

19

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11) Número de publicación: **2 890 732**

21) Número de solicitud: 202030713

51) Int. Cl.:

**A61K 31/435** (2006.01)**A61P 33/02** (2006.01)**C07D 221/00** (2006.01)**C07D 215/02** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22) Fecha de presentación:

**10.07.2020**

43) Fecha de publicación de la solicitud:

**21.01.2022**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**06.10.2022**

Fecha de concesión:

**25.10.2022**

45) Fecha de publicación de la concesión:

**02.11.2022**

73) Titular/es:

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (60.0%)**  
**Avda. Blasco Ibañez, 13**  
**46010 Valencia (Valencia) ES y**  
**UNIVERSIDAD DE GRANADA (40.0%)**

72) Inventor/es:

**GARCÍA-ESPAÑA MONSONÍS, Enrique;**  
**CLARES GARCÍA, María Paz;**  
**DELGADO PINAR, Estefanía;**  
**MARÍN SÁNCHEZ, Clotilde;**  
**SÁNCHEZ MORENO, Manuel;**  
**MARTÍN ESCOLANO, Rubén y**  
**MARTÍN MONTES, Álvaro**

74) Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**54) Título: **Uso de poliaminas acíclicas simples para el tratamiento de Leishmaniasis**

57) Resumen:

Uso de poliaminas acíclicas simples para el tratamiento de leishmaniasis.

La presente invención proporciona el uso de ciertas poliaminas acíclicas simples de la fórmula (1), unidas a heterociclos, para el tratamiento de leishmaniasis. Los compuestos estudiados muestran todos ellos actividad antiparasitaria contra especies de Leishmania, comparable o superior a la del principio activo del fármaco comúnmente utilizado para tratar esta enfermedad, pero con una toxicidad para macrófagos semejante o, en la mayor parte de los casos, inferior a la del compuesto comercial de referencia, y con índices de selectividad superiores frente a cepas representativas de las tres formas clínicas de la enfermedad: cutánea, mucocutánea y visceral. Los compuestos muestran capacidad de inhibición de la superóxido dismutasa del parásito, en general a concentraciones inferiores a las necesarias para inhibir la superóxido dismutasa humana. Todo ello apoya su utilidad para tratar leishmaniasis.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 890 732 B2

## DESCRIPCIÓN

Uso de poliaminas acíclicas simples para el tratamiento de leishmaniasis

### Campo técnico

5

La presente invención se refiere al uso de compuestos para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos protozoos de la familia *Trypanosomatidae*, particularmente parásitos protozoos pertenecientes a los géneros *Leishmania* o *Trypanosoma*. Más concretamente, la invención se refiere al uso de compuestos aromáticos heterocíclicos unidos a poliaminas acíclicas simples para el tratamiento de dichas enfermedades.

### Descripción de la invención

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

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

La familia *Trypanosomatidae* en particular es una familia de protozoos pertenecientes al orden Cinetoplastida, orden que se caracteriza porque sus miembros presentan un único flagelo o cinetoplasto. Aunque dentro de la familia puede considerarse incluido algún género de protozoos de vida libre, como *Proleptomonas*, la casi totalidad de sus miembros son exclusivamente parásitos, principalmente de insectos. A menudo estos parásitos presentan ciclos vitales que incluyen un hospedador secundario, como una planta o un animal

35

vertebrado. Entre estos últimos se encuentran géneros que causan enfermedades en los seres humanos, como la leishmaniasis (producida por especies del género *Leishmania*) o la tripanosomiasis (producida por especies del género *Trypanosoma*). Las especies más representativas de este último género son *Trypanosoma brucei* (que causa la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana) y *Trypanosoma cruzi* (que causa la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, tradicionalmente asociada con América Central y Sudamérica).

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

La Leishmaniasis o Leishmaniosis es una enfermedad infecciosa y parasitaria, causada por un parásito hemoflagelado de la familia *Trypanosomatidae* perteneciente al género *Leishmania*. Se trata de una enfermedad tropical y está catalogada por la OMS como "enfermedad olvidada" (*neglected tropical disease*), que suelen estar presentes en países en vías de desarrollo y afectan a millones de personas de bajos recursos económicos. [Leishmaniasis: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>].

Además, en los últimos años se ha extendido a países antes libres de la enfermedad como Paraguay o se han sucedido nuevos brotes en zonas en las que se creía controlada, como Madrid, y en lagomorfos, un reservorio desconocido hasta la fecha. [Reporte Epidemiológico: Córdoba, Argentina, nº 2142, <http://www.reporteepidemiologico.com/wp-content/uploads2019/01/REC-2142.pdf>, N. García, I. Moreno, J. Alvarez, M.L. de la Cruz, A. Navarro, M. Pérez-Sancho, T. García-Seco, A. Rodríguez-Bertas, M.L. Conty, A. Toraño, A. Prieto, L. Domínguez, M. Domínguez, Evidence of *Leishmania infantum* infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a natural area in Madrid, Spain, *Biomed Res Int.* 2014 (2014) 318254. doi: 10.1155/2014/318254.]

Se trata de una enfermedad endémica en 98 países y responsable de 20000 a 30000 muertes al año. Cada año se producen un millón de casos nuevos.

La enfermedad se transmite al hombre y animales a partir de la picadura de hembras de mosquitos flebótomos, en el Viejo Mundo pertenecientes al género *Phlebotomus* y en el Nuevo Mundo al género *Lutzomya*.

5 En función de la especie que infecte al hospedador humano, la patología varía. Existen 21 especies de este género, pero sólo tres formas clínicas principales. La más grave de todas es la leishmaniasis visceral (LV), que afecta a numerosos órganos internos, en especial el bazo y el páncreas, órganos en los que causa megalización y constituye el signo patognomónico de esta enfermedad. Además, esta forma también conocida como "kala-azar" provoca una  
 10 anemia severa y fiebre irregular. Su letalidad asciende al 95% cuando no se recibe tratamiento o este es insuficiente. De acuerdo con la revisión de Octubre de 2009 del *Center for Food Security & Public Health* de la Universidad del Estado de Iowa (<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/leishmaniasis-es.pdf>), la leishmaniasis visceral humana es causada principalmente por las especies *Leishmania donovani* y *Leishmania*  
 15 *infantum* (que actualmente incluye a la subespecie antes conocida como *L. chagasi*). En ocasiones, algunas especies que generalmente causan leishmaniasis cutánea, tales como *L. tropica* y *L. amazonensis*, pueden también causar leishmaniasis visceral en seres humanos.

Otra forma ampliamente distribuida es la leishmaniasis cutánea (LC) que provoca una o varias  
 20 lesiones en la piel en zonas cercanas a la picadura, que al curar dejan una cicatriz perpetua. En ocasiones, si el tratamiento es insuficiente o no existe, este tipo de forma clínica puede visceralizar y dar el cuadro clínico descrito anteriormente. La mayoría de las especies de *Leishmania* provocan en los seres humanos leishmaniasis cutánea. En el hemisferio occidental (incluidas Europa y África), las principales especies que provocan leishmaniasis  
 25 cutánea incluyen *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*, mientras que en el hemisferio oriental (incluida Latinoamérica) destacan *L. braziliensis*, *L. panamensis/L. guyanensis*, *L. shawi* y *L. peruviana* (que se consideran miembros del complejo *L. braziliensis*), *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* (consideradas miembros del complejo *L. mexicana*), además de *L. lainsoni*, *L. naiffi* y *L. linderbergi*. Además, alguna cepa de *L. infantum* puede causar  
 30 leishmaniasis cutánea sin afectar a los órganos internos.

La última forma clínica conocida se encuentra de forma exclusiva en América Latina, se conoce como leishmaniasis mucocutánea (LM) y destruye tejido conectivo y macizo facial, dando lugar a llamativas deformaciones que en ocasiones causan rechazo social en los  
 35 individuos afectados. [Leishmaniasis, [4](https://www.who.int/news-room/fact-</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

sheets/detail/leishmaniasis]. La principal especie causante de esta forma clínica es *L. braziliensis* y también puede estar causada por *L. panamensis*/*L. guyanensis*.

El reservorio principal de esta enfermedad es el perro, pero cualquier mamífero vertebrado puede ser reservorio de la enfermedad, tanto de ámbito selvático como periurbano. Algunos animales silvestres, tales como zarigüeyas, coatíes y jurumíes, entre otros, son portadores asintomáticos del parásito, mientras que algunos otros, incluidos miembros de la familia de los cánidos tales como el lobo o el zorro, sí pueden padecer la enfermedad. Algunos animales domésticos, entre los cuales se incluye no sólo al perro, sino también otros como gatos y équidos (caballos, mulas y burros), sí pueden mostrar síntomas de padecer la enfermedad, aunque la diferencia entre especies que causan síndromes cutáneos y viscerales es menos clara que en seres humanos. Por ejemplo, *L. infantum* puede causar la enfermedad tanto visceral como cutánea en los perros, y principalmente lesiones cutáneas en perros y caballos.

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

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

25 En estos momentos no existe ninguna vacuna eficaz ni un tratamiento que sea efectivo; además, los tratamientos actuales presentan muchos inconvenientes, como una elevada toxicidad, generación de resistencias, gran dificultad de cumplimiento del calendario de administración y elevado coste.

30 Los tratamientos más comunes consisten en la administración de compuestos basados en antimonio que pertenecen al grupo de los antimoniales pentavalentes. Estos fármacos son el antimoniato de meglumina (Glucantime®) y el estibogluconato sódico (Pentostam®). Estos fármacos, además de ser difíciles de administrar, son muy tóxicos a nivel hepático y renal. Su amplio uso y la dificultad de administración (inyección intramuscular) han dificultado el cumplimiento del tratamiento, lo cual ha desencadenado resistencias. Todo ello indica la necesidad de nuevos tratamientos más eficaces.

También existe la necesidad de nuevos tratamientos más eficaces en tripanosomiasis, enfermedades causadas por parásitos del género *Trypanosoma*, particularmente en el caso de la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Se trata de una enfermedad parasitaria tropical, generalmente crónica, causada por *Trypanosoma cruzi*. El reservorio natural lo constituyen los armadillos, marsupiales, roedores, murciélagos y primates silvestres, además de ciertos animales domésticos como perros, gatos, incluso ratas y las cobayas. Es transmitida al hombre comúnmente por triatominos hematófagos, como el *Triatoma infestans*, el cual transmite el parásito cuando defeca sobre la picadura que él mismo ha realizado para alimentarse. También puede transmitirse por transfusión de sangre contaminada, por la ingesta de alimentos contaminados por el parásito o verticalmente de la madre infectada al feto. El insecto que transmite esta enfermedad puede infectarse si pica a una persona que tenga la infección, y así adquirir la capacidad de seguir propagando este parásito.

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

*Trypanosoma cruzi* presenta tres formas distintas:

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

El compuesto activo más utilizado actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas es el benznidazol (BZN), un fármaco derivado del nitroimidazol al que también se conoce actividad contra la leishmaniasis y que se ha comercializado en Latinoamérica bajo diferentes denominaciones comerciales tales como Lafepe Benznidazol® en Brasil o Radanil® en Argentina. Sin embargo, tal y como ocurre en el caso de los fármacos comerciales para el

tratamiento de la leishmaniasis antes mencionados, estos fármacos no son muy efectivos, fundamentalmente en la fase crónica (más de 30 días de tratamiento) de la enfermedad y presentan una toxicidad muy elevada.

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

10

Tal como se divulga en el documento ES2414291B2, el grupo de los presentes inventores ha observado que poliaminas de tipo escorpiando (compuestos con un núcleo azamacrocíclico del que cuelgan brazos con diferentes funcionalidades aromáticas) presentan actividad antiparasitaria en relación con la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis, mostrando menor  
15 toxicidad que el antimonio de meglumina (Glucantime®) y el benznidazol. También se divulgan hallazgos de algunos de los presentes inventores en el documento ES2566228B1, referido al uso de ésteres derivados de pirazol, preferiblemente protón-ionizables, y sus sales para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos de la familia *Trypanosomatidae*, aportándose pruebas de su eficacia frente a parásitos del género *Leishmania* y frente a  
20 *Trypanosoma cruzi*. en ambos documentos de patente, la actividad de los compuestos parece estar relacionada con su capacidad para inhibir las enzimas tipo superóxido dismutasa (SOD) de los parásitos, sin inhibir apenas la CuZn-SOD humana. Esto es interesante pues, como se ha apuntado antes, la FeSOD desempeña un papel fundamental como parte de la defensa antioxidante en parásitos del género *Leishmania* y otros parásitos de la familia  
25 *Trypanosomatidae* que también causan enfermedades en seres humanos, tales como *Trypanosoma cruzi*, el causante de la enfermedad de Chagas. Los estudios de dinámica molecular llevados a cabo sugieren que las moléculas activas bloquean el canal de acceso del superóxido hasta el centro activo que contiene el ion metálico, interacción que además alteraría la red de puentes de hidrógeno establecida alrededor de la molécula de agua  
30 coordinada con el Fe, alterando parámetros básicos como el potencial redox normal del par  $Fe^{III}/Fe^{II}$ .

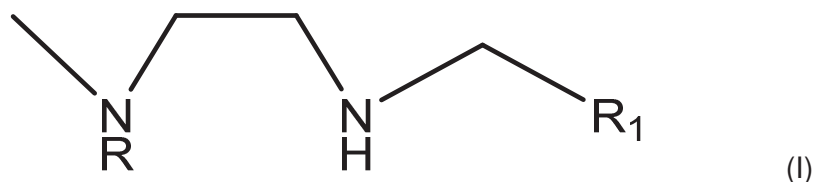
La incidencia y relevancia de las enfermedades citadas más arriba hace necesario el uso de compuestos antiparasitarios capaces de tratar dichas enfermedades de forma eficaz en todas  
35 las etapas del proceso, incluyendo la etapa crónica de la enfermedad de Chagas, y que, además, no resulten tóxicos para los pacientes, o, al menos, que presenten una toxicidad

reducida respecto a los compuestos de referencia utilizados actualmente. En el caso concreto de la leishmaniasis, la reciente expansión de la enfermedad y la ausencia de tratamientos eficaces hacen que pueda ser una amenaza para la salud pública, de ahí que la ya existente necesidad de nuevos tratamientos sea aún más acuciante. A esto se une el hecho de que también se han observado diferencias en la eficacia de los tratamientos dependiendo de factores como la forma clínica de leishmaniasis o la región geográfica. Así, aunque compuestos como los descritos en el documento ES2414291B2 parecen suponer una alternativa interesante a los tratamientos actualmente aplicados para leishmaniasis y enfermedad de Chagas, es aconsejable disponer de distintos tratamientos alternativos a los que poder recurrir para el control de enfermedades causadas por parásitos de la familia *Trypanosomatidae* tales como las anteriormente citadas.

La presente invención aporta una solución a dicho problema.

## 15 Sumario de la invención

La presente invención, en un primer aspecto, se refiere a un compuesto de la Fórmula (I)



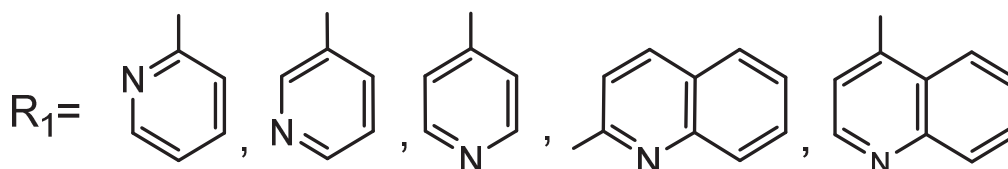
20

o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde

R se selecciona de entre H o CH<sub>3</sub>, y

R<sub>1</sub> se selecciona del grupo de

25



para su uso en el tratamiento de una enfermedad causada por un parásito de la familia *Trypanosomatidae*. Preferiblemente, la enfermedad se selecciona entre la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas. Se prefiere particularmente que la enfermedad sea la leishmaniasis. La leishmaniasis puede ser cutánea, mucocutánea o visceral.



A los compuestos de la Fórmula (I) así definidos, con las alternativas de R y R<sub>1</sub> que se acaban de mencionar, se alude en el resto de la memoria como los compuestos de Fórmula (I) tal como se han definido más arriba, los compuestos del Fórmula (I) según se definen en la presente solicitud o, particularmente en esta sección de "Sumario de la invención", los compuestos de la Fórmula (I) definidos en el primer aspecto de la invención, por ser esta la primera aparición de su definición.

En cuanto al sujeto a tratar, puede ser en un mamífero que puede padecer la enfermedad, con preferencia por el ser humano. En el caso de la leishmaniasis, el sujeto puede seleccionarse del grupo del perro, lobo, zorro, gato, caballo, mula, burro, oveja, cabra, vaca y ser humano, con preferencia por este último, pero también por el perro.

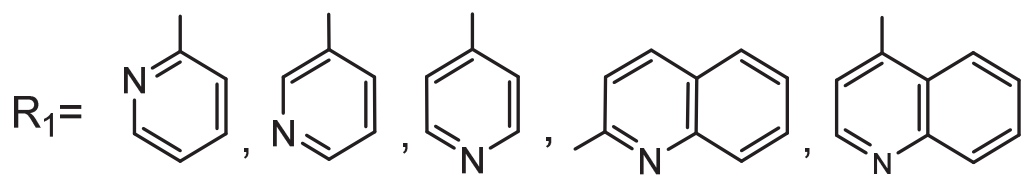
Preferiblemente, el compuesto se selecciona del grupo de los compuestos 1 a 10 que se muestran en la Fig. 1. Más preferiblemente, el compuesto se selecciona del grupo de los compuestos 2 (1-{3-piridil}-2,5-diazahehexano), 4 (1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazahehexano) y 5 (1-{3-piridil}-5-metil-2,5-díazahexano), de dicha Fig. 1. Se tiene especial preferencia por el compuesto 5.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica o veterinaria que comprende al menos un compuesto de la Fórmula (I) arriba indicada, o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde

R se selecciona de entre H o CH<sub>3</sub>, y

R<sub>1</sub> se selecciona del grupo de

25



y, opcionalmente, uno o más excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de una enfermedad causada por un parásito de la familia *Trypanosomatidae*. Al igual que en el caso del uso de los compuestos como tales, la enfermedad se selecciona entre la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas. Se prefiere particularmente que la enfermedad sea la leishmaniasis. La leishmaniasis puede ser cutánea, mucocutánea o visceral.

En una posible realización, el compuesto de la Fórmula (I) se selecciona del grupo de compuestos de fórmulas 1 a 10 de la Fig. 1.

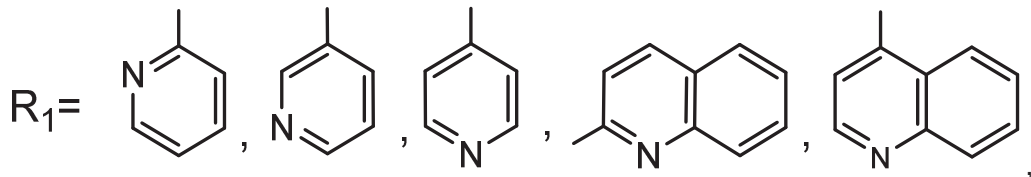
- 5 En otra posible realización, compatible con la anterior, una composición farmacéutica de la presente invención comprende más de un compuesto de la Fórmula (I) tal como se han definido en el primer aspecto de la invención, o más de un solvato o de una sal de los mismos.

Otro aspecto de la invención, muy relacionado con el anterior, es una preparación farmacéutica o veterinaria combinada que comprende:

- a) al menos un compuesto de la Fórmula (I) arriba indicada, o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde

R se selecciona de entre H o CH<sub>3</sub>, y

R<sub>1</sub> se selecciona del grupo de



o combinaciones de los mismos,

y

- b) al menos un agente antiparasitario con actividad frente a parásitos de la familia *Trypanosomatidae*, donde el agente antiparasitario adicional es diferente de los compuestos definidos en a),

para uso en el tratamiento de una enfermedad causada por un parásito de la familia *Trypanosomatidae*.

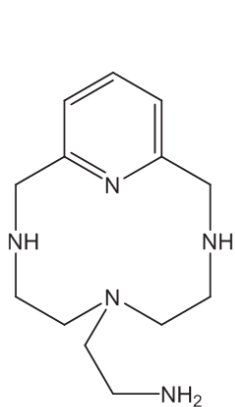
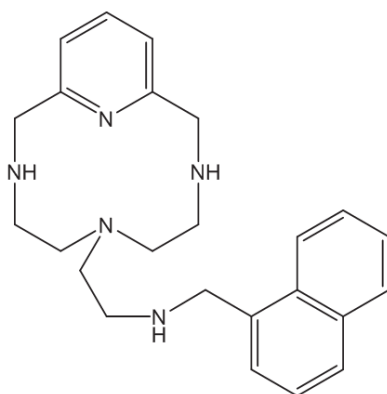
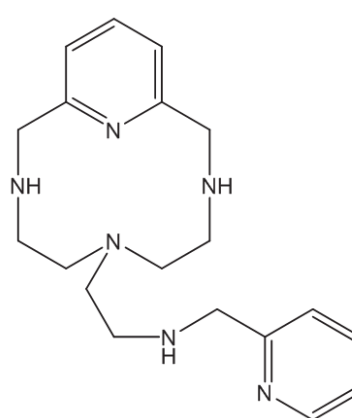
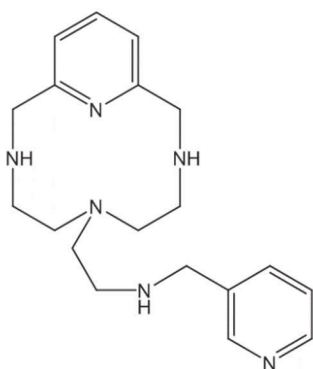
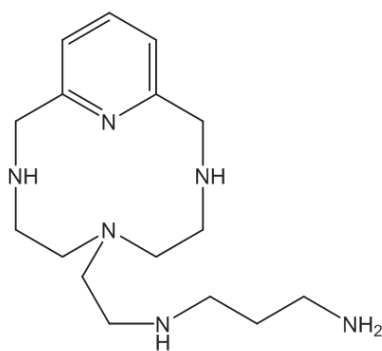
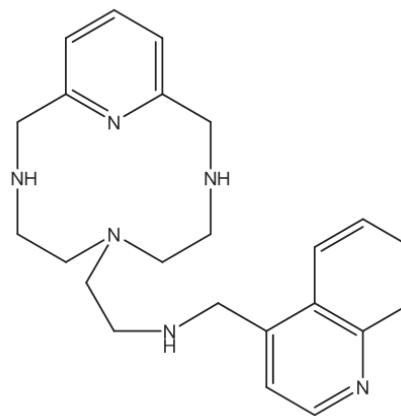
Preferiblemente, el agente antiparasitario se selecciona del grupo de antimonio de meglumina, estibogluconato sódico, benznidazol y los compuestos para uso según se divulga en los documentos ES2414291B2 o en el documento ES2566228B2 cuya fórmula y/o denominación se menciona expresamente en alguno de dichos documentos. Por tanto, una realización preferida es una preparación farmacéutica o veterinaria combinada que comprende

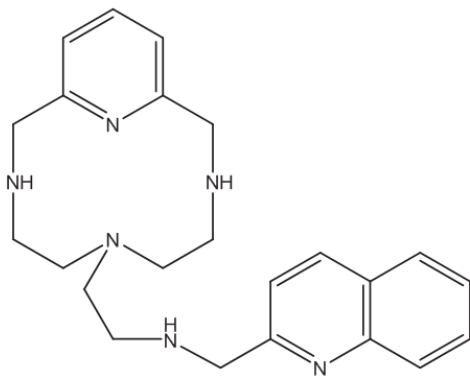
- 30 a) al menos un compuesto de la Fórmula (I) según se ha definido más arriba,

y

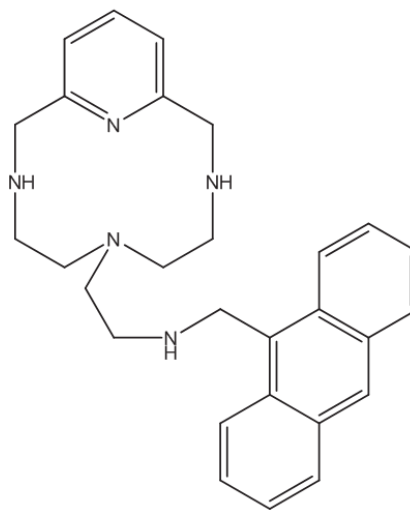
- b) al menos un agente antiparasitario con actividad frente a parásitos de la familia *Trypanosomatidae*, que se selecciona del grupo de

- 5
- i. antimonio de meglumina,
  - ii. estibogluconato sódico,
  - iii. benznidazol,
  - iv. un compuesto seleccionado del grupo de compuestos de fórmulas (II)sc, (III)sc, (IV)sc, (V)sc, (VI)sc, (VII)sc, (VIII)sc, (IX)sc, (X)sc, (XI)sc, (XII)sc, (XIII)sc, (XIV)sc, (XV)sc, (XVI)sc, (XVII)sc y (XVIII)sc siguientes:

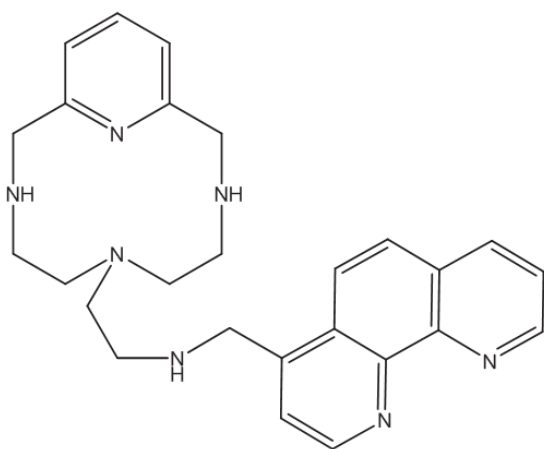
**(II)sc****(III)sc,****(IV)sc,****(V)sc,****(VI)sc,****(VII)sc,**



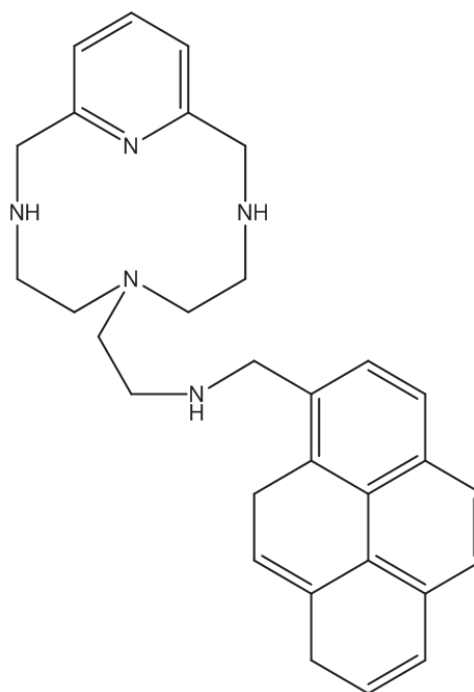
**(VIII)sc,**



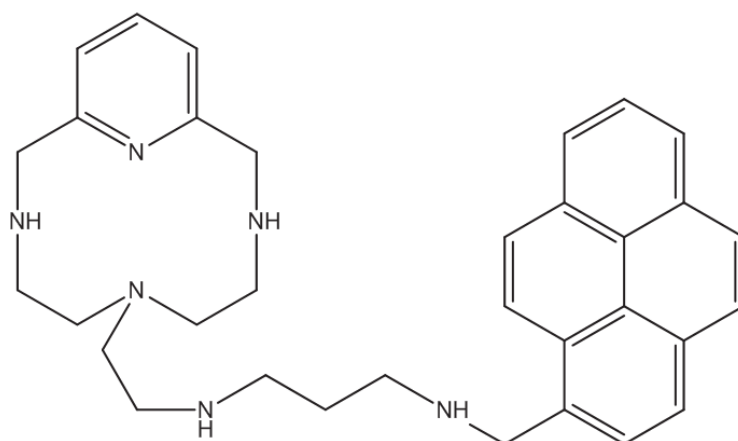
**(IX)sc,**



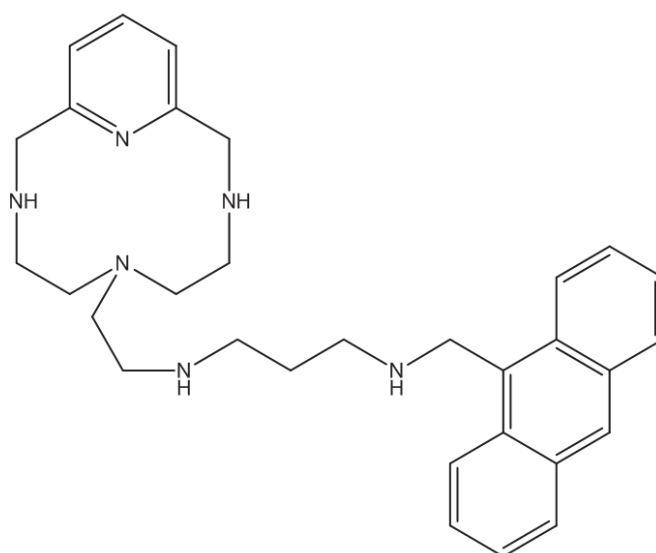
**(X)sc,**



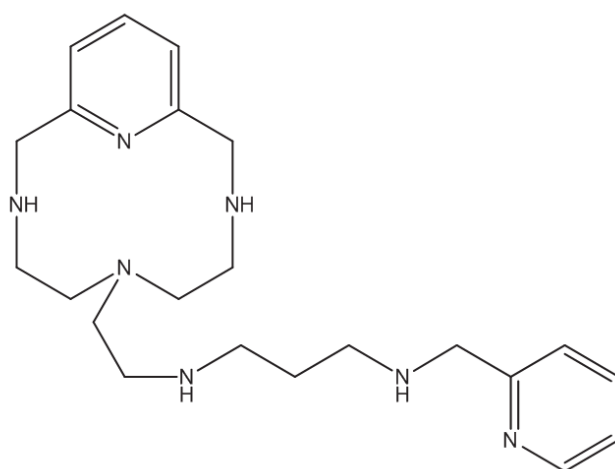
**(XI)sc,**



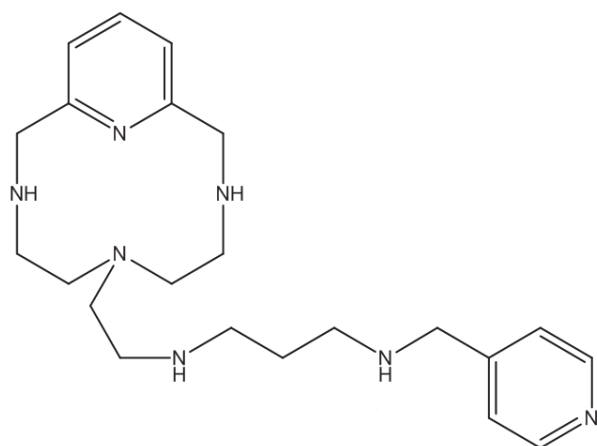
(XII)sc,



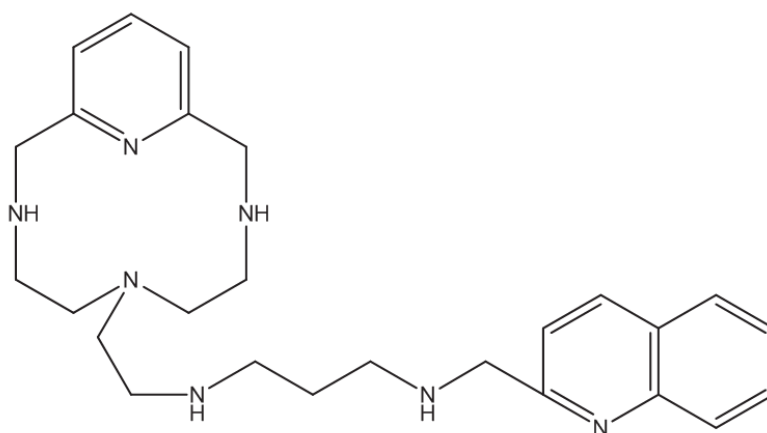
(XIII)sc,



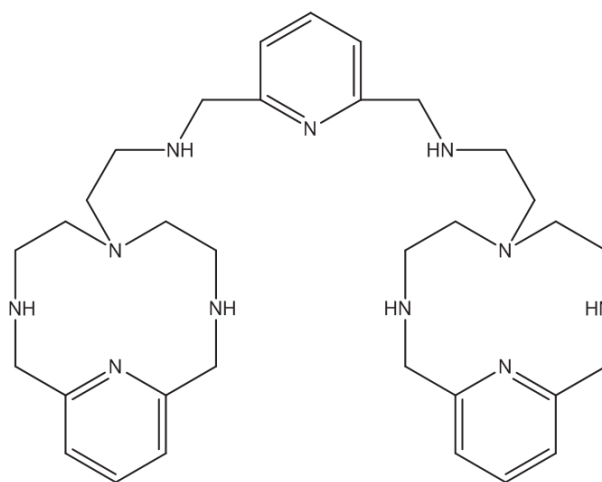
(XIV)sc,



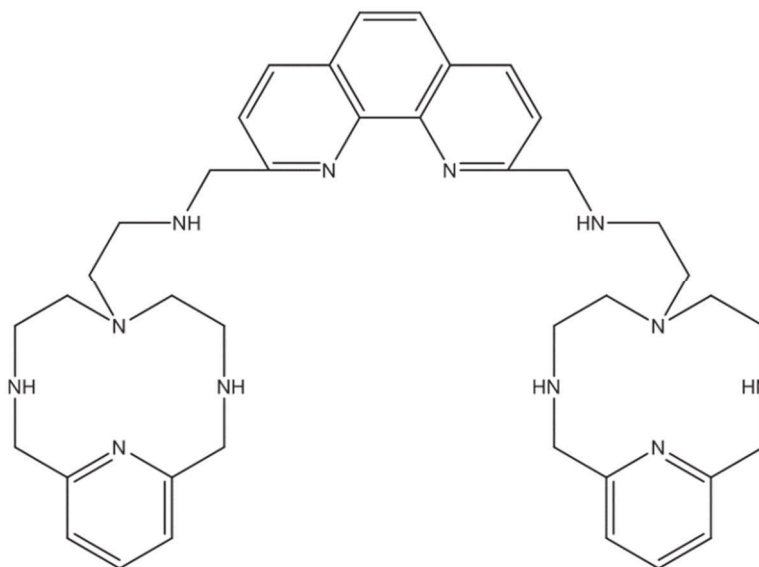
(XV)sc,



(XVI)sc,



(XVII)sc,



(XVIII)sc,

o

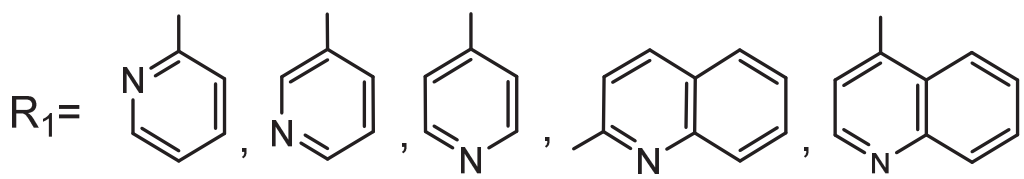
- v. un compuesto seleccionado del grupo de 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dimetilo, 3,5-bis(metoxicarbonil)pirazolato sódico, 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dietilo, 3,5-bis(etoxicarbonil)pirazolato sódico, 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dipropilo, 3,5-bis(propoxicarbonil)pirazolato sódico, 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de diisopropilo y 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dibutilo,
- o combinaciones de los mismos,
- para uso en el tratamiento de una enfermedad causada por un parásito de la familia *Trypanosomatidae*.

Como en el caso de las composiciones de la invención, en una posible realización, compatible con la anterior, el compuesto de la Fórmula (I) se selecciona del grupo de compuestos de fórmulas 1 a 10 de la Fig. 1, y sus solvatos o sus sales farmacéuticamente aceptables, o combinaciones de los mismos. Se tienen las mismas preferencias respecto a los compuestos de la Fórmula (I) que en el primer aspecto de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit de partes para la preparar una preparación farmacéutica o veterinaria combinada de la invención que comprende al menos un compuesto de la Fórmula (I) arriba indicada, o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde

R se selecciona de entre H o CH<sub>3</sub>, y

R<sub>1</sub> se selecciona del grupo de



o combinaciones de los mismos,

y al menos un agente antiparasitario con actividad frente a un parásito de la familia *Trypanosomatidae*, donde el agente antiparasitario adicional es diferente de los compuestos cuyo uso contra dichas enfermedades se divulga en la presente invención, para uso en el tratamiento de una enfermedad causada por un parásito de la familia *Trypanosomatidae*. Tanto en lo que se refiere al compuesto de Fórmula (I) como para el agente antiparasitario adicional se tienen las mismas preferencias que en el caso de una preparación farmacéutica combinada.

10

Los aspectos referidos a un compuesto de la Fórmula (I) según se define en el primer aspecto, o un solvato o una sal del mismo, para su uso según la presente invención, o de una composición farmacéutica o veterinaria que comprende al menos uno de dichos compuestos para su uso también según la presente invención, o de una preparación farmacéutica o veterinaria combinada de la invención para su uso también según la invención, o de un kit de partes de la invención para su uso según la invención, pueden también definirse, o están relacionados con, un método de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad causada por un parásito protozoo de la familia *Trypanosomatidae*, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula (I) según se ha definido más arriba, o de una sal o solvato del mismo, de una composición farmacéutica o veterinaria de la invención, de una preparación farmacéutica o veterinaria de la invención, o de un kit de partes de la invención.

Puede considerarse también un aspecto de la invención el uso de un compuesto de la Fórmula (I) según se define en el primer aspecto, o de un solvato o una sal del mismo, de una composición farmacéutica o veterinaria de la invención, de una preparación farmacéutica o veterinaria combinada de la invención o de un kit de partes de la invención, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada por un parásito de la familia *Trypanosomatidae*.

30

Tanto si se considera un compuesto de la Fórmula (I) según se define en el primer aspecto de la invención, o un solvato o una sal del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad causada por un parásito de la familia *Trypanosomatidae*, como si se considera el



aspecto del método de tratamiento de la enfermedad o el aspecto de preparación de un medicamento para el tratamiento de la misma, las posibilidades y preferencias respecto a la enfermedad a tratar, los sujetos a tratar y los compuestos (principios activos) a administrar son las mismas. Así, preferiblemente, la enfermedad se selecciona entre la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, con particular preferencia por la leishmaniasis, que puede seleccionarse, por ejemplo, entre leishmaniasis causada por una especie del género *Leishmania* que se selecciona entre *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*/*L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. linderbergi*, *L. infantum* y *L. donovani* (con especial preferencia por *L. braziliensis*, *L. infantum* y *L. donovani*) y/o entre los tipos de leishmaniasis cutánea, mucocutánea o visceral. El sujeto a tratar puede ser cualquier mamífero que pueda padecer la enfermedad, con preferencia por el ser humano en cualquiera de las posibles enfermedades causadas por un parásito de la familia *Trypanosomatidae*, y siendo posibles sujetos a tratar de leishmaniasis, los mamíferos del grupo de perro, lobo, zorro, gato, caballo, mula, burro, oveja, cabra, vaca y ser humano, con preferencia por el perro en el caso de la citada enfermedad. Y, en cualquiera de los aspectos mencionados, las alternativas respecto al compuesto o compuestos de la Fórmula (I) (o sus sales o solvatos) a incluir en la composición, la preparación combinada o el kit de partes de la invención son las mismas, de forma que a las preferencias por los compuestos de las Fórmulas 1 a 10 para formar parte de las composiciones, preparaciones combinadas y kits de la invención, se une la particular preferencia por el compuesto 5 o por uno de los compuestos del grupo de 2, 4 y 5; como también son las mismas las posibles alternativas y preferencias respecto a los posibles agentes antiparasitarios adicionales, que se han mencionado ya en las preferencias respecto a las preparaciones combinadas y los kits de partes de la invención.

25

La invención se explica ahora con mayor detalle, con ayuda de la descripción detallada, las figuras y los Ejemplos que se presentan a continuación.

### Breve descripción de las figuras

30

Fig. 1. Fórmulas de los compuestos 1 a 10 de la presente invención.

Fig. 2. Evaluación de los compuestos 2 ("Comp 2"), 4 ("Comp 4") y 5 ("Comp 5") sobre la capacidad de infección y división de las formas intracelulares de *L. infantum* en cultivo de macrófagos infectados con *L. infantum* (A) Porcentaje de infección. (B) número de amastigotes por célula infectada. Se incluyen también los datos obtenidos con el fármaco de

35

referencia, Glucantime® (“Gluc” en las leyendas). Junto a la abreviatura de cada compuesto se indica el porcentaje máximo de reducción respecto al control obtenido tras 10 días para el parámetro indicado en ordenadas en cada una de las gráficas.

5 Fig. 3. Evaluación de los compuestos 2 (“Comp 2”) y 4 (“Comp 4”) sobre la capacidad de infección y división de las formas intracelulares de *L. braziliensis* en cultivo de macrófagos infectados con *L. braziliensis* (A) Porcentaje de infección. (B) Número de amastigotes por célula infectada. Se incluyen también los datos obtenidos con el fármaco de referencia, Glucantime® (“Gluc” en las leyendas). Junto a la abreviatura de cada compuesto se indica el  
10 porcentaje máximo de reducción respecto al control obtenido tras 10 días para el parámetro indicado en ordenadas en cada una de las gráficas.

Fig. 4. Evaluación de los compuestos 2 (“Comp 2”) y 4 (“Comp 4”) sobre la capacidad de infección y división de las formas intracelulares de *L. donovani* en cultivo de macrófagos  
15 infectados con *L. donovani* (A) % infección. (B) Número de amastigotes por célula infectada. Se incluyen también los datos obtenidos con el fármaco de referencia, Glucantime® (“Gluc” en las leyendas). Junto a la abreviatura de cada compuesto se indica el porcentaje máximo de reducción respecto al control obtenido tras 10 días para el parámetro indicado en ordenadas en cada una de las gráficas.

20

Fig. 5. (A) Inhibición in vitro (%) de CuZnSOD de eritrocitos humanos con los compuestos 2 (“Comp 2”), 4 (“Comp 4”) y 5 (“Comp 5”). (B) Inhibición in vitro (%) de la FeSOD de las formas promastigotas de *L. infantum* con los compuestos 2 (“Comp 2”), 4 (“Comp 4”) y 5 (“Comp 5”). (C) Inhibición in vitro (%) de la FeSOD de las formas promastigotas de *L. braziliensis* con los  
25 compuestos 2 (“Comp 2”) y 4 (“Comp 4”). (D) Inhibición in vitro (%) de la FeSOD de las formas promastigotas de *L. donovani* con los compuestos 2 (“Comp 2”) y 4 (“Comp 4”).

Fig. 6. (A) Alteración en la producción y excreción de metabolitos de *L. infantum* causada por los compuestos 2, (“Comp 2”), 4 (“Comp 4”) y 5 (“Comp 5”). (B) Alteración en la producción y  
30 excreción de metabolitos de *L. braziliensis* causada por los compuestos 2 (“Comp 2”) y 4 (“Comp 4”). (C) Alteración en la producción y excreción de metabolitos de *L. donovani* causada por los compuestos 2 (“Comp 2”) y 4 (“Comp 4”).

Fig. 7. Efecto de los compuestos 2 (A) y 4 (B) en el potencial de membrana mitocondrial de *L. donovani*.  
35

### Descripción detallada de la invención

Tal como se ha indicado previamente, la presente invención se refiere a ciertos compuestos de la Fórmula (I), así como a sus posibles solvatos o sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos de la familia *Trypanosomatidae*, tales como la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis. Dichos compuestos de la Fórmula (I) presentan heterociclos aromáticos unidos a poliaminas acíclicas simples.

5 A pesar de la diferencia en la estructura con, por ejemplo, los compuestos tipo escorpiando descritos en el documento ES2414291B2 o los ésteres derivados de pirazol, preferiblemente protón-ionizables, descritos en el documento ES2566228B1, los ensayos que se describen más adelante en los Ejemplos de la presente solicitud, muestran que estos compuestos, y en particular los compuestos 1 a 10 cuya síntesis se describen en el Ejemplo 1, tienen actividades antiparasitarias notables frente a parásitos del género *Leishmania*. La actividad antiparasitaria parece estar relacionada con su capacidad para inhibir las enzimas tipo superóxido dismutasa (SOD) de los parásitos, sin inhibir apenas la CuZn-SOD humana, tal como también se divulgó previamente para los compuestos de los documentos ES241491B2 y ES2566228B1, donde se mostraba actividad antiparasitaria no sólo contra protozoos causantes de la leishmaniasis, sino también contra otro parásito de la familia *Trypanosomatidae*, *Trypanosoma cruzi*, que provoca la enfermedad de Chagas. Esta coincidencia en el modo de acción, a pesar de la diferencia estructural de los compuestos para uso antiparasitario de la presente solicitud con los de los dos documentos mencionados, no sólo hace que los hallazgos de la presente invención resulten sorprendentes e inesperados, sino que también hacen plausible extender el uso de los compuestos de la Fórmula (I) tal como se definen en la presente solicitud, (y el de las composiciones y preparaciones combinadas que los comprenden o los kit de partes para preparar estas últimas) al tratamiento de enfermedades producidas por otros parásitos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, que también presentan enzimas tipo superóxido dismutasa (SOD), concretamente enzimas FeSOD con Fe en el centro activo, y en los que dicha enzima parece desempeñar un papel fundamental como parte de la defensa antioxidante, por lo que los compuestos capaces de inhibir dicha enzima deberían tener efectos positivos en el tratamiento de las enfermedades producidas por dichos parásitos, también con baja toxicidad para el hospedador. Es por ello que el alcance de la presente invención comprende los compuestos de la Fórmula (I), tal como se definen en la presente solicitud, para su uso en el tratamiento de enfermedades producidas por parásitos

pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, quedando así comprendida tanto la leishmaniasis como tripanosomiasis como puede ser la enfermedad de Chagas.

Además, como puede verse en el Ejemplo 2, los datos de toxicidad en macrófagos son similares o, en la mayor parte de los casos (compuestos 3, 4, 5, 6, 7 y 9), muy inferiores a los obtenidos con el compuesto de referencia, el antimonio de meglumina (el principio activo del medicamento comercializado como Glucantime®), que es uno de los tratamientos más comúnmente administrados contra la leishmaniasis, pero que es tóxico a nivel hepático y renal. Los compuestos para uso según la presente invención, y más concretamente, todos los compuestos 1 a 10 con los que se han realizado ensayos, presentan además valores del índice de selectividad frente a los macrófagos varias veces superior a los del compuesto de referencia, para todas las cepas ensayadas (cepas de *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. donovani*) y para ambas formas de las mismas: amastigota y promastigotas. Además, estos compuestos están preparados de forma tal que pueden obtenerse los compuestos, o sales o hidratos de los mismos, a gran escala en un día de trabajo. Por todas estas razones, los compuestos para uso según la presente invención, y particularmente los compuestos 1 a 10 y sus solvatos (preferiblemente hidratos) o sales farmacéuticamente aceptables, representan una alternativa interesante a los tratamientos comúnmente utilizados e, incluso, adicional a los compuestos descritos en los documentos ES2414291B2 y ES2566228B1.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “solvato” incluye también el término “hidrato”, es decir, un compuesto formado por el agregado de agua o sus elementos a una molécula receptora. Los hidratos son los solvatos preferidos para los propósitos de la presente invención, en cualquiera de sus realizaciones. Como puede verse en el Ejemplo 1, por ejemplo, los datos del análisis realizado sobre los compuestos 1, 2, 4, 9 y 10 corresponden a hidratos de dichos compuestos. El término “sal”, por su parte, tal como se utiliza en la presente solicitud, incluye también sales de adición de ácido, como las sales de hidrocloreuro, que son la forma en la que se obtienen, por ejemplo, los compuestos 1 y 4 siguiendo la metodología descrita en el Ejemplo 1 de la presente solicitud.

Como puede verse en el Ejemplo 2 de la presente solicitud, por su toxicidad en macrófagos, inferior a la del compuesto de referencia, puede considerarse una realización preferida de la invención aquella en la que el compuesto se selecciona del grupo de los compuestos 3, 4, 5, 6, 7 y 9 de la Fig. 1 y sus solvatos y sales farmacéuticamente aceptables.

35

Por otro lado, teniendo en cuenta los resultados de los ensayos realizados respecto a los índices de selectividad, tanto para formas amastigotas y promastigotas, con cepas de *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. donovani*, son realizaciones particularmente preferidas de la invención aquellas que se refieren al uso de los compuestos 2, 4 (con buenos resultados para las tres cepas) y también el 5 (por sus buenos resultados de índice de selectividad respecto a *L. infantum*) de los compuestos representados en la Fig. 1. Como puede verse en el Ejemplo 3, cualquiera de estos tres compuestos disminuye la tasa de infección y el número de amastigotes por macrófago en mayor medida que el fármaco de referencia, el principio activo del Glucantime®. En los ensayos realizados con la cepa de *L. infantum* MCAN/ES/2001/UCM-10, aislada de perros y conocida por causar la forma cutánea de la leishmaniasis en humanos, los tres compuestos mostraron mejores resultados que el fármaco de referencia. Los compuestos 2 y 4, además, son también efectivos disminuyendo la tasa de infección y el número de amastigotes por macrófago de las otras dos cepas, la cepa MHOM/BR/1975/M2904 de *L. braziliensis* y LCR-L 133 LRC de *L. donovani*, que son representativas, respectivamente, de la forma mucocutánea y de la forma visceral de la leishmaniasis en seres humanos.

Así, aunque en principio cualquiera de los compuestos de la presente invención puede ser considerado una alternativa a los compuestos utilizados hasta ahora para usarse en el tratamiento de la leishmaniasis causada por cualquier especie del género *Leishmania* (por ejemplo, seleccionada del grupo de *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*/*L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. linderbergi*, *L. infantum*, *L. donovani*), son realizaciones preferidas de la invención aquellas en las que se usa el compuesto 2, 4 o 5 para el tratamiento de leishmaniasis causada por *L. infantum*, y el compuesto 2 o 4 para el tratamiento de la leishmaniasis causada por *L. braziliensis*, o para la leishmaniasis causada por *L. donovani*.

Los ensayos que se muestran más adelante en Ejemplos de la presente solicitud muestran que la leishmaniasis a tratar puede ser leishmaniasis visceral, leishmaniasis cutánea o leishmaniasis mucocutánea. Puede estar causada por cualquier protozoo homoflagelado perteneciente al género *Leishmania*, como por ejemplo los de las especies *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. donovani*. El tratamiento puede ser para su aplicación en mamíferos que puedan padecer la enfermedad, tales como seres humanos, gatos (*Felis silvestris catus*, también conocido como *Felis silvestris domesticus* o *Felis catus*), équidos (caballos, burros y mulas, es decir, individuos de las especies *Equus ferus caballus* y *Equus africanus asinus* y los individuos resultantes del cruce de ambas especies), ovejas (*Ovis orientalis aries* o,

simplemente, *Ovis aries*), cabras (*Capra aegagrus hircus* o, simplemente, *Capra hircus*), vacas y toros (*Bos taurus*) y mamíferos de la familia de los cánidos, con preferencia por el perro (*Canis familiaris*) y el lobo (*Canis lupus*), pero también zorros (*Vulpes vulpes*) y otros tales como el coyote (*Canis latrans*) o el chacal (*Canis aureus*).

5

Debido a los resultados más favorables obtenidos con cepas características de este tipo de manifestación clínica de la leishmaniasis en seres humanos, se prefiere un compuesto seleccionado entre 1-(3-piridil)-2,5-diazahexano (compuesto 2), 1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazahexano (compuesto 4) y 1-(3-piridil)-5-metil-2,5-diazahexano (compuesto 5) para su uso en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea; un compuesto seleccionado entre 1-(3-piridil)-2,5-diazahexano (compuesto 2) y 1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazahexano (compuesto 4) para su uso en el tratamiento de la leishmaniasis mucocutánea, y un compuesto seleccionado entre 1-(3-piridil)-2,5-diazahexano (compuesto 2) y 1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazahexano (compuesto 4) para su uso en el tratamiento de la leishmaniasis visceral, todo ello en seres humanos.

15

En el caso de que el mamífero sea un perro, que normalmente desarrolla leishmaniasis provocada por *L. infantum*, se prefiere que el compuesto se seleccione de entre los compuestos 2, 4 y 5, que han mostrado buenos resultados con la cepa de esta especie en los Ejemplos mostrados a continuación.

20

La utilidad de los compuestos 2, 4 y 5 en particular se ve apoyada por ensayos adicionales, en los que se ha estudiado la inhibición de la enzima FeSOD de las formas promastigotas de las tres cepas de *Leishmania* utilizadas en los presentes ensayos, frente a la concentración necesaria para inhibir la superóxido dismutasa sanguínea humana, la CuZnSOD de eritrocitos humanos. Estos ensayos son particularmente interesantes porque la enzima FeSOD es exclusiva de los parásitos kinetoplástidos a los que pertenece *Leishmania*, estando ausente del hospedador vertebrado, que suele poseer una forma análoga de esta enzima pero acomplejada con un átomo de cobre o zinc (Cu-ZnSOD). Por esta razón, la FeSOD es una diana terapéutica para el diseño de nuevos fármacos, pues la captura del ion metálico por mecanismos de complejación puede inactivar la enzima y comprometer la supervivencia del parásito ante la aparición de radicales libres. Como puede observar en el Ejemplo 4, los compuestos 2, 4 y 5 mostraron capacidad de inhibir la FeSOD de las formas promastigotas de las tres cepas de *Leishmania* utilizadas en los ensayos de esta solicitud; además, en casi todos los casos, los compuestos ensayados son capaces de inhibir la enzima FeSOD de parásito con un valor de IC<sub>50</sub> menor que el necesario para la enzima de eritrocitos humanos. Merecen destacarse, por una parte, el bajo valor de IC<sub>50</sub> del compuesto 2 para la cepa de *L.*

35

*infantum* y la cepa de *L. donovani*. También es destacable el alto valor de IC<sub>50</sub> del compuesto 4 con respecto a la CuZnSOD de eritrocitos humanos, más del doble que la IC<sub>50</sub> del mismo compuesto observada en los ensayos con *L. braziliensis* y casi un orden de magnitud superior a los valores obtenidos en los ensayos con *L. infantum* y *L. donovani*. Estas diferencias muestran que el parásito se ve afectado antes de que haya una inhibición significativa de la enzima del hospedador humano, lo que permite plantearse su uso para ser administrados a pacientes afectados por el parásito y, como se discutió más arriba, a pacientes afectados por enfermedades producidas por otros parásitos de la familia *Trypanosomatidae*, como puede ser la enfermedad de Chagas.

10

Los tres compuestos seleccionados para ensayos complementarios (2, 4 y 5) dan también lugar a alteraciones del metabolismo de la glucosa de las tres cepas estudiadas, resultando significativo el aumento de la producción de succinato frente al control.

15 Por tanto, los ensayos realizados apoyan la utilidad de los compuestos de la invención para el tratamiento de la leishmaniasis y otras enfermedades producidas por parásitos de la familia *Trypanosomatidae*. La sencillez de su método de síntesis, según se propone en la siguiente solicitud, y la facilidad para escalarlo para la producción industrial, como ya se comentó al principio, es también una ventaja que los convierte en una alternativa interesante a los  
20 tratamientos actuales.

Los compuestos, o sus solvatos o sales farmacéuticamente aceptables, se administrarán en forma de una composición farmacéutica o veterinaria, con excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables. La vía oral es una de las posibles vías de administración, por ejemplo en forma de comprimidos, grageas o cápsulas, pero también en forma de jarabes u  
25 otras formas líquidas diseñadas para ser ingeridas. Se contempla también la administración por vía tópica o por inyección intradérmica.

La presente invención cubre las composiciones farmacéuticas o veterinarias que comprendan  
30 al menos un compuesto de la Fórmula (I) según se definen en la presente solicitud, preferiblemente en una cantidad terapéuticamente efectiva, para su uso en el tratamiento de una enfermedad causada por un parásito de la familia *Trypanosomatidae*. Opcionalmente, dichas composiciones pueden contener también excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. En la presente invención se entiende por cantidad terapéuticamente efectiva  
35 aquella que hace revertir la enfermedad tratada o mejorar sus síntomas.

Se contemplan también, dentro del alcance de la presente invención, las preparaciones farmacéuticas o veterinarias combinadas que comprenden al menos un compuesto de la Fórmula (I) según se definen en la presente solicitud, o una sal o un solvato del mismo, y, adicionalmente, al menos un agente antiparasitario con actividad frente a un parásito de la familia *Trypanosomatidae*, donde el agente antiparasitario adicional es diferente de los compuestos cuyo uso contra dichas enfermedades se divulga en la presente invención. Los agentes antiparasitarios adicionales pueden seleccionarse del grupo de los que ya se utilizan para el tratamiento de leishmaniasis y/o tripanosomiasis (tales como antimoniato de meglumina, estibogluconato sódico, benznidazol) o también otros, como los compuestos para los cuales se divulgan actividad antiparasitaria contra parásitos de la familia *Trypanosomatidae* en los documentos de patente ES2414291B2 o en el documento ES2566228B2. La composición farmacéutica o veterinaria combinada puede comprender más de un compuesto de la Fórmula (I) según se definen en la presente solicitud, o sales o solvatos de los mismos, y más de un compuesto antiparasitario adicional. En ese último caso, puede considerarse un caso de “preparación farmacéutica o veterinaria combinada”.

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “preparación farmacéutica o veterinaria combinada”, incluye composiciones, formulaciones, preparaciones o formas farmacéuticas o veterinarias y es compatible con la “yuxtaposición” de los componentes de la misma, es decir, que no es necesario que dichos componentes se encuentren presentes formando una composición “verdadera” en su sentido más estricto (por ejemplo, disueltos o en solución en el mismo vehículo líquido o integrados en un mismo vehículo o portador sólido o formando parte de una misma partícula o forma sólida), sino que pueden estar físicamente separados y no integrados en una misma forma o presentación sólida o líquida. Así, el término “yuxtaposición” no implica necesariamente una combinación verdadera de los componentes, aunque es compatible con ella, de manera que las preparaciones combinadas de la presente invención incluyen en su definición posibles realizaciones de las composiciones farmacéuticas o veterinarias de la presente invención antes definidas. Esta definición amplia del término “preparación farmacéutica o veterinaria combinada”, contempla que los componentes de la misma estén disponibles para su aplicación combinada o separada, simultánea o secuencial, según se considere más conveniente. Así, puede considerarse comprendido dentro del alcance de la invención una preparación farmacéutica o veterinaria combinada que comprende un compuesto de la Fórmula (I) según se define en la presente solicitud, o un solvato o una sal del mismo, y un agente antiparasitario con actividad frente a un parásito de la familia *Trypanosomatidae*, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una enfermedad causada por un parásito de la familia *Trypanosomatidae*, prefiriéndose



que la enfermedad se seleccione entre la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis, con particular preferencia por esta última.

Como puede apreciarse, el concepto de composición farmacéutica o veterinaria combinada  
5 está relacionado con el de “kit de partes”, pues un kit de partes puede comprender los  
componentes necesarios para obtener una preparación farmacéutica o veterinaria combinada.  
Tal como se utiliza en la presente solicitud, un kit de partes se refiere a un conjunto de  
componentes adecuados para la obtención de una composición que, para los efectos de la  
presente invención, será una composición farmacéutica o veterinaria de la invención o, más  
10 preferiblemente, una preparación farmacéutica o veterinaria combinada de la presente  
invención. Los componentes del kit pueden o no estar empaquetados juntos, aunque cada  
componente puede estar en su propio contenedor y envase apropiados para su distribución  
comercial y/o apropiado para facilitar su posterior utilización o su conservación. Así, un kit de  
partes para su uso según la presente invención comprenderá al menos un compuesto de la  
15 Fórmula (I) según se define en la presente solicitud y, preferiblemente, también al menos un  
agente antiparasitario con actividad frente a parásitos de la familia *Trypanosomatidae*, de  
forma análoga a la de las preparaciones farmacéuticas o veterinarias combinadas.  
Preferiblemente, un kit de partes para uso según la presente invención es para preparar una  
preparación farmacéutica o veterinaria combinada de la presente invención.

20 Además, como se mencionó previamente, un aspecto de la presente invención es el uso de  
un compuesto de la Fórmula (I) como se define en la presente solicitud, o un solvato o una sal  
del mismo, una composición farmacéutica o veterinaria de la invención, una preparación  
farmacéutica o veterinaria combinada de la invención y/o un kit de partes de la invención para  
25 la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada por un  
parásito de la familia *Trypanosomatidae*. En una realización particular, el medicamento es  
apto para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y/o de la leishmaniasis o enfermedades  
causadas por parásitos del género *Leishmania*, preferiblemente parásitos de las especies *L.*  
*infantum*, *L. donovani* o *L. braziliensis*, y más preferiblemente para el tratamiento de  
30 leishmaniasis cutánea, mucocutánea, visceral y/o canina.

Estrechamente ligado con esto está también el aspecto referido a un método de tratamiento  
de un sujeto que padece una enfermedad causada por un parásito protozoo de la familia  
*Trypanosomatidae* que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente  
35 efectiva de al menos un compuesto de la Fórmula (I) según se define en la presente solicitud,  
o un solvato o una sal del mismo, o de una composición farmacéutica o veterinaria de la

invención, una preparación farmacéutica o veterinaria combinada de la invención o de un kit de partes de la invención. En este aspecto, el uso de una preparación farmacéutica o veterinaria combinada de la invención facilita la administración simultánea, separada o secuencial del compuesto de la Fórmula (I) según se define en la presente solicitud, o de un solvato o una sal del mismo, y el agente antiparasitario adicional que es también un componente de dicha preparación, dejando un margen más amplio para distintas pautas de tratamiento según se pueda considerar apropiado. En cualquier caso, el sujeto recibirá una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto de la Fórmula (I) según se define en la presente solicitud, o de un solvato o una sal del mismo.

10

Los efectos del método de tratamiento de la presente invención incluyen, pero no se limitan a los efectos de eliminación de la enfermedad, el incremento del tiempo de progresión de la enfermedad y el índice de supervivencia. Los efectos del tratamiento incluyen a más largo plazo, el control de la enfermedad.

15

La invención se explicará ahora con mayor detalle por medio de los Ejemplos y Figuras siguientes.

### **Ejemplos**

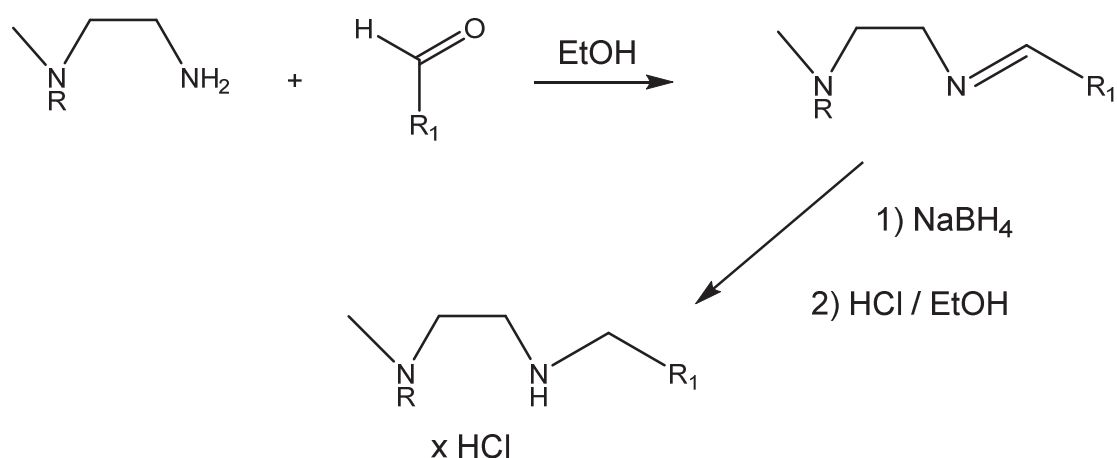
20

Ejemplo 1.- Síntesis de compuestos.

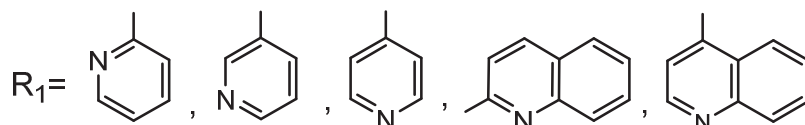
Todos los compuestos se sintetizaron modificando el procedimiento descrito para la síntesis de los compuestos 1 y 4 en las siguientes referencias: J. A. R. Hartman, R. W. Vachet, J. H. Callahan, Gas, solution, and solid state coordination environments for the nickel(II) complexes of a series of aminopyridine ligands of varying coordination number, *Inorganica Chimica Acta* 297 (2000) 79-87); y A. Raja, V- Rajendira, P. U. Maheswari, R. Balamurugan, C. A. Kilner, M. A. Halcrow, M. Palaniandavar, Copper(II) complexes of tridentate pyridylmethylethylenediamines: Role of ligand steric hindrance on DNA binding and cleavage, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1717-1732, F. GroB, A. Müller-Hartmann, Heinrich Vahrenkamp, Zinc Complexes of Condensed Phosphates, 3[\*1 Diphosphate-Zinc Complexes with Tridentate Coligands, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2000, 236322370; H-D. Bian, J.-Y. Xu, W. Gu, S-P. Van, D.-Z. Liao, Z.-H. Jiang, P. Cheng, Synthesis, structure and properties of terephthalate-bridged copper (II) polymeric complex with zigzag chain, *Inorg. Chem. Commun.* 6 (2003) 573-576).

35

La síntesis de los compuestos consistió en la reacción del carboxaldehído adecuado con la correspondiente diamina, en EtOH seco como disolvente (en lugar de metanol). La mezcla resultante se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente, y luego, se añadió en porciones un exceso de borohidruro de sodio para la reducción de la imina obtenida (reemplazando a la  
 5 hidrogenación con Pd descrita en la bibliografía). Después de 2 horas, el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se trató con agua y se extrajo repetidamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 40 ml). La fase orgánica se recogió y se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad para dar un aceite. Luego se recuperó el aceite con una cantidad mínima de EtOH y se precipitó con HCl en dioxano para obtener la sal de hidrocloreto, forma en la que se  
 10 conservaron los compuestos. Esto último representa otra variación sobre la metodología recogida en la bibliografía, donde se obtienen aminas libres, generalmente más difíciles de conservar.



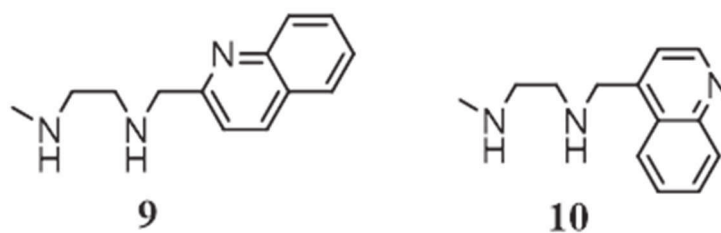
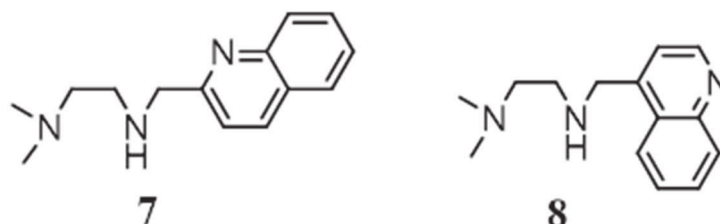
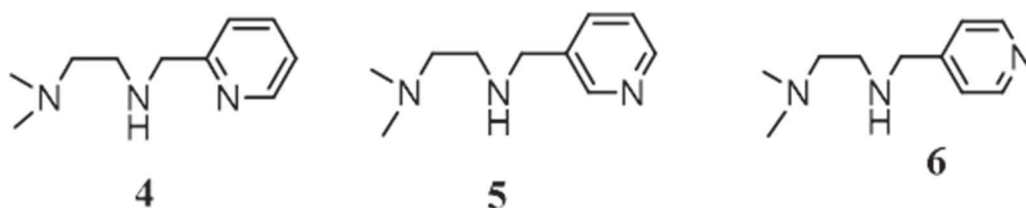
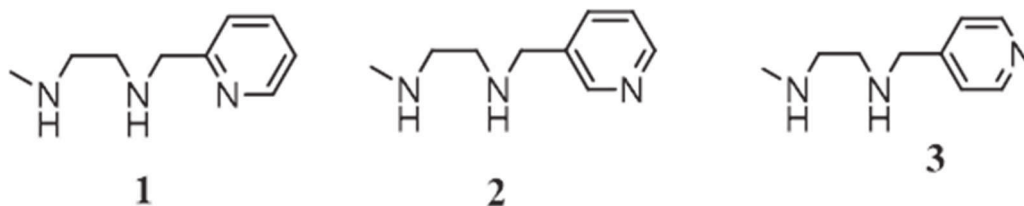
R = H, CH<sub>3</sub>



15

Esquema 1. Procedimiento general de síntesis.

Mediante el procedimiento indicado se sintetizaron los compuestos 1 a 10 cuya fórmula se indica a continuación, y que también se ha reproducido en la Fig. 1. Seguidamente se indican  
 20 también los resultados del análisis de cada uno de ellos.



**1-{2-piridil}-2,5-diazahecano. (1).**  $C_9H_{18}N_3Cl_3 \cdot 2H_2O$  (Peso molecular = 312,89 g/mol).  
 5 Rendimiento: 63,7 %.  $^1H$  NMR (300 Hz,  $D_2O$ ):  $\delta_H$  (ppm): 2,78 (s, 3H), 3,48 - 3,51 (m, 2H), 3,59-3,64 (m, 2H), 4,67 (s, 2H), 7,92 - 7,96 (m, 1H), 8,015 (d,  $J = 8,1Hz$ , 1H), 8,46 (t,  $J = 8,0Hz$ , 1H), 8,795 (d,  $J = 5,6Hz$ , 1H).  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ : 146,99, 145,68, 143,96, 126,55, 126,36, 49,22, 44,49, 43,25, 33,21. Punto de fusión: 165,6 °C.. Análisis elemental: Calculado: C 34,79 %; H 7,13 %; N 13,52 % Experimental: C 35,05 %; H 6,74 %; N 14,72 %.

10

**1-{3-piridil}-2,5-diazahecano. (2).**  $C_9H_{17}N_3Cl_2 \cdot 2H_2O$  (Peso molecular = 274,18 g/mol).  
 Rendimiento: 62,36 %.  $^1H$  NMR (300 Hz,  $D_2O$ ):  $\delta_H$  (ppm): 2,81 (s, 3H), 3,43 (s, 4H), 4,34 (s, 2H), 7,68 (dd,  $J = 8,1Hz$ ,  $J = 5,2Hz$ , 1H), 8,14 (d,  $J = 8,2Hz$ , 1H), 8,65 - 8,69 (m, 2H).  $^{13}C$  NMR

(75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 140,39, 125,17, 48,87, 45,03, 42,84, 33,09. Punto de fusión: 239,4 °C. Análisis elemental: Calculado: C 39,42 %; H 7,71%; N 15,32 % Experimental: C 39,35 %; H 4,83 %; N 14,30 %.

5 **1-(4-piridil)-2,5-diazahexano. (3)**. C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub> (Peso molecular = 294,60 g/mol). Rendimiento: 70,56 %. <sup>1</sup>H NMR (300 Hz, ):  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 2,81 (s, 3H), 3,49 - 3,54 (m, 2H), 3,62 - 3,67 (m, 2H), 4,68 (s, 2H), 8,17 (d,  $J = 6,2\text{Hz}$ , 2H), 8,89 (d,  $J = 6,2\text{Hz}$ , 2H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 151,02, 142,38, 127,14, 49,74, 44,37, 43,49, 33,22. Punto de fusión: 220,5 °C. Análisis elemental: Calculado: C 53,49 %; H 6,59 %; N 14,39 % Experimental: C 53,49 %; H 6,59 %; N 14,39 %.

15 **1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazahexano. (4)** C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub> · 0,5 H<sub>2</sub>O (Peso molecular = 297,65 g/mol), Rendimiento: 65,3 %. <sup>1</sup>H NMR (300 Hz, ):  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 3,00 (s, 6H), 3,58 (s, 4H), 4,49 (s, 2H), 7,63 - 7,71 (m, 2H), 8,13 (t,  $J = 7,8\text{Hz}$ , 1H), 8,67 (d,  $J = 5,3\text{Hz}$ , 1H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, )  $\delta$ : 147,43, 145,53, 143,95, 126,46, 126,30, 52,78, 49,34, 43,31, 42,04. Punto de fusión: 213,7 °C. Análisis Elemental: Calculado: C 40,35 %; H 7,11%; N 14,12 % Experimental: C 40,73 %; H 7,54 %; N 14,41 %.

20 **1-(3-piridil)-5-metil-2,5-diazahexano. (5)** C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub> (Peso molecular = 288,64 g/mol), Rendimiento: 64,15 %. <sup>1</sup>H NMR (300 Hz, ):  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 3,01 (s, 6H), 3,57 - 3,68 (m, 4H), 4,57 (s, 2H), 8,09 (d,  $J = 8,2\text{Hz}$ ,  $J = 5,7\text{Hz}$ , 1H), 8,65 (d,  $J = 8,1\text{Hz}$ , 1H), 8,88 (d,  $J = 5,7\text{Hz}$ , 1H), 8,95 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 148,00, 142,90, 142,79, 130,77, 127,89, 52,32, 47,83, 43,40, 41,99. Punto de fusión: 218,9 °C. Análisis Elemental: Calculado: C 41,61 %; H 6,98 %; N 14,56 % Experimental: C 41,82 %; H 7,01 %; N 14,45 %.

25

**1-(4-piridil)-5-metil-2,5-diazahexano. (6)** C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub> (Peso molecular = 288,64 g/mol). Rendimiento: 67,8%, <sup>1</sup>H NMR (300 Hz, D<sub>2</sub>O):  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 3,02 (s, 6H), 3,59 - 3,70 (m, 4H), 4,64 (s, 2 H), 8,16 (d,  $J = 6,71\text{Hz}$ , 2H), 8,90 (d,  $J = 6,8\text{Hz}$ , 2H). <sup>13</sup>C NMR (75 M Hz, )  $\delta$  151,16, 142,20, 127,28, 52,44, 49,84, 43,40, 42,31. Punto de fusión: 210,0 °C. Análisis Elemental: 30 Calculado: C 41,61 %; H 6,98 %; N 14,56 % Experimental: C 41,30 %; H 6,83 %; N 14,67 %.

**1-(2-quinolil)-5-metil-2,5-diazahexano. (7)** C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub> (Peso molecular = 338,70 g/mol), Rendimiento: 66,25 %. <sup>1</sup>H NMR (300 Hz, D<sub>2</sub>O):  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 3,02 (s, 6H), 3,62 - 3,72 (m, 4H), 4,43 (s, 2H), 7,74 (d,  $J = 8,5\text{Hz}$ , 1H), 7,80 (t,  $J = 7,7\text{Hz}$ , 1H), 7,98 (t,  $J = 8,6\text{Hz}$ , 1H), 8,15 (t,  $J = 9,2\text{Hz}$ , 1H), 8,68 (d,  $J = 8,6\text{Hz}$ , 1H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, )  $\delta_{\text{H}}$ : 150,96, 143,66, 141,91, 132,49, 128,54, 128,01, 125,25, 120,46, 53,06, 50,58, 43,26, 42,01. Punto de fusión: 211,1°C. Análisis

elemental: Calculado: C 49,65 %; H 6,55 %; N 12,41 % Experimental: C 49,81 %; H 6,37 %; N 12,53 %.

**1-(4-quinolil)-5-metil-2, 5-diazahexano. (8)**  $C_{14}H_{22}N_3Cl_3$  (Peso molecular = 338,70 g/mol),  
 5 Rendimiento: 66,62 %,  $^1H$  NMR (300 Hz, ):  $\delta_H$  (ppm): 3,02 (s, 6H), 3,59 - 3,68 (m, 4H), 5,04 (s, 2H), 8,06 (t,  $J = 7,7$ Hz, H), 8,12 (d,  $J = 5,7$ Hz, H) 8,21 (t,  $J = 7,8$ Hz, H), 8,32 (d,  $J = 8,6$ Hz, H), 8,43 (d,  $J = 8,6$ Hz, H), 9,17 (d,  $J = 5,6$ Hz, H).  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ : 144,30, 138,02, 135,19, 130,85, 126,74, 124,13, 121,83, 120,71, 52,87, 47,63, 43,34, 42,60. Punto de fusión: 211,1 °C. Análisis Elemental: Calculado: C 49,65 %; H 6,55%; N 12,41 % Experimental: C  
 10 49,55 %; H 6,51 %; N 12,56 %.

**1-(2-quinolil)-2,5-diazahexano. (9)**.  $C_{13}H_{19}N_3Cl_2 \cdot 2H_2O$  (Peso molecular = 291,82 g/mol).  
 Rendimiento: 52,76 %.  $^1H$  NMR (300 Hz, ):  $\delta_H$  (ppm): 2,85 (s, 3H), 3,55 - 3,63 (m, 4H), 4,69 (s, 2H), 7,63 (d,  $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,75 (t,  $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,93 (t,  $J = 7,5$ Hz, 1H), 8,06 - 8,15 (m,  
 15 2H), 8,55 (d,  $J = 8,5$ Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (75 MHz, )  $\delta$ : 151,63, 145,57, 139,65, 131,24, 128,29, 127,80, 126,99, 120,09,51,20, 44,83, 43,05, 33,10. Punto de fusión: 215,8 °C, Análisis Elemental: Calculado: C 36,94 %; H 6,88 %; N 14,35 % Experimental: C 37,80 %; H 6,72 %; N 14,03 %.

**1-(4-quinolil)-2,5-diazahexano. (10)**.  $C_{13}H_{20}N_3Cl_3 \cdot 2H_2O$  (Peso molecular = 360,71 g/mol).  
 Rendimiento: 64,34 %.  $^1H$  NMR (300 Hz, ):  $\delta_H$  (ppm): 2,85 (s, 3H), 3,50 - 3,66 (m, 4H), 5,04 (s, 2H), 8,01 - 8,08, (m, 2H), 8,19 (t,  $J = 7,8$ Hz, 1H), 8,31 (d,  $J = 8,8$ Hz, 1H), 8,40 (d,  $J = 8,7$ Hz, 1H), 9,15 (d,  $J = 5,6$ Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (75 M Hz, )  $\delta$ : 148,56, 144,57, 138,45, 134,99, 130,74, 126,66, 124,05, 122,16, 120,67, 47,50, 44,71, 43,80, 33,20. Punto de fusión: 214,8 °C. Análisis  
 25 Elemental: Calculado: C 43,44 %; H 6,73 %; N 11,69 % Experimental: C 43,29 %; H 6,70 %; N 11,65 %.

**Mediciones FEM.** Las valoraciones potenciométricas se llevaron a cabo a  $298,1 \pm 0,1$  K usando NaCl 0,15 M como electrolito de soporte. El procedimiento experimental (bureta,  
 30 potenciómetro, celda, agitador, microordenador, etc.) se ha descrito completamente en otra parte (E. García-España, M.-J. Ballester, F. Lloret, J.M. Moratal, J. Faus y A. Bianchi, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1988, 101-104). La adquisición de los datos de la FEM se realizó con el programa informático PASAT (M. Fontanelli y M. Micheloni, Programa para el control automático de la microbureta y la adquisición de las lecturas de fuerza electromotriz (PASAT).  
 35 Actas del 1<sup>er</sup> Congreso español-italiano de termodinámica de complejos metálicos, Peñíscola, Castellón, España, 1990). El electrodo de referencia era un electrodo Ag/AgCl en solución

saturada de KCl. El electrodo de vidrio se calibró como una sonda de concentración de iones de hidrógeno mediante la valoración de cantidades previamente normalizadas de HCl con soluciones de NaOH libres de CO<sub>2</sub> y el punto equivalente determinado por el método de Gran ((a) G. Gran, *Analyst* 1952, 77, 661 -671; (b) F.J. Rossotti y H. Rossotti, *J. Chem. Educ.* 1965, 42, 375-378) que proporciona el potencial estándar, E<sup>o</sup>, y el producto iónico del agua (pK<sub>w</sub> = 13,73 (1)).

El programa informático HYPERQUAD se utilizó para calcular las constantes de protonación y estabilidad (P. Gans, A. Sabatini y A. Vacca, *Talanta* 1996, 43, 1739-1753). El rango de pH investigado fue 2,5-11,0 y la concentración de los ligandos se varió de 1x10<sup>-3</sup> a 5x10<sup>-3</sup> M. Las diferentes curvas de titulación para cada sistema (al menos dos) se trataron como un conjunto único o como curvas separadas sin variaciones significativas en los valores de las constantes de estabilidad. Finalmente, los conjuntos de datos se fusionaron y se trataron simultáneamente para dar las constantes de protonación finales (Tabla 1). Para los compuestos 1, 7 y 9 se han podido detectar dos constantes de protonación en el intervalo de pH estudiado con valores que oscilan entre 5,51 y 9,68 unidades logarítmicas. Para el resto de compuestos se han podido medir tres constantes de protonación con valores que oscilan entre 10,08 y 2,25 unidades logarítmicas. Todos los compuestos presentan carga +1 al valor de pH fisiológico de 7,4. Estos resultados de caracterización de los compuestos no hacen desaconsejable su administración a seres humanos o animales.

**Tabla 1** Logaritmos de las constantes de protonación de los compuestos 1-10 medidas en 0,15 M NaCl a temperatura de 298,1 K.

Equilibrio	1	2	3	4	5
H+L ⇌ HL <sup>a</sup>	9,63(1) <sup>b</sup>	9,653(5)	9,503(5)	9,06(1) <sup>b</sup>	9,18(1)
HL+H ⇌ H <sub>2</sub> L	5,62(1)	5,687(5)	5,713(5)	5,58(1)	5,63(1)
H <sub>2</sub> L+H ⇌ H <sub>3</sub> L	----	2,95(2)	3,390(6)	2,25(2)	3,16(1)
Log β	15,25(1)	18,29(3)	18,60(1)	16,88(2)	17,98(1)

25

Equilibrio	6	7	8	9	10
H+L ⇌ HL <sup>a</sup>	8,865(3)	9,17(1)	10,08(1)	9,68(2)	9,512(6)
HL+H ⇌ H <sub>2</sub> L	5,407(3)	5,45(1)	5,59(1)	5,41(2)	5,297(7)
H <sub>2</sub> L+H ⇌ H <sub>3</sub> L	2,956(6)	---	3,32(1)	---	3,183(8)
Log β	17,22 (1)	14,63 (1)	18,99(2)	15,10(3)	17,99(1)

<sup>a</sup> Se omiten las cargas. <sup>b</sup> Los valores entre paréntesis hacen referencia a las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Ejemplo 2.- Evaluación de actividad *in vitro*. Toxicidad e índices de selectividad de los compuestos **1-10**.

5 En este Ejemplo se describe el procedimiento de evaluación de la actividad *in vitro* de los compuestos **1-10** frente a formas extracelulares (promastigotes) e intracelulares (amastigotes) de las especies *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. donovani*, el procedimiento de evaluación de la toxicidad frente a macrófagos de la línea J774.2 y los cálculos de Índices de Selectividad.

10 *Metodología:* Para estos estudios se utilizaron cultivos de tres especies de *Leishmania*. representativas de las especies causantes de cada una de las formas clínicas de la enfermedad. En concreto, se utilizaron las cepas MCAN/ES/2001/UCM-1 O de *L. infantum*, aislada y caracterizada en Madrid a partir de un perro infectado; MHOM/BR/1975/M2904 de *L. braziliensis*, aislada en Brasil en un caso humano, y LCR-L 133 LRC de *L. donovani*. aislada  
15 en Jerusalén, Israel a partir de un caso de kala-azar de un paciente de Etiopía (WHO Technical Reports Series 949. Geneva: WHO. March. Los cultivos de parásitos proceden de una colección propia que se elaboró a partir de un proyecto de biobanco (Biobanco y Unidad De Caracterización de Cepas y Especies de Tripanosomátidos, Responsables de Patologías Humanas, Animales y Vegetales, Cgl-2008-03687-E/Bos.), y están disponibles bajo petición.

20

El cultivo de las formas promastigotas de las tres especies estudiadas se realizó *in vitro* en esterilidad en medio de cultivo monofásico MTL (Mediurn Trypanosomes Liquid. elaborado a partir de Sales Equilibradas de Hank (Hank's Balanced Salts, Sigma-Aldrich, H6136) enriquecido con el 10% (v/v) de Suero Bovino Fetal (SBF-1) inactivado a 56 °C/ 30 minutos.

25 El inóculo de parásitos para iniciar el cultivo fue de  $5 \times 10^4$  células/ml en 5 ml de medio en frascos de plástico Falcon® de 25 cm<sup>2</sup> y se mantuvieron en una estufa a 28 °C. Los cultivos se realizaron de manera rutinaria consiguiendo el crecimiento exponencial de los flagelados hasta conseguir la masa celular necesaria para los posteriores estudios. Para la realización de los ensayos se usaron tanto formas promastigotas como amastigotas.

30

Las formas promastigotas de las tres cepas de *Leishmania*. cultivadas de la forma anteriormente descrita, fueron recolectadas en su fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación a 400 g durante 10 min. El número de parásitos fue contado en una cámara hemocitométrica de Neubauer y fueron sembrados en una placa de 24 pocillos a razón de una

35 concentración de  $5 \times 10^4$  parásitos/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 concentraciones finales de 100, 50, 25 y 12,5  $\mu\text{M}$ . El efecto de cada compuesto sobre el crecimiento de las formas promastigotas. a las diferentes concentraciones ensayadas se evaluó a las 72 h usando una cámara hemocitométrica de Neubauer y el efecto leishmanicida se expresó como la  $\text{IC}_{50}$  (concentración requerida para dar una inhibición del 50 %, calculado por el análisis de la regresión lineal de la Kc (pendiente de la recta que se ajusta con las concentraciones) a las concentraciones ensayadas) [Sánchez-Moreno. M. et al. J. Med. Chem. 2011. 54. 970-979].

10

Para el estudio del efecto *in vitro* sobre formas intracelulares de *Leishmania* se usó el modelo experimental diseñado por el grupo de los presentes inventores [Sánchez-Moreno. M. et al. J. Med. Chem. 2012, 55, 9900-9913; Sánchez-Moreno. M. et al. J. Antimicrob. Chemother. 2012, 67, 387-397]. Los macrófagos se despegaron del frasco de cultivo donde se encontraban adheridos mediante golpes secos. Para ello, se incubó en frío durante 5 minutos y tras eso se golpeó el frasco con la palma de la mano hasta que las células se despegaron del frasco. A continuación, se pasaron a un frasco de fondo cónico de 25 ml de capacidad tipo steriling (Deltalab) para centrifugarlas a 120 g durante 5 minutos, retirándose el sobrenadante y se contaron en cámara de Neubauer. Las células se suspendieron en medio RPMI a una concentración de  $1 \times 10^4$  células/pocillo, cultivándose a continuación 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, las células se dejaron 24 h a 37 °C en 5%  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, se procedió a infectar *in vitro* las células poniendo células de *Leishmania* a razón de 10 parásitos/macrófago según [Sánchez-Moreno. M et al. J. Med. Chem. 2011, 54, 970-979]. Durante las siguientes 24 horas los parásitos infectan las células, transcurrido ese tiempo, se retiró el medio de cultivo para sustituirlo por medio fresco con los productos a ensayar en concentraciones de 100, 50, 25 y 12,5  $\mu\text{M}$  con el objeto de calcular la  $\text{IC}_{50}$ . Se dejó actuar los productos durante 72 horas de incubación.

Una vez finalizado ese tiempo, se sacaron los cristales y se fijaron con metanol en un portaobjetos y se dejaron secar, tras lo cual se les añadió medio de montaje para microscopía DPX (Panreac®). Una vez montadas las preparaciones, se procedió a teñirlas con Giemsa diluyendo Azur-Eosina-Azul de Metileno solución según Giemsa DC (Código 251338) con tampón Sorensen (dilución 1:10). Se cubrieron las preparaciones y se dejaron colorear durante 20 minutos, tras lo cual se lavaron con agua destilada para luego dejarlas escurrir y

35

secar en vertical. Por último, se procedió al conteo de formas amastigotas con objetivo de inmersión en un total de 200 células.

Toxicidad frente a macrófagos: para este estudio se usó el modelo experimental diseñado por el grupo de los inventores [I. Ramírez-Macías. et. al. J. Antimicrob. Chemother. 2011, 66(4): 813-819] en el que se utiliza citometría de flujo. Brevemente, macrófagos de la línea J774.2 (número de la ECACC 91051511, obtenidos de un tumor de una rata hembra BALB/c en 1968) se depositaron en un tubo steriling y se centrifugaron a 120 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio MEM + Glutamina con un 20% de SBF (suero bovino fetal). A continuación, se depositaron  $1 \times 10^4$  células por pocillo de una placa de titulación de 24 pocillos y para fijarlas se incubaron durante 24-48 h a 37 °C en atmósfera húmeda enriquecida con 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio de cultivo y se adicionó medio fresco con los productos a ensayar a concentraciones de 100, 50, 25 y 12,5 µM. Tras 72 h de incubación, se procedió a la preparación de las muestras para su lectura en un citómetro de flujo. En concreto, se añadió a cada pocillo 100 µl de solución de yoduro de propidio (100 µg/ml) y se incubaron durante 10 min a 28 °C en la oscuridad. Posteriormente, se añadieron 100 µl/pocillo de diacetato de fluoresceína (FDA) (Sigma Chemical Co) en solución (100 ng/ml) y se repitió la incubación en las mismas condiciones durante 10 minutos. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 400 g durante 10 minutos y lavando el precipitado con PBS. Finalmente, se analizaron los resultados en un citómetro de flujo FACS Vantage (Becton Dickinson) teniendo en cuenta que las células con la membrana plasmática intacta emiten color verde al actuar las esterasas sobre la FDA, mientras que, las células que han perdido la integridad de la membrana y no son viables, emiten en el rango próximo a los 580 nm al penetrar el yoduro de propidio por difusión pasiva y unirse específicamente a los ácidos nucleicos de las mismas. Así, para calcular el porcentaje de viabilidad, se tuvo en cuenta el número de células muertas en comparación con los controles. La IC<sub>50</sub> (concentración necesaria para obtener el 50% de inhibición frente a células de macrófagos después de 72 h de cultivo) se calculó utilizando el análisis de la regresión lineal de la Kc a las concentraciones ensayadas.

30

Los resultados obtenidos, que corresponden a cinco experimentos independientes, se muestran en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2. Actividad y toxicidad encontradas en los compuestos 1-10 frente a formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania*

Compuesto	Actividad IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>						Toxicidad en Macrófagos IC <sub>50</sub> (μM) <sup>b</sup>
	<i>L. infantum</i>		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. donovani</i>		
	Formas Promastigotas	Formas Amastigotas	Formas Promastigotas	Formas Amastigotas	Formas Promastigotas	Formas Amastigotas	
Glucantime	18,0±3,1	24,2±2,6	18,0±3,1	24,2±2,6	18,0±3,1	24,2±2,6	15,2±1,0
1	0,6±0,2	0,7±0,1	7,4±0,6	5,7±0,3	7,0±0,5	8,9±0,9	13,7± 3,1
2	6,4±0,6	8,4±0,5	4,1±0,2	15,8±0,5	11,7±0,8	14,4±0, 1	310,3±11,5
3	12,6±2,1	13,9±1,0	14,3±1,0	27,9±1,2	18,4±0,8	5,1±0,3	222,7±17,3
4	28,6±2,5	33,6±1,4	37,3±0,9	30,8±1,3	34,8±1,5	38,8±1,4	1241,7±42,7
5	9,2±0,7	10,0±0,8	16,7±0,5	20,0±2,0	21,7±1,6	17,6±0,7	230,4±16,9
6	63,3±1,5	23,6±1,7	52,5±5,1	29,7±2,5	67,9±5,3	1 1,5±1,3	496,9±21,5
7	84,4±5,1	49,7±3,6	105,3±11,6	38,9±2,7	56,9±2,7	38,9±3,2	442,4±31,6
8	14,1±0,6	11,5±0,8	13,8±0,7	16,8±1,1	12,8±0,6	10,6±0,6	22,5±0,6
9	15,6±±0,8	14,3±0,6	28,0±0,3	26,5±0,9	27,5±0,4	31,9±1,1	353,9±31,7
10	12,5±1,1	18,7±1,5	18,4±1,1	21,7±2,3	24,1±0,6	26,8±2,1	164,3±10,0

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> = Concentración necesaria para obtener el 50 % de inhibición, calculada por análisis de regresión lineal del valor Kc a las concentraciones empleadas de (12,5, 25, 50 y 100 μM).

<sup>b</sup> Concentración necesaria para obtener el 50 % de inhibición frente a células de Macrófagos después de 72 h de cultivo.

5

Con los resultados anteriores se calcularon los índices de selectividad (IS) para formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania*.

Los resultados correspondientes a los cinco experimentos independientes se indican a continuación en la Tabla 3.

10

Tabla 3.- Índices de selectividad encontrados para formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania*

Compuesto	Índice de selectividad (IS) <sup>c</sup>					
	<i>L. infantum</i>		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. donovani</i>	
	Formas Promastigotas	Formas Amastigotas	Formas Promastigotas	Formas Amastigotas	Formas Promastigotas	Formas Amastigotas
Glucantime	0,8	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6
1	23 (28)	20 (33)	2 (3)	2 (4)	2 (3)	1(3)
2	48 (61)	37 (62)	76 (126)	20 (33)	26 (38)	21 (36)
3	18 (22)	16 (27)	16 (26)	8 (13)	12 (17)	44 (73)
4	43 (54)	37 (62)	33 (55)	40 (67)	36 (51)	32 (53)
5	25 (42)	23 (38)	14 (23)	11(19)	11(15)	13(22)
6	8 (10)	21(35)	9 (16)	17 (28)	7 (10)	43 (72)
7	5 (7)	9 (15)	4 (7)	11(19)	8(11)	11(19)
8	2 (2)	2 (3)	2 (3)	1(2)	2 (2)	2 (3)
9	23 (28)	25 (41)	13(21)	13(22)	13(19)	11(18)
10	13(16)	9 (15)	9 (15)	8(13)	7 (10)	6 (10)

<sup>c</sup> Índice de selectividad = IC<sub>50</sub> de macrófagos / IC<sub>50</sub> de las formas extracelulares e intracelulares de las diferentes especies estudiadas de *Leishmania*. Entre paréntesis, el número de veces que el IS supera al del fármaco de referencia

5

Como puede verse en las tablas anteriores, todos los compuestos mostraron actividad frente a las formas promastigotas y amastigotas de cualquiera de las tres cepas de *Leishmania* incluidas en el ensayo, actividad que, en la mayor parte de los casos, es incluso superior a la del compuesto de referencia. Es muy destacable que casi todos los compuestos de la presente invención presentan una toxicidad en macrófagos inferior a la del compuesto de referencia, Glucantime®, siendo muy destacables los datos obtenidos con algunos de los compuestos, como por ejemplo el 4, cuya IC<sub>50</sub> en macrófagos es casi dos órdenes de magnitud inferior a la del compuesto de referencia, es decir, se necesita una concentración casi 2 órdenes de magnitud superior del compuesto 4 para obtener la misma toxicidad que con el compuesto de referencia. También son muy notables las bajas toxicidades de los compuestos 6 y 7, así como las de los compuestos 9, 2 y 3. El compuesto 1 es el único que presenta un valor de la

10

15

IC<sub>50</sub> en macrófagos similar a la del compuesto de referencia, ligeramente inferior en el valor medio, aunque prácticamente igual si se considera el rango de oscilación.

Por otro lado, merecen destacarse los datos de la Tabla 3, en la que puede apreciarse que todos los compuestos de la presente invención presentan un índice de selectividad varias veces superior al del compuesto de referencia para todas las cepas ensayadas y en todas sus formas. Son de nuevo particularmente destacables los datos del compuesto 4, cuyos índices de selectividad son entre 51 y 67 veces superiores a los del compuesto de referencia, dependiendo de la cepa y la forma de la misma con la que se haya realizado el ensayo. Son también muy destacables los datos obtenidos con el compuesto 2, que presenta índices de selectividad similares a los del compuesto 4 en los ensayos realizados con la cepa de *L. infantum*, y que presenta un índice de selectividad muy alto, de 126, con respecto a las formas promastigotas de la cepa de *L. braziliensis* utilizada en el ensayo. Son también elevados los valores obtenidos para los compuestos 3 y 6 en los que se refiere a las formas amastigotas (las más importantes) de *L. donovani*, así como los obtenidos con el compuesto 5 en lo que se refiere a ambas formas de la cepa de *L. infantum*, resultados que hicieron que el compuesto 5 se incluyera en los siguientes experimentos.

Con estos resultados, se decidió continuar los ensayos con los compuestos 2, 4 y 5.

Ejemplo 3.- Evaluación de la velocidad de infección y el crecimiento de parásitos en cultivos de macrófagos infectados con las cepas de *Leishmania* (compuestos 2, 4 y 5).

*Metodología:* Se utilizaron Macrófagos de la línea J774.2 conservados en el laboratorio de los presentes inventores por criopreservación a -80 °C y sucesivos pases en medio MEM+Glutamina+20% SBF1, que fueron depositados en un tubo steriling y centrifugados a 100 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en su medio correspondiente a una concentración final de 1x10<sup>6</sup> células/ml.

Posteriormente, se depositaron 10 µl de la suspensión celular en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos cada uno de ellos con un cristal cubreobjetos redondo de 10 mm de diámetro. Se completó un volumen final de 500 µl con el medio de cultivo y se incubaron durante 24 h a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>.

Posteriormente, las células fueron infectadas con formas promastigotas de la especie de *Leishmania* correspondiente a cada ensayo, en una proporción 10:1 de promastigotes por

cada macrófago. Los compuestos 2 y 4 (y el 5 sólo para *L. infantum*) se adicionaron para alcanzar una concentración de IC<sub>25</sub> justo después de la infección y se incubaron durante 12 h a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>. Los parásitos no fagocitados y los productos se retiraron mediante lavado y los cultivos infectados se mantuvieron durante 10 días en medio fresco adicionado cada 48 horas. Se determinó la actividad de los compuestos por el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula infectada. Por último, los cultivos se fijaron y se tiñeron con metanol y Giemsa. El porcentaje de células infectadas y la media del número de amastigotes por célula infectada se determinó por el recuento de 200 células a microscopio durante 48 horas.

10

Como puede verse en las Figuras 2, 3 y 4 tanto los valores de la tasa de infección como el número de amastigotes por macrófago fueron, en todos los casos, inferiores a los obtenidos con los controles sin compuesto e, incluso, a los obtenidos con el fármaco de referencia. En todos los casos, los mejores resultados se obtuvieron con el compuesto 2, pues fue el que dio lugar a los valores más bajos a lo largo del tiempo. En el caso de los ensayos con *L. infantum* en los que se comprobó el comportamiento de cada uno de los tres compuestos, el compuesto 5 dio lugar a tasas de infección inferiores a las del compuesto 4 hasta que hubieron transcurrido 8 días, mientras que el compuesto 4 dio como resultado una tasa de infección inferior en el día 10; cuando se compararon los valores del número de amastigotes por macrófago en esos mismos ensayos, los resultados obtenidos con el compuesto 4 sí fueron mejores (inferiores) a los obtenidos con el compuesto 5.

20

Ejemplo 4.- Descripción de la capacidad de los compuestos 2, 4 y 5 para inhibir la actividad de la enzima Fe-SOD de los promastigotes de las tres especies de *Leishmania* en relación con la CuZnSOD de eritrocitos humanos.

25

*Metodología:* Los compuestos que se seleccionaron a partir de la actividad leishmanicida mostrada en anteriores experimentos se evaluaron como inhibidores de la actividad de la enzima FeSOD, que es exclusiva de los parásitos kinetoplástidos a los que pertenece *Leishmania*. Al ser exclusiva, se encuentra ausente en el hospedador vertebrado, ya que estos suelen poseer una forma análoga de esa enzima, pero acomplejada a un átomo de cobre o zinc (Cu/ZnSOD). Por esta razón, esta enzima es una diana terapéutica para el diseño de nuevos fármacos, pues la captura del ion metálico por mecanismos de complejación puede inactivar la enzima y comprometer la supervivencia del parásito ante la aparición de radicales libres.

35

Para llevar a cabo este ensayo, se utilizó la Cu/Zn-superóxido dismutasa de eritrocitos humanos de Boehringer Mannheim, mientras que las coenzimas y sustratos se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

- 5 La inhibición causada por los nuevos compuestos sobre la actividad FeSOD/ Cu-Zn SOD se cuantificó en el espectrofotómetro a 560 nm según la técnica descrita por [W F. Beyer. I. Fridovich. Anal Biochem. 1987. 161: 559-66] basada en la determinación de la reducción de NBT (del inglés *nitro blue tetrazolium*: nitroazul de tetrazolio) por los iones superóxido y que el grupo de los presentes inventores ha puesto a punto para el ensayo en tripanosomátidos.
- 10 siendo una técnica rutinaria en el laboratorio de dicho grupo [F. Luque. et. al. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. **2000**. 126: 39-44; M. Sanchez-Moreno. J. Med. Chem. **2011**. 54. 970-9; I. Ramírez-Macías. et. al. J. Antimicrob. Chemother **2011**. 66(4): 913-9].

Brevemente, los parásitos cultivados tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1 fueron  
15 sometidos a centrifugación, el *pellet* se resuspendió (0,5 – 0,6 g/ml) en 3 ml de tampón STE (sacarosa 0,25 M. Tris-HCl 25 mM. 1 M EDTA. pH 7,8) y se sometió a 3 ciclos de sonicación de 30 s a 60 V. A continuación, se centrifugó a 1500 *g* durante 10 min a 4 °C y el *pellet* se lavó 3 veces con tampón STE enfriado con hielo. Esta fracción se centrifugó (2500 *g* durante 10 min a 4 °C) y posteriormente se recogió el sobrenadante. Las concentraciones de las proteínas  
20 se determinaron mediante el método de Bradford (Sigma-Aldrich) usando albúmina de suero bovino como estándar. Para determinar la actividad de la enzima superóxido dismutasa FeSOD, a cada cubeta, situada en la solución *stock* (tampón fosfatos 50 mM. pH 7,8. 54 ml, L-metionina 3 ml, NBT 2 ml, Triton X-100 1,5 ml) se le añadió uno de los compuestos a ensayar y riboflavina. Se hizo una primera medida de la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro  
25 y, después de 10 minutos bajo luz y en condiciones de agitación, se volvió a determinar la absorbancia. Se consideró que una unidad es la cantidad de enzima necesaria para inhibir la velocidad de reducción del NBT en un 50%.

Los resultados obtenidos se muestran en los gráficos de la Fig. 5. En los gráficos se indica  
30 también la concentración necesaria para dar lugar a un 50% de inhibición con cada compuesto.

Como puede observarse, la concentración necesaria para que cualquiera de los compuestos 2, 4 y 5 dé lugar al 50 % de inhibición de la enzima FeSOD de las formas promastigotas de *L. infantum* es inferior a la necesaria para conseguir el mismo porcentaje de inhibición de la  
35 enzima CuZnSOD de eritrocitos humanos. Hecho que también se observa cuando se

compararon los datos de inhibición de la FeSOD de las formas amastigotas de *L. donovani* por parte de los compuestos 2 y 4, y en la inhibición de la FeSOD de las formas promastigotas de *L. braziliensis* por parte del compuesto 4, por lo que en casi todos los casos los compuestos ensayados son capaces de inhibir la enzima FeSOD de parásito con un valor de IC<sub>50</sub> menor  
5 que el necesario para la enzima de eritrocitos humanos.

Ejemplo 5.- Estudio de la alteración de la ruta glucolítica de los parásitos por acción de los nuevos compuestos.

10 *Metodología:* Se utilizaron promastigotes de las tres especies estudiadas para este estudio. Se dejaron crecer en un frasco de cultivo y posteriormente se trasladaron a un frasco de fondo cónico de 25 ml de capacidad (steriling) para que en cada uno hubiera  $5 \times 10^4$  parásitos/ml. Se  
adicionó la cantidad de compuesto necesario para llegar a la IC<sub>25</sub> de cada producto y se completó con medio de cultivo fresco para llegar a un volumen final de 3 ml y se incubaron a  
15 28 °C durante 72 h. Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron los frascos a 400 g durante 10 minutos, y se trasladaron 2 ml de sobrenadante a tubos Eppendorf®. Acto seguido, se analizaron mediante resonancia nuclear de protones y los espectros fueron analizados con el programa informático Mestre Nova® para obtener las gráficas de producción y excreción de  
20 metabolitos. A partir dichas gráficas se puede inferir qué enzima ha visto su actividad alterada mediante acción de los compuestos, en función del aumento o disminución del metabolito producido por la misma.

Tanto la disminución como el aumento de los metabolitos analizados pueden ser efectos positivos, al indicar un mal funcionamiento de la ruta metabólica. Un aumento de un metabolito  
25 mientras los otros bajan indica que la reacción que produce el metabolito se está repitiendo y el resto de reacciones no ocurren, produciéndose un bloqueo del metabolismo.

Los resultados se muestran en la Fig. 6.

30 Como puede verse, todos los compuestos alteran el metabolismo de las tres especies utilizadas en este estudio, aunque el compuesto 2 sólo produce un cierto incremento del succinato frente a *L. braziliensis* y casi no altera los demás metabolitos analizados. En cambio, es llamativo el incremento de la producción de succinato producida por el compuesto 4 tanto en *L. infantum* como en *L. braziliensis* (en la que produce disminución de los restantes  
35 metabolitos analizados), y por el compuesto 2 en *L. donovani*.



En este caso, el aumento de succinato y la disminución de los otros metabolitos en *L. infantum* y *L. braziliensis* indican que la glucosa no se está procesando bien (el parásito no está obteniendo energía), ya que la reacción que usa el succinato como sustrato no está teniendo lugar: por eso su excreción aumenta. En el caso de los efectos del compuesto 2 en *L. donovani* se pueden interpretar como una aceleración metabólica, ya que todos los metabolitos analizados aumentan, lo que puede llevar a agotar la glucosa del medio.

Ejemplo 6.- Análisis de la capacidad de alteración del potencial de membrana mitocondrial de los nuevos compuestos mediante la tinción de rodamina y por citometría de flujo.

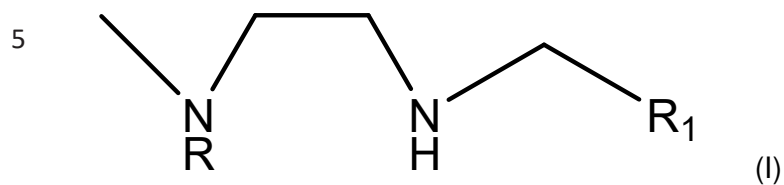
10

*Metodología:* De forma similar al ensayo del Ejemplo 5, se volvió a tratar con el IC<sub>25</sub> de los compuestos 2 y 4 una cantidad de  $5 \times 10^4$  parásitos/ml de *Leishmania donovani*, esta vez en un volumen final en los frascos de fondo cónico steriling de 5 ml. Una vez más, transcurridas 72 h de incubación con las mismas condiciones descritas en el Ejemplo 5, se centrifugaron los frascos a 400 g durante 10 minutos y se lavó el pellet resuspendiéndolo con PBS tres veces. Tras el último lavado, se resuspendió el pellet con 0,5 ml de PBS con rodamina 10 µg/ml. Tras 20 minutos de actuación de la rodamina, se realizó un análisis por citometría.

Los resultados se muestran en la Fig. 7, en la que puede observarse que la presencia de los compuestos 2 ó 4 da lugar sólo a una ligera despolarización de la membrana mitocondrial del parásito, por lo que no parece que dicha despolarización pueda ser la causa principal por la que dichos compuestos son efectivos. Atendiendo a los resultados del experimento de inhibición de SOD (aunque sin querer verse limitado por ninguna hipótesis) lo más probable es que los compuestos sean activos por su capacidad de inhibir la actividad enzimática en primer lugar y en segundo por alterar el metabolismo. Es más, en ocasiones las alteraciones metabólicas pueden deberse a la inhibición de la SOD.

## REIVINDICACIONES

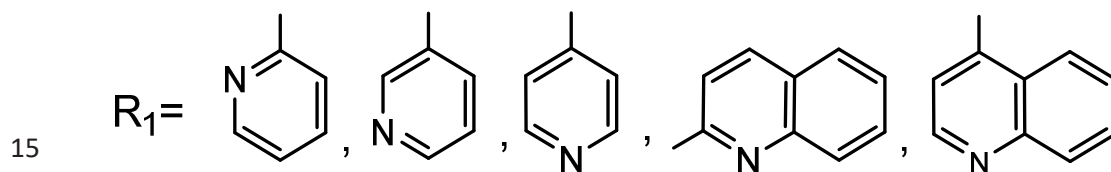
1. Un compuesto de la Fórmula (I)



10 donde

R se selecciona de entre H o CH<sub>3</sub> y

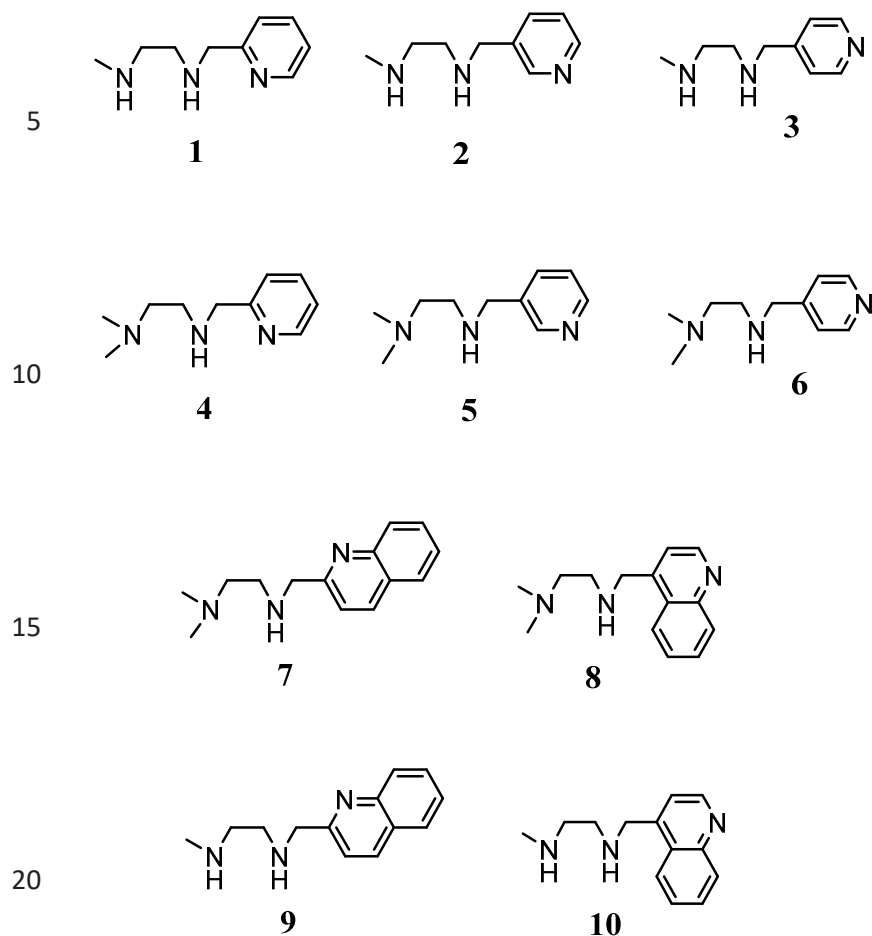
R<sub>1</sub> se selecciona del grupo de



o un solvato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

20 para su uso en el tratamiento de leishmaniasis.

2. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona del grupo de compuestos de fórmulas:



o los solvatos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

25 3. El compuesto para su uso según la reivindicación 2, en el que el compuesto se selecciona del grupo de los compuestos 3 (1-{4-piridil}-2,5-diazahexano), 4 (1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazahexano), 5 (1-{3-piridil}-5-metil-2,5-diazahexano), 6 (1-(4-piridil)-5-metil-2,5-diazahexano), 7 (1-(2-quinolil)-5-metil-2,5-diazahexano) y 9 (1-{2-quinolil}-2,5-diazahexano) y los solvatos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

30 4. El compuesto para su uso según la reivindicación 2, en el que el compuesto se selecciona del grupo de los compuestos 2 (1-{3-piridil}-2,5-diazahexano), 4 (1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazahexano) y 5 (1-{3-piridil}-5-metil-2,5-diazahexano) y los solvatos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

35 5. El compuesto para su uso según la reivindicación 2, en el que el compuesto es el compuesto 5 (1-{3-piridil}-5-metil-2,5-diazahexano) o un solvato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

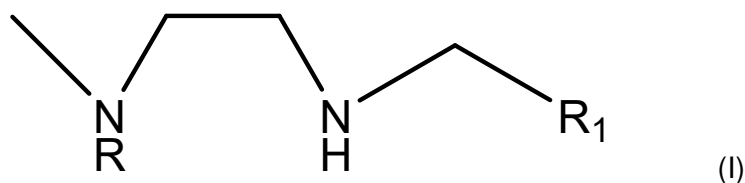
6. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la leishmaniasis está causada por una especie del género *Leishmania* que se selecciona entre *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. panamensis/L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. linderbergi*,  
5 *L. infantum* y *L. donovani*.
7. El compuesto para su uso según la reivindicación 4, en el que la leishmaniasis está causada por la especie *L. infantum* y el compuesto se selecciona del grupo de los compuestos 2 (1-{3-piridil}-2,5-diazahexano), 4 (1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazahexano) y 5 (1-{3-piridil}-5-  
10 metil-2,5-diazahexano) y los solvatos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
8. El compuesto para su uso según la reivindicación 4, en el que la leishmaniasis está causada por la especie *L. braziliensis* y el compuesto se selecciona del grupo de los compuestos 2 (1-{3-piridil}-2,5-diazahexano) y 4 (1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazahexano) y los  
15 solvatos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
9. El compuesto para su uso según la reivindicación 4, en el que la leishmaniasis está causada por la especie *L. donovani* y el compuesto se selecciona del grupo de los compuestos 2 (1-{3-piridil}-2,5-diazahexano) y 4 (1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazahexano) y los solvatos y  
20 sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
10. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el compuesto es para su uso en el tratamiento de la leishmaniasis en un mamífero que se selecciona del grupo del perro, lobo, zorro, gato, caballo, mula, burro, oveja, cabra, vaca y ser humano.  
25
11. El compuesto para su uso según la reivindicación 10, en el que el mamífero es un ser humano y la leishmaniasis se selecciona entre leishmaniasis cutánea, leishmaniasis visceral y leishmaniasis mucocutánea.
- 30 12. El compuesto para su uso según la reivindicación 11, en el que la leishmaniasis es leishmaniasis cutánea y el compuesto se selecciona del grupo de los compuestos 2 (1-{3-piridil}-2,5-diazahexano), 4 (1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazahexano) y 5 (1-{3-piridil}-5-metil-2,5-diazahexano) y los solvatos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 35 13. El compuesto para su uso según la reivindicación 11, en el que la leishmaniasis es leishmaniasis mucocutánea y el compuesto se selecciona del grupo de los compuestos 2 (1-

{3-piridil)-2,5-diazaheptano) y 4 (1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazaheptano), y los solvatos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

14. El compuesto para su uso según la reivindicación 11, en el que la leishmaniasis es leishmaniasis visceral y el compuesto se selecciona del grupo de los compuestos 2 (1-{3-piridil)-2,5-diazaheptano) y 4 (1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazaheptano), y los solvatos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

15. El compuesto para su uso según la reivindicación 10, en el que el mamífero es un perro y el compuesto se selecciona del grupo de 2 (1-{3-piridil)-2,5-diazaheptano), 4 (1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazaheptano) y 5 (1-{3-piridil}-5-metil-2,5-diazaheptano), y los solvatos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

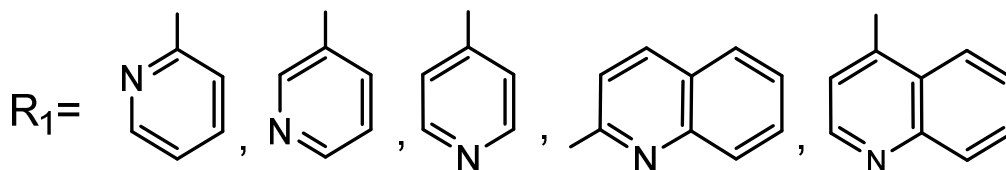
16. Una composición farmacéutica o veterinaria que comprende al menos un compuesto de la Fórmula (I)



o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde

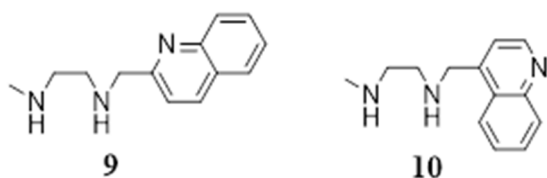
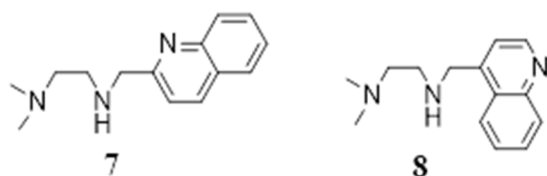
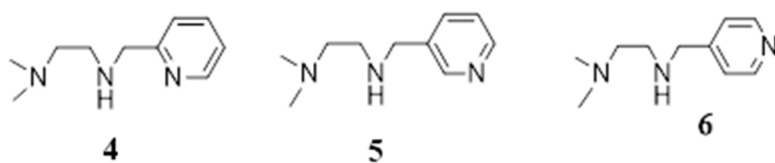
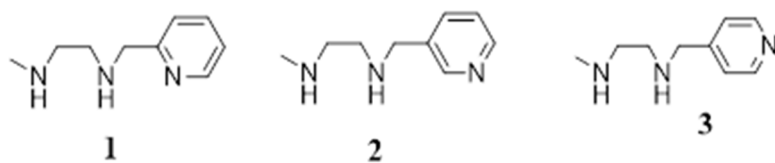
R se selecciona de entre H o CH<sub>3</sub>, y

R<sub>1</sub> se selecciona del grupo de



y que opcionalmente comprende uno o más excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de leishmaniasis.

17. La composición para su uso según la reivindicación 16, donde el compuesto de la Fórmula (I) se selecciona del grupo de compuestos de fórmulas 1 a 10 siguientes:

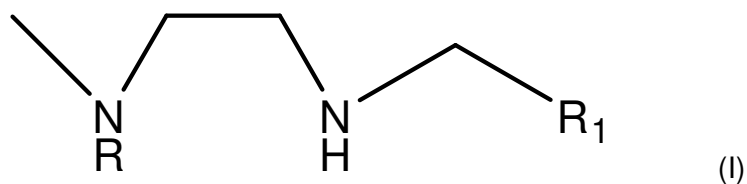


y los solvatos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

18. La composición para su uso según la reivindicación 16 o 17, que comprende más de un compuesto de la Fórmula (I) según se define en dicha reivindicación 16 o en la reivindicación 17, o más de un solvato o sal de los mismos.

19. Una preparación farmacéutica o veterinaria combinada que comprende:

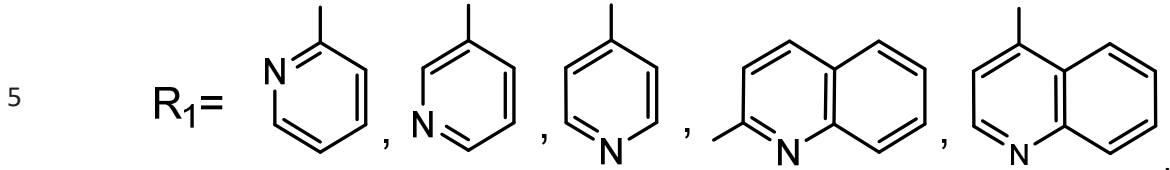
a) al menos un compuesto de la Fórmula (I)



35 o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde

R se selecciona de entre H o CH<sub>3</sub>, y

R<sub>1</sub> se selecciona del grupo de



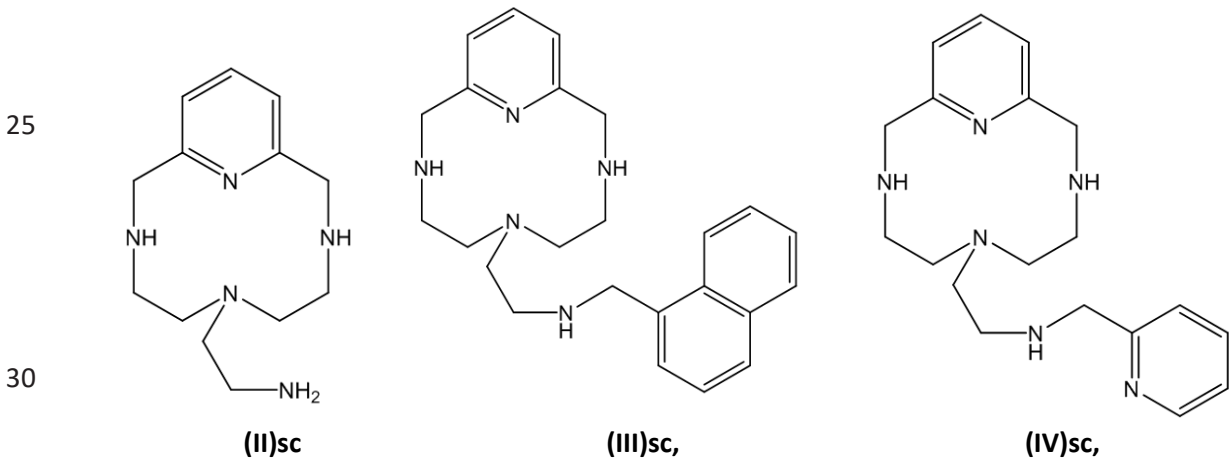
o combinaciones de los mismos,  
y adicionalmente

10 b) al menos un agente antiparasitario con actividad frente a un parásito de la familia *Trypanosomatidae*, donde el agente antiparasitario adicional es diferente de los compuestos definidos en a),

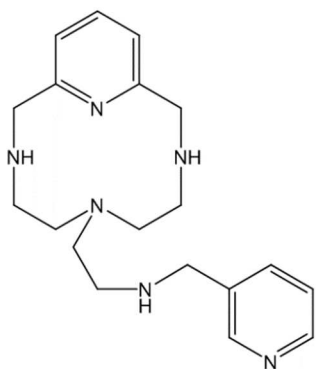
para su uso en el tratamiento de leishmaniasis.

20. .La preparación farmacéutica o veterinaria combinada para su uso según la  
15 reivindicación 19, donde el agente antiparasitario adicional se selecciona del grupo de:

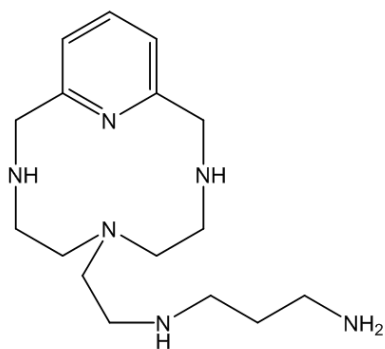
- i. Antimoniato de meglumina,
- ii. Estibongluconato sódico,
- iii. Benznidazol,
- iv. un compuesto seleccionado del grupo de los compuestos de fórmulas (II)sc,  
20 (III)sc, (IV)sc, (V)sc, (VI)sc, (VII)sc, (VIII)sc, (IX)sc, (X)sc, (XI)sc, (XII)sc, (XIII)sc, (XIV)sc, (XV)sc, (XVI)sc, (XVII)sc y (XVIII)sc siguientes



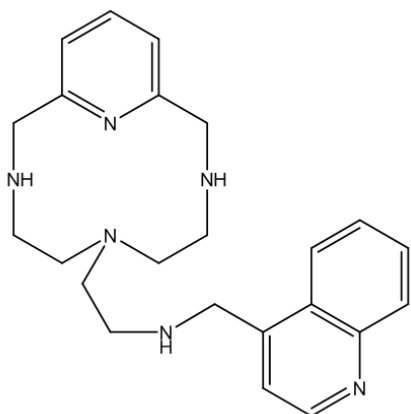
35



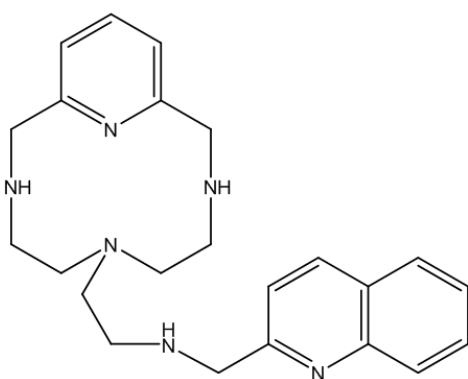
(V)sc,



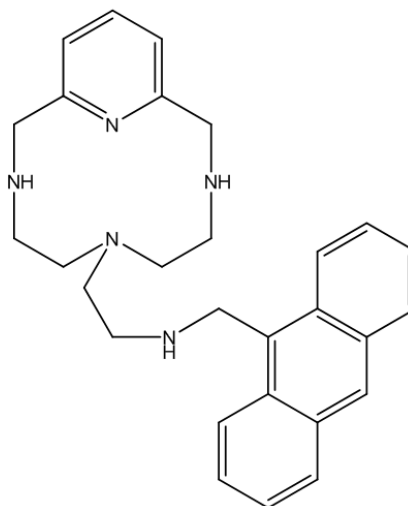
(VI)sc,



(VII)sc,

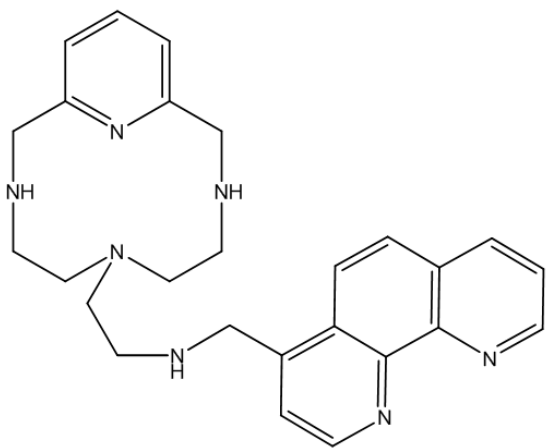


(VIII)sc,

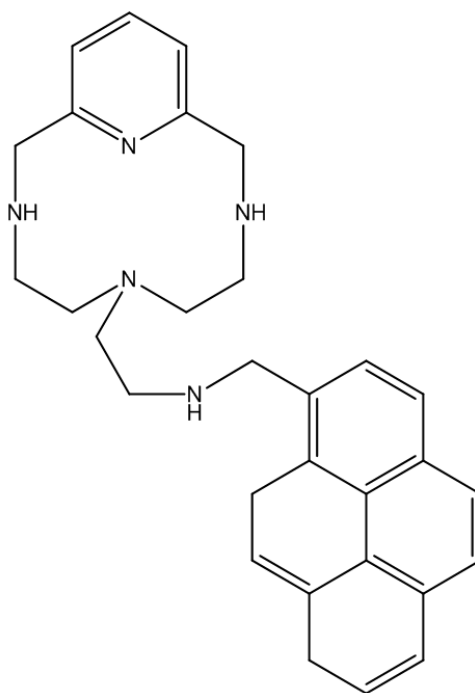


(IX)sc,

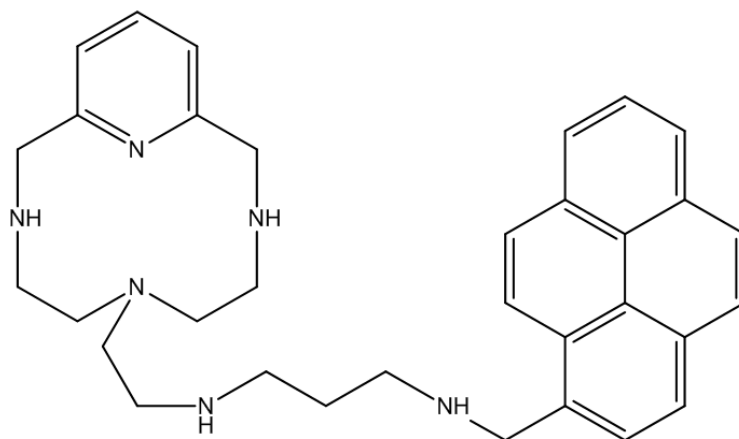




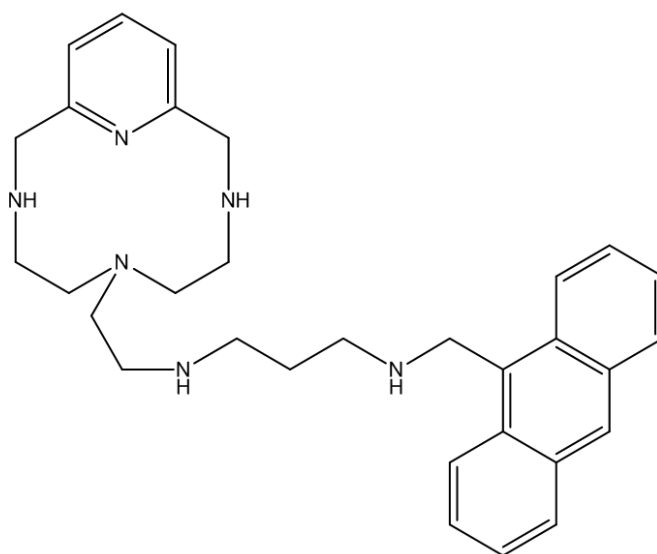
(X)sc,



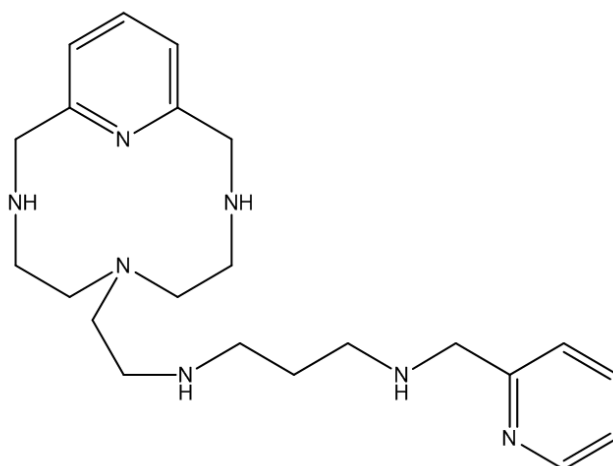
(XI)sc,



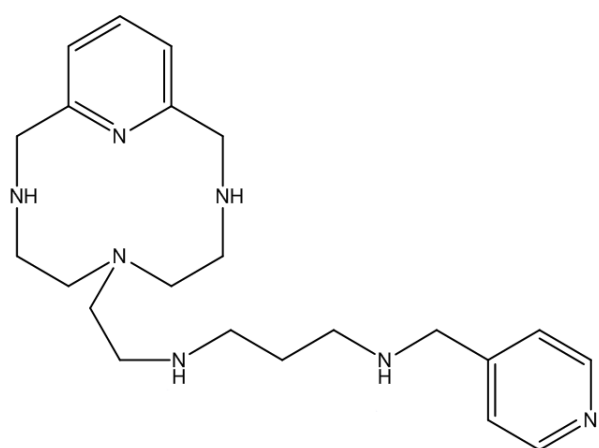
(XII)sc,



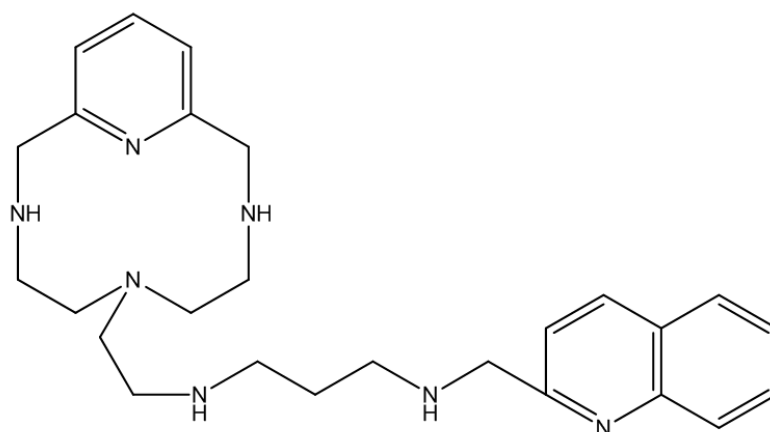
(XIII)sc,



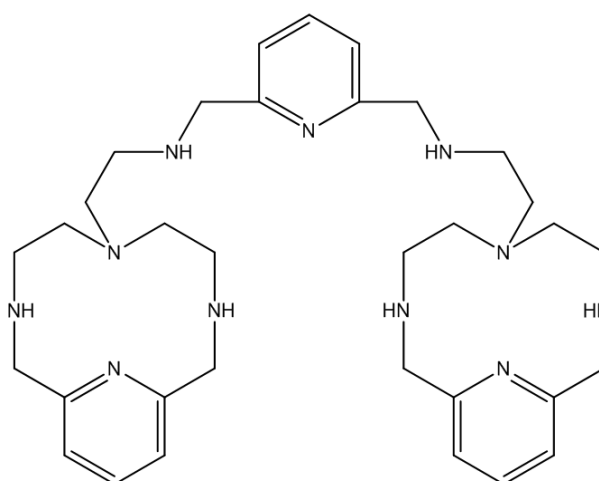
(XIV)sc,



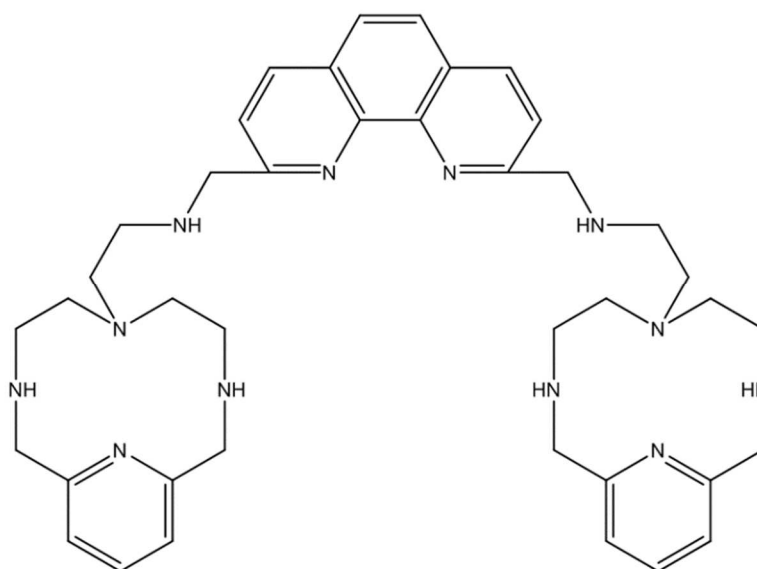
(XV)sc,



(XVI)sc,



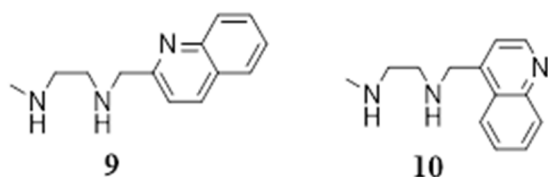
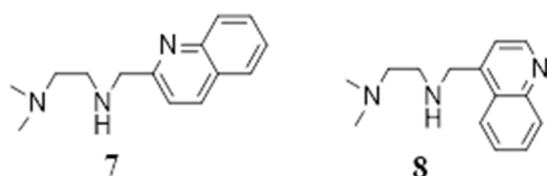
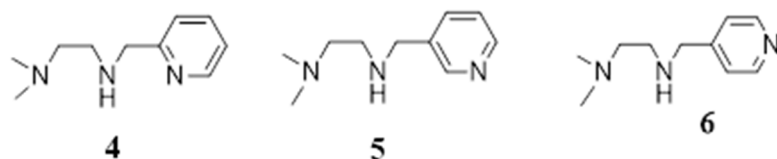
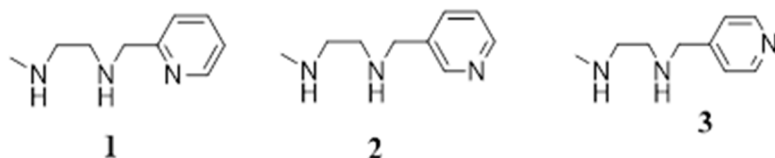
(XVII)sc,



(XVIII)sc,

v. un compuesto seleccionado del grupo de 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dimetilo, 3,5-bis(metoxicarbonil)pirazolato sódico, 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dietilo, 3,5-bis(etoxicarbonil)pirazolato sódico, 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dipropilo, 3,5-bis(propoxicarbonil)pirazolato sódico, 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de diisopropilo y 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dibutilo, o combinaciones de los mismos.

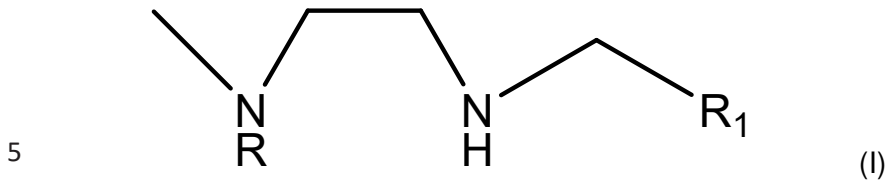
21. La preparación farmacéutica o veterinaria combinada para su uso según la reivindicación 19 o 20, donde el compuesto o compuestos de la Fórmula (I) se selecciona del grupo de compuestos de fórmulas:



y los solvatos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, o combinaciones de los mismos.

22. Un kit de partes para preparar una preparación farmacéutica o veterinaria combinada para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, que comprende:

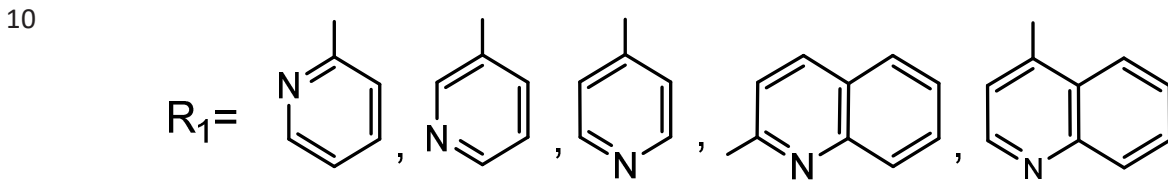
a) al menos un compuesto de la Fórmula (I)



o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde

R se selecciona de entre H o CH<sub>3</sub>, y

R<sub>1</sub> se selecciona del grupo de



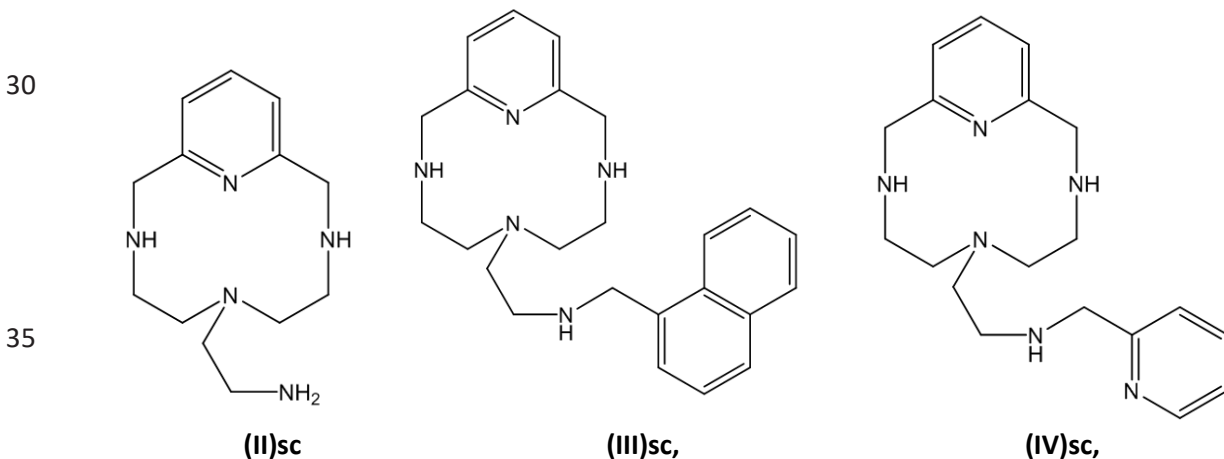
o combinaciones de los mismos,

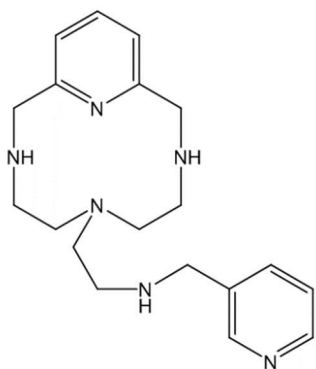
15 y adicionalmente

b) al menos un agente antiparasitario con actividad frente a un parásito de la familia *Trypanosomatidae*, donde el agente antiparasitario adicional es diferente de los compuestos definidos en a).

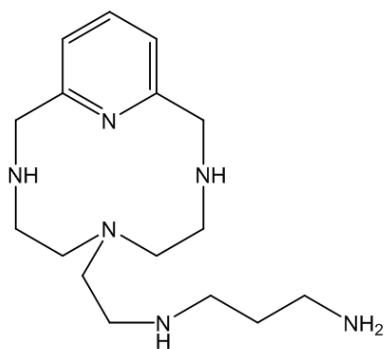
20 23. El kit de partes para su uso según la reivindicación 22, donde el agente antiparasitario adicional se selecciona del grupo de:

- i. Antimoniato de meglumina,
- ii. Estibongluconato sódico,
- iii. Benznidazol,
- 25 iv. un compuesto seleccionado del grupo de los compuestos de fórmulas (II)sc, (III)sc, (IV)sc, (V)sc, (VI)sc, (VII)sc, (VIII)sc, (IX)sc, (X)sc, (XI)sc, (XII)sc, (XIII)sc, (XIV)sc, (XV)sc, (XVI)sc, (XVII)sc y (XVIII)sc siguientes

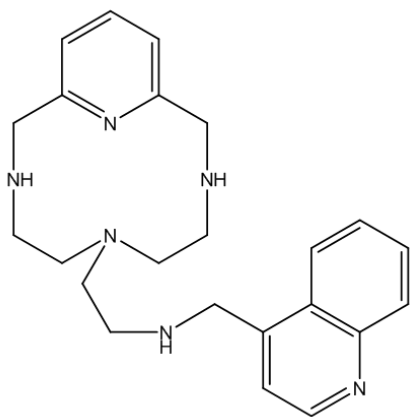




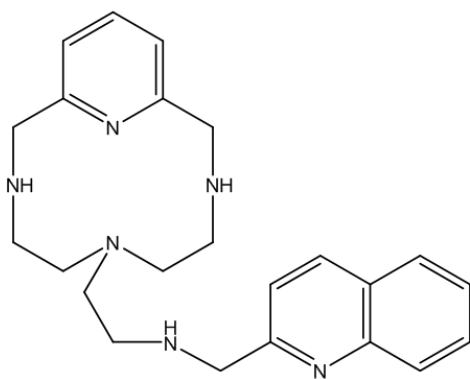
(V)sc,



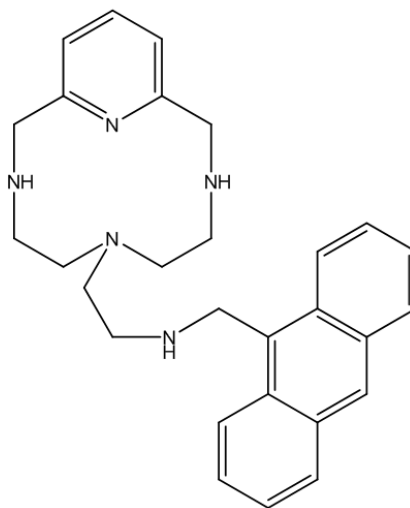
(VI)sc,



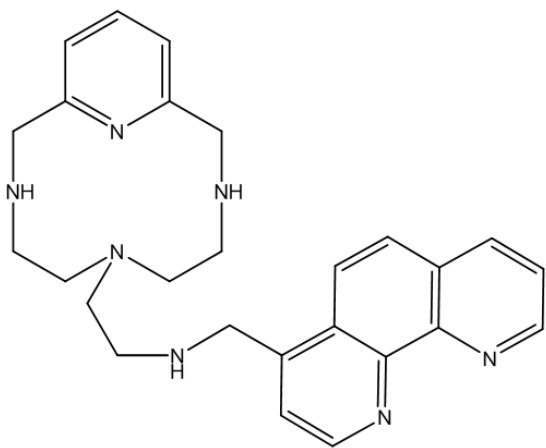
(VII)sc,



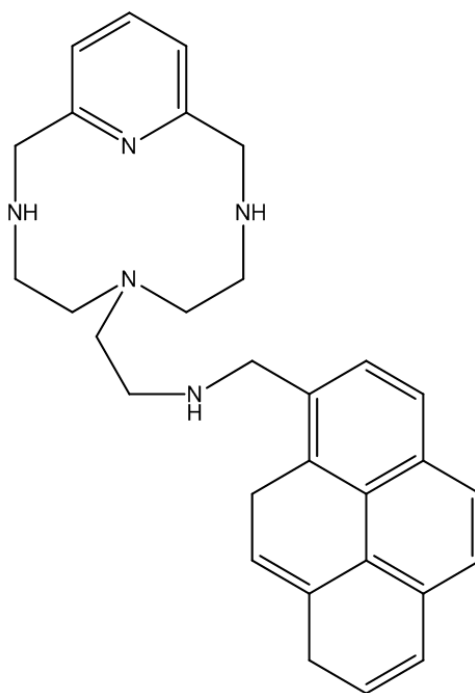
(VIII)sc,



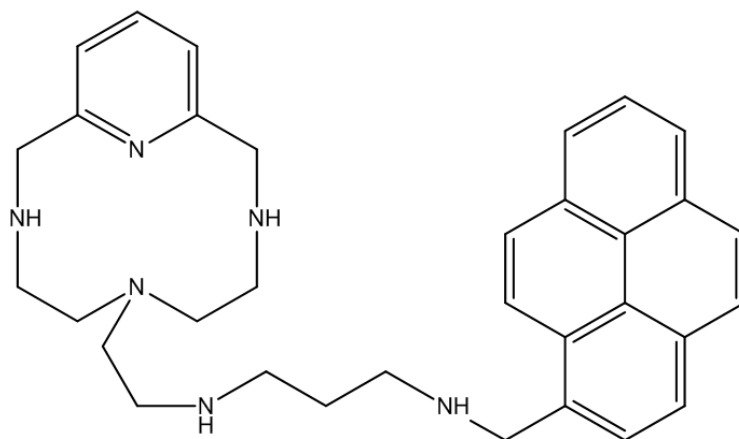
(IX)sc,



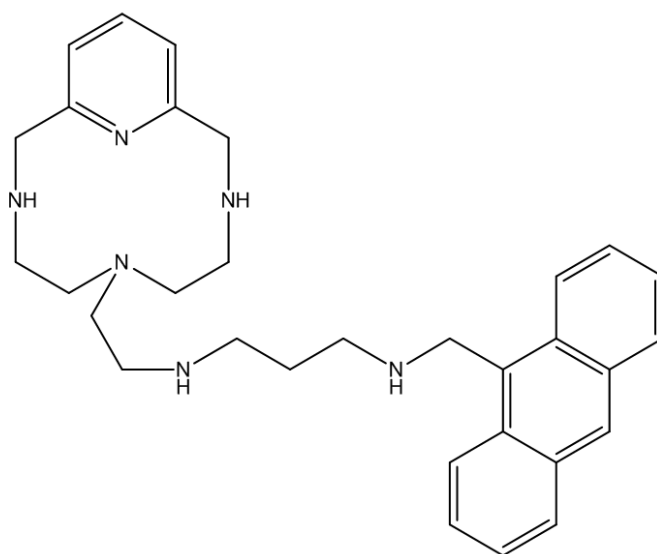
(X)sc,



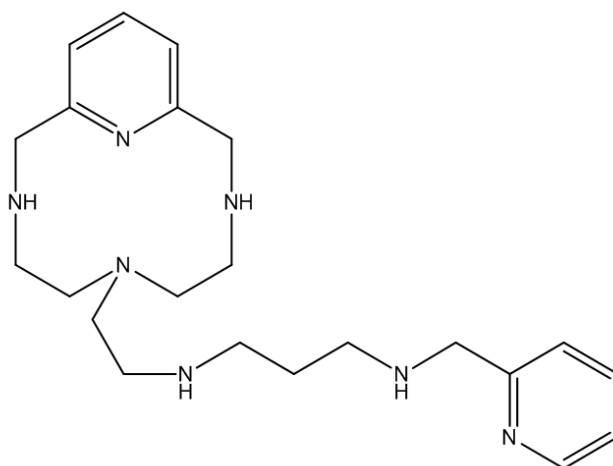
(XI)sc,



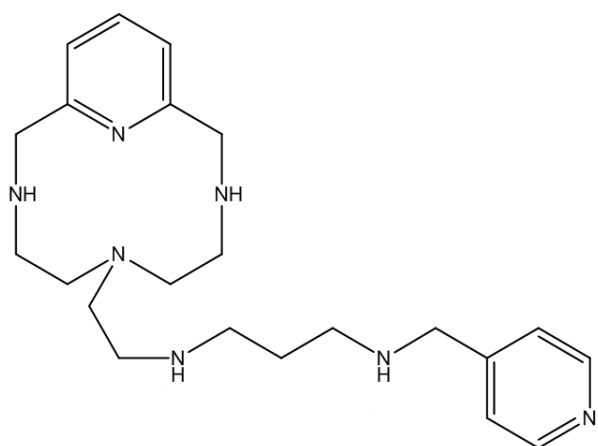
(XII)sc,



(XIII)sc,

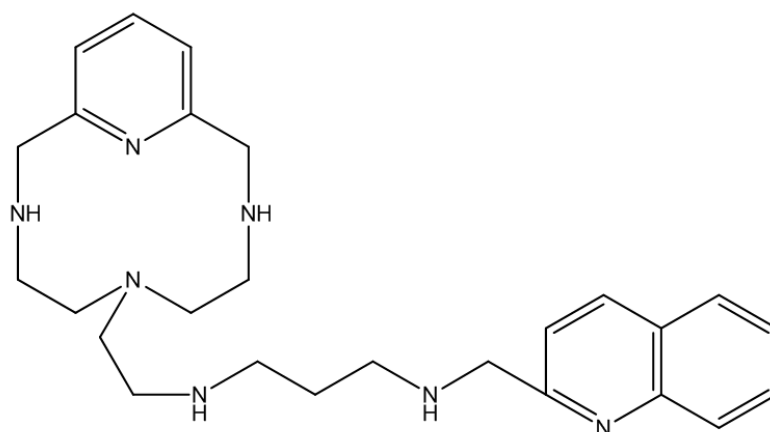


(XIV)sc,

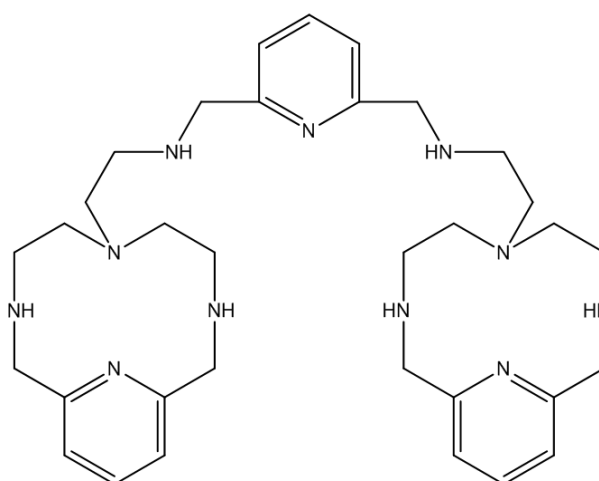


(XV)sc,

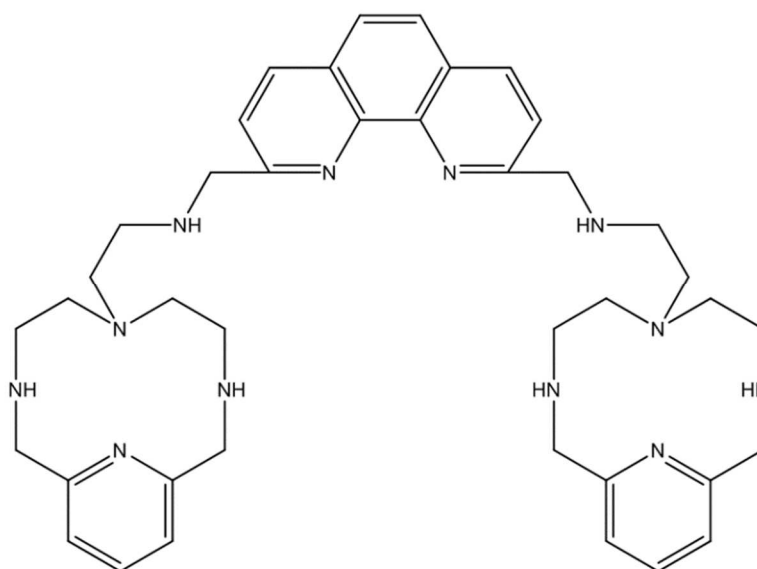




(XVI)sc,



(XVII)sc,

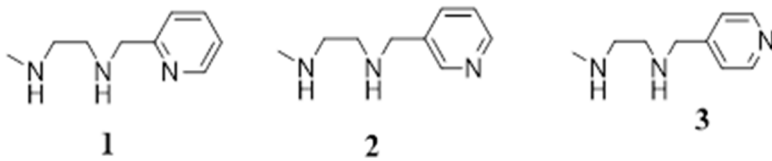


(XVIII)sc,

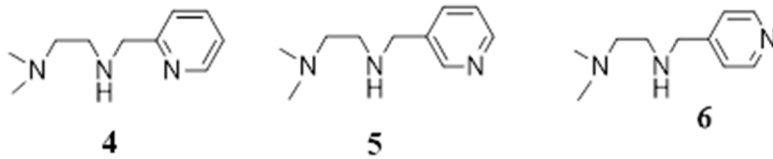
- v. un compuesto seleccionado del grupo de 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dimetilo, 3,5-bis(metoxicarbonil)pirazolato sódico, 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dietilo, 3,5-bis(etoxicarbonil)pirazolato sódico, 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dipropilo, 3,5-bis(propoxicarbonil)pirazolato sódico, 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de diisopropilo y 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dibutilo, o combinaciones de los mismos.

24. El kit de partes para su uso según la reivindicación 22 o 23, donde el compuesto o compuestos de la Fórmula (I) se selecciona del grupo de compuestos de fórmulas:

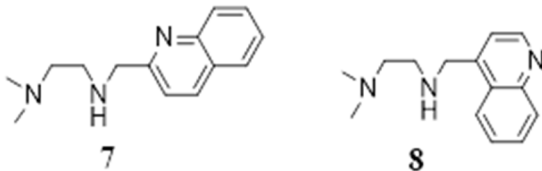
10



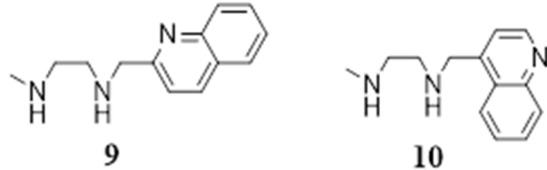
15



20



25



y los solvatos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, o combinaciones de los mismos.

30

25. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, una preparación farmacéutica o veterinaria para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 o un kit de partes para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en donde la composición, la preparación o el kit de partes comprende un compuesto que se selecciona del grupo de los compuestos 2 (1-{3-piridil)-2,5-

35

diazahehexano), 4 (1-(2-piridil)-5-metil-2,5-diazahehexano) y 5 (1-{3-piridil}-5-metil-2,5-diazahehexano) y los solvatos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

- 5 26. Una composición para su uso según la reivindicación 25, una preparación farmacéutica o veterinaria para su uso según la reivindicación 25 o un kit de partes de para su uso según la reivindicación 25, en donde la leishmaniasis está causada por una especie del género *Leishmania* que se selecciona entre *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*/*L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. linderbergi*, *L. infantum* y *L. donovani*.
- 10 27. Una composición para su uso según la reivindicación 26, una preparación farmacéutica o veterinaria para su uso según la reivindicación 26 o un kit de partes para su uso según la reivindicación 26, en donde la leishmaniasis está causada por una especie del género *Leishmania* que se selecciona entre *L. braziliensis*, *L. infantum* y *L. donovani*.
- 15 28. Una composición para su uso según la reivindicación 25, una preparación farmacéutica o veterinaria para su uso según la reivindicación 25 o un kit de partes para su uso según la reivindicación 257, en donde la leishmaniasis se selecciona del grupo de leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea o leishmaniasis visceral.
- 20 29. Una composición para su uso según la reivindicación 25, una preparación farmacéutica o veterinaria para su uso según la reivindicación 25 o un kit de partes de para su uso según la reivindicación 25, en donde el uso es en el tratamiento de la leishmaniasis en un mamífero que se selecciona del grupo del perro, lobo, zorro, gato, caballo, mula, burro, oveja, cabra, vaca y ser humano.
- 25 30. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 25 o 26, una preparación farmacéutica o veterinaria para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 25 o 26 o un kit de partes para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 25 o 26, en donde el uso es en el tratamiento de la leishmaniasis en un perro.
- 30 31. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 25 o 30, una preparación farmacéutica o veterinaria para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30 o un kit de partes para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, en donde el uso es en el tratamiento de la leishmaniasis en un ser humano.

35

32. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, una preparación farmacéutica o veterinaria para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 o un kit de partes para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en donde su uso es en el tratamiento de una enfermedad causada por un parásito del género *Leishmania* en un ser humano.
- 5

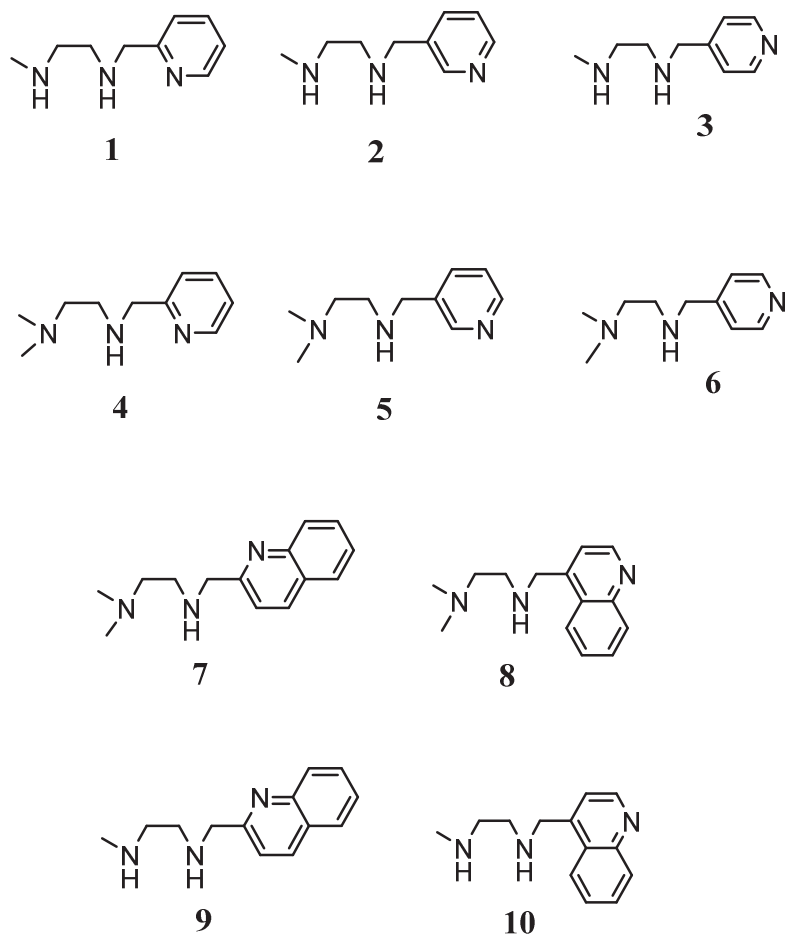


Fig. 1

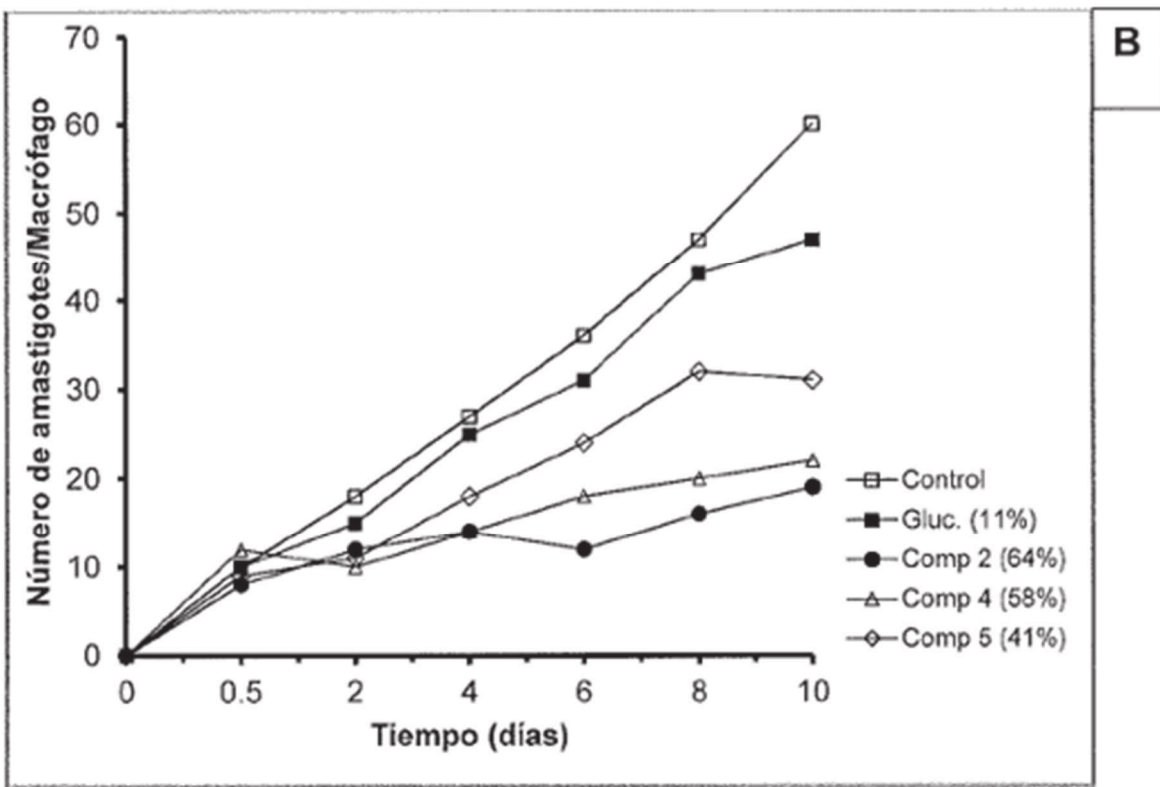
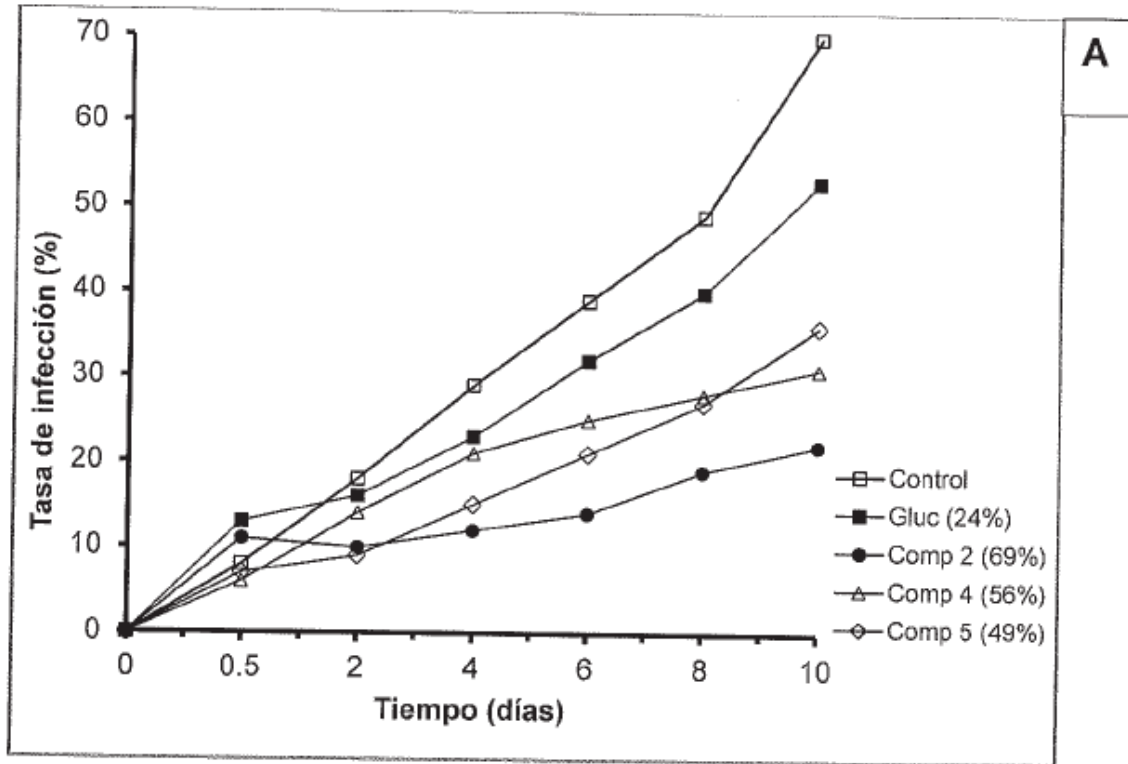


Fig. 2

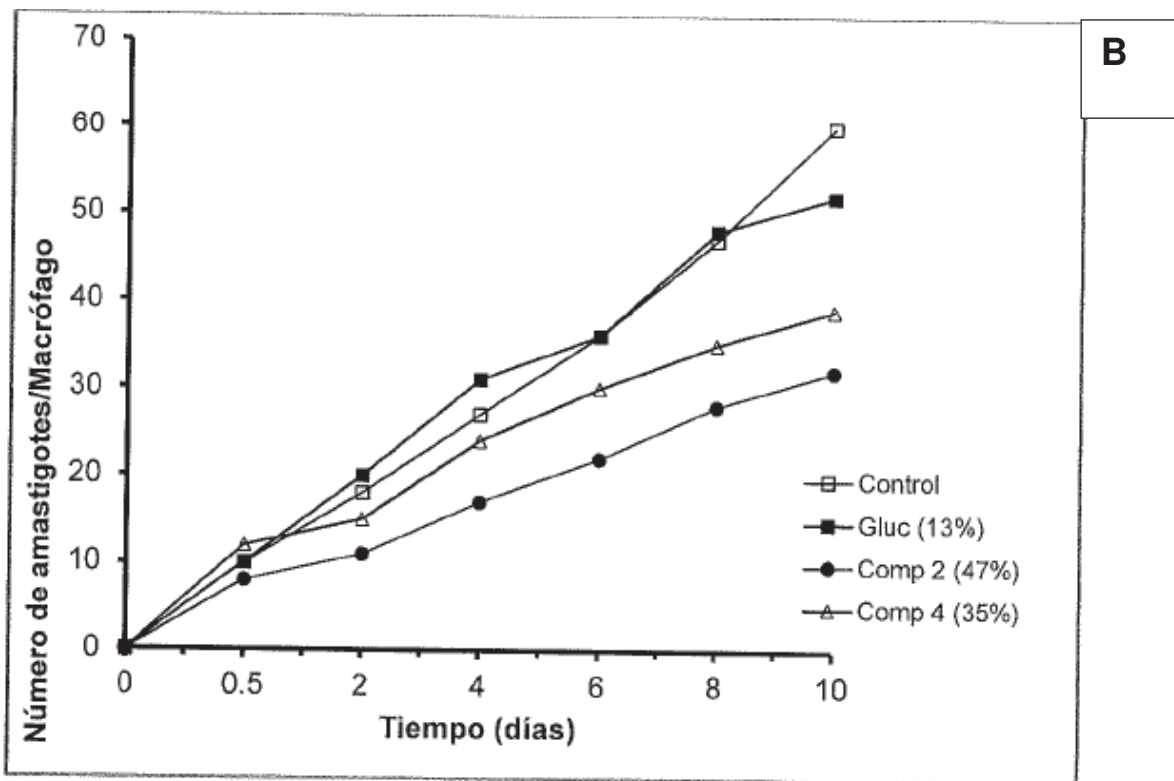
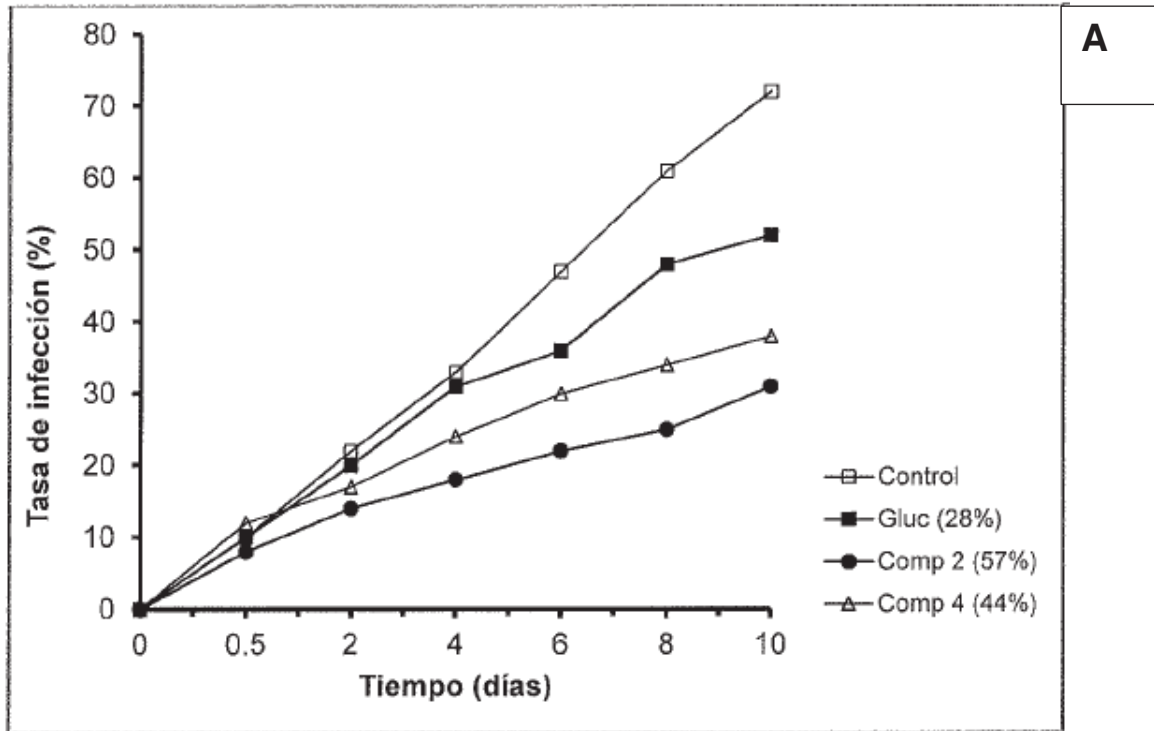


Fig. 3

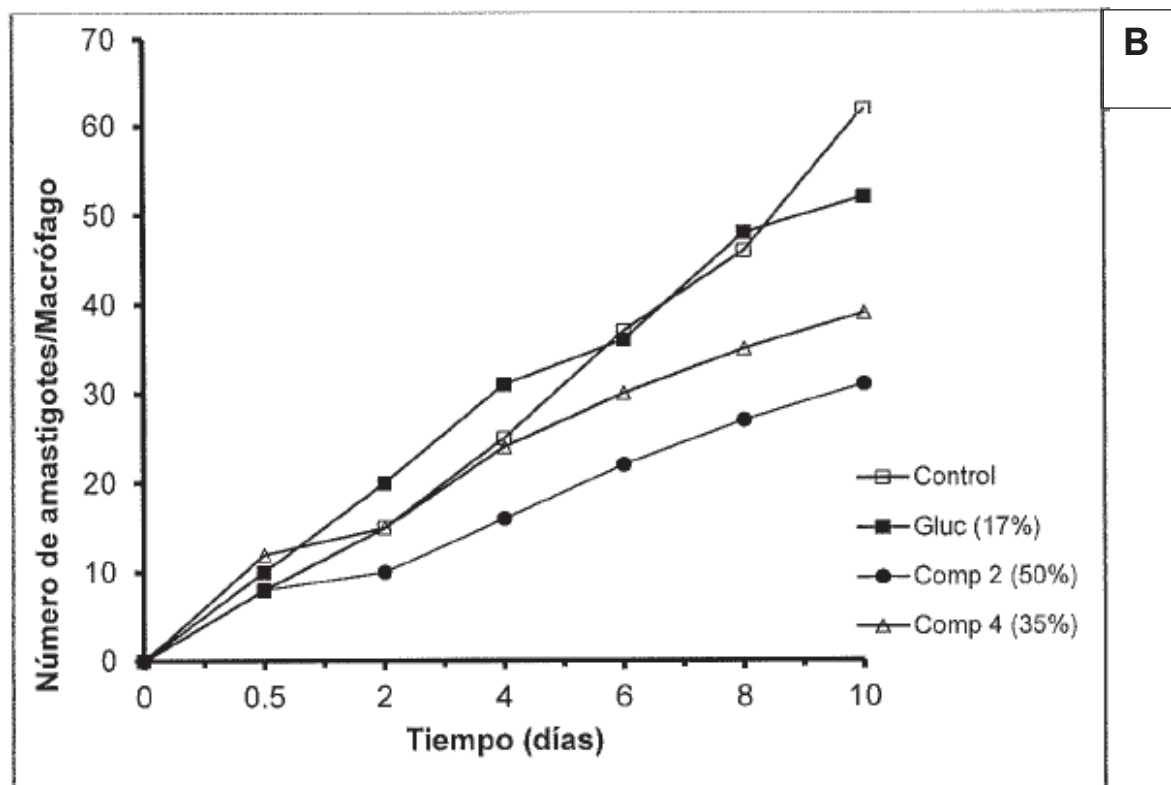
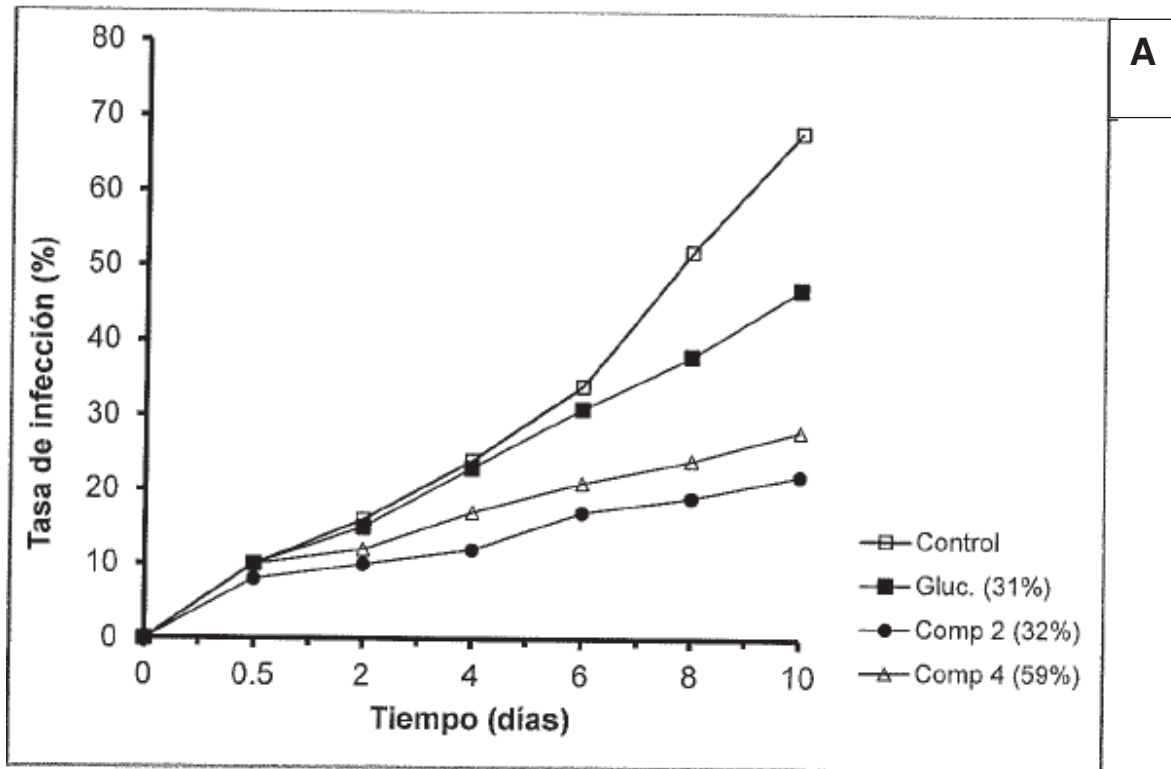


Fig. 4



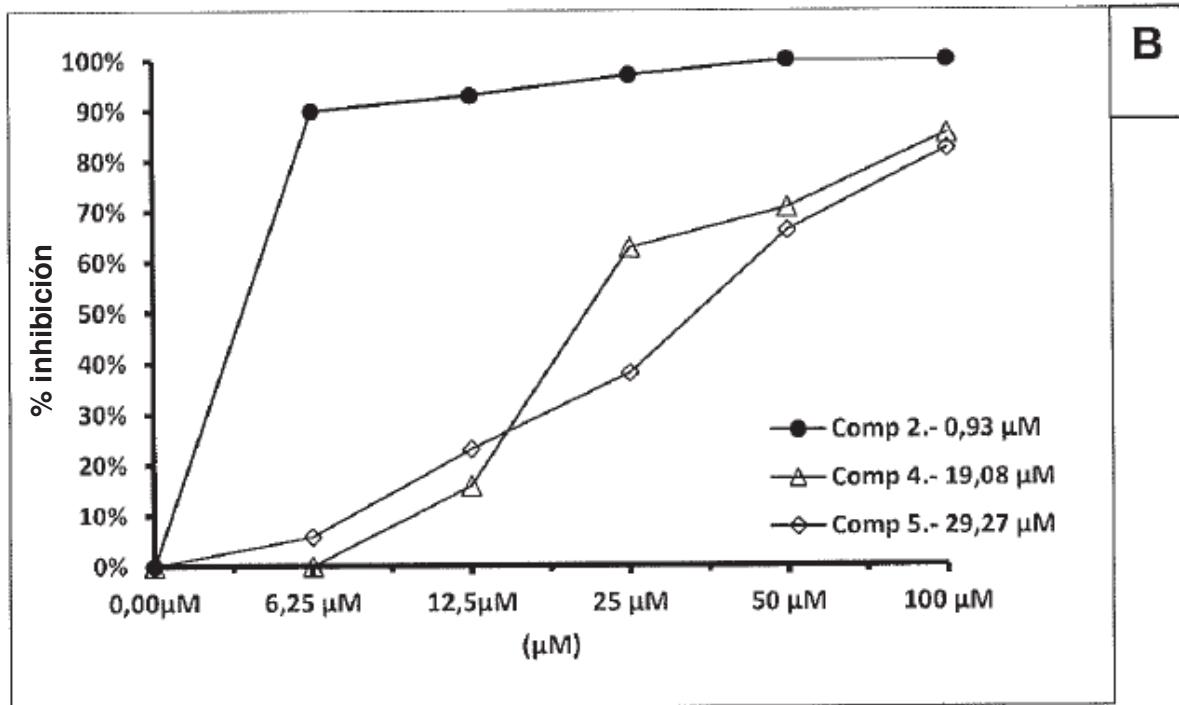
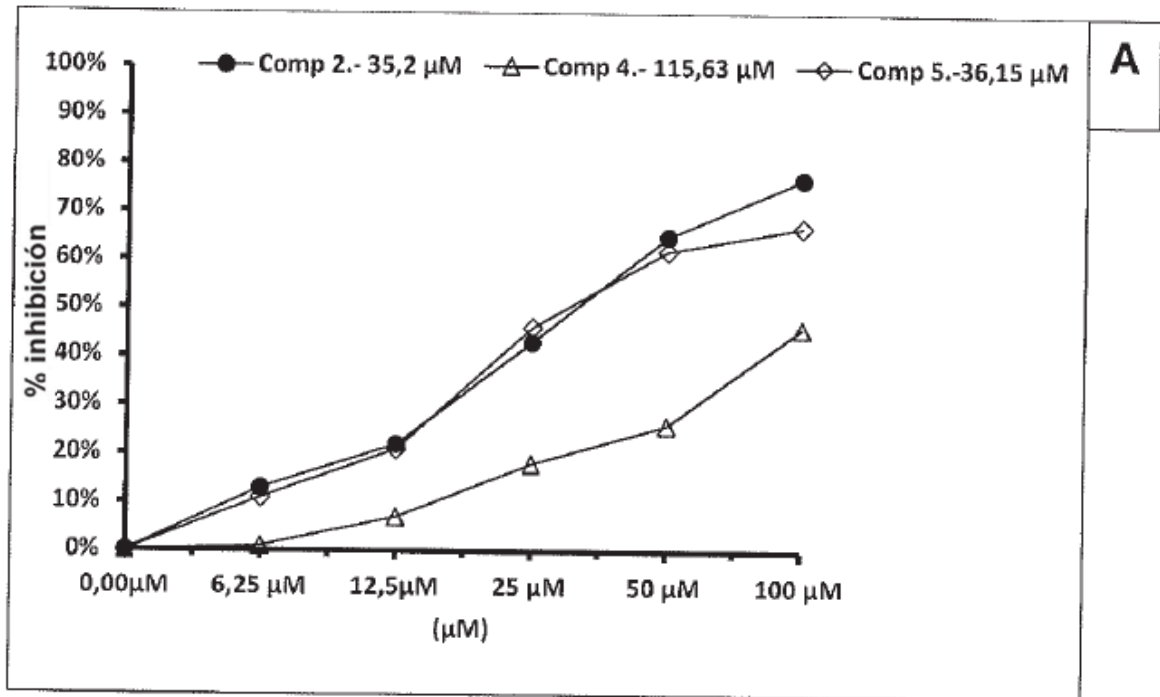


Fig. 5

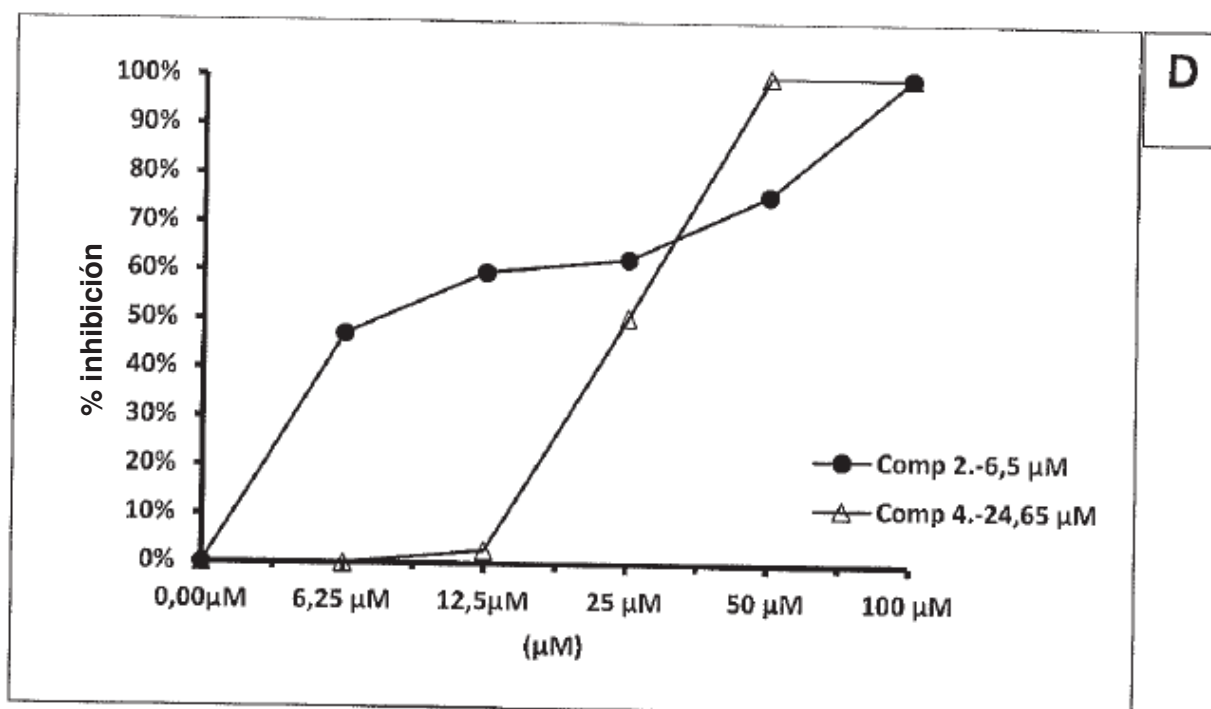
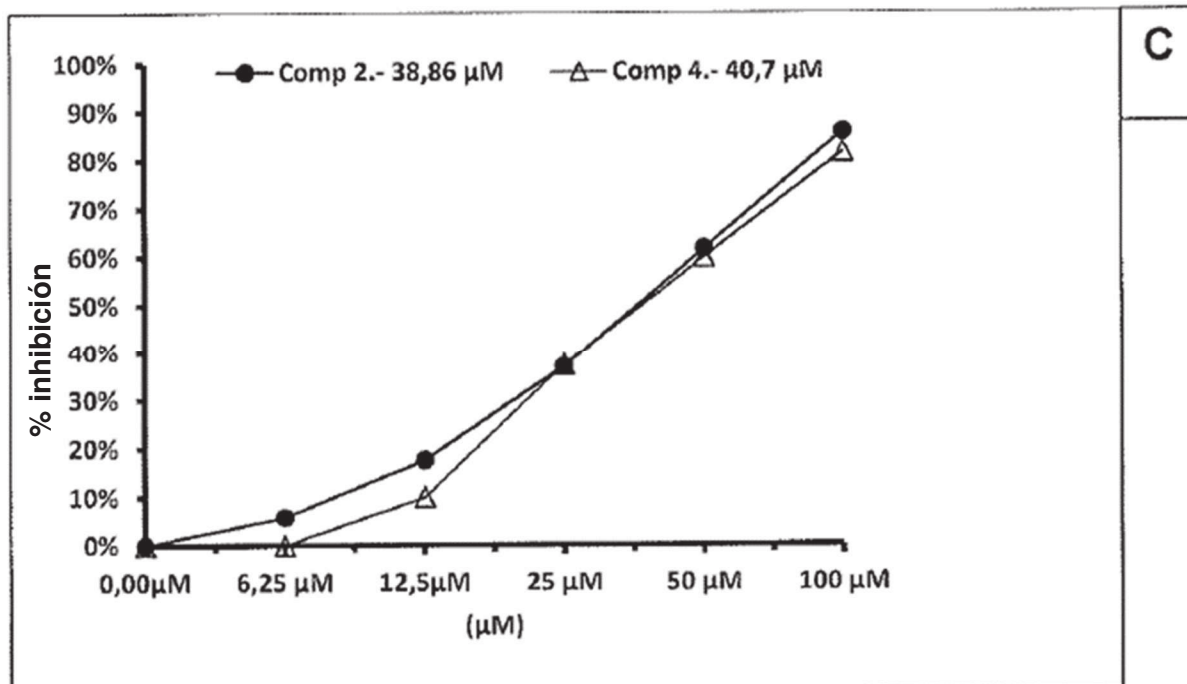


Fig. 5 (cont.)

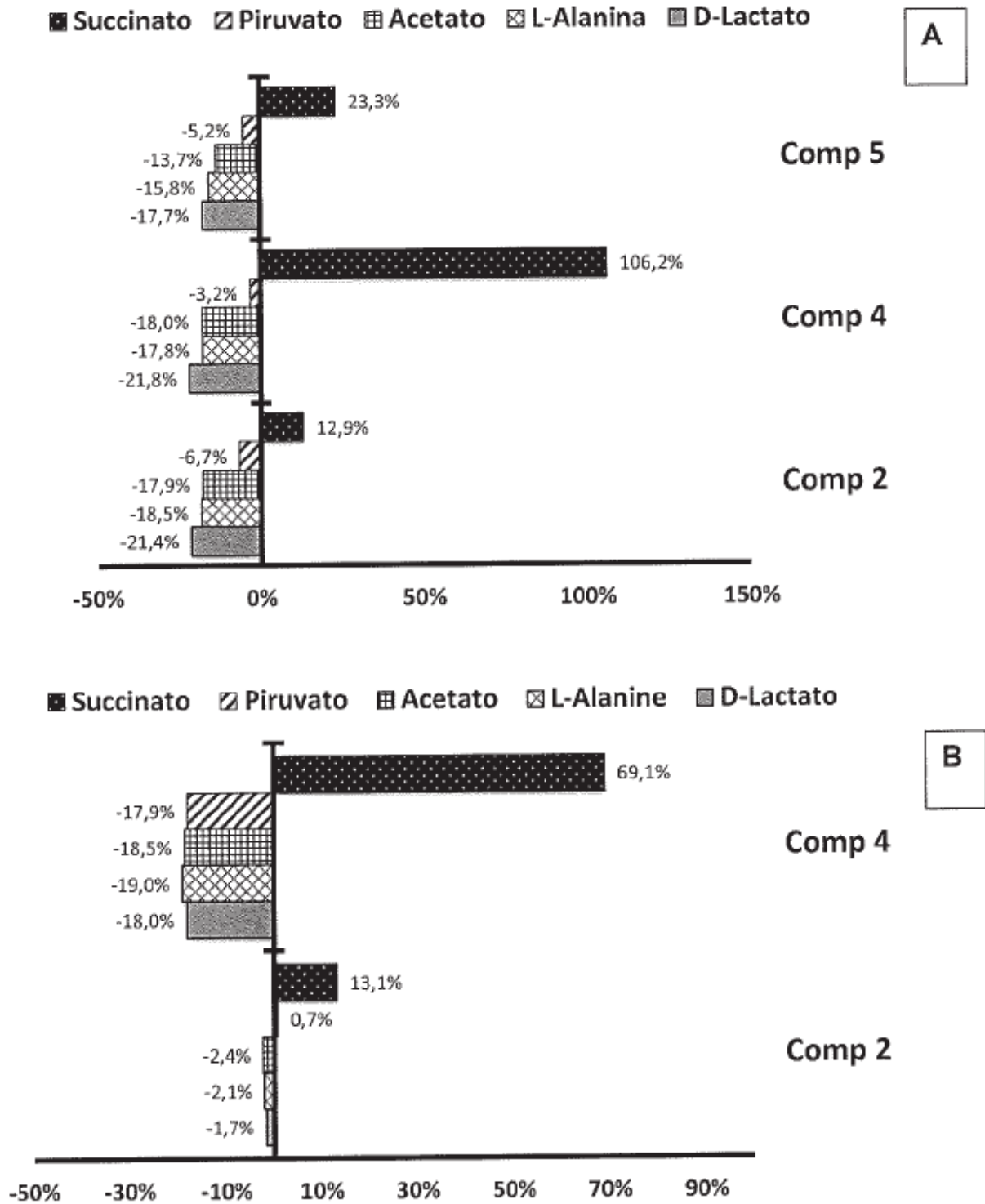


Fig. 6

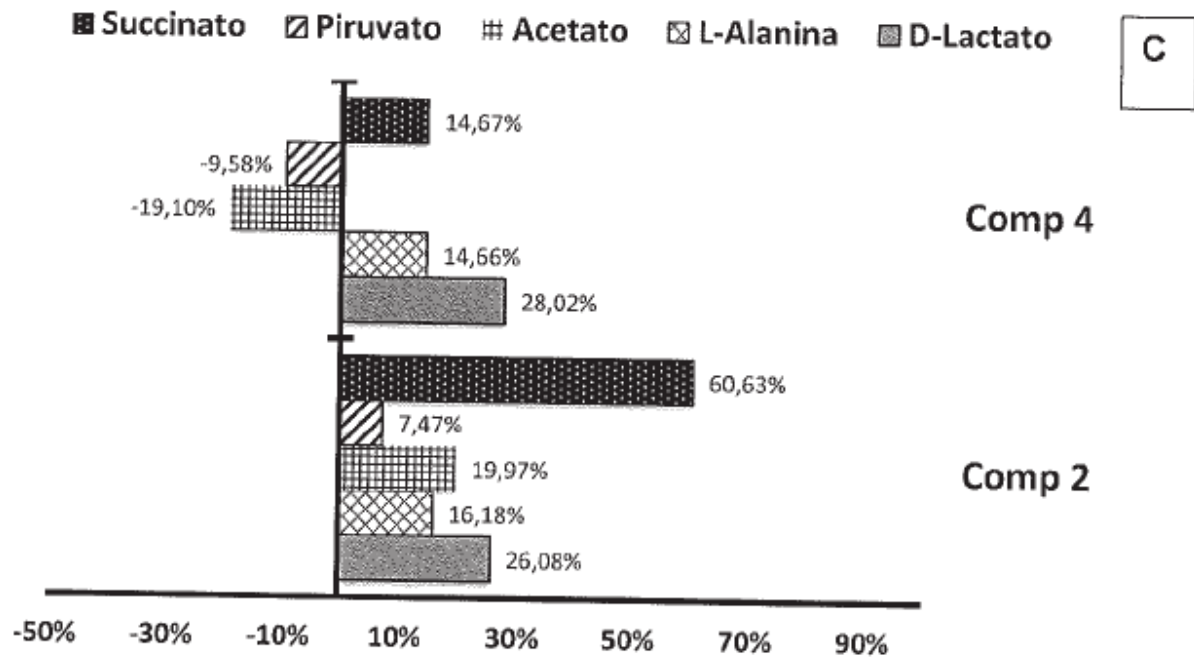


Fig. 6 (cont.)

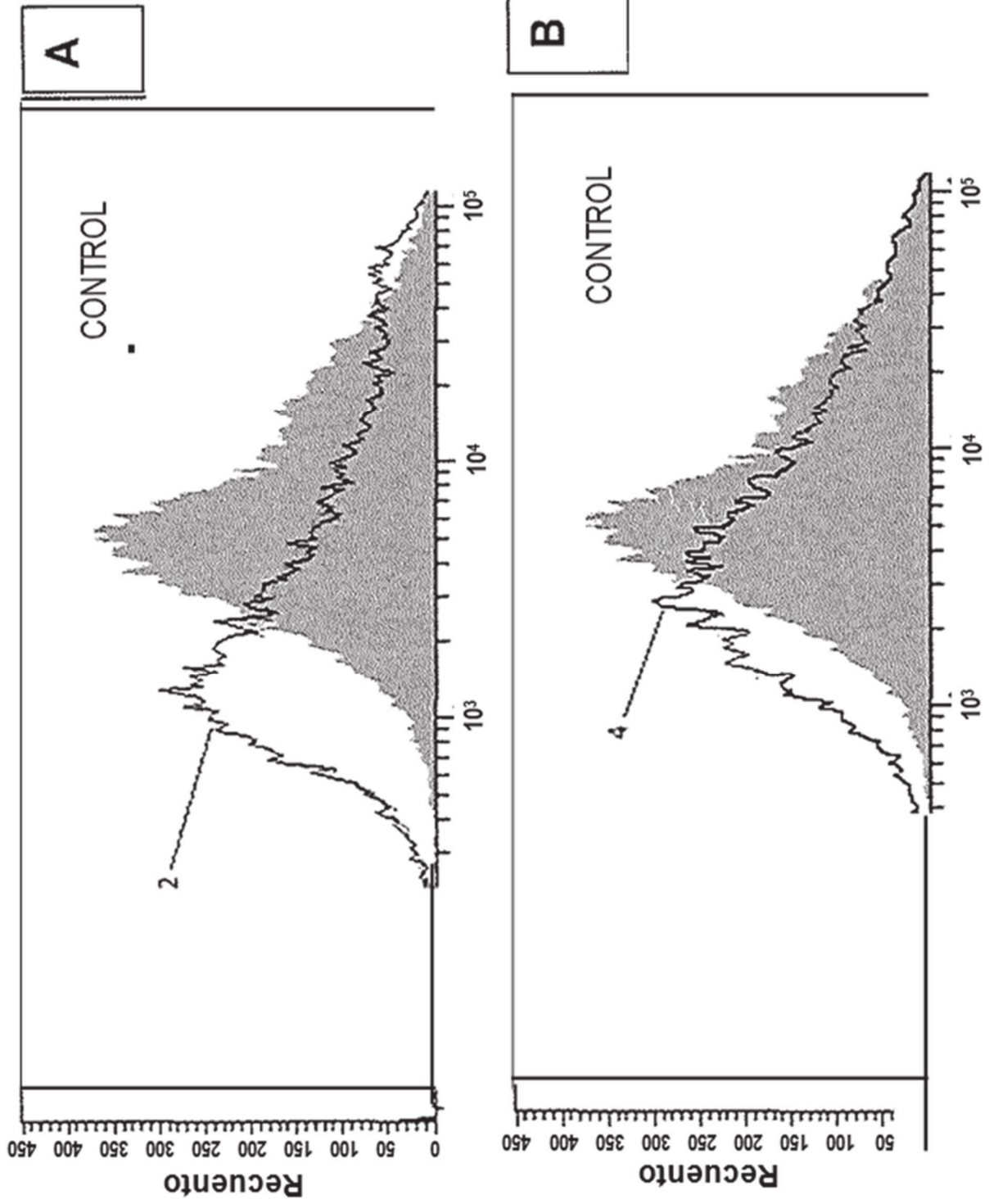


Fig. 7