

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2016/038238 A1

(43) Fecha de publicación internacional
17 de marzo de 2016 (17.03.2016) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/415 (2006.01) *A61P 33/02* (2006.01)
C07D 231/14 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2015/070658

(22) Fecha de presentación internacional:
10 de septiembre de 2015 (10.09.2015)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201431309
11 de septiembre de 2014 (11.09.2014) ES

(71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [ES/ES]; Complejo Administrativo Triunfo, Pab. 1, Cuesta del Hospicio, s/n, E-18071 Granada (ES). **UNIVERSITAT DE VALENCIA** [ES/ES]; Avda. Blasco Ibañez, 13, E-46010 Valencia (ES).

(72) Inventores: **REVIRIEGO PICON, Felipe**; Instituto de Química Medica (IQM), C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **NAVARRO TORRES, Pilar**; Instituto de Química Medica (IQM), C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **ARAN REDO, Vicente J.**; Instituto de Química Medica (IQM), C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **SANCHEZ MORENO, Manuel**; Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Complejo Administrativo Triunfo, Pab. 1, Cuesta del Hospicio, s/n, E-18071 Granada (ES). **MARIN SANCHEZ, Clotilde**; Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Complejo Administrativo Triunfo, Pab. 1, Cuesta del Hospicio, s/n, E-18071 Granada (ES). **OLMO AREVALO, Francisco**; Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Complejo Administrativo Triunfo, Pab. 1, Cuesta del Hospicio, s/n,

E-18071 Granada (ES). **RAMIREZ MACIAS, Inmaculada**; Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Complejo Administrativo Triunfo, Pab. 1, Cuesta del Hospicio, s/n, E-18071 Granada (ES). **GARCIA-ESPAÑA MONSONIS, Enrique**; Universitat de Valencia, Avda. Blasco Ibañez, 13, E-46010 Valencia (ES). **ALBELDA GIMENO, María Teresa**; Universitat de Valencia, Avda. Blasco Ibañez, 13, E-46010 Valencia (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (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: USE OF ESTER DERIVATIVES OF PYRAZOLE PROTON-IONIZABLE COMPOUNDS AND THE CORRESPONDING SALTS THEREOF FOR THE TREATMENT OF CHAGAS DISEASE AND LEISHMANIASIS

(54) Título : USO DE ÉSTERES DERIVADOS DE PIRAZOL PROTÓN-IONIZABLES Y SUS CORRESPONDIENTES SALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS Y LA LEISHMANIASIS

(57) Abstract: The invention relates to the use of ester derivatives of pyrazole, preferably proton-ionizable derivatives in neutral form or in the form of salts (pyrazolates), as drugs and, more particularly, for preventing and/or for treating diseases of parasitic origin such as Chagas disease or leishmaniasis.

(57) Resumen: Uso de ésteres derivados de pirazol, preferiblemente derivados protón-ionizables en forma neutra o en forma de sales (pirazolatos), como medicamentos y más particularmente para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de origen parasitario tales como la enfermedad de Chagas o la leishmaniasis.



WO 2016/038238 A1

**USO DE ÉSTERES DERIVADOS DE PIRAZOL PROTÓN-IONIZABLES Y SUS
CORRESPONDIENTES SALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD
DE CHAGAS Y LA LEISHMANIASIS**

5

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere al uso de ésteres derivados de pirazol protón-ionizables en forma neutra o en forma de sales (pirazolatos), como medicamentos y más particularmente para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de origen parasitario tales como la enfermedad de Chagas o la leishmaniasis.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana) es una enfermedad tropical infecciosa catalogada en el grupo de las denominadas “enfermedades olvidadas” (“neglected diseases”), que afecta en América Latina a millares de personas en áreas de población con bajos recursos económicos, y representa por tanto un grave problema de salud.

Se trata de una enfermedad parasitaria, generalmente crónica, causada por el parásito protozoario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). El reservorio natural lo constituyen armadillos, marsupiales, roedores, murciélagos y primates silvestres, además de ciertos animales domésticos (perros y gatos). Se transmite al hombre por triatomíneos hematófagos tales como *Triatoma infestans*, *Rhodius prolixus* o *Triatoma dimidiata*, que defecan sobre las picaduras que ellos mismos han realizado para alimentarse. La enfermedad puede ser también transmitida por mecanismos no vectoriales tales como transfusión de sangre contaminada o donación de órganos, por ingestión de alimentos contaminados o verticalmente de una madre infectada al feto.

Inicialmente, la fase de infección aguda es normalmente asintomática, y la mayor parte de los pacientes no se da cuenta de que han sido infectados; pero esta fase aguda evoluciona posteriormente a un estado crónico, al cual llegan entre el 30% y el 40% de todos los enfermos chagásicos, en el que se manifiestan severas complicaciones a los 10-30 años posteriores a la infección. Suele producirse cardiomiopatía difusa grave, alteraciones del sistema nervioso periférico, dilatación patológica del esófago y colon,

megaesófago, y megacolon, respectivamente. Muchos de ellos sufren fallo cardiaco y muerte súbita. Debido al gran incremento de viajes internacionales y a la inmigración, la enfermedad de Chagas se ha extendido, no solo a través de toda América Latina, sino también a Estados Unidos, Canadá, España, Italia y otros países.

5

Actualmente no hay una terapia adecuada ni una vacuna efectiva. Los dos medicamentos principalmente utilizados para tratar la enfermedad de Chagas son dos heterociclos nitroaromáticos descubiertos hace más de tres décadas: el nifurtimox (Nfx, 3-metil-4-(5-nitrofurfurilidenamino)tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido, Lampit[®],
10 que recientemente se ha dejado de fabricar por Bayer), y el benznidazol (Bzn, N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida, Rochagan[®] de Roche, ahora fabricado por LAFEPE en Brasil). El uso de dichos medicamentos en la fase aguda es ampliamente aceptado, pero su eficacia en la fase crónica es bastante controvertida, y se calcula que la cura parasitológica en esta fase sólo se obtiene en un 10-20% de los pacientes
15 [Maya, J.D. et al., *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **2007**, 146, 601-620]. Además, causan efectos secundarios severos como pancreatitis y toxicidad cardiaca. El más utilizado en clínica es el benznidazol, a pesar de que en adultos genera un considerable número de efectos secundarios adversos, tales como trastornos digestivos, hematológicos, dermatológicos y neurológicos [Castro, J.A. et al., *Hum. Exp. Toxicol.* **2006**, 25, 471-479].
20

Otro aspecto preocupante de la enfermedad de Chagas es la alta capacidad de reactivación de la parasitemia en individuos inmunodeprimidos. Se ha comprobado que pacientes curados que han sido sometidos posteriormente a trasplante de riñón o
25 hígado, diagnosticados de sida, o tratados con quimioterapia anticancerosa, sufrieron reactivación de la enfermedad de Chagas con un curso clínico muy agresivo conduciendo a meningoencefalitis y/o miocarditis aguda. De hecho, cuando enfermos con cardiopatía chagásica crónica sufren trasplante cardiaco, se produce reactivación de la parasitemia y el tratamiento con benznidazol solo conduce a remisión temporal,
30 pero la infección por *T. cruzi* persiste [Campos, S.V. et al., *J. Heart Lung Transp.* **2008**, 27, 597-602].

Considerando estos hechos, puede concluirse que urge la necesidad de encontrar nuevos medicamentos menos tóxicos para los pacientes y más efectivos en la fase
35 crónica de la enfermedad de Chagas que el benznidazol, utilizado actualmente, y que

tengan además la capacidad de reducir la reactivación de la parasitemia en casos de inmunodeficiencia.

Otra importante enfermedad producida por parásitos protozoarios kinetoplástidos es la leishmaniasis, causada por la infección con diferentes especies de protozoos del género *Leishmania*, que se transmite a través de la picadura de dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. Actualmente, la leishmaniasis es endémica en 98 países, principalmente en América, pero también en Europa y Asia, con más de 350 millones de personas en riesgo, más de 2 millones de nuevos casos cada año, y una mortalidad anual que supera los 60.000 pacientes. La Organización Mundial de la Salud la ha clasificado en noveno lugar entre las enfermedades infecciosas más severas.

La leishmaniasis se puede presentar con diferentes manifestaciones clínicas: (I) visceral, que es la más severa de todas; (II) la cutánea, que origina nódulos y úlceras que pueden persistir durante años; y (III), la mucocutánea, que causa lesiones permanentes en la boca, nariz o en la mucosa genital. La leishmaniasis visceral es la forma clínica que se cobra más vidas mundialmente. Puede ser fatal si no se trata a tiempo y se caracteriza por la inflamación del hígado y del bazo, acompañada por distensión abdominal severa, pérdida de condición corporal, desnutrición y anemia.

La *Leishmania infantum* (*L. infantum*) se considera que es el principal agente etiológico de la leishmaniasis visceral en el sureste de Europa. Utiliza perros como reservorio y afecta principalmente a niños, aunque la coinfección con HIV y el uso creciente de quimioterapia para inmunosupresión en trasplantes han conducido a un aumento considerablemente del porcentaje de casos en adultos. Otra especie significativa es la *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) que afecta principalmente a los países andinos, y cuenca de la Amazonia, y causa leishmaniasis cutánea y mucocutánea.

El tratamiento de la leishmaniasis es complicado. No hay vacunas efectivas y las pruebas diagnósticas no son específicas debido a las deficientes medidas de control del vector [Barrett, M.P. et al., *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, 2, 471-482]. La quimioterapia es el arma principal para combatir las manifestaciones clínicas de la mayoría de las formas de leishmaniasis. Los medicamentos que se han utilizado comúnmente hasta ahora son el estibogluconato sódico (Pentostan®) y el antimonio

de meglumina (Glucantime®). Pero son muy inefectivos y causan multitud de efectos secundarios tóxicos tales como náuseas, vómitos, diarrea, erupciones cutáneas, vértigos, arritmia cardíaca, hipotensión, hepatitis y pancreatitis. El tratamiento actual con Glucantime, se basa en la aplicación intramuscular durante un plazo de 20 a 30 días. Sin embargo, este fármaco muestra una toxicidad elevada y además no es efectivo [Palumbo, E., *Am. J. Ther.* **2009**, *16*, 178-182].

Otros medicamentos utilizados son: anfotericina B (AmBiosome®) que se administra durante un máximo de 10 días y no presenta 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. Por otra parte, las infecciones repetidas o los tratamientos inefectivos han ocasionado resistencia de los parásitos a estas terapias [Singh, N. et al., *Indian J. Med. Res.* **2006**, *123*, 411- 422]. Por lo tanto, resulta necesario obtener nuevos agentes antileishmaniásicos de menor coste, mayor efectividad y con menores efectos secundarios adversos.

La búsqueda de nuevos medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y de la leishmaniasis se ha centrado principalmente en su acción potencial sobre componentes esenciales y exclusivos de tripanosomátidos. Entre las enzimas específicas de tripanosomátidos se encuentra la hierro superóxido dismutasa (FeSOD), que juega un papel fundamental en la supervivencia de parásitos tales como *T. cruzi* y *Leishmania* spp., por su capacidad para evadir el daño originado por los radicales tóxicos del hospedador. Como la FeSOD no está presente en humanos puede considerarse una atractiva diana para la búsqueda de nuevos medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y de la leishmaniasis. Dado que los grupos prostéticos son esenciales en todos los procesos enzimáticos, las modificaciones en el centro activo de la enzima, ya sea por disociación del metal o por cambios en la geometría de coordinación, podrían ser una vía eficaz para desactivar su acción antioxidante, y posiblemente afectar tanto al crecimiento como a la supervivencia de las células del parásito.

Se ha descrito anteriormente que alquilamino derivados de benzo[g]ftalazina o ftalazina con actividad antiparasitaria *in vitro* y/o *in vivo* frente a *T. cruzi* y *Leishmania* spp., mostraron una potente capacidad de inhibición de la FeSOD de los respectivos

parásitos [Sánchez-Moreno, M. et al., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9900-9913]. De forma similar, poliaminas macrocíclicas y macrobíclicas conteniendo anillos de pirazol, que inhiben la FeSOD de *T. cruzi*, mostraron actividad tripanosomicida en las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas [Sánchez-Moreno, M. et al., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4231-4243]. Sin embargo, no se ha descrito hasta el momento la utilización de ésteres acíclicos sencillos derivados de pirazol protón-ionizables y de sus correspondientes sales (pirazolatos), a los que hace referencia esta invención, ni como inhibidores de FeSOD ni como agentes antiparasitarios para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis.

10

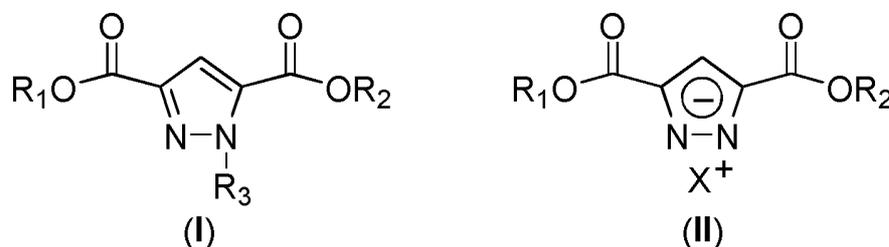
DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona el uso de unos compuestos de baja toxicidad y bajo coste, que poseen una potente actividad antiparasitaria frente a la clase Kinetoplastea y en concreto frente a la familia *Trypanosomatidae*, en particular actividad tripanosomicida en la enfermedad de Chagas, más particularmente, en casos de inmunodeficiencia en los que se produce frecuentemente reactivación de la parasitemia, además de actividad frente a la leishmaniasis. En general, dichos compuestos se caracterizan por una potente eficacia para inhibir la enzima hierro superóxido dismutasa (FeSOD). Dado que la supervivencia del parásito está estrechamente vinculada a la capacidad de sus enzimas (FeSOD) de evitar el daño originado por los radicales tóxicos de su hospedador y que, por lo tanto, la FeSOD desempeña un papel relevante como parte de la defensa antioxidante en los parásitos que causan dichas enfermedades, en la presente invención se han utilizado compuestos de fórmula (I) y (II) capaces de inhibir la FeSOD de *Trypanosoma* y *Leishmania*, limitando su defensa antioxidante frente a los radicales tóxicos del hospedador.

Como se evidencia en los ejemplos, los compuestos de la invención son estructuralmente diferentes a los fármacos conocidos y presentan una toxicidad mucho menor. Son particularmente significativos los resultados de actividad antiparasitaria y baja toxicidad obtenidos *in vivo* frente a *T. cruzi*, en la fase aguda y en la crónica de la enfermedad de Chagas, así como en condiciones de inmunodeficiencia en las que se producen procesos de reactivación de la parasitemia.

35

Un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) o (II) (a partir de ahora compuestos de la invención):



5

donde:

R_1 y R_2 , pueden ser iguales o diferentes y representan un grupo alquilo (C_1-C_{10});

R_3 se selecciona de entre hidrógeno o un grupo alquilo (C_1-C_{10}); y

X^+ es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable;

10 para la elaboración de un medicamento, preferiblemente el medicamento es un agente antiparasitario.

15 Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula general (I) o (II), descritos en la presente invención, para su uso como medicamento.

20 El término "alquilo", se refiere en la presente invención, a cadenas alifáticas lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *sec*-butilo o *terc*-butilo. Preferiblemente el grupo alquilo tiene de 1 a 4 átomos de carbono.

En una realización preferida los compuestos de la invención R_3 es hidrógeno.

25 En otra realización preferida, R_1 y/o R_2 es un grupo alquilo (C_1-C_4), más preferiblemente R_1 y R_2 son iguales.

En una realización preferida, X^+ es un catión alcalino, más preferiblemente se selecciona de entre Li^+ , Na^+ o K^+ , aún más preferiblemente es Na^+ .

30 En una realización preferida el compuesto de la invención se selecciona de entre:

1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dimetilo;

- 3,5-bis(metoxicarbonil)pirazolato sódico;
- 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dietilo;
- 3,5-bis(etoxicarbonil)pirazolato sódico;
- 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dipropilo;
- 5 3,5-bis(propoxicarbonil)pirazolato sódico;
- 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de diisopropilo; y
- 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dibutilo.

En una realización más preferida, los compuestos de la invención son 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dietilo o 3,5-bis(etoxicarbonil)pirazolato sódico, aún más preferiblemente el compuesto es el 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dietilo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) o (II) según se han descrito previamente, para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad parasitaria, que preferiblemente está basada en la inhibición de la enzima FeSOD parasitaria, más preferiblemente para la prevención y/o el tratamiento enfermedades causadas por un parásito de la clase Kinetoplastea, más preferiblemente de la familia *Trypanosomatidae*, más preferiblemente los parásitos son del género *Trypanosoma* o *Leishmania*. Especies de las mismas, pueden ser, pero sin limitarse *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica* o *Leishmania chagasi*, 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. Preferiblemente la tripanosomiasis es la enfermedad de Chagas, preferiblemente en su fase aguda o en su fase crónica, en particular en individuos inmunodeprimidos en los que se produce reactivación de la parasitemia.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) o (II) según se ha descrito previamente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente dicha composición puede comprender otro principio activo, preferiblemente el principio activo
5 es un antiparasitario. Además el uso de dicha composición será en una cantidad terapéuticamente efectiva.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos
10 en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

Los ésteres de pirazol de la presente invención y sus sales farmacéuticamente aceptables, así como las composiciones farmacéuticas que los contienen, pueden ser
15 utilizados junto con otros fármacos, o principios activos adicionales, preferiblemente antiparasitarios, para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de un compuesto de fórmula general (I) o
20 (II) o a la composición farmacéutica que los comprende.

Ejemplos de un principio activo adicional incluyen, pero no se limitan a: antimonio de meglumina, estibogluconato sódico, anfotericina B, ketoconazol, miltefosina, paromomicina, pentamidina, alopurinol, itraconazol, interferón gamma, bleomicina,
25 levamisol, mebendazol, metronidazol, clorpromazina, miconazol, minomicina, metiluracilo, nifurtimox, diminazeno, palmoato de cicloguanilo, emetina, furazolidona, rifampicina, isoniazida, interleucina 2, trimetoprima-sulfametoxazol, suramina, melarsoprol, eflornitina, cloroquina, quinina, fluconazol, tinidazol, así como cualquiera de sus sales, solvatos, esteroisómeros o prodrogas farmacéuticamente aceptables
30 administrados de forma simultánea o secuencial a al menos uno de los compuestos de fórmula (I) o (II) descritos en la presente invención.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a una preparación combinada para su uso por separado, simultáneo o secuencial que comprende al
35 menos un compuesto de fórmula general (I) o (II) como se ha descrito anteriormente y otro principio activo, preferiblemente un antiparasitario. Más preferiblemente el uso de

esa preparación combinada para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por un parásito, preferiblemente de la clase Kinetoplastea, más preferiblemente de la familia *Trypanosomatidae*, más preferiblemente los parásitos son del género *Trypanosoma* o *Leishmania*. Especies de
5 las mismas, pueden ser, pero sin limitarse *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica* o *Leishmania chagasi*, entre otras, conocidas por un experto en la materia.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente
10 efectiva" se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, así como la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

15 Dicha composición terapéutica se puede preparar en forma sólida o en suspensión, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica
20 adecuada a la vía de administración elegida.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a un compuesto seleccionado de entre: 3,5-bis(metoxicarbonil)pirazolato sódico; 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dipropilo; 3,5-bis(propoxicarbonil)pirazolato sódico; y 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de
25 dibutilo.

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
30 invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Evaluación de los compuestos **3** y **4** sobre la velocidad de infección y división de las formas intracelulares de *T. cruzi* en cultivo de células Vero infectadas. (A) % de infección. (B) número de amastigotes por célula infectada. (C) número de tripomastigotes en el medio de cultivo. Los valores son resultados de cuatro experimentos independientes; en la leyenda se indica el valor de la reducción del correspondiente parámetro en relación con el control para cada uno de los compuestos testados.

FIG. 2.- (A) Inhibición *in vitro* (%) de CuZnSOD de eritrocitos humanos con los compuestos **3** y **4**. (B) Inhibición *in vitro* (%) de FeSOD de formas epimastigote de *T. cruzi* con los compuestos **3** y **4**. Concentraciones ensayadas: 1-100 μ M; en la leyenda se indican los valores de IC₅₀ de la correspondiente SOD obtenidos para cada uno de los compuestos testados. Los valores de IC₅₀ para los eritrocitos se obtuvieron por extrapolación matemática.

FIG. 3.- Evaluación de los compuestos **3** y **4** sobre la velocidad de infección y división de las formas intracelulares de *L. infantum* en cultivo de macrófagos J774.2 infectados con *L. infantum*. (A) % de infección. (B) número de amastigotes por célula infectada. Medido a una concentración IC₂₅; en la leyenda se indica el valor de la reducción del correspondiente parámetro en relación con el control para cada uno de los compuestos testados.

FIG. 4.- Evaluación de los compuestos **3** y **4** sobre la velocidad de infección y división de las formas intracelulares de *L. braziliensis* en cultivo de macrófagos J774.2 infectados con *L. braziliensis*. (A) % de infección. (B) número de amastigotes por célula infectada. Medido a una concentración de IC₂₅; en la leyenda se indica el valor de la reducción del correspondiente parámetro en relación con el control para cada uno de los compuestos testados.

FIG. 5.- (A) Inhibición *in vitro* (%) de CuZnSOD de eritrocitos humanos por los compuestos **3** y **4**. (B) Inhibición *in vitro* (%) de FeSOD de formas promastigote de *L. infantum* por los compuestos **3** y **4**. (C) Inhibición *in vitro* (%) de FeSOD de formas

promastigote de *L. braziliensis* por los compuestos **3** y **4**. Concentraciones ensayadas: 1-100 μM ; en la leyenda se indican los valores de IC_{50} de la correspondiente SOD obtenidos para cada uno de los compuestos testados. Los valores de IC_{50} para los eritrocitos se obtuvieron por extrapolación matemática.

5

FIG. 6.- Parasitemia en modelo murino durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas. Dosis administrada: 25 mg/kg; en la leyenda se indica el valor de la reducción del número de tripomastigotes/mL en relación con el control (animales sin tratar) para cada uno de los compuestos testados.

10

FIG. 7.- Porcentaje de reactivación de la parasitemia tras la administración de un ciclo de tratamiento inmunosupresor tanto para el grupo de ratones control (animales sin tratar) como el de tratados.

15

FIG. 8.- Niveles totales de Ig-G anti-*T. cruzi* expresados en unidades de absorbancia (DO, densidad óptica) para los grupos de ratones control (animales sin tratar) y tratados a diferentes días posinfección (p.i.). Para el día 120 p.i. los grupos fueron divididos en dos subgrupos: inmunosuprimidos (IS) y no inmunosuprimidos.

20

FIG. 9.- Resultado de la amplificación de PCR para los órganos de ratón *post mortem* (día 120 p.i.), mediante el uso de unos *primers* específicos para el gen de la superóxido dismutasa del parásito (*sod-b*). Calles: (M) Marcador de pares de bases, (1) Control positivo de PCR, (2) Control negativo de PCR, (3) Corazón del grupo control de la infección, (4) Corazón del grupo infectado y tratado con el compuesto **4**, (5) Corazón del grupo infectado y tratado con el compuesto **3**, (6) Corazón del grupo control de la infección inmunosuprimido, (7) Corazón del grupo infectado, tratado con el compuesto **4** e inmunosuprimido, (8) Corazón del grupo infectado, tratado con el compuesto **3** e inmunosuprimido.

25

30 EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos estudios realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos de la invención

35

Ejemplo 1

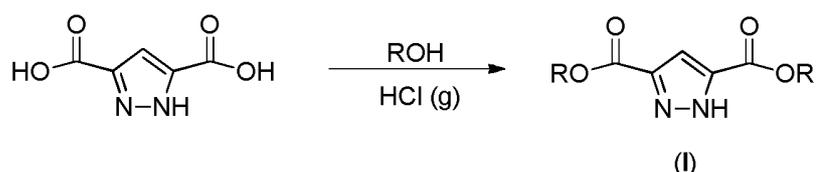
Preparación de los compuestos de fórmula general (I) y (II)

Los compuestos de fórmula general (I) se prepararon por esterificación del ácido 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxílico con el alcohol correspondiente y los compuestos de fórmula general (II) se prepararon por tratamiento de los esteres (I) con hidróxido sódico.

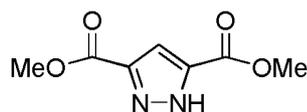
5

Procedimiento general de síntesis de compuestos de fórmula (I):

cuando R₁ y R₂ son iguales y se representan como R y R₃ es H



- 10 *Metodología:* A una solución de ácido 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxílico monohidrato (5,00 g; 28,7 mmol) en 100 mL del alcohol adecuado (ROH) se hizo pasar una corriente de cloruro de hidrógeno gaseoso hasta saturación, manteniendo la agitación durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el disolvente a sequedad y se añadió una
- 15 solución acuosa al 10% de NaCO₃H hasta alcanzar un pH básico. La mezcla de reacción se extrajo con cloroformo y se secó la fase orgánica con MgSO₄. La eliminación del disolvente conduce al producto deseado en forma de aceite cromatográficamente puro que solidifica al poco tiempo.

1H-pirazol-3,5-dicarboxilato de dimetilo (1)

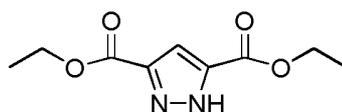
(1)

20

Reactivos: ácido 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxílico monohidrato, metanol. Rendimiento: 4,86 g (92%) (lit. 86%; Schenck, T.G. et al., *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 2334-2337). P. f. 154-155 °C. Análisis elemental (C₇H₈N₂O₄): Teórico %C 45,66, %H 4,38, %N 15,21; Hallado %C 45,77, %H 4,30, %N 15,07. $\nu_{\text{máx}}$ (KBr)/cm⁻¹ 3369 (NH), 1729, 1709 (CO).

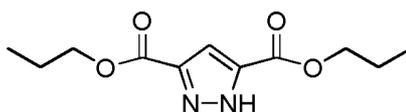
25 ¹H RMN (500 MHz; DMSO-*d*₆) δ : 14,71 (1 H, s), 7,21 (1 H, s), 3,84 (3H, s). ¹³C RMN (125 MHz; DMSO-*d*₆) δ : 160,7, 143,3, 135,9, 111,3, 52,5. EM-FAB (m/z): 185 (MH⁺).

1H-pirazol-3,5-dicarboxilato de dietilo (3)



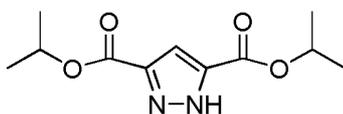
(3)

Reactivos: ácido 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxílico monohidrato, etanol. Rendimiento: 5,48 g (90%). P. f. 54-55 °C (hexano) (lit., p.f. 53-54 °C; Iturrino, L. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **1987**, 22, 445-451). Análisis elemental (C₉H₁₂N₂O₄): Teórico %C 50,94, %H 5,70, %N 13,20; Hallado %C 50,80, %H 5,51, %N 13,34. $\nu_{\text{máx}}$ (KBr)/cm⁻¹ 3260 (NH), 1730 (CO). ¹H RMN (300 MHz; DMSO-*d*₆) δ : 14,62 (1 H, s), 7,18 (1 H, s), 4,31 (4H, c), 1,31 (6H, t). ¹³C RMN (75 MHz; DMSO-*d*₆) δ : 160,9, 159,0, 143,6, 134,7, 110,8, 60,9, 14,1. EM-FAB (m/z): 213 (MH⁺).

10 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dipropilo (5)

(5)

Reactivos: ácido 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxílico monohidrato, propanol. Rendimiento: 6,35 g (92%). P. f. 53-55 °C. Análisis elemental (C₁₁H₁₆N₂O₄): Teórico %C 54,99, %H 6,71, %N 11,66; Hallado %C 54,91, %H 6,65, %N 11,71. $\nu_{\text{máx}}$ (KBr)/cm⁻¹ 3443 (NH), 1732 (CO). ¹H RMN (500 MHz; DMSO-*d*₆) δ : 14,64 (1 H, s), 7,17 (1 H, s), 4,19 (4H, t), 1,67 (4H, m), 0,92 (6H, t). ¹³C RMN (125 MHz; DMSO-*d*₆) δ : 161,2, 158,6, 143,8, 134,7, 110,8, 66,3, 21,54, 10,2. EM-FAB (m/z): 241 (MH⁺).

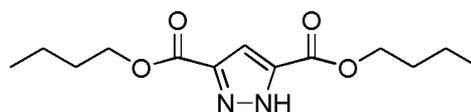
1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de diisopropilo (7)

(7)

Reactivos: ácido 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxílico monohidrato, isopropanol. Rendimiento: 6,21 g (90%). P. f. 50-52 °C. Análisis elemental (C₁₁H₁₆N₂O₄): Teórico %C 54,99, %H 6,71, %N 11,66; Hallado %C 55,07, %H 7,08, %N 11,62. $\nu_{\text{máx}}$ (KBr)/cm⁻¹ 3432 (NH), 1724 (CO). ¹H RMN (500 MHz; DMSO-*d*₆) δ : 14,58 (1 H, s), 7,11 (1 H, s), 5,09 (4H, m), 1,28 (6H, s), 1,26 (6H, s). ¹³C RMN (125 MHz; DMSO-*d*₆) δ : 161,0, 158,5, 144,4, 135,4,

111,1, 69,0, 22,0. EM-FAB (m/z): 241 (MH⁺).

1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dibutilo (8)



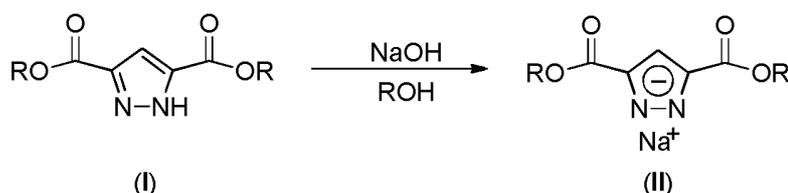
(8)

Reactivos: ácido 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxílico monohidrato, butanol. Rendimiento: 6,78 g (88%). P. f. 46-47 °C. Análisis elemental (C₁₃H₂₀N₂O₄): Teórico %C 58,19, %H 7,51, %N 10,44; Hallado %C 58,17, %H 7,42, %N 10,40. $\nu_{\text{máx}}$ (KBr)/cm⁻¹ 3437 (NH), 1727 (CO). ¹H RMN (500 MHz; DMSO-*d*₆) δ : 14,66 (1 H, s), 7,16 (1 H, s), 4,25 (4H, t), 1,65 (4H, m), 1,37 (4H, m), 0,89 (6H, t). ¹³C RMN (125 MHz; DMSO-*d*₆) δ : 160,3, 143,8, 135,4, 111,2, 64,9, 30,6, 19,1, 14,0. EM-ES⁺ (m/z): 269 (MH⁺).

10

Procedimiento general de síntesis de sales sódicas de fórmula (II):

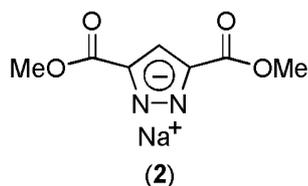
cuando R₁ y R₂ son iguales y se representan como R



15 *Metodología:* A una solución del éster del ácido 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxílico (1,00 g) en 30 mL del alcohol correspondiente (ROH), se añadió lentamente una cantidad equimolecular de hidróxido sódico disuelto en 10 mL del mismo alcohol. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación y a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo indicado en cada caso, se concentró el disolvente y se filtró el sólido obtenido.

20

3,5-bis(metoxicarbonil)pirazolato sódico (2)

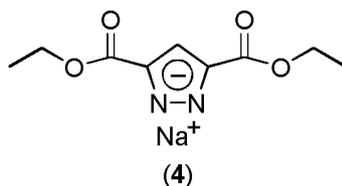


Reactivos: éster metílico del ácido 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxílico, metanol. Condiciones de reacción: agitación a temperatura ambiente 48 h. Rendimiento: 1,06 g (95%). P. f.: >215 °C (descomp.). Análisis elemental (C₇H₇N₂O₄Na): %C 40,79, %H 3,42, %N 13,59; Hallado %C 40,52, %H 3,55, %N 13,42. $\nu_{\text{máx}}$ (KBr)/cm⁻¹ 1704 (CO). ¹H RMN (500 MHz;

25

DMSO- d_6) δ : 6,97 (1H, s), 3,68 (6H, s). ^{13}C RMN (125 MHz; DMSO- d_6) δ : 163,3, 142,5, 111,0, 50,3. EM-FAB (m/z): 207 (MH^+).

3,5-bis(etoxicarbonil)pirazolato sódico (4)

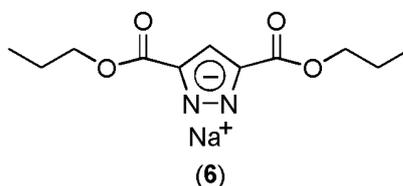


5

Reactivos: éster etílico del ácido 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxílico, etanol. Condiciones de reacción: agitación a temperatura ambiente 1 h. Rendimiento: 1,07 g (97%). P. f.: 213-214 °C (lit.³, p.f. 212-214 °C) (Reviriego, F. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16458-16459. Análisis elemental ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$): %C 46,15, %H 4,70, %N 11,96; Hallado %C 46,03, %H 4,68, %N 12,10. $\nu_{\text{máx}}$ (KBr)/ cm^{-1} 1670 (CO). ^1H RMN (500 MHz; DMSO- d_6) δ : 6,69 (1H, s), 4,16 (4H, c), 1,25 (6H, t). ^{13}C RMN (125 MHz; DMSO- d_6) δ : 163,6, 142,4, 111,1, 58,5, 14,4. EM-FAB (m/z): 235 (MH^+).

10

3,5-bis(propoxycarbonil)pirazolato sódico (6)



15

Reactivos: éster propílico del ácido 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxílico, propanol. Condiciones de reacción: agitación a temperatura ambiente 48 h. Rendimiento: 1,06 g (97%). P. f.: >300 °C. Análisis elemental ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$): %C 50,38, %H 5,77, %N 10,68; Hallado %C 50,72, %H 5,70, %N 10,43. $\nu_{\text{máx}}$ (KBr)/ cm^{-1} 1724, 1696 (CO). ^1H RMN (500 MHz; DMSO- d_6) δ : 6,93 (1H, s), 4,05 (4H, t), 1,64 (4H, m), 0,92 (6H, t). ^{13}C RMN (125 MHz; DMSO- d_6) δ : 163,9, 142,5, 110,9, 63,9, 21,7, 10,3. EM-FAB (m/z): 263 (MH^+).

20

Ensayos de actividad in vitro frente a T. cruzi y Leishmania spp.

Tal y como se demuestra en los Ejemplos 2 (Tabla 1) y 3 (Tablas 2 y 3), los compuestos que comparten la fórmula general (I) (compuestos 1, 3, 5, 7 y 8) y la fórmula general (II) (compuestos 2, 4, y 6) son eficaces *in vitro* en el tratamiento de enfermedades causadas por los parásitos *T. cruzi* y *Leishmania* spp., a la vez que mantienen un nivel de toxicidad bajo (sustancialmente menor que los compuestos de

25

referencia). En general, todos ellos inhiben selectivamente la FeSOD de los parásitos *T. cruzi* y *Leishmania* spp. en relación a la CuZnSOD.

Ejemplo 2

5 Procedimiento de evaluación de la actividad *in vitro* y toxicidad de los compuestos 1-8 frente a formas epimastigote (extracelulares) y amastigote (intracelulares) de *T. cruzi*, toxicidad frente a células Vero e índices de selectividad (IS)

Metodología: Para estos estudios se utilizó *T. cruzi* tipo I (cepa SN3, aislada en Guajira
10 al norte de Colombia en humanos, 2006) [Téllez-Meneses, J. et al., *Acta Trop.* **2008**,
108, 26-34]. El cultivo de las formas epimastigote de *T. cruzi* se realizó *in vitro* en
esterilidad en medio de cultivo monofásico MTL (Medium Trypanosomes Liquid)
enriquecido con el 10% (v/v) de suero bovino fetal (SBF-I) inactivado a 56 °C durante
30 minutos. El inóculo de parásitos para iniciar el cultivo fue de 5×10^4 células/mL en 5
15 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. Para la realización de los ensayos se usaron tanto formas
epimastigote como tripomastigote y amastigote.

20

Las formas epimastigote 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 sembrado en una placa de 24 pocillos a una
25 concentración de 5×10^4 parásitos/pocillo.

Los compuestos a ensayar se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO), disolvente que a
una concentración final en el medio de ensayo de 0,01% (v/v) no muestra toxicidad ni
tiene ningún efecto sobre el crecimiento de los parásitos. Los compuestos fueron
30 añadidos al medio de cultivo a concentraciones finales de 100, 50, 25, 10 y 1 µM. El
efecto de cada compuesto sobre el crecimiento de las formas epimastigote, a las
diferentes concentraciones ensayadas, se evaluó a las 72 h, usando una cámara
hemocitométrica de Neubauer y el efecto tripanocida se expresó como la IC₅₀
(concentración requerida para producir una inhibición del 50%, calculado por el

análisis de la regresión lineal de la K_c a las concentraciones ensayadas) [Sánchez-Moreno, M. et al., *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 970-979].

5 Para el estudio del efecto *in vitro* sobre formas intracelulares de *T. cruzi* se usó el modelo experimental diseñados por los autores de la presente invención [Ramírez-Macías, I. et al., *Parasitol. Int.* **2012**, *61*, 405-413]. Las células Vero se despegaron del frasco de cultivo donde se encontraban adheridas 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. Tras ello, se pasó la mezcla a un frasco de fondo cónico de 25 mL de capacidad (esterilín), se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y las células se contaron en cámara de Neubauer. Las células Vero se resuspendieron a una concentración de 1×10^4 células/pocillo en medio de cultivo RPMI, cultivándose en placas de 24 pocillos, en cada uno de los cuales se había introducido previamente un cristal cubreobjetos redondo de 12 mm. Para su adherencia, las células se dejaron 24 h a 37 °C en 5% CO₂.

20 Una vez adheridas las células, se infectaron *in vitro* con 1×10^5 células/pocillo de formas tripomastigote de *T. cruzi* [Ramírez-Macías, I. et al., *Parasitol. Int.* **2012**, *61*, 405-413]. 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 obtener la IC₅₀ (100 a 1 μM). A las 72 horas de la incubación, se procedió a la retirada de los cristales.

25 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 y se tiñeron con Giemsa; para ello, inmediatamente antes de su empleo y en tubo de ensayo, se diluyó solución Azur-Eosina-Azul de Metileno según Giemsa DC (Código 251338) con 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 formas amastigote intracelulares en un total de 200 células.

Para el estudio de la toxicidad inespecífica frente a células Vero se usó el modelo experimental diseñados por los autores de la presente invención [Marín, C. et al., *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 744-750]. Las células Vero fueron establecidas a partir del 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. Las células, 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/pocillo en placas 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 siguiendo un procedimiento descrito previamente. Se partió de las células y el medio presente en los pocillos, a los cuales se 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 (100 ng/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 control.

25

Tabla 1.- Actividad, toxicidad e índices de selectividad encontrados para los compuestos **1-8** frente a formas extracelulares e intracelulares de *T. cruzi*. Resultados de cuatro experimentos independientes. ^aIC₅₀ = concentración necesaria para obtener el 50% de inhibición, calculada por análisis de regresión lineal del valor K_c a las concentraciones empleadas (1, 10, 25, 50 y 100 µM). ^bConcentración necesaria para obtener el 50% de inhibición frente a células Vero después de 72 h de cultivo. ^cÍndice de Selectividad = IC₅₀ de las células Vero/IC₅₀ de las formas extracelulares e intracelulares de *T. cruzi*. Entre paréntesis: número de veces que el IS de los compuestos es superior al IS del fármaco de referencia.

35

Compuestos	IC ₅₀ μM ^a		Toxicidad IC ₅₀ cel. Vero (μM) ^b	IS ^c	
	Formas epimastigote	Formas amastigote intracelulares		Formas epimastigote	Formas amastigote intracelulares
Benznidazol	15,8±1,1	23,3±4,6	13,6±0,9	0,9	0,6
1	40,5±6,3	16,9±2,8	186,5±9,3	4,6 (5)	11,0 (18)
2	27,5±3,2	27,1±1,1	139,1±9,3	5,0 (6)	5,1 (9)
3	17,2±2,4	10,8±0,7	385,4±11,5	22,4 (25)	35,7 (59)
4	16,5±1,6	9,3±5,8	404,1±13,3	24,5 (27)	43,4 (72)
5	38,7±7,7	23,6±1,4	154,5±12,5	4,0 (4)	6,5 (11)
6	34,5±2,2	34,5±1,7	170,2±13,8	4,9 (6)	4,9 (8)
7	31,2±3,8	30,9±4,7	179,4±13,1	5,7 (6)	5,8 (10)
8	35,8±4,1	23,7±3,3	242,1±10,6	6,8 (7)	10,2 (17)

Los compuestos particularmente preferidos de la presente invención para su uso como antiparasitarios frente a *T. cruzi* son los compuestos de fórmula **3** y **4**, los cuales presentan un nivel de toxicidad inespecífica frente a células Vero mucho menor que la del benznidazol (Bzn) e incluso menor que el resto de los ésteres y pirazolatos estudiados en la presente invención.

Ejemplo 3

Procedimiento de evaluación de la actividad *in vitro* de los compuestos 1-8 frente a formas promastigote (extracelulares) y amastigote (intracelulares) de *L. infantum* y *L. braziliensis*, toxicidad frente a macrófagos e índices de selectividad

Metodología: Para este estudio, se emplearon formas promastigote y amastigote de dos especies del género *Leishmania*:

- *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904).
- *L. infantum* (MCAN/ES/2001/UCM-10).

Las especies de *Leishmania* se mantienen en nuestro laboratorio desde hace varios años mediante cultivos a 28 °C en medio MTL enriquecido con un 10% de suero bovino fetal inactivo (FCSI) y para que no pierda su virulencia se realizan pases

periódicos *in vivo* en ratones cepa Balb/c [Téllez-Meneses, J. et al., *Acta Trop.* 2008, 108, 26-34].

Alcanzada la fase exponencial de desarrollo (10^6 promastigotes/mL), el cultivo fue
5 centrifugado a 1000 g durante 10 minutos a fin de concentrar en un botón las formas
flageladas. Las formas amastigote se obtuvieron *in vitro* previa infestación de
macrófagos de la línea J774.2 (ECACC 85011428) de acuerdo con el método
desarrollado por los autores de la presente invención [González, P. et al., *J.*
Antimicrob. Agents 2005, 25, 136–141].

10

Para los ensayos *in vitro* de las formas promastigote, se partió de formas promastigote
en fase exponencial de crecimiento, cultivadas a 28 °C en medio MTL suplementado
con un 10% FCSI de las dos cepas de *Leishmania*. El ensayo sobre formas
promastigote se realiza de forma similar al descrito para el caso de formas
15 epimastigote de *T. cruzi*.

Para los estudios sobre formas amastigote se procede de forma similar a la descrita
para *T. cruzi*, sólo que en este caso se utilizan macrófagos J774.2 con formas
promastigote en fase estacionaria de crecimiento de las dos cepas de *Leishmania*,
20 según la metodología descrita anteriormente.

A lo largo de todos los experimentos se realizaron estudios encaminados a conocer las
diferencias en la sensibilidad de los parásitos frente a fármacos de actividad conocida
como el benznidazol en el caso de *T. cruzi* y Glucantime para las dos cepas de
25 *Leishmania*, lo que nos permitió comparar su comportamiento con los resultados
obtenidos con nuestros productos.

Tabla 2.- Actividad, toxicidad e índices de selectividad encontrados para los
compuestos 1-8 frente a formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania*
30 *infantum*. Resultados de cuatro experimentos independientes. ^aIC₅₀ = concentración
necesaria para obtener el 50% de inhibición, calculada por análisis de regresión lineal
del valor K_c a las concentraciones empleadas (1, 10, 25, 50 y 100 µM). ^bConcentración
necesaria para obtener el 50% de inhibición frente a macrófagos J 774.2 después de
72 h de cultivo. ^cÍndice de Selectividad = IC₅₀ de los macrófagos/IC₅₀ de las formas

extracelulares e intracelulares de *L. infantum*. Entre paréntesis: número de veces que el IS de los compuestos es superior al IS del fármaco de referencia

Compuestos	IC ₅₀ μM ^a		Toxicidad IC ₅₀ macrófagos (μM) ^b	IS ^c	
	Formas promastigote	Formas amastigote intracelulares		Formas promastigote	Formas amastigote intracelulares
Glucantime	18,0±3,1	30,0±2,7	15,2±1,3	0,8	0,5
1	23,5±4,2	18,4±2,0	166,2±11,4	7,1 (9)	9,0 (18)
2	17,5±3,2	22,4±1,5	222,4±21,2	12,7 (16)	9,9 (20)
3	24,4±1,5	16,3±0,9	233,5±15,6	9,6 (12)	14,3 (29)
4	5,9±0,2	6,7±1,0	288,6±23,1	48,9 (61)	43,1 (86)
5	15,6±0,8	7,6±0,6	170,2±13,5	10,9 (14)	22,4 (45)
6	17,7±2,5	21,3±1,0	264,3±16,9	14,9 (19)	12,4 (25)
7	19,7±0,8	2,8±0,7	158,1±7,4	8,0 (10)	56,1 (113)
8	24,8±2,6	19,1±1,1	271,1±16,1	10,9 (14)	14,2 (28)

5

Tabla 3.- Actividad, toxicidad e índices de selectividad encontrados para los compuestos **1-8** frente a formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania braziliensis*. Resultados de cuatro experimentos independientes. ^aIC₅₀ = concentración necesaria para obtener el 50% de inhibición, calculada por análisis de regresión lineal del valor K_c a las concentraciones empleadas (1, 10, 25, 50 y 100 μM). ^bConcentración necesaria para obtener el 50 % de inhibición frente a macrófagos J 774.2 después de 72 h de cultivo. ^cÍndice de Selectividad = IC₅₀ de los macrófagos/IC₅₀ de las formas extracelulares e intracelulares de *L. braziliensis*. Entre paréntesis: número de veces que el IS de los compuestos es superior al IS del fármaco de referencia.

10

Compuestos	IC ₅₀ μM ^a		Toxicidad IC ₅₀ macrófago s (μM) ^b	IS ^c	
	Formas promastigote	Formas amastigote intracelulares		Formas promastigote	Formas amastigote intracelulares
Glucantime	25,6±1,6	31,1±3,0	15,2±1,3	0,6	0,5
1	21,4±1,7	18,2±0,9	166,2±11,4	7,8 (13)	9,1 (18)
2	15,9±0,8	23,2±3,5	222,4±21,2	14,0 (23)	9,6 (19)
3	18,8±1,8	9,3±0,8	233,5±15,6	12,4 (21)	25,1 (50)
4	23,8±3,2	6,8±0,7	288,6±23,1	12,1 (20)	42,4 (85)
5	16,0±1,4	17,9±2,2	170,2±13,5	10,6 (18)	9,5 (19)
6	16,6±1,4	14,7±0,5	264,3±16,9	15,9 (26)	18,0 (36)
7	32,1±2,9	21,5±1,5	158,1±7,4	4,9 (8)	7,35 (15)
8	36,2±3,6	20,8±1,4	271,1±16,1	7,5 (13)	13,0 (26)

15

Los compuestos particularmente preferidos para su uso como antiparasitarios frente a *Leishmania* spp. son los de fórmula **3, 4 y 7**. Concretamente, los compuestos **3 y 4** son

mucho más activos frente a formas extracelulares (promastigotes) e intracelulares (amastigotes) de *L. infantum* y *L. braziliensis* que el medicamento de referencia, el Glucantime, y mucho menos tóxicos sobre macrófagos.

5 Ejemplo 4

Procedimiento de evaluación de los compuestos 3 y 4 sobre la velocidad de infección y el crecimiento de parásitos en medios de cultivo de células Vero infectadas con *T. cruzi*

Metodología: Las células Vero se cultivaron en las mismas condiciones reseñadas anteriormente durante 2 días. Después las células fueron infectadas *in vitro* con formas metacíclicas de *T. cruzi*, en proporción 10:1. Los compuestos 3 y 4 (a la concentración IC₂₅) fueron adicionados inmediatamente después de la infestación e incubados por 12 h a 37 °C en 5% CO₂. Los parásitos no fagocitados y los productos fueron eliminados mediante lavado y los cultivos infectados fueron cultivados durante 10 días en medio fresco, adicionando medio fresco cada 48 horas. La actividad de los compuestos fue determinada por el % de células infectadas, número de amastigotes por célula infectada y número de tripomastigotes en el medio. Cultivos tratados y sin tratar fueron fijados y teñidos con metanol y Giemsa. El % de células infectadas y la media del número de amastigotes por célula infectada se determinó por análisis de 200 células Vero en un microscopio cada 48 horas. El número de tripomastigotes en el medio fue determinado usando una cámara de Neubauer.

En ensayos de crecimiento de parásitos en medios de cultivo de células Vero infectadas con *T. cruzi*, los compuestos 3 y 4 reducen eficazmente la velocidad de infección, el número de amastigotes por célula infectada, y el número de tripomastigotes en el medio de cultivo en relación al control (ver FIG. 1). Los valores típicos del benznidazol en estos ensayos fueron 23% (FIG. 1A), 13% (FIG. 1B) y 46% (FIG. 1C) [Sánchez-Moreno, M. et al., *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4231-4243].

30 Ejemplo 5

Procedimiento de evaluación de la capacidad de los compuestos 3 y 4 para inhibir la FeSOD de epimastigotes de *T. cruzi* en relación a la CuZnSOD de eritrocitos humanos

Metodología: Los compuestos seleccionados previamente fueron evaluados como inhibidores de la enzima FeSOD exclusiva de protozoos parásitos de la clase

Kinetoplastea, y por lo tanto ausente en el hospedador mamífero, a fin de validar esta nueva y atractiva diana para el diseño de nuevos fármacos con actividad antiparasitaria debido a su capacidad para inactivar la acción de la FeSOD del parásito capturando su ión metálico mediante mecanismos competitivos de complejación.

5 Paralelamente se realizaron ensayos de selectividad FeSOD (parásito)/CuZnSOD (humana). La inhibición de los nuevos compuestos sobre la actividad FeSOD/CuZnSOD se cuantificó en un espectrofotómetro a 560 nm según una técnica descrita anteriormente [Beyer, W.F. & Fridovich, I., *Anal Biochem.* **1987**, *161*, 559-66], basada en la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) por los iones superóxido y que

10 los autores de la presente invención han puesto a punto para el ensayo en tripanosomátidos de modo rutinario [Sánchez-Moreno, M. et al., *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 970-979; Ramírez-Macías, I. et al., *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, *66*, 913-919].

En estos ensayos se ha demostrado como inhiben eficaz y selectivamente la FeSOD de formas epimastigote de *T. cruzi* en relación a la CuZnSOD de eritrocitos humanos (ver FIG. 2).

15

Ejemplo 6

Procedimiento de evaluación del efecto de los compuestos 3 y 4 sobre la

20 **velocidad de infección y el crecimiento de parásitos en medios de cultivo de macrófagos infectados con *L. infantum* y *L. braziliensis***

Metodología: Macrófagos de la línea J774.2, conservados en laboratorio por criopreservación en nitrógeno líquido y sucesivos pases en cultivo con medio esencial mínimo (MEM) + glutamina + 20% FCSI, fueron depositados en un esterilín y

25 centrifugados a 100 g durante 5 min, el sobrenadante fue descartado y las células resuspendidas en el mismo medio a una concentración final de 1×10^6 células/mL.

Luego, 10 μ l de la suspensión celular se depositó en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos (cada uno con un cristal cubreobjetos redondo de 10 mm de

30 diámetro) en un volumen total de 500 μ l, e incubadas por 24 h a 37 °C en atmósfera húmeda enriquecida con 5% CO₂.

Las células fueron infectadas *in vitro* con formas promastigote de las dos especies de *Leishmania*, en proporción 10:1. Los compuestos **3** y **4** (a una concentración IC₂₅)

35 fueron adicionados inmediatamente después de la infestación e incubados por 12 h a

37 °C en 5% CO₂. Los parásitos no fagocitados y los productos fueron eliminados mediante lavado y las células infectadas fueron cultivadas durante 10 días en medio fresco, que se fue adicionando cada 48 horas. La actividad de los compuestos fue determinada por el % de células infectadas y el número de amastigotes por célula infectada [Sánchez-Moreno, M. et al., *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 970-979]. Cultivos tratados y sin tratar fueron fijados y teñido con metanol y Giemsa. El % de células infectadas y la media del número de amastigotes por célula infectada se determinó por el análisis de 200 células en un microscopio cada 48 horas.

En ensayos de crecimiento de parásitos en medios de cultivo de macrófagos J774.2 infectados con *L. infantum* y *L. braziliensis*, los compuestos **3** y **4** también reducen eficazmente la velocidad de infección y división de las formas intracelulares en relación al control (ver FIG. 3 y 4). Los valores de estos ensayos son resultados de cuatro experimentos independientes. Los valores típicos del glucantime en estos ensayos fueron 24% (FIG. 3A), 30% (FIG. 3B), 22% (FIG. 4A) y 37% (FIG. 4B) [Marín, C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 466-477].

Ejemplo 7

Procedimiento de evaluación de la capacidad de los compuestos 3 y 4 para inhibir la FeSOD de promastigotes de *L. infantum* y *L. braziliensis* en relación a la CuZnSOD de eritrocitos humanos.

Metodología: El procedimiento utilizado para evaluar la capacidad de inhibición de la enzima FeSOD de las formas promastigote de *L. infantum* y *L. braziliensis* en relación a la CuZnSOD de eritrocitos humanos fue el mismo descrito anteriormente en el caso de *T. cruzi*.

Paralelamente a como ocurre en los ensayos de *T. cruzi*, los dos compuestos seleccionados (**3** y **4**) inhiben eficaz y selectivamente la FeSOD de promastigotes de *L. infantum* y *L. braziliensis* en relación a la CuZnSOD de eritrocitos humanos (ver FIG. 5).

Ejemplo 8

Procedimiento de evaluación de la toxicidad de los compuestos 3 y 4 *in vivo*

Metodología y resultados: Como modelo se utilizaron ratones albinos de la cepa Balb/c, lote de 5 animales de la misma edad (6-8 semanas) y peso (25-30 g) y de sexo

femenino, a los cuales se les administró una dosis inicial de 100 mg/kg de cada compuesto en días alternativos con el objeto de averiguar la dosis letal 50 (DL₅₀). En vista de que tras administrar 500 mg/kg peso no se alcanzaba ningún efecto tóxico aparente ni la muerte de ningún ejemplar, se procedió a administrar dosis de 500 mg/kg de cada compuesto en días alternativos hasta alcanzar los 6 g/kg, donde se decidió cesar el experimento por considerar que estos niveles de administración del compuesto dejaban patente la “no toxicidad” de los mismos. A la semana del cese del tratamiento se realizó un análisis de parámetros bioquímicos de rutina y no se observó ninguna alteración significativa. La única apreciación fuera de la norma era que en los 15-20 minutos inmediatos tras la administración de los compuestos los ratones mostraban cierta hiperactividad tras su traslado a la jaula, que cesaba tras este periodo y no dejaba ninguna secuela o cambio de comportamiento apreciable.

Los ensayos de toxicidad *in vivo* en modelo murino (ratones albinos de la cepa Balb/c) han dejado patente que a dosis comprendidas entre 500 mg/kg y 6 g/kg, los dos compuestos seleccionados (3 y 4) no producen efectos tóxicos aparentes ni se produce la muerte de ningún animal.

Ejemplo 9

20 Procedimiento de evaluación *in vivo* de la actividad de los compuestos 3 y 4 en la fase aguda de la enfermedad de Chagas

Metodología: Como modelo se utilizaron ratones albinos de la cepa Balb/c, lote de 6 animales de la misma edad (6-8 semanas) y peso (25-30 g), y de sexo femenino. Inicialmente se buscó la dosis letal (DL₅₀) de los compuestos seleccionados (como se ha visto en un ejemplo anterior), así como su permanencia y estabilidad en suero. Como inóculo se utilizaron tripomastigotes metacíclicos. A cada animal se le inoculó 5 x 10⁵ tripomastigotes metacíclicos, vía intraperitoneal. Los animales de experimentación fueron tratados bajo las normas y principios de la guía internacional para la investigación biomédica con animales de experimentación y con la autorización del Comité de Bioética de la Universidad de Granada. Los lotes quedaron distribuidos de la siguiente manera: a) un lote para el estudio del desarrollo de la enfermedad [fase aguda y fase crónica (Ejemplo 10)], grupo control positivo compuesto por animales infectados y sin ningún tratamiento, y b) un segundo grupo de lotes: animales infectados y tratados con diferentes concentraciones de los compuestos objeto del estudio (un sublote por producto y concentración a ensayar).

La parasitemia, número de parásitos circulantes, se cuantificó a través de la cámara de conteo de células hemáticas. Se utilizó sangre periférica, obtenida por punción de la vena maxilar, en tampón fosfato (PBS). Este conteo se realizó cada 3 días, durante 30 días (fin de la fase aguda). La administración de los productos se realizó al quinto día de la infección y, una vez confirmada la parasitación, se ensayaron diferentes concentraciones de los productos, de acuerdo con los datos de la DL₅₀ y la posología a la dosis establecida para cada producto y durante 5 días. Grupos similares de ratones fueron tratados con benznidazol (5 mg/Kg de peso/día durante 5 días), en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente.

10

Los dos compuestos **3** y **4** mostraron una gran eficacia de inhibición de la parasitemia en la fase aguda (ver FIG. 6).

Ejemplo 10

15 Procedimiento de evaluación *in vivo* de los compuestos 3 y 4 sobre los porcentajes de reactivación de la parasitemia después de inmunosupresión en la fase crónica de la enfermedad de Chagas

Metodología: Tras el día 60, los animales entran en fase crónica; al día 120 del experimento se induce una situación de inmunosupresión con monohidrato de ciclofosfamida según lo descrito [Cencig, S. et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1216]; finalmente tiene lugar el sacrificio de los animales para la extracción de tejidos y órganos que serán sometidos a valoración del efecto de los compuestos a nivel de la parasitemia tras el tratamiento, mediante conteo (fase aguda y crónica), ELISA (comparación fase aguda y crónica) y PCR de tejidos (fase crónica).

25

Una vez alcanzado el día 120 (fase crónica avanzada) los ratones fueron divididos en dos subgrupos, uno que se mantuvo bajo las mismas condiciones y otro que fue sometido a un tratamiento de inmunosupresión (inducida por monohidrato de ciclofosfamida). Esta variable añadida permitió determinar el grado de reactivación de la parasitemia y por tanto la curación parasitológica o no de los ejemplares (ver FIG. 7, **8** y **9**). En la FIG. 7, concretamente, se muestra el porcentaje de reactivación de la parasitemia, por conteo en fresco de los ejemplares que fueron inmunosuprimidos (tanto tratados como controles); el porcentaje de reactivación de la parasitemia, que en el control es del 60%, baja al 5% en presencia del compuesto **4**, y al 24% en presencia del compuesto **3**. En la FIG. 8 se observan las variaciones en las concentraciones de

35

anticuerpos frente a *T. cruzi*, señal del estado inmunológico del ratón; en ella se observa como alcanzada la fase crónica en situación normal, tratados o no, se alcanza un equilibrio inmunológico (señal de cronificación de la enfermedad); este estado de equilibrio es roto de modo artificial con la inmunosupresión, de modo que en la

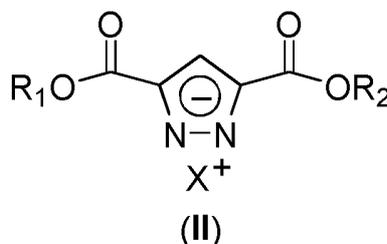
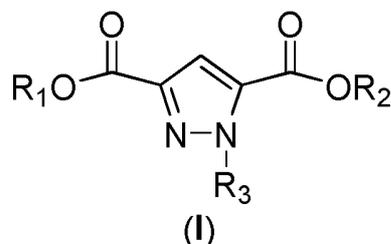
5 situación control se produce un aumento considerable en los niveles de inmunoglobulinas como consecuencia de la presencia del parásito en sangre, mientras que en los tratados con los compuestos **3** y **4** los niveles se mantienen prácticamente constantes, indicadores de una menor parasitemia. Son también especialmente notables los resultados del análisis *post mortem* que se muestran en la **FIG. 9**, en la

10 que se comparan resultados de eliminación de la parasitemia en tejidos del corazón de animales no inmunodeprimidos e inmunodeprimidos analizados mediante la técnica PCR. En ausencia de inmunosupresión, tanto por tratamiento con el compuesto **3** como con el **4**, no se detecta ninguna banda (señal de la disminución de la parasitemia). Pero en tejidos del corazón procedentes de animales previamente

15 inmunodeprimidos, en el caso de tratamiento con el compuesto **4** no se observa ninguna banda, mientras que en el caso de tratamiento con el compuesto **3** se observa una banda más tenue, señal de una menor parasitemia con respecto al control.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula general (I) o (II)



5

donde:

R_1 y R_2 , pueden ser iguales o diferentes y representan un grupo alquilo (C_1-C_{10});

R_3 se selecciona de entre hidrógeno o un grupo alquilo (C_1-C_{10}); y

10 X^+ es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable;
para la elaboración de un medicamento.

2. Uso según la reivindicación 1, donde R_3 es hidrógeno.

15 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde R_1 y/o R_2 es un grupo alquilo (C_1-C_4).

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R_1 y R_2 son iguales.

20 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde X^+ es un catión alcalino.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde X^+ se selecciona de entre Li^+ , Na^+ o K^+ , preferiblemente Na^+ .

25

7. Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto se selecciona de entre:

1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dimetilo;

3,5-bis(metoxicarbonil)pirazolato sódico;

1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dietilo;

30 3,5-bis(etoxicarbonil)pirazolato sódico;

1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dipropilo;

3,5-bis(propoxicarbonil)pirazolato sódico;

- 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de diisopropilo; y
1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dibutilo.
8. Uso según la reivindicación anterior, donde el compuesto es 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dietilo o 3,5-bis(etoxicarbonil)pirazolato sódico.
9. Uso de un compuesto de fórmula general (I) o (II) según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades parasitarias a través de la inhibición de la enzima FeSOD parasitaria.
10. Uso según la reivindicación anterior, donde las enfermedades son enfermedades causadas por un parásito de la clase Kinetoplastea.
11. Uso según la reivindicación 10, donde el parásito es de la familia *Trypanosomatidae*.
12. Uso según la reivindicación 11, donde los parásitos son de los géneros *Leishmania* o *Trypanosoma*.
13. Uso según la reivindicación 12, donde los parásitos son de las especies *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica* o *Leishmania chagasi*.
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde la enfermedad es tripanosomiasis.
15. Uso según la reivindicación 14, donde la enfermedad es la enfermedad de Chagas.
16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde la enfermedad es la leishmaniasis en humanos o animales.
17. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) o (II) según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
18. Composición farmacéutica según reivindicación 17, que además comprende al menos otro principio activo antiparasitario.

19. Compuesto seleccionado de entre:
- 3,5-bis(metoxicarbonil)pirazolato sódico;
 - 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dipropilo;
 - 3,5-bis(propoxicarbonil)pirazolato sódico; y
- 5 1*H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dibutilo.

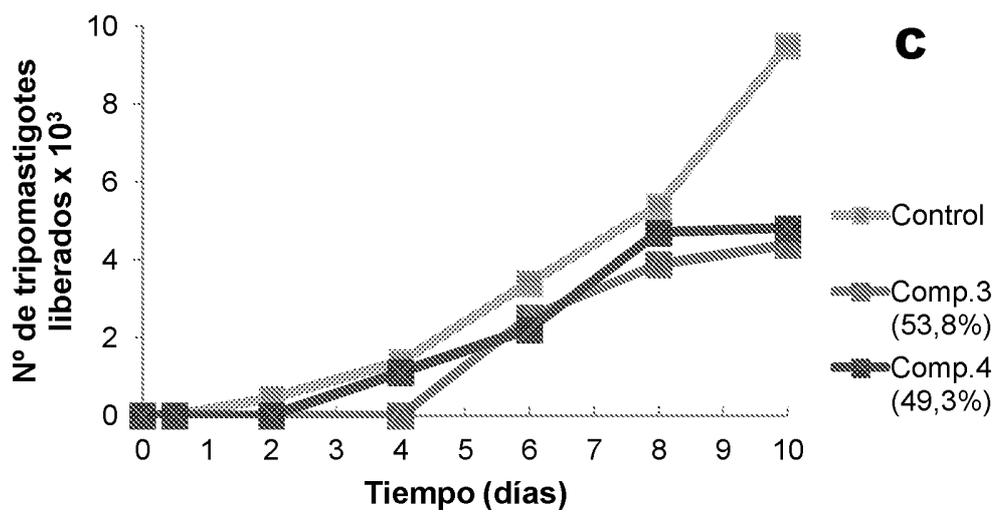
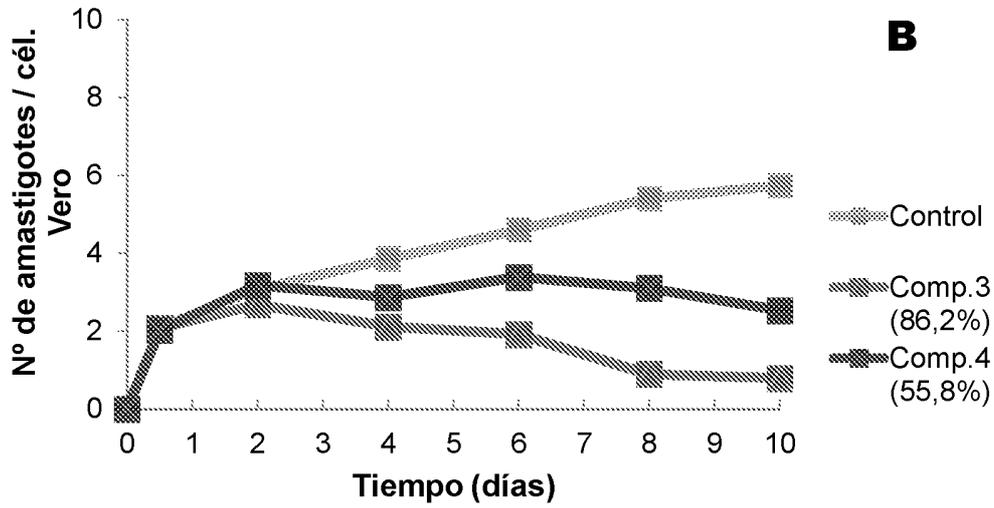
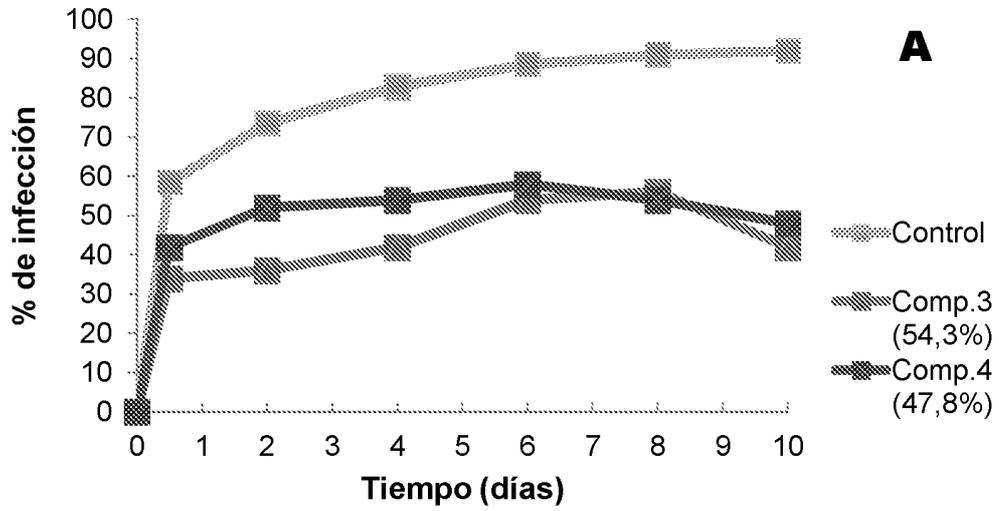


FIG. 1

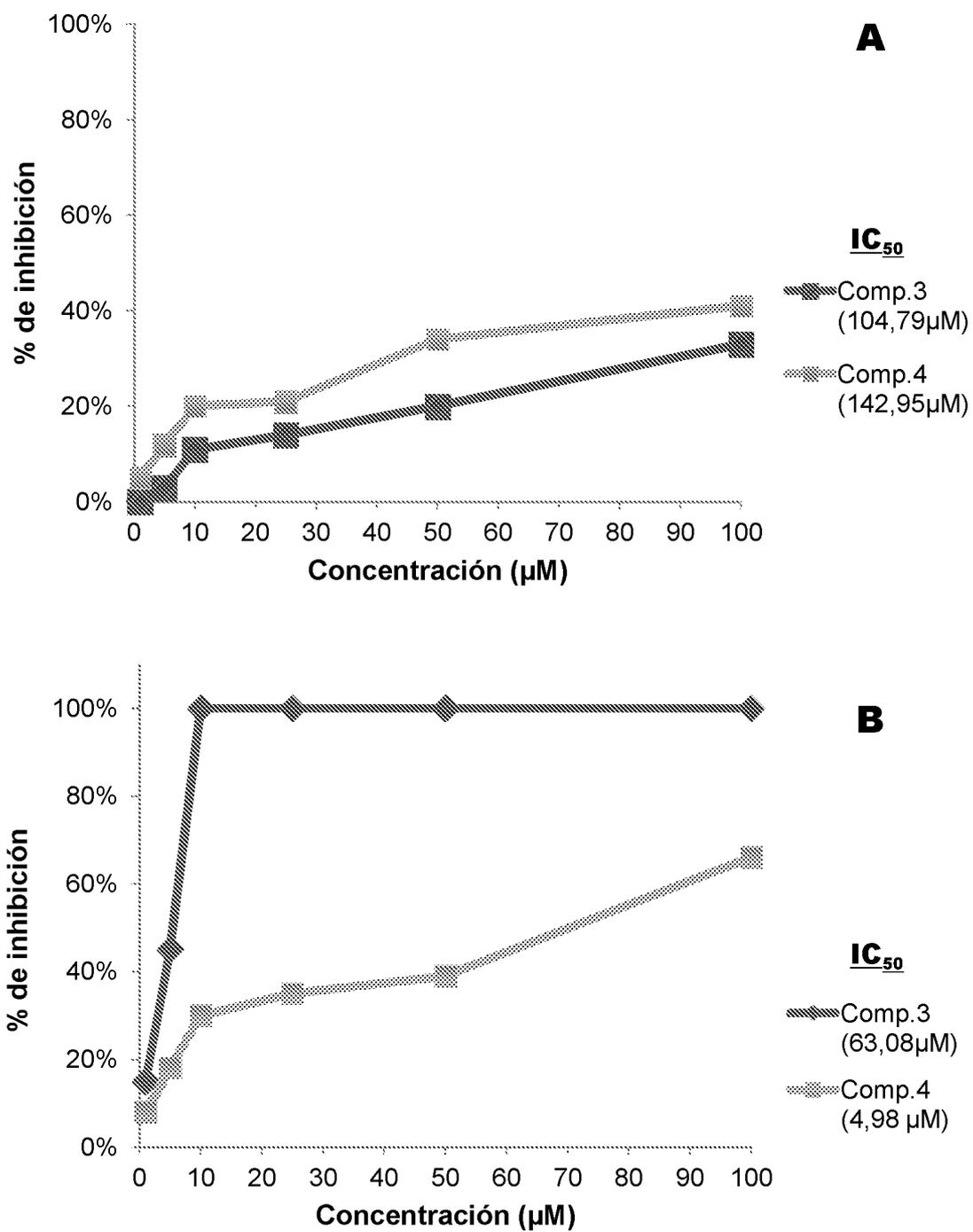


FIG. 2

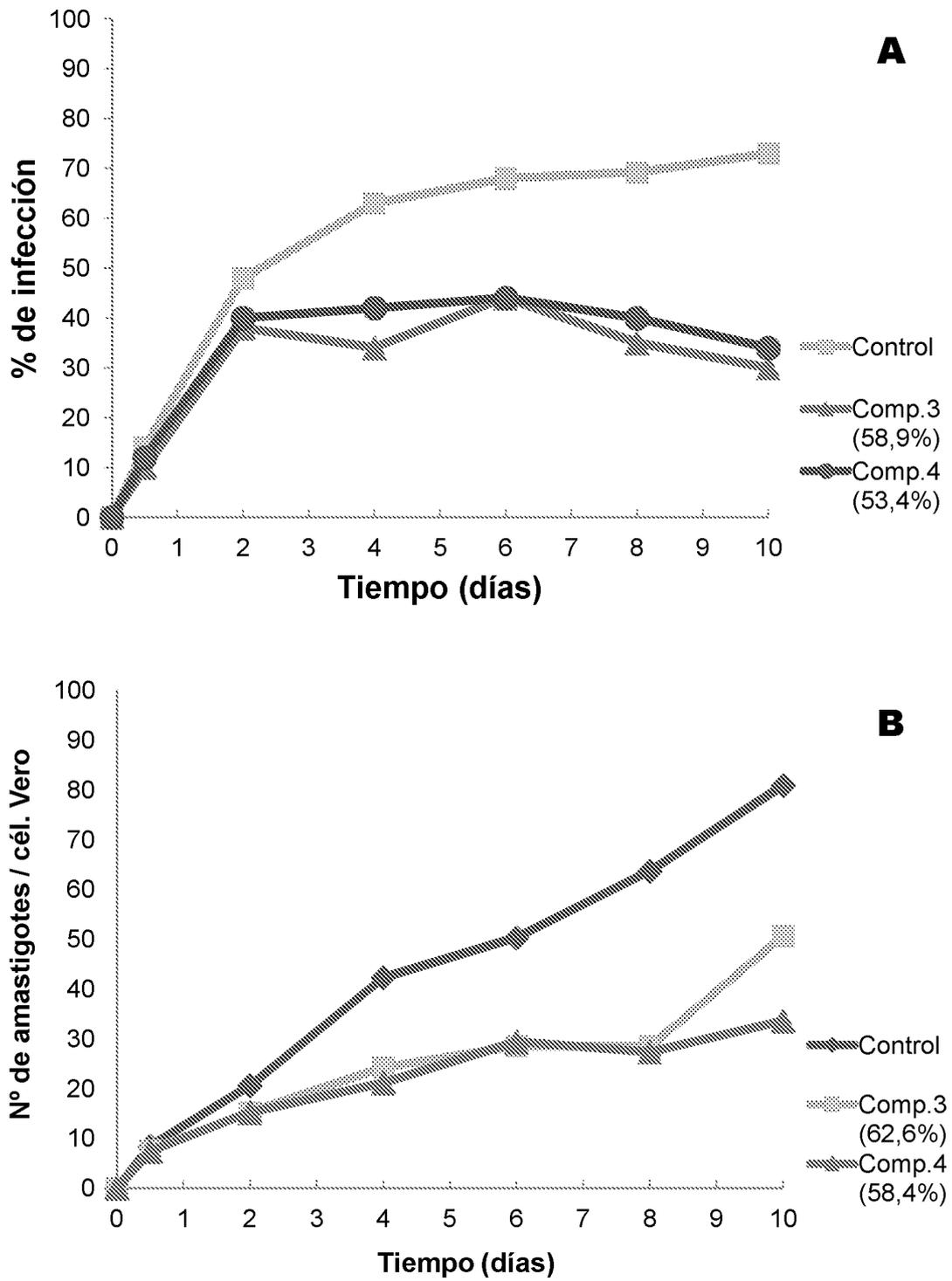


FIG. 3

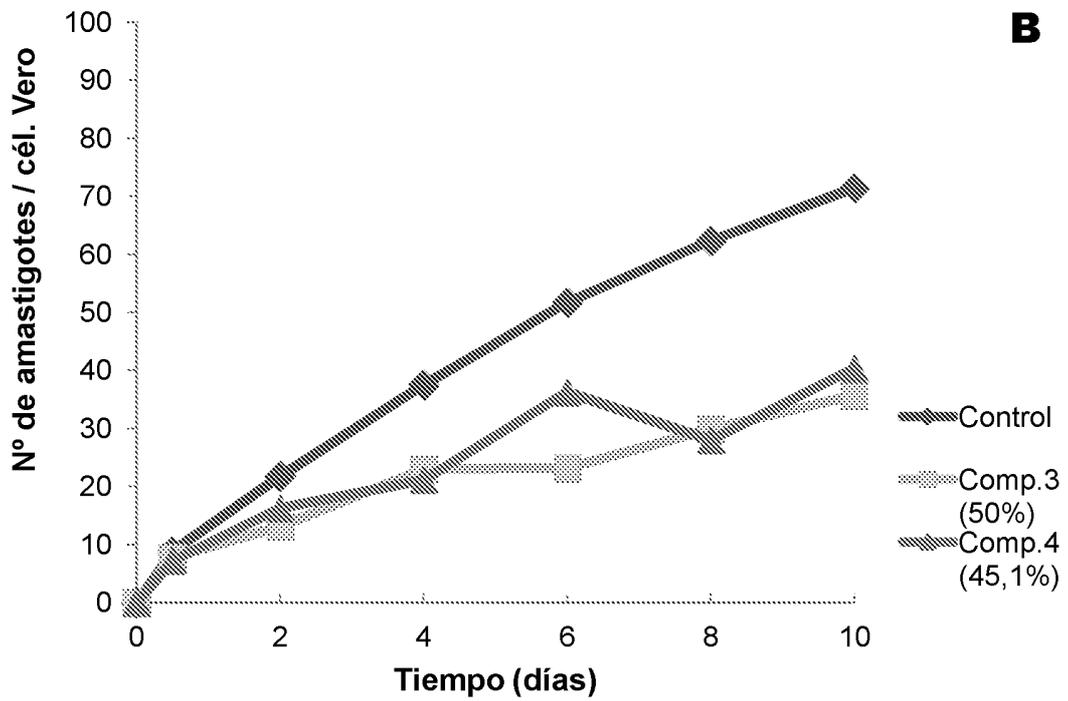
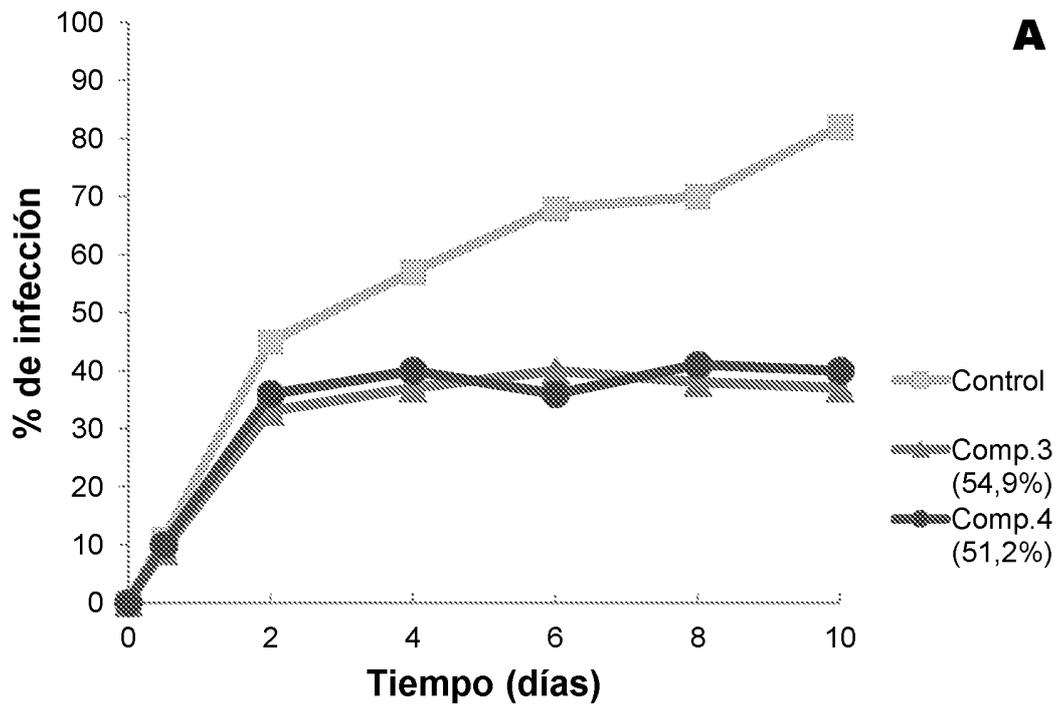


FIG. 4

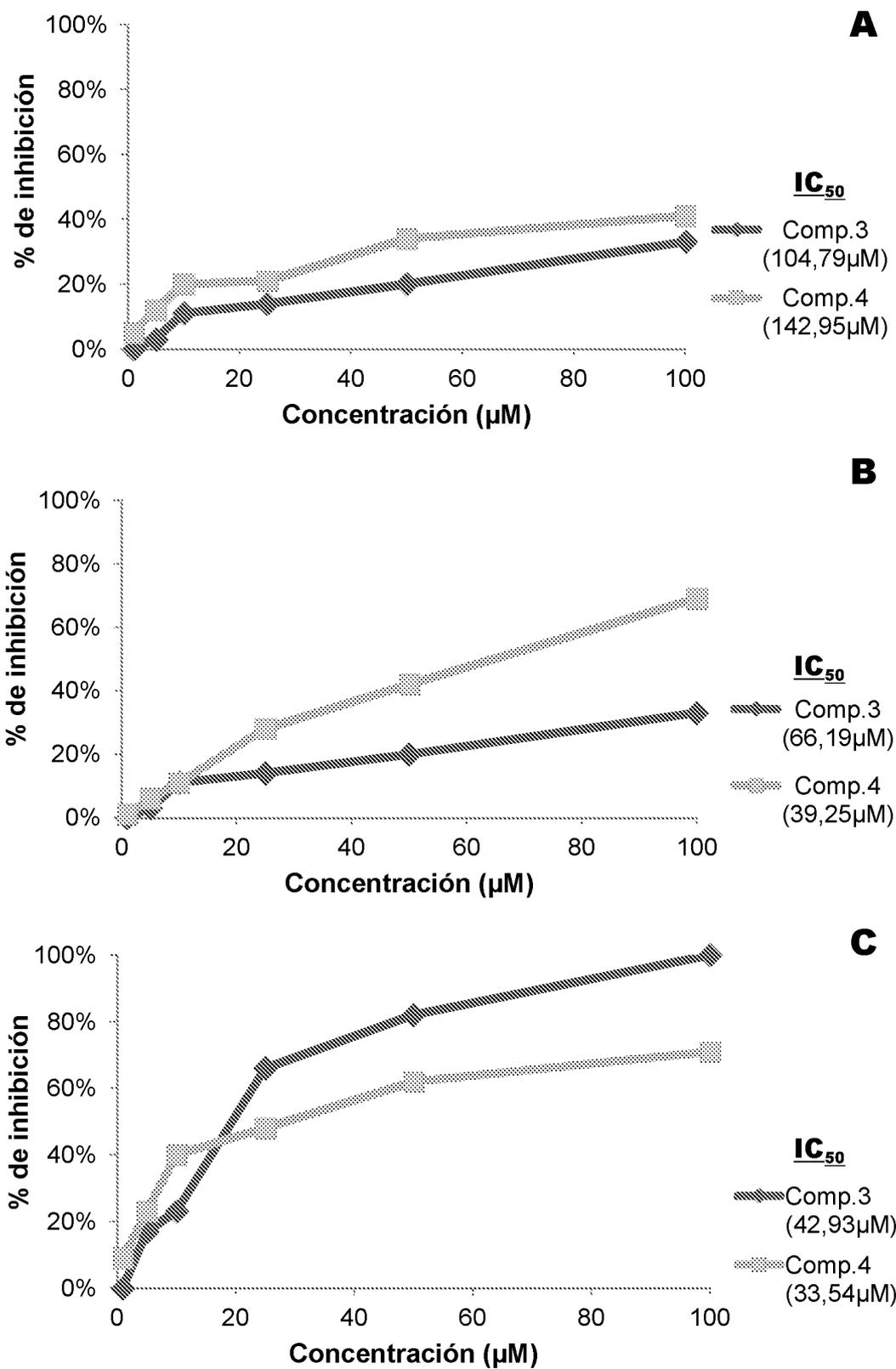


FIG. 5

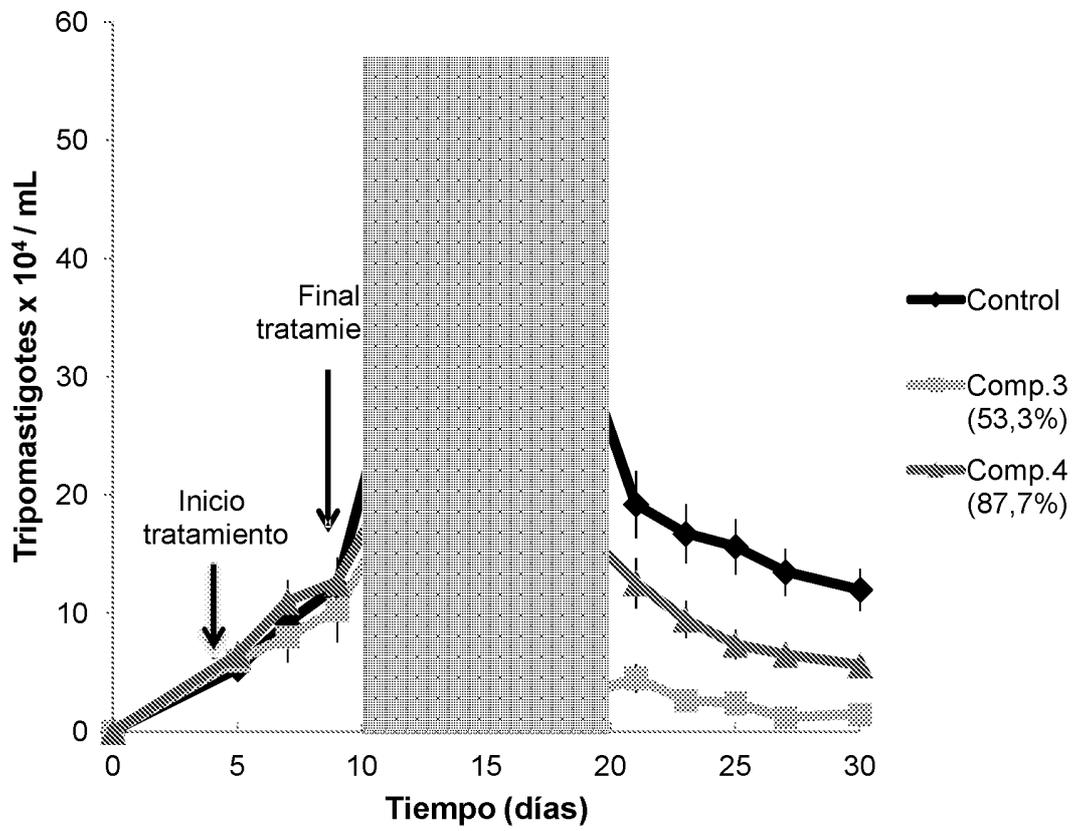


FIG. 6

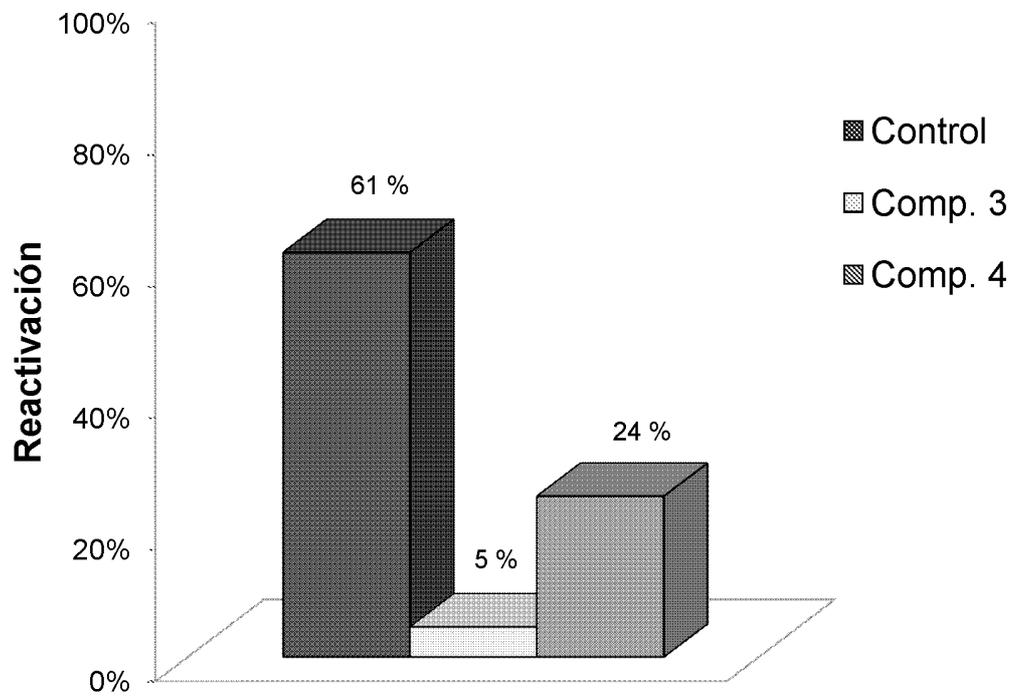


FIG. 7

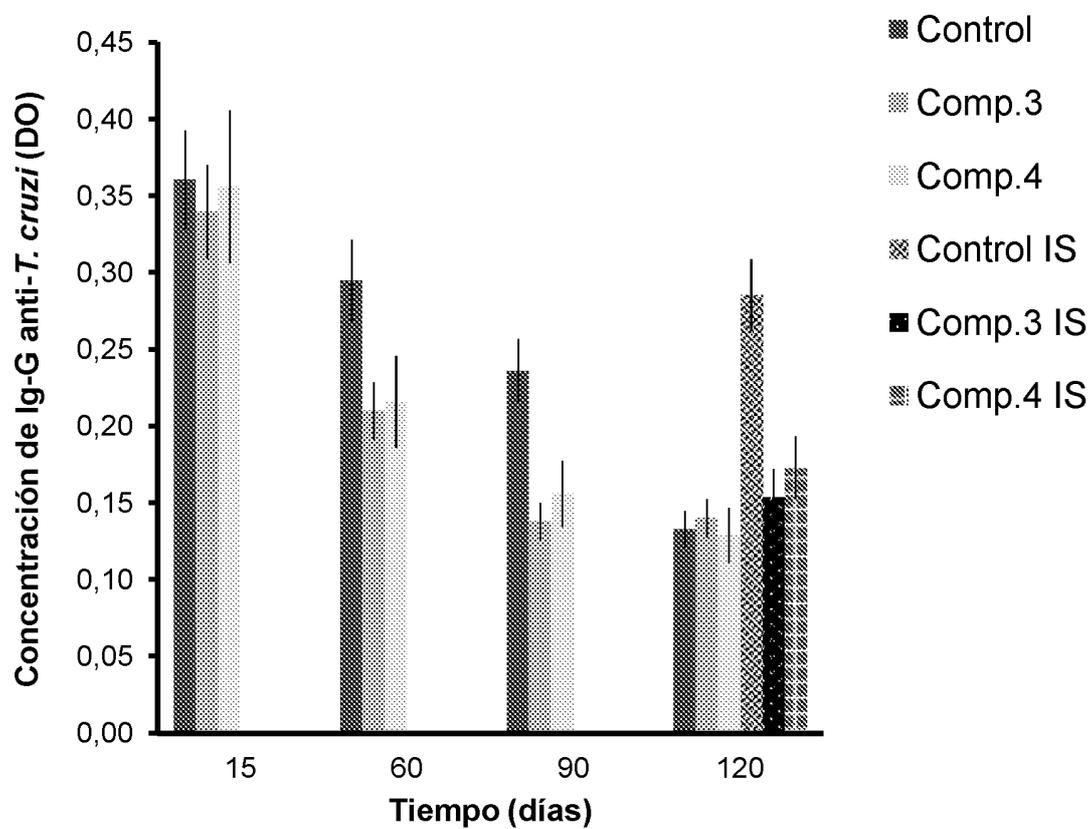


FIG. 8

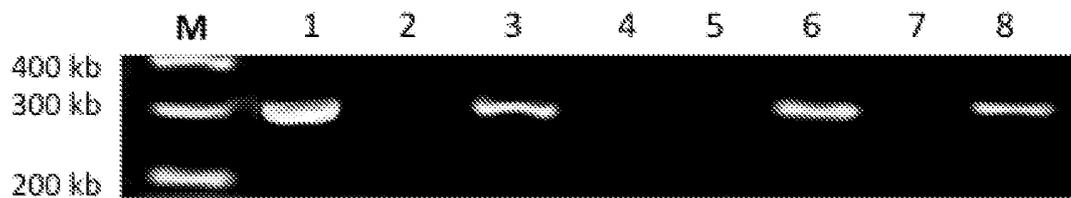


FIG. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070658

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)

A61K, C07D, A61P

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, NPL, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005020977 A1 (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND ET AL.) 10/03/2005, figure 1, paragraphs 28 and 36	1-8, 17.
A	WO 2014027009 A1 (HOFFMANN LA ROCHE ET AL.) 20/02/2014, claims, abstract	1-19
A	VERA-DIVAIO M A F et al. Synthesis, antichagasic in vitro evaluation, cytotoxicity assays, molecular modeling and SAR/QSAR studies of a 2-phenyl-3-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)-acrylic acid benzylidene-carbohydrazone series. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> , 20090101 PERGAMON, GB 01/01/2009 VOL: 17 No: 1 Pags: 295 - 302 ISSN 0968-0896 Doi: doi:10.1016/j.bmc.2008.10.085 Chibale Kelly, table 1.	1-19

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
30/11/2015

Date of mailing of the international search report
(02/12/2015)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
H. Aylagas Cancio

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

Telephone No. 91 3498563

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070658

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FARIA JÉSSICA V et al. Synthesis and activity of novel tetrazole compounds and their pyrazole-4-carbonitrile precursors against <i>Leishmania</i> spp. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i> Pergamon, AMSTERDAM, NL // 2013, VOL: 23 No: 23 Pags: 6310 - 6312 ISSN 0960-894X Doi: doi:10.1016/j.bmcl.2013.09.062, esquema 1, table 1.	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070658

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2005020977 A1	10.03.2005	US2011071222 A1 US8507557 B2 US2005059711 A1 US7863301 B2	24.03.2011 13.08.2013 17.03.2005 04.01.2011
-----	-----	-----	-----
WO2014027009 A1	20.02.2014	JP2015530371 A MX2015001023 A US2015158818 A1 KR20150042847 A CN104540807 A CA2880846 A1 EP2885276 A1	15.10.2015 08.04.2015 11.06.2015 21.04.2015 22.04.2015 20.02.2014 24.06.2015
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070658

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/415 (2006.01)

C07D231/14 (2006.01)

A61P33/02 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070658

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)

A61K, C07D, A61P

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, NPL, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 2005020977 A1 (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND ET AL.) 10/03/2005, Figura 1, párrafos 28 y 36	1-8, 17.
A	WO 2014027009 A1 (HOFFMANN LA ROCHE ET AL.) 20/02/2014, reivindicaciones, resumen	1-19
A	VERA-DIVAIO M A F et al. Synthesis, antichagasic in vitro evaluation, cytotoxicity assays, molecular modeling and SAR/QSAR studies of a 2-phenyl-3-(1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)-acrylic acid benzylidene-carbohydrazide series. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009.01.01 PERGAMON, GB 01/01/2009 VOL: 17 No: 1 Pags: 295 - 302 ISSN 0968-0896 Doi: doi:10.1016/j.bmc.2008.10.085 Chibale Kelly, tabla 1.	1-19

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"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).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"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.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"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.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
30/11/2015

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
02 de diciembre de 2015 (02/12/2015)

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
H. Aylagas Cancio
Nº de teléfono 91 3498563

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2015/070658

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	<p>FARIA JÉSSICA V et al. Synthesis and activity of novel tetrazole compounds and their pyrazole-4-carbonitrile precursors against Leishmania spp. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Pergamon, AMSTERDAM, NL // 2013, VOL: 23 No: 23 Pags: 6310 - 6312 ISSN 0960-894X Doi: doi:10.1016/j.bmcl.2013.09.062, esquema 1, tabla 1.</p>	1-19

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2015/070658

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2005020977 A1	10.03.2005	US2011071222 A1 US8507557 B2 US2005059711 A1 US7863301 B2	24.03.2011 13.08.2013 17.03.2005 04.01.2011
-----	-----	-----	-----
WO2014027009 A1	20.02.2014	JP2015530371 A MX2015001023 A US2015158818 A1 KR20150042847 A CN104540807 A CA2880846 A1 EP2885276 A1	15.10.2015 08.04.2015 11.06.2015 21.04.2015 22.04.2015 20.02.2014 24.06.2015
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K31/415 (2006.01)

C07D231/14 (2006.01)

A61P33/02 (2006.01)