

Búsqueda de nuevos agentes antiprotozoarios selectivos

Vladimir V. Kouznetsov, PhD, DSc*

Carlos Mario Meléndez Gómez, Químico**

Resumen

Se da la información general sobre los fármacos antiprotozoarios que están usándose en clínica, se discuten nuevas dianas de los parásitos protozoarios útiles en la búsqueda de nuevos agentes antiprotozoarios, enfocando la atención al rol biológico de las proteasas de los parásitos protozoarios. Esta información importante será útil para los estudiantes e investigadores que se interesen a los problemas de química medicinal (un área naciente en Colombia) cuál aporta mucho al desarrollo de ciencias médicas. [Kouznetsov V, Meléndez C. *Búsqueda de nuevos agentes antiprotozoarios selectivos. MedUNAB 2009; 12:33-45*].

Palabras clave: Agentes antiprotozoarios, Proteasas, Tripanosomiasis, Leishmaniasis, Malaria.

Introducción

Las enfermedades parasitarias constituyen un peligro para la salud mundial. Se ha calculado que tres billones de humanos, además de un número mayor de animales domésticos y salvajes, sufren parasitosis.¹ En un sentido científico general, el término “parásito” incluye a los virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos. En esta revisión, el término es usado solamente para referirse a protozoarios. Es de amplio conocimiento, que en algunos países tropicales, las infestaciones parasitarias son endémicas en un 80 % de la población.² En estos países este tipo de enfermedades son la principal causa de muerte. Por eso, una de las prioridades de las investigaciones médicas de muchos

Summary

The information is given on the antiprotozoal drugs used in clinic, new useful targets of the parasites protozoa in the search of new antiprotozoal agents are discussed, focusing the attention to the biological role of proteasas of the parasites protozoa. This important information will be useful for students and researchers, which are interested in the problems of medicinal chemistry (an appearing area in Colombia) that gives much to the development of medicine sciences. [Kouznetsov V, Meléndez C. *In search of new selective antiprotozoal agents. MedUNAB 2009; 12:33-45*].

Key words: Antiprotozoal agents, Protozoan proteins, Trypanosomiasis, Leishmaniasis, Malaria.

de estos países es la búsqueda de medicamentos efectivos contra las enfermedades parasitarias “propias”. En este sentido, cabe recordar que los éxitos de la medicina dependen en gran medida de los avances de la química medicinal y la industria farmacéutica, las cuales están estrechamente relacionadas con la química orgánica y la síntesis química. A pesar de los grandes avances en la lucha contra las infecciones durante el siglo pasado, las enfermedades parasitarias humanas causadas por un espectro variado de parásitos representan un problema médico global. Esta situación alarmante se debe principalmente a la falta de interés por parte de la industria farmacéutica de los países industrializados. Dicha ausencia se debe, a que estas enfermedades afectan, principalmente las personas de escasos recursos en los países del tercer

* Profesor titular, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

** Estudiante, Programa de doctorado en Ciencias Químicas, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Correspondencia: Dr. Kouznetsov, Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular - LQOBio, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
E-mail: kouznet@uis.edu.co (<http://ciencias.uis.edu.co/labqobio>)

Artículo recibido: 3 de octubre de 2008; aceptado: 14 de enero de 2009

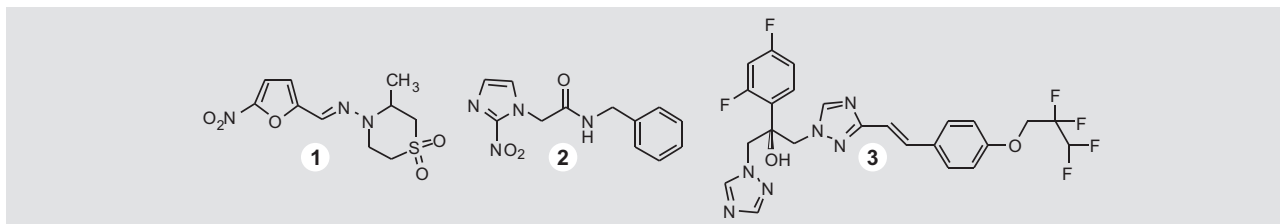


Figura 1. Fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: el nifurtimox es del grupo de los nitrofuranos; este fármaco está indicado en el cuadro agudo, en el cual se reduce considerablemente la sintomatología. Los niños y adolescentes toleran mejor el fármaco, el benznidazol es del grupo de los nitroimidazoles. Debe ser usado a la dosis de 5 a 8 mg/kg al día, durante 30 días. Dosis mayores después de la cuarta semana pueden llegar a producir manifestaciones cutáneas y polineuropatía periférica.

mundo (de regiones tropicales y subtropicales).^{3, 4} Otro problema consiste en que los parásitos protozoarios son organismos eucarióticos, por ende, su maquinaria celular y bioquímica es muy compleja. La biología celular de la interacción entre parásito y huésped es también increíblemente compleja.⁵ Los parásitos protozoarios de géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* son organismos flagelados, pertenecientes al subfilo Mastigophora, mientras que el *Plasmodium* a Esporozoa. Aunque son organismos diferentes, se presentan algunas similitudes bioquímicas que facilitarían la búsqueda de fármacos efectivos. Sin embargo, muchos parásitos protozoarios tienen una o más etapas intracelulares durante su ciclo de vida, es decir, presentan diferentes formas morfológicas. Por otra parte, para poder ingresar en las células del huésped, utilizan mecanismos de invasión muy sofisticados, de hecho, cada género de parásitos usa su propia táctica que le permite invadir a la célula del huésped.

El objetivo de esta revisión es resumir y apuntar algunos aspectos bioquímicos y biomédicos esenciales en la búsqueda racional de nuevos agentes antiprotozoarios, enfocando la atención al rol biológico de las proteasas de los parásitos protozoarios. Esta información importante será útil para los estudiantes e investigadores que se interesen a los problemas de química medicinal, el cuál aporta mucho al desarrollo de ciencias médicas en general, y de la medicina molecular parasitaria en particular.

Logros en el desarrollo de agentes antiprotozoarios

Tripanosomiasis. El protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* infecta a unos 14-16 millones de personas en América del Sur y Central donde constituye un enorme problema de salud pública. Actualmente, se calcula que alrededor de 2-3 millones de personas desarrollan los síntomas típicos de esta infección que produce aproximadamente de 17.000-50.000 de muertes al año.^{6, 7} Esta enfermedad es transmitida al hombre comúnmente por los insectos como el *Triatoma infestans*, conocidos popularmente como “pitos”, “barbeiros”, “chupos”, “vinchucas” o “chinches besadores”. Estos pican al

hombre, ingieren sangre y cuando la ingestión ha sido abundante defecan fácilmente sobre la piel. Las deyecciones son frotadas como consecuencia del rascado y través del sitio de la picadura o laceraciones que existan o se produzcan en la piel, ocurre la penetración del parásito, llamado en esta etapa *tripomastigote* metacíclico.

En los tejidos conjuntivos de la dermis (o en el tejido subcutáneo), estos se transforman en amastigotes que se multiplican por fisión binaria en las células de los tejidos infectados. Los amastigotes intracelulares se convierten en *tripomastigotes* que son liberados a la sangre circulante. Estos tripomastigotes pueden infectar otras células, pero no son capaces de multiplicarse en la sangre ya que la única forma replicativa en el vertebrado es la forma amastigote intracelular e invaden otras células, para repetir el ciclo, afectando a órganos importantes, como el corazón, el colon, el esófago (los “megasíndromes”). Solamente unos pocos fármacos con buena actividad tripanocida han sido aceptados, registrados y comercializados: nifurtimox (**1**) (Nfx, Lampit[®]), benznidazol (**2**) (Bnz, Radanil[®]) y el agente D0870 (**3**) (“bistrizol”, experimental) (figura 1).

Los dos primeros son efectivos contra las formas tripomastigotes, que circulan durante la fase aguda de la enfermedad y no garantizan la curación completa. Ambos actúan vía la reducción del grupo NO₂ y producen efectos secundarios que incluyen mutagénesis, éstos provienen en parte de los daños oxidativos de los tejidos del huésped. Por otra parte, el Bnz interactúa con las macromoléculas proteínicas formando enlaces covalentes vía intermediarios del grupo nitro reducido.

Un fenómeno parecido se observa en el caso de la tripanosomiasis africana, las moscas tsé-tsé (*Glossina palpalis* o *Glossina morsitans*) adquieren los parásitos cuando se alimentan de mamíferos enfermos. Dentro del insecto los parásitos se encuentran en forma epimastigote, posteriormente se transforman en la forma tripomastigote, la cual puede multiplicarse en el torrente sanguíneo del huésped y llega a los sistemas y órganos importantes, como el líquido cefaloraquídeo y el sistema nervioso central. Existen reportes que indican que más de 60 millones de personas en África están expuestas a la tripanosomiasis africana; en 1998 hubo 40.000 muertes provocadas por esta

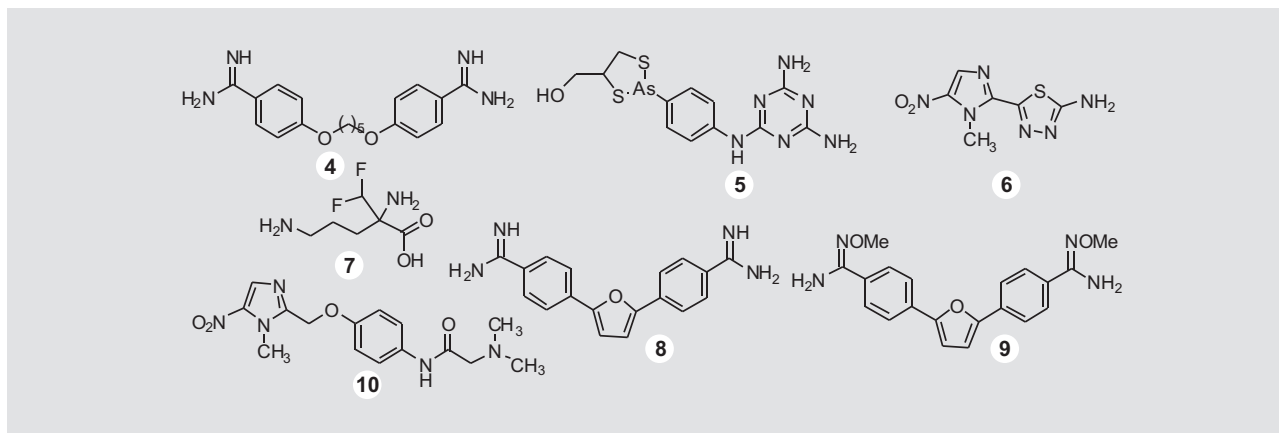


Figura 2. Fármacos utilizados en el tratamiento de la tripanosomiasis africana, provocada por las moscas tsé-tsé infectadas. La efectividad de estos fármacos no es satisfactoria y producen reacciones secundarias y tóxicas severas.

enfermedad.^{8,9} Los fármacos que se usan en este caso son la pentamidina (**4**), el melarsoprol (**5**) y el meglazol (**6**). Todos son tóxicos y producen efectos secundarios: hipertensión, dermatitis, daños miocárdiales. La eflornitina (difluorometilornitina-DFMO, **7**) es la única terapia eficaz para los pacientes con enfermedad del sueño gambiense que recaen tras haber recibido melarsoprol.¹⁰ En los casos nuevos, la eflornitina es igual de eficaz y mucho menos tóxica que este último. Algunos agentes están en diferentes fases clínicas, como la furamidina (**8**), la amidoxima (**9**) y el agente RO150216 (**10**) (figura 2).

Leishmaniasis. En la *Leishmania*, los parásitos enteramente intracelulares en el huésped vertebrado, producen una gran variedad de llagas y úlceras que destruyen la piel y tejidos subyacentes, la leishmaniasis cutánea es transmitida por insectos dípteros del género *Lutzomya* (que miden de 2 a 3 mm, de hábitos nocturnos, sólo la hembra es hematófaga). La picadura de estos insectos es dolorosa y deja una mácula eritematosa que persiste durante 2 a 3 días. Esta enfermedad existe en forma endémica en 88 países del mundo. Según la Organización Mundial de la Salud anualmente se presenta 1-2 millones de casos nuevos a nivel mundial, lo cual eleva la prevalencia a unos 12 millones de casos y la población expuesta a unos 350 millones de personas.¹¹ Se encuentran cinco especies importantes de *Leishmania* (*L. tropica*, *L. major*, *L. braziliensis*, *L. donovani* y *L. mexicana*), que causan las tres formas principales de la enfermedad en seres humanos, leishmaniasis cutánea, leishmaniasis visceral, y leishmaniasis mucocutánea. La forma y la severidad de la enfermedad dependen en gran medida de la especie y del estado del anfitrión inmune.¹² La puerta de entrada del parásito al hombre es la piel, a través de la picadura del vector. Las formas promastigotes del parásito invaden las células del sistema retículo-histiocitario, se reproducen bajo la forma de amastigotes y luego se diseminan por vía linfática o por vía sanguínea para localizarse en los macrófagos de la médula ósea, el hígado y el bazo, cuyo compromiso gradual, crónico, llega a ser masivo, lo cual explica las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

El tratamiento de esta enfermedad se basa en la administración intramuscular de sales del antimonio pentavalente (Sb^{5+}), Pentostum® (**11**) (figura 3), y su análogo Glucantime® (antimoniato de la N-metil glucamina). A veces, se usan pentamidina y amfotericina B.

Igualmente, se ha propuesto utilizar la miltefosina que un fosfolípido sintético activo por tópicamente y por vía oral, químicamente similar a los fosfolípidos naturales.¹³ Este fármaco con propiedades antineoplásicas, inmunomoduladoras, antivirales es particularmente interesante en el tratamiento de la leishmaniasis visceral en la que ocasiona hasta el 98% de curaciones, incluyendo pacientes previamente tratados con antimonio pentavalente en los que este había sido ineficaz o que habían recaído.¹⁴⁻¹⁷

Malaria. Teniendo la práctica evolucionaria de millones de años, el parásito de la malaria es un “campeón” del engaño, puede evadir el sistema inmune del hombre e invadir fácilmente las células rojas. Este parásito es un organismo complejo con 14 cromosomas, más de 7,000 genes y un ciclo vital que posee 4 etapas: una fase asexual en el hombre y una fase sexual en el mosquito *Anopheles*. Hay muchos parásitos del género *Plasmodium* que infectan hospederos vertebrados. La especie *Plasmodium falciparum* es la más virulenta y agresiva y ocasiona la mayoría de las muertes

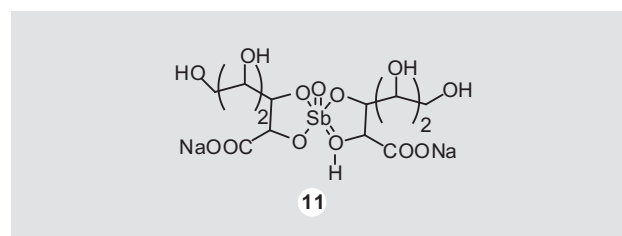


Figura 3. Sales del antimonio (Sb^{5+}) utilizadas en el tratamiento de la leishmaniasis. Antimoniato de N-metilglucamida. Se administra por vía intramuscular diariamente durante 2 a 3 semanas. Se presenta en ampollas de 5 ml que contienen 1.5 g de la sal.

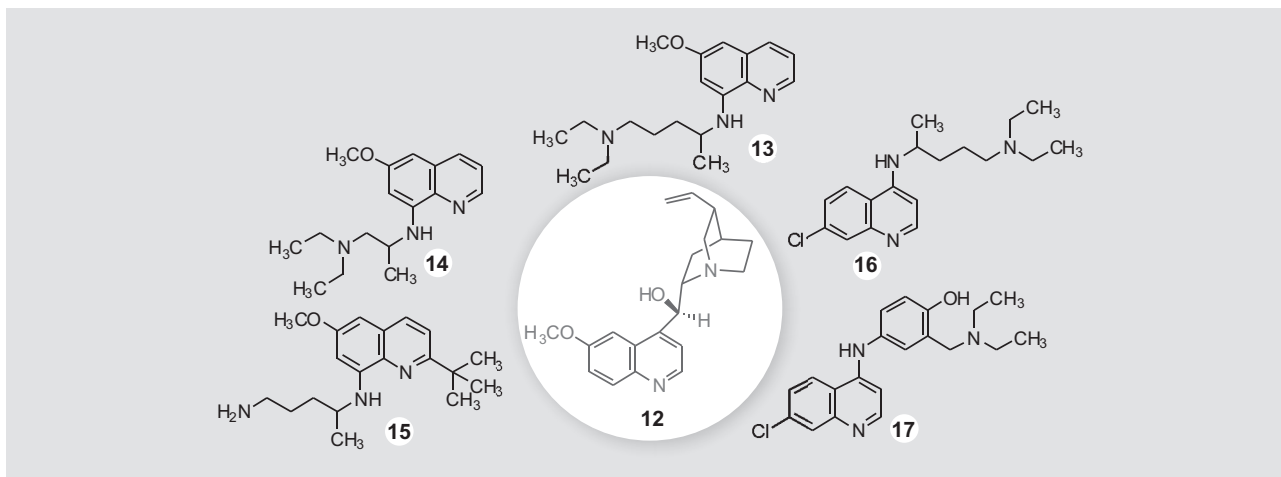


Figura 4. Aminoquinolinas sustituidas con excelente actividad antipalúdica. Su prototipo modelo es la quinina, aislada de la corteza del árbol Quina.

informadas. Su ciclo vital en los humanos comienza cuando el mosquito (en realidad, es la mosquita) infectado con los esporozoitos se alimenta (“pica”) y con su saliva ingresa cientos de esporozoitos al torrente sanguíneo, los cuales se dirigen a los hepatocitos. En un lapso de tiempo corto, los esporozoitos se transforman en esquizoites y merozoitos, los cuales rompen las células del hígado, salen nuevamente al torrente sanguíneo e infectan rápidamente a los glóbulos rojos (eritrocitos). La liberación de los merozoitos de las células rojas rotas conduce a los escalofríos característicos de la enfermedad. La fiebre subsiguiente se debe a restos de proteínas extrañas de las células rotas. Al salir de las células rotas, los merozoitos pueden tomar dos caminos: a) Participar en el proceso repetitivo de la amplificación; b) Pueden desarrollarse en “hembras” y “machos”, formas conocidas como gametocitos y reinfectar los mosquitos, los cuales infectan a los mamíferos. Se estima que esta enfermedad afecta a más de 600 millones de personas y causa la muerte a 1.7-2.7 millones a cada año.^{18,19} Esto quiere decir que durante ese lapso una persona muere cada 12 segundos por esta enfermedad, en su mayoría niños y cerca 1/3 de la humanidad vive en riesgo de contraerla. De cada diez casos, nueve ocurren en África sub-sahariana y 2/3 partes de los restantes se reparten entre seis países: Brasil, India, Sri-Lanka, Vietnam, Colombia e islas Salomón. Dentro del arsenal de fármacos contra la malaria se encuentran varios grupos de N-heterociclos (principalmente, el alcaloide quinina (**12**) y aminoquinolinas), además de otros sistemas.^{20,21}

Aunque la quinina presenta poca eficiencia y un alto grado de toxicidad, sigue siendo un fármaco importante en el tratamiento de la malaria multiresistente. Para reemplazarla se diseñaron compuestos más efectivos y menos tóxicos, que poseen como base estructural el sistema quinolínico: fármacos 8-aminoquinolínicos-primaquina (**13**), plasmocina (**14**), *l*-butilprimaquina (**15**) - y fármacos 4-aminoquinolínicos - cloroquina (CQ, **16**) y amodiaquina (AQ, **17**) (figura 4).

Otro tipo de fármacos antimaláricos lo constituyen el sesquiterpeno artemisinín (**18**, qinghaosu)²² y sus derivados semisintéticos (**19**, trioxanos, figura 5). Este sesquiterpeno fue aislado como un componente activo contra malaria en 1972. En la actualidad, sus derivados están siendo administrados rutinariamente en el tratamiento de la malaria, sobre todo en Asia. Su modo de acción ha sido propuesto²³ y estas investigaciones han ayudado a diseñar nuevos fármacos tomando como base la estructura del artemisinín. Algunos de estos trioxanos están en fase I de pruebas clínicas.

La CQ fue sintetizada en 1934 y desde entonces ha sido considerada como un agente antipalúdico de alta eficacia y toxicidad relativamente baja.²⁴⁻²⁶ Este fármaco fue utilizado extensamente por más de 50 años en varios programas de erradicación mundial de la malaria. Sin embargo, en los últimos años se ha observado una disminución en la efectividad del fármaco en África, América del Sur y el sureste asiático, principalmente por el desarrollo de resistencia a la CQ por parte del parásito *P. falciparum*. La búsqueda constante de nuevos análogos de la CQ es una

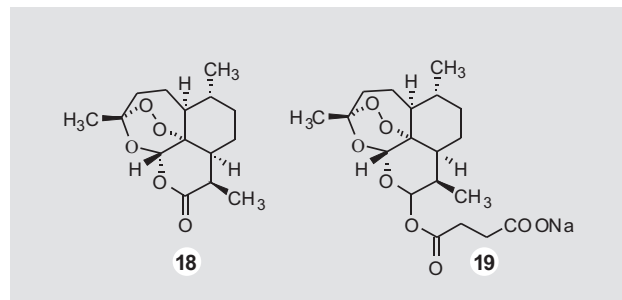


Figura 5. Fármacos sesquiterpénicos antimaláricos. Tienen las estructuras asombrosas con un puente peróxido. El prototipo es el artemisinín, aislado de la planta ancestral *Artemisia annua*, empleada como remedio herbal en China para la fiebre y más recientemente para el tratamiento de *P. falciparum* multi-resistentes.

tarea importante de los químicos medicinales.^{27, 28} Tal es el caso de la AQ, que posee alta eficacia, pero que tiene algunos efectos tóxicos. Por eso su uso se limitó a mediados de los años 80. Sin embargo, debido a su gran actividad contra los parásitos resistentes a la CQ, recientemente se ha incrementado su uso.¹³⁻¹⁷ Por otra parte, se encuentra la 2-*t*-butilprimaquina (**15**) que ha mostrado excelente eficacia antimalárica.²⁹ Anteriormente, se pensaba que el mecanismo de acción de estos compuestos estaba asociado con la formación de complejos con el ADN del parásito, y que la actividad estaba asociada con la estabilidad de este complejo.³⁰⁻³² Sin embargo, numerosas investigaciones han demostrado la invalidez de este modelo.

En la actualidad se acepta que las 4-aminoquinolinas interfieren con la desoxificación de la hematina libre (ferroprotoporfirina IX, Fe[III]FPIX), generada durante la degradación de la hemoglobina (Hb) dentro de la vacuola digestiva central del parásito. En este proceso, la hemoglobina es “transformada” en péptidos pequeños que a su vez son transportados (en forma de α -aminoácidos, AA) hacia el citoplasma del parásito (figura 6).

Fragmentos de la hematina pueden tener un efecto tóxico, por lo cual son convertidos (vía un mecanismo oxidativo) en cristales insolubles, llamados hemozoina (o β -hematina) o pigmento de malaria que es dímero cíclico del Fe[III]FPIX. Este mecanismo es conocido como la polimerización de hematina.³³⁻³⁵ El fármaco inhibe tanto la degradación oxidativa como la polimerización, formando un complejo

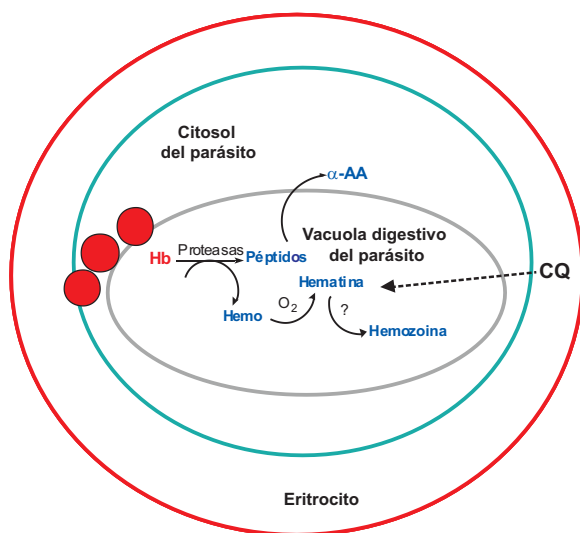


Figura 6. Procesos bioquímicos durante la ingestión de la Hb y blanco de la CQ. La CQ es una base débil diprótica ($pK_{a1} = 8.1$; $pK_{a2} = 10.2$), en su forma no protonada puede atravesar las membranas de los eritrocitos invadidos y moverse con el gradiente de pH para acumularse en la vacuola (pH ~ 5.5) del invasor, donde se cree que las 4-aminoquinolinas ejercen su acción antimalárica. La CQ se acumula hacia abajo del gradiente de pH, de tal forma que su acumulación en el parásito es 10,000 veces mayor que en el glóbulo rojo.

con la hematina, desencadenando un efecto tóxico por el aumento de la concentración de ésta, resultando en la muerte del parásito.³⁶

Búsqueda de un fármaco ideal contra parásitos protozoarios

Según los estudios realizados acerca de la bioquímica de los parásitos, el agente ideal, debería ser:

- a) Selectivo y potente, tanto contra las formas intracelulares como contra las formas extracelulares;
- b) De acción rápida y completa;
- c) Efectivo para impedir el progreso de las formas agudas e indeterminadas de la infección;
- d) Inocuo para la persona tratada y que no produzca efectos adversos;
- f) No debe inducir resistencia del parásito al medicamento.

Los estudios modernos de las enfermedades causadas por parásitos protozoarios de diversos géneros se basan en las investigaciones comparativas, bioquímicas y fisiológicas del parásito y del huésped para lograr notar diferencias en procesos esenciales que permitan una inhibición selectiva del primero. La quimioterapia moderna se enfoca en tres tipos principales de posibles blancos (dianas) en las parasitosis: *i*) enzimas únicas encontradas sólo en los protozoos; *ii*) enzimas importantes existentes en huésped y protozoo, pero indispensables sólo para el segundo; *iii*) funciones bioquímicas comunes, existentes en el protozoo y en el huésped, pero con diferentes propiedades farmacológicas. Las dianas promisorias del parásito protozoario son un sistema de glutatión (GSH)- glutatión oxidado (GSSG), mantenido por la glutatión reductasa; γ -glutamylcisteína sintasa (GGCS), farnesilpírofosfato sintasa (FPPS) y proteasas (catepsinas). La GGCS (EC 6.3.2.2) cataliza la etapa limitante de la síntesis de glutatión. Las enzimas proteolíticas, especialmente proteasas lisosomales (catepsinas) catalizan la hidrólisis de una variedad de sustancias proteínicas con un propósito diferente y están involucradas en diferentes procesos fisiológicos. La mayoría de las catepsinas pertenecen al grupo de las endopeptidasas (EC 3.4.21-24). Su clasificación es basada en la naturaleza química de los grupos que ejercen la actividad catalítica: grupo “Ser” (EC. 3.4.21), grupo “Cys” (EC 3.4.22), grupo “Asp” (EC 3.4.23) y grupo “Metal ión” (EC 3.4.24).

Teniendo en cuenta que la actividad biológica es el resultado de la interacción de un fármaco con una biomolécula y que un fármaco es también una molécula, que tiene unas características físico-químicas establecidas, como consecuencias de las mismas, ésta puede describirse como los acontecimientos de absorción, transporte, interacción y excreción. En la planeación de la síntesis de una molécula bioactiva, es necesario distinguir las estructuras privilegiadas, que son fragmentos únicos, capaces de proporcionar ligandos para diversos receptores.³⁷

Las proteasas del parásito protozoario son dianas promisorias en la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios

Los avances recientes en el análisis genómico de ciertos parásitos protozoarios revelaron factores claves involucrados en la patogénesis de estas enfermedades. Uno de estos factores es el rol importante de las proteasas (hidrolasas peptídicas, EC 3.4) que utiliza el parásito para entrar a una célula, migrar a través de las barreras de los tejidos, degradar la hemoglobina y otras proteínas de la sangre, escapar al sistema inmune y activar la inflamación.^{4, 38} Las principales proteasas de varios protozoos juegan un rol importante en el desarrollo de la enfermedad parasitaria producida por un protozoo.

Trypanosoma

Cruzaina. La cruzaina (o cruzipaina, GP57/51) es una proteasa del grupo “Cys” (proteasa cisteínica) que es responsable de la actividad proteolítica de *T. cruzi*.³⁹⁻⁴² Es expresada en cada etapa del ciclo vital de este protozoo, está localizada en diferentes partes del organismo del parásito para cumplir con las funciones especiales de cada etapa.

La forma epimastigote (del vector) la tiene localizada en lisosomas, en estos momentos, la cruzaina puede servir para degradar los nutrientes. En la forma tripomastigote extracelular, es responsable de infectar las células del huésped y está fijada a una región especial de los tripomastigotes. En la etapa de transformación de tripomastigotes en amastigote, se localiza en la superficie celular del citoplasma del huésped. También ayuda en la invasión de otras células del huésped por parte de los tripomastigotes.

Debido a la importancia de esta enzima en el funcionamiento normal del parásito, se considera como una diana atractiva e importante en la búsqueda de nuevos compuestos-líderes contra esta enfermedad. Uno de los primeros diseños de inhibidores de la cruzaina estaba enfocado en los inhibidores irreversibles como las vinil sulfonas (**20**)⁴³⁻⁴⁵ (figura 7).

Los estudios en animales indicaron que aunque los compuestos no son tóxicos en dosis terapéuticas, la selectividad de estos inhibidores para la cruzaina y las proteasas-cisteína humanas (catepsinas) era pobre. Sin embargo, este trabajo fue una base para otro diseño de inhibidores selectivos de

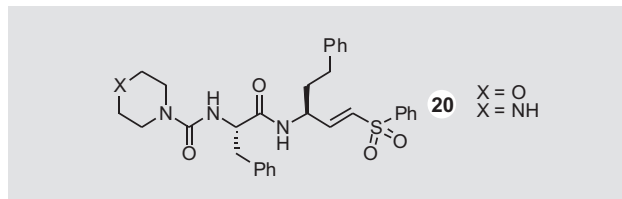


Figura 7. Sistemas utilizados como inhibidores de la enzima cruzaina. Son moléculas tipo vinil sulfonas que pueden interactuar con la cruzaina, inhibiéndola vía la formación de un enlace covalente.

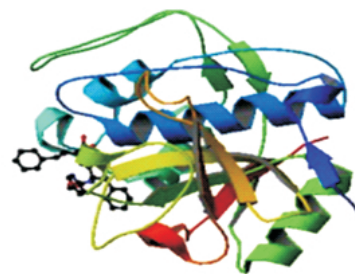
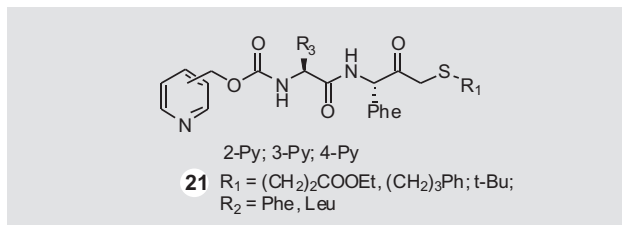


Figura 8. Interacción de los inhibidores (**21**) con el sitio activo de la enzima cruzaina.⁴⁹ Son moléculas tipo α-cetoamidas, tienen una potente actividad inhibitoria y selectividad (cruzaina/catepsinas) aceptable.

estructura general (**21**) que interactúan mucho mejor con el sitio activo de la cruzaina⁴⁶⁻⁴⁸ (figura 8). Los mejores inhibidores de este tipo tienen actividad inhibitoria K_i entre 0.9-10.0 nM y selectividad aceptable.

Los primeros inhibidores (**20**, **21**) tenían una gran desventaja, como se mencionó antes, son compuestos muy reactivos y por ende poco selectivos. Estos compuestos reaccionan con las proteasas cisteínicas u otras que contienen grupos SH. Para incrementar la selectividad y reducir la reactividad y toxicidad, se realizó la búsqueda de otros análogos hasta encontrar las tiosemicarbazonas (**22**) y semicarbazonas (**23**) (figura 9) que exhiben actividad ponente contra cruzaina y actividad tripanocida contra parásitos en cultivos celulares.⁵⁰

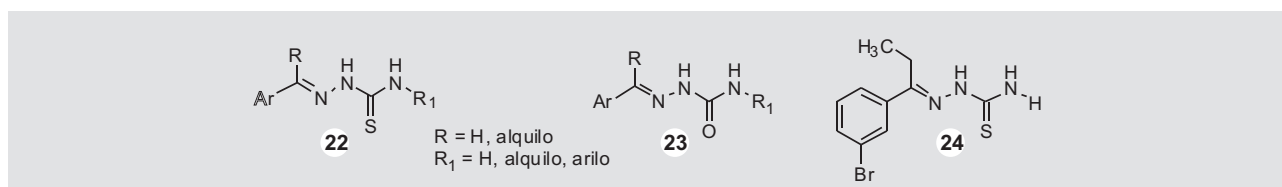


Figura 9. Compuestos sintéticos con alta actividad tripanocida. De sencilla estructura, las tiosemicarbazonas exhiben actividad ponente contra cruzaina y actividad tripanocida contra parásitos en cultivos celulares.

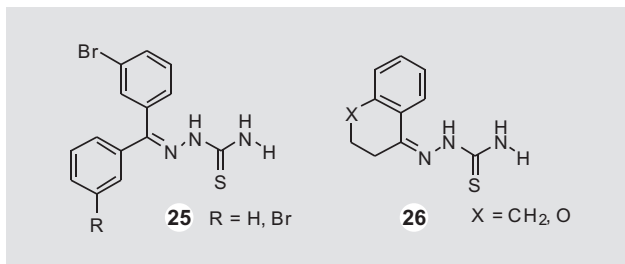


Figura 10. Compuestos-tripanocidas con una alta inhibición de la cruzaina, que se basan en la estructura de los primeros inhibidores. Son moléculas, preparadas a partir de cetonas y tiasemicarbazida. Tienen una capacidad grande para formar un enlace covalente con el residuo Cys de la cruzaina.

En particular, la 3'-bromopropiofenona tiosemicarbazona (**24**) resultó ser un inhibidor enzimático muy potente mostrando alta actividad tripanocida, en concentraciones que no presentan toxicidad para las células mamíferas. Otros estudios demostraron la importancia de este grupo funcional en el diseño de los inhibidores de las proteasas cisteínicas.⁵¹⁻⁵² Los compuestos similares (**25**, **26**) (figura 10) demostraron una potente inhibición de la cruzaina con IC₅₀ 17, 24 y 80 nM.⁵³

Los estudios de *docking* del sitio activo de la cruzaina sugieren que el ataque covalente del residuo Cys25 de la enzima sobre el carbono del grupo C=S de los compuestos **22-26** se realiza mejor gracias a la asistencia del residuo His159 vía la transferencia del H al grupo C=S.^{54,55} (figura 11).

Actualmente, se cree que la búsqueda racional de inhibidores-tripanocidas selectivos dentro nuevos derivados de tiosemicarbazonas es muy perspectiva y tendrá un impacto científico considerable.

Por último, cabe notar que recientemente se logró identificar y definir la estructura de chagasin, un inhibidor

endógeno de las proteasas cisteínicas de *Trypanosoma cruzi*.^{56,57} El conocimiento de la estructura cristalina del chagasin podría contribuir en la elucidación del mecanismo molecular de la inhibición de la cruzaina y otras proteasas cisteínicas de los protozoos similares.

Leishmania

Proteasas del grupo Cys. Las especies de *Leishmania*, particularmente *L. mexicana* y *L. major*, contienen un nivel alto de proteasas cisteínicas que son requeridas para la multiplicación del parásito. Las enzimas más representativas de este grupo son la catepsina L, parecida a la familia de proteasas A (CPA) y B (CPB) y la catepsina B, parecida a la familia de proteasas C (CPC), las cuales se encuentran en los organelos lisosomales de la forma amastigote del parásito. La estructura del sitio activo de estas proteasas puede ser reproducida con la estructura de la papaína.

El modo de acción del sitio activo (triada catalítica) de todas las proteasas cisteínicas consiste en las reacciones nucleófilas de los residuos Cys, His y Asp. Los estudios indicaron que las secuencias primarias de catepsinas B en *L. major* tiene una alta identidad general (54%) con las CPB del hígado humano, pero mucho menos (30%) comparando con la papaína.⁵⁸ Esta aclaración estructural permite diseñar modelos estructurales de CPB y CPL de especies *Leishmania* (Se comprobó que las secuencias de CPB de *L. major* y *L. mexicana* son idénticas en un 80%).

Usando las bases de datos (aprox. 150,000 compuestos comercialmente asequibles) y realizando estudios de interacción proteína-sustrato, se seleccionaron los mejores candidatos, los resultados mostraron que el

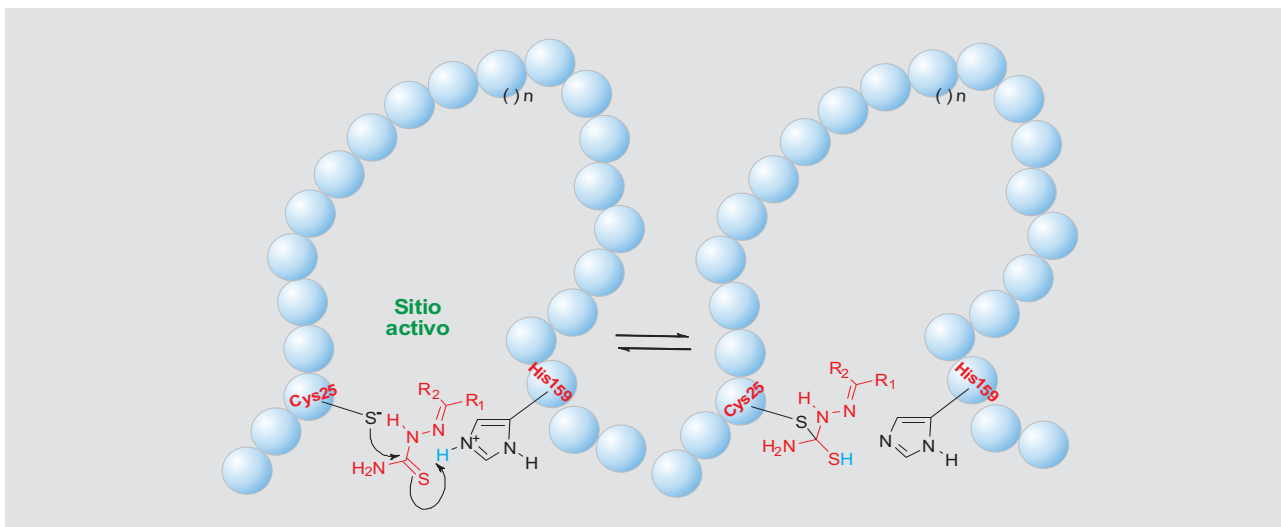


Figura 11. Un posible modo de acción de los tiosemicarbazonas vía inhibición de la cruzaina.^{54,55} La inhibición enzimática se realiza por medio de la reacción nucleófila del anión de azufre del Cys al grupo C=S de la tiosemicarbazona y la transferencia del H del His159.

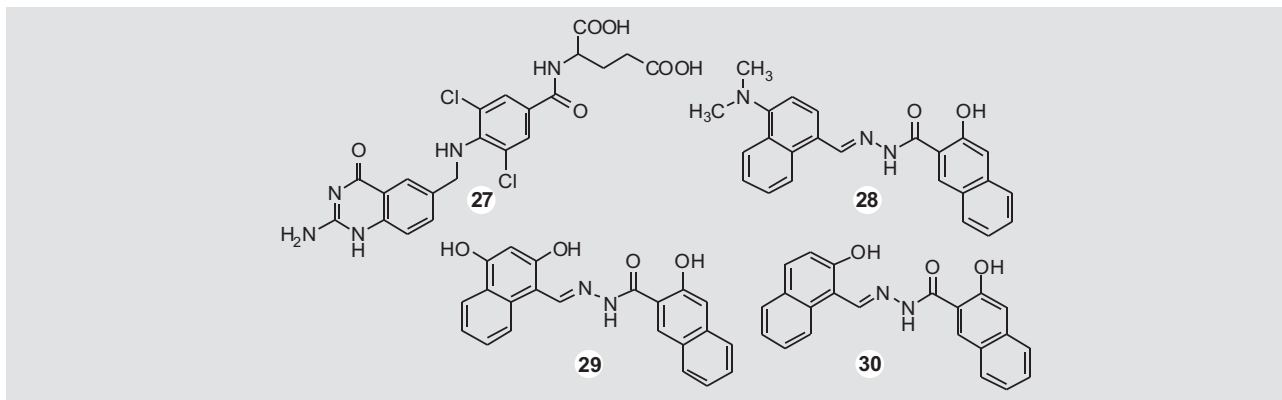


Figura 12. Inhibidores-leishmanicidas de las proteasas cisteínicas. Son moléculas aromáticas con los grupos funcionales (hidroxi, carboxi y amino) que pueden ser responsables por la actividad enzimática.

compuesto más promisorio fue el compuesto PS28 (27) (figura 12).

Luego, estudiaron la segunda generación de los inhibidores no peptídicos de CPB y CPL; los tres inhibidores codificados como ZLIII115A (28), ZLIII43A (29) y ZLIII133A (30) eran efectivos no solo contra la proteasa de *L. major*, sino también contra el parásito, teniendo IC_{50} 0.5-10 μ M. Sin embargo, estos últimos tienen poca selectividad sobre las catepsinas humanas.⁵⁹

Leishmanolisina. Otra diana promisorio del parásito *Leishmania* es la leishmanolisina, una proteasa del grupo "Metal ión", conocida como zinc-proteasa GP63 o PSP (*Promastigote Surface Proteinase*, figura 13), la cuál es un componente abundante de la superficie del promastigote ($\sim 5 \times 10^5$ moléculas por cada célula), donde es activa enzimáticamente contra sustratos polipeptídicos.^{60, 61} Se supone que es un ligando involucrado en la interacción entre el parásito y el sistema defensivo del huésped. Su estructura consiste en tres dominios, dos de los cuales (el dominio N-terminal y el dominio central) contribuyen en la formación del sitio activo: el ión de zinc (II) es coordinado con los átomos ϵ -nitrógeno de His-264, His-268 y His-334 a una distancia de 2.18 Å, 2.18 Å y 2.12 Å, respectivamente; estos

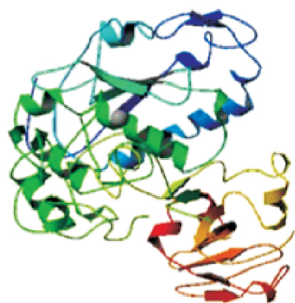


Figura 13. Estructura tridimensional de la metaloproteasa GP63.49 Es una proteasa conocida como zinc-proteasa PSP (*Promastigote Surface Proteinase*); es la segunda molécula importante de la superficie parasitaria que constituye aproximadamente el 1% de la proteína del parásito. Está aumentada en su expresión durante la metacicloogénesis.

parámetros son similares en otras zinc-metaloproteinasas. El desarrollo sintético de los inhibidores-leishmanicidas de la leishmanolisina está todavía en su infancia; no obstante, se considera que su estudio aportará mucha información valiosa en la lucha contra la leishmaniasis.

Plasmodium

Plasmepsinas. Las especies de *Plasmodium* se multiplican asexualmente en las células rojas de su huésped.⁶² El resultado final de esta multiplicación es la aparición de los merozoitos, una forma de vida corta. La proteína superficial más abundante es la MSP-1 (*Merozoite Surface Protein*) cuyo estudio biológico condujo al descubrimiento de un par de proteasas séricas PfSUB-1 y PfSUB-2- que juegan un papel importante en la invasión de las células rojas. Todavía no se conoce con exactitud su mecanismo. Otra proteasa del mismo grupo es la proteasa p76, componente de la membrana de *P. falciparum*. Ambos tipos de proteasas están implicadas en el proceso de invasión de los eritrocitos por parte del parásito. La figura 14 del ciclo vital de *P. falciparum* en los eritrocitos muestra el comienzo de la invasión de un eritrocito (círculos rojos) por parte de un merozoito (círculos negros); ambos tipos de proteasas están implicadas en este proceso.

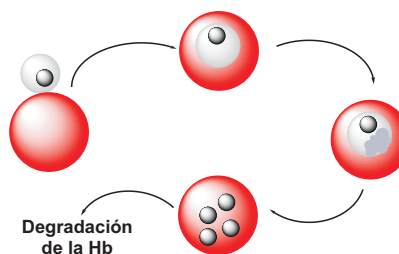


Figura 14. La invasión de los glóbulos rojos por los merozoitos. Los merozoitos se liberan desde las células hepáticas para infectar los eritrocitos en la corriente sanguínea. Una vez dentro de los eritrocitos, la reproducción asexual ocurre en ciclos de 48 horas. Los parásitos se desarrollan en etapas anulares, trofozoitos y luego en esquizontes.

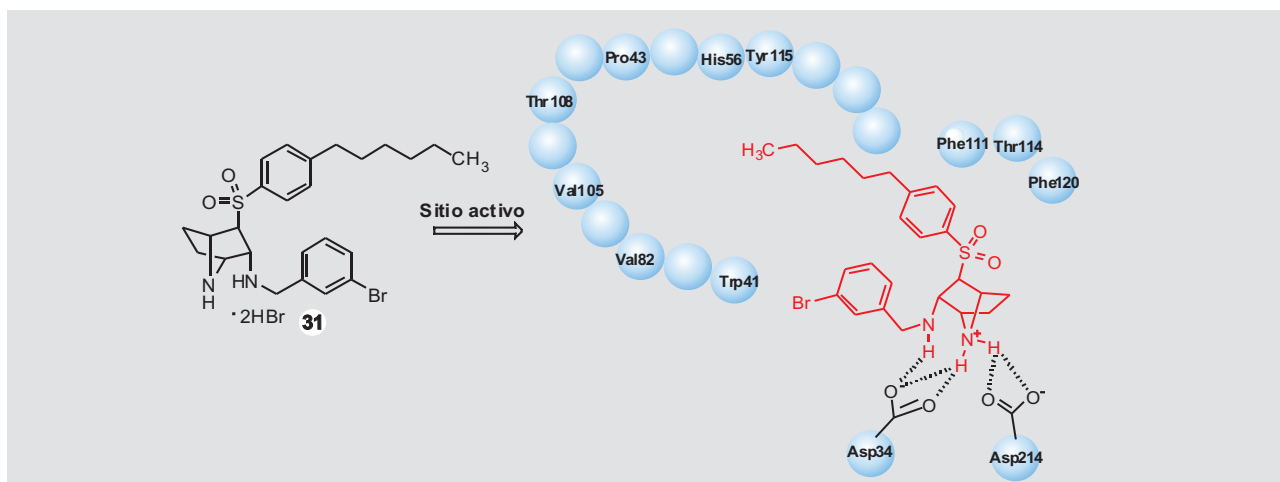


Figura 15. Modelo de inhibición sobre la proteína PM-2. La actividad inhibitoria del compuesto (31), se debe a la interacción del fragmento diamínico con los dos residuos Asp34 y Asp214 de la PM-2 (díada catalítica), por medio de la formación de puentes de hidrógeno.

Durante la fase intraeritrocítica de su ciclo de vida, el parásito de malaria ingiere y degrada una cantidad enorme de la hemoglobina del huésped. La degradación de la Hb es un proceso esencial del parásito y cualquier interrupción de este proceso conduce a la muerte del mismo. Se cree que dicha ruptura promueve la apertura y la liberación del fragmento hemo, el cual inicia un proceso de degradación. En esta última etapa participan otras proteasas - falcipainas (del grupo “Cys”) y falcilinas (del grupo “Metal ión”). Cabe notar que es una etapa de formación de los trofozoitos. Hasta ahora, la información precisa sobre los logros de búsqueda de los inhibidores contra estas proteasas es escasa.^{63,64} En este proceso, dos proteasas del grupo “Asp”, llamadas plasmepsinas: PM-1 y PM-2^{65,66} y otras⁶⁷ también están implicadas.

Las plasmepsinas inician esta degradación vía la hidrólisis del enlace peptídico entre los residuos Phe33 y Leu34 en la cadena α de la hemoglobina y son dianas prometedoras para desarrollar nuevos fármacos antimaláricos. La actividad proteolítica de las plasmepsinas requiere nuevos inhibidores selectivos que serían activos contra todas las plasmepsinas mientras no posean actividad contra las proteasas de “Asp” humanas (catepsinas D y E). Entre las

plasmepsinas, solo la estructura de la PM-2 ha sido caracterizada. Los primeros inhibidores de PM-1 y PM-2 han sido identificados en las colecciones químicas existentes^{68, 69} y en las librerías combinatorias,⁷⁰⁻⁷² tomando como base el modelo estructural de PM-2, el grupo de Prof. Diederich logró preparar algunos inhibidores que interactúan con los residuos Asp34 y Asp214, donde se destaca la diamina (31)⁷³ (figura 15), descubriendo mejoras con respecto a los primeros inhibidores sintéticos.⁷⁴⁻⁷⁶

El objetivo principal de nuestro laboratorio es generar la formación de sistemas heterociclos que puedan tener un amplio rango de actividades farmacológicas. Desde su inicio, nuestros esfuerzos están dedicados a la búsqueda de sustancias activas y su obtención por medio de nuestras propias estrategias. En nuestro laboratorio se preparan y se estudian diversas moléculas nitrogenadas: tetrahydroquinolinas, quinolinas, benzazepinas y piperidinas, entre otras. La atención actual se centra en la preparación efectiva de diversas quinolinas que podrían ser agentes antiparasitarios efectivos, esta idea se encuentra soportada por la información bioquímica de algunas quinolinas tanto naturales como sintéticas (figura 16).

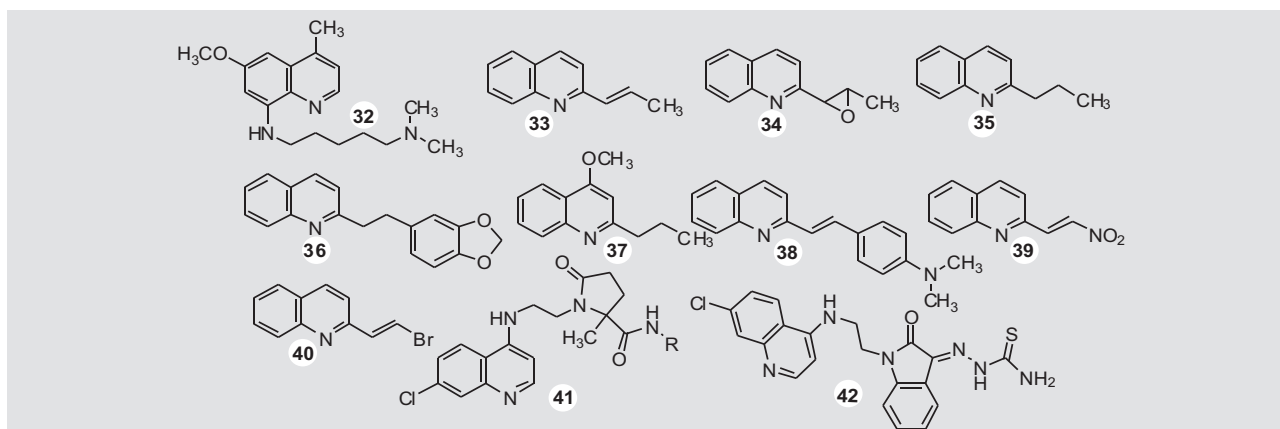


Figura 16. Sistemas quinolínicos con actividad antiparasitaria. Son moléculas tanto naturales como artificiales que actúan selectivamente frente algunos protozoos mencionados en este texto.

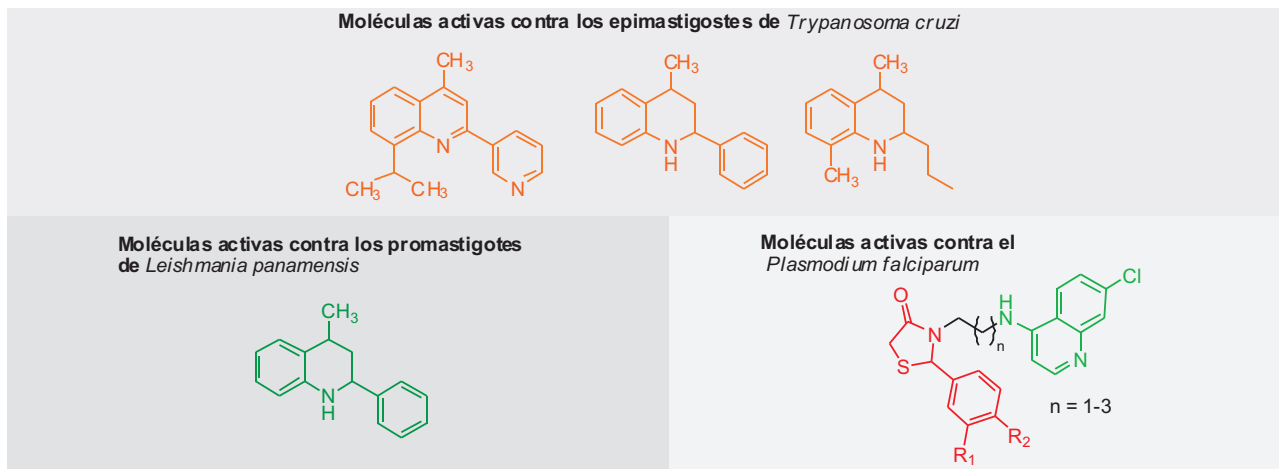


Figura 17. Biomoléculas diseñadas en el LQOBio. Son moléculas fáciles a sintetizar, todas contienen el mismo esqueleto de la quinolina.

Por ejemplo, la quinolina Q45 (**32**) que se ha recomendado como un agente quimioproláctico eficaz para esterilizar la sangre de las transfusiones contra la tripanosomiasis americana,⁷⁷ también es eficaz en el tratamiento de la leishmaniasis visceral. Por otra parte, el árbol *Eventa (Galipea longiflora)*, rutácea resultó ser una fuente rica de las quinolinas C-2 sustituidas (**33-37**, chimaninas **33-35**) que tienen acción terapéutica contra *Leishmania donovani*.⁷⁸⁻⁸¹ Sus análogos sintéticos (**38-40**), recientemente preparados, han demostrado potente actividad contra varios protozoos.⁸²⁻⁸⁴

La rapidez de la adquisición de la resistencia frente los fármacos antimaláricos actuales, sobre todo, la cloroquina obliga a identificar compuestos antimaláricos alternativos. Los enfoques recientes en la disminución de la resistencia de los fármacos basados en las 4-aminoquinolinas incluyen el diseño y síntesis de los inhibidores duales quinolínicos (**41,42**) o “los fármacos dobles” que podrían inhibir la formación de la haemozoína y otra diana diferente de este protozoos.^{85,86} Este enfoque podría funcionar si se buscara la hibridación de las partes electrófilas con los requisitos estructurales mínimos para la actividad biológica de estos protozoos. Dicha hibridación está basada en la selección racional de la variedad de las partes electrófilas y su ligamiento químico con las dianas de los parásitos mencionados.

Basándose en la premisa de que la medicina moderna requiere la intensificación de la elaboración de los fármacos para combatir las enfermedades, en nuestro laboratorio se desarrollan metodologías sintéticas modernas de las reacciones de condensación y/o ciclación multicomponente que pueden contribuir considerablemente tanto al desarrollo y diseño de nuevos fármacos como al desarrollo de la química verde.⁸⁷

Gracias a herramientas sintéticas muy eficientes como son las reacciones de Friedel-Crafts intramoleculares, de cicloadición [4+2] y la condensación de tres componentes, se generaron nuevas bibliotecas pequeñas de diferentes

clases de tetrahydroquinolinas o quinolinas. De otro lado, se desarrollaron nuevos híbridos de cloroquina-tiazolidinonas, cuya preparación consiste en dos pasos sintéticos utilizando la 4,7-dicloroquinolina y sus aminoproductos de sustitución. Análisis de actividades antiparasitarias *in vitro* preliminares de estos compuestos sintetizados⁸⁸⁻⁹² permiten esperar la aparición de nuevos agentes selectivos, accesibles económicamente y no tóxicos (figura 17) en la lucha contra ciertos protozoos.

La síntesis de estos compuestos se basa en la metodología moderna de economía de átomos usando condensaciones multi-componentes entre sustratos baratos y comerciales o sintéticamente accesibles y aplicando lo más posible los criterios de la química verde. En el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, se estudia con mucha admiración y respeto el inacabable surtido de moléculas que provee la impredecible Naturaleza e intenta aportar su modesto trabajo al descubrimiento de moléculas pequeñas con actividad antiparasitaria selectiva, buscando la aplicación de nuevas entidades propias para nuevas dianas de los protozoos, lo que enriquece a la química medicinal de enfermedades parasitarias.

Agradecimientos

Los autores presentan sus agradecimientos al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” (COLCIENCIAS- GENIVAM, contrato No. 432-2004) por su constante apoyo financiero.

Referencias

1. Katzung BG. Farmacología básica y clínica. Manual Moderno, México, 1993:640.
2. Hirst SI, Stapley LA. Parasitology: the dawn of a new millennium. *Parasitol Today* 2000; 16:1-3.
3. Fries DS, Fairlamb AH. In: Abraham DJ (ed). *Burger's medicinal chemistry and drug discovery: chemotherapeutic agents*. John Wiley & Sons, New York, 2003:1033-87.

4. McKerrow JH, Caffrey C, Nelly B, Loke P, Sajid M. Proteases in parasitic diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2006; 1:497-536.
5. Nyalwidhe J, Maier U, Lingelbach K. Intracellular parasitism: cell biological adaptations of parasitic protozoa to a life inside cells. *Zoology* 2003; 106:341-8.
6. Moncayo A. In: WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). World Health Organization, World Bank, Geneva, 1993:67-75.
7. World Health Organization: neglected tropical diseases, http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/index.html. Consultado 03.03.2009.
8. WHO Expert Comitee Control and Surveillance of African Tripanosomiasis. In: WHO Technical Report Series, World Health Organisation, Geneve, 1998, vol. 881.
9. TDR, a Special Programme for Research and Training in Tropical diseases, <http://www.who.int/tdr/svc/diseases/leishmaniasis>. Consultado: 06.03.2009
10. Pepin J, Khonde N, Maiso F, Doua F, Jaffar S, Ngampo S, et al. Short-course eflornithine in Gambian trypanosomiasis: a multicentre randomized controlled trial. *Bull World Health Organ* 2000; 78:1284-95.
11. World Health Organization. Rapport sur la Santé dans le Monde, 1998. WHO, Geneve, 1998: 48.
12. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in Infection by Leishmania. *Exp Mol Path* 2002; 72:132-41.
13. Croft SL, Seifert K, Duchêne M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues *Mol Biochem Parasitol* 2003; 126:165-72.
14. Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia MK, Goyal AK, Mandal AK, Voss A, et al. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet* 1998; 352:1821.
15. Sundar S, Gupta LB, Makharia MK, Singh MK, Voss A, Rosenkaimer F, et al. Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. *Ann Trop Med Parasitol* 1999; 93:589-97.
16. Bhattacharya SK, Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, et al. Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. *Clin Infect Dis* 2004; 38:217-21.
17. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *New Engl J Med* 2002; 347:1739-46.
18. TDR, a Special Programme for Research and Training in Tropical diseases, <http://www.who.int/tdr/svc/diseases/malaria>. Consultado: 06.03.2009
19. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. *Nature* 2005; 43:214-7.
20. Wiesner J, Ortmann R, Jomaa H, Schlitzer M. New antimalarial drugs. *Angew Chem Int Ed* 2003; 42:5274-93.
21. Bray PG, Ward SA, O'Neill PM. In: Sullivan DJ, Krishna S (eds). *Malaria: drugs, disease and post-genomic biology*. Springer-Verlag, Berlin, 2005:4-38.
22. Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* 1985; 228:1049-55.
23. Posner GH, O'Neill PM. Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome P450 metabolism of antimalarial trioxanes like artemisinin allows rational design of new antimalarial peroxides. *Acc Chem Res* 2004; 37:397-404.
24. Egan TJ, Hunter R, Kaschula CH, Marques HM, Misplon A, Walden J. Structure-function relationships in aminoquinolines: effect of amino and chloro groups on quinoline-hematin complex formation, inhibition of hematin formation, and antiplasmodial activity. *J Med Chem* 2000; 43:283-91.
25. O'Neill PM, Mukhtar A, Stocks PA, Randle LE, Hindley S, Ward SA, et al. Isoquine and related amodiaquine analogues: a new generation of improved 4-aminoquinolines antimalarials. *J Med Chem* 2003; 46:4933-45.
26. Kaschula CH, Egan TJ, Hunter R, Basilico N, Parapini S, Taramelli D, et al. Structure activity relationships in 4-aminoquinoline antiplasmodials. The role of the group at the 7-position. *J Med Chem* 2002; 45:3531-39.
27. Biot C, Glorian G, Maciejewski LA, Brocard JS. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of a new ferrocene-chloroquine analogue. *J Med Chem* 1997; 40:3715-18.
28. Sánchez-Delgado RA, Navarro M, Pérez H, Urbina JA. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 2. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of new ruthenium- and rhodium-chloroquine complex. *J Med Chem* 1996; 39:1095-99.
29. Jain M, Vangapandu S, Sachdeva S, Singh S, Singh PP, Jena GP, et al. Discovery of a bulky 2-tert-butyl group containing primaquine analogue that exhibits potent blood-schizontocidal antimalarial activities and complete elimination of methemoglobin toxicity. *J Med Chem* 2004; 47:285-87.
30. Bass GE, Hudson DR, Parker JE, Purcell WP. Mechanism of antimalarial activity of chloroquine analogs from quantitative structure-activity studies. Free energy related model. *J Med Chem* 1971; 14:275-83.
31. Bolte J, Demuynck C, Lhomme F. Synthetic models of DNA complex with antimalarial compounds. 2. The problem of the guanine specificity in chloroquine binding. *J Med Chem* 1977; 20:106-13.
32. Bolte J, Demuynck C, Lhomme F, Lhomme J, Barbet J, Roques BP. Synthetic models related to DNA intercalating molecules: comparison between quinacrine and chloroquine in their ring-ring interaction with adenine and thymine. *J Am Chem Soc* 1982; 104:760-5.
33. Foley M, Tilley L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. *Inter J Parasitol* 1997; 2:231-46.
34. Foley M, Tilley L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects of new agent. *Pharmacol Ther* 1998; 79:55-87.
35. Egan TE. Haemozoin (malaria pigment): a unique crystalline drug target. *Targets*. 2003; 2:115-24.
36. Stocks PA, Raynes KJ, Bray PG, Park BK, O'Neill PM, Ward SA. Novel short chain chloroquine analogues retain activity against chloroquine resistant K1 Plasmodium Falciparum. *J Med Chem* 2002; 45:4975-83.
37. Horton DA, Bourne GT, Smythe ML. The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures. *Chem Rev* 2003; 103:893-930.
38. Klemba M, Goldberg DE. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem* 2002; 71:275-305.
39. McGrath ME, Eakin AE, Engel JC, McKerrow JH, Craik CS, Fletterick RJ. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. *J Mol Biol* 1995; 247:251-9.

40. Otto HH, Schirmeister T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem Rev* 1997; 97:133-71.
41. McKerrow JH, Ángel JC, Caffrey CR. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg Med Chem* 1999; 7: 639-44.
42. Huang L, Lee A, Ellman JA. Identification of potent and selective mechanism-based inhibitors of the cysteine protease Cruzain using solid-phase parallel synthesis. *J Med Chem* 2002; 45: 676-84.
43. Bromme D, Klaus JL, Okamoto K, Rasnick D, Palmer JT. Peptidyl vinyl sulphones: a new class of potent and selective cysteine protease inhibitors. *Biochem J* 1996; 315:85-9.
44. Palmer JT, Rasnick D, Klaus JL, Bromme D. Vinyl sulfone as mechanism-based cysteine protease inhibitors. *J Med Chem* 1995; 38:3193-6.
45. Roush WR, Gwaltney II SL, Cheng J, Scheidt KA, McKerrow JH, Hansell E. Vinyl sulfone esters and vinyl sulfonamides: potent, irreversible inhibitors of cysteine proteases. *J Am Chem Soc* 1998; 120:10994-5.
46. Huang L, Brinen LS, Ellman JA. Crystal structures of reversible ketone-based inhibitors of the cysteine protease cruzain. *Bioorg Med Chem* 2003; 11:21-9.
47. Choe Y, Brinen LS, Price MS, Engel JC, Lange M, Grisostomi C, et al. Development of alpha-keto-based inhibitors of cruzain, a cysteine protease implicated in Chagas disease. *Bioorg Med Chem* 2005; 13:2141-56.
48. Roush WR, Hernandez AA, McKerrow JH, Selzer PM, Hansell E, Engel JC. Design, synthesis and evaluation of d-homophenylalanyl epoxysuccinate inhibitors of the trypanosomal cysteine protease Cruzain. *Tetrahedron* 2000; 56: 9747-62.
49. Representaciones estructurales de estas proteínas son dominio público, ver PDB (Protein Data Bank): <http://www.pdb.org>. Consultado 03.03.2009.
50. Du X, Guo C, Hansell E, Doyle PS, Caffrey CR, Holler TP, et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease Cruzain. *J Med Chem* 2002; 45:695-707.
51. Greenbaum DC, Mackey Z, Hansell E, Doyle P, Gut J, Caffrey CR, et al. Synthesis and structure-activity relationships of parasiticidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. *J Med Chem* 2004; 47:3212-9.
52. Fujii N, Mallari JP, Hansell EJ, Mackey Z, Doyle P, Zhou YM, et al. Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15:121-3.
53. Siles R, Chen SE, Zhou M, Pinney KG, Trawick ML. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16:4405-9.
54. Du X, Hansell E, Engel JC, Caffrey CR, Cohen FE, McKerrow JH. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents. *Chem Biol* 2000; 7:733-42.
55. Jordán J, Galindo MF, Ceña V, González-García C. Sistema proteasas y neurogeneración. *Rev Neurol* 2000; 31:333-40.
56. Monteiro AC, Abrahamson M, Lima AP, Vannier-Santos MA, Scharfstein J. Identification, characterization, and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci* 2001; 114:3933-42.
57. De Silva AAF, de Carvalho Vieira L, Krieger MA, Goldenberg S, Tonin Zanchin NI, Gomes Guimarães B. Crystal structure of chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor from *Trypanosoma cruzi*. *J Structural Biology* 2007; 157:416-23.
58. Selzer PM, Cheg X, Chan VJ, Cheng M, Kenyon GL, Kuntz ID, et al. *Leishmania major*: molecular modeling of cysteine proteases and prediction of new nonpeptide inhibitors. *Exp Parasitol* 1997; 87:212-21.
59. Leung D, Giovanni Abbenante G, Fairlie DP. Protease Inhibitors: Current Status and Future Prospects. *J Med Chem* 2000; 43:305-41.
60. Schlagenhauf E, Etges R, Metcalf P. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp 63). *Structure* 1998; 6:1035-46.
61. Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 132:1-16.
62. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 2006; 124:755-66.
63. Olson JE, Lee GK, Semenov A, Rosenthal PJ. Antimalarial effects in mice of orally administered peptidyl cysteine protease inhibitors. *Bioorg Med Chem* 1999; 7:633-38.
64. Singh A, Rosenthal PJ. Comparison of efficacies of cysteine protease inhibitors against five strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:949-51.
65. Silva AM, Lee AY, Gulnik SV, Majer P, Collins J, Bhat TN, et al. Structure and inhibition of plasmepsin II, a hemoglobin-degrading enzyme from *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:10034-9.
66. Boss C, Richard-Bildstein C, Weller T, Fischli W, Meyer S, Binkert C. Inhibitors of the *Plasmodium falciparum* parasite aspartic protease plasmepsin II as potential antimalarial agents. *Curr Med Chem* 2003; 10:883-907.
67. Nezami A, Kimura T, Hidaka K, Kiso A, Liu J, Kiso Y, et al. High-affinity inhibition of a family of *Plasmodium falciparum* proteases by a designed adaptative inhibitor. *Biochemistry* 2003; 42:8459-64.
68. Tyas L, Gluzman I, Moon RP, Rupp K, Westling J, Ridley RG, et al. Naturally-occurring and recombinant forms of the aspartic proteinases plasmepsins I and II from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett* 1999; 454:210-4.
69. Jiang S, Prigge ST, Wei L, Gao Y, Hudson TH, Gerena L, et al. New class of small nonpeptidyl compounds blocks *Plasmodium falciparum* development in vitro by inhibiting plasmepsins. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2577-84.
70. Carroll CD, Johnson TO, Tao S, Lauri G, Orlowski M, Gluzman IY, et al. Evaluation of a structure-based statine cyclic diamino amide encoded combinatorial library against plasmepsin II and cathepsin D. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8:3203-6.
71. Carroll CD, Patel H, Johnson TO, Guo T, Orlowski M, Zhen-Min He Z-M, et al. Identification of potent inhibitors of *Plasmodium falciparum* plasmepsin II from an encoded statine combinatorial library. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8:2315-20.
72. Haque TS, Skillman AG, Lee CE, Habashita H, Ilya Y, Gluzman IY, et al. Potent, low-molecular-weight non-peptide inhibitors of malarial aspartyl protease Plasmepsin II. *J Med Chem* 1999; 42:1428-40.

73. Hof F, Schütz A, Fäh C, Meyer S, Bur D, Liu J, et al. Starving the malaria parasite: inhibitors active against the aspartic proteases Plasmeppsins I, II, and IV. *Angew Chem Int Ed* 2006; 45:2138-41.
74. Carcache DA, Hirtner SR, Bertogg A, Diederich F, Dorn A, Jrki M, et al. A new class of inhibitors for the malarial aspartic protease plasmepsin II based on a central 11-azatricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-2,4,6-triene scaffold. *Helv Chim Acta* 2003; 86:2192-209.
75. Carcache DA, Hörtner SR, Seiler P, Diederich F, Dorn A, Märki HP, et al. Development of a new class of inhibitors for the malarial aspartic protease Plasmeppsins II based on a central 7-azabicyclo[2.2.1]heptane Scaffold. *Helv Chim Acta* 2003; 86:2173-91.
76. Carcache DA, Hörtner SR, Bertogg A, Binkert C, Bur D, Märki HP, et al. De novo design, synthesis, and in vitro evaluation of a new class of nonpeptidic inhibitors of the malarial enzyme plasmepsin II. *ChemBioChem* 2002; 3:1137-41.
77. Chiari E, Oliveira AB, Prado MA, Alves RJ, Galvao LM, et al. Potential use of WR6026 as prophylaxis against transfusion-transmitted American trypanosomiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:613-5.
78. Fournet A, Vagneur B, Richomme P, Bruneton J. Aryl-2 et alkyl-2 quinoleines nouvelles isolées d'une Rutacée bolivienne: *Galipea longiflora*. *Can J Chem* 1989; 67:2116-8.
79. Fournet A, Barrios AA, Muñoz V, Hocquemiller R, Cavé A, Bruneton J. 2-Substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:859-63.
80. Fournet A, Gantier JC, Gautheret A, Leysalles L, Munos MH, Mayrargue J, et al. The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33:537-44.
81. Fournet A, Hocquemiller R, Roblot F, Cavé A, Richomme R, Bruneton J. Les chimanines, nouvelles quinoleines substituées en 2, isolées d'une plante bolivienne antiparasitaire: *Galipea longiflora*. *J Nat Prod* 1993; 56:1547-52.
82. Frank X, Fournet A, Prina E, Mahieux R, Hocquemiller R, Figadère B. Biological evaluation of substituted quinolines. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14:3635-38.
83. Seck M, Frank X, Hocquemiller R, Figadère B, Peyrat J-F, Provot O, et al. Synthesis of substituted quinolines by iron-catalyzed coupling reactions between chloroenynes and Grignard reagents. *Tetrahedron Lett* 2004; 45:1881-4.
84. Farhfakh MA, Frank X, Fournet A, Hocquemiller R, Figadère B. Expeditious preparation of 2-substituted quinolines. *Tetrahedron Lett* 2001; 42:3847-50.
85. Burgess SJ, Selzer A, Kelly JX, Smilkstein MJ, Riscoe MK, Peyton DH. A Chloroquine-like molecule designed to reverse resistance in *Plasmodium falciparum*. *J Med Chem* 2006; 49:5623-5.
86. Chipeleme A, Gut J, Rosenthal PJ, Chibale K. Synthesis and biological evaluation of phenolic Mannich bases of benzaldehyde and (thio)semicarbazone derivatives against the cysteine protease falcipain-2 and a chloroquine resistant strain of *Plasmodium falciparum*. *Bioorg Med Chem* 2007; 15:273-82.
87. Zhu J, Bienaymé H (eds). Multicomponent reactions. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2005: 1-484.
88. Kouznetsov VV, Vargas LY, Tibaduiza B, Ochoa C, Montero M, Nogal JJ, et al. 4-N-Aryl(benzyl)amino-4-hetarylbut-1-enes as building blocks in heterocyclic synthesis. 4. Synthesis of 4,6-dimethyl-5-nitro(amino)-2-pyridylquinolines and their antiparasitic activities. *Archiv Pharmazie* 2004; 337:127-32.
89. Kouznetsov V, Rodríguez W, Stashenko EE, Ochoa C, Vega C, Rolón M, et al. Transformation of schiff bases derived from -naphthaldehyde. Synthesis, spectral data and biological activity of new 3-aryl-2-(-Naphthyl)-4-thiazolidinones and N-aryl-N-[1-(-Naphthyl)but-3-enyl]amines. *J Heterocycl Chem* 2004; 41:995-8.
90. Kouznetsov VV, Rivero J, Ochoa C, Stashenko EE, Martínez JR, Ochoa C, et al. Synthesis and antiparasitic properties of new 4-N-benzylamino-4-heteroarylbut-1-enes. 5. *Archiv Pharmazie* 2005; 338:32-7.
91. Gómez A, Montero D, Nogal JJ, Escario JA, Muelas S, Kouznetsov VV, et al. Antiparasitic properties of homoallylamines and related compounds. *Acta Parasitol* 2006; 51:73-8.
92. Kouznetsov VV, Vargas LY, Leal SM, Mora U, Coronado CA, Meléndez CM, et al. Target-oriented synthesis of antiparasitic 2-hetaryl substituted quinolines based on imino Diels-Alder reactions. *Lett Drug Design Discov* 2007; 4:293-6.