

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 397**

21 Número de solicitud: 201331558

51 Int. Cl.:

**C07D 401/12** (2006.01)

**A61K 31/444** (2006.01)

**A61K 31/4439** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**23.10.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**22.01.2014**

Fecha de la concesión:

**28.10.2014**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**04.11.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (50.0%)  
Hospital Real. C/ Hospicio s/n  
18071 Granada (Granada) ES y  
UNIVERSITAT DE GIRONA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RIBAS SALAMAÑA, Xavi;  
COSTAS SALGUEIRO, Miquel;  
CUSSÓ FOREST, Olaf;  
COMPANY CASADEVALL, Anna;  
LLORET FILLOL, Julio;  
SÁNCHEZ MORENO, Manuel;  
MARÍN SÁNCHEZ, Clotilde;  
ROSALES LOMBARDO, María José y  
OLMO ARÉVALO, Francisco**

74 Agente/Representante:

**CHAMORRO MARTÍNEZ, Jesús**

54 Título: **Compuestos poliamínicos y complejos metálicos que los comprenden para su uso como agentes antiparasitarios**

57 Resumen:

Compuestos poliamínicos y complejos metálicos que los comprenden para su uso como agentes antiparasitarios.

La presente invención se refiere al uso de compuestos de base poliamínica o de sus complejos metálicos para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de origen parasitario como por ejemplo la Tripanosomiasis americana también conocida como enfermedad de Chagas o la Leishmaniasis.

ES 2 439 397 B1

**COMPUESTOS POLIAMÍNICOS Y COMPLEJOS METÁLICOS QUE LOS  
COMPRENDEN PARA SU USO COMO AGENTES ANTIPARASITARIOS**

**DESCRIPCIÓN**

5

La presente invención se refiere al uso de compuestos poliamínicos y complejos metálicos con dichos compuestos poliamínicos para el tratamiento de enfermedades de origen parasitario como son la Tripanosomiasis americana, también conocida como enfermedad de Chagas, o la Leishmaniasis La presente invención es en el campo farmacéutico y veterinario, como composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de las enfermedades parasitarias humanas y animales

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

15

Las enfermedades olvidadas (Neglected diseases) son enfermedades que afectan a millares de personas en todo el mundo, pero que no disponen de tratamientos eficaces o adecuados. En su mayoría se trata de enfermedades tropicales infecciosas que afectan fundamentalmente a la población más pobre, como por ejemplo la Leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, que ocasionan un impacto devastador en la humanidad. Estas enfermedades infecciosas están causadas por parásitos protozoarios que afectan especialmente a los países menos desarrollados, representando un problema grave de salud pública en el mundo. Se estima que casi el 50% de la población mundial está expuesta a este riesgo de contraer estas infecciones, y que aproximadamente 500 millones de personas sufren cada año patologías relacionadas con este tipo de enfermedades.

20

25

En la actualidad no existe tratamiento eficaz frente a estas enfermedades olvidadas, ya que, son de larga duración y algunos son de obligada administración parenteral o intravenosa, además de tener una elevada toxicidad (pancreatitis y toxicidad cardiovascular) con lo que pueden conllevar un efecto letal. Todo esto acentúa el problema sanitario al no haber terapias efectivas además de la aparición de resistencias a los pocos fármacos accesibles existentes.

30

La enfermedad de Chagas está causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* que se transmite de forma natural a través de las deyecciones de una chinche

35

triatomina hematófaga (Orden Hemiptera). Otras vías de transmisión son por transfusión de sangre infectada, el trasplante de órganos e incluso de madres a hijos mediante el embarazo y la lactancia, o por vía oral a través de alimentos contaminados. En esta enfermedad se distinguen dos fases, la fase aguda en la que el parásito se multiplica activamente dentro de las células del hospedador y se detectan altos niveles de parasitemia en sangre; y la fase crónica, que desarrollan el 30% de los infectados, en la que el nivel de parasitemia se reduce a niveles subpatentes en sangre pero los parásitos forman pseudoquistes en diferentes órganos como corazón, esófago y colón, ocasionando cardiopatías o megasíndromes digestivos. Se trata de una enfermedad endémica en la mayor parte de América Latina y se ha clasificado por la WHO como la tercera enfermedad tropical más extendida después de la malaria y la esquistosomiasis. Se ha estimado que alrededor de 100 millones de personas están en peligro de ser infectadas y que hay entre 15 y 20 millones de personas infectadas. 50,000 personas mueren cada año como resultado de la infección de este parásito.

Desafortunadamente, el tratamiento para la enfermedad de Chagas utilizado en la actualidad es muy limitado y no se ha desarrollado una vacuna efectiva. Los agentes terapéuticos desarrollados hasta la actualidad se basan en estructuras nitro-heterocíclicas como el nitrofurano (nifurtimox) o el derivado del nitroimidazol (benznidazol). Tanto el nifurtimox como el benznidazol sólo son efectivos frente a la fase aguda de la enfermedad, demostrando tener una eficacia muy limitada en la fase crónica. Además son muy tóxicos y causan efectos secundarios severos como pancreatitis y toxicidad cardíaca.

La leishmaniasis, causada por la infección de diferentes especies de protozoos del género *Leishmania* es otra enfermedad común en las regiones tropicales y subtropicales, así como en zonas templadas por lo que se trata de una enfermedad cosmopolita. Alrededor de 20 millones de personas padecen esta enfermedad, la cual se transmite a través de la picadura de dípteros del género *Phlebotomus* o *Lutzomyia*. La leishmaniasis se puede presentar en diferentes manifestaciones clínicas: visceral, cutánea o mucocutánea, siendo la visceral la forma más severa de la enfermedad.

El tratamiento de la leishmaniasis es complicado y además, esta enfermedad presenta una morbilidad sustancial por lo que a menudo se requieren terapias expeditivas. Para

el tratamiento de la leishmaniasis se utilizan desde hace más de 70 años derivados pentavalentes del antimonio como: Estibogluconato sódico (Pentostan) o la Meglumina antimoniato (Glucantime). Otros medicamentos utilizados son: Anfotericina B (AmBiosome®) que se administra durante un máximo de 10 días y no presentan toxicidad pero es sumamente caro (1,500 a 2,400\$ por tratamiento); la miltefosina que es de administración oral pero el tratamiento dura 4 semanas y tiene restricciones de uso para gestantes y niños; la pentamidina y el Ketoconazol. Este problema se agrava dado que las infecciones repetidas de la población o los tratamientos inefectivos han ocasionado la resistencia de los parásitos a estas terapias.

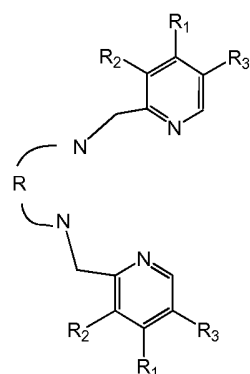
Por lo tanto, resulta necesario obtener nuevos agentes terapéuticos más efectivos tanto en las fases agudas como crónicas de las enfermedades mencionadas, y que además sean activos frente a cepas resistentes a los tratamientos habituales. Además es importante que presenten una menor toxicidad con el objetivo de disminuir los efectos secundarios adversos.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona unos compuestos y sus complejos metálicos útiles como agentes antiparasitarios, así como significativamente menos tóxicos que los principios activos utilizados en la actualidad para enfermedades de este tipo y además son activos tanto frente a las fases agudas como frente a las fases crónicas de la infecciones causadas por *Trypanosoma cruzi* o por *Leishmania* spp.

Por tanto, la presente invención se refiere al uso de compuestos poliamínicos y complejos metálicos de dichos compuestos poliamínicos como agentes antiparasitarios, en particular para el tratamiento de la leishmaniasis y de la enfermedad de Chagas.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto poliamínico de fórmula general (I):



(I)

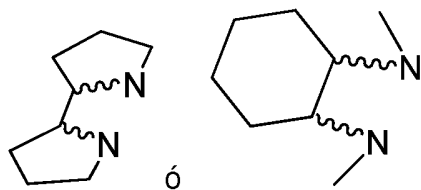
donde:  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son iguales o diferentes y representan un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno, alquilo ( $C_1$ - $C_5$ ),  $-NR'R''$ , halógeno, alcoxilo ( $C_1$ - $C_5$ ) y  $-COOR'''$ ; o

5

$R_1$  y  $R_3$  representan un grupo pineno o quinolina fusionado al anillo de piridina;

$R'$ ,  $R''$  y  $R'''$ , son iguales o diferentes y representan un hidrógeno o un grupo alquilo ( $C_1$ - $C_5$ );

y N-R-N representa los grupos:



10

cualquiera de sus isómeros y/o sales farmacéuticamente aceptables, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades parasitarias.

15

En los compuestos de fórmula (I) se incluyen tanto las conformaciones S,S' como R,R', y ello se representa con un enlace serpenteado.

20

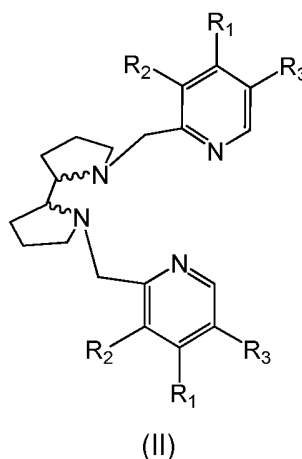
El término "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 3 átomos de carbono. Más preferiblemente son metilo. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico arilo, hidroxilo, amino, amido,

éster, carboxílico, éter, tiol, acilamino o carboxamido, que a su vez pueden opcionalmente estar sustituidos. Preferiblemente el grupo alquilo no está sustituido.

5 El término "alcoxilo" se refiere en la presente invención a un grupo de fórmula  $-OR_a$  en la que  $R_a$  es un alquilo ( $C_1-C_5$ ) como el descrito anteriormente. Por ejemplo, pero sin limitarse a metoxilo, etoxilo o propoxilo. Preferiblemente es un metoxilo.

10 Por "halógeno" se entiende por una molécula de Cl, Br, I o F. Preferiblemente es Cl o F.

En una realización preferida el compuesto de fórmula (I) es el compuesto de fórmula general (II):



15 En una realización más preferida del compuesto de fórmula (II)  $R_1$  representa un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno,  $-N(CH_3)_2$ , Cl,  $-OCH_3$  y  $-COOCH_2CH_3$ . En una realización más preferida,  $R_2$  y  $R_3$ , son iguales o diferentes y representan un hidrógeno o un grupo metilo, aún más preferiblemente  $R_2$  y  $R_3$  son iguales.

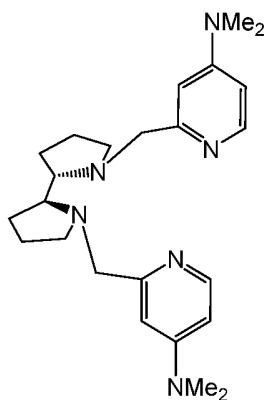
20

En otra realización preferida del compuesto de fórmula (II),  $R_1$  es  $-N(CH_3)_2$  y  $R_2$  y  $R_3$  son hidrógeno; o  $R_1$  es metoxilo y  $R_2$  y  $R_3$  metilo.

25 En estos compuestos de fórmula (II) se incluyen tanto las conformaciones S,S' como R,R'.

En una realización preferida el compuesto de fórmula (II) es 2,2'-(2S,2'S)-2,2'-

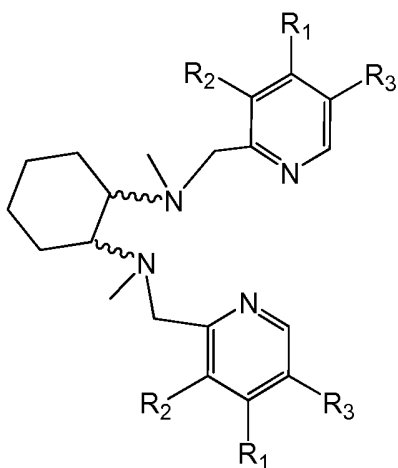
bipirrolidina-1,1'-diilbis(metileno)bis(N,N-dimetilpiridina-4-amina): también denominado (S,S')-(Me<sub>2</sub>N-Pyr)<sub>2</sub>-bpbp ó X15:



(X15)

5

En otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto de (III):



(III)

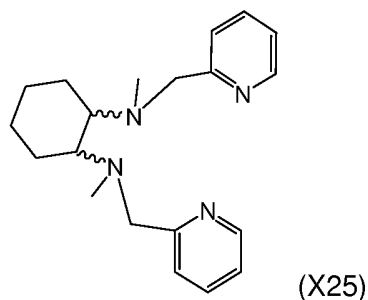
10 En una realización más preferida del compuesto de fórmula (III) R<sub>1</sub> representa un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Cl, -OCH<sub>3</sub> y -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. En una realización más preferida, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>, son iguales o diferentes y representan un hidrógeno o un grupo metilo, aún más preferiblemente R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son iguales.

15

En una realización más preferida del compuesto es de fórmula (III), R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son hidrógeno; o R<sub>1</sub> es metoxilo y R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> metilo.

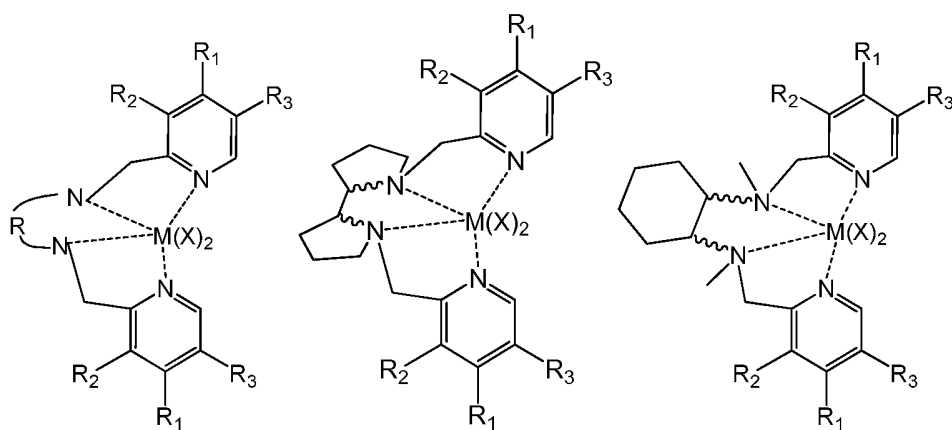
En estos compuestos de fórmula (III) se incluyen tanto las conformaciones S,S' como R,R'.

5 En otra realización preferida el compuesto de fórmula (III) es el compuesto racémico DL-N1,N2-dimetil-N1,N2-bis(piridin-2-ilmetil)ciclohexano-1,2-diamina, también denominado bpmcn-racémico o X25:



10 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un complejo metálico que comprende un ligando tetradentado que consiste en un compuesto de fórmula general (I), preferiblemente de fórmula (II) o (III), según se han descrito anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades parasitarias.

15 En una realización preferida el complejo metálico es de fórmula general (IV), preferiblemente (V), (VI):



20

(IV)

(V)

(VI)



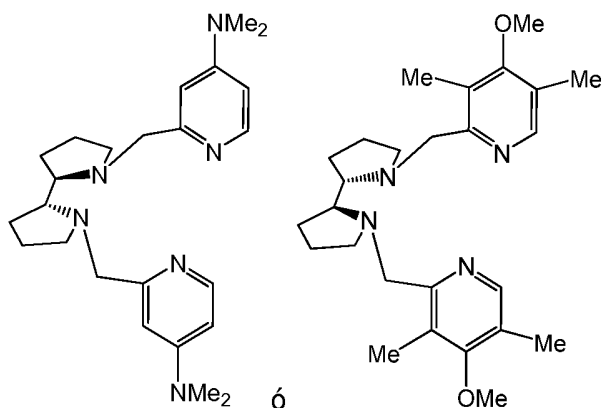
Donde: R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se han definido anteriormente; M es un metal divalente; y X es un contraanión monovalente.

5 Por "metal" se entiende a cualquier catión metálico, preferiblemente de transición, y más preferiblemente de la primera serie de transición, aunque se pueden usar metales de la segunda y tercera serie de transición de los grupos 7-12 de la tabla periódica, y aún más preferiblemente se selecciona entre Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn. El estado de oxidación del metal es preferiblemente +2, es decir, es un metal divalente, por tanto,  
10 cuando el contraanión es monovalente se precisan de dos contraaniones para compensar la carga positiva.

El contraanión (X) es cualquier anión farmacéuticamente aceptable conocido por un experto en la materia y preferiblemente se puede seleccionar de la lista que  
15 comprende CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup> y BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, más preferiblemente el contraanión es CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

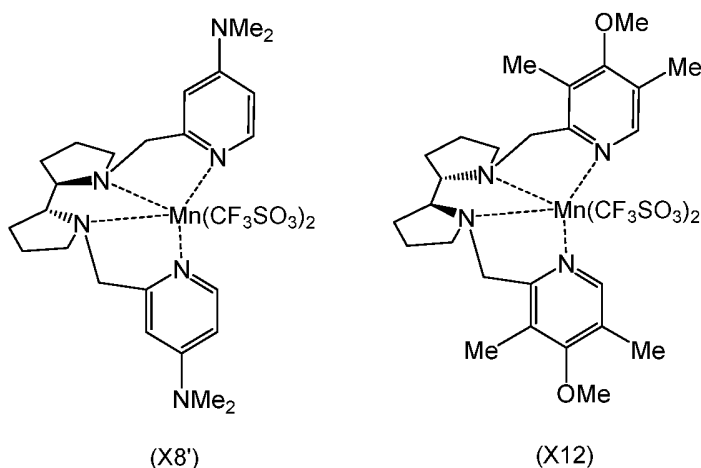
En una realización preferida de los complejos que comprenden el ligando tetradentado de fórmula (II) como se ha definido anteriormente, R<sub>1</sub> representa un grupo  
20 seleccionado de la lista que comprende hidrógeno, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Cl, -OCH<sub>3</sub> y -COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, más preferiblemente, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>, son iguales o diferentes y representan un hidrógeno o un grupo metilo, aún más preferiblemente R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son iguales. Aún más preferiblemente el compuesto de fórmula (II), R<sub>1</sub> es -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son hidrógeno; o R<sub>1</sub> es metoxilo y R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> metilo. En una realización más preferida el  
25 complejos es de fórmula (V) y se incluyen tanto las conformaciones S,S' como R,R'.

En una realización preferida más preferida, el complejo comprende como ligando los compuesto 2,2'-(2R,2'R)-2,2'-bipirrolidina-1,1'-diilbis(metileno)bis(N,N-dimetilpiridina-4-  
amina): también denominado (R,R')-(Me<sub>2</sub>N-Pyr)<sub>2</sub>-bpbp, o (2S,2'S)-1,1'-bis((4-metoxi-  
30 3,5-dimetilpiridin-2-il)metil)-2,2'-bipirrolidina, también denominado S,S'-(DMM-Py)<sub>2</sub>(bpbp):



5

En una realización más preferida el metal es divalente y el complejo es de fórmula (V), más preferiblemente el metal es Mn y aún más preferiblemente el complejo es X8' o X12:



10

(X8') es de fórmula  $[\{2,2'-(2R,2'R)-2,2'$ -bipirrolidina-1,1'-diilbis(metileno)bis(N,N-dimetilpiridina-4-amina) $\}Mn^{II}](CF_3SO_3)_2$  o también llamado  $[\{R,R'-(Me_2N-Py)_2(bppb)\}Mn^{II}](CF_3SO_3)_2$ ; y

(X12) es de fórmula  $[\{(2S,2'S)-1,1'$ -bis((4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil)-2,2'-bipirrolidina $\}Mn^{II}](CF_3SO_3)_2$  o también llamado  $[\{S,S'-(DMM-Py)_2(bppb)\}Mn^{II}](CF_3SO_3)_2$ .

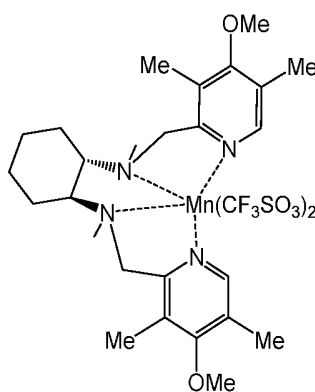
15

En otra realización preferida de los complejos que comprenden el ligando tetradentado de fórmula (III) como se ha definido anteriormente,  $R_1$  representa un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno,  $-N(CH_3)_2$ , Cl,  $-OCH_3$  y  $-COOCH_2CH_3$ , más preferiblemente,  $R_2$  y  $R_3$ , son iguales o diferentes y representan un hidrógeno o un grupo metilo, aún más preferiblemente  $R_2$  y  $R_3$  son iguales. Aún

más preferiblemente el compuesto de fórmula (III),  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son hidrógeno; o  $R_1$  es metoxilo y  $R_2$  y  $R_3$  metilo. En estos compuestos de fórmula (III) se incluyen tanto las conformaciones S,S' como R,R'.

- 5 En una realización preferida más preferida, el complejo comprende como ligando el compuesto (1R,2R)-N1,N2-bis((4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil)-N1,N2-dimetilciclohexano-1,2-diamina, o también denominado R,R'-(DMM-Py)<sub>2</sub>(bpmcn).

10 En una realización más preferida el metal es divalente y el complejo es de fórmula (VI), más preferiblemente el metal es Mn y aún más preferiblemente el complejo es X13:



(X13)

15 (X13) es de fórmula  $\{[(1R,2R)\text{-}N1,N2\text{-bis}((4\text{-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil)\text{-}N1,N2\text{-dimetilciclohexano-1,2-diamina}\}Mn^{II}](CF_3SO_3)_2$  o también llamada  $\{[R,R'\text{-(DMM-Py)}_2(\text{bpmcn})\}Mn^{II}](CF_3SO_3)_2$ .

20 Por “enfermedad parasitaria”, se entiende una enfermedad infecciosa causada por protozoos, vermes (cestodos, trematodos, nematodos) o artrópodos. En particular, en la presente invención, los parásitos son protozoos pertenecientes a los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, por tanto, se puede decir que los compuestos son antiprotozoarios. Especies de las mismas, pueden ser, pero sin limitarse, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania donovani*, entre otras conocidas por un experto en la materia.

25 Las enfermedades parasitarias a tratar podrían ser leishmaniasis o tripanosomiasis. La “Leishmaniasis” es una enfermedad causada por un protozoo del género *Leishmania* y transmitido, principalmente por dípteros conocidos como “sand fly”,

moscas de la arena o jejenes. Esta enfermedad se produce en humanos y animales vertebrados, como pueden ser marsupiales, cánidos, roedores y primates. Las "Tripanosomiasis" son enfermedades producidas en humanos o animales vertebrados que son causadas por parásitos protozoarios del género *Trypanosoma*, entre ellas se  
5 puede encontrar la tripanosomiasis humana africana, también conocida como enfermedad del sueño, la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas o la tripanosomiasis en animales o Nagana.

Por tanto, en una realización preferida los compuestos y/o complejos descritos en la  
10 presente invención se usan para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades parasitarias protozoarias, más preferiblemente los parásitos pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que  
15 comprende al menos un compuesto de fórmula general (I), preferiblemente (II) o (III), o sus complejos de fórmula general (IV), preferiblemente (V) o (VI), descritos anteriormente, junto con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente esta composición puede incluir otro principio activo, por ejemplo otro compuesto antiparasitario.

20 Un aspecto más de la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula general (I), preferiblemente (II) o (III), y sus complejos de fórmula general (IV), preferiblemente (V) o (VI), descritos anteriormente, para la elaboración de un medicamento.

25 Otro aspecto más de la presente invención se refiere al complejo (X13)  $\{[(1R,2R)-N1,N2-bis((4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil)-N1,N2-dimetilciclohexano-1,2-diamina]Mn^{II}\}(CF_3SO_3)_2$ .

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se  
35 pretende que sean limitativos de la presente invención.

**EJEMPLOS**

5 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

La síntesis de los compuestos poliamínicos y de sus complejos metálicos (familias (I), (II), (III), (IV), (V), (VI)) ha sido descrita anteriormente en distintos artículos científicos como por ejemplo (cf. J. Lloret Fillol et al., Nat. Chem. 2011, 3, 807-813; Gómez et al., J. Org. Chem. 2013, 78, 1421-1433; Gómez et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48, 5720-5723; I. Garcia-Bosch et al., Adv. Synth. Catal. 2012, 354, 65-70; I. Prat et al., Chem. Eur. J. 2013, 19, 1908-1913).

**ENSAYOS BIOLÓGICOS**

15

**CULTIVO PARASITARIO (PARA *Leishmania* spp)**

Formas promastigotas de las especies *Leishmania infantum* (MCAN/ES/2001/UCM-10) y *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/ M2904), fueron cultivadas *in vitro* en esterilidad, a 28° C en medio de cultivo monofásico MTL (Medium Trypanosomes Liquid) enriquecido con el 10 % (v/v) de suero bovino fetal inactivado frente al complemento (SBF-I) a 56°C/30 minutos. El inóculo de parásitos para iniciar el cultivo fue de  $5 \times 10^4$  células/ml en 5 ml de medio en frascos de plástico Falcon® de 25 cm<sup>2</sup>, y mantenidos en una estufa a 28°C. (González P, et al., Int J Antimicro Agents 2005, 25, 136-141). Los cultivos se realizaron de manera rutinaria, y renovando el medio cada dos días consiguiendo el crecimiento exponencial de los flagelados hasta conseguir la masa celular necesaria para los posteriores estudios.

25

**CULTIVOS CELULARES Y ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.**

30

Los macrófagos J774,2 fueron reclonados desde J774,2 (*European collection of cell cultures* (ECACC) número 91051511) originales de un tumor de hembra de ratón de la cepa Balb/c, manteniendo los cultivos entre  $3-9 \times 10^5$  células/ml a 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo MEM + Glutamina suplementado con un 20 % de SBF-I. El protocolo para trabajar con las células en cultivo fue despegándolas del frasco de

35

cultivo donde se encontraban adheridas mediante soporte frío y golpes secos. Se decantaron las células y se centrifugaron durante 5 minutos a 800 rpm. Se resuspendieron las células en medio de cultivo fresco para proceder a su conteo, mediante tinción con azul de tripán (dilución 1:1) y en cámara hemocitométrica de Neubauer, para los estudios posteriores (Sánchez-Moreno M, et al., J Antimicrob Chemother 2012; 67:387-397). Estos ensayos se realizaron mediante citometría de flujo. Los macrófagos de la línea J774,2, se depositaron en un *steriling* (Universal Tube®) y se centrifugaron a 800 rpm durante 5 min, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en medio MEM + Glutamina + 20 % SBF-I. Se depositaron  $1 \times 10^4$  células/en cada pocillo con un volumen final de 500  $\mu$ l de medio por pocillo en una placa de titulación de 24 pocillos, se incubaron durante 24 h a 37°C en atmósfera húmeda enriquecida con 5% CO<sub>2</sub>. Esto se realizó para que se fijasen las células. Transcurrido este tiempo el medio de cultivo se retiró y se adicionó medio fresco con los productos a ensayar, a las concentraciones de 50, 25, 10 y 1  $\mu$ M. A las 72 horas de la incubación, se procedió a la preparación de las muestras para su lectura en el citómetro de flujo.

El método seguido para la preparación de muestras es el descrito por Ormerod, 1994, partiendo de las células y el medio presente en los pocillos, a las cuales se le adicionó 100  $\mu$ l de solución de yoduro de propidio (PI, 100 g/ml) (Sigma Chemical Co), incubándose a 28°C en oscuridad unos 10 minutos, posteriormente, se añadió 100  $\mu$ l de diacetato de fluoresceína (FDA) (Sigma Chemical Co) en solución (100ng/ml) volviéndose a incubar a 28°C en oscuridad unos 10 minutos, y previa centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos, se procedió a lavar el precipitado con PBS. Finalmente, se analizaron los resultados en el citómetro teniendo en cuenta que las células con la membrana plasmática intacta tienen una fluorescencia color verde, mientras que las células dañadas o muertas presentan una fluorescencia roja. Se calculó el porcentaje de viabilidad. El número de células muertas se determinó por comparación con los cultivos controles.

30

#### ENSAYOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO*: FORMAS EXTRACELULARES

##### **Ensayo sobre formas promastigotas**

Las formas promastigotas de *L. infantum* cultivadas de la forma anteriormente descrita, fueron recolectadas en su fase exponencial de crecimiento mediante

35

centrifugación a 1500 rpm durante 10 min. Se resuspendieron en medio fresco. La concentración de parásitos fue contada en una cámara hemocitométrica de Neubauer y sembrados en una placa de 24 pocillos a razón de una concentración de  $5 \times 10^4$  parásitos/ pocillo. Los compuestos a ensayar se disolvieron con DMSO puro a una  
5 concentración de DMSO de 0,01% (v/v), a la cual, este disolvente no es tóxico ni tiene ningún efecto sobre el crecimiento de los parásitos. Los compuestos fueron añadidos al medio de cultivo en la placa de 24 pocillos a una concentración final de: 100, 50, 25, 10 y 1  $\mu\text{M}$ , y a un volumen final por pocillo de 500  $\mu\text{l}$ . El efecto de cada producto sobre el crecimiento de las formas promastigotas, a las diferentes concentraciones  
10 ensayadas, se evaluó a las 72 horas, usando una cámara hemocitométrica de Neubauer, y el efecto leishmanicida se expresó como la  $\text{IC}_{50}$  (concentración requerida para dar una inhibición del 50%, calculado por el análisis de la regresión lineal de la Kc a las concentraciones ensayadas) (González P, et al. Int J Antimicro Agents 2005; 25:136–141).

15

ENSAYOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO*: FORMAS INTRACELULARES.

#### **Ensayo sobre formas amastigotas**

Los macrófagos se despegaron del frasco de cultivo donde se encontraban adheridos  
20 mediante soporte frío y golpes secos. Para ello, se eliminó el medio de cultivo, seguidamente se cubrió la superficie celular con EDTA-tripsina y se incubó en frío durante 5 minutos según la metodología expuesta anteriormente. Tras ello, se pasó a un frasco de fondo cónico de 25 ml de capacidad (Steriling) para centrifugarlos a 800 rpm durante 5 minutos, retirándose el sobrenadante y resuspendiéndolos en MEM +  
25 Glutamina con 20% SBF-I. Se cuentan en cámara de Neubauer y se cultivan en placas de 24 pocillos a razón de  $1 \times 10^4$  células, en las que previamente habíamos introducido un cristal cubreobjetos redondo de 12 mm en cada pocillo. Para su adherencia, dejamos crecer las células 24 h a  $37^\circ\text{C}$  en 5%  $\text{CO}_2$ .

30 Una vez adheridas las células, se infectaron "*in vitro*": Macrófagos J774,2 con  $1 \times 10^5$  parásitos/pocillo de formas promastigotas metacíclicas en fase estacionaria de crecimiento de las especies de Leishmanias utilizadas (*L. infantum* y *L. braziliensis*) La infección se mantuvo durante 24 horas para que el parásito entrase en la célula. Transcurrido este tiempo el medio de cultivo se retiró y se adicionó medio fresco con  
35 los productos a ensayar, a las concentraciones necesarias para sacar la  $\text{IC}_{50}$  (100, 50,

25, 10 y 1  $\mu\text{M}$ ). A las 72 horas de la incubación, se procedió a la retirada de los cristales.

Una vez sacados los cristales se colocaron en un portaobjetos. Se fijaron con metanol y se dejaron secar. Una vez fijados y secos, se les añadió DPX (Panreac®), medio de montaje para microscopía. Se tiñeron con Giemsa, para ello, inmediatamente antes de su empleo y en tubo de ensayo, se diluyó 0,2 ml de Azur-Eosina-Azul de Metileno solución según Giemsa DC (Código 251338) con 2 ml de tampón Sorensen (dilución 1:10), se mezcló bien y se cubrió la preparación dejando colorear durante 20 minutos. Se lavó con agua destilada. Se dejó escurrir y secar en posición vertical. Por último se examinó con el objetivo de inmersión y se contó el número de formas amastigotas intracelulares en un total de 200 células (González P, et al. Int J Antimicro Agents 2005, 25, 136–141).

Los resultados de estos ensayos se muestran las Tablas 1 y 2.

**Tabla 1.-** Actividad y toxicidad encontradas para los compuestos poliamínicos y de los complejos con metales de transición estudiados sobre formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania* spp.

Compuesto	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>				Toxicidad $\text{IC}_{50}$ Macrófagos ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>
	<i>L. infantum</i>		<i>L. braziliensis</i>		
	Promastigote	Amastigote	Promastigote	Amastigote	
Glucatin®	18,0±3,1	24,2±2,6	25,6±1,6	30,4±6,1	15,20±1,3
<b>X8`</b>	27,4±0,7	24,7±1,2	26,4±0,7	19,4±1,7	60,3±3,3
<b>X12</b>	1,32±0,1	< 1	3,5±0,6	8,8±1,3	97,2±3,8
<b>X13</b>	7,3±0,1	12,2±1,5	< 1	11,7±1,1	137,6±7,4
<b>X15</b>	12,3±2,2	9,0±0,4	11,7±0,8	8,5±0,3	172,1±11,3
<b>X25</b>	83,0±9,9	22,5±3,1	73,8±3,6	21,7±1,4	268,3±16,2

Resultado de tres experimentos independientes. <sup>a</sup>  $\text{IC}_{50}$  = Concentración necesaria para obtener el 50 % de Inhibición, calculada por análisis linear de regresión del valor Kc a las concentraciones empleadas de (1, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ). <sup>b</sup> Frente a Macrófagos J774,2 después de 72 h de cultivo.

25



Tabla 2.- Índice de Selectividad encontrados los compuestos poliamínicos y de los complejos con metales de transición estudiados sobre formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania* spp.

Compuesto	IS <sup>°</sup>			
	<i>L. infantum</i>		<i>L. braziliensis</i>	
	<i>Promastigote</i>	<i>Amastigote</i>	<i>Promastigote</i>	<i>Amastigote</i>
Glucatinim®	0,8	0,6	0,6	0,5
<b>X8'</b>	2,2 (3)	2,4 (4)	2,3 (4)	3,1 (6)
<b>X12</b>	73,6 (92)	97 (162)	27,8 (46)	11,0 (22)
<b>X13</b>	18,8 (24)	9,6 (16)	137,6 (229)	10,0 (20)
<b>X15</b>	11,6 (15)	19,1 (32)	14,7 (24)	20,2 (41)
<b>X25</b>	3,2 (4)	11,9 (20)	3,6 (6)	12,4 (25)

- 5    ° **Índice de Selectividad**= IC<sub>50</sub> de los macrófagos/IC<sub>50</sub> de las formas extracelulares e intracelulares de los parásitos. Entre paréntesis: Numero de veces que la IS de los compuestos es superior a la IS de la droga de referencia.

10 Los compuestos estudiados se han evaluado frente a formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania* spp. (*L. infantum* y *L. braziliensis*), obteniéndose los índices IC<sub>50</sub> como indicadores de la actividad de los compuestos frente al protozoo, los índices de toxicidad IC<sub>50</sub> frente a Macrófagos y el índice de selectividad obtenido como IS= IC<sub>50</sub> frente a macrófagos /IC<sub>50</sub> frente formas extracelulares e intracelulares de los parásitos. En este estudio los valores obtenidos se comparan con los correspondientes a la droga referencia, Glucatinim®, utilizada comúnmente en el

15 tratamiento de la leishmaniasis.

20 El análisis de los resultados obtenidos indica que en general los compuestos estudiados son activos frente a las formas intracelulares y extracelulares del parásito utilizadas, con valores de IC<sub>50</sub> hasta cuatro superiores a los valores obtenidos para el compuesto referencia. Además en este caso se han obtenido valores de IC<sub>50</sub> frente a macrófagos entre 10 y 25 veces superiores al del compuesto referencia, lo cual indica que los nuevos compuestos presentan una baja toxicidad frente a los macrófagos, un hecho que constituye una ventaja a la hora de su uso como agentes terapéuticos. Por

25 lo tanto y a partir de dichos valores se han obtenido índices de selectividad con valores entre 15 y 150 para un grupo de los compuestos estudiados.

CULTIVO PARASITARIO (para *Trypanosoma cruzi*)

Se utilizó *Trypanosoma cruzi* cepa tipo I (IRHOD/CO/2008/SN3) (Tellez- Meneses et al., Acta Trop 2008; 108:26-34) cuyo origen geográfico es Guajira (Colombia) y su origen biológico *Rhodnius prolixus* en las formas de desarrollo: epimastigotas, tripomastigotas y amastigotas. El cultivo de las formas epimastigotas de *T. cruzi* se realizó *in vitro* en esterilidad en medio de cultivo monofásico MTL (Medium Trypanosomes Liquid, Ruiz-Pérez y col., 1986) enriquecido con el 10% (v/v) de Suero Bovino Fetal (SBF-I) inactivado a 56°C/ 30 minutos. El inóculo de parásitos para iniciar el cultivo fue de  $5 \times 10^4$  células/ml en 5 ml de medio en frascos de plástico Falcon® de 25 cm<sup>2</sup> y se mantuvieron en una estufa a 28°C. Los cultivos se realizaron de manera rutinaria consiguiendo el crecimiento exponencial de los flagelados hasta conseguir la masa celular necesaria para los posteriores estudios. (Téllez-Meneses J, y col. Acta Trop 2008; 108:26-34).

15

## CULTIVOS CELULARES Y ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.

Las células Vero fueron establecidas desde el riñón de un mono Verde Africano adulto, manteniendo los cultivos a una densidad  $1 \times 10^4$  células/ml a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El procedimiento para trabajar con las células en cultivo fue tripsinizar las células adheridas mediante lavado con PBS y añadiendo la cantidad suficiente de tripsina/EDTA (200ml de PBS + 0,1 g de EDTA y 200 ml de PBS + 0,5 g de tripsina. Se mezclan las dos soluciones. pH= 7,2-7,4 y se filtra). Se incubaron durante 5-10 minutos las células. Se decantaron las células y se centrifugaron durante 5 minutos a 800 rpm. Se resuspendieron las células en un medio de cultivo nuevo. Como medio de cultivo se utilizó RPMI suplementado con un 10 % de suero bovino fetal inactivado (SBF-I) (Sánchez-Moreno M, et al. J Antimicrob Chemother 2012; 67:387-397). Las células Vero, se depositaron en un esterilín y se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en medio RPMI. Se depositaron  $1 \times 10^4$  células/ml en cada pocillo de una placa de titulación de 24 pocillos, se incubaron durante 24 h a 37°C en atmósfera húmeda enriquecida con 5% CO<sub>2</sub>. Esto se realizó para que se fijasen las células. Transcurrido este tiempo el medio de cultivo se retiró y se adicionó medio fresco con los productos a ensayar, a las concentraciones de 100, 50, 25, 10 y 1 µM. A las 72 horas de la incubación, se procedió a la preparación de las muestras para su lectura en el citómetro de flujo. El método seguido es el descrito por (Ormerod, 1994), partiendo de las células y el

35

medio presente en los pocillos, a las cuales se le adicionó 100 µl de solución de yoduro de propidio (PI, 100 µg/ml) (Sigma Chemical Co), incubándose a 28°C en oscuridad unos 10 minutos, posteriormente, se añadió 100 µl de diacetato de fluoresceína (FDA) (Sigma Chemical Co) en solución (100ng/ml) volviéndose a incubar a 28°C en oscuridad unos 10 minutos, y previa centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos, se procedió a lavar el precipitado con PBS. Finalmente, se analizaron los resultados teniendo en cuenta que las células con la membrana plasmática intacta tienen una fluorescencia color verde, mientras que las células dañadas o muertas presentan una fluorescencia roja. Se calculó el porcentaje de viabilidad. El número de células muertas se determinó por comparación con los cultivos controles (Marín C, et al. J Nat Prod 2011; 74:744-750).

#### ENSAYOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO*: FORMAS EXTRACELULARES.

**15 Transformación de formas epimastigotas a formas tripomastigotas metacíclicas**  
La metaciclogénesis fue inducida a un cultivo de 5 días (fase estacionaria), tras ser centrifugado a 7000g durante 10 min a 10°C. Los parásitos fueron incubados 2h a 28°C a una densidad de  $5 \times 10^8$  parásitos/ml en medio TAU (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 8 mM phosphate buffer, pH 6,0). Después, los parásitos se incubaban a la dilución 1:100 durante 96h a 28°C en medio TAU3AAG (TAU suplementado con 10 mM L-prolina, 50 mM L-glutamato sódico, 2 mM L-aspartato sódico y 10 mM D-glucosa) en frascos de cultivo de 25 ml en posición horizontal impidiendo que supere 1cm de profundidad el medio. (Cardoso J, et al. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 5:1026-32).

25

#### **Formas epimastigotas**

Las formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas de la forma anteriormente descrita fueron recolectadas en su fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 min. El número de parásitos fue contado en una cámara hemocitométrica de Neubauer y sembrados en una placa de 24 pocillos a razón de una concentración de  $5 \times 10^4$  parásitos/ml en cada pocillo.

Los compuestos a ensayar se disolvieron en DMSO a una concentración de 0,01% (v/v) concentración a la cual este disolvente no es tóxico ni tiene ningún efecto sobre el crecimiento de los parásitos. Los compuestos fueron añadidos al medio de cultivo a

35

una concentración final de: 100, 50, 25, 10 y 1  $\mu\text{M}$ . El efecto de cada compuesto sobre el crecimiento de las formas epimastigotas, a las diferentes concentraciones ensayadas, se evaluó a las 72 h, usando una cámara hemocitométrica de Neubauer y el efecto tripanocida se expresó como la  $\text{IC}_{50}$  (concentración requerida para dar una inhibición del 50 %, calculado por el análisis de la regresión lineal de la  $K_c$  a las concentraciones ensayadas) (Sánchez-Moreno M, y col. J Med Chem. 2011; 54:970-9).

### Formas Tripomastigotas

La actividad (porcentaje de reducción de parásitos) es comparado con el control después de realizar la metodología descrita en (Júnior CO, y col. Biomed Pharmacother 2010; 64:624-6) con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio. El ensayo se lleva a cabo usando sangre infectada de ratón Balb/c que ha sido obtenida durante los días de máxima parasitemia (día 7 aprox. post infección). La sangre infectada se diluía con sangre no infectada para obtener una concentración de  $1-4 \times 10^6$  tripomastigotas/ml, entonces se diluía 1:2 con RPMI 1640 medium-GIBCO, invitrogen®. Soluciones stock de los compuestos a ensayar se preparan al mismo tiempo en DMSO. Una muestra de sangre infectada y la droga se añaden a una placa de 96 pocillos hasta un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  y las concentraciones de compuesto de 1 a 100  $\mu\text{M}$ , a fin de calcular la  $\text{IC}_{50}$  para cada uno. Para reproducir las condiciones de banco de sangre, las placas se incubaron a 4  $^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Los experimentos se repitieron tres veces. Cada muestra se examinó microscópicamente (OLYMPUS CX41) para el recuento de parásitos utilizando la cámara de Neubauer.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO*: FORMAS INTRACELULARES.

### Ensayo de amastigotas

Las células Vero se despegaron del frasco de cultivo donde se encontraban adheridos mediante tripsinización. Para ello, se eliminó el medio de cultivo, seguidamente se cubrió la superficie celular con EDTA-tripsina y se incubó en frío durante 5 minutos según la metodología expuesta anteriormente. Tras ello, se pasó a un frasco de fondo cónico de 25 ml de capacidad (Steriling) para centrifugarlos a 800 rpm durante 5 minutos, retirándose el sobrenadante y se cuentan en cámara de Neubauer. Resuspendiendo las células a una concentración de  $1 \times 10^4$  células/ pocillo en medio RPMI para las células Vero, cultivándose en placas de 24 pocillos, en las que

previamente habíamos introducido un cristal cubreobjetos redondo de 12 mm en cada pocillo. Para su adherencia, dejamos crecer las células 24 h a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>.

5 Una vez adheridas las células, se infectaron “in vitro” las células Vero con 1 x 10<sup>5</sup> células/ pocillo de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, obtenidos según la metodología citada anteriormente. La infección se mantuvo durante 24 horas para que el parásito entre a la célula. Transcurrido este tiempo el medio de cultivo se retiró y se adicionó medio fresco con los productos a ensayar, a las concentraciones necesarias para sacar la IC<sub>50</sub> (100 a 1 µM). A las 72 horas de la incubación, se procedió a la retirada  
10 de los cristales.

Una vez sacados los cristales se colocaron en un portaobjetos. Se fijaron con metanol y se dejaron secar. Una vez fijados y secos, se les añadió DPX (Panreac®), medio de montaje para microscopía. Se tiñeron con Giemsa, para ello, inmediatamente antes de  
15 su empleo y en tubo de ensayo, se diluyó 0,2 ml de Azur-Eosina-Azul de Metileno solución según Giemsa DC (Código 251338) con 2 ml de tampón Sörensen (dilución 1:10), se mezcló bien y se cubrió la preparación dejando colorear durante 20 minutos. Se lavó con agua destilada. Se dejó escurrir y secar en posición vertical. Por último se examinó con el objetivo de inmersión y se contó el número de amastigotas  
20 intracelulares en un total de 200 células.

Los datos obtenidos en los ensayos anteriores se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3.-**Actividad *in vitro*, toxicidad e índice de selectividad de los compuestos  
25 poliamínicos y de los complejos con metales de transición evaluados en formas extracelulares e intracelulares de *Trypanosoma cruzi*.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>			Toxicidad
	Epimastigote	Amastigote intracelular	Trypomastigote	IC <sub>50</sub> Cel. Vero (μM) <sup>b</sup>
<b>Benznidazol</b>	15,8±1,1	23,3±4,6	22,4±1,9	13,6±0,9
<b>X8`</b>	41,5±3,0	22,7±1,4	23,5±1,8	31,0±2,3
<b>X12</b>	18,2±0,6	< 1	1,4±0,2	78,0±11,0
<b>X13</b>	13,6±0,9	9,1±0,3	4,4±0,2	88,1±12,0
<b>X15</b>	33,6±0,7	14,5±0,8	9,5±0,5	108,0±10,0
<b>X25</b>	10,4±0,3	14,4±0,5	13,6±0,7	248,3±8,6

Los resultados representan la media obtenida en cuatro experimentos separados.<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> = concentración requerida para dar el 50% de inhibición, calculada por análisis de regresión lineal a partir de los valores Kc en las concentraciones utilizadas (1, 10, 25, 50 y 100 μM).<sup>b</sup> Frente a células Vero después de 72 h de incubación.

5

**Tabla 4.-** Índice de selectividad de los compuestos poliamínicos y de los complejos con metales de transición evaluados en formas extracelulares e intracelulares de *Trypanosoma cruzi*.

10

Compuesto	IS <sup>a</sup>		
	Epimastigote	Amastigote intracelular	Tripomastigote
<b>Benznidazole</b>	0,8	0,6	0,6
<b>X8`</b>	0,7 (1)	1,4 (2)	1,3 (2)
<b>X12</b>	4,3 (5)	78 (130)	55,7 (93)
<b>X13</b>	6,5 (8)	9,7 (16)	20 (33)
<b>X15</b>	3,2 (4)	7,5 (12)	11,4 (19)
<b>X25</b>	23,9 (30)	17,2 (29)	18,3 (30)

15

Los resultados representan la media obtenida en cuatro experimentos separados.<sup>a</sup> Índice de selectividad = IC<sub>50</sub> Células Vero / IC<sub>50</sub> formas extracelulares e intracelulares del parásito. Entre paréntesis: número de veces que el compuesto excede el índice de selectividad de la droga referencia (para formas extracelulares e intracelulares del *Trypanosoma cruzi*).

20

25

Estos valores se han comparado con los valores obtenidos para el Benznidazol ya que se trata del fármaco comúnmente utilizado para el tratamiento de esta enfermedad. Los resultados obtenidos indican que en general los compuestos estudiados son

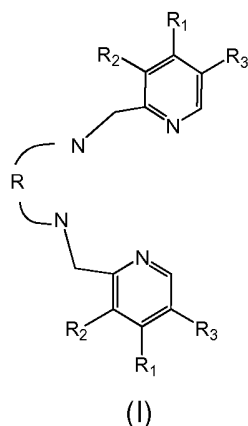
menos tóxicos que el Benznidazol frente a células Vero con valores de  $IC_{50}$  entre 10 y 30 veces superiores que el  $IC_{50}$  del compuesto referencia. En algunos casos como para los compuestos X12 y X13 su actividad es mucho mayor que el compuesto referencia ya que presentan valores de  $IC_{50}$  menores tanto en formas extracelulares como intracelulares. De acuerdo con estos resultados estos compuestos tienen índices de selectividad elevados con valores comprendidos entre 15 y 80. Todo ello indica que dichos compuestos presentan una actividad adecuada para su uso como agentes anti *T. cruzi*.

5

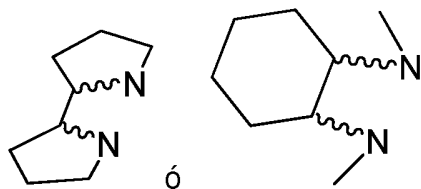
10

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto poliamínico de fórmula general (I)



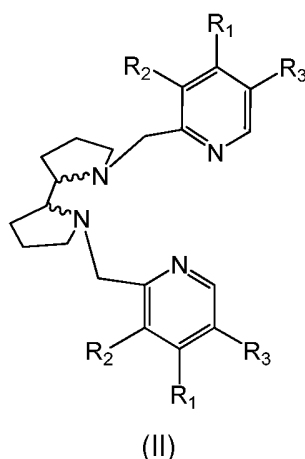
10 donde:  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son iguales o diferentes y representan un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno, alquilo ( $C_1-C_5$ ),  $-NR'R''$ , halógeno, alcoxilo ( $C_1-C_5$ ) y  $-COOR'''$ ; o  $R_1$  y  $R_3$  representan un grupo pineno o quinolina fusionado al anillo de piridina;  $R'$ ,  $R''$  y  $R'''$ , son iguales o diferentes y representan un hidrógeno o un grupo alquilo ( $C_1-C_5$ ); y donde N-R-N representa los grupos:



15 o cualquiera de sus isómeros y/o sales farmacéuticamente aceptables, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades parasitarias.

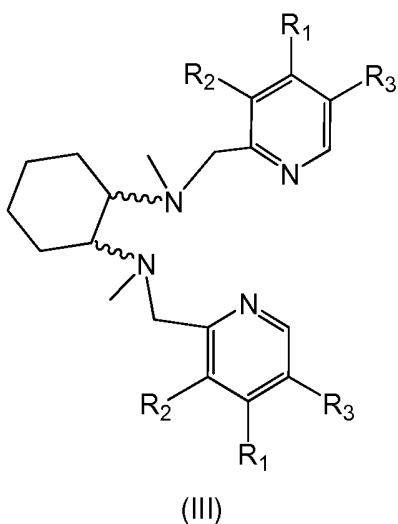
2. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto es de fórmula general (II):





donde  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  se han definido en la reivindicación 1.

- 5 3. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto es de fórmula (III)

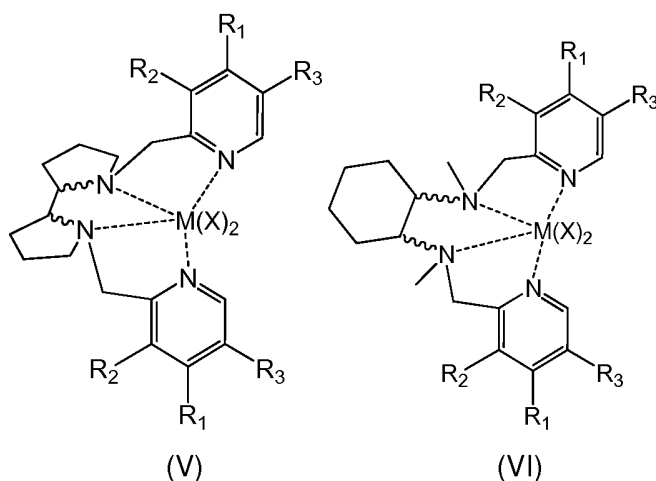


donde  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  se han definido en la reivindicación 1.

- 10 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde  $R_1$  representa un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno,  $-N(CH_3)_2$ , Cl,  $-OCH_3$  y  $-COOCH_2CH_3$ .
- 15 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde  $R_2$  y  $R_3$ , son iguales o diferentes y representan un hidrógeno o un grupo metilo.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde  $R_2$  y  $R_3$  son iguales.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 donde el compuesto es de fórmula (II),  $R_1$  es  $-N(CH_3)_2$  y  $R_2$  y  $R_3$  son hidrógeno; o  $R_1$  es  $-OCH_3$  y  $R_2$  y  $R_3$  metilo.
- 5 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, donde el compuesto es de fórmula (III) y  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  son hidrógeno.
9. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto se selecciona entre 2,2'-(2S,2'S)-2,2'-bipirrolidina-1,1'-diilbis(metileno)bis(N,N-dimetilpiridina-4-amina); DL-N1,N2-dimetil-N1,N2-bis(piridin-2-ilmetil)ciclohexano-1,2-diamina.
- 10 10. Uso de un complejo metálico que comprende un ligando tetradentado que consiste en un compuesto de fórmula general (I) según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades parasitarias.
- 15 11. Uso según la reivindicación 10, donde los metales se seleccionan de la lista que comprende Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn.
- 20 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde los metales son metales divalentes.
13. Uso según la reivindicación anterior, donde los complejos son de fórmula general (V) o (VI):

25



donde:  $R_1$  a  $R_3$  se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; M es un metal divalente según se describe en la reivindicación 12; y X es un contraanión.

- 5 14. Uso según la reivindicación anterior, donde el contraanión se selecciona de la lista que comprende  $CF_3SO_3^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $ClO_4^-$ ,  $PF_6^-$  y  $BF_4^-$ .
15. Uso según la reivindicación anterior donde el contraanión  $CF_3SO_3^-$ .
- 10 16. Uso según la reivindicación 10, donde los complejos se seleccionan de entre:  
 $[[2,2'-(2R,2'R)-2,2'-bipirrolidina-1,1'-diilbis(metileno)bis(N,N-dimetilpiridina-4-aminato)]Mn^{II}](CF_3SO_3)_2$ ;  $[[2S,2'S)-1,1'-bis((4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil)-2,2'-bipirrolidina]Mn^{II}](CF_3SO_3)_2$ ;  $[[1R,2R)-N1,N2-bis((4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil)-N1,N2-dimetilciclohexano-1,2-diamina]Mn^{II}](CF_3SO_3)_2$ .
- 15 17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad parasitaria es una enfermedad parasitaria protozoaria.
18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los parásitos pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*.
- 20 19. Uso según la reivindicación anterior, donde los parásitos pertenecen a la especie *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* o *Leishmania donovani*.
- 25 20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad es leishmaniasis o tripanosomiasis.
21. Uso según la reivindicación anterior, donde la tripanosomiasis es la enfermedad de
- 30 Chagas.
22. Uso de los compuestos de fórmula general (I) descritos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o de los complejos descritos en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, para la elaboración de un medicamento.

35

23. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, junto con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5

24. Complejo de fórmula  $[\{(1R,2R)\text{-}N1,N2\text{-bis}((4\text{-metoxi-}3,5\text{-dimetilpiridin-}2\text{-il)metil-N1,N2\text{-dimetilciclohexano-}1,2\text{-diamina})\text{Mn}^{\text{II}}\}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ .



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201331558

22 Fecha de presentación de la solicitud: 23.10.2013

32 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CUSSO, O. et al. "Asymmetric Epoxidation with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> by Manipulating the Electronic Properties of Non-heme Iron Catalysts". Journal of the American Chemical Society, 2013, Vol. 135, N. 39, páginas 14871-14878. Ver Resumen y Esquema 2.	1-24
A	GARCÍA-BOCH, I. et al. "Stereoselective Epoxidation of Alkenes with Hydrogen Peroxide using a Bipyrrrolidine-Based Family of Manganese Complexes". Advanced Synthesis and Catalysis, 2012, Vol. 354, páginas 65-70. Ver Resumen, esquema 1.	1-24
A	OTTENBACHER, R. V. et al. "Nonheme Manganese-Catalyzed Asymmetric Oxidation. A Lewis Acid Activation versus Oxygen Rebound Mechanism: Evidence for the "Third Oxidant". Inorganic Chemistry, 2010, Vol. 49, páginas 8620-8628. Ver Resumen y Esquema 1.	1-24
A	RAMÍREZ-MACÍAS, I. et al. "In vitro anti-leishmania evaluation of nickel complexes with a triazolopyrimidine derivative against Leishmania infantum and Leishmania braziliensis". Journal of Inorganic Biochemistry, 2012, Vol. 112, páginas 1-9. Ver Resumen y Figura 1.	1-24
A	SANCHEZ-MORENO, M. et al. "In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against Leishmania infantum and Leishmania braziliensis species". Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, Vol. 67, N. 2, páginas 387-397. Ver Resumen, Figura 3.	1-24
A	VERA-DIVAIO, M. A. F. et al. "Synthesis, antichagasic in vitro evaluation, cytotoxicity assays, molecular modeling and SAR/QSAR studies of a 2-phenyl-3-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)-acrylic acid benzylidene-carbohydrazide series". Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2009, Vol. 17, páginas 295-302. Ver Resumen y Tabla 1.	1-24

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe  
15.01.2014

Examinador  
N. Martín Laso

Página  
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07D401/12** (2006.01)

**A61K31/444** (2006.01)

**A61K31/4439** (2006.01)

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

C07D, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, BD-TXT, NPL, XPESP, BIOSIS, CAS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.01.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-24	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-24	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CUSO, O. et al. "Asymmetric Epoxidation with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> by Manipulating the Electronic Properties of Non-heme Iron Catalysts". Journal of the American Chemical Society, 2013, Vol. 135, N. 39, páginas 14871-14878.	03.09.2013
D02	GARCÍA-BOCH, I. et al. "Stereoselective Epoxidation of Alkenes with Hydrogen Peroxide using a Bipyrrrolidine-Based Family of Manganese Complexes". Advanced Synthesis and Catalysis, 2012, Vol. 354, páginas 65-70.	29.11.2011
D03	OTTENBACHER, R. V. et al. "Nonheme Manganese-Catalyzed Asymmetric Oxidation. A Lewis Acid Activation versus Oxygen Rebound Mechanism: Evidence for the "Third Oxidant". Inorganic Chemistry, 2010, Vol. 49, páginas 8620-8628.	24.08.2010
D04	RAMÍREZ-MACÍAS, I. et al. "In vitro anti-leishmania evaluation of nickel complexes with a triazolopyrimidine derivative against Leishmania infantum and Leishmania braziliensis". Journal of Inorganic Biochemistry, 2012, Vol. 112, páginas 1-9.	04.03.2012
D05	SANCHEZ-MORENO, M. et al. "In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against Leishmania infantum and Leishmania braziliensis species". Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, Vol. 67, N. 2, páginas 387-397.	2011
D06	VERA-DIVAIO, M. A. F. et al. "Synthesis, antichagasic in vitro evaluation, cytotoxicity assays, molecular modeling and SAR/QSAR studies of a 2-phenyl-3-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)-acrylic acid benzylidene-carbohydrazide series". Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2009, Vol. 17, páginas 295-302.	05.11.2008

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

La solicitud se refiere al uso de compuestos aminopiridínicos de fórmula general I y de los complejos metálicos que incluyen dichos compuestos I como ligandos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades parasitarias. Se refiere igualmente a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos I y al complejo de Mn  $\{[(1R,2R)\text{-}N1,N2\text{-bis}((4\text{-metoxi-}3,5\text{-dimetilpiridin-}2\text{-il)metil)N1,N2\text{-dimetilciclohexano-}1,2\text{-diamina})\text{MnII}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ .

El documento D01 divulga aminopiridinas de fórmula concordante con la que presentan los compuestos de fórmula general I definidos en la reivindicación 1 de la solicitud, así como los correspondientes complejos de Fe de dichas aminopiridinas. Divulga en concreto los complejos de Fe  $\{[(1R,2R)\text{-}N1,N2\text{-bis}((4\text{-metoxi-}3,5\text{-dimetilpiridin-}2\text{-il)metil)N1,N2\text{-dimetilciclohexano-}1,2\text{-diamina})\text{FeII}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$  y  $\{[2,2'\text{-}(2R,2'R)\text{-}2,2'\text{-bipirrolidina-}1,1'\text{-diilbis}(\text{metileno})\text{bis}(\text{N,N-dimetilpiridina-}4\text{-amina})\text{FeII}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ , utilizándose dichos complejos como catalizadores en la epoxidación estereoselectiva de alquenos (Resumen, Esquema 2).

El documento D02 divulga bipyrrrolidinasdiaminas concordantes con las de fórmula general I definidas en la solicitud y complejos de manganeso donde los ligandos son dichas bipyrrrolidinasdiaminas. Los complejos de manganeso catalizan con alta enantioselectividad la epoxidación de alquenos (Resumen, esquema 1).

El documento D03 divulga aminopiridinas de fórmula 1-5 concordantes con los compuestos de fórmula general I definidos en la solicitud y complejos de manganeso que incorporan dichos compuestos como ligandos  $[\text{LMnII}(\text{OTf})_2]$ . Los complejos de manganeso actúan como catalizadores en la epoxidación estereoselectiva de alquenos (Resumen, Esquema 1).

Los documentos D04, D05 y D06 divulgan el uso de complejos de níquel de derivados de triazolopyrimidina (D04: Resumen, Figura 1), de derivados benzo[g]phthalazinas de fórmula 1-6 (D05: Resumen, Figura 3) y de compuestos benzilidenecarbohidrazidas de fórmula 6a-z (Resumen, Tabla 1) para el tratamiento de la leishmaniosis.



Ninguno de dichos documentos divulgan ni dirigen al experto en la materia hacia el uso de compuestos aminopiridínicos como los de fórmula general I definidos en la solicitud y sus correspondientes complejos metálicos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades parasitarias, ni hacia composiciones farmacéuticas que comprendan dichos compuestos. Igualmente no se ha encontrado divulgado el complejo de Mn  $[\{(1R,2R)\text{-}N1,N2\text{-bis}((4\text{-metoxi-}3,5\text{-dimetilpiridin-}2\text{-il)metil)N1,N2\text{-dimetilciclohexano-}1,2\text{-diamina}\}MnII](CF_3SO_3)_2$ , no habiéndose encontrado indicios en el estado de la técnica que dirijan al experto en la materia hacia dicho complejo de Mn.

Por lo tanto, la invención definida en las reivindicaciones 1-24 de la solicitud es nueva y posee actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).