

Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica



TESIS DOCTORAL

**NUEVOS PIRIDOFANOS SIMÉTRICOS CON
ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y
LEISHMANICIDA**

Verónica Gómez Pérez
Granada 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Verónica Gómez Pérez
D.L.: GR 188-2014
ISBN: 978-84-9028-708-8



Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica
Universidad de Granada



Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra"
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

NUEVOS PIRIDOFANOS SIMÉTRICOS CON ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y LEISHMANICIDA

Directores de la Tesis

Dr. Joaquín M. Campos Rosa

Dr. Francisco Gamarro Conde

Memoria presentada por la licenciada **Verónica Gómez Pérez** para optar al grado de doctor con mención internacional por la Universidad de Granada.

Junio 2013

La doctoranda **Verónica Gómez Pérez** y los directores de la tesis **Joaquín María Campos Rosa** y **Francisco Gamarro Conde** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 7 de Junio de 2013

Directores de la Tesis

Fdo.: **Joaquín María Campos Rosa**
Catedrático de Química Farmacéutica y
Orgánica.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada

Fdo.: **Francisco Gamarro Conde**
Investigador Científico del CSIC.
Instituto de Parasitología y Biomedicina
López-Neyra.
Consejo Superior de Investigaciones
Científicas

Doctoranda

Fdo.: **Verónica Gómez Pérez**

El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado gracias a la concesión de una ayuda ‘Beca-Contrato FPU del Plan Propio 2009’ concedida por la Universidad de Granada, y de una ayuda ‘Ayuda de Posgrado para la Formación de Profesorado Universitario’ concedida por el Ministerio de Educación (AP2009-3910).

La estancia en el ‘Max Planck Institute for Biophysical Chemistry’ de Göttingen (Alemania) ha sido financiada por el programa de Acciones Integradas (HD2008-0028) del Ministerio de Ciencia e Innovación. La estancia en el ‘Department of Chemistry’ de la ‘University of Oxford’ ha sido realizada gracias a la ayuda para estancias breves de las ayudas predoctorales de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación.

Parte de los resultados de esta Memoria han sido publicados en:

Gómez-Pérez, Verónica; McSorley, Theresa; See Too, Wei Cun; Konrad, Manfred; Campos, Joaquín M. **Novel 4-Amino Bis-pyridinium and Bis-quinolinium Derivatives as Choline Kinase Inhibitors with Antiproliferative Activity against the Human Breast Cancer SKBR-3 Cell Line.** *ChemMedChem* **2012**, 7, 663-669.

Gamarro Conde, Francisco; Castanys Cuello, Santiago; García Hernández, Raquel; Manzano González, José I.; Campos Rosa, Joaquín M.; Gómez Pérez, Verónica. **Derivados Ciclofánicos de bis-Piridinio como Fármacos Anti-Protozoarios.** N.º de solicitud: **P201231534**. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 05/10/2012. Entidad titular: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Universidad de Granada.

A mis padres y mi hermano.

A mi abuelita y mi tita, siempre en mi memoria.

“Todo lo que hagas en la vida será insignificante,
pero es muy importante que lo hagas”.

Mahatma Gandhi

Agradecimientos

Esta tesis doctoral refleja sólo parte de lo aprendido durante los últimos cinco años, y llegado este momento, son muchas las personas a las que tengo que agradecer que todo esto haya sido posible.

A Joaquín, que me ha enseñado que el doctorado no es sino un proceso de aprendizaje, y ha contribuido a que realmente lo sea, gracias por darme la autonomía y la ayuda en el equilibrio justo que yo necesitaba.

A Paco, que me acogió en su grupo y desde el primer día me hizo sentir parte de él, gracias por abrirme las puertas a la parasitología y a la biología en general.

A D. Antonio Espinosa, por mostrarme por primera vez el mundo de la investigación y por ofrecerme la oportunidad de formar parte de él.

A Ana, que me acompañó desde mis primeros pasos en el laboratorio; gracias por todo lo que he aprendido sólo con escucharte, porque sólo unos minutos de conversación contigo me ayudan a esclarecer mis ideas y poder continuar.

A Eugenia, mi compañera, mi amiga. Gracias por alegrar cada uno de mis días, por hacer que siempre mereciera la pena ir al laboratorio. Por mostrarme que la pasión por el trabajo es totalmente compatible por la pasión por la vida y por recordarme siempre cuáles son las cosas que realmente importan.

A Manme, por ayudarme a descubrir que la felicidad está siempre a nuestro alcance.

A Lourdes, por conseguir que los días duros en el laboratorio terminaran bien, por compartir nuestros problemas de química y todos los demás.

A Olga, por escuchar siempre. Por ayudarme a buscar soluciones en tantas horas en comedores.

A Belén, por compartir conmigo una visión del trabajo en el laboratorio, y algún que otro matraz.

A Lucía, por ser un ejemplo de trabajo.

A todos los miembros del grupo de investigación, D. Miguel Ángel, Antonio Entrena, Encarna, Dori, Carlota, María José, y a los profesores de Química Orgánica. También a Antonio y a Luis. Gracias a todos por estar siempre dispuestos a ayudarme.

Y por supuesto a los becarios con los que he compartido mucho tiempo y poco espacio, Mariam, Ester, Santi, Fátima, Ana María, Sonia, Vito, Javi y a los que han estado menos tiempo pero han dejado su huella, Ester, Cayetana, Angélica. A los estudiantes italianos que nos han acompañado por épocas, por traernos aire nuevo, y sobre todo a Antonio.

A la gente del López-Neyra. A Santiago, por enseñarme este área nueva para mí, por dar solución a tantas preguntas. A Nacho, por guiarme en cada paso que he dado, por su paciencia y su toque de humor. A Raquel por ayudarme siempre con una sonrisa, por pararse siempre a explicarme cualquier duda. A todos los demás del 203/204 y 208, Sebas, María, David, Talía, Rubén, Marta, María y Fran, por hacerme sentir una más.

A todos los técnicos del Centro de Instrumentación Científica y del Instituto López-Neyra, que con su trabajo facilitan el nuestro.

Al Dr. Manfred Konrad, por darme la oportunidad de vivir una experiencia nueva, y a su grupo de investigación de Göttingen, Andrej, Theresa, Stephan y Ursula, por su apoyo y paciencia. A los ‘chicos’ del grupo Jovin: Lisandro, Elisa, Anthony, Pieter, Ragu, Vova, Dima, Ivona y Sebas, por hacer esa experiencia inolvidable.

Al Dr. Chris Schoffiel, por aceptarme en su grupo, en el que descubrí que no estamos tan lejos de una investigación de primera, que sólo nos faltan medios. A todas las personas del CJS group, en especial a los del LG-1, por prestarme siempre ayuda en el laboratorio. Al grupo de españoles de Oxford, que me hacían ver que no estaba tan lejos de casa. Y a Elena, por acogerme en su casa y en su vida, por guiarme por el laboratorio y por la ciudad, porque nunca me sentí sola.

A mi familia y amigos, por apoyarme sin necesidad de entenderme. A mis primas, por estar a mi lado cuando las he necesitado. A mi hermano, por creer en mí incluso cuando yo no lo hacía. A mis padres, por darme todas las herramientas necesarias para la vida; la libertad de decidir y la educación para hacerlo bien; porque todo lo que soy os lo debo.

A todas las personas que han pasado por mi vida estos años, en lo profesional y en lo personal, porque de todos he aprendido algo que me ha permitido llegar hoy aquí.

GRACIAS.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	XI
1. Introducción.....	3
1.1. Cáncer.....	5
1.1.1. Consideraciones generales.....	5
1.1.2. Metabolismo lipídico en cáncer.....	7
1.1.3. Colina quinasa (ChoK).....	8
1.1.3.1. Caracterización bioquímica.....	8
1.1.3.2. ChoK y cáncer.....	10
1.1.3.3. Inhibidores de ChoK.....	12
1.1.3.4. Farmacomodulación del HC-3.....	12
1.1.3.4.1. Modificaciones de la cabeza catiónica.....	13
1.1.3.4.2. Compuestos mitad.....	14
1.1.3.4.3. Modificaciones de la cabeza catiónica y el espaciador manteniendo la distancia entre las cabezas catiónicas.....	15
1.1.3.4.4. Influencia del espaciador.....	16
1.1.3.4.5. Compuestos bisquinolínicos.....	17
1.1.3.4.6. Compuestos triscatiónicos.....	18
1.1.3.4.7. Aumento de la rigidez: compuestos ciclofanos y bisciclofanos.....	19
1.1.3.4.8. Compuestos asimétricos.....	21
1.1.3.5. Mecanismo de inhibición de la actividad ChoK.....	22
1.2 Leishmaniasis.....	25
1.2.1. Consideraciones generales.....	25
1.2.2. El parásito <i>Leishmania</i>	26
1.2.2.1. Morfología y ciclo de vida.....	27
1.2.2.2. Biología y bioquímica del parásito.....	29
1.2.3. Manifestaciones clínicas de la enfermedad.....	33
1.2.4. Tratamiento de la leishmaniasis.....	34
1.2.4.1. Antimoniales pentavalentes.....	34
1.2.4.2. Anfotericina B.....	36
1.2.4.3. Miltefosina.....	37
1.2.4.4. Paromomicina.....	39
1.2.4.5. Terapia combinada.....	40

1.2.4.6. Otros fármacos leishmanicidas	41
1.2.4.6.1. Pentamidina	41
1.2.4.6.2. Sitamaquina	42
1.2.4.6.3. Alopurinol	42
1.2.4.6.4. Azoles	43
1.2.4.7. Principales problemas de la quimioterapia frente a la leishmaniasis	43
1.2.4.8. Potenciales fármacos leishmanicidas	45
2. Objetivos	49
3. Resultados y Discusión	53
3.1. Parte 1: Compuestos bispiridínicos abiertos	55
3.1.1. Química	55
3.1.1.1. Síntesis de espaciadores	57
3.1.1.2. Síntesis de las piridinas sustituidas en posición 4	58
3.1.1.3. Síntesis de las quinolinas sustituidas en posición 4	59
3.1.1.4. Síntesis de los compuestos finales bispiridínicos abiertos	60
3.1.2. Ensayos biológicos	61
3.1.2.1. Ensayos de actividad antiproliferativa	61
3.1.2.2. Estudios con la enzima ChoK humana	63
3.1.2.2.1. Purificación de la enzima	63
3.1.2.2.2. Ensayos de actividad quinasa	64
3.1.2.2.3. Estudios de inhibición	66
3.1.2.3. Ensayos de actividad leishmanicida	70
3.1.2.3.1. Ensayos de sensibilidad en formas promastigotas y amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i>	70
3.1.2.3.2. Estudio del mecanismo de acción del compuesto VGP-106 en promastigotes de <i>L. donovani</i>	76
3.1.2.3.3. Obtención de parásitos transfectados con el gen CEK o EK	76
3.1.2.3.4. Ensayo de sensibilidad de los promastigotes transfectados frente al compuesto VGP-106	79
3.1.2.3.5 Mecanismo de entrada y acumulación del compuesto VGP-106 en <i>L. donovani</i>	81

3.1.2.3.6. Efecto sobre la morfología ultraestructural de <i>L. donovani</i>	83
3.1.2.3.7. Efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial.....	86
3.1.2.3.8. Efecto sobre los niveles de ATP libre intracelular.....	87
3.1.2.3.9. Efecto sobre la integridad de la membrana plasmática.....	89
3.1.2.3.10. Detección de especies de oxígeno reactivas.....	91
3.1.2.3.11. Medida del calcio libre intracelular.....	92
3.1.2.3.12. Análisis del contenido en ADN.....	93
3.1.3. Discusión de la parte 1.....	95
3.2. Parte 2: Ciclofanos bispíridínicos.....	101
3.2.1. Química.....	101
3.2.1.1. Síntesis de las diaminas bispíridínicas intermedias.....	102
3.2.1.2. Síntesis de los compuestos finales ciclofanos bispíridínicos.....	103
3.2.2. Ensayos biológicos.....	104
3.2.2.1. Ensayos de actividad antiproliferativa.....	104
3.2.2.2. Ensayos de actividad leishmanicida.....	105
3.2.2.2.1. Ensayos de sensibilidad y toxicidad en formas promastigotas y amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i>	105
3.2.2.2.2. Ensayos de sensibilidad en formas promastigotas de <i>Leishmania</i> transfectadas con pXG-CEKm y pXG-EK.....	107
3.2.2.2.3. Efecto del compuesto VGP-318 en el metabolismo de <i>Leishmania</i>	108
3.2.3. Discusión de la parte 2.....	112
3.3. Consideraciones finales y perspectivas futuras.....	115
4. Parte experimental.....	119
4.1. Química.....	119
4.1.1. Condiciones generales.....	119
4.1.2. Materias primas.....	121
4.1.2.1. Síntesis de los espaciadores dibromados.....	121
4.1.2.1.1. Síntesis de 3,3'-bis(bromometil)bifenilo 36	121
4.1.2.1.2. Método general para la síntesis de los derivados del [bis(p-bromometil)fenil]alquilo.....	121
4.1.2.1.2.1. Síntesis de 4,4'-bis(bromometil)bifenilo 37	122

4.1.2.1.2.2. Síntesis de bis-p-(bromometil)bibencilo 38	122
4.1.2.1.2.3. Síntesis de 1,4-bis[p-(bromometil)fenil]butano 39	122
4.1.2.2. Síntesis de 4-perhidroazepinopiridina 40	123
4.1.2.3. Síntesis de las diaminas bispiridínicas.....	124
4.1.2.3.1. Síntesis de dibromhidrato de 1,3-bis[(piridin-4-il)aminometil]benceno 47	124
4.1.2.3.2. Síntesis de dibromhidrato de 1,4-bis[(piridin-4-il)aminometil]benceno 48	124
4.1.3. Nuevas experiencias y síntesis de compuestos intermedios.....	125
4.1.3.1. Síntesis de las piridinas sustituidas en posición 4.....	125
4.1.3.1.1. Síntesis de 4-(4-bromo-N-metilanilino)piridina 41	125
4.1.3.1.2. Síntesis de 4-(4-trifluorometil-N-metilanilino)piridina 42	126
4.1.3.2. Síntesis de las quinolinas sustituidas en posición 4.....	127
4.1.3.2.1. Síntesis de 7-cloro-4-perhidroazepinoquinolina 44	127
4.1.3.2.2. Síntesis de 4-(4-cloroanilino)quinolina 45	128
4.1.3.2.3. Síntesis de 4-(4-yodoanilino)quinolina 46	129
4.1.3.3. Síntesis de las diaminas bispiridínicas.....	130
4.1.3.3.1. Síntesis de N,N'-bis-[(4-piridil)pentano]-1,5-diamina 49	130
4.1.3.3.2. Síntesis de bis-[2-(4-piridil)aminoetil]éter 50	131
4.1.4. Productos finales.....	132
4.1.4.1. Método general para la síntesis de los compuestos biscatiónicos abiertos.....	132
4.1.4.1.1. Dibromuro de 1,1'-(bifenil-4,4'-diilmetilén)bis[4-(4- bromo-N-metilanilino)piridinio] VGP-106	133
4.1.4.1.2. Dibromuro de 1,1'-(bifenil-4,4'-diilmetilén)bis[4-(4- trifluorometil-N-metilanilino)piridinio] VGP-114	134
4.1.4.1.3. Dibromuro de 1,1'-[(Butano-1,4-bis(benceno-1,4-diilmetilén)] bis[4-(4-bromo-N-metilanilino)piridinio] VGP-118	135
4.1.4.1.4. Dibromuro de 1,1'-(bifenil-3,3'-diilmetilén)bis[4-(4- trifluorometil-N-metilanilino)piridinio] VGP-130	136
4.1.4.1.5. Dibromuro de 1,1'-(benceno-1,4-diilmetilén)bis[4- (perhidroazepin-1-il)piridinio] VGP-138	137

4.1.4.1.6. Dibromuro de 1,1'-[butano-1,4-bis(benceno-1,4-diilmetilén)] bis[4-(perhidroazepin-1-il)-7-cloroquinolinio] VGP-146	138
4.1.4.1.7. Dibromuro de 1,1'-(bifenil-3,3'-diilmetilén)bis[4- (perhidroazepin-1-il)-7-cloroquinolinio] VGP-150	139
4.1.4.1.8. Dibromuro de 1,1'-[etilénbis(benceno-1,4-diilmetilén)] bis[4-(perhidroazepin-1-il)-7-cloroquinolinio] VGP-162	140
4.1.4.1.9. Dibromuro de 1,1'-(benceno-1,3-diilmetilén)bis[4-(4- cloroanilino)quinolinio] VGP-174	141
4.1.4.1.10. Dibromuro de 1,1'-(benceno-1,3-diilmetilén)bis[4-(4- yodoanilino)quinolinio] VGP-182	142
4.1.4.2. Método general para la síntesis de los compuestos ciclofanos	143
4.1.4.2.1. Dibromuro de 2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,3)- bencenaciclododecafan-11,71-bis(ilio) VGP-222	144
4.1.4.2.2. Dibromuro de 10-oxa-2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,3)- bencenaciclododecafan-11,71-bis(ilio) VGP-234	145
4.1.4.2.3. Dibromuro de 2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,4)- bencenaciclododecafan-11,71-bis(ilio) VGP-310	146
4.1.4.2.4. Dibromuro de 10-oxa-2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,4)- bencenaciclododecafan-11,71-bis(ilio) VGP-312	147
4.1.4.2.5. Dibromuro de 2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinacicotetradecafan- 11,91-bis(ilio) VGP-318	148
4.1.4.2.6. Dibromuro de 9-oxa-6,12-diaza-1,5(1,4)-dipiridina-3(1,3)- bencenaciclododecafan-11,51-bis(ilio) VGP-328	149
4.1.4.2.7. Dibromuro de 5-oxa-2,8-diaza-1,9(4,1)- dipiridinacicotetradecafan- 11,91-bis(ilio) VGP-334	150
4.1.4.2.8. Dibromuro de 5,12-dioxa-2,8-diaza-1,9(4,1)- dipiridinacicotetradecafan-11,91-bis(ilio) VGP-340	151
4.1.4.2.9. Dibromuro de 12-oxa-2,8-diaza-1,9(4,1)- dipiridinacicotetradecafan-11,91-bis(ilio) VGP-352	152
4.2. Ensayos biológicos	153
4.2.1. Materiales	153
4.2.1.1. Líneas celulares	153
4.2.1.1.1. Parásitos	153

4.2.1.1.2. Bacterias.....	153
4.2.1.1.3. Células de mamífero.....	153
4.2.1.2. Medios de cultivo.....	154
4.2.1.2.1. Para <i>Leishmania</i>	154
4.2.1.2.2. Para bacterias.....	155
4.2.1.2.3. Para células.....	155
4.2.1.3. Tampones y soluciones.....	155
4.2.1.4. Vectores plasmídicos.....	156
4.2.1.4.1. Vectores de clonaje.....	156
4.2.1.4.2. Vectores de expresión.....	156
4.2.1.5. Oligonucleótidos.....	156
4.2.1.6. Reactivos de biología molecular.....	158
4.2.2. Métodos.....	159
4.2.2.1. Cultivo y manipulación de parásitos.....	159
4.2.2.1.1. Cultivo y mantenimiento.....	159
4.2.2.1.2. Determinación de la sensibilidad a los compuestos en formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	159
4.2.2.1.3. Determinación de la sensibilidad a los compuestos en formas amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i>	160
4.2.2.1.4. Transfección de parásitos.....	161
4.2.2.1.5. Determinación de la cinética de entrada y acumulación de VGP-106 en <i>Leishmania</i>	161
4.2.2.1.6. Medida de ATP.....	162
4.2.2.1.7. Determinación del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m).....	162
4.2.2.1.8. Determinación del potencial de membrana plasmática (Ψ_p).....	162
4.2.2.1.9. Determinación del cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática.....	163
4.2.2.1.10. Detección de la producción de ROS mitocondrial.....	163
4.2.2.1.11. Medida del calcio libre intracelular.....	163
4.2.2.1.12. Análisis del contenido de ADN.....	164
4.2.2.1.13. Microscopía electrónica de transmisión.....	164
4.2.2.2. Cultivo y manipulación de bacterias.....	165
4.2.2.2.1. Cultivo.....	165

4.2.2.2.2. Preparación de células electrocompetentes por choque térmico y transformación.....	165
4.2.2.3. Cultivo y manipulación de células.....	166
4.2.2.3.1. Cultivo de la línea celular mielomonocítica humana THP-1.....	166
4.2.2.3.2. Cultivo de la línea SKBR-3.....	166
4.2.2.3.3. Cultivo de la línea MCF-7.....	166
4.2.2.3.4. Ensayos de proliferación celular.....	167
4.2.2.3.5. Toxicidad celular.....	167
4.2.2.4. Ensayos enzimáticos.....	167
4.2.2.4.1. Expresión y purificación enzimática.....	167
4.2.2.4.2. Ensayos de actividad enzimática.....	168
4.2.2.4.3. Ensayos de inhibición enzimática.....	169
4.2.2.4.4. Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE.....	169
4.2.2.5. Manipulación de ácidos nucleicos.....	170
4.2.2.5.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción.....	170
4.2.2.5.2. Reacción de ligación.....	170
4.2.2.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	171
4.2.2.5.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	171
4.2.2.5.5. Secuenciación del ADN.....	171
4.2.2.5.6. Mutagénesis dirigida.....	172
4.2.2.5.7. Análisis del ARN aislado (RT-PCR).....	172
4.2.2.6. Análisis estadístico.....	173
5. Summary.....	177
5.1. Introduction.....	177
5.1.1. Cancer.....	177
5.1.2. Leishmaniasis.....	180
5.2. Aims.....	183
5.3. Results and Discussion.....	183
5.3.1. Bispyridinic compounds.....	183
5.3.1.1. Chemistry.....	183
5.3.1.2. Biological assays.....	185
5.3.1.2.1. Antiproliferative activity.....	185

5.3.1.2.2. Inhibition of ChoK.....	185
5.3.1.2.3. Antileishmanial activity.....	187
5.3.2. Bispyridinic Cyclophanes.....	192
5.3.2.1. Chemistry.....	192
5.3.2.2. Biological assays.....	194
5.3.2.2.1. Antiproliferative activity.....	194
5.3.2.2.2. Antileishmanial activity.....	194
6. Conclusiones.....	199
Conclusions.....	201
7. Bibliografía.....	205
Anexo I: Caracterización estructural de los compuestos finales.....	225
Anexo II: Publicaciones.....	247
Artículo <i>ChemMedChem</i> 2012.....	247
Patente P201231534.....	255

Lista de Abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CCCP	Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
CEK	Colina/etanolamina quinasa
ChoK	Colina quinasa
CI ₅₀	Concentración inhibitoria del 50% de crecimiento
CLT-1	Transportador específico de colina
CPT	DAG-colina fosfotransferasa
CT	CDP-fosforilcolina citidiltransferasa
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético
EK	Etanolamina quinasa
FCCP	Carbonilcianida p-trifluorometoxifenilhidrazona
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GST	Glutación- <i>S</i> -transferasa
HC	Hemicolinio
HRMS	Masas de alta resolución
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalacto-piranósido
iSBF	Suero bovino fetal inactivado por calor
k _{cat}	Constante catalítica
K _i	Constante de inhibición
K _M	Constante de Michaelis
KO	Knock out
LC	Leishmaniasis cutánea
LDH	Lactato-deshidrogenasa

LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LPA	Ácido lisofosfatídico
LV	Leishmaniasis visceral
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio
PA	Ácido fosfatídico
PAP	Fosfohidrolasa del ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PCD	Muerte celular programada
PCho	Fosfocolina
PC-PLD	Fosfolipasa D específica de PC
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEt	Fosfoetanolamina
PET	Tomografía por emisión de positrones
PK	Piruvato quinasa
PKDL	Leishmaniasis post-kala-azar
PLA2	Fosfolipasa A2
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
QSAR	Relaciones cuantitativas estructura-actividad
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
S _N Ar	Sustitución Nucleofílica Aromática
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
V _{máx}	Velocidad máxima

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción.

Resumen.

La búsqueda de fármacos frente a las enfermedades que afectan al hombre constituye una de las prioridades de la investigación en biomedicina, debido al reto que nos encontramos ante la inespecificidad, toxicidad, elevado coste y la resistencia a los fármacos disponibles frente a enfermedades como cáncer e infecciones parasitarias.

En el término **cáncer** se incluyen más de 200 enfermedades, caracterizadas por el crecimiento anómalo y descontrolado de las células. Las células contienen diferentes genes implicados en la regulación de la proliferación celular, como son los protooncogenes, que activan el crecimiento, y los genes supresores de tumores, que lo inhiben. Para que un tumor se desarrolle, deben ocurrir mutaciones en varios de estos genes.

Aunque cada cáncer tiene unas características únicas, los procesos básicos que los originan son muy similares. Además, los diferentes tipos de cáncer comparten una serie de características moleculares, bioquímicas y celulares comunes. Frecuentemente, las células cancerosas presentan alteraciones a nivel del metabolismo fosfolipídico, lo que da lugar a un desequilibrio de metabolitos lipídicos.

Colina quinasa (ChoK) es una enzima clave en la síntesis de fosfolípidos, que constituyen los componentes esenciales de la membrana celular. Uno de los miembros de la familia, colina quinasa α (ChoK α) está implicada en la regulación de la proliferación celular, transformación oncogénica y carcinogénesis, por lo que esta enzima ha sido considerada como una potencial diana para el desarrollo de nuevos fármacos frente al cáncer. Por ello, en nuestro grupo se ha desarrollado un proceso de diseño y síntesis de diversos inhibidores de ChoK que se basa en modificaciones estructurales del primer inhibidor de ChoK conocido: el hemicolinio-3 (HC-3).

Por otro lado, aunque pueda parecer una paradoja, bajo el término enfermedades olvidadas se engloban algunas de las patologías infecciosas que más matan en el mundo, desde la malaria hasta la úlcera de Buruli. Estas dolencias no están olvidadas por los millones de pacientes que las padecen, ni por los Gobiernos de los países donde se concentran. El desarrollo de nuevos fármacos para estas enfermedades es la clave para su superación, pero la inversión en este campo es mínima. La **leishmaniasis** es una de estas enfermedades olvidadas y representa un conjunto de enfermedades producidas por unas 20 especies del parásito protozoo *Leishmania*. Sin un tratamiento adecuado, la leishmaniasis visceral puede ser mortal, de modo que cada año mueren más de 50 mil personas, y se calcula que hay unos 350 millones en riesgo de padecer la enfermedad. De ahí la necesidad de encontrar un tratamiento eficaz y de bajo coste, al que puedan acceder todas las personas de las regiones endémicas.

El parásito *Leishmania* presenta dos formas morfológicamente distintas: una forma flagelada móvil (forma promastigota) presente en el insecto vector y una forma intracelular no flagelada (forma amastigota) presente en el hospedador mamífero. Las infecciones humanas con estos parásitos son transmitidas por la picadura de un insecto, y pueden producir diferentes formas clínicas de la enfermedad, entre ellas la leishmaniasis visceral, cutánea o mucocutánea.

El arsenal de fármacos recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) frente a la enfermedad está reducido a 4 fármacos: antimoniales pentavalentes, anfotericina B, miltefosina y paromomicina. A este inconveniente del bajo número de fármacos disponibles debemos añadir el significativo coste de los fármacos, su toxicidad y el incremento en el fallo terapéutico, lo que subraya la importancia y necesidad de desarrollar nuevos fármacos leishmanicidas más específicos y de bajo coste, frente a los que el parásito no sea capaz de desarrollar resistencias. Actualmente, existe una significativa actividad en programas de cribado de fármacos, pero la realidad es que no existe ningún fármaco leishmanicida en fase clínica III. Se estima que hace falta más de 10 años para que salga al mercado un nuevo fármaco. En este escenario, las estrategias terapéuticas van dirigidas hacia estimular por un lado la investigación de nuevos fármacos leishmanicidas, incluyendo la reposición de fármacos empleados para otras enfermedades, y por otro lado al uso de combinaciones de los fármacos actualmente disponibles.

1.1. Cáncer.

1.1.1. Consideraciones generales.

El cáncer es un conjunto de enfermedades en el que las células se dividen de forma descontrolada y pueden diseminarse a otras partes del cuerpo, por el sistema sanguíneo y por el sistema linfático, e invadir otros tejidos¹.

El cáncer es un problema de salud de primer orden en Europa donde, aunque las tasas de incidencia específicas por edad se mantienen estables, el número total de casos aumenta lentamente, debido a los avances en técnicas diagnósticas y sobre todo al envejecimiento de la población. En 2008 se diagnosticaron aproximadamente 3,2 millones de nuevos casos de cáncer en Europa, lo que supone un aumento del número anual de nuevos casos de cáncer del orden de 300.000 casos desde 2004².

El cáncer es la segunda causa de mortalidad en Europa y Estados Unidos, por detrás de las enfermedades cardiovasculares, y la tercera causa de mortalidad a nivel mundial, tras las enfermedades infecciosas y parasitarias (Figura 1.1). Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos moleculares del cáncer ha permitido que la tasa de supervivencia del cáncer a 5 años en Estados Unidos aumente de un 38% al final de la década de 1960 a un 68% en 2005³, y se estima que esa tasa aumente hasta el 80% en 2015⁴.

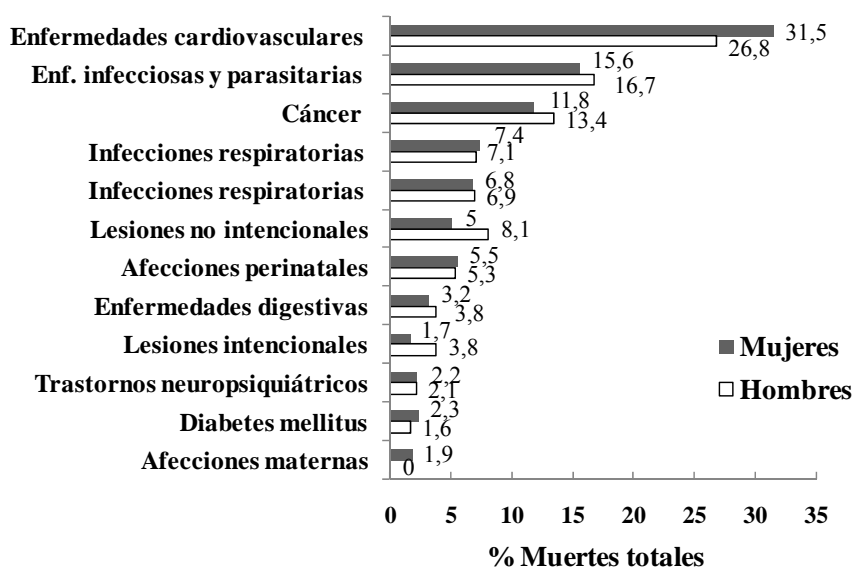


Figura 1.1. Distribución de las causas de mortalidad a nivel mundial⁵.

El cáncer es una enfermedad muy compleja que presenta una gran variedad de alteraciones en múltiples genes. Actualmente se han observado mutaciones en unos 500 genes en tumores humanos, lo que supone casi el 2% de los genes del genoma humano. El desarrollo de un tumor necesita de alteraciones secuenciales de varios genes, producidas en general por distintos agentes carcinogénicos. Estas alteraciones generan una inestabilidad genética que puede activar oncogenes o silenciar genes supresores de tumores⁶.

Los oncogenes son genes anormales que proceden de la mutación de un protooncogén y su principal función es la transformación de una célula normal en una maligna que desarrollará un determinado tumor. Los genes supresores de tumores, por el contrario, contribuyen al cáncer cuando las mutaciones los silencian, ya que en condiciones normales su función es la de impedir el crecimiento desmesurado. Muchos protooncogenes codifican proteínas que participan en cadenas moleculares de transmisión de señales estimuladoras de crecimiento, por lo que algunos oncogenes perturban la cascada de señales en algún punto del citoplasma.

A pesar de la gran diversidad y plasticidad de las células cancerosas, se han establecido una serie de características comunes a todos los tipos de cáncer, las llamadas “hallmarks” del cáncer, que se definen como capacidades que van adquiriendo las células a medida que evolucionan desde células normales a células tumorales y que les permiten convertirse en tumorigénicas y en última instancia en células malignas⁷ (Figura 1.2).

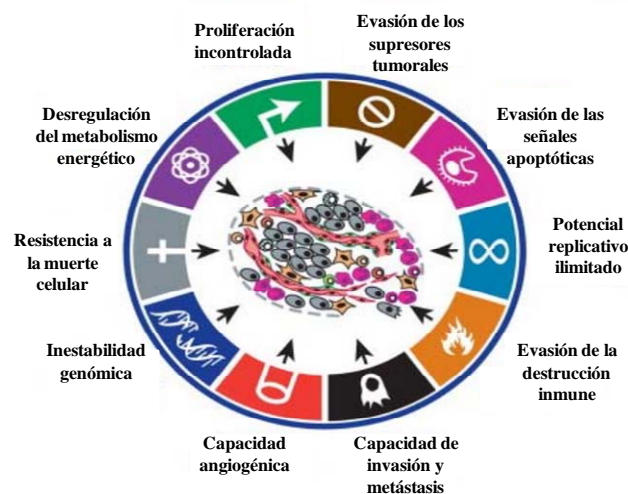


Figura 1.2. Hallmarks del cáncer⁷. Capacidades que van adquiriendo las células normales y que les permiten convertirse en células tumorales.

1.1.2. Metabolismo lipídico en cáncer.

Una de las alteraciones comunes en distintos tipos de tumores es la activación del metabolismo de la colina, caracterizada por un incremento de los niveles de fosfocolina (*PCho*), como muestran los estudios espectroscópicos de resonancia magnética^{8,9}. La *PCho* es un precursor en la síntesis de fosfatidilcolina (PC), el fosfolípido más abundante de la membrana celular de eucariotas, presente también en la de algunos procariontas. Su biosíntesis se lleva a cabo mediante la llamada ruta de Kennedy¹⁰, que comienza con la entrada de colina a través de la membrana plasmática mediante difusión pasiva o mediante el transportador específico de colina (CLT-1). Una vez dentro de la célula, la colina se fosforila por la acción de colina quinasa (ChoK), dando lugar a *PCho*, que se convierte en CDP-colina mediante la acción de la CDP-fosforilcolina citidiltransferasa (CT). A continuación la enzima DAG-colina fosfotransferasa (CPT) transforma la CDP-colina en PC, que es hidrolizada por la fosfolipasa D específica de PC (PC-PLD) para generar colina y ácido fosfatídico (PA), cerrándose de este modo el ciclo (Figura 1.3).

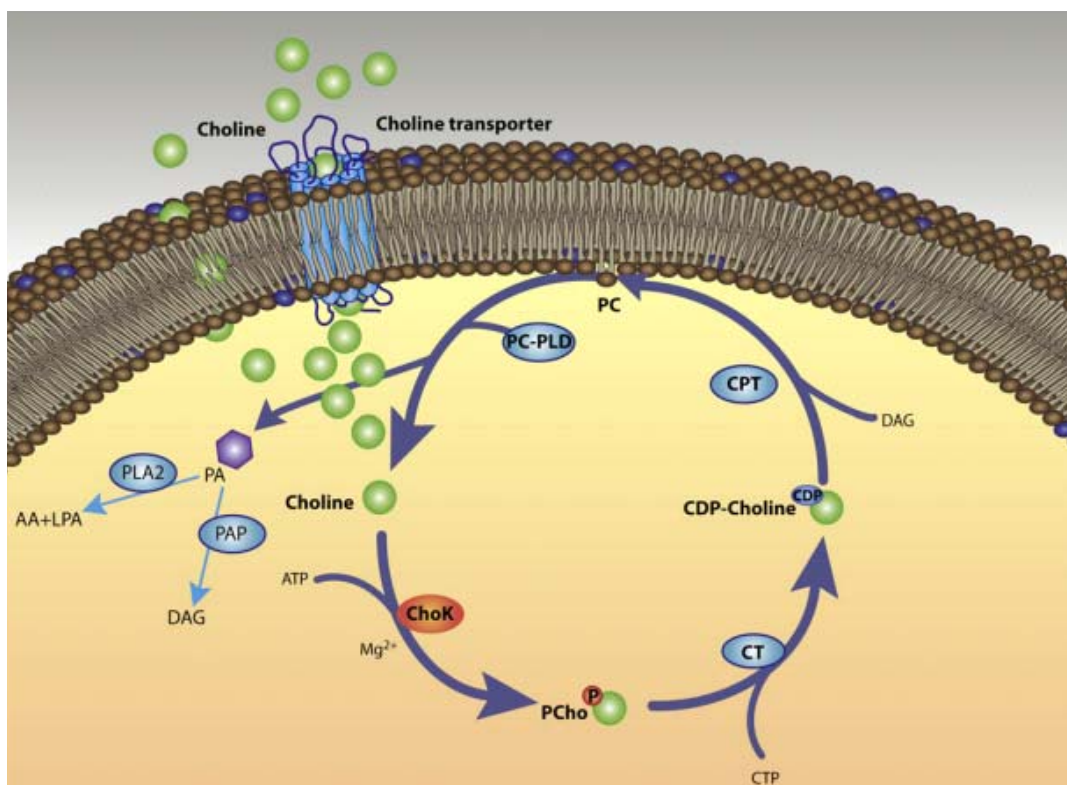


Figura 1.3. Ruta de Kennedy para la biosíntesis de PC¹¹.

Además de su función estructural como precursor de los componentes de la membrana celular, se ha demostrado la implicación de los metabolitos fosfolipídicos y sus derivados en diferentes rutas de señalización mitogénicas¹². De hecho varios productos del metabolismo de colina, como la *PCho* y el diacilglicerol (DAG) pueden actuar como segundos mensajeros esenciales para la transmisión de la señal mitogénica^{13,14}. En este sentido, la PC puede considerarse una fuente de segundos mensajeros lipídicos, ya que genera PA, que puede ser hidrolizado hasta DAG por la fosfohidrolasa del ácido fosfatídico (PAP) o desacetilado mediante la fosfolipasa A2 (PLA2) para dar ácido lisofosfatídico (LPA) y ácido araquidónico (AA) (Figura 1.3).

1.1.3. Colina quinasa (ChoK).

1.1.3.1. Caracterización bioquímica.

ChoK es la primera enzima de la ruta de Kennedy para la síntesis de fosfatidilcolina, y cataliza la fosforilación de colina a *PCho* usando ATP como dador de fosfatos y Mg^{2+} como cofactor. Además ChoK puede participar en la biosíntesis de fosfatidiletanolamina (PE), al transformar etanolamina en fosfoetanolamina (*PEt*)¹⁵.

En las células de mamíferos, existen al menos tres isoformas de ChoK que son codificadas por dos genes denominados *chok-α* y *chok-β*. Mientras que *chok-β* codifica para una sola proteína, (ChoKβ, de 395 aminoácidos), *chok-α* se somete a un proceso de corte y empalme alternativo para producir dos isoformas, (ChoKα1, de 439 aminoácidos y α2, de 457 aminoácidos), que se diferencian sólo en la secuencia de 18 aminoácidos presente en ChoKα2¹⁵. ChoKβ se diferencia de las isoformas α aproximadamente en un 40% de su secuencia¹⁵. La existencia de múltiples genes, variantes de empalme y estudios que muestran diferente regulación de las distintas isoformas sugieren que la modulación de la actividad ChoK ocurre principalmente a nivel de la expresión génica¹⁶.

Las isoformas ChoKα y β en mamíferos se expresan de forma ubicua en diferentes tejidos, donde interactúan generando diferentes combinaciones de complejos homodiméricos o heterodiméricos enzimáticamente activos, en una proporción específica para cada tejido¹⁴. Se ha demostrado que sobre el 60% de la actividad ChoK en hígado de ratón se debe a heterodímeros α/β de la enzima¹⁷ y que la actividad específica de los homodímeros α/α puede

ser mucho más alta que la de los dímeros β/β . Los homodímeros de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ presentan una actividad dual ChoK y etanolamina quinasa (EK), con un valor de constante de Michaelis (K_M) más bajo para la colina, que indica mayor afinidad por este sustrato. Sin embargo, el homodímero β/β presenta una actividad predominante EK, mientras que el heterodímero α/β tiene una especificidad de sustrato intermedia^{17,18}. Por tanto, la actividad ChoK en un determinado tipo celular puede regularse no sólo a nivel de cada isoforma, sino también mediante la combinación de las 3 isoformas.

Además de las diferencias en la actividad catalítica, estudios con ratones knock out (KO) han demostrado que las isoformas α y β tienen diferente función biológica. Los ratones KO para ChoK α mueren en el estado embrionario¹⁹, mientras que los KO para ChoK β son viables pero desarrollan distrofia muscular y deformidades óseas^{19,20}.

Estos ratones KO para ChoK β presentan niveles de PC normales en la mayoría de los tejidos, excepto en el músculo esquelético de las extremidades anteriores²⁰, lo que indica que ChoK α es suficiente para mantener la homeostasis en la mayoría de los tejidos. Sin embargo, los ratones heterocigotos nulos para ChoK α presentan una acumulación de colina y un descenso de PCho en hígado y testículos, lo que sugiere que éste es el principal papel de la ChoK α bajo condiciones fisiológicas y que la actividad ChoK β no es suficiente para compensar la biosíntesis de PC o, al menos, para proporcionar los requerimientos normales de PCho. Estos datos reafirman la hipótesis de que ChoK β tiene solo actividad EK. Además los ratones heterocigotos nulos para ChoK α muestran una falta de PE, mientras que los ratones KO para ChoK β , no presentan alteración en los niveles de PE, lo que indica una función dual de ChoK en la biosíntesis de PC y de PE.

ChoK $\alpha 2$ de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) ha sido cristalizada y la topología de esta proteína es notablemente similar a la de otras proteínas quinasa²¹. Aunque el nivel de secuencia de identidad varía entre los miembros de la familia de ChoK, el alto grado de conservación en el motivo Brenner y el motivo ChoK indica una alta semejanza estructural entre las ChoKs (Figura 1.4). Más recientemente se ha publicado la estructura cristalina de ChoK $\alpha 2$ humana, tanto de la proteína sola (forma apo), como en complejo con los ligandos ADP o PCho, revelando importantes detalles de los sitios de unión de ambos sustratos²².

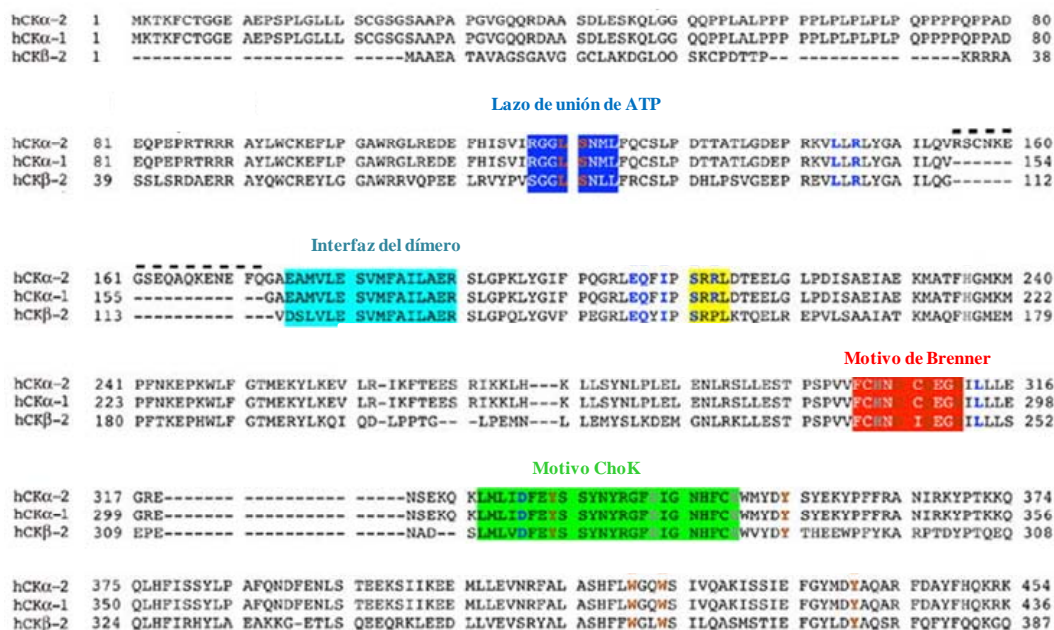


Figura 1.4. Alineación de la secuencia de ChoK α 1, α 2 y β . Los elementos estructurales clave están sombreados en colores²².

1.1.3.2. ChoK y cáncer.

Tanto la enzima ChoK como su producto de reacción, *PCho*, están implicados en procesos de proliferación celular y transformación¹². Se han publicado datos de una actividad ChoK incrementada en cáncer de mama humanos, y se ha observado la sobreexpresión de ChoK en cáncer de pulmón, próstata y colorrectal¹¹.

Las primeras evidencias del papel de ChoK en procesos tumorales surgieron al observar un incremento en los niveles de *PCho* como consecuencia del aumento de la actividad ChoK en transformaciones celulares mediadas por el oncogén *ras*^{23,24}, uno de los oncogenes más importantes implicados en procesos carcinogénicos en humanos. Posteriormente se demostró que la activación de ChoK producida por *ras* está mediada por dos de sus efectores más conocidos: PI3K y Ral-GDS²⁵, lo que sugiere un papel importante de esta enzima en la mitogénesis dependiente de *ras*. Sin embargo, *ras* no es el único oncogén relacionado con la activación de ChoK en condiciones malignas, sino que se ha demostrado que la transformación producida por otros oncogenes, como *src* o *mos*, así como el tratamiento con varios factores de crecimiento, inducen un incremento en la actividad basal de esta enzima^{26,27}.

Se ha demostrado la sobreexpresión de ChoK α , pero no de ChoK β , en varios cultivos celulares tumorales humanos de diversos orígenes, además de en muestras de biopsia de carcinomas de pulmón, colon y próstata, en comparación con sus correspondientes tejidos sanos^{18,28}. Estos estudios sugieren que ChoK α es esencial en la biosíntesis de PC, necesaria para el crecimiento incontrolado de las células tumorales. Además se ha observado un incremento de la actividad ChoK α en cáncer de colon humano²⁹ y en carcinoma de mama humano.³⁰ También se han detectado niveles elevados de PCho en varios tejidos tumorales humanos mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN)^{8,9}. Estos hallazgos sugieren que la expresión y la actividad de ChoK α están directamente relacionadas con un incremento de la proliferación y la malignidad de las células cancerosas, convirtiéndose de este modo en un potencial marcador para el diagnóstico y monitorización de algunos tipos de cáncer, como el de cáncer de pulmón de células no pequeñas³¹. Además mediante la tecnología de tomografía por emisión de positrones (PET), el metabolismo de la colina puede usarse no solo para el diagnóstico de tumores, sino también para monitorizar la respuesta a la terapia farmacológica en pacientes con cáncer de mama³².

Se ha propuesto la inhibición específica de la actividad ChoK como una prometedora estrategia antitumoral³³ y se ha demostrado que compuestos inhibidores de ChoK presentan actividad antiproliferativa *in vitro* e *in vivo*^{34,35}. Se han llevado a cabo estudios con ARN de interferencia, que permite regular la expresión de genes específicos, con los que se ha bloqueado la expresión de ChoK α en células de cáncer de mama, lo que conduce a una reducción en la proliferación y un aumento de la diferenciación³⁶. El bloqueo específico de la expresión de ChoK α promueve la apoptosis y mata selectivamente a las células cancerosas pero no a las células normales^{37,38}.

De este modo queda demostrada la implicación de ChoK α en la patogénesis del cáncer y se propone, tanto el diseño de fármacos inhibidores de su actividad como el bloqueo de su expresión, como estrategia potencial en la terapia anticancerosa.

1.1.3.3. Inhibidores de ChoK.

Desde que se propuso a ChoK como potencial diana para la terapia frente al cáncer, comenzó la búsqueda de compuestos que inhibieran su actividad. Los primeros compuestos que aparecieron eran inhibidores inespecíficos de la enzima, como los análogos de colina³⁹ o análogos estructurales del ATP⁴⁰ que pueden afectar también a otras enzimas y en general, no son inhibidores eficaces de ChoK.

El primer inhibidor de ChoK específico conocido fue el **hemicolinio-3** (HC-3, **1**, Figura 1.5) un homólogo de colina con estructura bifenílica⁴¹. Su especificidad sugiere que su efecto no se debe a una toxicidad inespecífica²⁶ lo que lo convierte en un modelo interesante para el diseño de nuevos agentes antitumorales. Sin embargo, la actividad antimitogénica del HC-3 se logra únicamente a concentraciones muy altas debido a su escasa potencia como inhibidor de colina quinasa ($CI_{50} = 500 \mu M$), lo que puede involucrar efectos secundarios del compuesto. Además el HC-3 tiene un potente efecto inhibitorio sobre un transportador de colina de alta afinidad y provoca una alta toxicidad respiratoria⁴¹ por lo que es un agente antitumoral imposible para su uso *in vivo*.

Por tanto, en nuestro grupo se ha desarrollado un riguroso proceso de variación estructural del HC-3, con el objetivo de mejorar su potencia y su selectividad de acción inhibidora ChoK, y al mismo tiempo, disminuir sus efectos tóxicos.

1.1.3.4. Farmacomodulación del HC-3.

El HC-3 es un inhibidor competitivo de la enzima ChoK debido a su homología estructural con la molécula de colina. Es una molécula simétrica con dos regiones claramente diferenciadas: una formada por el bifenilo central de naturaleza lipofílica y otra de tipo polar constituida por las dos cadenas similares a la colina con un átomo de nitrógeno cuaternizado. Este compuesto presenta un equilibrio entre la forma ciclohemicetálica y la forma abierta, desplazándose dicho equilibrio hacia la formación del ciclohemicetal en solución (Figura 1.5).

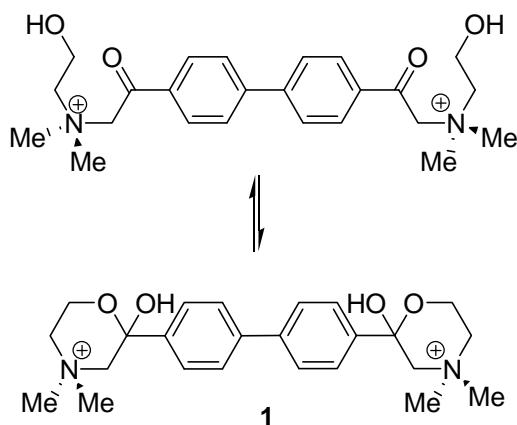


Figura 1.5. Estructura del Hemicolinio 3 (HC-3, **1**) que presenta un equilibrio entre las formas abierta y ciclohemicetálica.

1.1.3.4.1. Modificaciones de la cabeza catiónica.

En una primera fase de estudio, se realizaron modificaciones en la estructura del HC-3 que afectaban a la parte de la molécula que se asemeja a la colina, manteniendo la estructura bifénilica. En todos los casos se mantuvo el átomo de nitrógeno cuaternario mediante distintos grupos amonio e iminio (Figura 1.6). Para analizar los efectos de estas modificaciones se realizaron ensayos biológicos *ex vivo* utilizando ChoK de levadura purificada, y ensayos *in vitro* de actividad antiproliferativa sobre la línea tumoral humana HT-29 de cáncer de colon, una línea que es resistente a quimioterapia y expresa resistencia múltiple a fármacos⁴².

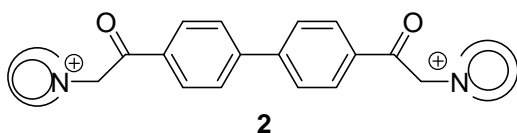
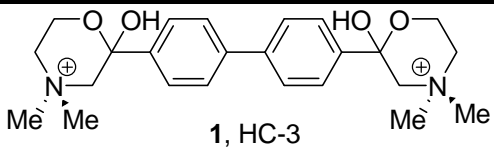
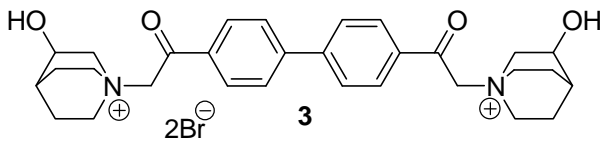
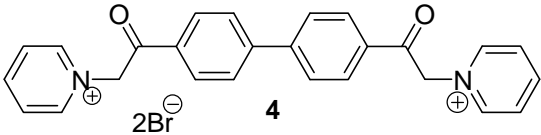


Figura 1.6. Estructura general de los compuestos obtenidos en la primera etapa del estudio de modificación de la estructura del HC-3.

En esta primera fase de estudio se comprobó que el grupo hidroxilo no es necesario para la afinidad entre la enzima y sus ligandos, aunque su presencia aumenta la actividad notablemente (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Actividad biológica de las estructuras derivadas del HC-3.

Compuesto	CI ₅₀ ChoK (μM)	CI ₅₀ HT-29 (μM)
 1, HC-3	500	2500
 3	0.5	>50
 4	13	10

CI₅₀: concentración a la que se consigue el 50% de inhibición.

El compuesto **3** es el inhibidor de ChoK más potente de la serie⁴³ siendo 1000 veces más potente que el HC-3 pero apenas presenta actividad antiproliferativa frente a la línea tumoral HT-29, posiblemente porque no es suficientemente lipofílico como para atravesar la membrana celular. En consecuencia se decidió sustituir el resto 3-hidroxiquinuclidinio por el resto piridino que es más lipofílico, y el resultado biológico fue un empobrecimiento de la afinidad por la enzima, pero un aumento de la actividad antiproliferativa. Por tanto parece que la lipofilia de la molécula juega un papel importante en la actividad anticancerosa de estos compuestos⁴⁴.

1.1.3.4.2. Compuestos mitad.

El hemicolinio 15 (HC-15, **5**, Figura 1.7) es el “compuesto mitad” del HC-3. Con objeto de investigar si es necesaria la presencia de las dos cabezas catiónicas, se desarrollaron una serie de compuestos monocuaternizados a partir del HC-15⁴⁴. El HC-15 no muestra actividad inhibitoria ChoK ni actividad antiproliferativa, pero algunos de los compuestos “mitad” diseñados sí la presentan. En general, parece que la presencia de dos cabezas catiónicas no es necesaria para la actividad, lo que es lógico si consideramos que el sustrato natural del enzima, la colina, sólo tiene una cabeza catiónica. Sin embargo, los compuestos más potentes presentan una estructura biscatiónica.

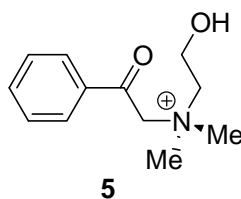


Figura 1.7. Estructura del HC-15, **5**, prototipo para el diseño de los compuestos mitad.

1.1.3.4.3. Modificaciones de la cabeza catiónica y el espaciador manteniendo la distancia entre las cabezas catiónicas.

Posteriormente se realizaron modificaciones más drásticas que afectaban tanto al espaciador como a la cabeza catiónica, manteniendo el número de átomos entre los nitrógenos cuaternizados. Se utilizaron estructuras piridínicas con distintos sustituyentes en posición 4 para estudiar la posible influencia electrónica del sustituyente en la posición 4 (R_4) del anillo de piridinio sobre la capacidad inhibitoria colina quinasa. Además, se sustituyó el anillo de piridinio por quinolinio e isoquinolinio para estudiar la influencia de la lipofilia (Figura 1.8).

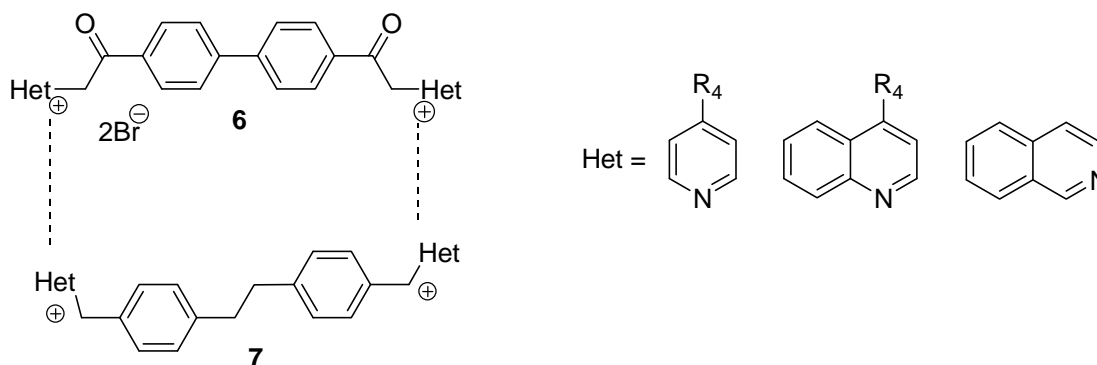


Figura 1.8. Estructuras generales de los compuestos biscatiónicos generados en la segunda fase del estudio.

En esta fase de la investigación, con el propósito de profundizar en el conocimiento de la interacción ChoK-fármaco, se realizó un estudio QSAR. Este estudio sugiere que la naturaleza electrónica de R_4 es el factor principal de la actividad inhibitoria, probablemente vía deslocalización de la carga positiva del anillo heteroaromático⁴⁵, de modo que cuanto más electrón-donante sea R_4 , más potente es el compuesto como inhibidor ChoK y como agente antiproliferativo.

Además, esta nueva serie de compuestos reproducen *in vivo* los efectos antiproliferativos mostrados sobre las células tumorales en cultivo, siendo capaces de frenar el crecimiento de estos tumores humanos implantados en ratones produciendo, en algún caso, un incremento de la expectativa de vida de un 143%⁴⁴.

1.1.3.4.4. Influencia del espaciador.

Para estudiar la importancia de la distancia entre las cabezas catiónicas sobre la actividad, se realizó el diseño de nuevos compuestos basándose en modificaciones de los espaciadores. En este sentido, se sintetizaron 5 familias de inhibidores en las que los espaciadores disminuyen la distancia entre las dos cabezas catiónicas (Figura 1.9).

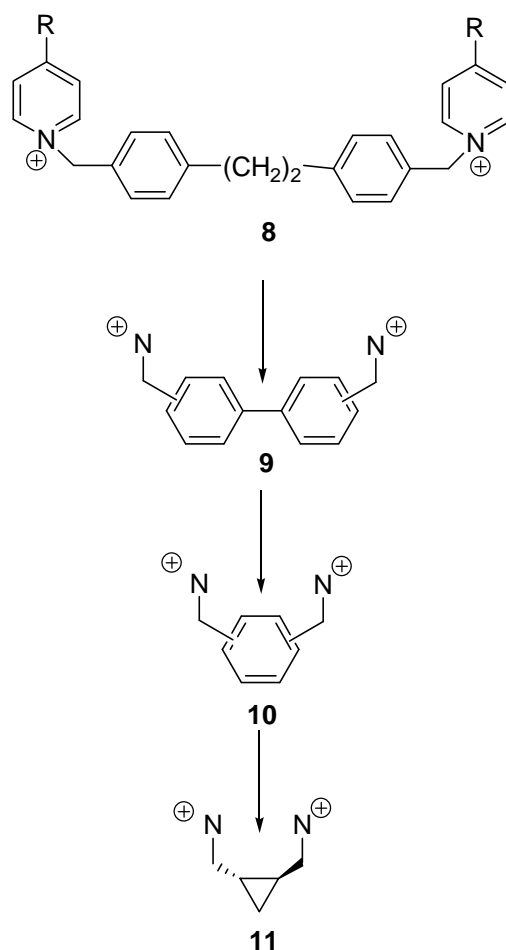


Figura 1.9. Estructuras generales de las cinco familias de compuestos que presentan una disminución del espaciador.

En este estudio se observa que la actividad inhibitoria ChoK se incrementa de forma progresiva con la distancia entre las cabezas catiónicas hasta alcanzar un valor óptimo, que se corresponde con la distancia del espaciador 3,3'-bifenilo. Una vez que se sobrepasa esa distancia, en general la potencia inhibitoria enzimática disminuye de nuevo. La relación entre la actividad antiproliferativa y la distancia entre las cabezas catiónicas no está tan clara, ya que en este caso, además de la interacción con ChoK, intervienen muchos otros factores⁴⁶.

1.1.3.4.5. Compuestos bisquinolínicos.

Con el objetivo de obtener nuevas relaciones estructura-actividad y estudiar en profundidad los parámetros que definen las actividades inhibitoria ChoK y antiproliferativa, se realizó el diseño de nuevos compuestos en los que las cabezas catiónicas piridínicas se sustituyeron por derivados de quinolinio. Con estos compuestos se quería comprobar el efecto del espaciador en las actividades biológicas. Además, la introducción de quinolinios permitió estudiar la influencia de la lipofilia sobre la actividad inhibitoria ChoK. El diseño de estos compuestos se basó en derivados con sustituyentes electrón donantes en la posición 4 del quinolinio (Figura 1.10).

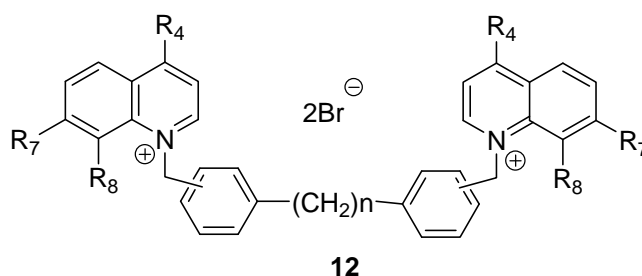


Figura 1.10. Estructura general de los compuestos derivados de quinolinio.

De los resultados biológicos obtenidos para estos compuestos se observa que el incremento en la lipofilia general de la molécula, debido a la introducción de dos anillos de quinolinio como cabeza catiónica, supone una mejora de la actividad antiproliferativa en relación con los compuestos bispiridínicos^{46,47}. Además, se confirma tanto la influencia positiva de la introducción de sustituyentes electrón donantes en posición 4 en el anillo de quinolinio, como que la inhibición de la enzima ChoK está influida por el tipo de espaciador arilalquílico que presenten los compuestos. En este caso, el mejor espaciador es el 3,3'-bifenilo, seguido por el 4,4'-bibencilo y finalmente, el 4,4'-bifenilo.

En el caso de la actividad antiproliferativa frente a la línea tumoral HT-29 se observa que la influencia del tipo de espaciador y del sustituyente en R₄ es menor. Algunos de los compuestos sintetizados, como por ejemplo los derivados de bis(7-aminoquinolinio), presentan actividad antiproliferativa a pesar de presentar una actividad inhibitoria marginal sobre ChoK, lo que refuerza la hipótesis de que este tipo de estructuras podrían actuar, además, o bien en otro punto de la ruta de señalización desencadenada tras la activación del oncogén *ras*, o bien en otra ruta implicada en la proliferación celular⁴⁷.

1.1.3.4.6. Compuestos triscatiónicos.

Los resultados obtenidos con los compuestos mitad demostraban la importancia de las dos cargas positivas para la actividad ChoK, y consecuentemente de la distancia entre ambas, por lo que se decidió estudiar la influencia de una tercera carga positiva sobre la inhibición de la ChoK y la actividad antiproliferativa (Figura 1.11).

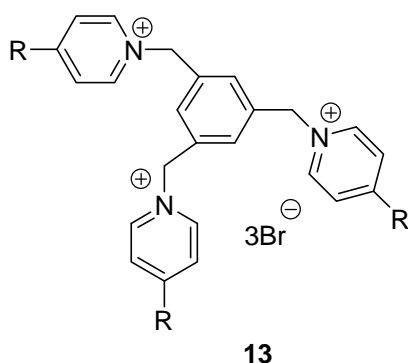


Figura 1.11. Estructura general de los compuestos triscatiónicos.

Estos compuestos trispiridínicos son más potentes que los bispiridínicos como inhibidores de la ChoK humana, por lo que se puede afirmar que la tercera carga positiva favorece la interacción fármaco-enzima. Sin embargo, la actividad antiproliferativa de estos compuestos es inferior, debido a una pérdida importante de lipofilia en las moléculas triscatiónicas⁴⁸ que les impide atravesar la membrana celular.

1.1.3.4.7. Aumento de la rigidez: compuestos ciclofanos y bisciclofanos.

Todos los compuestos sintetizados previamente son estructuras abiertas que presentan un cierto grado de flexibilidad. Sin embargo, la rigidificación es una táctica habitual en el diseño de fármacos para aumentar su actividad o reducir sus efectos adversos. La incorporación del esqueleto de un fármaco flexible en un anillo es una forma de restringir su conformación, lo que puede dar gran información de la conformación activa del compuesto. Con objeto de estudiar cómo afecta el aumento de la rigidez de las moléculas a las actividades inhibitoria ChoK y antiproliferativa, se diseñó una serie de inhibidores de ChoK basándose en un modelo simplificado de compuestos cíclicos que tienen un anillo de benceno como espaciador, dando lugar a una familia de ciclofanos bispiridínicos (**14-17**, Figura 1.12).

Estos compuestos se diferencian unos de otros en el modelo de sustitución de los anillos bencénicos, de modo que el primer prefijo se refiere al modelo de disustitución del anillo bencénico superior, mientras que el segundo lo describe para el anillo bencénico inferior.

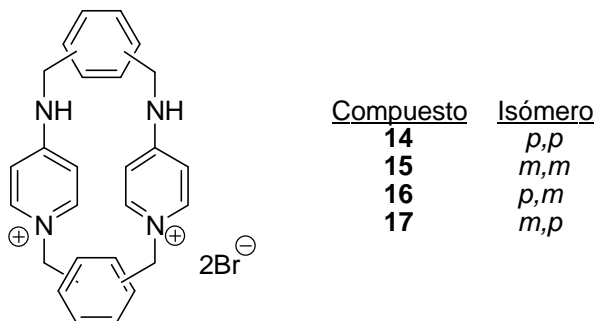


Figura 1.12. Estructura de los compuestos ciclofanos bispiridínicos. En los isómeros *p-p*, *m-m*, *p-m* y *m-p*, el primer prefijo se refiere al modelo de disustitución del anillo bencénico superior, mientras que el segundo lo describe para el anillo bencénico inferior.

Los resultados de las actividades biológicas para estos compuestos macrocíclicos (Tabla 1.2) muestran que el modelo de sustitución de los espaciadores es muy significativo para la actividad inhibitoria ChoK, ya que a pesar de ser isómeros estructurales, los cuatro compuestos presentan actividades muy diferentes⁴⁹. El compuesto **17** es el inhibidor de ChoK más potente publicado hasta la fecha, con una CI_{50} ChoK de 0,3 μ M, pero en general los ciclofanos presentan una actividad antitumoral modesta.

Tabla 1.2. Resultados de actividad inhibitoria ChoK y actividad antiproliferativa frente a la línea tumoral HT-29 para los compuestos ciclofanos bispiridínicos.

Compuesto	Isómero	CI ₅₀ ChoK (μM)	CI ₅₀ HT-29 (μM)
14	<i>p</i> - <i>p</i>	2,1	36,9
15	<i>m</i> - <i>m</i>	13,2	>100
16	<i>p</i> - <i>m</i>	24,8	58,6
17	<i>m</i> - <i>p</i>	0,3	28,82

En base a estos antecedentes con los compuestos **14-17** se consideró interesante el aumentar aún más la rigidez de la molécula insertando un tercer puente entre los anillos bencénicos, obteniendo los compuestos de estructura biciclofánica **18-20**⁵⁰ (Figura 1.13).

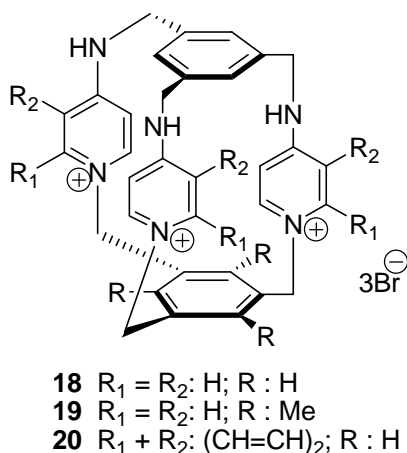


Figura 1.13. Estructura de los compuestos biciclofánicos.

Estos compuestos, además de poseer una estructura más rígida, están caracterizados por la presencia de un tercer centro catiónico. Estas moléculas resultaron ser inactivas⁵¹ como inhibidores de ChoK y como agentes antiproliferativos posiblemente debido a la presencia de esta tercera carga positiva, que las convierte en compuestos demasiado polares como para poder atravesar la membrana celular.

1.1.3.4.8. Compuestos asimétricos.

Todos los compuestos presentados hasta ahora se han diseñado a partir del HC-3, y presentan una estructura simétrica que contiene dos o tres cabezas catiónicas unidas mediante un espaciador. Estudios de “docking” (acoplamiento) realizados sobre la estructura cristalina de ChoK humana indican que estas moléculas podrían insertarse simultáneamente en el sitio de unión de la colina y en el del ATP, de modo tal que uno de los nitrógenos cuaternarios (piridínicos o quinolínicos) de los inhibidores podría ocupar el lugar que ocupa el nitrógeno cuaternario de la colina en el sitio de unión de ésta. No obstante, el sitio de unión del ATP no posee aminoácidos que estabilicen de forma eficaz la cabeza catiónica, pues en este sitio de unión, la estabilización del ATP se produce fundamentalmente a través de enlaces de hidrógeno. Por tanto se planteó el diseño de nuevos inhibidores de ChoK no simétricos, que sólo contengan una cabeza catiónica, mientras que la segunda cabeza catiónica se sustituye por adenina, para mimetizar el fragmento de ATP⁵² (Figura 1.14).

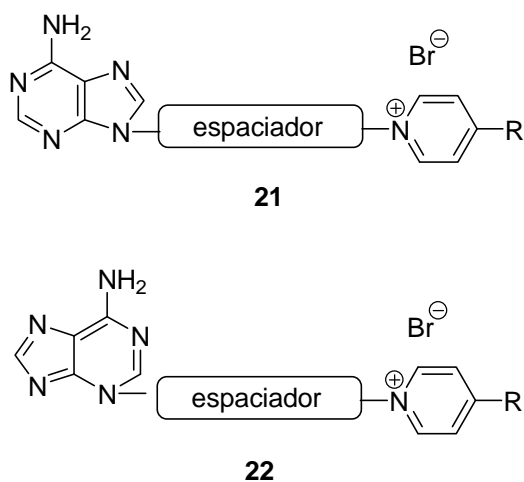


Figura 1.14. Estructura de los compuestos no simétricos.

Estos compuestos han sido ensayados como inhibidores de ChoK humana *in vitro* y como agentes antiproliferativos frente a la línea celular de hepatoma humano HepG2⁵². En general, estos compuestos presentan actividades inhibitoria ChoK y antiproliferativa inferiores a los últimos compuestos bicationicos sintetizados, lo que sugiere que la segunda cabeza catiónica, si no necesaria, es importante para la actividad de los compuestos.

1.1.3.5. Mecanismo de inhibición de la actividad ChoK.

El diseño de inhibidores de ChoK por parte de nuestro grupo comenzó antes de conocerse la estructura de la enzima, por lo que se basó en modificaciones de la estructura del HC-3, un inhibidor competitivo de ChoK por su homología con el sustrato⁵³.

En 2003, Peisach y col.²¹ determinaron la estructura cristalina de ChoK procedente de *C. elegans*, encontrándose una estructura homodimérica con cada monómero organizado en un plegamiento típico de las proteína quinasas. Poco después se describieron estudios de mutagénesis de dicha enzima, que permitieron proponer los sitios de unión del ATP y la colina⁵⁴. Basados en estos antecedentes, Milanese y col.⁵⁵ desarrollaron un modelo de ChoK humana y los estudios teóricos de dinámica molecular de dicha enzima justificaron los resultados de mutagénesis observados y confirmaron los hipotéticos sitios de unión del ATP y la colina. Además, dicho modelo permitió proponer un mecanismo de inhibición de nuestros compuestos en el que estas moléculas se insertan en los dos sitios de unión de los sustratos de la enzima.

En 2006 se elucidó la estructura tridimensional de ChoK humana²¹. Dichos estudios muestran una estructura cristalina de la proteína sola (forma apo) y otras dos conteniendo, cada una de ellas, ADP y *P*Cho respectivamente. Estas estructuras cristalinas confirmaban definitivamente los sitios de unión de ambos sustratos, y junto con los datos de mutagénesis obtenidos para la ChoK de *C. elegans*, se propuso un modelo de un complejo ternario enzima-ADP-fosfocolina (Figura 1.15).

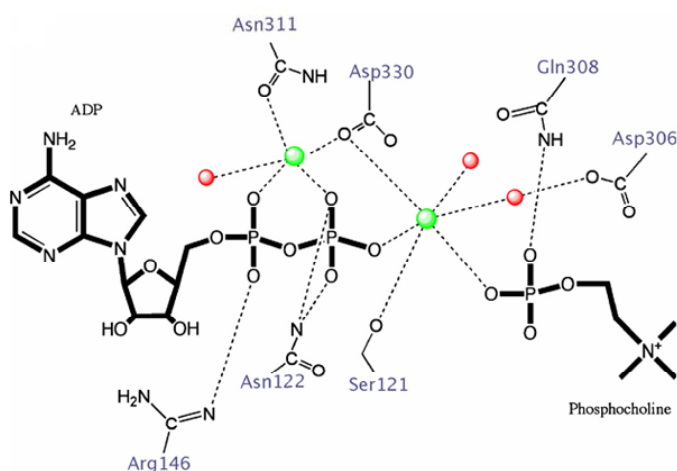


Figura 1.15. Modelo del complejo ternario ADP-*P*Cho, donde se muestran las interacciones entre los residuos del enzima y el ADP o la *P*Cho.

Posteriormente se determinó la estructura de rayos-X de alta resolución de ChoK α y β en complejo con el HC-3, lo que nos aporta un mayor conocimiento del mecanismo de inhibición enzimática⁵⁶. Ese estudio muestra cómo se fosforila el HC-3 por la ChoK β , lo que se confirma mediante experimentos *in vitro*. Otros experimentos muestran un modelo cristalográfico de inhibición, en el que el sitio de unión del HC-3 a las isoformas de ChoK se superpone con el de la colina, lo que concuerda con la idea de que el HC-3 compite por el sitio de unión de la colina (Figura 1.16). Esto plantea la posibilidad de que las diferencias en los valores de CI_{50} del HC-3 para las distintas isoformas se deban a la diferencia entre los valores de K_M para la colina de cada isoforma^{17,56}.

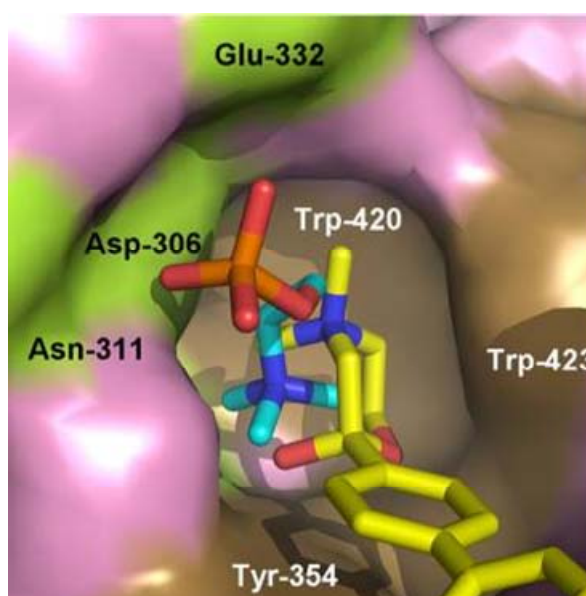


Figura 1.16. Estructura cristalina de la ChoK α , que muestra la superposición del HC-3, en amarillo, y la fosfocolina, en azul, en el bolsillo de unión a la colina⁵⁶.

Por otro lado, un estudio cinético reciente demuestra que ChoK α cataliza la transferencia del grupo fosfato desde el ATP a la colina a través de un mecanismo de desplazamiento doble⁵⁷, a diferencia de la mayoría de las quinasas, que realizan la transferencia de fosfato mediante un mecanismo de complejo ternario, en el que la enzima está unida a ambos sustratos, el receptor y el aceptor del grupo fosfato⁵⁸. Mediante este mecanismo de desplazamiento doble, ChoK α actúa en dos etapas diferentes, ya que se necesita la disociación del primer producto para que el segundo sustrato se una a la enzima. De este modo, primero se forma un intermedio fosfo-enzima, y a continuación se produce una etapa de isomerización asociada a la liberación del producto.

Se propone un mecanismo en el que el residuo Asp306 de la enzima juega un papel importante en la estabilización del intermedio fosfo-enzima, mediante una interacción débil que facilite la liberación del producto en la segunda etapa, como resultado de un cambio conformacional en el centro activo de la enzima⁵⁷ (Figura 1.17).

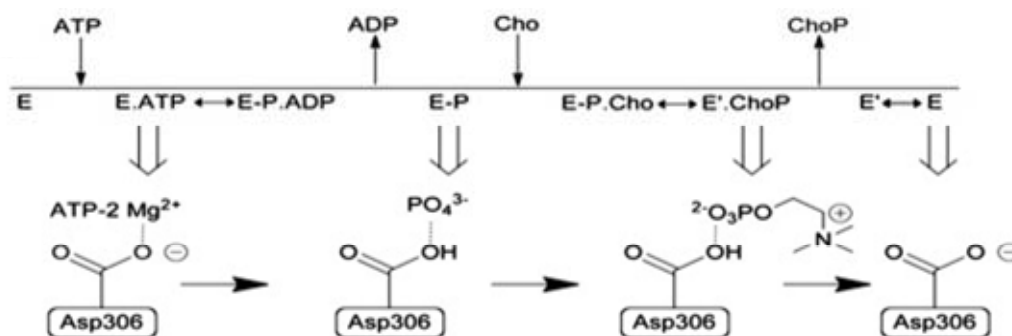


Figura 1.17. Representación esquemática del mecanismo de desplazamiento doble propuesto para ChoK α ⁵⁷.

Recientemente, se ha publicado el mecanismo de unión de un inhibidor de ChoK de estructura monocatiónica no simétrica mediante cristalografía de rayos X. En ese estudio se demuestra que la unión del compuesto a uno de los monómeros de ChoK induce una cooperatividad negativa en el segundo monómero mediante un mecanismo alostérico, de modo que se rompe la simetría de los dímeros⁵⁹.

1.2 Leishmaniasis.

1.2.1. Consideraciones generales.

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades causadas por parásitos protozoarios pertenecientes al género *Leishmania*. Se considera la enfermedad protozoaria más importante después de la malaria, con aproximadamente 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad y alrededor de 2 millones de nuevos casos cada año. Tradicionalmente, la leishmaniasis se ha clasificado en tres formas clínicas principales, leishmaniasis visceral (LV), cutánea (LC) o mucocutánea (LMC), que se diferencian tanto a nivel inmunopatológico como en la tasa de morbilidad y mortalidad. Mientras que la LC tiene una tendencia a curarse de forma espontánea dejando como resultado cicatrices desfigurantes, la LV es mortal si no se trata, causando más de 50 mil muertes al año. Aunque la leishmaniasis afecta a más de 98 países en todo el mundo, más del 90% de los casos de LV se localizan en 6 países: India, Bangladesh, Nepal, Sudán, Brasil y Etiopía; mientras que entre el 70-75% de los casos de LC ocurren en 10 países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Etiopía, Sudán, Irán, Perú, Costa Rica y Siria⁶⁰.

Es importante destacar la coinfección de *Leishmania* y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), ya que ambas enfermedades se refuerzan de un modo perjudicial. La infección por VIH aumenta la probabilidad de desarrollar LV, y ésta limita la respuesta del paciente a la terapia antirretroviral⁶¹.

En los últimos 10 años se han hecho avances científicos importantes en el tratamiento, diagnóstico y prevención de la leishmaniasis, con una reducción en los precios de los medicamentos esenciales. Sin embargo, la mayoría de los pacientes no tienen acceso a los medicamentos, y gran parte de los países endémicos no tienen programas de control, por lo que la morbilidad y mortalidad de la leishmaniasis mundial muestran una preocupante tendencia creciente. Esto justifica la importancia de la búsqueda de nuevos fármacos o vacunas profilácticas para un control temprano y eficaz de la leishmaniasis.

1.2.2. El parásito *Leishmania*.

Leishmania es un parásito protozoo patógeno responsable de la leishmaniasis. Pertenece a la familia Trypanosomatidae, dentro del orden Kinetoplastida (Figura 1.18), que engloba a un heterogéneo grupo de protozoos con un tamaño entre 5-89 µm, que poseen uno o dos flagelos en algún estado dentro de su ciclo de vida, y que se caracterizan por tener una única mitocondria que contiene grandes cantidades de ADN empaquetado en un orgánulo denominado kinetoplasto. El género *Leishmania* incluye 30 especies, de la que unas 20 son capaces de infectar a los humanos mediante la picadura de insectos de la subfamilia *Phlebotominae*. Las diferentes especies son muy similares morfológicamente, pero se diferencian en su composición en isoenzimas, antígenos, patología y sensibilidad a fármacos^{62,63}. Así, la especie de *Leishmania* va a determinar en gran medida la evolución de la enfermedad.

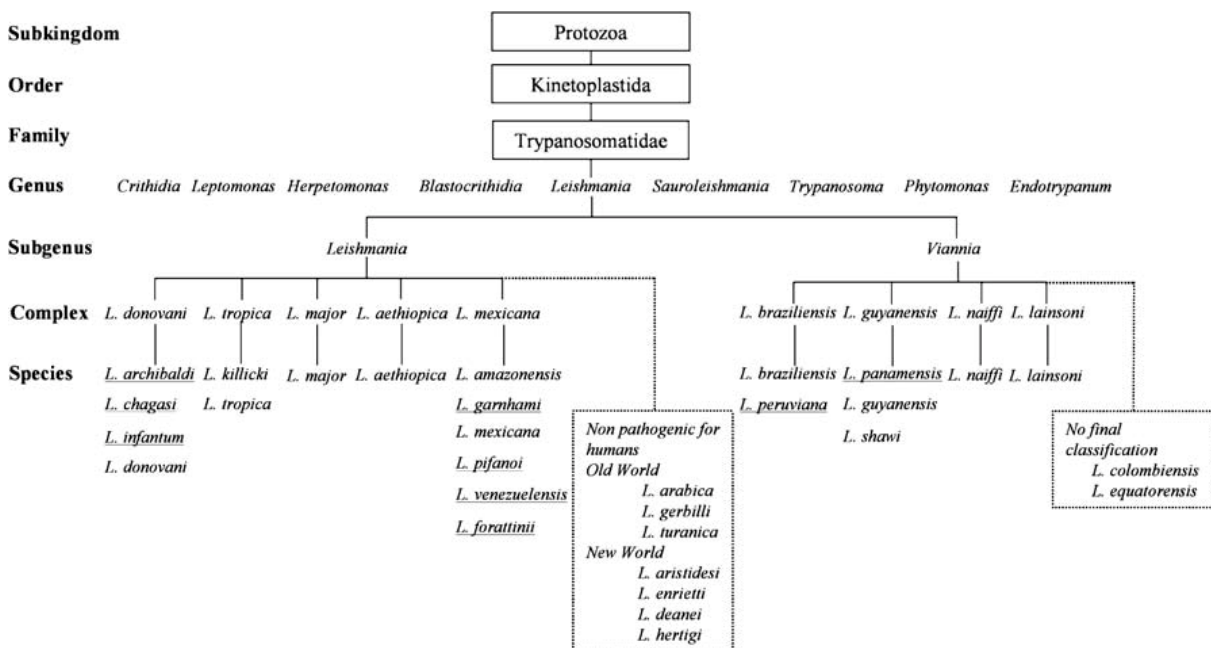


Figura 1.18. Clasificación Taxonómica de las especies de *Leishmania*.

1.2.2.1. Morfología y ciclo de vida.

La morfología de *Leishmania* está determinada por un ciclo de vida complejo, en el que los parásitos están expuestos a diferentes ambientes. Estos parásitos tienen un ciclo de vida digenético, con dos formas distintas. La forma promastigota extracelular, alargada, flagelada y móvil, se desarrolla en el aparato digestivo del flebotomo (vector de la enfermedad) y es, por tanto, la forma infectiva para el hospedador vertebrado. La forma amastigota intracelular, no flagelada, se desarrolla en el interior de células del sistema mononuclear del hospedador vertebrado (Figura 1.19).

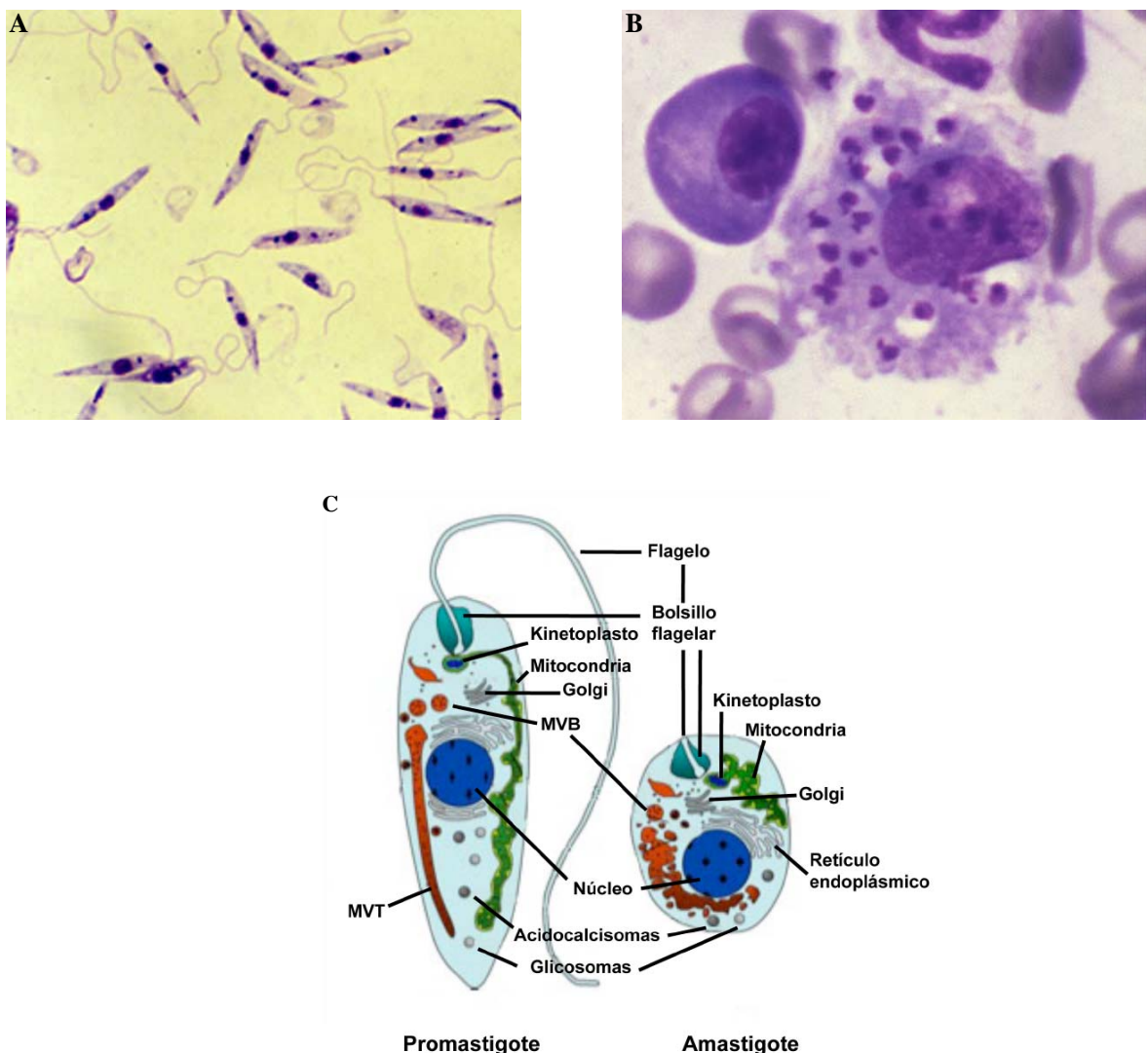


Figura 1.19. Formas promastigotas (A) y amastigotas intracelulares (B) de *Leishmania*. C) Representación esquemática de los orgánulos de las formas promastigotas y amastigotas de *Leishmania*⁶⁴, (MVB cuerpo multivesicular, MVT, túbulo multivesicular).

El ciclo biológico (Figura 1.20) comienza cuando la hembra del mosquito portadora del parásito pica a un hospedador vertebrado, inyectándole las formas promastigotas metacíclicas, altamente infectivas, que son rápidamente fagocitadas por células del sistema mononuclear del mamífero. En los macrófagos, los parásitos son incluidos en unas vacuolas fagolisosómicas en las que se transforman en formas amastigotas. Éstas se dividen por fisión binaria hasta romper la célula, liberándose al torrente sanguíneo para invadir diferentes tejidos donde serán nuevamente fagocitadas por macrófagos. El ciclo se completa cuando el insecto vector ingiere sangre con macrófagos infectados con formas amastigotas, con lo que se inicia el desarrollo del parásito dentro del tracto digestivo del vector hasta transformarse, mediante un proceso conocido como metaciclogénesis, en formas promastigotas metacíclicas, que podrán ser inoculados a un nuevo hospedador vertebrado.

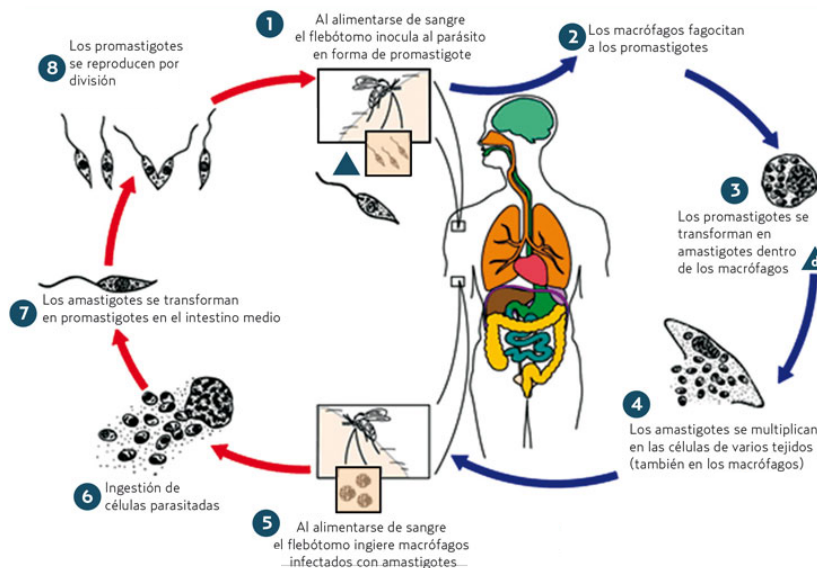


Figura 1.20. Ciclo de vida de *Leishmania*⁶⁵.

La mayoría de las leishmaniasis son zoonosis, transmitidas al hombre por animales, aunque algunas pueden ser transmitidas entre humanos (antroponosis), como se ha observado en algunas zonas de la India⁶⁶. La leishmaniasis canina debida a la infección por *L. infantum* es muy importante en veterinaria, al tratarse de una enfermedad mortal para el perro. Además el perro es el principal reservorio de estos parásitos para el hombre. En España, un 5-10% de la población canina está infectada por *Leishmania*, y en algunos focos endémicos la prevalencia alcanza el 35%⁶⁷.

1.2.2.2. Biología y bioquímica del parásito.

Genoma.

En 2005 se publicó la secuenciación del genoma de *L. major*, que identificaba 8.133 genes que codifican proteínas y elucidaba la estructura completa de los cromosomas de *Leishmania*⁶⁸. Posteriormente se describieron los genomas de *L. braziliensis* y *L. infantum*⁶⁹. La comparación de los tres genomas reveló una gran conservación de genes entre las diferentes especies y una estructura genómica muy similar, constituida por 36 cromosomas en el caso de *L. major* y *L. infantum*, mientras que *L. braziliensis* tiene 35 cromosomas.

En tripanosomátidos, la transcripción de los genes es policistrónica, al igual que en procariotas, pero a diferencia de estos, los genes son transcritos hasta unos precursores de ARN, que posteriormente son procesados hasta ARN mensajeros monocistrónicos mediante corte y empalme en trans y poliadenilación⁷⁰. Este procesamiento consiste en la introducción de una secuencia de 39 nucleótidos en el extremo 5', llamada mini-exón, y de una cola poliA en el extremo 3'. Ambos procesos están acoplados, de modo que la inserción del mini-exón condiciona la adición de la cola poliA en el gen situado en la posición inmediatamente anterior⁷¹. Una vez traducidas, las proteínas sufren una serie de modificaciones post-traduccionales, que suponen una regulación de la expresión génica.

El ADN del kinetoplasto constituye el 10-20% del ADN total del parásito y se caracteriza por formar unas estructuras complejas de círculos de diferente tamaño entrelazados, que se denominan maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos son el homólogo funcional del ADN mitocondrial de otros eucariotas, con un tamaño entre 20 y 40 kb, y codifican para ARN ribosómicos y proteínas de la cadena respiratoria. Los minicírculos tienen un tamaño entre 0,5 y 2,5 kb, y codifican para ARNs guías, necesarios para la edición de los ARNs mitocondriales, mediante delección o adición de un cierto número de residuos de uridinas⁷².

Metabolismo de *Leishmania*.

Durante su ciclo de vida, *Leishmania* se desarrolla en dos ambientes totalmente diferentes. Mientras que las formas promastigotas se desarrollan en el intestino del insecto vector, a unos 25-27 °C y pH 7, las formas amastigotas proliferan en el interior de los fagolisosomas de los macrófagos del hospedador vertebrado, a 37 °C y pH 4-5. Esta diferencia junto con la capacidad para adquirir nutrientes y la disponibilidad de oxígeno y CO₂, determinan que existan diferencias en el metabolismo de ambas formas⁷³. A pesar de estas diferencias, ambas formas de vida comparten unas características metabólicas que son esenciales para la supervivencia del parásito, y son la base para el diseño racional de nuevos fármacos⁷⁴.

Metabolismo energético.

Las formas promastigotas utilizan aminoácidos y azúcares como principal fuente de energía y la generación de energía ocurre mediante la glicolisis y el metabolismo mitocondrial. El metabolismo de las formas amastigotas se conoce menos por una menor disponibilidad de formas amastigotas intracelulares, pero se ha visto un aumento en la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga en comparación con las formas promastigotas y una reducción en el consumo de glucosa y prolina⁷⁵.

Al igual que el resto de eucariotas, los tripanosomátidos pueden degradar glucosa hasta piruvato a través de la glicolisis. Sin embargo, en estos parásitos una parte de esta ruta tiene lugar dentro de unos orgánulos de origen peroxisomal llamados glicosomas. Además *Leishmania* pertenece a un grupo de tripanosomátidos con un metabolismo mitocondrial más complejo, donde la producción de ATP se da principalmente por fosforilación oxidativa⁷⁶. Los componentes de la cadena respiratoria se encuentran dentro de la mitocondria, que en *Leishmania* es un único orgánulo que se ramifica y ocupa un 12% del volumen celular⁷⁷.

El metabolismo de purinas es una característica única de los tripanosomátidos, ya que a diferencia del hospedador no son capaces de sintetizar purinas *de novo*, por lo que para sobrevivir han desarrollado un sistema de transporte de purinas⁷⁸. Además, estos parásitos poseen un metabolismo redox peculiar, que depende de tioles y se basa en el tripanotión, un

conjugado de bisglutacionil-espermidina exclusivo del orden Kinetoplastida, que protege al parásito del estrés oxidativo⁷⁹.

Los acidocalcisomas son unos orgánulos densos acídicos con una alta concentración de pirofosfato y polifosfato complejados con calcio y otros cationes. Suponen la principal fuente de almacenaje de Ca^{2+} , y están asociados con funciones de mantenimiento del pH intracelular y osmorregulación del parásito⁸⁰.

Metabolismo lipídico de *Leishmania*.

La fosfatidilcolina (PC) es el principal fosfolípido de la membrana de *Leishmania*, representando un 33% del total de los lípidos y un 50% de los fosfolípidos del parásito⁸¹. En diversos organismos, la biosíntesis de PC tiene lugar principalmente mediante tres vías metabólicas, las rutas CDP-DAG-serina, CDP-colina y CDP-etanolamina⁸². El genoma de *Leishmania* presenta una etanolamina quinasa (EK) y una colina/etanolamina quinasa (CEK), que catalizan el primer paso de las rutas de Kennedy, donde la etanolamina y la colina son fosforiladas a *PEt* y *PCho*⁸³ (Figura 1.21).

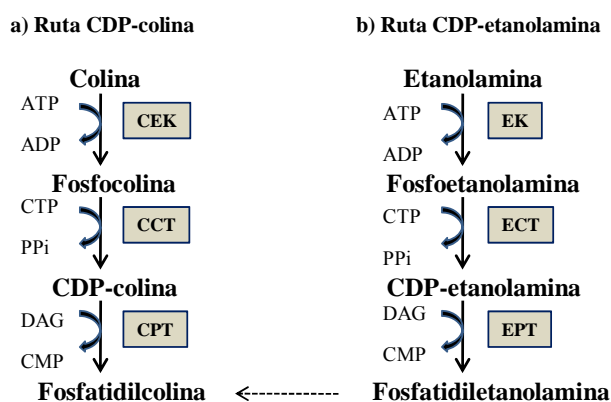


Figura 1.21. Rutas de Kennedy para la biosíntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

Las rutas de Kennedy han sido caracterizadas para otros protozoos, como *Plasmodium*⁸⁴⁻⁸⁶, e incluso para otros tripanosomátidos, como *Trypanosoma brucei*^{87,88}. El metabolismo de los fosfolípidos y la biosíntesis de PC parecen proporcionar dianas bioquímicas ideales para el desarrollo de nuevos compuestos contra *Plasmodium falciparum*⁸⁹. En *P. falciparum* la biosíntesis de PC también tiene lugar a través de la

participación de ChoK (PfChoK), que se ha convertido en una interesante diana bioquímica para el desarrollo de nuevas generaciones de fármacos antipalúdicos⁸⁹.

Sin embargo, se conoce poco a cerca de la biosíntesis de PC en *Leishmania*. Se ha demostrado que el crecimiento de formas promastigotas de *Leishmania* en un medio sin colina ni etanolamina permanece normal⁸², lo que parece indicar que las rutas CDP-etanolamina y CDP-colina no son esenciales para *Leishmania*, a diferencia de lo publicado para *Plasmodium*.

A diferencia de lo que sucede en mamíferos, el ergosterol, y no el colesterol, es el principal esteroide de membrana tanto en formas promastigotas como en formas amastigotas de *Leishmania*⁹⁰. Por tanto, las enzimas tales como 14 α -demetilasa⁹⁰ y esteroide-24-metiltransferasa⁹¹, implicadas en su biosíntesis, son potenciales blancos terapéuticos para la leishmaniasis.

Muerte celular.

En los organismos multicelulares la muerte celular juega un papel importante para el desarrollo y puede ocurrir por diferentes mecanismos bien definidos, que pueden estar regulados o no. La apoptosis es una de las formas de muerte celular programada (PCD) más importante, en contraste con la necrosis que no está regulada.

En los últimos años, se han realizado estudios en *Leishmania* que muestran un mecanismo de muerte celular mediante la producción de unos efectos típicos de la muerte por apoptosis⁹². La exposición a distintas condiciones de estrés o el tratamiento con diferentes fármacos han dado lugar en el parásito a una cascada de eventos comunes a la apoptosis como son la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), incremento de los niveles de Ca²⁺ intracelular, cambios en el potencial de membrana mitocondrial, exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática y fragmentación del ADN⁹². Sin embargo, aún no se han encontrado moléculas efectoras o reguladoras de la apoptosis homólogas a las de mamífero (como los miembros de la familia Bcl-2 o las caspasas), lo que sugiere que las rutas de muerte celular regulada son diferentes en estos parásitos.

1.2.3. Manifestaciones clínicas de la enfermedad.

La leishmaniasis puede presentarse con distintas manifestaciones clínicas, en función de la especie de *Leishmania* responsable de la enfermedad, y también de las características genéticas e inmunológicas de la persona infectada.

La **leishmaniasis visceral**, también llamada kala-azar, es la forma más severa de la enfermedad, y puede ser mortal tras unos meses en ausencia de tratamiento. Está causada principalmente por *L. donovani* en el este de África y en la India, y por *L. infantum* y *L. chagasi* en Europa, el norte de África y Latinoamérica. Se caracteriza por una infección visceral generalizada del sistema reticulo-endotelial, que da lugar a episodios de fiebre, pérdida de peso, hepato y esplenomegalia y anemia. Un tratamiento inadecuado de la enfermedad puede llevar a lesiones cutáneas tardías conocidas como **post-kala-azar (PKDL)**. La PKDL suele aparecer entre 6 meses y un año después de la cura aparente de la enfermedad, aunque puede ocurrir antes o incluso a la vez que la LV, especialmente en Sudán. La PKDL se cura espontáneamente en la mayoría de los casos en África, pero rara vez en los pacientes de la India. Se considera que juega un papel importante en el mantenimiento y la transmisión de la enfermedad, especialmente en periodos interepidémicos de LV, en los que actúa como reservorio para los parásitos.

La **leishmaniasis cutánea**, también denominada botón de oriente, es la forma más común de la enfermedad, y es producida principalmente por *L. major* y *L. tropica*. La enfermedad se caracteriza por úlceras cutáneas en el lugar de picadura del mosquito, que pueden dar lugar a cicatrices permanentes.

La **leishmaniasis mucocutánea** es una afección de las selvas tropicales amazónicas, causada por *L. braziliensis*. Produce lesiones que pueden conducir a la destrucción parcial o total de la membrana mucosa de la nariz, boca y garganta.

1.2.4. Tratamiento de la leishmaniasis.

En la actualidad no existe una vacuna eficaz ni programas de control del vector, por lo que la quimioterapia es la única herramienta de lucha frente a la enfermedad. Las principales opciones terapéuticas del tratamiento de la leishmaniasis para los próximos años incluyen cuatro fármacos:

1- Los **antimoniales pentavalentes**: el estibogluconato sódico (Pentostam[®]) y el antimoniato de meglumina (Glucantime[®]).

2- La **anfotericina B** (Fungizone[®]) y sobre todo las formulaciones lipídicas de anfotericina B como el Ambisome[®].

3- La **miltefosina** (Impavido[®]), el primer fármaco oral frente al tratamiento de la leishmaniasis.

4- La **paromomicina** (Aminosidine[®]), un antibiótico aminoglicósido desarrollado originariamente como bactericida.

Las recomendaciones de la OMS para el tratamiento de la leishmaniasis se basan en estos cuatro fármacos, y cada vez más, en una terapia combinada de los mismos. Otros fármacos, como la pentamidina han mostrado actividad, y podrían utilizarse como terapia suplementaria, pero su disponibilidad es limitada en las regiones donde la enfermedad es endémica.

1.2.4.1. Antimoniales pentavalentes.

Los antimoniales pentavalentes, el estibogluconato de sodio y el antimoniato de meglumina (**23** y **24**, Figura 1.22) se han usado para el tratamiento de la leishmaniasis durante más de cinco décadas, y continúan siendo la primera línea de elección en zonas donde no se han detectado resistencias⁹³. Se administran por vía parenteral con una dosis diaria de 20 mg/kg durante 30 días.

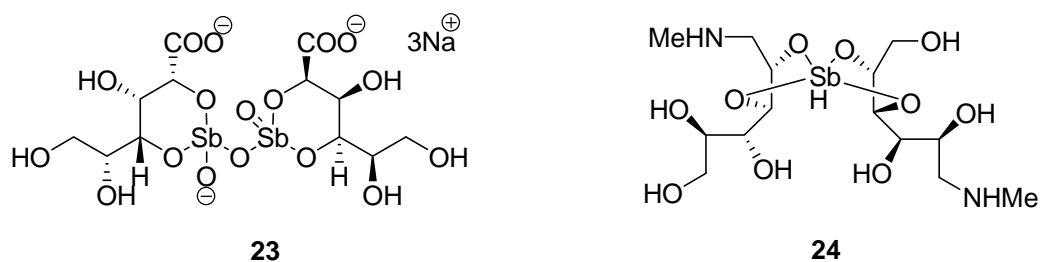


Figura 1.22. Estructura de los antimoniales pentavalentes: estibogluconato de sodio, **23**, y el antimoniato de meglumina, **24**.

El mecanismo de acción de estos compuestos no se conoce con exactitud, se propone que el antimonio pentavalente (Sb^{V}) actúa como profármaco, y es reducido hasta antimonio trivalente (Sb^{III}), la forma activa⁹⁴. Sin embargo, no se sabe si la reducción tiene lugar en el parásito, en el macrófago del hospedador o en ambos^{95,96}. Los antimoniales actúan a distintos niveles y afectan al metabolismo bioenergético de *Leishmania*, al inhibir la glucólisis, la beta-oxidación de ácidos grasos y la fosforilación de ADP^{97,98}. Además, se ha demostrado que alteran el potencial redox tiólico de formas promastigotas y amastigotas del parásito al promover el eflujo de tioles intracelulares, lo que induce una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS)⁹⁹. Tanto el Sb^{III} como el Sb^{V} producen una muerte del parásito mediante fragmentación del ADN¹⁰⁰.

Los tratamientos de larga duración con estos fármacos provocan su acumulación, principalmente en hígado y bazo, lo que da lugar a diversos efectos adversos¹⁰¹, tales como arritmias cardíacas, pancreatitis y hepatotoxicidad. Actualmente, y debido a la aparición de resistencias, estos compuestos no son recomendados en algunas regiones de India donde existen áreas que presentan una significativa resistencia a estos fármacos¹⁰².

Se han descrito diferentes mecanismos para la aparición de resistencias, como son una disminución en la reducción de Sb^{V} a Sb^{III} , un descenso en la entrada de Sb^{III} por una disminución de la expresión de los transportadores, o un aumento de las defensas antioxidantes del parásito^{103,104}. Además, se han identificado varios genes relacionados con la insensibilidad a antimoniales en aislados clínicos, lo que sugiere un mecanismo de resistencia multifactorial¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

1.2.4.2. Anfotericina B.

La anfotericina B (**25**, Figura 1.23) es un producto natural obtenido de *Streptomyces nodusus*, un actinomiceto del suelo, que actualmente representa el fármaco más prometedor en el tratamiento de la leishmaniasis visceral y mucocutánea en regiones en las que hay alta resistencia al tratamiento con antimoniales¹⁰⁹. Su estructura química consiste en un anillo de lactona macrocíclica, que por un lado contiene una cadena de polienos hidrofóbica y por el otro una cadena hidrofílica con siete grupos hidroxilos. Además, el anillo macrólido contiene un ácido carboxílico y el aminoazúcar micosamina unido mediante un enlace glucídico. Se administra por infusión intravenosa, en un hospital, para que el paciente pueda ser sometido a monitorización continua, empleándose dosis de 0,75-1 mg/kg/día durante 15-20 días o en días alternos, obteniéndose un porcentaje de curación del 97%¹¹⁰. Sin embargo, pueden darse dosis más altas de fármaco durante un periodo más corto, lo que reduce los costes de hospitalización.

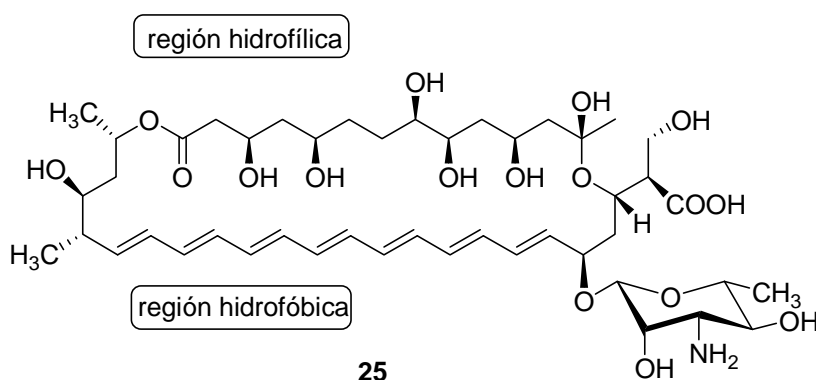


Figura 1.23. Estructura del antibiótico anfotericina B, **25**.

La anfotericina B actúa a nivel de los esteroides de la membrana del parásito, produciendo un aumento en la permeabilidad que conduce a la muerte del parásito. Su estructura con una mitad hidrofóbica, compuesta por dobles enlaces, y una mitad hidrofílica que contiene grupos hidroxilo, es ideal para actuar en la membrana celular. Varias moléculas de anfotericina B se agrupan dejando la cadena de alquenos hacia el exterior, formando poros con los grupos hidroxilos hacia el interior. De este modo se inserta en la membrana de la célula permitiendo que el contenido polar de la misma salga de ella por el interior hidrofílico de los poros, lo que conduce a la muerte celular por un mecanismo osmótico. La anfotericina

B tiene mayor afinidad por el ergosterol, presente en la membrana de los Trypanosomátidos, que por el colesterol¹¹¹.

A pesar de presentar una excelente actividad leishmanicida, la anfotericina B es tóxica y da lugar a efectos adversos, como fiebres y escalofríos. A nivel del riñón incrementa la concentración de sales e iones Ca^{2+} y la permeabilidad para los H^+ , lo que provoca un colapso del pH y del gradiente de Ca^{2+} en la membrana celular, y en último término la muerte celular por apoptosis¹¹².

Para minimizar los efectos adversos se han utilizado diferentes formulaciones clínicas, como son anfotericina B liposomal (AmBisome[®]), dispersión coloidal (Amphocil[®]) y complejo lipídico (Abelcit[®]). De ellas, AmBisome[®] es la más eficaz y con menos efectos tóxicos. En casos de LV, la anfotericina B liposomal ha demostrado una alta eficacia, siendo actualmente empleada en todas las zonas endémicas de leishmaniasis a pesar de que su elevado coste limita en muchos casos su empleo⁷⁴. En la India una dosis total de 10 mg/kg (5 dosis de 2 mg/kg) logra una tasa de cura superior al 95% frente a *L. donovani*.

1.2.4.3. Miltefosina.

La miltefosina (**26**, Figura 1.24) es una alquilfosfocolina, que pertenece al grupo de los alquilfosfolípidos, en los que la fosfocolina se esterifica con un alcohol de cadena larga. A pesar de que su actividad antineoplásica y leishmanicida se descubrieron simultánea aunque independientemente a principios de la década de 1980, se desarrolló primero como un fármaco anticanceroso. En 2002, la miltefosina se registró como el primer fármaco oral para el tratamiento de la LV, y desde entonces se ha estado usando en la India de forma exitosa^{103,113}. Con dosis diarias de 50 mg/kg en el caso de niños o 100 mg/kg en adultos, durante 28 días, se han logrado tasas de curación superiores al 90% en la India.

El mecanismo de acción leishmanicida de este compuesto no está del todo claro, pero se ha sugerido que actúa a nivel del metabolismo de alquilfosfolípidos, metabolismo del inositol, activación de la fosfolipasa, proteína quinasa C y otras rutas mitogénicas, produciendo la muerte del parásito por un mecanismo similar a la apoptosis^{114,115}.

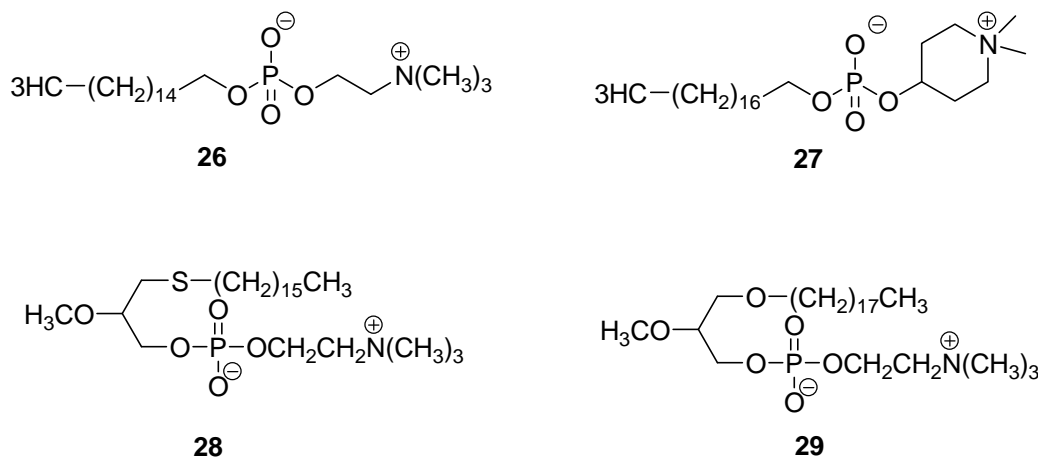


Figura 1.24. Estructura de los análogos de fosfolípidos: miltefosina, **26**; perifosina, **27**; ilmofosina, **28**, y edelfosina, **29**.

Los efectos adversos de este fármaco, principalmente molestias gastrointestinales y toxicidad renal, son reversibles y no muy graves. Sin embargo, produce efectos teratogénicos por lo que está contraindicado en mujeres embarazadas y niños pequeños¹¹⁶.

Inicialmente se consideró la terapia ideal en el tratamiento de la leishmaniasis, con una eficiencia del 94% en LV y del 33-91% en LC, pero la aparición de resistencias está determinando un uso controlado en las zonas endémicas. Recientemente, han aumentado los casos de fallo terapéutico de la miltefosina oral en la India¹¹⁷. El desarrollo de resistencias a miltefosina se debe tanto a factores intrínsecos del fármaco, principalmente su larga vida media (150-200 h), como a factores extrínsecos derivados de una práctica inadecuada, consecuencia del alto precio de la miltefosina y de la falta de control médico.

A partir del éxito de este compuesto, se han ensayado otros compuestos análogos de fosfolípidos, que han mostrado una actividad leishmanicida interesante¹¹⁸, como son la perifosina, ilmofosina y edelfosina (**27**, **28** y **29**, Figura 1.24). Además, se han realizado estudios de estructura-actividad, y se ha visto que la introducción de diversos anillos cicloalcanicos en la parte lipídica de la molécula produce un aumento de la actividad leishmanicida. Con respecto al grupo principal, hay una preferencia hacia la colina¹¹⁹.

1.2.4.4. Paromomicina.

La paromomicina (**30**, Figura 1.25) es un antibiótico aminoglicósido de amplio espectro que pertenece a la familia de la neomicina. Su estructura química consiste en 3 amino azúcares unidos a una subunidad ribofuranosil central mediante enlaces glicosídicos. Su actividad leishmanicida fue demostrada en la década de 1960¹²⁰ y fue registrada en la India para el tratamiento de la LV en 2006¹²¹. Su eficacia es mayor para la LC, especialmente si se administra por vía parenteral, ya que presenta una baja absorción tras su administración oral.¹²² Recientemente se han realizado ensayos que demuestran la eficacia de la paromomicina en forma tópica¹²³, lo que supone una ventaja en cuanto a facilidad de su uso. Es un fármaco seguro y muy barato, pero para el tratamiento de la LV requiere de inyecciones intramusculares durante 21 días (16-20 mg/kg/día)^{116,124}.

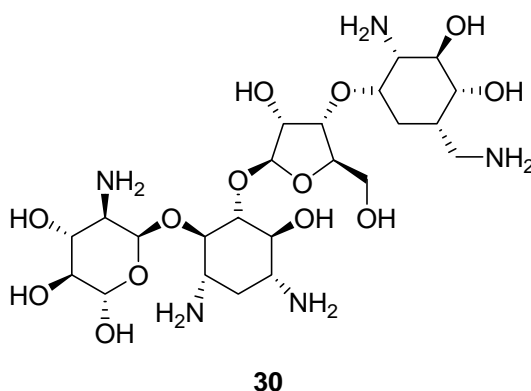


Figura 1.25. Estructura del antibiótico paromomicina, **30**.

El mecanismo de acción de la paromomicina es similar al descrito en bacterias. El fármaco actúa a nivel ribosomal, ya que se une a la subunidad 30S del ribosoma e interfiere con la iniciación de la síntesis de proteínas¹²⁵. Además, induce disfunción a nivel respiratorio y afecta a la permeabilidad y a la fluidez de la membrana. Un estudio reciente demuestra que la paromomicina catiónica se une al glicocalix cargado negativamente de *Leishmania*, lo que sugiere a la mitocondria como diana¹²⁶.

Aunque no se han registrado casos de resistencia, se ha inducido resistencia *in vitro* en *L. donovani* y *L. tropica*^{126,127}.

1.2.4.5. Terapia combinada.

A pesar de que la quimioterapia contra la leishmaniasis ha progresado significativamente durante los últimos años, la mayoría de los fármacos presentan algunas limitaciones como el precio, seguridad, eficacia, toxicidad, efectos adversos, y sobre todo, la probabilidad de un aumento de resistencias.

Actualmente, la OMS recomienda el uso de terapias combinadas, utilizando fármacos de distinta estructura química y con diferentes blancos de acción. Esta combinación de fármacos tiene las ventajas potenciales de acortar la duración del tratamiento, reducir la dosis global de medicamentos, con la consiguiente reducción de sus efectos tóxicos y del coste, y de reducir las probabilidades de adquisición de resistencias, prolongando así la vida efectiva de los medicamentos disponibles⁶⁶.

Se han realizado varios ensayos clínicos con combinaciones de distintos fármacos y los resultados han sido favorables. De este modo, la asociación de estibogluconato de sodio y paromomicina para tratar la LV es segura y efectiva en ensayos llevados a cabo en India y en el este de África y ha sido utilizada exitosamente en pacientes sudaneses, demostrando una menor mortalidad y menores complicaciones durante el tratamiento en comparación con una monoterapia con estibogluconato de sodio^{66,125}. Otras combinaciones de fármacos como anfotericina B liposomal y miltefosina, anfotericina B liposomal y paromomicina o miltefosina y paromomicina, ensayadas en India para tratar la LV, son más eficaces que el tratamiento estándar con anfotericina B y presentan menos efectos adversos¹²⁸.

En relación a la aparición de resistencias en terapias combinadas, sería de esperar que la probabilidad de que emerjan parásitos doble-resistentes sea muy baja. Sin embargo, se ha demostrado que *Leishmania* es capaz de desarrollar resistencia experimental a combinaciones de fármacos¹²⁹, por lo que es importante que este tipo de terapias se apliquen de forma controlada.

1.2.4.6. Otros fármacos leishmanicidas.

1.2.4.6.1. Pentamidina.

La pentamidina (**31**, Figura 1.26) es una diamidina aromática, en concreto la 4,4'-(pentametilendioxi)dibenzamida, cuya estructura consiste en dos benzamidinas unidas por un espaciador alifático. Comenzó a usarse como tratamiento de la enfermedad del sueño, producida por *Trypanosoma brucei*, y actualmente es un fármaco de segunda línea para el tratamiento de la leishmaniasis visceral. Su toxicidad, el desarrollo de resistencias y su vía de administración parenteral han restringido su uso como fármaco de primera elección.

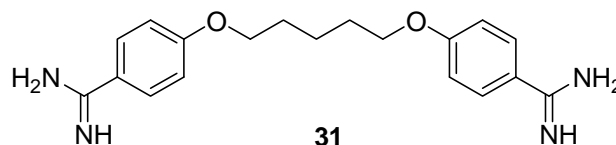


Figura 1.26. Estructura química de la diamina pentamidina, **31**.

Se sabe que la pentamidina entra en las formas promastigotas de *L. donovani* a través de los transportadores de arginina y poliamina, y se acumula en la mitocondria. Se ha determinado que actúa produciendo una inhibición de la síntesis de poliaminas y un desplazamiento de la espermidina de su lugar de unión al ADN del kinetoplasto, dificultando la replicación y transcripción a nivel mitocondrial¹³⁰. Además, la pentamidina inhibe la topoisomerasa I mitocondrial y produce un colapso en el potencial de membrana mitocondrial que lleva a la destrucción del kinetoplasto.

Se ha inducido resistencia a la pentamidina *in vitro*, y el mecanismo de resistencia se relaciona con la alteración en los transportadores específicos y la falta de acumulación mitocondrial¹³¹.

La pentamidina puede usarse para todas las formas clínicas de leishmaniasis. Su tasa de curación asociada a bajas dosis en un periodo corto la convierten en una alternativa para la LC en caso de fallo del tratamiento con los antimoniales. Sin embargo, su uso frente a la leishmaniasis en los casos de resistencia ha disminuido por su baja eficacia y toxicidad¹¹⁷.

1.2.4.6.2. Sitamaquina.

La sitamaquina (**32**, Figura 1.27) es una 8-aminoquinolina, análogo estructural del antimalárico primaquina, que está siendo desarrollado como una alternativa oral para el tratamiento de la LV. Es un fármaco que ha mostrado una buena eficacia en los estudios en fase clínica II para la LV, aunque también se han observado diversos efectos adversos^{132,133}.

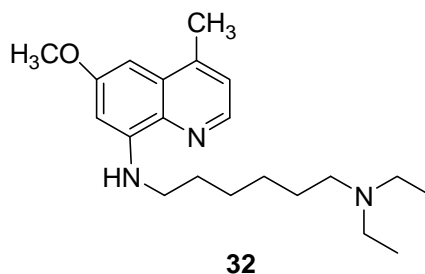


Figura 1.27. Estructura química de la sitamaquina, **32**.

A altas concentraciones, la sitamaquina afecta a la motilidad, morfología y crecimiento del parásito. Este compuesto produce alcalinización de los acidocalcisomas y un colapso en el potencial de membrana mitocondrial. Recientemente, se ha demostrado que la actividad leishmanicida de la sitamaquina está determinada por la inhibición del complejo II de la cadena respiratoria, lo que desencadena un estrés oxidativo y finalmente la muerte del parásito mediante un proceso similar a la apoptosis¹³⁴. Además, su actividad es independiente de la acumulación en acidocalcisomas¹³⁵.

1.2.4.6.3. Alopurinol.

El alopurinol (**33**, Figura 1.28), la 4-hidroxi-pirazolo-(3,4*d*)-pirimidina, es el primer análogo de purina que demostró actividad leishmanicida. Este compuesto interfiere en la síntesis de ARN y proteínas, al ser incorporado en los ácidos nucleicos del parásito por las enzimas de la ruta de las purinas¹⁰³.

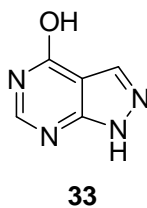


Figura 1.28. Estructura del análogo de purina alopurinol, **33**.

1.2.4.6.4. Azoles.

Los imidazoles y triazoles son agentes antifúngicos orales conocidos y en general bien tolerados. Han demostrado actividad leishmanicida contra algunas especies, al inhibir la 14α -demetilasa, una enzima clave en la biosíntesis de ergosterol, el principal fosfolípido de la membrana celular de *Leishmania*. Entre estos compuestos, se encuentra el ketoconazol (**34**, Figura 1.28) que se ha usado en el tratamiento frente a *L. panamensis* y *L. mexicana*¹³⁶, y el fluconazol (**35**, Figura 1.28) que se ha empleado en el tratamiento frente a *L. major*¹³⁷.

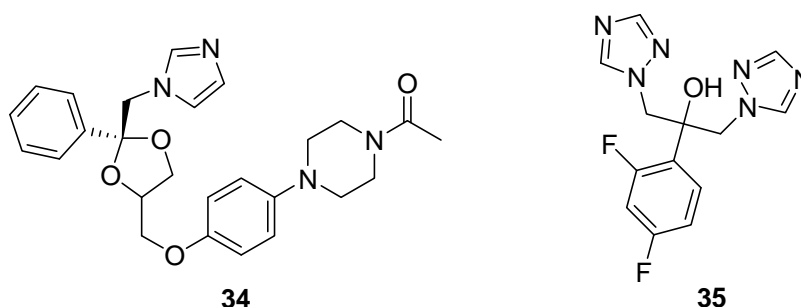


Figura 1.29. Estructura de los azoles con actividad leishmanicida ketoconazol, **34**, y fluconazol, **35**.

1.2.4.7. Principales problemas de la quimioterapia frente a la leishmaniasis.

El tratamiento frente a la leishmaniasis no es sencillo debido a una serie de problemas que hay que tener en cuenta a la hora de plantear las estrategias terapéuticas.

En primer lugar, el arsenal terapéutico es muy reducido. Las recomendaciones de la OMS para el tratamiento de la enfermedad se reducen a tan sólo 4 fármacos: antimoniales pentavalentes, anfotericina B, miltefosina y paromomicina. Actualmente, existe una actividad significativa en programas de cribado de fármacos, pero la realidad es que no existe ningún fármaco leishmanicida en fase clínica III. Además se estima que harán falta más de 10 años para que salga al mercado un nuevo fármaco. Esto subraya la importancia y la necesidad de desarrollar nuevos fármacos y nuevas estrategias terapéuticas frente a la leishmaniasis.

En segundo lugar, el alto coste de los fármacos hace que en muchos casos los tratamientos disten de ser aplicables¹³⁸. Se estima que sólo el coste de los fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis oscila entre 30 y 150\$, lo que es demasiado al compararlo con

el salario en países endémicos como la India, Nepal, Bangladesh o Brasil. La OMS considera que en países afectados por la leishmaniasis que tengan salarios muy bajos, la donación de fármacos es una solución efectiva para el control de la enfermedad.

Por último, es frecuente la aparición del fallo terapéutico. Por ejemplo, se han descrito un 60% de resistencias a los antimoniales para el tratamiento de la LV en la India¹³⁹ o un 20% de resistencia para la LC en Perú¹⁴⁰. Recientemente han aumentado los casos de fallo terapéutico de la miltefosina oral en la India¹¹⁷. Los factores que afectan a la eficacia de los fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis son:

- Las diferencias de sensibilidad entre las especies de *Leishmania*. Existen unas 20 especies diferentes de *Leishmania* que infectan al hombre, y aunque son muy similares morfológicamente, se diferencian en su composición en isoenzimas y antígenos^{62,63}, lo que determina una diferente sensibilidad a fármacos. De este modo, la especie de *Leishmania* va a determinar en gran medida la evolución de la enfermedad.
- Las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad producidas por las distintas especies conlleva a diferencias en la accesibilidad de los fármacos a los sitios de localización parasitaria, y por consiguiente determina diferencias en la eficacia terapéutica de los fármacos.
- El incremento de las resistencias a los fármacos por parte de los parásitos. En el periodo entre los años 1970-1990, la respuesta al antimonio ha disminuido significativamente, lo que ha hecho necesario que se aumenten las dosis de antimonio de 10 mg/Kg durante 6-20 días a 20 mg/Kg durante 20-40 días. Muchas veces una inadecuada administración (dosis o tiempo de tratamiento) del fármaco da lugar a una tolerancia progresiva al mismo por parte del parásito. Esta resistencia puede deberse a múltiples mecanismos, entre otros: la alteración de los niveles intracelulares del fármaco, la inactivación por metabolismo o secuestro del fármaco, la variación de los niveles del blanco de acción o la sobreexpresión de los mecanismos de reparación del parásito.

1.2.4.8. Potenciales fármacos leishmanicidas.

En los últimos años se está desarrollando un proceso de búsqueda de nuevos fármacos leishmanicidas. En muchos casos, la estrategia es el ensayo de fármacos usados comúnmente frente a otras patologías. Entre los fármacos actualmente en estudio destacan el fexinazol, un nitroimidazol oral actualmente en fase clínica I para el tratamiento de la tripanosomiasis africana que presenta actividad frente a la leishmaniasis visceral¹⁴¹; el posoconazol, un antifúngico que actúa sobre la enzima 14 α -demetilasa, implicada en la biosíntesis de esteroles¹⁴²; la buparvacuona (Butalex[®]), una hidroxinaftoquinona que ha mostrado actividad leishmanicida *in vivo*¹⁴³; la amiodarona, un fármaco antiarrítmico que interfiere en el metabolismo de esteroides de *Leishmania*¹⁴⁴, o la paromomicina liposomal, ensayada para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea¹⁴⁵.

La leishmaniasis es la única enfermedad tropical que se trata con fármacos que fueron descubiertos para otras patologías. Además, en la mayoría de los casos, no se conoce exactamente el mecanismo por el que esos fármacos actúan frente a *Leishmania*. Sin embargo, los estudios están avanzando en este sentido para permitir diseñar fármacos más activos y específicos.

La investigación de nuevas dianas farmacológicas se basa en las rutas bioquímicas y metabólicas esenciales para la supervivencia del parásito. Dentro de esas rutas, hay que buscar dianas enzimáticas que presenten diferencias estructurales o funcionales significativas con respecto a las correspondientes enzimas de mamíferos. En este sentido, las estrategias terapéuticas encaminadas a la inhibición de más de una enzima simultáneamente, sería esperable que muestren una mayor eficacia. Entre las vías metabólicas del parásito que se están estudiando destacan la ruta del metabolismo de purinas, el metabolismo de tioles y poliaminas, la biosíntesis de folato, la replicación del ADN, la ruta glicolítica así como la biosíntesis de ácidos grasos y de esteroides¹⁴⁶. Todos estos estudios permitirán identificar nuevos cabezas de serie y un conjunto de compuestos con un enorme potencial leishmanicida.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos.

El principal objetivo de esta tesis es el diseño y síntesis de nuevos compuestos de bispiridinio simétricos y el estudio de sus actividades biológicas: su capacidad antiproliferativa en células tumorales y su actividad leishmanicida.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. El diseño y síntesis de una familia de compuestos bispiridínicos abiertos (Figura 2.1), basándonos en las relaciones estructura-actividad establecidas previamente por nuestro grupo para este tipo de compuestos como inhibidores de la enzima colina quinasa (ChoK).

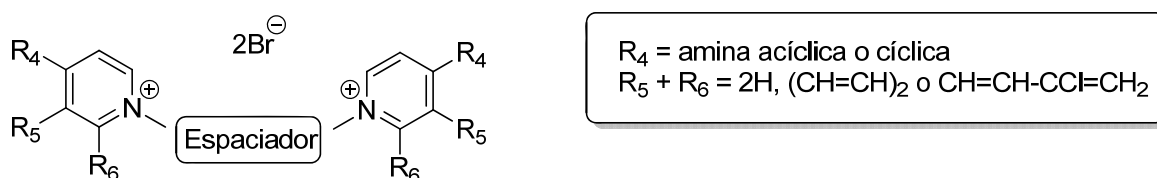


Figura 2.1. Estructura general de los compuestos bispiridínicos abiertos.

2. El diseño y síntesis de una familia de ciclofanos bispiridínicos. Esta familia de compuestos se ha diseñado en base a la experiencia previa del grupo en compuestos macrocíclicos. En este caso, se plantea la síntesis de compuestos donde al menos uno de los dos espaciadores, superior (que une a los dos grupos aminos exocíclicos) e inferior (que une a los dos átomos de nitrógenos cargados positivamente), es un resto alifático lineal, con o sin heteroátomos. Estos compuestos pueden considerarse como análogos macrociclofánicos de la pentamidina, en la que el centro básico de amidina (y por tanto, protonado a pH fisiológico) se sustituye por el nitrógeno positivo del anillo de piridinio (Figura 2.2).

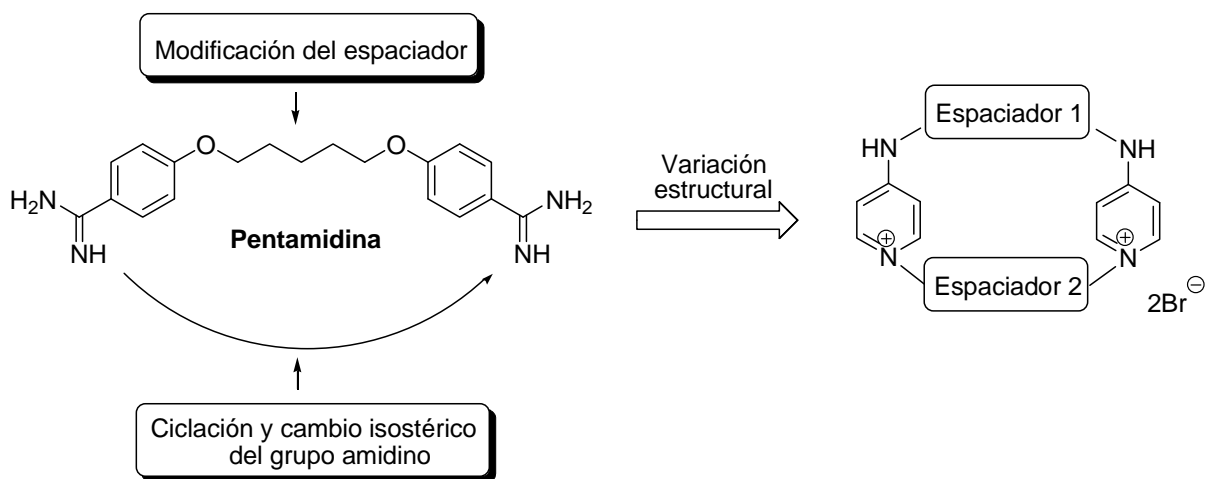


Figura 2.2. Estructura general de los compuestos ciclofanos bispiridínicos, y de la pentamidina.

3. La evaluación biológica de los compuestos sintetizados como agentes antiproliferativos frente a las líneas tumorales de adenocarcinoma humano SKBR-3 y MCF-7, y como inhibidores de la enzima ChoK, mediante ensayos *in vitro* frente a la enzima humana purificada. Además, se plantea para este tipo de compuestos la investigación del mecanismo de inhibición enzimático.

4. La evaluación biológica de los compuestos sintetizados como posibles agentes leishmanicidas. El análisis de la actividad leishmanicida en formas promastigotas y amastigotas intracelulares de dos especies de *Leishmania*: *L. major*, responsable de la leishmaniasis cutánea y *L. donovani*, responsable de la forma visceral de la enfermedad.

5. La determinación de la relación entre la actividad leishmanicida y la actividad inhibitoria ChoK humana de los compuestos sintetizados. Se plantea la hipótesis de que los compuestos ejerzan su acción leishmanicida mediante la inhibición de las enzimas de *Leishmania* colina/etanolamina quinasa (CEK) y etanolamina quinasa (EK), que son homólogas funcionales de la enzima ChoK humana.

6. El estudio del mecanismo de acción leishmanicida para un compuesto líder seleccionado de cada una de las dos familias estructurales sintetizadas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. Resultados y Discusión.

Resumen.

En este apartado se detalla la metodología sintética empleada en la preparación de los 19 compuestos finales presentados en esta Memoria, así como los ensayos biológicos realizados a los compuestos sintetizados. Se trata de compuestos piridofanos simétricos, que se han dividido en dos familias en base a que su estructura sea abierta o macrocíclica: compuestos bispiridínicos abiertos y ciclofanos bispiridínicos.

En la primera parte, se presenta la familia de compuestos bispiridínicos abiertos, formada por 10 compuestos finales que se clasifican, atendiendo a la cabeza catiónica, en derivados de bispiridinio o derivados de bisquinolinio. En todos los casos la cabeza catiónica está sustituida en posición 4 por un resto amino que, a su vez, puede ser cíclico o acíclico. Con estos compuestos abiertos se han realizado diferentes ensayos biológicos:

1. Ensayos de actividad antiproliferativa sobre cultivos celulares de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 y SKBR-3. Se han elegido estas líneas celulares por ser líneas resistentes a la terapia antitumoral y presentar el oncogén ras activo¹⁴⁷. Para ambas líneas se ha demostrado la sobreexpresión de la enzima colina quinasa α (ChoK α) humana²⁸, lo que justifica su uso en este trabajo.

2. Ensayos de inhibición enzimática con una variante truncada en *N*-terminal de la enzima ChoK α humana (Δ 84N-hChoK α 2). Se han seleccionado los compuestos **VGP-118** y **VGP-150** para realizar ensayos más profundos con objeto de conocer el mecanismo de inhibición enzimática.

3. Ensayos de actividad leishmanicida frente a formas promastigotas y amastigotas intracelulares de dos especies de *Leishmania*: *Leishmania donovani*, responsable de la forma visceral de la enfermedad, y *Leishmania major*, causante de la leishmaniasis cutánea. Se ha seleccionado el compuesto **VGP-106** para realizar ensayos sobre formas promastigotas de *L. donovani*. En primer lugar se ha realizado un ensayo con parásitos transfectados con el gen de la colina/etanolamina quinasa

(CEK) o con el gen de la etanolamina quinasa (EK), para establecer una relación entre la actividad leishmanicida y la capacidad inhibitoria de ChoK humana. Además, se ha llevado a cabo un estudio de microscopía electrónica para observar posibles alteraciones de las estructuras del parásito producidas tras el tratamiento con el compuesto. Asimismo se han realizado otros ensayos encaminados a conocer el mecanismo de acción leishmanicida del compuesto **VGP-106**, desde la entrada en el parásito, hasta los efectos a nivel del metabolismo energético y el mecanismo por el que finalmente produce la muerte celular.

En la segunda parte, se presenta la familia de ciclofanos, que son compuestos bispiridínicos simétricos unidos por un espaciador superior, que une los grupos amino exocíclicos y otro inferior, que une los dos átomos de nitrógeno cuaternizados. A diferencia de los compuestos previamente sintetizados donde ambos espaciadores eran anillos bencénicos⁴⁹, en este caso al menos uno de los dos espaciadores es una estructura alifática, lo que confiere a la molécula una mayor flexibilidad.

Con estos compuestos ciclofanos se han realizado ensayos de actividad antiproliferativa frente a la línea de adenocarcinoma de mama humano MCF-7. Además, se han llevado a cabo ensayos de actividad leishmanicida frente a formas promastigotas y amastigotas de *L. donovani* y *L. major*. Dentro de esta familia, se ha seleccionado el compuesto **VGP-318** para realizar otros ensayos sobre promastigotes de *Leishmania*, que nos permitan conocer su mecanismo de acción leishmanicida y esclarecer las diferencias de actividades entre las dos especies estudiadas.

3.1. Parte 1: Compuestos bispiridínicos abiertos.

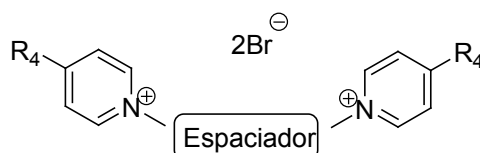
3.1.1. Química.

Se han sintetizado 10 compuestos biscatiónicos simétricos abiertos, que constan de un espaciador y de una cabeza catiónica sustituida en la posición 4 por aminas cíclicas o acíclicas. Los compuestos se agrupan en dos familias atendiendo a que la cabeza catiónica sea un piridinio o un quinolinio. Dentro de cada familia, los compuestos se diferencian tanto en el espaciador como en los sustituyentes del grupo amino de la posición 4 del heterociclo.

A continuación se detallan las estructuras de los compuestos finales, denominados con las siglas **VGP-106**, **VGP-114**, **VGP-118**, **VGP-130**, **VGP-138**, **VGP-146**, **VGP-150**, **VGP-162**, **VGP-174** y **VGP-182**.

Derivados de piridinio.

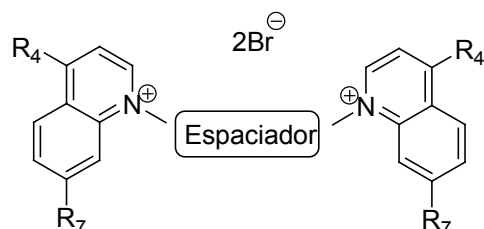
Para su síntesis se han utilizado cuatro espaciadores diferentes, y tres cabezas catiónicas distintas, en las que el piridinio tiene en posición 4 un grupo amino terciario, que es cíclico en uno de los casos y acíclico unido a un anillo aromático en los otros dos.



Compuesto	Espaciador	R ₄
VGP-106		
VGP-114		
VGP-118		
VGP-130		
VGP-138		

Derivados de quinolinio.

Para su síntesis se han utilizado cinco espaciadores diferentes, y tres cabezas catiónicas distintas, una de ellas es el 7-cloroquinolinio sustituido en posición 4 por un grupo amino terciario cíclico (resto de perhidroazepino) y las otras dos son quinolinios sustituidos en posición 4 por un grupo amino secundario acíclico, que a su vez está unido a un anillo aromático.

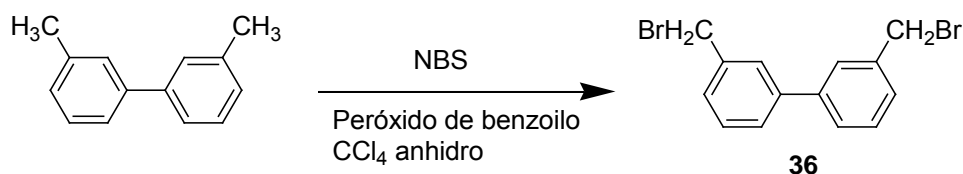


Compuesto	Espaciador	R ₄	R ₇
VGP-146			Cl
VGP-150			Cl
VGP-162			Cl
VGP-174			H
VGP-182			H

3.1.1.1. Síntesis de espaciadores.

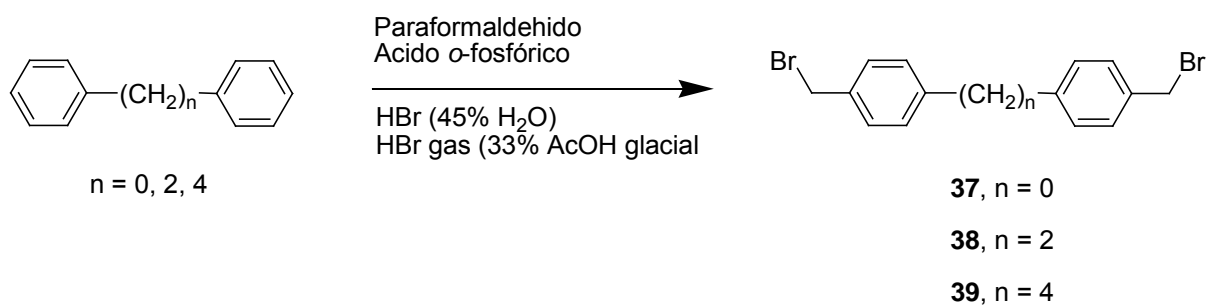
Se han utilizado seis tipos de espaciadores diferentes, dos de los cuales, el 1,3-bis(bromometil)benceno y el 1,4-bis(bromometil)benceno, están disponibles comercialmente. Los otros cuatro espaciadores se han preparado siguiendo las rutas sintéticas que se describen a continuación.

El espaciador 3,3'-bis(bromometil)bifenilo **36** (Esquema 3.1) se ha obtenido mediante halogenación bencílica de tipo radicalario del 3,3'-dimetilbifenilo comercial con *N*-bromosuccinimida (NBS) y peróxido de benzoilo como catalizador¹⁴⁸.



Esquema 3.1. Preparación de 3,3'-bis(bromometil)bifenilo **36**.

Los espaciadores 4,4'-bis(bromometil)bifenilo **37**, bis(*p*-bromometil)bibencilo **38** y 1,4-bis[*p*-(bromometil)fenil]butano **39** se han sintetizado a partir del correspondiente bifenilo, mediante una reacción de bisbromometilación en un solo paso, utilizando paraformaldehído y bromuro de hidrógeno en presencia de ácido *o*-fosfórico^{149,150} (Esquema 3.2).

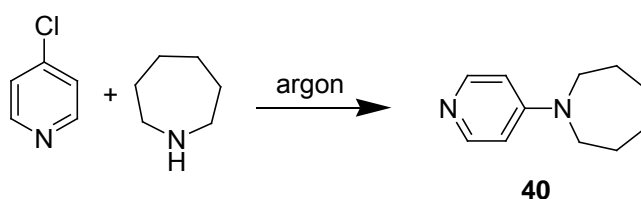


Esquema 3.2. Preparación de los dibromo derivados que van a constituir los espaciadores bis(*p*-bromometil)bifenilo **37**, bis(*p*-bromo-metil)bibencilo **38** y 1,4-bis[*p*-(bromometil)fenil]butano **39**.

3.1.1.2. Síntesis de las piridinas sustituidas en posición 4.

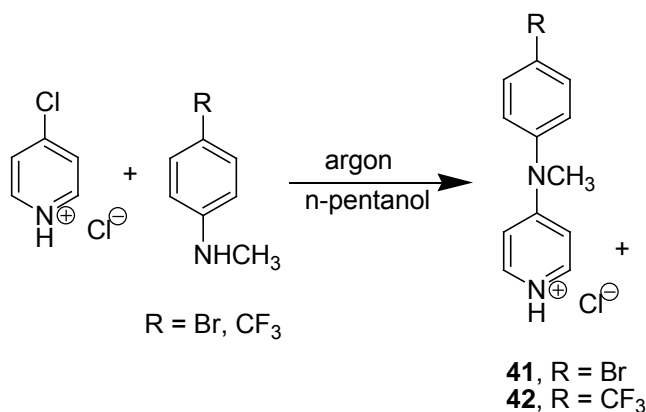
La síntesis de las piridinas se ha realizado a partir de la 4-cloropiridina y la amina secundaria correspondiente, mediante una Sustitución Nucleofílica Aromática (S_{NAr}).

4-Perhidroazepinopiridina 40. La reacción se realiza por tratamiento de la 4-cloropiridina con un exceso de perhidroazepina que se comporta como reactivo y disolvente de la reacción¹⁵¹ (Esquema 3.3).



Esquema 3.3. Síntesis de la 4-perhidroazepinopiridina 40.

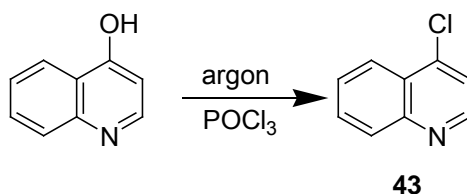
4-(4-Bromo-*N*-metilanilino)piridina 41 y **4-(4-trifluorometil-*N*-metilanilino)piridina 42.** Para obtener las piridinas sustituidas en posición 4 por los grupos 4-bromo-*N*-metilanilino ó 4-trifluorometil-*N*-metilanilino, (**41** y **42**, Esquema 3.4), la reacción se realiza usando clorhidrato de 4-cloropiridina ya que, al encontrarse el *N* cuaternizado, el átomo de cloro en posición 4 se convierte en mejor grupo saliente. En este caso, la reacción se lleva a cabo usando como disolvente *n*-pentanol, a la temperatura de reflujo de la mezcla y en condiciones anhidras. Se obtienen así los clorhidratos de los productos resultantes, que son transformados a sus formas de base neutra mediante tratamiento con NaOH antes de llevar a cabo la síntesis de los compuestos finales.



Esquema 3.4. Síntesis de la 4-(4-bromo-*N*-metilanilino)piridina **41** y la 4-(4-trifluorometil-*N*-metilanilino)piridina **42**.

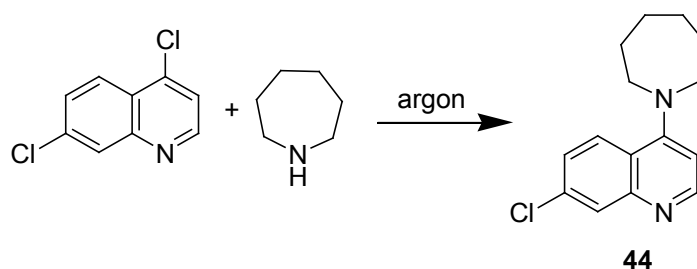
3.1.1.3. Síntesis de las quinolinas sustituidas en posición 4.

La síntesis de las quinolinas se ha realizado utilizando como producto de partida la 4-cloroquinolina **43**, que se obtiene a partir de la 4-hidroxiquinolina comercial¹⁵² (Esquema 3.5).



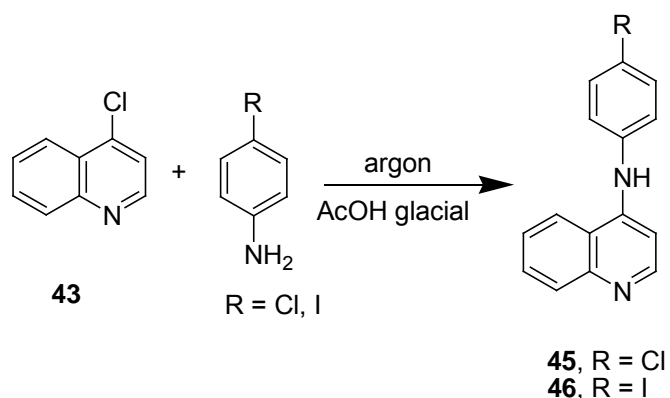
Esquema 3.5. Preparación de la 4-cloroquinolina **43**.

7-Cloro-4-(perhidroazepin-1-il)quinolina 44. En este caso, la reacción se realiza por tratamiento de la 4,7-dicloroquinolina con un exceso de perhidroazepina que se comporta como reactivo y disolvente de la reacción¹⁵¹ (Esquema 3.6).



Esquema 3.6. Síntesis de la 4-(perhidroazepin-1-il)quinolina **44**.

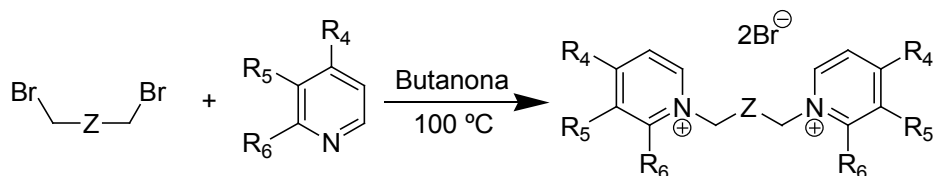
4-(4-Cloroanilino)quinolina 45 y 4-(4-yodoanilino)quinolina 46. Para obtener las quinolinas sustituidas en posición 4 por 4-cloroanilina y 4-yodoanilina se realiza la reacción a partir de la 4-cloroquinolina **43** con la anilina correspondiente, usando como disolvente ácido acético glacial a la temperatura de reflujo, en condiciones anhidras. (Esquema 3.7).



Esquema 3.7. Síntesis de la 4-(4-cloroanilino)quinolina **45** y la 4-(4-yodoanilino)quinolina **46**.

3.1.1.4. Síntesis de los compuestos finales bispiridínicos abiertos.

Los compuestos finales bispiridínicos abiertos se han sintetizado mediante calentamiento del correspondiente derivado dibromado y el heterociclo de piridina o quinolina, en una relación molar 1:2, en un tubo cerrado a 100 °C usando butanona como disolvente (Esquema 3.8).



Esquema 3.8. Síntesis de los compuestos finales bispiridínicos abiertos.

En estas condiciones ocurren dos reacciones S_N2 , obteniéndose el derivado bispiridínico deseado. La temperatura de 100 °C y el tiempo de reacción, de entre 5 y 10 días, son dos factores clave que favorecen la formación del derivado bispiridínico.

3.1.2. Ensayos biológicos.

Los compuestos bispiridínicos abiertos sintetizados se han ensayado como inhibidores de la enzima ChoK humana, como agentes antiproliferativos y como agentes leishmanicidas.

Los estudios de inhibición de ChoK han sido realizados durante una estancia de investigación en el Instituto Max Planck de Química Biofísica en Göttingen (Alemania) bajo la supervisión del doctor Manfred Konrad.

Los diferentes ensayos de actividad en *Leishmania* han sido realizados durante la estancia en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Granada, bajo la supervisión de los doctores Francisco Gamarro y Santiago Castanys.

3.1.2.1. Ensayos de actividad antiproliferativa.

En los ensayos de inhibición de la proliferación celular se ha medido la actividad antiproliferativa frente a cultivos celulares de las líneas de adenocarcinoma de mama humano SKBR-3 y MCF-7.

Para determinar el efecto de los compuestos sintetizados sobre la proliferación celular, se ha realizado un primer ensayo de citotoxicidad utilizando el método MTT para todos los compuestos a dos concentraciones fijas, 1 y 10 μM , sobre la línea SKBR-3 (Tabla 3.1). Este método se basa en la capacidad de las enzimas deshidrogenasas de las células de convertir el sustrato bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), soluble y amarillo, en el producto formazán, insoluble y de color azul. La cantidad de producto formado depende del número de células y de la viabilidad de las mismas.

Tabla 3.1. Actividad antiproliferativa de los compuestos bispiridínicos abiertos frente a las líneas celulares SKBR-3 y MCF-7.

Compuesto	SKBR-3			MCF-7
	% Inhibición			CI ₅₀ μM
	1 μM	10 μM	CI ₅₀ μM	
VGP-106	0	75,1	8,28 ± 0,74	9,15 ± 0,87
VGP-114	31,5	78,3	nd	11,33 ± 0,98
VGP-118	7,4	76,6	1,69 ± 0,10	2,94 ± 0,23
VGP-130	0	75,0	nd	8,09 ± 0,54
VGP-138	0	18,2	nd	59,19 ± 2,54
VGP-146	43,7	71,9	nd	3,46 ± 0,42
VGP-150	15,8	74,6	nd	4,15 ± 0,35
VGP-162	61,8	99,4	1,24 ± 0,25	4,44 ± 0,22
VGP-174	79,9	99,8	1,56 ± 0,31	1,28 ± 0,20
VGP-182	28,3	99,6	3,78 ± 0,89	2,47 ± 0,19

Los datos presentados son medias de los valores de CI₅₀ ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Nd- no determinado.

A partir de estos resultados se han elegido 5 compuestos, los 2 bispiridínicos y los 3 bisquinolínicos que presentan una mayor actividad, para llevar a cabo un ensayo de viabilidad celular en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos. La concentración a la que se consigue el 50% de inhibición (CI₅₀) se ha calculado a partir de las curvas de citotoxicidad de dichos compuestos para la línea celular de cáncer de mama SKBR-3. En la Figura 3.1, se muestra un ejemplo del estudio de citotoxicidad celular del compuesto **VGP-118** y la determinación del valor de CI₅₀.

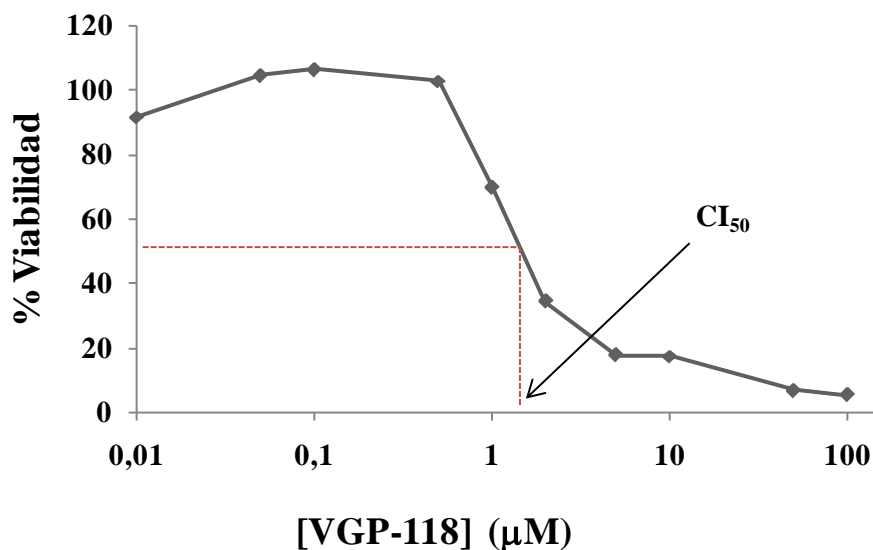


Figura 3.1. Curva de citotoxicidad del compuesto **VGP-118** frente a la línea de cáncer de mama SKBR-3. Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes.

Igualmente, se ha llevado a cabo un ensayo de citotoxicidad sobre la línea MCF-7. En este caso, el ensayo se ha realizado sobre los 10 compuestos. Se confirma que todos los compuestos presentan actividad antiproliferativa frente a la línea MCF-7, y además, los valores de CI_{50} son comparables a los obtenidos frente a la línea SKBR-3 (Tabla 3.1). En general, los compuestos derivados de quinolinio presentan una mayor actividad antiproliferativa que los derivados de piridinio, con unos valores de CI_{50} entre 1,3 y 4,5 μM , siendo el compuesto **VGP-174** el más activo de la serie. Entre los derivados de piridinio, el compuesto más activo es el **VGP-118**, con unos valores de CI_{50} de 1,7 y 2,9 μM para las líneas celulares SKBR-3 y MCF-7, respectivamente.

3.1.2.2. Estudios con la enzima ChoK humana.

3.1.2.2.1. Purificación de la enzima.

Los ensayos de inhibición de ChoK se han realizado con la variante de ChoK humana truncada en *N*-terminal $\Delta 84\text{N-hChoK}\alpha 2$, a la que le faltan 84 residuos de aminoácidos del extremo amino terminal. La purificación de la enzima $\Delta 84\text{N-hChoK}\alpha 2$ recombinante unida a la proteína glutatión-*S*-transferasa (GST) se ha realizado por cromatografía de afinidad a glutatión, mediante un proceso descrito en el apartado 4.2.2.4.1 a partir de cultivos de *E. coli* previamente transformados con el vector de expresión pGEX-RB- $\Delta 84\text{N-hChoK}\alpha 2$ ¹⁵³.

GST es una enzima muy utilizada en ingeniería genética para purificar proteínas de interés. La secuencia GST se incorpora en un vector de expresión en el extremo *N*-terminal de la secuencia del gen que codifica la proteína $\Delta 84N$ -hChoK $\alpha 2$. Al inducirse la expresión del vector, se produce la expresión de la proteína de fusión GST- $\Delta 84N$ -hChoK $\alpha 2$, que puede purificarse fácilmente debido a su alta afinidad por el glutatión. De este modo, se ha obtenido la proteína $\Delta 84N$ -hChoK $\alpha 2$ (Figura 3.2, línea 7), que tiene un peso molecular de 43,8 KDa, con una concentración de 2,8 mg/ml. Los distintos pasos de purificación de la proteína se han controlado mediante geles de SDS-PAGE (Figura 3.2).

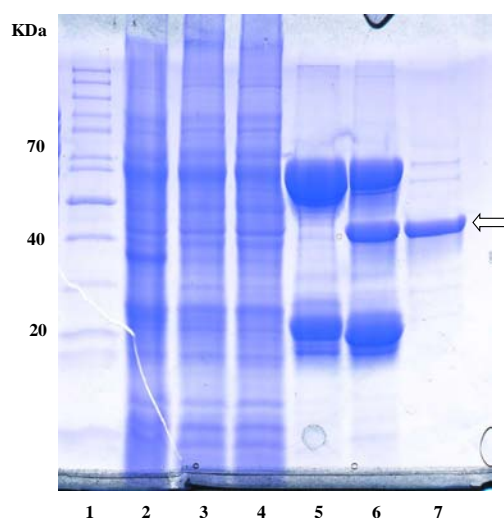
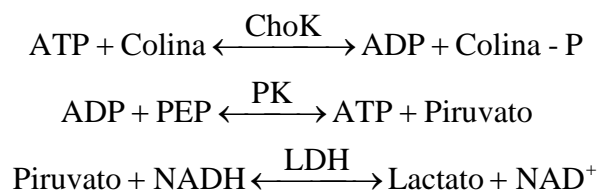


Figura 3.2. Análisis de la purificación de la proteína $\Delta 84N$ -hChoK $\alpha 2$ mediante SDS-PAGE. 1-Marcador, 2- lisado celular de *E. coli* con sobre-expresión de la proteína, 3- fracción insoluble de proteínas, 4- fracción soluble de proteínas, 5- unión a la matriz, 6- incubación con trombina, 7-elución de la proteína purificada, indicada mediante una flecha.

3.1.2.2.2. Ensayos de actividad quinasa.

Una vez purificada la enzima, y antes de realizar los ensayos de inhibición con los compuestos, se ha determinado su actividad mediante un ensayo enzimático acoplado basado en la valoración del ADP generado durante la fosforilación de la colina. Este ensayo requiere la enzima piruvato quinasa (PK), que transfiere un grupo fosfato desde el fosfoenolpiruvato (PEP) al ADP generado durante la fosforilación, regenerando el ATP inicial. En el proceso se forma ácido pirúvico que se reduce a ácido láctico por mediación de la enzima lactato-deshidrogenasa (LDH), con oxidación simultánea de NADH a NAD⁺, como muestra el Esquema 3.9.



Esquema 3.9. Reacción enzimática acoplada piruvato quinasa- lactato deshidrogenasa para la valoración del ADP generado en la fosforilación de la colina mediante la acción de la colina quinasa.

Con este ensayo, se puede monitorizar espectrofotométricamente la disminución de NADH, ya que tiene un máximo de absorción a 340 nm, que no presenta su forma oxidada (Figura 3.3). De este modo, se ha realizado el ensayo usando concentraciones crecientes de colina mientras se mantiene fija la concentración de ATP a 2 mM, en las condiciones descritas en el apartado 4.2.2.4.2.

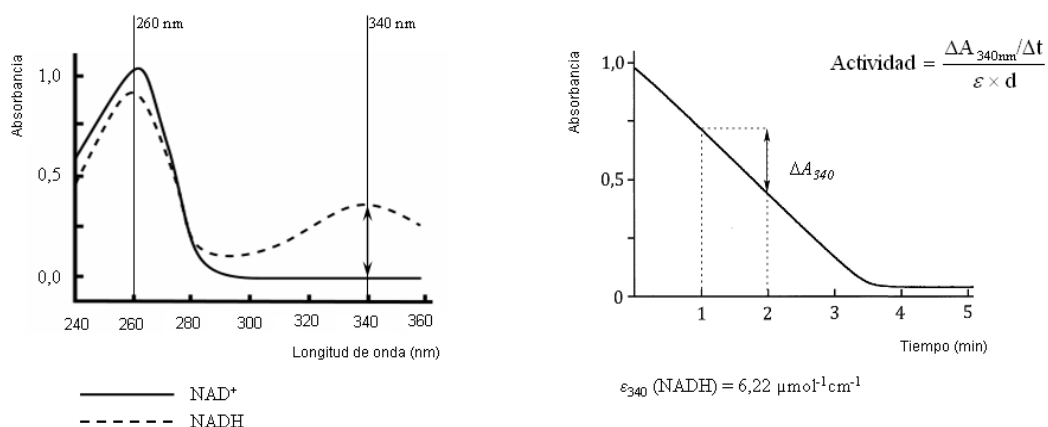


Figura 3.3. A) Curvas de absorbancia para NAD⁺ y NADH. B) Ensayo de la actividad quinasa de la enzima ChoK humana mediante la determinación de la disminución de NADH.

La enzima muestra una cinética estándar de saturación hiperbólica tipo Michaelis-Menten con respecto a la colina (Figura 3.4). A partir de esta curva se han determinado los parámetros cinéticos que caracterizan a esta enzima. La constante de Michaelis-Menten (K_M) caracteriza la afinidad de la enzima por el sustrato, y su valor se corresponde con la concentración de sustrato a la que se obtiene la mitad de la velocidad máxima. La constante catalítica (k_{cat}) o número de recambio define la capacidad del complejo enzima-sustrato para generar producto. El cociente k_{cat} / K_M es una medida de la eficacia catalítica, que permite comparar enzimas. El valor de K_M aparente calculado para $\Delta 84\text{N-hChoK}\alpha 2$ es de $0,054 \pm 0,013$ mM, con una k_{cat} de $48,7 \text{ s}^{-1}$. Por lo tanto, la k_{cat} / K_M de la enzima es $916,79 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$.

Estos parámetros cinéticos son similares a los descritos para la enzima completa²¹, lo que valida el uso de la proteína $\Delta 84N$ -hChoK $\alpha 2$ para los ensayos de inhibición de los compuestos.

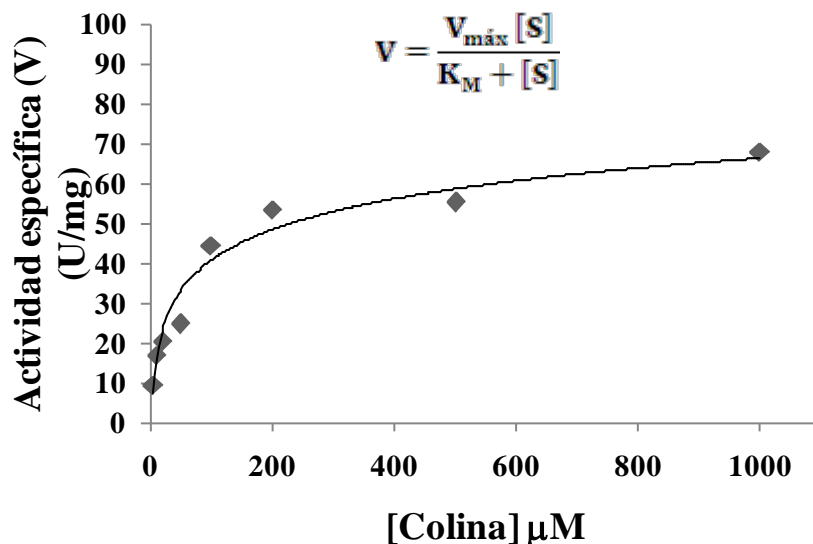


Figura 3.4. Cinética de la actividad de la proteína $\Delta 84N$ -hChoK $\alpha 2$ con respecto al sustrato colina. La actividad quinasa se determinó a distintas concentraciones de colina, empleando una concentración constante de ATP de 2 mM. El experimento es representativo de otros dos experimentos realizados en similares condiciones.

3.1.2.2.3. Estudios de inhibición.

Tras analizar la actividad enzimática de $\Delta 84N$ -hChoK $\alpha 2$, se ha estudiado la capacidad de inhibición *in vitro* de los 10 compuestos sintetizados. Para ello, se calcula la actividad relativa de la enzima para cada compuesto a diferentes concentraciones, manteniendo una concentración fija de 0,6 mM de colina y 2 mM de ATP. La CI_{50} se calcula a partir de la representación gráfica de la actividad relativa de la enzima frente a diferentes concentraciones del compuesto (Figura 3.5). Los valores de CI_{50} para los diferentes compuestos ensayados quedan reflejados en la Tabla 3.2.

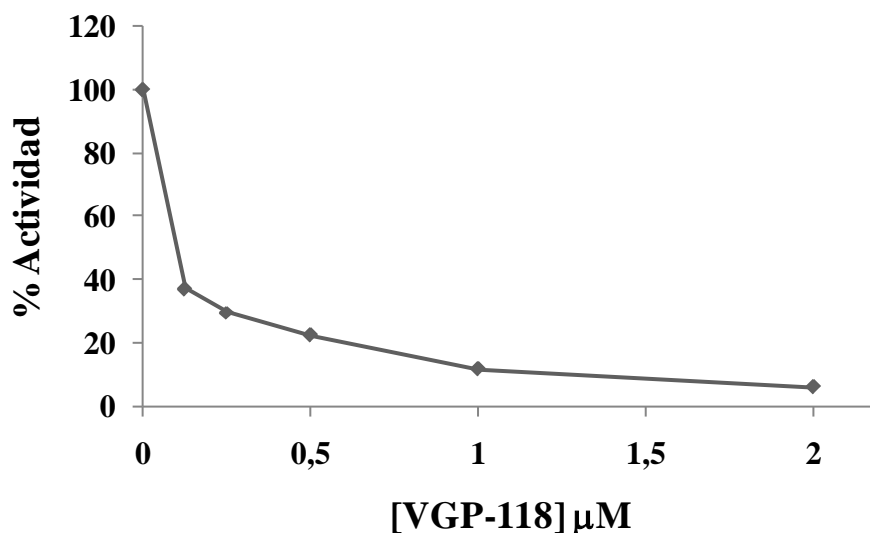


Figura 3.5. Actividad relativa de la enzima ChoK humana para el compuesto **VGP-118** a diferentes concentraciones. Es una representación de los valores de actividad obtenidos de tres experimentos independientes.

Tabla 3.2. Inhibición de la actividad del enzima $\Delta 84\text{N-hChoK}\alpha 2$ por los compuestos bispiridínicos abiertos.

Compuesto	CI₅₀ $\Delta 84\text{N-hChoK}\alpha 2$ μM
VGP-106	0,55
VGP-114	0,65
VGP-118	0,09
VGP-130	1,35
VGP-138	0,27
VGP-146	0,20
VGP-150	0,08
VGP-162	0,14
VGP-174	0,19
VGP-182	0,57
HC-3	0,92

Los datos presentados son medias de los valores de CI₅₀ de tres experimentos independientes. Como referencia se emplea el inhibidor de ChoK clásico Hemicolinio 3 (HC-3).

Todos los compuestos ensayados inhiben a la enzima, con unos valores de CI_{50} entre 0,08 y 1,35 μM . Los compuestos **VGP-118** y **VGP-150** son los inhibidores de la actividad colina quinasa más potentes, con unos valores de CI_{50} de 90 y 80 nM, siendo por tanto diez veces más potentes que el inhibidor de ChoK clásico HC-3, que presenta una CI_{50} de 0,92 μM ensayado en las mismas condiciones experimentales.

Los compuestos **VGP-118** y **VGP-150** se han seleccionado para investigar el mecanismo de inhibición enzimática de esta serie de compuestos biscatiónicos. Para ello, se ha analizado la velocidad de reacción enzimática (V) a distintas concentraciones del sustrato colina, para una concentración fija del inhibidor, es decir, la actividad colina quinasa en presencia de 0,5 μM de **VGP-118** o de **VGP-150** (Figura 3.6A).

En la inhibición competitiva, el inhibidor compite con el sustrato por el sitio activo del enzima, por lo que en presencia del inhibidor se requiere una mayor cantidad de sustrato para alcanzar la misma velocidad. Como consecuencia, los inhibidores competitivos no modifican la velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$) y producen un incremento de la K_M . En la inhibición no competitiva, el centro activo está siempre disponible para el sustrato, por lo que no se modifica el valor de K_M . Sin embargo, parte de las enzimas están unidas al inhibidor, y por tanto no están disponibles para la catálisis, lo que implica una disminución de $V_{\text{máx}}$.

En el caso de los compuestos **VGP-118** y **VGP-150**, se obtienen cinéticas de saturación estándar donde se incrementa la K_M aparente y disminuye la $V_{\text{máx}}$ en relación a los valores en ausencia de inhibidor (Figura 3.6A). Estos datos apuntan a un mecanismo de inhibición mixto¹⁵⁴.

La representación de Lineweaver-Burk, definida como el inverso de la actividad frente al inverso de la concentración del sustrato para la actividad quinasa en ausencia y en presencia de 0,5 μM de ambos inhibidores, es lineal. Las líneas rectas se cruzan en un punto del segundo cuadrante a la izquierda del eje de ordenadas pero por encima del eje de abscisas (Figura 3.6B), lo que confirma un tipo de inhibición mixta¹⁵⁴.

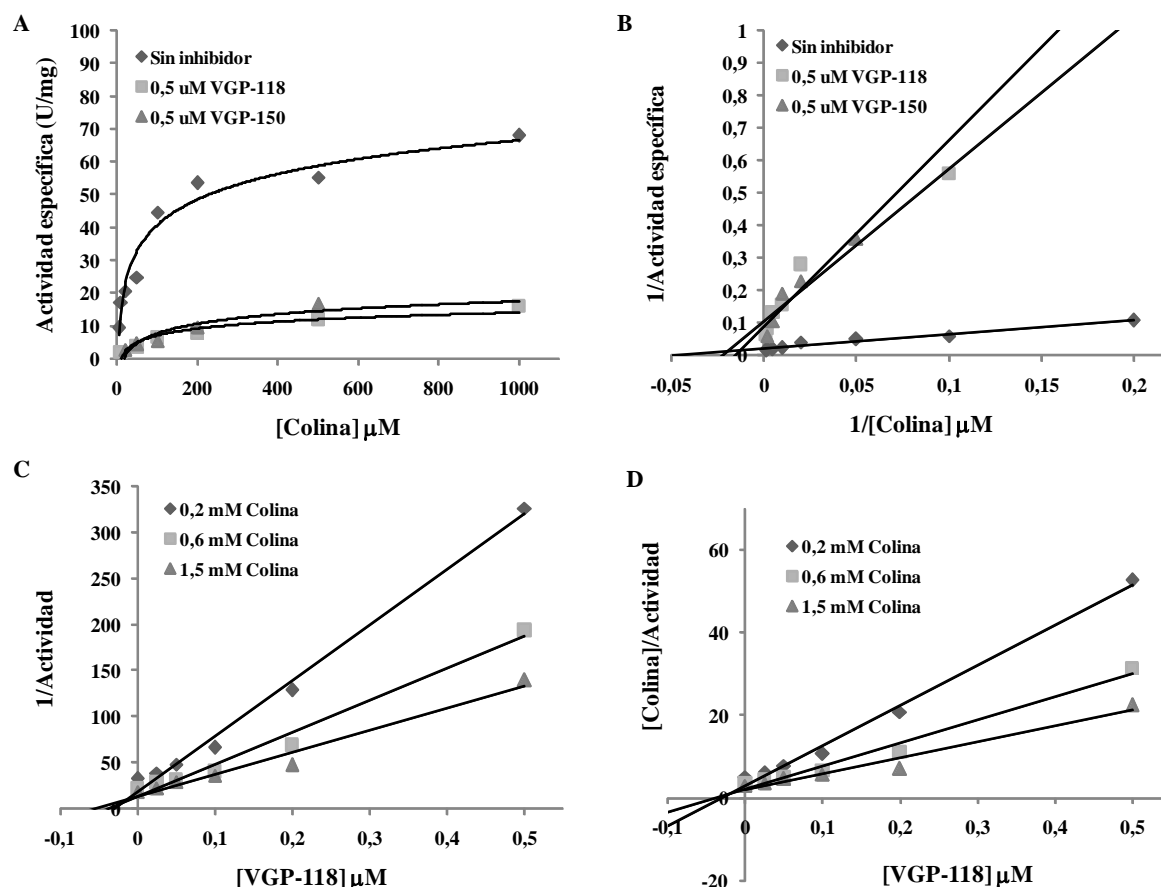


Figura 3.6. Inhibición de $\Delta 84N$ -hChoK $\alpha 2$ por parte de los compuestos **VGP-118** y **VGP-150**.

A) Representación gráfica de la actividad colina quinasa en presencia o ausencia de un solo inhibidor (**VGP-118** o **VGP-150** a $0,5 \mu\text{M}$). B) Gráfico de Lineweaver-Burk (doble recíproco del gráfico A). C) Gráfico de Dixon para el compuesto **VGP-118**. D) Representación gráfica de $[\text{colina}]/\text{actividad}$ frente a la concentración del compuesto **VGP-118**. Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes.

Para confirmar el patrón de inhibición se han realizado análisis cinéticos adicionales para el compuesto **VGP-118**. En el gráfico de Dixon (Figura 3.6C), que representa el inverso de la actividad frente a la concentración del compuesto **VGP-118** en presencia de 0,2, 0,6 ó 1,5 mM de colina, el conjunto de líneas se cruzan por encima del eje de abscisas. En la gráfica del cociente de la concentración de colina entre la actividad frente a la concentración de inhibidor (Figura 3.6D), las líneas se cruzan por debajo del eje. Estos datos se ajustan a una inhibición mixta predominantemente competitiva¹⁵⁵. Este tipo de inhibición ha sido descrita para otros tipos de inhibidores de quinasas¹⁵⁶, mientras que para el caso del HC-3 se ha descrito un tipo de inhibición competitiva de la enzima colina quinasa⁴³.

La CI_{50} se usa para comparar la capacidad inhibitoria de distintos inhibidores en unas condiciones de ensayo determinadas. Sin embargo, no es un indicador directo de la afinidad de la enzima por el inhibidor; para conocer ese valor de afinidad, es necesario determinar la constante de inhibición (K_i), cuyo cálculo depende del tipo de inhibición. En la inhibición mixta, el inhibidor puede unirse tanto al enzima libre como al complejo enzima- sustrato, con diferentes constantes de equilibrio. Por lo tanto el valor de K_i se separa en K_{ia} , la K_i para la unión al enzima libre, y K_{ib} , para la unión al complejo enzima-sustrato. Los valores de K_{ia} y K_{ib} para **VGP-118** son 0,03 y 0,38 μ M, respectivamente. En el caso de **VGP-150**, los valores de K_{ia} y K_{ib} son 0,03 y 0,40 μ M respectivamente. En ambos casos K_{ia} es menor que K_{ib} lo que confirma que la inhibición es predominantemente competitiva¹⁵⁵.

3.1.2.3. Ensayos de actividad leishmanicida.

3.1.2.3.1. Ensayos de sensibilidad en formas promastigotas y amastigotas intracelulares de *Leishmania*.

Los 10 compuestos bispiridínicos abiertos sintetizados se han ensayado frente a formas promastigotas y amastigotas intracelulares de *L. donovani* y *L. major*. Las sensibilidades de las formas promastigotas de *Leishmania* a los compuestos se han determinado mediante el método MTT, mientras que las sensibilidades de las formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* se han determinado mediante el recuento de los amastigotes intracelulares de *Leishmania* en cultivos de macrófagos THP-1 infectados tras 72 horas de cultivo (ver apartado 4.2.2.1.3). Los macrófagos THP-1 infectados se tratan con diferentes concentraciones de los compuestos durante 72 horas, y posteriormente se hace un tratamiento de fijación y tinción con el colorante fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Figura 3.7). El DAPI tiñe al ADN, por lo que podemos observar los núcleos de los macrófagos (círculos blancos) y de los amastigotes (puntos blancos pequeños, indicados por una flecha). La Figura 3.7A muestra un control de macrófagos infectados por amastigotes a las 72 h de cultivo, siendo el porcentaje de macrófagos infectados del 66,5 %, y la media del número de amastigotes por macrófagos de 3,8. La Figura 3.7B muestra la infección tras 72 h de tratamiento con 0,5 μ M del compuesto **VGP-114**, y se observa cómo disminuye tanto el porcentaje de macrófagos infectados (30%) como la media del número de amastigotes por macrófago (2,7).

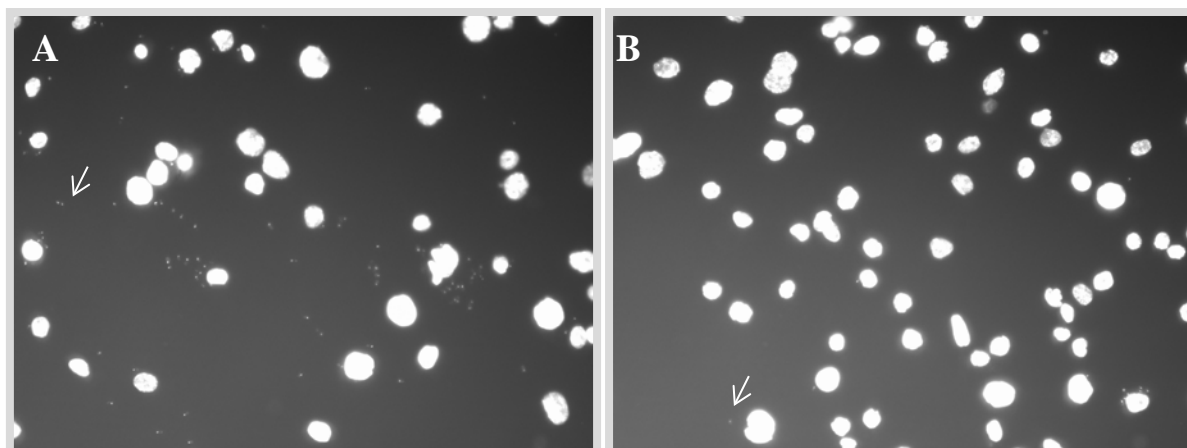


Figura 3.7. Imágenes de macrófagos THP-1 infectados con formas promastigotas infectivas de *L. major* sin tratar (A) o tras 72 h de incubación con 0,5 μ M del compuesto **VGP-114**. La flecha indica el núcleo de los amastigotes intracelulares.

La Tabla 3.3 resume los resultados obtenidos en estos ensayos, empleando como control de sensibilidad los fármacos leishmanicidas anfotericina B y miltefosina. Igualmente, la Tabla 3.3 muestra la toxicidad celular de todos los compuestos en la línea celular THP-1, mediante el método MTT. Los valores entre paréntesis mostrados debajo de los datos de CI_{50} en las formas amastigotas intracelulares indican la relación entre la CI_{50} de toxicidad celular y la CI_{50} frente al parásito, siendo un valor indicativo de la seguridad de los compuestos.

En general, todos los compuestos ensayados presentan actividad tanto frente a las formas promastigotas como a las formas intracelulares amastigotas en las dos especies de *Leishmania* seleccionadas, con unos valores de CI_{50} menores de 1 μ M en la mayoría de los casos. Excepto para los compuestos **VGP-106** y **VGP-118**, donde la actividad frente a *L. donovani* es significativamente mayor que frente a *L. major*, el resto de compuestos presenta un comportamiento similar en ambas especies, siendo ligeramente más activos para *L. major*.

Tabla 3.3. Sensibilidad y toxicidad celular de los compuestos bispiridínicos abiertos frente a formas promastigotas y amastigotas intracelulares de *Leishmania*.

Compuesto	CI ₅₀ promastigotes (μM)		CI ₅₀ amastigotes (μM)		Toxicidad celular CI ₅₀ (μM)
	<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>	
VGP-106	21,55 ± 3,72	0,36 ± 0,09	13,07 ± 6,30 (15,8)	0,86 ± 0,46 (240,2)	206,54 ± 9,89
VGP-114	0,47 ± 0,04	0,61 ± 0,09	0,10 ± 0,03 (1000,6)	0,85 ± 0,04 (117,7)	100,06 ± 8,57
VGP-118	29,15 ± 5,73	0,65 ± 0,19	6,21 ± 1,02 (2,4)	0,18 ± 0,03 (85,3)	15,35 ± 3,99
VGP-130	0,50 ± 0,07	0,73 ± 0,11	0,09 ± 0,02 (903,7)	2,02 ± 0,05 (40,3)	81,34 ± 10,65
VGP-138	0,74 ± 0,19	2,11 ± 0,48	0,30 ± 0,16 (586,8)	4,01 ± 0,43 (43,9)	176,05 ± 20,75
VGP-146	0,21 ± 0,06	0,33 ± 0,07	0,10 ± 0,04 (156,1)	0,42 ± 0,01 (37,2)	15,61 ± 3,26
VGP-150	0,36 ± 0,11	0,77 ± 0,04	0,09 ± 0,03 (267)	0,55 ± 0,16 (43,7)	24,03 ± 5,42
VGP-162	0,40 ± 0,08	0,35 ± 0,02	0,37 ± 0,03 (29,6)	1,00 ± 0,08 (11,0)	10,97 ± 2,41
VGP-174	1,70 ± 0,01	0,34 ± 0,03	0,41 ± 0,05 (6,1)	0,86 ± 0,03 (2,8)	2,47 ± 0,05
VGP-182	2,51 ± 0,01	0,92 ± 0,2	0,42 ± 0,12 (11,2)	0,52 ± 0,12 (9,1)	4,71 ± 0,23
Anfotericina B	0,32 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,24 ± 0,01 (59,7)	0,28 ± 0,13 (51,1)	14,32 ± 4,10
Miltefosina	16,65 ± 1,23	6,60 ± 1,57	10,61 ± 0,89 (2,5)	0,88 ± 0,14 (30,5)	26,86 ± 3,08

Los datos presentados son medias de los valores de CI₅₀ ± desviación estándar de tres experimentos independientes.

Todos los compuestos presentan una alta actividad frente a formas promastigotas y amastigotas intracelulares de *L. major*, con valores de CI_{50} entre 0,09 y 0,42 μM en las formas amastigotas intracelulares, a excepción de los compuestos **VGP-106** y **VGP-118**, que tienen unos valores aproximados de CI_{50} de 13 y 6 μM , respectivamente. Ambos compuestos tienen como cabeza catiónica la 4-bromo-*N*-metilanilino piridina, lo que sugiere que la presencia del bromo disminuye la actividad leishmanicida frente a *L. major*.

En el caso de *L. donovani*, todos los compuestos tienen un valor de CI_{50} inferior a 1 μM en formas promastigotas, con la excepción del compuesto **VGP-138** (2,11 μM). Estos valores en general aumentan ligeramente en las formas amastigotas intracelulares, pero la actividad es comparable a la de la miltefosina.

Al analizar los datos de toxicidad se observa que los derivados quinolínicos son más tóxicos que los piridínicos. El compuesto piridínico **VGP-118** supone una excepción al ser bastante tóxico (CI_{50} de 15,35 μM), pero su margen de seguridad sobre formas amastigotas es bueno (85,3), superior a la anfotericina B (51,1) y miltefosina (30,5), lo que indica una buena potencialidad del compuesto.

Con objeto de realizar estudios más profundos de actividad y mecanismo de acción en *L. donovani*, responsable de la forma visceral más grave de las leishmaniasis, se selecciona el compuesto **VGP-106**. Este compuesto presenta valores de CI_{50} de 0,36 y 0,86 μM en formas promastigotas y amastigotas intracelulares respectivamente, una actividad comparable al fármaco miltefosina. Además, tiene baja toxicidad en células THP-1 (CI_{50} de 206,54 μM), y su margen de seguridad en amastigotes intracelulares de *L. donovani* es 240, siendo el compuesto menos tóxico de la serie. Por otro lado, al ser fluorescente resulta interesante para los estudios de acumulación.

La curva de inhibición del compuesto **VGP-106** para las formas promastigotas de *L. donovani*, en la que se representa el porcentaje de viabilidad celular con respecto al control de parásitos sin tratar (100%) frente a concentraciones crecientes del compuesto (Figura 3.8A), es de tipo sigmoidea con una pendiente muy pronunciada, dando un valor de CI_{90} de $0,65 \pm 0,2$ μM , muy cercano al valor de CI_{50} .

Además, se ha realizado una curva de crecimiento de las formas promastigotas en presencia o ausencia de diferentes concentraciones (0,5, 1, 2, 5, 10 y 30 μM) del compuesto **VGP-106**, determinando el número de parásitos mediante recuento celular a las 24, 48 y 72 horas (Figura 3.8B). Para la menor concentración del compuesto (0,5 μM) se observa que hay crecimiento de los parásitos, aunque este crecimiento es inferior que el del control. Sin embargo, a la concentración de 1 μM , hay un ligero crecimiento en las primeras 24 horas, pero después el número de parásitos se mantiene constante. En los demás casos, se observa un ligero descenso en el número de parásitos desde las primeras 24 horas. Las curvas de crecimiento mediante recuento celular no diferencian si los parásitos están vivos o no, por lo que se ha realizado un ensayo de viabilidad celular mediante el método MTT, para cada concentración de compuesto a las 24, 48 y 72h (Figura 3.8C). Se observa que para 0,5 μM de **VGP-106**, que es aproximadamente el valor de CI_{50} a las 72h, la viabilidad no se ve afectada a las 24h pero va disminuyendo de forma progresiva de modo que a las 48h es de un 70% y a las 72h del 45%. Para las demás concentraciones, la viabilidad disminuye más del 50% en tan sólo 24h.

En base a estos resultados, se han elegido las concentraciones más adecuadas para cada ensayo de los descritos a continuación, utilizando concentraciones más altas a tiempos más cortos con objeto de poder observar los efectos que produce el compuesto **VGP-106** en *L. donovani* sin necesidad de largos periodos de incubación.

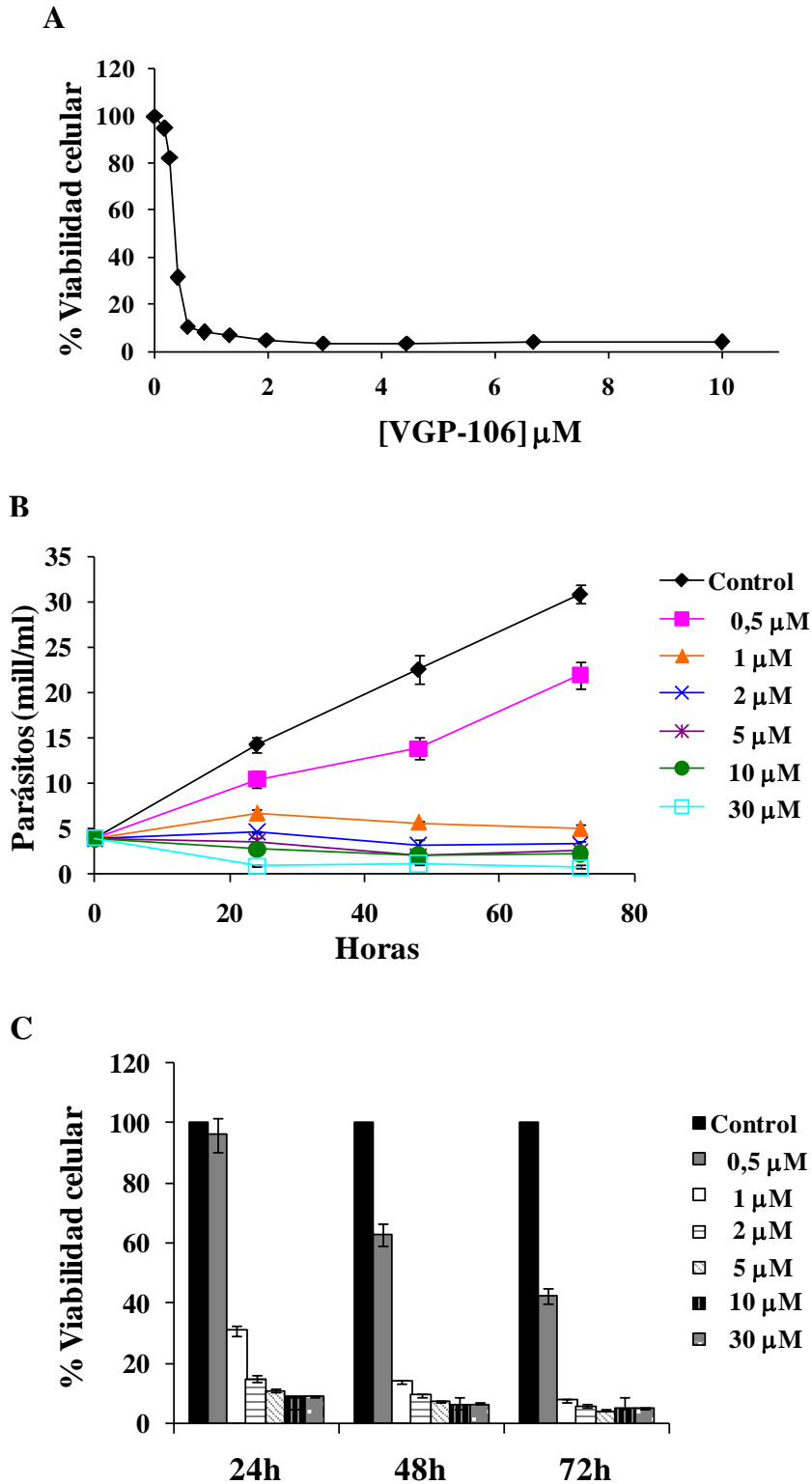


Figura 3.8. Curvas de viabilidad y crecimiento de los promastigotes de *L. donovani* en presencia del compuesto **VGP-106**. A) Curva de viabilidad celular a 72h. B) Curva de crecimiento y C) representación de la viabilidad celular de los promastigotes de *L. donovani* a 24, 48 y 72 horas en ausencia o presencia de distintas concentraciones de **VGP-106**. Los datos presentados son medias de los valores de tres experimentos independientes.

3.1.2.3.2. Estudio del mecanismo de acción del compuesto VGP-106 en promastigotes de *L. donovani*.

Los diez compuestos bispiridínicos abiertos sintetizados presentan actividad leishmanicida frente a formas promastigotas y amastigotas intracelulares de *Leishmania* (Tabla 3.3); sin embargo desconocemos su mecanismo de acción frente a los parásitos. El diseño de los compuestos se realizó en base a su capacidad de inhibir a la enzima ChoK humana, y de hecho todos los compuestos sintetizados muestran una importante actividad inhibidora frente a esta enzima (Tabla 3.2). En procariotas, como *Streptococcus pneumoniae*, ChoK puede ser una potencial diana farmacológica para el diseño de antibacterianos, ya que se ha publicado que desempeña un papel importante en la biosíntesis de PCho de la pared celular¹⁵⁷. Se ha demostrado que algunos análogos de colina inhiben la biosíntesis de fosfatidilcolina (PC) en *Plasmodium falciparum*⁸⁹. En este contexto, nos planteamos la posibilidad de que los compuestos descritos en esta memoria deban su actividad leishmanicida a la inhibición de la síntesis de PC, por lo que decidimos realizar un estudio de las enzimas colina/etanolamina quinasa (CEK) y etanolamina quinasa (EK) de *L. donovani*.

Además, se han llevado a cabo otros ensayos encaminados a conocer el mecanismo de acción de estos compuestos, desde los estudios de microscopía electrónica de transmisión para conocer el efecto de estos compuestos a nivel de orgánulos intracelulares del parásito, seguido de los estudios para conocer la entrada en el parásito, hasta los efectos a nivel del metabolismo energético y el mecanismo por el que finalmente producen la muerte celular.

3.1.2.3.3. Obtención de parásitos transfectados con el gen CEK o EK.

Antes de realizar un análisis más profundo de estas proteínas basado en su purificación y aislamiento, que podría ser un proceso largo que requiere de mucho trabajo, se decidió sobreexpresar cada una de estas enzimas en formas promastigotas de *L. donovani*, y comprobar si los parásitos transfectantes que sobreexpresan la proteína adquirirían resistencia frente a la actividad de los compuestos.

Clonaje de los genes CEK y EK de *L. donovani* en el vector de expresión pXG.

Para realizar el aislamiento de los genes CEK y EK de *L. donovani*, se utilizaron las bases de datos disponibles del genoma de *Leishmania* para diseñar los oligonucleótidos necesarios. El clonaje se realizó en varios pasos (Figura 3.9):

1. Amplificación por PCR de las secuencias de los genes CEK y EK de *Leishmania*, utilizando el ADN genómico de *L. donovani* como molde y empleando los oligos sentido y antisentido correspondientes descritos en el apartado 4.2.1.5. De este modo se añaden las dianas EcoRV y BamHI, en 5' y 3' de la secuencia para el gen CEK, y las dianas XmaI y BamHI, en 5' y 3' de la secuencia para el gen EK, que permitirán el clonaje de los genes en el vector pGEM-T. La Figura 3.9 muestra como ejemplo un esquema del clonaje del gen CEK.

2. El clonaje de cada uno de los fragmentos de ADN en pGEM-T se realizó mediante ligación con la enzima T4 DNA ligasa. Los productos de la PCR presentan colas de adenina introducidas por la DNA polimerasa, lo que permite su clonaje en el vector pGEM-T, que está linearizado y tiene extremos de timina. Una vez obtenido el vector con el inserto pGEMT-CEK o pGEMT-EK, se procedió a transformar las bacterias electrocompetentes, seleccionando las bacterias blancas. Esta selección se realiza gracias a que el vector pGEM-T contiene el gen *lacZ α* , una forma truncada de la β -galactosidasa. En condiciones normales esta enzima hidroliza al compuesto X-Gal, que se añade al medio, en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Este último se oxida a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble. Las bacterias transformadas con el plásmido carecen de actividad β -galactosidasa, originando colonias blancas en un medio de cultivo que contiene el sustrato incoloro X-gal mientras que las bacterias transformadas con plásmidos sin inserto aparecen como colonias azules en este medio.

3. Digestión de la construcción obtenida con las enzimas de restricción correspondientes para cada caso.

4. Clonaje del fragmento liberado en el vector pXG, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción que el fragmento, mediante ligación.

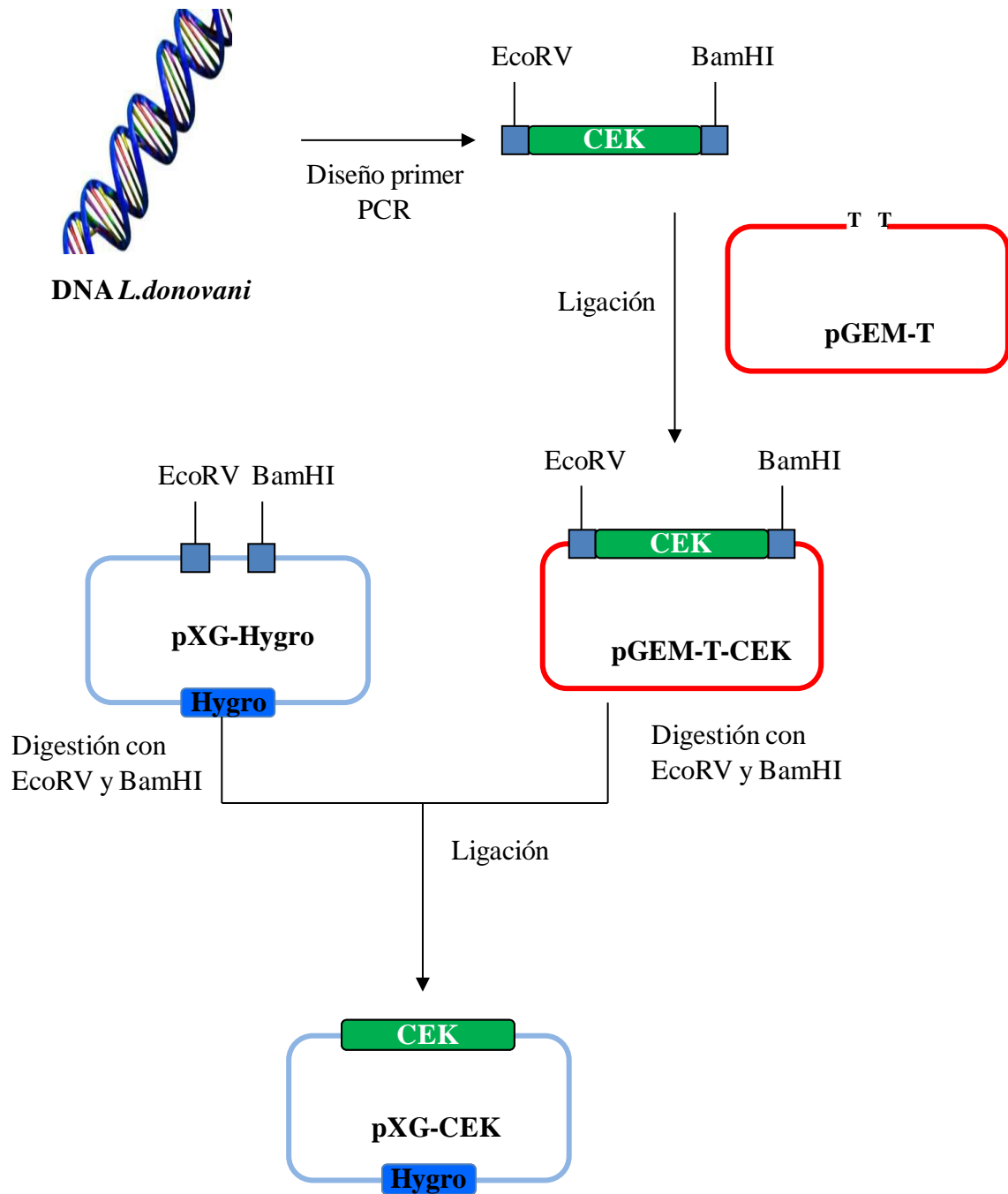


Figura 3.9. Esquema del clonaje del gen colina/etanolamina quinasa (CEK) a partir del ADN genómico de *L. donovani*.

Los plásmidos resultantes se han secuenciado para comprobar la secuencia de los genes CEK y EK de *Leishmania*. En el caso de pXG-CEK, se ha detectado una mutación puntual que provoca el cambio del aminoácido 452 leucina por una prolina. Este aminoácido está muy conservado en organismos similares, y además se encuentra dentro del dominio catalítico de la proteína, por lo que se ha realizado una mutagénesis dirigida siguiendo el

protocolo descrito en el apartado 4.2.2.5.6. De este modo se obtuvieron los plásmidos pXG-EK y pXG-CEKm.

Transfección de *L. donovani*.

Se han transfectado promastigotes de *L. donovani*, en fase estacionaria de crecimiento, con 100 µg del plásmido pXG-EK o pXG-CEKm, así como con el vector pXG vacío que se utiliza como control. Tras pases sucesivos a concentraciones crecientes de higromicina B (25, 50, 100, 200, 500 µg/ml), los parásitos transfectados se seleccionan y finalmente, tras 45 días de cultivo, se adaptan a una concentración de 500 µg/ml de higromicina B.

Análisis de la expresión de CEK y EK de *Leishmania*.

Se ha estudiado la sobreexpresión de los transcritos correspondientes a CEK y a EK mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), con la que el ARN aislado de los parásitos se retrotranscribe en ADN complementario (ADNc). El ADNc se diluye (1:10, 1:20 y 1:50) y es amplificado mediante PCR utilizando los cebadores descritos en la sección 4.2.1.5 y los productos resultantes han sido analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Figura 3.10). Como control de la expresión se ha usado el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), por ser un gen que se expresa de forma estable y constitutiva. Como puede observarse en la Figura 3.10 los parásitos transfectados muestran unos niveles de expresión de ARNm mayores para el gen en concreto que están sobreexpresando, en comparación con el control con el plásmido vacío.

3.1.2.3.4. Ensayo de sensibilidad de los promastigotes transfectados frente al compuesto VGP-106.

Una vez obtenidos los promastigotes de *L. donovani* que sobreexpresan la enzima CEK y la EK, se ha realizado un ensayo de sensibilidad de formas promastigotas y amastigotas intracelulares frente al compuesto **VGP-106**.

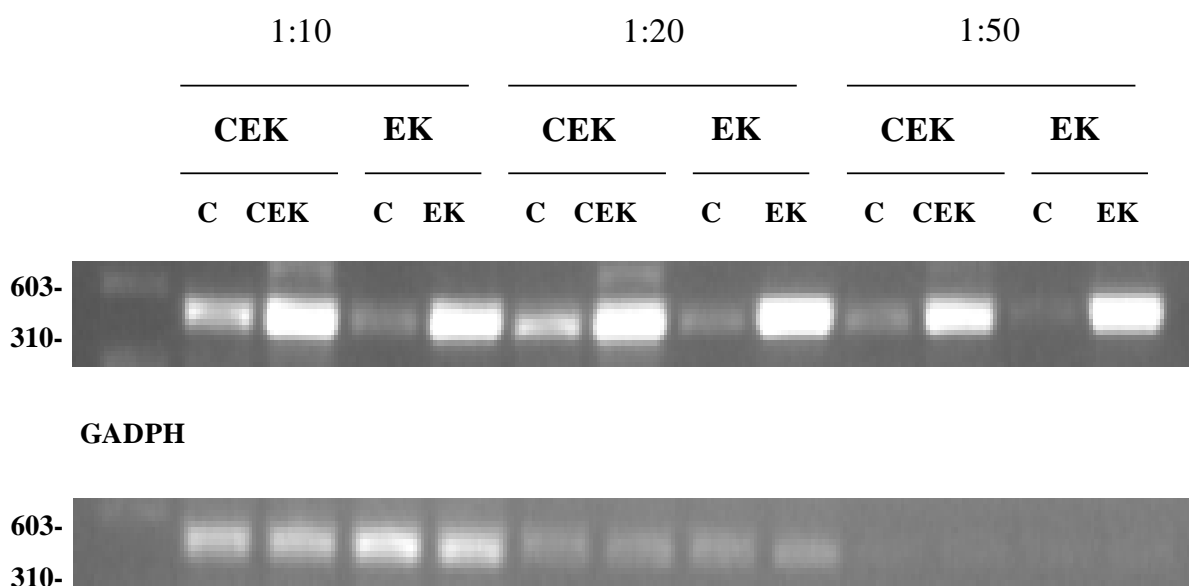


Figura 3.10. Sobreexpresión de CEK y EK en los parásitos transfectados de *L. donovani* frente al control con el plásmido vacío a distintas diluciones de ADNc (1:10, 1:20, 1:30). La expresión del gen GADPH se usó como control interno de expresión. Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes.

Como puede observarse en la Tabla 3.4, la sensibilidad para el compuesto **VGP-106** es similar para los parásitos transfectados y para el control con el plásmido vacío, tanto en formas promastigotas como en formas amastigotas intracelulares. Esto sugiere que el mecanismo de acción de este compuesto en *Leishmania* es independiente de las enzimas CEK y EK, ya que en caso contrario, la sobreexpresión de estas enzimas habría implicado una mayor resistencia al efecto inhibitor del compuesto, y por tanto un valor de CI_{50} mayor. En el caso de la miltefosina se observa un ligero aumento de la CI_{50} en los parásitos transfectados.

Además, se han realizado ensayos de sensibilidad con *L. donovani* en medios de cultivo con un exceso de colina o de etanolamina (aproximadamente 1000 veces superior a la concentración en el medio normal). Los valores de CI_{50} en el medio con 10 mM de colina ($0,31 \pm 0,08$), y con 10 mM de etanolamina ($0,21 \pm 0,01$) son similares a los valores de CI_{50} del medio normal ($0,25 \pm 0,06$). Esto confirma que el compuesto no compite con colina ni con etanolamina.

Tabla 3.4. Sensibilidad de líneas de *L. donovani* al compuesto **VGP-106**.

Compuesto	CI ₅₀ promastigotes (μM)			CI ₅₀ amastigotes (μM)		
	pXG	pXG-CEK	pXG-EK	pXG	pXG-CEK	pXG-EK
VGP-106	0,36 ± 0,09	0,36 ± 0,09	0,43 ± 0,05	0,45 ± 0,03	0,42 ± 0,05	0,35 ± 0,03
Miltefosina	6,60 ± 0,57	9,42 ± 0,89	10,33 ± 1,12	2,11 ± 0,15	3,74 ± 0,26	4,55 ± 0,51

La sensibilidad de las formas promastigotas y amastigotas intracelulares al compuesto **VGP-106** se determinó a las 72 h siguiendo el método colorimétrico MTT, empleando parásitos control (pXG) y parásitos que sobreexpresan las proteínas CEK (pXG-CEK) y EK (pXG-EK). Los datos presentados son medias de los valores de CI₅₀ ± desviación estándar de al menos dos experimentos independientes.

3.1.2.3.5 Mecanismo de entrada y acumulación del compuesto **VGP-106** en *L. donovani*.

La primera barrera que han de atravesar los compuestos para entrar en los parásitos es la membrana plasmática. Con el fin de dilucidar el mecanismo de entrada del compuesto **VGP-106** en las formas promastigotas de *L. donovani* y *L. major*, y determinar si existen diferencias entre ambas especies de *Leishmania* que puedan explicar las diferencias de sensibilidad al compuesto, se han realizado estudios de entrada y acumulación. Al ser un compuesto fluorescente, se ha podido monitorizar su entrada al parásito mediante espectrofluorimetría. La concentración utilizada en estos ensayos fue de 100 μM, concentración que nos permite detectar la fluorescencia en el espectrofluorímetro.

En la Figura 3.11A se observa que el compuesto presenta una cinética de entrada rápida, alcanzado la saturación muy rápidamente. Además, para determinar si el mecanismo por el que el compuesto atraviesa la membrana plasmática es un proceso que depende de la temperatura, estudiamos su acumulación a 4 °C y a 28 °C. No se observan diferencias significativas de acumulación del compuesto **VGP-106** a estas temperaturas (Figura 3.11B), lo que indica que en la entrada del compuesto no están implicados transportadores proteicos. La cinética de entrada rápida y la independencia de temperatura sugieren que la entrada del compuesto **VGP-106** en *Leishmania* tiene lugar mediante un proceso de difusión pasiva.

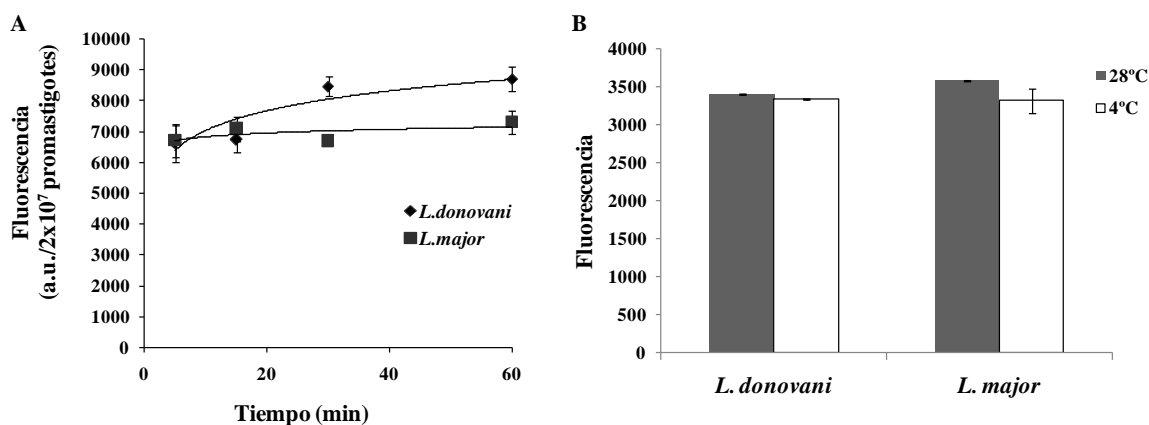


Figura 3.11. Entrada y acumulación del compuesto **VGP-106** en *L. donovani* y *L. major*. A) Curvas de entrada del compuesto en *Leishmania*. B) Acumulación de **VGP-106** en *L. donovani* y *L. major* a 28 °C y a 4 °C. Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Con estos datos se ha evaluado si existe una relación entre la acumulación del compuesto **VGP-106** y la susceptibilidad al mismo por parte del parásito. Para el compuesto **VGP-106**, *L. donovani* presenta una mayor sensibilidad que *L. major* tanto en formas promastigotas como amastigotas, con un valor de CI_{50} en promastigotes 50 veces menor (Tabla 3.3). La acumulación del compuesto en *L. donovani* es tan sólo un 18 % mayor que en *L. major*, un valor insuficiente para explicar las diferencias en la sensibilidad (Figura 3.11A).

3.1.2.3.6. Efecto sobre la morfología ultraestructural de *L. donovani*.

Se ha estudiado el efecto que produce el compuesto **VGP-106** sobre la morfología de promastigotes de *L. donovani* a nivel ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). El estudio se ha realizado en los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Tras incubar los parásitos con 0,5 μM de compuesto durante 24 horas, se observa que las mitocondrias están hinchadas en comparación con los parásitos control sin tratamiento (Figura 3.13A, la mitocondria se indica con una M). Al aumentar el tiempo de incubación a 48 horas, el aumento de la mitocondria se hace más notable, ocupando casi todo el citoplasma en algunos casos (Figura 3.13B). Si se incuban los parásitos con 1 μM del compuesto, a 24 y 48 h, el aumento del tamaño de las mitocondrias es cada vez más notorio, pero no se observa ninguna alteración morfológica de otros orgánulos y la membrana plasmática permanece intacta. También se observa que los núcleos no se alteran significativamente, aunque parece que aumenta la condensación de la cromatina en comparación con los parásitos control (Figura 3.13C, indicado por una flecha). Al incubar con 1 μM de **VGP-106** durante 48 horas se observa gran cantidad de restos celulares (Figura 3.13D), lo que sugiere la muerte celular por necrosis.

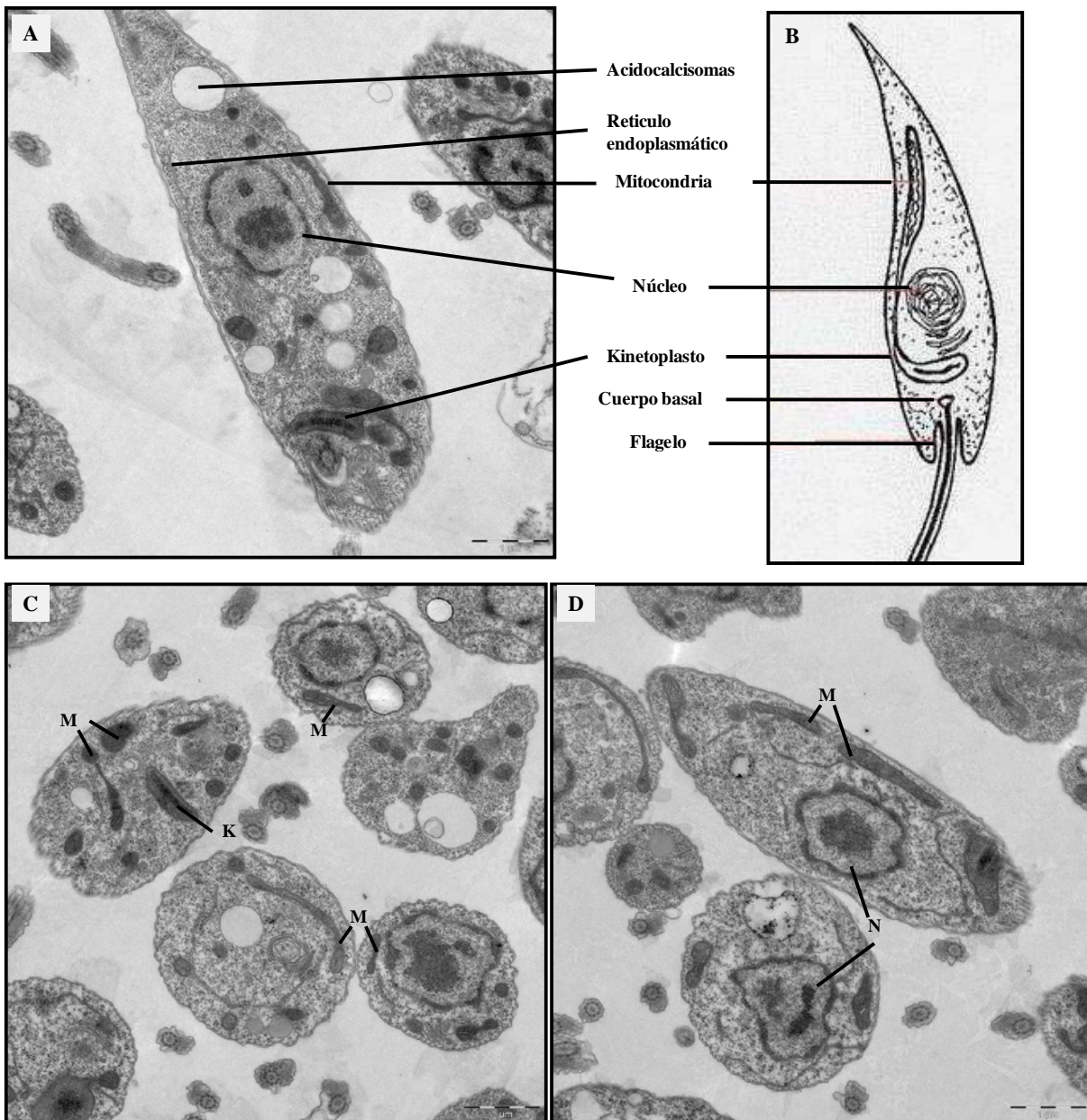


Figura 3.12. A), C) y D) Microscopía electrónica de transmisión de secciones ultrafinas correspondientes a formas promastigotas control de *L. donovani*, indicándose las principales estructuras del parásito: núcleo (N), mitocondria (M), kinetoplasto (K). Las imágenes están calibradas mediante una barra que indica el tamaño equivalente en micrómetros. B) Esquema de promastigotes de *Leishmania*¹⁵⁷.

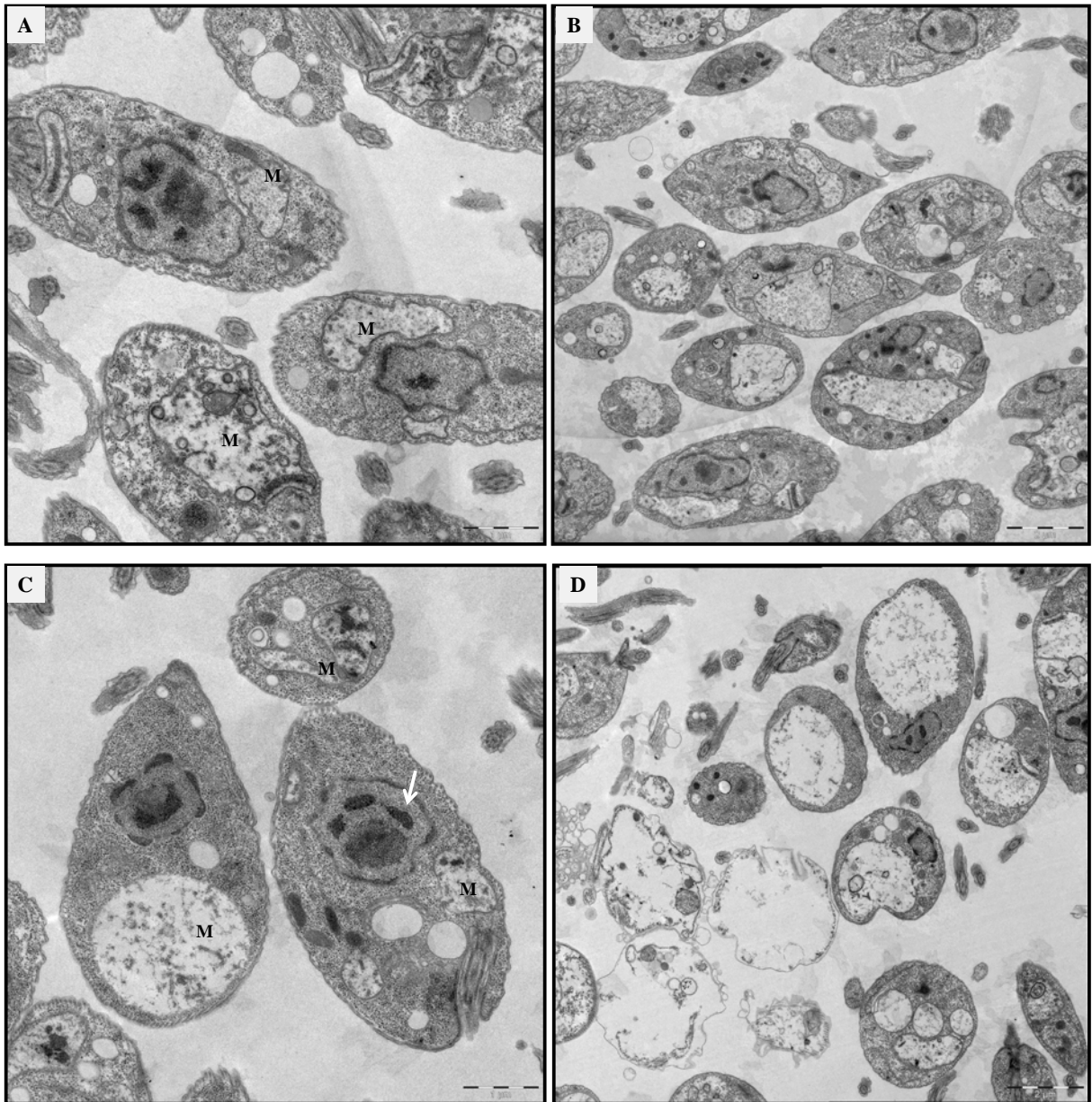


Figura 3.13. Microscopía electrónica de transmisión de secciones ultrafinas correspondientes a formas promastigotas de *L. donovani* tratados con el compuesto **VGP-106**. A) 0,5 μ M, 24 h. B) 0,5 μ M, 48 h. C) 1 μ M, 24 h. D) 1 μ M, 48 h. Las imágenes están calibradas mediante una barra que indica el tamaño equivalente en micrómetros. Se observa el aumento de las mitocondrias (M), la flecha indica la cromatina.

3.1.2.3.7. Efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial.

Teniendo en cuenta la alteración estructural de la mitocondria observada mediante TEM tras el tratamiento de *Leishmania* con el compuesto **VGP-106**, se ha decidido estudiar el efecto del compuesto sobre la función mitocondrial. Para ello se ha monitorizado la variación en el potencial mitocondrial, un indicador clave de la función mitocondrial, usando el marcador fluorescente JC-1. JC-1 es un compuesto catiónico fluorescente verde como monómero (emisión a 530 nm en FL1), que tiene una acumulación dependiente del potencial mitocondrial, indicada por un cambio en su fluorescencia de verde a rojo (emisión a 590 nm en FL2), debido a la formación de agregados fluorescentes rojos. La despolarización de la membrana mitocondrial reduce la acumulación del compuesto, con un cambio en la fluorescencia de rojo a verde, y por tanto una disminución del ratio de fluorescencia rojo/verde.

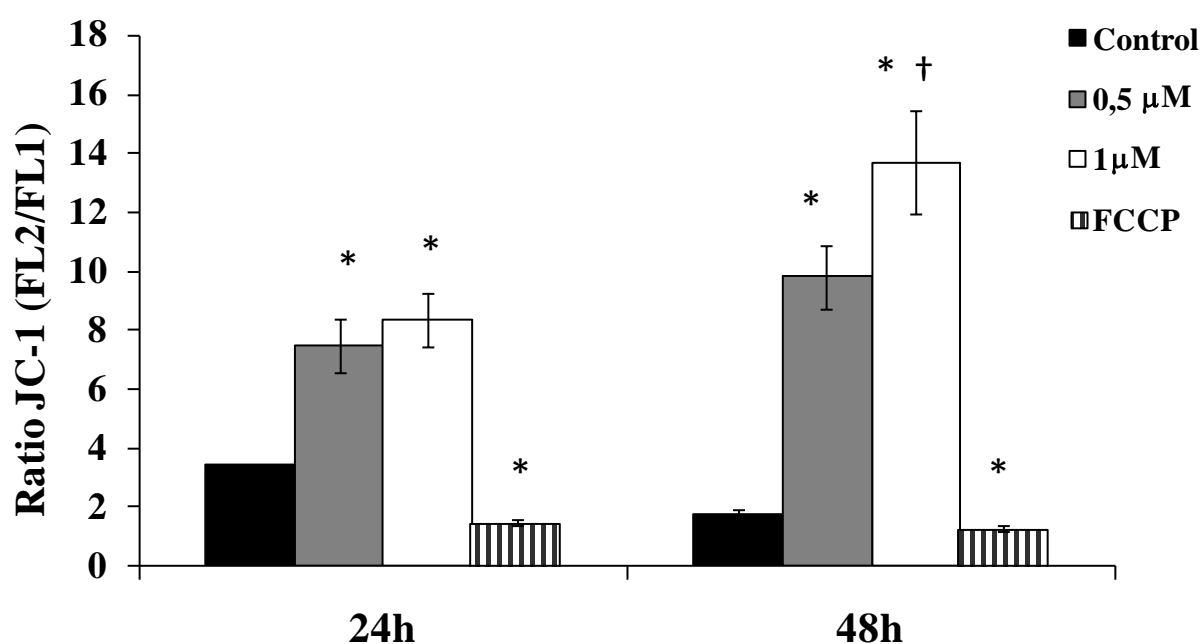


Figura 3.14. Efecto del compuesto **VGP-106** sobre el potencial de membrana mitocondrial de promastigotes de *L. donovani*. Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Las diferencias significativas se han determinado mediante el test de la *t* de Student (* $p < 0,01$ frente a los parásitos control, † $p < 0,01$ frente a 24 h).

Se ha realizado el ensayo en las condiciones experimentales en las que se observa una alteración de la mitocondria mediante TEM (apartado 3.1.2.3.6), específicamente tras incubar con 0,5 y 1 μM del compuesto **VGP-106** durante 24 y 48 horas. Desde las primeras 24 horas se observa un aumento del ratio JC-1 en los parásitos tratados con respecto al control de parásitos sin tratar (Figura 3.14), lo que indica una hiperpolarización de la membrana mitocondrial, no existiendo diferencias significativas entre el tratamiento con 0,5 y 1 μM del compuesto. A las 48 horas se observa un incremento en la hiperpolarización, que es significativamente mayor a 1 μM del compuesto. Como control positivo se usa el compuesto carbonilcianida *p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), un inhibidor de la fosforilación oxidativa mitocondrial, que produce una despolarización de la membrana mitocondrial.

3.1.2.3.8. Efecto sobre los niveles de ATP libre intracelular.

La síntesis de ATP en *Leishmania* se realiza principalmente en la mitocondria, siendo un indicativo de la función mitocondrial. Por tanto, se ha determinado el efecto del compuesto **VGP-106** en los niveles de ATP libre del parásito mediante el ensayo de bioluminiscencia CellTiter-Glo, que genera una señal luminiscente en los promastigotes, previamente tratados o no con distintas concentraciones del compuesto, que está directamente relacionada con la concentración del ATP.

El tratamiento con 0,5 y 1 μM del compuesto **VGP-106** produce una caída brusca en los niveles de ATP (Figura 3.15A) a las 24 y las 48 horas, lo que confirma que el compuesto altera la función mitocondrial; además, se ha determinado este efecto a tiempos más cortos (Figura 3.15B). A una concentración del compuesto de 2 μM los niveles de ATP permanecen constantes durante las dos primeras horas, descendiendo un 30% a las 3 horas. Por otro lado, cuando se aumenta la concentración a 30 μM se observa un descenso de los niveles de ATP del 20% a los 30 minutos, y continúan descendiendo de manera gradual hasta un 70% a las 3 horas.

La caída de los niveles de ATP puede deberse no sólo a una disminución de su síntesis, sino también a una salida de ATP del parásito debida a una alteración de la membrana plasmática, por lo que se ha estudiado el efecto del compuesto **VGP-106** sobre la integridad de la membrana plasmática.

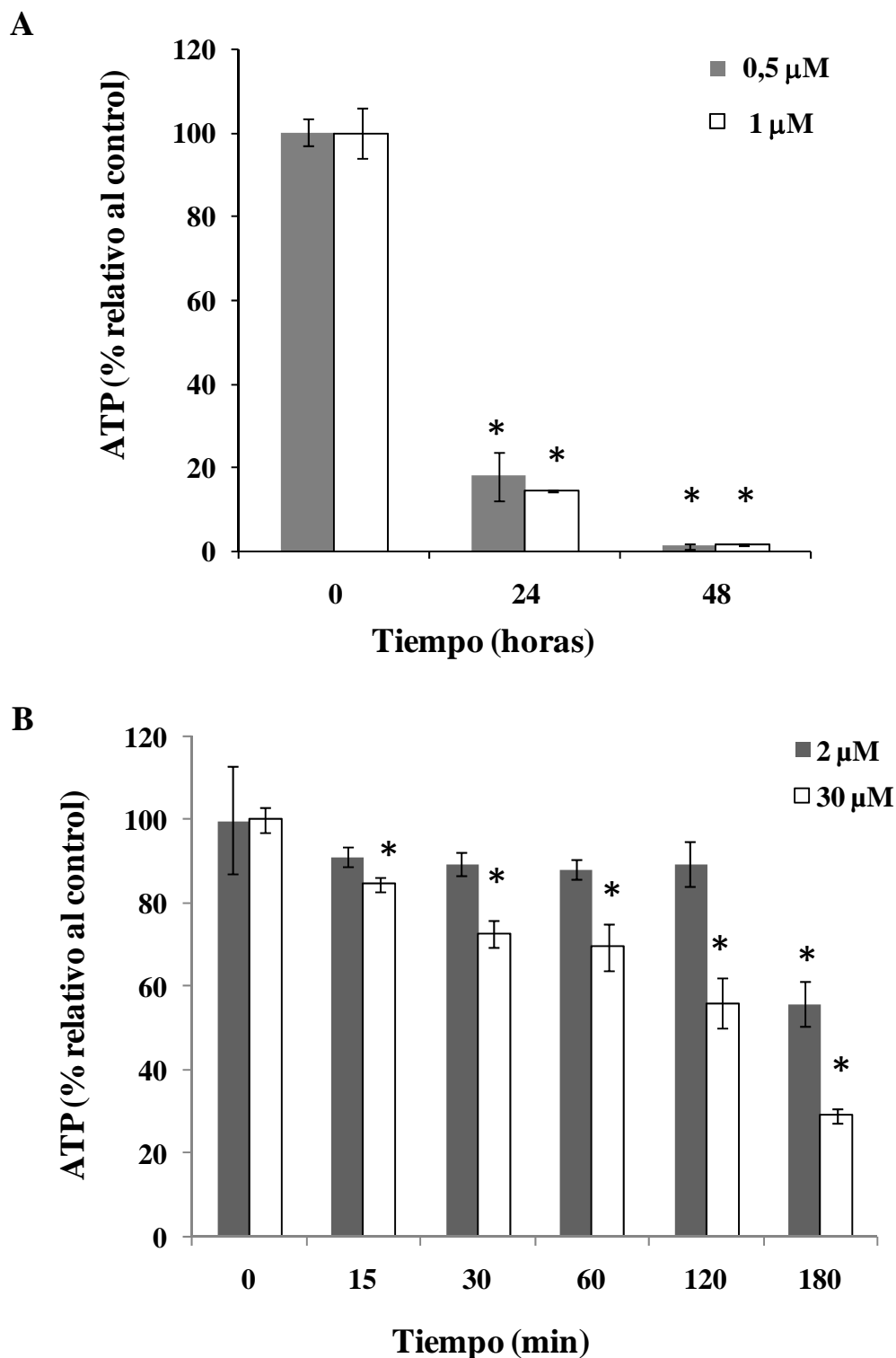


Figura 3.15. Efecto del compuesto **VGP-106** sobre los niveles de ATP libre intracelular de *L. donovani*. A) Efecto del compuesto a 0,5 y 1 μM durante 24 y 48 h, y B) Efecto del compuesto a 2 y 30 μM a tiempos cortos. Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes ± desviación estándar. Las diferencias significativas con los parásitos control se han determinado mediante la prueba *t* de Student (**p* < 0,02).

3.1.2.3.9. Efecto sobre la integridad de la membrana plasmática.

A. Cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática.

Las imágenes de TEM (Figura 3.13) muestran las membranas plasmáticas de los parásitos intactas tras el tratamiento con el compuesto **VGP-106**. Para comprobar que no hay alteraciones a este nivel se han incubado promastigotes de *L. donovani* con distintas concentraciones del compuesto, y a continuación se ha añadido la sonda fluorescente SYTOX Green, que sólo entra en la célula si existen alteraciones significativas de la membrana plasmática. Una vez dentro de la célula, la sonda se une a ácidos nucleicos emitiendo una señal fluorescente que nos permite monitorizarla por citometría de flujo (Figura 3.16A). Se observa cómo a medida que aumentan la concentración y el tiempo de incubación con el compuesto, la entrada de la sonda es mayor, lo que indica que el compuesto **VGP-106** produce una alteración en la permeabilización de la membrana dependiente de la concentración y del tiempo. Sin embargo, incluso a la mayor concentración ensayada (30 μM , 3 h), la acumulación de la sonda fluorescente es tan sólo del 20% en comparación con la observada en parásitos con la membrana plasmática totalmente permeabilizada debido a la incubación con el detergente Triton X-100 al 0,05%, lo que descarta que el compuesto **VGP-106** provoque grandes lesiones en la membrana plasmática.

B. Efecto sobre el potencial de la membrana plasmática.

A continuación se midió la despolarización de la membrana plasmática con el reactivo DiBAC₄(3), una sonda que se distribuye dentro de la membrana celular cuando el potencial de membrana cambia. De este modo si el compuesto **VGP-106** produce una despolarización de la membrana plasmática, dicha sonda va entrar en la membrana de la célula y como consecuencia se produce un aumento de la fluorescencia, que puede monitorizarse mediante citometría de flujo. Se comprueba así que a una concentración de 30 μM , el compuesto no produce cambios en el potencial de membrana (Figura 3.16B). Como control positivo se han utilizado parásitos tratados con el agente despolarizante carbonilcianuro-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP).

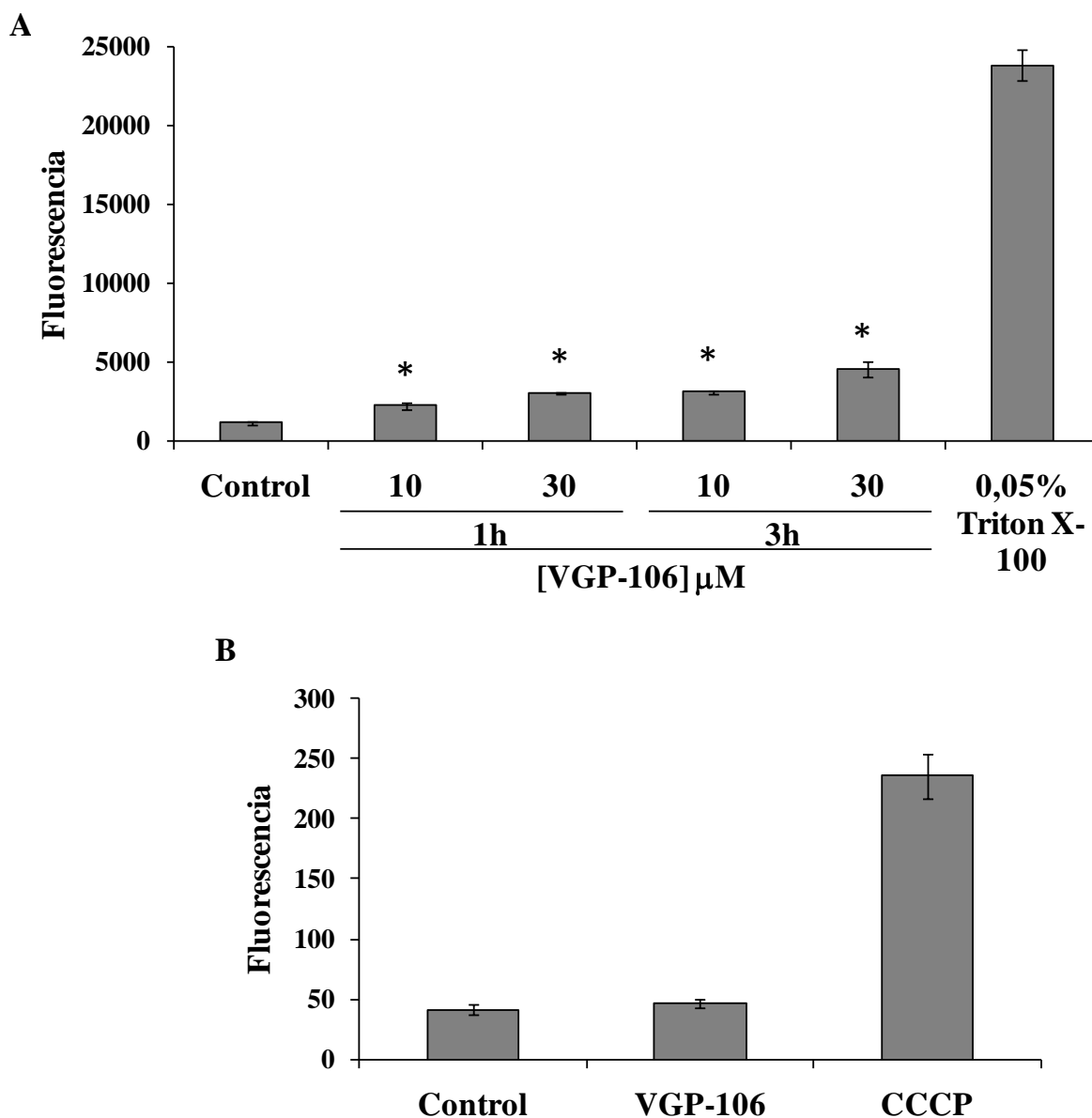


Figura 3.16. Efecto del compuesto **VGP-106** sobre la permeabilidad (A) y sobre el potencial (B) de la membrana plasmática de promastigotes de *L. donovani*. Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Las diferencias significativas con los parásitos control se han determinado mediante la prueba *t* de Student ($*p < 0,01$).

3.1.2.3.10. Detección de especies de oxígeno reactivas.

Con objeto de comprobar si el compuesto **VGP-106** produce estrés oxidativo mitocondrial en *L. donovani*, se han determinado los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), utilizando la sonda MitoSOX Red. La producción de ROS se realiza en condiciones normales de metabolismo, y al igual que las señales producidas por el Ca^{2+} , están relacionadas con una gran variedad de funciones vitales siendo necesarias para la supervivencia celular. Sin embargo, el aumento de ROS puede causar toxicidad celular y desencadenar la muerte del parásito. Para detectar si el compuesto **VGP-106** aumenta los niveles de ROS, se han incubado promastigotes de *L. donovani* con el compuesto, y posteriormente se ha añadido la sonda fluorescente MitoSOX Red, que se dirige selectivamente a la mitocondria donde se oxida localmente hasta un compuesto que es fluorescente al unirse a ácidos nucleicos. En comparación con el control de parásitos sin tratar, el compuesto **VGP-106** produce un aumento en los niveles de ROS dependiente del tiempo y de la concentración del compuesto, observando niveles significativamente mayores de ROS tras 1 h de tratamiento con 30 μM , y tras 3 h de tratamiento con 10 y 30 μM (Figura 3.17).

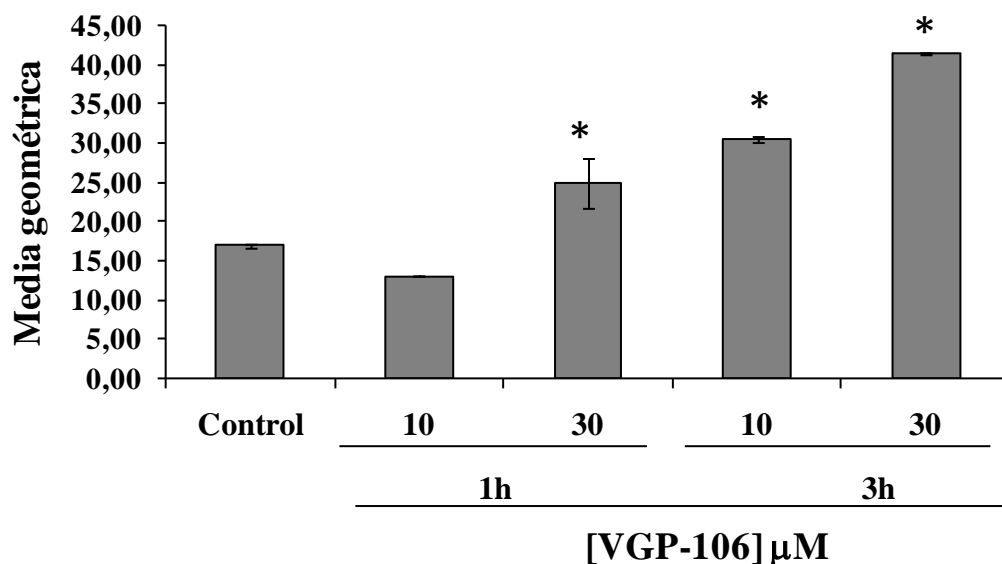


Figura 3.17. Determinación de los niveles de ROS en formas promastigotes de *L. donovani* tratadas con el compuesto **VGP-106**. Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Las diferencias significativas con los parásitos control se han determinado mediante el test de la *t* de Student (* $p < 0,01$).

3.1.2.3.11. Medida del calcio libre intracelular.

El aumento de los niveles de calcio intracelular en *Leishmania*, debido a un incremento del influjo de Ca^{2+} extracelular o a la movilización de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares, produce citotoxicidad y además es un indicativo de muerte celular programada o apoptosis⁹². Por tanto, se ha estudiado si el compuesto **VGP-106** produce alguna variación en los niveles de Ca^{2+} , para lo que se ha usado la sonda fluorescente Fluo-4, un indicador que incrementa la intensidad de la fluorescencia tras unirse a Ca^{2+} .

En primer lugar se ha realizado un ensayo en el fluorímetro que permite monitorizar cómo varía la fluorescencia del Fluo-4 al añadir el compuesto **VGP-106** (Figura 3.18A). Se observa que los promastigotes tratados con 30 μM del compuesto presentan un incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular con respecto al control sin tratar. Tras la adición de **VGP-106** se produce un aumento de fluorescencia debido a la fluorescencia propia del compuesto, pero ésta se estabiliza rápidamente, mientras que la fluorescencia debida al Fluo-4 sigue aumentando gradualmente como consecuencia del incremento de los niveles del Ca^{2+} intracelular (Figura 3.18A). Para determinar el origen de la elevación de Ca^{2+} se repitió el experimento en presencia de EGTA, un compuesto quelante de Ca^{2+} que no atraviesa la membrana celular, por lo que se une al Ca^{2+} extracelular bloqueando su entrada a la célula. En esas condiciones, el incremento de fluorescencia se reduce casi totalmente, por lo que se puede afirmar que el compuesto **VGP-106** produce un aumento del Ca^{2+} intracelular debido a la entrada externa de Ca^{2+} y no a la liberación de los depósitos intracelulares. Además, se ha realizado un ensayo a tiempo final, en el que se observa que el compuesto **VGP-106** (a 10 y 30 μM) produce un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular tras 30 minutos de incubación. (Figura 3.18B).

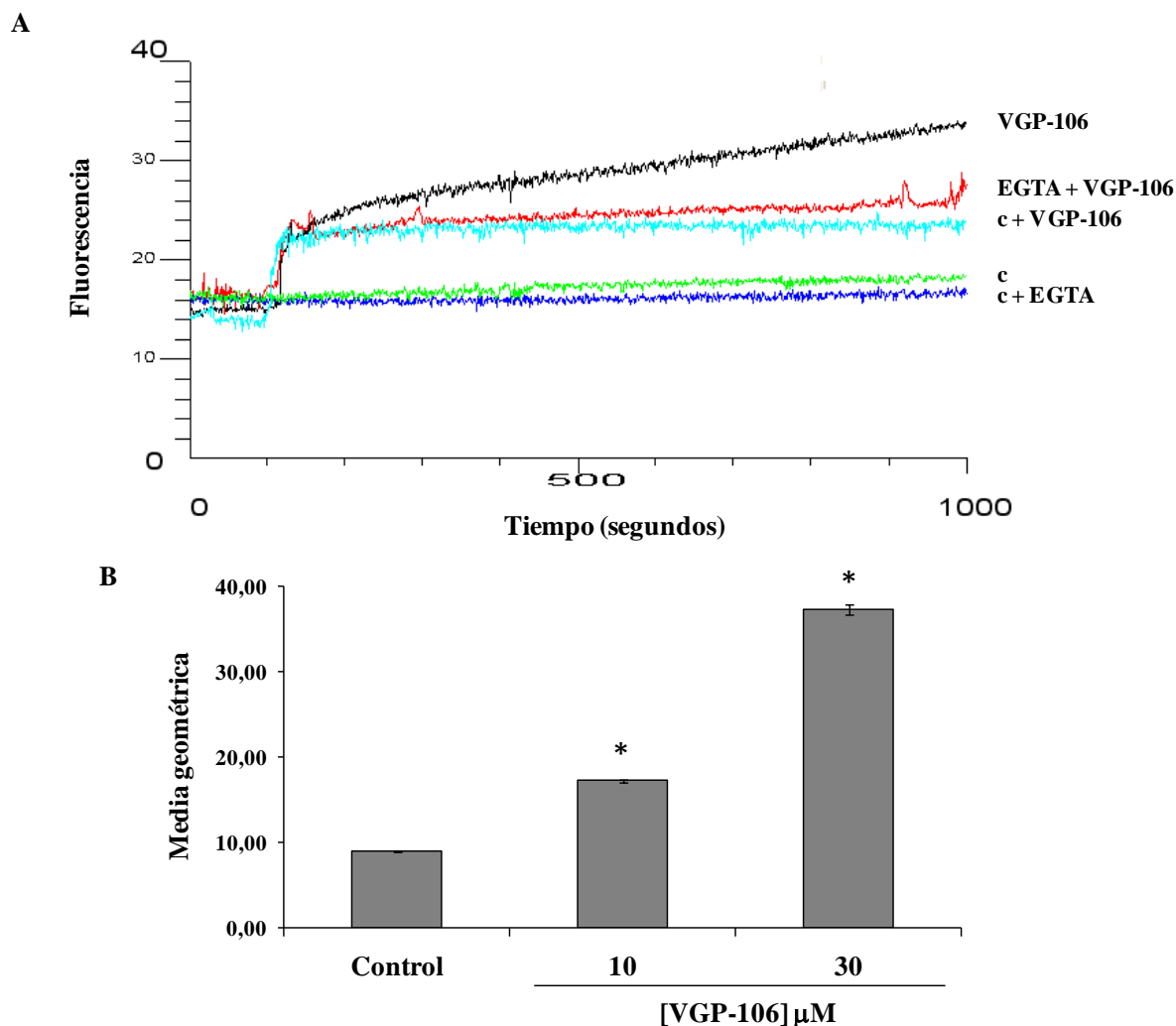


Figura 3.18. Determinación de los niveles de Ca^{2+} en formas promastigotas de *Leishmania* tratadas con el compuesto **VGP-106**. A) Análisis de la fluorescencia producida por la sonda Fluo-4 unida a Ca^{2+} durante 1000 s. B) Acumulación de Ca^{2+} intracelular tras 30 minutos de incubación con 10 ó 30 μM de **VGP-106**. Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Las diferencias significativas con los parásitos control se han determinado mediante el test de la *t* de Student ($*p < 0,01$).

3.1.2.3.12. Análisis del contenido en ADN.

Para investigar si el compuesto **VGP-106** produce algún efecto en el ciclo celular, se ha medido el contenido de ADN con yoduro de propidio (PI). El PI se une al ADN de forma proporcional a la cantidad de ADN presente en la célula, de manera que permite observar la cantidad de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular. Si se produce una fragmentación del ADN en la célula, característica de un proceso de apoptosis, los valores de

fluorescencia serán menores que para células en fase G₁, por lo que debería aparecer un pico subG₁ en el histograma del ADN (Figura 3.19). Tras 24 horas de incubación con 10 y 30 μM de **VGP-106**, el porcentaje de células en la fase subG₁ aumenta tan sólo al 6,8% y 7,2%, respectivamente, con respecto al 4,1% del control. A las 48 horas, se produce un ligero aumento del porcentaje de células en subG₁, 11% y 14,8%, para 10 y 30 μM, respectivamente, siendo sólo significativo para 30 μM (n = 3; p < 0,01), por lo que parece que no hay una fragmentación del ADN. Por el contrario, los datos concuerdan con una muerte celular no programada, en la que tiene lugar una destrucción del parásito, con la consecuente pérdida del ADN al medio, por lo que no se detecta la fragmentación.

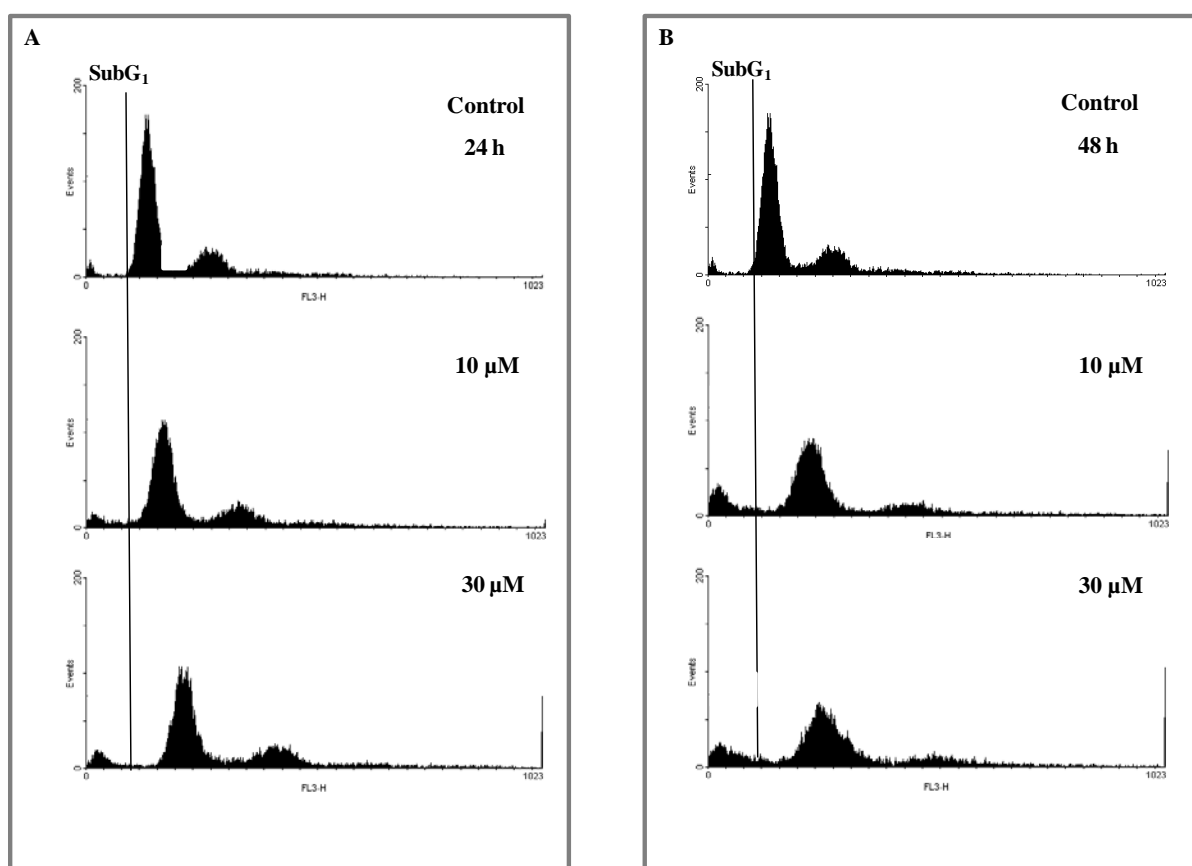


Figura 3.19. Análisis del contenido en ADN en formas promastigotas de *Leishmania* tratadas con diferentes concentraciones del compuesto **VGP-106** durante 24 h (A) ó 48 h (B). Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes.

3.1.3. Discusión de la parte 1.

Nuevos compuestos biscatiónicos abiertos como inhibidores de colina quinasa con actividad antiproliferativa.

Aunque no se conozca la función exacta de la enzima ChoK en las células cancerosas, se ha demostrado su implicación en los procesos carcinogénicos, y por tanto se ha validado como diana potencial para el diseño de agentes antiproliferativos³³. En este sentido, nuestro grupo de investigación se plantea el desarrollo de inhibidores de ChoK con una mejor selectividad y potencia para ser utilizados como herramientas farmacológicas en la investigación contra el cáncer.

En esta primera parte de la tesis se describen 10 nuevos compuestos bispiridínicos simétricos abiertos, con estructura de dibromuro de bispiridinio o bisquinolinio, sustituidos en posición 4 por un grupo electrón donante, tal como el grupo amino cíclico o acíclico. Estos compuestos han sido diseñados en base a los compuestos más activos como inhibidores de ChoK humana previamente sintetizados por el grupo⁵¹.

Para determinar la actividad antiproliferativa de los compuestos, se han elegido dos líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano que sobreexpresan la enzima ChoK, las líneas celulares MCF-7 y SKBR-3²⁸. Todos los compuestos sintetizados presentan actividad antiproliferativa, con unos valores de CI_{50} similares frente a ambas líneas (Tabla 3.1). Además, se confirma la tendencia previamente descrita de que, en general, los compuestos derivados de quinolinio presentan una mayor actividad antiproliferativa que los derivados de piridinio^{47,51}.

Igualmente se ha investigado la capacidad inhibitoria de los compuestos frente a la enzima ChoK humana purificada, usando una variante troncada en *N*-terminal de la isoforma ChoK α 2, que muestra una cinética similar a la enzima completa²². Todos los compuestos presentan actividad inhibitoria ChoK, con unos valores de CI_{50} entre 0,08 y 1.35 nM (Tabla 3.2).

Se observa que, en general, los compuestos con mayor actividad inhibitoria ChoK presentan también una buena actividad antiproliferativa, aunque no existe una correlación lineal directa entre ambas actividades. Los valores de CI_{50} son más altos para las actividades antiproliferativas que para las de inhibición enzimática, lo que puede explicarse porque la CI_{50} ChoK sólo determina el grado de afinidad sobre la enzima mientras que en la CI_{50} antiproliferativa intervienen otros factores biológicos como el paso a través de membranas celulares.

A pesar de que nuestro grupo de investigación tiene una amplia experiencia en la síntesis de compuestos inhibidores de ChoK^{44,51}, hasta ahora se sabía poco del modo de acción de los mismos, destacándose únicamente los análisis teóricos de dinámica molecular⁵⁵. Con objeto de investigar el mecanismo de inhibición enzimática, se han seleccionado los dos inhibidores más potentes del enzima, el compuesto **VGP-118**, de estructura bispiridínica, y el compuesto **VGP-150**, de estructura bisquinolínica, con los que se han realizado ensayos de cinética enzimática más profundos. Tanto el análisis de los distintos gráficos como el cálculo de las constantes de inhibición sugieren un mecanismo de inhibición mixto con predominio de una componente competitiva para ambos compuestos. Este tipo de inhibición mixta ha sido descrita previamente para diferentes proteínas quinasas, como la galactoquinasa¹⁵⁶.

Compuestos bispiridínicos como posibles agentes leishmanicidas.

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades parasitarias consideradas por la OMS como un problema de salud importante, sobre todo en los países en desarrollo. A pesar del esfuerzo realizado en investigación en los últimos años, la terapia leishmanicida actual presenta una serie de problemas de toxicidad y resistencias, por lo que hay una urgente necesidad de desarrollar un tratamiento seguro, económico y de fácil administración.

En los últimos años numerosos compuestos con diversas estructuras químicas han sido ensayado como agentes leishmanicidas, entre ellos compuestos biscatiónicos^{159,160} o derivados de quinolinio¹⁶¹, lo que sugiere la idea de que los 10 compuestos bispiridínicos presentados en esta Memoria puedan actuar como agentes leishmanicidas, y han sido ensayados como tales.

Todos los compuestos biscatiónicos sintetizados presentan actividad tanto frente a las formas promastigotas como a las formas amastigotas intracelulares de *L. donovani* y *L. major*, con unos valores de CI_{50} menores de 1 μ M en la mayoría de los casos (Tabla 3.3). La mayoría de los compuestos presenta un comportamiento similar en ambas especies, siendo ligeramente más activos frente a *L. major*. Sin embargo, los compuestos **VGP-106** y **VGP-118**, que tienen como cabeza catiónica al 4-(4-Bromo-*N*-metilanilino)piridinio, presentan una actividad significativamente mayor frente a *L. donovani*.

Mecanismo de acción leishmanicida.

Una vez establecida la actividad leishmanicida de esta nueva serie de compuestos, se han realizado ensayos más profundos sobre formas promastigotas de *Leishmania* para un mayor conocimiento del mecanismo de acción, que permita un diseño racional de futuros compuestos derivados. Para ello se ha seleccionado el compuesto **VGP-106** como representativo de la familia.

En primer lugar, los compuestos tienen que atravesar la membrana plasmática de los parásitos para ejercer su acción, por lo que es interesante estudiar el mecanismo de entrada al parásito. La fluorescencia intrínseca del compuesto **VGP-106** ha permitido su monitorización espectrofluorométrica, y se ha demostrado que entra al parásito mediante un proceso rápido e independiente de temperatura (Figura 3.11), lo que sugiere una entrada por un proceso de difusión.

Al mismo tiempo se ha evaluado si existe una relación entre la acumulación del compuesto y la susceptibilidad al mismo en las especies de *Leishmania* estudiadas. Los niveles de **VGP-106** son mayores en *L. donovani* que en *L. major* (Figura 3.11), sin embargo esta diferencia no es significativa, por lo que no explica las diferencias de sensibilidad entre ambas especies.

Por otro lado, teniendo en cuenta que estos compuestos inhiben a la enzima ChoK humana, se planteó la hipótesis de que los compuestos actuaran inhibiendo a las enzimas homólogas de *Leishmania*. Se ha demostrado que diversos compuestos dicatiónicos simétricos

presentan actividad antimalárica mediante un mecanismo de inhibición de la biosíntesis *de novo* de fosfatidilcolina (PC) de *P. falciparum*¹⁶².

En *Leishmania*, la PC es también el principal fosfolípido de la membrana, y en su genoma hay dos enzimas homólogas a la ChoK humana: etanolamina quinasa (EK) y colina/etanolamina quinasa (CEK). El ensayo de sensibilidad en parásitos transfectados con las enzimas CEK y EK frente al compuesto **VGP-106**, no muestra diferencias significativas con respecto a la sensibilidad de los parásitos control (Tabla 3.4). Estos datos indican que el mecanismo de acción leishmanicida de los compuestos bispiridínicos abiertos no es por inhibición de CEK ni de EK. Estos resultados son coherentes con el hecho de que *Leishmania* no es auxótrofo para colina ni etanolamina⁸², a diferencia de lo que ocurre en *Plasmodium*, donde la inhibición de ChoK lleva a la muerte del parásito⁸⁹. Además, no se han observado variaciones significativas de los valores de CI₅₀ para este compuesto en presencia o ausencia de 100 mM de colina ni de 100 mM de etanolamina (apartado 3.1.2.3.4), lo que indica que el compuesto **VGP-106** no compite con ninguno de los dos sustratos.

Metabolismo energético.

Mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), se ha estudiado la morfología ultraestructural de *L. donovani* en presencia o ausencia de **VGP-106**. Desde las concentraciones más bajas de incubación utilizadas (0,5 µM, 24 h) se observa una alteración significativa en la mitocondria, que aparece muy hinchada con respecto a los controles (Figura 3.13). Esa alteración es más acusada al aumentar la concentración del compuesto y el tiempo de incubación, de modo que a 1 µM durante 48 h todos los parásitos presentan una gran mitocondria que ocupa casi todo el citoplasma. No se observan alteraciones significativas de otros orgánulos, lo que sugiere que el compuesto actúa principalmente a nivel mitocondrial, por lo que se han realizado ensayos para valorar la función mitocondrial. Diversos estudios realizados en varias especies de *Leishmania* y *Trypanosoma* muestran que el tratamiento con diferentes fármacos produce alteraciones de la estructura mitocondrial que preceden a una pérdida de la viabilidad celular, lo que confirma la importancia de este orgánulo para la viabilidad del parásito^{100,163-166}.

Los ensayos de viabilidad mediante el método MTT, que mide la actividad de enzimas mitocondriales, muestran que la viabilidad de los parásitos tratados con 0,5 μ M del compuesto durante 24 h no varía con respecto a los parásitos control, lo que indica que a pesar de que hay una alteración morfológica de la mitocondria, su función se mantiene estable. En esas condiciones experimentales hay una hiperpolarización del potencial de membrana mitocondrial (Figura 3.14) y un descenso en los niveles de ATP (Figura 3.15) con respecto a los controles, debido a una disminución de la síntesis de ATP. Se ha publicado que bajo condiciones de estrés por calor, los parásitos de *L. infantum* parecen aumentar el ritmo de trabajo, lo que se traduce en una hiperpolarización de la membrana mitocondrial y un mayor consumo de oxígeno¹⁶⁷.

Estos datos sugieren que el compuesto se acumula en la mitocondria del parásito, alterando la función mitocondrial, aunque no se ha determinado que actúe sobre una diana específica. Se ha descrito que algunos compuestos cargados positivamente, como el decualinio, se localizan principalmente en la mitocondria alterando su morfología tras una exposición prolongada¹⁶⁸.

Muerte celular.

En las células de mamíferos, se ha descrito que la hiperpolarización de la membrana mitocondrial conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)¹⁶⁹. En base a esos antecedentes, se ha determinado si el compuesto **VGP-106** induce la producción de ROS mitocondrial mediante el uso de la sonda fluorescente MitoSOX Red que se oxida localmente en la mitocondria. Se comprueba que este compuesto produce un aumento de ROS proporcional al tiempo y a la concentración del compuesto (Figura 3.17).

Las bajas concentraciones de ROS están presentes normalmente en las células y parecen estar implicadas en procesos fisiológicos. Sin embargo, la sobreproducción de estos productos intermedios tóxicos de oxígeno puede inducir daños a las proteínas, los lípidos y el ADN, lo que conduce a la muerte celular programada (PCD) o necrosis¹⁶⁷. Aunque la PCD es característica de organismos multicelulares, se ha observado que algunos fármacos leishmanicidas, así como determinadas condiciones de estrés, producen la muerte del parásito mediante la producción de unos efectos característicos de muerte por apoptosis⁹², como son

alteración del potencial de membrana mitocondrial, condensación del ADN, aumento del calcio citosólico y de ROS o fragmentación del ADN, eventos que pueden ocurrir en distinto orden.

Se ha estudiado si el compuesto **VGP-106** altera la homeostasis del calcio, un evento típico de la apoptosis que está muy relacionado con la producción de ROS y la disfunción mitocondrial⁹². Se ha comprobado que este compuesto produce un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular, debido a la entrada externa de Ca^{2+} y no a la liberación de los depósitos intracelulares (Figura 3.18). Este aumento de Ca^{2+} ocurre inmediatamente tras el tratamiento con el compuesto, siendo así uno de los primeros eventos que se han observado que el compuesto **VGP-106** produce en el parásito.

Con objeto de conocer si el mecanismo de muerte celular producido por el compuesto **VGP-106** es un proceso similar a la apoptosis o un proceso necrótico se ha investigado su efecto en el ciclo celular. En el ensayo con yoduro de propidio parece que no hay una fragmentación del ADN en comparación con parásitos control, lo que sugiere que no está ocurriendo una muerte celular programada.

Estos datos junto con las imágenes de TEM de los parásitos tratados con 1 μM del compuesto **VGP-106** durante 48 horas, en la que se observan muchos restos celulares, concuerdan con una muerte celular no programada o necrosis.

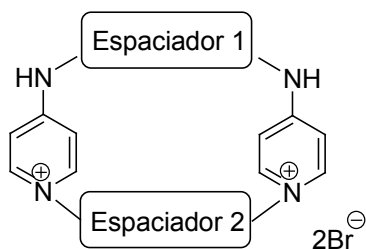
3.2. Parte 2: Ciclofanos bispiridínicos.

3.2.1. Química.

Se han sintetizado 9 compuestos finales con estructura macrocíclica. Todos son compuestos ciclofanos bispiridínicos simétricos, que se diferencian entre sí en los espaciadores superior e inferior. Se han utilizado 4 espaciadores diferentes, dos de ellos son anillos bencénicos sustituidos por dos grupos metilo en posiciones *para* o *meta*, y los otros dos son los espaciadores alifáticos 1,5-pentanodiilo y 3-oxa-1,5-pentanodiilo. La combinación de estos espaciadores da lugar a estructuras con distinta flexibilidad, en función de si presentan o no algún anillo bencénico.

A continuación se detallan las estructuras de los compuestos finales, denominados con las siglas **VGP-222**, **VGP-234**, **VGP-310**, **VGP-312**, **VGP-318**, **VGP-328**, **VGP-334**, **VGP-340** y **VGP-352**.

La síntesis de los compuestos finales macrocíclicos se realiza en dos pasos: primero se hace reaccionar la 4-bromopiridina con la diamina comercial para dar la diamina bispiridínica que reacciona, en un segundo paso, con el derivado dibromado correspondiente para dar el dibromuro final.



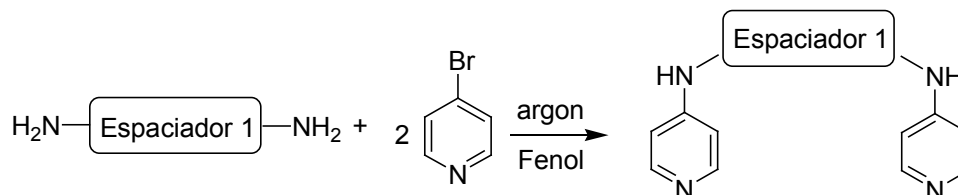
Compuesto	Espaciador 1	Espaciador 2
VGP-222		
VGP-234		
VGP-310		
VGP-312		
VGP-318	 	
VGP-328		
VGP-334		
VGP-340		
VGP-352		

3.2.1.1. Síntesis de las diaminas bispiridínicas intermedias.

En el primer paso de la síntesis de los ciclofanos bispiridínicos, se hace reaccionar la 4-bromopiridina con la diamina comercial correspondiente, utilizando un disolvente de alto punto de ebullición como el fenol, que actúa como dador de protones, agente solvatante y fuente de ión fenóxido, facilitando la sustitución del halógeno (Esquema 3.10).

La reacción se realiza bajo atmósfera de argón a una temperatura de 170 °C durante ocho horas⁴⁹. Tras enfriamiento a temperatura ambiente, el crudo de reacción se disuelve en metanol y se acidifica hasta pH 1-2 con HBr gas en acético glacial al 33%, para formar la sal

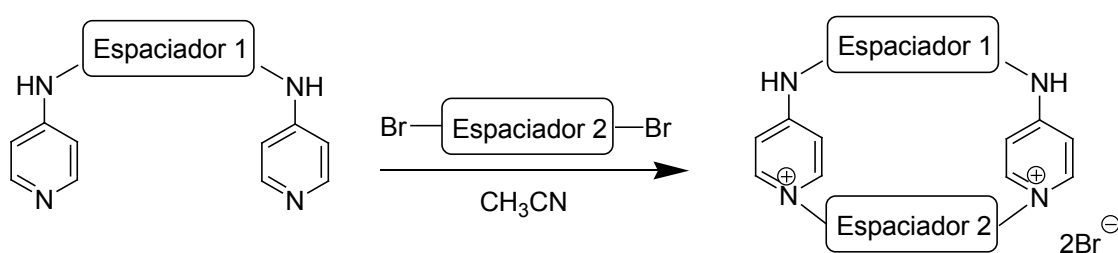
del producto que precipita al añadir éter etílico y se aísla por filtración a vacío. La sal obtenida se pasa a su forma de base libre añadiendo NaOH 1M hasta pH básico para dar la diamina bispiridínica.



Esquema 3.10. Síntesis de las diaminas bispiridínicas.

3.2.1.2. Síntesis de los compuestos finales ciclofanos bispiridínicos.

Los compuestos finales se obtienen mediante una reacción de ciclación de la diamina bispiridínica intermedia y el dibromuro comercial (Esquema 3.11). Para ello se siguió el método previamente descrito para la síntesis de este tipo de compuestos⁴⁹, en el que se hace reaccionar la diamina y el dibromuro en acetonitrilo a su temperatura de reflujo, utilizando una dilución de 0,004 M, durante un tiempo de reacción entre 10 y 15 días. La dilución empleada favorece la formación del compuesto ciclofánico y evita la reacción intermolecular.



Esquema 3.11. Síntesis de los piridociclofanos finales.

La síntesis de los compuestos finales **VGP-222**, **VGP-234** y **VGP-318** presenta, además del problema de los tiempos de reacción tan largos, los bajos rendimientos de obtención (<35%). Por ello, se intentaron obviar estos dos inconvenientes mediante la utilización del calentamiento con microondas.

La reacción en microondas se llevó a cabo en acetonitrilo, con una dilución de 0,02 M, a 140 °C durante 20 minutos. La purificación de estos compuestos se realiza por

recristalización, ya que la alta polaridad de los mismos no permite el uso de cromatografía en columna flash con silicagel. El microondas del laboratorio sólo nos permite realizar reacciones en pequeños volúmenes (hasta 5 ml), lo que supone que para mantener la dilución necesaria para que ocurra la reacción, hay que usar cantidades muy pequeñas de reactivos. Esto dificulta el proceso de recristalización, y hace que el rendimiento de la reacción sea comparable al caso anterior. Sin embargo, este método aporta la ventaja de una gran reducción del tiempo de reacción.

3.2.2. Ensayos biológicos.

Los compuestos ciclofánicos bispiridínicos sintetizados se han ensayado como agentes antiproliferativos y como agentes leishmanicidas. Estos ensayos se han realizado en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra del CSIC en Granada, bajo la supervisión de los doctores Francisco Gamarro y Santiago Castanys.

3.2.2.1. Ensayos de actividad antiproliferativa.

Los ensayos de proliferación celular se han realizado sobre la línea de adenocarcinoma de mama humano MCF-7. Para ello se ha determinado la viabilidad celular en presencia de distintas concentraciones de los compuestos utilizando el método MTT, bajo las mismas condiciones de ensayo que el realizado para los compuestos bispiridínicos abiertos (apartado 3.1.2.1). Tan sólo los compuestos **VGP-318** y **VGP-328** presentan actividad antiproliferativa, aunque moderada, con unos valores de CI_{50} de $35,8 \pm 7,1 \mu\text{M}$ y $29,1 \pm 3,4 \mu\text{M}$, respectivamente. Para el resto de los compuestos la CI_{50} obtenida es mayor de $100 \mu\text{M}$.

Los compuestos ciclofánicos presentan restricciones conformacionales debido a su mayor rigidez. El aumento de flexibilidad con respecto a los compuestos previamente sintetizados⁴⁹, introducida por los espaciadores alifáticos, parece que da lugar a una pérdida de la actividad antiproliferativa de los compuestos.

En base a estos resultados, se decide no realizar ensayos de inhibición de la enzima colina quinasa, ya que la actividad de inhibición de la enzima es el mecanismo de acción de la actividad antiproliferativa de los compuestos publicados previamente por el grupo de investigación⁴⁴.

3.2.2.2. Ensayos de actividad leishmanicida.

3.2.2.2.1. Ensayos de sensibilidad y toxicidad en formas promastigotas y amastigotas intracelulares de *Leishmania*.

Los 9 compuestos ciclofánicos sintetizados se han ensayado frente a formas promastigotas extracelulares y formas amastigotas intracelulares de dos especies de *Leishmania*: *L. donovani*, y *L. major*. Además, se ha determinado la toxicidad intracelular de todos los compuestos frente a la línea celular THP-1.

La Tabla 3.5 resume los resultados obtenidos en los ensayos de sensibilidad a los compuestos en los protozoos parásitos *L. major* y *L. donovani*, empleando como control de sensibilidad los fármacos leishmanicidas anfotericina B y miltefosina.

Todos los compuestos ciclofánicos bispiridínicos presentan actividad leishmanicida frente a formas promastigotas y formas amastigotas intracelulares de *L. donovani* y *L. major*, siendo más activos frente a la especie *L. major*, con unos valores de CI_{50} entre 1 y 17 μM en formas amastigotas intracelulares (Tabla 3.5). La actividad leishmanicida en formas promastigotas para los compuestos **VGP-310**, **VGP-318**, **VGP-334**, **VGP-340** y **VGP-352** es más de 100 veces superior en *L. major*, con unos valores de CI_{50} inferior a 1 μM , que en *L. donovani*. Sin embargo, en las formas amastigotas intracelulares la diferencia de actividad es tan sólo unas 10 veces superior en *L. major*, debido a que los valores de CI_{50} para esta especie en formas amastigotas intracelulares aumentan con respecto a las formas promastigotes (Tabla 3.5).

Todos los compuestos presentan muy baja toxicidad para células de mamíferos THP-1 (CI_{50} entre 154-220 μM), y un buen margen de seguridad, indicado por la relación entre la CI_{50} de toxicidad celular y la CI_{50} frente al parásito, incluso superior en algunos casos al obtenido con la anfotericina B y miltefosina.

Tabla 3.5. Sensibilidad de los compuestos ciclofánicos en formas promastigotas y amastigotas intracelulares de *Leishmania*.

Compuesto	CI ₅₀ promastigotes (µM)		CI ₅₀ amastigotes (µM)		Toxicidad celular, CI ₅₀ (µM)
	<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>	
VGP-222	16,84 ± 1,20	51,97 ± 1,97	5,94 ± 0,93 (32,3)	13,53 ± 1,40 (14,2)	191,90 ± 8,12
VGP-234	5,97 ± 0,35	33,77 ± 4,68	8,67 ± 1,04 (22,5)	8,92 ± 1,96 (10,3)	195,17 ± 6,41
VGP-310	0,17 ± 0,01	26,41 ± 1,28	0,97 ± 0,27 (170,2)	38,33 ± 1,74 (4,3)	165,06 ± 21,29
VGP-312	26,48 ± 2,44	76,87 ± 11,59	17,15 ± 1,50 (12,9)	63,67 ± 5,21 (3,5)	221,89 ± 8,27
VGP-318	0,07 ± 0,004	25,25 ± 0,83	1,26 ± 0,30 (122,3)	7,62 ± 0,16 (20,2)	154,07 ± 5,95
VGP-328	2,87 ± 0,36	76,27 ± 4,96	1,61 ± 0,35 (120,8)	21,25 ± 2,03 (9,2)	194,41 ± 2,95
VGP-334	0,26 ± 0,02	31,47 ± 2,53	2,59 ± 0,23 (62,7)	33,19 ± 0,57 (4,9)	162,44 ± 6,07
VGP-340	0,19 ± 0,009	23,43 ± 0,57	2,24 ± 0,35 (57,2)	20,72 ± 1,07 (6,2)	128,22 ± 9,78
VGP-352	0,26 ± 0,007	31,41 ± 3,02	2,18 ± 0,05 (98,5)	12,95 ± 1,86 (16,6)	214,65 ± 13,80
Anfotericina B	0,32 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,24 ± 0,001 (59,7)	0,28 ± 0,13 (51,1)	14,32 ± 4,10
Miltefosina	16,65 ± 1,23	6,60 ± 1,57	10,61 ± 0,89 (2,5)	0,88 ± 0,14 (30,5)	26,86 ± 3,08

Los datos presentados son medias de los valores de las CI₅₀ ± desviación estándar de tres experimentos independientes

El compuesto **VGP-318** presenta una buena actividad frente a las formas amastigotas intracelulares de *L. major* ($CI_{50} = 1,3 \mu\text{M}$), con un margen de seguridad (122) superior al obtenido con la anfotericina B (60). Este compuesto es además el más activo de la serie frente a las formas amastigotas intracelulares de *L. donovani* ($CI_{50} = 7,6 \mu\text{M}$), por lo que fue elegido como representante de la serie para realizar ensayos más profundos sobre el mecanismo de acción en estos parásitos.

La curva de inhibición del compuesto **VGP-318** para los promastigotes de *L. donovani*, en la que se representa el porcentaje de viabilidad celular con respecto al control de parásitos sin tratar (100%) frente a las concentraciones crecientes del compuesto tras 72 h de incubación, es de tipo sigmoidea (Figura 3.20). El valor de CI_{90} es de $18,4 \pm 0,5 \mu\text{M}$.

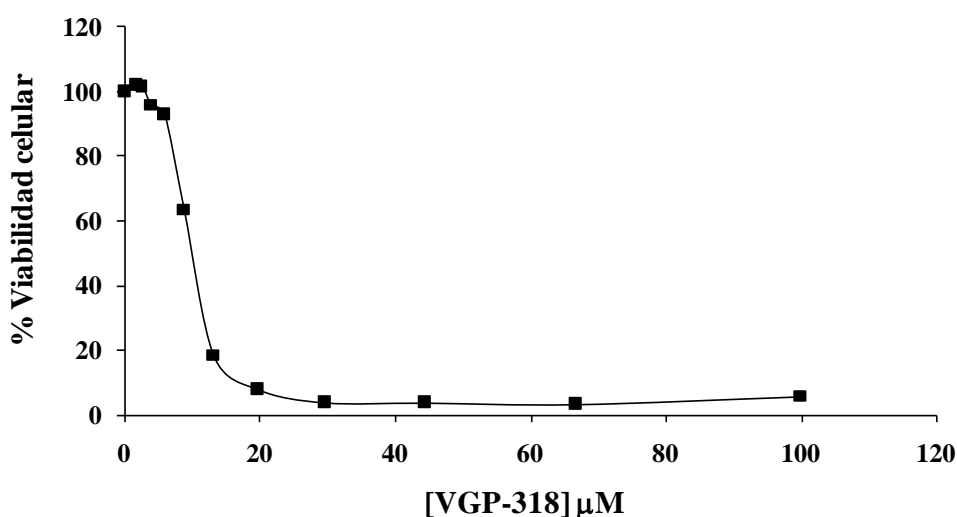


Figura 3.20. Curva de viabilidad celular de los promastigotes de *L. donovani* tras 72h de incubación con concentraciones crecientes del compuesto **VGP-318**.

3.2.2.2.2. Ensayos de sensibilidad en formas promastigotas de *Leishmania* transfectadas con pXG-CEKm y pXG-EK.

Se ha realizado un ensayo de sensibilidad de las formas promastigotas y amastigotas intracelulares de *L. donovani* que sobreexpresan las enzimas CEK o EK de *Leishmania* para el compuesto **VGP-318**.

Al igual que ocurre para el compuesto **VGP-106**, la sensibilidad para **VGP-318** es similar para los parásitos transfectados y para el control con el plásmido vacío, tanto en formas promastigotas como amastigotas intracelulares (Tabla 3.6). Aunque este compuesto no se ha ensayado como inhibidor de la enzima ChoK *in vitro*, podemos afirmar que su mecanismo de acción leishmanicida no está relacionado con las enzimas CEK y EK, ya que en caso contrario, la sobreexpresión de estas enzimas habría implicado una mayor resistencia al efecto inhibidor del compuesto, y por tanto un valor de CI_{50} mayor.

Tabla 3.6. Sensibilidad de líneas de *L. donovani* al compuesto **VGP-318**.

Compuesto	CI_{50} promastigotes (μM)			CI_{50} amastigotes (μM)		
	pXG	pXG-CEK	pXG-EK	pXG	pXG-CEK	pXG-EK
VGP-318	13,5 \pm 0,32	11,51 \pm 0,52	12,04 \pm 0,42	8,84 \pm 0,18	12,7 \pm 2,03	10,54 \pm 1,42
Miltefosina	6,60 \pm 0,57	9,42 \pm 0,89	10,33 \pm 1,12	2,11 \pm 0,15	3,74 \pm 0,26	4,55 \pm 0,51

La sensibilidad de las formas promastigotas y amastigotas intracelulares al compuesto VGP-318 se determinó a las 72 h siguiendo el método colorimétrico MTT (ver Material y Métodos), empleando parásitos control (pXG) y parásitos que sobreexpresan las proteínas CEK (pXG-CEK) y EK (pXG-EK) de *Leishmania*. Los datos presentados son medias de los valores de $CI_{50} \pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes.

También se han llevado a cabo ensayos de sensibilidad con promastigotes de *L. donovani* en medios de cultivo con un exceso de colina o de etanolamina (1000 veces superior a la concentración en el medio normal). Los valores de CI_{50} en el medio con 10 mM de colina (11,46 \pm 0,66), y con 10 mM de etanolamina (12,03 \pm 0,83) son comparables a los valores de CI_{50} del medio normal (10,64 \pm 1,03), lo que confirma que el compuesto no compite ni con la colina ni con la etanolamina.

3.2.2.2.3. Efecto del compuesto VGP-318 en el metabolismo de *Leishmania*.

Con objeto de investigar el mecanismo de acción de los compuestos ciclofánicos, se han realizado diversos ensayos para estudiar el efecto del compuesto **VGP-318** sobre el metabolismo energético de los parásitos.

Efecto sobre los niveles de ATP.

Para determinar los procesos metabólicos responsables del efecto leishmanicida del compuesto **VGP-318**, se ha estudiado en primer lugar el estado bioenergético de *L. donovani* mediante el análisis del efecto del compuesto sobre los niveles de ATP libre del parásito. Para ello se ha realizado un ensayo de bioluminiscencia CellTiter-Glo sobre las formas promastigotas de *L. donovani* y *L. major* tras incubarse con 0,2 ó 30 μM del compuesto a lo largo de 3 horas. Mientras que en *L. donovani* no se observa ningún efecto (Figura 3.21), en *L. major* los niveles de ATP descienden más del 50% con respecto al control, tras incubarse con 0,2 μM de **VGP-318** durante una hora, y continúan descendiendo gradualmente hasta las 3 horas (Figura 3.21). Esto parece indicar una diferencia en el mecanismo de acción de este compuesto en ambas especies.

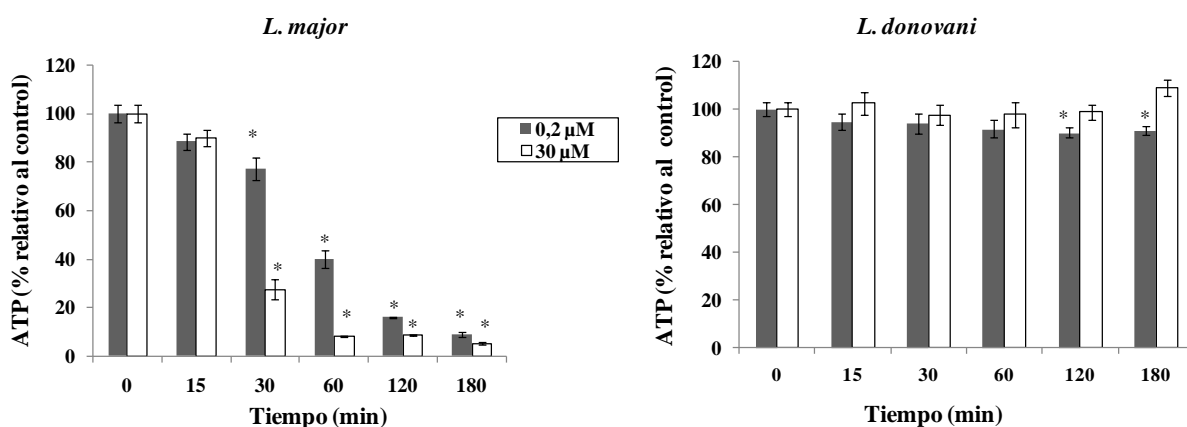


Figura 3.21. Efecto del compuesto **VGP-318** sobre los niveles de ATP libre intracelular en promastigotes de *Leishmania*. Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Las diferencias significativas con los parásitos control se han determinado mediante el test de la *t* de Student (* $p < 0,01$).

La disminución en los niveles de ATP puede deberse principalmente a dos causas: a un efecto del compuesto a nivel de la síntesis de ATP, o a una salida de ATP del parásito debido a una alteración de la membrana plasmática. Puesto que el compuesto **VGP-318** produce una caída de los niveles del ATP libre, se decide investigar a continuación su efecto sobre la membrana plasmática.

Efecto sobre el potencial de membrana plasmática.

Una de las posibles causas del descenso de los niveles de ATP intracelular es su salida de la célula debido a una alteración de la membrana plasmática producida por el compuesto **VGP-318**. Por ello se ha medido si el compuesto produce variaciones en el potencial de la membrana plasmática usando la sonda fluorescente DiBAC₄(3). A una concentración de 30 μ M, el compuesto **VGP-318** no produce ningún efecto significativo en ninguna de las dos especies (Figura 3.22).

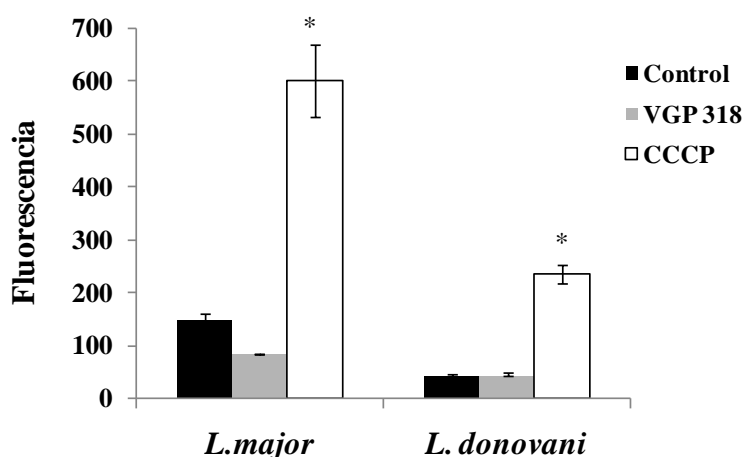


Figura 3.22. Efecto del compuesto **VGP-318** sobre el potencial de membrana plasmática de *Leishmania*. Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Las diferencias significativas con los parásitos control se han determinado mediante el test de la *t* de Student ($*p < 0,01$).

Efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial.

A continuación se ha analizado si el compuesto **VGP-318** produce su efecto a nivel mitocondrial, ya que la producción de ATP en *Leishmania* se da principalmente por fosforilación oxidativa⁷⁶. Para ello se ha monitorizado la variación en el potencial mitocondrial, usando el marcador fluorescente JC-1. En *L. donovani* se observa una ligera despolarización tras tratar a los promastigotes con 30 μ M de **VGP-318** durante 3 horas (Figura 3.23A). En *L. major*, los parásitos tratados con 0,2 μ M del compuesto durante 1 hora (condiciones en las que el ATP desciende un 50% con respecto al control) se observa un descenso significativo del potencial de membrana mitocondrial con respecto a los parásitos control (no tratados con el compuesto); resultados que son comparables al obtenido con el compuesto desacoplador clásico FCCP a 10 μ M (Figura 3.23B).

Estos datos sugieren que el compuesto **VGP-318** produce un daño a nivel mitocondrial que conlleva una caída de los niveles de ATP intracelulares en *L. major*.

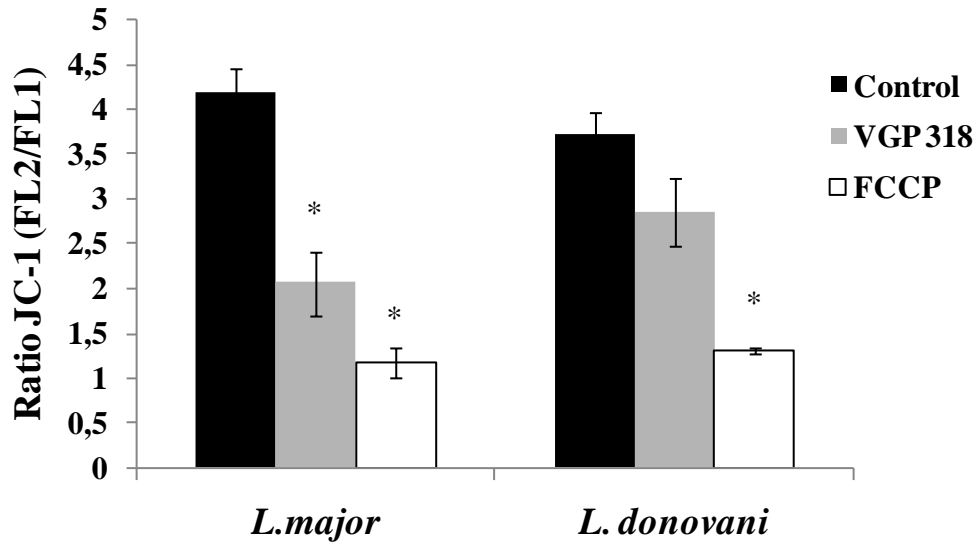


Figura 3.23. Efecto del compuesto **VGP-318** sobre el potencial de membrana de los promastigotes de *L. major* y *L. donovani*. Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Las diferencias significativas con los parásitos control se han determinado mediante el test de la *t* de Student ($*p < 0,01$).

3.2.3. Discusión de la parte 2.

Compuestos macrocíclicos.

En esta segunda parte de la tesis se describen 9 nuevos compuestos ciclofánicos, con estructura de dibromuro de bis(4-aminopiridinio), unidos por un espaciador superior, que une a los grupos amino exocíclicos y otro inferior, que une a los dos átomos de nitrógeno cuaternizados.

El aumento de la rigidez es una estrategia usada comúnmente en el diseño de fármacos para aumentar la actividad de un fármaco o disminuir sus efectos adversos. Con esta estrategia se consiguen reducir las posibilidades de interacción con varios receptores, y consecuentemente, los efectos adversos. Como desventajas, la síntesis de estas estructuras suele ser más complicada, y por otro lado, puede que al incrementar la rigidez, el compuesto no adquiera la conformación activa.

A diferencia de los ciclofanos previamente sintetizados donde ambos espaciadores eran anillos bencénicos⁴⁹, en este caso al menos uno de los dos espaciadores es una estructura alifática, lo que confiere a la molécula una mayor flexibilidad. Sin embargo, esta mayor flexibilidad implica la eliminación de la actividad antiproliferativa de los compuestos.

Compuestos cíclicos como posibles agentes leishmanicidas.

La pentamidina es uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de la enfermedad del sueño, producida por *Trypanosoma brucei*, y otras enfermedades infecciosas como la malaria y la leishmaniasis. A pesar de su eficacia, el uso de la pentamidina se ha limitado, debido a su baja biodisponibilidad, que es consecuencia de la alta basicidad de sus grupos amidinos¹⁷⁰. Por ello, en los últimos años se han desarrollado diferentes compuestos con estructura de diamidinas aromáticas con objeto de encontrar nuevos fármacos con mejor actividad, mayor lipofilia y menor toxicidad para el tratamiento de enfermedades parasitarias¹⁷¹.

Los compuestos ciclofanos bispiridínicos presentados en esta memoria pueden considerarse análogos cíclicos de la pentamidina, por lo que se han ensayado como posibles

agentes leishmanicidas. Todos los compuestos piridociclofánicos sintetizados presentan actividad tanto frente a las formas promastigotas como a las formas amastigotas intracelulares de *L. donovani* y *L. major*.

Un mismo agente terapéutico puede exhibir diferentes grados de actividad frente a especies diferentes de *Leishmania*^{103,172}. En este caso, todos los compuestos son más activos frente a la especie *L. major*, siendo esa diferencia más acentuada en las formas promastigotas, donde para los compuestos **VGP-310**, **VGP-318**, **VGP-334**, **VGP-340** y **VGP-352** es más de 100 veces superior (Tabla 3.5).

Todos los compuestos presentan muy baja toxicidad para células de mamíferos THP-1 (CI₅₀ entre 154-220 μM), y un buen margen de seguridad, incluso superior en algunos casos al obtenido con la anfotericina B y miltefosina.

Una vez establecida la actividad leishmanicida de esta nueva serie de compuestos, se han realizado ensayos más profundos sobre formas promastigotas de *Leishmania* para un mayor conocimiento del mecanismo de acción. Para ello se ha seleccionado el compuesto **VGP-318** como representativo de la familia, por ser el compuesto más activo de la serie frente a las formas amastigotas intracelulares de *L. donovani* (CI₅₀ = 7,6 μM), y por presentar una buena actividad frente a las formas amastigotas intracelulares de *L. major* (CI₅₀ = 1,3 μM), con un margen de seguridad (122) superior al obtenido con la anfotericina B (60).

Al analizar la acción del compuesto **VGP-318** sobre el metabolismo energético de *Leishmania*, se observa que produce una rápida caída de los niveles de ATP libre en *L. major*, y esa caída es dependiente de la concentración del fármaco. La disminución en los niveles de ATP puede deberse principalmente a dos causas: a un efecto del fármaco a nivel de la síntesis de ATP, o a una salida de ATP del parásito debido a una alteración de la membrana plasmática. En primer lugar se ha estudiado el efecto del compuesto sobre el potencial de la membrana plasmática, ya que su modificación puede afectar el consumo de ATP, necesario para el mantenimiento de este potencial. Para ello se ha usado una sonda fluorescente y se observa que el compuesto no produce ningún efecto a este nivel, lo que descarta que la caída del ATP libre intracelular se deba a una alteración de la membrana plasmática, y apunta a que puede deberse a un defecto en la síntesis de ATP.

Leishmania se clasifica dentro del grupo de tripanosomátidos donde la producción de ATP se da principalmente por fosforilación oxidativa⁷⁶, lo que ocurre en la mitocondria. La actividad antiparasitaria de muchos fármacos, como la pentamidina y la miltefosina, está mediada por una alteración del potencial de la membrana mitocondrial^{173,174}. Por tanto se ha estudiado el efecto del compuesto en el potencial mitocondrial. Observamos como al tratar promastigotes de *L. major* con el compuesto **VGP-318** se produce una despolarización del potencial de la membrana mitocondrial, lo que sugiere que el mecanismo de acción para este compuesto podría estar a nivel mitocondrial.

3.3. Consideraciones finales y perspectivas futuras.

Desde que se aislaron los primeros principios activos de plantas medicinales a mediados del siglo XIX, la investigación para el desarrollo de nuevos fármacos ha experimentado un cambio revolucionario. Este es un proceso largo y complejo que requiere una gran inversión de tiempo, dinero y recursos, por lo que las compañías farmacéuticas centran sus investigaciones en enfermedades importantes en el mundo desarrollado, tales como las enfermedades cardiovasculares, la obesidad o el cáncer. Sin embargo, la inversión realizada en enfermedades tropicales que afectan a países en desarrollo es mínima, aunque cada vez hay una mayor implicación de la industria, que se asocia con gobiernos y organizaciones filantrópicas para el estudio de enfermedades como la tuberculosis o la malaria.

Sin embargo, a pesar de los avances en biomedicina, que nos han permitido un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares de las enfermedades, sigue existiendo una necesidad de desarrollar nuevos fármacos que mejoren el arsenal terapéutico para evitar los problemas actuales de falta de especificidad, toxicidad o resistencia, en enfermedades tan dispares como el cáncer y la leishmaniasis.

En esta Memoria, se plantea el diseño y síntesis de 2 familias estructurales diferentes, que han sido ensayadas para la actividad antiproliferativa y leishmanicida.

En cuanto a la actividad antiproliferativa, los compuestos bispiridínicos abiertos son muy activos, con valores de CI_{50} entre 1-10 μM para las líneas de adenocarcinoma de mama humano SKBR-3 y MCF-7. Además, todos los compuestos son inhibidores de la enzima colina quinasa humana, confirmando que la inhibición de esta enzima es una estrategia anticancerosa. Por primera vez se determina el mecanismo de inhibición de este tipo de compuestos, resultando en un mecanismo mixto predominantemente competitivo. Por el contrario, en los compuestos ciclofánicos, a pesar de mantener las dos cabezas catiónicas piridínicas, se restringe la conformación estructural, lo que conlleva a una pérdida de la actividad antiproliferativa. En este sentido se plantea continuar los estudios con compuestos abiertos.

En cuanto a la actividad leishmanicida, en general, todos los compuestos bispiridínicos simétricos cíclicos y acíclicos presentados en esta Memoria muestran una buena actividad leishmanicida *in vitro*. Aunque se han determinado algunos aspectos de su mecanismo de acción, no se ha establecido ninguna diana clave sobre la que estén actuando, lo que sería determinante para el diseño racional de nuevas estructuras. El trabajo futuro debe ir encaminado a realizar estudios que permitan elucidar el metabolismo, farmacocinética y mecanismo de acción de estos compuestos. Por otro lado, sería interesante llevar a cabo un cribado de un gran número de compuestos de estructura piridofánica simétrica que nos permita establecer unas relaciones estructura-actividad que posibiliten el diseño de estructuras leishmanicidas aún más potentes.

En cualquier caso, el siguiente paso del proceso de desarrollo de fármacos sería continuar con ensayos *in vivo*, donde se evaluará la toxicidad y la potencia de estos compuestos.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4. Parte experimental.

4.1. Química.

4.1.1. Condiciones generales.

Los espectros RMN de ^1H y de ^{13}C se han realizado en un espectrómetro Varian Inova Unity de 300 MHz (2 canales), en un espectrómetro Varian Direct Drive de 400 MHz (2 canales) o en un espectrómetro Varian Direct Drive de 500 MHz (3 canales). Los datos se expresan en desplazamiento químico δ (ppm). Las constantes de acoplamiento J se expresan en Hz (ciclos por segundos). El aspecto y la multiplicidad de señales se indican mediante las siguientes abreviaturas: s, singlete; sa, singlete ancho; d, doblete; dd, doble doblete; t, triplete; pst, pseudo triplete; q, quintuplete; m, multiplete.

Los análisis elementales se han realizado en un aparato THERMO SCIENTIFIC Modelo Flash 2000. Las muestras se han secado en una estufa Gallencamp a presión reducida, con P_2O_5 en su interior. Por lo general, se hace a una temperatura entre 50 y 60 °C durante 24 horas, pero dado que el espectro RMN de ^1H de algunos compuestos finales revela la presencia de disolventes polares como etanol o metanol, la temperatura se aumentó hasta 80 °C y se llevó a cabo el secado durante 72 horas para intentar eliminar la mayor parte de estos disolventes.

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se han realizado en un aparato Bruker Autoflex mediante la técnica de ionización por láser asistida por nano-matriz (NALDI-TOF) o en un aparato Waters LCT Premier XE mediante ionización por electronebulización (ESI-TOF).

Los puntos de fusión se han medido en un aparato Electrothermal Melting Point Apparatus y están sin corregir.

Los procesos de reacción se controlaron de forma rutinaria mediante cromatografía en capa fina (c.c.f.) en cromatofolios Merck AL de Silicagel 60 F₂₅₄. Habitualmente, se han observado las manchas en lámpara de rayos ultravioleta; también se ha revelado con yodo o solución de ninhidrina. La purificación mediante cromatografía en columna flash se ha realizado utilizando Silicagel Merck 60 (230-400 mesh ASTM).

Todos los compuestos obtenidos comercialmente se han usado sin posteriores purificaciones.

Los espectros y los análisis elementales han sido realizados por el Centro de Instrumentación Científica (C.I.C.) de la Universidad de Granada.

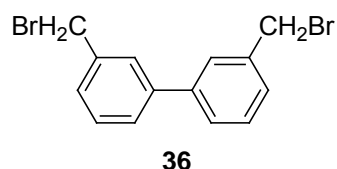
En el apartado 3 se describen los 19 compuestos finales sintetizados para el desarrollo de esta Memoria. Se trata de piridofanos simétricos con estructura abierta y cerrada. Los ciclofanos sólo pueden nombrarse correctamente usando las reglas de la IUPAC para fanos¹⁷⁵, mientras que todos los compuestos finales abiertos han sido nombrados usando tanto la nomenclatura clásica de la IUPAC como las citadas reglas, con objeto de utilizar un mismo sistema de nomenclatura para todos los compuestos finales.

La nomenclatura de fanos es un método para nombrar estructuras orgánicas que se realiza por agrupación de los nombres de las partes sencillas que componen una estructura compleja. Se denomina así porque la parte final “fanos” es obligatoria en todos los nombres de este nuevo método. El término ciclofano se usa para describir un tipo particular de estructuras cíclicas, pero fano no se restringe necesariamente a estas, por lo que dicha nomenclatura puede usarse tanto para estructuras abiertas como para macrocíclicas.

4.1.2. Materias primas.

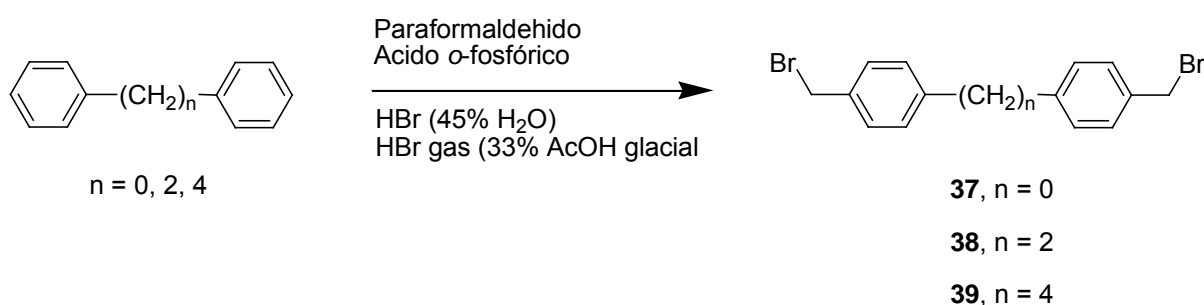
4.1.2.1. Síntesis de los espaciadores dibromados.

4.1.2.1.1. Síntesis de 3,3'-bis(bromometil)bifenilo **36**.



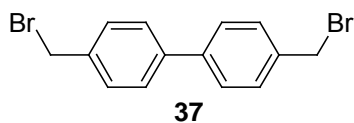
Una disolución de 3,3'-dimetilbifenilo (6,9 g, 37,8 mmoles), *N*-bromosuccinimida previamente recrystalizada de H₂O (14,1 g, 79,4 mmoles) y peróxido de benzoilo (275 mg, 1,1 mmoles) en 35 mL de CCl₄, se calienta a reflujo durante 7 horas. Tras ese tiempo y aún en caliente, la succinimida liberada se elimina por filtración y el filtrado se deja enfriar lentamente apareciendo unos cristales que se separan por filtración y se recrystalizan de CCl₄, obteniéndose el producto **36** con aspecto de sólido blanco (5,9 g, 46%). Pf. 106-108 °C (103-104 °C)¹⁴⁸.

4.1.2.1.2. Método general para la síntesis de los derivados del [bis(*p*-bromometil)fenil]alquilo.



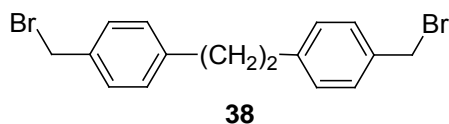
Una suspensión del correspondiente derivado bisarílico (1 mol), paraformaldehido (1,5 moles), HBr 48% (310 mL), ácido ortofosfórico (230 mL) y HBr en AcOH glacial al 45% (450 mL) se calienta a 100 °C durante 24 horas. Tras enfriamiento a temperatura ambiente precipita el producto, se filtra y se recrystaliza de acetona después de adicionar unas gotas de éter etílico para ayudar a la precipitación. Se obtiene el producto deseado con aspecto de sólido blanco.

4.1.2.1.2.1. Síntesis de 4,4'-bis(bromometil)bifenilo **37**.



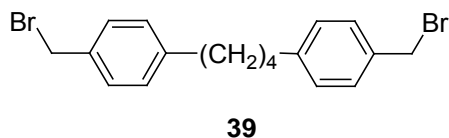
El derivado bisarílico de partida es el de bifenilo. Se obtiene **37** con aspecto de sólido blanco (11,7 g, 69%). Pf 162-165 °C (159-161 °C)¹⁴⁹.

4.1.2.1.2.2. Síntesis de bis-*p*-(bromometil)bibencilo **38**.

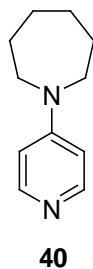


El derivado bisarílico de partida es el bibencilo. Se obtiene **38** con aspecto de sólido blanco (2,95 g, 16%). Pf: 130-132 °C (129-131 °C)¹⁴⁹.

4.1.2.1.2.3. Síntesis de 1,4-bis[*p*-(bromometil)fenil]butano **39**.



El derivado bisarílico de partida es el 1,4-difenilbutano. Se obtiene **39** con aspecto de sólido blanco (700 mg, 25%). Pf: 163 °C.

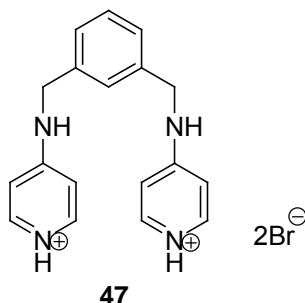
4.1.2.2. Síntesis de 4-perhidroazepinopiridina 40.

La 4-cloropiridina (1 g, 8,7 mmol) y un exceso de perhidroazepina (1,7 g, 17,5 mmol) se calientan a reflujo (130 °C) durante doce horas, en atmósfera de argón. Transcurrido el tiempo de reacción, se neutraliza con NaOH 1N, se extrae con diclorometano, se seca sobre sulfato magnésico anhidro, se filtra y se concentra obteniéndose un crudo (1,65 g) que se purifica por cromatografía flash empacando con diclorometano y eluyendo con proporciones adecuadas de diclorometano: metanol, obteniéndose **40** con aspecto de sirupo amarillo (276 mg, 18%).

4.1.2.3. Síntesis de las diaminas bispiridínicas.

4.1.2.3.1. Síntesis de dibromhidrato de 1,3-bis[(piridin-4-il)aminometil]benceno

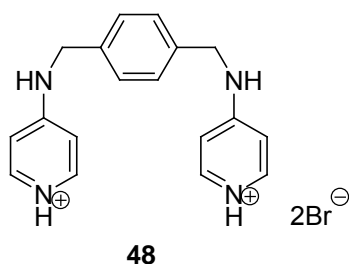
47.



Una mezcla de α,α' -diamino-*m*-xileno (1,2 g, 8,8 mmoles) y 4-bromopiridina (2,8 g, 17,7 mmoles) en *p*-cresol (8 g, 74 mmoles), se calienta bajo atmósfera de argón a 200 °C durante 8 horas. Tras enfriamiento a temperatura ambiente, el crudo de reacción se disuelve en metanol y se acidifica hasta pH 1-2 con HBr en AcOH glacial al 33%. Al añadir éter etílico precipita un sólido que se recoge por filtración a vacío y se lava con este disolvente para eliminar el *p*-cresol. El compuesto se purifica por recristalización de metanol obteniéndose el producto **47** con aspecto de sólido blanco (2,1 g, 54%). Pf: 256-257 °C (258 °C)⁴⁹.

4.1.2.3.2. Síntesis de dibromhidrato de 1,4-bis[(piridin-4-il)aminometil]benceno

48.

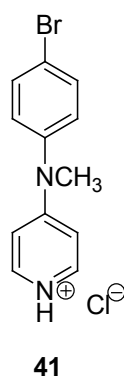


Una mezcla de α,α' -diamino-*p*-xileno (1,1 g, 8 mmoles) y 4-bromopiridina (2,6 g, 16 mmoles) en *p*-cresol (8 g, 74 mmoles), se calienta bajo atmósfera de argón a 180 °C, durante 7 horas. Tras enfriamiento a temperatura ambiente el crudo de reacción se disuelve en metanol y se acidifica hasta pH 1-2 con HBr en AcOH glacial al 33%. Al añadir éter etílico precipita un sólido que se recoge por filtración a vacío y se lava muy bien con este disolvente para eliminar el *p*-cresol. El compuesto se purifica por recristalización de metanol, obteniéndose el producto **48** con aspecto de sólido blanco (2,5 g, 69%). Pf: >350 °C (>350 °C)⁴⁹.

4.1.3. Nuevas experiencias y síntesis de compuestos intermedios.

4.1.3.1. Síntesis de las piridinas sustituidas en posición 4.

4.1.3.1.1. Síntesis de 4-(4-bromo-*N*-metilanilino)piridina **41**.

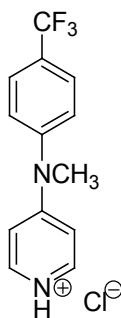


Una disolución de clorhidrato de 4-cloropiridina (1,3 g, 8,5 mmoles) y 4-bromo-*N*-metilanilina (5 g, 26,8 mmoles) en 20 mL de *n*-pentanol, se calienta a reflujo (135 °C) bajo atmósfera de argón durante 24 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se concentra y se ayuda a eliminar el disolvente formando azeótropo con agua. Se obtiene un sirupo marrón oscuro que se purifica mediante cromatografía flash, empacando con diclorometano y eluyendo con proporciones adecuadas de diclorometano: metanol, obteniéndose el producto objetivo **41** con aspecto de sirupo marrón (1,8 g, 80%).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 8,08 (dd, 2H, H-2,6_{py}, *J* = 1,61, 5,07) 7,62 (m, 2H, H-3,5_{anil}); 7,20 (m, 2H, H-2,6_{anil}); 6,65 (dd, 4H, H-3,5_{py}, *J* = 1,63, 5,07); 3,33 (s, 3H, CH₃).

¹³C-RMN (126 MHz, CD₃OD) δ 155,87(C-4_{py}); 149,93(C-2,6_{py}); 146,66(C-1_{anil}); 134,57 (C-3,5_{anil}); 129,95 (C-2,6_{anil}); 121,02 (C-4_{anil}); 109,83 (C-3,5_{py}); 39,92 (CH₃).

HRMS (m/e): Calculado para C₁₂H₁₂BrN₂ (M + H)⁺ 263,0184; encontrado 263,0178.

4.1.3.1.2. Síntesis de 4-(4-trifluorometil-*N*-metilanilino)piridina 42.**42**

Una disolución del clorhidrato de 4-cloropiridina (1,4 g, 9,5 mmoles) y 4-trifluoro-*N*-metilanilina (5 g, 28,5 mmoles) en 20 mL de *n*-pentanol, se calienta a reflujo (135 °C) bajo atmósfera de argón durante 24 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se concentra y se ayuda a eliminar el disolvente formando azeótropo con agua. Se obtiene un sirupo marrón-anaranjado que se purifica por cristalización de acetona, obteniéndose el producto objetivo **42** con aspecto de sirupo amarillo (1 g, 36%).

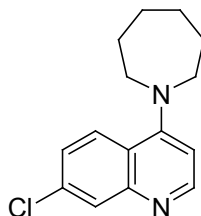
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,14 (dd, 2H, H-2,6_{py}, *J* = 1,59, 5,05); 7,76 (d, 2H, H-3,5_{anil}, *J* = 8,34); 7,47 (d, 2H, H-2,6_{anil}, *J* = 8,05); 6,78 (dd, 2H, H-3,5_{py}, *J* = 1,61, 5,04); 3,41 (s, 3H, CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ 155,46 (C-4_{py}); 150,87 (C-1_{anil}); 150,26 (C-2,6_{py}); 128,26 (C-3,5_{anil}); 127,48 (C-2,6_{anil}); 126,73 y 124,57 (CF₃ y C-4_{anil}); 110,84 (C-3,5_{py}); 39,87 (CH₃).

HRMS (m/e): Calculado para C₁₃H₁₂F₃N₂ (M + H)⁺ 253,0953; encontrado 253,0959.

4.1.3.2. Síntesis de las quinolinas sustituidas en posición 4.

4.1.3.2.1. Síntesis de 7-cloro-4-perhidroazepinoquinolina **44**.

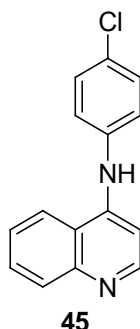
**44**

La 4,7-dicloroquinolina (890 mg, 4,5 mmol) y un exceso de perhidroazepina (1,14 g, 12 mmol) se calientan a reflujo (130 °C) durante doce horas, en atmósfera de argón. Transcurrido el tiempo de reacción, se neutraliza con NaOH 1N, se extrae con diclorometano, se seca sobre sulfato magnésico anhidro, se filtra y se concentra obteniéndose un crudo (1,1 g) que se purifica por cromatografía flash empacando con diclorometano y eluyendo con proporciones adecuadas de diclorometano: metanol, obteniéndose **44** con aspecto de sólido amarillo (928 mg, 79%). Pf: 88-90 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,55 (d, 1H, H-2_{quin}, *J* =5,34); 7,97 (d, 1H, H-5_{quin}, *J* =5,46); 7,95 (s, 1H, H-8_{quin}); 7,32 (dd, 1H, H-6_{quin}, *J* =2,19, 9,14); 6,73 (d, 1H, H-3_{quin}, *J* =5,37); 3,51 (m, 4H, H-2_{azep}); 1,90 (m, 4H, H-3_{azep}); 1,74 (m, 4H, H-4_{azep}).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 157,76 (C-4_{quin}); 151,45 (C-2_{quin}); 151,04 (C-8a_{quin}); 134,60 (C-7_{quin}); 128,85 (C-6_{quin}); 126,50 (C-5_{quin}); 124,86 (C-8_{quin}); 121,58 (C-4a_{quin}); 107,37 (C-3_{quin}); 54,48 (C-2_{azep}); 28,75 (C-3_{azep}); 27,90 (C-4_{azep}).

HRMS (m/e): Calculado para C₁₅H₁₈ClN₂ (M + H)⁺ 261,1159; encontrado 261,1166.

4.1.3.2.2. Síntesis de 4-(4-cloroanilino)quinolina 45.

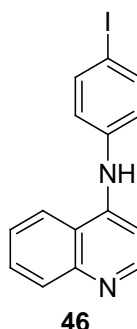
Una solución de 4-cloroquinolina (400 mg, 2,5 mmol) y 4-cloroanilina (640 mg, 5 mmol) en ácido acético glacial (7,5 mL) se calienta a reflujo (130-135 °C) durante 3 horas en atmósfera de argón. Transcurrido dicho tiempo, se deja enfriar a temperatura ambiente y se basifica con una solución de hidróxido sódico al 10% hasta pH 10; precipita un sólido que se filtra y se purifica mediante cromatografía flash, empacando con diclorometano y eluyendo con proporciones adecuadas de diclorometano: metanol, obteniéndose el compuesto **45** con aspecto de sólido blanco (305 mg, 48%). Pf: 178-179 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,58 (d, *J* = 5,2, 1H, H-2_{quin}); 8,04 (d, *J* = 8,5, 1H, H-5_{quin}); 7,90 (d, *J* = 8,9, 1H, H-8_{quin}); 7,69 (t, *J* = 7,8, 1H, H-7_{quin}); 7,51 (t, *J* = 7,7, 1H, H-6_{quin}); 7,37 (d, *J* = 8,6, 2H, H-3,5_{anilino}); 7,22 (s, 1H, H-2_{anilino} o H-6_{anilino}); 6,94 (s, 1H, H-6_{anilino} o H-2_{anilino}); 6,58 (d, *J* = 7,4, 1H, H-3_{quin}).

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃): δ 151,31 (C-2_{quin}); 149,57 (C-4_{quin}); 147,59 (C-8a_{quin}); 139,04 (C-1_{anilino}); 130,71 (C-3,5_{anilino}); 130,37 (C-7_{quin}); 130,16 (C-6_{quin}); 130,00 (C-5_{quin}); 126,04 (C-4_{anilino}); 124,27 (C-2,6_{anilino}); 120,19 (C-8_{quin}); 120,00 (C-4a_{quin}); 102,96 (C-3_{quin}).

HRMS (m/e): Calculado para C₁₅H₁₂ClN₂ (M + H)⁺ 255,0689; encontrado 255,0689.

4.1.3.2.3. Síntesis de 4-(4-yodoanilino)quinolina 46.



Una solución de 4-cloroquinolina (330 mg, 2 mmol) y 4-iodoanilina (876 mg, 4 mmol) en ácido acético glacial (7 mL) se calienta a reflujo (130-135 °C) durante 3 horas en atmósfera de argón. Transcurrido dicho tiempo, se deja enfriar a temperatura ambiente y se basifica con una solución de hidróxido sódico al 10% hasta pH 10; precipita un sólido que se filtra y se purifica mediante cromatografía flash, empacando con diclorometano y eluyendo con proporciones adecuadas de diclorometano: metanol, obteniéndose el compuesto **46** con aspecto de sólido amarillo (515 mg, 74%). Pf: 101-102 °C.

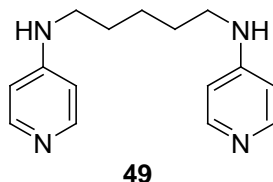
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,41 (d, *J* = 5,5, 1H, H-2_{quin}); 8,28 (d, *J* = 8,6, 1H, H-5_{quin}); 7,90 (d, *J* = 9,2, 1H, H-8_{quin}); 7,76-7,70 (m, 3H, H-7_{quin} y H-3,5_{anilino}); 7,55 (t, *J* = 7,0, 1H, H-6_{quin}); 7,19 (d, *J* = 8,8, 2H, H-2,6_{anilino}); 7,00 (d, *J* = 5,5, 1H, H-3_{quin}).

¹³C-RMN (126 MHz, CDCl₃): δ 150,86 (C-2_{quin}); 149,14 (C-4_{quin}); 141,68 (C-8a_{quin}); 139,86 (C-1_{anilino}); 131,41 (C-3,5_{anilino}); 130,82 (C-7_{quin}); 128,71 (C-6_{quin}); 126,77 (C-5_{quin}); 126,20 (C-2,6_{anilino}); 122,88 (C-8_{quin}); 121,38 (C-4a_{quin}); 102,98 (C-3_{quin}); 88,45 (C-4_{anilino}).

HRMS (m/e): Calculado para C₁₅H₁₂IN₂ (M + H)⁺ 347,0045; encontrado 347,0057.

4.1.3.3. Síntesis de las diaminas bispiridínicas.

4.1.3.3.1. Síntesis de *N,N'*-bis-[(4-piridil)pentano]-1,5-diamina **49**.

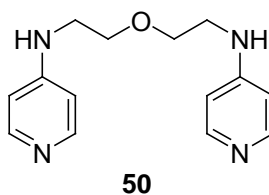


Una mezcla de pentano-1,5-diamina (0,28 mL, 2,3 mmoles) y 4-bromopiridina (720 mg, 4,6 mmoles) en fenol (3 mL) se calienta bajo atmósfera de argón a 170 °C durante 20 horas. Tras enfriamiento a temperatura ambiente el crudo de reacción se disuelve en metanol y se acidifica hasta pH 1-2 con HBr en HOAc glacial al 33%. Se añade Et₂O y el sólido se recoge por filtración a vacío. El dibromuro obtenido se pasa a forma de base añadiendo NaOH 1M hasta pH básico obteniéndose un sólido marrón microcristalino (0,8 g, 61%). Pf: 256 °C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,03 (s, 2H); 8,65 (sa, 2H); 8,20 (d, 2H, *J* = 7,1 Hz); 8,05 (d, 2H, *J* = 7,0 Hz); 6,98–6,79 (m, 4H); 3,25 (m, 4H); 1,59 (m, 4H); 1,46–1,34 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158,31(C-4_{py}); 141,14 y 138,78 (C-2_{py} y C-6_{py}); 110,17 y 105,07 (C-3_{py} y C-5_{py}); 42,45 (CH₂N); 27,94 (CH₂-2,4_{pent}); 24,07 (CH₂-3_{pent}).

HRMS (m/e): Calculado para C₁₅H₂₁N₄ (M + H)⁺ 257,1766; encontrado 257,1761.

4.1.3.3.2. Síntesis de bis-[2-(4-piridil)aminoetil]éter 50.

Una mezcla de bis-2-(aminoetil)éter (900 mg, 5,1 mmoles) y 4-bromopiridina (0,4 g, 10,2 mmoles) en fenol (4 mL), se calienta bajo atmósfera de argón a 170 °C durante 20 horas. Tras enfriamiento a temperatura ambiente el crudo de reacción se disuelve en metanol y se acidifica hasta pH 1-2 con HBr en HOAc glacial al 33%. Se añade Et₂O y el sólido se recoge por filtración a vacío. El dibromuro obtenido se pasa a forma de base añadiendo NaOH 1M hasta pH básico obteniéndose un sólido marrón microcristalino (1,3 g, 61%). Pf: 238 °C.

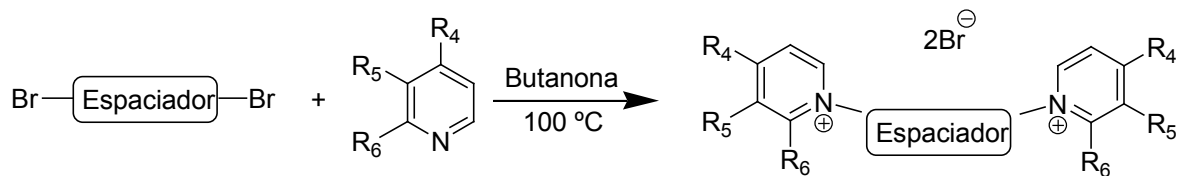
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,99 (d, 4H, *J* = 6,1 Hz); 6,49 (d, 4H, *J* = 6,3 Hz); 3,56 (t, 4H, *J* = 5,7 Hz); 3,23 (d, 4H, *J* = 5,6 Hz).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 153,98 (C-4_{py}); 149,82 (C-2_{py} y C-6_{py}); 107,58 (C-3_{py} y C-5_{py}); 69,07 (CH₂N); 41,98 (CH₂O).

HRMS (m/e): Calculado para C₁₄H₁₉N₄O (M + H)⁺ 259,1559; encontrado 259,1556.

4.1.4. Productos finales.

4.1.4.1. Método general para la síntesis de los compuestos biscatiónicos abiertos.

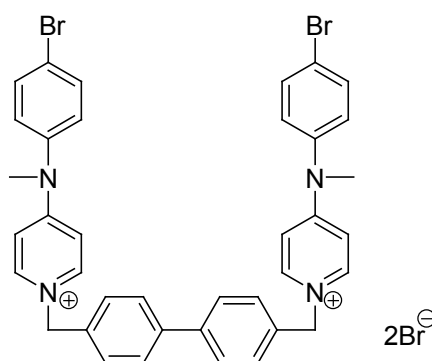


Una solución del derivado dibromado y el derivado heterocíclico correspondiente (relación molar 1:2) en butanona, se calienta a 100 °C en un tubo cerrado durante un tiempo de reacción que varía entre 5 y 10 días, tras el cual aparece un precipitado que se filtra a vacío y se lava con butanona, acetato de etilo y éter etílico.

Algunos compuestos se purifican por recristalización de etanol o metanol, añadiéndole si se considera necesario, unas gotas de éter etílico hasta turbidez, para favorecer la aparición de cristales.

4.1.4.1.1. Dibromuro de 1,1'-(bifenil-4,4'-diilmetilén)bis[4-(4-bromo-*N*-metilanilino)piridinio] VGP-106.

Dibromuro de 1⁴,10⁴-dibromo-2,9-dimetil-2,9-diaza-3(4,1),8(1,4)-dipiridina-1,10(1),5,6(1,4)-tetrabencenadecafan-3¹,8¹-bis(ilio).



VGP-106

Siguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.1, se obtiene **VGP-106** con aspecto de sólido marrón (235 mg, 73%). Pf: 268 °C – 290 °C.

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 8,33 (s, 4H, H-2,6_{py}); 7,75 (dd, 4H, H-2,6_{ph}, *J* = 2,00, 6,64); 7,69 (d, 4H, H-3,5_{anil}, *J* = 8,3); 7,50 (d, 4H, H-3,5_{ph}, *J* = 8,2); 7,31 (d, 4H, H-2,6_{anil}, *J* = 8,7); 6,96 (sa, 4H, H-3,5_{py}); 5,47 (s, 4H, CH₂N⁺); 3,53 (s, 6H, CH₃).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD) δ 158,62 (C-4_{py}); 144,05 (C-2,6_{py}); 142,51 (C-1_{ph}); 135,58 (C-4_{ph}); 135,32 (C-3,5_{anil}); 130,30 (C-3,5_{ph}); 129,80 (C-2,6_{anil}); 129,13 (C-2,6_{ph}); 123,74 (C-4_{anil}); 110,68 (C-3,5_{py}); 61,99 (CH₂N⁺); 41,48 (CH₃).

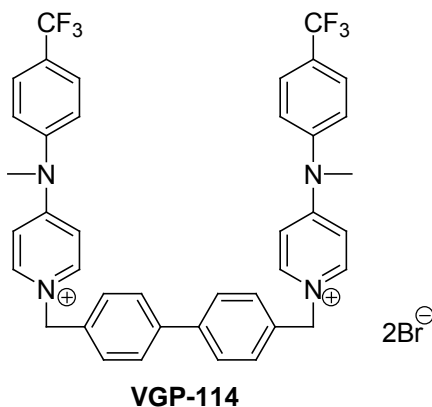
HRMS (m/e): Calculado para C₃₈H₃₄Br₃N₄ (M-Br)⁺ 783,0334; encontrado 783,0333.

Análisis Elemental: C₃₈H₃₄Br₄N₄

Teórico (%)	C 52,68	H 3,96	N 6,47
Obtenido (%)	C 52,65	H 3,65	N 6,59

4.1.4.1.2. Dibromuro de 1,1'-(bifenil-4,4'-diilmetilén)bis[4-(4-trifluorometil-*N*-metilanilino)piridinio] VGP-114.

Dibromuro de 1⁴,10⁴-bistrifluorometilo-2,9-dimetil-2,9-diaza-3(4,1),8(1,4)-dipiridina-1,10(1),5,6(1,4)-tetrabencenadecafan-3¹,8¹-bis(ilio).



Siguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.1, se obtiene **VGP-114** con aspecto de sólido blanco (238 mg, 72%). Pf: 199 °C – fusión progresiva hasta 320 °C.

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 8,37 (d, 4H, H-2,6_{py}, *J* =7,4); 7,91 (d, 4H, H-2,6_{ph}, *J* =8,5); 7,70 (d, 4H, H-3,5_{anil}, *J* =8,2); 7,61 (d, 4H, H-3,5_{ph}, *J* =8,4); 7,52 (d, 4H, H-2,6_{anil}, *J* =8,2); 7,00 (d, 4H, H-3,5_{py}, *J* =6,0); 5,50 (s, 4H, CH₂N⁺); 3,58 (s, 6H, CH₃).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD) δ 158,54 (C-4_{py}); 148,23 (C-1_{anil}); 144,22 (C-2,6_{py}); 142,50 (C-1_{ph}); 135,54 (C-4_{ph}); 130,35 (C-3,5_{anil}); 129,24 (C-3,5_{ph}); 129,14 (C-2,6_{anil}); 128,80 (C-2,6_{ph}); 126,40 (CF₃); 124,24 (C-4_{anil}); 110,93 (C-3,5_{py}); 62,09 (CH₂N⁺); 41,48 (CH₃).

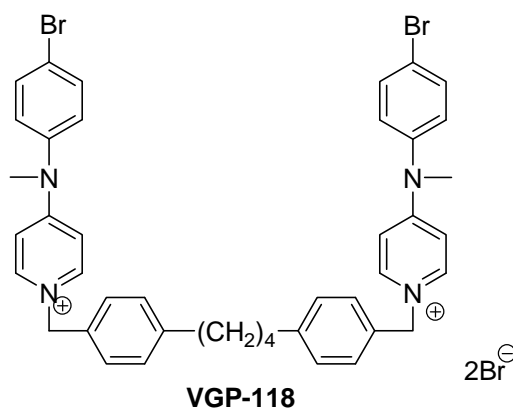
HRMS (m/e): Calculado para C₄₀H₃₄BrF₆N₄ (M-Br)⁺ 763,1871; encontrado 763,1872.

Análisis Elemental: C₃₈H₃₄Br₂F₆N₄

Teórico (%)	C 56,89	H 4,06	N 6,63
Obtenido (%)	C 56,91	H 4,08	N 6,33

4.1.4.1.3. Dibromuro de 1,1'-[(Butano-1,4-bis(benceno-1,4-diilmetilén)]bis[4-(4-bromo-*N*-metilanilino)piridinio] VGP-118.

Dibromuro de 1⁴,14⁴-dibromo-2,13-dimetil-2,13-diaza-3(4,1),12(1,4)-dipiridina-1,14(1),5,10(1,4)-tetrabencenatetradecafan-3¹,12¹-bis(ilio).



Siguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.1, se obtiene **VGP-118** con aspecto de sólido marrón (182 mg, 72%). Pf: 155 °C (gel) – 290 °C (fusión).

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 8,28 (s, 4H, H-2,6_{py}); 7,74 (d, 4H, H-3,5_{anil}, *J* = 8,6); 7,30 (d, 8H, H-2,3,5,6_{ph} *J* = 8,7); 7,23 (d, 4H, H-2,6_{anil}, *J* = 8,1); 6,92 (sa, 4H, H-3,5_{py}); 5,37 (s, 4H, CH₂N⁺); 3,52 (s, 6H, CH₃); 2,64 (t, 2H, CH₂, *J* = 6,7); 1,62 (t, 2H, CH₂, *J* = 3,2).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD) δ 158,59 (C-4_{py}); 145,47 (C-1_{anil}); 144,08 (C-1_{ph}); 143,94 (C-2,6_{py}); 135,32 (C-3,5_{anil}); 133,35 (C-4_{ph}); 130,34 (C-3,5_{ph}); 129,80 (C-2,6_{anil}); 129,67 (C-2,6_{ph}); 123,74 (C-4_{anil}); 110,63 (C-3,5_{py}); 62,24 (CH₂N⁺); 41,46 (CH₃); 36,44 (CH₂-1,4_{but}); 32,20 (CH₂-2,3_{but}).

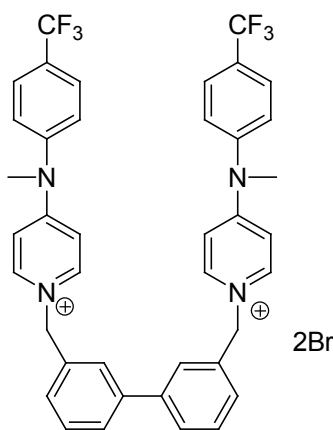
HRMS (m/e): Calculado para C₄₂H₄₂Br₃N₄ (M-Br)⁺ 839,0960; encontrado 839,0969.

Análisis Elemental: C₄₂H₄₂Br₄N₄

Teórico (%)	C 54,69	H 4,59	N 6,07
Obtenido (%)	C 54,68	H 4,55	N 6,18

4.1.4.1.4. Dibromuro de 1,1'-(bifenil-3,3'-diilmetilén)bis[4-(4-trifluorometil-*N*-metilanilino)piridinio] VGP-130.

Dibromuro de 1⁴,10⁴-bistrifluorometil-2,9-dimetil-2,9-diaza-3(4,1),8(1,4)-dipiridina-1,10(1,4),5,6(1,3)-tetrabencenadecafan-3¹,8¹-bis(ilio).



VGP-130

Siguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.1, se obtiene **VGP-130** con aspecto de sólido blanco (235 mg, 75%). Pf: 269-271 °C.

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 8,44 (d, 4H, H-2,6_{py}, *J* = 7,6); 7,89 (d, 4H, H-3,5_{anil}, *J* = 8,5); 7,86 (s, 2H, H-2_{ph}); 7,70 (d, 2H, H-6_{ph}, *J* = 7,8); 7,60 (d, 4H, H-2,6_{anil}, *J* = 8,3); 7,53 (t, 2H, H-5_{ph}, *J* = 7,66, 7,7); 7,42 (d, 2H, H-4_{ph}, *J* = 7, 7); 6,99 (d, 4H, H-3,5_{py}, *J* = 7,4); 5,53 (s, 4H, CH₂N⁺); 3,57 (s, 6H, CH₃).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD) δ 158,54 (C-4_{py}); 148,25 (C-1_{anil}); 144,24 (C-2,6_{py}); 142,80 (C-1_{ph}); 136,80 (C-3_{ph}); 131,31 (C-3,5_{anil}); 129,25 (C-5_{ph}); 129,22 (C-2,6_{anil}); 129,01 (C-4_{ph}); 128,80 (C-6_{ph}); 128,78 (C-2_{ph}); 126,39 (CF₃); 124,23 (C-4_{anil}); 110,95 (C-3,5_{py}); 62,36 (CH₂N⁺); 41,46 (CH₃).

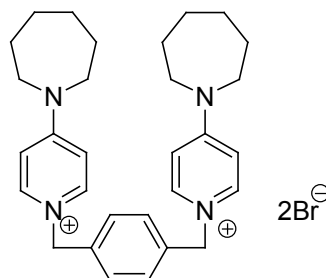
HRMS (m/e): Calculado para C₄₀H₃₃F₆N₄ (M-Br-HBr)⁺ 683,2609; encontrado 683,2611.

Análisis Elemental: C₄₀H₃₄Br₂F₆N₄

Teórico (%)	C 56,89	H 4,06	N 6,63
Obtenido (%)	C 56,90	H 4,31	N 6,52

4.1.4.1.5. Dibromuro de 1,1'-(benceno-1,4-diilmetilén)bis[4-(perhidroazepin-1-il)piridinio] VGP-138.

Dibromuro de 2(4,1),6(1,4)-dipiridina-1,7(1)-diperhidroazepina-4(1,4)-bencena-heptafan-2¹,6¹-bis(ilio).



VGP-138

Siguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.1, se obtiene **VGP-138** con aspecto de sólido blanco (70 mg, 19%). Pf: 269 °C.

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 8,19 (d, 4H, H-2,6_{py}, *J* = 7,9), 7,47 (s, 4H, H-2,3,5,6_{ph}), 7,05 (d, H-3,5_{py}, 4H, *J* = 7,9), 5,38 (s, 4H, CH₂N⁺), 3,73 (m, 8H, H-2_{azep}), 1,85 (s, 8H, H-3_{azep}), 1,60 (s, 8H, H-4_{azep}).

¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155,06 (C-4_{py}); 142,26 (C-2,6_{py}); 136,10 (C-1,4_{ph}); 128,70 (C-2,3,5,6_{ph}); 107,76 (C-3,5_{py}); 58,80 CH₂N⁺; 49,67 (C-2_{azep}); 25,68 (C-3_{azep}); 25,62 (C-4_{azep}).

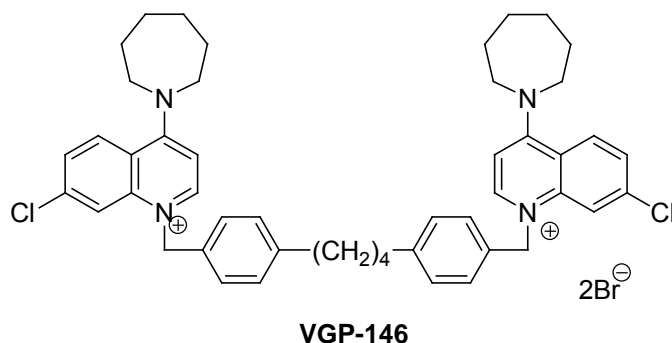
HRMS (m/e): Calculado para C₃₀H₄₀Br₂N₄ (M-Br)⁺ 535,2436; encontrado 535,2424.

Análisis Elemental: C₃₀H₄₀Br₂N₄

Teórico (%)	C 58,45	H 6,54	N 9,09
Obtenido (%)	C 58,57	H 6,59	N 9,00

4.1.4.1.6. Dibromuro de 1,1'-[butano-1,4-bis(benceno-1,4-diilmetilén)]bis[4-(perhidroazepin-1-il)-7-cloroquinolinio] VGP-146.

Dibromuro de 2(4,1),11(1,4)-bis(7-cloroquinolina)-1,12(1)-diperhidroazepina-4,9(1,4)-dibencenadodecafan-2¹,11¹-bis(ilio).



Siguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.1, se obtiene **VGP-146** con aspecto de sólido amarillo (188 mg, 68%). Pf: 245-248 °C

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,70 (d, 2H, H-2_{quin}, *J* = 7, 8); 8,34 (d, 2H, H-5_{quin}, *J* = 9,2); 8,07 (d, 2H, H-8_{quin}, *J* = 2,0); 7,64 (dd, 2H, H-6_{quin}, *J* = 2,0, 9,2); 7,17 (s, 8H, H-2,3,5,6_{Ph}); 7,15 (d, 2H, H-3_{quin}, *J* = 7,8); 5,80 (s, 4H, CH₂N⁺); 3,99 (t, 8H, H-2_{azep}, *J* = 5,5); 2,55 (t, 4H, CH₂-1,4-Ph, *J* = 6,5); 1,94 (sa, 8H, H-3_{azep}); 1,59 (sa, 8H, H-4_{azep}); 1,51 (m, 4H, CH₂-2,3-Ph).

¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158,38 (C-4_{quin}); 145,06 (C-2_{quin}); 142,25 (C-8_{aquin}); 140,13 (C-1_{ph}); 138,10 (C-7_{quin}); 132,15 (C-4_{ph}); 130,45 (C-3,5_{ph}); 128,82 (C-2,6_{ph}); 126,78 (C-6_{quin}); 124,89 (C-5_{quin}); 117,39 (C-4_{aquin}); 117,23 (C-8_{quin}); 102,99 (C-3_{quin}); 55,92 (CH₂N⁺); 53,48 (C-2_{azep}); 34,38 (CH₂-1-Ph); 30,29 (CH₂-2-Ph); 26,59 (C-3_{azep}); 26,47 (C-4_{azep}).

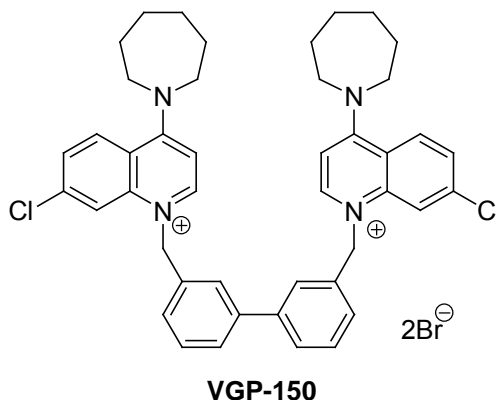
HRMS (m/e): Calculado para C₄₈H₅₄BrCl₂N₄ (M-Br)⁺ 835,2909; encontrado 835,2915.

Análisis Elemental: C₄₈H₅₄Br₂Cl₂N₄

Teórico (%)	C 62,82	H 5,93	N 6,11
Obtenido (%)	C 62,21	H 5,70	N 6,47

4.1.4.1.7. Dibromuro de 1,1'-(bifenil-3,3'-diilmetilén)bis[4-(perhidroazepin-1-il)-7-cloroquinolinio] VGP-150.

Dibromuro de 2(4,1),7(1,4)-bis(7-cloroquinolina)-1,8(1)-diperhidroazepina-4,5(1,3)-dibencenaoctafan-2¹,7¹-bis(ilio).



Siguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.1, se obtiene **VGP-150** con aspecto de sólido marrón (203 mg, 68%). Pf: 269-270 °C

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,79 (d, 2H, H-2_{quin}, *J* = 7,8); 8,35 (d, 2H, H-5_{quin}, *J* = 9,2); 8,16 (d, 2H, H-8_{quin}, *J* = 1,9); 7,76 (s, 2H, H-2_{Ph}); 7,65 (dd, 2H, H-6_{quin}, *J* = 1,8, 9,2); 7,60 (d, 2H, H-6_{Ph}, *J* = 7,8); 7,47 (t, 2H, H-5_{Ph}, *J* = 7,7); 7,18 (d, 6H, H-4_{Ph} y H-3_{quin}, *J* = 7,8); 5,92 (s, 4H, CH₂N⁺); 4,00 (m, 8H, H-2_{azep}); 1,93 (s, 8H, H-3_{azep}); 1,58 (s, 8H, H-4_{azep}).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158,42 (C-4_{quin}); 145,15 (C-2_{quin}); 140,20 (C-1_{Ph}); 140,08 (C-8_{aquin}); 138,17 (C-7_{quin}); 135,79 (C-3_{Ph}); 130,53 (C-5_{Ph}); 129,67 (C-6_{Ph}); 126,58 (C-6_{quin}); 125,90 (C-4_{Ph}); 125,68 (C-2_{Ph}); 124,98 (C-5_{quin}); 117,33 (C-8_{quin}); 117,22 (C-4_{aquin}); 103,07 (C-3_{quin}); 55,94 (CH₂N⁺); 53,49 (C-2_{azep}); 26,57 (C-3_{azep}); 26,45 (C-4_{azep}).

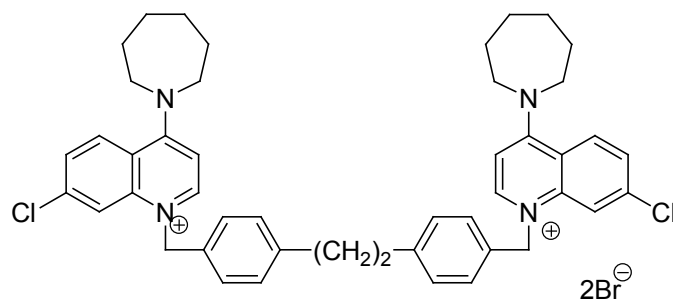
HRMS (m/e): Calculado para C₄₄H₄₆BrCl₂N₄ (M-Br)⁺ 779,2283; encontrado 779,2295.

Análisis Elemental: C₄₄H₄₆Br₂Cl₂N₄

Teórico (%)	C 61,34	H 5,38	N 6,50
Obtenido (%)	C 51,11	H 5,09	N 6,70

4.1.4.1.8. Dibromuro de 1,1'-[etilénbis(benceno-1,4-diilmetilén)]bis[4-(perhidroazepin-1-il)-7-cloroquinolinio] VGP-162.

Dibromuro de 2(4,1),9(1,4)-bis(7-cloroquinolina)-1,10(1)-diperhidroazepina-4,7(1,4)-dibencenadecafan-2¹,9¹-bis(ilio).



VGP-162

Siguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.1, se obtiene **VGP-162** con aspecto de sólido marrón (202 mg, 73%). Pf: 220 °C (gel) - 247 °C (fusión).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,70 (d, 2H, H-2_{quin}, *J* = 7,8); 8,34 (d, 2H, H-5_{quin}, *J* = 9,2); 8,05 (s, 2H, H-8_{quin}); 7,64 (d, 2H, H-6_{quin}, *J* = 9,2); 7,23 (d, 4H, H-,3,5_{Ph}, *J* = 8,2); 7,17 (m, 6H, H-3_{quin}, H-2,6_{ph}); 5,80 (s, 4H, CH₂N⁺); 3,99 (m, 8H, H-2_{azep}); 2,81 (s, 4H, CH₂); 1,94 (sa, 8H, H-3_{azep}); 1,59 (sa, 8H, H-4_{azep}).

¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158,36 (C-4_{quin}); 145,06 (C-2_{quin}); 141,49 (C-8_{aquin}); 140,13 (C-1_{Ph}); 138,07 (C-7_{quin}); 132,41 (C-4_{Ph}); 130,46 (C-3,5_{Ph}); 128,88 (C-2,6_{Ph}); 126,71 (C-6_{quin}); 124,94 (C-5_{quin}); 117,40 (C-4_{aquin}); 117,23 (C-8_{quin}); 102,98 (C-3_{quin}); 55,95 (CH₂N⁺); 53,48 (C-2_{azep}); 36,25 (CH₂); 26,59 (C-3_{azep}); 26,47(C-4_{azep}).

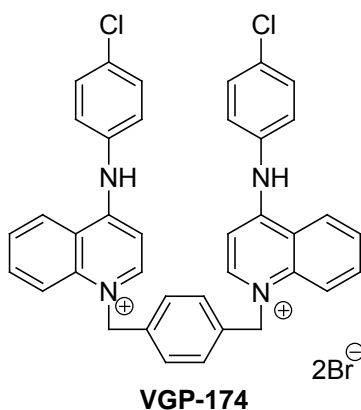
HRMS (m/e): Calculado para C₄₆H₅₀BrCl₂N₄ (M-Br)⁺ 807,2596; encontrado 807,2591.

Análisis Elemental: C₄₆H₅₀Br₂ Cl₂N₄

Teórico (%)	C 62,10	H 5,66	N 6,30
Obtenido (%)	C 62,15	H 5,62	N 6,50

4.1.4.1.9. Dibromuro de 1,1'-(benceno-1,3-diilmetilen)bis[4-(4-cloroanilino)quinolinio] VGP-174.

Dibromuro de 1⁴,9⁴-dicloro-2,8-diaza-3(4,1),7(1,4)-diquinolina-1,9(1,4),5(1,4)-tribencenanafan-3¹,8¹-bis(ilio).



Siguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.1, se obtiene **VGP-174** con aspecto de sólido amarillo (171 mg, 69%). Pf: 236 °C (gel) – 277 °C (fusión).

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,06 (s, 2H, NH_{anilino}); 8,83 (d, 2H, H-2_{quin}, J = 7,4); 8,78 (d, 2H, H-5_{quin}, J = 8,4); 8,07 (d, 2H, H-8_{quin}, J = 8,9); 7,99 (t, 2H, H-7_{quin}, J = 7,8); 7,82 (t, 2H, H-6_{quin}, J = 7,7); 7,66 (d, 4H, H-3,5_{anilino}, J = 8,7); 7,55 (d, 4H, H-2,6_{anilino}, J = 8,7); 7,26 (s, 4H, H-2,3,5,6_{Ph}); 6,94 (d, 2H, H-3_{quin}, J = 7,3); 5,92 (s, 4H, CH₂N⁺).

¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 154,96 (C-4_{quin}); 147,89 (C-2_{quin}); 137,95 (C-8a_{quin}); 135,16 (C-1_{anilino}); 134,41 (C-3,5_{anilino}); 131,81 (C-1,4_{Ph}); 129,94 (C-2,3,5,6_{ph}); 127,30 (C-2,6_{anilino}); 127,16 (C-7_{quin}); 124,45 (C-5_{quin}); 118,86 (C-8_{quin}); 118,45 (C-4a_{quin}); 100,62 (C-3_{quin}); 56,36 (N⁺-CH₂).

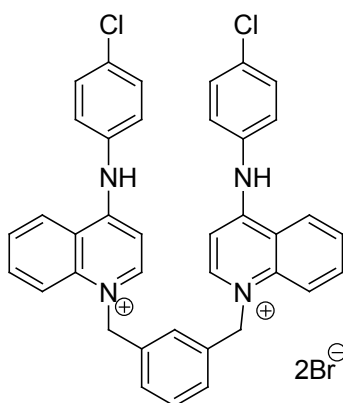
HRMS (m/e): Calculado para C₃₈H₃₀BrCl₂N₄ (M-Br)⁺ 691,1031; encontrado 691,1038.

Análisis Elemental: C₃₈H₃₀Br₂Cl₂N₄

Teórico (%)	C 59,01	H 3,91	N 7,24
Obtenido (%)	C 58,91	H 3,92	N 7,58

4.1.4.1.10. Dibromuro de 1,1'-(benceno-1,3-diilmetileno)bis[4-(4-yodoanilino)quinolinio] VGP-182.

Dibromuro de 1⁴,9⁴-diyodo-2,8-diaza-3(4,1),7(1,4)-diquinolina-1,9(1,4),5(1,3)-tribencenanonafan-3¹,7¹-bis(ilio).



VGP-182

Seguendo el procedimiento general de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.1, se obtiene **VGP-182** con aspecto de sólido amarillo (177 mg, 88%). Pf: 261 °C (gel) – 292 °C (fusión).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,03 (s, 2H, NH_{anilino}); 8,79 (d, 4H, H-2_{quin} y H-5_{quin}, J = 7,4); 7,93 (d, 4H, H-3,5_{anilino}, J = 8,5); 7,88 (d, 2H, H-8_{quin}, J = 4,4); 7,85 (d, 2H, H-7_{quin}, J = 8,5); 7,80 (t, 2H, H-6_{quin}, J = 7,4); 7,37 (t, J = 6,1, 1H, H-5_{ph}), 7,34 (d, 4H, H-2,6_{anilino}, J = 8,5); 7,21 (d, 2H, H-4,6_{ph}); 7,01 (s, 1H, H-2_{ph}), 6,96 (d, 2H, H-3_{quin}, J = 7,3); 5,92 (s, 4H, CH₂N⁺).

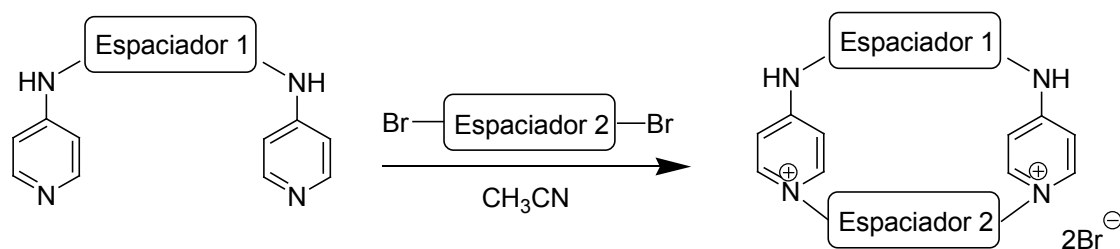
¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 155,10 (C-4_{quin}); 148,43 (C-2_{quin}); 139,19 (C-3,5_{anilino}); 138,43 (C-8_{aquin}); 137,23 (C-1_{anilino}); 136,43 (C-1,3_{ph}); 134,73 (C-7_{quin}); 130,18 (C-5_{ph}); 127,90 (C-2,6_{anilino}); 127,66 (C-6_{quin}); 126,77 (C-4,6_{ph}); 124,92 (C-2_{ph}); 124,84 (C-5_{quin}); 119,34 (C-8_{quin}); 118,89 (C-4_{aquin}); 101,09 (C-3_{quin}); 93,55 (C-4_{anilino}); 57,10 (N⁺-CH₂).

HRMS (m/e): Calculado para C₃₈H₃₀Br₂I₂N₄ (M-Br)⁺ 874,9743; encontrado 874,9750.

Análisis Elemental: C₃₈H₃₀Br₂I₂N₄

Teórico (%)	C 47,73	H 3,16	N 5,86
Obtenido (%)	C 47,66	H 3,22	N 5,98

4.1.4.2. Método general para la síntesis de los compuestos ciclofanos.

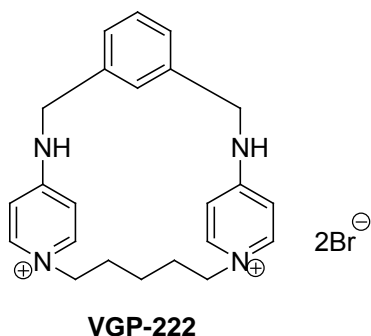


Los compuestos ciclofanos de esta memoria se han sintetizado siguiendo uno de los dos métodos detallados a continuación. El método A ha sido previamente descrito para la síntesis de este tipo de compuestos⁴⁹. Para algunos de los compuestos el rendimiento de la reacción era muy bajo, por lo que se intentó mejorar mediante el uso de microondas (método B). En ambos casos los rendimientos son comparables, aunque el microondas tiene la ventaja de que disminuye el tiempo de reacción.

Método A: Sobre una suspensión del derivado bispiridínico en acetonitrilo a reflujo, se añade gota a gota una solución del derivado dibromado en acetonitrilo (relación molar 1:1), con una dilución de 0,004M. Transcurrido el tiempo de reacción, que varía entre 10 y 15 días, se deja enfriar, se filtra a vacío y se lava con acetato de etilo y éter etílico. Los compuestos se purifican por recristalización de metanol.

Método B: Se mezclan el derivado bispiridínico y el derivado dibromado en acetonitrilo (relación molar 1:1) con una dilución de 0,02M. Se hace reaccionar en microondas, a 140 °C durante 20 minutos. Tras enfriamiento de la mezcla de reacción, se filtra a vacío y se lava con acetato de etilo y éter etílico. Los compuestos se purifican por recristalización de metanol.

4.1.4.2.1. Dibromuro de 2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,3)-bencenaciclododecafan-1¹,7¹-bis(ilio) VGP-222.



Siguiendo el procedimiento general A de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.2, se obtiene **VGP-222** con aspecto de sólido blanco (60,4 mg, 34%). Pf: 330-331 °C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,35 (t, 2H, NH, *J* = 6,5 Hz); 8,11 (dd; 2H, H-2_{py} o H-6_{py}, *J* = 7,3, 1,4 Hz); 8,06 (d, 2H, H-6_{py} o H-2_{py}, *J* = 7,3 Hz); 7,48–7,30 (m, 3H, H-4,5,6_{ph}); 7,22 (s, 1H, H-2_{ph}); 6,96 (dd, 2H, H-3_{py} o H-5_{py}, *J* = 7,3, 2,8 Hz.); 6,64 (dd, 2H, H-5_{py} o H-3_{py}, *J* = 7,3, 2,7 Hz); 4,56 (d, 4H, CH₂N, *J* = 6,3 Hz); 4,23–4,07 (m, 4H, CH₂-1,5_{pent}); 1,77 (m, 4H, CH₂-2,4_{pent}); 0,68–0,50 (m, 2H, CH₂-3_{pent}).

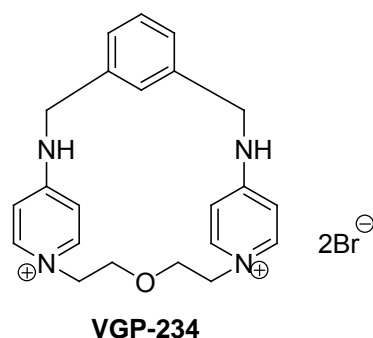
¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156,49(C-4_{py}); 143,36 y 141,58 (C-2_{py} y C-6_{py}); 137,71 (C-1,3_{ph}); 129,14, 127,12 y 123,48 (C-2,4,5,6_{ph}); 110,68 y 104,98 (C-3_{py} y C-5_{py}); 55,99 (CH₂N); 44,84 (CH₂-1,5_{pent}); 28,05 (CH₂-2,4_{pent}); 19,99 (CH₂-3_{pent}).

HRMS (m/e): Calculado para C₂₃H₂₈BrN₄ (M – Br)⁺ 439,1497; encontrado 439,1508.

Análisis Elemental: C₂₃H₂₈Br₂N₄

Teórico (%)	C 53,09	H 5,42	N 10,77
Obtenido (%)	C 53,21	H 5,31	N 10,83

4.1.4.2.2. Dibromuro de 10-oxa-2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,3)-bencenaciclododecafan-1¹,7¹-bis(ilio) VGP-234.



Siguiendo el procedimiento general A de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.2, se obtiene **VGP-234** con aspecto de sólido blanco (50,2 mg, 28%). Pf: 319-320 °C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,37 (t, 2H, NH, *J* = 6,5 Hz); 8,10 (dd, 2H, H-2_{py} o H-6_{py} *J* = 7,3, 1,6 Hz); 7,99 (d, 2H, H-6_{py} o H-2_{py}, *J* = 7,4 Hz); 7,51 (s, 1H, H-2_{ph}); 7,45–7,28 (m, 3H, H-4,5,6_{ph}); 6,95 (dd, 2H, H-3_{py} o H-5_{py}, *J* = 7,3, 2,8 Hz); 6,72 (dd, 2H, H-5_{py} o H-3_{py}, *J* = 7,4, 2,8 Hz); 4,51 (d, 4H, CH₂N, *J* = 6,5 Hz); 4,34–4,26 (m, 4H, CH₂N⁺); 3,77–3,66 (m, 4H, CH₂O).

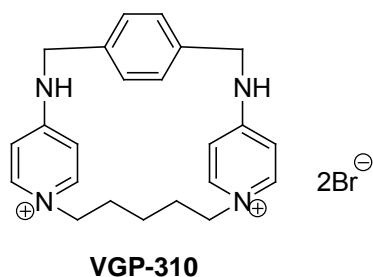
¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156,59 (C-4_{py}); 143,70 y 141,87 (C-2_{py} y C-6_{py}); 137,48 (C-1,3_{ph}); 129,32, 127,29 y 126,07 (C-2,4,5,6_{ph}); 110,66 y 104,95 (C-3_{py} y C-5_{py}); 68,38 (CH₂N); 56,51 (CH₂N⁺); 44,91 (CH₂O).

HRMS (m/e): Calculado para C₂₂H₂₆BrN₄O (M – Br)⁺ 441,1290; encontrado 441,1300.

Análisis Elemental: C₂₂H₂₆Br₂N₄O

Teórico (%)	C 50,59	H 5,02	N 10,73
Obtenido (%)	C 50,60	H 4,93	N 10,85

4.1.4.2.3. Dibromuro de 2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,4)-bencenaciclododecafan-1¹,7¹-bis(ilio) VGP-310.



Siguiendo el procedimiento general A de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.2, se obtiene **VGP-310** con aspecto de sólido blanco (115 mg, 58%). Pf: > 350 °C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,38 (t, 2H, NH, *J* = 6,3 Hz); 8,07 (d, 2H, H-2_{py} o H-6_{py}, *J* = 7,0 Hz); 7,99 (d, 2H, H-6_{py} o H-2_{py}, *J* = 7,1 Hz); 7,37 (s, 4H, H-2,3,5,6_{ph}); 6,94 (d, 2H, H-3_{py} o H-5_{py}, *J* = 4,5 Hz); 6,35 (d, 2H, H-5_{py} o H-3_{py}, *J* = 7,4 Hz); 4,56 (d, 4H, CH₂N, *J* = 5,9 Hz); 4,12 (m, 4H, CH₂-1,5_{pent}); 1,68 (m, 4H, CH₂-2,4_{pent}); 0,68 (m, 2H, CH₂-3_{pent}).

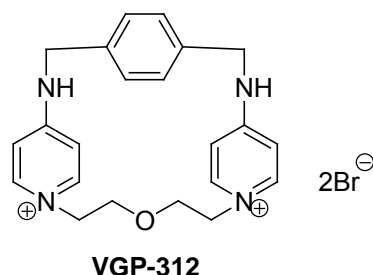
¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156,48 (C-4_{py}); 142,91 y 141,50 (C-2_{py} y C-6_{py}); 136,23 (C-1_{ph} y C-4_{ph}); 128,09 (C-2_{ph}, C-3_{ph}, C-5_{ph} y C-6_{ph}); 111,48 y 105,72 (C-3_{py} y C-5_{py}); 57,06 (CH₂N); 44,89 (CH₂-1,5_{pent}); 29,14 (CH₂-2,4_{pent}); 21,82 (CH₂-3_{pent}).

HRMS (m/e): Calculado para C₂₃H₂₈Br₂N₄ (M – Br)⁺ 439,1497; encontrado 439,1518.

Análisis Elemental: C₂₃H₂₈Br₂N₄

Teórico (%)	C 53,09	H 5,42	N 10,77
Obtenido (%)	C 53,00	H 5,35	N 10,51

4.1.4.2.4. Dibromuro de 10-oxa-2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,4)-bencenaciclododecafan-1¹,7¹-bis(ilio) VGP-312.



Siguiendo el procedimiento general A de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.2, se obtiene **VGP-312** con aspecto de sólido blanco (86 mg, 50%). Pf: 330-333 °C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,43 (s, 2H, NH); 8,11 (d, 2H, H-2_{py} o H-6_{py}, *J* = 7,3 Hz); 7,98 (d, 2H, H-6_{py} o H-2_{py}, *J* = 7,3 Hz); 7,37 (s, 4H, H-2,3,5,6_{ph}); 6,99 (dd, 2H, H-3_{py} o H-5_{py}, *J* = 7,3, 2,8 Hz); 6,04 (dd, 2H, H-5_{py} o H-3_{py}, *J* = 7,4, 2,8 Hz); 4,57 (d, 4H, CH₂N, *J* = 5,0 Hz); 4,29–4,21 (m, 4H, CH₂N⁺); 3,76–3,59 (m, 4H, CH₂O).

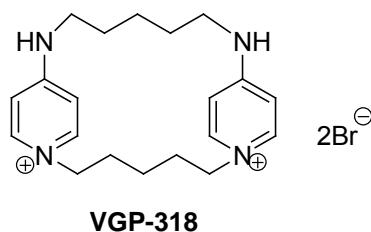
¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156,49 (C-4_{py}); 143,69 y 141,31 (C-2_{py} y C-6_{py}); 136,04 (C-1_{ph} y C-4_{ph}); 128,12 (C-2_{ph}, C-3_{ph}, C-5_{ph} y C-6_{ph}); 111,45 y 105,61 (C-3_{py} y C-5_{py}); 69,44 (CH₂N); 57,33 (CH₂N⁺); 45,37(CH₂O).

HRMS (m/e): Calculado para C₂₂H₂₅BrN₄O (M – HBr – Br)⁺ 361,2028; encontrado 361,2021.

Análisis Elemental: C₂₃H₂₈Br₂N₄O

Teórico (%)	C 50,59	H 5,02	N 10,73
Obtenido (%)	C 50,69	H 5,30	N 10,53

4.1.4.2.5. Dibromuro de 2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciotetradecafan-1¹,9¹-bis(ilio) VGP-318.



Seguendo el procedimiento general A de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.2, se obtiene **VGP-318** con aspecto de sólido beige (60 mg, 33%). Pf: 305-306 °C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,64 (t, 2H, NH, *J* = 6,1 Hz); 8,13 (d, 2H, H-2_{py} o H-6_{py}, *J* = 7,2 Hz); 8,00 (d, 2H, H-6_{py} o H-2_{py}, *J* = 7,3 Hz); 6,80 (d, 4H, H-3_{py} y H-5_{py}, *J* = 7,3 Hz); 4,12 (dd, 4H, CH₂N, *J* = 15,5; 9,7 Hz); 3,34 (m, 4H, CH₂N⁺); 1,78 (m, 4H, CH₂-2,4_{pent}); 1,53 (m, 4H, CH₂-2,4_{pent}); 1,30 (m, 2H, CH₂-3_{pent}); 0,64 (m, 2H, CH₂-3_{pent}).

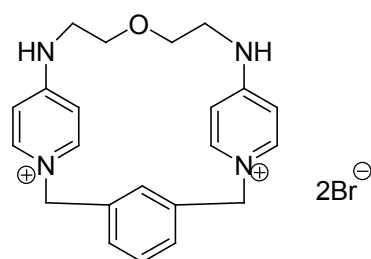
¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157,17 (C-4_{py}); 144,03 y 141,59 (C-2_{py} y C-6_{py}); 110,70 y 104,83 (C-3_{py} y C-5_{py}); 56,31 (CH₂N); 49,04 (CH₂N⁺); 41,84 y 28,54 (CH₂-2,4_{pent}); 23,40 y 20,56 (CH₂-3_{pent}).

HRMS (m/e): Calculado para C₂₀H₂₉N₄ (M – Br– HBr)⁺ 325,2392; encontrado 325,2399.

Análisis Elemental: C₂₀H₃₀Br₂N₄

Teórico (%)	C 49,40	H 6,22	N 11,52
Obtenido (%)	C 49,61	H 6,20	N 11,38

4.1.4.2.6. Dibromuro de 9-oxa-6,12-diaza-1,5(1,4)-dipiridina-3(1,3)-bencenaciclododecafan-1¹,5¹-bis(ilio) VGP-328.



VGP-328

Siguiendo el procedimiento general A de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.2, se obtiene **VGP-328** con aspecto de sólido beige (134 mg, 69%). Pf: 326 °C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,79 (t, 2H, NH, *J* = 5,8 Hz); 8,22 (dd, 2H, H-2_{py} o H-6_{py}, *J* = 7,3; 1,2 Hz); 8,01 (dd, 2H, H-6_{py} o H-2_{py}, *J* = 7,2; 1,6 Hz); 7,57–7,40 (m, 3H, H-4,5,6_{ph}); 6,96–6,82 (m, 4H, H-3_{py} y H-5_{py}); 6,20 (s, 1H, H-2_{ph}); 5,40 (s, 4H, CH₂N); 3,65–3;56 (m, 4H, CH₂N⁺); 3,55–3,47 (m, 4H, CH₂O).

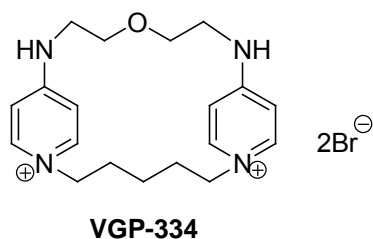
¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157,01 (C-4_{py}); 143,77 y 141,78 (C-2_{py} y C-6_{py}); 137,17 (C-1,3_{ph}); 129,33, 127,47 y 122,18 (C-2,4,5,6_{ph}); 110,43 y 105,14 (C-3_{py} y C-5_{py}); 67,99 (CH₂N); 58,83 (CH₂N⁺); 42,29 (CH₂O).

HRMS (m/e): Calculado para C₂₂H₂₅N₄O (M – Br – HBr)⁺ 361,2028; encontrado 361,2022.

Análisis Elemental: C₂₂H₂₆Br₂N₄O

Teórico (%)	C 50,59	H 5,02	N 10,73
Obtenido (%)	C 50,24	H 4,99	N 10,67

4.1.4.2.7. Dibromuro de 5-oxa-2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciclodecateradecafan-1¹,9¹-bis(ilio) VGP-334.



Seguendo el procedimiento general B de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.2, se obtiene **VGP-334** con aspecto de sólido marrón (14 mg, 21%). Pf: 314-316 °C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,66 (s, 2H, NH); 8,14 (d, 2H, H-2_{py} o H-6_{py}, *J* = 7,3 Hz); 8,04 (d, 2H, H-6_{py} o H-2_{py}, *J* = 7,2 Hz); 6,99–6,80 (m, 4H, H-3_{py} y H-5_{py}); 4,20–4,07 (m, 4H, CH₂N); 3,58 (t, 4H, CH₂O, *J* = 4,5 Hz); 3,54–3,45 (m, 4H, CH₂N⁺); 1,78 (m, 4H, CH₂-2,4_{pent}); 0,72–0,58 (m, 2H, CH₂-3_{pent}).

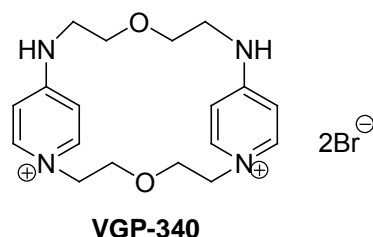
¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156,96 (C-4_{py}); 143,33 y 141,31 (C-2_{py} y C-6_{py}); 110,42 y 105,00 (C-3_{py} y C-5_{py}); 68,45 (CH₂N); 55,66 (CH₂N⁺); 42,32 (CH₂O); 27,71 (CH₂-2,4_{pent}); 19,77 (CH₂-3_{pent}).

HRMS (m/e): Calculado para C₁₉H₂₇N₄O (M – Br – HBr)⁺ 327,2185; encontrado 327,2186.

Análisis Elemental: C₁₉H₂₈Br₂N₄O

Teórico (%)	C 46,74	H 5,78	N 11,47
Obtenido (%)	C 46,73	H 5,63	N 11,58

4.1.4.2.8. Dibromuro de 5,12-dioxa-2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinacicotetradecafan-1¹,9¹-bis(ilio) VGP-340.



Seguendo el procedimiento general B de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.2, se obtiene **VGP-340** con aspecto de sólido marrón (21 mg, 35%). Pf: 283 °C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,04 (d, 2H, H-2_{py} o H-6_{py}, *J* = 7,4 Hz); 7,97 (d, 2H, H-6_{py} o H-2_{py}, *J* = 7,3 Hz); 6,90 (d, 2H, H-3_{py} o H-5_{py}, *J* = 7,4 Hz); 6,84 (dd, 2H, H-5_{py} o H-3_{py}, *J* = 7,3, 2,5 Hz); 4,26 y 3,75–3,65 (m, 8H, CH₂O); 3,56 (m, 4H, CH₂N); 3,50 (m, 4H, CH₂N⁺).

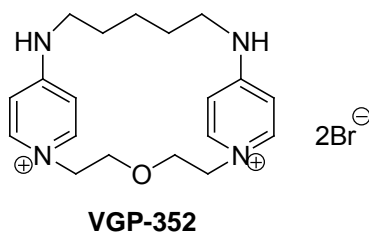
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157,59 (C-4_{py}); 143,93 y 142,39 (C-2_{py} y C-6_{py}); 110,73 y 105,45 (C-3_{py} y C-5_{py}); 68,97 y 68,92 (CH₂O); 56,83 (CH₂N); 42,79 (CH₂N⁺).

HRMS (m/e): Calculado para C₁₈H₂₆Br₂N₄O₂ (M – Br)⁺ 409,1239; encontrado 409,1236.

Análisis Elemental: C₁₈H₂₆Br₂N₄O₂

Teórico (%)	C 44,10	H 5,35	N 11,43
Obtenido (%)	C 44,00	H 5,50	N 11,24

4.1.4.2.9. Dibromuro de 12-oxa-2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciclodecáfano-1¹,9¹-bis(ilio) VGP-352.



Seguendo el procedimiento general A de síntesis descrito en el apartado 4.1.4.2, se obtiene **VGP-352** con aspecto de sólido marrón (19 mg, 33%). Pf: 267 °C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,67 (t, 2H, NH, *J* = 6,2 Hz); 8,06 (d, 2H, H-2_{py} o H-6_{py}, *J* = 7,4 Hz); 8,02 (dd, 2H, H-6_{py} o H-2_{py}, *J* = 7,3; 1,6 Hz); 6,85 (dd, 2H, H-3_{py} o H-5_{py}, *J* = 7,3, 2,8 Hz); 6,79 (dd, 2H, H-5_{py} o H-3_{py}, *J* = 7,4, 2,8 Hz); 4,35–4,21 (m, 4H, CH₂N o CH₂O); 3,78–3,68 (m, 4H, CH₂O o CH₂N); 3,33 (m, 4H, CH₂N⁺); 1,54 (m, 4H, CH₂-2,4_{pent}); 1,37 (m, 2H, CH₂-3_{pent}).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156,76 (C-4_{py}); 143,97 y 141,32 (C-2_{py} y C-6_{py}); 110,13 y 104,22 (C-3_{py} y C-5_{py}); 68,31 (CH₂N); 56,25 (CH₂N⁺); 41,32 (CH₂O); 27,10 (CH₂-2,4_{pent}); 22,75(CH₂-3_{pent}).

HRMS (m/e): Calculado para C₁₉H₂₈Br₂N₄O (M – Br)⁺ 407,1446; encontrado 407,1451.

Análisis Elemental: C₁₉H₂₈Br₂N₄O

Teórico (%)	C 46,74	H 5,78	N 11,47
Obtenido (%)	C 46,66	H 5,99	N 11,20

4.2. Ensayos biológicos.

4.2.1. Materiales.

4.2.1.1. Líneas celulares.

4.2.1.1.1. Parásitos.

Leishmania donovani

Cepa MHOM/IND/80/*Dd8*, cedida por el Dr. Simon L. Croft, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, Reino Unido.

Leishmania major

Cepa MHOM/JL/80/*Friedlin*, cedida por el Dr. Jeremy C. Mottram, Wellcome Centre for Molecular Parasitology and Division of Infection and Immunity, Universidad de Glasgow, Glasgow, Reino Unido.

4.2.1.1.2. Bacterias.

Cepa de la especie *Escherichia coli* DH5 α : *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1* (GibcoBRL).

4.2.1.1.3. Células de mamífero.

Línea celular de cáncer de mama SKBR-3, cedida por el Dr. Manfred Konrad, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Alemania.

Línea celular de cáncer de mama MCF-7, cedida por el Profesor Piet Borst, Division of Molecular Biology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Holanda.

Línea celular mielomonocítica humana THP-1, cedida por la Dra. Elena González Rey, Instituto de Parasitología y Biomedicina Lopez-Neyra, CSIC, Granada.

4.2.1.2. Medios de cultivo.

4.2.1.2.1. Para Leishmania.

RPMI 1640 modificado al 20% de iSBF.

Se compone de 8,32 g de RPMI 1640 (Gibco); 4,75 g de Hepes; 1,6 g de bicarbonato sódico; 100 ml de solución de aminoácidos orgánicos y azúcares (SAA) 10X; 0,2 ml de vitaminas (1000X) en 800 ml de H₂O, ajustándose el pH a 7,2 y esterilizándose por filtración. Se suplementa con suero bovino fetal (Invitrogen) al 20%, inactivado por calor a 56 °C durante 30 min (iSBF).

Solución de aminoácidos orgánicos y azúcares (SAA 10X).

Compuesta por arginina 4,4 mg/ml, cistina 0,8 mg/ml, glutamato 2,5 mg/ml, glutamina 16,4 mg/ml, prolina 69 mg/ml, L-orinitina 1 mg/ml, glucosa 7 mg/ml, frutosa 4 mg/ml, malato 6,7 mg/ml, α -cetoglutarato 3,7 mg/ml, fumarato 0,55 mg/ml y succinato 0,6 mg/ml.

Solución de vitaminas 100X.

Compuesta por pantotenato cálcico 1 mg/ml, cloruro de colina 1 mg/ml, ácido fólico 1 mg/ml, clorhidrato de piridoxal 1 mg/ml, clorhidrato de tiamina 1 mg/ml, I-inositol 20 mg/ml, nicotinamida 1 mg/ml y riboflavina 0,1 mg/ml.

Higromicina B (Invitrogen).

Inhibidor de la síntesis de proteínas. Se utilizó como antibiótico de selección de los parásitos transfectados con los vectores que contenían el gen de la higromicina B. Se utilizó en un rango de concentraciones desde 5 hasta 500 μ g/ml.

Medio de congelación para *Leishmania*.

RPMI modificado al 20% de iSBF con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

4.2.1.2.2. Para bacterias.

LB líquido.

Este medio contiene 10 g de bacto triptona, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura en 1 l de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7,5 y se esteriliza por autoclave.

LB agar.

Bacto Agar al 1,5% en LB líquido esterilizado en autoclave.

Medio de congelación para bacterias.

15% de glicerol en LB.

4.2.1.2.3. Para células.

DMEM modificado al 10% de iSBF.

Es un medio DMEM con bajo contenido en glucosa, L-glutamina y piruvato sódico al que se le añade 250 U/ml de Penicilina G Plus, dilución 1:50 de una solución 50X de MycoKill AB en PBS y un 10% de iSBF.

Medio de congelación para células.

DMEM modificado al 10% con iSBF, con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

4.2.1.3. Tampones y soluciones.

TAE 10X: Tris 0,4 M, EDTA 10 mM, ácido acético glacial 11,42 ml para 1l. Utilizado para electroforesis de ADN.

Solución de carga para ADN 6X: azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.

Tampón HPMI: NaCl 132 mM, KCl 3,5 mM, MgCl₂ 0,5 mM, CaCl₂ 1 mM, glucosa 5 mM y Hepes 20 mM a pH 7,25.

Tampón HBS: NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 7 mM, glucosa 6 mM y Hepes 21 mM a pH 7,4.

Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, Na₂HPO₄ 10 mM; pH 7,4.

Tampón de lisis: Tris-HCL 50 mM, NaCl 300 mM, EDTA 5 mM, glicerol 10%, tritón X-100 1%, ditiotretitol (DTT) 5 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,5 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas Complete™ (Roche) por cada 50 ml.

4.2.1.4. Vectores plasmídicos.

4.2.1.4.1. Vectores de clonaje.

pGEM-T (Promega): vector que posee residuos de desoxitimidina en los extremos 3'. Diseñado para el subclonado y secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR.

4.2.1.4.2. Vectores de expresión.

pXG-Hygro: vector de expresión para *Leishmania* derivado de pXG-GFP¹⁷⁶, que contiene el gen de la higromicina B, lo que nos permite seleccionar los parásitos transfectados. Este vector ha sido cedido a nuestro laboratorio por el Dr. Stephen Beverly (Washington University, School of Medicine, USA).

4.2.1.5. Oligonucleótidos.

Todos los oligonucleótidos utilizados se sintetizaron en el “Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos” del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC), Granada. Las letras minúsculas corresponden a secuencias no presentes en el ADN genómico, que fueron agregadas para introducir sitios de restricción. En el caso de los oligonucleótidos para mutagénesis, las letras minúsculas representan el lugar en el que se ha introducido la mutación (→).

Para clonaje de CEK

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')
CEK-FW	<u>atgatatc</u> ATGATGAGTGTGGACAATTC
CEK-RV	<u>atggatcc</u> TCAGATAAGCTGCTTGTCTC

Para secuenciación de CEK

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')
CEK-int1	GAGCTGGACGTCGAGAAG
CEK-int2	AGCGACTACTACCTTGAC
CEK-int3	GAGCCTGGCTTCATCAAG

Para mutagenesis de CEK

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')
CEK-MUT-FW	CAGTCGCAAGTTCCtGTCCAAGAAGGGCC
CEK-MUT-RV	GGCCCTTCTTGGACaGGAAGCTTGCGACTG

Para RT-PCR de CEK

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')
CEK-RTPCR-FW	AGTTCCTGTCCAAGAAG
CEK-RTPCR-RV	AGCTCAGGTGCGAGCAC

Para clonaje de EK

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')
EK-FW	<u>atcccggg</u> ATGGTGCAATTTACCGATATG
EK-RV	<u>atggatcc</u> TCACAGGTTCTCTGAGCAC

Para secuenciación de EK

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')
EK-int1	CAGCACATGCAGTAGCAC
EK-int2	TCCTCGTGTACGATTACC
EK-int3	TCCTGCTGTACGACGTTG

Para RT-PCR de EK

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')
EK-RTPCR-FW	ACCTACAAGGACGAGTC
EK-RTPCR-RV	ATCTCGTACTCGCGAGA

4.2.1.6. Reactivos de biología molecular.

5-bromo-4-cloro-3-indol-β-galactopiranosido (X-Gal): Roche. Solución 20 mg/ml en dimetilformamida.

Ampicilina: Sigma. Solución 100 mg/ml en agua.

Bromuro de etidio: Sigma.

Desoxinucleótidos: Roche.

Enzimas de restricción: Roche, Fermentas, NewEngland BioLabs.

Enzimas para el ensayo acoplado de actividad: piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa: Roche.

Fenol: Sigma.

Formaldehído: Panreac.

Isopropil-β-D-tiogalacto-piranosido (IPTG): Roche. Solución 0,5 M en agua.

Marcadores de peso molecular lambda DNA/HindIII, phi174 DNA/HaeIII: Promega.

PCR Extender System: Kit para amplificar fragmentos de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (5Prime).

Plasmid Mini Kit: Kit de extracción de ADN plasmídico a pequeña escala (Omega Bio-Tek).

QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit: Kit para realizar mutagénesis dirigida *in vitro* (Agilent Technologies).

SuperScript™ II Reverse Transcriptas. Kit para la cuantificación del RNA en la RT-PCR (Invitrogen).

T4 DNA ligasa: Invitrogen.

4.2.2. Métodos.

4.2.2.1. Cultivo y manipulación de parásitos.

4.2.2.1.1. Cultivo y mantenimiento.

Las formas promastigotas de *L. major* y de *L. donovani* se cultivaron en medio de cultivo modificado RPMI 1640 suplementado con un 20% de iSBF a 28 °C. El mantenimiento de los parásitos se realizó mediante pases continuados, que consistían en la resiembra de 4 millones de parásitos en fase logarítmica tardía por ml de medio fresco.

Los parásitos se conservaron en congeladores a -80 °C y en nitrógeno líquido. Para ello se tomaron alícuotas de 0,9 ml del cultivo de parásitos en fase logarítmica de crecimiento y se suplementaron con un 10% de DMSO.

En los experimentos que requieren recuento celular, se utilizó un contador Coulter Counter modelo Z1, diluyendo 100 µl del cultivo de parásitos en 9,9 ml de medio isotón II (Beckman Coulter).

4.2.2.1.2. Determinación de la sensibilidad a los compuestos en formas promastigotas de *Leishmania*.

Para determinar la sensibilidad a los compuestos se utilizó como dato de referencia la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀). La CI₅₀ se define como la concentración de compuesto requerida para inhibir el crecimiento de los parásitos en cultivo al 50%, cuando el cultivo en ausencia del mismo alcanza la fase logarítmica tardía de crecimiento. El valor de CI₅₀ se calculó utilizando un método colorimétrico basado en la reducción de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio; MTT), siguiendo un protocolo previamente descrito¹⁷⁷. El método se basa en la capacidad de las enzimas deshidrogenasas de los parásitos de convertir el sustrato MTT, soluble y amarillo, en el producto formazán, insoluble y de color azul. La cantidad de producto formado depende del número de células y de la viabilidad de las mismas.

Para realizar los ensayos de sensibilidad, se sembraron 3×10^5 parásitos/pocillo en un volumen final de 100 μ l de medio de cultivo en placa de microtitulación de 96 pocillos, y se incubó durante 72 horas a 28 °C en presencia de distintas concentraciones de los diferentes compuestos, por triplicado. A continuación, se añadieron 10 μ l de MTT (5mg/ml), y se incubó 4 horas a 28 °C para permitir la formación de los cristales de formazán. Finalmente, los cristales se disolvieron añadiendo 50 μ l de SDS 20% e incubando en oscuridad a 37 °C durante 4-6 horas. La reducción de MTT se determinó leyendo la DO_{540} en un lector de ELISA (Beckman Biomek 2000).

4.2.2.1.3. Determinación de la sensibilidad a los compuestos en formas amastigotas intracelulares de *Leishmania*.

La línea monocítica celular humana THP-1 se mantiene en cultivo en medio RPMI-1640 suplementado con 10% iSBF, 2 mM glutamato, 100 U/ml penicilina y 100 μ g/ml estreptomicina, a 37 °C y 5% CO_2 .

Para inducir la diferenciación de los monocitos THP-1 en macrófagos, 5×10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos con cristales estériles en el fondo, fueron tratadas con 20 ng/ml de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) durante 48 horas, seguido de 24 horas en medio de cultivo fresco¹⁷⁸. Estas células fueron infectadas con formas promastigotas de *Leishmania* en fase logarítmica tardía en una relación 1:10 macrófago/parásito a 35 °C y 5% CO_2 durante toda la noche. Los macrófagos infectados se mantuvieron en medio de cultivo a 37 °C y 5% CO_2 durante 72 horas en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos. A continuación, los macrófagos se fijaron con 2,5% paraformaldehído en PBS durante 30 minutos y se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100 en PBS durante otros 30 minutos. Las formas amastigotas intracelulares se visualizaron tiñendo el núcleo con una gota de DAPI (Invitrogen). La actividad de los compuestos se determinó teniendo en cuenta el porcentaje de infección y el número de formas amastigotas intracelulares por célula en relación con las células no tratadas.

4.2.2.1.4. Transfección de parásitos.

La transfección es la introducción de material genético externo en células eucariotas. En nuestro caso, se llevó a cabo mediante el proceso de electroporación descrito por Kapler¹⁷⁹ sobre los promastigotes de *L. donovani* en fase logarítmica tardía de crecimiento. Los parásitos (4×10^7 parásito/ml) se centrifugaron, se resuspendieron en 400 μ l de HBS estéril, se añadió 50 μ l de ADN plasmídico y se incubaron durante 10 min en hielo. La transfección se realizó mediante electroporación en el sistema ECM 600[®] de BTX, utilizando como condiciones 450 voltios, 800 μ F y 13 ohms. Tras la electroporación, los parásitos se incubaron 10 min en hielo y se transfirieron a 5 ml de medio RPMI modificado con 20% de iSBF, incubándose a 28 °C. A las 24 horas se les añadió higromicina B como fármaco de selección a una concentración inicial de 5 μ g/ml. Tras sucesivos pases en presencia de concentraciones crecientes de fármaco, los parásitos transfectados se mantuvieron a una concentración máxima de 500 μ g/ml de higromicina.

4.2.2.1.5. Determinación de la cinética de entrada y acumulación de VGP-106 en *Leishmania*.

Los promastigotes de *Leishmania*, a una concentración de 2×10^7 parásitos/ml, se resuspendieron en medio PBS suplementado con glucosa (10 μ l/ ml) y con el compuesto **VGP-106** (100 μ M), previamente sonicado (20 pulsos de 30´´) y se incubaron a 28 °C durante diferentes tiempos (1, 5, 10, 30 y 60 min). Posteriormente, los parásitos se centrifugaron, se lavaron para eliminar restos del compuesto en el medio y se resuspendieron en 1 ml de PBS. La fluorescencia se determinó en un fluorímetro Aminco-Bowman serie 2, usando unas longitudes de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 520 nm.

Para comprobar el efecto de la temperatura en la acumulación del compuesto en *Leishmania*, se realizó el ensayo de acumulación en las condiciones descritas anteriormente, incubando los parásitos con el compuesto a 28 °C ó a 4 °C durante 30 minutos. Tras ese tiempo se hicieron dos lavados con PBS y se midió la fluorescencia en las condiciones anteriores.

4.2.2.1.6. Medida de ATP.

El ATP se midió usando el ensayo de luminiscencia CellTiter-Glo, que genera una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP¹⁸⁰. Para el ensayo, los promastigotes de *Leishmania* (4×10^6 parásitos/ml) se incubaron a 28 °C en medio de cultivo con diferentes concentraciones del compuesto, según el compuesto y la especie de *Leishmania*, durante 15, 30, 60, 120 y 180 minutos. Posteriormente, una alícuota de 25 µl de los parásitos fue transferida a una placa de 96 pocillos, se mezcló con un volumen igual del reactivo CellTiter-Glo, y se incubó durante 10 minutos. La bioluminiscencia resultante se midió en un lector de microplacas Infinite F200 (Tecan Austria GmbH, Austria).

4.2.2.1.7. Determinación del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m).

La variación del potencial de membrana mitocondrial en promastigotes fue monitorizada mediante el marcador fluorescente JC-1, que presenta una acumulación dependiente del potencial que conlleva cambios en su fluorescencia. Promastigotes de *Leishmania* (1×10^7 parásitos/ml) fueron incubados con una determinada concentración del compuesto en HBS durante 1 ó 3 horas a 28 °C, lavados y resuspendidos en PBS. A continuación se incubaron con 5 µM de JC-1 durante 10 minutos en HBS. La fluorescencia celular se cuantificó calculando el ratio entre FL2 y FL1 mediante un citómetro de flujo FACScalibur. Como control se usaron parásitos despolarizados por incubación con 10 µM de FCCP durante 10 minutos.

4.2.2.1.8. Determinación del potencial de membrana plasmática (Ψ_p).

La medida del potencial de membrana mitocondrial se realizó con la sonda fluorescente DIBAC₄(3). Promastigotes de *Leishmania* (4×10^6 parásitos/ml) se resuspendieron en medio HBS suplementado con glucosa (6 mM), y se incubaron con una determinada concentración del compuesto durante 60 ó 120 minutos a 28 °C. A continuación se añadió 2 µM de DIBAC₄(3) y se incubaron en oscuridad 10 minutos a 28 °C. Como control positivo se utilizaron parásitos tratados con el agente despolarizante CCCP a una concentración de 20 µM durante 15 minutos. La fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo utilizando un citómetro FACScalibur y el programa informático Cell Quest.

4.2.2.1.9. Determinación del cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática.

Para analizar la integridad de la membrana plasmática se usó la sonda Sytox Green, que penetra fácilmente en la membrana de las células cuando está alterada, y se une a ácidos nucleicos. Promastigotes de *L. donovani* (1×10^7 parásitos/ml) se incubaron en medio HBS con 10 ó 30 μM de **VGP-106** durante 1 y 3 horas a 28 °C. A continuación se lavó con HBS, se añadió 2 μM de Sytox Green, y se incubó durante 15 minutos a 28 °C. Los parásitos se transfirieron a una microplaca de 96 pocillos (100 μl /pocillo), y la fluorescencia debida a la unión de la sonda a los ácidos nucleicos intracelulares se registró en un lector de microplacas Infinite F200, a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 535 nm. Como control de máxima fluorescencia se adicionó 0,05% de Tritón X-100.

4.2.2.1.10. Detección de la producción de ROS mitocondrial.

Para detectar la producción de ROS mitocondrial se utilizó la sonda fluorogénica permeable a las células MitoSOX Red, que se dirige selectivamente a la mitocondria, y se oxida localmente. Promastigotes de *L. donovani* (1×10^7 parásitos/ml) fueron preincubados con 0,5 μM de MitoSOX Red en medio HBS durante 30 minutos a 28 °C y posteriormente tratados con 10 ó 30 μM de **VGP-106** durante 1 y 3 horas. La fluorescencia a una emisión de 580 nm se midió mediante citometría de flujo en un citómetro FACScalibur con una longitud de onda de excitación de 488 nm.

4.2.2.1.11. Medida del calcio libre intracelular.

La medida del calcio (Ca^{2+}) libre intracelular se realizó con la sonda fluorescente específica de Ca^{2+} Fluo4. Promastigotes de *L. donovani* (2×10^7 parásitos/ml) se incubaron con 5 μM de Fluo4-AM en medio HPMI suplementado con 0,02% de ácido plurónico F127, que mejora la dispersión del ester acetoximetilo no polar en medio acuoso, durante 1 hora a 28 °C. Tras ese tiempo, se lavaron los parásitos, se resuspendieron en HPMI y se incubaron con 10 ó 30 μM de **VGP-106** en medio fresco suplementado o no con 8 mM de EGTA durante 30 minutos a 28 °C. La fluorescencia de la sonda Fluo4-AM unida al Ca^{2+} se analizó en un fluorímetro Aminco-Bowman serie 2, con una excitación de 490 nm y una emisión de

519 nm. Además la fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo utilizando un citómetro FacsCalibur y el programa informático Cell Quest.

4.2.2.1.12. Análisis del contenido de ADN.

El contenido de ADN fue analizado mediante yoduro de propidio (PI). El PI es un compuesto fluorescente que se intercala entre las bases del ADN y permite identificar células muertas en una población. El PI también se une al ARN, por lo que es necesario el tratamiento con la enzima RNasa que destruye el ARN. Para realizar este ensayo, promastigotes de *L. donovani* (1×10^7 parásitos/ml) fueron incubados en presencia de 10 y 30 μM de VGP-106 en medio de cultivo durante 24 y 48 horas a 28 °C. Tras ese tiempo, los parásitos fueron lavados con PBS y fijados con metanol frío mediante una incubación de 3 minutos en hielo. A continuación se lavaron con PBS, se resuspendieron en 500 μl de PBS con 1 $\mu\text{g/ml}$ de PI y 100 $\mu\text{g/ml}$ de RNase A y se incubaron 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. La fluorescencia fue analizada mediante citometría de flujo utilizando un citómetro FACScalibur y el programa informático Cell Quest.

4.2.2.1.13. Microscopía electrónica de transmisión.

La preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión se realizó en el Laboratorio de Preparación de Muestras Biológicas (LPMB) del C.I.C. de la Universidad de Granada, siguiendo el protocolo descrito por Megías, L. Y Renau, J¹⁸¹. El cultivo de promastigotes de *L. donovani* se fijó con una solución de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 2%, en tampón cacodilato 0,05 M, pH 7,2, durante 24 horas y a 4 °C. A continuación se centrifugaron los cultivos prefijados con el fin de obtener un pellets, que se lavó con tampón cacodilato 0,1M, pH 7,2 (3 cambios de 15 minutos cada uno), a 4 °C. Se realizó una postfijación con una solución acuosa de tetróxido de osmio al 1% y ferricianuro potásico al 1% durante 1 hora, en oscuridad y a temperatura ambiente. Tras lavar con agua destilada (3 cambios de 15 minutos) y PBS (5 minutos); se añadió ácido tánico al 1% en PBS durante 1 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a lavar con PBS (5 minutos) y con agua destilada (2 cambios de 5 minutos), y se realizó la tinción en bloque con acetato de uranilo al 1% en solución acuosa, en oscuridad y agitación, durante 1 hora. Se lavó en agua destilada (2 cambios de 15 minutos) y se realizó una deshidratación en un gradiente de concentraciones

crecientes de etanol de Merck. Se procedió a la infiltración en una mezcla 1:1 de etanol 100% de Merck con resina EMBED 812 (resina epoxi) (EMS), durante 2 horas en agitación y a temperatura ambiente. Por último se realizó la inclusión de las muestras en una resina pura durante 12 horas y la polimerización de las muestras a 70 °C durante 24 horas.

Una vez obtenidos los bloques de inclusión se procedió a la obtención de los cortes ultrafinos de 50-70 nm de espesor que se montaron sobre rejillas de Cu de malla 300, en un Ultramicrotomo Ultracut R de Leica del Laboratorio de Microscopía Electrónica del C.I.C. Por último antes de la observación de los cortes ultrafinos en el TEM Libra 120 Plus de Zeiss del C.I.C., se procede a contrastar las rejillas con acetato de uranio y citrato de plomo, según Reynolds¹⁸² en una atmósfera exenta de CO₂.

4.2.2.2. Cultivo y manipulación de bacterias.

4.2.2.2.1. Cultivo.

Los cultivos líquidos de bacterias se hicieron en medio LB a 37 °C y agitación constante en presencia del antibiótico de selección. Las bacterias también fueron cultivadas en medio semisólido, en placas de petri con LB agar, a 37 °C. Los stocks de bacterias se conservaron a -80 °C en medio LB suplementado con glicerol al 15%.

4.2.2.2.2. Preparación de células electrocompetentes por choque térmico y transformación.

Las células se crecieron en 5 ml de medio líquido durante 16 horas con agitación a 37 °C. Se inoculó 1 ml del precultivo en 200 ml de LB, continuando su crecimiento hasta una DO₆₀₀ de 0,375. Se enfriaron en hielo durante 10-15 min y se centrifugaron durante 7 min a 3500 g a 4 °C. Una vez eliminado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1/5 del volumen inicial de MgCl₂ 0,1 M estéril frío, incubando la suspensión en hielo durante 15-20 min. Se volvió a centrifugar (7 min, 3500 g, 4 °C) y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1/50 del volumen inicial de CaCl₂ 0,1 M estéril frío y se incubaron en hielo durante una hora. A esa suspensión se añadió glicerol hasta obtener una concentración final del 15% y se alicuotearon en 200 µl en tubos eppendorf enfriados previamente. Las células se mantienen a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación, se descongeló una alícuota de células competentes, a las que se añadió la mezcla de ligación de ADN. A continuación se realizó un choque térmico, para lo que se incubaron las bacterias durante 30 min en hielo, 45 segundos a 42 °C y 2 min en hielo. A la mezcla se añadieron 500 µl de LB y se incubó una hora a 37 °C en agitación. Una alícuota de la mezcla se plaqueó en el correspondiente medio de selección y se incubó a 37 °C durante 14-16 horas.

4.2.2.3. Cultivo y manipulación de células.

4.2.2.3.1. Cultivo de la línea celular mielomonocítica humana THP-1.

La línea monocítica celular humana THP-1 se mantuvo en cultivo en medio RPMI-1640 suplementado con 10% iSBF, 2 mM glutamato, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina, a 37 °C y 5% CO₂.

4.2.2.3.2. Cultivo de la línea SKBR-3.

La línea celular de cáncer de mama humano SKBR3 se mantuvo en cultivo en medio DMEM suplementado con 10% iSBF, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina, a 37 °C y 5% CO₂.

4.2.2.3.3. Cultivo de la línea MCF-7.

La línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 se mantiene en cultivo en medio DMEM suplementado con 10% iSBF, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina, a 37 °C y 5% CO₂.

4.2.2.3.4. Ensayos de proliferación celular.

Este ensayo se llevó a cabo mediante el reactivo MTT al igual que los ensayos de sensibilidad en promastigotes de *Leishmania* (apartado 4.2.2.1.2).

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración final de entre 6 a 7×10^3 células/pocillo y se dejaron asentar durante 24 horas en medio completo. A continuación, se siguió el mismo procedimiento descrito para la determinación de la sensibilidad a los compuestos en formas promastigotas de *Leishmania*, pero incubando las placas a 37 °C.

4.2.2.3.5. Toxicidad celular.

La toxicidad celular de los compuestos se determinó mediante el método colorimétrico MTT, como hemos indicado anteriormente. Para lo cual, 3×10^4 células THP-1 por pocillo, en placas de 96 pocillos, se diferenciaron a macrófagos mediante el tratamiento con 20 ng/ml de PMA durante 48 horas seguido de 24 horas en cultivo en medio fresco. A continuación, se siguió el mismo procedimiento descrito para la determinación de la sensibilidad de los compuestos en formas promastigotas de *Leishmania*, pero incubando las placas a 37 °C.

4.2.2.4. Ensayos enzimáticos.

4.2.2.4.1. Expresión y purificación enzimática.

La purificación de la enzima $\Delta 84N$ -hChoK $\alpha 2$ se realizó por cromatografía de afinidad, a partir de las cepas de *E.coli* transformadas con el vector pGEX-RB- $\Delta 84N$ -hChoK $\alpha 2$ ²¹, del laboratorio del Dr. Manfred Konrad, Grupo de Bioquímica Enzimática, Instituto Max Planck de Química Biofísica, Gotinga, Alemania.

El primer paso de la purificación consistió en la sobre-expresión de la enzima $\Delta 84N$ -hChoK $\alpha 2$ de *E.coli*. Para ello el clon de pGEX-RB- $\Delta 84N$ -hChoK $\alpha 2$ se creció en 1 litro de medio LB a 37 °C hasta una DO₆₀₀ de 0,8. En ese momento, la expresión proteica se indujo usando un medio de cultivo LBL autoinductor, e incubando durante 4 horas a 37 °C. Tras el

periodo de inducción, el cultivo se centrifugó a 4500 g durante 20 minutos a 4 °C, y las células se sometieron a tratamiento con lisozima. Para ello, las células se resuspendieron en tampón de lisis. La suspensión celular se sonicó en un baño de hielo, mediante pulsos discontinuos de 200 vatios durante 2 minutos. Tras la sonicación, el lisado celular se centrifugó a 20000 g durante 1 hora. A continuación, se incubó el sobrenadante con 1 ml de Glutation Sepharosa 4B durante 3-4 horas a 4 °C para permitir la unión de nuestra proteína a la matriz. Se preparó una columna de polipropileno de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial, la suspensión se vertió poco a poco en la columna, y se lavó con 3 x 30 ml tampón de lavado, con un flujo de unos 15 a 20 ml por hora.

Tras el paso de lavado, se añadieron 4 ml de tampón que contenía 1 unidad/ml de trombina, y se incubó durante toda la noche, para permitir la escisión de la proteína de fusión. Por último, se adicionó tampón de lavado, con lo que se produjo la elución de la enzima mientras que la proteína GST debe permanecer unida a la matriz. El eluyente recogido corresponde a la proteína purificada.

El seguimiento y control de la purificación de la proteína se evaluó mediante electroforesis en un gel SDS-PAGE.

4.2.2.4.2. Ensayos de actividad enzimática.

Antes de determinar in vitro la capacidad inhibidora de los compuestos sintetizados, se analizó la actividad enzimática colina quinasa de $\Delta 84N$ -hChoKa2 en ausencia de inhibidores. Para ello se usó un ensayo enzimático acoplado basado en la valoración del ADP generado durante la fosforilación de la colina. Este ensayo requiere la enzima piruvato quinasa (PK), que transfiere un grupo fosfato desde el fosfoenolpiruvato (PEP) al ADP generado durante la fosforilación, regenerando el ATP inicial. En el proceso se forma ácido pirúvico que se reduce a ácido láctico por mediación de la enzima lactato-deshidrogenasa (LDH), con oxidación simultánea de NADH a NAD⁺. Con este ensayo, se puede monitorizar espectrofotométricamente la disminución de NADH, ya que tiene un máximo de absorción a 340 nm, que no presenta su forma oxidada.

El ensayo se realizó a 25 °C en un espectrofotómetro UVIKON durante 5 minutos, en mezclas de reacción de 1 ml que contenían: 100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,5 mM PEP, 0,25 mM NADH, 5 unidades de lactato deshidrogenasa, 4 unidades de piruvato quinasa, 1 µg de enzima purificada y concentraciones crecientes de colina.

4.2.2.4.3. Ensayos de inhibición enzimática.

La capacidad de inhibición de la actividad colina quinasa *in vitro* de los nuevos compuestos sintetizados se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado, en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor en un rango entre 0 y 2 ó 5 µM, siguiendo el ensayo descrito en la sección anterior.

Para cada inhibidor y cada concentración, se calculó la actividad relativa de la enzima, a una concentración fija de 0,6 mM de colina y de 2 mM de ATP. La concentración a la que se consiguió el 50% de inhibición (CI₅₀) se calculó representando gráficamente la actividad relativa de la enzima frente a la concentración del compuesto.

Con el objeto de definir el tipo de inhibición que presentan los inhibidores sintetizados con respecto a la colina, se realizaron experimentos cinéticos en los que se varió las concentraciones de colina en presencia de una concentración fija del compuesto, lo que nos permitió calcular la K_M aparente. Además se ensayó la actividad colina quinasa del enzima, variando las concentraciones del inhibidor (0-0,5 µM) en presencia de 0,2, 0,6 y 1,5 mM de colina, y a una concentración fija de ATP de 2 mM. Se determinó el tipo de inhibición a partir de las representaciones de Lineweaver-Burk, de la representación secundaria del cociente de colina entre la actividad de la enzima frente a la concentración del compuesto, y de la representación de Dixon. Las constantes de inhibición se calcularon mediante el ajuste realizado por el software GraphPad Prism.

4.2.2.4.4. Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE.

La separación de proteínas en función de su tamaño se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE), según el método de Laemmli¹⁸³. La separación electroforética se realizó en geles discontinuos,

compuestos por un gel superior (concentrador) preparado al 3-4,5% de acrilamida/bisacrilamida y pH 6,8, y un gel inferior (separador) al 10-14% y pH 8,8, Los porcentajes de acrilamida se eligieron en función del tamaño de las proteínas de interés a separar. La electroforesis se llevó a cabo en minigeles empleando la cubeta del sistema *mini-PROTEAN* de Bio-Rad, a 20-25 mA/gel. Como marcador de peso molecular se utilizaron los standards preteñidos de Bio-Rad.

La fijación y visualización de las proteínas se realizó mediante tinción con una solución de Azul de Coomassie R-250 al 0,2% en 40% de metanol y 10% ácido acético durante media hora y posterior decoloración en 40% de metanol y 10% de ácido acético.

4.2.2.5. Manipulación de ácidos nucleicos.

4.2.2.5.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción fueron empleadas de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 40 μ l empleando de 1 a 10 U de enzima por μ g de ADN a digerir, incubándose 2 horas a la temperatura recomendada. Las enzimas se inactivaron de acuerdo con las condiciones descritas por la casa comercial.

4.2.2.5.2. Reacción de ligación.

Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se realizaron con la enzima T4 DNA ligasa (1 U/ μ g de ADN), procedente del bacteriófago T4. El volumen final fue 10 μ l en el tampón suministrado por la casa comercial, utilizando una relación molar inserto: vector de 3:1, La reacción se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente o durante 16 horas a 4 °C.

La mezcla resultante de la ligación se utilizó para transformar bacterias de *E.coli* competentes.

4.2.2.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta técnica nos permite obtener un elevado número de copias de una secuencia concreta de ADN, generadas por una ADN polimerasa termoestable.

Las reacciones PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl, con una mezcla de 20 pmol de cada cebador, 400 µl de cada desoxinucleótido, 10-100 ng de ADN molde, 0,1 volúmenes de tampón *Taq* polimerasa 10x y 1-5 U de la enzima *Taq* polimerasa.

En general, las condiciones de PCR fueron un primer ciclo de desnaturalización, a 94 °C durante 10 min; seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 10 min, anillamiento a una temperatura adecuada en función de la T_m de cada cebador durante 1 min y extensión a 68 °C durante 1 min/kb, y un último ciclo de elongación a 72 °C durante 10 min.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

4.2.2.5.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa.

Esta técnica permite separar fragmentos de ADN según su tamaño. Para efectuar la electroforesis se utilizaron geles de agarosa al 0,8% en tampón 1X TAE y se sometieron a un campo eléctrico en un tanque horizontal con el mismo tampón, a un voltaje de 100 V durante 25-30 min. Las muestras se cargaron en los geles con tampón de carga, y se usaron como marcador de peso molecular el ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción *Hind* III y el ADN del fago phiX174 digerido con *Hae* III. El ADN se visualizó tiñiendo los geles con 0,5 µg/ml bromuro de etidio y observándolos bajo luz ultravioleta.

4.2.2.5.5. Secuenciación del ADN.

El ADN fue secuenciado en el servicio técnico del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC). El procedimiento utilizado se basó en la técnica descrita por Sanger *et al.* (1997) modificada. El método se basa en la interrupción de la síntesis de ADN por una polimerasa mediante la incorporación de un dideoxinucleótido que detiene la

elongación de la cadena a partir de un cebador, por no tener un extremo 3'-OH al cual añadir el siguiente nucleótido trifosfato. La secuenciación se realizó con un secuenciador automático 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystem) utilizando el kit "AmpliTaQDyeDeoxy terminator Cycle Sequencing" (Perkin Elmer). Los cebadores utilizados fueron los universales (SP6, T3, T7), así como los oligonucleótidos descritos anteriormente.

4.2.2.5.6. Mutagénesis dirigida.

Para obtener una mutación puntual en un plásmido, se utilizó el protocolo recogido en el kit de mutagénesis *Quick Change[®] XL-Site-Directed* (Stratagene). Se emplearon un par de oligonucleótidos, que incluyen dicha mutación, complementarios entre sí y se realizó una reacción de PCR con la enzima *Pfu Ultra High Fidelity DNA Polimerasa* dando como resultado dos hebras completas y complementarias del plásmido amplificado. Después de eliminar el ADN de partida en una reacción de digestión con la enzima *DpnI*, que hidroliza el ADN metilado, se transformaron bacterias con el producto de la amplificación. Finalmente, se chequeó mediante digestión con enzimas de restricción y por secuenciación la existencia de la mutación en el plásmido obtenido de las bacterias transformadas.

4.2.2.5.7. Análisis del ARN aislado (RT-PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) es una técnica que consiste en retrotranscribir una hebra de ARN en ADN complementario (ADNc) usando una transcriptasa inversa, y el resultado se amplifica por PCR tradicional.

Para el desarrollo de esta técnica se utilizó el kit *SuperScript[™] II Reverse Transcriptase* (Invitrogen), donde se mezclaron 5 µg de ARN purificado con 2 pmol del cebador reverso y 0,5 mM de cada uno de los desoxinucleótidos hasta un volumen final de 10 µl. Esta mezcla se incubó a 65 °C durante 5 min y se enfrió otros 5 min en hielo. Transcurrido este tiempo, se añadió el tampón de la enzima 1X y 10 mM de DTT, y se volvió a calentar a 42 °C durante 2 min. Finalmente se incorporaron 200 U de la enzima *SuperScript II RNasa H Reverse Transcriptase* y se incubó la reacción a 42 °C durante 50 min. Una vez obtenido el ADNc, la enzima se inactivó por calentamiento de la muestra a 70 °C durante 15 min. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación por PCR empleando los cebadores adecuados.

Los productos de RT-PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de acrilamida al 0,8%.

4.2.2.6. Análisis estadístico.

Todos los experimentos se realizaron con muestras en triplicado y se repitieron al menos dos veces en ensayos independientes, hallándose los valores medios de ambos experimentos. En los casos en que existieron discrepancias significativas entre ambos ensayos, el experimento se repitió una vez más para contrastar los valores obtenidos y se hicieron las medias de los valores más próximos entre sí.

Las comparaciones estadísticas entre los grupos se realizaron mediante la prueba *t* de Student. Las diferencias se consideraron significativas a un nivel $p < 0,01$.

5. SUMMARY

5. Summary.

5.1. Introduction.

5.1.1. Cancer.

Cancer is a group of diseases characterized by the proliferation of cells without normal cellular control. Cells contain many genes that are involved in cell proliferation, such as proto-oncogenes, which stimulate cell proliferation, and tumour suppressor genes or anti-oncogenes, which put the break on cell proliferation. Some of these genes can be mutated to forms that lead to the carcinogenic process. Mutated versions of proto-oncogenes or oncogenes can promote tumour growth, while the inactivation of tumour suppressor genes results in dysfunction of proteins that normally inhibit cell cycle progression.

The transformation from a normal cell into a tumour cell is a multi-stage process, in which normal cells acquire a succession of “hallmark” capabilities that can be defined as the traits that enable them to become tumourigenic and ultimately malignant.⁷ Activated choline metabolism, which is characterized by increased phosphocholine (*PCho*) is emerging as a metabolic hallmark that is associated with oncogenesis and tumour progression.^{8,9} *Pcho* is a precursor and a breakdown product of phosphatidylcholine (PC), the most abundant phospholipids in the cell membrane.

Choline Kinase (ChoK) is responsible for the phosphorylation of choline to *PCho*. This constitutes the first step in the Kennedy pathway, responsible for the *de novo* biosynthesis of PC.¹⁰ In mammalian cells, ChoK exists in three isoforms (ChoK α 1, α 2 and β)

that are encoded by two separate genes termed as *chok-α* and *chok-β*.¹⁴ The active isoforms are present as either homo- or hetero-dimers, or as tetramers.

ChoK levels are increased in different tumour-derived cell lines and in several human tumours when compared to their corresponding normal tissues.²² Moreover, ChoK inhibition has drastic inhibitory effects on cell proliferation and prevents tumour growth in mice.³³ It has recently been demonstrated that ChoK inhibitors lead tumour cells to apoptosis, whilst normal cells remain unaffected.^{37,38} Recent studies on the biological function of ChoK isozymes revealed that ChoK α may play a more prominent role in cancer development compared to ChoK β , as only ChoK α is up-regulated in breast cancer cell lines.¹⁷

Due to the relevance of ChoK α in human carcinogenesis, ChoK α inhibition constitutes an efficient antitumour strategy. The choline homologue **hemicholinium-3** (HC-3, Figure 5.1) was reported to strongly inhibit ChoK activity *in vitro*, and to act as an inhibitor of mammalian cell proliferation. However, its major inhibitory effects appear to be on the high-affinity choline transport system, causing severe toxic effects in the cholinergic nerve system.⁴¹ Despite not being in clinical use, HC-3 has served as a lead compound for the development of more potent and selective ChoK inhibitors.

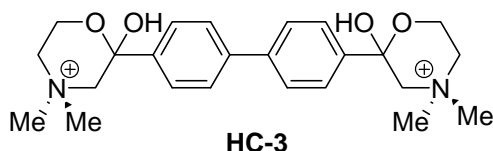


Figure 5.1. Hemicholinium 3 (HC-3).

The synthesis of several derivatives was based on structural modifications of HC-3 that improve the ChoK inhibitory activity without producing the toxic effect. In our earlier work, a high number of symmetrical bispyridinium compounds was designed, synthesized, characterized, and biologically assessed.⁴⁴⁻⁴⁷ Several biscationic dibromides with distinct heads [bis(4-substituted)pyridinium, bis(4-aminoquinolinium), bisquinolinium, and bisisoquinolinium moieties] and different spacers between the two charged nitrogen atoms were synthesised. The electron characteristic of the substituent at position 4 of the heterocycle and the theoretical lipophilic character of the whole molecule were found to significantly affect the antitumour activity.⁴⁵ We have studied the role played by a third positive charge on both ChoK inhibitory and antiproliferative activities.⁴⁸ A benzene ring was used as a linker in

order to carry out such a study because it allowed us to obtain symmetrical bis and triscationic compounds (Fig. 5.2). Trispyridinium compounds are more potent than the bispyridinium ones as inhibitors of human ChoK. Nevertheless, trispyridinium compounds are less active than the bispyridinium ones as antiproliferative agents because the latter show better lipophilicity to cross the cytosolic membranes. In order to study how the rigidity increase affects the ChoK inhibitory activity, a family of bispyridinium cyclophanes, which can be considered as rigid analogues of the previous biscationic ones, were prepared (Figure 5.2). The ChoK inhibitory potency is notably increased by closing the structures.⁴⁹ On the contrary, such a modification produces a decrease in the antiproliferative capacity due to the low lipophilicity of the compounds.

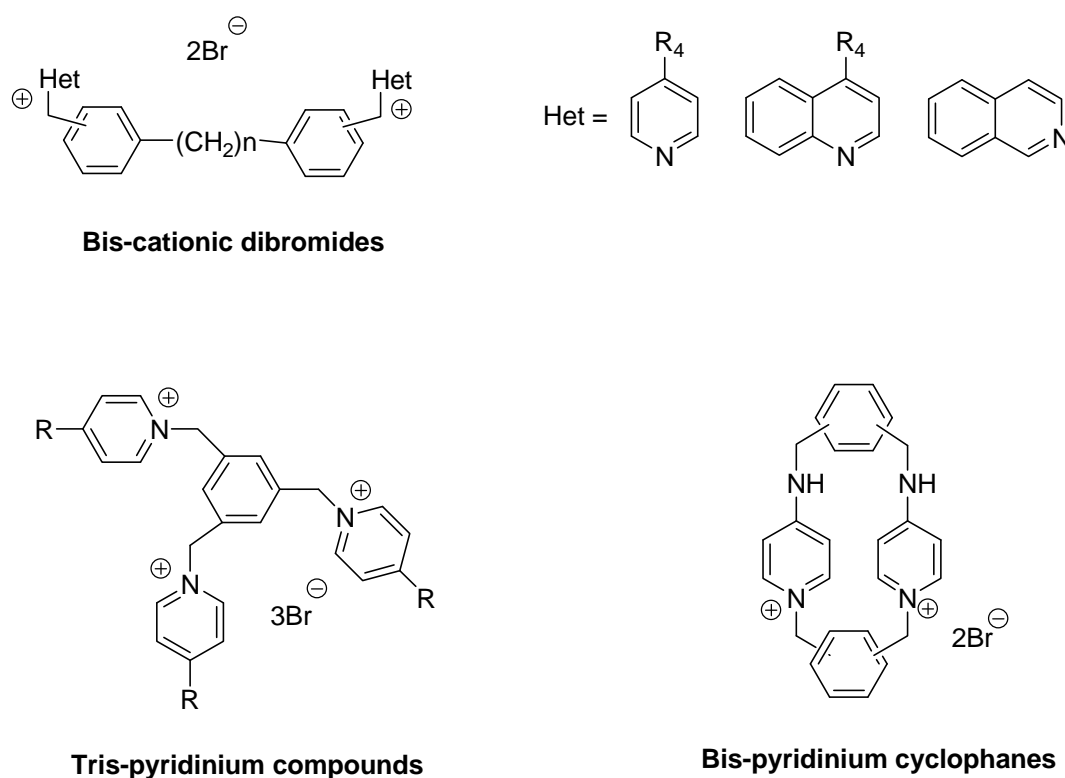


Figure 5.2. Several bis and triscationic derivatives as ChoK inhibitors.

5.1.2. Leishmaniasis.

Leishmaniasis is a wide spectrum disease caused by about 20 species of protozoan parasites that belong to order Kinetoplastida, family Trypanosomatidae and genus *Leishmania*. Leishmaniasis is still one of the world's most neglected diseases, with 350 million people considered at risk of contracting leishmaniasis, and more than 2 million new cases yearly.

All *Leishmania* species are digenetic parasites that exist as both insect vector and mammalian forms. The digenetic life cycle of *Leishmania* (Figure 5.3) consists of flagellated, motile, extracellular promastigote form that proliferates in the midgut of phlebotomine sand fly family vectors, which infect mammalian host and transform into the nonmotile, intracellular amastigote form that resides in phagolysosomes of macrophages and other reticuloendothelial cells.

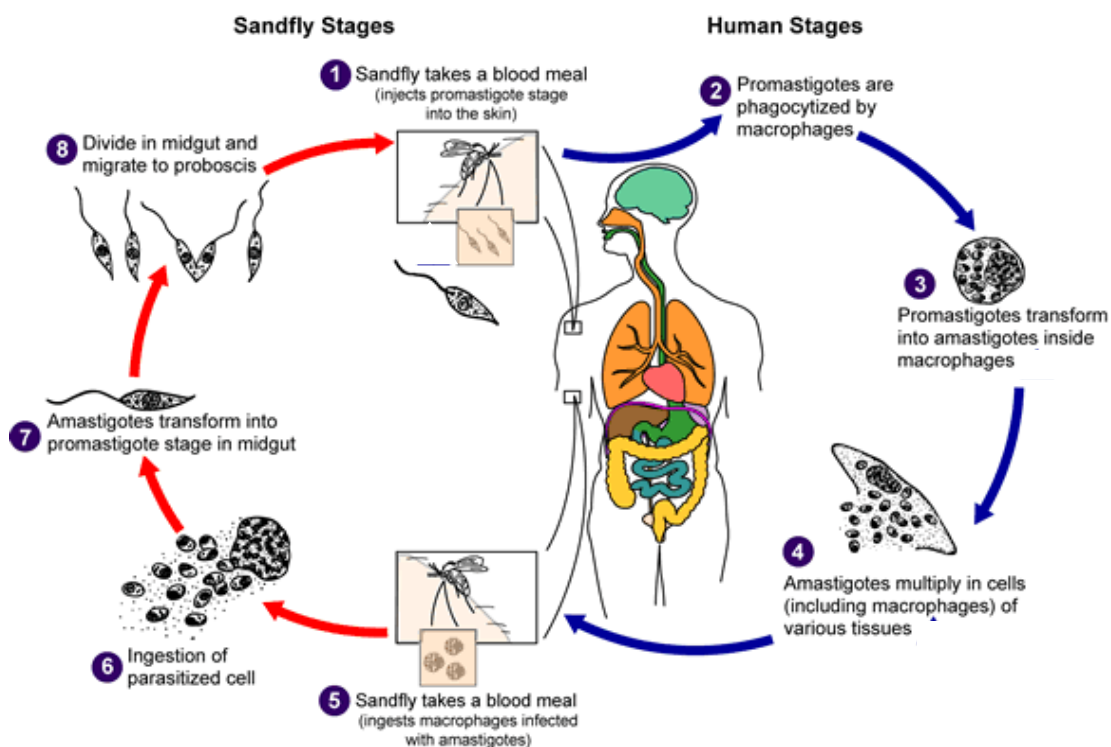


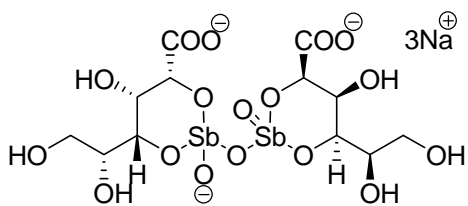
Figure 5.3. Lyfe cycle of *Leishmania*.⁶⁵

There are almost certainly differences in the metabolism of the two parasite stages because of the differences between the environments in which they reside.⁷³ Despite these differences, both forms share metabolic characteristics that are essential for the parasite survival.⁷⁴

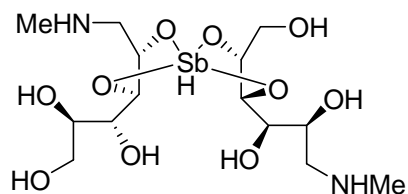
Trypanosomatids possess several striking biological characteristics, such as a kinetoplast containing the catenated circular network of mitochondrial DNA, and RNA editing, a process where mitochondrial transcripts are modified by insertions or deletions of uridines. The energetic metabolism of trypanosomatids is also special because a large part of glycolysis is performed in an organelle, the glycosome and because the electron transport chains of many trypanosomatids use an alternative oxidase that is otherwise found only in some fungi and plants.⁷⁶

Leishmaniasis has traditionally been classified into three main clinical forms: visceral (VL), cutaneous (CL) and mucocutaneous (MCL), which differ in immunopathologies and the degree of morbidity and mortality. VL, commonly known as Kala-azar, is caused by the parasite *Leishmania donovani* and is fatal in more than 90% of the untreated cases.

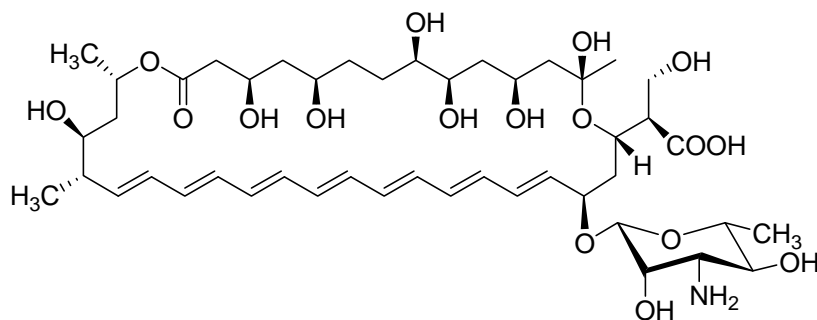
In the absence of effective vaccines against leishmaniasis, the main weapon to control the disease relies exclusively on chemotherapy. Treatment for leishmaniasis currently relies on a reduced arsenal of drugs (Figure 5.4), including pentavalent antimonials (sodium stibogluconate, meglumine antimoniate), amphotericin B deoxycholate, lipid formulations of amphotericin B, miltefosine, and paromomycin, all of which have drawbacks in terms of toxicity, efficacy, price, and inconvenient treatment schedules. To increase the therapeutic life span of these drugs and delay the emergence of resistance, the World Health Organization has recommended combination therapy as a strategy to be implemented in clinical trials.



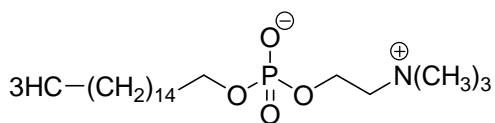
Sodium stibogluconate



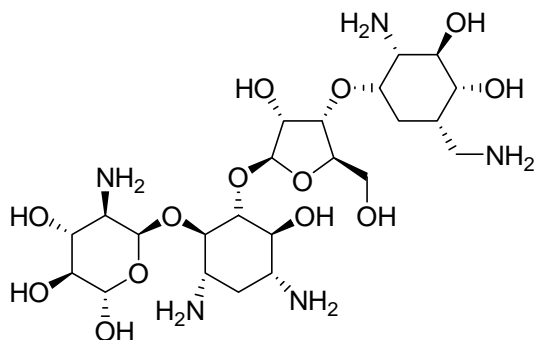
Meglumine antimoniate



Amphotericin B



Miltefosine



Paromomycin

Figure 5.4. Antileishmanial drugs in clinical use.

5.2. Aims.

The main objective of this thesis is to design and synthesize new symmetrical bispyridinium compounds and to study the biological activities: antiproliferative activity through ChoK inhibition, and leishmanicidal activity.

To achieve this aim, we have proposed the following specific objectives:

1. Design and synthesis of a new set of bispyridinium compounds with acyclic or cyclic structure.
2. Biological evaluation of all new synthesized compounds as antiproliferative agents against the human breast cancer SKBR-3 and MCF-7 cell lines.
3. Inhibition assays against the human ChoK α . Study for the most active compounds of their mechanism of enzyme inhibition.
4. Biological evaluation of all new synthesized compounds as antileishmanial agents against promastigotes and intracellular amastigotes of *L. donovani* and *L. major*.
5. Study of the antileishmanial mechanism of action of the leader compounds.

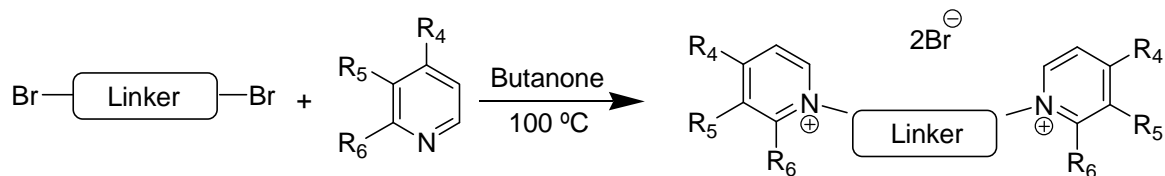
5.3. Results and Discussion.

5.3.1. Bispyridinic compounds.

5.3.1.1. Chemistry.

A series of ten bispyridinium and bisquinolinium derivatives were synthesized. They are biscationic compounds that consist of a linker and two cationic heads which are 4-substituted pyridinium or quinolinium rings with cyclic or acyclic amino groups. Six different types of linkers were used, of which 1,3-bis(bromomethyl)benzene and 1,4-bis(bromomethyl)benzene are commercially available. The other four linkers were synthesized as described previously.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ The 4-substituted pyridines and quinolines were synthesized from 4-chloropyridine or 4-chloroquinoline by a previously reported method.⁴⁴

The final compounds were synthesized by heating of the corresponding bromide and heterocyclic derivatives (in a molar ratio 1:2) using butanone as solvent.⁴⁴ The reaction was carried out in a sealed tube at 100 °C (Scheme 5.1) to afford the final compounds.



Scheme 5.1. General synthesis of final bispyridinic compounds.

Compound	Linker	R ₄	R ₅ +R ₆	R ₇
VGP-106			H	H
VGP-114			H	H
VGP-118			H	H
VGP-130			H	H
VGP-138			H	H
VGP-146				Cl
VGP-150				Cl
VGP-162				Cl
VGP-174				H
VGP-182				H

5.3.1.2. Biological assays.

5.3.1.2.1. Antiproliferative activity.

The effects of the synthesized compounds on cell proliferation were studied on the breast cancer SKBR3 and MCF-7 cells. In these cell lines, up-regulation of the expression levels of ChoK α was detected.²⁸ All the compounds tested showed antiproliferative activity with similar IC₅₀ values against both cell lines (Table 5.1).

Table 5.1. Antiproliferative and ChoK inhibitory activities of final bispiridinic compounds.

Compound	Antiproliferative activity		IC ₅₀ μ M
	IC ₅₀ μ M SKBR-3	IC ₅₀ μ M MCF-7	Δ 84N-hChoK α 2
VGP-106	8,28 \pm 0.74	9.15 \pm 0.87	0.55
VGP-114	nd	11.33 \pm 0.98	0.65
VGP-118	1.69 \pm 0.10	2.94 \pm 0.23	0.09
VGP-130	nd	8.09 \pm 0.54	1.35
VGP-138	nd	59.19 \pm 2.54	0.27
VGP-146	nd	3.46 \pm 0.42	0.20
VGP-150	nd	4.15 \pm 0.35	0.08
VGP-162	1.24 \pm 0.25	4.44 \pm 0.22	0.14
VGP-174	1.56 \pm 0.31	1.28 \pm 0.20	0.19
VGP-182	3.78 \pm 0.89	2.47 \pm 0,19	0.57

All experiments were conducted in duplicate. Data are means \pm SD of three independent determinations.

5.3.1.2.2. Inhibition of ChoK.

To analyze enzyme inhibition, we used the *N*-terminally truncated human choline kinase variant Δ 84N-hCK α 2, which lacks the first 84 amino acid residues that were not visible in the crystal structure of the enzyme.²¹ The kinetic parameters determined for Δ 84N-hCK α 2, K_M of 54 μ M for choline, and k_{cat} of 48.6 s⁻¹, are similar to those reported for the wild type protein and the Δ 49N-hCK α 2 truncated version.²¹

The inhibitory activities of the compounds were tested spectrophotometrically using a modified pyruvate kinase/lactate dehydrogenase coupled system. Results are shown in Table 5.1 using IC_{50} values to estimate their ChoK inhibition potential. All compounds show IC_{50} values in the range of 1.35 to 0.08 μM . To investigate the mechanism of enzyme inhibition, compounds **VGP-118** and **VGP-150**, which are the most potent ChoK inhibitors, were chosen as representative molecules. An analysis of several kinetic plots indicates that both compounds inhibit $\Delta 84\text{N-hCK}\alpha 2$ activity with a mixed type inhibition pattern (Figure 5.5).¹⁵⁵ In contrast, competitive inhibition had been reported for **HC-3**.⁴³

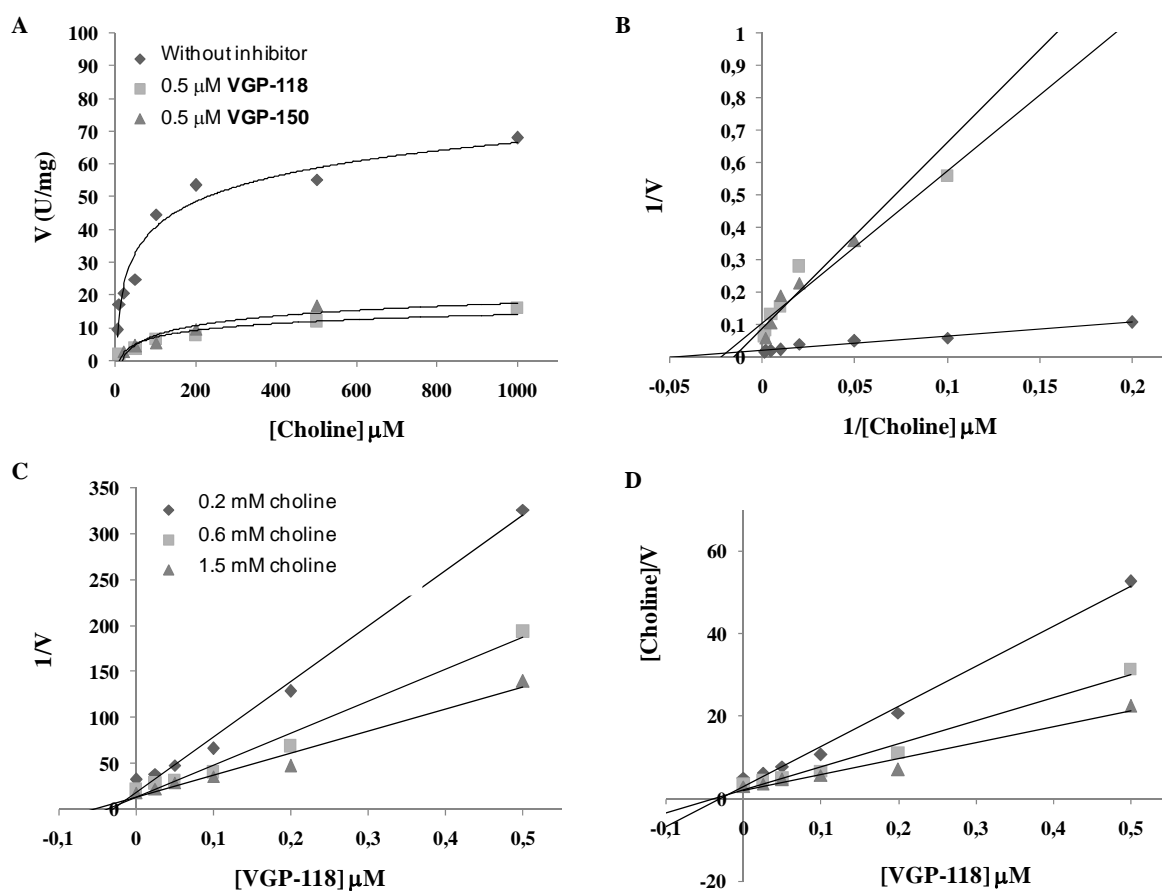


Figure 5.5. Kinetics and inhibition of $\Delta 84\text{N-hCK}\alpha 2$ by compounds **VGP-118** and **VGP-150**: (A) Plot of choline kinase activity without, or in the presence of a single inhibitor concentration (0.5 μM) at various choline concentrations. (B) Lineweaver-Burk plot (double reciprocal plot of A); lines intersect in the second quadrant, above the x-axis, indicating a mixed inhibition type. (C) Dixon plot, $1/V$ vs $[I]$ for compound **VGP-118**. (D) Plot of $[\text{choline}]/v$ vs $[I]$ for compound **VGP-118**.

In mixed inhibition, the inhibition constant (K_i values) is separated into K_{ia} , the K_i for binding to the free enzyme, and K_{ib} , for binding to the enzyme-substrate complex.¹⁵⁵

In both compounds $K_{ia} < K_{ib}$ indicating that the inhibition is predominantly competitive. Such a mixed type of inhibition has been previously reported, among others, for galactokinase and different protein kinase inhibitors.¹⁵⁶

5.3.1.2.3. Antileishmanial activity.

Final bisquaternary compounds have been tested as leishmanicidal agents against *L. donovani*, responsible for the visceral form of the disease and *L. major*, which causes cutaneous leishmaniasis. All compounds show antileishmanial activity against promastigotes and intracellular amastigotes of both species, showing IC_{50} values below 1 μ M in most cases (Table 5.2).

To further investigate the mechanism of action, **VGP-106** was chosen as representative compound.

First, we decided to study whether there is a relation between the ChoK inhibitory and antileishmanial activities. Therefore choline/ethanolamine kinase (CEK) and ethanolamine kinase (EK) enzymes were overexpressed in *L. donovani* promastigotes. The sensitivity of transfected parasite to compound **VGP-106** was tested both in promastigotes and in intracellular amastigotes. There are no significant differences between the IC_{50} values of parasites over-expressing CEK or EK enzymes compared to control parasites (Table 5.3). This suggests that the mechanism of action of this compound in *Leishmania* is independent of CEK and EK enzymes. Otherwise, the over-expression of these enzymes would have involved an increased resistance to the inhibitory effect of the compound, and therefore an increase in the IC_{50} value.

Table 5.2. Antileishmanial activity against promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania* and cellular toxicity of final biscationic compounds.

Compound	IC ₅₀ promastigotes (μM)		IC ₅₀ intracellular amastigotes (μM)		Cellular toxicity IC ₅₀ (μM)
	<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>	
VGP-106	21.55 ± 3.72	0.36 ± 0.09	13.07 ± 6.30	0.86 ± 0.46	206.54 ± 9.89
VGP-114	0.47 ± 0.04	0.61 ± 0.09	0.10 ± 0.03	0.85 ± 0.04	100.06 ± 8.57
VGP-118	29.15 ± 5.73	0.65 ± 0.19	6.21 ± 1.02	0.18 ± 0.03	15.35 ± 3.99
VGP-130	0.50 ± 0.07	0.73 ± 0.11	0.09 ± 0.02	2.02 ± 0.05	81.34 ± 10.65
VGP-138	0.74 ± 0.19	2.11 ± 0.48	0.30 ± 0.16	4.01 ± 0.43	176.05 ± 20.75
VGP-146	0.21 ± 0.06	0.33 ± 0.07	0.10 ± 0.04	0.42 ± 0.01	15.61 ± 3.26
VGP-150	0.36 ± 0.11	0.77 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.55 ± 0.16	24.03 ± 5.42
VGP-162	0.40 ± 0.08	0.35 ± 0.02	0.37 ± 0.03	1.00 ± 0.08	10.97 ± 2.41
VGP-174	1.70 ± 0.01	0.34 ± 0.03	0.41 ± 0.05	0.86 ± 0.03	2.47 ± 0.05
VGP-182	2.51 ± 0.01	0.92 ± 0.2	0.42 ± 0.12	0.52 ± 0.12	4.71 ± 0.23
Amphotericine B	0.32 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.28 ± 0.13	14.32 ± 4.10
Miltefosine	16.65 ± 1.23	6.60 ± 1.57	10.61 ± 0.89	0.88 ± 0.14	26.86 ± 3.08

Data are means ± SD of three independent determinations.

Table 5.3. Sensitivity of *Leishmania* lines to compound VGP-106.

Compound	CI ₅₀ promastigotes (μM)			CI ₅₀ amastigotes (μM)		
	pXG	pXG-CEK	pXG-EK	pXG	pXG-CEK	pXG-EK
VGP-106	0.36 ± 0.09	0.36 ± 0.09	0.43 ± 0.05	0.45 ± 0.03	0.42 ± 0.05	0.35 ± 0.03
Miltefosine	6.60 ± 0.57	9.42 ± 0.89	10.33 ± 1.12	2.11 ± 0.15	3.74 ± 0.26	4.55 ± 0.51

Data are means ± SD of three independent determinations.

To determine the uptake mechanism of **VGP-106** into *Leishmania* promastigotes, a spectrofluorometric assay was carried out. **VGP-106** uptake reaches saturation very quickly (Figure 5.6A) and there is no significant difference in **VGP-106** accumulation at 28 °C and 4 °C (Figure 5.6B), suggesting an uptake by a diffusion process. Additionally, **VGP-106** accumulation in *L. donovani* is only 18% higher than in *L. major*, which doesn't explain the differences in sensitivity.

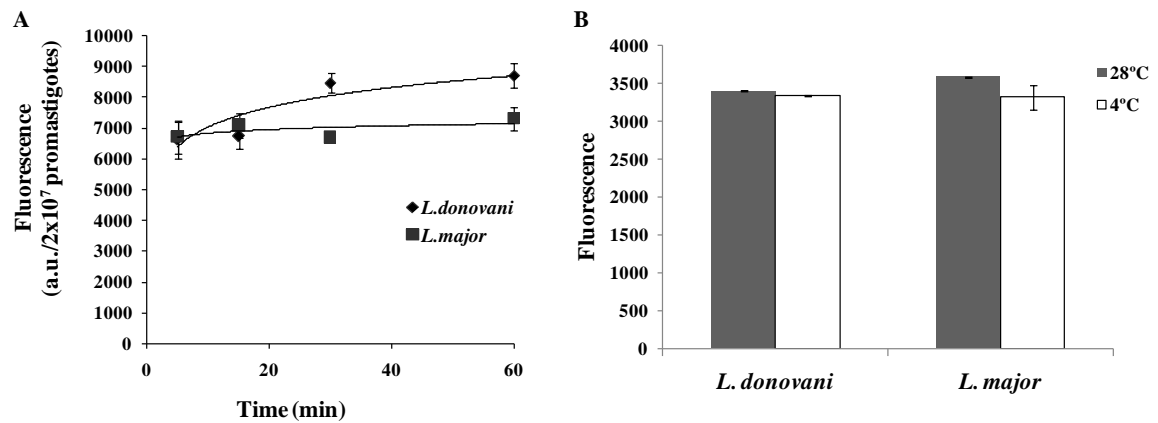


Figure 5.6. Uptake and accumulation of **VGP-106** in *Leishmania*. Data are means \pm SD of three independent experiments. Significant differences were determined by Student's *t*-test ($*p < 0.01$).

Ultrastructural effects of **VGP-106** in *L. donovani* promastigotes was studied by transmission electron microscopy (TEM). The changes began to appear at low concentration (0.5 μ M) after 24 or 48 h of incubation, being more evident at 1 μ M, and particularly notorious in the mitochondria, which displays an intense swelling (Figure 5.7).

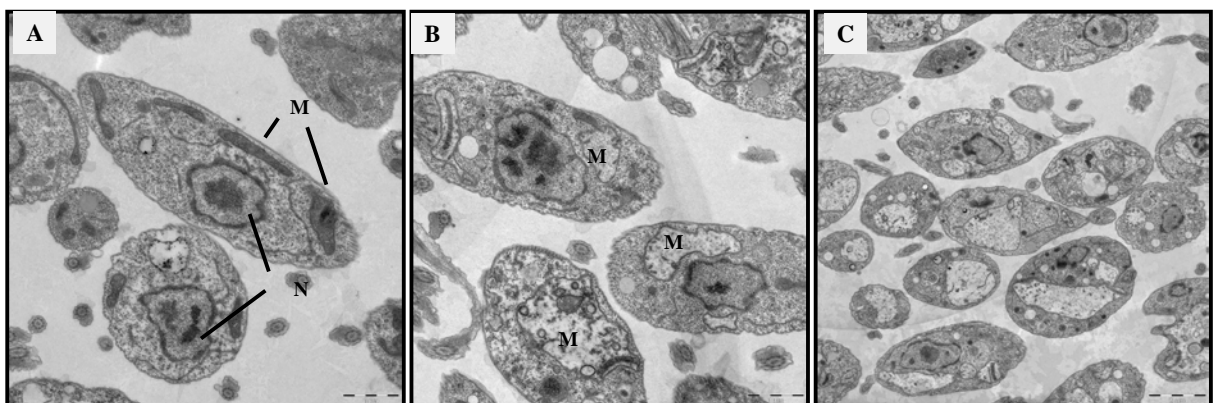


Figure 5.7. Ultrathin section of promastigotes of *L. donovani* control (A) or treated with 0.5 (B) or 1 μ M (C) of **VGP-106**. Mitochondria (M), nucleus (N) are indicated. Scale bars, 1 μ M.

To determine the effects of **VGP-106** in the mitochondrial function, we have studied the variation of the mitochondrial electrochemical potential ($\Delta\Psi_m$). Parasites incubated with 0.5 and 1 μM of **VGP-106** for 24 and 48 h, show significant increase in the JC-1 ratio compared with untreated parasite, indicating that the compound induces hyperpolarization of $\Delta\Psi_m$ (Figure 5.8A).

As $\Delta\Psi_m$ is essential for mitochondrial ATP synthesis, intracellular ATP level was measured using a CellTiter-Glo luminescence assay, which generates a luminescent signal proportional to the amount of ATP present. **VGP-106** reduces the intracellular ATP level in *L. donovani* promastigotes (Figure 5.8B).

These results suggest that compound **VGP-106** may accumulate in mitochondria, but it does not seem to have a specific mitochondrial target.

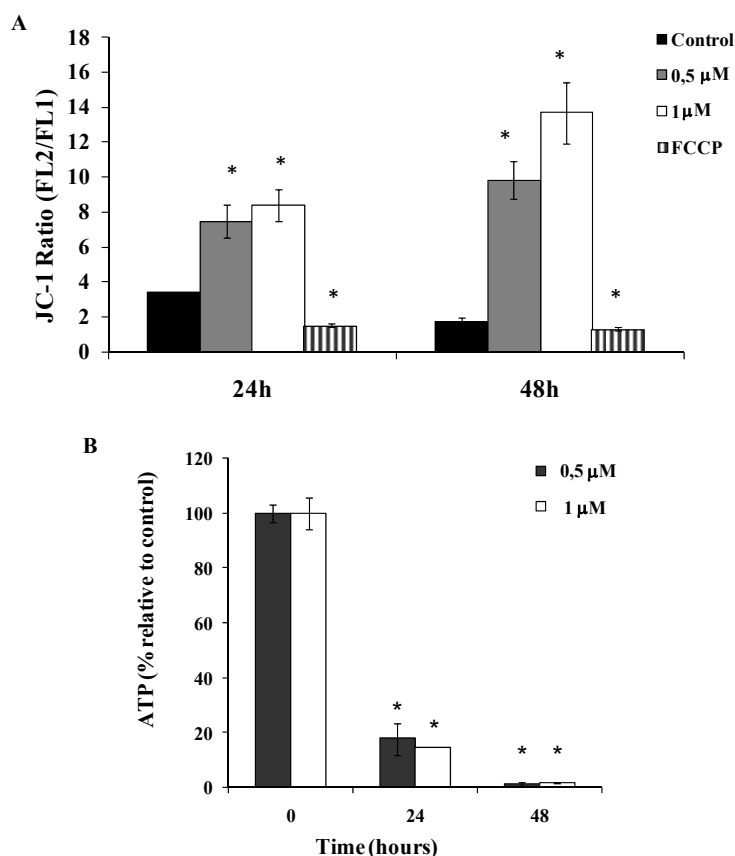


Figure 5.8. Effects of **VGP-106** in $\Delta\Psi_m$ (A) and in the intracellular ATP level (B) of *L. donovani* promastigotes. Data are means \pm SD of three independent experiments. Significant differences were determined by Student's *t*-test ($*p < 0.01$).

The decrease of $\Delta\Psi_m$ induced in *Leishmania* by a variety of drug treatments has been associated with reactive oxygen species (ROS) production, which induces damage to the components of the electron transport chain, disrupts mitochondrial function, decreases cellular ATP levels, and produces cell death.¹⁶⁷ The generation of mitochondrial ROS was measured using the cell probe MitoSOX Red, which targets mitochondria selectively, being oxidized by local superoxide. **VGP-106** produces an increase in ROS time and concentration dependent (Figure 5.9A).

Mitochondrial damage is associated not only with ROS production, but also with variation in intracellular calcium homeostasis. Promastigotes treated with 30 μM of **VGP-106** showed an increased cytosolic Ca^{2+} levels compared with untreated control parasites. To ascertain the source of the Ca^{2+} responsible of this effect, the experiment was repeated in the presence of EGTA to rule out the entry of external Ca^{2+} . Under these conditions the fluorescence decrease was reduced, evidencing that **VGP-106** increases the entry of external Ca^{2+} (Figure 5.9B).

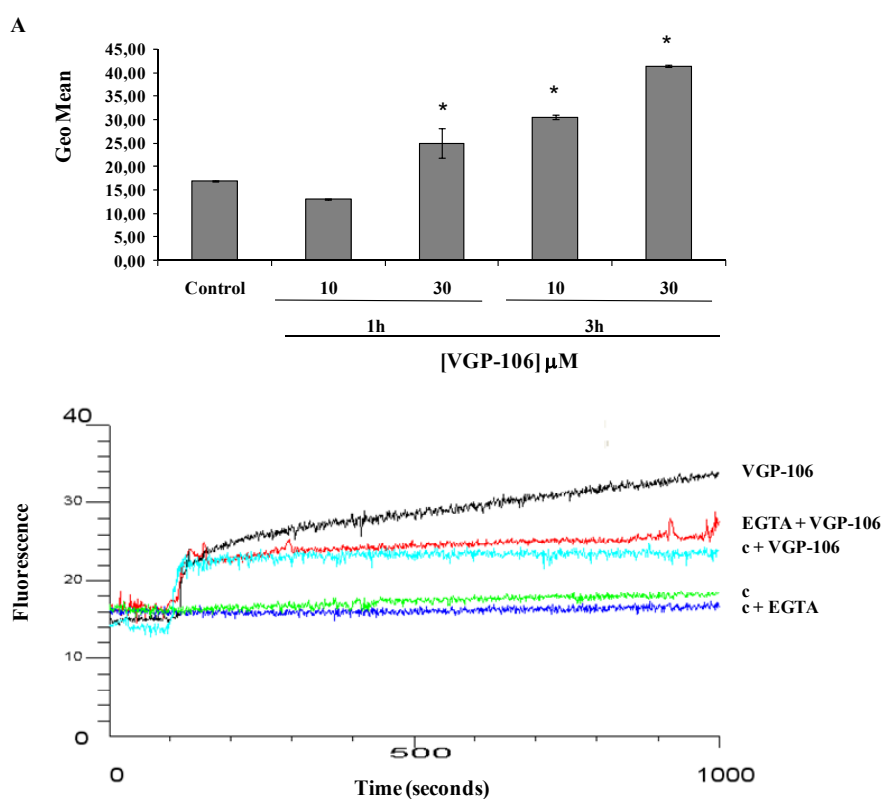


Figure 5.9. VGP-106 increases ROS levels (A) and cytosolic Ca^{2+} levels (B). Data are means \pm SD of three independent experiments. Significant differences were determined by Student's *t*-test ($*p < 0.01$).

In order to know the mechanism of cell death produced by the compound **VGP-106**, we have investigated if the compound produces DNA fragmentation, a key feature of apoptosis. We determined the hypodiploid DNA content in parasites by monitorization PI fluorescence using flow cytometry. After incubating parasites with 10 and 30 μM of **VGP-106** during 24 and 48 h, there were no important differences in the percentage of parasites having DNA in subG₁ phase (Table 5.4), indicating that there is no DNA fragmentation. By contrast, the data are consistent with an unprogrammed cell death, in which the destruction of the parasite occurs with consequent loss of the DNA into the medium, so no fragmentation is detected.

Table 5.4. VGP-106 effect on DNA fragmentation quantified by measuring the percentage of cells in the sub-G₁ DNA region.

	Control	24h		48h	
		0.5 μM	1 μM	0.5 μM	1 μM
% Cell in subG ₁	4.1	6.8	7.2	11.0	14.8

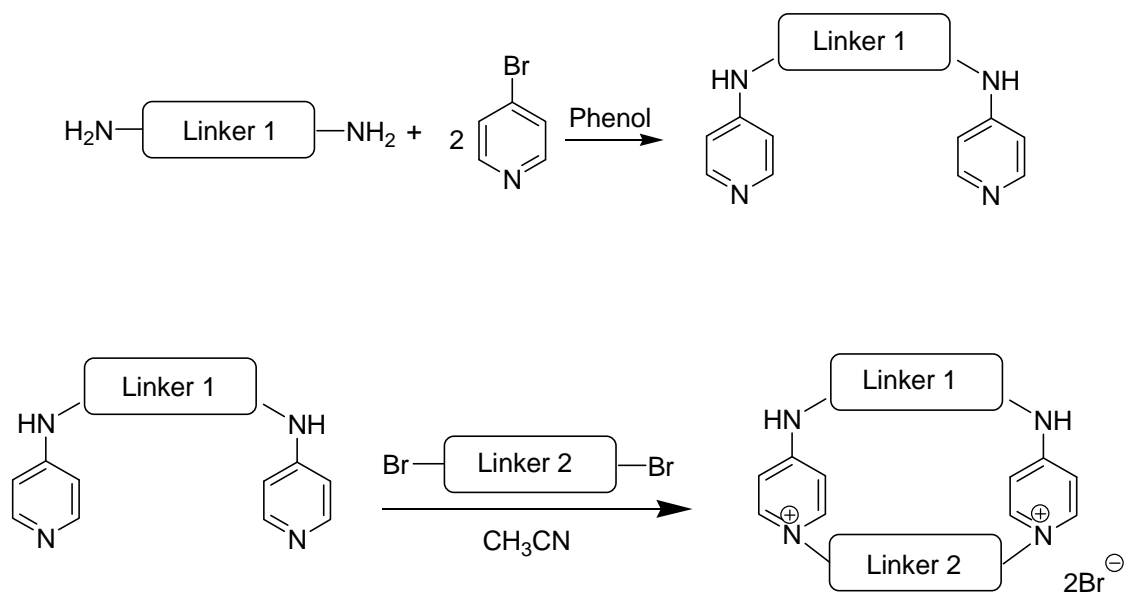
Data are representative of three independent determinations.

5.3.2. Bispyridinic Cyclophanes.

5.3.2.1. Chemistry.

A series of 9 biscyclophane derivatives were synthesized. They are symmetrical bispyridinium compounds which differ from each other in upper and lower spacers. 4 different spacers have been used: two are benzene rings substituted by two methyl groups in *para* or *meta* positions, and the other two spacers are aliphatic, such as the 1,5-pentanediy and 3-oxa-1,5-pentanediy moieties.

The cyclophanes were synthesized according to Scheme 5.2. The dipyrindines were prepared from the commercially available diamines and 4-bromopyridine in the presence of phenol. Dipyrindines react with a solution of the dibromide to obtain the final compounds **VGP-222**, **VGP-234**, **VGP-310**, **VGP-312**, **VGP-318**, **VGP-328**, **VGP-334**, **VGP-340** and **VGP-352**.



Scheme 5.2. General synthesis of final bispyridinic cyclophanes.

Compound	Linker 1	Linker 2
VGP-222		
VGP-234		
VGP-310		
VGP-312		
VGP-318		
VGP-328		
VGP-334		
VGP-340		
VGP-352		

5.3.2.2. Biological assays.

5.3.2.2.1. Antiproliferative activity.

The effects of the synthesized compounds on cell proliferation were studied on the breast cancer MCF-7 cells. With the exception of compounds **VGP-318** and **VGP-328**, with IC_{50} values of $35.8 \pm 7.1 \mu\text{M}$ and $29.1 \pm 3.4 \mu\text{M}$, all compounds show IC_{50} values above $100 \mu\text{M}$ suggesting that such cyclic structures are not potential drugs as antiproliferative agents.

5.3.2.2.2. Antileishmanial activity.

Final bicyclophanic compounds have been tested as leishmanicidal agents against *L. donovani* and *L. major*. All compounds show antileishmanial activity against promastigotes and intracellular amastigotes of both species, being more potent against *L. major* (Table 5.5).

Table 5.5. Antileishmanial activity against promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania* and cellular toxicity of final bispyridinic cyclophanes.

Compound	IC_{50} promastigotes (μM)		IC_{50} intracellular amastigotes (μM)		Cellular toxicity IC_{50} (μM)
	<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>	
VGP-222	16.84 ± 1.20	51.97 ± 1.97	5.94 ± 0.93	13.53 ± 1.40	191.90 ± 8.12
VGP-234	5.97 ± 0.35	33.77 ± 4.68	8.67 ± 1.04	8.92 ± 1.96	195.17 ± 6.41
VGP-310	0.17 ± 0.01	26.41 ± 1.28	0.97 ± 0.27	38.33 ± 1.74	165.06 ± 21.29
VGP-312	26.48 ± 2.44	76.87 ± 11.59	17.15 ± 1.50	63.67 ± 5.21	221.89 ± 8.27
VGP-318	0.07 ± 0.004	25.25 ± 0.83	1.26 ± 0.30	7.62 ± 0.16	154.07 ± 5.95
VGP-328	2.87 ± 0.36	76.27 ± 4.96	1.61 ± 0.35	21.25 ± 2.03	194.41 ± 2.95
VGP-334	0.26 ± 0.02	31.47 ± 2.53	2.59 ± 0.23	33.19 ± 0.57	162.44 ± 6.07
VGP-340	0.19 ± 0.009	23.43 ± 0.57	2.24 ± 0.35	20.72 ± 1.07	128.22 ± 9.78
VGP-352	0.26 ± 0.007	31.41 ± 3.02	2.18 ± 0.05	12.95 ± 1.86	214.65 ± 13.80
Anfotericina B	0.32 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.001	0.28 ± 0.13	14.32 ± 4.10
Miltefosina	16.65 ± 1.23	6.60 ± 1.57	10.61 ± 0.89	0.88 ± 0.14	26.86 ± 3.08

Data are means \pm SD of three independent experiments.

To further investigate the mechanism of action in *Leishmania*, **VGP-318** was chosen as representative compound.

The sensitivity of parasites over-expressing CEK and EK enzymes to compound **VGP-318** was tested both in promastigotes and in intracellular amastigotes. There are no significant differences between the IC₅₀s of transfected parasites and control parasites (Table 5.6), indicating that the mechanism of action of this compound in *Leishmania* is independent of CEK and EK enzymes.

Table 5.6. Sensitivity of *Leishmania* lines to compound **VGP-318**.

Compound	IC ₅₀ promastigotes (μM)			IC ₅₀ amastigotes (μM)		
	pXG	pXG-CEK	pXG-EK	pXG	pXG-CEK	pXG-EK
VGP-318	13.5 ± 0.32	11.51 ± 0.52	12.04 ± 0.42	8.84 ± 0.18	12.7 ± 2.03	10.54 ± 1.42
Miltefosine	6.60 ± 0.57	9.42 ± 0.89	10.33 ± 1.12	2.11 ± 0.15	3.74 ± 0.26	4.55 ± 0.51

Data are means ± SD of three independent experiments.

To study the effect of compound **VGP-318** on the energetic metabolism of parasites, we first analyze the effect of this compound in the intracellular ATP levels of *Leishmania* promastigotes using a bioluminescence assay. **VGP-318** decrease ATP in a concentration dependent manner in *L. major* (Figure 5.10A). Mitochondrial oxidative phosphorylation is the main source of ATP in *Leishmania* parasites.⁷⁶ To determine whether intracellular ATP decay was associated with an effect of **VGP-318** on the mitochondria, the variation of its electrochemical potential was monitored in parasites incubated with **VGP-318**. Parasites incubated for 1 hour with 0.2 μM of **VGP-318** showed a significant decrease of JC-1 ratio compared with untreated parasites (Figure 5.10C), evidencing a depolarization of the mitochondrial potential. FCCP (10 μM) was used as a positive depolarization control.

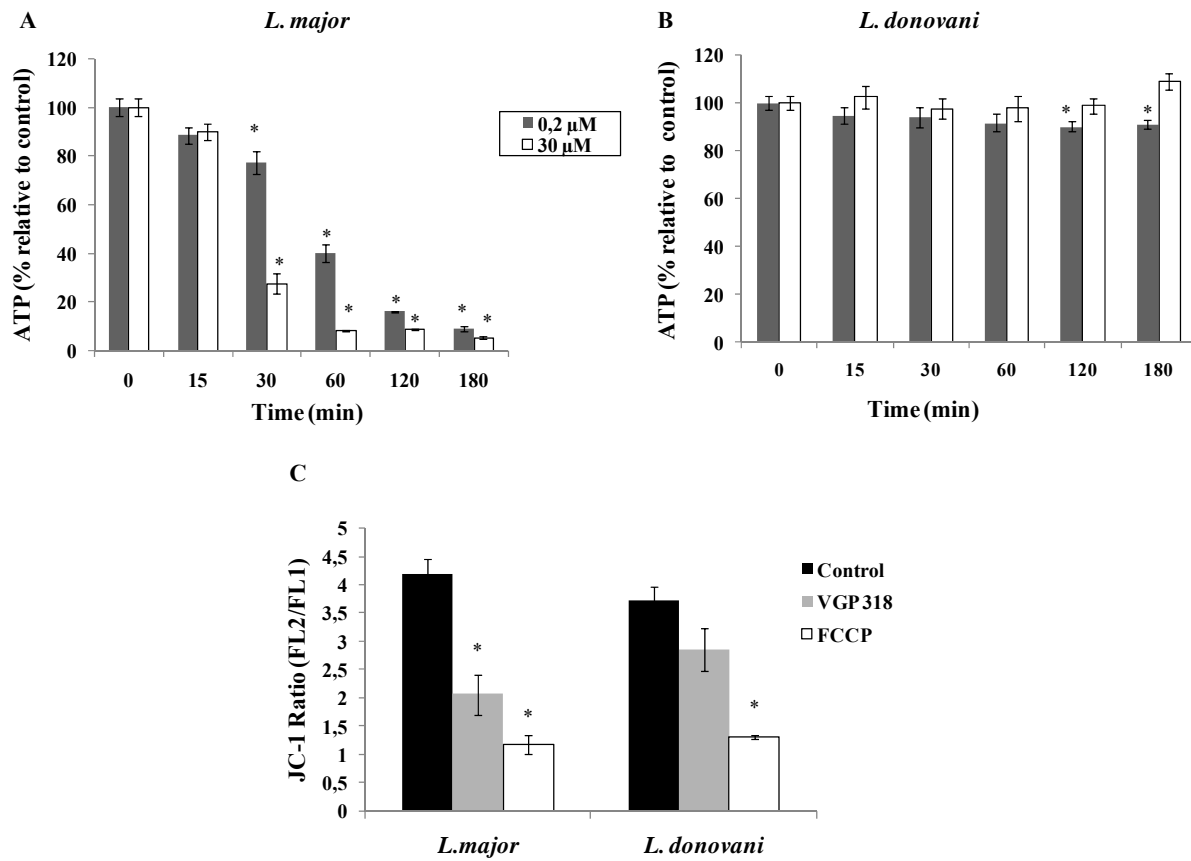


Figure 5.10. Effect of **VGP-318** in the intracellular ATP levels of *L. major* (A) and *L. donovani* (B) and in the mitochondrial potential of *Leishmania* (C). Data are means \pm SD of three independent experiments. Significant differences were determined by Student's *t*-test ($*p < 0.01$).

6. CONCLUSIONES

6. Conclusiones.

1. Se han sintetizado 10 compuestos piridofanos y quinolinofanos acíclicos biscatiónicos, que constan de un espaciador y diversas cabezas catiónicas. En todos los casos se han utilizado como cabezas catiónicas restos de piridinio o quinolinio sustituidos en posición 4 por grupos dadores de electrones, tales como grupos aminos terciarios o secundarios.

2. Se han sintetizado 9 compuestos ciclopiridofanos que pueden considerarse análogos rígidos de los anteriores, con un espaciador superior, que une los dos grupos aminos exocíclicos y otro inferior, que une los nitrógenos cargados positivamente. Al menos uno de los dos espaciadores es una estructura alifática, tales como restos alcánicos u oxialcánicos.

3. Todos los compuestos bispiridínicos acíclicos presentan actividad antiproliferativa frente a las líneas de adenocarcinoma de mama humano SKBR-3 y MCF-7, con unos valores de CI_{50} entre 1 y 10 μM . Los compuestos derivados de quinolinio presentan una mayor actividad antiproliferativa que los derivados de piridinio.

4. Tanto los compuestos bispiridínicos como los bisquinólinicos acíclicos inhiben a la enzima colina quinasa humana mediante un mecanismo de inhibición mixto predominantemente competitivo.

5. Todos los compuestos bispiridínicos finales sintetizados presentan actividad frente a formas promastigotas y formas amastigotas intracelulares de los protozoos parásitos *Leishmania donovani* y *Leishmania major*.

6. La mayoría de los compuestos acíclicos presentan un comportamiento similar en ambas especies, siendo ligeramente más activos frente a formas amastigotas de *Leishmania major*. Sin embargo, los compuestos **VGP-106** y **VGP-118**, que tienen como cabeza catiónica el resto de 4-(4-bromo-*N*-metilnilino)piridinio, presentan una actividad significativamente mayor frente a *Leishmania donovani*.

7. Todos los compuestos ciclopiridofánicos son más activos frente a formas promastigotas y formas amastigotas de *Leishmania major* que frente a *Leishmania donovani*.

8. La actividad leishmanicida de los compuestos bispiridínicos cíclicos y acíclicos es independiente de las enzimas de *Leishmania* etanolamina quinasa y colina/etanolamina quinasa.

9. El compuesto acíclico **VGP-106** entra en *Leishmania* mediante un proceso de difusión pasiva. Una vez dentro, se acumula en la mitocondria provocando un aumento de la misma y alterando el potencial de membrana mitocondrial. Además, produce un aumento de los niveles de calcio intracelular y de las especies reactivas de oxígeno mitocondriales. Como consecuencia, el compuesto provoca la muerte del parásito por necrosis.

10. El compuesto **VGP-318** es el más activo de la serie de los ciclopiridofanos frente a formas promastigotes y amastigotes de *Leishmania major*. El compuesto actúa a nivel mitocondrial provocando una despolarización de la membrana mitocondrial y una disminución de los niveles de ATP del parásito.

11. Los compuestos ciclopiridofánicos presentan únicamente actividad leishmanicida, aunque con una potencia menor que los derivados acíclicos. Estos últimos muestran además actividad antiproliferativa frente a las líneas de adenocarcinoma de mama humano SKBR-3 y MCF-7.

12. Todos los compuestos ciclopiridofánicos presentan muy baja toxicidad frente a células de mamíferos THP-1 y un margen de seguridad superior en algunos casos al de los fármacos leishmanicidas anfotericina B y miltefosina. Sin embargo, los derivados acíclicos presentan una variabilidad en la toxicidad con respecto a los compuestos de referencia anteriores.

Conclusions.

1. Ten new symmetrical bispyridinium and bisquinolinium acyclic structures have been synthesized. They are biscationic skeletons which contain a linker and 4-substituted cyclic or acyclic amino groups in the two cationic heads.

2. Nine new symmetrical bispyridinium cyclophanes have been synthesized. They are rigid derivatives with an upper spacer which joins the two exocyclic amino groups, and a lower spacer joining the two positively charged nitrogen atoms. At least one of the two spacers is an aliphatic linker, such as an alkane or oxialkane fragment.

3. All the bispyridinium acyclic compounds show antiproliferative activity against the human breast cancer SKBR-3 and MCF-7 cell lines, with IC_{50} values ranging from 1 to 10 μ M. The bisquinolinium derivatives display higher antiproliferative activity than the bispyridinium counterparts.

4. Both bispyridinium and bisquinolinium acyclic scaffolds inhibit the human choline kinase enzyme, exhibiting a mixed inhibition pattern with a predominantly competitive component.

5. All the targeted bispyridinium salts show activity against promastigotes and intracellular amastigotes of the protozoan parasites *Leishmania donovani* and *Leishmania major*.

6. Most acyclic compounds show a similar behaviour in both species, being slightly more active against *Leishmania major* amastigotes. However **VGP-106** and **VGP-118**, which

have the 4-(4-bromo-*N*-methylaniline)pyridinium as cationic heads, exhibit significantly higher activity against *Leishmania donovani*.

7. All the cyclophanes are more active against promastigotes and amastigotes of *Leishmania major* than *Leishmania donovani*.

8. The antileishmanial activity of the macrocyclic and acyclic bisquaternary salts is independent of the *Leishmania* enzymes ethanolamine kinase and choline/ethanolamine kinase.

9. The acyclic form **VGP-106** crosses the plasma membrane of *Leishmania* by a diffusion process. Once inside the parasite, it is accumulated in the mitochondria producing swelling and hyperpolarization of the mitochondrial membrane. It furthermore increases the intracellular calcium levels and the mitochondrial reactive oxygen species. As a result the compound kills the parasite by necrosis.

10. **VGP-318** is the most active compound among the cyclophane derivatives against promastigotes and amastigotes of *Leishmania major*. This compound acts at the mitochondria, producing depolarization of the mitochondrial membrane and a decrease in the ATP levels of the parasite.

11. Cyclopyridophanes display only antileishmanial activity although with a lower potency than the acyclic derivatives. These latter derivatives exhibit antiproliferative activity against the human breast cancer SKBR-3 and MCF-7 lines.

12. All cyclophanes exhibit very low toxicity against mammalian cells THP-1 and some of them evince a higher safety margin than well-known antileishmanial drugs such as amphotericin B and miltefosine. However, the acyclic compounds demonstrate a variable toxicity in relation to the previous reference compounds.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

1. <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es/> Definición de cáncer. Instituto Nacional del Cáncer.
2. Ferlay, J.; Parkin, D. M.; Steliarova-Foucher, E., Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* **2010**, 46, (4), 765-81.
3. DeVita, V. T., Jr.; Rosenberg, S. A., Two hundred years of cancer research. *N Engl J Med* **2012**, 366, (23), 2207-14.
4. Byers, T.; Barrera, E.; Fontham, E. T.; Newman, L. A.; Runowicz, C. D.; Sener, S. F.; Thun, M. J.; Winborn, S.; Wender, R. C., A midpoint assessment of the American Cancer Society challenge goal to halve the U.S. cancer mortality rates between the years 1990 and 2015. *Cancer* **2006**, 107, (2), 396-405.
5. 'The global burden of disease: 2004 update'; World Health Organization: **2008**, 144(5):646-674.
6. Perry, A. S.; Watson, R. W.; Lawler, M.; Hollywood, D., The epigenome as a therapeutic target in prostate cancer. *Nat Rev Urol* **2010**, 7, (12), 668-80.
7. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, 144, (5), 646-74.
8. Bhakoo, K. K.; Williams, I. T.; Williams, S. R.; Gadian, D. G.; Noble, M. D., Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of primary cells derived from nervous tissue. *J Neurochem* **1996**, 66, (3), 1254-63.
9. Ronen, S. M.; Jackson, L. E.; Belouèche, M.; Leach, M. O., Magnetic resonance detects changes in phosphocholine associated with Ras activation and inhibition in NIH 3T3 cells. *Br J Cancer* **2001**, 84, (5), 691-6.
10. Kennedy, E. P., Metabolism of lipides. *Annu Rev Biochem* **1957**, 26, 119-48.

11. Gallego-Ortega, D.; Gomez del Pulgar, T.; Valdes-Mora, F.; Cebrian, A.; Lacal, J. C., Involvement of human choline kinase alpha and beta in carcinogenesis: a different role in lipid metabolism and biological functions. *Adv Enzyme Regul* **2011**, 51, (1), 183-94.
12. Glunde, K.; Bhujwala, Z. M.; Ronen, S. M., Choline metabolism in malignant transformation. *Nat Rev Cancer* **2011**, 11, (12), 835-48.
13. Cuadrado, A.; Carnero, A.; Dolfi, F.; Jimenez, B.; Lacal, J. C., Phosphorylcholine: a novel second messenger essential for mitogenic activity of growth factors. *Oncogene* **1993**, 8, (11), 2959-68.
14. Price, B. D.; Morris, J. D.; Marshall, C. J.; Hall, A., Stimulation of phosphatidylcholine hydrolysis, diacylglycerol release, and arachidonic acid production by oncogenic ras is a consequence of protein kinase C activation. *J Biol Chem* **1989**, 264, (28), 16638-43.
15. Aoyama, C.; Liao, H.; Ishidate, K., Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells. *Prog Lipid Res* **2004**, 43, (3), 266-81.
16. Gee, P.; Kent, C., Multiple isoforms of choline kinase from *Caenorhabditis elegans*: cloning, expression, purification, and characterization. *Biochim Biophys Acta* **2003**, 1648, (1-2), 33-42.
17. Aoyama, C.; Ohtani, A.; Ishidate, K., Expression and characterization of the active molecular forms of choline/ethanolamine kinase-alpha and -beta in mouse tissues, including carbon tetrachloride-induced liver. *Biochem J* **2002**, 363, (Pt 3), 777-84.
18. Gallego-Ortega, D.; Ramirez de Molina, A.; Ramos, M. A.; Valdes-Mora, F.; Barderas, M. G.; Sarmentero-Estrada, J.; Lacal, J. C., Differential role of human choline kinase alpha and beta enzymes in lipid metabolism: implications in cancer onset and treatment. *PLoS One* **2009**, 4, (11), e7819.
19. Wu, G.; Aoyama, C.; Young, S. G.; Vance, D. E., Early embryonic lethality caused by disruption of the gene for choline kinase alpha, the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis. *J Biol Chem* **2008**, 283, (3), 1456-62.
20. Sher, R. B.; Aoyama, C.; Huebsch, K. A.; Ji, S.; Kerner, J.; Yang, Y.; Frankel, W. N.; Hoppel, C. L.; Wood, P. A.; Vance, D. E.; Cox, G. A., A rostrocaudal muscular dystrophy caused by a defect in choline kinase beta, the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis. *J Biol Chem* **2006**, 281, (8), 4938-48.
21. Peisach, D.; Gee, P.; Kent, C.; Xu, Z., The crystal structure of choline kinase reveals a eukaryotic protein kinase fold. *Structure* **2003**, 11, (6), 703-13.

22. Malito, E.; Sekulic, N.; Too, W. C.; Konrad, M.; Lavie, A., Elucidation of human choline kinase crystal structures in complex with the products ADP or phosphocholine. *J Mol Biol* **2006**, 364, (2), 136-51.
23. Lacal, J. C., Diacylglycerol production in *Xenopus laevis* oocytes after microinjection of p21ras proteins is a consequence of activation of phosphatidylcholine metabolism. *Mol Cell Biol* **1990**, 10, (1), 333-40.
24. Lacal, J. C.; Moscat, J.; Aaronson, S. A., Novel source of 1,2-diacylglycerol elevated in cells transformed by Ha-ras oncogene. *Nature* **1987**, 330, (6145), 269-72.
25. Ramirez de Molina, A.; Penalva, V.; Lucas, L.; Lacal, J. C., Regulation of choline kinase activity by Ras proteins involves Ral-GDS and PI3K. *Oncogene* **2002**, 21, (6), 937-46.
26. Jimenez, B.; del Peso, L.; Montaner, S.; Esteve, P.; Lacal, J. C., Generation of phosphorylcholine as an essential event in the activation of Raf-1 and MAP-kinases in growth factors-induced mitogenic stimulation. *J Cell Biochem* **1995**, 57, (1), 141-9.
27. Kiss, Z.; Chung, T., Choline phosphate and phorbol ester potentiate the mitogenic effect of insulin by competitive mechanisms in NIH 3T3 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**, 218, (2), 505-9.
28. Ramirez de Molina, A.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Gutierrez, R.; Martinez-Pineiro, L.; Sanchez, J.; Bonilla, F.; Rosell, R.; Lacal, J., Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**, 296, (3), 580-3.
29. Nakagami, K.; Uchida, T.; Ohwada, S.; Koibuchi, Y.; Suda, Y.; Sekine, T.; Morishita, Y., Increased choline kinase activity and elevated phosphocholine levels in human colon cancer. *Jpn J Cancer Res* **1999**, 90, (4), 419-24.
30. Ramirez de Molina, A.; Gutierrez, R.; Ramos, M. A.; Silva, J. M.; Silva, J.; Bonilla, F.; Sanchez, J. J.; Lacal, J. C., Increased choline kinase activity in human breast carcinomas: clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. *Oncogene* **2002**, 21, (27), 4317-22.
31. Ramirez de Molina, A.; Sarmentero-Estrada, J.; Belda-Iniesta, C.; Taron, M.; Ramirez de Molina, V.; Cejas, P.; Skrzypski, M.; Gallego-Ortega, D.; de Castro, J.; Casado, E.; Garcia-Cabezas, M. A.; Sanchez, J. J.; Nistal, M.; Rosell, R.; Gonzalez-Baron, M.; Lacal, J. C., Expression of choline kinase alpha to predict outcome in patients with early-stage non-small-cell lung cancer: a retrospective study. *Lancet Oncol* **2007**, 8, (10), 889-97.

- 32.** Kenny, L. M.; Contractor, K. B.; Hinz, R.; Stebbing, J.; Palmieri, C.; Jiang, J.; Shousha, S.; Al-Nahhas, A.; Coombes, R. C.; Aboagye, E. O., Reproducibility of [11C]choline-positron emission tomography and effect of trastuzumab. *Clin Cancer Res* **2010**, 16, (16), 4236-45.
- 33.** Lacal, J. C., Choline kinase: a novel target for antitumor drugs. *IDrugs* **2001**, 4, (4), 419-26.
- 34.** Rodriguez-Gonzalez, A.; Ramirez de Molina, A.; Fernandez, F.; Ramos, M. A.; del Carmen Nunez, M.; Campos, J.; Lacal, J. C., Inhibition of choline kinase as a specific cytotoxic strategy in oncogene-transformed cells. *Oncogene* **2003**, 22, (55), 8803-12.
- 35.** Rodriguez-Gonzalez, A.; Ramirez de Molina, A.; Banez-Coronel, M.; Megias, D.; Lacal, J. C., Inhibition of choline kinase renders a highly selective cytotoxic effect in tumour cells through a mitochondrial independent mechanism. *Int J Oncol* **2005**, 26, (4), 999-1008.
- 36.** Glunde, K.; Raman, V.; Mori, N.; Bhujwalla, Z. M., RNA interference-mediated choline kinase suppression in breast cancer cells induces differentiation and reduces proliferation. *Cancer Res* **2005**, 65, (23), 11034-43.
- 37.** Banez-Coronel, M.; Ramirez de Molina, A.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Sarmentero, J.; Ramos, M. A.; Garcia-Cabezas, M. A.; Garcia-Oroz, L.; Lacal, J. C., Choline kinase alpha depletion selectively kills tumoral cells. *Curr Cancer Drug Targets* **2008**, 8, (8), 709-19.
- 38.** Gruber, J.; See Too, W. C.; Wong, M. T.; Lavie, A.; McSorley, T.; Konrad, M., Balance of human choline kinase isoforms is critical for cell cycle regulation: implications for the development of choline kinase-targeted cancer therapy. *Febs J* **2012**, 279, (11), 1915-28.
- 39.** Clary, G. L.; Tsai, C. F.; Guynn, R. W., Substrate specificity of choline kinase. *Arch Biochem Biophys* **1987**, 254, (1), 214-21.
- 40.** Ishidate, K.; Nakazawa, Y., Choline/ethanolamine kinase from rat kidney. *Methods Enzymol* **1992**, 209, 121-34.
- 41.** Cannon, J. G., Structure-activity aspects of hemicholinium-3 (HC-3) and its analogs and congeners. *Med Res Rev* **1994**, 14, (5), 505-31.
- 42.** Schnall, S.F. and MacDonald, J.S. *Manual of Oncologic Therapeutics*, J.B. Lippincott, Philadelphia, **1995**, 170-184.

43. Hernandez-Alcoceba, R.; Saniger, L.; Campos, J.; Nunez, M. C.; Khaless, F.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Lacal, J. C., Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design. *Oncogene* **1997**, 15, (19), 2289-301.
44. Campos, J.; Nunez, M. C.; Conejo-Garcia, A.; Sanchez-Martin, R. M.; Hernandez-Alcoceba, R.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Lacal, J. C.; Gallo, M. A.; Espinosa, A., QSAR-derived choline kinase inhibitors: how rational can antiproliferative drug design be? *Curr Med Chem* **2003**, 10, (13), 1095-112.
45. Campos, J.; Nunez, M. C.; Rodriguez, V.; Gallo, M. A.; Espinosa, A., QSAR of 1,1'-(1,2-ethylenebisbenzyl)bis(4-substitutedpyridinium) dibromides as choline kinase inhibitors: a different approach for antiproliferative drug design. *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, 10, (8), 767-70.
46. Conejo-Garcia, A.; Banez-Coronel, M.; Sanchez-Martin, R. M.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Ramos, A.; Ramirez de Molina, A.; Espinosa, A.; Gallo, M. A.; Campos, J. M.; Lacal, J. C., Influence of the linker in bispyridinium compounds on the inhibition of human choline kinase. *J Med Chem* **2004**, 47, (22), 5433-40.
47. Sanchez-Martin, R.; Campos, J. M.; Conejo-Garcia, A.; Cruz-Lopez, O.; Banez-Coronel, M.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Gallo, M. A.; Lacal, J. C.; Espinosa, A., Symmetrical bis-quinolinium compounds: new human choline kinase inhibitors with antiproliferative activity against the HT-29 cell line. *J Med Chem* **2005**, 48, (9), 3354-63.
48. Conejo-Garcia, A.; Campos, J.; Sanchez, R. M.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Lacal, J. C.; Gallo, M. A.; Espinosa, A., Choline kinase inhibitory effect and antiproliferative activity of new 1,1',1''-(benzene-1,3,5-triylmethylene)tris[4-[(disubstituted)amino]pyridinium] tribromides. *Eur J Med Chem* **2003**, 38, (1), 109-16.
49. Conejo-Garcia, A.; Campos, J. M.; Sanchez-Martin, R. M.; Gallo, M. A.; Espinosa, A., Bispyridinium cyclophanes: novel templates for human choline kinase inhibitors. *J Med Chem* **2003**, 46, (17), 3754-7.
50. Conejo-Garcia, A.; Campos, J. M.; Entrena, A.; Sanchez-Martin, R. M.; Gallo, M. A.; Espinosa, A., Conformational dynamics of a bispyridinium cyclophane. *J Org Chem* **2003**, 68, (22), 8697-9.
51. Campos, J. M.; Sanchez-Martin, R. M.; Conejo-Garcia, A.; Entrena, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A., (Q)SAR studies to design new human choline kinase inhibitors as antiproliferative drugs. *Curr Med Chem* **2006**, 13, (11), 1231-48.
52. Rubio-Ruiz, B.; Conejo-Garcia, A.; Rios-Marco, P.; Carrasco-Jimenez, M. P.; Segovia, J.; Marco, C.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Entrena, A., Design, synthesis, theoretical

calculations and biological evaluation of new non-symmetrical choline kinase inhibitors. *Eur J Med Chem* **2012**, 50, 154-62.

53. Hamza, M.; Lloveras, J.; Ribbes, G.; Soula, G.; Douste-Blazy, L., An in vitro study of hemicholinium-3 on phospholipid metabolism of Krebs II ascites cells. *Biochem Pharmacol* **1983**, 32, (12), 1893-7.

54. Yuan, C.; Kent, C., Identification of critical residues of choline kinase A2 from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **2004**, 279, (17), 17801-9.

55. Milanese, L.; Espinosa, A.; Campos, J. M.; Gallo, M. A.; Entrena, A., Insight into the inhibition of human choline kinase: homology modeling and molecular dynamics simulations. *ChemMedChem* **2006**, 1, (11), 1216-28.

56. Hong, B. S.; Allali-Hassani, A.; Tempel, W.; Finerty, P. J., Jr.; Mackenzie, F.; Dimov, S.; Vedadi, M.; Park, H. W., Crystal structures of human choline kinase isoforms in complex with hemicholinium-3: single amino acid near the active site influences inhibitor sensitivity. *J Biol Chem* **2010**, 285, (21), 16330-40.

57. Hudson, C. S.; Knegt, R. M.; Brown, K.; Charlton, P. A.; Pollard, J. R., Kinetic and mechanistic characterisation of Choline Kinase-alpha. *Biochim Biophys Acta* **2013**, 1834, (6), 1107-1116.

58. Zhang, X.; Zhang, S.; Yamane, H.; Wahl, R.; Ali, A.; Lofgren, J. A.; Kendall, R. L., Kinetic mechanism of AKT/PKB enzyme family. *J Biol Chem* **2006**, 281, (20), 13949-56.

59. Sahun-Roncero, M.; Rubio-Ruiz, B.; Saladino, G.; Conejo-Garcia, A.; Espinosa, A.; Velazquez-Campoy, A.; Gervasio, F. L.; Entrena, A.; Hurtado-Guerrero, R., The Mechanism of Allosteric Coupling in Choline Kinase alpha1 Revealed by the Action of a Rationally Designed Inhibitor. *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, 52, (17), 4582-6.

60. Alvar, J.; Velez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den Boer, M., Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* **2012**, 7, (5), e35671.

61. Alvar, J.; Aparicio, P.; Aseffa, A.; Den Boer, M.; Canavate, C.; Dedet, J. P.; Gradoni, L.; Ter Horst, R.; Lopez-Velez, R.; Moreno, J., The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* **2008**, 21, (2), 334-59, table of contents.

62. Grimaldi, G., Jr.; Tesh, R. B.; McMahon-Pratt, D., A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* **1989**, 41, (6), 687-725.

63. Walton, B. C., Leishmaniasis. A worldwide problem. *Int J Dermatol* **1989**, 28, (5), 305-7.
64. Besteiro, S.; Williams, R. A.; Coombs, G. H.; Mottram, J. C., Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* **2007**, 37, (10), 1063-75.
65. www.dpd.cdc.gov/dpdx
66. Van Griensven, J.; Balasegaram, M.; Meheus, F.; Alvar, J.; Lynen, L.; Boelaert, M., Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* **2010**, 10, (3), 184-94.
67. Miro, G.; Cardoso, L.; Pennisi, M. G.; Oliva, G.; Baneth, G., Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* **2008**, 24, (8), 371-7.
68. Ivens, A. C.; Peacock, C. S.; Worthey, E. A.; Murphy, L.; Aggarwal, G.; Berriman, M.; Sisk, E.; Rajandream, M. A.; Adlem, E.; Aert, R.; Anupama, A.; Apostolou, Z.; Attipoe, P.; Bason, N.; Bauser, C.; Beck, A.; Beverley, S. M.; Bianchetti, G.; Borzym, K.; Bothe, G.; Bruschi, C. V.; Collins, M.; Cadag, E.; Ciarloni, L.; Clayton, C.; Coulson, R. M.; Cronin, A.; Cruz, A. K.; Davies, R. M.; De Gaudenzi, J.; Dobson, D. E.; Duesterhoeft, A.; Fazelina, G.; Fosker, N.; Frasch, A. C.; Fraser, A.; Fuchs, M.; Gabel, C.; Goble, A.; Goffeau, A.; Harris, D.; Hertz-Fowler, C.; Hilbert, H.; Horn, D.; Huang, Y.; Klages, S.; Knights, A.; Kube, M.; Larke, N.; Litvin, L.; Lord, A.; Louie, T.; Marra, M.; Masuy, D.; Matthews, K.; Michaeli, S.; Mottram, J. C.; Muller-Auer, S.; Munden, H.; Nelson, S.; Norbertczak, H.; Oliver, K.; O'Neil, S.; Pentony, M.; Pohl, T. M.; Price, C.; Purnelle, B.; Quail, M. A.; Rabinowitsch, E.; Reinhardt, R.; Rieger, M.; Rinta, J.; Robben, J.; Robertson, L.; Ruiz, J. C.; Rutter, S.; Saunders, D.; Schafer, M.; Schein, J.; Schwartz, D. C.; Seeger, K.; Seyler, A.; Sharp, S.; Shin, H.; Sivam, D.; Squares, R.; Squares, S.; Tosato, V.; Vogt, C.; Volckaert, G.; Wambutt, R.; Warren, T.; Wedler, H.; Woodward, J.; Zhou, S.; Zimmermann, W.; Smith, D. F.; Blackwell, J. M.; Stuart, K. D.; Barrell, B.; Myler, P. J., The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **2005**, 309, (5733), 436-42.
69. Peacock, C. S.; Seeger, K.; Harris, D.; Murphy, L.; Ruiz, J. C.; Quail, M. A.; Peters, N.; Adlem, E.; Tivey, A.; Aslett, M.; Kerhornou, A.; Ivens, A.; Fraser, A.; Rajandream, M. A.; Carver, T.; Norbertczak, H.; Chillingworth, T.; Hance, Z.; Jagels, K.; Moule, S.; Ormond, D.; Rutter, S.; Squares, R.; Whitehead, S.; Rabinowitsch, E.; Arrowsmith, C.; White, B.; Thurston, S.; Bringaud, F.; Baldauf, S. L.; Faulconbridge, A.; Jeffares, D.; Depledge, D. P.; Oyola, S. O.; Hilley, J. D.; Brito, L. O.; Tosi, L. R.; Barrell, B.;

Cruz, A. K.; Mottram, J. C.; Smith, D. F.; Berriman, M., Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* **2007**, 39, (7), 839-47.

70. Donelson, J. E.; Gardner, M. J.; El-Sayed, N. M., More surprises from Kinetoplastida. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96, (6), 2579-81.

71. LeBowitz, J. H.; Smith, H. Q.; Rusche, L.; Beverley, S. M., Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* **1993**, 7, (6), 996-1007.

72. Simpson, L., The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol* **1987**, 41, 363-82.

73. Opperdoes, F. R.; Coombs, G. H., Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol* **2007**, 23, (4), 149-58.

74. Singh, N.; Kumar, M.; Singh, R. K., Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med* **2012**, 5, (6), 485-97.

75. Hart, D. T.; Coombs, G. H., *Leishmania mexicana*: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Exp Parasitol* **1982**, 54, (3), 397-409.

76. Tielens, A. G.; van Hellemond, J. J., Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. *Trends Parasitol* **2009**, 25, (10), 482-90.

77. Brun, R.; Krassner, S. M., Quantitative ultrastructural investigations of mitochondrial development in *Leishmania donovani* during transformation. *J Protozool* **1976**, 23, (4), 493-7.

78. Datta, A. K.; Datta, R.; Sen, B., Antiparasitic chemotherapy: tinkering with the purine salvage pathway. *Adv Exp Med Biol* **2008**, 625, 116-32.

79. Krauth-Siegel, R. L.; Comini, M. A., Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta* **2008**, 1780, (11), 1236-48.

80. Docampo, R.; de Souza, W.; Miranda, K.; Rohloff, P.; Moreno, S. N., Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol* **2005**, 3, (3), 251-61.

81. Beach, D. H.; Holz, G. G., Jr.; Anekwe, G. E., Lipids of *Leishmania* promastigotes. *J Parasitol* **1979**, 65, (2), 201-16.

82. Zufferey, R.; Mamoun, C. B., Choline transport in *Leishmania major* promastigotes and its inhibition by choline and phosphocholine analogs. *Mol Biochem Parasitol* **2002**, 125, (1-2), 127-34.

83. Zhang, K.; Beverley, S. M., Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **2010**, 170, (2), 55-64.

84. Yeo, H. J.; Larvor, M. P.; Ancelin, M. L.; Vial, H. J., Plasmodium falciparum CTP:phosphocholine cytidyltransferase expressed in Escherichia coli: purification, characterization and lipid regulation. *Biochem J* **1997**, 324 (Pt 3), 903-10.
85. Yeo, H. J.; Sri Widada, J.; Mercereau-Puijalon, O.; Vial, H. J., Molecular cloning of CTP:phosphocholine cytidyltransferase from Plasmodium falciparum. *Eur J Biochem* **1995**, 233, (1), 62-72.
86. Elabbadi, N.; Ancelin, M. L.; Vial, H. J., Phospholipid metabolism of serine in Plasmodium-infected erythrocytes involves phosphatidylserine and direct serine decarboxylation. *Biochem J* **1997**, 324 (Pt 2), 435-45.
87. Signorell, A.; Rauch, M.; Jelk, J.; Ferguson, M. A.; Butikofer, P., Phosphatidylethanolamine in Trypanosoma brucei is organized in two separate pools and is synthesized exclusively by the Kennedy pathway. *J Biol Chem* **2008**, 283, (35), 23636-44.
88. Gibellini, F.; Hunter, W. N.; Smith, T. K., The ethanolamine branch of the Kennedy pathway is essential in the bloodstream form of Trypanosoma brucei. *Mol Microbiol* **2009**, 73, (5), 826-43.
89. Ancelin, M. L.; Vial, H. J., Several lines of evidence demonstrating that Plasmodium falciparum, a parasitic organism, has distinct enzymes for the phosphorylation of choline and ethanolamine. *FEBS Lett* **1986**, 202, (2), 217-23.
90. Roberts, C. W.; McLeod, R.; Rice, D. W.; Ginger, M.; Chance, M. L.; Goad, L. J., Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* **2003**, 126, (2), 129-42.
91. Lorente, S. O.; Jimenez, C. J.; Gros, L.; Yardley, V.; de Luca-Fradley, K.; Croft, S. L.; J, A. U.; Ruiz-Perez, L. M.; Pacanowska, D. G.; Gilbert, I. H., Preparation of transition-state analogues of sterol 24-methyl transferase as potential anti-parasitics. *Bioorg Med Chem* **2005**, 13, (18), 5435-53.
92. Smirlis, D.; Duszenko, M.; Ruiz, A. J.; Scoulica, E.; Bastien, P.; Fasel, N.; Soteriadou, K., Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. *Parasit Vectors* **2010**, 3, 107.
93. Singh, R. K.; Pandey, H. P.; Sundar, S., Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *Indian J Med Res* **2006**, 123, (3), 331-44.
94. Ephros, M.; Bitnun, A.; Shaked, P.; Waldman, E.; Zilberstein, D., Stage-specific activity of pentavalent antimony against Leishmania donovani axenic amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, 43, (2), 278-82.

95. Zhou, Y.; Messier, N.; Ouellette, M.; Rosen, B. P.; Mukhopadhyay, R., Leishmania major LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. *J Biol Chem* **2004**, 279, (36), 37445-51.
96. Torres, D. C.; Aداui, V.; Ribeiro-Alves, M.; Romero, G. A.; Arevalo, J.; Cupolillo, E.; Dujardin, J. C., Targeted gene expression profiling in Leishmania braziliensis and Leishmania guyanensis parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes. *Infect Genet Evol* **2010**, 10, (6), 727-33.
97. Berman, J. D.; Gallalee, J. V.; Best, J. M., Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in Leishmania mexicana amastigotes. *Biochem Pharmacol* **1987**, 36, (2), 197-201.
98. Chakraborty, A. K.; Majumder, H. K., Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of Leishmania donovani. *Biochem Biophys Res Commun* **1988**, 152, (2), 605-11.
99. Wyllie, S.; Fairlamb, A. H., Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochem Pharmacol* **2006**, 71, (3), 257-67.
100. Sudhandiran, G.; Shaha, C., Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular Leishmania donovani amastigotes. *J Biol Chem* **2003**, 278, (27), 25120-32.
101. Thakur, C. P.; Narayan, S.; Ranjan, A., Epidemiological, clinical & pharmacological study of antimony-resistant visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Indian J Med Res* **2004**, 120, (3), 166-72.
102. Sundar, S., Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* **2001**, 6, (11), 849-54.
103. Croft, S. L.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H., Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* **2006**, 19, (1), 111-26.
104. Ashutosh; Sundar, S.; Goyal, N., Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania. *J Med Microbiol* **2007**, 56, (Pt 2), 143-53.
105. Carter, K. C.; Hutchison, S.; Henriquez, F. L.; Legare, D.; Ouellette, M.; Roberts, C. W.; Mullen, A. B., Resistance of Leishmania donovani to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite gamma-glutamylcysteine synthetase. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, 50, (1), 88-95.
106. Decuypere, S.; Rijal, S.; Yardley, V.; De Doncker, S.; Laurent, T.; Khanal, B.; Chappuis, F.; Dujardin, J. C., Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V)

resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, 49, (11), 4616-21.

107. Choudhury, K.; Zander, D.; Kube, M.; Reinhardt, R.; Clos, J., Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosine and SbIII. *Int J Parasitol* **2008**, 38, (12), 1411-23.

108. Singh, N.; Singh, R. T.; Sundar, S., Novel mechanism of drug resistance in kala azar field isolates. *J Infect Dis* **2003**, 188, (4), 600-7.

109. Bern, C.; Adler-Moore, J.; Berenguer, J.; Boelaert, M.; den Boer, M.; Davidson, R. N.; Figueras, C.; Gradoni, L.; Kafetzis, D. A.; Ritmeijer, K.; Rosenthal, E.; Royce, C.; Russo, R.; Sundar, S.; Alvar, J., Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* **2006**, 43, (7), 917-24.

110. Sundar, S.; Rai, M., Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* **2002**, 15, (6), 593-8.

111. Romero, E. A.; Valdivieso, E.; Cohen, B. E., Formation of two different types of ion channels by amphotericin B in human erythrocyte membranes. *J Membr Biol* **2009**, 230, (2), 69-81.

112. Ramos, H.; Valdivieso, E.; Gamargo, M.; Dagger, F.; Cohen, B. E., Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *J Membr Biol* **1996**, 152, (1), 65-75.

113. Berman, J. J., Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2008**, 4, (9), 1209-16.

114. Verma, N. K.; Dey, C. S., Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, 48, (8), 3010-5.

115. Paris, C.; Loiseau, P. M.; Bories, C.; Breard, J., Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, 48, (3), 852-9.

116. Sundar, S.; Chatterjee, M., Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* **2006**, 123, (3), 345-52.

117. Sundar, S.; Singh, A.; Rai, M.; Prajapati, V. K.; Singh, A. K.; Ostry, B.; Boelaert, M.; Dujardin, J. C.; Chakravarty, J., Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clin Infect Dis* **2012**, 55, (4), 543-50.

118. Cabrera-Serra, M. G.; Valladares, B.; Pinero, J. E., *In vivo* activity of perifosine against *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop* **2008**, 108, (1), 20-5.

- 119.** Avlonitis, N.; Lekka, E.; Detsi, A.; Koufaki, M.; Calogeropoulou, T.; Scoulica, E.; Siapi, E.; Kyrikou, I.; Mavromoustakos, T.; Tsotinis, A.; Grdadolnik, S. G.; Makriyannis, A., Antileishmanial ring-substituted ether phospholipids. *J Med Chem* **2003**, 46, (5), 755-67.
- 120.** Neal, R. A., The effect of antibiotics of the neomycin group on experimental cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* **1968**, 62, (1), 54-62.
- 121.** Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Sinha, P. K.; Bhattacharya, S. K., Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med* **2007**, 356, (25), 2571-81.
- 122.** Tracy W, Webster L. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infection. JH Hardman, LE Limbird A, Goodman G, editores. Goodman & Gilman's. *The pharmacological basis of therapeutics*, International Nueva York Mc Graw Hill, **2001**, 1097-1120.
- 123.** Ben Salah, A.; Buffet, P. A.; Morizot, G.; Ben Massoud, N.; Zaatour, A.; Ben Alaya, N.; Haj Hamida, N. B.; El Ahmadi, Z.; Downs, M. T.; Smith, P. L.; Dellagi, K.; Groggl, M., WR279,396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. *PLoS Negl Trop Dis* **2009**, 3, (5), e432.
- 124.** Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R. W.; Alvar, J.; Boelaert, M., Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* **2007**, 5, (11), 873-82.
- 125.** Maarouf, M.; Lawrence, F.; Croft, S. L.; Robert-Gero, M., Ribosomes of *Leishmania* are a target for the aminoglycosides. *Parasitol Res* **1995**, 81, (5), 421-5.
- 126.** Jhingran, A.; Chawla, B.; Saxena, S.; Barrett, M. P.; Madhubala, R., Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **2009**, 164, (2), 111-7.
- 127.** Maarouf, M.; Adeline, M. T.; Solognac, M.; Vautrin, D.; Robert-Gero, M., Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasite* **1998**, 5, (2), 167-73.
- 128.** Sundar, S.; Sinha, P. K.; Rai, M.; Verma, D. K.; Nawin, K.; Alam, S.; Chakravarty, J.; Vaillant, M.; Verma, N.; Pandey, K.; Kumari, P.; Lal, C. S.; Arora, R.; Sharma, B.; Ellis, S.; Strub-Wourgaft, N.; Balasegaram, M.; Olliaro, P.; Das, P.; Modabber, F., Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet* **2011**, 377, (9764), 477-86.

- 129.** Garcia-Hernandez, R.; Manzano, J. I.; Castanys, S.; Gamarro, F., *Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations. *PLoS Negl Trop Dis* **2012**, 6, (12), e1974.
- 130.** Basselin, M.; Coombs, G. H.; Barrett, M. P., Putrescine and spermidine transport in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **2000**, 109, (1), 37-46.
- 131.** Coelho, A. C.; Messier, N.; Ouellette, M.; Cotrim, P. C., Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania amastigotes*. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 51, (8), 3030-2.
- 132.** Jha, T. K.; Sundar, S.; Thakur, C. P.; Felton, J. M.; Sabin, A. J.; Horton, J., A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *Am J Trop Med Hyg* **2005**, 73, (6), 1005-11.
- 133.** Wasunna, M. K.; Rashid, J. R.; Mbui, J.; Kirigi, G.; Kinoti, D.; Lodenyo, H.; Felton, J. M.; Sabin, A. J.; Albert, M. J.; Horton, J., A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* **2005**, 73, (5), 871-6.
- 134.** Carvalho, L.; Luque-Ortega, J. R.; Lopez-Martin, C.; Castanys, S.; Rivas, L.; Gamarro, F., The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**, 55, (9), 4204-10.
- 135.** Lopez-Martin, C.; Perez-Victoria, J. M.; Carvalho, L.; Castanys, S.; Gamarro, F., Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**, 52, (11), 4030-6.
- 136.** Saenz, R. E.; Paz, H.; Berman, J. D., Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *Am J Med* **1990**, 89, (2), 147-55.
- 137.** Alrajhi, A. A.; Ibrahim, E. A.; De Vol, E. B.; Khairat, M.; Faris, R. M.; Maguire, J. H., Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *N Engl J Med* **2002**, 346, (12), 891-5.
- 138.** Santos, D. O.; Coutinho, C. E.; Madeira, M. F.; Bottino, C. G.; Vieira, R. T.; Nascimento, S. B.; Bernardino, A.; Bourguignon, S. C.; Corte-Real, S.; Pinho, R. T.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C., Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* **2008**, 103, (1), 1-10.
- 139.** Sundar, S.; More, D. K.; Singh, M. K.; Singh, V. P.; Sharma, S.; Makharia, A.; Kumar, P. C.; Murray, H. W., Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis* **2000**, 31, (4), 1104-7.

- 140.** Arevalo, J.; Ramirez, L.; Adai, V.; Zimic, M.; Tulliano, G.; Miranda-Verastegui, C.; Lazo, M.; Loayza-Muro, R.; De Doncker, S.; Maurer, A.; Chappuis, F.; Dujardin, J. C.; Llanos-Cuentas, A., Influence of Leishmania (Viannia) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis* **2007**, 195, (12), 1846-51.
- 141.** Wyllie, S.; Patterson, S.; Stojanovski, L.; Simeons, F. R.; Norval, S.; Kime, R.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H., The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. *Sci Transl Med* **2012**, 4, (119), 119re1.
- 142.** Chen, C. K.; Leung, S. S.; Guilbert, C.; Jacobson, M. P.; McKerrow, J. H.; Podust, L. M., Structural characterization of CYP51 from Trypanosoma cruzi and Trypanosoma brucei bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole. *PLoS Negl Trop Dis* **2010**, 4, (4), e651.
- 143.** Garnier, T.; Mantyla, A.; Jarvinen, T.; Lawrence, J.; Brown, M.; Croft, S., *In vivo* studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *J Antimicrob Chemother* **2007**, 60, (4), 802-10.
- 144.** Serrano-Martin, X.; Garcia-Marchan, Y.; Fernandez, A.; Rodriguez, N.; Rojas, H.; Visbal, G.; Benaim, G., Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺ homeostasis and biosynthesis of sterols in Leishmania mexicana. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, 53, (4), 1403-10.
- 145.** Jaafari, M. R.; Bavarsad, N.; Bazzaz, B. S.; Samiei, A.; Soroush, D.; Ghorbani, S.; Heravi, M. M.; Khamesipour, A., Effect of topical liposomes containing paromomycin sulfate in the course of Leishmania major infection in susceptible BALB/c mice. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, 53, (6), 2259-65.
- 146.** Castillo, E.; Dea-Ayuela, M. A.; Bolas-Fernandez, F.; Rangel, M.; Gonzalez-Rosende, M. E. The kinetoplastid chemotherapy revisited: current drugs, recent advances and future perspectives. *Curr Med Chem* **2010**, 17, (33), 4027-51.
- 147.** Eckert, L.; Repasky, G. A.; ÜIKü, A. S.; McFall, A.; Zhou, H.; Sartor, C. I.; Der, C. J. Involvement of Ras Activation in Human Breast Cancer Cell Signaling, Invasion, an Anoikis. *Cancer Res* **2004**, 64, 4585-92.
- 148.** Wenner, W. Bis(bromometil)compounds. *J. Org. Chem.*, **1952**, 17, 523-528.
- 149.** H. A. Staab, M. Haenel. Transannulare Wechselwirkungen bei [2.2]Phanen, II. Synthesen von [2.2](4,4')Biphenylophan, [2.2](2,7)Phenanthrenophan und [2](4,4')Biphenylo[2](2,7)phenanthrenophan. *Chem. Ber.* **1973**, 106, 2190–2202.

- 150.** Cram, D. J.; Steinberg, H. Macro Rings. I. Preparation and Spectra of The Paracyclophanes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 5691-5704.
- 151.** Rajeev, A.; Vaidya; Lon, J. M. Polymeric Supernucleophilic Piridine Catalyst: Homogeneous Esterolysis of *p*-Nitrophenyl Esters. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 5514-5520.
- 152.** Surrey, A.R.; Hammer, H.F. Some 7-substituted 4-aminoquinoline derivates. *J. Am. Chem. Soc.*, **1946**, 68, 113-116.
- 153.** See Too, W. C. Biochemical characterization of human and yeast choline and ethanolamine kinases. *Tesis Doctoral*. Universidad de Göttingen (Alemania), **2006**.
- 154.** Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of enzyme kinetics*, Portland Press, London, **1995**.
- 155.** Cortes, A.; Cascante, M.; Cardenas, M. L.; Cornish-Bowden, A., Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data. *Biochem J* **2001**, 357, (Pt 1), 263-8.
- 156.** http://www.leishmania.it/?page_id=6
- 157.** Tang, M.; Wierenga, K.; Elsas, L. J.; Lai, K., Molecular and biochemical characterization of human galactokinase and its small molecule inhibitors. *Chem Biol Interact* **2010**, 188, (3), 376-85.
- 158.** Bean, B.; Tomasz, A., Choline metabolism in pneumococci. *J Bacteriol* **1977**, 130, (1), 571-4.
- 159.** Brendle, J. J.; Outlaw, A.; Kumar, A.; Boykin, D. W.; Patrick, D. A.; Tidwell, R. R.; Werbovetz, K. A., Antileishmanial activities of several classes of aromatic dications. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, 46, (3), 797-807.
- 160.** Rosypal, A. C.; Werbovetz, K. A.; Salem, M.; Stephens, C. E.; Kumar, A.; Boykin, D. W.; Hall, J. E.; Tidwell, R. R., Inhibition by Dications of in vitro growth of *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: causative agents of old world cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol* **2008**, 94, (3), 743-9.
- 161.** Bringmann, G.; Thomale, K.; Bischof, S.; Schneider, C.; Schultheis, M.; Schwarz, T.; Moll, H.; Schurigt, U., A Novel *Leishmania major* Amastigote Assay in 96-Well Format for Rapid Drug Screening and its Use for the Discovery and Evaluation of a New Class of Leishmanicidal Quinolinium Salts. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**.
- 162.** Peyrottes, S.; Caldarelli, S.; Wein, S.; Perigaud, C.; Pellet, A.; Vial, H., Choline analogues in malaria chemotherapy. *Curr Pharm Des* **2012**, 18, (24), 3454-66.

163. Mehta, A.; Shaha, C., Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J Biol Chem* **2004**, 279, (12), 11798-813.

164. Santa-Rita, R. M.; Lira, R.; Barbosa, H. S.; Urbina, J. A.; de Castro, S. L., Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *J Antimicrob Chemother* **2005**, 55, (5), 780-4.

165. Sen, N.; Das, B. B.; Ganguly, A.; Mukherjee, T.; Bandyopadhyay, S.; Majumder, H. K., Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* **2004**, 279, (50), 52366-75.

166. Vercesi, A. E.; Docampo, R., Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *Biochem J* **1992**, 284 (Pt 2), 463-7.

167. Alzate, J. F.; Arias, A. A.; Moreno-Mateos, D.; Alvarez-Barrientos, A.; Jimenez-Ruiz, A., Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* **2007**, 152, (2), 192-202.

168. Weiss, M. J.; Wong, J. R.; Ha, C. S.; Bleday, R.; Salem, R. R.; Steele, G. D., Jr.; Chen, L. B., Dequalinium, a topical antimicrobial agent, displays anticarcinoma activity based on selective mitochondrial accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, 84, (15), 5444-8.

169. Brookes, P. S., Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic Biol Med* **2005**, 38, (1), 12-23.

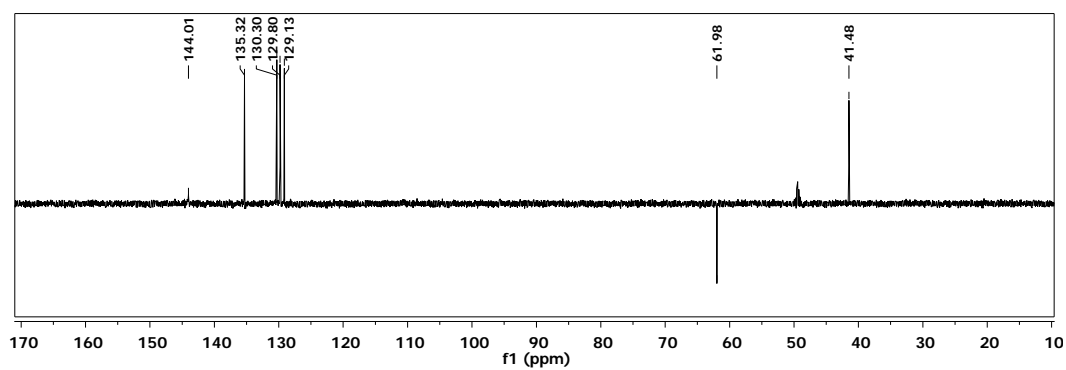
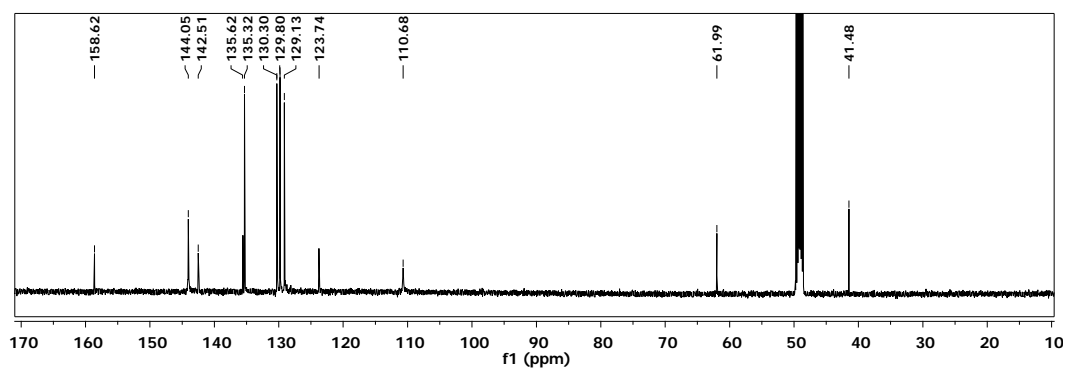
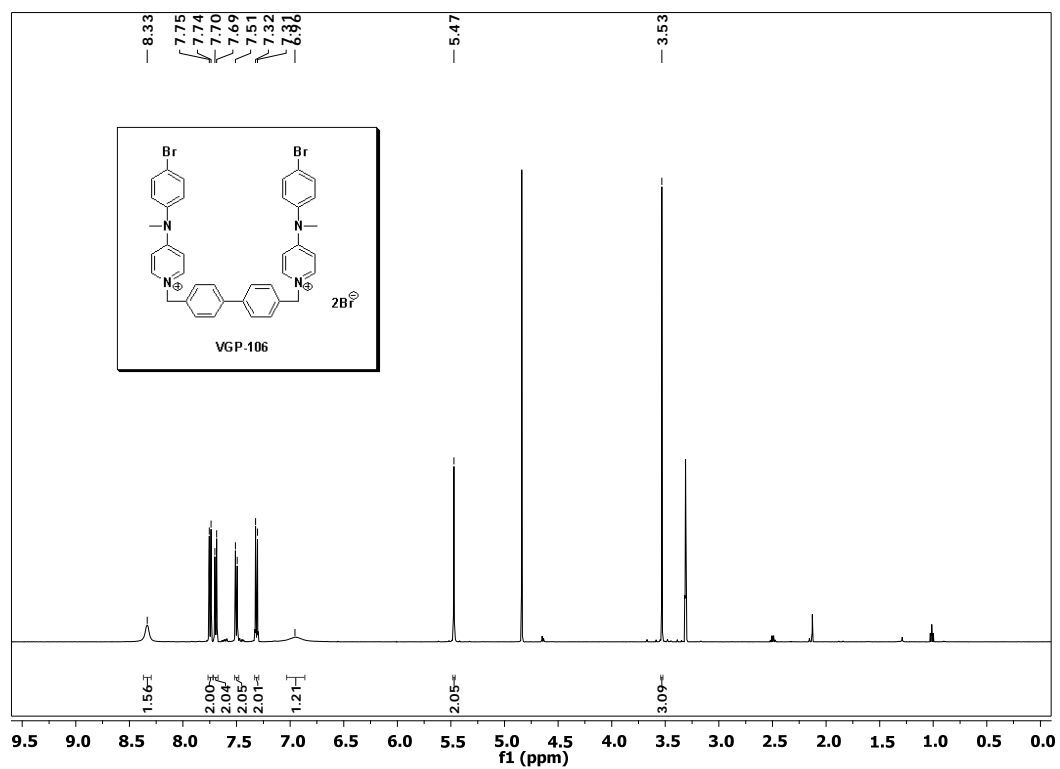
170. Porcheddu, A.; Giacomelli, G.; De Luca, L., New pentamidine analogues in medicinal chemistry. *Curr Med Chem* **2012**, 19, (34), 5819-36.

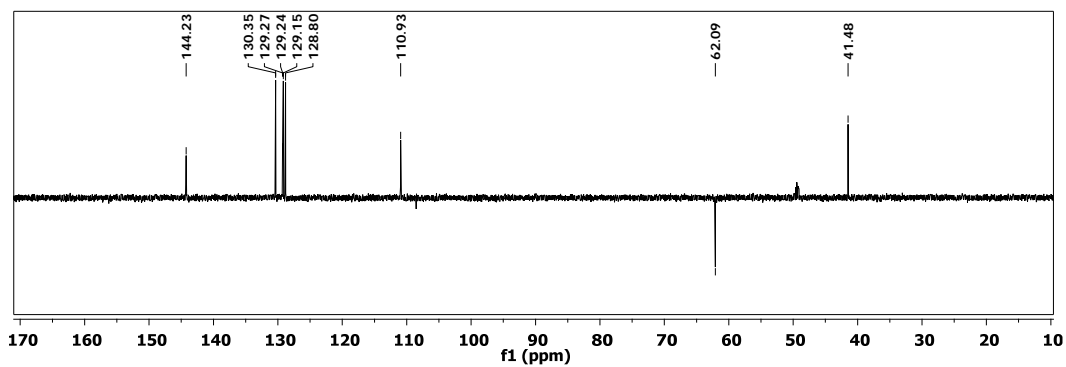
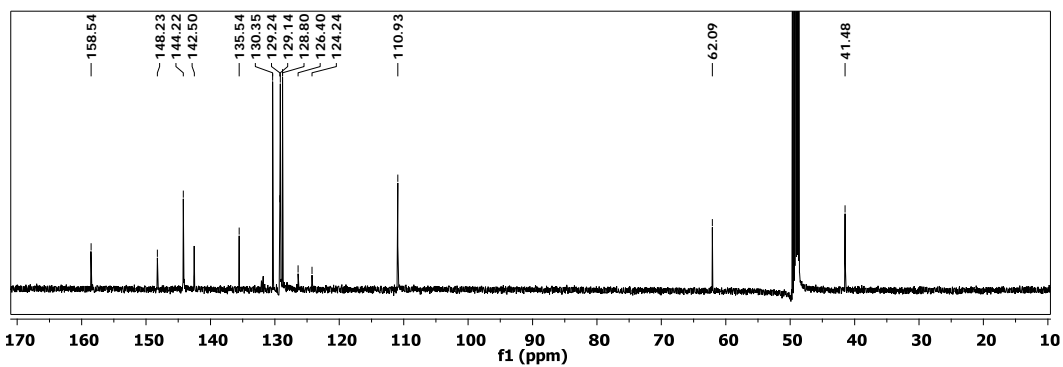
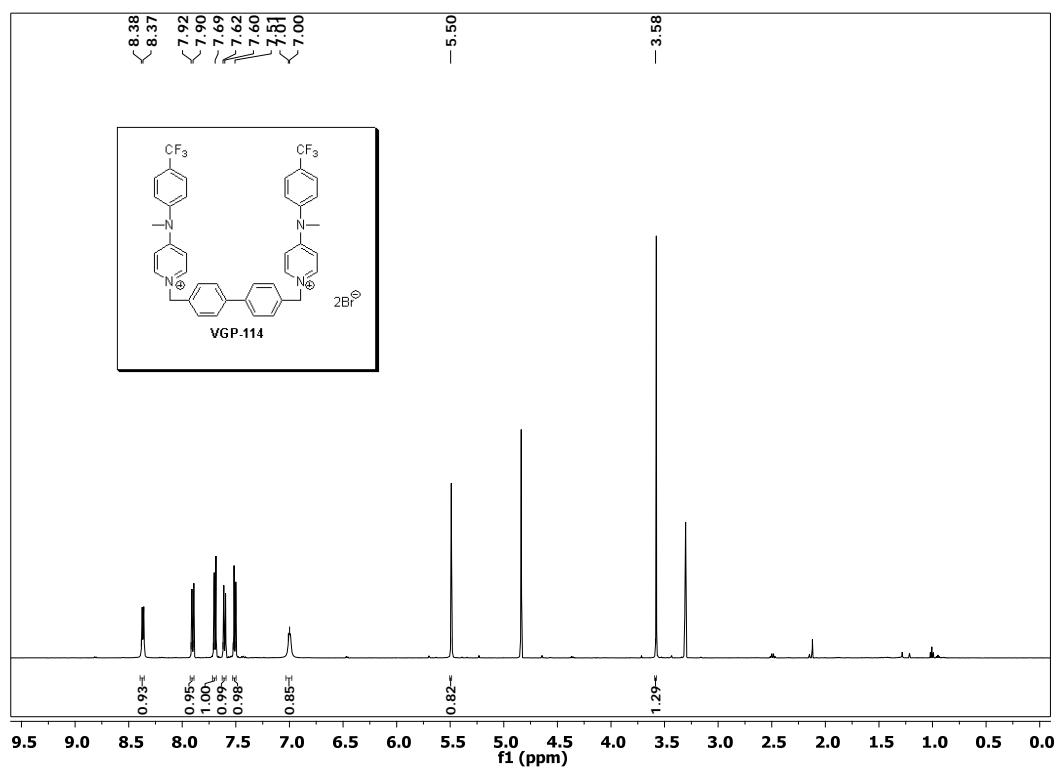
171. Patric, D. A.; Bakunov, S. A.; Bakunova, S. M.; Kumar, E.V.; Chen, H.; Jones, S. K.; Wenzler, T.; Barzcz, T.; Werbovets, K. A.; Brun, R.; Tidwell, R. R., Synthesis and antiprotozoal activities of dicationic bis(phenoxyethyl)benzenes, Bis(phenoxyethyl)naphthalenes, and bis(benzyloxy)naphthalenes. *Eur J Med Chem* **2009**, 44, 3543-51.

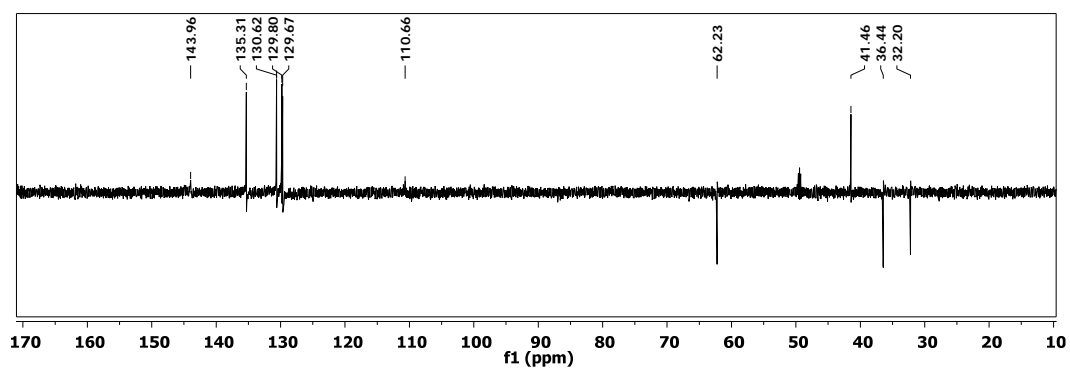
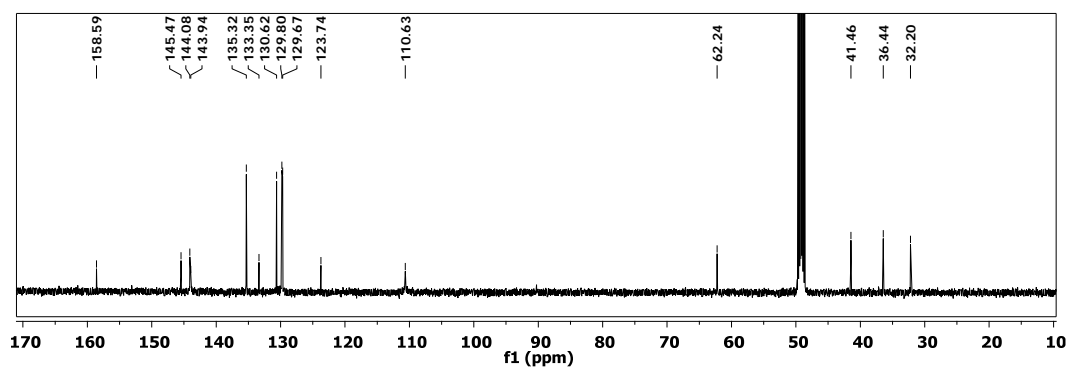
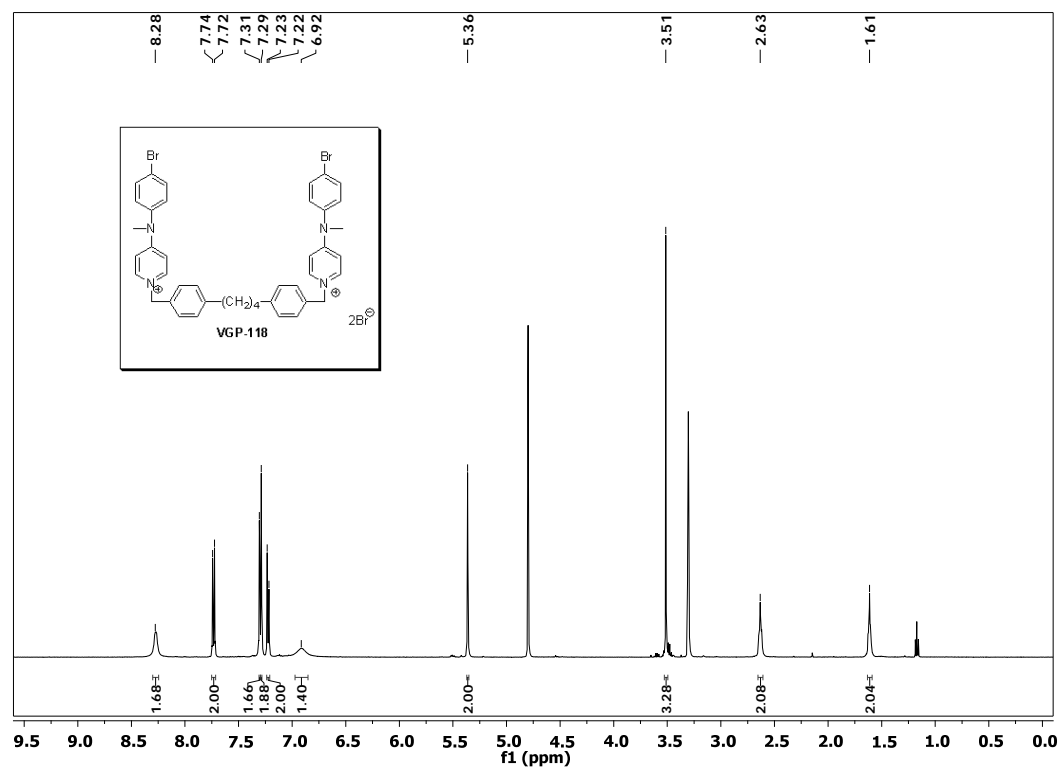
172. Rijal, S.; Yardley, V.; Chappuis, F.; Decuypere, S.; Khanal, B.; Singh, R.; Boelaert, M.; De Doncker, S.; Croft, S.; Dujardin, J. C., Antimonial treatment of visceral leishmaniasis: are current in vitro susceptibility assays adequate for prognosis of *in vivo* therapy outcome? *Microbes Infect* **2007**, 9, (4), 529-35.

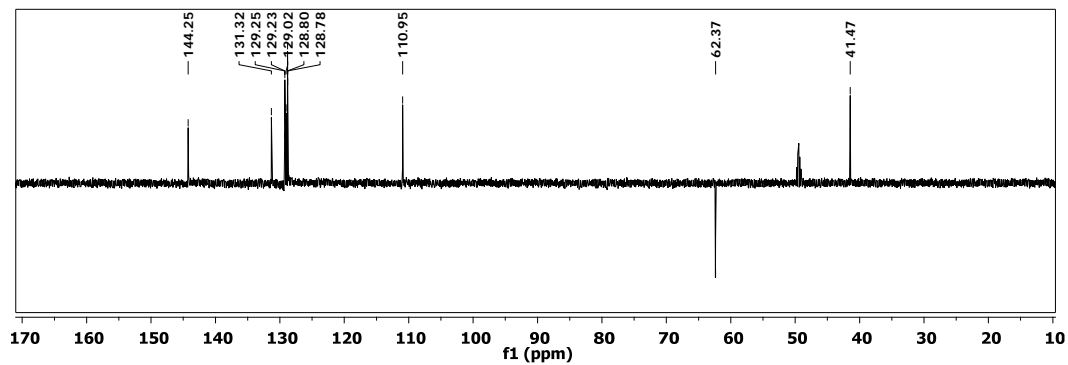
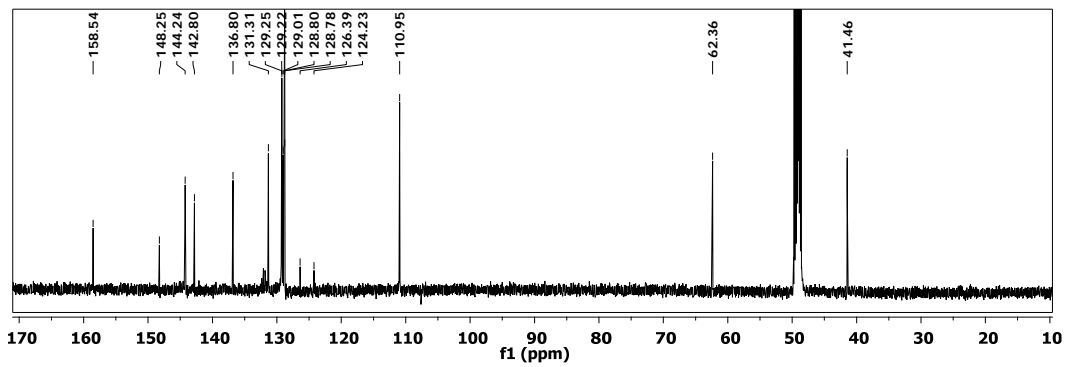
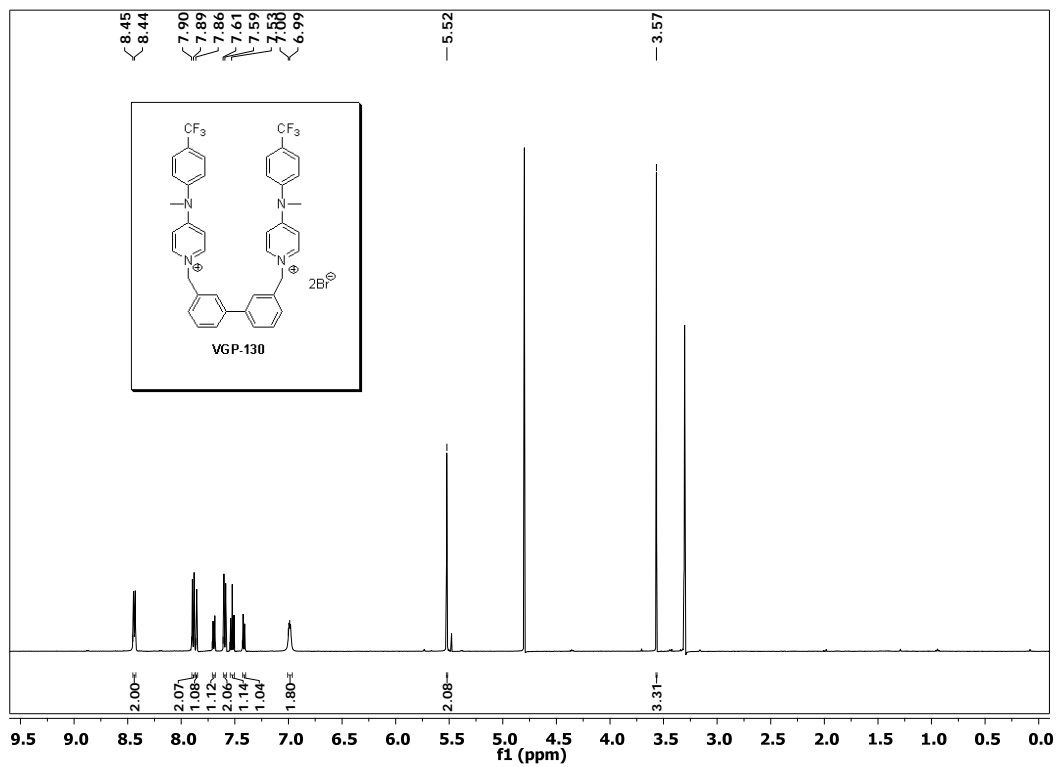
- 173.** Mukherjee, A.; Padmanabhan, P. K.; Sahani, M. H.; Barrett, M. P.; Madhubala, R., Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **2006**, 145, (1), 1-10.
- 174.** Luque-Ortega, J. R.; Rivas, L., Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 51, (4), 1327-32.
- 175.** <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/phane>. Phane Nomenclature. Part II: Substitution Derivatives of Phane Parent Hydrides. IUPAC Recommendations 2001.
- 176.** Ha, D. S.; Schwarz, J. K.; Turco, S. J.; Beverley, S. M., Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **1996**, 77, (1), 57-64.
- 177.** Kennedy, M. L.; Cortes-Selva, F.; Perez-Victoria, J. M.; Jimenez, I. A.; Gonzalez, A. G.; Munoz, O. M.; Gamarro, F.; Castanys, S.; Ravelo, A. G., Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J Med Chem* **2001**, 44, (26), 4668-76.
- 178.** El Fadili, K.; Imbeault, M.; Messier, N.; Roy, G.; Gourbal, B.; Bergeron, M.; Tremblay, M. J.; Legare, D.; Ouellette, M., Modulation of gene expression in human macrophages treated with the anti-leishmania pentavalent antimonial drug sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**, 52, (2), 526-33.
- 179.** Kapler, G. M.; Coburn, C. M.; Beverley, S. M., Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol* **1990**, 10, (3), 1084-94.
- 180.** Manzano, J. I.; Carvalho, L.; Perez-Victoria, J. M.; Castanys, S.; Gamarro, F., Increased glycolytic ATP synthesis is associated with tafenoquine resistance in *Leishmania major*. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**, 52, (3), 1045-52.
- 181.** J. Renau y L. Megías Manual de Técnicas de Microscopía Electrónica (M. E.T.). Aplicaciones Biológicas. Editores. Editorial Universidad de Granada. ISBN84-338-2470-8, **1998**.
- 182.** Reynolds, E. S., The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **1963**, 17, 208-12.
- 183.** Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, (5259), 680-5.

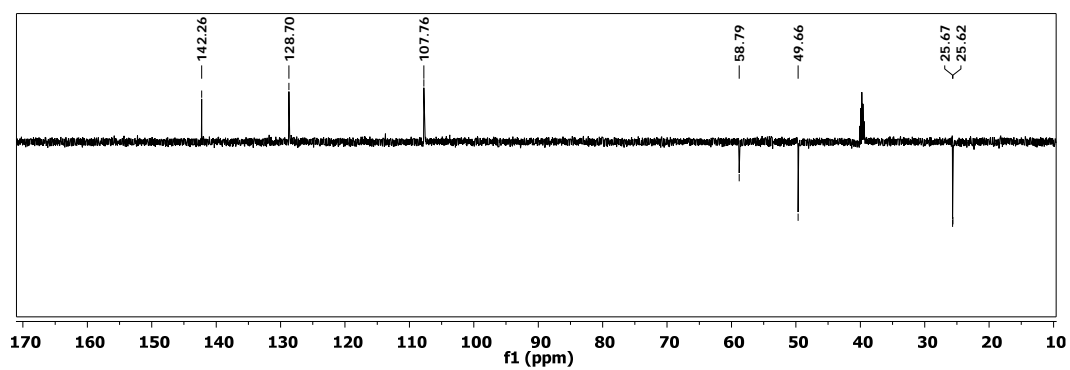
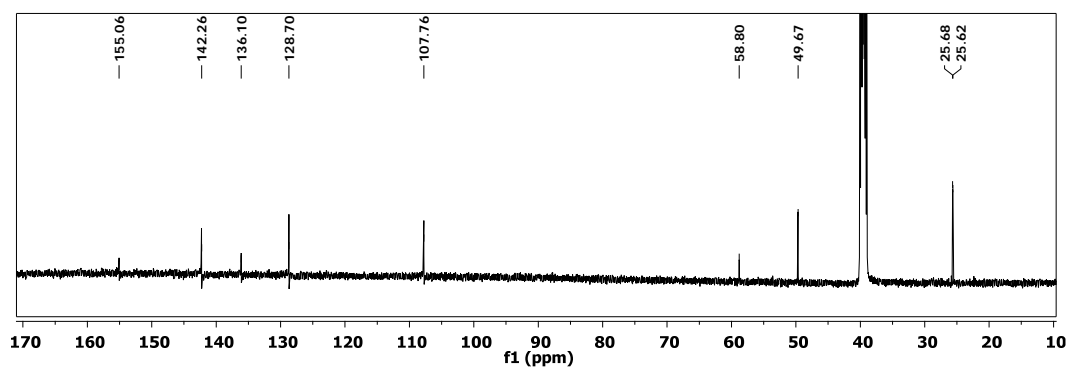
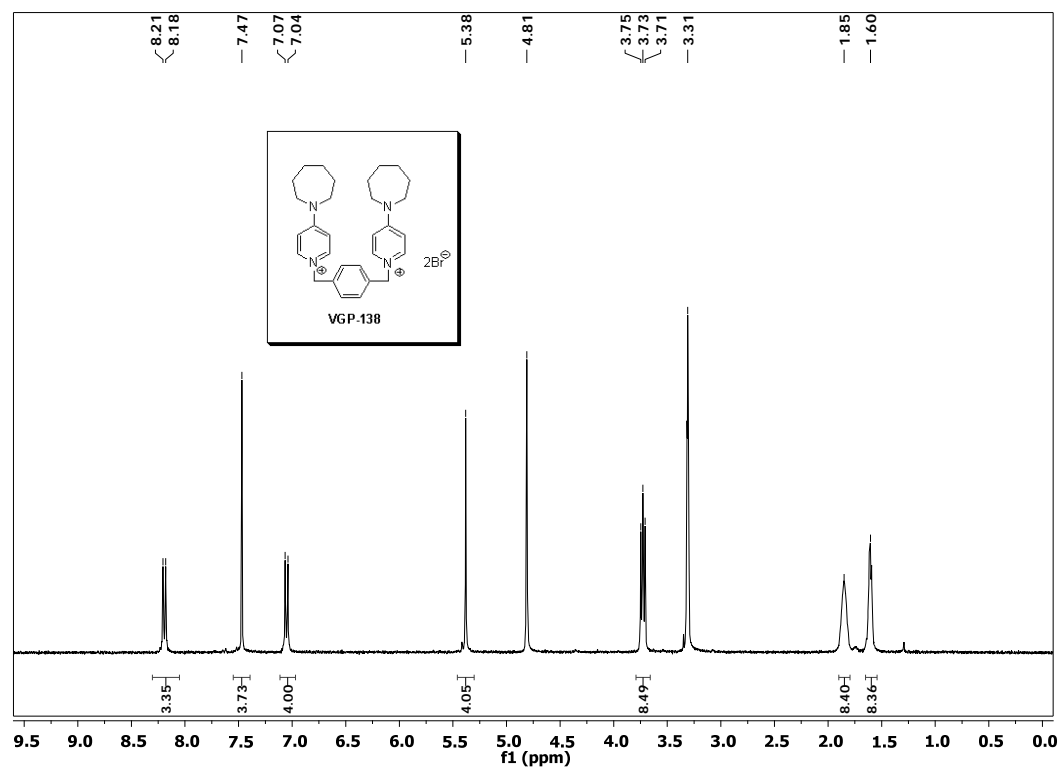
ANEXO I

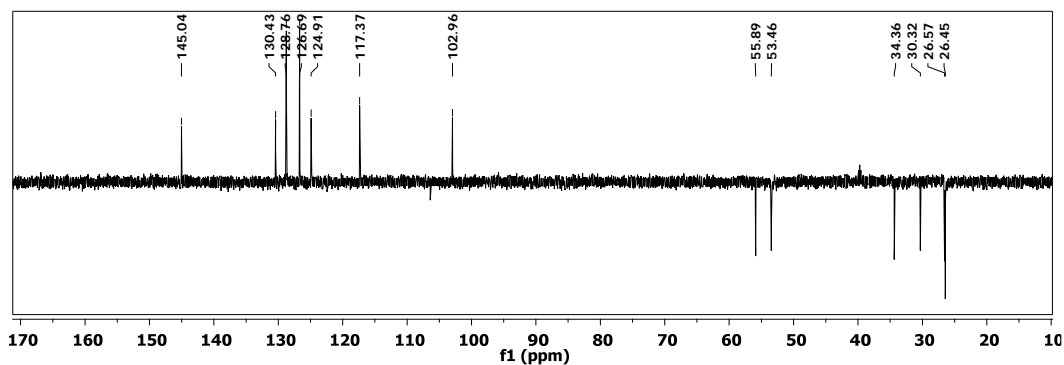
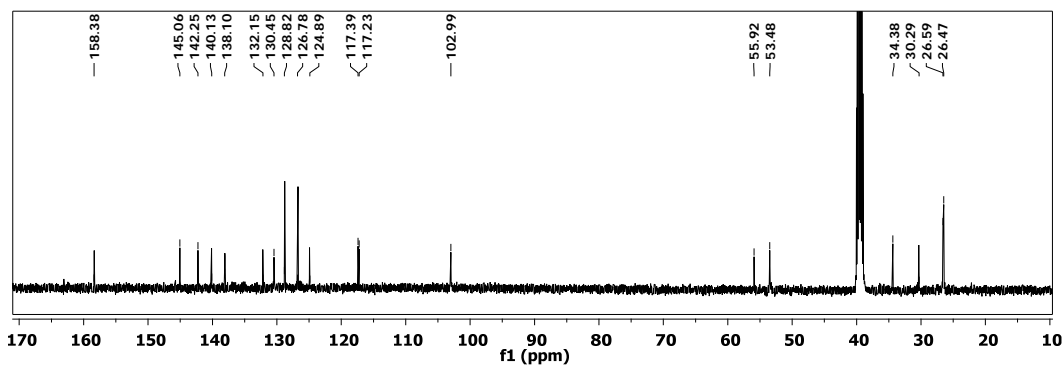
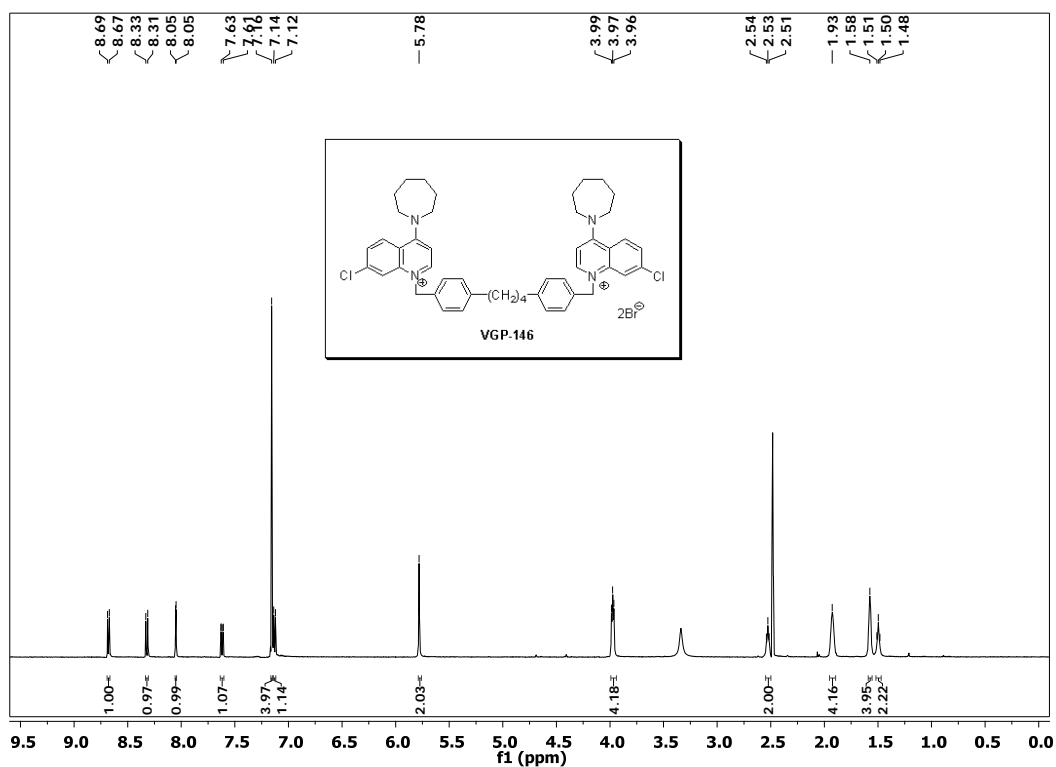


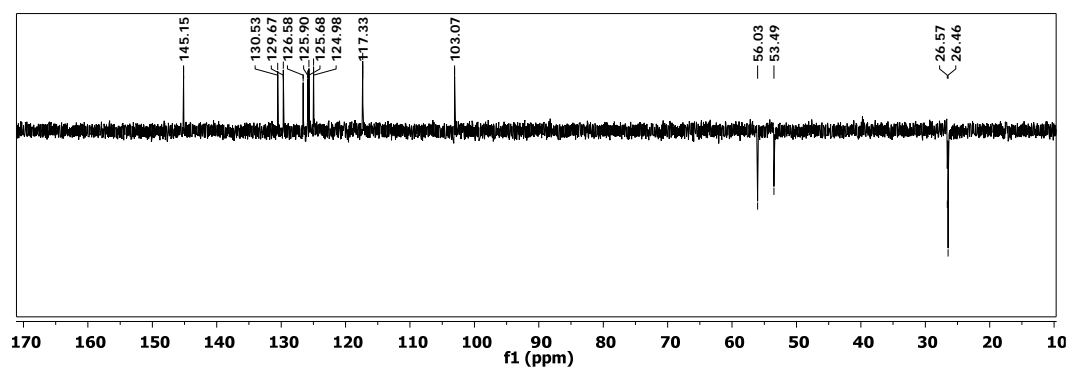
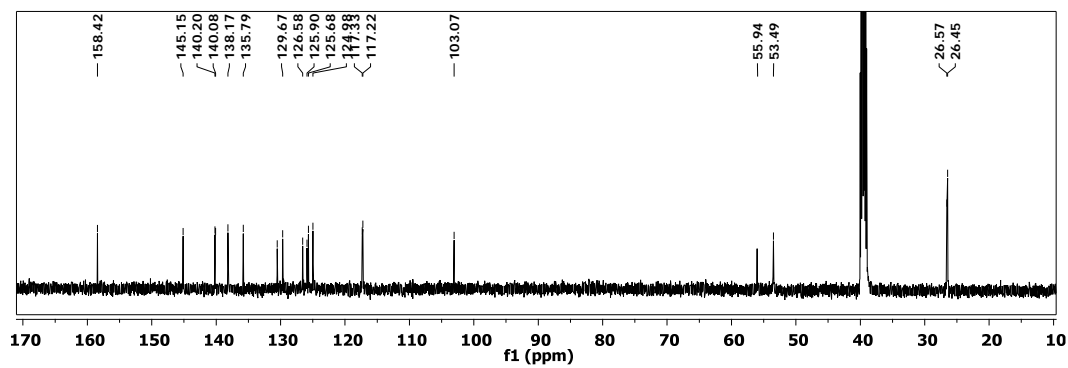
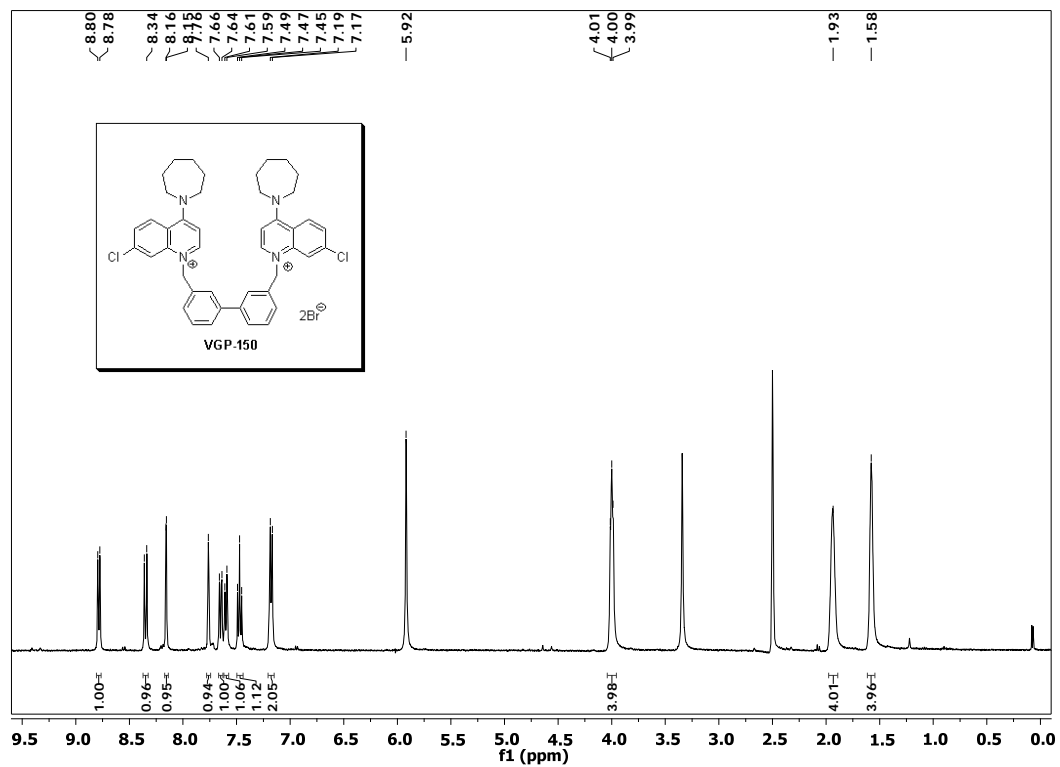


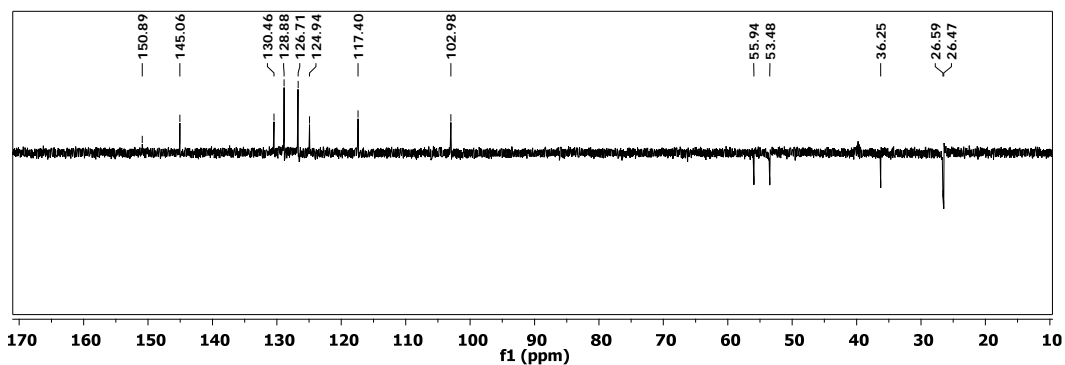
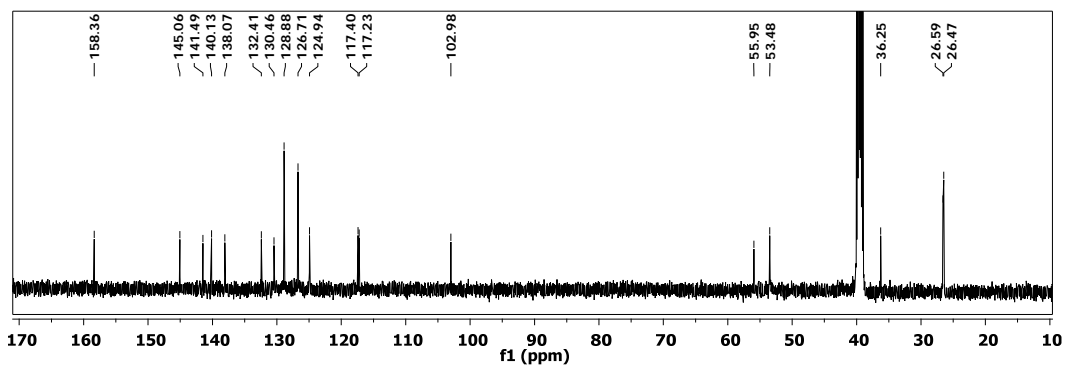
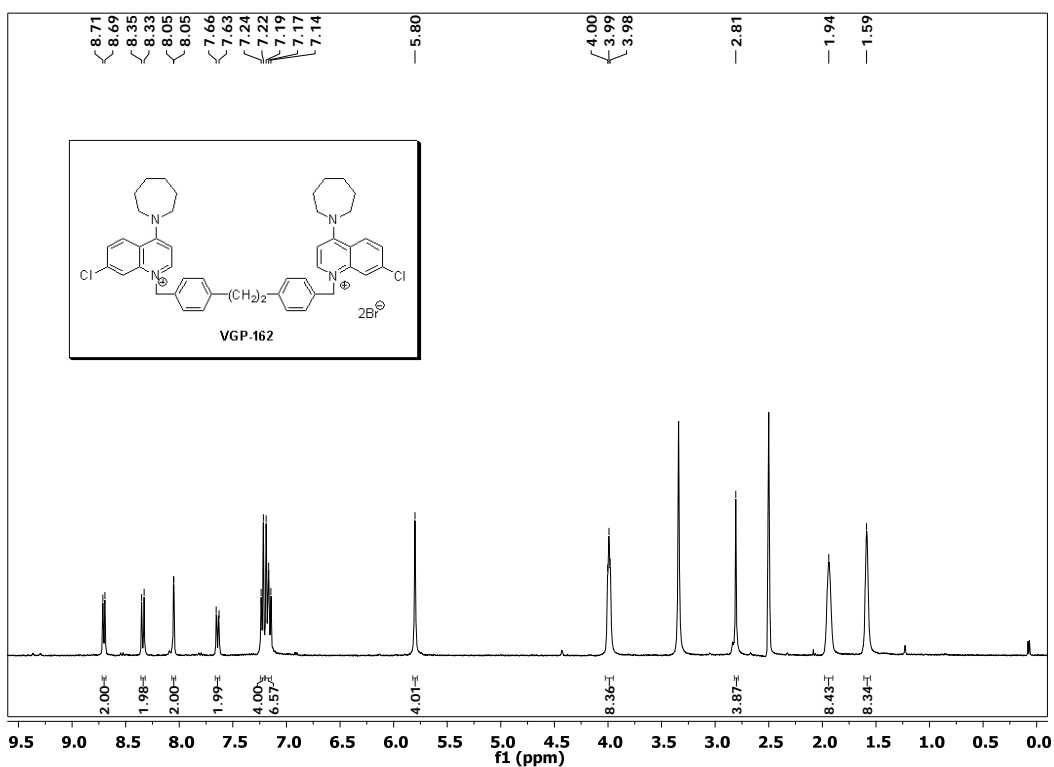


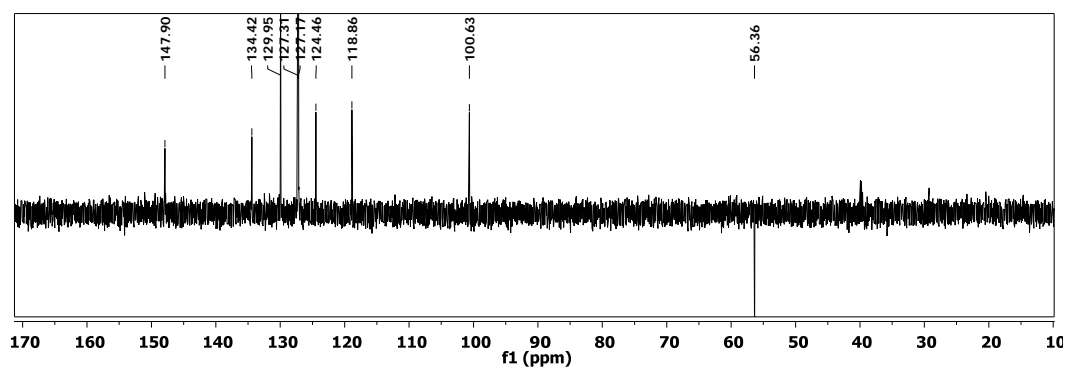
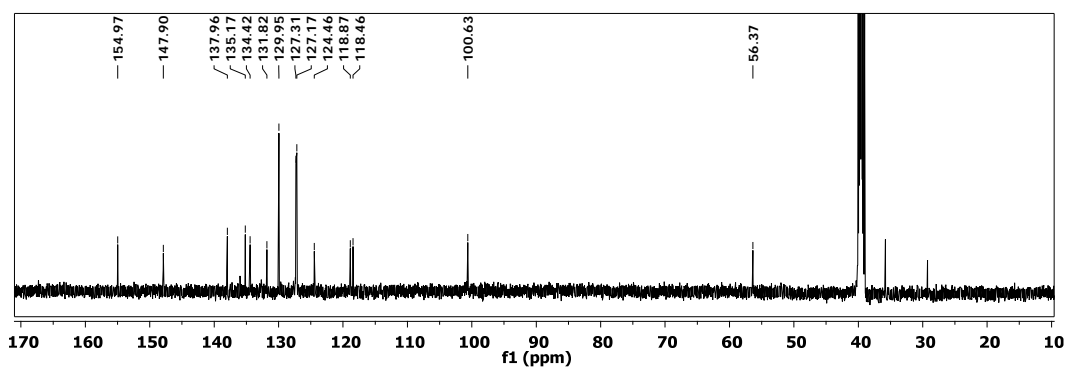
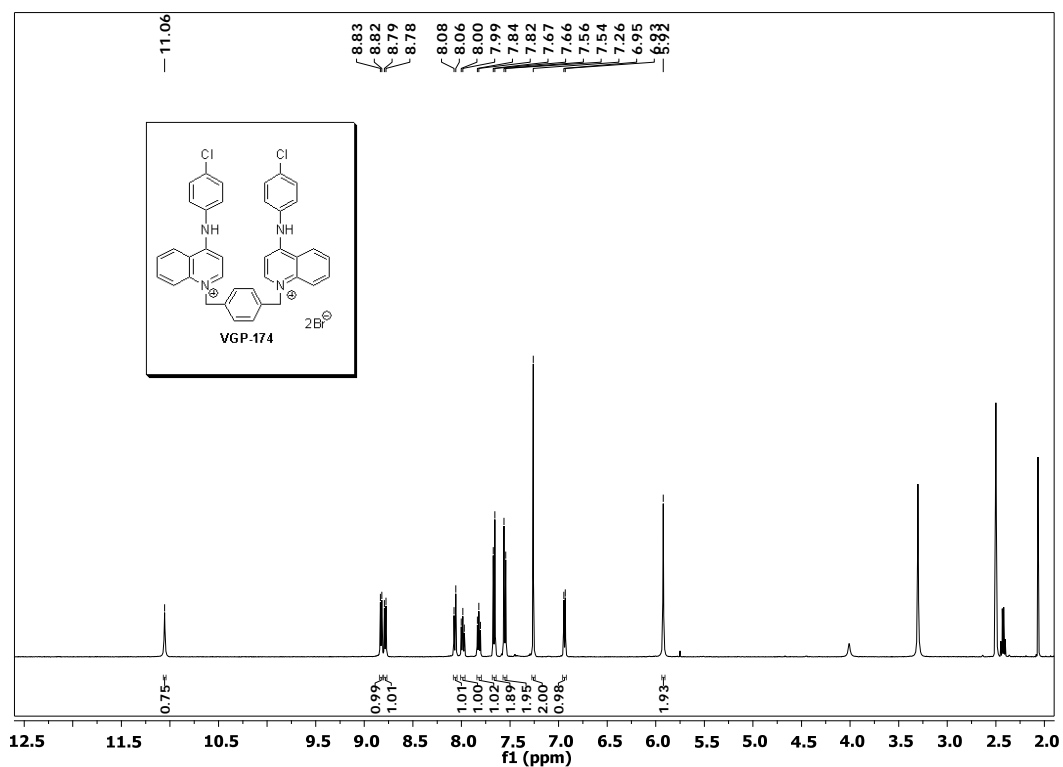


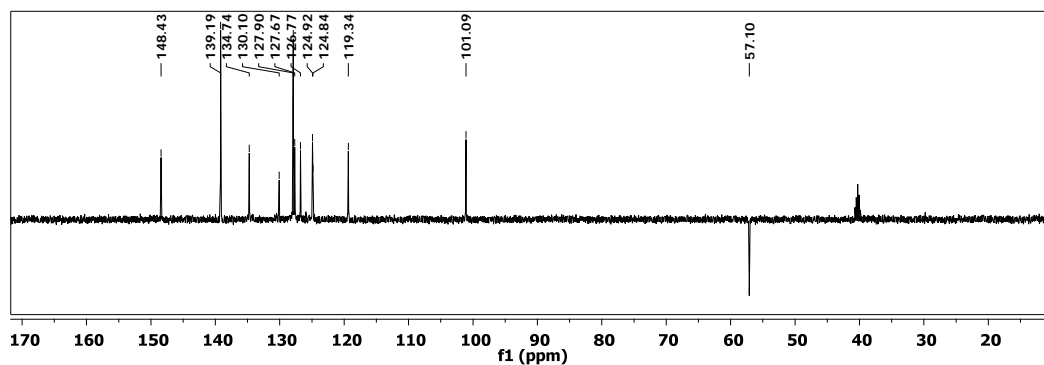
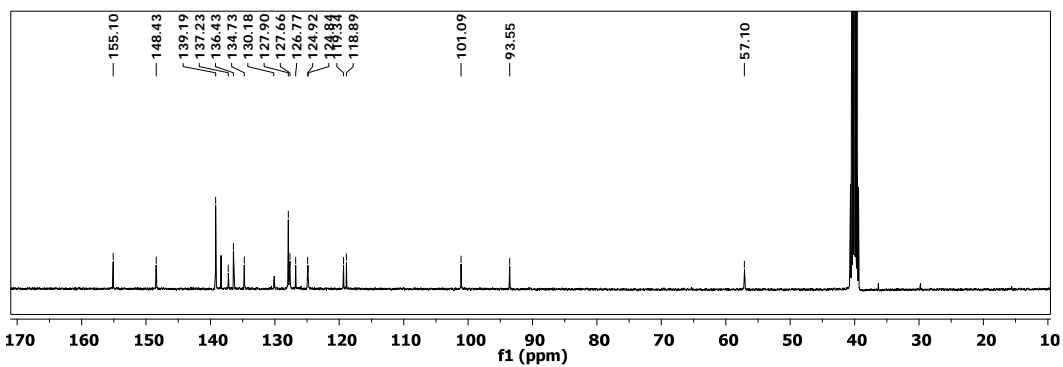
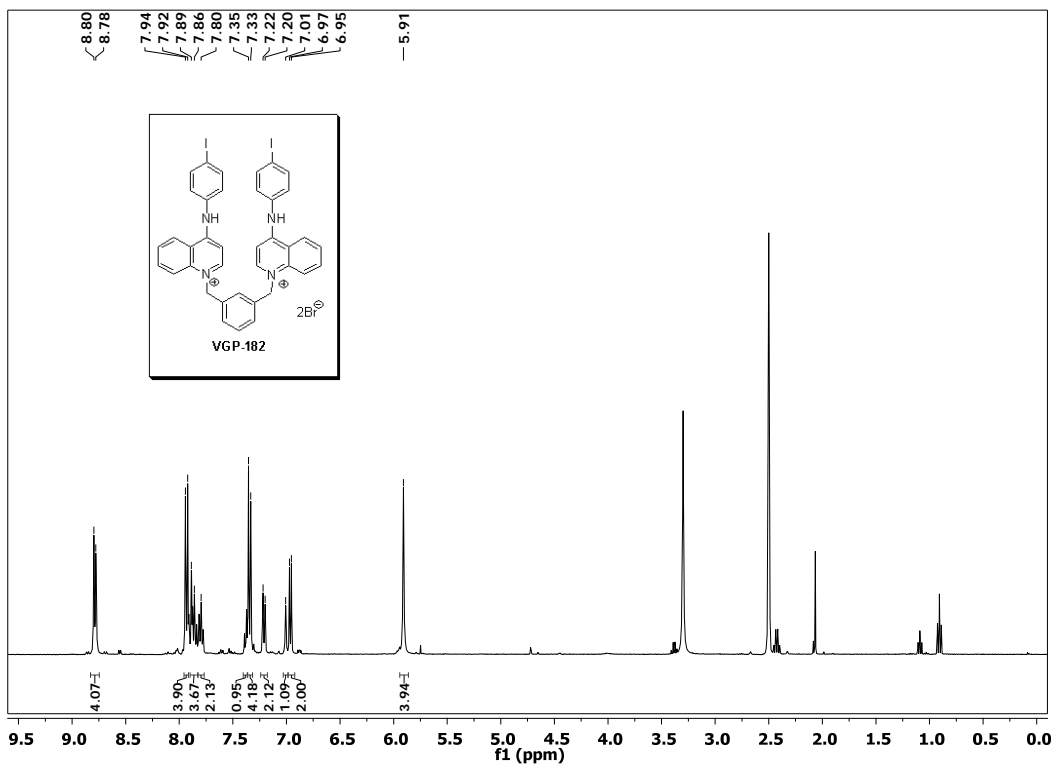


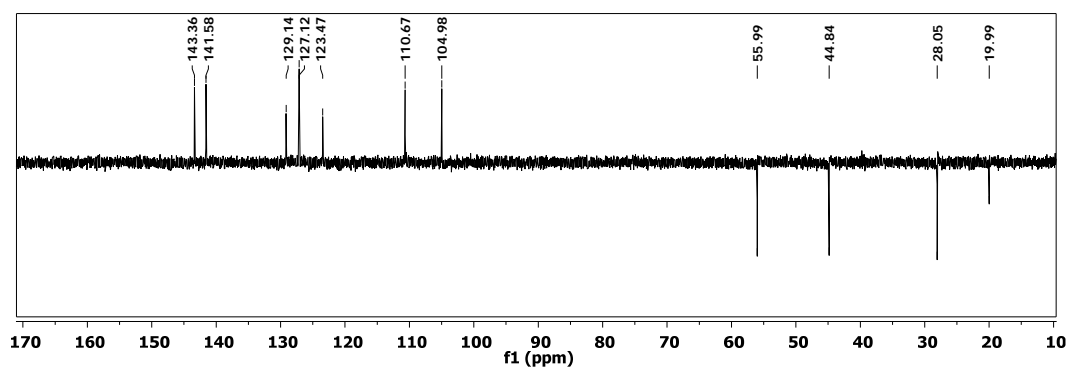
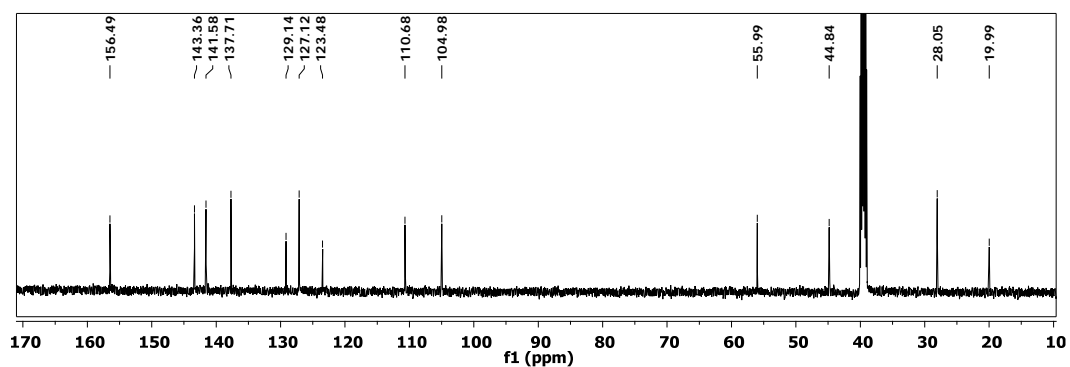
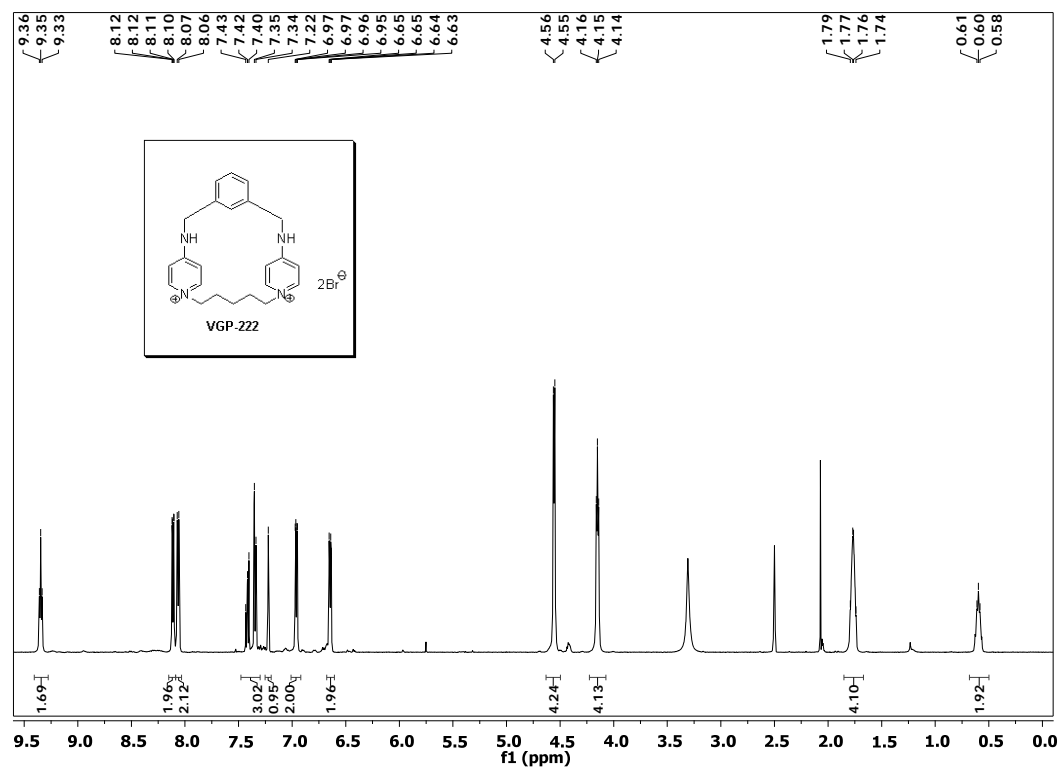


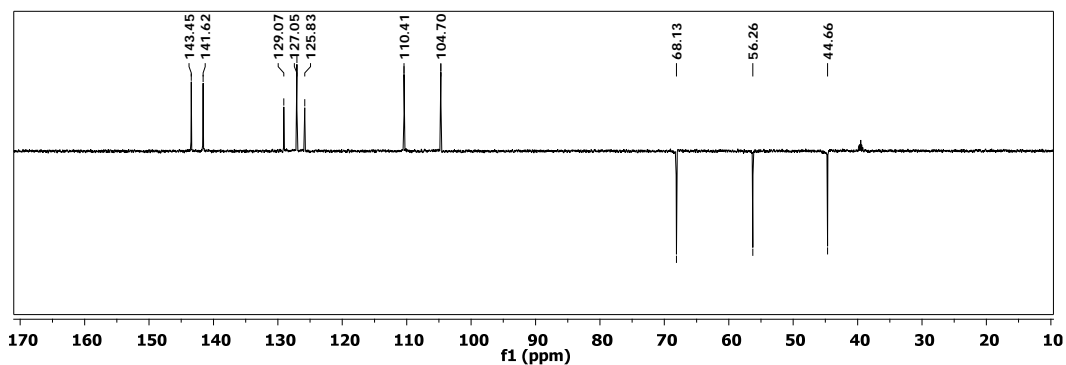
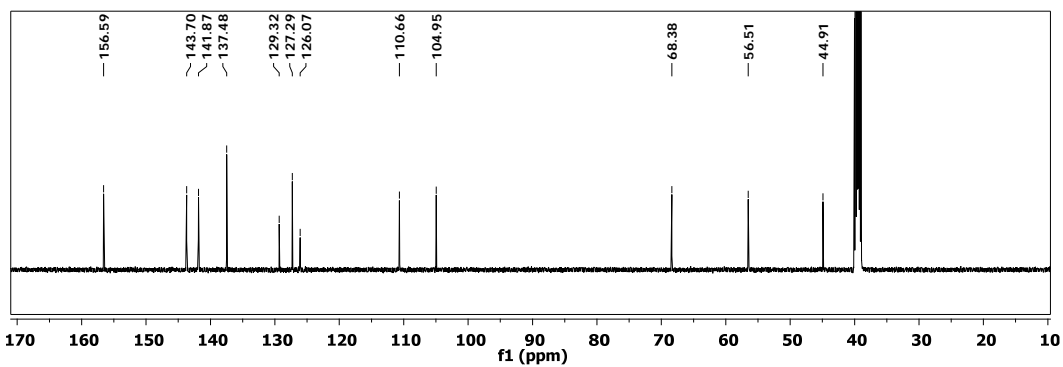
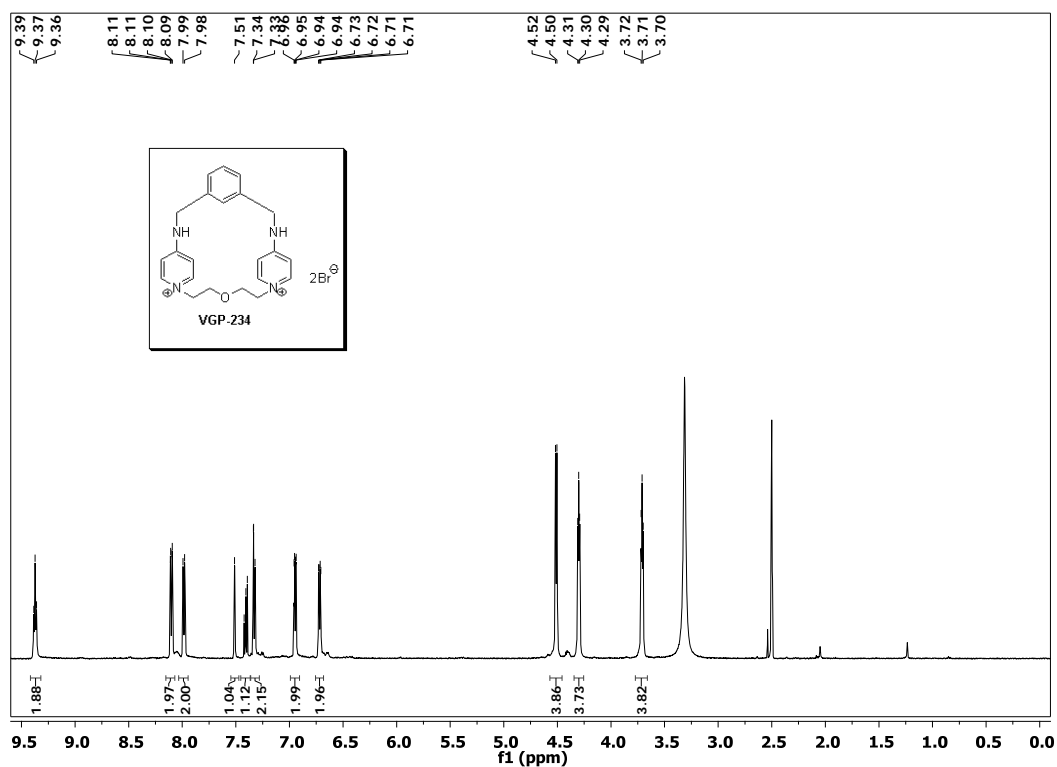


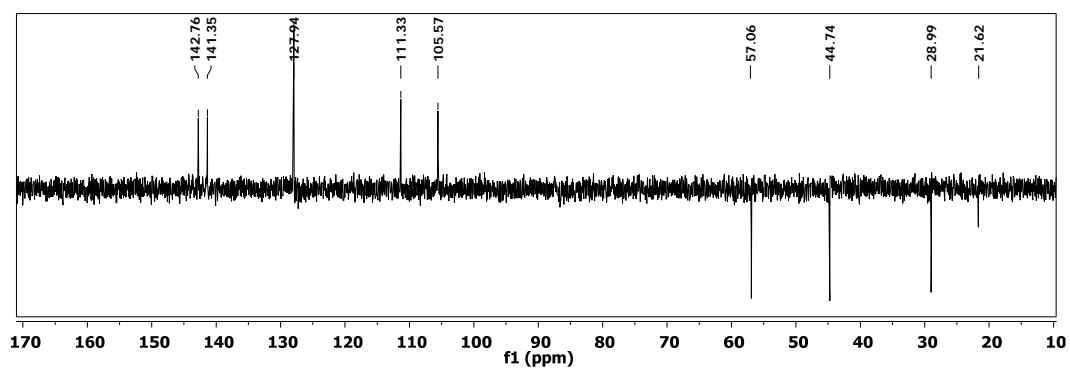
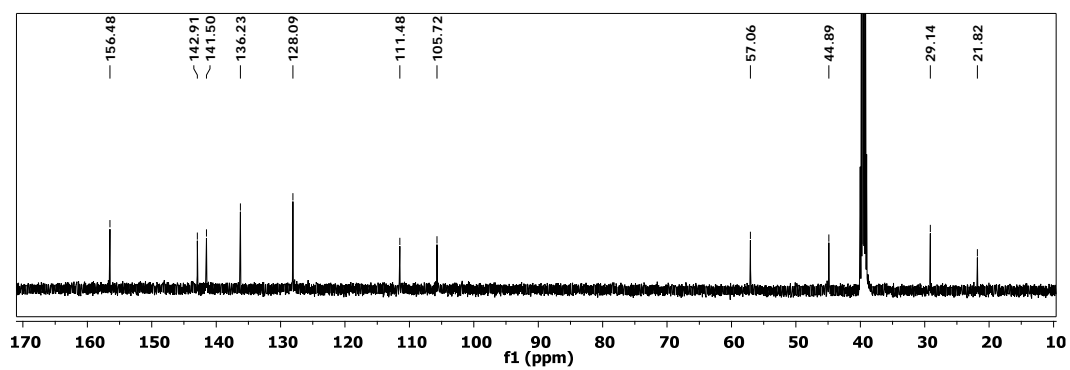
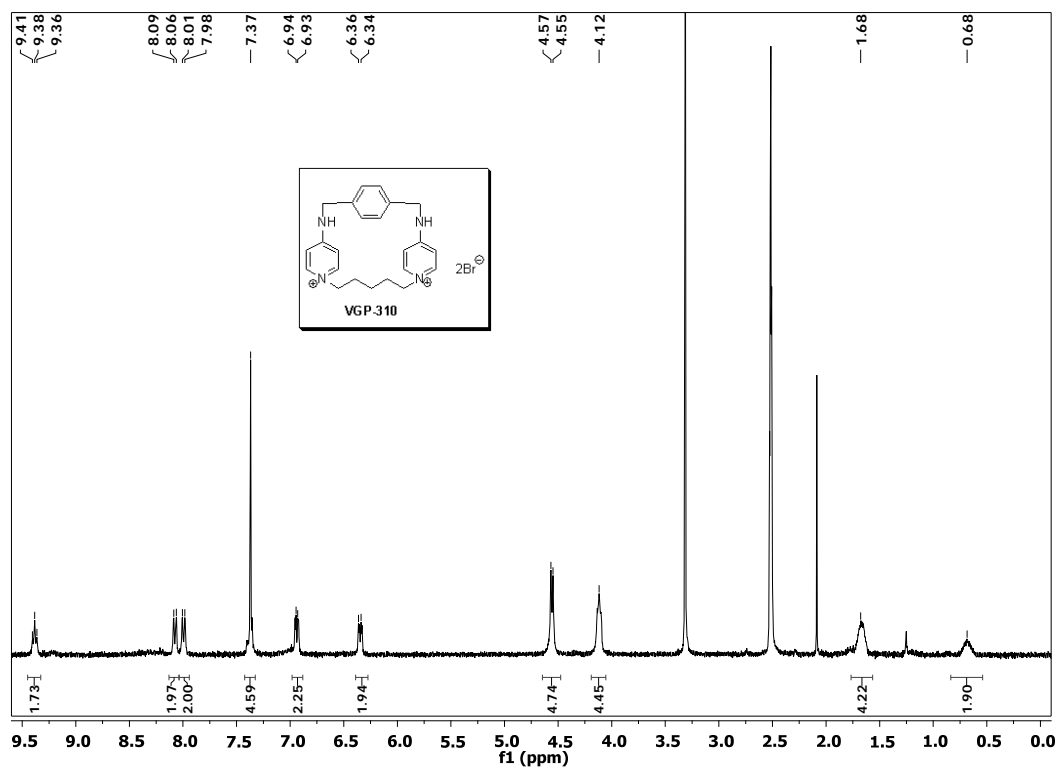


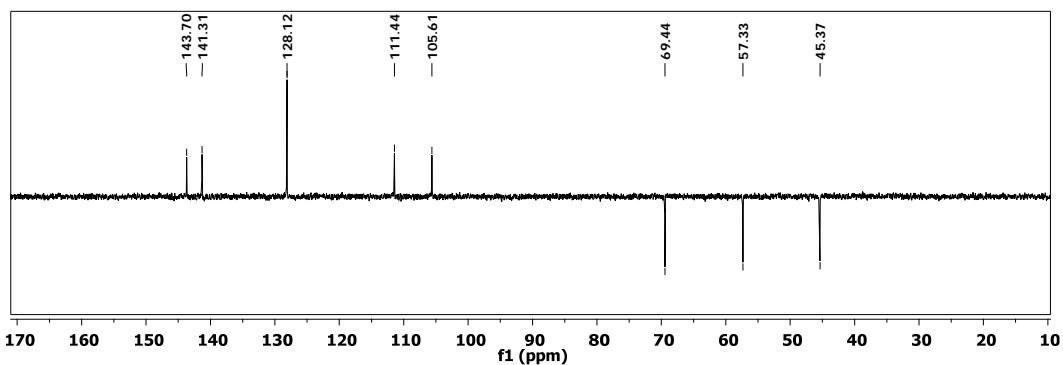
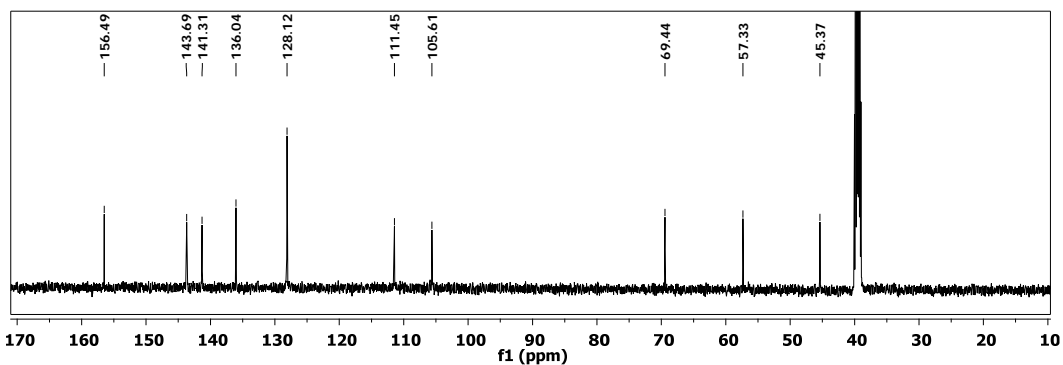
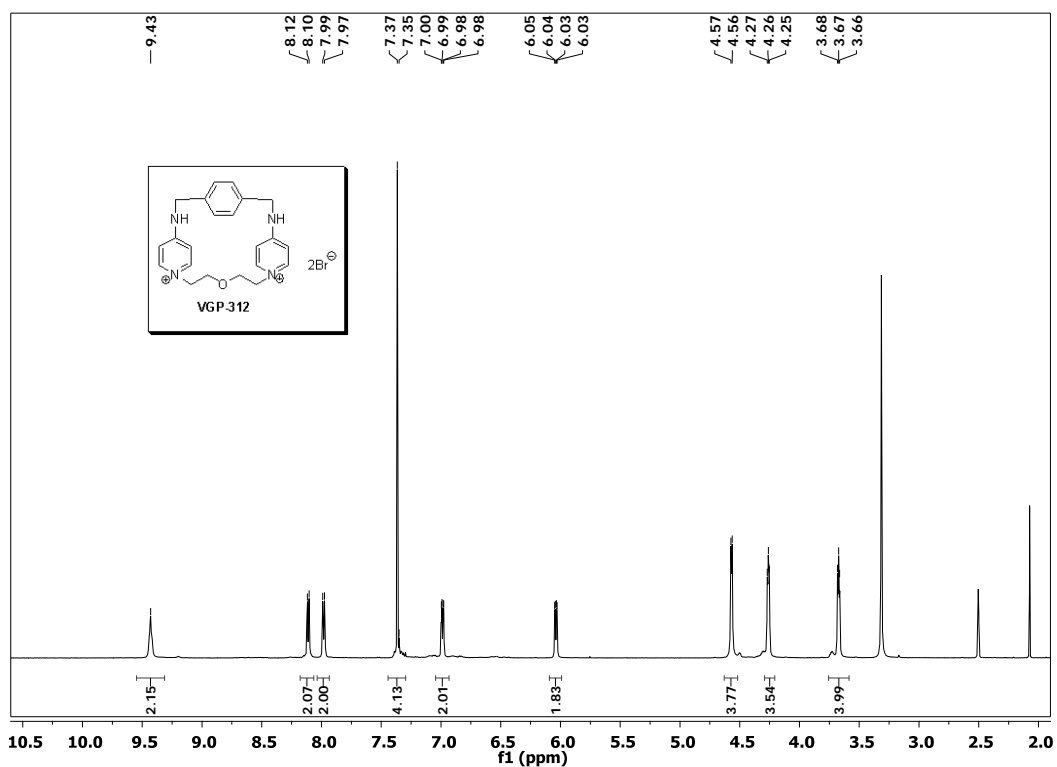


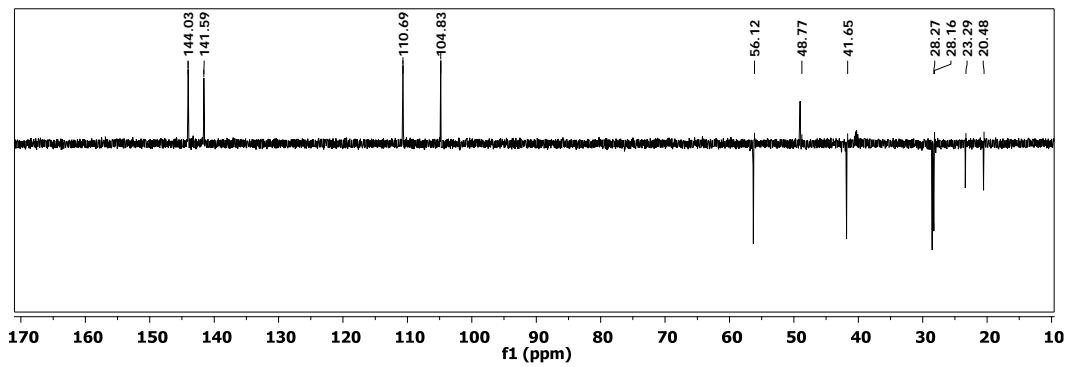
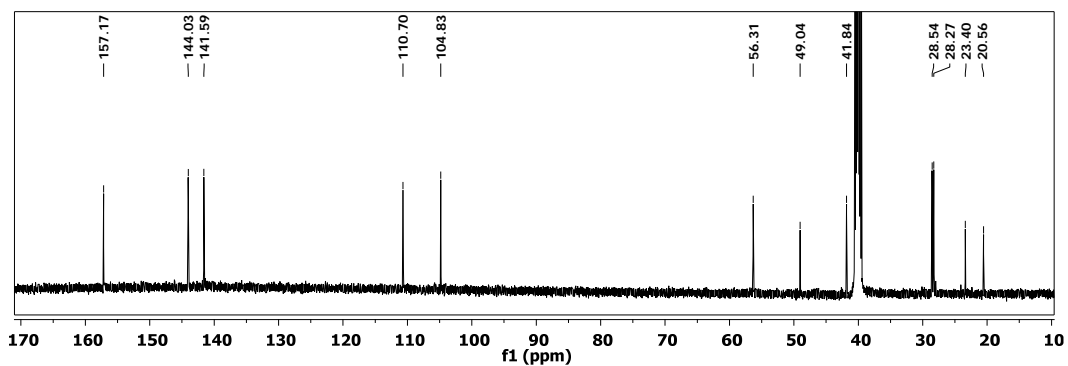
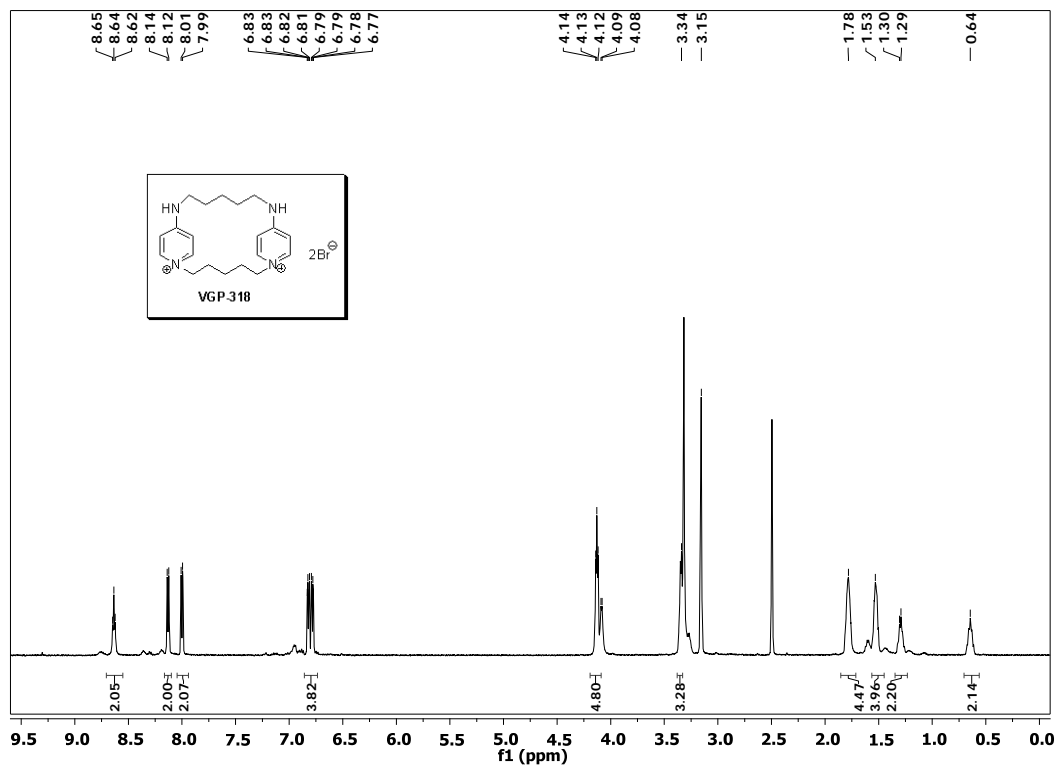


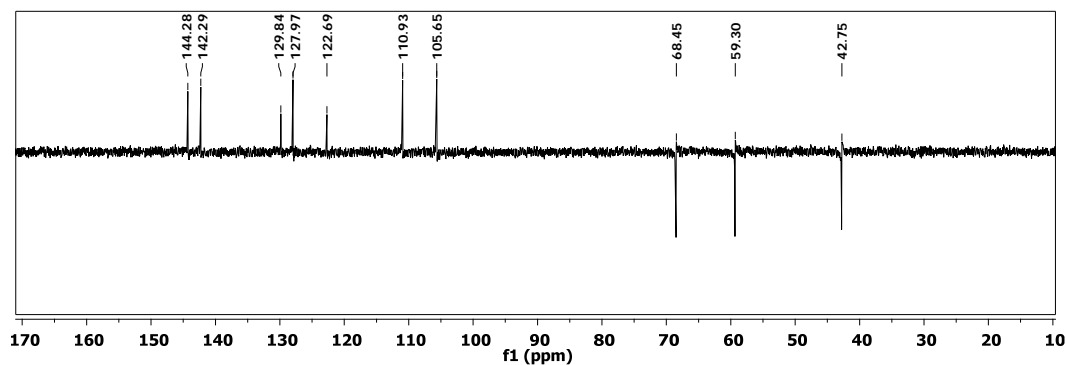
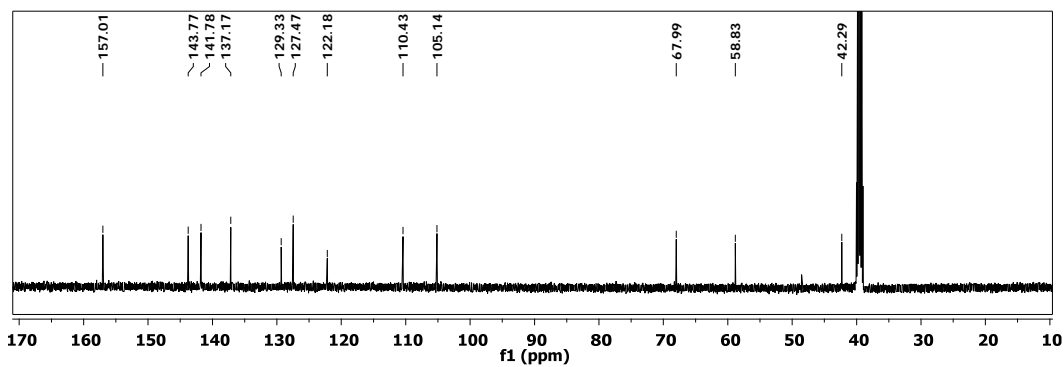
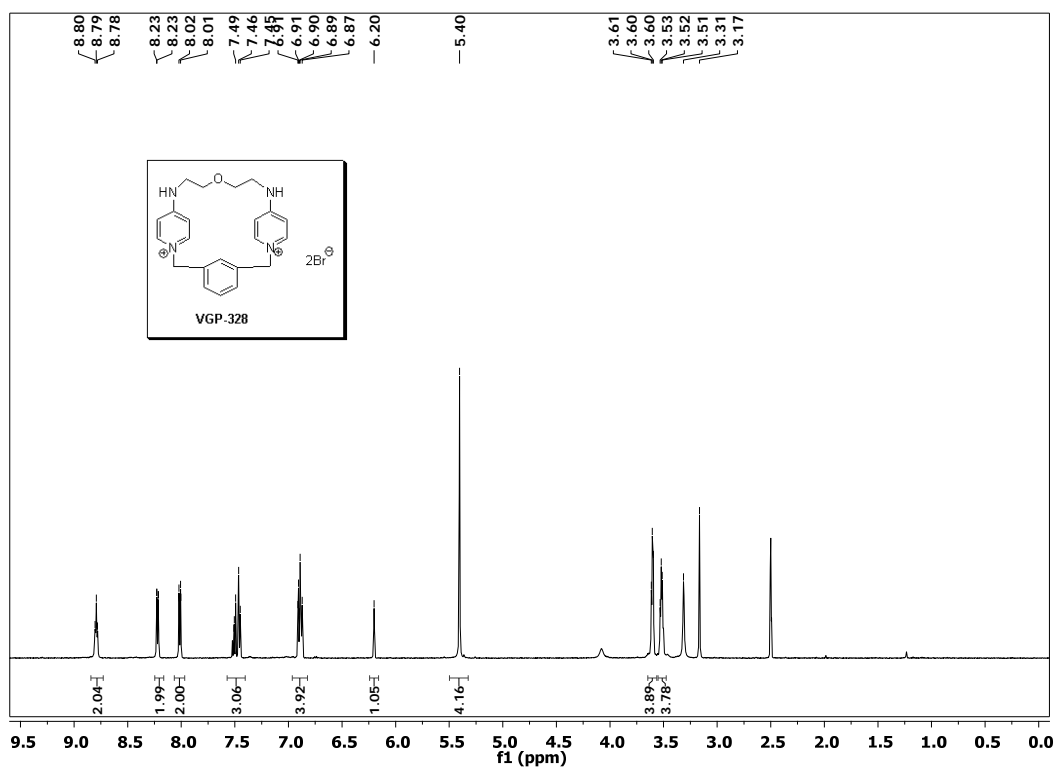


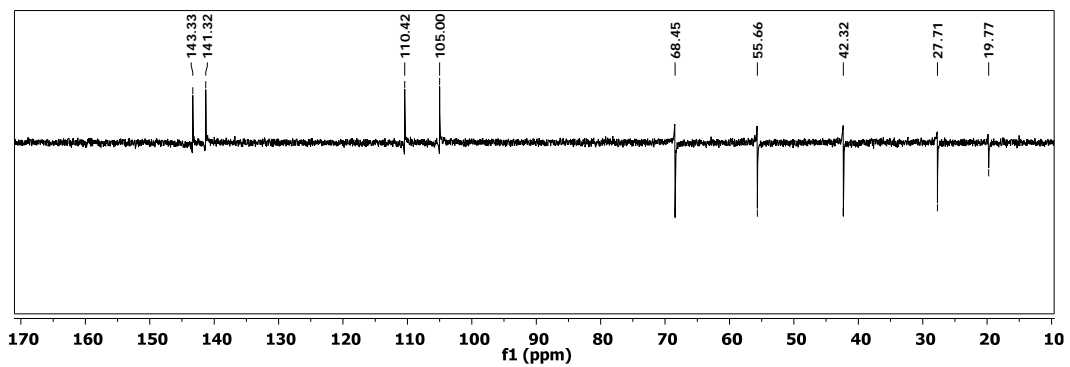
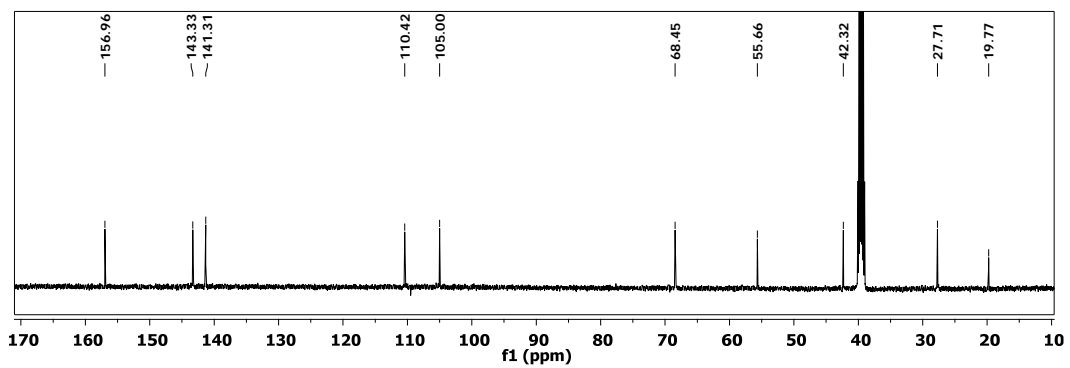
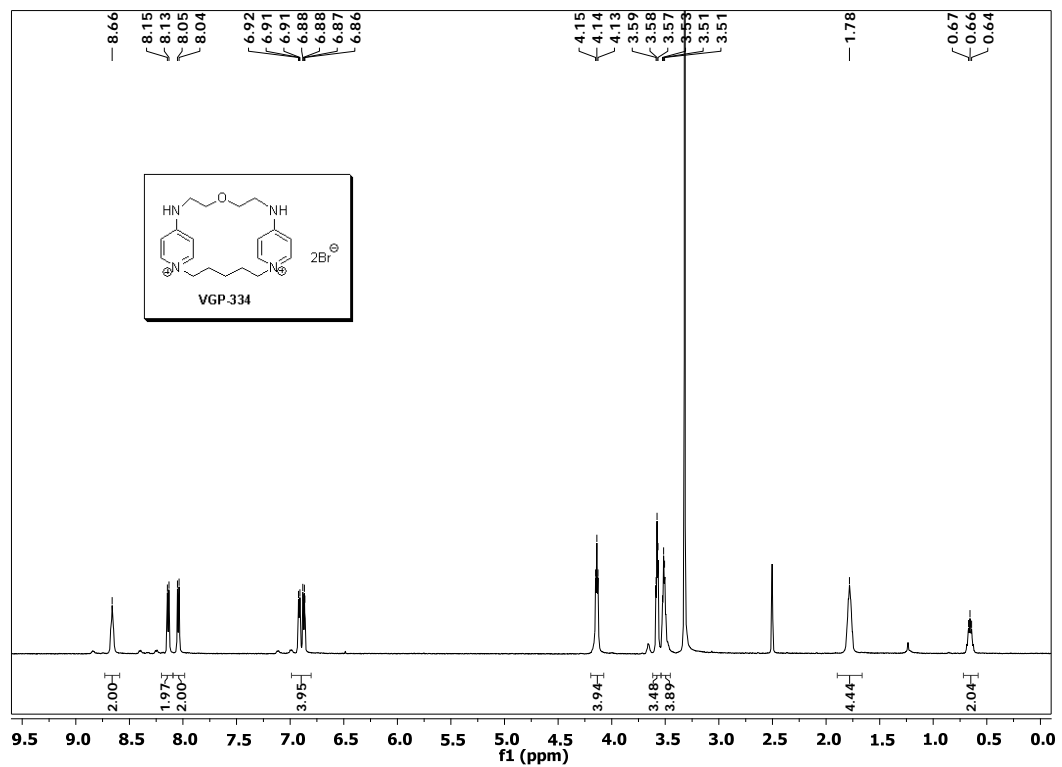


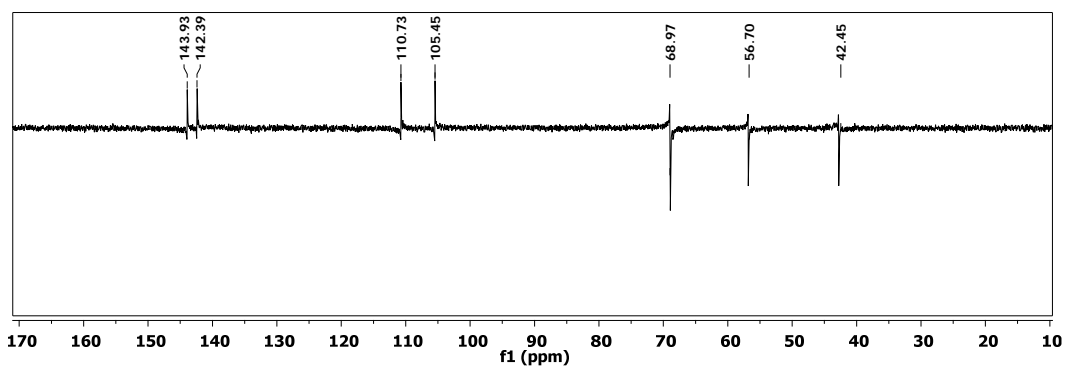
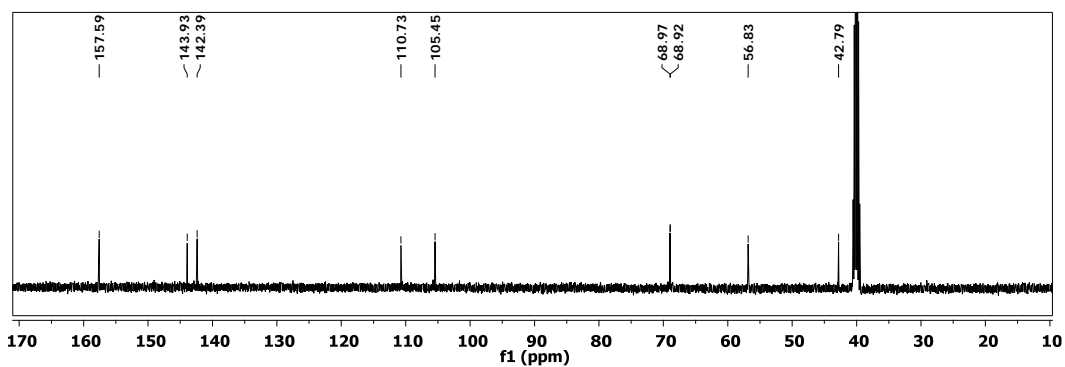
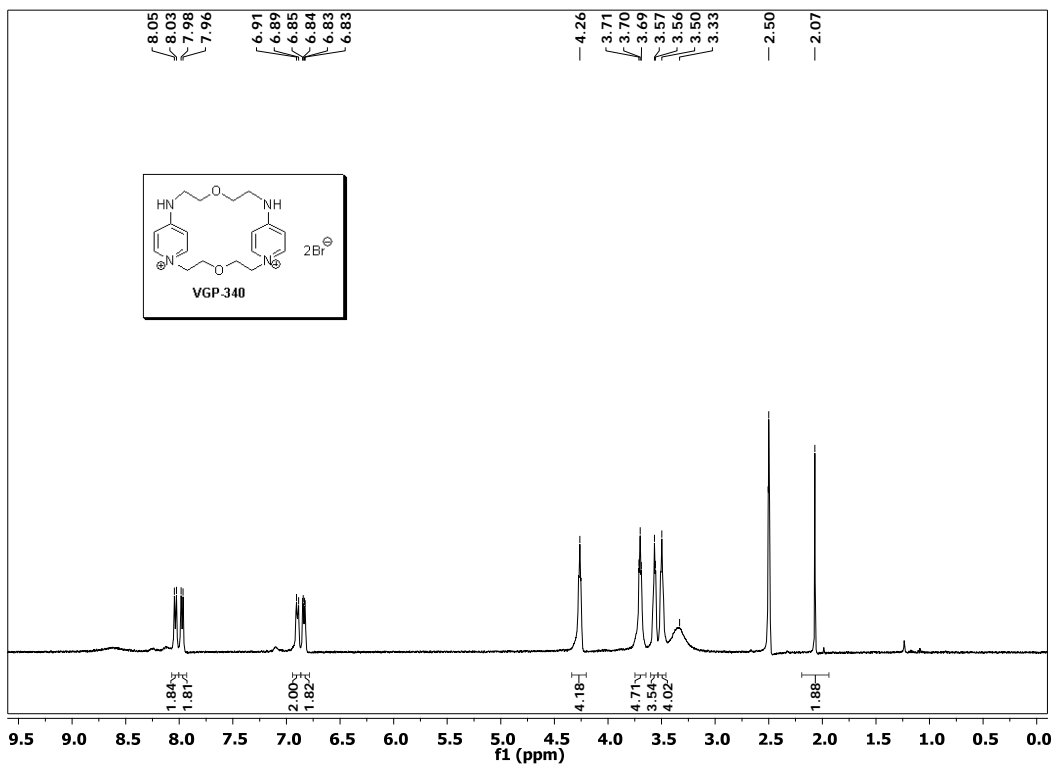


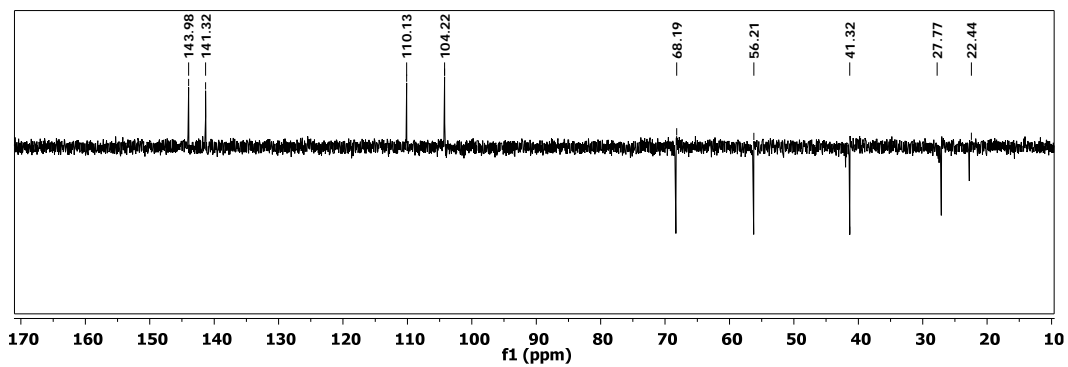
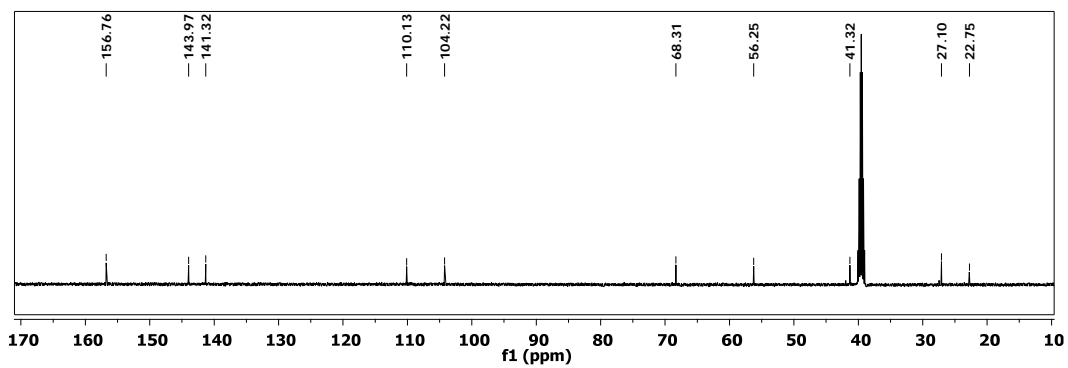
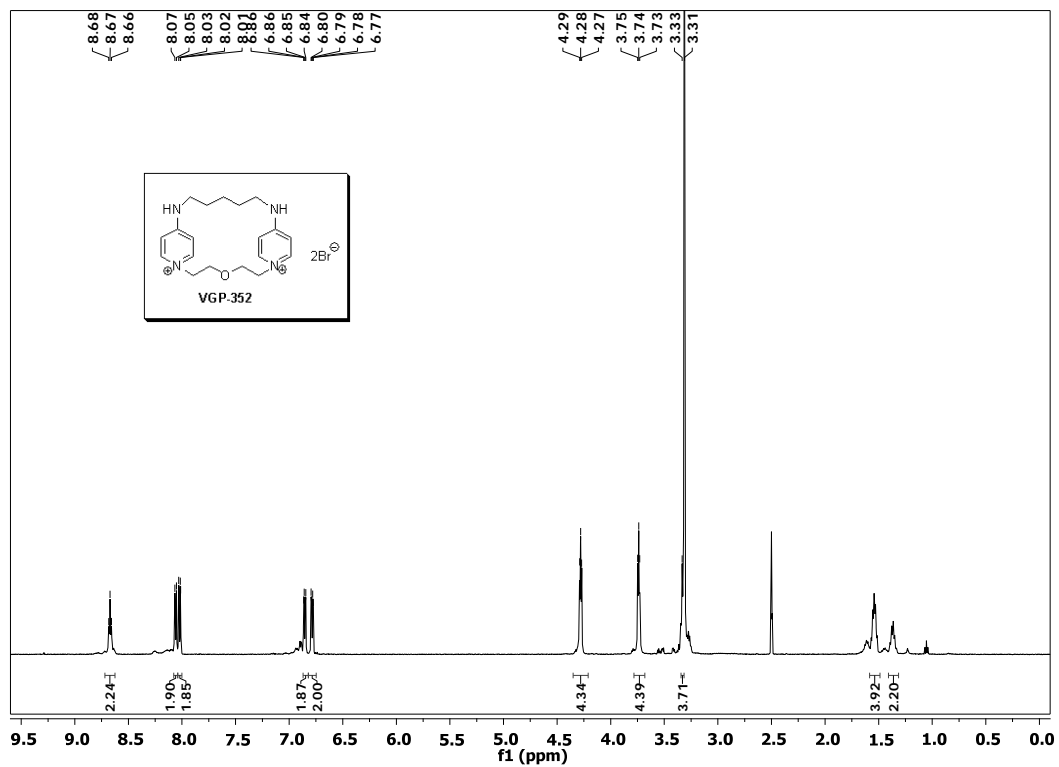












ANEXO II

DOI: 10.1002/cmdc.201100505

Novel 4-Amino Bis-pyridinium and Bis-quinolinium Derivatives as Choline Kinase Inhibitors with Antiproliferative Activity against the Human Breast Cancer SKBR-3 Cell Line

Verónica Gómez-Pérez,^[a] Theresa McSorley,^[b] Wei Cun See Too,^[b] Manfred Konrad,^[b] and Joaquín M. Campos^{*,[a]}

Choline kinase (ChoK) is the first enzyme in the CDP-choline pathway that synthesizes phosphatidylcholine, the major phospholipid in eukaryotic cell membranes. Human ChoK has three isoforms: ChoK α 1, α 2, and β . Specific inhibition of ChoK α has been reported to selectively kill tumor cells. In this study, ten new symmetrical bis-pyridinium and bis-quinolinium derivatives were synthesized and tested for their ability to inhibit human ChoK α 2. These compounds have electron-releasing groups at position 4 of the pyridinium or quinolinium rings.

1,1'-[(Butane-1,3-diylbis(benzene-1,4-diylmethylene))]bis[4-(4-bromo-*N*-methylanilino)pyridinium] dibromide and 1,1'-(bi-phenyl-3,3'-diylmethylene)bis[7-chloro-4-(perhydroazepine-1-yl)quinolinium] dibromide were identified as highly potent ChoK inhibitors with IC₅₀ values of 80 nM. Kinetic enzymatic assays indicated a mixed and predominantly competitive mechanism of inhibition for these compounds, which exhibited strong antiproliferative activity (EC₅₀ 1 μ M) against the human breast cancer SKBR3 cell line.

Introduction

Choline kinase (ChoK; EC 2.7.1.32) catalyzes the phosphorylation of choline by ATP in the presence of Mg²⁺, yielding phosphocholine (PCho) and ADP.^[1] In mammals, there are at least three isoforms of ChoK, encoded by two separate genes (*ChoK α* and *ChoK β*). While human *ChoK β* codes for a single protein, ChoK β (395 aa; NCBI accession number NP_005189, PDB code 3FEG), *ChoK α* undergoes alternative splicing, resulting in the expression of two isoforms, ChoK α 1 (439 aa, NCBI number NP_997634) and ChoK α 2 (457 aa, NCBI number NP_001268, PDB code 3G15).^[1] The active isoforms are present as homodimers, heterodimers, or tetramers. Recent studies regarding the biological function of ChoK isozymes revealed that ChoK α may play a more prominent role in cancer development as compared with ChoK β , as only ChoK α is upregulated in breast cancer cell lines.^[2] The mechanism by which ChoK is involved in tumor formation has not been fully elucidated. However, Chua et al.^[3] recently proposed that the enzyme plays a key role in regulating Akt (Ser473) phosphorylation, thereby promoting cell survival and proliferation.

To gain insight into the structural and functional features of this enzyme family, and to facilitate the structure-based design of specific inhibitors of human ChoKs, we cloned these isoforms, followed by expression in *E. coli* and purification. We aimed to characterize their specific properties with respect to enzymatic mechanism, substrate selectivity, catalytically important residues, protein stability, and distinctive tertiary structure elements.^[4,5] The present work focuses on the inhibitory interaction of novel compounds with human ChoK α 2. Our previous work on nucleoside and nucleotide kinases^[6–9] provided the basis for efficient production of recombinant proteins and

their crystallization in various substrate, substrate analogue, and inhibitor complexes. Structural analysis of human ChoK α 2 revealed the eukaryotic protein kinase fold and key elements of the ChoK family: an ATP-binding loop, the dimer interface, a Brenner's motif, and a choline kinase motif.^[4] The role of the 18-residue insert found in ChoK α 2, the only structural difference from ChoK α 1, is not known; however, our kinetic studies showed that the presence of this insert lowers the K_M value for choline more than tenfold and increases the catalytic rate (k_{cat}) approximately fivefold.

The choline homologue hemicholinium-3 (HC-3, Figure 1) has been reported to strongly inhibit ChoK activity in vitro and to act as an inhibitor of mammalian cell proliferation. However,

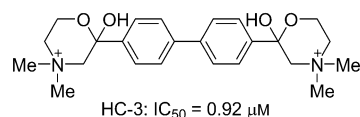


Figure 1. Structure and activity of hemicholinium-3 (HC-3).

- [a] V. Gómez-Pérez, Dr. J. M. Campos
Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia
Universidad de Granada, c/ Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada (Spain)
E-mail: jmcampos@ugr.es
- [b] Dr. T. McSorley, Dr. W. C. See Too,[†] Dr. M. Konrad
Enzyme Biochemistry Group
Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, 37077 Göttingen (Germany)
- [[†]] Current address: School of Health Sciences, Health Campus
Universiti Sains Malaysia, 16150 Kubang Kerian, Kelantan (Malaysia)

it appears to primarily exhibit inhibitory effects toward the high-affinity choline transport system, resulting in severe toxicity to the cholinergic nerve system. Although it is not approved for clinical use, HC-3 has served as the lead compound for the development of ChoK inhibitors with improved potency and selectivity.^[10] The HC-3 molecule is composed of a central hydrophobic biphenyl ring and two cholinomimetic oxazinium rings. Each of the oxazinium rings has a positively charged quaternary ammonium and a hydroxy group. To further the understanding of the molecular mechanism of ChoK inhibition, Park et al.^[11] determined the high resolution x-ray structures of the ChoK α 1 and ChoK α 2 isoforms in complex with HC-3. Detailed kinetic studies revealed that HC-3 is a much more potent inhibitor of the ChoK α 2 isoforms than of ChoK α 1.^[11]

The number and distribution of the positive charges present in these molecules may affect their intracellular location and influence their activity or toxicity, as has been reported for porphyrins.^[12] Another essential property which must be considered is the lipophilicity of these molecules, particularly in regard to antiproliferative activity, as these compounds may have other cellular targets in addition to their interaction with ChoK, such as acetyl- and butyrylcholinesterases (AChE and BChE, respectively). Our most recent computational studies of AChE and BChE enabled the identification of key molecular factors important for high affinity and selectivity toward any one of the three enzymes, and guided the design of an asymmetrical bis-pyridinium compound which exhibited the highest affinity for AChE and highest selectivity over BChE and ChoK.^[13] In our earlier work, a large number of symmetrical bis-pyridinium compounds were designed, synthesized, characterized, and assessed for biological activity.^[10,14–17] These compounds fall into two structural categories: acyclic bis-pyridinium compounds (1, 6, and 7, Figure 2) and bis-pyridinium cyclophanes, which can be considered rigid analogues of the

previous bis-cationic molecules (2–5, Figure 2). ChoK inhibitory potency is notably increased by closing the rings of the structures.^[17] However, such modification decreases antiproliferative activity due to the low lipophilicity of the compounds. Previous QSAR studies demonstrated that the presence of an electron-releasing group at position 4 of the pyridinium ring favors both ChoK inhibitory and antiproliferative activities.^[10] Enzyme inhibition was explained on the basis of other processes which are important for the strength of the drug–ChoK interaction, such as desolvation of the compounds.^[10]

The synthesis of a new set of compounds, all containing a substituted or unsubstituted amino group at position 4 of the heterocycle, is reported here based on variation of the $\log P$ ^[18] of the bis-cationic acyclic compounds. The $\log P$ values vary from 1.81 to 4.85 for a majority of the compounds (8–11, 13–17) with the exception of 12, which has a high hydrophilic value ($\log P = -2.44$), as a negative control (Table 1). A consensus definition of “drug-like” molecule has been derived^[19] from analysis of the CMC database^[20] by defining qualifying ranges (covering 89% of drug molecules) of calculated physical properties such as $\log P$ values between -0.4 and 5.6 (average 2.52). We analyzed the ability of these compounds to inhibit the activity of human ChoK in vitro and studied their antiproliferative effects in cell culture.

Results and Discussion

Chemistry

A series of ten bis-pyridinium and bis-quinolinium derivatives were synthesized. These bis-cationic compounds contain a linker and two cationic ends that are 4-substituted pyridinium or quinolinium rings with cyclic or acyclic amino groups (compounds 8–17). Six different linkers were used, of which 1,3-bis(bromomethyl)benzene and 1,4-bis(bromomethyl)benzene are commercially available. The other four linkers were synthesized as previously described.^[21–24] The 4-substituted pyridines and quinolines were synthesized from 4-chloropyridine or 4-chloroquinoline using a previously reported method.^[15] The final compounds were synthesized by heating the corresponding bromide and heterocyclic derivatives in a 1:2 molar ratio using butanone as solvent.^[15] The reaction was carried out in a sealed tube at 100 °C (Scheme 1).

Pharmacology

Enzyme activity and inhibition

To analyze enzyme inhibition, we used the N-terminally truncated human ChoK variant Δ 84N-hChoK α 2 which lacks the first 84 amino acid residues that are not visible in the crystal structure of the enzyme.^[4] The kinetic parameters determined for Δ 84N-hChoK α 2 (K_M for choline = 54 μ M, k_{cat} = 48.6 s^{-1}) are

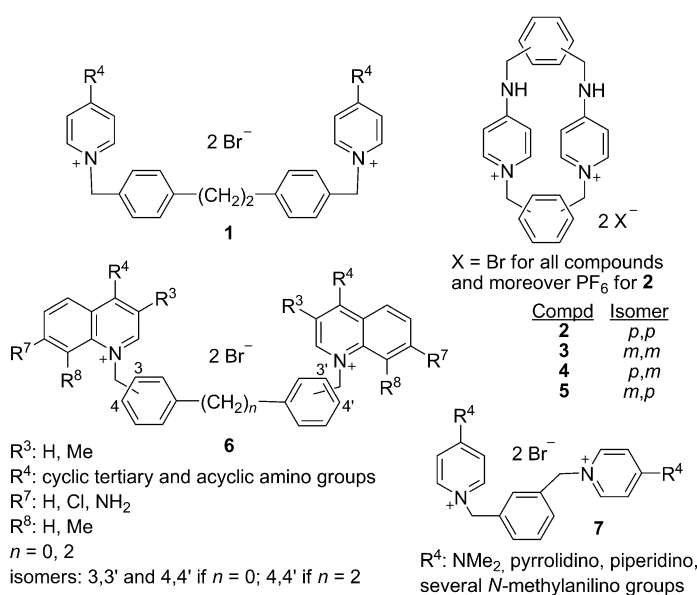


Figure 2. Families of bis-pyridinium compounds (1–5, 7), and bis-quinolinium compounds (6) prepared by our research group.

Table 1. Structure and hChoK α 2 inhibitory activity of bis-cationic compounds 8–17.

Compd	Het—Linker—Het		clog P ^[a]	IC ₅₀ [μ M]
	Het	Linker		
8			1.81	0.55
9			2.42	0.65
10			3.11	0.09
11			2.57	1.35
12			-2.44	0.27
13			4.85	0.20
14			3.70	0.08
15			3.83	0.14
16			1.74	0.18
17			2.62	0.57

[a] Predicted using the Ghose–Crippen modified atomic contribution system (Atomic5 option, Ref. [18]).

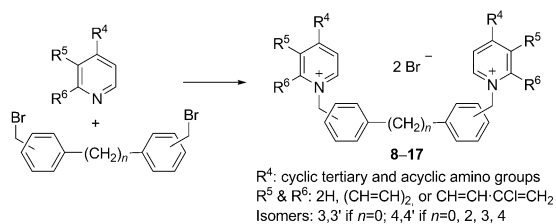
son. Results are shown in Table 1, with IC₅₀ values estimating ChoK inhibitory potential. All compounds displayed IC₅₀ values within the range of 0.08 to 1.35 μ M. Compounds **10** and **14** were the most potent ChoK inhibitors with IC₅₀ values of ~80 nM, a tenfold greater potency than HC-3 (IC₅₀=0.92 μ M) under the same assay conditions. Both compounds also exhibited similar inhibitory activity toward human ChoK α 1, with IC₅₀ values of 109 nM and 83 nM for compounds **10** and **14**, respectively, determined under assay conditions as described in the Experimental Section.

Compounds **10** and **14** were chosen as representative compounds to investigate the mechanism of enzyme inhibition. Analysis of the reaction velocities (V) as a function of substrate concentration ($[S]$) at several fixed inhibitor concentrations showed that the apparent K_M increased and V_{max} decreased relative to an absence of inhibitor. These data point to a mixed type of inhibition. An analysis of the Lineweaver–Burk plots, in which the curves intersected above the abscissa axis, indicated that both **10** and **14** inhibit Δ 84N-hChoK α 2 activity with a pattern indicative of mixed type inhibition^[25] (Figure 3). In contrast, competitive inhibition was

previously reported for HC-3.^[26]

To verify the inhibition characteristics, additional analysis was performed on compound **10**. In plotting $1/V$ against inhibitor concentration $[I]$ at various $[S]$ values (Dixon plot), the set of lines intersect above the abscissa axis, while in the plot of $[S]/V$ against $[I]$ intersection is below the axis. These data are in line with a mixed predominantly competitive inhibition.^[25] Such a mixed type of inhibition has been previously reported, among others, for galactokinase and different protein kinase inhibitors.^[27,28]

The inhibition constant (K_i values) were calculated from the apparent K_M and V_{max} changes. In mixed inhibition, the inhibitor is capable of binding to both the free enzyme and the enzyme–substrate complex with different equilibrium constants. Therefore, the K_i value is separated into K_{ia} , the K_i for binding to the free enzyme, and K_{ib} , for binding to the enzyme–substrate complex.^[29] The K_{ia} and K_{ib} values for **10** are



Scheme 1. Synthesis of ten bis-pyridinium and bis-quinolinium compounds as ChoK inhibitors. Reagents and conditions: a) butanone, sealed tube, 100 °C.

similar to those reported for the wild type protein and the Δ 49N-hChoK α 2 truncated version.^[4]

Inhibitory activities of the compounds were assessed as described in the Experimental Section, using HC-3 for compari-

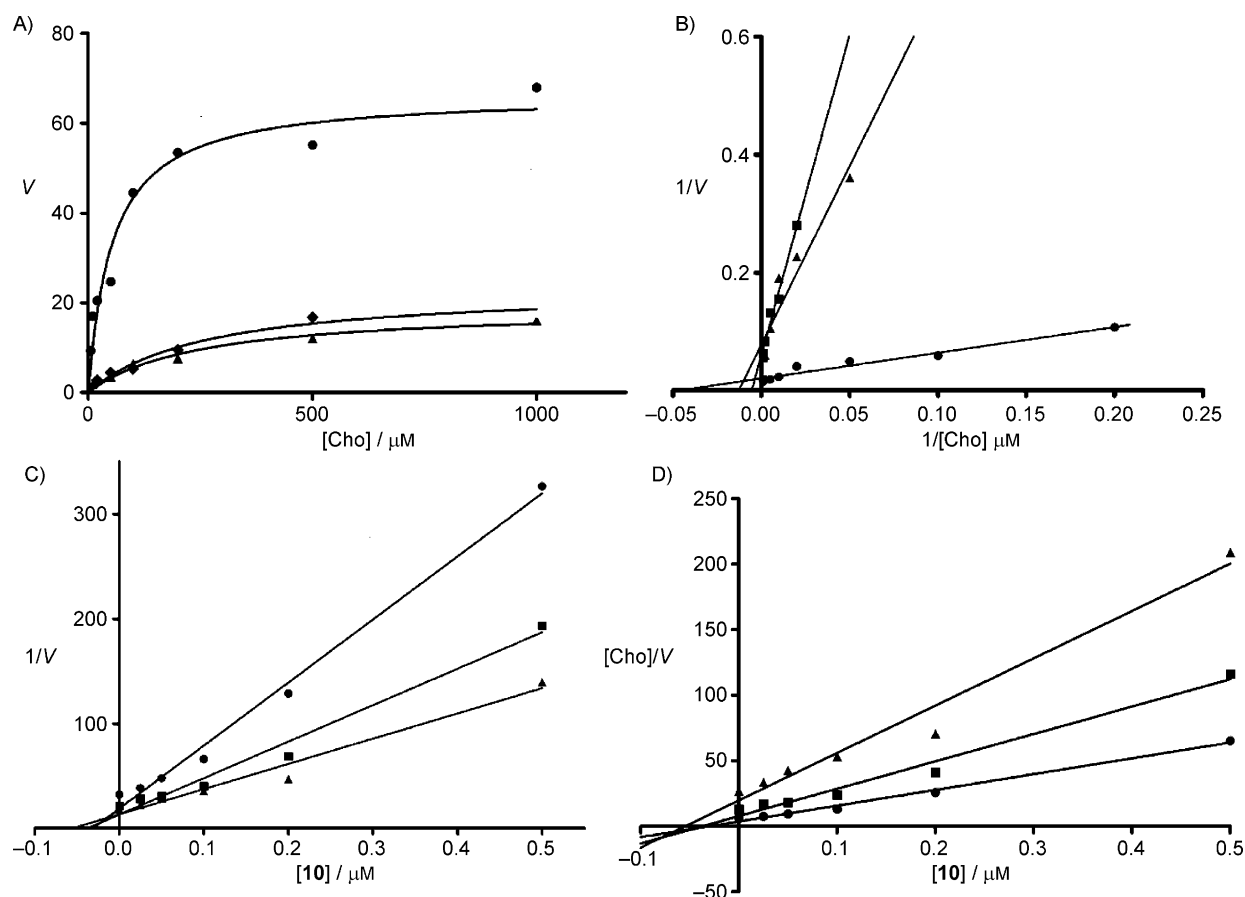


Figure 3. Kinetics and inhibition of $\Delta 84\text{NhChoK}\alpha 2$ by compounds **10** and **14**: A) Plot of ChoK activity alone (\bullet) or in the presence of a single inhibitor (**10** (\blacktriangle) or **14** (\blacklozenge) at $0.5 \mu\text{M}$) at various choline (Cho) concentrations; B) Lineweaver–Burk plot (double reciprocal plot of A): lines intersect in the second quadrant above the x-axis, indicating mixed inhibition. C) Dixon plot, $1/V$ versus $[I]$ for compound **10** with choline at $0.2 \mu\text{M}$ (\bullet), $0.6 \mu\text{M}$ (\blacksquare), and $1.5 \mu\text{M}$ (\blacktriangle); D) Plot of $[\text{chole}]/V$ versus $[I]$ for compound **10**.

0.03 and $0.20 \mu\text{M}$, respectively, and for compound **14**, the K_{ia} and K_{ib} values are 0.03 and $0.37 \mu\text{M}$ respectively. Therefore, the mechanism of inhibition is predominantly competitive ($K_{ia} < K_{ib}$) for both compounds.

Antiproliferative activity

The effects of these ChoK inhibitors on cell proliferation were studied using SKBR-3 cells. This cell line originates from a Her2/neu-positive human breast adenocarcinoma, which is an aggressive and often chemoresistant breast cancer.^[30] In SKBR-3 cells, as well as in a series of other cell lines, upregulation of ChoK α expression levels was detected, leading to elevated levels of phosphocholine.^[2]

To determine the effect of our synthesized compounds on SKBR-3 proliferation, we first screened each inhibitor at two fixed concentrations of 1 and $10 \mu\text{M}$ (Figure 4). On the basis of these initial screening data, we selected six compounds to further characterize with regard to inhibition of cell proliferation. Results obtained from the most representative compounds are summarized in Table 2 as EC_{50} values. All of the compounds evaluated showed activity against SKBR-3 cells, with EC_{50}

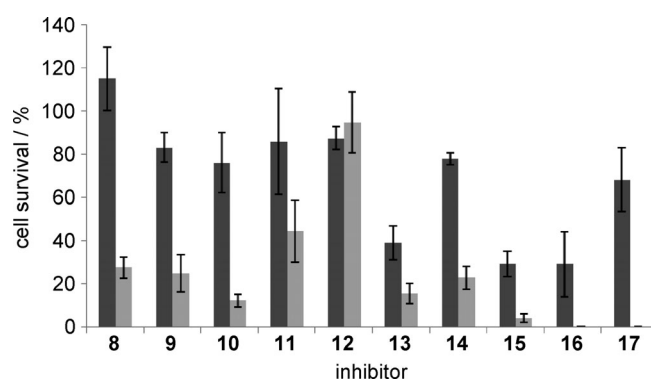


Figure 4. Antiproliferative activity of compounds **8–17** against the human breast cancer SKBR-3 cell line. SKBR-3 cells were incubated with each inhibitor at two concentrations ($1 \mu\text{M}$ (\blacksquare) and $10 \mu\text{M}$ (\square)) and were examined using an MTT assay after 72 h. The results are presented as the mean \pm SD (error bars) of three independent experiments.

values ranging from 1.2 to $8 \mu\text{M}$. Under the same conditions, HC-3 displayed an EC_{50} above $500 \mu\text{M}$, suggesting that our new compounds have in vitro inhibitory activity as much as three orders of magnitude higher than HC-3.

Table 2. Inhibitory activity of selected compounds against the SKBR-3 human breast cancer cell line.

Compd	EC ₅₀ [μM] ^[a]
HC-3	> 500
8	8.28 ± 0.74
10	1.69 ± 0.10
14	1.51 ± 0.12
15	1.24 ± 0.25
16	1.56 ± 0.31
17	3.78 ± 0.89

[a] All experiments were carried out in duplicate; data represent the mean ± SD of three independent determinations.

Conclusions

Although the precise role of ChoK in cancer cells is still not fully understood, it has been postulated that this kinase is up-regulated in order to provide lipid components for actively dividing cancer cells. In addition, the ChoK reaction product *P*Cho appears to induce mitogenic signaling, promoting cellular proliferation. Within our ongoing anticancer research program, there is strong interest in the development of ChoK inhibitors with improved selectivity and potency to be used as pharmacological tools. Both bis-pyridinium and bis-quinolinium-based ChoK inhibitors exhibit mixed inhibition with a predominantly competitive component. The most active compounds have antiproliferative activities of ~1 μM against the SKBR-3 breast cancer cell line, and are therefore significantly more potent than HC-3.

Experimental Section

Chemistry

Melting points were taken in open capillaries on an Electrothermal melting point apparatus and are uncorrected. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed using Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ aluminum sheets, and spots were developed using UV light. Evaporation was carried out in vacuo with a Büchi rotary evaporator and the pressure controlled by a Vacuubrand CVCII apparatus. Merck silica gel 60 with a particle size of 0.040–0.063 mm (230–400 mesh ASTM) was used for flash chromatography. Nuclear magnetic resonance spectra were carried out at the Centro de Instrumentación Científica (CIC) at the Universidad de Granada and were recorded on a 400 MHz ¹H and 100 MHz ¹³C NMR Varian NMR-System-TM 400 or 300 MHz ¹H and 75 MHz ¹³C NMR Varian Inova-TM spectrometers at ambient temperature. Chemical shifts (δ) are quoted in parts per million (ppm) and are referenced to the residual solvent peak. Spin multiplicities are given as s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), or m (multiplet). Coupling constants (*J*) are given in Hz to the nearest 0.5 Hz. High-resolution nano-assisted laser desorption/ionization (NALDI-TOF) or electrospray ionization (ESI-TOF) mass spectra were carried out on a Bruker Autoflex or a Waters LCT Premier Mass Spectrometer, respectively. HC-3 was purchased from Sigma-Aldrich (Spain). Anhydrous solvents (DMF and THF) were purchased from VWR International Eurolab. Anhydrous conditions were performed under argon.

Synthesis of starting materials: 3,3'-Bis(bromomethyl)biphenyl,^[21] 4,4'-bis(bromomethyl)biphenyl,^[22,22] bis-*p*-(bromomethyl)dibenzyl,^[24] 1,4-bis[*p*-(bromomethyl)phenyl]butane,^[25] 4-substituted pyridines^[14,16] and 4-substituted quinolines^[14,31] were synthesized according to literature procedures. 1,3-Bis(bromomethyl)benzene, and 1,4-bis(bromomethyl)benzene were purchased from Sigma-Aldrich.

General experimental procedure for the preparation of bis-pyridinium and bis-quinolinium compounds (8–17): A solution of the linker [bis(bromomethyl) compound] and the corresponding 4-substituted pyridine or quinoline (in a 1:2 molar ratio) was heated at 100 °C in a sealed tube for 15 to 192 h. After filtration and thorough washing with butanone, EtOAc, and diethyl ether, the solid was purified by recrystallization from EtOH or MeOH after the addition of diethyl ether to turbidity.

1,1'-(Biphenyl-4,4'-diylmethylene)bis[4-(4-bromo-*N*-methylanilino)pyridinium] dibromide (8): Brown solid (235 mg, 73%); mp: 268 °C (gel), progressive fusion to 290 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 3.53 (s, 6H), 5.47 (s, 4H), 6.96 (bs, 4H), 7.31 (d, 4H, *J* = 8.7), 7.50 (d, 4H, *J* = 8.2), 7.69 (d, 4H, *J* = 8.3), 7.75 (dd, 4H, *J* = 2.00, 6.64), 8.33 ppm (s, 4H); ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD): δ = 41.48, 61.99, 110.68, 123.74, 129.13, 129.80, 130.30, 135.32, 135.58, 142.51, 144.05, 145.15, 158.62 ppm; UV/Vis (DMSO): λ_{max} (ε) = 296 cm⁻¹ (59); HRMS-ESI (TOF) *m/z*: [*M*-Br]⁺ calcd for C₃₈H₃₄Br₂N₄: 783.0334, found: 783.0333; Anal. calcd for C₃₈H₃₄Br₂N₄: C 52.68, H 3.96, N 6.47, found: C 52.65, H 3.65, N 6.59.

1,1'-(Biphenyl-4,4'-diylmethylene)bis[4-(4-trifluoro-*N*-methylanilino)pyridinium] dibromide (9): White solid (238 mg, 72%); mp: 199 °C (gel), progressive fusion up to 320 °C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 3.58 (s, 6H), 5.50 (s, 4H), 7.00 (d, 4H, *J* = 6.0), 7.52 (d, 4H, *J* = 8.2), 7.61 (d, 4H, *J* = 8.4), 7.70 (d, 4H, *J* = 8.2), 7.91 (d, 4H, *J* = 8.5), 8.37 ppm (d, 4H, *J* = 7.4); ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD): δ = 41.48, 62.09, 110.93, 124.24, 126.40, 128.80, 129.14, 129.24, 130.35, 135.54, 142.50, 144.22, 148.23, 158.54 ppm; UV/Vis (DMSO): λ_{max} (ε) = 296 cm⁻¹ (111); HRMS-ESI (TOF): *m/z* [*M*-Br]⁺ calcd for C₄₀H₃₄Br₂F₆N₄: 763.1871, found: 763.1872; Anal. calcd for C₄₀H₃₄Br₂F₆N₄: C 56.89, H 4.06, N 6.63, found: C 56.91, H 4.08, N 6.33.

1,1'-[(Butane-1,3-diylbis(benzene-1,4-diylmethylene)]bis[4-(4-bromo-*N*-methylanilino)pyridinium] dibromide (10): Brown solid (182 mg, 72%); mp: 155 °C (gel), 239.5 °C (fusion); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 1.62 (t, 2H, *J* = 3.2), 2.64 (t, 2H, *J* = 6.7), 3.52 (s, 6H), 5.37 (s, 4H), 6.92 (bs, 4H), 7.23 (d, 4H, *J* = 8.1), 7.30 (d, 8H, *J* = 8.7), 7.74 (d, 4H, *J* = 8.6), 8.28 ppm (s, 4H); ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD): δ = 32.20, 36.44, 41.46, 62.24, 110.63, 123.74, 129.67, 129.80, 130.34, 133.35, 135.32, 143.94, 144.08, 145.47, 158.59 ppm; UV/Vis (DMSO): λ_{max} (ε) = 296 cm⁻¹ (270); HRMS-ESI (TOF) *m/z*: [*M*-Br]⁺ calcd for C₄₂H₄₂Br₂N₄: 839.096, found: 839.0969; Anal. calcd for C₄₂H₄₂Br₂N₄: C 54.69, H 4.59, N 6.07, found: C 54.68, H 4.55, N 6.18.

1,1'-(Biphenyl-3,3'-diylmethylene)bis[4-(4-trifluoro-*N*-methylanilino)pyridinium] dibromide (11): White solid (235 mg, 75%); mp: 269.3 °C; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 3.57 (s, 6H), 5.53 (s, 4H), 6.99 (d, 4H, *J* = 7.4), 7.42 (d, 2H, *J* = 7.7), 7.53 (t, 2H, *J* = 7.66, 7.7), 7.60 (d, 4H, *J* = 8.3), 7.70 (d, 2H, *J* = 7.8), 7.86 (s, 2H), 7.89 (d, 4H, *J* = 8.5), 8.44 ppm (d, 4H, *J* = 7.6); ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD): δ = 41.46, 62.36, 110.95, 124.23, 126.39, 128.78, 128.80, 129.01, 129.22, 129.25, 131.31, 136.80, 142.80, 144.24, 148.25, 158.54 ppm; UV/Vis (DMSO): λ_{max} (ε) = 296 cm⁻¹ (80); HRMS-NALDI-TOF *m/z*: [*M*-Br-HBr]⁺ calcd for C₄₀H₃₄BrF₆N₄: 683.2609, found: 683.2611;

Anal. calcd for $C_{40}H_{34}Br_2F_6N_4$: C 56.89, H 4.06, N 6.63, found: C 56.90, H 4.31, N 6.52.

1,1'-(Benzene-1,4-diylmethylene)bis[4-(perhydroazepin-1-yl)pyridinium] dibromide (12): White solid (70 mg, 19%); mp: > 350 °C; 1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ = 1.60 (s, 8H), 1.85 (s, 8H), 3.73 (m, 8H), 5.38 (s, 4H), 7.05 (d, 4H, J = 7.9), 7.47 (s, 4H), 8.19 ppm (d, 4H, J = 7.9); ^{13}C NMR (126 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 25.62; 25.68, 49.67, 58.80, 107.76, 128.70, 136.10, 142.26, 155.06 ppm; UV/Vis (DMSO): λ_{max} (ϵ) = 296 cm^{-1} (52); HRMS-ESI (TOF) m/z : $[M-Br]^+$ calcd for $C_{30}H_{40}BrN_4$: 535.2436, found: 535.2424; Anal. calcd for $C_{30}H_{40}Br_2N_4$: C 58.45, H 6.54, N 9.09, found: C 58.57, H 6.59, N 9.00.

1,1'-(Butane-1,4-diylbis(benzene-1,4-diylmethylene))bis[7-chloro-4-(perhydroazepin-1-yl)quinolinium] dibromide (13): Yellow solid (188 mg, 68%); mp: 245 °C; 1H NMR (500 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 1.51 (m, 4H), 1.59 (bs, 8H), 1.94 (bs, 8H), 2.55 (t, 4H, J = 6.5), 3.99 (t, 8H, J = 5.5), 5.80 (s, 4H), 7.15 (d, 2H, J = 7.8), 7.17 (s, 8H), 7.64 (dd, 2H, J = 2.0, 9.2), 8.07 (d, 2H, J = 2.0), 8.34 (d, 2H, J = 9.2), 8.70 ppm (d, 2H, J = 7.8); ^{13}C NMR (125 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 26.47, 26.59, 30.29, 34.38, 53.48, 55.92, 102.99, 117.23, 117.39, 124.89, 126.78, 128.82, 130.45, 132.15, 138.10, 140.13, 142.25, 145.06, 158.38 ppm; UV/Vis (DMSO): λ_{max} (ϵ) = 260 (26), 352 cm^{-1} (38), HRMS-NALDI-TOF m/z : $[M-Br]^+$ calcd for $C_{48}H_{54}BrCl_2N_4$: 835.2909, found: 835.2915; Anal. calcd for $C_{48}H_{54}Br_2Cl_2N_4$: C 62.82, H 5.93, N 6.11, found: C 61.11, H 5.09, N 6.70.

1,1'-(Biphenyl-3,3'-diylmethylene)bis[7-chloro-4-(perhydroazepin-1-yl)quinolinium] dibromide (14): Brown solid (203 mg, 68%); mp: 270.3 °C; 1H NMR (400 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 1.58 (s, 8H), 1.93 (s, 8H), 4.00 (m, 8H), 5.92 (s, 4H, CH_2N^+) 7.18 (d, 6H, J = 7.8), 7.47 (t, 2H, J = 7.7), 7.60 (d, 2H, J = 7.8), 7.65 (dd, 2H, J = 1.8, 9.2), 8.16 (d, 2H, J = 1.9), 7.76 (s, 2H), 8.35 (d, 2H, J = 9.2), 8.79 ppm (d, 2H, J = 7.8); ^{13}C NMR (126 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 26.45, 26.57, 53.49, 55.94, 103.07, 117.22, 117.33, 124.98, 125.68, 125.90, 126.58, 129.67, 130.53, 135.79, 138.17, 140.08, 140.20, 145.15, 158.42 ppm; UV/Vis (DMSO): λ_{max} (ϵ) = 260 (52), 352 cm^{-1} (42); HRMS-ESI (TOF) m/z : $[M-Br]^+$ calcd for $C_{44}H_{46}BrCl_2N_4$: 779.2283, found: 779.2295; Anal. calcd for $C_{44}H_{46}Br_2Cl_2N_4$: C 61.34, H 5.38, N 6.50, found: C 61.11, H 5.09, N 6.70.

1,1'-(Ethylenebis(benzene-1,4-diylmethylene))bis[7-chloro-4-(perhydroazepin-1-yl)quinolinium] dibromide (15): Brown solid (202 mg, 73%); mp: 220 °C (gel), progressive fusion up to 247 °C; 1H NMR (400 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 1.59 (bs, 8H), 1.94 (bs, 8H), 2.81 (s, 4H), 3.99 (m, 8H), 5.80 (s, 4H), 7.17 (m, 6H), 7.23 (d, 4H, J = 8.2), 7.64 (d, 2H, J = 9.2), 8.05 (s, 2H), 8.34 (d, 2H, J = 9.2), 8.70 ppm (d, 2H, J = 7.8); ^{13}C NMR (126 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 26.47, 26.59, 36.25, 53.48, 55.95, 102.98, 117.23, 117.40, 124.94, 126.71, 128.88, 130.46, 132.41, 138.07, 140.13, 141.49, 145.06, 158.36 ppm; UV/Vis (DMSO): λ_{max} (ϵ) = 260 (64), 352 cm^{-1} (120); HRMS-NALDI-TOF m/z : $[M-Br]^+$ calcd for $C_{46}H_{50}BrCl_2N_4$: 807.2596, found: 807.2591; Anal. calcd for $C_{46}H_{50}Br_2Cl_2N_4$: C 62.10, H 5.66, N 6.30, found: C 62.15, H 5.62, N 6.50.

1,1'-(benzene-1,3-diylmethylene)bis[4-(4-chloroanilino)quinolinium] dibromide (16): Yellow solid (171 mg, 69%); mp: 236 °C (gel), 277 °C (fusion); 1H NMR (500 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 5.92 (s, 4H), 6.94 (d, 2H, J = 7.3), 7.26 (s, 4H), 7.55 (d, 4H, J = 8.7), 7.66 (d, 4H, J = 8.7), 7.82 (t, 2H, J = 7.7), 7.99 (t, 2H, J = 7.8), 8.07 (d, 2H, J = 8.9), 8.78 (d, 2H, J = 8.4), 8.83 (d, 2H, J = 7.4), 11.06 ppm (s, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 56.36, 100.62, 118.45, 118.86, 124.45, 127.16, 127.30, 129.94, 131.81, 134.41, 135.16, 137.95, 147.89, 154.96 ppm, UV/Vis (DMSO): λ_{max} (ϵ) = 352 cm^{-1} (70); HRMS-ESI (TOF) m/z : $[M-Br]^+$ calcd for $C_{38}H_{30}BrCl_2N_4$: 691.1031, found:

691.1038; Anal. calcd for $C_{38}H_{30}Br_2Cl_2N_4$: C 59.01, H 3.91, N 7.24, found: C 58.91, H 3.92, N 7.58.

1,1'-(Benzene-1,3-diylmethylene)bis[4-(4-iodoanilino)quinolinium] dibromide (17): Yellow solid (177 mg, 88%); mp: 261.8 °C (gel), 292 °C (fusion); 1H NMR (400 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 5.92 (s, 4H), 6.96 (d, 2H, J = 7.3), 7.01 (s, 1H), 7.21 (d, 2H), 7.34 (d, 4H, J = 8.5), 7.37 (t, J = 6.1, 1H), 7.80 (t, 2H, J = 7.4), 7.85 (d, 2H, J = 8.5), 7.88 (d, 2H, J = 4.4), 7.93 (d, 4H, J = 8.5), 8.79 (d, 4H, J = 7.4), 11.03 ppm (s, 2H); ^{13}C NMR (100.62 MHz, $[D_6]DMSO$): δ = 57.10, 93.55, 101.09, 118.89, 119.34, 124.84, 124.92, 126.77, 127.66, 127.90, 130.18, 134.73, 136.43, 137.23, 138.43, 139.19, 148.43, 155.10 ppm; UV/Vis (DMSO): λ_{max} (ϵ) = 352 cm^{-1} (64); HRMS-ESI (TOF) m/z : $[M-Br]^+$ calcd for $C_{38}H_{30}BrI_2N_4$: 874.9743, found: 874.9750; Anal. calcd for $C_{38}H_{30}Br_2I_2N_4$: C 47.73, H 3.16, N 5.86, found: C 47.66, H 3.22, N 5.98.

Biology

Cell culture: Human breast cancer SKBR-3 cells (HTB-30, ATCC, Rockville, MD, USA) were cultured in McCoy's 5A medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) and GlutaMAX (Gibco, Grand Island, NY, USA). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% carbon dioxide.

Drugs and drug treatments: Inhibitors were dissolved in DMSO and stored at -20 °C. For each experiment, stock solutions were further diluted in medium to obtain the desired concentrations. Solvent (DMSO) did not display any cytotoxicity at the highest concentration used in cell culture.

Enzyme activity assays: Recombinant GST-tagged $\Delta 84N$ -hChokA2 was expressed and purified from *E. coli* as previously described.^[4] Choline kinase activity was assayed spectrophotometrically using a modified pyruvate kinase-lactate dehydrogenase coupled system.^[32] The reaction contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 100 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.5 mM phosphoenolpyruvate, 0.25 mM NADH, 4 units pyruvate kinase, 5 units lactate dehydrogenase, 1 μg purified enzyme, and substrates in a total volume of 1 mL. For determination of steady-state kinetic parameters, the concentration of ATP was kept constant at 2 mM while the concentration of choline was varied. The reaction was initiated by the addition of choline and performed at 37 °C. ADP formation was followed spectrophotometrically using a Uvikon 943 (Kontron) spectrophotometer by measuring the decrease of NADH at 340 nm.

Inhibition assays: The reaction was performed according to the above reaction conditions in the presence of 2 mM ATP, 0.6 mM choline, and varying concentrations of compounds. IC_{50} values were determined as the concentration of the inhibitor required to decrease the initial activity of the enzyme by 50%. The kinetic parameters (K_M and k_{cat}) and IC_{50} values were calculated by nonlinear fitting to the Michaelis-Menten equation using Origin 8.1 software.

The type of inhibition was determined with respect to the substrate choline under Michaelis-Menten steady-state reaction conditions. Inhibition types were determined by Lineweaver-Burk plots, a double reciprocal plot of substrate concentrations versus velocity; a Dixon plot, a plot of $1/V$ against $[I]$, and a plot of $[S]/V$ against inhibitor concentrations. Velocity versus the varying substrate concentrations was fitted to Equation (1) to determine K_M^{app} and V_{max}^{app} . Inhibition constants K_{ia} and K_{ib} were calculated by fitting to linear transformation of the data with GraphPad Prism software.

$$V = V_{\max}^{\text{app}} [S] / (K_M^{\text{app}} + [S]) = V_{\max} [S] / (K_M (1 + [I]/K_{\text{ia}}) + [S] (1 + [I]/K_{\text{ib}})) \quad (1)$$

Cell proliferation assay: Cell proliferation was measured using an MTT assay or WST-1 cell proliferation reagent (Roche Diagnostics), according to the manufacturer's instructions. Both WST-1 and the less expensive MTT were used for colorimetric assays in which the tetrazolium salt is reduced to formazan dyes by cellular enzymes. Unlike MTT, WST-1 yields a water-soluble cleavage product. Additionally, as the WST-1 assay requires one step fewer before quantification, it was chosen for determination of EC₅₀ values in cell proliferation assays.

In the first assay, SKBR-3 cells were cultured in 24-well plates (6–7 × 10³ cells per well). After 24 h, two different concentrations (1 and 10 μM) of the ten synthesized ChoK inhibitors were added to the medium. The MTT assay was performed 72 h after inhibitor addition using an Uvikon 943 spectrophotometer. Absorbance of converted dye was measured at 570 nm, subtracting background at 650 nm.

To determine the EC₅₀ value of selected compounds, SKBR-3 cells were seeded in 96-well plates (6–7 × 10³ cells per well). After 24 h, ten different concentrations (0.01–500 μM range) of the indicated ChoK inhibitors (Table 2) were added directly to the culture media; 72 h after inhibitor addition, 10 μL per well of WST-1 reagent was added, and the plates were incubated for 30 min. The absorbance was measured on a microQuant microplate spectrophotometer (Bio-Tek Instruments) at 450 nm using a 690 nm reference wavelength.

All cell proliferation assays were performed in duplicate and the data shown represent the average of at least three independent experiments. To calculate cell viability, the value of the signal from the treated culture well was expressed as a percentage of the control well. EC₅₀ values were calculated from individual inhibition curves and were plotted by GraphPad Prism software.

Acknowledgements

This study was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación through project HD2008-0028.

Keywords: antitumor agents • bis-pyridinium • bis-quinolinium • inhibitors • SKBR-3 cells

- [1] C. Aoyama, N. Yamazaki, H. Terada, K. Ishidate, *J. Lipid Res.* **2000**, *41*, 452–464.
- [2] G. Eliyahu, T. Kreizman, H. Degani, *Int. J. Cancer* **2007**, *120*, 1721–1730.
- [3] B. T. Chua, D. Gallego-Ortega, A. Ramirez de Molina, A. Ullrich, J. C. Lacal, J. Downward, *Mol. Cancer* **2009**, *8*, 131.
- [4] E. Malito, N. Sekulic, W. C. See Too, M. Konrad, A. Lavie, *J. Mol. Biol.* **2006**, *364*, 136–151.

- [5] W. C. See Too, M. T. Wong, L. L. Few, M. Konrad, *PLoS One* **2010**, *5*, e12999.
- [6] R. Brundiers, A. Lavie, N. Ostermann, J. Reinstein, I. Schlichting, T. Veit, R. S. Goody, M. Konrad, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 35289–35292.
- [7] C. Monnerjahn, M. Konrad, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 143–146.
- [8] a) E. Sabini, S. Ort, C. Monnerjahn, M. Konrad, A. Lavie, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 513–519; b) A. Lavie, M. Konrad, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 351–359.
- [9] B. M. Wöhrl, L. Loubiere, R. Brundiers, R. S. Goody, D. Klatzmann, M. Konrad, *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 757–764.
- [10] J. Campos, M. C. Núñez, V. Rodríguez, M. A. Gallo, A. Espinosa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 767–770.
- [11] B. S. Hong, A. Allali-Hassani, W. Tempel, P. J. Finerty, Jr., F. MacKenzie, S. Dimov, M. Vedadi, H.-W. Park, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 16330–16340.
- [12] T. J. Jensen, M. G. H. Vicente, R. Luguya, J. Norton, F. R. Fronczek, K. M. Smith, *J. Photochem. Photobiol. B* **2010**, *100*, 100–111.
- [13] A. Conejo-García, L. Pisani, M. C. Núñez, M. Catto, O. Nicolotti, F. Leonetti, J. M. Campos, M. A. Gallo, A. Espinosa, A. Carotti, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2627–2645.
- [14] J. Campos, M. C. Núñez, V. Rodríguez, A. Entrena, R. Hernández-Alcoceba, F. Fernández, J. C. Lacal, M. A. Gallo, A. Espinosa, *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 215–225.
- [15] J. M. Campos, M. C. Núñez, R. M. Sánchez, J. A. Gómez-Vidal, A. Rodríguez-González, M. Báñez, M. A. Gallo, J. C. Lacal, A. Espinosa, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2215–2231.
- [16] J. Campos, M. C. Núñez, A. Conejo-García, R. M. Sánchez-Martín, R. Hernández-Alcoceba, A. Rodríguez-González, J. C. Lacal, M. A. Gallo, A. Espinosa, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1095–1112.
- [17] A. Conejo-García, J. Campos, R. M. Sánchez-Martín, M. A. Gallo, A. Espinosa, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3754–3757.
- [18] Pallas Frame Module, CompuDrug Chemistry Ltd., P.O. Box 23196, Rochester, NY 14692 (USA).
- [19] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55–68.
- [20] Comprehensive Medicinal Chemistry Database 94.1, MDL Information Systems, San Leandro, CA (USA).
- [21] W. Wenner, *J. Org. Chem.* **1952**, *17*, 523–528.
- [22] G. L. Szendey, S. Munnes, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 38–42.
- [23] H. A. Staab, M. Haenel, *Chem. Ber.* **1973**, *106*, 2190–2202.
- [24] D. J. Cram, H. Steinberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 5691–5704.
- [25] A. Cortés, M. Cascante, M. L. Cárdenas, A. Cornish-Bowden, *Biochem. J.* **2001**, *357*, 263–268.
- [26] R. Hernández-Alcoceba, L. Saniger, J. Campos, M. C. Núñez, F. Khaless, M. A. Gallo, A. Espinosa, J. C. Lacal, *Oncogene* **1997**, *15*, 2289–2301.
- [27] M. Tang, K. Wierenga, L. J. Elsas, K. Lai, *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, *188*, 376–385.
- [28] H. Olsson, P. Sjöe, O. Ersoy, A. Kristoffersson, J. Larsson, B. Nordén, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4738–4740.
- [29] A. G. Marangoni, *Enzyme Kinetics: a Modern Approach*, Wiley-Interscience, New York, **2003**, p. 61.
- [30] R. Nahta, D. Yu, M. C. Hung, G. N. Hortobagyi, F. J. Esteva, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2006**, *3*, 269–280.
- [31] R. Sánchez-Martín, J. M. Campos, A. Conejo-García, O. Cruz-López, M. Báñez-Coronel, A. Rodríguez-González, M. A. Gallo, J. C. Lacal, A. Espinosa, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3354–3363.
- [32] T. Uchida, S. Yamashita, *Methods Enzymol.* **1992**, *209*, 147–153.

Received: October 31, 2011

Revised: December 15, 2011

Published online on January 25, 2012



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201231534	
Fecha de recepción:	05 octubre 2012, 09:47 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	195	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) - 50%	
Número de solicitantes:	2	
País:	ES	
Título:	DERIVADOS CICLOFÁNICOS DE BIS-PIRIDINIO COMO FÁRMACOS ANTI-PROTOZOARIOS	
Documentos enviados:	Descripción.pdf (18 p.) Reivindicaciones.pdf (6 p.) Resumen.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip POWATT.pdf (1 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=NOMBRE UNGRIA LOPEZ JAVIER - NIF 05211582N,OU=500050022,OU=FNMT Clase 2 CA,O=FNMT,C=ES	
Fecha y hora de recepción:	05 octubre 2012, 09:47 (CEST)	
Codificación del envío:	94:53:21:9C:59:79:8D:51:3C:2E:2C:EE:D3:C5:6B:67:3C:A2:05:8A	

/Madrid, Oficina Receptora/



(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACION:		OEPM, Presentación Electrónica
(5) DIRECCION ELECTRONICA HABILITADA (DEH):		
(6-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CODIGO POSTAL: PAIS RESIDENCIA: CODIGO PAIS: TELEFONO: FAX: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC) - 50% España ES Q2818002D SERRANO, 117 MADRID 28 Madrid 28006 España ES <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(6-2) SOLICITANTE 2:	DENOMINACION SOCIAL: NACIONALIDAD: CODIGO PAIS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CODIGO POSTAL: PAIS RESIDENCIA: CODIGO PAIS: TELEFONO: FAX:	UNIVERSIDAD DE GRANADA .- 50% España ES Q1818002F Parque Tec.de Ciencias de la Salud BIC GRANADA - Avda. de la Innovación, nº 1 ARMILLA 18 Granada 18100 España ES

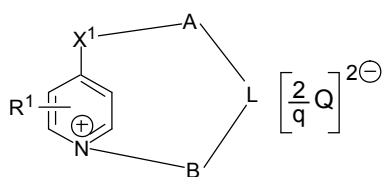
PERSONA DE CONTACTO:		
MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:	INVENCIÓN LABORAL: <input checked="" type="checkbox"/> CONTRATO: <input type="checkbox"/> SUCESIÓN: <input type="checkbox"/>	
(7-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: GAMARRO CONDE NOMBRE: FRANCISCO NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/PASAPORTE:	
(7-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: CASTANYS CUELLO NOMBRE: SANTIAGO NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/PASAPORTE:	
(7-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: GARCÍA HERNÁNDEZ NOMBRE: RAQUEL NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/PASAPORTE:	
(7-4) INVENTOR 4:	APELLIDOS: MANZANO GONZÁLEZ NOMBRE: JOSÉ IGNACIO NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/PASAPORTE:	
(7-5) INVENTOR 5:	APELLIDOS: CAMPOS ROSA NOMBRE: JOAQUÍN M ^a NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/PASAPORTE:	
(7-6) INVENTOR 6:	APELLIDOS: GÓMEZ PÉREZ NOMBRE: VERÓNICA NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/PASAPORTE:	
(8) TÍTULO DE LA INVENCION:		DERIVADOS CICLOFÁNICOS DE BIS-PIRIDINIO COMO FÁRMACOS ANTI-PROTOZOARIOS
(9) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>	
(10) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACCELERADO DE CONCESIÓN	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>	
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>	
(12) DEPOSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	

<p>(13) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:</p> <p>LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS</p>	<p>[] []</p>
<p>(14) EXPOSICIONES OFICIALES:</p> <p>LUGAR: FECHA:</p>	
<p>(15) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:</p> <p>PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:</p>	
<p>(16) AGENTE/REPRESENTANTE:</p> <p>APELLIDOS: UNGRIA LOPEZ NOMBRE: JAVIER CÓDIGO DE AGENTE: 0392/1</p> <p>NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/CIF/PASAPORTE:</p> <p>DOMICILIO: AVDA. RAMON Y CAJAL, 78 LOCALIDAD: MADRID PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28043 PAÍS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAÍS: ES TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: oepm@ungria.es</p> <p>NÚMERO DE PODER: 201101882 - 1º TITULAR</p>	
<p>(17) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:</p> <p>DESCRIPCIÓN: [✓] N.º de páginas: 18 REIVINDICACIONES: [✓] N.º de reivindicaciones: 19 DIBUJOS: [] N.º de dibujos: RESUMEN: [✓] N.º de páginas: 1 FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: [] N.º de figura(s): ARCHIVO DE PRECONVERSION: [✓] DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: [✓] N.º de páginas: 1 LISTA DE SECUENCIAS PDF: [] N.º de páginas: ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: [] OTROS (Aparecerán detallados):</p>	
<p>(18) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:</p> <p>DOC COPIA DNI: [] N.º de páginas: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: [] N.º de páginas: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: [] N.º de páginas: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: [] N.º de páginas: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: [] N.º de páginas: DOC COPIA OTROS: [] N.º de páginas:</p>	<p>[]</p>
<p>(19) NOTAS:</p>	
<p>(20) FIRMA:</p> <p>FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:</p> <p>LUGAR DE FIRMA: FECHA DE FIRMA:</p>	<p>NOMBRE UNGRIA LOPEZ JAVIER - NIF 05211582N MADRID 05 Octubre 2012</p>

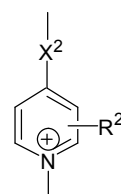
DERIVADOS CICLOFÁNICOS DE BIS-PIRIDINIO COMO FÁRMACOS ANTI-PROTOZOARIOS

RESUMEN

La presente invención se refiere a derivados ciclofánicos de bis-piridinio de fórmula general I, siendo L un grupo de fórmula II, donde Q es la base conjugada de un ácido orgánico o inorgánico y tiene carga negativa q; A y B se seleccionan independientemente entre un grupo espaciador C₂-C₁₅; R¹ y R² se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₁₀, haloalquilo C₁-C₁₀, amino, alquilamino C₁-C₁₀, hidroxilo o alcoxilo C₁-C₁₀; X¹ y X² se seleccionan independientemente entre NH, NR³, O, S y CH₂. Además, la presente invención también protege un método de obtención de los mismos, así como su uso como fármacos anti-protozoarios para el tratamiento y/o prevención de enfermedades producidas por tripanosomátidos, como la leishmaniasis.



Fórmula I



Fórmula II

DERIVADOS CICLOFÁNICOS DE BIS-PIRIDINIO COMO FÁRMACOS ANTI-PROTOZOARIOS

DESCRIPCIÓN

Sector de la técnica

5 La presente invención se relaciona con compuestos leishmanicidas y que encuentran aplicación en el tratamiento de otras enfermedades protozoarias por tripanosomátidos tanto en seres humanos y animales, así como con un método para la preparación de los compuestos de la invención, y ciertos intermedios de dicho método.

Estado de la técnica

10 La leishmaniasis es una enfermedad compleja causada por protozoos parásitos del género *Leishmania*. Los parásitos se transmiten por medio de las moscas hembras vía ciclos antroponóticos o zoonóticos. Los parásitos de *Leishmania* tienen un ciclo de vida dimórfico: la forma promastigota se desarrolla en el intestino de las moscas hembras y representan formas infecciosas que se transmiten al huésped mamífero. En el interior de las células de mamíferos, las formas promastigotas sobreviven y se multiplican como formas amastigotas en el interior de las vacuolas parasitóforas de los macrófagos. Las manifestaciones clínicas más relevantes incluyen la leishmaniasis visceral (LV) y la leishmaniasis cutánea (LC); existen otras manifestaciones clínicas como la leishmaniasis mucocutánea y la leishmaniasis dérmica post-kala-azar. 350 millones de personas en el mundo están en riesgo de infección o de contraer la enfermedad. La incidencia anual se estima entre 1,5 y 2 millones de personas con 59.000 muertes anuales. La leishmaniasis se incluye en el grupo de enfermedades tropicales olvidadas y se le relaciona con la pobreza.

20 El tratamiento de la leishmaniasis es complicado y la enfermedad presenta una gran morbilidad por lo que a menudo se requieren terapias expeditivas, ya que de no ser así, puede haber complicaciones. Entre los fármacos de primera elección se pueden citar los antimoniales pentavalentes (antimoniato de meglumina y estibogluconato de sodio) que se han utilizado para el tratamiento de la LV y la LC durante más de 60 años. Otros tratamientos incluyen al antibiótico poliénico anfotericina B (en particular la formulación en liposomas), la alquifosfocolina, miltefosina, inicialmente desarrollado como fármaco anti-canceroso, y la paromomicina, un antibiótico aminoglicósido que posee actividad antibacteriana y antiprotozoaria. Existen otros fármacos que se emplean en segunda línea, principalmente en casos de leishmaniasis que no responden al tratamiento con los antimoniales como la pentamidina y los azoles (ketoconazol).

30 La pentamidina es una diamidina aromática, todavía en uso como fármaco de primera elección para ciertas formas de LC. También se utiliza únicamente como tratamiento de segunda línea en LV debido a su toxicidad y a su eficacia. El mayor problema de la seguridad relacionada con la pentamidina es la inducción de diabetes mellitus que depende de insulina y su uso en la India para el tratamiento de la LV se ha abandonado).

35 Trabajos más recientes implican a la mitocondria en el modo de acción de la pentamidina. Estudios de microscopía electrónica en *Leishmania*, han demostrado que la pentamidina induce cambios morfológicos con inflamación de la mitocondria y fragmentación del ADN del kinetoplasto (*Langreth, S. G.; Berman, J. D.; Riordan, G. P.; Lee, L. S. J. Protozool. 1983, 30, 555-561*). Igualmente, se ha observado que la pentamidina induce en formas promastigotas de *L. donovani* un desacoplamiento *in situ* en la mitocondria con colapso del potencial de membrana mitocondrial; también se ha descrito una alcalinización de los acidocalcisomas en formas promastigotas de *L. donovani* tratadas con pentamidina (*Vercesi, A. E.; Rodrigues, C. O.; Catisti, R.; Docampo, R. FEBS Lett. 2000, 473, 203-206*). En un estudio reciente se ha sugerido a la mitocondria como el lugar de acumulación de la pentamidina en promastigotas de *L. donovani* y la resistencia a este fármaco está asociada con alteraciones de la mitocondria (*Mukherjee, A.; Padmanabhan, P. K.; Sahani, M. H.; Barrett, M. P.; Madhubala, R. Mol. Biochem. Parasitol. 2006, 145, 1-10*). La pentamidina entra en las formas promastigotas y amastigotas intracelulares de *Leishmania* a través de un transportador que reconoce con alta afinidad a las diamidinas (*Basselin, M.; Denise, H.; Coombs, G. H.; Barrett, M. P. Antimicrob. Agents Chemother. 2002, 46, 3731-3738*). El mecanismo de acción leishmanicida de la pentamidina no está bien definido pero probablemente actúe vía inhibición de la biosíntesis de poliaminas, por medio de interferencia en la síntesis del ADN y modificación en el potencial de membrana mitocondrial.

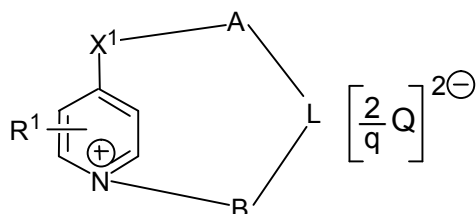
45 Existe por tanto una necesidad de desarrollar compuestos que presenten una buena actividad leishmanicida y que al mismo tiempo, presenten niveles bajos de toxicidad.

50 Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto que determinadas modificaciones en estructuras relacionadas con la pentamidina presentan una apreciable disminución en los niveles de toxicidad de dichos

compuestos, así como notables valores de la actividad leishmanicida, tanto en formas promastigotas como en formas amastigotas intracelulares del parásito *Leishmania*.

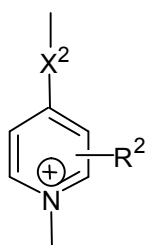
Por consiguiente, la invención proporciona en su primer aspecto una familia de compuestos que presentan fórmula general I,



5

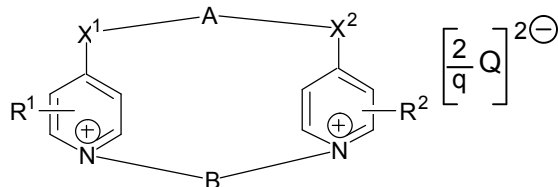
Fórmula I

o cualquiera de sus bases conjugadas, siendo L un grupo de fórmula II,

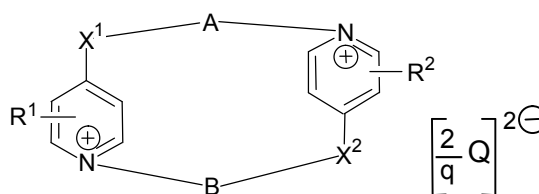


Fórmula II

10 de tal manera que el compuesto de fórmula I es un compuesto de fórmula I-a o fórmula I-b,



Fórmula I-a



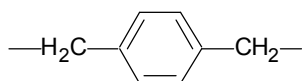
Fórmula I-b

y en donde:

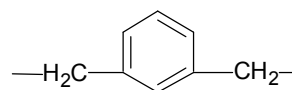
- Q es la base conjugada de un ácido orgánico o inorgánico, y tiene entre 1 y 3 cargas negativas;
- 15 - q es el número de cargas negativas de Q;
- R¹ y R² se seleccionan independientemente entre al menos un sustituyente del grupo que consiste en: hidrógeno, un halógeno, un grupo alquilo conteniendo desde un átomo de carbono hasta 10 (alquilo C₁-C₁₀), un grupo haloalquilo que contenga de 1 a 10 átomos de carbono (haloalquilo C₁-C₁₀), un grupo amino, un grupo alquilamino que puede tener entre 1 y 10 átomos de carbono, un grupo hidroxilo y un grupo alcoxilo;
- 20 - X¹ y X² se seleccionan independientemente entre al menos uno del grupo que consiste en: NH, NR³, O, S y CH₂, y donde R³ se selecciona independientemente entre al menos uno de la siguiente lista: un grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo alquilarilo y un grupo arilalquilo, conteniendo dichos grupos desde 1 a 10 átomos de carbono;
- 25 - A y B, que pueden ser iguales o diferentes, se seleccionan independientemente entre grupos espaciadores con una longitud de la cadena entre 2 y 15 átomos de carbono (espaciador C₂-C₁₅), preferentemente entre al menos uno de los siguientes: un espaciador de cadena tipo alcanodiilo, un espaciador de cadena tipo

alqueniido, un espaciador de cadena tipo alqueniido y un espaciador aromático, como por ejemplo los grupos que se muestran posteriormente en la presente descripción, de tal manera que cuando el compuesto de fórmula I consiste en el compuesto de fórmula I-a donde R^1 y R^2 son H, y X^1 y X^2 son NH, si el espaciador A consiste en un grupo espaciador aromático de fórmula III o un grupo espaciador aromático de fórmula IV,

5



Fórmula III



Fórmula IV

entonces el espaciador B es distinto de dichos grupos de fórmula III y de fórmula IV.

Para mantener la neutralidad de carga en el compuesto de fórmula I, el compuesto cíclico de bispiridinio y la base conjugada Q definida anteriormente se encuentran en relación estequiométrica 1:2/q, donde q es el número de cargas negativas que presenta Q. Esto significa que, por ejemplo, el contraión $[(2/q)Q]^{2\ominus}$ consiste en: $[2Q]^{2\ominus}$ cuando Q es la base conjugada de un ácido monobásico (por ejemplo $[2Br]^{2\ominus}$ cuando Q es el anión bromuro Br^{\ominus} , es decir, la base conjugada del HBr); $[Q]^{2\ominus}$ cuando Q es la base conjugada de un ácido dibásico o de un ácido dicarboxílico (como entre otros son los aniones sulfato $[SO_4]^{2\ominus}$ u oxalato $^{\ominus}OOC-COO^{\ominus}$); $[(2/3)Q]^{2\ominus}$ cuando Q es la base conjugada de un ácido tribásico (por ejemplo $[(2/3)PO_4]^{2\ominus}$ cuando Q es el anión fosfato $PO_4^{3\ominus}$, es decir, la base conjugada del ácido H_3PO_4). Según la invención, resultan preferidas aquellas bases conjugadas de ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de las mismas se describen más adelante en la presente descripción. Más preferiblemente, dicha base conjugada se refiere a un anión derivado de la disociación de un ácido inorgánico, y aún más preferiblemente al anión bromuro.

En el ámbito de la presente invención, "alquilo" significa un radical de hidrocarburo monovalente saturado lineal, de uno a seis átomos de carbono, o un radical de hidrocarburo monovalente saturado ramificado de tres a diez átomos de carbono, por ejemplo y sin limitarse a, metilo, etilo, *n*-propilo, 2-propilo, *tert*-butilo, pentilo, y similares. A lo largo de la presente descripción, el término "alquilo" puede ser igualmente referido como "alquilo C_1-C_{10} ".

En el ámbito de la presente invención, "haloalquilo" significa alquilo sustituido con uno o más, iguales o diferentes, haloátomos, p. ej. y sin limitarse a, $-CH_2Cl$, $-CF_3$, $-CH_2CF_3$ y $-CH_2CCl_3$ y similares, y además incluye aquellos grupos alquilo como el perfluoroalquilo, en los cuales todos los átomos de hidrógeno están reemplazados por átomos de flúor. A lo largo de la presente descripción el término "haloalquilo" puede ser igualmente referido como "haloalquilo C_1-C_{10} ".

En el ámbito de la presente invención, grupo "alquilamino" se refiere a un radical $-NHR^5$ en donde R^5 es un radical que contiene entre 1 y 10 átomos de carbono que se selecciona del grupo que consiste en: alquilo; heteroalquilo sustituido o no sustituido; haloalquilo; cicloalquilo, sustituido o no sustituido, que tiene desde 3 hasta 10 átomos; cicloalquilalquilo en el que el resto de cicloalquilo tiene entre 3 y 6 átomos de carbono; arilo, sustituido o no sustituido, como benceno, naftaleno o antraceno; aralquilo; aralqueno, como p. ej. vinilfenilo, 2-propenilfenilo, vinilnaftilo o (2-propenil)antraceno; heteroarilo como p. ej. furano, tiofeno, pirrol o piridino; heteroaralquilo como tienilalquilo, tenilalquilo, furilalquilo, furfurilalquilo, pirrolilalquilo, pirrolilmetilalquilo o pirridinalquilo; heteroaralqueno como tienilvinilo, tenilvinilo, furilvinilo, furfurilvinilo, pirrolilvinilo, pirrolilmetilvinilo, tienil-(2-propenilo), tenil-(2-propenilo), furil-(2-propenilo), furfuril-(2-propenilo), pirrolil-(2-propenilo), pirrolilmetil-(2-propenilo), pirridinvinilo o piridin-(2-propenilo); heterociclilo que consiste en un ciclo de 3 a 6 unidades, siendo una o dos de ellas heteroátomos del tipo O y/o N; y heterocicilalquilo que consiste en un ciclo de 3 a 7 unidades con un sustituyente alquilo (entre 1 y 6 átomos de carbono), siendo una o dos de ellas heteroátomos del tipo O y/o N, según se definen en esta memoria, p. ej., metilamino, etilamino, fenilamino, bencilamino o similares. A lo largo de la presente descripción el término "alquilamino" puede ser igualmente referido como "alquilamino C_1-C_{10} ".

En el ámbito de la presente invención, el término "grupo alcoxilo" se refiere a un radical $-OR^6$ en donde R^6 es un radical que contiene entre 1 y 10 átomos de carbono que se selecciona del grupo que consiste en: alquilo, arilo, aralquilo y heteroaralquilo, como se definen en esta memoria, p. ej., metoxilo, fenoxilo, piridin-2-ilmetiloxilo, benciloxilo, o similares. A lo largo de la presente descripción el término "grupo alcoxilo" puede ser igualmente referido como "grupo alcoxilo C_1-C_{10} ".

En el ámbito de la presente invención, el término "arilalquilo" o "aralquilo" se refiere a un radical $-R^7R^8$ que contiene desde 1 a 10 átomos de carbono (pudiendo ser igualmente referido en la presente descripción como "arilalquilo C_1-C_{10} " o "aralquilo C_1-C_{10} "), en donde R^7 es un grupo alquilo y R^8 es un grupo arilo, como se han definido en esta descripción. Dicho en otras palabras, aralquilo se refiere a un radical que comprende entre 1 y 10 átomos de carbono que consiste en un radical alquilo R^7 sustituido por un grupo arilo R^8 . Sin que sirva de

limitación, ejemplos de radicales aralquilo son entre otros bencilo, feniletilo (o fenetilo), fenilpropilo, 3-fenil-2-propanilo o similares.

En el ámbito de la presente invención, el término “alquilarilo” significa un radical $-R^9R^{10}$ que contiene desde 1 a 10 átomos de carbono (pudiendo ser igualmente referido en la presente descripción como “alquilarilo C_1-C_{10} ”), en donde R^9 es un grupo arilo y R^{10} es un grupo alquilo, según se han definido en esta memoria. Sin que sirva de limitación, ejemplos de radicales alquilarilo son entre otros los radicales metilfenilo (p. ej. 2-metilfenilo, 3-metilfenilo o 4-metilfenilo), etilfenilo (p. ej. 2-etilfenilo, 3-etilfenilo o 4-etilfenilo) o similares. En consecuencia, la diferencia entre los grupos aralquilo y alquilarilo se refiere a la localización del carácter radical; por ejemplo en el caso de un grupo aralquilo el radical está ubicado en la cadena alquílica unido al resto aromático, como por ejemplo un radical bencilo o feniletilo, mientras que en el caso de un grupo alquilarilo, el carácter de radical está ubicado en el resto arilo, como por ejemplo, los radicales metilfenilo o etilfenilo.

En el ámbito de la presente invención, el término “heteroalquilo” se refiere a heteroalquilo sustituido o no sustituido y arilo sustituido o no sustituido como por ejemplo son tienilmetil, tenilmetilo, furilmetilo, furfuralmetilo, pirrolilmetilo, pirrolilmetilmetilo, piridinmetilo o similares.

En el ámbito de la presente invención, el término “cicloalquilo” se refiere a un radical de cicloalcano que contiene entre 3 y 6 átomos de carbono, como por ejemplo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o similares.

En el ámbito de la presente invención, el término “cicloalquilalquilo” se refiere a grupos alquilo sustituidos con grupos cicloalquilo, o a grupos cicloalquilo sustituidos con grupos alquilo, de tal manera que el resto de cicloalquilo tiene entre 3 y 6 átomos de carbono y el resto alquilo puede contener entre 1 y 5 átomos de carbono, como por ejemplo, metilciclopropilo, metilciclobutilo, metilciclopentilo, etilciclopropilo, etilciclobutilo, propilciclopentilo, propilciclopropilo, propilciclobutilo, propilciclopentilo o similares.

En el ámbito de la presente invención, el término “arilo” se refiere a sustituyentes como fenilo, naftilo, antranilo o similares.

En el ámbito de la presente invención, el término “aralqueno” se refiere a grupos como por ejemplo son entre otros vinilfenilo, 2-propenilfenilo, vinilnaftilo, (2-propenil)antranilo o similares.

En el ámbito de la presente invención, el término “heteroarilo” se refiere a un radical de un heterociclo como los radicales del furano, tiofeno, pirrol, piridino o similares.

En el ámbito de la presente invención, el término “heteroaralquilo” se refiere a, pero no está limitado a tienilalquilo, tenilalquilo, furilalquilo, furfuralalquilo, pirrolilalquilo, pirrolilmetilalquilo, pirridinalquilo o heteroaralqueno como por ejemplo tienilvinilo, tenilvinilo, furilvinilo, furfuralvinilo, pirrolilvinilo, pirrolilmetilvinilo, tienil-(2-propenilo), tenil-(2-propenilo), furil-(2-propenilo), furfural-(2-propenilo), pirrolil-(2-propenilo), pirrolilmetil-(2-propenilo), pirridinvinilo o pirridin-(2-propenilo).

En el ámbito de la presente invención, el término “heteroaralqueno” se refiere a, pero no está limitado a tienilvinilo, tenilvinilo, furilvinilo, furfuralvinilo, pirrolilvinilo, pirrolilmetilvinilo y tienil-(2-propenilo), tenil-(2-propenilo), furil-(2-propenilo), furfural-(2-propenilo), pirrolil-(2-propenilo), pirrolilmetil-(2-propenilo), pirridinvinilo, pirridin-(2-propenilo) o similares.

En el ámbito de la presente invención, el término “heterociclilo” se refiere a un radical de un heterociclo de 3 a 6 unidades, siendo una o dos de ellas heteroátomos del tipo O y/o N, como por ejemplo, pero que no está limitado a radicales de oxirano, tiirano, aziridina, oxetano, tietano, azetidina, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofurano o pirrolidina.

En el ámbito de la presente invención, el término “heterociclilalquilo” se refiere a un radical de un heterociclo de 3 a 6 unidades con un sustituyente alquilo (entre 1 y 6 átomos de carbono), siendo una o dos de ellas heteroátomos del tipo O y/o N, como por ejemplo, pero que no está limitado a metiloxirano, metiltiirano, metilaziridina, metiloxetano, metiltietano, metilazetidina, metiltetrahidrofurano, metiltetrahidrotiofurano o metilpirrolidina.

Por tanto, este aspecto de la invención se refiere a cualquier compuesto de fórmula I o cualquiera de sus bases conjugadas como se define anteriormente, excepto cuando consiste en un compuesto de fórmula I-a donde R^1 y R^2 son H y X es NH, en cuyo caso A y B no pueden ser al mismo tiempo un grupo de fórmula III o un grupo de fórmula IV, ni tampoco A ser un grupo de fórmula III y B un grupo de fórmula IV, ni tampoco A ser un grupo de fórmula IV y B un grupo de fórmula III. Es decir, las cuatro posibles combinaciones de A y B con los grupos de fórmula III y de fórmula IV.

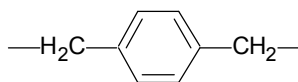
El término "longitud de la cadena", que se usará a lo largo de esta invención y de las reivindicaciones, significa el menor número de átomos entre un extremo y el otro del grupo espaciador. Este grupo espaciador puede contener anillos, como por ejemplo, cicloalquilo y aromáticos, incluyendo heterociclos sustituidos o no sustituidos, tales como un hidrocarburo aromático monocíclico o bicíclico monovalente, de 6 a 10 átomos anulares, el cual está sustituido independientemente entre sí, con uno o más sustituyentes, de preferencia uno, dos o tres sustituyentes seleccionados entre alquilo, haloalquilo, heteroalquilo, halo, nitro, ciano, metilendioxilo, etilendioxilo, cicloalquilo, fenilo opcionalmente sustituido, heteroarilo, haloalcoxilo, fenoxilo opcionalmente sustituido, heteroariloxilo, $-\text{COR}^{11}$ (en donde R^{11} es alquilo o fenilo opcionalmente sustituido), $-(\text{CR}^{12}\text{R}^{13})_{n1}-\text{COOR}^{14}$ (en donde $n1$ es un número entero de 0 a 5, R^{12} y R^{13} son independientemente entre sí hidrógeno o alquilo, y R^{14} es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o cicloalquilalquilo) ó $-(\text{CR}^{15}\text{R}^{16})_{n2}-\text{CONR}^{17}\text{R}^{18}$ (en donde $n2$ es un número entero de 0 a 5, R^{15} y R^{16} son independientemente entre sí, hidrógeno o alquilo, y R^{17} y R^{18} son independientemente entre sí hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o cicloalquilalquilo, ó R^{17} y R^{18} juntamente con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, forman un anillo heterocíclico). Más específicamente el término arilo incluye, pero no está limitado a fenilo, 1-naftilo, y 2-naftilo y los derivados de los mismos. El grupo espaciador puede contener uno o más átomos de O o de S como parte de las cadenas. Los tipos posibles de uniones con estos átomos pueden ser, por ejemplo, enlaces éter (-O-), enlaces azufrados (-S-) y (-S-S-). Para evitar inestabilidades, estas uniones no deberán estar localizadas de manera contigua al grupo X, si éste es NH, O o S.

La longitud de la cadena de los grupos espaciadores varía preferentemente entre 2 y 10, siendo la longitud preferida entre 4 y 7. En ejemplos preferidos de realización, la longitud de la cadena del espaciador está comprendida entre 5 y 6 átomos de carbono.

Los sustituyentes de los grupos de la invención, tales como los grupos alquilo, alquilamino, alcoxilo, arilo, arilalquil y alquilarilo mencionados previamente pueden ser sustituidos opcionalmente por otros sustituyentes, como por ejemplo los que se han definido anteriormente, que no eliminen el efecto deseado del compuesto.

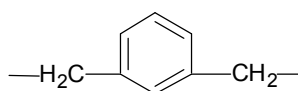
Grupos espaciadores A y B adecuados según la presente invención son entre otros:

- una cadena tipo alcanodiilo C_3-C_{10} , donde dicha cadena de tipo alcano C_3-C_{10} significa una cadena de hidrocarburo lineal de tres a diez átomos de carbono o una cadena de hidrocarburo ramificada de tres a diez átomos de carbono que puede tener al menos un heteroátomo como O y/o S, preferentemente una cadena $-(\text{CH}_2)_p-\text{Z}-(\text{CH}_2)_p-$, donde Z se selecciona entre CH_2 , un átomo de oxígeno o un átomo de S; y p es un valor comprendido entre 1 y 5, como por ejemplo son los espaciadores $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ y $-(\text{CH}_2)_5$, donde p es 2 y Z es un átomo de oxígeno o un grupo CH_2 , respectivamente;
- una cadena tipo alquenediilo C_3-C_{10} con uno o dos dobles enlaces $\text{C}=\text{C}$, donde dicha cadena de tipo alqueno C_3-C_{10} significa una cadena de hidrocarburo lineal de tres a diez átomos de carbono o una cadena de hidrocarburo ramificada de tres a diez átomos de carbono, que contienen por lo menos un doble enlace, p. ej. 1-propeno-1,3-diilo, 1-buteno-1,4-diilo, 2-buteno-1,4-diilo, 1,3-butadieno-1,4-diilo, y similares;
- una cadena tipo alquindiilo C_2-C_{10} con uno o dos triples enlaces $\text{C}\equiv\text{C}$, donde dicha cadena de tipo alquino C_2-C_{10} significa una cadena de hidrocarburo lineal de dos a diez átomos de carbono o una cadena de hidrocarburo ramificada de dos a diez átomos de carbono, que contienen por lo menos un enlace triple, p. ej., 1-propino-1,3-diilo, 1-butino-1,4-diilo, 2-butino-1,4-diilo, 2,4-hexadiino-1,6-diilo, y similares;
- un espaciador aromático C_5-C_{12} seleccionado entre un grupo de fórmula III;



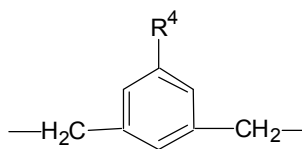
Fórmula III

un grupo de fórmula IV,



Fórmula IV

un grupo de fórmula V,

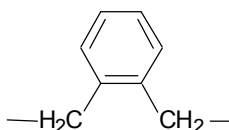


Fórmula V

donde R⁴ se selecciona entre OH u OMe;

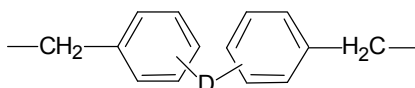
un grupo de fórmula VI,

5



Fórmula VI

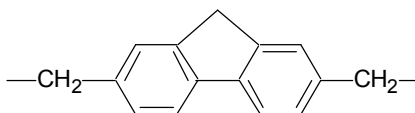
un grupo de fórmula VII,



Fórmula VII

10 donde D se une a los anillos a través de las posiciones *meta* o *para*, y se selecciona entre (CH₂)_n, CH=CH, C≡C y un anillo heterocíclico, siendo n igual a 0, 1 ó 2;

un grupo de fórmula VIII.



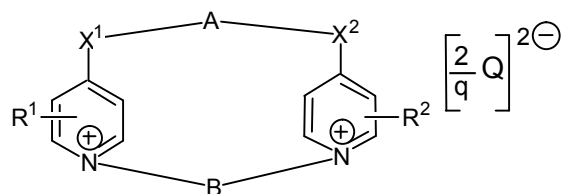
Fórmula VIII

15 En base a los espaciadores anteriores, y como se menciono previamente, cuando el compuesto de fórmula general I es un compuesto de fórmula I-a en donde R¹ y R² son H, X¹ y X² son NH y A es un espaciador de fórmula III o un espaciador de fórmula IV, entonces B es una cadena tipo alcanodiilo -(CH₂)_p-Z-(CH₂)_p-, o una cadena tipo alquendiilo C₃-C₁₀, o una cadena tipo alquindiilo C₂-C₁₀, o el espaciador aromático de formula V, o un espaciador aromático de fórmula VI, o un espaciador aromático de fórmula VII o el espaciador aromático de fórmula VIII como se definieron anteriormente.

25 El término "base conjugada de ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable", que se usará a lo largo de esta invención y de las reivindicaciones, se refiere a una base conjugada de un ácido con propiedades, tales como por ejemplo la toxicidad, adecuadas para ser administrada a un ser humano o animal. Estos compuestos son ampliamente conocidos por el experto en el sector farmacéutico y se encuentran descritos en manuales del sector. Preferiblemente, dicha base conjugada de la presente invención se refiere a los aniones derivados de la disociación de ácidos orgánicos, pero sin limitación, tales como los ácidos maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, embónico, succínico, oxálico, bismetilen-salicílico, metanosulfónico, etanodisulfónico, acético, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, glucónico, láctico, málico, mandélico, cinámico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, itacónico, glicólico, *p*-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, α-cetoglutámico, α-glicerofosfórico, trifluoroacético, glucosa-1-fosfórico y teofilinacético, así como las 8-haloteofilinas, como por ejemplo: 8-bromoteofilina, o bien a los aniones derivados de la disociación de ácidos inorgánicos, pero sin limitación, tales como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, fosforoso, hipofosforoso, bórico, metabórico, tetrabórico y nítrico. Más preferiblemente, dicha base conjugada se refiere a un anión derivado de la disociación de un ácido inorgánico, y aún más preferiblemente al anión bromuro.

35

En una realización preferida, el compuesto de fórmula I consiste en un compuesto de fórmula I-a,



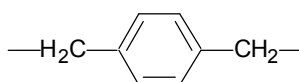
Fórmula I-a

5 o cualquiera de sus bases conjugadas, donde los grupos Q, R¹, R², X¹, X², A y B, se seleccionan independientemente tal como se definieron anteriormente.

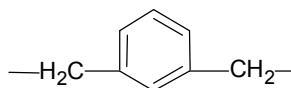
En otra realización preferida del compuesto de fórmula I o de cualquiera de sus bases conjugadas, tanto en sus variantes de fórmula I-a y/o de fórmula I-b, X¹ y X² son NH.

10 En otra realización preferida del compuesto de fórmula I o de cualquiera de sus bases conjugadas, tanto en sus variantes de fórmula I-a y/o de fórmula I-b, R¹ y R² son H. En una realización más preferida de la anterior, además, X¹ y X² son NH.

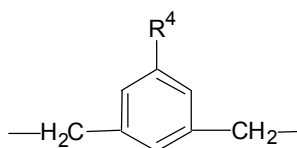
15 En otra realización preferida del compuesto de fórmula I o de cualquiera de sus bases conjugadas, tanto en sus variantes de fórmula I-a y/o de fórmula I-b, los espaciadores A y B se seleccionan independientemente entre al menos uno del siguiente grupo: una cadena tipo alcanodiilo -(CH₂)_p-Z-(CH₂)_p-, donde Z es CH₂ o un átomo de oxígeno, y p es un valor comprendido entre 1 y 3; y un espaciador aromático seleccionado entre un grupo de fórmula III, o un grupo de fórmula IV, o un grupo de fórmula V donde R⁴ se selecciona entre OH u OMe;



Fórmula III



Fórmula IV



Fórmula V

20 de manera que si el compuesto de fórmula general I corresponde a un compuesto de fórmula I-a donde R¹ y R² son H, X¹ y X² son NH, cuando A es un espaciador de fórmula III o un espaciador de fórmula IV, entonces B es la cadena tipo alcanodiilo anterior o el espaciador aromático de fórmula V. En realizaciones preferidas de la anterior, X¹ y X² son NH y/o R¹ y R² son H.

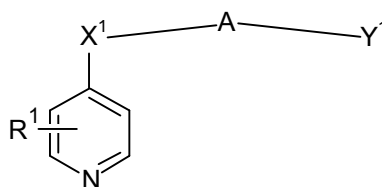
25 En otra realización preferida, el compuesto de fórmula general I (preferentemente el compuesto de fórmula I-a) o cualquiera de sus bases conjugadas, consiste en uno del grupo compuesto por:

- a) Dibromuro de 2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,3)-bencenaciclododecafán-1¹,7¹-bis(ilio) [Compuesto 1, código VGP-222];
- b) Dibromuro de 10-oxa-2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,3)-bencenaciclododecafán-1¹,7¹-bis(ilio) [Compuesto 2, código VGP-234];
- 30 c) Dibromuro de 2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,4)-bencenaciclododecafán-1¹,7¹-bis(ilio) [Compuesto 3, código VGP-310];
- d) Dibromuro de 10-oxa-2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,4)-bencenaciclododecafán-1¹,7¹-bis(ilio) [Compuesto 4, código VGP-312];

- e) Dibromuro de 2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciotetradecafan-1¹,9¹-bis(ilio) [Compuesto **5**, código **VGP-318**];
- f) Dibromuro de 9-oxa-6,12-diaza-1,5(1,4)-dipiridina-3(1,3)-bencenaciododecafan-1¹,5¹-bis(ilio) [Compuesto **6**, código **VGP-328**];
- 5 g) Dibromuro de 5-oxa-2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciotetradecafan-1¹,9¹-bis(ilio) [Compuesto **7**, código **VGP-334**];
- h) Dibromuro de 5,12-dioxa-2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciotetradecafan-1¹,9¹-bis(ilio) [Compuesto **8**, código **VGP-340**];
- i) Dibromuro de 12-oxa-2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciotetradecafan-1¹,9¹-bis(ilio) [Compuesto **9**, código **VGP-352**].

10 A lo largo de la presente descripción, cualquiera de los compuestos de fórmula **I** (que incluye tanto a los derivados de fórmula **I-a** como **I-b**) o de sus bases conjugadas pueden ser igualmente referidos como “compuesto de la invención” o “compuesto de la presente invención”.

15 Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un método para producir un compuesto de fórmula general **I** como cualquiera de los definidos anteriormente, que comprende una etapa de ciclación intermolecular de un compuesto de fórmula **VIII**.



Fórmula **VIII**

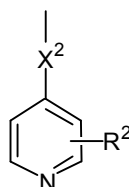
con un derivado de fórmula **IX**,



20 Fórmula **IX**

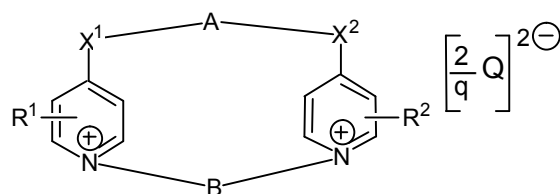
donde:

- R¹, X¹, A y B se seleccionan según se definen anteriormente en el compuesto de fórmula **I**,
- Z es un buen grupo saliente de una reacción de desplazamiento nucleofílico, conocido por cualquier experto, como son por ejemplo un halógeno seleccionado entre Cl, Br, I o el resto sulfonato,
- 25 - uno de los grupos Y¹ o Y² es un grupo de fórmula **X** (preferentemente el grupo Y¹),



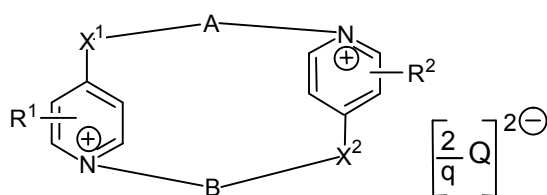
Fórmula **X**

30 y el otro de los grupos Y¹ o Y² (preferentemente el grupo Y²) se selecciona entre Cl, Br, I o sulfonato, de tal manera que cuando Y¹ es el grupo de fórmula **X**, entonces Y² se selecciona entre Cl, Br, I o sulfonato obteniéndose así un compuesto que consiste en la fórmula **I-a** o cualquiera de sus bases conjugadas;



Fórmula I-a

y cuando Y² es el grupo de fórmula X, entonces Y¹ se selecciona entre Cl, Br, I o sulfonato, obteniéndose así un compuesto que consiste en la fórmula I-b o cualquiera de sus bases conjugadas.



Fórmula I-b

5

10

15

Las condiciones de reacción para la obtención de los compuestos de fórmula I-a y I-b son las condiciones habituales en reacciones de desplazamiento nucleófilo y conocidas por cualquier experto medio en la materia. A modo de ejemplo, los compuestos de fórmula I-a se obtuvieron por reacción del derivado de piridina sustituida en 4 (VIII) con la correspondiente molécula IX en ácido acético glacial a reflujo. Tras enfriamiento, la solución se trata con una solución básica (p. ej. hidróxido sódico) y la suspensión resultante se concentra y purifica posteriormente por cromatografía flash. El método para la obtención de los compuestos de fórmula I-b consiste en hacer reaccionar el derivado heterocíclico correspondiente de fórmula VIII y el derivado de fórmula XI en cantidades molares 2:1 en un disolvente orgánico polar aprótico, como el acetonitrilo, a reflujo o a temperatura ambiente.

20

Según este método, se obtienen los compuestos de fórmula I-a o I-b en forma de sales donde Q es un anión cloruro, bromuro, yoduro o sulfonato, según si el grupo Z y el grupo Y¹ o Y² han sido seleccionados entre cloro, bromo, yodo o sulfonato, respectivamente. No obstante, la obtención de compuestos de fórmula I-a o I-b en forma de sales con aniones Q distintos de cloro, bromo, yodo o sulfonato, resulta trivial para cualquier experto medio mediante las habituales técnicas de intercambio de la parte aniónica conocidas y descritas en el estado de la técnica. A modo de ejemplo, a partir de la sal de cloruro, bromuro, yoduro o sulfonato, el método anterior comprendería además la disolución en agua de dicha bis sal inicialmente formada, a la que se le añade un exceso de otro ácido orgánico o inorgánico, hasta que precipite la nueva sal que se filtra al vacío, dando lugar al intercambio de la parte aniónica.

25

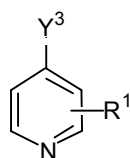
En una realización preferida del método descrito en este aspecto de la invención, cuando se obtiene un compuesto de fórmula I-a, es decir, cuando Y¹ es el grupo de fórmula X definido anteriormente e Y² es un halógeno seleccionado entre Cl, Br, I o sulfonato, comprende además la preparación del compuesto de fórmula VIII previamente a la etapa de ciclación intermolecular, mediante reacción de un compuesto de fórmula XI donde A es un grupo espaciador como se definió previamente,

30

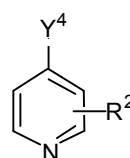


Fórmula XI

con un compuesto de fórmula XII y con un compuesto de fórmula XIII,



Fórmula XII

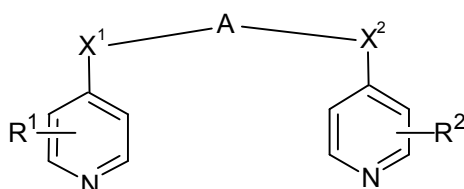


Fórmula XIII

donde:

- R^1 y R^2 se seleccionan independientemente según se han definido con anterioridad en la presente descripción,
- Y^3 e Y^4 se seleccionan independientemente entre Cl, Br, I o sulfonato.

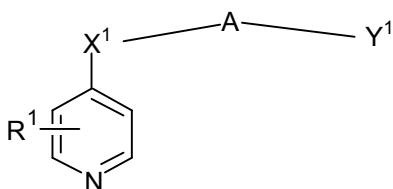
5 De este modo se obtiene el compuesto de fórmula **VIII** que consiste en la fórmula **VIII-a**,



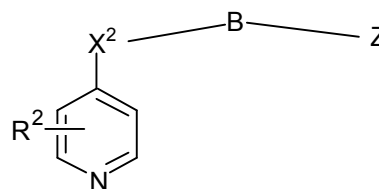
Fórmula **VIII-a**

en donde A, R^1 , R^2 , X^1 y X^2 se definen como anteriormente.

10 En una realización preferida del método para producir un compuesto de fórmula general **I**, Y^1 es un átomo de Cl, Br, I o sulfonato e Y^2 es el grupo de fórmula **X**, obteniéndose así un compuesto de fórmula **I-b**, de manera que dicha reacción de ciclación intermolecular consiste en la reacción del derivado de fórmula **VIII** con el derivado de fórmula **IX-b**,



Fórmula **VIII**



Fórmula **IX-b**

15 donde A, B, R^1 , R^2 , X^1 y X^2 se definen como anteriormente e Y^1 y Z se seleccionan independientemente entre Cl, Br, I y sulfonato, para obtener dicho compuesto de fórmula **I-b** o cualquiera de sus bases conjugadas. Mediante esta variante, los compuestos **VIII** y **IX-b** pueden ser idénticos cuando simultáneamente A es igual a B, R^1 es igual a R^2 , X^1 es igual a X^2 e Y^1 es igual a Z.

20 A lo largo de la presente descripción, cualquiera de los métodos de obtención de los compuestos de fórmula **I** (que incluye tanto a los derivados de fórmula **I-a** como **I-b**) puede ser igualmente referido como "método de la invención" o "método de la presente invención".

25 Los compuestos de fórmula **I** (preferentemente de fórmula **I-a** y/o **I-b**, y más preferentemente de fórmula **I-a**) son útiles para el tratamiento de las protozoosis como la leishmaniasis, y otras enfermedades protozoarias también producidas por tripanosomátidos tales como la denominada enfermedad del sueño (tripanosomiasis africana) o la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Por tanto, otro aspecto de la invención consiste en proporcionar formulaciones o composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de fórmula **I** (es decir, al menos un compuesto de fórmula **I-a** y/o **I-b**) para el tratamiento de las enfermedades protozoarias causadas por tripanosomátidos, preferentemente leishmaniasis, enfermedad del sueño y/o enfermedad de Chagas.

30 La invención proporciona, en su tercer aspecto, una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención donde Q es una base conjugada de ácido orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptable. Dicha composición puede ser igualmente referida en la presente descripción como "composición farmacéutica de la invención" o "composición de la invención", y puede comprender simultáneamente más de un compuesto de fórmula **I-a** y/o de fórmula **I-b**, resultando preferidas aquellas composiciones que comprenden al menos un compuesto de fórmula **I-a**.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar a humanos o se pueden usar en medicina veterinaria, particularmente con otros mamíferos. La administración se

llevará a cabo con una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo suficiente para que demuestre un beneficio para el paciente. Tal beneficio puede ser la mejora de al menos un síntoma. La cantidad administrada, y la velocidad y administración en el tiempo, dependerá de la naturaleza y de aquello que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, es decir, las decisiones sobre las dosis, etc., recaerá bajo la responsabilidad del médico general o del especialista.

En el ámbito de la presente invención, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto activo que provoca la respuesta biológica en el parásito suficiente para alcanzar el efecto tripanocida (p. ej. leishmanicida) caracterizado por la inhibición inicial del crecimiento y la posterior lisis de los parásitos.

Las composiciones farmacéuticas, de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente farmacéuticamente aceptable (agua, alcohol, glicerina, propilenglicol, acetona...), un transportador (tales como liposomas, polímeros de alcohol vinílico y derivados, como polivinilpirrolidona o vinilpirrolidona, polipéptidos de alanina y tiroxina o de lisina, microesferas elaboradas con polímeros sintéticos del tipo de la poliacrilamida, poliacrildextrano y copolímeros de etilvinilacetato), sistema tampón (p. ej. anión carbonato/anión bicarbonato, amonio/catión amonio, ácido acético/anión acetato, ácido cítrico/anión citrato...), estabilizador (tales como nanopartículas, nanocápsulas, sistemas micelares, dendrímeros, fullerenos o nanoestructuras de carbono) u otros materiales conocidos para los expertos en la materia. Tales materiales deben no ser tóxicos y además, no interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del transportador o de otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o mediante inyección, por ejemplo, cutánea, subcutánea o intravenosa.

Las formas farmacéuticas para la administración oral pueden ser en forma de tabletas, cápsulas, polvo o líquido. Una tableta puede contener un transportador sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un transportador líquido tal como agua, aceites animales, vegetales o sintéticos. Las soluciones salinas fisiológicas pueden contener dextrosa u otra solución de sacárido o de glicol tal como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o bien inyección en el lugar de la dolencia, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, que sea apirógena y que tenga un pH apropiado, estabilidad y tonicidad. Aquellos que sean expertos en la técnica podrán preparar soluciones apropiadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tal como una inyección salina, inyección con solución de Ringer e inyección con solución de Ringer con lactato. Cuando se requieran, se podrán incluir conservantes, estabilizadores, sistemas tampón, antioxidantes y/o otros aditivos.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de la invención de fórmula I (preferentemente de fórmula I-a) para la fabricación de una composición farmacéutica.

La composición farmacéutica anterior puede ser útil para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad protozoaria causada por un tripanosomátido, como son entre otras, y sin que sirva de limitación, una leishmaniasis o una tripanosomiasis. La presente invención demuestra la actividad de los compuestos de fórmula I (preferentemente de fórmula I-a) frente al parásito *Leishmania* (responsable de la leishmaniasis); sin embargo, la proximidad de estos parásitos con otros protozoos del Orden *Kinetoplastida* como *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas) y *Trypanosoma brucei* (enfermedad del sueño), permiten augurar su validez para estas otras tripanosomiasis.

Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso de al menos un compuesto de la invención de fórmula I (preferentemente de fórmula I-a) para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad protozoaria causada por un tripanosomátido.

En una realización preferida, dicho compuesto de la invención (preferentemente de fórmula I-a) se usa para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una leishmaniasis, preferentemente una leishmaniasis producida por *Leishmania major* (*L. major*) o por *Leishmania donovani* (*L. donovani*).

En otra realización preferida, dicho compuesto de la invención (preferentemente de fórmula I-a) se usa para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una tripanosomiasis.

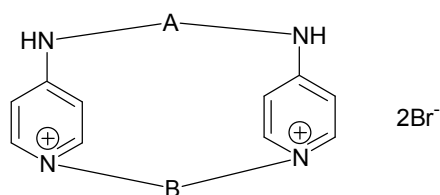
No obstante, debe entenderse de este aspecto de la invención, que la presente invención también protege el método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad protozoaria causada por un tripanosomátido en un sujeto (preferentemente frente a una leishmaniasis como las producidas por *Leishmania major* o por *Leishmania donovani*), que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva al menos uno de los compuestos de la invención de fórmula I, preferentemente de fórmula I-a, lo que incluye también la administración de dicho compuesto en cualquier composición o forma farmacéutica descrita con anterioridad.

Del mismo modo, en dicho aspecto de la presente invención también se contempla la protección del compuesto de la invención o de la composición farmacéutica que lo comprenda según se define anteriormente, para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad protozoaria causada por un tripanosomátido como aquí descrita.

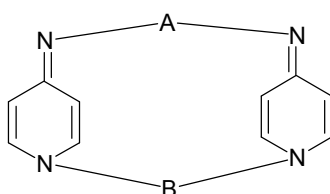
5 Ejemplos de realización de la invención

El alcance de la invención se detallará a continuación por medio de ejemplos. Se describirán las síntesis de distintos compuestos de la invención, identificados como compuestos 1, 2, etc., así como de los intermedios. El punto de fusión se referirá como pf. MeOH es CH₃OH, EtOAc es acetato de etilo, Et₂O es dietiléter, DMF es *N,N*-dimetilformamida y DMSO es dimetil sulfóxido.

10 Las estructuras de los compuestos **1** al **9** de la invención se pueden representar mediante la fórmula general:



Una representación estructural alternativa es la siguiente:



que representa la base conjugada.

15 Los grupos A y B se detallan en la Tabla 1 para cada uno de los compuestos **1** al **9**.

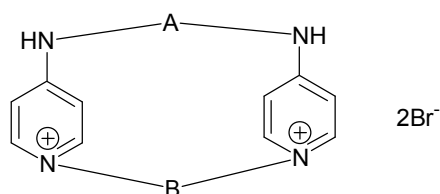
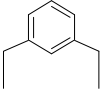
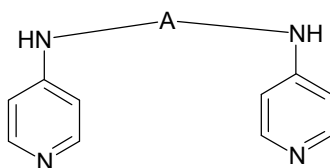


Tabla 1. Estructura de los ejemplos explicados en esta invención.

Compuesto N°	A	B	Código
1		(CH ₂) ₅	VGP-222
2		(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂	VGP-234
3		(CH ₂) ₅	VGP-310
4		(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂	VGP-312
5	(CH ₂) ₅	(CH ₂) ₅	VGP-318

Compuesto N°	A	B	Código
6	$(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$		VGP328
7	$(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$	$(\text{CH}_2)_5$	VGP-334
8	$(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$	$(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$	VGP-340
9	$(\text{CH}_2)_5$	$(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$	VGP-352

Los intermedios VIII-1 y VIII-2 tienen la fórmula estructural:



donde A consiste en un grupo definido en la Tabla 2:

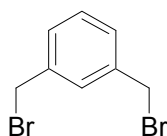
Tabla 2. Modificaciones estructurales de los intermedios VIII-1 y VIII-2.

Intermedio N°.	A	Código
VIII-1	$(\text{CH}_2)_5$	VGP-314
VIII-2	$(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$	VGP-320

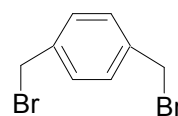
- 5 Los siguientes compuestos conocidos se prepararon como materiales de partida mediante el método publicado en la respectiva referencia suministrada para cada caso.

I) REACTIVOS DE PARTIDA CONOCIDOS

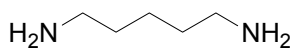
- 10 Los compuestos α,α' -dibromo-*m*-xileno (A), α,α' -dibromo-*p*-xileno (B), 1,5-diaminopentano (C), bis(2-aminoetil)éter (D), 1,5-dibromopentano (E), bis(2-bromoetil)éter (F) y 4-bromopiridina (G) son comerciales y suministrados por Sigma-Aldrich Química S. A.



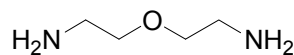
A.- α,α' -Dibromo-*m*-xileno



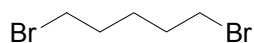
B.- α,α' -Dibromo-*p*-xileno



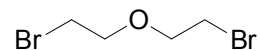
C.- 1,5-Diaminopentano



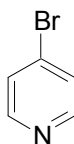
D.- Bis(2-aminoetil)éter



E.- 1,5-Dibromopentano



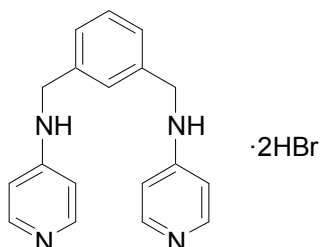
F.- Bis(2-bromoetil)éter



G.- 4-Bromopiridina.

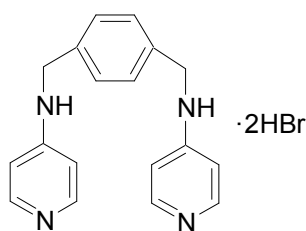
15

Los siguientes compuestos conocidos, el dibromidrato de 1,3-bis[(piridin-4-il)aminometil]benceno y el dibromidrato de 1,4-bis[(piridin-4-il)aminometil]benceno, se prepararon como sustancias de partida de acuerdo con el método indicado en la referencia: Conejo-García, A.; Campos, J. M.; Sánchez-Martín, R.; Gallo, M. A.; Espinosa, A. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3754-3757.



5

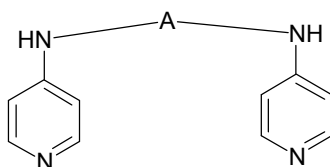
Dibromidrato de 1,3-bis[(piridin-4-il)aminometil]benceno



Dibromidrato de 1,4-bis[(piridin-4-il)aminometil]benceno

II) PREPARACIÓN DE NUEVAS SUSTANCIAS DE PARTIDA

10 Los intermedios **VIII-1** y **VIII-2** que tienen la fórmula estructural:



donde el grupo A se define en la Tabla 2, se prepararon por reacción de la 4-bromopiridina con la correspondiente diamina en fenol, a la temperatura de reflujo de la mezcla. Tras enfriamiento, la solución se acidificó con HBr en HOAc glacial al 33%. El dibromuro obtenido se obtuvo en forma de base usando NaOH 1M.

15 La obtención de los compuestos de fórmulas **VIII-1** y **VIII-2** se ejemplifica a continuación:

II.1) Intermedio **VIII-1**, **VGP-314**, ***N,N'***-bis-[(4-piridil)pentano]-1,5-diamina:

Una mezcla de pentano-1,5-diamina (0,28 mL, 2,3 mmoles) y 4-bromopiridina (720 mg, 4,6 mmoles) en fenol (3 mL) se calentó bajo atmósfera de argón a 170 °C durante 20 horas. Tras enfriamiento a temperatura ambiente el crudo de reacción se disolvió en metanol y se acidificó hasta pH 1-2 con HBr en HOAc glacial al 33%. Se añadió Et₂O y el sólido se recogió por filtración a vacío. El dibromuro obtenido se pasó a forma de base añadiendo NaOH 1M hasta pH básico obteniéndose un sólido marrón microcristalino (0,80 g, 61%); pf 256 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,03 (s, 2H); 8,65 (sa, 2H); 8,20 (d, 2H, *J* = 7,1 Hz); 8,05 (d, 2H, *J* = 7,0 Hz); 6,98–6,79 (m, 4H); 3,25 (m, 4H); 1,59 (m, 4H); 1,46–1,34 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158,31; 141,14; 138,78; 110,17; 105,07; 42,45; 27,94; 24,07. HRMS (*m/z*): Calculado para C₁₅H₂₁N₄ (M + H)⁺ 257,1766; encontrado 257,1761. Análisis para C₁₅H₂₀N₄. Calcd.: C 70,28; H 7,86; N 21,86; encontrado: C 70,03; H 7,97; N 21,62.

25

II.2) Intermedio **VIII-2**, **VGP-320**, bis-[2-(4-piridil)aminoetil]éter:

Una mezcla de bis-2-(aminoetil)éter (0,90 g, 5,1 mmoles) y 4-bromopiridina (0,40 g, 10,2 mmoles) en fenol (4 mL), se calentó bajo atmósfera de argón a 170 °C durante 20 horas. Tras enfriamiento a temperatura ambiente el crudo de reacción se disolvió en metanol y se acidificó hasta pH 1-2 con HBr en HOAc glacial al 33%. Se añadió Et₂O y el sólido se recogió por filtración a vacío. El dibromuro obtenido se pasó a forma de base añadiendo

30

NaOH 1M hasta pH básico obteniéndose un sólido marrón microcristalino (1,30 g, 61%); pf 238 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,99 (d, 4H, *J* = 6,1 Hz); 6,49 (d, 4H, *J* = 6,3 Hz); 3,56 (t, 4H, *J* = 5,7 Hz); 3,23 (d, 4H, *J* = 5,6 Hz). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 153,98; 149,82; 107,58; 69,07; 41,98; HRMS (m/z): Calculado para C₁₄H₁₉N₄O (M + H)⁺ 259,1559; encontrado 259,1556. Análisis para C₁₄H₁₈N₄O. Calcd.: C 65,09; H 7,02; N 21,69; encontrado: C 65,21; H 7,18; N 21,51.

III) EJEMPLOS PREPARATIVOS

III.1) Compuesto 1, código VGP-222, dibromuro de 2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,3)-bencenacilododecafan-1¹,7¹-bis(ilio):

Una disolución de 1,5-dibromopentano (47 μL, 0,34 mmoles) en acetonitrilo (35 mL) se adiciona gota a gota sobre una suspensión de 1,3-bis[(piridin-4-il)aminometil]benceno (100 mg, 0,34 mmoles) en acetonitrilo (50 mL) a reflujo. La mezcla de reacción se dejó agitando a reflujo durante 5 días. Tras enfriamiento, apareció un precipitado que se filtró a vacío, tras lavado con EtOAc y Et₂O. Se obtuvo un sólido blanco microcristalino (60,4 mg, 34%); pf 330 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,35 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H); 8,11 (dd, *J* = 7,3; 1,4 Hz, 2H); 8,06 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H); 7,48–7,30 (m, 3H); 7,22 (s, 1H); 6,96 (dd, *J* = 7,3; 2,8 Hz, 2H); 6,64 (dd, *J* = 7,3; 2,7 Hz, 2H); 4,56 (d, *J* = 6,3 Hz, 4H); 4,23–4,07 (m, 4H); 1,77 (c, *J* = 11,4 Hz, 4H); 0,68–0,50 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156,49; 143,36; 141,58; 137,71; 129,14; 127,12; 123,48; 110,68; 104,98; 55,99; 44,84; 28,05; 19,99. HRMS (m/z): Calculado para C₂₃H₂₈N₄Br (M – Br)⁺ 439,1497; encontrado 439,1508. Análisis para C₂₃H₂₈N₄Br₂. Calcd.: C 53,09; H 5,42; N 10,77; encontrado: C 53,21; H 5,31; N 10,83.

III.2) Compuesto 2, VGP-234, dibromuro de 10-oxa-2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,3)-bencenacilododecafan-1¹,7¹-bis(ilio):

Una disolución de bis(2-bromoetil)eter (43,2 μL, 0,34 mmoles) en acetonitrilo (35 mL) se adiciona gota a gota sobre una suspensión de 1,3-bis[(piridin-4-il)aminometil]benceno (100 mg, 0,34 mmoles) en acetonitrilo (50 mL) a reflujo. La mezcla de reacción se dejó agitando a reflujo durante 5 días. Tras enfriamiento, apareció un precipitado que se filtró a vacío, tras lavado con EtOAc y Et₂O. Se obtuvo un sólido blanco microcristalino (50,2 mg, 28%); pf 320 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,37 (t, 2H, *J* = 6,5 Hz); 8,10 (dd, 2H, *J* = 7,3; 1,6 Hz); 7,99 (d, 2H, *J* = 7,4 Hz); 7,51 (s, 1H); 7,45–7,37 (m, 1H); 7,36–7,28 (m, 2H); 6,95 (dd, 2H, *J* = 7,3; 2,8 Hz); 6,72 (dd, 2H, *J* = 7,4; 2,8 Hz); 4,51 (d, 4H, *J* = 6,5 Hz); 4,34–4,26 (m, 4H); 3,77–3,66 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156,59; 143,70; 141,87; 137,48; 129,32; 127,29; 126,07; 110,66; 104,95; 68,38; 56,51; 44,91. HRMS (m/z): Calculado para C₂₂H₂₆N₄OBr (M – Br)⁺ 441,1290; encontrado 441,1300. Análisis para C₂₂H₂₆N₄OBr₂. Calcd.: C 50,59; H 5,02; N 10,73; encontrado: C 50,60; H 4,93; N 10,85.

III.3) Compuesto 3, VGP-310, dibromuro de 2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,4)-bencenacilododecafan-1¹,7¹-bis(ilio):

Una disolución de 1,5-dibromopentano (51,6 μL, 0,38 mmoles) en acetonitrilo (40 mL) se adiciona gota a gota sobre una suspensión de 1,4-bis[(piridin-4-il)aminometil]benceno (110 mg, 0,80 mmoles) en acetonitrilo (55 mL) a reflujo. La mezcla de reacción se dejó agitando a reflujo durante 10 días. Tras enfriamiento, apareció un precipitado que se filtró a vacío, tras lavado con AcOEt y Et₂O. Se obtuvo un sólido blanco microcristalino (115 mg, 58%); pf > 350 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,38 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz); 8,07 (d, 2H, *J* = 7,0 Hz); 7,99 (d, 2H, *J* = 7,1 Hz); 7,37 (s, 4H); 6,94 (d, 2H, *J* = 4,5 Hz); 6,35 (d, 2H, *J* = 7,4 Hz); 4,56 (d, 4H, *J* = 5,9 Hz); 4,12 (s, 4H); 1,68 (m, 4H); 0,68 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156,48; 142,91; 141,50; 136,23; 128,09; 111,48; 105,72; 57,06; 44,89; 29,14; 21,82. HRMS (m/z): Calculado para C₂₃H₂₈N₄Br (M – Br)⁺ 439,1497; encontrado 439,1518. Análisis para C₂₃H₂₈N₄Br₂. Calcd.: C 53,09; H 5,42; N 10,77; encontrado: C 53,00; H 5,35; N 10,51.

III.4) Compuesto 4, VGP-312, dibromuro de 10-oxa-2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,4)-bencenacilododecafan-1¹,7¹-bis(ilio):

Una disolución de bis(2-bromoetil)eter (47 μL, 0,38 mmoles) en acetonitrilo (40 mL) se adiciona gota a gota sobre una suspensión de 1,4-bis[(piridin-4-il)aminometil]benceno (100 mg, 0,34 mmoles) en acetonitrilo (50 mL) a reflujo. La mezcla de reacción se dejó agitando a reflujo durante 9 días. Tras enfriamiento, apareció un precipitado que se filtró a vacío, tras lavado con AcOEt y Et₂O. Se obtuvo un sólido blanco microcristalino (86 mg, 50%); pf 330 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,43 (s, 2H); 8,11 (d, 2H, *J* = 7,3 Hz); 7,98 (d, 2H, *J* = 7,3 Hz); 7,37 (s, 4H); 6,99 (dd, 2H, *J* = 7,3; 2,8 Hz); 6,04 (dd, 2H, *J* = 7,4; 2,8 Hz); 4,57 (d, *J* = 5,0 Hz, 4H); 4,29–4,21 (m, 4H); 3,76–3,59 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156,49; 143,69; 141,31; 136,04; 128,12; 111,45; 105,61; 69,44; 57,33; 45,37. HRMS (m/z): Calculado para C₂₂H₂₅N₄OBr (M – HBr – Br)⁺ 361,2028; encontrado 361,2021. Análisis para C₂₂H₂₆N₄OBr₂. Calcd.: C 50,59; H 5,02; N 10,73; encontrado: C 50,69; H 5,3; N 10,53.

III.5) Compuesto 5, VGP-318, dibromuro de 2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciotetradecafan-1¹,9¹-bis(ilio):

Una disolución de 1,5-dibromopentano (50 μ L, 0,37 mmoles) en acetonitrilo (40 mL) se adiciona gota a gota sobre una suspensión de **VGP-314** (95 mg, 0,37 mmoles) en acetonitrilo (50 mL) a reflujo. La mezcla de reacción se dejó agitando a reflujo durante 14 días. Tras enfriamiento, apareció un precipitado que se filtró a vacío, tras lavado con AcOEt y Et₂O. El sólido se recrystalizó en MeOH, obteniéndose un sólido beige microcristalino (60 mg, 33%); pf 305 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,64 (t, 2H, *J* = 6,1 Hz); 8,13 (d, 2H, *J* = 7,2 Hz); 8,00 (d, 2H, *J* = 7,3 Hz); 6,80 (ddd, 4H, *J* = 18,9; 7,3; 2,7 Hz); 4,12 (dd, 4H, *J* = 15,5; 9,7 Hz); 3,34 (m, 4H); 1,78 (m, 4H); 1,53 (m, 4H); 1,30 (m, 2H); 0,64 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157,17; 144,03; 141,59; 110,70; 104,83; 56,31; 49,04; 41,84; 28,54; 23,40; 20,56. HRMS (*m/z*): Calculado para C₂₀H₂₉N₄ (M – Br – HBr)⁺ 325,2392; encontrado 325,2399. Análisis para C₂₀H₃₀N₄Br₂. Calcd.: C 49,40; H 6,22; N 11,52; encontrado: C 49,61; H 6,20; N 11,38.

III.6) Compuesto 6, VGP-328, dibromuro de 9-oxa-6,12-diaza-1,5(1,4)-dipiridina-3(1,3)-bencenaciotododecafán-1¹,5¹-bis(ilio):

Una disolución de α,α' -dibromo-*m*-xileno (99 mg, 0,37 mmoles) en acetonitrilo (40 mL) se adiciona gota a gota sobre una suspensión de **VGP-320** (95 mg, 0,37 mmoles) en acetonitrilo (50 mL) a reflujo. La mezcla de reacción se dejó agitando a reflujo durante 14 días. Tras enfriamiento, apareció un precipitado que se filtró a vacío, tras lavado con AcOEt y Et₂O. El sólido se recrystalizó en MeOH para dar un sólido beige microcristalino (134 mg, 69%); pf 326 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,79 (t, 2H, *J* = 5,8 Hz); 8,22 (dd, 2H, *J* = 7,3; 1,2 Hz); 8,01 (dd, 2H, *J* = 7,2; 1,6 Hz); 7,57–7,40 (m, 3H); 6,96–6,82 (m, 4H); 6,20 (s, 1H); 5,40 (s, 4H); 3,65–3,56 (m, 4H); 3,55–3,47 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157,01; 143,77; 141,78; 137,17; 129,33; 127,47; 122,18; 110,43; 105,14; 67,99; 58,83; 42,29. HRMS (*m/z*): Calculado para C₂₂H₂₅N₄O (M – Br – HBr)⁺ 361,2028; encontrado 361,2022. Análisis para C₂₂H₂₆N₄OBr₂. Calcd.: C 50,59; H 5,02; N 10,73; encontrado: C 50,24; H 4,99; N 10,67.

III.7) Compuesto 7 (VGP-334) Dibromuro de 5-oxa-2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciotetradecafán-1¹,9¹-bis(ilio):

En un vial de microondas se adicionó **VGP-320** (35 mg, 0,14 mmoles), 1,5-dibromopentano (18,8 μ L, 0,14 mmoles) y DMF (5 mL) y se hizo reaccionar en microondas a 160 °C durante 25 minutos. Tras enfriamiento, se eliminó el disolvente al rotavapor y el sólido se recrystalizó en MeOH obteniéndose un sólido marrón microcristalino (14 mg, 21%); pf 314 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,66 (s, 2H); 8,14 (d, 2H, *J* = 7,3 Hz); 8,04 (d, 2H, *J* = 7,2 Hz); 6,99–6,80 (m, 4H); 4,20–4,07 (m, 4H); 3,58 (t, 4H, *J* = 4,5 Hz); 3,54–3,45 (m, 4H); 1,78 (m, 4H); 0,72–0,58 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156,96; 143,33; 141,31; 110,42; 105,00; 68,45; 55,66; 42,32; 27,71; 19,77. HRMS (*m/z*): Calculado para C₁₉H₂₇N₄O (M – Br – HBr)⁺ 327,2185; encontrado 327,2186. Análisis para C₁₉H₂₈N₄OBr₂. Calcd.: C 46,74; H 5,78; N 11,47; encontrado: C 46,73; H 5,63; N 11,58.

III.8) Compuesto 8, VGP-340, dibromuro de 5,12-dioxa-2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciotetradecafán-1¹,9¹-bis(ilio):

En un vial de microondas se adicionó **VGP-320** (31 mg, 0,12 mmoles), bis(2-bromoetil)eter (15 μ L, 0,12 mmoles) y acetonitrilo (5 mL) y se hizo reaccionar en microondas a 160 °C durante 30 minutos. Tras enfriamiento, apareció un precipitado que se filtró a vacío, tras lavado con EtOAc y Et₂O en forma de sólido marrón microcristalino (21 mg, 35%); pf 283 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,04 (d, 2H, *J* = 7,4 Hz); 7,97 (d, 2H, *J* = 7,3 Hz); 6,90 (d, 2H, *J* = 7,4 Hz); 6,84 (dd, 2H, *J* = 7,3; 2,5 Hz); 4,26 (m, 4H); 3,75–3,65 (m, 4H); 3,56 (m, 4H); 3,50 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157,59; 143,93; 142,39; 110,73; 105,45; 68,97; 68,92; 56,83; 42,79. HRMS (*m/z*): Calculado para C₁₈H₂₆N₄O₂Br (M – Br)⁺ 409,1239; encontrado 409,1236. Análisis para C₁₈H₂₆N₄O₂Br₂. Calcd.: C 44,10; H 5,35; N 11,43; encontrado: C 44,00; H 5,50; N 11,24.

III.9) Compuesto 9, VGP-352, dibromuro de 12-oxa-2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciotetradecafán-1¹,9¹-bis(ilio):

En un vial de microondas se adicionó **VGP-314** (30 mg, 0,12 mmoles), bis(2-bromoetil)eter (15 μ L, 0,12 mmoles) y acetonitrilo (5 mL) y se hizo reaccionar en microondas a 160 °C durante 30 minutos. Tras enfriamiento, apareció un precipitado que se filtró a vacío, tras lavado con EtOAc y Et₂O en forma de sólido marrón microcristalino (19 mg, 33%); pf 267 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,67 (t, 2H, *J* = 6,2 Hz); 8,06 (d, 2H, *J* = 7,4 Hz); 8,02 (dd, 2H, *J* = 7,3; 1,6 Hz); 6,85 (dd, 2H, *J* = 7,3; 2,8 Hz); 6,79 (dd, 2H, *J* = 7,4; 2,8 Hz); 4,35–4,21 (m, 4H); 3,78–3,68 (m, 4H); 3,33 (m, 4H); 1,54 (m, 4H); 1,37 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156,76; 143,97; 141,32; 110,13; 104,22; 68,31; 56,25; 41,32; 27,10; 22,75. HRMS (*m/z*): Calculado para C₁₉H₂₈N₄OBr (M – Br)⁺ 407,1446; encontrado 407,1451. Análisis para C₁₉H₂₈N₄OBr₂. Calcd.: C 46,74; H 5,78; N 11,47; encontrado: C 46,66; H 5,99; N 11,20.

IV) ENSAYOS BIOLÓGICOS

IV.1) Cultivo de formas promastigotas de *Leishmania*.

Las formas promastigotas de *Leishmania major* (MHOM/JL/80/Friedlin) y de *Leishmania donovani* (MHOM/IND/80/Dd8) usadas en este estudio se cultivaron en medio modificado RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con un 20% de suero bovino fetal inactivado por calor (iFBS, Invitrogen) a 28 °C.

IV.2) Determinación de la sensibilidad a los compuestos en formas promastigotas de *Leishmania*.

Para determinar la sensibilidad a los compuestos se utiliza como dato de referencia la IC₅₀. La IC₅₀ ("half maximal inhibitory concentration", también referida como CI₅₀ en la presente descripción), se define como la concentración de los compuestos requerida para inhibir el crecimiento de los parásitos en cultivo al 50%, cuando el cultivo en ausencia de los mismos alcanza la fase logarítmica tardía de crecimiento. El valor de IC₅₀ se calcula utilizando un método colorimétrico basado en la reducción de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio; MTT) (Sigma), siguiendo un protocolo previamente descrito por nuestro grupo (Kennedy, M. L.; Cortés-Selva, F.; Pérez-Victoria, J. M.; Jiménez, I. A.; González, A. G.; Muñoz, O. M.; Gamarro, F.; Castanys, S.; Ravelo, A. G. J. *Med. Chem.* 2001, 44, 4668-4676). El método se basa en la capacidad de las enzimas deshidrogenasas de los parásitos de convertir el sustrato MTT, soluble y amarillo, en el producto formazán, insoluble y de color azul. La cantidad de producto formado depende del número de células y de la viabilidad de las mismas.

Para realizar los ensayos de sensibilidad, se sembraron 3×10^5 parásitos/pocillo en un volumen final de 100 μ l de medio de cultivo en placa de microtitulación de 96 pocillos, y se incubó durante 72 horas a 28 °C en presencia de distintas concentraciones de los diferentes compuestos, por triplicado. A continuación, se añadieron 10 μ l de MTT (5mg/mL), y se incubó 4 horas a 28 °C para permitir la formación de los cristales de formazán. Finalmente, los cristales se disolvieron añadiendo 50 μ l de SDS 20% e incubando en oscuridad a 37°C durante 4-6 horas. La reducción de MTT se determinó leyendo la DO₅₄₀ en un lector de ELISA.

IV.3) Cultivo de la línea celular mielomonocítica humana THP-1.

La línea monocítica celular humana THP-1 se mantiene en cultivo en medio RPMI-1640 suplementado con 10% iFBS, 2 mM glutamato, 100 U/mL penicilina y 100 μ g/ml estreptomina, a 37 °C y 5% CO₂.

IV.4) Determinación de la sensibilidad de los compuestos en formas amastigotas intracelulares de *Leishmania*.

Para inducir la diferenciación de los monocitos THP-1 en macrófagos, 5×10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos con cristales estériles en el fondo, son tratadas con 20 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) durante 48 horas, seguido de 24 horas en medio fresco (El Fadili, K.; Imbeault, M.; Messier, N.; Roy, G.; Gourbal, B.; Bergeron, M.; Tremblay, M.J.; Légaré, D.; Ouellette, M. *Modulation of gene expression in human macrophages treated with the anti-Leishmania pentavalent antimonial drug sodium stibogluconate.* 2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2008, 52, 526-533). Estas células fueron infectadas con formas promastigotas de *Leishmania* en fase logarítmica tardía en una relación 1:10 macrófago/parásito a 35 °C y 5% CO₂ durante toda la noche. Los macrófagos infectados se mantuvieron en medio de cultivo a 37 °C y 5% CO₂ durante 72 horas en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos. A continuación, los macrófagos se fijaron con 2,5% paraformaldehído en PBS durante 30 minutos y se permeabilizaron con 0.1% Triton X-100 en PBS durante otros 30 minutos. Las formas amastigotas intracelulares se visualizaron tiñendo el núcleo con DAPI (Invitrogen). La actividad de los compuestos se determinó teniendo en cuenta el porcentaje de infección y el número de formas amastigotas intracelulares por célula en relación con las células no tratadas.

IV.5) Determinación de la toxicidad celular de los compuestos.

La toxicidad celular de los compuestos se determinó mediante el método colorimétrico MTT, como hemos indicado anteriormente. Para lo cual, 3×10^4 células THP-1/pocillo, en placas de 96 pocillos, se diferenciaron a macrófagos mediante el tratamiento con 20 ng/mL de PMA durante 48 horas seguido de 24 horas en cultivo en medio fresco. A continuación, se siguió el mismo procedimiento descrito para la determinación de la sensibilidad de los compuestos en formas promastigotas de *Leishmania*, pero incubando las placas a 37 °C.

IV.6) Resultados obtenidos sobre la sensibilidad de los compuestos en formas promastigotas y amastigotas intracelulares de *Leishmania*.

La Tabla 3 resume los resultados obtenidos en los ensayos de sensibilidad a los compuestos en los protozoos parásitos *L. major* y *L. donovani*, empleando como control de sensibilidad los fármacos leishmanicidas anfotericina B (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y miltefosina (Zentaris GmbH, Frankfurt am Main, Germany).

Tabla 3. Sensibilidad de los compuestos derivados ciclofánicos de piridinio en formas promastigotas y amastigotas intracelulares de *Leishmania*

Producto	CI ₅₀ promastigotes (µM)		CI ₅₀ amastigotes intracelulares (µM)		Toxicidad celular CI ₅₀ (µM)
	<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>	
VGP-222	16.84 ± 1.20	51.97 ± 1.97	5.94 ± 0.93 [32.3]	13.53 ± 1.40[14.2]	191.90 ± 8.12
VGP-234	5.97 ± 0.35	33.77 ± 4.68	8.67 ± 1.04 [22.5]	18.92 ± 1.96[10.3]	195.17± 6.41
VGP-312	26.48 ± 2.44	76.87 ± 11.59	17.15 ± 1.50 [12.9]	63.67 ± 5.21 [3.5]	221.89 ± 8.27
VGP-318	0.07 ± 0.004	25.25 ± 0.83	1.26 ± 0.3 [122.3]	7.62 ± 0.16 [20.2]	154.07 ± 5.95
VGP-310	0.17 ± 0.01	26.41± 1.28	0.97 ± 0.27 [170.2]	38.33 ± 1.74 [4.3]	165.06 ± 21.29
VGP-334	0.26 ± 0.02	31.47 ± 2.53	2.59 ± 0.23 [62.7]	33.19 ± 0.57 [4.9]	162.44 ± 6.07
VGP-340	0.19 ± 0.009	23.43 ± 0.57	2.24 ± 0.35 [57.2]	20.72 ± 1.07 [6.2]	128.22 ± 9.78
VGP-352	0.26 ± 0.007	31.41 ± 3.02	2.18 ± 0.05 [98.5]	12.95 ± 1.86[16.6]	214.65 ± 13.8
VGP328	2.87 ± 0.36	76.27 ± 4.96	1.61 ± 0.35 [120.8]	21.25 ± 2.03 [9.2]	194.41± 2.95
Anfotericina B	0.32 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.001 [59.7]	0.28 ± 0.13 [51.1]	14.32 ± 4.10
Miltefosina	16.65 ± 1.23	6.60 ± 1.57	10.61 ± 0.89 [2.5]	0.88 ± 0.14 [30.5]	26.86 ± 3.08

- Los datos son medias de los valores de las CI₅₀ ± desviación estándar de tres experimentos independientes.

5 - Las sensibilidades de las formas promastigotas de *Leishmania* frente a los compuestos se determinaron mediante el análisis MTT, como previamente hemos descrito (Kennedy, M. L. et al. *J. Med. Chem.* 2001, 44, 4668-4676).

- Las sensibilidades de las formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* frente a los compuestos se determinaron mediante recuento de los amastigotas intracelulares de *Leishmania* tras 72 horas de cultivo de los macrófagos THP-1 infectados.

10 - Los valores entre corchetes mostrados a la derecha de los datos de CI₅₀ en las formas amastigotas indican la relación entre la CI₅₀ celular y la CI₅₀ para el parásito. Es un valor indicativo de la seguridad de los compuestos.

De los datos de la Tabla 3 se puede deducir que los compuestos de la presente invención presentan las siguientes características:

15 **a) VGP-222, VGP-234, y VGP-312** son compuestos que presentan una moderada actividad frente a formas amastigotas intracelulares tanto de *L. major* como *L. donovani*, con muy poca toxicidad para células de mamíferos THP-1 (CI₅₀ entre 192-220 µM).

20 **b) VGP-318:** es un compuesto no tóxico para células de mamíferos THP-1 (CI₅₀ = 154 µM), que presenta una buena actividad frente a las formas amastigotas intracelulares de *L. major* (CI₅₀= 1,3 µM), con un margen de seguridad (122) superior al obtenido con la anfotericina B (60). Igualmente, este compuesto presenta moderada actividad frente a las formas amastigotas de *L. donovani* (CI₅₀ = 7,6 µM)

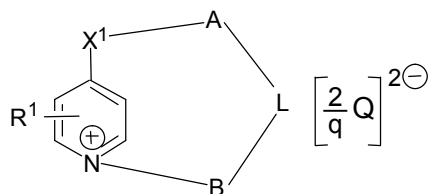
c) VGP-310, VGP-334, VGP-340 y VGP-352 son compuestos derivados del **VGP318**, que no son tóxicos para células de mamíferos THP-1 (CI₅₀ = 128-215 µM). Presentan una buena actividad frente a formas amastigotas intracelulares de *L. major*, con un margen de seguridad bueno, incluso superior al obtenido con la anfotericina B y miltefosina.

25 **d) VGP328** es un compuesto no tóxico para células de mamíferos TPH-1 (CI₅₀ = 194 µM) que presenta una buena actividad frente a formas amastigotas intracelulares de *L. major* (CI₅₀ ~ 1,6 µM) con un margen de seguridad bueno (120), superior al obtenido con la anfotericina B (60) y miltefosina (2,5).

30 Las concreciones de la presente invención se han descrito previamente por medio de ejemplos y deberá entenderse que se podrán llevar a cabo otras modificaciones alternativas con respecto a lo que se ha descrito e ilustrado específicamente, siempre dentro del ámbito de la invención, como resultará evidente a personas expertas en la técnica.

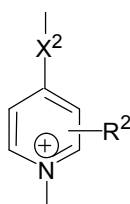
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general I,



Fórmula I

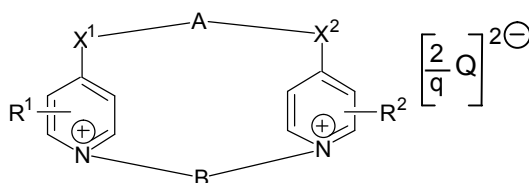
- 5 o cualquiera de sus bases conjugadas, donde L es un grupo de fórmula II,



Fórmula II

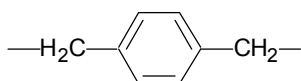
donde:

- Q es una base conjugada de un ácido orgánico o inorgánico, y tiene entre 1 y 3 cargas negativas;
- 10 - q es el número de cargas negativas de la base conjugada Q;
- R¹ y R² se seleccionan independientemente de al menos uno de los sustituyentes del grupo compuesto por: hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₁₀, haloalquilo C₁-C₁₀, amino, alquilamino C₁-C₁₀, hidroxilo y alcoxilo C₁-C₁₀;
- X¹ y X² se seleccionan independientemente de al menos uno de los sustituyentes del grupo compuesto por: NH, NR³, O, S y CH₂, donde R³ se selecciona independientemente entre alquilo C₁-C₁₀, arilo C₁-C₁₀, alquilarilo C₁-C₁₀ y arilalquilo C₁-C₁₀;
- 15 - A y B se seleccionan independientemente entre al menos un grupo espaciador con longitud de cadena C₂-C₁₅, de tal manera que cuando el compuesto de fórmula I consiste en el compuesto de fórmula I-a,

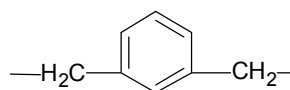


Fórmula I-a

- 20 donde R¹ y R² son H, y X¹ y X² son NH, si el espaciador A consiste en un grupo de fórmula III o un grupo de fórmula IV:



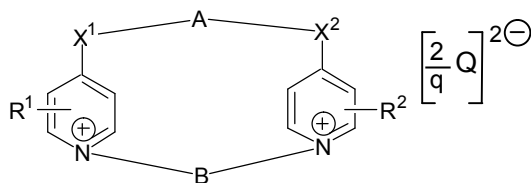
Fórmula III



Fórmula IV

el espaciador B es distinto de dichos grupos de fórmula III y de fórmula IV.

2. Un compuesto según la reivindicación 1 de fórmula general I-a,

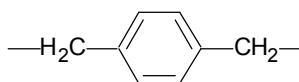


Fórmula I-a

o cualquiera de sus bases conjugadas, donde los grupos Q, R¹, R², X¹, X², A y B, se seleccionan independientemente tal como se definen en la reivindicación 1.

3. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o cualquiera de sus bases conjugadas, donde el grupo espaciador C₂-C₁₅ se selecciona del grupo que consiste en:

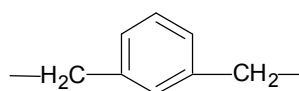
- una cadena de tipo alcanodiilo -(CH₂)_p-Z-(CH₂)_p-, donde Z se selecciona entre CH₂, un átomo de oxígeno o un átomo de S; y p es un valor comprendido entre 1 y 5;
- 10 - una cadena de tipo alquendiilo C₃-C₁₀ con uno o dos dobles enlaces C=C;
- una cadena de tipo alquindiilo C₂-C₁₀ con uno o dos triples enlaces C≡C;
- un espaciador aromático C₅-C₁₂ seleccionado entre al menos un grupo de la siguiente lista: un grupo de fórmula III;



Fórmula III

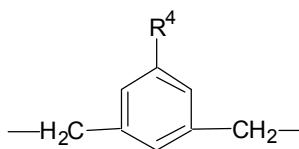
15

un grupo de fórmula IV;



Fórmula IV

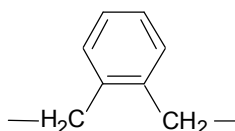
un grupo de fórmula V donde R⁴ se selecciona entre OH u OMe;



Fórmula V

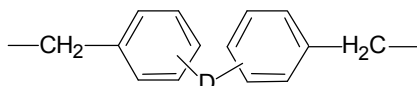
20

un grupo de fórmula VI;



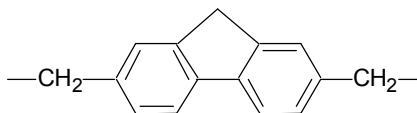
Fórmula VI

un grupo de fórmula **VII**, donde D se une a los anillos a través de las posiciones meta o para, y se selecciona entre $(CH_2)_n$, $CH=CH$, $C\equiv C$ y un anillo heterocíclico, siendo n igual a 0, 1 ó 2;



Fórmula **VII**

5 y un grupo de fórmula **VIII**;



Fórmula **VIII**

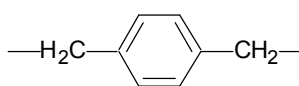
10 de manera que si el compuesto de fórmula general **I** corresponde a un compuesto de fórmula **I-a** donde R^1 y R^2 son H, X^1 y X^2 son NH, cuando A es un espaciador de fórmula **III** o un espaciador de fórmula **IV**, B es la cadena alquímica, o la cadena alquénica, o la cadena alquínica, o el espaciador aromático de fórmula **V**, o el espaciador aromático de fórmula **VI**, o el espaciador aromático de fórmula **VII** o el espaciador aromático de fórmula **VIII** definidos anteriormente.

4. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o cualquiera de sus bases conjugadas, donde X^1 y X^2 son NH.

15 5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o cualquiera de sus bases conjugadas, donde R^1 y R^2 son H.

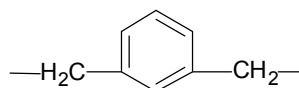
6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o cualquiera de sus bases conjugadas, donde A y B, se seleccionan independientemente entre:

- 20
- una cadena de tipo alcanodiilo $-(CH_2)_p-Z-(CH_2)_p-$, donde Z es CH_2 o un átomo de oxígeno; y p es un valor comprendido entre 1 y 3;
 - un espaciador aromático seleccionado entre al menos un grupo de la siguiente lista: un grupo de fórmula **III**,



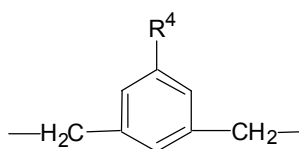
Fórmula **III**

un grupo de fórmula **IV**;



Fórmula **IV**

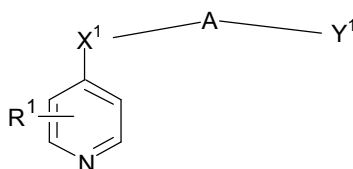
25 y un grupo de fórmula **V**, donde R^4 se selecciona entre OH u OMe;



Fórmula **V**

de manera que si el compuesto de fórmula general I corresponde a un compuesto de fórmula Ia donde R¹ y R² son H, X¹ y X² son NH, cuando A es un espaciador de fórmula III o un espaciador de fórmula IV, B es dicha cadena de alcanodiilo anterior o dicho espaciador aromático de fórmula V anterior.

- 5 7. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se selecciona del grupo que consiste en:
- a) Dibromuro de 2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,3)-bencenaciclododecafan-1¹,7¹-bis(ilio);
 - b) Dibromuro de 10-oxa-2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,3)-bencenaciclododecafan-1¹,7¹-bis(ilio);
 - c) Dibromuro de 2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,4)-bencenaciclododecafan-1¹,7¹-bis(ilio);
 - d) Dibromuro de 10-oxa-2,6-diaza-1,7(4,1)-dipiridina-4(1,4)-bencenaciclododecafan-1¹,7¹-bis(ilio);
 - 10 e) Dibromuro de 2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciotetradecafan-1¹,9¹-bis(ilio);
 - f) Dibromuro de 9-oxa-6,12-diaza-1,5(1,4)-dipiridina-3(1,3)-bencenaciclododecafan-1¹,5¹-bis(ilio);
 - g) Dibromuro de 5-oxa-2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciotetradecafan-1¹,9¹-bis(ilio);
 - h) Dibromuro de 5,12-dioxa-2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciotetradecafan-1¹,9¹-bis(ilio);
 - i) Dibromuro de 12-oxa-2,8-diaza-1,9(4,1)-dipiridinaciotetradecafan-1¹,9¹-bis(ilio).
- 15 8. Un método para producir un compuesto de fórmula general I definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque comprende una etapa de ciclación intermolecular de un compuesto de fórmula VIII,



Fórmula VIII

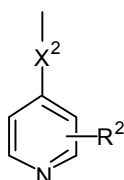
- 20 con un derivado de fórmula IX,



Fórmula IX

donde:

- R¹, X¹, A y B se seleccionan según se definen en la reivindicación 1,
- 25 - Z se selecciona entre Cl, Br, I o sulfonato,
- uno de los grupos Y¹ o Y² es un grupo de fórmula X, donde R² y X² se seleccionan según se definen en la reivindicación 1,



Fórmula X

y el otro de los grupos Y^1 o Y^2 se selecciona entre Cl, Br, I o sulfonato.

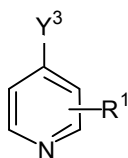
9. Un método según la reivindicación 8 que, cuando Y^1 es el grupo de fórmula **X**, comprende preparar el compuesto de fórmula **VIII** previamente a la etapa de ciclación, mediante reacción de un compuesto de fórmula **XI**,

5

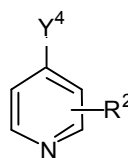


Fórmula **XI**

con un compuesto de fórmula **XII** y con un compuesto de fórmula **XIII**,



Fórmula **XII**

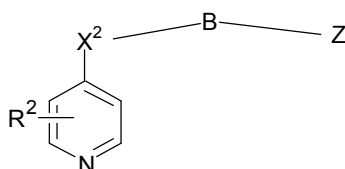


Fórmula **XIII**

10 donde:

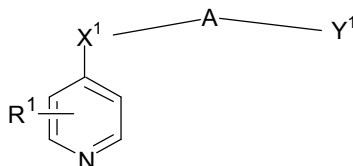
- A es un grupo espaciador según se define en la reivindicación 1,
- R^1 y R^2 se seleccionan independientemente según se definen en la reivindicación 1,
- Y^3 e Y^4 se seleccionan independientemente del grupo compuesto por: Cl, Br, I y sulfonato.

15 10. Un método según la reivindicación 8 donde, cuando Y^2 es el grupo de fórmula **X** de manera que el compuesto de fórmula **IX** consiste en el compuesto de fórmula **IX-b**,



Fórmula **IX-b**

dicho compuesto **IX-b** es igual al compuesto de fórmula **VIII**,



20

Fórmula **VIII**

de tal manera que A, B, R^1 , R^2 , X^1 y X^2 se definen como en la reivindicación 8, y además: R^1 y R^2 son iguales, X^1 y X^2 son iguales, A y B son iguales e Y^1 y Z son iguales.

11. Una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los compuestos definidos en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

25 12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 11 que además comprende un componente adicional seleccionado entre al menos uno del siguiente grupo: un excipiente farmacéuticamente aceptable, un transportador, un sistema tampón, un estabilizador y cualquier combinación de los mismos.

13. Uso de al menos uno de los compuestos definidos en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la fabricación de una composición farmacéutica.
- 5 14. Uso de al menos uno de los compuestos definidos en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad protozoaria causada por un tripanosomátido.
15. Uso de al menos uno de los compuestos según la reivindicación 14, donde la enfermedad protozoaria es una leishmaniasis.
16. Uso de al menos uno de los compuestos según la reivindicación 15, donde la leishmaniasis es una leishmaniasis producida por *L. major* o por *L. donovani*.
- 10 17. Uso de al menos uno de los compuestos según la reivindicación 14, donde la enfermedad protozoaria es una tripanosomiasis.
18. Un compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad protozoaria causada por un tripanosomátido.
- 15 19. Un método de tratamiento y/o prevención de una enfermedad protozoaria causada por un tripanosomátido en un sujeto, caracterizado porque comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos uno de los compuestos definidos en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.