(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 414 291**

(21) Número de solicitud: 201132035

(51) Int. Cl.:

C07D 471/08 (2006.01)
A61K 31/439 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

16.12.2011

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

18.07.2013

(71) Solicitantes:

UNIVERSITAT DE VALENCIA (50.0%)
Avenida Blasco Ibáñez, 13
46010 Valencia ES y
UNIVERSIDAD DE GRANADA (50.0%)

(72) Inventor/es:

GARCÍA-ESPAÑA MONSONÍS, Enrique;
CLARES GARCÍA, María Paz;
BLASCO LLOPIS, Salvador;
SORIANO SOTO, Conxa;
GONZÁLEZ GARCÍA, Jorge;
VERDEJO VIU, Begoña;
INCLÁN NAFRÍA, Mario;
SÁNCHEZ MORENO, Manuel;
MARÍN SÁNCHEZ, Clotilde y
OLMO ARÉVALO, Francisco

(74) Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

(54) Título: **COMPUESTOS MACROCÍCLICOS DE TIPO ESCORPIANDO Y SU USO COMO ANTIPARASITARIOS.**

(57) Resumen:

Compuestos macrocíclicos de tipo escorpiando y su uso como antiparasitarios. La presente invención hace referencia a compuestos macrocíclicos de tipo escorpiando, los cuales adquieren dicha nomenclatura debido a la particular forma de su estructura química formada por un cuerpo macrocíclico y un brazo colgante donde pueden sustituirse diferentes radicales. La presente invención además comprende el uso de dichos compuestos como medicamentos, particularmente en el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos, preferentemente por los parásitos Trypanosoma cruzi o Leishmania spp, como por ejemplo la enfermedad de Chagas o la Leishmaniasis.

ES 2 414 291 A1

DESCRIPCIÓN

COMPUESTOS MACROCÍCLICOS DE TIPO ESCORPIANDO Y SU USO COMO ANTIPARASITARIOS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención hace referencia a compuestos macrocíclicos de tipo escorpiando, los cuales adquieren dicha nomenclatura debido a su particular estructura química formada por un cuerpo macrocíclico y un brazo colgante donde pueden sustituirse diferentes radicales. La presente invención además comprende el uso de dichos compuestos como medicamentos, particularmente en el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos, preferentemente por los parásitos *Trypanosoma cruzi* o *Leishmania spp.*, como son la enfermedad de Chagas o la Leishmaniasis.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El parasitismo es la asociación biológica en la que un organismo ("el parásito") vive sobre (ectoparásito) o dentro (endoparásito) del cuerpo de otro organismo ("hospedador" o "huésped") del que obtiene sus nutrientes. Así, el parasitismo es un proceso por el cual una especie mejora su capacidad de supervivencia utilizando como hospedador a individuos de otras especies para que cubran sus necesidades básicas y vitales. El resultado de dicha asociación es principalmente beneficiosa para el parásito lo que se traduce en la mejora de su aptitud reproductiva (en inglés *reproductive fitness*) y, generalmente, va en detrimento de la aptitud reproductiva del hospedador.

Tal y como se vislumbra más arriba, los parásitos pueden clasificarse en diferentes grupos en función de su localización en el hospedador y de la influencia que ejercen sobre el mismo. Así, los parásitos que viven dentro del hospedador se llaman endoparásitos y, aquéllos que viven fuera, reciben el nombre de ectoparásitos. Por su parte, lo parásitos parasitoides se caracterizan por su capacidad de causar la muerte del organismo hospedador.

Se ha demostrado que la supervivencia del parásito está estrechamente vinculada a la capacidad de su enzima superóxido dismutasa (FeSOD) de evadir el daño originado por los radicales tóxicos del hospedador [*S. Ghosh. S. Goswami, S. Adhya, Biochem. J. 2003, 369, 447*]. Así, la FeSOD del parásito desempeña un papel relevante como parte de la defensa antioxidante en los parásitos que desarrollan enfermedades como por ejemplo la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) o la Leishmaniasis (*Leishmania spp.*) [*N. Le Trang, S. R. Meshnick, K. Kitchener, J. W. Eaton, J. Biol. Chem., 1983, 258, 125*].

Concretamente, la Leishmaniasis es una enfermedad causada por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania*. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad van desde úlceras cutáneas que cicatrizan espontáneamente, hasta formas fatales en las cuales se presenta inflamación severa del hígado y del bazo. La enfermedad por su naturaleza zoonótica, afecta tanto a perros como humanos. Sin embargo, animales silvestres como zarigüeyas, coatíes y jurumíes entre otros, son portadores asintomáticos del parásito, por lo que son considerados como animales reservorios. La forma cutánea de la enfermedad (Leishmaniasis cutánea) en humanos se caracteriza por la aparición de úlceras cutáneas indoloras en la zona de la picadura las cuales se pueden curar espontáneamente o permanecer de manera crónica durante años. La Leishmaniasis visceral es la forma clínica que se cobra más vidas mundialmente. Esta presentación puede ser fatal si no se trata a tiempo. Se caracteriza por la inflamación del hígado y del bazo, acompañada por distensión abdominal severa, pérdida de condición corporal, desnutrición y anemia.

El tratamiento actual de la Leishmaniasis se basa en la aplicación intramuscular de fármacos basados en antimonio como el antimoniato de meglumina (Glucantime®) durante un plazo de 20 a 30 días. Sin embargo, tal y como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, estos fármacos muestran una toxicidad elevada y no han demostrado ser efectivos en la etapa crónica de la enfermedad.

Los especímenes de *Leishmania* muestran dos morfologías durante su ciclo vital:

- Promastigote: forma alargada con flagelo anterior. Está presente en el intestino y glándulas salivales del invertebrado (vector).
- Amastigote: forma esférica y con un flagelo muy corto, que no sobresale de la bolsa flagelar, de modo que sólo es apreciable en el microscopio electrónico. Se reproduce dentro de macrófagos y células del sistema retículoendotelial del hospedador vertebrado. Las infecciones se producen en la piel (cutáneas), piel y mucosas (mucocutáneas) o en los órganos (viscerales).

Por su parte la enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria tropical, generalmente crónica, causada por *Trypanosoma cruzi*. El reservorio natural lo constituyen los armadillos, marsupiales, roedores, murciélagos y primates silvestres, además de ciertos animales domésticos como perros, gatos, incluso ratas y las cobayas. Es transmitida al hombre comúnmente por triatominos hematófagos, como el *Triatoma infestans*, el cual transmite el parásito cuando defeca sobre la picadura que él mismo ha realizado para alimentarse. También puede transmitirse por transfusión de sangre contaminada, por la ingesta de alimentos contaminados por el parásito o verticalmente de la madre infectada al feto. El insecto que transmite esta enfermedad puede infectarse si pica a una persona que tenga la infección, y así adquirir la capacidad de seguir propagando este parásito.

Se estima que son infectadas por la enfermedad de Chagas entre 15 y 17 millones de personas cada año, de las cuales mueren unas 50.000. La etapa aguda infantil se caracteriza por fiebre, linfadenopatía, aumento del tamaño de hígado y bazo y, en ocasiones, miocarditis o meningoencefalitis con pronóstico grave. En la etapa crónica, a la cual llegan entre el 30% y el 40% de todos los pacientes chagásicos, suele haber cardiomiopatía difusa grave, o dilatación patológica (megasíndromes) del esófago y colon, megaesófago y megacolon, respectivamente.

El medicamento más utilizado actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas es el Benzinidazol (BZN) ®. Sin embargo, tal y como ocurre en el caso de los fármacos comerciales para el tratamiento de la Leishmaniasis, y se evidencia en los ejemplos de la presente invención, estos fármacos no son muy efectivos,

fundamentalmente en la fase crónica (más de 30 días de tratamiento) de la enfermedad y presentan una toxicidad muy elevada.

Trypanosoma cruzi presenta tres formas distintas:

- Amastigote: esférico u ovalado, es la forma reproductiva en el interior de las células mamíferas.
- Epimastigote: alargado y con el cinetoplasto localizado anteriormente al núcleo, es la forma reproductiva en el tracto digestivo de los invertebrados y en medios de cultivo.
- Tripomastigote: también alargado, pero con el cinetoplasto localizado posteriormente al núcleo. Se encuentra en la sangre de los mamíferos y es la forma infectante de los mismos. Esta forma no se divide.

Así, aunque la Leishmaniasis y la enfermedad de Chagas son enfermedades causadas por parásitos que afectan a millones de personas en todo el mundo, actualmente existen remedios terapéuticos muy limitados y de dudosa eficacia. Además, como se ha explicado, los que se utilizan conllevan serios problemas, ya que su eficacia es variable, al ser tratamientos largos y caros, y, además, están asociados con graves efectos tóxicos.

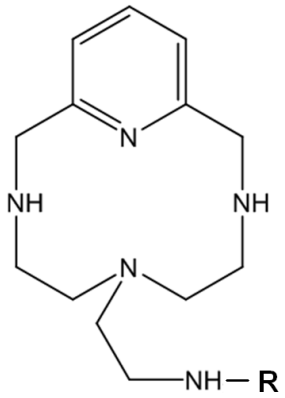
Por lo tanto, dada la incidencia y relevancia de las enfermedades citadas más arriba, se antoja necesario el uso de compuestos antiparasitarios capaces de tratar dichas enfermedades de forma eficaz en todas las etapas del proceso, incluyendo la etapa crónica, y que, además, no resulten tóxicos para los pacientes, o, al menos, que presenten una toxicidad reducida respecto a los compuestos de referencia utilizados actualmente.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención solventa el problema técnico arriba explicado mediante la utilización de compuestos macrocíclicos de tipo escorpiando para el tratamiento de

enfermedades causadas por parásitos, preferentemente por los parásitos *Trypanosoma cruzi* o *Leishmania spp*, como son la enfermedad de Chagas o la Leishmaniasis.

Los compuestos utilizados en la presente invención como antiparasitarios son compuestos de fórmula **(I)**:



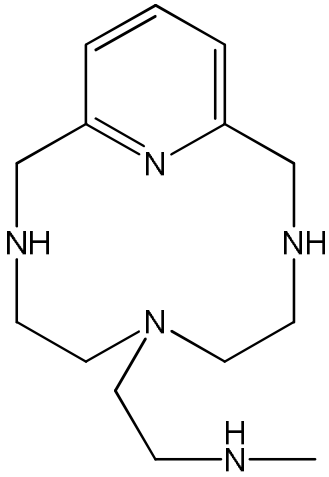
(I)

donde **R** puede ser H o una cadena hidrocarbonada que comprende los sustituyentes $\mathbf{R_1}$ y/o $\mathbf{R_2}$, donde $\mathbf{R_1}$ es un grupo amino sustituido por $\mathbf{R_2}$ o sin sustituir, $\mathbf{R_2}$ comprende carbociclos y/o heterociclos que pueden estar sustituidos por $\mathbf{R_3}$ o sin sustituir, y $\mathbf{R_3}$ comprende la fórmula (**I**) donde **R** es una cadena hidrocarbonada.

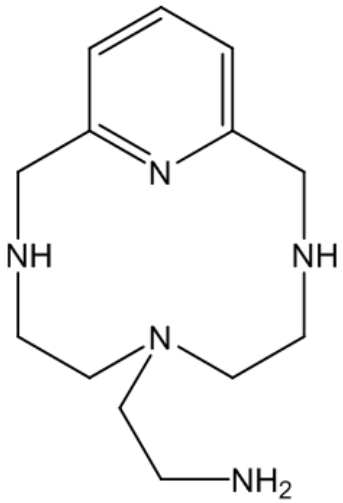
Tal y como se muestra en los ejemplos, la presente invención hace una comparativa de los compuestos de fórmula general (**I**) frente a Benzinidazol® (BZN) y Glucantime® que son fármacos de referencia utilizados en el tratamiento de las enfermedades causadas por *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp* respectivamente. Como se evidencia en los ejemplos, los compuestos que se utilizan en esta invención son estructuralmente diferentes a dichos fármacos de referencia, presentan una toxicidad alrededor de diez veces inferior y muestran resultados de actividad antiparasitaria tanto en la fase aguda como en la crónica. En un aspecto preferido el carbociclo es el benceno y el heterociclo es la piridina.

En un aspecto preferido, los compuestos utilizados en la presente invención como antiparasitarios son compuestos de fórmula **(I)** , donde **R** es un radical seleccionado del grupo que consiste en H, $-(C_1\text{-}C_{20})\text{-}NH\mathbf{R_1}$, donde la cadena hidrocarbonada es

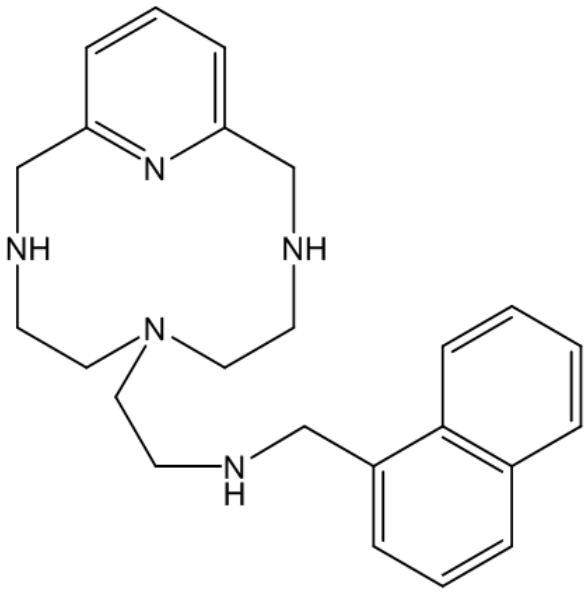
lineal, ramificada, saturada o insaturada y -(C_1-C_{20})-$\mathbf{R_2}$, donde la cadena hidrocarbonada es lineal, ramificada, saturada o insaturada; donde $\mathbf{R_1}$ es un radical seleccionado del grupo que consiste en -H y -(C_1-C_{20}) donde la cadena hidrocarbonada es lineal, ramificada, saturada o insaturada y donde el carbono terminal de dicha cadena tiene un sustituyente que comprende 1-7 anillos, siendo los anillos saturados, parcialmente insaturados o aromáticos, aislados o condensados, donde los anillos tienen 3-8 elementos, cada uno de estos elementos independientemente seleccionados del grupo que consiste en C, CH, CH_2, N, S, NH, NH^+, C=O, O, C-$\mathbf{R_3}$; donde $\mathbf{R_2}$ es igual a R_1 excepto -H; donde $\mathbf{R_3}$ es -(C_1-C_{10})-$\mathbf{R_4}$; y donde $\mathbf{R_4}$ es:



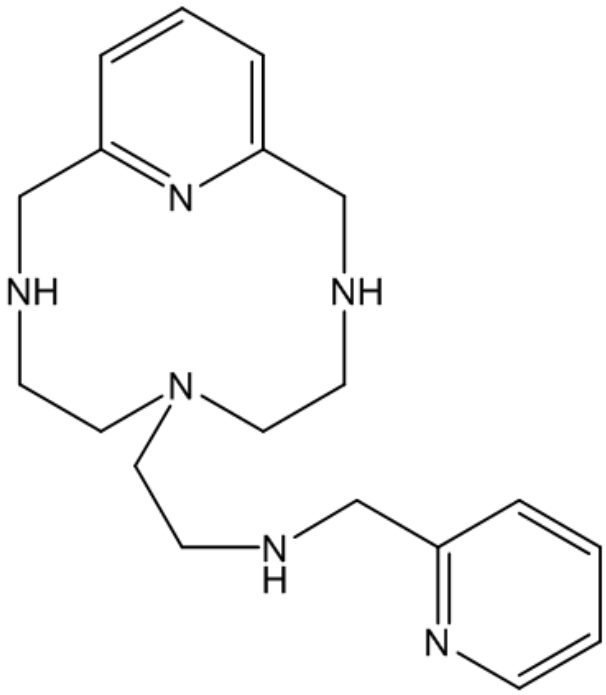
En una realización aún más preferida, los compuestos utilizados en la presente invención como antiparasitarios, son los siguientes:



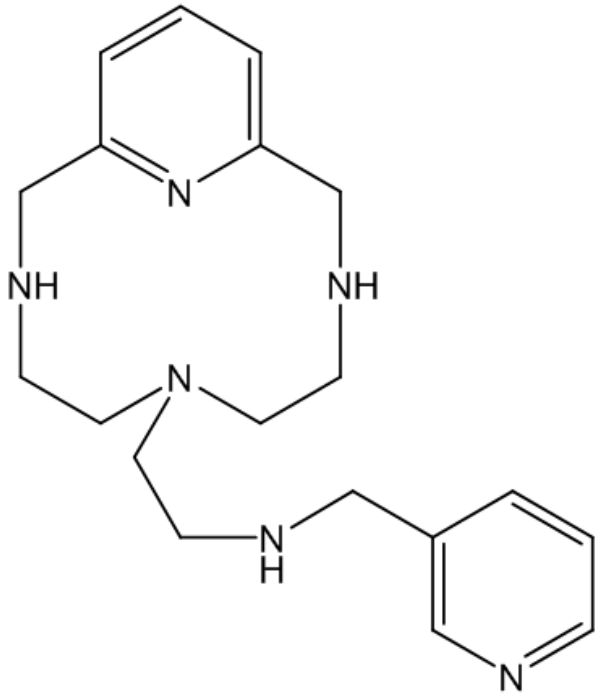
(II)



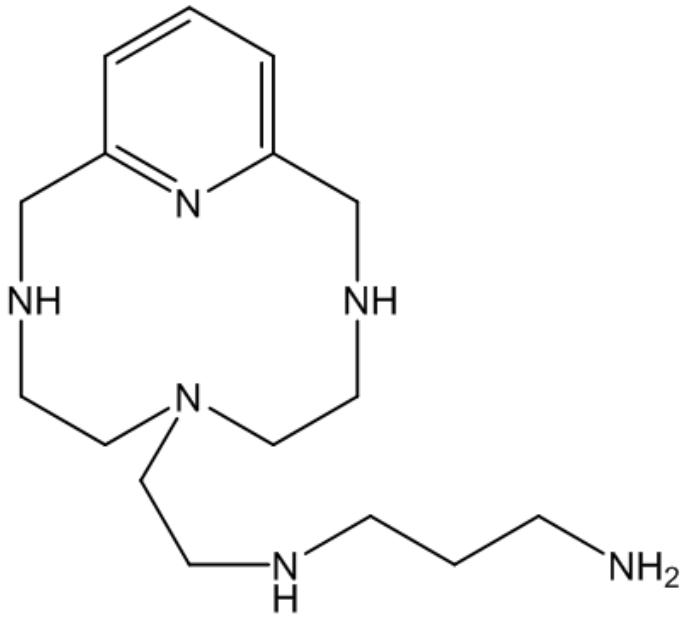
(III)



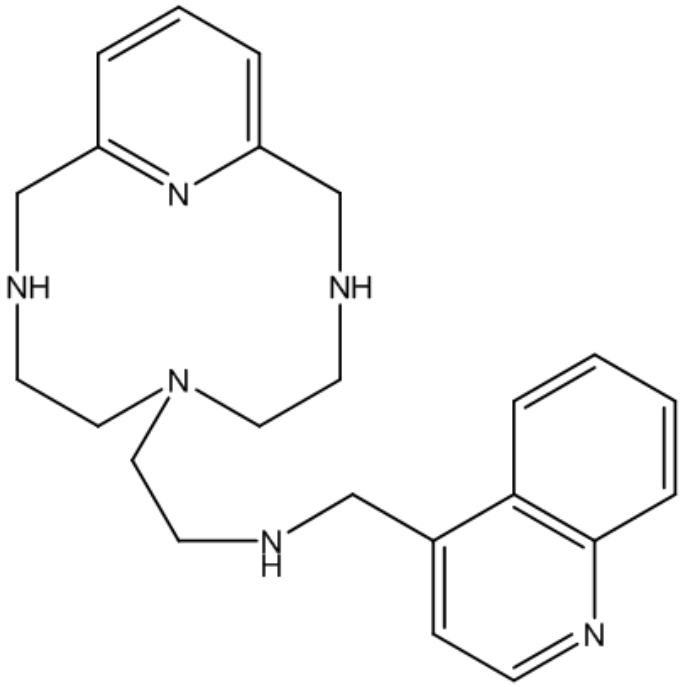
(IV)



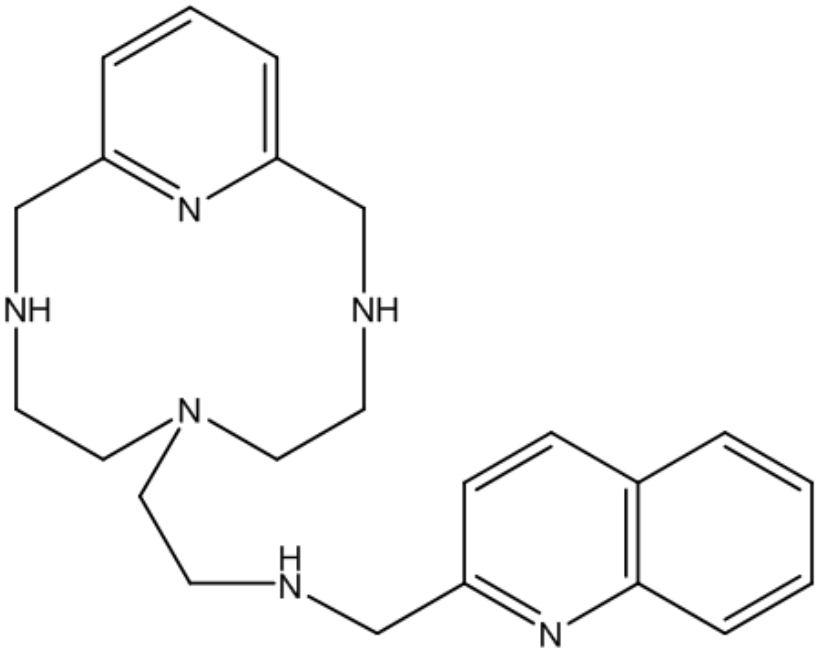
(V)



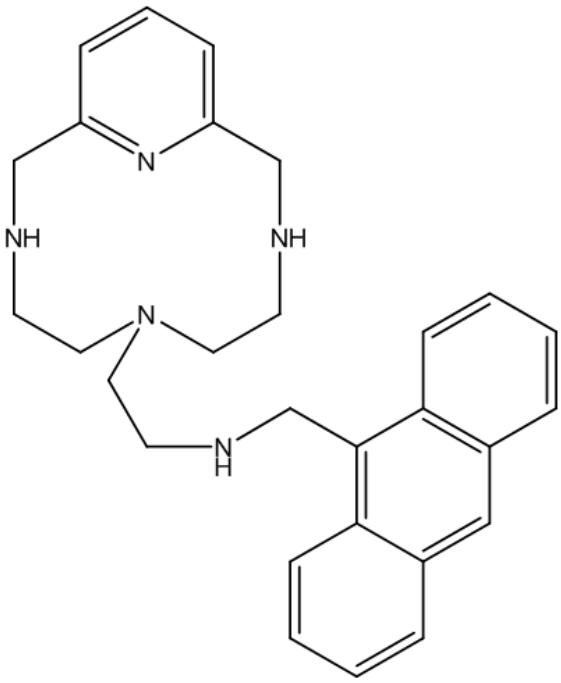
(VI)



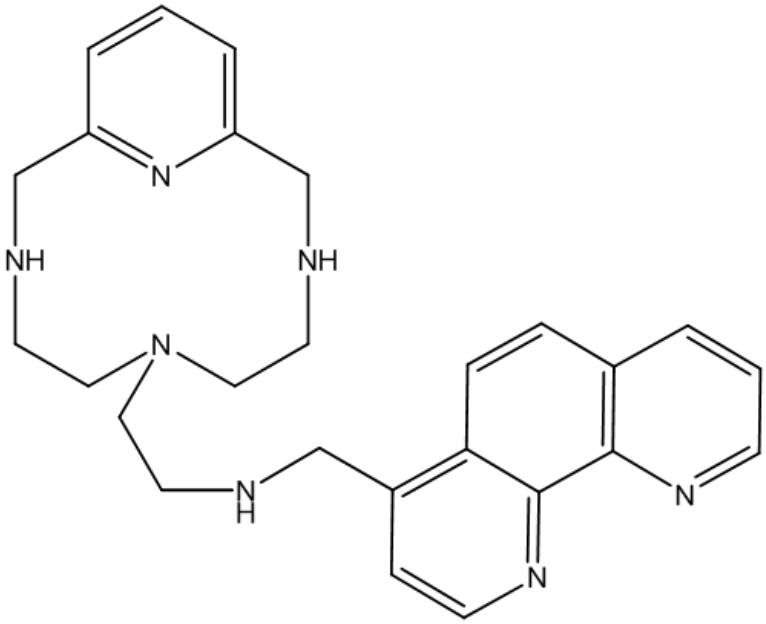
(VII)



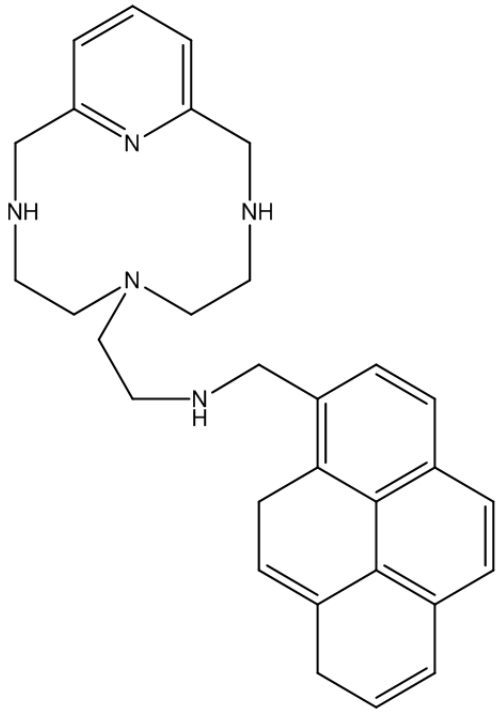
(VIII)



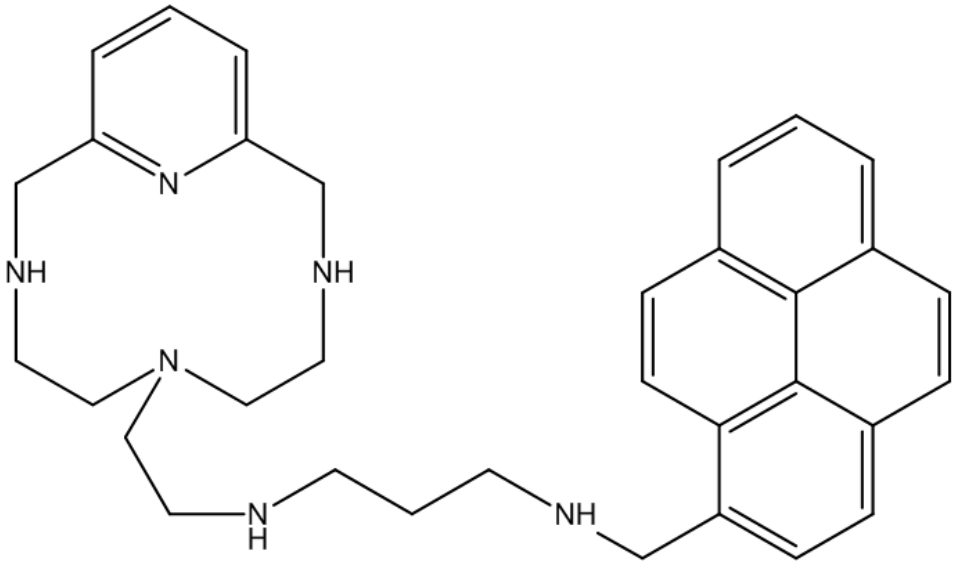
(IX)



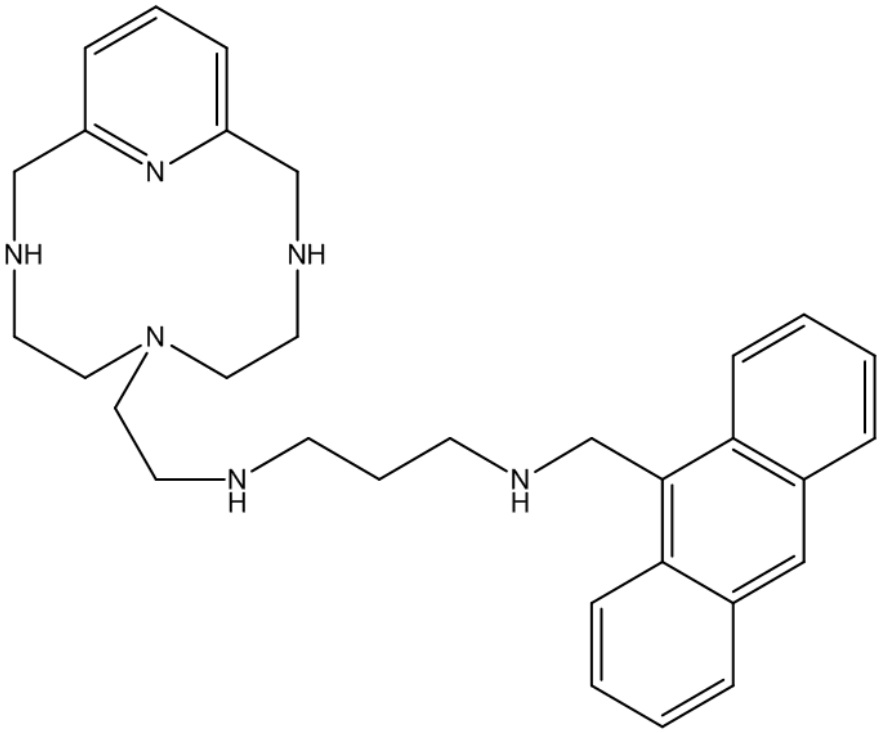
(X)



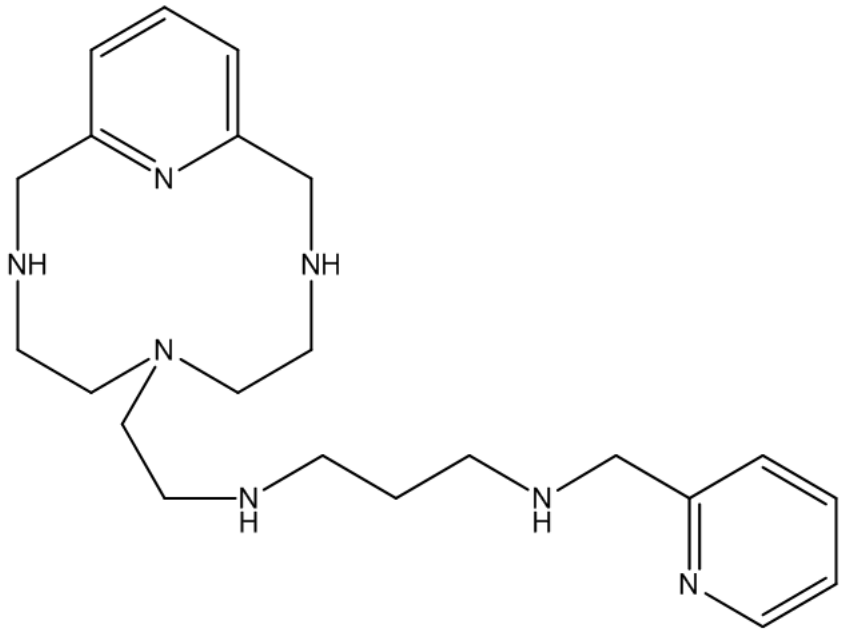
(XI)



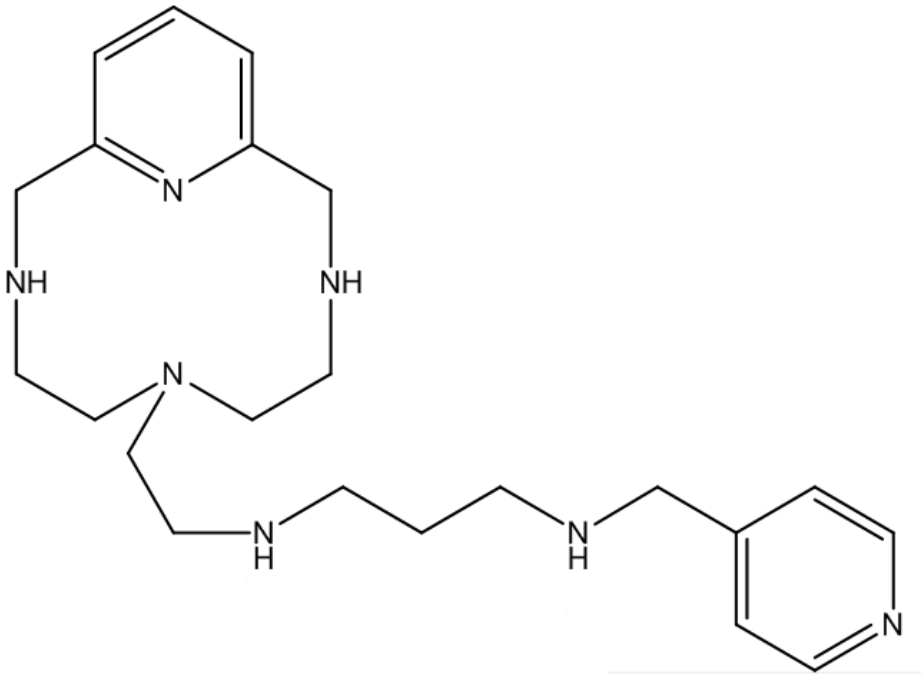
(XII)



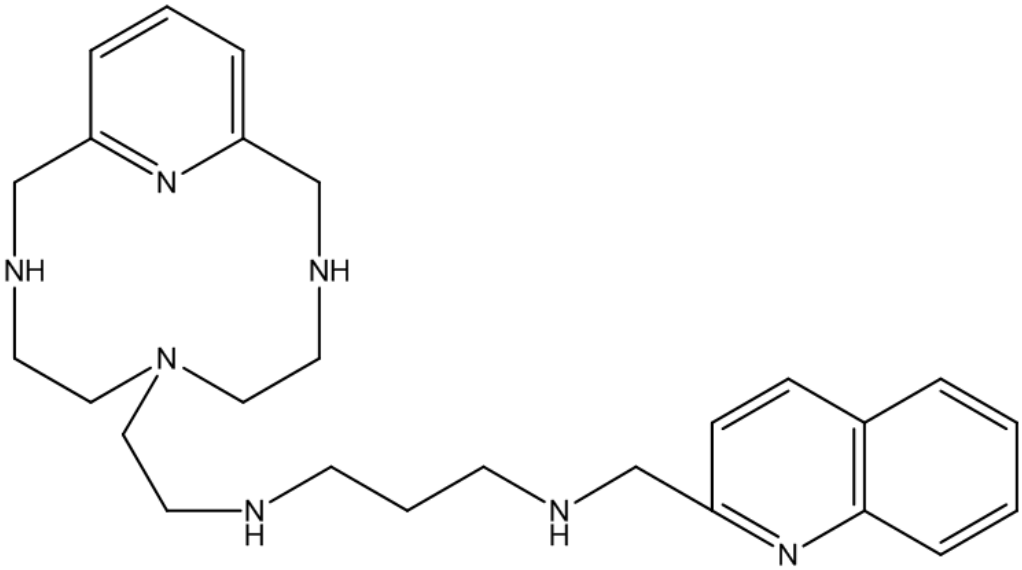
(XIII)



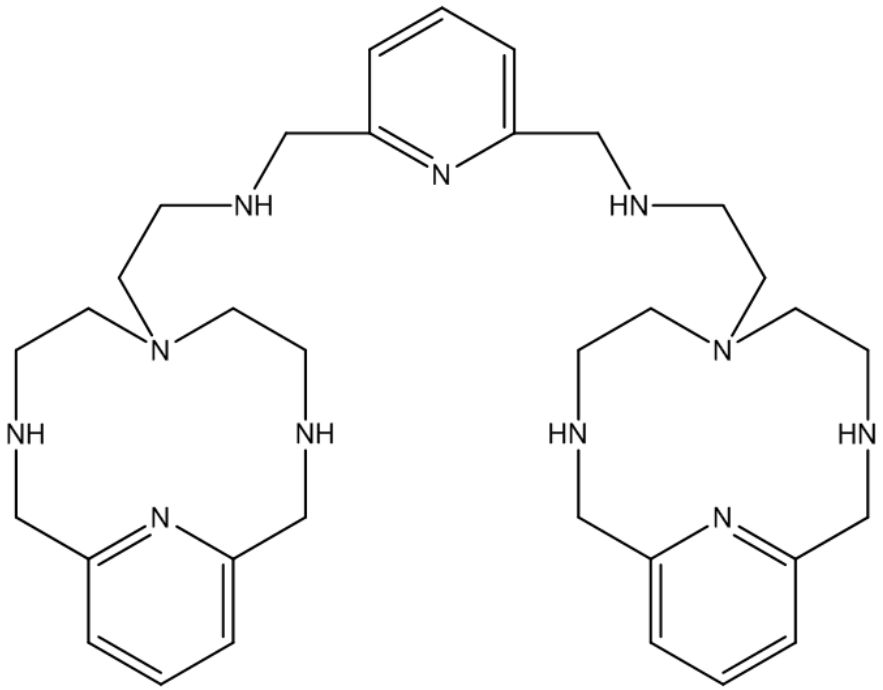
(XIV)



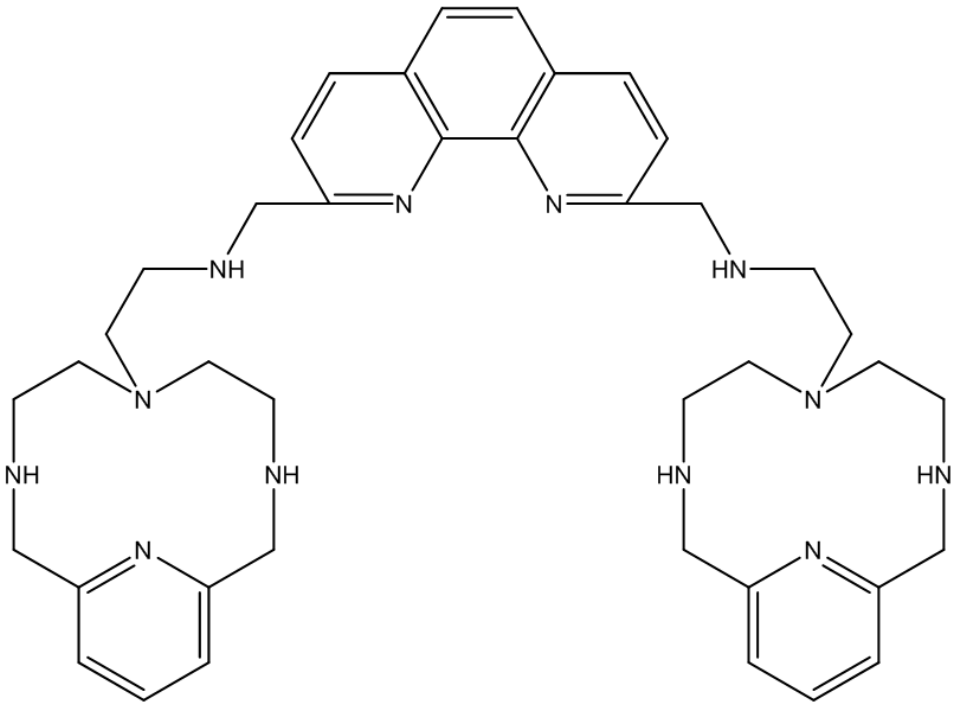
(XV)



(XVI)



(XVII)



(XVIII)

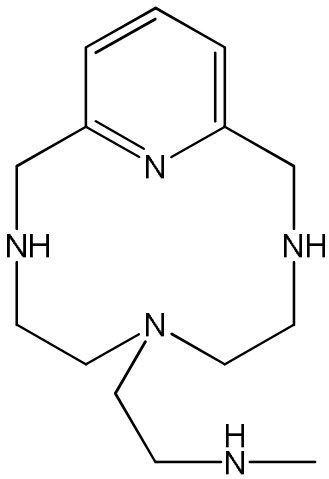
El uso de los compuestos de fórmula (**I**) como antiparasitarios se lleva a cabo, preferiblemente, frente a la enfermedad de Chagas (causada por *Trypanosoma cruzi*) o la Leishmaniasis (causada por *Leishmania spp*.). Dado que la supervivencia del parásito está estrechamente vinculada a la capacidad de sus enzimas (FeSOD) de evadir el daño originado por los radicales tóxicos de su hospedador y que, por lo tanto, la FeSOD del parásito desempeña un papel relevante como parte de la defensa antioxidante en los parásitos que desarrollan dichas enfermedades, en la presente invención se han utilizado compuestos de fórmula (**I**) capaces de inhibir la FeSOD del parásito, limitando su defensa antioxidante frente a los radicales tóxicos del hospedador.

Tal y como se muestra en los ejemplos, la presente invención hace una comparativa de los compuestos de fórmula general (**I**) frente a Benzinidazol® (BZN) y Glucantime® que son fármacos de referencia utilizados en el tratamiento de las enfermedades causadas por *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp* respectivamente. Como se evidencia en los ejemplos, los compuestos que se utilizan en esta invención son estructuralmente diferentes a dichos fármacos de referencia, presentan una toxicidad alrededor de diez veces inferior y muestran resultados de actividad antiparasitaria tanto en la fase aguda como en la crónica.

Aunque, tal y como se demuestra en el **Ejemplo 15**, **Tablas 1-3**, todos los compuestos que comparten la fórmula (**I**) son eficaces en el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos, a la vez que mantienen un nivel de toxicidad bajo (sustancialmente menor que los compuestos de referencia), los compuestos particularmente preferidos de la presente invención para su uso como antiparasitarios son los compuestos de fórmula (**II**), (**IV**) y (**V**) los cuales presentan un nivel de toxicidad incluso menor que el resto de los compuestos macrocíclicos de tipo escorpiando estudiados en la presente invención, obteniéndose para el compuesto **(V)** el mayor porcentaje de reducción del número de parásitos.

Así, el primer aspecto de la presente invención hace referencia al uso de un compuesto de fórmula (**I**), donde R puede ser H o una cadena hidrocarbonada que comprende los

sustituyentes R_1 y/o R_2, donde R_1 es un grupo amino sustituido por R_2 o sin sustituir, R_2 comprende carbociclos y/o heterociclos que pueden estar sustituidos por R_3 o sin sustituir, y R_3 comprende la fórmula (I) donde R es una cadena hidrocarbonada, preferentemente al uso de un compuesto de fórmula (I), donde R es un radical seleccionado del grupo que consiste en H, -(C1-C20)-NHR_1, donde la cadena hidrocarbonada es lineal, ramificada, saturada o insaturada y -(C1-C20)-R_2, donde la cadena hidrocarbonada es lineal, ramificada, saturada o insaturada; donde R_1 es un radical seleccionado del grupo que consiste en -H y -(C1-C20) donde la cadena hidrocarbonada es lineal, ramificada, saturada o insaturada y donde el carbono terminal de dicha cadena tiene un sustituyente que comprende 1-7 anillos, siendo los anillos saturados, parcialmente insaturados o aromáticos, aislados o condensados, donde los anillos tienen 3-8 elementos, cada uno de estos elementos independientemente seleccionados del grupo que consiste en C, CH, CH_2, N, S, NH, NH+, C=O, O, C-R_3; donde R_2 es igual a R_1 excepto -H; donde R_3 es -(C1-C10)-R_4; y donde R_4 es:



, y aún más preferentemente al uso de un compuesto seleccionado entre los compuestos de fórmula **(II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI), (XVII)** y **(XVIII)**, para la elaboración de una composición farmacéutica o veterinaria destinada al tratamiento de enfermedades causadas por parásitos. Igualmente, este primer aspecto reivindicable comprende a cualquiera de los compuestos anteriores para ser usados en el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos, es decir, como antiparasitarios.

Los compuestos de fórmula (**I**) descritos en la presente invención pueden utilizarse como principios activos en pacientes humanos o en animales pudiendo además ser preparados en composiciones farmacéuticas, o formulaciones, y administrados, de acuerdo a los conocimientos existentes en el estado la técnica del desarrollo galénico, de distintas formas tales como: por vía tópica, por inyección intradérmica o por vía oral mediante cápsulas, grageas o tabletas. De igual modo, las formas sólidas se elaboran en presencia de los excipientes necesarios seleccionados del grupo que comprende pero no se limita a: manitol, polivinilpirrolidona, celulosa microcristalina, silicagel, talco, estearato magnésico, óxido de titanio, colorantes y antioxidantes. Por lo tanto, la presente invención también cubre las propias composiciones farmacéuticas o veterinarias que comprendan dichos compuestos de fórmula (**I**) y, opcionalmente, excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos estudiados en la presente invención superan los problemas citados en el estado de la técnica al ser efectivos en fase crónica de la enfermedad (ver **Ejemplo 16**) y tener una toxicidad disminuida respecto a los compuestos usados como referencia (ver **Ejemplo 15**). Así, los compuestos estudiados en esta invención presentan valores de IC_{50} más bajos que los compuestos de referencia lo que tiene importantes implicaciones debido a que cuanto menor sea dicho valor, menor será la cantidad de compuesto necesaria para causar el efecto antiparasitario deseado. Por lo tanto, el uso de menor cantidad de compuesto para conseguir dicho efecto reducirá considerablemente sus efectos secundarios, entre ellos la toxicidad.

En un aspecto preferido los compuestos utilizados de acuerdo con el primer aspecto de la invención forman un complejo con Mn(II).

En otro aspecto preferido, las enfermedades tratadas por los compuestos del primer aspecto de la invención son la enfermedad de Chagas o la Leishmaniasis, lo que significa que los compuestos de la invención son eficaces contra los parásitos causantes de dichas enfermedades, concretamente *Trypanosoma cruzi* o *Leishmania spp*.

Otro aspecto de la invención hace referencia a un método de tratamiento de enfermedades causadas por parásitos, como por ejemplo la enfermedad de Chagas o la Leishmaniasis, que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los compuestos citados en el primer aspecto de la invención. En la presente invención se entiende por cantidad terapéuticamente eficaz a aquélla que hace revertir la enfermedad tratada o mejorar sus síntomas.

El tercer aspecto de la invención hace referencia a un compuesto de fórmula (**I**), seleccionado entre los compuestos de fórmula (**X**), (**XI**), (**XIV**) y (**XV**) y, en un aspecto preferido, al uso de los mismos para preparar un medicamento. Alternativamente, este aspecto preferido también cubre a dichos compuestos de fórmula (**X**), (**XI**), (**XIV**) y (**XV**) para ser usados como medicamento.
El último aspecto de la invención hace referencia a una composición farmacéutica o veterinaria que comprende al menos un compuesto de fórmula (**X**), (**XI**), (**XIV**) y (**XV**) y excipientes farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Esta figura muestra el porcentaje de reducción *in vitro* en el número de tripomastigotes (forma infectante del parásito *Trypanosoma cruzi*) (eje de ordenadas) en función de los diferentes compuestos de la invención ensayados a diferentes concentraciones (eje de abscisas). Se observa que para el compuesto P3py (fórmula **V**), a una concentración 50μM, se obtiene el mayor porcentaje de reducción del número de tripomastigotes.

Figura 2. En esta figura se estudia la parasitemia (cantidad de parásitos en sangre) en la fase aguda de la enfermedad de Chagas en ratones. Se muestra la presencia de tripomastigotes en sangre en ratones (eje de ordenadas) en función del tiempo de tratamiento con los compuestos de la invención en días (eje de abscisas). La dosis utilizada de los compuestos de la invención y del fármaco de referencia (BZN) es de 5 mg/Kg. Se observa que en los ratones donde se ha inyectado el compuesto P (fórmula

II), P2py (fórmula **IV**) y P3py (fórmula **V**), la presencia de parásitos es bastante menor, particularmente con el compuesto P3py (fórmula **V**). Control (-▲-) y dosis de 5 mg/Kg recibidas de: BZN (**-Δ-**), **P** (-□-), **P2py** (-♦-) y **P3py** (-●-).

Por otro lado en esta figura se reflejan los resultados obtenidos de la curva de parasitemia en la que se aprecia que los compuestos de fórmula **II** (P), fórmula **IV** (P2py) y fórmula **V** (P3py) son los más efectivos al inicio de la fase crónica (a los 30 días preferentemente a los 60 días post infección) puesto que reducen significativamente el número de parásitos en sangre.

Figura 3. En esta figura se muestra un estudio de la actividad de los compuestos P (fórmula **II**), P2py (fórmula **IV**) y P3py (fórmula **V**) en la capacidad de infestación y el crecimiento de los parásitos de *T. cruzi* (eje de ordenadas) en función del tiempo de tratamiento en días (eje de abscisas). Control (-▲-), BZN (-Δ-), P (-□-), P2py (-♦-) y P3py (-●-). Medido a una concentración de IC_{25}:

A) Capacidad de infestación.
B) Número de amastigotes (forma reproductiva del parásito) por célula Vero infectada.
C) Número de tripomastigotes (forma infectante del parásito) en el medio de cultivo.

En estos gráficos puede observarse que los compuestos de la invención P (fórmula **II**), P2py (fórmula **IV**) y P3py (fórmula **V**), muestran un porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito mayor al del fármaco de referencia, particularmente en el caso del compuesto P3py (fórmula **V**), y, además, disminuyen la capacidad de infestación.

Figura 4. Esta figura muestra un estudio de inhibición de las diferentes enzimas superóxido dismutasa (Cu-ZnSOD, MnSOD y FeSOD) ya que la supervivencia del parásito está estrechamente vinculada a la capacidad de los enzimas de evadir el daño originado por los radicales tóxicos de su anfitrión.

A) Inhibición *in vitro* (%) de la enzima CuZn-SOD de eritrocitos humanos (actividad 23.36 ± 4.21 U/mg).

B) Inhibición *in vitro* (%) de la enzima Mn-SOD de *Escherichia coli* (actividad 18.12 ± 5.32 U/mg).

C) Inhibición *in vitro* (%) de la enzima FeSOD de *T. cruzi* (epimastigotes) (actividad 20.77 ± 3.18 U/mg).

Puede observarse que los compuestos de la invención son capaces de inhibir la enzima FeSOD de parásito con un valor de IC_{50} (concentración requerida para conseguir una inhibición del 50%) menor que en el resto de la enzimas. Así, puede decirse que los compuestos de la invención llevan a cabo una acción selectiva o específica en la inhibición de la enzima FeSOD del parásito.

Figura 5. Imágenes de las alteraciones ultraestructurales tomadas por microscopio electrónico de transmisión (TEM) en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* tratados con los diferentes compuestos.

(1) Parásito control de *T. cruzi*, muestra orgánulos con su aspecto característico, como reservosomas (R), mitocondria (M), glicosomas (G), microtubulos (MT) y flagelo (F). (Bar: 0.583 μ).

(2) Epimastigotes de *T. cruzi* tratadas con el compuesto P (fórmula **II**) que aparecieron rotos (ver flecha) y con citoplasma poco electrodenso de aspecto granuloso (ver flecha). (Bar: 1.00 μ).

(3) Epimastigotes de *T. cruzi* tratado con **P2py** (fórmula **IV**) muestra mitocondrias hinchadas (M) y festoneamiento de la membrana citoplasmática (ver flecha). (Bar: 1.00 μ).

(4) Epimastigotes de *T. cruzi* tratado con **P3py** (fórmula **V**) muestra abundantes acidocalcisomas (A), enormes glicosomas fuertemente electrondesos (G) y grandes vacuolas (V). (Bar: 0.583 μ)

Las conclusiones obtenidas del estudio ultraestructural indican daños en la estructura celular del parásito como consecuencia del efecto de los compuestos estudiados en la presente invención. El daño a nivel de los orgánulos es clave en el metabolismo

energético del parásito (mitocondria y glicosomas) el cual originará la inviabilidad celular.

Figura 6. Representación del espectro ^{1}H-NMR en epimastigotes de *T. cruzi* tratados con los compuestos ensayados en la invención (concentración IC_{25}): (**A**) Control (sin tratamiento); (**B**) Compuesto de fórmula (**II**) (P**)**; (**C**) Compuesto de fórmula (**IV**) (P2py); (**D**) Compuesto de fórmula (**V**) (P3py). Lac (L-lactato), Ala (L-alanina); Ac (acetato); S (succinato); Eth (etanol) y Gly (glicerol). Se observa una disminución de los metabolitos excretados por el parásito, como consecuencia de una alteración en su metabolismo por acción de los compuestos antiparasitarios.

Figura 7. Esta figura muestra la efectividad de los compuestos P (fórmula **II**), P2py (fórmula **IV**) y P3py (fórmula **V**) en fase crónica. Se exhiben los niveles de anticuerpos parasitarios que muestran la eficacia de los compuestos de la invención, en la fase crónica de la enfermedad (modelo *in vivo* en fase crónica). La disminución de los niveles de anticuerpos parásitos es indicativa de la efectividad de los compuestos utilizados en la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Los ejemplos que se exponen a continuación tienen el objetivo de ilustrar la invención sin limitar el alcance de la misma.

EJEMPLOS

ENSAYOS LLEVADOS A CABO EN *T. CRUZI*

Ejemplo 1. Cultivo de los parásitos.

Se aisló la cepa SN3 de *T. cruzi* a partir de IRHOD/CO/2008/SN3. Esta nomenclatura hace referencia al hospedador de donde se aisló el parásito: I (insecto), RHOD (rhodnius), al país (Colombia) y al año de aislamiento (2008). Concretamente el

parásito se aíslo a partir de *Rhodnius prolixus* originario de Guajira (Colombia) [*Biological characterization of Trypanosoma cruzi stocks from domestic and sylvatic vectors in Sierra Nevada of Santa Marta, Colombia. Jair Téllez-Meneses, Ana María Mejía-Jaramillo, Omar Triana-Chávez Acta Tropica 108 (2008) 26–34, 2008)*].

Las formas epimastigotes se crecieron en medio axénico (Grace's Insect Medium Gibco®) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivo (FBS) a 28ºC en frascos para el cultivo de tejidos. Para obtener la suspensión de parásitos, se concentró el cultivo de epimastigotes (en fase de crecimiento exponencial) mediante centrifugación a 400 g durante 10 minutos y se contó el número de flagelos en un hemocitómetro.

Ejemplo 2. Trasformación de epimastigotes a formas metacíclicas.

El paso a tripomastigote metacíclico (forma que se encuentra en el vector en el último tramo del intestino y que son en realidad las formas infectivas para el hospedador mamífero) se indujo mediante el cultivo de los parásitos a 28ºC en medio modificado (Grace's medium Gibco®) durante 12 días [*Osuna, A.; Adroher, F. J.; Lupiañez, J. A. Cell. Differ. Dev. 1990, 30, 89–95*]. Después de 12 días de cultivo a 28ºC, se contaron las formas metacíclicas en un hemocitómetro de Neubauer. La proporción de formas metacíclicas fue de alrededor del 40% en esta etapa.

Ejemplo 3. Preparación del cultivo celular donde se ensayan los compuestos.

Se crecieron células Vero en medio RPMI (Rowell Park Memorial Institute Medium) (Gibco®) suplementado con 10% de suero bovino fetal, en aire humidificado al 95%, atmósfera con un 5% de CO_2 a 37ºC durante dos días. Para la evaluación de la citotoxicidad, las células se situaron en botellas de 25ml (Sterling) y se centrifugaron a 100g durante 5 minutos. Se retiró el medio de cultivo, adicionándose medio fresco a una concentración final de $1x10^5$ células/ml. Esta suspensión celular se distribuyó en el plato de cultivo con un ratio de 100 µl/pocillo y se incubó durante dos días a 37ºC en una atmósfera humidificada enriquecida con 5% de CO_2. El medio fue retirado, y

se añadió medio fresco junto con cada compuesto ensayado (a concentraciones de 100, 50, 25, 10 y 1 μM). Después de 72h de tratamiento, se determinó la viabilidad celular mediante citometría de flujo [*Clotilde Marín, Inmaculada Ramírez-Macías, Angeles López-Céspedes, Francisco Olmo, Noelia Villegas, Jesús G. Díaz, María José Rosales, Ramón Gutierrez-Sánchez, and Manuel Sánchez-Moreno J. Nat. Prod. 2011, 74, 744–750*].

Ejemplo 4. Ensayo de actividad *in vitro*: formas extracelulares.

Ensayo de los compuestos en epimastigotes

Se recogieron las formas epimastigotes en fase de crecimiento exponencial y se distribuyeron en platos de cultivo (con 24 pocillos) a una concentración final de $5x10^4$ parásitos/pocillo.

Los compuestos de la invención listados en la **Tabla 1** del **Ejemplo 15** y el Benzinidazol® fueron disueltos en medio líquido MTL (Mediun Trypanosome Liquid), y testados a las siguientes concentraciones: 100, 50, 25, 10 y 1 μM. Los efectos de cada compuesto frente a las formas epimastigotes se visualizaron a las 72 horas usando un hemocitómetro de Neubauer. El efecto de los compuestos sobre los parásitos se expresa en valores de IC_{50}, es decir, la concentración requerida para conseguir un 50% de inhibición calculada mediante un análisis de regresión linear a partir de los valores Kc de las concentraciones empleadas (Kc representa las concentraciones que se ensayan de los productos y que se utilizan en la regresión lineal para calcular el IC_{50}).

Los resultados se muestran en la **Tabla 1** del **Ejemplo 15**.

Ensayo de los compuestos de la invención en tripomastigotes

Los compuestos utilizados en la invención fueron evaluados en la forma tripomastigote de *T. cruzi*. Se utilizaron ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* después de 7 días de infección. Se obtuvo la sangre mediante punción cardiaca usando 3.8% de citrato de sodio como anticoagulante en un ratio de sangre/anticoagulante de 7:3. La parasitemia en los ratones infectados fue de $1x10^5$ parásitos/ml. Los

compuestos a ensayar se diluyeron en medio PBS para dar una concentración final de 10, 25 y 50 µM por cada producto. Se mezclaron alícuotas (20 µL) de cada solución en los platos de cultivo (96 pocillos) con 55 µL de sangre infectada que contiene los parásitos a una concentración cercana a $1x10^6$ parásitos/ml. Se utilizó como control sangre infectada en medio PBS. Los platos de cultivo se agitaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se mantuvieron a 4ºC durante 24 h. Se examinó cada solución con un microscopio (OLYMPUS CX41) con el objetivo de contar los parásitos usando el hemocitómetro de Neubauer. La actividad (porcentaje de reducción de los parásitos) fue comparada con el control [*Boiani, M.; Boiani, L.; Denicola, A.; Torres de Ortiz, S.; Serna, E.; Vera de Bilbao, N.; Sanabria, L.; Yaluff, G.; H. Nakayama, H.; Rojas de Arias, A.; Vega, C.; Rolan, M.; Gómez-Barrio, A.; Cerecetto, H.; González, M. 2H-Benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: a new family of water-soluble anti-trypanosomatidagents. J. Med. Chem. 2006, 49, 3215-3224*] [*Gerpe, A.; Aguirre, G.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; González, M.; Olea-Azar, C.; Rigol, C.; Maya, J. D.; Morello, A.; Piro, O. E.; Arán, V. J.; Azqueta, A.; López de Ceráin, A. L.; Monge, A.; Rojas, M. A.; Yaluff, G. IndazoleN-oxide derivatives as antiprotozoalagents: synthesis, biologicalevaluation and mechanism of actionstudies. Bioorg. Med. Chem. 2006, 14, 3467- 3480*].

Ejemplo 5. Ensayo de actividad *in vitro*: formas intracelulares.

Cultivo de amastigotes axénicos

Los amastigotes axénicos son una forma artificial conseguida por la transformación en un cultivo especial para el estudio *in vitro*, ya que la forma intracelular natural sólo se puede estudiar cuando está internalizada en células de macrófago.

Se cultivaron los amastigotes axénicos de *T. cruzi* siguiendo la metodología descrita en [*David Moreno, Daniel Plano, Ylenia Baquedano, Antonio Jiménez-Ruiz, Juan Antonio Palop, Carmen Sanmartín Parasitol Res (2011) 108:233–239*]. Por lo tanto, la transformación de los epimastigotes a amastigotes se consiguió después de tres días de cultivo en medio M199 (Invitrogen, Leiden, Holanda) suplementado con 10% de FCS (Foetal calf serum) inactivado por calor, 1 g/L β-alanina, 100 mg/L L-

asparagina, 200 mg/L sacarosa, 50 mg/L piruvato de sodio, 320 mg/L ácido málico, 40 mg/L ácido fumárico, 70 mg/L ácido succínico, 200 mg/L ácido α-cetoglutarato, 300 mg/L ácido cítrico, 1.1 g/L bicarbonato de sodio, 5 g/L MES (4-morpholineethanesulfonic acid), 0.4 mg/L hemina, 10 mg/L gentamicina pH 5.4 a 37°C. El efecto de cada compuesto frente a los amastigotes axénicos se testó a las 48 horas usando un hemocitómetro de Neubauer. El efecto se expresa en valores IC_{50}, es decir, la concentración requerida para conseguir un 50% de inhibición calculada mediante un análisis de regresión linear a partir de los valores Kc de las concentraciones empleadas.

Los resultados se muestran en la **Tabla 1** del **Ejemplo 15**.

Ensayo de los compuestos en amastigotes intracelulares

Se cultivaron células Vero en medio RPMI en ambiente humidificado al 95%, atmósfera de CO_2 al 5% y 37ºC. Dichas células fueron cultivadas durante dos días a una densidad de $1x10^4$ células/pocillo en microplatos de 24 pocillos (Nunc). Posteriormente, las células Vero se infectaron *in vitro* con las formas metacíclicas de *T. cruzi*, a un ratio de 10:1 y se mantuvieron durante 24 horas a 37ºC en atmósfera de 5% de CO_2. Los parásitos extracelulares se retiraron mediante lavado, y los cultivos infectados se incubaron con los compuestos de la invención a las siguientes concentraciones: 1, 10, 25, 50 y 100 µM y, posteriormente, se cultivaron durante 72 horas en medio RPMI y 10% de suero fetal bovino inactivado. La actividad de los compuestos se determinó a partir de la reducción del porcentaje de amastigotes en los cultivos. Los valores son la media de cuatro determinaciones individuales [*González P, Marín C, Rodríguez-González I, Hitos AB, Rosales MJ, Reina M, Dıaz JG, Gonzalez-Coloma A, Sanchez-Moreno M. In vitro activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of Leishmania infantum. Int J Antimicrob Agents 2005; 25: 136–41*]. El efecto se muestra, como en los casos anteriores, expresado como IC_{50}.

Los resultados se muestran en la **Tabla 1** del **Ejemplo 15**.

Ejemplo 6. Ensayo de los compuestos en la capacidad de infestación y crecimiento de parásitos.

Las células Vero se cultivaron en medio RPMI tal y como se describe más arriba. Posteriormente, las células se infectaron *in vitro* con las formas metacíclicas de *T. cruzi,* con un ratio 10:1. Los compuestos de la invención (concentraciones IC_{25}) se añadieron inmediatamente después de la infección y se incubaron durante 12 horas a 37ºC en atmósfera con 5% de CO_2. Los parásitos extracelulares y los compuestos ensayados fueron retirados mediante lavado, y los cultivos infectados se crecieron durante 10 días en medio fresco. El medio fresco fue añadido cada 48 horas. La actividad de cada compuesto de la invención ensayado se determinó a partir del porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula infectada en cultivos tratados y no tratados, en muestras fijadas con metanol y teñidas con Giemsa. El porcentaje de células infectadas y el número medio de amastigotes por célula infectada se determinó mediante el análisis de más de 100 células hospedadoras distribuidas en campos microscópicos elegidos aleatoriamente. Los valores se expresan como la media de cuatro determinaciones individuales. El número de tripomastigotes en el medio fue determinado tal y como se ha descrito anteriormente [*Osuna, A.; Adroher, F. J.; Lupiañez, J. A. Cell. Differ. Dev. 1990, 30, 89–95*].

Los resultados se ilustran en la **Figura 3** donde puede observarse que los compuestos de la invención P (fórmula **II**), P2py (fórmula **IV**) y P3py (fórmula **V**), muestran un porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito mayor al del fármaco de referencia, particularmente en el caso del compuesto P3py (fórmula **V**), y, además, disminuyen la capacidad de infestación.

Ejemplo 7. Ensayo de los compuestos en la inhibición de la SOD del parásito.

Los parásitos cultivados tal y como se describe anteriormente fueron sometidos a centrifugación. El pellet se suspendió en 3 ml de tampón STE (0.25 M sucrosa, 25 mM Tris–HCl, 1 M EDTA, pH 7.8) y se sometió a 3 ciclos de sonicación, 30 segundos a 60 V. El homogenado sometido a sonicación se centrifugó a 1500g durante

5 minutos a 4ºC, y el pellet se lavó durante 3 veces con tampón STE enfriado con hielo. Esta fracción se centrifugó (2500 g durante 10 minutos a 4º C) y posteriormente se recogió en sobrenadante. Las concentraciones de las proteínas se determinaron mediante el método de Bradford [*Bradford MM. A refined and sensitive method for the quantification of microquantities of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248*].

A) La actividad de la enzima superóxido dismutasa FeSOD se determinó según el método descrito en [*Beyer WF and Fridovich I. 1987.Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. Anal Bicohem 161: 559-566*] el cual estima la reducción del NTB (nitro blue tetrazolium) por los iones superóxido. Cada cubeta, situada en la solución Stock (tampón fosfato 50mM, pH 7.8, 54 ml, L-Metionina 3 ml, NBT 2 ml, Triton-X-100 1.5 ml.), muestra compuestos a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1, 5, 12.5, 25 µM) y riboflavina. La absorbancia se determinó a 560 nm en un espectrofotómetro. Después de 10 minutos bajo luz y en condiciones de agitación, se volvió a determinar la absorbancia. Las enzimas CuZn-SOD y Mn-SOD de humanos, los coenzimas y sustratos usados en estos ensayos se obtuvieron de Sigma Chemical Co, Alemania. Los datos obtenidos se analizaron con el test de Newman-Keuls.

Los resultados se ilustran en la **Figura 4** donde puede observarse que los compuestos utilizados en la invención son capaces de inhibir la enzima FeSOD de parásito con un valor de IC_{50} (concentración requerida para conseguir una inhibición del 50%) menor que en el resto de la enzimas.

Ejemplo 8. Secreción de metabolitos.

Los cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* (concentración inicial de 5×10^5 células/ml) recibieron concentraciones IC_{25} de los compuestos excepto en el caso de los cultivos control. Después de la incubación durante 96 horas a 28ºC, las células se centrifugaron a 400g durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió para determinar los

metabolitos secretados a través de ^{1}H-NMR, y los resultados se expresaron en partes por millón (ppm), usando 2, 2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sodio como señal de referencia [*Fernández-Becerra C, Sánchez-Moreno M, Osuna A, Opperdoes FR. Comparative aspects of energy metabolism in plant trypanosomatids. J Eukaryotic Microbiol 1997; 44: 523-9*]. Ver la **Figura 6**.

Ejemplo 9. Alteraciones ultraestructurales.

Los parásitos se cultivaron a una densidad de 5×10^{5} células/ml en el medio correspondiente, conteniendo cada uno de ellos los compuestos de la invención a concentración IC_{25}. Después de 96 horas, los cultivos se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos y los pellets producidos se lavaron en medio PBS y se mezclaron con 2% (v/v) de *p*-formaldehído/glutaraldehído en 0.05M de tampón cacodilato (pH 7.4) durante 4 horas a 4ºC. Después de esto, los pellets se prepararon para ser observados por microscopía electrónica de transmisión empleando la técnica descrita en [*González P, Marín C, Rodríguez-González I, Hitos AB, Rosales MJ, Reina M, Dıaz JG, Gonzalez-Coloma A, Sanchez-Moreno M. In vitro activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of Leishmania infantum. Int J Antimicrob Agents 2005; 25: 136–41*].

Los resultados se muestran en la **Figura 5** donde se ilustra el efecto de los compuestos de la invención sobre los parásitos.

Ejemplo 10. Ensayo de la actividad de tripanocida *in vivo*.

Un grupo de tres ratones hembra BALB/c (con una edad de 6 a 8 semanas y 20-25g de peso) mantenidos bajo condiciones estándar, fueron infectados con una concentración $1x10^{5}$ de formas metacíclicas de *T. cruzi* a través de la ruta intraperitoneal.

Los animales se dividieron en los grupos siguientes:

- Grupo 1: no infectados y no tratados.
- Grupo 2: infectados con *T. cruzi* pero no tratados.

- Grupo 3: no infectados pero tratados con 1 mg/kg peso/día, durante cinco días consecutivos (7 a 12 días post-infección) mediante ruta intraperitoneal [*Díaz, J. G.; Carmona, A. J.; Perez de Paz, P.; Werner, H. Phytochem. Letters 2008, 1, 125–129*].
- Grupo 4: infectados y tratados durante cinco días consecutivos (7 a 12 días post-infección) con los compuestos de la invención y Benzinidazol®.

Los tratamientos se comenzaron siete días después de la infección del animal. Los compuestos de la invención se administraron de forma similar a lo explicado anteriormente y a las mismas concentraciones. Se tomó una muestra de sangre (5 µl) de la vena mandibular de cada ratón tratado y se diluyó en proporción 1:15 (50 µl de tampón citrato: ácido cítrico 0.1 M, citrato sódico 0.1 M y 20 µL de tampón de lisis a pH 7.2: Tris-Cl 2M, $MgCl_2$).

El número de formas metacíclicas de *T. cruzi* en el torrente sanguíneo fue recogido cada tres días desde los días 7 al 60 después de la infección. El número de formas metacíclicas se observó a 200 campos microscópicos.

Los anticuerpos circulantes anti- *T. cruzi*, en los días 60 y 90 de post-infección, se evaluaron cuantitativamente mediante inmunoensayo. La sangre, diluida en una proporción 1:50 en PBS, se hizo reaccionar con un antígeno compuesto de la enzima FeSOD secretada de los epimastigotes de *T. cruzi*. Los resultados se expresan como el ratio de absorbancia por cada muestra a 490 nm frente al valor de referencia. El valor de referencia de cada reacción es la media de los valores determinados en los controles negativos más tres veces la desviación estándar [*Longoni SS, Marín C, Sauri-Arceo CH, López-Cespedes A, Rodríguez-Vivas RI, Villegas N, Escobedo-Ortegón J, Barrera-Pérez MA, Bolio-Gonzalez ME, Sánchez-Moreno M. An Iron-Superoxide Dismutase Antigen-Based Serological Screening of Dogs Indicates Their Potential Role in the Transmission of Cutaneous Leishmaniasis and Trypanosomiasis in Yucatan, Mexico. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011 Feb 16*].

ENSAYOS LLEVADOS A CABO EN *LEISHMANIA SPP.*

Ejemplo 11. Cultivo *in vitro* de macrófagos.

Los macrófagos J774.2 fueron reclonados desde J774.2 originales de un tumor, manteniendo los cultivos a una concentración entre 3-9 x 10^5 células/ml a 37ºC y a 5% de CO_2. El procedimiento para trabajar con las células en cultivo fue tripsinizar las células adheridas mediante lavado con PBS, añadiendo la cantidad suficiente de tripsina/EDTA (200ml de PBS + 0,1 g de EDTA y 200 ml de PBS + 0,5 g de tripsina). Se mezclaron las dos soluciones a pH 7,2-7,4 y se filtraron. Las células se incubaron durante 5-10 minutos. Posteriormente dichas células se decantaron y se centrifugaron durante 5 minutos a 800 rpm. Finalmente se resuspendieron en un medio de cultivo nuevo. Como medio de cultivo se utilizó MEM + Glutamina suplementado con un 20 % de suero bovino fetal inactivado (SBF-I).

Ejemplo 12. Cultivo *in vitro* de *Leishmania spp*.

Se emplearon formas promastigotes de dos especies del género *Leishmania*:

- *L. Viannia braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904).
- *L. Leishmania infantum* (MCAN/ES/2001/UCM-10).

Las formas promastigotes de las dos especies de *Leishmania* se obtuvieron del cultivo a 28ºC en medio MTL al 10% de SBF-I. Iniciando el cultivo con un inóculo de 5 x 10^4 células/ml en 5 ml de medio en frascos de plástico Falcon® de 25 cm^2, siempre trabajando en esterilidad.

Ejemplo 13. Ensayos biológicos *in vitro*.

<u>Ensayos sobre formas promastigotes de *Leishmania spp.*</u>

Las formas promastigotes de *Leishmania spp,* cultivadas de la forma anteriormente descrita, fueron recolectadas en su fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 min. El número de parásitos fue contado en una

cámara hemocitométrica de Neubauer y sembrados en una placa de 24 pocillos a razón de una concentración de $5x10^4$ parásitos en cada pocillo.

Los compuestos a ensayar se disolvieron en DMSO a una concentración de 0.01% (v/v), concentración a la cual este disolvente no es tóxico ni tiene ningún efecto sobre el crecimiento de los parásitos. Los compuestos fueron añadidos al medio de cultivo a una concentración final de: 100, 50, 25, 10 y 1 μM. El efecto de cada compuesto sobre el crecimiento de las formas promastigotes, a las diferentes concentraciones ensayadas, se evaluó a las 72 h, usando una cámara hemocitométrica de Neubauer y el efecto leishmanicida se expresó como la IC_{50} (concentración requerida para dar una inhibición del 50 %, calculado por el análisis de la regresión lineal de la K_c a las concentraciones ensayadas).

Ensayos sobre formas amastigotes de *Leishmania spp.*

Los ensayos sobre las formas amastigotes se hicieron llevando a cabo la siguiente metodología. Los macrófagos J774.2 se despegaron del frasco de cultivo donde se encontraban adheridos mediante tripsinización y mediante golpes secos. Para ello se eliminó el medio de cultivo, seguidamente se cubrió la superficie celular con EDTA-tripsina y se incubó durante 5 minutos. Tras ello, se pasó a un frasco de fondo cónico de 25 ml de capacidad (Steriling) para centrifugarlos a 800 rpm durante 5 minutos, retirándose el sobrenadante, y se contaron las células en cámara de Neubauer. Se cultivaron las células en placas de 24 pocillos, en las que previamente se había introducido un cristal cubreobjetos redondo de 12 mm en cada pocillo a una concentración de $1x10^4$ células en cada pocillo. Para su adherencia, se dejó crecer las células 24-48 h a 37ºC en 5% CO_2.

Una vez adheridas las células, se infectaron *in vitro* con $1x10^5$ células de formas amastigotes en fase estacionaria de *Leishmania spp*. Se incubaron durante 24 horas a 37ºC en 5% CO_2. Transcurrido ese tiempo, los parásitos que se encontraban libres en el medio de cultivo, se retiraron mediante varios lavados con medio fresco. A continuación se cambió el medio a los cultivos de células (MEM + Glut al 20% SBF-

I) y se añadió el compuesto a ensayar a una concentración de 1, 10, 25, 50 y 100 µM. Se dejó incubar durante 72 horas a 37ºC en 5% CO_2.

Transcurridas las 72 horas, se sacaron los cristales y se colocaron en un portaobjetos. Se fijaron con metanol y se dejaron secar. Una vez fijados y secos, se les añadió DPX (Panreac®), medio de montaje para microscopía. Se tiñeron con Giemsa, para ello, inmediatamente antes de su empleo y en tubo de ensayo, se diluyó 1 ml de Azur-Eosina-Azul de Metileno solución según Giemsa DC (Código 251338) con 10 ml de Solución tampón pH 7,2 DC (Código 252164), se mezcló y se cubrió la preparación dejando colorear durante 20 minutos. Se lavó con solución tampón pH 7,2 DC (Código 252164). Se dejó escurrir y secar en posición vertical. Por último se examinó con el objetivo de inmersión y se contó el número de formas amastigote intracelulares en un total de 200 células de cada cristal.

La actividad antiparasitaria de los productos se determinó con el número de amastigote intracelulares presentes a las distintas concentraciones y en el control. Y se expresó como la IC_{50} (concentración requerida para dar una inhibición del 50%, calculado por el análisis de la regresión lineal de la K_c a las concentraciones ensayadas).

Ejemplo 14. Ensayos de citotoxicidad.

Estos ensayos se realizaron mediante citometría de flujo. Macrófagos de la línea J774.2, se depositaron en un tubo (steriling) y se centrifugaron a 800rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en medio MEM + Glutamina con un 20% de SBF.

Se depositaron $1x10^4$ células en cada pocillo de una placa de titulación de 24 pocillos, se incubaron durante 24-48 h a 37ºC en atmósfera húmeda enriquecida con 5% CO_2. Esto se realizó para que se fijasen las células. Transcurrido este tiempo el medio de cultivo se retiró y se adicionó medio fresco con los productos a ensayar, a las

concentraciones de 100, 50, 25, 10 y 1 µM. A las 72 horas de la incubación, se procedió a la preparación de las muestras para su lectura en el citómetro de flujo.

El método seguido fue el descrito por [*Ormerod MG. 1994. Flow Cytometry. A practical Approach. 2º Edition. IRL. Press (Oxford University Press)*], partiendo de las células y el medio presente en los pocillos, a las cuales se le adicionó 100 µl de solución de ioduro de propidio (PI, 100 µg/ml) (Sigma Chemical Co), incubándose a 28ºC en oscuridad unos 10 minutos. Posteriormente, se añadió 100 µl de diacetato de fluoresceína (FDA) (Sigma Chemical Co) en solución (100 ng/ml) volviéndose a incubar a 28ºC en oscuridad durante unos 10 minutos, y previa centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos, se procedió a lavar el precipitado con PBS. Finalmente, se analizaron los resultados teniendo en cuenta que las células con la membrana plasmática intacta emiten color verde al actuar las esterasas sobre la FDA, mientras que las células que han perdido la integridad de la membrana y no son viables, emiten en el rango de los 580 nm al penetrar el PI por difusión pasiva y unirse específicamente a los ácidos nucleicos de las mismas. El análisis de citometría de flujo se llevo a cabo con un citómetro de flujo FACS Vantage (Becton Dickinson).

Se calculó el porcentaje de viabilidad. El número de células muertas se determinó por comparación con los cultivos controles. La IC_{50} se calculó usando el análisis de regresión lineal de la K_c a las concentraciones ensayadas.

RESULTADOS

Ejemplo 15. Resultados del estudio comparativo de los compuestos de la invención frente a Benzinidazol® y Glucantime®.

Inicialmente se llevó a cabo el estudio de los compuestos de la invención y sus complejos con Mn(II) en comparación con el Benzinidazol (BZN) (fármaco de referencia para el *Trypanosoma cruzi*) en el que se midió la toxicidad, la actividad *in vitro* y el índice de selectividad (SI) en las formas epimastigotes y amastigotes de *Trypanosoma cruzi* (**Tabla 1**).

Tabla 1

Compuesto	Actividad [a]			Toxicidad [b]	SI[c]		
	Ep.	Am. Axén.	Am. Intrac.		Ep.	Am. Axén.	Am. Intrac.
BZN	15.9±1.1	18.9±1.5	23.3±4.6	13.6± 0.9	0.8	0.7	0.6
II	6.5±0.8	4.0±0.4	7.8±0.7	269.5±16.1	41.4 (52)	66.6 (95)	34.5 (57)
II*	12.9±1.2	14.9±2.0	15.7±1.5	234.9±20.6	18.1 (23)	15.7 (22)	14.9 (25)
IV	8.7±2,0	10.2±0.8	10.0±1.3	366.2±14.7	42.2 (53)	35.9 (51)	36.4 (61)
IV*	14.9±2.4	12.8±1.6	14.2±2.3	2614±21.1	17.6 (22)	20.5 (29)	18.4 (31)
III	10.4±1.2	12.8±1.5	15.7±2.0	324.9±23.7	31.2 (39)	25.3 (36)	20.7 (34)
III*	15.1±1.6	18.2±2.3	19.5±2.2	271.3±23.1	18.0 (22)	14.9 (21)	13.9 (23)
V	8.1±1.3	9.3±1.0	9.5±0.6	425.2±29.6	52.7 (66)	45.5 (65)	44.8 (75)
V*	20.9±1.7	21.2±2.3	21.5±1.1	271.9±22.3	13.0 (16)	12.8 (18)	12.6 (21)
VI	20.9±1.9	19.2±2.4	20.2±1.8	167.3±22.6	8.0 (10)	8.7 (12)	8.3 (14)
VI*	21.3±1.9	26.5±2.7	20.2±2.4	214.3±31.0	10.1 (13)	8.1 (12)	10.6 (18)

[a] Actividad: expresada como IC_{50} (µM): concentración requerida para conseguir el 50% de inhibición.
[b] Toxicidad: expresada como IC_{50} (µM) en células Vero después de 72 horas de cultivo.
[c] SI: índice de selectividad = IC_{50} en células Vero/ IC_{50} intracelular y extracelular del parásito. Los compuestos más activos frente a las formas intracelulares del parásito son los que su valor SI es mayor de 50 veces con respecto al compuesto de referencia.
( ): número de veces que el valor SI del compuesto de la invención excede el valor SI del compuesto de referencia.
* Compuesto en forma de complejo con Mn(II).
Ep.: forma epimastigote.
Am. Axén.: forma amastigote.
Am. Intrac.: forma amastigote intracelular.

Posteriormente, se llevó a cabo el estudio de los compuestos de la invención y sus complejos con Mn(II) en comparación con Glucantime® (fármaco de referencia para la *Leishmania spp)*. En *Leishmania infantum* se midió la toxicidad, la actividad *in vitro* y el índice de selectividad (SI) de los compuestos en las formas promastigote y amastigote (**Tabla 2**).

Tabla 2

Compuesto	Actividad [a]			Toxicidad [b]	SI[c]		
	Pro. Extrac.	Am. Axén.	Am. Intrac.		Pro. Extrac.	Am. Axén.	Am. Intrac.
Glucantime®	18.0	31.0	30.8	15.2	0.8	0.5	0.5
II	18.9	29.2	25.6	231.6	12.2 (15)	8.0 (16)	9.0 (18)
II*	40.7	40.4	30.7	218.6	5.4 (7)	5.4 (11)	7.1 (14)
IV	15.5	25.4	19.6	254.0	16.4 (20)	10.0 (20)	13.0 (26)
IV*	21.2	77.8	50.3	275.7	13.0 (16)	3.5 (7)	5.5 (11)
III	21.7	28.1	17.4	365.3	18.8 (23)	13.0 (26)	21.0 (42)
III*	38.2	45.0	60.1	387.9	10.2 (13)	8.6 (17)	6.5 (13)
V	18.8	15.9	6.3	467.8	24.9 (31)	29.4 (59)	74.3 (149)
V*	40.8	33.7	50.1	223.9	5.5 (7)	6.6 (13)	4.5 (9)
VI	24.2	29.8	44.9	220.4	9.1 (11)	7.4 (15)	4.9 (10)
VI*	27.0	33.6	61.6	258.1	9.6 (12)	7.7 (15.4)	4.2 (8)

[a] Actividad: expresada como IC_{50} (µM): concentración requerida para conseguir el 50% de inhibición.
[b] Toxicidad: expresada como IC_{50} (µM) en macrófagos J774.2 después de 72 horas de cultivo.
[c] SI: índice de selectividad = IC_{50} en macrófagos / IC_{50} intracelular y extracelular del parásito. Los compuestos más activos frente a las formas intracelulares del parásito son los que su valor SI es mayor de 20 veces con respecto al compuesto de referencia.
( ): número de veces que el valor SI del compuesto de la invención excede el valor SI del compuesto de referencia.
* Compuesto en forma de complejo con Mn(II).
Pro. Extrac.: forma extracelular promastigote.
Am. Axén.: forma amastigote axénico.
Am. Intrac.: forma amastigote intracelular.

Además, se llevó a cabo el estudio de los compuestos de la invención y sus complejos con Mn(II) en comparación con Glucantime® (fármaco de referencia para la *Leishmania spp)* en *Leishmania braziliensis*. Se midió la toxicidad, la actividad *in vitro* y el índice de selectividad (SI) de los compuestos en las formas amastigote y promastigote (**Tabla 3**).

Tabla 3

Compuesto	Actividad [a]			Toxicidad [b]	SI[c]		
	Pro. Extrac.	Am. Axén.	Am. Intrac.		Pro. Extrac.	Am. Axén.	Am. Intrac.
Glucantime®	25.6	30.9	19.7	15.20	0.6	0.5	0.8
II	11.8	16.0	10.0	231.6	19.6 (30)	14.5 (29)	23.2 (29)
II*	32.8	54.3	30.4	218.6	6.8 (11)	4.0 (8)	7.3 (9)
IV	11.3	16.0	10.4	254.0	22.5 (37)	15.9 (32)	24.4 (30)
IV*	12.4	26.7	16.4	275.7	22.2 (37)	10.3 (20)	16.8 (21)
III	12.3	24.9	16.6	365.3	29.7 (49)	14.7 (29)	22.0 (27)
III*	29.5	59.2	28.9	387.9	13.1 (22)	6.6 (13)	13.4 (17)
V	23.0	23.9	10.3	467.8	20.3 (34)	19.6 (39)	45.4 (57)
V*	21.2	41.6	47.0	223.9	10.6 (18)	5.4 (11)	4.8 (6)
VI	15.5	31.4	19.1	220.4	14.2 (24)	7.0 (14)	11.5 (14)
VI*	25.5	42.6	77.8	258.1	10.1 (17)	6.1 (12)	3.3 (4)

[a] Actividad: expresada como IC_{50} (µM): concentración requerida para conseguir el 50% de inhibición.
[b] Toxicidad: expresada como IC_{50} (µM) en macrófagos J774.2 después de 72 horas de cultivo.
[c] SI: índice de selectividad = IC_{50} en macrófagos / IC_{50} intracelular y extracelular del parásito. Los compuestos más activos frente a las formas intracelulares del parásito son los que su valor SI es mayor de 20 veces con respecto al compuesto de referencia.
( ): número de veces que el valor SI del compuesto de la invención excede el valor SI del compuesto de referencia.
* Compuesto en forma de complejo con Mn(II).
Pro. Extrac.: forma extracelular promastigote.
Am. Axén.: forma amastigote axénico.
Am. Intrac.: forma amastigote intracelular.

A la vista de los resultados obtenidos de este ejemplo, queda demostrado que los compuestos de la invención, caracterizados por la fórmula (**I**), son eficaces en el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos manteniendo un nivel bajo de toxicidad, particularmente los tres compuestos menos tóxicos: Pytren (P) (fórmula **II**), Pytren2py (P2py) (fórmula **IV**) y Pytren3py (P3py) (fórmula **V**).

Ejemplo 16. Efectividad de los compuestos de la invención en fase crónica.

Un grupo de ratones cepa Balb/c fue llevado a 140 días post infección con la idea de reproducir la fase crónica del tratamiento. A partir del séptimo día de post infección se les administró el tratamiento que consistía en 5 dosis de 100 µl para reunir finalmente una concentración de 15 mg/kg peso. Posteriormente se tomaron muestras de sangre para seguir el estado de la parasitemia en el ratón por conteo en fresco, así como para evaluar el estado inmunológico por medio del test de ELISA.

En el día 140 los ratones fueron inmunodeprimidos mediante dos ciclos de ciclofosfamida (50 mg/kg peso día, 4 días tratamiento con 3 de descanso) y posteriormente se obtuvo una última muestra donde se incluyeron órganos (corazón e hígado) tras la necropsia para ser evaluados por estudios anatomopatológicos.

Tras el examen de la parasitemia en fresco se observó una fuerte disminución del número de parásitos en sangre. Además se observó la ausencia de variaciones significativas entre los animales inmunodeprimidos y no inmunodeprimidos que habían sido tratados con el producto, lo cual es indicativo de un efecto tripanocida por parte del producto en el momento de tratamiento. Es interesante destacar que no existen fármacos útiles para la fase crónica que es la que se produce a partir de los 30 días cuando el parásito se desplaza a órganos como hígado, esófago y corazón. Los productos ensayados constituyen fármacos válidos para el tratamiento de la fase crónica de la parasitemia. La **Figura 7** exhibe los niveles de anticuerpos parasitarios que muestran la eficacia de los compuestos de la invención en la fase crónica de la enfermedad (modelo *in vivo* en fase crónica).

En la **Figura 2** se reflejan los resultados obtenidos de la curva de parasitemia en la que se aprecia que los compuestos de fórmula (**II)** (P), fórmula (**IV**) (P2py) y fórmula (**V**) (P3py) son los más efectivos al inicio de la fase crónica (día 60) puesto que reducen significativamente el número de parásitos en sangre.

Ejemplo 17. Síntesis de los compuestos utilizados en la presente invención.

El compuesto de fórmula (**II**) se hizo reaccionar con el grupo aldehído de un compuesto de fórmula R-COH, donde R comprende los sustituyentes R_1 y/o R_2, donde R_1 es un grupo amino sustituido por R_2 o sin sustituir, R_2 comprende carbociclos y/o heterociclos que pueden estar sustituidos por R_3 o sin sustituir, y R_3 comprende la fórmula (I) donde R es una cadena hidrocarbonada, estando los dos compuestos disueltos preferentemente en etanol u otro alcohol, y posteriormente se añadió preferentemente borohidruro sódico u otro reductor para la reducción de la imina formada. La mezcla se trató convenientemente para extraer el producto de reacción, del que se prepara la sal amónica mediante adición de ácido clorhídrico. Las sales de los diferentes compuestos son sólidas y se purificaron a través de lavados sucesivos con etanol. Los compuestos son perfectamente caracterizados por espectroscopia de RMN (Resonancia Magnética Nuclear), espectrometría de masas, análisis cristalográfico y a través de análisis elemental.

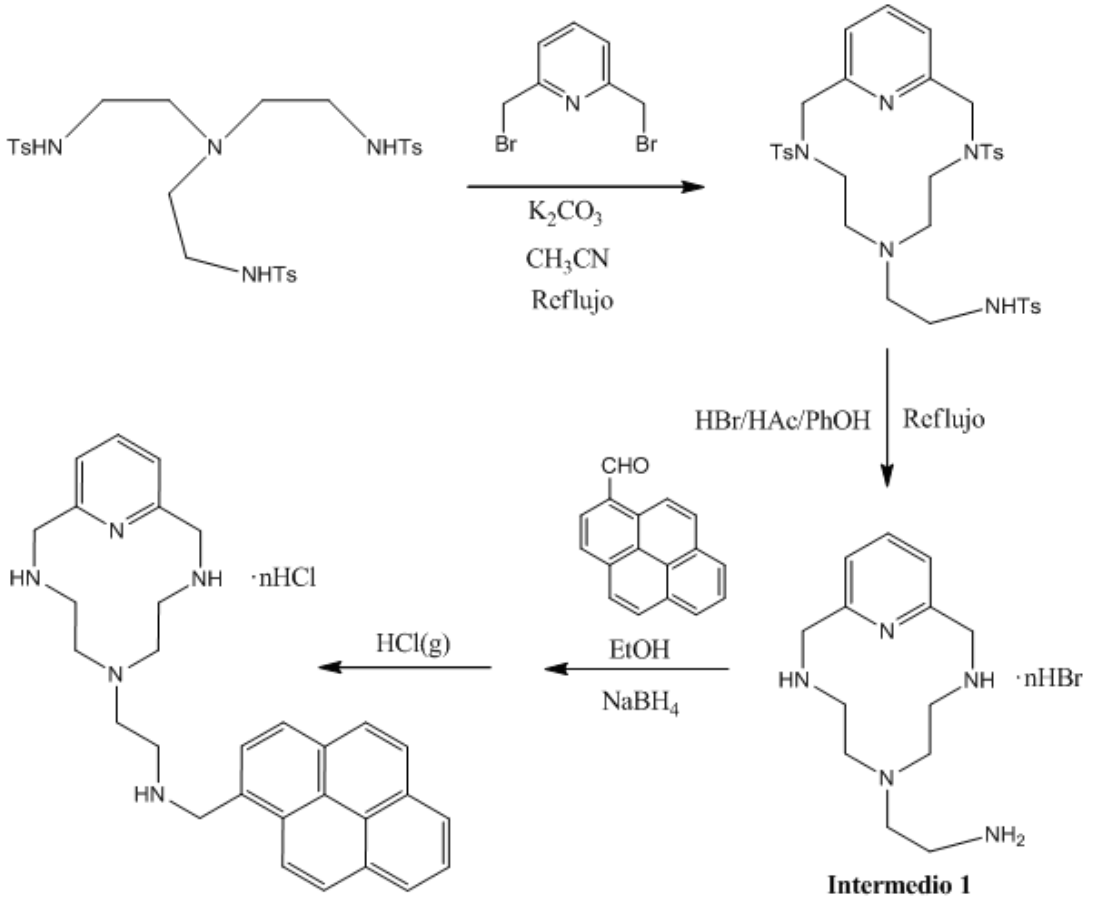
Además, los compuestos utilizados en la presente invención pueden presentarse en forma de complejos con Mn(II) para lo cual se mezcla, en disolución acuosa, el ligando y el metal correspondiente (en este caso Mn(II)) en relación molar 1:1 (L:M), se ajusta el pH de la disolución al pH de formación de la especie y se deja evaporar lentamente.

<u>Síntesis del compuesto de fórmula (XI)</u>

La síntesis de este compuesto se logró siguiendo una modificación del procedimiento Richman-Atkins [*B. Verdejo, A. Ferrer, S. Blasco, C. E. Castillo, J. González, J. Latorre, M. A. Mañez, M. G. Basallote, C. Soriano and E. García-España, Inorg. Chem., 2007, 46, 5707*] mediante la reacción de la poliamina *tren* pertosilada con la 2,6-bis(bromometil)piridina en una relación molar 1:1, usando preferiblemente K_2CO_3 como base, y a reflujo en CH_3CN. La detosilación se llevó a cabo con HBr/HAc para dar el Intermedio 1, tal como se indica en el Esquema 1.

El compuesto de fórmula (**XI**) se obtuvo por la reacción de este producto intermedio detosilado, en su forma de amina libre, con antraceno-9-carbaldehído en etanol seco, seguido de una reducción *in situ* con borohidruro sódico. El producto se precipitó en forma de sal de clorhidrato (Esquema 1).

Esquema 1:



6-[4-(1-pirenil)-3-azabutil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano (XI). El compuesto de fórmula **(II)** se disolvió en un disolvente seco (preferiblemente etanol) y se añadió pireno-1-carbaldehído disuelto en el mismo disolvente, gota a gota. Se agitó la reacción durante 2 horas. Se añadió un reductor (en este caso $NaBH_4$) y la disolución resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se trató con agua y diclorometano. La fase orgánica fue separada y eliminada a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en etanol y se precipitó como sal clorhidrato **(XI)**.

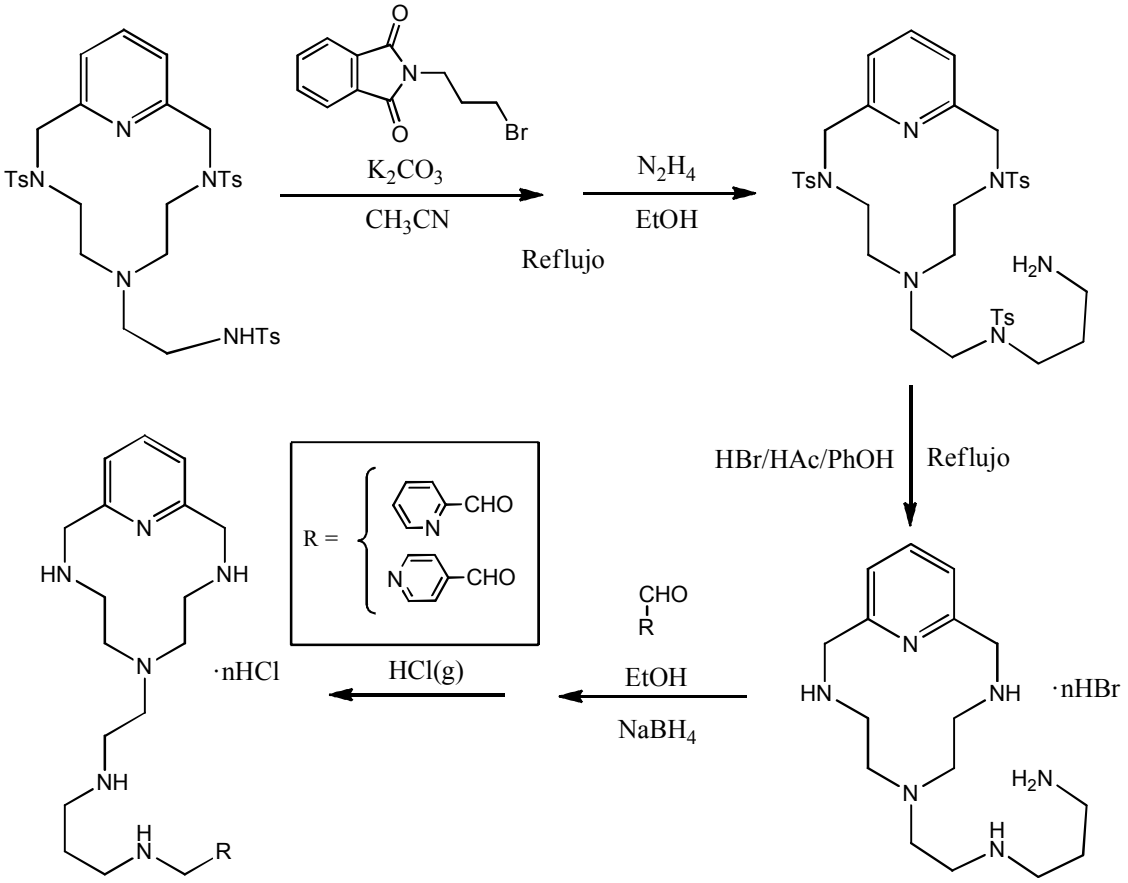
^{1}H RMN (D_2O, 300MHz): δ_H 8.10 (d, J = 8Hz, 1H), 8.06 (d, J = 8Hz, 1H), 7.95 (d, J = 4Hz, 1H), 7.92 (t, J = 6Hz, 1H), 7.90 (t, J = 6Hz, 1H), 7.86 (m, 1H), 7.81 (t, J = 6Hz,

2H), 7.79 (d, J = 5Hz, 1H), 7.70 (d, J = 10Hz, 1H), 7.30 (d, J = 8Hz, 2H), 4.62 (s, 2H), 4.46 (s, 4H), 3.22 (m, 2H), 3.05 (m, 4H), 2.89 (t, J = 8Hz, 2H), 2.69 (t, J = 5Hz, 4H).

Síntesis de los compuestos de fórmula (XIV) y (XV)

Haciendo reaccionar la forma pertosilada del producto Intermedio 1 con N-(3-bromopropil)ftalimida en CH_3CN seco a reflujo se obtuvo un producto blanco que fue desprotegido con hidrazina y detosilado con HBr/HAc para obtener el Intermedio 2. Como en el caso anterior, haciendo reaccionar este producto intermedio detosilado en forma de amina libre con el correspondiente aldehído en etanol seco, seguido de la reacción *in situ* con borohidruro sódico y precipitando el producto en forma de clorhidrato se consiguieron sintetizar estos dos compuestos **(XIV y XV)**, tal y como se muestra en el Esquema 2.

Esquema 2



6-[8-(2-piridil)-3,7-diazaoctil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano (XIV). El compuesto de fórmula **(IX)** se disolvió en etanol seco y se añadió piridina-2-carbaldehído disuelto en etanol seco, gota a gota. Se agitó la reacción durante 2 horas. Se añadió $NaBH_4$ y la disolución resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó el etanol a presión reducida. El residuo resultante se trató con agua y diclorometano. La fase orgánica fue separada y eliminada a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en etanol y se precipitó como sal clorhidrato **(XIV)**.
^{1}H RMN (D_2O, 300MHz): δ_H 8.83 (d, J = 5Hz, 1H), 8.51 (t, J = 6Hz, 1H), 8.05 (m, 3H), 8.00 (m, 3H), 7.96 (m, 3H), 7.48 (d, J = 9Hz, 2H), 4.69 (s, 6H), 3.37 (m, 5H), 3.32 (m, 5H), 3.10 (t, J = 6Hz, 2H), 2.98 (m, 4H), 2.28 (m, 2H). ^{13}C RMN (D_2O, 75.43MHz): δ_C 149.2, 146.4, 145.5, 140.1, 127.5, 122.6, 51.3, 50.8, 49.9, 48.9, 46.3, 45.3, 44.0, 23.1. Anal. Calc. Para $C_{22}H_{35}N_7{\cdot}5HCl$: C, 42.9; H, 7.2; N, 15.9. Experimental: C, 42.4; H, 7.5; N, 15.4.

6-[8-(4-piridil)-3,7-diazaoctil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano (XV). El compuesto de fórmula **(IX)** se disolvió en etanol seco y se añadió piridina-4-carbaldehído disuelto en etanol seco, gota a gota. Se agitó la reacción durante 2 horas. Se añadió $NaBH_4$ y la disolución resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó el etanol a presión reducida. El residuo resultante se trató con agua y diclorometano. La fase orgánica fue separada y eliminada a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en etanol y se precipitó como sal clorhidrato **(XV)**.
^{1}H RMN (D_2O, 300MHz): δ_H 8.92 (d, J = 8Hz, 2H), 8.25 (d, J = 8Hz, 2H), 8.00 (t, J = 8Hz, 1H), 7.51 (d, J = 9Hz, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.68 (s, 4H), 3.39 (m, 5H), 3.33 (m, 5H), 3.13 (t, J = 6Hz, 2H), 2.96 (t, J = 6Hz, 4H), 2.30 (m, 2H). ^{13}C RMN (D_2O, 75.43MHz): δ_C 151.7, 149.2, 142.4, 140.1, 127.9, 122.6, 51.3, 50.8, 49.9, 48.8, 46.3, 45.6, 45.3, 44.1, 23.1. Anal. Calc. Para $C_{22}H_{35}N_7{\cdot}5HCl{\cdot}5H_2O$: C, 39.4; H, 7.5; N, 14.6. Experimental: C, 39.6; H, 7.1; N, 14.3.

Síntesis del compuesto de fórmula (X)

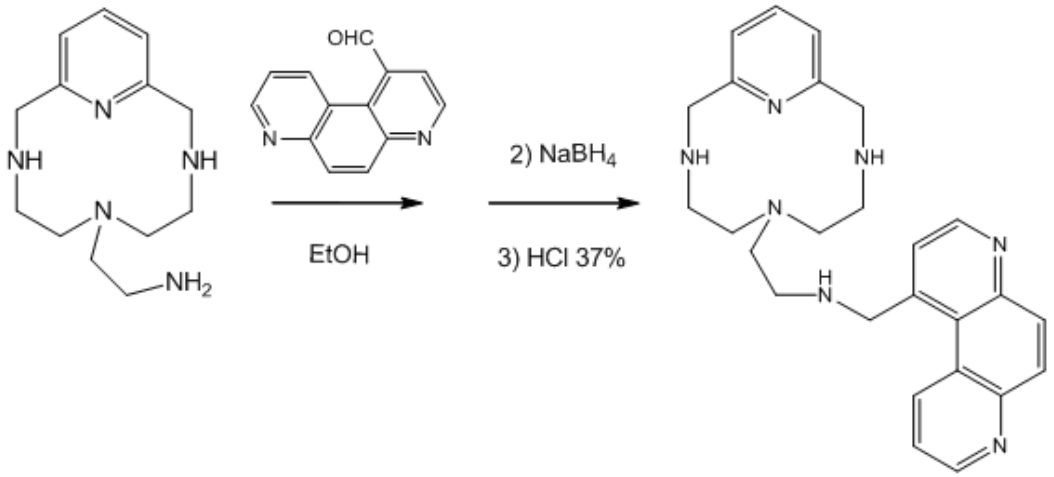
Se disolvió e l 5-(2-Aminoetil)-2,5,8-triaza[12]-2,6-piridinofano y el 4-carboxaldehido-2,9-fenantrolina en etanol seco y se dejó agitando a temperatura

ambiente durante 2 horas. La imina formada se redujo, preferentemente, con $NaBH_4$ y se dejó otras 2 horas agitando a temperatura ambiente. Se eliminó el disolvente en el rotavapor. El sólido obtenido se extrajo con H_2O y CH_2Cl_2. La fase orgánica fue separada y eliminada a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en etanol y se precipitó como sal clorhidrato, tal y como se muestra en el Esquema 3. Rendimiento 60%.

^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ (ppm) = 8.69 (d, J = 5 Hz, 1H), 8.67 (d, J = 4 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.86 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 4 Hz, 1H), 7.58 (dd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 5 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8 Hz, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.55 (s, 4H), 3.44 (t, J = 7 Hz, 2H), 3.26-3.18 (m, 4H), 3.09 (t, J = 7 Hz, 2H), 2.89 (t, J = 5 Hz, 4H).

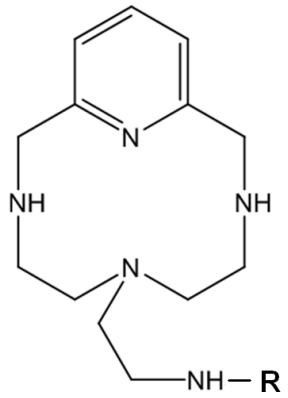
^{13}C NMR (125 MHz, D_2O): δ (ppm) = 149.35, 148.95, 147.59, 141.41, 140.31, 139.89, 139.65, 128.01, 126.03, 124.28, 122.06, 121.56, 51.01, 50.56, 49.57, 46.82, 45.94, 44.18.

Esquema 3



REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula **(I)**:

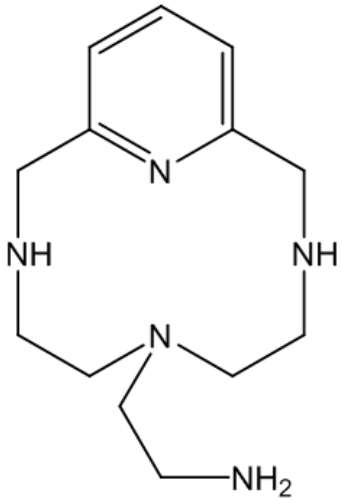


(I)

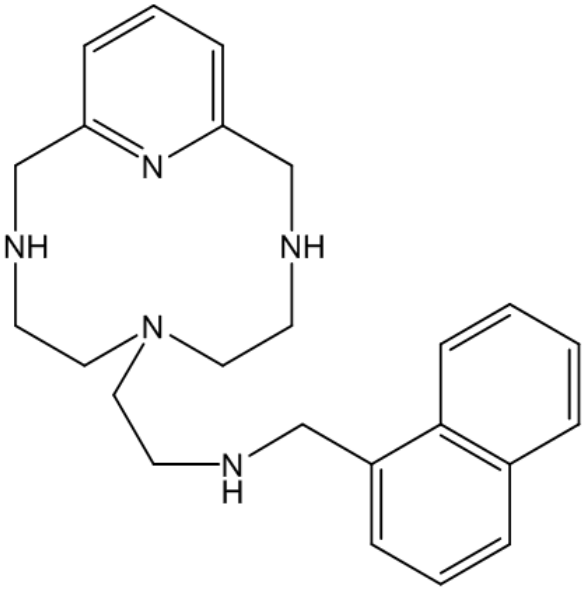
donde **R** puede ser H o una cadena hidrocarbonada que comprende los sustituyentes $\mathbf{R_1}$ y/o $\mathbf{R_2}$, donde $\mathbf{R_1}$ es un grupo amino sustituido por $\mathbf{R_2}$ o sin sustituir, $\mathbf{R_2}$ comprende carbociclos y/o heterociclos que pueden estar sustituidos por $\mathbf{R_3}$ o sin sustituir, y $\mathbf{R_3}$ comprende la fórmula **(I)** donde **R** es una cadena hidrocarbonada; para la elaboración de una composición farmacéutica o veterinaria destinada al tratamiento de enfermedades causadas por parásitos.

2. Uso, según la reivindicación 1, donde en el compuesto de fórmula (**I**) el carbociclo es el benceno y el heterociclo es la piridina.

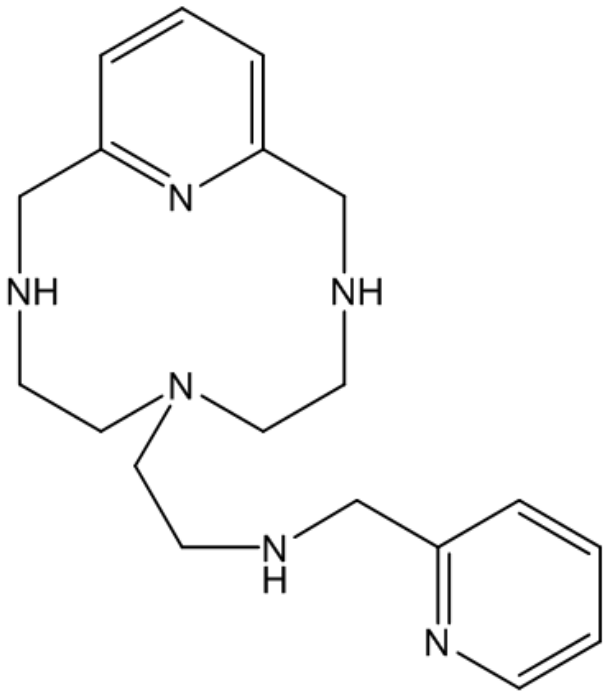
3. Uso, según las reivindicaciones 1 ó 2, donde el compuesto se selecciona entre los siguientes:



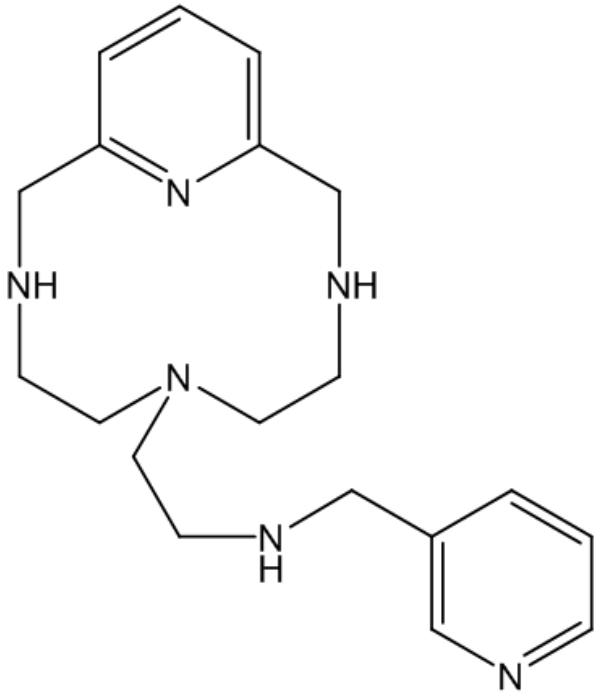
(II)



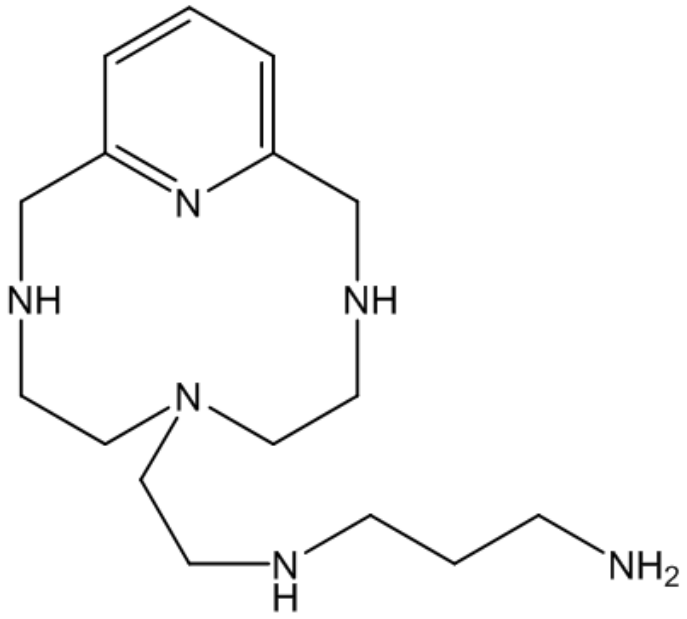
(III)



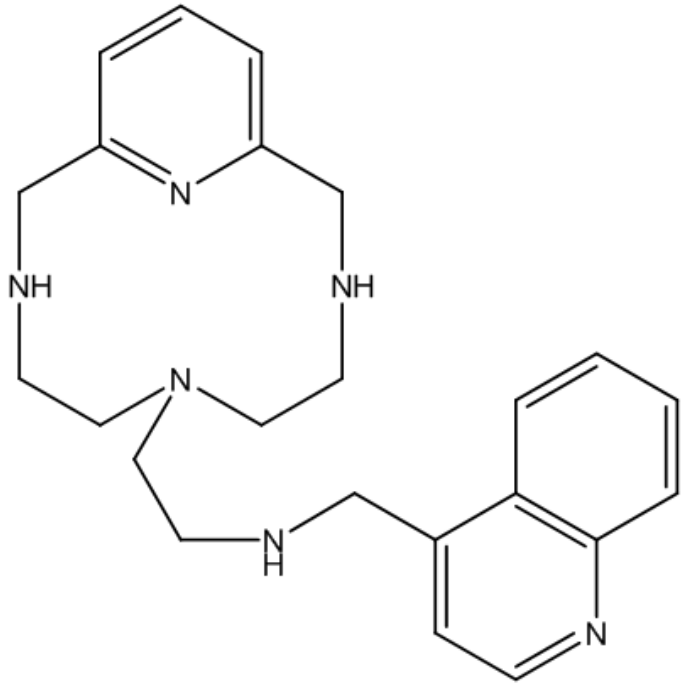
(IV)



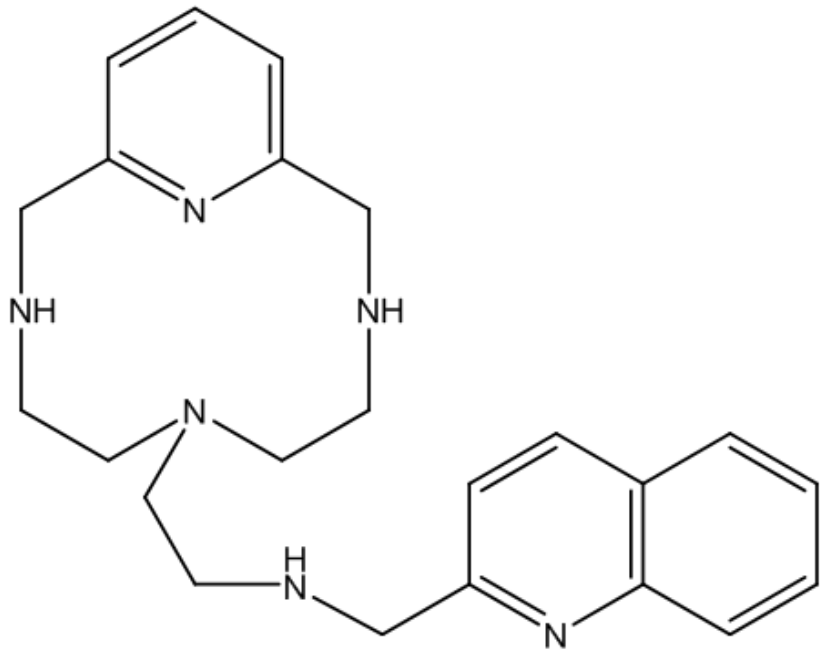
(V)



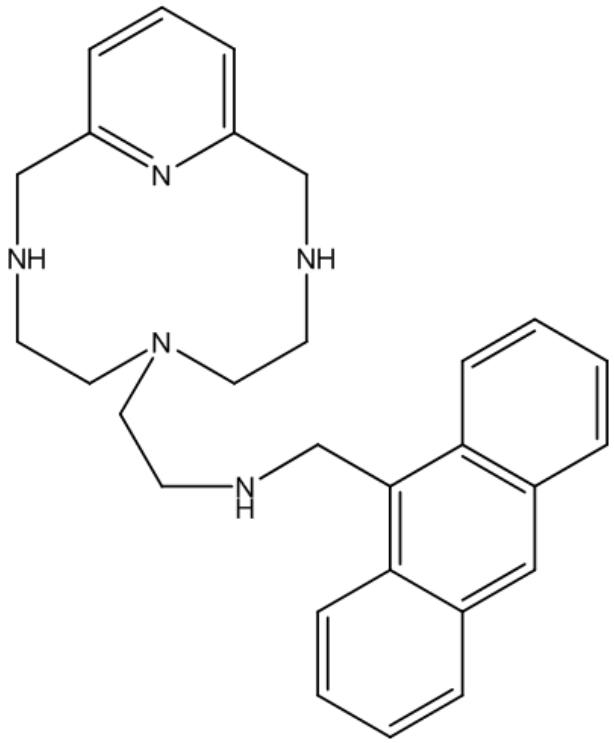
(VI)



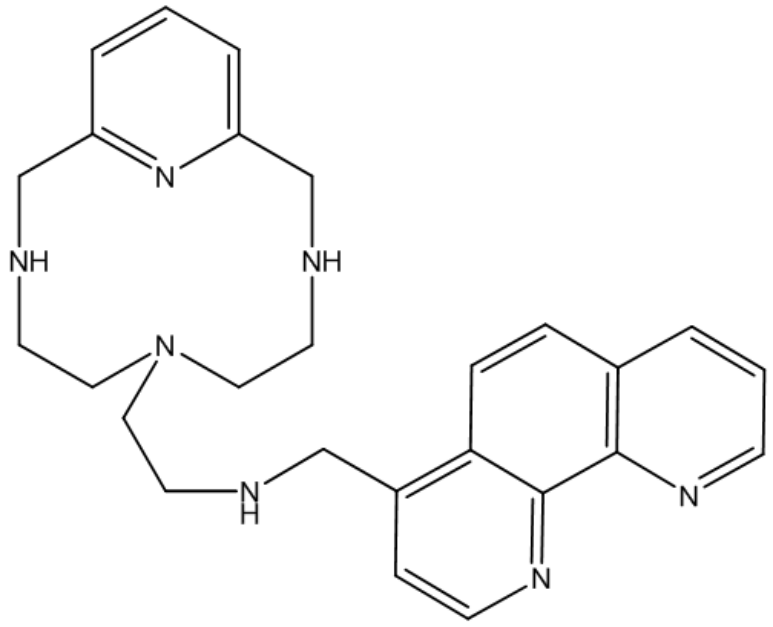
(VII)



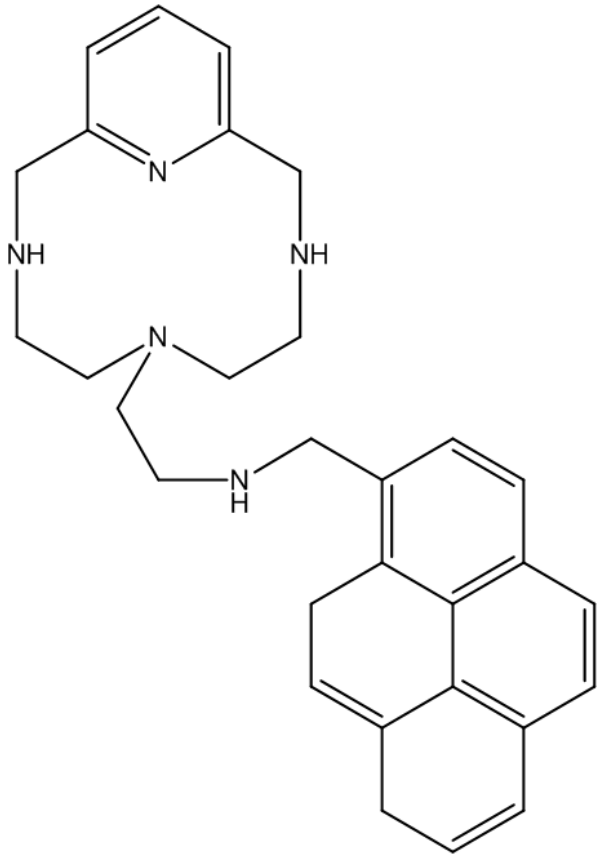
(VIII)



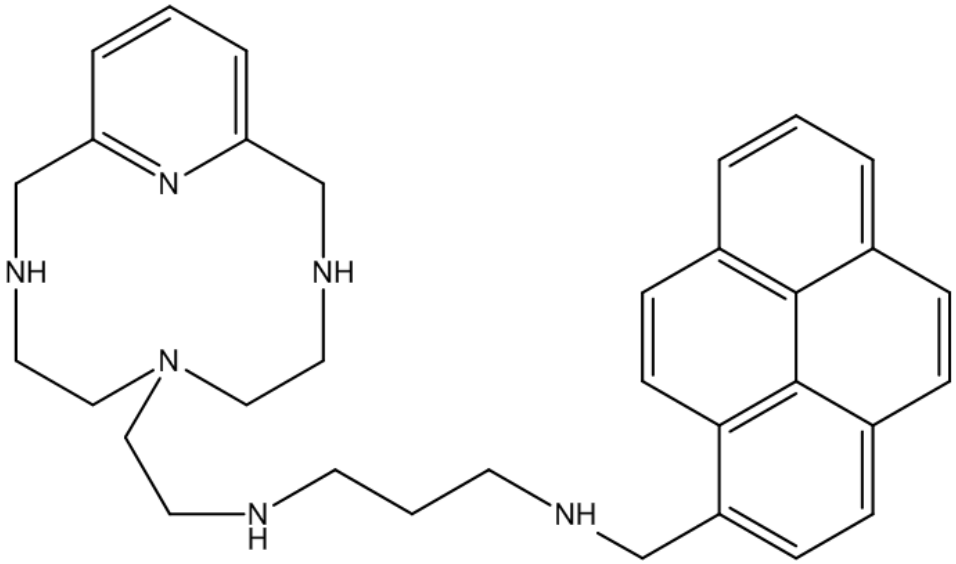
(IX)



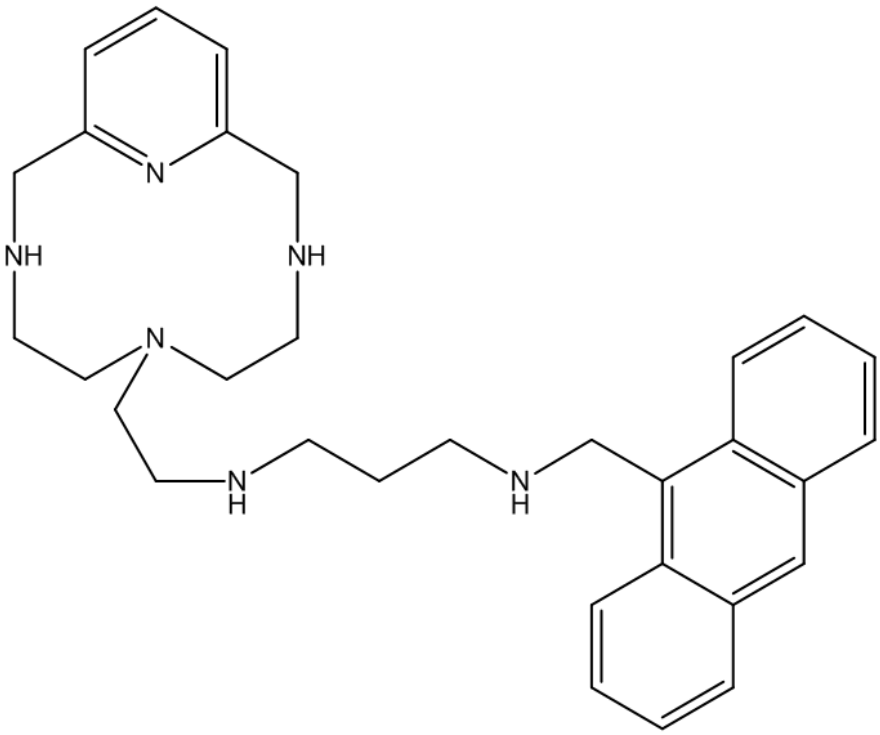
(X)



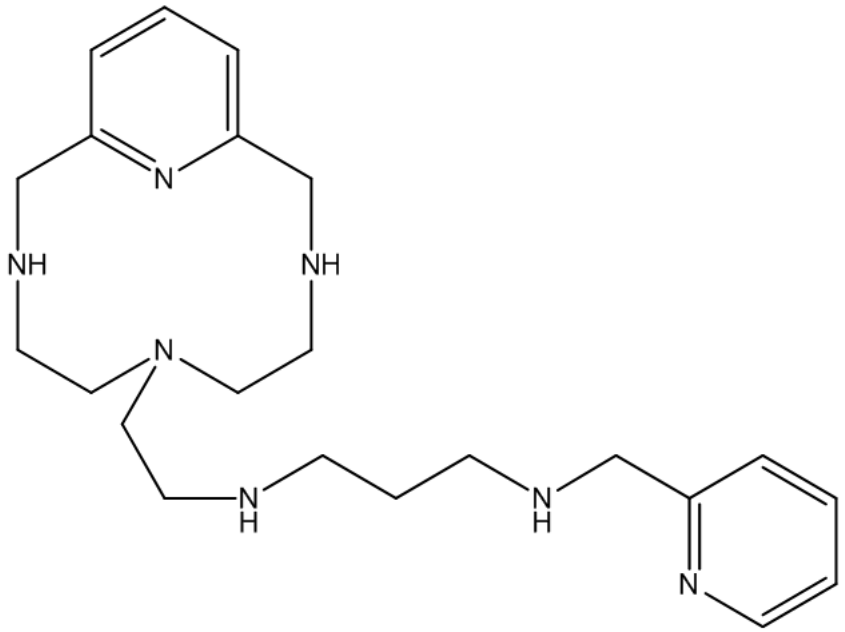
(XI)



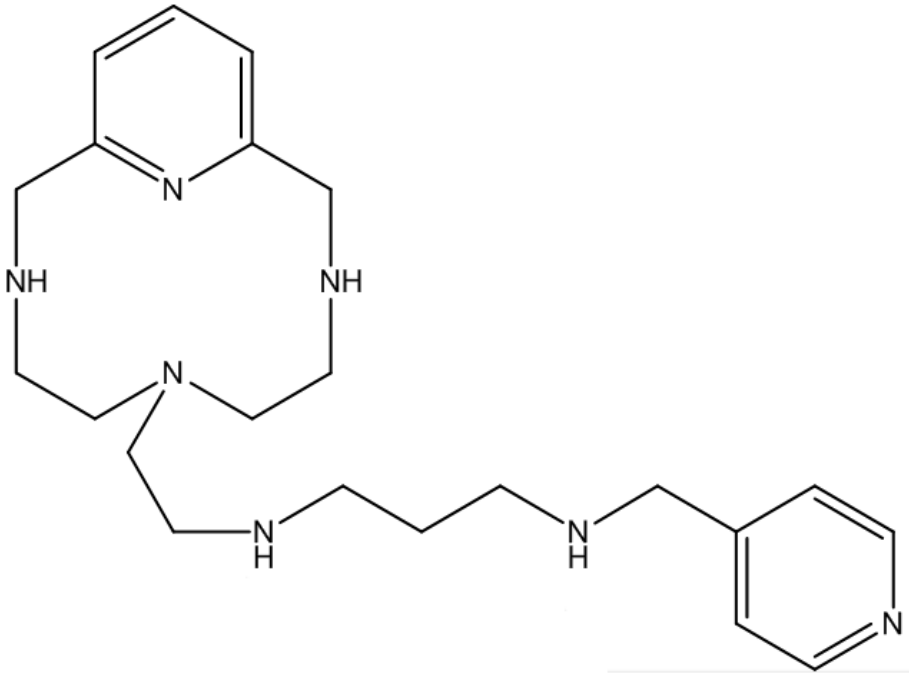
(XII)



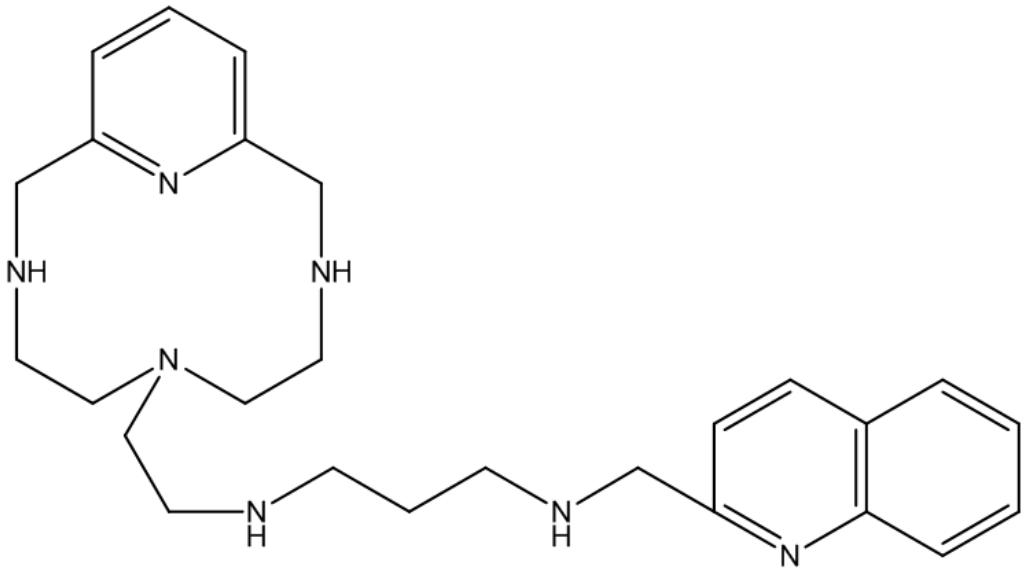
(XIII)



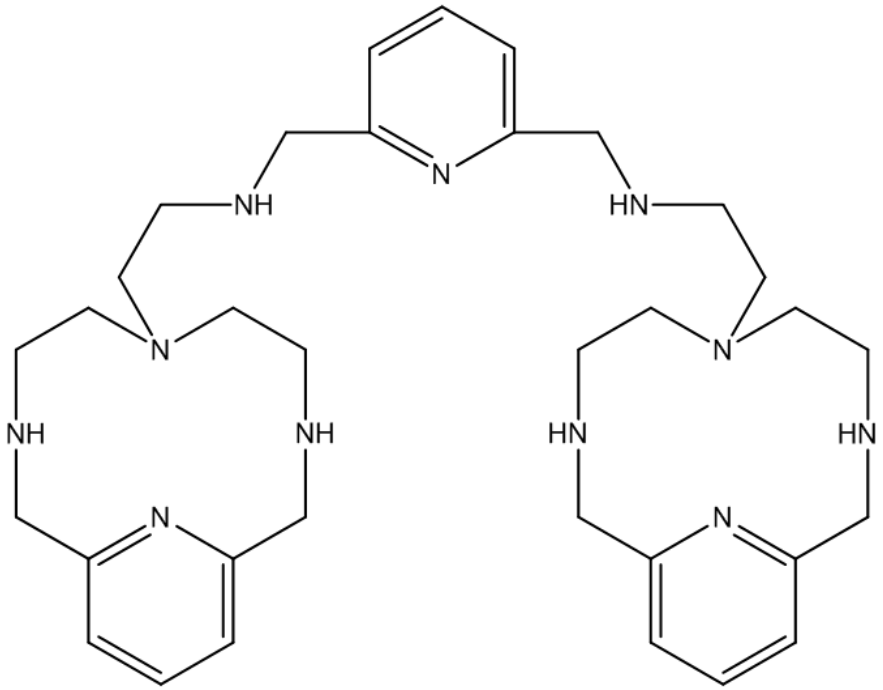
(XIV)



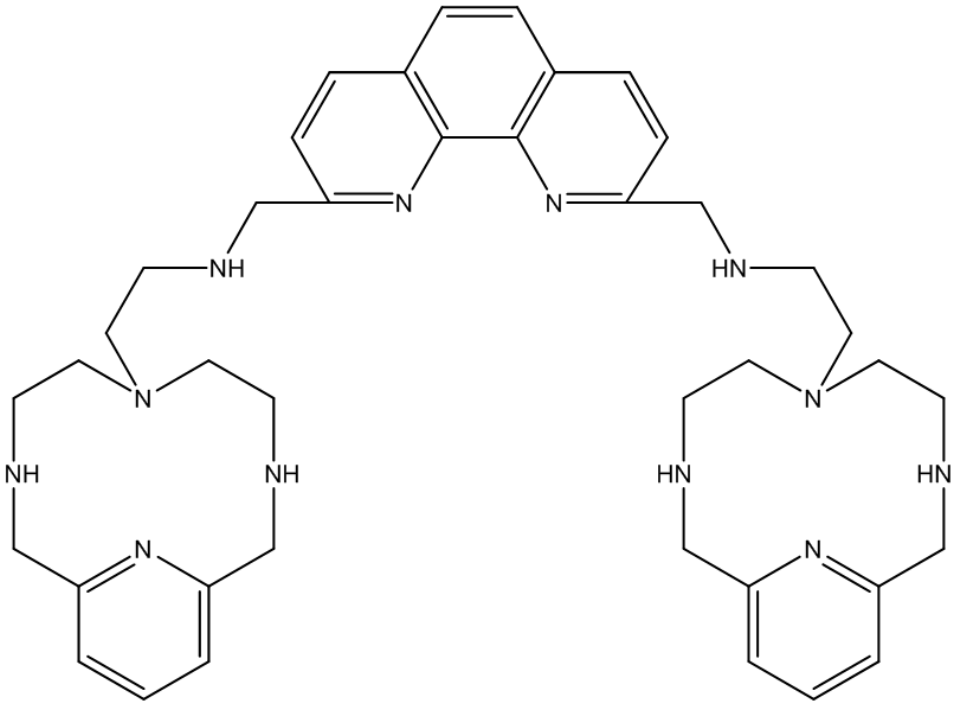
(XV)



(XVI)



(XVII)



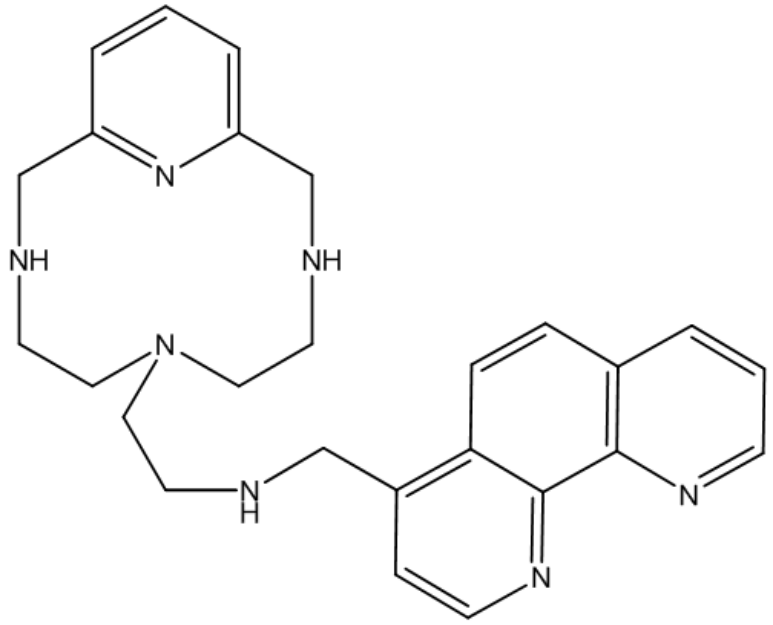
(XVIII)

4. Uso de un compuesto de fórmula **(II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV), (XV), (XVI), (XVII)** o **(XVIII)**, donde el compuesto forma un complejo con Mn(II), para la elaboración de una composición farmacéutica o veterinaria destinada al tratamiento de enfermedades causadas por parásitos.

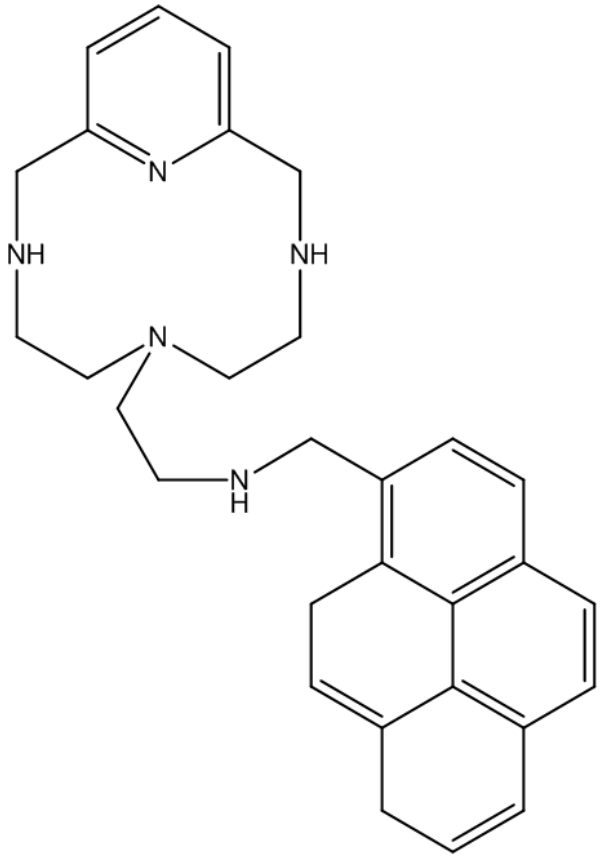
5. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque las enfermedades tratadas son la enfermedad de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi* o la leishmaniasis causada por *Leishmania spp*.

6. Uso, según la reivindicación 5, caracterizado porque las enfermedades son tratadas en la fase crónica de las mismas.

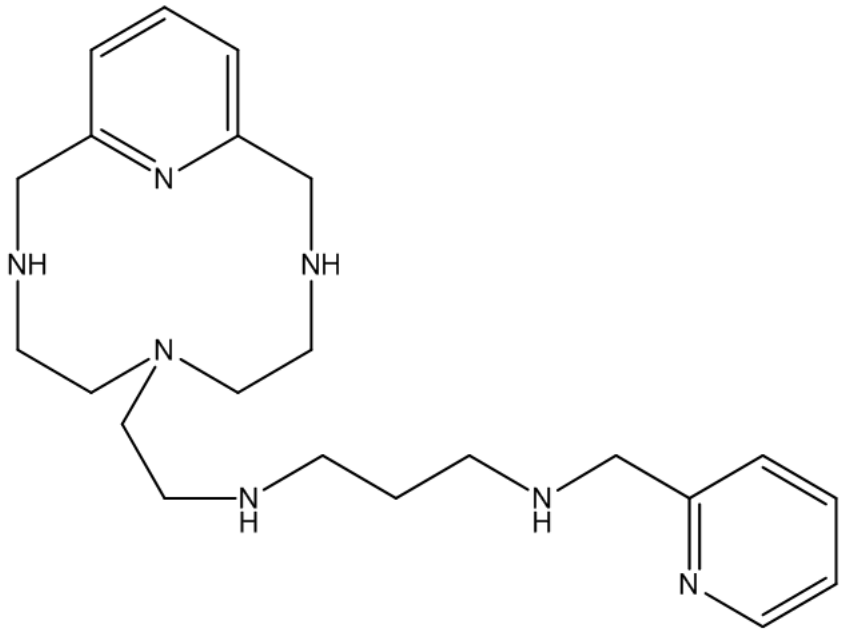
7. Compuesto seleccionado del grupo que comprende:



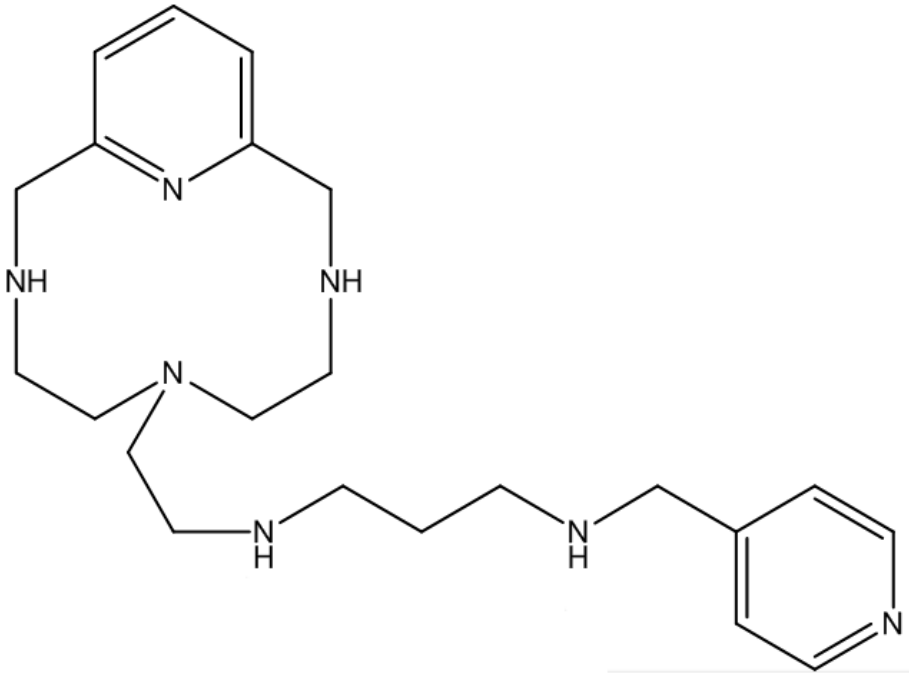
(X)



(XI)



(XIV)



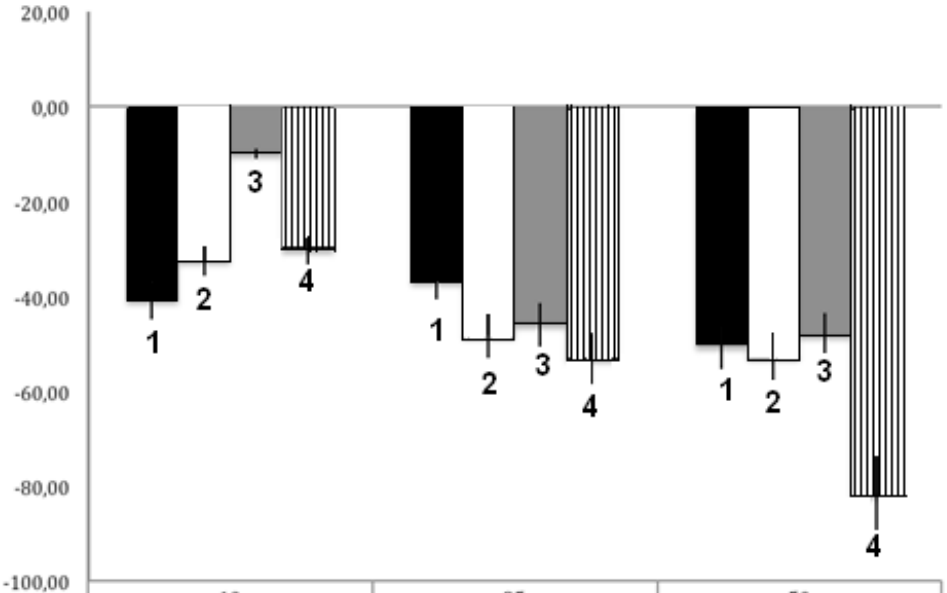
(XV)

8. Compuesto, según la reivindicación 7, caracterizado por formar complejos con Mn(II).

9. Uso de cualquiera de los compuestos de las reivindicaciones 7-8 para preparar un medicamento.

10. Composición farmacéutica o veterinaria que comprende al menos un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 7-8 y excipientes farmacéuticamente aceptables.

FIGURA 1



	10	25	50
1 BNZ	-40,80	-36,94	-50,45
2 P	-32,43	-48,20	-52,70
3 P2py	-9,91	-45,95	-48,20
4 P3py	-30,18	-53,15	-81,98

FIGURA 2

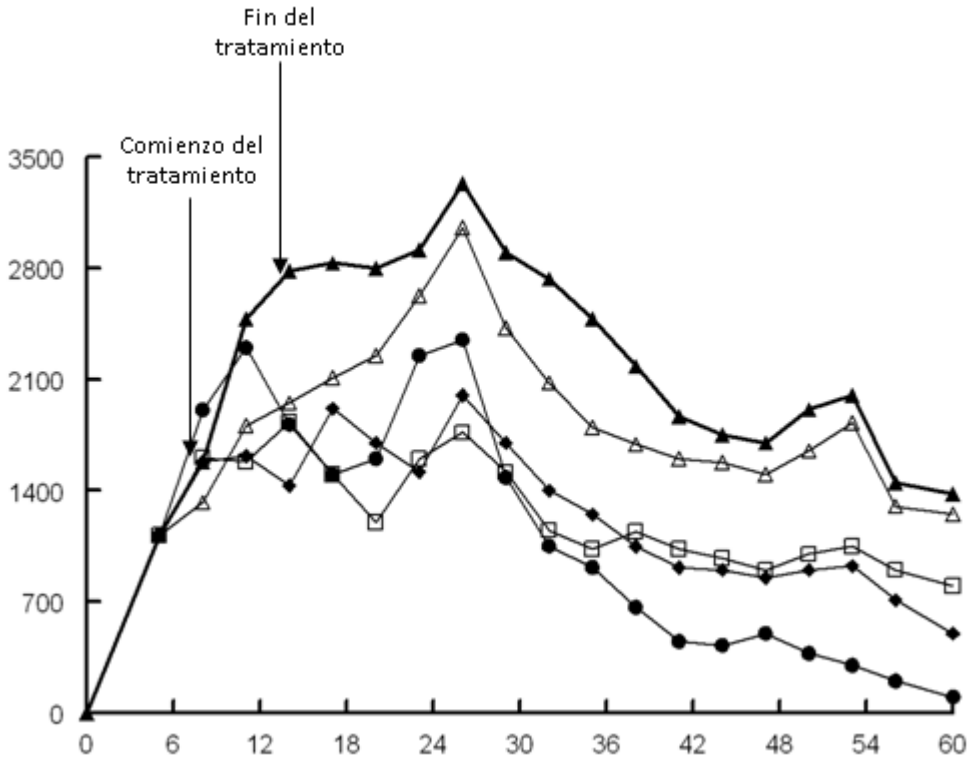

Fin del tratamiento
Comienzo del tratamiento
3500
2800
2100
1400
700
0
0
6
12
18
24
30
36
42
48
54
60

FIGURA 3A

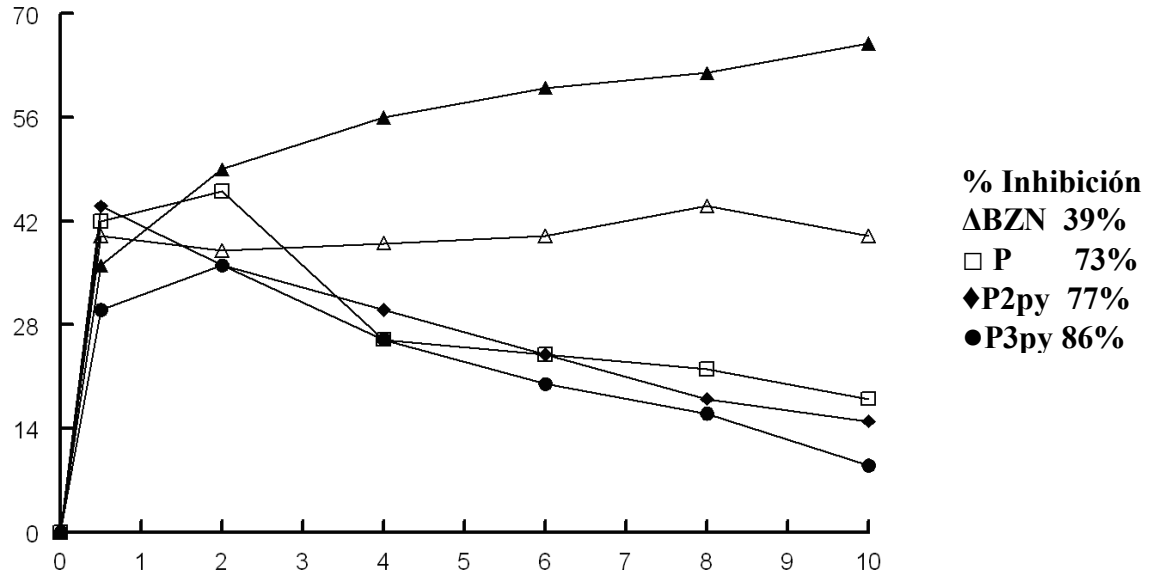


FIGURA 3B

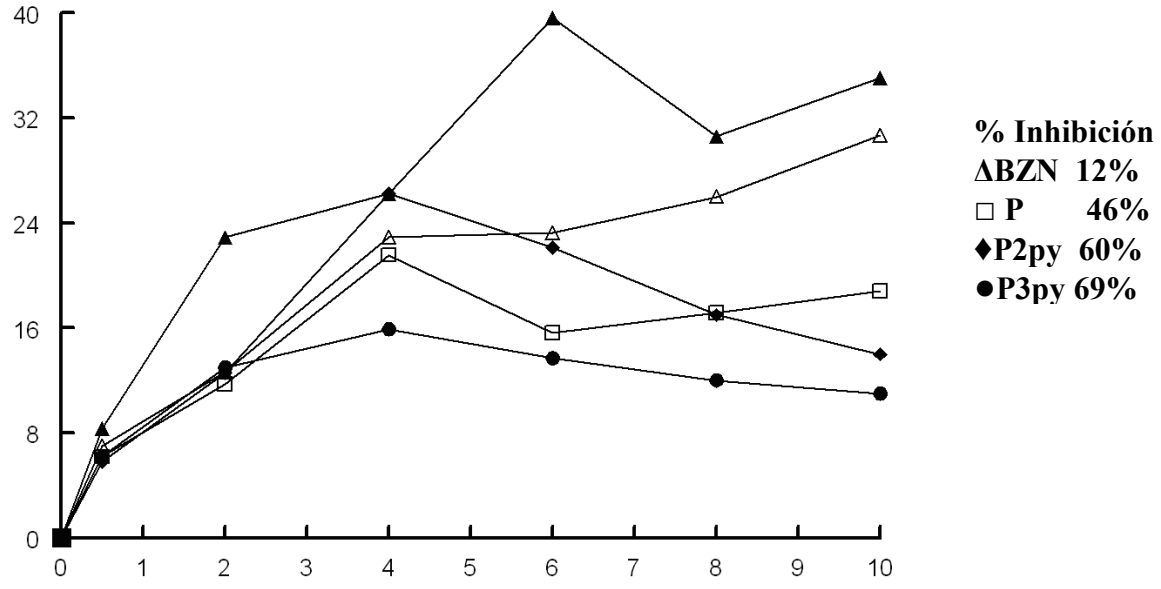


FIGURA 3C

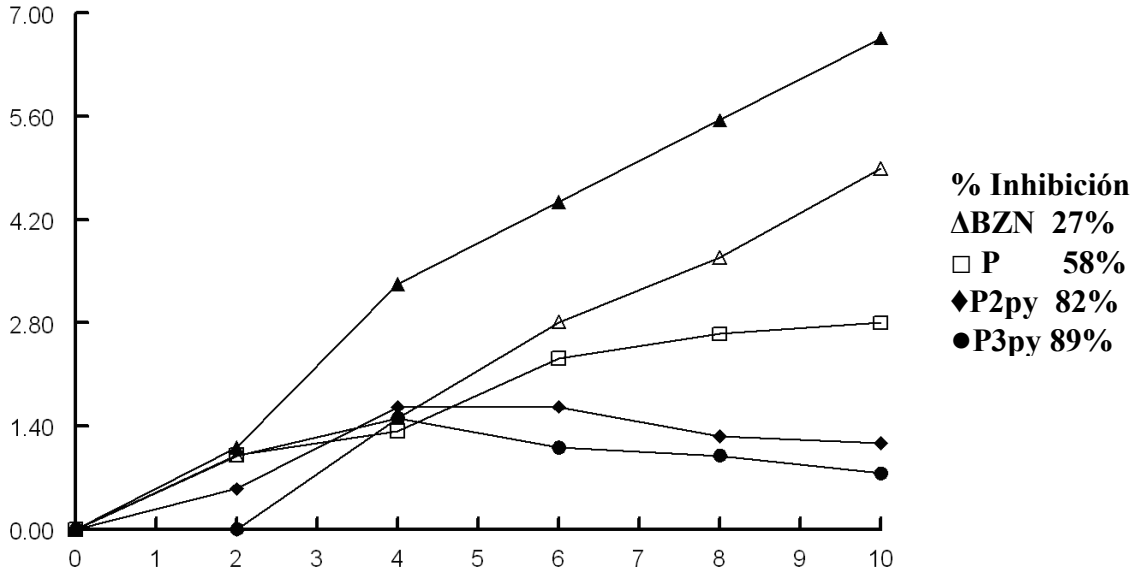

7.00
5.60
4.20
2.80
1.40
0.00
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
% Inhibición
ΔBZN 27%
□ P 58%
♦P2py 82%
●P3py 89%

FIGURA 4A

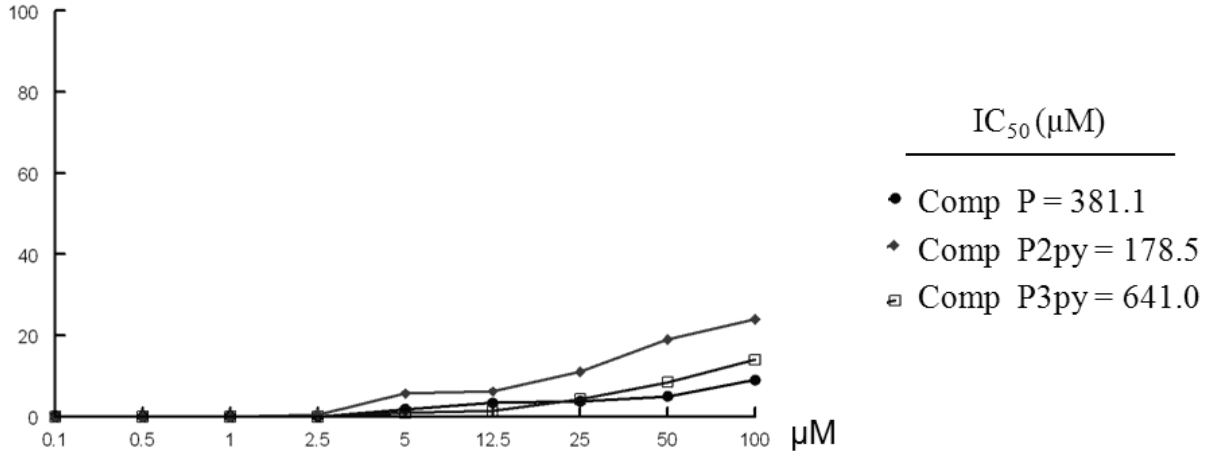


FIGURA 4B

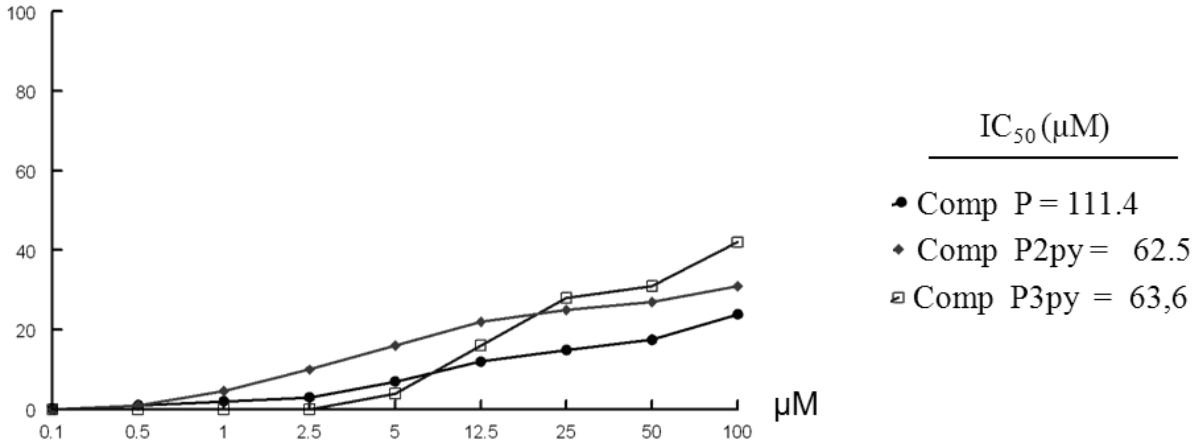


FIGURA 4C

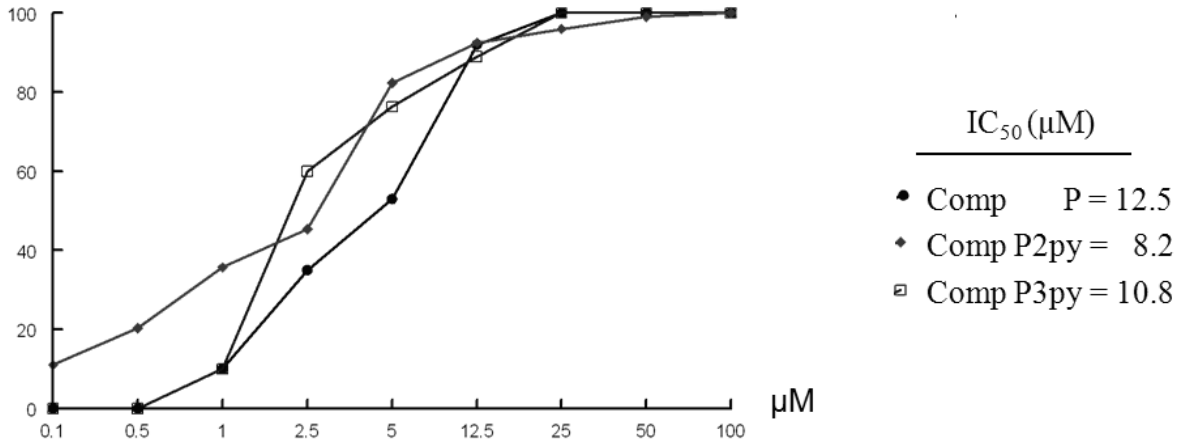


FIGURA 5

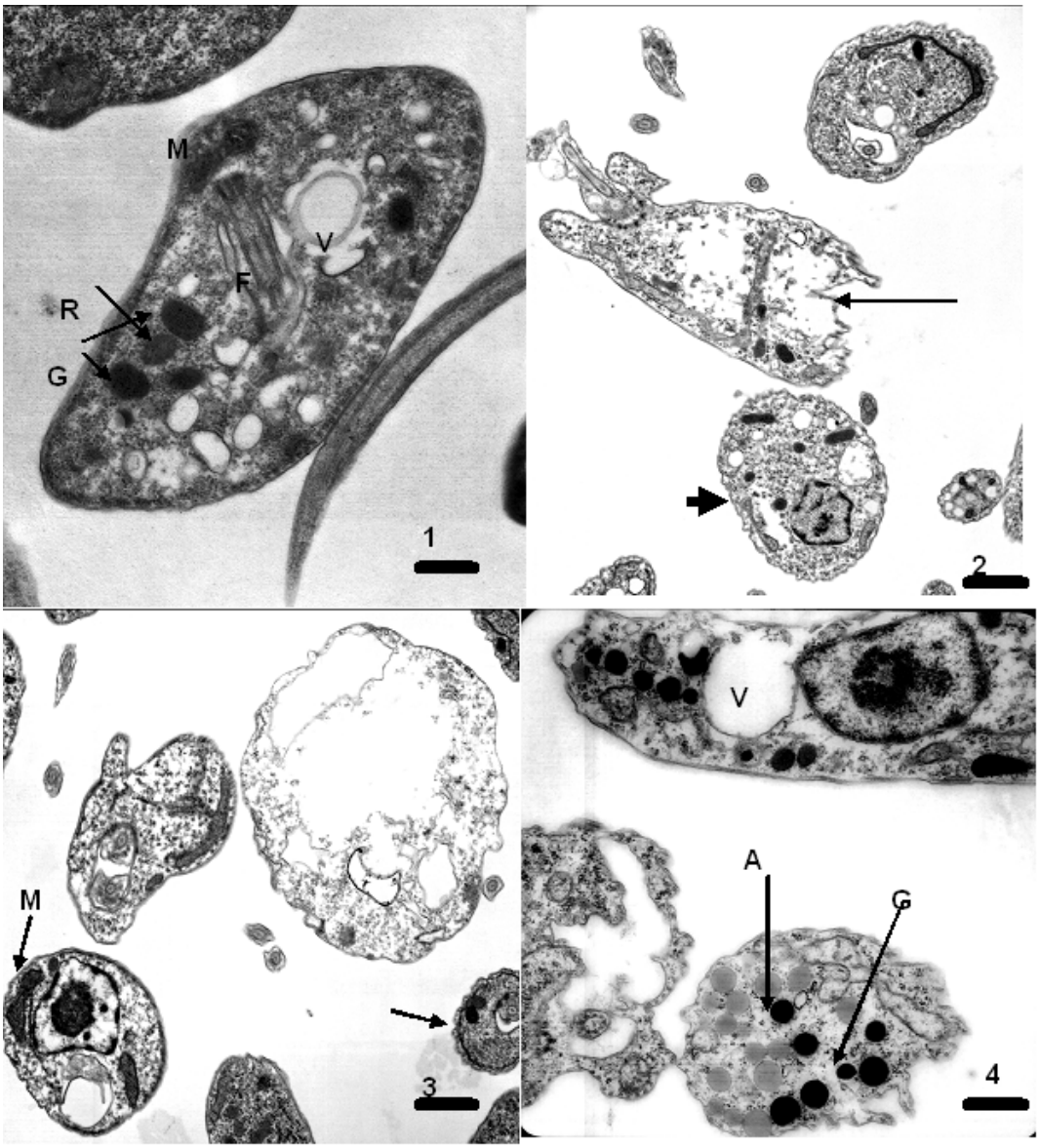


FIGURA 6 A

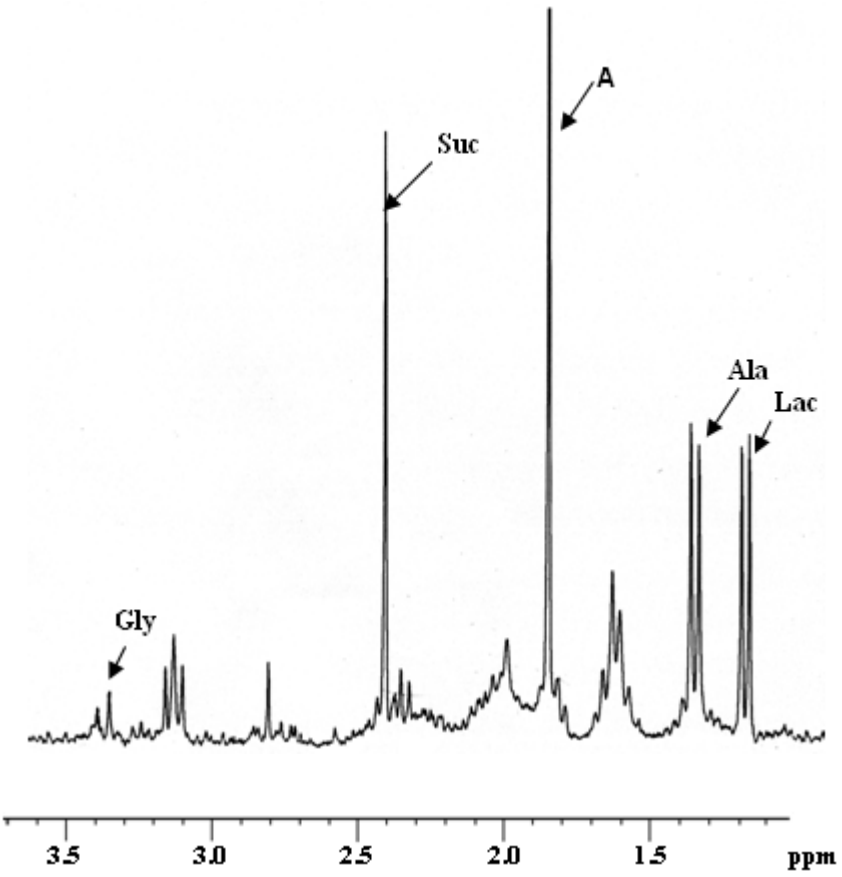


FIGURA 6 B

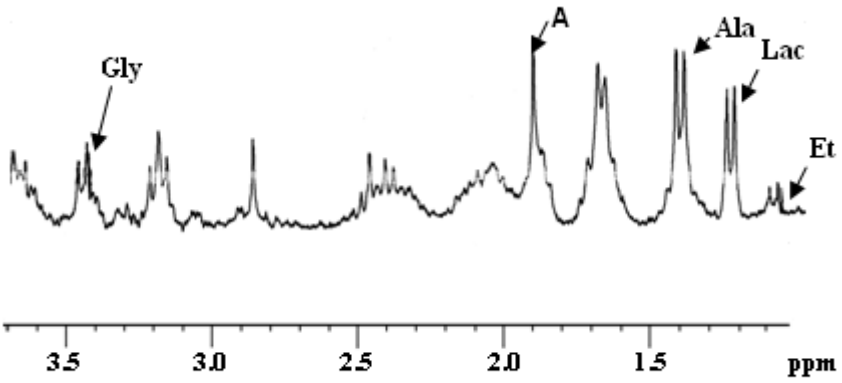


FIGURA 6 C

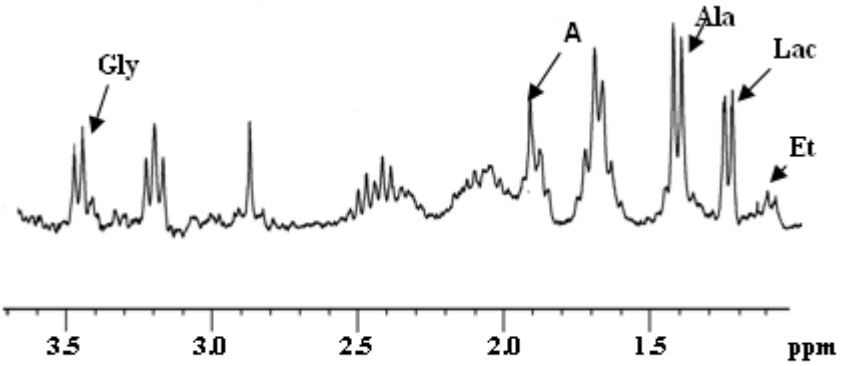


FIGURA 6 D

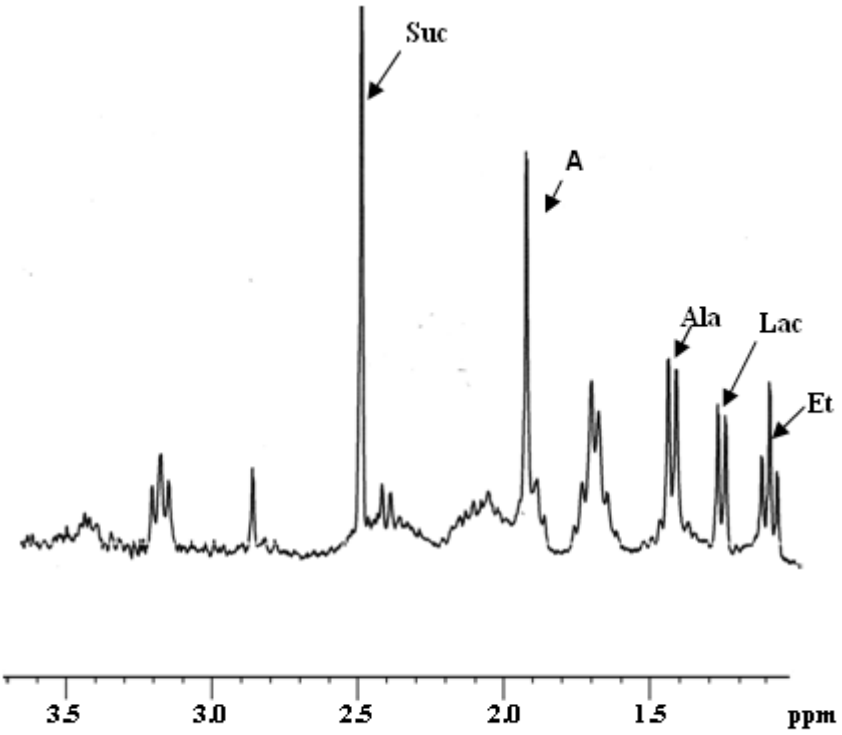
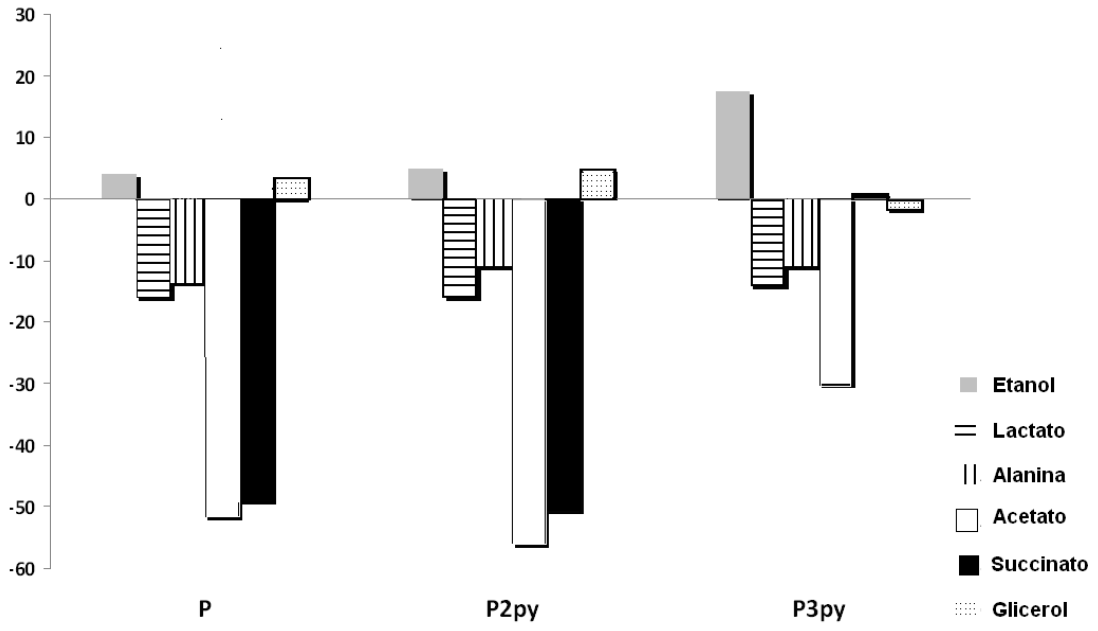


FIGURA 7


30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
P
P2py
P3py
Etanol
Lactato
Alanina
Acetato
Succinato
Glicerol

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201132035

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 16.12.2011

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2011033163 A2 (UNIVERSITAT DE VALENCIA) 24.03.2011, página 4, líneas 23-31; páginas 5-6, compuestos 1-3; página 6, líneas 19-23; página 7, líneas 1-6,23-28.	1-10
A	GONZÁLEZ, J. et al. "Tritopic phenanthroline and pyridine tail-tied aza-scorpiands". Organic and Biomolecular Chemistry 2010, Volumen 8, páginas 2367-2376. [Disponible en línea el 24.03.2010). Ver página 2367, resumen e introducción; página 2368, cuadro 1; página 2369, columna 2, párrafo 2; figura 4.	1-10
A	BLASCO, S. et al. "Hydrogen and Copper ion Induced Molecular Reorganizations in Two New Scorpiand-Like Ligands Appended with Pyridine Rings". Inorganic Chemistry 2010, Volumen 49, Número 15, páginas 7016-7027. [Disponible en línea el 07.08.2010). Ver página 7016, resumen; página 7017, cuadro 1; página 7018, columna 1, párrafo 3.	1-10
A	SÁNCHEZ-MORENO, M. et al. "In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[*g*]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* species". Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2012, Volumen 67, páginas 387-397. [Advance Access] [Disponible en línea 29.11.2011]. Ver página 1, resumen; página 3, figura 3.	1-10
A	GHOSH, S. et al. "Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within macrophage". Biochemical Journal 2003, Volumen 369, páginas 447-452. Ver página 447, resumen.	1-10

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	Examinador	Página
27.03.2013	G. Esteban García	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D471/08 (2006.01)
A61K31/439 (2006.01)
A61P33/02 (2006.01)

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

C07D, A61K, A61P

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

EPODOC,WPI,REGISTRY,HCAPLUS,MEDLINE,BIOSIS,XPESP,NPL,EMBASE,CHEMSPIDER,PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.03.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-10	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-10	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2011033163 A2	24.03.2011
D02	GONZÁLEZ, J. et al. Organic and Biomolecular Chemistry 2010, Vol. 8, pp. 2367-2376.	24.03.2010
D03	BLASCO, S. et al. Inorganic Chemistry 2010, Vol. 49, Nº 15, pp. 7016-7027.	07.08.2010
D04	SÁNCHEZ-MORENO, M. et al. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2012, Vol. 67, pp. 387-397.	29.11.2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es el uso de un compuesto de fórmula general (**I**) para la elaboración de una composición farmacéutica o veterinaria destinada al tratamiento de enfermedades causadas por parásitos; un compuesto seleccionado del grupo que comprende los compuestos (**X**), (**XI**), (**XIV**) y (**XV**); el uso de dichos compuestos para preparar un medicamento; y una composición farmacéutica o veterinaria que comprende al menos uno de estos compuestos.

El documento D01 divulga los compuestos (**1**) y (**2**), macrociclos poliazapiridinofanos con un heterociclo de quinolina unido al esqueleto central de la molécula (ver página 4, líneas 23-31), que se corresponden con los compuestos (**VII**) y (**VIII**) de la invención, no reivindicados (ver páginas 5 y 6). Estos compuestos, obtenidos a partir del compuesto (**3**), que posee la cadena de etilamina sin sustituir (compuesto **II** de la invención), forman complejos de coordinación con un átomo de manganeso (II) miméticos de la enzima superóxido dismutasa o SOD (ver página 6, líneas 19-23). Estos complejos pueden utilizarse en terapia para el tratamiento de enfermedades (en humanos o animales) cuya etiología se basa en anomalías de la actividad o carencia de la SOD endógena, actuando principalmente como antiinflamatorios, analgésicos y antioxidantes protectores del estrés oxidativo (ver página 7, líneas 1-6, 23-28).

El documento D02 divulga dos receptores derivados de azaescorpiandos de fórmulas **L1** (compuesto **XVII** de la invención) y **L2** (compuesto **XVIII** de la invención), además de los precursores **L3** y **L4** (compuestos **II** y **IV** de la invención, respectivamente) (ver página 2367, resumen; página 2368, cuadro 1). Estos compuestos tienen la capacidad de coordinarse a iones metálicos, como por ejemplo Zn(II) (ver página 2369, columna 2, párrafo 2; figura 4), además de potenciales aplicaciones en química farmacéutica (ver página 2367, introducción). Ninguno de estos compuestos se encuentra recogidos en las reivindicaciones de la solicitud objeto del presente informe.

El documento D03 divulga ligandos constituidos por una estructura de tris(2-aminoetil)amina unida a las posiciones 2,6 de una piridina que actúa como espaciador a través de grupos metileno funcionalizados (ver página 7016, resumen), como son los compuestos **L1** (compuesto **IV** de la solicitud), **L2** (compuesto **V** de la solicitud), **L4** (compuesto **III** de la solicitud), además del precursor **L3** (compuestos **II** de la solicitud) (ver página 7017, cuadro 1). Estos compuestos, que no se hallan reivindicados en la presente solicitud, forman complejos de coordinación con iones metálicos, como el Cu(II) (ver página 7018, columna 1, párrafo 3), en contraposición con los compuestos de la invención que forman complejos de Mn(II).

El documento D04 divulga una serie de compuestos derivados de benzo[*g*]ftalazina que poseen radicales imidazol o pirazol (ver página 1, resumen), en los que el grupo benzo[*g*]ftalazina actúa como espaciador entre los dos restos imidazol o pirazol, a través de sendas cadenas de trietileno funcionalizadas con un grupo amino (ver página 3, figura 3, compuestos **1**, **3**, **5**). Estos compuestos presentan actividad antiparasitaria, en concreto, resultaron activos *in vitro* contra dos especies de *Leishmania*, siendo menos tóxicos para las células de mamíferos que los fármacos de referencia.

Los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos, tomado solo o en combinación con los otros, divulga ni contiene sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia el uso de un compuesto de fórmula general (**I**) para la elaboración de una composición farmacéutica o veterinaria destinada al tratamiento de enfermedades causadas por parásitos; ni hacia los compuestos concretos (**X**), (**XI**), (**XIV**) y (**XV**); y, por tanto, tampoco hacia el uso de éstos para preparar un medicamento ni hacia una composición farmacéutica o veterinaria que los comprende.

Por lo tanto, se considera que el objeto de la solicitud reúne, respecto al estado de la técnica, los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/86.