

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 079**

21 Número de solicitud: 201330699

51 Int. Cl.:

C07C 49/593 (2006.01)

C07C 49/613 (2006.01)

A61K 31/122 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

16.05.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.12.2014

Fecha de la concesión:

11.01.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

18.01.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070405

73 Titular/es:

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS (50.0%)
Campus Universitario, Cra. de Valldemossa,
Km.7,5 Edifici Son Lledó
07122 Palma de Mallorca (Illes Balears) ES y
UNIVERSIDAD DE GRANADA (50.0%)

72 Inventor/es:

ROTGER PONS, Maria Del Carmen;
COSTA TORRES, Antonio;
SÁNCHEZ MORENO, Manuel y
MARÍN SÁNCHEZ, Clotilde

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE ESCUARAMIDAS**

57 Resumen:

Actividad antiparasitaria de escuaramidas.

La presente invención se refiere a la síntesis y uso de compuestos de base escuaramida para el tratamiento de enfermedades de origen parasitario como son la Tripanosomiasis americana también conocida como enfermedad de Chagas o la Leishmaniasis.

ES 2 525 079 B1

Actividad antiparasitaria de escuaramidas

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a la síntesis y uso de compuestos de base escuaramida para el tratamiento de enfermedades de origen parasitario como son la Tripanosomiasis americana también conocida como enfermedad de Chagas o la Leishmaniasis.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las enfermedades olvidadas (Neglected diseases) son enfermedades que afectan a millares de personas en todo el mundo, pero que no disponen de tratamientos eficaces o adecuados. En su mayoría se trata de enfermedades tropicales infecciosas que
15 afectan fundamentalmente a la población más pobre, como por ejemplo la Leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, que ocasionan un impacto devastador en la humanidad. Estas enfermedades infecciosas están causadas por parásitos protozoarios que afectan especialmente a los países menos desarrollados, representando un problema grave de salud pública en el mundo. Se estima que casi el
20 50% de la población mundial está expuesta a este riesgo de contraer estas infecciones, y que aproximadamente 500 millones de personas sufren cada año patologías relacionadas con este tipo de enfermedades.

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

30

La enfermedad de Chagas está causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* que se transmite de forma natural a través de las deyecciones de una chinche triatoma hematófaga (Hemiptera reduviidae). Otras vías de transmisión son por transfusión de sangre infectada, el trasplante de órganos e incluso de madres a hijos

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

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

La leishmaniasis, causada por la infección de diferentes especies de protozoos del género *Leishmania* es una enfermedad cosmopolita. Alrededor de 20 millones de personas padecen esta enfermedad, la cual se transmite a través de la picadura de dípteros del género *Phlebotomus* o *Lutzomyia*. La leishmaniasis se puede presentar en diferentes manifestaciones clínicas: visceral, cutánea o mucocutánea, siendo la visceral la forma más grave de la enfermedad.

El tratamiento de la leishmaniasis es complicado y además, esta enfermedad presenta una morbilidad sustancial por lo que a menudo se requieren terapias expeditivas. En la leishmaniasis se utilizan desde hace más de 70 años derivados pentavalentes del antimonio como: Estibogluconato sódico (Pentostan) o la Meglumina antimoniató (Glucantime). Otros medicamentos utilizados son: Anfotericina B (AmBiosome®) que

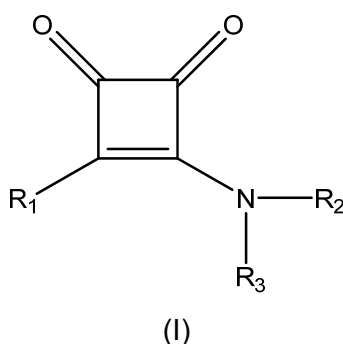
se administra durante un máximo de 10 días y no presentan toxicidad pero, es sumamente caro (1,500 a 2,400\$ por tratamiento); la miltefosina que de administración oral pero el tratamiento dura 4 semanas y tiene restricciones de uso para gestantes y niños; la pentamidina y el Ketoconazol. Este problema se agrava dado que las infecciones repetidas de la población o los tratamientos inefectivos han ocasionado la resistencia de los parásitos a estas terapias.

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

DESCRIPCION DE LA INVENCION

En la presente invención se proporciona unos compuestos de base escuaramida como agentes antiparasitarios, en particular para el tratamiento de la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas.

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



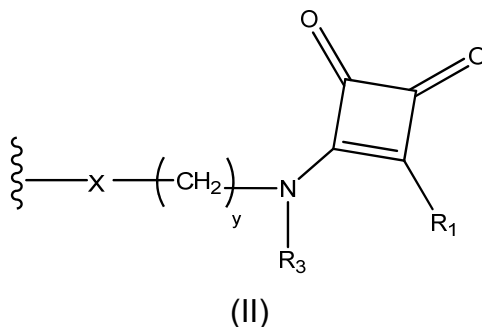
25

donde:

R_1 se selecciona de entre $-NR_aR_b$ o $-OR_c$, donde:

R_a se selecciona de entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5); preferiblemente hidrógeno o alquilo (C_1-C_3); más preferiblemente hidrógeno o metilo.

- R_b se selecciona de la lista que comprende arilo, opcionalmente sustituido, preferiblemente fenilo, $-(CH_2)_x-NR_1'R_1''$ o $-(CH_2)_x-CO_2R_1'''$; x tiene un valor de 0 a 5 y R_1' , R_1'' y R_1''' se seleccionan de manera independiente entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5);
- 5 R_c se selecciona de entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5); preferiblemente entre hidrógeno o alquilo (C_1-C_3); más preferiblemente es hidrógeno;
- R_2 se selecciona de la lista que comprende arilo, opcionalmente sustituido; heterociclo, opcionalmente sustituido; aralquilo (C_1-C_5), opcionalmente sustituido; alquilo (C_1-C_{20}), preferiblemente alquilo (C_4-C_{15}); $-(CH_2)_x-NR_2'R_2''$; o $-(CH_2)_y-R_4$, donde x tiene un valor de 0 a 5, y tiene un valor de 0 a 5 y R_2' y R_2'' se seleccionan de manera independiente entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5);
- 10 R_3 se selecciona de entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5); preferiblemente hidrógeno o alquilo (C_1-C_3); más preferiblemente hidrógeno y metilo; aún más preferiblemente hidrógeno;
- 15 R_4 es el grupo de fórmula (II):



- donde: X se selecciona de la lista que comprende $-NR_4'$ -, $-CH$ - y arilo, opcionalmente sustituido; R_4' se selecciona de entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5); y R_1 , R_3 e y se han definido anteriormente;
- 20

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

25

En una realización preferida, cuando R_b es el grupo $-(CH_2)_x-NR_1'R_1''$:

x puede tener los valores 1, 2 o 3, más preferiblemente 2 o 3, y R_1' y R_1'' se seleccionan independientemente entre un grupo alquilo (C_1-C_4); más preferiblemente metilo o butilo; o

x puede ser 0 y R_1' y R_1'' se seleccionan independientemente entre hidrógeno o alquilo (C_1-C_3), más preferiblemente R_1' y R_1'' son hidrógeno, y en este caso R_b es $-NH_2$.

- 5 En una realización preferida, cuando R_b es el grupo $-(CH_2)_x-CO_2R_1'''$; R_1''' es preferiblemente hidrógeno, metilo o etilo y más preferiblemente hidrógeno y x tiene el valor de 1, 2 o 3.

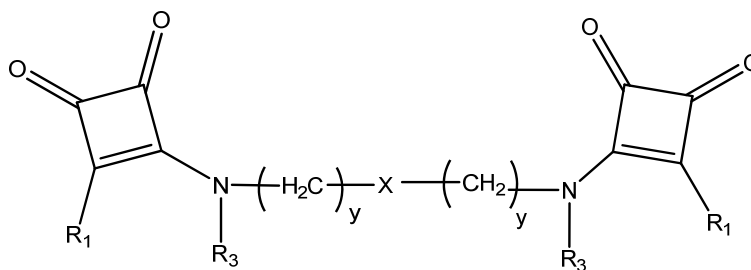
10 El término "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 5, y más preferiblemente entre 1 y 3, átomos de carbono o entre 4 y 15 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico
15 arilo, hidroxilo, amino, amido, éster, carboxílico, éter, tiol, acilamino o carboxamido, que a su vez pueden opcionalmente estar sustituidos. Preferiblemente el grupo alquilo no está sustituido.

20 El término "arilo" se refiere en la presente invención a una cadena carbocíclica aromática, que tiene de 6 a 18 átomos de carbono, pudiendo ser de anillo único ó múltiple, en este último caso con anillos separados y/o condensados. Un ejemplo, no limitante, de arilo es un grupo fenilo, naftilo, indenilo, etc....El grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido por al menos un grupo seleccionado de entre un hidroxilo, éster, carboxilo, alquilo o grupo $-(CH_2)_x-NR'R''$, donde x tiene un valor de 0 a 5 y R' y
25 R'' se seleccionan independientemente entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5). Preferiblemente el grupo arilo es un fenilo, en donde el grupo fenilo puede contener 1 o más sustituyentes según se han descrito anteriormente y preferiblemente está sustituido por un grupo éster, hidroxilo, $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$, o $-N(CH_3)_2$.

30 El término "aralquilo" se refiere, en la presente invención, a una cadena alifática de entre 1 y 5 átomos de carbono en el que al menos uno de los hidrógenos se ha sustituido por un grupo arilo, con las acepciones anteriores. Como por ejemplo, pero sin limitarse, un grupo benciloofenetilo. Estos grupos aralquilo pueden, a su vez, estar opcionalmente sustituidos por un grupo alquilo, hidroxilo, nitro, amino o halógeno.
35 Preferiblemente es un grupo bencilo, opcionalmente sustituido, y más preferiblemente es un grupo bencilo que no está sustituido.

El término “heterociclo” se refiere, en la presente invención, a un radical de cadena carbocíclica y que consiste en átomos de carbono, entre 3 y 6, más preferiblemente 5 o 6, donde al menos un átomo de carbono es sustituido por un heteroátomo
 5 seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno o azufre. Esta cadena carbocíclica puede estar insaturada, saturada o parcialmente saturada. Preferiblemente está saturada. Puede estar opcionalmente sustituida por 1 o más
 10 sustituyentes del grupo formado por alquilo, hidroxilo, nitro, amino, halógeno, arilo o aralquilo. Preferiblemente es un grupo piperidina, y más preferiblemente sustituida por un grupo bencilo, y aún más preferiblemente en la posición 1.

En otra realización preferida, cuando R_2 es $-(CH_2)_y-R_4$ y el compuesto es de fórmula (III):



15 (III)

donde: X, y, R_1 y R_3 se han definido anteriormente.

Cuando X es un grupo arilo, preferiblemente es un grupo fenilo, opcionalmente
 20 sustituido, más preferiblemente sin sustituir, y aún más preferiblemente y es 1, 2 o 3, más preferiblemente y es 1.

Cuando X es el grupo $-CH-$, preferiblemente y es 1, 2 o 3, más preferiblemente 1.

25 Cuando X es $-NR_4'-$, R_4' preferiblemente se selecciona entre hidrógeno o un alquilo (C_1-C_3), preferiblemente metilo o etilo, más preferiblemente es metilo. En una realización aún más preferida y es 2, 3 o 4, aún más preferiblemente y es 3.

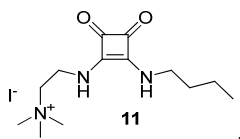
En una realización más preferida, R_3 es hidrógeno en el compuesto de fórmula (III).
 30

En una realización aún más preferida, R_1 es $-NR_aR_b$, R_a es metilo y R_b es el grupo $-(CH_2)_x-NR_1'R_1''$, donde R_1' y R_1'' son metilo y x es 2 o 3.

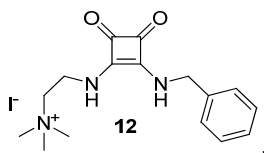
Los compuestos, de fórmula general (I) como de fórmula general (III) pueden estar en
5 forma de sales de halógeno, como por ejemplo, pero sin limitarse a ioduros, cloruros o fluoruros, preferiblemente las sales son de ioduro.

Los compuestos de fórmula (I), y en particular algunos de fórmula (III), se pueden seleccionar de lista que comprende:

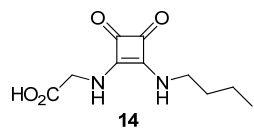
- 10 3-(butilamino)-4-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (2),
3-(butilamino)-4-(1-metilhidrazinil)ciclobut-3-en-1,2-diona (5),
3-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)-4-(octilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (3),
3-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)-4-(dodecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (4),
3,4-bis((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (6),
15 3-((1-benzilpiperidin-4-il)amino)-4-(fenilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (9),
3-(butilamino)-4-((3-(dibutilamino)propil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (8),
3-(butilamino)-4-((2-(dimetilamino)etil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (7),
3-((2-(dimetilamino)etil)amino)-4-(pentadecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (10),
ioduro de 2-((3,4-dioxo-2-(pentadecilamino)ciclobut-1-en-1-il)amino)-N,N,N-
20 trimetiletanamonio (13),
benzoato de etil 4-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino) (18),
ioduro de 2-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N,N,N-
trimetiletanamonio (11)



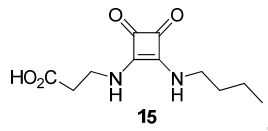
- 25 ioduro de 2-((2-(bencilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N,N,N-
trimetiletanamonio (12)



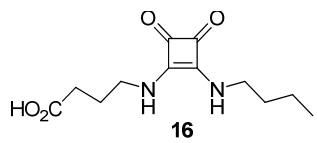
ácido 2-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)acético (14)



ácido 3-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propanoico (15)

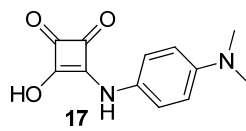


ácido 4-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)butanoico (16)

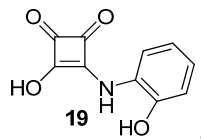


5

3-((4-(dimetilamino)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (17)

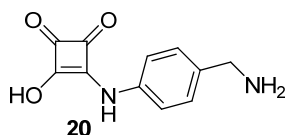


3-hidroxi-4-((2-hidroxifenil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (19)

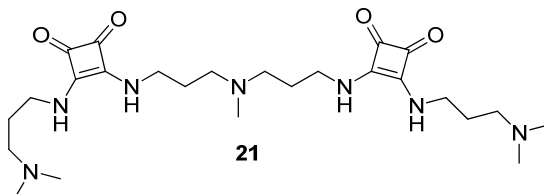


10

3-((4-(aminometil)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (20)

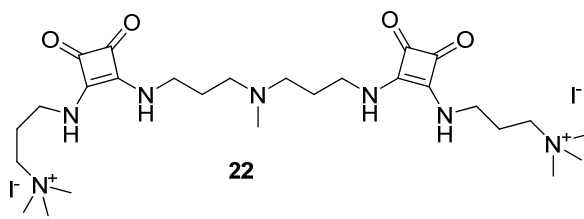


4,4'-(((metilazanediiil)bis(propano-3,1-diil))bis(azanediiil))bis(3-((3-(dimetilamino)propil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona) (21)

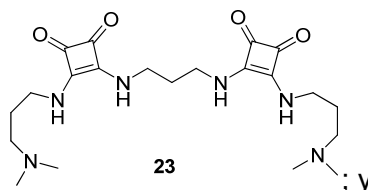


15

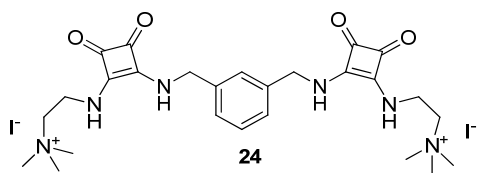
ioduro de 3,3'-((((metilazanediiil)bis(propano-3,1-diil))bis(azanediiil))bis(3,4-dioxociclobut-1-en-2,1-diil))bis(azanediiil))bis(N,N,N-trimetilpropan-1-amonio) (22)



4,4'-(propano-1,3-diilbis(azanedil))bis(3-((3-dimetilamino)propil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona) (23)



5 ioduro de 2,2'-((((1,3-fenilenebis(metilene))bis(azanedil))bis(3,4-dioxociclobut-1-en-2,1-diil))bis(azanedil))bis(N,N,N-trimetiletanamonio) (24)



10 Para los compuestos descritos en la presente invención se ha demostrado que son útiles para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades parasitarias.

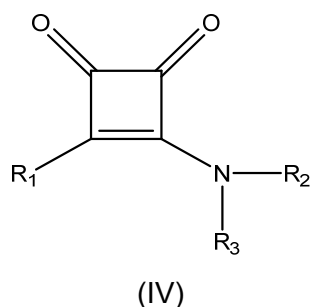
15 Por “enfermedad parasitaria”, se entiende en la presente invención a una enfermedad infecciosa causada por protozoos, vermes (cestodos, trematodos, nematodos) o artrópodos. En particular los parásitos son protozoos, por tanto, se puede decir que los compuestos son antiprotozoarios. En una realización más preferida los parásitos pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*, más preferiblemente los parásitos son del género *Trypanosoma* o *Leishmania*. Especies de las mismas, pueden ser, pero sin limitarse, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania infantum*, *Leishmania*
20 *brazilensis*, *Leishmania donovani*, *Leishmania trópica* o *Leishmania chagasi*, entre otras, conocidas por un experto en la materia.

25 Las enfermedades parasitarias a tratar podrían ser leishmaniosis (o leishmaniasis) o tripanosomiosis (o tripanosomiasis). “Leishmaniosis” es una enfermedad causada por un protozoo del género *Leishmania* y transmitido, principalmente por mosquitos flebotomos o jejenes. Esta enfermedad se produce en humanos y animales

vertebrados, como pueden ser marsupiales, cánidos, roedores y primates. Y “tripanosomiasis” son enfermedades producidas en humanos o animales vertebrados que son causadas por parásitos protozoarios del género *Trypanosoma*, entre ellas se puede encontrar la tripanosomiasis humana africana, también conocida como enfermedad del sueño, la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas o la tripanosomiasis en animales o Nagana.

En una realización preferida de la presente invención los compuestos descritos en la presente invención se usan para el tratamiento y/o la prevención de la leishmaniosis o la enfermedad de Chagas.

Un segundo aspecto de la presente invención es un compuesto de fórmula general (IV):



donde:

R_1 es un grupo $-NR_aR_b$, donde:

R_a es un alquilo C_1-C_3 ; preferiblemente R_a es un metilo y

R_b es el grupo $-(CH_2)_x-NR_1'R_1''$, donde x tiene un valor de 0 a 5 y R_1' y R_1'' se seleccionan de manera independiente entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5);

R_2 se selecciona de un grupo alquilo (C_1-C_{20}), preferiblemente alquilo (C_4-C_{12}), o un grupo $-(CH_2)_x-NR_2'R_2''$; x tiene un valor de 0 a 5, preferiblemente de 1 a 5, más preferiblemente de 2, 3, o 4, más preferiblemente 3, y R_2' y R_2'' se seleccionan de manera independiente entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5), preferiblemente entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_3), más preferiblemente metilo; y

R_3 se selecciona de entre hidrógeno o un alquilo (C_1-C_5), preferiblemente hidrógeno o alquilo (C_1-C_3); más preferiblemente hidrógeno o metilo; o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En una realización preferida R_b es el grupo $-(CH_2)_x-NR_1'R_1''$, x tiene un valor de 1 a 5 y R_1' y R_1'' se seleccionan de manera independiente un alquilo (C_1-C_3), más preferiblemente R_b es el grupo $-(CH_2)_x-NR_1'R_1''$, x tiene un valor de 1 a 5 y R_1' y R_1'' son metilo, aún más preferiblemente x es 2, 3 ó 4, y aún más preferiblemente x es 3.

5

En otra realización preferida R_b es el grupo $-(CH_2)_x-NR_1'R_1''$, x es 0 y R_1' y R_1'' se seleccionan de manera independiente un alquilo (C_1-C_3), más preferiblemente R_1' y R_1'' son hidrógeno.

10 En una realización más preferida, el compuesto de fórmula (IV) se selecciona de la lista que comprende:

3-(butilamino)-4-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (2),

3-(butilamino)-4-(1-metilhidrazinil)ciclobut-3-en-1,2-diona (5),

3-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)-4-(octilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (3),

15 3-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)-4-(dodecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (4), y

3,4-bis((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (6).

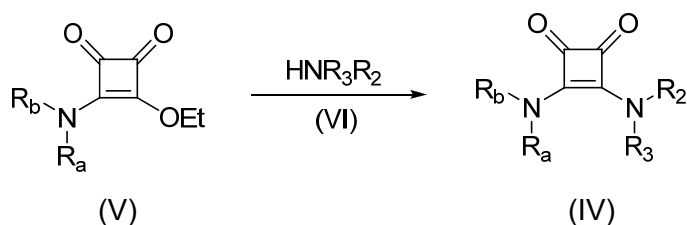
Más preferiblemente el compuesto es 3-(butilamino)-4-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona.

20

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula (IV) que comprende la etapa de:

-hacer reaccionar un éster de monoescuaramida de fórmula general (V) con una amina de fórmula general (VI):

25

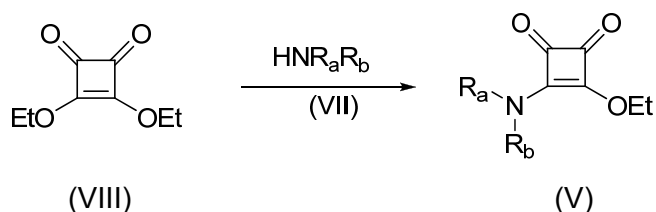


Donde: Et es etilo y R_a , R_b , R_2 y R_3 se ha descrito anteriormente para el compuesto de fórmula general (IV). Dicha reacción tiene lugar preferiblemente a temperatura ambiente y entre 9 y 20 horas. De manera opcional se puede proceder a una etapa

30

posterior de filtrado, previamente con o sin evaporación del disolvente, y/o posterior secado del compuesto de fórmula (IV) obtenido.

- El procedimiento de la presente invención puede tener una etapa previa de obtención del compuesto de fórmula general (V) que comprende:
- 5 hacer reaccionar un escuaramato de dietilo de fórmula (VIII) con una amina de fórmula (VII)



10

Donde: Et es etilo y R_a y R_b se ha descrito anteriormente para el compuesto de fórmula general (IV). Dicha reacción tiene lugar preferiblemente a temperatura ambiente y entre 9 y 20 horas. De manera opcional se puede proceder a una etapa posterior de filtrado, previamente con o sin evaporación del disolvente, y/o posterior secado del

15 compuesto de fórmula (V) obtenido.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a los compuestos que se seleccionan de la lista que comprende:

- 3-((1-benzilpiperidin-4-il)amino)-4-(fenilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (9),
- 20 3-(butilamino)-4-((3-(dibutilamino)propil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (8),
- 3-(butilamino)-4-((2-(dimetilamino)etil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (7),
- 3-((2-(dimetilamino)etil)amino)-4-(pentadecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (10),
- Ioduro de 2-((3,4-dioxo-2-(pentadecilamino)ciclobut-1-en-1-il)amino)-N,N,N-trimetiletanamonio (13), y
- 25 Benzoato de etil 4-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino) (18).

- Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (IV) o a los compuestos descritos en el cuarto aspecto de la invención, junto con al menos un vehículo
- 30 farmacéuticamente aceptable, opcionalmente esta composición puede incluir otro principio activo, por ejemplo otro compuesto antiparasitario.

Un sexto aspecto más de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula general (IV) o a los compuestos descritos en el cuarto aspecto de la invención, para la elaboración de un medicamento.

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

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

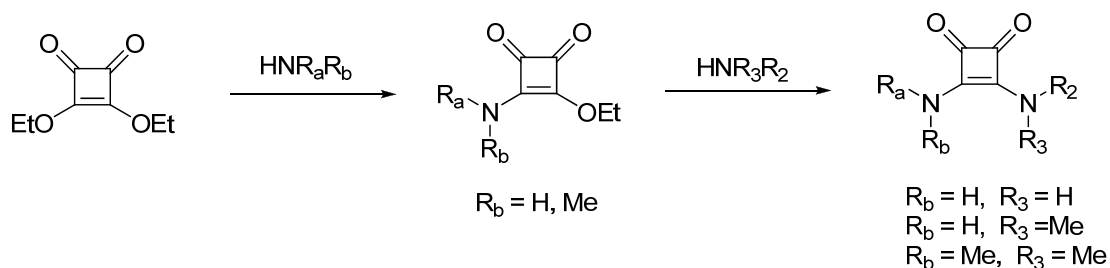
Fig. 1. Representa la evolución de los niveles de parasitemia en sangre a lo largo del
15 tiempo en ratones infectados y no tratados (control) y ratones infectados y tratados con los compuestos **2, 7, 8 y 22**.

Fig. 2. Resultados *in vivo* después de la inmunosupresión para ratones no tratados (control) y tratados con 40 mg/kg de compuesto **2**. (A) Reactivación de la parasitemia
20 en sangre después de los ciclos de inmunosupresión. (B) Diferencias en los niveles de IgG medidos mediante ensayos ELISA en ratones control (no IS) e inmunosuprimidos (IS) (C) Amplificación por PCR después de la purificación del ADN total de los corazones de los ratones.

25 EJEMPLOS

SINTESIS COMPUESTOS

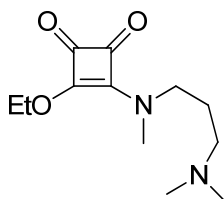
30 **Método general para la obtención de las mono escuaramidasdisecundarias**



6,4 mmol de amina en 30 mL de éter dietílico se adicionan gota a gota a una disolución de escuarato de etilo (1 g, 5,8 mmol) en 10 mL de éter dietílico a temperatura ambiente. La reacción se deja agitando a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido este periodo de tiempo, en algunos casos se observa la aparición de un precipitado de color amarillo pálido. El sólido se filtra y se lava con éter dietílico (3 x 10 mL), obteniéndose la monoescuaramidaester en un rendimiento que oscila dependiendo de la amina utilizada entre el 60-90%. Alternativamente, si el producto de reacción permanece en disolución, se evapora el disolvente y el sólido obtenido se lava con n-pentano (3 x 10 mL) o se purifica mediante cromatografía en columna (SiO_2 , AcOEt/ EtOH 1%).

1,1 mmol de amina en (20 ml) de etanol se adiciona gota a gota a un disolución de mono escuaramidaester (1 mmol) en 10 mL de etanol. La reacción se deja a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido este periodo de tiempo, en algunos casos se observa la aparición de un precipitado de color amarillo pálido. El sólido se filtra y se lava con etanol (3 x 10 mL), obteniéndose la monoescuaramidadisecundaria en un rendimiento que oscila dependiendo de la amina utilizada entre el 60-90%. Alternativamente, si el producto de reacción permanece en disolución, se evapora el disolvente y el sólido obtenido se lava con n-pentano (3 x 10 mL).

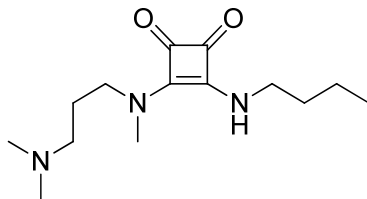
3-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)-4-etoxiciclobut-3-en-1,2-diona (1)



1 se ha preparado como se indica en el método general a partir de escuarato de dietilo (0,50 g, 2,94 mmol) en acetonitrilo (25 mL) y N¹,N¹,N³-trimetilpropano-1,3-diamina (0,3 g, 2,65 mmol) en acetonitrilo (5 mL). Se evapora el disolvente y se purifica mediante cromatografía en columna SiO₄ CH₂Cl₂-EtOH 10%. Se obtiene **1** (0,63 g, 12.6 mmol) como aceite incoloro. Rendimiento 90%.

¹HRMN (CDCl₃) δ = 4.76 (2 H, J = 7.2 Hz, q), 3.72 (1H J = 6.9 Hz, t), 3.45 (1H J = 7.2 Hz, q), 3.34 (1.5 H, s), 3.16 (1.5 H, s), 2.37 (2H, J = 6.6, t), 2.28 (3H, s), 2.23 (3 H, s), 1.85 (2 H, m), 1.50 (3 H, J = 6.3 Hz, t) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): 188.3, 188.0, 181.5, 175.6, 175.5, 171.6, 171.3, 68.7, 55.4, 49.7, 49.0, 44.4, 36.0, 35.6, 25.0, 24.8, 15.2 ppm.

3-(butilamino)-4-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (**2**)

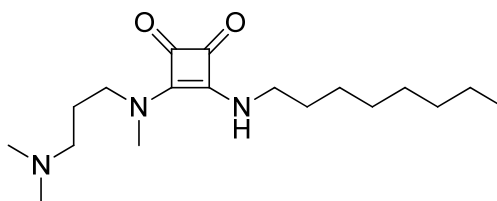


2 se ha preparado como se indica en el método general a partir **1** (0,37 g, 1,55 mmol) en etanol (5 mL) y n-butilamina (0,13 g, 1,8 mmol) en etanol (15 mL). Se obtiene **2** (0,40 g , 1,53 mmol) como sólido blanco. Rendimiento 85 %.

¹HRMN (CDCl₃) δ = 8.36 (1H, br), 3.67 (2 H , J = 6.3 Hz, q), 3.34 (3 H, s), 2.37 (2 H, m), 2.23 (6 H, s), 1.75 (2 H, m), 1.55 (2 H, m), 1.26 (2 H, m), 0.95 (3H, J = 4.5 Hz, t) ppm. ¹³C RMN (DMSO- d₆) δ = 183.7, 183.6, 169.4, 168.8, 54.5, 48.66, 45.2, 44.9, 36.5, 34.0, 24.1, 20.2, 14.2 ppm. HRMS calc para C₁₄H₂₆N₃O₂ [MH⁺] 268.2025 exp. 268.2022

De manera alternativa el compuesto **2** se preparó a partir de escuarato de etilo (0,50 g, 2,94 mmol) y N¹,N¹,N³-trimetilpropano-1,3-diamina (0,33 g, 2,65 mmol), se mezclan y agitan a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se añade n-butilamina (0.23 g, 3.2 mmol) y se calienta agitando a 80 °C durante 2 h. El crudo se purifica mediante cromatografía en columna (Al₂O₃, CH₂Cl₂/EtOH 5%) obteniéndose **2** como sólido blanco. Rendimiento 96 %.

3-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)-4-(octilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (**3**)

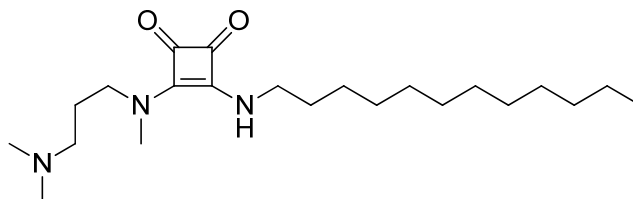


3 se ha preparado como se indica en el método general a partir de **1** (0,54 g, 2,25 mmol) en etanol (5 mL) y octilamina (0,34 g, 2,4 mmol) en etanol (15 mL). Se obtiene **3** (0,57 g, 1,68 mmol) como sólido blanco. Rendimiento 70 %.

- 5 $^1\text{HRMN}$ (CDCl_3) δ = 8.36 (1 H, s), 3.66 (2 H, J = 6.3 Hz, q), 3.30 (5 H, m), 2.36 (2 H, J = 5.7 Hz, t), 2.22 (6 H, s), 1.74 (2 H, m), 1.56 (2 H, m), 1.30 (20 H, s), 0.88 (3 H, J = 6.3 Hz, t) ppm. ^{13}C RMN (CDCl_3) δ = 183.3, 168.4, 54.8, 54.2, 49.11, 45.19, 44.6, 32.1, 32.0, 30.1, 30.0, 29.9, 27.1, 23.8, 23.1, 14.5 ppm. HRMS calc para $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_2$ [MH^+] 324.2651 exp. 324.2653.

10

3-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)-4-(dodecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (4)



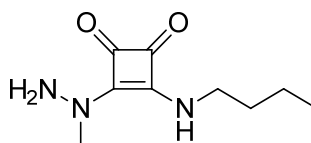
4 se ha preparado como se indica en el método general a partir de **1** (0,5 g, 2,1 mmol) en dietileter (5 mL) y dodecilamina (0,43 g, 2,3 mmol) en etanol (15 mL). Se obtiene **4** (0,63 g, 1,65 mmol) como un aceite incoloro. Rendimiento 80 %.

15

- $^1\text{HRMN}$ (CDCl_3) δ = 8.36 (1 H, s), 3.67 (2 H, J = 6.3 Hz, q), 3.30 (5 H, m), 2.36 (2 H, J = 5.7 Hz, t), 2.22 (6 H, s), 1.74 (2 H, m), 1.56 (2 H, m), 1.30 (28 H, s), 0.88 (3 H, J = 6.3 Hz, t) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 182.7, 168.5, 168.0, 54.2, 48.4, 44.6, 44.4, 35.9, 31.6, 31.3, 29.3, 29.0, 26.3, 23.8, 22.4, 13.3 ppm HRMS calc para $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_2$ [MH^+] 380.3266 exp. 380.3277

20

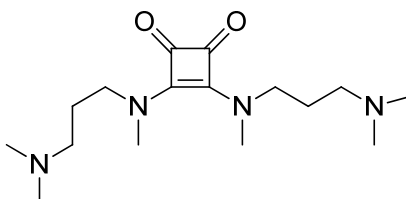
3-(butilamino)-4-(1-metilhidrazinil)ciclobut-3-en-1,2-diona (5)



5 se ha preparado como se indica en el método general a partir de **1** (0,38 g, 1,94 mmol) en dietiléter (5 mL) y N-metilhidrazina (0,08 g, 1,76 mmol) en etanol (15 mL). Se obtiene **5** (0,21 g, 1,05 mmol) como un sólido rojizo. Rendimiento 60%.

¹HRMN (CDCl₃) δ = 6.19 (1 H, s), 4.04 (2 H, s), 3.64 (2 H, J = 6.9 Hz, q), 3.50 (3 H, s),
 5 1.58 (2 H, m), 1.38 (2 H, m), 0.94 (3H, J = 4.5 Hz, t) ppm. ¹³CRMN (CDCl₃) δ = 181.8, 180.9, 169.0, 168.5, 44.7, 43.4, 33.8, 20.0, 14.1 ppm. HRMS calc para C₁₈ H₃₀ N₆ O₄ Na [2MNa⁺] 417.2234 exp. 417.2226.

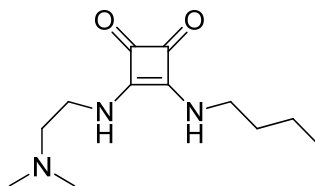
3,4-bis((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (6)



10

Escuarato de dietilo (0,29 g, 1,71 mmol) y N¹,N¹,N³-trimetilpropano-1,3-diamina (0,44 g, 3,76 mmol) en etanol (20 mL). Se dejan a temperatura ambiente durante 12h. Seguidamente se elimina el disolvente y el residuo obtenido se lava con n-pentano (3x15 mL). Se obtiene **6** (0,40 g, 1,28 mmol) como un sólido blanco. Rendimiento 75%
 15 ¹HRMN (CDCl₃) δ = 3.71 (4 H, J = 7.2 Hz t), 3.17 (6 H,s), 2.29 (4 H, J = 7.20 Hz, t), 2.21 (12 H, s), 1.80 (4 H, m) ppm. ¹³CRMN (CDCl₃) δ = 184.4, 168.6, 56.8, 51.6, 45.9, 40.1, 26.7 ppm. HRMS calc para C₁₆ H₃₁ N₄ O₂ [MH⁺] 311.2444 exp. 311.2447

3-(butilamino)-4-((2-(dimetilamino)etil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (7)



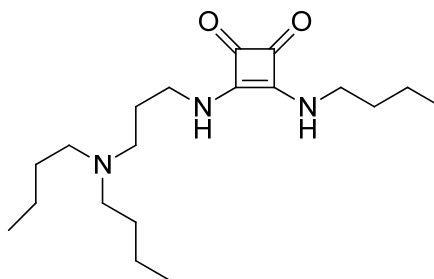
20

7 se preparó a partir de n-butilescuramidadietilester (preparado siguiendo el procedimiento descrito en M. C. Rotger, M. N. Piña, A. Frontera, G. Martorell, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa; *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 2302-2308) (5,50 g, 2,53 mmol) y N, N dimetiletano-1,2-diamina (0,22 g, 2,53 mmol) en etanol (20 mL). Se dejan
 25 a temperatura ambiente durante 12h. Seguidamente se elimina el disolvente y el sólido obtenido se lava con n-pentano (3x15 mL). Se obtiene **7** (0,51 g, 2,12 mmol) como sólido blanco. Rendimiento 84%.

$^1\text{HRMN}$ (DMSO-d_6) δ = 7.58 (1 H, br), 7.43 (1 H, br), 3.70 (2 H, J = 5.3 Hz, d), 3.61 (2 H m), 2.49 (2H J = 5.9 Hz, t), 2.27 (6 H, s), 1.56 (2 H m), 1.41 (2 H, m), 0.99 (3 H, J = 7.3 Hz, t) ppm. $^{13}\text{C RMN}$ (DMSO-d_6) δ = 182.4, 167.7, 167.5, 59.2, 45.0, 42.8, 41.0, 32.8, 19.0, 13.5, ppm. HRMS calc para $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ [MNa^+] 262.1531 exp. 262.1540

5

3-(butilamino)-4-((3-(dibutilamino)propil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (8)



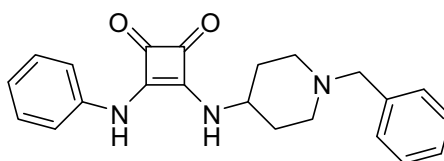
8 se preparó a partir de n-butilesuaramidadietilester (5,50 g, 2,53 mmol) y N, N dibutilpropano-1,3-diamina (0,48 g, 2,6 mmol) en etanol (20 mL). Se dejan a temperatura ambiente durante 12h. Seguidamente se elimina el disolvente y el sólido obtenido se lava con n-pentano (3x15 mL). Se obtiene **8** (0,69 g, 2,01 mmol) como sólido blanco. Rendimiento 80%.

$^1\text{HRMN}$ (CDCl_3) δ = 7.87 (1 H, br), 7.50 (1 H, br), 3.65 (4 H, m), 2.52 (2 H, J = 6.8 Hz, t), 3.39 (4 H J = 7.11 Hz t), 1.78 (2 H, m), 1.62 (2H, m), 1.34 (14H, m), 0.92 (9 H, m).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 182.5, 182.4, 168.2, 168.1, 53.9, 51.5, 44.6, 43.5, 33.4, 29.2, 28.4, 20.9, 19.8, 14.3, 13.9 ppm. HRMS calc para $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_2$ [MH^+] 338.2808, exp. 338.2795.

20

3-((1-benzilpiperidin-4-il)amino)-4-(fenilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (9)



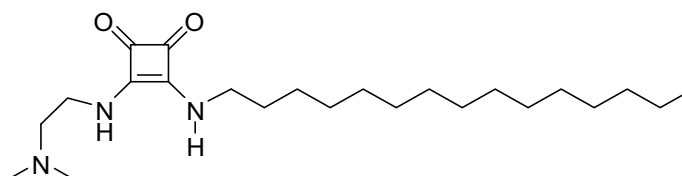
Escuarato de etilo (0,5 g, 2,94 mmol), y anilina (0,28 g, 3 mmol) en etanol (20 ml) se dejan durante 12h a reflujo. Se elimina el disolvente y el sólido obtenido se redisuelve en etanol (20 ml) con 1 equivalente de 4-amino-1-benzilpiperidinas y se deja durante 12 h a temperatura ambiente. Se elimina el disolvente y se lava con n-pentano. Se obtiene **9** (0,78 g, 2,20 mmol) como sólido blanco. Rendimiento 75%.

25

$^1\text{HRMN}$ (DMSO-d_6) δ = 7.65 (1H, br), 7.31 (9H, m), 4.68 (2H, J = 6 Hz, d), 3.74 (1 H, br), 3.74 (2H, s), 2.70 (2H, s), 2.03 (2 H, m), 1.81 (2 H, m), 1.45 (2H, m) ppm. $^{13}\text{C RMN}$

(DMSO- d_6) δ = 188.0, 187.90, 172.8, 144.5, 143.9, 134.5, 134.3, 133.8, 133.3, 131.1, 132.5, 67.6, 56.8, 56.1, 52.4, 38.6 ppm. HRMS calc para $C_{22}H_{23}N_3O_2$ $[MH^+]$ 376.2025 exp. 376.2023.

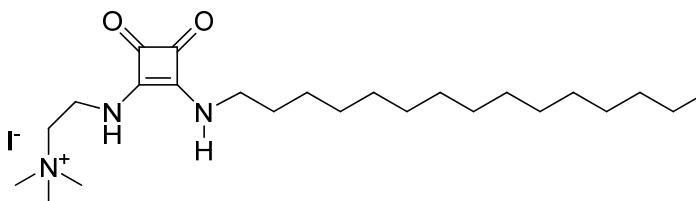
5 **3-((2-(dimetilamino)etil)amino)-4-(pentadecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (10)**



10 se preparó a partir de N,N dimetiletanodiaminadietilester (5,50 g, 2,53 mmol) y N, N dimetiletano-1,2-diamina (0,22 g, 2,53 mmol) en etanol (20 mL). Se deja a temperatura ambiente durante 12h. Seguidamente se elimina el disolvente y el sólido obtenido se lava con n-pentano (3x15 mL). Se obtiene **10** (0,87 g, 2,12 mmol) como sólido blanco. Rendimiento 84%.

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 7.46 (br, 1H), 7.31 (br, 1H), 3.6-3.58 (br, 2H), 3.48-3.46 (br, 2H), 2.38 (m, 2H), 2.16 (s, 6H), 1.49 (br, 2H), 1.23 (br, 26H), 0.84 (m, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): 182.6, 182.3, 168.2, 168.1, 59.8, 45.6, 44.9, 42.4, 32.1, 31.4, 29.9, 29.5, 26.8, 22.8, 14.2 ppm. HRMS calc. for $C_{24}H_{46}N_3O_2$ 408.35900; found 408.35834 $[M+H]^+$.

20 **Ioduro de 2-((3,4-dioxo-2-(pentadecilamino)ciclobut-1-en-1-il)amino)-N,N,N-trimetiletanamonio (13)**

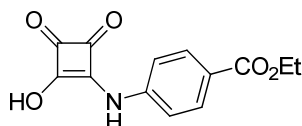


La escuaramida **10** (0,5 g, 1,2 mmol) se suspende en una mezcla de 20 mL de acetona anhidro y 10 mL de DMF anhidro junto con yoduro de metilo (0,5 g, 3,6 mmol). La mezcla se deja a reflujo durante 12 h. Al calentar la mezcla se observa la disolución de los reactivos. A medida que transcurre la reacción se forma un precipitado. Finalizado el tiempo de reacción se filtra el precipitado y se lava con acetona (5 x 10 mL), obteniéndose **13** (0,49 g, 0,9 mmol) como un sólido amarillo claro. Rendimiento 90%.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ = 7.52 (br, 1H), 7.40 (br, 1H), 3.95-3.93 (br, 2H), 3.5 (br, 4H), 3.11 (m, 9H), 1.49 (s, 2H), 1.23 (br, 26 H), 0.84 (br, 3H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): 182.9, 182.3, 168.4, 166.9, 65.0, 52.7, 43.3, 37.4, 31.2, 30.6, 29.0, 28.6, 25.8, 22.0, 13.9. HRMS calc. for $\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}_2$ 422.3759; found 422.3747 $[\text{M-I}]^+$.

5

Benzoato de etil 4-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino) (18)



En un matraz de fondo redondo de 10 mL se mezclan etil-4-aminobenzoato (41 mg, 0,25 mmol, con ácido escuaàrico (57 mg, 0,5 mmol) y 5 mL de agua. La mezcla se
10 deja a reflujo durante 3 h. Trnascurrido este tiempo, la mezcla de reacción se diluye con 20 mL de NaHCO_3 5%. Se hacen cuatro extracciones con 20 mL de éter dietílico cada una. La fase acuosa se acidifica con HCl 3N (10 mL), y se hacen diez extracciones con éter dietílico. La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra. El producto se obtiene como un sólido amarillo (48 mg, 73% de
15 rendimiento).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.60 (s, 1H), 7.89 (d, J = 8.7, 2H), 7.56 (d, J = 7.8, 2H), 4.27 (m, 2H), 1.29 (t, J = 6.9, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 189.9, 185.2, 171.2, 165.3, 143.3, 130.6, 130.4, 123.5, 118.0, 60.3, 14.2. IR (KBr, ν cm^{-1}): 3474, 3233, 3104, 2935, 1804, 1699, 1610, 1574, 1531, 1458, 1280, 1113. HRMS (ESI,
20 modo positivo): m/z calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Na}$, $[\text{2M}+\text{Na}]^+$: 523.1353; experimental: 523.1346. Punto de fusión: descomposición sobre 230 °C.

ENSAYOS BIOLOGICOS

25 CULTIVO PARASITOLÓGICO (PARA LEISHMANIA SPP)

Formas promastigotas de las especies *Leishmania infantum* (MCAN/ES/2001/UCM-10) y *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904), fueron cultivadas *in vitro* en esterilidad, a 28° C en medio de cultivo monofásico MTL (Medium Trypanosomes
30 Liquid, Ruiz-Perez y col., 1986) enriquecido con el 10 % (v/v) de suero bovino fetal inactivado frente al complemento (SBF-I) a 56°C/30 minutos. El inóculo de parásitos para iniciar el cultivo fue de 5×10^4 células/ml en 5 ml de medio en frascos de plástico Falcon® de 25 cm^2 , y mantenidos en una estufa a 28°C. (González P, Marín C, et al.,

Int J Antimicrob Agents 2005;25:136–141). Los cultivos se realizaron de manera rutinaria, y renovando el medio cada dos días consiguiendo el crecimiento exponencial de los flagelados hasta conseguir la masa celular necesaria para los posteriores estudios.

5

CULTIVOS CELULARES Y ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.

Los macrófagos J774.2 fueron reclonados desde J774.2 (*European collection of cell cultures* (ECACC) número 91051511) originales de un tumor de hembra de ratón de la cepa Balb/c, manteniendo los cultivos entre $3-9 \times 10^5$ células/ml a 37°C y a 5% de CO₂ en medio de cultivo MEM + Glutamina suplementado con un 20 % de SBF-I. El protocolo para trabajar con las células en cultivo fue despegándolas del frasco de cultivo donde se encontraban adheridas mediante soporte frío y golpes secos. Se decantaron las células y se centrifugaron durante 5 minutos a 800 rpm. Se resuspendieron las células en medio de cultivo fresco para proceder a su conteo, mediante tinción con azul de tripán (dilución 1:1) y en cámara hemocitométrica de Neubauer, para los estudios posteriores (Sánchez-Moreno M, et al., J Antimicrob Chemother 2012; 67:387-397). Estos ensayos se realizaron mediante citometría de flujo. Macrófagos de la línea J774.2, se depositaron en un *steriling* (Universal Tube®) y se centrifugaron a 800 rpm durante 10 min, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en medio MEM + Glutamina + 20 % SBF-I. Se depositaron 1×10^4 células/ml en cada pocillo con medio en una placa de titulación de 24 pocillos, se incubaron durante 24 h a 37°C en atmósfera húmeda enriquecida con 5% CO₂. Esto se realizó para que se fijasen las células. Transcurrido este tiempo el medio de cultivo se retiró y se adicionó medio fresco con los productos a ensayar, a las concentraciones de 100, 50, 25, 10 y 1 µM. A las 72 horas de la incubación, se procedió a la preparación de las muestras para su lectura en el citómetro de flujo.

El método seguido para la preparación de muestras es el descrito por Sánchez-Moreno M, et al., J Antimicrob Chemother 2012; 67:387-397, partiendo de las células y el medio presente en los pocillos, a las cuales se le adicionó 100 µl de solución de yoduro de propidio (PI, 100 µg/ml) (Sigma Chemical Co), incubándose a 28°C en oscuridad unos 10 minutos, posteriormente, se añadió 100 µl de diacetato de fluoresceína (FDA) (Sigma Chemical Co) en solución (100ng/ml) volviéndose a incubar

a 28°C en oscuridad unos 10 minutos, y previa centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos, se procedió a lavar el precipitado con PBS. Finalmente, se analizaron los resultados en el citómetro teniendo en cuenta que las células con la membrana plasmática intacta tienen una fluorescencia color verde, mientras que las células
5 dañadas o muertas presentan una fluorescencia roja. Se calculó el porcentaje de viabilidad. El número de células muertas se determinó por comparación con los cultivos controles.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO*: FORMAS EXTRACELULARES

10

Ensayo sobre formas promastigotas

Las formas promastigotas de *L. infantum* y *L. braziliensis* cultivadas de la forma anteriormente descrita, fueron recolectadas en su fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 min. Se resuspendieron en medio
15 fresco. La concentración de parásitos fue contada en una cámara hemocitométrica de Neubauer y se sembraron en una placa de 24 pocillos a razón de una concentración de 5×10^4 parásitos por pocillo. Los compuestos a ensayar se disolvieron con DMSO puro a una concentración de DMSO de 0,01% (v/v), a la cual, este disolvente no es tóxico ni tiene ningún efecto sobre el crecimiento de los parásitos. Los compuestos
20 fueron añadidos al medio de cultivo en la placa de 24 pocillos a una concentración final de: 100, 50, 25, 10 y 1 μ M, y a un volumen final por pocillo de 500 μ l. El efecto de cada producto sobre el crecimiento de las formas promastigotas, a las diferentes concentraciones ensayadas, se evaluó a las 72 horas, usando una cámara hemocitométrica de Neubauer, y el efecto leishmanicida se expresó como la IC50
25 (concentración requerida para dar una inhibición del 50%, calculado por el análisis de la regresión lineal de la Kc a las concentraciones ensayadas) (González P, Marín et al. Int J AntimicroAgents 2005;25:136–141).

ENSAYOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO*: FORMAS INTRACELULARES.

30

Ensayo sobre formas amastigotas

Los macrófagos se despegaron del frasco de cultivo donde se encontraban adheridos mediante soporte frío y golpes secos. Para ello, se eliminó el medio de cultivo, seguidamente se cubrió la superficie celular con EDTA-tripsina y se incubó en frío
35 durante 5 minutos según la metodología expuesta anteriormente. Tras ello, se pasó a

un frasco de fondo cónico de 25 ml de capacidad (Steriling) para centrifugarlos a 800 rpm durante 5 minutos, retirándose el sobrenadante y resuspendiéndolos en MEM + Glutamina con 20% SBF-I. Se cuentan en cámara de Neubauer y se cultivan en placas de 24 pocillos a razón de 1×10^3 células, en las que previamente se había introducido un cristal cubreobjetos redondo de 12 mm en cada pocillo. Para su adherencia, se dejaron crecer las células 24 h a 37°C en 5% CO₂.

Una vez adheridas las células, se infectaron "*in vitro*": Macrófagos J774.2 con 1×10^5 parásitos/pocillo de formas promastigotas metacíclicas en fase estacionaria de crecimiento de *L. infantum*. La infección se mantiene durante 24 horas para que el parásito entre a la célula. Transcurrido este tiempo el medio de cultivo se retiró y se adicionó medio fresco con los productos a ensayar, a las concentraciones necesarias para calcular la IC50 (50, 25, 10 y 1 µM). A las 72 horas de la incubación, se procedió a la retirada de los cristales.

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

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

Tabla 1.- Actividad y toxicidad encontradas para los compuestos escuaramídicos estudiados sobre formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania* spp.

Productos	IC ₅₀ (µM) ^a				Toxicidad IC ₅₀ Macrófagos (µM) ^b
	<i>L.infantum</i>		<i>L. braziliensis</i>		
	<i>Promastigote</i>	<i>Amastigote</i>	<i>Promastigote</i>	<i>Amastigote</i>	
Glucatin®	18,0±3,1	24,2±2,6	25,6±1,6	30,4±6,1	15,2± 1,0
(9)	68,5±7,4	31,7±2,5	39,2±4,1	35,8±5,2	257,9±16,4
(8)	97,7±8,5	32,5±1,6	75,1±8,8	34,7±6,7	162,3±15,1
(7)	72,3±6,4	35,2±1,2	21,0±3,1	21,1±1,7	156,8±10,4
(10)	65,9±4,5	37,7±1,4	14,9±2,2	17,6±0,6	100,4±5,1
(13)	16,3±0,8	31,3±2,4	24,0±1,2	30,1±2,3	351,1±22,5
(11)	40,5±3,7	30,5±1,1	60,1±6,3	40,5±7,3	79,1±6,1
(12)	39,4±4,4	29,5±2,1	35,1±2,7	30,6±1,5	94,3±4,7
(14)	55,3±6,6	46,8±5,7	39,9±4,1	29,6±1,6	83,2±6,0
(15)	57,2±3,3	40,7±2,8	39,3±2,0	23,5±1,8	28,7±2,1
(16)	31,1±1,6	27,4±0,8	38,3±0,8	22,0±2,7	61,4±5,7
(2)	18,0±3,6	15,1±0,8	17,3±1,4	16,8±0,8	406,1±21,4
(17)	85,0±5,5	64,3±3,7	15,9±1,7	22,3±0,6	66,8±4,8
(18)	19,9±1,1	30,0±1,4	22,2±3,5	25,8±2,7	318,4±17,8
(19)	33,3±4,6	27,1±1,8	15,6±1,2	19,4±0,9	70,1±6,3
(20)	25,2±3,6	23,5±1,5	36,8±1,5	34,2±0,8	56,4±3,7
(21)	38,3±1,9	22,6±1,8	39,5±2,2	27,3±1,6	57,2±5,2
(22)	19,3±0,8	15,7±0,7	17,5±1,3	16,7±0,5	330,0±27,8
(23)	23,8±1,4	20,0±0-7	25,2±2,1	22,4±1,3	41,7±6,2
(24)	33,3±4,3	25,4±1,2	26,7±1,5	29,6±1,8	90,4±6,6

5 Resultado de tres experimentos independientes. ^a IC₅₀ = Concentración necesaria para obtener el 50 % de Inhibición, calculada por análisis linear de regresión del valor Kc a las concentraciones empleadas de (1, 10, 25, 50 y 100 μM). ^b Frente a Macrófagos J774.2 después de 72 h de cultivo.

Tabla 2.- Índice de Selectividad (IS) encontrados para los compuestos escuaramídicos estudiados sobre formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania* spp.

Productos	IS ^c			
	<i>L. infantum</i>		<i>L. braziliensis</i>	
	<i>Promastigote</i>	<i>Amastigote</i>	<i>Promastigote</i>	<i>Amastigote</i>
Glucatin®	0,8	0,6	0,6	0,5
(9)	3,8 (5)	8,1 (13)	6,6 (11)	7,2 (14)
(8)	1,7 (2)	5,0 (8)	2,2 (4)	4,7 (9)
(7)	2,2 (3)	4,4 (7)	7,5 (12)	7,4 (15)
(10)	1,5 (2)	2,7 (4)	6,7 (11)	5,7 (9)
(13)	21,5 (27)	11,2 (19)	14,6 (24)	11,7 (23)
(11)	1,9 (2)	2,6 (4)	1,3 (2)	1,9 (4)
(12)	2,4 (3)	3,2 (5)	2,7 (5)	3,1 (6)
(14)	1,5 (2)	1,8 (3)	2,1 (3)	2,8 (6)
(15)	0,5 (1)	0,7 (1)	0,7 (1)	1,2 (2)
(16)	2,0 (2)	2,2 (4)	1,6 (3)	2,8 (6)
(2)	22,6 (28)	26,9 (45)	23,5 (39)	24,2 (48)
(17)	0,8 (1)	1,0 (2)	4,2 (7)	4,2 ((8)
(18)	16,0 (20)	10,6 (18)	14,3 (24)	12,3 (25)
(19)	2,1 (3)	2,6 (4)	4,5 (7)	3,6 (7)
(20)	2,2 (3)	2,4 (4)	1,5 (3)	1,6 (3)
(21)	1,5 (2)	2,5 (4)	1,4 (2)	2,1 (4)
(22)	17,1 (21)	21,0 (35)	18,8 (31)	19,8 (33)
(23)	1,8 (2)	2,1 (3)	1,6 (3)	1,9 (4)
(24)	2,7 (3)	3,6 (6)	3,4 (6)	3,0 (6)

- 5 ^c**Índice de Selectividad**= IC₅₀ de los macrófagos/IC₅₀ de las formas extracelulares e intracelulares de los parásitos. Entre paréntesis: Numero de veces que la IS de los compuestos es superior a la IS de la droga de referencia.

Algunos compuestos escuaramídicos se han evaluado frente a formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania* spp (*L. infantum* y *L. braziliensis*), obteniéndose los

índices IC_{50} como indicadores de la actividad de los compuestos frente al protozoo, los índices de toxicidad IC_{50} frente a macrófagos y el índice de selectividad obtenido como $IS = IC_{50}$ frente a macrófagos / IC_{50} frente formas extracelulares e intracelulares de los parásitos. En este estudio los valores obtenidos se comparan con los correspondientes a la droga referencia, Glucatime, utilizada comúnmente en el tratamiento de la leishmania.

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

CULTIVO PARASITOLÓGICO (para *Trypanosoma cruzi*)

Se utilizó *Trypanosoma cruzi* cepa tipo I (IRHOD/CO/2008/SN3) (Tellez- Meneses y col, Acta Trop 2008; 108:26-34) cuyo origen geográfico es Guajira (Colombia) y su origen biológico *Rhodnius prolixus* en las formas de desarrollo: epimastigotas, tripomastigotas y amastigotas. El cultivo de las formas epimastigotas de *T. cruzi* se realizó *in vitro* en esterilidad en medio de cultivo monofásico MTL (Medium Trypanosomes Liquid, Ruiz-Pérez y col., 1986) enriquecido con el 10% (v/v) de Suero Bovino Fetal (SBF-I) inactivado a 56°C/ 30 minutos. El inóculo de parásitos para iniciar el cultivo fue de 5×10^4 células/ml en 5 ml de medio en frascos de plástico Falcon® de 25 cm² y se mantuvieron en una estufa a 28°C. Los cultivos se realizaron de manera rutinaria consiguiendo el crecimiento exponencial de los flagelados hasta conseguir la masa celular necesaria para los posteriores estudios. (Téllez-Meneses J,y col. Acta Trop 2008; 108:26-34).

CULTIVOS CELULARES Y ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.

Las células Vero fueron establecidas desde el riñón de un mono Verde Africano adulto, manteniendo los cultivos a una densidad 1×10^4 células/cm² a 37°C y 5% de CO₂. El procedimiento para trabajar con las células en cultivo fue tripsinizar las células adheridas mediante lavado con PBS y añadiendo la cantidad suficiente de tripsina/EDTA (200ml de PBS + 0,1 g de EDTA y 200 ml de PBS + 0,5 g de tripsina. Se mezclan las dos soluciones. pH= 7,2-7,4 y se filtra). Se incubaron durante 5-10 minutos las células. Se decantaron las células y se centrifugaron durante 5 minutos a 800 rpm. Se resuspendieron las células en un medio de cultivo nuevo. Como medio de cultivo se utilizó RPMI suplementado con un 10 % de suero bovino fetal inactivado (SBF-I). (Sánchez-Moreno M, y col. J Antimicrob Chemother 2012;67:387-397). Las células Vero, se depositaron en un esterlín y se centrifugaron a 800 rpm durante 10 min, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en medio RPMI. Se depositaron 1×10^4 células/ml en cada pocillo de una placa de titulación de 24 pocillos, se incubaron durante 24 h a 37°C en atmósfera húmeda enriquecida con 5% CO₂. Esto se realizó para que se fijasen las células. Transcurrido este tiempo el medio de cultivo se retiró y se adicionó medio fresco con los productos a ensayar, a las concentraciones de 100, 50, 25 y 10 µM. A las 72 horas de la incubación, se procedió a la preparación de las muestras para su lectura en el citómetro de flujo. El método seguido es el descrito por Marín C, y col. J Nat Prod. 2011 Apr 25;74(4):744-50, partiendo de las células y el medio presente en los pocillos, a las cuales se le adicionó 100 µl de solución de yoduro de propidio (PI, 100 µg/ml) (Sigma Chemical Co), incubándose a 28°C en oscuridad unos 10 minutos, posteriormente, se añadió 100 µl de diacetato de fluoresceína (FDA) (Sigma Chemical Co) en solución (100ng/ml) volviéndose a incubar a 28°C en oscuridad unos 10 minutos, y previa centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos, se procedió a lavar el precipitado con PBS. Finalmente, se analizaron los resultados teniendo en cuenta que las células con la membrana plasmática intacta tienen una fluorescencia color verde, mientras que las células dañadas o muertas presentan una fluorescencia roja. Se calculó el porcentaje de viabilidad. El número de células muertas se determinó por comparación con los cultivos controles. (Marín C, y col. J Nat Prod 2011; 74:744-750).

ENSAYOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO*: FORMAS EXTRACELULARES.

Transformación de formas epimastigotas a formas trypomastigotasmeciclicas

La metaciclogenesis fue inducida a un cultivo de 5 días (fase estacionaria), tras ser centrifugado a 7000 g durante 10 min a 10°C. Los parásitos fueron incubados 2h a 28°C a una densidad de 5×10^8 parásitos/ml en medio TAU (190 mMNaCl, 17 mMKCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 8 mMphosphate buffer, pH 6.0). Después, los parásitos se incubaban a la dilución 1:100 durante 96h a 28°C en medio TAU3AAG (TAU suplementado con 10 mM L-prolina, 50 mM L-glutamato sódico, 2 mM L-aspartato sódico y 10 mM D-glucosa) en frascos de cultivo de 25 ml en posición horizontal impidiendo que supere 1cm de profundidad del medio. (Cardoso J, y col. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 5:1026-32).

Formas epimastigotas

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

Los compuestos a ensayar se disolvieron en DMSO a una concentración de 0,01% (v/v) concentración a la cual este disolvente no es tóxico ni tiene ningún efecto sobre el crecimiento de los parásitos. Los compuestos fueron añadidos al medio de cultivo a una concentración final de: 100, 50, 25, 10 y 1 µM. El efecto de cada compuesto sobre el crecimiento de las formas epimastigotas, a las diferentes concentraciones ensayadas, se evaluó a las 72 h, usando una cámara hemocitométrica de Neubauer y el efecto tripanocida se expresó como la IC₅₀ (concentración requerida para dar una inhibición del 50%, calculado por el análisis de la regresión lineal de la K_c a las concentraciones ensayadas) (Sánchez-Moreno M, y col.. J Med Chem. 2011; 54:970-9).

Formas Trypomastigotas

La actividad (porcentaje de reducción de parásitos) es comparado con el control después de realizar la metodología descrita por (Júnior CO, y col. BiomedPharmacother 2010; 64:624-6) con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio. El ensayo se lleva a cabo usando sangre infectada de ratón Balb/c que ha

5 sido obtenida durante los días de máxima parasitemia (día 7 aprox. post infección). La sangre infectada fue diluida con sangre no infectada para obtener una concentración de $1-4 \times 10^6$ trypomastigotas/ml, entonces se diluía 1:2 con RPMI 1640 medium-GIBCO. Soluciones stock de los compuestos a ensayar se preparan al mismo tiempo en DMSO. Una muestra de sangre infectada y la droga se añaden a una placa de 96 pocillos hasta un volumen final de 200 μ l y a las concentraciones de compuesto de 1, 10, 25, 50 y 100 mM, a fin de calcular la IC₅₀ para cada uno y posteriormente las placas se incubaron a 4 °C durante 24 h. Los experimentos se repitieron tres veces. Cada muestra se examinó microscópicamente (OLYMPUS CX41) para el recuento de parásitos utilizando la cámara de Neubauer.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO*: FORMAS INTRACELULARES.

Ensayo de amastigotas

15 Las células Vero se despegaron del frasco de cultivo donde se encontraban adheridos mediante tripsinización. Para ello, se eliminó el medio de cultivo, seguidamente se cubrió la superficie celular con EDTA-tripsina y se incubó en frío durante 5 minutos según la metodología expuesta anteriormente. Tras ello, se pasó a un frasco de fondo cónico de 25 ml de capacidad (Steriling) para centrifugarlos a 800 rpm durante 5 minutos, retirándose el sobrenadante y se cuentan en cámara de Neubauer.

20 Resuspendiendo las células a una concentración de 1×10^4 células/ml en medio RPMI para las células Vero, cultivándose en placas de 24 pocillos, en las que previamente se había introducido un cristal cubreobjetos redondo de 12 mm en cada pocillo. Para su adherencia, se dejaron crecer las células 24 h a 37°C en 5% CO₂.

25 Una vez adheridas las células, se infectaron “in vitro” las células Vero con 5×10^4 células/ml de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, obtenidos según la metodología citada anteriormente. La infección se mantiene durante 24 horas para que el parásito entre a la célula. Transcurrido este tiempo el medio de cultivo se retiró y se adicionó medio fresco con los productos a ensayar, a las concentraciones necesarias para

30 sacar la IC₅₀ (100, 50, 25, 10 y 1 μ M). A las 72 horas de la incubación, se procedió a la retirada de los cristales.

Una vez sacados los cristales se colocaron en un portaobjetos. Se fijaron con metanol y se dejaron secar. Una vez fijados y secos, se les añadió DPX (Panreac®), medio de

montaje para microscopía. Se tiñeron con Giemsa, para ello, inmediatamente antes de su empleo y en tubo de ensayo, se diluyó 0,2 ml de Azur-Eosina-Azul de Metileno solución según Giemsa DC (Código 251338) con 2 ml de tampón Sörensen (dilución 1:10), se mezcló bien y se cubrió la preparación dejando colorear durante 20 minutos.

- 5 Se lavó con agua destilada. Se dejó escurrir y secar en posición vertical. Por último se examinó con el objetivo de inmersión y se contó el número de amastigotas intracelulares en un total de 200 células.

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

10

Tabla 3.- Actividad *in vitro*, toxicidad e índice de selectividad de los compuestos escuaramídicos evaluados en formas extracelulares e intracelulares de *Trypanosoma cruzi*.

Compuesto	IC ₅₀ (μM) ^a		Toxicidad		IS ^c	
	Epimastigote	Amastigote intracelular	IC ₅₀ Cel. Vero (μM) ^b	Epimastigote	Amastigote intracelular	
Benznidazol	15,9±1,1	23,3±4,6	13,6±0,9	0,8	0,6	
(9)	96,9±4,2	34,7±1,3	337,5±18,5	3,5 (4)	9,7 (16)	
(8)	21,1±3,8	6,0±0,4	147,8±8,4	13,3 (17)	24,6 (41)	
(7)	17,5±7,0	14,3±6,4	260,2±11,3	14,9 (19)	18,25 (30)	
(10)	49,8±2,7	22,4±1,7	90,1±6,2	1,8 (2)	3,4 (6)	
(13)	44,9±3,0	26,3±1,5	151,4±7,4	3,4 (4)	5,7 (10)	
(11)	107,2±6,3	38,5±5,7	57,6±6,8	0,5 (1)	1,5 (2)	
(12)	60,8±1,4	39,2±2,0	74,2±3,2	1,2 (1)	1,9 (3)	
(14)	35,7±1,1	23,8±2,5	54,8±3,4	1,5 (2)	2,3 (4)	
(15)	45,5±2,7	23,4±0,7	25,3±1,6	0,6 (1)	1,1 (2)	
(16)	17,3±2,0	66,9±1,2	21,6±3,1	1,2 (2)	0,3 (1)	
(2)	11,4±0,4	14,5±0,4	453,1±22,6	39,8 (50)	31,2 (52)	
(17)	15,9±0,3	10,1±1,0	12,9±1,2	0,8 (1)	1,3 (2)	
(18)	50,8±4,1	44,0±1,9	228,3±12,5	4,5 (6)	5,2 (9)	
(19)	26,3±2,0	18,4±0,8	21,5±1,2	0,8 (1)	1,2 (2)	
(20)	89,1±4,5	72,6±5,3	36,6±3,0	0,4 (0)	0,5 (0)	
(21)	20,4±3,0	17,4±0,3	28,6±0,7	1,4 (2)	1,6 (3)	
(22)	18,5±1,1	17,1±0,4	300,7±22,7	16,2 (20)	17,5 (29)	
(23)	96,2±7,2	46,0±2,6	11,4±0,5	0,1 (1)	0,2 (1)	
(24)	118,9±7,8	43,9±2,7	73,1±5,3	0,6 (1)	1,7 (3)	

5

Los resultados representan la media obtenida en cuatro experimentos separados. ^a. IC₅₀ = concentración requerida para dar el 50% de inhibición, calculada por análisis de regresión lineal a partir de los valores Kc en las concentraciones utilizadas (1, 10, 25, 50 and 100 μM).^b Frente a células Vero después de 72 h de incubación.^c Índice de

selectividad = IC_{50} Células Vero/ IC_{50} formas extracelulares e intracelulares del parásito. Entre paréntesis: número de veces que el compuesto excede el índice de selectividad de la droga referencia (para formas extracelulares e intracelulares del *Trypanosoma cruzi*).

- 5 Tablas 4 y 5 - Actividad *in Vitro*, Toxicidad e Índice de Selectividad encontrados para los compuestos 3 a 6 en formas extracelulares e intracelulares de *T. cruzi*.

Tabla 4

10	Comp.	Epimastigote formas	IC ₅₀ (μM) ^a		Toxicidad IC ₅₀ Macrófagos (μM)
			Intracelular amastigote formas	Trypomastigotes	
15	5	190,59	12,25	180	960,99
	4	175,33	2,17	34	21,06
	3	164,81	21,75	176	497,67
	6	157,7	15,95	1000	327,76

Tabla 5

25	Compuesto	Epimastigote formas	ISc	
			Intracelular amastigote formas	Trypomastigotes
30	5	5,04(6)	78,00(130)	5,33 (9)
	4	0,12 (1)	9,70(16)	0,63(1)
35	3	3,01(4)	22,88 (38)	2,82(5)
	6	2,08(3)	20,54 (34)	1(1)

- 40 ^aIC₅₀ = la concentración requerida para obtener el 50% de inhibición, calculada por regresión lineal del análisis de los valores Kc a las concentraciones empleadas (1, 10, 25, 50 and 100 μM).

^bSobre células Vero después de 72 h de cultivo.

°Índice de Selectividad= IC_{50} Células Vero/ IC_{50} formas extracelulares e intracelulares parasitarias. Entre paréntesis: número de veces que el compuesto supera al índice IS de la droga de referencia.

Estos valores se han comparado con los valores obtenidos para el Benznidazol ya que se trata del fármaco comúnmente utilizado para el tratamiento de esta enfermedad. Los resultados obtenidos indican que en general los compuestos escuaramídicos son menos tóxicos que el Benznidazol frente a células Vero con valores de IC_{50} entre 10 y 30 veces superiores que el IC_{50} del compuesto referencia. En algunos casos como el compuesto (8), (7) o (2) su actividad es mucho mayor que el compuesto referencia ya que presentan valores de IC_{50} menores tanto en formas extracelulares como intracelulares. De acuerdo con estos resultados estos compuestos tienen índices de efectividad elevados con valores de índices de selectividad comprendidos entre 20 y 50. Todo ello indica que dichos compuestos presentan una actividad adecuada para su uso como agentes anti *T. cruzi*.

15

Ensayos *In vivo* de la actividad tripanocida

Los ensayos *in vivo* se realizaron para la determinación de los siguientes aspectos:

- determinación del efecto de los compuestos usados en los niveles de parasitemia después del tratamiento, calculando la actividad parasitaria en una cámara de Neubauers como marcador de la fase aguda,
- medida de la reactivación de la parasitemia después de la inmunosupresión como marcador de la fase crónica,
- realización de ensayos ELISA para determinar la respuesta inmunológica y comparar los niveles de IgG en las fases aguda y crónica,
- detección de la presencia del parásito mediante PCR en órganos y
- estudio del nivel de daño en el tejido cardíaco mediante estudios histopatológicos.

Grupos de tres ratones hembra BALB/c de entre 6-8 semanas de edad y peso 20-25 g, se mantuvieron bajo condiciones estándar. Se infectaron mediante vía intraperitoneal con 1×10^5 formas sanguíneas de *T. cruzi*. Los animales se dividieron en los siguientes grupos:

- (I) Grupo 1: no infectado (no infectado y no tratado)
- (II) Grupo 2: no tratado (infectado con *T. cruzi* pero no tratado)

- (III) Grupo 3: tratado (infectado y tratado con 1 mg/kg peso/día durante 5 días consecutivos, 5-10 días después de la infección, mediante vía intraperitoneal, con los compuestos probados y benzinidazol).
- 5 Una muestra sanguínea (5 µL) se extrajo de la vena mandibular de cada ratón tratado y se diluyó a concentración 1: 100 con PBS. El número de formas trypomastigote de *T. cruzi* se registró cada 2 días desde los 5 a 60 días post-infección utilizando una cámara de Neubauer. El número de parásitos se expresa como parásitos/mL.
- 10 Los anticuerpos frente al *Trypanosoma cruzi* presentes en el suero circulatorio, en los días 40 y 120 post-infección se evaluaron cuantitativamente mediante ensayos ELISA (enzyme-linked immunoassay). El suero se obtuvo a partir de la sangre por centrifugación y se diluyó a concentración 1:80 en PBS. El antígeno se compone de una isoforma excretada de enzima Fe-SOD de epimastigotes *T. cruzi*. Los resultados
- 15 obtenidos se expresan como la relación entre la absorción de cada muestra a 490 nm respecto al valor máximo estimado. El valor máximo estimado se calcula como la media de los valores obtenidos en los controles negativos (no tratados) más tres veces la desviación estándar.
- 20 Después del día 150 post-infección, los grupos de ratones tratados cuyos niveles de parasitemia hubieron decrecido de forma significativa se sometieron a tres ciclos de inmunosupresión con monohidrato de ciclofosfamida. El experimento finalizó con la sangría completa de los ratones y la extracción de los órganos objetivo, corazón e hígado. La sangre recogida se usó para el control del tanto por ciento de reactivación
- 25 de los niveles de parasitemia y para la determinación de la concentración de Ig-G en el suero mediante ensayos ELISA como se ha indicado anteriormente y con el objetivo de conocer el perfil del cambio en el nivel de antígenos asociado a la presencia del parásito en sangre. Finalmente, tras la extracción de los corazones e hígados, estos se cortaron longitudinalmente. Una de las mitades se utilizó para obtener el DNA total
- 30 y después se llevó a cabo una PCR para un fragmento en el gen SOD del *T. cruzi* de acuerdo a un par de cebadores diseñados TciSOD_d: ATG GTC TTC AGC ATT CCT CC (SEQ NO: 1), TciSOD_r: GTT GAT CTC GTC GGC AAC TT (SEQ NO: 2) que permite la detección del DNA del *T. cruzi* en diferentes muestras biológicas. La otra mitad del órgano, en el caso del hígado, se utilizó para llevar a cabo análisis

histopatológicos, por lo que se lavó en PBS frío (0° C) y se fijó en una disolución tampón con un 10% de formalina. Los tejidos se deshidrataron y fueron embebidos en parafina. Se cortaron secciones de 4-5 µm de grosor y se tiñeron con Tricomo, siguiendo el protocolo de Masson. Los portaobjetos con muestras se marcaron para un análisis ciego. Los exámenes histológicos se realizaron utilizando un microscopio óptico convencional. Cada muestra se visualizó a menos en 30 campos diferentes (aumentos totales: x 40, x 100, x 200 y x 400) Las alteraciones histológicas recibieron una puntuación de 0 (-) a 5 (+++++), donde 0 representa la ausencia de alteraciones y 5 representa las alteraciones más severas.

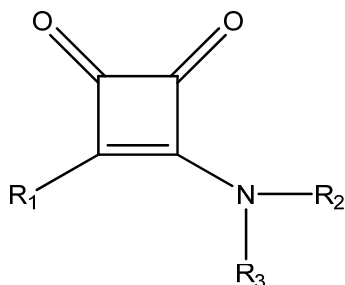
Como definición de cura, se consideran curados aquellos animales inoculados con *T. cruzi* y tratados cuya parasitemia no se repite después de los ciclos de inmunosupresión y cuyas secciones histológicas no presentan nidos amastigote u otra forma de parásitos.

Estos experimentos con animales se llevaron a cabo bajo la aprobación de la Comisión de Ética de la Universidad de Granada.

Los resultados in vivo durante la fase aguda de la infección muestran que el compuesto 2 fue el que redujo en mayor porcentaje la parasitemia (67%) (Figura 1). Los estudios de la fase crónica muestra que el compuesto 2 solamente se reactiva en un porcentaje mínimo (3,1%, Figura 2A) tras la inmunosupresión, en comparación con el control donde se reactiva prácticamente el 100%, este resultado se confirma con el mantenimiento de los niveles de IgG (Figura 2B). Mediante los estudios de PCR se demuestra la prácticamente curación, tanto en ratones tratados con el producto 2 y no inmunodeprimidos como los tratados e inmunodeprimidos:

REIVINDICACIONES

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



(I)

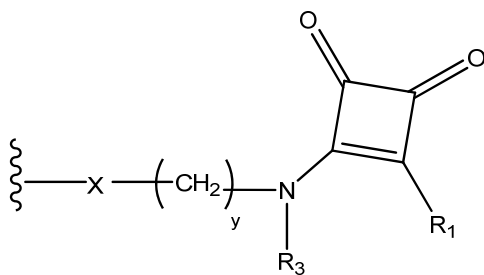
donde:

R_1 se selecciona de entre $-NR_aR_b$ o $-OR_c$, donde: R_a se selecciona de entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5); R_b se selecciona de la lista que comprende arilo, opcionalmente sustituido, $-(CH_2)_x-NR_1'R_1''$ o $-(CH_2)_x-CO_2R_1'''$; x tiene un valor de 0 a 5 y R_1' , R_1'' y R_1''' se seleccionan de manera independiente entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5); R_c se selecciona de entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5);

R_2 se selecciona de la lista que comprende arilo, opcionalmente sustituido; heterociclo, opcionalmente sustituido; aralquilo (C_1-C_5), opcionalmente sustituido; alquilo (C_1-C_{20}); $-(CH_2)_x-NR_2'R_2''$; o $-(CH_2)_y-R_4$, donde y tiene un valor de 0 a 5, x tiene un valor de 0 a 5 y R_2' y R_2'' se seleccionan de manera independiente entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5);

R_3 se selecciona de entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5); y

R_4 es el grupo de fórmula (II):



(II)

donde: X se selecciona de la lista que comprende $-NR_4'$, $-CH-$ y arilo, opcionalmente sustituido; y donde R_4' se selecciona de entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5),

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

5

2. Uso según la reivindicación anterior, donde R_a es hidrógeno o metilo.

3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R_b es fenilo.

10

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde R_b es el grupo $-(CH_2)_x-NR_1'R_1''$ y R_1' , R_1'' y x está definido en la reivindicación 1.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4, donde R_1' y R_1'' se seleccionan de manera independiente entre alquilo (C_1-C_4).

15

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 ó 5, donde R_1' y R_1'' son metilo o butilo.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 6, donde x es 2 ó 3.

20

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4, donde R_b es $-NH_2$.

9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde R_b es el grupo $-(CH_2)_x-CO_2R_1'''$, x tiene el valor de 1, 2 ó 3 y R_1''' es hidrógeno.

25

10. Uso según la reivindicación 1, donde R_1 es $-OH$.

11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde R_3 es hidrógeno o metilo.

30

12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R_2 es un grupo piperidina, opcionalmente sustituido.

13. Uso según la reivindicación anterior, donde la piperidina está sustituida por un grupo bencilo.

14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde R_2 es un grupo fenilo, opcionalmente sustituido.

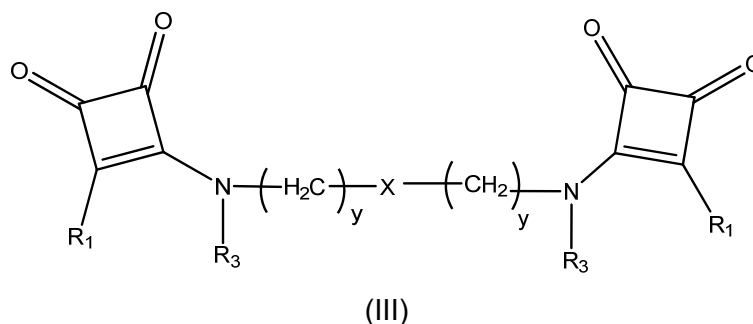
15. Uso según la reivindicación anterior, donde el grupo fenilo está sustituido por al menos un grupo seleccionado de la lista que comprende hidroxilo, éster o grupo $-(CH_2)_x-NR'R''$, donde x tiene un valor de 0 a 5 y R' y R'' se seleccionan independientemente entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5).

16. Uso según la reivindicación anterior, donde el grupo fenilo esta sustituido por un éster, hidroxilo, $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$, o $-N(CH_3)_2$.

17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde R_2 es un grupo alquilo (C_4-C_{15}).

18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde R_2 es bencilo, opcionalmente sustituido.

19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde R_2 es $-(CH_2)_y-R_4$ y el compuesto es de fórmula (III):



donde: X , y , R_1 y R_3 se han definido en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

20. Uso según la reivindicación anterior, donde X es un fenilo, opcionalmente sustituido.

21. Uso según la reivindicación 19, donde X es el grupo –CH–.
22. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, donde y es 1.
- 5 23. Uso según la reivindicación 19 donde X es –NR₄'–, donde R₄' está definido en la reivindicación 1.
24. Uso según la reivindicación anterior, donde R₄' es metilo.
- 10 25. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 23 o 24, donde y es 3.
26. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, donde R₃ es hidrógeno.
27. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26, donde R₁ es –NR_aR_b, R_a es
15 metilo y R_b es el grupo –(CH₂)_x–NR₁'R₁'', donde R₁' y R₁''' son metilo y x es 2 o 3.
28. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los compuestos están en forma de sales de halógeno.
- 20 29. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto se selecciona de lista que comprende:
- 3-(butilamino)-4-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona
- 3-(butilamino)-4-(1-metilhidrazinil)ciclobut-3-en-1,2-diona
- 3-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)-4-(octilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona
- 25 3-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)-4-(dodecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona
- 3,4-bis((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona
- 3-((1-benzilpiperidin-4-il)amino)-4-(fenilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona
- 3-(butilamino)-4-((3-(dibutilamino)propil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona
- 3-(butilamino)-4-((2-(dimetilamino)etil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona
- 30 3-((2-(dimetilamino)etil)amino)-4-(pentadecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona
- ioduro de 2-((3,4-dioxo-2-(pentadecilamino)ciclobut-1-en-1-il)amino)-N,N,N-trimetiletanamonio
- benzoato de etil 4-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)
- ioduro de 2-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N,N,N-

trimetiletanamonio;

ioduro de 2-((2-(bencilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N,N,N-trimetiletanamonio;

ácido 2-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)acético;

5 ácido 3-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)propanoico;

ácido 4-((2-(butilamino)-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)butanoico;

3-((4-(dimetilamino)fenil)amino)-4-hidroxociclobut-3-en-1,2-diona

3-hidroxi-4-((2-hidroxifenil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona;

3-((4-(aminometil)fenil)amino)-4-hidroxociclobut-3-en-1,2-diona;

10 4,4'-(((metilazanedil)bis(propano-3,1-diil))bis(azanedil))bis(3-((3-(dimetilamino)propil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona);

ioduro de 3,3'-((((metilazanedil)bis(propano-3,1-diil))bis(azanedil))bis(3,4-dioxociclobut-1-en-2,1-diil))bis(azanedil))bis(N,N,N-trimetilpropan-1-amonio);

15 4,4'-(propano-1,3-diilbis(azanedil))bis(3-((3-dimetilamino)propil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona); y

ioduro de 2,2'-((((1,3-fenilenebis(metilene))bis(azanedil))bis(3,4-dioxociclobut-1-en-2,1-diil))bis(azanedil))bis(N,N,N-trimetiletanamonio).

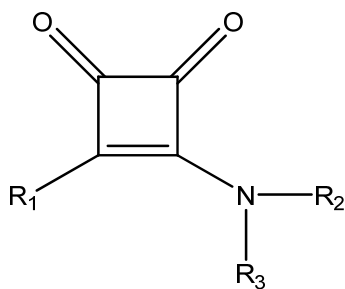
20 30. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad parasitaria es una enfermedad parasitaria protozoaria.

31. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los parásitos pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*, preferiblemente del género *Leishmania* o *Trypanosoma*, más particularmente la especie *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma*
25 *brucei*, *Leishmania infantum* o *Leishmania braziliensis*.

32. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad es leishmaniasis o tripanosomiasis.

30 33. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las enfermedades son leishmaniosis o enfermedad de Chagas.

34. Un compuesto de fórmula general (IV):



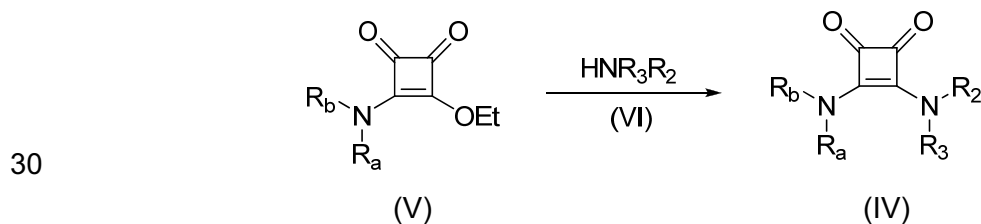
(IV)

donde:

- 5 R_1 es un grupo $-NR_aR_b$, donde: R_a es un alquilo C_1-C_3 ; y R_b es el grupo $-(CH_2)_x-NR_1'R_1''$, donde x tiene un valor de 0 a 5 y R_1' y R_1'' se seleccionan de manera independiente entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5);
- R_2 se selecciona de un grupo alquilo (C_1-C_{20}) o un grupo $-(CH_2)_x-NR_2'R_2''$; x tiene un valor de 0 a 5 y R_2' y R_2'' se seleccionan de manera independiente entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_5); y
- 10 R_3 se selecciona de entre hidrógeno o un alquilo (C_1-C_5);
o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables.

35. Compuesto según la reivindicación anterior, donde R_a es un metilo.
- 15 36. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 34 ó 35, donde R_b es el grupo $-(CH_2)_x-NR_1'R_1''$, x tiene un valor de 1 a 5 y R_1' y R_1'' se seleccionan de manera independiente un alquilo (C_1-C_3).
37. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 36, donde R_b es el grupo
- 20 $-(CH_2)_x-NR_1'R_1''$, x tiene un valor de 1 a 5 y R_1' y R_1'' son metilo.
38. Compuesto según la reivindicación anterior, donde x es 3.
39. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 34 ó 35, donde R_b es el grupo
- 25 $-(CH_2)_x-NR_1'R_1''$; x es 0 y R_1' y R_1'' son hidrógeno.
40. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 39, donde R_2 es un alquilo (C_4-C_{12}).

41. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 39, donde R_2 es un grupo $-(CH_2)_x-NR_2'R_2''$; x tiene un valor de 1 a 5 y R_2' y R_2'' se seleccionan de manera independiente entre hidrógeno y alquilo (C_1-C_3).
- 5 42. Compuesto según la reivindicación anterior, donde x es 3 y R_2' y R_2'' son metilo.
43. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 42, donde R_3 es hidrógeno o metilo.
- 10 44. Compuesto según la reivindicación 34, seleccionado de la lista que comprende:
 3-(butilamino)-4-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona;
 3-(butilamino)-4-(1-metilhidrazinil)ciclobut-3-en-1,2-diona;
 3-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)-4-(octilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona;
 3-((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)-4-(dodecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona; y
 15 3,4-bis((3-(dimetilamino)propil)(metil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona.
45. Compuesto seleccionado de la lista que comprende:
 3-((1-benzilpiperidin-4-il)amino)-4-(fenilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona;
 3-(butilamino)-4-((3-(dibutilamino)propil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona;
 20 3-(butilamino)-4-((2-(dimetilamino)etil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona;
 3-((2-(dimetilamino)etil)amino)-4-(pentadecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona;
 Ioduro de 2-((3,4-dioxo-2-(pentadecilamino)ciclobut-1-en-1-il)amino)-N,N,N-trimetiletanamonio; y
 Benzoato de etil 4-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino).
- 25 46. Procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula (IV) según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 44, que comprende hacer reaccionar un éster de monoescuaramida de fórmula general (V) con una amina de fórmula general (VI):



donde: Et es etilo y R_a , R_b , R_2 y R_3 se han descrito en las reivindicaciones 34 a 44.

47. Composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 45, junto con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5

48. Uso del compuesto descrito según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 45, para la elaboración de un medicamento.

10

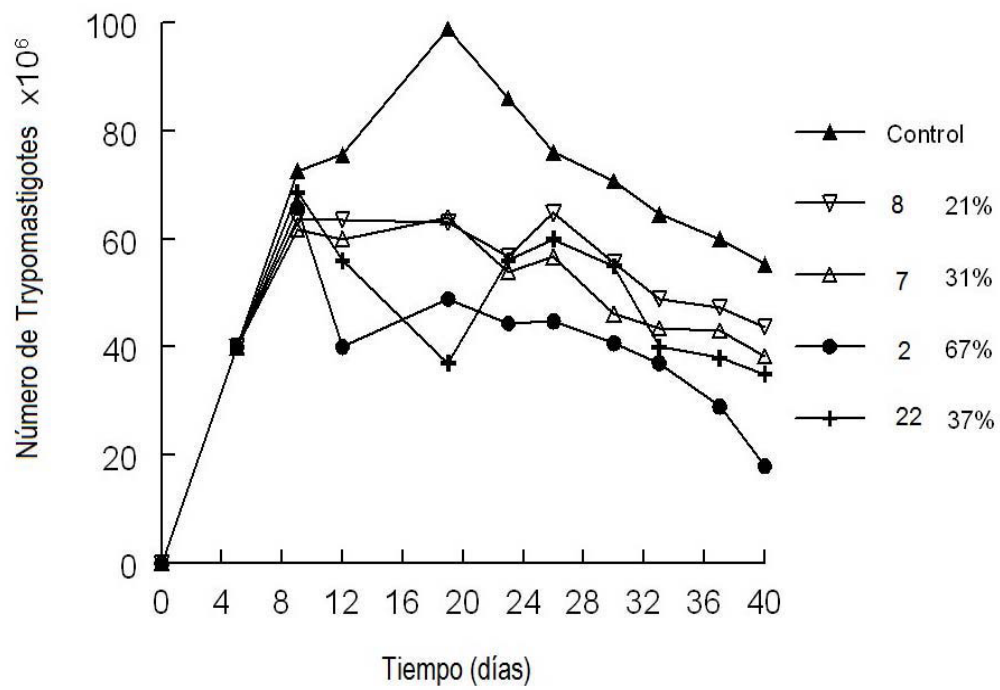


FIG. 1

A

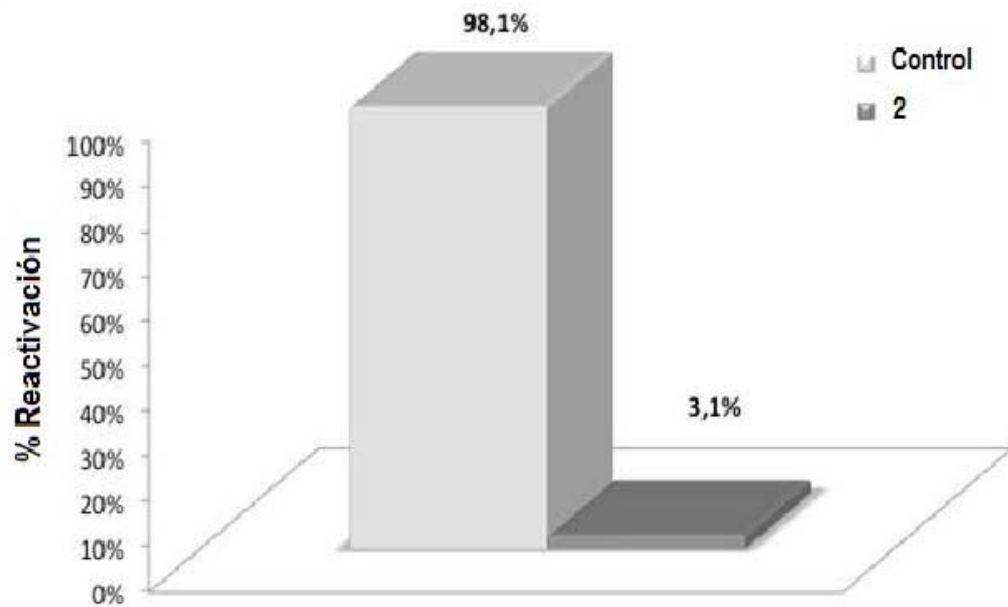


FIG. 2 (cont.)

B

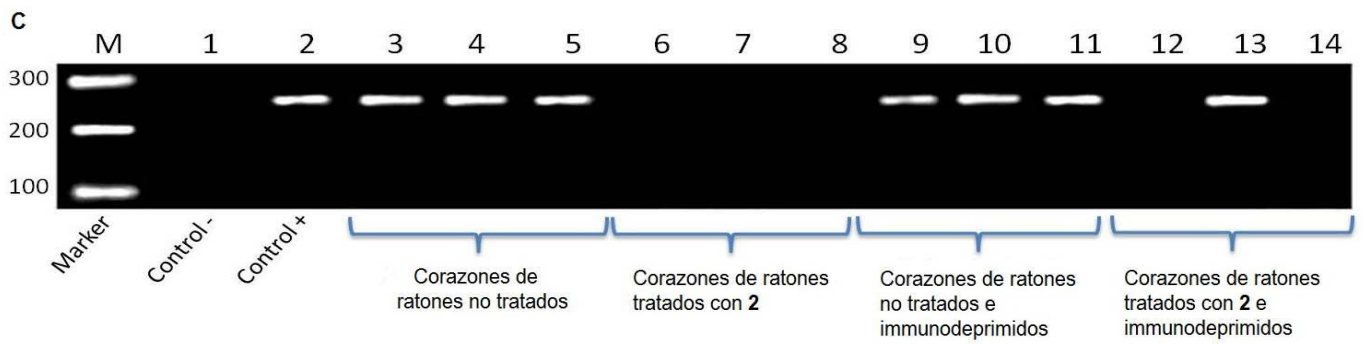
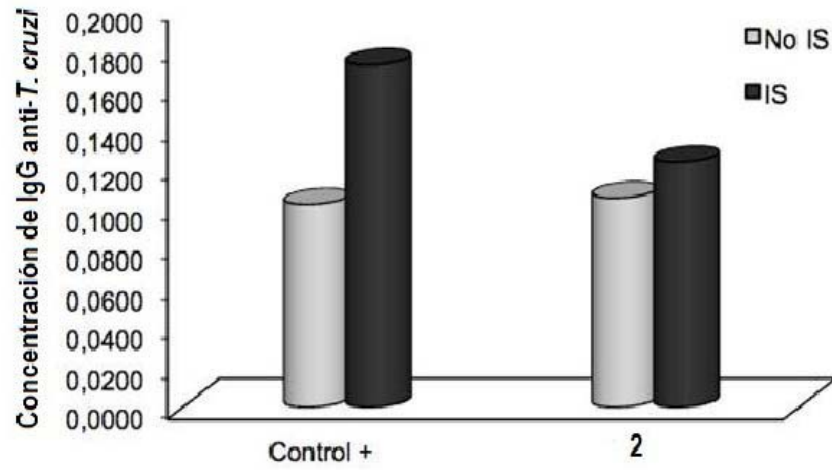


FIG. 2

LISTA DE SECUENCIAS

<110>	Universitat de les Illes Balears Universidad de Granada	
<120>	Actividad antiparasitaria de escuaramidas	
<130>	ES1597.17	
<160>	2	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador TciSOD directo	
<400>	1	
	atggtcttca gcattcctcc	20
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador TciSOD reverso	
<400>	2	
	gttgatctcg tcggcaactt	20