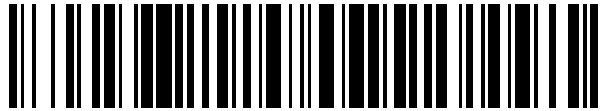


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 800**

51 Int. Cl.:

A61K 38/55 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

A61K 31/4015 (2006.01)

A61P 33/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2004 E 12001094 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2457582**

54 Título: **Método y composiciones para controlar ectoparásitos**

30 Prioridad:

16.07.2003 US 487717 P

16.07.2003 AU 2003903686

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.08.2014

73 Titular/es:

**HATCHTECH PTY LTD (100.0%)
205-211, Grattan Street
Parkville, VIC 3052, AU**

72 Inventor/es:

BOWLES, VERNON MORRISON

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 483 800 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y composiciones para controlar ectoparásitos

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se relaciona con métodos y composiciones para controlar ectoparásitos. En particular, la invención se relaciona con métodos y composiciones para inhibir la eclosión de un huevo de ectoparásito. La invención también proporciona métodos y composiciones para prevenir o tratar la infestación por ectoparásitos. La invención se relaciona también con métodos para identificar compuestos que puedan inhibir la eclosión de los huevos de ectoparásitos.

15 **Descripción de la técnica anterior**

Los ectoparásitos, incluyendo algunos insectos, causan problemas de plagas significativos en una amplia variedad de animales y plantas. En particular, los ectoparásitos normalmente pueden molestar, picar y causar infecciones a humanos y animales domesticados. De particular preocupación son la presencia y el efecto de tales parásitos en humanos, animales domésticos o animales de compañía, tales como perros y gatos, y otros animales domesticados, tales como caballos.

25 Se conocen diversas composiciones y técnicas de aplicación para controlar o eliminar plagas picadoras o chupadoras de sangre (ectoparásitos), tales como pulgas, garrapatas, moscas, piojos y ácaros. A lo largo de los años, se ha propuesto una multitud de aerosoles y sprays para espacios, líquidos, jabones, champús, polvos humectables, gránulos, cebos y polvos para el control de dichos ectoparásitos.

30 Las medidas convencionales de control para ectoparásitos se han basado en el uso de insecticidas químicos, por ejemplo hidrocarburos clorados (DDT, endosulfán, etc.), y piretroides sintéticos (cipermetrina, deltametrina). Como problemas asociados al uso de pesticidas químicos, se incluyen el desarrollo de resistencia por los ectoparásitos diana, la persistencia de los agentes químicos en el medio ambiente y en los tejidos vegetales y animales y los efectos nocivos sobre organismos huésped y no diana.

35 Otros tipos de ectoparasiticidas incluyen los insecticidas, tales como reguladores del crecimiento de los insectos (RCI), que se sabe interfieren con la síntesis de quitina, y toxinas bacterianas insecticidas (v.g., toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt)). Son grupos más útiles de insecticidas los que tienen una gran actividad insecticida y una baja persistencia ambiental, tales como los organofosfatos y los piretroides sintéticos. Sin embargo, un problema significativo asociado a estos insecticidas es el desarrollo de resistencia por los insectos diana.

40 Por ejemplo, se describen agentes insecticidas usados para el tratamiento de piojos en EP 0.191.236 y en la Pat. EE.UU. Nº 5.288.483. Un inconveniente significativo de la utilización de estos agentes es que los piojos pueden volverse resistentes. La necesidad de un mayor tratamiento aumenta la exposición a estos duros agentes y aumenta el coste. Adicionalmente, los clínicos y los padres son reacios a tratar a los niños con agentes que también pueden resultar tóxicos para los seres humanos. Más aún, muchos de estos compuestos tienen olores desagradables u otras propiedades indeseables que provocan incumplimiento por parte del paciente, que da lugar a reinfestación del individuo y a propagación de la infestación a otros. Además, la dureza de estos agentes los hace inadecuados para uso como profilácticos.

50 En el caso de la infestación por piojos de la cabeza, remedios caseros tales como la aplicación de aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de eucalipto, aceite de neem, aceite de coco, mahonesa o jalea de petróleo durante un período de tiempo suficiente como para matar a los piojos (v.g., durante la noche) no son prácticos o completamente efectivos. Otro inconveniente de los métodos de tratamiento de los piojos de la cabeza es el requerimiento de la eliminación de las liendres del pelo en una etapa de tratamiento independiente. La eliminación de las liendres ha sido normalmente realizada a mano usando peines especiales de dientes finos. El uso sólo del peinado para tratar los piojos de la cabeza tiene el inconveniente de que los piojos pueden agarrarse a los tallos del pelo usando sus garras o escapar alejándose del área que está siendo peinada. Este trabajo método requiere un peinado diario, es doloroso y es desagradable, ya que los piojos son activos, visibles y reptantes.

60 Existe una significativa necesidad de un mejor control de los piojos a nivel mundial. En particular, existen fallos bien documentados de productos destinados al tratamiento de los piojos. Se considera que el desarrollo de resistencia de los piojos a muchos de los productos químicos actualmente utilizados, incluyendo la permetrina, la piretrina y el malatión, es un factor importante en los fallos del tratamiento. Además, también se piensa que formulaciones inapropiadas que contienen principios activos subóptimos son en parte responsables del desarrollo de resistencia. Más recientemente, ha habido un crecimiento significativo en el mercado de productos de herbolario para el tratamiento de los piojos de la cabeza; sin embargo existe muy poca evidencia publicada de pruebas apropiadamente realizadas como para permitir hacer una valoración efectiva de estos productos. Además, aunque

una serie de productos reivindican poseer actividad ovicida, la evidencia de ello en el campo está lejos de ser convincente, por lo que es común para los productos recomendar que, tras un tratamiento inicial, se dé un segundo tratamiento entre 7 y 14 días después para matar a las ninfas recién emergidas.

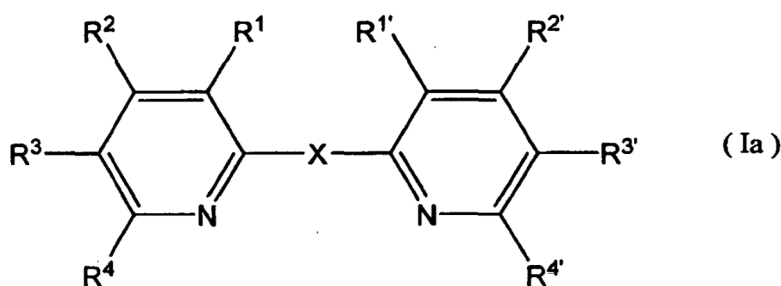
5 Recientemente, se ha dirigido la atención a proteasas de insectos que pueden proporcionar un posible medio de control de los ectoparásitos. Las proteasas realizan diversas funciones en el organismo, incluyendo la regulación y la descomposición de proteínas y péptidos, y por lo tanto ayudan a la digestión. También están implicadas en la reorganización de tejidos durante el desarrollo del embrión, la muda y la pupación. Las proteasas son un grupo
10 ampliamente variable de enzimas e incluyen proteasas digestivas que varían considerablemente tanto en número como en propiedades catalíticas intra- e interespecies. Por ejemplo, se ha reconocido que las serina proteasas de tipo tripsina están implicadas en el área clave reguladora del crecimiento de la muda (Samuels R.I. y Paterson C.J., Comparative Biochemistry and Physiology, 1995, 110B: 661-669).

15 Se ha sugerido que los inhibidores de proteasas son una alternativa útil a los métodos de control químicos, particularmente cuando los ectoparásitos se han hecho resistentes a estos pesticidas químicos. En particular, se ha visto que los inhibidores de serina y cisteína proteasas reducen el crecimiento larvario y/o la supervivencia de diversos insectos (Dymock y col., New Zealand Journal of Zoology, 1992, 19: 123-131). Se ha conseguido la inhibición del crecimiento con inhibidores de las enzimas digestivas principales del intestino y se han dirigido éstos a larvas de ectoparásitos o a parásitos maduros. Sin embargo, se sabe poco acerca de otros tipos de actividad y
20 función de diversas clases de inhibidores de proteasas. Un problema común de los ectoparasiticidas existentes es que no afectan a los huevos de los ectoparásitos y, por lo tanto, la aplicación de los parasiticidas a los hospedadores requiere con frecuencia un tratamiento repetido o una exposición prolongada al parasiticida para que sea efectivo. Esto no sólo resulta inconveniente, sino que también aumenta los riesgos para el medio ambiente y para el hospedador.

25 Young y col. (2000), Int. J. Parasit., 30: 925-932, se relaciona con la caracterización de las proteasas implicadas en la eclosión de los huevos de la mosca azul de las ovejas, *Lucilia cuprina*. Los estudios indican un papel para la serina proteasa y/o las metaloproteasas en la facilitación de la eclosión de los huevos de *L. cuprina*.

30 Sigue habiendo una necesidad de disponer de métodos y composiciones alternativas que sean efectivos en la inhibición de la eclosión de los huevos de los ectoparásitos para disponer de un control eficaz de los ectoparásitos.

35 Según un aspecto de la invención, se proporciona el uso de al menos un agente quelante de metales o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola para la fabricación de una composición tópica para uso en la inhibición de la eclosión de un huevo de ectoparásito sobre un hospedador humano o animal, donde el al menos un agente quelante de metales es un compuesto de fórmula (Ia):

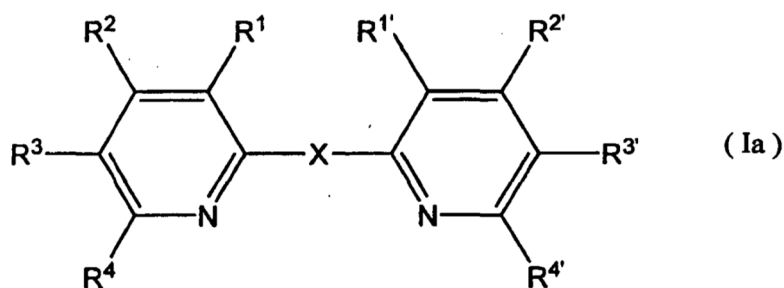


40 donde X es un enlace covalente, CH₂-Z-CH₂ o -Z-,

donde R¹ y R^{1'} son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃,

45 donde al menos uno de R², R^{2'}, R³, R^{3'}, R⁴ y R^{4'} es un grupo metilo y los R², R^{2'}, R³, R^{3'}, R⁴ y R^{4'} restantes son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃, y Z es seleccionado entre un enlace covalente, -NH-, -O-, -S-, -C(O)- y -C(S)-.

50 Otro aspecto proporciona un método para inhibir la eclosión de un huevo de un ectoparásito, excluyendo el uso sobre un hospedador humano o animal, que comprende la exposición del huevo del ectoparásito a una composición tópica que contiene al menos un agente quelante de metales, donde el al menos un agente quelante de metales es un compuesto de fórmula (Ia):



donde X es un enlace covalente, CH₂-Z-CH₂ o -Z-,

5 donde R¹ y R^{1'} son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃,

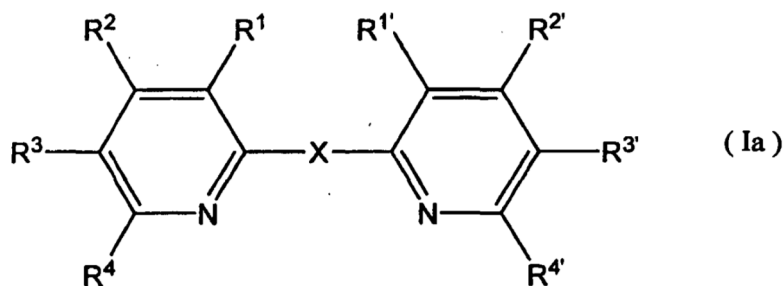
donde al menos uno de R², R^{2'}, R³, R^{3'}, R⁴ y R^{4'} es un grupo metilo y los R², R^{2'}, R³, R^{3'}, R⁴ y R^{4'} restantes son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃, y Z es seleccionado entre un enlace covalente, -NH-, -O-, -S-, -C(O)- y -C(S)-,

10

o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

Otro aspecto proporciona el uso de una cantidad efectiva de al menos un agente quelante de metales o de una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola para la fabricación de un medicamento tópico para uso en el tratamiento de la infestación por ectoparásitos en un hospedador humano o animal, donde el al menos un agente quelante de metales es un compuesto de fórmula (Ia):

15



20 donde X es un enlace covalente, CH₂-Z-CH₂ o -Z-,

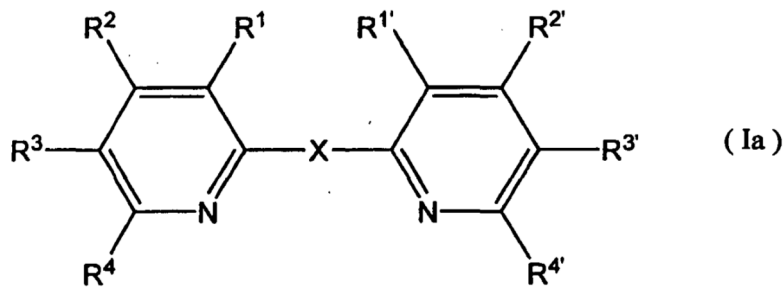
donde R¹ y R^{1'} son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃,

25

donde al menos uno de R², R^{2'}, R³, R^{3'}, R⁴ y R^{4'} es un grupo metilo y los R², R^{2'}, R³, R^{3'}, R⁴ y R^{4'} restantes son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃, y Z es seleccionado entre un enlace covalente, -NH-, -O-, -S-, -C(O)- y -C(S)-.

Otro aspecto proporciona un método de tratamiento de la infestación por ectoparásitos, excluyendo el uso sobre un hospedador humano o animal, que comprende la exposición del hospedador a una cantidad efectiva de al menos un agente quelante de metales, donde el al menos un agente quelante de metales es un compuesto de fórmula (Ia):

30



donde X es un enlace covalente, CH₂-Z-CH₂ o -Z-,

35

donde R¹ y R^{1'} son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃,

donde al menos uno de R², R^{2'}, R³, R^{3'}, R⁴ y R^{4'} es un grupo metilo y los R², R^{2'}, R³, R^{3'}, R⁴ y R^{4'} restantes son

independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃, y Z es seleccionado entre un enlace covalente, -NH-, -O-, -S-, -C(O)- y -C(S)-,

o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

El huevo de ectoparásito puede estar presente sobre: plantas hospedadoras, incluyendo cultivos de cereales, árboles frutales, algodón, cultivos de semillas oleaginosas, plantas ornamentales, flores, cultivos de vid, cultivos de tubérculos, plantas de pasto y hortalizas, o sobre sitios de cría, tales como: casas y edificios, recintos para animales domésticos y de granja, alfombras, mantas, cortinas y mobiliario.

Z puede ser -NH-, -O- o S.

El compuesto de fórmula (Ia) puede ser seleccionado entre: 6,6'-dimetil-2,2'-dipiridilo, 5,5'-dimetil-2,2'-dipiridilo, 4,4'-dimetil-2,2'-dipiridilo o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

El huevo de ectoparásito puede ser puesto por un ectoparásito de una especie de un orden seleccionado entre el grupo consistente en Lepidoptera, Hemiptera, Orthoptera, Psocoptera, Hymenoptera, Isoptera, Coleoptera, Dictyoptera, Thysanoptera, Homoptera, Diptera, Anaplura, Malophaga, Siphoneptera, Arachnida y Phthiraptera.

El huevo de ectoparásito puede ser puesto por un ectoparásito de una especie seleccionada entre el grupo consistente en *Helicoverpa spp.*, *Crocidolomia pavonana* (oruga del racimo de la col), *Pieris rapae* (blanquita de la col), *Phthorimaea operculella* (polilla de la patata), *Chrysodeixis spp.* (plusias del tabaco), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Eiphyas postvittana* (Walker) (palomilla marrón de la manzana), *Bovicola ovis* (piojo mordedor de la oveja), *Bovicola bovis*, *Haemotopinus eurysternus* (piojo nariz corta del ganado), *Linognathus vituli* (piojo de trompa larga del ganado bovino), *Solenoptes scabiei suis*, *Sarcoptes scabiei bovis*, *Psoroptes ovis*, *Pthirus pubis*, *Pediculus humanus capitis*, *Pediculus humanus humanus*, *Sarcoptes scabiei* var. *humani* y *Dermatophagoides spp.*

La infestación por ectoparásitos puede ser una infestación por piojos.

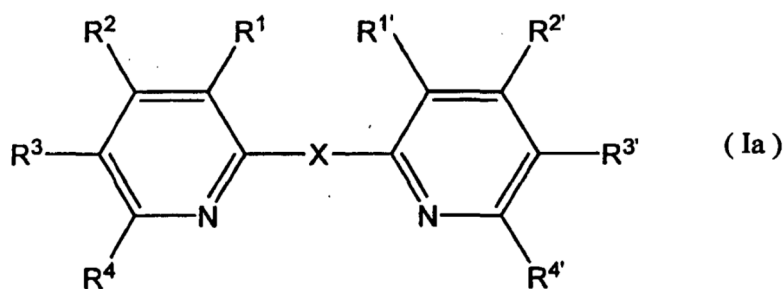
El agente quelante de metales puede ser aplicado simultáneamente, por separado o secuencialmente con respecto a un segundo ectoparasitida. El segundo ectoparasitida puede controlar a las ninfas y/o a los ectoparásitos adultos.

La composición puede ser formulada para uso en una aplicación tópica directa en una forma seleccionada entre el grupo consistente en un baño, un spray, un aerosol, un champú, una espuma, una emulsión, una solución, una crema, un polvo, una loción, espumas, microemulsiones y jaleas.

El huevo de ectoparásito puede ser un huevo de piojo de la cabeza humano, y la composición es formulada para uso en una aplicación tópica al cuero cabelludo humano y está en una forma seleccionada entre el grupo consistente en un baño, un spray, un aerosol, un champú, una espuma, una emulsión, una solución, una crema, un polvo, una loción, espumas, microemulsiones y jaleas.

La composición puede incluir: agua, soluciones de sales, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, estearato de magnesio o ácido silícico.

Otro aspecto proporciona al menos un agente quelante de metales o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola para uso en la inhibición de la eclosión de un huevo de ectoparásito sobre un hospedador humano o animal, donde el al menos un agente quelante de metales es un compuesto de fórmula (Ia):

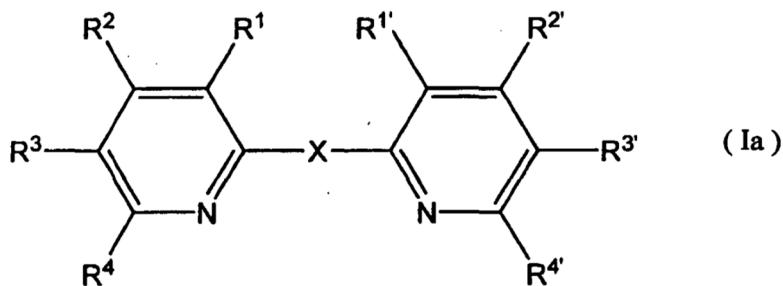


donde X es un enlace covalente, CH₂-Z-CH₂ o -Z-,

donde R¹ y R^{1'} son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃,

donde al menos uno de R^2 , R^2 , R^3 , R^3 , R^4 y R^4 es un grupo metilo y los R^2 , R^2 , R^3 , R^3 , R^4 y R^4 restantes son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C_{1-3} , y Z es seleccionado entre un enlace covalente, -NH-, -O-, -S-, -C(O)- y -C(S)-.

- 5 Otro aspecto proporciona un método de inhibición de la eclosión de un huevo de ectoparásito, excluyendo el uso sobre un hospedador humano o animal, que comprende la exposición del huevo de ectoparásito a al menos un agente quelante de metales o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola, donde el al menos un agente quelante de metales es un compuesto de fórmula (Ia):



- 10 donde X es un enlace covalente, CH_2-Z-CH_2 o $-Z-$,
- 15 donde R^1 y $R^{1'}$ son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C_{1-3} ,
- 20 donde al menos uno de R^2 , R^2 , R^3 , R^3 , R^4 y R^4 es un grupo metilo y los R^2 , R^2 , R^3 , R^3 , R^4 y R^4 restantes son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C_{1-3} , y Z es seleccionado entre un enlace covalente, -NH-, -O-, -S-, -C(O)- y -C(S)-.
- 25 El huevo de ectoparásito puede estar presente sobre: plantas hospedadoras, incluyendo cultivos de cereales, árboles frutales, algodón, cultivos de semillas oleaginosas, plantas ornamentales, flores, cultivos de vid, cultivos de tubérculos, plantas de pasto y hortalizas, o sobre sitios de cría, tales como: casas y edificios, recintos para animales domésticos y de granja, alfombras, mantas, cortinas y mobiliario.
- El compuesto de fórmula (Ia) puede ser 5,5'-dimetil-2-2'-dipiridilo o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

Breve descripción de las figuras

- 30 **Figura 1:** muestra un análisis de SDS-PAGE en sustrato de gelatina de la actividad proteasa de lavados obtenidos de diversas muestras de pelo y de huevos de piojos tras teñir el gel con azul Coomassie y destefir. La calle 1 muestra la actividad proteasa detectada en los lavados obtenidos de huevos de piojos no eclosionados en 12 horas de eclosión. La actividad proteasa se encontraba en la región de mayor peso molecular del gel de SDS. La calle 2 muestra la actividad proteasa detectada en los lavados de pelo, indicando la presencia de una serie de proteasas altamente activas y estables probablemente de origen materno. La calle 3 muestra una muestra de pelo que fue lavada con una solución al 1% de hipoclorito de sodio durante 1 minuto, seguido de una serie de lavados con agua en un intento de eliminar estas proteasas contaminantes. Este tratamiento era capaz de eliminar las proteasas maternas, para dar como resultado que no se detectara ninguna especie de proteasas en la muestra sólo de pelo. La calle 4 muestra la actividad proteasa detectada en los lavados de huevos en las 12 horas de la eclosión de los huevos tratados con hipoclorito de sodio (como se ha descrito anteriormente). Este tratamiento eliminaba la actividad proteasa que se observaba en la muestra no lavada (compárese con la calle 1). La calle 5 muestra la presencia de una o dos especies de proteasas de alto peso molecular en lavados de huevos de huevos de piojos que habían sido pretratados con hipoclorito de sodio y a los que se había dejado eclosionar. Estas proteasas se asociaban específicamente a los huevos de piojos en el momento de la eclosión de los huevos.

- 45 **Figura 2:** muestra una tinción de Coomassie de geles de SDS-PAGE en gelatina tratados con inhibidor de los lavados de cortezas de huevos procedentes de huevos de piojos después de un tratamiento con hipoclorito. Tres bandas eran evidentes a aproximadamente 25-30 kDa (entre corchetes). Calle 1, control positivo de LCH sin tratamiento con inhibidor, calle 2, LCH tras tratamiento con 1,10-fenantrolina 10 mM, calle 3, LCH tras tratamiento con PMSF 5 mM y calle 4 LCH tras tratamiento con E-64 10 μ m. Se realizó la incubación a 37 °C durante 3 horas. Obsérvese la significativa reducción en la actividad proteasa tras el tratamiento con 1,10-fenantrolina (calle 2, región entre corchetes). No se observó ninguna reducción en la actividad proteasa del LCH cuando se usó el inhibidor aspártico pepstatina (datos no mostrados).

- 55 **Figura 3:** muestra el efecto de la 1,10-fenantrolina sobre la eclosión de los huevos en piojos. Los huevos fueron tratados 5 días después de la deposición y se observó luego la eclosión a lo largo del tiempo.

Figura 4: muestra el efecto de la bestatina sobre la eclosión de los huevos en piojos. Los huevos fueron tratados 5 días después de la deposición y se observó luego la eclosión a lo largo del tiempo.

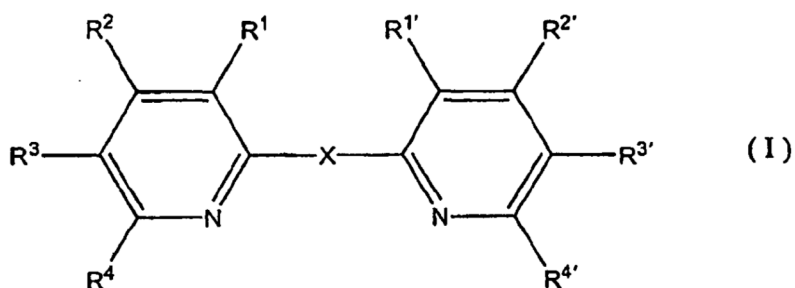
Descripción detallada

Tal como se usa en el presente documento, el término "agente quelante de metales" se refiere a un compuesto que tiene al menos dos heteroátomos capaces de coordinarse simultáneamente con un ion metálico, siendo seleccionado al menos uno de los dos heteroátomos entre nitrógeno, azufre, oxígeno o fósforo, donde el compuesto tiene al menos un anillo carbocíclico substituido con al menos un heteroátomo y/o un substituyente que contiene al menos un heteroátomo, o el compuesto tiene al menos un anillo heterocíclico que contiene al menos un heteroátomo, y donde dicho anillo heterocíclico esta eventualmente substituido con al menos un heteroátomo y/o un substituyente que contiene al menos un heteroátomo. Preferiblemente, el agente quelante de metales contiene un anillo de arilo o heteroarilo. Más preferiblemente, el agente quelante de metales tiene al menos un heteroátomo de nitrógeno. Preferiblemente, el agente quelante de metales es no intercalante.

Tal como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de metaloproteasas" se refiere a una molécula, un compuesto, una proteína o un agente que inhibe la actividad de una metaloproteasa asociada a la eclosión de los huevos de los ectoparásitos. La inhibición puede ser inhibición de la expresión de la metaloproteasa o inhibición de la actividad enzimática de la metaloproteasa. Los inhibidores preferidos de metaloproteasas son agentes quelantes de metales.

Los agentes quelantes de metales e inhibidores de metaloproteasas preferidos son seleccionados entre compuestos biarilo, derivados de péptidos y aminoácidos, antibióticos tetracíclicos y tioureas. Como compuestos biarilo preferidos, se incluyen compuestos bipyridilo y compuestos de 1,10-fenantrolina.

Un agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas puede ser un compuesto de fórmula (I):



donde X es seleccionado entre un enlace covalente, $-C(R^5)_2-$, $-Z-$ o $-C(R^5)_2-Z-C(R^5)_2-$; R^1 y $R^{1'}$ son independientemente seleccionados entre hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenido C_{1-6} , alquinilo C_{2-6} , hidroxilo, alcoxi C_{1-6} , tiol, alquiltio C_{1-6} , CO_2H , CO_2 alquilo C_{1-6} , SO_3H , SO_3 alquilo C_{1-6} , NH_2 , NH alquilo C_{1-6} o N (alquilo C_{1-6}) $_2$, o R^1 y $R^{1'}$ tomados conjuntamente son $-C(R^5)_2-$, $-C(R^5)_2-C(R^5)_2-$, $-CR^5=CR^5-$, $C(O)$, $C(S)$ o NH ; R^2 , R^2' , R^3 , R^3' , R^4 y R^4' son independientemente seleccionados entre hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenido C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , hidroxilo, alcoxi C_{1-6} , tiol, alquiltio C_{1-6} , CO_2H , CO_2 alquilo C_{1-6} , SO_3H , SO_3 alquilo C_{1-6} , NH_2 , NH alquilo C_{1-6} o N (alquilo C_{1-6}) $_2$, o $-CH_2CHNH(CO_2H)$; o R^2 y R^3 o R^3 y R^4 y/o R^2 y R^3 o R^3 y R^4 , tomados conjuntamente con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico o heterocíclico de 5 ó 6 miembros; cada R^5 es independientemente seleccionado entre hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenido C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , hidroxilo, alcoxi C_{1-6} , tiol, alquiltio C_{1-6} , CO_2H , CO_2 alquilo C_{1-6} , SO_3H , SO_3 alquilo C_{1-6} , NH_2 , NH alquilo C_{1-6} o N (alquilo C_{1-6}) $_2$; y Z es seleccionado entre un enlace covalente, $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-C(O)-$ y $-C(S)-$; o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

Los compuestos preferidos de fórmula (I) tienen al menos una de las siguientes características:

R^1 y $R^{1'}$ son independientemente seleccionados entre alquilo C_{1-6} , alquenido C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , hidroxilo, alcoxi C_{1-6} , tiol, alquiltio C_{1-6} , CO_2H , CO_2 alquilo C_{1-6} , SO_3H , SO_3 alquilo C_{1-6} , NH_2 , NH alquilo C_{1-6} o N (alquilo C_{1-6}) $_2$, más preferiblemente hidrógeno o alquilo C_{1-3} , incluso más preferiblemente hidrógeno o metilo; R^2 y R^2' son independientemente hidrógeno o alquilo C_{1-3} , más preferiblemente hidrógeno; R^3 , R^3' , R^4 y R^4' son independientemente seleccionados entre hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenido C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , alcoxi C_{1-6} , alquiltio C_{1-6} o CO_2 alquilo C_{1-6} , preferiblemente hidrógeno o alquilo C_{1-3} , más preferiblemente hidrógeno o metilo; cada R^5 es independientemente seleccionado entre hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenido C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , alcoxi C_{1-6} , alquiltio C_{1-6} o CO_2 alquilo C_{1-6} , preferiblemente hidrógeno o alquilo C_{1-3} , más preferiblemente hidrógeno o

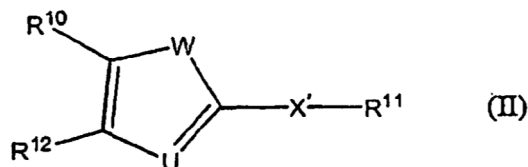
metilo;

X es un enlace covalente, -CH₂-Z-CH₂- o Z, preferiblemente un enlace covalente; y

Z es -NH-, -O- o -S-, preferiblemente -NH-.

- 5 Como compuestos preferidos de fórmula (I), se incluyen
 2,2'-dipiridilo,
 6,6'-dimetil-2,2'-dipiridilo y
 5,5'-dimetil-2,2'-dipiridilo,
 o una sal de los mismos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

10 Un agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas puede también ser un compuesto de fórmula (II):

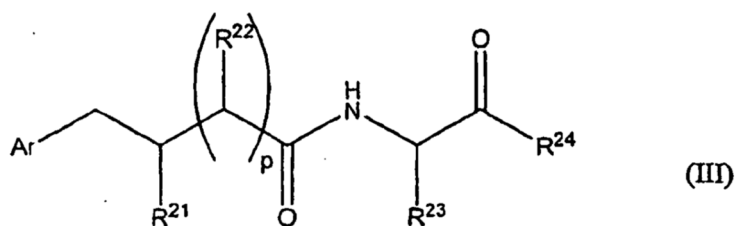


- 15 donde X' es seleccionado entre un enlace covalente, -C(R¹³)₂-, Z' o C(R¹³)₂-Z'-C(R¹³)₂-;
 U es seleccionado entre N o C(R¹³);
 W es seleccionado entre -NH-, -S- o -O-;
 Z' es seleccionado entre un enlace covalente, -NH-, -O-, -S-, -C(O)-, o -C(S)-;
 R¹⁰ es seleccionado entre hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, hidroxi, alcoxi C₁₋₆, tiol, alquiltiol
 C₁₋₆, CO₂H, CO₂alquilo C₁₋₆, SO₃H, SO₃alquilo C₁₋₆, NH₂, NH(alquilo C₁₋₆), N(alquilo C₁₋₆)₂ o -(CH₂)_nR¹⁴;
 R¹¹ es seleccionado entre (CH₂)_marilo o (CH₂)_mheteroarilo, donde cada arilo o heteroarilo está eventualmente
 sustituido con uno o más alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, hidroxi, alcoxi C₁₋₆, tiol, alquiltiol C₁₋₆, CO₂H,
 CO₂alquilo C₁₋₆, SO₃H, SO₃alquilo C₁₋₆, NH₂, NH(alquilo C₁₋₆), N(alquilo C₁₋₆)₂ o halo;
 cada R¹² es independientemente seleccionado entre hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, hidroxi,
 25 alcoxi C₁₋₆, tiol, alquiltiol C₁₋₆, CO₂H, CO₂alquilo C₁₋₆, SO₃H, SO₃alquilo C₁₋₆, NH₂, NH(alquilo C₁₋₆), N(alquilo C₁₋₆)₂
 o -(CH₂)_nR¹⁴; o
 R¹⁰ y R¹², junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico o heterocíclico
 de 5 ó 6 miembros;
 cada R¹³ es independientemente seleccionado entre hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆, hidroxi,
 30 alcoxi C₁₋₆, tiol, alquiltiol C₁₋₆, CO₂H, CO₂alquilo C₁₋₆, SO₃H, SO₃alquilo C₁₋₆, NH₂, NH(alquilo C₁₋₆), N(alquilo C₁₋₆)₂
 o -(CH₂)_nR¹⁴;
 R¹⁴ es seleccionado entre NH₂, OH, SH o CO₂H;
 m es 0 o un número entero de 1 a 4; y
 n es un número entero de 1 a 4;
 35 o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

Los compuestos preferidos de fórmula (II) tienen al menos una de las siguientes características:

- 40 X es un enlace covalente o -CH₂-Z-CH₂-;
 U es N;
 W es NH o S;
 Z' es NH;
 R¹⁰ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆ o (CH₂)_nR¹⁴, preferiblemente hidrógeno, alquilo C₁₋₃ o
 (CH₂)_nR¹⁴;
 45 R¹¹ es fenilo, fenilo sustituido con alquilo C₁₋₃ o halo, tiofeno, piridina, piridinilmetilo, imidazol o imidazol
 sustituido con uno o dos alquilos C₁₋₃;
 R¹² es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆, alquino C₂₋₆ o (CH₂)_nR¹⁴, preferiblemente hidrógeno, alquilo C₁₋₃ o
 (CH₂)_nR¹⁴; o
 R¹⁰ y R¹², junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo de fenilo fusionado;
 50 R¹³ es hidrógeno o alquilo C₁₋₃, preferiblemente hidrógeno o metilo;
 R¹⁴ es NH₂ o CO₂H;
 m es 0 ó 1; y
 n es 1 ó 2.

55 Un agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas puede ser también seleccionado entre un compuesto
 de fórmula (III):



donde Ar es fenilo, naftilo o indolilo eventualmente sustituido con uno o más alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, tiol, alquiltiol C₁₋₆, CO₂H, CO₂alquilo C₁₋₆, SO₃H, SO₃alquilo C₁₋₆, NH₂, NH(alquilo C₁₋₆) o N(alquilo C₁₋₆)₂;

R²¹ es seleccionado entre NH₂, NHR²⁵ o -CH₂SR²⁵;

R²² es seleccionado entre hidrógeno, hidroxilo o alcoxi C₁₋₆;

R²³ es seleccionado entre hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆ o alquinilo C₂₋₆;

R²⁴ es seleccionado entre OH, OR²⁶, NH₂, NHalquilo C₁₋₆ o N(alquilo C₁₋₆)₂;

R²⁵ es seleccionado entre hidrógeno o C(O)alquilo C₁₋₆ donde el alquilo está eventualmente sustituido con -SH u -OH;

R²⁶ es seleccionado entre alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ o bencilo; y

p es 0 ó 1,

o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

Los compuestos preferidos de fórmula (III) tienen al menos una de las siguientes características:

Ar es fenilo o naftilo;

R²¹ es NH₂, -NHC(O)alquilo C₁₋₆ eventualmente sustituido con SH, -CH₂SC(O)alquilo C₁₋₆ o CH₂SH;

R²² es hidrógeno o hidroxilo;

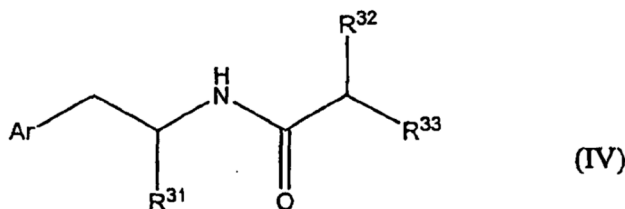
R²³ es hidrógeno o alquilo C₁₋₃, preferiblemente hidrógeno o metilo;

R²⁴ es OH, NH₂ u O-bencilo; y

p es 0 ó 1.

Los compuestos preferidos de fórmula III incluyen bestatina y tiorfano o una sal de los mismos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

Un agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas puede también ser un compuesto de fórmula (IV):



donde Ar es fenilo, naftilo o indolilo eventualmente sustituido con uno o más alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, tiol, alquiltiol C₁₋₆, CO₂H, CO₂alquilo C₁₋₆, SO₃H, SO₃alquilo C₁₋₆, NH₂, NH(alquilo C₁₋₆) o N(alquilo C₁₋₆)₂;

R³¹ es seleccionado entre CO₂H, CO₂alquilo C₁₋₆, CO₂alquenilo C₂₋₆, CO₂alquinilo C₂₋₆, CONH₂, CONH(alquilo C₁₋₆) o CON(alquilo C₁₋₆)₂;

R³² es seleccionado entre hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, tiol, alquiltiol C₁₋₆, CO₂H, CO₂alquilo C₁₋₆, SO₃H, SO₃alquilo C₁₋₆, NH₂, NH(alquilo C₁₋₆), N(alquilo C₁₋₆)₂, CH₂CH₂CO₂H, CH₂CH₂CONH₂, CH₂CH₂OH o CH₂CH₂SH; y

R³³ es seleccionado entre alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, hidroxilo, alcoxi C₁₋₆, tiol, alquiltiol C₁₋₆, CO₂H, CO₂alquilo C₁₋₆, SO₃H, SO₃alquilo C₁₋₆, NH₂, NH(alquilo C₁₋₆), N(alquilo C₁₋₆)₂, CH₂CO₂H, CH₂CO₂alquilo C₁₋₆, CH₂CONH₂, CH₂OH o CH₂SH, o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

Los compuestos preferidos de fórmula (IV) tienen al menos una de las siguientes características:

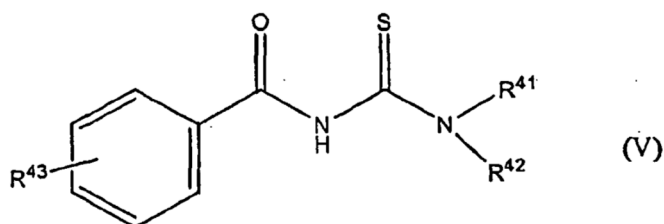
Ar es fenilo o indolilo,

R³¹ es CO₂H o CONH₂,

R³² es alquilo C₁₋₆, CH₂CH₂CO₂H, CH₂CH₂CONH₂, CH₂CH₂OH o CH₂CH₂SH,

R³³ es CH₂CO₂H, CH₂CONH₂, CH₂OH o CH₂SH.

Un agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas puede también ser un compuesto de fórmula (V):



5 donde R^{41} y R^{42} son independientemente seleccionados entre hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alqueno C_{2-6} o alquino C_{2-6} , o R^{41} y R^{42} , tomados junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico de 5 ó 6 miembros que está eventualmente sustituido con uno o más grupos alquilo C_{1-6} , alqueno C_{2-6} o alquino C_{2-6} ; y R^{43} es seleccionado entre hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alqueno C_{2-6} , alquino C_{2-6} , hidroxilo, alcoxi C_{1-6} , tior, alquiltior C_{1-6} , CO_2H , CO_2 alquilo C_{1-6} , SO_3H , SO_3 alquilo C_{1-6} , NH_2 , NH alquilo C_{1-6} o N (alquilo C_{1-6}) $_2$; o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

Los compuestos preferidos de fórmula (V) tienen al menos una de las siguientes características:

15 R^{41} y R^{42} son independientemente seleccionados entre alquilo C_{1-6} , o, tomados junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un grupo piperidina, piperazina, N -metilpiperazina o morfolina; R^{43} es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alqueno C_{2-6} o alquino C_{2-6} .

20 Un agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas puede ser también un antibiótico tetracíclico seleccionado entre el grupo consistente en tetraciclina, doxiciclina o minociclina o una sal de las mismas aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

25 Un agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas puede ser también seleccionado entre 1-[(2S)-3-mercapto-2-metil-1-oxopropil]-L-prolina (Captopril) o N -(alfa-ramnopiranosiloxihidroxifosfinil)-L-leucil-L-triptófano (fosforamidón), o una sal de los mismos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado saturado de cadena lineal o ramificado y puede tener un número especificado de átomos de carbono. Por ejemplo, C_{1-6} , como en "alquilo C_{1-6} ", incluye grupos que tienen 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 carbonos en una disposición lineal o ramificada. Como ejemplos de grupos alquilo adecuados, se incluyen, aunque sin limitación, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *i*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 4-metilbutilo, *n*-hexilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 5-metilpentilo, 2-etilbutilo y 3-etilbutilo.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alqueno" se refiere a un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificado que tiene uno o más dobles enlaces entre átomos de carbono y puede tener un número especificado de átomos de carbono. Por ejemplo, C_{2-6} , como en "alqueno C_{2-6} ", incluye grupos que tienen 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de carbono en una disposición lineal o ramificada. Como ejemplos de grupos alqueno adecuados, se incluyen, aunque sin limitación, etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, pentenilo y hexenilo.

40 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquino" se refiere a un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificado que tiene uno o más triples enlaces entre átomos de carbono y puede tener un número especificado de átomos de carbono. Por ejemplo, C_{2-6} , como en "alquino C_{2-6} ", incluye grupos que tienen 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de carbono en una disposición lineal o ramificada. Como ejemplos de grupos alquino adecuados, se incluyen, aunque sin limitación, etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo y hexinilo.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "halo" o "halógeno" se refiere a flúor (fluoro), cloro (cloro), bromo (bromo) y yodo (yodo).

50 El término "alquiloxi", tal como se usa en el presente documento, representa un grupo alquilo como se ha definido anteriormente unido a través de un puente de oxígeno. Como ejemplos de grupos alquiloxi adecuados, se incluyen, aunque sin limitación, metoxi, etoxi, *n*-propiloxi, *i*-propiloxi, *n*-butiloxi, *i*-butiloxi, *t*-butiloxi, *n*-pentiloxi y *n*-hexiloxi.

55 El término "alquiltío", tal como se usa en el presente documento, representa un grupo alquilo como se ha definido anteriormente unido a través de un puente de azufre. Como ejemplos de grupos alquiltío adecuados, se incluyen, aunque sin limitación, metiltío, etiltío, propiltío, *i*-propiltío, butiltío, *i*-butiltío, *t*-butiltío, pentiltío y hexiltío.

El término "anillo carbocíclico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo de 3 a 10 miembros o un sistema de anillos fusionados, en donde todos los átomos que forman el anillo son átomos de carbono. El anillo carbocíclico C_{3-10} puede ser saturado, insaturado o aromático. Como ejemplos de anillos carbocíclicos adecuados,

se incluyen, aunque sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, fenilo, naftilo y tetrahidronaftilo.

5 El término "anillo heterocíclico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo de 3 a 10 miembros o sistema de anillos fusionados en donde al menos uno de los átomos que forman el anillo es un heteroátomo. Preferiblemente, el heteroátomo es seleccionado entre nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. El anillo heterocíclico C₃₋₁₀ puede ser saturado, insaturado o aromático. Como ejemplos de anillos heterocíclicos adecuados, se incluyen, aunque sin limitación, benzoimidazolilo, benzofuranilo, benzofurazanilo, benzopirazolilo, benzotriazolilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, carbazolilo, carbolinilo, cinolinilo, furanilo, imidazoilo, indolinilo, indolilo, indolazinilo, 10 indazolilo, isobenzofuranilo, isoindolilo, isoquinolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, naftiridinilo, oxadiazolilo, oxazolilo, oxazolino, isoxazolino, oxetanilo, piranilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridopiridinilo, piridazinilo, piridilo, pirimidilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolilo, quinoxalinilo, tetrahidropiranilo, tetrazolilo, tetrazolopiridilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo, azetidino, aziridinilo, 1,4-dioxanilo, hexahidroazepinilo, piperazinilo, piperidinilo, pirrolidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, dihidrobenzoimidazolilo, dihidrobenzofuranilo, dihidrobenzotiofenilo, 15 dihidrobenzoxazolilo, dihidrofurano, dihidroimidazolilo, dihidroindolilo, dihidroisoxazolilo, dihidroisotiazolilo, dihidrooxadiazolilo, dihidrooxazolilo, dihidropirazinilo, dihidropirazolilo, dihidropiridinilo, dihidropirimidinilo, dihidropirrolilo, dihidroquinolinilo, dihidrotetrazolilo, dihidrotiadiazolilo, dihidrotiazolilo, dihidrotienilo, dihidrotriazolilo, dihidroazetidino, metilendioxibenzoilo, tetrahidrofuranilo y tetrahidrotienilo, y sus N-óxidos. La unión de un sustituyente heterocíclico puede producirse a través de un átomo de carbono o a través de un heteroátomo.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "arilo" pretende significar cualquier anillo de carbono monocíclico o bicíclico estable de hasta 6 átomos en cada anillo, donde al menos un anillo es aromático. Como ejemplos de dichos grupos arilo, se incluyen, aunque sin limitación, fenilo, naftilo y tetrahidronaftilo.

25 El término "heteroarilo", tal como se usa en el presente documento, representa un anillo monocíclico o bicíclico estable de hasta 6 átomos en cada anillo, donde al menos un anillo es aromático y al menos un anillo contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados entre el grupo consistente en O, N y S. Como grupos heteroarilo dentro del alcance de esta definición, se incluyen, aunque sin limitación, acridinilo, carbazolilo, cinolinilo, quinoxalinilo, pirrazolilo, indolilo, benzotriazolilo, furanilo, tienilo, benzotienilo, benzofuranilo, quinolinilo, isoquinolinilo, oxazolilo, isoxazolilo, 30 indolilo, pirazinilo, piridazinilo, piridinilo, pirimidinilo, pirrolilo y tetrahydroquinolino.

Los compuestos de la invención utilizados pueden estar en forma de sales aceptables desde un punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola. Como sales farmacéuticamente aceptables adecuadas, se incluyen, aunque sin limitación, sales de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables, tales como los ácidos clorhídrico, sulfúrico, 35 fosfórico, nítrico, carbónico, bórico, sulfámico y bromhídrico, o sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables, tales como los ácidos acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, maleico, cítrico, láctico, místico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, toluensulfónico, bencenosulfónico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutámico, edético, esteárico, palmítico, oleico, láurico, pantoténico, tánico, ascórbico y valérico.

40 Como sales de bases, se incluyen, aunque sin limitación, las formadas con cationes farmacéuticamente aceptables, tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, amonio y alquilamonio.

45 Los grupos que contienen nitrógeno básico pueden ser cuaternizados con agentes tales como un haluro de alquilo inferior, como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo, como sulfato de dimetilo y dietilo; y otros.

También se reconocerá que muchos compuestos usados en la invención poseen centros asimétricos y son, por lo tanto, capaces de existir en más de una forma estereoisomérica. La invención se relaciona también, por lo tanto, con 50 compuestos en forma isomérica substancialmente pura en uno o más centros asimétricos, *v.g.*, más de aproximadamente un 90% ee, tal como aproximadamente un 95% o un 97% ee o más de un 99% ee, así como mezclas, incluyendo mezclas racémicas, de los mismos. Dichos isómeros pueden ser preparados por síntesis asimétrica, por ejemplo usando intermediarios quirales, o por resolución quiral.

55 Se pueden obtener comercialmente una serie de agentes quelantes de metales e inhibidores de metaloproteasas útiles en la presente invención de compañías de productos químicos especializados. Los que no pueden ser adquiridos comercialmente pueden ser sintetizados a partir de materiales de partida comerciales usando reacciones conocidas para los expertos en la técnica.

60 Por ejemplo, se pueden obtener 2,2-bipiridilos y 1,10-fenantrolinas sustituidos a partir de 2,2-bipiridilos o 1,10-fenantrolinas halogenados adecuados. Por ejemplo, se puede obtener ácido 2,2'-bipiridin-6,6'-dicarboxílico a partir de 6,6'-dibromo-2,2'-dipiridilo por intercambio de halógeno-metal con butillitio, tratamiento con hielo seco y acidificación [Buhleier y col., Chem. Ber., 1978, 111: 200-204]. Se puede obtener la monosustitución de un bipiridilo, por ejemplo con CH₂CHNH₂(CO₂H) en la posición 6, por tratamiento de 6-metil-2,2'-bipiridilo con N-bromosuccinimida, seguido de alquilación con éster de glicina N-protégida. Los grupos protectores pueden ser entonces eliminados por hidrólisis ácida (Imperiali B. y Fisher S.L., J. Org. Chem., 1992, 57: 757-759).

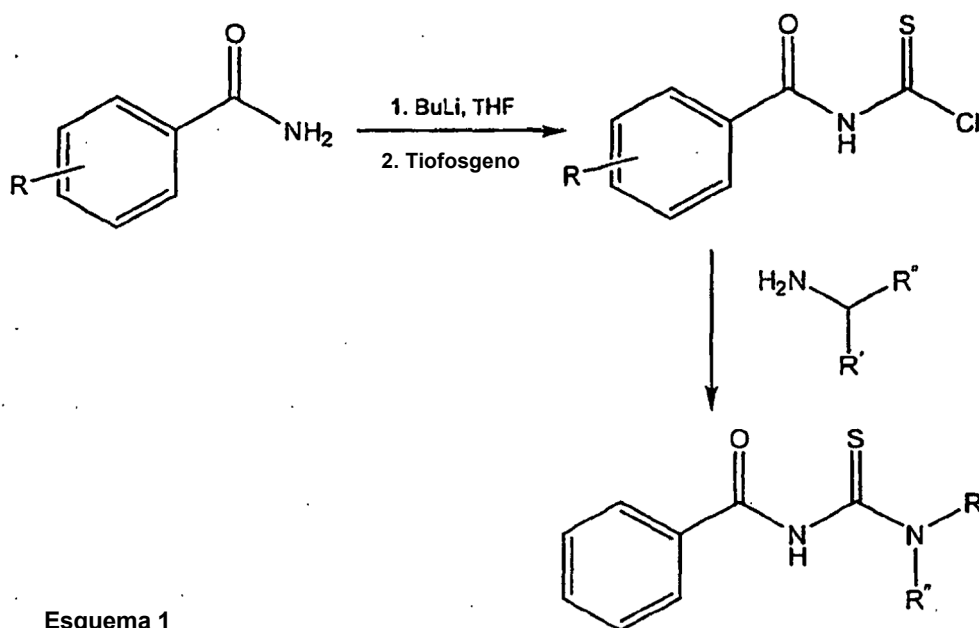
Los 2,2'-dipiridilos pueden sufrir una sustitución nucleofílica en las posiciones C6 y C4 para introducir sustituyentes. Esta reacción es más favorable cuando se usa un dipiridilo halogenado como material de partida. Por ejemplo, se puede introducir una amina en C6 y/o C6' usando 2,2'-dipiridilo 6-mono o di-halogenado y haciendo que este material de partida reaccione con amoníaco.

Se pueden preparar ácidos biperidilsulfónicos a partir de 2,2'-biperidilo por calentamiento con óleum (una solución de trióxido de azufre en ácido sulfúrico concentrado) o sulfato de mercurio (II)/ácido sulfúrico concentrado a 300 °C.

Se pueden obtener biperidilos no simétricamente sustituidos a partir de biperidilos simétricos; por ejemplo, se puede preparar ácido 6'-metil-2,2'-biperidil-6-carboxílico a partir de 6,6'-dimetil-2,2'-biperidilo por oxidación con dióxido de selenio, seguida de tratamiento con nitrato de plata (Al-Sayah y col., European J. Org. Chem., 2004, 173-182).

Se pueden preparar los compuestos de las fórmulas (III) y (IV) a partir de aminoácidos comerciales, por ejemplo fenilalanina y triptófano, usando reacciones de copulación conocidas con los grupos ácido carboxílico o amina de los aminoácidos (Jones J., Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford Chemistry Press, 1992). Pueden ser necesarias etapas adecuadas de protección y desprotección, como es sabido en la técnica y se muestra en Jones, 1992, *supra*, o en Green T.W. y Wutz P., Protecting Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Son, 3ª Ed., 1999.

Se pueden preparar las tioureas de fórmula (V) por reacción de una benzamida adecuada con butillitio, seguido de tiofosgeno. Se puede hacer reaccionar entonces al producto resultante con una amina o aminoácido adecuado, como se muestra en el Esquema 1.



En la presente memoria descriptiva, se entiende que el término "ectoparásito" incluye cualquier especie animal parasitaria que infeste externamente a un hospedador y que se reproduzca mediante deposición de huevos. Como ectoparásitos preferidos de la invención, se incluye una especie de un orden seleccionado entre el grupo consistente en Lepidoptera, Hemiptera, Orthoptera, Psocoptera, Hymenoptera, Isoptera, Coleoptera, Dictyoptera, Thysanoptera, Homoptera, Diptera, Anaplura, Malophaga, Siphonaptera y Arachnida.

Como ectoparásitos adecuados que pueden ser controlados usando los métodos de la presente invención, se incluyen:

(a) del orden de los lepidópteros (Lepidoptera), por ejemplo, *Adoxophyes orana*, *Agrotis ypsilon*, *Agrotis segetum*, *Alabama argillacea*, *Anticarsia gemmatalis*, *Argyresthia conjugella*, *Autographa gamma*, *Cacoecia murinana*, *Capua reticulana*, *Choristoneura fumiferana*, *Chilo partellus*, *Choristoneura occidentalis*, *Cirphis unipuncta*, *Cnaphalocrocis medinalis*, *Crocidolomia binotalis*, *Cydia pomonella*, *Dendrolimus pini*, *Diaphania nitidalis*, *Diatraea grandiosella*, *Earias insulana*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Eupoecilia ambiguella*, *Feltia subterranea*, *Grapholitha funebrana*, *Grapholitha molesta*, *Heliothis armigera*, *Heliothis virescens*, *Heliothis zea*, *Hellula undalis*, *Hibernia defoliaria*, *Hyphantria cunea*, *Hyponomeuta malinellus*, *Keiferia lycopersicella*, *Lambdina fiscellaria*, *Laphygma exigua*, *Leucoptera scitella*, *Lithocolletis blancardella*, *Lobesia botrana*, *Loxostege sticticalis*, *Lymantria dispar*, *Lymantria monacha*, *Lyonetia clerkella*, *Manduca sexta*, *Malacosoma neustria*,

- 5 *Mamestra brassicae*, *Mocis repanda*, *Operophtera brumata*, *Orgyia pseudotsugata*, *Ostrinia nubilalis*, *Pandemis heparana*, *Panolis flammea*, *Pectinophora gossypiella*, *Phthorimaea operculella*, *Phyllocnistis citrella*, *Pieris brassicae*, *Plathypena scabra*, *Platynota stultana*, *Plutella xylostella*, *Prays citri*, *Prays oleae*, *Prodenia sunia*, *Prodenia ornithogalli*, *Pseudoplusia includens*, *Rhyacionia frustrana*, *Scrobipalpula absoluta*, *Sesamia inferens*, *Sparganothis pilleriana*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera litura*, *Syllepta derogata*, *Synanthedon myopaeformis*, *Thaumatopoea pityocampa*, *Tortrix viridana*, *Trichoplusia ni*, *Tryporyza incertulas*, *Zeiraphera canadensis*;
- 10 (b) del orden de los hemípteros (Hemiptera), por ejemplo, *Aphis*, *Bemisia*, *Phorodon*, *Aeneolamia*, *Empoasca*, *Parkinsiella*, *Pyrilla*, *Aonidiella*, *Coccus*, *Pseudococcus*, *Helopeltis*, *Lygus*, *Dysdercus*, *Oxycarenus*, *Nezara*, *Aleyrodes*, *Triatoma*, *Psylla*, *Myzus*, *Megoura*, *Phylloxera*, *Adelges*, *Nilaparvata*, *Nephotettix* o *Cimwx* spp.;
- 15 (c) del orden de los ortópteros (Orthoptera), por ejemplo, *Gryllotalpa gryllotalpa*, *Locusta migratoria*, *Melanoplus bivittatus*, *Melanoplus femur-rubrum*, *Melanoplus mexicanus*, *Melanoplus sanguinipes*, *Melanoplus spretus*, *Nomadacris septemfasciata*, *Schistocerca americana*, *Schistocerca peregrina*, *Stauronotus maroccanus*, *Schistocerca gregaria*;
- 20 (d) del orden de los psocópteros (Psocoptera), por ejemplo, *Peripsocus* spp.;
- 25 (e) del orden de los himenópteros (Hymenoptera), por ejemplo, *Athalia rosae*, *Atta cephalotes*, *Atta sexdens*, *Atta texana*, *Hoplocampa minuta*, *Hoplocampa testudinea*, *Iridomyrmex humilis*, *Iridomyrmex purpureus*, *Monomorium pharaonis*, *Solenopsis geminata*, *Solenopsis invicta*, *Solenopsis richteri*, *Technomyrmex albipes*;
- 30 (f) del orden de las termitas (Isoptera), por ejemplo, *Calotermes flavicollis*, *Coptotermes* spp, *Leucotermes flavipes*, *Macrotermes subhyalinus*, *Nasutitermes* spp, tal como *Nasutitermes walkeri*, *Odontotermes formosanus*, *Reticulitermes lucifugus*, *Termes natalensis*;
- 35 (g) del orden de los escarabajos (Coleoptera), por ejemplo, *Anthonomus grandis*, *Anthonomus pomorum*, *Apion vorax*, *Atomaria linearis*, *Blastophagus piniperda*, *Cassida nebulosa*, *Ceratomyza trifurcata*, *Ceuthorrhynchus assimilis*, *Ceuthorrhynchus napi*, *Chaetocnema tibialis*, *Conoderus vespertinus*, *Crioceris asparagi*, *Dendroctonus refipennis*, *Diabrotica longicornis*, *Diabrotica 12-punctata*, *Diabrotica virgifera*, *Epilachna varivestis*, *Epitrix hirtipennis*, *Eutinobothrus brasiliensis*, *Hyllobius abietis*, *Hypera brunneipennis*, *Hypera postica*, *Ips typographus*, *Lema bilineata*, *Lema melanopus*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Limonius californicus*, *Lissorhoptrus oryzophilus*, *Melanotus communis*, *Meligethes aeneus*, *Melolontha hippocastani*, *Melolontha melolontha*, *Oulema oryzae*, *Ortiorrhynchus sulcatus*, *Otiorrhynchus ovatus*, *Phaedon cochleariae*, *Phyllopertha horricola*, *Phyllophaga* sp., *Phyllotreta chrysocephala*, *Phyllotreta nemorum*, *Phyllotreta striolata*, *Popillia japonica*, *Psylliodes napi*, *Scolytus intricatus*, *Sitona lineatus*;
- 40 (h) del orden Dictyoptera, por ejemplo, de las familias *Polyphagidae*, *Bladberidae*, *Blattidae*, *Epilampridae*, *Chaetecsididae*, *Metallycidae*, *Mantoididae*, *Amorphoscelidae*, *Eremiaphilidae*, *Hymenopodidae*, *Mantidae* y *Empusidae*;
- 45 (i) del orden de los trips (Thysanoptera), por ejemplo, *Frankliniella fusca*, *Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella tritici*, *Haplothrips tritici*, *Heliothrips haemorrhoidalis*, *Scirtothrips citri*, *Thrips oryzae*, *Thrips palmi*, *Thrips tabaci*;
- 50 (j) del orden de los homópteros (Homoptera), por ejemplo, *Acyrtosiphon onobrychis*, *Acyrtosiphon pisum*, *Adelges laricis*, *Aonidiella aurantii*, *Aphidula nasturtii*, *Aphis fabae*, *Aphis gossypii*, *Aphis pomi*, *Aulacorthum solani*, *Bemisia tabaci*, *Brachycaudus cardui*, *Brevicoryne brassicae*, *Dalbulus maidis*, *Dreyfusia nordmanniana*, *Dreyfusia piceae*, *Dysaphis radicola*, *Empoasca fabae*, *Eriosoma lanigerum*, *Laodelphax striatella*, *Macrosiphum avenae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Macrosiphum rosae*, *Megoura viciae*, *Metopolophium dirhodum*, *Myzus persicae*, *Myzus cerasi*, *Nephotettix cincticeps*, *Nilaparvata lugens*, *Perkinsiella saccharicida*, *Phorodon humuli*, *Psylla mali*, *Psylla piri*, *Psylla pyricola*, *Rhopalosiphum maidis*, *Schizaphis graminum*, *Sitobion avenae*, *Sogatella furcifera*, *Toxoptera citricida*, *Trialeurodes abutilonea*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Viteus vitifolii*;
- 55 (k) del orden de los dípteros (Diptera), por ejemplo, *Anastrepha ludens*, *Ceratitis capitata*, *Contarinia sorghicola*, *Dacus cucurbitae*, *Dacus oleae*, *Dasineura brassicae*, *Delia coarctata*, *Delia radicum*, *Hydrellia griseola*, *Hylemyia platura*, *Liriomyza sativae*, *Liriomyza trifolii*, *Lucilia* Sp., *Mayetiola destructor*, *Musca* sp., *Orseolia oryzae*, *Oscinella frit*, *Pegomya hyoscyami*, *Phobia antiqua*, *Phorbia brassicae*, *Phorbia coarctata*, *Rhagoletis cerasi*, *Rhagoletis pomonella*;
- 60 (l) del orden Anaplura, por ejemplo, *Pthirus pubis*, *Pediculus humanus capitis*, *Pediculus humanus humanus*;
- (m) del orden Mallophaga, por ejemplo, de los géneros *Bovicola*, *Damalania*, *Trichodectus* y *Menopon*;
- 65 (n) del orden de los sifonápteros (Siphonaptera), por ejemplo, *Ctenocephalides* o *Pulex* spp.

(o) del orden Arachnida, por ejemplo, *Ixodes holocyclus*, *Boophilus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Sarcoptes scabiei* y *Dermatophagoides spp.*

Se prefiere seleccionar el huevo de ectoparásito cuya eclosión se previene mediante la presente invención entre el grupo consistente en piojo, pulga, garrapata, mosca y otros huevos de ectoparásitos picadores o chupadores de sangre. En una realización preferida, el huevo de ectoparásito es un huevo de piojo, más preferiblemente un huevo de piojo de la cabeza. Los piojos son parásitos que se alimentan de la piel y la sangre de los animales y depositan sus jugos digestivos y su materia fecal en la piel. Estos materiales, así como la propia herida por punción, causan irritación y lesiones cutáneas por la acción de rascarse como resultado de ello y pueden causar una infección seria con inflamación ganglionar. Los piojos son también vectores de ciertas enfermedades, tales como el tifus exantemático o epidémico y la fiebre recurrente. La hembra adulta del piojo tiene una vida de aproximadamente un mes y puede depositar hasta diez huevos al día. Los piojos que infectan a humanos pueden incluir la especie de la ladilla (*Pthirus pubis*) y la especie independiente *Pediculus humanus*, que está compuesta por dos subespecies, *Pediculus humanus capitis* o piojos de la cabeza y *Pediculus humanus humanus* o piojos de la ropa (Busvine, Antenna, 1993, 17: 196-201). Las subespecies de piojos anteriores están estrechamente relacionadas y se sabe que se cruzan con éxito entre sí (Busvine, Cutaneous Infestations and Insect Bites, 1985, 163-174).

El piojo de la cabeza, *Pediculus humanus var. capitis*, es un ectoparásito con especificidad de huésped que vive exclusivamente sobre las cabezas humanas y se alimenta succionando sangre del cuero cabelludo. Después de una ingesta de sangre, las hembras adultas maduras de los piojos depositarán hasta 10 huevos cerca del cuero cabelludo a lo largo de un período de 24 h. Los huevos se adhieren firmemente al tallo del pelo mediante un pegamento. De siete a diez días después de su deposición, dependiendo de la temperatura y de la humedad, los huevos eclosionarán y las ninfas recién emergidas comenzarán a alimentarse. Las ninfas progresan a través de tres mudas (1^o instar, 2^o instar, 3^o instar), tardando cada muda entre 3 y 5 días en completarse. Después de la muda final, emerge el macho o la hembra adulta, teniendo lugar el apareamiento tan sólo dos días más tarde. Tras alimentarse durante unas horas, se producirán huevos y el ciclo continúa. La totalidad del ciclo vital de huevo a huevo tarda aproximadamente 20-30 días en completarse, dependiendo de las condiciones de calor y humedad. Tras la eclosión del huevo, la corteza del huevo permanece adherida al tallo capilar y se separará gradualmente del cuero cabelludo a medida que el pelo se alarga. Los huevos eclosionados (liendres) son detectados con relativa facilidad debido a su naturaleza refractaria, que aparece blanca bajo luz artificial; por el contrario, los huevos no eclosionados tienen un color marrón claro tenue que los permite mezclarse con la mayoría de los colores capilares y, por lo tanto, los hace más difíciles de detectar.

En una realización de la presente invención, los métodos y composiciones utilizados en la invención están destinados a curar a un sujeto de los piojos inhibiendo la eclosión de los huevos de los piojos. Los presentes solicitantes han identificado agentes quelantes de metales e inhibidores de metaloproteasas como agentes efectivos para inhibir la eclosión de los huevos de piojos ectoparásitos. El uso de agentes quelantes de metales o inhibidores de metaloproteasas para inhibir la eclosión de los huevos de piojos ectoparásitos tiene la ventaja de prevenir los ciclos reproductivos de los ectoparásitos, controlando así la infestación por ectoparásitos.

Se entiende que el término "metaloproteasa", tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a una proteasa implicada en la eclosión de los huevos de ectoparásitos, donde la proteasa tiene un ion metálico activo que actúa como catalizador. Preferiblemente, la metaloproteasa contiene un ion zinc que participa en la catálisis polarizando una molécula de agua para atacar a un enlace sustrato-péptido. Más preferiblemente, la metaloproteasa es sensible a agentes quelantes de metales que son capaces de bloquear su actividad. La metaloproteasa preferiblemente está implicada en la inducción de la eclosión de los huevos actuando sobre el opérculo de un huevo para facilitar la eclosión del huevo. Como metaloproteasas adecuadas implicadas en la eclosión de los huevos de ectoparásitos, se pueden incluir endoproteasas (enzimas que provocan escisión dentro de la cadena peptídica) y exoproteasas (enzimas que escinden aminoácido(s) de los extremos de los péptidos). Las exoproteasas pueden además ser clasificadas como carboxiproteasas (que escinden aminoácido(s) del extremo C) o aminopeptidasas (que escinden aminoácidos del extremo N). Las metalocarboxiproteasas requieren un catión bivalente (normalmente Zn^{2+}) para su actividad, mientras que las aminopeptidasas son generalmente clasificadas según su dependencia de iones metálicos (Zn^{2+} o Mg^{2+}). Existen tanto en forma libre como unidas a membranas y favorecen la actividad a pH elevado (8-10). Un método de detección de metaloproteasas asociadas a la eclosión de los huevos puede conllevar la recogida del fluido que rodea al embrión en desarrollo en el momento de la eclosión del huevo o el lavado de las cortezas de los huevos vacíos poco después de la eclosión de los huevos y el análisis de la muestra en cuanto a la presencia de proteasas usando análisis de SDS-PAGE en sustrato de gelatina. Una vez mostrada la presencia de actividad proteolítica en la muestra, es entonces posible incubar la muestra en presencia de un inhibidor de metaloproteasas, por ejemplo 1,10-fenantrolina, y volver a analizar luego la muestra tratada para determinar si se ha inhibido la actividad de las proteasas extraídas del huevo. Una vez mostrada la inhibición de la actividad de la(s) metaloproteasa(s) obtenida(s) del huevo eclosionado, es entonces posible exponer los huevos no eclosionados al mismo inhibidor y valorar si se produce inhibición de la eclosión de los huevos. Las metaloproteasas implicadas en la eclosión de los huevos pueden ser también identificadas por identificación de un gen codificante de una metaloproteasa, silenciamiento de ese gen y demostración de que el huevo es incapaz de eclosionar por métodos conocidos para los expertos en la técnica.

Se entiende que la expresión "inhibición de la eclosión de un huevo de ectoparásito" tal como se usa en el presente documento, significa que se previene la eclosión de un huevo de ectoparásito. En la presente invención, se expone un huevo de ectoparásito a un agente quelante de metales o un inhibidor de metaloproteasas que es capaz de prevenir la eclosión del huevo en comparación con un huevo de ectoparásito no tratado. La eclosión del huevo se caracteriza por la apertura de la tapa de eclosión u opérculo de un huevo y poco después la emergencia de una ninfa. En el caso de los piojos, aparece primero la cabeza, seguida del tórax, al que están unidas las extremidades. Finalmente, emerge el abdomen y la ninfa sale libremente del huevo. Se entiende que la eclosión del huevo excluye el daño o la ruptura accidental de la corteza de un huevo.

Preferiblemente, el agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas es un compuesto capaz de inhibir la eclosión del huevo cuando se aplica al huevo en cualquier momento entre la deposición y la eclosión.

El huevo de ectoparásito está preferiblemente presente, aunque sin limitación, sobre un organismo hospedador, tal como sobre la piel, el pelo, el pelaje o la lana de un animal o el cabello de un humano. En realizaciones alternativas de la invención, el huevo de ectoparásito puede estar presente sobre animales hospedadores, incluidos los humanos, plantas hospedadoras, incluyendo cultivos de cereales, árboles frutales, algodón, cultivos de semillas oleaginosas, plantas ornamentales, flores, cultivos de vid, cultivos de tubérculos, plantas de pasto y hortalizas, u otros sitios de cría, tales como, aunque sin limitación, casas y edificios, recintos para animales domésticos y de granja, alfombras, mantas, cortinas y mobiliario.

Según la presente invención, el huevo de ectoparásito puede ser expuesto a un agente quelante de metales o un inhibidor de metaloproteasas por cualquier medio adecuado. Un experto en la técnica apreciará que estos medios pueden variar ampliamente, dependiendo de si se ha de aplicar el inhibidor a un hospedador, tal como una planta o un animal, o a diversos otros sitios de cría, y dependiendo de la naturaleza y del tipo del ectoparásito al que va dirigido. Como medios adecuados para exponer los huevos de ectoparásitos presentes sobre animales a agentes quelantes de metales o inhibidores de metaloproteasas, se incluyen, aunque sin limitación, la aplicación tópica directa, tal como mediante baño o pulverización, los implantes y las formulaciones o los dispositivos de liberación retardada. Cuando se aplica la invención a humanos, como formulaciones adecuadas para aplicación tópica, se incluyen, aunque sin limitación, sprays, aerosoles, champús, espumas, cremas y lociones, y, como formulaciones adecuadas para aplicación interna, se incluyen, aunque sin limitación, tabletas, cápsulas o formulaciones líquidas. En algunas situaciones, la administración parenteral por inyección puede ser el medio más adecuado de tratamiento para humanos o animales. Cuando se ha de aplicar el agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas a plantas, como medios adecuados se incluyen, aunque sin limitación, sprays, polvos, pellas o aerosoles. El método de la invención también incluye el uso concurrente o sucesivo de dos o más agentes quelantes de metales o inhibidores de metaloproteasas o el uso de uno o más agentes quelantes de metales y/o metaloproteasas conjuntamente, simultánea o sucesivamente, con otros agentes conocidos que controlan a los ectoparásitos.

En aún otro aspecto de la invención, los métodos y composiciones pueden incluir otros ectoparasiticidas que controlen la eclosión, a las ninfas o a los ectoparásitos adultos. Por ejemplo, como ectoparasiticidas adecuados que pueden ser usados conjuntamente, ya sea simultáneamente o por separado, con los agentes quelantes de metales o inhibidores de metaloproteasas de la presente invención, se incluyen organofosfatos, tales como malatión, piretroides sintéticos (cipermetrina, deltametrina), reguladores del crecimiento de los insectos, incluyendo análogos de la hormona juvenil, inhibidores de la síntesis de quitina y derivados de triazina, toxinas bacterianas insecticidas, hidrocarburos clorados (DDT, endosulfán) o agentes insecticidas descritos en EP 0.191.236, EE.UU. 5.288.483 y EE.UU. 6.727.228. Otros insecticidas útiles incluyen dimeticona copolíoles, tales como los descritos en EE.UU. 6.663.876 y EE.UU. 6.607.716, que tienen poca toxicidad. La ventaja de dicha combinación es que puede ser necesaria sólo una aplicación para controlar al ectoparásito a lo largo de todo su ciclo vital.

El agente quelante de metales o el inhibidor de metaloproteasas puede ser aplicado al pelo o a la piel de un hospedador, preferiblemente en una región que está infestada con un ectoparásito. La infestación por ectoparásitos puede ser preferiblemente debida a ectoparásitos seleccionados entre el grupo consistente en piojos, pulgas, garrapatas, moscas y otros ectoparásitos picadores o chupadores de sangre y sus combinaciones. Más preferiblemente, la infestación por ectoparásitos se debe a piojos. Se puede aplicar el agente quelante de metales o el inhibidor de metaloproteasas tópicamente en forma de ungüentos, composiciones acuosas, incluyendo soluciones y suspensiones, cremas, lociones, sprays aerosol o polvos para uso externo.

El término "cantidad efectiva" significa una concentración de al menos un agente quelante de metales o al menos un inhibidor de metaloproteasas suficiente para proporcionar el tratamiento o la prevención de la infestación por ectoparásitos en un hospedador. La cantidad efectiva de un agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas usado en los métodos de la presente invención puede variar dependiendo del hospedador y del tipo y nivel de infestación por ectoparásitos. El agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas es preferiblemente aplicado al cuero cabelludo de una persona que sufre de infestación por piojos de la cabeza y se deja sobre la persona tratada durante un período de tiempo suficiente para prevenir la eclosión de los huevos de los piojos. Preferiblemente, el período de tiempo es de entre 5 y 15 minutos. El agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas es preferiblemente utilizado a una concentración de entre aproximadamente 0,0001 mM y 1 M, preferiblemente de entre 0,01 mM y 100 mM, más preferiblemente en el rango de 0,1 mM a 30 mM. La cantidad

efectiva depende del agente quelante de metales o metaloproteasa utilizados. Sin embargo, algunos compuestos dipiridilo pueden ser adecuadamente aplicados en el rango de 5 mM a 15 mM, especialmente a un nivel de aproximadamente 10 mM. Dado que un número significativo de proteasas de mamíferos requieren zinc para su actividad y pueden resultar afectadas por agentes quelantes de metales y/o inhibidores de metaloproteasas, sería necesario asegurarse de que el agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas sea utilizado en una cantidad segura y efectiva y se dirija preferiblemente de un modo específico a huevos de ectoparásitos.

El hospedador tratado mediante los métodos de la invención puede ser seleccionado, aunque sin limitación, entre el grupo consistente en humanos, ovejas, vacas, caballos, cerdos, aves de corral, perros y gatos. Los métodos de tratamiento o prevención de la presente invención pueden ser aplicables a plantas y/o a otros sitios de cría de ectoparásitos. Las plantas tratadas mediante los métodos de la invención son preferiblemente seleccionadas entre el grupo consistente en algodón, cultivos de semillas oleaginosas, plantas ornamentales, flores, árboles frutales, cultivos de cereales, cultivos de vid, cultivos de tubérculos, plantas de pasto y hortalizas.

Las composiciones usadas en la presente invención pueden ser formuladas como soluciones y emulsiones. También pueden estar presentes en las composiciones excipientes adecuados, tales como emulsores, surfactantes, estabilizadores, tintes, potenciadores de la penetración y antioxidantes. Como soportes adecuados que pueden ser añadidos a las composiciones, se pueden incluir agua, soluciones de sales, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, estearato de magnesio y ácido silícico. Las composiciones pueden incluir soluciones acuosas estériles y no estériles. Las composiciones están preferiblemente en una forma soluble y el agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas está preferiblemente diluido en una solución salina o acuosa tamponada estéril soluble. Las composiciones pueden ser también formuladas como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden además contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, y pueden también contener estabilizadores. Las soluciones pueden contener también tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Las composiciones pueden incluir otros componentes auxiliares que sean compatibles con la actividad del agente quelante de metales o inhibidor de metaloproteasas. Las composiciones de la presente invención pueden ser formuladas y utilizadas como espumas, emulsiones, microemulsiones, champús, espumas, cremas y jaleas. Las formulaciones de las composiciones anteriormente descritas serían conocidas para los expertos en el campo de los ectoparasitocidas.

En una realización preferida, la composición incluye un agente quelante de metales a una concentración de aproximadamente 0,0001 mM a 1 M, preferiblemente de entre 0,1 mM y 100 mM, más preferiblemente en el rango de 0,1 mM a 30 mM. Las composiciones que contienen algunos agentes quelantes de metales o inhibidores de metaloproteasas, por ejemplo, los compuestos dipiridilo, pueden contener preferiblemente entre 5 y 15 mM de compuesto, especialmente a un nivel de aproximadamente 10 mM.

La invención también proporciona un método de identificación de un compuesto que inhibe la eclosión de un huevo de ectoparásito, cuyo método comprende la valoración de la capacidad del compuesto para inhibir una metaloproteasa presente en el huevo de ectoparásito.

Se puede valorar el efecto del compuesto sobre la actividad de la metaloproteasa de una serie de formas; sin embargo, en general, la valoración preferiblemente conlleva la comparación de la actividad de las enzimas metaloproteasas en presencia y en ausencia del compuesto de ensayo. Un método de detección de metaloproteasas asociadas a la eclosión de los huevos puede conllevar la recogida del fluido que rodea al embrión en desarrollo en el momento de la eclosión del huevo o el lavado de las cortezas de los huevos vacíos poco después de la eclosión de los huevos y el análisis de la muestra en cuanto a la presencia de proteasas usando análisis de SDS-PAGE en substrato de gelatina. Tras haber mostrado la presencia de actividad proteolítica en la muestra, es entonces posible incubar la muestra en presencia de un inhibidor de metaloproteasas, por ejemplo, 1,10-fenantrolina, y volver a analizar después la muestra tratada para determinar si se ha inhibido la actividad de las proteasas extraídas del huevo. Tras haber mostrado inhibición de la actividad de la metaloproteasa obtenida del huevo eclosionado, es entonces posible exponer los huevos no eclosionados al mismo inhibidor y valorar si se produce inhibición de la eclosión de los huevos. Las metaloproteasas implicadas en la eclosión del huevo pueden ser también identificadas por identificación de un gen codificante de una metaloproteasa, silenciación de ese gen y demostración de que el huevo es incapaz de eclosionar por métodos conocidos para los expertos en la técnica.

En una realización preferida, el método incluye además el estudio del compuesto en un ensayo biológico de eclosión de huevos de ectoparásitos.

Un ensayo biológico de eclosión de huevos de ectoparásitos adecuado preferiblemente comprende la exposición de una muestra control de huevos de ectoparásitos a una solución tampón control exponiendo al mismo tiempo una muestra de ensayo de huevos de ectoparásitos a una solución que contiene un compuesto de ensayo.

Se identifica un compuesto que es efectivo en la inhibición de la eclosión de huevos de ectoparásitos cuando se observa eclosión de los huevos en la muestra control y se observa un menor nivel de eclosión en la muestra de ensayo. En el ensayo biológico preferido de eclosión de huevos de la presente invención, los huevos de ectoparásitos son seleccionados entre el grupo consistente en huevos de piojo, pulga, garrapata, mosca y otros

ectoparásitos picadores o chupadores de sangre. En una realización preferida, la muestra de huevos de ectoparásitos son huevos de piojos. Preferiblemente, las muestras de huevos (muestras control y de ensayo) utilizadas no tienen más de 6-7 días desde su deposición. Más preferiblemente, las muestras de huevos utilizadas han sido depositadas no más de 1 día antes.

La solución tampón control puede incluir, aunque sin limitación, solución salina tamponada con fosfatos o agua estéril. El compuesto estudiado es preferiblemente un agente quelante de metales y/o un inhibidor de metaloproteasas. En el ensayo biológico de eclosión de huevos, se observa la eclosión cuando se abre la tapa de eclosión u opérculo del huevo y poco después comienza a emerger la ninfa. En el caso de los piojos, aparece primeramente la cabeza, seguida del tórax, al que se unen las extremidades. Finalmente, sale el abdomen y la ninfa se separa libremente del huevo. En el caso de los piojos de la cabeza, la corteza del huevo permanece luego cementada en el tallo capilar.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un uso de al menos un agente quelante de metales según la fórmula (Ia) en la fabricación de una composición para inhibir la eclosión de un huevo de ectoparásito o para tratar o prevenir la infestación por ectoparásitos.

En aún otro aspecto de la invención, se proporciona un uso de al menos un inhibidor de metaloproteasas según la fórmula (Ia) en la fabricación de una composición para inhibir la eclosión de un huevo de ectoparásito o para tratar o prevenir la infestación por ectoparásitos.

La presente invención también ampara agentes que comprenden al menos un agente quelante de metales y/o al menos un inhibidor de metaloproteasas según la fórmula (Ia) para inhibir la eclosión de un huevo de ectoparásito o para tratar o prevenir la infestación por ectoparásitos.

En toda esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende(n)", implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, establecidos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Se describirá a continuación la invención mediante las siguientes Figuras y Ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1 - valoración del mecanismo de eclosión de los huevos de piojos

Se valoró el mecanismo de eclosión de los huevos de piojos bajo un microscopio de disección. Se alimentó a hembras de piojos de la ropa durante media hora sobre un conejo antes de transferirlas a una placa de Petri que contenía cabello humano. Se puso entonces la placa de Petri en una incubadora a 32 °C, humedad relativa del 42%. En las 5 horas durante las cuales se alimentaron, los piojos hembra comenzaron a depositar sus huevos. Cada hembra deposita hasta 10 huevos en una sesión. Los huevos se desarrollan a lo largo de los siguientes 7-9 días. En las últimas 12 h antes de la eclosión, se observaron los siguientes cambios. Los ojos del embrión en desarrollo podían ser claramente detectados en el interior del huevo, estando orientado el embrión en desarrollo de forma que tiene su cabeza adyacente a la tapa de eclosión u opérculo. Se puede observar al embrión moviéndose dentro del huevo. La eclosión tiene lugar cuando se abre el opérculo y poco después el embrión comienza a emerger. En primer lugar, aparece la cabeza, seguida del tórax, al que se unen las extremidades. Finalmente, sale el abdomen y la ninfa se separa del huevo, que permanece cementado en el pelo. No hay estructuras obvias asociadas a la cabeza de la ninfa recién emergida visibles bajo microscopía óptica que faciliten la eclosión (es decir, no hay presencia de ningún diente en el huevo). Esta observación sugiere que, aunque el movimiento físico de la ninfa dentro del huevo probablemente contribuye a la eclosión del huevo, otros sucesos bioquímicos específicos están implicados.

Ejemplo 2 - detección de la actividad proteasa en extractos de huevos de piojos

Dentro de las 12 horas posteriores a la eclosión, se retiraron del pelo 50 huevos de piojos del cuerpo (*Pediculus humanus humanus*) y se pusieron en un tubo eppendorf de 1 ml. Se añadieron 20 µl de agua destilada a los huevos no eclosionados y se incubó la preparación durante 30 minutos a 32 °C. Se recuperaron los 20 µl y se guardaron a -70 °C. También se recogieron un número de otras muestras como se ha descrito. También se recogieron muestras de pelo de las que se habían retirado huevos de piojos no eclosionados y se incubaron como se ha descrito anteriormente. Además, se recogieron una muestra de huevos no eclosionados y una muestra de pelo de la que se habían retirado huevos de piojos 7 días después de la deposición (en las 24 h posteriores a la eclosión de los huevos). Se lavaron ambas muestras en 10 ml de una solución al 1% de hipoclorito de sodio durante 1 minuto, seguido de 5 lavados de 1 minuto en 25 ml de agua destilada para eliminar el hipoclorito. Se incubaron entonces estas muestras en 20 µl de agua destilada como se ha descrito anteriormente. Además, se pretrató un grupo de 25 huevos de piojos que se encontraban dentro de las 24 horas de la eclosión con hipoclorito de sodio al 1%, se lavaron como se ha descrito anteriormente y se dejó que eclosionaran. En 1-2 horas después de la eclosión, se

incubaron las cortezas de los huevos vacíos en 20 μ l de agua destilada como se ha descrito anteriormente, se recogieron los lavados de las cortezas de los huevos eclosionados y se guardaron a -70 °C. Se liofilizaron luego durante la noche todas las muestras de extractos. Se resuspendieron después las muestras liofilizadas en 15 μ l de tampón de muestras SDS no reductor, se centrifugaron a 10.000 g durante 2 minutos y se cargó la totalidad de los 5 15 μ l en geles de SDS-PAGE con substrato de gelatina al 10%. Se trabajaron los geles a 4 °C durante 10 minutos a 10 mA, seguido de otros 25 minutos a 15 mA por gel. Se incubaron entonces durante 2 x 20 minutos en una solución de Tritón-X 100 al 2,5%, seguido de una incubación de tres horas en Tris/HCl 0,1 M que contenía CaCl₂ 1 mM, pH 8,0. Se detectó la actividad como áreas claras en el gel, que son el resultado de la actividad proteasa que degrada la gelatina en el gel.

Los resultados de estos estudios indicaban que había presencia de actividad proteolítica en una serie de preparaciones diferentes analizadas usando SDS-PAGE con substrato. Se detectó actividad proteasa en los lavados obtenidos de los huevos de piojos no eclosionados en las 12 horas siguientes a la eclosión (Figura 1, calle 1). Esta actividad se encontraba en la región de mayor peso molecular del gel. Cuando se analizaron muestras de pelo de las que se habían retirado huevos de piojos en SDS-PAGE con substrato de gelatina, se detectó una cantidad significativa de actividad proteasa (Figura 1, calle 2). La explicación más probable para esta actividad era que era de origen materno, producida en el momento de la deposición. El tratamiento de muestras de pelo con hipoclorito de sodio eliminó por completo las proteasas contaminantes (Figura 1, calle 3). Además, el tratamiento de los huevos no eclosionados era también capaz de eliminar esta actividad proteasa (Figura 1, calle 4). Se decidió, por lo tanto, tratar todos los huevos antes de la eclosión con hipoclorito de Na al 1% como se ha descrito antes para eliminar estas proteasas maternas. El análisis de cortezas de huevos recién eclosionados (Lavados de Cortezas de Huevos) indicaba la presencia de dos especies de alto peso molecular (Figura 1, calle 5). Obsérvese que sólo se usaron 25 25 huevos de piojos en esta recogida, lo que posiblemente contribuye al menor nivel de actividad proteasa. Estos resultados demuestran la presencia de actividad proteasa directamente asociada a los huevos de piojos recién eclosionados.

Para concluir, el proceso de eclosión en piojos fue estudiado por microscopía óptica. La eclosión de los huevos parece estar asociada a la actividad física de la ninfa en desarrollo dentro del huevo. Sin embargo, la falta de cualquier estructura especializada para perforar o aflojar la tapa de eclosión u opérculo indica que en el proceso de eclosión puede también estar implicado un componente bioquímico. Aunque se detectaron proteasas muy activas alrededor del momento de la eclosión de los huevos en los piojos, la fuente primaria de estas proteasas parece ser de origen materno. Se consiguió la eliminación de esta actividad antes de la eclosión de los huevos usando hipoclorito de sodio, progresando los piojos hacia una eclosión eficaz. El análisis posterior de LCH procedentes de piojos recién eclosionados indicaba la presencia de un número limitado de especies de proteasas, que fueron además investigadas como objetivos para inhibir la eclosión de los huevos en piojos.

Ejemplo 3: caracterización de proteasas en lavados de cortezas de huevos

Con objeto de evaluar el potencial de las proteasas de eclosión de los piojos en los lavados de cortezas de huevos como dianas para la inhibición de la eclosión de los huevos, era primeramente necesario caracterizar la naturaleza de las proteasas de eclosión. Se usaron inhibidores de las 4 clases principales de proteasas para clasificar las proteasas en los LCH.

Se cargaron geles de SDS-PAGE con substrato de gelatina al 10% con lavados de cortezas de huevos liofilizados de 100 huevos de piojos que habían sido resuspendidos en 50 μ l de tampón de muestras no reductor con muestras trabajadas a 10 μ l por calle. Se trabajaron los geles a 4 °C durante 10 minutos a 10 mA por gel, seguido de otros 25 minutos a 15 mA por gel. Se cortaron entonces los geles en tiras y se incubó cara tira durante 2 x 20 minutos en una solución de Tritón-X 100 al 2,5% que contenía un inhibidor específico. Los inhibidores usados eran el inhibidor de la serina proteasa PMSF (5 mM), el inhibidor de metaloproteasas 1,10-fenantrolina (10 mM), la proteasa aspártica pepstatina (5 μ M) y el inhibidor de cisteína E-64 (10 μ M). Se incubaron luego las tiras de gel en Tris/HCl 0,1 M que contenía CaCl₂ 1 mM, pH 8, que contenía los diferentes inhibidores de proteasas durante 3 h a 37 °C, antes de teñirlas en azul de Coomassie y destañadas como se ha descrito previamente. Contrariamente a la Figura 1, la calle 5 muestra una predominancia de actividad proteolítica a alrededor de 25-30 kDa (hágase referencia a los corchetes de la Figura 2). El posterior análisis de numerosas preparaciones de LCH indicaba que este triplete de actividad proteolítica a alrededor de 25-30 kDa era altamente reproducible.

Los resultados de los estudios de inhibidores indican una reducción significativa en la actividad proteasa después del tratamiento con 1,10-fenantrolina (región entre corchetes de la calle 2). No se observó ninguna reducción en la actividad proteasa de los LCH cuando se usó el inhibidor de la serina proteasa PMSF o el inhibidor de la cisteína proteasa E64. Además, el inhibidor aspártico pepstatina no mostró ninguna reducción en la actividad proteasa (datos no mostrados).

Ejemplo 4: desarrollo de un bioensayo *in vitro* para medir la eclosión de los huevos de piojos

Para evaluar los efectos potenciales de los inhibidores de proteasas sobre la eclosión de los huevos de piojos, era

necesario desarrollar un bioensayo fiable *in vitro*. Se alimentaron machos y hembras de piojos de la ropa sobre un conejo como se ha descrito previamente. Se transfirieron entonces los piojos adultos hembras y machos en una proporción de 3:1 a una placa de Petri limpia que contenía una tela de nilón de aproximadamente 3 x 3 cm² y se dejaron durante 12 h a 32 °C. Durante este período, las hembras de los piojos depositaron sus huevos y los adhirieron a la tela tejida. Se retiraron entonces todos los piojos y se permitió que los huevos se incubaran durante los 5 días siguientes. El día 6, se puso la tela que contenía los huevos durante 1 minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 1% y se lavó después extensamente. Los huevos progresaron entonces hasta sus estadios finales de desarrollo y eclosionaron. En los huevos control no tratados, se obtuvo un porcentaje medio fiable de eclosión de entre un 85-95 por ciento usando el ensayo de eclosión de huevos *in vitro*. Se vio posteriormente que, para el ensayo de eclosión de huevos, no era necesario pretratar los huevos de piojos con hipoclorito de sodio.

Ejemplo 5: identificación de compuestos que pueden inhibir la actividad de las proteasas de eclosión de los piojos

(a) Estudio de inhibidores de proteasas usando el bioensayo de eclosión de huevos de piojos

Después de haber refinado un bioensayo para medir la eclosión de los huevos en piojos, la siguiente fase de la investigación consistía en usar este bioensayo como medio de estudio de los efectos de diferentes inhibidores de proteasas sobre la eclosión de los huevos.

Se depositaron huevos de piojos sobre una tela como se ha descrito anteriormente. Cinco días después de la puesta, se retiró la tela que contenía los huevos de piojos y se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio al 1% antes de lavarla extensamente en agua destilada y secarla sobre papel de seda. Se contaron los huevos de piojos bajo un microscopio de disección y se cortó la tela en lotes de entre 10 y 30 huevos, usando 3-5 réplicas por tratamiento. Se sumergió entonces la tela que contenía los huevos de piojos en una solución de inhibidor de proteasa durante un período de entre 2 y 10 minutos, se puso sobre papel de seda durante 1 minuto para que se secase antes de transferirla a una placa de Petri limpia y se incubó hasta la eclosión. Se observaron los huevos a intervalos de tiempo regulares en cuanto a evidencia de eclosión de los huevos a lo largo de los 1-2 días siguientes, tiempo hacia el cual los huevos control habían eclosionado. Se prepararon soluciones de inhibidores de proteasas normalmente como soluciones stock y se añadieron recientes a la concentración apropiada. Específicamente, las soluciones stock fueron preparadas como sigue: 1,10-fenantrolina (200 mM en metanol) y bestatina (5 mg/ml en metanol). Además, se añadieron los niveles equivalentes del solvente a los huevos control que no contenían inhibidor para estudiar cualquier efecto del tampón solo. Se calculó el porcentaje de inhibición de la eclosión como el porcentaje de reducción en la eclosión de los huevos en comparación con el control no tratado. Se asignó al control no tratado un porcentaje de eclosión del 100%.

La adición de 1,10-fenantrolina, un agente quelante de metales y un inhibidor de metaloproteasas, inhibía significativamente la eclosión de los huevos en los piojos a 10 mM, mientras que a 1 mM el nivel de inhibición era de aproximadamente el 30% en comparación con el de los controles (hágase referencia a la Figura 3). La bestatina, un agente quelante de metales y un inhibidor de metaloproteasas, y más específicamente de la aminopeptidasa M y N, era también capaz de inhibir significativamente la eclosión de los huevos de los piojos a 5 mM (Figura 4).

Estos resultados aportan datos sobre el efecto de agentes quelantes de metales e inhibidores de metaloproteasas específicos sobre la eclosión de los huevos en piojos. Se vio, sin embargo, que, cuando se añadían 1,10-fenantrolina o bestatina dentro de las 24 horas de la eclosión, se observaba una inhibición variable de la eclosión de los huevos (datos no mostrados). Esta variabilidad en la inhibición de la eclosión podría ser debida a una serie de factores relacionados con el estadio de desarrollo específico del piojo. Además, estos estudios indicaban que es muy difícil predecir el momento exacto de la eclosión de los huevos y, por lo tanto, la elección de un solo punto temporal en el que tratar los huevos puede ser problemática al valorar los efectos de un inhibidor específico sobre la eclosión de los huevos. El sistema de ensayo *in vitro* fue, por lo tanto, modificado para tener en cuenta esta variabilidad en el desarrollo de los piojos.

(b) Experimento de curso temporal usando el ensayo de eclosión in vitro

Se realizaron una serie de experimentos de curso temporal como medio de valoración de los inhibidores de la eclosión de los huevos de los piojos. Se depositaron huevos sobre una tela como se ha descrito previamente y luego, a intervalos de 24 h, se añadió un inhibidor a un nuevo grupo de huevos hasta las 120 h posteriores a la puesta. Se incubaron entonces los huevos a 28 °C durante 8 días más para permitir la eclosión de los huevos. Este método de ensayo de inhibidores refleja más estrechamente la situación de campo, en la que los huevos de los piojos estarán en diversos estadios de desarrollo.

Los resultados de estos estudios son mostrados en la Tabla 1. Se demostró una inhibición significativa por la 1,10-fenantrolina a concentraciones variables en el curso de la eclosión de los piojos. También se observó un grado de dependencia de la concentración con los efectos inhibitorios de la 1,10-fenantrolina. Los resultados indican que los experimentos de curso temporal proporcionan un medio más fiable de valoración de los efectos de inhibidores específicos sobre la eclosión de los huevos de los piojos. La adición de bestatina dio como resultado una inhibición

significativa, pero sólo cuando se aplicaba aproximadamente 24 h antes de la eclosión de los huevos.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de la eclosión de los huevos después de un tratamiento con diferentes concentraciones de 1,10-fenantrolina y bestatina 5 mM a intervalos de 24 h después de la deposición de los huevos

Inhibidor	Tiempo después de la deposición de los huevos (h)					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
1,10-Fenantrolina 10 mM	100	100	100	100	100	100
1,10-Fenantrolina 5 mM	100	100	100	100	93	96
1,10-Fenantrolina 2,5 mM	100	100	85	85	89	60
Bestatina 5 mM	-	-	-	-	-	53

Los resultados de los estudios anteriores indican que las enzimas de eclosión de los piojos son proteasas de la clase metalo, según se juzga por la capacidad del agente quelante de metales e inhibidor de metaloproteasas 1,10-fenantrolina para inhibir su actividad. Además, este compuesto era capaz de inhibir significativamente la eclosión de los huevos en los piojos en todos los puntos temporales examinados con alguna evidencia de un efecto dependiente de la dosis, particularmente cuando los huevos fueron tratados con las concentraciones más bajas alrededor del tiempo de la eclosión. La 1,10-fenantrolina ejerce sus efectos a través de su capacidad para quelar iones metálicos, preferiblemente el zinc, e inhibir así las proteasas dependientes de zinc.

Los datos para la bestatina también indicaban que el compuesto podría inhibir parcialmente la eclosión de los huevos de los piojos al ser administrada a los huevos en el estadio de desarrollo tardío. La bestatina es un compuesto cíclico que comprende un anillo de arilo sustituido con un sustituyente que contiene una amina, un grupo hidroxilo, una amida y un grupo ácido carboxílico. La bestatina es un antibiótico de origen microbiano, que se utiliza para tratar diversas formas de cáncer, incluyendo la leucemia no linfocítica y también diferentes formas de tumores sólidos, incluyendo tumores de pulmón, estómago, vejiga, cabeza, cuello y esófago, donde se usa bajo la denominación de ubenimex. Se puede administrar con baja toxicidad a células cultivadas, animales intactos y humanos. Aunque la bestatina es normalmente usada como un inhibidor de proteasas purificadas a concentraciones micromolares (10 μ M y 130 μ M), los datos obtenidos hasta ahora muestran que es efectiva a 5 mM. Este resultado puede ser debido a una serie de factores, incluyendo la capacidad de la bestatina para penetrar en el huevo y su especificidad para las proteasas de eclosión de los piojos.

Ejemplo 6: cribado de inhibidores de proteasas para inhibir la eclosión de los huevos de los piojos

Se depositaron huevos de piojos sobre una tela como se ha descrito en el Ejemplo 4. Se organizaron una serie de experimentos de curso temporal como se describe en el Ejemplo 5 (parte (b)). Se estudió un número considerable de inhibidores de proteasas/quelantes de metales comerciales en el ensayo de eclosión de piojos para determinar el efecto de los inhibidores de proteasas individuales sobre la eclosión de los huevos de los piojos (Tabla 2). Se calculó el porcentaje de inhibición de la eclosión como el porcentaje de reducción en la eclosión de los huevos en comparación con el control no tratado. Se asignó al control no tratado un porcentaje de eclosión del 100%.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de la eclosión de los huevos de los piojos después de un tratamiento con diversos inhibidores de proteasas. El porcentaje de inhibición se refiere a la máxima eclosión de huevos obtenida a lo largo del curso temporal del experimento

Número	Inhibidor	% Inhibición*
1	1,10-Fenantrolina (10 mM)	100
2	2,2-Dipiridilo (10 mM)	100
3	6,6'-Dimetil-2,2'-dipiridilo (10 mM)	100
4	5,5'-Dimetil-2,2'-dipiridilo (10 mM)	100
5	Captopril (23 mM)	27
6	D-L-Tiorofán (1 mg/ml)	20

(continuación)

Número	Inhibidor	% Inhibición*
7	Fosforamidón (5 mM)	41
8	Actinonina (5 mM)	0
9	Bestatina (5 mM)	58
10	Nitrobestatina (1 mg/ml)	0
11	Amastatina (5 mM)	26
12	Leuhistina (5 mM)	0
13	Ebelactona (1, 2 y 5 mM)	0
14	L-Leucintiol (5 mM)	0
15	Fumagilina (5 mM)	0
16	Inhibidor de carboxipeptidasa (5 mM)	26
17	N-CBZ-PRO-LEU-GLY Hidroximato (10 mM)	0
18	Tetraciclina (5 mg/ml)	89
19	Doxiciclina (5 mg/ml)	69
20	Minociclina (5 mg/ml)	55
21	GM 1489	0
22	GM6001	0
23	Inhibidor IV	0
24	Diclorhidrato de clorhexidina	0

*Se ha calculado el porcentaje de inhibición de la eclosión de los huevos de los diferentes inhibidores de proteasas en relación a los controles apropiados y representa la máxima inhibición de la eclosión de los huevos observada.

Una serie de inhibidores de proteasas mostraron inhibir marcadamente la eclosión de los huevos de los piojos. Los inhibidores más efectivos estudiados incluían agentes quelantes de metales e inhibidores de metaloproteasas tales como 1,10-fenantrolina, 2,2-dipiridilo, 6,6'-dimetil-2,2'-dipiridilo y 5,5'-dimetil-2,2'-dipiridilo (100% de inhibición a 10 mM cada uno). La bestatina, un inhibidor de metaloproteasas, era también capaz de inhibir significativamente la eclosión de los huevos (58% a 5 mM).

Como inhibidores de metaloproteasas de la matriz (MMP) naturales y agentes quelantes de metales que son compuestos tetracíclicos en los que un anillo es un anillo de arilo y donde la estructura tetracíclica esta substituida con un número de grupos hidroxilo, grupos carbonilo, una amina y una amida, se incluían: Tetraciclina (89% de inhibición a 5 mg/ml), Doxiciclina (65% de inhibición a 5 mg/ml) y Minociclina (55% a 5 mg/ml). Estos quelantes de metales mostraban actividad inhibitoria hacia la eclosión de los huevos; sin embargo, los resultados para estos compuestos eran más variables en magnitud y parecían ser dependientes del tiempo. La utilidad global de los inhibidores hidroxamato puede ser limitante debido al deseo de reducir el uso de antibióticos en el medio ambiente general. Estos resultados indican que los inhibidores MMP pueden también ejercer un efecto inhibitorio sobre la eclosión de los huevos de piojos. Otros inhibidores de proteasas que fueron estudiados incluían EDTA a 100 mM, EGTA a 10 mM y trietanolamina al 5%. Los resultados indicaban que estos inhibidores no parecían tener un efecto sobre la eclosión de los huevos a las concentraciones usadas (resultaos no mostrados).

Ejemplo 7: efecto del lavado de los huevos después del tratamiento con 1,10-fenantrolina

Se acometió un experimento para determinar si el lavado de los huevos afectaría a la actividad inhibitoria de la 1,10-fenantrolina (Tabla 3). Se organizó también un grupo control (metanol al 5%). Se calculó el porcentaje de inhibición de la eclosión como el porcentaje de reducción en la eclosión de los huevos en comparación con el control no tratado. Se asignó al control no tratado un porcentaje de eclosión del 100%. Los resultados de este experimento

indican que la 1,10-fenantrolina es aún altamente eficaz en la inhibición de la eclosión de los huevos de los piojos tras el lavado de los huevos en agua. En los huevos de estadios más tardíos que se están aproximando a la eclosión de los huevos (día 5), los efectos parecen reflejar una dependencia de la concentración similar a la observada cuando se usaron concentraciones más bajas del inhibidor. También se observó que una proporción de huevos tratados con 1,10-fenantrolina tenían embriones que parecían desarrollarse normalmente pero que aún así no consiguieron eclosionar.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de la eclosión de los huevos después de un tratamiento con 1,10-fenantrolina 10 mM a intervalos de 24 h después de la puesta de huevos en los piojos. Los huevos de los piojos fueron tratados con el inhibidor durante 10 minutos y se dejaron sin lavar o se trataron y se lavaron durante 1 minuto y luego se dejó que eclosionaran.

	<u>Tiempo después de la puesta (h)</u>				
	<u>24 h</u>	<u>48 h</u>	<u>72 h</u>	<u>96 h</u>	<u>120 h</u>
<u>Tratado/no lavado</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>
<u>Tratado/lavado</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>97</u>	<u>62</u>

Ejemplo 8: inhibición de la eclosión de huevos de piojos de la cabeza con 1,10-fenantrolina

Se realizaron pruebas para determinar si el agente quelante de metales e inhibidor de metaloproteasas 1,10-fenantrolina podía inhibir la eclosión de los huevos de los piojos de la cabeza (*Pediculus humanus capitis*) en lugar de los piojos del cuerpo. Se obtuvieron huevos de piojos de la cabeza poniendo grupos de 1-2 machos adultos y 6-8 hembras adultas de piojos de la cabeza en pocillos separados en una placa de Petri de 24 pocillos que contenía tela de algodón. Se transfirió la placa de Petri a una incubadora húmeda a 32 °C, 70% de HR, durante 12 horas para permitir que los piojos hembra depositaran sus huevos. A las 12 horas, se retiraron todos los piojos adultos de los pocillos de la placa de Petri y se realizaron una serie de experimentos de curso temporal. Se trató a un grupo de huevos (24 h de edad) durante 10 minutos con 200 µl de una solución 10 mM de 1,10-fenantrolina. También se incluyó un grupo control (es decir, sin tratamiento con inhibidor) de huevos. Se retiraron los huevos del inhibidor, se secaron sobre papel de seda, se pusieron a 32 °C, 70% de HR, y se dejó que eclosionaran. Se trató a un segundo grupo de huevos (48 h de edad) como se ha descrito previamente y también se dejó que eclosionaran. Se repitió este procedimiento a intervalos de 24 h sobre huevos de piojos de la cabeza hasta las 120 h posteriores a la puesta. Este método de ensayo de inhibidores refleja más estrechamente la situación de campo, en la que los huevos de los piojos estarán en diversos estadios de desarrollo sobre la cabeza, y permite observar los efectos inhibitorios sobre estos diferentes estadios del parásito.

Los resultados de los estudios anteriores indican que la 1,10-fenantrolina puede inhibir significativamente la eclosión de los huevos en los piojos de la cabeza (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de la eclosión de los huevos después de un tratamiento con 1,10-fenantrolina 10 mM a intervalos de 24 h después de la puesta de huevos en los piojos en relación al control.

	<u>Días después de la puesta</u>				
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
<u>Tratado</u>	<u>100</u>	<u>87</u>	<u>88</u>	<u>100</u>	<u>100</u>

Estos resultados sugieren con fuerza que los piojos del cuerpo son un modelo efectivo para estudiar los efectos de los inhibidores de proteasas en la eclosión de los huevos de los piojos de la cabeza.

Ejemplo 9: inhibición de la eclosión de los huevos de los piojos con quelantes de metales

Se realizaron experimentos usando dos agentes quelantes de metales que pueden actuar como inhibidores de metaloproteasas para determinar sus efectos sobre la eclosión de los huevos de los piojos. Estos compuestos fueron estudiados en el ensayo de piojos estándar para determinar sus efectos ovicidas (hágase referencia a los ejemplos 5 y 6 sobre los métodos usados para estudiar inhibidores). Se evaluaron los siguientes agentes quelantes de metales: 2,2'-dipiridilo y 6,6'-dimetil-2,2'-dipiridilo. Los resultados de este estudio son mostrados en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Resultados de la eclosión de los huevos después del tratamiento con 2,2'-dipiridilo a intervalos de 24 h tras la puesta de los huevos. Se indican los resultados para: N (número de huevos por réplica), E (número de huevos eclosionados con éxito) y Pe (número de huevos parcialmente eclosionados).

Réplicas	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe
1	7	0	0	6	0	0	7	0	0	13	0	0	10	0	0
2	8	0	0	14	0	0	7	0	0	9	1	0	10	0	0
3	11	0	0	-	-	-	14	0	0	10	0	0	13	0	0

Tabla 6. Resultados de la eclosión de los huevos después del tratamiento con 6,6'-dimetil-2,2'-dipiridilo a intervalos de 24 h tras la puesta de los huevos. Se indican los resultados para: N (número de huevos por réplica), E (número de huevos eclosionados con éxito) y Pe (número de huevos parcialmente eclosionados).

Réplicas	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe
1	10		0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	23	0	0
2	10	0	0	11	0	0	16	0	0	22	0	0	9	0	0
3	11	0	0	6	0	0	10	0	0	18	0	0	-	-	-

Los resultados de estos estudios indican que tanto el 6,6'-dimetil-2,2'-dipiridilo como el 2,2'-dipiridilo exhibían una muy potente actividad ovicida, mediante la cual se inhibió completamente la eclosión de los huevos de los piojos en todos los puntos temporales examinados. Tanto el 6,6'-dimetil-2,2'-dipiridilo como el 2,2'-dipiridilo son agentes quelantes de metales e inhibidores de metaloproteasas que no son intercalantes.

Ejemplo 10: valoración comparativa de productos comerciales para piojos con 1,10-fenantrolina

Se evaluaron las propiedades ovicidas de tres productos comerciales principales para los piojos de la cabeza en el ensayo estándar de eclosión de huevos de piojos. Los tres productos comerciales para los piojos de la cabeza eran los siguientes:

1. KP-24® Nelson Laboratories, principios activos, maldisón al 1% (malatión);
2. RID® Bayer, principios activos, piretrinas al 1%; y
3. NIX® Pfizer, principios activos, permetrina al 1%.

Estos tres productos fueron estudiados según las recomendaciones del fabricante. Se trataron grupos de huevos (24 h de edad) con los diferentes productos según las recomendaciones del fabricante durante el período de tiempo apropiado (5-10 minutos), seguido de un aclarado durante 1-2 minutos en agua a 32 °C. Se incorporaron también un control positivo (1,10-fenantrolina 10 mM) y dos controles negativos (sin tratamiento y metanol al 20%). Tras exposición a los diferentes productos, se aclararon los huevos con agua templada a 32 °C antes de secarlos sobre papel de seda y se pusieron a 32 °C, 70% de HR, y se dejó que eclosionaran. Se trató a un segundo grupo de huevos (48 h de edad) como se ha descrito previamente y también se dejó que eclosionaran. Se repitió este procedimiento a intervalos de 24 h sobre huevos de piojos de la cabeza hasta las 120 h posteriores a la puesta. Este método de ensayo de inhibidores refleja más estrechamente la situación de campo, en la que los huevos de los piojos estarán en diversos estadios de desarrollo sobre la cabeza, y permite observar los efectos inhibitorios sobre estos diferentes estadios del parásito. Los resultados de estos estudios son mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de la eclosión de los huevos después del tratamiento con tres productos comerciales para piojos de la cabeza, 1,10-fenantrolina 10 mM y controles a intervalos de 24 h tras la puesta de los huevos. Se indican los resultados para: N (número de huevos por réplica), E (número de huevos eclosionados con éxito) y Pe (número de huevos parcialmente eclosionados).

NIX-Pfizer															
Réplicas	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe
1	16	12	2	9	7	0	18	3	3	12	8	3	19	12	3
2	10	4	3	6	2	3	10	3	3	15	7	5	18	8	7

(continuación)

NIX-Pfizer															
Réplicas	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe
3	10	7	2	9	4	3	17	5	7	-	-	-	36	21	5
RID-Bayer															
Réplicas	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe
1	8	0	3	12	3	4	7	0	0	8	0	0	14	0	1
2	8	2	5	7	0	1	5	1	2	8	0	0	-	-	-
3	5	0	2	10	0	2	6	1	3	11	0	0	-	-	-
KP24KP24															
Réplicas	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe
1	7	7	0	10	10	0	10	1	3	10	0	0	10	0	0
2	6	6	0	10	9	0	0	0	0	7	0	0	8	0	0
3	9	8	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	0	1
1,10-Fenantrolina (10 mM)															
Réplicas	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe
1	13	0	0	5	0	0	7	0	0	10	0	0	9	0	0
2	9	0	0	15	0	0	7	0	0	10	0	0	6	4	0
3	-	-	-	8	0	0	9	0	0	-	-	-	7	1	0
Control (metanol al 20%)															
Réplicas	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe
1	-	-	-	14	14	0	10	10	0	10	10	0	13	13	0
2	-	-	-	5	4	0	8	8	0	10	9	0	7	7	0
3	-	-	-	-	-	0	9	7	0	4	4	0	10	10	0
Control (no tratado)															
Réplicas	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe
1	10	9	0	11	11	0	25	24	0	10	8	0	20	20	0
2	20	18	0	8	7	0	10	10	0	11	10	0	20	18	0
3	-	-	-	8	8	0	-	-	-	10	10	0	-	-	-

Los resultados del estudio de tres pediculicidas comerciales indican que exhibían niveles inconsistentes de actividad ovicida a través de los diferentes estadios de la eclosión de los huevos de los piojos, mientras que el compuesto 1,10-fenantrolina era altamente efectivo en la inhibición de la eclosión de los huevos de los piojos.

Ejemplo 11: Valoración de productos comerciales para piojos adicionales

Se evaluaron las propiedades ovicidas de dos productos comerciales principales para los piojos de la cabeza en el ensayo estándar de eclosión de huevos de piojos. Los dos productos comerciales para los piojos de la cabeza eran los siguientes:

1. Pronto Plus® Shampoo Del Laboratories, principios activos, piretrinas al 0,33%; y
2. Pronto Plus® Mousse Shampoo Del Laboratories, principios activos, piretrinas al 0,33%.

Estos dos productos fueron estudiados según las recomendaciones del fabricante. Se trataron grupos de huevos (24 h de edad) con los diferentes productos según las recomendaciones del fabricante durante el período de tiempo apropiado (5-10 minutos), seguido de un aclarado durante 1-2 minutos en agua a 32 °C. Se incorporaron también dos controles negativos (sin tratamiento y etanol al 20%). Tras la exposición a los diferentes productos, se secaron los huevos sobre papel de seda y se pusieron a 32 °C, 70% de HR, y se dejó que eclosionaran. Se trató a un segundo grupo de huevos (48 h de edad) como se ha descrito previamente y también se dejó que eclosionaran. Se repitió este procedimiento a intervalos de 24 h sobre huevos de piojos de la cabeza hasta las 120 h posteriores a la puesta. Este método de estudio de inhibidores refleja más estrechamente la situación de campo, en la que los huevos de piojos estarán en diversos estadios de desarrollo sobre la cabeza, y permite observar los efectos inhibitorios sobre estos diferentes estadios del parásito. Los resultados de estos estudios son mostrados en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de la eclosión de los huevos después del tratamiento con dos productos comerciales para

piojos de la cabeza y controles a intervalos de 24 h tras la puesta de los huevos. Se indican los resultados para: N (número de huevos por réplica), E (número de huevos eclosionados con éxito) y Pe (número de huevos parcialmente eclosionados).

Pronto Plus Shampoo															
Réplicas	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe
1	14	10	2	11	9	0	30	27	0	35	30	0	40	38	2
2	20	15	3	21	18	0	19	16	0	42	36	0	38	29	5
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pronto Plus Mousse Shampoo															
Réplicas	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe
1	10	8	0	18	15	0	47	31	9	63	8	34	51	7	40
2	15	13	0	10	6	0	30	14	8	29	5	10	50	8	30
3	11	9	0	-	-	-	34	13	17	21	1	15	31	1	17
Control (etanol)															
Réplicas	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe
1	12	10	0	18	16	0	40	36	1	21	20	0	49	47	0
2	11	9	0	21	18	0	41	37	0	28	26	0	39	36	0
3	11	11	0	13	11	0	75	70	0	29	27	0	36	34	0
Control (no tratado)															
Réplicas	24 h			48 h			72 h			96 h			120 h		
	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe	N	E	Pe
1	10	9	0	27	26	0	61	60	0	50	49	1	48	46	0
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5 Los resultados del estudio de dos pediculicidas comerciales indican que exhibían una actividad ovicida muy pobre e inconsistente a través de los diferentes estadios de la eclosión de los huevos de los piojos.

10 Referencias

Al-Sayah, M.H., McDonald, R., Branda, N.R., Euro. J. Org. Chem., 2004, 173-182.

Buhleier, E., Wehner, W., Vögthe, F., Chem. Ber., 1978,111, 200-204.

15 Busvine, J.R., Entomology y evolution. Antenna. 1993, 17: 196-201.

Busvine, J.R, Biology of the parasites. Cutaneous Infestations y Insect Bites (M. Orkin y H.I. Maibach, eds).1985, pp.163-174. New York: Marcel Dekker.

20 Dymock, J.J., Laing W.A., Shaw B.D., Gatehouse A.M.R, Cristellar. J.T. New Zealand Journal of Zoology, 1992, 19: 123-131.

Green, T.W. y Wutz, P., Protecting groups of organic synthesis, John Wiley & Son, 3rd Edition, 1999.

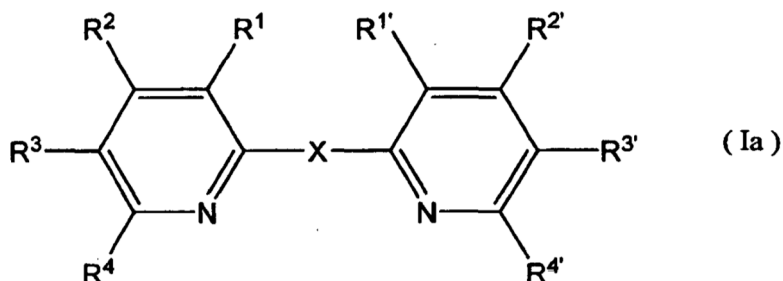
25 Imperiali, B. y Fisher, S.L., J. Org. Chem., 1992, 57, 757-759.

Jones, J., Amino acid synthesis y peptide synthesis, Oxford Chemistry Press, 1992.

Samuels R. I. y Paterson J. C. Comparative Biochemistry y Physiology. 1995 110B: 661-669.

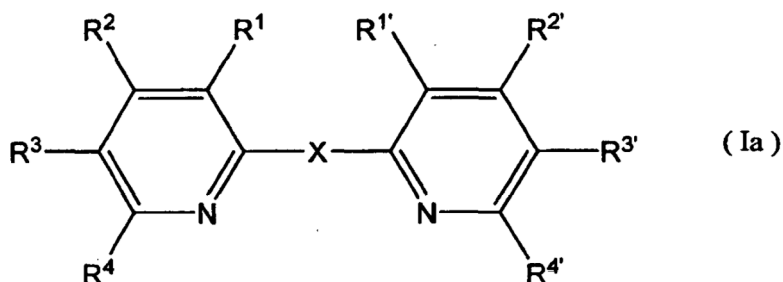
REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos un agente quelante de metales o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola para la fabricación de una composición tópica para uso en la inhibición de la eclosión de un huevo de ectoparásito sobre un hospedador humano o animal, donde el al menos un agente quelante de metales es un compuesto de fórmula (Ia):



- donde X es un enlace covalente, $\text{CH}_2\text{-Z-CH}_2$ o $-\text{Z}-$,
 donde R^1 y $\text{R}^{1'}$ son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C_{1-3} ,
 donde al menos uno de R^2 , R^2 , R^3 , R^3 , R^4 y $\text{R}^{4'}$ es un grupo metilo y los R^2 , R^2 , R^3 , R^3 , R^4 y $\text{R}^{4'}$ restantes son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C_{1-3} , y
 Z es seleccionado entre un enlace covalente, $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{C}(\text{O})-$ y $-\text{C}(\text{S})-$.

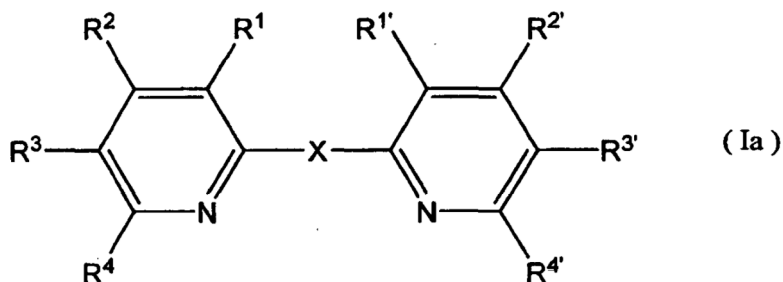
2. Un método para inhibir la eclosión de un huevo de ectoparásito, excluyendo el uso sobre un hospedador humano o animal, que comprende la exposición del huevo de ectoparásito a una composición tópica que contiene al menos un agente quelante de metales, donde el al menos un agente quelante de metales es un compuesto de fórmula (Ia):



- donde X es un enlace covalente, $\text{CH}_2\text{-Z-CH}_2$ o $-\text{Z}-$,
 donde R^1 y $\text{R}^{1'}$ son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C_{1-3} ,
 donde al menos uno de R^2 , R^2 , R^3 , R^3 , R^4 y $\text{R}^{4'}$ es un grupo metilo y los R^2 , R^2 , R^3 , R^3 , R^4 y $\text{R}^{4'}$ restantes son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C_{1-3} , y
 Z es seleccionado entre un enlace covalente, $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{C}(\text{O})-$ y $-\text{C}(\text{S})-$;

o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

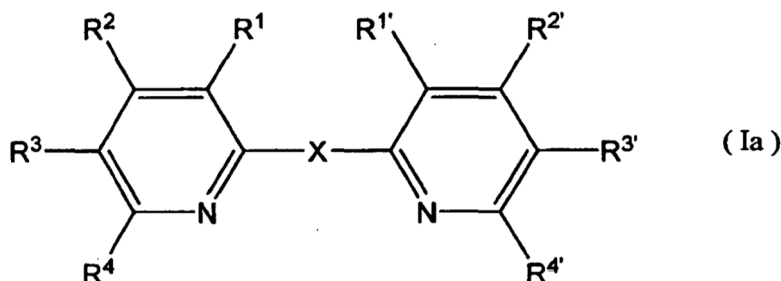
3. Uso de una cantidad efectiva de al menos un agente quelante de metales o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola para la fabricación de un medicamento tópico para uso en el tratamiento de la infestación por ectoparásitos en un hospedador humano o animal, donde el al menos un agente quelante de metales es un compuesto de fórmula (Ia):



- donde X es un enlace covalente, $\text{CH}_2\text{-Z-CH}_2$ o $-\text{Z}-$,
 donde R^1 y $\text{R}^{1'}$ son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C_{1-3} ,
 donde al menos uno de R^2 , R^2 , R^3 , R^3 , R^4 y $\text{R}^{4'}$ es un grupo metilo y los R^2 , R^2 , R^3 , R^3 , R^4 y $\text{R}^{4'}$ restantes son

independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃, y
Z es seleccionado entre un enlace covalente, -NH-, -O-, -S-, -C(O)- y -C(S)-.

4. Un método de tratamiento de la infestación por ectoparásitos, excluyendo el uso sobre un hospedador humano o animal, que comprende la exposición del hospedador a una cantidad efectiva de al menos un agente quelante de metales, donde el al menos un agente quelante de metales es un compuesto de fórmula (Ia):



- 10 donde X es un enlace covalente, CH₂-Z-CH₂ o -Z-,
donde R¹ y R^{1'} son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃,
donde al menos uno de R², R^{2'}, R³, R^{3'}, R⁴ y R^{4'} es un grupo metilo y los R², R^{2'}, R³, R^{3'}, R⁴ y R^{4'} restantes son
independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃, y
Z es seleccionado entre un enlace covalente, -NH-, -O-, -S-, -C(O)- y -C(S)-;

15 o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

5. El uso o el método según la reivindicación 2 o la reivindicación 4, donde el huevo de ectoparásito está presente sobre: plantas hospedadoras, incluyendo cultivos de cereales, árboles frutales, algodón, cultivos de semillas oleaginosas, plantas ornamentales, flores, cultivos de vid, cultivos de tubérculos, plantas de pasto y hortalizas, o sobre sitios de cría, tales como: casas y edificios, recintos para animales domésticos y de granja, alfombras, mantas, cortinas y mobiliario.

6. El uso o el método según cualquier reivindicación anterior, donde Z es -NH-, -O- o S.

7. El uso o el método según cualquier reivindicación anterior, donde el compuesto de fórmula (Ia) es seleccionado entre:

- 30 6,6'-dimetil-2,2'-dipiridilo,
5,5'-dimetil-2,2'-dipiridilo,
4,4'-dimetil-2,2'-dipiridilo
o una sal de los mismos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

8. El uso o el método según cualquier reivindicación anterior, donde el huevo de ectoparásito es depositado por un ectoparásito de una especie de un orden seleccionado entre el grupo consistente en Lepidoptera, Hemiptera, Orthoptera, Psocoptera, Hymenoptera, Isoptera, Coleoptera, Dictyoptera, Thysanoptera, Homoptera, Diptera, Anaplura, Malophaga, Siphonaptera, Arachnida y Phthiraptera.

9. El uso o el método según cualquier reivindicación anterior, donde el huevo de ectoparásito es depositado por un ectoparásito de una especie seleccionada entre el grupo consistente en *Helicoverpa spp.*, *Crocidolomia pavonana* (oruga del racimo de la col), *Pieris rapae* (blanquita de la col), *Phthorimaea operculella* (polilla de la patata), *Chrysodeixis spp.* (plusias del tabaco), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Eiphyas postvittana* (Walker) (palomilla marrón de la manzana), *Bovicola ovis* (piojo mordedor de la oveja), *Bovicola bovis*, *Haemotopinus eurysternus* (piojo nariz corta del ganado), *Linognathus vituli* (piojo de trompa larga del ganado bovino), *Solenoptes scabiei suis*, *Sarcoptes scabiei bovis*, *Psoroptes ovis*, *Pthirus pubis*, *Pediculus humanus capitis*, *Pediculus humanus humanus*, *Sarcoptes scabiei* var. *humani* y *Dermatophagoides spp.*

10. El uso o el método según cualquier reivindicación anterior, donde la infestación por ectoparásitos es una infestación por piojos.

11. El uso o el método según cualquier reivindicación anterior, donde el agente quelante de metales es aplicado simultáneamente, por separado o secuencialmente con respecto a un segundo ectoparasiticida.

12. El uso o el método según la reivindicación 11, donde el segundo ectoparasiticida controla a las ninfas y/o a los ectoparásitos adultos.

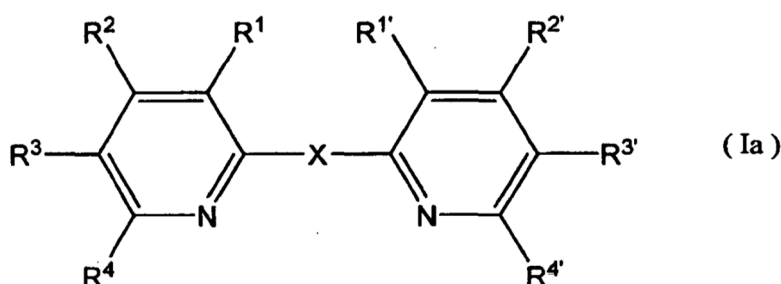
13. El uso o el método según cualquier reivindicación anterior, donde dicha composición es formulada para uso en

una aplicación tópica directa en una forma seleccionada entre el grupo consistente en un baño, un spray, un aerosol, un champú, una espuma, una emulsión, una solución, una crema, un polvo, una loción, espumas, microemulsiones y jaleas.

5 14. El uso o el método según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, donde dicho huevo de ectoparásito es un huevo de piojo de la cabeza humano y la composición es formulada para uso en una aplicación tópica al cuero cabelludo humano y está en una forma seleccionada entre el grupo consistente en un baño, un spray, un aerosol, un champú, una espuma, una emulsión, una solución, una crema, un polvo, una loción, espumas, microemulsiones y jaleas.

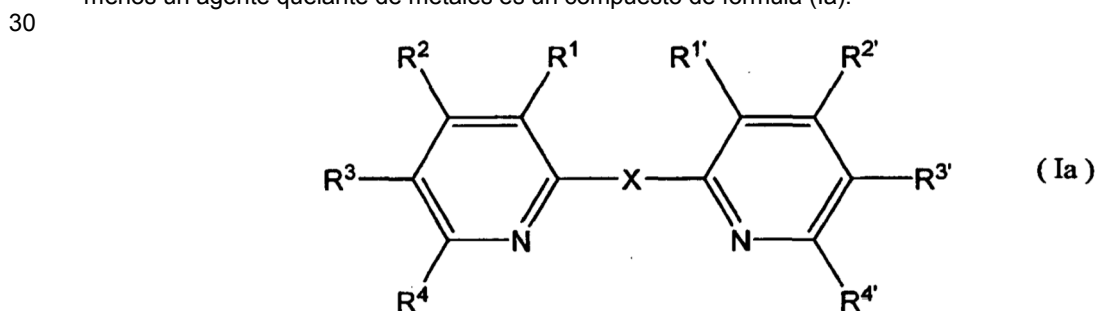
10 15. El uso o el método según cualquier reivindicación anterior, donde dicha composición incluye: agua, soluciones de sales, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, estearato de magnesio o ácido silícico.

15 16. Al menos un agente quelante de metales o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola para uso en la inhibición de la eclosión de un huevo de ectoparásito sobre un hospedador humano o animal, donde el al menos un agente quelante de metales es un compuesto de fórmula (Ia):



20 donde X es un enlace covalente, CH₂-Z-CH₂ o -Z-,
 donde R¹ y R^{1'} son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃,
 donde al menos uno de R², R^{2'}, R³, R^{3'}, R⁴ y R^{4'} es un grupo metilo y los R², R^{2'}, R³, R^{3'}, R⁴ y R^{4'} restantes son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃, y
 Z es seleccionado entre un enlace covalente, -NH-, -O-, -S-, -C(O)- y -C(S)-.

25 17. Un método de inhibición de la eclosión de un huevo de ectoparásito, excluyendo el uso sobre un hospedador humano o animal, que comprende la exposición del huevo de ectoparásito a al menos un agente quelante de metales o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola, donde el al menos un agente quelante de metales es un compuesto de fórmula (Ia):



35 donde X es un enlace covalente, CH₂-Z-CH₂ o -Z-,
 donde R¹ y R^{1'} son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃,
 donde al menos uno de R², R^{2'}, R³, R^{3'}, R⁴ y R^{4'} es un grupo metilo y los R², R^{2'}, R³, R^{3'}, R⁴ y R^{4'} restantes son independientemente seleccionados entre hidrógeno o alquilo C₁₋₃, y
 Z es seleccionado entre un enlace covalente, -NH-, -O-, -S-, -C(O)- y -C(S)-.

40 18. El método según la reivindicación 17, donde el huevo de ectoparásito está presente sobre: plantas hospedadoras, incluyendo cultivos de cereales, árboles frutales, algodón, cultivos de semillas oleaginosas, plantas ornamentales, flores, cultivos de vid, cultivos de tubérculos, plantas de pasto y hortalizas, o sobre sitios de cría, tales como: casas y edificios, recintos para animales domésticos y de granja, alfombras, mantas, cortinas y mobiliario.

45 19. El uso, el método o el agente según cualquier reivindicación anterior, donde el compuesto de fórmula (Ia) es 5,5'-dimetil-2,2'-dipiridilo o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista farmacéutico, veterinario o agrícola.

Figura 1

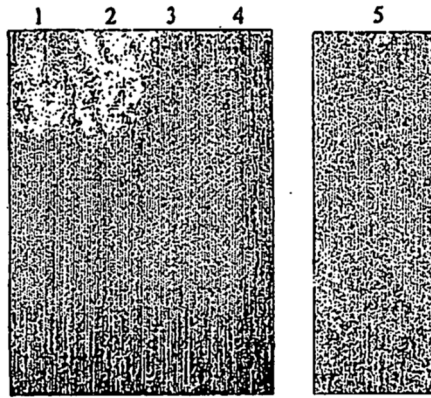


Figura 2

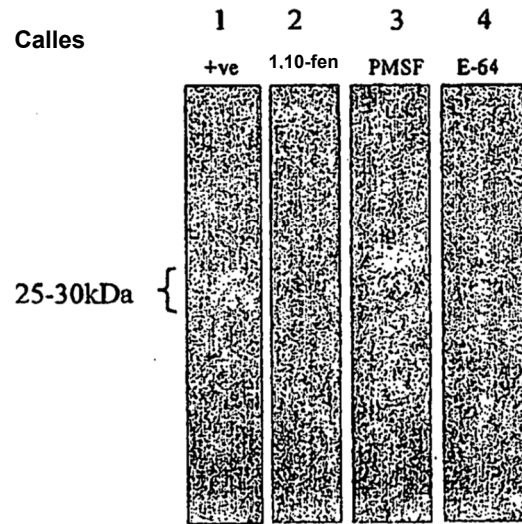


Figura 3

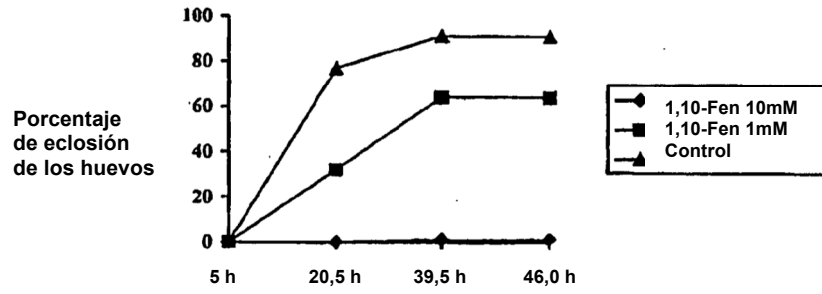


Figura 4

