

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 957 960**

21 Número de solicitud: 202230581

51 Int. Cl.:

A61K 31/122 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.06.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.01.2024

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (100.0%)

Calle Pedro Zerolo s/n

38200 La Laguna (Santa Cruz de Tenerife) ES

72 Inventor/es:

DÍAZ MARRERO, Ana Raquel;

FERNÁNDEZ CASTRO, José Javier;

LÓPEZ ARENCIBIA, Atteneri;

PIÑERO BARROSO, José E;

LORENZO MORALES, Jacob;

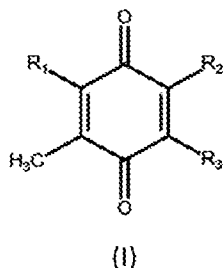
GARCÍA DAVIS, Sara y

BETHENCOURT ESTRELLA, Carlos Javier

54 Título: **COMPUESTOS DERIVADOS DE QUINONAS Y SU USO FRENTE A *LEISHMANIA* spp.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a compuestos derivados de quinonas con actividad de actividad leishmanicida y el uso de estos en el sector farmacéutico, en concreto en el campo de las enfermedades parasitarias. Concretamente está relacionado con compuesto de fórmula (I), sus formas isoméricas y sales de los mismos,



donde R1 y R3 son hidrógeno y R2 es seleccionado de la lista que consiste, ciclopentilo, cicloheptilo, 3-metil-pentilo y adamantano;

o donde R1 y R2 es hidrogeno, y R3 es seleccionado de la lista que consiste, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

ES 2 957 960 A1

DESCRIPCIÓN**COMPUESTOS DERIVADOS DE QUINONAS Y SU USO FRENTE A *LEISHMANIA* spp.****SECTOR DE LA TÉCNICA**

- 5 La presente invención se refiere a compuestos derivados de quinonas y el uso de estos en el sector farmacéutico, en concreto en el campo de las enfermedades parasitarias.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Las enfermedades parasitarias protozoarias representan un importante problema de salud pública a nivel global, costando a las economías en desarrollo billones de dólares cada año (WHO, 2017). La leishmaniasis es causada por un parásito protozoo que comprende 20 especies de *Leishmania* y es clasificada en tres diferentes formas clínicas: visceral, mucocutánea y cutánea. Esta última es la forma más común, estimándose anualmente entre 600000 a 1 millón de nuevos casos a nivel mundial
- 15 (WHO, 2021).

- La leishmaniasis es curable si se diagnostica a tiempo y si se administra la medicación apropiada. El tratamiento de primera elección se basa en sales de antimonio pentavalente como el antimoniato de metil glucamina y el estibogluconato de sodio.
- 20 Otros medicamentos como la miltefosina se usan como tratamiento de segunda línea (Copeland and Aronson, 2015). Sin embargo, esta presenta alta toxicidad y resistencia, además de ser un tratamiento largos y costosos, por lo que es necesaria la búsqueda de tratamientos más seguros, efectivos y económicos (Oryan, 2015).
- 25 La leishmaniasis cutánea, cuyas lesiones son caracterizadas por nódulos que pueden llegar a destruir la epidermis y así resultar en úlceras (Peralta *et al.* 2021), puede ser tratada con resultados variables entre 55 y 98% de éxito, dependiendo de la zona geográfica y la especie causante de la enfermedad (Corpas-López *et al.* 2016). En muchos países en desarrollo es una enfermedad endémica debido principalmente al
- 30 limitado número de medicamentos disponibles para los pacientes. Además, la mayoría de los tratamientos requieren de administración parenteral, causando poca conformidad en los pacientes, altos costos y por consiguiente menores resultados (Azim *et al.* 2021). A pesar de que se han desarrollado y evaluado preparaciones tópicas de paromomicina, anfotericina B y miltefosina, no se han obtenido formulaciones suficientemente efectivas
- 35 (Corpas-López *et al.* 2016).

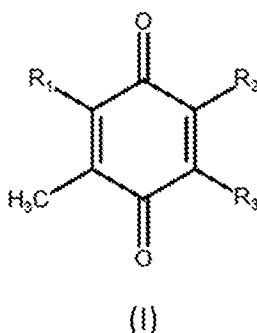
En los últimos años se ha hecho mucho énfasis en el desarrollo de alternativas tópicas fáciles de aplicar y que no generen toxicidad sistémica, observando cierta preferencia por algunos tipos de moléculas, como es el caso de aquellas que poseen un núcleo quinona, que suele actuar como intercalante de ADN, alquilante de biomoléculas, y/o

También se han descrito algunos compuestos obtenidos por síntesis (Gunatilaka *et al.*, 2001) o por derivatización de productos naturales que comprenden este fragmento, por ejemplo, a partir de perezona, una quinona natural utilizada como base para sintetizar una serie de derivados citotóxicos. Sin embargo, a pesar de que se han descrito valores de Cl_{50} entre 3.3 y 24.8 μM (Concepción-Lozada *et al.*, 2012), valores más óptimos de Cl_{50} para el tratamiento leishmanicida serían inferiores a 1 $\mu g/mL$ (Nwaka and Hudson, 2006; Nwaka *et al.*, 2009)

En consecuencia, existe la necesidad de proporcionar tratamientos para la leishmaniasis, eficaces y de baja toxicidad que puedan solventar las desventajas arriba mencionadas.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención, por lo tanto, resuelve los problemas planteados. De esta manera, el primer aspecto de la invención está relacionado con un compuesto de fórmula (I), sus formas isoméricas y sales de los mismos,



Compuesto de fórmula (I)

donde R1 y R3 son hidrógeno y R2 es seleccionado de la lista que consiste, ciclopentilo, cicloheptilo, 3-metil-pentilo y adamantano;

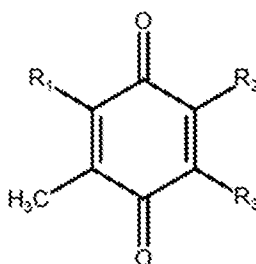
o donde R1 y R2 es hidrogeno, y R3 es seleccionado de la lista que consiste, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

5

Los compuestos de formula (I) de acuerdo al primer aspecto de la invención presentan actividad frente a la leishmaniasis, mostrando buena eficacia y baja toxicidad. Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo al primer aspecto presentan valores $Cl_{50} < 1$ $\mu\text{g/mL}$ lo cual supone una mejora significativa, frente al fármaco de referencia Miltefosina donde Cl_{50} 2.64 $\mu\text{g/mL}$.

10

El segundo aspecto de la invención se relaciona con compuestos de fórmula (I), sus formas isométricas y sales de los mismos, para su uso como medicamento,



(I)

15

donde R1 y R3 son hidrógeno y R2 es seleccionado de la lista que consiste, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, 3-metil-pentilo, isopentanilo o adamantano;

o donde R1 y R2 es hidrogeno, y R3 es seleccionado de la lista que consiste, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

20

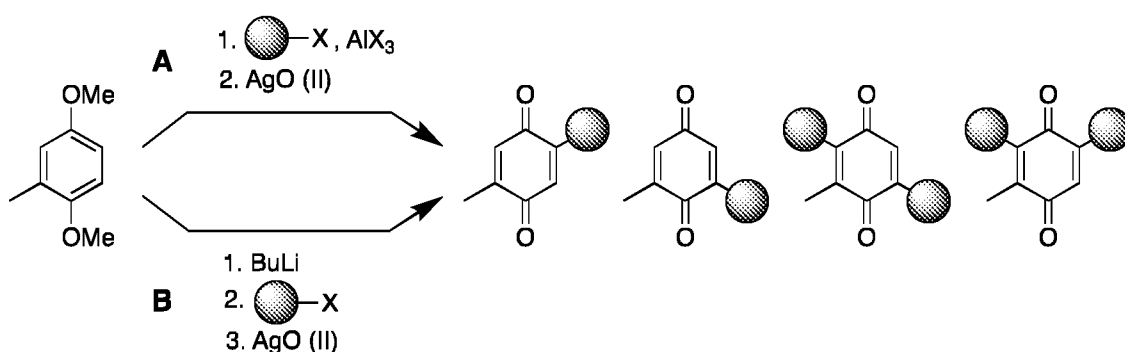
Los compuestos de formula (I) de acuerdo al segundo aspecto de la invención presentan actividad frente a la leishmaniasis, mostrando buena eficacia y baja toxicidad. Por ejemplo, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo al segundo aspecto de la invención presentan valores $Cl_{50} < 1$ $\mu\text{g/mL}$, lo que supone una mejora frente al fármaco de referencia Miltefosina donde Cl_{50} 2.64 $\mu\text{g/mL}$.

25

Teniendo en cuenta que una de las principales limitaciones para la realización de los estudios pre-clínicos y clínicos de potenciales agentes terapéuticos es el difícil acceso

a la fuente natural, el tercer aspecto de la invención está relacionado con la síntesis de los compuestos del primer y segundo aspecto de la invención.

El procedimiento sintético se puede abordar a través de dos metodologías que comprenden por lo menos dos etapas de reacción y se pueden llevar a cabo a partir de compuestos comerciales de fácil acceso y bajo coste, como se describe en el esquema 1.



- Método A.

Etapla 1: Alquilación de Friedel y Craft sobre 2,5-dimetoxitolueno mediante el uso de haluros sustituidos en presencia de AlCl_3 .

Etapla 2: Reacción de desprotección mediante oxidación con AgO (II) .

- Método B.

Etapla 1: Reacción de acoplamiento del fragmento de interés por reacción de haluros de alquilo con el carbanión obtenido por tratamiento de 2,5-dimetoxitolueno en presencia de BuLi .

Etapla 2: Reacción de desprotección mediante oxidación con AgO (II) .

Los compuestos de acuerdo al primer aspecto obtenidos mediante estas dos metodologías sintéticas, tercer y cuarto aspecto de la invención, han permitido obtener los compuestos de fórmula (I) del primer y segundo aspecto para posteriormente poder evaluar la actividad anti-leishmania. Dichos compuestos se han obtenido con un buen rendimiento y pureza superior al 95%, preferiblemente superior al 99%, lo que los hace adecuados para su uso médico.

El quinto aspecto de la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula (I) de acuerdo al primer o segundo aspecto

inventivo o a los compuestos obtenidos del tercer aspecto de la invención, además de un excipiente farmacéutico aceptable.

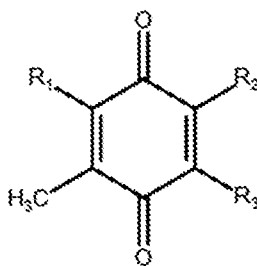
BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 La siguiente descripción gráfica es dada a modo de ejemplo no limitante con el fin de detallar las características y ventajas de la invención.

Figura 2. Estructura química de quinonas sintéticas.

10 DESCRIPCION DETALADA DE LA INVENCION

El primer aspecto de la invención está relacionado con los compuestos de fórmula (I), sus formas isoméricas y sales de los mismos,



(I)

15

Compuesto de formula (I)

donde R1 y R3 son hidrógeno y R2 es seleccionado de la lista que consiste, ciclopentilo, cicloheptilo, 3-metil-pentilo y adamantano;

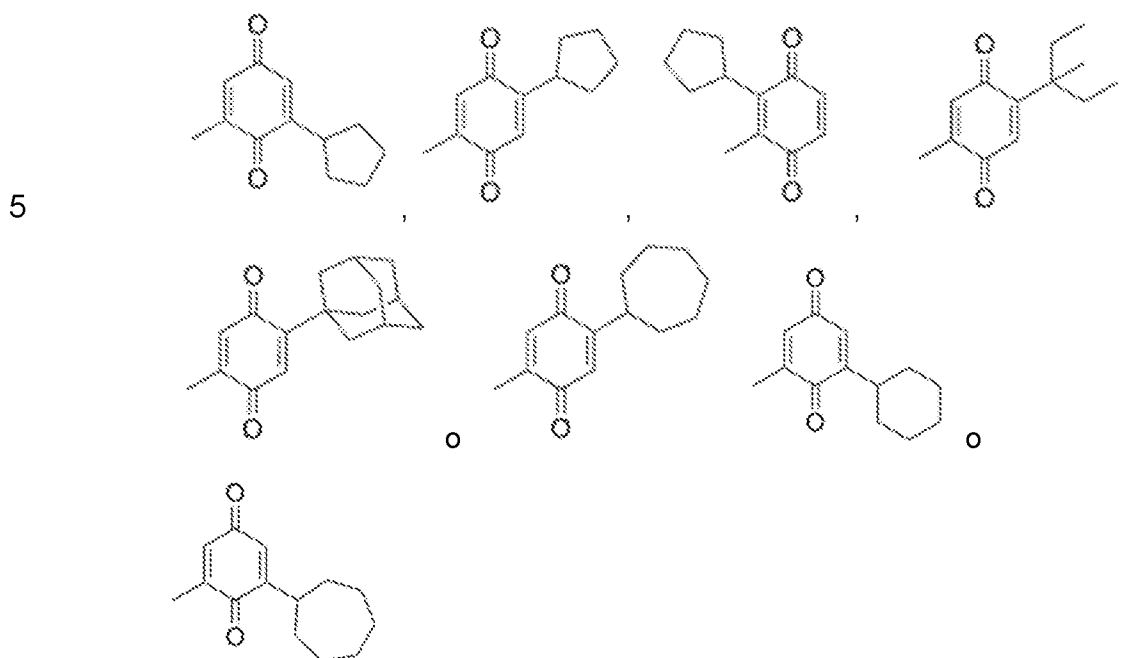
20

o donde R1 y R2 es hidrogeno, y R3 es seleccionado de la lista que consiste, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

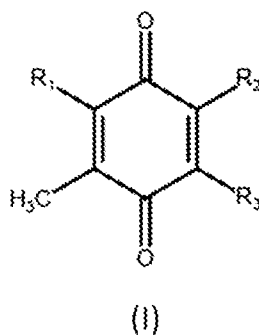
25

Los compuestos de formula (I) de acuerdo al primer aspecto de la invención presentan actividad frente a la leishmaniasis, mostrando buena eficacia y baja toxicidad. Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo al primer aspecto presenta valores $Cl_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ lo cual supone una mejora significativa, frente al fármaco de referencia Miltefosina donde Cl_{50} 2.64 $\mu\text{g/mL}$.

En una realización preferida del primer aspecto los compuestos de fórmula I se selecciona de la lista de estructuras que consiste en:



10 El segundo aspecto de la invención se relaciona con compuestos de fórmula (I), sus formas isométricas y sales de los mismos, para su uso como medicamento,



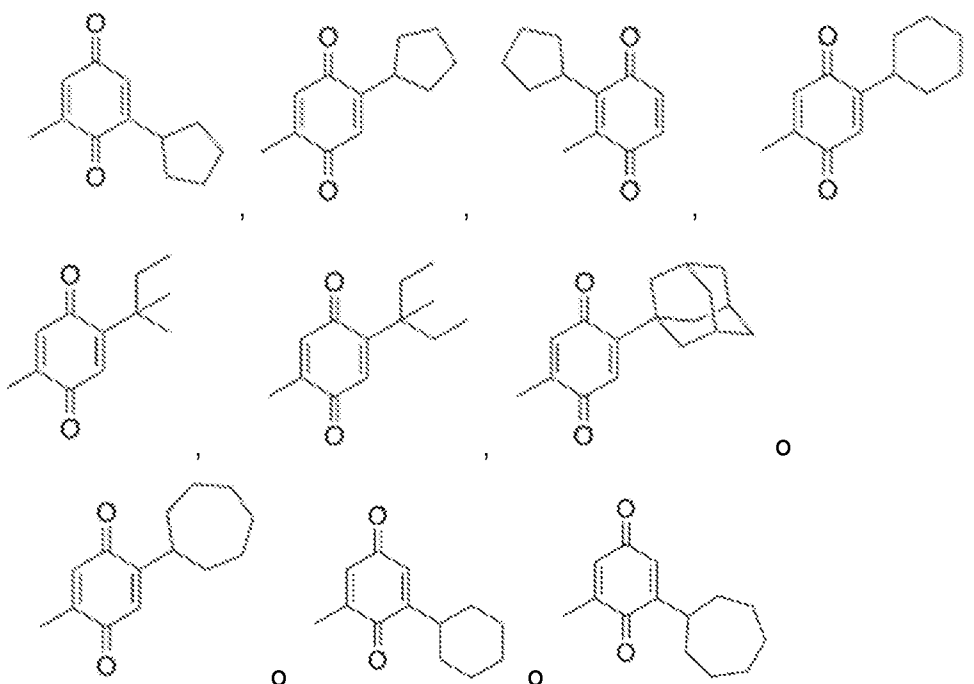
15 donde R1 y R3 son hidrógeno y R2 es seleccionado de la lista que consiste, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, 3-metil-pentilo, isopentanilo o adamantano;

o donde R1 y R2 es hidrogeno, y R3 es seleccionado de la lista que consiste, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo al segundo aspecto de la invención presentan actividad frente a la leishmaniasis, mostrando buena eficacia y baja toxicidad. Por ejemplo, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo al segundo aspecto de la invención presentan valores $Cl_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$, lo que supone una mejora frente al fármaco de referencia Miltefosina donde $Cl_{50} 2.64 \mu\text{g/mL}$.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención el compuesto de fórmula I se selecciona de la lista de estructuras que consiste en:

10



15

Una realización preferida del segundo aspecto de la invención está relacionada con los compuestos de fórmula (I) para su uso como medicamento humano o veterinario.

Una realización preferida del segundo aspecto se relaciona con los compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la leishmaniasis.

En una realización más preferida del segundo aspecto de la invención, la leishmaniasis es causada por *Leishmania spp.*

El tercer aspecto de la invención está relacionado con un método de obtención del compuesto de fórmula (I) de acuerdo al primer aspecto o el compuesto de fórmula (I) de

acuerdo al segundo aspecto, donde el método comprende al menos las siguientes etapas:

- 5 i) Proporcionar una mezcla de 2,5-dimetoxitolueno en presencia de tricloruro de aluminio y cloruro de alquilo en un disolvente nitrogenado, preferiblemente nitrometano;
- ii) Agitar la mezcla de la etapa anterior durante por lo menos 30min a un rango de temperatura entre -10°C hasta 10°C, preferiblemente 0°C, en condiciones anhidras y atmósfera inerte;
- 10 iii) Adición de agua al producto de la reacción anterior para detener la reacción seguido de extracción de los productos obtenidos en la etapa anterior con un disolvente orgánico;
- iv) Adición de óxido de plata y ácido nítrico de manera secuencial a los productos obtenidos en la etapa anterior;
- 15 v) Opcionalmente adición de agua al producto de la reacción anterior seguido de extracción con un disolvente orgánico;
- vi) Opcionalmente etapa de purificación.

20 Otros disolventes fueron probados en la etapa i) tales como éter, THF, hexano o pentano, sin embargo, dichos disolventes proporcionaron malos resultados al menos en relación al rendimiento de la reacción.

25 En una realización preferida de la invención de acuerdo al tercer aspecto de la invención, el disolvente orgánico de la etapa iii) se selecciona de una lista que consiste en; hexano, pentano, acetato de etilo o diclorometano;

30 En una realización preferida de la invención de acuerdo al tercer aspecto de la invención, el disolvente orgánico de la etapa v) se selección de la lista que consiste en, diclorometano, hexano, dietil eter, acetona, metanol, etanol, isopropanol tetrahidrofurano y dietil amina,

35 El cuarto aspecto de la invención se relaciona con un método de obtención del compuesto de fórmula (I) de acuerdo al primer aspecto o el compuesto de fórmula (I) de acuerdo al segundo aspecto, donde el método comprende al menos las siguientes etapas:

- i) Proporcionar una mezcla de 2,5-dimetoxitolueno disolvente orgánico a una temperatura en un rango entre -5°C hasta 15°C, preferiblemente entre 0-10°C;
- 5 ii) Añadir a la mezcla anterior una disolución de n-butillitio en disolvente orgánico a una temperatura en un rango entre - 5°C hasta 10°C durante por lo menos 10 minutos; preferiblemente 0°C durante 10 minutos;
- iii) Aumentar la temperatura de la mezcla anterior a un rango de entre 20°C hasta 30°C;
- 10 iv) Enfriar producto de etapa anterior a una temperatura en un rango entre - 10°C hasta 5°C, seguido de adición de cloruro de alquilo gota a gota;
- v) Añadir cloruro amónico al producto de la etapa anterior, seguido de extracción con disolvente orgánico;
- vi) Adición de óxido de plata y ácido nítrico de manera secuencial a los productos obtenidos en la etapa anterior;
- 15 vii) Opcionalmente adición de agua al producto de la reacción anterior seguido de extracción con un disolvente orgánico;
- viii) Opcionalmente etapa de purificación.

20 En una realización preferida de la invención de acuerdo al cuarto aspecto de la invención, el disolvente orgánico de las etapas i) se selecciona de hexano y acetona.

En otra realización preferida de la invención de acuerdo al cuarto aspecto de la invención, El alquilo de la etapa iv) es un alquilo lineal o ramificado, C1-C10.

25 En otra realización preferida de la invención de acuerdo al cuarto aspecto de la invención, el disolvente orgánico de las etapas i) y vii) se selección de la lista que consiste en, diclorometano, hexano, dietil eter, acetona, metanol, etanol, isopropanol tetrahidrofurano y dietil amina,

30 El quinto aspecto de la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula (I) de acuerdo al primer o segundo aspecto inventivo o a los compuestos obtenidos del tercer y cuarto aspecto de la invención, además de un excipiente farmacéutico aceptable.

35 En una realización preferida del quinto aspecto, la composición farmacéutica está de aplicación tópica u oral.

En otra realización preferida del quinto aspecto, la composición farmacéutica del quinto aspecto, es de aplicación tópica y está en forma líquida, de crema o en forma de gel.

5 En una realización preferida del tercer aspecto la composición farmacéutica es de aplicación oral en forma de comprimido, capsula, gránulos, píldoras o liofilizados.

En otra realización más preferida del quinto aspecto, la composición farmacéutica es de aplicación tópica, preferiblemente en forma de gel o crema.

10 En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, el compuesto de fórmula (I) está presente en la composición farmacéutica en un rango entre 0,1-5% w/w (en peso).

15 En otra realización preferida del quinto aspecto de la invención, la composición comprende:

0,1-5% en peso del compuesto de fórmula (I)

35-45 % en peso de Polyacrylamide

15- 25 % en peso de C13-14 Isoparafina

20 3-8 % surfactante, preferiblemente el surfactante es Laureth-7

EJEMPLOS

25 Ejemplo 1. Obtención de compuestos DE FORMULA I con (SG-0013, donde R1 y R3 es H y R2 es cicloheptano) actividad leishmanicida

30 El primer paso para la obtención de los compuestos de formula (I) SG-013, donde R1 y R3 es H y R2 es cicloheptano, consiste en la formación de sustancias aromáticas 2-metil sustituidas (método A figura 1). Para ello, se hizo reaccionar una disolución de 2,5-dimetoxitolueno (3.285 mmol), en presencia de tricloruro de aluminio (6.57 mmol) y clorocicloheptano (6.57 mmol), disueltos en nitrometano, condiciones anhidras y atmósfera inerte. La reacción se mantiene en agitación a 0°C durante 1 hora. Tras la adición de agua, los productos de reacción se extrajeron con éter (Williamson 1999).

35 A continuación, se realizó una extracción líquido-líquido con éter etílico y se secó con MgSO₄. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto se

fraccionó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (150 x 30 mm Ø) usando como eluyente mezclas de *n*-hex:AcOEt (99:1 – 97:3). Las fracciones obtenidas se concentraron y se identificó, según los espectros de RMN de ^1H , aquella que mostró señales de la sustitución del anillo 2,5-dimetoxitolueno.

- 5 El siguiente paso de reacción consiste en la desprotección de los grupos metoxilo y formación de las quinonas por adición de óxido de plata (II) (4.84 mmol) disuelto en ácido nítrico 7 N (0.2 mL) a una disolución de 300 mg de los productos intermedios en 4 mL de dioxano. La reacción se mantuvo en agitación a 0°C durante 1 hora; se detuvo con agua y se extrajo con diclorometano (Sánchez et al. 1985).

- 10 El producto se fraccionó mediante cromatografía en columna de sílica (150 x 15 mm Ø) usando como eluyente *n*-hex:AcOEt en condiciones isocráticas (99:1). Según el espectro de RMN de ^1H de las fracciones obtenidas, se seleccionó aquella mostrando señales de benzoquinonas. La fracción de interés fue purificada mediante HPLC utilizando una columna de sílica (250 x 10 mm Ø) con *n*-Hex:AcOEt en gradiente (99:1 – 0:100) como eluyente

El rendimiento de la reacción fue 49% y la pureza de SG-013 es del 95%. El compuesto se caracterizó por resonancia magnética nuclear y se confirmó por espectrometría de masas.

- 20 El compuesto SG-0013 se obtuvo como un cristal traslucido; HRESIMS m/z 217.1234 $[\text{M-H}]^-$ (calc. $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_2$, 217.1234) ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 1.40 (1H, m, H-9), 1.40 (1H, m, H-10), 1.55 (1H, m, H-10), 1.65 (1H, m, H-11), 1.75 (1H, m, H-9), 1.75 (1H, m, H-10), 2.02 (3H, d, $J=0.92$, H-7), 2.84 (1H, tt, $J=10.6$, 3.1, H-8), 6.49 (1H, s, H-3), 6.57 (1H, d, $J=0.92$, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3)
25 δ 15.53 (C-7), 27.05 (C-10), 27.92 (C-11), 34.25 (C-9), 37.79 (C-8), 130.68 (C-3), 133.86 (C-6), 145.26 (C-5), 155.35 (C-2), 187.65 (C-1), 188.93 (C-4).

Los compuestos sintetizados se detallan en la Figura 2.

- 30 Ejemplo 2. Obtención de compuestos DE FORMULA I con actividad leishmanicida

En otra realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) se han preparado mediante el siguiente método B que se describe en la figura 1:

Para la obtención de los compuestos de formula (I) SG-013, donde R1 y R3 es H y R2 es cicloheptano, se partió de una disolución de 2,5-dimetoxitolueno (50.0 mg, 0.3 mmol) en 10 mL de éter a una temperatura de 0°C y se añadió una
 5 disolución de 0.5 mL n-butilitio (0.5 mmol) 1.7 M en hexano. Tras 10 min a 0°C, la reacción se mantuvo en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se enfrió a 0°C nuevamente, y se añadió, gota a gota, el clorocicloheptano. Tras 30 min de agitación, se detuvo la reacción con una disolución de cloruro amónico saturado, se diluyó con agua y se extrajo con
 10 acetato de etilo (Sánchez et al. 1985).

A continuación, se realizó una extracción líquido-líquido con éter etílico y se secó con MgSO₄. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto se fraccionó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente *n*-hex:AcOEt (99:1 – 97:3). Las fracciones obtenidas se concentraron y
 15 se identificó, según los espectros de RMN de ¹H, aquella que mostró señales de la sustitución del anillo 2,5-dimetoxitolueno.

El último paso de reacción, al igual que en el ejemplo 1, consiste en la desprotección de los grupos metoxilo y formación de las quinonas por adición de óxido de plata disuelto en ácido nítrico. Los productos resultantes (compuestos
 20 de formula I) se purificaron mediante cromatografía en columna de sílica, seguido de purificación vía HPLC (cromatografía líquida) utilizando *n*-hex:AcOEt (99:1 – 0:100) como eluyente. La identificación se realizó mediante técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear y se confirmaron por espectrometría de masas.

25 El compuesto SG-0013 se obtuvo como un cristal traslucido; HRESIMS *m/z* 217.1234 [M-H]⁻ (calc. C₁₄H₁₈O₂, 217.1234) ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 1.40 (1H, m, H-9), 1.40 (1H, m, H-10), 1.55 (1H, m, H-10), 1.65 (1H, m, H-11), 1.75 (1H, m, H-9), 1.75 (1H, m, H-10), 2.02 (3H, d, J=0.92, H-7), 2.84 (1H, tt, J=10.6, 3.1, H-8), 6.49 (1H, s, H-3), 6.57 (1H, d, J=0.92, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)
 30 δ 15.53 (C-7), 27.05 (C-10), 27.92 (C-11), 34.25 (C-9), 37.79 (C-8), 130.68 (C-3), 133.86 (C-6), 145.26 (C-5), 155.35 (C-2), 187.65 (C-1), 188.93 (C-4).

Ejemplo 1. Obtención de compuestos DE FORMULA I con (SG-010, donde R1 y R3 es H y R2 es 2-metilbutano) actividad leishmanicida

El primer paso para la obtención de los compuestos de formula (I) SG-010, donde
5 R1 y R3 es H y R2 es 2-metilbutano, consiste en la formación de sustancias aromáticas 2-metil sustituidas (método A figura 1). Para ello, se hizo reaccionar una disolución de 2,5-dimetoxitolueno (3.28 mmol), en presencia de tricloruro de aluminio (6.57 mmol) y 2-cloro-2-metilbutano (6.57 mmol), disueltos en nitrometano, en condiciones anhidras y atmósfera inerte. La reacción se mantuvo
10 en agitación a 0°C durante 1 hora. Tras la adición de agua, los productos de reacción se extrajeron con éter (Williamson 1999).

A continuación, se realizó una extracción líquido-líquido con éter etílico y se secó con MgSO₄. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto se fraccionó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (120 x 30 mm Ø)
15 usando como eluyente *n*-hex:AcOEt (99:1 – 97:3). Las fracciones obtenidas se concentraron y se identificó, según los espectros de RMN de ¹H, aquella que mostró señales de la sustitución del anillo 2,5-dimetoxitolueno.

El siguiente paso de reacción consiste en la desprotección de los grupos metoxilo y formación de las quinonas por adición de óxido de plata (II) (5.34 mmol) disuelto
20 en ácido nítrico 7 N (2 mL) a una disolución de 294.0 mg de los productos intermedios en 4 mL de dioxano. La reacción se mantuvo en agitación a 0°C durante 1 hora; se detuvo con agua y se extrajo con diclorometano (Sánchez et al. 1985).

El producto se fraccionó mediante cromatografía en columna de sílica (120 x 30
25 mm Ø) usando como eluyente *n*-hex:AcOEt en condiciones isocráticas (99:1). Según el espectro de protón de las fracciones obtenidas, se seleccionó aquella mostrando señales de benzoquinonas. La fracción de interés fue purificada mediante HPLC utilizando una columna de sílica (250 x 10 mm Ø) con *n*-Hex:AcOEt en gradiente (99:1 – 0:100) como eluyente

30 El rendimiento de la reacción fue 37% y la pureza de SG-010 es del 95%. El compuesto se caracterizó por resonancia magnética nuclear y se confirmó por espectrometría de masas.

El compuesto SG-0010 se obtuvo como un cristal traslucido; HRESIMS *m/z* 191.1072 [M-H]⁻ (calc. C₁₂H₁₅O₂, 191.1072) ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 0.87

(3H, m, H-11), 1.20 (3H, s, H-8), 1.20 (3H, s, H-12), 1.70 (2H, dd, J= 5.0, 3.6 Hz, H-10), 2.01 (3H, d, J= 1.6 Hz, H-7), 6.52 (1H, s, H-6); ^{13}C NMR δ 15.2 (C-7), 27.8 (C-8), 27.8 (C-12), 30.2 (C-11), 35.7 (C-10), 38.5 (C-9), 133.3 (C-6), 135.5 (C-3), 144.3 (C-2), 155.2 (C-5), 187.9 (C-4), 188.8 (C-1).

5

Los compuestos sintetizados se detallan en la Figura 2.

El compuesto SG-010, donde R1 y R3 es H y R2 es cicloheptano y muestra actividad leishmanicida.

10

Ejemplo 2. Obtención de compuestos DE FORMULA I con actividad leishmanicida

15

En otra realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) se han preparado mediante el siguiente método B que se describe en la figura 1:

20

Para la obtención de los compuestos de formula (I) SG-010, donde R1 y R3 es H y R2 es 2-metilbutano, se partió de una disolución de 2,5-dimetoxitolueno (50.0 mg, 0.3 mmol) en 10 mL de éter a una temperatura de 0°C y se añadió una disolución de 0.5 mL n-butilitio (0.5 mmol) 1.7 M en hexano. Tras 10 min a 0°C, la reacción se mantuvo en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se enfrió a 0°C nuevamente, y se añadió, gota a gota, el 2-cloro-2-metilbutano. Tras 30 min de agitación, se detuvo la reacción con una disolución de cloruro amónico saturado, se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo (Sánchez et al. 1985).

25

30

A continuación, se realizó una extracción líquido-líquido con éter etílico y se secó con MgSO_4 . El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto se fraccionó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente *n*-hex:AcOEt (99:1 – 97:3). Las fracciones obtenidas se concentraron y se identificó, según los espectros de RMN de ^1H , aquella que mostró señales de la sustitución del anillo 2,5-dimetoxitolueno.

El último paso de reacción, al igual que en el ejemplo 1, consiste en la desprotección de los grupos metoxilo y formación de las quinonas por adición de óxido de plata disuelto en ácido nítrico. Los productos resultantes (compuestos

de fórmula I) se purificaron mediante cromatografía en columna de sílica, seguido de purificación vía HPLC (cromatografía líquida) utilizando *n*-hex:AcOEt (99:1 – 0:100) como eluyente. La identificación se realizó mediante técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear y se confirmaron por espectrometría de masas.

El compuesto SG-0010 se obtuvo como un cristal traslucido; HRESIMS m/z 191.1072 [M-H]⁻ (calc. C₁₂H₁₅O₂, 191.1072) ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 0.87 (3H, m, H-11), 1.20 (3H, s, H-8), 1.20 (3H, s, H-12), 1.70 (2H, dd, J= 5.0, 3.6 Hz, H-10), 2.01 (3H, d, J= 1.6 Hz, H-7), 6.52 (1H, s, H-6); ¹³C NMR δ 15.2 (C-7), 27.8 (C-8), 27.8 (C-12), 30.2 (C-11), 35.7 (C-10), 38.5 (C-9), 133.3 (C-6), 135.5 (C-3), 144.3 (C-2), 155.2 (C-5), 187.9 (C-4), 188.8 (C-1).

Ejemplo 3. Evaluación de actividad leishmanicida

La actividad leishmanicida fue testada para los compuestos de fórmula I del primer y segundo aspecto o los compuestos obtenidos a partir del tercer o cuarto aspecto, tal y como se ve en la tabla I. Para los estudios de dicha actividad, los compuestos sintetizados por el método del ejemplo 1 fueron incubados durante 72 horas en presencia de promastigotes de *Leishmania amazonensis* y su efecto fue evaluado respecto a la fluorescencia emitida por el alamarBlue, de tal manera que cuanto menos cantidad de compuesto se requiera para eliminar al parásito, menor es el valor de CI₅₀, es decir, la concentración de compuesto que inhibe al 50% de los parásitos.

Tabla I. Efecto de los compuestos sintéticos sobre macrófagos murinos y promastigotes de *Leishmania amazonensis*

Compuesto	Toxicidad Macrófagos CC ₅₀ (µg/mL)	<i>L. amazonensis</i> CI ₅₀ (µg/mL)	IS (CC ₅₀ /CI ₅₀)
SG-003	4.53 ± 0.90	0.34 ± 0.01	13.30
SG-005	0.72 ± 0.01	0.13 ± 0.03	5.50
SG-007	0.52 ± 0.09	0.07 ± 0.02	7.40
SG-008	2.55 ± 0.20	0.06 ± 0.01	42.50
SG-010	4.51 ± 0.47	0.12 ± 0.02	37.50

SG-011	12.27 ± 0.77	0.89 ± 0.06	13.80
SG-012	0.78 ± 0.02	0.08 ± 0.01	9.75
SG-013	0.92 ± 0.05	0.09 ± 0.00	7.10
SG-014	8.95 ± 1.75	0.70 ± 0.02	24.20
Miltefosina ²	29.42 ± 1.25	2.64 ± 0.10	11.14

¹ Natural quinones; ² Reference Drug, NS: no selectivo.

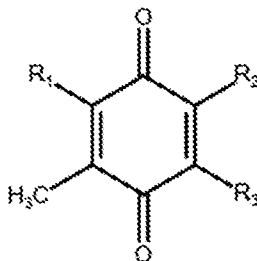
5 Los compuestos de formula (I) de la invencion presentan CI_{50} entre 0.06 y 0.89 $\mu\text{g/mL}$, presentando todos ellos mayor actividad leishmanicida que el fármaco de referencia miltefosina.

10 Para valorar la toxicidad, todos los compuestos fueron evaluados frente a células de ratón durante 24 horas mediante el ensayo de alamarBlue. Los compuestos presentaron concentración citotóxica media (CC_{50}) entre 0.52 y 12.27 $\mu\text{g/mL}$. A mayor valor de CC_{50} , mayor es la cantidad de compuesto que se requiere para dañar a las células de ratón, por tanto, menor será la toxicidad del compuesto.

15 La relación entre la CC_{50} y la CI_{50} es el índice de selectividad (IS). Refleja la selectividad del compuesto sobre los parásitos, de tal manera que podemos establecer un índice que muestra la relación entre la dosis requerida para dañar la célula de ratón y la requerida para inhibir al parásito. Los compuestos de fórmula I presentan buenos valores de IS siendo en su mayoría mejores que el valor de IS de la Miltefosina

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I), sus formas isoméricas y sales de los mismos,



(I)

5

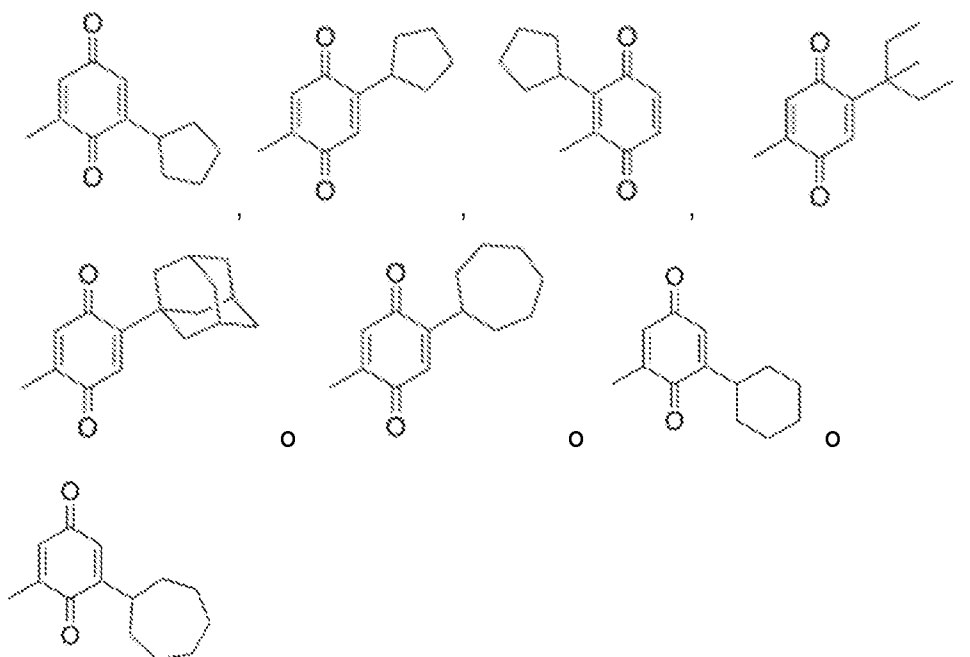
donde R1 y R3 son hidrógeno y R2 es seleccionado de la lista que consiste, ciclopentilo, cicloheptilo, 3-metil-pentilo y adamantano;

10

o donde R1 y R2 es hidrogeno, y R3 es seleccionado de la lista que consiste, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

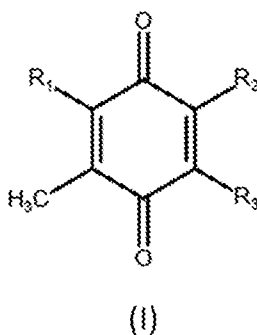
2. Compuesto de acuerdo a la reivindicación I, donde el compuesto se selecciona de la lista de estructuras que consiste en:

15



20

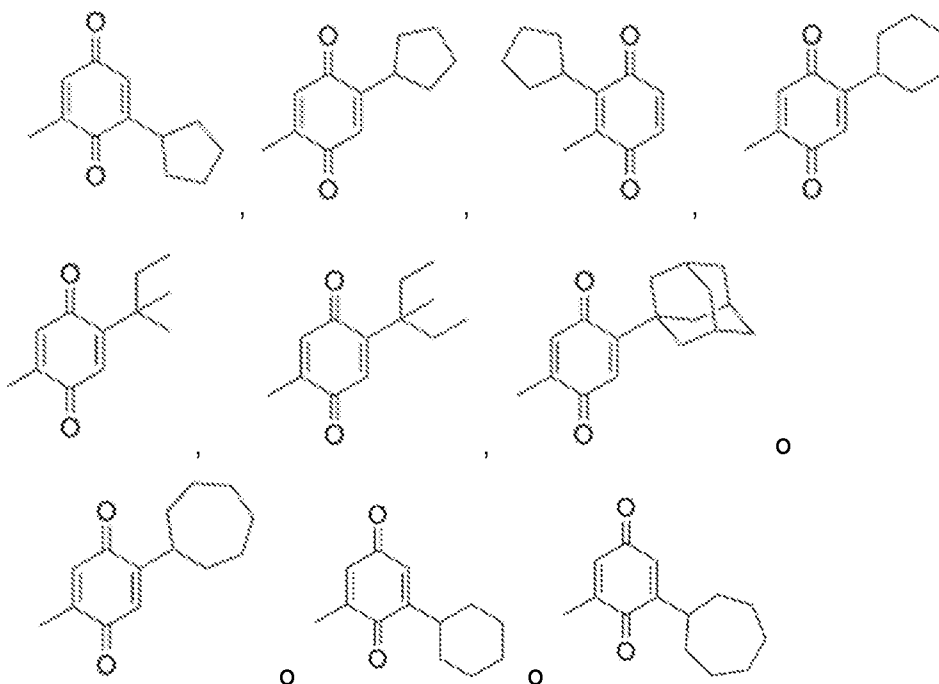
3. Compuesto de fórmula (I), sus formas isoméricas y sales de los mismos, para su uso como medicamento,



- 5 donde R1 y R3 son hidrógeno y R2 es seleccionado de la lista que consiste, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, 3-metil-pentilo, isopentanilo o adamantano;

o donde R1 y R2 es hidrogeno, y R3 es seleccionado de la lista que consiste, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

- 10 4. Compuesto de acuerdo a la reivindicación 3, donde el compuesto se selecciona de la lista de estructuras que consiste en:



5

5. Compuesto de la fórmula (I) de acuerdo a las reivindicaciones 3 o 4, para su uso como medicamento humano o veterinario.

6. Compuesto de acuerdo a la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de la leishmaniasis.

10

7. Compuesto de acuerdo a la reivindicación 6, donde leishmaniasis es causada por *Leishmania spp.*

8. Composición farmacéutica que comprende compuesto de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y al menos un excipiente farmacéutico aceptable.

15

9. Composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación anterior, que comprende el compuesto de fórmula (I) en un rango en peso en la composición entre 0,1-5% w/w.

10. Composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 8, que comprende:

- 0,1-5% en peso del compuesto de fórmula (I),
- 35-45 % en peso de polyacrylamida,
- 15- 25 % en peso de C13-14 Isoparafina, and
- 3-8 % surfactante, preferiblemente el surfatante es Laureth-7

20

11. Composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 8-10 para uso tópico, en forma líquida, de crema o en forma de gel.

25

12. Composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde la composición es una composición para uso oral es en forma de comprimido, capsula, gránulos, píldoras o liofilizado.

13. Método de obtención de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende al menos las siguientes etapas:

- 5 i) Proporcionar una mezcla de 2,5-dimetoxitolueno en presencia de tricloruro de aluminio y cloruro de alquilo en un disolvente nitrogenado, preferiblemente nitrometano;
- ii) Agitar la mezcla de la etapa anterior durante por lo menos 30min a un rango de temperatura entre -10°C hasta 10°C, preferiblemente 0°C, en condiciones anhidras y atmósfera inerte;
- 10 iii) Adición de agua al producto de la reacción anterior para detener la reacción seguido de extracción de los productos obtenidos en la etapa anterior con un disolvente orgánico;
- iv) Adición de óxido de plata y ácido nítrico de manera secuencial a los productos obtenidos en la etapa anterior;
- 15 v) Opcionalmente adición de agua al producto de la reacción anterior seguido de extracción con un disolvente orgánico;
- vi) Opcionalmente etapa de purificación.

20 14. Método de obtención de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo a la reivindicación anterior donde, el disolvente orgánico de la etapa iii) se selecciona de una lista que consiste en; hexano, pentano, acetato de etilo o diclorometano;

25 15. Método de obtención de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 13-14, donde el disolvente orgánico de la etapa v) se selección de la lista que consiste en, diclorometano, hexano, dietil eter, acetona, metanol, etanol, isopropanol tetrahidrofurano y dietil amina,

30 16. Método de obtención de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende al menos las siguientes etapas:

- i) Proporcionar una mezcla de 2,5-dimetoxitolueno disolvente orgánico a una temperatura en un rango entre -5°C hasta 10°C, preferiblemente a 0°C;
- 35 ii) Añadir a la mezcla anterior una disolución de n-butillitio en disolvente orgánico a una temperatura en un rango entre - 5°C hasta 10°C durante por lo menos 10 minutos; preferiblemente 0°C durante 10 minutos;

- 5
- iii) Aumentar la temperatura de la mezcla anterior a un rango de entre 20°C hasta 30°C;
 - iv) Enfriar producto de etapa anterior a una temperatura en un rango entre -10°C hasta 5°C, seguido de adición de cloruro de alquilo gota a gota;
 - 5 v) Añadir cloruro amónico al producto de la etapa anterior, seguido de extracción con un disolvente orgánico;
 - vi) Adición de óxido de plata y ácido nítrico de manera secuencial a los productos obtenidos en la etapa anterior;
 - 10 vii) Opcionalmente adición de agua al producto de la reacción anterior seguido de extracción con un disolvente orgánico;
 - viii) Opcionalmente etapa de purificación.
17. Método de acuerdo a la reivindicación anterior donde, el alquilo de la etapa iv) alquilo lineal o ramificado, C₁-C₁₀.
- 15
18. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 16-17 donde, el disolvente orgánico de las etapas i) y vii) se selección de la lista que consiste en, diclorometano, hexano, dietil eter, acetona, metanol, etanol, isopropanol tetrahidrofurano y dietil amina,
- 20

Figura 1

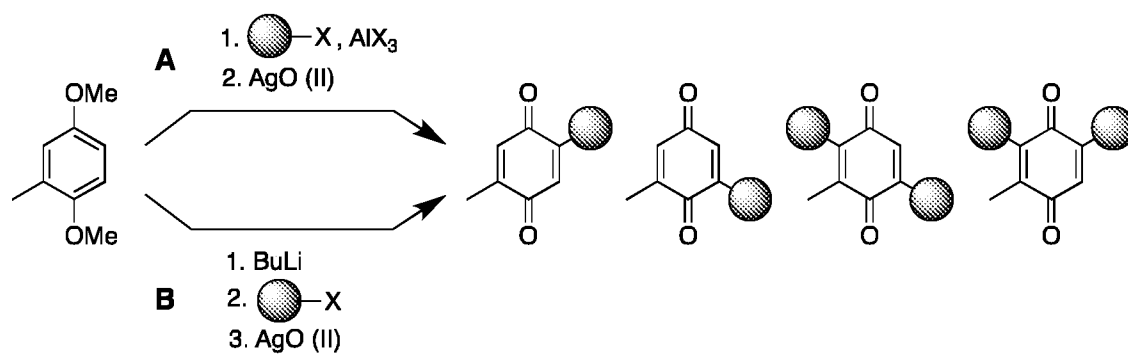
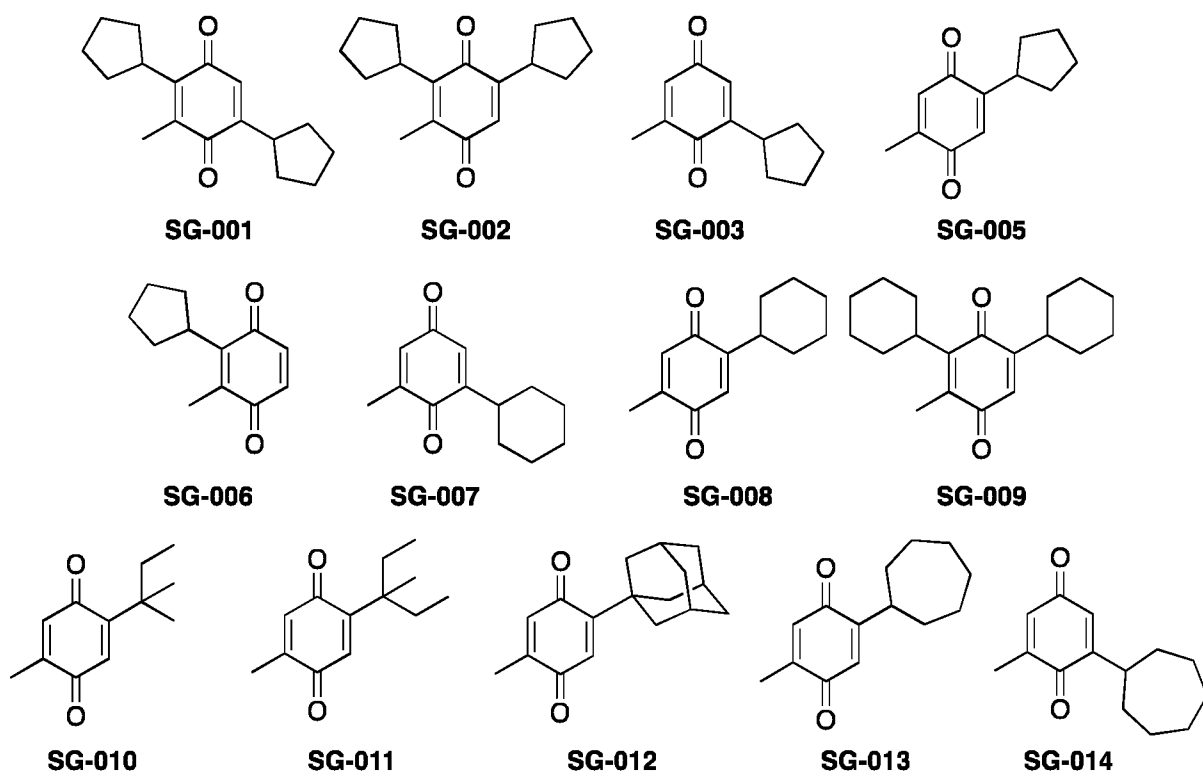


Figura 2





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

② N.º solicitud: 202230581

② Fecha de presentación de la solicitud: 28.06.2022

③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. cl.: **A61K31/122** (2006.01)
A61P33/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BARTON, DEREK H. R.; SAS, WOJCIECH. The invention of radical reactions. Part XIX. The synthesis of very hindered quinones.. Tetrahedron (1990), 46(10), 3419-30, 1990, Vol. 46, Páginas 3419-30, ISSN 0040-4020, <DOI: 10.1016/S0040-4020(01)81512-X>. página 3421 el compuesto 7c ; Base de datos Registry , compuesto con RN 129453-19-6.	1-2
A	DUBININ, B. M. Aromatic substances with musk odor. 2,6-Dinitro-4-tertamyl-3-methoxytoluene. . Zhurnal Obshchei Khimii (1951), 21, 2170-4, 1951, Vol. 21, Páginas 2170-4, ISSN: 0044-460X. Resumen; Base de datos Registry, compuesto con RN 857009-51-9	1-2
A	BARTON, DEREK H. R.; BRIDON, DOMINIQUE; ZARD, SAMIR Z. The invention of radical chain reactions. Part XIV. A decarboxylative radical addition to quinones. . Tetrahedron , 1987, Vol. 43, Páginas 5307-14, ISSN: 0040-4020, <DOI: 10.1016/S0040-4020(01)87707-3>. página 5310 el compuesto 15c; Base de datos REGISTRY, compuesto con RN 100611-91-4	1-2
A	SEBASTIAN-PEREZ VICTOR et al. Naphthoquinone as a New Chemical Scaffold for Leishmanicidal Inhibitors of Leishmania GSK-3. Biomedicines MAY 2022. , 30/04/2022, Vol. 10, Páginas Article No.: 1136, ISSN 2227-9059(electronic), <DOI: doi:10.3390/biomedicines10051136>. todo el documento, en especial tabla 1, figura 3, esquemas 2 y 3, tabla 2.	1-18
A	PEREZ-PERTEJO YOLANDA et al. Antileishmanial activity of terpenylquinones on Leishmania infantum and their effects on Leishmania topoisomerase IB. International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance DEC 2019. , 30/11/2019, Vol. 11, Páginas 70-79, ISSN 2211-3207(print) ISSN 2211-3207(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.ijpddr.2019.10.004>. todo el documento, en especial página 72, tabla 1 y página 73, tabla 2	1-18

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
17.05.2023

Examinador
E. Albarrán Gómez

Página
1/2

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

A61K, A61P

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

REGISTRY, CHEMICAL ABSTRACT, BIOSIS, EMBASE, MEDALINE, NPL, WPI, INVENES, EPODOC