

(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
25 de enero de 2018 (25.01.2018)



(10) Número de publicación internacional
WO 2018/015595 A2

(51) Clasificación internacional de patentes:
Sin clasificar

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2017/070502

(22) Fecha de presentación internacional:
11 de julio de 2017 (11.07.2017)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201630944 11 de julio de 2016 (11.07.2016) ES
P201730208 20 de febrero de 2017 (20.02.2017) ES

(71) Solicitante: UNIVERSIDAD DE GRANADA [ES/ES];
HOSPITAL REAL., AVDA. DEL HOSPICIO S/N, 18071
GRANADA (ES).

(72) Inventores: GÓMEZ VIDAL, José Antonio; UNIVE-
RSIDAD DE GRANADA, Dpto. de Química Farmacéu-
tica y Orgánica, 18071 Granada (ES). DÍAZ GAVI-
LÁN, Mónica; UNIVERSIDAD DE GRANADA, Dpto. de
Química Farmacéutica y Orgánica, 18071 Granada (ES).
FRANCO MONTALBÁN, Francisco; UNIVERSIDAD
DE GRANADA, Dpto. de Química Farmacéutica y Or-
gánica, 18071 Granada (ES). MORILLAS MÁRQUEZ,
Francisco; UNIVERSIDAD DE GRANADA, Dpto. de Pa-
rasitología, 18071 Granada (ES). CORPAS LÓPEZ, Vic-
toriano; UNIVERSIDAD DE GRANADA, Dpto. de Pa-
rasitología, 18071 Granada (ES). MARTÍN SÁNCHEZ,
Joaquín; UNIVERSIDAD DE GRANADA, Dpto. de Pa-
rasitología, 18071 Granada (ES). LÓPEZ-VIOTA GA-
LLARDO, Margarita; UNIVERSIDAD DE GRANADA,

Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, 18071 Gra-
nada (ES). LÓPEZ-VIOTA GALLARDO, Julián; UNI-
VERSIDAD DE GRANADA, Farmacia y Tecnología Far-
macéutica, 18071 Granada (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, JO, JP, KE, KG, KH,
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:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada
nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))

(54) Title: COMPOUNDS FOR THE TREATMENT OF DISEASES CAUSED BY LEISHMANIA GENUS PARASITES

(54) Título: COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES CAUSADAS POR PARÁSITOS DEL GÉNERO LEISHMANIA

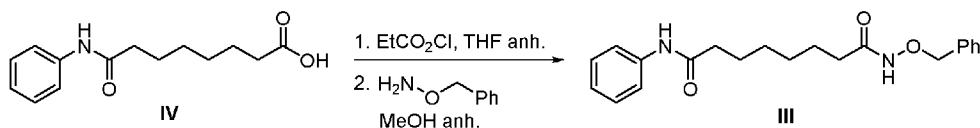


Figura 1

(57) Abstract: The present invention relates to a family of compounds which are effective against parasites of the genus *Leishmania*, preferably caused by *L. infantum*, *L. major* or *L. tropica*, and which have low toxicity, even at high doses of the compound. The invention also relates to pharmaceutical compositions, preferably suitable for oral or topical administration, comprising the aforementioned compounds, and to the use thereof as a drug for the treatment of visceral, canine or cutaneous leishmaniasis.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a una familia de compuestos que resultan efectivos frente a parásitos del género *Leishmania*, preferentemente causadas por *L. infantum*, *L. major* o *L. tropica*, y que presentan una baja toxicidad incluso a dosis altas del compuesto. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas, preferentemente aptas para administración oral o tópica, que comprenden esos compuestos y a su uso como medicamento para el tratamiento de leishmaniosis visceral, canina o cutánea.



WO 2018/015595 A2

**COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES CAUSADAS
POR PARÁSITOS DEL GÉNERO LEISHMANIA**

SECTOR DE LA TÉCNICA

5

La presente invención se encuadra en general en el campo de la biomedicina y en particular se refiere a un nuevo compuesto útil como medicamento, preferentemente útil para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos del genero *Leishmania*.

10

ESTADO DE LA TECNICA

Leishmaniosis

15

La leishmaniosis es una enfermedad de transmisión vectorial causada por protozoos parásitos del género *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) y transmitida por la picadura de la hembra de flebotomos (Insecta, Diptera, Phlebotomidae) pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. Es una de las enfermedades más importantes dentro de las enfermedades tropicales y está incluida dentro de las "*Neglected Tropical Diseases*" o enfermedades tropicales olvidadas. A pesar de ello no está limitada a zonas tropicales y subtropicales, y se da también con carácter endémico en zonas templadas como nuestro país. El espectro clínico de la leishmaniosis es amplio y abarca desde una forma cutánea estricta que puede curar de forma espontánea dejando cicatriz, hasta una forma grave y mortal sin tratamiento como es la leishmaniosis visceral. Según la Organización Mundial de la Salud, hasta 350 millones de personas se encuentran en riesgo de padecer leishmaniosis en 98 países de zonas templadas y tropicales del planeta. Se considera que aproximadamente 12 millones de personas están actualmente infectadas, y cada año se producen 2 millones de casos nuevos, de los cuales 500.000 casos son de tipo visceral.

20

25

30

Las especies de *Leishmania* muestran dos fases morfológicas durante su ciclo de vida:

- Promastigote, con forma alargada y móvil con un flagelo anterior, en el intestino del vector.

35

- Amastigote, con forma esférica u ovoide y sin flagelo visible al microscopio óptico, que se reproduce de forma obligada dentro de las células del sistema retículo endotelial del hospedador vertebrado (hombre y diversas especies de animales en función de la especie de *Leishmania*).

5

De la veintena de especies responsables de la leishmaniosis, únicamente dos, *L. donovani* y *L. infantum* (sinónimo *L. chagasi*) causan leishmaniosis visceral. *L. infantum* es la única especie identificada que causa tanto la enfermedad visceral como la cutánea. Además, también se ha identificado como agente causal de leishmaniosis cutáneo-mucosa y mucosa. Mientras en la leishmaniosis visceral el parásito prolifera en la médula ósea, el hígado y el bazo, órganos en los que abundan las células del sistema retículo endotelial, en la forma cutánea el parásito permanece en el sitio de picadura del flebotomo, lo que puede causar úlceras de larga duración que terminan por dejar cicatrices desfigurantes. Como decíamos anteriormente, la enfermedad en su forma visceral es mortal si no es tratada correctamente. *L. infantum* es la especie con distribución más amplia estando presente en 61 de los 98 países endémicos de leishmaniosis. *L. infantum* es endémica en todos los países de la Cuenca Mediterránea. A diferencia de *L. donovani*, la leishmaniosis debida a *L. infantum* es una zoonosis, siendo el principal reservorio el perro. En España, la prevalencia de leishmaniosis canina en muestreos aleatorios usando técnicas serológicas, varía entre el 5 y 30%, y pueden alcanzar valores del 100% en algunos focos si se usa la técnica de PCR [Martín-Sánchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Barón S, Díaz V, Morillas-Márquez F. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. Emerg Infect Dis. 2009 May;15 (5):795-8. doi: 10.3201/eid1505.080969]. Estas elevadas prevalencias de infección son un considerable factor de riesgo para la emergencia de la enfermedad en humanos. En el perro, *L. infantum* causa la leishmaniosis canina que es un síndrome multisistémico de muy difícil curación por la falta de colaboración del sistema inmune del animal. Hasta ahora, ninguno de los fármacos utilizados para el tratamiento de la leishmaniosis canina (que son los mismos usados en el hombre) permite la eliminación completa del parásito en el animal. En España puede haber entre 6 y 13 millones de perros. Aunque las prevalencias de leishmaniosis canina varían entre regiones y según la técnica empleada, podemos estimar que el 30% de ellos están infectados; esto nos daría 2,8 millones de perros con leishmaniosis canina como potenciales receptores de fármacos frente a la

35

leishmaniosis, sólo en España. A ellos habría que sumar los existentes en otros países endémicos como Portugal, Francia, Italia, Brasil, etc., además de otros no endémicos. Por ejemplo, en Alemania, a pesar de no ser un país endémico de leishmaniosis, se estima que hay 20.000 perros con leishmaniosis canina adquirida durante las vacaciones en los países de la Cuenca Mediterránea que serían también potenciales receptores.

Por otro lado, la leishmaniosis cutánea es endémica en más de 70 países, con una incidencia de 1,2 millones de casos por año. Está causada por diversas especies de *Leishmania*, principalmente por *L. tropica* y *L. major*. También *L. infantum* (sinónimo *L. chagasi*) causan leishmaniosis cutánea aunque en este último caso, la leishmaniosis suele visceralizar en los animales. *L. tropica* es la principal causa de leishmaniosis cutánea en Oriente Medio y algunas zonas del norte de África. En Marruecos, es la especie más extendida geográficamente y es causa frecuente de brotes epidémicos.

Tratamiento de la Leishmaniosis

Los fármacos actualmente utilizados para el tratamiento de la leishmaniosis presentan diversos problemas, incluida la toxicidad para el hospedador, los efectos adversos, la aparición de resistencias y el elevado coste. Entre ellos, los derivados de antimonio pentavalente, como antimoniato de meglumina o metilglucamina antimoniato (Glucantime®) han sido considerados de primera elección durante un largo periodo de tiempo, a pesar de su elevada toxicidad. No obstante, el antimoniato de meglumina no es apto para administración oral dado que se absorbe mal y es sumamente irritante para el tracto gastrointestinal, por lo que hay que administrarlo por vía parenteral o por inyección local.

La pentamidina, la anfotericina B y la paromomicina han sido considerados como fármacos de segunda elección, aunque últimamente la anfotericina B liposomal está sustituyendo a los derivados del antimonio como fármaco de elección en algunas zonas geográficas. No obstante, la pentamidina y la anfotericina B tienen una toxicidad elevada que se consigue reducir con las formulaciones lipídicas de ésta última pero elevando considerablemente el precio. Por otro lado, la paromomicina tampoco se absorbe por vía oral, por lo que debe administrarse por

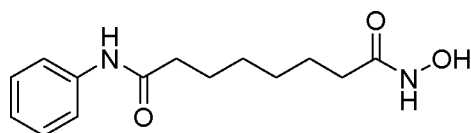
vía parenteral o por vía tópica; se excreta por el riñón sin metabolizarse e induce nefrotoxicidad y ototoxicidad, al igual que otros aminoglucósidos [Ramos, J. y Segovia, M. - Revista española de Quimioterapia, 1997. p 26].

- 5 El último fármaco incorporado al arsenal terapéutico de la leishmaniosis es la miltefosina, que concebida inicialmente como fármaco antineoplásico, tiene la ventaja de permitir una administración oral pero no está exenta de toxicidad, tiene problemas de resistencias [Mondelaers A, y otros. "Genomic and Molecular Characterization of Miltefosine Resistance in *Leishmania infantum* Strains with
- 10 Either Natural or Acquired Resistance through Experimental Selection of Intracellular Amastigotes". PLoSOne. 2016 Apr 28;11(4):e0154101. doi: 10.1371/journal.pone.0154101] y provoca efectos adversos gastrointestinales, además de ser potencialmente teratogénico y abortivo.
- 15 En cuanto a la leishmaniosis cutánea, no existe actualmente un tratamiento satisfactorio. La evolución de las lesiones tiende a la cronicidad, curando espontáneamente en varios meses aunque dejando cicatriz que en algunos casos puede llegar a la desfiguración o requerir cirugía ya que la zona más afectada suele ser la cara. Entre otras medidas existentes se emplean antimoniales pentavalentes,
- 20 parenterales o intralesionales, con numerosos efectos secundarios, o crioterapia aplicando nitrógeno líquido sobre la lesión. Recientemente se está probando la paromomicina tópica y la anfotericina B tópica. La anfotericina B deoxicolato es activa frente a *Leishmania*, pero los efectos adversos son frecuentes (hiperpirexia, malestar general, hipotensión, tromboflebitis, daño renal, hipopotasemia, anemia y
- 25 hepatitis). La anfotericina B liposomal es menos tóxica aunque su coste ha limitado su uso en leishmaniasis cutánea. Por otro lado, la paromomicina tópica (Leshcutan®) no está disponible en España ni en Estados Unidos y debe reservarse para los casos sin riesgo de afectación mucosa.

30

Inhibidores de HDAC con actividad frente a la Leishmaniosis

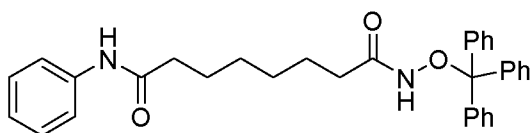
El fármaco vorinostat (también denominado SAHA) (Fórmula I) es un inhibidor de histonas desacetilasas (HDAC) que posee actividad frente a *Leishmania* [9, 10].



I

Vorinostat presenta como principal desventaja su toxicidad a concentraciones elevadas.

- 5 Por otra parte, la patente ES 2 402 252, solicitada por la Universidad de Granada, describe una estructura con fórmula II que posee actividad frente a *Leishmania*.



II

- 10 Al igual que ocurre con antimonio de meglumina, el compuesto II no es apto para administración oral ya que no es químicamente estable a pH bajo. El grupo químico tritilo, presente en el compuesto II, es un conocido grupo protector inestable a pH ácido (4 y menor).

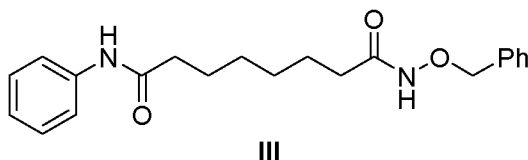
- 15 Existe pues la necesidad de encontrar un medicamento para el tratamiento de la infección por *Leishmania*, que solucione los problemas descritos en el estado de la técnica, especialmente que aporte una mayor eficacia en la eliminación del parásito, menor toxicidad y efectos adversos para el paciente (hospedador) y que permita la posibilidad de administración oral y tópica.

- 20 El uso de sistemas de vehiculización y liberación tales como nanopartículas puede resolver problemas de solubilidad de compuestos de naturaleza hidrofóbica cuya utilización *in vivo* sería inviable, además de mejorar la eficacia y disminuir efectos adversos.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una familia de compuestos efectivos frente a Leishmaniosis o enfermedades causadas por parásitos del genero *Leishmania*, preferentemente causadas por *L. infantum*, *L. major* o *L. tropica*.

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al compuesto de fórmula III:



5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al compuesto de fórmula III según se ha descrito anteriormente y excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al compuesto de fórmula III soportado sobre nanopartículas farmacéuticamente
10 aceptables, preferentemente nanopartículas de oro.

En un tercer aspecto la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula III o de las composiciones farmacéuticas que lo comprenden como medicamento. De forma particular la invención se refiere a su uso como medicamento para el tratamiento de Leishmaniosis o enfermedades causadas por parásitos del genero *Leishmania*,
15 más preferentemente *L. infantum*, *L. major* o *L. tropica*.

En una realización particular, la invención se refiere al uso del compuesto de fórmula III o de las composiciones farmacéuticas que lo comprenden para el tratamiento o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de Leishmaniosis cutánea.

20 En otra realización particular, la invención se refiere al uso del compuesto de fórmula III o de las composiciones farmacéuticas que lo comprenden para el tratamiento o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de Leishmaniosis visceral o Leishmaniosis canina.

En otro aspecto, la invención se refiere a preparaciones combinadas de compuestos de fórmula III y otros compuestos o fármacos empleados para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos del género *Leishmania*, , así como a un método de tratamiento de dichas enfermedades que emplea una de estas preparaciones combinadas.
25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Esquema de síntesis del compuesto III.

5

Figura 2.- Imagen obtenida por microscopía de las nanopartículas. En la imagen superior se observan sólo los núcleos de oro sin compuesto; en la inferior, las nanopartículas están vehiculizando el compuesto y se observa una corona alrededor de los núcleos de oro que casi duplica el tamaño hidrodinámico de las partículas de la imagen superior.

10

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

15

El término "nanopartículas" como se describe en la presente invención se refiere a partículas de menos de 1 micrómetro en alguna de sus dimensiones, preferentemente en un rango de 10 a 900 nanómetros.

20

El término "tratamiento" o "tratar" en el contexto de este documento se refiere a la administración de un compuesto o una composición según la invención para mejorar o eliminar una enfermedad, condición patológica o uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad o condición en un mamífero, preferentemente en cánidos o humanos, más preferentemente en perros. "Tratamiento" también abarca la mejora o eliminación de las secuelas fisiológicas de la enfermedad. Concretamente, el concepto "tratar" se puede interpretar como:

25

- i. Inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- ii. Aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causa la regresión de la enfermedad o la condición patológica;
- iii. Estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

30

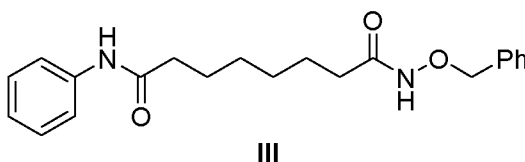
A lo largo de la descripción y las reivindicaciones el término "comprende", que también podrá interpretarse como "consiste en", y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los

expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

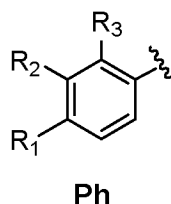
Compuestos de la invención

5

En un primer aspecto de la invención, la presente invención se refiere a compuestos ("compuestos de la invención"), de fórmula III



10 Donde Ph es un fenilo de fórmula:



Siendo:

15 R1 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO₂.R2 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO₂R3 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO₂20

En una realización particular, los compuestos de la invención se presentan en forma cristalina como compuestos libres o solvatados (por ejemplo hidratos) o como enantiómeros, isómeros, o sales de dichos compuestos estando todas estas formas comprendidas en el ámbito de protección de la presente invención. Los métodos de solvatación son generalmente conocidos en el estado de la técnica.

25

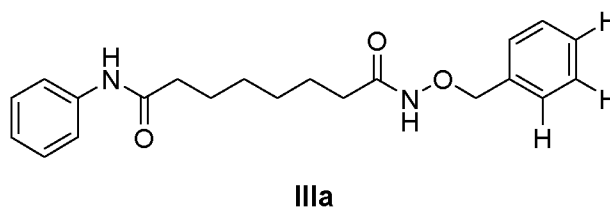
También quedan comprendidos en el ámbito de la presente invención los profármacos de los compuestos de la invención.

30

En una realización particular los compuestos de la invención son compuestos de fórmula III caracterizados por que R1=H o R2=H o R3=H.

En una realización aún más particular, los compuestos de la invención son compuestos de fórmula III caracterizados porque al menos dos de los tres radicales del fenilo están formados por hidrógeno. Es decir, compuestos de fórmula III
5 caracterizados por que $R_1=R_2=H$ o $R_1=R_3=H$ o $R_2=R_3=H$.

En una realización preferente, la invención se refiere a compuestos de fórmula IIIa consistentes en compuestos de fórmula III caracterizados por que los tres radicales del fenilo están formados por hidrógeno. Es decir, compuestos de fórmula III
10 caracterizados por que $R_1=H$, $R_2=H$ y $R_3=H$.



Composiciones farmacéuticas

15 En un segundo aspecto, la invención proporciona formulaciones, formas o composiciones farmacéuticas, en adelante "composiciones de la invención" que comprenden como ingrediente activo una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto de la invención, en particular un compuesto de los detallados
20 en las realizaciones preferidas del primer aspecto de la invención. Dichas formulaciones puede contener cualquier otro ingrediente activo en el tratamiento de leishmaniosis o bien caracterizarse por contener como principio activo únicamente un compuesto de la invención o una combinación de compuestos de la invención.

25 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a aquella cantidad de un compuesto de la invención que cuando se administra a un mamífero, preferentemente cánidos y humanos, y entre los cánidos, más preferentemente perros, es suficiente para producir el tratamiento, tal
30 como se define más abajo, de una enfermedad o condición patológica de interés en el mamífero, con preferencia cánidos y humanos, y entre los cánidos, más preferentemente perros. La cantidad de un compuesto de la invención que

constituye una cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la actividad del compuesto específico empleado; la estabilidad metabólica y duración de la acción del compuesto; la especie (preferentemente humana o canina), la forma clínica de la enfermedad humana (preferentemente visceral, cutánea o mucosa), la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; la vía de administración, dada la posibilidad de administración oral o sistémica; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la condición patológica particulares; y el sujeto que se somete a terapia, pero puede ser determinada por un especialista en la técnica según su propio conocimiento y esa descripción.

Po otro lado, de acuerdo con la presente invención, la "forma farmacéutica" es la disposición individualizada a la que se adaptan los fármacos (principios activos) y excipientes (materia farmacológicamente inactiva) para constituir un medicamento.

Los compuestos de la invención, III, por su naturaleza hidrofóbica, hacen que sea inviable su utilización in vivo a menos que estén vehiculizados. En particular, el compuesto III en medio acuoso agrega rápidamente, imposibilitando su administración parenteral.

Así, dichas composiciones farmacéuticas comprenden uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en las formulaciones de la invención son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas. Un ejemplo de vehículo farmacéuticamente aceptable es una nanopartícula de oro con un tamaño adecuado para su administración.

Opcionalmente la composición farmacéutica puede comprender otro principio activo. Además del requerimiento de la eficacia terapéutica, que puede necesitar el uso de agentes terapéuticos, además de los compuestos de la invención, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso de una combinación de un compuesto de la invención y otro agente

terapéutico, tal y como en el tratamiento de enfermedades o afecciones que directa o indirectamente modulan la función de la sustancia.

Las formulaciones pueden contener además excipientes.

5

Los excipientes y los vehículos empleados tienen que ser farmacéutica y farmacológicamente tolerables, de modo que puedan ser combinados con otros componentes de la formulación o preparación y no ejerzan efectos adversos en el organismo tratado. Las composiciones farmacéuticas o formulaciones incluyen aquellas que son adecuadas para la administración oral o parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), aunque la mejor vía de administración depende del estado del paciente. Las formulaciones pueden ser en forma de dosis sencillas. Las formulaciones se preparan de acuerdo con métodos conocidos en el campo de la farmacología. Las cantidades de sustancias activas para administrarse pueden variar en función de las particularidades de la terapia.

10

15

Las composiciones de la invención se preparan utilizando métodos habituales tales como aquéllos descritos o a los que se hace referencia en las Farmacopeas Española y Estadounidense y textos de referencia similares.

20

Formulación en nanopartículas

En una realización preferente de las composiciones de la invención el compuesto de la invención III está soportado sobre nanopartículas farmacéuticamente aceptables, más preferentemente sobre nanopartículas de oro.

25

En una realización particular, las nanopartículas de oro empleadas como vehículos transportadores del compuesto de la invención están recubiertas por citrato sódico.

30

En otra realización particular las nanopartículas de oro empleadas como vehículos transportadores del compuesto de la invención tienen un tamaño aproximado de entre 20 y 30 nm, preferentemente entre 22 y 26 nm.

El compuesto III así funcionalizado ha demostrado tener unas características de solubilidad mucho mejores que el compuesto solo, sin que su efectividad disminuya.

35

Composiciones tópicas

5 En el contexto de la presente invención, por "vía tópica" se entiende la vía de administración de fármacos que utiliza la piel y las mucosas.

10 Para su administración por vía tópica, preferentemente sobre el tejido lesionado o las lesiones producidas por parásitos del género Leishmania, en particular Leishmaniosis cutánea, las composiciones de la invención son composiciones adecuadas para su administración tópica. De forma preferente, las composiciones de la invención comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto III, preferentemente una concentración de III igual o superior al 0.5% p/p), más preferentemente en una concentración del compuesto III igual o superior al 2%.

15 De forma preferente las composiciones de la invención son lipófilas.

Preparaciones combinadas

20 Los compuestos III no actúan sobre las enzimas del citocromo P450 por lo que no debe interaccionar *in vivo* sobre otros fármacos y admitiría su uso combinado con otros fármacos en el tratamiento de la leishmaniosis.

25 El término "preparación combinada" o también denominada "yuxtaposición", en esta memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo en una composición verdadera, para poder encontrarse disponibles para su aplicación combinada, separada o secuencial. De esta manera, la expresión "yuxtapuesta" implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación

30 física de los componentes.

Así, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición, preparación o forma farmacéutica, de ahora en adelante "preparación combinada de la invención", que comprende:

35 a) un compuesto de fórmula general III, y

b) otro principio activo frente a Leishmaniosis.

En una realización particular, la preparación combinada de la invención comprende

- 5 a) un compuesto de fórmula general III, y
 b) un compuesto de fórmula general II.

Kit de la invención

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit ("*kit-de-partes*", del inglés "*kit of parts*") para la preparación de la composición o de la preparación combinada de la invención.

15 El término "kit", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una combinación de un conjunto de componentes adecuados para la obtención de la composición o de la preparación combinada de la invención, que pueden estar o no empaquetados juntos, junto con sus contenedores y envases apropiados para su venta comercial, etc.

20 En la presente invención, se entiende como "*componente adecuado para la obtención de la composición o de la preparación combinada de la invención*", a cualquier compuesto que puede usarse para la obtención de las mismas, e incluye, sin limitación, soluciones acuosas, preparados sólidos, tampones, jarabes, soluciones de preservación, aromatizantes, correctores de pH, espesantes, etc.

25 Los componentes del kit se pueden proporcionar en viales separados (en forma de "*kit- de-partes*") o en un único vial. Además, se entiende que el kit de la presente invención está destinado a la preparación de la composición o de la preparación combinada o de la forma farmacéutica (por ejemplo, de la solución oral, colutorio, enjuague, gargarismo, elixir, etc.) de la invención. Preferiblemente, los
30 componentes del kit de la presente invención están listos para ser usados para preparar la composición o la preparación combinada o la forma farmacéutica de la presente invención. Además, el kit contiene preferiblemente instrucciones explicativas acerca de cómo preparar la composición o la preparación combinada

o la forma farmacéutica de la presente invención. Las instrucciones se pueden proporcionar a los usuarios en forma electrónica o en papel.

5 Por lo tanto, la invención proporciona un kit para la preparación de la composición de la invención o de la preparación combinada de la invención un recipiente que comprende un envase con el compuesto de fórmula general III en cualquier formulación farmacéuticamente aceptable, junto con componentes adecuados para la obtención de la composición o de la preparación combinada de la invención.

10 De forma particular, el kit de la invención comprende, además, un envase con el compuesto de fórmula general II en cualquier formulación farmacéuticamente aceptable.

15 En una realización preferente, el compuesto de fórmula general III se encuentra soportado sobre nanopartículas farmacéuticamente aceptables, más preferentemente sobre nanopartículas de oro.

Uso de los compuestos de la invención

20

Un tercer aspecto de la invención consiste en el uso de los compuestos y/o las composiciones y/o las preparaciones combinadas y/o el kit de la invención como medicamento o para la elaboración de un medicamento. En una realización particular dicho medicamento es apto para el tratamiento de Leishmaniosis o enfermedades causadas por parásitos del genero *Leishmania*, más preferentemente *L. infantum*, *L. major* o *L. tropica*., y más preferentemente para el tratamiento de Leishmaniosis visceral, Leishmaniosis canina y/o Leishmaniosis cutánea.

25

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de pacientes afectados por Leishmaniosis, en adelante “método de tratamiento de la invención” mediante el uso de los compuestos y/o las composiciones y/o las preparaciones combinadas y/o el kit de la invención. Los efectos de este método de tratamiento incluyen, pero no se limitan, a los efectos de eliminación de la enfermedad, el incremento del tiempo de progresión de la enfermedad y al índice

de supervivencia. Los efectos del tratamiento incluyen a más largo plazo el control de la enfermedad.

5 Este tratamiento consiste en la administración a los individuos afectados por estas enfermedades de cantidades terapéuticamente efectivas de un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que lo incluya.

10 En una realización preferente, la enfermedad que se trata empleando compuestos y/o las composiciones y/o las preparaciones combinadas y/o el kit de la invención y/o el método de tratamiento de la invención es Leishmaniosis visceral, Leishmaniosis canina y/o Leishmaniosis cutánea.

15 En otra realización preferente, la enfermedad que se trata empleando los compuestos y/o las composiciones y/o las preparaciones combinadas y/o el kit de la invención y/o el método de tratamiento de la invención es leishmaniosis cutánea.

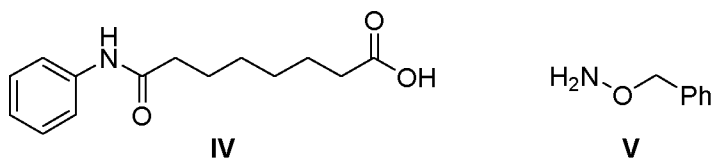
20 Para el tratamiento de leishmaniosis cutánea se emplea, preferentemente, una composición adecuada para su administración tópica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto III, preferentemente una concentración de III igual o superior al 0.5% p/p), más preferentemente en una concentración del compuesto III igual o superior al 2%. De forma preferente dicha composición adecuada para ser utilizada de forma tópica es lipófila.

25 La administración de los compuestos de la invención, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada, o en combinación con otros compuestos, composiciones o medicamentos, se puede llevar a cabo por medio de los modos de administración de agentes aceptados para servir a similares utilidades.

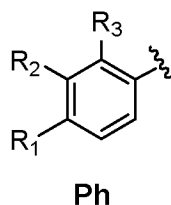
30

Procedimiento de síntesis de los compuestos de la invención

35 El procedimiento empleado para sintetizar los compuestos de la invención comprende [Figura 1] hacer reaccionar en una disolución un ácido de formula IV, con bencilhidroxil amina de formula V.



Donde Ph es un fenilo de fórmula



Siendo:

R1 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO2

R2 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO2

R3 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO2

Preferentemente la disolución se realizará en metanol/THF anhidro manteniendo la reacción en atmosfera de argón.

En una realización preferente, el compuesto de formula general III se obtiene a partir de una disolución con el derivado del ácido carboxílico de fórmula general IV (1 equiv.) cloroformiato de etilo (1.35 equiv.), trietilamina (3.5 equiv.) y bencilhidroxil amina (1.7 equiv.) en THF/metanol. La reacción debe mantenerse a 0° C y atmosfera de argón.

Funcionalización de III con nanopartículas de oro

En una realización preferente, las composiciones de la invención comprende el compuesto III funcionalizado con nanopartículas de oro.

Para llevar a cabo la funcionalización de las partículas de oro con el compuesto III, se añade gota a gota la suspensión de partículas de oro a la solución del compuesto en dimetilsulfóxido (DMSO), preferentemente al 0.5%, y Triton X100, preferentemente al 0.1%. A continuación, la suspensión obtenida se añade gota a gota sobre una solución

de Albúmina de Suero Bovino (*Bovine Serum Albumina* o BSA), preferentemente al 1 %. Tras una incubación durante al menos 2 horas, se concentran las partículas por centrifugación y se resuspenden en tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (Phosphate Buffered Saline o PBS) pH 7.2.

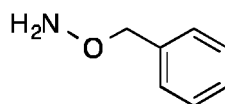
5

MODOS DE REALIZACIÓN

- 10 Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención:

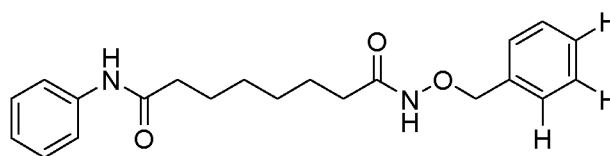
Ejemplo de síntesis de compuestos de la invención

- 15 El compuesto O-bencilhidroxamato, **IIIa**, fue obtenido según un esquema de reacción (Figura 1) que deriva del procedimiento para síntesis de ácidos hidroxámicos. Así, el compuesto de formula **IIIa** se obtiene a partir de una disolución con el derivado del ácido carboxílico de fórmula **IV** (1 equiv.), en THF anhidro bajo argón. La solución se enfría y se adiciona el cloroformiato de etilo
- 20 (1.35 equiv.) seguido de trietilamina (3.5 equiv.). La mezcla se agita a baja temperatura en atmósfera de argón. El sólido precipitado obtenido se filtra y el líquido filtrado se adiciona a una disolución que contiene el compuesto de fórmula **Va** (1.7 equiv.) disuelto en metanol anhidro.

**Va**

25

- Se mantiene en agitación durante 1.5 h a temperatura ambiente, tiempo tras el cual la reacción se diluye con acetato de etilo y se realiza un lavado con agua destilada (3x 15 mL). La fase orgánica resultante se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y
- 30 se concentra a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash utilizando una mezcla de diclorometano y metanol como eluyente para obtener **IIIa** (sólido blanco, 28 mg, 40% rendimiento).

**IIIa**

- 5 Mp 130-131 °C. ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 7.54 (m, 2H), 7.33-7.25 (m, 7H), 7.08 (m, 1H), 4.75 (s, 2H), 2.52 (m, 2H), 2.36 (m, 2H), 1.70-1.65 (m, 4H), 1.41 (m, 4H); ¹³C RMN (125 MHz, CD₃OD) δ 176.1, 174.6, 139.9, 138.0, 129.7, 129.5, 129.3, 128.5, 125.1, 121.3, 52.9, 37.9, 33.1, 30.1, 30.0, 26.8, 25.8; HRMS (ESI) m/z calculado para C₂₁H₂₇N₂O₃ [M + H]⁺ 355.2022, encontrado 355.2025. Pureza según HPLC (λ=254): 100%, t_R= 11.14 min.
- 10 Método HPLC: Solución A (H₂O:ACN 70:30 + 0.1% HCOOH), solución B (ACN 100% + 0.1% HCOOH); solución isocrática A 2 min.; gradiente desde A B 13 min; solución isocrática B 5 min.

15 **Conservación de los compuestos**

El compuesto **IIIa** se puede conservar a 4°C durante al menos 6 meses sin que se produzcan cambios aparentes en sus características físico-químicas ni pérdidas de actividad.

- 20 Por otro lado, el compuesto **IIIa** es químicamente estable a pH 2 y pH 5, lo que permite su administración oral.

Síntesis de partículas inorgánicas de oro-fármaco del compuesto IIIa

- 25 Inicialmente, las nanopartículas de oro fueron sintetizadas de acuerdo con el método descrito por Turkevich [J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, Discuss. Trans. Faraday Soc. 11 (1951) 55], basado en la reducción de sales de oro en presencia de citrato a altas temperaturas.
- 30 De acuerdo con el mismo, se preparó una solución de 4.5mg de tetracloroaurato (III) sódico dihidratado en un volumen de 25 mL. Bajo agitación magnética constante se sometió a la solución a temperatura de 180 °C bajo reflujo. Alcanzada esta condición,

se añadió a la solución de oro, 1mL de una solución al 1% de citrato de sodio. Se dejó crecer a las partículas en presencia de los iones citrato durante un tiempo nunca inferior a 20 minutos. Posteriormente se dejó que la suspensión de partículas alcanzase temperatura ambiente antes de ser empleada. El resultado es una
5 suspensión estable de partículas de oro, de color rojo vino.

Para llevar a cabo la funcionalización de las partículas de oro con el compuesto **IIIa**, en primer lugar se disolvió el compuesto a una concentración 0.25 % en una solución compuesta por Dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.5 % y Triton X100 al 0.1 %. Una vez
10 disuelto el compuesto **IIIa** se le añade gota a gota 20 mL de suspensión de partículas de oro. Inmediatamente después, se añade gota a gota la suspensión de partículas de oro funcionalizadas con el compuesto **IIIa** sobre una solución al 1 % de BSA. Se deja incubar durante un mínimo de 2 horas en presencia de BSA, y seguidamente después, se centrifuga a 14000 rpm para eliminar el exceso de BSA presente en el
15 medio de las partículas conjugadas. Una vez centrifugadas las partículas, se retira el sobrenadante y se resuspenden en PBS pH 7.2 previo a su utilización.

Se ha comprobado que las suspensiones iniciales que tienen un color rosáceo, tienden a cambiar de color hacia el azul, cuando el volumen en el que se resuspenden
20 las partículas es bajo. Por esta razón, con el fin de evitar la agregación de las partículas, se procede a resuspender en volúmenes superiores a 5 mL.

Mediante medidas realizadas por técnicas de dispersión de luz (*dynamic light scattering*) y por microfotografías obtenidas por Microscopía de Transmisión de
25 electrones como las mostradas en la imagen inferior, se ha determinado un tamaño aproximado para las partículas de oro empleadas como vehículos transportadores del fármaco **IIIa**, de (24 ± 2) nm. La presencia de **IIIa** y BSA se observa claramente mediante técnicas de dispersión de luz, como una corona alrededor de los núcleos de oro, llegando a duplicarse el tamaño hidrodinámico de las partículas (47 ± 8) nm
30 [Figura 2]. Las suspensiones tienen un color rosáceo.

La adsorción del fármaco **IIIa** sobre la superficie de las partículas de oro, muestra cambios en la carga eléctrica superficial de las partículas de oro. Las partículas de oro a pH fisiológico muestra carga eléctrica superficial (-36 ± 7) mV, mientras que las
35 partículas de oro recubiertas de **IIIa** y BSA en las mismas condiciones de pH, muestran

una carga eléctrica superficial de (-10 ± 4) mV. Desde el punto de vista electrocinético, cualquier diferencia determinada sobre la carga eléctrica superficial es atribuida a la adsorción de cualquier ente sobre la superficie de las partículas, en este caso, el fármaco IIIa y la BSA.

5

Ejemplos de ensayos con los compuestos de la invención

Evaluación de la actividad *in vitro* del compuesto IIIa sobre infección causada por *L. infantum*

- 10 Para ensayar el porcentaje de infección por *L. infantum* se utilizaron macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de ratones tipo Swiss ICR (CD-1). Estas células se extrajeron conforme a lo establecido por [Zamboni, D, S.; Rabinovitch, M. Nitric oxide partially controls *Coxiellaburnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect. Immun.* **2003**, 71(3), 1225-1233]. Los BMDM se cultivaron sobre
- 15 cubreobjetos en pocillos de placas de microtitulación de 24 pocillos, a una concentración de 4×10^5 BMDM en cada pocillo conteniendo medio RPMI-1640 con suero bovino fetal (FCS) al 10% y 5% de medio de células L929. Las placas con BMDM se dejaron toda la noche a una temperatura de 37°C a 5% de CO₂ para que las células se adhieran. Las infecciones se realizaron conforme a lo establecido por
- 20 [Zauli-Nascimento, R C., Miguel, D. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K.; Pereira, L. I., Pelli de Oliveira, M. A., Ribeiro-Dias, F., Doria, M. L. Uliana, S. R. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop. Med. Int. Health* **2010** 15(1) 68-76] ajustadas a la proporción de 5 promastigotes en fase estacionaria de *L. infantum* por cada macrófago. Los
- 25 promastigotes se adicionaron a los pocillos manteniéndolos durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ en RPMI-1640 con 10% de FCS. Pasado este tiempo el medio se retiró y los macrófagos se lavaron con medio RPMI-1640 para eliminar los promastigotes.

- Se adicionó un nuevo medio RPMI-1640 enriquecido con 10% SBF y 5% de medio condicionado de células L929 y que contuviera el fármaco en sus distintas
- 30 concentraciones. Tras 48 h de incubación a 37°C, 5% CO₂, los cubres se fijaron con metanol y tiñeron con Giemsa 20%. Se contaron 200 macrófagos distribuidos por todos los campos del cubre y se calculó el porcentaje de macrófagos infectados y no infectados. Se consideraron como infectados los macrófagos que contuvieran al menos un amastigote. Cada experimento se realizó por triplicado. Tras el tratamiento

- a diversas concentraciones de cada compuesto, la respuesta observada en forma de % de infección se convierte en % de reducción de infección. Por último se realiza un análisis de regresión lineal múltiple (software SPSS 150) para calcular la CI₅₀ (concentración del compuesto que reduce al 50% la carga parasitaria) y CC₅₀ (concentración del compuesto que mata al 50% de las células de mamífero) del producto evaluado. La actividad del compuesto **IIIa** frente al parásito responde a un patrón de doble inversa con la siguiente fórmula: $RP = 1/(0.0118124 + 0.00044687/C)$ ($R^2=97\%$), donde RP es la reducción en el porcentaje de infección y C es la concentración del compuesto **IIIa**.
- Los resultados obtenidos para el compuesto **IIIa** se muestran en la Tabla 1, tras su evaluación in vitro frente a *L. infantum* intracelular (CI₅₀) y su citotoxicidad en células de mamíferos (CC₅₀). Como control se utilizaron los fármacos vorinostat (I), pentamidina (PI) y antimonio de meglumina (MA) o Glucantime®.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM) ^a	CC ₅₀ (μM) ^b
II	3.21±1.8	>100	>100
IIIa	0.69 ± 0.1	>100	>100
Vorinostat (I)	6.3 ± 3,8	5-20	NR ^c
PI	1.50 ± 0.1	5-20	6.08 ± 0.2
MA	144.40 ± 41.0	200-500	273.08 ± 12.2

Tabla 1. CI₅₀ y CC₅₀ del compuesto **IIIa**: Actividad frente a amastigotes de *L. infantum* en macrófagos y citotoxicidad en células de mamífero.

(a) CC₅₀ sobre macrófagos derivados de médula ósea de ratones (BMDM)

(b) CC₅₀ sobre fibroblastos de ratón L929

(c) NR: No realizado

Eficacia y toxicidad in vitro

El compuesto **IIIa** mostró una CI₅₀ frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* aproximadamente 5 veces superior a la del compuesto (**II**) y mostrando, además, una actividad superior a los fármacos utilizados como control. Este hecho unido a su baja citotoxicidad (CC₅₀ >100 μM), le confiere un índice de selectividad mayor a 100. Al igual que el compuesto **II**, el compuesto **IIIa** no mostró actividad frente a promastigotes de *L. infantum* en el rango de concentraciones 1- 100 μM.

Evaluación de la actividad in vivo del compuesto **IIIa en un modelo animal infectado con *L. infantum***

En este ensayo se han empleado ratones Balb/c hembra de 6 semanas de edad

Toxicidad subaguda in vivo

- 5 El compuesto (**IIIa**) vehiculizado sobre nanopartículas de oro se administró a un grupo de 10 ratones Swiss ICR (CD-1) de 6 semanas de edad a una dosis de 500 mg/kg/día durante 10 días. Finalizado el tratamiento, se realizó una observación adicional de los animales durante dos semanas. Se evaluó la aparición de signos de dolor, sufrimiento, diarrea, pérdida de peso, hepato o esplenomegalia. Durante el tratamiento y posterior
- 10 seguimiento, ningún animal murió ni apareció ninguno de los signos anteriormente indicados, lo que indica que el compuesto carece de toxicidad aguda o subaguda (dosis letal 50% (DL50) >500 mg/kg).

Procedimiento de infección y tratamiento

- 15 Se infectaron 35 ratones Balb/c hembra de 6 semanas de edad con 10 millones de promastigotes de *L. infantum* en fase estacionaria de crecimiento por vía intraperitoneal en un volumen de 0,4 mL de solución salina isotónica. Tras 28 días post-infección, los animales se dividieron en cinco grupos de 7 ratones cada uno que se sometieron a diferentes tratamientos diarios por vía intraperitoneal durante 10 días.
- 20 Los tratamientos utilizados in vivo son los siguientes:
- Grupo control tratado con nanopartículas de oro sin fármaco; grupo tratado con compuesto (**IIIa**) a 10 mg/kg;
 - Grupo tratado con compuesto (**IIIa**) vehiculizado en nanopartículas de oro a 25 mg/kg;
 - 25 – Grupo control de referencia tratado con antimonio de meglumina a 104 mg SbV/kg;
 - Grupo tratado con una combinación de antimonio de meglumina a 104 mg SbV/kg y compuesto (**IIIa**) vehiculizado en nanopartículas de oro a 10 mg/kg.
- 30 Para la cuantificación de la carga parasitaria en los órganos de los ratones sacrificados tras el tratamiento, se pesan 20 mg de tejido, se homogeniza y se extrae el ADN con un kit comercial adecuado, quedando éste resuspendido en un volumen de 20 microL. A continuación se realiza una PCR cuantitativa (a tiempo real). Esta PCR utiliza sondas TaqMan y es específica de *L. infantum*. Se calcula el número de parásitos
- 35 presentes en cada muestra interpolando el Ct obtenido en una curva patrón

previamente establecida usando diluciones seriadas de parásitos. A partir del número de parásitos presentes en la muestra y conociendo el peso del órgano utilizado para la extracción del ADN, se estima el número de parásitos/mg de órgano.

5 Resultados obtenidos *in vivo*

El compuesto **IIIa** vehiculizado en nanopartículas de oro resultó muy eficaz a 25 mg/kg, reduciendo las cargas parasitarias en un 99% en hígado y un 93% en bazo, frente a la reducciones del 83% en hígado y 52% en bazo utilizando como fármaco control el antimonio de meglumina.

10 En la Tabla 2 se muestra una comparación, en términos de reducción de carga parasitaria, de los compuestos **II** y **IIIa**, ambos vehiculizados en nanopartículas de oro.

	Compuesto II	Compuesto IIIa	MA
Reducción de la carga parasitaria en bazo	96 %	93 %	52 %
Reducción de la carga parasitaria en hígado	68 %	99 %	83 %

Tabla 2. Reducción en el porcentaje de infección por *L. infantum* con respecto al control sin tratamiento tras 14 días de tratamiento a una dosis de 25 mg/kg/día del compuesto **II** o 10 días de tratamiento a la misma dosis del compuesto **IIIa**. La dosis de antimonio de meglumina (MA) fue de 390 mg/kg (equivalente a 104 mg/kg/día de antimonio SbV) y el tratamiento duró 14 días.

Evaluación de la toxicidad en animales infectados

20 En el tratamiento con el compuesto **IIIa** de los animales infectados experimentalmente con *L. infantum* no se observaron efectos adversos gastrointestinales, pérdida de peso, dolor u otros síntomas generales. Tampoco se observaron alteraciones en los valores bioquímicos y enzimáticos evaluados en suero o sangre, como transaminasas (GPT y GOT), urea, fosfatasa alcalina y creatinina. Tampoco se encontró hepato o
25 esplenomegalia asociadas al tratamiento. Por tanto, el fármaco tampoco muestra toxicidad en ratones infectados.

El compuesto **IIIa** ha resultado ser un potente fármaco frente a los amastigotes de *L. infantum* siendo la actividad dosis dependiente. Existe una relación positiva entre la
30 concentración administrada y el porcentaje de reducción de la infección encontrado.

Además, no ha mostrado a las dosis evaluadas actividad sobre la forma promastigote. La dosis a la que se evidencian efectos citotóxicos es muy superior a la dosis antiparasitaria. El índice de selectividad es también superior al encontrado para pentamidinaisetonato (IS = 4) y la meglumina antimoniatato (IS = 2) que constituyen los fármacos control (fármacos habitualmente utilizados en el tratamiento de la leishmaniosis).

10 Evaluación de la actividad in vivo del compuesto IIIa en un modelo animal infectado con *L. tropica*

En otro ensayo se evaluó la eficacia del compuesto IIIa frente a la leishmaniosis cutánea usando hamsters sirios de 80-100 g infectados por *Leishmania tropica*.

15 Los hamsters se inocularon en la planta del pie izquierdo con 3×10^7 parásitos/50 μ L phosphate buffer saline (PBS).

20 El compuesto se administró usando dos tipos de pomadas distintas, una más hidrófila y otra más lipófila (indicar composición concreta), y con dos concentraciones de IIIa diferentes (0.5% y 2% p/p). La eficacia en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea se midió determinando la reducción de la carga parasitaria y del tamaño de la lesión.

25 Como tratamiento comparativo se administró Glucantime mediante inyecciones intralesionales de 100 mg Sb^V/kg. La reducción en la carga parasitaria de los hamsters tratados con este fármaco fue del 61.6%

Aunque las 4 composiciones ensayadas reducían la carga parasitaria, la pomada más eficaz fue la más lipófila con la concentración más elevada de compuesto III.

30 La pomada con compuesto III al 2,5% reduce la carga parasitaria hasta en un 75% y el tamaño de las lesiones se va reduciendo progresivamente sin mostrar ninguna toxicidad ni efecto secundario en los animales. La actividad fue mayor que el compuesto de referencia (antimonio pentavalente) que sólo mostró una reducción de la carga parasitaria del 62%.

35

Tipo de pomada	Concentración de IIIa	Reducción de carga parasitaria
Hidrófila	0.5%	41.5%
Hidrófila	2%	59.7%
Lipófila	0.5%	55%
Lipófila	2%	74.8%

Ensayo de interacción entre fármacos

5

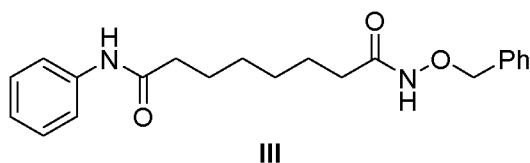
Las potenciales interacciones entre fármacos se pueden predecir evaluando *in vitro* el citocromo P450.

10

Se ha podido comprobar que el compuesto IIIa, al igual que anteriormente se comprobó para el compuesto II, no actúa sobre las enzimas del citocromo P450 por lo que no debe interaccionar *in vivo* sobre otros fármacos y admitiría su uso combinado con otros fármacos en el tratamiento de la leishmaniosis. En particular, la combinación entre los fármacos II y III es viable desde este punto de vista.

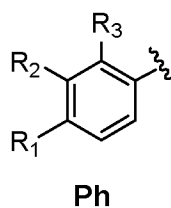
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general III



así como compuestos racémicos, estereoisómeros, sales o solvatos del mismo;

donde Ph es un fenilo de fórmula



Y donde

R1 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO2.

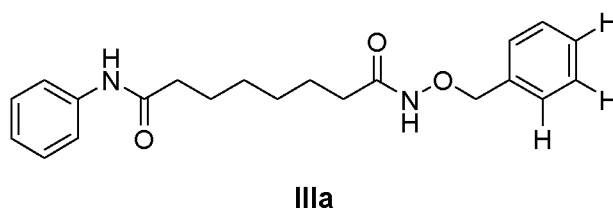
R2 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO2

R3 = H, F, Cl, Br, I, Me, OMe ó NO2

2. Compuesto según reivindicación anterior caracterizado por que R1=H o R2=H o R3=H.

3. Compuesto según reivindicación anterior caracterizado porque al menos dos de los tres radicales del fenilo están formados por hidrógeno

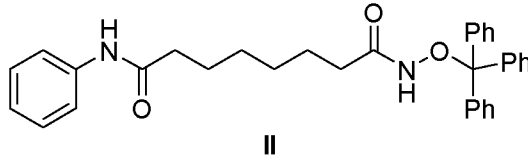
4. Compuesto según reivindicación anterior caracterizado por que R1=H, R2=H y R3=H (Compuesto IIIa).



- 5 5. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como principio activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 6. Composición farmacéutica que comprende como único principio activo un compuesto, o una combinación de compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, junto un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 caracterizado porque los compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 están funcionalizados en nanopartículas de oro.
- 15 8. Composición según reivindicación anterior caracterizada porque las nanopartículas de oro están compuestas por núcleo de oro y recubrimiento con citrato sódico.
- 20 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 caracterizada porque las nanopartículas tienen un diámetro de entre 20 y 30 nm, preferentemente entre 22 y 26 nm.
- 25 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 apta para administración oral.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 apta para administración tópica
- 30 12. Composición según reivindicación anterior en la que la concentración de compuesto III es igual o superior al 0.5% p/p, preferentemente igual o superior al 2%.
- 35 13. Preparación combinada que comprende:
a) un compuesto de fórmula general III, y
b) otro principio activo frente a Leishmaniosis.

14. Preparación combinada según reivindicación anterior que comprende

- a) un compuesto de fórmula general III, y
- b) un compuesto de fórmula general II



5

15. Preparación combinada según reivindicaciones 13 o 14 caracterizada por que el compuesto de fórmula general III se encuentra soportado sobre nanopartículas farmacéuticamente aceptables, más preferentemente sobre nanopartículas de oro.

10

16. Kit para la preparación de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12 o de la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15.

15

17. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, o preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 o el kit según reivindicación 16 para la elaboración de un medicamento.

20

18. Uso según la reivindicación anterior para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de Leishmaniosis.

19. Uso según la reivindicación anterior caracterizado por que la Leishmaniosis es Leishmaniosis canina o Leishmaniosis visceral.

25

20. Uso según la reivindicación 18 caracterizado por que la Leishmaniosis es Leishmaniosis cutánea.

30

21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 caracterizado por que la Leishmaniosis está causada por *L. Infantum*.

22. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 18 o 20 caracterizado por que la Leishmaniosis está causada por *L. tropica*.

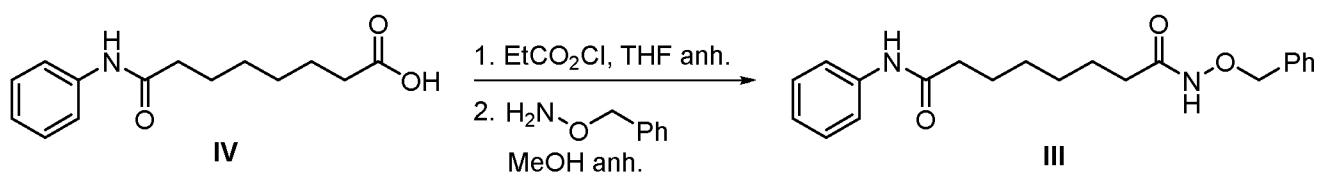


Figura 1

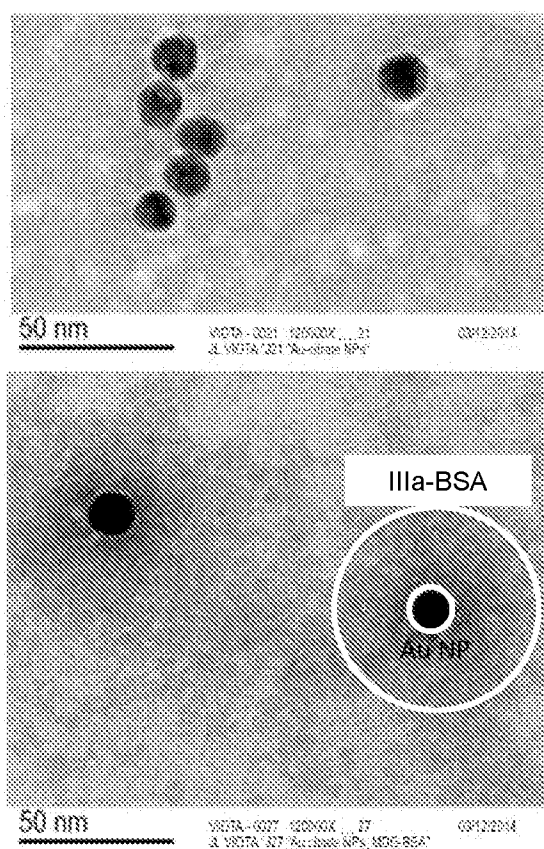


Figura 2