

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 674**

21 Número de solicitud: 201700741

51 Int. Cl.:

C07D 231/56 (2006.01)

A61K 31/416 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.10.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.02.2018

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(40.0%)**

Avda. Séneca, 2

28040 Madrid ES;

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (30.0%) y**

**CENTRO DE BIOACTIVOS QUÍMICOS, FACULTAD
DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL
MARTA ABREU DE LAS VILLAS (30.0%)**

72 Inventor/es:

ESCARIO GARCIA-TREVIJANO, José Antonio;

GÓMEZ BARRIO, Alicia;

NOGAL RUIZ, Juan José;

FONSECA BERZAL, Cristina Rosa;

IBÁÑEZ ESCRIBANO, Alexandra;

ARÁN REDÓ, Vicente Jesús;

DARDONVILLE, Christophe;

VELA ORTEGA, Nerea;

SIFONTES RODRIGUEZ, Sergio y

MENESES MARCEL, Alfredo Irenaldo

74 Agente/Representante:

PINGARRÓN CARRAZÓN, J. M.

54 Título: **Aminas derivadas de 5 - nitroindazol con propiedades antiprotozoarias**

57 Resumen:

Aminas derivadas de 5-nitroindazol con propiedades antiprotozoarias.

La presente invención se refiere a tres familias de aminas derivadas de 5-nitroindazol [1-(aminoalquil)indazolinonas, 3-(aminoalcoxi)indazoles y 3-(alquilamino)indazoles] que poseen propiedades antiprotozoarias y a su empleo para la fabricación de medicamentos, preferentemente para el tratamiento de infecciones causadas por protozoos patógenos de las familias Trypanosomatidae y Trichomonadidae, tales como la enfermedad de Chagas, la leishmaniosis y la tricomonosis.

ES 2 653 674 A1

DESCRIPCIÓN

Aminas derivadas de 5-nitroindazol con propiedades antiprotozoarias

Sector de la técnica

- 5 La presente invención se refiere a tres familias de aminas derivadas del 5-nitroindazol [fórmulas (I), (II) y (III)], a su preparación y a su uso en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de parasitosis, particularmente para las provocadas por protozoos de las familias *Trypanosomatidae* (*Trypanosoma*, *Leishmania*) y *Trichomonadidae* (*Trichomonas*). La invención se engloba, por tanto, dentro del sector farmacéutico.

10

Estado de la técnica

- Varias de las parasitosis más importantes están causadas por protozoos patógenos; muchas de estas enfermedades tienen una especial prevalencia en zonas poco desarrolladas de la Tierra, apenas despiertan el interés de las grandes compañías farmacéuticas, y se consideran "enfermedades tropicales desatendidas". La mayoría de los medicamentos existentes para su tratamiento presentan una serie de inconvenientes como baja eficacia, alta toxicidad, precios elevados, protocolos de administración complejos, etc., por lo que el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos para la mayoría de estas enfermedades es una necesidad urgente.

20

- El protozoo patógeno *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana; esta dolencia es endémica de 21 países latinoamericanos, donde provoca más de 7.000 muertes anuales y mantiene alrededor de 25 millones de personas en riesgo de contraer la infección. En la zona afectada originalmente por la enfermedad, esta es transmitida principalmente a través de las heces contaminadas de chinches hematófagas, aunque existen rutas alternativas de infección como la ruta digestiva, la transfusión de sangre contaminada o la vía congénita. Como consecuencia de las migraciones internacionales producidas en las últimas décadas, la enfermedad de Chagas es una patología emergente en países como Estados Unidos o España, considerándose que en la actualidad afecta a cerca de 7 millones de personas en todo el mundo (WHO, *Investing to overcome the global impact of Neglected Tropical Diseases. Third WHO report on Neglected Tropical Diseases, 2015*).

Tras la infección, la fase aguda inicial de la enfermedad de Chagas es generalmente leve o asintomática y tiene una duración de 1-2 meses. La infección persiste toda la vida, aunque un 60-70% de los infectados entran en lo que se denomina fase indeterminada de la enfermedad, y nunca desarrollan manifestaciones clínicas. Sin embargo, el 30-40% restante, 10-30 años después de la infección inicial desarrollan la fase crónica de la enfermedad, caracterizada por una gravísima cardiomiopatía y/o severos problemas digestivos (megacolon y megaesófago).

No se dispone de vacuna para la enfermedad de Chagas, y los dos únicos fármacos disponibles, los nitroheterociclos nifurtimox y benznidazol, son bastante efectivos en la fase aguda, pero muestran una eficacia limitada en la fase crónica. Por otra parte, ambos compuestos pueden producir efectos secundarios severos, aunque el benznidazol es generalmente mejor tolerado por los pacientes y se considera el tratamiento de elección para esta enfermedad.

Aunque se han ido describiendo en la literatura compuestos con actividad antichagásica y diferentes dianas moleculares potenciales del parásito, no existen actualmente alternativas terapéuticas que puedan sustituir al nifurtimox y al benznidazol. Algunos azoles antifúngicos, inhibidores de la síntesis de esteroides, se han mostrado especialmente prometedores por su alta eficacia en modelos animales; sin embargo, un estudio clínico reciente llevado a cabo con posaconazol ha mostrado que este compuesto es bastante menos efectivo que el benznidazol, al menos como terapia única (Molina, I. et al., *N. Engl. J. Med.* **2014**, 370, 1899-1908). Muy recientemente, también ha despertado interés la descripción de algunas imidazo- y triazolopirimidinas muy eficaces, que actúan a través de la inhibición del proteasoma de varios tripanosomátidos patógenos (*Trypanosoma*, *Leishmania*) (Khare, S. et al., *Nature* **2016**, 537, 229-233).

En relación con este tema, el grupo de trabajo de los inventores ha descrito en los últimos años la síntesis y propiedades antichagásicas de muchos derivados de 5-nitroindazol; por su relación directa con la presente solicitud, podemos destacar la actividad frente a *T. cruzi* de diversas 5-nitroindazolin-3-onas 1,2-disustituidas [Vega, M. C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 58, 214-227; Escario, J. A. et al., P 201500769 (27-10-2015), PCT/ES 2016/000119 (27-10-2016); Fonseca-Berzal, C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 115, 295-310]. También se han descrito las propiedades tripanocidas de

algunos 3-alcoxi-1-alquilindazoles (Arán, V. J. et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 3197-3207; Boiani, L. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 1034-1040; Rodríguez, J. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 1545-1553; Rodríguez, J. et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 8186-8196; Muro, B. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 74, 124-134); estos últimos
5 compuestos, no obstante, presentan los sustituyentes en posiciones 1 y 3 del anillo de indazol y, por lo tanto, no están relacionados directamente con los incluidos en esta invención.

Por otra parte, la leishmaniosis es una enfermedad parasitaria causada por diferentes
10 especies de protozoos del género *Leishmania*, que se trasmite a través de la picadura de dípteros hematófagos del grupo de los flebótomos. Esta enfermedad está distribuida por la mayor parte del mundo, en especial en áreas tropicales y subtropicales. Aparece en 98 países, muchos de ellos poco desarrollados. Se calcula que cada año aparecen 1,3 millones de casos nuevos, 1 millón de leishmaniosis cutánea y 300.000 de
15 leishmaniosis visceral, estimándose que esta última forma es responsable de 20.000 a 50.000 muertes anuales (WHO, *Investing to overcome the global impact of Neglected Tropical Diseases. Third WHO report on Neglected Tropical Diseases*, **2015**). En humanos, dependiendo de la especie concreta de *Leishmania* implicada, la enfermedad presenta tres formas clínicas principales: leishmaniosis cutánea, mucocutánea y
20 visceral, esta última generalmente mortal sin tratamiento.

Tampoco en este caso existen vacunas efectivas, por lo que la quimioterapia es el único tratamiento existente. Durante muchos años, y todavía hoy en día, los derivados de antimonio pentavalente (estibogluconato sódico y antimoniato de meglumina) han
25 constituido la primera alternativa de tratamiento en muchos países. Como segunda línea de tratamiento podemos mencionar la pentamidina, la anfotericina B, la miltefosina y la paromomicina, y más recientemente, la sitamaquina (Santos, D. O. et al., *Parasitol. Res.* **2008**, 103, 1-10; Singh, N. et al., *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2012**, 5, 485-497). También parecen muy prometedoras las imidazo- y triazolopirimidinas inhibidoras del proteasoma
30 mencionadas al hablar de la enfermedad de Chagas (Khare, S. et al., *Nature* **2016**, 537, 229-233).

También en este caso resulta necesario obtener nuevos agentes antileishmaniásicos de menor coste, mayor efectividad y con menores efectos secundarios adversos. Aunque

los nitroheterociclos no se usan actualmente para el tratamiento de la leishmaniosis, se ha descrito recientemente las propiedades leishmanicidas de algunos compuestos de este grupo como el tripanocida fexinidazol (Wyllie, S. et al., *Sci. Transl. Med.* **2012**, 4, 119re1) o el antiparasitario de amplio espectro nitazoxanida y algunos análogos (Chan-Bacab, M. J. et al., *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, 63, 1292-1293). En este contexto, se han estudiado en los últimos años las propiedades leishmanicidas de algunos 3-alcoxi-1-alkil-5-nitroindazoles (Boiani, L. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 1034-1040; Marín, C. et al., *Acta Trop.* **2015**, 148, 170-178). Como se ha mencionado anteriormente, estos compuestos presentan los sustituyentes en posiciones 1 y 3 del anillo de indazol y no están relacionados directamente con los incluidos en esta invención.

Otra enfermedad causada por un protozo patógeno es la tricomonosis, cuyo agente etiológico es *Trichomonas vaginalis*. Esta infección de transmisión sexual (ITS) supone más del 50% de los casos curables de este tipo de dolencias en el mundo. De acuerdo con la OMS, el número de casos en adultos se estimó en más de 276,4 millones en 2008 (Harp, D. F. & Chowdhuri, I., *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2011**, 157, 3-9; WHO, *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted diseases - 2008*, **2012**).

Esta enfermedad muestra un amplio rango de manifestaciones clínicas; el hombre es frecuentemente portador asintomático y potencial transmisor de la infección, mientras que en la mujer suele producir inflamación más o menos grave de los conductos genitourinarios acompañados de una leucorrea característica, eritema, prurito, disuria, infertilidad, etc. Se ha asociado con problemas en la gestación y partos prematuros, aumenta el riesgo de desarrollo de neoplasia cervical y de próstata y también de coinfección con otras ITS de origen bacteriano, vírico o fúngico.

El fármaco de referencia para el tratamiento de la tricomonosis es el nitroheterociclo metronidazol. Este producto y su análogo el tinidazol, son los dos únicos medicamentos aceptados por la Food and Drug Administration (FDA) para tratar esta infección. Estos fármacos son, en general, eficaces, pero hay que buscar alternativas para aquellos pacientes que sean hipersensibles o para tratar infecciones causadas por aislados

resistentes a los nitroimidazoles (ca. 10% en la actualidad, pero probablemente en aumento).

En este sentido, se ha descrito recientemente la actividad tricomonocida de diversos derivados de 5-nitroindazol, destacando por su relación con la presente invención, los 3-alcoxi-2-alkilindazoles (Escario, J. A. et al., P 201500769 (27-10-2015), PCT/ES 2016/000119 (27-10-2016); Ibáñez-Escribano, A. et al., *Parasitology* **2016**, 143, 34-40; Fonseca-Berzal, C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 115, 295-310). Por otra parte, se ha descrito la actividad tricomonocida de otros derivados de indazol que, al poseer los sustituyentes en otras posiciones del anillo, no están relacionados directamente con los incluidos en esta invención: 3-alcoxi-1-alkilindazoles (Arán, V. J. et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 3197-3207; Ibáñez-Escribano, A. et al., *Parasitology* **2016**, 143, 34-40), 3-alcoxiindazoles, indazol-3-oles 1-sustituidos, indazolin-3-onas 2-sustituidas e indazolin-3-onas condensadas (Marrero-Ponce, Y. et al., *Curr. Drug Discov. Technol.* **2005**, 2, 245-265; Marrero-Ponce, Y. et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 6502-6524).

Muchos de los derivados de 5-nitroindazol comentados al tratar la enfermedad de Chagas, la leishmaniosis y la tricomonosis son, en general, compuestos lipófilos con escasa solubilidad en agua y con propiedades farmacocinéticas poco adecuadas. Este problema se ha intentado solventar anteriormente a través de algunos derivados que contienen grupos carboxilo en su estructura y forman sales hidrosolubles, pero desgraciadamente, carecen de actividad significativa [Escario, J. A. et al., P 201500769 (27-10-2015), PCT/ES 2016/000119 (27-10-2016); Fonseca-Berzal, C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 115, 295-310].

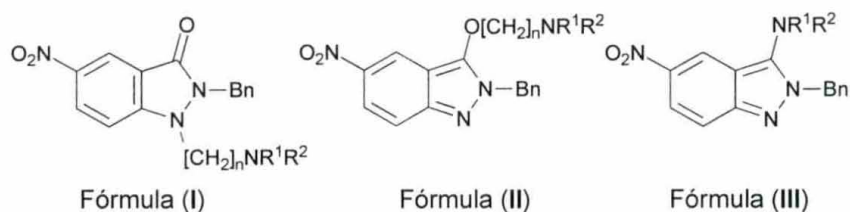
Descripción de la invención

La presente invención se refiere a tres grupos de compuestos derivados de 5-nitroindazol que poseen actividad biológica frente a protozoos patógenos de diversos géneros como *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Trichomonas*. Los compuestos de fórmulas generales (I) y (II) son estructuralmente muy diferentes de los fármacos actualmente utilizados para el tratamiento de estas infecciones y resultan significativamente menos citotóxicos; aunque están basados en otros compuestos previamente preparados por el equipo, han sido diseñados para ser solubles en agua y presentar mejores propiedades farmacocinéticas, mediante la introducción de grupos amino primarios, secundarios o

terciarios, capaces de formar sales hidrosolubles con ácidos inorgánicos u orgánicos apropiados.

Por otra parte, no tenemos constancia de que se hayan descrito propiedades antiparasitarias para los compuestos de fórmula general (III), procedentes de la transposición de ciertos derivados de fórmula general (II).

Así pues, un primer aspecto de la invención se refiere a tres diferentes tipos de compuestos, de fórmulas generales (I), (II) y (III).



En los compuestos de fórmulas (I) y (II), NR^1R^2 puede ser un grupo amino, alquilamino o dialquilamino, un resto de amina secundaria cíclica como el grupo pirrolidino, o grupos ftalimido (que se preparan como intermedios sintéticos de los compuestos con grupo NH_2 final), y n puede ser 2-3; en los compuestos de fórmula (III), NR^1R^2 puede ser un grupo alquilamino, (ω -hidroxialquil)amino, o alquil(ω -hidroxialquil)amino. En compuestos de fórmula (I), cuando $n = 2$, se excluye específicamente el compuesto en el que NR^1R^2 es un grupo piperidino, por haber sido descrita previamente su actividad frente a epimastigotes de *T. cruzi* (Mura, F. et al., *J. Spectrosc. Dyn.* **2013**, 3, artículo 8).

En una realización más preferida, la presente invención se refiere a un compuesto [fórmula (I)] que se selecciona de la lista siguiente:

- 25 2-Bencil-1-[2-(dimetilamino)etil]-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (hidrocloruro)
- 2-Bencil-5-nitro-1-(2-pirrolidinoetil)-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (oxalato)
- 2-Bencil-1-(3-ftalimidopropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-(2-ftalimidoetil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona
- 1-(2-Aminoetil)-2-bencil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (hidrocloruro)
- 30 1-(3-Aminopropil)-2-bencil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (hidrocloruro)
- 2-Bencil-1-[3-(metilamino)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (hidrocloruro)

2-Bencil-1-[3-(dimetilamino)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona (hidrocloruro)
2-Bencil-5-nitro-1-(3-piperidinopropil)-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona (oxalato)

o sus solvatos o profármacos, u otras sales.

5

En otra realización más preferida, la presente invención se refiere a un compuesto [fórmula (II)] que se selecciona de la lista siguiente:

2-Bencil-3-(2-ftalimidoetoxi)-5-nitro-2*H*-indazol

2-Bencil-3-(3-ftalimidopropoxi)-5-nitro-2*H*-indazol

10 2-Bencil-3-[2-(dimetilamino)etoxi]-5-nitro-2*H*-indazol (hidrocloruro)

3-(3-Aminopropoxi)-2-bencil-5-nitro-2*H*-indazol (hidrocloruro)

o sus solvatos o profármacos, u otras sales.

15 En otra realización más preferida, la presente invención se refiere a un compuesto [fórmula (III)] que se selecciona de la lista siguiente:

2-Bencil-3-metilamino-5-nitro-2*H*-indazol

2-Bencil-3-[(2-hidroxietil)amino]-5-nitro-2*H*-indazol

2-Bencil-3-[(3-hidroxipropil)amino]-5-nitro-2*H*-indazol

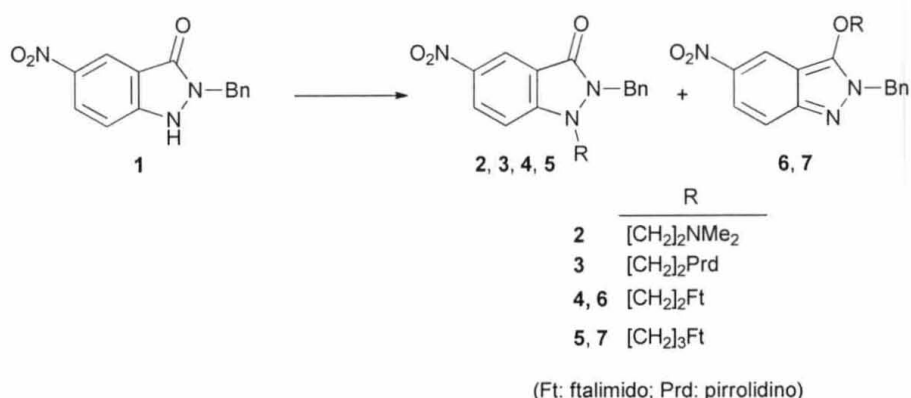
20 2-Bencil-3-[(2-hidroxietil)metilamino]-5-nitro-2*H*-indazol

2-Bencil-3-[(3-hidroxipropil)metilamino]-5-nitro-2*H*-indazol

o sus solvatos o profármacos.

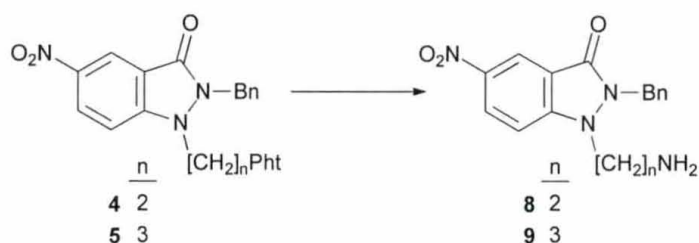
25 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de algunos de los compuestos de fórmula general (I) o (II) por alquilación de la 5-nitroindazolin-3-ona **1**; debido al carácter tautómero de esta última, algunos de los mencionados compuestos se obtienen a la vez al hacer reaccionar el producto de partida bajo condiciones diversas con agentes alquilantes, tal como se muestra en el Esquema

30 1. Como se detalla en los ejemplos, la alquilación de la forma tautómera representada, "indazolin-3-ona", conduce a los compuestos **2-5** [fórmula general (I)], mientras que la alquilación de la forma tautómera "3-hidroxi-2*H*-indazol" conduce a los compuestos **6** y **7** [fórmula general (II)].



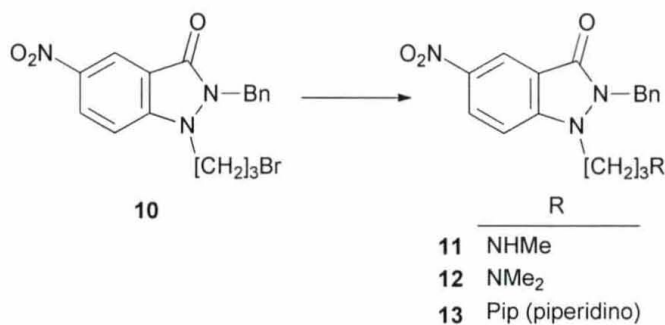
Esquema 1. Ruta sintética para la preparación de las 2-bencilindazolin-3-onas 1-sustituidas **2-5** [fórmula (I)] y de los 3-alcoxi-2-bencilindazoles **6 y 7** [fórmula (II)].

- 5 Otros compuestos de fórmula general (I) se obtienen por transformación química a partir de precursores conteniendo cadenas convenientemente ω -funcionalizadas en posición 1 del anillo de indazol, como se detalla, así mismo, en los ejemplos. Así, la eliminación del grupo protector ftaloílo de los precursores **4 y 5** origina las aminas primarias **8 y 9** (Esquema 2), y la sustitución nucleófila del bromo del compuesto **10** con aminas primarias o secundarias da lugar a las aminas **11-13** (Esquema 3).
- 10



Esquema 2. Ruta sintética para la preparación de las 1-(ω -aminoalquil)-2-bencilindazolin-3-onas **8 y 9** [fórmula (I)].

15



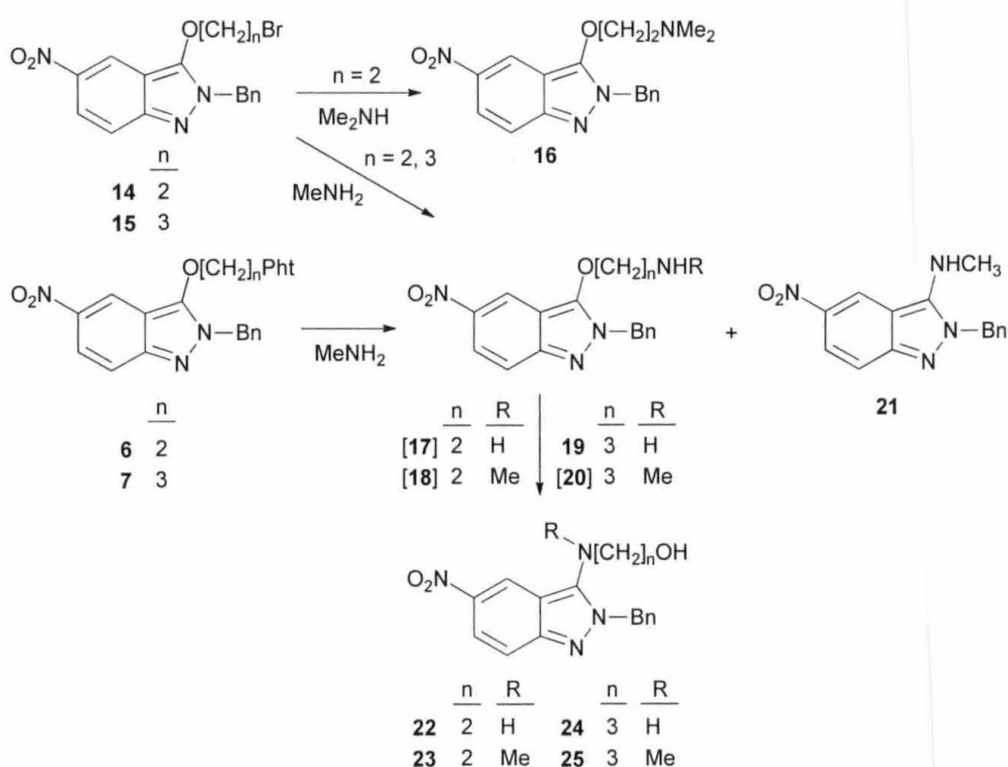
Esquema 3. Ruta sintética para la preparación de las 1-(3-aminopropil)-2-bencilindazolin-3-onas **11-13** [fórmula (I)].

5 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de algunos de los compuestos de fórmula general **II** (**16** y **19**) y **III** (**21-25**) a partir de los correspondientes 3-(ω -bromoalcoxi)indazoles (**14**, **15**) y aminas, o de los 3-(ω -ftalimidoalcoxi) derivados (**6**, **7**) por eliminación del grupo ftaloílo seguida de transposición intramolecular de los 3-(ω -aminoalcoxi)indazoles (**17-20**) inicialmente obtenidos (Esquema 4).

10

Un quinto aspecto de esta invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I), (II) o (III) para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades causadas por protozoos, preferiblemente tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas), leishmaniosis y tricomonosis, causadas por parásitos de los
15 géneros *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Trichomonas*, respectivamente.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprenda un compuesto de fórmula general (I), (II) o (III) junto con adyuvantes o vehículos farmacéuticos aceptables; opcionalmente dicha composición puede contener
20 también otros principios activos.



Esquema 4. Ruta sintética para la preparación de los 3-(ω-aminoalcoxi)-2-bencilindazoles **16** y **19** [fórmula (II)] y de los 3-alkilamino-2-bencilindazoles **21-25** [fórmula (III)]. Los compuestos incluidos entre corchetes [**17**, **18** y **20**] son intermedios de reacción que no fueron aislados.

5

Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance.

10 EJEMPLO 1. Preparación de los compuestos 2-5 [fórmula (I)] y 6, 7 [fórmula (II)] a partir de la 2-bencil-5-nitroindazolinona 1.

Las aminas finales **2** y **3**, así como los ftalimido derivados intermedios **4** y **5** se obtuvieron por alquilación de la 2-bencil-5-nitroindazolin-3-ona **1** (Arán, V. J. et al., *Liebigs Ann.* **1996**, 683-691) con los correspondientes haluros de alquilo funcionalizados (Esquema 1); este tipo de reacciones suele conducir a mezclas de indazolinonas 1,2-disustituidas (**2-5**) y de los 3-alcoxi-2-alkilindazoles isómeros; estos últimos compuestos son en muchos casos productos minoritarios de reacción (Vega, M. C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 58, 214-227; Fonseca-Berzal, C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 115, 295-310) y, en este caso, solo se aislaron los 3-(ω-ftalimidoalcoxi) derivados **6** y **7**.

20

Ejemplo 1a. Preparación de las 1-[2-(dialquilamino)etil]indazolinonas **2** y **3**. En el caso del compuesto **2**, una mezcla agitada de la 2-bencilindazolinona **1** (1,35 g, 5,01 mmol), cloruro de 2-(dimetilamino)etilo (hidrocloruro) (1,44 g, 10,00 mmol) y K₂CO₃ (2,76 g, 19,97 mmol) en dimetilformamida (DMF; 50 mL) se calienta a 100 °C durante 24 h; posteriormente, se prosigue la calefacción durante tres días, añadiendo cada 24 h porciones adicionales del cloruro (1.44 g) y de K₂CO₃ (2.76 g). Para obtener el compuesto **3** se sigue un procedimiento similar a partir de N-(2-cloroetil)pirrolidina (hidrocloruro) (1,44 g, 10,00 mmol); en este caso la reacción se lleva a cabo en butanona (100 mL) y se refluje durante 3 días. En ambos casos, la mezcla de reacción se evapora a continuación a sequedad y, tras la adición de H₂O (100 mL), se extrae con CHCl₃ (4 × 50 mL). La fase orgánica se seca (MgSO₄), se concentra, y se aplica a una columna de cromatografía flash de gel de sílice que se eluye con mezclas CHCl₃/MeOH (50/1 a 25/1). Las fracciones conteniendo el principal producto de reacción se evaporan a sequedad; en el caso del compuesto **2**, el residuo se trata con una solución de HCl conc. (1.0 mL) en EtOH (50 mL) y a continuación se evapora para suministrar el producto deseado en forma del correspondiente hidrocloruro; en el caso del compuesto **3**, el producto obtenido tras la cromatografía en columna se trata con una solución saturada de ácido oxálico en EtOH (10 mL) y la mezcla obtenida se gotea sobre éter dietílico (100 mL). El oxalato precipitado se recoge por filtración, se lava con éter dietílico (2 × 20 mL) y se seca al aire.

2-Bencil-1-[2-(dimetilamino)etil]-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (hidrocloruro) (2).
 Rendi-miento: 0,74 g (39%). P. f. 286-288 °C (EtOH/H₂O). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 11,34 (s a, 1H, NH⁺), 8,55 (d, J = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 8,45 (dd, J = 9,3, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,81 (d, J = 9,3 Hz, 1H, 7-H), 7,29 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,29 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,54 (t, J = 7,5 Hz, 2H, 1'-H), 2,99 (t, J = 7,5 Hz, 2H, 2'-H), 2,71 (s, 6H, Me); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 161,09 (C-3), 149,10 (C-7a), 142,18 (C-5), 135,91 (C-1 Bn), 128,75 (C-3, -5 Bn), 127,95 (C-4 Bn), 127,58 (C-6), 127,50 (C-2, -6 Bn), 120,37 (C-4), 116,73 (C-3a), 112,53 (C-7), 50,54 (C-2'), 44,65 (CH₂ Bn), 42,20 (Me), 41,45 (C-1'); EM (ES⁺): m/z (%) 341 (100) ([M+H]⁺), 703 (26) ([2M+Na]⁺). Anál. calc. para C₁₈H₂₁ClN₄O₃ (376,84): C 57,37; H 5,62; N 14,87. Encontrado: C 57,59; H 5,87; N 14,59.

2-Bencil-5-nitro-1-(2-pirrolidinoetil)-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (oxalato) (3).
 Rendimiento: 1,10 g (48%). P. f. 216-218 °C (MeOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ

8,53 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 4-H), 8,40 (dd, $J = 9,0, 2,2$ Hz, 1H, 6-H), 7,73 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, 7-H), 7,35-7,20 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,18 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,27 (s a, 2H, 1'-H), 2,79 (s a, 6H, 1'-H y 2-, 5-H pirrolidino), 1,69 (s a, 4H, 3-, 4-H pirrolidino); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 165,01 (CO oxalato), 161,21 (C-3), 149,34 (C-7a), 141,82 (C-5), 135,93 (C-1 Bn), 128,75 (C-3, -5 Bn), 127,90 (C-4 Bn), 127,39 (C-2, -6 Bn), 127,33 (C-6), 120,35 (C-4), 116,23 (C-3a), 112,45 (C-7), 53,17 (C-2, -5pirrolidino), 49,39 (C-2'), 44,84 (CH₂ Bn), 43,55 (C-1'), 22,83 (C-3, -4 pirrolidino); EM (ES⁺): m/z (%) 367 (100) ([M+H]⁺), 755 (10) ([2M+Na]⁺). Anál. calc. para C₂₂H₂₄N₄O₇ (456,45): C 65,78; H 4,42; N 12,27. Encontrado: C 65,99; H 4,21; N 12,42.

10

Ejemplo 1b. Preparación de las 1-(ω -ftalimidoalquil)indazolinonas **4**, **5** y de los 3-(ω -ftalimidoalcoxi)indazoles **6**, **7**. Con objeto de obtener los 2-ftalimidoetil derivados **4** y **6**, una mezcla agitada de la 2-bencilindazolinona **1** (1,00 g, 3,72 mmol), *N*-(2-bromoetil)ftalimida (1,27 g, 5,00 mmol) y K₂CO₃ (0,55 g, 3,98 mmol) en DMF (15 mL) se calienta a 100 °C durante 5 h; a continuación, se añade una cantidad adicional de *N*-(2-bromoetil)ftalimida (1,00 g) y se continúa la calefacción durante 12 h más. El disolvente se evapora a sequedad y, tras la adición de H₂O (50 mL), el precipitado se recoge por filtración, se lava con agua y se seca al aire. El sólido obtenido se suspende en CHCl₃ (10 mL) y el producto **6** insoluble (0,32 g) se recoge por filtración, se lava con CHCl₃ (2 × 5 mL) y se seca al aire. El filtrado se concentra y se aplica a una columna de cromatografía flash de gel de sílice, que se eluye con mezclas CHCl₃/acetona (50/1 a 20/1) para suministrar, siguiendo este orden de elución, una cantidad adicional del compuesto **6** y, a continuación, el compuesto **4**.

20

Los 3-ftalimidopropil derivados **5** y **7** se preparan siguiendo un procedimiento similar, utilizando la cantidad correspondiente de *N*-(3-bromopropil)ftalimida (1,34 g, 5,00 mmol). La reacción acaba en este caso en 3 h. Después de evaporar la DMF y añadir agua, se extrae la mezcla con cloroformo (3 x 50 mL). La solución orgánica se seca (MgSO₄), se concentra y se cromatografía como se ha descrito anteriormente, proporcionando, en este orden de elución, los compuestos **7** y **5**.

30

2-Bencil-1-(2-ftalimidoetil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (4). Rendimiento: 1,07 g (65%). P. f. 190-192 °C (1-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,33 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 4-H), 7,87 (dd, $J = 9,0, 2,4$ Hz, 1H, 6-H), 7,66 (m, 4H, H ftalimido), 7,36 (d, $J = 9,0$

Hz, 1H, 7-H), 7,25 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,20 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,36 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H, 1'-H), 3,63 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 166,99 (CO ftalimido), 161,11 (C-3), 149,40 (C-7a), 140,93 (C-5), 136,00 (C-1 Bn), 134,32 (C-4, -5 ftalimido), 130,98 (C-1, -2 ftalimido), 128,68 (C-3, -5 Bn), 127,83 (C-4 Bn), 127,37 (C-2, -6 Bn), 126,39 (C-6), 122,84 (C-3, -6 ftalimido), 120,12 (C-4), 116,31 (C-3a), 111,48 (C-7), 45,30 (C-1'), 44,72 (CH₂ Bn), 34,29 (C-2'); EM (ES⁺): m/z (%) 443 (100) ([M+H]⁺), 465 (11) ([M+Na]⁺), 885 (20) ([2M+H]⁺), 907 (6) ([2M+Na]⁺). Anál. calc. para C₂₄H₁₈N₄O₅ (442,42): C 65,15; H 4,10; N 12,66. Encontrado: C 65,40; H 3,97; N 12,57.

10 *2-Bencil-1-(3-ftalimidopropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (5)*. Rendimiento: 0,93 g (55%). P. f. 202-204 °C (1-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,48 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, 4-H), 8,34 (dd, $J = 9,0, 2,0$ Hz, 1H, 6-H), 7,81 (m, 4H, H ftalimido), 7,71 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, 7-H), 7,22 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,22 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,13 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, 1'-H), 3,49 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, 3'-H), 1,60 (m, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 167,82 (CO ftalimido), 161,14 (C-3), 148,93 (C-7a), 141,45 (C-5), 136,08 (C-1 Bn), 134,22 (C-4, -5 ftalimido), 131,72 (C-1, -2 ftalimido), 128,63 (C-3, -5 Bn), 127,75 (C-4 Bn), 127,22 (C-6 y C-2, -6 Bn), 122,91 (C-3, -6 ftalimido), 120,40 (C-4), 115,92 (C-3a), 112,21 (C-7), 45,02 (C-1'), 44,96 (CH₂ Bn), 34,86 (C-3'), 24,82 (C-2'); EM (IE): m/z (%) 456 (100) (M⁺), 426 (18), 218 (15), 188 (67), 160 (83), 130 (29), 104 (18).
20 Anál. calc. para C₂₅H₂₀N₄O₅ (456,45): C 65,78; H 4,42; N 12,27. Encontrado: C 65,50; H 4,67; N 12,51.

2-Bencil-3-(2-ftalimidoetoxi)-5-nitro-2H-indazol (6). Rendimiento: 0,49 g (30%). P. f. 249-251 °C (MeNO₂). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO, 80 °C]: δ 8,81 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 4-H), 7,86 (dd, $J = 9,6, 2,1$ Hz, 1H, 6-H), 7,82 (m, 4H, H ftalimido), 7,48 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, 7-H), 7,18 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,36 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,97 (t, $J = 5,4$ Hz, 2H, 1'-H), 4,14 (t, $J = 5,4$ Hz, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO, 80 °C]: δ 167,19 (CO ftalimido), 148,72 (C-3), 146,46 (C-7a), 140,25 (C-5), 135,11 (C-1 Bn), 133,88 (C-4, -5 ftalimido), 131,19 (C-1, -2 ftalimido), 127,90 (C-3, -5 Bn), 127,19 (C-2, -4, -6 Bn), 122,55 (C-3, -6 ftalimido), 119,73 (C-6), 119,32 (C-4), 117,64 (C-7), 104,47 (C-3a), 70,49 (C-1'), 51,24 (CH₂ Bn), 37,05 (C-2'); EM (ES⁺): m/z (%) 174 (90), 443 (100) ([M+H]⁺), 465 (14) ([M+Na]⁺). Anál. calc. para C₂₄H₁₈N₄O₅ (442,42): C 65,15; H 4,10; N 12,66. Encontrado: C 65,03; H 4,27; N 12,47.

2-Bencil-3-(3-ftalimidopropoxi)-5-nitro-2H-indazol (**7**). Rendimiento: 0,68 g (40%). P. f. 183-185 °C (1-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO, 80 °C]: δ 8,84 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, 4-H), 7,88 (dd, *J* = 9,6, 1,9 Hz, 1H, 6-H), 7,82 (m, 4H, H ftalimido), 7,51 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H, 7-H), 7,30 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,44 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,79 (t, *J* = 5,4 Hz, 2H, 1'-H), 3,83 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, 3'-H), 2,17 (m, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 168,07 (CO ftalimido), 149,62 (C-3), 146,81 (C-7a), 140,11 (C-5), 135,73 (C-1 Bn), 134,26 (C-4, -5 ftalimido), 131,76 (C-1, -2 ftalimido), 128,63 (C-3, -5 Bn), 127,95 (C-2, -6 Bn), 127,90 (C-4 Bn), 122,96 (C-3, -6 ftalimido), 121,08 (C-4), 119,88 (C-6), 117,99 (C-7), 104,95 (C-3a), 71,40 (C-1'), 51,67 (CH₂ Bn), 34,11 (C-3'), 28,21 (C-2'); EM (IE): *m/z* (%) 456 (1) (M⁺), 368 (2), 188 (100), 160 (64), 130 (16). Anál. calc. para C₂₅H₂₀N₄O₅ (456,45): C 65,78; H 4,42; N 12,27. Encontrado: C 65,86; H 4,67; N 12,09.

EJEMPLO 2. Preparación de las 1-(ω-aminoalquil)indazolinonas **8 y **9** [fórmula (I)] por desprotección de los correspondientes ω-ftalimidoalquil derivados **4** y **5**.**

La eliminación del grupo protector ftaloilo de los compuestos **4** y **5** (descritos en el Ejemplo 1) con MeNH₂/H₂O condujo a las 1-(ω-aminoalquil)indazolinonas finales **8** y **9** (Esquema 2).

Para ello, una suspensión de la correspondiente 1-(ω-ftalimidoalquil)indazolinona (**4** o **5**; 2,50 mmol) en MeNH₂/H₂O (40% p/p; 20 mL) se calentó a 80 °C durante 4 h. Se dejó enfriar la reacción a temperatura ambiente, se extrajo la amina formada con cloroformo (4 × 50 mL) y la solución orgánica se evaporó a sequedad. En cada caso, el producto obtenido fue disuelto en HCl N (50 mL) y extraído con éter (4 × 50 mL); la fase acuosa se evaporó a sequedad y el residuo se trituró con éter (20 mL), proporcionando las aminas deseadas como los correspondientes hidroclouros, que se recogieron por filtración y se secaron.

1-(2-Aminoetil)-2-bencil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (hidrocloruro) (**8**). Rendimiento: 0,84 g (96%). P. f. 261-263 °C (EtOH/H₂O). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,53 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, 4-H), 8,41 (dd, *J* = 9,3, 2,4 Hz, 1H, 6-H), 8,33 (s a, 3H, NH₃⁺), 7,68 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H, 7-H), 7,27 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,29 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,39 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, 1'-H), 2,80 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 160,79 (C-3), 148,23 (C-7a), 141,64 (C-5), 135,93 (C-1 Bn), 128,77 (C-3, -5 Bn), 127,91 (C-4 Bn), 127,38 (C-6), 127,26 (C-2, -6 Bn), 120,45 (C-4), 116,06 (C-3a), 111,88 (C-7),

44,63 (CH₂ Bn), 43,56 (C-1'), 35,41 (C-2'); EM (ES⁺): *m/z* (%) 313 (100) ([M+H]⁺), 335 (4) ([M+Na]⁺), 625 (57) ([2M+H]⁺), 647 (26) ([2M+Na]⁺). Anál. calc. para C₁₆H₁₇ClN₄O₃ (348,78): C 55,10; H 4,91; N 16,06. Encontrado: C 55,37; H 4,76; N 15,85.

- 5 1-(3-Aminopropil)-2-bencil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (hidrocloruro) (**9**). Rendimiento: 0,86 g (95%). P. f. 202-204 °C (1-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,53 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, 4-H), 8,40 (dd, *J* = 9,0, 2,4 Hz, 1H, 6-H), 8,03 (s a, 3H, NH₃⁺), 7,75 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, 7-H), 7,27 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,20 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,20 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, 1'-H), 2,71 (s a, 2H, 3'-H), 1,61 (m, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 161,22 (C-3), 149,07 (C-7a), 141,61 (C-5), 136,10 (C-1 Bn), 128,69 (C-3, -5 Bn), 127,85 (C-4 Bn), 127,42 (C-2, -6 Bn), 127,31 (C-6), 120,51 (C-4), 116,10 (C-3a), 112,36 (C-7), 44,65 (CH₂ Bn), 44,30 (C-1'), 36,07 (C-3'), 23,92 (C-2'); EM (ES⁺): *m/z* (%) 327 (100) ([M+H]⁺), 349 (10) ([M+Na]⁺), 653 (25) ([2M+H]⁺), 675 (18) ([2M+Na]⁺). Anál. calc. para C₁₇H₁₉ClN₄O₃ (362,81): C 56,28; H 5,28; N 15,44. Encontrado: C 56,12; H 4,99; N 15,71.

EJEMPLO 3. Preparación de las 1-(3-aminopropil)indazolinonas 11-13 [fórmula (I)] a partir de la 1-(3-bromopropil)indazolinona 10.

- El tratamiento de la 1-(3-bromopropil)indazolinona **10** (Fonseca-Berzal, C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 115, 295-310) con aminas primarias (MeNH₂) o secundarias (Me₂NH, piperidina) dio lugar a los productos finales **11-13** (Esquema 3). Reacciones análogas partiendo del 2-bromoetil análogo de **10** no condujeron a los productos esperados, ya que en estos casos el derivado halogenado sufrió preferentemente una deshidrohalogenación a la correspondiente 1-vinilindazolinona (Fonseca-Berzal, C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 115, 295-310).

- En el caso del 3-metilamino (**11**) y 3-dimetilamino (**12**) derivados, una mezcla de la 1-(3-bromopropil)indazolinona **10** (0,98 g, 2,51 mmol) y la correspondiente amina (MeNH₂/EtOH 33% p/p o Me₂NH/EtOH 33% p/p; 30 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Se evaporó la mezcla a sequedad, se extrajo la amina formada con cloroformo (4 × 50 mL) y la solución orgánica se evaporó nuevamente. El producto obtenido se disolvió en HCl N (50 mL) y se extrajo con éter (4 × 50 mL); la fase acuosa se evaporó a sequedad y el residuo se trituro con éter (20 mL), proporcionando las

aminas deseadas como los correspondientes hidroclouros, que se recogieron por filtración y se secaron.

En el caso del 3-piperidino derivado (**13**), una mezcla del 3-bromopropil derivado **10** (0,98 g, 2,51 mmol) y piperidina (0,45 g, 5,28 mmol) en EtOH (50 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 48 h y luego se reflujo durante 3 h. La reacción se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en HCl N (50 mL) y se extrajo con éter (4 × 50 mL). La fase acuosa se alcalinizó con K₂CO₃, y la amina libre se extrajo con cloroformo (4 × 50 mL). El residuo obtenido por evaporación del disolvente se trató con ácido oxálico (sat.) en etanol (5 mL) y a continuación se precipitó el oxalato de la amina por adición de éter (100 mL). La sal obtenida se recogió por filtración y se secó.

2-Bencil-1-[3-(metilamino)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (hidrocloruro) (**11**). Rendi-miento: 0,90 g (95%). P. f. 186-188 °C (1-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,61 (s a, 2H, NH₂⁺), 8,52 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 8,40 (dd, *J* = 9,0, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,74 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, 7-H), 7,27 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,20 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,19 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, 1'-H), 2,81 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, 3'-H), 2,44 (s, 3H, Me), 1,64 (m, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 161,19 (C-3), 148,96 (C-7a), 141,63 (C-5), 136,07 (C-1 Bn), 128,72 (C-3, -5 Bn), 127,86 (C-4 Bn), 127,38 (C-2, -6 Bn), 127,34 (C-6), 120,51 (C-4), 116,13 (C-3a), 112,28 (C-7), 45,30 (C-3'), 44,71 (CH₂ Bn), 44,20 (C-1'), 32,25 (Me), 22,44 (C-2'); EM (ES⁺): *m/z* (%) 341 (100) ([M+H]⁺), 681 (18) ([2M+H]⁺). Anál. calc. para C₁₈H₂₁ClN₄O₃ (376,84): C 57,37; H 5,62; N 14,87. Encontrado: C 57,20; H 5,87; N 14,77.

2-Bencil-1-[3-(dimetilamino)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (hidrocloruro) (**12**). Ren-dimiento: 0,87 g (89%). P. f. 176-178 °C (2-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 10,90 (s a, 1H, NH⁺), 8,53 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 8,39 (dd, *J* = 9,3, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,75 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H, 7-H), 7,28 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,22 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,19 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, 1'-H), 2,96 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, 3'-H), 2,59 (s, 6H, Me), 1,69 (m, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 161,10 (C-3), 148,78 (C-7a), 141,59 (C-5), 136,14 (C-1 Bn), 128,74 (C-3, -5 Bn), 127,85 (C-4 Bn), 127,38 (C-2, -6 Bn), 127,31 (C-6), 120,47 (C-4), 116,09 (C-3a), 112,22 (C-7), 53,44 (C-3'), 44,76 (CH₂ Bn), 44,30 (C-1'), 41,85 (Me), 20,80 (C-2'); EM (ES⁺): *m/z* (%) 355 (100) ([M+H]⁺), 377 (7) ([M+Na]⁺),

731 (7) ($[2M+Na]^+$). Anál. calc. para $C_{19}H_{23}ClN_4O_3$ (390,86): C 58,38; H 5,93; N 14,33. Encontrado: C 58,09; H 5,98; N 14,57.

2-Bencil-5-nitro-1-(3-piperidinopropil)-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (oxalato) (13).

5 Rendimiento: 1,03 g (85%). P. f. 178-180 °C (MeOH). 1H RMN [300 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 8,52 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 4-H), 8,45 (s a, 1H, NH^+), 8,38 (dd, $J = 9,3, 2,1$ Hz, 1H, 6-H), 7,68 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H, 7-H), 7,28 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,18 (s, 2H, CH_2 Bn), 4,09 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, 1'-H), 2,86 (m a, 6H, 3'-H, 2-, 6-H piperidino), 1,63 (s a, 6H, 2'-H, 3-, 5-H piperidino), 1,44 (s a, 2H, 4-H piperidino); ^{13}C RMN [75 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 164,79 (CO oxalato), 161,04 (C-3), 148,85 (C-7a), 141,58 (C-5), 136,11 (C-1 Bn), 128,76 (C-3, -5 Bn), 127,85 (C-4 Bn), 127,33 (C-2, -6 Bn), 127,28 (C-6), 120,44 (C-4), 116,11 (C-3a), 112,23 (C-7), 52,82 (C-3'), 51,93 (C-2, -6 piperidino), 44,75 (CH_2 Bn), 44,37 (C-1'), 22,58 (C-3, -5 piperidino), 21,42 (C-4 piperidino), 20,66 (C-2'); EM (ES^+): m/z (%) 395 (100) ($[M+H]^+$), 417 (8) ($[M+Na]^+$), 811 (4) ($[2M+Na]^+$). Anál. calc. para $C_{24}H_{28}N_4O_7$ (484,50): C 59,50; H 5,83; N 11,56. Encontrado: C 59,75; H 5,57; N 11,57.

EJEMPLO 4. Preparación del 3-[2-(dimetilamino)etoxi]indazol 16 [fórmula (II)] a partir del 3-(2-bromoetoxi)indazol 14.

El tratamiento del 3-(2-bromoetoxi)indazol **14** (Fonseca-Berzal, C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 115, 295-310) con una amina secundaria como la Me_2NH dio lugar al 2-(dimetilamino)etoxi derivado esperado **16** (Esquema 4).

Con este fin, una mezcla del 3-(2-bromoetoxi)indazol **14** (0,94 g, 2,50 mmol) y $Me_2NH/EtOH$ (33% p/p; 20 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Se evaporó la mezcla a sequedad y el residuo se extrajo con cloroformo (4 × 50 mL); evaporada la fase orgánica, el residuo se disolvió en HCl N (50 mL) y la solución se extrajo con éter (4 × 50 mL). La fase acuosa se evaporó a sequedad y el residuo se trituró con éter (20 mL), proporcionando el hidrocloreto de la amina deseada, que se recogió por filtración y se secó.

2-Bencil-3-[2-(dimetilamino)etoxi]-5-nitro-2H-indazol (hidrocloreto) (16). Rendimiento: 0,87 g (92%). P. f. 177-179 °C (2-PrOH). 1H RMN [300 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 11,39 (s a, 1H, NH^+), 8,94 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 4-H), 7,91 (dd, $J = 9,6, 2,1$ Hz, 1H, 6-H), 7,55 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, 7-H), 7,30 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,65 (s, 2H, CH_2 Bn), 5,19 (t, $J = 4,2$ Hz,

2H, 1'-H), 3,63 (t, $J = 4,2$ Hz, 2H, 2'-H), 2,84 (s, 6H, Me); ^{13}C RMN [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 148,81 (C-3), 146,82 (C-7a), 140,27 (C-5), 136,00 (C-1 Bn), 128,53 (C-3, -5 Bn), 128,03 (C-2, -6 Bn), 127,79 (C-4 Bn), 121,14 (C-4), 119,88 (C-6), 118,07 (C-7), 104,84 (C-3a), 67,60 (C-1'), 55,32 (C-2'), 51,68 (CH_2 Bn), 42,48 (Me); EM (ES^+): m/z (%) 341 (100) ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Anál. calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_3$ (376,84): C 57,37; H 5,62; N 14,87. Encontrado: C 57,10; H 5,43; N 14,99.

EJEMPLO 5. Preparación del 3-(3-aminopropoxi)indazol 19 [(fórmula (II))], del 3-(metilamino)indazol 21 [fórmula (III)] y de los 3-[(ω -hidroxialquil)amino]indazoles 22 y 24. [fórmula (III)] a partir de los 3-(ω -ftalimidoalcoxi) derivados 6 y 7.

La eliminación del resto ftaloílo de los compuestos 6 y 7 (Ejemplo 1) con $\text{MeNH}_2/\text{H}_2\text{O}$ dio lugar a las aminas 17 y 19; estos compuestos fueron fácilmente detectados por cromatografía en capa fina (CCF) en las mezclas de reacción e incluso 19 pudo ser aislado con bajo rendimiento; estos productos, sin embargo, no resultaron estables, experimentando una transposición intramolecular a los correspondientes 3-[(ω -hidroxialquil)amino]indazoles 22 y 24. En ambos casos, también se pudo aislar de estas reacciones el 3-(metilamino)indazol 21, procedente de la sustitución nucleófila intermolecular del grupo 3-alcoxi de 6/17 y de 7/19 por el resto de MeNH_2 presente en el medio de reacción (Esquema 4).

Con este objetivo, una suspensión del correspondiente 3-(ftalimidoalcoxi)indazol (6 o 7) (2,50 mmol) en $\text{MeNH}_2/\text{H}_2\text{O}$ (40% p/p; 20 mL) se calentó a 80 °C durante 4 h (para 22) o 20 h (para 24). Se dejó enfriar la reacción a temperatura ambiente, se extrajo con cloroformo (4 $\times$ 50 mL) y la solución orgánica se evaporó a sequedad. Partiendo de 6, el residuo se cromatografió en columna flash de gel de sílice eluyendo con mezclas cloroformo/acetona (30/1 a 5/1) para conducir, en este orden de elución, a los compuestos 21 (49 mg, 7%) y 22. Partiendo de 7, la columna se eluyó con mezclas de cloroformo/etanol (50/1 a 10/1) para obtener los compuestos 21 (0,26 g, 37%) y 24 y, a continuación, con cloroformo/metanol (20/1 a 5/1) para obtener el 3-(3-aminopropoxi)indazol 19; este último se aisló como el correspondiente hidrocloreuro por disolución en HCl N (15 mL), seguida de evaporación a sequedad.

3-(3-Aminopropoxi)-2-bencil-5-nitro-2H-indazol (hidrocloreuro) (19). Rendimiento: 36 mg (4%). P. f. 194-196 °C (reblandecimiento previo) (2-PrOH). ^1H RMN [500 MHz,

(CD₃)₂SO]: δ 8,91 (d, J = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 8,03 (s a, 3H, NH₃⁺), 7,91 (dd, J = 9,6, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,55 (d, J = 9,6 Hz, 1H, 7-H), 7,33 (m, 5H, Bn aromát. H), 5,47 (s, 2H, Bn CH₂), 4,88 (t, J = 5,9 Hz, 2H, 1'-H), 3,01 (t, J = 6,0 Hz, 2H, 3'-H), 2,16 (m, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [125 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 149,54 (C-3), 146,81 (C-7a), 140,17 (C-5), 135,79 (Bn C-1), 128,68 (Bn C-3, -5), 127,92 (Bn C-2, -4, -6), 121,15 (C-4), 119,94 (C-6), 118,07 (C-7), 104,90 (C-3a), 70,59 (C-1'), 51,72 (Bn CH₂), 35,78 (C-3'), 27,24 (C-2'); MS (ES⁺): m/z (%) 327 (100) ([M+H]⁺), 349 (13) ([M+Na]⁺). Anál. calc. para C₁₇H₁₉ClN₄O₃ (362,81): C 56,28; H 5,28; N 15,44. Encontrado: C 56,01; H 5,57; N 15,17.

- 10 *2-Bencil-3-metilamino-5-nitro-2H-indazol (21)*. P. f. 185-187 °C (2-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,79 (d, J = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 7,79 (dd, J = 9,6, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,40-7,14 (m, 7H, 7-H, NH, H aromát. Bn), 5,38 (s, 2H, CH₂ Bn), 3,23 (d, J = 4,8 Hz, 3H, Me); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 147,72 (C-7a), 146,51 (C-3), 137,18 (C-5), 136,17 (C-1 Bn), 128,50 (C-3, -5 Bn), 127,51 (C-4 Bn), 127,25 (C-2, -6 Bn), 123,65 (C-4), 120,32 (C-6), 115,78 (C-7), 107,40 (C-3a), 51,04 (CH₂ Bn), 31,13 (Me); EM (IE): m/z (%) 282 (100) (M⁺), 236 (5), 191 (21), 163 (3), 145 (6), 117 (11), 102 (11). Anál. calc. para C₁₅H₁₄N₄O₂ (282,30): C 63,82; H 5,00; N 19,85. Encontrado: C 63,57; H 5,27; N 19,67.

- 20 *2-Bencil-3-[(2-hidroxietil)amino]-5-nitro-2H-indazol (22)*. Rendimiento: 0,70 g (90%). P. f. 171-173 °C (MeCN). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,80 (d, J = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 7,81 (dd, J = 9,6, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,38-7,10 (m, 7H, 7-H, NH, H aromát. Bn), 5,44 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,94 (s a, 1H, OH), 3,66 (s a, 4H, 1', 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 147,79 (C-7a), 145,90 (C-3), 137,36 (C-5), 136,30 (C-1 Bn), 128,50 (C-3, -5 Bn), 127,50 (C-4 Bn), 127,34 (C-2, -6 Bn), 123,31 (C-4), 120,25 (C-6), 116,00 (C-7), 107,17 (C-3a), 59,97 (C-2'), 51,18 (CH₂ Bn), 46,97 (C-1'); EM (IE): m/z (%) 312 (63) (M⁺), 281 (37), 221 (5), 191 (7), 102 (6), 91 (100). Anál. calc. para C₁₆H₁₆N₄O₃ (312,32): C 61,53; H 5,16; N 17,94. Encontrado: C 61,70; H 4,97; N 17,57.

- 30 *2-Bencil-3-[(3-hidroxipropil)amino]-5-nitro-2H-indazol (24)*. Rendimiento: 0,44 g (54%). P. f. 154-156 °C (2-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,81 (d, J = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 7,80 (dd, J = 9,6, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,38-7,10 (m, 7H, 7-H, NH, H aromát. Bn), 5,42 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,63 (t, J = 5,1 Hz, 1H, OH), 3,66 (m, 2H, 1'-H), 3,52 (m, 2H, 3'-H), 1,80 (m, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 147,77 (C-7a), 145,71 (C-3), 137,42 (C-5), 136,23 (C-1 Bn), 128,51 (C-3, -5 Bn), 127,51 (C-4 Bn), 127,28 (C-2, -6 Bn), 123,46

(C-4), 120,28 (C-6), 115,98 (C-7), 107,05 (C-3a), 58,02 (C-3'), 51,17 (CH₂ Bn), 41,46 (C-1'), 32,37 (C-2'); EM (IE): *m/z* (%) 326 (100) (M⁺), 281 (24), 235 (18), 205 (8), 191 (16), 102 (10). Anál. calc. para C₁₇H₁₈N₄O₃ (326,35): C 62,57; H 5,56; N 17,17. Encontrado: C 62,83; H 5,77; N 16,93.

5

EJEMPLO 6. Preparación del 3-(metilamino)indazol 21 y los 3-[(ω-hidroxi)alquil]metilamino]indazoles 23 y 25 [fórmula (III)] a partir de los 3-(ω-bromoalcoxi)indazoles 14 y 15.

Tanto el compuesto **14** como su 3-bromopropoxi análogo **15** (Fonseca-Berzal, C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 115, 295-310), tratados con una amina primaria como la MeNH₂ condujeron inicialmente a los correspondientes 3-(ω-aminoalcoxi) derivados **18** y **20** que, como se ha descrito para los análogos **17** y **19** (Ejemplo 5), se transpusieron rápidamente a los 3-[(ω-hidroxi)alquil]metilamino]indazoles **23** y **25**, respectivamente; el 3-(metilamino)indazol **21** también pudo ser aislado de estos proceso (Esquema 4).

15

Para ello, una suspensión del correspondiente 3-(ω-bromoalcoxi)indazol (**14** o **15**) (2,50 mmol) en MeNH₂/EtOH (33% p/p; 30 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 20 h (para **23**) o 4 días (para **24**). La mezcla se evaporó a sequedad y el residuo se cromatografió en columna flash de gel de sílice utilizando mezclas cloroformo/acetona (30/1 a 10/1). Siguiendo este orden de elución, se obtuvo primero el metilamino derivado **21** [77 mg (11%) a partir de **14**; 0,13 g (18%) a partir de **15**] y, a continuación, los correspondientes productos transpuestos **23** y **25**.

2-Bencil-3-[(2-hidroxietil)metilamino]-5-nitro-2H-indazol (23). Rendimiento: 0,70 g (86%). P. f. 111-113 °C (2-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,86 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, 4-H), 7,93 (dd, *J* = 9,6, 2,4 Hz, 1H, 6-H), 7,60 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H, 7-H), 7,38-7,20 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,61 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,78 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H, OH), 3,54 (m, 2H, 2'-H), 3,32 (t, *J* = 4,5 Hz, 2H, 1'-H), 3,02 (s, 3H, Me); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 148,11 (C-3), 147,63 (C-7a), 140,33 (C-5), 136,44 (C-1 Bn), 128,51 (C-3, -5 Bn), 127,69 (C-2, -6 Bn), 127,60 (C-4 Bn), 120,73 (C-4), 119,64 (C-6), 118,28 (C-7), 112,61 (C-3a), 58,47 (C-2'), 58,29 (C-1'), 52,24 (CH₂ Bn), 41,26 (Me); EM (IE): *m/z* (%) 326 (42) (M⁺), 295 (100), 249 (13), 235 (21), 205 (11), 192 (7), 161 (7), 116 (11), 91 (49). Anál. calc. para C₁₇H₁₈N₄O₃ (326,35): C 62,57; H 5,56; N 17,17. Encontrado: C 62,30; H 5,77; N 17,01.

30

2-Bencil-3-[(3-hidroxipropil)metilamino]-5-nitro-2H-indazol (**25**). Rendimiento: 0,65 g (76%). Aceite que solidifica con el tiempo; p. f. 67-69 °C. ^1H RMN [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 8,83 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 4-H), 7,93 (dd, $J = 9,3, 2,1$ Hz, 1H, 6-H), 7,62 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H, 7-H), 7,38-7,12 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,55 (s, 2H, CH_2 Bn), 4,45 (t, $J = 5,1$ Hz, 1H, OH), 3,37 (m, 2H, 3'-H), 3,32 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, 1'-H), 2,94 (s, 3H, Me), 1,62 (m, 2H, 2'-H); ^{13}C RMN [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 147,94 (C-7a), 147,62 (C-3), 140,51 (C-5), 136,31 (C-1 Bn), 128,55 (C-3, -5 Bn), 127,66 (C-4 Bn), 127,52 (C-2, -6 Bn), 120,53 (C-4), 119,68 (C-6), 118,43 (C-7), 112,58 (C-3a), 58,04 (C-3'), 52,83 (C-1'), 52,36 (CH_2 Bn), 41,46 (Me), 30,58 (C-2'); EM (IE): m/z (%) 340 (81) (M^+), 295 (100), 249 (48), 205 (51), 174 (10), 159 (7), 130 (7), 116 (21), 102 (6). Anál. calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$ (340,38): C 63,52; H 5,92; N 16,46. Encontrado: C 63,24; H 5,77; N 16,71.

EJEMPLO 7. Estudio *in vitro* de la actividad e índice de selectividad de los derivados de indazol sobre *Trypanosoma cruzi*.

Estos estudios se realizan siguiendo un protocolo secuencial de cribado *in vitro* publicado en la literatura y seguido anteriormente por los inventores (Fonseca-Berzal, C. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 4851-4856; Fonseca-Berzal, C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 115, 295-310). En primer lugar, se evalúa simultáneamente la actividad de los productos frente a epimastigotes de *T. cruzi* (forma extracelular presentes en el insecto vector) y su toxicidad inespecífica frente a fibroblastos L929 (células hospedadoras de los amastigotes). Los compuestos que presentan una selectividad en epimastigotes igual o superior a la del fármaco de referencia, el benznidazol, se seleccionan para un estudio posterior en amastigotes, más significativos desde el punto de vista de la enfermedad humana al ser las formas intracelulares del parásito presentes en mamíferos.

Ejemplo 7a. Actividad frente a epimastigotes de *T. cruzi*.

Para determinar la actividad *in vitro* sobre epimastigotes se utilizaron cultivos axénicos de *T. cruzi*, cepa CL clon B5 transfectada de manera estable con el gen de la β -galactosidasa (*lacZ*) de *E. coli*. La actividad se obtiene a partir de un método colorimétrico que determina el rojo de clorofenol liberado a partir de su β -D-galactopiranosido (CPRG) por los parásitos que permanecen vivos tras el tratamiento. Los compuestos, disueltos en sulfóxido de dimetilo (DMSO), se ensayaron a

concentraciones finales en el medio de cultivo de 256-0,125 μM siguiendo un procedimiento descrito (Fonseca-Berzal, C. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 4851-4856). A partir de las correspondientes curvas dosis-respuesta se estimó para cada compuesto la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento de los epimastigotes (CI_{50} epimastigotes). Los resultados de actividad, mostrados en la Tabla 1, se expresan como la media de la CI_{50} en epimastigotes $\pm$ desviación estándar (DS), a partir de los valores obtenidos en tres experimentos realizados de manera independiente.

Puede observarse que siete indazolinonas 1,2-disustituídas [fórmula (I); **2**, **3**, **8**, **9** y **11-13**], un 3-aminoalcoxi-2-bencilindazol [fórmula (II); **19**] y tres 3-alkilamino-2-bencilindazoles [fórmula (III); **21**, **22** y **24**] muestran valores de actividad del mismo orden o superiores al del benznidazol. Merecen especial atención las aminas primarias **8** y **9** y la secundaria **11**, mucho más activas ($\text{CI}_{50} \leq 0,5 \mu\text{M}$) frente a epimastigotes de *T. cruzi* que el fármaco de referencia benznidazol ($\text{CI}_{50} = 26,6 \mu\text{M}$) y que una amina terciaria relacionada, derivada de piperidina, descrita previamente ($\text{CI}_{50} = 9,0 \mu\text{M}$) (Mura, F. et al., *J. Spectrosc. Dyn.* **2013**, 3, artículo 8).

Tabla 1. Actividad *in vitro* frente a formas extracelulares (epimastigotes) e intracelulares (amastigotes) de *T. cruzi* CL-B5, citotoxicidad inespecífica en fibroblastos murinos L929, expresadas como CI_{50} y CL_{50} , respectivamente, e índices de selectividad (IS).

Comp.	CI_{50} epimastigotes (μM)	CL_{50} L929 (μM)	IS ^a epimastigotes	CI_{50} amastigotes (μM)	IS ^b amastigotes
2	10,63 $\pm$ 0,18	> 256	> 24,08	3,93 $\pm$ 1,11	> 65,14
3	23,36 $\pm$ 5,89	> 256	> 10,96	—	—
4	89,73 $\pm$ 6,07	> 256	> 2,85	—	—
5	> 256	> 256	ND	—	—
6	> 256	> 256	ND	—	—
7	> 256	> 256	ND	—	—
8	0,35 $\pm$ 0,00	237,21 $\pm$ 27,93	677,74	0,29 $\pm$ 0,03	817,96
9	0,24 $\pm$ 0,12	161,36 $\pm$ 22,55	672,33	0,25 $\pm$ 0,13	645,44
11	0,50 $\pm$ 0,19	242,91 $\pm$ 6,23	485,82	0,71 $\pm$ 0,02	342,13
12	0,94 $\pm$ 0,05	103,86 $\pm$ 31,97	110,49	1,24 $\pm$ 0,17	83,76
13	16,95 $\pm$ 0,79	> 256	> 15,10	15,25 $\pm$ 2,70	> 16,79

16	41,76 ± 6,59	126,59 ± 17,32	3,03	–	–
19	14,07 ± 2,67	102,32 ± 8,12	7,27	–	–
21	17,55 ± 6,90	113,00 ± 18,47	6,44	–	–
22	22,46 ± 1,91	> 256	> 11,40	1,37 ± 0,26	>186,86
23	58,47 ± 2,12	159,29 ± 2,61	2,72	–	–
24	13,43 ± 8,24	200,65 ± 27,70	14,94	5,52 ± 0,04	36,35
25	31,76 ± 1,32	100,58 ± 13,70	3,17	–	–
Benznidazol	26,55 ± 4,53	> 256	> 9,64	0,50 ± 0,03	> 512

^aÍndices de selectividad para epimastigotes (IS = CL₅₀ L929/CI₅₀ epimastigotes).

^bÍndices de selectividad para amastigotes (IS = CL₅₀ L929/CI₅₀ amastigotes).

ND: no determinado.

–: No evaluado en amastigotes por no alcanzar en epimastigotes el mínimo de selectividad establecido por el fármaco de referencia (IS_{Compuesto} < IS_{Benznidazol}).

Ejemplo 7b. Citotoxicidad inespecífica sobre fibroblastos murinos L929 y determinación de índices de selectividad (IS).

Con el fin de determinar si la actividad anti-*T. cruzi* de los indazoles estudiados es específica y que no son tóxicos para células de mamífero, se evaluó su citotoxicidad inespecífica en fibroblastos por fluorimetría utilizando resazurina, indicador redox que sufre un cambio de color y emite fluorescencia en presencia de células metabólicamente activas (Fonseca-Berzal, C. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 4851-4856).

Los compuestos estudiados se añadieron al medio de cultivo a concentraciones finales 256-0,125 µM, y se calculó para cada uno de ellos la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular (CL₅₀ L929) a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta. Los resultados de actividad, mostrados en la Tabla 1, se expresan como la media de la CL₅₀ ± DS, a partir de los valores obtenidos en tres experimentos independientes. A partir de estos datos, se calcularon los correspondientes índices de selectividad (IS = CL₅₀ L929/CI₅₀ epimastigotes).

Puede observarse que los compuestos más activos frente a epimastigotes (**8, 9, 11 y 12**) presentan IS (110,5-677,7) muy superiores al del fármaco de referencia (> 9,6). Otros compuestos con actividad anti-epimastigote interesante (**2, 3, 13, 19, 21, 22 y 24**)

resultaron, sin embargo, bastante tóxicos para los fibroblastos, por lo que sus IS (6,4 a > 24,1) no resultaron tan satisfactorios.

Ejemplo 7c. *Actividad frente a amastigotes de T. cruzi.*

- 5 Estos ensayos se realizaron sobre la misma cepa utilizada al estudiar la actividad frente a epimastigotes, usando así mismo el sustrato cromogénico CPRG, siguiendo protocolos previamente descritos (Fonseca-Berzal, C. et al., *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 1049-1056). Para ello se infectaron células L929 con tripomastigotes derivados de cultivo celular (TDC), que rápidamente se transformaron intracelularmente en
- 10 amastigotes. Este estudio se llevó a cabo con los compuestos que mostraron frente a epimastigotes un IS similar o superior al del fármaco de referencia (benznidazol), determinándose, tal como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 7a), la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento de los amastigotes (CI_{50} amastigotes) a partir de las correspondientes curvas dosis-respuesta. Los resultados de actividad se
- 15 expresan como la media de la $CI_{50} \pm DS$, a partir de los valores encontrados en tres experimentos independientes. Las actividades obtenidas, así como los correspondientes IS para amastigotes se recogen en la Tabla 1.

- Puede observarse que la mayoría de los compuestos efectivos frente a epimastigotes
- 20 muestran también una actividad similar (**8**, **9**, **11-13**) o, como ocurre con el benznidazol, superior (**2**, **22** y **24**) frente a amastigotes. Destacan los compuestos **8** y **9** ($CI_{50} = 0,29$ y $0,25 \mu M$, respectivamente), con actividad superior a la del benznidazol ($CI_{50} = 0,50 \mu M$) y unos valores excelentes de IS (> 645). Estos resultados son especialmente interesantes desde el punto de vista de la enfermedad humana teniendo en cuenta el
- 25 relevante papel que juegan en su desarrollo los amastigotes, formas intracelulares presentes en las células de mamífero.

- En este sentido, muchos compuestos cumplen los requisitos de actividad e IS frente a amastigotes de una cepa de *T. cruzi* del tipo TcVI necesarios para ser considerados
- 30 buenos puntos de partida (*hits*) para el desarrollo de nuevos fármacos antichagásicos ($CI_{50} \leq 10 \mu M$ o $< 5 \mu M$ e IS > 10; Don, R. & Ioset, J.-R., *Parasitology* **2014**, *141*, 140-146; Chatelain, E., *J. Biomol. Screen.* **2015**, *20*, 22-35).

Los resultados aquí descritos confirman nuestra hipótesis de que la introducción de grupos ω -aminoalquilo en posición 1 de las 2-bencilindazolinonas [fórmula (I)] conduce a compuestos que mantienen una elevada actividad tripanocida, al mismo tiempo que confieren, a través de las sales de amonio correspondientes, una alta solubilidad en agua. Por otra parte, resulta muy interesante la actividad mostrada por el compuesto **19** [fórmula (II)], dado que otros 3-alcoxi-2-alquilindazoles análogos descritos previamente, con sustituyentes de otra naturaleza, presentan escasa actividad antichagásica. Finalmente, la notable actividad tripanocida de algunos 3-(alquilamino)indazoles, e. g., **22** y **24** [fórmula (III)], especialmente frente a amastigotes, no ha sido descrita con anterioridad, por lo que este tipo de estructura constituye un nuevo esqueleto prometedor de cara al desarrollo posterior de nuevos fármacos antichagásicos derivados de indazol.

EJEMPLO 8. Actividad *in vitro* de los derivados de indazol frente a promastigotes de *Leishmania amazonensis* y determinación de índices de selectividad (IS).

Dado el estrecho parentesco entre los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, pertenecientes ambos a la familia *Trypanosomatidae*, algunas de las indazolinonas 1,2-disustituidas [fórmula (I): **2**, **8**, **9**, **11** y **12**] y 3-(alquilamino)indazoles [fórmula (III): **21**, **22** y **24**] activos frente a *T. cruzi* fueron ensayados también frente a *L. amazonensis* siguiendo un procedimiento publicado con anterioridad (Sifontes-Rodríguez, S. et al., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2015**, 110, 166-173). Para ello, los promastigotes de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) fueron cultivados a 26 °C en medio de Schneider suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina sódica (200 UI/mL) y estreptomicina (200 µg/mL). Los compuestos a ensayar fueron previamente disueltos en sulfóxido de dimetilo y luego se llevaron a cabo diluciones seriadas con medio de cultivo en placas de 96 pocillos a las que se agregaron cultivos frescos de promastigotes para lograr una densidad final de 5×10^5 promastigotes/mL. Se ensayaron ocho concentraciones de cada producto y cada concentración se ensayó por cuadruplicado. Después de 72 h de incubación a 26 °C se agregó a cada pocillo 20 µL de resazurina 3 mM y se incubó por otras 3 h en iguales condiciones. Posteriormente se leyeron las placas en un lector de fluorescencia, se calcularon los valores de inhibición del crecimiento asociados a cada concentración y se estimaron las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) mediante ajuste no lineal a curvas sigmoides. Cada producto fue ensayado cuatro veces. Simultáneamente se probó la actividad de la anfotericina B

(desoxicolato), usada como fármaco de referencia. Por otra parte, con objeto de determinar los correspondientes índices de selectividad (IS) frente a células de mamífero, se usaron los valores de citotoxicidad inespecífica obtenidos previamente para fibroblastos murinos L929 (Ejemplo 7b, Tabla 1). Los valores de actividad obtenidos, así como los correspondientes IS, se relacionan en la Tabla 2.

Puede destacarse la elevada actividad ($Cl_{50} < 4 \mu M$) de las indazolinonas 1,2-disustituidas **8**, **9** y **11** [fórmula (I)] y de los 3-(alquilamino)indazoles **21**, **22** y **24** [fórmula (III)] frente a promastigotes de *L. amazonensis*. Estos valores son muy superiores a los encontrados para la anfotericina B, fármaco leishmanicida muy efectivo pero también muy tóxico y de elevado coste en sus formulaciones liposomales. Los valores de Cl_{50} obtenidos para nuestros compuestos son, por otra parte, del mismo orden que los descritos para otros dos fármacos de referencia (miltefosina y pentamidina) frente a promastigotes de esta especie. Para la miltefosina se han publicado valores de Cl_{50} de $16,8 \mu M$ (Trinconi, C. T. et al., *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 1314-1322) y $3,4 \mu M$ (Santa-Rita, R. M. et al., *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 704-710), mientras que para la pentamidina han sido de $29,9 \mu M$ (Dutra, L. A. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 4837-4847) y $4,8 \mu M$ (de Melos, J. L. R. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *103*, 409-417). Esta notable actividad leishmanicida de algunas indazolinonas 1,2-disustituidas, e. g., **8**, **9** y **11** [fórmula (I)] y 3-(alquilamino)indazoles, e. g., **21**, **22** y **24** [fórmula (III)], no ha sido descrita con anterioridad, por lo que ambos tipos de derivados de indazol resultan prometedores de cara al desarrollo de nuevos fármacos leishmanicidas.

Tabla 2. Actividad *in vitro* frente a formas extracelulares (promastigotes) de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), citotoxicidad inespecífica en fibroblastos murinos L929, expresadas como Cl_{50} y CL_{50} , respectivamente, e índices de selectividad (IS).

Comp.	Cl_{50} promastigotes (μM)	CL_{50} L929 (μM)	IS ^a promastigotes
2	$35,82 \pm 1,91$	> 256	$> 7,15$
8	$1,04 \pm 0,18$	$237,21 \pm 27,93$	228,09
9	$3,42 \pm 1,52$	$161,36 \pm 22,55$	47,18
11	$2,34 \pm 0,39$	$242,91 \pm 6,23$	103,81
12	$12,83 \pm 0,72$	$103,86 \pm 31,97$	8,10

21	1,82 ± 1,33	113,00 ± 18,47	62,09
22	1,61 ± 1,12	> 256	> 159,01
24	1,34 ± 0,71	200,65 ± 27,70	149,74
Anfotericina B	0,044 ± 0,014	–	–

^aÍndices de selectividad para promastigotes (IS = CL₅₀ L929/CI₅₀ promastigotes).

EJEMPLO 9. Estudio *in vitro* de la actividad e índice de selectividad de los derivados de indazol sobre *Trichomonas vaginalis*.

Estos estudios encaminados a la búsqueda de nuevos agentes tricomonicidas están basados en un modelo secuencial de cribado compuesto por varias fases que, actuando como filtro, permiten pasar al siguiente nivel de estudio solo a aquellos productos que muestran valores significativos de actividad (Ibáñez-Escribano, A. et al., *J. Microbiol. Methods* **2014**, 105, 162-167). En primer lugar, los derivados de indazol son evaluados frente a trofozoítos de un aislado de *T. vaginalis* sensible al metronidazol (fármaco de referencia) y, simultáneamente, frente a células Vero para detectar su posible toxicidad inespecífica. Los compuestos que muestran una actividad relevante frente al aislado sensible al fármaco de referencia son sometidos después a evaluación frente a un aislado de *T. vaginalis* metronidazol-resistente.

Ejemplo 9a. Actividad frente a trofozoítos de *T. vaginalis*.

En primer lugar, los derivados de indazol fueron evaluados frente a trofozoítos del aislado JH31A4 de *T. vaginalis* (ATCC), sensible al fármaco de referencia metronidazol. El cribado *in vitro* se lleva a cabo evaluando el porcentaje de crecimiento de un cultivo controlado tras 24 h en contacto con distintas concentraciones del compuesto a evaluar, siguiendo un procedimiento previamente descrito (Ibáñez-Escribano, A. et al., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2012**, 107, 637-643). Para determinar las correspondientes CI₅₀, se prepara una solución stock de los compuestos a evaluar en sulfóxido de dimetilo (DMSO) y se ensayan en un rango de seis concentraciones finales distintas en diluciones dobles seriadas sucesivas, partiendo de una concentración máxima de 300 µM. Las células viables tras el tratamiento se determinan aprovechando su capacidad de reducir el colorante redox resazurina a resorufina, tal como se ha comentado en el Ejemplo 7b (Ibáñez-Escribano, A. et al., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2012**, 107, 637-643). Los valores de CI₅₀ se calculan a partir de la media obtenida a partir de, al menos, dos

experimentos independientes. Todos los compuestos son evaluados por triplicado en cada ensayo, obteniéndose una DS por debajo del 10%.

Los valores de CI_{50} obtenidos para el aislado de *T. vaginalis* JH31A4 sensible a metronidazol, así como los intervalos de confianza del 95%, se recogen en la Tabla 3. Los compuestos que pasaron el primer filtro de evaluación en *T. vaginalis*, presentando valores de $CI_{50} < 50 \mu M$, fueron las indazolinonas 1,2-disustituidas **8** y **11-13** [fórmula (I)], los 3-aminoalcoxi-2-bencilindazoles **16** y **19** [fórmula (II)], y los 3-alkilamino-2-bencilindazoles **21-23** y **25** [fórmula (III)]. Cabe destacar los compuestos **19** [fórmula (II)], y **23** y **25** [fórmula (III)] que, aunque menos activos que el metronidazol ($CI_{50} = 1,4 \mu M$), presentaron actividades relevantes frente al parásito con valores de CI_{50} de 5,6, 8,5 y 10,0 μM , respectivamente.

Algunos de los compuestos que mostraron una actividad relevante frente al aislado JH31A4 (**19**, **22**, **23** y **25**) se sometieron también a evaluación frente a trofozoítos del aislado metronidazol-resistente IR 78, siguiendo un procedimiento de cribado *in vitro* idéntico al descrito anteriormente.

Los resultados obtenidos frente al aislado IR 78 se recogen en la Tabla 4. Los valores de CI_{50} correspondientes a los compuestos **19** y **25** (8,5 y 11,0 μM , respectivamente) son similares a los obtenidos en el aislado sensible a metronidazol, lo que pone en evidencia la falta de resistencia cruzada entre estos compuestos y el fármaco de referencia. De este modo, los esqueletos de 3-(ω -aminoalcoxi)-2-bencilindazol [fórmula (II)] y de 3-[(ω -hidroxialquil)amino]-2-bencilindazol [fórmula (III)] de los compuestos **19** y **25**, respectivamente, presentan interés para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de infecciones causadas por aislados de *T. vaginalis* resistentes a 5-nitroimidazoles.

Tabla 3. Actividad *in vitro* frente a trofozoítos de *T. vaginalis* JH31A4, citotoxicidad inespecífica frente a células Vero, expresadas como CI_{50} y CC_{50} , respectivamente, e índices de selectividad (IS).

Comp.	CI_{50} (μM) ^a	CC_{50} (μM)	IS ^b
2	276,2 [200,2-540,7]	—	—
3	ND	—	—

4	61,9 [49,4-78,5]	–	–
5	ND	–	–
6	ND	–	–
7	93,1 [71,4-126,5]	–	–
8	49,4 [29,8-101,3]	> 300	> 6,1
9	170,9 [146,0-205,7]	–	–
11	48,9 [38,8-61,4]	> 300	> 6,1
12	40,8 [30,2-55,6]	> 300	> 7,4
13	41,3 [26,5-71,6]	> 300	> 7,3
16	41,3 [26,5-71,6]	> 300	> 7,3
19	5,6 [4,7-6,4]	104,1 ^c	18,7
21	45,4 [38,6-53,3]	> 300	> 6,6
22	15,7 [11,7-20,3]	> 300	> 19,1
23	8,5 [6,4-10,8]	> 300	> 35,2
24	52,7 [46,8-59,2]	–	–
25	10,0 [9,1-11,0]	> 300	> 16,2
Metronidazol	1,4 [1,1-1,8]	> 600	> 419,6

ND: No determinado por ausencia de actividad antiparasitaria.

–: No evaluados frente a células Vero debido a los bajos valores de CI_{50} .

^aEntre corchetes, intervalos de confianza del 95%.

5 ^bÍndices de selectividad ($IS = CI_{50} \text{ trofozoítos} / CC_{50} \text{ células Vero}$).

^cIntervalo de confianza del 95%: 78,5-138,5.

Tabla 4. Actividad *in vitro* frente a *T. vaginalis* IR 78 y citotoxicidad inespecífica frente a células Vero, expresadas como CI_{50} y CC_{50} , respectivamente.

Comp.	CI_{50} (μM) ^a	CC_{50} (μM)	IS
19	8,5 [7,6-9,6]	104,1 ^b	> 12,2
22	34,8 [30,7-39,3]	> 300	> 8,6
23	49,3 [34,3-71,0]	> 300	> 6,1
25	11,0 [6,5-14,4]	> 300	> 27,4
Metronidazol	2,6 [2,2-3,2]	> 600	> 143,0

^aEntre corchetes, intervalos de confianza del 95%.

^bIntervalo de confianza del 95%: 78,5-138,5.

Ejemplo 9b. Citotoxicidad inespecífica sobre células Vero y determinación de índices de selectividad (IS).

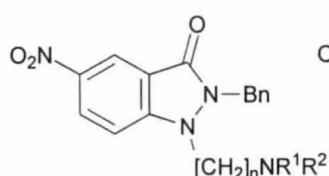
Este ensayo se llevó a cabo utilizando la línea celular Vero CCL-81 (ATCC) y únicamente para aquellas moléculas que habían mostrado una actividad significativa *in vitro* frente a trofozoítos de *T. vaginalis* ($CI_{50} < 50 \mu M$). Su objeto es determinar si los indazoles estudiados presentan una actividad específica sobre el protozoo, careciendo de toxicidad inespecífica para las células de mamífero. El método utilizado para determinar las concentraciones de los productos capaces de producir un 50% de citotoxicidad (CC_{50}) está basado en la reducción de la resazurina, tal como se ha descrito en los Ejemplos 7b, 8 y 9a. Los valores de CC_{50} se calculan a partir de la media obtenida tras la realización de al menos dos experimentos independientes. Cada concentración se evalúa por triplicado obteniéndose una DS por debajo del 10%, existiendo además un control de crecimiento al que se le asume un 0% de actividad citotóxica inespecífica.

Los valores de CC_{50} obtenidos en este estudio, así como los índices de selectividad (IS) se recogen en la Tablas 3 y 4. La mayor parte de los compuestos ensayados (**8**, **11-13**, **16**, **21-23** y **25**) mostraron una actividad citotóxica inespecífica baja ($CC_{50} > 300 \mu M$) y, en el caso del aislado sensible JH31A4, unos valores del IS razonables ($> 6,1$ a $> 35,2$). El compuesto **19** resultó algo más tóxico, pero debido a su elevada actividad todavía alcanzó un notable IS (18,7). Los valores del IS obtenidos para el aislado metronidazol-resistente IR 78 son del mismo orden ($> 6,1$ a $> 27,4$).

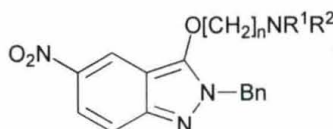
Los resultados descritos en esta invención confirman nuestra hipótesis de que los 2-alquil-3-(ω -aminoalcoxi)indazoles, e. g., **19** [fórmula (II)], mantienen la actividad tricomonida descrita para algunos análogos conteniendo en posición 3 grupos alcóxilo sencillos (Ibáñez-Escribano, A. et al., *Parasitology* **2016**, 143, 34-40; Fonseca-Berzal, C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 115, 295-310), pero poseen la ventaja de presentar mejores propiedades farmacocinéticas debido a los grupos amino básicos que permiten la preparación de sales hidrosolubles. Por otra parte, la notable actividad de algunos 3-(alquilamino)indazoles, e. g., **22**, **23** y **25** [fórmula (III)], no había sido descrita con anterioridad, por lo que este tipo de estructura constituye un nuevo esqueleto prometedor de cara al desarrollo de nuevos tricomonidas derivados de indazol.

REIVINDICACIONES

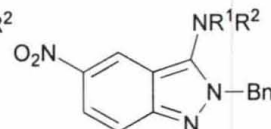
1. Compuestos derivados del 5-nitroindazol, de fórmulas generales (I), (II) y (III).



Fórmula (I)



Fórmula (II)



Fórmula (III)

donde:

- en los compuestos de fórmulas (I) y (II), NR^1R^2 puede ser un grupo amino, alquilamino o dialquilamino, un resto de amina secundaria cíclica como el grupo pirrolidino, o grupos ftalimido, y n puede ser 2-3;
- en los compuestos de fórmula (III), NR^1R^2 puede ser un grupo alquilamino, (ω -hidroxialquil)amino, o alquil(ω -hidroxialquil)amino;
- en compuestos de fórmula (I), cuando n = 2, se excluye específicamente el derivado en el que NR^1R^2 es piperidino.

o sus posibles sales, solvatos o profármacos.

2. Un compuesto de fórmula general (I) según la reivindicación 1, seleccionado de la lista siguiente:

2-Bencil-1-[2-(dimetilamino)etil]-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona
(hidrocloruro)

2-Bencil-5-nitro-1-(2-pirrolidinoetil)-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (oxalato)

2-Bencil-1-(3-ftalimidopropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona

2-Bencil-1-(2-ftalimidoetil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona

1-(2-Aminoetil)-2-bencil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (hidrocloruro)

1-(3-Aminopropil)-2-bencil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (hidrocloruro)

2-Bencil-1-[3-(metilamino)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona
(hidrocloruro)

2-Bencil-1-[3-(dimetilamino)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona
(hidrocloruro)

2-Bencil-5-nitro-1-(3-piperidinopropil)-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (oxalato)

o sus solvatos o profármacos, u otras sales.

3. Un compuesto de fórmula general (II) según la reivindicación 1, seleccionado de la lista siguiente:

5 2-Bencil-3-(2-ftalimidoetoxi)-5-nitro-2*H*-indazol
 2-Bencil-3-(3-ftalimidopropoxi)-5-nitro-2*H*-indazol
 2-Bencil-3-[2-(dimetilamino)etoxi]-5-nitro-2*H*-indazol (hidrocloruro)
 3-(3-Aminopropoxi)-2-bencil-5-nitro-2*H*-indazol (hidrocloruro)

o sus solvatos o profármacos, u otras sales.

10

4. Un compuesto de fórmula general (III) según la reivindicación 1, seleccionado de la lista siguiente:

 2-Bencil-3-metilamino-5-nitro-2*H*-indazol
 2-Bencil-3-[(2-hidroxietil)amino]-5-nitro-2*H*-indazol
 15 2-Bencil-3-[(3-hidroxipropil)amino]-5-nitro-2*H*-indazol
 2-Bencil-3-[(3-hidroxipropil)metilamino]-5-nitro-2*H*-indazol
 2-Bencil-3-[(2-hidroxietil)metilamino]-5-nitro-2*H*-indazol

o sus solvatos o profármacos.

- 20 5. Procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula general (I) y (II) por tratamiento de la 5-nitroindazolinona con haluros de ω -(dialquilamino)alquilo o haluros de ω -ftalimidoalquilo, según se recoge en el Esquema 1.

- 25 6. Procedimiento para la preparación de 1-(ω -aminoalquil)indazolinonas de fórmula general (I) a partir de los correspondientes ω -ftalimidoalquil derivados, por eliminación del grupo protector ftaloílo, según se recoge en el Esquema 2.

- 30 7. Procedimiento para la preparación de 1-(ω -aminoalquil)indazolinonas de fórmula general (I) a partir de los correspondientes haluros y las aminas secundarias o terciarias necesarias, según se recoge en el Esquema 3.

8. Procedimiento para la preparación de 3-(ω -aminoalcoxi)indazoles de fórmula general (II) a partir a) de los correspondientes haluros y las aminas terciarias

necesarias, o b) de los correspondientes ω -ftalimidoalcoxi derivados, por eliminación del grupo protector ftaloílo, según se recoge en el Esquema 3.

- 5 9. Procedimiento para la preparación de 3-(alquilamino)indazoles de fórmula general (III) a partir a) de los correspondientes haluros y las aminas primarias necesarias, o b) de los correspondientes ω -ftalimidoalcoxi derivados, por eliminación del grupo protector ftaloílo, según se recoge en el Esquema 3.
- 10 10. Uso de los compuestos de las reivindicaciones 1-4 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades causadas por protozoos patógenos de las familias *Trypanosomatidae* (*Trypanosoma*, *Leishmania*) y *Trichomonadidae* (*Trichomonas*).
- 15 11. Una composición farmacéutica que incluya cualquiera de los compuestos definidos en las reivindicaciones 1-4 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
12. Una composición farmacéutica, según la reivindicación 11, que, opcionalmente, pueda contener también otros principios activos.



- ②① N.º solicitud: 201700741
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.10.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MURA, F. Y COL. Indazoles and quinazolines as potential anti-Trypanosoma cruzi agents: an electrochemical, ESR and biological study. . Journal of Spectroscopy and Dynamics (2013), 2013, Vol. 3, Páginas 1-9, ISSN: 2249-2712. Página 2, figura 1, compuesto 6; página 7 , tabla 3.	1-12
A	FONSECA-BERZAL CRISTINA et al. Antichagasic and trichomonacidal activity of 1-substituted 2-benzyl-5-nitroindazolin-3-ones and 3-alkoxy-2-benzyl-5-nitro-2H-indazoles. European Journal of Medicinal Chemistry JUN 10 2016. , 10/06/2016, Vol. 115, Páginas 295-310, ISSN 0223-5234(print) ISSN 1768-3254(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.ejmech.2016.03.036>. a	1-12
A	WO 2017072374 A1 (UNIV MADRID COMPLUTENSE) 04/05/2017, Todo el documento.	1-12
A	MURO BEATRIZ et al. New perspectives on the synthesis and antichagasic activity of 3-alkoxy-1-alkyl-5-nitroindazoles. European Journal of Medicinal Chemistry MAR 3 2014. , 28/02/2014, Vol. 74, Páginas 124-134, ISSN 0223-5234(print) ISSN 1768-3254(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.ejmech.2013.12.025>	1-12
A	MARIN CLOTILDE et al. In vitro leishmanicidal activity of 1,3-disubstituted 5-nitroindazoles. Acta Tropica AUG 2015. , 31/07/2015, Vol. 148, Páginas 170-178, ISSN 0001-706X(print) ISSN 1873-6254(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.actatropica.2015.04.028>. Todo el documento.	1-12
A	IBANEZ-ESCRIBANO ALEXANDRA et al. In vitro trichomonacidal activity and preliminary in silico chemometric studies of 5-nitroindazolin-3-one and 3-alkoxy-5-nitroindazole derivatives. Parasitology JAN 2016. , 31/12/2015, Vol. 143, Páginas 34-40, ISSN 0031-1820(print) ISSN 1469-8161(electronic), <DOI: doi:10.1017/S0031182015001419>	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
23.01.2018

Examinador
E. Albarrán Gómez

Página
1/2

INFORME DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D231/56 (2006.01)

A61K31/416 (2006.01)

A61P33/02 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL