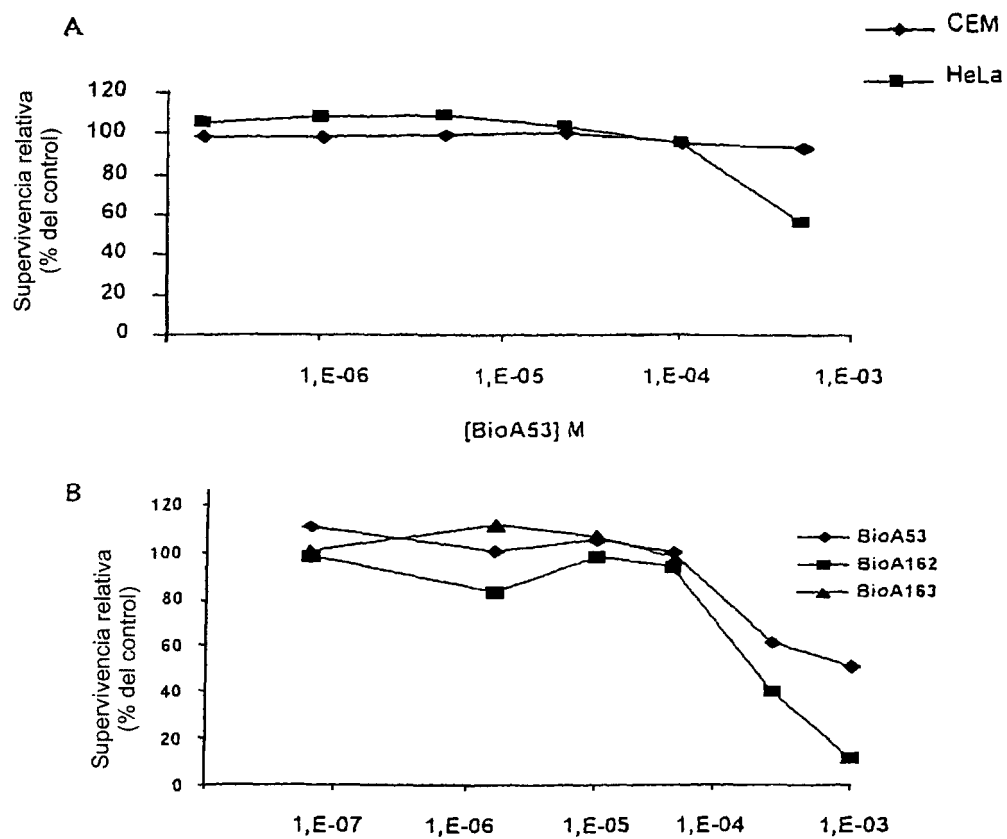


FIGURA 3

