

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
30 de abril de 2015 (30.04.2015)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/059337 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C07D 401/12 (2006.01) **C07D 401/06** (2006.01)
A61K 31/444 (2006.01) **A61K 31/395** (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070800

(22) Fecha de presentación internacional:

23 de octubre de 2014 (23.10.2014)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201331558
23 de octubre de 2013 (23.10.2013) ES
P201331559
23 de octubre de 2013 (23.10.2013) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [ES/ES]; Hospital Real, Avenida del Hospicio s/n, E-18071 Granada (ES). **UNIVERSITAT DE GIRONA** [ES/ES]; Plaça Sant Domènec, 3, E-17071 Girona (ES).

(72) Inventores: **RIBAS SALAMAÑA, Xavi**; Universitat de Girona, Plaça Sant Domenec 3, E-17071 Girona (ES). **COSTAS SALGUEIRO, Miquel**; Universitat de Girona, Plaça Sant Domenec 3, E-17071 Girona (ES). **CUSSÓ FOREST, Olaf**; Universitat de Girona, Plaça Sant Domenec 3, E-17071 Girona (ES). **COMPANY CASADEVALL, Anna**; Universitat de Girona, Plaça Sant Domenec 3, E-17071 Girona (ES). **LLORET FILLOL, Julio**; Universitat de Girona, Plaça Sant Domenec 3, E-17071 Girona (ES). **SÁNCHEZ MORENO, Manuel**; OTRI - Universidad de Granada, Centro de Transferencia Tecnológica, 3ª planta, Gran Vía de Colón, 48, E-18071 Granada (ES). **MARÍN SÁNCHEZ, Clotilde**; OTRI -

Universidad de Granada, Centro de Transferencia Tecnológica, 3ª planta, Gran Vía de Colón, 48, E-18071 Granada (ES). **ROSALES LOMBARDO, María José**; OTRI - Universidad de Granada, Centro de Transferencia Tecnológica, 3ª planta, Gran Vía de Colón, 48, E-18071 Granada (ES). **OLMO ARÉVALO, Francisco**; OTRI - Universidad de Granada, Centro de Transferencia Tecnológica, 3ª planta, Gran Vía de Colón, 48, E-18071 Granada (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: POLYAMINE COMPOUNDS AND METAL COMPLEXES COMPRISING SAME FOR THE USE THEREOF AS ANTIPARASITIC AGENTS

(54) Título : COMPUESTOS POLIAMÍNICOS Y COMPLEJOS METÁLICOS QUE LOS COMPRENEN PARA SU USO COMO AGENTES ANTIPARASITARIOS

(57) Abstract: The invention relates to the use of polyamine-based compounds or the metal complexes thereof for the prevention and/or treatment of diseases of parasitic origin such as American trypanosomiasis also known as Chagas disease, or Leishmaniasis.

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



WO 2015/059337 A1

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

DESCRIPCIÓN

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

ESTADO DE LA TÉCNICA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

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

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

Definiciones

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

tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico arilo, hidroxilo, amino, amido, éster, carboxílico, éter, tiol, acilamino o carboxamido, que a su vez pueden opcionalmente estar sustituidos. Preferiblemente el grupo alquilo no está sustituido.

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

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

Por "heteroarilo" se refiere, en la presente invención, a anillos heterocíclicos aromáticos (mono- o bicíclicos) que tienen entre 5 y 10 miembros, entre ellos átomos de carbono y al menos entre 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre N, O y S. Preferiblemente el grupo heteroarilo tiene entre 5 y 6 miembros. Los radicales heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como grupos alquilo, halógeno, hidroxilo, alcóxido, tiol, nitro, amino, acilamino, ciano, carboxilato, carboxamida, carboxiéster o combinaciones de estos grupos. Preferiblemente son anillos piridina, que en los complejos están unidos a los metales por el átomo de N.

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

Por "enfermedad parasitaria", se entiende una enfermedad infecciosa causada por protozoos, vermes (cestodos, trematodos, nematodos) o artrópodos. En particular, en la presente invención, los parásitos son protozoos pertenecientes a los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, por tanto, se puede decir que los compuestos son antiprotozoarios. Especies de las mismas, pueden ser, pero sin limitarse,

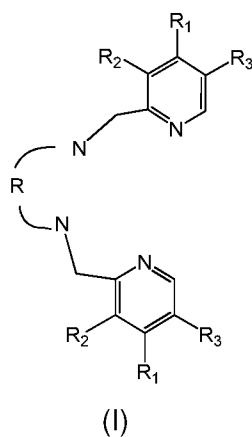
Trypanosoma cruzi, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania donovani*, entre otras conocidas por un experto en la materia.

Las enfermedades parasitarias a tratar podrían ser leishmaniasis o tripanosomiasis. La "Leishmaniasis" es una enfermedad causada por un protozoo del género *Leishmania* y transmitido, principalmente por dípteros conocidos como "sand fly", moscas de la arena o jejenes. Esta enfermedad se produce en humanos y animales vertebrados, como pueden ser marsupiales, cánidos, roedores y primates. Las "Tripanosomiasis" son enfermedades producidas en humanos o animales vertebrados que son causadas por parásitos protozoarios del género *Trypanosoma*, entre ellas se puede encontrar la tripanosomiasis humana africana, también conocida como enfermedad del sueño, la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas o la tripanosomiasis en animales o Nagana.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

Compuestos de fórmula general (I)

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

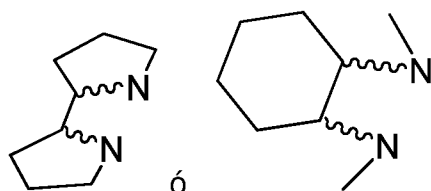


donde: R_1 , R_2 y R_3 son iguales o diferentes y representan un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C_1 - C_5), $-NR'R''$, halógeno, alcoxilo (C_1 - C_5) y $-COOR'''$; o

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

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

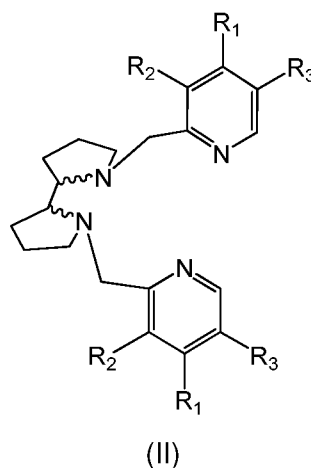
y N-R-N representa los grupos:



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

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

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



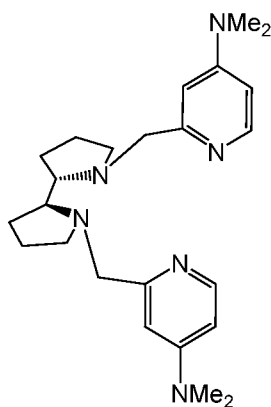
En una realización más preferida del compuesto de fórmula (II) R_1 representa un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno, $-N(CH_3)_2$, Cl, $-OCH_3$ y $-COOCH_2CH_3$. En una realización más preferida, R_2 y R_3 , son iguales o diferentes y

representan un hidrógeno o un grupo metilo, aún más preferiblemente R_2 y R_3 son iguales.

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

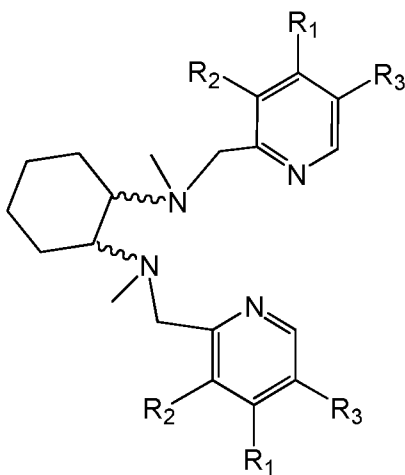
En estos compuestos de fórmula (II) se incluyen tanto las conformaciones S,S' como R,R'.

En una realización preferida el compuesto de fórmula (II) es 2,2'-(2S,2'S)-2,2'-bipirrolidina-1,1'-diilbis(metileno)bis(N,N-dimetilpiridina-4-amina): también denominado (S,S')-(Me₂N-Pyr)₂-bpbp ó X15:



(X15)

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



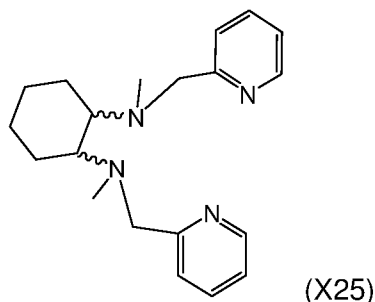
(III)

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

En una realización más preferida del compuesto es de fórmula (III), R_1 , R_2 y R_3 son hidrógeno; o R_1 es metoxilo y R_2 y R_3 metilo.

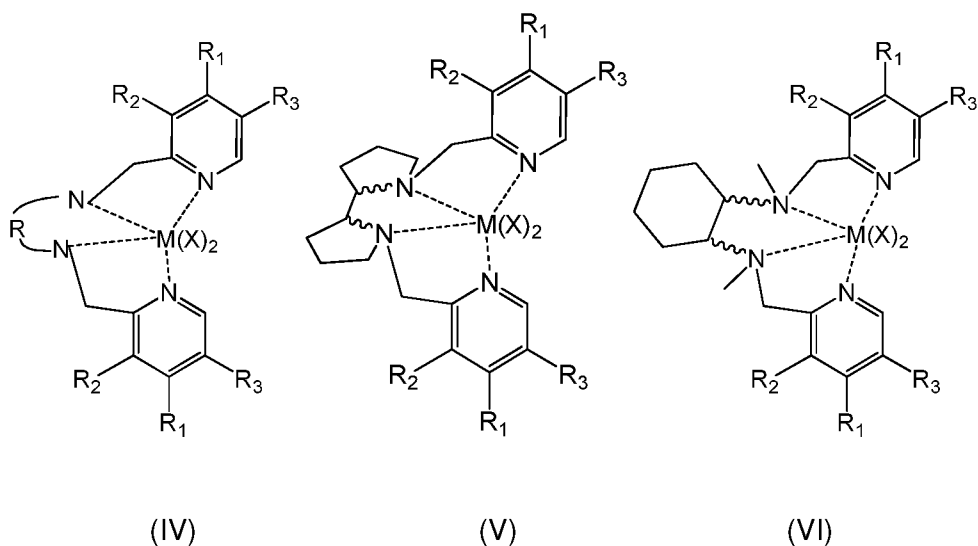
En estos compuestos de fórmula (III) se incluyen tanto las conformaciones S,S' como R,R'.

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



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

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

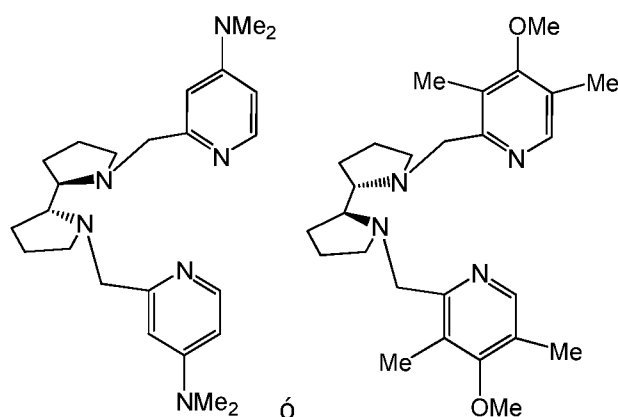


Donde: R , R_1 , R_2 y R_3 se han definido anteriormente; M es un metal divalente; y X es un contraanión monovalente.

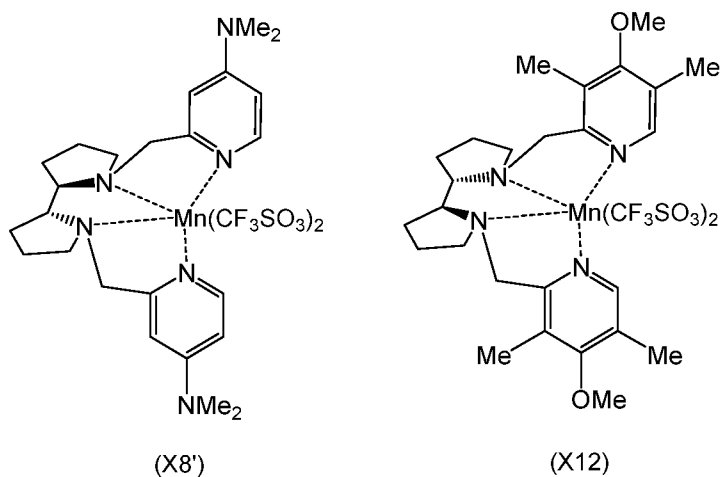
El contraanión (X) es cualquier anión farmacéuticamente aceptable conocido por un experto en la materia y preferiblemente se puede seleccionar de la lista que comprende $CF_3SO_3^-$, Cl^- , Br^- , ClO_4^- , PF_6^- y BF_4^- , más preferiblemente el contraanión es $CF_3SO_3^-$.

En una realización preferida de los complejos que comprenden el ligando tetradentado de fórmula (II) como se ha definido anteriormente, R_1 representa un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno, $-N(CH_3)_2$, Cl , $-OCH_3$ y $-COOCH_2CH_3$, más preferiblemente, R_2 y R_3 , son iguales o diferentes y representan un hidrógeno o un grupo metilo, aún más preferiblemente R_2 y R_3 son iguales. Aún más preferiblemente el compuesto de fórmula (II), R_1 es $-N(CH_3)_2$ y R_2 y R_3 son hidrógeno; o R_1 es metoxilo y R_2 y R_3 metilo. En una realización más preferida el complejo es de fórmula (V) y se incluyen tanto las conformaciones S,S' como R,R' .

En una realización preferida más preferida, el complejo comprende como ligando los compuesto 2,2'-(2R,2'R)-2,2'-bipirrolidina-1,1'-diilbis(metileno)bis(N,N-dimetilpiridina-4-amina): también denominado $(R,R')-(Me_2N-Pyr)_2-bpbbp$, o (2S,2'S)-1,1'-bis((4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil)-2,2'-bipirrolidina, también denominado $S,S'-(DMM-Py)_2(bpbbp)$:



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



(X8') es de fórmula $[\{2,2'-(2R,2'R)-2,2'-\text{bipirrolidina-1,1'-diilbis}(\text{metileno})\text{bis}(\text{N,N-dimetilpiridina-4-amina})\}\text{Mn}^{\text{II}}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ o también llamado $[\{R,R'-(\text{Me}_2\text{N-Py})_2(\text{bpbp})\}\text{Mn}^{\text{II}}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$; y

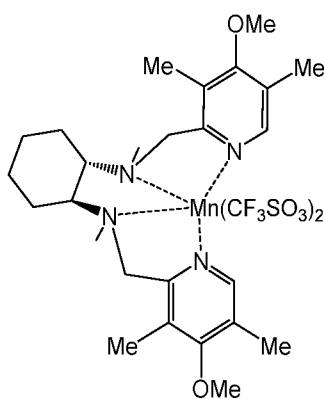
(X12) es de fórmula $[\{(2S,2'S)-1,1'-\text{bis}((4\text{-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il})\text{metil})-2,2'-\text{bipirrolidina}\}\text{Mn}^{\text{II}}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ o también llamado $[\{S,S'-(\text{DMM-Py})_2(\text{bpbp})\}\text{Mn}^{\text{II}}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$.

En otra realización preferida de los complejos que comprenden el ligando tetradentado de fórmula (III) como se ha definido anteriormente, R_1 representa un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, Cl, $-\text{OCH}_3$ y $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, más preferiblemente, R_2 y R_3 , son iguales o diferentes y representan un hidrógeno o un grupo metilo, aún más preferiblemente R_2 y R_3 son iguales. Aún

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

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

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

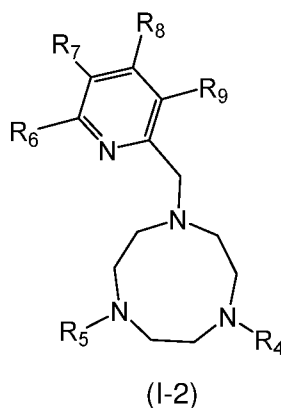


(X13)

(X13) es de fórmula $[(\text{(1R,2R)-N1,N2-bis}((4\text{-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil})\text{-N1,N2-dimetilciclohexano-1,2-diamina})\text{Mn}^{\text{II}}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ o también llamada $[\text{R,R'-(DMM-Py)}_2(\text{bpmcn})]\text{Mn}^{\text{II}}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$.

Uso de compuestos de Fórmula general (I-2)

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto poliamínico de fórmula general (I-2):



donde: R_4 y R_5 son iguales o diferentes, y representan un hidrógeno, un grupo alquilo (C_1 - C_5) o un grupo $-CH_2$ -Cy;

R_6 representa un hidrógeno, un halógeno o un grupo alquilo (C_1 - C_5);

R_7 y R_9 son iguales o diferentes, y representan un hidrógeno o un grupo alquilo (C_1 - C_5);

R_8 representa un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno, $-NR'R''$, halógeno, alcoxilo (C_1 - C_5), $-NO_2$ y $-COOR'''$;

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

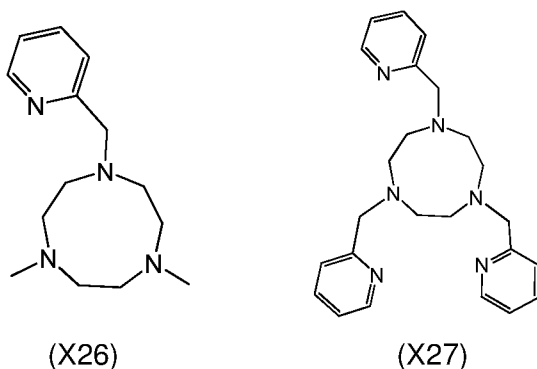
Cy representa un heteroarilo,

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

En una realización preferida del compuesto de fórmula (I-2), R_4 y R_5 son iguales o diferentes, y representan un hidrógeno, un metilo o un grupo $-CH_2$ -Cy; donde Cy es piridina, más preferiblemente R_4 y R_5 son iguales. En una realización más preferida R_6 representa hidrógeno, Cl, F o metilo. En una realización aún más preferida, R_7 y R_9 son iguales o diferentes, y representan hidrógeno o metilo; más preferiblemente R_7 y R_9 son iguales. En una realización más preferida, R_8 representa un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno, $-N(CH_3)_2$, Cl, $-OCH_3$, NO_2 y $-COOCH_2CH_3$.

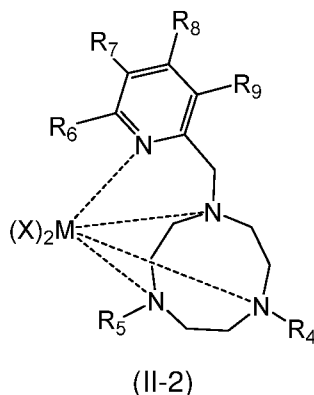
En otra realización preferida del compuesto de fórmula (I-2), R_4 y R_5 son iguales y representan un metilo o un grupo $-CH_2$ -piridina; y R_6 , R_7 , R_8 y R_9 son hidrógeno.

En otra realización más preferida el compuesto de fórmula (I-2) se selecciona de entre 1,4-dimetil-7-(piridin-2-ilmetil)-1,4,7-triazonano, también denominado PyTACN (X26); y 1,4,7-tris(piridin-2-ilmetil)-1,4,7-triazonano, también denominado Py3TACN (X27):



Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un complejo metálico que comprende un ligando tetradentado que consiste en un compuesto de fórmula general (I-2), según se han descrito anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades parasitarias.

En una realización preferida el complejo metálico es de fórmula general (II-2):

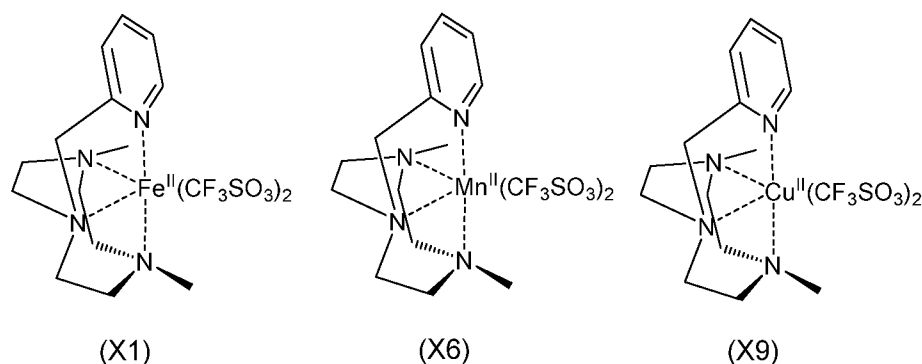


Donde: R₄, R₅, R₆, R₇, R₈ y R₉ se han definido anteriormente; M es un metal divalente; y X es un contraanión monovalente.

El contraanión (X) es cualquier anión farmacéuticamente aceptable conocido por un experto en la materia y preferiblemente se puede seleccionar de la lista que comprende CF₃SO₃⁻, Cl⁻, Br⁻, ClO₄⁻, PF₆⁻ y BF₄⁻, más preferiblemente el contraanión es CF₃SO₃⁻.

En otra realización preferida de los complejos que comprenden el ligando tetradentado de fórmula (I-2) como se ha definido anteriormente, preferiblemente R_4 y R_5 son iguales o diferentes, y representan un hidrógeno, un metilo o un grupo $-\text{CH}_2\text{-Cy}$; donde Cy es piridina, más preferiblemente R_4 y R_5 son iguales. En una realización más preferida R_6 representa hidrógeno, Cl, F o metilo. En una realización aún más preferida, donde R_7 y R_9 son iguales o diferentes, y representan hidrógeno o metilo; más preferiblemente R_7 y R_9 son iguales. En una realización más preferida, R_8 representa un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, Cl, $-\text{OCH}_3$, NO_2 y $-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$. En otra realización preferida del compuesto de fórmula (I-2), R_4 y R_5 son iguales y representan un metilo o un grupo $-\text{CH}_2\text{-piridina}$; y R_6 , R_7 , R_8 y R_9 son hidrógeno. En otra realización más preferida el compuesto de fórmula (I-2) se selecciona de entre 1,4-dimetil-7-(piridin-2-ilmetil)-1,4,7-triazonano, también denominado PyTACN y 1,4,7-tris(piridin-2-ilmetil)-1,4,7-triazonano, también denominado Py3TACN (X27), más preferiblemente es el compuesto PyTACN.

En una realización más preferida el metal es divalente y el complejo es de fórmula (II-2), más preferiblemente el metal es Mn, Fe o Cu y aún más preferiblemente el complejo es X1, X6 o X9:



X1 es de fórmula $[\{1,4\text{-dimetil-7-(piridin-2-ilmetil)-1,4,7-triazonano}\}\text{Fe}^{\text{II}}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ o también denominados $[\{\text{PyTACN}\}\text{Fe}^{\text{II}}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$;

X6 es de fórmula $[\{1,4\text{-dimetil-7-(piridin-2-ilmetil)-1,4,7-triazonano}\}\text{Mn}^{\text{II}}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ o también denominado $[\{\text{PyTACN}\}\text{Mn}^{\text{II}}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$; y

X9 es de fórmula $[\{1,4\text{-dimetil-7-(piridin-2-ilmetil)-1,4,7-triazonano}\}\text{Cu}^{\text{II}}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ o también denominado $[\{\text{PyTACN}\}\text{Cu}^{\text{II}}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$.

Composiciones farmacéuticas y medicamentos

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

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

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I-2) o sus complejos de fórmula general (II-2), descritos anteriormente, junto con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente esta composición puede incluir otro principio activo, por ejemplo otro compuesto antiparasitario.

Un aspecto más de la presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula general (I-2) o sus complejos de fórmula general (II-2), descritos anteriormente, para la elaboración de un medicamento.

Complejos objeto de la invención

Otro aspecto de la presente invención se refiere al complejo (X13) $[(1R,2R)\text{-}N1,N2\text{-bis}((4\text{-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil})\text{-}N1,N2\text{-dimetilciclohexano-1,2-diamina}]\text{Mn}^{II}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere al complejo (X9) $[1,4\text{-dimetil-7-(piridin-2-ilmetil)-1,4,7-triazonano}]\text{Cu}^{II}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$.

Uso preferido de los compuestos y/o complejos descritos

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

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Síntesis de los compuestos poliamínicos y complejos metálicos (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI)

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

Síntesis de los compuestos poliamínicos y complejos metálicos (I-2) y (II-2)

La síntesis de los compuestos poliamínicos y de sus complejos metálicos (familias (I-2) y (II-2)) ha sido descrita anteriormente en distintos artículos científicos como por ejemplo (cf. I. Prat et al., Chem. Eur. J. 2013, 19, 6724-6738; I. Prat et al., Adv. Synth. Catal. 2013, 355, 947-956; A. Company et al., Chem. Eur. J. 2008, 14, 5727-5731; Gómez et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48, 5720-5723; Flassbeck et al., Z. Anorg. Allg. Chem. 1992, 608, 60-68; V. Stavila et al., New J. Chem., 2008, 32, 428-435)

ENSAYOS BIOLOGICOS

CULTIVO PARASITARIO (PARA *Leishmania* spp)

Formas promastigotas de las especies *Leishmania infantum* (MCAN/ES/2001/UCM-10) y *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/ M2904), fueron cultivadas *in vitro* en esterilidad, a 28° C en medio de cultivo monofásico MTL (Medium Trypanosomes Liquid) enriquecido con el 10 % (v/v) de suero bovino fetal inactivado frente al complemento (SBF-I) a 56°C/30 minutos. El inóculo de parásitos para iniciar el cultivo fue de 5×10^4 células/ml en 5 ml de medio en frascos de plástico Falcon® de 25 cm², y mantenidos en una estufa a 28°C. (González P, et al., Int J Antimicro Agents 2005, 25, 136–141). Los cultivos se realizaron de manera rutinaria, y renovando el medio cada dos días consiguiendo el crecimiento exponencial de los flagelados hasta conseguir la masa celular necesaria para los posteriores estudios.

CULTIVOS CELULARES Y ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.

Los macrófagos J774,2 fueron reclonados desde J774,2 (*European collection of cell cultures* (ECACC) número 91051511) originales de un tumor de hembra de ratón de la cepa Balb/c, manteniendo los cultivos entre $3-9 \times 10^5$ células/ml a 37°C y a 5% de CO₂ en medio de cultivo MEM + Glutamina suplementado con un 20 % de SBF-I. El protocolo para trabajar con las células en cultivo fue despegándolas del frasco de cultivo donde se encontraban adheridas mediante soporte frío y golpes secos. Se decantaron las células y se centrifugaron durante 5 minutos a 800 rpm. Se resuspendieron las células en medio de cultivo fresco para proceder a su conteo, mediante tinción con azul de tripán (dilución 1:1) y en cámara hemocitométrica de Neubauer, para los estudios posteriores (Sánchez-Moreno M, et al., J Antimicrob Chemother 2012; 67:387-397). Estos ensayos se realizaron mediante citometría de flujo. Los macrófagos de la línea J774,2, se depositaron en un *steriling* (Universal Tube®) y se centrifugaron a 800 rpm durante 5 min, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en medio MEM + Glutamina + 20 % SBF-I. Se depositaron 1×10^4 células/en cada pocillo con un volumen final de 500 µl de medio por pocillo en una placa de titulación de 24 pocillos, se incubaron durante 24 h a 37°C en atmósfera húmeda enriquecida con 5% CO₂. Esto se realizó para que se fijasen las células. Transcurrido este tiempo el medio de cultivo se retiró y se adicionó medio fresco con los productos a ensayar, a las concentraciones de 50, 25, 10 y 1 µM. A las 72 horas

de la incubación, se procedió a la preparación de las muestras para su lectura en el citómetro de flujo.

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

ENSAYOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO*: FORMAS EXTRACELULARES

Ensayo sobre formas promastigotas

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

ENSAYOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO*: FORMAS INTRACELULARES.**Ensayo sobre formas amastigotas**

Los macrófagos se despegaron del frasco de cultivo donde se encontraban adheridos mediante soporte frío y golpes secos. Para ello, se eliminó el medio de cultivo, seguidamente se cubrió la superficie celular con EDTA-tripsina y se incubó en frío durante 5 minutos según la metodología expuesta anteriormente. Tras ello, se pasó a un frasco de fondo cónico de 25 ml de capacidad (Steriling) para centrifugarlos a 800 rpm durante 5 minutos, retirándose el sobrenadante y resuspendiéndolos en MEM + Glutamina con 20% SBF-I. Se cuentan en cámara de Neubauer y se cultivan en placas de 24 pocillos a razón de 1×10^4 células, en las que previamente habíamos introducido un cristal cubreobjetos redondo de 12 mm en cada pocillo. Para su adherencia, dejamos crecer las células 24 h a 37°C en 5% CO₂.

Una vez adheridas las células, se infectaron "*in vitro*": Macrófagos J774,2 con 1×10^5 parásitos/pocillo de formas promastigotas metacíclicas en fase estacionaria de crecimiento de las especies de Leishmanias utilizadas (*L. infantum* y *L. braziliensis*). La infección se mantuvo durante 24 horas para que el parásito entrase en la célula. Transcurrido este tiempo el medio de cultivo se retiró y se adicionó medio fresco con los productos a ensayar, a las concentraciones necesarias para sacar la IC₅₀ (100, 50, 25, 10 y 1 µM). A las 72 horas de la incubación, se procedió a la retirada de los cristales.

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

Resultados de los Ensayos

Los resultados de los ensayos realizados con los compuestos y complejos de las familias (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI) se muestran en las Tablas 1 y 2.

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

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

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

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

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

° **Índice de Selectividad**= IC_{50} de los macrófagos/ IC_{50} de las formas extracelulares e intracelulares de los parásitos. Entre paréntesis: Numero de veces que la IS de los compuestos es superior a la IS de la droga de referencia.

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

El análisis de los resultados obtenidos indica que en general los compuestos estudiados son activos frente a las formas intracelulares y extracelulares del parásito utilizadas, con valores de IC_{50} hasta cuatro superiores a los valores obtenidos para el compuesto referencia. Además en este caso se han obtenido valores de IC_{50} frente a macrófagos entre 10 y 25 veces superiores al del compuesto referencia, lo cual indica que los nuevos compuestos presentan una baja toxicidad frente a los macrófagos, un hecho que constituye una ventaja a la hora de su uso como agentes terapéuticos. Por lo tanto y a partir de dichos valores se han obtenido índices de selectividad con valores entre 15 y 150 para un grupo de los compuestos estudiados.

Los resultados de estos ensayos para los compuestos y complejos de las familias (I-2) y (II-2) se muestran las Tablas 3 y 4.

Tabla 3.- Actividad y toxicidad encontradas para los compuestos poliamínicos y de los complejos con metales de transición estudiados sobre formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania* spp.

Compuesto	IC_{50} (μM) ^a		Toxicidad IC_{50} Macrófagos (μM) ^b
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	

	<i>Promastigote</i>	<i>Amastigote</i>	<i>Promastigote</i>	<i>Amastigote</i>	
Glucatin®	18,0±3,1	24,2±2,6	25,6±1,6	30,4±6,1	15,20±1,3
X1	18,5±1,6	20,5±1,8	22,3±0,6	21,3±0,9	37,9±4,2
X6	8,5±0,4	< 1	5,3±0,3	8,7±0,6	98,5±6,3
X9	45,7±2,8	37,9±5,4	46,7±4,9	19,7±2,5	147,0±6,9
X26	71,7±10,0	33,4±3,2	53,2±3,6	30,7±2,5	100,5±4,8
X27	2,56±0,7	10,4±0,1	5,5±0,8	11,9±0,8	126,1±7,1

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

Tabla 4.- Índice de Selectividad encontrados los compuestos poliamínicos y de los complejos con metales de transición estudiados sobre formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania* spp.

Compuesto	IS ^c			
	<i>L. infantum</i>		<i>L. braziliensis</i>	
	<i>Promastigote</i>	<i>Amastigote</i>	<i>Promastigote</i>	<i>Amastigote</i>
Glucatin®	0,8	0,6	0,6	0,5
X1	2,05 (3)	1,8 (3)	1,7 (3)	1,8 (4)
X6	11,6 (15)	98,5 (164)	18,6 (31)	11,3 (23)
X9	3,2 (4)	3,9 (6)	3,1 (5)	7,5 (15)
X26	1,4 (2)	3,0 (5)	1,9 (3)	3,3 (6)
X27	49,2 (62)	12,1 (20)	22,9 (38)	10,6 (21)

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

Los compuestos estudiados se han evaluado frente a formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania* spp. (*L. infantum* y *L. braziliensis*), obteniéndose los índices IC₅₀ como indicadores de la actividad de los compuestos frente al protozoo, los índices de toxicidad IC₅₀ frente a Macrófagos y el índice de selectividad obtenido como IS= IC₅₀ frente a macrófagos /IC₅₀ frente formas extracelulares e intracelulares de los parásitos. En este estudio los valores obtenidos se comparan con los

correspondientes a la droga referencia, Glucatin®, utilizada comúnmente en el tratamiento de la leishmaniasis.

El análisis de los resultados obtenidos indica que en general los compuestos estudiados son activos frente a las formas intracelulares y extracelulares del parásito, con valores de IC_{50} menores a los valores obtenidos para el compuesto referencia, principalmente los compuestos X6 y X27. Además, en todos los compuestos estudiados los valores de IC_{50} frente a macrófagos superan de 7 a 10 veces al del compuesto referencia, lo cual indica que los nuevos compuestos presentan una baja toxicidad frente a los macrófagos, un hecho que constituye una ventaja a la hora de su uso como agentes terapéuticos. Por lo tanto y a partir de dichos valores los índices de selectividad de los compuestos X6 y X27 superan al del glucantime en 20 y 164 veces para las formas amastigotas de ambas especies de *Leishmania*.

El análisis de los resultados obtenidos indica que en general los compuestos estudiados son activos frente a las formas intracelulares y extracelulares del parásito utilizadas, con valores de IC_{50} hasta cuatro superiores a los valores obtenidos para el compuesto referencia. Además en este caso se han obtenido valores de IC_{50} frente a macrófagos entre 10 y 25 veces superiores al del compuesto referencia, lo cual indica que los nuevos compuestos presentan una baja toxicidad frente a los macrófagos, un hecho que constituye una ventaja a la hora de su uso como agentes terapéuticos. Por lo tanto y a partir de dichos valores se han obtenido índices de selectividad con valores entre 15 y 150 para un grupo de los compuestos estudiados.

CULTIVO PARASITARIO (para *Trypanosoma cruzi*)

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

rutinaria consiguiendo el crecimiento exponencial de los flagelados hasta conseguir la masa celular necesaria para los posteriores estudios. (Téllez-Meneses J, y col. *Acta Trop* 2008; 108:26-34).

CULTIVOS CELULARES Y ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.

Las células Vero fueron establecidas desde el riñón de un mono Verde Africano adulto, manteniendo los cultivos a una densidad 1×10^4 células/ml a 37°C y 5% de CO₂. El procedimiento para trabajar con las células en cultivo fue tripsinizar las células adheridas mediante lavado con PBS y añadiendo la cantidad suficiente de tripsina/EDTA (200ml de PBS + 0,1 g de EDTA y 200 ml de PBS + 0,5 g de tripsina. Se mezclan las dos soluciones. pH= 7,2-7,4 y se filtra). Se incubaron durante 5-10 minutos las células. Se decantaron las células y se centrifugaron durante 5 minutos a 800 rpm. Se resuspendieron las células en un medio de cultivo nuevo. Como medio de cultivo se utilizó RPMI suplementado con un 10 % de suero bovino fetal inactivado (SBF-I) (Sánchez-Moreno M, et al. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:387-397). Las células Vero, se depositaron en un esterilín y se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en medio RPMI. Se depositaron 1×10^4 células/ml en cada pocillo de una placa de titulación de 24 pocillos, se incubaron durante 24 h a 37°C en atmósfera húmeda enriquecida con 5% CO₂. Esto se realizó para que se fijasen las células. Transcurrido este tiempo el medio de cultivo se retiró y se adicionó medio fresco con los productos a ensayar, a las concentraciones de 100, 50, 25, 10 y 1 µM. A las 72 horas de la incubación, se procedió a la preparación de las muestras para su lectura en el citómetro de flujo. El método seguido es el descrito por (Ormerod, 1994), partiendo de las células y el medio presente en los pocillos, a las cuales se le adicionó 100 µl de solución de yoduro de propidio (PI, 100 µg/ml) (Sigma Chemical Co), incubándose a 28°C en oscuridad unos 10 minutos, posteriormente, se añadió 100 µl de diacetato de fluoresceína (FDA) (Sigma Chemical Co) en solución (100ng/ml) volviéndose a incubar a 28°C en oscuridad unos 10 minutos, y previa centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos, se procedió a lavar el precipitado con PBS. Finalmente, se analizaron los resultados teniendo en cuenta que las células con la membrana plasmática intacta tienen una fluorescencia color verde, mientras que las células dañadas o muertas presentan una fluorescencia roja. Se calculó el porcentaje de viabilidad. El número de células muertas se determinó por comparación con los cultivos controles (Marín C, et al. *J Nat Prod* 2011; 74:744-750).

ENSAYOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO*: FORMAS EXTRACELULARES.

Transformación de formas epimastigotas a formas tripomastigotas metacíclicas

La metaciclologénesis fue inducida a un cultivo de 5 días (fase estacionaria), tras ser centrifugado a 7000g durante 10 min a 10°C. Los parásitos fueron incubados 2h a 28°C a una densidad de 5×10^8 parásitos/ml en medio TAU (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 8 mM phosphate buffer, pH 6,0). Después, los parásitos se incubaban a la dilución 1:100 durante 96h a 28°C en medio TAU3AAG (TAU suplementado con 10 mM L-prolina, 50 mM L-glutamato sódico, 2 mM L-aspartato sódico y 10 mM D-glucosa) en frascos de cultivo de 25 ml en posición horizontal impidiendo que supere 1cm de profundidad el medio. (Cardoso J, et al. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 5:1026-32).

Formas epimastigotas

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

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

Formas Tripomastigotas

La actividad (porcentaje de reducción de parásitos) es comparado con el control después de realizar la metodología descrita en (Júnior CO, y col. Biomed Pharmacother 2010; 64:624-6) con algunas modificaciones realizadas en el

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

ENSAYOS DE ACTIVIDAD *IN VITRO*: FORMAS INTRACELULARES.

Ensayo de amastigotas

Las células Vero se despegaron del frasco de cultivo donde se encontraban adheridos mediante tripsinización. Para ello, se eliminó el medio de cultivo, seguidamente se cubrió la superficie celular con EDTA-tripsina y se incubó en frío durante 5 minutos según la metodología expuesta anteriormente. Tras ello, se pasó a un frasco de fondo cónico de 25 ml de capacidad (Steriling) para centrifugarlos a 800 rpm durante 5 minutos, retirándose el sobrenadante y se cuentan en cámara de Neubauer. Resuspendiendo las células a una concentración de 1×10^4 células/ pocillo en medio RPMI para las células Vero, cultivándose en placas de 24 pocillos, en las que previamente habíamos introducido un cristal cubreobjetos redondo de 12 mm en cada pocillo. Para su adherencia, dejamos crecer las células 24 h a 37°C en 5% CO₂.

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

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

Los datos obtenidos en los ensayos anteriores realizados con los compuestos y complejos de las familias (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI) se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5.- Actividad *in vitro*, toxicidad e índice de selectividad de los compuestos poliamínicos y de los complejos con metales de transición evaluados en formas extracelulares e intracelulares de *Trypanosoma cruzi*.

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

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

Tabla 6.- Índice de selectividad de los compuestos poliamínicos y de los complejos con metales de transición evaluados en formas extracelulares e intracelulares de *Trypanosoma cruzi*.

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

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

Estos valores se han comparado con los valores obtenidos para el Benznidazol ya que se trata del fármaco comúnmente utilizado para el tratamiento de esta enfermedad. Los resultados obtenidos indican que en general los compuestos estudiados son menos tóxicos que el Benznidazol frente a células Vero con valores de IC_{50} entre 10 y 30 veces superiores que el IC_{50} del compuesto referencia. En algunos casos como para los compuestos X12 y X13 su actividad es mucho mayor que el compuesto referencia ya que presentan valores de IC_{50} menores tanto en formas extracelulares como intracelulares. De acuerdo con estos resultados estos compuestos tienen índices de selectividad elevados con valores comprendidos entre 15 y 80. Todo ello indica que dichos compuestos presentan una actividad adecuada para su uso como agentes anti *T. cruzi*.

Los datos obtenidos en los ensayos anteriores realizados con los compuestos y complejos de las familias (I-2) y (II-2) se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7.- Actividad *in vitro*, toxicidad e índice de selectividad de los compuestos poliamínicos y de los complejos con metales de transición evaluados en formas extracelulares e intracelulares de *Trypanosoma cruzi*.

Compuesto	IC ₅₀ (μM) ^a		Trypomastigote	Toxicidad IC ₅₀ Cel. Vero (μM) ^b
	Epimastigote	Amastigote intracelular		
Benznidazol	15,8±1,1	23,3±4,6	22,4±1,9	13,6±0,9
X1	40,7±2,1	20,8±1,7	19,0±0,8	17,9±3,1
X6	52,5±8,5	21,5±2,6	30,0±1,4	80,0±7,7
X9	51,6±3,6	41,5±8,5	33,2±2,9	117,7±6,2
X26	93,8±9,1	34,9±2,3	23,8±0,5	80,2±9,0
X27	7,3±0,8	7,0±0,9	5,7±0,8	71,6±6,3

Los resultados representan la media obtenida en cuatro experimentos separados.^a

IC₅₀ = concentración requerida para dar el 50% de inhibición, calculada por análisis de regresión lineal a partir de los valores Kc en las concentraciones utilizadas (1, 10, 25, 50 y 100 μM).^b Frente a células Vero después de 72 h de incubación.

Tabla 8.- Índice de selectividad de los compuestos poliamínicos y de los complejos con metales de transición evaluados en formas extracelulares e intracelulares de *Trypanosoma cruzi*.

Compuesto	IS ^a		Tripomastigote
	Epimastigote	Amastigote intracelular	
Benznidazole	0,8	0,6	0,6
X1	0,4 (1)	0,9 (1)	0,9 (2)
X6	1,44 (2)	3,7 (6)	2,66 (4)
X9	2,3 (3)	2,8 (5)	3,5 (6)
X26	0,8 (1)	2,3 (4)	3,4 (6)
X27	9,8 (13)	10,2 (17)	12,6 (21)

Los resultados representan la media obtenida en cuatro experimentos separados.^a

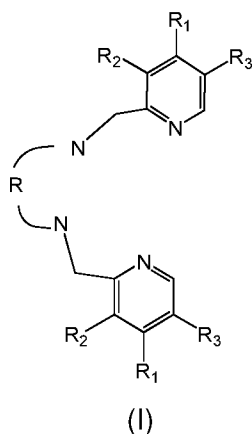
Índice de selectividad = IC₅₀ Células Vero / IC₅₀ formas extracelulares e intracelulares del parásito. Entre paréntesis: número de veces que el compuesto excede el índice de selectividad de la droga referencia (para formas extracelulares e intracelulares del *Trypanosoma cruzi*).

Estos valores se han comparado con los valores obtenidos para el Benznidazol ya que se trata del fármaco comúnmente utilizado para el tratamiento de esta enfermedad. Los resultados obtenidos indican que en general los compuestos estudiados son menos tóxicos que el Benznidazol frente a células Vero con valores de IC₅₀ entre 6-9 veces superiores que el IC₅₀ del compuesto referencia. En algunos casos, como por

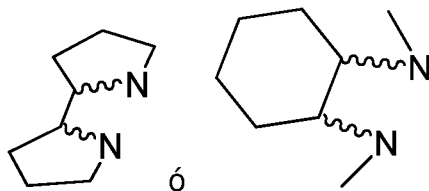
ejemplo el X27 su actividad es mucho mayor que la del compuesto de referencia ya que presentan valores de IC_{50} menores tanto en formas extracelulares como intracelulares. De acuerdo con estos resultados algunos de estos compuestos como el X27 tienen índices de selectividad elevados con valores comprendidos entre 17 y 21. Todo ello indica que dichos compuestos presentan una actividad adecuada para su uso como agentes anti *T. cruzi*.

REIVINDICACIONES

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



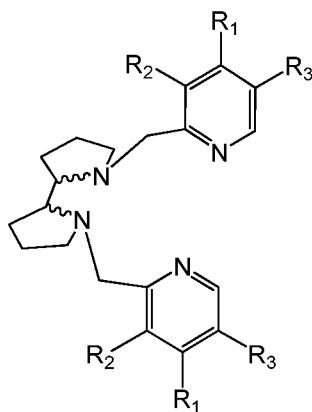
donde: R_1 , R_2 y R_3 son iguales o diferentes y representan un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno, alquilo (C_1 - C_5), $-NR'R''$, halógeno, alcoxilo (C_1 - C_5) y $-COOR'''$; o R_1 y R_3 representan un grupo pineno o quinolina fusionado al anillo de piridina; R' , R'' y R''' ,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



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

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

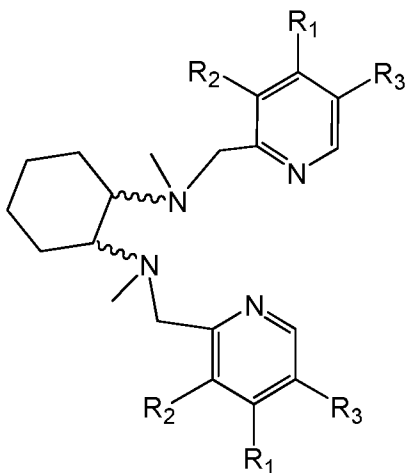
32



(II)

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

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

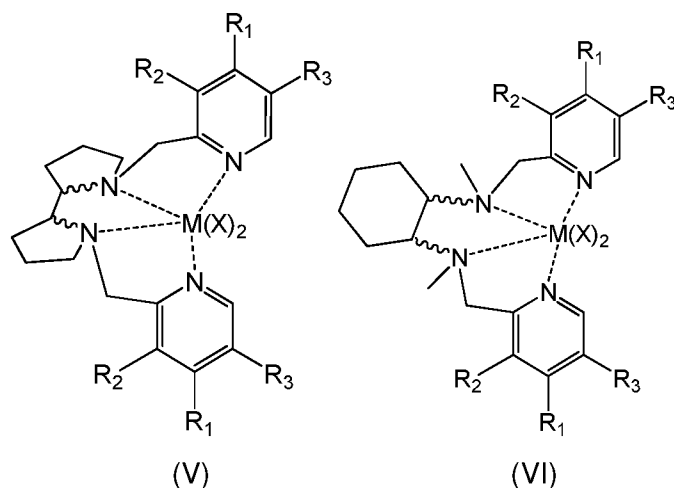


(III)

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

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

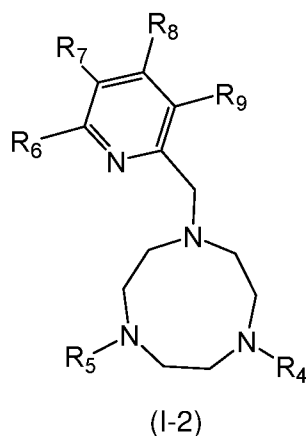
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 donde el compuesto es de fórmula (II), R_1 es $-N(CH_3)_2$ y R_2 y R_3 son hidrógeno; o R_1 es $-OCH_3$ y R_2 y R_3 metilo.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, donde el compuesto es de fórmula (III) y R_1 , R_2 y R_3 son hidrógeno.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



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

14. Uso según la reivindicación anterior, donde el contraanión se selecciona de la lista que comprende CF_3SO_3^- , Cl^- , Br^- , ClO_4^- , PF_6^- y BF_4^- .
15. Uso según la reivindicación anterior donde el contraanión CF_3SO_3^- .
16. Uso según la reivindicación 10, donde los complejos se seleccionan de entre:
[$\{2,2'-(2R,2'R)-2,2'$ -bipirrolidina-1,1'-diilbis(metileno)bis(N,N-dimetilpiridina-4-amina) $\}\text{Mn}^{\text{II}}\}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$; [$\{(2S,2'S)-1,1'$ -bis((4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil)-2,2'-bipirrolidina) $\}\text{Mn}^{\text{II}}\}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$; [$\{(1R,2R)-N1,N2$ -bis((4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil)-N1,N2-dimetilciclohexano-1,2-diamina) $\}\text{Mn}^{\text{II}}\}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$.
17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad parasitaria es una enfermedad parasitaria protozoaria.
18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los parásitos pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*.
19. Uso según la reivindicación anterior, donde los parásitos pertenecen a la especie *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* o *Leishmania donovani*.
20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad es leishmaniasis o tripanosomiasis.
21. Uso según la reivindicación anterior, donde la tripanosomiasis es la enfermedad de Chagas.
22. Uso de los compuestos de fórmula general (I) descritos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o de los complejos descritos en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, para la elaboración de un medicamento.

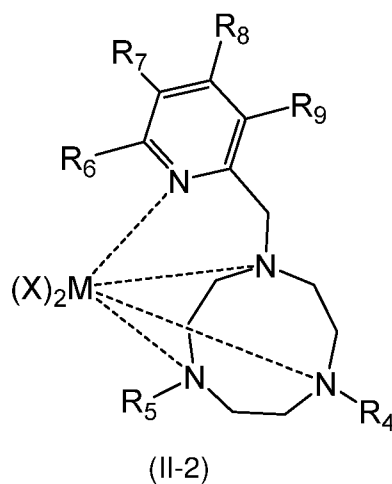
23. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, junto con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
24. Complejo de fórmula $[(1R,2R)\text{-}N1,N2\text{-bis}((4\text{-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil)-N1,N2\text{-dimetilciclohexano-1,2-diamina})Mn^{II}](CF_3SO_3)_2$.
25. Uso de un compuesto de fórmula general (I-2):



donde: R_4 y R_5 son iguales o diferentes, y representan un hidrógeno, un grupo alquilo ($C_1\text{-}C_5$) o un grupo $-\text{CH}_2\text{-Cy}$; R_6 representa un hidrógeno, un halógeno o un grupo alquilo ($C_1\text{-}C_5$); R_7 y R_9 son iguales o diferentes, y representan un hidrógeno o un grupo alquilo ($C_1\text{-}C_5$); R_8 representa un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno, $-\text{NR}'\text{R}''$, halógeno, alcoxilo ($C_1\text{-}C_5$), $-\text{NO}_2$ y $-\text{COOR}'''$; R' , R'' y R''' , son iguales o diferentes y representan un hidrógeno o un grupo alquilo ($C_1\text{-}C_5$); y Cy representa un heteroarilo, o cualquiera de sus isómeros y/o sales farmacéuticamente aceptables para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades parasitarias.

26. Uso según la reivindicación 25, donde R_4 y R_5 son iguales o diferentes, y representan un hidrógeno, un metilo o un grupo $-\text{CH}_2\text{-Cy}$; donde Cy es piridina.
27. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 o 26, donde R_4 y R_5 son iguales.

28. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, donde R_6 representa hidrógeno, Cl, F o metilo.
29. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, donde R_7 y R_9 son iguales o diferentes, y representan hidrógeno o metilo.
30. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, donde R_7 y R_9 son iguales.
31. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, donde R_8 representa un grupo seleccionado de la lista que comprende hidrógeno, $-N(CH_3)_2$, Cl, $-OCH_3$, NO_2 y $-COOCH_2CH_3$.
32. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 31, donde R_4 y R_5 son iguales y representan un metilo o un grupo $-CH_2$ -piridina; y R_6 , R_7 , R_8 y R_9 son hidrógeno.
33. Uso según la reivindicación 25, donde el compuesto se selecciona entre 1,4-dimetil-7-(piridin-2-ilmetil)-1,4,7-triazonano; y 1,4,7-tris(piridin-2-ilmetil)-1,4,7-triazonano.
34. Uso de un complejo metálico que comprende un ligando tetradentado que consiste en un compuesto de fórmula general (I-2) según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 25 a 33 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades parasitarias.
35. Uso según la reivindicación 34, donde los metales se seleccionan de la lista que comprende Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn.
36. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 34 o 35, donde los metales son metales divalentes.
37. Uso según la reivindicación anterior, donde los complejos son de fórmula general (II-2):



Donde: R_4 a R_9 se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; M es un metal divalente según se describe en la reivindicación 12; y X es un contraanión.

38. Uso según la reivindicación anterior, donde el contraanión se selecciona de la lista que comprende CF_3SO_3^- , Cl^- , Br^- , ClO_4^- , PF_6^- y BF_4^- .
39. Uso según la reivindicación anterior donde el contraanión CF_3SO_3^- .
40. Uso según la reivindicación 34, donde los complejos se seleccionan de entre: $[\{1,4\text{-dimetil-7-(piridin-2-ilmetil)-1,4,7-triazonano}\}\text{Fe}^{\text{II}}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$; $[\{1,4\text{-dimetil-7-(piridin-2-ilmetil)-1,4,7-triazonano}\}\text{Mn}^{\text{II}}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$; y $[\{1,4\text{-dimetil-7-(piridin-2-ilmetil)-1,4,7-triazonano}\}\text{Cu}^{\text{II}}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$.
41. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 40, donde la enfermedad parasitaria es una enfermedad parasitaria protozoaria.
42. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 41, donde los parásitos pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*.
43. Uso según la reivindicación anterior, donde los parásitos pertenecen a la especie *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* o *Leishmania donovani*.

44. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 43, donde la enfermedad es leishmaniasis o tripanosomiasis.
45. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la tripanosomiasis es la enfermedad de Chagas.
46. Uso de los compuestos de fórmula general (I-2) descritos en cualquiera de las reivindicaciones 25 a 34, o de los complejos descritos en cualquiera de las reivindicaciones 35 a 41, para la elaboración de un medicamento.
47. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, junto con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
48. Complejo $\{[1,4\text{-dimetil-7-(piridin-2-ilmetil)-1,4,7\text{-triazonano}]\text{Cu}^{\text{II}}\}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070800

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2868320 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT ET AL.) 07/10/2005, claims 1-5, 11 and 12; page 16, line 8 - page 18, line 11.	47
A	Cusso, O. et al. "Asymmetric Epoxidation with H ₂ O ₂ by Manipulating the Electronic Properties of Non-heme Iron Catalysts". Journal of the American Chemical Society, 2013, Vol. 135, N. 39, pages 14871-14878. See Abstract and Scheme 2.	1-48
A	KASAPBASI, E. E. et al. "Density Functional Investigation of the Water Oxidation by Iron Complexes Based on Tetradentate Nitrogen Ligands". Inorganic Chemistry, 2012, Vol. 51, pages 10850-10855. See Abstract, compounds 1 and 2.	1-48

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01/12/2014

Date of mailing of the international search report
(02/12/2014)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
N. Martín Laso

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493278

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070800

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Ramírez-Macías, I. et al. "In vitro anti-leishmania evaluation of nickel complexes with a triazolopyrimidine derivative against <i>Leishmania infantum</i> and <i>Leishmania braziliensis</i> ". <i>Journal of Inorganic Biochemistry</i> , 2012, Vol. 112, pages 1-9. See Abstract and figure 1.	1-48
A	Sanchez-Moreno, M. et al. "In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against <i>Leishmania infantum</i> and <i>Leishmania braziliensis</i> species". <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> , 2012, Vol. 67, N. 2, pages 387-397. See Abstract, figure 3.	1-48
A	DIAS, L. S. L. et al. "Synthesis, in vitro evaluation, and SAR studies of a potential antichagasic 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine series". <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> , 2007, Vol. 15, pages 211-219. See Abstract, Esquema 1.	1-48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2014/070800

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR2868320 A1	07.10.2005	US2007218010 A1	20.09.2007
		JP2007530646 A	01.11.2007
		WO2005094903 A2	13.10.2005
		WO2005094903 A3	26.01.2006
		ES2334242T T3	08.03.2010
		EP1729818 A2	13.12.2006
		EP1729818 B1	23.09.2009
		AT443529T T	15.10.2009
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070800

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D401/12 (2006.01)

A61K31/444 (2006.01)

A61K31/4439 (2006.01)

C07D401/06 (2006.01)

A61K31/395 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2014/070800

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C07D, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

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

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	FR 2868320 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT ET AL.) 07/10/2005, reivindicaciones 1-5, 11 y 12; página 16, línea 8 - página 18, línea 11.	47
A	Cusso, O. et al. "Asymmetric Epoxidation with H2O2 by Manipulating the Electronic Properties of Non-heme Iron Catalysts". Journal of the American Chemical Society, 2013, Vol. 135, N. 39, páginas 14871-14878. Ver Resumen y Esquema 2.	1-48
A	KASAPBASI, E. E. et al. "Density Functional Investigation of the Water Oxidation by Iron Complexes Based on Tetradentate Nitrogen Ligands". Inorganic Chemistry, 2012, Vol. 51, páginas 10850-10855. Ver Resumen, compuestos 1 y 2.	1-48

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
01/12/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
02 de diciembre de 2014 (02/12/2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
N. Martín Laso
Nº de teléfono 91 3493278

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2014/070800

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	Ramírez-Macías, I. et al. "In vitro anti-leishmania evaluation of nickel complexes with a triazolopyrimidine derivative against <i>Leishmania infantum</i> and <i>Leishmania braziliensis</i> ". <i>Journal of Inorganic Biochemistry</i> , 2012, Vol. 112, páginas 1-9. Ver Resumen y Figura 1.	1-48
A	Sanchez-Moreno, M. et al. "In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against <i>Leishmania infantum</i> and <i>Leishmania braziliensis</i> species". <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> , 2012, Vol. 67, N. 2, páginas 387-397. Ver Resumen, Figura 3.	1-48
A	DIAS, L. S. L. et al. "Synthesis, in vitro evaluation, and SAR studies of a potential antichagasic 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine series". <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> , 2007, Vol. 15, páginas 211-219. Ver Resumen, Esquema 1.	1-48

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070800

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
FR2868320 A1	07.10.2005	US2007218010 A1	20.09.2007
		JP2007530646 A	01.11.2007
		WO2005094903 A2	13.10.2005
		WO2005094903 A3	26.01.2006
		ES2334242T T3	08.03.2010
		EP1729818 A2	13.12.2006
		EP1729818 B1	23.09.2009
		AT443529T T	15.10.2009
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C07D401/12 (2006.01)

A61K31/444 (2006.01)

A61K31/4439 (2006.01)

C07D401/06 (2006.01)

A61K31/395 (2006.01)