



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 173 017**

② Número de solicitud: 009902582

⑤ Int. Cl.⁷: A61K 31/12
A61P 33/02

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **23.11.1999**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2002**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.10.2002

⑦ Solicitante/s: **Universidad de La Laguna
C/ Molinos de Agua, s/n
38207 La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, ES**

⑦ Inventor/es: **Gutiérrez Ravelo, Ángel;
Mamani Tincusi, Benigna;
López Bazzocchi, Isabel;
Jiménez Díaz, Ignacio A.;
Valladares Hernández, Basilio;
Piñero Barroso, José;
Aragón Mamani, Zulma y
Castillo Remiro, Antonio del**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Control de la leishmaniasis con *trans*-chalcona.**

⑤ Resumen:

Control de la leishmaniasis con *trans*-chalcona.
La *trans*-chalcona (1,3-difenil-2-propen-1-ona) es un producto derivado biogénicamente del fenil propano y del acetato, caracterizado por tener dos anillos aromáticos unidos por una cadena con un sistema carbonílico insaturado. Se ha encontrado que esta molécula tiene una potente acción sobre formas promastigotes de *Leishmania* (Fórmula I). Es el objeto de invención el definir una sustancia previamente no descrita para el control de la leishmaniasis. También es objeto de invención el dar nuevos usos a la *trans*-chalcona como leishmanicida. Dichos usos no resultan evidentes del estado de la técnica. El objeto de invención es susceptible de aplicación industrial ya que puede obtenerse tanto por síntesis química, como directamente de planta.

ES 2 173 017 A1

DESCRIPCION

Control de la leishmaniasis con *trans*-chalcona.

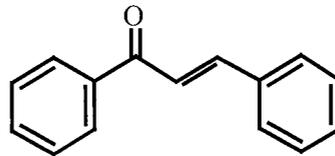
5 Uso de la *trans*-chalcona en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral.

Descripción de la invención

10 Se refiere al uso la *trans*-chalcona para preparar un medicamento que sirve para el tratamiento de la leishmaniasis, enfermedad producida por protozoos del género *Leishmania*.

La *trans*-chalcona (1,3-difenil-2-propen-1-ona) es un producto derivado biogenéticamente del fenil propano y acetato, caracterizado por tener dos anillos aromáticos unidos por una cadena con un sistema carbonílico α, β insaturado. (Fórmula I).

15



20

Fórmula I

25

A modo de ejemplo, la *trans*-chalcona puede obtenerse a partir de extractos vegetales ya que se encuentra de forma natural principalmente en plantas de las familias asteráceas, oxilidáceas, escrofulariáceas, gesneriáceas, acantáceas y liliáceas, y puede ser sintetizada en el laboratorio, entre otros métodos, mediante la acción de NaOH (hidróxido sódico) en una solución alcohólica de benzaldehído y acetofenona.

30

El tratamiento de la leishmaniasis se ha fundamentado en el uso de productos con alta toxicidad, baja especificidad, y en algunos casos con productos prohibidos en los países más desarrollados, tales como sales de antimonio (V) y sodio en forma de estibogluconato y antimoniato de meglumina; también se han utilizado antibióticos tipo anfotericina, o antifúngicos del tipo ketoconazol bien de forma independiente o asociada. Esta enfermedad origina cada año 400.000 nuevos casos en zonas definidas de la tierra, y de forma especial a pacientes inmunodeprimidos, tales como enfermos transplantados, de hepatitis, o de SIDA.

35

Las terapias conocidas muestran ser inadecuadas. Un buen leishmanicida debe tener una alta especificidad, para lo cual debe ser altamente tóxico para el agente patógeno pero no para el hospedador.

40

Se ha encontrado que la *trans*-chalcona tiene una potente acción leishmanicida (Ejemplo 1) *in vitro* a una concentración de 0.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inhibe el crecimiento del 50% de las formas promastigotes de *Leishmania braziliensis* y tiene una toxicidad aguda en ratón muy baja (Ejemplo 2) y no presenta toxicidad en el ensayo de *Artemia salina* ($\text{LD}_{50} = 0.0247 \text{ mM}$) (Ejemplo 3). No presenta efecto clastogénico (Ejemplo 4) ni efecto mutagénico en el ensayo de AMES (Ejemplo 5).

45

Desde un punto de vista práctico, las formulaciones leishmanicidas objeto de la patente podrían prepararse directamente a partir de la *trans*-chalcona, la cual es soluble en dimetilsulfóxido, éter, bisulfuro de carbono, benceno, poco soluble en alcohol, soluble en mezclas Tween-20 y DMSO (dimetilsulfóxido), o bien mezclas de aceite de ricino con algún surfactante y disolventes aromáticos como xilenos. Para las aplicaciones tópicas serían deseables formulaciones con tween-20 y aceite de ricino, aunque no se descartan otro tipo de combinaciones, la *trans*-chalcona a utilizar deben ser de elevada pureza, para evitar que contaminantes minoritarios puedan ejercer efectos tóxicos o enmascarar sus efectos. La concentración ideal para su uso tópico es de una solución 3.1×10^{-6} Molar en el vehículo apropiado.

50

Para que sea efectiva la *trans*-chalcona debe aplicarse en los alrededores de las lesiones cutáneas y directamente sobre ellas, no descartándose la posibilidad de uso sistémico, tomándose la *trans*-chalcona por vía oral.

60

Los siguientes ejemplos tienen como fin ilustrar la invención y en modo alguno limitan las posibilidades de la invención que se defienden en las reivindicaciones.

Ejemplo 1

Actividad leishmanicida de la trans-chalcona in vitro IC₅₀ (Actividad antileishmania in vitro frente a prosmatigote de Leishmania braziliensis)

5 *Procedencia y cultivo del parásito*

Las cepas estudiadas proceden de la provincia de la Convención de Cuzco, Perú. Las muestras fueron obtenidas del borde de la lesión ulcerosa en pacientes clínicamente diagnosticados de leishmaniasis.

10 Los aislados obtenidos se cultivan en medio USMARU, medio especialmente indicado para organismos exigentes en sus condiciones nutricionales, como es el caso de las *Leishmania* del complejo *braziliensis* (Los prosmatigotes de *Leishmania* crecen en este medio con una temperatura de incubación de 22 a 25°C).

15 Una vez las cepas en nuestro laboratorio se adaptó su cultivo al medio líquido RPMI 1640, enriquecido con SBFÍ al 20%. El pH del medio se ajustó a 7.2 con NaOH (hidróxido sódico) al 10% y al 5% antes de añadir SBFÍ al 20%.

20 El medio se esterilizó por filtración con un filtro VacuCap de 0.2 µm y una bomba de vacío, en cabina de flujo laminar. A continuación, se alicuotó en recipientes estériles de 250 ml y se almacenó a 4°C.

25 Antes de utilizar cada alicuota de medio se añadió un antibiótico para evitar la contaminación bacteriana (gentamicina a una concentración de 40 mg/l) y un antifúngico para evitar el crecimiento de hongos en el medio (fluorocitosina a una concentración de 0,002 g/ml). El antifúngico se utilizó solamente en la adaptación de las cepas al medio RPMI 1640, una vez las cepas están adaptadas se deja de añadir el antifúngico.

30 Se tomaban 500 µl de la fase líquida del cultivo sembrado en medio USMARU y se mantenían en una estufa a 24°C. Para el cultivo se utilizaron "Flask" de 25 cm³ de la casa Costar, estériles, que contenían 2 ml de medio RPMI 1640 enriquecido con SBFÍ al 20%, vitaminas y aminoácidos.

35 Se examinaba el cultivo cada día, utilizando un microscopio invertido modelo Leica DMIL hasta que los prosmatigotes se observaban activos. Se tomaban en ese momento 500 µl de ese cultivo y se inoculaba en 2 ml de medio fresco.

Una vez adaptados al medio líquido RPMI, y conociendo los tiempos de duplicación se realizaban los pasos sucesivos. Para ello, y cada dos días, se renovaba el medio de cultivo, eliminando casi todo el cultivo en NaOH (hidróxido sódico), dejando cantidad suficiente en el fondo del recipiente y añadiendo 2 ml de medio fresco.

40 El manejo de las cepas se realizaba siempre en una cámara de flujo laminar, esterilizada previamente mediante luz UV y provistos de guantes y mascarillas.

Ensayos de actividad

45 Los principios activos empleados se encontraban en estado sólido en viales estériles. Para realizar las pruebas estos productos fueron disueltos en DMSO (dimetilsulfóxido) y almacenados a 4°C hasta su utilización.

50 Los ensayos se realizaron en placas de microtiter estériles de 24 pocillos. En estos pocillos se añadieron 250.000 parásitos, en forma promastigotes y procedentes de cultivos en fase logarítmica de crecimiento, y la cantidad de principio activo necesaria para lograr la concentración a ensayar. El volumen final por pocillo fue de 500 µl. Los ensayos se repitieron al menos dos veces para verificar los resultados obtenidos.

55 Se ensayaron distintas concentraciones de estos productos y se procedió a contar los parásitos después de 48 y 72 horas calculando la CI₅₀ (Concentración Inhibitoria 50). La CI₅₀ se define como la dosis (µg/ml) de principio activo que inhibe el porcentaje de crecimiento reduciéndolo a la mitad en relación con la muestra de control. Para el cálculo de este parámetro se representa el porcentaje de inhibición del crecimiento frente a la concentración de principio activo, ajustando los puntos que se obtienen mediante
60 una ecuación de tipo logarítmica o lineal.

El recuento se realizó tomando alícuotas en tubos eppendorf de todos los ensayos realizados. Los

ES 2 173 017 A1

tubos se agitaron vigorosamente para separar bien los parásitos y, una vez separados, se tomaron 10 μ l de la muestra en un segundo tubo eppendorf, al que se añadía una disolución de PBS-formol. El volumen a añadir dependía de la dilución que se realizaba, que a su vez estaba en función de la cantidad de promastigotes observados al microscopio invertido. A mayor densidad de parásitos habría que realizar dilución para facilitar el recuento.

A continuación se tomaron 10 μ l del segundo eppendorf y se colocaban en la cámara de recuento Bürker. En el microscopio y con el objetivo de 40x se observaron las *Leishmanias*. El recuento se realizaba tres veces, expresándose el resultado como la media de dichos recuentos.

El porcentaje de inhibición se calculó considerando el número de parásitos de control como el 100 % de crecimiento, o lo que es lo mismo, el 0 % de inhibición.

El número de parásitos por mililitro se calcula mediante la ecuación:

$$NI = N_o \times f \times 10 \times 1000$$

NI, el número de parásitos por mililitro.

NO, el número de parásitos por 0,1 mm³ (volumen de cada cuadrado)

F, la dilución de la muestra en PBS y formol.

10, el factor de conversión de 0,1 mm³ a 1 mm³.

1000, el factor de conversión de mm³ a ml.

Ejemplo 2

Toxicidad para ratón Albino-Swiss

Se estudió la toxicidad en ratón “Albino-Swiss” macho mediante la aplicación intraperitoneal (i.p.) de dosis variables de *trans*-chalcona en 10 ratones por tratamiento. Se valoró el número de animales muertos a las 24 horas de aplicación y se calculó la ecuación de la curva de regresión que mejor explica los resultados del experimento. A partir de las ecuaciones de regresión se estimaron las DL₅₀ y DL₀ (dosis de *trans*-chalcona sin efecto aparente) a las 24 horas. También se estimó el potencial de toxicidad (pT) (Luckey y Venugopal, 1997. J. Toxicol. & Environ. Health. 2:633).

La DL₅₀ se estimó en 1494 mg/Kg a las 24 h. De estos datos se deduce que la *trans*-chalcona es una sustancia ligeramente tóxica con DL₅₀ comprendido entre 0.5 y 5 g/Kg (Loomis, 1982. Ed. Acribia. Zaragoza, 33-43). El efecto letal cero para la *trans*-chalcona a las 24 h fue de DL₀ = 653.85 mg/Kg.

El potencial de toxicidad se estimó en pT = 2.14. Según la escala de toxicidad de Repeto (Repeto, M., 1981. Ed. Científico Médica. Barcelona, 28), la *trans*-chalcona es una sustancia con muy poco potencial tóxico y se encuentra entre el ácido pantoténico (pT50 = 2.39) y el CdCl₂ (pT50 = 2.13), en esta escala se acerca bastante al potencial de toxicidad del ClNa (pT50 = 1.35).

Ejemplo 3

Citotoxicidad, ensayo con Artemia salina “Brine shrimp assay”

Los análisis de toxicidad de una sustancia para el camarón de la salmuera *Artemia salina* (Brine shrimp), dan una idea muy aproximada de la actividad biológica de un producto, y más en concreto de su toxicidad.

El experimento se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Mayer et al., 1982 (Planta Med., 45: 31-34) calculándose la DL₅₀ a las 24 h para los camarones. Se usaron cuatro replicados de cada una de las concentraciones de *trans*-chalcona (0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 mM) y los controles adecuados. La DL₅₀ estimada fue de 0.0247 mM, dosis que coincide aproximadamente con la calculada para las larvas de segundo estadio de nemátodos de quiste (DL₅₀ = 0.033).

ES 2 173 017 A1

Ejemplo 4

Potencial clastogénico in vivo de la trans-chalcona

5 *Propósito del estudio*

El objetivo del presente estudio ha sido obtener información sobre el potencial clastogénico in vivo de la *trans*-chalcona cuantificando sus efectos sobre la aparición de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de la médula ósea de ratón.

10

Tanto en el estudio preliminar como en el estudio principal, la *trans*-chalcona fue administrada una sola vez, por sondaje gástrico, a volumen de 10 ml/Kg. En todos los casos, fue administrada como una suspensión en carboximetilcelulosa 0.2% con Tween 80 1% en agua destilada.

15

La dosis de la sustancia, en el estudio principal, fue establecida en base a un estudio de dosis máxima no letal.

Resultados del estudio principal

20

No se registraron mortalidades ni signos clínicos.

Los datos obtenidos sobre eritrocitos policromáticos micronucleados se muestran en la Tabla n° 1.

TABLA N° 1

25

Tratamiento	Total EPC	Total EPC con micronúcleo	Media de % EPC Micronúc.	Total ENC con micronúcleo	Media de la Relación ENC/EPC	Media de ENC por 1000
CMC+Tween 10mL/Kg, 24h	1000	6	0.06 ±0.07	3	1.927 ±0.6621	647.5 ±54.00
<i>trans</i> -chalcona 2000 mg/Kg, 24h	1000	18	0.18 ±0.092	8	1.842 ±0.5658	634.5 ±76.39
ciclofosfamida 50 mg/Kg, 24 h	1000	123	1.23 ±0.531	15	1.196 ±0.2851	538.1 ±56.67
CMC+Tween 10 mL/Kg, 48 h	1000	23	0.23 ±0.095	9	2.011 ±0.7503	648.1 ±88.90
<i>trans</i> -chalcona 2000 mg/Kg, 48 h	1000	21	0.21 ±0.12	12	1.634 ±0.4350	611.6 ±58.55
CMC+Tween 10 mL/Kg, 72 h	1000	19	0.19 ±0.099	5	1.989 ±0.4325	659.1 ±48.31
<i>trans</i> -chalcona 2000 mg/Kg, 72 h	1000	18	0.18 ±0.123	10	1.558 ±0.3250	603.4 ±49.81

55

CMC+Tween: Carboximetilcelulosa 0.2% con Tween 80 1%.

EPC: Eritrocitos policromáticos.

ENC: Eritrocitos normocromáticos.

60

*Discusión**Eritrocitos policromáticos micronucleados*

5 No se han registrado incrementos en el número de eritrocitos policromáticos micronucleados en la médula ósea de los ratones tratados con la *trans*-chalcona a la dosis de 2000 mg/Kg en los tiempos de muestreo de 48 y 72 horas, respecto de los correspondientes controles negativos.

10 El test exacto de Fisher, detectó diferencias significativas entre el grupo tratado con *trans*-chalcona y el correspondiente control negativo a tiempo de muestreo de 24 horas ($p = 0.011929$).

A la vista de los resultados, esta significación debe ser atribuida a un nivel bajo de eritrocitos micronucleados en el control negativo y no a un incremento real en el grupo tratado con *trans*-chalcona que se mantiene en niveles similares a los grupos de muestreo de 48 y 72 horas. Por lo tanto, la significación estadística mencionada debe ser considerada irrelevante.

15 La administración de CICLOFOSFAMIDA A 50 mg/Kg ha provocado un notable incremento de micronúcleos. Este efecto es compatible con el descrito en la bibliografía (Kirkhart, 1981).

20 *Hematopoesis*

No se han observado variaciones dignas de mención en la relación ENC/EPC en los animales tratados con *trans*-chalcona en los tres tiempos de muestreo.

25 *Conclusiones*

En las condiciones experimentales indicadas en el presente estudio, el producto *trans*-chalcona ha resultado no clastogénico a la dosis de 2000 mg/Kg.

30 **Bibliografía**

Ashby, S. & Mohamed, R. “Slide preparations and sampling as major source of variability in the mouse micronucleus assay” Mutation Research, 164, 217-235, 1986.

35 **Kirkhart, B.** “Micronucleus test on 21 compounds” en “Evaluation of Short -Team Test for Carcinogens”. Ed. F.J. de Serres, Elsevier, Holland, 1981.

Lovell, D.P. et al. “Statistical Analyses of in vivo Cytogenetic Assay” en “Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data” Ed. D.J. Kirkland, UKEMS. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1989.

40 **Schmidt, W.** “Micronucleus Test” Mutation Research, 31, 9-15, 1975.

Ejemplo 5

45 *Potencial mutagénico de la trans-chalcona**Introducción*

50 El objetivo de este estudio es valorar el posible potencial mutagénico de la *trans*-chalcona, usando cinco cepas de *Salmonella typhimurium*. Con o sin la adición de un sistema de activación metabólica.

Las cinco cepas son histidina dependientes, y la mutagenicidad es detectada mediante un significativo aumento del número de especies revertidoras (colonias de bacterias en las cuales desaparece la dependencia de la histidina en orden a crear prototofos) en comparación con las reversiones espontáneas o naturales. Usando cinco cepas bacterianas se pueden detectar diferentes tipos de mutágenos. En este sentido, las cepas TA-1537, TA-98 y TA-1538 favorecen prototofos debido a que la mutagénesis induce cambios en la estructura de su DNA, causando un desplazamiento en la característica de la lectura. Las cepas TA-100 y TA-1535 favorecen prototofos cuya mutagénesis se caracteriza por pares de bases en el DNA.

60 Las cepas TA-98 y TA-180 son portadoras del plásmido R-factor PKM 101 (factor resistente a la ampicilina) (Ames, 1975; Maron, 1983). El sistema de activación metabólica (S-9) se obtiene por inducción

ES 2 173 017 A1

con fenobarbital-metilcolantreno en hígado de rata y cofactor estándar fueron usados para determinar si la *trans*-chalcona necesita ser metabolizada para que haya mutaciones.

Procedimiento experimental

5

Bacteria: Cepas de *Salmonella typhimurium* fueron usadas. Varios días antes del comienzo del estudio, cinco viales de las cepas bacterianas fueron descongelados y cultivados en placas Petri al objeto de obtener cultivos puros, éstas cápsulas Petri fueron conservadas a 4°C hasta que se sugirió su uso.

10

Dieciséis horas antes de que comenzara el estudio se preparó un inóculo de cada una de las cinco cepas bacterianas en 20 ml de suero nutritivo y se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Los requerimientos de histidina, la presencia o ausencia de plásmido pKM 101, el factor rfa (sensibilidad al violeta) y el factor *uvr* β (sensibilidad a los rayos ultravioleta) se chequearon en las cepas utilizadas para preparar los inóculos.

15

Preparación de la sustancia a ensayar

El disolvente utilizado para *trans*-chalcona fue el dimetilsulfóxido (DMSO).

20

El límite de solubilidad del producto fue de 1.25 g/ml, pero a esta concentración la sustancia era tóxica. Se realizaron diluciones para determinar la concentración máxima de la sustancia que no resultaba tóxica. A la concentración de 1250 $\mu\text{g/ml}$ la sustancia no presentaba toxicidad si se usaba S-9, pero seguía resultando tóxica en ensayos sin S-9. Así, los niveles para las dosis sin S-9 estaban entre 15.62 $\mu\text{g/placa}$, y con S-9, entre 125 $\mu\text{g/placa}$ y 3.91 $\mu\text{g/placa}$.

25

Sistema de activación metabólica

En ambos experimentos se usó un homogeneizado de hígado de rata (S-9), inducido por fenobarbital-metilcolantreno a una concentración del 10% en cofactores estándar.

30

El sistema de activación metabólica (S-9) fue proporcionado por IFFA CREDO (Francia).

Procedimiento experimental

35

El método usado fue descrito en los Procedimientos de Operación Estándar del Centro de Investigación y Desarrollo Aplicado (No. BMU/ML/1010.), Barcelona.

40

Se añadieron 0.1 ml del cultivo bacteriano y 0.1 ml de la sustancia a ensayar diluida a 0.5 ml de tampón fosfato ó a 0.5 ml de S-9 (para chequear si es activa cuando es metabolizada). Para los controles, se añadieron 0.1 ml de los solventes correspondientes a cada producto. Esta mezcla fue incubada durante 20 minutos a 37°C y añadida a 2 ml de agar derretido a 45°C conteniendo biotina e histidina.

45

Las enzimas metabolizantes en la mezcla S-9 no son estables a 45°C, de forma que los contenidos de los tubos fueron mezclados rápidamente en un rotor y vertidos en placas que contenían una capa base de agar mínimo. La mezcla de agar se dejó solidificar y las placas fueron incubadas a 37°C durante 72 horas.

El experimento fue repetido otro día usando cultivos bacterianos frescos y soluciones químicas recién preparadas.

50

Controles positivos

Durante el análisis de *trans*-chalcona se ensayaron también sustancias mutagénicas conocidas para determinar como eran de sensibles las cepas a los agentes mutagénicos.

55

Los disolventes usados fueron: agua para el AZ (azida sódica) y DMSO (dimetilsulfóxido) para el 9Ac (9-amino-acridina), el NOPD (4-nitro-orto-fenilendiamina) y el 2A (2-amino-antraceno).

Evaluación estadística

60

El resultado de los productos estándar y del grupo de control se compararon usando el test de Student (Steel, 1985).

ES 2 173 017 A1

En cada grupo, la comparación estadística entre las diferentes concentraciones de la sustancia a ensayar se llevó a cabo usando análisis en una dirección de la varianza (Steel, 1989).

Conclusiones

5

A la vista de los resultados obtenidos en los dos ensayos, se puede deducir que la *trans*-chalcona no tiene un efecto mutagénico en ninguna de las cinco cepas de bacterias usadas, con o sin la adición de S-9.

Referencias

10

Ames, B.N., et al, 1975. *Mutation Research* 31: 347-364.

Maron, D.M. & **Ames**, B.N., 1983. *Mutation Research* 113:173-215.

15

Steel, R.G.D. & **Torrie**, J.H. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. McGraw-Hill (1985).

20

25

30

35

40

45

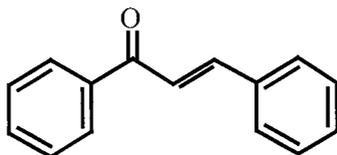
50

55

60

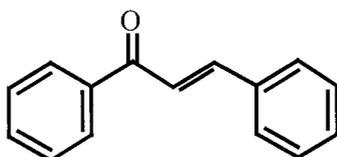
REIVINDICACIONES

1. El uso de *trans*-chalcona (1,3-difenil-2-propen-1-ona) de Fórmula I para preparar un medicamento para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea o mucocutánea, que implica la aplicación directa sobre las lesiones de una cantidad efectiva del medicamento.



Fórmula I

2. El uso de *trans*-chalcona (1,3-difenil-2-propen-1-ona) de Fórmula I para preparar un medicamento para el tratamiento de la leishmaniasis visceral, que implica la toma oral de una cantidad efectiva del medicamento.



Fórmula I

3. El uso según la reivindicación 1, cuando *trans*-chalcona se aplica en combinación de una sustancia vehículo o portador apropiado.

4. El uso según la reivindicación 2, cuando *trans*-chalcona se aplica en combinación con una sustancia vehículo o portador apropiado.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: A61K 31/12, A61P 33/02

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9317671 A (STATENS SERUM INSTITUT) 16.09.1993, página 137, tabla 14.1; fórmula 1.	1-4
A	NIELSEN, S.F. y col. Antileishmanial Chalcones: Statistical Design, Synthesis, and Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis. Journal of Medicinal Chemistry. 1998, Vol. 4, N° 24, páginas 4819-4832. ISSN: 0022-2623	1-4
A	WO 9900114 A (STATENS SERUM INSTITUT) 07.01.1999, página 5, líneas 20-28.	1-4
A	ES 2088353 A (UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA) 01.08.1996, todo el documento.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

19.08.2002

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/1