

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 228**

21 Número de solicitud: 201431309

51 Int. Cl.:

A61K 31/415 (2006.01)

C07D 231/14 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

11.09.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.04.2016

Fecha de la concesión:

01.02.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

08.02.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070658

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (40.0%)
C/ SERRANO 117
28006 MADRID (Madrid) ES;
UNIVERSIDAD DE GRANADA (40.0%) y
UNIVERSITAT DE VALENCIA (20.0%)**

72 Inventor/es:

**REVIRIEGO PICON, Felipe;
NAVARRO TORRES, Pilar;
ARAN REDO, Vicente J.;
SANCHEZ MORENO, Manuel;
MARIN SANCHEZ, Clotilde;
OLMO AREVALO, Francisco;
RAMIREZ MACIAS, Inmaculada;
GARCIA-ESPAÑA MONSONIS, Enrique y
ALBELDA GIMENO, Maria Teresa**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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 Resumen:

Uso de ésteres derivados de pirazol protón-ionizables y sus correspondientes sales para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis.

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.

ES 2 566 228 B1

DESCRIPCIÓN

Uso de ésteres derivados de pirazol protón-ionizables y sus correspondientes sales para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis.

5

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.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis 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.

20

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 triatomos 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.

25

30

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 cardíaco y muerte súbita. Debido al gran incremento de viajes

35

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)tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido, Lampit[®], 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
10 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 [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
15 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 hígado, diagnosticados de sida, o tratados con quimioterapia anticancerosa, sufrieron
25 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, pero la infección por *T. cruzi* persiste [Campos, S.V. et al., *J. Heart Lung Transp.*
30 **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 crónica de la enfermedad de Chagas que el benznidazol, utilizado actualmente, y que
35 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 antimonioato 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].

5

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.

10

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.

15

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

20

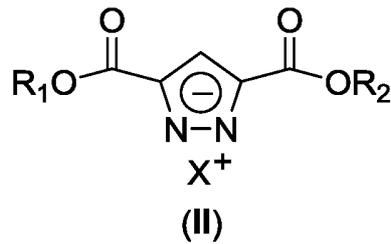
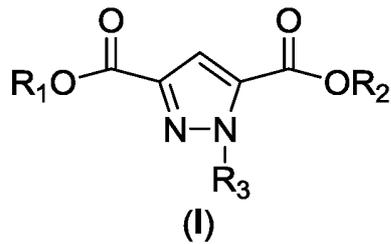
y crónica de la enfermedad de Chagas [Sánchez-Moreno, M. et al., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4231-4243]. Sin embargo, no se ha descrito hasta el momento la utilización de ésteres acíclicos sencillos derivados de pirazol protón-ionizables y de sus correspondientes sales (pirazolatos), a los que hace referencia esta invención, ni como inhibidores de FeSOD ni como agentes antiparasitarios para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis.

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.

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):



donde:

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

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

X^+ es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable;

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

10 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.

15 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.

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

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.

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

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;
- 30 1 *H*-pirazol-3,5-dicarboxilato de dietilo;
- 3,5-bis(etoxicarbonil)pirazolato sódico;

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

5

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.

10

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.

15

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.

20

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

25

30

35

previamente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente dicha composición puede comprender otro principio activo, preferiblemente el principio activo es un antiparasitario. Además el uso de dicha composición será en una cantidad terapéuticamente efectiva.

5

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

10

Los ésteres de pirazol de la presente invención y sus sales farmacéuticamente aceptables, así como las composiciones farmacéuticas que los contienen, pueden ser 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 (II) o a la composición farmacéutica que los comprende.

15

20

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, 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 administrados de forma simultánea o secuencial a al menos uno de los compuestos de fórmula (I) o (II) descritos en la presente invención.

25

30

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 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

35

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.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente 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.

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 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 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 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.

5

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 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. 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.

5 **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.

10 **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.

15 **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.

EJEMPLOS

25 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

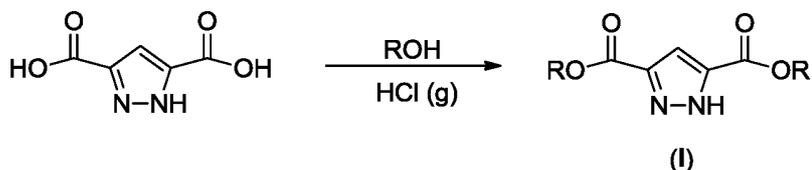
Ejemplo 1

30 *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 ésteres (I) con hidróxido sódico.

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

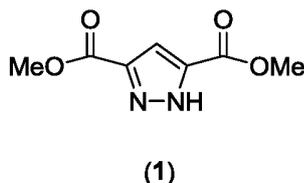
cuando R₁ y R₂ son iguales y se representan como R y R₃ es H



5 *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 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

10 cromatográficamente puro que solidifica al poco tiempo.

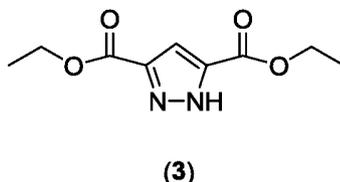
1H-pirazol-3,5-dicarboxilato de dimetilo (1)



15 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). 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⁺).

20

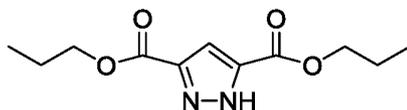
1H-pirazol-3,5-dicarboxilato de dietilo (3)



25 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).

^{13}C 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 $^+$).

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



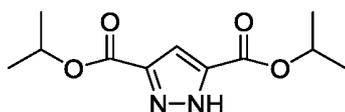
(5)

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). ^{13}C 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 $^+$).

10

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



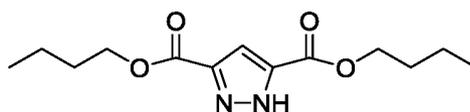
(7)

15

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). ^{13}C 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 $^+$).

20

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



(8)

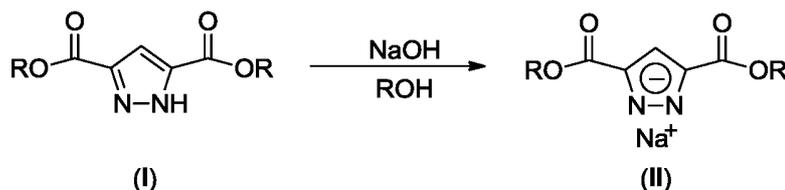
25

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). ^{13}C RMN (125 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) δ : 160,3, 143,8, 135,4, 111,2, 64,9, 30,6, 19,1, 14,0. EM-ES⁺ (m/z): 269 (MH⁺).

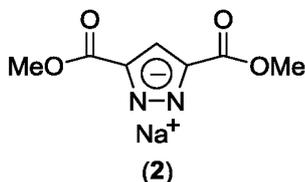
Procedimiento general de síntesis de sales sódicas de fórmula (II):

5 cuando R₁ y R₂ son iguales y se representan como R



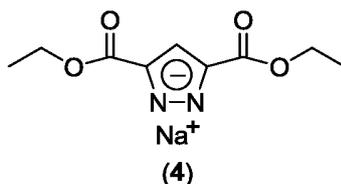
10 *Metodología:* A una solución del éster del ácido 1H-pirazol-3,5-dicarboxílico (1,00 g) en 30 mL del alcohol correspondiente (ROH), se añadió lentamente una cantidad equimolecular de hidróxido sódico disuelto en 10 mL del mismo alcohol. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación y a temperatura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

15 *3,5-bis(metoxicarbonil)pirazolato sódico (2)*



20 *Reactivos:* éster metílico del ácido 1H-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; $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6,97 (1H, s), 3,68 (6H, s). ^{13}C RMN (125 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) δ : 163,3, 142,5, 111,0, 50,3. EM-FAB (m/z): 207 (MH⁺).

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

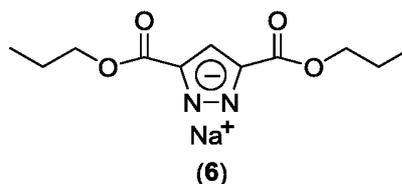


25

Reactivos: éster etílico del ácido 1H-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 (C₉H₁₁N₂O₄Na): %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). ¹³C RMN (125 MHz; DMSO-*d*₆) δ : 163,6, 142,4, 111,1, 58,5, 14,4. EM-FAB (m/z): 235 (MH⁺).

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



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 (C₁₁H₁₅N₂O₄Na): %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). ¹³C 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⁺).

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 formula general (I) (compuestos **1, 3, 5, 7 y 8**) y la formula 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 referencia). En general, todos ellos inhiben selectivamente la FeSOD de los parásitos *T. cruzi* y *Leishmania* spp. en relación a la CuZnSOD.

Ejemplo 2

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 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 mL de medio en frascos de plástico Falcon® de 25 cm² y se mantuvieron en una
5 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.

10 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 concentración de 5×10^4 parásitos/pocillo.

15 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 añadidos al medio de cultivo a concentraciones finales de 100, 50, 25, 10 y 1 µM. El
20 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-
25 Moreno, M. et al., *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 970-979].

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-
30 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.
35 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.

5 Una vez adheridas las células, se infectaron *in vitro* con 1 x 10⁵ 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
10 cristales.

Una vez sacados los cristales se colocaron en un portaobjetos. Se fijaron con metanol y se dejaron secar. Una vez fijados y secos, se les añadió DPX (Panreac®), medio de montaje para microscopía y se tiñeron con Giemsa; para ello, inmediatamente antes
15 de su empleo y en tubo de ensayo, se diluyó solución Azur-Eosina-Azul de Metileno según Giemsa DC (Código 251338) con tampón Sørensen (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
20 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
25 de un mono verde africano adulto, manteniendo los cultivos a una densidad 1 x 10⁴ 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 x 10⁴ células/pocillo en placas de titulación de 24 pocillos, se incubaron durante 24 h a 37 °C en atmósfera húmeda
30 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
35 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.

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.

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 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].

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 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*, según la metodología descrita anteriormente.

5

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 *Leishmania*, lo que nos permitió comparar su comportamiento con los resultados obtenidos con nuestros productos.

10

Tabla 2.- Actividad, toxicidad e índices de selectividad encontrados para los compuestos 1-8 frente a formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania 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

15

20

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)

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

25

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 = IC_{50} de los macrófagos/ IC_{50} 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.

5

Compuestos	IC_{50} μM^a		Toxicidad IC_{50} macrófagos (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)

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.

10

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*

15

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 IC_{25}) fueron adicionados inmediatamente después de la infestación e incubados por 12 h a 37 °C en 5% CO_2 . 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

25

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].

10

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

15

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. 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 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].

20
25
30

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).

35

Ejemplo 6**Procedimiento de evaluación del efecto de los compuestos 3 y 4 sobre la velocidad de infección y el crecimiento de parásitos en medios de cultivo de macrófagos infectados con *L. infantum* y *L. braziliensis***

5 *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 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.

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

15 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) 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

20 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

30 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].

35

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.

5 *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*.

10 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).

15 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
20 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
25 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
30 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
35 compuestos seleccionados (**3** y **4**) no producen efectos tóxicos aparentes ni se produce la muerte de ningún animal.

Ejemplo 9**Procedimiento de evaluación *in vivo* de la actividad de los compuestos 3 y 4 en la fase aguda de la enfermedad de Chagas**

- 5 *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
- 10 $\times 10^5$ 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
- 15 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).
- 20 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
- 25 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.
- 30 Los dos compuestos 3 y 4 mostraron una gran eficacia de inhibición de la parasitemia en la fase aguda (ver FIG. 6).

Ejemplo 10

- 35 **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**

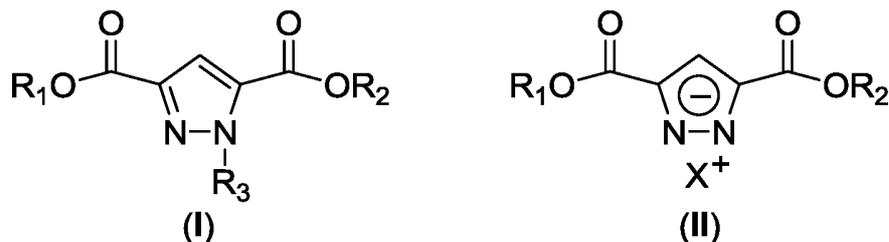
Metodología: Tras el día 60, los animales entran en fase crónica; al día 120 del experimento se induce una situación de inmunosupresión con monohidrato de ciclofosfamida según lo descrito [Cencig, S. et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1216]; finalmente tiene lugar el sacrificio de los animales 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).

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 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 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 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 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});

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

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;

30

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

3,5-bis(etoxicarbonil)pirazolato sódico;

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

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

- 5 8. Uso según las reivindicación anterior, donde el compuesto es 1H-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
10 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.
- 15 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
20 *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*.
- 25 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
30 Chagas.
16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde la enfermedad es la leishmaniasis en humanos o animales.
- 35 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:

- 5 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 dibutilo.

10

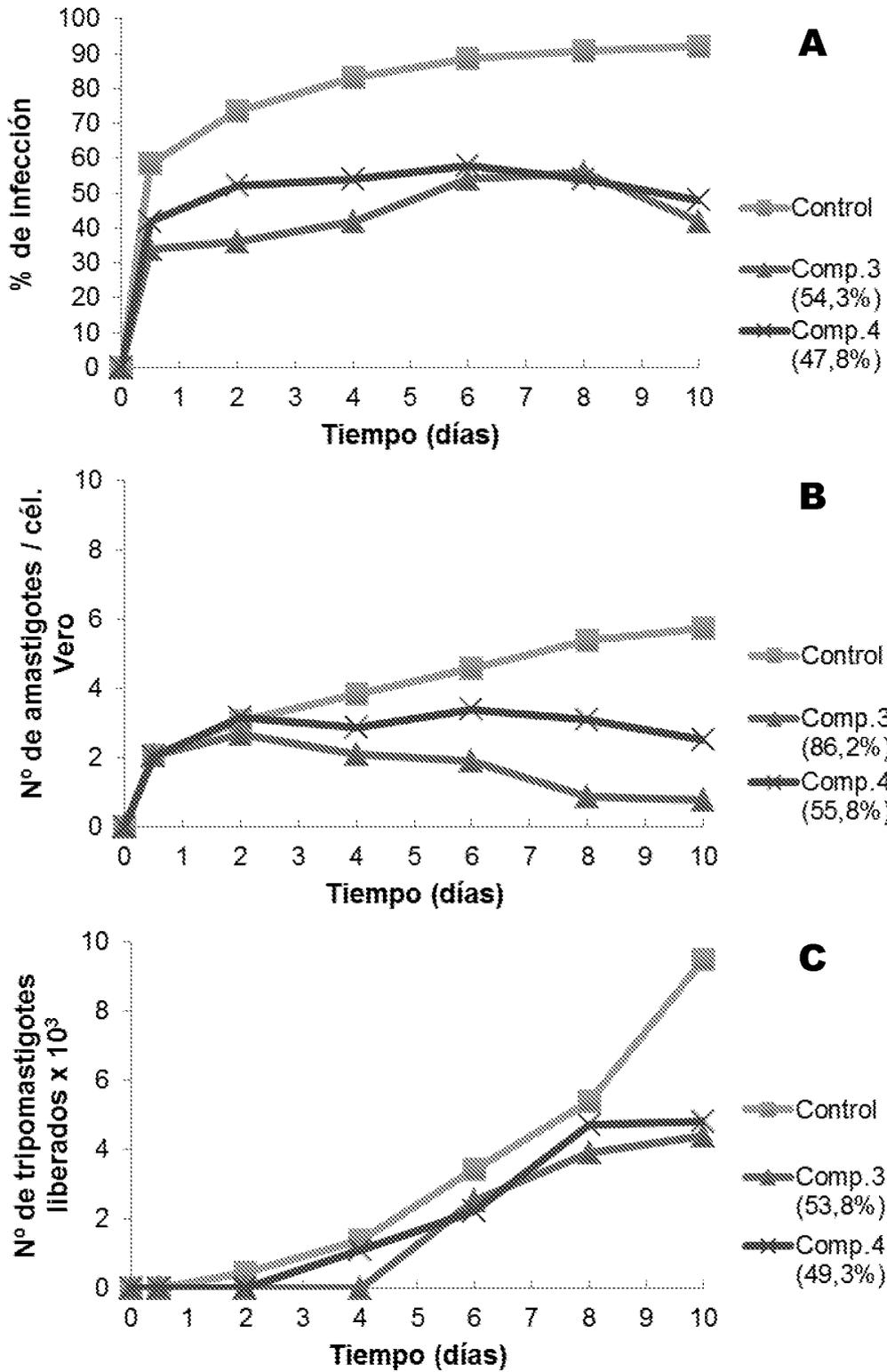


FIG. 1

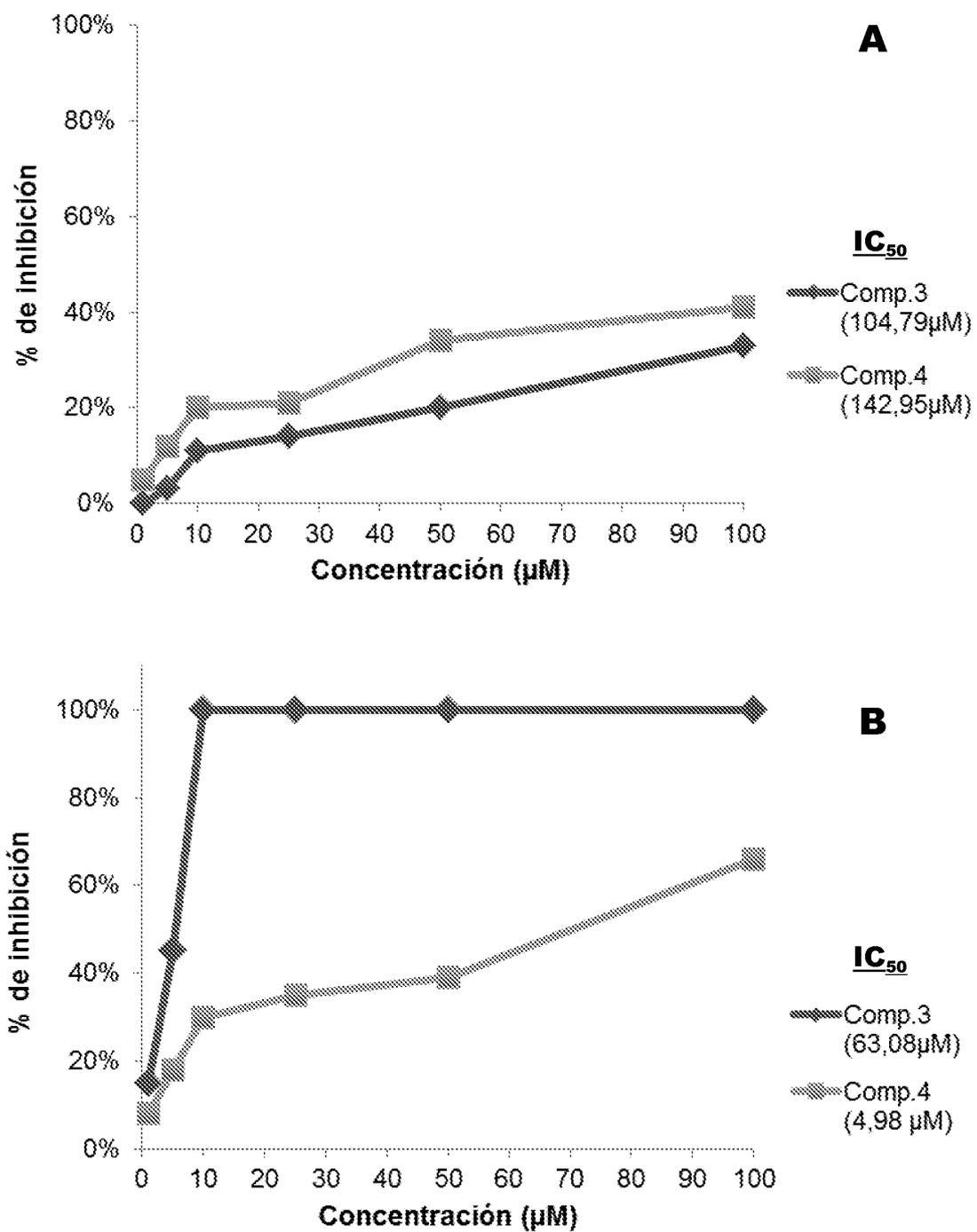


FIG. 2

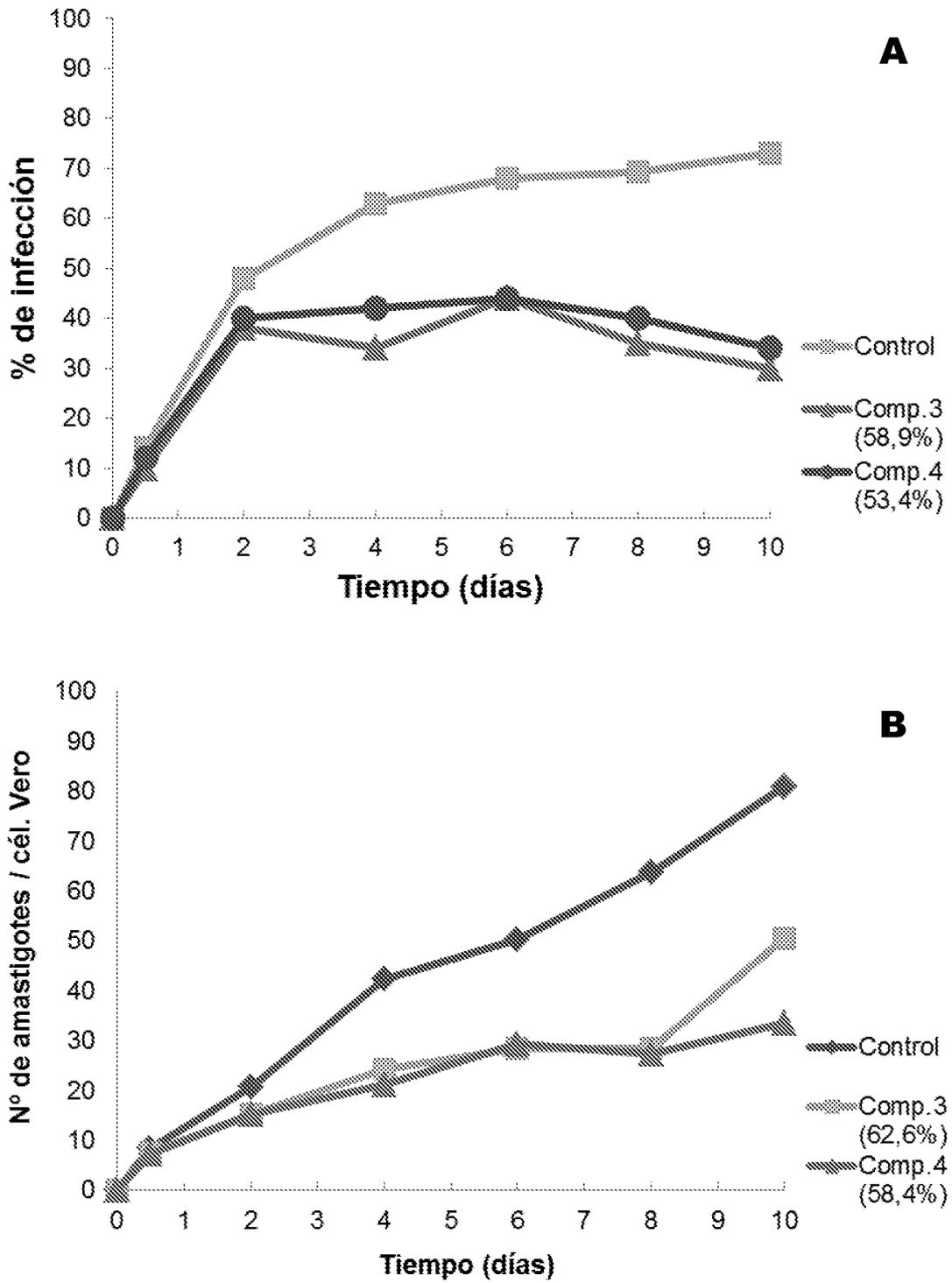


FIG. 3

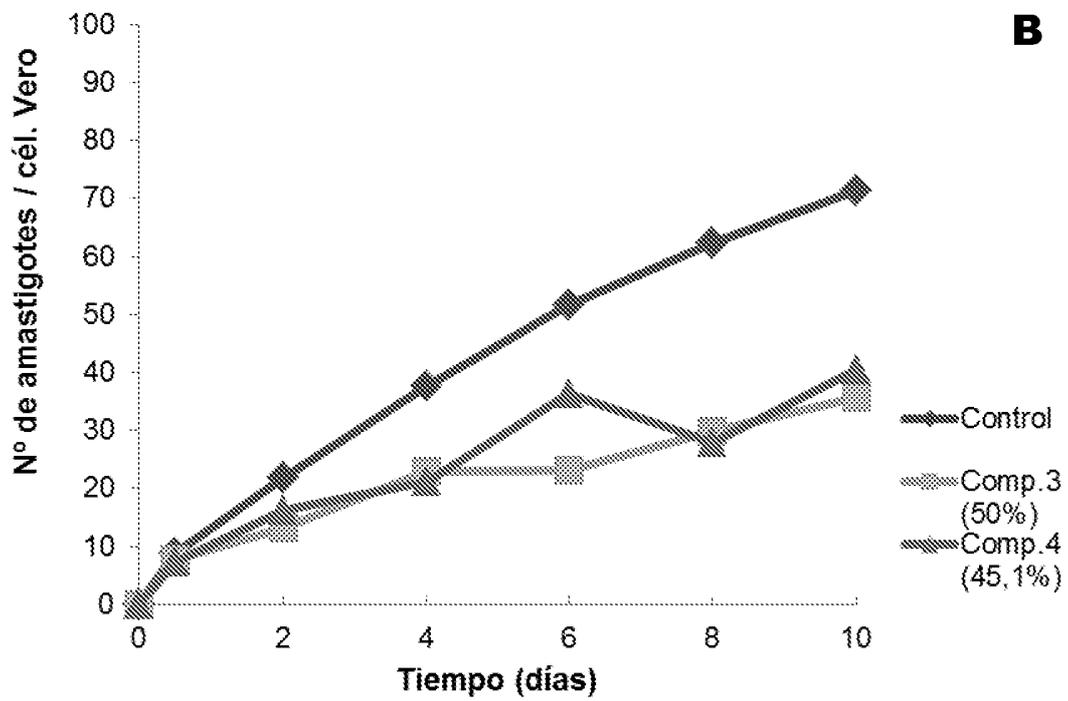
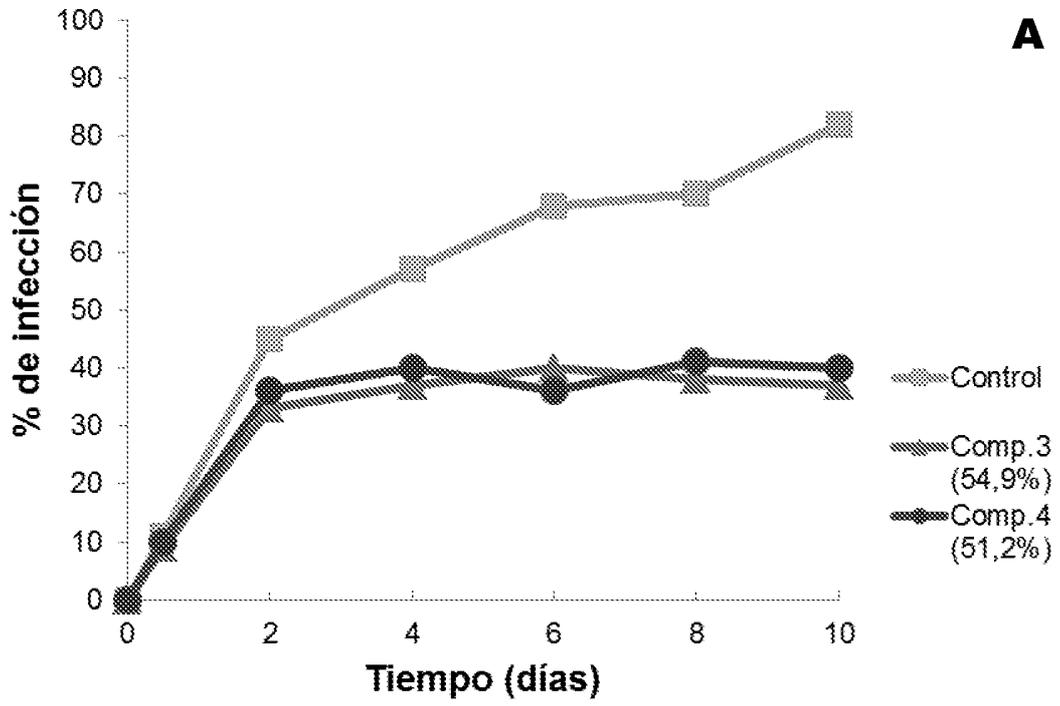


FIG. 4

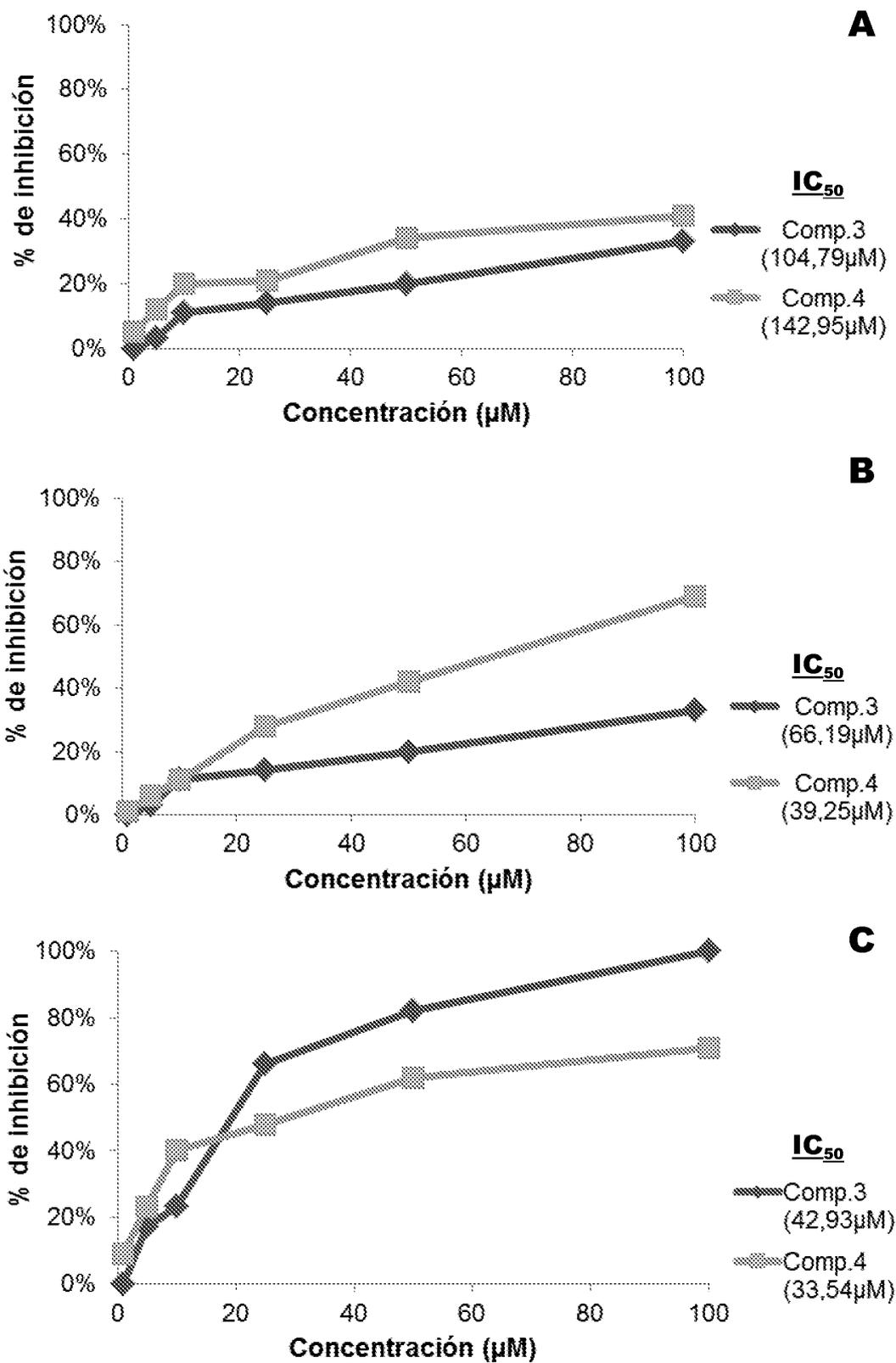


FIG. 5

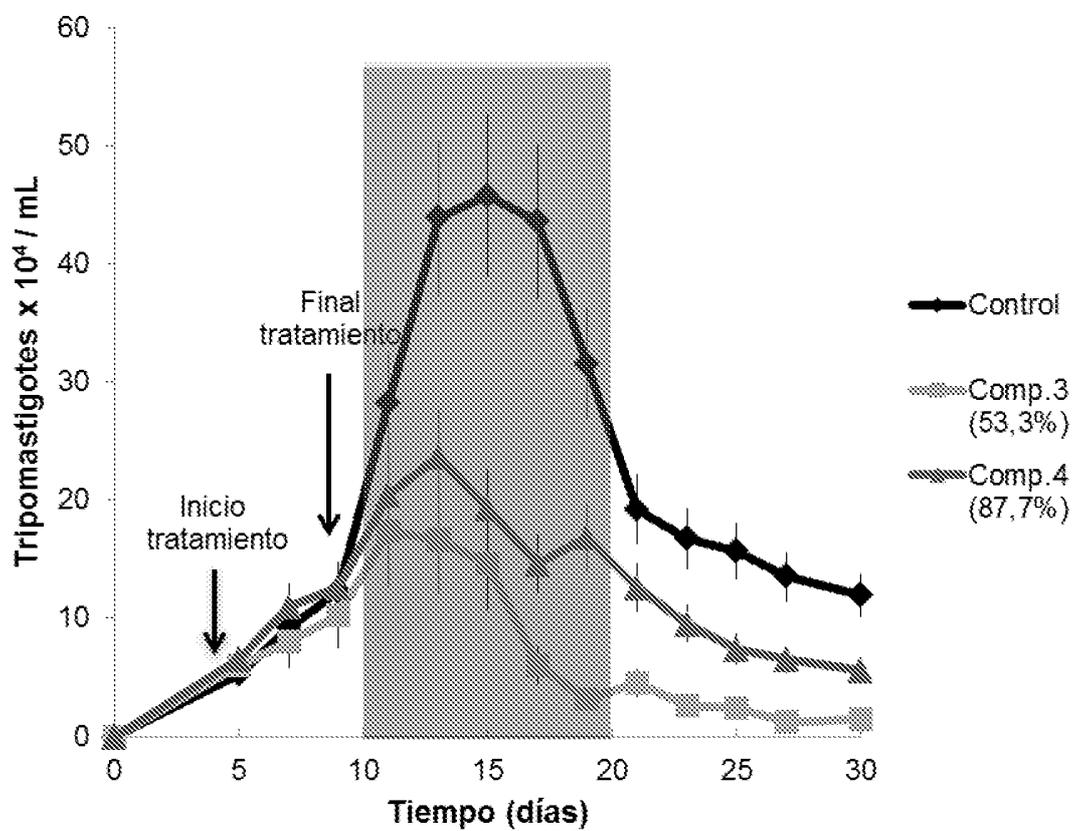


FIG. 6

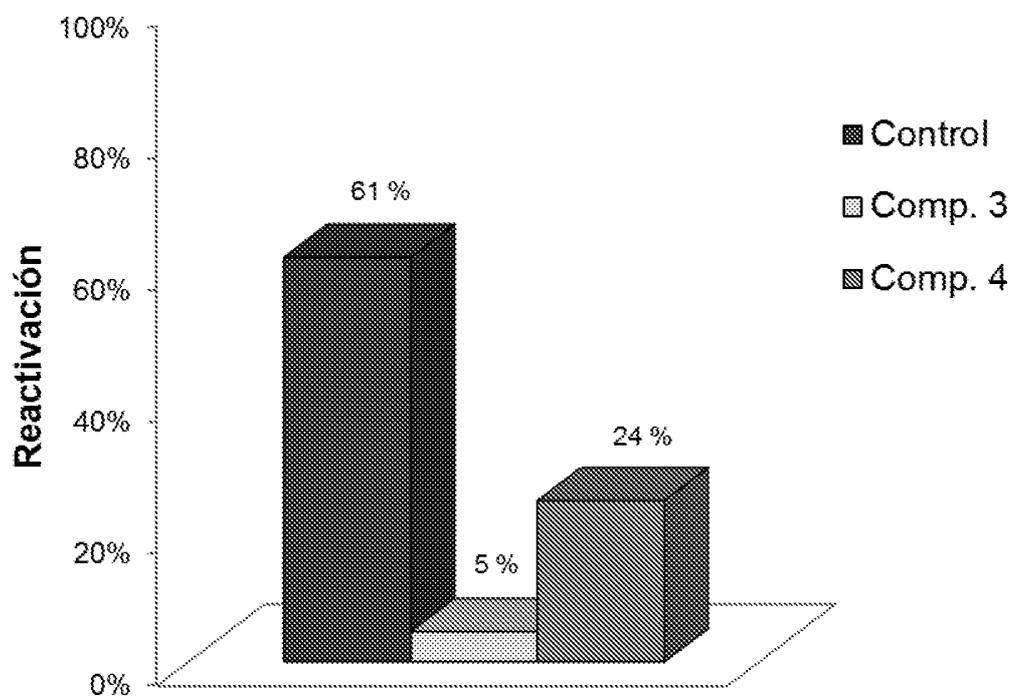


FIG. 7

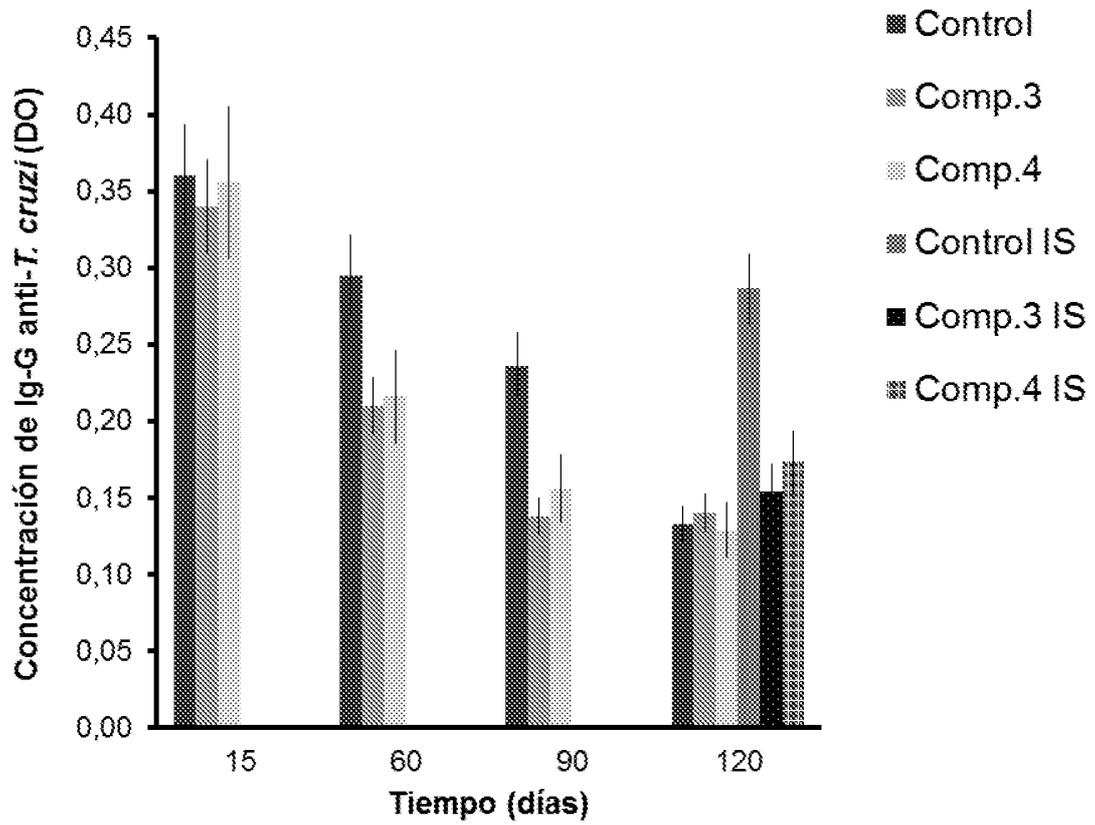


FIG. 8

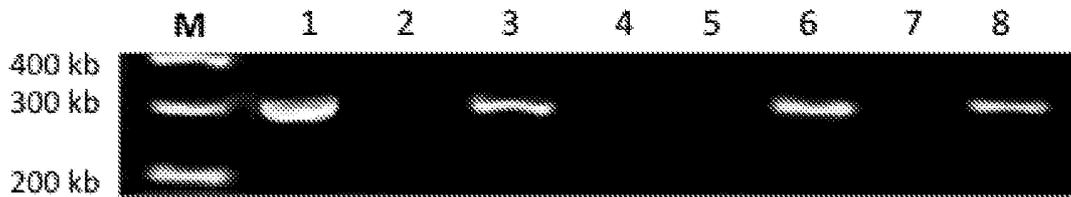


FIG. 9