

MOLÉCULAS TIPO ESTIRILQUINOLINAS CON ACTIVIDAD ANTI-PROTOZOOARIA

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se relaciona con formulaciones de compuestos derivados de estirilquinolinas, los cuales tienen actividad anti-protózoaria. Particularmente, la presente solicitud se relaciona con formulaciones de compuestos derivados de estirilquinolinas, las cuales son útiles para el tratamiento de enfermedades parasitarias como la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis o la malaria.

10

ESTADO DEL ARTE

La invención se refiere a derivados de estirilquinolinas los cuales son útiles para el tratamiento de enfermedades parasitarias como la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis o la malaria.

15

Para todas estas enfermedades existen tratamientos farmacológicos basados en compuestos sintéticos, los cuales presentan inconvenientes para su uso, principalmente asociados con la toxicidad.

20

En la última década se ha impulsado la investigación en la búsqueda de nuevas moléculas a partir de las cuales se puedan desarrollar medicamentos. Son abundantes los trabajos que reportan actividad ya sea contra *Leishmania*, *Plasmodium* o *Trypanosoma cruzi*. Algunos estudios se enfocan en quinolinas obtenidas de fuentes naturales o productos de síntesis evaluando sus actividades frente a diferentes agentes patógenos, comprobándose así la eficacia y efectividad de esta clase de compuestos. Por ejemplo, de la *Galipea officinalis*, planta nativa de Venezuela se identificaron cuatro alcaloides perteneciente al grupo de las 2-arilquinolinas: Agustureine, Galipeine, Cuspareine y Galipinina, las cuales presentaron buena actividad antimalárica *in vitro* (Jacquemond-Collet, 2002).

25

Así mismo Franck y colaboradores, 2004 reportaron el estudio la síntesis de 2-alquilquinolinas y 2-arilquinolinas, sustancias previamente aisladas de plantas, las cuales mostraron ser activas *in vitro* contra *Trypanosoma brucei*, *T. Cruzi*, *Leishmania infantum*, *L.amazonensis* y *Plasmodium falciparum*, además, resultaron ser potentes inhibidores *in vitro* del virus de inmunodeficiencia humana del tipo-1 (HIV-1) integrado.

30

De igual forma, algunas investigaciones han arrojado resultados prometedores tanto en estudios *in vitro* como en estudios *in vivo* como el caso de una 8-aminoquinolina

(Sitamaquina) un análogo del antimalárico primaquina, el cual es usado en la actualidad para el tratamiento de la Leishmaniasis visceral. (Nisha, 2014).

Se han sintetizado análogos quinolínicos tipo 2-estirilquinolina y derivados reducidos de los mismos, las cuales han mostrado ser compuestos promisorios *in vitro*, para el tratamiento de Leishmaniasis y la Chagas (Mesa et al, 2008; Garcia, 2010), de la misma forma, Sánchez, et al, 2014 sintetizó una serie de 2- estirilquinolinas que mostraron también ser activas frente a cepas de *Leishmania (V) panamensis*. Torres 2014, reportó la síntesis de compuestos tipo estirilquinolina que mostraron ser activas frente a cepas de *P. Falciparum* y Santafe, 2016 también reportó la actividad antiplasmodial *in vitro* de algunos compuestos del mismo tipo.

La patente de Estados Unidos No. 5.541.196, la cual se incorpora acá en su totalidad a modo de referencia, enseña quinoleinas 2-sustituidas útiles para el tratamiento de la leishmaniasis. Las quinoleinas pueden extraerse de una planta del género Galipea, también pueden obtenerse por síntesis química, según cualquier procedimiento conocido en sí mismo, por ejemplo el descrito por ISHIKURA y col. [Heterocycles, 23, 2375 (1985)].

Las quinoleinas preferidas son las que están sustituidas en 2 por una cadena de 3 átomos de carbono, saturada o no, y sustituidas o no; en este marco, la invención se refiere en particular a la 4-metoxi-2-n-propil-quinoleina, denominada quimanina A, y la 2-(1',2'-trans-epoxipropil)-quinoleina, denominada quimanina D, que son nuevas, así como la 2-n-propilquinoleina y la 2-propenilquinoleina, que ya son conocidas [VIEIRA y KUBO; ISHIKURA y col., publicaciones citadas anteriormente], pero en las que no se conocen las propiedades anti-leishmánicas.

Las quinoleinas anti-leishmánicas de acuerdo con la invención son activas tanto sobre las leishmaniasis responsables de la leishmaniasis cutánea y cutáneo-mucosa (por ejemplo, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania venezuelensis*, etc ...) que sobre las responsables de la leishmaniasis visceral (*Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*); se utilizan en medicina humana o medicina veterinaria; además son activas por vía oral.

La invención tiene además por objeto unas composiciones farmacéuticas para el tratamiento de las leishmaniasis, caracterizadas porque comprenden, como principio activo, al menos una quinoleina de fórmula (I), elegida entre las quinoleinas nuevas, o las quinoleinas en las que la utilización terapéutica no se ha propuesto anteriormente, definidas anteriormente.

Por su parte, la patente de Estados Unidos US 2012/0225903, que se incorpora acá en su totalidad a modo de referencia, enseña nuevos derivados de quinolina 2-sustituidos, un procedimiento para su preparación y el uso de los mismos para la producción de medicamentos. Se han descrito quinolinas sustituidas de estructuras variadas por su acción en el tratamiento de infecciones causadas por protozoos, tales como leishmaniasis, tripanosomiasis, toxoplasmosis y / o infecciones causadas por retrovirus, por ejemplo, VIH o HTLV. Algunas moléculas entre las quinolinas, y en particular las quinolinas 2-sustituidas, han mostrado un potencial ventajoso en el tratamiento de estas afecciones patológicas. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de moléculas que sean aún más activas y que puedan producirse a escala industrial. Específicamente, para permitir el desarrollo de un medicamento, una molécula debe mostrar al mismo tiempo una actividad farmacológica in vivo satisfactoria, baja toxicidad y también la posibilidad de producirse industrialmente con costes aceptables.

A pesar de lo anterior, aún existe la necesidad de nuevos medicamentos para el tratamiento de estas enfermedades que afectan a millones de personas, principalmente en países ubicados sobre el Ecuador. Particularmente, existe la necesidad de formulaciones de tipo tópico que ayuden a tratar la leishmaniasis cutánea.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 corresponde a fotografías de lesiones en hámsteres antes y después del tratamiento con compuestos de acuerdo con la presente invención.

La Figura 2 corresponde a curvas de actividad in vivo de algunos compuestos de acuerdo con la presente invención.

La Figura 3 corresponde a diagramas que muestran el desenlace clínico de hámsteres tratados con compuestos de la presente invención.

La Figura 4 corresponde a una gráfica de la evolución del peso de hámsteres tratados con compuestos de acuerdo con la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con compuestos sintéticos tipo esterililquinolinas con actividad anti-Plasmodium falciparum, Actividad Anti-Leishmania (*L. panamensis* y *L. braziliensis*) y anti-Tripanosoma cruzi.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención se obtienen mediante una reacción de Perkin modificada. Esto permite obtener 10 compuestos con actividad contra enfermedades parasitarias como la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis o la malaria.

5

Las formulaciones de acuerdo con la presente solicitud pueden utilizarse en composiciones de uso tópico para el tratamiento de lesiones cutáneas causadas por la leishmaniasis.

10 La reacción de Perkin que permite obtener las estililquinolinas de la presente solicitud comprende los siguientes pasos:

A una solución de Quinaldina o de 8-hidroxiquinaldina (4mmol) en 14mL anhídrido acético, se le adiciona un aldehído aromático (6mmol), seleccionado del grupo que se

15

menciona en la Tabla 1, a continuación:

Tabla 1. Listado de aldehídos aromáticos que se pueden emplear en la reacción

N°	REACTIVO
1	4-Metoxibenzaldehido
2	3-Metoxibenzaldehido
3	4-Dimetilaminobenzaldehido
4	2-Hidroxi-4-Metoxibenzaldehido
5	3-Etoxi-4-Hidroxiobenzaldehido
6	2-Hidroxi-5-Nitrobenzaldehido
7	Salicilaldehido
8	2-Hidroxi-3-Metoxibenzaldehido
9	5-Bromo-2-Hidroxiobenzaldehido
10	2-Clorobenzaldehido
11	2-Hidroxi-4-Metilquinolina
12	4-Isopropilbenzaldehido
13	3,5-Dimetoxi-4-hidroxibenzaldehido
14	8-Hidroxiquinaldina 98%
15	2,4-Dimetoxibenzaldedo

20 Esta solución se calentó a reflujo a temperatura en un rango entre 120-180 °C por 8 a 12 horas, monitoreando periódicamente el avance de la reacción mediante cromatografía en capa fina. Al completar la reacción (según lo indicado en cromatografía en capa fina), la mezcla se deja enfriar a temperatura ambiente, luego se le adicionan 100mL de solución saturada de bicarbonato de sodio poco a poco hasta lograr la hidrólisis

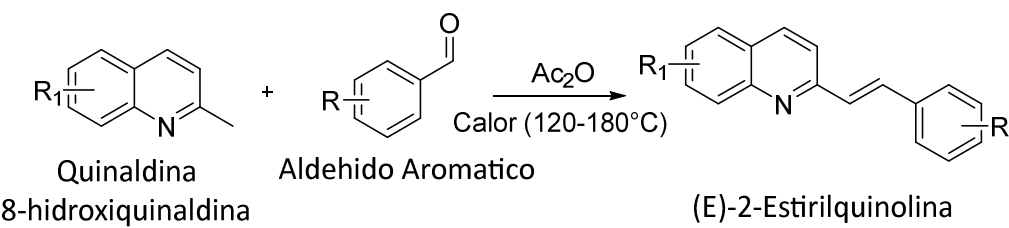
25 completa.

La mezcla se extrae con tres porciones de 50 mL de mezcla de bencina de petróleo: acetato de etilo en una proporción de 1:2, la fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra al vacío. Luego el producto crudo se extrae por cromatografía en columna (CC), utilizando como eluente bencina de petróleo: acetato de etilo con una composición de 66,666% de acetato de etilo y 33,333% de bencina de petróleo. Para la purificación de los compuesto se emplea también la técnica de cromatografía de columna con un eluente de bencina de petróleo y acetato de etilo, pero con gradiente de polaridad creciente de acuerdo a la Tabla 2:

Tabla 2. Proporciones de solventes empleados en la purificación de los compuestos

Bencina de Petróleo (%)	Acetato de Etilo (%)
100	0
95	5
90	10
85	15
80	20
70	30

A continuación se muestra un ejemplo de la ruta sintética empleada para obtener los compuestos de la presente invención:



La reacción anterior permite obtener diferentes compuestos derivados de estilrilquinolinas, de los cuales la presente solicitud selecciona los siguientes:

- 2-metoxi-6-(E)-(2-(quinolin-2-il)etenil)fenilacetate (RQ.5)
- 25 2-(E)-(2-(8-hidroxiquinolin-2-il)etenil)-6-metoxifenill-acetate (RQ.6)
- 2-(E)-(2-(8-hidroxiquinolin-2-il)etenil)fenil-acetate (RQ.2)
- 5-metoxi-2-(E)-(2-(quinolin-2-il)etenil)fenil-acetate (RQ.12)
- 2-[(E)-2-(4-metoxifenil)etenil]quinolin (RQ.16)
- (E)-2-(2-(8-hidroxiquinolin-2-il)etenil)-5-metoxifenil acetato (RQ.18)
- 30 2-[(E)-2-(3-metoxifenil)etenil]quinolin-8-ol (RQ-19)

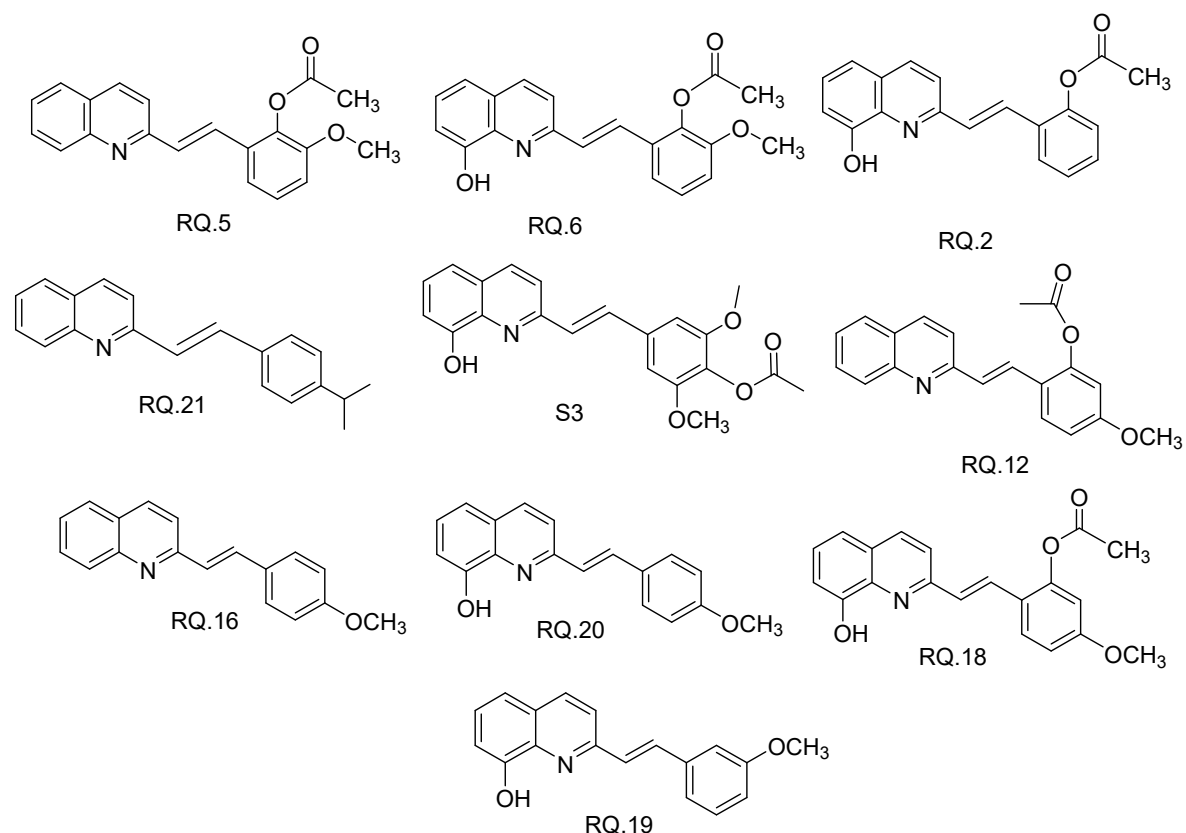
2-[(E)-2-(4-metoxifenil)etenil]quinolin-8-ol (RQ.20)

2-[(E)-(4-isopropilfenil)etenil]quinoline (RQ.21)

4-[(E)-2-(8-hidroxiquinolin-2-il)etenil]-2,6-dimetoxifenil-acetato (S3)

- 5 o mezclas de los mismos para desarrollar formulaciones tópicas con actividad anti-Plasmodium falciparum, Actividad Anti-Leishmania (*L. panamensis* y *L. braziliensis*) y anti-Tripanosoma cruzi.

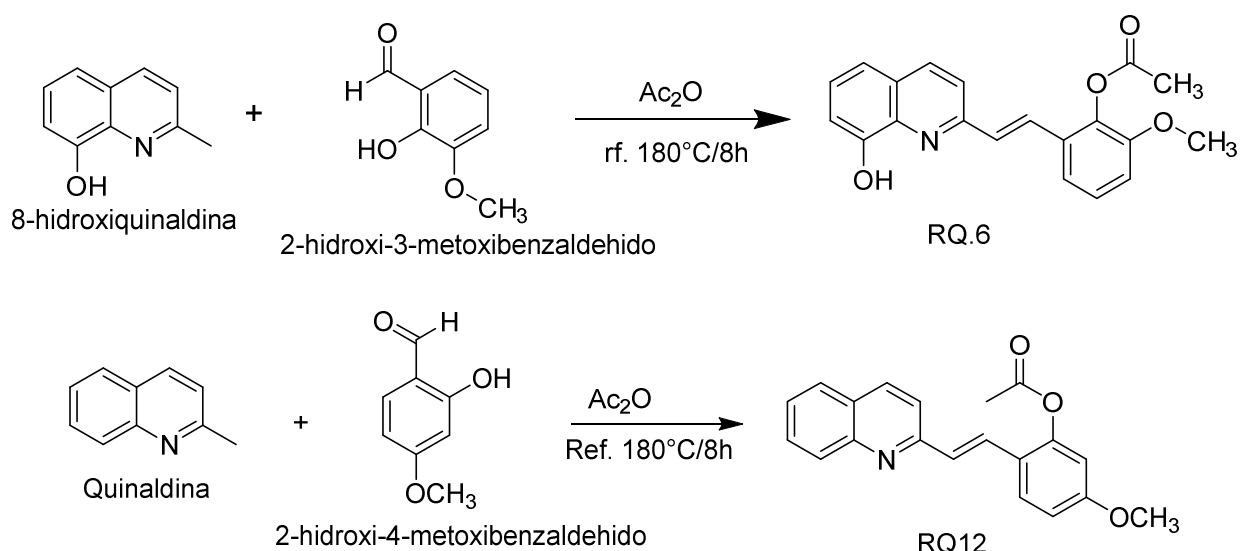
Estos compuestos tienen las siguientes estructuras moleculares:

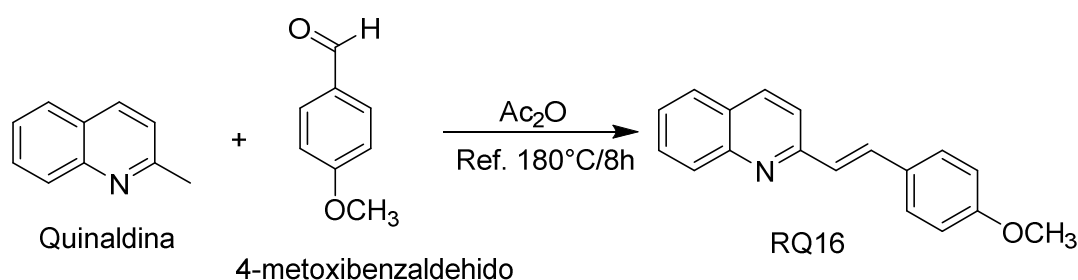


10

A continuación de muestran las rutas sintéticas para tres de los compuestos arriba mencionados, a saber, RQ6, RQ12 y RQ18:

15





Con el fin de evaluar la eficacia de los compuestos sintetizados, se probó su actividad antiparasitaria *in vitro*, los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4, a continuación:

Leishmaniasis:

Los productos de condensación RQ.2, RQ.5, RQ.6, y S3 mostraron un gran potencial leishmanicida reflejados en los valores de concentración Efectiva 50 (CE₅₀) 1,1 µg/ml, 1,5 µg/ml, 2,4 µg/ml, y 3.4 µg/ml respectivamente en comparación con la anfotericina B que es el medicamento control que presentó un valor de CE₅₀ de 0,05 µg/ml en amastigotes intracelulares de *L. panamensis* (cepa UA140 pirGFP).

En cuanto a la toxicidad evaluada sobre la línea celular U937, todos los compuestos sintetizados RQ.2, RQ.5, RQ.6 y S3 mostraron ser citotóxicos reportando valores de concentración letal media CL₅₀ de 16.7 µg/ml, 9.2 µg/ml, 16.3 µg/ml y 3.4 µg/ml respectivamente, sin embargo se puede afirmar que los compuestos sintetizados en este trabajo son promisorios porque su capacidad leishmanicida supera su capacidad citotóxica y esto se ve reflejado en los valores de índice de selectividad (IS) que son de 15.18, 6.13, 6.79 y 1.0 sugiriendo que los compuestos pueden considerarse como compuestos HIT y por lo tanto tienen potencial para continuar con estudios *in vivo* que validen su potencial terapéutico para tratamiento de la leishmaniasis.

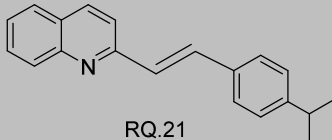
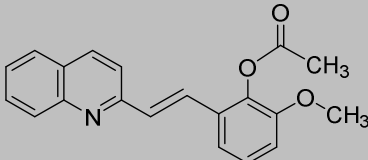
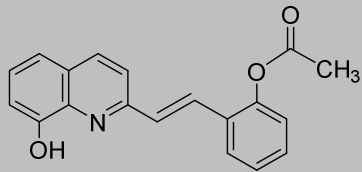
Malaria:

Los productos de condensación RQ.2, RQ.5, RQ.6, y S3 mostraron un gran potencial antimalárico reflejados en los valores de concentración Efectiva 50 (CE₅₀) 29.11µg/ml, 34.98 µg/ml. 27.39 µg/ml, y 17.75 µg/ml respectivamente en comparación con la cloroquina que es el medicamento control que presentó un valor de CE₅₀ de 3.35 y un IS 14.9 µg/ml, estos compuestos.

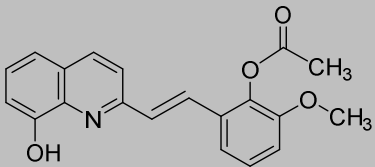
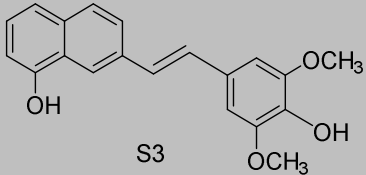
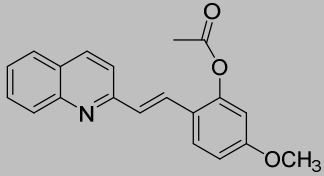
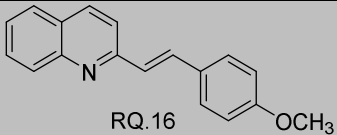
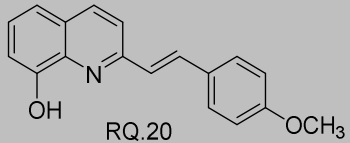
Chagas:

Todos los compuestos mostraron ser efectivos, sin embargo, solo RQ.2, RQ.5, RQ.6 exhibieron actividad promisorio contra el parásito, mostrando una concentración Efectiva 50 (CE₅₀) 12.53µg/ml, >4.6 µg/ml y 12.03 µg/ml respectivamente y con índices de selectividad de 1.86, 2.0 y 3.63 (Tabla 3) sugiriendo que los compuestos pueden considerarse como compuestos HIT y por lo tanto tienen potencial para continuar con estudios in vivo que validen su potencial terapéutico para tratamiento de la enfermedad chagas.

Tabla 3. Actividad antiaparasitaria (anti-Leishmania, Anti-Trypanosoma y anti-Plasmodium) *in vitro* de compuestos

Producto	Rendimiento (%)	Citotoxicidad (CL ₅₀ µg/mL)	Anti-Leishmania panamensis (Leishmaniasis)		Anti- <i>Plasmodium falciparum</i> (Malaria)		Ensayo de anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> (Chagas)	
			(CE ₅₀ µg/mL)	IS	(CE ₅₀ µg/mL)	IS	(CE ₅₀ µg/mL)	IS
 RQ.21	74,5	5,3	3,63	4.24	85.45	0.05	11.79	2,4
 RQ.5	79	9.2 ± 1.9	1.5	6.13	34,98	0,83	>4,6	2,0
 RQ.2	71	16.7 ± 3.8	1.1	15.18	29,11	0,87	12,53	1,86

1079-P

 RQ.6	75	16.3 ± 3.5	2.4	6.79	27,39	0,52	12,03	3.63
 S3	60.8	CL50: 5,5	2,8	1,96	17,75	0,19	7,89	0,43
 RQ.12	45	6.1 ± 0.4	1.8	3.4	13,70	>14,59	19,15	1,21
 RQ.16	71	54,1	24,7	2,19	18.31	2.95	65,95	0,82
 RQ.20	45.8	2,1	2,84	0,74	21.6	0.09	0.99	2,11

1079-P

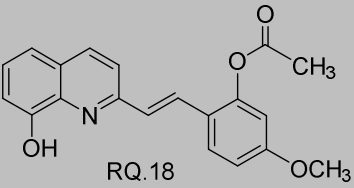
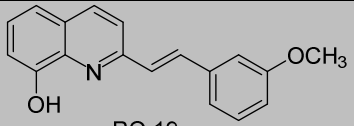
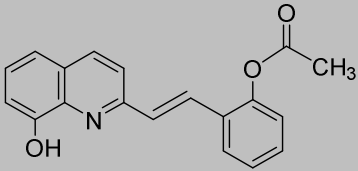
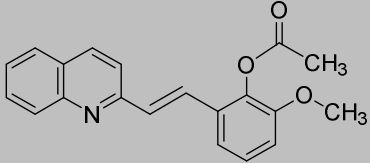
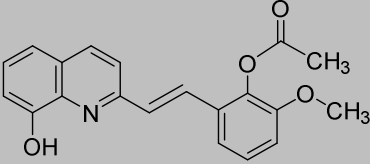
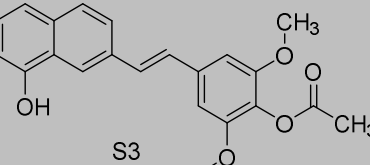
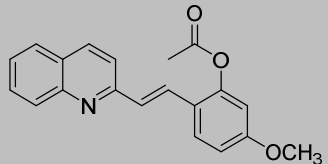
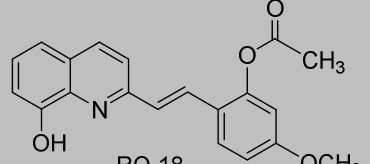
 RQ.18	40,3	>200	59,43	>3,36	>50	<4	13,75	>14,6 5
 RQ.19	57.6	3,4	1,78	1,92	13.54	0.25	1,30	2,62

Tabla 4. Resultados de actividad biológica *in vitro*

Producto	Citotoxicidad (CL ₅₀ μg/mL)	Anti-Leishmania panamensis (Leishmaniasis)		Anti- <i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i> (Malaria)		Ensayo de anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> (Chagas)	
		(CE ₅₀ μg/mL)	IS	(CE ₅₀ μg/mL)	IS	(CE ₅₀ μg/mL)	IS
 RQ.2	16.7 ± 3.8	1.1	15.1 8	29,11	0,87	12,53	1,86

1079-P

 RQ.5	9.2 ± 1.9	1.5	6.13	34,98	0,83	>4,6	2,0
 RQ.6	16.3 ± 3.5	2.4	6.79	27,39	0,52	12,03	3.63
 S3	3,4	3.4	1,00	17,75	0,19	7,89	0,43
 RQ.12	6.1 ± 0.4	1.8	3.4	13,70	>14,59	19,15	1,21
 RQ.18	>200	59,43	>3,3 6	>50	<4	13,75	>14,6 5
Anfotericina B	52.5 ± 3.6	0.05	1044				

1079-P

Cloroquina	50			3.35	14,9		
Benznidazol	>128					14,7	8,7

Los compuestos RQ6, RQ12 y RQ18 mostraron ser moléculas promisorias en estudios *in vitro* frente a parásitos causantes de enfermedades como malaria, chagas y leishmaniasis. Mostrando IS por encima de la unidad, sugiriendo que los compuestos pueden considerarse como compuestos HIT y por lo tanto tienen potencial para continuar con estudios *in vivo* que validen su potencial terapéutico para tratamiento de estas enfermedades. Además de esto, estas moléculas no están reportadas en el **Scifinder** ni en el **ChemSpider**, lo que nos permite afirmar que son nuevas.

Para el caso de RQ6, se validó su potencial *in vitro* con los estudios *in vivo* mostrando ser efectivos para el tratamiento de la leishmaniasis.

A continuación, se tomaron los compuestos RQ1, RQ2, RQ5, RQ6 y S3 y se probaron en hámsteres con lesiones cutáneas de leishmaniasis. Estos compuestos se seleccionaron para los ensayos *in vivo*, porque presentaron una actividad contra *Leishmania panamensis* *in vitro* promisorio con valores de CE_{50} entre 2.8 $\mu\text{g/mL}$, 1.1 $\mu\text{g/mL}$, 1.5 $\mu\text{g/mL}$ y 2.8 $\mu\text{g/mL}$ e índice de selectividad (IS) >1 (1.96, 15.18, 6.13 y 6.79) comparados con el medicamento control Anfotericina B que presenta una CE_{50} 0.05 $\mu\text{g/mL}$ y un IS de 1044, lo que nos permite confirmar que su actividad contra el parásito supera su citotoxicidad y lo convierte en compuestos candidatos a ensayos *in vivo*.

La figura 1 muestra el estado inicial y el estado final de las lesiones cutáneas antes y después del tratamiento que duró 12 semanas con formulaciones de los compuestos RQ2, RQ5, RQ6 y S3.

La Figura 2 muestra las curvas de actividad *in vivo* de los compuestos S3, RQ2, RQ5 y RQ6, específicamente la evolución de las lesiones al inicio del tratamiento (TD0), al final del tratamiento (TD20) y durante los 30, 60 y 90 días posteriores al

final del tratamiento. Como se puede observar, el tamaño de las lesiones se redujo consistentemente para todos los compuestos excepto para el compuesto RQ6, las cuales volvieron a crecer 90 días después de terminado el tratamiento.

- 5 La Figura 3 muestra el desenlace clínico del tratamiento con los compuestos de fórmula SQ3, RQ2, RQ5 y RQ6. Esta figura permite observar que para los compuestos S3, RQ2 y RQ5 el tratamiento fue exitoso y no hubo reincidencia de la enfermedad; por el contrario, el compuesto RQ6 si bien muestra tener un mayor porcentaje de sujetos con mejoría, también muestra un número alto de sujetos
10 donde el tratamiento falló.

- Finalmente, la Figura 4 muestra el efecto sobre el peso corporal de los hámsteres durante el tratamiento con formulaciones de los compuestos S3, RQ2, RQ5 y RQ6. Como se puede observar, los sujetos tratados con los compuestos S3, RQ2 y RQ5
15 subieron de peso al final del tratamiento, en tanto que los tratados con el compuesto RQ6 mostraron una pérdida de peso.

- Las formulaciones utilizadas para los ensayos comprenden entre 1% y 5% del compuesto activo S3 o RQ2 o RQ5 o RQ6 y entre 95% y 99% de excipientes
20 seleccionados del grupo que comprende árnica, caléndula, miel de abejas, elastina, colágeno, urea, alantonina y mezclas de los mismos.

- Si bien hasta ahora se ha hecho una descripción de la invención en función a algunas modalidades preferidas de la misma, esto no significa que la misma sea de
25 carácter restrictivo ya que se busca proteger no solo las formulaciones ejemplificadas sino también formulaciones con los demás compuestos activos desarrollados, así como también mezclas de los mismos y con otros compuestos activos que han demostrado tener aplicación en el tratamiento de este tipo de enfermedades.

Así mismo, el experto con habilidad ordinaria en la materia entenderá que existen variaciones y modificaciones a las formulaciones descritas arriba, las cuales caen dentro del espíritu y el alcance de la solicitud como se reclama en el capítulo reivindicatorio a continuación.