

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

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
4 de mayo de 2017 (04.05.2017)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2017/072374 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07D 231/56 (2006.01) A61K 31/416 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2016/000119

(22) Fecha de presentación internacional:
26 de octubre de 2016 (26.10.2016)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201500769
27 de octubre de 2015 (27.10.2015) ES

(71) Solicitante: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID [ES/ES]; Avenida de Séneca, 2, 28040 Madrid (ES).

(72) Inventores: ESCARIO GARCÍA-TREVIJANO, José Antonio; Dpto. de Parasitología, Fac. de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (ES). GÓMEZ BARRIO, Alicia; Dpto. de Parasitología, Fac. de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (ES). NOGAL RUÍZ, Juan José; Dpto. de Parasitología, Fac. de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (ES). IBÁÑEZ ESCRIBANO, Alejandra; Dpto. de Parasitología, Fac. de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (ES). FONSECA BERZAL, Cristina Rosa; Dpto. de Parasitología, Fac. de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (ES). ARÁN REDÓ, Vicente Jesús; Dpto. de Parasitología, Fac. de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (ES). REVIRIEGO PICÓN, Felipe; Dpto. de Parasitología, Fac. de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (ES). CUMELLA MONTÁNCHEZ, José María; Dpto. de Parasitología,

Fac. de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (ES). CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (33,3%); C/ Serrano, 117, 28002 Madrid (ES).

(74) Mandatario: CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel; c/o Clarke Modet & Co., Suero de Quiñones 34-36, 28002 Madrid (ES).

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

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

Publicada:

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

(54) Title: 5-NITROINDAZOLE DERIVATIVES AND USE THEREOF AS ANTIPROTOZOAL AGENTS

(54) Título: DERIVADOS DE 5-NITROINDAZOL Y SU USO COMO AGENTES ANTIPROTOZOARIOS

(57) Abstract: The invention relates to two families of 5-nitroindazole derivatives that have antiparasitic properties and to the use thereof for the production of a drug, preferably for the treatment of infections caused by pathogenic protozoa from the *Trypanosomatidae* and *Trichomonadidae* families, such as Chagas disease, leishmaniasis and trichomoniasis.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a dos familias de derivados de 5-nitromdazol que poseen propiedades antiparasitarias y a su empleo para la fabricación de un medicamento, 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.



WO 2017/072374 A1

Título

DERIVADOS DE 5-NITROINDAZOL Y SU USO COMO AGENTES ANTIPROTOZOARIOS

5 Sector de la Técnica

La presente invención se refiere a dos familias de compuestos derivados de 5-nitroindazol, a su procedimiento de preparación y a su uso para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de infecciones, particularmente las provocadas por protozoos de las familias *Trypanosomatidae* y *Trichomonadidae*. La invención, por
10 tanto, se engloba dentro del sector farmacéutico.

Estado de la técnica

Los protozoos son los agentes etiológicos de varias de las principales enfermedades parasitarias. Muchas de estas infecciones se concentran en las zonas más pobres del
15 planeta y se consideran "enfermedades tropicales desatendidas". Los tratamientos farmacológicos existentes para muchas de estas protozoosis están lejos de ser satisfactorios y el desarrollo de una vacuna es un objetivo todavía inalcanzado. Las terapias existentes en la actualidad no son adecuadas debido esencialmente a varios factores, tales como los índices terapéuticos bajos que conducen a altas toxicidades y
20 efectos secundarios inaceptables, la aparición de parásitos resistentes, la dificultad de cumplimiento del tratamiento debido a protocolos complejos, los altos precios que están fuera del alcance de los pacientes en los países afectados, etc.

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana), ocasionada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (fam. *Trypanosomatidae*), es una antroponosis transmitida principalmente a través de las heces contaminadas de chinches hematófagas. Se estima que en todo el mundo hay unos 7 millones de personas infectadas y alrededor de 25 millones más en riesgo de contraer la enfermedad, que
25 provoca más de 7.000 muertes anuales, principalmente en 21 países latinoamericanos donde es endémica (WHO, *Investing to overcome the global impact of Neglected Tropical Diseases. Third WHO report on Neglected Tropical Diseases, 2015*). Sin embargo, la existencia de otras rutas de transmisión alternativas a la vectorial
30

(transfusión de sangre contaminada, trasplante de órganos infectados o por vía congénita), junto con las migraciones internacionales producidas en las últimas décadas, han hecho de la enfermedad de Chagas una patología emergente en diversos países desarrollados; en España, se estima que puede haber unas 85.000 personas infectadas, principalmente de origen boliviano (Schmunis, G.A. y Yadon, Z.E., *Acta Trop.* **2010**, *115*, 14-21).

La enfermedad de Chagas presenta una fase aguda inicial de entre 1–2 meses de duración, generalmente asintomática o leve y con parasitemia detectable. Tras una fase indeterminada, entre el 30–40% de los pacientes evolucionan hacia una fase crónica que se manifiesta 10–30 años después de la infección. Esta se caracteriza por la presencia de lesiones cardíacas y digestivas irreversibles, que surgen como consecuencia de lesiones inflamatorias (Rassi Jr., A. et al., *Lancet* **2010**, *375*, 1388-1402) producidas por la persistencia del parásito junto con reacciones de carácter autoinmune (Marín-Neto, J.A. et al., *Circulation* **2007**, *115*, 1109-1123).

Actualmente no se dispone de vacuna ni tratamiento completamente eficaz para la enfermedad de Chagas. Los dos únicos fármacos hasta hoy disponibles, los nitroheterociclos nifurtimox y benznidazol, se desarrollaron hace más de cuarenta años (Coura, J.R. et al., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 549-554). Ambos son bastante efectivos en la fase aguda, pero su eficacia en la fase crónica es muy limitada. Por otra parte, la aparición de cepas de *T. cruzi* resistentes a estos fármacos ha dado lugar a variaciones en su eficacia ligadas a la zona geográfica. Además, ambos compuestos presentan efectos secundarios de carácter severo, pero el benznidazol es mejor tolerado por los pacientes y generalmente se considera el tratamiento de elección para la enfermedad de Chagas (Urbina, J.A., *Acta Trop.* **2010**, *115*, 55-68; Rassi Jr., A. et al., *Lancet* **2010**, *375*, 1388-1402).

En los últimos años se han descrito muchos compuestos con actividad antichagásica, así como diferentes dianas moleculares potenciales del parásito (Guedes, P.M.M. et al., *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2011**, *9*, 609-620; Urbina, J.A., *Acta Trop.* **2010**, *115*, 55-68; Cerecetto, H. y González, M., *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 810-838;

Sánchez-Sancho, F. et al., *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 423-452; Soeiro, M.N.C. y de Castro S.L., *Expert Opin. Ther. Targets* **2009**, *13*, 105-121).

5 Especial interés han despertado los azoles antifúngicos inhibidores de la síntesis de esteroides, pero estudios clínicos recientes han resultado muy decepcionantes, mostrando que estos compuestos son bastante menos efectivos que el benzimidazol, al menos como quimioterapia única (Chatelain, E., *J. Biomol. Screen.* **2015**, *20*, 22-35).

10 Todos estos hechos ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y, por otra parte, se ha señalado recientemente que los derivados nitroheterocíclicos siguen representando la única alternativa real en la lucha antichagásica (Moraes, C.B. et al., *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4703; DOI:10.1038/srep04703).

15 Se ha descrito también la actividad antichagásica de diversos 5-nitroindazoles con estructuras y patrones de sustitución completamente diferentes de los que poseen los compuestos incluidos en esta invención: 1-alkilindazol-3-oles (Arán, V.J. et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3197-3207; Boiani, L. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1034-1040), 3-alcxiindazoles (Montero-Torres, A. et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6264-6275), 3-alcxi-1-alkilindazoles (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; Vega, M.C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 214-227; Muro, B. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 124-134), indazolin-3-onas 1,2-condensadas (Díaz-Urrutia, C.A. et al., *Spectrochim. Acta A* **2012**, *95*, 670-678) y 1,1'-hidrocarbilenbis(3-alcxi- y 3-hidroxindazoles) (Aguilera-Venegas, B. et al., *Int. J. Electrochem. Sci.* **2012**, *7*, 5837-5863).

20 También se conoce la actividad frente a *Trypanosoma brucei rhodesiense*, agente etiológico de la enfermedad del sueño africana, de diversos derivados de 5-nitroindazol: 1-alkil- y 1-arilindazol-3-oles, 2-alkilindazolin-3-onas, 3-alcxiindazoles, 3-alcxi-1-alkilindazoles, indazolin-3-onas 1,2-condensadas, y 1,1'-

hidrocarbilenbis(3-alcóxiindazoles) (Arán, V.J. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 4506-4516), así como las propiedades leishmanicidas de algunos 3-alcóxi-1-alquilindazoles (Boiani, L. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 1034-1040; Marín, C. et al., *Acta Trop.* **2015**, 148, 170-178) que habían mostrado previamente actividad
5 frente a *T. cruzi*.

En la presente invención se proponen 5-nitroindazolin-3-onas 1,2-disustituidas como agentes antichagásicos.

10 En este contexto, se ha descrito en los últimos años la síntesis y propiedades antichagásicas de algunas indazolinonas relacionadas (Montero-Torres, A. et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 6264-6275; Vega, M.C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 58, 214-227; Mura, F. et al., *J. Spectrosc. Dyn.* **2013**, 3, artículo 8; Fonseca-Berzal, C. et al., *Parasitol. Res.* **2014**, 113, 1049-1056), así como la escasa actividad
15 anti-*T. cruzi* de los 3-alcóxi-2-alquilindazoles isómeros (Vega, M.C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 58, 214-227; Mura, F. et al., *J. Spectrosc. Dyn.* **2013**, 3, 8; Fonseca-Berzal, C. et al., *Parasitol. Res.* **2014**, 113, 1049-1056).

También se conoce la actividad frente a *T. brucei rhodesiense* (Arán, V.J. et al.,
20 *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 4506-4516) de algunas 5-nitroindazolinonas 1,2-disustituidas, así como sus propiedades antiinflamatorias (Marrero-Ponce, Y. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 5736-5753).

Las indazolin-3-onas 1,2-disustituidas previamente publicadas presentan en posición 1
25 grupos alquilo simples (metilo, propilo, isopropilo, butilo y pentilo) o bencilo. En la presente invención se muestra cómo estos grupos pueden ser sustituidos por grupos alquilo complejos, conteniendo insaturaciones o diversas funcionalidades variadas (halógeno, carboxilo, éster, éter, alcohol, amida, etc.) o por grupos acilo o sulfonilo, pudiéndose obtener compuestos más activos y menos tóxicos que los previamente
30 conocidos además de aumentar la solubilidad en agua de los compuestos mediante la introducción de grupos polares pudiendo presentar, así, un comportamiento farmacocinético más apropiado.

Por otra parte, *Trichomonas vaginalis* (fam. *Trichomonadidae*) es el agente causal de la tricomonosis, una infección de transmisión sexual (ITS) responsable de más del 50% de todas las ITS curables del mundo. Según los últimos datos estimados por la Organización Mundial de la Salud y publicados en 2012, se producen más de 276 millones de infecciones cada año (WHO, *Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted diseases – 2008, 2012*).

Este protozoo es transmitido únicamente mediante contacto sexual. Se caracteriza por mostrar un amplio rango de manifestaciones clínicas que pueden ocasionar casos graves de inflamación de conductos genitourinarios acompañados de una leucorrea característica, eritema, prurito, disuria, infertilidad o la formación de pequeñas lesiones denominadas "colpitis macularis" en el cuello uterino. En el hombre, esta infección puede derivar en una uretritis no gonocócica y la alteración de la viabilidad y movilidad espermática (Swygard, H. et al., *Sex. Transm. Infect.* **2004**, *80*, 91-95; Lewis, D.A., *Medicine (Baltimore)* **2010**, *38*, 291-293). Sin embargo, los estudios epidemiológicos revelan que al menos la mitad de las mujeres así como el 80% de los varones infectados no presentan síntomas, convirtiéndose en portadores asintomáticos y potenciales transmisores de esta infección.

La tricomonosis urogenital humana se ha asociado a distintas complicaciones como problemas durante la gestación o neonatos con bajo peso, partos prematuros, etc. (Cotch, M.F. et al., *Sex. Transm. Dis.* **1997**, *24*, 353-360). Asimismo, esta ITS también aumenta el riesgo de desarrollo de neoplasia cervical (Viikki, M. et al., *Acta Oncol.* **2000**, *39*, 71-75) y de próstata (Sutcliffe, S. et al., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2006**, *15*, 939-945), así como una mayor predisposición a la coinfección con otras ITS de origen bacteriano, vírico, etc. (Schwebke, J.R. y Burgess, D., *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 794-803; Cherpes, T.L. et al., *Sex. Transm. Dis.* **2006**, *33*, 747-752; Allsworth, J.E. et al., *Sex. Transm. Dis.* **2009**, *36*, 738-744; McClelland, R.S. et al., *J. Infect. Dis.* **2007**, *195*, 698-702).

La tricomonosis se trata preferentemente con el nitroheterociclo metronidazol, introducido en el mercado hacia 1960. Actualmente, el metronidazol y el tinidazol, ambos de la misma familia de 5-nitroimidazoles, son los dos únicos medicamentos aceptados por la Food and Drug Administration (FDA) para tratar esta ITS (Crowell, A.L. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 1407-1409). Sin embargo, no existen alternativas eficaces para aquellos pacientes que desarrollen efectos secundarios, que muestren hipersensibilidad o en los que su uso esté contraindicado. Por otra parte, se estima que aproximadamente el 5% de los casos diagnosticados de tricomonosis son causados por un aislado resistente a nitroimidazoles (Vázquez, F. et al., *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2001**, *19*, 114-124).

Por todo ello, es necesaria la búsqueda de alternativas farmacológicas para el tratamiento de esta enfermedad. En la presente invención se proponen 3-alcoxi-2-alquil-2H-indazoles.

Se ha estudiado la actividad tricomonicida de ciertas indazolin-3-onas 1,2-disustituidas (Ibáñez Escribano, A. et al., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2012**, *107*, 637-643), así como la de diversos derivados de 5-nitroindazol con estructuras y patrones de sustitución completamente diferentes de los que poseen los compuestos objeto de esta invención: 1-alquilindazol-3-oles (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), 2-alquilindazol-3-onas, 3-alcoxiindazoles, indazol-3-onas 1,2-condensadas y 1,1'-hidrocarbilenbis(3-hidroxiindazoles) (Marrero-Ponce, Y. et al., *Curr. Drug Discov. Technol.* **2005**, *2*, 245-265), y 3-alcoxi-1-alquilindazoles (Arán, V.J. et al., *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3197-3207). Pero la actividad frente a *T. vaginalis* de los 3-alcoxi-2-alquilindazoles, objeto de esta invención, no se encuentra descrita en la literatura.

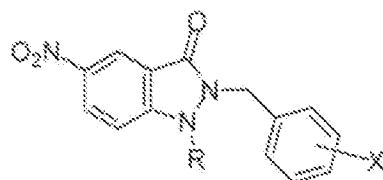
Descripción detallada de la invención

Derivados de 5-nitroindazol y su uso como agentes antiprotozoarios.

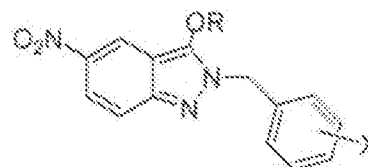
La presente invención se refiere a dos grupos de compuestos derivados de 5-nitroindazol, fácilmente asequibles, que poseen actividad biológica frente a determinados protozoos patógenos.

- 5 Un primer aspecto de la invención se refiere a dos diferentes tipos de compuestos, de fórmulas generales (I) y (II). Los compuestos de tipo (I) son 5-nitroindazolin-3-onas 1,2-disustituidas y presentan, en general, actividad frente a *Trypanosoma cruzi*, mientras que los de tipo (II) son 3-alcóxi-2-alkil-2*H*-indazoles que presentan actividad frente a *Trichomonas vaginalis*.

10



Fórmula (I)



Fórmula (II)

donde R puede ser:

- 15 - un grupo alquénilo o alquinilo de 2-6 átomos de carbono y con el enlace múltiple en las diversas posiciones posibles; se excluye específicamente la 1-*alil*-2-bencil-5-nitroindazolinona [compuesto tipo (I)] descrita como intermedio sintético en una patente [Qin, D. et al. (GSK), WO2012162129 A1].
- 20 - un grupo polimetilénico de longitud variable $[(CH_2)_n, n = 1-6]$ con sustituyentes terminales de tipo Br, OH, COOR (R = H o alquilo de 1-5 carbonos), $CONR^1R^2$ (R^1 y/o $R^2 = H$ o alquilo de 1-5 carbonos), CN u OR (R = grupos alquilo o acilo de 1-5 carbonos).
- 25 - un grupo alcóxicarbonilo con el grupo alcóxido de 1-5 átomos de carbono.
- un grupo acilo alifático (de 1 a 5 átomos de carbono) u aromático (benzoilo o benzoilo o benzoilos diferentemente sustituidos en las posiciones 2, 3 o 4 con grupos tales como F, Cl, Br, OH, OR, NH_2 , NO_2 o CN).

- un grupo sulfonilo alifático o aromático,

5 y X puede ser cualquier sustituyente de los que pueden encontrarse habitualmente en las posiciones 2, 3 o 4 de un grupo bencilo, tales como grupos alquilo sencillos o ramificados de 1-5 átomos de carbono, grupos trifluorometilo (CF₃), átomos de halógeno (F, Cl, Br), grupos hidroxilo o alcoxilo (OH y OR; R = alquilo), grupos amino primario, secundario o terciario (NH₂, NHR, NR₂; R = alquilo), nitro (NO₂) o ciano (CN).

10

En compuestos de tipo (I), cuando R = CH₂COOH, se excluyen específicamente derivados con dos átomos de halógeno en el sustituyente bencílico que han sido estudiados como inhibidores de aldosa reductasa (Malamas, M.S. y Millen, J., *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1492-1503).

15

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

- 2-Bencil-5-nitro-1-propargil-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (2)
- 20 2-Bencil-1-(2-bromoetil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (3)
- 2-Bencil-1-(3-bromopropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (4)
- 2-Bencil-1-(metoxicarbonil)metil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (5)
- 2-Bencil-1-cianometil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (6)
- 2-Bencil-1-[2-(metoxicarbonil)etil]-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (7)
- 25 2-Bencil-1-[3-(etoxicarbonil)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (8)
- 2-Bencil-1-(2-hidroxietil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (9)
- 2-Bencil-1-(3-hidroxipropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (10)
- 2-Bencil-1-(2-metoxietil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (11)
- 2-Bencil-1-etoxicarbonil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (12)
- 30 2-Bencil-1-benciloxicarbonil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (13)
- 1-Acetil-2-bencil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (14)
- 2-Bencil-1-benzoil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (15)

- 2-Bencil-5-nitro-1-tosil-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona (16)
2-Bencil-5-nitro-1-vinil-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona (24)
2-Bencil-1-(2-carboxietil)-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona (25)
2-Bencil-1-(3-carboxipropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona (26)
5 2-Bencil-1-(3-carbamoilpropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona (27)
2-Bencil-1-[3-(metilcarbamoil)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona (28)
2-Bencil-1-[3-(dimetilcarbamoil)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona (29)
2-Bencil-1-(3-etoxipropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona (30)
1-(2-Acetoxietil)-2-bencil-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona (31)

10

o sus solvatos o profármacos.

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

15

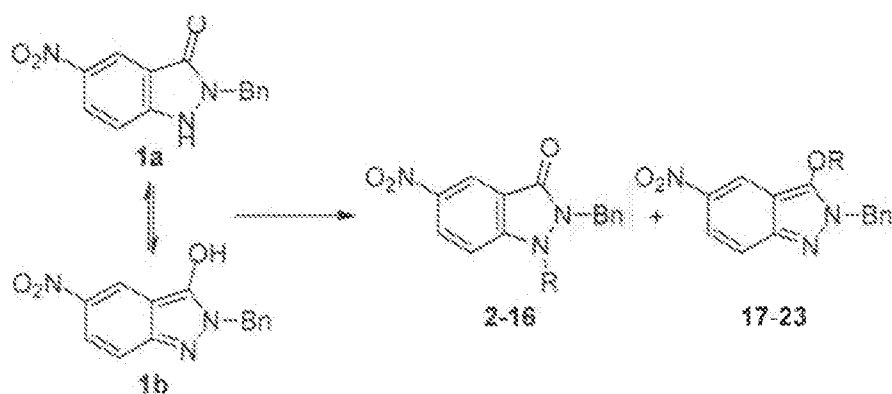
- 2-Bencil-3-(2-bromoetoxi)-5-nitro-2*H*-indazol (17)
2-Bencil-3-(3-bromopropoxi)-5-nitro-2*H*-indazol (18)
2-Bencil-3-(metoxycarbonil)metoxi-5-nitro-2*H*-indazol (19)
2-Bencil-3-[2-(metoxycarbonil)etoxi]-5-nitro-2*H*-indazol (20)
20 2-Bencil-3-(2-hidroxietoxi)-5-nitro-2*H*-indazol (21)
2-Bencil-3-(3-hidroxipropoxi)-5-nitro-2*H*-indazol (22)
2-Bencil-3-(2-metoxietoxi)-5-nitro-2*H*-indazol (23)

o sus solvatos o profármacos.

25

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula general (I) o (II); como consecuencia del carácter tautómero de la 5-nitroindazolin-3-ona (1), algunos de estos compuestos se obtienen a la vez al hacer reaccionar el producto de partida bajo condiciones diversas con agentes
30 alquilantes, acilantes o sulfonilantes apropiados, tal como se muestra en el Esquema 1. A partir de la forma tautómera 1a (forma "indazolin-3-ona") se obtienen los compuestos de fórmula general (I), mientras que la forma tautómera 1b (forma "3-

hidroxi-2*H*-indazol) conduce a los compuestos de fórmula general (II). Las condiciones concretas para cada reacción dependen de los reactivos alquilantes, acilantes o sulfonilantes concretos, tal como se describe en los ejemplos 1a-f.



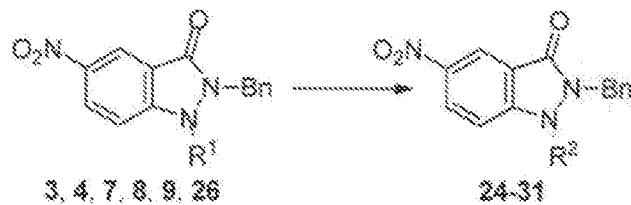
5

Esquema 1. Ruta sintética para la preparación de los compuestos 2-16 [tipo (I)] y 17-23 [tipo (II)] a partir de la 2-bencil-5-nitroindazolinona 1a,b.

Un cuarto aspecto está relacionado con la preparación de otros compuestos de fórmula general (I) por transformación química de las cadenas en posición 1 de los productos anteriores resultantes de la alquilación, utilizando procedimientos variados (deshidrohalogenación, hidrólisis o aminólisis de ésteres, eterificación de haluros de alquilo o acilación de alcoholes), tal como se muestra en el Esquema 2.

10

11



Compuesto	R ¹	Compuesto	R ²
3	[CH ₂] ₂ Br	24	CH=CH ₂
7	[CH ₂] ₂ COOMe	25	[CH ₂] ₂ COOH
8	[CH ₂] ₃ COOEt	26	[CH ₂] ₃ COOH
8	[CH ₂] ₃ COOEt	27	[CH ₂] ₃ CONH ₂
8	[CH ₂] ₃ COOEt	28	[CH ₂] ₃ CONHMe
26	[CH ₂] ₃ COOH	29	[CH ₂] ₃ CONMe ₂
4	[CH ₂] ₃ Br	30	[CH ₂] ₃ OEt
9	[CH ₂] ₂ OH	31	[CH ₂] ₂ OAc

Esquema 2. Rutas sintéticas para la preparación de los compuestos 24-31 [tipo (II)] a partir de los compuestos 3, 4, 7-9 y 26 [tipo (II)].

5

Un quinto aspecto de esta invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) o (II) para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades causadas por protozoos patógenos de las familias *Trypanosomatidae* (*Trypanosoma*, *Leishmania*) y *Trichomonadidae* (*Trichomonas*), preferiblemente tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas) y tricomonosis, causadas por los parásitos *T. cruzi* y *T. vaginalis*, respectivamente.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprenda un compuesto de fórmula general (I) o (II) y, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable (adyuvantes o vehículos farmacéuticos aceptables); opcionalmente dicha composición puede contener también otros principios activos.

Modo de realización de la invención

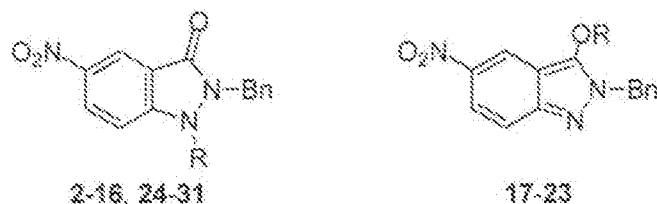
La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

5 EJEMPLO 1. Preparación de los compuestos 2-16 [tipo (I)] y 17-23 [tipo (II)] a partir de la 2-bencil-5-nitroindazolinona 1.

Los compuestos recogidos en la Tabla 1 se obtuvieron mediante la alquilación, alcóxicarbonilación, acilación o sulfonilación de la 2-bencil-5-nitroindazolin-3-ona 1 con los reactivos requeridos, que se mencionan en cada caso concreto.

10

Tabla 1. Compuestos preparados y estudiados.



Compuesto	R	Compuesto	R
2	CH ₂ C≡CH	14	Ac
3, 17	[CH ₂] ₂ Br	15	Bz
4, 18	[CH ₂] ₃ Br	16	Ts
5, 19	CH ₂ COOMe	24	CH=CH ₂
6	CH ₂ CN	25	[CH ₂] ₂ COOH
7, 20	[CH ₂] ₂ COOMe	26	[CH ₂] ₃ COOH
8	[CH ₂] ₃ COOEt	27	[CH ₂] ₃ CONH ₂
9, 21	[CH ₂] ₂ OH	28	[CH ₂] ₃ CONHMe
10, 22	[CH ₂] ₃ OH	29	[CH ₂] ₃ CONMe ₂
11, 23	[CH ₂] ₂ OMe	30	[CH ₂] ₃ OEt
12	COOEt	31	[CH ₂] ₂ OAc
13	COOBn		

Las reacciones de alquilación conducen por lo general a mezclas de las correspondientes indazolin-3-onas 1,2-disustituidas [2-11; compuestos tipo (I)] y de

15

los 3-alcoxi-2-alkil-2*H*-indazoles [17-23; compuestos tipo (II)]; estos últimos compuestos son generalmente productos minoritarios de reacción que en algunos casos no fueron aislados (Vega, M.C. et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 58, 214-227).

Muchas de las reacciones de alquilación se llevaron a cabo en K₂CO₃/DMF a 100 °C.

5 Sin embargo, la reacción de propargilación que conduce al compuesto 2 dio mejores resultados utilizando K₂CO₃ en acetona a reflujo, y la alquilación del compuesto 1 con bromoacetato de metilo o bromoacetonitrilo para conducir a los compuestos 5/19 y 6, respectivamente, se llevó a cabo utilizando bicarbonato sódico en acetona a 35 °C. Por otra parte, durante la alquilación del compuesto 1 a los derivados 7/20 con 3-
10 bromopropionato de metilo en DMF a 100 °C se observó intensa deshidrogenación de este último a acrilato de metilo; mejores resultados se obtuvieron llevando a cabo la reacción con K₂CO₃ en tolueno/agua utilizando catálisis de transferencia de fase; sin embargo, también se obtuvieron notables cantidades del correspondiente ácido 25, procedente de la hidrólisis del resto éster del compuesto 7 en las condiciones básicas
15 utilizadas.

Por otra parte, el tratamiento del compuesto 1 con los cloroformiatos de alquilo requeridos o con los correspondientes cloruros de acilo o sulfonilo en piridina proporcionó las 1-alcoxicarbonil (12, 13), 1-benzoil (15) o 1-tosilindazolinona (16)
20 deseadas. El 1-acetil derivado 14 fue obtenido por tratamiento de 1 con anhídrido acético en piridina. De acuerdo con algunos resultados publicados con anterioridad, en estos procesos sólo pudieron ser aislados los correspondientes derivados 1,2-disustituídos (Baiocchi, L. et al., *Synthesis* **1978**, 633-648).

25 *Ejemplo 1a. Preparación de los 3-(etoxicarbonil)propil (8), 2-hidroxietyl (9/21), 3-hidroxietyl (10/22) y 2-metoxietyl (11/23) derivados.* Una mezcla agitada de la 2-bencilindazolinona de partida 1 (1,00 g, 3,71 mmol), el bromuro requerido (4,00 mmol) y K₂CO₃ (0,55 g, 4,00 mmol) en DMF (20 mL) se calentó a 100 °C hasta la finalización de la reacción [CCF; 12 h (para 11/23); 12 h seguidas de 1-3 adiciones de
30 cantidades adicionales del bromuro requerido (0,3 mmol) y, eventualmente, si es necesario, base (0,3 mmol) cada 6 h (para 8, 9/21 y 10/22)]. La mezcla se evaporó a sequedad y, después de la adición de agua (200 mL), se extrajo con CHCl₃ (3 x 50

mL). La fase clorofórmica concentrada se aplicó a una columna de cromatografía que se eluyó con mezclas de cloroformo/acetona (50:1 a 25:1) (para **8** y **11/23**) o con las mismas mezclas (10:1 a 5:1) y a continuación cloroformo/metanol (50:1 a 25:1) (para **9/21** y **10/22**). En todos los casos, los 3-alcoxi-2-bencil-2*H*-indazoles (**21-23**) eluyeron en primer lugar, seguidos por las correspondientes 2-bencilindazolinonas 1-sustituídas (**8-11**).

2-Bencil-1-[3-(etoxicarbonil)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (**8**).

Rendimiento: 1,00 g (70%). Aceite que solidifica con el tiempo; pf 51-53 °C. ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,52 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 8,38 (dd, *J* = 9,0, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,62 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, 7-H), 7,25 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,19 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,06 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, 1'-H), 3,99 (c, *J* = 7,0 Hz, CH₂ Et), 2,21 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, 3'-H), 1,53 (m, 2H, 2'-H), 1,13 (t, *J* = 7,0 Hz, CH₃); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 172,00 (C-4'), 160,88 (C-3), 148,56 (C-7a), 141,32 (C-5), 136,11 (C-1 Bn), 128,70 (C-3, -5 Bn), 127,81 (C-4 Bn), 127,26 (C-2, -6 Bn), 127,19 (C-6), 120,54 (C-4), 115,62 (C-3a), 111,88 (C-7), 59,99 (CH₂ Et), 45,86 (C-1'), 44,70 (CH₂ Bn), 30,11 (C-3'), 21,40 (C-2'), 14,00 (CH₃); EM (ES⁺): *m/z* (%) 789 (29) ([2M+Na]⁺), 767 (64) ([2M+H]⁺), 406 (37) ([M+Na]⁺), 384 (100) ([M+H]⁺). Anál. calc. para C₂₀H₂₁N₃O₅ (383,40): C 62,65; H 5,52; N 10,96. Encontrado: C 62,50; H 5,72; N 11,17.

2-Bencil-1-(2-hidroxietil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (**9**). Rendimiento: 0,91 g (78%). Pf 137-139 °C (2-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,49 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 8,31 (dd, *J* = 9,3, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,60 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H, 7-H), 7,29 (m, 3H) y 7,20 (m, 2H) (H aromát. Bn), 5,20 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,73 (t, *J* = 5,1 Hz, 1H, OH), 4,12 (t, *J* = 4,9 Hz, 2H, 1'-H), 3,45 (m, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 160,88 (C-3), 149,23 (C-7a), 140,66 (C-5), 136,15 (C-1 Bn), 128,72 (C-3, -5 Bn), 127,78 (C-4 Bn), 127,20 (C-2, -6 Bn), 126,43 (C-6), 120,29 (C-4), 114,65 (C-3a), 112,42 (C-7), 58,39 (C-2'), 49,17 (C-1'), 44,78 (CH₂ Bn); EM (IE): *m/z* (%) 313 (100) (M⁺), 282 (11), 236 (6), 192 (11), 177 (9), 162 (5), 146 (8), 131 (11), 103 (7). Anál. calc. para C₁₆H₁₅N₃O₄ (313,31): C 61,34; H 4,83; N 13,41. Encontrado: C 61,57; H 4,69; N 13,68.

2-Bencil-1-(3-hidroxipropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (10). Rendimiento: 0,58 g (48%). Pf 141-143 °C (2-PrOH). ^1H RMN [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 8,52 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, 4-H), 8,36 (dd, $J = 9,3, 2,4$ Hz, 1H, 6-H), 7,62 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H, 7-H), 7,26 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,18 (s, 2H, CH_2 Bn), 4,58 (t, $J = 4,8$ Hz, 1H, OH), 4,09 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, 1'-H), 3,23 (m, 2H, 3'-H), 1,45 (m, 2H, 2'-H); ^{13}C RMN [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 160,88 (C-3), 148,64 (C-7a), 141,19 (C-5), 136,12 (C-1 Bn), 128,71 (C-3, -5 Bn), 127,81 (C-4 Bn), 127,24 (C-2, -6 Bn), 127,05 (C-6), 120,47 (C-4), 115,46 (C-3a), 111,97 (C-7), 57,50 (C-3'), 44,77 (CH_2 Bn), 44,08 (C-1'), 29,26 (C-2'); EM (ES $^+$): m/z (%) 350 (40) ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 328 (100) ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Anál. calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$ (327,33): C 62,38; H 5,23; N 12,84. Encontrado: C 62,19; H 5,57; N 13,09.

2-Bencil-1-(2-metoxietil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (11). Rendimiento: 0,78 g (64%). Pf 116-118 °C (2-PrOH). ^1H RMN [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 8,50 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 4-H), 8,32 (dd, $J = 9,3, 2,1$ Hz, 1H, 6-H), 7,62 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H, 7-H), 7,25 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,18 (s, 2H, CH_2 Bn), 4,23 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H, 1'-H), 3,35 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H, 2'-H), 2,98 (s, 3H, CH_3); ^{13}C RMN [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 161,10 (C-3), 149,54 (C-7a), 141,05 (C-5), 136,13 (C-1 Bn), 128,76 (C-3, -5 Bn), 127,86 (C-4 Bn), 127,27 (C-2, -6 Bn), 126,73 (C-6), 120,35 (C-4), 114,92 (C-3a), 112,45 (C-7), 68,92 (C-2'), 58,15 (CH_3), 47,67 (C-1'), 44,94 (CH_2 Bn); EM (IE): m/z (%) 327 (100) (M^+), 282 (21), 250 (4), 236 (4), 206 (2), 177 (9), 131 (7), 103 (4). Anál. calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$ (327,33): C 62,38; H 5,23; N 12,84. Encontrado: C 62,57; H 5,37; N 12,57.

2-Bencil-3-(2-hidroxietoxi)-5-nitro-2H-indazol (21). Rendimiento: 0,21 g (18%). Pf 167-169 °C (2-PrOH). ^1H RMN [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 8,90 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 4-H), 7,91 (dd, $J = 9,6, 2,1$ Hz, 1H, 6-H), 7,53 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, 7-H), 7,31 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,50 (s, 2H, CH_2 Bn), 5,16 (t, $J = 5,5$ Hz, OH), 4,72 (t, $J = 4,5$ Hz, 2H, 1'-H), 3,81 (m, 2H, 2'-H); ^{13}C RMN [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 149,99 (C-3), 146,92 (C-7a), 140,19 (C-5), 135,93 (C-1 Bn), 128,61 (C-3, -5 Bn), 128,01 (C-2, -6 Bn), 127,88 (C-4 Bn), 120,86 (C-4), 119,91 (C-6), 118,03 (C-7), 105,33 (C-3a), 76,43 (C-1'), 59,77 (C-2'), 51,49 (CH_2 Bn); EM (IE): m/z (%) 313 (100) (M^+), 269 (58), 252 (14).

222 (7), 191 (41), 164 (7), 149 (4), 103 (14). Anál. calc. para $C_{16}H_{15}N_3O_4$ (313,31): C 61,34; H 4,83; N 13,41. Encontrado: C 61,49; H 5,97; N 13,55.

2-Bencil-3-(3-hidroxipropoxi)-5-nitro-2H-indazol (22). Rendimiento: 0,12 g (10%).
 5 Pf 122-124 °C (2-PrOH). ^1H RMN [300 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 8,89 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 4-H), 7,90 (dd, $J = 9,6, 2,1$ Hz, 1H, 6-H), 7,53 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, 7-H), 7,32 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,44 (s, 2H, CH_2 Bn), 4,80 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, 1'-H), 4,68 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H, OH), 3,60 (m, 2H, 3'-H), 1,97 (m, 2H, 2'-H); ^{13}C RMN [75 MHz, $(CD_3)_2SO$]:
 10 δ 149,82 (C-3), 146,84 (C-7a), 140,14 (C-5), 135,81 (C-1 Bn), 128,64 (C-3, -5 Bn), 127,90 (C-4 Bn), 127,82 (C-2, -6 Bn), 121,00 (C-4), 119,90 (C-6), 118,02 (C-7), 104,94 (C-3a), 71,16 (C-1'), 56,75 (C-3'), 51,64 (CH_2 Bn), 32,36 (C-2'); EM (ES^+):
 m/z (%) 350 (27) ($[M+Na]^+$), 328 (100) ($[M+H]^+$). Anál. calc. para $C_{17}H_{17}N_3O_4$ (327,33): C 62,38; H 5,23; N 12,84. Encontrado: C 62,09; H 5,52; N 13,09.

15 2-Bencil-3-(2-metoxietoxi)-5-nitro-2H-indazol (23). Rendimiento: 0,39 g (32%). Pf 109-111 °C (2-PrOH). ^1H RMN [300 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 8,88 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 4-H), 7,90 (dd, $J = 9,6, 2,1$ Hz, 1H, 6-H), 7,53 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, 7-H), 7,30 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,45 (s, 2H, CH_2 Bn), 4,82 (m, 2H, 1'-H), 3,74 (m, 2H, 2'-H), 3,32 (s, 3H, CH_3); ^{13}C RMN [75 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 149,70 (C-3), 146,89 (C-7a), 140,28 (C-5), 135,82 (C-1 Bn), 128,62 (C-3, -5 Bn), 127,91 (C-2, -4, -6 Bn), 120,75 (C-4),
 20 119,92 (C-6), 118,07 (C-7), 105,36 (C-3a), 73,70 (C-1'), 70,38 (C-2'), 58,22 (CH_3), 51,61 (CH_2 Bn); EM (IE): m/z (%) 327 (100) (M^+), 269 (7), 252 (4), 222 (5), 191 (4), 164 (7), 149 (4), 103 (13). Anál. calc. para $C_{17}H_{17}N_3O_4$ (327,33): C 62,38; H 5,23; N 12,84. Encontrado: C 62,50; H 4,97; N 12,63.

25

Ejemplo 1b. Preparación del propargil derivado 2. Una mezcla agitada de la 2-bencilindazolinona 1 (1,00 g, 3,71 mmol), bromuro de propargilo (80% en peso en tolueno) (4,00 mmol) y K_2CO_3 (0,55 g, 4,00 mmol) en acetona (50 mL) se refluyó durante 12 h. La mezcla se evaporó a sequedad y, después de la adición de agua (200 mL), se extrajo con $CHCl_3$ (3 x 50 mL). La fase clorofórmica concentrada se aplicó a una columna de cromatografía que se eluyó con mezclas de cloroformo/acetona (50:1 a 30:1) para proporcionar el compuesto 2.

30

2-Bencil-5-nitro-1-propargil-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (2). Rendimiento: 0,62 g (54%). Pf 163-165 °C (EtOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,52 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 8,47 (dd, *J* = 9,0, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,80 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, 7-H), 7,27 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,12 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,96 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H, 1'-H), 3,16 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H, 3'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 161,48 (C-3), 151,61 (C-7a), 143,11 (C-5), 136,09 (C-1 Bn), 128,56 (C-3, -5 Bn), 127,75 (C-4 Bn), 127,60 (C-6 y C-2, -6 Bn), 119,89 (C-4), 118,77 (C-3a), 114,02 (C-7), 76,58 (C-2'), 75,95 (C-3'), 44,69 (CH₂ Bn), 38,52 (C-1'); EM (IE): *m/z* (%) 307 (100) (M⁺), 268 (13), 249 (5), 230 (3), 203 (4), 128 (5), 115 (4), 103 (11). Anál. calc. para C₁₇H₁₃N₃O₃ (307,30): C 66,44; H 4,26; N 13,67. Encontrado: C 66,58; H 4,47; N 13,59.

Ejemplo 1c. Preparación de los 2-bromoetil (3/17) y 3-bromopropil (4/18) derivados.

Una mezcla agitada de la 2-bencilindazolinona de partida 1 (2,00 g, 7,43 mmol), el α,ω-dibromoalcano requerido (40,00 mmol) y K₂CO₃ (1,10 g, 8,00 mmol) en DMF (50 mL) se calentó a 100 °C durante 3 h. La mezcla se evaporó a sequedad y, después de la adición de agua (200 mL), se extrajo con CHCl₃ (3 x 50 mL). La fase orgánica se secó (MgSO₄), se concentró y se aplicó a una columna de cromatografía que se eluyó con mezclas de cloroformo/acetona (50:1 a 25:1). A partir de 1,2-dibromoetano se obtuvieron, en este orden de elución, el indazol 2,3-disustituido 17, el 1-vinilindazol 24 [70 mg (3%)] y la indazolinona 1,2-disustituida 3. Análogamente, a partir de 1,3-dibromopropano, se obtuvieron el correspondiente indazol 2,3-disustituido 18 y la indazolinona 1,2-disustituida 4.

2-Bencil-1-(2-bromoetil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (3). Rendimiento: 1,20 g (43%). Pf 172-174 °C (2-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,52 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, 4-H), 8,37 (dd, *J* = 9,0, 2,4 Hz, 1H, 6-H), 7,75 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, 7-H), 7,26 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,19 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,53 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, 1'-H), 3,51 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 161,39 (C-3), 149,28 (C-7a), 141,46 (C-5), 135,95 (C-1 Bn), 128,75 (C-3, -5 Bn), 127,87 (C-4 Bn), 127,26 (C-2, -6 Bn), 127,02 (C-6), 120,36 (C-4), 115,43 (C-3a), 112,59 (C-7), 47,67 (C-1'), 45,23 (CH₂ Bn), 29,17 (C-2'); EM (IE): *m/z* (%) 377 (99) ([M+2]⁺), 375 (100) (M⁺),

361 (5), 359 (5), 347 (7), 345 (7), 256 (9), 254 (9), 192 (8), 177 (9), 164 (9), 145 (8), 131 (17), 103 (36). Anál. calc. para $C_{16}H_{14}BrN_3O_3$ (376,20): C 51,08; H 3,75; N 11,17. Encontrado: C 50,90; H 3,69; N 11,46.

- 5 *2-Bencil-1-(3-bromopropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (4)*. Rendimiento: 0,90 g (31%). Pf 111-113 °C (2-PrOH). ^1H RMN [300 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 8,52 (d, J = 2,5 Hz, 1H, 4-H), 8,39 (dd, J = 9,1, 2,5 Hz, 1H, 6-H), 7,65 (d, J = 9,1 Hz, 1H, 7-H), 7,28 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,18 (s, 2H, CH_2 Bn), 4,14 (t, J = 7,3 Hz, 2H, 1'-H), 3,36 (t, J = 6,6 Hz, 2H, 3'-H), 1,80 (m, 2H, 2'-H); ^{13}C RMN [75 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 160,98 (C-3), 148,73 (C-7a), 141,52 (C-5), 136,01 (C-1 Bn), 128,72 (C-3, -5 Bn), 127,84 (C-4 Bn), 127,27 (C-6 y C-2, -6 Bn), 120,48 (C-4), 115,87 (C-3a), 112,02 (C-7), 45,52 (C-1'), 44,89 (CH_2 Bn), 30,81 (C-3'), 29,19 (C-2'); EM (IE): m/z (%) 391 (98) ($[M+2]^+$), 389 (100) ($[M]^+$), 361 (4), 359 (4), 345 (6), 314 (6), 312 (6), 282 (7), 192 (27), 149 (23), 146 (21), 131 (25), 103 (26). Anál. calc. para $C_{17}H_{16}BrN_3O_3$ (390,23): C 52,32; H 4,13; N 10,77. Encontrado: C 52,58; H 4,17; N 10,73.
- 10
- 15

- 2-Bencil-3-(2-bromoetoxi)-5-nitro-2H-indazol (17)*. Rendimiento: 0,84 g (30%). Pf 140-142 °C (2-PrOH). ^1H RMN [300 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 8,88 (d, J = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 7,91 (dd, J = 9,6, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,56 (d, J = 9,6 Hz, 1H, 7-H), 7,32 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,50 (s, 2H, CH_2 Bn), 5,05 (m, 2H, 1'-H), 3,93 (m, 2H, 2'-H); ^{13}C RMN [75 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 148,91 (C-3), 146,86 (C-7a), 140,46 (C-5), 135,65 (C-1 Bn), 128,63 (C-3, -5 Bn), 128,03 (C-2, -6 Bn), 127,97 (C-4 Bn), 120,50 (C-4), 119,97 (C-6), 118,16 (C-7), 105,33 (C-3a), 73,84 (C-1'), 51,80 (CH_2 Bn), 31,41 (C-2'); EM (IE): m/z (%) 377 (60) ($[M+2]^+$), 375 (61) ($[M]^+$), 268 (31), 252 (58), 222 (10), 199 (65), 197 (67), 191 (47), 164 (14), 149 (7), 117 (51), 109 (97), 107 (100). Anál. calc. para $C_{16}H_{14}BrN_3O_3$ (376,20): C 51,08; H 3,75; N 11,17. Encontrado: C 50,91; H 3,70; N 11,47.
- 20
- 25

- 2-Bencil-3-(3-bromopropoxi)-5-nitro-2H-indazol (18)*. Rendimiento: 0,84 g (29%). Pf 124-126 °C (2-PrOH). ^1H RMNR [300 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 8,88 (d, J = 2,4 Hz, 1H, 4-H), 7,90 (dd, J = 9,6, 2,4 Hz, 1H, 6-H), 7,54 (d, J = 9,6 Hz, 1H, 7-H), 7,31 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,47 (s, 2H, CH_2 Bn), 4,82 (t, J = 5,8 Hz, 2H, 1'-H), 3,66 (t, J = 6,6 Hz,
- 30

2H, 3'-H), 2,35 (m, 2H, 2'-H); ^{13}C RMN [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 149,37 (C-3), 146,81 (C-7a), 140,28 (C-5), 135,82 (C-1 Bn), 128,63 (C-3, -5 Bn), 127,88 (C-4 Bn), 127,74 (C-2, -6 Bn), 120,76 (C-4), 119,91 (C-6), 118,09 (C-7), 104,92 (C-3a), 71,75 (C-1'), 51,76 (CH_2 Bn), 32,02 (C-2'), 30,51 (C-3'); EM (IE): m/z (%) 391 (99) ([M+2]⁺), 389 (100) (M⁺), 280 (7), 269 (98), 252 (43), 222 (12), 191 (38), 164 (14), 123 (48), 121 (50), 103 (27). Anál. calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{BrN}_3\text{O}_3$ (390,23): C 52,32; H 4,13; N 10,77. Encontrado: C 52,51; H 4,36; N 10,57.

Ejemplo 1d. Preparación de los (metoxycarbonil)metil derivados 5/19 y del cianometil derivado 6. Una mezcla agitada de la 2-bencilindazolinona **1** (1,00 g, 3,71 mmol), bromoacetato de metilo o bromoacetonitrilo (4,5 mmol) y NaHCO_3 (0,42 g, 5,00 mmol) en acetona (30 mL) se calentó a 35 °C durante 5 días. La mezcla se evaporó a sequedad y, después de la adición de agua (50 mL), el sólido precipitado se recogió por filtración. Para los compuestos **5/19**, el sólido filtrado se lavó con acetona (2 x 5 mL) proporcionando el compuesto **5** puro (1,03 g). El filtrado se concentró a sequedad, se disolvió en cloroformo y comatografió en una columna que se eluyó con cloroformo y una mezcla de cloroformo/acetona (50:1) para dar, siguiendo este orden de elución, el compuesto **19** [0,04 g (3%)] y luego una cantidad adicional del compuesto **5** [rendimiento total: 1,18 g (93%)].

Para el compuesto **6**, el sólido filtrado se cromatografió directamente con mezclas de cloroformo/acetona (50:1 a 30:1) para proporcionar el 1-cianometil derivado puro [0,84 g (73%)].

2-Bencil-1-(metoxycarbonil)metil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (5). Los cristales (2-PrOH) de este compuesto reblandecen a 150-170 °C; a continuación el producto vuelve a solidificar mostrando un pf posterior a 195-197 °C. ^1H RMN [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 8,54 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 4-H), 8,40 (dd, $J = 9,3, 2,1$ Hz, 1H, 6-H), 7,67 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H, 7-H), 7,27 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,15 (s, 2H, CH_2 Bn), 5,09 (s, 2H, 1'-H), 3,41 (s, 3H, CH_3); ^{13}C RMN [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 167,27 (C-2'), 160,83 (C-3), 150,13 (C-7a), 141,79 (C-5), 135,94 (C-1 Bn), 128,55 (C-3, -5 Bn), 127,72 (C-4 Bn), 127,45 (C-2, -6 Bn), 127,30 (C-6), 120,10 (C-4), 116,30 (C-3a), 112,00 (C-7), 52,00 (CH_3), 47,77 (C-1'), 44,87 (CH_2 Bn); EM (ES⁺): m/z (%) 705 (23)

($[2M+Na]^+$), 683 (25) ($[2M+H]^+$), 364 (34) ($[M+Na]^+$), 342 (100) ($[M+H]^+$). Anál. calc. para $C_{17}H_{15}N_3O_5$ (341,32): C 59,82; H 4,43; N 12,31. Encontrado: C 60,11; H 4,71; N 12,59.

5 *2-Bencil-1-cianometil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (6)*. Pf 146-148 °C (2-PrOH). ^1H RMN [300 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 8,57 (m, 2H, 4-, 6-H), 7,89 (d, $J = 9,9$ Hz, 1H, 7-H), 7,27 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,43 (s, 2H, 1'-H), 5,17 (s, 2H, CH_2 Bn); ^{13}C RMN [75 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 161,86 (C-3), 151,58 (C-7a), 144,08 (C-5), 135,71 (C-1 Bn), 128,66 (C-3, -5 Bn), 128,48 (C-6), 127,92 (C-4 Bn), 127,66 (C-2, -6 Bn), 120,14
10 (C-4), 119,15 (C-3a), 114,23 (C-7), 114,04 (C-2'), 45,13 (CH_2 Bn), 38,00 (C-1'); EM (IE): m/z (%) 308 (87) (M^+), 281 (100), 264 (3), 251 (4), 234 (4), 231 (5), 175 (14), 149 (6), 131 (5), 129 (5), 103 (19). Anál. calc. para $C_{16}H_{12}N_4O_3$ (308,29): C 62,33; H 3,92; N 18,17. Encontrado: C 62,45; H 3,72; N 18,01.

15 *2-Bencil-3-(metoxicarbonil)metoxi-5-nitro-2H-indazol (19)*. Pf 94-96 °C (2-PrOH). ^1H RMN [300 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 8,83 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, 4-H), 7,91 (dd, $J = 9,6, 2,2$ Hz, 1H, 6-H), 7,57 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, 7-H), 7,33 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,54 (s, 2H, CH_2 Bn), 5,49 (s, 2H, 1'-H), 3,74 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR [75 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ 168,38 (C-2'), 148,71 (C-3), 146,80 (C-7a), 140,56 (C-5), 135,63 (C-1 Bn), 128,58
20 (C-3, -5 Bn), 127,87 (C-2, -4, -6 Bn), 120,15 (C-4), 119,88 (C-6), 118,20 (C-7), 105,15 (C-3a), 69,52 (C-1'), 52,22 (CH_3), 51,84 (CH_2 Bn); EM (IE): m/z (%) 341 (100) (M^+), 325 (1), 282 (2), 268 (16), 252 (2), 236 (2), 222 (2), 191 (2), 164 (2), 103 (3). Anál. calc. para $C_{17}H_{15}N_3O_5$ (341,32): C 59,82; H 4,43; N 12,31. Encontrado: C 59,53; H 4,67; N 12,57.

25

Ejemplo 1e. Preparación de los 2-(metoxicarbonil)etil derivados 7/20 y del 2-carboxietil derivado 25. Una solución agitada de la 2-bencilindazolinona **1** (1,00 g, 3,71 mmol), K_2CO_3 (1,38 g, 10,00 mmol) y bromuro de benciltributilamonio (0,10 g) en una mezcla de agua (20 mL) y tolueno (20 mL) se calentó a 100 °C durante 30 min y, a continuación, se añadió 3-bromopropionato de metilo (0,84 g, 5,03 mmol). Cantidades adicionales de 3-bromopropionato de metilo (ca. 10 x 0,25 g) y, eventualmente, si fuera necesario, K_2CO_3 para mantener el pH básico, se fueron
30

añadiendo durante 2 días cada 5-10 h. La mezcla de reacción se dejó alcanzar la temperatura ambiente y luego se separó la fase de tolueno, se secó (MgSO_4) y se evaporó a sequedad. El residuo obtenido se sometió a cromatografía en una columna usando mezclas de cloroformo/acetona (50:1 a 10:1) para dar, siguiendo este orden de
 5 elución, el compuesto **20** [0,15 g (11%)] y luego el compuesto **7** [0,56 g (42%)].

La fase acuosa restante se acidificó con HCl acuoso conc. (pH 1) y el sólido precipitado se recogió por filtración, se secó y se aplicó a una columna de cromatografía que se eluyó primero con cloroformo/metanol (50:1 a 10:1) y luego con
 10 cloroformo/metanol (10:1) conteniendo ácido acético (0,5%), para obtener, en este orden de elución, la indazolinona de partida **1** recuperada [0,07 g (7%)] y después el ácido **25** [0,33 g (26%)].

2-Bencil-1-[2-(metoxicarbonil)etil]-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (7). Pf 127-
 15 129 °C (2-PrOH). ^1H RMN [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 8,50 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 4-H), 8,37 (dd, $J = 9,0, 2,1$ Hz, 1H, 6-H), 7,68 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, 7-H), 7,25 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,16 (s, 2H, CH_2 Bn), 4,32 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, 1'-H), 3,43 (s, 3H, CH_3), 2,36 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, 2'-H); ^{13}C RMN [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 170,82 (C-3'), 161,31 (C-3), 149,04 (C-7a), 141,68 (C-5), 136,02 (C-1 Bn), 128,71 (C-3, -5 Bn), 127,82 (C-
 20 4 Bn), 127,28 (C-2, -6 Bn), 127,17 (C-6), 120,29 (C-4), 116,25 (C-3a), 112,62 (C-7), 51,48 (CH_3), 44,94 (CH_2 Bn), 42,98 (C-1'), 30,30 (C-2'); EM (IE): m/z (%) 355 (100) (M^+), 282 (5), 278 (5), 177 (5), 131 (8), 103 (8). Anál. calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5$ (355,34): C 60,84; H 4,82; N 11,83. Encontrado: C 60,77; H 4,91; N 11,57.

2-Bencil-3-[2-(metoxicarbonil)etoxi]-5-nitro-2H-indazol (20). Pf 130-132 °C (2-PrOH). ^1H RMN [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 8,90 (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), 5,42 (s, 2H, CH_2 Bn), 4,90 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, 1'-H), 3,64 (s, 3H, CH_3), 2,95 (t, $J = 5,7$ Hz, 2'-H); ^{13}C RMN [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$]: δ 170,83 (C-3'), 149,22 (C-3), 146,85 (C-7a),
 30 140,42 (C-5), 135,69 (C-1 Bn), 128,61 (C-3, -5 Bn), 127,90 (C-2, -4, -6 Bn), 120,51 (C-4), 119,95 (C-6), 118,14 (C-7), 105,34 (C-3a), 70,18 (C-1'), 51,68 (CH_2 Bn, CH_3), 34,10 (C-2'); EM (IE): m/z (%) 355 (22) (M^+), 324 (3), 91 (100). Anál. calc. para

$C_{18}H_{17}N_3O_5$ (355,34): C 60,84; H 4,82; N 11,83. Encontrado: C 60,99; H 5,11; N 11,53.

2-Bencil-1-(2-carboxietil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (25). Pf 224-226 °C (EtOH/H₂O). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 12,39 (s, 1H, COOH), 8,50 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 8,37 (dd, *J* = 9,3, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,69 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H, 7-H), 7,26 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,17 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,27 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, 1'-H), 2,26 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 171,87 (C-3'), 161,27 (C-3), 149,01 (C-7a), 141,64 (C-5), 136,05 (C-1 Bn), 128,73 (C-3, -5 Bn), 127,83 (C-4 Bn), 127,29 (C-2, -6 Bn), 127,14 (C-6), 120,29 (C-4), 116,22 (C-3a), 112,68 (C-7), 44,96 (CH₂ Bn), 43,07 (C-1'), 30,48 (C-2'); EM (ES⁺): *m/z* (%) 705 (51) ([2M+Na]⁺), 683 (35) ([2M+H]⁺), 364 (65) ([M+Na]⁺), 342 (100) ([M+H]⁺). Anál. calc. para $C_{17}H_{15}N_3O_5$ (341,32): C 59,82; H 4,43; N 12,31. Encontrado: C 59,60; H 4,66; N 12,60.

15

Ejemplo 1f. Alcoxycarbonilación, acilación y sulfonilación de la 2-bencil-5-nitroindazolin-3-ona 1: preparación de alcoxycarbonil (12, 13), acil (14, 15) y tosil (16) derivados. A una solución agitada de la 2-bencilindazolin-3-ona 1 (1,00 g; 3,71 mmol) en piridina (15 mL), se añadieron lentamente el cloroformiato de alquilo requerido (4,00 mmol) (para 12, 13), anhídrido acético (2,0 mL, exceso) (para 14) o el correspondiente cloruro de ácido (3,90 mmol) (para 15, 16). La mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante 3 h (para 14), o se agitó a temperatura ambiente durante 1 h (para 12, 13, 15 y 16), y después se vertió en agua (100 mL). El sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con HCl acuoso al 2% (50 mL) y con agua abundante, y se secó al aire.

25

2-Bencil-1-etoxycarbonil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (12). Rendimiento: 1,20 g (95%). Pf 135-137 °C (EtOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,56 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, 4-H), 8,52 (dd, *J* = 9,0, 2,2 Hz, 1H, 6-H), 8,00 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, 7-H), 7,26 (m, 3H) y 7,11 (m, 2H) (H aromát. Bn), 5,33 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,39 (c, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂ Et), 1,30 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, CH₃); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 162,58 (C-3), 149,48 (COO), 145,57 (C-7a), 144,18 (C-5), 135,33 (C-1 Bn), 128,88

30

(C -6), 128,66 (C-3, -5 Bn), 127,96 (C-4 Bn), 127,41 (C-2, -6 Bn), 119,63 (C-4), 118,19 (C-3a), 116,35 (C-7), 64,75 (CH₂ Et), 49,98 (CH₂ Bn), 13,83 (CH₃); EM (ES⁺): *m/z* (%) 705 (39) ([2M+Na]⁺), 683 (75) ([2M+H]⁺), 364 (15) ([M+Na]⁺), 342 (100) ([M+H]⁺). Anál. calc. para C₁₇H₁₅N₃O₅ (341,32): C 59,82; H 4,43; N 12,31.

5 Encontrado: C 60,04; H 4,17; N 12,19.

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

Rendimiento: 1,45 g (97%). Pf 143-145 °C (2-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,56 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 8,51 (dd, *J* = 8,9, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,99 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, 7-H), 7,42 (m, 6H), 7,21 (m, 2H) y 7,00 (m, 2H) (H aromát. O- y NBn), 5,44 (s, 2H, CH₂ OBn), 5,30 (s, 2H, CH₂ NBn); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 162,66 (C-3), 149,44 (COO), 145,56 (C-7a), 144,27 (C-5), 135,05, 134,47 (C-1, y O- y NBn), 128,95 (C-6), 128,81, 128,78, 128,64 (2 señales superpuestas), 128,01, 127,49 (O- y NBn, y C-2, -3, -4, -5, -6), 119,70 (C-4), 118,29 (C-3a), 116,30 (C-7), 69,67 (OCH₂), 49,95 (NCH₂); EM (ES⁺): *m/z* (%) 829 (68) ([2M+Na]⁺), 807 (36) ([2M+H]⁺), 426 (22) ([M+Na]⁺), 404 (100) ([M+H]⁺). Anál. calc. para C₂₂H₁₇N₃O₅ (403,39): C 65,50; H 4,25; N 10,42. Encontrado: C 65,59; H 4,06; N 10,16.

20 *1-Acetil-2-bencil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona* (14). Rendimiento: 1,03 g (89%). Pf 165-167 °C (2-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,56 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 8,50 (dd, *J* = 9,3, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 8,30 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H, 7-H), 7,25 (m, 3H) y 7,11 (m, 2H) (H aromát. Bn), 5,33 (s, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 168,37 (CO Ac), 164,05 (C-3), 145,89 (C-7a), 144,11 (C-5), 135,12 (C-1 Bn), 128,92 (C-6), 128,67 (C-3, -5 Bn), 128,02 (C-4 Bn), 127,57 (C-2, -6 Bn), 119,69 (C-4), 118,52 (C-3a), 116,18 (C-7), 51,14 (CH₂), 24,98 (CH₃); EM (ES⁺): *m/z* (%) 645 (44) ([2M+Na]⁺), 623 (3) ([2M+H]⁺), 334 (62) ([M+Na]⁺), 312 (100) ([M+H]⁺). Anál. calc. para C₁₆H₁₃N₃O₄ (311,29): C 61,73; H 4,21; N 13,50. Encontrado: C 61,50; H 4,47; N 13,59.

30 *2-Bencil-1-benzoil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona* (15). Rendimiento: 1,36 g (98%). Pf 164-166 °C (2-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,59 (d, *J* = 2,4

Hz, 1H, 4-H), 8,28 (dd, $J = 9,3, 2,4$ Hz, 1H, 6-H), 7,76 (dd, $J = 7,6, 7,6$ Hz, 1H, 4-H Bz), 7,57 (dd, $J = 7,6, 7,6$ Hz, 2H, 3-, 5-H Bz), 7,41 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, 2-, 6-H Bz), 7,27 (m, 3H) y 7,08 (m, 2H) (H aromát. Bn), 6,48 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H, 7-H), 5,27 (s, 2H, CH₂); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 164,76 (CO Bz), 162,18 (C-3), 145,08 (C-7a), 144,03 (C-5), 134,84 (C-1 Bn), 134,18 (C-4 Bz), 132,62 (C-1 Bz), 129,51 (C-3, -5 Bz), 129,15 (C-2, -6 Bz), 128,84 (C-3, -5 Bn), 128,53 (C-4 Bn), 128,29 (C-6), 127,72 (C-2, -6 Bn), 120,11 (C-4), 117,85 (C-3a), 114,09 (C-7), 48,84 (CH₂); EM (ES⁺): m/z (%) 769 (72) ([2M+Na]⁺), 747 (44) ([2M+H]⁺), 396 (26) ([M+Na]⁺), 374 (100) ([M+H]⁺). Anál. calc. para C₂₁H₁₅N₃O₄ (373,36): C 67,56; H 4,05; N 11,25. Encontrado: C 67,40; H 4,27; N 10,97.

2-Bencil-5-nitro-1-tosil-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (16). Rendimiento: 1,54 g (98%). Pf 162-164 °C (1-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,58 (dd, $J = 9,0, 2,1$ Hz, 1H, 6-H), 8,40 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 4-H), 8,14 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, 7-H), 7,44 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,29 (m, 5H) y 7,20 (m, 2H) (H aromát. Bn y Ts), 5,34 (s, 2H, CH₂), 2,28 (s, 3H, CH₃); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 163,57 (C-3), 147,75 (C-7a), 147,23 (C-4 Ts), 146,29 (C-5), 135,11 (C-1 Bn), 130,04 (C-3, -5 Ts), 129,36 (C-6), 128,69 (C-3, -5 Bn), 128,60 (C-2, -6 Ts), 128,20 (C-2, -6 Bn), 128,12 (C-4 Bn), 126,74 (C-1 Ts), 121,33 (C-3a), 119,91 (C-4), 119,08 (C-7), 50,19 (CH₂), 21,11 (CH₃); EM (IE): m/z (%) 423 (4) (M⁺), 268 (41), 155 (4), 91 (100). Anál. calc. para C₂₁H₁₇N₃O₅S (423,44): C 59,57; H 4,05; N 9,92. Encontrado: C 59,50; H 4,17; N 10,09

EJEMPLO 2. Preparación de los compuestos 24-31 [tipo (I)] a partir de los compuestos 3, 4, 7-9 y 26 [tipo (I)].

Los compuestos 24-31 se obtuvieron (Esquema 2) a partir de algunas de las indazolinonas 1,2-disustituidas incluidas en el Esquema 1, siguiendo diferentes procedimientos. Así, el 1-vinil derivado 24 se preparó a partir del 2-bromoetil derivado 3 a través de una reacción de deshidrohalogenación. El derivado de ácido propiónico 25 se obtuvo, junto con el éster 7, en la alquilación de la indazolinona 1 con 3-bromopropionato de metilo según el procedimiento del Ejemplo 1e, por hidrólisis parcial del éster inicialmente formado en el medio básico de reacción; dado

su origen, el compuesto **25** se describe en el Ejemplo 1. El derivado de ácido butírico **26** se obtuvo por hidrólisis (LiOH) del correspondiente éster **8**. La butiramida **27** y la *N*-metilbutiramida **28** se obtuvieron por tratamiento del éster etílico **8** con amoníaco o metilamina, respectivamente; la *N,N*-dimetilbutiramida **29** se preparó a partir del
5 cloruro del ácido **26** (SOCl₂) y dimetilamina. El 3-etoxipropil derivado **30** se aisló de un intento de preparación del 3-hidroxipropil derivado **10** a partir del bromuro **4** y NaOH en etanol/agua. Por último, el 2-acetoxietil derivado **31** se preparó por acetilación (Ac₂O) del correspondiente 2-hidroxietil derivado **9**.

10 *Ejemplo 2a. Preparación del vinil derivado 24.* Una solución de la 1-(2-bromoetil)indazolinona **3** (0,56 g, 1,49 mmol) y piperidina (0,35 g, 4,11 mmol) en etanol (20 mL) se calentó a reflujo durante 48 h. La solución se evaporó a sequedad y, después de la adición de HCl acuoso al 2% (50 mL), se extrajo con cloroformo (3 x 50 mL). La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se evaporó a sequedad para proporcionar el
15 compuesto deseado; resultados similares se obtuvieron usando metilamina (33% p/p en solución etanólica).

El compuesto **24** también se obtuvo como un subproducto en la alquilación de la 2-bencilindazolinona **1** con 1,2-dibromoetano (véase más arriba, Ejemplo 1c).

20 *2-Bencil-5-nitro-1-vinil-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (24).* Rendimiento: 0,41 g (93%). Pf 116-118 °C (2-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,53 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H, 4-H), 8,40 (dd, *J* = 9,3, 3,0 Hz, 1H, 6-H), 7,71 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H, 7-H), 7,26 (m, 3H) y 7,15 (m, 2H) (H aromát. Bn), 7,08 (dd, *J* = 14,7, 9,0 Hz, 1H, 1'-H), 5,25 (dd, *J* = 14,7, 1,4 Hz, 1H, 2'-H_{trans}), 5,20 (s, 2H, CH₂ Bn), 5,10 (dd, *J* = 9,0, 1,4 Hz, 1H, 2'-H_{cis}); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 162,05 (C-3), 146,73 (C-7a), 142,10 (C-5), 135,48 (C-1 Bn), 129,93 (C-1'), 128,66 (C-3, -5 Bn), 128,07 (C-6), 127,90 (C-4 Bn), 127,38 (C-2, -6 Bn), 120,43 (C-4), 115,46 (C-3a), 112,13 (C-7), 104,68 (C-2'), 47,00 (CH₂ Bn); EM (IE): *m/z* (%) 295 (100) (M⁺), 280 (2), 265 (2), 218 (2), 158 (3), 145 (3), 116 (7), 104 (9). Anál. calc. para C₁₆H₁₃N₃O₃ (295,29): C 65,08; H 4,44; N
25 14,23. Encontrado: C 65,30; H 4,46; N 14,07.
30

Ejemplo 2b. Preparación del ácido 4-(indazol-1-il)butírico 26. Una mezcla del éster etílico **8** (0,50 g, 1,30 mmol) y LiOH (0,16 g, 6,68 mmol) en THF/H₂O (1:1, 20 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. A continuación, el THF se evaporó y la solución acuosa se acidificó con HCl acuoso conc. (pH 1). El sólido precipitado se
5 recogió por filtración, se lavó con HCl acuoso (1%; 3 x 3 mL) y se secó al aire.

2-Bencil-1-(3-carboxipropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (26).

Rendimiento: 0,42 g (91%). Pf 202-204 °C (EtOH/H₂O). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 12,20 (s, 1H, COOH), 8,52 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, 4-H), 8,37 (dd, *J* = 9,3, 2,4 Hz, 1H, 6-H), 7,62 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H, 7-H), 7,27 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,20 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,05 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, 1'-H), 2,15 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, 3'-H), 1,50 (m, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 173,61 (C-4'), 160,81 (C-3), 148,53 (C-7a), 141,31 (C-5), 136,13 (C-1 Bn), 128,72 (C-3, -5 Bn), 127,83 (C-4 Bn), 127,27 (C-2, -6 Bn), 127,17 (C-6), 120,55 (C-4), 115,62 (C-3a), 111,89 (C-7), 45,95 (C-1'),
10 44,66 (CH₂ Bn), 30,15 (C-3'), 21,40 (C-2'); EM (ES⁺): *m/z* (%) 378 (20) ([M+Na]⁺), 356 (100) ([M+H]⁺). Anál. calc. para C₁₈H₁₇N₃O₅ (355,34): C 60,84; H 4,82; N 11,83. Encontrado: C 60,59; H 4,97; N 11,68.

Ejemplo 2c. Preparación de la amida 27 y de la N-metilamida 28. Para obtener el
20 compuesto **27**, una mezcla de éster etílico **8** (0,50 g, 1,30 mmol) y una solución saturada de amoníaco en metanol (15 mL) se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 días. Tras eliminar el disolvente y el amoníaco, con objeto de eliminar algunos subproductos, el residuo se cromatografió en una columna que se eluyó con una mezcla de cloroformo/metanol (25: 1) para proporcionar el producto requerido.

25 Para obtener el compuesto **28**, una mezcla de éster etílico **8** (0,50 g, 1,30 mmol) y metilamina 8 M en etanol (20 mL) se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad, proporcionando la amida deseada.

2-Bencil-1-(3-carbamoilpropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (27).

30 Rendimiento: 0,45 g (98%). Aceite que solidifica tras trituración con 2-PrOH; pf 106-108 °C. ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,52 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 8,36 (dd, *J* = 9,0, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,62 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, 7-H), 7,25 (m, 6H, H aromát. Bn y

NH_A), 6,79 (s ancho, 1H, NH_B), 5,21 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,03 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, 1'-H), 1,98 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, 3'-H), 1,51 (m, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 173,16 (C-4'), 160,73 (C-3), 148,40 (C-7a), 141,20 (C-5), 136,16 (C-1 Bn), 128,72 (C-3, -5 Bn), 127,82 (C-4 Bn), 127,25 (C-2, -6 Bn), 127,09 (C-6), 120,54 (C-4), 115,49 (C-3a), 111,87 (C-7), 46,18 (C-1'), 44,61 (CH₂ Bn), 31,04 (C-3'), 21,77 (C-2'); EM (ES⁺): m/z (%) 731 (15) ([2M+Na]⁺), 709 (40) ([2M+H]⁺), 377 (12) ([M+Na]⁺), 355 (100) ([M+H]⁺). Anál. calc. para C₁₈H₁₈N₄O₄ (354,36): C 61,01; H 5,12; N 15,81. Encontrado: C 61,30; H 4,92; N 15,57.

10 *2-Bencil-1-[3-(metilcarbamoil)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona* (28). Rendimiento: 0,45 g (94%). Pf 159-161 °C (2-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,52 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 4-H), 8,36 (dd, $J = 9,3, 2,1$ Hz, 1H, 6-H), 7,67 (c ancho, $J = 4,5$ Hz, 1H, NH), 7,61 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H, 7-H), 7,25 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,20 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,03 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, 1'-H), 2,52 (d, $J = 4,5$ Hz, 3H, CH₃), 1,97 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, 3'-H), 1,53 (m, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 171,32 (C-4'), 160,77 (C-3), 148,45 (C-7a), 141,19 (C-5), 136,15 (C-1 Bn), 128,71 (C-3, -5 Bn), 127,81 (C-4 Bn), 127,24 (C-2, -6 Bn), 127,07 (C-6), 120,53 (C-4), 115,47 (C-3a), 111,87 (C-7), 46,16 (C-1'), 44,63 (CH₂ Bn), 31,27 (C-3'), 25,40 (CH₃), 22,01 (C-2'); EM (ES⁺): m/z (%) 759 (17) ([2M+Na]⁺), 737 (53) ([2M+H]⁺), 391 (22) ([M+Na]⁺), 369 (100) ([M+H]⁺). Anál. calc. para C₁₉H₂₀N₄O₄ (368,39): C 61,95; H 5,47; N 15,21. Encontrado: C 61,75; H 5,77; N 15,50.

Ejemplo 2d. Preparación de la N,N-dimetilamida 29. Una suspensión del ácido 26 (0,53 g, 1,49 mmol) y SOCl₂ (1,00 mL) en CHCl₃ (30 mL) se calentó a reflujo durante 1 h. Después de la evaporación del disolvente y del exceso de SOCl₂, se añadió al residuo aceitoso una solución de clorhidrato de dimetilamina (1,63 g, 19,99 mmol) y K₂CO₃ (2,80 g, 20,26 mmol) en agua (20 mL). La mezcla se agitó vigorosamente durante 12 h y después el producto precipitado 29 se recogió por filtración, se lavó con agua (3 x 5 mL) y se secó al aire.

30

2-Bencil-1-[3-(dimetilcarbamoil)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (29). Rendimiento: 0,51 g (90%). Pf 144-146 °C (2-PrOH). ¹H RMN [300 MHz,

(CD₃)₂SO]: δ 8,52 (d, J = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 8,37 (dd, J = 9,0, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,60 (d, J = 9,0 Hz, 1H, 7-H), 7,25 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,23 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,04 (t, J = 7,5 Hz, 2H, 1'-H), 2,80 (s, 3H, CH₃ *trans*), 2,78 (s, 3H, CH₃ *cis*), 2,19 (t, J = 6,6 Hz, 2H, 3'-H), 1,51 (m, 2H, 2'-H); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 170,80 (C-4'), 160,69 (C-3), 148,39 (C-7a), 141,19 (C-5), 136,20 (C-1 Bn), 128,71 (C-3, -5 Bn), 127,79 (C-4 Bn), 127,26 (C-2, -6 Bn), 127,04 (C-6), 120,53 (C-4), 115,51 (C-3a), 111,79 (C-7), 46,19 (C-1'), 44,57 (CH₂ Bn), 36,39 (CH₃ *trans*), 34,79 (CH₃ *cis*), 28,61 (C-3'), 21,47 (C-2'); EM (IE): m/z (%) 382 (41) (M⁺), 337 (32), 310 (10), 291 (19), 282 (23), 268 (25), 246 (64), 232 (9), 218 (49), 192 (19), 172 (21), 128 (47), 114 (100), 106 (27).
 10 Anál. calc. para C₂₀H₂₂N₄O₄ (382,41): C 62,82; H 5,80; N 14,65. Encontrado: C 62,99; H 5,96; N 14,51.

Ejemplo 2e. Preparación del 3-etoxipropil derivado 30. A una solución del 1-(3-bromopropil) derivado 4 (0,59 g, 1,51 mmol) en etanol (100 mL), se añadió NaOH (0,40 g, exceso) en agua (20 mL), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. A continuación, se evaporó el etanol y la solución básica se extrajo con CHCl₃ (3 x 50 mL). La fase orgánica se secó (MgSO₄), se concentró y se cromatografió en columna con mezclas de cloroformo/acetona (50:1 a 25:1) para proporcionar el éter 30.

20 *2-Bencil-1-(3-etoxipropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (30).* Rendimiento: 0,38 g (71%). Pf 93-95 °C (2-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,51 (d, J = 2,1 Hz, 1H, 4-H), 8,36 (dd, J = 9,0, 2,1 Hz, 1H, 6-H), 7,61 (d, J = 9,0 Hz, 1H, 7-H), 7,26 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,17 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,09 (t, J = 6,8 Hz, 2H, 1'-H), 3,17 (c, J = 7,1 Hz, CH₂ Et), 3,09 (t, J = 6,0 Hz, 2H, 3'-H), 1,56 (m, 2H, 2'-H), 1,02 (t, J = 7,1 Hz, 3H, CH₃); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 160,94 (C-3), 148,64 (C-7a), 141,11 (C-5), 136,11 (C-1 Bn), 128,71 (C-3, -5 Bn), 127,80 (C-4 Bn), 127,21 (C-2, -6 Bn), 126,93 (C-6), 120,44 (C-4), 115,34 (C-3a), 111,88 (C-7), 66,16 (C-3'), 65,19 (CH₂ Et), 44,87 (CH₂ Bn), 44,09 (C-1'), 26,56 (C-2'), 14,90 (CH₃); EM (IE): m/z (%) 355 (100) (M⁺), 282 (3), 278 (4), 268 (4), 220 (4), 192 (13), 146 (7), 131 (4), 106 (4), 103 (4). Anál. calc. para C₁₉H₂₁N₃O₄ (355,39): C 64,21; H 5,96; N 11,82. Encontrado: C 63,92; H 5,77; N 11,98.

Ejemplo 2f. Preparación del 2-acetoxietil derivado 31. Una suspensión del 1-(2-hidroxietil) derivado 9 (0,47 g, 1,50 mmol) en anhídrido acético (5 mL) se calentó a 100 °C durante 2 h. La reacción se evaporó a sequedad y el residuo se trituró con 2-PrOH (2 mL); el compuesto insoluble se recogió por filtración, se lavó con 2-PrOH (2 x 2 mL) y se secó al aire.

1-(2-Acetoxietil)-2-bencil-5-nitro-1,2-dihidro-3H-indazol-3-ona (31). Rendimiento: 0,47 g (88%). Pf 168-170 °C (2-PrOH). ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 8,51 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, 4-H), 8,38 (dd, *J* = 9,0, 2,4 Hz, 1H, 6-H), 7,66 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, 7-H), 7,25 (m, 5H, H aromát. Bn), 5,19 (s, 2H, CH₂ Bn), 4,36 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H, 1'-H), 4,07 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H, 2'-H), 1,57 (s, 3H, CH₃); ¹³C RMN [75 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 169,53 (CO Ac), 161,19 (C-3), 149,90 (C-7a), 141,32 (C-5), 136,04 (C-1 Bn), 128,73 (C-3, -5 Bn), 127,86 (C-4 Bn), 127,32 (C-2, -6 Bn), 126,84 (C-6), 120,33 (C-4), 115,51 (C-3a), 112,48 (C-7), 60,22 (C-2'), 45,95 (C-1'), 44,81 (CH₂ Bn), 20,08 (CH₃); EM (IE): *m/z* (%) 355 (100) (M⁺), 325 (2), 295 (5), 282 (6), 204 (6), 177 (9), 131 (10), 103 (7). Anál. calc. para C₁₈H₁₇N₃O₅ (355,34): C 60,84; H 4,82; N 11,83. Encontrado: C 60,60; H 5,03; N 11,57.

20 EJEMPLO 3. Estudio *in vitro* de la actividad de los derivados de indazol sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Los ensayos de actividad frente *T. cruzi* se llevan a cabo de acuerdo con un protocolo secuencial de cribado farmacológico *in vitro* en el que, en primer lugar, se realizan ensayos simultáneos de actividad frente a epimastigotes (forma extracelular) y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929 (células hospedadoras de los amastigotes, forma intracelular del parásito). Los epimastigotes son formas extracelulares presentes sólo en los insectos vectores (triatominos), pero dado que son fácilmente cultivables *in vitro* en el laboratorio, se usan para los cribados iniciales de actividad antichagásica. Aquellos compuestos que resultan con una selectividad en epimastigotes igual o superior a la del benznidazol, son seleccionados para un posterior ensayo de actividad sobre amastigotes (Fonseca-Berzal, C. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013, 23, 4851-4856). Los amastigotes son parásitos intracelulares

de las células de mamífero afectadas, por lo que los resultados obtenidos sobre ellos son mucho más significativos desde el punto de vista de la enfermedad de Chagas en humanos.

- 5 Para evaluar la actividad *in vitro* en 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 *Escherichia coli* (Buckner, F. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2592-2597). Esta cepa presenta un comportamiento biológico similar al de la cepa CL parental que la hace idónea para el cribado farmacológico *in*
10 *vitro* (Le-Senne, A. et al., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 1101-1105). La expresión de la enzima β -galactosidasa por el parásito da lugar a la reducción del sustrato cromogénico rojo de clorofenol β -D-galactopiranosido (CPRG) a rojo de fenol. Dicha reacción colorimétrica es directamente proporcional al número de parásitos vivos, lo que permite estimar los porcentajes de actividad de los compuestos
15 mediante espectrofotometría.

- Los cultivos de epimastigotes se mantienen a 28 °C en medio LIT suplementado al 10% (v/v) con suero bovino fetal inactivado (56 °C, 30 min.), penicilina (100 UI/mL) y estreptomycin (100 µg/mL), realizando subcultivos semanalmente para mantenerlos
20 continuamente en fase de crecimiento exponencial.

- De acuerdo con el protocolo estandarizado por Vega, M. C. et al. (*Parasitol. Res.* **2005**, *95*, 296-298), posteriormente modificado por Fonseca-Berzal, C. et al. (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4851-4856), los cultivos en fase de crecimiento
25 exponencial se distribuyeron en placas de 96 pocillos a razón de 250.000 epimastigotes/mL en volúmenes de 200 µL/pocillo y se incubaron junto con los compuestos a ensayar durante 72 h a 28 °C. Todos los compuestos se disolvieron en sulfoxido de dimetilo (DMSO) y se añadieron extemporáneamente a los respectivos medios de cultivo en concentraciones finales de 256-0,125 µM. La concentración final
30 de DMSO en los cultivos nunca superó el 0,2% (v/v), no presentando a esta concentración efecto tóxico para células y parásitos. En cada placa se ensayó cada concentración por triplicado y se incluyeron controles de crecimiento, blancos de

medio y de compuesto, así como un control interno con benznidazol, fármaco de referencia. Una vez transcurridas las 72 h, se procedió a revelar el ensayo mediante la adición de 50 μ L/pocillo de una solución de CPRG en 0,9% Tritón X-100 (concentración final 200 μ M, pH 7.4) y posterior incubación de las placas durante 3 h a 37 °C. Finalmente, se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de placas (ELx808 ELISA reader, Biotek Instruments Inc.) y se estimaron los porcentajes de actividad mediante comparación del valor medio obtenido en los pocillos tratados con el valor medio de absorbancia que presenta el control de crecimiento.

Para cada compuesto, se estimó la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento de los epimastigotes (CI_{50} epimastigotes) a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta (concentración ensayada vs porcentaje de actividad en epimastigotes). Los resultados de actividad se expresan como la media de la CI_{50} en epimastigotes $\pm$ desviación estándar (SD), a partir de los valores obtenidos en tres experimentos realizados de manera independiente ($n = 3$). Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 2. Puede observarse que los 3-alcoxi-2-bencilindazoles [compuestos de la serie (II)] presentan escasa actividad, mientras que muchas de las indazolinonas 1,2-disustituidas [compuestos de la serie (I)] presentan actividades, expresadas como CI_{50} , muy superiores a la del benznidazol, fármaco de referencia ($CI_{50} = 22,73 \mu$ M). Destacan las indazolinonas conteniendo en posición 1 grupos alquilo sustituidos tales como 2-bromoetilo (3), 3-bromopropilo (4), 2-hidroxietilo (9), 3-hidroxipropilo (10) o grupos alquenoilo como vinilo (24), con valores de $CI_{50} = 1,58$ -2,90 μ M. Los derivados con una cadena lateral de ácido carboxílico (25, 26) así como los compuestos acilados en posición 1 (14, 15), al contrario, no presentan actividad.

25

EJEMPLO 4. Estudio *in vitro* de la citotoxicidad inespecífica de los derivados de indazol frente a fibroblastos murinos L929 y determinación de los índices de selectividad (IS).

Con el fin de descartar cualquier efecto tóxico de los compuestos sobre células de mamífero, así como para determinar la selectividad de los mismos hacia *T. cruzi*, se evaluó su citotoxicidad inespecífica en fibroblastos L929.

30

Tabla 2. Actividad *in vitro* frente a formas extracelulares (epimastigotes) e intracelulares (amastigotes) de *T. cruzi* y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos murinos L929, expresadas como CI_{50} y CL_{50} , respectivamente.

Compuesto	CI_{50} epimas- tigotes (μM)	CL_{50} L929 (μM)	IS^a epimastigotes	CI_{50} amasti- gotes (μM)	IS^a amastigotes
2	$10,79 \pm 4,80$	$195,27 \pm 9,70$	18,10	$3,02 \pm 0,55$	64,66
3	$2,13 \pm 0,72$	> 256	> 120,19	$1,14 \pm 0,14$	> 224,56
4	$2,90 \pm 0,37$	$25,19 \pm 3,16$	8,69	- ^c	-
5	$26,17 \pm 11,31$	$128,89 \pm 10,32$	4,92	-	-
6	$11,66 \pm 2,13$	> 256	> 21,95	$3,50 \pm 0,83$	> 73,14
7	$9,19 \pm 1,20$	> 256	> 27,86	$2,93 \pm 1,68$	> 87,37
8	$11,14 \pm 0,59$	$78,07 \pm 8,02$	7,01	-	-
9	$1,58 \pm 0,06$	> 256	> 162,02	$0,22 \pm 0,06$	> 1.163,64
10	$1,68 \pm 0,36$	> 256	> 152,38	$0,25 \pm 0,12$	> 1.024,00
11	$6,56 \pm 0,87$	> 256	> 39,02	$2,29 \pm 0,79$	> 111,79
12	$49,01 \pm 14,58$	$122,03 \pm 15,98$	2,49	-	-
13	$43,59 \pm 5,41$	$86,06 \pm 13,66$	1,97	-	-
14	>256	> 256	ND ^d	-	-
15	>256	$145,52 \pm 6,10$	< 0,57	-	-
16	$28,76 \pm 2,67$	> 256	> 8,90	-	-
17	> 256	> 256	ND	-	-
18	$39,04 \pm 13,42$	$59,04 \pm 4,61$	1,51	-	-
19	$144,71 \pm 9,30$	> 256	> 1,77	-	-
20	> 256	> 256	ND	-	-
21	> 256	> 256	ND	-	-
22	$64,91 \pm 8,34$	> 256	> 3,94	-	-
23	> 256	> 256	ND	-	-
24	$2,75 \pm 0,09$	$160,46 \pm 14,89$	58,35	$0,47 \pm 0,10$	341,40
25	> 256	> 256	ND	-	-
26	> 256	> 256	ND	-	-
27	$30,98 \pm 3,94$	> 256	> 8,26	-	-
28	$13,29 \pm 0,92$	> 256	> 19,26	$1,50 \pm 0,23$	> 170,67
29	$3,86 \pm 0,37$	> 256	> 66,32	$0,54 \pm 0,04$	> 474,07
30	$6,57 \pm 0,27$	$170,41 \pm 9,94$	25,94	$3,31 \pm 0,52$	51,48
31	$5,43 \pm 1,89$	> 256	> 47,14	$0,25 \pm 0,14$	> 1.024
Benznidazol	$22,73 \pm 3,33$	> 256	> 11,26	$0,68 \pm 0,08$	> 376,47

^aÍndices de selectividad para epimastigotes ($IS = CL_{50} \text{ L929} / CL_{50} \text{ epimastigotes}$).

^bÍndices de selectividad para amastigotes ($IS = CL_{50} \text{ L929} / CL_{50} \text{ amastigotes}$).

^cNo determinado.

5 ^dNo evaluado en amastigotes por no alcanzar en epimastigotes el mínimo de selectividad establecido por el fármaco de referencia ($IS_{\text{Compuesto}} < IS_{\text{Benznidazol}}$).

Los cultivos de L929 se mantienen a 37 °C y 5% CO₂ en frascos de 75 cm² de superficie, utilizando medio MEM sin rojo de fenol, suplementado al 10% (v/v) con suero bovino fetal inactivado (56 °C, 30 min.), penicilina (100 UI/mL) y
10 estreptomicina (100 µg/mL).

La citotoxicidad en fibroblastos L929 se determinó mediante fluorimetría en presencia del sustrato resazurina, indicador redox que al mismo tiempo sufre un cambio de color y emite fluorescencia en presencia de células metabólicamente activas (AlamarBlue®
15 Assay, U.S. Patent No. 5,501,959).

Para la realización del ensayo, las células L929 se despegaron del frasco de cultivo mediante tripsinización. Para ello, tras retirar el medio de cultivo, se adicionó al frasco una solución de EDTA-tripsina y se incubó durante 5 min a 37 °C y 5% CO₂. Esta
20 mezcla se centrifugó 5 min a 1.500 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio MEM a una concentración de 15×10^4 L929/mL, que se distribuyó en placas de 96 pocillos colocando 100 µL/pocillo. Tras incubar las placas 3 h a 37 °C y 5% CO₂ para favorecer la adhesión de las células, se descartó el medio de cultivo y se añadieron 200 µL/pocillo de los compuestos a ensayar diluidos en MEM fresco.

25 Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C y 5% CO₂. Cada concentración se evaluó por triplicado y se incluyeron controles de crecimiento, blancos de medio y de compuesto, así como un control interno con benznidazol en cada placa. Finalmente, se añadieron 20 µL/pocillo de una solución de resazurina en 1% PBS (2 mM, pH 7) y se
30 incubaron las placas durante 3 h a 37 °C y 5% CO₂. La intensidad de fluorescencia se determinó a 535 nm (excitación) y 590 nm (emisión) en un espectrofluorímetro de placas (Infinite 200, Tecan). El porcentaje de citotoxicidad se calculó mediante comparación de la señal de fluorescencia emitida por las células tratadas con respecto

a la emitida por las células sin tratar (Fonseca-Berzal, C. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4851-4856).

Para cada compuesto se estimó la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular (CL₅₀ L929) a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta (concentración ensayada vs porcentaje de citotoxicidad en fibroblastos). Los resultados de actividad se expresan como la media de la CL₅₀ ± SD, a partir de los valores obtenidos en tres experimentos independientes (n = 3). Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 2. Puede observarse que la mayor parte de los compuestos activos frente a epimastigotes (3, 9, 10 y 24) presentan mucha menor toxicidad que el benznidazol frente a fibroblastos, por lo que sus IS para epimastigotes son muy superiores a los del fármaco de referencia.

EJEMPLO 5. Estudio *in vitro* de la actividad de los derivados de indazol sobre amastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

De la misma manera que las pruebas de actividad en epimastigotes, estos ensayos se realizaron sobre la cepa CL-B5 transfectada con el gen de la β-galactosidasa (*lacZ*) de *Escherichia coli* y se determinó la actividad de los compuestos mediante reducción del sustrato CPRG (Buckner, F. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2592-2597).

Para evaluar la actividad *in vitro* en amastigotes, forma parasitaria clínicamente relevante en la enfermedad de Chagas, se obtuvieron tripomastigotes derivados de cultivo celular (TDC) mediante la infección de cultivos de células L929 con epimastigotes en fase estacionaria de crecimiento. Los cultivos se incubaron junto con las formas infectivas durante 24 h a 33 °C y 5% CO₂ para favorecer la invasión celular. Transcurrido este tiempo, aquellos parásitos que no habían infectado a las células se retiraron mediante lavado de los cultivos con PBS. Tras adicionar medio MEM fresco, los cultivos infectados se incubaron en similares condiciones de temperatura y humedad durante 7 días, momento en el cual se obtuvieron TDC en el sobrenadante.

Las pruebas se realizaron en placas de cultivo celular de 48 pocillos (Fonseca-Berzal, C. et al., *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 1049-1056). Tras despegar las células L929 de sus frascos de cultivo celular mediante tripsinización, se distribuyeron por cada pocillo 10.000 L929 en 120 μ L de MEM y se incubaron las placas 2 h a 37 °C y 5% CO₂. Una vez adheridas las células, éstas se infectaron con TDC en proporción 1:6 (célula: parásito) y se incubaron durante 24 h a 33 °C y 5% CO₂. A continuación, se retiró el medio de cultivo, se realizaron lavados con PBS para eliminar los TDC que no penetraron en las células y se añadieron diluciones de los compuestos a ensayar en MEM fresco en un volumen final de 450 μ L/pocillo. Las placas se incubaron durante 7 días a 33 °C y 5% CO₂ y en ellas se evaluó cada concentración por triplicado, incluyéndose controles de infección, crecimiento celular, blancos de medio y de compuesto, así como un control interno con benznidazol. Una vez finalizado el tiempo de incubación con los compuestos, se procedió a revelar el ensayo mediante la adición de 50 μ L/pocillo de una solución de CPRG en 3% Tritón X-100 (concentración final 400 μ M, pH 7.4) y posterior incubación de las placas durante 3 h a 37 °C. Finalmente, se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofluorímetro de placas (Infinite 200, Tecan). Los porcentajes de actividad se estimaron mediante comparación del valor medio de absorbancia obtenido en los pocillos tratados, con respecto a la absorbancia media que presentan los controles de infección. La absorbancia correspondiente a los controles de crecimiento celular (sólo células L929) fue restada en los grupos experimental y de control de infección.

Para cada compuesto se estimó la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento de los amastigotes (CI₅₀ amastigotes) a partir de la correspondiente curva dosis-respuesta (concentración ensayada vs porcentaje de actividad en amastigotes). Los resultados de actividad se expresan como la media de la CI₅₀ para amastigotes $\pm$ SD, a partir de los valores encontrados en tres experimentos independientes (n = 3). Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 2. Puede observarse que varias indazolinonas 1,2-disustituídas [compuestos de la serie (I)] son también superiores al benznidazol (CI₅₀ = 0,68 μ M; IS > 376,47) en cuanto a actividad e índice de selectividad frente a amastigotes, destacando los productos **9**, **10**, **29** y **31** (CI₅₀ = 0,22-0,54 μ M; IS > 474,07-> 1.163,64).

EJEMPLO 6. Estudio *in vitro* de la actividad de los derivados de indazol sobre trofozoitos de *Trichomonas vaginalis*.

La búsqueda de nuevos agentes tricomonicidas sigue un modelo secuencial de cribado basando en varias fases que, a modo de filtro, permiten pasar al siguiente nivel de estudio sólo aquellos productos que muestran determinados 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 al aislado de *T. vaginalis* JH31A4, de la colección de la American Type Culture Collection (ATCC), sensible al fármaco de referencia metronidazol. Este aislado se mantiene en cultivo en medio TYM (tripticasa, extracto de levadura, maltosa), suplementado con L-cisteína, ácido ascórbico y un 10% de suero bovino fetal descomplementado. Los cultivos del parásito se mantienen en estufa a 37 °C y 5% CO₂, realizándose pases cada 48 h.

El cribado *in vitro* se lleva a cabo evaluando el porcentaje de crecimiento de un cultivo controlado tras 24 h en contacto con concentraciones crecientes del compuesto a evaluar. Para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), se prepara una solución stock de los compuestos en sulfóxido de dimetilo (DMSO), y se ensayan en un rango de seis concentraciones distintas en diluciones dobles seriadas sucesivas, partiendo de una concentración máxima de 300 µM.

En primer lugar se preparan los cultivos en tubos de vidrio con 100.000 trofozoitos/mL en un volumen final de 2 mL. Tras 5 h de incubación en estufa, se añaden 4 µL de los compuestos disueltos en DMSO (volumen final del disolvente < 0,2%). Tras 24 h de incubación a 37 °C y 5% CO₂, se reparten 200 µL de cada cultivo en placas estériles de fondo plano de 96 pocillos (Nunc). A continuación se retira el medio de cultivo tras centrifugar las placas a 2.000 rpm durante 5 min y se resuspenden los trofozoitos en el mismo volumen de tampón fosfato estéril suplementado con 0,1% de glucosa. Finalmente, se revela la prueba añadiendo 20 µL de una solución stock de resazurina 3 mM a cada pocillo. Este sustrato es un colorante redox capaz de ser reducido a resorufina por células viables. La resorufina, a diferencia de la resazurina, emite fluorescencia pudiéndose determinar el porcentaje

de viabilidad celular mediante lectura fluorimétrica. Tras una hora de incubación a 37 °C la intensidad de fluorescencia es determinada en un fluorímetro INFINITE ($\lambda_{excitación}$ 535 nm y $\lambda_{emisión}$ 590 nm), siguiendo el protocolo previamente descrito por el grupo de investigación (Ibáñez Escribano, A. et al., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2012**, 107, 637-643). En todos los ensayos se incluye un control de metronidazol 25 μ M y tres controles de crecimiento a los que se les añade el mismo volumen de disolvente (DMSO). Los resultados se calculan a partir de la media obtenida de al menos dos experimentos independientes. Todos los compuestos son evaluados por triplicado en cada ensayo, obteniéndose una DS por debajo del 10%.

Los compuestos que muestran una actividad relevante frente al aislado parasitario se sometieron también a evaluación frente al cultivo de *T. vaginalis* metronidazol-resistente IR 78. El procedimiento de cribado *in vitro* es idéntico al descrito para el aislado JH31A4.

Los resultados obtenidos para el aislado de *T. vaginalis* JH31A4 sensible a metronidazol se recogen en la Tabla 3, donde se muestran los valores de concentración que producen una inhibición del 50% del crecimiento del parásito (CI_{50}). 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 [compuestos tipo (I)] **9** y **29**, y los 3-alcoxi-2-alquilindazoles [compuestos tipo (II)] **18**, **20**, **21** y **22**. Cabe destacar los compuestos de tipo (II) **21** y **22** [3-(2-hidroxietoxi)- y 3-(3-hidroxipropoxi)indazoles], que presentaron una actividad relevante frente al parásito con valores de CI_{50} de 9,82 y 7,25 μ M, respectivamente. El derivado **22** mostró la actividad antiparasitaria más elevada logrando una inhibición de crecimiento de más del 90% a la máxima concentración evaluada, siendo superior a la actividad mostrada a la misma concentración por el metronidazol, fármaco de referencia.

El resto de moléculas ensayadas resultaron poco activas o incluso no mostraron ningún efecto sobre el crecimiento de los parásito, no pudiéndose calcular en estos casos sus valores de CI_{50} .

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos frente al aislado de *T. vaginalis* resistente a metronidazol IR 78. El valor de CI_{50} correspondiente al compuesto 22 es muy similar al obtenido con el aislado sensible a metronidazol, lo que pone en evidencia la falta de resistencia cruzada entre este compuesto y el fármaco de referencia. De este modo, el compuesto 22 puede considerarse un buen prototipo para el desarrollo de fármacos utilizables en los casos de resistencia a los 5-nitroimidazoles, para los cuales no existe un medicamento alternativo aceptado por los organismos de salud internacional.

10 **EJEMPLO 7. Estudio *in vitro* de la citotoxicidad inespecífica de los derivados de indazol frente a células Vero y determinación de los índices de selectividad (IS).**

En este estudio se analizan sólo aquellas moléculas que han mostrado una actividad significativa *in vitro* frente a *T. vaginalis* ($CI_{50} < 50 \mu M$).

15 Este ensayo se lleva a cabo sobre la línea celular Vero CCL-81 (ATCC); las células son mantenidas en botes de cultivo celular horizontal, en medio RPMI-1460 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero bovino fetal y solución de antibióticos. Las células se despegan empleando una solución estéril de EDTA-tripsina. A continuación se hace un recuento hemocitométrico con azul Tripán, añadiéndose a placas estériles de 96 pocillos una concentración de 50.000 células/100 μL /pocillo. Se mantienen las
20 placas en estufa a 37 °C y 5% CO_2 para favorecer la adhesión de las células al plástico. Tras la incubación se añaden los compuestos a las mismas concentraciones que fueron ensayadas frente a *T. vaginalis*. Tras mantener en contacto las células con los compuestos durante 24 h, se procede al revelado de la prueba añadiendo 20 μL del
25 colorante resazurina preparado a una concentración stock de 1 mM en solución PBS estéril. Las lecturas fluorimétricas se llevan a cabo tras 3 horas de incubación con el sustrato redox. Al igual que en los ensayos *in vitro* frente a *T. vaginalis*, los resultados se calculan a partir de la media obtenida tras la realización de al menos dos experimentos independientes. Cada concentración se evalúa por triplicado
30 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 resultados obtenidos en este estudio se recogen en la Tablas 3 y 4, donde se muestran los valores necesarios para inhibir un 50% del crecimiento de las células Vero (CC₅₀). Igualmente, se han estimado los índices de selectividad (IS) que determinan la toxicidad selectiva de la molécula a partir de la relación entre la CC₅₀ y la CI₅₀. Los seis compuestos ensayados (**9**, **18**, **20**, **21**, **22** y **29**) mostraron una actividad citotóxica inespecífica baja, con porcentajes de inhibición del crecimiento de células Vero < 20% a 300 µM y unos valores del IS entre 6,0 y > 41,4. Nuevamente hay que destacan los compuestos de tipo (II) **21** y **22**, que mostraron porcentajes de citotoxicidad (%C) a la máxima concentración ensayada (300 µM) muy bajas (%C₂₃ = 14,7 ± 4,3; %C₂₄ = 14,5 ± 3,2).

Tabla 3. Actividad *in vitro* frente a *T. vaginalis* JH31A4 y citotoxicidad inespecífica frente a células Vero, expresadas como CI₅₀ y CC₅₀ respectivamente.

Compuesto	CI ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM)	IS	Compuesto	CI ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM)	IS
2	260,97			16	151,47		
3	347,74			17	64,75		
4	80,21			18	18,57	538,85	29,0
5	534,57			20	43,02	> 300	> 7,0
6	ND			21	9,82	> 300	> 30,5
7	375,54			22	7,25	> 300	> 41,4
8	192,42			23	107,45		
9	17,94	> 300	> 16,7	24	258,43		
10	128,44			25	ND		
11	284,62			27	104,13		
12	418,86			28	182,01		
13	588,88			29	48,94	> 300	> 6,1
14	212,91			30	362,18		
15	197,42			31	265,63		
Metronidazol	1,43	> 600	> 100				

ND: No determinado por ausencia de actividad antiparasitaria

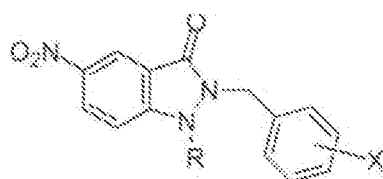
Tabla 4. Actividad *in vitro* frente a *T. vaginalis* IR 78 y citotoxicidad inespecífica frente a células Vero, expresadas como CI₅₀ y CC₅₀, respectivamente.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	IS
18	39,12	538,85	13,8
21	49,82	> 300	> 6,0
22	9,11	> 300	> 32,9
Metronidazol	5,78	> 600	> 100

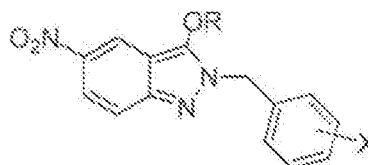
En el caso del aislado de *T. vaginalis* resistente a metronidazol, los valores del IS están comprendidos entre > 6,0 y > 32,9, presentando una vez más el compuesto **22** el máximo valor, por lo que resulta prometedor como una alternativa al fármaco de referencia.

REIVINDICACIONES

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



Fórmula (I)



Fórmula (II)

5

donde R puede ser:

- un grupo alquenilo o alquinilo de 2-6 átomos de carbono y con el enlace múltiple en cualquiera de las posiciones posibles. Se excluye específicamente la 1-alil-2-bencil-5-nitroindazolinona [compuesto tipo (I)].
- 10 - un grupo polimetilénico de longitud variable $[(CH_2)_n, n = 1-6]$ con sustituyentes terminales de tipo Br, OH, COOR (R = H o alquilo de 1-5 átomos de carbono), CONR¹R² (R¹ y/o R² = H o alquilo de 1-5 átomos de carbono), CN, OR (R = grupos alquilo o acilo de 1-5 átomos de carbono).
- un grupo etoxicarbonilo o benciloxicarbonilo.
- 15 - un grupo acilo alifático (de 1 a 5 átomos de carbono tales como formilo, acetilo o propionilo) u aromático (benzoilo o benzoilos diferentemente sustituidos en las posiciones 2, 3 o 4 con grupos tales como F, Cl, Br, OH, OR, NH₂, NO₂ o CN).
- un grupo sulfonilo alifático o aromático [metanosulfonilo o *p*-toluenosulfonilo (tosilo)].

20

y donde X puede ser cualquier sustituyente en las posiciones 2, 3 o 4 de un grupo bencilo, seleccionado entre un grupo alquilo sencillo o ramificado de 1-5 átomos de carbono, trifluorometilo (CF₃), F, Cl, Br, grupos hidroxilo (OH), alcóxido (OR; R = alquilo), grupos amino (NH₂, NR₂), nitro (NO₂) o ciano (CN). En compuestos de tipo (I), cuando R = CH₂COOH, se excluyen específicamente derivados con dos átomos de halógeno en el sustituyente bencilico.

25

o sus solvatos o profármacos.

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

- 2-Bencil-5-nitro-1-propargil-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-(2-bromoetil)-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 5 2-Bencil-1-(3-bromopropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-(metoxycarbonil)metil-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-cianometil-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-[2-(metoxycarbonil)etil]-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-[3-(etoxycarbonil)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 10 2-Bencil-1-(2-hidroxietil)-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-(3-hidroxipropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-(2-metoxietil)-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-etoxycarbonil-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-benciloxycarbonil-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 15 1-Acetil-2-bencil-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-benzoil-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-5-nitro-1-tosil-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-5-nitro-1-vinil-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-(2-carboxietil)-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 20 2-Bencil-1-(3-carboxipropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-(3-carbamoilpropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-[3-(metilcarbamoil)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-[3-(dimetilcarbamoil)propil]-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 2-Bencil-1-(3-etoxipropil)-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona
- 25 1-(2-Acetoxietil)-2-bencil-5-nitro-1,2-dihidro-3*H*-indazol-3-ona

o sus solvatos o profármacos.

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

- 2-Bencil-3-(2-bromoetoxi)-5-nitro-2*H*-indazol
- 2-Bencil-3-(3-bromopropoxi)-5-nitro-2*H*-indazol

2-Bencil-3-(metoxicarbonil)metoxi-5-nitro-2*H*-indazol

2-Bencil-3-[2-(metoxicarbonil)etoxi]-5-nitro-2*H*-indazol

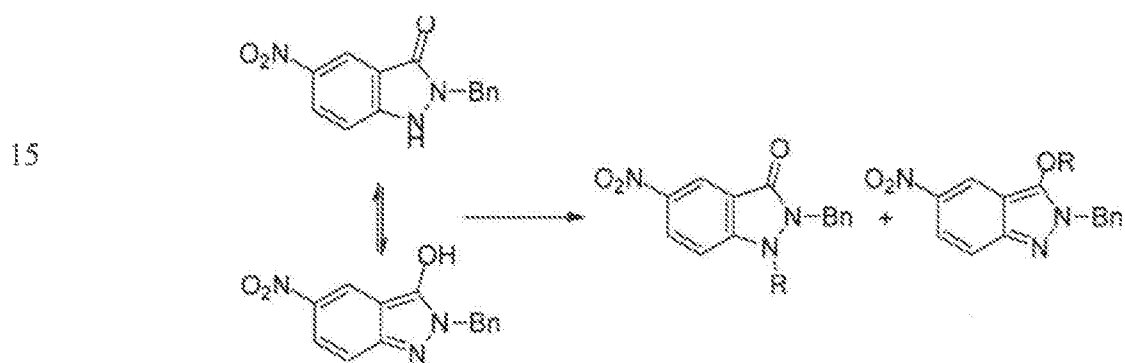
2-Bencil-3-(2-hidroxietoxi)-5-nitro-2*H*-indazol

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

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

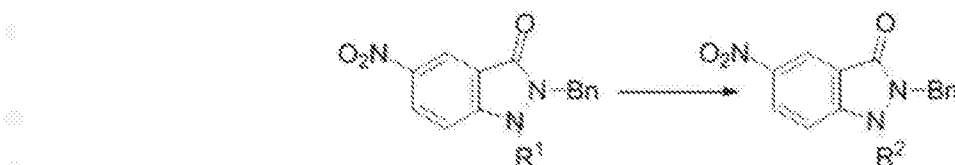
o sus solvatos o profármacos.

4. Procedimiento para la preparación de los compuestos de fórmula general (I) y (II)
10 por tratamiento de la 5-nitroindazolinona con agentes alquilantes, alcoxicarbonilantes, acilantes y sulfonilantes, según se recoge en el Esquema 1.



Esquema 1

5. Procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula general (I) por
modificación química de la cadena lateral de los compuestos de fórmula general (I)
incluidos en la reivindicación 1, según se recoge en el Esquema 2.



Esquema 2

6. Uso de los compuestos de las reivindicaciones 1-3 para la preparación de un
medicamento destinado al tratamiento de enfermedades causadas por protozoos

patógenos de las familias *Trypanosomatidae* (*Trypanosoma*, *Leishmania*) y *Trichomonadidae* (*Trichomonas*).

7. Una composición farmacéutica que incluya cualquiera de los compuestos definidos en las reivindicaciones 1-3 y, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. Una composición farmacéutica, según reivindicación 7, que, opcionalmente, puede contener también otros principios activos.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/000119

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D231/56 (2006.01)

A61K31/416 (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D, A61K

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

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

EPODOC, INVENES, WPI, REGISTRY, CAS, ESPACENET, NPL, PUBMED

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	2012, V J Arán et al, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2012, vol 22, pp 4506-4516. "Discovery of nitroheterocycles active against african trypanosomes. In vitro screening and preliminary SAR studies", the whole document	1-8
A	2012, M C Vega et al, European Journal of Medicinal Chemistry 2012, vol 58, pp 214-227. "Synthesis, biological evaluation and chemometric analysis of indazole derivatives. 1,2-disubstituted-5-nitroindazolinones., the whole document	1-8
A	2015, C Fonseca-Berzal et al, Parasitology Open 2015, vol 1, pp 1-10. "Exploring the potential activity spectrum of two 5-nitroindazolinone prototypes on different Trypanosoma Cruzi strains", obtenido in http://dx.doi.org/10.1017/pao.2015.4 > http://dx.doi.org/10.1017/pao.2015.4	1-8

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Date of the actual completion of the international search

28/12/2016

Date of mailing of the international search report

(10/01/2017)

Name and mailing address of the ISA

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer

M. Fernández Fernández

Telephone No. 91 3495489

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/000119

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D231/56 (2006.01)

A61K31/416 (2006.01)

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C07D, A61K

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

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

EPODOC, INVENES, WPI, REGISTRY, CAS, ESPACENET, NPL, PUBMED

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	2012, V J Arán et al, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2012, vol 22, pp 4506-4516. "Discovery of nitroheterocycles active against african trypanosomes. In vitro screening and preliminary SAR studies", todo el documento	1-8
A	2012, M C Vega et al, European Journal of Medicinal Chemistry 2012, vol 58, pp 214-227. "Synthesis, biological evaluation and chemometric analysis of indazole derivatives. 1,2-disubstituted-5-nitroindazolinones., todo el documento	1-8
A	2015, C Fonseca-Berzal et al, Parasitology Open 2015, vol 1, pp 1-10. "Exploring the potential activity spectrum of two 5-nitroindazolinone prototypes on different Trypanosoma Cruzi strains", obtenido en http://dx.doi.org/10.1017/pao.2015.4 > http://dx.doi.org/10.1017/pao.2015.4	1-8

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

28/12/2016

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.

10 de enero de 2017 (10/01/2017)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado

M. Fernández Fernández

Nº de teléfono 91 3495489